

폐 대식세포주에서 벤젠에 의한 세포 사멸 효과와 산화성 스트레스 관련성

임재청 · 김종춘 · 박수현*

전남대학교 수의과대학 바이오치료 산업인력 양성팀, 동물의학 연구소

Relationship between Cell Death and Oxidative Stress in the effect of benzene in Cultured Lung Epithelial Cells

Jae Chung Lim, Jong Choon Kim and Soo-Hyun Park* (Bio-therapy Human Resources Center, Animal Medical Center, Department of Veterinary Physiology, College of Veterinary Medicine, Chonnam National University, Yong Bong Dong 300, Buk-gu, Gwangju, 500-757, Korea)

Received: 28 November 2010 / Accepted: 23 December 2010
© The Korean Society of Environmental Agriculture

Abstract: Benzene is one of volatile environmental pollutants to induce asthma and allergy in respiratory system. The airway epithelium is a physical barrier to inhaled toxicants and particulates. However, the effect of benzene in lung epithelial cell viability has not been elucidated. Thus, this study was conducted to investigate the effect of benzene on apoptosis in A549 cells, lung epithelial cell line. In this study, benzene decreased cell viability of A549 cells in a dose-dependent manner ($>10 \mu\text{M}$). Benzene-induced decrease of cell viability was blocked by the treatment of antioxidants (vitamin C and NAC). Indeed, benzene induced lipid peroxide formation in A549 cells. Benzene decreased Bcl-2 expression but increased Bax expression in A549 cells. In addition, benzene also increased the cleaved form of caspase-3. In conclusion, benzene induced apoptosis via oxidative stress in cultured epithelial cells.

Key Words: Apoptosis, benzene, Lung epithelial cells, Oxidative stress

서 론

휘발성유기화합물(volatile organic compounds)은 대

기 중에 휘발돼 악취나 오존을 발생시키는 탄화수소화합물을 일컫는 말로 피부접촉이나 호흡기를 통한 흡입에 의해 다양한 질병을 일으키는 발암물질로 알려져 있다 (Kampa and Castanas, 2008). 휘발성유기화합물중의 대표적 오염물질인 벤젠은 주로 방향족 화합물 생산의 주원료로 살충제, 건축재료, 세탁용제 및 페인트 등에 의해서 노출되게 된다. 이러한 벤젠은 장기간 노출시에 백혈병, 신경 독성, 면역 억제 및 암을 일으키는 것으로 보고되고 있다 (Khalade *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2010).

폐는 생체에서 호흡에 중추적인 역할을 담당하는 기관으로 다양한 가스, 분말 및 미량 액체 등이 호흡 기도에 노출이 되었을 때 폐의 실질 등이 손상을 받게 된다. 여러 자극 원인들 중 인체내의 다양한 경로에 의해 유발되는 산화적 스트레스는 생체 안에 존재하는 항산화계에 의해 제거 되지만 산화적 스트레스가 항산화계의 수준을 초과하여 제거되지 못하면 DNA 변형과 기능 상실에 의하여 퇴행성 질환이 유발되는데 공기에 의한 오염 등에 의해서 폐 세포에서 섬유화 및 각종 질환의 발병에 관여할 수 있음을 시사해 주고 있다 (Kamdar *et al.*, 2008). 그리고 폐상피세포의 세포 사멸은 급성 폐 손상 및 급성 호흡부전 증후군의 발생기전에 중요한 역할을 한다고 보고되었다 (Kitamura *et al.*, 2001). 그러나 지금까지 직접적으로 폐 세포에서 benzene에 대한 산화성 스트레스 및 세포 사멸에 대한 상관 관계 연구는 시행된바 없다.

