

· 基础研究 ·

## $\alpha$ 受体介导的雌二醇对大鼠结肠平滑肌细胞 RhoA/ROCK 通路的影响

姜玲, 汤玉蓉, 熊文婕, 俞汀, 郑永婷, 沈小雪, 林琳\*

南京医科大学第一附属医院消化科, 江苏 南京 210029

**[摘要]** 目的:探讨17 $\beta$ -雌二醇(17 $\beta$ -estradiol, E2)对大鼠结肠平滑肌细胞(smooth muscle cell, SMC)RhoA/ROCK通路的影响。方法:体外分离培养 Sprague-Dawley (SD)大鼠结肠 SMCs。细胞免疫荧光双标法观察 ROCK1、雌激素受体(ER) $\alpha$ 与 $\alpha$ 肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)共表达。不同浓度和不同时间 E2 刺激后,以反转录实时荧光定量 qRT-PCR、Western blot 检测 RhoA、ROCK1 表达。不同浓度 ROCK 抑制剂 Y27632 刺激后,Western blot 检测 E2 对其下游蛋白表达情况。观察 ER 阻断剂 ICI182780、牛血清白蛋白结合的 E2(BSA-E2)、ER $\alpha$ 激动剂 PPT 及 ER $\beta$ 激动剂 DPN 在 E2 影响 RhoA、ROCK1 表达的作用。构建 ER $\alpha$ 、ER $\beta$ 的 siRNA,观察 E2 刺激对转染后 SMC 中 RhoA、ROCK1 表达的影响。结果:细胞免疫荧光示结肠 SMC 上 ROCK1 与 $\alpha$ -SMA 共表达。50 nmol/L E2 刺激 24 h 可显著抑制大鼠结肠 SMC 上 RhoA、ROCK1 表达( $P < 0.05$ )。Y27632 可浓度依赖性抑制下游蛋白 p-MYPT1、p-CPI17、p-MLC 表达。E2 组及 PPT 组 RhoA、ROCK1 表达显著低于其他各组( $P < 0.05$ )。ER $\alpha$  siRNA 组可上调 RhoA、ROCK1 表达( $P < 0.05$ )。结论:大鼠结肠 SMC 上存在 ROCK1, E2 可抑制 RhoA/ROCK 通路表达,该作用由雌激素 $\alpha$ 受体介导。

**[关键词]** 雌二醇; RhoA/ROCK 通路; 平滑肌; 结肠

**[中图分类号]** R329.26

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2020)02-174-07

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20200205

## Estradiol regulates the expression of RhoA/ROCK pathway in rat colonic smooth muscle cells in an estrogen receptor $\alpha$ -dependent manner

JIANG Ling, TANG Yurong, XIONG Wenjie, YU Ting, ZHENG Yongping, SHEN Xiaoxue, LIN Lin\*

Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

**[Abstract]** **Objective:** The aim of the study was to investigate the effect of 17 $\beta$ -estradiol (E2) on the expression of RhoA/ROCK pathway in rat colon smooth muscle cells (SMC). **Methods:** Sprague-Dawley rat colonic SMCs were isolated and cultured *in vitro*. Double immunofluorescence staining was used to observe the expression of ROCK1/ER $\alpha$  and  $\alpha$ -actin. After stimulation with E2 at different concentrations and different times, the expression of RhoA and ROCK1 were detected by reverse transcription real-time quantitative PCR (qRT)-PCR and Western blot. After stimulation with different concentrations of ROCK inhibitor Y27632 and 17 $\beta$ -estradiol, the expression of ROCK downstream protein was detected by Western blot. The effects of estrogen receptor (ER) inhibitor ICI182780, bovine serum albumin-bound (BSA-E2), ER $\alpha$  selective agonist propyl pyrazole triol (PPT) and ER $\beta$  selective agonist diarylpropionitrile (DPN) on RhoA/ROCK pathway expression were observed. The ER $\alpha$  and ER $\beta$  siRNAs were constructed, and the effects of E2 stimulation on the expression of RhoA and ROCK1 in SMCs were observed. **Results:** Double immunofluorescence staining showed that ROCK1 and  $\alpha$ -SMA co-expressed in rat colon SMC. Treatment with 50 nmol/L E2 for 24 h could significantly inhibit the expression of RhoA and ROCK1 ( $P < 0.05$ ). ROCK inhibitor Y27632 inhibited the expression of downstream proteins p-MYPT1, p-CPI17 and p-MLC in a concentration-dependent manner. The expressions of RhoA and ROCK1 in E2 group and PPT group were significantly lower than those in other groups ( $P < 0.05$ ). The expressions of RhoA/ROCK1 in ER $\alpha$  siRNA group were higher than those in control group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** ROCK1 is localized in rat colonic SMCs, and E2 inhibits the RhoA/ROCK pathway in an ER $\alpha$ -dependent manner.

