

法舒地尔通过 Rho-ROCK 通路抑制高糖诱导的单核细胞与内皮细胞黏附

李琦, 李海玲, 彭文辉, 徐亚伟

(同济大学附属第十人民医院心血管内科, 上海市 200072)

[关键词] 高糖; 法舒地尔; Rho-ROCK 通路; 人脐静脉内皮细胞; 细胞黏附分子

[摘要] 目的 观察 Rho 激酶抑制剂法舒地尔能否抑制高糖诱导的单核细胞(THP-1)与人脐静脉内皮细胞黏附,初步探讨其潜在机制。方法 使用荧光显微镜观察荧光标记的 THP-1 与人脐静脉内皮细胞黏附。血管细胞黏附分子 1 和单核细胞趋化蛋白 1 的 mRNA 及蛋白表达水平分别通过 RT-PCR、Western blot 检测。使用 Western blot 检测 RhoA、ROCK-1、p-MYPT 及 MYPT 蛋白表达水平变化。结果 法舒地尔显著抑制高糖诱导的 THP-1 与人脐静脉内皮细胞黏附,并呈剂量依赖性,其中,低浓度法舒地尔(10^{-6} mmol/L)干预 24 h 黏附减少约 33.4%,高浓度法舒地尔(10^{-5} mmol/L)干预 24 h 黏附减少约 42.8% (P 值均 <0.05),干预 12 h 组趋势相同。法舒地尔显著减低高糖诱导的人脐静脉内皮细胞血管细胞黏附分子 1 及单核细胞趋化蛋白 1 的 mRNA 及蛋白表达水平,并呈时间依赖性和剂量依赖性。高糖显著增加 p-MYPT/MYPT 比值,而法舒地尔减弱高糖对 p-MYPT/MYPT 比值的影响,抑制 Rho/ROCK 通路激活。结论 法舒地尔抑制高糖诱导的 THP-1 与人脐静脉内皮细胞黏附,减低高糖诱导的人脐静脉内皮细胞血管细胞黏附分子 1 和单核细胞趋化蛋白 1 的表达,减少高糖诱导的 Rho/ROCK 通路激活,提示法舒地尔可能成为新的糖尿病大血管病变治疗药物。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Fasudil Inhibiting High Glucose Induced Monocyte-Endothelial Cells Adhesion Through Rho/ROCK Pathway

LI Qi, LI Hai-Ling, PENG Wen-Hui, and XU Ya-Wei

(Department of Cardiology, the Tenth People's Hospital, School of Medicine, Tongji University, Shanghai 200072, China)

[KEY WORDS] High Glucose; Fasudil; Rho-ROCK Pathway; Human Umbilical Vein Endothelial Cells; Cell Adhesion Molecules

[ABSTRACT] **Aim** To investigate whether Rho kinase inhibitor fasudil inhibits high glucose (HG)-induced cell adhesion to human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) and search for its underlying mechanisms. **Methods** The adhesion of monocytes to HUVEC was determined using fluorescence-labeled monocytes. The mRNA and protein levels of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) and monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1) were measured using real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot. The amounts of RhoA, ROCK1, p-MYPT and MYPT were determined using Western blot analysis. **Results** Fasudil significantly suppressed HG-induced adhesion of THP-1 to HUVEC in a dose manner; namely by about 33.4% in the presence of low dose (10^{-6} mmol/L) and by 42.8% in high dose (10^{-5} mmol/L) at 24 hours (both $P < 0.05$); the same for 12 h. Fasudil significantly suppressed the HG-induced increase of mRNA and protein expression of VCAM-1 and MCP-1 in dose and time manner. HG markedly increased ratio of p-MYPT/MYPT, while fasudil inhibited HG-induced activation of Rho/ROCK pathway. **Conclusion** The adhesion of monocytes to HUVEC and the expression of VCAM-1 and MCP-1 induced by high glucose could be inhibited by fasudil, the same to activation of Rho/ROCK pathway. It suggests that fasudil may represent a new treatment for diabetic vascular injury.

