

EL FACTOR DE CRECIMIENTO DE HEPATOCITOS Y SU RECEPTOR C-MET EN LA PROTECCIÓN CONTRA EL DAÑO HEPÁTICO INDUCIDO POR EL ALCOHOL*

Mayrel Palestino-Domínguez, Denise Clavijo-Cornejo,
María Concepción Gutiérrez-Ruiz y Luis Enrique Gómez-Quiroz

Laboratorio de Fisiología Celular, Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. Avenida San Rafael Atlixco 186 Vicentina, Iztapalapa, 09340 Ciudad de México, Distrito Federal. Tel. (55) 58-04-47-30. Correspondencia: Dr. Luis Enrique Gómez-Quiroz, correo E: legq@xanum.uam.mx

RESUMEN

El factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) juega un papel primordial en la reparación y regeneración hepática durante el daño al órgano. El HGF es producido, en el hígado, por células no parenquimatosas, como las células estelares hepáticas, endoteliales del sinusoide, las células de Kupffer y células del sistema inmune. Entre las múltiples funciones biológicas dirigidas por el HGF es importante subrayar la proliferación, la sobrevivencia, la morfogénesis, entre otras. Nuestro grupo ha venido caracterizado la respuesta antioxidante del HGF, función que retoma particular interés en la enfermedad hepática alcohólica. La protección hepática ejercida por el HGF contra el daño por alcohol es multifactorial, ya que se ha observado que regula transcripcionalmente a algunos componentes del sistema microsomal de oxidación del etanol, y esta regulación representa el primer frente de defensa, mientras que el segundo nivel de protección está dado por la expresión de proteínas antioxidantes, de sobrevivencia y reparación.

PALABRAS

CLAVE:

Hígado, HGF, c-Met, etanol, ROS

ABSTRACT

The hepatocyte grow factor (HGF) plays a major role in liver repair and regeneration during organ injury. HGF is produced in the liver, by non-parenchymal cells, such stellate cells, sinusoidal endothelial, Kupffer and immune cells. Among the multiple biological functions targeted by HGF is important to emphasize cell proliferation, survival, morphogenesis, among others. Our group has characterized the HGF antioxidant response, function relevant in the alcoholic liver disease. The hepatic protection exerted by HGF is multifactorial. It has been observed that regulates transcriptionally some of the microsomal ethanol oxidizing system components, and this regulation represents the first frontline of defense, while the second level of protection is driven by the expression of antioxidants, survival and repair proteins.

KEY WORDS:

Liver, HGF, c-Met, ethanol, ROS

INTRODUCCIÓN

El factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) juega un papel importante en la reparación y regeneración hepática durante el daño. El HGF desencadena una red compleja de rutas de señalización que activan funciones claves para la reparación del hígado, sobrevivencia y el control redox celular (1, 2). Todas estas funciones son iniciadas por la

unión del HGF a su receptor c-Met el cual, después de su autofosforilación, recluta una gran variedad de proteínas de transducción.

Después del daño, el hígado inicia el proceso de reparación que puede estar dado por la proliferación de hepatocitos maduros, normalmente quiescentes o, cuando el daño es extenso y los hepatocitos maduros son incapaces de proliferar, la reparación se da por la activación de las células

progenitoras o células ovales del mismo órgano (3).

Es bien sabido que el proceso de reparación inicia con la activación de las células de Kupffer, los macrófagos residentes del hígado, los cuales responden al daño secretando al factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) e interleucina (IL-) 6, estas proteínas impactan e inducen la activación de rutas de señalización en los hepatocitos como la que conduce a la activación del factor nuclear κ B (NF- κ B) y a la del transductor de señal y activador de la transcripción 3 (Stat3) respectivamente. Más aún, las células hepáticas estelares (por sus siglas en inglés HSC) y las células inflamatorias inician la producción del HGF el cual junto con el TNF- α y la IL-6 dan una señal cooperativa para superar el control del ciclo celular y sacar a los hepatocitos de su arresto en la fase G0 para encaminarlos a la fase G1/S, permitiéndoles proliferar y reparar el tejido dañado (3).

HGF/c-MET Y SU FUNCIÓN EN LA REPARACIÓN DEL HÍGADO

El HGF fue originalmente descubierto en el suero de rata, en 1984, como un potente agente mitógeno de hepatocitos de rata adulta (4). El gen humano está localizado en el cromosoma 7 banda 7q21.1. La glucoproteína precursora del HGF se sintetiza como pre-pro-HGF, consta de 728 residuos de aminoácidos, incluyendo la secuencia señal y el péptido que contienen las subunidades alfa y beta. El HGF se activa extracelularmente por la serina proteasa uPA, el activador del plasminógeno tipo urocinasa (5). El HGF maduro es un heterodímero de 697 residuos de aminoácidos, cuyas subunidades alfa y beta están unidas por un puente disulfuro. La cadena α esta formada por 463 residuos de aminoácidos y contiene cuatro dominios tipo Kringle. La cadena β consiste de 234 residuos de aminoácidos. Se piensa que *in vivo* el HGF actúa de forma paracrina, siendo producido por células mesenquimales, como las células de Kupffer o estelares hepáticas y con blanco en las células epiteliales vecinas, como los hepatocitos o los colangiocitos.

