

# RhoA/Rho 激酶信号通路在血管紧张素 刺激心肌成纤维细胞增殖和胶原合成中的作用

汪祥海, 伍 卫, 杨 军, 方 昶, 耿登峰, 黄至斌  
( 中山大学附属第二医院心内科, 广东 广州 510120 )

**摘 要:** 【目的】探讨 RhoA/Rho 激酶信号通路在血管紧张素 (angiotensin, Ang) 刺激心肌成纤维细胞 (cardiac fibroblasts, CFBs) 增殖和胶原合成中的作用。【方法】采用胰酶消化、差速贴壁法培养新生 SD 大鼠 CFBs,并用 Ang 诱导 CFBs 增殖和胶原合成。采用四氮唑盐比色法测定细胞增殖,羟脯氨酸法测定 CFBs 胶原含量,RT-PCR 检测 RhoA/Rho 激酶 mRNA 的表达,Western blot 检测肌球蛋白结合亚基磷酸化 (phosphorylation of myosin-binding subunit, MBS-P) 表达作为 Rho 激酶功能活化的标志。【结果】Ang ( $10^{-7}$  mol/L) 刺激 48 h 可诱导新生 SD 大鼠 CFBs 的 Rho 激酶活化 ( $P < 0.01$ ), 上调 RhoA、Rho 激酶 mRNA 表达 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.05$ ); Rho 激酶特异性抑制剂 Hydroxyfasudil (H4413) 对 Ang 刺激的 CFBs 增殖与胶原合成具有明显的抑制作用 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.05$ )。【结论】RhoA/Rho 激酶信号通路可能在调控 Ang 刺激 CFBs 增殖和胶原合成中发挥重要作用。

关键词: 心肌成纤维细胞; Rho 激酶; 血管紧张素

中图分类号: R542.23

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2007)01-0030-05

## Roles of RhoA/Rho-kinase Signal Pathway in Cardiac Fibroblasts Proliferation and Collagen Synthesis Induced by Angiotensin

WANG Xiang-hai, WU Wei, YANG Jun, FANG Chang, GENG Deng-feng, HUANG Zhi-bin  
( Department of Cardiology, The Second Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510120, China )

**Abstract:** 【Objective】To investigate the role of RhoA/Rho-kinase signal pathway in cardiac fibroblasts (CFBs) proliferation and collagen synthesis induced by angiotensin (Ang). 【Methods】CFBs of neonatal Sprague-Dawley (SD) rats were isolated with the method of trypsin digestion and differential anchoring velocity. Stimulation of the CFBs with Ang induced fibrosis model. Proliferation of CFBs was observed by MTT colorimetric assay. Synthesis of collagen was observed by the hydroxyproline. The expression of RhoA and Rho-kinase mRNA was examined using semi-quantitative RT-PCR analysis. The extent of phosphorylation of myosin-binding subunit (MBS-P) of myosin phosphatase was quantified by Western blot analysis, and it was used to evaluate the activity of Rho-kinase. 【Results】Stimulation of neonatal SD rats CFBs with Ang ( $10^{-7}$  mol/L) significantly activated Rho-kinase ( $P < 0.01$ ), and significantly increased the expression of RhoA and Rho-kinase mRNA ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.05$ ). Pretreatment of CFBs with a Rho-kinase inhibitor, hydroxyfasudil (H4413), effectively inhibited Ang-induced CFBs proliferation and collagen synthesis ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.05$ ). 【Conclusion】RhoA/Rho-kinase signal pathway maybe one of the most important signal transducer for Ang-induced CFBs proliferation and collagen synthesis in neonatal SD rats.

Key words: cardiac fibroblasts; Rho-kinase; angiotensin

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2007, 28(1): 30-35]

心室重塑的发展过程被认为是各种病因导致晚期心脏功能衰竭共同的发病机制。心室重塑包

括心肌实质重塑和心肌间质重塑。近年来的研究显示,血管紧张素 (Ang) 是刺激心肌成纤维细

收稿日期: 2006-08-31

基金项目: 广州市科委基金资助项目 (2004Z3-E0331)

作者简介: 汪祥海 (1969-), 安徽安庆人, 博士生, 主治医师; 伍 卫, 博士生导师, 通信作者. E-mail: Wu.wei@medmail.com.cn

