폐상피세포에서 Paraquat에 의한 아포프토시스에 관한 연구

단국대학교 의과대학 내과학교실, [1]건국대학교 의과대학 내과학교실
송탁호, 양주연, 정인국, 박재석, 지영구, 김윤섭, 이계영[1]

Paraquat-Induced Apoptotic Cell Death in Lung Epithelial Cells

Tak Ho Song, M.D., Joo Yeon Yang, M.D., In Kook Jeong, M.D., Jae Seok Park, M.D., Young Koo Jee, M.D., Youn Seup Kim, M.D., Kye Young Lee, M.D.[1]

Department of Internal Medicine, College of Medicine, Dankook University, Cheonan, Korea,
[1]Department of Internal Medicine, Konkuk University Hospital School of Medicine, Konkuk University, Seoul Korea

Background: Paraquat is extremely toxic chemical material, which generates reactive oxygen species (ROS), causing multiple organ failure. In particular, paraquat leads to irreversible progressive pulmonary fibrosis. Exaggerated cell deaths exceeding the normal repair of type Ⅱ pneumocytes leads to mesenchymal cells proliferation and fibrosis. This study examined the followings; ⅰ) whether or not paraquat induces cell death in lung epithelial cells; ⅱ) whether or not paraquat-induced cell deaths are apoptosis or necrosis; and ⅲ) the effects of N-acetylcysteine, dexamethasone, and bcl-2 on paraquat-induced cell deaths.
Methods: A549 and BEAS-2B lung epithelial cell lines were used. The cell viability and apoptosis were evalluated using a MTT assay, Annexin Ⅴ staining was monitored by fluorescence microscopy, The level of bcl-2 inhibition was examined by establishing stable A549 pcDNA3-bcl-2 cell lines throung the transfection of pcDNA3-bcl-2 with the mock.
Results: Paraquat decreased the cell viability in A549 and BEAS-2B cells in a dose and time dependent manner. The Annexin Ⅴ assay showed that apoptosis was the type of paraquat-induced cell death. Paraquat-induced cell deaths was significantly inhibited by N-acetylcysteine, dexamethasone, and bcl-2 overexpression. The cell viability of A549 cells treated with N-acetylcysteine, and dexamethasone on the paraquat-induced cell deaths were increased significantly by 10 ~ 20%, particularly at high doses. In addition, the cell viability of A549 pcDNA3-bcl-2 cells overexpressing bcl-2 was significantly higher than the untransfected A549 cells.
Conclusion: Paraquat induces apoptotic cell deaths in lung epithelial cells in a dose and time dependent manner. The paraquat-induced apoptosis of lung epithelial cells might occur through the mitochondrial pathway.
(Tuberc Respir Dis 2006; 61: 366-373)

Key words: Paraquat, Apoptosis, Bcl-2, N-acetylcysteine, Dexamethasone.

서 론

Paraquat (N,N′-dimethyl-4, 4′-bipyridilium; methyl viologen, PQ)는 우리나라를 포함하여 전세계적으로 농업분야에서 널리 사용되는 비선택성 제초제이다. 노출 시 인체 내에서 용해되어 전자수용체로 반응성 산소유리기(reactive oxygen species, ROS)를 발생시켜 세포막, 단백질, 핵산 등과 반응하여 세포손상을 일으킨다[1-3].

Paraquat는 폐, 간, 신장, 심장 등 신체 중요장기에 손상을 초래하나 특히 폐에 심한 손상을 일으킨다. 폐조직에서는 에너지의존과정으로 paraquat가 흡수되어 혈장과 비교해 폐에서의 paraquat 농도가 6~10배 정도 높다. 또한 폐는 대기의 산소와 가장 가깝게 접할 수 있는 장기로서 반응성 산소유리기에 의해 가장 많이 손상 받는다[4]. Paraquat에 의한 폐 손상은 반응성 산소유리기에 의한 직접손상, 염증세포의 활성화에 의한 초기 폐 손상, 그리고 섬유아세포 증식 및 세포기질의 변화들이 나타나는 후기손상 등이 특징이다. 따라서 paraquat를 섭취하면 급성 폐 손상과 급성 호흡부전 증후군 및 폐 섬유화로 대부분 사망한다[5].

최근의 연구보고들에 따르면 폐상피세포의 아포프토시스가 급성 폐 손상 및 급성 호흡부전 증후군의 발

Address for correspondence: **Kye Young Lee, M.D.**
Department of Internal medicine, Konkuk University Hospital School of Medicine, Konkuk University 4-12, Hwayang-Dong, Gwangjin-Gu, Seoul, 143-914, Korea
Phone: 82-2-2030-7521 Fax: +82-2-2030-7748
E-mail: kyleemd@kuh.ac.kr
Received: Aug. 7. 2006
Accepted: Sep. 21. 2006

생기전에 중요한 역할을 할 가능성이 크다[6].

