

## 1,3-Dichloro-2-Propanol (1,3-DCP)에 의한 세포의 손상기전

정 지 학<sup>\*</sup> · 신 익 재 · 신 영 민<sup>\*\*</sup> · 박 흥 재<sup>\*\*\*</sup> · 안 원 군  
부산대학교 나노과학기술대학 나노메디컬공학과,  
<sup>\*</sup>경북대학교 생물학과, <sup>\*\*</sup>부산지방식품의약품안전청 시험분석센터,  
<sup>\*\*\*</sup>인제대학교 환경공학부/인제대학교 생명환경연구소  
(2006년 12월 7일 접수; 2007년 1월 3일 채택)

## 1,3-Dichloro-2-Propanol (1,3-DCP) Induced Cell Damage

Ji-Hak Jeong<sup>\*</sup>, Ik-Jae Sin, Yeong-Min Sin<sup>\*\*</sup>, Heung-Jai Park<sup>\*\*\*</sup>, Won-Gun An

Department of Nanomedical Engineering, College of Nano Science and Technology,

Pusan National University, Busan 609-735, Korea

<sup>\*</sup>Department of Biology, College of Natural Sciences, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

<sup>\*\*</sup>Center for Food & Drug Analysis., Busan Regional Food & Drug Administration, Busan 608-829, Korea

<sup>\*\*\*</sup>School of Environmental Science & Engineering/Institute of Life Environment, Inje University, Gimhae 621-749, Korea

(Manuscript received 7 Deember, 2006; accepted 3 January, 2007)

Endocrine disrupting compounds (EDC's) are chemicals that either mimic endogenous hormones interfering with pharmacokinetics or act by other mechanisms. Some endocrine disrupters were reported to be chemical substances that cause apoptosis in cells.

A number of reports have indicated that 1,3-DCP, one of the EDC's may act as an endocrine disrupter and also has possible carcinogenic effects. 1,3-DCP, present in commercial protein hydrolysates used for human nutrition, are genotoxic and 1,3-dichloro-2-propanol induced tumors in rats. In the present study, it was investigated whether 1,3-DCP induces ROS generation and apoptosis in A549 adenocarcinoma cells.

Here we show that 1,3-DCP inhibits the growth of lung cancer cell lines and generates reactive oxygen species (ROS), a major cause of DNA damage and genetic instability. It was investigated that 1,3-DCP increases G1 phase cells after 12 hours, thereafter abruptly draws A549 cells to G0 state after 24 hours by flow cytometric analysis. 1,3-DCP induces p53 and p21<sup>Cip1/WAF1</sup> activation time- and dose-dependently by 24 hours, while the level p21<sup>Cip1/WAF1</sup> was decreased after 48 hours. These results suggest that 1,3-DCP, an EDC's generates ROS and regulates genes involved with cell cycle and apoptosis.

Key Words : 1,3-Dichloro-2-propanol (1,3-DCP), Endocrine disrupting compounds (EDC's), Apoptosis, ROS, P53, P21

### 1. 서 론

1,3-dichloro-2-propanol (1,3-DCP)는 상온에서 무색의 점성고체와 달콤한 냄새를 가지고 있으며<sup>1,2)</sup>, 다른 명칭으로서는 디클로로히드린 (dichlorohydrin) 또는 1,3-디클로로프로판올 (1,3-dichloro-propanol)

등으로 명명된다. 1,3-DCP는 의류에 사용되는 방화물질인 Tris (1,3-dichloro-2-propyl)의 대사체가기도하며, 살충제 1,3-dichloropropene의 불순물이기도 하다<sup>3)</sup>. 또한 식물성단백질이 가수분해 될 때에도 생성되어 육류성 풍미와 콩류 양념을 첨가한 조미료 등에서도 검출된다<sup>4)</sup>.