Entre las múltiples funciones biológicas dirigidas por el HGF es importante subrayar la proliferación celular, la protección contra apoptosis, la morfogénesis, la motilidad celular, la invasión y la metástasis (6). La transducción de señal que conduce a todos estos efectos inicia con la inducción de la dimerización y la activación del receptor del HGF por su ligando, el proto-oncogen c-Met (por sus siglas en inglés cellular-mesenchymal epithelial transition factor) (7).

El gen humano c-Met está localizado en el cromosoma 7 banda 7q31; el producto es un polipé-

tido de 150 kDa que después de su glicosilación y procesamiento proteolítico, genera al receptor heterodimérico maduro α - β . La cadena α extracelular unida por puente disulfuro a una cadena transmembranal β de 140 kDa, la cual contiene múltiples sitios de regulación por fosforilación. La unión del ligando al receptor lleva a la autofosforilación de las tirosinas 1230, 1234 y 1235 localizadas dentro del bucle de activación del dominio catalítico con actividad de cinasa de tirosina. Adicionalmente, la fosforilación de los residuos 1313, 1349 y 1356 le generan un sitio de anclaje (docking site) para el reclutamiento de proteínas adaptadoras o ejecutoras de la transducción de señales. Particularmente la fosforilación en la tirosina 1313 genera un sitio de unión preferido por la fosfoinositol 3-cinasa (PI3K), mientras en el sitio de unión multisustrato de las tirosinas 1349, y 1356 conducen a la activación de proteínas como Shc, Src, Gab1, Grb2, SHP2, fosfolipasa C- γ (PLC- γ) entre otros (8). Estas rutas han sido extensamente caracterizadas *in vivo* e *in vitro*, y se han encontrado diferencias importantes con respecto a otros factores de crecimiento con actividades de reparación de tejidos, como el factor de crecimiento epidermal (EGF), el TNF- α o la IL-6. Finalmente, c-Met contiene un dominio conocido como yuxtamembranal en el cual se encuentra la serina 956 y la tirosina 1093 (Fig. 1), que al ser fosforiladas inician la endocitosis y posterior reclutamiento de ligasas de ubiquitinas las cuales inician el proceso de degradación del receptor tras su activación y función, por lo que este dominio representa un punto de regulación negativa de la ruta iniciada por el HGF.

Con la finalidad de resumir las principales rutas de protección inducidas por el HGF, la figura 2 muestra que, en concreto, la ruta de PI3K/Akt está dirigida a activación del NF- κ B que básicamente favorece la expresión de proteínas de sobrevivencia o antiapoptóticas, mientras que, rutas como las gobernadas por PKC o Nrf2 conducen a la regulación y activación de factores como Nrf2 que inducen la expresión de enzimas antioxidantes. Ambas rutas conducen, de manera conjunta a la sobrevivencia y a la reparación del tejido.

En humanos sanos los niveles circulantes del HGF están siempre presentes y pueden ser afectados por la edad, el género y el embarazo. Se considera que el intervalo normal es de 0.26 a 0.39 ng/mL. Sin embargo, es bien sabido que el incremento del HGF en suero, tanto en el daño agudo como en el crónico (9), depende del tipo de daño o enfermedad. Por ejemplo, en cirrosis alcohólica el valor reportado de HGF es de 0.78 ng/mL (10), en pacientes con hepatocarcinoma la concentración promedio es 1.06 ± 1.45 ng/mL y en

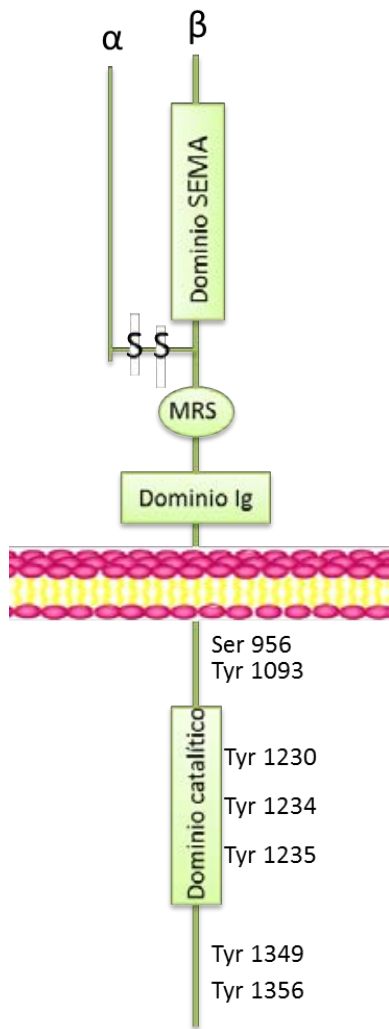


Figura 1. Estructura del receptor c-Met. Formado por una cadena α extracelular y una cadena β transmembranal, unidas por un puente disulfuro. Se muestran los principales sitios catalíticos, donde se autofosforila en tirosinas tras la unión a su ligando HGF. Las tirosinas 1230, 1234, 1235 se localizan en el dominio catalítico. Y en el sitio de unión multisustrato las tirosinas 1349 y 1356. En el dominio juxtamembranal se localiza la Serina 956 y la Tirosina 1039 que al ser fosforiladas conducen a la degradación del receptor.

pacientes con hepatitis fulminante puede alcanzar valores de 16.40 ± 14.67 ng/mL (9). El incremento muestra una correlación positiva con marcadores de falla hepática como la bilirrubina en suero o de la gama-glutamyl transpeptidasa, y una correlación negativa con el contenido de albumina, sugiriendo que los niveles del HGF pueden reflejar el grado de daño hepático y puede ser considerado como un indicador pronóstico.

