

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.24.008

布地奈德通过干预线粒体钙单转运蛋白影响哮喘大鼠气道上皮细胞自噬和屏障功能的机制*

郭靖宁¹ 朱 静^{2Δ} 张金虎¹ 史艳平¹ 吉 慧¹

(1 西安交通大学附属儿童医院中西医结合科 陕西 西安 710100; 2 西安国际医学中心医院药学部 陕西 西安 710100)

摘要 目的:探究布地奈德通过干预线粒体钙单转运蛋白影响哮喘大鼠气道上皮细胞自噬和屏障功能的机制。**方法:**30 只雄性 SD 大鼠作为研究对象,并根据实验目的分为 3 组:对照组(正常大鼠,生理盐水干预,n=10),哮喘组(通过 OVA 诱导大鼠哮喘模型,n=10),布地奈德组(气雾剂布地奈德用于治疗过敏性哮喘的大鼠,n=10)。通过钙测定试剂盒和蛋白印迹分析大鼠气道上皮细胞中 Ca^{2+} 的吸收和 MCU 蛋白表达;TEER 和 TRITC 荧光分析检测大鼠气道上皮中的屏障功能;免疫组化分析气道上皮细胞屏障功能相关因子 ZO-1、E-cadherin 的蛋白表达;ELISAF 分析 BALF 上清液中炎症因子 IL-4、IL-5 和 IL-13 的水平;二氢乙锭衍生物和蛋白印迹分析 BALF 中 ROS 含量和 caspase-3 活性。**结果:**哮喘组较对照组 Ca^{2+} 浓度降低,MCU 蛋白表达升高($P<0.05$),布地奈德组较哮喘组 Ca^{2+} 浓度升高,MCU 蛋白表达降低($P<0.05$)。哮喘组较对照组 TEER 降低,TRITC 升高($P<0.05$),布地奈德组较哮喘组 TEER 升高,TRITC 降低($P<0.05$)。哮喘组较对照组 ZO-1、E-cadherin 的蛋白表达降低($P<0.05$),布地奈德组较哮喘组 ZO-1、E-cadherin 的蛋白表达升高($P<0.05$)。哮喘组较对照组 IL-4、IL-5 和 IL-13 的水平升高($P<0.05$),布地奈德组较哮喘组 IL-4、IL-5 和 IL-13 的水平降低($P<0.05$)。对照组组支气管和肺泡结构未见异常,与对照组相比哮喘组大鼠表现出肺泡间隔增厚,可见的肺毛细血管水肿,以及肺毛细血管和肺泡间隙中的大量炎症细胞浸润($P<0.05$),与哮喘组相比,布地奈德组显著减轻肺部病变的严重程度($P<0.05$)。哮喘组较对照组 LC3B II/I、ATG5、Beclin-1 和 LC3II 的表达升高($P<0.05$),布地奈德组较哮喘组 LC3B II/I、ATG5、Beclin-1 和 LC3II 的表达降低($P<0.05$)。哮喘组较对照组 ROS 含量和 caspase-3 活性升高($P<0.05$),布地奈德组较哮喘组 ROS 含量和 caspase-3 活性降低($P<0.05$)。**结论:**布地奈德通过调节 MCU 表达介导气道上皮细胞的屏障完整性和自噬水平,缓解哮喘气道炎症,改善哮喘症状。

关键词:布地奈德;MCU;哮喘大鼠;细胞屏障;自噬

中图分类号:R-332;R562.25 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2021)24-4641-05

Budesonide Interferes with the Mechanism of Mitochondrial Calcium Single Transporter in Affecting Autophagy and Barrier Function of Airway Epithelial Cells in Asthmatic Rats*

GUO Jing-ning¹, ZHU Jing^{2Δ}, ZHANG Jin-hu¹, SHI Yan-ping¹, JI Hui¹

(1 Department of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Children's Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi, 710100, China; 2 Department of Pharmacy, Xi'an International Medical Center Hospital, Xi'an, Shaanxi, 710100, China)