胞 (CFBs) 增殖和胶原合成的一个重要因素, 与心肌间质重塑、心肌纤维化密切相关。但 Ang 促 CFBs 增殖和胶原合成的分子机制目前尚未完全清楚。小分子 Rho GTP 酶家族是相对分子质量为 (20~30)  $\times 10^3$  的 Ras 超家族成员, 根据其序列和功能可分为 3 个亚族, 即 Rho、Rac 和 Cdc42。现已发现的 Rho 家族主要成员有 RhoA、RhoB、RhoC 等, 其中最重要的是 RhoA<sup>[1]</sup>。Rho 激酶又称为 Rho 相关激酶 (Rho-associated kinase, ROCK), 属于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族成员, 是 RhoA 下游最主要、最具特色的信号分子<sup>[2]</sup>。近期研究发现, RhoA/Rho 激酶通路可能参与调控心肌肥厚和血管平滑肌肥大, 并与肺、肾、肝等器官的慢性炎症纤维化有关, 但该信号通路在心肌间质重塑中的作用报道甚少。本研究旨在探讨 RhoA/Rho 激酶信号通路对血管紧张素 刺激心肌成纤维细胞增殖和胶原合成的调控作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

出生 1~3 d 的 SD 大鼠, 雌雄不拘, 中山大学第二附属医院实验动物中心提供。

### 1.2 主要试剂

Ang、Rho 激酶抑制剂 Hydroxyfasudil (H4413) 等为 sigma 产品; 小鼠抗大鼠波形蛋白单克隆抗体、血管平滑肌肌动蛋白单克隆抗体均购自武汉博士德生物试剂公司; 山羊抗大鼠 MBS-P 单克隆抗体购自 Santa Cruz 公司; 总 RNA 提取试剂 (Trizol) 购自 Gibco 公司; 逆转录试剂盒购自上海生工生物工程技术服务有限公司; 羟脯氨酸试剂盒购自南京建成公司; SABC 试剂盒购自博士德生物试剂公司。

### 1.3 CFBs 的分离、培养

取 1~3 d 龄的 SD 大鼠, 无菌开胸, 剪取心室, 用 D-Hanks 液清洗, 剪碎, 用 1.25 g/L 胰酶消化液反复消化后 (37 恒温摇床摇动 8~10 min), 分别收集各次消化上清液, 加等量 100 mL/L 胎牛血清的 DMEM 培养基, 离心, 弃上清液, 取沉淀加 100 mL/L 胎牛血清的 DMEM 培养基, 制成细胞悬液, 接种培养瓶中, 置 37、5% CO<sub>2</sub> 培养箱内培养。差速贴壁 90 min, 去除心肌细胞。实验采用 3~6 代细胞。

### 1.4 CFBs 的鉴定

1.4.1 病理形态学观察 用倒置显微镜观察心肌成纤维细胞的形态学特征。

1.4.2 SABC 法免疫组织化学染色 滴加正常山羊血清封闭液, 室温 20 min; 滴加一抗工作液, 37 孵育 60 min; 采用山羊血清和 PBS 作为一抗替代物作阴性对照; PBS 洗 3 次; 滴加生物素化的山羊抗小鼠 IgG, 37 孵育 20 min; PBS 洗 3 次; 滴加试剂 SABC, 37 孵育 20 min; PBS 洗 4 次; DAB 显色, 显微镜下控制显色时间, 蒸馏水洗涤; 苏木素复染。

### 1.5 MTT 法测定

取对数生长期 CFBs  $5 \times 10^3$  个细胞接种于 96 孔板中, 37、5% CO<sub>2</sub> 及饱和湿度下培养 24 h 后换无血清培养基, 继续培养 24 h 后, 使细胞进入生长静止期, 吸弃各孔培养基, 继之分组再培养 48 h。实验分组 (各组 DMEM 培养基中含 100 mL/L 胎牛血清): 含胎牛血清的 DMEM 培养基组; 含 Ang  $10^{-7}$  mol/L 组; 含 Ang  $10^{-7}$  mol/L 及 H4413  $10^{-5}$  mol/L 组; 含 H4413  $10^{-5}$  mol/L 组。在分组培养后的 96 孔板每孔中加入 5 g/L MTT 10  $\mu$ L, 置 37 4 h 后, 弃上清, 加入 100  $\mu$ L DMSO 震荡 15 min 后, 在酶联免疫检测仪上 490 nm 处测定吸光度值 (A<sub>490</sub> 值)。

