



论文

双氧水刺激引发巨噬细胞坏死向凋亡的死亡模式转换

林旭竹, 孙廷哲, 蔡梅红, 沈萍萍*

南京大学医药生物技术国家重点实验室, 南京 210093

* 联系人, Email: ppschen@nju.edu.cn

收稿日期: 2009-11-29; 接受日期: 2009-12-06

国家自然科学基金(批准号: 30870588)、国家自然科学基金创新团队(批准号: 30821006)和教育部新世纪优秀人才支持计划(批准号: NCET-06-0445)资助项目

摘要 通常而言, 细胞死亡模式可以大致划分为凋亡和坏死两种. 由于两者给生物体带来的后果大相径庭, 因此对于细胞死亡模式转换的研究有着重要的临床意义. 本文通过流式细胞技术和免疫荧光技术首次在双氧水作用下的巨噬细胞 RAW 264.7 中发现了坏死向凋亡的转换. 同时研究了其中与细胞死亡密切相关的转录因子 NF- κ B 和 MAPK 家族的时序性变化, 它们呈现出不同的活化方式. 为了探寻这种转换的分子机制, 根据已有的实验数据及近期文献建立了 2 个数学模型. 根据模型得到的计算机模拟结果, 预测 NF- κ B 和 MAPK 之间的相互作用以及它们对细胞死亡影响的差异性在巨噬细胞坏死向凋亡转换中起关键作用, 对进一步研究其分子机制有重要指导意义.

关键词巨噬细胞
双氧水
凋亡
坏死
细胞死亡模式转换

最近 10 年, 关于细胞死亡模式转换机制的研究受到了越来越多的关注^[1]. 细胞死亡通常分为凋亡和坏死: 坏死常带来大范围的炎症, 甚至会导致器官衰竭和死亡^[2]. 而凋亡的细胞可快速被周围的吞噬细胞消除, 引发的炎症反应远小于坏死. 因此, 凋亡和坏死的差异常常在临床治疗中受到重点关注. 虽然以往在不同的细胞类型中都发现有死亡模式转换的存在^[3,4], 但在免疫细胞中尚未见相关报道.

巨噬细胞作为先天免疫系统中重要的功能性细胞, 能够有效地识别和清除机体内自身有害成分以及入侵的病原体. 在正常生理状态下巨噬细胞能够存活较长时间, 而一些病理刺激会导致其快速死亡, 这些刺激包括: 细胞因子的作用、细菌侵入以及内质网

压力等^[5-7]. 此外, 过量的 ROS(reactive oxygen species) 也是一个重要的刺激因子^[8,9]. 因此, 研究 ROS 引发的巨噬细胞死亡模式有重要临床意义.

ROS 除了引起巨噬细胞死亡, 还能激活胞内一系列的信号转导通路, 包括 MAPK(mitogen-activated protein kinase) 通路和 NF- κ B(nuclear factor- κ B) 通路^[10,11]. MAPK 包括 4 个激酶亚家族, 常被作为研究对象的有 3 种, 分别是 ERK(extracellular regulated protein kinase), JNK(Jun N-terminal kinase) 以及 p38 家族. 而 NF- κ B 的亚基通常与其抑制蛋白 I κ B 形成异源二聚体存在于胞质中, I κ B 的磷酸化可导致自身降解, 从而释放活化的 NF- κ B 亚基进入核内发挥转录活性. 目前已有许多文献报道这两条信号通路与细胞死亡密切

相关[12,13], 但仍未见其参与调控细胞死亡模式转换的相关报道.

本文研究了巨噬细胞 RAW 264.7 中双氧水引发的死亡模式. 通过流式分析以及免疫荧光分析, 本研究首次在巨噬细胞中发现了从坏死向凋亡的死亡模式转换. 同时, 检测了 MAPK 家族及 NF- κ B 的活性随着时间变化的情况. 不仅如此, 还通过建立数学模型进行计算机模拟分析, 提出了基于这种死亡模式转换的一种可能的调控机制, 对于受感染的机体免于炎症扩大化有一定的参考价值.

1 材料与方法

1.1 试剂与抗体

双氧水母液浓度为 10 mol/L, 使用前稀释至需要浓度(100, 200, 300, 400 和 500 μ mol/L). DMEM 培养基购于 Hyclone 公司. 胎牛血清购于 PAA 公司. 所有抗体均购于 Cell Signaling Technology 公司. 所有化学药品均购于 Sigma Chemicals 公司. 所有试剂盒均购于碧云天生物技术研究.

1.2 细胞培养

RAW 264.7 巨噬细胞系购于中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心. RAW 264.7 细胞在 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂的条件下, 用含双抗和 10%胎牛血清的DMEM 培养基传代培养, 实验用细胞除血清浓度降至 1%之外培养条件不变.

1.3 Annexin V-PI 染色分析

操作均按照试剂盒说明书进行. 细胞培养加药处理完毕后加入预冷的PBS洗涤 2 次, 再重悬于 200 μ L 结合缓冲液中, 密度为 1×10^6 细胞/mL. 加入 5 μ L Annexin V 以及 10 μ L PI, 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 15 min. 之后细胞用缓冲液稀释, 在流式细胞仪用 488 nm 激发光检测.

