

Palmitic acid에 의한 간세포 사멸효과에 대한 p38 MAPK 및 JNK 관련성

배춘식 · 박수현*

전남대학교 수의과대학

Received April 27, 2009 / Accepted May 26, 2009

The Involvement of p38 MAPK and JNK Activation in Palmitic Acid-Induced Apoptosis in Rat Hepatocytes. Chun-Sik Bae and Soo-Hyun Park*. *Bio-therapy Human Resources Center, Animal Medical Institute, College of Veterinary Medicine, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea* - Hyperlipidemia has been reported to be associated with the development of fatty liver. Palmitic acid, a major saturated fatty acid, is involved in the development of diverse diseases. The activation of mitogen activated protein kinases (MAPKs), such as Jun N-terminal kinase (JNKs) and p38 MAPK, is implicated in the apoptosis in diverse cells. Thus, this study was conducted to investigate the effects of palmitic acid on apoptosis and its relationship between JNK and p38 MAPK in cultured rat hepatocytes. In the present study, palmitic acid (>50 μ M) decreased cell proliferation and increased lactate dehydrogenase activity in hepatocytes, which was blocked by the treatment of SP600125 (a JNK inhibitor) and SB203580 (a p38 MAPK inhibitor). Indeed, palmitic acid decreased Bcl-2 expression but increased Bax expression in rat hepatocytes, which was blocked by the treatment of SP600125 and SB203580. In addition, palmitic acid decreased glutathione (GSH) content and increased lipid peroxide formation, which was blocked by the treatment of SP600125 and SB203580. Western immunoblotting analysis also revealed that palmitic acid increased JNK and p38 MAPK. In conclusion, palmitic acid induced apoptosis through oxidative stress via JNK and p38 MAPK activation in rat hepatocytes.

Key words : Hepatocyte, palmitic acid, apoptosis, JNK, p38 MAPK, oxidative stress

서 론

간은 당, 단백질, 지방등의 물질 대사의 중심으로 체내에 들어온 생체 외물질 및 독성 물질들을 산화, 환원, 가수 분해 및 포합 반응을 통해 배설하는 장기이다. 이러한 간장에 중성 지방이 축적되는 것을 지방간이라고 한다. 지방간 질환 중 비알콜성 지방간 질환은 알코올 섭취력은 거의 없지만 알코올성 지방간과 유사한 간에서 지방대사의 장애로 인해 중성지방이 간에 축적되는 상태로, 최근 여러 연구를 통하여 비만, 당뇨병, 고혈압, 지질대사이상 등을 포함하는 대사증후군과 관련이 있음이 입증되었고, 그 중에서도 비만이 중요한 원인 인자로 알려져 있다[9,16,19,21]. 비만의 여러 가지 원인 중에서 간의 지방산 노출이 직·간접적인 원인으로 보고되고 있으며 간의 지방산의 축적이 많이 되는 경우 간의 섬유소화를 야기하고 나아가 비가역적인 간경화로 진행이 될 수도 있는 것으로 알려지고 있으며 이에 대한 주요한 원인은 지방산에 의한 산화성 스트레스 증가 및 간세포 사멸로 추측되고 있는 실정이다[1,6]. 지방산은 크게 포화 지방산과 불포화 지방산으로 분류되며, 특히 포화 지방산이 지방간 발병에 중요한 역할을 담당하는 것으로 보고되고 있다[13].

