PO Box 2345 Beijing 100023, China
Fax: +86-10-85381893
Email: wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

World Chin J Digestol 2004 May;12(5):1077-1080
世界华人消化杂志 ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

鼠暴发性肝衰竭中Fas表达与肝细胞凋亡的关系

王玉梅, 冯国和, 黄 芬, 石理兰, 李 颖, 王占英

王玉梅, 冯国和, 黄芬, 石理兰, 李颖, 王占英, 中国医科大学附属第二医院感染科 辽宁省沈阳市 110004
王玉梅, 女, 1970-02-26 生, 山西省大同市人, 2002 年获中国医科大学博士, 讲师, 主要从事病毒性肝炎发病机制的研究.
项目负责人: 王玉梅, 110004, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属第二医院感染科. wangym7002@yahoo.com
电话: 024-83956961 传真: 024-62124785
收稿日期: 2003-11-18 接受日期: 2004-02-01

Relationship between hepatocytic apoptosis and Fas expression in mouse fulminant hepatic failure

Yu-Mei Wang, Guo-He Feng, Fen Huang, Li-Lan Shi, Ying Li, Zhan-Ying Wang

Yu-Mei Wang, Guo-He Feng, Fen Huang, Li-Lan Shi, Ying Li, Zhan-Ying Wang, Department of Infectious Diseases, Second Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China
Correspondence to: Yu-Mei Wang, Department of Infectious Diseases, Second Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. wangym7002@yahoo.com
Received: 2003-11-18 Accepted: 2004-02-01

Abstract

AIM: To study the relationship among tumor necrosis factor-α, Fas expression and hepatocyte apoptosis in an experimental model of fulminant hepatic failure (FHF).

METHODS: A mouse model of FHF was established by LPS and D-GalN. The expression of Fas in liver tissue was detected by immunohistochemical method. Serum TNF-α level and TNF-α mRNA expression in liver were analyzed by ELISA and RT-PCR method respectively. Hepatocytic apoptosis was examined by DNA agarose gel electrophoresis and TUNEL method. TNF-α, Fas and hepatocytic apoptosis were observed in the different stage after drug administration. In addition, changes of the above items were observed after pretreatment with anti-TNF-αIgG1.

RESULTS: There was a little expression of Fas at 2 h in model group. The expression of Fas increased distinctly at 8 h and 12 h and there was no statistical difference between them. The expression of Fas at 8 h and 12 h was higher than that at 2 h and 4 h (P <0.01 and P <0.05, respectively). TNF-α mRNA expression in liver increased statistically (0.91±0.75) and the data of normal control was (0.32±0.10) in 2 hours to 4 hours after administration of LPS and D-GalN. The level of serum TNF-α increased (320±87 ng/L, the data of normal control was 17±7 ng/L). There was typical manifestation of hepatocytic apoptosis at 8 h after the drug administration. The level of serum ALT and TBil obviously increased (9 352±1 000 nkat/L and 163.7±34.5 μmoL/L, respectively, the data of normal control was 393±134 nkat/L and 14.9±4.8 μmoL/L, respectively). and there were hepatocytic apoptosis and necrosis at 12 hour after drug administration, at the same time, the level of serum ALT and TBil reached the peak (11 141±1 312 nkat /L and 203.2±19.9 μmol/L, respectively). Hepatocytic apoptosis and liver injury and the expression of Fas could be blocked after antagonized with TNF-α.

CONCLUSION: TNF-α plays an important role on hepatocytic apoptosis and liver injury in fulminant hepatic failure. The hepatocytic apoptosis induced by TNF-α is correlated with the expression of Fas.

Wang YM, Feng GH, Huang F, Shi LL, Li Y, Wang ZY. Relationship between hepatocytic apoptosis and Fas expression in mouse fulminant hepatic failure. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(5):1077-1080

摘要

目的: 研究Fas表达及肿瘤坏死因子-α (tumor necrosis factor-α, TNF-α)在暴发性肝衰竭(fulminant hepatic failure, FHF)中与肝细胞凋亡的关系.

方法: 采用脂多糖(LPS)和D-氨基半乳糖(D-GalN)联合用药制备FHF小鼠模型; 采用免疫组化方法检测肝组织Fas表达, 分别采用ELISA方法和RT-PCR法检测血清TNF-α水平及肝组织TNF-α mRNA表达; 采用肝组织DNA琼脂糖凝胶电泳和 TUNEL 法检测肝细胞凋亡; 在用药后 2, 4, 8, 12 h 的不同时期动态观察 Fas表达、血清TNF-α水平及肝组织TNF-α mRNA表达及肝细胞凋亡的变化, 并对模型鼠给予TNF-α mAb, 动态观察上述指标的变化.

