

## 배양 기관지 상피세포 (BEAS-2B cells)에서 6가 크롬에 의한 산화적 스트레스

박은정, 강미선, 김대선<sup>1</sup>, 박광식\*

동덕여자대학교 약학대학, <sup>1</sup>국립환경과학원 환경역학과

### Induction of Oxidative Stress by Hexavalent Chromium in Human Bronchial Epithelial Cells (BEAS-2B)

Eun-Jung Park, Mi Sun Kang, Dae-Seon Kim<sup>1</sup> and Kwangsik Park\*

College of Pharmacy, Dongduk Women's University,  
#23-1, Wolgok-dong, Seongbuk-gu, Seoul 136-714, Korea

<sup>1</sup>Environmental Epidemiology Division, National Institute of Environmental Research  
Environmental Research Complex, Kyungseo-Dong, Seo-Gu, Incheon 404-170, Korea

#### ABSTRACT

Chromium compounds are widely used in diverse industries including pigment manufacturing, painting, metal plating and leather tanning. With the wide uses of chromium, various adverse effects of the compounds on the environment and human health have been reported. Among them, hexavalent chromium [Cr (VI)], which is a carcinogenic heavy metal, has been widely studied. Epidemiological investigations have shown that respiratory cancers had been found in workers who had been occupationally exposed to Cr (VI). In this study, cell toxicity and induction of reactive oxygen species (ROS) by Cr (VI) (1, 2, 4, 8  $\mu$ M) in cultured human bronchial epithelial cells were investigated. Exposure of the cells to Cr (VI) led to cell death, ROS increase, and cytosolic caspase-3 activation. The ROS increase was related with the decreased level of GSH. Chromatin condensation and fragmentation were occurred by Cr (VI) when evaluated by DAPI staining or agarose gel electrophoresis of the extracted DNA. Expression of ROS related genes including glutathione S-transferase, heme oxygenase-1, metallothionein were significantly induced in Cr (VI) treated cells. This result suggests the toxicity in cultured cells by Cr (VI) was expressed through the apoptotic process with ROS induction.

**Key words** : chromium, ROS, BEAS-2B cells, apoptosis

#### 서 론

산업화와 더불어 호흡성 분진과 분진에 결합된 발암성 금속에 의한 건강피해가 최근 급속히 증가

되고 있다. 그 중에서도 특히, 크롬은 독성이 강하고 호흡기계의 질환을 유발하여 급성폐렴과 호흡기 부종을 일으킬 뿐만 아니라 심장혈관계, 골격계 및 신장질환을 유발하는 것으로 알려져 있다(한 등, 2006). 크롬 화합물은 안료제조, 페인트, 금속 도금, 가죽 무두질 등을 포함한 다양한 공정 및 산업 제품에서 널리 이용되어 왔다. 크롬 화합물은 여러 가지 산화상태로 존재하나 가장 일반적인 것이 3

\* To whom correspondence should be addressed.  
Tel: +82-2-940-4522, Fax: +82-2-940-4195  
E-mail: kspark@dongduk.ac.kr

가와 6가 상태이다. 크롬 화합물 중 6가 크롬은 발암성 중금속이며 전세계적으로 존재하는 중요한 오염물질이다. 6가 크롬 화합물은 정사면체 구조로서 산화물이나 산음이온(oxyanions)으로 존재하며 세포막을 빠르게 통과한 후 체내에서 크롬 5가와 4가를 거쳐 안정한 크롬 3가로 환원된다. 일반적으로 비발암성 물질로 알려진 크롬 3가는 팔면체 구조로서 양이온으로 존재하며 6가 크롬보다 크기 때문에 세포막 통과가 어렵다(박, 1996).

역학조사에 의하면, 크롬에 대한 노출은 직업적으로 노출된 근로자에게서 주로 발견되며, 환경과 인간의 건강에 대한 6가 크롬의 다양한 위험성에 대한 연구결과가 지속적으로 발표되고 있다. 크롬이 6가로부터 5가, 4가로 환원되는 과정은 단순하지 않으며, 이 과정중 발생하는 ROS가 크롬의 독성작용, 발암작용에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 최근 크롬 6가의 환원과정에서 hydroxyl radical ( $\cdot\text{OH}$ )이나 singlet oxygen ( $^1\text{O}_2$ )같은 ROS (Reactive Oxygen Species)의 생성이 EPR (Electron Paramagnetic Resonance) Spectroscopy에 의해 보고되었으며, 이러한 과정에서 생성된 ROS는 유전자에 변이를 일으킨다(박, 1996).