**[Key words]** estradiol; RhoA/ROCK pathway; smooth muscle; colon

[J Nanjing Med Univ, 2020, 40(02): 174-179, 199]

**[基金项目]** 国家自然科学基金青年基金(81400599)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: Lin9100@aliyun.com

慢性便秘(chronic constipation, CC)是全球范围内常见的胃肠功能障碍性疾病,严重影响人们身心健康和生活质量,成为多种心脑血管病变致残致死的诱因<sup>[1]</sup>。最新数据显示,我国8.2%的人群受便秘困扰(约1亿人)<sup>[2]</sup>,男女比例约为1:2.3<sup>[3]</sup>,育龄期和妊娠期妇女发病率更高<sup>[4]</sup>。动物实验发现雌激素可抑制大鼠结肠运动,致便秘发生<sup>[5-6]</sup>。然而,雌激素抑制结肠平滑肌(smooth muscle cell, SMC)收缩的机制尚未完全明确。

肌球蛋白轻链(MLC)的磷酸化水平是决定平滑肌收缩程度的关键因素。MLC磷酸化水平受钙离子/钙调蛋白依赖的肌球蛋白轻链激酶(MLCK)和钙离子非依赖的肌球蛋白磷酸酶(MLCP)的双重调节<sup>[7]</sup>。RhoA/ROCK通路是调控MLCP活性的主要通路之一(钙敏化机制)<sup>[8-10]</sup>。活化后的ROCK主要通过2条途径抑制MLCP活性:其一是通过磷酸化MLCP的调节亚单位MYPT1,使其失去催化MLC脱磷酸化的能力,细胞质内磷酸化MLC水平提升,使平滑肌收缩;其二是通过磷酸化一种平滑肌特异性磷蛋白CPI-17,使其发生一系列构象改变而抑制MLCP活性<sup>[11-12]</sup>。研究发现雌激素可抑制冠脉、膀胱、尿道、血管等平滑肌RhoA/ROCK表达<sup>[13-15]</sup>。因此,本研究旨在从细胞水平探讨17 $\beta$ -雌二醇(17 $\beta$ -estradiol, E2)对大鼠结肠平滑肌上RhoA/ROCK通路的影响,为治疗雌激素相关性便秘等胃肠动力障碍提供新的靶点。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

清洁级雌性Sprague-Dawley(SD)大鼠,10日龄[南京医科大学实验动物中心提供,合格证号SCXK(苏)2016-000]。DMEM培养液、青霉素-庆大霉素双抗(Hyclone公司,美国),胎牛血清、II型胶原酶(Gibco公司,美国),E2、牛血清白蛋白(BSA)结合的E2(BSA-E2)、雌激素受体阻断剂ICI82780、雌激素受体 $\alpha$ (ER $\alpha$ )选择性激动剂PPT、雌激素受体 $\beta$ (ER $\beta$ )选择性激动剂DPN(Sigma公司,美国),ROCK抑制剂Y27632(Selleck公司,美国),RhoA、ROCK1、 $\alpha$ -肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)抗体(Abcam公司,美国),p-MYPT1、p-CPI17、p-MLC、 $\beta$ -actin抗体(CST公司,美国),ER $\alpha$ 、ER $\beta$ 抗体(Santa Cruz公司,美国),辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG二抗、DAPI、BCA蛋白定量试剂盒(碧云天公司),Cy3标记山羊抗兔IgG二抗、FITC标记山羊抗小鼠IgG二抗(Bioworld

公司,美国),Super ECL化学发光试剂盒(Thermo公司,美国),试剂盒(TaKaRa公司,日本)。

细胞培养箱(Thermo公司,美国),酶标仪(Molecular Devices公司,美国),蛋白电泳及转膜系统(Bio-Rad公司,美国),凝胶成像分析系统(GE Healthcare公司,美国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 大鼠结肠SMC的分离及培养

将出生12~15 d SD雌性大鼠断颈处死,自肛门上2 cm取结肠5~7 cm左右,以PBS缓冲液快速反复冲洗,去除黏膜层和浆膜层,剪碎平滑肌组织,加入10% II型胶原酶消化液,吹打消化5 min,1 500 r/min离心5 min,弃上清反复重悬离心3次,用含10%胎牛血清的DMEM培养液终止消化并重悬细胞、过筛,接种于培养皿,于37  $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>条件下培养,细胞隔天换液。

待SMC长至致密单层时,以PBS冲洗,0.25%胰蛋白酶消化3~5 min,加入同体积含10%胎牛血清的DMEM培养液终止消化。收集全部细胞吸入15 mL离心管,1 000 r/min离心5 min,弃去上清,细胞沉淀用完全培养液重悬,以1:2~1:4比例接种于同体积培养皿中。

#### 1.2.2 对结肠SMC进行ROCK1/ER $\alpha$ 与 $\alpha$ -SMA免疫双标

取对数生长期的SMC,0.25%胰蛋白酶消化,制成单细胞悬液,接种至激光共聚焦培养皿中,于CO<sub>2</sub>培养箱培养1~3 d,待SMC长至单层时,吸去培养液,以PBS洗1次,加100%冰丙酮固定10 min,PBS冲洗3次,每次10 min,加10%山羊血清封闭1 h,然后吸去山羊血清,分别加 $\alpha$ -SMA一抗(小鼠1:100)和ROCK1一抗(兔1:100),或 $\alpha$ -SMA一抗(兔1:100)和ER $\alpha$ 一抗(小鼠1:50),阴性对照不加一抗,4  $^{\circ}$ C过夜;PBS冲洗3次,每次10 min,避光,加Cy3标记山羊抗兔IgG二抗(1:100)和FITC标记山羊抗小鼠IgG二抗(1:100),37  $^{\circ}$ C孵育1 h,PBS冲洗3次,每次10 min;DAPI染核10 min,PBS冲洗3次,每次10 min,镜下观察特异性荧光。 $\alpha$ -SMA用于鉴定培养的结肠SMC<sup>[16]</sup>。

