论著

文章编号:1000-5404(2013)18-1952-05

Rock信号通路参与TNF-α刺激兔基底动脉平滑肌增殖

安家印,周 政,刘 俊,杨 辉,雷 雪,李正杨 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院神经外科)

[摘要] **目的** 探索Rock信号通路在肿瘤坏死因子α(tumor necrosis factor-α,TNF-α)引起兔基底动脉血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells,VSMCs)增殖中的作用。**方法** 组织块法原代培养兔基底动脉VSMCs,TNF-α刺激VSMCs,Rho激酶(Rho kinase,Rock)抑制剂Y-27632预处理,CCK-8法检测细胞增殖变化,流式细胞仪检测细胞周期,免疫细胞化学观察增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen,PCNA)在VSMCs的定位及表达变化,Western blot法检测细胞PCNA表达量的变化。**结果** 细胞培养24 h后,与阴性对照组比较,20 ng/mL TNF-α处理可以显著增加VSMCs的增殖率($P<0.01$),PCNA蛋白表达显著增高($P<0.01$),S期+G_2/M期细胞比例明显增加($P<0.05$);加入Y-27632预处理后,与20 ng/mL TNF-α处理组相比,VSMCs的增殖率受到显著抑制($P<0.01$),PCNA蛋白表达明显减少($P<0.05$),S期+G_2/M期细胞比例明显减少($P<0.05$)。**结论** TNF-α可促进VSMCs增殖和细胞周期进程,Rock抑制剂可阻滞TNF-α对VSMCs的这一作用,Rock信号通路参与TNF-α诱导的VSMCs增殖和细胞周期进程加速。

[关键词] 基底动脉;血管平滑肌细胞;rho相关激酶类;细胞增殖;肿瘤坏死因子α;兔

[中图法分类号] R322.121;R329.26;R329.28 [文献标志码] A

Rock signaling pathway mediates rabbit basilar artery smooth muscle proliferation stimulated by TNF-α

An Jiayin, Zhou Zheng, Liu Jun, Yang Hui, Lei Xue, Li Zhengyang (Department of Neurosurgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the role of Rho kinase (Rock) signaling pathway in the proliferation of rabbit basilar artery vascular smooth muscle cells (VSMCs) stimulated by tumor necrosis factor-α (TNF-α). **Methods** VSMCs were isolated and primarily cultured from rabbit basilar artery. After Y-27632, Rock inhibitor at different concentrations was added into the culture medium, followed by the stimulation of TNF-α. Cell viability was determined with CCK-8 assay. Cell cycle of VSMCs was determined by flow cytometry. The expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in the VSMCs was measured with immunocytochemical staining and Western blot analysis. **Results** Compared with normal control cells, TNF-α treatment at 20 ng/mL for 24 h markedly induced VSMCs proliferation ($P<0.01$), increased the percentage of cells in S and G_2/M phase ($P<0.05$), and enhanced PCNA expression ($P<0.01$). Pretreatment with Y-27632, however, significantly reversed the above effects induced by 20 ng/mL TNF-α, that is, significantly inhibited cell proliferation ($P<0.01$), decreased expression of PCNA protein ($P<0.05$) and the amounts of cells at S and G_2/M phase ($P<0.05$). **Conclusion** TNF-α promotes the proliferation of VSMCs and cell cycle, but Rock inhibitor, Y-27632, effectively reverses the above effects induced by TNF-α. Rock signaling pathway mediates TNF-α-induced acceleration of VSMCs proliferation and cell cycle progression.

