

心血管疾病

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.001592

Rho 激酶抑制剂对先天性膈疝大鼠模型胎仔肺血管重构的作用

周 昉, 党红星, 陈应富, 白 科, 方 芳, 许 峰

(重庆医科大学附属儿童医院重症医学科、儿童发育疾病研究教育部重点实验室、儿童发育重大疾病国家国际科技合作基地、儿科学重庆市重点实验室, 重庆 400014)

【摘要】目的:探讨先天性膈疝(congenital diaphragmatic hernia, CDH)大鼠模型胎仔肺 Rho 激酶的表达及其抑制剂法舒地尔对肺血管重构的影响。**方法:**将定时配种成功的 SD 雌鼠随机分为对照组(5 只)、膈疝组(6 只)和法舒地尔干预组(6 只)。分别给予膈疝组和干预组除草醚(100 mg/只)一次性灌胃建立 CDH 动物模型, 对照组灌等量橄榄油。孕 16.5 d 给予干预组腹腔注射法舒地尔(15 mg/kg, 1 次/d, 连续 3 d), 对照组和膈疝组予等量生理盐水腹腔注射。定时剖宫产取出胎肺, 光镜下进行肺血管重构观察, 采用 RT-PCR 法和 Western blot 法观察肺组织 Rho 激酶表达变化; Western blot 法检测 Rho 激酶底物肌球蛋白磷酸酶的磷酸化状态。**结果:**膈疝组肺小动脉管壁厚度占血管外径百分比(WT%)和肺小动脉中膜厚度百分比(MT%)均明显高于对照组[(26.88 ± 2.41) vs. (13.50 ± 1.45); (25.59 ± 2.57) vs. (16.47 ± 2.07), $P=0.000$]; 管腔面积与血管总面积百分比(LA%)明显低于对照组[(39.22 ± 2.23) vs. (61.20 ± 3.23), $P=0.000$]。法舒地尔干预组 WT%、MT%显著低于膈疝组[(15.38 ± 2.14) vs. (26.88 ± 2.41); (17.69 ± 1.79) vs. (25.59 ± 2.57), $P=0.000$], LA%明显高于膈疝组[(58.67 ± 3.06) vs. (39.22 ± 2.23), $P=0.000$]。与对照组相比, 膈疝组 Rho 激酶 mRNA 和蛋白质表达明显升高, 肌球蛋白磷酸酶磷酸化水平也明显增高($P=0.000$)。法舒地尔干预后 Rho 激酶 mRNA 和蛋白、肌球蛋白磷酸酶磷酸化水平均较膈疝组明显降低($P<0.01$)。**结论:**先天性膈疝胎仔肺内存在肺血管重构, Rho/Rho 激酶信号通路参与此过程, 产前给予法舒地尔明显改善 CDH 胎仔的肺血管重构。

【关键词】Rho 激酶抑制剂; 先天性膈疝; 肺血管重构; 大鼠**【中图分类号】**R725.6**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2017-07-10

Effects of Rho-kinase inhibitor on lung vascular remodeling in fetal rats with congenital diaphragmatic hernia

Zhou Fang, Dang Hongxing, Chen Yingfu, Bai Ke, Fang Fang, Xu Feng

(Department of Pediatric Intensive Care Unit, Children's Hospital of Chongqing Medical University; Key Laboratory of Children's Development and Disorders Established by Ministry of Education; International and National Science and Technology Cooperation Base for Children's Development and Major Disorders; Chongqing Key Laboratory of Pediatrics)

【Abstract】Objective: To investigate the expression of Rho kinase in fetal rats with congenital diaphragmatic hernia (CDH), and to explore the effect of Rho kinase inhibitor fasudil on lung vascular remodeling. **Methods:** Timed-pregnant SD rats were randomly divided into control group (5 rats), CDH group (6 rats) and fasudil intervention group (6 rats). Nitrofen of 100 mg was given to by gavage CDH and intervention group for establishing CDH models and olive oil of the same dose was given to the control group. At day 16.5 of gestation, fasudil (15 mg/kg, qd, for 3 consecutive days) was given via intraperitoneal injection to the intervention group, while Ns was given to by the same way control and CDH group. All fetal rats were delivered by cesarean in fixed time. The small pulmonary arterial morphologic changes in all groups were analyzed with microscopy. The gene and protein expression of Rho kinase were respectively examined by RT-PCR and Western blot; the phosphorylation of myosin binding subunit (MBS) of myosin phosphatase—a substrate of Rho kinase was detected by Western blot as a marker of the activated kinase. **Results:** Morphometry investigation showed that the ratio of small pulmonary artery wall thickness to vascular external diameter (WT%) and the medium

