

인간 간세포주 에서 포름알데히드에 의한 세포 사멸 효과

박수현*

전남대학교 수의과대학 바이오치료 산업인력 양성팀, 동물의학 연구소
(2009년 12월 9일 접수, 2009년 12월 26일 수리)

Apoptotic effect of formaldehyde in cultured human hepatocyte cell lines

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)

ABSTRACT: Exposure of formaldehyde (FA), one of the major compounds in pesticides and in the onset of sick house syndrome, has been implicated in the development of diverse diseases. Liver is a very important organ to body metabolism and drug detoxification. Apoptosis of hepatocytes is associated with the onset of liver diseases such as hepatitis. However, the apoptotic effect of FA in hepatocytes is not clear. Therefore, this study was conducted to investigate the effect of FA on the apoptosis in HepG2 cells, a human hepatocyte cell line. As a result, FA (>500 μ M) decreased cell viability and increased lactate dehydrogenase activity in HepG2 cells, which was blocked by the treatment of vitamin E and N-acetylcysteine (NAC). In addition, FA decreased glutathione (GSH) contents and Bcl-2 levels, while increasing lipid peroxide formation and Bax levels. It also cleaved caspase-3 form, which was blocked by the treatment of vitamin E and NAC. It is insisted that FA induced apoptosis via oxidative stress in human hepatocytes.

Key Words: Apoptosis, Formaldehyde, Human hepatocytes, Oxidative stress

서 론

포름알데히드는 무색투명한 액체로 심한 자극성으로 소독제, 살균제, 방충제, 살충제 등의 용도로 사용 된다¹⁾. 최근에는 단열재나 섬유유감, 실내가구인 장농, 싱크대, 바닥재 난방연료의 연소과정, 흡연, 생활용품 등에서 발생하며 새집 증후군의 주범으로 지목됨으로써 관심이 높아지고 있다^{2,3)}. 이러한 FA는 주 오염 경로는 호흡기로써 상부기도 염증 및 폐암을 유발하는 것으로 알려져 있다^{4,5)}.

간은 단백질 생산, 물질 대사, 독소제거 등을 관장하는 중요한 기관으로 생명유지에 필수적인 장기이다⁶⁾. 간은 혈액의 흐름이 매우 풍부한 기관으로 혈류를 통한 독성 물질의 침투도 용이하게 일어날 수 있다. 따라서 포름알데히드의 간세포에서의 독성과 그 기전을 이해하는 것은 인체 건강유지에 있

어서 중요한 역할을 할 것으로 판단이 된다.

지질 과산화물, H₂O₂ 등의 생성을 억제하는 항산화 물질은 superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) 등의 효소 계열과 vitamin C 및 vitamin E 등의 비효소 계열로 나눌 수 있다. 간에서 일어나는 산화적 스트레스가 항산화계의 수준을 초과하여 제거되지 못하면 DNA 변형과 기능 상실에 의하여 퇴행성 질환이 유도되어 다양한 간질환을 유발시키는 것으로 보고되고 있다⁷⁾. 그러나 지금까지 FA에 대한 산화성 스트레스 및 간세포 사멸에 대한 상관관계 연구는 극히 미약한 실정에 있다.

간세포의 사멸에는 미토콘드리아의 세포 사멸 억제 단백질인 Bcl-2 및 세포 사멸 촉진 단백질인 Bax 등의 단백질이 관여 하는 것으로 보고되고 있다⁸⁾. 세포내의 cysteine 단백질 분해 효소인 caspases 는 간세포 사멸에 중요한 실행자 역할을 수행하며, 여러 caspase 중 caspase -3는 세포 자기 사멸의 중요한 실행 단백질이다⁹⁾. 그럼에도 불구하고 FA에 의한 이들 단백질들의 조절 기전은 아직까지 알려져 있지 않고 있다. 따라서 본 실험에서는 사람 간세포주를 이용하여 새집증

*연락처:

Tel: +82-62-530-2832 Fax: +82-62-530-2809
E-mail: parksh@chonnam.ac.kr

후군의 후보물질인 FA가 간세포 사멸에 미치는 효과와 이와 관련된 신호전달계중 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.