[**Key words**] basilar artery; vascular smooth muscle cells; rho-associated kinases; cell proliferation; tumor necrosis factor-α; rabbits

Corresponding author: Zhou Zheng, Tel: 86-23-68774010, E-mail: 13808337911@163.com

[通信作者] 周 政,电话:(023)68774010, E-mail: 13808337911@163.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130410.1712.016.html(2013-04-10)

迟发性脑血管痉挛(delayed cerebral vasospasm, DCVS)是蛛网膜下腔出血(subarachnoid hemorrhage, SAH)后的严重并发症,引起很高的病死率,可导致患者遗留严重的认知功能障碍和局灶性神经功能障碍[1]。DCVS引起脑血管直径明显减小,同时伴有明显的血管壁增厚。SAH后发生痉挛动脉的病理解剖可观察到内皮细胞变性脱落,平滑肌细胞增生肥大,血管中膜显著增厚[2]。平滑肌细胞是脑动脉的主要细胞成分之一,其过度增殖是发生DCVS的重要原因,多种因素参与调控平滑肌细胞增殖的过程。目前研究[3]表明,免疫炎性反应在脑血管痉挛(cerebral vasospasm, CVS)的发生机制中发挥重要的作用,临床上利用甲基泼尼松龙、阿托伐他汀等药物正是通过抑制炎性反应而起到减轻SAH后CVS的发生[4-5],作为重要致炎因子的肿瘤坏死因子α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)在SAH后CVS发生过程中发挥重要的作用[6]。

Rock信号通路中,Rock是RhoA下游效应产物。RhoA属于小G蛋白家族成员,具有GTP酶活性,活化的RhoA可激活下游的如Rock等效应分子,从而调节细胞收缩、增殖、迁移等各项功能[7]。目前法舒地尔作为Rock抑制剂临床上已用来治疗SAH后的CVS[8]。SAH后TNF-α是否参与DCVS出现的血管壁增生及其与Rock信号通路的关系目前尚不清楚。本研究原代培养家兔基底动脉平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs),利用炎症因子TNF-α及Rho激酶抑制剂Y-27632处理细胞,以探讨Rock信号通路在TNF-α诱导的脑动脉平滑肌细胞增殖中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

DMEM/F-12培养基与胎牛血清(fetal calf serum, FBS)购自Hyclone公司,Recombinant Rabbit TNF-α购自美国American Research Products公司,Y-27632购自美国Selleck Chemicals公司,CCK-8试剂盒购自Dojindo公司,鼠抗α-actin购自碧云天生物技术公司,鼠抗增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)单克隆抗体、SABC免疫组化试剂盒及Western blot相关试剂购自武汉博士德公司,辣根过氧化物酶标记羊抗小鼠二抗购自中衫生物科技公司,Bio-Rad电泳仪、实验动物新西兰大白兔由新桥医院实验动物中心提供。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与鉴定 取家兔基底动脉,以组织贴块法原代培养VSMCs,细胞大小不等,呈长梭形、三角形或星形,细胞间突起相连。细胞生长融合后,用0.25%的胰酶消化离心后传代。用免疫荧光的方法对细胞内平滑肌肌动蛋白α-actin进行荧光标记,共聚焦显微镜下细胞细胞质内呈现红色荧光,证实细胞为兔基底动脉VSMCs。取生长良好的3~8代细胞用于实验。

1.2.2 实验分组 将细胞以大约10^5/mL的密度接种于96孔板内(用于CCK-8实验)或放有盖玻片的6孔板内(用于免疫细胞化学实验),用含10% FBS的DMEM/F-12培养液置于37 ℃、5%的CO_2孵箱内培养。24 h后换用无血清DMEM/F-12培养基孵育24 h,之后再换液加入干预措施培养24 h,分为:①阴性对照组:无血清的DMEM培养液;②TNF-α处理组:含20 ng/mL TNF-α的培养液;③TNF-α + Y-27632处理组:加入TNF-α处理前1 h加入Y-27632(10、20、30 μmol/L)预处理。

1.2.3 CCK-8法检测VSMCs的增殖活性 将处于对数生长期的VSMCs消化,计数,按如上分组接种于96孔板内(每组设3个复孔),同时设置Y-27632(10 μmol/L)单独处理组,每孔100 μL,饥饿培养使细胞同步化后按以上分组静息培养24 h。每孔加入10 μL CCK-8溶液后置于孵箱内孵育4 h,将孔板置于自动酶标仪上在450 nm波长条件下测定各孔光密度值。

