doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.31.010

S- 亚硝基 -N- 乙酰 -DL- 青霉胺对 RAW264.7 巨噬细胞亚型 分化的影响 *

胡海英¹ 胡旭堂¹ 王志禄^{2△} 谢宛霞¹ 徐 芳¹ 蒙 颖¹ 朱 海¹ 白海渊¹ 元朝波¹ (1 兰州大学第—临床医学院 甘肃 兰州 730000;2 兰州大学第—医院心内科 甘肃 兰州 730000)

摘要 目的:探讨 S- 亚硝基 -N- 乙酰 -DL- 青霉胺(SNAP)对巨噬细胞亚型分化的影响及其机制。方法:以 RAW264.7 巨噬细胞为研 究对象,分为空白对照组、SNAP 组、SNAP+PBA(4- 苯基丁酸)组,采用不同浓度(30、100、300、400、500 μ mol/L)的 SNAP 或 300 μ mol/L SNAP+20 mmol/L PBA 对巨噬细胞进行干预 24 h,应用 RT-PCR 法检测 RAW264.7 巨噬细胞亚型分化标志物 M1(iNOS, CD86)、M2(Arg-I,MR)及 CHOP mRNA 的表达,应用 Western blot 技术检测 iNOS 及 ERS 通路中相关蛋白 CHOP、P-PERK 的表 达。结果:与空白对照组比较,SNAP 组 iNOS、CD86、CHOP mRNA 的表达均明显降低(P<0.05),Arg-ImRNA 表达明显升高(P<0.05),而 MR mRNA 表达升高,但差异无统计学意义(P>0.05);与 300 μ mol/L SNAP 组比较,300 μ mol/L+PBA 组 iNOS、CHOP mRNA 均无 明显变化(P>0.05),CD86 mRNA 升高,Arg-I、MR mRNA 均明显降低(P<0.05)。SNAP 组 CHOP、iNOS、p-PERK 蛋白表达均明显低 于对照组 (P<0.05), 300 μ mol/L SNAP+20 mmol/L PBA 组与 300 μ mol/L SNAP 组比较 iNOS 蛋白、p-PERK、CHOP 蛋白表达升高 (P<0.05)。结论:NO 可能通过内质网应激机制抑制巨噬细胞向 M1 亚型分化。

关键词:动脉粥样硬化;S-亚硝基-N-乙酰-DL-青霉胺;RAW264.7 巨噬细胞;M1 亚型;M2 亚型 中图分类号:R543.5 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2014)31-6039-05

Effect of S-nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine (SNAP) on the Subtype Differentiation of RAW264.7 Macrophages*

HU Hai-ying¹, HU Xu-tang¹, WANG Zhi-lu²², XIE Wan-xia¹, XU Fang¹, MENG Ying¹, ZHU Hai¹, BAI Hai-yuan¹, YUAN Chao-bo¹ (1 The First Affiliated Hospital, 2 Department of Cardiology, Lanzhou University, Lanzhou, Gansu, 730000, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect and mechanism of SNAP on the subtype differentiation of RAW264.7 macrophages. **Methods:** RAW264.7 macrophages were plated in 12 wells plate as 10%ml for 24 h before intervention of SNAP in different concentration (30, 100, 300, 400 and 500 μ mol/L) or 300 μ mol/L SNAP+20 mmol/L PBA. Total RNA of cells were extracted after intervention for 24 hours. The mRNA expression of phonetype marker iNOS, CD86 (as M1 phenotypes markers), MR, and Arginase-I (Arg-I) (as M2 phenotypes markers) were detected respectively by real time PCR. The protein expression of CHOP, p-PERK were detected by western blotting. **Results:** Compared with the control group, the iNOS, CD86 and CHOP mRNA expression significantly decreased(P<0.05), Arg-I mRNA expression increased, but no significant difference was found(P>0.05). Compared with 300 μ mol/L SNAP group, no remarkable difference was found in iNOS, CHOP mRNA expression of 300 μ mol/L+PBA group, but Arg-I, MR mRNA expression both significantly decreased (P<0.05). The protein expression of CHOP, iNOS and p-PERK of SNAP group were all significantly lower than those of the control group (P<0.05), compared with 300 μ mol/L SNAP group, the protein expression of CHOP, p-PERK, iNOS increased. **Conclusion:** SNAP could suppress macrophage differentiation to M1 subtype through endoplasmic reticulum stress (ERS).