[收稿日期] 2011-07-30

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30900520)

[作者简介] 李琦, 硕士, 研究方向为冠心病, E-mail 为 lqlq1982@yahoo.com.cn。通讯作者徐亚伟, E-mail 为 xuyawei2011@yahoo.com.cn。

目前,糖尿病血管病变机制尚未完全明确,但高糖诱导的内皮功能障碍发挥重要作用^[1]。血液循环中单核细胞向内皮下间隙迁徙、黏附,进而转化为巨噬细胞衍生的泡沫细胞是动脉粥样硬化过程中的主要环节。这一过程部分受趋化因子如单核细胞趋化蛋白1(MCP-1)、黏附分子如血管细胞黏附分子1(VCAM-1)调节^[2]。最近研究发现 RhoA/ROCK 通路与糖尿病血管并发症有关。实验证明,在1型糖尿病大鼠主动脉内 Rho/ROCK 通路明显活化,同时伴随动脉舒张功能下降^[3]。近年来,RhoA/ROCK 通路因涉及心血管疾病如心绞痛、缺血性发作及心衰被高度重视^[4,5]。ROCK 抑制剂法舒地尔(Fasudil, HA1077, AT877)是一种新型的5-异喹啉磺胺衍生物,兼具新型的钙离子拮抗剂、蛋白激酶抑制剂作用。既往研究表明 ROCK 抑制剂在不依赖其降脂、降糖作用的前提下,抑制 ROCK,激活内皮型一氧化氮合酶(eNOS),降低血管炎症,从而发挥抗动脉粥样硬化作用^[6]。目前,国内法舒地尔在不稳定型心绞痛患者中应用有良性作用的报道^[7]。因此,本研究拟通过体外细胞实验探究药物阻断 RhoA/ROCK 通路将通过抑制高糖诱导的单核细胞与内皮细胞黏附、迁徙发挥血管保护作用。

1 材料和方法

1.1 细胞培养

将人脐静脉内皮细胞(HUVEC)[Clonetics Cell Discovery Systems (BioWhittaker, Inc)]接种在含10%热灭活胎牛血清的达尔贝科改良 Eagle 培养基(DMEM)(Gibco, NY, USA)中,常规37℃、体积分数5%CO₂条件下培养,0.025%胰蛋白酶消化、洗涤后接种于直径100 mm 组织培养皿(Nunc, Roskilde, Denmark)中。人单核细胞系(THP-1)(American Type Culture Collection)接种在添加2 mmol/L 左旋谷氨酰胺、10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养基(Gibco, NY, USA)中。每次实验所用细胞均为传代3~8代细胞。培养基中细胞90%融合时,弃培养液,换不含胎牛血清的 RPMI 1640 培养基继续培养24 h,使细胞基本同步化于G0期后再进行分组实验。其中,一组用高糖(HG,20 mmol/L)或高糖(20 mmol/L)加法舒地尔[川威,天津红日药业股份有限公司,规格为2 mL:30 mg 注射液(国药准字H20040356),其安全性及有效性相对可靠](10⁻⁵ mmol/L)干预特定时期(0 h、3 h、6 h、12 h、24 h、48 h),另一组按以下条件干预:①加入5 mmol/L 葡萄

糖作为空白对照;②加入20 mmol/L 葡萄糖;③加入33 mmol/L 葡萄糖(高糖);④加入33 mmol/L 葡萄糖及法舒地尔(10⁻⁶ mmol/L);⑤加入33 mmol/L 葡萄糖及法舒地尔(10⁻⁵ mmol/L);⑥加入5.5 mmol/L 葡萄糖及14.5 mmol/L 甘露醇。所有细胞的RNA、蛋白、上清液均被收集。

1.2 单核细胞与内皮细胞黏附检测

使用改良的细胞黏附实验方法^[8],将HUVEC和THP-1接种在6孔板中,用高糖或高糖加法舒地尔分别干预12 h或24 h,然后用10 mg/L 的双-(羧乙基)-5,6-羧基荧光素(BCECF/AM, Sigma Chemical Co, St Louis, MO)以10 μmol/L 终浓度在37℃、RPMI 1640 培养基中标记THP-1细胞1 h。标记的THP-1细胞用磷酸缓冲盐溶液(PBS)洗涤三次后离心收集,按1×10⁹个/L(200 μL)加入HUVEC六孔板中,37℃孵育1 h。孵育完成后,吸出培养液,用PBS轻轻洗涤培养皿底层细胞三次,去除未黏附的细胞。THP-1细胞与HUVEC之间黏附通过荧光显微镜(Leica DMIRB, Leica, Germany)检测。荧光强度分别在485 nm 和535 nm 波长激发下测量。黏附细胞的数量按测得的荧光强度测算。每孔采集三个视野进行测量,并取平均值进行统计。全部实验至少重复三次。

