

인간 간암 세포주인 SK-Hep-1에서 Stearic Acid에 의한 산화적 스트레스 및 항산화효소의 발현변화 평가

오정민 · 이지윤 · 이관호 · 김봉희 · 김상겸[#]

충남대학교 약학대학

(Received December 30, 2011; Revised January 27, 2012; Accepted February 1, 2012)

Evaluation of Oxidative Stress and Antioxidant Enzyme Expression in Human Hepatocarcinoma SK-Hep-1 Cells Treated with Stearic Acid

Jung-Min Oh, Ji-Yoon Lee, Gwan-Ho Lee, Bong-Hee Kim and Sang-Kyum Kim[#]

College of Pharmacy Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

Abstract — Nonalcoholic steatohepatitis(NASH) is serious metabolic disease related to fatty acid. According to "two hit theory", fatty acid-induced oxidative stress is important factor to progress nonalcoholic steatohepatitis from steatosis. In this study, we evaluated stearic acid induced oxidative stress in human hepatocarcinoma SK-Hep-1 cell. Cell viability, reactive oxygen species (ROS) production, glutathione (GSH), malondialdehyde and expression of antioxidant enzymes were determined at various time-points and concentrations of stearic acid. At 0.2 mM, non-toxic concentration, of stearic acid, production of ROS was significantly increased at 24 hours and the level of GSH was significantly decreased. Expression of superoxide dismutase-1 and 2 was slightly increased in 0.2 mM stearic acid at 24 hours. These results represent that the non-toxic concentration of stearic acid resulted in oxidative stress, suggesting that stearic acid may play a critical role in development of steatohepatitis.

Keywords □ NASH, oxidative stress, stearic acid, steatosis, saturated fatty acid

지방간(steatosis)은 전체 간 무게의 5% 이상의 지방이 축적되어 있는 간을 말한다. 이 현상은 간으로의 자유 지방산(free fatty acid)의 유입(inflow)과 중성지방(triglyceride)의 합성(synthesis)과 배출(excretion)의 불균형에 기인하는 것이다.¹⁻³ 비알콜성 지방간염(NASH: nonalcoholic steatohepatitis)은 알코올 섭취를 하지 않는 지방간 환자에게 염증을 수반하는 지방간이 발병한 것으로 간 섬유화(fibrosis)나 간경화(cirrhosis)로 발전할 가능성이 높은 질환이다. 비만인 사람을 대상으로 시행된 간 생체검사(liver biopsy)에서 약 30~40%가 넘는 사람들이 지방간 이상의 경과를 보였고, 지방간염 환자의 74%가 간 섬유화로 진행했으며, 약 30%가 간경화로 발전되었다.^{4,5} 현재 비알콜성 간질환 및 지방간염 환자는 전세계적으로 증가하고 있으며, 이에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있다.⁶ 지방간에서 비알콜성 지방간염으로의 유발을 설명하기 위해, 1998년도에 Christopher Day와 Oliver

James에 의해서 "two hit theory"가 처음 제안되었다.^{7,8} "Two hit theory"는 두 가지 요인(two hit)이 작용하여 지방간에서 비알콜성 지방간염이 유발된다는 이론이다.⁹ 첫째 요인(first hit)은 지방간에 축적되어 있는 중성지방이다. 둘째 요인(second hit)은 축적된 중성지방에 의해 발생하여, 염증 반응에 관여하는 요인들이다. 이 이론은 학계에 널리 알려졌고, 많은 연구자들이 이 이론을 바탕으로 지방간염 연구를 하였다. 연구된 둘째 요인으로는 산화적 스트레스(oxidative stress),¹⁰⁻¹² 미토콘드리아 기능 부전(mitochondrial dysfunction),^{13,14} 인슐린 저항성(insulin resistance),¹⁵⁻¹⁷ 사이토카인(cytokine)¹⁸⁻²⁰ 등이 있다.