La principal evidencia de la relevancia del HGF en la regeneración y reparación del hígado se da

con la generación del ratón con supresión de la señalización de c-Met específico en hepatocitos (MetKO) (11). La pérdida de la señalización de c-Met parece no ser perjudicial para la función hepática bajo condiciones fisiológicas, sin embargo, dosis subletales del agonista FAS (anticuerpo Jo2) induce una hipersensibilización al daño, generando apoptosis y necrosis, sin efectos importantes en el ratón control (MetWT). Los hepatocitos derivados del ratón MetKO muestran sensibilización a Jo2 induciendo apoptosis y problemas en la motilidad y la fagocitosis, actividades que son requeridas para un correcto proceso de reparación (1, 11).

HGF Y c-MET EN LA ENFERMEDAD DE HÍGADO ALCOHÓLICO

Las funciones del HGF en la enfermedad por hígado alcohólico (por sus siglas en inglés ALD) permanecen parcialmente caracterizadas. Sin embargo, está claro que HGF y c-Met están involucrados en todas las etapas de la patología, desde la respuesta inflamatoria hasta la esteatohepatitis alcohólica, fibrosis, cirrosis y hepatocarcinoma (12, 13, 14), lo cual deja claro que este factor de crecimiento es requerido por el órgano a lo largo de la progresión del daño. Sin embargo, es bien sabido que en células transformadas o de cáncer, las funciones de c-Met solo confieren resistencia y sobrevivencia a las células del tumor, por lo que el escenario es distinto al de un daño agudo, como en los estadios previos de la enfermedad como en la hepatitis o en la esteatosis alcohólica.

RADICALES LIBRES, ESTRÉS OXIDANTE Y METABOLISMO DE ETANOL

Fisiológicamente del 1-2% del oxígeno molecular es convertido, por mecanismos enzimáticos y no enzimáticos, a especies reactivas de oxígeno (por sus siglas en inglés ROS) las cuales incluyen peróxido de hidrógeno (H_2O_2), anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), oxígeno molecular (1O_2), radical hidroxilo ($OH^{\bullet}$), entre otros (15). Con el fin de evitar los efectos perjudiciales de estas moléculas, las células contienen una batería de defensas antioxidantes que comprenden componentes enzimáticos y no enzimáticos. Entre las enzimas antioxidantes la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa, la glutatión (GSH) peroxidasa (GSHPx) y la GSH reductasa (GSHRd) mantienen la principal actividad de destoxificación. Las SOD1, 2 y 3, las cuales están localizadas en el citosol, mitocondria y en la membrana plasmática respectivamente, conducen la transformación del $O_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 . Aunque el H_2O_2 no es un radical libre, es precursor de especies