1.2.4 免疫细胞化学技术检测VSMCs内PCNA的表达 将细胞以大约10^5/mL的密度接种于放有盖玻片的6孔板,10% FBS的DMEM培养24 h后换液,加入无血清DMEM处理24 h后按1.2.2分组处理细胞,各组处理后24 h,取出盖玻片,按SABC法进行免疫细胞化学染色,最后用DAB显色,自来水冲洗30 s,细胞核内呈棕黄色为阳性结果。每组3张爬片,光镜下每张片子随机选择3个视野,用Image-Pro Plus 6.0软件测定阳性产物灰度值。

1.2.5 流式细胞仪检测细胞周期 按1.2.4方法处理细胞,处理后24 h消化离心,预冷PBS洗涤离心细胞,将离心后细胞吹打成单细胞悬液,用70%的冷乙醇4 ℃固定过夜。碘化丙啶溶液在室温条件下染色1 h,用流式细胞仪测定细胞周期。

1.2.6 Western blot检测PCNA的表达 按照1.2.2分组方法处理细胞,收集处理后各组VSMCs,加入含有1 mmol/L PMSF的细胞裂解液,充分裂解后收集裂解液12 000 r/min离心10 min,取上清,分装,-20 ℃保存,BCA法蛋白定量。每孔上样50 μg,12% SDS-PAGE凝胶电泳,转膜,5%脱脂奶粉溶液封闭2 h,加入单克隆一抗PCNA(1∶200稀释)、GAPDH(1∶2 000稀释)为内参,4 ℃过夜,洗膜3次,加入辣根酶标记二抗,37 ℃孵育1 h,DAB显色,凝胶成像仪照相,Image-Pro Plus 6.0软件进行灰度分析测其累计光密度值,将GAPDH的光密度值作为1,用PCNA与GAPDH光密度比值表示PCNA的表达水平,实验重复3次。

1.3 统计学分析

利用SPSS 10.0统计软件,数据以$\bar{x} \pm s$表示,组间采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 基底动脉VSMCs的鉴定

激光共聚焦扫描显微镜下观察可见:细胞α-actin标记阳性,α-actin与细胞纵轴平行排列,呈丝状或网状,证实为VSMCs。见图1。

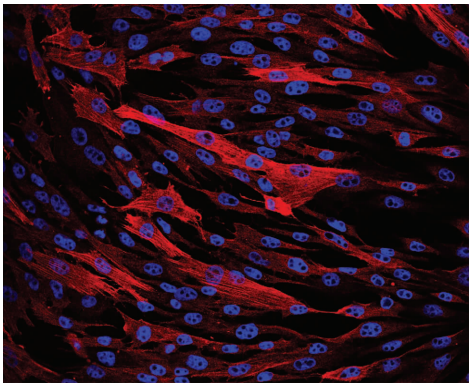
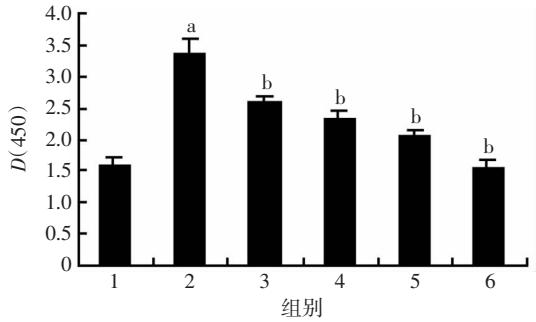


图1 免疫荧光鉴定 α-actin 在细胞内的表达
（激光共聚焦显微镜 ×400）

2.2 Y-27632 对 TNF-α 诱导的 VSMCs 增殖活性的影响

CCK-8 法检测结果显示细胞在培育 24 h 后与阴性对照组相比，TNF-α 可以显著促进 VSMCs 的增殖（$P<0.01$），但 Y-27632 预处理能显著逆转 TNF-α 的促增殖作用（$P<0.01$），并呈浓度依赖性，Y-27632 单独作用于细胞与阴性对照组相比无明显差异（$P>0.05$），表明 Y-27632 对 VSMCs 增殖无影响。Y-27632 在浓度 10 μmol/L 时即可显著抑制 TNF-α 诱导的 VSMCs 增殖（$P<0.01$），因此，我们选择 10 μmol/L Y-27632 进行后续实验。见图 2。



