

TNF- α 在 IFN- γ 诱导的感染牛分枝杆菌的 THP-1 细胞凋亡过程中的作用及相关信号通路分析

张交儿¹, 王志远², 黄 璞¹, 王 洋¹, 尹晓敏¹, 周向梅¹, 赵德明^{1*}

(1. 中国农业大学 国家动物海绵状脑病实验室, 北京 100193; 2. 山东畜牧兽医职业学院, 潍坊 261060)

摘 要: 为研究 IFN- γ 对感染牛分枝杆菌的 THP-1 细胞的促凋亡作用, 及 TNF- α 在此细胞凋亡过程中的作用和相关信号分子的变化, 使用浓度为 15 ng · mL⁻¹ 的 IFN- γ 作用于不同剂量牛分枝杆菌北京株(MOI10 : 1, 20 : 1) 感染的 THP-1 细胞, 在感染后 12、24、36、48 和 72 h, 使用流式细胞仪测定细胞凋亡百分比。结果显示, IFN- γ 诱导了 *M. bovis* 北京株感染的细胞凋亡, 并且凋亡呈时间相关性。随着细胞凋亡百分比的增加, 牛分枝杆菌的 CFU 降低。在 IFN- γ 和 *M. bovis* 北京株(MOI10 : 1) 处理的巨噬细胞内加入抗 TNF- α 单克隆抗体, 感染后 36 h, 细胞凋亡百分比测定结果显示, 加入抗 TNF- α 单抗抑制了 IFN- γ 诱导的 *M. bovis* 感染的 THP-1 细胞的凋亡, 与对照组相比, 差异显著($P < 0.05$); 用分光光度计检测表明 Caspase-3 和 Caspase-8 的激活是 TNF- α 依赖性的。在 IFN- γ 和 *M. bovis* 北京株(MOI10 : 1) 作用的 THP-1 细胞内分别加入 JNK inhibitor I 或 NEMO-Binding Domain Binding Peptide, 或同时加入 2 种抑制剂, 36 h 后测定细胞凋亡情况, 与对照组相比, 加入抑制剂后, 细胞凋亡无显著差异($P > 0.05$), 说明在本试验中, JNK 通路和 NF- κ B 凋亡通路未被激活。本研究初步阐明了 TNF- α 在 IFN- γ 诱导的感染牛分枝杆菌的细胞凋亡过程中的作用及相关信号通路。

关键词: 牛分枝杆菌; IFN- γ ; THP-1 细胞; 细胞凋亡; TNF- α ; 信号通路

中图分类号: S852.618

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2010)05-0581-06

Study of TNF- α Mediated Signal Pathway Involved in IFN- γ -Promoted Apoptosis of THP-1 Cells during Infection with *Mycobacterium bovis*

ZHANG Jiao-er¹, WANG Zhi-yuan², HUANG Ying¹, WANG Yang¹, YIN Xiao-min¹,
ZHOU Xiang-mei¹, ZHAO De-ming^{1*}

(1. National Animal BSE Laboratory, China Agricultural University, Beijing 100193, China;
2. Shandong Vocational Animal Science and Veterinary College, Weifang 261060, China)

Abstract: This experiment was conducted to study the promoting effect of IFN- γ on apoptosis of THP-1 cells infected with *Mycobacterium bovis*, and the role of TNF- α and its relevant signal molecules during cell apoptosis. IFN- γ (15 ng · mL⁻¹) was added to PMA differentiated THP-1 cells infected with *M. bovis*-BJ at different dose of MOI (10 : 1, 20 : 1), the percentage of apoptotic cells were analyzed by flow cytometry at 12, 24, 36, 48 and 72 h post infection. The results showed that IFN- γ promoted apoptosis of THP-1 cells infected with *M. bovis* was in a time-dependent manner. As incidence of apoptotic *M. bovis* - infected THP-1 cells treated with IFN- γ increased, the number of viable bacilli decreased. Anti-TNF- α monoclonal antibodies (3.0 μ g · mL⁻¹, Mab) were added to THP-1 cells treated with IFN- γ and *M. bovis* (MOI, 10 : 1), and the percentage of apoptotic cells and caspase-3, 8, 9 activity were determined at 36 h post infection. The results showed that the addition of anti-TNF- α Mab inhibited apoptosis of THP-1 cells

