

巨噬细胞中诱导型一氧化氮合酶来源的 NO 对共培养 HL60 细胞凋亡的影响

张 申¹, 尹利华¹, 卫涛涛²

Effects of Inducible Nitric Oxide Synthase Derived Nitric Oxide on Apoptosis of HL60 Cells Co-cultured with RAW264.7 Macrophages

ZHANG Shen¹, YIN Li-hua¹, WEI Tao-tao²

1. Department of Laboratory Medicine, Huaihua Medical College, Huaihua 418000, China; 2. Center for Structural and Molecular Biology, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences

Abstract: **Objective** To study effects of inducible nitric oxide synthase (iNOS)-derived nitric oxide (NO) on apoptosis of HL60 cells co-cultured with RAW 264.7 macrophages. **Methods** Upon stimulation with lipopolysaccharide (LPS) and interferon- γ (IFN- γ), inducible nitric oxide synthase gene was expressed in RAW 264.7 macrophages, which caused the consequent generation of nitric oxide. Effects of nitric oxide on HL60 cells viability, expression of bcl-2 and bax protein, activity of Caspase-3 and cell apoptosis were evaluated with MTT assay, Western blot analysis, fluorescence analysis, flow cytometry (FCM), transmission electron microscopy (TEM) and DNA agarose gel electrophoresis. **Results** The results showed that iNOS-derived nitric oxide caused oxidative damage of HL60 cells co-cultured with RAW 264.7 macrophages, and decreased cell viability, and evidently reduced expression of bcl-2 and increased expression of bax, and induced activity of caspase-3 and DNA fragmentation. **Conclusion** The results suggested important effect of iNOS-derived nitric oxide on apoptosis of cells in RAW 264.7 macrophages.

Key words: Inducible nitric oxide synthase; Nitric oxide; Apoptosis; Macrophage

收稿日期:2006-02-21;修回日期:2006-04-14
基金项目:怀化市科技计划资助项目(0502)
作者单位:1. 418000 湖南怀化医学高等专科学校检验系;2. 中国科学院生物物理研究所结构与分子生物学研究中心
作者简介:张申(1955-),男,学士,教授,主要从事自由基生物学研究

摘要:目的 研究巨噬细胞中诱导型一氧化氮合酶(iNOS)来源的一氧化氮(NO)对共培养 HL60 细胞凋亡的影响。方法 以脂多糖(LPS)和 γ -干扰素(INF- γ)诱导 RAW 264.7 巨噬细胞 iNOS 基因的表达产生过量 NO 为实验模型,通过

PEG10 mRNA 的抑制作用最强,表明靶 mRNA 的二级结构对 siRNA 的功能有很大影响。

本研究中我们构建针对 PEG10 基因的 siRNA 真核表达载体,并通过酶切鉴定和测序鉴定,说明我们构建的针对 PEG10 的真核表达载体是正确有效的,可以用于后续 PEG10 基因功能的研究,以及沉默 PEG10 后抑制肝癌细胞生长,诱导肝癌细胞凋亡,从而为肝癌的基因治疗提供理论依据和实验工具。

参考文献:

[1] Ryuichi Ono, Shin Kobayashi, Hirota Waga, et al. A retrotransposon-derived gene, PEG10, is a novel imprinted gene located on human chromosome 7q21 [J]. Genomics, 2001, 73(2): 232-237.

[2] Noble A, Towne C, Chopin L, et al. Insulin-like growth factor bound to vitronectin enhances MCF-7 breast cancer cell migration[J]. Endocrinology, 2003, 144(6): 2417-2424.

[3] Moorehead RA, Sanchez OH, Baldwin RM, et al. Transgenic overexpression of IGF β induces spontaneous lung tumors: a model for human lung adenocarcinoma [J]. Oncogene, 2003,

22(6): 853-857.

[4] Vella V, Sciacca L, Pandini G, et al. The IGF system in thyroid cancer: new concepts[J]. Mol Pathol, 2001, 54(3): 121-124.