结果: 在 FHF 模型小鼠中, 用药后 2 h 开始 Fas 有少量表达, 至 8 h 和 12 h 表达均很多, 二者比较无显著差异, 与 2 h 组比较 P <0.01, 与 4 h 组比较 P <0.05. 用药后 2-4 h 肝组织 TNF-α mRNA 表达显著增加(0.91 ± 0.75, 正常值为 0.32 ± 0.10), 伴血清 TNF-α 水平升高(320 ± 87 ng/L, 正常值为 17 ± 7 ng/L), 8 h 可出现典型的肝细胞凋亡表现, 血清 ALT 和 TBil 水平显著增加(分别为 9 352 ± 1 000 nkat/L 和 163.7 ± 34.5 μmoL/L, 正常值分别为 393 ± 134 nkat/L 和 14.9 ± 4.8 μmoL/L), 12 h 肝细胞坏死和凋亡同时存在, 血清 ALT 和 TBil 水平达最高峰(分别为 11141 ± 1312 nkat /L 和 203.2 ± 19.9 μmoL/L). 给予TNF-αmAb后LPS/D-GalN 介导的肝细胞凋亡和损伤被阻断, Fas 表达亦被阻断.

结论: 在FHF中, TNF-α对肝细胞凋亡及肝损伤起重要的作用, 肝细胞凋亡的发生与 Fas 的表达增加有关.

王玉梅, 冯国和, 黄芬, 石理兰, 李颖, 王占英. 鼠暴发性肝衰竭中 Fas 表达与肝细胞凋亡的关系. 世界华人消化杂志 2004;12(5):1077-1080
http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1077.asp

0 引言

近年研究发现，暴发性肝衰竭(fulminant hepatic failure, FHF)中肝细胞凋亡与坏死密切相关，是肝细胞坏死的早期过程. 在肝脏疾病中，肝细胞的凋亡主要是通过 Fas/FasL 途径介导所致[12, 18-20]，但在 FHF 动物模型中对 Fas 表达与肝细胞凋亡关系的研究却很少见，我们对 FHF 模型鼠肝细胞凋亡、肝组织 Fas 及 TNF-α 表达的检测，探讨在暴发性肝衰竭(fulminant hepatic failure，FHF)中肝组织 Fas 及 TNF-α 表达与肝细胞凋亡的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 LPS 购自 Sigma 公司，D-GalN 购自重庆医科大学，抗 TNF-αIgG1(Endogen 公司产品)、TNF-α 酶标试剂盒(Golden bridge公司产品)购自深圳晶美生物公司，ALT 试剂盒购自上海复星长征医学科学有限公司，TBil 试剂盒购自日本纺绩株式会社，TNF-α mRNA 引物购自北京奥科生物公司，cDNA 合成试剂盒购自宝生物工程有限公司(TaKaRa 产品)，TUNEL 试剂盒及 Fas 免疫组化试剂盒均购自武汉博士德生物公司. 雄性昆明小鼠(中国医科大学附属二院动物实验室提供)76 只，清洁级，质量 20-25 g，随机分成 12 组，取 4 组(每组 7 只)给予 LPS 10 μg/kg sc，D-GalN 800 mg/kg ip，另取 4 组(每组 7 只)除注射 LPS 和 D-GalN 外，同时 sc 抗 TNF-αIgG1mAb 100 μg，余 4 组动物(每组 5 只)注射同样体积的生理盐水，对上述小鼠分别于注药后 2，4，8，12 h 处死，每个时间点为 1 组动物，留取血清及肝脏标本，将血清于 -20 ℃冻存待检，肝组织一部分于 40 g/L 中性甲醛固定，一部分于 -80 ℃冻存待检. 注射 LPS+D-GalN 后 2，4，8，12 h 分别编号为 A1，A2，A3，A4 组，注射生理盐水后 2，4，8，12 h 分别编号为 B1，B2，B3，B4 组，注射 LPS+D-GalN+抗 TNF-aIgG1 单抗后 2，4，8，12 h 分别编号为 C1，C2，C3，C4 组.