세포의 사멸에는 다양한 단백질들이 관여하는 것으로 보고되고 있으며 특히 미토콘드리아의 세포 사멸 억제 단백질인 Bcl-2 및 세포 사멸 촉진 단백질인 Bax, Bad 및 Bid 등의 단백질이 관여 한다 (Zinkel *et al.*, 2006). 세포내의

*교신저자(Corresponding author): S. H. Park
Tel: +82-62-530-2832 Fax: +82-62-530-2809
E-mail: parksh@chonnam.ac.kr

cysteine 단백질 분해 효소인 caspases 는 세포 사멸에 중요한 실행자 역할을 수행하며, 여러 caspase 중 caspase-3 은 세포 자기 사멸의 중요한 실행 단백질이다 (Kutuk and Basaga, 2007; Zakeri and Lockshin, 2008). 그럼에도 불구하고 benzene에 의한 이들 단백질들의 조절 기전은 아직까지 알려져 있지 않고 있다. 따라서 본 실험에서는 폐 상피세포주를 이용하여 새집증후군의 원인물질인 benzene이 폐포의 상피세포 사멸에 미치는 효과와 이와 관련된 신호 전달계중 산화성 스트레스 및 관련 단백질 발현 관련성에 대해 알아보았다.

재료 및 방법

재료

Dulbecco's Modified Eagle's Medium(D-MEM)-nutrient mixture F-12(D-MEM/F-12) 와 Class IV collagenase은 Life Technologies(Grand Island, NY, USA)로부터 구입하였다. MTT assay kit, penicillin 및 streptomycin는 Sigma Chemical Company(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. Bax, Bcl-2, caspase-3, 및 beta actin 항체는 Cell Signaling technology (Herts, UK)에서 구입하였다.

A549 세포 배양

A549 세포는 American Type Culture Collection (ATCC)에서 구입하였다. 이들 세포들은 5% Fetal bovine Serum (FBS)를 함유한 Dulbecco's modified Eagle's 배지(Life Technologies, Grand Island, NY)에 배양하였다. 이들 세포들이 70% confluence되었을 때 세포성장을 정지시키기 위해 무혈청 배지에서 이들을 배양하여 세포의 성장을 동기화 시켜서 실험에 이용하였다.

MTT 측정

벤젠의 폐 상피세포 사멸 효과를 측정하기 위하여 MTT 환원 실험을 실시하였다. 세포주를 96-well plate에 1×10^5 cells/mL의 농도로 100 μ L씩 분주하여 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양한 후 벤젠을 처리하여 24시간 배양하였다. 반응 후 well 바닥에 형성된 formazan이 흡수되지 않게 상층액을 제거하고 DMSO 100 μ L 첨가하여 ELISA reader(Model 680, BioRad, Hercules, CA, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구 세포수를 100%로 하여 상대적인 세포성장 억제율을 구하였다.

Lactate dehydrogenase (LDH) 측정

벤젠의 폐 상피세포 사멸 효과를 측정하기 위하여 LDH 방출측정 kit를 이용하여 실시하였다. A549 세포주를 1×10^5 cells/mL로 맞춘 후, 100 μ L씩 96 well plate에 분주하여 CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 그 후, benzene을 처리하여 24시간 배양하였다. 배양액을 새로운 96-well plate에 50 μ L 분주하고 LDH reagent를 50 μ L

첨가하여 반응시킨 후, 반응이 완료 되면 1 N HCl을 100 μ L 첨가하여 반응을 중지시킨다. 또한 살아남은 세포의 LDH 측정을 위해 남은 배양액을 제거하고, 0.5% Triton X-100용액을 50 μ L 첨가하여 40 rpm으로 10분 동안 교반시키고 같은 방법으로 LDH reagent 첨가하여 반응시킨다. 반응이 끝나면 반응 정지액을 넣은 뒤, 각각을 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. LDH에 의한 세포 독성의 백분율은 배양액과 살아있는 세포에서 유리된 총 LDH에 대한 배양액으로부터 유리된 LDH의 값으로 계산하여 무처리 대조구와 비교한 값을 나타내었다.

Lipid peroxide (LPO)형성

LPO 형성은 Ohkawa *et al* (1979)의 방법에 따라 malonaldehyde의 양으로 측정하였으며, 간략히 요약하면 다음과 같다. 세포들을 수확한 후 초음파로 세포를 분쇄한 후, 반응용액 [8% SDS 100 μ L, 0.8% 2-thiobarbituric acid (TBA) 200 μ L, 20% acetic acid 200 μ L]을 넣은 후 95°C에서 60분간 반응시켰다. 이후, 얼음으로 차게한 물에 식힌 후, 비특이적인 적색 색소를 제거하기 위하여 n-butanol-pyridine 혼합액(15:1, v/v)을 첨가한 후 4,000xg에서 10분간 원심분리하여 상층액을 수확하였다. 이 시료를 spectrofluometry (emission 파장 553 nm, excitation 파장 515 nm)로 측정하여 nmol/mg protein으로 표시하였다.

