

全反式维甲酸拮抗地塞米松抑制人气道 上皮细胞16HBE凋亡

王韵婷¹ 胡婕¹ 邹文静¹ 丁凤霞^{1,2} 田代印^{1,2} 应林燕^{1,2} 代继宏^{1,2}
罗征秀^{1,2} 符州^{1,2} 牛超^{1,2*}

(¹重庆医科大学附属儿童医院 儿童发育疾病研究教育部重点实验室, 儿童发育重大疾病国家国际科技合作基地, 儿科学重庆市重点实验室, 重庆 400014; ²重庆医科大学附属儿童医院呼吸中心, 重庆 400014)

摘要 该研究探讨全反式维甲酸(all-trans Retinoic Acid, ATRA)对GCs诱导人气道上皮细胞过度凋亡的拮抗作用。将人支气管上皮细胞16HBE作为研究对象, 使用10 μmol/L地塞米松(Dex)、1 μmol/L ATRA处理细胞, 体外培养16HBE细胞, 分为Dex组、ATRA组、Dex+ATRA组和Control组。采用TUNEL法检测16HBE细胞凋亡情况, Annexin V/PI双染法检测膜磷脂酰丝氨酸外翻的情况, 荧光探针JC-1检测线粒体膜电位变化, Western blot检测细胞的凋亡蛋白Caspase-3和其水解片段Cleaved-caspase-3的水平。相较于Control组, Dex组的TUNEL阳性细胞明显增多, Annexin V阳性蛋白明显上调, 线粒体膜电位明显下降, Caspase-3和Cleaved-caspase-3的水平明显增高; 联合ATRA则可以显著减轻Dex引起的细胞凋亡。因此, Dex可以导致人支气管上皮16HBE细胞的过度凋亡, 而ATRA可以削弱Dex的这种作用。

关键词 支气管哮喘; 全反式维甲酸; 地塞米松; 凋亡

Antagonistic Effect of All-trans Retinoic Acid against Dexamethasone on Apoptosis of Human Airway Epithelial Cells 16HBE

Wang Yunting¹, Hu Jie¹, Zou Wenjing¹, Ding Fengxia^{1,2}, Tian Daiyin^{1,2}, Ying Linyan^{1,2}, Dai Jihong^{1,2},
Luo Zhengxiu^{1,2}, Fu Zhou^{1,2}, Niu Chao^{1,2*}

(¹Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders, China International Science and Technology Cooperation base of Child development, Chongqing Key Laboratory of Pediatrics, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China; ²Department of Respiratory Medicine Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China)

Abstract This paper will investigate the antagonistic effects of all-trans retinoic acid (ATRA) on the glucocorticoid-induced apoptosis of human airway epithelial cells. Human bronchial epithelial 16HBE cells were used as the research object, and treated with dexamethasone (Dex) at a concentration of 10 μmol/L and ATRA at a concentration of 1 μmol/L. 16HBE cells were cultured *in vitro* and divided into Control group, Dex group, ATRA group and Dex+ATRA group. The nuclear apoptosis of 16HBE cells was detected by TUNEL method. The membrane phosphatidylserine valgus was detected by Annexin V/PI double staining. The mitochondrial membrane potential was detected by fluorescent probe JC-1. The levels of apoptosis proteins Caspase-3 and Cleaved-

收稿日期: 2018-12-01 接受日期: 2019-03-12

国家自然科学基金(批准号: 81600022)、重庆市卫生和计划生育委员会医学科研计划重点项目(批准号: 81670018)资助的课题

*通讯作者。Tel: 13983270212, Email: niuchao1985@yeah.net

Received: December 1, 2018 Accepted: March 12, 2019

This work was supported by the National Youth Science Fund Project (Grant No.81600022) and the Key Project of Medical Research of Chongqing Municipal Health and Family Planning Commission (Grant No.81670018)

*Corresponding author. Tel: +86-13983270212, Email: niuchao1985@yeah.net

网络出版时间: 2019-06-13 16:17:51 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20190613.1617.002.html>

caspase-3 were detected by Western blot. Compared with the Control group, more TUNEL-positive cells were observed in the Dex group, which significantly induced the up-regulation of Annexin V-positive protein, which led to a decrease in mitochondrial membrane potential and a significant increase in the levels of Caspase-3 and Cleaved-caspase-3. And ATRA can significantly suppress this trend caused by Dex. Dex can cause excessive apoptosis of human bronchial epithelial 16HBE cells, and ATRA can attenuate this effect of Dex.