1.2 方法 于日立 7170 全自动生化分析仪进行血清 ALT，TBil 水平检测. TNF-α 水平检测按试剂盒说明书进行，抗原抗体反应后显色，在酶标仪 492 nm 处读取 *A* 值，并以标准曲线为标准计算样品的含量. TNF-α mRNA的相对含量的检测采用异硫氰酸胍 - 酚 - 氯仿方法, 提取肝组织内 RNA，采用 TNF-α-2(antisense primer)，在 30-65 ℃，35 min 条件下逆转录合成 TNF-α mRNA cDNA 后进行 PCR 反应，引物序列如下: TNF-α-1 5’-ACCAGAGCGGCAAGAAGAACCAT-3’(sense primer); TNF-α-2 5’-CATCAGACATCGGAGGCAGGAAG-3’ anti-sense primer)(产物长 329 bp)，同时设内参照，引物序列: β-ctin-1 5’-TGTATGCCTCTGGTCGTACCAC-3’(sense primer); β-ctin-2 5’-ACAGAGTACTTGCGCTCAGGAG-3’(anti-sense primer)(产物长 592 bp). PCR 反应条件: 94 ℃变性 3 min，然后 94 ℃ 30 s，57 ℃ 1 min，72 ℃ 1 min 进行 32 个循环，72 ℃延伸 5 min. 将 PCR 产物在 20 g/L 琼脂糖凝胶上电泳，用 Kodak 1D 型凝胶成像分析系统分析检测各扩增带的产物含量，用下列公式表示: TNF-α mRNA 的相对含量 =TNF-α mRNA/β actin×100. Fas 免疫组化检测按试剂盒说明书进行，对石蜡包埋的肝组织切片进行抗原抗体反应后 DAB 显色，染色后细胞质呈棕褐色染色的为阳性细胞，细胞质无棕褐色染色的为阴性细胞. 阳性细胞记数分3级: 低倍镜视野阳性细胞数小于 1/3 为(+)，1/3-2/3 为(++)，大于 2/3 为(+++). 采用酚、氯仿提取肝组织 DNA，于 7 g/L 琼脂糖凝胶电泳(100 V，1.5 h)观察 DNA 梯形带的变化. 缺口原位末端标记技术按试剂盒说明书进行检测，对石蜡包埋的肝组织切片进行缺口原位末端标记后 DAB 显色，染色后细胞核呈棕褐色染色的为阳性细胞，细胞核无棕褐色染色的为阴性细胞. 阳性细胞记数分 3 级: 低倍镜视野阳性细胞数小于 1/3 为(+)，1/3-2/3 为(++)，大于 2/3 为(+++). 肝组织石蜡切片用 HE 染色于光镜下观察肝组织学变化.

统计学处理 采用 mean±SD 表示血清 ALT，TBil，TNF-α 水平及 TNF-αmRNA 相对含量，使用 SAS 软件包作方差分析，并进行两两比较，采用 χ^2 检验进行 Fas 阳性表达率及 TUNEL 法检测肝细胞凋亡的比较.

2 结果

2.1 血清 ALT，TBil，TNF-α 和肝组织 TNF-αmRNA 表达与对照组相比，应用 LPS+D-GalN 后 2，4，8 h 血清 TNF-α 水平、肝组织 TNF-α mRNA 的相对含量及阳性表达率均显著升高(P <0.01)，其中，尤以 2 h 组升高最为显著，以后逐渐下降. 从 LPS+D-GalN 应用后 4 h 开始，ALT，TBil 明显升高，与各时间点对照组相比有显著差异(P <0.01)，其中 8，12 h 升高更明显，与 4 h 组相比 P <0.01. 阻断 TNF-α 后各时间点 ALT，TBil 水平均降至正常. 经阻断 TNF-α 后，血清 TNF-α 水平及肝组织 TNF-α mRNA 的相对含量及阳性表达率均降至正常水平(表 1).

