

Thesis

甲状腺癌細胞における亜鉛の細胞毒性

埼玉医科大学第4内科学教室

(指導：片山 茂裕教授)

皆川 晃伸

The Effect of Zinc on Human Thyroid Cancer Cell Line

Akinobu Minagawa (Fourth Department of Internal Medicine, Saitama Medical School, Moroyama, Iruma-gun, Saitama 350-0495, Japan)

Zinc is an essential component of a wide variety of metalloenzymes, transcription factors and other proteins. Intracellular homeostasis of zinc is believed to be critical because of its different biological roles. To attain homeostasis under different conditions, cell must adjust the rate of zinc uptake and efflux, binding to intracellular and extracellular proteins or other molecules, and sequestration into vesicles or organelles. This suggests that proteins involved in controlling such processes would be regulated directly by zinc. The expression of zinc transporters in human thyroid cancer cell line is not unknown.

Zinc has been reported to have potent cytotoxic effect on thyroid cancer cells. Zinc induced necrotic cell death predominantly rather than apoptotic cell death in thyroid cancer cells. In this study, it was demonstrated that the expression of the antiapoptotic proteins (Bcl-2, Bcl-xL, phosphorylated Bad, and phosphorylated Akt) were increased, whereas the expression of the proapoptotic proteins (Bad and Bax) were decreased following zinc exposure in 8505C thyroid cancer cells. Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) inhibitors inhibited the phosphorylation of Akt induced by zinc, suggesting that zinc activates PI3K followed by phosphorylation of Akt and Bad. Phosphorylation of Akt and Bad may prevent the thyroid cancer cells from apoptotic cell death.

The expression of zinc transporter (ZnT)-1 and -4 was demonstrated in 8505C thyroid cancer cells by northern blot analysis. Because ZnT-1 is a membrane protein that transports zinc out of cells, it is of interest that the expression of ZnT-1 mRNA in 8505C was significantly lower than other human cancer cell lines. In contrast, the expression of ZnT-4 mRNA in 8505C thyroid cancer cell line was markedly increased as compared with other human cancer cell lines. The expression of ZnT-2 and ZnT-3 was not observed even by the polymerase chain reaction (PCR) method. Zinquin, a specific fluorescent probe for zinc, showed an increase in intracytoplasmic zinc concentrations after zinc exposure in 8505C.

In summary, the potent cytotoxic effect of zinc on the thyroid cancer cell line may be due to a decrease in the expression of ZnT-1 that leads to an increase in intracytoplasmic zinc concentration. Although zinc has potent cytotoxic effect, zinc also activates antiapoptotic proteins, especially phosphorylated Akt and Bad, which may prevent the cells from apoptotic cell death.

Keywords: zinc, zinc transporter, thyroid cancer, apoptosis, Akt

緒言

生体内における亜鉛の吸収は主に小腸で行われ、
医学博士 甲第857号 平成15年3月28日(埼玉医科大学)

胆汁・膵液中に排泄される。亜鉛は金属酵素や Zinc-finger をもつ転写因子、ホルモンの構成成分となり、成長や代謝に必須の微量元素で、神経系統や性巣、皮膚、腸管など様々な臓器に影響を及ぼす。

また、亜鉛は細胞の分裂周期にも影響を及ぼし、有糸分裂(細胞分裂増殖)を促進する¹⁾ことと、apoptosisを抑制する²⁾ことが知られており、細胞に対するシグナル伝達系統の一端を担い、細胞、及び組織の成長を調節していると考えられている。

