

自由基相关细胞信号传导的研究进展

廖日滔¹ 郭静科² 李冰洁¹ 饶平凡^{2*}

(¹福州大学生物工程研究所, 福州 350002; ²中国科学院上海生命科学研究院—浙江工商大学
食品营养科学联合研究中心, 杭州 310035)

摘要 自由基是带有一个孤对电子的分子, 具有很强的反应性。自由基可以直接与细胞组成成分发生反应, 造成细胞损伤, 如通过氧化线粒体DNA和线粒体心磷脂对线粒体造成氧化损伤, 从而诱导细胞凋亡。此外, 自由基还能影响包括Ca²⁺、蛋白质磷酸化、转录因子、*Bcl-2*基因等多种细胞信号传导。因此, 自由基产生的生物学效应范围广泛, 覆盖了从生理功能调节到影响诸多疾病的病程变化。该文从自由基的产生、清除及其对多种细胞信号传导的影响等方面对相关自由基的研究进展作简要的阐述, 以期获得对自由基相关细胞信号传导研究进展较为全面的了解。

关键词 自由基; 信号传导; Ca²⁺; 蛋白质磷酸化; *Bcl-2*

The Review on the Cell Signal Transduction Pathway Related to Free Radicals

Liao Ritao¹, Guo Jingke², Li Bingjie¹, Rao Pingfan^{2*}

(¹Institute of Biotechnology, Fuzhou University, Fuzhou 350002, China; ²Shanghai Institutes for Biological Sciences of Chinese Academy of Sciences-Zhejiang Gongshang University Joint Centre for Food and Nutrition Research, Hangzhou 310035, China)

Abstract Free radicals are molecules with an unpaired electron, and they are strong reactive. Free radicals are able to directly react with cellular components and result in cell damage. For example, free radicals could cause oxidation damage in mitochondrion through cardiolipin peroxidation and mtDNA peroxidation, and subsequently induce apoptosis. Moreover, free radicals enable to influence the signal transduction pathways including Ca²⁺, protein phosphorylation, transcription factor and *Bcl-2* gene, which play most important roles in apoptosis. Therefore, free radicals produce many biological effects, ranging widely from the regulation of physiological function to the increasing destructive changes related to pathology. Here we summary the generation and elimination of free radicals and their influence on signal transduction pathways, and attempt to achieve more comprehensive understanding of the signal transduction by free radicals.

Key words free radical; signal transduction; Ca²⁺; protein phosphorylation; *Bcl-2*

自1900年Moses Gomberg发现自由基至今, 在各类期刊上发表的与自由基相关的研究文献已有数十万篇。自由基, 特别是与生命活性密切相关的氧自由基研究已经成为当今生物学和医学研究领域的热点。氧自由基广义的定义为含氧的活跃性的化学物

质, 其中包括了O₂⁻、NO·和OH·等严格意义上的自由基, 其特征是外分子轨道含有一个或多个不成对电子。另外, 有些分子如H₂O₂、O₃、ONOO-等活性氧分子, 它们不具有未成对电子, 但是在特定条件下能通过化学反应形成具有不成对电子的自由基分子^[1-2]。由于

收稿日期: 2014-05-19 接受日期: 2014-07-02

国家重点基础研究发展计划(批准号: 2010CB530605)、国家自然科学基金(批准号: 31271859)和福建省自然科学基金(批准号: 2012J01133)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0571-28008907, E-mail: pingfan.rao@gmail.com

Received: May 19, 2014 Accepted: July 2, 2014

This work was supported by the National Basic Research Program of China (Grant No.2010CB530605), the National Natural Science Foundation of China (Grant No.30972411) and the Provincial Natural Science Foundation of Fujian (Grant No.2012J01133)

*Corresponding author. Tel: +86-571-28008907, E-mail: pingfan.rao@gmail.com

网络出版时间: 2014-10-20 15:07 URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.11.0175.html>

氧自由基和活性氧可以互相转变, 且对生物体的作用难以绝对分开, 故有学者把这部分活性氧的作用与氧自由基视为类似。自由基具有很强的化学反应活性并能引起细胞内脂质、氨基酸、核酸和碳水化合物不可逆的过氧化反应, 破坏其分子结构并引起细胞相应生理功能的紊乱, 进而导致细胞衰老^[3]、死亡以及癌变^[4,5]。另外, 自由基通过可逆的氧化修饰与大分子发生相互作用, 参与细胞增殖、分化以及细胞内的囊泡运输^[2,6], 可以影响细胞的发育和细胞吞噬病原体与异质的过程^[6], 造成DNA损伤^[7]。

除了直接对成分和结构的改变带来对细胞生理功能的影响外, 自由基通过对各类细胞信号传导途径的影响而在诸多疾病中扮演了重要角色。近年来, 存在大量的研究文献着眼于调查自由基对细胞信号传递因子或其他功能因子的影响及作用机制, 以期获得通过控制细胞自由基水平来调整细胞信号传递的方法, 进而为各种疾病的治疗提供新的思路^[8,9]。

近年研究结果显示, 自由基能影响的细胞信号传导途径众多, 并且发现自由基在不同细胞、疾病中所影响的信号传导途径和环节各异。这些研究结果逐步显示出了自由基在细胞信号传导上的调控作用, 但却缺乏一个全面明确的调控机制的探讨和描述。本文旨在探讨自由基的产生及清除机制的同时, 总结自由基相关细胞信号传导途径, 以期获得一个较为全面的梗概。

1 简述

1.1 自由基的生成

哺乳动物体内的氧自由基主要是由线粒体内膜电子传递链的电子泄漏而产生。在细胞核与线粒

体中, 编码线粒体内膜电子传递链的基因突变可阻断电子传递, 导致电子泄漏^[10](图1)。O₂捕获泄漏的电子, 生成O₂⁻。在Mn-SOD、Cu/Zn-SOD或细胞外SOD的作用下, O₂⁻通常转化为H₂O₂, 并传递到细胞核中攻击DNA^[11]。同时, H₂O₂发生Fenton反应, 即在Fe²⁺或Cu²⁺的催化下生成OH⁻^[12]。在巨噬细胞和癌细胞中, O₂⁻还能由膜上的由NOX1、NOX2、NOX3、NOX4、细胞色素C氧化酶、环加氧酶和与内质网组织相关的黄嘌呤氧化酶(XO)所组成的NAD(P)H氧化产物催化生成。O₂⁻、H₂O₂、OH⁻等均称为活性氧(reactive oxygen species, ROS)。此外, 生物体内具有多种多样的组织特异的一氧化氮合酶(NO synthetase, NOS)亚型分布: 线粒体NOS、神经元NOS、内皮NOS、可诱导型NOS^[12]。NOS催化精氨酸生成NO[·], NO[·]与O₂⁻迅速生成ONOO⁻。NO[·]和ONOO⁻被称为活性氮(reactive nitrogen species, RNS), 其被氧化后同样形成ROS。

1.2 自由基的清除

哺乳动物拥有强大的抗氧化酶系统, 包括超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GPX)和过氧化氢酶(catalase, CAT), 能维持细胞内较低的自由基浓度。O₂⁻一旦形成, 迅速被SOD催化生成H₂O₂, 进而被过氧化氢酶转化成H₂O和O₂以消除其对细胞的毒害作用。此外, GPX也催化H₂O₂生成H₂O和O₂达到相同效果^[2]。巨噬细胞中的髓过氧化物酶催化H₂O₂生成具有强杀菌作用的次氯酸^[6], 从而代谢细胞中的H₂O₂。