간세포의 손상 및 사멸과정에는 다양한 신호전달계가 관여

한다. Mitogen activated protein kinases (MAPKs)는 일반적으로 p44/42 MAPK, p38 MAPK 및 Jun N-terminal kinase (JNK) 등으로 나누어지며 이들 중 간세포의 세포사멸에는 p38 MAPK 및 JNK 등이 주요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있다[17,24]. 이러한 보고들은 p38 MAPK 및 JNK 등의 활성이 포화 지방산에 의한 간세포의 작용기전에 관여 할 수 있음을 말해 주고 있다. 한편 인체 내의 다양한 경로에 의해 유발되는 산화적 스트레스는 생체 안에 존재하는 항산화계에 의해 제거되지만 산화적 스트레스가 항산화계의 수준을 초과하여 제거되지 못하면 DNA 변형과 기능상실에 의하여 퇴행성 질환이 유도되는데 간세포에서도 지방간의 발병에 관여할 수 있음을 시사해 주고 있다. 그러나 지금까지 palmitic acid에 대한 MAPK 활성 및 산화성 스트레스에 대한 상관관계 연구는 극히 미약한 실정에 있다. 따라서 본 실험에서는 쥐 간세포를 초대배양하여 포화 지방산인 palmitic acid가 간세포의 세포사멸에 미치는 효과와 이와 관련된 신호전달계중 p38 MAPK 및 JNK와의 관련성 및 나아가 산화성 스트레스와의 관련성에 대해 알아보았다.

재료 및 방법

재료

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (D-MEM)/Ham's nutrient mixture F-12 (D-MEM/F-12)와 Class IV collagenase

*Corresponding author

Tel : +82-62-530-2832, Fax : +82-62-530-2809

E-mail : parksh@chonnam.ac.kr

은 Life Technologies (Grand Island, NY, USA)로부터 구입하였다. Palmitic acid, penicillin, streptomycin 및 acrylamide는 Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. PD98059, SB203580 및 SP600125는 Calbiochem (La Jolla, CA, USA)에서 구입하였다. JNK, p38 MAPK, Bcl-2, Bax 및 beta actin 항체는 Cell Signaling technology (Herts, UK)에서 구입하였다. 그 외 실험에 이용된 모든 시약들은 고품질의 시약을 사용하였다.

간세포 배양

H4IIE 세포는 랫트의 간세포주로 ATCC회사에서 구입하였다. 이들 세포들은 5% FBS를 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

간세포를 96-well plate에 1×10^5 cells/ml의 농도로 100 μ l씩 분주하여 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 길항제를 이용한 실험의 경우 먼저 길항제들을 처리하였다. 그리고 30분 후에 palmitic acid를 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.

Western immunoblotting

배지를 제거한 간세포를 PBS로 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 원심분리하여 상층액을 새로운 tube에 저장하였다. Bradford 단백질 정량법[7]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, p38 MAPK, phospho-JNK, 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 Chemiluminescent (ECL) 시약을 1분간 처리한 다음 X-ray 필름에 30초간 노출시켜 현상하였다.

Lipid peroxide formation

간세포에서 LPO 형성은 Ohkawa 등[20]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 4,000 \times g에서 10분간 원심분리하여 상층액을 수합하였다. 이 시료를 spectrofluometry (emission 파장 553 nm, excitation 파장 515 nm)로 측정하여 nmol/mg protein으로 표시하였다.

Lactate dehydrogenase (LDH) 측정

세포 손상은 LDH 활성으로 측정하였다. 배지에서의 LDH 활성은 LDH assay kit를 이용하여 측정하였으며, LDH 활성은 Wroblewski 단위로 표시하였다.

Glutathione (GSH)의 측정

단백질의 thiol group은 Albano 등[2]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.

통계처리

실험결과의 통계적 처리는 Student's t-test 및 Analysis of Variance (ANOVA)로 하였으며, P -value<0.05를 유의한 차이의 한계로 하였고, 실험결과의 표현은 means \pm SE로 하였다.

결 과

간세포의 세포 생존율 및 LDH assay에 대한 palmitic acid의 효과

간세포 사멸에 대한 palmitic acid의 효과를 알아보기 위하여, palmitic acid를 농도별(0-500 μ M)로 처리 후 MTT assay를 실시하였다. 실험결과 Fig. 1A에서와 같이 palmitic acid를 50 μ M 이상 처리 시 세포 생존율은 감소하였다. 아울러 세포 손상 지표 효소인 LDH를 분석한 결과에서도 palmitic acid를 50 μ M 이상 처리 시 유의성 있게 증가하였다. 따라서 본 실험에서는 아치사 농도인 palmitic acid 100 μ M을 24시간 처리하였다.