收稿日期: 2009-08-10

基金项目: 国家科技支撑计划(2006BAD06A13; 2008BAK42B08-5)

作者简介: 张交儿(1976-), 男, 山西石楼人, 博士, 主要从事动物分子与免疫病理学研究, E-mail: jiaozhang2002@yahoo.com.cn

* 通讯作者: 赵德明, E-mail: zhaodm@cau.edu.cn

treated with IFN- γ and *M. bovis*. A significant difference was found in the THP-1 cells treated with IFN- γ and *M. bovis* in the presence or absence of anti-TNF- α Mab ($P < 0.05$), and that caspase-3 and caspase-8 were activated via a TNF- α dependent manner. THP-1 cells treated with IFN- γ and *M. bovis*-BJ were incubated for 36 hours in the presence of the following reagents: JNK inhibitor I or NEMO-Binding Domain (NBD) Binding Peptide alone, or the two inhibitors combined. No significant difference of THP-1 cells apoptosis in the presence or absence of the two inhibitors were observed ($P > 0.05$), indicating that JNK and NF- κ B signal pathways are unlikely to be activated. This study elucidated that TNF- α associated in signal pathway of THP-1 cell apoptosis promoted by IFN- γ during early infection with *Mycobacterium bovis*.

Key words: *Mycobacterium bovis*; Interferon- γ ; THP-1 cells; apoptosis; TNF- α ; signal pathway

结核病(tuberculosis)是由牛分枝杆菌(*Mycobacterium bovis*)和结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)感染引起的一种慢性、消耗性人兽共患传染病。作为一种具有广泛宿主谱的致病因子,牛分枝杆菌除了感染多种动物外,还可通过呼吸道、消化道,偶尔通过损伤的皮肤或黏膜引起人的结核病。据统计,在世界范围内,由牛分枝杆菌感染引起的结核病约占人类结核病例的10%^[1-2]。牛分枝杆菌感染引起的动物源性结核病,除了造成巨大的经济负担外,还对人类的健康构成极大的威胁。牛分枝杆菌感染宿主后,主要定居于网状内皮细胞系统,尤其是巨噬细胞内。研究表明,有毒力的分枝杆菌可通过多种机制逃避巨噬细胞的杀灭作用^[3]。巨噬细胞凋亡是一种重要的抗细胞内病原的先天性免疫防御机制,在分枝杆菌与巨噬细胞的相互作用中发挥重要作用^[4-5]。

IFN- γ 是一种重要的细胞因子,在巨噬细胞激活和抗细胞内病原过程中发挥重要作用。研究发现,编码IFN- γ 的基因敲除鼠,一旦感染结核分枝杆菌,由于不能限制细菌在细胞内生长而很快死亡。IFN- γ 在感染分枝杆菌的巨噬细胞中的作用也已得到证实^[6-7]。体外试验表明,当感染牛分枝杆菌时,IFN- γ 促进了牛肺泡巨噬细胞的凋亡,并且这种凋亡依赖于内源性TNF- α 的产生^[8]。

THP-1细胞是人的急性单核细胞性白血病来源的细胞系,在PMA刺激后,可分化为巨噬细胞的表型。作为一种有用的细胞模型,THP-1细胞被广泛应用于分枝杆菌与巨噬细胞的相互作用研究^[9-10]。当人感染致病性分枝杆菌时,IFN- γ 是否在巨噬细胞凋亡中起作用,至今仍不清楚。本试验研究了TNF- α 在IFN- γ 诱导的感染牛分枝杆菌的THP-1细胞凋亡中的作用,以及细胞凋亡过程中

TNF-R1相关的信号通路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与细胞系 牛分枝杆菌菌株C68006由中国兽医药品监察所国家菌种保藏中心提供;THP-1细胞系(ATCC No. TIB-202)购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。