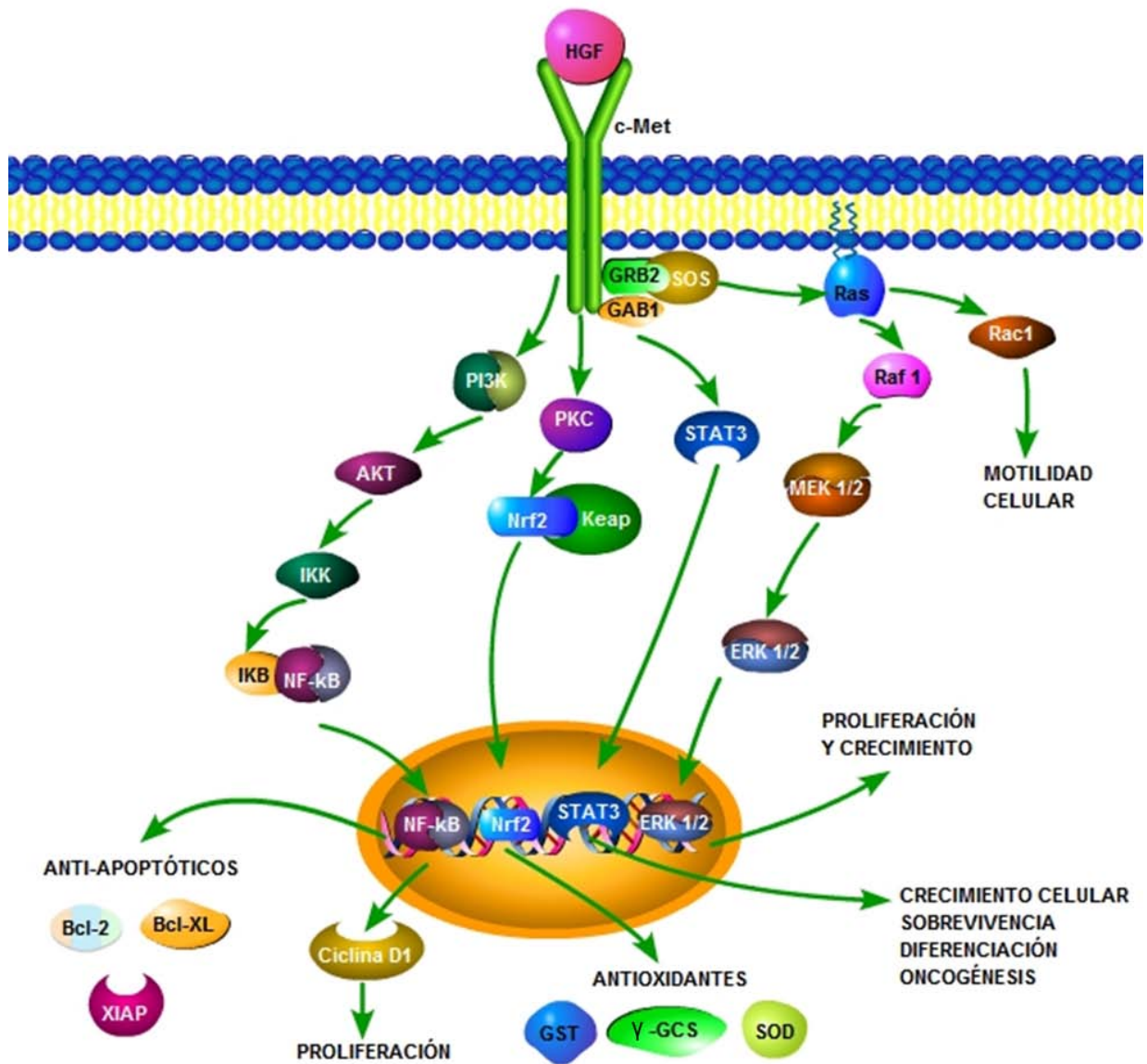


Figura 2. Principales rutas de señalización inducidas por HGF/c-Met. Tras la dimerización y autofosforilación del receptor c-Met se reclutan proteínas adaptadoras y efectoras, las cuales desencadenan cascadas de señalización que activan factores de transcripción importantes para la síntesis de proteínas de proliferación, diferenciación, motilidad, supervivencia y antioxidantes.

reactivas más tóxicas como el radical $\text{OH}\cdot$, ya sea a través de la reacción de Fenton, la cual requiere la presencia de Fe^{3+} o Cu^{2+} para el proceso, o la reacción de Haber-Weiss (16).

Para contrarrestar este fenómeno el H_2O_2 es transformado a H_2O por la acción de la catalasa o la GSHPx, ésta última emplea dos moléculas de GSH para reducir H_2O_2 , generando la forma oxidada de glutatión (GS_{SG}) el cual puede ser regenerado a GSH por la acción de GSHPd usando NADPH como donador de electrones.

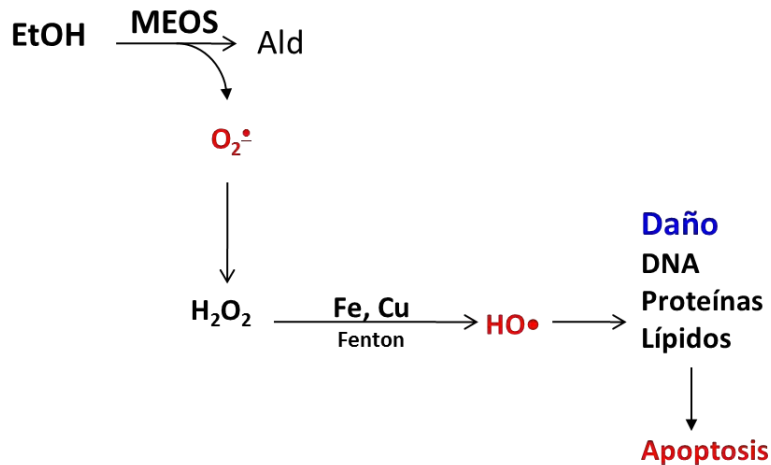
El GSH es el principal tiol natural, es produci-

do en el citosol por la acción de dos enzimas, la γ -glutamyl cisteina ligasa (también conocida como γ -glutamyl cisteina sintetasa, γ -GCS) que cataliza la formación del dipeptido L- γ -glutamyl-L-cisteína y por la glutatión sintetasa la cual convierte este dipeptido en GSH (L- γ -glutamyl-L-cisteinil-Glicina).

La habilidad del GSH para hacer frente a las ROS no está restringido como un cofactor de GSHPx, sino que en sí mismo posee capacidad de secuestrar radicales libres, como sucede con otros antioxidantes no enzimáticos como la vitamina C y E, y el β -caroteno.

Figura 3.

Biotransformación de etanol y generación de estrés oxidante. El etanol es transformado a acetaldehído mediante el MEOS al mismo tiempo que se producen especies reactivas de oxígeno que pueden inducir daño a macromoléculas importantes como lípidos, proteínas y principalmente el DNA, por lo cual la célula puede llegar a la apoptosis si el daño no es reparado.