1,3-DCP는 흔히 환경호르몬이라고 알려진 내분비계 교란물질 (endocrine disrupting compounds, EDC's)로도 알려져 있다. 1,3-DCP는 강한 간독성을 가지며 인간에게 눈과 피부 염증, 구역질 및

Corresponding Author : Won-Gun An, Department of Nanomedical Engineering, College of Nano Science and Technology, Pusan National University, Busan 609-735, Korea  
Phone: +82-51-510-3025  
E-mail: wgan@pusan.ac.kr

구토와 같은 다양한 독성을 나타낸다<sup>5)</sup>. 1,3-DCP는 동물에 다량으로 장기간 투여하면 생식독성 발암물질 (genotoxic carcinogen)<sup>6)</sup>이 될 수 있다는 영국 보건부(The department of health)와 유럽연합의 식품과학위원회(EC Scientific Committee for foods)와 Omura<sup>7)</sup>의 보고가 있다. 1,3-DCP가 glycerol을 거쳐 epichlorohydrin을 형성한 후 mercapturic acid 유도체와 결합함으로써 glutathione이 고갈되어 간독성을 일으킬 것이라는 연구보고도 있으나<sup>8)</sup>, 1,3-DCP의 독성에 관한 원인에 대해서는 아직 규명되지 못하고 있다.

Apoptosis는 개체의 발생 및 항상성을 유지하기 위하여 요구되어지는 기작으로서 정상적인 세포수의 조절이나 손상된 세포의 제거는 생체에 있어서 필수적인 과정이라고 할 수 있다<sup>9)</sup>. Apoptosis의 원인으로서는 DNA 손상, hypoxia, nucleotide depletion, 종양 유전자의 활성화 그리고 활성산소종(Reactive oxygen species, ROS) 등이 알려져 있다. 세포에서 apoptosis가 유도될 때에는 여러 가지 형태학적 변화와 생화학적인 변화를 수반하는데, 세포막의 농포(membrane blebbing), 핵막의 구조 단백질인 lamin-B의 분해에 의한 염색체의 응축<sup>10)</sup>, 미토콘드리아에서의 cytochrome c의 방출<sup>11)</sup>이 일어난다. 이 apoptosis 과정에는 bax, poly-ADP ribose polymerase (PARP), bcl-2, p53, caspases 등의 유전자가 관여 하는데, 특히 p53은 암세포에서 가장 일반적으로 보이는 mutated 유전자이며 genomic DNA의 integrity, 즉, 온전함을 check하는 중요한 기능을 갖는 유전자이다.

최근 몇몇 내분비계 교란물질이 세포에 apoptosis를 유도하는 화학물질로 보고되었다<sup>12)</sup>. 그러나 1,3-DCP의 세포 내 유전자 조절기전에 대한 연구는 현재까지 수행된 바 없다. 따라서 본 연구에서는 내분비계 교란물질로 알려진 1,3-DCP를 A549 폐암세포주에 노출시킨 후 ROS의 생성 및 DNA 손상에 의해 유도되는 세포사멸 및 생존인들의 조절에 대해 연구하였다.

## 2. 실험재료 및 방법

### 2.1. 실험재료

1,3-DCP은 Aldrich chemical co. (USA)사의 제품을 구입하여 사용하였으며, 배지와 혈청은 Gibco BRL (Grand Island, NY) 사의 RPMI 1640과 fetal bovine serum (FBS)을 사용하였다.

실험에 사용된 A549 세포 (human lung carcinoma cells, ATCC CCL-185)는 ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD)사로부터 분양을 받았다. Antibiotics는 Gibco BRL사로부터 구

입하였다. Cell culture dish는 Corning (CORNING, NY, USA) 사의 제품을, 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)는 Sigma co. (St. louis, MO, USA) 사로부터 구입하였으며, 그 외 실험에 사용된 시약은 고순도의 특급 시약을 사용하였다.

### 2.2. 세포배양

폐암세포주인 A549세포는 RPMI 1640 (GIBCO/BRL, Grand Island, USA)에 10% fetal bovine serum (GIBCO/BRL, Grand Island, USA)과 20mL/L의 antibiotic-antimycotic (GIBCO/BRL, Grand Island, USA)을 첨가하여  $3 \times 10^6$  cells/mL 세포의 밀도를 유지하면서 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 세포배양기에서 배양하였다.

### 2.3. 세포 생존을 측정

96-well plate에  $2 \times 10^4$  cells/well 세포의 밀도로 100μL씩 분주하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 세포배양기에서 12시간 이상 세포를 안정화시켰다. 1,3-DCP를 3-9 μM 농도로 처리하고 24 시간 및 48시간 동안 배양한 후, CellTiter 96<sup>®</sup> Non Radioactive Cell Proliferation Assay kit (Promega, Madison, WI, USA)의 dye solution을 15μL/well씩 첨가하고 4시간 더 반응시켰다. Stop solution 100μL/well을 넣고 1시간 뒤 570nm 파장에서 흡광도를 측정했다.