### 1.6 羟脯氨酸测定及胶原量的计算

分组同 MTT 法, 换用 24 孔培养板, 药物作用 48 h。操作步骤严格按试剂盒说明。

### 1.7 RT-PCR 方法检测 RhoA/Rho 激酶 mRNA 的表达

用 6 孔培养板, 各组药物培养 48 h 后收集细胞, 用 Trizol 提取总 RNA, 紫外分光光度计检测纯度。反应分两步进行: 取 1  $\mu$ L 总 RNA, 在 M-MLV 逆转录酶作用下合成 cDNA; 再取 2  $\mu$ L 逆转录产物进行 PCR 扩增反应。Rho 激酶上游引物为 5-GAGCAACTATGA TGTGCCTGAAAAAT-3, 下游引物为 5-GATGTGCTTTGATTTCTTCTAC-3, 产物大小 512 bp; RhoA 上游引物为 5-GTAGAGT TGGCTTTATGGG-3, 下游引物为 5-CACTCC GTCTTGGTCTT-3, 产物大小 345 bp;  $\beta$ -actin 上游引物为 5-GGGACCTGACCGACTAC CTC-3, 下游引物为 5-GGGCGATGATCTTG ATCTTC-3, 产物大小 245 bp。PCR 反应条件: 94 变性 1 min, 52 退火 45 s, 72 延伸 1 min, 32 个循环, 最后 72 延伸 7 min。每一 PCR 反应至少重复 3

次。PCR 产物经 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳分离, 溴化乙锭染色, 紫外透射反射仪观察扩增产物的大小及亮度并摄影。使用凝胶分析系统对扩增条带进行密度分析, 以平均灰度值代表相应基因的表达量, 并除以  $\beta$ -actin 灰度值, 所得数值作为各扩增产物 mRNA 的相对表达量。

### 1.8 Western blot 检测肌球蛋白结合亚基磷酸化 (MBS-P) 表达

各组药物培养 48 h 后, 弃培养液, 用预冷 PBS 洗细胞 2 次, 加入 100  $\mu$ L 细胞裂解液, 刮起细胞, 超声粉碎 30 s, 4 12 000r/min 离心 5 min, 吸上清, BCA 法测定总蛋白浓度。取 30  $\mu$ g 的上述样品加样至 15% 的 SDS-PAGE 凝胶, 电泳。用转移缓冲液把凝胶上蛋白质转移至硝酸纤维膜上, 膜在室温下用 50 g/L 脱脂奶粉封闭液封闭 1 h, 加入 1:1000 稀释的山羊抗大鼠 MBS-P 单克隆抗体及  $\beta$ -actin 多克隆抗体于 4  $^{\circ}$ C 孵育 12 h, 然后加辣根过氧化物酶标记的抗 (1:1000) 室温孵育 1 h, TBST 洗膜后用 ECL 液显影, 将结果进行图像分

析, 以  $\beta$ -actin 为内参照, 测定各样品的 MBS-P 蛋白的相对表达量。

### 1.9 统计学处理

所有数据采用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 使用 SPSS 统计软件, 采用 2  $\times$  2 析因设计的方差分析,  $P < 0.05$  为有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 CFBs 的形态及免疫组化鉴定结果

倒置显微镜观察 (图 1) CFBs 生长迅速, 2~3 d 即呈汇合状态, 细胞排列紧密, 有的交叉重叠生长。与心肌细胞不同, CFBs 呈梭形或多角形, 胞体较大, 胞质透明, 无自发性搏动。SABC 免疫细胞化学染色结果: 光镜下见细胞呈梭形或多角形, 胞质中较多的棕黄色颗粒为染色阳性颗粒, 波形蛋白染色阳性 (图 2), 平滑肌肌动蛋白染色呈阴性 (图 3), 符合 CFBs 的染色特征。



图 1 分离培养的心肌成纤维细胞形态  
Fig.1 Shape of CFBs during cultivation ( $\times 100$ )

图 2 心肌成纤维细胞波形蛋白免疫组化染色  
Fig.2 Immunohistochemical staining result of vimentin in CFBs ( $\times 200$ )

图 3 心肌成纤维细胞  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白免疫组化染色  
Fig.3 Immunohistochemical staining result of  $\alpha$ -SMA in CFBs ( $\times 200$ )

### 2.2 Ang 对鼠 CFBs 的 RhoA、Rho 激酶 mRNA 表达影响及 H4413 干预

方差分析结果示 Ang 与 H4413 对 SD 大鼠 CFBs 的 RhoA、Rho 激酶 mRNA 表达有交互效应 ( $F=7.46$  和  $8.59$ ),  $10^{-7}$  mol/L Ang 刺激大鼠心肌成纤维细胞 48 h 后, 可显著提高 RhoA、Rho 激酶 mRNA 表达 ( $F=8.23$  和  $9.16$ ),  $10^{-5}$  mol/L H4413 预处理对 RhoA、Rho 激酶 mRNA 表达无显著影响 ( $F=0.025$  和  $1.38$ ), 但可抑制 Ang 的作用。 (表 1; 图 4, 5)。