폐상피세포에 대한 세포독성이 paraquat의 농도와 시간에 따라 어떠한 양상으로 나타나는지, 이러한 세포독성이 아포프토시스인지, 그리고 항 염증제인 dexamethasone과 항 산화제인 N-acetylcysteine, 항 아포프토시스 단백질인 bcl-2가 paraquat에 의한 세포독성에 어떠한 영향을 미치는지 등을 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 세포주 및 시약

인체의 폐상피세포주로 A549 (type Ⅱ pneumocyte) 세포주와 BEAS-2B (transformed bronchial epithelial cell) 세포주를 DMEM (supplemented with 10% fetal calf serum, 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin and 100 U/mL streptomycin) 배양액을 이용하여 37℃, 5% CO2 incubator에서 배양하였다. Paraquat, N-acetylcysteine, 그리고 dexamethasone은 Sigma사(St. Louise, USA)에서 구입하였다.

2. Cell viability assay

모세포주를 96 well plate에 well당 10^5개의 세포가 되도록 심어 배양하였다. Paraquat에 의한 세포독성 정도를 알아보기 위해 paraquat의 농도는 대조군, 1 μM, 10 μM, 100 μM, 1 mM, 그리고 10 mM을 처치하였으며 각각 24시간, 48시간, 그리고 72시간 이후에 세포의 손상정도를 알아보았다. Dexamethasone (1 μM)은 paraquat 투여 12시간 전에 전처치 하였고, N-acetylcysteine (1 mM)은 paraquat 투여 1시간 전에 전처치 하였다. 세포의 손상정도는 3-(4,5)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay를 이용하였다[7]. MTT assay는 생존세포에만 선택적으로 흡수되는 황색 염료로서 생존세포의 비율에 따라 흡광도가 증가하는 성질을 이용한 세포독성 검사방법으로

Table 1-A. MTT assay for paraquat-induced cell deaths in A549 cells

	Cell viability(%)		
	24hr	48hr	72hr
Control	100	100	100
PQ1μM	96.4±9.1	89.8±8.8	56.6±7.8
PQ10μM	81.4±7.3	76.3±4.6	47.5±6.1
PQ100μM	65.9±5.1	30.3±5.0	19.1±1.6
PQ1mM	50.7±3.0	12.7±2.1	12.2±1.4
PQ10mM	36.9±2.8	11.5±0.5	9.3±0.1

PQ : paraquat

Data are the means ± SD.uat

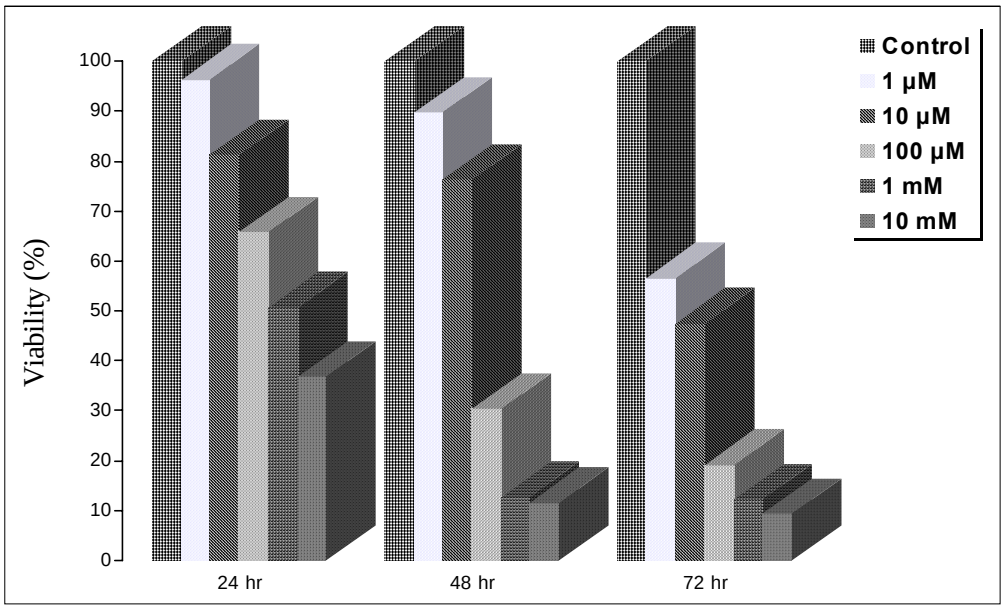

Figure 1-A. MTT assay for paraquat-induced cell deaths in A549 cells

서, 그 방법을 요약하면, MTT 용액(5 mg/mL)을 모세포주가 있는 96 well plate에 20 μL씩 첨가한 후 CO_2 incubator에서 2시간 동안 배양한 후 0.1 M HCl, isopropanol 100 μL를 96 well plate에 첨가하고 약 30분 간 CO_2 배양기에 저장하여 반응을 일으킨 뒤 ELISA kit를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하여 그 비율로서 세포독성을 측정하였다.

