

法舒地尔对脂多糖诱导的小鼠急性肺损伤的保护作用

赵新云,孔 辉,王晶晶,闫晓培,刘文睿,曾晓宁,解卫平*

(南京医科大学第一附属医院呼吸内科,江苏 南京 210029)

[摘要] **目的:**探讨 Rho 激酶抑制剂法舒地尔(fasudil)对脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)所致小鼠败血症继发急性肺损伤(acute lung injury, ALI)的保护作用及机制。**方法:**C57BL/6 小鼠随机分为对照(Control)组、LPS 模型组、LPS+fasudil(10 mg/kg)组、LPS + 地塞米松(dexamethasone, Dex, 5 mg/kg)组。造模后观察不同时间点各组生存率,6 h 处死小鼠收集血清、支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)、肺组织,ELISA 测定血清中肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素(IL)-1 β 、IL-10 水平,检测 BALF 中细胞计数和蛋白浓度,HE 染色观察各组肺组织病理改变,湿干重比评估肺含水量,ELISA 测定肺组织中粒细胞髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)含量。**结果:**fasudil 可显著改善动物生存率、延长生存时间;缓解肺组织炎性损伤及肺水肿程度,降低 MPO 含量,下调血清中促炎细胞因子 IL-1 β 、TNF- α 水平,上调抗炎细胞因子 IL-10 表达。**结论:**fasudil 可有效缓解 LPS 所致的小鼠 ALI,其作用可能与减轻受累肺组织炎症反应相关。

[关键词] 急性肺损伤;脂多糖;法舒地尔

[中图分类号] R563

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)07-898-06

doi: 10.7655/NYDXBNS20140709

Fasudil attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice

Zhao Xinyun, Kong Hui, Wang Jingjing, Yan Xiaopei, Liu Wenrui, Zeng Xiaoning, Xie Weiping*

(Department of Respiratory Medicine, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:**To investigate the protective effects of fasudil, a Rho kinase inhibitor, on the inflammation of lipopolysaccharide (LPS)-induced acute lung injury (ALI) in mice secondary to sepsis and its probably mechanism in mice. **Methods:**C57BL/6 mice were randomly assigned to the control group, the LPS group, the LPS+fasudil (10 mg/kg) group and the LPS+dexamethasone (Dex, 5 mg/kg) group. Mortality rates of different timing of each group was assessed after the establishment of the model. Mice were sacrificed at 6 h after LPS injection. Serum, bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and lung tissues were collected. ELISA was performed to analyze the level of TNF- α , IL-1 β and IL-10 in the serum, analyze the cell count and the protein content in BALF, stain with hematoxylin and eosin; test the wet-to-dry (W/D) weight; measure the content of myeloperoxidase (MPO) content in lung tissue by ELISA. **Results:**Fasudil significantly improved the mortality rates and prolonged the survival time of mice, relieved inflammatory injury and edema of lung tissue, and decreased MPO content. Moreover, fasudil down regulated the expression of TNF- α and IL-1 β and up regulated IL-10 in serum. **Conclusion:**Fasudil effectively relieved LPS-induced ALI, which may be relevant to controlling the inflammatory response in the lungs.

[Key words] acute lung injury; lipopolysaccharide; fasudil

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(07): 898-903]

急性肺损伤(acute lung injury, ALI)是临床疑难危重症之一,常与微生物感染、损伤等因素有关,临

床治疗困难,病死率高。革兰阴性细菌感染所致的败血症是引起 ALI 发生的最常见原因。其机制可能与肺部炎症渗出、气体交换功能受损有关,各种信号通路参与其中,机制复杂。脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)作为革兰阴性细菌细胞壁的主要成分,是感染性疾病的主要病原^[1],可激活大量炎症细胞,诱导急性炎症,导致 ALI 发生。

[基金项目] 国家自然科学基金(81273571, 81001427);江苏省人事厅六大人才高峰(2008074);江苏省科技厅科技支撑计划(BE2011801);江苏省呼吸病临床医学研究中心(BL2012012)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: wxie@njmu.edu.cn

