한국환경농학회지 제28권 제3호 (2009)
Korean Journal of Environmental Agriculture Vol. 28, No. 3, pp. 295-300

연구보문

폐 대식세포주에서 포름알데히드에 의한 세포 사멸 효과에 대한 산화성 스트레스 관련성

박수현*

전남대학교 수의과대학 바이오치료 산업인력 양성팀, 동물의학 연구소

(2009년 8월 12일 접수, 2009년 8월 31일 수리)

Involvement of Oxidative Stress in Formaldehyde-induced Apoptosis in Cultured Lung Macrophage Cells

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: Formaldehyde (FA) is an important irritant compound in pesticide to induce asthma and allergy in respiratory system. Alveolar macrophage is also an pivotal cell in the immune response of respiratory system. However, the effect of FA in macrophage cell viability has not been elucidated. Thus, this study was conducted to investigate the effect of FA on apoptosis in Raw 264.7 cells, alveolar macrophage cell line. In this study, FA decreased cell viability of lung alveolar macrophage cells in a dose-dependent manner (>100 μM). FA-induced decrease of cell viability was blocked by the treatment of antioxidants (vitamin C, NAC, and catalase). Indeed, FA induced lipid peroxide formation in Raw 264.7 cells. FA decreased Bcl-2 expression but increased Bax expression in lung alveloar macrophage cells. In addition, FA also increased the cleaved form of caspase-3. In conclusion, FA induced apoptosis via oxidative stress in cultured Raw 264.7 cells.

Key Words: Alveolar macrophage, Apoptosis, Formaldehyde, Oxidative stress

서 론

휘발성유기화합물(volatile organic compounds)에 의한 오염은 사람에게 있어서 구토, 설사, 인후자극 및 호흡곤란을 일으킨다고 알려져 있다[1]. 휘발성유기화합물중의 대표적 오염물질인 FA는 자극적인 냄새가 나며 물에 잘 녹는 무색의 기체로서, 요소계와 페놀계의 포름 알데히드 합성수지의 생산에 이용된다. 포름알데히드 합성수지는 파티클보드, 섬유판, 베니아판 등을 생산할 때 접착제 및 발포 단열제로서 가구, 건축 재료에서 많이 포함되어 있으며 포름알데히드 수지를 함유하고 있는 직물류에서 발생할 수 있다[2,3]. Paraquat 처리 시 이러한 포름알데히드로 배출이 확인되고 있다[4]. 이러한 FA는 상부 기도, 눈 등의 점막과 피부에 자극을 일으키며, 장기간 노출된 경우 호흡기계에 기침, 가래, 천식, 만성 기관지염 등의 폐쇄성 폐질환 및 폐암의 발병과 관련된다는 보고가 되고 있다[5,6]. 실제 사람에게서도 FA에 지속적으로 노출 되게 되면 사망률이 증가하는 것으로 보고되어 FA는 호흡기 감염에 중요한 역할을 할 것으로 인식되어지고 있다[7]. 그럼에도 불구하고 직접적으로 폐 세포에 대한 FA의 독성 효과에 대한 연구는 시행된바 없다.

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 원인들중 인체내의 다양한 경로에 의해 유발되는 산화적 스트레스는 생체안에 존재하는 항산화계에 의해 제거 되지만 산화적 스트레스가 항산화계의 수준을 초과하여 제거되지 못하면 DNA 변형과 기능 상실에 의하여 퇴행성 질환이 유도되는데 공기에 의한 오염등에 의해서 폐 세포에서 폐 섬유화 및 각종 질환의 발병에 관여할 수 있음을 시사해 주고 있다[8]. 폐의

