

文章编号 1006-8147(2018)05-0404-05

论 著

同型半胱氨酸对自发性高血压大鼠脑组织损伤免疫调节机制的研究

张宇, 李新, 冷晓, 王林

(天津医科大学第二医院干部保健科, 天津市老年病学研究所, 天津 300211)

摘要 目的:探讨同型半胱氨酸(Hcy)对自发性高血压(SHR)大鼠脑组织损伤的免疫调节机制。方法:取60只SHR大鼠,随机分为SHR-C(对照组)、SHR-M(高蛋氨酸组)和SHR-T(治疗组),每组20只。SHR-C普通饲料喂养,SHR-M给予2 mg/(kg·d)高蛋氨酸饮食。SHR-T组前8周给予2 mg/(kg·d)高蛋氨酸饮食,第9周开始给予叶酸4 mg/(kg·d)、维生素B₁₂(VB₁₂)0.09 mg/(kg·d)、维生素B₆(VB₆)0.09 mg/(kg·d)灌胃治疗。分别于第0、8、16周检测3组大鼠的体质量、收缩压(SBP)和血浆Hcy浓度。分别于第8、16周用ELISA测血浆中的IL-17和IL-10,实时定量PCR(Q-PCR)检测脑组织中IL-17和IL-10。第16周,免疫组织化学染色法检测脑组织中IL-17和IL-10表达情况。**结果:**第8周,SHR-M和SHR-T的体质量显著低于SHR-C,血浆Hcy浓度显著高于SHR-T,血浆IL-17浓度显著高于SHR-C,血浆IL-10浓度显著低于SHR-C,脑组织IL-10表达水平显著低于SHR-C(均 $P<0.05$);SHR-M和SHR-T各参数差异没有统计学意义($P>0.05$)。第16周,经治疗后SHR-T组的体质量升高、血浆Hcy浓度下降,与SHR-M组比较具有显著性差异($P<0.05$);SHR-T组的血浆IL-17浓度降低、IL-10浓度升高,与SHR-M组比较具有显著性差异($P<0.05$);SHR-T组脑组织IL-17表达水平显著低于SHR-M组,IL-10表达水平显著高于SHR-M组($P>0.05$);SHR-M的脑组织IL-17细胞阳性率明显高于SHR-C和SHR-T,IL-10细胞阳性率明显高于SHR-C和SHR-T。**结论:**高同型半胱氨酸血症可促进炎症反应从而导致脑组织病变的发生,下调免疫反应后可起到保护作用。

关键词 同型半胱氨酸;自发性高血压大鼠;免疫机制

中图分类号 R544.1

文献标志码 A

Study on the immunomodulatory mechanism of homocysteine in brain tissue injury in spontaneously hypertensive rats

ZHANG Yu, LI Xin, LENG Xiao, WANG Lin

(Department of Geriatrics, The Second Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300211, China)

Abstract **Objective:** To explore the immunomodulatory mechanism of homocysteine (Hcy) in brain tissue injury in spontaneously hypertensive rats SHR rats. **Methods:** Sixty SHR rats were randomly divided into SHR-C (control group), SHR-M (high methionine group) and SHR-T (treatment group), with 20 rats in each group. SHR-C was fed with ordinary diet and SHR-M was given to 2 mg/(kg·d) high methionine diet. SHR-T was given 2 mg/(kg·d) high methionine diet for the first 8 weeks, and folic acid 4 mg/(kg·d), vitamin B₁₂(VB₁₂) 0.09 mg/(kg·d) and vitamin B₆(VB₆) were intragastrically administered from week 9. The body weight, systolic blood pressure (SBP) and plasma Hcy concentration in three groups were measured at 0, 8th and 16th weeks, respectively. Enzyme-linked and immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the plasma concentration levels of IL-17 and IL-10 at 8th and 16th weeks, and real-time quantitative PCR (Q-PCR) was applied to detected the mRNA levels in the brain tissues. The expression of IL-17 and IL-10 in brain tissue were detected by immunohistochemical staining at week 16. **Results:** At the 8th week, the body weight of SHR-M and SHR-T was significantly lower than that of SHR-C, and plasma Hcy concentration was significantly higher than that of SHR-T, and plasma IL-17 concentration higher than that of SHR-T, and plasma IL-17 concentration higher than that of SHR-T (all $P<0.05$). However, there was no significant difference between all parameters of SHR-M and SHR-T at the 8th week ($P>0.05$). At the 16th week, the body weight of SHR-T increased, and the Hcy concentration decreased after treatment, which were significantly different from those of SHR-M ($P<0.05$); the plasma IL-17 concentration of SHR-T decreased and IL-10 concentration increased, which were statistically significant compared with SHR-M ($P<0.05$); the mRNA expression level of IL-17 of SHR-T in brain tissue samples was significantly lower than that of SHR-M, and the expression level of IL-10 was significantly higher than that of SHR-M ($P>0.05$); the positive rate of IL-17 cells of SHR-M was higher than that of SHR-C and SHR-T in the brain tissue ($P<0.05$), and the positive rate of IL-10 cells was higher. **Conclusion:** Hcy can promote the inflammatory response and lead to the development of brain tissue, and it can play a protective role after reducing the immune response.