본 연구는 대기 중 오염물질의 주 표적장기인 호흡기계에 미치는 영향을 관찰하기 위하여, 사람의 정상 기관지 상피세포에서 유래된 BEAS-2B cell에 6가 크롬화합물( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ )을 처리함으로써, ROS의 증가를 통한 세포사멸의 유도과정을 연구하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 세포독성

사람의 정상 기관지상피세포인 BEAS-2B cell line을 ATCC사(American Tissue Culture Cell)에서 분양 받아 10%FBS (Fetal Bovine Serum)와 1% penicillin-streptomycin을 함유하는 DMEM/F12배지를 이용하여  $\text{CO}_2$  배양기에서 계대배양하였다. 계대배양한 BEAS-2B cell을 트립신으로 처리하여 회수한 후 FBS-free media로 2회 세척하고 96 well plates에 분주하여  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  배양기에서 24시간 동안 부착시켰다. 크롬화합물( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ )을 각 농도별로 처리하고 각각 24, 48, 72, 96시간씩 노출시

킨 후 2 mg/mL의 MTT (3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide)용액을 well당 40  $\mu\text{L}$ 씩 넣어 배양기내에서 4시간 정도 반응시켰다. plate에 있는 상등액을 제거하고 DMSO (Dimethyl Sulfoxide)를 well당 150  $\mu\text{L}$ 씩 넣어 준 후 30분 정도 가볍게 흔들어 주고 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 농도당 4 well씩 3회 이상 시험하였으며 각각의 O.D값을 대조군의 O.D값과 비교하여 백분율로 표시하였다(Choi *et al.* 2004, Hsiao *et al.* 2000).

### 2. ROS 측정

세포내의 ROS측정을 위해 세포를 12 well plate에  $2 \times 10^5$  cells/mL로 분주한 후 24시간 동안 부착시키고 크롬화합물을 각 농도별, 시간별로 처리하고 PBS (Phosphate Buffered Saline)로 세척한 후 DCFH-DA (2',7'-dichlorofluorescein diacetate)를 가하여  $37^\circ\text{C}$ 에서 30분 동안 반응시켰다. 다시 PBS로 세척한 후 1 M NaOH를 well당 400  $\mu\text{L}$ 씩 넣어 세포를 분해시키고 일정량을 96 well black plate으로 옮겨 480 nm (Ex.) 및 530 nm (Em.)에서 형광을 측정 후 단백질( $\mu\text{g}$ )당 흡광도를 대조군의 백분율로 나타내었다. 실험결과는 Students' t-test로 통계 분석하여 유의성을 검증하였다.

ROS의 생성 세포에 대한 형광이미지 제작을 위해서는 8 chamber slide에 BEAS-2B cell을  $2 \times 10^5$  cells로 분주하고 크롬화합물을 처리하여 24시간 동안 부착시킨 후 DCFH-DA를  $37^\circ\text{C}$ 에서 30분 동안 반응시켰다. PBS로 세척한 후 형광현미경으로 관찰하였다(Fotakis *et al.*, 2005; Elbekai *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2006).

### 3. GSH 측정

세포내의 환원형 글루타치온의 감소는 orthophthaldialdehyde를 기질로 이용하여 측정되었다. 간략히 설명하면, 먼저 세포를 6 well plate에  $1 \times 10^6$  cells/mL 농도로 분주한 후 24시간 동안 부착시켰다. 크롬화합물을 각 농도별, 시간별로 처리한 후 트립신으로 처리하여 세포를 회수하였으며 PBS로 1회 세척하고, 1% perchloric acid로 세포를 용해시켰다. 얼음 위에서 10분간 방치한 후,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ /EDTA로 희석한 1 mg/mL의 orthophthaldialdehyde

를 넣고 30분간 실온에서 반응시켰다. 350 nm (Ex) 과 420 nm (Em)에서 형광을 측정한 후 대조군에 대한 백분율로 나타내었다 (Fotakis *et al.*, 2005; Elbekai *et al.*, 2005). 실험결과는 Students' t-test로 통계분석하여 유의성을 검증하였다.

