

全反式视黄酸诱导 ARPE-19 细胞凋亡的信号途径

吴娟 崔冬梅 杨晓 曾骏文

中山大学中山眼科中心 眼科学国家重点实验室, 广州 510060

崔冬梅现在深圳市眼科医院 518040

通信作者: 曾骏文, Email: zeng_zoc@163.com

【摘要】 目的 探讨全反式视黄酸(ATRA)体外诱导人视网膜色素上皮(ARPE)-19 细胞凋亡的信号途径。**方法** 采用不同浓度的 ATRA 处理 ARPE-19 细胞 24 h、48 h, 采用细胞计数试剂盒-8(CCK-8)法检测其细胞活性; 分别采用 0、2.5、5、10、15 和 20 $\mu\text{mol/L}$ ATRA 处理 ARPE-19 细胞 24 h, 通过流式细胞术和 Western blot 法检测细胞凋亡水平和 caspase 相关蛋白相对表达量; 分别采用 0、2.5、5、10 和 20 $\mu\text{mol/L}$ ATRA 处理 ARPE-19 细胞 24 h, 通过流式细胞术检测其总活性氧簇(ROS)水平和多重半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(multicaspase)水平, 通过实时荧光定量 PCR 法检测 caspase 相关基因 mRNA 相对表达量。其中 0 $\mu\text{mol/L}$ ATRA 组作为空白对照。**结果** CCK-8 检测结果显示, ATRA 处理 ARPE-19 细胞 24 h 和 48 h 后的半数抑制浓度(IC_{50})分别为 13.88 $\mu\text{mol/L}$ 和 11.99 $\mu\text{mol/L}$, 不同浓度 ATRA 处理 ARPE-19 细胞 24 h 和 48 h 后细胞存活率总体比较, 差异均有统计学意义($F = 176.60, 350.30$, 均 $P < 0.01$)。细胞培养 24 h 时, 2 $\mu\text{mol/L}$ 、6 $\mu\text{mol/L}$ ATRA 组细胞存活率较空白对照组高, 12、14、16、18、20 $\mu\text{mol/L}$ ATRA 组细胞存活率较空白对照组低, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。流式细胞术检测结果显示, 不同浓度 ATRA 处理 ARPE-19 细胞后 24 h, 细胞凋亡、multicaspase 及 ROS 水平总体比较差异均有统计学意义($F = 86.39, 166.84, 101.40$, 均 $P < 0.01$), 其中 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 和 5 $\mu\text{mol/L}$ ATRA 组细胞凋亡率较空白对照组下降, 10、15 和 20 $\mu\text{mol/L}$ ATRA 组较空白对照组升高, 2.5、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ ATRA 组 multicaspase 和 ROS 相对表达量较空白对照组升高, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$); Western blot 检测结果显示, 与空白对照组比较, 2.5、5、10、15、20 $\mu\text{mol/L}$ ATRA 组 caspase 9 蛋白相对表达量升高, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$); 与空白对照组比较, 2.5 $\mu\text{mol/L}$ ATRA 组 caspase 12 蛋白相对表达量升高, 5、10、15、20 $\mu\text{mol/L}$ ATRA 组逐渐降低, 2.5、15、20 $\mu\text{mol/L}$ ATRA 组与空白对照组比较差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$); 与空白对照组比较, 5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ ATRA 组 caspase 3 蛋白相对表达量升高, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$); 与空白对照组比较, 2.5、5、10、15、20 $\mu\text{mol/L}$ ATRA 组 cleaved caspase 3 蛋白相对表达量显著升高, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)。实时荧光定量 PCR 结果显示, 与空白对照组比较, 2.5、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ ATRA 组 caspase 9、caspase 12 mRNA 及 5 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$ ATRA 组 caspase 3 mRNA 相对表达量明显升高, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)。ATRA 浓度小于 10 $\mu\text{mol/L}$ 时, caspase 9 和 caspase 12 mRNA 的相对表达量呈浓度依赖性升高, 当浓度达 20 $\mu\text{mol/L}$ 时, 其相对表达量显著降低, 但仍高于空白对照组。**结论** ATRA 体外诱导 ARPE-19 细胞凋亡是通过激活 ROS 及内源性 caspase 依赖性凋亡途径导致的。

【关键词】 全反式视黄酸; 视网膜色素上皮细胞; 氧化应激反应; Caspase 凋亡途径

基金项目: 国家自然科学基金项目(81170872)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20190704-00293

All-trans retinoic acid-induced apoptosis signaling pathway in ARPE-19 cells

Wu Juan, Cui Dongmei, Yang Xiao, Zeng Junwen

State Key Laboratory of Ophthalmology, Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, China

Cui Dongmei is working at Shenzhen Eye Hospital, Shenzhen 518040, China

Corresponding author: Zeng Junwen, Email: zeng_zoc@163.com

【Abstract】 Objective To investigate all-trans retinoic acid(ATRA)-induced apoptosis signaling pathway in ARPE-19 cells *in vitro*. **Methods** The ARPE-19 cell was treated with different concentrations of ATRA for 24 hours and 48 hours. Cell counting kit-8 (CCK-8) was used to detect the cell viability in order to determine the experimental concentration range. Flow cytometry and Western blot method were performed to evaluate the apoptosis and caspase related protein levels in ARPE-19 cells treated with 0, 2.5, 5, 10, 15 and 20 $\mu\text{mol/L}$ of ATRA for