Key words homocysteine (Hcy);spontaneously hypertensive rats (SHR); immune mechanism

作者简介 张宇(1982-),男,主治医师,博士,研究方向:老年医学;通信作者:王林,E-mail: wang lin@medmail.com.cn.

高血压是老年常见疾病之一,随着人均寿命的延长,老年人日益增多,老年高血压患者也相继增多,老年高血压的防治研究已成为医学界十分关注的问题。血清同型半胱氨酸(homocysteine,Hcy)水平是心血管疾病的重要标志之一^[1]。大量动物实验证实,高蛋氨酸摄入可引发高同型半胱氨酸血症(hyperhomocysteinemia,HHcy)。伴有Hcy升高的高血压病(H型高血压)患者,其心脑血管疾病发生风险较血浆Hcy水平正常患者发生风险升高,当Hcy超过 $18\text{ }\mu\text{mol/L}$ 以后,高血压风险是不伴有Hcy升高患者的3倍之多;而对于缺血性脑病患者而言,再次出现脑血管意外的风险增加,且再次出现脑血管意外后症状更加严重^[2-3]。高血压脑损伤免疫失调机制是近年来的研究热点^[4-5]。机体调节性T(regulatory T,Treg)细胞/辅助性T(helper T,Th)细胞受Hcy作用后出现比例失调,进而介导炎症反应增加,是高血压免疫损伤的基础^[6]。但是,Th17和Treg细胞在脑缺血炎症反应发生中的作用尚存在争议^[7]。心脑血管疾病尤高血压患者血浆同型半胱氨酸高于正常人,而叶酸、维生素B₆(vitamin B₆,VB₆)、维生素B₁₂(vitamin B₁₂,VB₁₂)水平低于正常人。Hcy能够提高血脑屏障通透性,联合维生素治疗可降低血浆Hcy水平,保护血脑屏障^[8-9]。本文旨在观察伴HHcy的SHR补充叶酸、VB₆和VB₁₂前后血压、血浆IL-10、IL-17水平、脑组织细胞因子表达情况及光镜下Th17和Treg细胞变化情况。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 60只雄性自发性高血压(spontaneously hypertensive rats,SHR)大鼠,8周龄,体质量 $193.3\sim 243.2\text{ g}$ (平均 222.9 g),购自北京维通利华实验动物技术有限公司。本研究已获天津医科大学第二医院伦理委员会批准。

1.1.2 主要试剂 Rat Interleukin 17(IL-17)ELISA kit和Rat Interleukin 10(IL-10)ELISA kit购自美国R&D公司,实时定量荧光PCR试剂盒FastStart Universal SYBR Green Master(Rox)购自美国Roche公司,二氨基联苯胺(Diaminobenzidine,DBA)显色试剂盒购自北京天根生化科技有限公司。苏木素伊红染料购自北京中杉金桥生物技术有限公司,所用抗体购自美国Abcam公司,Trizol、Hcy、叶酸、VB₆、VB₁₂等购自美国Sigma公司。

