

## Mice에서 D-galactosamine과 lipopolysaccharide의 유도에 의한 간장의 apoptosis

곽수동 · 김종섭 · 강정부 · 고필옥 · 서득록 · 양재훈

경상대학교 수의과대학 동물의학연구소  
(2000년 3월 11일 게재승인)

### Apoptosis of livers induced by D-galactosamine and lipopolysaccharide in mice

Soo-dong Kwak, Chong-sup Kim, Chung-boo Kang, Phil-ok Koh,  
Deuk-lok Seo, Je-hoon Yang

*Institute of Animal Medicine, College of Veterinary Medicine,  
Gyeongsang National University*

(Accepted by Mar 11, 2000)

**Abstract** : Experimental induction of apoptosis by bacterial lipopolysaccharide is useful for understanding the role of apoptosis cell death in clinical endotoxin shock or septic shock.

Thirty three mice were injected intraperitoneally with D-galactosamine (20mg) and lipopolysaccharide (5 $\mu$ g) per mouse. Five to eight mice per each experimental group were sacrificed at 6, 12, 24, 48 and 72 hrs post administration.

The cells with apoptotic bodies in H-E stained sections were investigated histologically. Development of the apoptotic bodies in livers was observed in 11 of 33 mice (33.3%). These cells were diffusely or collectively appeared only in liver but not observed in kidney, thymus and spleen.

Mean percentage of the cells with apoptotic bodies in the livers were 0.32, 4.34 and 5.50% respectively at 6, 12, and 24 hrs post administration. But percentage of these apoptotic cells were fairly less in 48 and 72 hrs post administration. The percentages of cells with 3 to 9 apoptotic bodies per cell were 70~90% of all apoptotic cells. The cells with more apoptotic bodies than limit number at 12 to 72 hrs post administration were believed to be necrosed.

The percentage of positive cells by TUNEL methods were 0.00~0.08, 0.00~0.52, 1.63~4.18, 12.41~20.21 respectively at control, 6, 12 and 24 and less than 0.01% at 48 and 72 hrs.

The above results suggest that development of liver cell apoptosis by lipopolysaccharide (5 $\mu$ g) and D-galactosamine (20mg) was less at 6 hrs and markedly increased at 12 to 24 hrs and then

---

이 연구는 1996년도 한국과학재단 특정기초연구과제(96-04-02-11-01-3)에 의해 수행되었음.

Address reprint requests to Dr. Soo-dong Kwak, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Republic of Korea.

was fairly less at 48 and 72 hrs post administration.

**Key words** : apoptosis, TUNEL method, lipopolysaccharide, liver, mouse.

## 서 론

세포의 괴사를 수동적인 사고사(acidental death)라고 한다면 apoptosis는 계획된 자연사(natural death)로서 능동적이면서 자발적인 사망기전이고 개체의 발생·생체의 균형유지·성장조절 등에서 조직이 재변화(remodeling)하는 이미 준비된 사망프로그램으로 능동적으로 죽음을 맞이한다는 개념이다. 그러므로 세포의 apoptosis는 가슴샘을 비롯한 비장 및 림프기관 등 어느 부위에서나 정상적으로 일어나고 있다<sup>1-4</sup>.

Apoptosis는 병리학적으로는 hormone의 결핍, 독소, virus 감염 및 화학요법제와 같은 수많은 외인성 물질에 의해서 유도되며<sup>5-6</sup>, 암환자에서는 침투성이고 악성암의 도수가 높을수록 apoptosis 지수는 높다고 하여 악성암과 양성암의 구별의 자료가 된다<sup>7-9</sup>. Apoptosis로 소멸하는 세포와 유사분열로 증식하는 세포가 서로 균형을 이루거나 apoptosis가 일어나는 세포가 더 높다면 종양은 크기가 더 크지 않거나 감소하여 치료에 좋은 결과가 될 것이다. 실제로 항암제는 apoptosis를 유발하지만 정상적으로도 일어나므로 많은 종양세포에 선택적으로 일으키느냐가 중요하다. 그래서 암치료의 측면에서 apoptosis가 활발히 연구되고 있다<sup>10-12</sup>.