Rho 激酶是小分子 GTP 酶 Rho 家族的效应器之一,参与调控细胞的多种重要功能,如细胞骨架的维持,细胞黏附、增殖和迁移,细胞凋亡及基因转录等。Rho/Rho 激酶通过调节核因子 κ B(NF- κ B)的活性,调控多种炎症因子的合成释放,抑制组织器官炎症反应,是一种潜在的防治炎症相关性疾病的靶标^[2]。Meyer-Schwesinger 等^[3]研究发现,Rho 激酶抑制剂通过抑制 NF- κ B p65 信号通路,保护 LPS 所致的急性肾损伤小鼠;Hou 等^[4]研究提示,选择性 Rho 激酶抑制剂法舒地尔(fasudil)可通过抑制 Toll 样受体 4(TLR-4)、NF- κ B p65 活化,降低白细胞介素(IL)-1 β 、IL-6、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)等水平发挥抗炎效应,减缓自身免疫性脑脊髓炎的进展。fasudil 作为一种被广泛认可的选择性 Rho 激酶抑制剂,目前已被用于治疗脑血管痉挛^[5]、脑卒中^[6]和外伤性脊髓损伤^[7]。然而,尽管近年来已有研究表明 fasudil 对 ALI 有一定治疗作用,但其具体机制尚未完全阐明。本实验以 LPS 建立小鼠 ALI 模型,通过检测支气管肺泡灌洗液(BALF)、血清中各类炎症因子水平探讨 fasudil 对小鼠 ALI 保护作用的相关机制。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物和分组

健康雄性 6~8 周龄 C57BL/6 品系小鼠 128 只,体重 18~22 g(北京维通利华)。实验小鼠均分笼饲养在清洁环境中,保证足够的食物和水,实验室温度维持在 25℃左右。

1.1.2 试剂

Fasudil (天津红日药业股份有限公司),LPS(*E. coli*055:B5)、地塞米松(dexamethasone, Dex)(Sigma 公司,美国),髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)测定试剂盒(Hycult biotech 公司,美国),小鼠 TNF- α 、IL-1 β 、IL-10 ELISA 测定试剂盒(R&D 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠急性肺损伤模型的构建

取小鼠 48 只,以 4%水合氯醛 1 g/kg 腹腔注射麻醉,随机平均分成以下 4 组,每组 12 只:control 组(生理盐水 0.2 ml 腹腔注射),LPS 组(LPS 30 mg/kg 腹腔注射),fasudil+LPS 组(LPS 腹腔注射前 1 h 给予 fasudil 10 mg/kg),Dex +LPS 组(LPS 腹腔注射前 1 h 给予 Dex 5 mg/kg)。注射 LPS 或生理盐水后 6 h 麻醉动物,摘眼球取血并处死动物,收集 BALF 和肺组织,测定各项指标。

1.2.2 小鼠生存率评估

为观察 fasudil 对急性肺损伤的保护效果,取小鼠 80 只,同上分为 4 组,每组 20 只,注射 LPS 或生理盐水后记录各组小鼠的精神状态和生存情况,每 8 h 观察 1 次,共观察 72 h,计算生存率并绘制生存曲线。

1.2.3 ELISA 检测血清 TNF- α 、IL-1 β 、IL-10 水平

小鼠摘眼球取血后 37℃静置 0.5 h,3 500 r/min,4℃离心 10 min,收集上层血清用以检测各种炎症因子水平。参照试剂盒说明书,分别将标准品和血清样本加入相应孔中(100 μ l/孔),封板胶纸封住反应孔,37℃温箱孵育 90 min;洗板 5 次,除空白孔外均加入生物素化抗体工作液(100 μ l/孔),37℃温箱孵育 60 min;洗板 5 次后加入酶结合物工作液(100 μ l/孔),37℃避光孵育 30 min;洗板 5 次后加入显色底物 100 μ l/孔,37℃避光孵育 15 min,加入终止液 100 μ l/孔,混匀后即刻测量 $D(450\text{ nm})$ 值。