#### 1.2.3 SMC干预

取第2~3代SMC,PBS冲洗、加无血清的DMEM培养液饥饿12 h。采用随机数字表法进行随机分组:E2不同浓度组(0、10、50、100 nmol/L,24 h);E2不同时间组(0、6、12、24、48 h);Western blot和实时荧光定量(qRT)-PCR检测SMC中RhoA、ROCK1蛋白和

mRNA 表达水平,根据得出的E2最适浓度及时间进行以下实验:ROCK抑制剂Y27632不同浓度组(1、5、10、25、50  $\mu\text{mol/L}$ ):Y27632预处理1 h后,加含50 nmol/L E2的无血清培养液;溶剂对照组(C组):含2  $\mu\text{L}$  DMSO的无血清培养液;E2组:含50 nmol/L E2的无血清培养液;PPT组:含1  $\mu\text{mol/L}$  PPT的无血清培养液;DPN组:含1  $\mu\text{mol/L}$  DPN的无血清培养液;ICI182780组:1  $\mu\text{mol/L}$  ICI182780预处理1 h后,加含50 nmol/L E2的无血清培养液;BSA-E2组:含50 nmol/L BSA-E2的无血清培养液;干预24 h,用于下面的实验。溶剂DMSO的终浓度均不超过1%。以上实验各重复3次。

#### 1.2.4 Western blot检测SMC中RhoA/ROCK通路中蛋白表达

RIPA裂解液裂解细胞,提取各组细胞蛋白,BCA法测定蛋白浓度。每泳道加入40~60  $\mu\text{g}$ 蛋白样品,行SDS-PAGE凝胶电泳,电泳结束后将蛋白转移至PVDF膜上,5%脱脂奶粉溶液封闭2 h,分别加入RhoA抗体(1:1 000)、ROCK1抗体(1:1 000)、p-MYPT1抗体(1:1 000)、p-CPI17抗体(1:1 000)、p-MLC抗体(1:1 000)、 $\beta$ -actin抗体(1:1 000),4  $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,TBST洗膜3次,每次10 min,加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1:1 000),37  $^{\circ}\text{C}$ 孵育1 h,ECL显影,凝胶成像系统拍照、分析。以 $\beta$ -actin为内参。

#### 1.2.5 实时荧光定量(qRT)-PCR法检测SMC中RhoA、ROCK1 mRNA表达

按TRIzol试剂说明书,提取各组细胞总RNA。根据TaKaRa试剂盒说明书,按10  $\mu\text{L}$ 体系反转录为cDNA。以获得的cDNA为模板行qRT-PCR扩增;反应条件:95  $^{\circ}\text{C}$  30 s;95  $^{\circ}\text{C}$  5 s,60  $^{\circ}\text{C}$  20 s,40个循环。由系统自动记录荧光曲线并分析计算出 $C_r$ 值,以GAPDH作为内参。RhoA上游引物5'-GTTTATGTGCCACGGTGT-3',下游引物5'-ACTATCAGGGCTGTGATGG-3';ROCK1上游引物5'-TGTGAAGCCTGACAACATGC-3',下游引物5'-CTGACCACAGTCACACTCT-3';GAPDH上游引物5'-GGCCTTCCGTGTTCTACC-3',下游引物5'-CGCCTGCTTACCACCTTC-3'。

#### 1.2.6 验证E2抑制RhoA/ROCK通路的核受体(ER $\alpha$ 或ER $\beta$ )

分别构建ER $\alpha$ 、ER $\beta$ 的siRNA,待传代细胞长至30%~50%,用脂质体Lipo2000<sup>TM</sup>将ER $\alpha$  siRNA、ER $\beta$  siRNA分别转染至SMC中,以沉默ER $\alpha$ 或ER $\beta$ 表达,qRT-PCR鉴定转染效率,并分为以下组:①对照

siRNA组;②ER $\alpha$  siRNA组;③ER $\beta$  siRNA组,转染48 h后予50 nmol/L E2刺激,qRT-PCR、Western blot检测RhoA、ROCK1蛋白及mRNA表达。以上实验各重复3次。

#### 1.3 统计学方法

应用SPSS 20.0统计软件,非参数检验之K-S检验进行数据正态性分析,各组数据均呈正态分布,数据以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示;各组间比较采用单因素方差分析和SNK法两两比较, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

#### 2.1 结肠SMC鉴定及ROCK1、ER $\alpha$ 表达

免疫荧光双标结果显示结肠SMC上表达ROCK1、ER $\alpha$ (图1)。

#### 2.2 不同浓度和不同时间E2刺激对大鼠结肠SMC中RhoA、ROCK1蛋白和mRNA表达的影响

10、50、100 nmol/L E2组RhoA、ROCK1蛋白及mRNA表达均低于0 nmol/L对照组,呈浓度依赖性,因50 nmol/L组与100 nmol/L组差异无统计学意义,故50 nmol/L为E2最适浓度(图2)。