1：阴性对照组；2：TNF-α 处理组；3～5：20 ng/mL TNF-α + 10、20、30 μmol/L的 Y-27632 处理组；6：10 μmol/L 的 Y-27632 处理组；a：$P<0.01$，与阴性对照组比较；b：$P<0.01$，与 TNF-α 处理组比较

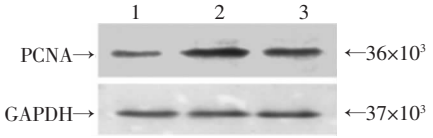
图2 CCK-8 法检测 Y-27632 对 TNF-α 诱导的 VSMCs 增殖的影响

2.3 免疫细胞化学检测 Y-27632 对 VSMCs 的 PCNA 蛋白表达的影响

阴性对照组细胞核内有 PCNA 的少量表达，阳性产物灰度值为（1.120 ± 0.199）；TNF-α 处理组细胞核内阳性产物呈深棕黄色，阳性产物灰度值为（3.199 ± 0.494），PCNA 表达与阴性对照组相比较明显增强（$P<0.01$）；TNF-α + Y-27632 处理组细胞核内 PCNA 表达亦较弱，阳性产物灰度值为（2.077 ± 0.203），表达强度明显低于 TNF-α 处理组（$P<0.05$）。见图 3。

2.4 Western blot 检测 Y-27632 对 VSMCs 的 PCNA 蛋白表达的影响

阴性对照组蛋白表达为（0.196 ± 0.014），TNF-α 作用 24 h 后，PCNA 蛋白表达为（0.505 ± 0.061），较对照组显著增加（$P<0.01$），TNF-α + Y-27632 处理组 PCNA 蛋白表达为（0.299 ± 0.074），较 TNF-α 处理组明显下降（$P<0.05$）。见图 4。