1.3 RNA 提取及 RT-PCR

总RAN均使用RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany)提取,逆转录均使用Prime Script RT 试剂盒(Takara Biotechnology, Tokyo, Japan)。RT-PCR测定在ABI 7900HT (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)上完成,mRNA表达水平用SYBR Premix Ex Taq™(Takara Biotechnology, Tokyo, Japan)实时定量试剂盒检测。所有样品均95℃热变性1 min,40个循环,每个循环包括95℃5 s、60℃30 s。引物序列为VCAM-1上游5'-CCC TTG ACC GGC TGG AGA TT-3',下游5'-TGG GGG CAA CAT TGA CAT AAA GTG-3';MCP-1上游5'-CCC CAG TCA CCT GCT GTT AT-3',下游5'-CCA CAA TGG TCT TGA AGA TCA C-3';GAPDH上游5'-ACG GAT TTG GTC GTA TTG GG-3',下游5'-TGA TTT TGG AGGGAT CTC GC-3'。人VCAM-1和MCP-1的mRNA表达水平以GAPDH为内参测算。

1.4 蛋白提取及 Western blot 分析

本次研究所使用的抗VCAM-1和抗MCP-1抗体均从Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)购买,抗β肌动蛋白、抗ROCK-1、抗RhoA、抗p-MYPT及抗MYPT抗体从Cell Signaling Technology (Dan-

vers,Massachusetts,USA) 购买。按时间节点分组干预细胞后,弃上清,RIPA 裂解液裂解细胞,冰上孵育 10 min 后,-80℃ 保存。BCA 法蛋白定量。以各组细胞中的 Actin 做内参,细胞匀浆(40 μg 蛋白)用 8% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,转膜至 PVDF,5% 脱脂奶粉封闭 1 h(p-MYPT 使用 5% BSA、TBST)。按供方推荐浓度稀释一抗后 4℃ 过夜孵育,洗去一抗后室温孵育二抗 1 h,TBST 洗膜,ECL 发光、显影、定影,胶片扫描保存。

1.5 统计学方法

所有数据均使用 SPSS 13.0 (SPSS Inc,Chicago,Illinois,USA) 分析。连续变量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组及多组样本均数的比较使用成组设计的方差分析,多重条件组间比较使用 Bonferroni 多重比较检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 法舒地尔抑制高糖介导的单核-内皮细胞黏附

用高糖干预 24 h 的 HUVEC 与 THP-1 黏附明显高于对照组,其中 20 mmol/L 葡萄糖增强黏附 2.2 倍,33 mmol/L 葡萄糖增强黏附 3.1 倍($P < 0.01$,图 1),12 h 组我们观察到同样趋势(表 1)。与高糖组相比,同时加入法舒地尔和高糖干预的 HUVEC 与 THP-1 黏附显著降低,其中,低浓度法舒地尔(10^{-6} mmol/L)干预 24 h 黏附减少约 33.4%,高浓度法舒地尔(10^{-5} mmol/L)干预 24 h 黏附减少约 42.8% ($P < 0.01$,图 1),12 h 组趋势相同(表 1)。

2.2 法舒地尔对高糖诱导的人脐静脉内皮细胞 VCAM-1 及 MCP-1 mRNA 表达水平的影响

量效实验结果发现,与对照组比较,高糖(20 mmol/L 和 33 mmol/L)干预 24 h 后 HUVEC 胞内 VCAM-1 及 MCP-1 mRNA 表达水平明显增高,相似高浓度的甘露醇组无明显差异,同时加入高糖及法舒地尔组则出现表达抑制。其中高浓度法舒地尔组(10^{-5} mmol/L) VCAM-1 表达减低 63.6%、MCP-1 减低 63.9%,低浓度法舒地尔组(10^{-6} mmol/L) VCAM-1 表达减低 32.7%、MCP-1 减低 45.2%,高浓度法舒地尔组抑制作用较低浓度法舒地尔组更明显(图 2)。

时效实验结果发现,20 mmol/L 葡萄糖干预 HUVEC 0~48 h,其 VCAM-1 及 MCP-1 mRNA 表达水平呈时间相关性增长,并在 12 h 达到高峰,随后出现下降趋势。而同时在高糖(20 mmol/L)的基础上加入法舒地尔(10^{-5} mmol/L),HUVEC 胞内 VCAM-1 及 MCP-1 mRNA 表达水平明显抑制(图 3)。

