·基础研究·

# Rho相关卷曲螺旋蛋白激酶1在动脉粥样硬化血管壁中的表达及其与基质金属蛋白酶2及转化生长因子1的相关性

杨雅雯，夏敏，吴芬，宋梦星，陆文烨，马占龙*
（南京医科大学第一附属医院放射科，南京 210029）

【摘　要】 **目的** 研究Rho相关卷曲螺旋蛋白激酶1（ROCK1）在动脉粥样硬化血管壁中的表达及其与基质金属蛋白酶2（MMP2）、转化生长因子1（TGF-β1）的相关性。**方法** 选择30只载脂蛋白 *E* 基因敲除小鼠为实验组，高脂饲料喂养，另选30只C57BL/6小鼠为对照组，普通饲料喂养。在喂养的第10、16、22、28及34周，取眼球血监测小鼠血脂水平；取小鼠腹主动脉作为标本，包埋切片并进行苏木精-伊红染色观察血管壁形态；应用免疫组化染色观察血管壁中ROCK1、MMP2、TGF-β1的表达；使用Image Pro Plus 6.0软件测量切片中血管壁厚度、斑块面积、血管壁中ROCK1、MMP2及TGF-β1的表达量。采用SPSS 27.0统计软件进行数据分析。采用单因素方差分析进行组间比较，两两比较采用Tukey检验。采用Pearson相关与线性回归分析ROCK1与血管壁厚度及斑块面积、MMP2、TGF-β1的关系。**结果** 成功建立动脉粥样硬化小鼠模型。在喂养第10、16、22、28及34周，实验组血脂水平明显高于对照组，差异有统计学意义（$P<0.05$）。自喂养第16周起，实验组小鼠血管内均有斑块形成，随着喂养时间的延长，斑块面积和血管壁厚度不断增加，差异有统计学意义（$P<0.05$）；血管壁内ROCK1的表达逐步增高，其表达与斑块面积及血管壁厚度呈正相关（$r=0.821$，$0.730$；$P<0.05$）。线性相关分析及回归分析显示，ROCK1与MMP2、TGF-β1表达均呈正相关（$r=0.801$，$0.906$；$P<0.05$）。**结论** 在动脉粥样硬化血管壁中存在ROCK1蛋白的表达，且表达量随着血管壁厚度增加而增高，ROCK1的表达与MMP2、TGF-β1呈显著正相关性。鉴于ROCK1蛋白的致血管痉挛作用，提示动脉粥样硬化血管壁可能易于痉挛，具体机制需进一步研究。

**【关键词】** 动脉粥样硬化；Rho相关卷曲螺旋蛋白激酶；基质金属蛋白酶；转化生长因子；心血管事件
**【中图分类号】** R543.5　**【文献标志码】** A　**【DOI】** 10.11915/j.issn.1671-5403.2023.01.010

# Expression of Rho associated coiled-coil forming protein kinase 1 in mouse arteriosclerotic vessel walls and its correlation with matrix metalloproteinase 2 and transforming growth factor 1

YANG Ya-Wen, XIA Min, WU Fen, SONG Meng-Xing, LU Wen-Ye, MA Zhan-Long*
(Department of Radiology, First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China)

**【Abstract】** **Objective** To determine the expression of Rho associated coiled-coil forming protein kinase 1 (ROCK1) in atherosclerotic vessel walls and its correlation with matrix metalloproteinase 2 (MMP2) and transforming growth factor 1 (TGF-β1). **Methods** Thirty apolipoprotein E knockout mice were selected as the experimental group and fed with high-fat diet. Another 30 C57BL/6 mice were selected as the control group and fed with ordinary diet. At the 10th, 16th, 22nd, 28th and 34th weeks of feeding, the eyeball blood samples were harvested to measure the blood lipid levels. The abdominal aorta of mice was collected as samples, and then embedded and sectioned, followed by hematoxylin eosin staining to observe the morphology of vascular wall. Immunohistochemical staining was also performed to observe the expression of ROCK1, MMP2 and TGF-β1 in vascular wall. Image Pro Plus 6.0 software was used to measure the thickness of vascular wall, plaque area, and expression levels of ROCK1, MMP2 and TGF-β1 in vascular wall. SPSS statistics 27.0 was used to analyze the experimental indicators. One-way ANOVA was used to compare among groups, and Tukey test was employed for pairwise comparison. Pearson correlation analysis and linear regression analysis were applied to analyze the relationship of ROCK1 expression with thickness of vascular wall, plaque area and MMP2 and TGF-β1. **Results** The mouse model of atherosclerosis was successfully established. At the 10th, 16th, 22nd, 28th and 34th weeks of feeding, the blood lipid levels were significantly higher in the experimental group than the control group ($P<0.05$). Since the 16th week of feeding, plaques were observed in all the blood vessels of the experimental group, and its area and vessel wall thickness were increased with the extension of feeding time ($P<0.05$).