1.4 免疫荧光分析

细胞在加药处理后用 Hoechst 33342(终浓度 5 μ mol/L)和 PI(终浓度 0.5 μ mol/L)37 $^{\circ}$ C 避光染色 10 min. 在 PBS 洗涤 2 次后用 2%多聚甲醛固定细胞, 之后用荧光显微镜观察.

1.5 蛋白印迹法分析(Western blotting)

操作按照试剂盒说明书进行. 细胞加药处理后用适当的裂解液裂解并提取蛋白, 蛋白经过变性、上样电泳、转膜、孵育抗体以及显色后, 膜片在暗室里进行曝光显影.

1.6 凝胶迁移分析(EMSA)

操作均按照试剂盒说明书进行. 使用核蛋白提取试剂盒提取出加药细胞的核蛋白后, 蛋白经过与标记探针结合、电泳、转膜、紫外交联、Streptavidin-HRP 孵育及显色后, 膜片在暗室里进行曝光显影.

1.7 数学模型

采用两个简单的模型来研究 MAPK(M)和 NF- κ B(N)之间的联系以及它们在凋亡坏死转变中的作用. 在方程中只考虑激活和失活速率(表 1). 用一个希尔函数 $G_i(N)$ 项来表示非线性抑制作用(NF- κ B 依赖的 MAPK 活化抑制). 模型中同时考虑了延迟项. DDEs (延迟微分方程)通过 MATLAB 中 dde23 算子来求解(MathWork, R2007b, Release 14).

表 1 数学模型参数列表^{a)}

参数	参数描述	取值
a_m	MAPK 激活速率	0.01
σ_m	MAPK 失活速率	0.3
a_n	NF- κ B 激活速率	0.1
σ_n	NF- κ B 失活速率	0.015
E_0	归一化的抑制阈值	0.05
n	希尔系数	5
τ_m	MAPK 延迟时间	80
k_1	P38 介导的凋亡激活系数	0.001
k_2	P38 介导的凋亡向坏死转化速率	0.05
k_3	JNK 介导的凋亡抑制速率	0.005
k_4	ERK 介导的凋亡抑制系数	0.05
k_5	JNK 介导的凋亡激活系数	0.1
k_6	JNK 介导的坏死激活系数	0.06
k_7	ERK 介导的坏死抑制系数	0.001
I_A	NF- κ B 介导的凋亡抑制	0.001
I_N	NF- κ B 介导的坏死抑制	0.001

a) 时间单位: min, 除时间外其他参数无量纲

$$\frac{dM_1}{dt} = a_m \cdot G_1(N) - \sigma_m \cdot M_1 \quad (1)$$

$$\frac{dN}{dt} = a_n \cdot M(t - \tau_m) - \sigma_n \cdot N \quad (2)$$

$$\frac{dM_2}{dt} = a_m \cdot G_2(N) - \sigma_m \cdot M_2 \quad (3)$$

$$\frac{dM_3}{dt} = a_m \cdot G_3(N) - \sigma_m \cdot M_3 \quad (4)$$

$$\begin{aligned} \frac{dA_{\text{frac}}}{dt} = & k_1 \cdot M_1 \cdot (1 - A_{\text{frac}} - N_{\text{frac}}) + k_2 \cdot M_1 \cdot N_{\text{frac}} \\ & - k_3 \cdot M_3 \cdot A_{\text{frac}} - k_4 \cdot M_2 + k_5 \cdot M_3 \cdot \\ & (1 - A_{\text{frac}} - N_{\text{frac}}) - I_A \cdot N \cdot A_{\text{frac}}, \end{aligned} \quad (5)$$

$$\begin{aligned} \frac{dN_{\text{frac}}}{dt} = & k_6 \cdot M_3 \cdot (1 - A_{\text{frac}} - N_{\text{frac}}) + k_3 \cdot M_3 \cdot A_{\text{frac}} \\ & - k_2 \cdot M_1 \cdot N_{\text{frac}} - k_7 \cdot M_2 - I_N \cdot N \cdot N_{\text{frac}}, \end{aligned} \quad (6)$$

这里, $G_i(N) = \frac{1}{1 + [\frac{N(t - \tau_i)}{E_0}]^n}$, ($i=1, 2$ 和 3), A_{frac} 和

N_{frac} 分别代表凋亡和坏死的比例, 而 $(1 - A_{\text{frac}} - N_{\text{frac}})$ 则表示正常细胞的比例. M_1 , M_2 和 M_3 分别代表磷酸化形式的 p38, ERK 和 JNK.

1.8 统计分析

数据表示为 $\bar{x} \pm \text{SE}$, 统计学分析使用 t 检验, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 认为是存在显著性差异.