24 hours. Flow cytometry was used to detect the reactive oxygen species (ROS) and multicaspase levels and quantitative real-time PCR was carried out to determine the mRNA relative expression levels of caspase related proteins in ARPE-19 cells treated with 0, 2.5, 5, 10 and 20 $\mu\text{mol/L}$ of ATRA, and 0 $\mu\text{mol/L}$ ATRA group was used as the blank control group. **Results** CCK-8 test showed that the half maximal inhibitory concentration of ARPE-19 cells treated with different concentrations of ATRA for 24 hours and 48 hours were 13.88 $\mu\text{mol/L}$ and 11.99 $\mu\text{mol/L}$, respectively. The cell survival rates of ARPE-19 cells treated with different concentrations of ATRA for 24 hours and 48 hours were significantly different ($F = 176.60, 350.30$; both at $P < 0.01$). When cultured for 24 hours, the cell survival rates of ARPE-19 cells in the 2 $\mu\text{mol/L}$ and 6 $\mu\text{mol/L}$ of ATRA groups were higher than that of the blank control group (both at $P < 0.05$), and the cell survival rates of ARPE-19 cells in the 12, 14, 16, 18 and 20 $\mu\text{mol/L}$ of ATRA groups were lower than that of the blank control group (all at $P < 0.05$). Flow cytometry showed that there were significant differences in the apoptosis, ROS and multicaspase level among ARPE-19 cell groups treated with different concentrations of ATRA ($F = 86.39, 116.84, 101.40$; all at $P < 0.01$). The apoptosis rates of APRE-19 cells in the 2.5 $\mu\text{mol/L}$ and 5 $\mu\text{mol/L}$ of ATRA groups were significantly decreased than that of the blank control group, and the apoptosis rate of APRE-19 cells in the 10, 15 and 20 $\mu\text{mol/L}$ of ATRA groups were significantly increased than that of the blank control group (all at $P < 0.01$). The relative expression levels of multicaspase and ROS were significantly higher in the 2.5, 5, 10 and 20 $\mu\text{mol/L}$ of ATRA groups than that of the blank control group (all at $P < 0.01$). Western blot assay showed that the relative expression level of caspase 9 was increased in the 2.5, 5, 10, 15 and 20 $\mu\text{mol/L}$ of ATRA groups than that of the blank control group (all at $P < 0.05$). Compared with the blank control group, the relative expression levels of caspase 12 were increased in the 2.5 $\mu\text{mol/L}$ of ATRA group and reduced gradually in the 5, 10, 15 and 20 $\mu\text{mol/L}$ of ATRA groups, among which there were significant differences between the blank control group and 2.5, 15, and 20 $\mu\text{mol/L}$ of ATRA groups (all at $P < 0.05$). The relative expression level of caspase 3 was significantly increased in the 5, 10 and 20 $\mu\text{mol/L}$ of ATRA groups than that of the blank control group (all at $P < 0.05$). The relative expression level of cleaved caspase 3 was significantly increased in the 2.5, 5, 10, 15 and 20 $\mu\text{mol/L}$ of ATRA groups than that of the blank control group (all at $P < 0.01$). Quantitative real-time PCR assay showed that the relative expression levels of caspase 9 and caspase 12 mRNA were significantly higher in the 2.5, 5, 10 and 20 $\mu\text{mol/L}$ of ATRA groups than that of the blank control group (all at $P < 0.01$). The relative expression levels of caspase 3 mRNA were significantly higher in the 5 $\mu\text{mol/L}$ and 10 $\mu\text{mol/L}$ of ATRA groups than that of the blank control group (both at $P < 0.01$). When the concentration of ATRA was lower than 10 $\mu\text{mol/L}$, the relative expression levels of caspase 9 and caspase 12 mRNA were elevated in a concentration-dependent manner. When the concentration of ATRA reached 20 $\mu\text{mol/L}$, the relative expression levels of caspase 9 and caspase 12 mRNA were markedly decreased, but it was still higher than that of the blank control group. **Conclusions** ATRA induces apoptosis in ARPE-19 cells *in vitro* through activating the reactive oxygen species and endogenous caspase-dependent apoptotic pathway.

[**Key words**] All-trans retinoic acid; Retinal pigment epithelial cells; Response to oxidative stress; Caspase apoptotic pathway

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81170872)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20190704-00293

视觉循环也被称为类维生素 A 循环,是人类视觉的基础。全反式视黄酸(all-trans retinoic acid, ATRA)是维生素 A 的代谢产物^[1],对维生素 A 的代谢是视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)细胞的主要功能之一^[2-3]。RPE 细胞也可为光感受器细胞提供营养,维持光感受器外段的日常吞噬作用,使其保持兴奋性并实现自我更新^[4-5]。由于光感受器外段的吞噬作用、特殊的解剖位置和高代谢活性,RPE 细胞尤其容易受到损害^[6]。研究发现,ATRA 在 RPE 细胞内的过度积累可引起细胞毒性并导致细胞凋亡^[7-8],使眼底发生变性疾病。既往研究表明,由 ATRA 诱导并通过 NADPH 氧化酶介导的活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)参与了光感受器和 RPE 细胞的变性退化^[9],但关于

RPE 细胞变性的分子机制仍不清楚。本研究拟探讨 ATRA 体外诱导 ARPE-19 细胞凋亡的信号途径,以期对视网膜病变中 ATRA 的毒性作用提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

ARPE-19 细胞系购自美国 ATCC 细胞库。DMEM/F12 培养基、质量分数 0.25% 胰蛋白酶-乙二胺四乙酸(ethylenediamine tetraadetic acid, EDTA)(美国 Gibco 公司);胎牛血清(bovine serum albumin, BSA)、ATRA、二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, DMSO)(美国 Sigma 公司);青链霉素(100 $\mu\text{g/ml}$)、Trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司);细胞计数试剂盒-8(cell

counting kit-8, CCK8) (日本 Dojindo 公司); 膜联蛋白 V-荧光素异硫氰酸盐 (annexin V-fluorescein isothiocyanate, Annexin-V) 凋亡试剂盒 (美国 Becton 公司); Multicaspase 分析试剂盒 (MCH100109)、ROS 检测试剂盒、聚偏氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜 (美国 Merck Millipore 公司); Powerwave XS 微孔板分光光度计 (美国 BioTek 公司); Brilliant SYBR Green 试剂盒 (日本 Takara 公司); 引物序列 (上海 Sangon Biotech 公司); RIPA 裂解缓冲液 (上海碧云天公司); 兔源 caspase 12 单克隆抗体 (ab62484)、兔源 caspase 3 单克隆抗体 (ab90437) (美国 Abcam 公司); 兔源 caspase 8 单克隆抗体 (#4790)、兔源 caspase 9 单克隆抗体 (ab669514)、兔源 cleaved caspase 3 单克隆抗体 (#9964)、兔源 GAPDH 单克隆抗体 (#5174) (美国 Cell Signaling Technology 公司)。流式细胞仪 (美国 Beckman 公司); ECL 蛋白印迹检测系统 (美国 Millipore 公司); 酶标仪 (日本 Olympus 公司); Quantity One 成像软件、实时荧光定量 PCR 检测系统 (美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 ARPE-19 细胞用含质量分数 10% BSA、青链霉素的 DMEM/F12 培养基, 置于 37 °C、体积分数 5% CO₂ 的加湿培养箱中培养。每 2~3 d 更换 1 次培养基。采用 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 溶液消化 2 min, 在 25 mm² 培养瓶中以 1:4~1:6 传代培养。在 100 mm² 培养皿中培养至 70%~80% 融合, 提取蛋白质。