1.1.2 试剂及培养基 重组人IFN- γ 购自美国Perotech Inc.公司,phorbol 12-myristate 13-acetate(PMA)购自美国Sigma公司;TNF- α (P/T2)抗肿瘤坏死因子单克隆抗体购自美国Santa Cruz Biotechnology, Inc;NK Inhibitor I和NEMO-Binding Domain Binding Peptide(NBD binding peptide),购自美国Calbiochem;喜树碱购自碧云天生物技术研究;Z-VAD-fmk(benzyloxy-carbonyl-Val-Ala-Asp-fluoromethyl ketone),购自日本MBL Co. Ltd. 7H9液体培养基,7H11固体培养基及OADC营养液均购自美国BD公司。AnnexinV-EGFP细胞凋亡检测试剂盒及Caspase-3、Caspase-8和Caspase-9分光光度法检测试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司。

1.2 方法

1.2.1 THP-1细胞的分化及*M. bovis*的培养

将THP-1细胞培养48 h后,更换新鲜培养基,使其继续生长12 h,细胞计数,然后将其接种至24孔培养板,调整细胞数为每孔 2×10^5 个。然后每孔加入PMA,使其终浓度为 $60 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 培养18~24 h后,更换新鲜培养基,继续培养48~60 h。每隔24 h,倒置显微镜下观察PMA分化的THP-1细胞一次,使其完全分化为巨噬细胞表型。将冻干保存的牛分枝杆菌北京株,用生理盐水

溶解,然后取0.1 mL,直接接种到7H9液体培养基,然后37℃恒温培养10~14 d,将系列稀释的菌液接种于含OADC的7H11固体培养基,每个梯度接种3个平板。14 d后计算其平均CFU。

1.2.2 *M. bovis* 体外感染分化的THP-1细胞

感染前,24孔板内分化为巨噬细胞表型的THP-1细胞用无菌的PBS洗2次,将已测定浓度的牛分枝杆菌在37℃培养2 h后,按不同稀释倍数制备细菌溶液并加入PMA分化的THP-1细胞,37℃孵育4 h。使用抗酸染色法调整感染比例,使MOI分别为5:1、10:1、20:1和30:1,同时设立未感染细胞为阴性对照。每个MOI组设3个重复。

1.2.3 感染*M. bovis*的THP-1细胞凋亡检测

把THP-1细胞接种于24孔培养板,37℃、5%CO₂恒温培养,调整细胞密度为 2×10^5 个·孔⁻¹,PMA分化使其转化为巨噬细胞表型。牛分枝杆菌感染前12 h,把 $15 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ IFN- γ 加入PMA分化的THP-1细胞,感染牛分枝杆菌北京株(MOI 10:1)的同时再补充加入等量的IFN- γ ,再加入 $3.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 抗TNF- α 单克隆抗体,以未加抗TNF- α 单抗、IFN- γ 刺激的感染牛分枝杆菌的THP-1细胞作为对照。每个处理设3个重复。37℃、5%CO₂恒温培养。细胞培养36 h后,收集细胞,使用AnnexinV-EGFP细胞凋亡检测试剂盒对各组细胞进行染色(按说明书操作),通过流式细胞仪检测细胞凋亡。

1.2.4 IFN- γ 诱导的感染THP-1凋亡过程中

Caspase-3、-8和-9信号通路检测 牛分枝杆菌感染前12 h,将 $15 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ IFN- γ 加入PMA分化的THP-1细胞,感染*M. bovis*北京株(MOI 10:1)的同时再补充加入等量的IFN- γ ,加入 $3.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 抗TNF- α 单克隆抗体或 $3.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 抗TNF- α + $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Z-VAD-fmk或 $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Z-VAD-fmk,以IFN- γ 刺激的感染牛分枝杆菌的THP-1细胞作为对照。37℃、5%CO₂恒温培养。每个处理组设4个重复。细胞培养36 h后,加入含EDTA的0.25%胰酶,37℃消化20 min,悬浮细胞。按照Caspase-3、Caspase-8和Caspase-9分光光度法检测试剂盒的方法,通过计算OD诱导剂/OD阴性对照的值来确定凋亡诱导剂组Caspase活化程度。