[5] Tsou AP, Chuang YC, Su JY, et al. Overexpression of a novel imprinted gene, PEG10, in human hepatocellular carcinoma and in regenerating mouse livers[J]. J Biomed Sci, 2003, 10(6 Pt 1): 625-635.

[6] Hiroshi Okabe, Seiji Satoh, Yoichi Furukawa, et al. Involvement of PEG10 in human hepatocellular carcinogenesis through interaction with SIAH1 [J]. Cancer Research, 2003, 63(12): 3043-3048.

[7] 常莹,陶璐薇,陈孝平等. 肝癌组织中遗传印记基因 PEG10 表达的特异性及其意义[J]. 世界华人消化杂志, 2005, 13(12): 1408-1411.

[8] Naito Y, Yamada T, Ui-Tei K, et al. siDirect: highly effective, target-specific siRNA design software for mammalian RNA interference[J]. Nucleic Acids Res, 2004, 32: W124-129.

[9] Reynolds A, Leake D, Boese Q, et al. Rational siRNA design for RNA interference[J]. Nat Biotechnol, 2004, 22(3): 326-330.

[编辑:刘红武]



噻唑蓝(MTT)试验、蛋白质印迹分析、荧光分析、流式细胞术(FCM)、透射电镜和 DNA 琼脂糖凝胶电泳等分析技术,观察 NO 对共培养的 HL60 细胞存活率、bcl-2 和 bax 蛋白表达、Caspase-3 活性和细胞凋亡的影响。结果 RAW264.7 巨噬细胞中 iNOS 来源的 NO 对共培养 HL60 细胞能造成氧化损伤,降低细胞的存活率;bcl-2 表达明显下降,而 bax 表达增加;激活 Caspase-3 和促进 DNA 的降解。结论 巨噬细胞中 iNOS 来源的 NO 在诱导细胞凋亡中发挥重要的作用。

关键词:诱导型一氧化氮合酶;一氧化氮;细胞凋亡;巨噬细胞
中图分类号:Q786 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2007)01-0088-05

0 引言

巨噬细胞是一种参与机体非特异性免疫防御的重要免疫细胞。1988 年 Hibbs 首先证明哺乳动物的巨噬细胞能产生 NO^[1],现已证实,NO 是一种具有重要生理、病理功能的内源性生物信息分子,在生物体内,NO 由三种不同的一氧化氮合酶(Nitric oxide synthase, NOS)催化 L-精氨酸而生成,其中可诱导型一氧化氮合酶(Inducible nitric oxide synthase, iNOS)是在诱导因素作用下,由巨噬细胞、中性粒细胞、胶质细胞等产生,其活性不受 Ca²⁺ 浓度的影响,生成 NO 量大,主要作用是参与炎症反应和免疫细胞对病原体的防御。但过量的 NO 可与超氧阴离子(O₂⁻)迅速反应,生成具有强氧化性的过氧化亚硝基阴离子(ONOO⁻)^[2],ONOO⁻ 引起的氧化损伤是 NO 具有细胞毒性的重要原因之一^[3,4]。本研究以脂多糖(LPS)和 γ -干扰素(IFN γ)诱导 RAW 264.7 细胞 iNOS 基因的表达产生过量 NO 为模型,通过 MTT 试验、蛋白质印迹分析、荧光分析、透射电镜、DNA 琼脂糖凝胶电泳等分析技术,观察 NO 对共培养的 HL60 细胞存活率、bcl-2 和 bax 蛋白表达、Caspase-3 活性和细胞凋亡的影响。为与 NO 相关疾病的防治提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

RAW 264.7 细胞株及 HL60 细胞株(中科院上海细胞生物学研究所),细胞培养瓶(Costar 公司),DMEM 培养基及 RPMF1640 培养基(Gibco BRL 公司),胎牛血清(Hyclone 公司),LPS、IFN γ 、RNase A、N-硝基-精氨酸(N-nitro-L-arginine, L-NNA)、PVDF 膜(Sigma 公司),UNIQ-10 柱式总 RNA 提取纯化试剂盒(上海生工公司);Access Quick RT-PCR 试剂盒(Promega 公司),蛋白酶 K(Merck 公司),兔抗 bcl-2、bax 多抗(Santa Cruz 公