El metabolismo del etanol (Fig. 3) es principalmente conducido por dos sistemas, la alcohol deshidrogenasa (por sus siglas en inglés ALDH) y el sistema microsomal de oxidación del etanol (por sus siglas en inglés MEOS), principalmente por el citocromo P450 (CYP) 2E1; ambos sistemas generan acetaldehído como metabolito primario, pero solo el MEOS produce, además, ROS, las cuales conducen a la oxidación del DNA, de proteínas y de lípidos (15). Se ha reportado que el CYP2E1 se induce por el consumo de etanol de manera crónica, principalmente en la zona 3 de los hepatocitos. Biopsias de hígado de sujetos tomadores crónicos activos revelan un incremento de 4 a 10 veces en los valores normales de esta isoforma (17).

Otras isoformas del CYP han sido implicadas en el metabolismo del etanol, como el CYP1A2 y CYP3A4, por lo tanto el término de MEOS caracteriza la oxidación microsomal total del etanol, no solo el CYP2E1 (18).

En términos del metabolismo de etanol y su consecuente estrés oxidante, podemos definir dos niveles principales en la protección mediada por el HGF. El primer nivel está en la regulación del MEOS, y el segundo es el control o neutralización de los radicales libres formados como consecuencia del metabolismo del etanol.

EL HGF REGULA LOS SISTEMAS DE GENERACIÓN DE ROS

El HGF regula la expresión y actividad de CYP1A1/2, CYP2A6, CYP2E1 y CYP2B6 en cultivo primario de hepatocitos humanos (19). La actividad de CYP1A2, CYP3A4 y CYP1A1/2 fueron significativamente disminuidos a 72 horas de tratamiento con el HGF (10 ng/ml). Particularmente en cinco cultivos de hepatocitos de cinco diferentes donadores sanos, el tratamiento con el HGF resultó en la reducción de la actividad del CYP2E1, del 55% al 69% con

respecto a los cultivos no tratados. Estos efectos se correlacionaron con el decremento en el mRNA, sugiriendo que el HGF disminuye transcripcionalmente y post-transcripcionalmente algunos componentes del MEOS. Esta regulación representa la primera línea de defensa inducida por el HGF contra la toxicidad del etanol.

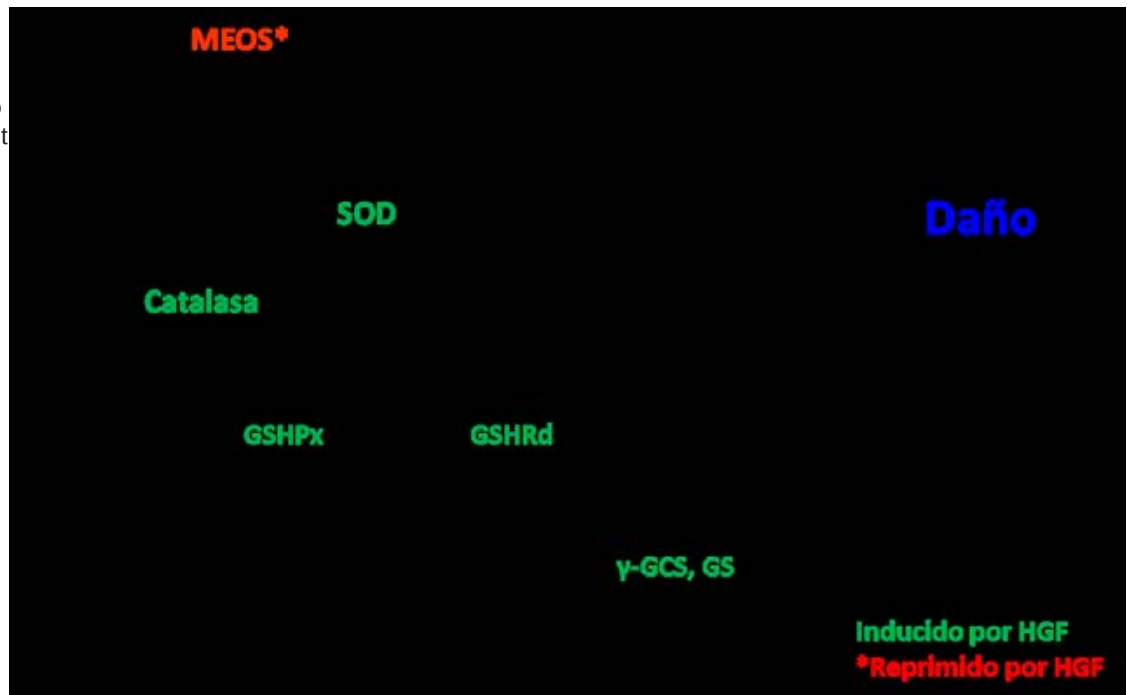
Además de la disminución de los componentes del MEOS por el HGF, está reportado que también reprime otros sistemas generadores de ROS como la NADPH oxidasa (1), la cual está involucrada en muchas enfermedades hepáticas como la fibrosis (20), la infección por virus de la hepatitis C (21) y la enfermedad hepática alcohólica, donde se activa la oxidasa principalmente en las células de Kupffer llevando a la producción de TNF- α (22).

EL HGF REGULA LAS ROS PRODUCIDAS POR EL METABOLISMO DEL ETANOL

El segundo nivel de protección desplegado por el HGF contra el efecto oxidativo inducido por el metabolismo del etanol está dado por la expresión de proteínas antioxidantes. Es bien sabido que HGF/c-Met pueden regular la activación de factores de transcripción relacionados con la sobrevivencia, como el NF- κ B o el Nrf2 (1, 23, 24) los cuales son responsables de la expresión de una amplia gama de antioxidantes, proteínas de detoxificación y antiapoptóticas (25, 26).