Western immunoblotting

배지를 제거한 A549 세포를 phosphate buffered saline (PBS)로 2번씩 세척한 후, 각기 150 μ L의 lysis buffer(10 x PBS, 1% NP-40, 20% SDS, 0.5 M EDTA, 0.01 M PMSF, 10 mg/mL Leupeptin, 1 mg/mL pepstatin A)를 처리하여 균질화 시켰다. 균질화된 세포를 tube에 옮긴 후, 15,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 상층액을 새로운 tube에 저장하였다. Bradford 단백질 정량법 (Bradford, 1976)을 이용하여 각각 60 μ g의 sample들을 8% SDS-PAGE 전기영동을 시킨 후, polyvinylidene difluoride membrane에 transfer하였다. Membrane은 5% skim milk에 1시간 동안 차단시켰고, 각각의 항체 (Bcl-2, Bax, caspase-3, beta actin)를 1% skim milk에 1,000배 희석하여 4°C에서 18시간 이상 배양하였다. 그 후, membrane을 0.1% Tween-20/1x TBS에 10분 간격으로 3번 세척 하였고, membrane을 1% skim milk에 5,000배 희석된 horseradish-peroxidase labeled 2차 항체에 1시간 동안 배양한 후, 3번 세척을 거쳐서 Enhanced Chemiluminoscent (ECL) 시약을 1분간 처리한 다음 X-ray 필름에 30초간 노출시켜 현상하였다.

통계처리

실험 결과의 통계적 처리는 Student's t test 및 Analysis of Variance (ANOVA)로 하였으며, P 값 < 0.05 을 유의한 차이의 한계로 하였고, 실험결과의 표현은 means \pm S.E 로 하였다.

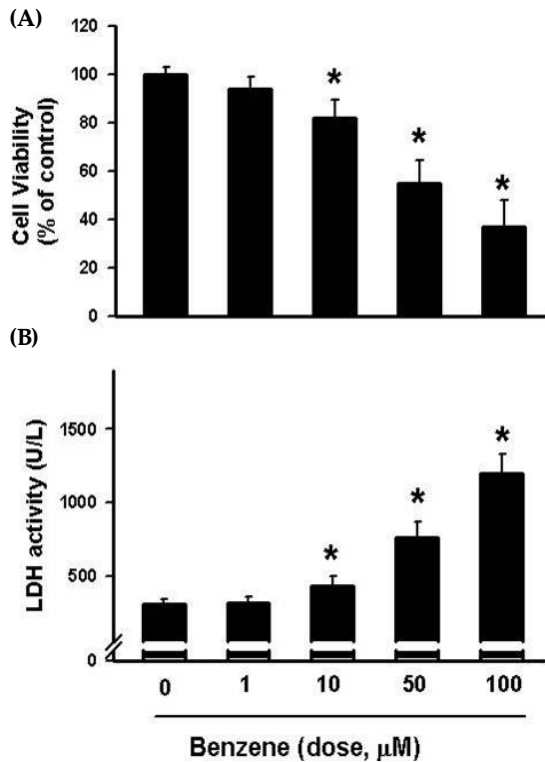


Fig. 1. Dose-dependent effect of benzene on cell viability (A) and lactate dehydrogenase (LDH) activity (B) in cultured A549 cells. A549 cells were incubated with different dosage of benzene (0 to 100 μM) for 24 hr. Then MTT assay and LDH assay were conducted as described in 'Material & Method'. Values are means±S.E. of 9 separate experiments performed on 3 different cultures. *P<0.05 vs. control.

