

## Study on Morphological Changes and TUNEL Reaction of Apoptotic Cells in Mouse Liver by Apoptosis Induction

Soo-Dong Kwak<sup>†</sup>, Je-Hoon Yang, Phil-Ok Koh\*, Deuk-Lok Seo and Chung-Boo Kang

*Institute of Animal Medicine, College of Veterinary Medicine Gyeongsang National University  
Department of Veterinary Medicine, Kangwon National University\**

We investigated the morphological changes and TUNEL reaction of apoptotic cells in the liver of D-galactosamine (20 mg/mouse) and lipopolysaccharide (5 µg/mouse) -treated 30 mice (BALB/c), and in addition, also of apoptotic cells in kidney and spleen. The livers and other some organs of mice at 6, 12, 24, 48 and 72 hrs after treatment were collected and were fixed with 10% neutral formalin and paraffin sections were stained with hematoxylin-eosin or terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) method. Morphological changes in apoptotic hepatocytes were chondensation of nuclei and density of cytoplasm, then the margination and pyknosis of chromatin, the formation of half-moon- or horse-shoe- or ship-like shapes of condensed chromatin mass, lastly formation of apoptotic bodies, disappearance of nuclear envelopes, decrease of stainability, then lysis and disappearance of apoptotic bodies. TUNEL positive reactions of hepatocytes were appeared first moderate in uncondensed hepatocytes, severe in condensed hepatocytes, moderate in chromatin-marginated hepatocytes. These reactions also were appeared moderate in hepatocytes with half-moon- or horse-shoe- or ship-like pyknotic chromatin mass or apoptotic bodies, and mild or negative in hepatocytes with lysed apoptotic bodies or with disappeared nuclear envelopes. Consequently these results suggested that TUNEL positive reactions of hepatocytes appeared at more early stages than appearance of chromatin condensation and disappeared at more early stage than disappearance of histological findings of apoptosis. We also confirmed that the differentiation of apoptotic cells from normal healthy cells of Kupffer cells and vascular endothelial cells in liver, reticular cells and lymphocytes in spleen, and epithelial cells of tubules and ducts in kidney was impossible in H-E preparations but was possible in TUNEL preparations.

**Key Words:** Apoptosis, D-galactosamine, Lipopolysaccharide, Hepatocytes, TUNEL

### 서 론

세포의 괴사 (necrosis)를 수동적인 사고사 (accidental death)라고 한다면 apoptosis는 계획된 자연사 (natural death)로서 능동적이면서 자발적인 사망기전이고 개체의 발생, 생체의 균형유지, 성장조절 등에서 조직형태가 재 변화 (remodeling)하는 이미 준비된 사망프로그램으로 능동적으로 죽음을 맞이한다는 개념이다. 그러므로 세포의 apoptosis는 흉선, 창자의 움 세포 (crypt cells), 고환의 정세포, 난소난포의 과립막세포 등 체내 어느 기관에서나 정상적으로 일어나고 있다<sup>4,7,13,20</sup>.

\*는 문 접 수: 2002년 9월 16일

수정재접수: 2002년 9월 26일

<sup>†</sup>Corresponding author: Soo-Dong Kwak, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Jinju, Gyeongnam, 660-701 Republic Korea. Tel: 055-751-5813, Fax: 055-751-5803

e-mail: sdkwak@nongae.gsnu.ac.kr

이 논문은 2000년도 경상대학교 발전기금재단 학술연구조성비에 의하여 연구되었음.