表 1 鼠血清 ALT, TBil 和 TNF-α 水平变化及肝组织 TNF-α mRNA 表达的变化(mean±SD)

分组	ALT(nkat/L)	TBil(μmol/L)	TNF-α(ng/L)	TNF-α mRNA 相对含量
A1	624 ± 67	15.8 ± 3.0	320 ± 87[b]	0.91 ± 0.75[b]
A2	1 238 ± 180[a]	38.9 ± 5.9[a]	282 ± 53[b]	0.82 ± 0.08[b]
A3	9 352 ± 1 000[b]	163.7 ± 34.5[b]	145 ± 29[b]	0.70 ± 0.06[b]
A4	11 140 ± 1 312[bc]	203.2 ± 19.9[bc]	70 ± 17[ac]	0.44 ± 0.09[c]
B1	386 ± 136	13.3 ± 6.3	17 ± 7	0.32 ± 0.10
B2	401 ± 154	13.8 ± 4.7	16 ± 6	0.30 ± 0.11
B3	393 ± 134	14.9 ± 4.8	17 ± 4	0.31 ± 0.10
B4	381 ± 120[△]	15.1 ± 6.6[△]	17 ± 5[△]	0.30 ± 0.09[△]
C1	523 ± 122	13.5 ± 4.0	17 ± 4	0.33 ± 0.09
C2	558 ± 115	12.5 ± 4.36	17 ± 5	0.32 ± 0.08
C3	416 ± 191	12.7 ± 4.5	17 ± 5	0.34 ± 0.08
C4	429 ± 152	13.0 ± 4.3	17 ± 5	0.33 ± 0.09

[a]P <0.05, [b]P <0.01, *vs* 对照组; [c]P <0.05, *vs* B4, C4.

2.2 肝细胞凋亡的检测结果 LPS+D-GalN应用后8 h可见典型的DNA梯形带，LPS+D-GalN应用后12 h则出现坏死带，其余时间点均无DNA梯形带或坏死带的出现，经阻断TNF-α后，各时间点均无DNA梯形带或坏死带的出现(图1). 肝组织TUNEL检测结果显示，LPS+D-GalN应用后2 h，肝组织可出现少量阳性细胞，4 h时阳性细胞有所增加，8 h时阳性细胞明显增加，12 h时亦存在凋亡细胞，且肝组织出现明显的坏死表现. 经阻断TNF-α后，各时间点阳性细胞均显著减少(图2).

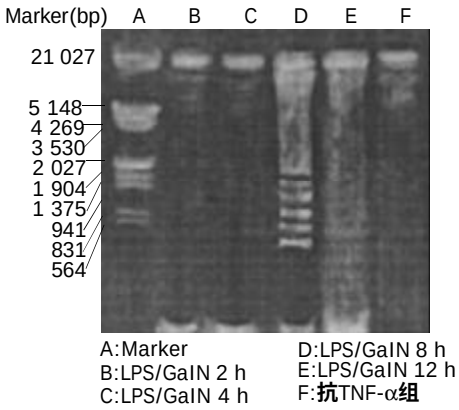

图1 鼠肝组织DNA琼脂糖凝胶电泳结果.

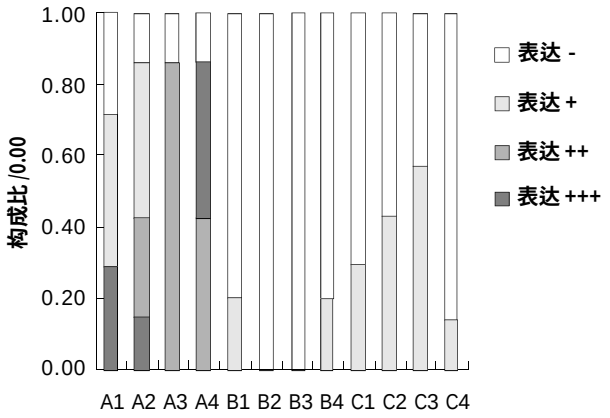

图2 鼠肝组织TUNEL检测结果.

2.3 肝组织Fas表达的检测结果 在LPS+D-GalN应用后2 h Fas有少量表达，4 h表达较多，8 h和12 h时表达均很多，8 h和12 h组比较无显著差异，与2 h组比较 $P<0.01$,与4 h组比较 $P<0.05$. 阻断TNF-α后Fas表达显著减少，与未阻断前12，8 h比较 $P<0.01$，与4 h组比较 $P<0.05$(表2).

2.4 肝组织学改变 LPS+D-GalN应用后2 h组肝组织基本上无异常所见，4 h组可见肝细胞胞质疏松化，呈气球样变，并可见散在的嗜酸变性，8 h组可见点片状肝细胞坏死，其中有较多的嗜酸变性和坏死，12 h组则见肝细胞呈大片坏死，核碎裂或溶解，呈现大块状出血坏死. LPS+D-GalN+抗-TNF-α组肝组织HE染色基本上无异常所见.