ABSTRACT Objective: To explore the mechanism of budesonide's influence on autophagy and barrier function of airway epithelial cells in asthmatic rats by interfering with mitochondrial calcium single transport protein. **Methods:** Thirty male SD rats were used as the research objects and were divided into 3 groups according to the purpose of the experiment: control group (healthy reared rats as a control, normal saline as a vehicle for control treatment, n=10), asthma group (a rat asthma model induced by OVA, n=10), budesonide group (aerosol budesonide used to treat rats with allergic asthma, n=10). Calcium assay kit and Western blot were used to analyze Ca^{2+} uptake and MCU protein expression in rat airway epithelial cells. TEER and TRITC fluorescence analysis were used to detect the barrier function in rat airway epithelium. The protein expressions of ZO-1 and E-cadherin, which are related to the barrier function of airway epithelial cells, were analyzed by immunohistochemistry. The levels of inflammatory factors IL-4, IL-5 and IL-13 in the BALF supernatant were analyzed by ELISAF. ROS content and caspase-3 activity in BALF were analyzed by dihydroethidium derivatives and Western blotting. **Results:** Compared with the control group, the Ca^{2+} concentration of the asthma group was lower, and the expression of MCU protein was increased($P<0.05$). Compared with the asthma group, the Ca^{2+} concentration of the budesonide group was higher, and the expression of MCU protein was lower ($P<0.05$). Compared with the control group, the asthma group had lower TEER and higher TRITC ($P<0.05$).

* 基金项目:陕西省自然科学基金基础研究计划项目(2018JQ-487)

作者简介:郭靖宁(1990-),女,硕士,住院医师,研究方向:肺炎、哮喘、腹泻、过敏性紫癜等儿科疾病相关,

电话:15388697903, E-mail: ggn86989627@163.com

Δ 通讯作者:朱静(1987-),女,本科,主管药师,研究方向:西医用药相关,电话:13689193147, E-mail: ggn86989627@163.com

(收稿日期:2021-04-06 接受日期:2021-04-28)

05), and the budesonide group had higher TEER and lower TRITC than the asthma group ($P<0.05$). The protein expression of ZO-1 and E-cadherin in the asthma group was lower than that in the control group ($P<0.05$), and the protein expression of ZO-1 and E-cadherin in the budesonide group was higher than that in the asthma group ($P<0.05$). The levels of IL-4, IL-5 and IL-13 in the asthma group were higher than those in the control group ($P<0.05$), and the levels of IL-4, IL-5 and IL-13 in the budesonide group were lower than those in the asthma group ($P<0.05$). The bronchi and alveolar structure of the control group were not abnormal. Compared with the control group, rats in the asthma group showed thickened alveolar septum, visible pulmonary capillary edema, and a large number of inflammatory cell infiltrations in pulmonary capillaries and alveolar spaces ($P<0.05$). Compared with the asthma group, the budesonide group significantly reduced the severity of lung lesions ($P<0.05$). The expression of LC3B II/I, ATG5, Beclin-1 and LC3II in the asthma group was higher than that in the control group ($P<0.05$), and the expression of LC3B II/I, ATG5, Beclin-1 and LC3II in the budesonide group was lower than that in the asthma group ($P<0.05$). Compared with the control group, the ROS content and caspase-3 activity were higher in the asthma group ($P<0.05$), and the budesonide group was lower than the asthma group ROS content and caspase-3 activity ($P<0.05$). **Conclusion:** Budesonide mediates the barrier integrity and autophagy level of airway epithelial cells by regulating the expression of MCU, so as to alleviate airway inflammation and improve asthma symptoms.

Key words: Budesonide; MCU; Asthmatic rats; Cell barrier; Autophagy

Chinese Library Classification(CLC): R-332; R562.25 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2021)24-4641-05

前言

哮喘是一种常见的慢性气道炎症性疾病,其特征是可逆性气道阻塞、大量粘液产生、炎症细胞浸润气道^[1,2]。气道上皮是多种过敏原反应的重要控制者,包括炎症、免疫和再生过程,通常吸入的毒素和某些炎性细胞因子会破坏屏障的完整性,这是过敏原致敏的危险因素,因此了解气道上皮屏障功能的调节对于哮喘免疫学和病理生理学具有重要意义^[3,4]。研究显示:过量的活性氧(Reactive oxygen species, ROS)对哮喘中观察到的组织损伤和上皮屏障功能障碍的发展有显著影响^[5-7]。越来越多的证据表明自噬参与了各种呼吸系统疾病的发病机制^[8-10]。一方面,自噬在体内平衡中起保护作用,一项研究表明哮喘患者的成纤维细胞和上皮细胞中双膜自噬体的数量多于健康对照组^[11,12]。另一方面,有证据表明自噬是纤维化的调节剂,可增强气道间充质细胞中 ECM 的产生,导致气道增厚和僵硬,而自噬如果参与 ECM 蛋白的降解,则可能减轻纤维化^[13,14]。在新型生物制剂被引入临床的时代,糖皮质激素仍然是哮喘治疗的主要选择,因为它们具有显著的抗炎、免疫抑制和免疫调节作用,布地奈德是一种合成糖皮质激素类固醇,经常用于治疗哮喘^[15,16]。为探讨布地奈德是否通过 MCU 对哮喘大鼠气道上皮细胞自噬和屏障起到调节作用,研究使用卵清蛋白诱导大鼠过敏性哮喘模型,以为布地奈德在哮喘的治疗上提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验大鼠