1.2.5 IFN- γ 诱导的*M. bovis*感染的THP-1细胞

凋亡中NF- κ B和JNK信号通路检测 在IFN- γ 处理并感染牛分枝杆菌的THP-1细胞中加入如

下试剂:JNK Inhibitor I(JNK组)或NBD Binding Peptide(NF- κ B组)或2种抑制剂的混合物(JNK+NF- κ B组)。仅牛分枝杆菌感染的PMA分化的THP-1细胞作为阴性对照,补充有喜树碱的牛分枝杆菌感染的细胞作为阳性对照。每个处理组设3个重复。37℃、5%CO₂孵育36 h,用无菌的PBS洗2次,加入不含EDTA的0.25%胰酶,37℃消化20 min使细胞悬浮。细胞凋亡检测方法同1.2.3。

1.2.6 统计学分析 根据以上各组的试验数据,使用SPSS15.0软件进行统计学分析。结果表示为“ $\bar{x} \pm s$ ”形式,采用“One-way ANOVA”法进行差异显著性分析, $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果

2.1 THP-1细胞的培养与分化

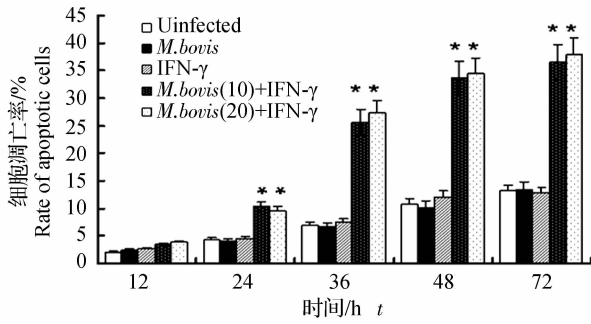
未诱导时,THP-1细胞在RPMI1640完全培养基中悬浮生长,细胞呈圆形或卵圆形,胞质较透亮,细胞核较大,无伪足或触角;THP-1细胞经 $60 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ PMA诱导60 h后,细胞伸出伪足,贴壁生长,质核比例增加,从形态学上可看出诱导后的细胞已经由悬浮的单核细胞株转化为了具有巨噬细胞特征的贴壁细胞。

2.2 *M. bovis*感染THP-1细胞最佳MOI的确定

IFN- γ 诱导了感染牛分枝杆菌的THP-1的凋亡,且诱导的细胞凋亡率呈时间相关性,随着时间的延长,细胞的凋亡率增加(图1)。在IFN- γ 诱导感染牛分枝杆菌北京株的THP-1细胞后的不同时间(12 h除外),凋亡细胞数差异显著($P < 0.05$)。未感染牛分枝杆菌的THP-1细胞和只感染牛分枝杆菌但未用IFN- γ 刺激的细胞仅发生极少量凋亡。相同时间点,MOI 10:1和MOI 20:1的感染量,IFN- γ 诱导的细胞凋亡无显著差异($P > 0.05$)

2.3 IFN- γ 降低了PMA分化的THP-1细胞内*M. bovis*的存活量

在不同时间,用流式细胞仪检测IFN- γ 诱导的感染牛分枝杆菌细胞凋亡的同时,收获平行孔内的细胞,将其接种于7H11培养基,37℃培养约2周后计算细菌CFU。结果显示,随着IFN- γ 诱导的细胞凋亡率增加,感染细胞内的活菌数降低。感染后12 h,仅有 $10.41\% \pm 0.98\%$ 的IFN- γ 刺激的感染THP-1细胞凋亡,细胞内的活菌数为 $(2.91 \pm 0.15) \times 10^6$ 。72 h,细胞凋亡率为 $36.34\% \pm 2.49\%$ 时,CFU进一步降低到 $(2.1 \pm 0.2) \times 10^6$ 。