Apoptosis의 연구는 동물장기의 발생과 퇴화, 암의 악성 양성의 구별, 약물의 치료효과 조사 등의 연구에 중요한 자료가 되며 세균에 의해 산생된 lipopolysaccharide (LPS)를 이용한 실험적 apoptosis 유도는 세균성 shock에서 세포의 괴사를 연구하는데 중요한 자료가 된다.

일반적으로 apoptosis가 진행중인 세포는 세포질의 호산성 핵농축 등의 소견이 있으나 현미경상에서 정확하게 한계를 구별하는 것은 어렵고, apoptosis의 진행과정에서 생기는 apoptotic body를 가진 세포를 조사함이 가장 명확한 방법이나 이러한 방법으로 구체적으로 조사된 바가 거의 없다<sup>13-15</sup>. 또 근래에는 면역조직화학적 방법에 의한 TUNEL 법이 개발되어 apoptosis가 일어나는 세포

의 조사에 한 방법으로 소개되고 있다<sup>5,16</sup>.

본 연구는 마우스에 apoptosis 유도물질을 투여하여 apoptosis body가 출현한 세포와 TUNEL 법에 의해 apoptosis 양성반응세포를 대상으로 하여 투여후 경과시간에 따라 간장 등에서 발생의 차이를 조사하였다.

## 재료 및 방법

5~7주령의 암·수 같은 비율의 BALB/c 마우스(20~35g) 33마리에다 세균에 의해서 생산된 LPS(Sigma, USA)를 마리당 5 $\mu$ g과 D-galactosamine hydrochloride(Sigma, USA)를 마리당 20mg씩 생리적 식염수에 희석하여 복강내 주사하였고, Table 1과 같이 6, 12, 24, 48 및 72시간 경과군으로 각각 임의로 구분하고 해당시간에 경부를 탈구한 후 방혈하고 부검하여, 간장 가슴샘 비장 신장 및 심장 등 여러 장기를 채취하여 통상방법과 같이 10% 중성 formalin에 고정하고 paraffin 조직절편을 만들어 H-E 염색을 실시하여 apoptotic body가 형성된 세포의 출현여부를 조사하고, 간조직을 대상으로 광학현미경의 400 X 하에서 마리당 임의로 정한 20~30개 시야(4,800~7,200개의 세포에 해당) 중에서 핵이 apoptotic body가 형성된 세포의 비율을 조사하였고 apoptosis가 일어나는 세포에서 세포당 apoptotic body의 수는 1,000 X의 시야에서 굴절정도를 조절해가며 한 세포에서 형성된 것으로 보이는 body의 수를 조사하였다.

면역조직화화학적으로 apoptosis가 일어나는 세포의 조사는 TUNEL 법<sup>5,16</sup>에 따라 *In situ* apoptosis detection kit (Oncor Co. USA)를 이용하여 paraffin 절편을 proteinase K, 2% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, working strength TdT enzyme, anti-Digoxigenin-peroxidase를 차례로 적용한 후 DAB로 발색하고 hematoxylin으로 대조염색을 하여 핵이 짙은 갈색으로 발색되는 세포를 양성반응세포로 간주하고 이들 세포의 형태와 현미경 400 X 시야(시야당 240개 세포정도)당 양성반응 세포의 비율을 조사하여 집계하였다.

**Table 1. Comparison of mice with apoptotic bodies in livers after treatment**

| Hours after treatment         | 6     | 12    | 24    | 48    | 72    | total |
|-------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| No. of mice tested            | 8     | 7     | 7     | 5     | 6     | 33    |
| No. of mice with apop* bidoes | 3     | 3     | 2     | 1     | 2     | 11    |
| % of mice with apop bodies    | 37.5% | 42.9% | 28.6% | 20.0% | 33.3% | 33.3% |

apop\* : apoptotic.