Keywords bronchial asthma; all-trans retinoic acid; dexamethasone; apoptosis

哮喘是世界上最常见的慢性病之一,其发病率在中国有2%~4%,发达国家则达到15%~20%;同20年前相比,患者的日常症状和急性加重上升趋势^[1],已有的治疗手段并未控制哮喘发病率上升的趋势^[2]。因此完善哮喘治疗手段,降低哮喘的发病率和死亡率,对减轻家庭和社 会的负担,具有重要的临床意义。

糖皮质激素(glucocorticoids, GCs)是抑制气道炎症和控制哮喘的最重要药物,然而GCs无法完全防治哮喘慢性气道炎症^[3]。重症哮喘患者需要长期使用GCs,并且对GCs的反应较差。有些患者尽管使用了GCs治疗,但仍继续出现哮喘症状,肺功能亦长期下降^[3]。气道上皮细胞是GCs重要的作用细胞,GCs具有诱导气道上皮细胞过度凋亡的副作用,使气道上皮缺损形成和扩大;同时,破损的气道上皮更易受过敏原的刺激,导致炎性细胞因子的持续产生,可能加重哮喘气道高反应性、气道慢性炎症和气道重塑,从而削弱了GCs的治疗效果^[3-4]。因此,在GCs为主要治疗的基础上,寻求新药物减轻其副作用,可能是提高GCs疗效的重要手段。

维生素A(vitamin A, VA)是指源于 β -紫香酮,具有视黄醇生物活性的一类物质。临床研究表明,哮喘儿童体内VA水平普遍低于健康患儿,哮喘的发作程度与患儿体内血清VA水平呈负相关^[5-6]。最新研究表明,VA的代谢产物全反式维甲酸(ATRA)可能具有维护上皮细胞完整性的作用^[7]。因此,适量补充VA可能会维护气道上皮的完整,进而提升GCs对哮喘的治疗效果。本研究以人气道上皮细胞16HBE为研究对象,使用VA的活性产物ATRA和GCs中最有效力的地塞米松(dexamethasone, Dex)进行研究^[4],探讨ATRA是否可以拮抗GCs造成的气道上皮细胞过度凋亡,达到既控制哮喘气道炎症,又维护气道上皮完整性,为VA应用于临床哮喘治疗提供重要的理论依据和实验基础。

1 材料与方 法

1.1 主要材料与试剂

16HBE购自美国模式培养物保藏所(American Type Culture Collection, ATCC), DMEM完全培养液、胰蛋白酶和胎牛血清均购自Gibco公司;地塞米松购自ENZO公司;ATRA购自Sigma公司;全蛋白提取试剂盒、Annexin V/PI细胞凋亡检测试剂盒、JC-1线粒体膜电位测定试剂盒购自江苏凯基生物技术股份有限公司;Western blot配胶盒购自上海碧云天生物技术有限公司;FITC标记山羊抗小鼠IgG购自北京中杉金桥生物技术有限公司;小鼠抗人Caspase-3抗体购自武汉三鹰生物技术公司;Cleaved-caspase-3抗体购自Cell Signaling Technology公司。蛋白染料MAKER购自Thermo公司。TUNEL试剂盒购自Roche公司。

1.2 细胞培养及分组

16HBE细胞加10%胎牛血清的DMEM培养液,置于5% CO₂、37 °C培养,定时于显微镜下观察细胞形态和生长情况。当细胞贴壁长满培养瓶的80%~90%时,用胰蛋白酶消化、传代。待细胞贴壁后分为4个组: Dex组、ATRA组、Dex+ATRA组和Control组,分别加入10 μ mol/L Dex和1 μ mol/L ATRA^[8]。Control组加入与处理组同剂量的溶剂DMSO。以下实验均至少重复3次。

1.3 TUNEL法检测细胞核中DNA的断裂情况

将16HBE细胞以 2×10^5 /孔的细胞数接种于24孔板中,贴壁后如前分组处理。继续培养24 h,按凋亡试剂盒说明书操作,吸走培养液,用PBS洗3次,用4%的甲醛室温固定60 min,再用PBS洗3次,溶于甲醛的3% H₂O₂封闭20 min,再用PBS洗3次,溶于柠檬酸钠的0.1% Tris-ton-X通透15 min后,滴加TUNEL反应液,37 °C反应60 min, PBS洗3次,滴加荧光淬灭剂。于荧光显微镜下观察,放大倍数为100倍。

1.4 Annexin V/PI双染法检测细胞早期凋亡比例

将16HBE细胞悬液以每孔 2×10^5 个细胞接种于6孔板中,贴壁后如前分组处理。继续培养24 h后,用不含EDTA的0.25%胰蛋白酶500 μ L消化细胞,1 mL含10%胎牛血清的DMEM培养基终止消化,用移液管轻柔吹打使细胞脱落后收集于1.5 mL的EP管中,2 000 r/min离心5 min,弃去上清液抖散管底细胞,用PBS重复洗2次。用500 μ L的结合缓冲液悬浮细胞,加入5 mL Annexin V-FITC混匀后再加入5 mL PI混匀,室温避光反应10~15 min,随即于流式细胞仪检测。

