

시험관 및 동물실험 모델에서 유리규산에 의한 아포프토시스

가톨릭대학교 성모병원 산업의학과, 산업의학연구소 *

김지홍 · 장황신 · 박영만 · 안병용 · 김경아 · 임 영*

— Abstract —

Silica Induced Apoptosis In Vitro and In Vivo

Ji Hong Kim, Hwang Shn Chang, Yung Mann Baag,
Byung Yong Ahn, Kyoung Ah Kim, Young Lim*

Department of Occupational & Environmental Medicine, Institute of Industrial Medicine,
St. Mary's Hospital, The Catholic University of Korea*

Silica exposure results in acute inflammatory response followed by chronic fibrotic change. The mechanism for the maintenance of silica-induced inflammation has not been understood yet. Apoptosis is a morphologically distinct form of programmed cell death that plays major role during homeostasis and in many diseases including cancer, acquired immune deficiency syndrome and neurodegenerative disorders. Apoptosis is characterized by cell shrinkage, membrane blebbing and nuclear condensation.

To demonstrate the involvement of apoptosis in underlying mechanism for the development of silica-induced pathological changes, this study was designed in vitro and in vivo models. In in vitro study, alveolar epithelial cell line (A549) was stimulated with silica and performed flow cytometry and DNA electrophoresis. In in vivo study, bronchoalveolar lavage (BAL) was done to count the total and apoptotic cells from silica-instilled rats.

The results were as follows:

1. Apoptotic cell fraction of silica-treated groups (10 and 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) was significantly higher than that of control group.
2. Genomic DNA from silica-treated groups (10 and 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) showed DNA ladder in agarose gel electrophoresis, while group of 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ didn't.
3. Total cell number and apoptotic cell number of BAL fluid from silica-instilled rats (10, 20 and 40 mg/kg) were significantly higher than those of control.
4. Silica induced apoptosis of cells in BAL fluid was confirmed by microscopic observation with nuclear fragmentation.

These results suggest that apoptosis may contribute to development of silica-induced pathological changes.

Key Words : silicosis, apoptosis, flow cytometry, microscopy

서 론

규폐증은 무기성 또는 유기성 분진의 흡입으로 발생하는 여러 진폐증 중 가장 먼저 알려진 질환이며, 주로 결정형의 유리규산(석영)을 함유하는 분진을 흡입하여 발생하는 폐실질의 병변으로 대표적인 직업성 호흡기 질환이다(Banks와 Parker, 1998). 대부분의 분진은 중말 기관지와 근위부의 폐포주변에 침착하는데 이는 이 부위가 mucociliary clearance가 저하되어 있는 것에 기인한다(Brady, 1991). 유리규산은 침착부위 주위에 폐포 대식세포를 비롯한 여러 가지 염증성 세포를 자극하여 활동성 산소기, cytokine과 성장인자 등의 매개물질을 분비시킨다(Rom, 1991; Saffiotti 등, 1994). 이러한 매개물질들은 유리규산에 의한 염증반응과 섬유화를 초래하고 심지어 종양을 유발시키는 데에도 일부 작용한다고 알려져 있으며 IARC(International Agency for Research on Cancer)에서는 유리규산을 유해물질 분류상 사람에게서 종양을 유발시킬 수 있는 I군으로 분류하였다(IARC, 1997).

최근 많은 규폐증 환자에서 면역상태의 이상을 나타내는 항핵 항체(antinuclear antibody)와 류마티드 인자(rheumatoid factor)의 증가가 보고(Nagaoka 등, 1993)되고 있으나 이의 기전은 아직 규명되지 않고 있다. 진폐증 발생기전 연구는 폐포대식세포와 중성구를 주요 목표세포로 하여 이루어져 왔으나, 최근 paraquat나 고농도의 산소를 이용하여 폐섬유화를 유도하고 이 때 폐포 상피세포 특히 2형 폐포 상피세포가 폐의 손상과 그 치유과정에 중요하다는 연구결과가 발표되었다(Uhal 등, 1995; Jyonouchi 등, 1998). 폐에서의 염증반응 및 섬유화 과정에 관여하는 세포들이 중국에는 피사라는 사멸과정만을 거치는 것으로 알려져 왔으나 한편으로는 계획된 사멸 즉 아포프토시스가 동반하여 일어난다는 것이 일부 보고되었다(Hamilton 등, 1996; Leigh 등, 1997; Iyer 등, 1997).

