

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.05.003

同型半胱氨酸经 PERK 磷酸化激活 CHOP-ERO1 α 通路介导心肌细胞凋亡的研究*

杜海林¹, 杨绍兵², 丛广志², 王 凯², 贾绍斌^{2 Δ}

(1. 宁夏医科大学临床医学院, 银川 750004; 2. 宁夏医科大学总医院心脏中心, 银川 750004)

[摘要] **目的** 探讨同型半胱氨酸(Hcy)对心肌的损伤作用及其可能机制。**方法** 选用 H9C2 心肌细胞, 分别用不同浓度 Hcy、4-苯基丁酸(4-PBA)干预细胞。将 H9C2 细胞分为对照组、H400 组、H400P2 组, 对照组使用普通培养基, H400 组加入 400 μ mol/L 的 Hcy, H400P2 组在 H400 组基础上加入 2 mmol/L 的 4-PBA。CCK-8 检测细胞存活率, TUNEL 染色评估细胞凋亡, 免疫细胞化学检测内质网氧化还原酶 1 α (ERO1 α)表达, Western blot 检测蛋白表达差异。**结果** Hcy 对 H9C2 心肌细胞损伤呈浓度依赖性($F=2\ 039.958, P<0.01$)。与对照组比较, H400 组细胞凋亡分数及胰腺内质网激酶(PERK)、磷酸化 PERK(p-PERK)、CCAAT 增强子结合蛋白同源蛋白(CHOP)、ERO1 α 表达均增加($P<0.01$); H400P2 组细胞凋亡分数及 PERK、p-PERK、CHOP、ERO1 α 表达均有所下降, 与 H400 组比较均差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** Hcy 通过内质网应激机制介导心肌细胞凋亡。

[关键词] 同型半胱氨酸; CCAAT 增强子结合蛋白同源蛋白; 内质网氧化还原酶 α ; 肌细胞, 心脏; 细胞凋亡

[中图分类号] R542.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2018)05-0584-04

Homocysteine mediates cardiomyocyte apoptosis by phosphorylating PERK and activating CHOP-ERO1 α pathway*

DU Hailin¹, YANG Shaobing², CONG Guangzhi², WANG Kai², JIA Shaobin^{2 Δ}

(1. Clinical Medical College, Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750004 China;

2. Heart Center, General Hospital, Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750004 China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of homocysteine(Hcy) on myocardial injury and its possible mechanisms. **Methods** The selected H9C2 cardiomyocytes were intervened with various concentrations of Hcy and 4-phenyl butyric acid(4-PBA). The H9C2 cells were divided into the control group, H400 group and H400P2 group. The control group used the common medium, the H400 group was added with 400 μ mol/L Hcy, the H400P2 group was added with 2 mmol/L 4-PBBA on the basis of H400 group. The cell livability was detected by using cell counting kit-8(CCK-8). Apoptosis was evaluated by using the terminal deoxynucleotidyl transferase mediated nick-end labelling(TUNEL) staining. The ERO1 α expression was determined by using immunocytochemistry, and the protein expression difference was determined by using Western blot. **Results** The injury of Hcy on H9C2 cardiomyocytes showed a concentration-dependent manner($F=2\ 039.958, P<0.01$). Compared with the control group, the apoptosis percentages and expression levels of PERK, p-PERK, CHOP and ERO1 α in the H400 group were increased($P<0.01$); while which in the H400P2 group were decreased, the difference was statistically significant($P<0.05$). **Conclusion** Hcy mediates myocardial apoptosis through endoplasmic reticulum stress mechanism.