司),增强化学发光检测试剂盒(Pierce 公司),其余为国产分析纯试剂。

1.2 细胞的培养及处理

将复苏的 RAW 264.7 细胞和 HL60 细胞分别接种于含 10% 胎牛血清、100U/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素的 RPMF1640 培养基中,置 5% CO₂、37 培养箱,待细胞生长至对数生长期时用于实验。实验前换成无血清的 RPMF1640 培养基,将 RAW 264.7 细胞分为对照组(不经过 LPS 和 IFN γ 诱导)、LPS 组(用终浓度为 1 μ g/ml LPS 和 100U/ml IFN γ 诱导)、LPS + L-NNA 组(用终浓度为 1 μ g/ml LPS 和 100U/ml IFN γ 诱导,同时加入终浓度为 400 μ mol/L L-NNA)。

1.3 RAW 264.7 细胞产生的 NO 的检测

采用 ESR 自旋捕集技术检测 RAW 264.7 细胞产生的 NO。RAW 264.7 细胞培养于 25cm² 细胞培养瓶中,经过 LPS 和 IFN γ 诱导 24h 后,加入 1mmol/L NO 捕集剂(DETC)₂-Fe²⁺,继续培养 3h 后收集细胞培养的上清液,经乙酸乙酯萃取,用波谱仪检测其电子顺磁共振(ESR)波谱。

1.4 RT-PCR 分析

RAW 264.7 细胞经 LPS 和 IFN γ 处理一定时间后,用 Trizol 试剂提取 RNA,用 Promega Access QuickTM RT-PCR 试剂盒进行 RT-PCR 扩增以分析 iNOS 基因的转录水平,用 GAPDH 作为内参物。PCR 引物设计参照文献[5],由上海生工公司合成。iNOS 引物序列:5'-GTG TTC CAC CAG GAG ATG TTG-3' / 5'-CTC CTG CCC ACT GAG TTC GTC-3', 扩增片段长度 576 bp; GAPDH 引物序列:5'-GAA GGG TGG GGC CAA AAG-3' / 5'-GGA TGC AGG GAT GAT GTT CT-3', 扩增片段长度 295 bp。扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测,并用 UVP 凝胶成像系统进行扫描分析。

1.5 共培养 HL60 细胞存活率的检测

将分别诱导 24h、12h、6h、0h 的 RAW 264.7 细胞用无血清的 RPMF1640 培养基洗涤 1 次,然后各加入 1 \times 10⁶ 个/ml HL60 细胞悬液 5ml,共培养 24h,取上述各组中的 HL60 细胞悬液 100 μ l 分别加入 96 孔板的孔内(1 \times 10⁵ 个/孔),以未经过任何处理的 HL60 细胞(1 \times 10⁵ 个/孔)为对照,加入 MTT (5mg/ml) 10 μ l,37 培养 4h,加入 100 μ l 的裂解缓冲液(25% DMF、10% SDS、2.5% 冰醋酸),37、5% CO₂ 孵箱中孵育 10min,紫色结晶完全溶解后,用酶标仪检测各组细胞的 570nm 吸光度(A)值。

1.6 共培养 HL60 细胞 bcl-2、bax 蛋白的检测

RAW 264.7 细胞经 LPS 和 IFN γ 处理一定时

间后,各加入 1×10^6 个/ml HL60 细胞悬液 5ml,共培养 24h,收集各组共培养 HL60 细胞,4 1 000r/min 离心 5min,加入细胞裂解液 100 μ l,置 - 20 过夜。取冻融细胞于 4 15 000r/min 离心 20min,取上清液用 Bradford 方法测定蛋白浓度。取总蛋白 40 μ g、以 10 % SDS-PAGE 凝胶电泳分离,电转移蛋白至 PVDF 膜,用 4 %BSA 封闭 1 ~ 2h,加入一抗在室温孵育 1h,漂洗去除未结合的一抗,加入二抗在室温孵育 1h,漂洗去除未结合的二抗,在暗室中进行化学发光法显影。