#### 4. 유전자 발현

대조군과 크롬처리군에서 추출한 RNA를 이용해 RT-PCR과 PCR을 실행하여 개별 유전자의 발현을 확인하였다. RNA 1 µg에 oligo dT, reverse transcriptase 및 nucleotide가 혼합된 반응액 20 µL를 42°C에서 60분간 반응시켜 cDNA를 얻은 후 Taq polymerase 및 nucleotide 등이 혼합된 (주)바이오니아(대전, 한국)의 PCR premix tube에 각각의 합성된 primer와 RT-PCR에서 얻은 반응생성물 1 µL를 넣고 95°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 30초씩 25회 반응시켰다. 마지막 반응 이후에 72°C에서 15분간 더 증폭시켰다. 증폭을 통해 생성된 반응물을 ethidium bromide (10 mg/mL)를 함유하는 1.5% 아가로스 겔상에서 TAE완충용액을 사용하여 전기영동하였다. 유전자 증폭에 사용된 합성 primer의 염기서열은 Table 1에 제시하였다 (Park *et al.*, 2006).

#### 5. Caspase-3 활성 측정

Caspase-3 activity는 (주)켄트론에서 구입한 caspase-3 fluorescent assay kit을 이용하여 실행하였다.

프로토콜에 따라,  $5 \times 10^5$  cells/mL의 세포를 24시간 동안 부착시킨 후 크롬화합물을 각 농도별, 시간별로 처리하고 트립신을 이용하여 세포를 회수한 후 용해완충액을 이용하여 용해산물을 만들었다. 세포 용해물을 fluorogenic caspase-specific substrate (DEVD-AMC)와 37°C에서 30분 동안 반응시킨 후, 360 nm (Ex)과 460 nm (Em)에서 형광을 측정한 후 대조군에 대한 백분율로 나타내었다. 자료는 Students' t-test로 통계분석하여 유의성을 검증하였다.

#### 6. DNA 분절시험

DNA 분절 (fragmentation)을 확인하기 위해 Pro-mega Corporation (WI, Madison, USA)의 Genomic DNA purification kit을 이용하여 추출한 DNA를 ethidium bromide (10 mg/mL) 0.02% 함유하는 1.5% 아가로스 겔에 전기영동하고 UV light로 확인하였다 (Spallarossa *et al.*, 2004).

#### 7. DAPI 염색시험

세포를 8 chamber slide에  $2 \times 10^3$  cells로 분주한 후 24시간 동안 부착시키고 크롬화합물을 각 농도별로 24시간 동안 처리하였다. PBS로 세척해주고 4% paraformaldehyde를 넣고 5분간 고정시킨 후 다시 PBS로 세척하였다. 0.1% Triton X-100을 처리하고 PBS로 한 번 더 세척해 준 후 DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)용액으로 염색하여 세포 핵의 변화를 형광현미경으로 관찰하였다 (Dhar-

**Table 1.** Primer sequences for RT-PCR of oxidative stress related-genes

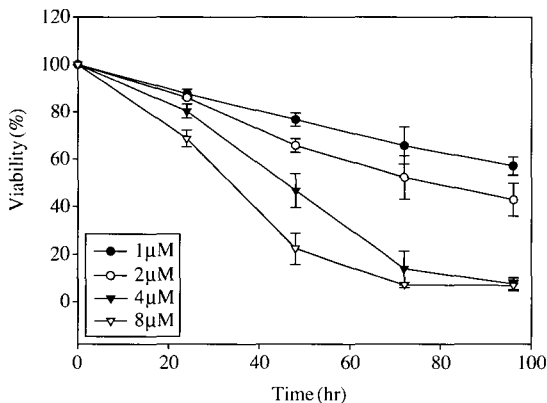
Gene name	Size	GB No.	Primer sequences
glutathione S-transferase	262	NM146421.1	F : 5'-CCATCTTTGAGAACACAGGT-3' R : 5'-GAGAAGATTCGTGTGGACAT-3'
heme oxygenase-1	260	NM002133.1	F : 5'-CTCTGAAGTTTAGGCCATTG-3' R : 5'-AGTTGCTGTAGGGCTTTATG-3'
NAD (P)H dehydrogenase, quinone 1	260	NM000903.1	F : 5'-CTAGTAGCTGGGATGACAGG-3' R : 5'-CATATTGCAGATGTACGGTG-3'
metallothionein	277	NM005946.1	F : 5'-TTCTATATCTTCGAGCAGGG-3' R : 5'-TAGCCTCTCAACTTCTTGCT-3'
Thioredoxin reductase	277	AF108213.1	F : 5'-AAACCAATACCAGCAAGA AA-3' R : 5'-CTATGAGAATGCTTATGGGC-3'
Catalase	250	NM001752.2	F : 5'-TCATGACATTTAATCAGGCA-3' R : 5'-GTGTCAGGATAGGCCAAAAAG-3'