Key words: Atherosclerosis(AS); SNAP; RAW264.7 macrophage; M1/M2 phenotypes Chinese library Classification: R737.33 Document code: A Article ID: 1673-6273(2014)31-6039-05

前言

巨噬细胞在动脉粥样硬化的发生、发展过程中发挥着关键 的作用,也是粥样斑块细胞成分的主要构成部分。血液中单核 细胞渗入到内皮下并分化为巨噬细胞,其不仅可以通过表面受体如清道夫受体(SPRs)、Toll 样受体(TLRs)等吞噬氧化变性的低密度脂蛋白形成泡沫细胞,而且和病灶局部的炎症及斑块的稳定性密切相关^[1,2]。粥样斑块内存在着 M1、M2 两种亚型巨噬

 ^{*} 基金项目:甘肃省自然科学研究基金项目(1010RJZA122);甘肃省卫生行业科研计划管理项目(GWGL2010-16) 作者简介:胡海英(1984-),女,硕士,医师,主要研究方向:动脉粥样硬化的发病机制,电话,13609312099,E-mail:HHXXHHY@163.com 胡旭堂(1981-),男,硕士,医师,主要研究方向:动脉粥样硬化的发病机制,电话:18298381021,E-mail:609728913@qq.com
 △通讯作者:王志禄,主任医师,教授,E-mail:wangzhilu@medmail.com.cn (收稿日期:2014-02-14 接受日期:2014-03-12)

细胞,其差异表达不同的表面抗原、受体、酶等。如 M1 巨噬细 胞高表达诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, i-NOS)、CD86, 而 M2 亚型巨噬细胞却高表达甘露糖受体(mannose receptor, MR)、精氨酸酶 [(arginase-I, Arg-I)等^[3]。不同亚型 巨噬细胞对泡沫细胞的形成及斑块的稳定性产生不同的影响 四,因此调控巨噬细胞亚型分化可能是治疗动脉粥样硬化的潜 在靶点^[4]。有研究报道内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)和巨噬细胞分化密切相关^[5,6],而NO可引发巨噬细胞内质 网应激变化^[7]。本研究通过观察 NO 释放剂 S- 亚硝基 -N- 乙酰 -DL- 青霉胺 (S-nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine, SNAP) 对 RAW 264.7 巨噬细胞分化标志物 iNOS 、CD86(鉴定 M1 亚型巨 噬细胞); MR、Arg-I(鉴定 M2 亚型巨噬细胞)^{18,9}及 ERS 通路中 的相关蛋白 C/EBP 同源蛋白(C/EBP homology protein, CHOP)、 磷酸化双链 RNA 依赖蛋白激酶样 ER 激酶(Phosphorylation protein kinase RNA (PKR)-like ER kinase, p-PERK)表达的影响, 旨在探讨 NO 对巨噬细胞亚型分化的影响及其可能机制,为临 床防治动脉粥样硬化提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

RAW 264.7 单核巨噬细胞购自中国科学院上海细胞库,高 糖 DMEM 培养基系美国 HyCLone 公司产品。新生胎牛血清购 自杭州四季青生物有限公司。SNAP、PBA 均购自美国 Sigma 公司,胰酶购自美国 Gibco 公司。小鼠 β-Actin、iNOS、CD86、 MR、Arg-1、CHOP 引物均由大连宝生物试剂公司合成。RNA 提 取、逆转录、SYBR@ Premix Ex Tap[™]II (Tli RNaseH Plus)均购 于大连宝生物试剂公司。兔抗小鼠 NOS2 多克隆一抗(sc-650)、 兔抗人 P-PERK 多克隆一抗 (sc-32577)、兔抗小鼠 GADD 153 (CHOP)(sc-575) 多克隆一抗均购自 Santa 公司, HRP 标记山羊 抗兔二抗购自 Raygene 公司。其余试剂均为进口或国产分析纯 试剂。