1.7 共培养 HL60 细胞 Caspase-3 活力测定

以荧光基团标记的寡肽 Ac-DEVD-MCA 作为 Caspase-3 底物,采用荧光法测定细胞凋亡过程中 Caspase-3 活力的变化^[6]。离心收集 1.2×10^7 个细胞,加入 0.4ml 匀浆缓冲液,冰浴匀浆破碎细胞,4 12 000r/min 离心 15min 后收集上清液,用 Bradford 法测定蛋白浓度。酶活力测定体系总体积为 150 μ l,含有 100 μ g 蛋白提取物,荧光底物 DEVD-MCA 的浓度为 25 μ mol/L。37 反应 30min 后用荧光酶标仪测定寡肽底物降解释放出的荧光物质,激发波长 355nm,发射波长 460nm。Caspase-3 酶活力单位定义为在 37 、底物浓度饱和的条件下每分钟产生 1 pmol MCA。

1.8 共培养 HL60 细胞凋亡分析

RAW 264.7 细胞经脂 LPS 和 IFN- 处理一定时间后,各加入 1×10^6 个/ml HL60 细胞悬液 5ml,共培养 24h,收集各组共培养 HL60 细胞,细胞用 80 %乙醇悬浮,置 4 固定 24h。取固定后的细胞用生理盐水洗涤 2 次后,加入 RNase A 至终浓度 50 μ g/ml,37 恒温水浴 1h,加入 PI 染液至终浓度为 25 μ g/ml,摇匀后经尼龙网过滤,在 FACS420 型流式细胞仪上记数 10 000 个细胞,测定凋亡细胞所占比例。同时通过透射电镜 (TEM) 观察细胞超微结构并照相。

1.9 共培养 HL60 细胞 DNA 片段分析

RAW 264.7 细胞经脂 LPS 和 IFN- 处理一定时间后,各加入 1×10^6 个/ml HL60 细胞悬液 5ml,共培养 24h,分别收集各组 HL60 细胞,加入细胞裂解液,置 37 水浴 24h,4 13 000r/min 离心 15min,弃上清液,滤干,加适量 TE 溶解,加 RNase A (终浓度为 100 μ g/ml),37 水浴 2h,加乙醇沉淀 DNA,离心,弃上清液,滤干,加 50 μ l TE 溶解,1.8 %琼脂糖凝胶电泳,在 UVP 凝胶成像系统进行摄影。

1.10 统计学处理

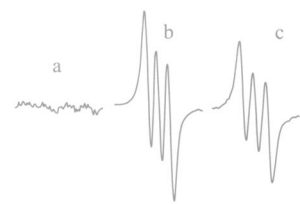
实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.0 软件用

t 检验对数据进行统计分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 L-NNA 可抑制 RAW264.7 细胞产生 NO

应用 ESR 自旋捕集技术测定了 L-NNA (一种 NOS 的竞争性抑制剂)对 LPS 和 IFN- 诱导的 NO 生成的影响。RAW 264.7 细胞经 LPS 和 IFN- 处理 24h 后,产生了大量 NO,用 ESR 波谱仪可以检测到典型的 $[ON-Fe^{2+} (DETC)_2]$ ESR 三重峰信号。L-NNA 能抑制 RAW 264.7 细胞产生 NO,经过 400 μ mol/L L-NNA 处理的细胞其 $(DETC)_2-Fe^{2+}-NO$ 自旋加合物的信号强度减少为 LPS 组细胞的 $(71.4 \pm 6.8) \%$,见图 1。

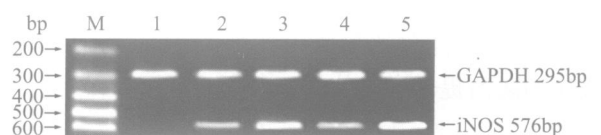


a:对照组;b:LPS 组(诱导 24h);c:LPS+L-NNA 组(诱导 24h)