1.5 JC-1线粒体膜电位测定

检测16HBE细胞凋亡早期线粒体膜电位的下降。细胞于6孔板接种贴壁后,同前分组处理24 h后,收集细胞,PBS洗2次(2 000 r/min, 5 min),配制JC-1工作液(用灭菌去离子水将培养缓冲液稀释10倍,并预热至37 $^{\circ}$ C,每500 μ L稀释后的液体加入1 μ L JC-1,混匀),每孔细胞用500 μ L工作液悬浮均匀,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂孵育15~20 min。2 000 r/min、5 min,室温离心收集细胞后,再用1 \times 缓冲液洗2次,每孔用500 μ L稀释后的培养缓冲液重悬细胞后即刻于流式细胞仪检测。

1.6 Western blot检测凋亡标志蛋白Caspase-3的表达

16HBE细胞分组处理后,提取细胞全蛋白。BCA法测定蛋白浓度。按分子量大小配制SDS-PAGE分离胶:Caspase-3、 β -actin用浓度为12%的分离胶,Cleaved-caspase-3、 β -actin用浓度为10%的分离胶。60 V电压电泳30 min,0.45 μ m PVDF膜电转60 min后,用5%脱脂牛奶于室温置于摇床,封闭60 min。一抗稀释浓度为: β -actin(1:200)、Caspase-3(1:1 000)、Cleaved-caspase-3(1:1 000),置于4 $^{\circ}$ C冰箱过夜后,均用二抗山羊抗兔(1:5 000)常温孵育60 min。用ECL和ImageJ软件分别发光显影,分析条带灰度值。

1.7 统计学分析

所有数据用GraphPad Prism 5.0软件和SPSS 13.0软件进行统计学检验,mean \pm S.D.表示结果,组间行单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示结果有显著性差异。

2 结果

2.1 ATRA减少Dex诱导的16HBE细胞DNA断裂

TUNEL是目前公认的检测细胞凋亡的金标准^[9]。为了确定ATRA是否减轻Dex诱导的16HBE细胞凋亡,我们测定比较Dex、ATRA单独处理和

联合处理的16HBE细胞中DNA双链断裂情况。

ARTA组中的凋亡细胞和Control组接近;Dex处理组与Control相比,可见较多TUNEL阳性细胞,提示Dex可以引起TUNEL阳性细胞水平升高;与Dex组相比,Dex+ATRA组中观察到显著较少的TUNEL阳性细胞,提示Dex可以诱导16HBE细胞DNA双链断裂($P < 0.05$),而ATRA可以减轻Dex诱导的这种现象($P < 0.05$)(图1)。

2.2 ATRA削弱Dex诱导的16HBE细胞Annexin V阳性蛋白上调

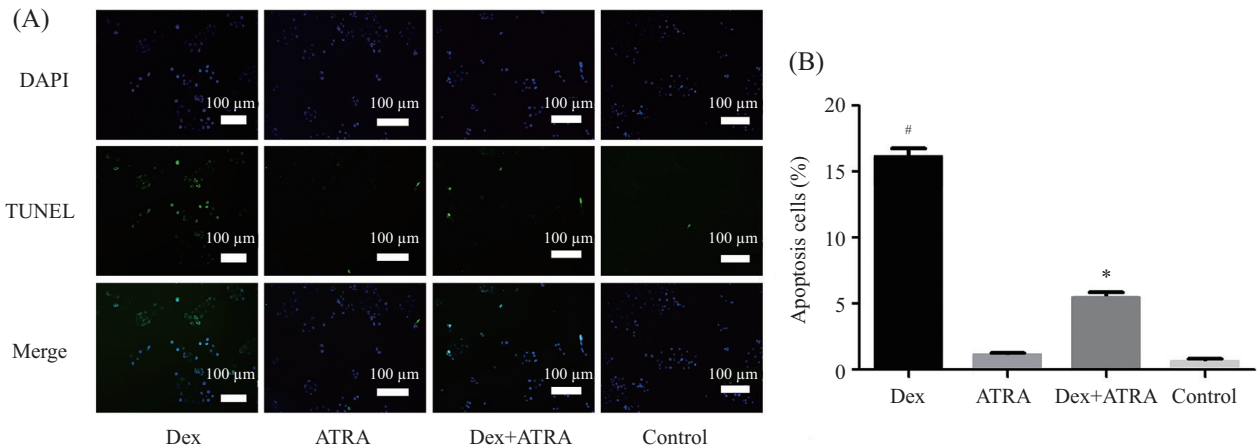
细胞凋亡早期改变发生在细胞膜表面,出现膜磷脂酰丝氨酸(PS)外翻。Annexin V为对PS亲和力和较高的磷脂结合蛋白,PI为能标记坏死细胞的染料碘化丙啶。流式细胞分析图中,横坐标右侧图示代表Annexin V高染,纵坐标上方图示代表PI高染。早期凋亡细胞位于右下象限,活细胞位于左下象限,而坏死细胞位于左上象限^[10]。Control组和ATRA处理组仅有少数细胞凋亡,而相比于Control组,Dex处理组明显诱导Annexin V阳性蛋白上调,同时Dex+ATRA处理组的Annexin V阳性蛋白水平明显弱于Dex组;这提示Dex可诱导气道上皮凋亡($P < 0.05$),ATRA可以抑制Dex引起的这种趋势($P < 0.05$)(图2)。