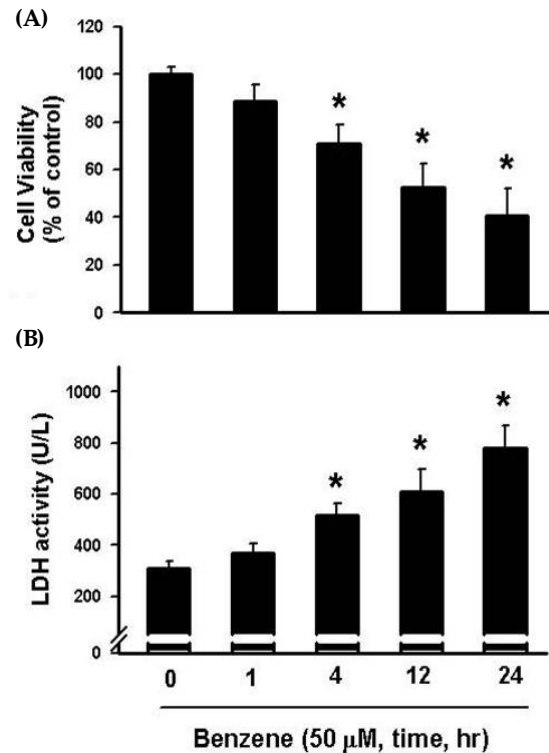


Fig. 2. Time-dependent effect of benzene on cell viability (A) and lactate dehydrogenase (LDH) activity (B) in cultured A549 cells. A549 cells were incubated with 50 μM benzene at different time intervals (0 to 24 hr). Then MTT assay and LDH assay were conducted as described in 'Material & Method'. Values are means±S.E. of 9 separate experiments performed on 3 different cultures. *P<0.05 vs. control.

결 과

벤젠의 폐 상피 세포 사멸 효과

폐 상피 세포 사멸에 대한 벤젠의 농도별 효과를 알아보기 위하여, 벤젠을 농도별(1~100 μM)로 처리 후 MTT assay를 실시하였다. 실험 결과 Fig. 1A에서 보이듯이 1 μM 벤젠 처리 시에는 세포 생존율에는 영향을 미치지 않았으며 10 μM 이상에서 폐 세포 사멸을 유발하는 것으로 나타났으며 50 μM 이상에서 이러한 현상은 더욱 현저하게 나타났다. 이러한 현상은 세포 손상의 또 다른 지표인 LDH assay에서도 같은 양상을 볼 수 있었다(Fig. 1B).

벤젠에 대한 시간 의존성 효과를 알아보기 위하여 50 μM 벤젠을 시간별로 처리하였다. 50 μM 벤젠 처리 시 1시간에서는 대조군과 유의성 있는 차이가 인정이 되지 않았으나 4시간 이상에서 유의성 있게 세포 생존율은 감소하였으며 24시간 이상에서 현저하게 억제되었다(Fig. 2A). 이러한 결과는 LDH assay에서도 같은 양상을 볼 수 있었다(Fig. 2B). 따라서 본 실험에서는 아치사 농도인 벤젠 50 μM을 24시간 처리하였다.

벤젠에 의한 폐 상피세포 사멸 효과에 대한 산화성 스트레스 관련성

산화성 스트레스와의 관련성을 알아보기 위하여 lipid peroxide (LPO) 형성을 측정하였다. 실험결과 벤젠은 산화성 스트레스를 증가시켰으며 이러한 작용은 항산화제인 vitamin C (1 mM) 및 NAC (100 μM)에 의해 차단되는 것으로 나타났다(Fig. 3A). 이러한 결과는 세포 생존율에서도 같은 결과를 볼 수 있었다(Fig. 3B).

벤젠에 의한 폐 상피세포 사멸 효과에 대한 단백질 발현 변화

벤젠에 의한 폐 상피세포 사멸이 세포 사멸 관련 단백질인 Bax, Bcl-2 및 caspase-3의 발현을 살펴보았다. 실험결과 벤젠은 세포 사멸 촉진 단백질인 Bax의 발현을 증가하였으며 이에 반해 세포사멸 억제 단백질인 Bcl-2 발현은 감소시키는 것으로 나타났다. 아울러 세포 사멸 실행자인 caspase-3의 활성화형 form인 절단된 caspase-3의 form 역시 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 4).