[Key words] homocysteine; CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein; endoplasmic reticulum oxidoreductin- α ; myocytes, cardiac; apoptosis

同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)是体内一种含硫氨基酸, 近年相关研究表明, Hcy 通过多种机制导致疾病的发生, 并将其列为心血管疾病重要的独立危险因素^[1]。在 Hcy 致心血管疾病的众多机制中, 内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)作为近年来研究损伤与凋亡的热点而备受关注^[2]。内质网是细胞内调节蛋白质合成和折叠的细胞器, 体内外诸多因素导致错误折叠蛋白和未折叠蛋白集聚在内质网称 ERS。在未发生应激时, 内质网分子伴侣葡萄糖调节蛋白(glucose-regulated-protein, GRP78)与胰腺内质网激酶(pancreatic-ER-kinase, PERK)、肌醇必须酶-1(inositol requiring RNase-1, IRE1)及转录激活因子-6(activating-transcription factor-6, ATF-6)紧密结合在一起, 抑制后三者激活^[3]。在应激状态下, PERK、IRE1、ATF-6 和 GRP78 解离, 进而结合未折叠蛋白, 启动未折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR), 阻止未折叠蛋白堆积而发挥细胞保护作用。但长时间 ERS, PERK 磷酸化为磷酸化 PERK(p-PERK), 后者激活下游

的 CCAAT 增强子结合蛋白同源蛋白(CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein, CHOP)及 CHOP 下游靶点内质网氧化还原酶 1 α (endoplasmic reticulum oxidoreductin-1 α , ERO1 α), 启动凋亡程序^[4]。有研究发现, 慢性心力衰竭(CHF)患者血清 Hcy 水平较无心力衰竭患者增高, 提示除缺血因素外, Hcy 是导致 CHF 的又一独立危险因素, 但其机制仍不清楚^[5]。目前 Hcy 通过 ERS 促进动脉斑块形成的报道较多, 而 Hcy 对心肌的影响鲜见报道。本研究旨在探讨 Hcy 是否通过 ERS 导致心肌细胞损伤, 其损伤是否和 CHOP-ERO1 α 通路激活所介导的凋亡有关, 以为临床干预提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 H9C2 心肌细胞由中乔新舟提供; Dulbecco's 改良培养基(DMEM)及胎牛血清(FBS)购自 Gibco 公司, 4-苯基丁酸(4-phenylbutyric acid, 4-PBA)及 Hcy 购自 Sigma 公司; 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)制备试剂盒购自康为世纪公司; 抗 GAPDH 单抗及抗 β -actin 单抗购自中杉金

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81460079)。 作者简介: 杜海林(1982-), 主治医师, 硕士研究生, 主要从事同型半胱氨酸致心脏疾病的机制研究。 Δ 通信作者, E-mail: jsbxn@163.com。

桥公司;ER-Stress 抗体试剂盒购自 Cell Signaling Technology; Anti-ERO1 α 抗体购自 Abcam 公司;FITC 标记山羊抗兔荧光二抗购自中杉金桥公司;全蛋白提取试剂盒及 BCA 蛋白浓度检测试剂盒均购自凯基生物公司;CCK-8 细胞毒力检测试剂盒购自上海合元生物公司;罗氏 TUNEL 凋亡检测试剂盒购自 Roche 公司;酶标仪由 Thermo 公司提供。