1.2.2 ATRA 制备 将 ATRA 溶解于 DMSO 至 1×10⁻² mol/L, 分装成 10 ml 于 -20 °C 下冷冻保存, 避光, 使用前使用 DMEM/F12 稀释 ATRA 至工作浓度。

1.2.3 ARPE-19 细胞形态变化观察 将 ARPE-19 细胞以 2.5×10⁵/ml 密度接种于 6 孔板, 分别采用 0、2.5、5、10 和 20 μmol/L ATRA 处理细胞 24 h, 观察不同 ATRA 浓度下 ARPE-19 细胞形态变化。

1.2.4 CCK-8 法检测细胞存活率 将 ARPE-19 细胞以 5×10⁴/ml 密度接种至 96 孔板中, 培养基为 100 μl。在含有 10% BSA 的 DMEM/F12 培养基中预培养 24 h 后, 分别添加 0、2、4、6、8、10、12、14、16、18 和 20 μmol/L ATRA 进行实验, 其中不添加 ATRA 者设为空白对照组。培养 24 h 或 48 h 后, 去除上清液, 每孔加入含有 10 μl CCK8 的 DMEM/F12 100 μl, 在 37 °C 下再培养 4 h。采用 CCK-8 法检测细胞增生情况, 使用微孔板阅读器在 450 nm 处测量吸光度 (A) 值。所有实验均独立重复 3 次。CCK-8 细胞存活率 = (实验孔 A 值 - 空白孔 A 值) / (对照孔 A 值 - 空白孔 A 值) × 100%。

1.2.5 流式细胞术检测细胞凋亡水平 采用 Annexin-V 凋亡试剂盒检测细胞凋亡水平。取 ARPE-19 细胞以 2.5×10⁵/ml 密度接种于 6 孔板, 分别采用 0、2.5、5、10、15 和 20 μmol/L ATRA 处理细胞, 其中不添加 ATRA 者设为空白对照组, 处理 24 h 后收集细胞培养液备用, 使用 0.25% 胰蛋白酶消化收集细胞, 用预冷磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) 洗 1 次, 离心半径 13.5 cm, 1 000 r/min 离心 3 min 收集细胞, 预冷 PBS 洗 1 次, 收集细胞并将其悬浮在含有 Annexin-V 和碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 的 1 倍结合缓冲液中 30 min, 用流式细胞仪在 488 nm 激发波长下检测红色荧光及光散射情况, 根据阴性对照组设定阴性对照区, 检测各分区的数值, 所有实验独立重复 3 次。

1.2.6 流式细胞术检测细胞 multicaspase 水平 采用 Multicaspase 分析试剂盒快速测定 caspase 的激活、细胞质膜渗透和细胞死亡情况。取 ARPE-19 细胞以 2.5×10⁵/ml 密度接种于 6 孔板, 分别采用 0、2.5、5、10 和 20 μmol/L ATRA 处理细胞, 其中不添加 ATRA 者设为空白对照组, 处理后 24 h 收集细胞培养液备用, 使用 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 溶液消化收集细胞, 用预冷 PBS 洗 1 次, 1 000 r/min 离心 3 min 收集细胞, 预冷 PBS 洗 1 次, 每组加入含有 7-氨基放线菌素 D (7-Aminoactinomycin D, 7-AAD) 和 PI 的 1 倍结合缓冲液, 孵育 30 min, 用流式细胞仪在 488 nm 激发波长下检测红色荧光及光散射情况, 根据阴性对照组设定阴性对照区, 检测各分区的数值, 列入统计计算的为死细胞区+晚调细胞区+早调细胞区, 所有实验独立重复 3 次。

1.2.7 流式细胞术检测细胞 ROS 水平 采用 DCFH-DA 染色法检测总 ROS 水平。取 ARPE-19 细胞以 2.5×10⁵/ml 密度接种于 6 孔板, 分别采用 0、2.5、5、10 和 20 μmol/L ATRA 处理细胞, 其中不添加 ATRA 者设为空白对照组, 处理后 24 h 收集细胞培养液备用, 使用 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 溶液消化收集细胞, 用预冷 PBS 洗 1 次, 1 000 r/min 离心 3 min, 收集细胞, 预冷 PBS 洗 1 次, 每组加入 1 μmol/L ROS 和荧光探针 DCFH-DA 孵育 30 min, 用流式细胞仪在 488 nm 激发波长下检测红色荧光及光散射情况, 红色波形代表 ROS 阳性细胞, 荧光染色阳性数值即为 ROS 水平。所有实验独立重复 3 次。

1.2.8 实时荧光定量 PCR 检测 caspase 相关靶基因 mRNA 相对表达量 取 ARPE-19 细胞以 2.5×10⁵/ml 密度接种于 6 孔板, 分别采用 0、2.5、5、10 和 20 μmol/L ATRA 处理细胞, 其中不添加 ATRA 者设为空白对照组, 处理后 24 h 收集细胞培养液备用,

使用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA, 采用 Brilliant SYBR Green 试剂盒进行实时荧光定量 PCR 反应。引物序列由中国上海 Sangon Biotech 公司提供(表 1)。空白对照组(无 cDNA)每个基因没有扩增, Ct 值大于 33。对至少 3 个不同的实验样品进行实时荧光定量 PCR 反应, 并对每个样品进行 3 次评估。以 GAPDH 为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算每个靶基因的相对表达量。

1.2.9 Western blot 法检测 caspase 相关靶蛋白相对表达量 采用 0、2.5、5、10、15 和 20 $\mu\text{mol/L}$ ATRA 处理 ARPE-19 细胞后 24 h 收集细胞, PBS 洗涤后 RIPA 裂解缓冲液溶解细胞, 用 SDS-PAGE 凝胶电泳。将蛋白质转移至 PVDF 膜, 并在室温下用质量分数 5% 脱脂牛奶封闭 1 h。用质量分数 5% BSA 稀释 caspase 12 (1:1 000)、caspase 3 (1:1 000)、caspase 8 (1:1 000)、caspase 9 (1:1 000)、cleaved caspase 3 (1:1 000)、GAPDH (1:500) 抗体, 摇床上孵育 30 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 孵育时间不少于 12 h, TBST 洗膜 5 min 共 3 次。置于 HRP 标记的山羊抗兔二抗中摇床上孵育 1 h, 采用 ECL 化学发光法显色, 使用 Bio-Rad Quantity One 成像软件分析条带。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计学软件和 GraphPad Prism 6 图形软件进行统计分析和作图。计量资料数据经 W 检验证实呈正态分布, 以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示; 经 Levene 检验方差齐性。各组细胞生存率和凋亡率、multicaspase 水平、ROS 水平及 caspase 相关 mRNA 和蛋白相对表达量总体比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 Dunnett-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度 ATRA 对 ARPE-19 细胞活性的影响