表 1 心肌成纤维细胞 RhoA、Rho 激酶 mRNA 的表达

Table 1 Level of RhoA and Rho -kinase mRNA expression in CFBs ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

Group	RhoA/ $\beta$ -actin	Rho-kinase/ $\beta$ -actin
Control	0.46 $\pm$ 0.08	0.48 $\pm$ 0.09
Ang ( $10^{-7}$ mol/L)	0.65 $\pm$ 0.08 <sup>1)</sup>	0.78 $\pm$ 0.08 <sup>1)</sup>
H4413 ( $10^{-5}$ mol/L)	0.48 $\pm$ 0.07 <sup>2)</sup>	0.47 $\pm$ 0.06 <sup>2)</sup>
Ang +H4413 ( $10^{-5}$ mol/L)	0.49 $\pm$ 0.07 <sup>3)</sup>	0.51 $\pm$ 0.06 <sup>3)</sup>

Compared with control group, 1)  $P < 0.05$ , 2)  $P > 0.05$ ; Compared with Ang group, 3)  $P < 0.05$ . Ang: angiotensin; H4413: hydroxyfasudil

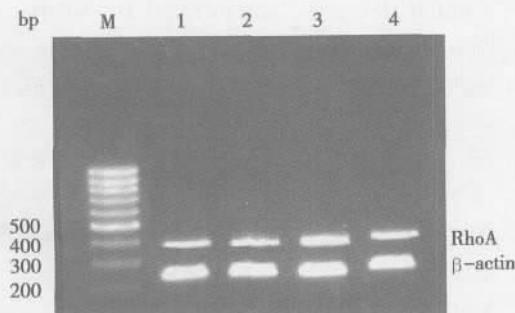


图 4 心肌成纤维细胞 RhoA mRNA 电泳

Fig.4 Electrophoresis of RhoA mRNA of CFBs

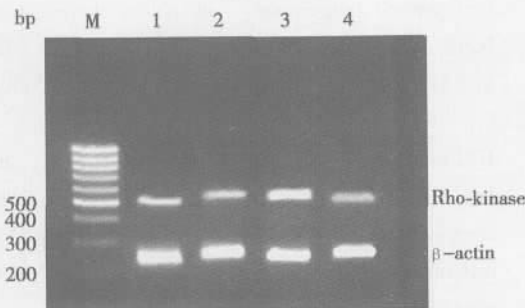


图 5 心肌成纤维细胞 Rho 激酶 mRNA 电泳

Fig.5 Electrophoresis of Rho-kinase mRNA of CFBs

M:100 bp DNA marker; 1:control; 2: H4413  $10^{-5}$  mol/L; 3: Ang II  $10^{-7}$  mol/L; 4: Ang II  $10^{-7}$  mol/L + H4413  $10^{-5}$  mol/L

### 2.3 Ang 对鼠 CFBs Rho 激酶活性的影响及 H4413 干预

肌球蛋白结合亚基(MBS)是 Rho 激酶的主要底物之一,其磷酸化被认为是 Rho 激酶活化的重要标志,因此,我们检测磷酸化 MBS 蛋白表达用于反应 Rho 激酶活性。对图 6 做图像分析,对照组、H4413 组、Ang 组和 Ang +H4413 组的 MBS-P 蛋白的相对表达量分别为:  $0.09 \pm 0.03$ 、 $0.06 \pm 0.04$ 、 $0.58 \pm 0.11$  和  $0.14 \pm 0.07$  ( $n=3$ )。方差分析结果显示,Ang 与 H4413 对 CFBs 的 MBS-P 蛋白表达存在交互效应 ( $F=12.49$ ,  $P < 0.01$ ),  $10^{-7}$  mol/L Ang 可诱导 MBS-P 蛋白表达 ( $F=15.74$ ,  $P < 0.01$ ),  $10^{-5}$  mol/L H4413 对 MBS-P 蛋白表达无显著影响 ( $F=2.74$ ,  $P > 0.05$ ), 但可抑制 Ang 诱导的 MBS-P 蛋白表达。可见,Ang 可诱导 Rho 激酶活化, H4413 对 Ang 诱导的 Rho 激酶活化具有抑制作用。