1.2 方法

细胞培养及实验分组:将 RAW 264.7 巨噬细胞置于加入 10%胎牛血清的高糖 DMEM 培养基中,此培养基中加入通过 0.22 µm 滤膜过滤除菌的 100 U/ml 青霉素和 100 U/ml 的链霉 素,37 ℃、5 % CO₂ 孵育箱内培养,2-3 代后处于对数生长期的 RAW 264.7 细胞用于实验。实验分组:(1)空白对照组:完全培 养基;(2) 不同浓度 SNAP 组:分别加入 30、100、300、400、500 µmol/L 的 SNAP 作用 24 小时;(3)PBA 干预组:预先用 20 mmol/L 的 PBA 孵育 24 h 后,再加入 300 µmol/L 的 SNAP 作 用 24 h^[10]。

1.3 荧光定量 PCR 检测 CD163、MR、CD86、iNOS、CHOP mR-NA 的表达

各组培养瓶中分别加入 1 mL Trizol RNA 提取试剂,按照 说明书操作提取 RNA,溶于 DEPC 处理水中。经核酸紫外线分 析仪检测,确定样本中 RNA 的含量及纯度(A260/A280)。按照 逆转录试剂盒操作说明进行逆转录,反应总体积为 10 μ L, RNA 为 500 ng,反应条件为 37 ℃、15 min,85 ℃ 灭火 5 s,反应 结束后,取 2 μ L cDNA 采用 SYBR II 嵌合荧光法直接进行扩 增。扩增引物序列见表 1。两部扩增法:条件为:一个循环 95 ℃ 、10 s;40 个循环,95 ℃、5 s,60 ℃、31 s。结束后进行溶解曲线 分析,通过观察溶解曲线是否为单一峰评价 PCR 反应产物的 特异性,每个反应设置 2 个复孔。所有 Real-time PCR 实验至少 重复 3 次。Real-time PCR 统计分析采用 2^{-△Δα}法, $\Delta \Delta$ Ct= 各 组 Δ Ct(目的基因 - 管家基因 Ct)-对照组 Δ Ct(目的基因 Ct-管家基因 Ct)。

表 1	RT-PCR 所用引物序列
Table 1	Primer sequences of RT-PCR

目的基因 Target gene	上游序列 Upstream sequences	下游序列 Downstream sequences	扩增长度 Length(bp)
CD86	TGACCGTTGTGTGTGTGTTCTGGA	GCCACAGTAACTGAAGCTGTAA	130
Arg1	TCTGGGAATCTGCATGG	TACACGATGTCTTTGGCAGATA	125
MR	TTCATCTTCGGGCCTTTG	GACCACTCCTGCTGCTTTAG	178
СНОР	CACGCACATCCCAAAG	GACCACTCTGTTTCCGTTTC	114
β-Actin	CATCCGTAAAGACCTCTATGCCAAC	ATGGAGCCACCGATCCACC	171

1.4 Western blotting 技术检测 CHOP、INOS、P-PERK 蛋白的表达

收集各组细胞,经 PBS 洗涤三次,加入蛋白裂解液裂解细胞,置冰上1h,于4℃、12000 rpm 离心 20 min,弃去沉淀。用 BCA 法进行蛋白定量。取 100 μg 蛋白溶于蛋白缓冲液,煮沸 5 分钟,使蛋白变性。用 6% SDS-聚丙烯胺凝胶进行电泳分离、转膜。5% 脱脂牛奶封闭1h后,分别加入一抗,4℃过夜。PBST 洗膜 10 min×3次,加入辣根过氧化物酶标记的二抗,室温孵育1h,PBST 洗膜 15 min×3次。把膜放于 WEST PICO 两分钟,压片,显影,检测特异性蛋白条带。凝胶成像系统拍照,将拍好的照片采用 ImageJ 软件进行灰度分析。