ARPE-19 细胞在 ATRA 浓度为 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 和 5 $\mu\text{mol/L}$ 时形态保持正常, 10 $\mu\text{mol/L}$ 时细胞开始皱缩, 20 $\mu\text{mol/L}$ 时细胞皱缩明显, 数量显著下降(图 1)。CCK-8 法检测结果提示, 不同浓度 ATRA 处理 ARPE-19 细胞 24 h 和 48 h 细胞存活率总体比较差异均有统计学意义 ($F = 176.60、350.30$, 均 $P < 0.01$)。2 $\mu\text{mol/L}$ 、6 $\mu\text{mol/L}$ ATRA 组细胞培养 24 h 和 48 h 后细胞存活率较空白对照组升高, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$); 细胞培养 24 h 时, 12、14、16、18、20 $\mu\text{mol/L}$ ATRA 组细胞存活率低于空白对照组, 细胞培养 48 h 时, 10、12、14、16、18、20 $\mu\text{mol/L}$ ATRA 组细胞存活率低于空白对照组, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$); 20 $\mu\text{mol/L}$ ATRA 处理 24 h 后细胞存活率下降到 30% 以下(表 2)。ATRA 对细胞存活具有剂量依赖性, 高剂量抑制细胞存活, ATRA 处理 24 h 和 48 h 后的半数抑制浓度 (half maximal inhibitory concentration, IC_{50}) 分别为 13.88 $\mu\text{mol/L}$ 和 11.99 $\mu\text{mol/L}$, 选择处理 24 h 进行后期实验。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列
Table 1 Primer sequences of quantitative real-time PCR

基因	基因库号码	引物序列(5'-3')	扩增片段长度(bp)
Caspase 3	NM_004346	正向: CATGGAAGCGAATCAATGGACT	139
		反向: CTGTACCAGACCGAGATGTCA	
Caspase 8	NM_033356	正向: GTTGTGTGGGGTAATGACAATCT	222
		反向: TCAAAGGTCGTGGTCAAAGCC	
Caspase 9	NM_001229.4	正向: CTCAGACCAGAGATTCGCAAAC	116
		反向: GCATTTCCCTCAAACCTCAA	
Caspase 12	NM_001191016.2	正向: AACAAACCGTAAGTCCAGAGT	118
		反向: CTGCACCGGCTTTTCCACT	
GAPDH	NM_001256799.2	正向: GGACCGAGATCCCTCCAAAAT	197
		反向: GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG	

注: PCR: 聚合酶链式反应; GAPDH: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶

Note: PCR: polymerase chain reaction; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase



图 1 不同浓度 ATRA 处理 ARPE-19 细胞 24 h 细胞形态变化(标尺 = 50 μm) A: 0 $\mu\text{mol/L}$ ATRA B: 2.5 $\mu\text{mol/L}$ ATRA C: 5 $\mu\text{mol/L}$ ATRA D: 10 $\mu\text{mol/L}$ ATRA E: 20 $\mu\text{mol/L}$ ATRA

Figure 1 The morphology changes of ARPE-19 cells treated with different concentrations of ATRA for 24 hours (bar = 50 μm)

A: 0 $\mu\text{mol/L}$ ATRA B: 2.5 $\mu\text{mol/L}$ ATRA C: 5 $\mu\text{mol/L}$ ATRA D: 10 $\mu\text{mol/L}$ ATRA E: 20 $\mu\text{mol/L}$ ATRA

表 2 不同浓度 ATRA 处理 ARPE-19 细胞后不同时间点细胞存活率比较 (mean±SD, %)

Table 2 Comparison of cell survival rates of ARPE-19 cells treated with different concentrations of ATRA at different time points (mean±SD, %)

ATRA 浓度 (μmol/L)	样本量	不同时间点细胞存活率	
		24 h	48 h
0	3	100.00±0.00	100.00± 0.00
2	3	108.33±3.51 ^a	131.67± 9.07 ^a
4	3	107.33±6.11	107.67± 6.02
6	3	111.33±6.51 ^a	128.00±11.27 ^a
8	3	105.00±7.00	101.00± 1.73
10	3	98.00±4.36	76.00± 2.64 ^a
12	3	78.67±8.62 ^a	40.67± 5.51 ^a
14	3	34.93±2.57 ^a	25.67± 4.51 ^a
16	3	27.00±1.00 ^a	20.57± 2.54 ^a
18	3	16.34±5.51 ^a	16.73± 1.72 ^a
20	3	26.33±3.51 ^a	9.08± 1.30 ^a
F 值		176.60	350.30
P 值		<0.01	<0.01

注:与各自 0 μmol/L ATRA (空白对照)组比较, ^aP<0.01 (单因素方差分析, Dunnett-t 检验) ATRA:全反式视黄酸

Note: Compared with the respective 0 μmol/L ATRA (blank control) group, ^aP<0.01 (One way ANOVA, Dunnett-t test) ATRA: all-trans retinoic acid

2.2 不同浓度 ATRA 对 ARPE-19 细胞凋亡及细胞中 multicaspase 和 ROS 水平的影响

0、2.5、5、10、15、20 μmol/L ATRA 处理后 ARPE-19 细胞凋亡率分别为 (7.52±0.00)%、(5.81±0.13)%、(3.93±0.07)%、(19.31±4.47)%、(51.79±7.35)%和(56.42±6.69)%,总体比较差异有统计学意义 (F = 86.39, P < 0.01), 其中 2.5 μmol/L 和 5 μmol/L ATRA 组细胞凋亡率较空白对照组明显下降, 10、15 和 20 μmol/L ATRA 组细胞凋亡率呈浓度依赖性升高, 差异均有统计学意义 (均 P < 0.01), 当 ATRA 浓度高于 10 μmol/L 时, 细胞凋亡率明显上调。不同浓度 ATRA 处理 ARPE-19 细胞 24 h 后细胞 multicaspase 和 ROS 相对表达量总体比较差异均有统计学意义 (F = 166.84、101.40, 均 P < 0.01)。2.5、5、10、20 μmol/L ATRA 组 multicaspase 和 ROS 的相对表达量均较空白对照组升高, 差异均有统计学意义 (均 P < 0.01) (图 2, 表 3)。