表2 鼠肝组织Fas检测结果 %(n/n)

分组	表达(+++)	表达(++)	表达(+)	表达(-)
A1	0	0.14 (1/7)	0.43 (3/7)	0.43 (3/7)[bd]
A2	0.14 (1/7)	0.14 (1/7)	0.57 (4/7)	0.14 (1/7)[bd]
A3	0.86 (6/7)	0.14 (1/7)	0	0[b]
A4	0.57 (4/7)	0.29 (2/7)	0.14 (1/7)	0[b]
B1	0	0	0.20 (1/5)	0.80 (4/5)
B2	0	0	0.20 (1/5)	0.80 (4/5)
B3	0	0	0	1.00 (5/5)
B4	0	0	0	1.00 (5/5)
C1	0	0	0.43 (3/7)	0.57 (4/7)
C2	0	0	0.43 (3/7)	0.57 (4/7)[e]
C3	0	0	0.57 (4/7)	0.43 (3/7)[d]
C4	0	0	0.29 (2/7)	0.71 (5/7)[f]

[b] $P<0.01$, *vs* 对照组; [d] $P<0.01$, *vs* A3; [e] $P<0.05$, *vs* A2; [f] $P<0.01$, *vs* A4.

3 讨论

暴发性肝衰竭是病毒性肝炎和许多肝病死亡的主要原因，死亡率高达70%以上，其发病机制复杂，至今尚未完全阐明. 许多学者采用多种方法进行不同种动物FHF的体内和体外实验[1-7]，对其发病机制及治疗等方面进行研究，取得了一定的进展. 我们应用LPS10 μg/kg+D-GalN 800 mg/kg联合用药建立FHF小鼠模型，从动物的临床表现、生化检查和肝脏病理学检查所示的各种变化均符合FHF，与既往的研究一致[3, 8-9]. TNF-α对肝脏具有明显的损伤，可引起肝细胞坏死[10]，近年研究还发现，TNF-α可通过诱导肝细胞凋亡参与肝脏疾病的发病过程，Leist *et al*的研究表明，同时给小鼠注射LPS和D-GalN，早期可出现肝细胞凋亡的病理及生化改变，表明在LPS+D-GalN的FHF模型中，LPS的毒性作用实际上是体现为严重的凋亡性肝损伤和完全的破坏，TNF-α是LPS诱导肝细胞凋亡的重要递质. 已证实细胞内蛋白激酶的激活是TNF-α诱导细胞凋亡的一种早期过程，在TNF-α诱导肝衰竭的实验研究中肝细胞凋亡与肝细胞坏死有着非常密切的联系[1-2, 10-17]. 本结果表明，给予LPS和D-GalN后2 h TNF-α产生最多，以后逐渐下降，至12 h时降至正常，且肝功及肝组织学变化显著，于给药后8 h出现肝细胞凋亡，12 h出现肝细胞坏死，给予TNF-α mAb后TNF-α水平降至正常，同时亦阻断了肝细胞凋亡及肝生化及组织学变化，提示TNF-α在FHF早期肝细胞凋亡的过程中起重要作用. Fas/Apo-1系统与其mAb结合后Ca^{2+}内流，胞质内Ca^{2+}浓度升高可直接激活依赖Ca^{2+}/Mg^{2+}内源性核酸酶从而导致DNA断裂，染色质固缩而使细胞凋亡，在肝脏疾病中，肝细胞的凋亡主要是通过Fas/FasL途径介导所致[1, 5, 11-15, 18-20, 28-29]. 在病毒性肝病中，肝细胞的死亡主要是通过Fas抗原介导的，对暴发性肝衰竭模型小鼠腹腔内注射Fas受体的抗体可加重肝细胞

凋亡和肝功能衰竭，在重型肝炎、慢性肝病患者的肝细胞表面均有Fas抗原的表达[21-25]. 本结果表明，在LPS+GalN用药后Fas表达增加，且其表达水平的变化与肝细胞凋亡的检测结果相一致，提示在此种FHF模型中肝细胞凋亡的发生与Fas的表达增加有关. caspase-3的激活在肝细胞凋亡的发生中起重要的作用，Fas系统参与caspase-3细胞凋亡作用的发挥，在Fas介导细胞凋亡的过程中，caspase-3是其死亡信号途径下游的一个关键效应组分，他可被水解成活性酶形式，进而酶切PARP，导致DNA片段化、细胞凋亡[27]. TNF-α能激活caspase-3蛋白酶活性并能诱发肝细胞凋亡[26-27, 30]. 本研究结果表明，在LPS+GalN所致的FHF中，TNF-α水平及TNF-α mRNA的表达均增加，Fas的表达亦增加，伴有肝细胞凋亡的发生，进一步阻断TNF-α的作用后Fas的表达及肝细胞凋亡均被阻断，提示在此种模型中TNF-α促进肝细胞凋亡的作用与Fas的表达增加有关.

