

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.09.006

4- 苯基丁酸抑制内质网应激改善高同型半胱氨酸引起的血管重构 *

李 炜¹ 郭 丽² 刘 静³ 安慧仙¹ 方 东¹ 王 伟¹ 刘 慧³ 曾广伟^{1Δ}

(1 西安国际医学中心医院心脏病医院心脏内科 陕西 西安 710100; 2 空军军医大学第一附属医院老年科 陕西 西安 710032; 3 空军军医大学第二附属医院心脏内科 陕西 西安 710038)

摘要 目的:探讨高同型半胱氨酸血症(hyperhomocysteinemia, HHcy)导致血管损伤的机制并证明内质网应激抑制剂 4- 苯基丁酸(4-PBA)在其中的保护作用。**方法:**采用蛋氨酸饲料喂养 SD 大鼠制备 HHcy 模型,24 只大鼠随机分为 3 组(每组 8 只):对照组(Control)、HHcy 模型组(HHcy)和 4-PBA 处理组(4-PBA);测量大鼠血压和心率,检测血清中同型半胱氨酸浓度,HE 染色观察血管形态,Western blot 和免疫组化染色观察内质网应激分子 GRP78 和 GRP94 的表达,Western blot 检测内质网应激促凋亡因子 CHOP 和 Caspase 12 的表达,TUNEL 染色观察主动脉血管的细胞凋亡。**结果:**3 组大鼠血压和心率没有显著差异 ($P>0.05$);和 Control 组比较,HHcy 组血清中同型半胱氨酸浓度明显增加 ($P<0.05$),而 4-PBA 处理组血清同型半胱氨酸浓度与 HHcy 组比有降低但没有统计学差异 ($P>0.05$);和 Control 组比较,HHcy 组主动脉血管平滑肌细胞肥大,走行紊乱,部分断裂,细胞核固缩,管壁增厚,内质网应激分子 GRP78 和 GRP94 以及促凋亡因子 CHOP 和 Caspase 12 的表达明显增加 ($P<0.05$),TUNEL 染色阳性细胞也显著增多;而 4-PBA 处理组能明显改善 HHcy 组主动脉血管的这些变化 ($P<0.05$)。**结论:**高同型半胱氨酸血症能引起主动脉血管重构,而 4-PBA 可通过抑制内质网应激和细胞凋亡改善高同型半胱氨酸血症引起的血管重构。

关键词:高同型半胱氨酸血症;内质网应激;4- 苯基丁酸;血管重构

中图分类号:R-33;R543 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2021)09-1627-06

4-phenylbutyric Acid Alleviating Hyperhomocysteinemia-induced Vascular Remodeling via Inhibiting Endoplasmic Reticulum Stress*

LI Wei¹, GUO Li², LIU Jing³, AN Hui-xian¹, FANG Dong¹, WANG Wei¹, LIU Hui³, ZENG Guang-wei^{1Δ}

(1 Department of Cardiology, Heart Hospital, Xi'an International Medical Center Hospital, Xi'an, Shaanxi, 710100, China;

2 Department of Geratology, The First Affiliated Hospital of Air Force Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China;

3 Department of Cardiology, The Second Affiliated Hospital of Air Force Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710038, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the mechanism of hyperhomocysteinemia (HHcy) induced vascular injury and to prove the protective effect of 4-phenylbutyric acid (4-PBA). **Methods:** Twenty-four SD rats were randomly divided into 3 groups (8 rats in each group): control group (control group), HHcy model group and 4-PBA treated HHcy group. Blood pressure, heart rate and serum homocysteine concentration were detected. Vascular morphology was observed by HE staining. The expressions of endoplasmic reticulum stress molecules GRP78 and GRP94 were observed by Western blot and immunohistochemistry. The expressions of apoptotic-related factors CHOP and caspase 12 were detected by Western blot. The apoptosis of aortic vessels was observed by TUNEL staining. **Results:** There was no significant difference in blood pressure and heart rate among the three groups ($P>0.05$). Compared with the control group, serum homocysteine concentration was significantly increased in the HHcy group ($P<0.05$), while serum homocysteine concentration in 4-PBA treatment group was lower than that in HHcy group, but there was no statistical difference ($P>0.05$). Compared with the control group, aortic smooth muscle cells in the HHcy group were hypertrophic, disordered and partially broken. The expressions of endoplasmic reticulum stress molecules GRP78 and GRP94 and apoptotic-related factors CHOP and caspase 12 were significantly increased ($P<0.05$), and TUNEL staining positive cells were also significantly increased. 4-PBA treatment group could significantly improve these changes in HHcy group ($P<0.05$). **Conclusion:** Hyperhomocysteinemia could induce aortic vascular remodeling, and 4-PBA could alleviate hyperhomocysteinemia-induced vascular remodeling by inhibiting endoplasmic reticulum stress and apoptosis.