50 nmol/L E2刺激结肠SMC 6、12、24、48 h组RhoA、ROCK1蛋白及mRNA表达均低于0 h对照组呈时间依赖性,因24 h组与48 h组差异无统计学意义,故24 h为最适时间(图3)。

#### 2.3 不同浓度ROCK抑制剂Y27632对其下游蛋白表达的影响

5、10、25、50  $\mu\text{mol/L}$  Y27632组下游信号蛋白p-MYPT1、p-CPI17、p-MLC表达明显低于0  $\mu\text{mol/L}$ ,呈浓度依赖性,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),1  $\mu\text{mol/L}$ 组蛋白表达亦低于0  $\mu\text{mol/L}$ ,但差异无统计学意义( $P > 0.05$ ,图4)。

#### 2.4 鉴定E2抑制RhoA/ROCK通路的受体类型

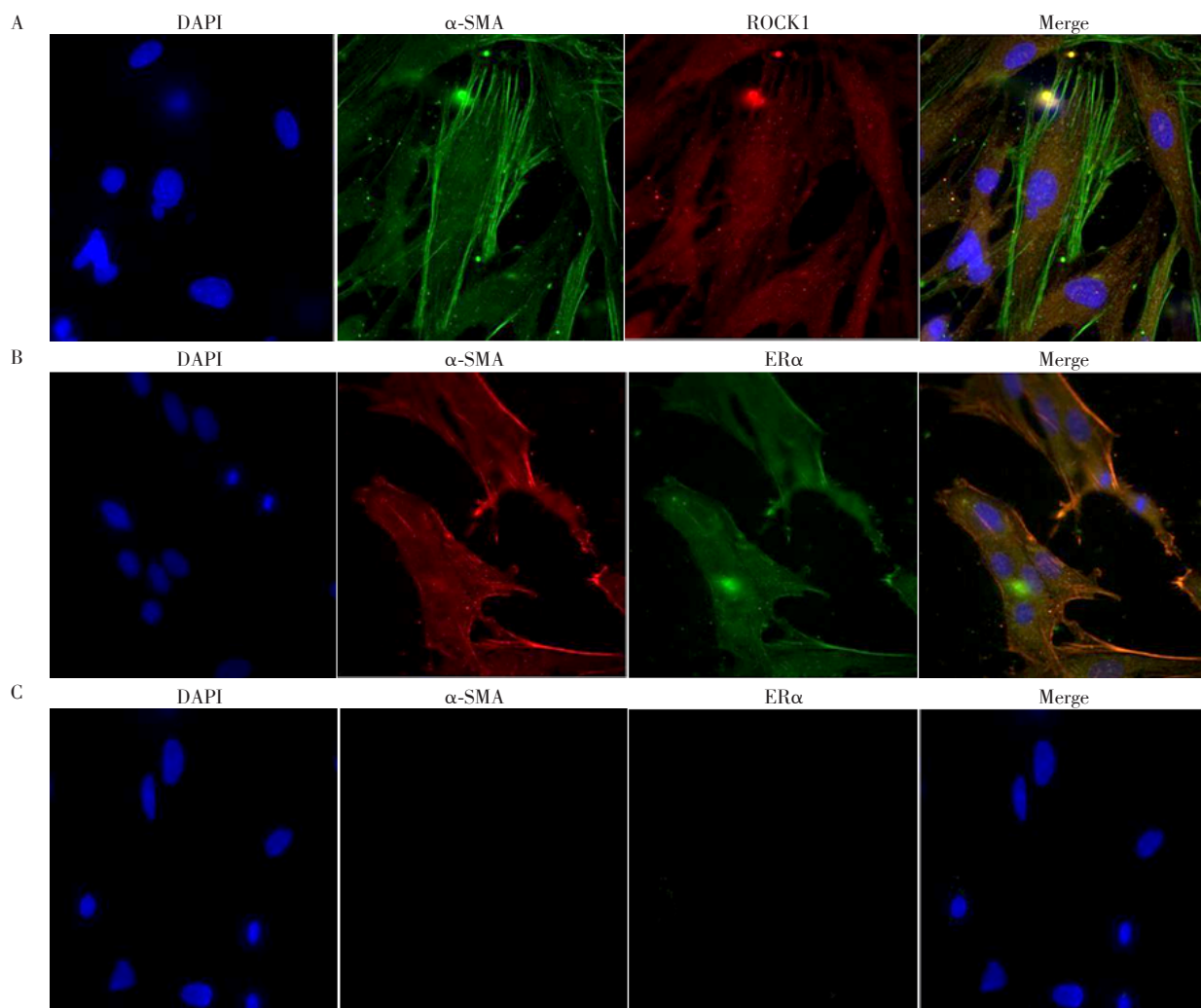
E2组RhoA、ROCK1蛋白及mRNA表达显著低于C组, $\beta$ 受体激动剂DPN组、ICI 182780组、BSA-E2组RhoA、ROCK1蛋白及mRNA与对照组无明显差异。 $\alpha$ 受体激动剂PPT组RhoA、ROCK1蛋白及mRNA表达亦明显低于C组( $P$ 均 $< 0.05$ ,图5)。