세포에서의 아포프토시스의 발생을 알아보는 방법은 직접적으로는 현미경을 통한 세포 축소, 염색질 농축과 핵의 분절 소견을 관찰하며, 간접적으로는 유세포 측정법, in situ labeling 방법과 전기영동 방법 등이 있지만 가장 정확한 방법은 전자현미경

관찰이라고 알려져 있다.

본 연구에서는 규폐증의 발생과정에 관여한다고 알려져 있는 기관지 폐포 세포에서 유리규산에 의하여 아포프토시스가 일어나는 지를 보고자 하였다. 이에 시험관내에서 유리규산을 2형 폐포상피세포에서 유래된 A549 세포에 노출시켜 DNA를 추출하여 전기영동법을 실시하여 아포프토시스의 소견을 관찰하고, 유세포 측정기를 통하여 유리규산의 농도에 따른 아포프토시스의 발생정도를 정량화하고자 하였다. 또한 규폐증 동물실험 모델의 기관지 폐포 세척액 내 세포에서 아포프토시스의 발생을 형태학적으로 관찰하고자 하였다.

연구대상 및 방법

1. 유리규산 분진

본 실험에 사용한 유리규산(SiO_2)은 Min-U-Sil 5 Crystalline Silica(Berkley Springs, WV)이며 입자크기는 0.6-8 μm 이고, 직경이 5 μm 이하가 98% 이상을 차지하였다. 엑스선 회절검사상 석영이 99.5%이며 내독소는 전혀 포함되지 않았다. 분진을 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 2시간 동안 초음파 처리하여 4°C에 보관, 사용하였다.

2. 시험관 모델

1) 세포주 및 배양조건

시험관 모델에서는 A549 세포(ATCC CCL 185: American Type Culture Collection, Rockville, MD)를 이용하였다. A549 세포를 10% 우태아혈청(Fetal Bovine Serum(FBS), Boeringer Mannheim, Mannheim, Germany), 2 mM L-glutamine과 1.5 g/L 탄산염이 첨가된 F-12K 배지(Sigma Chemical Company, St. Louis, MO)를 이용하여 배양하였다. 실험에 이용하기 위해 0.05% trypsin으로 배양판으로부터 세포를 분리시킨 후 배지로 세척하였다. 세포가 2.5×10^6 cells/well이 되도록 6 well-plates(Corning, NY)에 분주하고 이산화탄소 배양기에서 24시간 배양하였다. 배양 24시간 후 배양 상층액을 제거하고 10% FBS가 첨가된 배지로 1회 세척한 후 유리규산을 농도별로 분주하였다. 이때 분진의 농도는 0, 1, 10, 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 으로 하였다. 분진을 분주한 후 4,

24, 48시간 후 배양 상층액을 제거하고 세포는 trypsinization하여 배양판으로부터 떼어낸 후 유세포 측정법과 DNA의 전기영동법으로 아포프토시스를 관찰하였다. 유리규산을 처리하지 않은 군을 대조군으로 하였으며, 실험은 세 번 반복하여 통계처리하였다.

2) 유세포 측정법(Flow cytometry)

A549 세포를 인산 완충액으로 세척한 후 200 x g로 5분 동안 원심분리하여 cell pellet을 20 μ l Annexin-V-Fluores reagent (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany)와 20 μ l Propidium iodide(PI)의 형광염료시료들을 첨가한 100 μ l HEPES buffer로 재부유시킨 후에 15분 동안 배양시켰다. 유세포기는 FACS(fluorescein activated cell sorter) flow cytometer(EPICS PRO FILE-2)로 Annexin V와 PI의 검출을 위하여 488 nm laser excitation line으로 각각 515 nm와 560 nm 이상의 band filter를 사용하였다.