Apoptosis는 병리학적으로는 hormone의 결핍, 독소, virus 감염 및 화학요법제와 같은 수많은 외인성 물질에 의해서도 유도되며<sup>6,10,11,14,16,24</sup>, 암환자에서는 침투성이고 악성암의 도수가 높을 수록 apoptosis 지수는 높다고 하여 악성암과 양성암의 구별의 자료가 된다<sup>3,15,17,21,26</sup>. 만약 암조직에서 유사분열로 증식하는 세포 보다 apoptosis가 일어나는 세포가 더 많으면 이 종양은 크기가 점점 작아지므로 좋은 예후의 결과가 될 것이다. 실제로 항암제는 종양세포에만 얼마나 많이 선택적으로 apoptosis를 일으키느냐가 중요하다. 그래서 암치료의 측면에서 apoptosis가 활발히 연구되고 있다<sup>8,14,21,22</sup>. 또한 apoptosis의 연구는 암의 악성과 양성 구별 외에도 동물의 태생기 장기발생과 퇴화, 약물의 치료효과 등의 연구에 중요한 자료가 되며, 세균에 의해 산생된 lipopolysaccharide (LPS)를 이용한 실험적 apoptosis 유도는 세균성 shock에서 세포의 괴사를 연구하는데 중요한 자료가 된다<sup>24</sup>.

일반적으로 apoptosis가 진행중인 세포의 형태학적 변화는 핵염색질의 치밀, 핵분절 (nuclear fragmentation), 세포질의 농

축, 표면에 물집 (bleb)형성과 들출, apoptotic body의 형성 등으로 알려져 있다<sup>1,2,5,9,13,20,22,24</sup>.

이러한 소견은 현미경하에서 정확한 한계를 구별하는 것은 어렵고, 다만 apoptosis의 진행의 한 과정에서 생기는 apoptotic body를 가진 세포를 조사함이 가장 명확한 방법이다<sup>5,9</sup>. 또 근래에는 면역조직화학적 방법에 의한 terminal deoxynucleotid transferase-mediated dUTP nick end labelling method (TUNEL)법이 개발되어 apoptosis가 일어나는 세포의 조사에 한 특이적 방법으로 소개되고 있다<sup>6,17,18,22,24</sup>. 그러나 이들 TUNEL법에 있어서 apoptosis가 일어나는 세포들이 어떤 형태, 어떤 단계의 범위까지 염색되는지에 대하여서는 조사된 바가 없다.

본 연구는 마우스에 lipopolysaccharide와 D-galactosamine hydrochloride를 투여하여 실험적으로 apoptosis를 유도한 후 apoptosis 세포가 어떤 형태로 변화되며 또 면역조직화학적인 TUNEL법에 의해 apoptosis 양성반응을 나타내는 세포가 어떤 형태이고 어떤 단계의 세포인지에 대하여 조사하였다.

## 재료 및 방법

본 실험에 공시된 동물은 경상남도 축산진흥연구소의 실험 동물사에서 양호한 환경에서 사육되고 성숙한 암수구별하지 않는 마우스 (BALB/c) 30수 (21~28 gm)를 공시하였고, 투여 약제는 기보고 등<sup>16,26</sup>을 참고하여 세균에 의해서 생산된 Lipo-

polysaccharide (Sigma, USA)를 수당 5 µg과 D-galactosamine hydrochloride (Sigma, USA)를 수당 20 mg를 생리적 식염수에 수당 0.7 ml 되게 희석하여 복강내 주사하였다. 주사 후 6, 12, 24, 48 및 72시간 경과군 등 5개군으로 각각 임의로 구분하고 해당시간에 경부를 탈구한 후 방혈하고 부검하여, 간장, 비장, 신장 등을 채취하여 통상방법과 같이 10% 중성 formalin에 고정하고 paraffin 조직절편을 만들어 통상방법과 같이 H-E 염색을 실시하여 광학현미경하에서 apoptosis가 일어나는 세포 단계적 형태의 변화를 조사하였다.

Apoptosis가 일어나는 세포의 면역조직화학적 조사는 paraffin 조직절편을 TUNEL법<sup>6,18,25</sup>에 따라 In situ apoptosis detection kit (Oncor Co. USA)를 이용하여 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 간주하였다. 이들 세포의 형태와 염색성을 H-E염색에서의 형태와 비교하였다.