2 结果

2.1 双氧水刺激后巨噬细胞出现坏死向凋亡的死亡模式转换

为验证双氧水引发细胞死亡, 分别用 100, 200, 300, 400 和 500 $\mu\text{mol/L}$ 的双氧水处理 RAW 264.7 4 h 后, 用 Annexin V/PI 双染检测细胞死亡. 如图 1(A) 所示, 双氧水引发了巨噬细胞死亡, 并呈现出剂量依赖性. 在各浓度双氧水作用下, 凋亡细胞和坏死细胞所占的比例分别是 3.0%, 3.6%, 7.8%, 11.6%, 19.1% 和 20.8% 以及 4.9%, 5.2%, 7.9%, 7.1%, 16.5% 和 23.7%. 为了研究其中可能的死亡模式转换, 又测定了不同刺激时间 (0.5, 1, 2, 4 和 6 h) 后凋亡和坏死细胞的比例. 在 500 $\mu\text{mol/L}$ 的双氧水作用下, 凋亡细胞和坏死细胞比例随时间的变化表现出明显差异. 如图 1(B) 所示, 凋亡细胞在 6 h 内均逐步快速上升, 而坏死细胞比例在前 4 h 快速上升后, 在接下来的 2 h 显著下降

了 8%. 凋亡细胞和坏死细胞的比值在 4 h 后约从 1.0 上升到了 2.0, 提示坏死向凋亡的死亡模式转换可能存在.

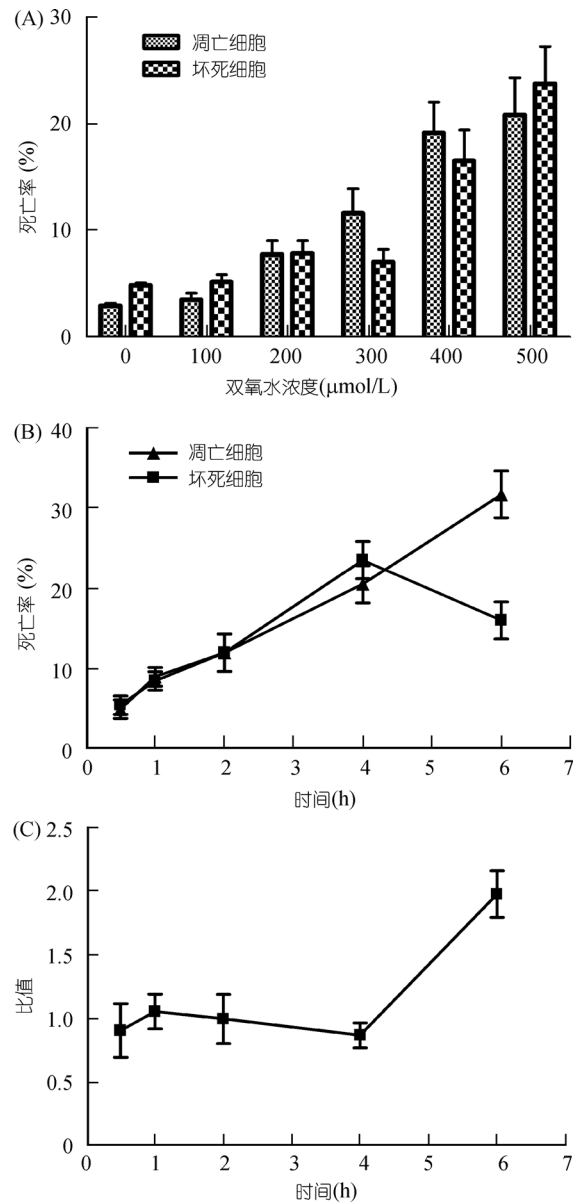


图 1 双氧水刺激后巨噬细胞出现坏死向凋亡的死亡模式转换

(A) 分别用 100, 200, 300, 400 和 500 $\mu\text{mol/L}$ 双氧水处理 RAW 264.7 4 h 后, 用 Annexin V/PI 染色法通过流式分析检测细胞死亡; (B) 用 500 $\mu\text{mol/L}$ 双氧水分别刺激细胞 0.5, 1, 2, 4 和 6 h 后, 用 (A) 中方法检测细胞死亡; (C) 凋亡细胞与坏死细胞比值在 6 h 内的变化. 实验结果经过 2 次重复

接着利用免疫荧光技术探寻细胞从坏死转向凋亡的“中间状态”,以证实细胞死亡模式转换的存在.在用 500 $\mu\text{mol/L}$ 双氧水分别刺激细胞 3、5 和 7 h 后,用 Hoechst 33342 和 PI 对细胞进行染色.如图 2(B)所示,在双氧水刺激 3 h 后,可见大量含有亮蓝色皱缩细胞核的凋亡细胞(黄色箭头)和含有亮红色细胞核的坏死细胞(白色箭头).与图 2(B)相比,受双氧水刺激 5 h 的巨噬细胞图像中,典型的坏死细胞已较少见(图 2(C)和(E)),而出现许多核内既染上大量 PI,又开始显现亮蓝色的细胞,且其核亦开始出现明显的皱缩现象(黄色箭头).因此,将这些细胞定义为从坏死向凋亡转变的“中间细胞”.在受双氧水刺激 7 h 的细胞图像中(图 2(D)),已经几乎观察不到坏死细胞的存在,而见到许多核内同时染上 Hoechst 33342 及 PI 的凋亡细胞(红色箭头),猜测它们源自图 2(C)中的“中间细胞”.综上所述,本实验证实了在双氧水刺激的巨噬细胞 RAW 264.7 中存在从坏死向凋亡的细胞死亡模式转换.