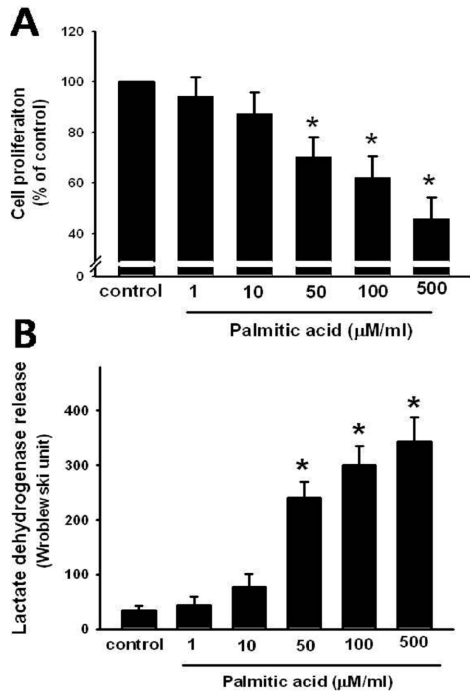


Fig. 1. Dose-dependent effect of palmitic acid on cell viability (A) and lactate dehydrogenase (LDH) activity (B) in rat hepatocytes (A). Rat hepatocytes were incubated with different dosage of palmitic acid (0 to 500 μ M) for 24 hr. Then MTT assay and LDH activity were conducted as described in 'Material & Method'. Values are means \pm S.E. of 9 separate experiments performed on 3 different cultures. * $p < 0.05$ vs. control.

Palmitic acid에 의한 간세포 사멸 효과에 대한 p38 MAPK 및 JNK 활성화의 관련성

Palmitic acid에 의한 간세포 사멸 과정에 p38 MAPK 및 JNK 활성이 관여하는지를 알아보기 위하여 palmitic acid 처리 30 분전에 p38 MAPK 억제제인 SB203580 및 JNK 억제제인 SP600125를 처리하였다. Fig. 2에서 보이듯이 palmitic acid 처리시 증가되었던 간세포 사멸 및 LDH activity는 SB203580 및 SP600125 처리에 의해 선택적으로 차단되는 것으로 나타났다. 세포 사멸 억제 단백질인 Bcl-2는 감소하였고 Bax는 증가를 하였으며 이러한 작용은 SB203580 및 SP600125 처리에 의해 선택적으로 차단되는 것으로 나타났다(Fig. 3).

산화성 스트레스와의 관련성을 알아보기 위하여 산화성 스트레스 지표인 lipid peroxide 를 측정 한 결과 palmitic acid 처리 시 현저하게 증가하였으며 이러한 작용은 SB203580 및 SP600125 처리에 의해 선택적으로 차단되었으나 PD98059에 의해서는 차단되지 않는 것으로 나타났다. GSH 함량을 측정 한 결과 palmitic acid 처리군에서 감소되었으며 이러한 작용은 SB203580 및 SP600125 처리에 의해 선택적으로 차단되었으나 PD98059에 의해서는 차단되지 않는 것으로 나타났다(Fig. 4).

실제로 palmitic acid를 처리 시 p38 MAPK 및 JNK 활성이

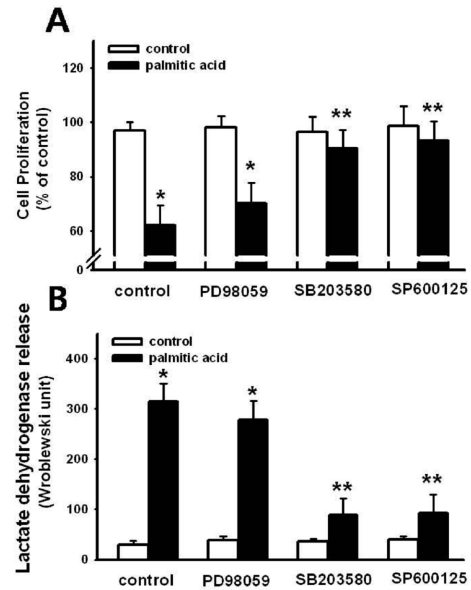


Fig. 2. Effect of SB203580 and SP600125 on palmitic acid-induced cell viability (A) and lactate dehydrogenase activity (B). Rat hepatocytes were incubated with PD 98059 (p44/42 MAPK inhibitor), SB203580 (a p38 MAPK inhibitor) or SP600125 (a JNK inhibitor, 10^{-6} M, respectively) for 30 min prior to the treatment of palmitic acid (100 μ M) for 24 hr. Then MTT assay and LDH activity were conducted as described in 'Material & Method'.