### 2.4. 활성산소 측정

세포를 6-well plate에  $4 \times 10^4$  cells/well 세포의 밀도로 분주하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 세포배양기에서 배양하였다. 1,3-DCP를 3-9μM 농도로 처리하고 12시간 동안 배양한 후, DCFH-DA(2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate : H<sub>2</sub>DCFDA, Molecular Probe, Eugene, Oregon, USA)를 10μM 농도로 처리하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 세포배양기에서 30분간 반응시켰다. 세포를 ice-cold PBS로 3회 수세 후, lysis buffer (protease inhibitor cocktail tablets (Roche, Germany) 1tablet/50mL TNES buffer (1M Tris-HCl, pH 7.4, 1% NP-40, 0.5M EDTA, 5M NaCl))를 100μL씩 첨가하여 단백질을 추출한 다음 4°C, 12,000rpm에서 10분간 원심 분리 (VS 15000CF, Vision Scientific Co., LTD, Korea) 하여 상등액을 모았다. 분리된 상등액의 형광측정은 ELISA Reader (Anthos 2020, Austria)을 이용하여 발광파장 504nm, 흡광파장 524nm에서 측정하였다.

### 2.5. Cell Cycle 분석

$1 \times 10^6$ /ml 세포의 밀도로 분배하고 안정화시킨 후, 6μM의 농도로 1,3-DCP를 처리하였다. 24시간 후 PBS로 수세하고 75% ice-cold ethanol (EtOH)

## 1,3-Dichloro-2-Propanol (1,3-DCP)에 의한 세포의 손상기전

에서 24시간 고정된 세포를 2,000 rpm에서 3분간 원심 분리하여 상등액을 제거하고, RNase A (100µg/mL)를 함유한 propidium iodide (PI : 50µg/mL of 0.1% NP-40)용액 1mL에 현탁한 후, 4°C의 압소에서 30분간 반응시켰다. 염색한 각 세포의 DNA 함량은 flow cytometer (Becton Dickinson, FACS Calibur, France)로 분석하였다 (PI detect : 발광파장 488nm, 흡광파장 585nm).

### 2.6. Western blot 분석

세포를 ice-cold PBS로 3회 수세한 다음 lysis buffer (protease inhibitor cocktail tablets (Roche, Germany), 1tablet/50mL TNES buffer (1M Tris-HCl, pH 7.4, 1% NP-40, 0.5M EDTA, 5M NaCl))를 100µL씩 첨가하여 단백질을 추출한 다음 4°C, 12,000rpm에서 10분간 원심 분리 (VS 15000CF, Vision Scientific Co., LTD, Korea) 하여 상등액을 모았다. BCA protein assay kit (Pierce, Rockford, IL, Korea)로 정량하고 동일량의 단백질 (30µg)을 sodium dodecyl sulfate-polyacryl amide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 분리한 후, nitrocellulose membrane (NC)에 transfer하였다. 이 NC를 5% non-fat dry milk를 함유한 Tris buffered saline-Tween (10mM Tris-HCl pH 7.4, 0.1M NaCl, 0.1% Tween 20)으로 30분간 반응시켜 비특이적 단백질에 대한 반응성을 차단한 후 p53, p21<sup>Waf1/Cip1</sup>에 대한 항체와 반응시키고, 각 항체들에 대한 2차 항체인 anti-mouse IgG 항체로 각각 1시간씩 반응시켰다. 각 반응사이에 TBS-T로 10분씩 3회, 30분 동안 수세하였다. 이어서 각 항체에 대한 대응 단백질 band는 enhanced chemiluminescence (ECL) detection 방법으로 확인하였다.

### 3. 결과 및 고찰

내분비계 교란물질인 1,3-DCP에 의해 A549 세포의 세포독성 효과를 MTT법을 이용하여 대조군에 대한 백분율로 얻은 상대 생존율을 확인하였다 (Table 1, Fig. 2). 1,3-DCP를 3-9µM 농도로 각각 24시간과 48시간 노출시켰다. 그 결과 1,3-DCP에 대해 A549세포는 농도와 시간 의존적으로 세포독성 효과가 있음이 관찰되었다. A549 세포에서 IC<sub>50</sub>의 농도는 24시간 노출시 약 6µM, 48시간 노출시 약 3µM이었다.