1.3 自由基与细胞信号传导

细胞信号转导通常是指细胞通过细胞表面受体接受外界信号, 通过系统级联传递机制, 将细胞外

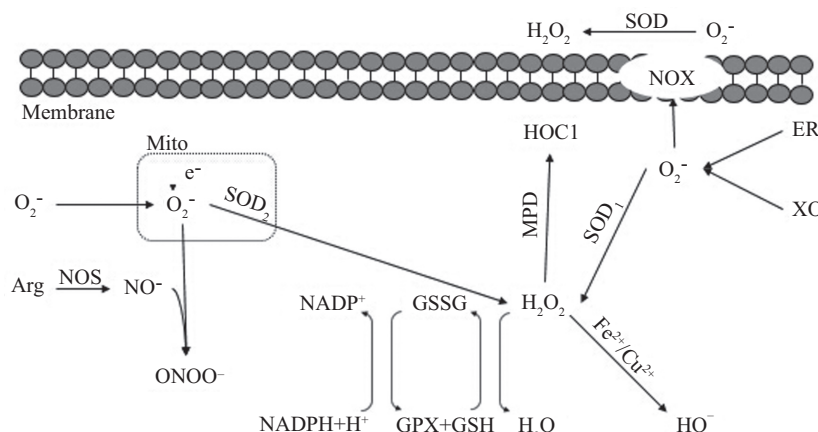


图1 自由基在生物体内的生成与清除途径

Fig.1 The generation and eliminating pathway of free radicals *in vivo*

信号转导为胞内信号, 最终引起细胞生理反应或诱导特定基因的表达, 引起细胞的应答。随着自由基领域研究的不断深入, 学者们开始注意到自由基与各种细胞信号传导之间存在内在关联, 体内代谢和外源性的自由基通过一些细胞传导途径影响着细胞状态、疾病的发生与发展, 进而对人类的健康产生威胁。因此, 自由基相关的细胞信号传导机制备受关注。

在细胞程序性死亡中, 产生信号的自由基的来源有两个。其一, 由线粒体电子链传递过程产生; 其二, 由各种代谢产生。在细胞凋亡早期, 贮存于线粒体或内质网的 Ca^{2+} 释放引起胞内 Ca^{2+} 水平升高, 并协同其他因素作用引发线粒体产生大量ROS并直接或间接改变线粒体通透性, 从而使自由基以及凋亡相关物质, 如细胞色素C等, 进入细胞质, 并与代谢产生的自由基一并通过各种途径, 如 Ca^{2+} 、蛋白质磷酸化、转录因子和*Bcl-2*基因等, 诱导细胞凋亡。本文以自由基在线粒体电子传递链中产生至最终通过多途径导致细胞凋亡的过程为线索, 阐述其各阶段相关细胞信号传导的研究进展。

2 自由基对线粒体的影响

线粒体既作为自由基产生的主要场所, 又对自由基作用极其敏感。自由基除了下文所述的调节线粒体钙稳态和修饰蛋白质之外, 还通过氧化线粒体DNA和线粒体心磷脂对线粒体造成氧化损伤, 从而诱导细胞凋亡。

2.1 自由基诱导mtDNA氧化损伤

人体内自由基的90%来源于线粒体, 而mtDNA直接暴露于氧化磷酸化过程中产生的高反应性氧中, 缺乏组蛋白及其他结合蛋白的保护, 缺乏完善的损伤修复系统, 致使氧化损伤成为mtDNA突变的主要原因, 所以mtDNA比核DNA突变率高5~17倍^[13]。一旦mtDNA受到不可修复的氧化应激, 将导致线粒体呼吸链的中断、膜电位的崩溃和ATP合成障碍, 导致细胞凋亡。

活性氧生成和mtDNA损伤的前反馈级联假说阐述了自由基对mtDNA的损伤途径, 即ROS导致mtDNA氧化损伤, 其线粒体多肽表达改变, 进而电子传递链功能下降, 线粒体膜电位下降, ATP生成减少, 凋亡诱导因子(apoptosis-inducing factor, AIF)和细胞色素C释放, ROS生成增多。Tanahashi等^[14]发现, mtDNA的氧化损伤在线粒体膜电位下降的细胞中持

续发生, 同时细胞中有大量 H_2O_2 生成。Gonzalo等^[15]证实, 在抗氧化酶活性未改变时, mtDNA突变改变线粒体复合酶I活性, 进而生成大量 O_2^- 使线粒体内自由基过量, 导致线粒体内mtDNA和脂质氧化损伤加剧。

2.2 自由基诱导线粒体心磷脂氧化损伤

心磷脂主要存在于动物细胞中线粒体的内膜, 是仅有的含有双甘油的磷脂, 15%的磷脂存在于心肌。心磷脂富含脂酰基团, 其不饱和脂肪酰基链与线粒体功能的最佳发挥相适应, 并与大量线粒体内膜蛋白质, 如细胞色素C氧化酶、细胞色素C、NADH、泛醌等相互作用, 激活某些酶, 特别是与氧化磷酸化和ATP的产生密切相关的酶类。由于心磷脂接近线粒体ROS产生的部位, 极易被ROS氧化损伤。

心磷脂的过氧化作用导致细胞色素C从线粒体内膜解离, 并且加入各种氧化剂后氧化型心磷脂的数量与细胞色素C的释放成正相关^[16]。Baqchi等^[17]发现, 细胞色素C从线粒体释放进入细胞浆并与凋亡蛋白激活因子-1(apoptotic protease activating factor-1, Apaf-1)和Caspase-9前体结合, 激活Caspase级联凋亡途径, 导致细胞出现凋亡特征性的生化和形态改变。

此外, 自由基增多使线粒体内膜脂质氧化损伤, 影响跨膜质子梯度, 使合成ATP功能发生障碍, 同时, 线粒体功能障碍导致自由基产生增多, 引起生物膜结构和蛋白过氧化, 线粒体膜通透性下降, 电子传递链活性下降, 形成恶性循环, 最终导致细胞死亡。

3 自由基与 Ca^{2+} 信号传导的关系

Ca^{2+} 作为细胞内第二信使, 在细胞信号传导中发挥着重要的作用。自由基借助 Ca^{2+} 途径增加细胞间 Ca^{2+} 信号传导^[18], 同时抑制细胞 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换蛋白活性, 使细胞内 Ca^{2+} 浓度升高。

线粒体作为细胞内最重要的钙库, 对细胞浆内钙离子浓度平衡的调节至关重要。 Ca^{2+} -ATP酶位于线粒体膜上, 其将 Ca^{2+} 主动从胞浆摄入到基质内, 维持细胞的钙稳态。线粒体膜脂质受到自由基的攻击时, 酶构象因脂质过氧化而改变, Ca^{2+} -ATP酶活性降低。同时, 当MDA大量增加时, 线粒体膜流动性下降, 依赖线粒体膜流动性的 Ca^{2+} -ATP酶活性下降, 导致细胞内 Ca^{2+} 增加, 线粒体摄取 Ca^{2+} 减少, 最终 Ca^{2+} 超载造成细胞凋亡。细胞内 Ca^{2+} 激活 Ca^{2+} 依赖性磷脂酶, 使线粒体膜进一步受损, 在呼吸链末端生成

的ROS进一步增加,细胞内ATP浓度缓慢下降,专一的蛋白酶被激活,引起细胞色素C释放,诱导细胞凋亡。 Ca^{2+} 也激活核酸内切酶,降解细胞核DNA,诱导细胞凋亡。

内质网中,自由基信号传导主要与莱恩索受体(ryanodine receptor, RyR)和三磷酸肌醇受体(IP3 receptor, IP3R)相关。自由基作用于一些细胞内的内源性蛋白,调节RyR活性,并影响钙离子的释放。在动脉内皮细胞中,自由基浓度升高导致促进细胞内 Ca^{2+} 外流的IP3受体的阈值下降,增加胞外 Ca^{2+} 浓度。在平滑肌细胞中,自由基选择性地刺激IP3R,增强受IP3诱导的 Ca^{2+} 释放,从而增强肌肉收缩和基因表达信号的传递^[19]。研究显示,自由基还通过其他途径对 Ca^{2+} 信号传导产生影响。心肌细胞缺血再灌注损伤中,自由基一方面使 Ca^{2+} -ATP通过上述线粒体一系列反应,最终诱发内质网应激。另一方面, Ca^{2+} 浓度增加还会导致对 Ca^{2+} 敏感的第二信使系统和gp91phox被激活,进一步促进NADPH氧化酶产生^[20]。

此外,自由基作用于 Ca^{2+} ,还影响蛋白质磷酸化进而影响细胞内信号传导,如 Ca^{2+} 作为酪氨酸蛋白激酶(protein tyrosine kinase, PTK)中胰岛素受体的调节因子,其浓度升高可减弱PTK受体活性进而削弱胰岛素功能,同时胞内 Ca^{2+} 浓度升高进一步促进PKC的活化,最终导致胰岛素抵抗。

