

## 鉄存在下 HepG2 細胞における TNF- $\alpha$ /actinomycin D 処理による 肝障害モデルの構築

高橋 昌悟, 三浦 彩佳, 佐々木 瞳, 坂口 修平, 永田 清\*

### TNF- $\alpha$ /actinomycin D-mediated HepG2 cells in the presence of iron as a model of hepatocyte injury

Shogo TAKAHASHI, Ayaka MIURA, Hitomi SASAKI, Shuhei SAKAGUCHI, and Kiyoshi NAGATA\*

(Received November 20, 2012)

We examined the contribution of iron to the cytotoxicity of tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  combined with actinomycin D (ActD) as a model of hepatocyte injury in HepG2 cells. In general, hepatocytes are resistant to TNF- $\alpha$ . However, a transcriptional inhibitor such as ActD can sensitize them to TNF- $\alpha$ . In the present study, we show that low levels of ActD (0.5 nM) sensitized HepG2 cells to the cytotoxic effects of TNF- $\alpha$  (20 ng/mL) for 48 h. Iron plays a critical role in catalyzing the formation of potent oxidants. To assess the toxicological significance of this TNF- $\alpha$ /ActD interaction, ferric-nitriilotriacetate (Fe-NTA, 2  $\mu$ M) was added to the cells. Treatment with Fe-NTA significantly increased the sensitivity to the TNF- $\alpha$ /ActD-mediated cell death. TNF- $\alpha$ /ActD-mediated cell death in the presence of a lower concentration of iron did not result in DNA fragmentation. We suggest that iron increased the sensitivity to the cytotoxicity of TNF- $\alpha$ /ActD in HepG2 cells. It is likely that TNF- $\alpha$ /ActD/Fe-NTA-mediated cell death contributes to the non-apoptotic death of cells via oxidative stress caused by iron. Our experimental model may be useful for studying hepatic drug metabolism using TNF- $\alpha$  as a model of hepatocyte injury, especially in HepG2 cells.

**Key words** — Tumor necrosis factor, cytotoxicity, actinomycin D, oxidative stress, iron

## 緒 言

創薬において、医薬品候補化合物の開発中止における重大な要因は、ヒトに対する効能不足および毒性発現とされている。<sup>1)</sup> すなわち、非臨床試験で有効とされていた新薬候補化合物が、臨床試験において有効性が認められない、または強い副作用により開発中止を余儀なくされている。<sup>2-4)</sup> その中でも、薬物暴露により肝臓に生じる毒性（薬物性肝障害）は、非常に高頻度で発現する副作用である。<sup>5)</sup> 実際、薬物性肝障害は開発中止、警告あるいは販売中止に至る主要な薬剤関連有害事象となっている。<sup>6)</sup> 薬物性肝障害は非臨床試験および市販後試験のいずれの段階においても発現し得るため、肝障害ポテンシャルおよび肝障害機序を可能な限り早期かつ正確に評価し、リスク・ベネフィット分析等を通じて、医薬品開発に関する go/no-go の決定は、新薬の生産性に大きく貢献すると考えられる。近年の実験動物から得られた知見として、穏やかな炎症状態が毒性への閾値を低下

させ、副作用への個々の感受性を上昇させるとの報告があり、<sup>7)</sup> 肝障害に対する炎症反応の寄与が注目されている。また、Wei らにより、非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) のスリダクが、中用量の Lipopolysaccharide (LPS) 処理により肝障害が誘発されるとの報告がなされた。<sup>8,9)</sup> 加えて、そのスリダク誘発性肝障害は、tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  により増強されることが示唆されている。TNF- $\alpha$  は本来、生体防御機構に関わる炎症性サイトカインであり、肝において炎症性変化の中心的役割を演じている。一方で、近年の TNF- $\alpha$  による肝細胞死誘導のメカニズムの研究により、この TNF- $\alpha$  は肝細胞の TNF- $\alpha$  受容体に結合し reactive oxygen species (ROS) 産生とともに c-jun N-terminal kinase (JNK) 経路を活性化し、炎症を起こした肝細胞の細胞死を誘導し、炎症を収束させると考えられている。<sup>10)</sup> これは、活性化された JNK が、caspase-8 に対する阻害作用をもつ cellular FLICE-inhibitory protein (c-Flip) を抑制し引き起こされると考えられている。<sup>10)</sup> しかしなが