1.2 方法

1.2.1 CCK-8 检测 Hcy 及 4-PBA 对细胞损伤 将 H9C2 细胞于含 10%FBS 的 DMEM(普通培养基)中培养,待细胞生长至对数期时用于实验:(1)将细胞重悬后接种于 96 孔板用于 CCK-8 检测,密度为 1×10^3 个/孔,并将其分为对照组(H0)及 H 组,培养 24 h 使其贴壁,对照组给予普通培养基培养,H 组分别在上述普通培养基中加入终浓度为 50、100、400、1 000 $\mu\text{mol/L}$ 的 Hcy(分别为 H50、H100、H400、H1000),每组 10 个复孔。培养 72 h 后更换无血清 DMEM,并向每孔中加入 CCK-8 检测试剂 10 μL 。同时设置空白对照组:仅加入无血清培养基及 CCK-8 检测试剂。继续培养 2 h 后酶标仪检测 OD 值。(2)取上述对数生长期细胞检测 4-PBA 对细胞存活率的影响,将细胞分为对照组(P0)和 P 组,对照组给予普通培养基培养,P 组分别在上述普通培养基中加入终浓度为 1、2、3、4、5 mmol/L 的 4-PBA(分别为 P1、P2、P3、P4、P5),其余实验步骤同上,检测出 2 mmol/L 的 4-PBA 对细胞无损伤作用,并将此浓度用于后续实验。(3)取对数生长的 H9C2 细胞,分为 H 组和 HP2 组,H 组按上述(1)步骤加入不同浓度 Hcy(分别为 H50、H100、H400、H1000)。HP2 组除按(1)步骤加入 Hcy 外,每组另加终浓度为 2 mmol/L 的 4-PBA(分别为 H50P2、H100P2、H400P2、H1000P2),其余操作同前。经过 72 h 干预,使用酶标仪检测 96 孔板 OD 值,通过 OD 值计算每孔细胞存活率。细胞存活率 = $(A_{\text{干预}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}) \times 100\%$ 。A_{干预}指含有细胞、CCK-8 溶液和干预试剂孔的 OD 值;A_{空白}指含有培养基和 CCK-8 溶液而没有细胞孔的 OD 值;A_{对照}指含有细胞、CCK 溶液而无药物溶液孔的 OD 值。

1.2.2 TUNEL 凋亡染色 经过 CCK-8 检测,根据细胞半数抑制率及存活率选择 400 $\mu\text{mol/L}$ 的 Hcy 及 2 mmol/L 的 4-PBA 作为最适浓度,用于后续实验。预先在 24 孔板中放入细胞爬片,向孔内接种对数生长期 H9C2 细胞,密度为 1×10^4 个/孔,并将其分为对照组、H400 组、H400P2 组,贴壁 24 h 后,对照组给予普通培养基培养,H400 组给予含 Hcy 终浓度为 400 $\mu\text{mol/L}$ 上述普通培养基培养,H400P2 组在 H400 组基础上加入终浓度为 2 mmol/L 的 4-PBA。培养 72 h 后取出爬片,按罗氏 TUNEL 凋亡染色试剂盒说明进行操作,荧光显微镜下观察并计数视野下细胞总数及凋亡细胞数,每组计数 10 个视野用于统计学分析。

1.2.3 免疫荧光检测 ERO1 α 表达 预先在 24 孔板中放入细胞爬片,向孔内接种对数生长期 H9C2 细胞,密度为 5×10^3

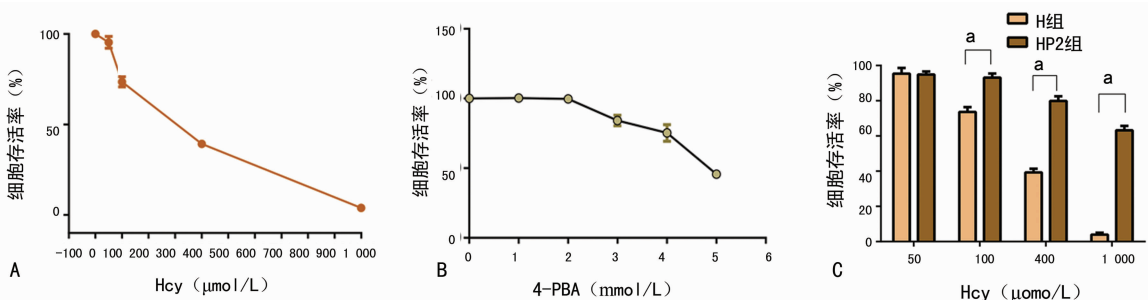
个/孔,并将其分为对照组、H400 组、H400P2 组,贴壁 24 h 后,对照组给予普通培养基培养,H400 组给予含 Hcy 终浓度为 400 $\mu\text{mol/L}$ 上述普通培养基培养,H400P2 组在 H400 组基础上加入终浓度为 2 mmol/L 的 4-PBA。培养 72 h 后取出爬片,4%多聚甲醛固定,3%过氧化氢作内源性过氧化物酶处理,1% Triton-X100 通透,山羊血清封闭,加入抗 ERO1 α 单抗(1:200)于 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,次日 PBS 清洗后加入 FITC 标记山羊抗兔荧光二抗(1:100),DAPI 显色,荧光显微镜下观察细胞质红染的阳性细胞,并计数每个视野下阳性细胞数占该视野下细胞总数百分数,每组计数 10 个视野用于统计学分析。