#### 2.5 验证E2抑制RhoA/ROCK通路的核受体

转染效率验证:ER $\alpha$  siRNA、ER $\beta$  siRNA转染结肠SMC后,其mRNA表达均显著低于转染对照组(图6A)。

siRNA转染SMC 48 h后予E2刺激,ER $\alpha$  siRNA组RhoA、ROCK1蛋白及mRNA表达高于对照组(图

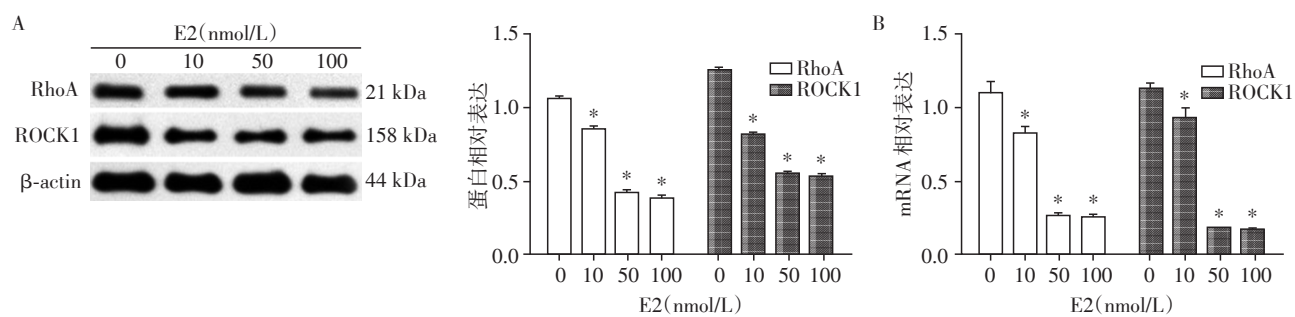




A: 结肠 SMC 上 ROCK1 表达; B: 结肠 SMC 上 ER $\alpha$  表达; C: 阴性对照(免疫荧光,  $\times 400$ )。

图1 大鼠结肠 SMC 中 ROCK1、ER $\alpha$  的表达

Figure 1 Expression of ROCK1 and ER $\alpha$  in rat colon SMC



A: E2 作用 24 h 呈浓度依赖性抑制 RhoA、ROCK1 蛋白表达, 与 0 nmol/L 组比较,  $^*P < 0.05$ ; B: E2 呈浓度依赖性抑制 RhoA、ROCK1 mRNA 表达, 与 0 nmol/L 组比较,  $^*P < 0.05$ 。

图2 不同浓度 E2 刺激 24 h 对大鼠结肠 SMC 中 RhoA、ROCK1 表达的影响

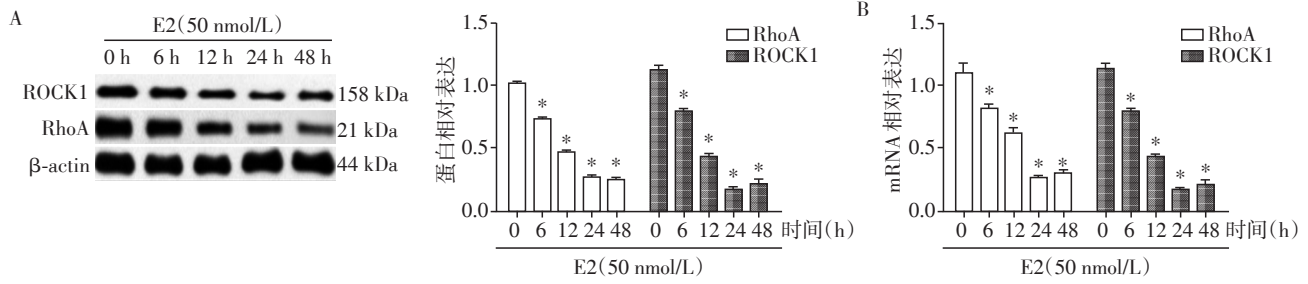
Figure 2 Effects of E2 with different concentrations on RhoA and ROCK1 expression in rat colon SMCs

6B), ER $\beta$  siRNA 组与对照组差异无统计学意义。

### 3 讨论

胃肠道动力障碍性疾病是临床常见病、多发病,

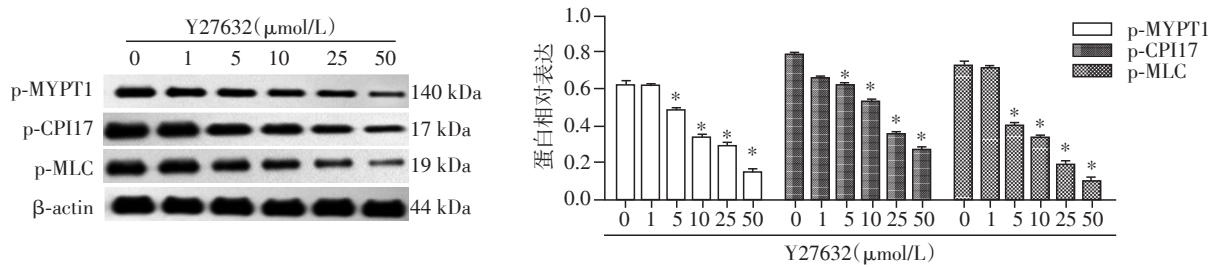
大量临床研究显示女性发病率高于男性, 提示女性激素在胃肠动力的抑制性调节中有重要作用<sup>[17-19]</sup>。多项研究证实雌激素可松弛膀胱、子宫、尿道等部位平滑肌<sup>[20-21]</sup>, 但对结肠平滑肌收缩的直接作用鲜有