30 只雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠被用作本次研究对象,体重 180-220 g,由大学实验动物中心提供。所有大鼠均饲养于(20~24℃)温室中,12 h 明暗循环,自由进食和饮水。

1.2 分组及治疗

通过卵清蛋白致敏和激发诱导过敏性哮喘大鼠模型。在第 0、7 和 14 天,通过腹腔注射 1 mL 抗原致敏液致敏(无菌生理盐水稀释 10% OVA 和 10 mg 氢氧化铝作为佐剂)。在第 22 天,连续 3 周每天一次吸入 1% OVA,每次 20 min。

1.3 实验分组

根据实验目的,将大鼠随机分为三组:对照组、哮喘组和布地奈德组,每组 10 只。对照组大鼠给予等体积生理盐水,从第 21 d,布地奈德治疗组的大鼠每周暴露于气雾剂布地奈德 100 μg/kg,每日 3 次,每次持续 30 min。

1.4 实验方法

1.4.1 蛋白质印迹 使用放射免疫沉淀分析缓冲液从肺组织中分离总蛋白。蛋白质用 6% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳提取,转移到聚偏二氟乙烯膜上,用含 5% 脱脂牛奶的 TBST 室温封闭 2 h。用针对 LC3-I、LC3-II、Beclin-1、Atg5、MCU 和 GAPDH 作为上样对照(1:1000 稀释;Cell Signaling Technology,波士顿,马萨诸塞州),4℃ 过夜,用 TBST 洗涤,与辣根过氧化物酶偶联的二抗在室温下孵育 1 h。针对 GAPDH 对条带强度进行标准化,并在 Molecular Imager ChemiDoc XRS 系统上使用增强型化学发光试剂分析相对密度。

1.4.2 邻甲酚酞 Ca^{2+} 测定 将 BALF 样品悬浮在冰冷的甘露醇、不含 EGTA 的蔗糖(MS)缓冲液中,以避免 Ca^{2+} 螯合。将线粒体沉淀并在钙测定缓冲液中稀释,均质化和超声处理(2×10 s,最大功率输出的 40%)。使用 O'-甲酚酞复合物—钙测定试剂盒通过分光光度法测定上清液中的 Ca^{2+} 含量。根据制造商方案(Bio-Rad),将值标准化为通过 DC 测定测量的总蛋白质浓度。

1.4.3 跨上皮电阻和电导 将 BALF 中细胞接种在多孔板中的胶原包被的细胞培养插入物(Transwell-clear, 直径 12 mm, 0.4 μm 孔;Corning, Acton, MA)上,并在 DMEM-F-12(Gibco)中的浸没条件下培养或 MTBEC 培养基在 10% 胎牛血清(FBS)和青霉素/链霉素(1%)存在下直至融合。将介质从上隔室中取出,以允许在气液界面(ALI)处发生极化。气道上皮细胞单层的跨上皮电阻(TEER)用上皮电压计测量。通过从单层测定的总电阻中减去支持过滤器和不含细胞的缓冲介质的基线电阻来计算上皮单层的电阻。电导计算为 TEER 的倒数($1/\Omega \times \text{cm}^2$)。

1.4.4 内皮屏障通透性 将 TRITC-葡聚糖添加到在 ALI 培养的上皮细胞的心尖室(总体积 1 mg/mL)中。20 分钟后,从下

室收集 100 μ L 培养基。在 SpectroMax ELISA 酶标仪上测量 TRITC 荧光,数据计算为控制的百分比(设置为 100%)。

1.4.5 免疫组织化学 肺用 4% 多聚甲醛固定,石蜡包埋,5 μ m 组织切片。修复抗原后洗涤,过氧化氢淬灭内源性过氧化物酶、透化,然后在山羊抗兔血清中封闭,孵育抗 ZO-1(兔抗人或小鼠,1:100)和抗 E-cadherin(兔抗,1:100)24 小时,山羊抗生物素(1:2000,DAB)室温 1 小时,辣根过氧化物酶偶联二抗室温 30 min。在室温下用二氨基联苯胺(DAB,Sigma-Aldrich)底物染色 3 min,苏木精复染后固定。采用 Olympus BX-61 光学显微镜官兵拍照。切片以盲法评估,染色强度使用 NIH Image J 软件(ImageJ64,版本 1.48,美国国立卫生研究院)评分。具体而言,核 DAB 染色的强度被视为背景,数值除以平均面积。