### 2.4 Ang 对鼠心肌 CFBs 增殖和胶原合成的影响及 H4413 干预

方差分析结果显示 Ang 与 H4413 对 SD 大鼠 CFBs 的 CFBs 增殖和胶原合成有交互效应 ( $F=5.24$

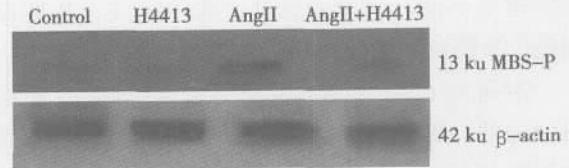


图 6 新生 SD 大鼠心肌成纤维细胞磷酸化 MBS 蛋白表达  
Fig.6 MBS-P protein expression in CFBs of neonatal Sprague-Dawley rats

和 6.41),  $10^{-7}$  mol/L Ang 刺激大鼠心肌成纤维细胞 48 h 后, MTT ( $A_{490}$  值)和胶原合成量均显著增高 ( $F=7.38$  和 8.51),  $10^{-5}$  mol/L H4413 预处理对  $A_{490}$  值和胶原合成量无显著影响 ( $F=0.046$  和 1.27), 但可抑制 Ang 的作用(表 2)。

表 2 H4413 和 Ang 对新生 SD 大鼠 CFBs 增殖和胶原合成的影响

Table 2 Effects of H4413 and Ang on the proliferation and collagen synthesis of cultured neonatal rats CFBs ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=9$ )

Groups	MTT	Collagen synthesis
Control	$0.397 \pm 0.031$	$1.63 \pm 0.22$
Ang ( $10^{-7}$ mol/L)	$0.482 \pm 0.045^{1)}$	$2.04 \pm 0.28^{1)}$
H4413( $10^{-5}$ mol/L)	$0.392 \pm 0.037^{2)}$	$1.64 \pm 0.23^{2)}$
Ang +H4413( $10^{-5}$ mol/L)	$0.425 \pm 0.035^{3)}$	$1.76 \pm 0.21^{3)}$

Ang : angiotensin ; H4413: hydroxyfasudil

Compared with control group, 1)  $P < 0.01$ , 2)  $P > 0.05$ ; Compared with Ang group, 3)  $P < 0.05$

## 3 讨论

心肌成纤维细胞(CFBs)增殖和胶原合成在心肌纤维化中起重要作用,心肌纤维化又是心功能由代偿向失代偿期转变的重要病理过程<sup>[3]</sup>。Ang 是促进心肌成纤维细胞(CFBs)增殖、胶原合成的一个重要因素。本研究发现,  $10^{-7}$ mol/L Ang 具有促进 CFBs 增殖活力和胶原合成作用,这与国内外许多作者的研究相一致<sup>[4,5]</sup>。但 Ang 刺激 CFBs 增殖和胶原合成受体后的确切的确切的胞内信号转导机制目前尚未完全清楚。

小分子 Rho GTP 酶家族具有广泛的生物学功能,除了对细胞骨架重排有重要调控作用外,亦参与调节细胞的局部黏附、迁移、聚集、增殖和基因转录等<sup>[1,6]</sup>。新近有研究发现, Rho 激酶可能参与调控 Ang 诱导心肌肥厚和血管平滑肌肥大<sup>[7]</sup>,另有文献报道 RhoA/Rho 激酶通路与 SHR 大鼠心血

管重构及小鼠心肌梗死后左室重构有关, 长期抑制 Rho 激酶可显著改善心血管重构<sup>[2,8]</sup>。

本研究在培养的新生 SD 大鼠 CFBs 上观察到, Ang ( $10^{-7}$  mol/L) 在刺激 CFBs 增殖、胶原合成的同时可激活 Rho 激酶, 并明显上调 CFBs 的 RhoA 和 Rho 激酶 mRNA 的表达水平, 提示在 Ang 刺激 CFBs 增殖和胶原合成中 RhoA/Rho 激酶信号通路被活化。Hydroxyfasudil (H4413) 是 RhoA/Rho 激酶信号通路高度特异性的抑制剂, 常应用于该信号通路的功能研究<sup>[9]</sup>, 我们用 H4413  $10^{-5}$  mol/L 预处理 CFBs, 结果发现, H4413 与 Ang 对大鼠 CFBs 的 Rho 激酶活化和 RhoA、Rho 激酶 mRNA 表达有交互效应,  $10^{-5}$  mol/L H4413 可显著抑制  $10^{-7}$  mol/L Ang 刺激的 CFBs 增殖与胶原合成。从上述结果我们可以推论出, Ang 刺激 CFBs 增殖和胶原合成至少部分是通过 RhoA/Rho 激酶信号通路所介导。