4 自由基与蛋白质磷酸化相关的信号传导的关系

蛋白质磷酸化是细胞信号传导过程中重要的

一环,也是一种细胞信号传导的重要调节方式。活性氧通过改变多种蛋白激酶和磷酸酶活性,影响蛋白质磷酸化,从而调节细胞信号传导。目前,研究多集中于丝/苏氨酸激酶和磷酸酶,以及酪氨酸激酶和磷酸酶。丝氨酸蛋白激酶特异性地作用于第二信使的主要靶蛋白——含磷酸的Ser/Thr残基,使其脱去磷酸基团并改变生物活性。酪氨酸激酶仅催化磷酸化酪氨酸残基的去磷酸化反应,主要介导生长因子刺激的信号传递。目前已知的自由基与蛋白质磷酸化相关的信号传导关系如图2所示。

4.1 自由基与MAPK信号传导的关系

4.1.1 自由基与p38 MAPK信号传导的关系 p38 MAPK属丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPK)家族,是由360个氨基酸组成的分子量为38 kDa的酪氨酸磷酸化蛋白激酶。目前,p38 MAPK信号传导的研究多集中于心肌细胞。在心肌细胞中,p38 MAPK途径产生的自由基有利于NOX4分化。Bogoyevitch等^[21]在成年大鼠的心脏缺血再灌注模型上发现,缺血可激活p38 MAPK磷酸化。这与Ma等^[22]的实验存在一定的一致性——p38 MAPK是缺血再灌注后心肌细胞凋亡时自由基信号传导的一个关键因子。近年,Lu等^[23]还发现,在大鼠局灶性和全脑缺血模型中,自由基导致的p38 MAPK的持续活化可诱导神经细胞凋亡。孙德标等^[24]利用依达拉奉——一种脑保护剂(自由基清除剂)以清除自由基,并抑制p38 MAPK通路,进而减少细胞凋亡。二者均阐明自由基通过p38 MAPK途径诱导细胞凋亡。然而,Kwon等^[25]研究发现,大鼠p38 MAPK信号

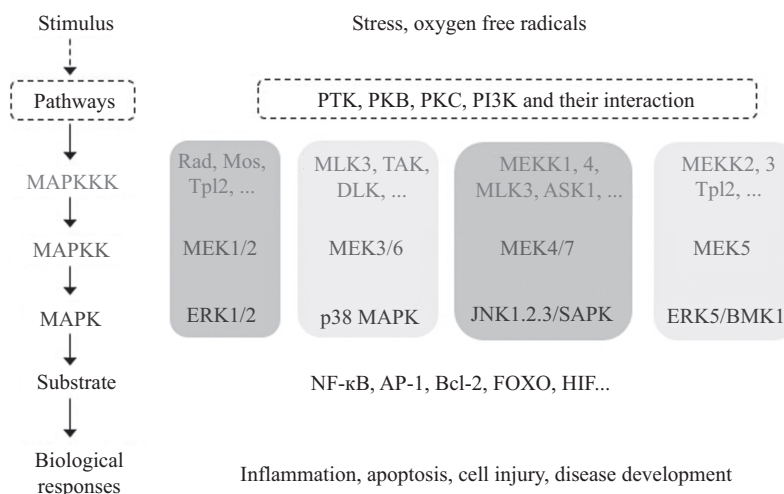


图2 自由基与蛋白质磷酸化相关的信号传导关系

Fig.2 The signal transduction pathway of the protein phosphorylation related to free radicals

传导未被自由基激活。自由基与p38 MAPK信号传导的矛盾结论可能是各心肌细胞产生的p38 MAPK构型不同所致,其中 α 型促进细胞凋亡, β 型促进心肌肥大,但具体机制尚未可知^[26]。

4.1.2 自由基与ERK信号传导的关系 胞外信号调节激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK)通路在促进神经元细胞增殖、分化和抑制凋亡中发挥重要作用。ERK信号传导通路的大致模式为:多种生长因子 \rightarrow Ras \rightarrow Raf \rightarrow MEK1/2 \rightarrow ERK \rightarrow 有丝分裂、分化。

顾乐怡等^[27]发现,羧甲赖氨酸刺激足细胞,细胞内产生的自由基作用于p21Ras的第118位半胱氨酸,信号通过Raf传导到MEK,使ERK磷酸化。在心肌细胞中,Kwon等^[25]证实低浓度H₂O₂能激活ERK途径,促进蛋白质合成。在脑缺血再灌注中,不同的实验动物和方法导致自由基对ERK信号传导作用迥异。大多数研究表明,自由基激活ERK磷酸化,可降低NMDA受体活性,抑制Ca²⁺流入细胞,保护神经元^[28]。而Namura等^[29]的研究结果却表明,ERK介导神经元凋亡。在卵巢癌中,Xia等^[30]研究显示,受丝裂原活化蛋白激酶磷酸酶3(mitogen-activated protein kinase phosphatase 3, MKP3)抑制的ERK1/2酶可促进卵巢癌细胞生长。Chan等^[31]研究证实,卵巢癌发病过程中,氧自由基的产生可能导致MKP3的含量下降,进而激活ERK1/2,促进卵巢癌细胞的生长并增强其抗药性。在肝癌中,Caja等^[32]研究表明,癌细胞通过刺激MEK/ERK途径和抑制Nox4的增加以避免TGF- β 引起的细胞凋亡。杨水祥等^[33]发现,人主动脉内皮

细胞(human aortic endothelial cells, HAEC)凝血酶释放韦伯潘力氏小体(Webel-Palade body, WPB)受rac1依赖的活性氧调节,进一步证明上述ERK的信号传导通路模式。

4.1.3 自由基与JNK信号传导的关系 c-Jun氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)蛋白激酶有3个基因编码,*jnk 1*和*jnk 2*基因在全身广泛表达,而*jnk 3*仅在脑、心脏和睾丸中表达。JNK信号传导途径是细胞的重要功能,在应激反应中起重要作用。目前已知JNK信号传导途径大致如图3所示。

内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)导致的未折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR)由三种ERS反应感受蛋白介导,包括蛋白激酶R样内质网激酶(protein kinase R-like ER kinase, PERK)、活化转录因子6(the activating transcription factor 6, ATF6)和肌醇酶1(inositol requiring enzyme 1, IRE1)。ERS时,IRE1能激活JNK,使肿瘤坏死因子受体相关因子-2(tumor necrosis factor-associated factor-2, TNF-2)磷酸化。一方面,磷酸化的TNF-2与IRE1形成复合物,导致TNF-2与Caspase-12前体解离,使Caspase-12活化,诱导细胞的凋亡^[34]。另一方面,磷酸化的TNF-2传递信号至凋亡信号调节激酶1(apoptosis signal-regulating kinase 1, ASK1)和JNK末端激酶,最终导致线粒体/Apaf1依赖的凋亡活化^[35]。UPS时,肿瘤坏死因子受体相关因子-2还可通过二聚体或寡聚化激活Caspase-12,并通过JNK途径磷酸化JUN,导致细胞凋亡。