細胞レベルでの亜鉛のホメオスタシスの調節機構に携わる特異的トランスポーターとして Zinc Transporter (ZnT) ファミリーが存在する。ZnT ファミリーには4つのアイソフォームが知られている。いずれも6回膜貫通ドメインを持つ蛋白で、亜鉛の汲み出し、或いは小胞での蓄積においてそれぞれが機能する。ZnT-1^{3-6, 11, 12)}は、小腸、腎臓、肝臓などさまざまな組織に発現し、細胞膜に局限し存在する。細胞から亜鉛の汲み出し、亜鉛が細胞内に蓄積するのを阻止するように作用する。ZnT-2^{7, 11, 12)}は亜鉛を蓄積する酸性小胞に分布し、構造上 ZnT-3^{8, 11)}に類似している。PCRにて、この輸送体は小腸、腎臓、性巣に発現していることが確認された。ZnT-3は脳、性巣に局限して発現していると考えられている。脳においては海馬と大脳皮質に ZnT-3 mRNA の発現が豊富に認められている。現在でも ZnT-2、及び ZnT-3 の生理機能はいずれもまだはっきりとは解明されていない。ZnT-4⁹⁻¹²⁾の変異は、lethal milk 症候群(致死的ミルク症候群)を招く。この症候群は、亜鉛欠乏のため乳腺での母乳への亜鉛の移送の欠乏により生じる。そのため、ZnT-4 は母乳への亜鉛の移送に関連すると考えられている。それぞれが複雑に相互作用し、或いは個別に作用し亜鉛の細胞でのホメオスタシスを調節している。甲状腺濾胞上皮細胞における ZnT ファミリーの発現状況、亜鉛投与による変化などについては現在のところ余り知られていない。そこで甲状腺癌細胞株の 8505C (低分化型ヒト甲状腺乳頭癌細胞株)を用い亜鉛刺激下における ZnT ファミリーの発現について検討した。また亜鉛の特異的蛍光 probe である膜透過性蛍光担体の Zinquin [(2-methyl-8-p-toluenesulphonamido-6-quinolyloxy) acetic acid] を使用し 8505C における細胞内の亜鉛動態について検討した。

培養甲状腺細胞に対しては、亜鉛が高濃度で細胞障害性を示すことが報告されている¹³⁾。甲状腺癌細胞に対して亜鉛は necrosis を誘導し、apoptosis は少なかった。本研究では、亜鉛の細胞障害性が甲状腺癌細胞における ZnT-1 発現の減少に関係する可能性を示した。

実験材料及び方法

1. 材料

細胞培養液に使用した FBS (fetal bovine serum) は EQUITECH-BIO. Inc (Kerrville, USA) から、Nutrient Mixture HAM F-12 は SIGMA (SIGMA, St. Louis, USA)

から、Earle's MEM, ピルビン酸ナトリウムは GIBCO (GIBCO BRL, Life Technologies. Inc., Rockville, USA) から、トブラマイシンは塩野義製薬(塩野義製薬, 大阪)から購入した。Total RNA の回収には ISOGEN (ニッポンジーン, 東京)を使用した。蛋白回収における細胞溶解液には 10 mM EDTA (ethylenediamine-N,N,N',N'-tetraacetic acid · dihydrate, 同仁化学研究所), 2 mM EGTA (ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether) -N,N,N',N'-tetraacetic acid, 同仁化学研究所), 0.1% NP-40 (ナカライテスク株式会社, 京都), 10% glycerol, sodium orthovanadate (和光, 大阪), 1 nM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride, SIGMA), 10 mg/ml leupeptin, hemisulfate salt (SIGMA), 10 mM DTT (DL-dithiothreitol, SIGMA) を含む Hepes (2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethanesulfonic acid, 同仁化学研究所, 熊本), pH 7.9, 50 mM NaCl バッファーの組成のものを使用した。Western blot 法における一次抗体の抗 Bcl-2 (rabbit polyclonal IgG), 抗 Bcl-xL (rabbit polyclonal IgG), 抗 Bad (rabbit polyclonal IgG), 抗 Bax (rabbit polyclonal IgG) は Santa Cruz Biotechnology Inc (Delaware Avenue, USA) から、抗リン酸化 Bad (ser 112/136), 及び抗リン酸化 Akt は NEW ENGLAND Biolabs, Inc (Beverly, USA) から、二次抗体の抗ウサギ IgG ヤギ抗体は Amersham Pharmacia Biotech (Buckinghamshire, England) から購入した。

2. 細胞培養方法

8505C を 37°C, 5% CO₂ 条件下で培養シャーレに 10% FBS, トブラマイシン 0.05 mg/ml を含む HAM F-12 を用いて 80% confluent まで培養後、上清を除去し ZnCl₂ 7.5~200 μM の各濃度の試薬を含む培養液にて処理した。処理後、15分, 30分, 60分, 120分で ISOGEN を用いて total RNA を回収した。