3) A549 세포에서의 DNA 추출과 전기영동

유리규산을 처리하지 않은 A549 세포와 처리한 A549 세포를 48 시간 배양후 인산 완충액으로 세척하였다. Apoptosis DNA ladder kit(Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany)을 사용하여 DNA를 분리하였다. 추출한 DNA는 spectrophotometer로 같은 농도로 정량(50 ng/ml)한 후 2% agarose gel에서 50 volt, 2 시간 전기영동하여 ethidium bromide 염색에 의한 DNA ladder를 확인하였다. DNA의 크기를 나타내는 표식자는 8-587bp 크기를 표시할 수 있는 DNA Molecular Weight Marker V(BMS, Seoul, Korea)를 사용하여 전기영동을 하였다.

3. 동물실험 모델

1) 실험 규폐증 및 기관지 폐포 세척액의 획득

체중 250~300 gm의 수컷 흰쥐(Sprague-Dawley)를 이용하여 Ketamine(25 mg/kg)을 근육 주사하여 전신 마취시켰다. 그 후 흰쥐의 경부를 절개하여 기관을 노출시킨 다음 유리규산 투여군에는 10, 20, 40 mg/kg가 함유된 0.5 ml 생리식염수를 1 ml 주사기를 이용하여 기도내로 일회에 주입하였

다. 대조군은 0.5 ml 생리식염수만 주입하였다. 각각의 군은 5마리로 하였다. 주입 1주 후에 흰쥐에 urethane(0.12 g/100 gm)을 복강내 주사하여 마취한 후 개흉하여 기관을 절개한 후 정맥도자(6 번)를 기관에 삽입하였다. 1회에 5 ml 씩 총 100 ml의 37 $^{\circ}$ C 생리식염수를 주사기를 이용하여 주입하였다. 회수하는 방법으로 기관지 폐포 세척술을 실시하였다. 회수된 세척액을 50 ml conical tube(Falcon, Franklin, NJ)에 모은 후 즉시 얼음에 보관하였다.

2) 기관지 폐포 세척액에서의 세포 관찰

기관지 폐포 세척액을 300 g로 10분간 4 $^{\circ}$ C에서 원심분리한 후 남은 cell pellet을 RPMI-1640 배지(Sigma Chemical Company, St. Louis, MO)로 부유시켰다. 총 세포수는 cytometer로 측정하고, 세포 생존율은 trypan blue exclusion법으로 측정하였다. cytospin(Hettich)을 이용하여 0.5 x 10⁶/ml의 세포를 유리 slide에 부착시키고 메탄올로 고정후 Diff-Quik(Baxter Healthcare Co. Miami, FL)염색을 하였다. 염색된 세포의 형태를 보기 위하여 현미경(Olympus) 관찰(x 1,000, oil immersion)을 하였다. 그 중 1,000 개의 세포에서 형태학적으로 아포프토시스가 일어난 세포를 세었고, 아포프토시스의 소견이 관찰된 폐포 대식세포를 촬영하였다.

4. 통계학적 분석

자료처리는 SAS 프로그램을 이용하였고, 실험 성적은 평균±표준편차로 표시하였다. 시험관내 실험에서 대조군과 유리규산을 처리한 군의 유의성 검정은 Wilcoxon rank sum test로 하였다. 동물실험 모델에서 대조군과 유리규산을 주입한 군에서의 기관지 폐포 세척액내의 총 세포수와 폐포 대식세포수의 유의성 검정은 Kruskal-Wallis test로 하였다.

연구결과

1. 실험관 모델에서 유세포 측정법 소견

유리규산 분진을 처리한 군(10, 50 μ g/cm²)과 대조군의 생존 세포를 비교하였을 때 4, 24와 48시간 배양기간에서 모두 분진을 처리한 군에서 유의하게 낮았다(p<0.05)(Fig. 1).

아포프토시스가 발생한 세포 수는 유리규산을 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 처리하고 48시간 배양시킨 군을 제외하고는 대조군과 비교하였을 때 4, 24와 48시간 배양기간에서 모두 분진을 처리한 군에서 유의하게 높았다($p < 0.05$) (Fig. 2).