Mascareno *et al.*, 2005).

## 결과 및 고찰

호흡기 노출의 경우, 3가 크롬은 IARC에서 인간을 대상으로 한 발암성의 증거가 불충분하여 Group 3으로 분류되어 있는 반면 6가 크롬은 많은 역학적 연구들의 증거를 토대로 하여 Group 1으로 분류되어 있다. 또한, 3가 크롬은 세포막을 쉽게 통과하지 못하기 때문에 위장관이나 호흡기계의 흡수가 거의 이루어지지 못하는 반면 6가 크롬은 구강, 호흡기, 피부 등을 통해 흡수가 가능하며 흡수된 6가 크롬은 세포 내에 함유된 크롬의 약 90%를 차지하는 3가 크롬 형태로 빠르게 환원되는 것으로 알려져 있다(기 등, 1996).

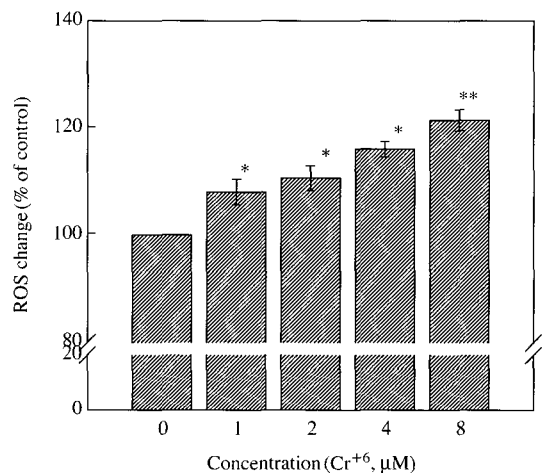
본 연구에서는 사람의 호흡기에 미치는 크롬의 영향을 *in vitro*상으로 관찰하고 평가하기 위하여 사람의 정상 기관지 상피세포에서 유래한 세포주인 BEAS-2B cell line에 크롬화합물( $K_2Cr_2O_7$ )을 크롬 농도로서 계산하여 1, 2, 4, 8  $\mu M$ 씩 처리하여 24, 48, 72, 96시간의 세포생존율을 관찰하였다. 그 결



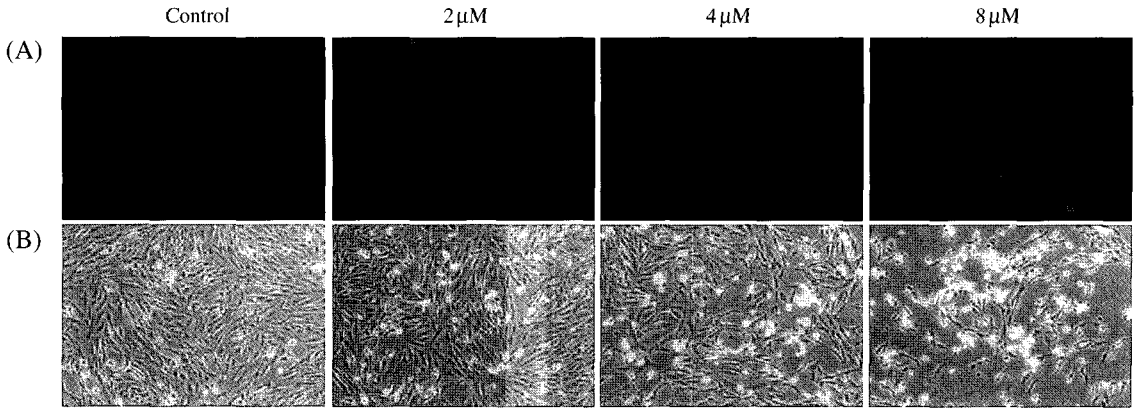
**Fig. 1.** Effect of Cr(VI) on viability of BEAS-2B cell lines *in vitro*. Cells were treated with the indicated concentration of Cr(VI) as of  $K_2Cr_2O_7$  for 24, 48, 72 and 96 hr. Cell viability was assessed by MTT assay. Data are presented as the percentage of the control group. Cell viability was greatly reduced in a dose- and time-dependent manner by Cr(VI). Results represent means of three independent experiments, and error bars represent the standard error of the mean.