3. クリスタルバイオレット法

8505C, ヒト類上皮細胞癌細胞 HeLa229, およびヒト肝細胞癌細胞 HepG2 とで検討した。8505C と HeLa229 には前述の細胞培養液を、HepG2 には 10% FBS, 1 mM ピルビン酸ナトリウム, トブラマイシン 0.05 mg/ml を含む Earle's MEM を細胞培養液として使用した。

24 穴 microtiter plates (IWAKI, 東京) に 1×10⁴ cells/well で細胞を培養し、150 μM, 及び 300 μM の ZnCl₂ で 24 時間, 37°C, 5% CO₂ で処理し、既報¹⁴⁾のクリスタルバイオレット法にて細胞の生存率を測定した。

4. Western blot 法

Apoptosis を促進する蛋白である Bad, Bax, また

apoptosis を抑制する蛋白である Bcl-2, リン酸化 Bad (ser 112/136), Bcl-xL, 及びリン酸化 Akt の亜鉛投与による発現変化について以前報告した方法¹⁴⁾ に準じて western blot 法にて検討した. 細胞を細胞溶解液にて溶解後, 10000 rpm, 4°C, 10 分間で遠心分離し上清を抽出し, 蛋白濃度測定とした. 7.5-12% SDS-PAGE にて分離し, 192 mM グリシンを含む 25 mM Tris バッファーを用いてクリアプロット・P 膜 (アトー株式会社, 東京) に転写した. 転写したメンブレンを, 0.1% Tween 20 と 5% non-fat dry milk を含む 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 137 mM NaCl の Tris バッファーを用い, 室温 60 分間で非特異的反応をブロックした後, 一次抗体として抗 Bcl-2, 抗 Bcl-xL, 抗 Bad, 抗 Bax, 抗リン酸化 Bad (ser 112/136), 及び抗リン酸化 Akt に反応させ, 二次抗体として抗ウサギ IgG ヤギ抗体を反応させた. 以上, これらの検出にはウェスタンブロッティング化学発光検出システムの ECL Western Blotting Detection Kit (Amersham Pharmacia Biotech) を使用した.

5. Northern Blot 法とハイブリダイゼーション

Northern blot は以前に報告した手順にて行った^{13,14)}. すなわち, 回収した各 total RNA 15 µg を formaldehyde を含む 1.0% アガロールゲルにて 1× MOPS(3-(N-morpholin)propanesulfonic acid, SIGMA) で電気泳動後, ナイロンメンブレン(GeneScreen Plus, PerkinElmer Life Sciences, Inc, Boston, USA) にブロッティングした. Total RNA を転写したメンブレンを 10×SSC で洗浄後, 80°C でオープン乾燥させた.

ZnT-1のcDNA⁹⁾ (Dr. Palmiter より供与), 及び ZnT-4のcDNA⁹⁾ (Dr. Huang より供与) を, T7 QuickPrime™ Kit (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて [α -³²P] dCTP (Amersham Pharmacia Biotech) で標識した. 標識した cDNA を ProbeQuant™ G-50 Micro Column (Amersham Pharmacia Biotech) で遠心精製し, cDNA プローブとして使用した.

QuikHyb™ Hybridization Solution (STRATAGENE CLONING SYSTEMS, La Jolla, USA) 15 ml を加えたハイブリボトルにメンブレンを入れ, 68°C, 15 分でプレハイブリダイゼーション後, プローブを加え, 68°C, 2~3 時間ハイブリダイゼーションを行った. ハイブリダイゼーション後, メンブレンを 2×SSC と 0.1% SDS を含む洗浄液で洗浄した. メンブレンをラップで包み, レントゲンフィルムに暴露させ, -70°C に 12~24 時間保存後, 現像した.