A549에 1,3-DCP (3-9µM)에 대한 활성산소종 (ROS) 생성율을 DCF-DA법을 이용하여 대조군에 대해 상대 ROS 생성율을 Fig. 3에 나타내었다. 1,3-DCP에 대해 A549세포는 농도 의존적으로 ROS 생성 효과가 있음이 관찰되었다. A549 세포에

Table 1. 1,3-DCP induced cytotoxicity in A549 cells as measured by the MTT assay

Conc.(µM)	Time	Viability (%)	
		24 h	48 h
0		100.0	100.0
3		71.5	52.5
6		53.6	39.6
9		38.8	20.5

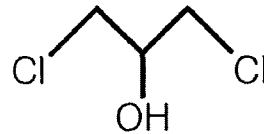


Fig. 1. Chemical structure of 1,3-dichloro-2-propanol (1,3-DCP).

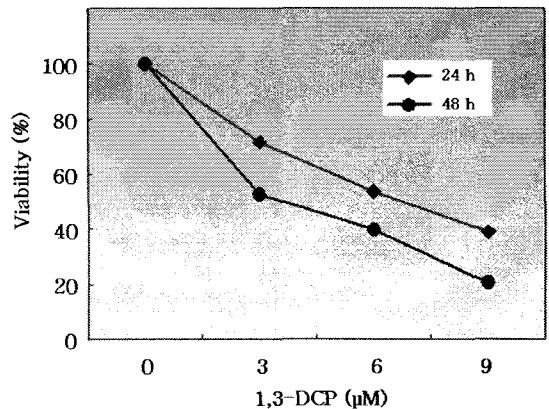


Fig. 2. Cytotoxicity of A549 cells treated with 1,3-DCP. Cells were treated with various concentrations of 1,3-DCP for 24h and 48h, and cell viability was determined by the MTT assay. Results are expressed as percentages of proliferation compared to the untreated control (mean ± SE, n = 3).

서 1,3-DCP에 의해 6µM의 농도에서 12시간 노출 시 대조군에 비해 약 50% 이상의 ROS 생성이 증가하였다. ROS에 대한 연구가 고조되면서, ROS의 DNA 손상으로 인한 apoptosis에 대한 연구 또한 활발히 이루어지고 있다<sup>13-15</sup>. 이들 ROS는 세포구성 성분들인 지질, 단백질, 당, DNA 등에 대하여 비선택적, 비가역적인 파괴작용을 함으로써 노화는 물론 암을 비롯하여 뇌졸중, 파킨슨병 등의 뇌질환과 심장질환, 허혈, 동맥경화, 피부질환, 소화기질환, 염증, 류마티스, 자기면역질환 등의 각종 질병을 일으키는 것으로 알려져 있다. 또한 이들 ROS에 의한 지질과산화 결과 생성되는 지질과산화물을 비롯하

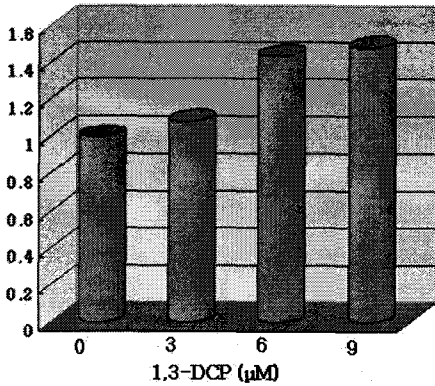


Fig. 3. 1,3-DCP increases ROS production in A549 cells. A549 cells were treated with 1,3-DCP for indicated concentrations for 12h. Intracellular ROS generation in A549 cells was assayed using DCFH-DA. ROS generation was dependent on dose of 1,3-DCP.

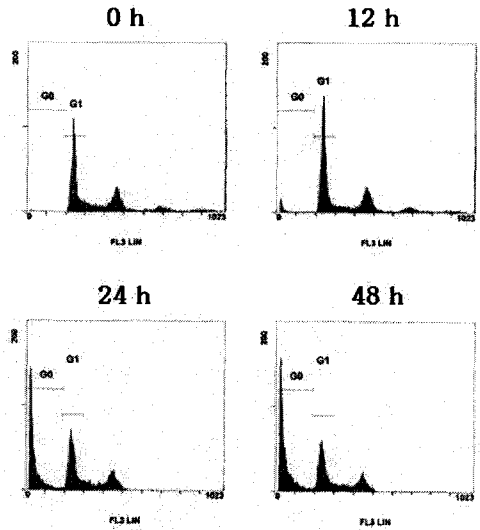
여 여러 가지 체내 과산화물도 세포에 대한 산화적 파괴로 인한 각종 기능장애를 야기함으로써 암을 비롯한 여러 질병의 원인이 되기도 한다.