Key words: Hyperhomocysteinemia; Endoplasmic reticulum stress; 4-PBA; Vascular remodeling

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R543 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2021)09-1627-06

* 基金项目:陕西省重点研发计划项目(2019SF-202);唐都医院创新发展基金项目(2018QYTS011)

作者简介:李炜,博士,E-mail: 52660276@qq.com

Δ 通讯作者:曾广伟,硕士,副主任医师,E-mail: zengguangwei1026@163.com

(收稿日期:2020-10-28 接受日期:2020-11-23)

前言

心血管疾病多年来一直是危害人类健康和生命的头号杀手,目前仍然是全世界范围内致残和致死的主要原因之一,其病因复杂,发病机制还未完全明确^[1]。同型半胱氨酸是一种高反应性的含硫氨基酸,是蛋氨酸代谢的中间产物。同型半胱氨酸代谢受遗传因素、营养缺陷、肾脏功能损伤、年龄、性别以及药物等的影响,在健康个体中,血浆同型半胱氨酸的含量在 5-10 $\mu\text{mol/L}$,当人体血浆中同型半胱氨酸水平超过 15 $\mu\text{mol/L}$ 时,称为高同型半胱氨酸血症(hyperhomocysteinemia, HHcy)^[2-4]。研究表明,HHcy 能通过氧化应激导致血管炎症,同时还能通过内质网应激导致血管损伤^[5]。已有多项研究表明 HHcy 与众多心血管疾病的发生发展密切相关,是心血管疾病的独立危险因素^[6,7],并作为临床诊断的辅助标志物,但是 HHcy 引起血管损伤的具体机制还不十分清楚。

内质网(endoplasmic reticulum, ER)是细胞内的一种重要细胞器,在蛋白质修饰、折叠和钙储存等方面发挥重要作用^[8]。当未折叠、错误折叠蛋白堆积或 Ca^{2+} 超载时可引起内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS),触发未折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR)^[9]。而葡萄糖调节蛋白 78(Glucose regulate protein 78, GRP78)能够使蛋白的合成减少并增强内质网处理未折叠蛋白的能力,以保持内质网的稳态,然而错误或未折叠蛋白堆积过多,超过内质网自身调节能力时,就可导致 ERS 功能障碍,然而持续的内质网应激通过诱导凋亡相关分子 CHOP 的表达和 Casepase 12 的活化而导致细胞凋亡^[10,11]。目前已知的是在心力衰竭和缺血性心脏病中存在 ERS,但 ERS 是否参与 HHcy 诱导的血管损伤,以及其作用的具体机制还不是十分清楚。

1 材料与方法

1.1 实验动物和试剂

蛋氨酸饲料和普通饲料购买于空军军医大学实验动物中心,蛋氨酸饲料制作方法是在普通饲料中添加 3%的蛋氨酸;在空军军医大学实验动物中心购买 24 只雄性 SD 大鼠,体重 200 g-220 g,大鼠可自由获取食物和水。

1.2 实验分组

24 只大鼠随机分为 3 组,每组 8 只;对照组(Control):给予普通饲料喂养 20 周;高同型半胱氨酸血症组(HHcy):给予蛋氨酸饲料喂养 20 周;4-苯基丁酸组处理组(4-PBA):蛋氨酸饲料喂养 20 周的同时,500 mg/(kg·d) 4-PBA 灌胃 20 周^[12]。各组大鼠饮水均不受限制。

1.3 大鼠动脉血压和心率的测量

有研究表明血浆中 Hcy 浓度升高会影响动脉血压和心率^[13],但慢性蛋氨酸喂养对动脉血压和心率是否有影响还不清楚。本研究采用鼠尾无创血压测量仪检测大鼠血压,先对大鼠进行适应环境和刺激的训练,避免因操作时大鼠活动受限导致应激反应影响血压测量;将大鼠尾巴露于固定器外侧,维持大鼠尾部的温度;根据大鼠的重量选取合适的加压尾套,将加压尾套固定在大鼠尾巴根部,脉搏换能器置于大鼠尾巴中上三分之一的位置,脉搏换能器的凹槽正对大鼠尾正中动脉;向气带内加压至大鼠尾动脉搏动完全消失后继续向上加压 10-20 mmHg 后,

缓慢松开橡皮球,让加压气袋放弃至大鼠尾动脉搏动至正常水平后,取下加压气带;记录大鼠心率和 SBP;每只大鼠测量 3 次,每次间隔 5 分钟。

1.4 ELISA 检测血清中 Hcy 的浓度

用 2%戊巴比妥钠(0.2 mL/100 g)对大鼠腹腔注射麻醉,并仰卧于手术台上,采集眼眶静脉丛血液于离心管中,室温放置 30 min,置入 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心机以 4000 g/min 离心 15 min,吸取上清置于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱冻存。取出冻存的血清和检测试剂,放置至恢复常温后按照操作说明进行 Hcy 检测:首先,插卡后对样本按顺序进行标号;然后取 8 μL 样本移入比色皿 1 中,开始检测;最后根据仪器的提示加入试剂 2 约 40 μL ,再次进行检测,保存结果。