괴사된 세포 수는 유리규산을 처리한 군에서 대조

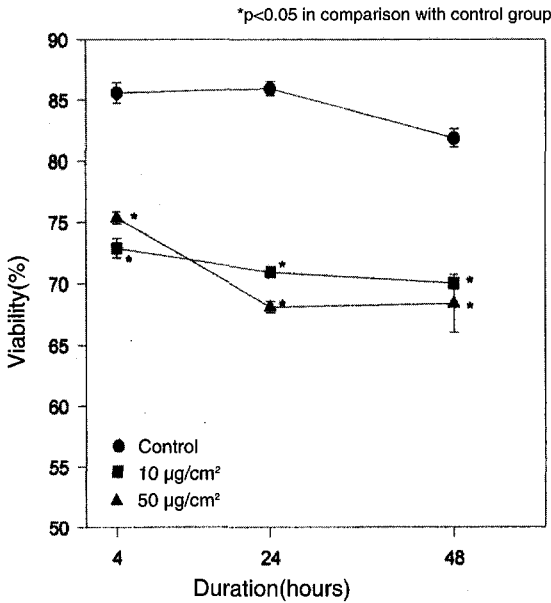


Fig. 2. Viability fraction by silica concentration and culture duration.

군보다 48시간 배양시를 제외하고 4와 24시간 배양시에 유의하게 높았다($p < 0.05$) (Fig. 3).

2. A549 세포에서 추출한 DNA의 전기영동

대조군과 유리규산을 처리한 A549 세포에서 추출한 genomic DNA를 전기영동을 하였다. 유리규산을 각각 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 처리한 군에서 아포프토시스에 특이적으로 보이는 50~300 bp의 DNA

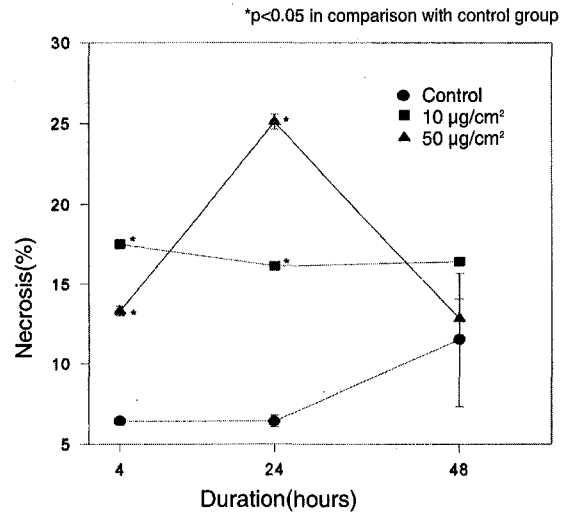


Fig. 3. Necrosis fraction by silica concentration and culture duration.

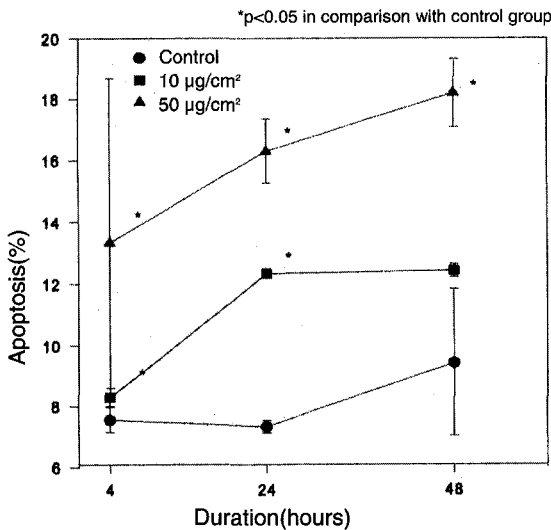


Fig. 2. Apoptosis fraction by silica concentration and culture duration.

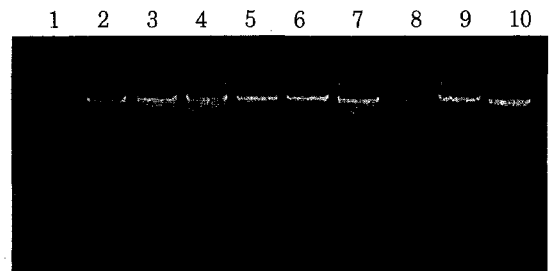


Fig. 4. Agarose gel electrophoresis of DNA extracted from A549 cell in control and silica-treated groups.