此外,方芳等^[36]发现,SHSY5Y细胞经人参皂苷

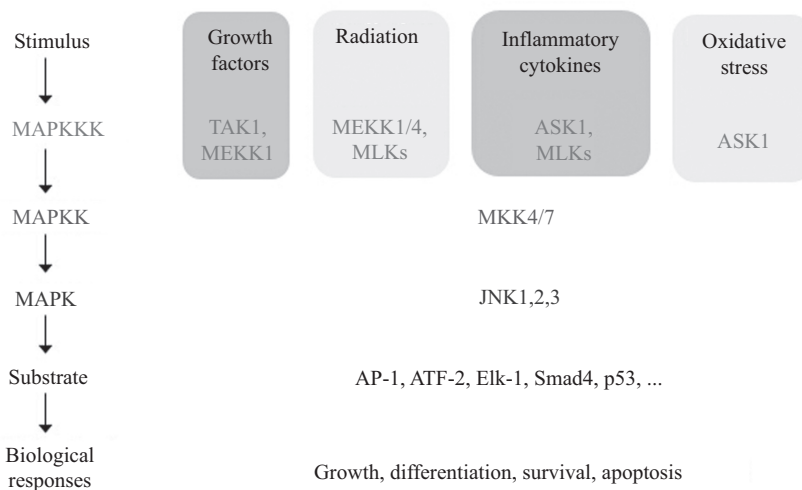


图3 JNK信号传导途径

Fig.3 The signal transduction pathway of JNK

Rg1处理,有效抑制MRP⁺诱导的细胞凋亡,同时细胞内ROS下降,JNK激酶的活性减弱,裂解的Caspase-3阳性细胞表达率下降。孟春等^[37]证明,激活SHSY5Y细胞表达的PXR可抑制自由基等因素引起的细胞死亡。Okuno等^[38]利用大鼠动脉缺血再灌注实验推测,JNK通路在脑缺血性损伤中参与细胞凋亡的过程。Kajimoto等^[39]研究表明,自由基激活胰岛β细胞JNK通路,降低胰岛素促进因子-1(pancreatic duodenal homeobox-1, PDX-1)的DNA结合活性,抑制生成胰岛素基因的表达。吴扬等^[40]发现,从银杏中提取的单体槲皮素(Que)可抑制血管紧张素II(Ang II)诱导的氧化应激,进而减少心肌细胞JNK通路的表达,抑制心脏肥大。研究还表明,自由基可激活凋亡信号调节激酶1(apoptosis signal regulating kinase 1, ASK1),其作为上游调节蛋白激活JNK激酶和Caspase通路,促进线粒体释放细胞色素C和细胞核碎裂,与Fas结合蛋白Daxx作用并促进NF-κB和AP-1表达,从而导致细胞凋亡^[41]。

4.2 自由基与PTK信号传导的关系

酪氨酸蛋白激酶(protein tyrosine kinase, PTK)能催化多种底物蛋白质酪氨酸残基磷酸化,在细胞生长、增殖和分化中具有重要作用。Lu等^[23]和Droge等^[42]的研究表明,由于不同的ROS水平对蛋白酪氨酸磷酸酶(protein tyrosine phosphatase, PTP)和胰岛素受体底物-1(insulin receptor substrate-1, IRS-1)的作用不同,糖尿病患者体内的氧化应激是一种双刃剑现象:适量过剩的ROS可提高胰岛素信号传导水平,而大量的ROS过剩则具有破坏性。PTP的巯基经ROS氧化后激活胰岛素受体PTK并增强胰岛素信号传导,而Ser-307-IRS-1在ROS作用下产生的磷酸化作用则抑制IRS-1活性。另有研究^[43]表明,自由基可提高血小板内Ca²⁺浓度,促进Ca²⁺与钙调蛋白结合,同时抑制PTP活性并提高激活的PTK含量,使分裂素活化的蛋白激酶磷酸化,从而激活磷脂酶A₂。

4.3 自由基与PKB、PKC信号传导的关系

丝/苏氨酸蛋白激酶(protein kinase B/C, PKB/PKC)为丝/苏氨酸激酶家族的成员,其酶活性与ROS水平相关。高浓度H₂O₂激活PKB/PKC^[44],而低浓度H₂O₂并无作用^[25]。

PKB参与胰岛素介导的葡萄糖转运调节,PKB激活作用受损是产生胰岛素抵抗的途径之一。Tiosh等^[45]发现,3T3-L1脂肪细胞经H₂O₂处理,细胞发生氧

化应激,低密度微粒体中与IRS-1和p85相关的PI3K的活性降低,PKB 473位丝氨酸及PKB-α和PKB-β活性下降约90%,从而减少2-脱氧葡萄糖的摄取并抑制GLUT4从胞浆转向细胞膜。

PKC中富含氧化还原敏感的半胱氨酸域,其调节域中的C₁有Zn-巯基,因此对氧自由基极为敏感。研究表明,高血糖的细胞中二酯酰甘油含量升高,激活PKC,进而活化NAD(P)H氧化酶,诱导自由基生成和脂质过氧化。同时,生成的自由基进一步活化PKC,形成恶性循环。此外,PKC通过多种途径导致胰岛素抵抗。PKC-ε、PKC-β和PKC-θ通过磷酸化β亚基上的丝/苏氨酸残基,抑制IRS-1自身的磷酸化反应,从而减弱胰岛素作用。PKC-δ通过直接磷酸化IRS-1抑制IRS-1的酪氨酸磷酸化,从而抑制NS信号传导,导致胰岛素抵抗。PKC还直接减少IRS-1的数量,导致胰岛素抵抗^[46]。

4.4 自由基与PI3K信号传导的关系

PI3K是一种胞内磷脂酰肌醇激酶,本身也具有丝/苏氨酸激酶的活性。在自由基信号传导中,PI3K一方面作为PKB/PKC的上游蛋白起到调节作用,如上文提到的高血糖氧化应激。另一方面,PI3K通过抗cAMP应答元件结合蛋白抗体作用。杜怡峰等^[47]发现,自由基代谢产物含量增加导致PI3K信号转导通路蛋白表达异常,而TrkA受体介导神经生长因子通过PI3K通路促进基底前脑胆碱能神经元分化并抑制其病变。此外,王丽萍等^[48]在SD大鼠中发现ROS激活PI3K-Akt进而降低线粒体通透性是缺血后处理或控制性低压灌注减轻大鼠脊髓缺血再灌注损伤的机制。PI3K-Akt还可激活PKB,磷酸化Bcl-2,进而磷酸化并激活CREB的Ser133,其结合蛋白参与转录,引发Bcl-2等靶位基因表达,最终避免神经元凋亡^[49]。

5 自由基与转录因子信号传导的关系

自由基与多种转录因子相关途径的信号传导有密切关联,包括NF-κB、AP-1、HIF和FOXO等。自由基通过2种途径调节转录因子活性:一是细胞内的自由基直接氧化修饰转录因子,二是自由基参与磷酸化修饰的级联反应。

核转录因子(nuclear factor-kappa B, NF-κB)是p50/p65蛋白组成的二聚体,是自由基发挥损伤作用的敏感靶因子,在细胞增殖、凋亡等多种过程中起关键作用。NF-κB作用的靶基因通常包括: NOS、

COX-2、MMP-9、ICAM和Cytokines等。NF- κ B通过以下途径激活:(1)Kheradmand等^[50]研究发现,自由基通过rac-依赖途径,即H₂O₂与脂质过氧化产物通过小G蛋白rac1使NF- κ B的I κ B α 与P⁵⁰、P⁶⁵亚单位分离,激活NF- κ B。(2)MAPKKK激活IKK或细胞膜受体激活引起I κ B α 的Ser32与Ser36及I κ B β 的Ser19和Ser23磷酸化后,I κ B从NF- κ B上脱落并被E3^{I κ B}泛素连接酶混合物泛素化,最终导致26S蛋白酶体降解,NF- κ B由抑制状态被激活。NF- κ B转位入核并激发一系列反应^[51,52]。Shi等^[53]利用纳米银颗粒通过与ROS有关的IKK/NF- κ B途径引起人脐静脉内皮细胞功能紊乱。Guo等^[54]发现,AICAR或复合物C通过抑制ROS生成和IKK、I κ B与NF- κ B磷酸化,削弱脂多糖诱导的自由基的NF- κ B信号传导和免疫应答,减轻肝细胞损伤。(3)脂质过氧化产物——乙醛,在一定条件下通过MAP激酶级联系统,也可抑制NF- κ B活性^[55]。此外,有多项研究表明,自由基可激活NF- κ B,但具体机制尚未可知。Peterson等^[56]研究表明,自由基通过激活NF- κ B,促进核启动子区域的结合,引起急性呼吸窘迫综合征,从而启动一系列应急反应蛋白的合成,加重肺部损伤。Schwartz等^[57]进一步检测肺部损伤患者巨噬细胞中多种转录调节蛋白的活化情况,结果仅NF- κ B出现活化。贺立立等^[58]也证实了该结果。刘莉等^[59]通过降低NF- κ B活性减轻活性氧引起的肝损伤。轻微氧化的低密度脂蛋白(minimally modified low density lipoprotein-cholesterol, mm-LDL)也可激活NF- κ B^[60]。