2.2 双氧水刺激引发巨噬细胞 RAW 264.7 中 NF- κ B 活性的变化

近年来,有许多 NF- κ B 密切调控细胞死亡的报

道^[12],因此在本实验的细胞模型中运用 EMSA 和 Western blotting 分别检测了 NF- κ B 的活性以及 I κ B 的磷酸化水平.如图 3(A)所示,在刺激 2 h 后 NF- κ B 即被激活,其转录活性到 4 h 升至峰值,之后逐渐降至正常水平.与此对应的是, I κ B 在 1 h 开始出现磷酸化,在 2 h 左右磷酸化到达峰值,之后逐渐降至低水平.

2.3 双氧水刺激引发巨噬细胞 RAW 264.7 中 MAPK 磷酸化水平的变化

已有文献证实, MAPK 家族中的 JNK、ERK 及 p38 均参与了细胞死亡的调控^[13].本实验室检测了在 500 $\mu\text{mol/L}$ 双氧水刺激不同时间后, RAW 264.7 中 MAPK 的磷酸化水平.如图 4 所示, JNK 发生瞬时磷酸化,在 2 h 内即达到峰值,之后回落至基准水平.与之类似, ERK 的磷酸化在 0.5 h 即能被检测到,在 2 h 达到最高水平,之后快速下降.而 p38 的磷酸化呈现双峰现象,在 0.5 和 4 h 均有较高值,在 2 h 左右水平较低.以上这些时序变化的结果表明, MAPK 很可能在死亡模式转换中起重要调控作用.

2.4 利用数学模型预测 NF- κ B 和 MAPK 之间的关系

根据已有研究,建立了一个由 NF- κ B 和 MAPK

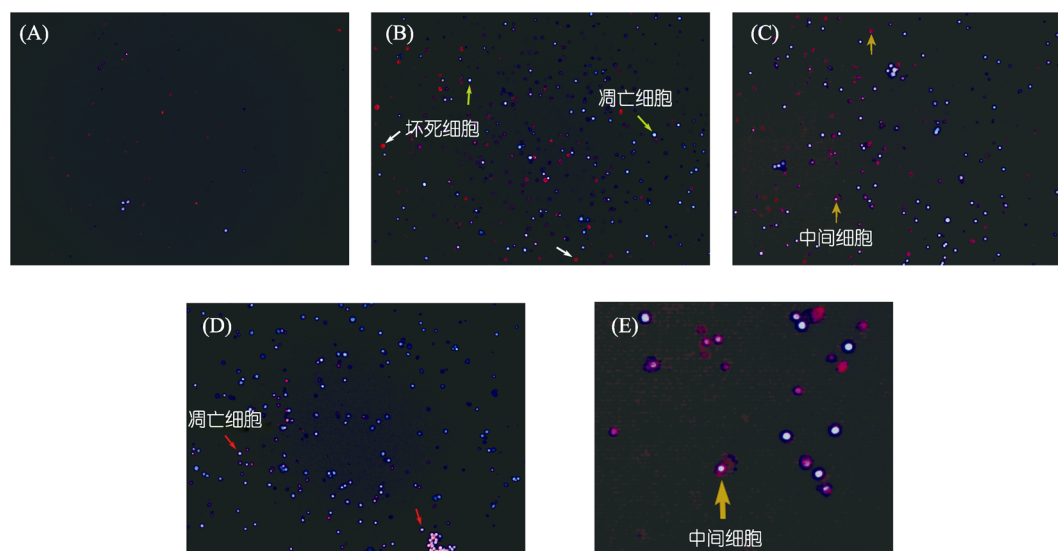


图 2 用免疫荧光分析观察坏死向凋亡转变的“中间细胞”

用 DNA 特异性染料 Hoechst 33342(蓝)和 PI(红)对细胞染色,使用荧光显微镜应用恰当的激发波长对细胞的死亡情况进行观测.(A) 对照组中细胞死亡状况;(B) 经 500 $\mu\text{mol/L}$ 双氧水刺激 3 h 后细胞的死亡状况.凋亡细胞和坏死细胞分别用黄色和白色箭头指示;(C) 经 500 $\mu\text{mol/L}$ 双氧水刺激 5 h 后细胞死亡状况,从坏死转向凋亡的“中间细胞”用黄色箭头指示;(D) 500 $\mu\text{mol/L}$ 双氧水刺激 7 h 后细胞死亡状况.红色箭头指示源自(C)中“中间细胞”的凋亡细胞;(E) 图中放大了(C)中“中间细胞”的放大图.实验结果重复 2 次