1.2.4 Western blot 检测 PERK/p-PERK/CHOP/ERO1 α 表达 取对数生长期 H9C2 细胞,重悬后将其接种于 6 孔板,密度为 5×10^4 个/孔,并将其分为对照组、P2 组、H400 组、H400P2 组。贴壁 24 h 后,对照组给予普通培养基培养;P2 组给予含 4-PBA 终浓度为 2 mmol/L 的上述普通培养基培养;H400 组给予含 Hcy 终浓度为 400 $\mu\text{mol/L}$ 的上述普通培养基培养;H400P2 组在 H400 组基础上加入终浓度为 2 mmol/L 的 4-PBA。培养 72 h 后使用全蛋白提取试剂盒提取各组细胞全蛋白,使用 BCA 蛋白检测试剂盒检测蛋白浓度,以 10% SDS-PAGE 电泳转移至聚偏二氟乙烯膜(PVDF),室温下脱脂牛奶封闭 90 min,加入相应一抗:PERK(1:1 000)、p-PERK(1:1 000)、CHOP(1:1 000)、ERO1 α (1:1 000)、GAPDH(1:2 000)、 β -actin(1:2 000)于 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,次日洗膜后加入相应的辣根过氧化物酶标记的二抗,室温孵育 1 h。Clinx-ChemiScope6300 化学发光成像系统自动曝光,并使用系统配套软件分析条带灰度值。以 GAPDH 或 β -actin 作为内参,重复实验 3 次,将 3 次实验结果所测得的灰度值作统计学分析。

1.3 统计学处理 所有数据均采用 SPSS21.0 统计软件包进行分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验,方差不齐时使用 *t'* 检验;多组之间比较使用方差分析,均采用双侧检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