3. 아포프토시스 assay

폐상피세포에 대한 paraquat의 아포프토시스 여부는 세포에 Annexin-V를 염색한 후에 형광현미경을 이용하여 확인하였다. 방법을 요약하면 세포를 PBS로 세척하고 원심분리기로 이용해서 세포를 침전 시킨다. 세포 침전물을 100 μL의 결합 완충제(binding buffer)로 resuspension한다. 여기에 Annexin-V 를 5 μL 첨가하고 차광하여 실온에서 15분간 배양한 후에 분석하였다.

4. Bcl-2 inhibition study

Paraquat로 인한 아포프토시스에 bcl-2 단백질이 미치는 효과는 A549 세포주에 A549 pcDNA3-bcl-2 construct를 유전자주입한 후 G418을 처치하여 안정된 세포주를 얻은 뒤에 이용하였다. 유전자의 gene construct는 강원의대 김영명 교수로부터 공여 받았으며 유전자전달감염(gene transfection) 방법은 lipofectamine-plus (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD) 를 이용하여 유전자 주입을 시행한 후 G418 400-600 μg/ml 농도 하에서 배양하여 내성 세포 클론을 얻었다. 안정된 세포주의 여부는 monoclonal anti-bcl-2 antibody (Santacruz Biotech, CA)를 이용하여 western blot을 시행하여 확인하였다.

Table 1-B. MTT assay for paraquat-induced cell deaths in BEAS-2B cells

	Cell viability(%)		
	24hr	48hr	72hr
Control	100	100	100
PQ1μM	85.9±7.2	88.5±4.6	78.8±5.1
PQ10μM	83.9±6.8	76.6±5.4	75.9±5.3
PQ100μM	75.6±4.5	47.9±3.2	31.9±2.8
PQ1mM	65.6±5.1	27.2±3.0	21.7±2.7
PQ10mM	24.9±1.3	7.1±0.8	5.5±0.1

PQ : paraquat
Data are the means ± SD.

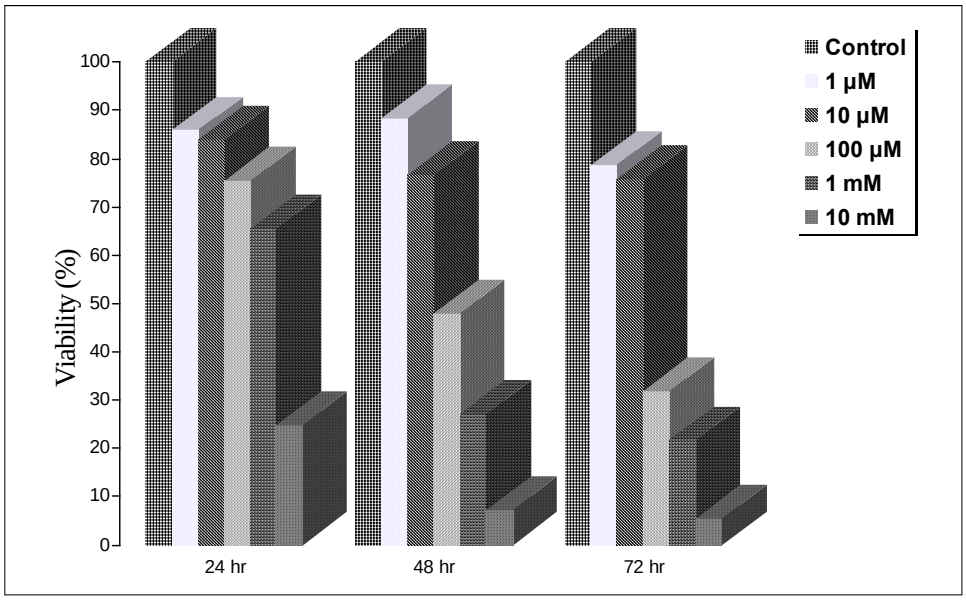

Figure 1-B. MTT assay for paraquat-induced cell deaths in BEAS-2B cells

Table 2. The paraquat-induced between apoptotic cells death and necrotic cells death in A549 cells by Annexin-V assay.

	Apoptotic cell death (%)	Necrotic cell death (%)
PQ 1 mM	96.4±4.6	4.4±2.8
PQ 10 mM	82.5±6.8	18.8±3.2

PQ : paraquat
Data are the means ± SD.

결 과

1. Paraquat에 의한 폐상피세포의 생존율

A549 세포에 paraquat를 1 μM, 10 μM, 100 μM, 1 mM, 10 mM 농도로 처치하였을 때 세포 생존율(%)은 농도를 증가시킴에 따라 시간 의존적으로 감소하였다 (Table 1-A)(Figure 1-A).

BEAS-2B 세포에서도 paraquat를 1 μM, 10 μM, 100 μM, 1 mM, 10 mM 농도로 처치하였을 때 A549 세포와 유사하게 세포 생존율(%)의 농도 의존적이고 시간 의존적으로 감소하였다 (Table 1-B)(Figure 1-B).