2.3 不同浓度 ATRA 处理 ARPE-19 细胞中 caspase 相关靶基因 mRNA 和蛋白相对表达量比较

Western blot 检测结果显示, 不同浓度 ATRA 组 caspase 8 蛋白相对表达量总体比较, 差异无统计学意义 (F = 2.91, P = 0.06); caspase 9、caspase 12、caspase 3、cleaved-caspase3 蛋白相对表达量总体比较差异均有统

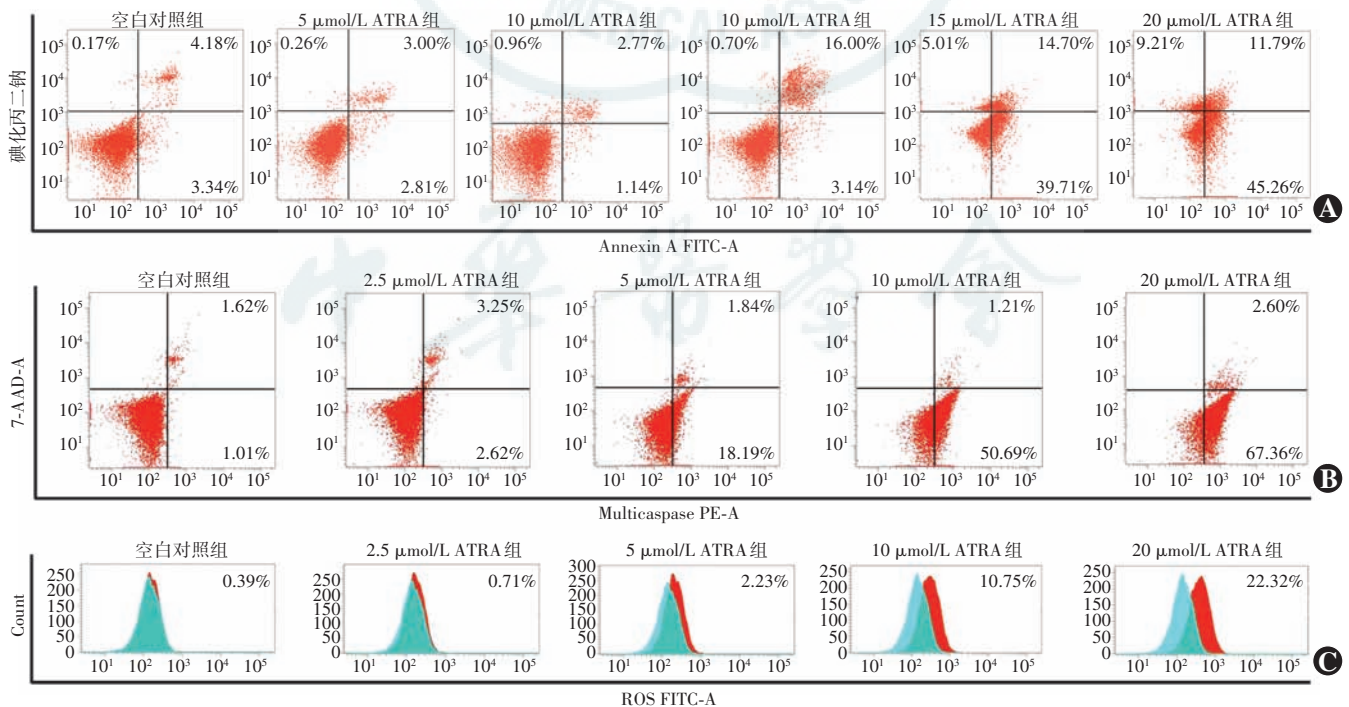


图 2 流式细胞仪检测不同浓度 ATRA 组 ARPE-19 细胞凋亡及细胞中 multicaspase、ROS 水平 A: 凋亡水平检测 B: multicaspase 水平检测 C: ROS 水平检测 7-AAD: 7-氨基放线菌素 D: ROS: 活性氧簇; ATRA: 全反式视黄酸

Figure 2 Apoptosis, multicaspase and ROS levels in ARPE-19 cells treated with different concentrations of ATRA by flow cytometry A: apoptosis level B: multicaspase level C: ROS level 7-AAD: 7-Aminoactinomycin D; ROS: reactive oxygen species; ATRA: all-trans retinoic acid

表 3 不同浓度 ATRA 处理后 ARPE-19 细胞中 multicaspase、ROS 相对表达量比较 (mean±SD)

Table 3 Comparison of relative expression levels of multicaspase, ROS in ARPE-19 cells among different concentrations of ATRA treatment (mean±SD)

ATRA 浓度 (μmol/L)	样本量	multicaspase 相对表达量	ROS 相对表达量
0	3	2.71±0.08	0.39±0.01
2.5	3	5.62±0.57 ^a	0.71±0.01 ^a
5	3	20.42±2.77 ^a	2.12±0.08 ^a
10	3	51.90±5.92 ^a	11.63±1.62 ^a
20	3	70.73±6.09 ^a	23.38±3.46 ^a
F 值		166.84	101.40
P 值		<0.01	<0.01

注:与各自 0 μmol/L ATRA (空白对照)组比较, ^aP<0.05 (单因素方差分析, Dunnett-t 检验) ATRA:全反式视黄酸; ROS:活性氧簇

Note: Compared with the respective 0 μmol/L ATRA (blank control) group, ^aP<0.01 (One way ANOVA, Dunnett-t test) ATRA: all-trans retinoic acid; ROS: reactive oxygen species

计学意义 ($F = 10.31, 8.19, 3.78, 138.51$, 均 $P < 0.05$)。与空白对照组比较, 2.5、5、10、15、20 μmol/L ATRA 组 caspase 9 蛋白相对表达量升高, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$); 2.5 μmol/L ATRA 组 caspase 12 蛋白相对表达量升高, 5、10、15、20 μmol/L ATRA 组逐渐降低, 2.5、15、20 μmol/L ATRA 组差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。与空白对照组比较, 5、10、20 μmol/L ATRA 组 caspase 3 蛋白相对表达量升高, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。与空白对照组比较, 2.5、5、10、15、20 μmol/L ATRA 组 cleaved caspase 3 蛋白相对表达量显著升高, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$) (图 3, 表 4)。

实时荧光定量 PCR 结果显示, 不同浓度 ATRA 组 caspase 8 mRNA 相对表达量总体比较差异无统计学意义 ($F = 3.02, P = 0.07$), caspase 9、caspase 12、caspase 3 mRNA 相对表达量总体比较差异均有统计学意义 ($F = 212.90, 60.85, 32.77$, 均 $P < 0.01$)。与空白对照组比较, 2.5、5、10、20 μmol/L ATRA 组 caspase 9 mRNA 相对表达量明显升高, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$); 2.5 μmol/L 及 5 μmol/L ATRA 组 caspase 9 mRNA 相对表达量逐渐升高, 随着浓度继续升高其相对表达量逐渐下降; 2.5、5、10、20 μmol/L ATRA 组 caspase 12 mRNA 相对表达量较空白对照组明显升高, 差异均有统计学意义