**收稿日期**：2022-05-24；**接受日期**：2022-07-25
**基金项目**：国家自然科学基金面上项目（81971669）
**通信作者**：马占龙，E-mail：mazhanlong@126.com

And the expression of ROCK1 in vessel wall was gradually elevated, and the level was positively correlated with plaque area and vessel wall thickness ($r=0.821$, $0.730$; $P<0.05$). Linear correlation analysis and regression analysis showed that the expression of ROCK1 with MMP2 and TGF-β1 were positively correlated ($r=0.801$, $0.906$; $P<0.05$). **Conclusion** ROCK1 is expressed in atherosclerotic vessel wall, and its expression level is elevated with the thickening of vessel wall and positively correlated with MMP2 and TGF-β1. In view of the vasospasm-causing effect of ROCK1 protein, it is suggested that atherosclerotic vessel walls may be prone to spasm, and the specific mechanism needs further study.

**【Key words】** atherosclerosis; Rho associated coiled-coil forming protein kinases; matrix metalloproteinases; transforming growth factor; cardiovascular events

*This work was supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China* (81971669).

*Corresponding author*: *MA Zhan-Long*, *E-mail*: *mazhanlong@126.com*

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)相关心血管事件如急性冠脉综合征、心肌梗死、脑卒中等在发达国家和发展中国家均有较高的致死率,预防 AS 患者急性心血管事件的发生对于提高患者生存率具有重要意义。Rho 相关卷曲螺旋激酶(Rho associated coiled-coil forming protein kinase, ROCK)是三磷酸乌苷(guanosine triphosphate, GTP)结合蛋白家族分子 RhoA 的主要下游调节蛋白。研究报道,RhoA/ROCK 通路的激活与心血管疾病如冠状动脉痉挛、高血压、动脉粥样硬化、动脉瘤等的发病、进展和预后密切相关。ROCK 分为 ROCK1 和 ROCK2,其中 ROCK1 被认为与心血管病理性纤维化、高血压、糖尿病等密切相关[1,2]。基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)是一类能降解细胞外基质的酶,其上调导致胶原蛋白缺失发生 AS 斑块破裂、主动脉瘤、主动脉夹层等急性事件[3],其中 2 型 MMP 在血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)中表达较为丰富。转化生长因子 β1(transforming growth factor-β1, TGF-β1)促进细胞外基质沉积,在心肌纤维化和血管硬化方面有重要作用。

既往研究证明,冠状动脉痉挛患者外周白细胞中的 Rho 激酶活性增加[4],急性心肌梗死患者的 MMP 水平显著高于稳定型心绞痛患者[5],TGF-β1 可导致动脉粥样硬化血管壁纤维化增厚及管腔狭窄,三者均参与到心血管不良事件。但 ROCK1 在动脉粥样硬化发生及发展过程中血管壁的表达及其与 MMP2 及 TGF-β1 的相关性尚未见详细研究报道。本次实验通过建立动脉粥样硬化动物模型,研究 ROCK1 在动脉粥样硬化血管壁中的表达特点及其与 MMP2、TGF-β1 的相关性,为急性心血管事件的预防提供新思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

SPF 级雄性 *ApoE* 基因敲除小鼠,6 周龄,体质量 18~20 g,购自北京维通利华研究动物技术有限公司。野生型 C57BL/6 小鼠,6 周龄,体质量 18~20 g,购自南京医科大学动物研究中心。高脂饲料(含 1.25%胆固醇)由南京协同医药生物工程公司提供。ROCK1 抗体、MMP2 抗体、TGF-β1 抗体由北京博奥森生物技术有限公司提供,使用全自动生化分析仪(Chemray 240,深圳雷杜生命科技)测量血脂,使用光学显微镜及成像系统(eclipse Ci-e,日本尼康)观察病理标本。本实验得到实验伦理委员会批准。