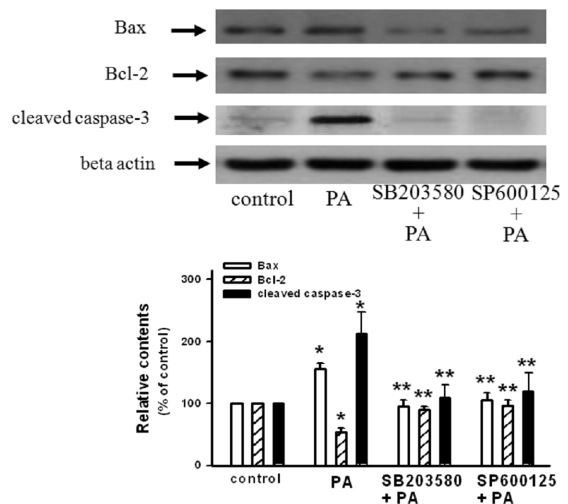


Fig. 3. Effect of SB203580 and SP600125 on palmitic acid-induced alteration of Bax, Bcl-2, and cleaved caspase-3 protein expression. Rat hepatocytes were incubated with SB203580 (a p38 MAPK inhibitor) or SP600125 (a JNK inhibitor, 10^{-6} M, respectively) for 30 min prior to the treatment of palmitic acid (100 μ M) for 24 hr. Then western immunoblotting was conducted, as described in 'Material & Method'. Lower panel depicts the values of relative contents compared to control. Values are means \pm S.E. of 3 different experiments. * $p < 0.05$ vs. control, ** $p < 0.05$ vs. palmitic acid alone.

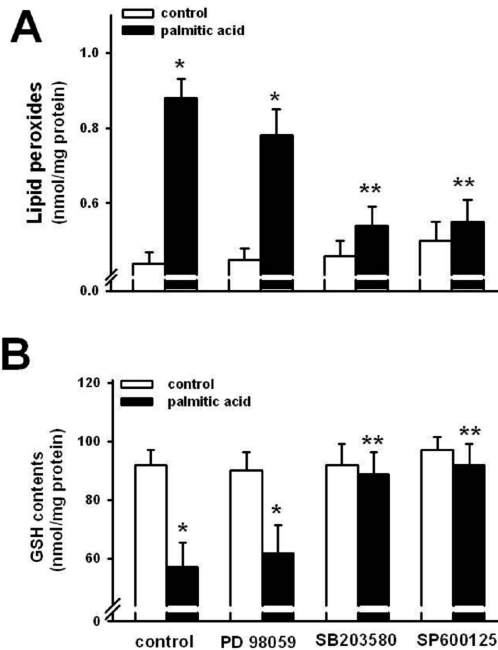


Fig. 4. Effect of SB203580 and SP600125 on palmitic acid-induced lipid peroxide formation (A) and GSH contents (B). Rat hepatocytes were incubated with PD98059 (p44/42 MAPK inhibitor), SB203580 (a p38 MAPK inhibitor) or SP600125 (a JNK inhibitor, 10⁻⁶ M, respectively) for 30 min prior to the treatment of palmitic acid (100 μM) for 24 hr. Then lipid peroxide formation and GSH contents were conducted as described in 'Material & Method'.