活化蛋白-1(activator protein-1, AP-1)是由Fos蛋白和Jun蛋白组成的异源二聚体。自由基大多通过Ca²⁺信号传导、蛋白质磷酸化等途径激活AP-1,使原癌基因*c-fos*、*c-jun*表达,同时进一步活化下游*AP-1*基因,促进其与DNA结合,参与细胞功能和凋亡的调节。Vollgraf等^[61]研究表明,H₂O₂可激活AP-1转录因子。

自由基介导的以上2种细胞信号传导,最终还可能通过转录因子的激活而进入细胞核,与特定的DNA序列结合,调节RNA聚合酶II活性、调控DNA表达。同时,氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein-cholesterol, ox-LDL)可刺激AP-1和NF- κ B与DNA结合的活性。

低氧诱导因子-1(hypoxia inducible factor-1, HIF-1)属于DNA结合蛋白,是具有转录活性的核蛋白。自

由基通过p38、ERK、PKB和PI3K途径调节HIF-1的表达。低氧处理通过激活p38 MAPK途径,增加其上游MKK6和MKK3激酶表达,提高HIF-1水平^[62]。Zhao等^[63]微波照射神经性PC12细胞产生ROS,通过ERK与PI3K通路激活HIF-1 α ,导致细胞损伤。前列腺素诱导大肠癌细胞、冲击波诱导骨细胞、IL-1诱导胎盘细胞滋养层细胞和血管紧张素诱导平滑肌细胞等均激活ERK1/2表达HIF-1^[64]。同时,在DU145细胞^[65-66]、肝细胞、HepG₂细胞^[67]和PC12细胞^[63]中,自由基诱导激活PKB和PI3K途径提高HIF-1水平,介导细胞凋亡。低氧条件下,线粒体释放的自由基对调节HIF-1有两种不同的效应。一是脯氨酸羟化酶活性增强可抑制HIF-1,另一个是通过HIF-1氧化还原活性调节位点实现负向调节,其C端反式激活域上的800和848半胱氨酸残基是HIF-1与氧化还原因子结合的关键位点。

叉头转录因子(Forkhead box O, FOXO)也是一类与ROS密切相关的转录因子,包括FOXO1、FOXO3、FOXO4和FOXO6。自由基与氧化应激对FOXO的影响取决于细胞环境和自由基产生的时间与浓度,其最终影响激酶的活化情况。自由基大多数通过PI3K-PKB途径抑制FOXO活性。生理水平的H₂O₂可通过激活胰岛素受体和磷酸化IRS-1^[68],激活EGFR和PGFR磷酸化^[69]以及Shc-Grb2-SOS结合EGFR^[70]等途径激活PI3K-PKB途径,磷酸化FOXO或抑制其活化。此外,自由基通过p38^[71]、ERK^[72]和JNK^[73]等途径也可影响FOXO活性。氧化应激产生的NF- κ B使FOXO3磷酸化并抑制其激活^[74]。然而,氧化应激激活的MAPK和JNK也可通过直接磷酸化FOXO4的Thr447和Thr451位点^[73],磷酸化并抑制将FOXO隔离在细胞质中的14-3-3蛋白^[75]以及间接抑制PKB活性^[76]以增强FOXO活性。

6 自由基与*Bcl-2*基因信号传导的关系

*Bcl-2*基因(B细胞淋巴瘤/白血病-2基因)是一种原癌基因,具有抑制凋亡的作用。在大多数细胞中,*Bcl-2*家族蛋白是凋亡的关键调控者^[77]。目前,*Bcl-2*是凋亡分子机制研究的主要靶分子,且已有研究揭示自由基与*Bcl-2*基因作用的可能机制。(1)*Bcl-2*通过间接抗氧化作用抑制自由基启动细胞凋亡信号传导。Hockenbery等^[78]发现,线粒体、内质网和核膜这些生成自由基的亚细胞器膜富含*Bcl-2*,*Bcl-2*的过

度表达抑制超氧自由基生成和脂质过氧化,对自由基诱导的心肌细胞凋亡具有保护作用。众多研究均在细胞凋亡的过程中检测到Bcl-2蛋白含量上升。(2)自由基通过促进Bcl-2亚族促凋亡Bax基因表达并抑制Bcl-2基因表达而诱导细胞凋亡。Bax与Bcl-2可结合形成同源蛋白二聚体,Bcl-2同二聚体多则细胞存活,反之则细胞凋亡。Narima等^[79]和Tian等^[80]的实验均证实,细胞产生氧化应激导致Bax增多,Bcl-2减少,最终细胞凋亡。(3)Bcl-2是细胞色素C释放的上游调控因子^[77]。Bcl-2的促凋亡BH3-only亚家族蛋白是启动以线粒体为主的细胞凋亡途径的必要条件。当细胞受到自由基刺激时,BH3-only蛋白活化,并通过一定的方式活化Bax或Bak^[81],使Bax和Bak在线粒体膜上形成寡聚物,使膜通透性增加,释放促凋亡蛋白如细胞色素C,驱使Caspase活化介导细胞凋亡^[82]。(4)Bcl-2通过调节胞内Ca²⁺浓度以调节细胞凋亡。Farrukh等^[83]最新研究发现,人体皮肤细胞暴露于UV-B中,ROS水平上升,内质网Ca²⁺浓度下降,激活ERK-peIF2 α -CHOP通道,导致内质网应激和未折叠蛋白质反应。然而,Wei等^[84]在神经元细胞GT1-7中发现,Bcl-2可抑制由TG所诱导的凋亡,但并不能抑制TG诱导的胞内Ca²⁺浓度升高;同时,Jason等^[85]在中国仓鼠卵巢细胞5AHSmyc中去除细胞内贮存Ca²⁺后发现,过度表达的Bcl-2仍可抑制凋亡,提示Bcl-2对胞内Ca²⁺浓度的调节作用也只能是其抑制凋亡的机制之一。

7 小结与展望

总而言之,自由基在人体内的产生和清除具有一定的机制,并引起某些疾病或加重某些疾病的病况。自由基相关细胞信号传导的主要途径有Ca²⁺、蛋白质磷酸化、转录因子、Bcl-2和线粒体相关的信号传导途径,其中Bcl-2是目前凋亡分子机制研究的主要靶分子。几种自由基相关信号传导途径间存在相互影响,乃至协同作用。尽管自由基通过各种途径都能够进行细胞信号传导,但不同细胞、疾病传导信号的物质和途径完全不同,关系错综复杂。近年,Guo等^[86]发现,SD大鼠体内可能存在自由基通路,并认为通过这条通路可将脏器受激产生的自由基传导出体表^[87-88],调节体内氧化应激水平,影响自由基相关细胞信号传导。同时,Siegfried等^[89]在秀丽隐杆线虫中发现,当自由基以某种方式刺激细胞凋

亡时,细胞的抵抗力增加,生命周期延长。自由基在该实验中展现出的量效关系为探究自由基对生物体积极作用的分子机制提供了指导。因此,进一步探究各种自由基相关细胞信号传导的途径和影响机理为阐明自由基对细胞功能与存活的利弊、探究生物功能因子作用提供具体的分子机制。

目前的研究多集中于自由基相关的负面的细胞信号传导途径,而几乎没有涉及自由基作为正面信号分子及其传导机制研究。自由基对细胞乃至生物体的利弊作用是否与自由基水平相关,其信号传导途径是否一致尚未可知。已知的自由基信号传导也集中于少数细胞和疾病中的信号传导。同时,同一症状可能具有不同的信号传导途径,各种信号传导途径之间的主次关系、相互作用和是否具有器官、细胞等特异性问题仍值得继续探究。此外,可尝试针对已知的自由基信号传导途径开发相应功能保健品,甚至是药物,并应用于疾病治疗和人体保健、养生。

参考文献 (References)