### 1.2 建立动脉粥样硬化动物模型

实验组为 30 只 *ApoE* 基因敲除小鼠,高脂饲料喂养;对照组为 30 只 C57BL/6 小鼠,普通饲料喂养。2 组分别于喂养的第 10、16、22、28 及 34 周测量血脂并取主动脉标本观察血管斑块形成情况。

### 1.3 实验方法

在监测时间点,实验组和对照组各随机选取 5 只小鼠,腹腔注射 10%水合氯醛(5 ml/kg),麻醉生效后取眼球血测量血脂水平,之后过量麻醉处死小鼠,从主动脉弓至主动脉降部取 1~1.5 cm 主动脉作为标本,用生理盐水及磷酸盐(phosphate buffered saline, PBS)缓冲液反复冲洗标本,至表面无明显杂质残留之后,置于 4%多聚甲醛溶液固定,常规石蜡包埋切片,片厚约 4 μm。每个标本取 3 张切片做苏木精-尹红(hematoxylin-eosin, HE)染色,普通光镜下观察血管壁情况,若显示有斑块形成,则另取相应标本的切片做 ROCK1、MMP2、TGF-β1 单抗免疫组化染色(各 3 张),光学显微镜观察蛋白表达分布情况。

### 1.4 HE 染色和免疫组化染色及相关指标定量

HE 染色:石蜡切片脱蜡至水,入苏木素染色 3~5 min,水洗反蓝,伊红液染色 5 min,无水乙醇脱水,封片晾干,光学显微镜下观察,细胞核为蓝色,细胞质为红色。使用 Image Pro Plus 6.0 软件测量血管壁厚度、斑块面积、血管腔面积及斑块面积/血管腔面积。

免疫组化染色:石蜡切片脱蜡至水,入柠檬酸抗原修复缓冲液中进行抗原修复,PBS 洗涤,入 3%双

氧水阻断内源性过氧化物酶,PBS 洗涤,每张切片加一抗覆盖组织(一抗稀释度均为 1:200),PBS 洗涤,洗后加二抗,PBS 洗后再加二氨基联苯胺(diaminobenzidine,DAB)显色溶液,控制显色,苏木素复染细胞核,水洗返蓝,脱水封片晾干,光学显微镜下观察,细胞核为蓝色,DAB 显出的阳性表达为棕黄色。使用 Image Pro Plus 6.0 软件计算免疫组化切片中阳性表达区的面积和相对灰度值(单位面积中的平均光密度值,作为免疫组化结果定量依据)。

### 1.5 统计学处理

采用 SPSS 27.0 统计软件进行数据分析。计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 Tukey 检验。采用 Pearson 相关与线性回归分析 ROCK1 与血管壁厚度及斑块面积、MMP2、TGF-β1 之间的关系。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 2 组小鼠血脂水平变化

在各个监测点上,与对照组相比,实验组的胆固醇(total cholesterol,TC)、低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)水平明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$);与对照组相比,实验组的甘油三酯(triglyceride, TG)水平逐渐升高,但差异无统计学意义($P>0.05$)。在第 28 与 34 周,实验组的高密度脂蛋白胆固醇(high-density lipoprotein cholesterol , HDL-C)水平明显高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$;表 1)。

### 2.2 2 组小鼠腹主动脉血管壁组织形态变化

对照组小鼠腹主动脉血管内均无斑块形成,血管壁结构正常。实验组小鼠在第 10 周见血管内膜局部隆起,内皮下脂质沉积,第 16~34 周均见主动脉管壁局部增厚,血管内均有斑块形成,在第 34 周最明显(图 1)。随着饲养时间延长,血管壁厚度逐渐增加,斑块面积逐渐增大,斑块面积/管腔面积逐渐增大,差异均有统计学意义($P<0.05$);喂养过程中,小鼠血管腔面积未见明显变化,差异无统计学意义($P>0.05$;表 2)。