图 1 L-NNA 对 LPS 和 IFN- 诱导 RAW 264.7 细胞 NO 生成的影响

2.2 L-NNA 对 RAW 264.7 细胞 iNOS 基因表达的影响

采用 RT-PCR 分析从 mRNA 水平研究了 L-NNA 对 RAW 264.7 细胞 iNOS 基因表达的影响。RAW 264.7 细胞经 LPS 和 IFN- 的处理后,iNOS mRNA 的表达量大大增加。在加入 LPS 和 IFN- 处理同时加入 L-NNA 不影响 iNOS 基因的转录,见图 2。



M:Marker;1:对照组;2:LPS 12h 组;3:LPS 24h 组;4:LPS+L-NNA 12h 组;5:LPS+L-NNA 24h 组

图 2 L-NNA 对 LPS 和 IFN- 诱导 RAW 264.7 细胞 iNOS 基因表达的影响

2.3 内源性 NO 对 HL60 细胞的毒性作用

MTT 比色原理是利用活细胞线粒体脱氢酶能将 MTT 盐还原成蓝紫色的甲臞颗粒,以颗粒溶解后呈现的颜色深浅反映细胞活性。HL60 细胞与诱导后的 RAW 264.7 细胞共培养 12h,由于诱导后的 RAW 264.7 细胞产生大量的 NO,导致共培养的

HL60 细胞存活率降低,使 MTT 盐还原成蓝紫色的甲臍减少。以未经过任何处理的 HL60 细胞存活率为 100%,其他组细胞存活率见,见表 1。

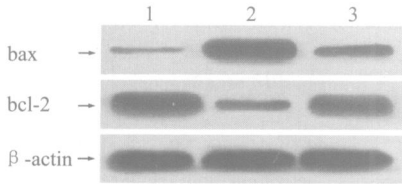
表 1 内源性 NO 对共培养 HL60 细胞存活率的影响(%)

Groups	Inductive mite			
	0h	6h	12h	24h
LPS+IFN γ	87.8 \pm 7.4	68.2 \pm 5.7 *	46.7 \pm 5.1 *	37.5 \pm 4.3 *
LPS+IFN γ +L-NNA	94.1 \pm 6.5	80.4 \pm 7.2 **	65.2 \pm 5.8 **	57.5 \pm 4.6 **

注:n=6, $\bar{x} \pm s$ 、与对照组比较,* P<0.05;与 LPS 组比较,** P<0.05

2.4 内源性 NO 对 HL60 细胞 bcl-2、bax 蛋白表达的影响

用蛋白质印迹分析检测 HL60 细胞中 bcl-2、bax 蛋白表达水平,可观察到与 WAR 264.7 细胞共培养的 HL60 细胞 bcl-2 蛋白水平下降,bax 蛋白水平增高,bcl-2/ bax 比例相应下降,见图 3。



1:对照组;2:LPS 组(24h);3:LPS + L-NNA 组(24h)

图 3 内源性 NO 对 HL60 细胞 bcl-2、bax 蛋白表达的影响

2.5 内源性 NO 激活 HL60 细胞 Caspase-3 信号通路

Caspase-3 的活化是细胞凋亡的典型特征之一,通过荧光法测定了 HL60 细胞与诱导 24h、12h、6h、3h、0h 的 RAW 264.7 细胞共培养后细胞胞浆中 Caspase-3 的活力,HL60 细胞与 RAW 264.7 细胞共培养 12h 后胞浆中 Caspase-3 的活力大幅度上升,L-NNA 能抑制 iNOS 活力,减少 NO 的生成,从而显著降低胞浆中 Caspase-3 的活化,见图 4。

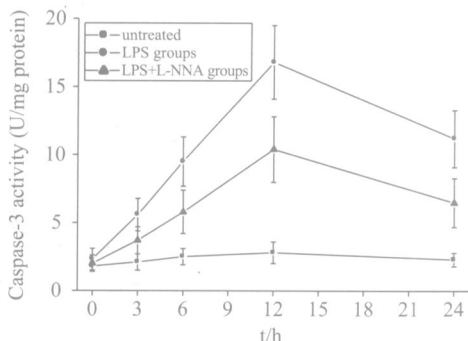
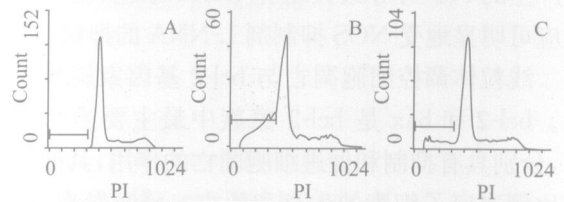