## 결 과

실험동물에 인공적으로 apoptosis를 유도하기 위하여 마우스에 LPS와 D-galactosamine를 투여한 바, 간세포에 apoptotic body가 형성된 마우스는 Table 1과 같이 6시간 경과군은 8마리중에 3마리(37.5%)에서, 12시간 경과군은 7마리중 3마리(42.9%)에서, 24시간 경과군은 7마리중 2수(28.6%)에서, 48시간 경과군은 5마리중 1마리(20.0%)에서, 72시간 경과군은 6마리중 2마리(33.3%)에서만 관찰되어 이들의 apoptotic body가 형성된 마리수의 평균은 33.3%(11/33두)로 발생비율이 낮았다.

각 개체별로 간장, 신장, 가슴샘 및 신장 등의 각 장기에서 apoptotic body의 형성여부를 조사한 바, 간장에서만 형성되었고 간장의 신장, 가슴샘, 비장, 심장 등 다른 장기에서는 형성되지 않았다.

실험군별 개체별의 간세포중에 apoptotic body를 가진 간세포의 비율은 Graph 1과 같이 6시간 경과군 3마리는 각각 0.08, 0.39, 및 0.49%로 이 평균은 0.32%였고, 12시간 경과군 3마리는 각각 1.78, 3.70, 및 7.54%로 이 평균은 4.34%였고, 24시간 경과군 2마리는 각각 2.80 및 8.20%로 이 평균은 5.50%였고, 48시간 경과군 1마리는 1.67%

**Graph 1. Comparison of cells with apoptotic bodies post administration.**

였고, 72시간 경과군 2마리는 간세포의 피사가 많은 부위에서 최고 0.02, 0.12% 이하로 관찰되었고 정상으로 회복된 부위에서는 거의 관찰되지 않았다. 그래서 apoptotic body를 가진 세포는 24시간 경과군, 12시간 경과군 순으로 가장 많이 나타났고 그 다음은 48, 6 및 72시간 경과군 순으로 많이 나타났다.

Apoptosis가 일어나는 간세포는 처음 간세포 세포질의 호산성화 apoptotic body화가 간소엽의 어떤 부위에 산재성 또는 집단적으로 출현하였고(Fig 1, 2), 48시간 또는 72시간 경과군에서는 대부분의 세포질의 공포화 또는 염색성의 소실, 핵은 붕괴되어 핵편이 혈관내로 유입되어 집합되어 있었고(Fig 3), 특히 72시간 경과군에서는 전반적으로 변성된 부위와 정상으로 회복된 부위로 구분화 되어 있었고 정상으로 회복되는 부위는 주로 혈관 주위에 위치하고 있었고, 피사된 부위에는 주로 Kupffer 세포와 혈관 내피세포가 잔존하고 있었다.

Apoptotic body의 형태는 호산성 또는 염기성으로 농축되고 치밀하고 원형 또는 타원형으로 분리되었고 가끔 상호연결된 것이 있었고 그 외는 반월모양을 하고 핵막쪽으로 주변화하고 있었다(Fig 2, 4).

Apoptotic body를 가진 세포들 중에서 세포당 body의 수는 Graph 2와 같이 3~9개를 가진 세포가 70~90%로 대부분이었고 최고는 하나의 세포핵이 19개로 분리된 것도 있었다. 시간경과에 따른 세포당 body의 평균수는 6시간 경과군은 4.05개, 12시간 경과군은 8.89개, 24시간 경과군은 11.42개, 48시간 경과군은 10.51개, 72시간 경과군은 10.20로 이 평균은 10개 내외로 보아 Graph 2와 같이 일정 수의 범위 이상에서는 분리되어 증가되기 보다 붕괴되어 소실되고 간세포가 피사로 변함을 알 수 있었다.

TUNEL 법에 의해 마우스 간장에서 핵이 갈색으로 염색되는 양성반응세포의 형태를 조사한 바(Fig 5, 6), 정상 세포의 형태를 하거나 핵염색질이 농축되어 주변화된

형태를 하고 있었고, 형성된 apoptotic body는 소수만이 양성반응을 나타내었다. 이들 양성반응 세포들의 출현 부위는 apoptotic body를 가진 세포와는 다르게 특정한 부위가 없이 산재성으로 출현하는 경향이였다.