Estudios *in vitro* han revelado el prominente papel del HGF en la sobrevivencia celular contra la toxicidad del etanol. Uno de los principales problemas para determinar los mecanismos moleculares por los que el alcohol induce daño a nivel celular, es que el cultivo primario de hepatocitos pierde la capacidad de metabolizar etanol debido a la represión en la expresión del MEOS y de la alcohol deshidrogenasa. Líneas celulares transfectadas que expresan un CYP2E1 y/o alcohol deshidrogenasa

Figura 4. Efecto protector del HGF en el metabolismo de EtOH. HGF/c-Met inducen la síntesis de proteínas (SOD, Catalasa, Glutación peroxidasa, Glutación reductasa, γ -Glutación sintetasa) que protegen contra el estrés oxidante generado por el metabolismo del etanol mediante el sistema microsomal de oxidación del etanol; además, HGF disminuye la expresión y actividad del MEOS.



estable y constitutivo han establecido un modelo conveniente para suplir la ausencia del metabolismo de alcohol en cultivo de hepatocitos normales (27, 28). La línea celular VL17Aes particularmente relevante debido a que expresa tanto al CYP2E1 como a la alcohol deshidrogenasa (28) la cual se asemeja más a las condiciones en hepatocitos normales, con respecto a otras líneas como la E47 que solo sobreexpresa al CYP2E1. (27).

En un trabajo publicado recientemente por nuestro grupo (24), se usó la línea celular VL17A para determinar los efectos del HGF en un modelo celular que metaboliza etanol. El HGF fue capaz de disminuir la producción de ROS, el daño por oxidación de las proteínas y la lipoperoxidación inducida por el metabolismo del etanol, además, el efecto se relacionó con un incremento en la viabilidad celular. El análisis de los mecanismos involucrados en la protección inducida por el HGF contra la toxicidad del metabolismo del etanol reveló que el HGF induce la activación de NF- κ B, con una expresión concomitante de enzimas antioxidantes como la catalasa, la SOD1, y la γ -GCS, con una elevación en la síntesis de GSH como consecuencia de la expresión de esta última. La inhibición de NF- κ B, o los principales activadores río arriba de este factor de transcripción (PI3K y Akt), abrogaron significativamente el papel de protección del HGF (1, 24). El estudio dejó muy claro que la protección fue ejercida por una ruta bien definida (c-Met/PI3K/Akt/NF- κ B) promovida por HGF/c-Met.

Se ha demostrado que el HGF es un buen inductor en la expresión de la catalasa y la GSHRd (29). La catalasa transforma el H_2O_2 en H_2O , y GSHRd

restaura los niveles de GSH a partir de la reducción de GSSG (Fig. 4).

La relevancia del GSH en la enfermedad hepática alcohólica ha sido muy bien caracterizada por el grupo del Dr. Fernández-Checa y colaboradores (30, 31, 32, 33), y está propuesto que la disminución del GSH, particularmente a nivel mitocondrial, representa un mecanismo clave en la inducción de daño hepatocelular por alcohol.

El HGF regula fuertemente la homeostasis del GSH por la inducción de la expresión de γ -GCS (24, 34). Nuestro grupo de investigación ha publicado varios trabajos tanto en animales MetKO como en WT que muestran que el HGF y c-Met son los principales reguladores en el mantenimiento de la homeostasis redox celular en el hígado (1, 23, 24, 35). Los ratones MetKO se encuentran bajo estrés oxidante debido a un incremento en la actividad de la NADPH oxidasa, y la depleción del GSH (1). Recientemente, el grupo ha caracterizado que c-Met regula a este sistema pro-oxidante por un mecanismo dual que involucra una regulación transcripcional y post-traducciona (Clavijo-Cornejo 2012, enviado). En un estudio de carcinogénesis experimental en ratones MetKO sometidos al agente carcinogénico N-nitrosodietilamina se observó que los ratones KO fueron más susceptibles al desarrollo de tumores en el hígado, presentando un incremento en la multiplicidad, tamaño e incidencia. Este efecto fue abrogado por la administración oral de N-acetil cisteína (NAC) el cual es un precursor de la síntesis del GSH (35). Estos hallazgos se correlacionaron con estudios *in vitro*, ya que los hepatocitos MetKO son más susceptibles al agonista

de Fas Jo2 para inducir daño hepatocelular, efecto que fue abrogado por el tratamiento con NAC, el cual indujo la restauración de los reservorios del GSH (1).

La principal consecuencia de la generación de ROS es la inducción de apoptosis en los hepatocitos. Las ROS pueden inducir la activación de la ruta de señalización de la cinasa jun llevando a la activación del factor de transcripción AP-1 que promueve la expresión de proteínas proapoptóticas como FasL, TNF- α y Bak. Las ROS también apuntan a la mitocondria induciendo la permeabilización de la membrana y liberación de proteínas proapoptóticas (citocromo c, Smac/ diablo, EndoG, entre otras) (36), las cuales participan en el proceso de muerte celular.

Es bien conocido el efecto antiapoptótico del HGF, no solo en hepatocitos, sino también en otros tipos celulares, el HGF induce la expresión de proteínas antiapoptóticas como Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1, entre otras, las cuales redondean el papel general de protección celular (25, 29, 37, 38).