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

대식세포는 폐포의 손상 및 독성 물질을 제거하는 일을 담당하는 세포로 호흡기에 대한 생체 방어 능력을 담당하는 주요한 세포로 알려져 있다[9]. 아울러 이들 폐 대식세포는 다양한 숙주 반응에 관여하여 항상성 유지 및 염증 반응 시에는 다양한 cytokine을 생산하여 감염 초기에 생체 방어에 중요한 역할을 한다[10]. 이들 세포들은 산화성 스트레스 등의 발병에 이들 세포의 기능이 약화되어 진다고 보고되고 있다[11]. 특히 이 세포들은 세포 사멸이 유도되었을 때는 현저한 생체 방어 능력이 약화되어 다양한 호흡기 질환을 유도하는 것으로 보고되고 있다[12]. 그러나 지금까지 FA에 대한 산화성 스트레스 및 세포 사멸에 대한 상관 관계 연구는 극히 미약한 실정에 있다.

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[13]. 세포내의 cysteine 단백분해 효소인 caspases 는 세포 사멸에 중요한 실행자 역할을 수행하며, 여러 capase 중 caspase -3는 세포 자기 사멸의 중요한 실행 단백질이다[14,15]. 그럼에도 불구하고 FA에 의한 이들 단백질들의 조절 기전은 아직까지 알려져 있지 않고 있다. 따라서 본 실험에서는 폐 대식세포주를 이용하여 새집증후군의 후보물질인 FA가 폐포의 대식세포 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.

Raw 264.7 세포 배양

Raw 264.7세포는 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 이틀을 배양하여 세포의 성장을 동기화 시켜서 실험에 이용하였다.

MTT 측정

FA의 폐 대식세포 사멸 효과를 측정하기 위하여 MTT 환원 실험을 실시하였다. 세포주를 96-well plate에 1×10^5 cells/mL의 농도로 100 μL씩 분주하여 24시간 동안 37℃, 5% CO_2 incubator에서 배양한 후 FA를 처리하여 24시간 배양하였다. 반응 후 well 바닥 에 형성된 formazan이 흩어지지 않게 상등액을 제거하고 DMSO 100 μL 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 폐 대식세포 사멸 효과를 측정하기 위하여 LDH 방출측정 kit를 이용하여 실시하였다. Raw 264.7 세포주를 1×10^5 cells/mL로 맞춘 후, 100 μL씩 96 well plate에 분주하여 CO_2 incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 그 후, FA를 처리하여 24시간 배양하였다. 배양액을 새로운 96-well plate에 50 μL 분주하고 LDH reagent를 50 μL 첨가하여 반응 시킨 후, 반응이 완료 되면 1 N HCl을 100 μL 첨가하여 반응을 중지시킨다. 또한 살아남은 세포의 LDH 측정을 위해 남은 배양액을 제거하고, 0.5% Triton X-100용액을 50 μL 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.

Western immunoblotting

배지를 제거한 Raw 264.7세포를 phosphate buffered saline (PBS)로 2번씩 세척한 후, 각기 150 μL의 lysis buffer(10× 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 ㎍의 sample들을 8% SDS-PAGE 전기영동을 시킨 후, polyvinylidine 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℃에서 18시간 이상 배양하였다. 그 후, membrane을 0.1% Tween-20/1× 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±S.E 로 하였다.

결 과

FA의 폐 대식 세포 사멸 효과

폐 대식 세포 사멸에 대한 FA의 농도별 효과를 알아보기 위하여, FA를 농도별(0 – 1 mM)로 처리 후 MTT assay를 실시하였다. 실험 결과 Fig. 1A에서 보이듯이 10 μM FA 처리시에는 세포 생존률에는 영향을 미치지 않았으며 100 μM 이상에서 폐 세포 사멸을 유발하는 것으로 나타났으며 0.5 mM 이상에서 이러한 현상은 더욱 현저하게 나타났다. 이러한 현상은 세포 손상의 또 다른 지표인 LDH assay에서도 같은 양상을 볼 수 있었다(Fig. 1B).