1.4.6 酶联免疫吸附测定(ELISA) 使用 ELISA 试剂盒测量 BALF 中各种促炎细胞因子的水平,收集 1 mL BALF 并离心($400\times g$,10 min, 4°C)。根据制造商说明,分析(IL-4、IL-5、IL-13、eotaxin、tIgE 和 mMCP-1)。制备肺组织进行苏木精-伊红(HE)染色,观察肺组织形态学变化和炎性细胞浸润。将组织固定在 4% 的甲醛中,切成 5 μ m 的切片,用苏木精和伊红染色,并在光学显微镜下检查。

1.4.7 ROS 检测 使用 5 μ M 二氢乙锭衍生物 mitoSOX red 在活培养的 HAEC 中测量 ROS。使用 LSM 510 共聚焦显微镜对细胞进行成像,并使用 NIH ImageJ 进行分析。

1.4.8 Caspase-3 活性测定 HAEC 被表达 DN-MCU 或 Mt-GFP 的腺病毒感染(48 h,10 MOI),并在 RIPA 缓冲液中裂解之前暴露于 IL-13(72 h)并在 4°C 下以 $6000\times g$ 离心 10 min 分离不溶性成分。根据制造商方案通过 DC 分析测量蛋白质浓度。根据制造商的说明评估细胞裂解物的 caspase-3 活性。

1.5 统计分析

所有数据均表示为数学平均值 $\pm$ 平均值的标准误差。双尾 t 检验、单向方差分析用于评估统计差异。 P 值 ≤ 0.05 被认为具有统计学意义。

2 结果

2.1 布地奈德降低气道上皮细胞 Ca^{2+} 的吸收和 MCU 表达

哮喘组较对照组 Ca^{2+} 浓度降低,MCU 蛋白表达升高($P<0.05$),布地奈德组较哮喘组 Ca^{2+} 浓度升高,MCU 蛋白表达降低($P<0.05$)。(表 1)。

表 1 Ca^{2+} 吸收和 MCU 蛋白印迹分析
Table 1 Ca^{2+} absorption and MCU protein imprint analysis

Groups	Ca^{2+}	MCU
Control group	0.16 ± 0.02	1.14 ± 0.03
The Asthma group	0.07 ± 0.01	1.95 ± 0.18
The Budenide Formation	0.12 ± 0.03	1.26 ± 0.05
F	13.052	11.684
P	0.013	0.006

2.2 布地奈德提高气道上皮细胞的完整性和屏障功能

哮喘组较对照组 TEER 降低,TRITC 升高($P<0.05$),布地

奈德组较哮喘组 TEER 升高,TRITC 降低($P<0.05$)。(表 2)。

表 2 哮喘大鼠气道上皮细胞屏障功能分析
Table 2 Analysis of airway epithelial cell barrier function in asthma rats

Groups	TEER($\Omega \times 10^3 \text{ cm}^2$)	TRITC(1 mg/mL)
Control group	3.75 ± 0.26	1.06 ± 0.01
The Asthma group	1.23 ± 0.06	1.54 ± 0.04
The Budenide Formation	2.83 ± 0.17	1.18 ± 0.02
F	9.632	14.569
P	0.002	0.015

2.3 布地奈德提高气道上皮细胞的完整性和屏障功能

哮喘组较对照组 ZO-1、E-cadherin 的蛋白表达降低($P<0.05$),布地奈德组较哮喘组 ZO-1、E-cadherin 的蛋白表达升高($P<0.05$)。(表 3)。

2.4 布地奈德减弱哮喘大鼠炎症反应

哮喘组较对照组 IL-4、IL-5 和 IL-13 的水平升高($P<0.05$),布地奈德组较哮喘组 IL-4、IL-5 和 IL-13 的水平降低($P<0.05$)。

2.5 布地奈德抑制哮喘大鼠的自噬水平

哮喘组较对照组 LC3B II/I、ATG5、Beclin-1 和 LC3II 的表达升高($P<0.05$),布地奈德组较哮喘组 LC3B II/I、ATG5、Beclin-1 和 LC3II 的表达降低($P<0.05$)。(表 5)。