많이 나타났고 48시간째 이후는 거의 발생되지 않음을 알 수 있었다.

## 고 찰

세포의 apoptosis는 조직장기의 발생과 퇴화, 악성 또는 양성암의 치료효과 조사 등 여러가지 연구에 이용되고 있고, 간세포에 apoptosis를 유도는 약제에 대하여는 근래에 Leist *et al*<sup>17</sup>은 cocaine, ethanol, diethylnitrosamine, D-galactosamine 및 lead 등을, Mills *et al*<sup>9</sup>는 perillyl alcohol을, Ledda-Columban *et al*<sup>6</sup>은 thioacetamide를 소개한 바 있다.

본 실험에서는 Morikawa *et al*<sup>18</sup>의 방법에 따라 마우스에 D-galactosamine으로 감각시키고 LPS로서 apoptosis를 유도하였다.

동물에 apoptosis 유도물질을 투여할 경우 개체별 반응 유무에 차이에 대하여는 거의 언급된 바가 없고 다만 Morikawa *et al*<sup>17</sup>이 LPS 투여시 숙주의 조건에 따라 발생 여부의 차이가 있음이 명백하다고 한 바 있다. 본 실험에서는 6시간에서 72시간 경과군 중에 총 33마리 중에 11마리인 33.3%의 마우스에서만 발생되어 반응이 있는 경우가 낮음을 나타내었다. 이러한 결과에 대하여는 더 많은 조사가 요망되었다.

간장에서 apoptosis가 일어나는 세포들의 비율에 관하여서는 James *et al*<sup>14</sup>는 사료를 자유급여한 마우스의 간세포 중에 apoptotic body가 출현한 세포는 0.008%였고, 제한급여한 마우스는 0.023%로 약간 높았다고 하였고, Colechia<sup>5</sup>은 사람간의 adenocarcinomas에서 0.09%와 1.73%(평균 0.71%)였으나 내분비 치료(endocrine therapy)시에도 유의적 차이가 없었다고 하였다. 또 Mustonen *et al*<sup>19</sup>은 유방의 양성 ductal hyperplasias와 sclerosing adenoses에서 각각 0.15%와 0.07%였고, 침투성 carcinoma는 0.76%, Soini *et al*<sup>8</sup>는 adenoma에서 0.01%(0.00%~0.07%), 악성 타액성암에서 0.42%(0.00%~1.75%), Stephens *et al*<sup>12</sup>은 mice의 간세포성 암종(hepatocellular carcinoma)는 0.6%였으나 방사선 2.5Gy로 처치한 이후는 20%, 25Gy로 처치한 이후는 30%로 높았다고 하였다.

이와같이 apoptosis가 일어나는 세포의 비율은 악성 암일수록 높은 편이나 그 범위는 1% 이하였다. 그러나 방사선으로 처리하였을 때는 20~30%로 높게 나타났다.

본 조사에서도 대조군에서는 apoptotic body가 형성된

Graph 2. Comparison of apoptotic cells by body number post administration.

투여후 시간 경과군 별로 TUNEL 법에 의한 양성반응 세포의 출현은 그 비율이 낮아 개체별로 나타내기는 불가능하여 각 시야별로 조사한 바, Graph 3과 같이 시야당 대조군은 최하 0.00%에서 최고 0.08%였고, 8시간째 경과군은 최하 0.00%에서 최고 0.52%, 12시간 경과군은 최하 1.63%에서 최고 4.18%, 24시간 경과군은 최하 12.41%에서 최고 20.21%였고, 48시간 경과군과 72시간 경과군은 최하 0.00%에서 최고 0.01%로 거의 관찰되지 않았다. 그래서 24시간 경과군과 12시간 경과군 순으로 가장 많이 나타났고 그 외는 아주 낮았다.

Graph 3. Comparison of apoptotic cells by TUNEL method post administration.