2. Paraquat에 의한 폐상피세포의 apoptosis

Annexin V 염색을 통해서 paraquat가 폐상피세포의 아포프토시스를 유발한다는 것을 확인할 수 있었으며 paraquat 1 mM 이하의 농도와 다르게 Paraquat 농도 10 mM에서는 아포프토시스와 함께 세포괴사가 일어나는 것으로 볼 때, 10 mM 이상의 고농도에서는 세포괴사가 일어나는 것으로 생각된다 (Table 2).

3. Paraquat에 의한 아포프토시스에서 N-acetylcysteine & dexamethasone의 효과

항산화제인 N-acetylcysteine 1 mM을 paraquat 투여 1시간 전에 전처치한 군과 전처치하지 않은 군에서 세포 생존율을 비교하였다. Paraquat를 1 μM, 10 μM, 100 μM, 1 mM, 10 mM 농도로 투여하였을 때, 시간의 경과에 따른 세포 생존율(%)은 전처치 하지 않은 군에 비해서 N-acetylcysteine 전처치 후에 세포 생존율의 증가를 보였다(Figure 3). 통계분석은 비모수통계법을 이용하였고 각 군간의 차이는 Mann-Whitney U test를 이용하여 비교 분석하였으며 P-value < 0.05를 통계적으로 유의하다고 분석하였다. 그 결과 1mmM 이상의 농도에서 의미 있게 생존율의 증가를 보였다.

Dexamethasone 1 μM을 paraquat 투여 12시간 전에 전처치한 군과 전처치하지 않은 군에서 세포 생존율을 비교하였다. Paraquat를 1 μM, 10 μM, 100 μM, 1 mM, 10 mM 농도로 처치하였을 때, N-acetylcysteine과 dexamethasone이 paraquat에 의한 아포프토시스를 억제시킨다는 것을 확인할 수 있었으며 이

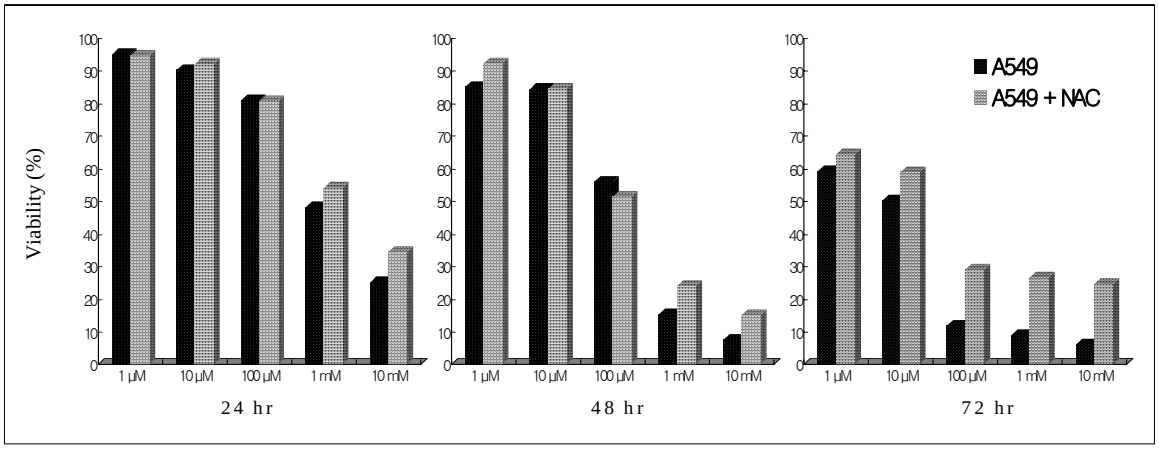

Figure 3. Inhibition of paraquat-induced cell deaths by NAC (NAC : N-acetylcysteine)