6. 蛍光染色法

チャンバースライドに 8505C を培養し, 25 µM Zinquin (Toronto Research Chemicals, Inc, North York, Canada), 及び核染色用の propidium iodide (PI,

SIGMA) で遮光, 室温, 30~60 分間染色後, PBS に溶解した 0.1 M メルカプトエチルアミン (和光純薬, 大阪) とグリセリンの混合液で封入し, 亜鉛の細胞内での存在部位を Axiophot 蛍光顕微鏡 (Carl Zeiss, Germany) で観察した. 核は, 赤く, Zinquin により細胞内亜鉛が青く蛍光される. SenSys™0400 冷却 CCD カメラ (Photometrics Ltd, Tucson, USA) で観察した蛍光所見を取り込み, 画像処理ソフトの IPLab Spectrum™ version 3.0 と Adobe PhotoShop™ version 5.5 にて画像処理した.

結果

1. 亜鉛による細胞毒性効果

ヒト甲状腺乳頭癌細胞である 8505C と他のヒト癌細胞とで, 亜鉛による細胞毒性効果を比較した (Fig. 1). 他のヒト癌細胞株に比し, 8505C においては亜鉛による細胞毒性効果が著明に認められた.

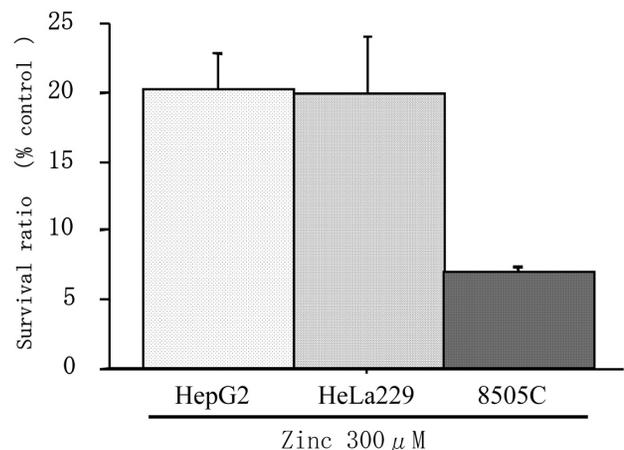


Fig. 1. Cytotoxic effect of zinc on various human cancer cell lines. Cytotoxicity of zinc to 8505C thyroid cancer cell line was significantly higher than that to other human cancer cell lines.

2. 亜鉛の甲状腺癌におけるアポトーシスへの影響

一般に亜鉛は apoptosis 抑制効果が知られているが, 甲状腺癌細胞株に対しては主として necrosis を誘導し, apoptosis は少ないことを報告した¹³⁾. なぜ apoptosis が起こりにくいかについて western blot 法により apoptosis 関連蛋白の亜鉛による変動について検討した. Fig. 2 に示すように, apoptosis を抑制する antiapoptotic protein の Bcl-2 やリン酸化 Bad (ser 112, 及び ser136) が亜鉛投与後, 時間依存性に発現増加傾向が認められた. 反対に apoptosis を促進する proapoptotic protein の Bad, Bax は時間依存性にその発現が減少傾向にあった. リン酸化 Bad の上流に存在する Akt (PKB) の発現変化について検

討したところ、亜鉛刺激にて時間依存性にその発現増加が認められた (Fig. 3-A)。また Akt の上流の Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) の阻害薬である Ly294002 (CALBIOCHEM, San Diego, USA), 或いは Wortmannin (SIGMA) にて亜鉛によるリン酸化 Akt の発現が抑制された (Fig. 3-B, C)。このことは、亜鉛により PI3K の活性化が誘導され、PI3K により Akt がリン酸化され、さらに Bad がリン酸化されたと考えられた。

3. ZnT ファミリーの癌細胞における発現, 及び亜鉛の影響

亜鉛の汲み出しに作用する Zinc transporter の ZnT-1 の発現について、Northern blot 法にて 8505C, ヒト類上皮細胞癌細胞 HeLa229, およびヒト肝細胞癌細胞 HepG2 とで検討した。また、8505C と HeLa229

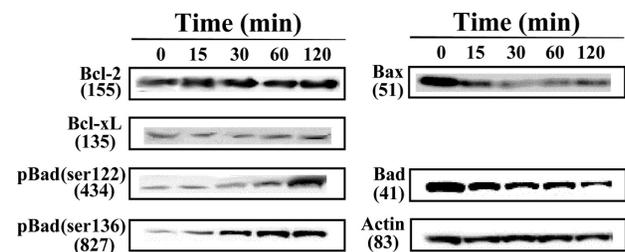


Fig. 2. Expression of apoptosis-related proteins in 8505C thyroid cancer cells following exposure to 200 μM Zn²⁺ by western blot analysis. Figures in parentheses indicate the percentage ratio of amounts of each protein expressed before Zn²⁺ exposure and 120 min after. Data are representative of two different experiments.