**表 1 不同时期各组小鼠血脂水平**

Table 1 Blood lipid levels of mice in different periods (mmol/L, $\bar{x}\pm s$)

| Group | TC | TG | HDL-C | LDL-C |
|---|---|---|---|---|
| Experimental | | | | |
| 10 weeks | 17.53±0.43* | 1.10±0.80 | 1.56±0.20 | 7.61±1.07* |
| 16 weeks | 20.81±0.64* | 1.33±0.43 | 1.71±0.08 | 9.41±0.70* |
| 22 weeks | 23.11±0.47* | 1.84±0.31 | 2.21±0.46 | 10.87±0.65* |
| 28 weeks | 24.18±0.87* | 2.14±0.27 | 3.42±0.58* | 10.25±1.81* |
| 34 weeks | 26.22±1.43* | 3.01±0.72 | 3.72±0.72* | 13.13±0.26* |
| Control | | | | |
| 10 weeks | 2.07±1.12 | 1.84±0.31 | 1.78±0.21 | 0.57±0.07 |
| 16 weeks | 2.65±0.29 | 1.32±0.72 | 1.11±0.08 | 0.89±0.09 |
| 22 weeks | 2.99±0.18 | 1.57±0.90 | 1.41±0.41 | 0.96±0.43 |
| 28 weeks | 3.53±0.19 | 1.56±0.67 | 1.32±0.27 | 1.64±0.33 |
| 34 weeks | 3.73±0.02 | 2.20±0.51 | 1.78±0.15 | 1.71±0.10 |

TC: total cholesterol; TG: triglyceride; HDL-C: high-density lipoprotein cholesterol; LDL-C: low-density lipoprotein cholesterol. Compared with control group at the same time, *$P<0.05$.

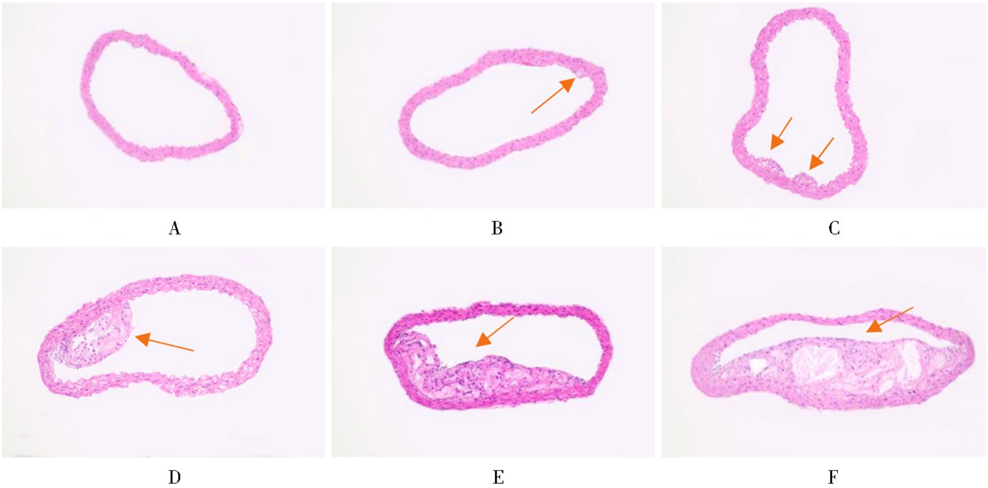


**图 1 2 组小鼠腹主动脉血管壁形态学变化**

Figure 1 Morphological changes of abdominal aortic wall in two groups (HE ×100)

A: control group; B, C, D, E, F: experimental group.

Arrows indicate foam cell deposits and plaques. HE: hematoxylin-eosin staining.

表 2 实验组小鼠主动脉血管壁厚度及斑块情况

Table 2 Aortic wall thickness and plaque in experimental group ($\bar{x}\pm s$)

| Time | Vessel wall thickness (mm) | Plaque area ($mm^2$) | Lumen area ($mm^2$) | Plaque area/lumen area |
|---|---|---|---|---|
| 16 weeks | 0.14±0.02 | 0.03±0.01 | 0.88±0.22 | 0.03±0.02 |
| 22 weeks | 0.29±0.08* | 0.21±0.06* | 0.99±0.45 | 0.21±0.16* |
| 28 weeks | 0.39±0.01*# | 0.41±0.17*# | 0.99±0.02 | 0.41±0.28*# |
| 34 weeks | 0.54±0.02*#△ | 0.70±0.09*#△ | 0.98±0.39 | 0.72±0.07*#△ |

Compared with 16 weeks, *$P<0.05$; compared with 22 weeks, #$P<0.05$; compared with 28 weeks, △$P<0.05$.