FA에 대한 시간 의존성 효과를 알아보기 위하여 500 μM FA를 시간별로 처리하였다. 500 μM FA 처리 시 1시간에서는 대조군과 유의성 있는 차이는 인정이 되지 않았으나 4시간 이상에서 유의성 있게 세포생존율은 감소하였으며 24시간 이상에서 현저하게 억제되었다(Fig. 2A). 이러한 결과는 LDH assay에서도 같은 양상을 볼 수 있었다(Fig. 2B). 따라서 본 실험에서는 아치사 농도인 FA 500 μM을 24 시간 처리하였다.

FA에 의한 폐 대식세포 사멸 효과에 대한 산화성 스트레스 관련성

산화성 스트레스와의 관련성을 알아보기 위하여 lipid peroxide (LPO) 형성을 측정하였다. 실험결과 FA는 산화성 스트레스를 증가 시켰으며 이러한 작용은 항산화제인 vitamin C (1 mM), NAC (100 μM) 및 catalase (1 mM)에 의해 차단되는 것으로 나타났다 (Fig. 3A). 이러한 결과는 세포 생존율에서도 같은 결과를 볼 수 있었다 (Fig. 3B). FA 처리시 Bax 단백질 발현은 대조군에 비해 증가하였으나, Bcl-2 단백질 발현은 대조군에 비해 감소하였으며, 아울러 세포 손상 마커 단백질인 caspase-3의 활성형 역시 FA 처리 시 증

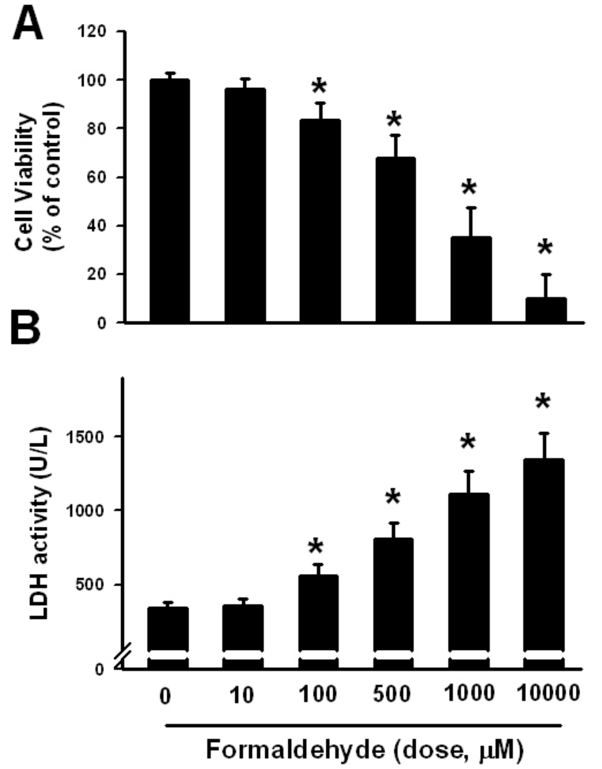

Fig. 1. Dose-dependent effect of formaldehyde on cell viability (A) and lactate dehydrogenase (LDH) activity (B) in cultured Raw 264.7 cells. Raw 264.7 cells were incubated with different dosage of formaldehyde (0 to 1 mM) for 24 hr. Then MTT assay and LDH assay were conducted as described in 'Material & Method'. Values are means±S.E. of 9 separate experiments performed on 3 different cultures. *P < 0.05 vs. control.