(均 $P < 0.01$), 2.5、5 及 10 μmol/L ATRA 组其相对表达量逐渐升高, 20 μmol/L ATRA 组其相对表达量轻度下降; 5 μmol/L、10 μmol/L ATRA 组 caspase 3 mRNA 相对表达量较空白对照组明显升高, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$); ATRA 浓度小于 10 μmol/L 时, caspase 9 和 caspase 12 的 mRNA 相对表达量呈浓度依赖性升高, 当浓度达 20 μmol/L 时, 其相对表达量呈下降趋势 (表 5)。

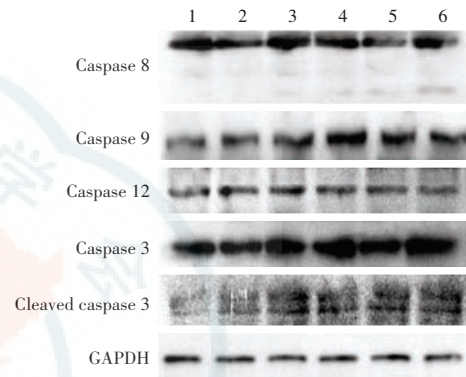


图 3 Western blot 法检测不同浓度 ATRA 组 caspase 8、caspase 9、caspase 12、caspase 3 及 cleaved caspase 3 表达水平 1: 0 μmol/L ATRA 组; 2: 2.5 μmol/L ATRA 组; 3: 5 μmol/L ATRA 组; 4: 10 μmol/L ATRA 组; 5: 15 μmol/L ATRA 组; 6: 20 μmol/L ATRA 组 GAPDH: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶

Figure 3 Expression levels of caspase 8, caspase 9, caspase 12, caspase 3 and cleaved caspase 3 in ARPE-19 cells treated with different concentrations of ATRA by Western blot 1: 0 μmol/L ATRA group; 2: 2.5 μmol/L ATRA group; 3: 5 μmol/L ATRA group; 4: 10 μmol/L ATRA group; 5: 15 μmol/L ATRA group; 6: 20 μmol/L ATRA group GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

表 4 不同浓度 ATRA 处理 ARPE-19 细胞的 caspase 相关蛋白相对表达量比较 (mean±SD)

Table 4 Comparison of relative expression levels of caspase related proteins in ARPE-19 cells among different concentrations of ATRA treatment (mean±SD)

ATRA 浓度 (μmol/L)	样本量	不同蛋白相对表达量				
		caspase 8	caspase 9	caspase 12	caspase 3	cleaved caspase 3
0	3	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
2.5	3	1.07±0.25	1.34±0.19 ^a	1.27±0.04 ^a	1.19±0.18	1.91±0.02 ^a
5	3	1.29±0.19	1.71±0.21 ^a	0.95±0.27	1.57±0.29 ^a	3.12±0.09 ^a
10	3	1.18±0.21	1.92±0.13 ^a	0.69±0.24	1.49±0.20 ^a	2.38±0.22 ^a
15	3	0.78±0.16	1.42±0.12 ^a	0.68±0.09 ^a	1.16±0.25	2.43±0.15 ^a
20	3	1.09±0.12	1.58±0.26 ^a	0.59±0.08 ^a	1.46±0.17 ^a	2.94±0.02 ^a
F 值		2.91	10.31	8.19	3.78	138.51
P 值		0.06	<0.01	<0.01	0.03	<0.01

注:与各自 0 μmol/L ATRA (空白对照)组比较, ^aP<0.05 (单因素方差分析, Dunnett-t 检验) ATRA:全反式视黄酸

Note: Compared with the respective 0 μmol/L ATRA (blank control) group, ^aP<0.05 (One way ANOVA, Dunnett-t test) ATRA: all-trans retinoic acid

表 5 不同浓度 ATRA 处理 ARPE-19 的 caspase 8、caspase 9、caspase 12、caspase 3 mRNA 相对表达量比较 (mean±SD)
Table 5 Comparison of the relative expression levels of caspase 8, caspase 9, caspase 12 and caspase 3 mRNA in ARPE-19 cells among different concentrations of ATRA treatment (mean±SD)

ATRA 浓度 (μmol/L)	样本量	不同 mRNA 相对表达量			
		caspase 8	caspase 9	caspase 12	caspase 3
0	3	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
2.5	3	0.97±0.03	4.49±0.19 ^a	1.73±0.19 ^a	1.02±0.10
5	3	1.16±0.20	16.33±1.60 ^a	2.16±0.26 ^a	1.23±0.04 ^a
10	3	1.18±0.08	11.30±0.66 ^a	4.98±0.73 ^a	1.26±0.04 ^a
20	3	1.03±0.06	1.78±0.23 ^a	2.63±0.70 ^a	0.83±0.04 ^a
F 值		3.02	212.90	60.85	32.77
P 值		0.07	<0.01	<0.01	<0.01

注:与各自 0 μmol/L ATRA (空白对照)组比较,^a $P<0.01$ (单因素方差分析, Dunnett-*t* 检验) ATRA:全反式视黄酸

Note: Compared with the respective 0 μmol/L ATRA (blank control) group, ^a $P<0.01$ (One way ANOVA, Dunnett-*t* test) ATRA: all-trans retinoic acid

3 讨论

ATRA 是视觉循环中不可缺少的部分,但是过度累积也会造成光感受器细胞和 RPE 细胞的凋亡。作为视网膜内的一种内源性化合物,ATRA 可通过视黄醛脱氢酶还原而被清除,或形成一系列困在 RPE 细胞溶酶体中的视网膜衍生物^[10-11]。其可以解释 RPE 细胞对低浓度的 ATRA 耐受,光感受器细胞和 RPE 细胞有一套内在的机制清除游离 ATRA,但当 ATRA 过度累积会导致 RPE 细胞受损,最终引起细胞凋亡。