4 参考文献

1 Xia M, Xu C, Ji S, Xue S. Shedding of Fas ectodomain that affects apoptosis of hepatocytes occurring in regenerative liver. *J Gastroenterol* 2002;37:1042-1047
2 Matsuki Y, Li L, Hsu HC, Yang PA, Zheng R, Edwards CK 3rd, Chaudry IH, Zhang HG, Mountz JD. Soluble Fas gene therapy protects against Fas-mediated apoptosis of hepatocytes but not the lethal effects of Fas-induced TNF-alpha production by Kupffer cells. *Cell Death Differ* 2002;9:626-635
3 Nagaki M, Naiki T, Brenner DA, Osawa Y, Imose M, Hayashi H, Banno Y, Nakashima S, Moriwaki H. Tumor necrosis factor alpha prevents tumor necrosis factor receptor-mediated mouse hepatocyte apoptosis, but not fas-mediated apoptosis: role of nuclear factor-kappaB. *Hepatology* 2000;32:1272-1279
4 Imose M, Nagaki M, Naiki T, Osawa Y, Brenner DA, Asano T, Hayashi H, Kato T, Moriwaki H. Inhibition of nuclear factor kappaB and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt is essential for massive hepatocyte apoptosis induced by tumor necrosis factor alpha in mice. *Liver Int* 2003;23:386-396
5 Jodo S, Kung JT, Xiao S, Chan DV, Kobayashi S, Tateno M, Lafyatis R, Ju ST. Anti-CD95-induced lethality requires radioresistant Fcgamma RII+ cells. A novel mechanism for fulminant hepatic failure. *J Biol Chem* 2003;278:7553-7557
6 Galun E, Axelrod JH. The role of cytokines in liver failure and regeneration: potential new molecular therapies. *Biochim Biophys Acta* 2002;1592:345-358
7 Poussin D, Malassagne B, Tran Van Nhieu J, Trebeden H, Guery L, Chereau C, Soubrane O, Calmus Y, Weill B, Batteux F. Biliary administration of naked DNA encoding Fas-Fc protein prevents acute liver failure in mice. *Hum Gene Ther* 2002;13:901-908
8 Arvelo MB, Cooper JT, Longo C, Daniel S, Grey ST, Mahiou J, Czismadia E, Abu-Jawdeh G, Ferran C. A20 protects mice from D-galactosamine/lipopolysaccharide acute toxic lethal hepatitis. *Hepatology* 2002;35:535-543
9 Nakama T, Hirono S, Moriuchi A, Hasuike S, Nagata K, Hori T, Ido A, Hayashi K, Tsubouchi H. Etoposide prevents apoptosis in mouse liver with D-galactosamine/lipopolysaccharide-induced fulminant hepatic failure resulting in reduction of lethality. *Hepatology* 2001;33:1441-1450
10 Hatano E, Bradham CA, Stark A, Iimuro Y, Lemasters JJ, Brenner DA. The mitochondrial permeability transition augments Fas-induced apoptosis in mouse hepatocytes. *J Biol Chem* 2000;275:11814-11823
11 Ku NO, Soetikno RM, Omary MB. Keratin mutation in transgenic mice predisposes to Fas but not TNF-induced apoptosis and massive liver injury. *Hepatology* 2003;37:1006-1014
12 Bajt ML, Vonderfecht SL, Jaeschke H. Differential protection with inhibitors of caspase-8 and caspase-3 in murine models of tumor necrosis factor and Fas receptor-mediated hepatocellular apoptosis. *Toxicol Appl Pharmacol* 2001;175:243-252
13 Osawa Y, Banno Y, Nagaki M, Brenner DA, Naiki T, Nozawa Y, Nakashima S, Moriwaki H. TNF-alpha-induced sphingosine 1-phosphate inhibits apoptosis through a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in human hepatocytes. *J Immunol* 2001;167:173-180
14 Osawa Y, Nagaki M, Banno Y, Yamada Y, Imose M, Nozawa Y, Moriwaki H, Nakashima S. Possible involvement of reactive oxygen species in D-galactosamine-induced sensitization against tumor necrosis factor-alpha-induced hepatocyte apoptosis. *J Cell Physiol* 2001;187:374-385
