

Rac1/MAPK/ERK 通路介导脂多糖 LPS 诱导的人内皮细胞
单层通透性增高机制研究 *

韩秀敏¹ 于卉影² 孙英慧² 朱鲜阳¹ 张 坡¹ 崔春生¹

(中国人民解放军沈阳军区总医院 1 先心病内科 ;2 医学实验科 辽宁 沈阳 110016)

摘要 目的 探讨 LPS 诱导的人内皮细胞单层通透性改变的分子机制。方法 应用逆转录病毒为载体 ,感染并筛选稳定表达持续活化型 Rac1 和主导抑制型 Rac1 的人 HUVEC 细胞 ,应用 LPS 刺激并观察细胞骨架蛋白 F-actin 和 HUVEC 单层通透性的改变。同时应用 Western blot 方法检测 LPS 刺激前后细胞中 MAPK/ERK 信号通路的改变及加入 PD98059 阻断 ERK 表达后 ,细胞内 F-actin 的改变情况。结果 与正常 HUVEC 相比较 ,LPS 刺激后 ,感染活化型 Rac1 和主导抑制型 Rac1 的 HUVEC 中 F-actin 重构并形成大量应力纤维 ,细胞单层通透性显著增加。而抑制型 Rac1 感染后的 HUVEC 中 F-actin 无重构现象 ,同时细胞单层通透性无明显增加。LPS 刺激前后 ,各组细胞中 ERK1/2 总蛋白均无明显改变。LPS 刺激后 ,感染活化型 Rac1 的 HUVEC 中 p-ERK 增加。经 PD98059 阻断后 ,细胞内 p-ERK 表达下降同时伴随 F-actin 解聚发生。结论 LPS 诱导的内皮细胞通透性增加是经过 Rac1-MAPK/ERK 通路介导的。

关键词 LPS ;HUVEC ;Rac1 ;ERK ;通透性

中图分类号 :Q75 Q78 Q813 文献标识码 :A 文章编号 :1673-6273(2012)09-1609-04

LPS Regulates the Enhancement of HUVEC Permeability Mediated
by Rac1- MAPK/ERK Signal Pathway*

HAN Xiu-min, YU Hui-ying, SUN Ying-hui, ZHU Xian-yang, ZHANG Po, CUI Chun-sheng

(Department of Congenital Heart Disease, Genetal Hospital of Shenyang Military Region of PLA, Shenyang 110016, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the mechanism of LPS regulating the enhancement of endothelium permeability in vitro. **Methods:** The HUVECs in vitro were infected by the retrovirals mediated domain-negative N17Rac1 and activate Q61Rac1. The increase of endothelial permeability was induced by addition of LPS and the change of F-actin cytoskeleton was investigated by phalloidin-Rhodamin staining. The expressions of pERK and total ERK were detected by western blot with and without addition of LPS. Subsequently, F-actin cytoskeleton of HUVEC was investigated by phalloidin-Rhodamin staining when cells was incubated by PD98059 to block the activation of pERK. **Results:** Compared with that in the normal HUVECs, the formation of actin stress fibers was investigated associated with the enhancement of endothelial permeability in cells infected with Q61Rac1 with and without treatment of LPS. In contrast, there were no changes in cells infected with N17Rac1. Although there was change in the total ERK1/2 with or without LPS treatment in HUVECs, the expression of pERK significantly increased in cells treated by LPS by Western blotting. Meanwhile, the expression of pERK enhance in Q61Rac1-infected HUVECs with or without LPS stimulation. Reversely, the cells infected by N17Rac1 inhited the activation of pERK induced by LPS. Moreover, when cells were treated with PD98059, a pERK inhibitor, LPS induced F-actin stress fibre disformatted and the endothelial permeability was inhited in Q61Rac1-infected cells. **Conclusion:** Rac1-MAPK/ERK is involved in the regulation of LPS-indcued endothelial permeability and F-actin stress fiber formation.