### 2.3 2 组小鼠 ROCK1 的免疫组化结果

2 组小鼠 ROCK1 免疫组化结果比较，对照组血管壁 ROCK1 的表达较少，主要集中在细胞核；实验组血管壁局部及斑块内均有较多的 ROCK1 表达，主要集中在斑块肩部及斑块侧的血管壁(图 2，图 3)。

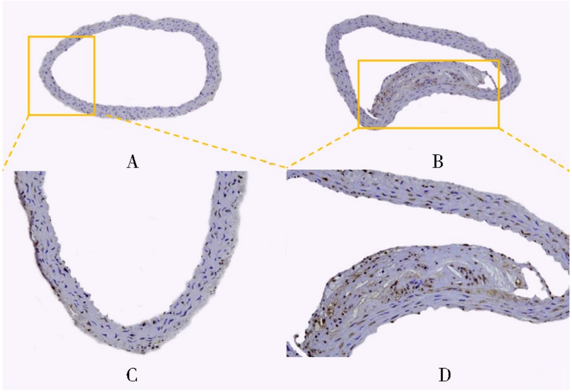


图 2 2 组小鼠 ROCK1 免疫组化结果

Figure 2 Immunohistochemical staining results of Rock1 in two groups

A, C: control group; B, D: experimental group. A, B: HE ×100; C, D: HE ×50. The nuclei were stained blue with hematoxylin, and the positive expression area of DAB was brown yellow. ROCK1: Rho associated coiled-coil forming protein kinase 1; DAB: diaminobenzidine; HE: hematoxylin-eosin.

### 2.4 实验组不同时期 ROCK1、MMP2 及 TGF-β1 的表达和分布

不同时期血管壁斑块内均有 ROCK1、MMP2 及 TGF-β1 的表达，随着饲养时间延长，斑块内 ROCK1、MMP2、TGF-β1 表达均呈上升趋势，ROCK1 的表达水平稍高于 MMP2、TGF-β1 的表达(图 3)。

### 2.5 实验组不同时期 ROCK1、MMP2 及 TGF-β1 表达与斑块面积的相关性

使用 Image Pro Plus 6.0 软件计算不同时期 ROCK1、MMP2 及 TGF-β 的表达量，采用线性相关分析三者与斑块面积的相关性。结果显示，建模过程中，ROCK1、MMP2、TGF-β1 的表达与斑块面积呈正相关($r=0.979, 0.801, 0.720$；$P<0.01$；图 4)。Pearson 相关与线性回归分析结果显示：ROCK1 与 MMP2、TGF-β1 呈显著正相关($r=0.801, 0.906$，$P<0.05$；$R=0.582, 0.790$，$P<0.05$)。

## 3 讨论

动脉粥样硬化相关的心血管事件在全世界范围有着较高的发病率和死亡率[6]，识别高风险 AS 患者对提高其生存率具有重要意义。本实验通过建立动脉粥样硬化模型研究 ROCK1 在动脉粥样硬化血管壁中的表达及其与 MMP2、TGF-β1 的相关性。

ROCK1 是小 GTP 酶蛋白 RhoA 最重要的下游蛋白，血管壁中 ROCK1 过度激活会促进平滑肌细胞收缩和血管内皮源性舒张因子合成减少，继而导致血管痉挛[4]。研究显示，ROCK1 导致的血管壁肌球蛋白轻链磷酸化的程度与冠状动脉痉挛的程度呈显著正相关[7]，使用 Rho 激酶抑制剂能有效降低稳定型心绞痛患者的发作频率和减轻血管痉挛性心绞痛患者的冠状动脉血管痉挛[8]。可见，ROCK1 蛋白是一种痉挛性收缩异常蛋白。此外，RhoA/ROCK1 通路激活与高血压、糖尿病、肥胖症等目前世界公认的动脉粥样硬化高危因素有密切关系[9-11]。ROCK1 激活导致血管内膜功能障碍、VSMC 增殖迁移和表型转化、血管外膜炎症反应、泡沫细胞形成等，ROCK1 被认为是促炎和促动脉粥样硬化分子。本研究结果显示，与正常血管壁相比，AS 血管壁 ROCK1 蛋白表达水平较高，主要分布在斑块的肩部及斑块侧的血管壁中，提示动脉粥样硬化血管壁可能易于发生痉挛，随着斑块面积不断增大及血管壁逐渐增厚，ROCK1 表达也增多，两者呈明显正相关，说明 ROCK1 可能促进动脉粥样硬化的进展。