산화적 스트레스는 정상적인 세포의 대사 과정에서 생성되는 활성 산소종(ROS: reactive oxygen species)이 세포에 유해한 효과를 나타내는 것이다. 활성 산소종의 종류에는 superoxide anion, hydroxyl radical, peroxy radical, hydrogen peroxide 등이 있으며, 과도한 활성 산소종은 세포의 지질막이나 단백질 또는 DNA의 정상적인 기능을 파괴시킨다. 한편, 세포 내에서 활성 산소종이 생성되는 시스템뿐만 아니라 생성된 활성 산소종들을 제거하는 항산화제들도 있다. 이와 같은 산화제(pro-oxidant)와 항산화

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 042-821-5930 (팩스) 042-823-6566
(E-mail) sangkim@cnu.ac.kr

제(antioxidant)의 균형이 무너진 것을 산화적 스트레스라 정의하기도 한다.²¹⁻²³⁾ 세포 내에 존재하는 항산화제들로는, 세포 내 항산화 효소인 superoxide dismutase(SOD), catalase(CAT), glutathione peroxide(GPx) 등이 있고, 비효소적인 항산화물질로 glutathione(GSH), ascorbic acid(vitamin C), α -tocopherol (vitamin E), carotenoids, flavonoids 등이 있다.

Stearic acid는 탄소수가 18개인 포화지방산으로서, 탄소수 16개의 포화지방산인 palmitic acid와 함께 임상적으로 비알콜성 지방간염 환자의 간에 증가되어 있는 것으로 보고 되어있다.²⁴⁾ 그러나 비알콜성 지방간염과 관련하여 palmitic acid에 대해서는 많이 연구가 되어 있는 반면에, 상대적으로 stearic acid에 대해서는 보고된 바가 적다. 따라서, 본 연구에서는 사람의 간암 세포주인 SK-Hep-1 cell에, stearic acid를 처리하고 여러 다양한 산화적 스트레스 평가 지표들을 평가하여, two hit theory에 기초한 지방간염의 발병기전의 둘째 요인(second hit)인 산화적 스트레스가 stearic acid에 의해 발생하는 여부를 평가하고자 하였다.

실험방법

실험 재료

실험에 사용한 세포는 human hepatocarcinoma cell line인 SK-Hep-1 세포를 이용했으며, Dulbecco's modified Eagle's media(DMEM, Low glucose)와 PenStrep은 GIBCO(Grand Island, NY, U.S.A)에서 구입하였다. Fetal bovine serum(FBS)은 HyClone(Logan, UT)에서 구입했다. Bovine serum albumin(BSA)는 Calbiochem(Darmstadt, Germany)에서 구입했다. Sodium stearate, tetraethoxypropane(TEPP), thiobarbituric acid(TBA), butylated hydroxyl toluene(BHT)는 Sigma (St. Louis, MO)에서 구입했다. 3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT)는 MP Biomedicals(Santa Ana, CA)에서 구입했다. 5-(and-6)-chloromethyl-2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester(CM-H2DCFDA)는 Invitrogen(Oregon, USA)에서 구입했다. Catalase, GR, SOD-1, SOD-2, GPX-1, GPX-4, GAPDH, Trx-1, Trx-2 Prx-1, Prx-2, Prx-3 항체들은 Ab frontier(Seoul, Republic of Korea)에서 구입했다. GST- α , GST- π 는 Detroit R&D, INC.(Detroit, USA)에서 구입했다. Horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit 은 Bio-Rad Laboratories(Hercules, CA)에서 구입했다. Enhanced chemiluminescence detection reagent(ECL)은 Santa Cruz biotech(Santa Cruz, CA)에서 구입했다. 기타 시약들은 세포 배양용 및 1등급 시약들을 사용하였다.

세포 배양

인간의 간암세포인 SK-Hep-1 세포를 실험에 사용하였다. 배

양을 위해 low glucose DMEM에 열처리한 FBS를 10% 처리하고, penicillin과 streptomycin을 각각 100 unit/ml과 100 μ g/ml의 농도로 처리하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 일 주일에 두 번씩 1:4의 비율로 계대배양 하였다.

Stearic acid 조제

75°C에서 5시간을 PBS(phosphate buffer saline)에 녹여 10 mM 조제 후 stearic acid : 5% BSA : 100% DMEM 비율이 각각 1 : 6.6 : 2.4의 비율로 혼합하여 1 mM을 조제하여 여과한 후 사용하였다. 그 이하의 농도들은 90% DMEM에 희석하여 조제하였다.