이상에서 마우스에 lipopolysaccharide와 D-galactosamine에 투여에 의한 apoptosis는 개체별 발생율이 낮았고 발생된 개체도 간장에서만 나타났고 발생시기는 6시간째부터 나타나기 시작하여 12시간째와 24시간째는 가장

세포는 거의 관찰되지 않았으나 6시간 경과군에서는 평균 0.32%, 12시간 경과군은 4.34%, 24시간 경과군은 5.50%로 위 종양 등에서 보다 더 높게 나타나서 apoptosis가 높게 유도되었고 Stephens *et al*<sup>12</sup>의 방사선 처치 때 보다는 더 낮게 유도되었다.

또 투여후 경과시간에 따른 차이에 대하여는 투여양과 경과시간에 따라 상관관계가 있을 것이므로 독성이 가장 적고 가장 많이 apoptosis를 일으키는 양의 조사가 요망된다. 본 조사에서는 마우스 마리당 LPS 5 $\mu$ g과 D-galactosamine 20mg을 투여한 바, 12~24시간 경과시에 가장 높았다.

Apoptosis의 형태학적 변화는 chromatin의 치밀, 핵분절(nuclear fragmentation), 세포질의 농축, 표면에 bleb 형성과 돌출, apoptotic body의 형성 등이다<sup>15</sup>. 그러나 실제 apoptotic body가 형성된 세포외의 apoptosis 소견은 구별하기가 쉽지 않다. 또 apoptotic body의 소견도 apoptosis 과정중에 나타나므로 전체 apoptosis가 일어나는 세포의 비율보다 훨씬 낮을 것이나 이들 상호간의 비율에 대하여는 조사된 바가 없다.

TUNEL 법에 의한 양성반응은 apoptosis 초기에 DNA strand가 분절이 있을 때 일어난다. 본 조사에서도 TUNEL 법의 양성반응세포는 형태학적으로 이상이 시작되지 않은 세포가 주었고 그의 apoptotic body를 가진 세포들은 body가 반월모양을 하고 핵막쪽으로 주변화된 일부 세포만 양성반응을 나타내었다.

TUNEL 법의 양성반응세포에서와 H-E 표본의 apoptosis가 일어난 세포의 출현비율의 차이에 대하여서는 Negoescu *et al*<sup>16</sup>은 고정액의 종류에 따라 apoptosis가 일어난 세포중에 TUNEL 법으로는 20%~55%만이 표지되었다고 하였다. Tsutsui *et al*<sup>20</sup>는 마우스에 3g/kg의 D-galactosamine 투여시 두 방법 공히 12시간과 24시간 경과군에서 많이 나타났으나 TUNEL 방법에서는 6시간과 48시간 경과군에서는 드물게 관찰되었고 H-E 표본의 apoptotic body를 가진 세포는 6시간 경과군과 같이 초기에서는 관찰되지 않았고 48시간 경과군과 72시간 경과군은 이미 피사부위로 변하고 그 비율이 아주 낮았다고 한 바 있으나 apoptotic body를 가진 세포에 대하여 숫적으로 제시하지 않았다.

본 조사에서는 H-E 표본에서 apoptotic body를 가진 세포와 TUNEL 양성반응세포는 12시간과 24시간 경과때 가장 많이 나타났으나 48시간 경과군과 72시간 경과군

에서는 아주 낮게 관찰되었다.

간에서 apoptosis가 일어나는 세포의 종류에 대하여는 언급된 바가 없어 모든 변화가 간세포에서 일어난 것으로 간주되어 왔다. 본 조사에서는 혈관 내피세포와 Kupffer 세포에서 TUNEL 법에서 일어나고 있음을 관찰할 수 있었다.

세포당 얼마나 많은 수의 apoptotic body가 형성되는가에 대하여는 조사된 바가 없으나 본 조사에서는 최고 19개까지 많은 수로 분리되는 예도 있었고 apoptotic cell의 70~90%는 3~9개의 body를 형성하고 있었다. 그래서 apoptosis가 시작된 후 body의 수가 10개 이상 되면 대부분의 세포는 소멸되는 것으로 생각되었다.