A: E2呈时间依赖性抑制 RhoA、ROCK1 蛋白表达,与 0 h 组比较, \* $P < 0.05$ ; B: E2呈时间依赖性抑制 RhoA、ROCK1 mRNA 表达,与 0 h 组比较, \* $P < 0.05$ 。

图3 50 nmol/L E2 刺激不同时间对大鼠结肠 SMC 中 RhoA、ROCK 表达的影响

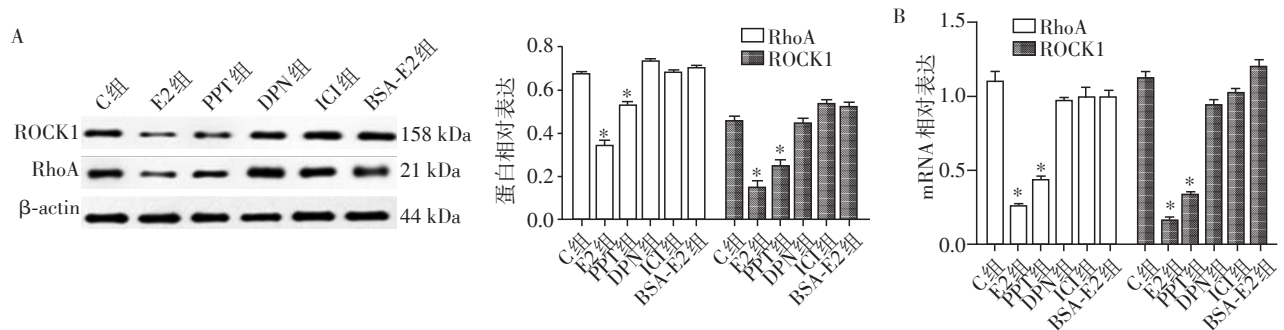
Figure 3 Effect of 50 nmol/L E2 on RhoA and ROCK1 expression in rat colonic SMC at different time



Y27632 呈浓度依赖性抑制 ROCK 下游蛋白表达,与 0 μmol/L 组比较, \* $P < 0.05$ 。

图4 不同浓度 ROCK 抑制剂 Y27632 对其下游蛋白表达的影响

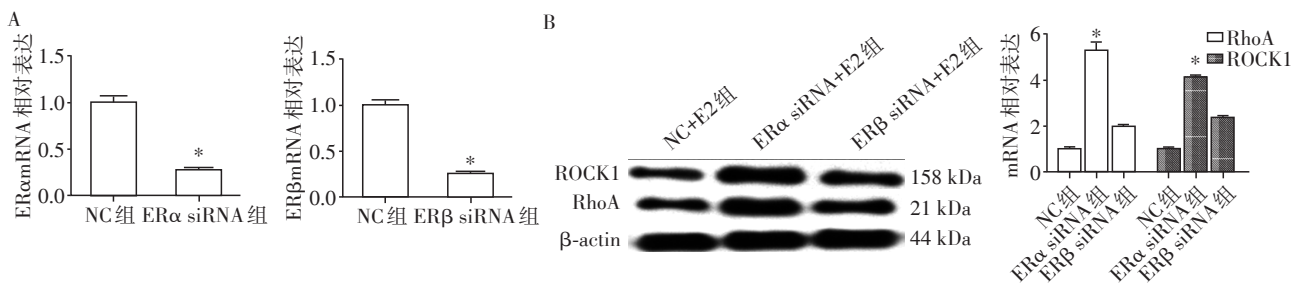
Figure 4 Effect of ROCK inhibitor Y27632 with different concentrations on its downstream protein expression



A: E2 组及 PPT 组 RhoA、ROCK1 蛋白表达显著低于其他各组, \* $P < 0.05$ ; B: E2 组及 PPT 组 RhoA、ROCK1 mRNA 表达显著低于其他各组, \* $P < 0.05$ 。

图5 鉴定 E2 抑制 RhoA/ROCK 通路的受体类型

Figure 5 Identification of receptor types that E2 inhibits RhoA/ROCK pathway



A: ERα siRNA、ERβ siRNA 转染效率验证,与对照组比较, \* $P < 0.05$ ; B: ERα siRNA 组上调 RhoA、ROCK1 表达,与对照组比较, \* $P < 0.05$ 。