Key Words: LPS ;HUVEC ;Rac1 ;ERK ;Permeability

Chinese Library Classification(CLC): Q75 Q78 Q813 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2012)09-1609-04

前言

血管内皮是调控血液与周围组织进行物质交换的主要屏障。血管内皮通透性的增加往往是血管内炎症反应所致病变的病理基础。细胞 F-actin 骨架蛋白是维持细胞形态与极性的基本骨架蛋白。细胞骨架蛋白 F-actin 的重构是炎症反应和血管损伤引起的血管内皮通透性增高的分子基础^[1-4]。脂多糖是革兰氏阴性细菌细胞壁中的一种成分 ,其对宿主是有毒性的。当细菌死亡溶解或用人工方法破坏菌细胞后释放出来 ,所以叫做内

毒素 ,在炎症反应引起的内皮细胞通透性增加中起着主要作用^[5,6]。尽管目前对于 LPS 介导的人血管内皮通透性增加的发生机制还不十分明确 ,但已有研究表明 ,LPS 对内皮功能的损坏与骨架蛋白的重构密切相关^[7]。Rac1 是小 G 蛋白家族重要成员 ,其主要通过介导骨架蛋白重构来调控内皮通透性改变^[8,9]。本研究应用逆转录病毒为载体 ,以 HUVEC 为模型 ,体外培养并筛选得到分别表达持续活化型和主导抑制型 Rac1 的 HUVEC 细胞。探讨 LPS 作用下 ,内皮细胞通透性和肌动蛋白骨架 F-actin 的变化与 Rac1 活性改变的关系 ,初步阐明 MAPK/ERK

* 基金项目 辽宁省科技攻关计划资助项目(2005225013-15)
作者简介 韩秀敏 ,医学博士 ,沈阳军区总医院先心病内科副主任 ,主任医师。E-mail:xiuminhan@126.com
(收稿日期 2011-08-10 接受日期 2011-08-31)

信号传导通路在 LPS 介导的人内皮细胞通透性改变中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

表达持续活化型 (pLNCX-Q61LRac1)、主导抑制型 (pLNCX-T17NRac1) Rac1 蛋白和绿色荧光蛋白 (pLNCX-GFP) 的逆转录病毒真核表达载体及 293 包装细胞系均由 Robert Peter 教授惠赠。人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 购自中科院上海细胞所。抗 Rac1、抗 ERK1、ERK2 和磷酸化 p-ERK 抗体购自 Santa Cruz。Phalloidin 购自 sigma 公司。RhoGTPase pull down kit 购自 cell cytoskeleton 公司。细胞培养用小牛血清购于长春四季青公司。DMEM 培养基购自 GIBCO BRL。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 生长于含 10% FCS 的 DMEM 培养基中。37℃, 5% CO₂ 恒温培养箱培养。

1.2.2 细胞感染 磷酸钙沉淀法转染 pLNCX-GFP, pLNCX-T17NRac1, pLNCX-Q61LRac1 质粒入 293 包装细胞, 转染后 48h 收获上清, 并用快速 CPE 法检测病毒滴度, 调整病毒浓度 5.0×10^8 pfu/mL, 分装 -70℃ 冻存。HUVEC 细胞接种于六孔板上, 使细胞在感染当天达到 50% 融合率。以 20MOI 浓度进行感染, 感染后 72 h 加入 G418 进行抗性筛选, 挑单克隆并传代得到稳定表达的感染细胞。

1.2.3 LPS 刺激实验组细胞 将感染前后的 HUVEC 细胞培养在含 10% FCS 的 DMEM 培养基中, 生长近融合时, 去血清培养 24h。在培养基中加入 LPS 120 ng/ml, 于不同时间收获培养细胞进行实验。

1.2.4 PD98059 阻断实验 将感染前后的 HUVEC 细胞培养在含 10% FCS 的 DMEM 培养基中, 生长近融合时, 去血清饥饿培养 24h。在培养基中加入 PD98059 100 ng/ml, 于不同时间收获培养细胞进行实验。