1,3-DCP가 A549 세포의 DNA content에 미치는 영향을 미치는지 확인하기 위하여 유식세포 계측기로 세포주기를 관찰하였다 (Table 2, Fig. 4). A549 세포에서 6μM 농도의 1,3-DCP 처리에 의해 12시간 후 세포의 G1 단계가 증가하였고 24시간 처리 후에는 G0 단계가 급격히 증가함을 보였다. 이는 A549 세포에 노출된 1,3-DCP가 12시간까지 세포의 G1 단계에서 성장을 억제하다가 24시간 이후 손상된 DNA를 수리하지 못하고 결국 apoptotic 단계인 G0 단계로 DNA content를 조절하는 것으로 사료된다.

1,3-DCP는 A549 세포 내의 apoptosis 및 cell cycle arrest와 관련된 유전자인 p53 유전자와 p21<sup>Cip1/WAF1</sup>을 조절하였다. A549 세포에 1,3-DCP를 노출하였을 때 p53 유전자는 시간과 농도에 의존

Table 2. Cell cycle distribution of A549 cells treated with 1,3-DCP at the indicated times. Results were obtained by flow cytometric analysis of propidium iodide-stained cells at 1,3-DCP (6μM) treatment

Time	Stage	% gated of G0 stage	% gated of G1 stage
0 h		0.94	34.28
12 h		3.62	41.20
24 h		39.51	31.46
48 h		46.87	28.25



A549, 1,3-DCP (6 μM)

Fig. 4. Effect of 1,3-DCP on the A549 cells cycle progression. A549 cells were treated with 1,3-DCP(6 μM) for indicated times and harvested for cell cycle analysis. DNA was stained with PI and determined by flow cytometry.

적으로 증가하는 것이 관찰되었다 (Fig. 5, 6). Fig. 6에서 보듯이 A549 세포에 1,3-DCP를 노출하였을 때 p21<sup>Cip1/WAF1</sup> 유전자는 24시간까지 농도와 시간 의존적으로 증가하다가 48시간 이후는 감소한다.

Tumor suppressor라고 알려진 p53 유전자는 정상세포가 암세포가 되거나, 또는 암세포가 더욱 악성화되어 체내에서 종양을 형성하는 것을 막는 기능을 한다. p53 유전자가 관여하는 세포내 작용은 apoptosis, cell cycle arrest 및 senescence로 크게 3가지로 나눌 수 있다<sup>16-19)</sup>. 이 가운데 apoptosis의 과정에서 p53 유전자의 기능은 DNA 복제를 하기 직전 자신의 genomic DNA의 integrity, 즉, 온전함을 check하는 기능으로 DNA에 변형을 초래하는 자극이 들어왔을 경우, p53이 활성화되어 세포를 S기 전단계인 G1기에 붙들어 두면서 손상된 genome을 회복하게 된다. 1,3-DCP는 세포내에서 가수분해 되어 HCl을 방출하고 epichlorohydrin을 형성하게 된다. 이 epichlorohydrin은 에폭시드 구조를 갖고 있어서 ROS의 생성을 수반한 세포의 DNA에 손상을 주는 것으로 사료된다. 결국 세포가 DNA의 손상을 회복하지 못하면 caspase의 활성을 통해 apoptosis의 과정을 겪거나<sup>20-24)</sup>, cell cycle을 진행하지 못하고 G1기에 머무르게 된다.

p53은 유전자의 발현을 촉진하는 transactivator

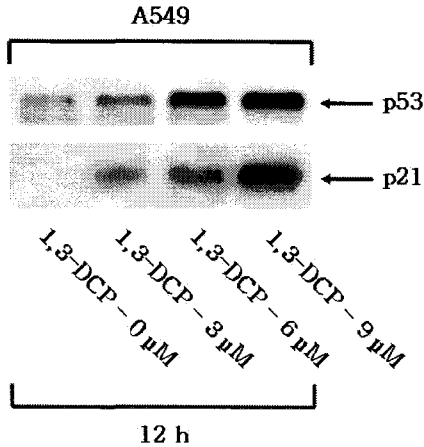


Fig. 5. Change of gene regulating apoptosis in A549 cells. Effects of 1,3-DCP on expression of p53 and p21 proteins. Cells were treated with 1,3-DCP at indicated concentrations for 12 h. Total cellular proteins were prepared and western blot were performed with an antibody specific for corresponding proteins.