2.6 布地奈德抑制 ROS 和 caspase-3 活性

哮喘组较对照组 ROS 含量和 caspase-3 活性升高($P<0.05$),布地奈德组较哮喘组 ROS 含量和 caspase-3 活性降低($P<0.05$)。(表 6)。

表 3 免疫组化分析 ZO-1 和 E-cadherin 表达
Table 3 Immunohistochemical expression of ZO-1 and histochemistry

Groups	ZO-1	E-cadherin
Control group	1.85± 0.17	1.92± 0.18
The Asthma group	1.16± 0.08	1.05± 0.03
The Budenide Formation	1.86± 0.15	1.88± 0.16
F	13.729	9.021
P	0.002	0.034

表 4 ELISA 分析
Table 4 ELISA Analysis

Groups	IL-4(pg/mL)	IL-5(pg/mL)	IL-13(pg/mL)
Control group	8.35± 2.61	4.68± 0.75	58.97± 6.22
The Asthma group	31.54± 5.27	11.29± 1.88	275.28± 46.58
The Budenide Formation	17.58± 3.06	7.33± 1.43	194.14± 26.36
F	12.815	14.276	10.776
P	0.012	0.037	0.007

表 5 蛋白印迹分析自噬相关因子的表达
Table 5 Protein imanalysis the expression of autophagage related factors

Groups	LC3B II/I	ATG5	Beclin-1	LC3II
Control group	1.14± 0.04	1.06± 0.02	1.12± 0.02	1.05± 0.01
The Asthma group	1.96± 0.19	2.14± 0.20	2.06± 0.19	1.97± 0.18
The Budenide Formation	1.06± 0.02	1.26± 0.11	1.32± 0.13	1.24± 0.13
F	14.826	9.381	10.775	13.193
P	0.024	0.015	0.005	0.034

表 6 ROS 和 caspase-3 活性分析
Table 6 ROS and caspase-3 activity analysis

Groups	ROS	caspase-3
Control group	1.46± 0.25	1.16± 0.11
The Asthma group	3.28± 0.72	1.85± 0.18
The Budenide Formation	1.82± 0.41	1.34± 0.13
F	9.403	12.724
P	0.006	0.011

3 讨论

哮喘是呼吸道慢性炎症性疾病,临床上,哮喘分为过敏性和非过敏性两种形式,其区别在于有无临床过敏反应和体外对特定气源性过敏原的 IgE 反应^[17]。在治疗中,实际的基本策略是联合吸入药物,以促进哮喘急性发作的快速症状缓解,减少支气管收缩和气道炎症^[18,19]。哮喘会导致可变气流阻塞的传导气道紊乱,气道炎症是哮喘病理生理学的核心并导致气道重塑,其特征是粘液分泌过多、上皮纤维化、杯状细胞的化生和增生,以及气道平滑肌肥大和增生^[20]。本研究使用 OVA 诱导的大鼠哮喘模型,从而研究了布地奈德对哮喘反应的保护作用。

MCU 是负责线粒体基质 Ca^{2+} 摄取的通道,目前通过使用遗传和药物制剂来抑制 MCU 活性进行广泛研究。虽然哮喘也是一种 ROS 驱动的疾病,但其在肺中的作用未见报道,因此,本研究将 MCU 定位为哮喘线粒体功能障碍的调节剂。线粒体自噬是通过自噬选择性降解线粒体,常发生在暴露于环境污染物 / 过敏原或压力后受损的线粒体,并在促进线粒体更新和防止功能失调的线粒体积累方面发挥关键作用^[21]。线粒体功能障碍和 ROS 产生增加与过敏性疾病有关,包括特应性、特应性皮炎和哮喘,其稳态的紊乱会导致 ROS 的产生,减弱屏障,继而导致气道炎症、上皮脆性和分泌能力受损^[22,23]。本研究发现 MCU 参与哮喘发生,其在模型大鼠中 MCU 的蛋白表达升高,

并且 Ca^{2+} 浓度降低,说明 MCU 促进了 Ca^{2+} 摄取,促进病变的发生,而随着布地奈德的介入治疗后,MCU 的表达受到抑制。

研究表明,过敏原暴露可通过不同的免疫学和分子机制诱导细胞自噬和气道炎症^[24]。自噬在气道炎症中起重要作用,可通过激活 NF- κ B 和激活蛋白 1 在过敏原诱导的气道上皮炎症中发挥关键作用^[25]。此外,过敏原可诱导炎症细胞因子释放(例如,IL-4、IL-5 和 IL-13)和肺细胞的氧化损伤,从而促进 AMPK 的激活以及气道上皮细胞中 ATG5、Beclin-1 和 LC3II 的表达。本实验表明过度自噬参与了 OVA 诱导的哮喘模型,结果表明:气雾剂布地奈德可抑制哮喘诱导的自噬,减少自噬体的形成以及自噬相关蛋白(LC3B II/I、ATG5、Beclin-1 和 LC3I-I)的表达。Zitong Ma 等^[26]研究结果表明:布地奈德可通过调节细胞凋亡和自噬的作用从而减弱气道重塑,与本研究相关结论一致。