图 4 内源性 NO 对 HL60 细胞 Caspase-3 活力的影响

2.6 内源性 NO 诱导 HL60 细胞凋亡

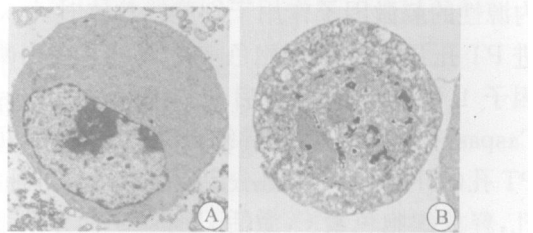
细胞发生凋亡以后,活化的核酸内切酶将染色体 DNA 切割成许多小的片段,这些小片段由于分子量低,可从细胞中扩散出去,使细胞内的 DNA 含

量减少。经 PI 染色后采用流式细胞术检测细胞内 DNA 含量,可见在正常细胞 G₁ 峰前出现一个 DNA 含量减少的“G₁ 亚峰”见图 5,该峰的出现被认为是细胞发生凋亡的重要标志之一。经计算机分析,凋亡细胞所占比例对照组为 3.1%,LPS 组诱导 24h 为 25.3%,LPS + L - NNA 组诱导 24h 为 14.8%。透射电镜观察显示,与 RAW 264.7 细胞共培养的 HL60 细胞发生了染色质浓缩、沿核周边分布、形成凋亡小体,呈现典型的凋亡细胞形态,见图 6B。



A:对照组;B:LPS 组(24h);C:LPS + L - NNA 组(24h)

图 5 内源性 NO 对 HL60 细胞凋亡的影响

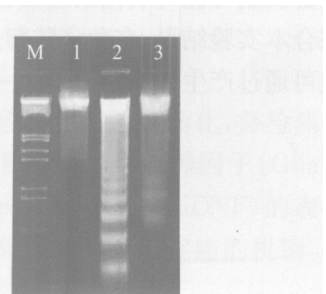


A:对照组 HL60 细胞透射电镜形态(x6000);B:凋亡 HL60 细胞透射电镜形态(x6000)

图 6 HL60 细胞透射电镜形态

2.7 内源性 NO 使 HL60 细胞 DNA 降解

细胞凋亡的一个典型特征就是核 DNA 降解。活化的核酸内切酶可将 DNA 降解为大约以 200 个 bp 为基数的片段。对 DNA 进行琼脂糖凝胶电泳后,可显示出梯状电泳条带,见图 7。



M: DNA Marker;1:对照组;2:LPS 组(24h);3:LPS + L - NNA 组(24h)

图 7 断裂 DNA 琼脂糖凝胶电泳图

3 讨论

过量的 NO 可导致细胞损伤,NO 通过氧化应激机制与超氧阴离子(O₂⁻)形成过氧化亚硝基阴离子(ONOO⁻),消耗细胞内的抗氧化物质,如还原

型谷胱甘肽,使 DNA 发生碱基突变和氧化损伤,使蛋白质中的巯基氧化、脂质过氧化,从而破坏线粒体的结构完整性,导致线粒体 PT 孔道的开放。体外实验证实,NO 可诱导细胞凋亡,而且与 NO 有量效关系^[7]。本研究以 LPS 和 INF- γ 诱导 RAW 264.7 细胞过度活化为实验模型,观察活化的 RAW 264.7 细胞产生的 NO 对共培养 HL60 细胞的损伤作用,通过 MTT 实验、流式细胞术、透射电镜及 DNA 琼脂糖凝胶电泳等方法证实,活化的 RAW 264.7 细胞所产生的 NO 可导致共培养 HL60 细胞凋亡,这种效应可明显地受 NOS 抑制剂 L-NNA 的抑制。