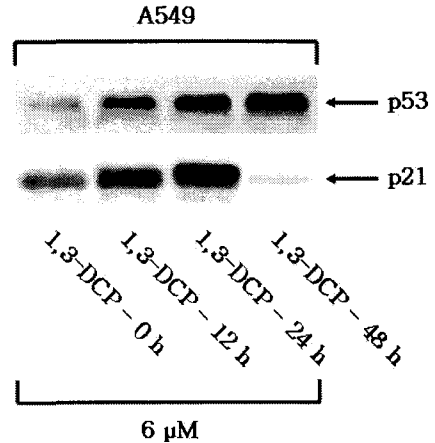


Fig. 6. Change of gene regulating apoptosis in A549 cells. Effects of 1,3-DCP on expression of p53 and p21 proteins. Cells were treated with 1,3-DCP at 6 μM for indicated times. Total cellular proteins were prepared and western blot were performed with an antibody specific for corresponding proteins.

의 기능을 갖고 있어서 여러 유전자의 발현을 유도하는데, 그러한 유전자 중에서 가장 먼저 알려진  $p21^{Cip1/WAF1}$ 은 Rb를 인산화하여 비활성화시키는 G1 cyclin-cdk의 작용을 저해하는 CDK inhibitor이다. 일반적으로  $p21^{Cip1/WAF1}$ 은 p53의 downstream에 위치하여 cell cycle arrest 및 senescence 과정에서 과발현되며<sup>25-27)</sup> apoptosis를 억제하는 것으로 알려져 있다<sup>28-30)</sup>. DNA의 손상에 의해 세포가 growth arrest 상태가 되면 p53에 의해 p53R2가 활성화되어 세포의 DNA 손상을 회복한다. 결국 세포가 DNA의 손상을 회복하지 못하면 세포는 permanent growth arrest 상태가 되어 성장을 멈추거나 apoptosis의 과정을 거쳐 자살을 한다. 이 과정에서  $p21^{Cip1/WAF1}$ 은 growth arrest 상태에서 apoptosis를 억제하다가 회복하지 못한 DNA의 손상에 의해 불안정화되어 결국 분해되어 버린다.

결론적으로, 1,3-DCP는 A549 세포 내에서 ROS를 생성하고, 세포주기 및 apoptosis와 관련된 유전자를 조절함으로써 apoptosis를 야기하였다 (Fig. 7). 생체내의 내분비교란물질에 대한 연구는 아직 미흡한 실정이다. 이 연구를 토대로 하여 내분비교란물질에 의한 apoptosis의 신호전달 체계를 확립하고, 나아가 내분비계 교란물질에 의한 여러 가지 질환의 발병기전을 이해하는 데에도 크게 기여하며, 내분비계 교란물질에 의한 질병의 예방 및 치료제 개발에도 기초적인 자료를 제공하리라 사료된다.

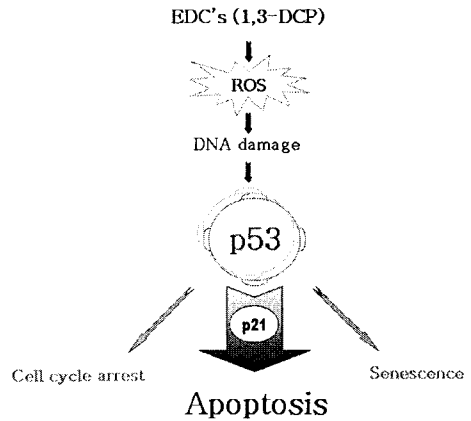


Fig. 7. Schematic representation of the suggested effects of 1,3-DCP on the apoptotic pathway. 1,3-DCP induces apoptosis mediated with p53 by generation of ROS in A549 cells.

#### 4. 결론

내분비계 교란물질은 체내 약물생체반응을 간섭하거나 다른 작용을 하도록 하는 내분비계 호르몬의 역할을 하는 화학물질이다. 어떤 내분비계 교란물질은 세포주에서 apoptosis를 야기하는 화학물질로 보고되어 지고 있다. 또한, 1,3-DCP는 내분비계 교란물질로 작용할 뿐만 아니라 발암물질의 가능성을 가지고 있음을 보고되어지고 있다. 인간의 영양에 이용되어지는 단백질 가수분해물에 존재하는 1,3-DCP는 유전독성을 가지고 있고, rat에서 암을

유도한다. 본 연구에서는 1,3-DCP가 ROS 발생 및 A549 폐암세포주에서 apoptosis를 유도하는지에 대해서 조사하였다.