本课题组之前的研究已证实, $1 \times 10^{-9} \sim 1 \times 10^{-6}$ mol/L ATRA 可激活 ARPE-19 细胞中的丝裂原活化蛋白激酶途径,从而调节细胞增生^[12],推测低浓度 ATRA 可能促进细胞增生,减少细胞凋亡,与本研究中低浓度 ATRA 降低凋亡水平结果相符。流式细胞术检测结果显示,随着 ATRA 浓度的升高, multicaspase 水平及 ROS 水平显著升高。Western blot 及实时荧光定量 PCR 检测结果显示, caspase 9、caspase 12、caspase 3 及 cleaved caspase 3 分子在凋亡过程中被激活,而 caspase 8 分子未被激活,说明 ATRA 过量累积激活了 ARPE-19 细胞内源性 caspase 依赖性凋亡途径。

氧化应激可由 ROS 引起,持续过度的 ROS 产生和有限的抗氧化屏蔽可产生氧化应激,与各种生物反应,如凋亡相关^[13-14]。研究表明,过多的 ROS 可引起线粒体功能紊乱,导致线粒体膜电位耗散和细胞凋亡^[14]。先前的研究表明,经 ATRA 处理的细胞表现出明显的线粒体膜电位下降^[15]。任何通过线粒体呼吸链的电子传递损伤都会导致氧的不完全还原,最终导致 ROS 的形成^[16],这可以解释 ROS 在线粒体中定位

的原因。ATRA 诱导线粒体中的 ROS 过度产生可能是直接导致线粒体功能障碍的另一种途径。

细胞凋亡包括内源性途径(线粒体途径)、外源性途径、细胞毒性 CD8⁺T 细胞介导途径和 caspase 途径,所有途径均以 caspase 激活为最终手段。细胞凋亡过程中 caspase 活化和线粒体释放细胞色素 C (cytochrome C, CytC) 的相对时间决定了细胞凋亡的 2 条主要途径:(1) 外源途径 通过激活死亡受体,效应器 caspase 在线粒体改变之前被激活;(2) 内在途径 CytC 在 caspase 激活之前从线粒体膜间隙释放。值得注意的是, caspase 3 是最重要的效应蛋白 caspase, 2 种途径通过 caspase 3 融合^[17-18]。

Caspase 是含有半胱氨酸蛋白酶的一个促细胞凋亡家族,该家族通常以无活性酶原形式存在于细胞中,由于 caspase 可自我活化并能相互激活,因此凋亡过程一旦触发,即呈级联放大效应。Caspase 9 位于级联反应上游,当凋亡起始信号作用于线粒体后,引起线粒体释放 CytC,接着 CytC 与凋亡蛋白酶活化因子-1 (apoptotic protease activating factor, Apaf-1) 结合并使 Apaf-1 构象改变形成八聚体,后者与 caspase 9 结合并诱导其发生自我催化,活化的 caspase 9 进一步激活下游的 caspase,使级联反应进一步放大,因此 caspase 9 是细胞线粒体依赖的凋亡途径中重要起始因子^[19]。Canton 等^[20]用补骨脂素联合 A 波段紫外线的暴露疗法处理淋巴细胞株 Jurkat 细胞发现, caspase 9 激活与线粒体功能障碍密切相关。

Rao 等^[21]用布雷菲德菌素 A 和毒胡萝卜素作用于 293T 细胞时发生内质网应激,最后引起细胞凋亡,经检测 caspase 12 的含量明显增加,而用三苯氧胺诱导的细胞凋亡并未引起内质网应激,相应的 caspase 12 含量未发生变化。Nakagawa 等^[22]研究发现,减少体外培养的神经胶质细胞氧和葡萄糖的摄入,引起内质网应激,导致 caspase 12 被切割成了许多片段而被激活。这些研究结果都证明, caspase 12 的激活是内质网应激引起的凋亡途径之一,其可以引起其他 caspase 家族活化。Sanges 等^[23]研究发现,当视网膜出现变性时,细胞内部出现钙离子储存失衡,导致钙蛋白酶激活,影响线粒体系统导致凋亡诱导因子产生,同时影响内质网系统产生 caspase 12。本研究中, ATRA 诱导后 caspase 12 蛋白表达量下降, mRNA 表达量上升,说明

在凋亡过程中, caspase 12 很有可能激活后被切割成了片段, 从而引起内质网应激反应。Datta 等^[24] 研究证实, 激活的 caspase 12 从内质网进入到细胞液中作用于 caspase 9, 激活 caspase 3 最后引起细胞凋亡。Hitomi 等^[25] 也认为, caspase 12 直接激活了 caspase 3 最后引起细胞凋亡。在所有 caspase 家族中, 最频繁激活的是 caspase 3, 进而形成 cleaved caspase 3, 其催化主要细胞蛋白的分裂和染色质的凝聚。Caspase 还可激活 DNA 酶, 该酶通过核间小体碎片化导致 DNA 断裂^[26]。本研究结果显示, ATRA 处理后 cleaved caspase 3 蛋白相对表达量大幅上调, 说明最终 caspase 3 的激活, 导致细胞凋亡。

有研究证实, ATRA 介导过度产生的 ROS 是内质网应激诱导 RPE 细胞凋亡的早期事件, 通过抗氧化剂清除 ROS 可能是保护细胞凋亡的有效策略^[27]。尽管 ATRA 对视力的维持是必不可少的, 但这种分子在 RPE 细胞内的过度积累会导致细胞毒性。本研究结果显示, ATRA 体外诱导 ARPE-19 细胞凋亡是通过激活 ROS 及内源性 caspase 依赖性凋亡途径导致的。这些途径的诱导导致细胞内 ROS 水平升高, 线粒体膜电位降低, 进而导致内质网应激反应和 caspase 依赖途径的激活, 最终导致细胞死亡。本研究扩大了我们对 ATRA 对人 RPE 细胞毒性的认识, 其特征是 ATRA 清除延迟, 在减轻 ATRA 对细胞器有害作用的基础上, 为 RPE 细胞的靶向治疗开辟了新的途径。