作者介绍: 周 昉, Email: consn@126.com,

研究方向: 小儿心脏及呼吸重症。

通信作者: 许 峰, Email: xufeng9899@163.com。

基金项目: 重庆市教委科学技术研究资助项目 (编号: KJ1400229)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20180408.1432.026.html>
(2018-04-08)

thickness percentage (MT%) were significantly increased in CDH group than those in control group[(26.88 ± 2.41) vs. (13.50 ± 1.45); (25.59 ± 2.57) vs. (16.47 ± 2.07), $P=0.000$]. The ratio of small pulmonary vascular lumen area to the total area(LA%) in the CDH group was markedly lower than that in the control group[(39.22 ± 2.23) vs. (61.20 ± 3.23), $P=0.000$]. However, compared with those in the CDH group, WT% and MT% in the intervention group were significantly lower [(15.38 ± 2.14) vs. (26.88 ± 2.41); (17.69 ± 1.79) vs. (25.59 ± 2.57), $P=0.000$] and LA% was higher[(58.67 ± 3.06) vs. (39.22 ± 2.23), $P=0.000$]. The expression of Rho kinase mRNA and Rho kinase protein was significantly higher in the CDH group than in the control group($P=0.000$). The phosphorylation of MBS was also significantly higher in the CDH group($P=0.000$). Compared with those in the CDH group, expressions of Rho kinase mRNA and protein and the phosphorylation of MBS were significantly reduced in the fasudil intervention group(all $P<0.01$). **Conclusion:** Lung vascular remodeling is confirmed in fetal rats with CDH and Rho/Rho kinase signaling pathway may be involved in. Prenatal fasudil treatment may obviously improve the lung vascular remodeling in fetal rats with CDH.

[Key words] Rho kinase inhibitor; congenital diaphragmatic hernia; lung vascular remodeling; rat

先天性膈疝(congenital diaphragmatic hernia, CDH)是由于单侧或双侧膈肌发育缺损,致使胸腔脏器疝入胸腔引起一系列病理生理变化的先天性疾病,其发病率为 1/3 000~1/2 000,且合并不同程度的肺发育不良(pulmonary hypoplasia, PH)和持续性肺动脉高压(persistent pulmonary hypertension, PPH)^[1]。虽然手术可以修复缺损的膈肌,新生儿重症监护技术的进步也改善了本病生存率^[2],但对于导致 CDH 患儿死亡的根本病因——肺发育不良和持续性肺动脉高压迄今仍缺乏有效根治手段,本病死亡率仍高达 20%~60%^[3],如能通过产前干预促进患儿肺发育并改善肺血管重构,必将改善 CDH 患儿存活率。近十余年国内外研究发现, Rho/Rho 激酶信号通路主要参与了肺动脉高压的发病机制,本研究拟通过除草醚诱导的 CDH 大鼠模型,观察 Rho 激酶抑制剂对胎肺血管重构的影响,进一步探讨产前给予 Rho 激酶抑制剂治疗对 CDH 胎鼠的影响及意义。

1 材料和方法

1.1 实验动物分组和动物模型建立

SD大鼠(购于第三军医大学大坪医院实验动物中心)30只,其中雌鼠20只,雄鼠10只,2:1分笼定时配种,12 h后检查雌鼠,以见到孕栓定为孕0.5 d。交配后共17只雌鼠怀孕,孕9.5 d将孕鼠随机分为对照组(5只)、膈疝组(6只)和法舒地尔干预组(6只)。动物模型的建立采用除草醚灌胃法。该法使用除草醚(Nitrofen)灌胃诱导怀孕大鼠产生膈疝胎鼠,于1990年由 Kluth 等^[4]首次报道,现已成为一种较成熟的经典的先天性膈疝建模方法,广泛用于国内外关于膈疝的动物研究。膈疝组与干预组予以除草醚(德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司)100 mg/只(溶于2 mL 橄榄油)一次性灌胃,对照