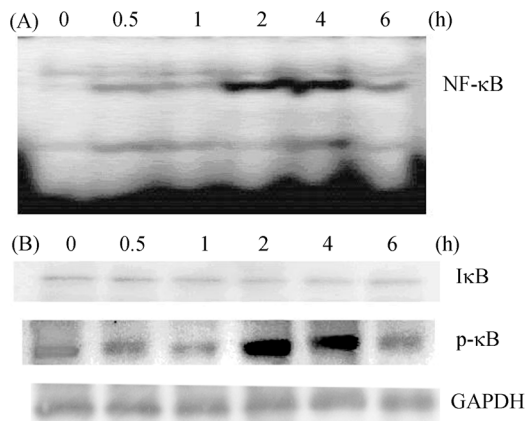


图3 双氧水刺激诱导了巨噬细胞 RAW 264.7 中 NF-κB 的活化

细胞用 500 μmol/L 双氧水分别刺激 0.5, 1, 2, 4 和 6 h, 之后裂解并收集蛋白. (A) 用 EMSA 检测 6 h 中 NF-κB 的活性变化; (B) 用 Western blotting 检测 6 h 中 IκB 的磷酸化水平变化. 实验结果重复 2 次

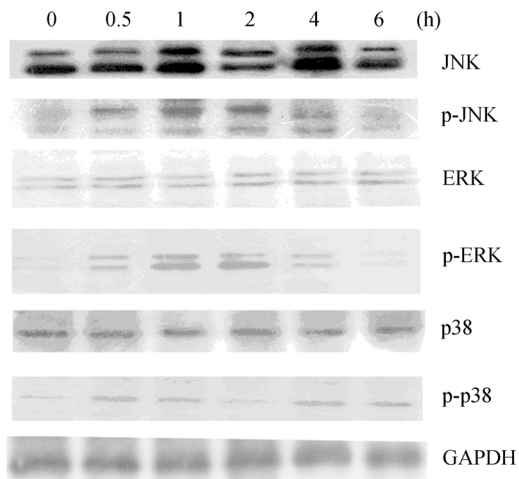


图4 双氧水刺激诱导了巨噬细胞 RAW 264.7 中 MAPK 的磷酸化

细胞用 500 μmol/L 双氧水分别刺激 0.5, 1, 2, 4 和 6 h, 之后裂解并收集蛋白. 用 Western blotting 检测 JNK, ERK 和 p38 的磷酸化. 实验结果重复 2 次

构成的调控模型. 由于 NF-κB 和 MAPK 的相互调控错综复杂, 且其中具体机制的研究也尚未完善, 采用了一种简化的双组分负反馈模型来模拟它们之间的关联.

MAPK 被双氧水激活后, 对 NF-κB 的正向调控有

一个延时 τ_m . 又引入参数 τ_i ($i=1, 2$ 或 3) 作为 NF-κB 反向抑制 MAPK 的延时, 及活化的 NF-κB 在 τ_i 时间后使上游的 MAPK 失活. 较小的 τ_i 表示这种反向调控较为迅速, 而较大的 τ_i 表示慢速的抑制作用. 所得模拟结果如图 5(B) 所示, 与图 3 和 4 类似, 证明了本研究所建模型的可靠性.

2.5 利用数学模型模拟坏死向凋亡的转换

依据以上模拟结果及已有报道和预测, 进一步提出了一个模型来阐释双氧水刺激下巨噬细胞中坏死向凋亡死亡模式转换的机制. 由图 6(A) 可见, p38 可以促进凋亡以及可能促使坏死向凋亡的转变; 而 JNK 不但能促进细胞死亡, 而且可以增大坏死细胞的比例; NF-κB 和 ERK 在本实验模型中能够促进细胞生存. 模拟结果如图 6(B) 所示, 其与图 2(A) 所得实验结果一致, 表明了此模型的准确性.

3 讨论

本文首先检测了双氧水引发的巨噬细胞 RAW 264.7 的死亡. 如图 1(A) 所示, 发现凋亡和坏死同时发生. 由于这两种死亡模式给生物体带来的后果大相径庭, 因此对这两类死亡细胞比例进行了时序检测, 以探寻可能存在的死亡模式转换. 结果表明, 在双氧水刺激 4 h 后凋亡细胞相对坏死细胞的比值大幅上升(图 2(B)); 同时, 通过免疫荧光分析找到了从坏死转变为凋亡的“中间细胞”(图 2(C)和(E)). 由此, 本研究首次在受双氧水刺激的巨噬细胞中证实了坏死向凋亡的死亡模式转换.

有关各种细胞中死亡模式转换的机制已有报道, 得出的结论包括胞内 ATP 水平的降低 [14], 各种 caspase 的失活 [15] 以及蛋白激酶 C 的调控作用 [16] 等. 但是, 从未有过提及 NF-κB 和 MAPK 参与调控的相关报道. 本实验结果表明, 在发生死亡模式转换的时间前后存在 NF-κB, JNK 和 ERK 的瞬时活化以及 p38 的二次活化(图 3 和 4). 因此, 猜测 NF-κB 和 MAPK 在死亡模式转换的调控中发挥重要作用.