线粒体调控细胞凋亡与 bcl-2 基因家族密切相关。bcl-2 和 bax 是 bcl-2 家族中最主要的两个成员,分别具有抑制和促进细胞凋亡的作用,其彼此间的比例决定了细胞的生存和死亡。研究发现,bcl-2 定位于线粒体外膜称为 PT 孔的线粒体通透性转运孔道,而 bax 则散布在基质中,呈可溶性。外源性或内源性的刺激因子作用于细胞线粒体时,bax 可促进 PT 孔开放,释放细胞色素 C,与凋亡蛋白酶激活因子 1 (Apaf-1) 结合,启动 Apaf-1 Caspase-9 Caspase-3 级联反应,诱导细胞凋亡,而 bcl-2 可抑制 PT 孔的开放^[8]。NO 在一定程度上可通过开放 PT 孔,释放细胞色素 C,激活 Caspase-3 而导致细胞凋亡^[9,10]。本研究结果表明,在活化的 RAW 264.7 细胞产生的 NO 诱导 HL60 细胞凋亡的过程中,反映线粒体膜通透性增加,线粒体膜上的 bcl-2 和 bax 蛋白的表达发生变化。bcl-2 表达明显下降,而 bax 表达增加,bcl-2 与 bax 比值间的变化与细胞凋亡呈同步关系,提示 NO 诱导 HL60 细胞凋亡的途径之一是作用于线粒体,通过 bcl-2 和 bax 基因蛋白的表达,调控细胞凋亡。NO 引起线粒体结构和功能改变的上游机制可能与氧化剂应激有关。

综合本实验结果,在免疫防御过程中,活化的巨噬细胞可通过产生超氧阴离子和一氧化氮来杀伤病

原体和肿瘤细胞。了解巨噬细胞产生和释放超氧阴离子、一氧化氮的分子机制,有利于认识巨噬细胞杀伤入侵病原体和肿瘤细胞的免疫机制,有利于寻找一些方法防止这一过程中超氧阴离子、一氧化氮及其衍生物对正常细胞和组织的损伤,对于预防和治理过量 NO 引起的疾病具有一定的指导意义。

参考文献:

- [1] Hibbs JB Jr, Taintor RR, Vavrin Z, et al. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1988, 157(1): 87-94.
- [2] Juliet PA, Hayashi T, Iguchi A, et al. Concomitant production of nitric oxide and superoxide in human macrophages[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 310(2): 367-370.
- [3] Brune B, Zhou J, Von Knethen A. Nitric oxide, oxidative stress, and apoptosis[J]. *Kidney Int Suppl*, 2003, (84): S22-24.
- [4] Brown GC, Borutaite V. Nitric oxide, mitochondria, and cell death[J]. *IUBMB Life*, 2001, 52 (3-5): 189-195.
- [5] El-Mahmoudy A, Matsuyama H, Borgan MA, et al. Thymoquinone suppresses expression of inducible nitric oxide synthase in rat macrophages[J]. *Int Immunopharmacol*, 2002, 2(11): 1603-1611.
- [6] Dare E, Tofighi R, Vettori MV, et al. Styrene 7,8-oxide induces caspase activation and regular DNA fragmentation in neuronal cells[J]. *Brain Res*, 2002, 933(1): 12-22.
- [7] Chan SH, Wu KL, Wang LL, et al. Nitric oxide- and superoxide-dependent mitochondrial signaling in endotoxin-induced apoptosis in the rostral ventrolateral medulla of rats[J]. *Free Radic Biol Med*, 2005, 39(5): 603-618.
- [8] Sharpe JC, Arnoult D, Youle RJ. Control of mitochondrial permeability by Bcl-2 family members [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1644(2-3): 107-113.
- [9] Vieira H, Kroemer G. Mitochondria as targets of apoptosis regulation by nitric oxide[J]. *IUBMB Life*, 2003, 55(10-11): 613-616.
- [10] Yung HW, Bal-Price AK, Brown GC, et al. Nitric oxide-induced cell death of cerebrocortical murine astrocytes is mediated through p53- and Bax-dependent pathways [J]. *J Neurochem*, 2004, 89(4): 812-821.

[编辑:周永红]