组予等量橄榄油灌胃。孕16.5~18.5 d连续3 d给予干预组孕鼠腹腔注射法舒地尔(日本旭化成名古屋医药工厂)15 mg/kg(法舒地尔按2 mL/kg 孕鼠体质量加NS稀释),对照组和膈疝组给予2 mL/kg 孕鼠体质量NS腹腔注射。本研究符合作者所在单位实验动物伦理委员会所制定的伦理学标准。

1.2 膈疝观察和胎肺组织收集

雌鼠妊娠21.5 d,40 mg/kg 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后剖宫取胎鼠,称重后处死。再经胸骨正中切口剖胸,完整取出左右两侧肺组织,同时在放大镜下观察膈疝形成情况。

1.3 实验方法

1.3.1 胎肺组织光镜标本制备 取出的胎肺(每组22个标本)用4%多聚甲醛溶液固定过夜,常规石蜡包埋,切片后行HE染色。用Image Pro Plus6.0图像分析软件测定每个视野肺组织灰度值百分比,分别计算每个切片单位面积内直径<200 μm 的肺小动脉管壁厚度占血管外径百分比(WT%)、中膜厚度百分比(MT%)以及管腔面积与血管总面积百分比(LA%)作为胎鼠肺血管形态学指标,并进行统计学分析。

1.3.2 Western blot 法检测胎肺组织 Rho 激酶 ROCK1 及底物 MBS 表达情况 肌球蛋白轻链磷酸化酶的肌球蛋白结合亚基(myosin binding subunit, MBS)是 Rho 激酶底物,可作为 Rho 激酶功能活化状态的指标^[5]。收集胎仔肺组织(每组10个标本)提取蛋白质,考马斯亮蓝法测定目的蛋白浓度,电泳、转膜,封闭加抗 ROCK1 一抗(英国 Abcam 公司)或 MBS 磷酸化一抗(美国 Santa Cruz 公司)、二抗完成免疫杂交反应, DAB 显色。以图像分析仪将蛋白表达量转换为内参 β-actin 校正的灰度值进行计算。

1.3.3 半定量逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测胎肺组织 Rho 激酶 mRNA 的表达 提取胎肺(每组10个标本)总 RNA 参照逆转录试剂盒说明书操作。引物由上海生物工程有限公司设计,内参 β-actin 引物:扩增产物大小 287 bp,上游 5'-ATCCGTAAAGACCTCTATG-3',下游 5'-ACTGTTACTGAG-CTGCGTT-3'; Rho 激酶引物:扩增产物 201 bp,上游 5'-GGAAACGCTCCGAGACACTG-3',下游 5'-CTGGGATTTC-

TGAAGGTAAG -3'。RT-PCR 扩增产物经 2%琼脂糖凝胶电泳后经凝胶成像系统分析处理,以 β -actin 为内参照计算 Rho 激酶 mRNA 相对表达量。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计软件对实验结果进行统计学分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。膈疝组和干预组致畸率比较采用卡方检验;多组比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD- t 法。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

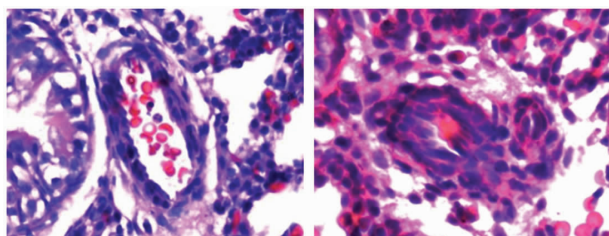
2 结果

2.1 胎鼠膈疝形成情况

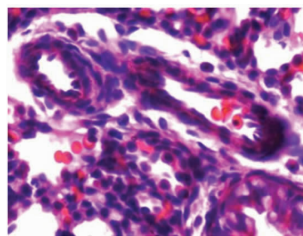
对照组获得胎仔 49 只,无膈疝形成;实验组(膈疝组和法舒地尔干预组)共获胎仔 131 只,形成膈疝 87 只,总致畸率 66.41%,其中膈疝组获胎仔 67 只,形成膈疝 45 只,致畸率 67.16%;干预组获胎仔 64 只,形成膈疝者 42 只,致畸率 65.63%。膈疝组和干预组的致畸率差异无统计学意义($P>0.05$)。膈疝形成大多位于左侧,疝内容物主要为胃、小肠,其次为肝脏,有 3 例膈疝有脾脏疝入。