近年来, 已有很多围绕 NF-κB 和 MAPK 之间复杂关联的报道出现. Maritz 和 Martin [11] 发现, 受双氧水刺激的巨噬细胞中 ERK1/2 能够激活 NF-κB. Eirini 等

人^[17]提出, ERK和p38 均可在氧化压力下促使NF- κ B 活化. 另外, Vladimir等人^[18]报道, JNK可通过活化 β -TrCP来激活NF- κ B. NF- κ B一旦被活化, 即可启动许多MAPK抑制因子的转录及表达. 例如, NF- κ B可以促使多种JNK抑制蛋白的上调, 包括GADD45 β , XIAP及c-FLIPL^[19,20].

从图 5(B)中可得, 对于p38, $\tau_1=10$ min, 被MAPK 激活的NF- κ B对其产生快速抑制效应, 使p38 的磷酸化水平在 2 h迅速降低. 在p38 失活后, NF- κ B的活化亦受影响, 因而对p38 的抑制作用也逐渐减弱, 因此p38 在 260 min左右出现二次磷酸化. 对于ERK, $\tau_2=120$ min, NF- κ B对ERK的抑制效应较为缓慢, 因此ERK在 120 min左右才出现失活现象, 并且只在 6 h的

时间内单次活化. 对于JNK, $\tau_3=150$ min, 因此其磷酸化水平直到 290 min才出现下调.

根据以上模拟结果, 继而探寻由NF- κ B和MAPK 调控的坏死向凋亡死亡模式转换的机制. 在巨噬细胞中, 有报道指出, NF- κ B和ERK起到促生存作用, JNK的活化被认为能够促使坏死的产生, 而p38 会促进细胞凋亡^[21~24]. 因此, 提出了第 2 个数学模型来阐释NF- κ B和MAPK具体调控死亡模式转换的机制. 如图 6(A)所示, p38 和JNK促使凋亡的产生, 而JNK亦能促进细胞坏死. 同时, p38 被假定能够促使坏死细胞向凋亡细胞转变, 而JNK引发与此相反转变的进行. NF- κ B和ERK能够促使细胞存活. 本实验得到的模拟结果与图 2 (A)十分类似, 凋亡细胞比

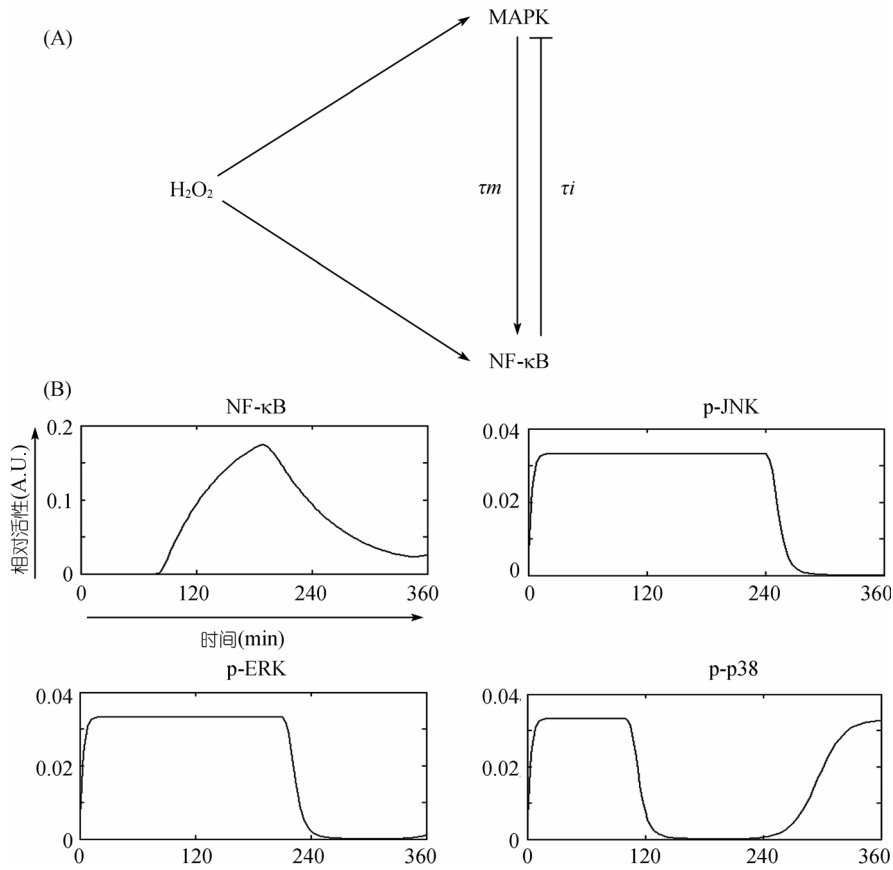


图 5 用数学模型预测 NF- κ B 和 MAPK 之间的关联

(A) NF- κ B和MAPK的调控模型. NF- κ B和MAPK均可被双氧水刺激激活, MAPK正向调控NF- κ B而其对上流的MAPK有一个反馈抑制作用. τ_m 和 τ_i ($i=1, 2, 3$)作为MAPK激活NF- κ B和NF- κ B抑制不同MAPK的延时; (B) 调控模型的模拟结果图. 模拟结果与图 3 和 4 的实验结果类似