Cell viability assay

SK-Hep-1 세포를 100 mm 배양접시에서 70~80% confluency에 도달하도록 배양하였다. PBS로 1회 세척 후 trypsin을 처리하고 DMEM 배지에 희석하여, 96 well 배양접시에 옮겨 배양하였다. 세포가 70% 정도의 confluency에 도달한 후, 혈청이 없는 DMEM 배지에서 16시간 이상 배양하였다. 특정 농도의 stearic acid를 처리하여 24시간 동안 배양하였다. MTT 용액을 0.5 mg/ml로 각 well에 처리하였다. 40분 동안 배양한 후 DMSO를 처리하여 microplate reader로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

ROS 측정

SK-Hep-1 세포를 100 mm 배양접시에서 70~80% confluency에 도달하도록 배양하였다. PBS로 1회 세척 후 trypsin을 처리하고 DMEM 배지에 희석하여, 48 well 배양접시에 옮겨 배양하였다. 세포가 70% 정도의 confluency에 도달한 후, 0.2 mM의 stearic acid를 각각 일정한 시간 동안 처리하였다. 5 μ M의 5-(and-6)-chloromethyl-2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester(CM-H2DCFDA)를 처리한 후, 30분간 배양하였다. 형광측정기(TECAN, GENios)로 형광을 측정하였다(Ex- 485 nm, Em- 535 nm).

GSH assay

SK-Hep-1 세포를 non-denature 완충용액으로 수집하여 perchloric acid로 1:2 희석하고 원심 분리하여 상등액을 취해 시료로 사용하였다. Reduced GSH(glutathione)를 3차 증류수로 녹여서 표준품으로 사용하였다. 시료를 phosphate/EDTA (phosphate 0.125 mM, EDTA 6.3 mM, pH 7.5) 용액으로 10배 희석시켰다. GSH 측정을 위해, NADPH/buffer(phosphate 0.125 mM, EDTA 6.3 mM, NADPH 0.3 mM) 용액 700 μ l, DTNB (phosphate 0.125 mM, EDTA 6.3 mM, DTNB 6 mM) 용액 100 μ l, 표준품 또는 시료를 200 μ l씩 semi-micro cuvette에 가하여 혼합 후 4분 동안 방치하고, 12 units/ml의 glutathione

reductase 40 μ l을 혼합하였다. 분광 광도계(Jasco, V-550)를 이용하여 412 nm에서 1분간 kinetic으로 측정했다. 결과는 nmole/mg protein으로 표시하였다.

Malondialdehyde assay

SK-Hep-1 세포에 non-denature 완충용액을 처리하여 수집한 후 시료로 사용하였다. HPLC는 Shimadzu 회사의 SCL-10Avp (controller), LC-10ATvp(pump), RF-10AXL(fluorescence detector), Stainless-steel column 5 μ m, 4.6 \times 150 mm, Intensis ODS-3 (GL science Inc.), 20 μ l loop sample injector(Rheodyne 7725i)를 사용하였다. 이동상으로 40% methanol과 60%, 50 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)를 1.3 ml/min 유속으로 사용했다. 형광 검출기는 excitation 515 nm, emission 553 nm에서 사용했다. 표준 검량선 작성을 위해서는, MDA 표준품으로 TEPP를 3차 증류수에 희석시켜, 0, 5/27, 5/9, 5/3 μ M을 조제했다. 시료 처리 및 측정을 위해서는 1 mM DTPA(pH 3.5)를 함유하고 있는 2 M sodium acetate buffer에 TBA를 녹여 0.2%로 조제하였다. 0.2% TBA, 300 μ l에 96% 에탄올에 녹인 0.5% BHT, 3 μ l를 혼합한 후, 표준품 또는 시료를 각각 30 μ l씩 혼합하였다. 95~100°C 항온조에서 45분 동안 가열한 후 얼음에 냉각하여, HPLC로 측정하였다. 표준품에서 검량선을 작성하여 nmole/mg protein으로 계산하였다.

Protein assay

SK-Hep-1 세포를 non-denature 완충용액으로 수집하였다. Protein assay kit(Pierce)을 사용하여 microplate reader로 570 nm에서 측정하였다. BSA 표준 검량선과 비교하여 산출하였다.

Immunoblot analysis

항산화 효소들의 발현 평가를 위해서 12 well 배양접시에 세포를 배양하였다. 혈청을 고갈시킨 배지에 16시간 이상 세포를 배양 한 후, 0.05, 0.1, 0.2 mM의 stearic acid를 처리하였다. 24 시간 배양한 후, non-denature buffer, 75 μ l를 처리하여 세포를 수집하였다. 1 ml 주사기로 세포를 분쇄한 후 immunoblot analysis의 시료로 사용하였다. 겔은 단백질의 분자량에 따라 7.5~12%를 사용하였고, 각각의 일차 항체는 1:1000 또는 1:3000으로 희석하여 측정하였다. 이차 항체는 GST를 제외한 나머지 단백질들은 goat-anti rabbit, 1:10000으로 측정하였고, GST- α , π 는 rabbit-anti goat, 1:10000으로 희석하여 사용하였다. 단백질 차폐(blocking)는 5% milk가 포함된 TBST 용액으로 하였다. 겔은 150 volt에서 1시간~1시간 반 동안 전개한 후, 80 volt로 2시간 동안 니트로셀룰로오스로 이동시켰다. 1시간 반 동안 단백질 차폐를 수행한 후, 일차 항체는 4°C에서 overnight로, 이차 항체는 2시간 동안 반응시켰다. 검출은 LAS-4000(Fujifilm,