1.5 HE 染色观察血管形态

喂养 20 周后,用 2%戊巴比妥钠(0.2 mL/100 g)对大鼠腹腔注射麻醉,并仰卧于手术台上,开胸暴露出心脏,沿血管走行,分离出主动脉(上至主动脉弓下至腹主动脉),放入预冷的 PBS 中多次冲洗,一部分放入 4%多聚甲醛中固定,石蜡包埋切片,剩余的用锡纸包裹后,在液氮中保存。石蜡切片在二甲苯和梯度酒精中处理完成脱蜡复水;将切片放入染料苏木素中染核 30 min;切片浸入伊红染液中染细胞质;中性树胶封片。

1.6 免疫组化染色检测 GRP78 和 GRP94 蛋白的表达

将组织切片进行脱蜡处理,PBS 洗涤 3 次,每次 5 min;切片浸入柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液中,微波煮沸并加热 3 min,自然冷却;封闭内源性过氧化氢酶;用山羊血清封闭 30 min,PBS 洗涤 3 次,每次 5 min;用 GRP78 和 GRP94 一抗(1:200)在 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜;PBS 洗涤 3 次,每次 5 min,加入生物素偶联的二抗,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min;PBS 洗涤 3 次,每次 5 min,加入亲和素-辣根过氧化物酶,30 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 15 min;DAB 显色;脱水、透明并用中性树脂封片。

1.7 TUNEL 染色观察细胞凋亡

将组织切片进行脱蜡处理,PBS 洗涤 3 次,每次 5 min;切片用 0.2% Triton X-100 处理 10 min,PBS 洗涤 3 次,每次 5 min;配置罗氏 TUNEL 染色试剂工作液(A 液和 B 液为 1:50),37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴避光 2 h,PBS 洗涤 3 次,每次 5 min;37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴避光 DAPI 染核 5 min,PBS 洗涤 3 次,每次 5 min,50%甘油封片保存;激光共聚焦显微镜观察并统计凋亡细胞数。

1.8 Western blot 检测大鼠主动脉血管中相关蛋白的表达

将血管放入 EP 管中,用眼科剪在冰上剪碎后加入 RIPA 裂解液裂解 30 min,4 $^{\circ}\text{C}$,12000 $\times$ g 离心 10 min 后,取上清液按 4:1 加入上样缓冲液,沸水煮 10 min,分装并放入 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存;10% SDS-PAGE 胶每孔上样 20 g,恒压 100 V 电泳 90 min,硝酸纤维素膜 60 V 恒压湿转 3 h,转膜结束后,将膜放入 5%脱脂奶粉中室温封闭 2 h,将膜放入相应一抗中 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;TBST 洗膜 5 次,每次 5 min,将膜和相应二抗室温孵育 2 h,TBST 洗膜 5 次,每次 5 min,ECL 化学发光,Image 图像分析软件分析条带灰度。

1.9 统计学处理

使用 SPSS17.0 统计软件对数据进行分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组均数间比较采用单因素方差分析(one way ANOVA), $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠心率、收缩压和血清中 Hcy 浓度的比较

喂养 20 周后对各组大鼠进行心率以及收缩压测定, 结果表明各组大鼠心率比较没有明显差异无统计学意义($P>0.05$);

各组大鼠收缩压比较也未见明显变化, 无统计学差异($P>0.05$)。20 周后对所有大鼠取血进行血清 Hcy 水平检测, 结果显示, 喂食高蛋氨酸组大鼠血清中 Hcy 浓度明显高于对照组($P<0.01$); 4-PBA 组大鼠血清中 Hcy 浓度低于高蛋氨酸组但无统计学意义($P>0.05$)。结果见表 1。

表 1 各组大鼠心率、SBP 变化($n=8, \bar{x} \pm s$)
Table 1 The heart rate and SBP in each group($n=8, \bar{x} \pm s$)

	Control	HHcy	4-PBA
HR(bpm)	366 $\pm$ 37	370 $\pm$ 41	372 $\pm$ 38
SBP(mmHg)	90 $\pm$ 9	95 $\pm$ 10	99 $\pm$ 11
Hcy(μ mol/L)	8.36 $\pm$ 2.89	46.12 $\pm$ 8.44**	41.69 $\pm$ 4.79**

Note: * $P<0.05$ vs. Control, ** $P<0.01$ vs. Control.