경과시간별로 세포당 apoptotic body가 형성된 수의 차이를 비교한 바, 6시간 경과군에 가장 수가 적었고 12시간에서 72시간까지 경과경과군에서는 상호차이가 거의 없어 apoptosis는 72시간째에도 계속 진행되고 있는 것으로 생각되었다.

## 결론

세균에 의해 생성된 lipopolysaccharide를 이용하여 인위적으로 apoptosis를 유도하는 것은 세균독소에 의한 폐혈증성 shock에서 일어나는 세포피사를 연구하는데 주요한 자료가 된다.

본 실험은 마우스에 lipopolysaccharide와 D-galactosamine hydrochloride를 투여하여 시간경과에 따라 6, 12, 24, 48 및 72시간 경과군으로 구분하고 간장, 신장, 가슴샘 및 신장에서 조직학적으로 apoptotic body를 형성한 세포의 출현을 조사한 바, 투여후 모든 마우스에서 신장, 가슴샘 및 비장에서는 apoptotic body를 가진 세포가 관찰되지 않았고 간장에서만 33.3%(11/33) 두수에서 관찰되었다.

간장에서 apoptotic body를 가진 세포의 비율의 평균은 6시간 경과군은 0.32%, 12시간 경과군은 4.34%, 24시간 경과군은 5.50%로, 24시간, 12시간 및 6시간 경과군의 순으로 많이 나타났고 48시간 경과군과 72시간 경과군에서는 거의 관찰되지 않았다.

Apoptotic body가 형성된 간세포는 산재성 또는 집단적으로 출현하였고, apoptotic body를 가진 간세포중에서 세포당 body의 수를 조사한 바, 3~9개를 가진 세포가 70~90%로 대부분이었고 최고는 19개를 가진 세포도 있었고 평균수는 6시간 경과군은 4.05개, 12시간에서 72시

간 경과군에서는 평균 10개 내외로 이후는 세포가 붕괴 피사됨을 알 수 있었다.

TUNEL 법에 의한 양성반응세포의 출현비율은 대조군은 각 시야당 0.00%~0.08%, 6시간째 경과군은 0.00%~0.52%, 12시간 경과군은 1.63%~4.18%, 24시간 경과군은 12.41%~20.21% 범위였고, 48시간 경과군과 72시간 경과

군은 0.00%~0.01% 범위로 24시간 경과군과 12시간 경과군에서 가장 높았다.

이상에서 apoptosis가 일어난 간세포의 수는 6시간째 부터 시작되어 12~24시간째에 가장 많고 48시간째 부터는 발생이 낮았다.

## Legends for figures

Fig 1. Numerous apoptotic cells with condensed nuclei or apoptotic bodies are seen in liver of a mouse from 24 hrs post administration. H-E stain, Bar = 50.6 $\mu$ m.

Fig 2. Higher power of fig 1. Condensed nuclei or apoptotic bodies (arrows) are seen. H-E stain, Bar = 25.3 $\mu$ m.

Fig 3. Many necrosed-apoptotic bodies (arrows) in sinusoid are seen in liver of a mouse from 72 hrs post administration. H-E stain. Bar = 25.3 $\mu$ m.

Fig 4. Condensed nuclei and apoptotic bodies (arrows) of liver cells by high power are seen in liver of a mouse from 12 hrs post administration. H-E stain. Bar = 10.2 $\mu$ m.

Fig 5. Several apoptotic hepatocytes (arrows) with brown color nucleus are seen at liver of a mouse from 24 hrs post administration. TUNEL method. Bar = 25.3 $\mu$ m.

Fig 6. Many apoptotic bodies (arrows) with brown color are seen at liver of a mouse from 72 hrs post administration. TUNEL method. Bar = 25.3 $\mu$ m.