HepG2 간세포 배양

HepG2세포는 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

FA의 간세포 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 FA를 처리하여 24시간 배양하였다. 반응 후 well 바닥에 형성된 formazan이 흡수되지 않게 상등액을 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

FA의 간세포 사멸 효과를 측정하기 위하여 LDH 방출측정 kit를 이용하여 실시하였다. HepG2 세포주를 1×10^5 cells/mL로 맞춘 후, 100 μ L씩 96 well plate에 분주하여 CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 그 후, FA를 처리하여 24시간 배양하였다. 배양액을 새로운 96-well plate에 50 μ L 분주하고 LDH reagent를 50 μ L 첨가하여 반응시킨 후, 반응이 완료되면 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 첨가 하여 반응 시킨다. 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.

Glutathione(GSH)의 측정

단백질의 thiol group은 Albano 등¹⁰⁾의 방법에 의거 Ellman 시약을 이용하여 측정하였다. 세포를 수확한 후에 원심분리를 한 후 PBS로 세척하였다. 세포 pellet은 5% trichloroacetic acid 및 5 mM의 EDTA가 들어 있는 용액으로 처리하여 단백질을 침전시켰다. 이 후 같은 용액으로 두 번 세척하였다. 침전된 단백질은 5 mM EDTA 및 0.5% SDS가 함유되어 있는 0.1 M Tris-HCl 완충액으로 다시 녹였다. 이 후 이 용액을 Ellman 시약과 반응시켰다. 수치는 glutathione을 표준으로 잡아서 SH 당량을 nmole로 표시하였다.

Western immunoblotting

배지를 제거한 HepG2세포를 phosphate buffered saline (PBS)로 2번씩 세척한 후, 각기 150 μ L의 lysis buffer (10 \times 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 균질화를 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 차단을 시켰고, 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-20/1 \times 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.

결 과

FA의 간세포 사멸 효과

간세포 사멸에 대한 FA의 농도별 효과를 알아보기 위하여, FA를 농도별(0 - 1 mM)로 처리한 MTT assay를 실시하였다. 실험 결과 Fig. 1A에서 보이듯이 100 μ M FA 처리 시에는 세포 생존률에는 영향을 미치지 않았지만 500 μ M 이상에서 간세포 사멸을 유발하는 것으로 나타났으며 1 mM 이상에서 이러한 현상은 더욱 현저하게 나타났다. 이러한 결과는 세포 손상의 또 다른 지표인 LDH assay에서도 같은 양상을 볼 수 있었다 (Fig. 1B).

FA에 의한 간세포 사멸 효과에 대한 산화성 스트레스 관련성

산화성 스트레스와의 관련성을 알아보기 위하여 lipid peroxide (LPO) 형성을 측정하였다. FA는 산화성 스트레스를 증가시켰으며 이러한 작용은 항산화제인 vitamin E (1 mM) 및 NAC (100 μ M)에 의해 차단되는 것으로 나타났다 (Fig. 2A). 이러한 결과는 세포 생존율에서도 비슷한 경향을 나타내었다

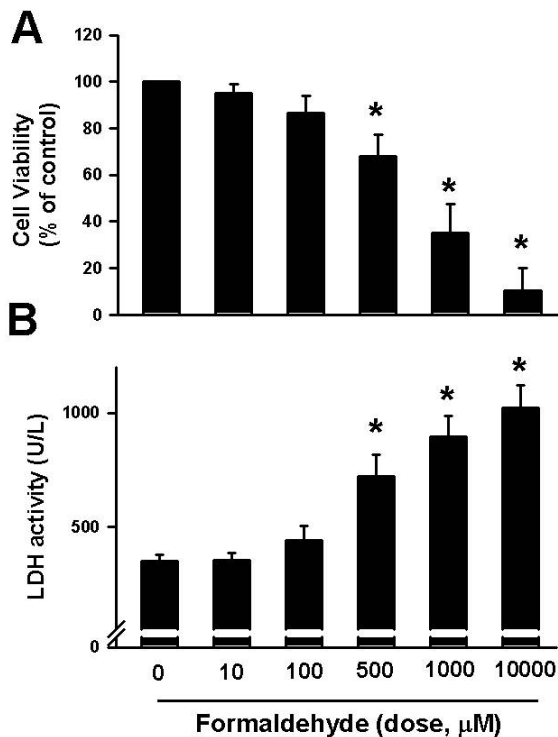


Fig. 1. Dose-dependent effect of formaldehyde on cell viability (A) and lactate dehydrogenase (LDH) activity (B) in cultured HepG2 cells. HepG2 cells were incubated with different dosage of formaldehyde (0 to 1 mM) for 24 hr. Then MTT assay and LDH assay were conducted as described in 'Material & Method'. Values are means \pm S.E. of 9 separate experiments performed on 3 different cultures. * P < 0.05 vs. control.