1.5 数据统计与分析

采用 SPSS 18.0 进行统计学分析,所有数据采用 \bar{x} ± s 表示,实验数据组间比较采用单样本或两样本 t 检验,两样本 t 检验时检验方差齐性,总体方差不齐时采用 Cochran & Cox 法,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SNAP 及 PBA 对 RAW264.7 巨噬细胞生长状态的影响

根据预定干预条件对 RAW 264.7 进行刺激 24 h 后,显微 镜下观察细胞的生长状态:空白对照组巨噬细胞形态以类圆形 为主,500 µmol/LSNAP 干预组存活的细胞状态较差,与正常培养条件下的细胞相比,贴壁能力较弱。而中小剂量 SNAP 及

300 μmol/L SNAP+20 mmol/L PBA 干预组的细胞存活率高,细胞状态较正常培养情况下并无太多改变(图 1)。



图 1 SNAP 及 PBA 对 RAW264.7 巨噬细胞生长状态的影响 Fig. 1 Effect of SNAP and PBA on the growth and morphology of RAW264.7 macrophages 注:a、b、c、d、f 分别为空白对照组、30、100、300、500 μmol/L SNAP 干预组,e为 300 μmol/L SNAP+20 mmol/L PBA 组 的光镜照片(10×)。

Note: Picture a was the blank control group, b was 30 μmol/L SNAP intervention group, c was 100 μmol/L SNAP intervention group, d was 300 μmol/L SNAP intervention group, f was 500 μmol/L SNAP intervention group, e was 300 μmol/L SNAP +20 mmol/L PBA group electron micrograph(10×).

2.2 SNAP 及 PBA 对 RAW264.7 巨噬细胞 iNOS、CD86、 Arg-1、MR mRNA 表达的影响

不同浓度 SNAP 作用于 RAW 264.7 巨噬细胞 24 h 后,其 iNOS、CD86 mRNA 的表达均明显低于空白对照组(P<0.05); Arg-I mRNA 表达明显高于空白对照组(P<0.05),且 300 μmol/L SNAP 处理后其升高最明显; MR mRNA 表达升高,但差异无统 计学意义(P>0.05)。300 μmol/L SNAP 和 20 mmol/L PBA 作用 于 RAW 264.7 巨噬细胞 24 h 后,其 iNOS mRNA 的表达与 300 μmol/L SNAP 干预组比较无明显变化,CD86 mRNA 表达明显 升高 (P<0.05),Arg-I、MR mRNA 表达均显著降低 (P<0.05)(图 2)。

2.3 SNAP 及 PBA 对 RAW264.7 巨噬细胞 CHOP mRNA 表达的影响

不同浓度 SNAP(30、100、300、400、500 μmol/L)SNAP 作用 于 RAW264.7 巨噬细胞 24 h 后,其 CHOP mRNA 表达均较空 白对照组明显下降 (P<0.05);300 μmol/L SNAP 和 20 mmol/L PBA 作用于 RAW264.7 巨噬细胞后,其 CHOP mRNA 表达与 300 μmol/L SNAP 干预组比较无明显差异(P>0.05)(图 3)。