2.3 ATRA减少Dex引起的16HBE细胞线粒体膜电位改变

线粒体膜电位的破坏被广泛认为是细胞凋亡过程中最早发生的事件之一^[11]。本实验采用荧光染料JC-1染色,用流式细胞分析仪检测16HBE线粒体膜电位的变化。结果显示,与Control相比,Dex处理组的线粒体膜电位下降较多($P < 0.05$),而Dex和ATRA联合处理的线粒体膜电位较Dex处理组明显增高($P < 0.05$),表明ATRA可以通过线粒体膜电位层面减轻Dex引起的16HBE细胞凋亡(图3)。

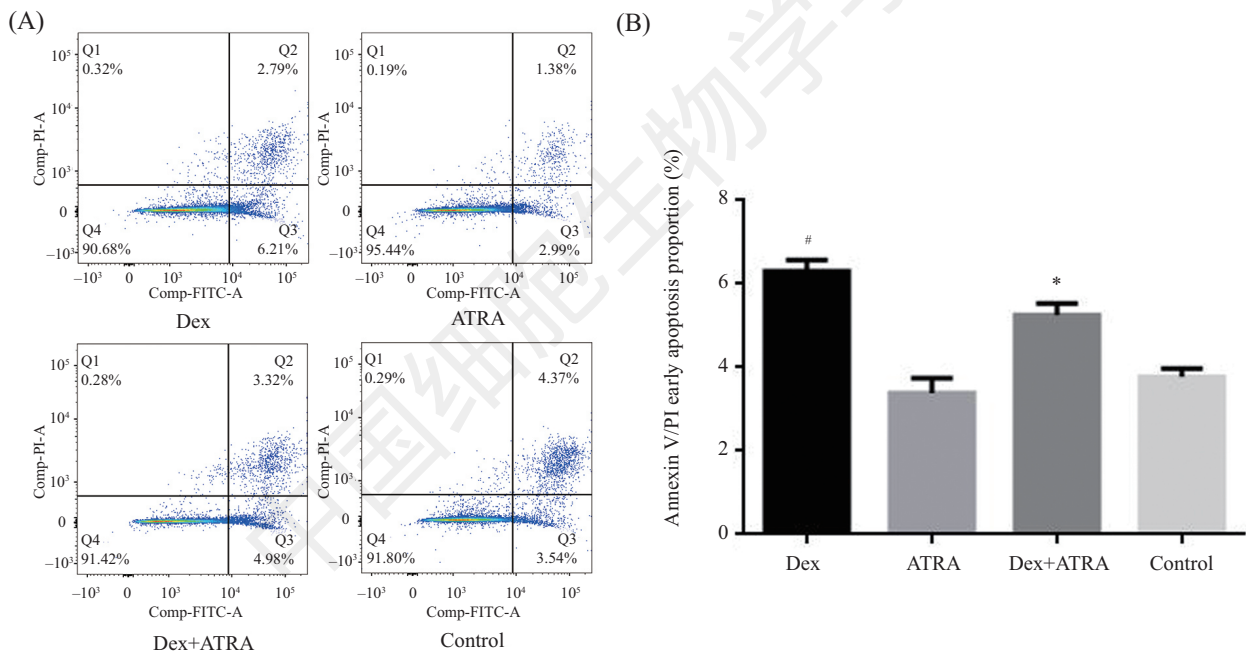
2.4 ATRA能通过下调Caspase-3凋亡蛋白减少Dex引起的16HBE细胞凋亡

Caspase-3是凋亡蛋白Caspase家族中最关键的执行者,被称作“死亡蛋白酶”。Cleaved-caspase-3是Caspase-3活化过程中剪切形成的成熟片段,它的水平反应了细胞中Caspase-3的表达活性^[12]。我们用Western Blot检测Cleaved-caspase-3和Caspase-3的变化情况,发现Dex+ATRA联合处理的表达水平较Dex组有明显下调;而Dex组中,Caspase-3和其水解片段的水平也高于Control组;ATRA可以减轻Dex引起的



A: 荧光显微镜下观察16HBE细胞的凋亡情况; B: 统计各组凋亡细胞比率。[#] $P < 0.05$, Dex组与Control组相比; ^{*} $P < 0.05$, Dex组与Dex+ATRA组相比。
A: apoptosis of 16HBE cells was observed by fluorescence microscope; B: statistics of cell apoptosis ratio in each group. [#] $P < 0.05$, Dex vs Control; ^{*} $P < 0.05$, Dex vs Dex+ATRA.