1.2.4 BALF 炎症细胞总数、分类计数及蛋白含量测定

固定小鼠,切开颈部正中皮肤及肌肉,暴露颈部气管。行气管插管,用 0.4 ml 生理盐水灌洗肺组织 3 次,合并 3 次收集 BALF。3 500 r/min,4℃离心 10 min,以 1 ml 红细胞裂解液重悬沉淀去除红细胞,3 500 r/min,4℃ 2 次离心 10 min,100 μ l 生理盐水重悬沉淀行白细胞计数,Wright-Giemsa 染色后进行细胞分类计数。留取上清用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定其中的蛋白含量,比较各组小鼠炎性渗出的严重程度。

1.2.5 肺组织病理学观察及评分

动物处死后,解剖观察肺大体标本。取小鼠左肺下叶新鲜组织,4%多聚甲醛固定 24 h,酒精梯度脱水、脱蜡后石蜡包埋,制作厚度为 4 μ m 的切片,HE 染色后光镜下观察肺组织病理改变。参照 Mikawa 等^[8]方法,肺损伤通过肺组织充血、水肿、间质炎症改变及炎症细胞浸润程度 4 个范畴进行评判,根据每个范畴的严重程度分为 0 级(正常)、1 级(轻度)、2 级(中度)、3 级(中度)、4 级(极重)5 个等级,通过对 4 个范畴的评分加成计算总的肺损伤评分。

1.2.6 肺组织湿/干重量比(W/D)

小鼠固定后开胸,取左肺叶用生理盐水冲洗 2 次,滤纸吸干表面血水后称此叶肺组织的湿重,置 70℃恒温箱烘烤 72 h 至干重恒定,称干重后计算湿/干重量比。W/D 代表肺组织含水量,用于评定肺水肿的严重程度。

1.2.7 肺组织 MPO 含量测定

取约 100 mg 肺组织置于预冷的 1 ml PBS (pH7.4)中匀浆,再以 12 000 g,4℃离心 10 min 取上清,参照 MPO ELISA 试剂盒说明书检测肺组织中 MPO 的含量。

1.3 统计学方法

使用 SPSS13.0 软件进行统计学分析。定量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$),多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 *q* 检验。应用 Kaplan-Meier 曲线计算生存率,应用 Log-rank 检验比较不同组的生存曲线。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠的一般情况

Control 组小鼠活泼好动,呼吸均匀,毛发有光泽。LPS 组小鼠精神差,活动明显减少,眼角有脓性渗出,部分伴腹泻及鼻出血,呼吸加速,双腿蜷缩,反应迟钝,毛发凌乱。LPS + fasudil 组及 LPS + Dex 组小鼠的一般精神状态明显好于 LPS 组。

2.2 小鼠生存率

造模后,根据时间推移统计每组小鼠的生存情况,记录每只小鼠的生存时间,绘制生存分析曲线。结果如图 1 所示,动物死亡主要发生在 24~72 h,72 h 后则死亡较少。同时行 Log-rank 方法比较不同组之间的生存率,结果表明 control 组动物无死亡,LPS 组较 control 组生存率明显减低 ($P < 0.05$),fasudil 和 Dex 可显著提升 LPS 诱导的 ALI 小鼠生存率($P < 0.05$)。

2.3 血清 TNF- α 、IL-1 β 、IL-10 表达

LPS 组血清 TNF- α 和 IL-1 β 水平较 control 组显著升高($P < 0.05$),fasudil 及 Dex 可显著下调血清中 TNF- α 和 IL-1 β 水平,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。LPS + Dex 组 TNF- α 水平与 control 组比较无统计学意义,但 LPS + fasudil 与 control 组比较仍有