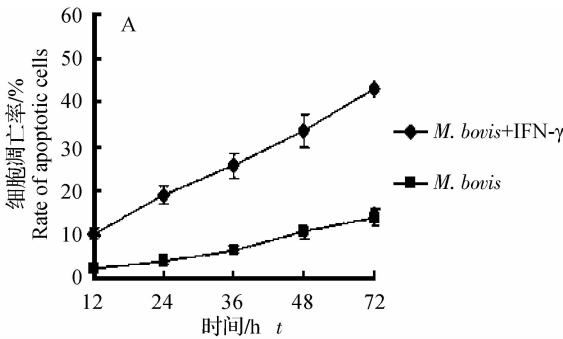


*. $P < 0.05$

图1 IFN- γ 以时间相关性的方式促进了感染牛分枝杆菌北京株的THP-1的凋亡

Fig. 1 The occurrence of apoptotic THP-1 cells with IFN- γ stimulation and *M. bovis*-BJ infection increased in a time dependent manner

然而,只感染牛分枝杆菌的PMA分化的THP-1细胞内细菌CFU仅轻微降低(图2)。



2.4 抗TNF- α 单克隆抗体降低了IFN- γ 诱导的感染*M. bovis*的THP-1细胞的凋亡

IFN- γ 诱导的感染牛分枝杆菌北京株的THP-1细胞中加入抗TNF- α 单克隆抗体,细胞凋亡结果显示,加入抗TNF- α 单抗显著降低了细胞的凋亡(图3)。与未加抗TNF- α 单抗的IFN- γ 刺激的感染细胞凋亡率 $33.19\% \pm 2.42\%$ 相比,加入抗TNF- α 单抗后,细胞的凋亡率降低到 $10.85\% \pm 1.56\%$,表明IFN- γ 诱导的感染牛分枝杆菌北京株的细胞凋亡主要是由TNF- α 介导的。加入抗TNF- α 单抗或Z-VAD-fmk的试验组与仅用IFN- γ 刺激的THP-1细胞组相比,差异显著($P < 0.05$)。

2.5 IFN- γ 刺激的感染*M. bovis*的THP-1细胞凋亡过程中Caspase-3、Caspase-8和Caspase-9活性增加

IFN- γ 刺激的感染*M. bovis*北京株的THP-1细胞在 37°C 孵育36h后,使用Caspase分光光度法检测试剂盒测定Caspase-3、Caspase-8和Caspase-9激

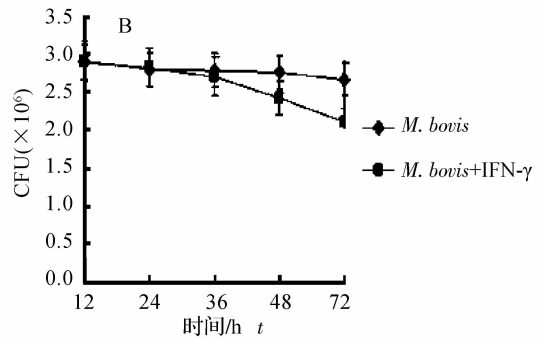
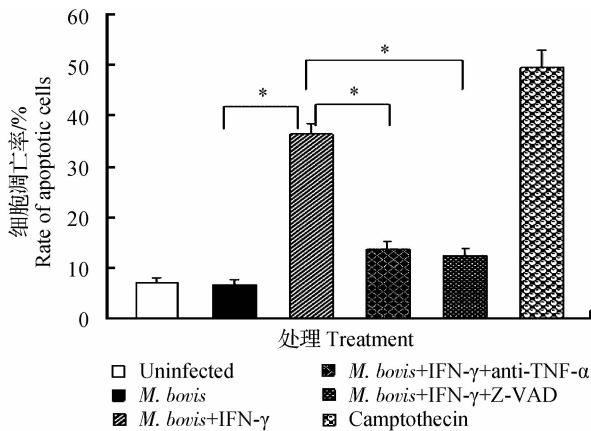