## 참 고 문 헌

1. Billig H, Furuta I, Hsueh AJW. Gonadotropin-releasing hormone directly induces apoptotic cell death in the rat ovary : Biochemical and in Situ detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in granulosa cells. *Endocrinology* , 134:245-252, 1994.
2. Billig H, Chun SY, Eisenhauer K, *et al.* Gonadal cell apoptosis : hormone-regulated cell demise. *Human Reprod Update* , 2(2):103-117, 1996.
3. 김인경. Apoptosis and chemotherapeutic agents. 대한생화학 분자생물학회지, 2(3):20-22, 1995.
4. 서정선. Apoptosis. 대한생화학 분자생물학회지, 2(3): 12-18, 1995.
5. Colechia M, Frigo B, Del Boca, *et al.* Detection of apoptosis by the tunel technique in clinically localised prostatic cancer before and after combined endocrine therapy. *J Clin Pathol* , 50(50):384-388, 1997.
6. Ledda-Columbano GM, Coni P, Curto M, *et al.* Induction to two different modes of cell death, apoptosis and necrosis, in rat liver after a single dose of thioacetamide. *Am J Pathol* , 139:1099-1109, 1991.
7. Mustonen M, Raunio H, Paakko P, *et al.* The extent of apoptosis is inversely associated with bcl-2 expression in premalignant and malignant breast lesions. *Histopathology* , 31:347-354, 1997.
8. Soini Y, Tormanen U, Paakoo P. Apoptosis is inversely related to bcl-2 but not bax expression in salivary gland tumours. *Histopathology* , 32:28-34, 1998.
9. Mills JJ, Chari RS, Boyer LJ, *et al.* Induction of apoptosis in liver tumors by the monoterpene perillyl alcohol. *Cancer Research* , 55:979-983, 1995.
10. Brocheriou I, Carnot F, Briere J. Immunohistochemical detection of bcl-2 protein in thymoma. *Histopathology* , 27:251-255, 1995.
11. Meyn RE, Stephens LC, Hunter NR, *et al.* Induction of apoptosis in murine tumors by cyclophosphamide. *Cancer Chemother Pharmacol* , 33:410-414, 1994.
12. Stephens LC, Hunter NR, Ang KK, *et al.* Development of apoptosis in irradiated murine tumors as a function of time and dose. *Radiation Research* , 135: 73-80, 1993.
13. Hughes FM, Gorospe WC. Biochemical identification of apoptosis (Programmed cell death) in granulosa cells : Evidences for a potential mechanism underlying follicular atresia. *Endocrinology* , 129:2415-2422, 1991.
14. James SJ, Muskhelishvili L. Rates of apoptosis and proliferation vary with caloric intake and may influence incidence of spontaneous hepatoma in C57BL/6 x C3HF1 mie. *Cancer Reserach* , 54:5508-5510, 1994.
15. Kerr JFR, Gobe CG, Winterford CM, *et al.* Anatomical methods in cell death. *Method in Cell Biology* , 46:1-27. 1995.
16. Negoescu A, Lorimier P, *et al.* TUNEL : Improvement and evaluation of the method for *In situ* apoptotic cell identification. *Biochemica* , 2:12-17, 1997.
17. Leist M, Gantner F, Naumann H, Bluethmann H, *et al.* Tumor necrosis factor - induced apoptosis during the poisoning of mice with hepatotoxins. *Gastroenterology* , 112:923-934, 1997.
18. Morikawa A, Sugiyama T, Kato Y, *et al.* Apoptotic cell death in the response of D-galactosamine-sensitized mice to lipopolysaccharide as an experimental endotoxic shock model. *Infection and Immunity* , 64(3):734-738, 1996.
19. Mustonen M, Raunio H, Paakko P, *et al.* The extent of apoptosis is inversely associated with bcl-2 expression in premalignant and malignant breast lesions. *Histopathology* , 31:347-354, 1997.
20. Tsutsul S, Hirasawa K, Takeda M, Itagaki SI, *et al.* Apoptosis of murine hepatocytes induced high doses of galactosamine. *J Vet Med Sci* , 59(9):758-790, 1997.