ら, *In vitro*では多くの細胞がTNF- $\alpha$ の細胞死誘導に対して耐性であり, 特に肝細胞や肝がん細胞においては顕著である. 近年の研究から, それには, nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B)によるJNK経路の抑制が寄与しており,<sup>11)</sup> また, NF- $\kappa$ Bの発現量をノックダウンした細胞では, 少量のTNF- $\alpha$ でも細胞死が起こることが知られている.<sup>12)</sup> 従って, 薬物性肝障害を起こしやすいモデル細胞を樹立するには, NF- $\kappa$ B抑制によるJNK経路の感受性を高めることが必要である. 一方, 転写阻害剤であるactinomycin D (ActD), D-galactosamineおよび $\alpha$ -amanitinの存在下で, TNF- $\alpha$ による細胞死が誘導されることが明らかとなっている.<sup>13)</sup> また, 酸化ストレスの誘導が細胞死に重要であることが報告されているが,<sup>14)</sup> 近年TNF- $\alpha$ 刺激による細胞死においても, 活性酸素による細胞シグナル制御(ROSシグナル)が関与することが明らかになってきている.<sup>15)</sup> そこで本稿では*in vitro*における薬物性肝障害評価系の構築を目的として転写阻害剤ActDおよび酸化ストレス誘発剤鉄ニトリロ三酢酸(Fe(III)-nitrilotriacetic acid, Fe-NTA)を肝モデル細胞として汎用されるHepG2細胞へ添加し, TNF- $\alpha$ 誘導性肝細胞障害モデルの構築を試みた.

## 実験方法および実験材料

### 1. 細胞培養

HepG2細胞は, 東北大学加齢医学研究所医用細胞資源センターより供与されたものを用いた. この細胞を10% fetal calf serum (FCS, WAKO社製)およびAntibiotic-Antimycotic [100 U/mL penicillin G sodium, 100  $\mu$ g/mL amphotericin B (Invitrogen社製)], 0.45% glucose, 2 mM-glutamine含有Dulbecco's modified Eagle's medium, (DMEM, WAKO社製)中で, 5% CO<sub>2</sub>-95% airを気相とし, 37°Cでインキュベーションを行った.

### 2. Fe-NTA調製

Awaiらの方法に従った.<sup>16)</sup> 硝酸鉄(III)九水合物(WAKO社製)は1 M HCl溶液を用いて50 mMに調整した. また, NTA(Nacalai tesque社製)は1 M NaOH溶液(Nacalai tesque社製)を用いて150 mMに調整した. 50 mM硝酸鉄(Nacalai tesque社製)および150 mM NTAを1:3で混合し, NaHCO<sub>3</sub>を用いてpH 7.4に合わせた後, 0.45  $\mu$ m membrane filterでろ過滅菌し, Fe-NTAとして使用した.

### 3. MTT assay

細胞毒性試験はMTT試薬([3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide], Nacalai tesque社製)を用いて, 同社のプロトコールに従って行った. 細胞を96 well-plate (Becton, Dickinson社製)に $2 \times 10^4$  cells/wellの密度で播種し, CO<sub>2</sub>インキュベーター内で24時間前培養した後, ActDを処置し, 30分後TNF- $\alpha$ , さらに1時間後Fe-NTAを細胞に処理した. 48時間培養後, MTT溶液を各wellに10  $\mu$ Lずつ添加し, 定色反応を4時間行った. 可溶化液(0.04 M塩酸を含むイソプロピルアルコール)を100  $\mu$ L添加し, 沈殿したホルマザンをピペッティングにより可溶化し, その後マイクロプレートリーダー(TOSOH社製)を用いて570 nmの吸光度測定を行った.