- 1 Abbas HA, Maccio DR, Coskun S, Jackson JG, Hazen AL, Sills TM, *et al.* Mdm2 is required for survival of hematopoietic stem cells/progenitors via dampening of ROS-induced p53 activity. *Cell Stem Cell* 2010; 7(5): 606-17.
- 2 Trachootham D, Alexandre J, Huang P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: A radical therapeutic approach. *Nat Rev Drug Discov* 2009; 8(7): 579-91.
- 3 王福龙, 王甄真, 陈雁. 衰老的分子机制与干预研究的最新进展. *中国细胞生物学报*(Wang Fulong, Wang Zhenzhen, Chen Yan. *Advances in the research of the mechanism and intervention of aging. Chinese Journal of Cell Biology*) 2012; 34(8): 739-48.
- 4 Trachootham D, Zhang H, Zhang W, Feng L, Du M, Zhou Y, *et al.* Effective elimination of fludarabine-resistant CLL cells by PEITC through a redox-mediated mechanism. *Blood* 2008; 112(5): 1912-22.
- 5 West AP, Brodsky IE, Rahner C, Woo DK, Erdjument-Bromage H, Tempst P, *et al.* TLR signalling augments macrophage bactericidal activity through mitochondrial ROS. *Nature* 2011; 472(7344): 476-80.
- 6 Raj L, Ide T, Gurkar AU, Foley M, Schenone M, Li X, *et al.* Selective killing of cancer cells by a small molecule targeting the stress response to ROS. *Nature* 2011; 475(7355): 231-4.
- 7 李小曼, 徐红德, 蔺美娜, 宋晓宇, 冯艳玲, 羿菲, 等. DNA损伤修复反应的双刃剑效应在肿瘤与衰老发生发展中的作用. *中国细胞生物学报*(Li Xiaoman, Xu Hongde, Lin Meina, Song Xiaoyu, Feng Yanling, Yi Fei, *et al.* DNA damage: A double-edge sword in tumor and cellular senescence. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2013; 35(2): 134-40.
- 8 杨文鸽, 茅宇虹, 刘冰冰, 徐大伦, 束玉珍. 鲨鱼肉酶解物清除自由基能力的研究. *中国食品学报*(Yang Wenge, Mao Yuhong,

- Liu Bingbing, Xu Dalun, Shu Yuzhen. Free radical scavenging activity of enzymic hydrolysis from shark meat. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology* 2012; 12(7): 17-23.
- 9 陈卉卉, 于平, 励建荣. 东海海参胶原蛋白多肽的制备及清除自由基功能研究. *中国食品学报*(Chen Huihui, Yu Ping, Li Jianrong. The preparation of collagen polypeptide with free radical scavenging ability purified from *Acaudina molpadoides semper*. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology* 2010; 10(1): 19-25.
- 10 Shi X, Zhang Y, Zheng J, Pan J. Reactive oxygen species in cancer stem cells. *Antioxid Redox Signal* 2012; 16(11): 1215-28.
- 11 Pervaiz S, Taneja R, Ghaffari S. Oxidative stress regulation of stem and progenitor cells. *Antioxid Redox Signal* 2009; 11(11): 2777-89.
- 12 Diehn M, Cho RW, Lobo NA, Kalisky Tm Dorie MJ, Kulp AN, *et al*. Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells. *Nature* 2009; 458(7239): 780-83.
- 13 Wei YH, Lee HC. Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and impairment of antioxidant enzymes in aging. *Exp Biol Med (Maywood)* 2002; 227(9): 671-82.
- 14 Tanahashi C, Nakayama A, Yoshida M, Ito M, Mori N, Hashizume Y. MELAS with the mitochondrial DNA 3243 point mutation: A neuropathological study. *Acta Neuropathol* 2000; 99(1): 31-8.
- 15 Gonzalo R, Garcia-Arumi E, Llige D, Marti R, Solano A, Montoya J, *et al*. Free radicals-mediated damage in transmembrane cells harboring the T14487C mutation in the ND6 gene of mtDNA. *FEBS Lett* 2005; 579(30): 6909-13.
- 16 李英哲, 黄连珍, 周丽玲. 维生素A缺乏对大鼠脂质过氧化和抗氧化系统的影响. *营养学报*(Li Yingzhe, Huan Lianzhen, Zhou Liling. Effect of vitamin A deficiency on lipid peroxidation and antioxidation system in rats. *Acta Nutrimenta Sinica*) 2001; 23(1): 1-4.
- 17 Bagchi M, Kuszynski CA, Balmoori J, Joshi SS, Stohs SJ, Bagchi D. Protective effects of antioxidants against smokeless tobacco-induced oxidative stress and modulation of Bcl-2 and p53 genes in human oral keratinocytes. *Free Radic Res* 2001; 35(2): 181-94.
- 18 Zimmerman MC, Sharma RV, Davisson RL. Superoxide mediates angiotensin II induced influx of extracellular calcium in neural cells. *Hypertension* 2005; 45(4): 717-23.
- 19 Suzuki YJ, Ford GD. Redox regulation of signal transduction in cardiac and smooth muscle. *J Mol Cell Cardiol* 1999; 31(2): 345-53.
- 20 Waki K, Inanami O, Yamamori T, Nagahata H, Kuwabara M. Involvement of protein kinase Cdelta in the activation of NADPH oxidase and the phagocytosis of neutrophils. *Free Radic Res* 2006; 40(4): 359-67.
- 21 Bogoyevitch MA, Gillespie-Brown J, Ketterman AJ, Fuller SJ, Ben-Levy R, Ashworth A, *et al*. Stimulation of the stress-activated mitogen-activated protein kinase subfamilies in perfused heart, p38/RK mitogen-activated protein kinases and c-Jun N-terminal kinases are activated by ischemia/reperfusion. *Circ Res* 1996; 79(2): 162-73.
- 22 Ma XL, Kumar S, Gao F, Loudon CS, Lopez BL, Christopher TA, *et al*. Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinases decreases cardiomyocyte apoptosis and improves cardiac function after myocardial ischemia and reperfusion. *Circulation* 1999; 99(13): 1685-91.
- 23 Lu Q, Rau TF, Harris V, Johnson M, Poulsen DJ, Black SM. Increased p38 mitogen-activated protein kinase signaling is involved in the oxidative stress associated with oxygen and glucose deprivation in neonatal hippocampal slice cultures. *Eur J Neurosci* 2011; 34(7): 1093-101.
- 24 孙德标, 胡海涛. 依达拉奉对大鼠脑缺血模型MAPK表达的影响. *心脑血管病防治*(Sun Debiao, Hu Haitao. Effect of edaravone on the MAPK pathways after brain ischemia in rats. *Prevention and Treatment of Cardio-Cerebral-Vascular Disease*) 2012; 8(12): 294-6.
- 25 Kwon SH, Pim DR, Rem A, Sawyer DB, Colucci WS. H(2)O(2) regulates cardiac myocyte phenotype via concentration-dependent activation of distinct kinase pathways. *J Mol Cell Cardiol* 2003; 35(6): 615-21.
- 26 Wu S, Gao J, Ohlemeyer C, Roos D, Niessen H, Köttgen E, *et al*. Activation of AP-1 through reactive oxygen species by angiotensin II in rat cardiomyocytes. *Free Radic Biol Med* 2005; 39(12): 1601.
- 27 顾乐怡, 钱家麟, 倪兆慧. 晚期糖基化产物受体信号传导在羧甲基赖氨酸诱导足细胞表达单核细胞趋化因子中的作用. *中华肾脏病杂志*(Gu Leyi, Qian Jialin, Ni Zhaohui. Effect of advanced glycation end product receptor signal transduction on MCP-1 expression of podocyte induced by carboxymethyllysine. *Chinese Journal of Nephrology*) 2005; 21(11): 689-94.
- 28 Fahlman CS, Bickler PE, Sullivan B, Gregory GA. Activation of the neuroprotective ERK signaling pathway by fructose-1, 6-bisphosphate during hypoxia involves intracellular Ca²⁺ and phospholipase C. *Brain Res* 2002; 958(1): 43-51.
- 29 Namura S, Iihara K, Takami S, Nagata I, Kikuchi H, Matsushita K, *et al*. Intravenous administration of MEK inhibitor U0126 affords brain protection against forebrain ischemic and focal cerebral ischemic. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(20): 11569-74.
- 30 Xia C, Meng Q, Liu LZ, Rojanasakul Y, Wang XP, Jiang BH. Reactive oxygen species regulate angiogenesis and tumor growth through vascular endothelial growth factor. *Cancer Res* 2007; 67(22): 10823-30.
- 31 Chan DW, Liu VW, Tsao GS, Yao KM, Furukawa T, Chan KK, *et al*. Loss of MK3 mediated by oxidative stress enhances tumorigenicity and chemiluminescence of ovarian cancer cells. *Carcinogenesis* 2008; 29(9): 1742-50.
- 32 Caja L, Sancho P, Bertran E, Iqlesias-Serret D, Gil J, Fabregat I. Overactivation of the MEK/ERK pathway in liver tumor cells confers resistance to TGF- β -induced cell death through impairing up-regulation of the NADPH oxidase NOX4. *Cancer Res*, 2009, 69(19): 7595-602.
- 33 杨水祥, 闫娟, 陈明哲. Rac1在内皮细胞韦伯潘力氏小体释放中的作用. *中华心血管病杂志*(Yang Shuixiang, Yan Juan, Chen Mingzhe. Effect of Rac1 on Weibel-Palade body release in human aortic endothelial cells. *Chinese Medical Journal of Cardiology*) 2004; 32(2): 161-6.
- 34 Oono K, Yoneda T, Manabe T, Yamagishi S, Matsuda S, Hitomi J, *et al*. JAB1 participates in unfolded protein responses by