Tokyo, Japan)을 사용하였고, Multi Gauge(Fujifilm, Tokyo, Japan) 프로그램을 사용하여 정량 하였다.

Statistic analysis

결과는 세 군 이상일 경우는 ANOVA test 후 Dunnett's test로 유의적 차이를 검증하였고, 두 군일 경우에는 un-paired Student's t-test를 이용하여 유의적 차이를 검증하였다.

실험결과 및 고찰

SK-Hep-1 세포를 이용하여 stearic acid에 의한 산화적 스트레스를 평가하기 위해, stearic acid의 농도를 0에서 0.5 mM까지 조제하여 24시간 동안 처리하여 세포 독성을 평가하였다(Fig. 1). 그 결과 0.2 mM까지는 세포 독성이 관찰되지 않았고, 0.5 mM에서 유의적인 세포 독성이 관찰 되었다($P<0.01$). 위의 결과를 바탕으로 본 실험에서는 독성이 없는 농도인 0.2 mM 및 그 이하 농도를 사용하였다.

Stearic acid 처리에 의한 세포에서의 활성 산소종의 발생 여부를 평가하기 위해, stearic acid, 0.2 mM을 처리한 후, 0시간에서 24시간까지 활성 산소종 발생을 평가하였다(Fig. 2). 그 결과, stearic acid 0.2 mM을 24시간 처리한 군에서 활성 산소종 발생의 유의적인 증가가 관찰되었고, 그 외의 시간에서는 유의적인 변화가 관찰되지 않았다. 이로써, stearic acid 처리 후 24시간에서 활성 산소종 발생이 증가함을 확인하였다. 이 결과는 기존의 보고된 랫트의 간암세포주인 H4IIE cell과 사람의 간암세포주인 HepG2에서 palmitic acid를 처리하였을 때, 활성 산소종 발생이

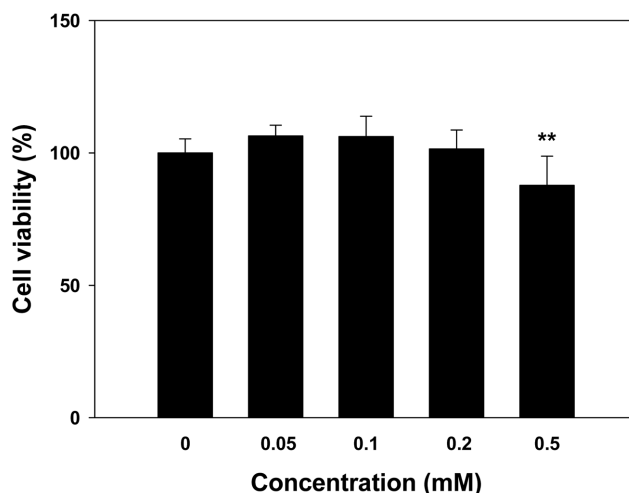


Fig. 1 – Cytotoxicity of stearic acid in SK-Hep-1 cells. SK-Hep-1 cells were treated with stearic acid (SA; 0.05~0.5 mM) for 24 hours. Data are mean \pm S.D. for eight separate samples. **Significantly different than levels monitored in control, $P<0.01$ (ANOVA followed by Dunnett's test).