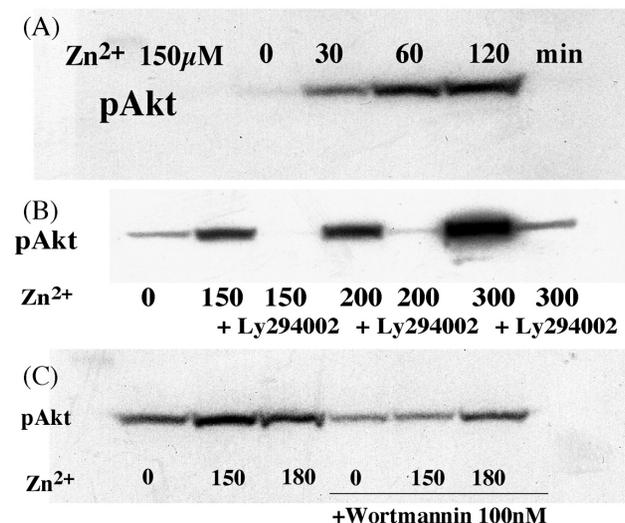


Fig. 3. The change of phosphorylation of Akt by Zn²⁺ in 8505C thyroid cancer cells following exposure to 150 μM Zn²⁺ (Fig. 3-A). The effect of PI3K inhibitor on phosphorylation of Akt induced by Zn²⁺ in 8505C thyroid cancer cells. Both Ly294002 (Fig. 3-B) at 50 μM and 100 nM of Wortmannin (Fig. 3-C) inhibited phosphorylation of Akt induced by Zn²⁺.

における亜鉛の濃度変化による ZnT-1 の発現変化、および時間的発現変化を検討した。亜鉛非存在下では、何れも ZnT-1 の発現は少なかったが、8505C での発現が最も少なかった (Fig. 4)。亜鉛 200 μM, 2 時間刺激下では何れの細胞においても ZnT-1 mRNA の発現が増強したが、8505C での発現は他の細胞株より少なかった。また、亜鉛の濃度を変え、8505C と HeLa229 で ZnT-1 の発現の違いを検討したところ、8505C では亜鉛 100 μM 以上にてその発現が急速に増強し、HeLa 229 では低濃度から ZnT-1 mRNA の発現が増強していた (Fig. 5-A, B)。データは示さないが、

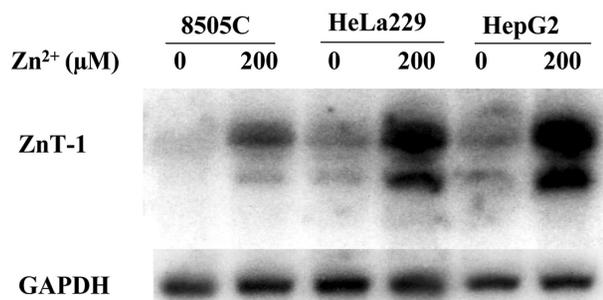


Fig. 4. Comparison of the expression of ZnT-1 mRNA in cancer cell lines. Zinc induced a marked increase in ZnT-1 mRNA expression. The expression of ZnT-1 mRNA in 8505C thyroid cancer cell line was lower than that in other cancer cell lines.