(Fig. 2B). FA 처리시 GSH 함량은 현저하게 감소하는 것으로 나타났다 (Fig. 2C). FA 처리시 세포 사멸 촉진 단백질인 Bax 단백질 발현은 대조군에 비해 증가하였으나, Bcl-2 단백질 발현은 대조군에 비해 감소하였다. 이러한 작용은 vitamin E 및 NAC에 의해 차단되는 것으로 나타났다 (Fig. 3). Caspase-3 활성화 역시 FA 처리시 증가하였으며 vitamin E 및 NAC 전 처리시 현저하게 억제 되었다 (Fig. 3).

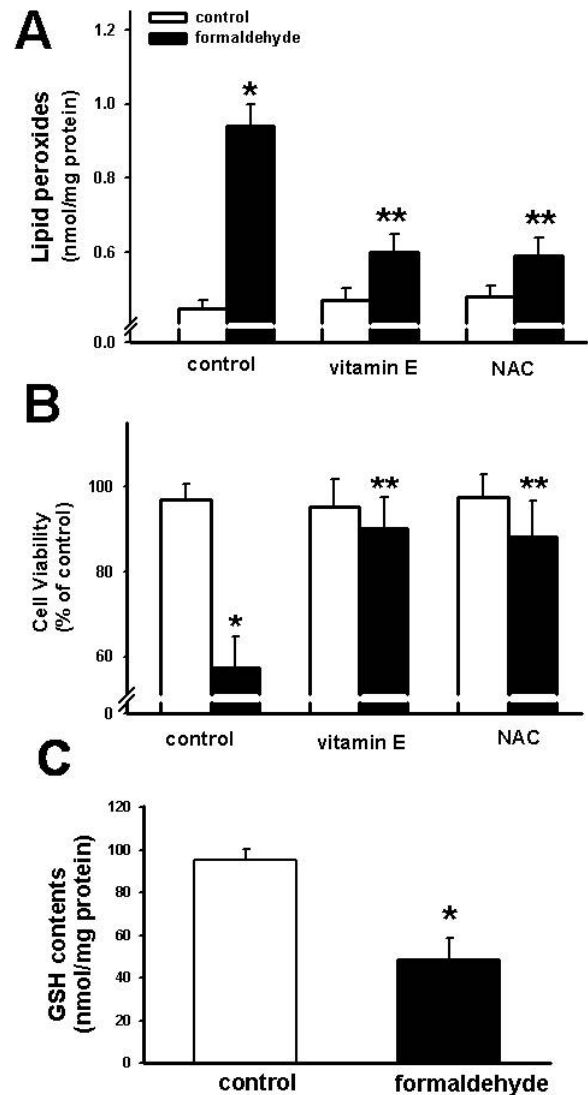


Fig. 2. Effect of antioxidants on formaldehyde-induced increase of lipid peroxide formation (A) and decrease of cell viability (B) and GSH contents (C) in cultured HepG2 cells. HepG2 cells were incubated with vitamin E (1 mM) or NAC (100 μ M) for 30 min prior to the treatment of formaldehyde (500 μ M) for 24 hr. Then lipid peroxide formation, MTT assay, and GSH contents was examined 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. formaldehyde alone.

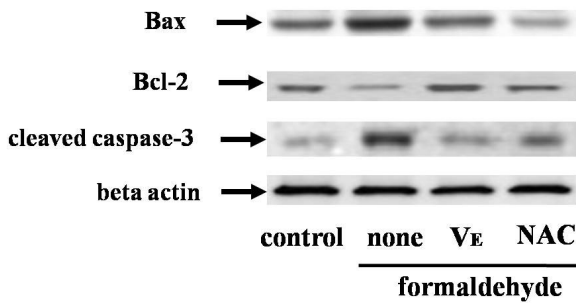


Fig. 3. Effect of antioxidants on formaldehyde-induced alteration of Bcl-2, Bax and caspase-3 in cultured HepG2 cells. HepG2 cells were incubated with vitamin E (1 mM) or NAC (100 μ M) for 30 min prior to the treatment of formaldehyde (500 μ M) for 24 hr. Then western immunoblotting was conducted as described in 'Material & Method'. β actin was used as a control. The example shown is a representative of three experiments.