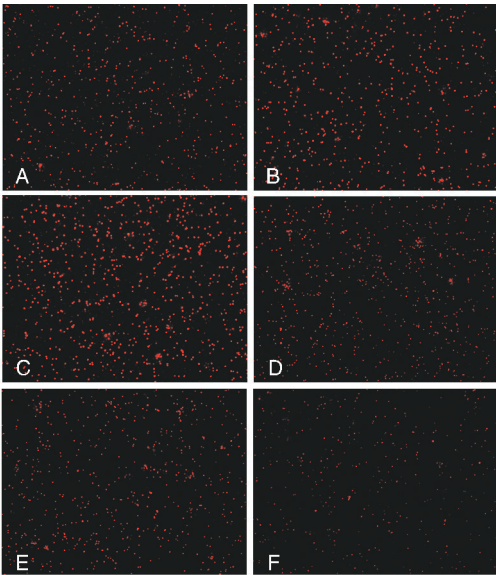


图 1. 法舒地尔抑制高糖介导的单核细胞与人脐静脉内皮细胞黏附(24 h) A 为对照组,B 为 20 mmol/L 葡萄糖组,C 为 33 mmol/L 葡萄糖组,D 为 33 mmol/L 葡萄糖 + 10^{-6} mmol/L 法舒地尔组,E 为 33 mmol/L 葡萄糖 + 10^{-5} mmol/L 法舒地尔组,F 为 5.5 mmol/L 葡萄糖 + 14.5 mmol/L 甘露醇组。

Figure 1. Fasudil inhibiting monocyte-endothelial cells adhesion induced by high glucose

表 1. 法舒地尔及高糖干预不同时间对单核细胞与人脐静脉内皮细胞黏附的影响

Table 1. Effect of fasudil and high glucose for 12h or 24 h on monocyte-endothelial cells adhesion

干预条件	12 h	24 h
对照组	1.00 ± 0.13	1.00 ± 0.20
20 mmol/L 葡萄糖组	2.23 ± 0.90 ^a	2.27 ± 0.95 ^a
33 mmol/L 葡萄糖组	3.18 ± 1.56 ^a	3.00 ± 1.03 ^a
33 mmol/L 葡萄糖 + 10^{-6} mmol/L 法舒地尔组	2.43 ± 1.01 ^b	2.00 ± 0.56 ^b
33 mmol/L 葡萄糖 + 10^{-5} mmol/L 法舒地尔组	2.15 ± 0.74 ^b	1.72 ± 0.57 ^b
5.5 mmol/L 葡萄糖 + 14.5 mmol/L 甘露醇组	1.08 ± 0.23	1.09 ± 0.28

a 为 $P < 0.01$,与对照组比较;b 为 $P < 0.01$,与 33 mmol/L 葡萄糖组比较。

2.3 法舒地尔对高糖诱导的人脐静脉内皮细胞 VCAM-1 及 MCP-1 蛋白表达水平的影响

法舒地尔抑制高糖介导的 HUVEC 胞内 VCAM-1、MCP-1 蛋白表达水平,趋势与 mRNA 表达相似。其中量效实验结果发现,高糖作用 24 h 后 VCAM-1 及 MCP-1 蛋白表达增高,同时加入法舒地尔则抑制了蛋白的表达;而加入甘露醇(14.5 mmol/L)组 HUVEC 胞内 VCAM-1、MCP-1 蛋白表达水平无明显变化(图 4),提示高糖介导的 VCAM-1、MCP-1 蛋白表达水平增加与高渗透压无关。时效实验结果发