图6 E2 抑制 RhoA/ROCK 通路的核受体

Figure 6 Nuclear receptor types that E2 inhibits RhoA/ROCK pathway

研究。

RhoA 是小 G 蛋白 Rho 亚家族成员之一,分布

于大多数具有收缩功能的细胞,如心肌细胞、平滑肌细胞<sup>[22]</sup>等,ROCK 是其下游最主要的效应分子。

ROCK 包括 ROCK1 和 ROCK 2 两种亚型,其中, ROCK1 广泛分布于各种组织中,而 ROCK2 主要分布于骨骼肌和脑组织中<sup>[23]</sup>。本研究对体外培养的 SMC 进行  $\alpha$ -SMA 与 ROCK1 荧光标记,均呈阳性表达,提示大鼠结肠 SMC 上有 ROCK1 表达。RhoA/ROCK 通路可抑制 MLCP 活性,增加 SMC 对钙离子敏感性(钙敏化机制),使 MLC 磷酸化水平增加,收缩加强<sup>[11,24]</sup>。研究发现 RhoA/ROCK 可通过钙敏化机制调控膀胱、尿道、冠脉等平滑肌收缩活动<sup>[14-15]</sup>。Chrissobolis 等<sup>[25]</sup>发现雌激素可抑制大鼠基底动脉平滑肌 RhoA/Rho-kinase 活性。Rigassi 等<sup>[13]</sup>发现甲氧雌二醇可抑制人血管平滑肌 RhoA 活化,并可减少 MLC 及 MLCP 调节亚基的表达。而结肠平滑肌中 RhoA/ROCK 的表达与雌激素的关系尚不明确。本研究在细胞水平上发现 E2 可抑制大鼠结肠 SMC 中 RhoA/ROCK 通路的表达。

雌激素可通过与膜受体(mER)或核受体(ER $\alpha$ 、ER $\beta$ )结合发挥作用<sup>[26-27]</sup>,本研究发现 E2 处理后 RhoA/ROCK 表达下降,而非细胞膜通透的 BSA-E2 处理后不影响 RhoA/ROCK 表达,提示雌激素可通过核受体(ER $\alpha$ 、ER $\beta$ )途径发挥作用。 $\alpha$ 受体激动剂 PPT 处理后亦可抑制 RhoA/ROCK 表达,ER $\alpha$  干扰后,E2 诱导的 RhoA/ROCK 表达上升,验证了雌激素可通过  $\alpha$ 受体抑制 RhoA/ROCK 通路表达。

人体内雌激素可随着年龄、妊娠、月经期等不断变化,不同阶段雌激素作用是否不同还仍待进一步研究。雌激素是否通过 ER $\alpha$  直接介导了 RhoA/ROCK 通路表达亦有待研究。

#### [参考文献]

[1] MODY R, GUERIN A, FOK B, et al. Prevalence and risk of developing comorbid conditions in patients with chronic constipation [J]. *Curr Med Res Opin*, 2014, 30(12): 2505-2513

[2] CHU H, ZHONG L, LI H, et al. Epidemiology characteristics of constipation for general population, pediatric population, and elderly population in China [J]. *Gastroenterol Res Pract*, 2014, 2014: 532734

[3] ARORA G, MANNALITHARA A, MITHAL A, et al. Concurrent conditions in patients with chronic constipation: a population-based study [J]. *PLoS One*, 2012, 7(10): e42910

[4] ZIELINSKI R, SEARING K, DEIBEL M. Gastrointestinal distress in pregnancy: prevalence, assessment, and treatment of 5 common minor discomforts [J]. *J Perinat Neonatal Nurs*, 2015, 29(1): 23-31

[5] OH J E, KIM Y W, PARK S Y, et al. Estrogen rather than progesterone cause constipation in both female and male mice [J]. *Korean J Physiol Pharmacol*, 2013, 17(5): 423-426

[6] 熊文婕,姜亚,汤玉蓉,等. SK3 表达在雌二醇介导的大鼠结肠平滑肌收缩中的作用 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2018, 38(6): 753-757

[7] SOMLYO A P, SOMLYO A V.  $Ca^{2+}$  sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase [J]. *Physiol Rev*, 2003, 83(4): 1325-1358

[8] RIENTO K, RIDLEY A J. Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003, 4(6): 446-456

[9] BUSTELO X R, SAUZEAU V, BERENJENO I M. GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions *in vivo* [J]. *Bioessays*, 2007, 29(4): 356-370

[10] KHROMOV A, CHOUDHURY N, STEVENSON A S, et al. Phosphorylation-dependent autoinhibition of myosin light chain phosphatase accounts for  $Ca^{2+}$  sensitization force of smooth muscle contraction [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(32): 21569-21579

[11] KHASNIS M, NAKATOMI A, GUMPPER K, et al. Reconstituted human myosin light chain phosphatase reveals distinct roles of two inhibitory phosphorylation sites of the regulatory subunit, MYPT1 [J]. *Biochemistry*, 2014, 53(16): 2701-2709

[12] PAGIATAKIS C, GORDON J W, EHYAI S, et al. A novel RhoA/ROCK-CPI-17-MEF2C signaling pathway regulates vascular smooth muscle cell gene expression [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(11): 8361-8370

[13] RIGASSI L, BARCHIESI BOZZOLO F, LUCCHINETTI E, et al. 2-Methoxyestradiol blocks the RhoA/ROCK1 pathway in human aortic smooth muscle cells [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2015, 309(12): E995-1007