고 찰

FA는 새집 증후군 발병 및 농약 성분의 하나로 환경에 노출시 호흡기 질환과 관련하여 기도 염증 및 세포 사멸을 일으키는 것으로 알려져 있다¹¹). 그러나 최근 간세포에서도 이들의 역할이 필요할 것으로 보고되고 있다. 실험에서도 FA 농도 500 μ M 이상에서 간세포 사멸이 인정이 되었다. 이러한 결과는 세포는 다르지만 본 연구진의 보고에 의한 포름알데히드 처리시 폐 세포에서 세포 사멸을 유도한다는 결과와 일치하였다¹²). 농도면에서는 폐 세포에서는 100 μ M 이상에서 세포 사멸이 야기되었다. 이는 간세포의 농도가 상대적으로 높음을 알 수 있는데 이는 FA가 간세포에서는 다양한 대사 효소 및 물질들의 존재로 쉽게 대사가 이루어 질 수 있는 것을 시사해주고 있다. 그럼에도 불구하고 본 연구에서는 포름알데히드에 의해서도 간세포의 독성이 인정된다고 할 수 있다.

LPO 형성은 식이성 불포화 지방산의 주된 과산화 생성물 형태로서 지질 과산화물의 지표로 널리 이용되고 있다. GSH (Glutathione)는 hydrogen peroxidase를 H₂O로 환원시켜서 산화성 스트레스에 대하여 세포를 보호하는 내인성 효소이다¹³). 본 실험에서 FA 처리시 산화성 스트레스는 증가를 하였으며, GSH 수치는 감소하였다. 본 연구결과는 Teng 등¹⁴)에 의해서 보고된 분리된 쥐 간세포에 포름알데히드 처리시 산화성 스트레스의 증가가 유도되었으며 GSH수치의 감소가 야기되었다는 보고와 일맥상통 하였다. 본 실험결과는 사람의 간세포에서도 같은 양상을 나타낸다고 할 수 있다. 포름알데히드는 GSH-의존성 formaldehyde dehydrogenase에 의해서 신속히 대사가 된다¹⁵). NAC은 메탄올의 산화에 기인한 포름알데히드에 의해 감소된 GSH 함량을 회복시키는 기능(Skrzydewska와 Farbiszewski¹⁶)이 있다고 하여 본 연구결과를 뒷받침 해주고 있다. 또한 본 연구결과를

vitamin E를 처리 하였을 때 FA에 의한 랫트의 간 및 혈장에서 산화성 스트레스 증가를 완화하였다는 보고(Gulec M 등¹⁷)와 일치하였다. 이러한 연구결과는 산화성 스트레스가 간세포의 자연사 (apoptosis)와 연결될 수 있다는 것을 제시해 주고 있다.

간세포 사멸에는 Bax 및 Bcl-2 등의 다양한 미토콘드리아와 관련이 있는 단백질들이 관여 한다¹⁸). 특히 Bax는 세포 사멸사를 촉진하고 Bcl-2는 세포 사멸사를 억제하는 것으로 알려져 있다¹⁹). 본 실험에서도 포름알데히드 처리 시 간세포 사멸 억제를 담당하는 Bcl-2의 발현은 감소하였고, 세포사멸 촉진을 담당하는 Bax의 발현이 증가하여 Bax/Bcl-2의 비율은 증가하였다. 포름알데히드에 노출된 폐 조직에서는 사멸사 유전자들의 발현이 증가하였다고 보고되었다²⁰). 그렇지만 포름알데히드에 의한 간세포의 사멸사 연구는 거의 수행되지 않았다. 이 연구 결과는 간세포에서 포름알데히드에 의한 사멸사 연구에 관한 첫 보고일 것이다. 이에 대한 임상 실험은 향후 연구에서 더 구체적으로 밝혀져야 할 것이다.

본 실험에서는 FA에 의한 산화성 스트레스 발생이 세포 사멸 억제 단백질인 Bcl-2 발현 및 Bax 활성화에 직접적으로 미치는 영향을 조사하지 않았지만 포름알데히드에 의한 Bax, Bcl-2 발현 및 caspase-3의 활성화 증가 작용이 항산화제인 vitamin E 및 NAC에 의해서 차단되는 것으로 보아 이들의 활성이 Bcl-2를 억제하고 세포 사멸 촉진 단백질인 Bax 활성을 증가 할 것으로 추측된다. 이러한 결과는 산화성 스트레스가 Bax, Bcl-2 발현 및 caspase-3 발현을 조절함으로써 세포 사멸에 깊숙이 관여하는 것으로 판단된다.