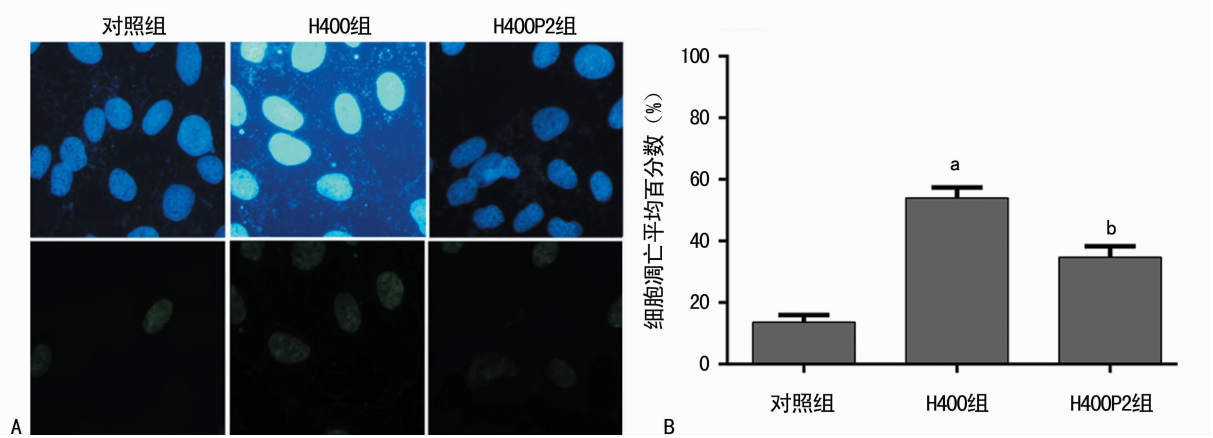
2 结果

2.1 Hcy 及 4-PBA 对细胞损伤 经不同浓度 Hcy 干预 72 h 后,细胞存活率明显降低,且随 Hcy 浓度增加存活率呈下降趋势,与对照组比较差异有统计学意义($F = 2.039.580, P < 0.01$),见图 1A。当 Hcy 浓度为 400 $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞存活率接近半数抑制率,故选用 Hcy 浓度为 400 $\mu\text{mol/L}$ 完成后续实验。4-PBA 为 3 mmol/L 时,可见明显损伤作用。而 4-PBA 为 2 mmol/L 时,对 H9C2 心肌细胞无明显损伤作用,与对照组比较差异无统计学意义($t = 0.245, P = 0.823$),见图 1B,故选用 2 mmol/L 的 4-PBA 作为后续实验浓度。Hcy 浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$ 时,是否加入 4-PBA,细胞存活率差异无统计学意义($t = 0.320, P = 0.755$),见图 1C。随着 Hcy 浓度增大,HP2 组细胞存活率较同浓度 H 组明显增加,差异均有统计学意义($t = 13.161, 29.255, 52.474, P < 0.01$)。



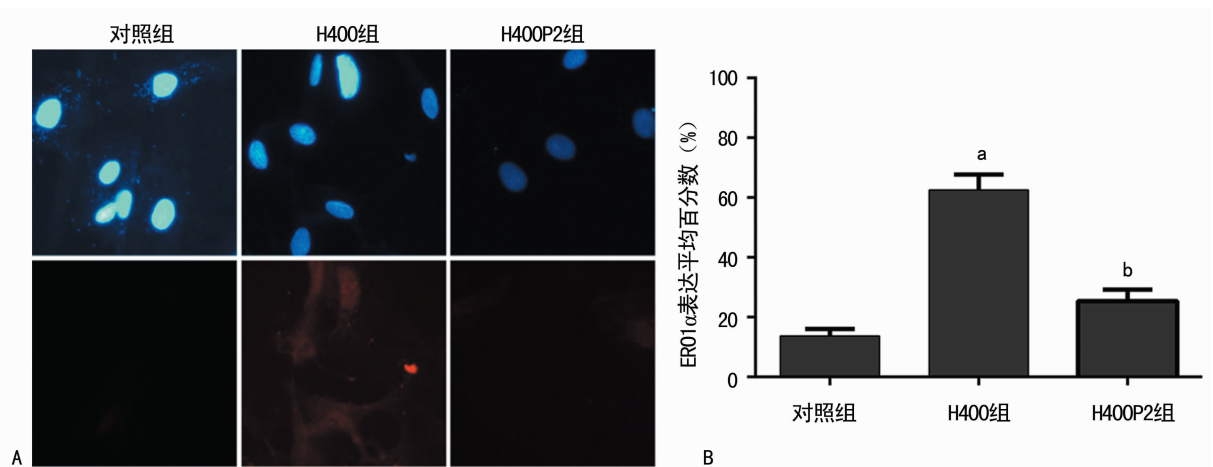
A: Hcy 干预后细胞存活率; B: 4-PBA 干预后细胞存活率; C: 相同 Hcy 浓度下 H 组与 HP2 组细胞存活率比较; * $P < 0.01$, 与 H 组比较