[14] NING N, LIN G, LUE T F, et al. Effects of estrogen, raloxifene, and levormeloxifene on the expression of Rho-kinase signaling molecules in urethral smooth muscle cells [J]. *Urology*, 2010, 76(6): 1517.e1516-1511

[15] ABURIMA A, WALLADBEGI K, WAKE J D, et al. cGMP signaling inhibits platelet shape change through regulation of the RhoA-Rho kinase-MLC phosphatase signaling pathway [J]. *J Thromb Haemost*, 2017, 15(8): 1668-1678

[16] TANG Y R, YANG W W, WANG Y, et al. Estrogen regulates the expression of small-conductance  $Ca$ -activated  $K^+$  channels in colonic smooth muscle cells [J]. *Digestion*, (下转第 199 页)

- 国组织工程研究[J]. 2018,22(8):1281-1286
- [6] SHARMA A, HONMA K, EVANS R T, et al. Oral immunization with recombinant *Streptococcus gordonii* expressing porphyromonas gingivalis fimA domains[J]. Infect Immun, 2001, 69(5):2928-2934
- [7] MIYACHI K, ISHIHARA K, KIMIZUKA R, et al. Arg-gingipain A DNA vaccine prevents alveolar bone loss in mice[J]. J Dent Res, 2007, 86(5):446-450
- [8] WILENSKY A, POTEPA J, HOURI-HADDAD Y, et al. Vaccination with recombinant RgpA peptide protects against Porphyromonas gingivalis-induced bone loss[J]. Journal of Periodontal Research, 2017, 52(2):285-291
- [9] CAO Q M, NI Y Y, CAO D, et al. Recombinant porcine reproductive and respiratory syndrome virus expressing membrane-bound IL-15 as immunomodulatory adjuvant enhances NK and  $\gamma\delta$  T cell responses and confers heterologous protection.[J]. J Virol, 2018, 92(13):7-18
- [10] WATSON D C, MOYSI E, VALENTIN A, et al. Treatment with native heterodimeric IL-15 increases cytotoxic lymphocytes and reduces SHIV RNA in lymph nodes [J]. PLoS Pathog, 2018, 14(2):e1006902
- [11] ANTIGA E, MAGLIE R, VOLPI W, et al. T helper 1-related molecules as well as IL-15 are hyperexpressed in the skin lesions of patients with pyoderma gangrenosum [J]. Clin Exp Immunol, 2017, 189(3):383-391
- [12] 夏丹丹, 席晓薇. IL-15联合HPV基因疫苗治疗宫颈癌的前景[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2019, 392(3):436-441 [收稿日期] 2019-06-03

(上接第179页)

- 2015, 91(3):187-196
- [17] TANG Y R, YANG W W, WANG Y L, et al. Sex differences in the symptoms and psychological factors that influence quality of life in patients with irritable bowel syndrome [J]. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2012, 24(6):702-707
- [18] CHANG L, TONER B B, FUKUDO S, et al. Gender, age, society, culture, and the patient's perspective in the functional gastrointestinal disorders [J]. Gastroenterology, 2006, 130(5):1435-1446
- [19] SHI W, XU X, ZHANG Y, et al. Epidemiology and risk factors of functional constipation in pregnant women [J]. PLoS One, 2015, 10(7):e0133521
- [20] PROVENCE A, HRISTOV K L, PARAJULI S P, et al. Regulation of guinea pig detrusor smooth muscle excitability by 17beta-estradiol: The role of the large conductance voltage- and  $Ca^{2+}$ -activated  $K^{+}$  channels [J]. PLoS One, 2015, 10(11):e0141950
- [21] RAHBK M, NAZEMI S, ODUM L, et al. Expression of the small conductance  $Ca^{2+}$ -activated potassium channel subtype 3(SK3) in rat uterus after stimulation with 17beta-estradiol[J]. PLoS One, 2014, 9(2):e87652
- [22] LUO W, LIUC T, YANG Q H, et al. New angle of view on the role of rho/rho kinase pathway in human diseases [J]. Iran J Allergy Asthma Immunol, 2014, 13(6):378-395
- [23] JULIAN L, OLSON M F. Rho-associated coiled-coil containing kinases (ROCK): structure, regulation, and functions [J]. Small GTPases, 2014, 5:e29846
- [24] ASLAM M, HARTEL F V, ARSHAD M, et al. cAMP/PKA antagonizes thrombin-induced inactivation of endothelial myosin light chain phosphatase: role of CPI-17 [J]. Cardiovasc Res, 2010, 87(2):375-384
- [25] CHRISOBOLIS S, BUDZYN K, MARLEY P D, et al. Evidence that estrogen suppresses rho-kinase function in the cerebral circulation *in vivo* [J]. Stroke, 2004, 35(9):2200-2205
- [26] CHIMENTO A, SIRIANNI R, CASABURI I, et al. Role of estrogen receptors and G protein-coupled estrogen receptor in regulation of hypothalamus-pituitary-testis axis and spermatogenesis [J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2014, 5(1):1
- [27] PROSSNITZ E R, BARTON M. Estrogen biology: new insights into GPER function and clinical opportunities [J]. Mol Cell Endocrinol, 2014, 389(1-2):71-83 [收稿日期] 2019-06-17