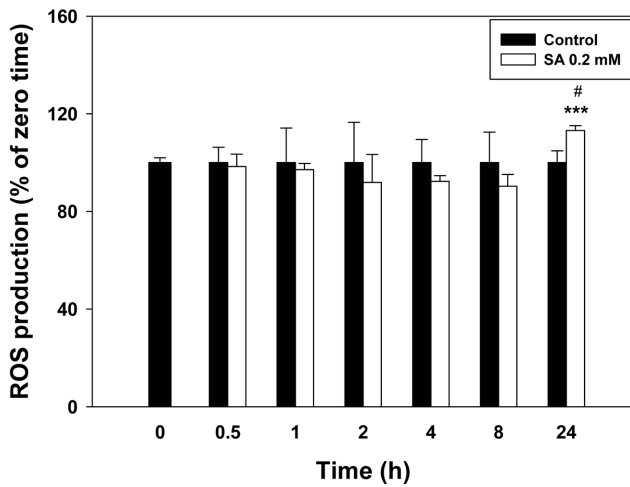


Fig. 2 – ROS production in SK-Hep-1 cells treated with 0.2 mM stearic acid. SK-Hep-1 cells were cultured in the presence of 0.2 mM stearic acid for 30 minutes to 24 hours. Data are the mean±S.D. for eight separate samples. ***Significantly different than levels monitored in corresponding control cells, $P < 0.001$ (un-paired Student's t-test). # Significantly different than levels monitored at zero time, $P < 0.05$ (ANOVA followed by Dunnett's test).

증가한다는 보고들과 일치된 결과로서, stearic acid가 산화적 스트레스를 발생하여 지방간염의 발생에 기여할 수 있음을 시사하는 것이다.^{25,26)}

산화적 스트레스의 다른 지표로서 세포 내 대표적인 항산화 물질로 알려진 GSH의 변화와 지질과산화의 지표인 malondialdehyde (MDA)의 발생 양을 평가하였다. 0.2 mM stearic acid을 다양한 시간(0~24시간) 동안 처리하고 GSH와 MDA의 양을 평가 하였다. GSH는 stearic acid의 처리 30분, 1시간 및 4~24시간 처리한 군에서 모두 유의적으로 감소하였다(Fig. 3A). 그러나 MDA는 모든 시간에서 stearic acid 처리에 따른 유의적인 변화가 없었다(Fig. 3B). Stearic acid의 처리에 따른 세포 내 GSH의 감소는 stearic acid에 의해 발생하는 활성 산소종을 GSH가 무독화시키는 과정에서 감소했을 것으로 사료된다. 지질과산화지표인 MDA 무변화는 GSH를 비롯한 세포 내 항산화 효소 및 물질들의 보호작용에 의해, stearic acid에 의해 발생했던 활성 산소종들이 효과적으로 제거되었기 때문이라 사료된다. 이는 stearic acid에 의해 발생한 활성 산소종의 양이 세포 손상을 일으킬 만큼 유독한 양은 아님을 의미한다. 임상적으로 지방간과 비알콜성 지방간염 환자의 간에서 GSH의 양은 감소되어 있으며, 지질과산화는 지방산에서 비알콜성 지방간염으로의 진행을 매개하는 것으로 보고되었다.^{27,28)} 따라서 stearic acid에 의한 세포의 GSH의 감소는, stearic acid가 지방간 및 지방간염에 관여할 가능성이 있음을 시사하는 것이다.