- association and dissociation with IRE1. *Neurochem Int* 2004; 45(5): 765-72.
- 35 Shiraishi H, Okamoto H, Yoshimura A, Yoshida H. ER stress-induced apoptosis and caspase-12 activation occurs downstream of mitochondrial apoptosis involving Apaf-1. *J Cell Sci* 2006; 119(19): 3958-66.
- 36 方芳, 陈晓, 朱元贵, 周宜灿. 人参皂苷Rg1可能通过丝裂素活化蛋白激酶途径抑制细胞凋亡. *药学学报*(Fang Fang, Chen Xiao, Zhu Yuanguai, Zhou Yican. Ginsenoside Rg1 may protect SHSY5Y cells from apoptosis induced by MPP+ through JNK way. *Acta Pharmaceutica Sinica*) 2003; 38(3): 176-80.
- 37 孟春, 贾振华, 陈俊, 熊玉林, 王航, 李锋, 等. PXR激活在拮抗SH-SY5Y细胞凋亡中的作用. *中国细胞生物学学报*(Meng Chun, Jia Zhenhua, Chen Jun, Xiong Yulin, Wang Hang, Li Feng, *et al.* Effect of PXR activation on neuroblastoma cells SH-SY5Y apoptosis. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2011; 33(2): 149-53.
- 38 Okuno S, Saito A, Hayashi T, Chan PH. The c-Jun N-terminal protein kinase signaling pathway mediates Bax activation and subsequent neuronal apoptosis through interaction with Bim after transient focal cerebral ischemia. *J Neurosci* 2004; 24(36): 78-87.
- 39 Kajimoto T, Kaneto H. Role of oxidative stress in pancreatic beta-cell dysfunction. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1011: 168-76.
- 40 吴扬, 顾玉梅. 银杏叶提取物抑制培养的乳鼠心肌细胞肥大及其信号传导机制的实验研究. *中华心血管病杂志*(Wu Yang, Gu Yumei. Extract of ginkgo biloba and quercetin inhibit angiotensin-II induced hypertrophy in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Chinese Medical Journal of Cardiology*) 2006; 34(5): 454-7.
- 41 Charette SJ, Lambert H, Landry J. A kinase-independent function of Ask1 in caspase-independent cell death. *J Biol Chem* 2001; 276 (39): 36071-4.
- 42 Droge W. Oxidative aging and insulin receptor signaling. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2005; 60(11): 1378-85.
- 43 蔡新江, 张燕鸿, 汪家瑞. 氧自由基与心肌再灌注时的血小板活化. *心肺血管病杂志*(Cai Xinjiang, Zhang Yanhong, Wang Jiarui. Platelet activation of oxygen free radicals and myocardial reperfusion. *Journal of Cardiovascular and Pulmonary Diseases*) 1999; 4(18): 306-9.
- 44 Modesti A, Bertolozzi I, Gamberi T, Marchetta M, Lumachi C, Coppo M, *et al.* Hyperglycemia activates JAK2 signaling pathway in human failing myocytes via angiotensin II-mediated oxidative stress. *Diabetes* 2005; 54(2): 394-401.
- 45 Schieven GL, Mittler RS, Nadler SG, Kirihara JM, Bolen JB, Kanner SB, *et al.* ZAP270 tyrosine kinase, CD45, and T cell receptor involvement in UV- and H₂O₂-induced T cell signal transduction. *J Biol Chem* 1994; 269(32): 20712-26.
- 46 Ikeda Y, Olsen GS, Ziv E, Hansen LL, Busch AK, Hansen BF, *et al.* Cellular mechanism of nutritionally induced insulin resistance in psammomys obesus: Overexpression of protein kinase C in skeletal muscle precedes the onset of hypersulinemia and hyperglycemia. *J Diabetes* 2001; 50(3): 584-92.
- 47 杜怡峰, 郭守刚, 闫鹏, 王蓉, 赵志炜, 姬志娟, 等. 快速老化小鼠P10海马PI3K信号转导通路的变化及APP17肽的影响. *山东大学学报*(Du Yifeng, Guo Shengang, Yan Peng, Wang Rong, Zhao Zhiwei, Ji Zhijuan, *et al.* Variation of PI3K signal transduction pathway relative protein in SAMP10 (senescence accelerated mice/prone 10) and effect of APP17 peptide. *Journal of Shandong University*) 2009; 47(7): 4-8.
- 48 王丽萍, 张铨, 陈国忠. ROS和PI3K-Akt在缺血后处理或控制性低压灌注减轻大鼠脊髓缺血再灌注损伤中的作用. *中华麻醉学杂志*(Wang Liping, Zhang Quan, Chen Guozhong. Roles of reactive oxygen species and phosphatidyl-inositol 3-kinase-Akt in neuroprotection against spinal cord ischemia-reperfusion injury by ischemic postconditioning or controlled low perfusion pressure in rats. *Chinese Journal of Anesthesiology*) 2010; 30(6): 728-32.
- 49 Zhong D, Liu X, Khuri FR, Sun SY, Vertino PM, Zhou W. LKB1 is necessary for Akt-mediated phosphorylation of proapoptotic proteins. *Cancer Res* 2008; 68(18): 7270-7.
- 50 Kheradmand F, Werner E, Tremble P, Symons M, Werb Z. Role of Rac1 and oxygen radicals in collagenase-1 expression induced by cell shape change. *Science* 1998(5365); 280: 898-902.
- 51 Baeuerle PA, Baltimore D. NF- κ B: Ten years after. *Cell* 1996; 87(1): 13-20.
- 52 Beg AA, Baltimore D. An essential role for NF- κ B in preventing TNF- α -induced cell death. *Science* 1996; 274(5288): 782-4.
- 53 Shi J, Sun X, Lin Y, Zou X, Li Z, Liao Y, *et al.* Endothelial cell injury and dysfunction induced by silver nanoparticles through oxidative stress via IKK/NF- κ B pathways. *Biomaterials* 2014; 35(24): 6657-66.
- 54 Guo Y, Zhang Y, Hong K, Luo F, Gu Q, Lu N, *et al.* AMPK inhibition blocks ROS-NF κ B signaling and attenuates endotoxemia-induced liver injury. *PLoS One* 2014; 9(1): 1-7.
- 55 Leonarduzzi G, Arkan MC, Bařaęa H, Chiarotto E, Sevanian A, Poli G. Lipid oxidation products in cell signaling. *Free Rad Biol Med* 2000; 28(9): 1370-8.
- 56 Peterson MW, Walter ME, Gross TJ. Asbestos directly increases lung epithelial permeability. *Am J Physiol* 1993; 265(3): 308-17.
- 57 Schwartz MD, Moore EE, Moore FA, Shenkar R, Moine P, Haenel JB, *et al.* Nuclear factor-kappa B is activated in alveolar macrophages from patients with acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 1996; 24(8): 1285-92.
- 58 贺立立, 陈勤, 彭申明, 曹炎贵, 李杨, 朱敏. 桔梗皂苷对慢性支气管炎小鼠肺细胞中的IL-1 β 和TNF- α 表达的影响. *中国细胞生物学学报*(He Lili, Chen Qin, Peng Shenming, Cao Yangui, Li Yang, Zhu Min. The effect of kiyosaponin on expression of IL-1 β and TNF- α from pneumocyte of chronic bronchitis (CB) mice. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2013; 35(1): 17-23.
- 59 刘莉, 管小琴, 李芬, 郑传东. 茶多酚对酒精性肝病大鼠核因子 κ B及环氧合酶2表达的影响. *中国实验动物学报*(Liu Li, Guan Xiaoqin, Li fen, Zheng Chuandong. Effect of tea polyphenols on expression of nuclear factor kappa B and cyclooxygenase 2 in rats with alcoholic liver diseases. *Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica*) 2008; 16(3): 209-14.
- 60 尹鸿操, 刘欣岩, 刘佩毛, 张华, 梁平, 王宗立, 等. mm-LDL对内皮细胞转录因子NF- κ B活性的影响. *中国医学科学院学报*(Yi Hongcao, Liu Xinyan, Liu Peimao, Zhang Hua, Liang Ping, Wang Zongli, *et al.* Effect of mm-LDL on NF- κ B activation in endothelial cell. *Acta Academiae Medicinae Sinicae*) 2001; 23(4): 312-6.
- 61 Vollgraf U, Wegner M, Richter-Landsberg C. Activation of AP-1 and nuclear factor-kappa B transcription factors is