图1 TUNEL法检测细胞凋亡早期过程中细胞核DNA的断裂情况—
Fig.1 Detection of nuclear DNA breaks during early apoptosis by TUNEL assay



A: 流式细胞学检测16HBE细胞凋亡(Q1: 坏死细胞, Q2: 晚期凋亡细胞, Q3: 早期凋亡细胞, Q4: 活细胞); B: 统计各组早期凋亡率。[#] $P < 0.05$, Dex组与Control组相比; ^{*} $P < 0.05$, Dex组与Dex+ATRA组相比。

A: apoptosis of 16HBE cells was detected by flow cytometry, Q1: necrotic cells, Q2: late apoptotic cells, Q3: early apoptotic cells, Q4: living cells; B: statistics of early apoptotic rate in each group. [#] $P < 0.05$ Dex vs Control; ^{*} $P < 0.05$ Dex vs Dex+ATRA.

图2 AnnexinV/PI双染法检测16HBE早期凋亡比例

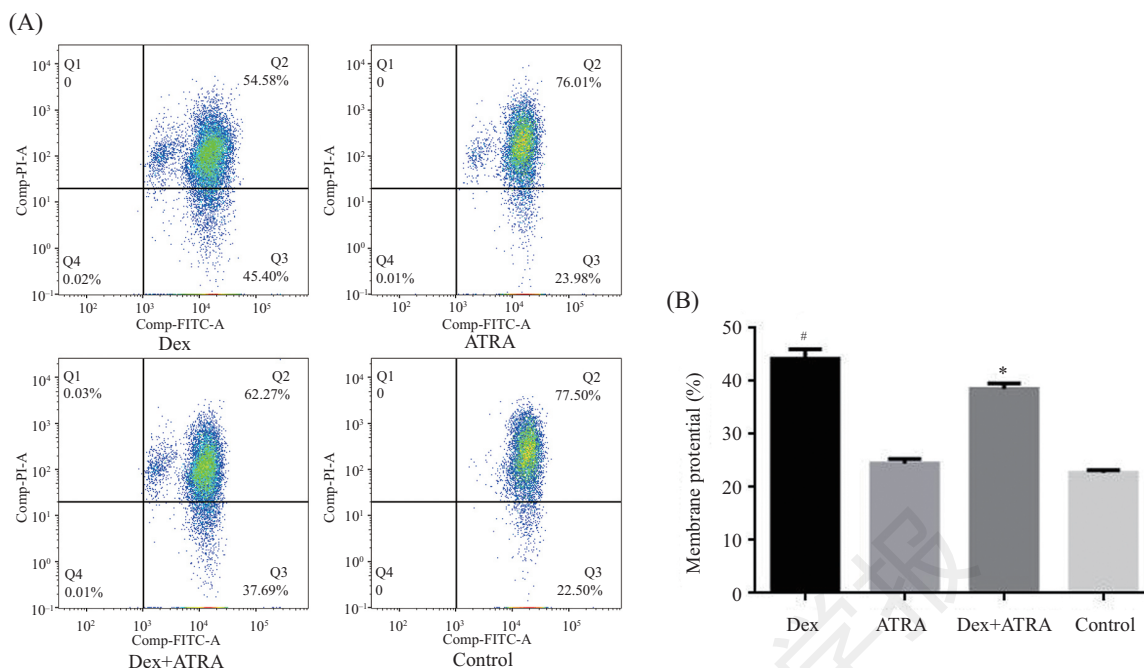
Fig.2 Detection of early apoptotic ratio of 16HBE cells by Annexin V/PI double staining

凋亡蛋白Caspase-3和其水解片段的表达($P < 0.05$, 图4)。

3 讨论

气道上皮细胞是呼吸系统先天免疫系统的重要组成部分。除了作为气-液界面的保护性物理屏

障外, 气道上皮还起着有效的化学和免疫屏障作用^[13-14]。细胞凋亡是正常气道上皮细胞中重要且有益的调节机制^[15], 而气道上皮细胞的过度凋亡通常被认为是气道损伤的主要机制之一^[16-17]。研究发现, 人类和动物哮喘模型中气道上皮细胞是过度凋亡的, 但哮喘患者的气道屏障功能缺陷也可能是可逆