GSH 외에 stearic acid에 의해 발생하는 산화적 스트레스를 제

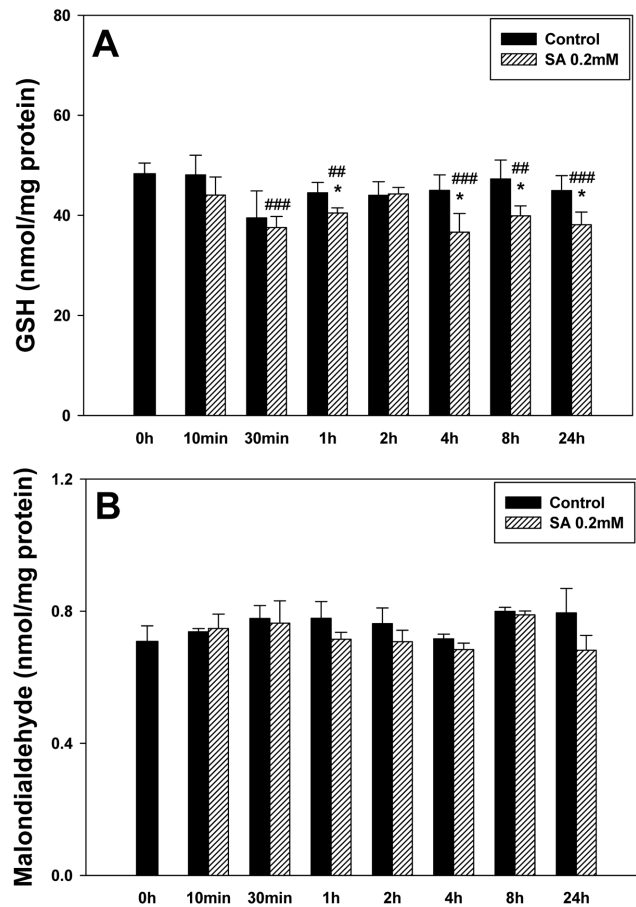


Fig. 3 – Cellular total GSH and MDA levels in SK-Hep-1 cells treated with 0.2 mM stearic acid. SK-Hep-1 cells were cultured in the presence of 0.2 mM stearic acid for 10 minutes to 24 hours. Data are the mean±S.D. for three separate samples. *Significantly different than levels monitored in corresponding control cells, $P < 0.05$ (un-paired Student's t-test). ##, ### Significantly different than levels monitored at zero time, $P < 0.01$ or $P < 0.001$, respectively (ANOVA followed by Dunnett's test).

거하는 데 관여하는 다른 기전을 알아보기 위하여 세포 내 여러 다양한 항산화 효소들의 변화를 평가하였다. Stearic acid를 각각 0.05, 0.1, 0.2 mM으로 24시간 처리 후, 항산화 효소들인 catalase, GR, GST- α , GST- π , GPX-1, GPX-4, Prx-1, Prx-2, Prx-3, SOD-1, SOD-2, Trx-1, Trx-2의 발현 변화를 평가하였다. 그 결과, 모든 항산화 효소들에서 지방산 처리 농도에 따른 유의적인 변화는 없었다. 그러나 0.2 mM에서, SOD-1과 SOD-2가 대조군 대비 각각 $123 \pm 8\%$ ($P < 0.05$; un-paired Student's t-test), $136 \pm 7\%$ ($P < 0.01$; un-paired Student's t-test)로 유의적으로 증가하였다(Fig. 4). SOD-1은 cytoplasmic Cu/Zn SOD로서 superoxide anion을 환원시켜서 hydrogen peroxide를 생성하며, SOD-2는 mitochondrial Mn-SOD로서 산화적 스트레스에서 mitochondria를 보호하는 역할을 한다.^{29,30)} 이는 stearic acid에 의해 발생한

Catalase				
	100±19 %	114±6 %	98±5 %	98±6 %
GR				
	100±12 %	88±16 %	102±12 %	98±3 %
GST-α				
	100±15 %	95±8 %	97±17 %	80±15 %
GST-π				
	100±23 %	90±32 %	94±16 %	105±19 %
GPX-1				
	100±12 %	101±24 %	84±14 %	107±26 %
GPX-4				
	100±23 %	161±55 %	94±23 %	126±45 %
Prx-1				
	100±19 %	79±9 %	86±4 %	108±28 %
Prx-2				
	100±9 %	129±16 %	110±17 %	134±28 %
Prx-3				
	100±19 %	101±8 %	106±13 %	107±37 %
SOD-1				
	100±4 %	111±34 %	105±7 %	123±8 %
SOD-2				
	100±8 %	117±26 %	92±20 %	136±7 %
Trx-1				
	100±10 %	95±12 %	108±10 %	114±11 %
Trx-2				
	100±21 %	130±28 %	149±44 %	109±8 %
GAPDH				
	CT	0.05	0.1	0.2
		Stearic acid (mM)		

Fig. 4 – Expression of antioxidant enzymes in SK-Hep-1 cells treated with stearic acid. SK-Hep-1 cells were treated with stearic acid for 24 hours at 0.05, 0.1 or 0.2 mM. Values are shown as the percentage of cells cultured in the absence (CT) of stearic acid. Data are mean±S.D. of immunoblot band densities. There were no significant differences in expression of antioxidant enzymes (ANOVA followed by the Dunnett's test). GR; glutathione reductase, GST; glutathione-S-transferase, GPX; glutathione peroxidase, Prx; peroxiredoxin, SOD; superoxide dismutase, Trx; thioredoxin.

활성 산소종의 제거에 항산화 효소인 SOD-1, 2가 관여하고 있음을 의미한다.