人类哮喘患者有强有力的上皮脱屑证据,这可能导致气道重塑和更慢性和持久的炎症表型^[27]。从哮喘患者获得的初级气道上皮细胞降低了上皮屏障功能并降低了 ZO-1 和 E-cadherin 的表达^[28],ZO-1 是一种细胞内膜蛋白,可聚集和稳定顶端连接复合体的粘附成分。在本研究中,我们发现抑制 MCU 会在过敏原激发后保留 ZO-1 和 E-cadherin 表达,而布地奈德治疗后哮喘模型中 ZO-1 和 E-cadherin 的蛋白质水平增加。有一些证据表明 ROS 介导的 ZO-1 表达变化^[29],本研究结论一致。为了进一步证实我们在 BALF 中的发现,从各组大鼠中分离出支气管气道上皮细胞。与对照组相比,哮喘模型组中的 TEER 和 TRITC-葡聚糖运动来评估屏障功能显著降低,用布地奈德治疗后,与哮喘组相比,布地奈德提高了气道上皮细胞的屏障功能。这些结果证明 MCU 介导了气道上皮细胞屏障功能障碍。另外,本研究数据还表明 MCU 调节 caspase-3 活性对细胞凋亡具有额外影响,可促进其相对表达量降低,已有研究表明在成年小鼠心脏中抑制 MCU 的表达后 caspase-3 蛋白表达也显著降低^[30]。

综上所述,本研究数据表明,在过敏原存在的情况下,MCU 导致气道上皮细胞屏障功能丧失和自噬水平升高,进而导致细胞凋亡发生,布地奈德通过抑制 MCU 维持其上皮层完整性可能是治疗过敏性哮喘的一种有效方法。

参考文献(References)

[1] Talmon M, Rossi S, Lim D, et al. Absinthin, an agonist of the bitter taste receptor hTAS2R46, uncovers an ER-to-mitochondria Ca^{2+} -shuttling event[J]. *J Biol Chem*, 2019, 294(33): 12472-12482

[2] 王冰,晏纪军,段争,等.哮喘大鼠血清 IL-8、IFN- γ 水平与疾病分期的相关性[J]. *现代生物医学进展*, 2021, 21(7): 1239-1243

[3] Wisniewski AV, Liu J, Redlich CA. Analysis of Lung Gene Expression Reveals a Role for Cl⁻ Channels in Diisocyanate-induced Airway Eosinophilia in a Mouse Model of Asthma Pathology[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2020, 63(1): 25-35

[4] Kalidhindi RSR, Katragadda R, Beauchamp KL, et al. Androgen Receptor-Mediated Regulation of Intracellular Calcium in Human Airway Smooth Muscle Cells [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2019, 53(1): 215-228

[5] Wang Y, Wang A, Zhang M, et al. Artesunate attenuates airway resistance in vivo and relaxes airway smooth muscle cells in vitro via bit-

ter taste receptor-dependent calcium signalling[J]. *Exp Physiol*, 2019, 104(2): 231-243

[6] Kim HJ, Lee SH, Jeong S, et al. Protease-Activated Receptors 2-Antagonist Suppresses Asthma by Inhibiting Reactive Oxygen Species-Thymic Stromal Lymphopoietin Inflammation and Epithelial Tight Junction Degradation [J]. *Allergy Asthma Immunol Res*, 2019, 11(4): 560-571

[7] Ketelaar ME, Portelli MA, Dijk FN, et al. Phenotypic and functional translation of IL33 genetics in asthma [J]. *J Allergy Clin Immunol*. 2021, 147(1): 144-157

[8] Silveira JS, Antunes GL, Kaiber DB, et al. Autophagy induces eosinophil extracellular traps formation and allergic airway inflammation in a murine asthma model [J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235 (1): 267-280

[9] Li W, Wu Y, Zhao Y, et al. MTOR suppresses autophagy-mediated production of IL25 in allergic airway inflammation[J]. *Thorax*, 2020, 75(12): 1047-1057