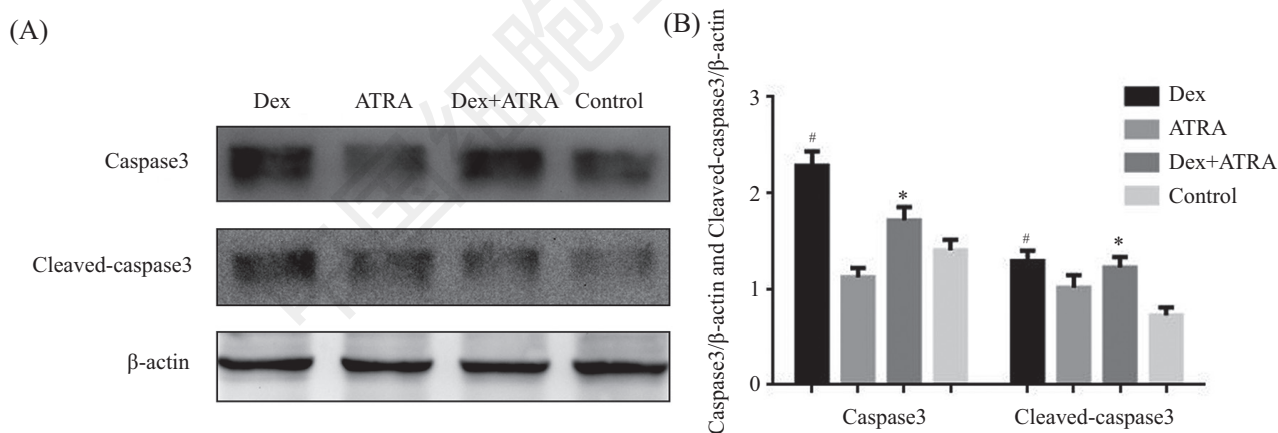


A: JC-1检测凋亡早期16HBE线粒体膜电位比较, Q1: 坏死细胞, Q2: 晚期凋亡细胞, Q3: 早期凋亡细胞, Q4: 活细胞; B: 统计线粒体膜电位下降比例。# $P < 0.05$, Dex组与Control组相比; * $P < 0.05$, Dex组与Dex+ATRA组相比。

A: comparison of mitochondrial membrane potential of 16HBE cells in early detection of apoptosis by JC-1, Q1: necrotic cells, Q2: late apoptotic cells, Q3: early apoptotic cells, Q4: living cells; B: statistics on the proportion of mitochondrial membrane potential decline. # $P < 0.05$ Dex vs Control; * $P < 0.05$ Dex vs Dex+ATRA.

图3 JC-1测定细胞凋亡早期线粒体膜电位下降情况

Fig.3 Determination of cell mitochondrial membrane potential decline in early apoptosis by JC-1



A: Western blot检测凋亡相关标志蛋白Caspase-3和Cleaved-caspase-3的水平; B: 统计各组条带的灰度值。# $P < 0.05$, Dex组与Control组相比; * $P < 0.05$, Dex组与Dex+ATRA组相比。

A: the levels of apoptosis-associated marker proteins Caspase-3 and Cleaved-caspase-3 by Western blot; B: statistics of gray values of each group of strips. # $P < 0.05$, Dex vs Control; * $P < 0.05$, Dex vs Dex+ATRA.

图4 Western blot测定凋亡蛋白Caspase-3及其水解片段Cleaved-caspase-3的表达

Fig.4 Expression of caspase-3 and its hydrolyzed fragment Cleaved-caspase-3 by Western blot

的^[18-20]。GCs广泛用于控制哮喘, 但它在发挥治疗作用的同时, 亦会诱导气道上皮细胞的过度凋亡, 导致哮喘患者的气道上皮进一步损伤和气道重塑^[21]。因此, 探索通过抑制上皮细胞凋亡过程来恢复上皮完整性的新型治疗可能成为气道疾病的新治疗靶点。

VA对上皮细胞正常的结构和功能有重要意义, 是人体维持正常生命活动不可缺少的基本物质^[22]。ATRA是VA的生物活性衍生物, 具有抗细胞凋亡特性^[23-24]。研究表明, ATRA可在Dex破坏肺泡发育之后, 诱导肺泡上皮的再生^[25], 提示ATRA具有维护上

皮细胞的重要作用。

TUNEL法是结合分子生物学与形态学的一种常用检测细胞凋亡的办法。细胞凋亡早期,核酸内切酶被激活,将DNA降解成寡聚核苷酸,这个过程中每次降解都会形成新的3'-OH末端,从而被标记染色。荧光显微镜下绿色的荧光点,即是凋亡细胞核。而正常细胞几乎不存在DNA双链的断裂,因此不会被标记染色^[10]。我们发现,Dex可导致凋亡细胞增多,促进气道上皮凋亡; ATRA抑制Dex导致的这种趋势,提示ATRA可以减轻Dex诱导的16HBE细胞DNA断裂的现象。