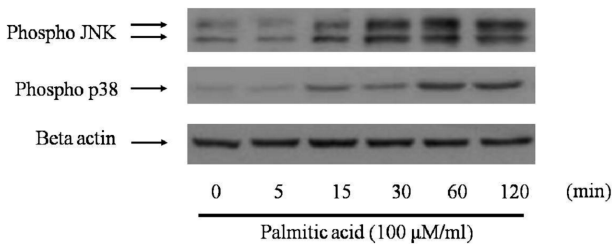


Fig. 5. Time-dependent effect of palmitic acid on phospho-JNK and phospho-p38 MAPK activity in cultured rat hepatocytes. Rat hepatocytes were incubated with palmitic acid (100 μM) with different time intervals (0 to 120 mins). Then western immunoblotting was conducted, as described in 'Material & Method'.

증가하는 지를 확인한 결과 pJNK 활성 및 p38 MAPK 활성은 palmitic acid 처리 시 15분 이상에서 시간 의존적으로 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 5).

고찰

지방간은 간에서 지방대사의 장애로 인해 중성지방이 간에 축적되는 상태이며, 간의 지방산 축적이 지방간을 일으키는

것으로 최근 보고되고 있다[6,16]. 특히 지방산에 의한 지방간의 병변 변화에는 불포화 지방산이 아닌 포화 지방산에 의한 간세포의 사멸이 관련되는 것으로 여러 문헌에 의해서 알려져 있다[25,26]. 본 실험에서는 불포화 지방산에 대한 결과는 시도 되지 않았지만 포화 지방산인 palmitic acid를 랫트 간세포에 처리하였을 때 간세포의 세포 사멸이 인정되는 것으로 나타나 기존 가설을 뒷받침 해주고 있다.

간세포 손상에는 Bax, Bcl-2, Bad 등의 다양한 미토콘드리아와 관련이 있는 세포사멸 인자들이 관여한다[15]. 특히 Bax/Bcl-2 비율은 미토콘드리아 경로에 의한 세포사멸의 주요한 표지인자로 인식이 되어져 오고 있다[22]. 본 실험에서도 역시 palmitic acid에 의해서 세포사멸 억제제를 담당하는 Bcl-2의 발현은 감소하였고 세포사멸 촉진을 담당하는 Bax의 발현이 증가하여 Bax/Bcl-2의 비율은 증가하였다. 한편 caspase-3는 세포 사멸 시에 이들 단백질이 절단되어 세포 사멸을 유도하는 효능 단백질로 간세포에서도 보고되어 지고 있다[27]. 본 실험에서도 palmitic acid 처리시 caspase-3의 절단이 현저하게 증가되는 것으로 확인할 수 있어서 palmitic acid에 의한 간세포 사멸이 인정된다고 할 수 있다. LDH의 경우 간세포 자체의 손상을 반영하는 지표로 볼 수 있으며, 본 연구에도 palmitic acid 처리 시 LDH의 현저한 증가를 볼 수 있었다. 이러한 결과는 본 실험에서 palmitic acid에 의한 세포사멸 효과와 일치하였다. 그렇지만 유리 지방산에 의한 간세포의 사멸 기전에 대해서는 아직까지 확실히 알려져 있지 않고 있다.

세포내 GSH는 산화제 및 다양한 형태의 독성 및 병태 생리학적 스트레스에 대한 세포 방어 기전에 중요한 인자이다[11]. 이러한 GSH는 GSH peroxidase 및 GSH S-transferases를 통해 세포내 peroxides에 작용하여 방어기전에 관여하며, GSH는 비효소성 기전에 의해 유리 radicals를 제거한다[4]. 지방산의 산화과정에서 사립체는 주로 superoxide (O₂⁻) 또는 H₂O₂ 형태로 소량의 ROS를 방출하게 되는데 항산화 효소가 부족하면 금속 이온의 작용에 의해 또 다른 형태의 ROS인 hydroxyl radical (OH)이 생성되고 이 물질에 의해 지방산의 과산화이 일어나 MDA, 4-hydroxynonenal (HNE) 등의 대사물이 생성되어 간의 섬유화를 유발하여 지방간을 일으키게 된다. 본 연구에서 palmitic acid 처리 시 GSH 함량은 현저하게 감소되는 것으로 보아 이는 항산화 효소의 결핍이 산화성 스트레스를 일으키는 것으로 추측이 된다.