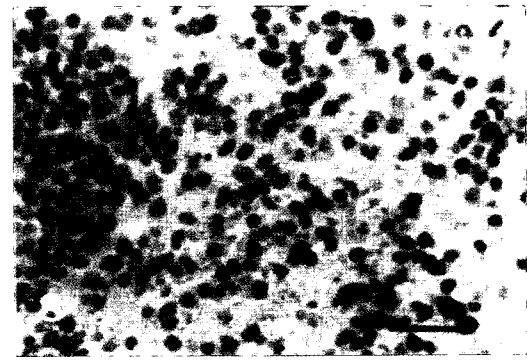
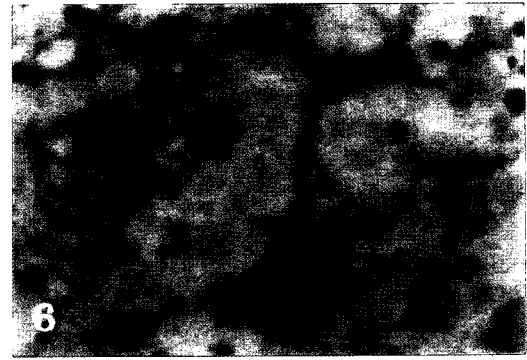
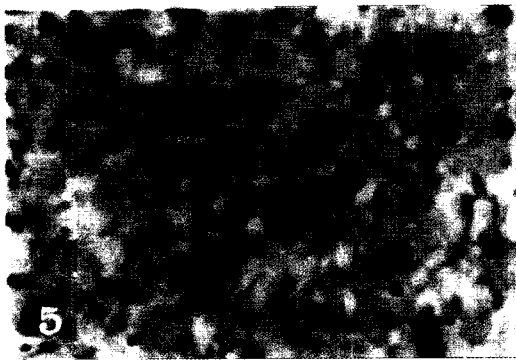
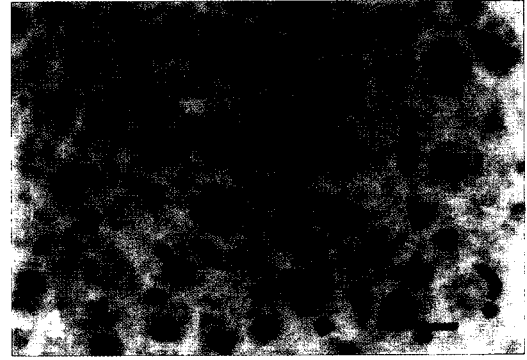
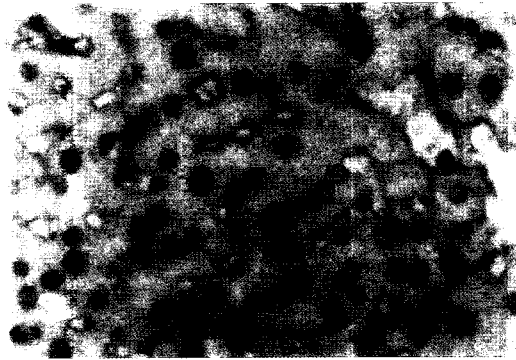
## 결 과

마우스에 lipopolysaccharide와 D-galactosamine hydrochloride를 투여하여 간장, 신장, 비장 등에서 apoptosis가 일어나는 세포를 조사한 바, 간장의 간세포에서 가장 명확하게 관찰되었다.