2.2 HE 染色观察大鼠主动脉血管形态的变化

蛋氨酸喂养 20 周后, 取大鼠胸主动脉血管进行 HE 染色。结果显示: Control 组大鼠血管组织中, 细胞排列正常, 细胞核形态正常, 而 HHcy 组大鼠主动脉血管平滑肌细胞肥大, 平滑肌走行紊乱, 部分断裂, 细胞核固缩, 碎裂, 管壁增厚; 与 HHcy

组相比, 4-PBA 组大鼠主动脉血管壁变薄, 血管平滑肌细胞部分排列整齐, 细胞核畸形紊乱减少。以上结果说明 HHcy 引起了主动脉血管重构, 而内质网应激抑制剂 4-PBA 可以改善 HHcy 引起的主动脉血管重构(见图 1)。

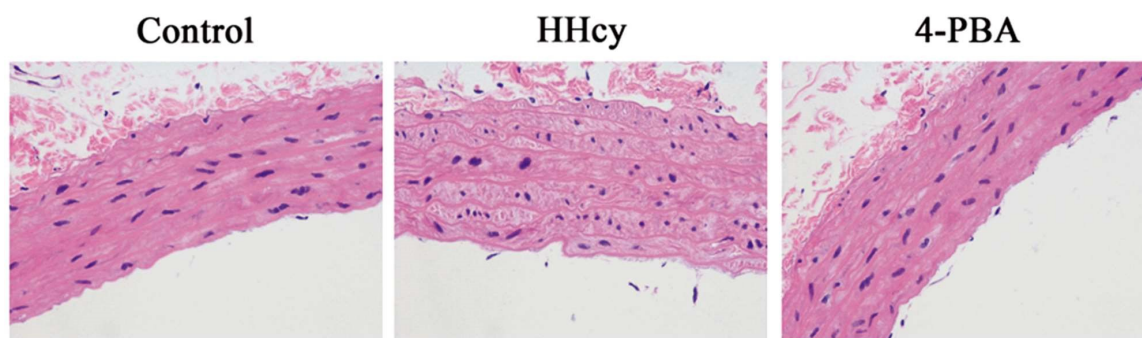


图 1 HE 染色观察大鼠血管形态($\times 40$)

Fig.1 HE staining of vascular morphology in rats ($\times 40$)

2.3 免疫组化观察主动脉血管中内质网应激相关因子 GRP78 和 GRP94 的表达

GRP78 和 GRP94 蛋白在内质网应激时特异性表达^[14], 免疫组化染色时可见血管平滑肌细胞胞质中出现棕黄色颗粒。免疫组化结果显示, Control 组大鼠血管平滑肌细胞胞浆中可见少量棕黄色颗粒, HHcy 组大鼠血管平滑肌细胞胞浆中可见大量棕黄色颗粒, 而 4-PBA 组大鼠血管平滑肌细胞胞浆中棕黄色颗粒比 HHcy 组大鼠明显减少(见图 2), 提示 GRP78 和 GRP94 等内质网应激蛋白可能是 HHcy 引起血管重构的重要原因, 而 4-PBA 可以明显降低 GRP78 和 GRP94 的表达。

2.4 Western blot 检测主动脉血管中内质网应激相关因子 GRP78 和 GRP94 的表达

为了进一步检测 GRP78 和 GRP94 在 HHcy 引起血管重构中的表达, 我们采用 western blot 方法检测 GRP78 和 GRP94 的蛋白表达。与 Control 组相比, HHcy 组大鼠血管组织中 GRP78 和 GRP94 蛋白表达升高($P<0.05$), 与 HHcy 组比较, 4-PBA 组大鼠血管组织中 GRP78 和 GRP94 表达降低($P<0.05$)(见图 3)。这些提示进一步提示 HHcy 引起的血管重构中 GRP78 和 GRP94 等内质网应激蛋白表达升高, 而 4-PBA 可以明显降低 GRP78 和 GRP94 的表达。

2.5 Western blot 检测主动脉血管中凋亡相关因子 CHOP 和 Caspase 12 的表达

CHOP 促进细胞凋亡的内质网应激的特异性蛋白。在 Control 组大鼠主动脉血管中, CHOP 蛋白表达较少; 与 Control 组比较, HHcy 组大鼠主动脉血管中 CHOP 蛋白表达明显升高($P<0.05$); 而 4-PBA 组大鼠主动脉血管中 CHOP 蛋白表达低于 HHcy 组($P<0.05$)。Caspase 12 正常情况下以其前体 pro-Caspase 12 的形式存在, 被裂解后激活, 可特异性介导内质网应激引起的细胞凋亡。与 Control 组相比, HHcy 组大鼠血管平滑肌中裂解的 Caspase 12 表达升高($P<0.05$), 与 HHcy 组比较, 4-PBA 组大鼠血管中裂解的 Caspase 12 表达降低($P<0.05$)(见图 4)。

2.6 TUNEL 染色检测大鼠主动脉血管平滑肌细胞凋亡

Control 组中可见只有极少数细胞核被染上绿色荧光, HHcy 组大鼠主动脉血管组织切片可见部分细胞核被绿色荧光染色, 4-PBA 组大鼠主动脉血管组织切片少量细胞核被绿色荧光染色(见图 5)。