다양한 신호전달물질 중 JNK는 일부 세포에서 세포사멸에 관여하는 것으로 보고되고 있으며[3,5], 본 실험에서도 palmitic acid에 의한 세포사멸 효과에 JNK의 활성이 관여하는 것으로 관찰되었다. 이러한 결과는 지방세포에서 palmitate 처리 시 ER stress 유도 및 세포사멸이 유도된다는 보고와 일맥상통하다고 할 수 있다[12]. 더욱이 본 연구에서는 palmitic acid에 의한 GSH 함량 감소 및 산화성 스트레스 증가 작용이 JNK 신호전달계를 통하여 움직인다는 것을 확인할 수 있었다.

최근에 간세포에서 산화성 스트레스에 JNK 활성화를 통하여 간세포 사멸이 유도된다고 보고되어 본 연구결과를 더욱 뒷받침 해주고 있다[23]. 포화 지방산인 palmitic acid에 의한 세포사멸이 JNK 활성 및 간세포 사멸에 직접 관련이 있다는 보고는 본 연구결과가 최초로 판단이 된다.

한편 p38 MAPK는 간세포에서 간의 당신생의 조절에 유리 지방산과 밀접한 관련이 있는 것으로 보고되었다[8,10]. 본 연구결과는 p38 MAPK가 유리 지방산에 의한 간세포 사멸에 중요한 매개체라는 것을 새롭게 제시하여 주고 있다. 이들 역시 GSH 감소 및 산화성 스트레스와 직접적으로 관련이 되고 있음을 본 연구결과에서 확인할 수 있었다. 흥미스러운 것은 p44/42 MAPK 활성은 palmitic acid에 의한 간세포 산화성 스트레스 증가 및 세포사멸에 관여하지 않는다는 것이다. p44/42 MAPK 활성이 palmitic acid에 의한 간세포의 생리기능에 어떠한 효과가 있는지는 향후 연구에서 밝혀져야 할 사항으로 판단된다.

본 실험에서는 palmitic acid에 의한 JNK 및 p38 MAPK 활성이 세포사멸 억제 단백질인 Bcl-2 발현을 억제하고 세포사멸 촉진 단백질인 Bax 활성을 증가한다는 것을 말해주고 있다. 이러한 결과는 JNK 활성이 Bax 활성과 일치한다는 연구결과와 일맥상통하였다[18]. Kim 등[14]도 인간 간암종 세포인 HepG2세포에서 JNK 및 p38 MAPK가 Bax의 인산화를 유도하여 미토콘드리아의 세포사멸을 유도한다고 하여 본 결과를 간접적으로 뒷받침 해주고 있다.

지금까지 간세포에서 포화 지방산에 의한 간세포 사멸 효과에 구체적인 신호 전달계에 대한 보고는 거의 이루어지지 않고 있다. 그러한 의미에서 본 실험은 랫트의 간세포에 있어서 지방간 발생기전 연구 및 치료물질 표적 후보 물질 선정에 있어서 p38 MAPK 및 JNK 단백질을 표적으로 할 수 있다는 중요한 기초자료를 제시하고 있다고 판단이 된다. 결론적으로 포화 지방산인 palmitic acid는 JNK 및 p38 MAPK 활성화를 통해 GSH 함량 감소 및 산화성 스트레스 증가를 유도하여 이들이 Bcl-2 단백질 발현을 감소시키고 Bax 단백질을 증가시켜 간세포 사멸에 관여하여 이들이 지방간의 발병에 간접적으로 작용하고 있음을 확인할 수 있었다.