1.1.3 主要仪器 7500B全自动生化仪购自美国ABI公司,泰盟BP-100A全自动大小鼠无创血压测量系统购自成都泰盟软件有限公司,ABI 7500荧光

定量PCR仪购自美国ABI公司,Multiskan FC多功能酶标仪购自英国Thermo Fisher Scientific公司。

1.2 方法

1.2.1 动物处理方案 按照随机数字表法将动物随机分为SHR-C、SHR-M以及SHR-T,每组20只。SHR-C普通饲料喂养,SHR-M给予 $2\text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 高蛋氨酸饮食,连续16周。SHR-T组前8周给予 $2\text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 高蛋氨酸饮食,第9周开始给予普通饲料喂养,并给予叶酸 $4\text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 、维生素B₁₂(vitamin B₁₂,VB₁₂) $0.09\text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 、维生素B₆(vitamin B₆,VB₆) $0.09\text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 灌胃治疗,直至16周。根据每只大鼠的公斤体质量计算其药物剂量,并依照体质量变化及时调整剂量。分别于第0、8、16周进行大鼠尾静脉穿刺取血,每次取血 $500\sim 800\text{ }\mu\text{L}$ 。第8周时,每组大鼠随机选取10只,麻醉后处死,摘取全脑。第16周时,将剩余的3组大鼠全部处死,摘取全脑。

1.2.2 体质量、收缩压(systolic blood pressure,SBP)和血浆Hcy浓度检测 分别于第0、8、16周记录大鼠安静状态下的体质量,在大鼠清醒状态下用无创血压测量系统检测收缩压(systolic blood pressure,SBP)。用全自动生化仪检测大鼠血浆Hcy浓度,每次测定所需样本量为 $100\sim 150\text{ }\mu\text{L}$ 血浆。每次检测重复3次。

1.2.3 ELISA 应用ELISA方法于实验第8周及第16周测量大鼠血浆IL-17及IL-10浓度。大鼠鼠尾取血,离心取血浆严格按照试剂盒使用说明,采用ELISA检测3组大鼠血浆中IL-17和IL-10的蛋白表达水平。实验重复3次。

1.2.4 实时定量PCR(real time quantitative PCR,Q-PCR) 取实验第8周及第16周大鼠脑组织用Q-PCR检测3组大鼠脑组织中IL-17和IL-10的mRNA表达水平。将脑组织置于液氮预冷的研钵中研碎,用Trizol提取总RNA,并逆转录成cDNA。所有引物委托上海生工生物工程股份有限公司设计并合成。IL-17引物序列:上游 $5'\text{-GCA GCG GTA CTC ATC CCT CAA-}3'$,下游 $5'\text{-TCA TTG CGG CTC AGA GTC CAG-}3'$ 。IL-10引物序列:上游 $5'\text{-ACG CTG TCA TCG ATT TCT CCC-}3'$,下游 $5'\text{-TCC CAC ACT CCA GGT TCG GTC-}3'$ 。 β -actin引物序列:上游 $5'\text{-TCA GGT CAT CAC TAT CGG CAA-}3'$,下游 $5'\text{-AGC ACT GTG TTG GCA TAG AGG-}3'$ 。反应体系:选择 $25\text{ }\mu\text{L}$ 体系,分别加入SYBR $12.5\text{ }\mu\text{L}$ 、cDNA $2\text{ }\mu\text{L}$ 、上游及下游引物各 $1.5\text{ }\mu\text{L}$,用水补足至 $25\text{ }\mu\text{L}$;反应条件:预变性 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 min 、 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 20 s 、 $57\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 20 s 、 $57\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 35 s ,循环数40个。目的基因的相对定量结果用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 表示。