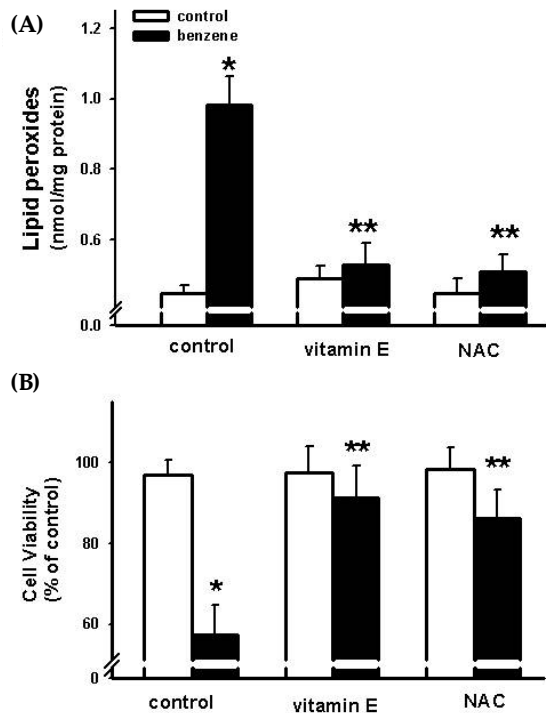


Fig. 3. Effect of antioxidants on benzene-induced increase of lipid peroxide formation (A) and decrease of cell viability (B) in cultured A549 cells. A549 cells were incubated with vitamin C (1 mM) or NAC (100 μ M) for 30 min prior to the treatment of benzene (50 μ M) for 24 hr. Then lipid peroxide formation and MTT assay was conducted as described in 'Material & Method'. Values are means \pm S.E. of 9 separate experiments performed on 3 different cultures. * P < 0.05 vs. control, ** P < 0.05 vs. benzene alone.

고찰

벤젠은 새집 증후군 발병 및 농약 성분의 하나로 환경에 노출 시 중요한 질병의 발병과 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있으며 기도 염증 및 세포 사멸을 야기 한다 (Weaver *et al.*, 2008). 본 실험에서도 벤젠 농도 100 μ M 이상에서 폐 상피세포 사멸이 인정되었다. 이러한 결과는 최근에 Giuliano *et al.* (2009)이 인간의 폐 세포에 낮은 농도의 benzene (10^6 M, 10^8 M) 처리 시 세포 성장이 증가하였다는 보고와 정반대의 결과로 판단된다. 그럼에도 불구하고 일부 연구자들에 의해서 A549 세포에서 벤젠 노출 시 세포 사멸 관련 지표가 증가하였다고 하였다 (Pariselli *et al.*, 2009). 이러한 차이는 세포주의 차이 (LL24 세포 대 A549 세포) 또는 실험 조건의 차이로 판단이 된다.

본 실험에서는 벤젠 처리 시 산화성 스트레스를 의미하는 LPO 형성은 증가하였다. 이러한 결과는 벤젠 노출 시 랫트에서 폐의 항산화 효소 활성이 감소하였다는 보고와 일맥 상통하다고 할 수 있다 (Verma and Rana, 2004). 최근 Sharma and Rana (2010) 역시 벤젠에 의한 간 독성에서 항산

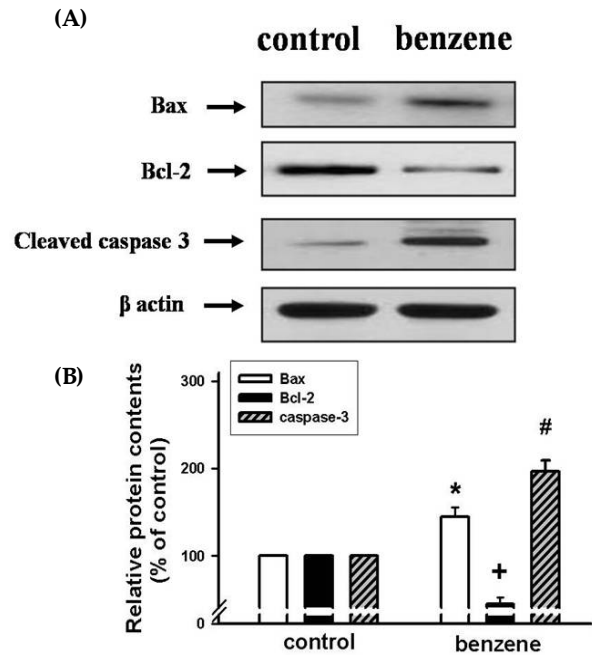


Fig. 4. Effect of benzene on the expression of Bcl-2, Bax and caspase-3 in cultured A549 cells. A549 cells were incubated with benzene (50 μ M) for 24 hr. Then western immunoblotting was conducted as described in 'Material & Method'. β actin was used as a control. The example shown is a representative of three experiments. Lower panel depicts the values of density performed on 3 different cultures. * P < 0.05 vs. control.