과, 농도 및 용량의존적으로 세포생존율이 감소하는 것을 알 수 있었으며 1, 2, 4, 8  $\mu M$ 씩 24시간 처리한 결과, Fig. 1에서 보는 바와 같이 세포생존율이 88~69% 정도로 감소하였다. 특히, 8  $\mu M$ 로 96시간 처리한 경우의 세포생존율은 7% 정도에 머물렀다.

세포내의 자유라디칼의 발생과 항산화 시스템의 불균형에 의해 야기되는 산화적 스트레스는 비소나 크롬과 같은 금속이온에 의해 유도되는 세포성 반응과 발암성에 있어서 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다(Shi *et al.*, 2004). ROS는  $\cdot OH$ ,  $^1O_2$ ,  $^3O_2$ ,  $O_2^-$ 와  $H_2O_2$ 를 포함하며, 이들은 모두 반응성이 매우 높아 세포의 지질, 단백질, 핵산 등을 공격함으로써 세포의 기능을 손상시킨다. ROS는 효소의 불활성화, 변이, 유전자의 재작성, 세포사멸과 같은 다양한 종류의 독성을 일으킨다. 크롬 6가를 투여하여 발생하는 ROS는 환원형 염료인 DCFH를 산화시켜 형광성을 나타내게 된다. 그러므로 염료 형광성의 강도는 발생하는 ROS에 정비



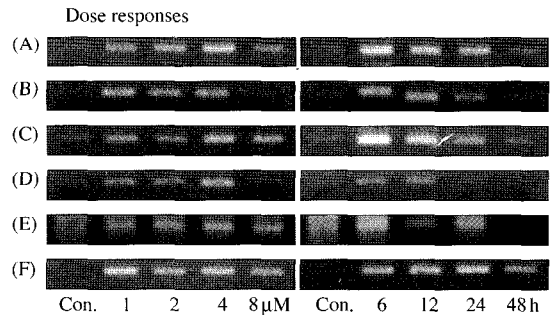
**Fig. 2.** Effect of Cr(VI) on ROS production in BEAS-2B cell line. Cells grown in confluent were pretreated with Cr(VI), washed with phosphate buffered saline, and then incubated with DCFH-DA 40  $\mu M$ . At the end of DCFH-DA incubation, the cells were lysed with NaOH and fluorescence of aliquot was measured. Results represent means of three independent experiments, and error bars represent the standard error of the mean. Asterisks indicate a statistically significant difference (\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ ) from the control group.



**Fig. 3.** Qualitative characterization of ROS generation by DCFH-DA staining using fluorescence microscopy. (A): Cells grown in confluent were pretreated with Cr (VI), washed with PBS, and then loaded with 40 μM DCFH-DA. After washing with PBS, cells were visualized by fluorescent microscopy (× 100). (B): Images of phase contrast microscope (× 100) are shown in lower panel.