### 4. アガロースゲル電気泳動法によるDNA断片化の検出

100 mm培養ディッシュで培養した細胞を回収し, 滅菌済みDulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS, WAKO社製)200  $\mu$ Lに浮遊させ, 1.5 mLチューブに移した. 遠心分離(250 $\times$ g, 10分間)後上清を取り除き, 細胞ペレットに細胞溶解バッファー[0.1 M Tris-HCl, 0.1 M-2-(2-[bis(carboxymethyl)amino]ethyl)(carboxymethyl)amino)acetic acid (EDTA), 5% Triton]100  $\mu$ Lを加え, 細胞を溶解させ, DNA断片を抽出した. 4°C, 10分間放置後, 15,000 rpm, 5分間遠心分離し, 上清を新たな1.5 mLチューブに取り, TEバッファー300  $\mu$ L, フェノール/クロロホルム(Nacalai tesque社製)400  $\mu$ L加え再度, 遠心分離(15,000 rpm, 5分間)した. 上清を新たな1.5 mLチューブに取り, Ribonuclease A (RNase A, Invitrogen社製)溶液を1  $\mu$ L加え, 37°C, 1時間温置した後, proteinase K (Nacalai tesque社製)溶液を8  $\mu$ L加え, 20°Cで一晩放置した. 遠心分離後(15,000 rpm, 15分間), 上清を除去し, 70%エタノール1 mL加え, 再度遠心分離した. 上清を除去後TEバッファー20  $\mu$ L添加し, 1.2%アガロースゲル電気泳動を行った.

### 5. 統計学的解析

得られた実験値は平均値 $\pm$ 標準偏差(mean $\pm$ S.D.)で示し, 比較検定にはStudentの*t*検定を行った. 統計学的有意差は危険率1%を基準として判定した.

## 結 果

1. TNF- $\alpha$  (A), ActD (B), Fe-NTA (C) 単独処理での HepG2 細胞への細胞毒性

我々はまず, TNF- $\alpha$ , ActD, および Fe-NTA 単独処置による細胞毒性を検討した. HepG2 細胞において, TNF- $\alpha$  単独添加 (0.1~100 ng/mL) の 48 時間後では有意な細胞毒性を示さなかった (Fig. 1A). また, HepG2 細胞は TNF- $\alpha$  誘発性肝障害に対する耐性を示し, それは ActD 等により減少することが知られている.<sup>17)</sup> そこで, ActD を 0.1~100

nM の範囲で処理し, 48 時間後の細胞毒性を検討した. その結果, Fig. 1B に示すように量依存性で細胞毒性が増大し, 100 nM の ActD では生存率は 36%に低下した. 一方, 0.1~1 nM Act D 処置群では細胞毒性は示さなかった. さらに, 我々は酸化ストレスモデルを構築する目的で代表的な遷移金属である鉄を導入して検討を行った. 一般に鉄イオン単独での細胞内導入率は低いことから, 導入効率の良い Fe-NTA を使用し, HepG2 細胞にそれを 0.5~150  $\mu$ M の範囲で曝露した. 48 時間で 0.5~10  $\mu$ M では有意な細胞毒性は認められなかったが, 50~150  $\mu$ M では有意な毒性が認められた (Fig. 1C).

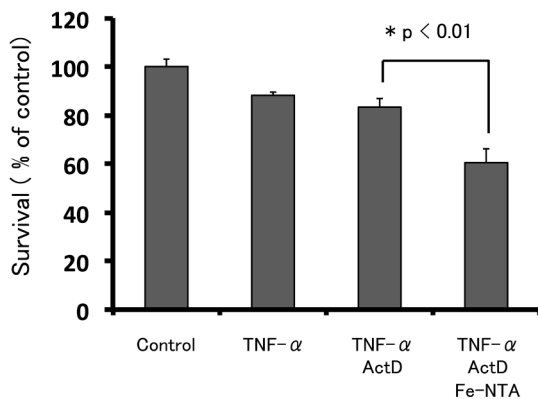
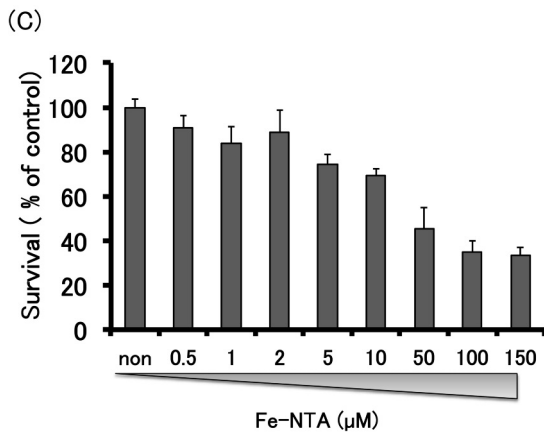
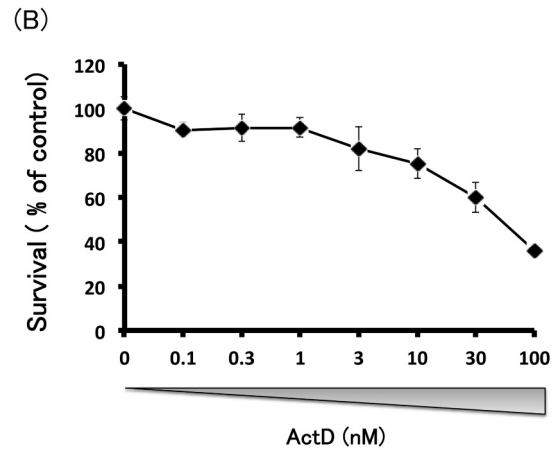
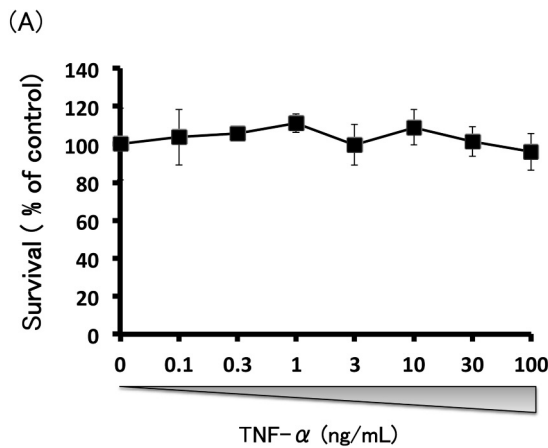