ROCK 在心脏纤维化和脉管系统的硬化方面发挥重要作用。ROCK 通过调控细胞内应力纤维聚合促进纤维化相关信号途径如心肌素相关转录因子(myocardin-related transcription factor, MRTF)/血清应答因子(serum response factor, SRF)、Yes 相关蛋白(Yes associated protein, YAP)/转录共激活因子 PDZ

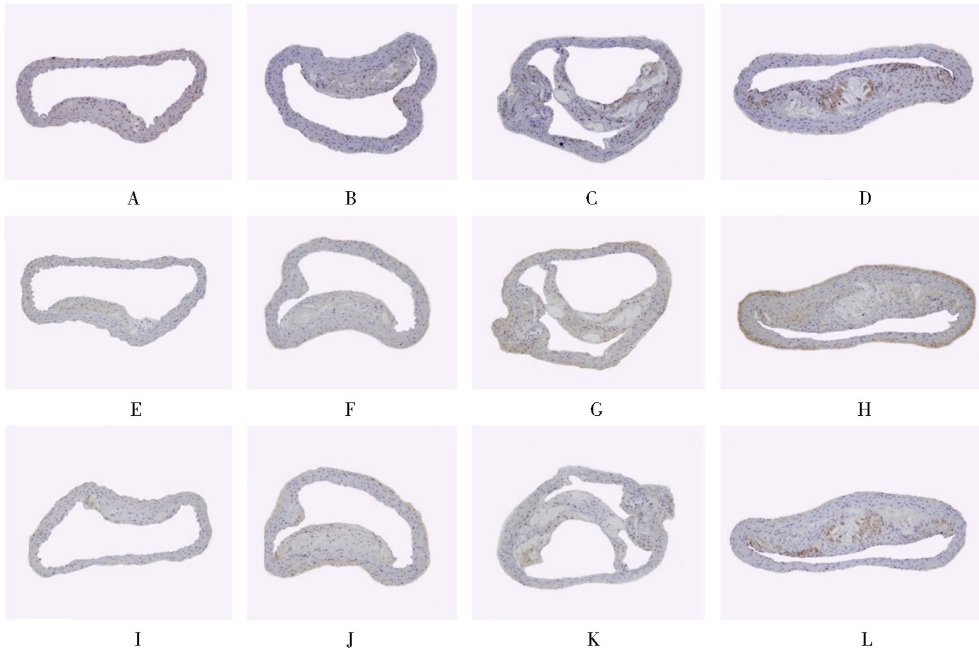


**图3 实验组 ROCK1、MMP2 及 TGF-β1 免疫组化结果**

Figure 3 Immunohistochemistry of ROCK1, MMP2 and TGF-β1 in experimental group (HE ×100)

A, B, C, D: immunohistochemistry of Rock1 in experimental group; E, F, G, H: immunohistochemistry of MMP2 in experimental group; I, J, K, L: immunohistochemistry of TGF-β1 in experimental group. ROCK1: Rho associated coiled-coil forming protein kinase 1; MMP2: matrix metalloproteinase 2; TGF-β1: transforming growth factor-β1.