图2 IFN- γ 诱导的THP-1细胞凋亡(A)与细胞内牛分枝杆菌CFU降低(B)有关

Fig. 2 Apoptosis(A) of THP-1 cells with IFN- γ treatment and *M. bovis* infection is linked to decreased CFU(B)



*. $P < 0.05$

图3 加入抗TNF- α 单克隆抗体显著降低了IFN- γ 诱导的感染*M. bovis*的THP-1细胞的凋亡

Fig. 3 The addition of anti-TNF- α Mab decreased apoptosis of THP-1 cells with IFN- γ treatment and *M. bovis* infection

活情况。结果显示,IFN- γ 和牛分枝杆菌共同处理的THP-1细胞显著诱导了Caspase的激活。当在培养细胞中加入广谱Caspase抑制剂Z-vad-fmk和抗TNF- α 单抗后,Caspase-3、Caspase-8和Caspase-9的酶活性显著降低,与仅由IFN- γ 诱导组相比,差异显著($P < 0.05$)(图4)。

2.6 IFN- γ 诱导的感染*M. bovis*的THP-1细胞凋亡过程中未观察到JNK信号通路和NF- κB 信号通路的激活

将2种抑制剂JNK Inhibitor I或NBD Binding Peptide单独或同时加入IFN- γ 诱导的感染*M. bovis*的THP-1细胞, 37°C 孵育36h后用流式细胞仪测定其细胞凋亡百分率。统计分析结果表明,2种信号通路抑制剂单独或共同加入时,细胞凋亡的发生率无显著差异($P > 0.05$)。并且,在JNK和

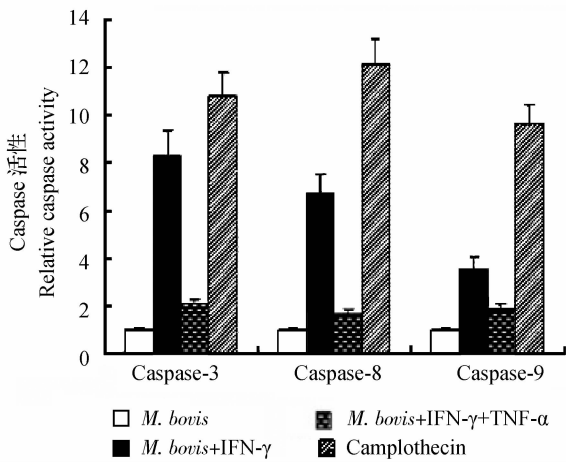


图4 IFN- γ 诱导的 *M. bovis* 的 THP-1 细胞孵育 36 h 后 Caspase-3、Caspase-8 和 Caspase-9 的激活

Fig. 4 Caspase activation of Caspase-3, Caspase-8, Caspase-9 in THP-1 cells with IFN- γ and *M. bovis* (MOI 10) incubated for 36 h

NF- κ B 信号通路抑制剂处理组和未处理组也无显著差异($P>0.05$)(图5)。

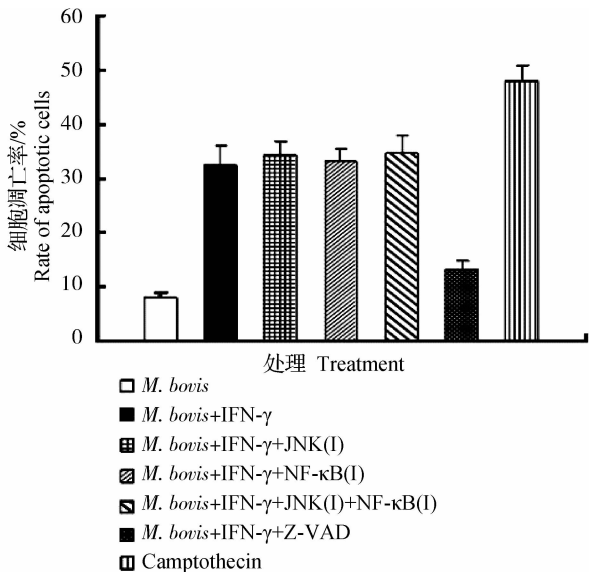


图5 使用不用抑制剂处理的 IFN- γ 诱导的感染牛分枝杆菌的 THP-1 细胞凋亡百分率

Fig. 5 Percentage of apoptosis in PMA differentiated THP-1 treated with IFN- γ and *M. bovis*-BJ in the presence of JNK and NF- κ B pathway inhibitors