Fig. 1. Changes in cell viability of the treatments with TNF- $\alpha$  (A), ActD (B) and Fe-NTA (C) in HepG2 cells.

These cells were preincubated for 24 h with DMEM. After the addition of TNF- $\alpha$  (0.1~100 ng/mL), ActD (0.1~100 nM) and Fe-NTA (0.5~150  $\mu$ M) to the culture medium, the cells were incubated for 48 h. The cell survival was measured by the MTT assay as described in materials and methods. Data represent the means  $\pm$  SD ( $n=4$  experiments).

Fig. 2. Effect of iron on TNF- $\alpha$ /ActD-induced cytotoxicity in HepG2 cells.

These cells were incubated with TNF- $\alpha$  (20 ng/mL) combined with ActD (0.5 nM) for 48 h in the presence of Fe-NTA (2  $\mu$ M). Cell survival was measured by the MTT assay as described in materials and methods. The surviving fraction was determined by dividing the absorbance of treated cells by that of control cells. A: Control, B: TNF- $\alpha$ , C: TNF- $\alpha$ /ActD, D: TNF- $\alpha$ /ActD/Fe-NTA. Data represent the mean  $\pm$  SD ( $n=4$  experiments). \* $p < 0.01$ , compared to cells treated with TNF- $\alpha$ /ActD (Student's  $t$ -test).

## 2. 鉄存在下での ActD-感受性 HepG2 細胞における TNF- $\alpha$ の細胞毒性

本研究において, ActD (0.5 nM), Fe-NTA (2  $\mu$ M) では HepG2 細胞における細胞毒性は認められなかったことから, TNF- $\alpha$  (20 ng/mL) /ActD (0.5 nM) /Fe-NTA (2  $\mu$ M) の低添加量を選択し, 48 時間後での鉄存在下 TNF- $\alpha$  /ActD による HepG2 細胞における細胞毒性を検討した. ActD は TNF- $\alpha$  処理 30 分前に細胞に添加した. その 1 時間後に Fe-NTA を処理した (Fig. 2). その結果, TNF- $\alpha$  /ActD では無処置細胞に比べ細胞生存率は 82% であるが, 鉄存在下での TNF- $\alpha$  /ActD/Fe-NTA 群においては顕著な細胞死が観察され, 細胞生存率は 60% まで低下した (Fig. 2).

## 3. HepG2 細胞での TNF- $\alpha$ /ActD/Fe-NTA 処理による DNA の断片化

上記に示すように鉄存在下 TNF- $\alpha$  /ActD が有意な細胞死を認めたため, この肝細胞死の形態がアポトーシスあるいはネクローシスかについて検討した.

本研究においてアガロースゲル電気泳動法で DNA 断片化に基づく細胞死の判定を行ったところ, アポトーシス陽性対照として用いた 10  $\mu$ M camptothecin 処置群においては, ラダーリングは

認められたが, 低濃度 TNF- $\alpha$  /ActD/Fe-NTA 処置群においては整数倍のラダーパターン (180-200 bp) は見られなかった. この結果より, 本鉄存在下での TNF- $\alpha$  /ActD 誘導細胞死はネクローシス様の細胞死であることが示唆された (Fig. 3).