Table 1. Morphological changes and staining reactions of apoptotic cells in mouse

| Organs | Cells                              | Staining | Time after treatment             |      |       |       |       |       |   |
|--------|------------------------------------|----------|----------------------------------|------|-------|-------|-------|-------|---|
|        |                                    |          | Changed findings                 | 6 hr | 12 hr | 24 hr | 48 hr | 72 hr |   |
| Liver  | Hepatocyte                         | H-E      | CP* condense                     | +    | +     | +++   |       |       |   |
|        |                                    |          | CM** pyknosis                    | +    | ++    |       |       |       |   |
|        |                                    |          | CM half-moon shape               |      | +     | +++   | +++   |       |   |
|        |                                    |          | CM margination                   |      | ±     | +++   | +++   |       |   |
|        |                                    |          | Apoptotic body                   |      |       |       | +++   | +, ±  | ± |
|        |                                    |          | Nuclear memb disapp <sup>#</sup> |      |       |       | +     | ++    |   |
|        | TUNEL                              |          | +                                | +++  | ++    | +     | ±, -  |       |   |
|        | Kupffer cell & Endothelial cell    | H-E      | no                               | no   | no    | no    | no    |       |   |
|        |                                    | TUNEL    | +                                | ++   | +     | ±, -  | -     |       |   |
| Kidney | Epithelial cells of tubules & duct | H-E      | no                               | no   | no    | no    | no    |       |   |
|        |                                    | TUNEL    | +++                              | ++   | +     | ±, -  | -     |       |   |
| Spleen | Reticular cells & lymphocytes      | H-E      | no                               | no   | no    | no    | no    |       |   |
|        |                                    | TUNEL    | ++                               | ++   | +     | ±, -  | -     |       |   |

CP\*: cytoplasm, CM\*\*: chromatin, memb disapp<sup>#</sup>: membrane disappearance staining degree; -: negative ±: weak, +: mild ++: moderate +++: severe



## Legends for Figures

**Fig. 1.** Some apoptotic hepatocytes with condensed cytoplasm and nucleus in the liver of a mouse are seen at 6 hrs after treated with 5 µg of lipopolysaccharide and 20 mg of D-galactosamine hydrochloride. H-E stain. Bar = 25.3 µm

**Fig. 2.** Many apoptotic hepatocytes with marginated or half-moon-like or ship-like chromatin mass or apoptotic bodies in the liver of a mouse are seen at 48 hrs after treated with 5 µg of lipopolysaccharide and 20 mg of D-galactosamine hydrochloride. H-E stain, Bar = 25.3 µm

**Fig. 3.** Some TUNEL positive hepatocytes (nuclei showing brown color) with almostly normal morphology in liver of a mouse are seen at 6 hrs after treated with 5 µg of lipopolysaccharide and 20 mg of D-galactosamine hydrochloride. TUNEL method. Bar = 25.3 µm

**Fig. 4.** Hepatocytes, Kupffer cells and endothelial cells of TUNEL positive reactions in the liver of a mouse are seen at 6 hrs after treated with 5 µg of lipopolysaccharide and 20 mg of D-galactosamine hydrochloride. TUNEL method. Bar = 25.3 µm

**Fig. 5.** Numerous TUNEL positive hepatocytes with marginated or half-moon-like or ship-like chromatin mass or apoptotic bodies in the liver of a mouse are seen at 24 hrs after treated with 5 µg of lipopolysaccharide and 20 mg of D-galactosamine hydrochloride. TUNEL method, Bar = 25.3 µm

**Fig. 6.** Many TUNEL positive hepatocytes or chromatin mass or apoptotic bodies in liver of a mouse are seen at 48 hrs after treated with 5 µg of lipopolysaccharide and 20 mg of D-galactosamine hydrochloride. TUNEL method, Bar = 25.3 µm

**Fig. 7.** Several TUNEL positive epithelial cells of convoluted tubules and collecting ducts in kidney of a mouse are seen at 12 hrs treated with 5 µg of lipopolysaccharide and 20 mg of D-galactosamine hydrochloride. TUNEL method, Bar = 25.3 µm

**Fig. 8.** Numerous TUNEL positive lymphocytes and reticular cells on white and red pulp of spleen are seen at 12 hrs after treated with 5 µg of lipopolysaccharide and 20 mg of D-galactosamine hydrochloride. TUNEL method, Bar = 25.3 µm