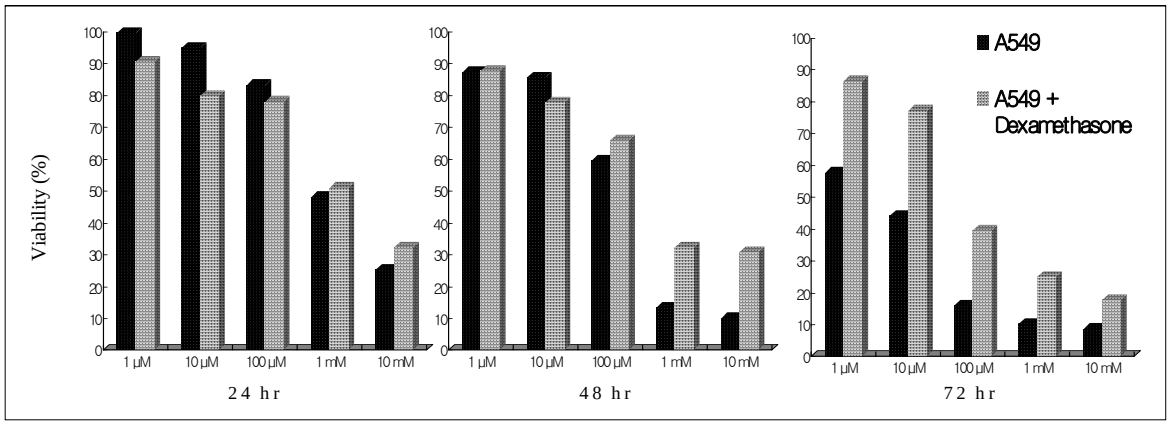

Figure 4. Inhibition of paraquat-induced cell deaths by dexamethasone

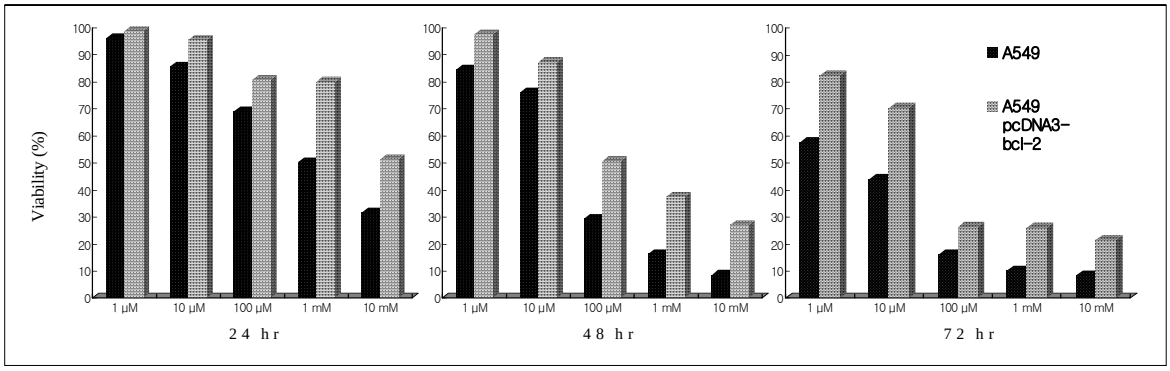

Figure 5. The role of bcl-2 in paraquat-induced cell deaths (Inhibition of paraquat-induced cell deaths by bcl-2 overexpression)

러한 억제효과는 paraquat 농도가 증가할수록, 시간이 경과할수록 뚜렷하였다.

4. Paraquat에 의한 아포프토시스에서 bcl-2 단백질의 효과

Bcl-2를 overexpression시킨 A549 pcDNA3-bcl-2 군과 A549 군에서 세포 생존율을 비교하였다. Paraquat를 1 μM, 10 μM, 100 μM, 1 mM, 10 mM 농도로 처치하였을 때, 시간의 경과에 따른 세포생존율은 A549 세포군 보다 A549 pcDNA3-bcl-2 세포 군에서 더 높게 나왔으며 농도가 증가할수록 유의한 증가를 보였다 (Figure 5).

이러한 결과로 볼 때 paraquat에 의한 A549 세포의 아포프토시스에 bcl-2 단백질이 분명한 억제효과를 가지며, paraquat의 농도가 증가할수록 그리고 시간이 경과할수록 억제효과가 뚜렷하였다.

고 찰

인체의 폐는 40가지 이상의 다른 세포들로 이루어진 다양한 기관으로, 이들 세포 각각은 독특한 형태학적, 기능적 특징을 가진다. 호흡기의 상피세포들은 화학물질, 약물, 그리고 무기질 과립 등에 지속적으로 노출된다. 폐포의 대식세포는 폐포 공간 안에서 하나의 자유로운 세포 군으로 존재하며 변연부 폐세포의 5%를 차지한다. 이들은 흡입한 공기에 있는 독성 과립, 가스들, 그리고 병독소들과 직접적으로 접촉하게 되며, 대식세포의 식세포작용 동안 상당량의 활동성 산소유리기가 생산된다. 이들은 식세포과정에 필요하

지만, 위험한 부작용을 유발할 수 있고 폐에 손상을 주기도 한다[8,9].

Paraquat는 20세기 초에 산화·환원 지시제로 영국에서 개발되었다. 1950년대에 제초제로 변형 개발되어 전세계적으로 농업분야 등에 널리 이용되지만, 인체에 노출 시 사망할 정도로 치명적인 부작용을 가지고 있다. Paraquat는 인체 내에서 용해되어 전자수용체로 작용하며 반응성 산소유리기(reactive oxygen species, ROS)를 발생시킨다. 반응성 산소유리기는 신호전도의 두 번째 전달자로서, 세포신호 전달과정에 참여한다. 반응성 산소유리기는 세포막, 단백질, 핵산 등과 반응함으로써 세포손상을 일으킨다. Rose 등은 paraquat가 혈중보다 폐에 6~10배 더 축적된다고 보고하였으며, 산소분압이 높고 free radical의 제거효소계가 상대적으로 적은 폐포세포에서 가장 심한 손상이 일어난다고 하였다[10]. Paraquat에 의한 반응성 산소유리기는 폐포상피세포인 type Ⅰ, type Ⅱ 폐포세포에 직접 작용하여 폐포내 출혈, 폐부종, 폐포상피세포의 파괴를 초래하여 폐포염을 유발하게 되고 결국 폐섬유증을 일으킨다. 따라서 이러한 paraquat에 기인한 폐섬유증은 간질성 폐질환의 원인과 병리기전을 연구하는 모델로서 이용되고 있다[11]. 본 연구에서 인체의 폐상피세포주인 A549 세포주와 BEAS-2B 세포주를 이용하여 paraquat의 세포죽음을 알아본 결과 paraquat는 농도증가 및 시간경과에 비례하여 세포죽음이 유발됨을 알 수 있었다.