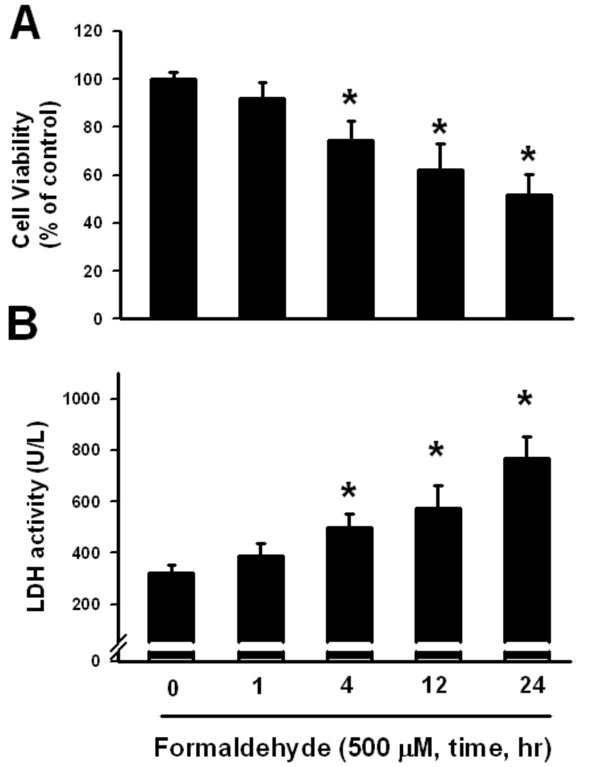

Fig. 2. Time-dependent effect of formaldehyde on cell viability (A) and lactate dehydrogenase (LDH) activity (B) in cultured Raw 264.7 cells. Raw 264.7 cells were incubated with formaldehyde at different time intervals (0 to 24 hr). Then MTT assay and LDH assay were conducted as described in 'Material & Method'. Values are means±S.E. of 9 separate experiments performed on 3 different cultures. *P < 0.05 vs. control.

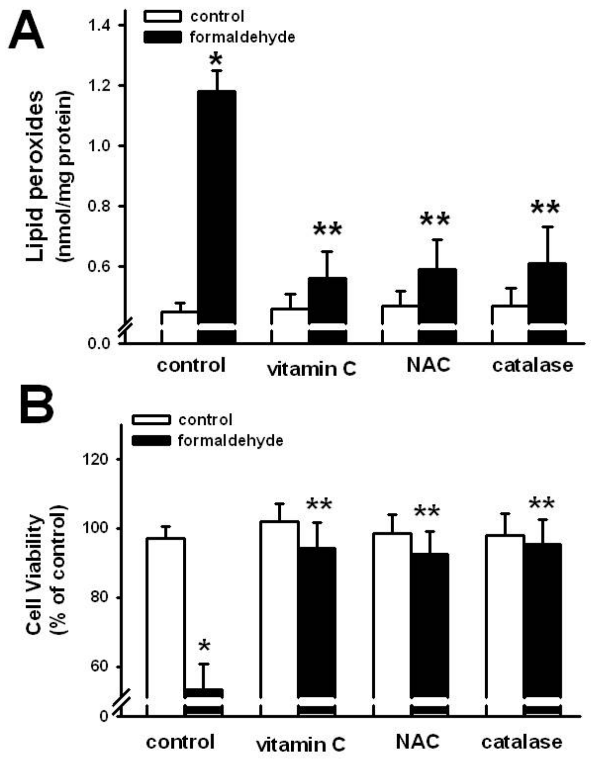

Fig. 3. Effect of antioxidants on formaldehyde-induced increase of lipid peroxide formation (A) and decrease of cell viability (B) in cultured Raw 264.7 cells. Raw 264.7 cells were incubated with vitamin C (1 mM), NAC (100 μM), or catalase (1 mM) for 30 min prior to the treatment of formaldehyde (500 μM) for 24 hr. Then lipid peroxide formation and MTT assay was 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, **$P < 0.05$ vs. formaldehyde alone.