화제인 melatonin을 처리하였을 때 이들이 완화되었다고 하여 비록 장기는 간과 폐로 다르지만 비슷한 결과로 판단되며 이를 뒷받침해주고 있다. 최근 Barillet *et al.* (2010)은 본 실험에서 사용한 세포주에 silicon carbide 처리 시 산화성 스트레스가 증가하였으며 세포의 죽음이 야기된다고 하여 산화성 스트레스의 증가가 세포 사멸과 밀접한 관련이 있다는 것을 시사해 주고 있다. 특히 본 실험에서는 벤젠에 의한 산화성 스트레스가 항산화제인 vitamin C 및 NAC 처리 시 차단되었으며 실제 세포 생존율의 경우에서도 세포 죽음의 증가가 차단되어 산화성 스트레스가 세포 죽음에 강력히 관여하고 있음을 이야기 해주고 있다. 최근 Yang and Zhou (2010)는 폐의 과도한 반응기 산소의 증가가 벤젠의 유도체 중 하나인 benzoquinone에 의한 햄스터의 폐 세포 사멸 및 DNA 손상에 관여한다고 하여 본 결과와 비슷하다고 할 수 있다. Badham and Winn (2010)은 자궁에 벤젠 노출시에 산화성 스트레스의 증가로 인하여 태아 조혈 원시 세포 성장이 억제 되었다고 하여 본 연구결과를 뒷받침해주고 있다. 랫트의 sertoli 세포에 benzene hexachloride 노출시 세포 사멸이 일어났는데 이는 산화성 스트레스의 증가에 기인한 것이라고 하였다. 이에 대한 생체 실험은 향후 연구에서 밝혀져야 할 사항으로 생각된다.

폐 세포 사멸에는 Bax, Bcl-2, Bad 등의 다양한 미토콘

드리아와 관련이 있는 단백질들이 관여 한다 (Wu *et al.*, 2007; Cao *et al.*, 2008). 특히 Bax/Bcl-2 비율은 미토콘드리아 경로에 의한 세포 사멸의 주요한 표지 인자로 인식이 되고 있다 (Tong *et al.*, 2007). 본 실험에서도 벤젠 처리 시 폐 상피 세포 사멸 억제제를 담당하는 Bcl-2의 발현은 감소하였고 폐 상피세포사멸 촉진을 담당하는 Bax의 발현이 증가하여 Bax/Bcl-2의 비율은 증가하였다. 이러한 결과는 최근에 랫트에 벤젠 흡입시에 Bax의 발현 증가 및 Bcl-2의 발현 감소가 폐 상피에 관찰된다는 보고 (Weaver and Liu, 2008)에 비추어 볼 때 본 연구결과가 직접적으로 생체에서도 이루어질 수 있음을 시사해주고 있다. Das *et al.* (2010)은 최근에 폐 상피세포에서 벤젠의 유도체중의 하나인 benzoquinone 처리 시 세포사멸이 유도되었는데 이는 caspase-3의 활성화에 의한 결과임을 보고하였다. Du *et al.* (2006) 역시 본 실험에서 사용한 동일 세포에서 caspase-3가 세포 사멸사에 관여한다고 보고하였다. 이러한 보고는 caspase-3의 활성이 벤젠에 의한 세포 사멸에 강력히 관여하고 있음을 시사해 주고 있다.