본 실험에서는 NAC 및 Vitamin E 처리 시 FA에 의한 Bcl-2 억제 및 Bax 증가 및 caspase-3의 증가가 차단되었다. 이는 FA에 의한 산화성 스트레스 유발이 세포 사멸 촉진 단백질인 Bax 활성을 증가시키고 Bcl-2 단백질 발현을 억제하는 것으로 추측된다. San-Miguel 등²¹)은 NAC은 간염에 의한 간세포의 사멸사를 억제하였다고 하였다. 이는 FA에 의한 자극뿐만 아니라 다양한 간 손상 억제에 NAC이 관여하고 있음을 말해 주고 있다. 이러한 결과는 FA에 의한 산화성 스트레스의 발생이 세포 사멸에 관여되는 다양한 단백질 조절을 유도함으로써 작용한다고 할 수 있다. 이상의 연구결과들을 종합해보면 FA 처리 시 산화성 스트레스 증가가 발생하며 Bcl-2 발현 감소, Bax 발현 증가 및 caspase-3 유도를 통해 간세포 사멸을 유도하는 것으로 관찰되었다. 이러한 변화에 따른 간세포의 세포 사멸에 따라 생체내의 내인성 항산화 효소 기전이 약화되어 다양한 간 관련 질병이 유도되는 것으로 사료된다. 포름알데히드에 의한 간세포 손상에 의한 간세포의 사멸사를 억제하는 것은 이차적으로 간 섬유화를 억제하여 궁극적으로 간경변정을 예방하게 될 수 있으므로 포름알데히드의 노출을 줄일 수 있는 물질들의 개발이 새집 증후군 또는 농약 사용 등을 약화시킬 수 있는 하나의 대안으로 평가될 수 있다고 판단이 된다.

요 약

포름알데히드는 새집 증후군 유발 및 농약 노출 시에 나타나는 중요한 물질로 호흡기에 대한 효과는 많이 알려져 있지만 간세포에서의 세포 자멸사에 대한 연구는 전혀 알려져 있지 않고 있다. 그래서 사람 간세포주인 HepG2 세포를 이용하여 포름알데히드에 의한 세포 자멸사 연구를 실시하였다. 실험 결과 포름알데히드는 세포 생존율을 감소 시켰으며, 이러한 반응은 항산화제인 vitamin E 및 NAC 처리시 차단되었다. 실제로 포름알데히드 처리시 산화성 스트레스 지표인 lipid peroxide 형성이 증가하였으며 내인성 항산화제인 GSH 함량이 감소하였다. 한편 포름알데히드 처리시 세포 사멸 촉진 단백질인 Bax 발현은 증가하였으며 세포 사멸 억제 단백질인 Bcl-2의 발현은 억제 되었으며 이러한 반응은 항산화제 (Vitamin E 및 NAC) 처리시 차단되었다. 세포사멸 실험 단백질인 caspase-3의 활성형 역시 증가하였으며, 항산화제 처리시 차단되었다. 따라서 포름알데히드는 사람 간세포에서 산화성 스트레스 증가를 통해 세포 자멸사를 일으키는 것으로 나타났다.

감사의 글

이 논문은 2009년 교육과학기술부로부터 지원받아 수행된 연구이며 2009년 바이오하우징연구소의 지원을 받아 수행된 연구입니다. 이에 깊이 감사드립니다.