2.4 SNAP 和 PBA 对 RAW264.7 巨噬细胞内 CHOP、iNOS、 p-PERK 蛋白含量的影响

与空白对照组比较,不同浓度(30、100、300 μmol/L)SNAP 组 CHOP、p-PERK、iNOS 蛋白表达均明显降低,差异有统计学 意义 (P<0.05),PBA 组 CHOP、iNOS、p-PERK 蛋白表达无明显 变化(P<0.05);300 μmol/L SNAP+20 mmol/L PBA 组 iNOS 蛋、 p-PERK、CHOP 蛋白表达较 300 μmol/L SNAP 组显著增加 (P<0.05)。 一氧化氮除了扩张血管作用外对动脉粥样硬化的影响也 是多方面的^[11],如 Martinet 等证实 NO 可以选择性促进巨噬细 胞凋亡而使动脉粥样斑块更加稳定^[12]。此外,NO 还参与机体炎 症、免疫反应过程^[13],iNOS 可以被细胞因子、内毒素等诱导表 达。在炎症、免疫防御过程中 M1 巨噬细胞可以通过表达 iNOS 产生 NO 发挥其杀菌及杀死肿瘤细胞的作用,并可造成自身组 织的损伤^[14]。NO 渗透性强,是炎症反应局部重要的活性物质 ^[15]。我们的实验证明 NO 可降低 M1 巨噬细胞亚型标志物 iN-OS、CD86 的表达,并可能增加 M2 巨噬细胞亚型标志物 Arg-I 的表达,这可能会抑制巨噬细胞向 M1 亚型巨噬细胞分化,在



图 2 SNAP 和 PBA 对 RAW264.7 巨噬细胞 iNOS、Arg-I、CD86、MR mRNA 表达的影响

Fig. 2 The effect of SNAP and PBA on the mRNA expression of iNOS, Arg-I, CD86, MR in RAW264.7 macrophages

* 注:**"***P<0.05**"**表示与对照组比较有显著差异。"☆P<0.05**"**表示与 300 μmol/L SNAP 干预组比较有显著差异。

Note: "" indicated there was significant difference the compared with the control group(P<0.05).(☆ "indicated there was significant difference compared with 300 µmol/L SNAP intervention group(P<0.05).</p> •







Note:"" indicated there was significant difference the compared with the blank control group(P<0.05).



图 5 SNAP 和 PBA 对 RAW264.7 巨噬细胞内 CHOP、iNOS、p-PERK 蛋白表达的影响

Fig .5 The effect of SNAP and PBA on the protein expression of CHOP, iNOS and p-PERK in RAW264.7 macrophages

*注:"☆P<0.05"表示与 300 µmol/L SNAP 干预组比较有显著差异。
Note:"" indicated there was significant difference the compared with the control group(P<0.05).☆"indicated there was significant difference compared with 300 µ mol/L SNAP intervention group(P<0.05).

炎症局部可能通过这种负反馈作用调节炎症过程,同样也可能 影响动脉粥样硬化病程。

NO是 M1 巨噬细胞在炎性过程中分泌的一种重要的作用 因子,当巨噬细胞受到微生物、脂多糖等刺激向 M1 亚型分化 时,细胞内 iNOS 表达增加,其可将精氨酸转化为 NO 和瓜氨 酸,在 M2 亚型巨噬细胞内 Arg-I 表达增加,其可与 iNOS 竞争 共同底物,将精氨酸转化为鸟氨酸而使 NO 的合成减少,而鸟 氨酸是多肽和脯氨酸的前体,和细胞的分化,修复等密切相关¹⁹。 iNOS 和 Arg-I 分别可作为鉴定 M1、M2 亚型巨噬细胞的标



图 4 各组细胞 CHOP、iNOS、p-PERK 蛋白表达水平的免疫印迹结果 Fig. 4 CHOP, iNOS, p-PERK protein expressions in the RAW264.7 macrophages detected by Western blotting

* 注:1 为对照组、2 为 30 μmol/L SNAP 组、3 为 100 μmol/L SNAP 组、 4 为 300 μmol/L SNAP 组、5 为 300 μmol/L SNAP+20 mmol/L PBA 干 预组。

*Note:1 indicated control group, 2 was 30 μmol/L intervention group, 3 was 100 μmol/L intervention group, 4 was 300 μmol/L intervention group. and 5 was 300 μmol/L SNAP and 20 mmol/L PBA intervention group.