3 讨论

作者研究了 IFN- γ 在诱导牛分枝杆菌北京株感染的巨噬细胞凋亡方面的作用。结果表明,IFN- γ 诱导了感染牛分枝杆菌巨噬细胞的凋亡。并且,

细胞凋亡与其杀菌活性有关。

TNF- α 是一种重要的细胞因子,据报道,TNF- α 在分枝杆菌感染的巨噬细胞凋亡过程中起作用^[11-12]。当肺泡巨噬细胞感染结核分枝杆菌的致弱株或无毒株时,细胞凋亡以 TNF- α 依赖性方式进行,并且在凋亡过程中,有 Caspase-3 和 Caspase-9 的参与。相反,有毒力的分枝杆菌感染时,细胞凋亡很少发生^[9]。

先前的研究表明,TNF- α 通过 2 种表面受体 TNF-R1 和 TNF-R2 启动细胞凋亡信号。TNF- α 三聚体与 TNF-R1 结合交联,这种结合导致 SODD 的释放和受体附近由接头蛋白 TRADD、TRAF2、RIP 和 FADD 组成的 TNF-R1 复合物形成。这些接头蛋白进而吸引另外的信号通路特异性的酶至 TNF-R1 复合物,从而这些信号特异性的酶被激活,启动下游凋亡信号^[13]。作者研究了 IFN- γ 诱导感染牛分枝杆菌的 THP-1 细胞 36 h 后 TNF-R1 相关的信号通路,发现 IFN- γ 通过诱导内源性 TNF- α 的产生促进感染牛分枝杆菌北京株的巨噬细胞的凋亡。

TNF-R1 复合物可吸引大量的 Caspase-8,高浓度的 Caspase-8 激活其蛋白水解酶活性,启动信号级联,导致细胞凋亡。通过试验发现,Caspase-3 和 Caspase-8 活性在 IFN- γ 诱导的感染牛分枝杆菌的 THP-1 细胞中显著增加。但是,当加入抗 TNF- α 单克隆抗体时,Caspase-3 和 Caspase-8 的活性大大降低。数据表明,TNF- α 参与了 IFN- γ 诱导的感染牛分枝杆菌北京株的 THP-1 细胞的凋亡,并且细胞凋亡过程中激活了 TNFR-1 介导的外源性信号通路。

研究证明,JNK 信号通路和 NF- κ B 信号通路是 TNF- α 介导的感染牛分枝杆菌的巨噬细胞凋亡中的重要事件^[14-15]。JNK Inhibitor I 是一种细胞通透性的生物活性肽,可阻止转录因子 Jun 的激活^[14]。NBD binding peptide 是一种细胞通透性的融合肽,可切断 NEMO 和 IKK 复合物的联系,进而阻止 NF- κ B 的激活^[15]。当将 JNK Inhibitor I 和 NBD binding peptide 单独或混合加入 IFN- γ 诱导的感染牛分枝杆菌北京株的 THP-1 细胞中时,3 种处理组的细胞凋亡仅有轻微的变化。与未加抑制剂的 IFN- γ 诱导的感染牛分枝杆菌北京株的 THP-1 细胞凋亡率相比,组间并无显著差异。这就提示了一个信息,在 IFN- γ 诱导的感染细胞凋亡过程中,

JNK 和 NF- κ B 信号通路可能作用不大。因为由 TNF- α 介导的细胞凋亡是一个复杂的信号网络。细胞凋亡、NF- κ B 和 JNK 信号相互作用,相互影响^[13]。究竟参与凋亡的信号分子是如何相互作用的,其分子机制有待进一步研究。