Lane 1: DNA Molecular Weight Marker
 Lane 2, 3, & 4: SiO_2 (50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) treated group
 Lane 5, 6, & 7: SiO_2 (10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) treated group
 Lane 8: control group
 Lane 9 & 10: SiO_2 (1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) treated group

Table 1. Means of total cells and apoptotic cells in BAL fluid at 1 week after rats was instilled with saline and silica

Group(n)	Total cells($\times 10^5$ /ml)	Apoptotic cells/ 10^3 cells
Control(5)	2.5 \pm 0.1	3.2 \pm 1.8
Silica 10 mg/kg(5)	4.6 \pm 0.5*	22.5 \pm 8.1*
Silica 20 mg/kg(5)	10.2 \pm 1.3*	20.1 \pm 6.8*
Silica 40 mg/kg(5)	12.9 \pm 1.9*	50.4 \pm 17.9*

* $p < 0.05$: compared with control group

ladder가 관찰되는(lane 2~7) 반면 대조군과 1 μ g/ cm^2 를 처리한 군에서는 관찰되지 않았다(Fig. 4).

3. 기관지 폐포 세척액에서의 관찰 소견

생리 식염수 0.5 cc와 유리규산 10, 20, 40 mg/kg을 각각 5 마리의 흰쥐의 폐장내로 주입 후 1주째에 기관지 폐포 세척술을 시행하여 얻어진 100 cc의 기관지 폐포 세척액내의 총 세포수와 이들 중 103 개의 세포에서 아포프토시스가 일어난 세포수를 Diff-Quik 염색법을 사용하여 세었다. 총 세포수와 아포프토시스가 일어난 세포수는 생리 식염수 대조군에 비하여 유리규산을 주입한 군에서 유의하게 높게 나왔다($p < 0.05$) (Table 1). 주입한 유리규산의 양이 많을수록 총 세포수와 아포프토시스가 발생한 세포수가 증가하는 경향을 보였다.

4. 흰쥐 폐포대식세포의 광학현미경 소견

Fig. 5는 흰쥐에게 유리규산을 40 mg/kg를 주입한 후 1주째에 기관지 폐포 세척술을 시행하여 얻은 폐포대식세포의 광학현미경 소견(x 1,000, oil immersion)이다. 화살표로 표시한 폐포대식세포에서 아포프토시스의 특징인 핵의 분절소견이 관찰되었다.

고 찰

세포의 사멸은 크게 형태학적으로 괴사에 의한 것과 아포프토시스에 의한 사멸현상으로 분류한다. 괴사는 세포팽창에 의한 형태학적 파괴를 특징으로 하는 병적 상태의 사멸현상으로 대개 염증성 반응과 수동적 사멸을 동반하는 반면 아포프토시스는 세포의 크기가 작아지고 핵이 응축되지만 세포막의 파괴를 동반하지 않는 생리적 자연사멸의 형태학적인 현



Fig. 5. Micrograph of alveolar macrophage showing nuclear fragmentation(arrow) ($\times 1,000$, oil immersion)

상이라고 알려져 있었다(Klaassen과 Gregus, 1996), 아포프토시스는 암 발생, 후천성 면역부전 증후군등의 바이러스 감염질환, 전신 루푸스 홍반증 등의 자가 면역질환, 재생불량성 빈혈 등의 혈액질환과 알츠하이머병 등의 신경 질환의 발생기전에도 관여하는 것으로 밝혀져 아포프토시스가 생리적 세포사멸현상뿐만 아니라 비생리적 혹은 병적 상태에서도 주로 나타나는 세포사멸현상이 보고되었다.(Solary 등, 1996). 괴사와 아포프토시스는 한 장기 내에서 동시에 나타나기도 하며 시간적 혹은 공간적 차이를 두고도 일어난다고 한다(Leist 등, 1998). 세포독성에 의하여 나타나는 괴사와 아포프토시스의 세포사멸현상이 각각 특이한 신호전달체계를 통하여 전달된다(Leist와 Nicitera, 1997). 아포프토시스에 대한 많은 연구결과가 있기 전까지 폐장에 유리규산이 흡입되어 나타나는 세포독성이 염증을 유발시켜 모두 세포에 괴사를 초래하는 것으로 이해되었다. Bleomycin, 석면, 농노도의 산소 등의 폐섬유화 유발물질을 폐포대식세포와 중피세포에 노출시켰을 때 아포프토시스가 관찰되었고 아포프토시