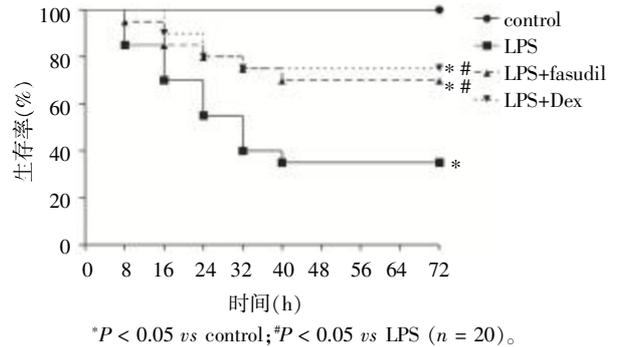


图 1 Fasudil 和 Dex 对 LPS 刺激后小鼠生存率的影响
Figure 1 Effect of fasudil and Dex on survival in LPS-administered mice

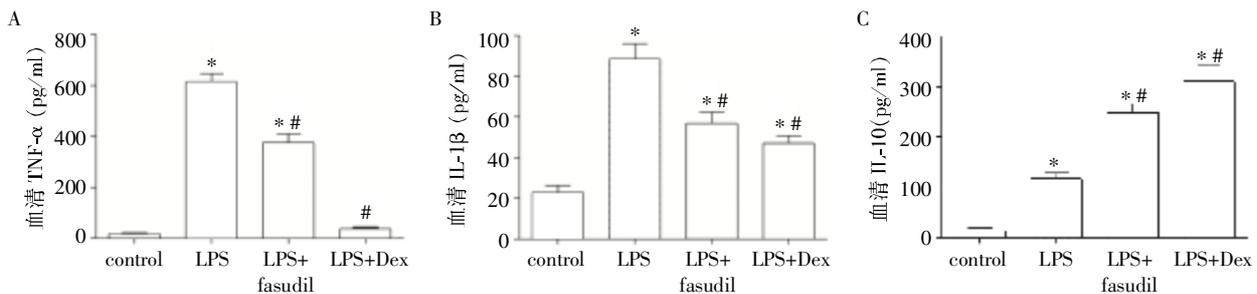
统计学差异 ($P < 0.05$)。LPS + fasudil 组及 LPS + Dex 组血清 IL-1 β 水平与 control 组比较有统计学差异。LPS 组血清 IL-10 水平较 control 组显著升高($P < 0.05$),LPS + fasudil 及 LPS + Dex 组 IL-10 水平较 LPS 组也显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$,图 2)。

2.4 BALF 中炎症细胞总数、分类计数及蛋白含量的变化

与 control 组相比,LPS 组 BALF 细胞总数、中性粒细胞数、蛋白含量显著升高($P < 0.05$);LPS + fasudil 和 LPS + Dex 组 BALF 细胞总数、中性粒细胞数、蛋白含量则显著降低 ($P < 0.05$);LPS + fasudil 组及 LPS + Dex 组 BALF 细胞总数、中性粒细胞数、蛋白含量虽较 LPS 组有所降低,但与 control 组相比仍较高,差异有统计学意义($P < 0.05$,图 3)。

2.5 肺组织病理学改变

小鼠肺组织 HE 染色后,control 组肺组织偶有少量炎症细胞浸润,LPS 组小鼠肺泡结构紊乱,肺泡毛细血管渗出、出血,肺间质及肺泡腔内有大量炎症细胞浸润,肺泡壁增厚,部分肺泡萎陷。LPS + fasudil 组图 4 及 LPS + Dex 组小鼠肺间质及肺泡出血渗出



A:血清 TNF- α 含量;B:血清 IL-1 β 含量;C:血清 IL-10 含量。* $P < 0.05$ vs control;# $P < 0.05$ vs LPS ($n = 12$)。

图 2 Fasudil 和 Dex 对 LPS 刺激的小鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-10 表达的影响

Figure 2 Effect of fasudil and Dex on TNF- α , IL-1 β and IL-10 level in serum of LPS challenged mice