3 讨论

HHcy 与许多血管疾病的发展密切相关, 是心血管疾病的

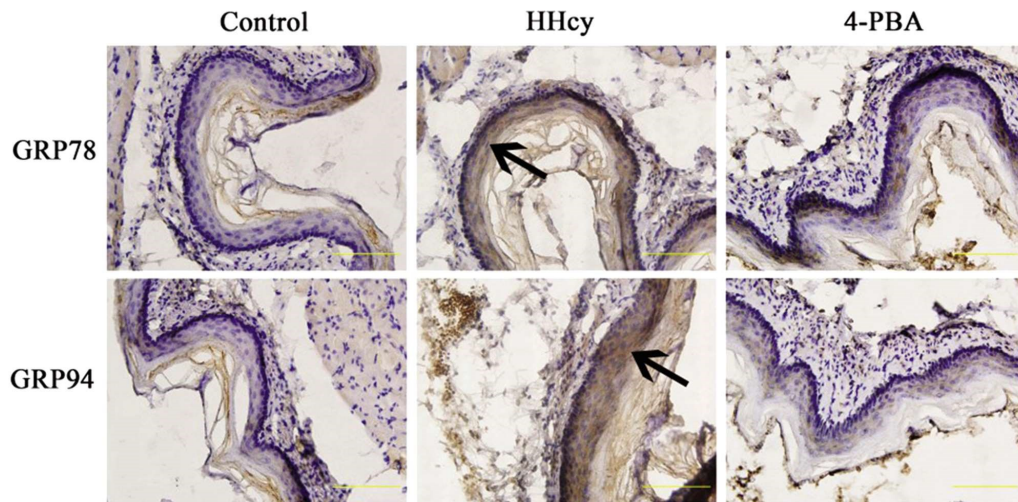


图2 免疫组化检测各组大鼠血管平滑肌组织 GRP78 及 GRP94 表达($\times 20$)

Fig.2 Immunohistochemical staining of GRP78 and GRP94 in vascular smooth muscle of rats ($\times 20$)

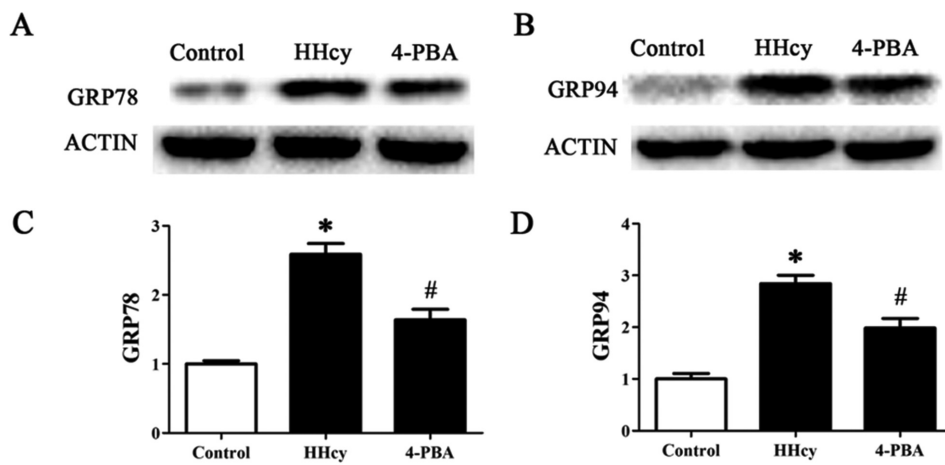


图3 Western blot 检测各组大鼠主动脉血管中 GRP78 和 GRP94 蛋白表达

Fig.3 The protein levels of GRP78 and GRP94 detecting by western blot in aorta of rats

A 和 C: 各组大鼠主动脉血管中 GRP78 蛋白表达; B 和 D: 各组大鼠主动脉血管中 GRP94 蛋白表达。与 Control 组比较, $*P < 0.05$; 与 HHcy 组比较, $^{\#}P < 0.05$ 。

A and C: Representative immunoblots of GRP78 and results of densitometric analyses of GRP78; B and D: Representative immunoblots of GRP94 and results of densitometric analyses of GRP94. $*P < 0.05$ vs. Control; $^{\#}P < 0.05$ vs. HHcy.