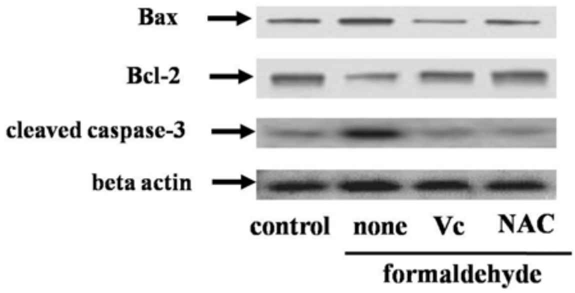

Fig. 4. Effect of antioxidants on formaldehyde-induced alteration of Bcl-2, Bax and caspase-3 in cultured Raw 264.7 cells. Raw 264.7 cells were incubated with vitamin C (1 mM) or NAC (100 μM) for 30 min prior to the treatment of formaldehyde (500 μM) for 24 hr. Then western immunoblotting was conducted as described in 'Material & Method'. β actin was used as a control. The example shown is a representative of three experiments

가하였다 (Fig. 4). 이러한 작용은 vitamin C 및 NAC에 의해 차단되는 것으로 나타났다.

고 찰

FA는 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[16]. 본 실험에서도 FA 농도 100 μM 이상에서 폐 대식세포 사멸이 인정이 되었다. 이러한 결과는 세포는 다르지만 랫트의 흉선세포에 포름알데히드 처리시에서도 100 μM 이상에서 세포 사멸 및 세포 위축이 야기되었다는 결과와 일치하였다[17]. FA는 기관지세포에서 지속적인 DNA 손상을 유도한다는 보고 역시 본 실험결과와 유사한 것이라 할 수 있다[18]. 특히 본 실험결과에서 의미하는 FA에 의한 폐 대식세포 사멸 효과는 이들이 호흡기 면역계를 담당하는 대식세포이므로 FA 처리시 면역계의 방어기능이 손상될수 있다는 가설을 뒷받침 해주고 있다. 이에 대한 생체 실험은 향후 연구에서 밝혀져야 할 사항으로 생각된다.

본 실험에서는 FA 처리 시 산화성 스트레스를 의미하는 LPO 형성은 증가하였다. 이러한 결과는 lipopolysacharide 처리시 폐 손상시에 LPO 혈성이 증가하였다는 보고와 비슷한 결과라고 할 수 있다[19]. 특히 본 실험에서는 FA에 의한 산화성 스트레스가 항산화제인 vitamin C, NAC 및 catalase 처리 시 차단되었으며 실제는 세포 생존율의 경우에서도 세포 죽음의 증가가 차단되어 산화성 스트레스가 세포 죽음에 강력히 관여하고 있음을 이야기 해주고 있다. 폐 세포 사멸에는 Bax, Bcl-2, Bad 등의 다양한 미토콘드리아와 관련이 있는 단백질들이 관여 한다[20,21]. 특히 Bax/Bcl-2 비율은 미토콘드리아 경로에 의한 세포 사멸의 주요한 표지 인자로 인식이 되어져 오고 있다[22]. 본 실험에서도 포름 알데히드 처리시 폐 세포 사멸 억제를 담당하는 Bcl-2의 발현은 감소하였고 세포사멸 촉진을 담당하는 Bax의 발현이 증가하여 Bax/Bcl-2의 비율은 증가하였다. An 등[23] 역시 폐포 허혈성 손상 시에 Bcl-2의 감소 및 Bax 단백질이 증가하였으며 caspase-3의 활성이 증가하였다고 하여 본 실험 결과와 비슷한 보고를 제시하였다. 이러한 결과는 FA 투여 시에 면역적으로 민감한 마우스의 뇌의 해마에 Bax/Bcl-2 비율이 증가하여 뇌세포의 사멸이 유도되었다는 보고와 일치하였다[24].