스 세포사멸현상도 폐장에서의 염증반응과 섬유화에 연관된 기전임이 발표되었다(Hamilton 등, 1996; Iyer 등, 1997; Leigh 등, 1997). 또한 폐섬유화성 물질로 인한 손상이 있을 때 폐포상피세포가 많은 기여를 한다는 것이 보고되었다(Uhal 등, 1995; Jyonouchi 등, 1998). 이에 본 연구는 유리규산의 노출에 의해 A549 세포에서 아포프토시스가 일어나는 지를 유세포 측정법과 전기영동법을 사용하여 관찰하였으며 흰쥐를 사용하여 노출시킨 유리규산 양과 아포프토시스 반응정도를 정량적으로 연구하였다. 본 연구에서는 괴사와 아포프토시스의 감별은 유세포 측정기를 이용하여 Annexin-V와 PI를 처리하여 이루어졌다. 그 원리는 세포에서 괴사가 일어나면 세포막이 파손되어 투과성이 증가되므로 PI가 핵에 부착되지만 건강한 세포와 아포프토시스 세포는 세포막이 보존되므로 PI는 부착되지 않는다. 또한 Annexin-V는 세포막 내부에 있는 phosphatidyl serine(PS)과 선택적으로 결합하는 물질로 아포프토시스가 일어나면 세포막내에 있던 PS가 세포막 외부로 노출되어 Annexin-V가 세포막에 부착되므로 아포프토시스의 발생여부를 간접적으로 알 수 있다(Fadok 등, 1992).

아포프토시스의 또 다른 특징인 DNA의 분절을 보고자 전기영동을 시행하였는데 아포프토시스에서 일반적으로 나타나는 50-300 bp 크기의 분절 즉 DNA ladder가 잘 관찰되었다(그림 4). 유리규산을 처리하지 않았거나 유리규산 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 을 처리한 A549 세포에서 DNA ladder가 보이지 않은 것은 저농도의 유리규산이 아포프토시스를 발생시키지 않은 것으로 해석되었다. 즉 유세포 측정법과 전기영동법의 결과에서 나타난 유리규산의 농도와 아포프토시스의 반응정도와의 양의 관계는 석면분진을 중피세포에 노출시켰을 때 석면분진이 높을수록 아포프토시스의 발생정도가 증가하였다는 Timblin 등(1998)의 실험결과와 일치하였다.

또한 흰쥐에서 유리규산을 기관지내 주입한 후 시행한 기관지 폐포세척술에서 얻은 세포 1,000 개당 아포프토시스가 일어난 세포를 조사한 결과 총세포수의 증가와 함께 유의한 상승을 보였다.

즉 유리규산을 처리한 A549 세포와 유리규산을 기관지내로 주입한 흰쥐에서의 아포프토시스의 발현은 유리규산에 의한 조직반응시 나타나는 병리기전중

한가지이며, 이는 유리규산에 의한 섬유화 및 발암성 전개에 관여할 수 있는 것으로 생각된다.

결론

폐장에서 유리규산에 노출되었을 때의 병리학적 변화 기전의 하나로 아포프토시스가 관련되는 지를 보고자 실험관 모델과 동물실험 모델의 실험을 실시하였다. 실험관 모델에서 유리규산을 폭로시킨 A549 세포를 사용하여 유세포 측정법과 DNA를 추출하여 전기영동을 하였다. 동물실험 모델로는 유리규산을 기도내로 주입한 흰쥐의 기관지 폐포 세척액에서 얻은 세포를 사용하였다.

각각의 실험결과는 다음과 같다.

1. 유세포 측정법에서 유리규산(10, 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$)을 폭로시킨 A549 세포에서 대조군보다 아포프토시스 발생이 유의하게 높았다.

2. 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 의 유리규산을 처리한 군에서 DNA ladder가 나타나지 않은 반면 10, 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 의 유리규산을 처리한 세포에서는 DNA ladder가 잘 관찰되었다.