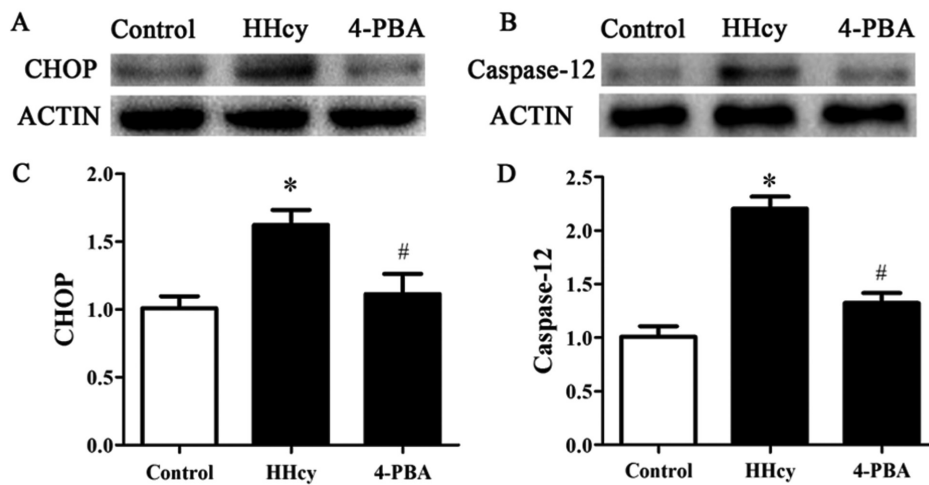
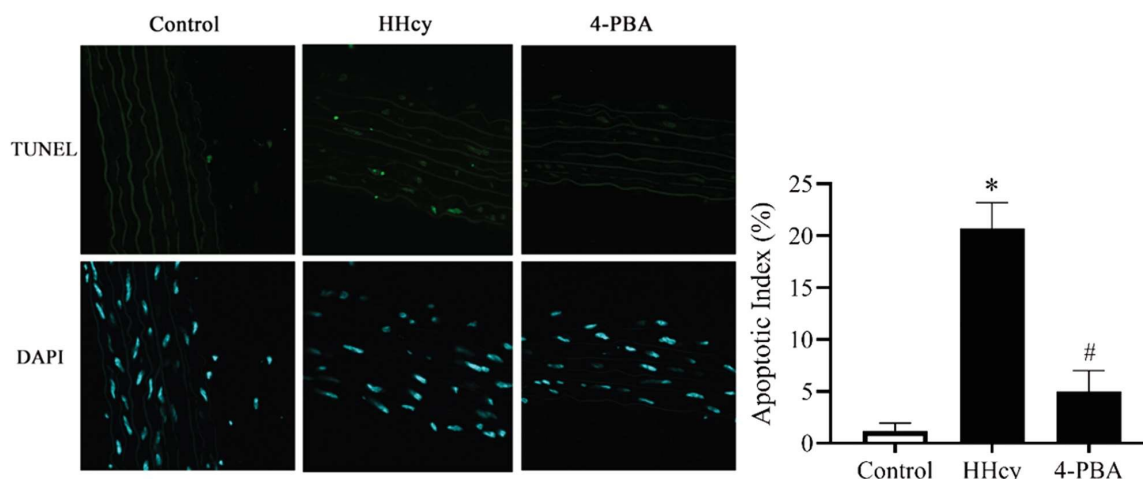


图4 Western blot 检测各组大鼠主动脉血管中 CHOP 和 Caspase-12 蛋白的表达

Fig. 4 The protein levels of CHOP and Caspase-12 detecting by western blot in aorta of rats

A 和 C: 各组 SD 大鼠主动脉血管中 CHOP 蛋白的表达; B 和 D: 各组 SD 大鼠主动脉血管中裂解的 Caspase-12 蛋白表达; 注: 与 Control 组比较, $*P < 0.05$; 与 HHcy 组比较, $^{\#}P < 0.05$ 。

A and C: Representative immunoblots of CHOP and results of densitometric analyses of CHOP; B and D: Representative immunoblots of Caspase-12 and results of densitometric analyses of Caspase-12. $*P < 0.05$ vs. Control; $^{\#}P < 0.05$ vs. HHcy.

图5 TUNEL检测各组大鼠主动脉血管平滑肌细胞凋亡($\times 40$)Fig.5 TUNEL staining of vascular smooth muscle of rats ($\times 40$)

TUNEL 阳性细胞核呈绿色,代表细胞凋亡,DAPI 染色细胞核呈蓝色。

TUNEL-positive nucleus showing apoptosis was green and DAPI staining was blue.

诊断标志物或独立危险因素^[15,16]。研究表明,HHcy 介导的氧化应激,低甲基化等损伤内皮细胞,导致炎症因子的聚集以及内源性一氧化氮合成减少,使血栓聚集和血管舒张功能发生障碍,可能是其导致血管功能障碍的机制之一^[17,18]。另外,HHcy 可以诱导血管平滑肌细胞肥大和增殖,引起血管重构,但是长期的 HHcy 能否诱导血管平滑肌细胞的凋亡以及其与血管重构的关系还不清楚。本研究中,高蛋氨酸喂养 20 周诱导 HHcy 组血浆中同型半胱氨酸浓度显著高于正常饮食喂养的对照组,说明 HHcy 大鼠模型成功,同时 HHcy 组主动脉血管 HE 染色显示,血管平滑肌细胞肥大,平滑肌走行紊乱,部分断裂,细胞核固缩,碎裂,管壁增厚,说明长期 HHcy 引起了主动脉血管的重构,证实了 HHcy 有引起血管损伤的作用,但是具体机制仍有待阐明。