결론

본 연구는 사람의 간암 세포주인 SK-Hep-1 세포에서, 비알콜성 지방간 환자의 간에서 증가된 것으로 보고된 stearic acid의 처리가, 다양한 산화적 스트레스 평가 지표에 미치는 영향을 평가하였다. 세포 독성 실험 결과 stearic acid는 0.5 mM에서 세포 독성을 유발하였으며, 0.2 mM 이하의 농도에서는 세포독성을 유발하지 않았다. 따라서 최대 무독성 용량을 0.2 mM로 설정하고 향후 실험을 진행하였다. 0.2 mM의 stearic acid를 처리하고 활성 산소종의 발생을 다양한 시간에서 평가한 결과 24시간에서 증가함을 확인하였다. 세포 내 항산화 물질인 GSH와 지질과산화의 산물인 MDA를 다양한 시간에서 평가한 결과 GSH는 30

분, 1시간 및 4~24시간까지 감소하였고, MDA는 변화가 없었다. 다양한 항산화 효소들의 발현 변화 평가결과, 0.2 mM stearic acid에서 SOD-1과 SOD-2의 발현을 증가시켰다. 이로써, stearic acid에 의해서 산화적 스트레스가 발생함과 발생한 산화적 스트레스의 무독화 기전에 GSH와 SOD-1, 2가 관여함을 알 수 있었다. 이는 two hit theory에 기초하여, stearic acid가 지방간에서 지방간염으로의 발병에 관여할 가능성이 있음을 시사하는 것이다. 또한, 향후 *in vitro* 지방간염 모델의 구축 및 관련 연구에 stearic acid의 역할을 규명하기 위한 추가적인 연구가 필요함을 시사한다.

감사의 말씀

이 논문은 2009년도 교육과학기술부의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(No. 2009-0076058).

참고문헌

- Gasbarrini, G., Vero, V., Miele, L., Forgione, A., Hernandez, A. P., Greco, A. V., Gasbarrini, A. and Grieco, A. : Nonalcoholic fatty liver disease: defining a common problem. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **9**, 253 (2005).
- Bradbury, M. W. : Lipid metabolism and liver inflammation. I. Hepatic fatty acid uptake: possible role in steatosis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **290**, G194 (2006).
- Koruk, M., Savas, M. C., Yilmaz, O., Taysi, S., Karakok, M., Gündoğdu, C. and Yilmaz, A. : Serum lipids, lipoproteins and apolipoproteins levels in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *J. Clin. Gastroenterol.* **37**, 177 (2003).
- Mccullough, A. J. : Pathophysiology of nonalcoholic steatohepatitis. *J. Clin. Gastroenterol.* **40**, S17 (2006).
- Clark, J. M. : The epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease in adults. *J. Clin. Gastroenterol.* **40**, S5 (2006).
- Bellentani, S. and Marino, M. : Epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease. *Ann. Hepatol.* **8**, S4 (2009).
- Day, C. P. and James, O. F. : Steatohepatitis: a tale of two 'hits'? *Gastroenterology* **114**, 842 (1998).
- Day, C. P. and James, O. F. : Hepatic steatosis: innocent bystander or guilty party? *Hepatology* **27**, 1463 (1998).
- Byrne, C. D. : Fatty liver: role of inflammation and fatty acid nutrition. *Prostaglandins. Leukot. Essent. Fatty Acids.* **82**, 265 (2010).
- Sanyal, A. J., Campbellsargent, C., Mirshahi, F., Rizzo, W. B., Contos, M. J., Sterling, R. K., Luketic, V. A., Shiffman, M. L. and Clore, J. N. : Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities.