2.2 胎肺血管形态学观察

光镜下观察,对照组肺组织发育良好,肺泡结构明显,肺小动脉管壁薄,管腔大,内皮细胞分布均匀,连续性较好;膈疝组胎仔肺泡小而少,肺小动脉血管内皮细胞连续性破坏,中膜增生,管壁普遍增厚,血管腔变窄;法舒地尔干预组胎鼠肺组织发育好于膈疝组,肺小动脉管壁变薄,血管腔狭窄程度较膈疝组明显减轻(图 1)。肺小动脉图像分析实验各组 WT%、MT%和 LA%结果见表 1、图 2。



A. 对照组(肺小动脉管壁菲薄,管腔大,内皮细胞分布均匀) B. 膈疝组(肺小动脉中膜增厚,血管壁厚,血管腔狭窄)



C. 干预组(肺小动脉管壁变薄,血管腔狭窄程度较膈疝组明显减轻)

图 1 CDH 胎仔肺小动脉 HE 染色(400 $\times$)

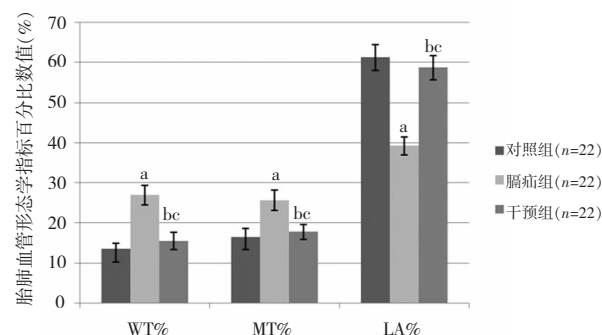
Fig.1 HE staining of lung tissue in fetal rats(400 $\times$)

表 1 各组胎肺 WT%、MT%、LA%测定结果比较

Tab.1 Comparison of WT%,MT% and LA% among 3 groups

组别	例数	WT%	MT%	LA%
对照组	22	13.50 $\pm$ 1.45	16.47 $\pm$ 2.07	61.20 $\pm$ 3.23
膈疝组	22	26.88 $\pm$ 2.41 ^a	25.59 $\pm$ 2.57 ^a	39.22 $\pm$ 2.23 ^a
干预组	22	15.38 $\pm$ 2.14 ^{bc}	17.69 $\pm$ 1.79 ^{bc}	58.67 $\pm$ 3.06 ^{bc}
F 值		276.162	106.829	384.448
P 值		0.000	0.000	0.000

注:a,膈疝组与对照组相比, $P<0.05$ (3 项检测指标均 $P=0.000$);b:干预组与对照组相比, $P<0.05$ (WT%检测 $P=0.003$,MT%检测 $P=0.026$,LA%检测 $P=0.005$);c:干预组与膈疝组相比, $P<0.05$ (3 项检测指标均 $P=0.000$)



a, b: 与对照组相比, $P<0.05$; c: 与膈疝组相比, $P<0.05$

图 2 各组胎肺 WT%、MT%、LA%测定结果比较柱状图

Fig.2 Histogram of levels of WT%,MT% and LA% among 3 groups

2.3 胎肺组织 Rho 激酶 ROCK1 蛋白表达及 MBS 磷酸化情况

Western blot 法显示膈疝组胎鼠肺组织 ROCK1 蛋白表达较对照组明显增加($P=0.000$),与膈疝组相比,法舒地尔干预组 ROCK1 蛋白明显降低($P=0.000$,表 2、图 3、图 5)。胎仔肺组织 MBS 磷酸化水平在膈疝组较对照组明显增加($P=0.000$),法舒地尔干预组 MBS 磷酸化水平较膈疝组明显降低($P=0.000$,表 2、图 4、图 5)。