En resumen, el control del estrés oxidante inducido por el etanol, así como el proceso de reparación del hígado, están mediados por el HGF

y su receptor c-Met por medio de un mecanismo generalizado que permite la expresión de enzimas antioxidantes, que frenarán o contrarrestarán el incremento de las ROS promovidas por el CYP2E1, por la expresión de proteínas antiapoptóticas, que frenarán los efectos de muerte celular, eventualmente por la inducción de la expresión de proteínas de reparación, como aquellas involucradas en el ciclo celular, y que forman parte de la respuesta mitogénica que posee el HGF y c-Met, todo ello gobernado por la activación de rutas canónicas de sobrevivencia por ejemplo, Akt/ NF- κ B, Erk1/2 o Stat3, (1, 24). Pero también la inducción del GSH, apoya su función antiapoptótica del HGF, basada en el hecho que el tratamiento con NAC reduce significativamente la apoptosis inducida por Jo2 en hepatocitos y que el pretratamiento con BSO, un inhibidor de γ -GCS, aboga el efecto protector tanto del NAC como del HGF (1).

Agradecimientos. Este trabajo fue parcialmente apoyado por el CONACYT No. 131707, por Fundhepa, estímulo "Antonio Ariza Cañadilla" y por la Universidad Autónoma Metropolitana Izta-



REFERENCIAS

- Gomez-Quiroz LE, Factor VM, Kaposi-Novak P, Coulouarn C, Conner EA, Thorgeirsson SS. (2008) Hepatocyte-specific c-Met deletion disrupts redox homeostasis and sensitizes to Fas-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 283: 14581-14589.
- Nakamura T, Mizuno S. (2010) The discovery of hepatocyte growth factor (HGF) and its significance for cell biology, life sciences and clinical medicine. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 86: 588-610.
- Riehle KJ, Dan YY, Campbell JS, Fausto N. (2011) New concepts in liver regeneration. *J Gastroenterol Hepatol* 26 Suppl 1: 203-212.
- Nakamura T, Nawa K, Ichihara A. (1984) Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats. *Biochem Biophys Res Commun* 122: 1450-1459.
- Naldini L, Tamagnone L, Vigna E, Sachs M, Hartmann G, Birchmeier W, Daikuhara Y, Tsubouchi H, Blasi F, Comoglio PM. (1992) Extracellular proteolytic cleavage by urokinase is required for activation of hepatocyte growth factor/scatter factor. *EMBO J* 11: 4825-4833.
- Hanna JA, Bordeaux J, Rimm DL, Agarwal S. (2009) The function, proteolytic processing, and histopathology of Met in cancer. *Adv Cancer Res* 103: 1-23.
- Ma PC, Maulik G, Christensen J, Salgia R. (2003) c-Met: structure, functions and potential for therapeutic inhibition. *Cancer Metastasis Rev* 22: 309-325.
- Bertotti A, Comoglio PM. (2003) Tyrosine kinase signal specificity: lessons from the HGF receptor. *Trends Biochem Sci* 28: 527-533.
- Funakoshi H, Nakamura T. (2003) Hepatocyte growth factor: from diagnosis to clinical applications. *Clin Chim Acta* 327: 1-23.
- Antoljak N, Topic E, Duvnjak M, Vrkic N, Zuntar I. (2001) Hepatocyte growth factor levels in Croatian healthy and alcoholic liver cirrhosis patients. *Coll Antropol* 25: 341-348.
- Huh CG, Factor VM, Sanchez A, Uchida K, Conner EA, Thorgeirsson SS. (2004) Hepatocyte growth factor/c-met signaling pathway is required for efficient liver regeneration and repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 4477-4482.