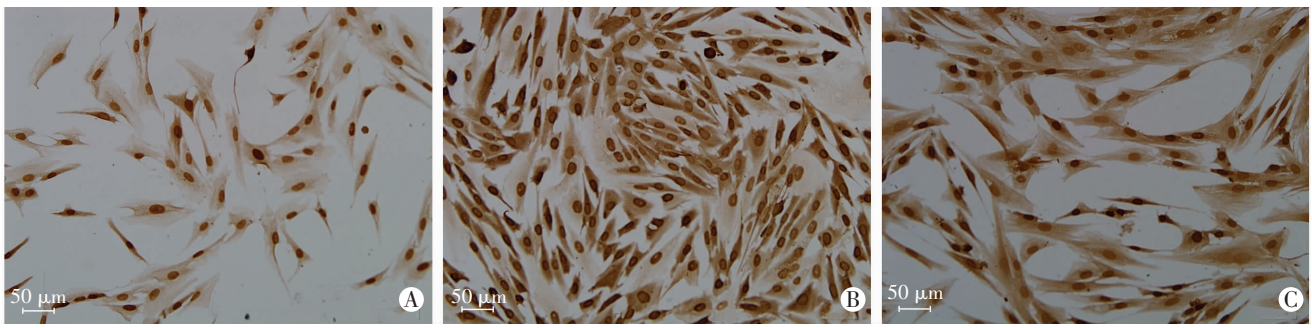


1：阴性对照组；2：TNF-α 处理组；3：TNF-α + Y-27632 处理组

图4 Western blot 检测各组 VSMCs PCNA 蛋白的表达

2.5 流式细胞仪检测 Y-27632 对 TNF-α 作用 VSMCs 周期的影响

在分组处理 24 h 后，阴性对照组处于 G_0/G_1 期和 S 期 + G_2/M 期细胞比例分别为（86.54 ± 5.33）%、（13.45 ± 5.33）%；TNF-α 处理组处于 G_0/G_1 期细胞比例下降为（62.00 ± 13.03）%（$P<0.05$），处于 S 期 + G_2/M 期细胞比例上升为（37.99 ± 13.03）%，与阴性对照组比较差异有统计学意义（$P<0.05$）。10 μmol/L 的 Y-27632 预处理后，与 TNF-α 处理组相比，TNF-α + Y-27632 处理组处于 G_0/G_1 期细胞比例显著升高至（84.81 ± 1.87）%（$P<0.05$），处于 S 期 + G_2/M 期细胞比例降至（15.18 ± 1.87）%（$P<0.05$），提示 Y-27632 显著阻滞了 TNF-α 诱导的细胞周期进程，该结果与 CCK-8 法检测结果一致。



A：阴性对照组；B：TNF-α 处理组；C：TNF-α + Y-27632 处理组

图3 免疫细胞化学染色观察各组 VSMCs PCNA 的表达 （SABC ×200）

3 讨论

目前对于SAH后DCVS的研究表明,DCVS的发生机制十分复杂,是一个多因素多环节共同参与的过程。研究[9]发现DCVS的发生不仅是动脉的持续痉挛引起的,还包括脑血管壁发生结构性改变,血管壁增生可导致血管腔的狭窄,细胞的增殖和凋亡参与这一病理过程。许多证据表明免疫炎性反应参与了SAH后DCVS的发生:DCVS在SAH后数日内发生,这与炎症发生的时相基本一致。SAH后血凝块引发的炎症反应分为以蛋白酶为基础的炎症反应和以细胞浸润为基础的炎症反应[10],而后者则发生在迟发性脑血管痉挛时。作为炎性反应核心因子之一的NF-κB与SAH后DCVS所发生的脑血管壁增殖密切相关[11]。Rock信号通路在血管病发病机制中发挥重要作用,它通过多种途径导致SAH后CVS的发生,选择性Rock抑制剂对脑血管病的预防和治疗作用已在许多动物和临床实验中被证实,目前使用一种Rock选择性抑制剂法舒地尔可改善和预防SAH后CVS[8]。已有研究[12]报道利用RT-PCR检测重要致炎因子TNF-α在模拟SAH后CVS的狗"二次注血"模型中其mRNA显著升高。据此,我们推测:TNF-α与Rock信号通路在SAH后DCVS发生血管壁增殖过程中关系密切。然而,目前TNF-α在SAH后DCVS发生中的具体作用以及Rock信号通路是否在TNF-α参与的DCVS中发挥作用尚不清楚。

本研究CCK-8法检测结果显示TNF-α能显著促进脑基底动脉VSMCs的增殖,而Rock的抑制剂Y-27632呈浓度依赖性的抑制TNF-α诱导的细胞增殖。PCNA是细胞核内的低分子量蛋白质,在S期细胞核内表达达高峰,在进入G_2/M期表达下降,其量的变化与DNA合成一致,其在胞内的变化情况可以反映出细胞的增殖情况[13]。本研究利用免疫细胞化学和Western blot法检测PCNA在不同处理组的分布及表达情况,结果表明Rock抑制剂Y-27632显著抑制TNF-α诱导的PCNA表达增高,与CCK-8法检测结果相符合。已有研究[14]表明:G_1晚期是细胞周期中的1个时间控制点,细胞越过这一控制点进入细胞周期并大量合成DNA。本研究利用流式细胞技术探究了Y-27632抑制TNF-α诱导的VSMCs增殖这一过程中细胞周期所起的作用,结果提示Y-27632是通过阻滞G_0/G_1期来实现其抑制作用。