表 2 各组 Rho 激酶 mRNA 和 ROCK1 蛋白、MBS 磷酸化水平比较

Tab.2 Comparison of Rho kinase mRNA and protein expression of ROCK1, MBS-P among 3 groups

组别	例数	Rho 激酶 mRNA	ROCK1 蛋白	MBS-P
对照组	10	0.18 $\pm$ 0.01	0.81 $\pm$ 0.13	0.62 $\pm$ 0.05
膈疝组	10	0.47 $\pm$ 0.03 ^a	1.27 $\pm$ 0.15 ^a	1.31 $\pm$ 0.13 ^a
干预组	10	0.20 $\pm$ 0.01 ^{bc}	1.03 $\pm$ 0.12 ^{bc}	0.93 $\pm$ 0.09 ^{bc}
F 值		638.526	28.708	138.587
P 值		0.000	0.000	0.000

注:a,膈疝组与对照组相比, $P<0.05$ (3 项检测指标均 $P=0.000$);b:干预组与对照组相比, $P<0.05$ (Rho 激酶 mRNA 表达 $P=0.009$,ROCK1 蛋白表达 $P=0.001$,MBS-P 蛋白表达 $P=0.000$);c:干预组与膈疝组相比, $P<0.05$ (3 项检测指标均 $P=0.000$)

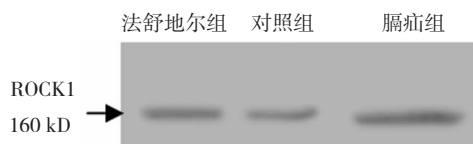


图 3 Western blot 检测 ROCK1 蛋白水平的表达

Fig.3 Expression of ROCK1 protein

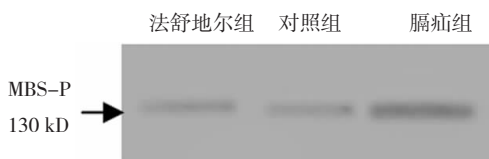


图 4 Western blot 检测 MBS 磷酸化水平的表达

Fig.4 Phosphorylation of via Western blot MBS via Western blot

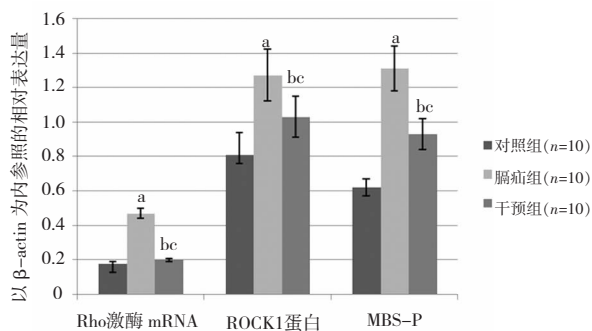
a, b: 与对照组相比, $P < 0.05$; c: 与膈疝组相比, $P < 0.05$

图 5 各组 Rho 激酶 mRNA 和 ROCK1 蛋白、MBS 磷酸化水平比较柱状图

Fig.5 Histogram for comparison of the levels of Rho kinase mRNA and protein expression of ROCK1, MBS-P

2.4 胎仔肺组织 Rho 激酶 mRNA 的表达

膈疝组胎鼠肺组织 Rho 激酶 mRNA 表达量较对照组明显上调 $[(0.47 \pm 0.03) \text{ vs. } (0.18 \pm 0.01), P=0.000]$,与膈疝组相比,法舒地尔干预组 Rho 激酶 mRNA 表达水平明显降低 $[(0.20 \pm 0.01) \text{ vs. } (0.47 \pm 0.03), P=0.000]$,见表 2、图 5。

3 讨论

CDH 的基础病理特征是膈肌缺损,影响 CDH 患儿存活率的根本原因之一是持续性肺动脉高压,形态上表现为 CDH 肺的肺血管床减少及肺中小动脉中膜增厚、管腔变窄、弹性降低,是肺血管重构的结果^[6]。本研究采用除草醚诱导大鼠 CDH 模型,致畸率 66.41%。光镜下观察,膈疝组胎仔肺小动脉中膜平滑肌细胞增生,管壁普遍增厚,管腔狭窄,表明建模成功的膈疝胎仔存在肺血管重构。