본 실험에서는 FA에 의한 산화성 스트레스 발생이 세포사멸 억제 단백질인 Bcl-2 발현 및 Bax 활성에 직접적으로 미치는 영향을 조사하지 않았지만 포름알데히드에 의한 Bax, Bcl-2 발현 및 caspase-3의 활성형 증가 작용이 항산화제인 vitamin C 및 NAC에 의해서 차단되는 것으로 보아 이들의 활성이 Bcl-2를 억제하고 세포 사멸 촉진 단백질인 Bax 활성을 증가 할 것으로 추측 해주고 있다. 이러한 결과는 산화성 스트레스가 Bax, Bcl-2 발현 및 caspase-3 발현을 조절함으로써 세포 사멸에 깊숙이 관여하는 것으로 판단된다. 최근 Susnow 등[25] 역시 폐의 산화성 스트레스가 Bcl-2 단백질 발현에 중요한 역할을 한다고 하여 본 연구결과를 뒷받침해주고 있다. 본 연구진이 아는 한 FA에 의한 폐 세포 사멸에 산

화성 스트레스가 관련된다는 보고는 최초로 알고 있다. 이상의 연구결과들을 종합해보면 FA 처리 시 Bcl-2 발현 감소 및 Bax 발현 증가 등을 통하여 caspase-3 유도를 통해 폐 대식 세포 사멸을 유도하는 것으로 나타났으며 산화성 스트레스가 이들을 매개하는 것으로 관찰되었다. 이러한 변화에 따른 폐 대식세포의 세포 사멸에 따라 생체내의 방어 기전이 약화되어 다양한 폐 관련 질병이 유도되는 것으로 사료된다. 이러한 결과는 본 연구에서는 FA의 폐 대식세포 손상 및 방어기전 약화에 대한 작용 기전을 제시하였다. 이러한 연구는 FA에 대한 독성 기전 제시를 세포 수준에서 밝힐 수 있는 기회를 제공하였으며 이는 FA에 의한 다양한 질병 발병을 억제할 수 있는 물질들을 개발하는 연구에 기초적 자료로 사용될 수 있을 것으로 판단이 된다.

요 약

포름알데히드는 농약 노출 시에 나타나는 중요한 물질로 천식 및 알러지등의 호흡 질환을 일으키는 물질로 알려져 있으며, 폐에서 대식세포는 면역 반응에 있어서 방어 기능을 담당하는 세포로 알려져 있다. 그러나 대식세포에서 포름알데히드에 대한 효과는 알려져 있지 않고 있어서 대식 세포주인 Raw 264.7 세포를 이용하여 실험하였다. 실험 결과 포름알데히드는 세포 생존율을 감소 시켰으며, 이러한 반응은 항산화제인 vitamin C, NAC, 및 catalase 처리 시 차단되었다. 실제로 포름알데히드 처리시 산화성 스트레스 지표인 lipid peroxide 형성이 증가하였으며 이들 반응 역시 항산화제들에 의해 차단되었다. 한편 포름알데히드 처리시 세포 사멸 촉진 단백질인 Bax 발현은 증가하였으며 세포 사멸 억제 단백질인 Bcl-2의 발현은 억제 되었으며 이러한 반응은 항산화제 처리시 차단되었다. 세포사멸 실행 단백질인 casapse-3의 활성형 역시 증가하였으며, 항산화제 처리시 차단되었다. 결론적으로 포름알데히드는 폐 대식세포에서 산화성 스트레스 증가를 통해 세포 사멸을 일으키는 것으로 나타났다.