[10] Li BB, Chen YL, Pang F. MicroRNA-30a Targets ATG5 and Attenuates Airway Fibrosis in Asthma by Suppressing Autophagy[J]. *Inflammation*. 2020, 43(1): 44-53

[11] Kim D, Cho S, Castaño MA, et al. Biased TAS2R Bronchodilators Inhibit Airway Smooth Muscle Growth by Downregulating Phosphorylated Extracellular Signal-regulated Kinase 1/2[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2019, 60(5): 532-540

[12] Li H, Bi Q, Cui H, et al. Suppression of autophagy through JAK2/STAT3 contributes to the therapeutic action of rhynchophylline on asthma[J]. *BMC Complement Med Ther*, 2021, 21(1): 21

[13] Song G, Zhang Y, Yu S, et al. Chrysophanol attenuates airway inflammation and remodeling through nuclear factor-kappa B signaling pathway in asthma[J]. *Phytother Res*, 2019, 33(10): 2702-2713

[14] Silveira JS, Antunes GL, Kaiber DB, et al. Autophagy induces eosinophil extracellular traps formation and allergic airway inflammation in a murine asthma model [J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235 (1): 267-280

[15] 马莉娟,周瑞,王娟娟,等.布地奈德混悬液联合孟鲁司特钠治疗儿童胸闷变异性哮喘的效果分析 [J]. *中华全科医学*, 2020, 18(6): 18-20+24

[16] McDowell PJ, Stone JH, Zhang Y, et al. Quantification of Glucocorticoid-Associated Morbidity in Severe Asthma Using the Glucocorticoid Toxicity Index [J]. *J Allergy Clin Immunol Pract*, 2021, 9(1): 365-372. e5

[17] Deering-Rice CE, Memon T, Lu Z, et al. Differential Activation of TRPA1 by Diesel Exhaust Particles: Relationships between Chemical Composition, Potency, and Lung Toxicity [J]. *Chem Res Toxicol*, 2019, 32(6): 1040-1050

[18] 朱桂萍,叶伶,金美玲.支气管哮喘靶向治疗的研究进展[J]. *国际呼吸杂志*, 2021, 41(7): 529-535

[19] 刘霞,尹凤先,范明鑫,等.分级诊疗管理对支气管哮喘患者吸入技术及疾病认知的影响[J]. *中华全科医师杂志*, 2021, 20(5): 575-580

[20] Liu J, Liang R, Huang H, et al. Effect of an Antagonistic Peptide of CCR5 on the Expression of Autophagy-related Genes and β -Arrestin 2 in Lung Tissues of Asthmatic Mice [J]. *Allergy Asthma Immunol Res*, 2021, 13(1): 106-121