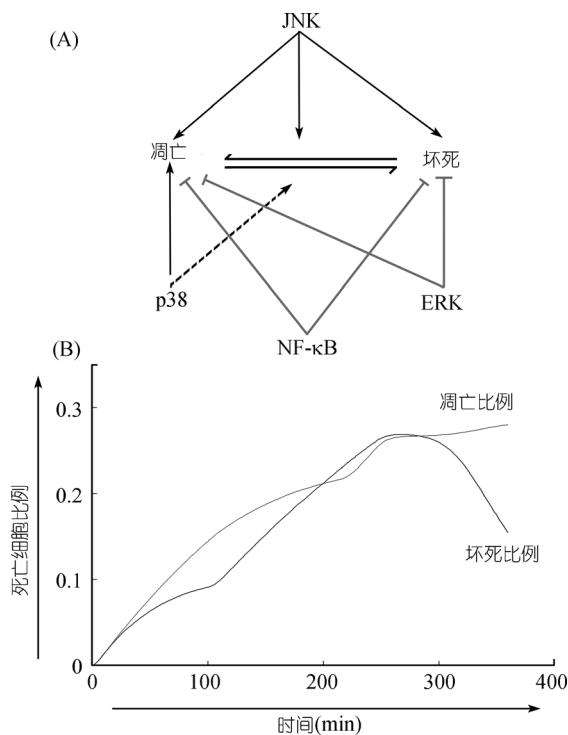


图 6 用数学模型模拟坏死向凋亡的转换

(A) 一个包含各种 MAPK 和 NF- κ B 的模型被提出来阐释细胞死亡模式转换的机制。凋亡被 p38 和 JNK 激活, 坏死被 JNK 单独促进。p38 被假定可促进坏死细胞向凋亡细胞的转变, 而 JNK 有着相反的转变作用。NF- κ B 和 ERK 被设定有促生存作用; (B) 调控模型的模拟结果图。模拟结果与图 1(B) 实验结果一致

例在 6 h 内稳步上升(图 6(B)), 而坏死细胞比例在经过前 4 h 的上升期后逐步下降。在双氧水刺激早期(大约前 4 h), MAPK 受到的反馈抑制效应较小, 凋亡和坏死细胞的比例均持续增长。4 h 后, JNK 和 ERK 的活化消失, 仅剩二次活化的 p38 继续发挥促使坏死向凋亡的转化作用, 使坏死细胞比例下降。模拟结果表明, 不同 MAPK 带来的时序性调控可能是导致凋亡和坏死时序变化差异性的重要因素。

综上所述, 快速的反馈抑制能在 6 h 内形成 MAPK (p38) 的 2 次活化, 而慢速的抑制效应只能带来一次瞬时活化(ERK 和 JNK)。模拟结果显示, 尽管 NF- κ B 对 MAPK 均有抑制作用, 但是不同的抑制延时带来了不同的 MAPK 活化的动力学形式。进一步的模拟结果表明, 这两个模型均有较高的可信度。

对死亡模式转换机制的透彻研究, 在急性炎症临床治疗中有重大意义。本研究中, 受双氧水刺激的巨噬细胞死亡模式被证实发生了转换。众所周知, 先天性免疫细胞在病原体入侵时可以产生大量的 ROS 以杀灭病菌, 但是过量的 ROS 同样会伤及免疫细胞本身, 甚至引发其死亡。幸运的是, 巨噬细胞在氧化压力下能从坏死转向凋亡, 这一死亡模式转换机制可以控制坏死细胞的数量, 保护机体免于炎症反应的扩大化。本实验的数学模拟结果揭示了该转换受 NF- κ B 和 MAPK 调控的可能机制, 为今后的研究工作指明了方向。