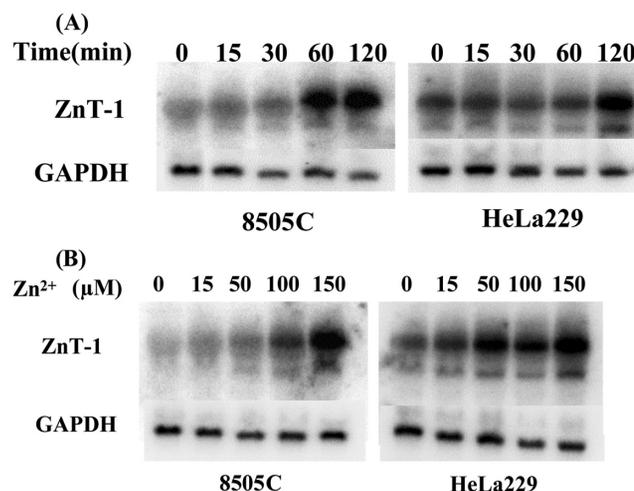


Fig. 5. Time- and concentration-dependent increase in ZnT-1 mRNA expression following zinc exposure. Panel (A) shows the time course of ZnT-1 mRNA expression after 200 μM zinc exposure in 8505C and HeLa229. The expression of ZnT-1 mRNA -before as well as 15 and 30 min after zinc stimulation was low as compared with that in HeLa229. Panel (B) shows the change of ZnT-1 mRNA expression after the exposure of various concentrations of zinc in 8505C and HeLa229. The expression of ZnT-1 mRNA in 8505C was low at the low concentrations of zinc as compared with that in HeLa229.

ZnT-2, ZnT-3 に関しては, PCR においても 8505C ではその発現は認められなかった. Fig. 6 に示すように, 亜鉛濃度変化による ZnT-4 mRNA の発現変化は認められなかったが, 他のヒト癌細胞株に比べ 8505C では, その発現が増強していた. また Fig. 7 に示すように, 細胞内の Zinquin は亜鉛の濃度依存性に増加し, 細胞内亜鉛濃度は亜鉛が細胞外亜鉛濃度依存性に上昇していることを示唆していた.

考 察

身体は, 2~3g の亜鉛を含んでおり, 主に骨, 歯, 毛髪, 皮膚, 肝臓, 筋肉, 白血球及び性巣に見られる. 血漿中の亜鉛 100 μ g/dl (15.3 μ mol/l) のうち, 1/3 はアルブミンとゆるく結合し, およそ 2/3 がグロブリンと固く結合している. 100 以上の亜鉛金属結合酵素が有り, これには多数の NADH デヒドロゲナーゼ, RNA ポリメラーゼ, DNA ポリメラーゼ, DNA 転写因子の他に, アルカリフォスファターゼ, スーパーオキシドジスムターゼ, 炭酸脱水酵素等が含まれる.

亜鉛は金属酵素や Zinc-finger をもつ転写因子, ホル

モンの構成成分となり, 成長や代謝に必須の微量元素で, 神経系統や精巣, 皮膚, 腸管など様々な臓器に影響を及ぼす. また, 亜鉛は細胞の分裂周期にも影響を及ぼし, 有糸分裂を促進することが知られており, 細胞に対するシグナル伝達系統の一端を担い, 細胞, 及び組織の成長を調節していると考えられる.

また亜鉛は apoptosis を抑制することが知られている¹⁵⁻¹⁷. 興味深いことに亜鉛は細胞によっては apoptosis を誘導することが報告されている^{18,19}. Iitaka らは甲状腺癌細胞を用いて, 高濃度の亜鉛は主として necrosis 誘導するが, 一部に apoptosis を同時に誘導することを示した¹³. 今回亜鉛刺激で, apoptosis 促進に働く proapoptotic protein の Bax, Bad の減少と, apoptosis 抑制蛋白である Bcl-2, Bcl-xL, リン酸化 Bad の増加を認めた. 特にリン酸化 Bad の増加が著しく, apoptosis 抑制に重要な役割を果たしていると考えられる. さらに Bad のリン酸化が Akt - PI3K の活性化によるものであることを示した. すなわち, 亜鉛は PI3K を活性化し, PI3K が Akt をリン酸化し, Akt がさらに Bad をリン酸化する cascade が活性化されたために甲状腺癌細胞では apoptosis が誘導されにくいと思われた. 亜鉛にて細胞障害を受けない細胞においては, これらの経路の活性化は認められなかった.