최근의 연구보고에 의하면 급성 폐 손상 및 급성 호흡부전 증후군의 발생기전에 있어서 폐상피세포의 아포프토시스가 중요한 역할을 한다고 한다[6]. 급성 호흡부전 증후군은 과립구의 축적, 혈관 투과성의 증가, 폐탄성의 감소, 가스교환의 이상, 그리고 흉부 방사선 소견상 미만성 폐 침윤 등을 특징으로 하는 염증성 폐질환이다[12]. 이러한 증후군은 호흡기 질환에 의한 사망의 주요 원인이다. Hagimoto 등은 동물실험에서 DNA 손상을 초래하고, 아포프토시스를 유발하는 것으로 알려진 bleomycin에 의해 폐섬유증이 발생할 때 폐포상피세포에서 Fas mRNA가 발현되는 것을 밝혔다. 또한 침윤된 임파구에서도 FasL mRNA가 발현되었으며, 이러한 전구 아포프토시스 분자들의 발현은 아포프토시스에 의해 폐포상피세포 손상이 일어난다는 것을 의미한다[11,13-15]. 또 급성기에 활성화된 과립구의 제거가 지연되면 기도 내에 과립구의 축적이 생기며 급성 폐 손상 후반기에 폐포 상피벽이 파괴된다. 이것은 아포프토시스 분자의 적절한 발현이 폐 손상을 치유하는데도 필수적이라는 것을 암시한다. 폐포막에서 일어나는 아포프토시스는 급성 폐 손상과 급성 호흡곤란 증후군의 치유와 결과에 영향을 미칠 것이다[11,16,17].

Paraquat에 의한 폐 손상은 반응성 산소유리기의 직접작용, 염증세포의 활성화에 의한 초기 폐 손상, 그리고 섬유아세포 증식 및 세포 기질들의 변화가 나타나는 후기 손상을 특징으로 한다. 급성 폐 손상 후에 폐상피세포가 심각하고 장기적으로 손상되면, 정상적 세포들간의 관계가 장기간 파괴된다[5,8]. 만약 폐상피세포의 복구가 순조롭게 진행되지 못하면 간엽세포의 증식이 수반되고 결국에는 섬유화에 이르게 된다. 이것은 급성 폐손상 후에 발생하는 폐상피세포의 아포프토시스가 폐 섬유화의 병리적인 특징임을 보여준다[11,18]. 본 연구의 결과 폐상피세포주에서 paraquat에 의해 아포프토시스가 일어남을 확인할 수 있었다. 다만 고농도의 paraquat를 투여 시에는 아포프토시스와 세포괴사가 같이 나타나는데 10 mM이상의 농도에서는 세포괴사가 주로 일어난다.

Glucocorticoids는 가장 강력한 항염증 능력과 면역억제 능력을 가지는 약제로 NF-κB의 전사활성을 억제하는[19,20] 등 다양한 기전에 의해 항염증 효과를 나타낸다. 또한 glucocorticoid는 phospholipase에 의한 세포막 phospholipids의 분해를 억제함으로써 arachidonic acid cascade에서 반응성 산소유리기의 형성을 억제하고, 지속적으로 산화물에 노출되는 폐상피세포에서 glutathione 합성을 증가시킴으로써 상피세포를 보호한다. 최근의 연구에서 glucocorticoid는 caspase 3의 발현을 억제하고 bcl-2를 발현시킴으로써 세포의 생명력을 증가시키고 아포프토시스로 인한 세포손상을 억제한다고 하였다[21,22]. 본 연구에서 glucocorticoid는 paraquat의 농도가 높을 때, 시간이 어느 정도 지났을 때 paraquat에 의한 폐상피세포의 손상을 억제하였다. 이는 paraquat에 의한 세포죽음에서 gluco-

corticoid의 효과가 항염증 효과가 아니고 폐포상피세포를 보호하는 효과라는 것을 의미한다.