1.2.5 免疫组织化学染色实验 取第 16 周大鼠脑组织进行免疫组织化学染色。选择 Poly-Lysine 浸泡载玻片,捞取组织切片后置烤箱 58~60℃烤 30~60 min,使切片紧密结合黏附,切片常规脱腊至水。30%过氧化氢 1 份加蒸馏水 10 份混合,室温下 5~10 min 灭活内源性酶;蒸馏水冲洗 3 次。切片浸 0.01 mmol/L 枸橼酸盐缓冲液(pH 6.0),微波炉加热至沸腾后断电,高温下维持 5~10 min,间隔 5~10 min,反复 1~2 次,以修复抗原。冷却后磷酸盐缓冲液(pH7.20~7.60)洗涤 1~2 次;5%牛血清白蛋白(BSA)封闭,室温下 20 min;滴加一抗,以试剂盒所附阳性切片作为阳性对照,另取切片以磷酸盐缓冲液代替一抗(兔抗鼠 IL-17 和 IL-10 抗体)作为阴性对照;37℃1 h;磷酸盐缓冲液冲洗 2 min,共 3 次;滴加生物素化山羊抗兔 IgG,20~37℃共 20 min,磷酸盐缓冲液冲洗 2 min,3 次;滴加试剂 SABC,20~37℃反应 20 min,磷酸盐缓冲液冲洗 5 min,4 次。使用 DAB 显色试剂盒混匀稀释后加至切片,室温下显色 12 min,

蒸馏水洗涤终止反应;苏木素轻度复染;脱水,透明,封片;400 倍光学显微镜下观察胞浆呈红色染色的阳性细胞。

1.3 数据统计 采用 SPSS 17.0 软件包对实验数据进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示。两组间的比较采用配对 t 检验,3 组间比较采用 F 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组 SHR 大鼠的体质量、SBP、血浆 Hcy 浓度测定结果 0 周时,3 组 SHR 大鼠的体质量、SBP 和血浆 Hcy 浓度没有统计学差异($P>0.05$)。8 周时,SHR-M 和 SHR-T 的体质量显著低于 SHR-C,血浆 Hcy 浓度显著高于 SHR-C 组($P<0.05$);SHR-M 和 SHR-T 的体质量、SBP 和血浆 Hcy 浓度没有统计学差异($P>0.05$)。16 周时,经治疗后 SHR-T 组的体质量升高、血浆 Hcy 浓度下降,与 SHR-M 组比较具有统计学意义($P<0.05$)。此外,第 0、8、16 周时,3 组大鼠的 SBP 没有显著差异($P>0.05$)。详见表 1。

表 1 3 组 SHR 大鼠的体质量、SBP、血浆 Hcy 浓度测定结果($\bar{x}\pm s, n=3$)

Tab 1 Body weight, SBP and serum Hcy in three groups ($\bar{x}\pm s, n=3$)

	体质量/g			SBP/(mmHg)			Hcy/($\mu\text{mol/L}$)		
	0 周	8 周	16 周	0 周	8 周	16 周	0 周	8 周	16 周
SHR-C	223.61 \pm 8.76	329.82 \pm 9.21	355.21 \pm 10.32	165.41 \pm 6.11	186.33 \pm 8.76	194.12 \pm 8.14	28.24 \pm 0.89	26.26 \pm 0.76	28.36 \pm 0.54
SHR-M	224.82 \pm 9.78	290.91 \pm 10.76 ^a	266.32 \pm 11.24 ^a	168.22 \pm 7.01	197.34 \pm 11.08	214.52 \pm 12.32	28.74 \pm 1.86	39.23 \pm 2.88 ^a	48.22 \pm 3.24 ^a
SHR-T	220.34 \pm 8.12	294.61 \pm 9.86 ^a	338.84 \pm 9.66 ^b	167.12 \pm 6.85	201.41 \pm 9.64	186.23 \pm 8.17	28.60 \pm 1.67	39.11 \pm 2.01 ^a	27.02 \pm 0.86 ^b
F	0.14	9.29 [*]	13.86 [*]	0.09	1.25	4.49	1.67	16.34 [*]	32.81 [*]