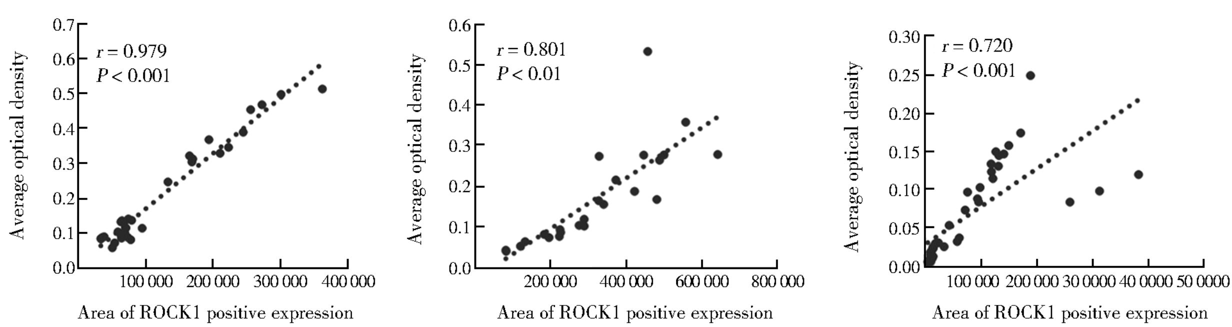


**图4 实验组不同时期 ROCK1、MMP2 及 TGF-β1 表达与斑块面积的相关性**

Figure 4 Correlation of ROCK1, MMP2, TGF-β1 with plaque area in experimental group at different stages

ROCK1: Rho associated coiled-coil forming protein kinase 1; MMP2: matrix metalloproteinase 2; TGF-β1: transforming growth factor-β1.

结合基(transcriptional co-activator with PDZ-binding motif, TAZ)/TEA 结构域转录因子(TEA domain transcription factor, TEAD)激活[12]。细胞因子 TGF-β1 是心血管纤维化过程的重要介质,其促纤维化作用包括经典及非经典通路。经典途径即 TGF-β1 磷酸化下游转录激活因子 Smad2/3 进而促进纤维化基因表达,抑制 ROCK 活性能抑制经典途径。非经典途径即 TGF-β1 通过激活 ROCK1 来调节 F-肌动蛋白的聚合驱动相关基因表达[12]。可见,ROCK 能独立也能与 TGF-β1 通路相互作用来促进心血管纤维化过程[12,13],ROCK 抑制剂表现出抗重塑的作用[14]。

MMP 是一组可以降解细胞外基质成分的蛋白酶类,其中 MMP2 主要降解胶原蛋白和弹性蛋白,尤其是纤维帽的基质成分,导致纤维帽变薄进而发生斑块破裂、血栓形成、心肌梗死等严重心血管事件[15]。主动脉瘤与血管壁炎症及高活性 MMP 有密切关系[16],使用 Rho 激酶抑制剂能显著抑制 VSMC 分泌 MMP2,减少主动脉瘤形成[5],可能是 ROCK1 通过调节细胞中肌动蛋白的形成进而激活细胞外调

节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK)/P38 丝裂原活化蛋白激酶家族(mitogen-activated protein kinase,MAPK)通路,促进 MMP2 的分泌。

本实验研究发现,与正常血管壁相比,AS 血管壁中 ROCK1 表达水平更高,且随血管壁厚度及斑块面积增大而不断增高,同时 ROCK1 的表达与 MMP2、TGF-β1 的表达呈正相关。实验证明动脉粥样硬化小鼠血管壁中存在 ROCK1 蛋白的异常表达,ROCK1、MMP2、TGF-β1 三者可能共同促进 AS 的进展,但具体机制需进一步研究。鉴于 ROCK1 蛋白的致血管痉挛作用,本实验结果提示动脉粥样硬化斑块可能容易发生痉挛,且在 AS 晚期痉挛风险可能更高。研究 AS 血管壁中 ROCK1 的活性对于提高 AS 患者的生存率具有重要意义。未来研究或许可以将 ROCK1 活性作为 AS 患者预后结果的生物标志物[17],或者应用分子影像学的知识制备特异性靶向 ROCK1 探针,根据血管壁局部磁共振信号的改变推算出 ROCK1 含量,对 AS 患者进行危险分层与预后评估,以便更好地预防急性心血管事件的发生,但这仍然需要进行大量长期的临床研究。

**【参考文献】**


[1] Shi J, Wei L. Rho kinases in embryonic development and stem cell research[J]. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2022 , 70(1): 4. DOI: 10.1007/s00005-022-00642-z.

[2] Landry T, Shookster D, Huang H. Tissue-specific approaches reveal diverse metabolic functions of Rho-kinase 1[J]. Front Endocrinol (Lausanne). 2021,11: 622581. DOI: 10.3389/fendo.2020.622581.