연구결과, 1,3-DCP는 폐암세포주의 성장 저해, ROS 생성, DNA 손상 및 유전적 불안정성의 주요한 원인이 됨을 확인하였다. 1,3-DCP는 flow cytometry 분석에 의해 12시간 후에 G1 phase 세포가 증가하다가, 24시간 후에 급격히 A549세포를 G0 단계로 조절한다. 또한, 1,3-DCP는 p53과 p21<sup>Cip1/WAF1</sup> 유전자 활성을 24시간까지 농도와 시간 의존적으로 증가하는 반면, p21<sup>Cip1/WAF1</sup>수준은 48시간 이후는 감소한다. 이러한 결과는 내분비계 교란물질인 1,3-DCP는 세포주기와 apoptosis와 관련된 유전자를 조절하고 ROS를 생성함을 확인하였다.

### 감사의 글

이 논문은 2003년도 한국과학재단의 지원에 의하여 연구되었음 (R05-2003-000-10461-0).

### 참고 문헌

- Budavari, S., 1989, The Merck index, Merck, Rahway, 3058pp.
- L'Huillier, N., M. K. Pratten and R. H. Clothier, 2002, The relative embryotoxicity of 1,3-dichloro-2-propanol on primary chick embryonic cells. *Toxicol In Vitro.*, 16(4), 433-442.
- Talcott, R. E. and J. King, 1984, Mutagenic impurities in 1,3-dichloropropene preparations. *J. Natl. Cancer Inst.*, 72(5), 1113-1116.
- Piasecki, A., A. Ruge and H. Marquardt, 1990, Malignant transformation of mouse M2-fibroblasts by glycerol chlorohydrines contained in protein hydrolysates and commercial food, *Arzneimittelforschung*, 40(9), 1054-1055.
- Shiozaki, T., Y. Mizobata, H. Sugimoto, T. Yoshioka and T. Sugimoto, 1994, Fulminant hepatitis following exposure to dichlorohydrin-report of two cases, *Hum. Exp. Toxicol.*, 13(4), 267-270.
- Hahn, H., E. Eder and C. Deininger, 1991, Genotoxicity of 1,3-dichloro-2-propanol in the SOS chromotest and in the Ames test. Elucidation of the genotoxic mechanism, *Chem. Biol. Interact.*, 80(1), 73-88.
- Omura, M., M. Hirata, M. Zhao, A. Tanaka and N. Inoue, 1995, Comparative testicular toxicities of two isomers of dichloropropanol, 2,3-dichloro-1-propanol, and 1,3-dichloro-2-propanol, and their metabolites alpha-chlorohydrin and epichlorohydrin, and the potent testicular toxicant 1,2-dibromo-3-chloropropane. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 55(1), 1-7.
- Katoh, T., J. Haratake, S. Nakano, M. Kikuchi, M. Yoshikawa and K. Arashidani, 1998, Dose-dependent effects of dichloropropanol on liver histology and lipid peroxidation in rats. *Ind. Health*, 36(4), 318-323.
- Ellis, R. E., J. Y. Yuan and H. R. Horvitz, 1991, Mechanisms and functions of cell death. *Annu. Rev. Cell Biol.*, 7, 663-698.
- Shimizu, T., C.X. Cao, R.G. Shao and Y. Pommier, 1998, Lamin B phosphorylation by protein kinase calpha and proteolysis during apoptosis in human leukemia HL60 cells. *J. Biol. Chem.*, 273(15), 8669-8674.
- Green, D. and G. Kroemer, 1998, The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria?. *Trends Cell Biol.*, 8(7), 267-271.
- Liu, X. M., J. Z. Shao, L. X. Xiang and X. Y. Chen, 2006, Cytotoxic effects and apoptosis induction of atrazine in a grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) cell line. *Environ. Toxicol.*, 21(1), 80-89.
- Chen, T. J., J. Y. Jeng, C. W. Lin, C. Y. Wu and Y. C. Chen, 2006, Quercetin inhibition of ROS-dependent and -independent apoptosis in rat glioma C6 cells, *Toxicology*, 223(1-2), 113-126.
- Martirosyan, A., S. Leonard, X. Shi, B. Griffith, P. Gannett and J. Strobl, 2006, Actions of a histone deacetylase inhibitor NSC3852 (5-nitroso-8-quinolinol) link reactive oxygen species to cell differentiation and apoptosis in MCF-7 human mammary tumor cells, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 317(2), 546-552.
- Pathak, N. and S. Khandelwal, 2006, Oxidative stress and apoptotic changes in murine splenocytes exposed to cadmium. *Toxicology*, 220(1), 26-36.
- Bargonetti, J. and J. J. Manfredi, Multiple