现,高糖 (20 mmol/L) 干预 HUVEC 0 ~ 48 h,其 VCAM-1 及 MCP-1 蛋白表达水平分别在 24 h 和 6 h 达到高峰,随后出现下降趋势;而同时在高糖 (20

mmol/L) 的基础上加入法舒地尔 (10^{-5} mmol/L), HUVEC 胞内 VCAM-1 及 MCP-1 蛋白表达水平明显抑制 (图 5)。

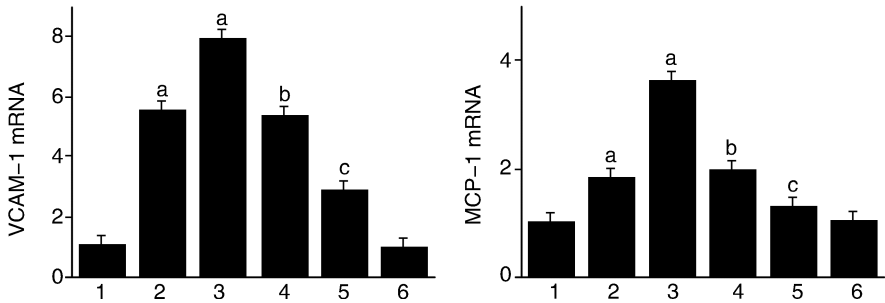


图 2. 不同剂量高糖及法舒地尔对 VCAM-1 和 MCP-1mRNA 表达水平的影响 1 为对照组,2 为 20 mmol/L 葡萄糖组,3 为 33 mmol/L 葡萄糖组,4 为 33 mmol/L 葡萄糖 + 10^{-6} mmol/L 法舒地尔组,5 为 33 mmol/L 葡萄糖 + 10^{-5} mmol/L 法舒地尔组,6 为 5.5 mmol/L 葡萄糖 + 14.5 mmol/L 甘露醇组。a 为 $P < 0.01$,与对照组比较;b 为 $P < 0.05$,c 为 $P < 0.01$,与 33 mmol/L 葡萄糖组比较。

Figure 2. Effect of different concentrations of high glucose and fasudil on mRNA expression of VCAM-1 and MCP-1

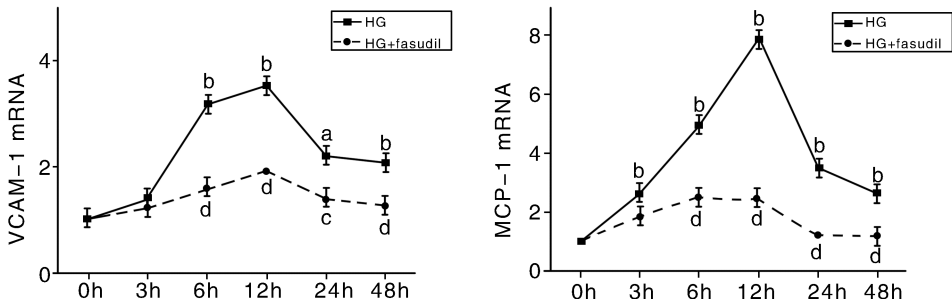


图 3. 高糖及法舒地尔干预不同时间对 VCAM-1 和 MCP-1mRNA 表达水平的影响 ($n = 3$) a 为 $P < 0.05$,b 为 $P < 0.01$,与 0 h 比较;c 为 $P < 0.05$,d 为 $P < 0.01$,与高糖组比较。

Figure 3. Effect of high glucose and fasudil for different time on mRNA expression of VCAM-1and MCP-1

2.4 法舒地尔通过抑制 Rho/ROCK 通路减少高糖介导的单核-内皮细胞黏附

Western blot 分析发现,高糖 (20 mmol/L) 显著增加 HUVEC 胞内 p-MYPT/MYPT 的比值,而法舒地尔 (10^{-5} mmol/L) 减低高糖 (20 mmol/L) 诱导的

HUVEC 胞内 p-MYPT/MYPT 比值的增加,提示 Rho/ROCK 通路被抑制 (图 6)。此外,我们还发现高糖增加 HUVEC 胞内 Rho A、ROCK-1 蛋白的表达水平,法舒地尔 (10^{-5} mmol/L 和 10^{-6} mmol/L) 则可以减轻高糖导致的这种影响 (图 4 和图 5)。