近年来,众多研究证实 Rho/Rho 激酶信号传导通路在肺动脉高压发病机制中发挥着重要作用,同时也主要参与了血管挛缩、缺血再灌注损伤、高血压、中风和心脏衰竭等的发病^[7-9]。Takayasu 等^[10]对除草醚诱导的 CDH 模型研究发现 CDH 胎仔肺血管中 RhoA 表达增高且具有促进血管平滑肌细胞增殖作用,认为 RhoA 介导的血管收缩参与了 CDH 中肺动脉高压的发病机制。本研究检测了实验各组 Rho 蛋白下游最具有特征性的效应 Rho 激酶之一 ROCK1 及其底物 MBS 蛋白表达情况,结果发现, Rho 激酶 ROCK1 蛋白表达在膈疝组明显升高,其底物 MBS 磷酸化水平也明显增高,同时检测 Rho 激酶 mRNA 表达也是在膈疝组明显升高,结合 Takayasu 等^[10]的研究结果,提示在除草醚诱导的膈疝中存在 Rho/Rho 激酶信号通路活化。通过文献复习可知, Rho 蛋白与胞外 G 蛋白偶联受体结合后激活 Rho 激酶,活化的 Rho 激酶底物肌球蛋白磷酸酶(myosin phosphatase, MP)被磷酸化修饰后失活,使肌球蛋白轻链(myosin light chain, MLC)不能脱磷酸化,细胞浆内磷酸化 MLC 水平升高,引起肌动-肌球蛋白交联增加,促进肌动蛋白微丝骨架聚合,参与细胞收缩、粘附、增殖、分化、凋亡和迁移等功能及血管平滑肌钙调敏感性收缩,最终可导致肺动脉管壁肥厚、管腔狭窄,所有这都可以参与肺动脉高压和动脉硬化^[11]。联系本实验光镜下膈疝组胎仔肺小动脉的形态学改变,据此推测 Rho 激酶异常活化在除草醚诱导膈疝模型胎仔肺血管重构过程中起重要作用,它可能通过直接影响平滑肌细胞收缩、调节细胞功能参与肺动脉高压的形成。

近年来, Rho 激酶的研究已取得很大进展,其抑制剂被认为可用于血管平滑肌高收缩性疾病、动脉粥样硬化性疾病、与平滑肌细胞功能失调相关性疾病、炎症性疾病、肿瘤性疾病等的治疗^[12]。法舒地尔是 Rho 激酶抑制剂的代表药物之一,通过竞争性抑制阻断 Rho 激酶活性,并通过调节磷酸化修饰,抑制 MLC 磷酸化,使收缩的肺血管等舒张。作为第一个上市的 Rho 激酶抑制剂,法舒地尔已在临床使用,用于改善和预防成人蛛网膜下腔出血后脑血管痉挛及引起的脑缺血症状^[13]。本实验对除草醚诱导的膈疝胎仔给予 Rho 激酶抑制剂法舒地尔进行干预。因目前国内外尚无法舒地尔在儿童使用的报道,仅见

于实验室研究,而本研究主要关注 Rho 激酶抑制剂对肺血管重构的影响,故参考国内外文献关于法舒地尔用于 SD 大鼠低氧性肺动脉高压的研究中所采用的用法用量进行干预,结果发现光镜下观察到干预组肺小动脉 WT%和 MT%较膈疝组下降,LA%较膈疝组升高,差异具有统计学意义,提示较膈疝组相比,膈疝胎儿肺小动脉管壁变厚管腔变窄的情况在干预组中得到改善,表明法舒地尔可改善肺血管重构。

众多动物模型和临床研究显示,法舒地尔能明显改善肺动脉高压,缓解肺动脉高压症状^[8,14-17]。本研究也发现,法舒地尔干预组 Rho 激酶基因和蛋白表达较膈疝组明显降低,MBS 磷酸化水平也明显降低。结合光镜下发现,表明 Rho 激酶基因、蛋白及其活性变化与肺血管病变存在同步性,提示 Rho 激酶与肺血管重构有着密切关系。Rho 激酶抑制剂法舒地尔通过阻断肺组织 Rho 激酶的过度表达和活化,抑制肺血管收缩,改善肺血管重构,从而阻抑肺动脉高压进展。