12. Cornella H, Alsinet C, Villanueva A. (2011) Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *Alcohol Clin Exp Res* 35: 821-825.
13. Tahara M, Matsumoto K, Nukiwa T, Nakamura T. (1999) Hepatocyte growth factor leads to recovery from alcohol-induced fatty liver in rats. *J Clin Invest* 103: 313-320.
14. Taieb J, Delarche C, Paradis V, Mathurin P, Grenier A, Crestani B, Dehoux M, Thabut D, Gougerot-Pocidalo MA, Poynard T, Chollet-Martin S. (2002) Polymorphonuclear neutrophils are a source of hepatocyte growth factor in patients with severe alcoholic hepatitis. *J Hepatol* 36: 342-348.
15. Cadenas E. (1989) Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu Rev Biochem* 58: 79-110.
16. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39: 44-84.
17. Tsutsumi M, Lasker JM, Shimizu M, Rosman AS, Lieber CS. (1989) The intralobular distribution of ethanol-inducible P450IIE1 in rat and human liver. *Hepatology* 10: 437-446.
18. Salmela KS, Kessova IG, Tsyrllov IB, Lieber CS. (1998) Respective roles of human cytochrome P-450E1, 1A2, and 3A4 in the hepatic microsomal ethanol oxidizing system. *Alcohol Clin Exp Res* 22: 2125-2132.
19. Donato MT, Gomez-Lechon MJ, Jover R, Nakamura T, Castell JV. (1998) Human hepatocyte growth factor down-regulates the expression of cytochrome P450 isozymes in human hepatocytes in primary culture. *J Pharmacol Exp Ther* 284: 760-767.
20. De Minicis S, Seki E, Paik YH, Osterreicher CH, Kodama Y, Kluwe J, Torozzi L, Miyai K, Benedetti A, Schwabe RF, Brenner DA. (2010) Role and cellular source of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase in hepatic fibrosis. *Hepatology* 52: 1420-1430.
21. de Mochel NS, Seronello S, Wang SH, Ito C, Zheng JX, Liang TJ, Lambeth JD, Choi J. (2010) Hepatocyte NAD(P)H oxidases as an endogenous source of reactive oxygen species during hepatitis C virus infection. *Hepatology* 52: 47-59.
22. Kono H, Rusyn I, Yin M, Gabele E, Yamashina S, Dikalova A, Kadiiska MB, Connor HD, Mason RP, Segal BH, Bradford BU, Holland SM, Thurman RG. (2000) NADPH oxidase-derived free radicals are key oxidants in alcohol-induced liver disease. *J Clin Invest* 106: 867-872.
23. Kaposi-Novak P, Lee JS, Gomez-Quiroz L, Coulouarn C, Factor VM, Thorgeirsson SS. (2006) Met-regulated expression signature defines a subset of human hepatocellular carcinomas with poor prognosis and aggressive phenotype. *J Clin Invest* 116: 1582-1595.
24. Valdes-Arzate A, Luna A, Bucio L, Licona C, Clemens DL, Souza V, Hernandez E, Kershenobich D, Gutierrez-Ruiz MC, Gomez-Quiroz LE. (2009) Hepatocyte growth factor protects hepatocytes against oxidative injury induced by ethanol metabolism. *Free Radic Biol Med* 47: 424-430.
25. Fan S, Gao M, Meng Q, Laterra JJ, Symons MH, Coniglio S, Pestell RG, Goldberg ID, Rosen EM. (2005) Role of NF-kappaB signaling in hepatocyte growth factor/scatter factor-mediated cell protection. *Oncogene* 24: 1749-1766.
26. Klaassen CD, Reisman SA. (2010) Nrf2 the rescue: effects of the antioxidative/electrophilic response on the liver. *Toxicol Appl Pharmacol* 244: 57-65.
27. Chen Q, Cederbaum AI. (1998) Cytotoxicity and apoptosis produced by cytochrome P450 2E1 in Hep G2 cells. *Mol Pharmacol* 53: 638-648.
28. Donohue TM, Osna NA, Clemens DL. (2006) Recombinant Hep G2 cells that express alcohol dehydrogenase and cytochrome P450 2E1 as a model of ethanol-elicited cytotoxicity. *Int J Biochem Cell Biol* 38: 92-101.
29. Arends B, Slump E, Spee B, Rothuizen J, Penning LC. (2008) Hepatocyte growth factor improves viability after H₂O₂-induced toxicity in bile duct epithelial cells. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 147: 324-330.
30. Fernandez-Checa JC, Colell A, Garcia-Ruiz C. (2002) S-Adenosyl-L-methionine and mitochondrial reduced glutathione depletion in alcoholic liver disease. *Alcohol* 27: 179-183.
31. Fernandez-Checa JC, Hirano T, Tsukamoto H, Kaplowitz N. (1993) Mitochondrial glutathione depletion in alcoholic liver disease. *Alcohol* 10: 469-475.
32. Fernandez-Checa JC, Yi JR, Garcia Ruiz C, Ookhtens M, Kaplowitz N. (1996) Plasma membrane and mitochondrial transport of hepatic reduced glutathione. *Semin Liver Dis* 16: 147-158.
33. Hirano T, Kaplowitz N, Tsukamoto H, Kamimura S, Fernandez-Checa JC. (1992) Hepatic mitochondrial glutathione depletion and progression of experimental alcoholic liver disease in rats. *Hepatology* 16: 1423-1427.

34. Tsuboi S. (1999) Elevation of glutathione level in rat hepatocytes by hepatocyte growth factor via induction of gamma-glutamylcysteine synthetase. *J Biochem* 126: 815-820.
35. Takami T, Kaposi-Novak P, Uchida K, Gomez-Quiroz LE, Conner EA, Factor VM, Thorgeirsson SS. (2007) Loss of hepatocyte growth factor/c-Met signaling pathway accelerates early stages of N-nitrosodiethylamine induced hepatocarcinogenesis. *Cancer Res* 67: 9844-9851.
36. Serviddio G, Bellanti F, Sastre J, Vendemiale G, Altomare E. (2010) Targeting mitochondria: a new promising approach for the treatment of liver diseases. *Curr Med Chem* 17: 2325-2337.
37. Kitta K, Day RM, Ikeda T, Suzuki YJ. (2001) Hepatocyte growth factor protects cardiac myocytes against oxidative stress-induced apoptosis. *Free Radic Biol Med* 31: 902-910.
38. Santangelo C, Matarrese P, Masella R, Di Carlo MC, Di Lillo A, Scazzocchio B, Vecchi E, Malorni W, Perfetti R, Anastasi E. (2007) Hepatocyte growth factor protects rat RINm5F cell line against free fatty acid-induced apoptosis by counteracting oxidative stress. *J Mol Endocrinol* 38: 147-158.