15 Hatano E, Bennett BL, Manning AM, Qian T, Lemasters JJ, Brenner DA. NF-kappaB stimulates inducible nitric oxide synthase to protect mouse hepatocytes from TNF-alpha-and Fas-mediated apoptosis. *Gastroenterology* 2001;120:1251-1262
16 Mundt B, Kuhnel F, Zender L, Paul Y, Tillmann H, Trautwein C, Manns MP, Kubicka S. Involvement of TRAIL and its receptors in viral hepatitis. *FASEB J* 2003;17:94-96
17 Zhang G, Zhou X, Wang C, Yao M, Yu H, Xie Q. mRNA and protein expression of Fas associated death domain protein in apoptosic hepatocyte induced by tumor necrosis factor-alpha. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2001;9:10-12
18 Matsui H, Hikichi Y, Tsuji I, Yamada T, Shintani Y. LIGHT, a member of the tumor necrosis factor ligand superfamily, prevents tumor necrosis factor-alpha-mediated human primary hepatocyte apoptosis, but not Fas-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 2002;277:50054-50061
19 Murohisa G, Kobayashi Y, Kawasaki T, Nakamura S, Nakamura H. Involvement of platelet-activating factor in hepatic apoptosis and necrosis in chronic ethanol-fed rats given endotoxin. *Liver* 2002;22:394-403
20 Reinehr R, Graf D, Fischer R, Schliess F, Haussinger D. Hyperosmolarity triggers CD95 membrane trafficking and sensitizes rat hepatocytes toward CD95L-induced apoptosis. *Hepatology* 2002;36:602-614
21 Kasahara I, Saitoh K, Nakamura K. Apoptosis in acute hepatic failure: histopathological study of human liver tissue using the tunel method and immunohistochemistry. *J Med Dent Sci* 2000;47:167-175
22 Yang SH, Lee CG, Lee CW, Choi EJ, Yoon SK, Ahn KS, Sung YC. Hepatitis C virus core inhibits the Fas-mediated p38 mitogen activated kinase signaling pathway in hepatocytes. *Mol Cells* 2002;13:452-462
23 McGregor AH, More LJ, Simpson KJ, Harrison DJ. Liver death and regeneration in paracetamol toxicity. *Hum Exp Toxicol* 2003;22:221-227
24 Rivero M, Crespo J,Fabrega E, Casafont F, Mayorga M, Gomez-Fleitas M, Pons-Romero F. Apoptosis mediated by the Fas system in the fulminant hepatitis by hepatitis B virus. *J Viral Hepat* 2002;9:107-113
25 Terradillos O, de La Coste A, Pollicino T, Neuveut C, Sitterlin D, Lecoeur H, Gougeon ML, Kahn A, Buendia MA. The hepatitis B virus X protein abrogates Bcl-2-mediated protection against Fas apoptosis in the liver. *Oncogene* 2002;21:377-386
26 Rudiger HA, Clavien PA. Tumor necrosis factor alpha, but not Fas, mediates hepatocellular apoptosis in the murine ischemic liver. *Gastroenterology* 2002;122:202-210
27 Wang YM, Feng GH, Huang F, Li Y, Zhao GZ. Tumor necrosis factor-alpha, caspase-3 expression and hepatocyte apoptosis in fulminanting hepatic failure. *Zhonghua Neike Zazhi* 2003;42:566-570
28 Zhao Y, Ding WX, Qian T, Watkins S, Lemasters JJ, Yin XM. Bid activates multiple mitochondrial apoptotic mechanisms in primary hepatocytes after death receptor engagement. *Gastroenterology* 2003;125:854-867
29 Nakae H, Zheng YJ, Wada H, Tajimi K, Endo S. Involvement of IL-18 and soluble fas in patients with postoperative hepatic failure. *Eur Surg Res* 2003;35:61-66
30 Schuchmann M, Varfolomeev EE, Hermann F, Rueckert F, Strand D, Koehler H, Strand S, Lohse AW, Wallach D, Galle PR. Dominant negative MORT1/FADD rescues mice from CD95 and TNF-induced liver failure. *Hepatology* 2003;37:129-135