본 실험에서는 벤젠에 의한 산화성 스트레스 발생이 세포 사멸 억제 단백질인 Bcl-2 발현 및 Bax 활성화에 직접적으로 미치는 영향을 조사하지 않았지만 벤젠에 의한 Bax, Bcl-2 발현 및 caspase-3의 활성형 증가 작용과 항산화제인 vitamin C 및 NAC에 의한 세포 사멸 차단 작용의 결과로 보아 이들의 활성이 Bcl-2를 억제하고 세포 사멸 촉진 단백질인 Bax 활성을 증가할 것으로 추측 해주고 있다. 이러한 결과는 산화성 스트레스가 Bax, Bcl-2 발현 및 caspase-3 발현을 조절함으로써 세포 사멸에 깊숙이 관여하는 것으로 판단된다. 이러한 연구는 벤젠에 대한 독성 기전 제시를 세포 수준에서 밝힐 수 있는 기회를 제공하였으며 이는 벤젠에 의한 다양한 질병 발병을 억제할 수 있는 물질들을 개발하는 연구에 기초적 자료로 사용 될 수 있을 것으로 판단이 된다.

요 약

벤젠은 농약 노출 및 새집 증후군시에 나타나는 중요한 물질로 천식 및 알러지 등의 호흡 질환을 일으키는 물질로 알려져 있으나 폐 상피세포에 대한 자세한 효과는 알려져 있지 않고 있다. 본 실험에서는 폐 상피세포인 A549 세포를 이용하여 벤젠에 대한 효과를 알아보았다. 실험 결과 벤젠은 세포 생존율을 감소 시켰으며, 이러한 반응은 항산화제인 vitamin C 및 NAC 처리 시 차단되었다. 실제로 벤젠 처리 시 산화성 스트레스 지표인 lipid peroxide 형성이 증가하였으며 이들 반응 역시 항산화제들에 의해 차단되었다. 한편 벤젠 처리시 세포 사멸 촉진 단백질인 Bax 발현은 증가하였으며 세포 사멸 억제 단백질인 Bcl-2의 발현은 억제 되었으며 세포 사멸 실행 단백질인 caspase-3의 활성형 역시 증가하였다. 결론적으로 벤젠은 폐 상피세포에서 산화성 스트레스 증가를 통해 세포 사멸을 일으키는 것으로 나타났다.

감사의 글

이 논문은 2010년 교육과학기술부로부터 지원받아 수행된 연구이며 2010년 바이오하우징연구소의 지원을 받아 수행된 연구입니다. 전남대학교 동물의학 연구소에 의해서도 지원을 받아 수행한 논문입니다. 아울러 교육과학 기술부의 한국 연구재단 BK 21 사업의 대학원생 지원 프로그램에 의해 수행되었습니다. 이에 깊이 감사드립니다.

참고문헌

- Badham, H.J., Winn, L.M., 2010. In utero and in vitro effects of benzene and its metabolites on erythroid differentiation and the role of reactive oxygen species, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 244(3), 273-279.
- Barillet, S., Jugan, M.L., Laye, M., Leconte, Y., Herlin-Boime, N., Reynaud, C., Carriere, M., 2010. In vitro evaluation of SiC nanoparticles impact on A549 pulmonary cells: cyto-, genotoxicity and oxidative stress, *Toxicol Lett.* 198(3), 324-330.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Cao, X., Bennett, R.L., May, W.S., 2008. c-Myc and caspase-2 are involved in activating Bax during cytotoxic drug-induced apoptosis, *J. Biol. Chem.* 283(21), 14490-14496.
- Das, A., Chakrabarty, S., Choudhury, D., Chakrabarti, G. 2010. 1,4-Benzoquinone (PBQ) induced toxicity in lung epithelial cells is mediated by the disruption of the microtubule network and activation of caspase-3, *Chem. Res. Toxicol.* 23(6), 1054-1066.
- Du, A., Zhao, B., Yin, D., Zhang, S., Miao J., 2006. Safrole oxide induces apoptosis by activating caspase-3, -8, and -9 in A549 human lung cancer cells. *Bioorg. Med. Chem Lett.* 16(1), 81-83.
- Giuliano, M., Stellavato, A., Cammarota, M., Lamberti, M., Miraglia, N., Sannolo, N., De Rosa, M., 2009. Effects of low concentrations of benzene on human lung cells in vitro, *Toxicol. Lett.* 188(2), 130-136.
- Kamdar, O., Le, W., Zhang, J., Ghio, A.J., Rosen, G. D., Upadhyay, D., 2008. Air pollution induces enhanced mitochondrial oxidative stress in cystic fibrosis airway epithelium. *FEBS Lett.* 582, 3601-3606.
- Kampa, M, Castanas, E., 2008. Human health effects of air pollution, *Environ Pollut.* 151(2), 362-367.
- Kataoka, M., Wiehle, S., Spitz, F., Schumacher, G., Roth, J.A., Cristiano, R.J., 2000. Down-regulation of bcl-2