なぜ, 亜鉛が甲状腺癌細胞特異的に細胞障害をきたすかについて, 亜鉛の輸送体となる ZnT ファミリーについて検討してみた. ZnT-1 は, 細胞膜上に存在する亜鉛の輸送体であり, 主として細胞質中の亜鉛の汲み出しに関与している^{3-6, 11, 12}. 甲状腺癌細胞株では ZnT-1 の発現が他のヒト癌細胞株に比べ低下していた. ZnT-1 の発現は亜鉛刺激により濃度および時間依存性に増強したが, 甲状腺癌細胞株では亜鉛抵抗性の HeLa229 細胞に比して低濃度の亜鉛刺激での反応が悪かった. ZnT-1 発現の低下は細胞内亜鉛濃度の

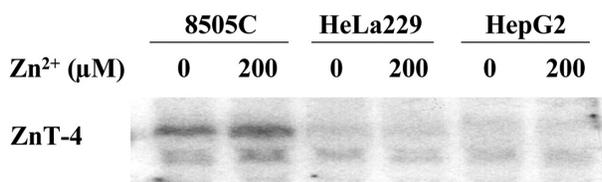


Fig. 6. The expression of ZnT-4 mRNA in human cancer cell lines. The expression of ZnT-4 mRNA was high in 8505C thyroid cancer cell line, although it was not increased after 200 μ M zinc exposure. In contrast, expression of ZnT-4 mRNA in other human cancer cell line was very low.

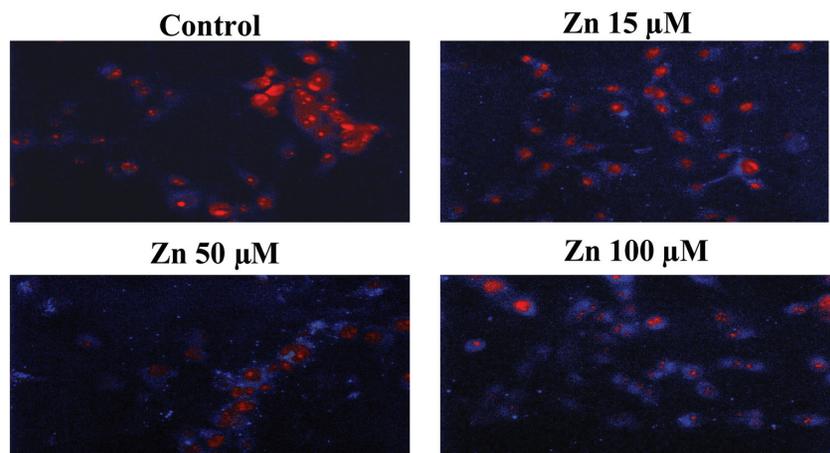


Fig. 7. The changes of cytoplasmic zinc concentration in 8505C thyroid cancer cell line demonstrated by Zinquin. The fluorescent intensity of Zinquin (blue) in the cytoplasm increased as the concentration of zinc in the medium increased, suggesting an increase in intracytoplasmic concentrations of zinc. Nuclei were stained red by propidium iodide.

上昇をきたし、他のヒト癌細胞株に比べ亜鉛による細胞毒性が出現しやすいものと考えられる。すなわち、ZnT-1の低下が甲状腺癌細胞株における亜鉛による細胞障害の原因の一つであると考えられる。ZnT-4の発現は、甲状腺癌細胞株のみに認められた。その理由については不明であるが、細胞質内の亜鉛濃度が他の細胞に比して高濃度であるために、細胞内小器官でのZnT-4の発現が増強しているのかも知れない。

結 論

今回の検討で、甲状腺癌細胞株では亜鉛の排泄を司るZnT-1の発現が減少していることが判明した。ZnT-1の減少が細胞内亜鉛濃度の上昇につながり、細胞毒性をもたらす可能性が示唆された。亜鉛によりapoptosisが誘導されにくい機序としては、PI3K-Akt-Badのリン酸化 cascade 反応が誘導されapoptosis抑制的に働くことが重要な役割を果たしている可能性を示した。

謝 辞

本稿を作成するに当たり、御指導、また御鞭撻を賜りました埼玉医科大学第4内科学教室、片山茂裕教授、飯高誠助教授、藤巻聡美非常勤講師、鈴木徳子実験助手、並びに教室員各位に深謝致します。