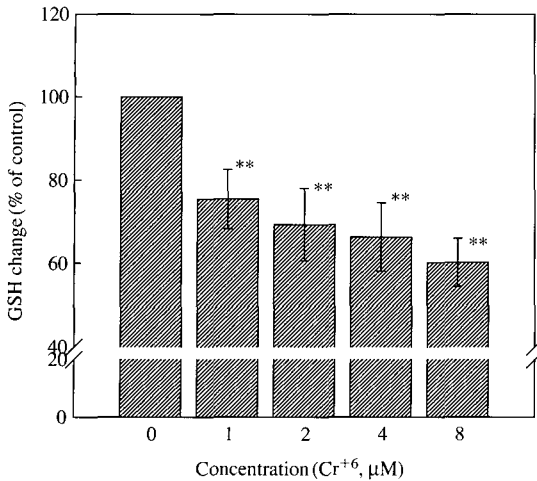
레한다고 판단할 수 있다 (박, 1996; Wang *et al.*, 2006). BEAS-2B 세포주에 크롬을 1, 2, 4, 8 μM로 24시간 처리하여 형광강도의 변화를 관찰해 본 결과, Fig. 2에서 관찰되는 것처럼 형광강도가 농도의 존적으로 증가하였으며 8 μM로 처리했을 경우 비처리군과 비교해 약 1.2배 정도 증가하였다. ROS의 생산을 시각적으로 확인하고자 8 chamber slide에 BEAS-2B cell을 2 × 10<sup>3</sup> cells로 부착시키고 크롬을 2, 4, 8 μM로 각각 처리하여 24시간이 경과한 후 형광현미경을 이용하여 변화를 관찰한 결과, Fig. 3에서 보는 바와 같이 형광강도의 변화가 8 μM 농도에서 뚜렷하게 확인되었다.

ROS가 증가하는 과정에는 다양한 유전자가 관여하는 것으로 알려져 있다. 기존의 연구를 통해 산화적 스트레스와 관련이 있는 것으로 알려진 다양한 유전자들에 대해 1, 2, 4, 8 μM로 48시간 처리한 후의 mRNA 수준과 8 μM로 6, 12, 24, 48시간 처리한 후의 mRNA 수준을 관찰해보았다. 1, 2, 4, 8 μM로 48시간 처리한 경우, catalase와 thioredoxin reductase는 1 μM에서 가장 뚜렷한 증가를 보인 후 농도의존적으로 감소하는 경향을 보인 반면 glutathione S-transferase와 heme oxygenase-1, metallothionein-1, NADPH quinone oxydase의 경우는 4 μM까지 농도의존적으로 증가하다가 세포생존율이 20% 정도로 감소하는 8 μM에서는 급격히 감소하였다. 또한, 8 μM을 시간별로 처리한 경우에는는



**Fig. 4.** Effect of Cr (VI) on the induction of oxidative stress-related genes. Right: Cells were treated with Cr (VI) of 8 μM for the indicated time. Left: Cells were treated with the indicated concentration of Cr (VI) for 24 hr. mRNA transcription was detected by RT-PCR analysis using respective primers described in Table 1. (A): glutathione S transferase, (B): catalase, (C): heme oxygenase-1, (D): metallothionein, (E): NADPH quinone oxydase, (F): thioredoxin reductase.

12시간에서 최고수준을 나타낸 metallothionein-1을 제외하고 실험에 이용한 모든 유전자가 6시간에서 최고수준을 나타내었다. 이러한 결과를 통해 세포 생존율이 감소함에 따라 유전자 발현도 현저히 떨어지는 것을 확인할 수 있었으며 동시에 catalase와 thioredoxin reductase는 외부물질의 자극에 대해 가장 먼저 작용하는 유전자일 것으로 추정되었다

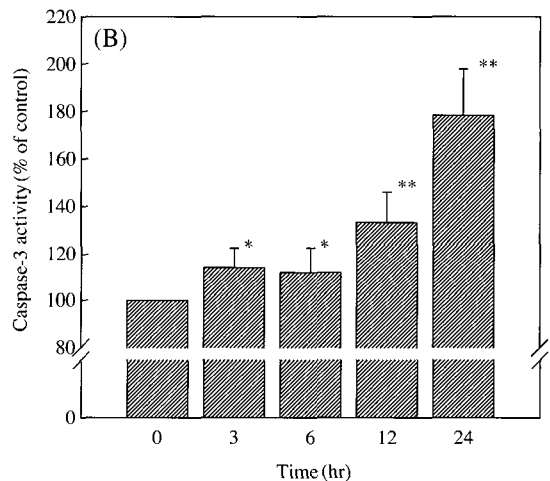
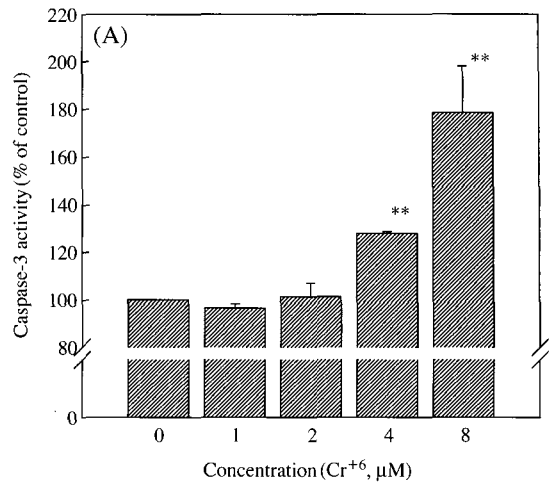