利益冲突 所有作者均声明不存在任何利益冲突

参考文献

- Saari JC. Vitamin A and vision [J]. *Subcell Biochem*, 2016, 81 : 231-259. DOI: 10. 1007/978-94-024-0945-1_9.
- Maeda A, Maeda T, Golczak M, et al. Retinopathy in mice induced by disrupted all-trans-retinal clearance [J/OL]. *J Biol Chem*, 2008, 283(39) : 26684-26693 [2020-06-25]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18658157/>. DOI: 10. 1074/jbc. M804505200.
- Masutomi K, Chen C, Nakatani K, et al. All-trans retinal mediates light-induced oxidation in single living rod photoreceptors [J]. *Photochem Photobiol*, 2012, 88(6) : 1356-1361. DOI: 10. 1111/j. 1751-1097. 2012. 01129. x.
- Sparrow JR, Wu Y, Kim CY, et al. Phospholipid meets all-trans-retinal: the making of RPE bisretinoids [J]. *J Lipid Res*, 2010, 51(2) : 247-261. DOI: 10. 1194/jlr. R000687.
- He S, Young J, Kim YH, et al. Endoplasmic reticulum stress induced by oxidative stress in retinal pigment epithelial cells [J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2008, 246(5) : 677-683. DOI: 10. 1007/s00417-008-0770-2.
- Ao J, Wood JP, Chidlow G, et al. Retinal pigment epithelium in the pathogenesis of age-related macular degeneration and photomodulation as a potential therapy? [J]. *Clin Exp Ophthalmol*, 2018, 46(6) : 670-686. DOI: 10. 1111/ceo. 13121.
- Li J, Cai X, Xia Q, et al. Involvement of endoplasmic reticulum stress in all-trans-retinal-induced retinal pigment epithelium degeneration [J]. *Toxicol Sci*, 2015, 143(1) : 196-208. DOI: 10. 1093/toxsci/ kfu223.
- Maeda A, Maeda T, Golczak M, et al. Involvement of all-trans-retinal in acute light-induced retinopathy of mice [J/OL]. *J Biol Chem*, 2009, 284(22) : 15173-15183 [2020-06-28]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19304658/>. DOI: 10. 1074/jbc. M900322200.
- Chen Y, Okano K, Maeda T, et al. Mechanism of all-trans-retinal toxicity with implications for stargardt disease and age-related macular degeneration [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(7) : 5059-5069. DOI: 10. 1074/jbc. M111. 315432.
- Parker RO, Crouch RK. Retinol dehydrogenases (RDHs) in the visual cycle [J]. *Exp Eye Res*, 2010, 91(6) : 788-792. DOI: 10. 1016/j. exer. 2010. 08. 013.
- Sparrow JR, Wu Y, Kim CY, et al. Phospholipid meets all-trans-retinal: the making of RPE bisretinoids [J]. *J Lipid Res*, 2010, 51(2) : 247-261. DOI: 10. 1194/jlr. R000687.
- McFadden SA, Howlett MH, Mertz JR. Retinoic acid signals the direction of ocular elongation in the guinea pig eye [J]. *Vision Res*, 2004, 44(7) : 643-653. DOI: 10. 1016/j. visres. 2003. 11. 002.
- Matsuzawa A, Ichijo H. Stress-responsive protein kinases in redox-regulated apoptosis signaling [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2005, 7(3-4) : 472-481. DOI: 10. 1089/ars. 2005. 7. 472.
- Chiu WH, Luo SJ, Chen CL, et al. Vinca alkaloids cause aberrant ROS-mediated JNK activation, Mcl-1 downregulation, DNA damage, mitochondrial dysfunction, and apoptosis in lung adenocarcinoma cells [J]. *Biochem Pharmacol*, 2012, 83(9) : 1159-1171. DOI: 10. 1016/j. bcp. 2012. 01. 016.
- Maiese K, Chong ZZ, Li F, et al. Erythropoietin: elucidating new cellular targets that broaden therapeutic strategies [J]. *Prog Neurobiol*, 2008, 85(2) : 194-213. DOI: 10. 1016/j. pneurobio. 2008. 02. 002.
- Wang Y, Fang J, Leonard SS, et al. Cadmium inhibits the electron transfer chain and induces reactive oxygen species [J]. *Free Radic Biol Med*, 2004, 36(11) : 1434-1443. DOI: 10. 1016/j. freeradbiomed. 2004. 03. 010.
- Julien O, Wells JA. Caspases and their substrates [J]. *Cell Death Differ*, 2017, 24(8) : 1380-1389. DOI: 10. 1038/cdd. 2017. 44.
- Boland K, Flanagan L, Prehn JH. Paracrine control of tissue regeneration and cell proliferation by caspase-3 [J/OL]. *Cell Death Dis*, 2013, 4 : e725 [2020-06-23]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23846227/>. DOI: 10. 1038/cddis. 2013. 250.
- 杨士英, 赵亚刚. 胃癌中 Livin 与 Caspase-9 关系的研究进展 [J]. *临床军医杂志*, 2012, 40(2) : 484-487. DOI: 10. 3969/j. issn. 1671-3826. 2012. 02. 085.
- Canton M, Caffieri S, Dall'Acqua F, et al. PUVA-induced apoptosis involves mitochondrial dysfunction caused by the opening of the permeability transition pore [J]. *FEBS Lett*, 2002, 522(1-3) : 168-172. DOI: 10. 1016/s0014-5793(02)02926-5.
- Rao RV, Hermel E, Castro-Obregon S, et al. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. Mechanism of caspase activation [J/OL]. *J Biol Chem*, 2001, 276(36) : 33869-33874 [2020-06-29]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11448953/>. DOI: 10. 1074/jbc. M10222 5200.
- Nakagawa T, Yuan J. Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis [J]. *J Cell Biol*, 2000, 150(4) : 887-894. DOI: 10. 1083/jcb. 150. 4. 887.
- Sanges D, Comitato A, Tammaro R, et al. Apoptosis in retinal degeneration involves cross-talk between apoptosis-inducing factor (AIF) and caspase-12 and is blocked by calpain inhibitors [J/OL]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(46) : 17366-17371 [2020-06-21]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17088543/>. DOI: 10. 1073/pnas. 0606276103.
- Datta D, Khatri P, Singh A, et al. Mycobacterium fortuitum-induced ER-mitochondrial calcium dynamics promotes calpain/caspase-12/caspase-9 mediated apoptosis in fish macrophages [J/OL]. *Cell Death Discov*, 2018, 4 : 30 [2020-06-23]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29531827/>. DOI: 10. 1038/s41420-018-0034-9.
- Hitomi J, Katayama T, Taniguchi M, et al. Apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress depends on activation of caspase-3 via caspase-12 [J]. *Neurosci Lett*, 2004, 357(2) : 127-130. DOI: 10. 1016/j. neutlet. 2003. 12. 080.
- Lossi L, Castagna C, Merighi A. Caspase-3 mediated cell death in the normal development of the mammalian cerebellum [J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(12) : 3999 [2020-06-15]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30545052/>. DOI: 10. 3390/ijms19123999.
- Walter P, Ron D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation [J]. *Science*, 2011, 334(6059) : 1081-1086. DOI: 10. 1126/science. 1209038.

(收稿日期: 2020-07-23 修回日期: 2021-04-27)

(本文编辑: 刘艳 施晓萌)