细胞凋亡是由多种蛋白参与的一种复杂调控,Caspase蛋白酶家族是凋亡蛋白最重要的一大类,而Caspase-3又是其中最关键的^[26]。在细胞凋亡的过程中,内源性、外源性途径都通过它进行细胞凋亡的执行^[26]。由此可见,Caspase-3在细胞凋亡过程中的重要作用。而本实验结果显示,Dex可促进凋亡相关标志蛋白Caspase-3和Cleaved-caspase-3的水平增高,而ATRA可明显下调Dex引起的两种蛋白增高的水平,提示ATRA可以从部分凋亡关键蛋白层面减轻Dex诱导的16HBE细胞凋亡。

Annexin V/PI双染法可以通过检测凋亡早期,由细胞膜内翻转到细胞膜外的PS,从而将活细胞、凋亡细胞、坏死细胞区分开^[10]。通过本实验,我们发现,Dex可促进细胞膜PS的外翻,ATRA可减少这个现象,提示ATRA可以从细胞膜层面上减弱Dex诱导的16HBE细胞凋亡。

线粒体作为细胞器,除了为细胞提供能量和代谢物,还参与细胞凋亡,是细胞凋亡的主要途径之一。细胞色素C在凋亡早期线粒体外膜透化时,进入细胞质激活Caspase,触发凋亡^[27]。而线粒体膜电位,是目前最常用来反应线粒体通透性的指标之一。线粒体膜电位下降越多则凋亡程度越深^[11]。因此,本研究发现Dex可促进线粒体膜电位下降导致细胞凋亡,而ATRA可以通过线粒体层面,减轻Dex引起的这个现象。

综上所述,我们通过TUNEL法检测16HBE细胞核凋亡情况,Annexin V/PI双染法检测细胞凋亡早期膜磷脂酰丝氨酸外翻,荧光探针JC-1检测线粒体膜电位变化,Western blot检测细胞的凋亡蛋白Caspase-3和Cleaved-caspase-3表达情况;即从4个方面证明了Dex可导致细胞膜、细胞核、线粒体、凋

亡关键蛋白凋亡信号的上调;而ATRA的联合应用则抑制了这种趋势。该研究提示,VA可能通过抑制气道上皮过度凋亡,减轻糖皮质激素诱导上皮过度凋亡的副作用,从而提高哮喘的治疗效果,为哮喘防治可能提供新的思路和突破点。

参考文献 (References)

- 1 Subbarao P, Mandhane PJ, Sears MR. Asthma: epidemiology, etiology and risk factors. *CMAJ* 2009; 181(9): E181-90.
- 2 Reddel HK, Bateman ED, Becker A, Boulet LP, Cruz AA, Drazen JM, *et al.* A summary of the new GINA strategy: a roadmap to asthma control. *Eur Respir J* 2015; 46(3): 622-39.
- 3 Dorscheid DR, Wojcik KR, Dorscheid D, Wojcik K, Sun S, Marroquin B, *et al.* Apoptosis of airway epithelial cells induced by corticosteroids. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164(10): 1939-47.
- 4 Barnes PJ. Glucocorticosteroids: current and future directions. *Br J Pharmacol* 2011; 163(1): 29-43.
- 5 Thalhamer T, McGrath MA, Harnett MM. MAPKs and their relevance to arthritis and inflammation. *Rheumatology (Oxford)* 2008; 47(4): 409-14.
- 6 McGowan SE, Holmes AJ, Smith J. Retinoic acid reverses the airway hyperresponsiveness but not the parenchymal defect that is associated with vitamin A deficiency. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004; 286(2): L437-44.
- 7 Uniyal S, Dhasmana A, Tyagi A, Moyal JP. ATRA reduces inflammation and improves alveolar epithelium regeneration in emphysematous rat lung. *Biomed Pharmacother* 2018; 108(10): 1435-50.
- 8 刘静月. GCs抑制气道上皮细胞修复的机制及干预研究. 重庆医科大学 (Liu Jingyue. The mechanism and intervention studies of glucocorticoids inhibiting airway epithelial cells repair. Chongqing Medical University) 2013.
- 9 杨细飞, 贺春娥, 汤瑞华, 田生礼, 刘建军. Hoechst33342/PI双染法和TUNEL染色技术检测神经细胞凋亡的对比研究. 癌变·畸变·突变 (Yang Xifei, He Chune, Tang Ruihua, Tian Shengli, Liu Jianjun. A comparative study on the measurement of neuronal cell apoptosis by Hoechst33342/PI double staining and TUNEL assay A comparative study on the detection of neuronal apoptosis by Hoechst33342/PI double staining and TUNEL staining. *Carcinogenesis, Distortion, Mutation*) 2014; 26(3): 180-4.
- 10 郭晓红, 刘立新. Annexin V/PI流式细胞分析法和TUNEL法检测肝细胞凋亡的对比研究. 山西医科大学学报 (Guo Xiaohong, Liu Lixin. Comparative study on Annexin V/PI and TUNEL in detecting hepatocyte apoptosis. *Journal of Shanxi Medical University*) 2008; 39(5): 476-9.
- 11 朱玲玲, 赵捷平, 窦勤玲, 张景利. 线粒体凋亡途径在槲皮素诱导U937细胞凋亡中的作用研究. 中国免疫学杂志 (Zhu Lingling, Zhao Jieping, Dou Qinling, Zhang Jinli. Experimental study of mitochondrial apoptosis pathway on quercetin-induced apoptosis in U937 cells. *Chinese Journal of Immunology*) 2018; 34(10): 1466-71.
- 12 李永宁, 肖晶晶, 赵建勇. Caspase-3及Cleaved-Caspase-3在氟中毒大鼠肝脏中表达. 贵州医药 (Li Yongning, Xiao Jinjin, Zhao