투여 후 경과시간별 간세포의 변화 (Fig. 1~6)는 Table 1과 같이 투여 후 초기 6시간째부터 핵소체의 소멸, 세포질의 치밀화와 핵농축 소견이 나타났고, 12시간째 부터는 핵농축이 더 심화되었고, 24시간째부터는 농축된 핵염색질이 핵막 쪽으로 주변화하며, 반달모양, 마제형, 또는 배 (ship)모양으로 변하였고 apoptotic body가 형성되었다. 48시간째는 apoptotic body의 염색성의 감소, 붕괴, 핵막의 소실 소견이, 72시간째는 apoptotic body의 소실 소견이 나타났다. 이러한 변화의 순서는 apoptosis 유도약제의 투여량, 개체의 감수성 등에 따라 출현의 시간적 차이는 있었으나 출현의 순서는 있는 것으로 인정되었다.

간장에서 간세포 외에 Kupffer 세포와 혈관내피세포는 핵이 다소 농축된 듯 하였으나, 변화가 적어 정상 세포들과의 구별이 불가능하였고, 핵염색질의 집단화, 주변화, 또는 apoptotic body 형성 등의 소견은 나타나지 않았다. 비장의 세망세포와 림프구, 신장의 세뇨관과 집합관 등의 상피세포에서는 변화의 소견이 나타나지 않았다.

TUNEL법에 의한 염색 (Fig. 3~8)에서는 Table 1과 같이 간세포는 6시간째부터 핵과 세포질의 형태적 변화를 관찰할 수 없는 세포도 양성반응을 나타내기 시작하여 12시간째부터는 세포질의 치밀화와 핵농축의 과정에 있는 간세포가 가장 강하게 양성반응을 나타내었고, 24시간째부터는 핵막이 잔존하고 핵염색질이 농축되고 apoptotic body가 형성된 간세포가 그 다음의 강도로 양성반응을 나타내었고, 48시간째부터는 농축된 핵염색질이 핵막쪽으로 주변화하였고 apoptotic body가 다소 변성되어 염색성이 감퇴함으로써 더 미약한 양성반응을 나타내었고, 72시간째는 핵막이 소실되고 염색성이 감퇴

또는 소실된 apoptotic body만 잔류하여 아주 미약한 양성반응을 나타내거나 또는 양성반응을 나타내지 않았다.

간장에서 Kupffer 세포와 혈관내피세포는 6시간째부터 간세포가 핵농축을 나타낼 때 가장 강한 양성반응을 나타내었고, 그 후 양성반응은 시간경과에 따라 점차 감소하여 48시간째와 72시간째는 거의 나타나지 않았다 (Fig. 4~6).

신장의 세뇨관과 집합관의 상피세포는 변화가 적어 일반 염색에서는 정상세포와의 구별이 불가능하였고 TUNEL법에 의해서만 apoptosis가 일어나는 세포를 구별할 수 있었다 (Fig. 7).

비장의 세망세포와 림프구 등은 극히 일부에서 apoptotic body 붕괴 파편이 관찰되었으나 그 수가 너무 적어 거의 구별이 불가능하였고 TUNEL법에 의해서 만이 구별이 가능하였다 (Fig. 8).

따라서 TUNEL법에서 간세포는 H-E염색법으로 apoptosis 반응의 구별이 불가능한 초기부터 양성반응을 나타내기 시작하여 핵과 세포질이 농축되고 apoptotic body가 형성될 때 가장 강한 양성반응을 나타내었으며, 이 후 시간이 경과할 수록 반응이 감퇴되어 핵막이 소실되고 염색성이 감퇴될 때 TUNEL법은 양성반응이 매우 약하거나 나타나지 않았다. 간의 Kupffer 세포와 혈관내피세포, 신장의 세뇨관과 집합관의 상피세포, 비장의 림프구와 세망세포 등은 TUNEL법에 의해서만 apoptosis가 일어나는 세포를 구별할 수 있었다.