^a:3 组间 $P<0.05$;^{*}与 SHR-C 比较,^b与 SHR-M 相比较, $P<0.05$

2.2 3 组 SHR 大鼠的血浆 IL-17 及 IL-10 测定 SHR-T 组的血浆 IL-17 浓度降低、IL-10 浓度升高,然而 SHR-M 组的血浆 IL-17 浓度继续升高、IL-10 浓度继续降低,SHR-M 和 SHR-T 组血浆 IL-17 和 IL-10 浓度测定结果 8 周时,SHR-M 和 SHR-T 的血浆 IL-17 浓度显著高于 SHR-C,IL-10 浓度显著低于 SHR-C ($P<0.05$);SHR-M 和 SHR-T 的血浆 IL-17 和 IL-10 浓度没有显著差异($P>0.05$)。16 周时,经治疗后浓度具有显著差异($P>0.05$)。

表 2 3 组 SHR 大鼠的血浆 IL-17 及 IL-10 测定结果($\bar{x}\pm s, n=3$)

Tab 2 ELISA result of IL-17/IL-10 in three groups ($\bar{x}\pm s, n=3$)

分组	IL-17/($\mu\text{mol/L}$)		IL-10/($\mu\text{mol/L}$)	
	8 周	16 周	8 周	16 周
SHR-C	22.91 \pm 1.23	24.22 \pm 3.86	40.52 \pm 0.89	41.31 \pm 1.01
SHR-M	39.41 \pm 1.14 ^a	72.82 \pm 2.88 ^a	26.33 \pm 1.21 ^a	18.63 \pm 0.67 ^a
SHR-T	41.63 \pm 1.31 ^a	28.63 \pm 1.74 ^b	26.71 \pm 0.76 ^a	52.75 \pm 4.23 ^{ab}
F	138.61 [*]	165.34 [*]	138.42 [*]	93.46 [*]

^a:3 组间 $P<0.05$;^{*}与 SHR-C 比较,^b与 SHR-M 相比较, $P<0.05$

2.3 3 组 SHR 大鼠的脑组织 IL-17 及 IL-10 mRNA 的表达 8 周时,SHR-M 和 SHR-T 的脑组织 IL-10 表达水平显著低于 SHR-C ($P<0.05$),SHR-M 和 SHR-T 的 IL-10 表达水平差异没有统计学意义($P>0.05$),3 组间脑组织 IL-17 表达水平没有显著差异($P>0.05$)。16 周时,SHR-T 组脑组织 IL-17 表达水平显著低于 SHR-M 组,IL-10 表达水平显著高于 SHR-M 组($P>0.05$)。

表 3 3 组 SHR 大鼠的脑组织 IL-17 及 IL-10 测定结果($x=2^{-\Delta\Delta Ct}, \bar{x}\pm s, n=3$)

Tab 3 IL-17/IL-10 mRNA expression in brain tissue of three groups ($x=2^{-\Delta\Delta Ct}, \bar{x}\pm s, n=3$)

分组	IL-17/($\mu\text{mol/L}$)		IL-10/($\mu\text{mol/L}$)	
	8 周	16 周	8 周	16 周
SHR-C	2.29 \pm 0.33	2.31 \pm 0.36	4.21 \pm 0.84	4.15 \pm 0.71
SHR-M	3.03 \pm 0.64	4.26 \pm 0.77 ^a	2.24 \pm 0.41 ^a	1.26 \pm 0.17 ^a
SHR-T	3.11 \pm 0.61	2.32 \pm 0.24 ^b	2.35 \pm 0.43 ^a	4.65 \pm 0.73 ^b
F	1.38	9.708 [*]	6.94 [*]	18.84 [*]