图 1 不同浓度 Hcy 及 4-PBA 干预后的细胞存活率



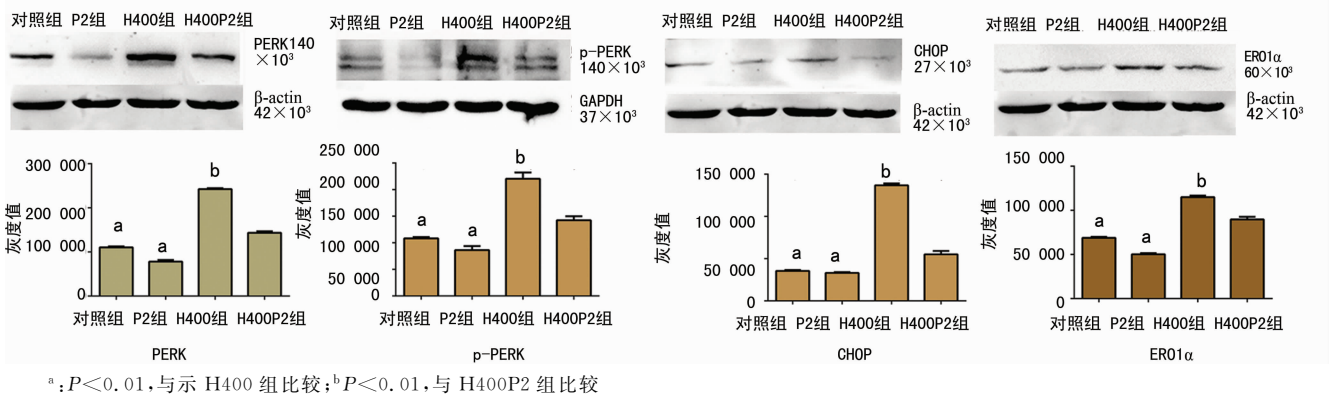
A: 上图为视野下所有细胞, 下图为凋亡细胞($\times 400$); B: 不同组凋亡平均百分数比较; ^a: $P < 0.01$, 与对照组比较; ^b: $P < 0.01$, 与 H400 组比较

图 2 TUNEL 细胞凋亡染色检测



A: 上图为视野下细胞总数, 下图为阳性细胞($\times 400$); B: 各组 ERO1 α 表达阳性细胞平均百分数; ^a: $P < 0.01$, 与对照组比较; ^b: $P < 0.01$, 与 H400 组比较

图 3 免疫荧光染色检测 ERO1 α 表达



^a: $P < 0.01$, 与 H400 组比较; ^b: $P < 0.01$, 与 H400P2 组比较

图 4 各组 PERK、p-PERK、CHOP、ERO1 α 表达在各组中的条带灰度值

2.2 TUNEL 凋亡染色 H400 组经 $400 \mu\text{mol/L}$ 的 Hcy 干预后, 与对照组比较, 凋亡细胞分数明显增加 ($t = 21.593, P < 0.01$); H400P2 组由于培养基中含有 2 mmol/L 的 4-PBA, 与 H400 组比较, 细胞凋亡分数明显减少 ($t = 8.742, P < 0.01$), 见图 2A、B。

2.3 免疫荧光检测 ERO1 α 表达 与对照组比较, H400 组细胞质 ERO1 α 表达明显增加, 差异有统计学意义 ($t = 19.205, P < 0.01$); 而同时经 Hcy 及 4-PBA 干预的 H400P2 组, ERO1 α 表达与 H400 组比较明显减低, 差异有统计学意义 ($t = 9.908, P < 0.01$), 见图 3A、B。

2.4 Western blot 检测 PERK、p-PERK、CHOP、ERO1 α 表达

H9C2 心肌细胞经 $400 \mu\text{mol/L}$ 的 Hcy 干预后, ERS 相关蛋白 PERK、p-PERK、CHOP、ERO1 α 表达均有所增加, 与对照组比较, 各因子表达均差异有统计学意义 ($t = 70.326, 15.973, 69.353, 39.019, P < 0.01$)。与 H400 组比较, H400P2 组 PERK、p-PERK、CHOP、ERO1 α 表达均有所下降 ($t = 40.766, 9.540, 30.390, 12.587, P < 0.01$), 见图 4。