SAH后患者脑脊液中PDGF、VEGF、TGF-β1等各种细胞因子明显升高[2],其中PDGF与TGF-β1可以刺激VSMCs、成纤维细胞、胶质细胞分裂增生[15],VEGF具有强烈刺激平滑肌细胞增生作用,其在血管疾病的发病中起重要作用[16]。这些细胞因子能够引起VSMCs增殖从而在DCVS的发生中起重要作用。炎性细胞因子在受到额外刺激如感染和创伤时释放,SAH后诱导的白细胞通过增高脑脊液中细胞因子IL-6的含量,在出血后的炎性反应中起作用,与持久的血管痉挛有关[17]。作为重要炎性细胞因子的TNF-α在SAH后脑脊液中浓度升高,TNF-α可以活化NF-κB通路。NF-κB作为炎性反应核心因子可结合在细胞周期素cyclin D启动子上激活其转录,使细胞周期进程加速,DNA合成增加[18],加速细胞增殖,本研究结果与这一结果相符,说明SAH后脑脊液中TNF-α浓度升高,促进了脑VSMCs的增殖,导致了DCVS发生。

Rock信号通路在CVS发生中起到重要作用。研究[19]认为Rock信号通路参与SAH后CVS的发生的主要机制由两个因素参与,一是Rock抑制肌球蛋白轻链导致肌球蛋白轻链磷酸化,二是Rock激活的PKC途径介导钙调素结合蛋白的磷酸化。这些因素共同作用导致脑动脉收缩引起CVS的发生。同时研究[20]显示:Rock与血管壁炎症密切相关,人冠状动脉血管平滑肌培养时,炎性刺激(如IL-1β)可增加Rock mRNA及其蛋白的表达和功能,并呈时间和浓度依赖性,Bao等[21]和Deo等[22]发现,Rock抑制剂可减少炎性细胞因子的产生,并可能通过抑制巨噬细胞IL-6 mRNA的转录,减少IL-6等炎性细胞因子产生。故我们推测:在DCVS发生血管壁增生过程中,脑脊液中显著升高的炎性因子可通过Rock信号通路引起VSMCs的增殖,本研究证实Rock抑制剂Y-27632可以抑制TNF-α对于脑VSMCs的增殖效应,说明Rock信号通路介导了SAH中TNF-α引发的DCVS。

综上所述,炎症因子TNF-α可以引起VSMCs的增殖,提示SAH后升高的TNF-α参与了血管壁的平滑肌细胞增殖反应,在DCVS中血管壁的增殖变化中起了重要作用。Rock抑制剂Y-27632对TNF-α诱导的VSMCs的增殖具有抑制作用,提示Rock信号通路参与了DCVS中TNF-α引起的血管壁的增殖效应。该结果进一步揭示了TNF-α与Rock信号通路在DCVS中所起作用,对于临床上探索治疗SAH后DCVS的新策略具有潜在的应用价值。

参考文献:

[1] Jeon H, Ai J, Sabri M, *et al*. Neurological and neurobehavioral assessment of experimental subarachnoid hemorrhage[J]. BMC Neurosci, 2009, 10: 103.

[2] Harrod C G, Bendok B R, Batjer H H. Prediction of cerebral vasospasm in patients presenting with aneurysmal subarachnoid hemor-