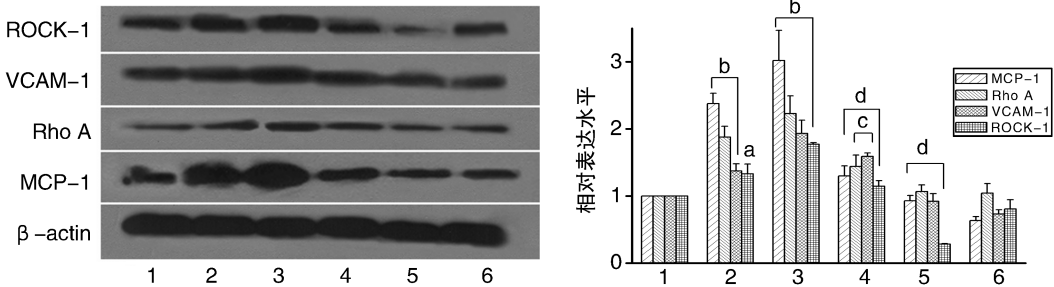


图 4. 不同剂量高糖及法舒地尔对 VCAM-1、MCP-1、ROCK-1 和 Rho A 蛋白表达水平的影响 1 为对照组,2 为 20 mmol/L 葡萄糖组,3 为 33 mmol/L 葡萄糖组,4 为 33 mmol/L 葡萄糖 + 10^{-6} mmol/L 法舒地尔组,5 为 33 mmol/L 葡萄糖 + 10^{-5} mmol/L 法舒地尔组,6 为 5.5 mmol/L 葡萄糖 + 14.5 mmol/L 甘露醇组。a 为 $P < 0.05$,b 为 $P < 0.01$,与对照组比较;c 为 $P < 0.05$,d 为 $P < 0.01$,与 33 mmol/L 葡萄糖组比较。

Figure 4. Effect of different concentrations of high glucose and fasudil on protein expression of VCAM-1, MCP-1, ROCK-1 and Rho A

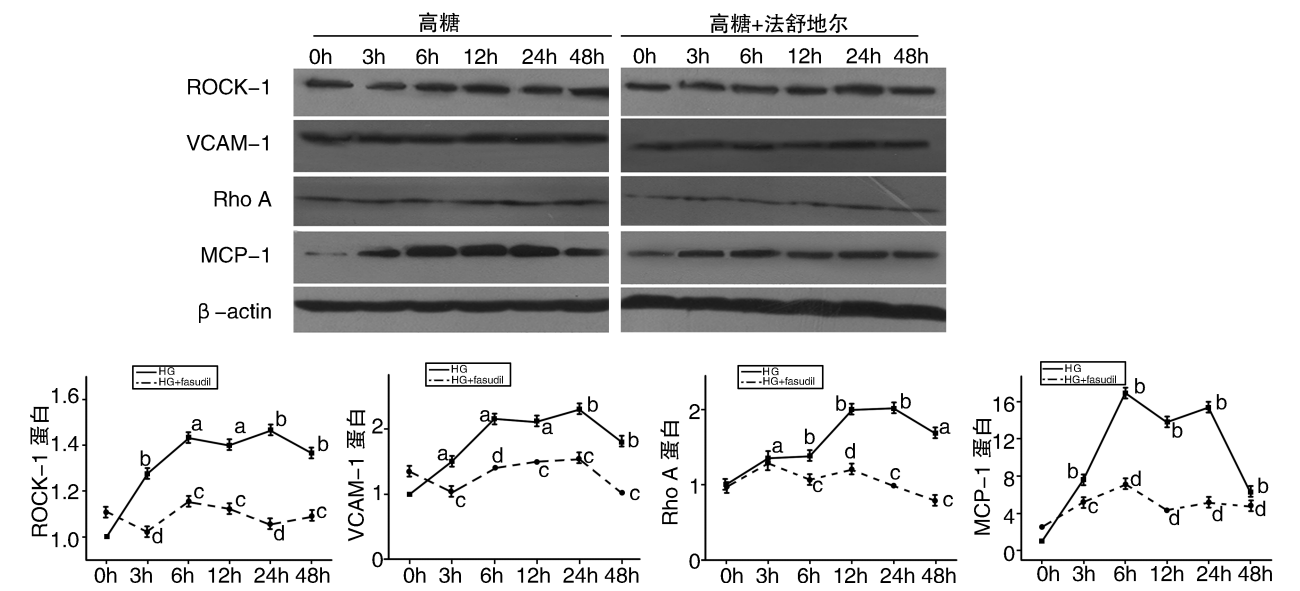


图 5. 高糖及法舒地尔干预不同时间对 VCAM-1、MCP-1、ROCK-1 和 Rho A 蛋白表达水平的影响 ($n=3$) a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与 0 h 比较; c 为 $P < 0.05$, d 为 $P < 0.01$, 与高糖组比较。

Figure 5. Effect of high glucose and fasudil for different time on protein expression of VCAM-1, MCP-1, ROCK-1 and Rho A