3 讨论

Hcy 作为体内蛋氨酸脱甲基代谢的一种中间产物, 具有细胞毒性。当前的一些研究证实其毒性作用可致全身多种疾病,

包括 2 型糖尿病、肿瘤、肾脏疾病及动脉粥样硬化等^[6-7]。本研究第一次观察到 Hcy 对心肌细胞的直接损伤作用,并通过细胞模型探讨了损伤的机制,对临床高同型半胱氨酸血症(HHcy)的干预提供了理论依据。

HHcy($\geq 10 \mu\text{mol/L}$)是 WHO 近年公布的致心血管疾病的危险因素^[8]。关于 Hcy 致心血管疾病的机制,较为明确的有:(1)Hcy 诱发氧化应激反应^[9];(2)诱导平滑肌细胞增殖等导致动脉粥样硬化^[10];(3)诱导生长抑制因子和 DNA 损伤诱导因子(GADD34)及 T 细胞死亡基因 51(TDAG51)表达,触发 ERS 反应^[11]。本课题组首先通过 CCK-8 试剂盒检测到了 Hcy 对心肌细胞损伤,同时通过 TUNEL 染色,证实了 Hcy 致心肌损伤的机制是通过促进细胞凋亡所致,最后采用免疫荧光及 Western blot 等手段,观察到了经 Hcy 干预后,ERS 通路中,凋亡调节蛋白的表达增加,清楚地阐明了 Hcy 通过 ERS 致心肌凋亡的一条通路。首次发现了 Hcy 通过 ERS 机制,直接导致心肌损伤。

Hcy 是人体蛋氨酸代谢的产物,体内叶酸和维生素 B₁₂ 缺乏都将导致血清 Hcy 积聚^[12]。故目前对 HHcy 的预防主要是补充维生素 B₁₂ 和叶酸^[13]。但近来一些临床相关的 Meta 分析显示,人为的补充 VB₁₂ 和叶酸并不能降低临床发生心血管事件的风险^[14]。因此需要探索新的手段对临床高 Hcy 进行干预,本实验结果显示,在含有 Hcy 的培养基中加入 4-PBA,细胞损伤明显减轻,TUNEL 染色也提示相应凋亡细胞比例减少,Western blot 也显示,4-PBA 干预后的心肌细胞内质网通路相关蛋白 PERK、p-PERK、CHOP、ERO1 α 表达均有所下降,而 CHOP 及 ERO1 α 被认为是细胞凋亡的起始因子,此二者表达增加提示 Hcy 可以经凋亡通路介导心肌损伤^[15-16]。其机制可能为 4-PBA 作为一个分子伴侣,通过阻断炎症信号,稳定蛋白构象而抑制 ERS^[17]。同时通过辅助内质网进行正确的蛋白折叠,减轻 ERS 负担,从而抑制 CHOP 及其下游分子 ERO1- α 转录和翻译,减轻心肌细胞凋亡,发挥心肌保护作用。本实验创新之处在于引入 4-PBA,一方面利用其对 ERS 的阻断作用,证实 ERS 在 Hcy 致心肌细胞凋亡过程中的重要性,另一方面也为血清高 Hcy 的干预寻找可能的靶点。

总之,本研究证实了 Hcy 对心肌细胞的直接损伤,其对心肌细胞的损伤是通过促细胞凋亡实现的,至少有一条通路是通过激活 ERS,促进 PERK 磷酸化,介导 CHOP 及 ERO1 α 表达,导致细胞凋亡。同时本研究还有许多不足之处,比如,未探讨 Hcy 对 ERS 其他通路的影响,未进行体内实验等,这些不足课题组将在后续研究中加以补充。