参考文献

- 1 Marcin K, Edyta N, Makoto M, et al. The switch mechanism of the cell death mode from apoptosis to necrosis in menadione-treated human osteosarcoma cell line 143B cells. *Microsc Res Techniq*, 2004, 64: 255—268[DOI]
- 2 Susan L F, Brad T C. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect Immun*, 2005, 73: 1907—1916[DOI]
- 3 Naoyuki S, Koichi I. Nicotine switches the form of H₂O₂-induced cell death from apoptosis to necrosis in U937 cells. *Immunol Lett*, 2000, 72: 163—166[DOI]
- 4 Diane M S, Joyce A B. Cyclic AMP differentiation of the oligodendroglial cell line N20.1 switches staurosporine-induced cell death from necrosis to apoptosis. *J Neurosci Res*, 2001, 66: 691—697[DOI]
- 5 Hongtao L, Yingyu M, Lisa J P, et al. TNF- α -induced apoptosis of macrophages following inhibition of NF- κ B: a central role for disruption of mitochondria. *J Immunol*, 2004, 172: 1907—1915
- 6 Chen Y, Smith M R, Thirumalai K, et al. A bacterial invasion induces macrophage apoptosis by binding directly to ICE. *Embo J*, 1996, 15: 3853—3860
- 7 Tracie D S, Yankun L, Pin M Y, et al. Cholesterol-induced macrophage apoptosis requires ER stress pathways and engagement of the type A scavenger receptor. *J Cell Biol*, 2005, 171: 61—73[DOI]
- 8 Han M S, Zhuo Z, Qi F Z, et al. Reactive oxygen species and caspase activation mediate silica-induced apoptosis in alveolar macrophages. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2001, 280: 10

- 9 Sawyer R T, Dobis D R, Goldstein M, et al. Beryllium-stimulated reactive oxygen species and macrophage apoptosis. *Free Radic Biol Med*, 2005, 38: 928—937[DOI]
- 10 Takuya N, Ken I, Hisashi F, et al. Requirement of reactive oxygen species-dependent activation of ASK1-p38 MAPK pathway for extracellular ATP-induced apoptosis in macrophage. *J Biol Chem*, 2008, 283: 7657—7665[DOI]
- 11 Maritza J, Martin O. Hydrogen peroxide induces murine macrophage chemokine gene transcription via extracellular signal-regulated kinase- and cyclic adenosine 5'-monophosphate (cAMP)-dependent pathways: involvement of NF- κ B, Activator protein 1, and cAMP response element binding protein. *J Immunol*, 2002, 169: 7026—7038
- 12 Tarek B, Eric C, Peter M. Mitogen-activated protein(MAP) kinase/MAP kinase phosphatase regulation: roles in cell growth, death, and cancer. *Pharmacol Rev*, 2008, 60: 261—310[DOI]
- 13 Dutta J, Fan Y, Gupta N, et al. Current insights into the regulation of programmed cell death by NF- κ B. *Oncogene*, 2006, 25: 6800—6816[DOI]
- 14 Marcel L, Barbara S, Anna F C, et al. Intracellular adenosine triphosphate(ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J Exp Med*, 1997, 185: 1481—1486[DOI]
- 15 Marek L, Malgorzata M, Davide F, et al. Activation and caspase-mediated inhibition of PARP: a molecular switch between fibroblast necrosis and apoptosis in death receptor signaling. *Mol Biol Cell*, 2002, 13: 978—988[DOI]
- 16 Cho H K, Song I H, Su Y L, et al. Protein kinase C-ERK1/2 signal pathway switches glucose depletion-induced necrosis to apoptosis by regulating superoxide dismutases and suppressing reactive oxygen species production in A549 lung cancer cells. *J Cell Physiol*, 2007, 211: 371—385[DOI]
- 17 Eirini K, Catherine G, Isidoros B, et al. ERK1/2 and p38-MAPK signalling pathways, through MSK1, are involved in NF- κ B transactivation during oxidative stress in skeletal myoblasts. *Cell Signal*, 2006, 18: 2238—2251[DOI]
- 18 Vladimir S S, Pete S, Esther L, et al. Induction of β -transducin repeat-containing protein by JNK signaling and its role in the activation of NF- κ B. *J Biol Chem*, 2001, 276: 27152—27158[DOI]
- 19 Yadong Z, Fei C. Reactive oxygen species(ROS), troublemakers between nuclear factor- κ B(NF- κ B) and c-Jun NH2-terminal kinase(JNK). *Cancer Res*, 2004, 64: 1902—1905[DOI]
- 20 Akihito N, Sachiko K, Mutsuhiro T, et al. An antiapoptotic protein, c-FLIPL, directly binds to MKK7 and inhibits the JNK pathway. *EMBO J*, 2006, 25: 5549—5559[DOI]
- 21 Jin M P, Florian R G, Athena W, et al. Signaling pathways and genes that inhibit pathogen-induced macrophage apoptosis-CREB and NF- κ B as key regulators. *Immunity*, 2005, 23: 319—329[DOI]
- 22 Manikandan S, Chandrima S. Up-regulation of Bcl-2 through ERK phosphorylation is associated with human macrophage survival in an estrogen microenvironment. *J Immunol*, 2007, 179: 2330—2338
- 23 Juan J V, Patricia C, Richard A F, et al. JNK potentiates TNF-stimulated necrosis by increasing the production of cytotoxic reactive oxygen species. *Genes Dev*, 2004, 18: 2905—2915[DOI]
- 24 Sayaka I, Tomoko N, Shuhei T, et al. Cationic liposomes induce apoptosis through p38 MAP kinase—caspase-8-Bid pathway in macrophage-like RAW264.7 cells. *J Leukoc Biol*, 2006, 79: 184—191