## 고 찰

실험적으로 apoptosis의 유도는 간의 독성물질인 cocaine,

ethanol, dimethylnitrosamine, D-galactosamine, lead tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 등을 투여하면 간세포에서 apoptosis가 일어난다고 하였다<sup>10-12,16,24</sup>.

실험적으로 투약 후 apoptosis가 일어나는 시기에 대하여는 Leist *et al*<sup>11)</sup>은 투약 후 4시간 후부터, Sakaguchi Y *et al*<sup>19)</sup>은 4시간째부터 나타나서 8시간째 최고치에 도달한 후 48시간째는 소실되었다고 하였고, Morikawa A *et al*<sup>16)</sup>은 투여 후 7시간째에 가장 많고 16시간째는 소멸된다고 하였다.

본 조사에서는 투여 후 6, 12, 24, 48 및 72시간 군으로 분류한 바 H-E염색에서는 6시간째는 소수에서 미약하게 나타났으나 12시간째부터 24시간째까지는 많은 수가 명확하게 나타났고 48시간째는 약간 소멸되기 시작하여 72시간째는 거의 소멸되는 경향이었고, TUNEL법에서는 6시간째에 형태적 변화가 없는 세포에서부터 양성반응을 나타내기 시작하여 24시간째까지 세포종류에 따른 차이는 있었으나 강한 양성반응을 보였고 72시간째는 소실되었다.

간세포의 apoptosis 세포의 형태적 특징은 세포 표면에 물집형성과 돌출, 세포질의 수축과 치밀, 핵DNA의 분절, 염색질의 농축 치밀과 집단화, 핵막쪽 주변화, 핵의 반월모양, 마제양, 또는 배 (ship) 모양형성, 핵붕괴와 농축된 핵편의 형성, apoptotic bodies의 형성과 잔존 또는 대식세포나 이웃세포에 의한 탐식 등의 변화가 있다고 하였다<sup>9,13</sup>.

Apoptosis가 일어나는 세포의 형태적 변화의 순서에 대하여서는 Angermueller *et al*<sup>1)</sup>은 초기에 핵농축이 일어나기 전에 먼저 사립체외막의 국소파괴가 있다고 하였고, Arends *et al*<sup>2)</sup>은 apoptosis를 3단계로 나누는데 그 1단계는 핵수축, 염색질의 농축과 반월형화, 주변화, 핵소체의 소멸, 세포질의 수축, 소기관의 치밀화, 형질내세망의 확대, 2단계는 핵과 세포질에 의한 apoptotic body의 분리 및 대식세포나 인근세포에 의한 탐식, 3단계는 핵과 세포질의 점진적 변성이라고 하였다.

Bisgaard *et al*<sup>3)</sup>은 apoptotic cells의 구별의 기준으로 첫째 apoptotic body의 분포, 둘째 세포의 수축과 이웃세포간의 공간의 형성, 셋째 세포질의 균질화, 넷째 핵의 농축과 치밀 및 particles화, 다섯째 핵이 여러 소체로 분절화 하는 것 등이라고 하였다. 그러나 물집형성과 돌출 조건 등 몇몇 소견은 전자현미경적 소견이라 광학현미경하에서는 구별이 불가능하고, 구별이 가능한 소견도 어떤 단계 어떤 순서로 진행되는지에 대하여 불분명한 점이 많았다.

본 조사의 H-E염색에서는 간세포에서만 핵과 세포질의 농축, 핵염색질의 농축 집단화 및 주변화, apoptotic body의 출현, 핵막의 소실, apoptotic body의 변성과 소실 등의 순서로 진행됨을 추정할 수 있었고 그의 다른 장기에서의 세포는 Kupffer 세포, 내피세포에서 만 핵농축 소견이 있었고 그의 소견은 거의 관찰할 수 없었다.