**Fig. 5.** Effect of Cr(VI) on the level of intracellular reduced glutathione (GSH). Fluorometric method using *o*-phthalaldehyde was used to measure the intracellular GSH. Results represent the average of three different analyses. GSH was calculated as nmol of glutathione per mg of protein and then was presented as the percentage of the control group. All treated group showed statistically significant difference by Student's t-test ( $p < 0.01$ ) from the control group.

(Fig. 4).

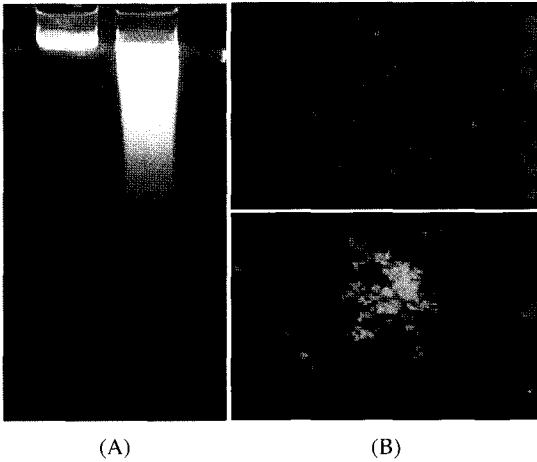
ROS의 증가와 환원형 글루타치온의 감소는 서로 밀접하게 연관되어 세포사멸을 유도하는 것으로 알려져 있다. BEAS-2B 세포에 1, 2, 4, 8  $\mu\text{M}$ 의 크롬을 24시간 동안 처리한 결과, Fig. 5에서 보는 바와 같이 환원형 글루타치온이 75.5~60% 정도로 감소하였다.

어떤 외부물질의 자극에 의하여 세포가 세포사멸로 사망하는 경우 하류 메카니즘으로서 caspase cascade가 일어나며 특히, caspase-3는 이 cascade의 최종단계에 해당된다. 또한 이러한 caspase-3 활성의 증가는 결국 핵내의 크로마틴의 응축과 DNA의 분절을 유도한다. 본 연구에서는 사람의 호흡기에 대한 크롬의 독성이 세포사멸을 통해 일어난다는 것을 확인하기 위하여 사람의 정상 기관지 상피세포에서 유래한 BEAS-2B cell line에 1, 2, 4, 8  $\mu\text{M}$ 의 크롬을 24시간 동안 처리한 후 caspase-3의 활성의 변화를 관찰하였으며 그 결과 8  $\mu\text{M}$ 로 처리한 경우 약 1.8배 정도의 증가율을 나타내었다(Fig 6A). 또한, 8  $\mu\text{M}$ 로 처리하여 24시간까지 시간의 경



**Fig. 6.** Effect of Cr(VI) on the caspase-3 activity. The cell lysate was tested for protease activity by the addition of a caspase specific substrate DEVD-AMC. The cleavage of the peptide by the caspase releases the chromophore pNA, which can be quantitated using fluorescent microplate reader at a wavelength of 360 (ex) and 460 (em). (A): dose dependent change, (B): time dependent change. Asterisks indicate a statistically significant difference (\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ ) from the control group.