3. 흰쥐의 기관지 폐포 세척액내의 총 세포수와 아포프토시스가 발생한 세포수는 유리규산(10, 20, 40 mg/kg)을 주입한 군에서 대조군보다 유의하게 증가하였다. 또한 현미경 관찰에서 아포프토시스의 전형적인 핵의 분절 소견을 관찰할 수 있었다.

이러한 결과들로서 폐포 상피세포와 폐포 대식세포에서 유리규산에 노출되었을 때 아포프토시스가 유발되고, 용량-반응 관계가 있음을 알 수 있었다. 향후 보다 다양한 원인물질과 기간을 사용하여 아포프토시스의 생리적·기능적인 차이를 밝히는 것과 발암과정의 연관성에 대한 신호전달계의 역할 연구가 필요할 것으로 생각된다.

인용문헌

- Banks DE, Parker JE. Quartz and silicosis. In : Banks DE, Parker JE. Occupational lung disease. London: Chapman & Hall medical 1998: 191-212.
- Brady AR. Production of cytokines by particle-exposed lung macrophages. In : Cellular and molecular aspects of fiber carcinogenesis. New

- York: Cold Spring Harbor Laboratory Press 1991.
- Eldadah BA, Yakovlev AG, Faden AI. A new approach for the electrophoretic detection of apoptosis. *Nucl Acid Resear* 1996;24:4092-4093.
- Fadok VA, Voelker DR, Camphell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers recognition and removal by macrophages. *J Immunol* 1992;148:2207-2216.
- Hamilton RF, Li L, Iyer R, Holian A. Asbestos induces apoptosis in human alveolar macrophages. *Lung Cell Mol Physiol* 1996;15:813-819.
- IARC(International Agency for Reseach on Cancer). IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. volume 68. London: IARC press, 1997.
- Iyer R, Holian A. Involvement of the ICE family of proteases in silica-induced apoptosis in human alveolar macrophages. *Am J Physiol* 1997;273:760-767.
- Jyonouchi H, Sun S, Abiru T, Chareancholvanich S, Ingbar DH. The effects of hyperoxic injury and antioxidant vitamins on death and proliferation of human small airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998;19:426-436.
- Klaassen CD. Toxicology. 5th ed. In : Gregus Z, Klaassen C, editors. Mechanisms of toxicity. New York: McGraw-Hill, 1996:35-74.
- Leigh J, Wang H, Bonin A, Peters M, Rean X. Silica induced apoptosis in alveolar and granulomatosse cell in vivo. *Env Health Persp* 1997;105(supp5): 1241-1245.
- Leist M, Kuhnle S, Single B, Nicotera P. Differential between apoptotic and necrotic cell death by means of the BH cell death detection ELISA or annexin V staining. *Biochemica* 1998;2:25-28.
- Leist M, Nicotera P. In shape of cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;236:1-9.
- Nagaoka T, Tabata M, Kobayashi K, Okada A. Studies on production of anticollagen antibodies in silicosis. *Environ Res* 1993;60(1):12-29.
- Rom WN. Relationship of inflammatory cell cytokines to disease severity in individual with occupational inorganic dust exposure. *Am J Ind Med* 1991;19: 15-17.
- Saffiotti U, Daniel LN, Mao Y, Shi X, William AO, Kaighn ME. Mechanisms of carcinogenesis by crystalline silica in relation to radicals. *Env Health Persp* 1994;102(supp10):159-163.
- Solary E, Dubrez L, Eymin B. The role of apoptosis in the pathogenesis and treatment of diseases. *Eur Respir J* 1996;9:1293-1305.
- Timblin CR, Guthrie GD, Janssen YW, Walsh ES, Vacek P, Mossman BT. Patterns of c-fos and c-jun proto-oncogene expression, apoptosis, and proliferation in rat pleural mesothelial cells exposed to erionite or asbestos fibers. *Toxicol Appl Phamacol* 1998;151:88-97.
- Uhal PD, Joshi I, True A, Mundle S, Raza A, Pardo A, Selman M. Fibroblasts isolated after fibrotic lung injury induce apoptosis of alveolar epithelial cells in vitro. *Am J physiol* 1995;13: 819-828.
- Witschi H. Responses of the lung to toxic injury. *Env Health Persp* 1990;85:5-13.