较 LPS 组减轻。肺组织病理学评分提示,LPS 组分值较 control 组明显升高($P < 0.05$),LPS + fasudil 组及 LPS+Dex 组分值较 LPS 组明显降低 ($P < 0.05$),差异具有统计学意义,而 LPS + fasudil 组及 LPS + Dex 组分值与 control 组相比仍有统计学差异 ($P < 0.05$,图 4)。

2.6 肺 W/D 比

结果显示 (图 5A),与 control 组相比,LPS 组 W/D 比值显著升高($P < 0.05$);LPS + fasudil 和 LPS + Dex 组肺 W/D 比值则显著低于 LPS 组 ($P <$

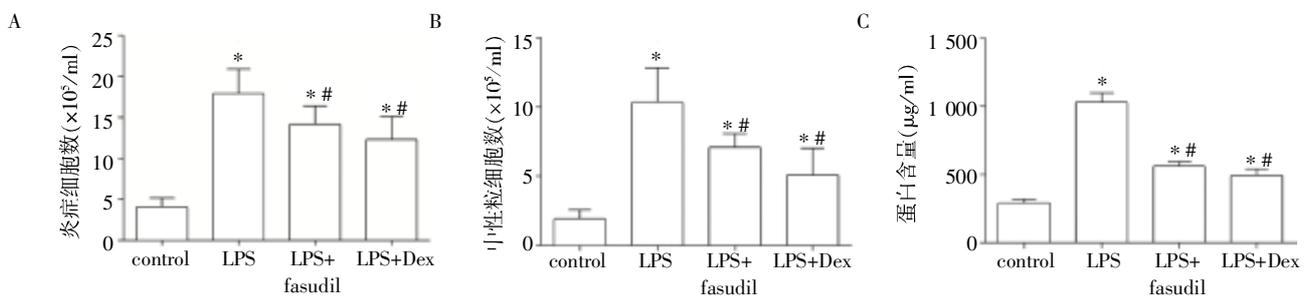
0.05);LPS + fasudil 组及 LPS+Dex 组与 control 组相比无明显差异($P > 0.05$)。

2.7 肺组织 MPO 含量的变化

造模 6 h 后 LPS 组中小鼠肺组织 MPO 的含量显著高于 control 组($P < 0.05$),LPS + fasudil 和 LPS + Dex 组 MPO 含量均较 LPS 组显著降低($P < 0.05$,图 5B)。

3 讨论

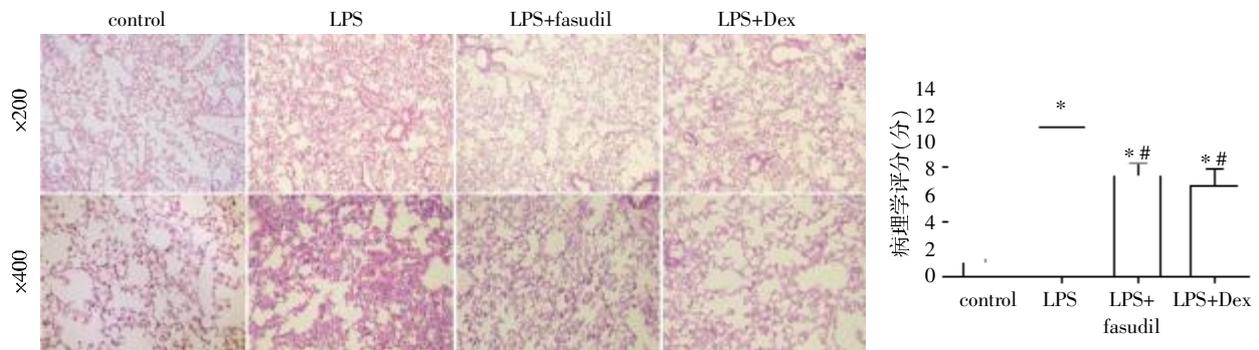
败血症是感染所致的系统性炎症反应,可导致



A: BALF 中炎症细胞总数;B: BALF 中性粒细胞计数;C: BALF 中蛋白含量。* $P < 0.05$ vs control;# $P < 0.05$ vs LPS ($n = 12$)。