TUNEL법에 의한 양성반응 세포가 어떤 단계 어떤 형태의

세포인가에 대하여는 Negoescu *et al*<sup>18)</sup>은 고정액의 종류에 따라 apoptosis가 일어난 세포중에 TUNEL법에서는 20%~55%만이 표지되었다고 하여 모든 apoptosis 세포에 양성반응을 나타내지 않음을 제시한 바 있다. Tsutsui *et al*<sup>24)</sup>은 TUNEL 양성반응은 apoptosis 초기에 핵농축이 일어나기 전, DNA strand가 분절이 있을 때 일어난다고 하였으며, 6시간과 48시간 경과군에서 드물게 관찰되었다고 하였고 또 apoptotic body를 가진 세포의 반응을 조사한 바 초기인 6시간 경과군에서는 관찰되지 않았고 48시간 경과군과 72시간 경과군은 이미 괴사부위로 변하고 그 비율이 아주 낮았다고 하였다.

본 조사에서는 위의 형태변화과정에서 이상이 발견되지 않는 6시간 경과군에서 양성반응이 나타났으며 6~12시간 경과군에서 세포질과 핵이 농축되고 apoptotic body가 형성된 세포에서 가장 강한 양성반응이 일어났고 그 외 더 경과되어 핵염색질의 농축과 집단화, 반월모양을 하고 핵막쪽으로 주변화된 세포에도 약한 양성반응을 나타내었으나 핵막이 소실된 48~72시간 경과군의 세포에서는 거의 양성반응이 일어나지 않았다. 이러한 소견은 DNA 분절이 일어난 후부터 핵막이 소실되기 전까지 양성반응을 나타내고 있음을 나타내고 있다.

Apoptosis 반응은 투여량과 개체에 따라 차이가 있겠으나 본 조사에서 간장에서는 H-E 표본에서 12~48시간째 가장 많이 나타났고, TUNEL법에서는 보다 더 빠르게 6~12시간째 가장 많이, 가장 강한 양성반응을 보여 두 염색법에서 차이가 있었다.

간장 외의 신장의 곡세뇨관과 집합관의 상피세포와 비장의 세망세포 등에서는 핵농축 등의 소견으로 apoptotic cells을 구별하기가 불가능하였으나 TUNEL법에서 만이 구별이 가능하였다.

## 참 고 문 헌

- 1) Angermueller S, Kunstle G and Tiegs G (1998): Pre-apoptotic alterations in hepatocytes of TNF $\alpha$ -treated galactosamine-sensitized mice. *J Histochem Cytochem*, **46**: 1175-1183.
- 2) Arends MJ, Morris RG and Wyllie AH (1990): Apoptosis. The role of the endonuclease. *Am J Pathol*, **136**(3): 593-608.
- 3) Baretton GB, Diebold J, Christoforis G, Vogt M, Muller C and Lohrs U (1996): Apoptosis and immunohistochemical bcl-2 expression in colorectal adenomas and carcinomas. *Cancer*, **77**(2): 255-264.
- 4) Billig H, Chun SY, Eisenhauer K and Hsueh JW (1996): Gonadal cell apoptosis: hormone-regulated cell demise. *Human Reprod Update*, **2**(2): 103-117.
- 5) Bisgaard HC, Nagy P, Santoni-Rugiu E and Thorgeirsson SS (1996): Proliferation, apoptosis, and induction of hepatic