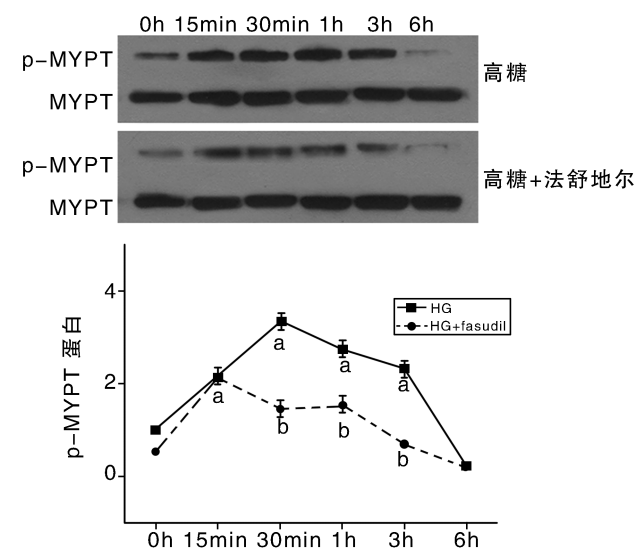


图 6. 法舒地尔对高糖诱导的人脐静脉内皮细胞内 Rho/ROCK 通路的影响 ($n=3$) a 为 $P < 0.01$, 与 0 h 比较; b 为 $P < 0.01$, 与高糖组比较。

Figure 6. Effect of fasudil on high-glucose-induced Rho/ROCK Pathway in HUVEC

3 讨论

既往研究显示,单核-内皮细胞相互作用的增加在促进糖尿病相关动脉粥样硬化中起重要作用^[9]。糖尿病患者内皮功能障碍早期表现为黏附因子表达和内皮白细胞黏附^[10,11]。本研究发现,高糖干预的 HUVEC 胞内 VCAM-1、MCP-1 表达明显增高,高糖刺激显著增加小 GTP 酶 RhoA 的激活,与先前研究

报道结果一致^[12]。值得一提的是,我们发现 Rho 激酶抑制剂法舒地尔显著抑制高糖诱导的 THP-1 与 HUVEC 黏附,其对 VCAM-1、MCP-1、RhoA 及 ROCK1 表达水平的抑制呈剂量、时间相关性。这些研究结果提示,法舒地尔对高血糖诱导的血管内皮炎症过程可能起保护作用。

动脉粥样硬化是一个慢性炎症过程。血管炎症最早表现为单核细胞黏附内皮,随后渗入、分化为巨噬细胞。其中,关键步骤为内皮细胞表面分子与单核细胞的相互作用^[13,14]。ROCK 通路已被证实正向调节炎症性动脉硬化损害^[15,16]。ROCK 通路的激活可能通过调节核因子 κ B 活化、T 淋巴细胞增殖促进早期动脉粥样硬化发展^[17]。在猪及敲除低密度脂蛋白受体的动脉粥样硬化小鼠模型体内试验中发现,长期抑制 ROCK 可显著逆转冠状动脉粥样硬化,使冠状动脉血管痉挛活动消失^[17,18]。此外,ROCK 通路还被发现涉及血管功能相关的多种基因表达,如 MCP-1^[19]、细胞间黏附分子 1^[20]、纤溶酶原激活物抑制剂 1^[21]。结合本研究结果,法舒地尔对高糖介导的 VCAM-1、MCP-1 表达及高糖诱导的 Rho/ROCK 通路的激活均起抑制作用,故我们推测法舒地尔抑制高糖诱导的单核-内皮细胞黏附与 Rho-ROCK 通路抑制有关。但是本研究结果均为体外细胞实验结果,实际应用价值有限。下一步,我们将在体外细胞实验的基础上,设计临床实验,比较糖尿病大血管病变患者在法舒地尔干预前后血浆 sVCAM-1、MCP-1 的水平变化,进一步评价法舒地尔在

实际病例中的应用价值,开辟临床糖尿病大血管病变治疗的新思路和新方法。

[参考文献]