图 3 fasudil 和 Dex 对 LPS 刺激的小鼠 BALF 中多形核白细胞浸润及蛋白含量的影响

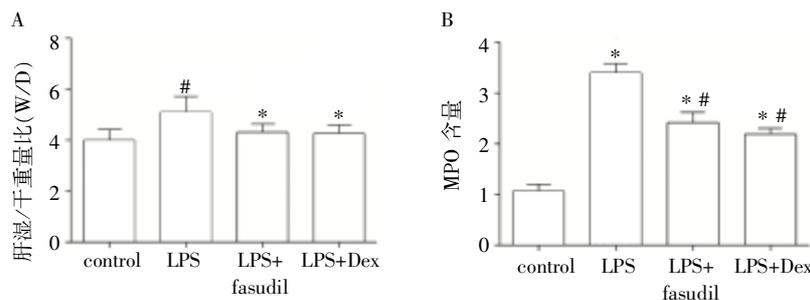
Figure 3 Effect of fasudil and Dex on PMN infiltration in BALF of LPS-induced ALI mice



* $P < 0.05$ vs control;# $P < 0.05$ vs LPS ($n = 6$)。

图 4 Fasudil 和 Dex 对 LPS 刺激后小鼠肺组织形态学的影响(HE)

Figure 4 Effect of fasudil and Dex on pathology in LPS-administered mice (HE)



A:肺损伤后肺湿重/干重;B:肺组织 MPO 含量。* $P < 0.05$ vs control;# $P < 0.05$ vs LPS ($n = 12$)。

图 5 fasudil 和 Dex 对 LPS 刺激的小鼠急性肺损伤后肺湿重/干重及肺组织 MPO 含量的影响

Figure 5 Effect of fasudil and Dex on lung W/D and MPO content in the lung of LPS-induced ALI mice

多器官功能衰竭,肺组织是最重要的靶器官之一,引起肺泡上皮细胞和毛细血管内皮细胞损伤,出现弥漫、广泛的肺间质充血水肿、炎症细胞浸润、ALI、低氧血症甚至急性呼吸衰竭。ALI的特征之一是大量液体渗出至肺泡腔,使肺泡-毛细血管屏障功能受损,导致肺泡水肿、气体交换效率降低^[9]。为确定ALI/急性呼吸窘迫综合征(ARDS)小鼠肺水肿的严重程度及肺组织通透性,本实验测定了肺W/D比值及BALF中总蛋白含量。结果显示,给予fasudil预保护后,肺W/D比值及BALF中总蛋白含量显著降低,提示fasudil可有效减轻肺水肿、阻止蛋白水肿液渗出到肺组织,从而缓解ALI/ARDS症状。

迄今,ALI/ARDS的发病机制尚未十分明确,目前观点认为由先天性免疫应答介导的炎症机制占主导作用。中性粒细胞浸润是急性肺损伤时肺内炎症的主要标志,它通过释放蛋白酶、过氧化物等细胞毒性物质及大量炎症因子,损伤毛细血管内皮及肺泡上皮细胞,活化周围邻近的中性粒细胞,引起级联放大的炎症反应。Dex作为一种常用的非特异性抗炎药物,能显著抑制急性肺损伤患者的局部及全身炎症反应,改善患者的临床症状及长期预后,但其不良反应较大,因此有必要开发新型替代激素治疗且全身不良反应较小的有效化合物。本研究发现,fasudil是一种较有潜力的治疗ALI的化合物,可减轻LPS引起的肺组织损伤及肺内中性粒细胞等炎症细胞浸润,从而阻断瀑布样炎症级联反应的正反馈通路。