[3] Satoh K, Nigro P, Matoba T, *et al*. Cyclophilin A enhances vascular oxidative stress and the development of angiotensin Ⅱ-induced aortic aneurysms[J]. Nat Med, 2009, 15(6): 649-656. DOI: 10.1038/nm.1958.

[4] 阙春杏,虞逸静,陈晗,等. 冠状动脉痉挛发病机制的研究进展及法医学应用[J]. 法医学杂志,2018,34(1):60-66. DOI: 10.3969/j.issn.1004-5619.2018.01.012.

Que CX, Yu YJ, Chen H, *et al*. Research progress and forensic application on the pathogenesis of coronary artery spasm[J]. J Forensic Med, 2018, 34(1): 60-66. DOI: 10.3969/j.issn.1004-5619.2018.01.012.

[5] Schmidt R, Bültmann A, Ungerer M, *et al*. Extracellular matrix metalloproteinase inducer regulates matrix metalloproteinase activity in cardiovascular cells: implications in acute myocardial infarction[J]. Circulation, 2006,113(6): 834-841. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.568162.

[6] Libby P, Buring JE, Badimon L, *et al*. Atherosclerosis[J]. Nat Rev Dis Primers, 2019, 5(1): 56. DOI: 10.1038/s41572-019-0106-z.

[7] Shimokawa H, Sunamura S, Satoh K. RhoA/Rho-Kinase in the cardiovascular system[J]. Circ Res, 2016, 118(2): 352-366. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306532.

[8] Narumiya S, Thumkeo D. Rho signaling research: history, current status and future directions[J]. FEBS Lett, 2018, 592(11): 1763-1776. DOI: 10.1002/1873-3468.13087.

[9] Touyz RM, Alves-Lopes R, Rios FJ, *et al*. Vascular smooth muscle contraction in hypertension[J]. Cardiovasc Res, 2018, 114(4): 529-539. DOI: 10.1093/cvr/cvy023.

[10] Zuo C, Li X, Huang J, *et al*. Osteoglycin attenuates cardiac fibrosis by suppressing cardiac myofibroblast proliferation and migration through antagonizing lysophosphatidic acid 3/matrix metalloproteinase 2/epidermal growth factor receptor signalling[J]. Cardiovasc Res, 2018, 114(5): 703-712. DOI: 10.1093/cvr/cvy035.

[11] Miao J, Wang B, Shao R, *et al*. CircUSP36 knockdown alleviates oxidized low-density lipoprotein-induced cell injury and inflammatory responses in human umbilical vein endothelial cells *via* the miR-20a-5p/ROCK2 axis[J]. Int J Mol Med, 2021, 47(4): 40. DOI: 10.3892/ijmm.2021.4873.

[12] Yu B, Sladojevic N, Blair JE, *et al*. Targeting Rho-associated coiled-coil forming protein kinase (ROCK) in cardiovascular fibrosis and stiffening[J]. Expert Opin Ther Targets, 2020, 24(1): 47-62. DOI: 10.1080/14728222.2020.1712593.

[13] Seccia TM, Rigato M, Ravarotto V, *et al*. ROCK (RhoA/Rho kinase) in cardiovascular-renal pathophysiology: a review of new advancements[J]. J Clin Med, 2020, 9(5): 1328. DOI: 10.3390/jcm9051328.

[14] Montagnoli TL, da Silva JS, Sudo SZ, *et al*. ROCK inhibition as potential target for treatment of pulmonary hypertension[J]. Cells, 2021,10(7): 1648. DOI: 10.3390/cells10071648.

[15] Emini Veseli B, Perrotta P, De Meyer GRA, *et al*. Animal models of atherosclerosis[J]. Eur J Pharmacol, 2017, 816: 3-13. DOI: 10.1016/j.ejphar.2017.05.010.

[16] Skotsimara G, Antonopoulos A, Oikonomou E, *et al*. Aortic wall inflammation in the pathogenesis, diagnosis and treatment of aortic aneurysms[J]. Inflammation, 2022, 45(3): 965-976. DOI: 10.1007/s10753-022-01626-z.

[17] Ma L, Dai W, Lin Y, *et al*. Leukocyte Rho kinase activity and serum cystatin C affect cardiovascular events in acute coronary syndrome[J]. Medicine (Baltimore), 2020, 99(28): e20060. DOI: 10.1097/MD.0000000000020060.


(编辑: 郑真真)