참고문헌

1. Bagchi, D., Bagchi, M., Hassoun, E.A. and Stohs, S. J. (1993) Detection of paraquat-induced in vivo lipid peroxidation by gas chromatography/mass spectrometry and high-pressure liquid chromatography. *J. Anal. Toxicol.* 17, 411-414.
2. Kita, T., Fujimura, M., Myou, S., Ishiura, Y., Abo, M., Katayama, N., Nishitsuji, M., Yoshimi, Y., Nomura, S., Oribe, Y. and Nakao, S. (2003) Potentiation of allergic bronchoconstriction by repeated exposure to formaldehyde in guinea-pigs in vivo. *Clin Exp Allergy* 33, 1747-1753.
3. Nakazawa, H., Ikeda, H., Yamashita, T., Hara, I., Kumai, Y., Endo, G. and Endo, Y. (2005) A case of sick building syndrome in a Japanese office worker. *Ind Health.* 43, 341-345.
4. Callas, P.W., Pastides, H., and Hosmer, D. W. Jr. (1996) Lung cancer mortality among workers in formaldehyde industries. *J Occup Environ Med.* 38: 747-748.
5. Collins, J.J., Acquavella, J.F. and Esmen, N.A. (1997) An updated meta-analysis of formaldehyde exposure and upper respiratory tract cancers. *J Occup Environ Med.* 39, 639-651.
6. Kaplowitz, N. (2002) Biochemical and cellular mechanisms of toxic liver injury. *Semin Liver Dis.* 22, 137-144.
7. Webb, C. and Twedt, D. (2008) Oxidative stress and liver disease. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 38, 125-135.
8. Ghavami, S., Hashemi, M., Kадkhoda, K., Alavian, S. M., Bay, G. H. and Los, M. (2005) Apoptosis in liver diseases-detection and therapeutic applications. *Med Sci Monit.* 11(11), RA337-RA345.
9. Faubel, S. and Edelstein, C. L. (2005) Caspases as drug targets in ischemic organ injury. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord.* 5(3), 269-287.
10. Albano, E., Rundgren, M., Harvison, P.J., Nelson, S.D. and Moldeus, P. (1985) Mechanisms of N-acetyl-p-benzoquinone imine cytotoxicity. *Mol. Pharmacol.* 28, 306-311.
11. Fujimaki, H., Kurokawa, Y., Kunugita, N., Kikuchi, M., Sato, F. and Arashidani, K. (2004) Differential immunogenic and neurogenic inflammatory responses in an allergic mouse model exposed to low levels of formaldehyde. *Toxicology.* 197, 1-13.
12. Park, S. H. (2009) Involvement of oxidative stress in formaldehyde-induced apoptosis in cultured lung macrophage cells. *Kor. J. of Environ. Agri.* 28, 295-300.
13. Meister, A. (1991) Glutathione deficiency produced by inhibition of its synthesis, and its reversal; applications in research and therapy. *Pharmacol Ther.* 51, 155-194.
14. Teng, S., Beard, K., Pourahmad, J., Moridani, M., Easson, E., Poon, R. and O'Brien, P. J. (2001) The formaldehyde metabolic detoxification enzyme systems and molecular cytotoxic mechanism in isolated rat hepatocytes. *Chem Biol Interact.* 130-132: 285-296.
15. Koivusalo, M. and Uotila, L. (1993) Glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase/class III alcohol dehydrogenase: further characterization of the rat liver enzyme. *Adv Exp Med Biol.* 328, 465-474.
16. Skrzydlewska, E. and Farbiszewski, R. (1999) Protective effect of N-acetylcysteine on reduced glutathione, reduced glutathione-related enzymes and lipid peroxidation in methanol intoxication. *Drug Alcohol Depend.* 57, 61-67.
17. Gulec, M., Gurel, A. and Armutcu, F. (2006) Vitamin E protects against oxidative damage caused by

-
- formaldehyde in the liver and plasma of rats. *Mol Cell Biochem.* 290, 61-67.
18. Guha, M., Kumar, S., Choubey, V., Maity, P. and Bandyopadhyay, U. (2006) Apoptosis in liver during malaria: role of oxidative stress and implication of mitochondrial pathway. *FASEB J.* 20, 1224-1226.
19. Tong, Q. S., Zheng, L. D., Tang, S. T., Jiang, G. S., Ruan, Q. L., Zeng, F. Q. and Dong, J. H. (2007) Nitrofen suppresses cell proliferation and promotes mitochondria-mediated apoptosis in type II pneumocytes. *Acta Pharmacol Sin.* 28, 672-684.
20. Sul, D., Kim, H., Oh, E., Phark, S., Cho, E., Choi, S., Kang, H. S., Kim, E. M., Hwang, K. W. and Jung, W. W. (2007) Gene expression profiling in lung tissues from rats exposed to formaldehyde. *Arch Toxicol.* 81, 589-597.
21. San-Miguel, B., Alvarez, M., Culebras, J.M., Gonzalez-Gallego, J. and Tunon, M. J. (2006) N-acetyl-cysteine protects liver from apoptotic death in an animal model of fulminant hepatic failure. *Apoptosis.* 11, 1945-1957.
-