研究表明,ERS 作为一种胞内细胞器上的应激反应,能够在细胞水平上参与多种疾病的病理过程。ERS 时钙稳态失衡和蛋白质形成异常,通常表现为 GRP78 和 GRP94 等内质网应激分子表达上调。GRP78、GRP94 等一起作为分子伴侣,调节内质网蛋白质合成、翻译后折叠等细胞生理过程,减轻细胞损伤^[19,20]。本研究发现 HHcy 组大鼠动脉组织中内质网应激标志性蛋白 GRP78 和 GRP94 的蛋白表达升高,说明 HHcy 引起了血管平滑肌细胞的内质网应激反应;同时 HHcy 组大鼠主动脉血管中内质网凋亡相关蛋白 CHOP 的表达升高、裂解的 Caspase 12 增多,TUNEL 染色可见明显的细胞凋亡,说明 HHcy 可以通过内质网应激引起血管平滑肌细胞的凋亡,这可能是 HHcy 导致血管重构的重要机制。

4-PBA 是一种低分子量脂肪酸和一种无毒的药理化合物,已被发现具有分子伴侣样活性,其理化性质可以稳定肽结构,提高 ER 处理折叠异常蛋白的能力,被认为是一种特异的内质网应激抑制剂。研究表明给予腹主动脉缩窄术后小鼠口服 4-PBA 可降低 GRP78、p-PERK 和 p-eIF2 α 的表达。4-PBA 还可显著下调肥大和纤维化相关基因的表达^[21]。在本研究中,与 HHcy 组相比,使用内质网应激抑制剂 4-PBA 后,主动脉血管平滑肌细胞肥大、排列紊乱、断裂以及细胞核紊乱、固缩、碎裂

减轻,内质网应激标志性蛋白 GRP78 和 GRP94 表达降低,内质网凋亡相关蛋白 CHOP 和 Caspase 12 表达减少,进一步说明内质网应激参与了 HHcy 致血管重构,是其致血管重构的机制之一,而内质网应激抑制剂可能对改善血管重构具有积极作用。

综上所述,高蛋氨酸喂养所致的同型半胱氨酸升高引起了内质网分子伴侣 GRP78 和 GRP94 表达增加,提示 HHcy 引起了主动脉血管内质网应激反应,同时 HHcy 时内质网应激凋亡相关蛋白 CHOP 和裂解的 Caspase 12 表达升高,细胞凋亡增加,而内质网应激抑制剂 4-PBA 可以显著抑制这些变化,表明 HHcy 可以通过内质网应激引起血管平滑肌凋亡,这可能是其导致血管重构的机制之一,这些结果为临床上治疗 HHcy 提供了实验依据。

参考文献(References)

- [1] Zelniker TA, Wiviott SD, Raz I, et al. SGLT2 inhibitors for primary and secondary prevention of cardiovascular and renal outcomes in type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis of cardiovascular outcome trials[J]. *Lancet*, 393(10166): 31-39
- [2] Kim J, Kim H, Roh H, et al. Causes of hyperhomocysteinemia and its pathological significance[J]. *Arch Pharm Res*, 2018, 41(4): 372-383
- [3] Price BR, Wilcock DM, Weekman EM. Hyperhomocysteinemia as a Risk Factor for Vascular Contributions to Cognitive Impairment and Dementia[J]. *Front Aging Neurosci*, 2018, 10: 350
- [4] Djuric D, Jakovljevic V, Zivkovic V, et al. Homocysteine and homocysteine-related compounds: an overview of the roles in the pathology of the cardiovascular and nervous systems [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2018, 96(10): 991-1003
- [5] Fu Y, Wang X, Kong W. Hyperhomocysteinemia and vascular injury: advances in mechanisms and drug targets [J]. *Br J Pharmacol*, 2018, 175(8): 1173-1189
- [6] Azad MAK, Huang P, Liu G, et al. Hyperhomocysteinemia and cardiovascular disease in animal model[J]. *Amino Acids*, 2018, 50(1): 3-9
- [7] Koller A, Szenasi A, Dornyei G, et al. Coronary Microvascular and Cardiac Dysfunction Due to Homocysteine Pathometabolism; A Complex Therapeutic Design [J]. *Curr Pharm Des*, 2018, 24 (25):