## 考 察

TNF- $\alpha$  は腫瘍部位に出血壊死を誘導する因子として見いだされたが, 現在では炎症での生体防御機構に広く関わる炎症性サイトカインとして理解されている.<sup>4)</sup> 肝細胞においても, 炎症反応を惹起するサイトカインとして中心的な役割を演じ, 生体の恒常性の維持に重要な役割を果たしている. また, TNF- $\alpha$  は, 過剰に生産されると肝障害を誘発することから, TNF- $\alpha$  は肝障害 mediator とも考えられている.<sup>23)</sup> 我々は, 薬物性肝障害モデル細胞として, 薬物代謝や肝毒性研究に汎用されるヒト肝癌由来細胞株の HepG2 細胞を使用してきた. しかしながら, この細胞は NF- $\kappa$ B による JNK 経路の抑制を示すことが知られているため, 転写阻害剤である ActD および酸化ストレス誘発材である Fe-NTA により, TNF- $\alpha$  誘発性肝障害に感受性を持たせることを試みた. ActD は, 転写阻害剤として知られており, *in vivo*, *in vitro* でアポトーシスを誘導する.<sup>18)</sup> Leist らは<sup>13)</sup> HepG2 細胞への ActD 333 nM, 24 時間処理で TNF- $\alpha$  の感受性増大を報告しているが, Fig. 1B に示すように著者らの検討ではこれらの ActD 濃度では細胞障害が強く不適であったため, 0.5 nM 処置を行った (Fig. 1B). また, 肝障害においては, 活性酸素による酸化ストレスが起こることが知られており,<sup>24)</sup> 2 価のフリー鉄は Fenton/Haber-Weiss 反応により有毒なヒドロラジカル ( $\cdot$ OH) を生じ酸化ストレスを生起する.<sup>19)</sup> HepG2 細胞へ Fe-NTA を添加しない ActD/TNF- $\alpha$  に比べ, Fe-NTA 添加群では, 明らかに TNF- $\alpha$  による細胞障害が認められた (Fig. 2). これらの結果から 2 価鉄と ActD が TNF- $\alpha$  誘導細胞に対する感受性因子に重要な役割を演じることが示された.

スリンドク/LPS 誘導性肝障害などの炎症反応が関与する薬物性肝障害において, TNF- $\alpha$  が媒介する経路は重要な役割を担っている.<sup>9)</sup> それは, TNF- $\alpha$  による death receptor を介した経路の他に JNK 活性化経路, さらに NF- $\kappa$ B 活性化によるアポ

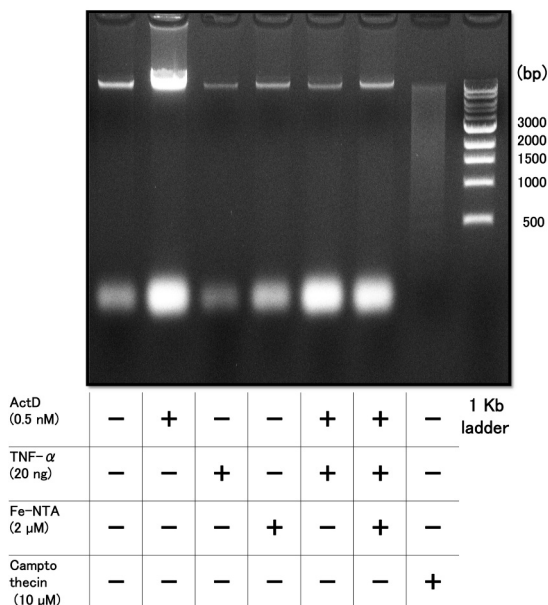


Fig. 3. Effects of TNF- $\alpha$ /ActD/Fe-NTA-treated HepG2 cells on DNA laddering.

These cells were incubated with TNF- $\alpha$  (20 ng/mL) combined with ActD (0.5 nM) for 48 h in the presence of Fe-NTA (2  $\mu$ M). DNA was prepared from supernatant of 15,000 rpm of cell homogenates and electrophoresed as described in materials and methods. DNA fragments were used as molecular markers. DNA laddering was absent in control cells.