志物。J. Assreuy 等的实验证实 NO 可以直接抑制 iNOS 活性^[17]。我们的实验进一步证实 NO 可抑制 iNOS 基因的转录,而不 是仅仅抑制 iNOS 酶活性发挥负反馈作用。

内质网是一种膜性细胞器,其功能与蛋白质折叠、成熟及 跨膜转运相关。在细胞分化、环境改变及不同的生理阶段都可 以发生内质网应激,主要为未折叠蛋白反应,其需要 3 种内质 网定位蛋白参与,其中 P-PERK 可通过磷酸化真核生物起始因 子 2(eIF2)及氨基末端激酶(JNK)通路发挥作用。内质网应激和 巨噬细胞及动脉粥样硬化密切相关^[18,19]。多项研究报道 NO 可 以通过内质网应激机制引起巨噬细胞凋亡^[1,20],而 2012 年 Jisu Oh.等报道内质网应激是促进巨噬细胞向 M2 亚型分化的机制 并推测其可能是通过 JNK、PPAR-γ 通路发挥作用^[5]。我们的实 验发现 NO 干预巨噬细胞 24 小时后其内质网应激标志物 CHOP、p-PERK 表达降低,这可能和内质网应激随时间变化及 检测的时间点有关^[12],而 NO 和内质网应激及巨噬细胞亚型分 化的关系还需进一步的研究。

巨噬细胞是动脉粥样硬化斑块内细胞的主要构成部分,不 同亚型巨噬细胞对泡沫细胞的形成、坏死及斑块的稳定性具有 不同的效果[221],因此其平衡对病程的发展及斑块的稳定有重 要影响。斑块的破裂并形成血栓是引起急性心血管事件的主要 原因,但目前还没有专门针对动脉斑块稳定性的治疗措施,因 此有人提出以调控斑块内巨噬细胞亚型分化为靶点,通过改变 不同亚型巨噬细胞的比例来改善或控制动脉粥样硬化的病程 进展^[2]。但不同亚型巨噬细胞对动脉粥样硬化病程是复杂的, 在动脉粥样硬化早期斑块内主要为 M2 亚型巨噬细胞,发展到 后期时 M1 亚型巨噬细胞增多。有人认为这种变化可能是引起 病程进展的关键,由于 M2 减少而致使"胞葬"作用减弱引发二 次坏死及 M1 亚型巨噬细胞增多,其分泌的促炎物质等招募更 多的炎性细胞到局部等都加重局部的炎性反应。同时,由于引 起斑块内平滑肌死亡并分泌基质金属蛋白激酶致使斑块不稳 定容易破裂。但巨噬细胞亚型改变的机制不十分清楚,有实验 认为是招募到血液中单核细胞亚型改变引起,也有认为是斑块 内环境变化使巨噬细胞亚型分化改变引起的^[23]。不同亚型巨噬 细胞对泡沫细胞形成的影响也有不同的观点。有实验结果显示 M2 亚型巨噬细胞有更强吞噬变性脂质的能力,其胞质内脂滴 更大,更易形成泡沫细胞,但也有其他实验报告不同的结果^[24]。 本实验研究证实 NO 可以抑制巨噬细胞向 M1 亚型分化,可能 和内质网应激相关,其具体机制及在动脉粥样硬化病程中的影 响还需要进一步的研究。

参考文献(References)