감사의 글

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

참고문헌

1. Kampa, M. and Castanas, E. (2008) Human health effects of air pollution. *Environ Pollut.* 151(2), 362-367.
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. 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(7), 411-414.
5. Callas, P.W., Pastides, H., and Hosmer, D. W. Jr. (1996) Lung cancer mortality among workers in formaldehyde industries. *J. Occup. Environ. Med.* 38(8), 747-748.
6. 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(7), 639-651.
7. Marsh, G.M., Stone, R.A., Esmen, N.A., Henderson, V.L., and Lee, K.Y. (1996) Mortality among chemical workers in a factory where formaldehyde was used. *Occup. Environ. Med.* 53(9), 613-627.
8. Kamdar, O., Le, W., Zhang, J., Ghio, A.J., Rosen, G. D, and Upadhyay, D. (2008) Air pollution induces enhanced mitochondrial oxidative stress in cystic fibrosis airway epithelium. *FEBS Lett.* 582, 3601-3606.
9. Schneider, J. C., Card, G. L., Pfau, J. C., and Holian, A. (2005) Air pollution particulate SRM 1648 causes oxidative stress in RAW 264.7 macrophages leading to production of prostaglandin E2, a potential Th2 mediator. *Inhal. Toxicol.* 17, 871-877.
10. Higychi, M., Hisgahi, N., Taki, H., and Osawa, T. (1990) Cytolytic mechanisms of activ ated macrophages. Tumor necrosis facto and L-arginine-dependent mechani는 act synergistically as the major cytolytic mechani는 of activated macrophages. *J. Immunology.* 144, 1425-1431.
11. Khadaroo, R. G., Kapus, A., Powers, K.A., Cybulsky, M. I., Marshall, J. C., and Rotstein, O.D. (2003) Oxidative stress reprograms lipopolysaccharide signaling via Src kinase-dependent pathway in RAW 264.7 macrophage cell line. *J. Biol. Chem.* 278, 47834-47841.
12. Imrich, A., Ning, Y., Lawrence, J., Coull, B., Gitin, E., Knutson, M., and Kobzik L. (2007) Alveolar

macrophage cytokine response to air pollution particles: oxidant mechanisms. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 218, 256–264.

13. Zinkel, S., Gross, A. and Yang, E. (2006) BCL2 family in DNA damage and cell cycle control. *Cell Death Differ.* 13(8), 1351–1359.
14. Kutuk, O. and Basaga, H. (2007) Apoptosis signalling by 4–hydroxynonenal: a role for JNK–c–Jun/AP–1 pathway. *Redox Rep.* 12(1), 30–34.
15. Zakeri, Z. and Lockshin, R. A. (2008) Cell death: history and future. *Adv Exp Med Biol.* 615, 1–11.
16. 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.
17. Nakao, H., Umebayashi, C., Nakata, M., Nishizaki, Y., Noda, K., Okano, Y., and Oyama, Y. (2003) Formaldehyde–induced shrinkage of rat thymo–cytes. *J. Pharmacol. Sci.* 91(1), 83–86.
18. Grafstrom, R. C., Fornace, A. J. Jr, Autrup, H., Lechner, J. F., and Harris, C. C. (1983) Formaldehyde damage to DNA and inhibition of DNA repair in human bronchial cells. *Science.* 220, 216–218.
19. Shang, Y., Li, X., Prasad, P. V., Xu, S., Yao, S., Liu, D., Yuan, S., and Feng, D. (2009) Erythro–poietin attenuates lung injury in lipopolysaccharide treated rats. *J. Surg. Res.* 155, 104–110.
20. Wu, Y., Xing, D., Chen, W.R. and Wang, X. (2007) Bid is not required for Bax translocation during UV–induced apoptosis. *Cell Signal.* 19(12), 2468–2478.
21. Cao, X., Bennett, R. L. and 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.
22. 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(5), 672–684.
23. An, S., Hishikawa, Y., Liu, J., and Koji, T. (2007) Lung injury after ischemia–reperfusion of small intestine in rats involves apoptosis of type II alveolar epithelial cells mediated by TNF–alpha and activation of Bid pathway. *Apoptosis.* 12(11), 1989–2001.
24. Tsukahara, S., Yamamoto, S., Tin–Tin–Win–Shwe, Ahmed, S., Kunugita, N., Arashidani, K., and Fujimaki, H. (2006) Inhalation of low–level formaldehyde increases the Bcl–2/Bax expression ratio in the hippocampus of immunologically sensitized mice. *Neuroimmunomodulation.* 13(2), 63–68.
25. Susnow, N., Zeng, L., Margineantu, D., and Hockenbery DM. (2009) Bcl–2 family proteins as regulators of oxidative stress. *Semin. Cancer Biol.* 19(1), 42–49.