rhage: a review [J]. Neurosurgery, 2005, 56(4): 633 – 654.
[3] Dumont A S, Dumont R J, Chow M M, *et al*. Cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage: putative role of inflammation [J]. Neurosurgery, 2003, 53(1): 123 – 133.
[4] 高成, 赵振环, 刘巍, 等. 阿托伐他汀对大鼠蛛网膜下腔出血后脑血管痉挛作用[J]. 中华神经外科杂志, 2005, 21(9): 552 – 557.
[5] Thai Q A, Oshiro E M, Tamargo R J. Inhibition of experimental vasospasm in rats with the periadventitial administration of ibuprofen using controlled-release polymers[J]. Stroke, 1999, 30(1): 140 – 147.
[6] Vecchione C, Frati A, Di-Pardo A, *et al*. Tumor necrosis factor-alpha mediates hemolysis-induced vasoconstriction and the cerebral vasospasm evoked by subarachnoid hemorrhage [J]. Hypertension, 2009, 54(1): 150 – 156.
[7] Shimokawa H, Takeshita A. Rho-kinase is an important therapeutic target in cardiovascular medicine[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005, 25(9): 1767 – 1775.
[8] Suzuki Y, Shibuya M, Satoh S, *et al*. A postmarketing surveillance study of fasudil treatment after aneurysmal subarachnoid hemorrhage [J]. Surg Neurol, 2007, 68(2): 126 – 131.
[9] Chen D, Chen J J, Yin Q, *et al*. Role of ERK1/2 and vascular cell proliferation in cerebral vasospasm after experimental subarachnoid hemorrhage[J]. Acta Neurochir (Wien), 2009, 151(9): 1127 – 1134.
[10] Yanamoto H, Kikuchi H, Okamoto S, *et al*. Cerebral vasospasm caused by cisternal injection of polystyrene latex beads in rabbits is inhibited by a serine protease inhibitor[J]. Surg Neurol, 1994, 42(5): 374 – 381.
[11] 张建忠, 周政, 刘俊, 等. NF-κB在兔蛛网膜下腔出血模型基底动脉中的表达及其与血管平滑肌增殖的关系[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(18): 1976 – 1980.
[12] Aihara Y, Kasuya H, Onda H, *et al*. Quantitative analysis of gene expressions related to inflammation in canine spastic artery after subarachnoid hemorrhage[J]. Stroke, 2001, 32(1): 212 – 217.
[13] Suzuki T, Sawaki D, Aizawa K, *et al*. Kruppel-like factor 5 shows proliferation-specific roles in vascular remodeling, direct stimulation of cell growth, and inhibition of apoptosis[J]. J Biol Chem, 2009, 284(14): 9549 – 9557.
[14] Coleman M L, Marshall C J, Olson M F,. RAS and RHO GTPases in G_1-phase cell-cycle regulation[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004, 5(5): 355 – 366.
[15] Borel C O, McKee A, Parra A, *et al*. Possible role for vascular cell proliferation in cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage [J]. Stroke, 2003, 34(2): 427 – 433.
[16] Testa U, Pannitteri G, Condorelli G L. Vascular endothelial growth factors in cardiovascular medicine[J]. J Cardiovasc Med (Hagerstown), 2008, 9(12): 1190 – 1221.
[17] Seifert V, Loffler B M, Zimmermann M, *et al*. Endothelin concentrations in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage. Correlation with cerebral vasospasm, delayed ischemic neurological deficits, and volume of hematoma [J]. J Neurosurg, 1995, 82(1): 55 – 62.
[18] Tanner F C, Yang Z Y, Duckers E, *et al*. Expression of cyclin-dependent kinase inhibitors in vascular disease[J]. Circ Res, 1998, 82(3): 396 – 403.
[19] Obara K, Nishizawa S, Koide M, *et al*. Interactive role of protein kinase C-delta with rho-kinase in the development of cerebral vasospasm in a canine two-hemorrhage model[J]. J Vasc Res, 2005, 42(1): 67 – 76.
[20] Hiroki J, Shimokawa H, Higashi M, *et al*. Inflammatory stimuli upregulate Rho-kinase in human coronary vascular smooth muscle cells [J]. J Mol Cell Cardiol, 2004, 37(2): 537 – 546.
[21] 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.
[22] Doe C, Bentley R, Behm D J, *et al*. Novel Rho kinase inhibitors with anti-inflammatory and vasodilatory activities[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2007, 320(1): 89 – 98.

(**收稿**:2013-03-05;**修回**:2013-03-28)
(编辑　王小寒)

上传稿件中图的注意事项

为方便排版处理和达到印刷质量,本刊要求作者在提供修改稿终稿的同时提供EXECL格式的统计图和照片图原图。请作者在上传时注意:

1. 统计图

需要作者提供带数据的EXECL原始图,是指生成EXECL图的数据,而不是所有的原始数据;而且要求用提供的数据生成图,而不是复制的图,即可以激活修改的图。

2. 照片图

如果一个图由多幅图组成,不要组合在一起,最好也不要裁剪,请作者提供单张JPG或TIFF图片格式原始图片,要求像素在300万以上。

所有图按要求提供后以在稿件中的图序、图题命名,一起压缩后以稿件附件形式上传,并请作者确认是否上传成功。如有问题,请及时与编辑部联系。

本刊编辑部