^a:3 组间 $P<0.05$;^{*}与 SHR-C 比较,^b与 SHR-M 相比较, $P<0.05$

2.4 3组SHR大鼠的脑组织IL-17及IL-10免疫组织化学染色结果 3组SHR大鼠的脑组织IL-17及IL-10免疫组织化学染色结果见图1。由图1可

以看出,16周时,SHR-M的脑组织IL-17细胞阳性率明显高于SHR-C和SHR-T,IL-10细胞阳性率明显高于SHR-C和SHR-T。

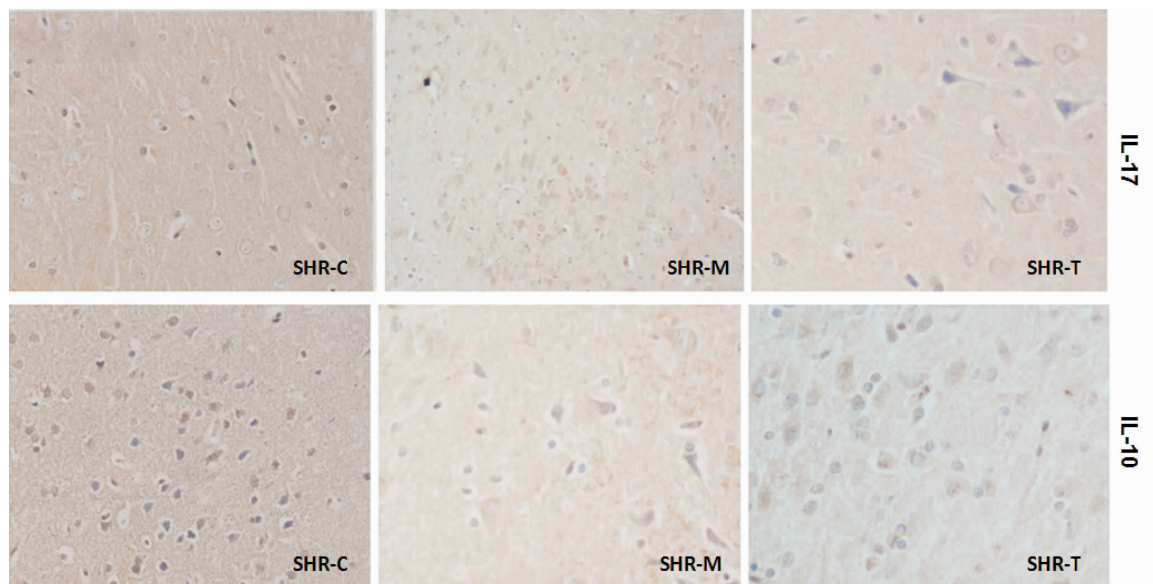


图1 3组SHR大鼠的脑组织IL-17及IL-10免疫组织化学染色结果($\times 200$)

Fig 1 Immunohistochemical staining of IL-17/IL-10 in brain tissue of three groups (magnification $\times 200$)

3 讨论

蛋氨酸去甲基后可以形成Hcy,叶酸、VB₆和VB₁₂是蛋氨酸代谢过程中重要的辅酶。Hcy的代谢异常导致血清中Hcy浓度升高,称为高同型半胱氨酸血症。Hcy是风湿性关节炎的独立危险因素,亦是高血压患者靶器官损害的独立危险因素。Hcy与血管疾病关系密切,特别是脑梗死及脑出血^[10]。Hcy通过氧化应激、炎症反应、损害血管内皮、激活血小板及促进平滑肌细胞增殖等多种机制促进风湿性关节炎的发生和发展^[11]。Hcy与高血压发挥协同作用,可致血管疾病的风险明显增加^[12]。本研究对高血压大鼠进行高蛋白饮食造成高血压合并HHcy模型,并用叶酸联合维生素干预模型,进而研究Hcy对高血压的影响。结果显示,8周时高蛋白饮食的SHR-M和SHR-T血浆Hcy浓度显著高于正常饮食的SHR-C($P<0.05$)。此结果说明8周时SHR大鼠的HHcy模型建立成功。叶酸、VB₆和VB₁₂治疗后SHR-T组的血浆Hcy浓度下降到正常水平,继续进行高蛋白饮食的SHR-M组的血浆Hcy继续升高,并且显著高于SHR-T和SHR-C组($P<0.05$)。该结果说明叶酸联合B组维生素能够有效降低SHR合并HHcy模型大鼠的血浆Hcy水平。此外,高蛋白饮食影响SHR大鼠的体质量,我们的研究发现8周时,SHR-M和SHR-T的体质量显著低于SHR-C,治疗后SHR-T组的体质量升高。