- involved in hydrogen peroxide-induced apoptotic cell death of oligodendrocytes. *J Neurochem* 1999; 73(6): 2501-9.
- 62 Fukuda R, Kelly B, Semenza GL. Vascular endothelial growth factor gene expression in colon cancer cells exposed to prostaglandin E2 is mediated by hypoxia-inducible factor 1. *Cancer Res* 2003; 63(9):2330-4.
- 63 Zhao L, Yang YF, Gao YB, Wang SM, Wang LF, Zuo HY, *et al.* Upregulation of HIF-1 α via activation of ERK and PI3K pathway mediated protective response to microwave-induced mitochondrial injury in neuron-like cells. *Mol Neurobiol* 2014; doi: 10.1007/s12035-014-8667-z.
- 64 Kietzmann T, Jungermann K, Görlach A. Regulation of the hypoxia-dependent plasminogen activator inhibitor 1 expression by MAP kinases. *Thromb Haemost* 2003; 89(4): 666-73.
- 65 Jiang BH, Jiang G, Zheng JZ, Lu Z, Hunter T, Vogt PK. Phosphatidylinositol 3-kinase signaling controls levels of hypoxia-inducible factor 1. *Cell Growth Differ* 2001; 12(7): 363-9.
- 66 Gao N, Shen L, Zhang Z, Leonard SS, He H, Zhang XG, *et al.* Arsenite induces HIF-1 α and VEGF through PI3K, Akt and reactive oxygen species in DU145 human prostate carcinoma cells. *Mol Cell Biochem* 2004; 255(1-2): 33-45.
- 67 Kietzmann T, Samoylenko A, Roth U, Jungermann K. Hypoxia-inducible factor-1 and hypoxia response elements mediate the induction of plasminogen activator inhibitor-1 gene expression by insulin in primary rat hepatocytes. *Blood* 2003; 101(3): 907-14.
- 68 Heffetz D, Rutter WJ, Zick Y. The insulinomimetic agents H2O2 and vanadate stimulate tyrosine phosphorylation of potential target proteins for the insulin receptor kinase in intact cells. *Biochem J* 1992; 288(5): 631-5.
- 69 Chen CH, Cheng TH, Lin H, Shih NL, Chen YL, Chen YS, *et al.* Reactive oxygen species generation is involved in epidermal growth factor receptor transactivation through the transient oxidization of SHP-2 in endothelin-1 signaling pathway in rat cardiac fibroblasts. *Mol Pharmacol* 2006; 69(4): 1347-55.
- 70 Rao GN. Hydrogen peroxide induces complex formation of SHC-Grb2-SOS with receptor tyrosine kinase and activates Ras and extracellular signal-regulated protein kinases group of mitogen-activated protein kinases. *Oncogene* 1996; 13(4): 713-9.
- 71 Nishida E, Gotoh Y. The MAP kinase cascade is essential for diverse signal transduction pathways. *Trends Biochem Sci* 1993; 18(4): 128-31.
- 72 Guyton KZ, Liu Y, Gorospe M, Xu Q, Holbrook NJ. Activation of mitogen-activated protein kinase by H2O2: Role in cell survival following oxidant injury. *J Biol Chem* 1996; 271(8): 4138-42.
- 73 Essers MA, Weijzen S, de Vries-Smits AM, Saarloos I, de Ruiter ND, Bos JL, *et al.* FOXO transcription factor activation by oxidative stress mediated by the small GTPase Ral and JNK. *EMBO J* 2004; 23(24): 4802-12.
- 74 Hu MC, Lee DF, Xia W, Golfman LS, Ou-Yang F, Yang JY, *et al.* IkappaB kinase promotes tumorigenesis through inhibition of forkhead FOXO3a. *Cell* 2004; 117(2): 225-37.
- 75 Sunayama J, Tsuruta F, Masuyama N, Gotoh Y. JNK antagonizes Akt-mediated survival signals by phosphorylating 14-3-3. *J Cell Biol* 2005; 170(2): 295-304.
- 76 Sunters A, Madureira PA, Pomeranz KM, Aubert M, Brosens JJ, Cook SJ, *et al.* Paclitaxel-induced nuclear translocation of FOXO3a in breast cancer cells is mediated by c-Jun NH2-terminal kinase and Akt. *Cancer Res* 2006; 66(1): 212-20.
- 77 Cory S, Huang DCS, Adams JM. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* 2003; 22(53): 8590-607.
- 78 Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin XM, Millman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 function in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 1993; 75(2): 241-51.
- 79 Narrima P, Paydar M, Looi CY, Wong YL, Taha H, Wong WF, *et al.* *Persea declinata* (Bl.) kosterm bark crude extract induces apoptosis in MCF-7 cells via G₀/G₁ cell cycle arrest, Bcl-2/Bax/Bcl-xl signaling pathways, and ROS generation. *Evid Based Complement Alternat Med* 2014; doi: 10.1155/2014/248103.
- 80 Tian W, Wei T, Li B, Wang Z, Zhang N, Xie G. Pathway of programmed cell death and oxidative stress induced by β -hydroxybutyrate in dairy cow abomasum smooth muscle cells and in mouse gastric smooth muscle. *PLoS One* 2014; 9(5): 1-12.
- 81 Zong WX. BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak. *Genes Dev* 2001; 15(12): 1481-6.
- 82 Green DR, Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 2004; 305(5684): 626-9.
- 83 Farrukh MR, Nissar UA, Afnan Q, Rafiq RA, Sharma L, Amin S, *et al.* Oxidative stress mediated Ca²⁺ release manifests endoplasmic reticulum stress leading to unfolded protein response in UV-B irradiated human skin cells. *J Dermatol Sci* 2014; 75(1): 5-16.
- 84 Wei H, Wei W, Bredesen DE, Perry DC. Bcl-2 protects against apoptosis in neuronal cell line caused by thapsigargin-induced depletion of intracellular calcium stores. *J Neurochem* 1998; 70(6): 2305-14.
- 85 Reynolds JE, Eastman A. Intracellular calcium stores are not required for Bcl-2-mediated protection from apoptosis. *J Biol Chem* 1996; 271(44): 27739-43.
- 86 Guo J, Liu S, Cheng X, Zhou J, Ke L, Chen X, *et al.* Revealing acupuncture meridian-like system by reactive oxygen species visualization. *Biosci Hypotheses* 2009; 2(6): 443-5.
- 87 Guo J, Chen Y, Yuan B, Liu S, Rao P. Effects of intracellular superoxide removal at acupoints with TAT-SOD on obesity. *Free Rad Biol Med* 2011; 51(12): 2185-9.
- 88 Guo J, Rao P. Is Acupuncture Meridians a Novel System for Superoxide Disposition. In: Marcelo Saad. *Acupuncture Concepts and Physiology*. Croatia: InTech, 2011, 81-100.
- 89 Yee C, Yang W, Hekimi S. The intrinsic apoptosis pathway mediates the pro-longevity response to mitochondrial ROS in *C. elegans*. *Cell* 2014; 157(4): 897-909.