- [1] Potenza MA, Gagliardi S, Nacci C, et al. Endothelial dysfunction in diabetes: from mechanisms to therapeutic targets[J]. *Curr Med Chem*, 2009, 16: 94-112.
- [2] Gerszten RE, Garcia-Zepeda EA, Lim YC, et al. MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions[J]. *Nature*, 1999, 398: 718-723.
- [3] Tang J, Kusaka I, Massey AR, et al. Increased RhoA translocation in aorta of diabetic rats[J]. *Acta Pharmacol Sinica*, 2006, 27(5): 543-548.
- [4] Loirand G, Guerin P, Pacaud P. Rho kinases in cardiovascular physiology and pathophysiology[J]. *Circ Res*, 2006, 98: 322-334.
- [5] Noma K, Oyama N, Liao JK. Physiological role of ROCKs in the cardiovascular system[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2006, 290: C661-668.
- [6] Mallat Z, Gojova A, Sauzeau V, et al. Rho-associated protein kinase contributes to early atherosclerotic lesion formation in mice[J]. *Circ Res*, 2003, 93(9): 884-888.
- [7] 张帆, 费瑜, 吕丽丽, 等. TNF- α 在不稳定型心绞痛中的作用及法舒地尔对其的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2011, 31(1): 36-38.
- [8] Lee YJ, Kang DG, Kim JS, et al. Effect of Buddleja officinalis on high-glucose-induced vascular inflammation in human umbilical vein endothelial cells[J]. *Exp Biol Med* (Maywood), 2008, 233: 694-700.
- [9] Carantoni M, Abbasi F, Chu L, et al. Adherence of mononuclear cells to endothelium in vitro is increased in patients with NIDDM[J]. *Diab Care*, 1997, 20: 1462-465.
- [10] Xu J, Zou MH. Molecular insights and therapeutic targets for diabetic endothelial dysfunction[J]. *Circulation*, 2009, 120: 1266-286.
- [11] Manduteanu I, Voinea M, Antohe F, et al. Effect of enoxaparin on high glucose-induced activation of endothelial cells[J]. *Eur J Pharmacol*, 2003, 477: 269-276.
- [12] Kim JA, Berliner JA, Natarajan RD, et al. Evidence that glucose increases monocyte binding to human aortic endo-

- thelial cells[J]. *Diabetes*, 1994, 43: 1103-107.
- [13] Littlewood TD, Bennett MR. Apoptotic cell death in atherosclerosis[J]. *Curr Opin Lipidol*, 2003, 14: 469-475.
- [14] Piconi L, Quagliaro L, Da Ros R, et al. Intermittent high glucose enhances ICAM-1, VCAM-1, E-selectin and interleukin-6 expression in human umbilical endothelial cells in culture: the role of poly(ADP-ribose) polymerase[J]. *J Thromb Haemost*, 2004, 2: 1453-459.
- [15] Kandabashi T, Shimokawa H, Miyata K, et al. Inhibition of myosin phosphatase by upregulated rho-kinase plays a key role for coronary artery spasm in a porcine model with interleukin-1 β [J]. *Circulation*, 2000, 101: 1319-323.
- [16] Kandabashi T, Shimokawa H, Mukai Y, et al. Involvement of rho-kinase in agonists-induced contractions of arteriosclerotic human arteries[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, 22: 243-248.
- [17] Morishige K, Shimokawa H, Eto Y, et al. Adenovirus-mediated transfer of dominant-negative rho-kinase induces a regression of coronary arteriosclerosis in pigs in vivo[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, 21: 548-554.
- [18] Mallat Z, Gojova A, Sauzeau V, et al. Rho-associated protein kinase contributes to early atherosclerotic lesion formation in mice[J]. *Circ Res*, 2003, 93: 884-888.
- [19] Funakoshi Y, Ichiki T, Shimokawa H, et al. Rho-kinase mediates angiotensin II-induced monocyte chemoattractant protein-1 expression in rat vascular smooth muscle cells[J]. *Hypertension*, 2001, 38: 100-104.
- [20] Anwar KN, Fazal F, Malik AB, et al. RhoA/Rho-associated kinase pathway selectively regulates thrombin-induced intercellular adhesion molecule-1 expression in endothelial cells via activation of I kappa B kinase beta and phosphorylation of RelA/p65[J]. *J Immunol*, 2004, 173: 6965-972.
- [21] Takeda K, Ichiki T, Tokunou T, et al. Critical role of Rho-kinase and MEK/ERK pathways for angiotensin II-induced plasminogen activator inhibitor type-1 gene expression[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, 21: 868-873.

(此文编辑 许雪梅)