关于高同型半胱氨酸血症对脑血管系统疾病的影响机制具有很多研究,包括动脉粥样硬化、埃尔夫海默症、帕金森综合征、中风等。徐志红等^[13]认为同型半胱氨酸能引起人脐静脉内皮细胞炎症因子的表达与释放,这些生物学效应是通过核转录因子 κ B信号通路来实现的。孔炜等^[14]发现免疫细胞介导的氧化应激和炎症反应在早期动脉粥样硬化形成中的重要作用。本研究重点研究高同型半胱氨酸对自发性高血压大鼠脑损伤的免疫调控机制。IL-10来源于Th2和部分Treg细胞,能抑制Th1细胞应答及合成细胞因子,是近年来发现的免疫抑制因子和抗炎因子,在机体中主要起免疫调节和抗炎作用,能抑制炎症细胞因子的表达,可促进NO的合成,还能通过抑制炎症介质诱导NO的释放发挥抗炎效应^[15-16]。Th17细胞主要效应因子是IL-17,IL-17是一种主要由活化的T细胞产生的致炎细胞因子,可以促进T细胞的激活和刺激上皮细胞、内皮细胞、成纤维细胞产生多种细胞因子如IL-6、IL-8、粒细胞-巨噬细胞刺激因子(GM-CSF)和化学趋化素及细胞黏附分子1 (cellular adhesion molecule 1, CAM-1),从而导致炎症的产生^[17-18]。Chastain等^[19]的研究表明高同型半胱氨酸可以加重脑脊髓炎的临床症状,其机理可能同Hcy破坏血脑屏障,促进TH1细胞分泌TNF- α 、IFN- γ 等致炎因子有关。我们的结果显示:第8周时,高蛋白饮食的SHR-M

和 SHR-T 组血浆和脑组织中的促炎因子 IL-17 浓度均显著高于正常饮食组 SHR-C, 血浆和脑组织中的抑炎因子 IL-10 水平均低于 SHR-C; 16 周时, 经叶酸联合维生素治疗后 SHR-T 组血浆和脑组织中的促炎因子 IL-17 降低, 抑炎因子 IL-10 水平升高, 并且免疫组化也得到类似结果。因此, 我们推测 Hey 通过调节炎症反应进而影响高血压患者的脑组织病变。即 Hey 可促进炎症反应从而导致脑组织病变的发生, 下调免疫反应后可起到保护作用。

参考文献:

- [1] Ganguly P, Alam S F. Role of homocysteine in the development of cardiovascular disease[J]. *Nutr J*, 2015, 14: 6
- [2] He L M, Gao C Y, Wang Y, et al. Red cell distribution width and homocysteine act as independent risk factors for cardiovascular events in newly diagnostic essential hypertension[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(60):102590
- [3] Li S, Zhu J, Wu L, et al. The association between Plasma homocysteine and ambulatory blood Pressure variability in Patients with untreated hypertension[J]. *Clin Chim Acta*, 2017, 477: 32
- [4] Kirabo A. A new paradigm of sodium regulation in inflammation and hypertension[J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2017, 313(6): R706
- [5] Bartoloni E, Alunno A, Gerli R. Hypertension as a cardiovascular risk factor in autoimmune rheumatic diseases[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2018, 15(1): 33
- [6] 张宇, 王林. 同型半胱氨酸与 H 型高血压研究进展[J]. *中华老年病研究电子杂志*, 2016, 3(1): 30
- [7] Li Q, Wang Y, Yu F, et al. Peripheral Th17/Treg imbalance in patients with atherosclerotic cerebral infarction[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2013, 6(6): 1015
- [8] Lehmann M, Regland B, Blennow K, et al. Vitamin B12-B6-folate treatment improves blood-brain barrier function in patients with hyperhomocysteinaemia and mild cognitive impairment[J]. *Dement Geriatr Cogn Disord*, 2003, 16(3): 145
- [9] Werder S F. Cobalamin deficiency, hyperhomocysteinemia, and dementia[J]. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 2010, 6: 159
- [10] Miwa K, Tanaka M, Okazaki S, et al. Increased Total Homocysteine Levels Predict the Risk of Incident Dementia Independent of Cerebral Small-Vessel Diseases and Vascular Risk Factors[J]. *J Alzheimers Dis*, 2016, 49(2): 503
- [11] Kayacelebi A A, Willers J, Pham V V, et al. Plasma homoarginine, arginine, asymmetric dimethylarginine and total homocysteine interrelationships in rheumatoid arthritis, coronary artery disease and Peripheral artery occlusion disease[J]. *Amino Acids*, 2015, 47(9): 1885
- [12] Liu J, Liu H, Zhao H, et al. Relationship between cardio-ankle vascular index and homocysteine in hypertension subjects with hyperhomocysteinemia[J]. *Clin Exp Hypertens*, 2016, 38(7): 652
- [13] 徐志红, 陆国平, 吴春芳. 高同型半胱氨酸血症对内皮细胞炎症反应的促发作用及其干预性研究[J]. *上海医学*, 2007, 15(5): 353
- [14] 孔炜, 王宪. 免疫炎症反应与动脉粥样硬化—高同型半胱氨酸血症促进动脉粥样硬化早期发病的免疫炎症机制[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2007, 15(7): 525
- [15] Xie L, Choudhury G R, Winters A, et al. Cerebral regulatory T cells restrain microglia/macrophage-mediated inflammatory responses via IL-10[J]. *Eur J Immunol*, 2015, 45(1): 180
- [16] Ferlazzo V, D'Agostino P, Milano S, et al. Anti-inflammatory effects of annexin-1: stimulation of IL-10 release and inhibition of nitric oxide synthesis[J]. *Int J Immunopharmacol*, 2003, 3(10/11): 1363
- [17] Beringer A, Noack M, Miossec P, et al. IL-17 in chronic inflammation: from discovery to targeting[J]. *Trends Mol Med*, 2016, 22(3): 230
- [18] Wojkowska D W, Szpakowski P, Glabinski A, et al. Glabinski, interleukin 17A promotes lymphocytes adhesion and induces CCL2 and CXCL1 release from brain endothelial cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(5): Pii: E1000
- [19] Chastain E M, Duncan D S, Rodgers J M, et al. The role of antigen Presenting cells in multiple sclerosis[J]. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 2011, 1812(2):265

(2018-01-29 收稿)

(上接第 403 页)

- [4] Kozono S, Ohuchida K, Eguchi D, et al. Pirfenidone inhibits pancreatic cancer desmoplasia by regulating stellate cells[J]. *Cancer Res*, 2013, 73(7):2345
- [5] Yang Y F, Ye Y M, Lin X C, et al. Inhibition of pirfenidone on TGF- β 2 induced proliferation, migration and Epithelial-Mesenchymal transition of human lens epithelial cells line SRA01/04[J]. *PLoS One*, 2013, 8(2):e56837
- [6] Hisatomi K, Mukae H, Sakamoto N, et al. Pirfenidone inhibits TGF- β 1-induced over-expression of collagen type I and heat shock protein 47 in A549 cells[J]. *BMC pulmonary medicine*, 2012, 12:24
- [7] Cottin V. The role of pirfenidone in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Respir Res*, 2013, 14(1):S5
- [8] Chen T, You Y A, Jiang H, et al. Epithelial-mesenchymal transition (EMT): A biological process in the development, stem cell differentiation, and tumorigenesis[J]. *J Cell Physiol*, 2017, 232(12):3261
- [9] Ikeguchi M, Makino M, Kaibara N. Clinical significance of E-cadherin-catenin complex expression in metastatic foci of colorectal carcinoma[J]. *J Surg Oncol*, 2001, 77(3):201
- [10] Liu C Y, Lin H H, Tang M J, et al. Vimentin contributes to epithelial-mesenchymal transition cancer cell mechanics by mediating cytoskeletal organization and focal adhesion maturation[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(18):15966
- [11] Valcourt U, Kowanzetz M, Niimi H, et al. TGF- β and the Smad signaling pathway support transcriptomic reprogramming during epithelial-mesenchymal cell transition[J]. *Mol Biol Cell*, 2005, 16(4):1987
- [12] Zhang J, Tian X J, Zhang H, et al. TGF- β -induced epithelial-to-mesenchymal transition proceeds through stepwise activation of multiple feedback loops[J]. *Sci Signal*, 2014, 7(345):ra91

(2018-02-14 收稿)