폐의 산화손상에 있어서 N-acetylcysteine (NAC)의 보호역할은 이미 알려져 있다. 본 연구에서 N-acetylcysteine은 시간과 paraquat 농도에 따라서 약간의 차이를 보이나 전반적으로 10~30% 정도의 방어효과가 있었다. 이러한 효과는 현재까지 몇 가지의 기전을 통해서 설명이 되는데 alveolar type II 세포를 보호하거나 glutathione을 증가시킴으로써 산화손상에 대한 세포의 저항을 증가시킨다고 한다[23-25].

Bcl-2는 마이토콘드리아의 외부막에 위치하는 항아포프토시스 단백질로 잘 알려져 있다. 아포프토시스와 관련된 세포의 손상은 마이토콘드리아 기능의 손상과 반응성 산소유리기의 과다한 생산 때문인데 bcl-2는 산화성 자극에 의한 세포손상을 보호한다. Bcl-2는 반응성 산소유리기의 생산 혹은 항산화 경로에 영향을 미칠 것으로 생각된다. 본 연구에서 paraquat에 의한 폐상피세포의 손상에 bcl-2가 어떠한 영향을 주는지 알아보았으며, bcl-2를 과발현시켰을 때 세포독성이 약 20~30% 정도 감소하였다. 이러한 결과는 이전의 연구결과와 일치한다[26-28].

결론적으로, paraquat는 저 농도에서 아포프토시스를 일으킨다. 또한 bcl-2 단백질과 N-acetylcysteine의 항아포프토시스 역할을 고려할 때, paraquat에 의해 유발되는 아포프토시스는 마이토콘드리아 경로를 거칠 것으로 생각된다.

요 약

연구배경 : Paraquat는 P-450 reductase에 의해 반응성 산소유리기(ROS)를 발생시켜 세포막, 단백질, 핵산 등과 반응함으로써 세포손상을 유도하며 급성 폐 손상을 일으킨다. 최근 급성 폐 손상 및 급성 호흡곤란 증후군에 있어서 폐상피세포의 아포프토시스가 중요한 역할을 한다고 알려지기 시작하였다. 이에 반응성 산소유리기에 의한 폐 손상의 대표적 물질인 paraquat로 인한 폐상피세포의 세포죽음이 아포프토시스인지 확인하고 dexamethasone, N-acetylcysteine, 그리고 bcl-2가 paraquat로 인한 폐상피 세포죽음에 어떠한 영향을 미치는지 등을 연구하였다.

방법 : 폐상피세포주인 A549와 BEAS-2B 세포주, 그리고 bcl-2 construct를 유전자 주입한 A549 pcDNA3-bcl-2 세포주를 이용하였다. 아포프토시스는 Annexin V assay를 이용하여서 판정하였으며 세포독성 검사는 MTT assay를 이용하였다. Paraquat는 0, 1 μM, 10 μM, 100 μM, 1 mM, 10 mM의 농도로 사용하였다. Dexamethasone은 1 μM의 농도로 paraquat 투여 12시간 전에 전처치하였고, N-acetylcysteine은 1 mM의 농도로 paraquat 투여 1시간 전에 전처치하였다.

결과 : 양 세포주 모두에서 paraquat는 농도와 시간 경과에 따라서 세포죽음을 증가시켰고, 이러한 세포죽음은 아포프토시스였다. N-acetylcysteine과 dexamethasone은 시간과 농도에 따라 약간의 차이가 있으나 전반적으로 10~30%의 방어효과가 있었다. Bcl-2를 과발현시킨 A549-bcl-2 세포주에서 A549-neo 세포주에 비해 paraquat에 의한 세포독성이 약 20~30% 정도 차단되었다.

결론 : Paraquat는 폐상피세포에서 아포프토시스를 유도하며, paraquat에 의한 아포프토시스는 마이토콘드리아 경로에 의해 일어날 것으로 추정된다.

참 고 문 헌

1. Aldrich TK, Fisher AB, Cadenas E, Chance B. Evidence for lipid peroxidation by paraquat in the perfused rat lung. J Lab Clin Med 1983;101:66-73.
2. Skillrud DM, Martin WJ 2nd. Paraquat-induced injury of type II alveolar cells. Am Rev Respir Dis 1984;129:995-9.
3. TH Lee, SW Yang, TG LEE, SY Choi, YW Lee, KY Lee, Therapeutic effect of hemoperfusion in paraquat poisoning patients. Kor J Int Med 1997;52:114-9.
4. SI Lee, KW Ahn, CH Chung, The effect of aminotriazole on pulmonaty toxicity of paraquat poisoning. Tuber Respir Dis 1994;41:222-30.
5. Uhal BD, Joshi L, True AL, Mundle S, Raza A, Pardo A, et al. Fibroblasts isolated after fibrotic lung injury induce apoptosis of alveolar epithelial cells in vitro. Am J Physiol 1995;269:L819-28.
6. Kitamura Y, Hashimoto S, Mizuta N, Kobayashi A, Kooguchi K, Fujiwara I,et al. Fas/FasL-dependent