总之,本研究首次报道了 IFN- γ 在诱导牛分枝杆菌北京株感染的 THP-1 细胞凋亡方面的作用以及细胞凋亡过程中 TNF- α 相关的信号通路,为进一步阐明 IFN- γ 在牛分枝杆菌感染巨噬细胞过程中的作用机制提供了基础数据。

参考文献:

- [1] DE LA RUA-DOMENECH R. Human *Mycobacterium bovis* infection in the United Kingdom; Incidence, risks, control measures and review of the zoonotic aspects of bovine tuberculosis[J]. *Tuberculosis (Edinb)*, 2006, 86(2): 77-109.
- [2] O'REILLY L M, DABORN C J. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man; a review[J]. *Tuber Lung Dis*, 1995, 76(Suppl)1: 1-46.
- [3] GLICKMAN M S, JR JACOBS W R. Microbial pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*: dawn of a discipline[J]. *Cell*, 2001, 104(4): 477-485.
- [4] LEE J, REMOLD H G, IEONG M H, et al. Macrophage apoptosis in response to high intracellular burden of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by a novel caspase-independent pathway[J]. *J Immunol*, 2006, 176(7): 4267-4274.
- [5] VEGA-MANRIQUEZ X, LOPEZ-VIDAL Y, MORAN J, et al. Apoptosis-inducing factor participation in bovine macrophage *Mycobacterium bovis*-induced caspase-independent cell death[J]. *Infect Immun*, 2007, 75(3): 1223-1228.
- [6] FLYNN J L, CHAN J, TRIEBOLD K J, et al. An essential role for interferon gamma in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection [J]. *J Exp Med*, 1993, 178(6): 2249-2254.
- [7] LI X, MCKINSTRY K K, SWAIN S L, et al. IFN-gamma acts directly on activated CD4+ T cells during mycobacterial infection to promote apoptosis by inducing components of the intracellular apoptosis machinery and by inducing extracellular proapoptotic signals[J]. *J Immunol*, 2007, 179(2): 939-949.
- [8] DENIS M, WEDLOCK D N, BUDDLE B M. IFN-gamma enhances bovine macrophage responsiveness to *Mycobacterium bovis*: Impact on bacterial replication, cytokine release and macrophage apoptosis[J]. *Immunol Cell Biol*, 2005, 83(6): 643-650.
- [9] RIENDEAU C J, KORNFELD H. THP-1 cell apoptosis in response to Mycobacterial infection[J]. *Infect Immun*, 2003, 71(1): 254-259.
- [10] YADAV A B, MISRA A. Enhancement of apoptosis of THP-1 cells infected with *Mycobacterium tuberculosis* by inhalable microparticles and relevance to bactericidal activity[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007, 51(10): 3740-3742.
- [11] ARCILA M L, SANCHEZ M D, ORTIZ B, et al. Activation of apoptosis, but not necrosis, during *Mycobacterium tuberculosis* infection correlated with decreased bacterial growth; role of TNF-alpha, IL-10, caspases and phospholipase A2[J]. *Cell Immunol*, 2007, 249(2): 80-93.
- [12] BALCEWICZ-SABLINSKA M K, KEANE J, KORNFELD H, et al. Pathogenic *Mycobacterium tuberculosis* evades apoptosis of host macrophages by release of TNF-R2, resulting in inactivation of TNF-alpha[J]. *J Immunol*, 1998, 161(5): 2636-2641.
- [13] CHEN G, GOEDEL D V. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway[J]. *Science*, 2002, 296(5573): 1634-1635.
- [14] WEISS D J, SOUZA C D, EVANSON O A. Effects of nuclear factor-kappaB on regulation of cytokine expression and apoptosis in bovine monocytes exposed to *Mycobacterium avium* subsp paratuberculosis[J]. *Am J Vet Res*, 2008, 69(6): 804-810.
- [15] BARR R K, KENDRICK T S, BOGOYEVITCH M A. Identification of the critical features of a small peptide inhibitor of JNK activity[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(13): 10987-10997.