中性粒细胞是机体抵御病原微生物入侵的第一道防线,可迅速抵达感染发生部位,它是ALI肺组织中主要的细胞类型,MPO作为中性粒细胞的标志酶,其活性反映了中性粒细胞在肺组织中的聚集情况^[10-11],在ALI时显著升高。多数控制ALI炎症反应的药物可降低MPO含量,本实验应用fasudil预保护能显著下调小鼠肺部MPO含量,提示fasudil可通过抑制多核中性白细胞聚集,缓解LPS介导的肺损伤。

LPS通过细胞表面Toll样受体-4(TLR-4)启动下游信号级联反应,诱导细胞因子的基因表达,过度表达的促炎细胞因子又可加速败血症发展。内毒素刺激数分钟内合成释放的TNF- α 、IL-1 β 是最重要的早期促炎细胞因子。IL-10是TH2细胞源性抗炎细胞因子,可有效抑制和终止炎症反应,抑制炎症细胞因子TNF- α 、IL-1 β 等的释放,抑制免疫炎症反应,提高机体的抗感染能力。本文结果显示,fasudil可显著下调LPS诱导的小鼠血清中TNF- α 、IL-1 β 表达,上调抗炎

细胞因子IL-10表达,继而维持促炎因子与抗炎因子的相对平衡,利于ALI患者的预后和转归。

Rho激酶作为调控细胞多种重要功能的关键元件,参与了炎症相关的信号通路如NF- κ B的活化及T细胞增殖。Fasudil作为一种Rho激酶抑制剂,已被证实可降低早期炎症反应中促炎细胞因子及黏附分子(ICAM-1)水平、抑制肺组织中大量中性粒细胞聚集。研究表明,Rho激酶在LPS所致的AP-1活化中扮演了重要作用,Rho激酶抑制剂fasudil可通过抑制AP-1活化而保护LPS所致的ALI小鼠^[12],Rho激酶抑制剂通过下调Rho激酶2活性、减少细胞因子产生及白细胞浸润,缓解LPS所致的小鼠肾损伤^[3];同时在心肌^[13]及肝脏缺血再灌注损伤^[14]、组织纤维化^[15]、脑缺血^[16]及肺动脉高压^[17]等疾病中,Rho激酶抑制剂也发挥了重要的保护作用。本研究发现,fasudil可减轻小鼠ALI炎症反应,改善小鼠精神状态、延长小鼠生存时间,Rho/Rho激酶可能参与了ALI的发生发展等病理生理过程。

综上所述,Rho激酶抑制剂fasudil可以改善LPS诱导的急性肺损伤小鼠的全身症状、精神状态,抑制ALI时肺组织水肿、炎症细胞浸润、调控炎症介质释放、调节促炎及抗炎因子的平衡。fasudil可能是未来治疗ALI的候选药物。但其对ALI更具体的作用机制还需更进一步探讨研究。

[参考文献]

- [1] Rubenfeld GD, Caldwell E, Peabody E, et al. Incidence and outcomes of acute lung injury [J]. *New Engl J Med*, 2005, 353(16):1685-1693
- [2] Montaner S, Perona R, Saniger L, et al. Multiple signalling pathways lead to the activation of the nuclear factor kappaB by the Rho family of GTPases [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(21):12779-12785
- [3] Meyer-Schwesinger C, Dehde S, von Ruffer C, et al. Rho kinase inhibition attenuates LPS-induced renal failure in mice in part by attenuation of NF-kappaB p65 signaling [J]. *Am J Physiol-Renal*, 2009, 296(5):F1088-1099
- [4] Hou SW, Liu CY, Li YH, et al. Fasudil ameliorates disease progression in experimental autoimmune encephalomyelitis, acting possibly through antiinflammatory effect [J]. *Cns Neurosci Ther*, 2012, 18(11):909-917
- [5] Pierot L, Aggour M, Moret J. Vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: recent advances in endovascular management [J]. *Cur Opin Crit Care*, 2010, 16(2):110-116
- [6] Rikitake Y, Kim HH, Huang Z, et al. Inhibition of Rho