요 약

포화 지방산이 인슐린 저항성 및 지방간등의 다양한 질병의 발병에 관련된다고 보고되고 있다. 그러나 간세포에서 포화지방산이 세포 사멸에 대한 효과 및 이와 관련된 신호전달계에 대해서는 거의 알려져 있지 않고 있다. 본 연구에서는 대표적인 포화지방산인 palmitic acid 처리 시 랫트 간세포 사멸에 미치는 효과와 이들이 mitogen activated protein kinases (MAPKs)와 관련되는 지를 알아보았다. 본 실험에서 palmitic acid 처리 시 간세포 성장은 억제 되었고 lactate dehydrogen-

ase (LDH) 활성은 증가하였다. 이러한 작용은 JNK 및 p38 MAPK 억제제에 의해서 선택적으로 차단되었다. 아울러 palmitic acid에 의한 Bcl-2 발현 억제, Bax 발현 증가 작용, GSH 함량 감소작용 및 산화성 스트레스 증가작용 역시 JNK 및 p38 MAPK 억제제에 의해서 선택적으로 차단되었다. 실제로 palmitic acid 처리시 JNK 및 p38 MAPK 활성은 증가하였다. 결론적으로 palmitic acid는 간세포에서 JNK 및 p38 MAPK 활성을 경유하여 산화성 스트레스 증가를 통하여 간세포 사멸을 유도하는 것으로 나타났다.

감사의 글

이 논문은 2007년 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국 학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임(KRF-2007-E00019). 아울러 이 연구의 일부는 2008년 교육과학기술부로부터 지원받아 수행된 연구이며 2008년 바이오하우징연구소의 지원을 받아 수행된 연구입니다. 이에 깊이 감사드립니다.

References

1. Adiels, M., M. R. Taskinen, and J. Boren. 2008. Fatty liver, insulin resistance, and dyslipidemia. *Curr. Diab. Rep.* **8**, 60-64.
2. Albano, E., M. Rundgren, P. J. Harvison, S. D. Nelson, and P. Moldeus. 1985. Mechanisms of N-acetyl-p-benzoquinone imine cytotoxicity. *Mol. Pharmacol.* **28**, 306-311.
3. Ammendrup, A., A. Maillard, K. Nielsen, N. Aabenhus Andersen, P. Serup, O. Dragsbaek Madsen, T. Mandrup-Poulsen, and C. Bonny. 2000. The c-Jun amino-terminal kinase pathway is preferentially activated by interleukin-1 and controls apoptosis in differentiating pancreatic beta-cells. *Diabetes* **49**, 1468-1476.
4. Anderson, M. E. and A. Meister. 1983. Transport and direct utilization of gamma-glutamylcyst(e)ine for glutathione synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **80**, 707-711.
5. Becker, E. B., J. Howell, Y. Kodama, P. A. Barker, and A. Bonni. 2004. Characterization of the c-Jun N-terminal kinase-BimEL signaling pathway in neuronal apoptosis. *J. Neurosci.* **24**, 8762-8770.
6. Bradbury, M. W. 2006. Lipid metabolism and liver inflammation. I. Hepatic fatty acid uptake: possible role in steatosis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **290**, G194-198.
7. 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.
8. Cao, W., Q. F. Collins, T. C. Becker, J. Robidoux, E. G. Lupo, K. W. Daniel, L. Floering, and S. Collins. 2005. p38 Mitogen-activated protein kinase plays a stimulatory role in hepatic gluconeogenesis. *J. Biol. Chem.* **280**, 42731-42737.
9. Clark, J. M., F. L. Brancati, and A. M. Diehl. 2002.

- Nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* **122**, 1649-1657.
10. Collins, Q. F., Y. Xiong, E. G. Lupo, H. Y. Liu, and W. Cao. 2006. p38 Mitogen-activated protein kinase mediates free fatty acid-induced gluconeogenesis in hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **281**, 24336-24344.
 11. Dickinson, D. A. and H. J. Forman. 2002. Glutathione in defense and signaling: lessons from a small thiol. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **973**, 488-504.
 12. Guo, W., S. Wong, W. Xie, T. Lei, and Z. Luo. 2007. Palmitate modulates intracellular signaling, induces endoplasmic reticulum stress, and causes apoptosis in mouse 3T3-L1 and rat primary preadipocytes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **293**, E576-586.
 13. Joshi-Barve, S., S. S. Barve, K. Amancherla, L. Gobejishvili, D. Hill, M. Cave, P. Hote, and C. J. McClain. 2007. Palmitic acid induces production of proinflammatory cytokine interleukin-8 from hepatocytes. *Hepatology* **46**, 823-830.
 14. Kim, B. J., S. W. Ryu, and B. Song. 2006. JNK- and p38 kinase-mediated phosphorylation of Bax leads to its activation and mitochondrial translocation and to apoptosis of human hepatoma HepG2 cells. *J. Biol. Chem.* **281**, 21256-21265.
 15. Kowluru, R. A. and S. N. Abbas. 2003. Diabetes-induced mitochondrial dysfunction in the retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **44**, 5327-5334.
 16. Larter, C. Z., M. M. Yeh, W. G. Haigh, J. Williams, S. Brown, K. S. Bell-Anderson, S. P. Lee, and G. C. Farrell. 2008. Hepatic free fatty acids accumulate in experimental steatohepatitis: role of adaptive pathways. *J. Hepatol.* **48**, 638-647.
 17. Lin, H. H., J. H. Chen, W. H. Kuo, and C. J. Wang. 2007. Chemopreventive properties of *Hibiscus sabdariffa* L. on human gastric carcinoma cells through apoptosis induction and JNK/p38 MAPK signaling activation. *Chem. Biol. Interact.* **165**, 59-75.
 18. Malhi, H., S. F. Bronk, N. W. Werneburg, and G. J. Gores. 2006. Free fatty acids induce JNK-dependent hepatocyte lipopoptosis. *J. Biol. Chem.* **281**, 12093-12101.
 19. Marceau, P., S. Biron, F. S. Hould, S. Marceau, S. Simard, S. N. Thung, and J. G. Kral. 1999. Liver pathology and the metabolic syndrome X in severe obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **84**, 1513-1517.
 20. Ohkawa, H., N. Ohishi, and K. Yagi. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* **95**, 351-358.
 21. Reid, B. N., G. P. Ables, O. A. Otlivanchik, G. Schoiswohl, R. Zechner, W. S. Blaner, I. J. Goldberg, R. F. Schwabe, S. C. Chua Jr, and L. S. Huang. 2008. Hepatic overexpression of hormone-sensitive lipase and adipose triglyceride lipase promotes fatty acid oxidation, stimulates direct release of free fatty acids, and ameliorates steatosis. *J. Biol. Chem.* **283**, 13087-13099.
 22. Sharifi, A. M., S. H. Mousavi, M. Farhadi, and B. Larijani. 2007. Study of high glucose-induced apoptosis in PC12 cells: role of bax protein. *J. Pharmacol. Sci.* **104**, 258-262.
 23. Singh, R. and M. J. Czaja. 2007. Regulation of hepatocyte apoptosis by oxidative stress. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **22 Suppl 1**, S45-48.
 24. Suzuki, T. and I. Tsukamoto. 2006. Arsenite induces apoptosis in hepatocytes through an enhancement of the activation of Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase caused by partial hepatectomy. *Toxicol. Lett.* **165**, 257-264.
 25. Wei, Y., D. Wang, F. Topczewski, and M. J. Pagliassotti. 2006. Saturated fatty acids induce endoplasmic reticulum stress and apoptosis independently of ceramide in liver cells. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **291**, E275-281.
 26. Wu, X., L. Zhang, E. Gurley, E. Studer, J. Shang, T. Wang, C. Wang, M. Yan, Z. Jiang, P. B. Hylemon, A. J. Sanyal, W. M. Pandak Jr, and H. Zhou. 2008. Prevention of free fatty acid-induced hepatic lipotoxicity by 18beta-glycyrrhetic acid through lysosomal and mitochondrial pathways. *Hepatology* **47**, 1905-1915.
 27. Yazihan, N., H. Ataolu, B. Yener, and C. Aydin. 2007. Erythropoietin attenuates hydrogen peroxide-induced damage of hepatocytes. *Turk. J. Gastroenterol.* **18**, 239-244.