トーシス抑制経路が主なものである。一般に、肝細胞における TNF- $\alpha$  の細胞死に対する耐性は、NF- $\kappa$ B の肝細胞と炎症細胞における作用の違いに起因すると考えられている。すなわち、NF- $\kappa$ B は、肝細胞においては TNF- $\alpha$  誘導性の細胞死シグナルに対して拮抗する生存シグナルを伝えるが、一方、炎症細胞においては、TNF- $\alpha$  の産生を誘導する二面性をもつことから説明されている。本モデルにおいては、ActD により NF- $\kappa$ B 経路が阻害され、細胞死が誘導された可能性が示唆される。

また、細胞死は形態学的にアポトーシスとネクローシスに区別され、TNF- $\alpha$  による肝障害においても、肝細胞ではアポトーシスおよびネクローシスが関与し細胞死を誘導することが報告されている。<sup>13,20)</sup> 従って、その細胞死を識別することは、その原因を探索する上で重要な手がかりとなる。DNA 断片化 (DNA fragmentation) は、アポトーシスの生化学的指標とされており、通常、アポトーシスが生じた細胞より抽出した DNA をアガロースゲル電気泳動で泳動後、180~200 bp の整数倍の“ラダー (ladder)”として検出されている。<sup>21)</sup> 一方、ネクローシスによる DNA の断片化はアポトーシスに比べて少ないのが特徴である。ActD はアポトーシスを誘導するが、Kleeff らは ActD 100~1000 ng/mL では DNA 断片化が認められるが、10 ng/mL では認められないと述べている。<sup>22)</sup> 本条件下 ActD は 0.5 nM を使用しているため、この ActD の濃度ではアポトーシスを誘導しないと考えられた。実際、この条件下での TNF- $\alpha$ /ActD/Fe-NTA 添加の細胞死誘導は、アポトーシスの特徴である DNA の断片化は見られず、非アポトーシスによることを示唆した (Fig. 3)。スリダクなどの薬物による TNF- $\alpha$  を媒介した肝障害においても、その細胞死は、主にネクローシスであることが示唆されている。<sup>8)</sup> また、そのような薬物性肝障害は、ROS の発生が重要な因子となることが報告されている。<sup>24,25)</sup> そこで、我々の肝障害モデルでは、Fe-NTA 添加により、細胞内の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を反応性の強い  $\cdot$ OH に変換させ (Fenton 反応)、ROS の産生能を増加させている。これにより、薬物およびその代謝物により産生された ROS に対する感受性が増大し、薬物性肝障害を感度よく予測することができると考えられる。

これまでカスパーゼを介するアポトーシスが分子生物学的および生化学的に解明されてきており、

ネクローシスは偶発的なものと考えられてきた。しかし、近年、TNF- $\alpha$  による細胞死が細胞の種類によってアポトーシスではなく、ネクローシス様の細胞死を誘導することが知られており、<sup>26,27)</sup> “偶発的でない制御されたネクローシス”の存在が示唆されていた。その分子機構は全く不明であったが、最近、TNF- $\alpha$  によって誘導されるネクローシス様の細胞死は RIPK1 および RIPK3 (RIPK; receptor-interacting protein kinase) というキナーゼに依存性であることが明らかとなり、<sup>27)</sup> ネクローシスもアポトーシスと同様に高度に遺伝子によって制御されたプログラムネクローシス (necroptosis) の存在が認知されるようになった。TNF- $\alpha$  受容体の活性化は細胞死および細胞生存という相互に排他的な 2 つのシグナル伝達経路を誘発するが、<sup>28)</sup> 前者はさらに、カスパーゼに依存性のアポトーシスと RIPK に依存性のネクローシスという 2 つの形態の細胞死につながるシグナル伝達経路に分岐する。近年、薬物性肝障害における TNF- $\alpha$  など炎症性サイトカインの寄与が示唆されているが、<sup>6)</sup> このシグナル伝達経路の均衡の崩れが肝障害に寄与する可能性が考えられる。また、酸化ストレスにおいても、その強弱によりアポトーシスあるいはネクローシスが誘導されると推測されている。<sup>29)</sup> ヒト白血病 T 細胞株である Jurkat 細胞において、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> は 0.7  $\mu$ M 以下では細胞増殖に作用し、1~3  $\mu$ M 以下ではアポトーシス、そして 3  $\mu$ M 以上ではネクローシスを生じることが報告されている。<sup>30)</sup> 薬物性肝障害においても、ネクローシスとアポトーシスの発生の差異は、酸化ストレスによっても担われると推測される。すなわち、TNF- $\alpha$  および酸化ストレスに対して、高感受性である TNF- $\alpha$ /ActD/Fe-NTA による本モデルは、薬物性肝障害モデルとして有用な情報を提供するツールになると考えられる。更なる検討により、薬物性肝障害の病態をより正確に評価できる系が確立されれば、創薬において、医薬品の開発プロセスにおける精度良い予測を可能にし、創薬シーズのヒット率の上昇に寄与できると考えられる。