- Moore K J, Tabas I. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis[J]. Cell, 2011, 145(3): 341-355
- [2] Williams H J, Fisher E A, Greaves D R. Macrophage Differentiation and Function in Atherosclerosis: Opportunities for Therapeutic Intervention?[J]. Journal of Innate Immunity, 2012, 4(5-6): 498-508
- [3] St Ger J L, Gijbels M J, Van Der Velden S, et al. Distribution of macrophage polarization markers in human atherosclerosis [J]. Atherosclerosis, 2012, 225: 461-468
- [4] Ley K, Miller Y I, Hedrick C C. Monocyte and macrophage dynamics during atherogenesis [J]. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2011, 31(7): 1506-1516
- [5] Oh J, Riek A E, Weng S, et al. Endoplasmic reticulum stress controls M2 macrophage differentiation and foam cell formation[J]. Journal of Biological Chemistry, 2012, 287(15): 11629-11641
- [6] Cullen S J, Fatemie S, Ladiges W. Breast tumor cells primed by endoplasmic reticulum stress remodel macrophage phenotype [J]. American journal of cancer research, 2013, 3(2): 196-210
- [7] Gotoh T, Oyadomari S, Mori K, et al. Nitric oxide-induced apoptosis in RAW 264.7 macrophages is mediated by endoplasmic reticulum stress pathway involving ATF6 and CHOP [J]. Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(14): 12343-12350
- [8] Bouhlel M, Derudas B, Rigamonti E, et al. PPAR A activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with antiinflammatory properties[J]. Cell metabolism, 2007, 6(2): 137-143
- [9] Khallou-Laschet J, Varthaman A, Fornasa G, et al. Macrophage plasticity in experimental atherosclerosis [J]. PLoS One, 2010, 5(1): e8 852
- [10] Carlisle R E, Brimble E, Werner K E, et al. 4-Phenylbutyrate Inhibits Tunicamycin-Induced Acute Kidney Injury via CHOP/GADD153 Repression[J]. PLoS One, 2014, 9(1): e84663
- [11] Butt H. Nitric oxide and atherosclerosis: possible implications for therapy[J]. Molecular medicine today, 1996, 2(12): 510-518
- [12] Martinet W, Croons V, Timmermans J P, et al. Nitric oxide

selectively depletes macrophages in atherosclerotic plaques via induction of endoplasmic reticulum stress [J]. British journal of pharmacology, 2007, 152(4): 493-500

- [13] Wink D A, Hines H B, Cheng R Y, et al. Nitric oxide and redox mechanisms in the immune response[J]. Journal of leukocyte biology, 2011, 89(6): 873-891
- [14] Tuteja N, Chandra M, Tuteja R, et al. Nitric oxide as a unique bioactive signaling messenger in physiology and pathophysiology[J]. Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2004, 2004(4): 227-237
- [15] Nussler A K, Billiar T. Inflammation, immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase[J]. Journal of leukocyte biology, 1993, 54(2): 171-178
- [16] Mori M, Gotoh T. Regulation of nitric oxide production by arginine metabolic enzymes [J]. Biochemical and biophysical research communications, 2000, 275(3): 715-719
- [17] Assreuy J, Cunha F, Liew F, et al. Feedback inhibition of nitric oxide synthase activity by nitric oxide [J]. British journal of pharmacology, 1993, 108(3): 833-837
- [18] Ozcan L, Tabas I. Role of endoplasmic reticulum stress in metabolic disease and other disorders [J]. Annual review of medicine, 2012, 63: 317
- [19] Scull C M, Tabas I. Mechanisms of ER stress-induced apoptosis in atherosclerosis[J]. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2011, 31(12): 2792-2797
- [20] Oyadomari S, Takeda K, Takiguchi M, et al. Nitric oxide-induced apoptosis in pancreatic A cells is mediated by the endoplasmic reticulum stress pathway[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2001, 98(19): 10845-10850
- [21] Lee R H, Vazquez G. Evidence for a prosurvival role of alpha\7 nicotinic acetylcholine receptor in alternatively (M2).\activated macrophages[J]. Physiological Reports, 2013, 1(7): e001890
- [22] Mantovani A, Garlanda C, Locati M. Macrophage Diversity and Polarization in Atherosclerosis A Question of Balance [J]. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2009, 29(10): 141 9-1423
- [23] Leitinger N, Schulman I G. Phenotypic polarization of macrophages in atherosclerosis [J]. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2013, 33(6): 1120-1126
- [24] St Ger J L, Gijbels M J, Van Der Velden S, et al. Distribution of macrophage polarization markers in human atherosclerosis [J]. Atherosclerosis, 2012, 225(2): 461-468