RhoA/Rho 激酶通路可能并非 Ang 诱导 CFBs 增殖、胶原合成唯一的胞内信号转导通路, 有学者报道, Ang 可通过结合 AT1 受体, 以酪氨酸激酶途径激活细胞外信号调节激酶(ERK)引起心肌纤维化<sup>[9]</sup>; 另有文献报道, Ang 可通过增加心肌成纤维细胞 MAPK 活性和 DNA 合成刺激转化生长因子 1 mRNA 表达和蛋白合成的增加, 进而引起心肌纤维化<sup>[10]</sup>。在调控 Ang 刺激的 CFBs 增殖和胶原合成中, RhoA/Rho 激酶通路与 ERK、MAPK 间的信号转导关系有待进一步明确。

Rho 激酶有两种同源性极高的异构体形式 (ROCK / ROCK 2 和 ROCK / ROCK 1), 新近, 利用基因敲除技术, 有学者发现 ROCK1 在压力负荷致心肌间质纤维化中起重要作用<sup>[11]</sup>。在调控 Ang 刺激的 CFBs 的增殖和胶原合成中, 何种 Rho 激酶亚型起主要作用, 亦有待进一步研究。

参考文献:

- [1] BURRIDGE K, WENNERBERG K. Rho and Rac take center stage[J]. *Cell*, 2004,116(2):167- 179.
- [2] LOIRAND G, GUERIN P, PACAUD P, et al. Rho kinases in cardiovascular physiology and pathophysiology[J]. *Circ Res*, 2006,98(3):322- 334.
- [3] GALLAGHER A M, BAHNDON T D, YU H, et al. Species variability in angiotensin receptor expression by cultured cardiac fibroblasts and the infarcted heart [J]. *Am J Physiol*, 1998,247(3 pt 2):H 801- 809.
- [4] 张伟, 杨涛, 苏彦欣, 等. 双苯氟嗪对血管紧张素诱导新生大鼠心肌成纤维细胞增殖和胶原合成的影响及其机制研究 [J]. *中国药理学通报*, 2006,22 (2): 207- 212.
- [5] KAWANO H, DO Y S, KAWANO Y, et al. Angiotensin has multiple profibrotic effects in human cardiac fibroblasts[J]. *Circulation*, 2000,101(10):1130 - 1137.
- [6] TAKEUCHI S, KAWASHIMA S, RIKITAKE Y, et al . Cerivastatin suppresses lipopolysaccharide-induced ICAM- 1 expression through inhibition of Rho GTPase in BAEC[J]. *Biochem Biophys Res Commun* , 2000,269 (1): 97- 102.
- [7] HIGASHI M, SHIMOKAWA H, HATTORI T, et al. Long-term inhibition of Rho -kinase suppresses angiotensin -induced cardiovascular hypertrophy in rats in vivo: effect on endothelial NAD (P)H oxidase system[J]. *Circ Res*, 2003,93(8):767- 775.
- [8] HATTORI T, SHIMOKAWA H, HIGASHI M, et al. Long-term inhibition of Rho-kinase suppresses left ventricular remodeling after myocardial infarction in mice[J]. *Circulation*, 2004 ,109(18):2234- 2239.
- [9] MIURA M, HATA Y, HIRAYAMA K, et al. Critical role of the Rho -kinase pathway in TGF -beta2 -dependent collagen gel contraction by retinal pigment epithelial cells[J]. *Exp Eye Res*, 2006, 82(5):849- 859.
- [10] ZOU Y, KOMURO I, YAMAZAKI T, et al. Cell type-specific angiotensin -evoked signal transduction pathways: critical roles of Gbetagamma subunit, Src family, and Ras in cardiac fibroblasts [J]. *Circ Res*, 1998, 82(3):337- 345.
- [11] KAWANO H, DO Y S, KAWANO Y, et al. Angiotensin has multiple profibrotic effects in human cardiac fibroblasts[J]. *Circulation*, 2000,101 (10):1130- 1137.
- [12] ZHANG Y M, BO J, TAFFET G E, et al. Targeted deletion of ROCK1 protects the heart against pressure overload by inhibiting reactive fibrosis [J]. *FASEB J*, 2006, 20(7):916- 925.

(编辑 黄小延)