- 2911-2920
- [8] Wang M, Kaufman RJ. Protein misfolding in the endoplasmic reticulum as a conduit to human disease [J]. *Nature*, 2016, 529(7586): 326-335
- [9] Gáll T, Balla G, Balla J. Heme, Heme Oxygenase, and Endoplasmic Reticulum Stress-A New Insight into the Pathophysiology of Vascular Diseases[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(15): 3675
- [10] Louessard M, Bardou I, Lemarchand E, et al. Activation of cell surface GRP78 decreases endoplasmic reticulum stress and neuronal death[J]. *Cell Death Differ*, 2017, 24(9): 1518-1529
- [11] Bi X, Zhang G, Wang X, et al. Endoplasmic Reticulum Chaperone GRP78 Protects Heart from Ischemia/Reperfusion Injury Through Akt Activation[J]. *Circ Res*, 2018, 122(11): 1545-1554
- [12] Ma S, Wang Y, Yao J, et al. The etiological role of endoplasmic reticulum stress in acute lung injury-related right ventricular dysfunction in a rat model[J]. *Am J Transl Res*, 2020, 12(8): 4371-4383
- [13] Bi X, Niu J, Ding W, et al. Angiotensin II attenuates angiotensin I-induced ER stress in glomerular endothelial cells via a Tie2 receptor/ERK1/2-p38 MAPK-dependent mechanism [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2016, 428: 118-132
- [14] Miyajima A, Bamba M, Muto T, et al. Dysfunction of blood pressure regulation in hyperhomocysteinemia model in rats [J]. *J Toxicol Sci*, 2015, 40(2): 211-221
- [15] Kang SS, Rosenson RS. Analytic Approaches for the Treatment of Hyperhomocysteinemia and Its Impact on Vascular Disease [J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2018, 32(2): 233-240
- [16] Chaouad B, Moudilou EN, Ghoul A, et al. Hyperhomocysteinemia and myocardial remodeling in the sand rat, *Psammomys obesus* [J]. *Acta Histochem*, 2019, 121(7): 823-832
- [17] Fu Y, Wang X, Kong W. Hyperhomocysteinemia and vascular injury: advances in mechanisms and drug targets [J]. *Br J Pharmacol*, 2018, 175(8): 1173-1189
- [18] Hemanth Kumar B, Dinesh Kumar B, Diwan PV. Hesperidin, a citrus flavonoid, protects against l-methionine-induced hyperhomocysteinemia by abrogation of oxidative stress, endothelial dysfunction and neurotoxicity in Wistar rats[J]. *Pharm Biol*, 2017, 55(1): 146-155
- [19] Zhang Q, Liu J, Chen S, et al. Caspase-12 is involved in stretch-induced apoptosis mediated endoplasmic reticulum stress[J]. *Apoptosis*, 2016, 21(4): 432-42
- [20] Hou X, Fu M, Cheng B, et al. Galanthamine improves myocardial ischemia-reperfusion-induced cardiac dysfunction, endoplasmic reticulum stress-related apoptosis, and myocardial fibrosis by suppressing AMPK/Nrf2 pathway in rats[J]. *Ann Transl Med*, 2019, 7(22): 634
- [21] Luo T, Chen B, Wang X. 4-PBA prevents pressure overload-induced myocardial hypertrophy and interstitial fibrosis by attenuating endoplasmic reticulum stress[J]. *Chem Biol Interact*, 2015, 242: 99-106

(上接第 1663 页)

- [26] Schild HH, Pieper CC. Where Have All the Punctures Gone? An Analysis of Thoracic Duct Embolizations [J]. *J Vasc Interv Radiol*, 2020, 31(1): 74-79
- [27] 张德梁. 经皮腹腔穿刺引流治疗重症急性胰腺炎的疗效 [J]. *中国保健营养*, 2018, 28(18): 123-123
- [28] Wang X, Xie H, Zhang L. Multiple myeloma with onset of pancreas involvement: A case report [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2019, 98(30): e16567
- [29] Jellestad PL, Teklay BB. Post-endoscopic retrograde cholangiopancreatography with descending abscess to knee level [J]. *Ugeskr Laeger*, 2019, 181(35): V12180885
- [30] Koizumi K, Masuda S, Tazawa T, et al. Endoscopic ultrasonography-guided drainage for spontaneous rupture of a pancreatic pseudocyst into the peritoneal cavity in a patient with autoimmune pancreatitis[J]. *Clin J Gastroenterol*, 2020, 13(13): 999-1004
- [31] Kusumoto K, Kawamura M, Ikeda A, et al. Successful biliary drainage by percutaneous transhepatic puncture common bile duct and rendezvous technique for a case of recurrent biliary pancreatitis with a Roux-en-Y reconstruction and without extension of the bile duct[J]. *Nihon Shokakibyo Gakkai Zasshi*, 2019, 116(9): 739-746
- [32] Liu J, Wang Y, Yin S, et al. Huge peliosis hepatis mimicking cystic echinococcosis: A case report[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2019, 98(51): e18141
- [33] Liu T, Sun S, Gao H, et al. CT-guided percutaneous catheter drainage of pancreatic postoperative collections [J]. *Minim Invasive Ther Allied Technol*, 2019, 13: 1-6
- [34] Mori T, Kondo H, Naitoh I, et al. Endoscopic Ultrasonography-guided Fine-needle Aspiration Revealed Metastasis-induced Acute Pancreatitis in a Patient with Adrenocortical Carcinoma [J]. *Intern Med*, 2019, 58(18): 2645-2649
- [35] 王东和. 乌司他丁结合 B 超下腹腔穿刺引流术治疗重症胰腺炎患者的效果及对相关性肺损伤的防治作用[J]. *贵州医药*, 2019, 43(7): 1072-1074
- [36] Yasuda H, Kataoka K, Takeyama Y, et al. Usefulness of urinary trypsinogen-2 and trypsinogen activation peptide in acute pancreatitis: A multicenter study in Japan [J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2019, 25(1): 107-117