- kinase (ROCK) leads to increased cerebral blood flow and stroke protection [J]. *Stroke*, 2005, 36 (10): 2251-2257
- [7] Hara M, Takayasu M, Watanabe K, et al. Protein kinase inhibition by fasudil hydrochloride promotes neurological recovery after spinal cord injury in rats [J]. *J Neurosurg*, 2000, 93(1 Suppl): 94-101
- [8] Mikawa K, Nishina K, Takao Y, et al. ONO-1714, a nitric oxide synthase inhibitor, attenuates endotoxin-induced acute lung injury in rabbits [J]. *Anesth Analg*, 2003, 97 (6): 1751-1755
- [9] Duan Y, Learoyd J, Meliton AY, et al. Inhibition of Pyk2 blocks lung inflammation and injury in a mouse model of acute lung injury [J]. *Res Rese*, 2012, 13(1): 4
- [10] Bokoch GM. Regulation of innate immunity by Rho GTPases [J]. *Trends Cell Biol*, 2005, 15(3): 163-171
- [11] Kunkel SL, Standiford T, Kasahara K, et al. Interleukin-8 (IL-8): the major neutrophil chemotactic factor in the lung [J]. *Exp Lung Res*, 1991, 17(1): 17-23
- [12] Ding RY, Zhao DM, Zhang ZD, et al. Pretreatment of Rho kinase inhibitor inhibits systemic inflammation and prevents endotoxin-induced acute lung injury in mice [J]. *J Surg Res*, 2011, 171(2): e209-214
- [13] Bao W, Hu E, Tao L, et al. Inhibition of Rho-kinase protects the heart against ischemia/reperfusion injury [J]. *Cardiovasc Res*, 2004, 61(3): 548-558
- [14] Shiotani S, Shimada M, Suehiro T, et al. Involvement of Rho-kinase in cold ischemia-reperfusion injury after liver transplantation in rats [J]. *Transplantation*, 2004, 78(3): 375-382
- [15] Bourgie C, Haydont V, Milliat F, et al. Inhibition of Rho kinase modulates radiation induced fibrogenic phenotype in intestinal smooth muscle cells through alteration of the cytoskeleton and connective tissue growth factor expression [J]. *Gut*, 2005, 54(3): 336-343
- [16] Satoh S, Utsunomiya T, Tsurui K, et al. Pharmacological profile of hydroxy fasudil as a selective rho kinase inhibitor on ischemic brain damage [J]. *Life Sci*, 2001, 69 (12): 1441-1453
- [17] 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

[收稿日期] 2013-10-31

(上接第 897 页)

- healthy postmenopausal women [J]. *Int J Gynaecol Obstet*, 2001, 75(3): 273-278
- [11] 王美莲, 钟华绣, 孙丽洲, 等. 两种结合雌激素对改善绝经期综合征的临床观察 [J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2007, 27(9): 989-1004
- [12] 丁 昉, 石凤英, 刘邦忠, 等. 卵巢切除对大鼠肥胖评定指数与血糖的影响 [J]. *复旦学报: 医学版*, 2005, 32 (4): 495-496
- [13] 王 懿, 刘彩玲. 雌激素和雌激素受体在脂肪组织中的作用 [J]. *国外医学妇幼保健分册*, 2003, 14(2): 94-95
- [14] Erhardt LR, Hobbs FD. A global survey of physicians' perceptions on cholesterol management: the From The Heart study [J]. *Int J Clin Pract*, 2007, 61(7): 1078-1085
- [15] Ceballos C, Ribes C, Amado JA, et al. Venous endothelial function in postmenopausal women who are receiving long-term estrogen and progestagen therapy [J]. *Fertil Steril*, 2000, 74(2): 268-273
- [16] 刁爱芹, 阙伶俐, 任丹阳, 等. 17 β -雌二醇对体外机械牵张诱导心肌细胞肥大的影响 [J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2011, 31(7): 976-980

[收稿日期] 2013-06-21