apoptosis of alveolar cells after lipopolysaccharide-induced lung injury in mice. Am J Respir Crit Care Med 2001;163:762-9.
7. EK Mo, JH Lee, CG Yoo, YW Kim, K Han, et al. The effect of TNF-α gene trasfer on chemosensitivity in lung cancer cells. Reports of Korean Tuberculosis Research Center 1996;7:29-54.
8. Dusinska M, Kovacilova Z, Vallova B, Collins A. Responses of alveolar macrophages and epithelial type II cells to oxidative DNA damage caused by paraquat. Carcinogenesis 1998;19:809-12.
9. Mossman BT, Gee JB. Pulmonary reactions and mechanisms of toxicity of inhaled fibers. Toxicol Appl Pharmacol 1988;93:472-83.
10. Rose MS, Smith LL, Wyatt I. Evidence for energy-dependent accumulation of paraquat into rat lung. Nature 1974;252:314-5.
11. Hagimoto N, Kuwano K, Nomoto Y, Kunitake R, Hara N. Apoptosis and expression of Fas/Fas ligand mRNA in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. Am J Respir Cell Mol Biol 1997;16:91-101.
12. Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, Carlet J, Falke K, Hudson L, et al. The American-European Consensus Conference on ARDS: definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. Am J Respir Crit Care Med 1994;149:818-24.
13. Cox G, Crossley J, Xing Z. Macrophage engulfment of apoptotic neutrophils contributes to the resolution of acute pulmonary inflammation in vivo. Am J Respir Cell Mol Biol 1995;12:232-7.
14. Woo D. Apoptosis and loss of renal tissue in polycystic kidney disease. N Engl J Med 1995;333:18-25.
15. Hashimoto S, Kobayashi A, Kooguchi K, Kitamura Y, Onodera H, Nakajima H. Upregulation of two death pathways of perforin/granzyme and FasL/Fas in septic acute respiratory distress syndrome. Am J Respir Crit Care Med 2000;161:237-43.
16. Matute G, Liles WC, Radella F, Steinberg KP, Ruzinski JT, Jonas M, et al. Neutrophil apoptosis in the acute respiratory distress syndrome. Am J Respir Crit Care Med 1997;156:1969-77.
17. Matthay MA, Wiener-Kronish JP. Intact epithelial barrier function is critical for the resolution of alveolar edema in humans. Am Rev Respir Dis 1990;142:1250-7.
18. Svee K, White J, Vaillant P, Jessurun J, Roongta U, Krumwlede M,et al. Acute lung injury fibroblast migration and invasion of a fibrin matrix is medigated by CD44. J Clin Invest 1996;98:1713-27.
19. Auphan N, Didonato JA, Rosette C, Helmberg A, Karin M. Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. Science 1995;270:286-90.
20. KY Lee, YS Kim, MH Ko, JS Park, YK Jee, KY Kim. Dexamethasone-induced inhibition of NF-κB transactivation in lung epithelial cells. Tuber Respir Dis 2000;48:682-98.
21. Rahma I, Li XY, Donaldson K, Harrison DJ, MacNee W. Glutathione homeostasis in alveolar epithelial cells in vitro and lung in vivounder oxidative stress. Am J Physiol 1995;269:L285-92.
22. Bailly-Maitre B, Sousa G, Boulukos K, Gugenheim J, Rahmani R. Dexamethasone inhibits spontaneous apoptosis in primary cultures of human and rat hepatocytes via Bcl-2 and Bcl-xL induction. Cell Death Differ 2001;8:279-88.
23. Fassina G, Giunciuglio D, Aluigi MG, Cai T, Masiello L, Dagostino F,et al. Inhibition of angiogenesis and protection from apoptosis by N-acetylcysteine. Cancer Detect Prev 1998;22:125-6.
24. Hoffer E, Avidor I, Benjaminov O, Shenker L, Tabak A, Tamir A, et al. N-acetylcysteine delays the infiltration of inflammatory cells into the lungs of paraquat intoxicated rats. Toxicol Appl Pharmacol 1993;120:8-12.
25. Hoffer E, Baum Y, Tabak A, Taitelman U. N-acetylcysteine increases the glutathione content and protects rat alveolar type II cells against paraquat-induced cytotoxicity. Toxicol Lett 1996;84:7-12.
26. Fabisiak JP, Kagan VE, Ritov VB, Jonhson DE, Lazo JS. Bcl-2 inhibits selective oxidation and externalization of phosphatidylserine during paraquat-induced apoptosis. Am J Physiol 1997;272:C675-84.
27. Rimpler MM, Rauen U, Schmidt T, Moroy T, de Groot H. Protection against hydrogen peroxide cytotoxicity in Rat-1 fibroblasts provided by the oncoprotein Bcl-2: maintenance of calciumhomeostasis is secondary to the effect of Bcl-2 on cellular glutathione. Biochem J 1999;340:291-7.
28. Guinee D Jr, Brambilla E, Fleming M, Hayashi T, Rahn M, Koss M,et al. The potential role of Bax and Bcl-2 expression in diffuse alveolar damage. Am J Pathol 1997;151:999-1007.