- Jianyong. The expression of Caspase-3 and Cleaved caspase-3 in liver of the fluorosis rats. *Guizhou Medicine* 2016; 40(3): 239-40.
- 13 Georas SN, Rezaee F. Epithelial barrier function: At the front line of asthma immunology and allergic airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2014; 134(3): 509-20.
- 14 Lópezrodríguez JC, Benedé S, Barderas R, Villalba M, Batanero E. Airway epithelium plays a leading role in the complex framework underlying respiratory allergy. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2017; 27(6): 346-55.
- 15 White SR. Apoptosis and the airway epithelium. *J Allergy* 2011; 2011: 948406.
- 16 Tesfaigzi, Yohannes. Roles of apoptosis in airway epithelia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006; 34(5): 537-47.
- 17 Hackett TL, Knight DA. The role of epithelial injury and repair in the origins of asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2007; 7(1):63-68.
- 18 Song L, Liu D, Wu C, Wu S, Yang J, Ren F, Li Y, *et al.* Antibody to mCLCA3 suppresses symptoms in a mouse model of asthma. *PLoS One* 2013; 8(12): e82367.
- 19 Li M, Shang YX. Ultrastructural changes in rat airway epithelium in asthmatic airway remodeling. *Pathol Res Pract* 2014; 210(12): 1038-42.
- 20 Halwani R, Sultana A, Alkufaidy R, Jamhawi A, Vazquez-Tello A, Al-Muhsen S. Th-17 regulatory cytokines inhibit corticosteroid induced airway structural cells apoptosis. *Respir Res* 2016; 17: 6.
- 21 Cohen L, E X, Tarsi J, Ramkumar T, Horiuchi TK, Cochran R, *et al.* Epithelial cell proliferation contributes to airway remodeling in severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 176(2): 138-45.
- 22 Zhang ML, Tao Y, Zhou WQ, Ma PC, Cao YP, He CD, *et al.* All-trans retinoic acid induces cell-cycle arrest in human cutaneous squamous carcinoma cells by inhibiting the mitogen-activated protein kinase-activated protein 1 pathway. *Clin Exp Dermatol* 2014; 39(3): 354-60.
- 23 Tsai FM, Shyu RY, Lin SC, Wu CC, Jiang SY. Induction of apoptosis by the retinoid inducible growth regulator RIG1 depends on the NC motif in HtTA cervical cancer cells. *BMC Cell Biol* 2009, 10(1): 15.
- 24 Ueki S, Mahemuti G, Oyamada H, Kato H, Kihara J, Tanabe M, *et al.* Retinoic acids are potent inhibitors of spontaneous human eosinophil apoptosis. *J Immunol* 2008; 181(11): 7689-98.
- 25 Hind M, Maden M. Retinoic acid induces alveolar regeneration in the adult mouse lung. *Eur Respir J* 2004; 23(1): 20-7.
- 26 杨涛, 费振海, 钟兴明. Caspase家族与细胞凋亡的研究进展. *浙江医药*(Yang Tao, Fei Zhenghai, Zhong Xinming. *Progress in Caspase family and apoptosis. Zhejiang Medical*) 2018; 40(18): 2083-2087, 2091.
- 27 Muñoz-Pinedo C. Signaling pathways that regulate life and cell death: evolution of apoptosis in the context of self-defense. *Adv Exp Med Biol* 2012; 738: 124-43.