文 献

- Zalewski PD, Forbes IJ, Seamark RF, Borlinghaus R, Betts WH, Lincoln SF, et al. Flux of intracellular labile zinc during apoptosis (gene-directed cell death) revealed by a specific chemical probe, Zinquin. *Chem Biol* 1994;1:153-61.
- Zalewski PD, Forbes IJ, Betts WH. Correlation of apoptosis with change in intracellular labile Zn(II) using zinquin [(2-methyl-8-p-toluenesulphonamido-6-quinolyloxy)acetic acid], a new specific fluorescent probe for Zn(II). *Biochem J* 1993;296:403-8.
- Langmade SJ, Ravindra R, Daniels PJ, Andrews GK. The transcription factor MTF-1 mediates metal regulation of the mouse ZnT1 gene. *J Biol Chem* 2000;275:34803-9.
- Lasat MM, Pence NS, Garvin DF, Ebbs SD, Kochian LV. Molecular physiology of zinc transport in the Zn hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *J Exp Bot* 2000;51:71-9.
- McMahon RJ, Cousins RJ. Regulation of the zinc transporter ZnT-1 by dietary zinc. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:4841-6.
- Palmiter RD, Findley SD. Cloning and functional characterization of a mammalian zinc transporter that confers resistance to zinc. *EMBO J* 1995;14:639-49.
- Palmiter RD, Cole TB, Findley SD. ZnT-2, a mammalian protein that confers resistance to zinc by facilitating vesicular sequestration. *EMBO J* 1996;15:1784-91.
- Palmiter RD, Cole TB, Quaife CJ, Findley SD. ZnT-3, a putative transporter of zinc into synaptic vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:14934-9.
- Huang L, Gitschier J. A novel gene involved in zinc transport is deficient in the lethal milk mouse. *Nat Genet* 1997;17:292-7.
- Murgia C, Vespignani I, Cerase J, Nobili F, Perozzi G. Cloning, expression, and vesicular localization of zinc transporter Dri 27/ZnT4 in intestinal tissue and cells. *Am J Physiol* 1999;277:G1231-9.
- Cousins RJ, McMahon RJ. Integrative aspects of zinc transporters. *J Nutr* 2000;130(5S Suppl):1384S-7S.
- Liuzzi JP, Blanchard RK, Cousins RJ. Differential regulation of zinc transporter 1, 2, and 4 mRNA expression by dietary zinc in rats. *J Nutr* 2001;131:46-52.
- Iitaka M, Kakinuma S, Fujimaki S, Oosuga I, Fujita T, Yamanaka K, et al. Induction of apoptosis and necrosis by zinc in human thyroid cancer cell lines. *J Endocrinol* 2001;169:417-24.
- Iitaka M, Kitahama S, Ishii J. Involvement of protein kinase A and C in the production of interleukin-1 alpha-induced prostaglandin E2 from mouse osteoblast-like cell line, MC3T3-E1. *Biochim Biophys Acta* 1994;1221:78-82.
- Shimizu T, Kubota M, Tanizawa A, Sano H, Kasai Y, Hashimoto H, et al. Inhibition of both etoposide-induced DNA fragmentation and activation of poly(ADP-ribose) synthesis by zinc ion. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;169:1172-7.
- Tanuma S, Shiokawa D. Multiple forms of nuclear deoxyribonuclease in rat thymocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;203:789-97.
- Shiokawa D, Ohyama H, Yamada T, Takahashi K, Tanuma S. Identification of an endonuclease responsible for apoptosis in rat thymocytes. *Eur J Biochem* 1994;226:23-30.
- Manev H, Kharlamov E, Uz T, Mason RP, Cagnoli CM. Characterization of zinc-induced neuronal death in primary cultures of rat cerebellar granule cells. *Exp Neurol* 1997;146:171-8.
- Telford WG, Fraker PJ. Preferential induction of apoptosis in mouse CD4⁺CD8⁺ $\alpha\beta$ TCR^{lo}CD3 ϵ ^{lo} thymocytes by zinc. *J Cell Physiol* 1995;164:259-70.