- roles of the tumor suppressor p.53, *Curr. Opin. Oncol.*, 14(1), 86-91.
- 17) Choisy-Rossi, C., P. Reisdorf and E. Yonish-Rouach, 1998, Mechanisms of p.53- induced apoptosis: in search of genes which are regulated during p.53-mediated cell death. *Toxicol. Lett.*, 102-103, 491-496.
  - 18) Hansen, R. and M. Oren, 1997, p.53; from inductive signal to cellular effect. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 7(1), 46-51.
  - 19) Blagosklonny, M. V., 2002, P53: an ubiquitous target of anticancer drugs. *Int. J. Cancer*, 98(2), 161-166.
  - 20) Romano, M. F., R. Avellino, A. Petrella, R. Bisogni, S. Romano and S. Venuta, 2004, Rapamycin inhibits doxorubicin-induced NF-kappaB/Rel nuclear activity and enhances the apoptosis of melanoma cells, *Eur. J. Cancer*, 40(18), 2829-2836.
  - 21) Soengas, M. S., R. M. Alarcon, H. Yoshida, A. J. Giaccia, R. Hakem, T. W. Mak and S. W. Lowe, 1999, Apaf-1 and caspase-9 in p.53- dependent apoptosis and tumor inhibition. *Science*, 284(5411), 156-159.
  - 22) Gao, C. and N. Tsuchida, 1999, Activation of caspases in p.53-induced transactivation-independent apoptosis. *Jpn. J. Cancer Res.*, 90(2), 180-187.
  - 23) Fisher, D. E., 1994, Apoptosis in cancer therapy: crossing the threshold. *Cell*, 78(4), 539-542.
  - 24) Wang, S. and W. S. El-Deiry, 2004, The p.53 pathway: targets for the development of novel cancer therapeutics. *Cancer Treat. Res.*, 119, 175-187.
  - 25) Roninson, I. B., 2002, Oncogenic functions of tumour suppressor p.21(Waf1/Cip1/ Sdi1): association with cell senescence and tumour-promoting activities of stromal fibroblasts. *Cancer Lett.*, 179(1), 1-14.
  - 26) Dumont, P., M. Burton, Q. M. Chen, E. S. Gonos, C. Fripiat, J.B. Mazarati, F. Eliaers, J. Remacle and O. Toussaint, 2000, Induction of replicative senescence biomarkers by sub-lethal oxidative stresses in normal human fibroblast. *Free Radic. Biol. Med.*, 28(3), 361-373.
  - 27) Morisaki, H., A. Ando, Y. Nagata, O. Pereira-Smith, J.R. Smith, K. Ikeda and M. Nakanishi, 1999, Complex mechanisms underlying impaired activation of Cdk4 and Cdk2 in replicative senescence: roles of p16, p21, and cyclin D1. *Exp. Cell Res.*, 253(2), 503-510.
  - 28) Hattangadi, D. K., G. A. DeMasters, T. D. Walker, K. R. Jones, X. Di, I.F. Newsham and D. A. Gewirtz, 2004, Influence of p.53 and caspase 3 activity on cell death and senescence in response to methotrexate in the breast tumor cell. *Biochem. Pharmacol.*, 68(9), 1699-1708.
  - 29) Choisy-Rossi, C., P. Reisdorf and E. Yonish-Rouach, 1998, Mechanisms of p.53- induced apoptosis: in search of genes which are regulated during p.53-mediated cell death. *Toxicol. Lett.*, 102-103, 491-496.
  - 30) el-Deiry, W. S., T. Tokino, V. E. Velculescu, D. B. Levy, R. Parsons, J. M. Trent, D. Lin, W. E. Mercer, K.W. Kinzler and B. Vogelstein, 1993, WAF1, a potential mediator of p.53 tumor suppression. *Cell*, 75(4), 817-825.