## REFERENCES

- 1) Frank R., Hargreaves R., *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2**, 566-580 (2003).
- 2) Ebert A. D., Svendsen C. N., *Nat. Rev. Drug Discov.*,

- 9, 367–372 (2010).
- 3) Teranishi M., Manabe S., *Nihon Yakurigaku Zasshi*, **132**, 347–350 (2008).
- 4) Kola I., Landis J., *Nat. Rev. Drug Discov.*, **3**, 711–715 (2004).
- 5) Lee W. M., *N. Engl. J. Med.*, **349**, 474–485 (2003).
- 6) Kaplowitz N., *Nat. Rev. Drug Discov.*, **4**, 489–499 (2005).
- 7) Roth R. A., Luyendyk J. P., Maddox J. F., Ganey P. E., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **307**, 1–8 (2003).
- 8) Zou W., Devi S. S., Sparckenbaugh E., Younis H. S., Roth R. A., Ganey P. E., *Toxicol. Sci.*, **108**, 184–193 (2009).
- 9) Zou W., Beggs K. M., Sparckenbaugh E. M., Jones A. D., Younis H. S., Roth R. A., Ganey P. E., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **331**, 114–121 (2009).
- 10) Liu J., Lin A., *Cell Res.*, **15**, 36–42 (2005).
- 11) Wullaert A., Heyninc K., Beyaert R., *Biochem. Pharmacol.*, **72**, 1090–1101 (2006).
- 12) Liu H., Lo C. R., Czaja M. J., *Hepatology*, **35**, 772–778 (2002).
- 13) Leist M., Gantner F., Bohlinger I., Germann P. G., Tiegs G., Wendel A., *J. Immunol.*, **153**, 1778–1788 (1994).
- 14) Novo E., Parola M., *Fibrogenesis Tissue Repair*, **5**, S4 (2012).
- 15) Papa S., Bubici C., Zazzeroni F., Franzoso G., *Biol. Chem.*, **390**, 965–976 (2009).
- 16) Awai M., Narasaki M., Yamanoi Y., Seno S., *Am. J. Pathol.*, **95**, 663–673 (1979).
- 17) Karin M., *Nature*, **441**, 431–436 (2006).
- 18) Perry R. P., Kelley D. E., *J. Cell Physiol.*, **76**, 127–139 (1970).
- 19) Aust S. D., Morehouse L. A., Thomas C. E., *J. Free Radic. Biol. Med.*, **1**, 3–25 (1985).
- 20) Fiers W., Beyaert R., Declercq W., Vandenabeele P., *Oncogene*, **18**, 7719–7730 (1999).
- 21) Carson D. A., Ribeiro J. M., *Lancet*, **341**, 1251–1254 (1993).
- 22) Kleeff J., Kornmann M., Sawhney H., Korc M., *Int. J. Cancer*, **86**, 399–407 (2000).
- 23) Schwabe R. F., Brenner D. A., *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **290**, G583–589 (2006).
- 24) Sun Y., Chen J., Rigas B., *Carcinogenesis*, **30**, 93–100 (2009).
- 25) Tafazoli S., Spehar D. D., O'Brien P. J., *Drug Metab. Rev.*, **37**, 311–325 (2005).
- 26) Festjens N., Vanden Berghe T., Vandenabeele P., *Biochim. Biophys. Acta*, **1757**, 1371–1387 (2006).
- 27) Zhang D. W., Shao J., Lin J., Zhang N., Lu B. J., Lin S. C., Dong M. Q., Han J., *Science*, **325**, 332–336 (2009).
- 28) Nagaki M., Moriwaki H., *Hepato. Res.*, **38**, S19–28 (2008).
- 29) Morgan M. J., Kim Y. S., Liu Z. G., *Cell Res.*, **18**, 343–349 (2008).
- 30) Antunes F., Cadenas E., *Free Radic. Biol. Med.*, **30**, 1008–1018 (2001).