目前关于 CDH 患儿两大致死性病因的发病机制尚不完全清楚,Rho/Rho 激酶信号通路的研究对于阐明持续性肺动脉高压的发病机制具有重要意义,产前给予 Rho 激酶抑制剂可能成为治疗先天性膈疝胎儿的新疗法。

参 考 文 献

- [1] Keijzer R,Puri P. Congenital diaphragmatic hernia[J]. Semin Pediatr Surg,2010,19(3):180-185.
- [2] Logan JW,Rice HE,Goldberg RN,et al. Congenital diaphragmatic hernia:a systematic review and summary of best-evidence practice strategies[J]. J Perinatol,2007,27(9):535-549.
- [3] Wilkinson DJ,Losty PD. Management of congenital diaphragmatic hernia[J]. Paediatrics and Child Health,2014,24(1):23-26.
- [4] Kluth D,Kangah R,Reich P,et al. Nitrofen-induced diaphragmatic hernias in rats:an animal model[J]. J Pediatr Surg,1990,25(8):850-854.
- [5] Wang Z,Lanner MC,Jin N,et al. Hypoxia inhibits myosin phosphatase in pulmonary arterial smooth muscle cells:role of Rho-kinase[J]. Am J Respir Cell Mol Biol,2003,29(4):465-471.
- [6] Hofmann AD,Takahashi T,Duess JW,et al. Increased pulmonary vascular expression of Krüppel-like factor 5 and activated survivin in experimental congenital diaphragmatic hernia[J]. Pediatr Surg Int,2014,30(12):1191-1197.
- [7] Odagiri K,Watanabe H. Effects of the Rho-kinase inhibitor,fasudil,on pulmonary hypertension[J]. Circ J,2015,79(6):1213-1214.
- [8] Abe K,Shimokawa H,Morikawa K,et al. Long-term treatment with a Rho-kinase inhibitor improves monocrotaline-induced fatal pulmonary hypertension in rats[J]. Circ Res,2004,94(3):385-393.
- [9] Nunes KP,Rigsby CS,Webb RC. RhoA/Rho-kinase and vascular diseases:what is the link?[J]. Cell Mol Life Sci,2010,67(22):3823-3836.
- [10] Takayasu H,Masumoto K,Hagiwara K,et al. Increased pulmonary RhoA expression in the nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia rat model[J]. J Pediatr Surg,2015,50(9):1467-1471.
- [11] Fukumoto Y,Tawara S,Shimokawa H. Recent progress in the treatment of pulmonary arterial hypertension:expectation for rho-kinase inhibitors[J]. Tohoku J Exp Med,2007,211(4):309-320.
- [12] Shimokawa H. Rho-kinase as a novel therapeutic target in treatment of cardiovascular diseases[J]. J Cardiovasc Pharmacol,2002,39(3):319-327.
- [13] Tamura M,Nakao H,Yoshizaki H,et al. Development of specific Rho-kinase inhibitors and their clinical application[J]. Biochim Biophys Acta,2005,1754(1-2):245-252.
- [14] Raja SG. Evaluation of clinical efficacy of fasudil for the treatment of pulmonary arterial hypertension[J]. Recent Pat Cardiovasc Drug Discov,2012,7(2):100-104.
- [15] Do e Z,Fukumoto Y,Takaki A,et al. Evidence for Rho-kinase activation in patients with pulmonary hypertension[J]. Circ J,2009,73(9):1731-1739.
- [16] Li F,Xia W,Yuan S,et al. Acute inhibition of Rho-kinase attenuates pulmonary hypertension in patients with congenital heart disease[J]. Pediatr Cardiol,2009,30(3):363-366.
- [17] Oka M,Fagan KA,Jones PL,et al. Therapeutic potential of RhoA/Rho kinase inhibitors in pulmonary hypertension[J]. Br J Pharmacol,2008,155(4):444-454.

(责任编辑:张学颖)