- [7] 王正国, 张良. 创伤性脑损伤 [J]. 中华急诊医学杂志, 2015, 24(5): 465-466
- [8] Kay T, Harrington DE, Adams R, et al. Mild traumatic brain injury committee of the head injury interdisciplinary special interest group of the American Congress of Rehabilitation Medicine: definition of mild traumatic brain injury [J]. J Head Trauma Rehabil, 1993, 8(1): 86-87
- [9] Dixon KJ. Pathophysiology of Traumatic Brain Injury [J]. Phys Med Rehabil Clin N Am, 2017, 28(2): 215-225
- [10] Chitturi J, Santhakumar V, Kannurpatti SS. Beneficial Effects of Kaempferol after Developmental Traumatic Brain Injury Is through Protection of Mitochondrial Function, Oxidative Metabolism, and Neural Viability[J]. J Neurotrauma, 2019, 36(8): 1264-1278
- [11] Dorsett CR, McGuire JL, DePasquale EA, et al. Glutamate Neurotransmission in Rodent Models of Traumatic Brain Injury[J]. J Neurotrauma, 2017, 34(2): 263-272
- [12] Corps KN, Roth TL, McGavern DB. Inflammation and neuroprotection in traumatic brain injury[J]. JAMA Neurol, 2015, 72(3): 355-362
- [13] 宋鸽, 程世翔, 刘晓银, 等. 创伤性脑损伤后神经炎症药物治疗的研究进展[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2020, 2: 253-256
- [14] Jassam YN, Izzy S, Whalen M, et al. Neuroimmunology of Traumatic Brain Injury: Time for a Paradigm Shift [J]. Neuron, 2017, 95(6): 1246-1265
- [15] Shi J, Gao W, Shao F. Pyroptosis: Gasdermin-Mediated Programmed Necrotic Cell Death[J]. Trends Biochem Sci, 2017, 42(4): 245-254
- [16] Frank D, Vince JE. Pyroptosis versus necroptosis: similarities, differences, and crosstalk[J]. Cell Death Differ, 2019, 26(1): 99-114
- [17] 梅旦, 张玲玲, 魏伟. 细胞焦亡机制及与疾病的关系 [J]. 生理科学进展, 2020, 2: 151-156
- [18] Swanson KV, Deng M, Ting JP. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics [J]. Nat Rev Immunol, 2019, 19(8): 477-489
- [19] Mangan MSJ, Olhava EJ, Roush WR, et al. Targeting the NLRP3 inflammasome in inflammatory diseases [J]. Nat Rev Drug Discov, 2018, 17(8): 588-606
- [20] 秦灵芝, 李玮, 王晓娟, 等. 白藜芦醇预处理减轻神经元焦亡及对神经元缺血性损伤的保护作用 [J]. 华中科技大学学报: 医学版, 2019, 48(1): 38-41
- [21] Satheesh NJ, Samuel SM, Büsselberg D. Combination Therapy with Vitamin C Could Eradicate Cancer Stem Cells [J]. Biomolecules, 2020, 10(1): 79
- [22] Jafari T, Fallah AA, Reyhanian A, et al. Effects of pomegranate peel extract and vitamin E on the inflammatory status and endothelial function in hemodialysis patients: a randomized controlled clinical trial[J]. Food Funct, 2020, 11(9): 7987-7993
- [23] Fowler AA, Truitt JD, Hite RD, et al. Effect of Vitamin C Infusion on Organ Failure and Biomarkers of Inflammation and Vascular Injury in Patients With Sepsis and Severe Acute Respiratory Failure: The CITRIS-ALI Randomized Clinical Trial [J]. JAMA, 2019, 322(13): 1261-1270
- [24] Chen W, Guo J, Guo H, et al. Protective Effect of Vitamin C against Infancy Rat Corneal Injury Caused by Acute UVB Irradiation [J]. Biomed Res Int, 2020, 2020: 8089273
- [25] Bernardo-Colón A, Vest V, Clark A, et al. Antioxidants prevent inflammation and preserve the optic projection and visual function in experimental neurotrauma[J]. Cell Death Dis, 2018, 9(11): 1097

(上接第 4645 页)

- [21] 李忱菲, 周新, 李锋. 线粒体自噬在 COPD 发病机制中作用的研究进展[J]. 国际呼吸杂志, 2020, 40(8): 628-632
- [22] Zhang Y, Do DC, Hu X, et al. CaMKII oxidation regulates cockroach allergen-induced mitophagy in asthma [J]. J Allergy Clin Immunol, 2021, 147(4): 1464-1477. e11
- [23] Kim HJ, Woo J, Nam YR, et al. Flos Magnoliae and its Constituent Linoleic Acid Suppress T Lymphocyte Activation via Store-Operated Calcium Entry[J]. Am J Chin Med, 2019, 47(7): 1627-1641
- [24] Flores-Flores A, Estrada-Soto S, Millán-Pacheco C, et al. Functional mechanism of tracheal relaxation, antiasthmatic, and toxicological studies of 6-hydroxyflavone[J]. Drug Dev Res, 2019, 80(2): 218-229
- [25] Srisomboon Y, Squillace DL, Maniak PJ, et al. Fungal allergen-induced IL-33 secretion involves cholesterol-dependent, VDAC-1-mediated ATP release from the airway epithelium [J]. J Physiol, 2020, 598(10): 1829-1845
- [26] Shimada T, Takahashi K, Tominaga M, et al. Identification of molecular targets for toxic action by persulfate, an industrial sulfur compound[J]. Neurotoxicology, 2019, 72(5): 29-37
- [27] Heras AF, Veerappan A, Silver RB, et al. Increasing Sphingolipid Synthesis Alleviates Airway Hyperreactivity[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2020, 63(5): 690-698
- [28] Ding S, Zhang J, Yin S, et al. Inflammatory cytokines tumour necrosis factor- α and interleukin-8 enhance airway smooth muscle contraction by increasing L-type Ca²⁺ channel expression [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2019, 46(1): 56-64
- [29] Wang L, Ginnan RG, Wang YX, et al. Interactive Roles of CaMKI-I/Ryanodine Receptor Signaling and Inflammation in Lung Diseases [J]. Adv Exp Med Biol, 2021, 1303(1): 305-317
- [30] Bergantin LB. The Interplay Between Asthma and Other Diseases: Role of Ca²⁺/cAMP Signalling[J]. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets, 2020, 20(3): 321-327