- Gastroenterology* **120**, 1183 (2001).
- 11) Sumida, Y., Nakashima, T., Yoh, T., Furutani, M., Hirohama, A., Kakisaka, Y., Nakajima, Y., Ishikawa, H., Mitsuyoshi, H., Okanoue, T., Kashima, K., Nakamura, H. and Yodoi, J. : Serum thioredoxin levels as a predictor of steatohepatitis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J. Hepatol.* **38**, 32 (2003).
 - 12) Morrow, J. D. : Is oxidant stress a connection between obesity and atherosclerosis? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **23**, 368 (2003).
 - 13) Pessayre, D., Berson, A., Fromenty, B. and Mansouri, A. : Mitochondria in steatohepatitis. *Semin. Liver Dis.* **21**, 57 (2001).
 - 14) McClain, C. J., Barve, S., Deaciuc, I., Kugelmas, M. and Hill, D. : Cytokines in alcoholic liver disease. *Semin. Liver Dis.* **19**, 205 (1999).
 - 15) Marceau, P., Biron, S., Hould, F. S., Marceau, S., Simard, S., Thung, S. N. and Kral, J. G. : Liver pathology and the metabolic syndrome X in severe obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **84**, 1513 (1999).
 - 16) Marchesini, G., Brizi, M., Morsellilabate, A. M., Bianchi, G., Bugianesi, E., McCullough, A. J., Forlani, G. and Melchionda, N. : Association of nonalcoholic fatty liver disease with insulin resistance. *Am. J. Med.* **107**, 450 (1999).
 - 17) Knobler, H., Schattner, A., Zhornicki, T., Malnick, S. D., Keter, D., Sokolovskaya, N., Lurie, Y. and Bass, D. D. : Fatty liver -- an additional and treatable feature of the insulin resistance syndrome. *Q.J.M.* **92**, 73 (1999).
 - 18) Chawla, R., Watson, W., Eastin, C., Lee, E., Schmidt, J. and McClain C. J. : S-adenosylmethionine (AdoMet) deficiency and tumor necrosis factor (TNF) in lipopolysaccharide (LPS) induced hepatic injury. *Am. J. Physiol.* **275**, G125 (1998).
 - 19) Delapena, A., Leclercq, I., Field, J., George, J., Jones, B. and Farrell, G. : NF-kappaB activation, rather than TNF, mediates hepatic inflammation in a murine dietary model of steatohepatitis. *Gastroenterology* **129**, 1663 (2005).
 - 20) Kugelmas, M., Hill, D. B., Vivian, B., Marsano, L. and McClain, C. J. : Cytokines and NASH: effects of lifestyle modification and vitamin E. *Hepatology* **38**, 413 (2003).
 - 21) Kovacic, P. and Jacintho, J. D. : Mechanisms of carcinogenesis: Focus on oxidative stress and electron transfer. *Curr. Med. Chem.* **8**, 773 (2001).
 - 22) Ridnour, L. A., Isenberg, J. S., Espey, M. G., Thomas, D. D., Roberts, D. D. and Wink, D. A. : Nitric oxide regulates angiogenesis through a functional switch involving thrombospondin-1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 13147 (2005).
 - 23) Valko, M., Morris, H., Mazur, M., Rapt, P. and Bilton, R. F. : Oxygen free radical generating mechanisms in the colon: Do the semiquinones of vitamin K play a role in the aetiology of colon cancer? *Biochim. Biophys. Acta.* **1527**, 161 (2001).
 - 24) Araya, J., Rodrigo, R., Videla, L. A., Thielemann, L., Orellana, M., Pettinelli, P. and Poniachik, J. : Increase in long-chain polyunsaturated fatty acid n - 6/n - 3 ratio in relation to hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Clin. Sci. (Lond)* **106**, 635 (2004).
 - 25) Nakamura, S., Takamura, T., Matsuzawa-Nagata, N., Takayama, H., Misu, H., Noda, H., Nabemoto, S., Kurita, S., Ota, T., Ando, H., Miyamoto, K. and Kaneko, S. : Palmitate induces insulin resistance in H4IIEC3 hepatocytes through reactive oxygen species produced by mitochondria. *J. Biol. Chem.* **284**, 14809 (2009).
 - 26) Gao, D., Nong, S., Huang, X., Lu, Y., Zhao, H., Lin, Y., Man, Y., Wang, S., Yang, J. and Li, J. : The effects of palmitate on hepatic insulin resistance are mediated by NADPH Oxidase 3-derived reactive oxygen species through JNK and p38MAPK pathways. *J. Biol. Chem.* **285**, 29965 (2010).
 - 27) Videla, L. A., Rodrigo, R., Orellana, M., Fernandez, V., Tapia, G., Quinones, L., Varela, N., Contreras, J., Lazarte, R., Csendes, A., Rojas, J., Maluenda, F., Burdiles, P., Diaz, J. C., Smok, G., Thielemann, L. and Poniachik, J. : Oxidative stress-related parameters in the liver of non-alcoholic fatty liver disease patients. *Clin. Sci. (Lond)* **106**, 261 (2004).
 - 28) Singh, R., Wang, Y., Schattenberg, J. M., Xiang, Y. and Czaja, M. J. : Chronic oxidative stress sensitizes hepatocytes to death from 4-hydroxynonenal by JNK/c-Jun over activation. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **297**, G907 (2009).
 - 29) Murphy, L. M., Strange, R. W. and Hasnain, S. S. : A critical assessment of the evidence from XAFS and crystallography for the breakage of the imidazolate bridge during catalysis in CuZn superoxide dismutase. *Structure* **5**, 371 (1997).
 - 30) Tang, L., Ou, X., Henkle-Duhrsen, K. and Selkirk, M. E. : Extracellular and cytoplasmic CuZn superoxide dismutase from *Brugia lymphatic filaria* nematode parasites. *Infect. Immun.* **62**, 961 (1994).