- transcription factors are characteristics of the early response of biliary epithelial (oval) cells to chemical carcinogens. *Hepatology*, **23**: 62-70.
- 6) Colecchia M, Frigo B, Del Boca C, Guardamagna M, Zucchi A and Leopardi O (1997): 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.
  - 7) Eisenhaauer KM, Chun SY, Billig H and Hsueh JW (1995): Growth hormone suppression of apoptosis in preovulatory rat follicles and partial neutralization by insulin-like growth factor binding protein. *Biology of Reproduction*, **53**: 13-20.
  - 8) Kwak SD, Kim CS, Kang CB, Koh PO, Seo DL and Yang JH (2000): Apoptosis of livers induced by D-galactosamine and lipopolysaccharide in mice. *Korean J Vet Res*, **40(2)**: 213-220.
  - 9) Kerr JF, Gobe CG, Winterford CM and Harmon BV (1995): Anatomical methods in cell death. *Methods Cell Biol*, **46**: 1-27.
  - 10) Ledda-Columbano GM, Coni P, Curto M, Giacomini G and Faa G (1991): 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.
  - 11) Leist M, Gantner F, Bohlinger I and German PG (1994): Murine hepatocyte apoptosis induced in vitro by TNF- $\alpha$  requires transcriptional arrest. *J Immunol*, **153**: 1778-1788.
  - 12) Leist M, Gantner F, Naumann H, Bluethmann H and Vogt K (1997): Tumor necrosis factor - induced apoptosis during the poisoning of mice with hepatotoxins. *Gastroenterology*, **112**: 923-934.
  - 13) Majno G and Joris I (1995): Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol*, **146(1)**: 3-5.
  - 14) Meyn RE, Stephens LC, Hunter NR and Milas L (1994): Induction of apoptosis in murine tumors by cyclophosphamide. *Cancer Chemother Pharmacol*, **33**: 410-414.
  - 15) Mills JJ, Chari RS, Boyer IJ, Gould MN and Jirtle RL (1995): Induction of apoptosis in liver tumors by the monoterpene perillyl alcohol. *Cancer Res*, **55**: 979-983.
  - 16) Morikawa A, Sugiyama T, Kato Y and Koide N (1996): Apoptotic cell death in the response of D-galactosamine-sensitized mice to lipopolysaccharide as an experimental endotoxic shock model. *Infect Immun*, **64(3)**: 734-738.
  - 17) Mustonen M, Raunio H, Paakko P and Soni Y (1997): The extent of apoptosis is inversely associated with bcl-2 expression in premalignant and malignant breast lesions. *Histopathology*, **31**: 347-354.
  - 18) Negoescu A and Lorimier P (1997): Tunel: Improvement and evaluation of the method for In Situ apoptotic cell identification. *Biochemica*, **2**: 12-17.
  - 19) Sakaguchi Y, Cilfton Stephen L and Makino M (1995): Apoptosis in tumors and normal tissues induced whole body hyperthermia. *Cancer Res*, **55**: 5459-5464.
  - 20) Seo JS (1995): Apoptosis. *Korean Society of Medical Biochemistry and Molecular Biology*, **16(2)**: 12-18.
  - 21) Soini Y, Tormanen U and Paakoo P (1993): Apoptosis is inversely related to bcl-2 but not bax expression in salivary gland tumours. *Histopathology*, **32**: 28-34.
  - 22) Stephens LC, Hunter NR, Ang KK and Milas L (1993): Development of apoptosis in irradiated murine tumors as a function of time and dose. *Radiat Res*, **135**: 73-80.
  - 23) Tessitore L, Costelli P, Sacchi C and Palcentini M (1993): The role of apoptosis in growing and stationary rat ascites hepatoma, Yoshida AH-130. *J Pathol*, **171**: 301-309.
  - 24) Tsutsul S, Hirasawa K, Takeda M, Itagaki SI, Kawamura S, Moeda K and Doi K (1997): Apoptosis of murine hepatocytes induced high doses of galactosamine. *J Vet Med Sci*, **59(9)**: 758-790.
  - 25) Wijsman JH, Jonker RR, Keijzer R, vande Velde CJ and Cornelise CJ (1993): A new method to detect apoptosis in paraffin sections; In situ end-labeling of fragmented DNA. *J Histochem Cytochem*, **41(1)**: 7-12.
  - 26) Xiong Q, Hase K, Tezuka Y, Namba T and Kadota S (1999): Acetoside inhibits apoptosis in D-galactosamine and lipopolysaccharide-induced liver injury. *Life Sci*, **65(4)**: 421-430.