- is associated with p16INK4-mediated apoptosis in non-small cell lung cancer cells, *Oncogene*. 19(12), 1589-1595.
- Khalade, A., Jaakkola, M.S., Pukkala, E., Jaakkola, J.J., 2010. Exposure to benzene at work and the risk of leukemia: a systematic review and meta-analysis, *Environ Health*. 9:31.
- Kitamura, Y., Hashimoto, S., Mizuta, N., Kobayashi, A., Kooguchi, K., Fujiwara, I. 2001. Fas/FasL-dependent apoptosis of alveolar cells after lipopolysaccharide induced lung injury in mice, *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 163, 762-769.
- Kutuk, O., Basaga, H., 2007. Apoptosis signalling by 4-hydroxynonenal: a role for JNK-c-Jun/AP-1 pathway. *Redox Rep*. 12(1), 30-34.
- Li, A.A., Maurissen, J.P., Barnett, J.F. Jr., Foss, J., Freshwater, L., Garman, R.H., Peachee, V.L., Hong, S.J., Stump, D.G., Bus, J.S., 2010. Oral gavage subchronic neurotoxicity and inhalation subchronic immunotoxicity studies of ethylbenzene in the rat, *Neurotoxicology*. 31(3), 247-258.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem*. 95, 351-358.
- Pariselli, F., Sacco, M.G., Rembges, D., 2009. An optimized method for in vitro exposure of human derived lung cells to volatile chemicals. *Exp. Toxicol. Pathol*. 61(1), 33-39.
- Sharma, S., Rana, S.V., 2010. Melatonin inhibits benzene-induced lipid peroxidation in rat liver, *Arh. Hig. Rada. Toksikol*. 61(1), 11-18.
- Shi, Y., Song, Y., Wang, Y., Wang, Y., Liang, X., Hu, Y., Yu, H., Guan, X., Cheng, J., Yang, K., 2010. beta-Benzene hexachloride induces apoptosis of rat sertoli cells through generation of reactive oxygen species and activation of JNKs and FasL, *Environ Toxicol*. (in press)
- Tong, Q.S., Zheng, L.D., Tang, S.T., Jiang, G.S., Ruan, Q.L., Zeng, F. Q., Dong, J.H., 2007. Nitrofen suppresses cell proliferation and promotes mitochondria-mediated apoptosis in type II pneumocytes. *Acta. Pharmacol. Sin*. 28(5), 672-684.
- Verma, Y., Rana, S.V., 2004. Sex differences in oxidative stress induced by benzene in rats, *Indian J. Exp. Biol*. 42(1), 117-120.
- Weaver, C.V., Liu, SP., 2008. Differentially expressed pro- and anti-apoptogenic genes in response to benzene exposure: Immunohistochemical localization of p53, Bag, Bad, Bax, Bcl-2, and Bcl-w in lung epithelia, *Exp. Toxicol. Pathol*. 59(5), 265-272.
- Wu, Y., Xing, D., Chen, W.R., Wang, X., 2007. Bid is not required for Bax translocation during UV-induced apoptosis, *Cell Signal*. 19(12), 2468-2478.
- Yang, F., Zhou, J.H., 2010. Cytotoxicity and DNA damage induced by 1, 4-benzoquinone in v79 Chinese hamster lung cells, *J. Toxicol. Environ. Health A*. 73(7), 483-489.
- Zakeri, Z., Lockshin, R.A., 2008. Cell death: history and future. *Adv. Exp. Med. Biol*. 615, 1-11.
- Zinkel, S., Gross, A., Yang, E., 2006. BCL2 family in DNA damage and cell cycle control, *Cell Death Differ*. 13(8), 1351-1359.