参考文献

- [1] KOSOKABE T, OKUMURA K, SONE T, et al. Relation of a common methylenetetrahydrofolate reductase mutation and plasma homocysteine with intimal hyperplasia after coronary stenting [J]. *Circulation*, 2001, 103(16): 2048-2054.
- [2] ZHANG C, KAWAUCHI J, ADACHI M T, et al. Activation of JNK and transcriptional repressor ATF3/LRF1 through the IRE1/TRAF2 pathway is implicated in human vascular endothelial cell death by homocysteine [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 289(3): 718-724.
- [3] WALTER P, RON D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation [J]. *Science*, 2011, 334(6059): 1081-1086.
- [4] SZEGEZDI E, MACDONALD D C, GUPTA S, et al. Bcl-2 family on guard at the ER [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2009, 296(5): C941-953.
- [5] AGOSTON-COLDEA L, MOCAN T, GATFOSSE M, et al. Plasma homocysteine and the severity of heart failure in patients with previous myocardial infarction [J]. *Cardiol J*, 2011, 18(1): 55-62.
- [6] ZHU L, JIA F, WEI J, et al. Salidroside protects against homocysteine-induced injury in human umbilical vein endothelial cells via the regulation of endoplasmic reticulum stress [J]. *Cardiovasc Ther*, 2017, 35(1): 33-39.
- [7] CHENG J, KAPLOWITZ N. Hyperhomocysteinemia, endoplasmic reticulum stress, and alcoholic liver injury [J]. *World J Gastroenterol*, 2004, 10(12): 1699-1708.
- [8] ANTONIADES C, ANTONOPOULOS A S, TOUSOULIS D, et al. Homocysteine and coronary atherosclerosis: from folate fortification to the recent clinical trials [J]. *Eur Heart J*, 2009, 30(1): 6-15.
- [9] DAYAL S, ARNING E, BOTTIGLIERI T, et al. Cerebral vascular dysfunction mediated by superoxide in hyperhomocysteinemic mice [J]. *Stroke*, 2004, 35(8): 1957-1962.
- [10] YOUNG P B, KENNEDY S, SCOTT J M, et al. Lipid peroxidation induced in vivo by hyperhomocysteinemia in pigs [J]. *Atherosclerosis*, 1997, 129(1): 67-71.
- [11] POONE G K, HASSELDAM H, MUNKHOLM N, et al. The hypothermic influence on CHOP and Ero1-alpha in an endoplasmic reticulum stress model of cerebral ischemia [J]. *Brain Sci*, 2015, 5(2): 178-187.
- [12] COOK J, YIN Q, MALINOW R. Hyperhomocyst(e)inemia induces accelerated transplant vascular sclerosis in syngeneic and allogeneic rat cardiac transplants [J]. *Am J Transplant*, 2002, 2(3): 244-251.
- [13] OZKAN Y, OZKAN E, SIMSEK B. Plasma total homocysteine and cysteine levels as cardiovascular risk factors in coronary heart disease [J]. *Int J Cardiol*, 2002, 82(3): 269-277.
- [14] HUANG T, CHEN Y, YANG B, et al. Metaanalysis of B vitamin supplementation on plasma homocysteine, cardiovascular and all-cause mortality [J]. *Clin Nutri*, 2012, 31(4): 448-454.
- [15] LI G, MONGILLO M, CHIN K T, et al. Role of ERO1-alpha-mediated stimulation of inositol 1,4,5-triphosphate receptor activity in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis [J]. *J Cell Biol*, 2009, 186(6): 783-792.
- [16] MCCULLOUGH K D, MARTINDALE J L, KLOTZ L O, et al. Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state [J]. *Mol Cell Biol*, 2001, 21(4): 1249-1259.
- [17] RANGA RAO S, SUBBARAYAN R, AJITKUMAR S, et al. 4PBA strongly attenuates endoplasmic reticulum stress, fibrosis, and mitochondrial apoptosis markers in cyclosporine treated human gingival fibroblasts [J]. *J Cell Physiol*, 2017, 9999(1): 1-7.