과에 따른 변화를 관찰한 결과에서도 시간의존적으로 활성이 증가하는 것을 알 수 있었다(Fig. 6B). 또한, 크롬을 8  $\mu\text{M}$ 로 24시간 처리한 세포에서 추출한 DNA를 전기영동해 본 결과 비처리군과 비교했을 때 크롬을 처리한 세포에서는 DNA의 규칙적



**Fig. 7.** DNA fragmentation and DAPI staining in BEAS-2B cells exposed to Cr(VI) for 24 hours. Cells were exposed to 8  $\mu$ M Cr(VI) for 24 hours, DNA was extracted and fragmentation was shown using 1.5% agarose gel electrophoresis (A). DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole) staining was performed in Cr(VI) treated cells (B). DAPI solution was applied to cultured cells in 8 chamber slide, and the slides were incubated for 10 min in the dark at 37°C, and the images of nucleus were made by fluorescent microscope. The cells treated with Cr(VI) 8  $\mu$ M showed the chromosome condensation or breakages.

인 분절 (Fig. 7A)이 관찰되었으며 DAPI염색을 통해 형광현미경상으로 세포의 핵내의 변화를 관찰해 본 결과에서도 chromatin의 응축이 뚜렷하게 관찰되었다 (Fig. 7B).

이러한 결과에 의거하여, 사람의 기관지 상피세포에서 유래한 BEAS-2B에 대한 크롬의 독성은 세포사멸을 통하여 일어남을 알 수 있었다.

### 감사의 글

본 연구는 환경부 차세대핵심환경기술개발사업 (Eco-technopia 21 project) 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

### 참 고 문 헌

기혜성, 손은희, 유일재, 맹승희, 정해원. 크롬에 의한 CHO

세포의 세포독성기전에 관한 연구, 한국환경위생학회지, 1996; 22: 77-81.

박형숙. 크롬 6가 투여 후 A549세포에서의 reactive oxygen species와 크롬 5가의 발생, 한국환경독성학회지, 1996; 11: 49-57.

박형숙. 산화성 크롬의 배양세포에서의 독성작용, 한국환경독성학회지, 1998; 13: 1-9.

한두석, 전성우, 양승진, 최병남, 석승환, 홍기연, 송호준. 배양 섬유모세포에서 6가 크롬의 세포독성에 대한 poncirin의 영향, 대한본초학회지, 2006; 21(1): 101-107.

Choi JH, Kim JS, Kim YC, Kim YS, Chung NH and Cho MH. Comparative study of PM2.5-and PM10-induced oxidative stress in rat lung epithelial cell, J Vet Sci, 2004; 5: 11-18.

Dhar-Mascareno M, Carcamo JM and Golde DW. Hypoxia-reoxygenation-induced mitochondrial damage and apoptosis in human endothelial cells are inhibited by vitamin C, Free Radic Biol Med 2005; 38: 1311-1322.

Elbekai RH and El-Kadi AOS. The role of oxidative stress in the modulation of aryl hydrocarbon receptor-regulated genes by As<sup>3+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, and Cr<sup>6+</sup>, Free Radic Biol Med, 2005; 39: 1499-1511.

Fotakis G, Cemeli E, Anderson D and Timbrell JA. Cadmium chloride-induced DNA and lysosomal damage in a hepatoma cell line, Toxicol in Vitro 2005; 19: 481-489.

Hsiao W, Mo ZY, Fang M, Shi XM and Wang F. Cytotoxicity of PM<sub>2.5</sub> and PM<sub>2.5-10</sub> ambient air pollutants assessed by the MTT and the Comet assays, Mutation Research/Genetic Toxicol Environ Mutagen 2000; 471: 45-55.

Park EJ and Pakr K. Gene expression profiles of cultured rat cardiomyocytes (H9C2 cells) in response to arsenic trioxide at subcytotoxic level and oxidative stress, J Health Sci 2006; 52(5): 512-521.

Shi H, Hudson LG and Liu, Redox-active metal ions, reactive oxygen species, and apoptosis, Free Radic Biol Med 2004; 37(5): 582-593.

Spallarossa P, Garibaldi S, Altieri P, Fabbi P, Manca V, Nasti S, Rossettin P, Ghigliotti G, Ballestrero A, Patrone F, Barsotti A and Brunelli C. Carvedilol prevents doxorubicin-induced free radical release and apoptosis in cardiomyocytes in vitro, J Mol Cell Cardiol 2004; 37: 837-846.

Wang XF, Xing ML, Shen Y, Zhu X and Xu LH. Oral administration of Cr(VI) induced oxidative stress, DNA damage and apoptotic cell death in mice, Toxicol 2006; 228: 16-23.