1.2.5 Pull down 分析 感染前后 HUVEC 细胞生长至融合时, PBS 洗 3 次, 加入 0.5mL 冰冷的细胞裂解液 500 μ L, 4℃, 10 000 rpm, 10 min 离心, 收获细胞, BCA 法测定细胞浓度。在上述细胞提取物中分别加入 20 μ L 结合在 Glutathione Sepharose 4B 凝胶柱上的 GST-hRBD 融合蛋白, 4℃ 涡旋孵育 1 h, 2 500 rpm, 3min 离心, 去上清。沉淀用 500 μ L Wash Buffer 洗涤, 5 000 rpm, 3 min 离心, 去上清。沉淀进行 12% SDS-PAGE 电泳后, western blot 检测活性 Rho A 的表达。

1.2.6 Western blot 按文献^[10]进行 SDS-PAGE、转膜、抗体结合及显色。分离胶浓度为 12%; 一抗分别为抗 Rac1 单抗和抗 ERK 抗体。经 HRP 标记的二抗孵育后, 按 ECL 试剂盒说明书进行曝光。

1.2.7 细胞通透性检测 参照 Essler 等建立的方法, 用 HRP 作为示踪剂检测 EC 单层通透性改变^[11]。将 EC 接种在 Transwell chamber 模型中, 细胞接种密度为 5×10^4 /well, 约 4~7 d 融合成单层, Hank's 液洗两遍, 上、下室分别加入 500 μ L、1.5 mL DMEM 培养基。在上室加入 HRP 至终浓度 0.6 μ g/mL。加入终浓度为 120 ng/mL 的 LPS, 分别于 0 min、1 min、5 min、10 min、30 min、1 h、2 h、4 h、6 h、12 h、24 h 从下室取 60 μ L 培养基于 96 孔板, 样品收集后, OPD 法显色, 酶标仪检测 HRP 吸光度的

变化。

1.2.8 细胞蛋白骨架染色分析 细胞接种至盖玻片上生长至融合单层, PBS 洗 3 次, 4% 多聚甲醛固定 20 min, 0.2% Triton X-100 通透 30min 后, 100ng/mL 的 Rhodamine-Phalloidin 染色 60min, DAPI 核复染, 30% 甘油 -PBS 封片, Co-focus 观察肌动蛋白细胞骨架分布。

2 结果

2.1 稳定转染内皮细胞的筛选及 Rac1 蛋白的活性分析

pLNCX-T17NRac1 和 pLNCX-Q61LRac1 感染 HUVEC 细胞后, 经 G418 筛选, 得到稳定表达的阳性克隆。荧光显微镜下观察, 细胞感染效率为 90% 以上, 见图 1。

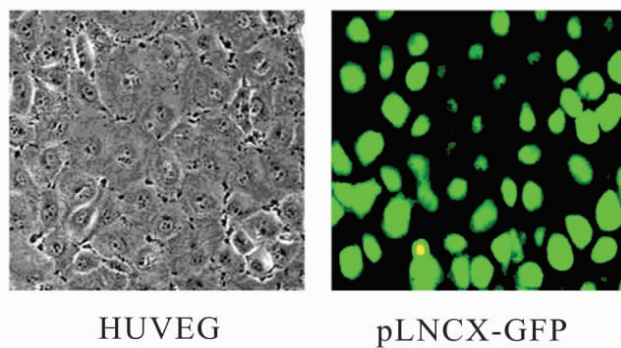


图 1 pLNCX-GFP 逆转录病毒载体感染效率检测

Fig.1 Infection efficiency of pLNCX-GFP was evaluated with fluorescent microscopy

正常 HUVEC 呈单层扁平上皮细胞状, 细胞外膜周边清楚, 呈典型的 "铺路石" 状相嵌排列, 无重叠、伪足和突起, 细胞间连接紧密。经 Q61LRac1 基因转染后, 细胞形态发生明显改变, 细胞排列更加紧密, 呈克隆样聚集生长。T17NRac1 基因感染后, 大多数 HUVEC 收缩变圆, 部分细胞呈多边形改变。同时 pull-down 实验检测发现, 转染前后细胞中总 Rac1 蛋白表达变化不明显, 但活化的 Rac1 蛋白在 Q61LRac1 基因转染组明显增加, 同时 T17NRac1 基因转染后, 细胞内活化的 Rac1 蛋白表达明显下降, 见图 2。

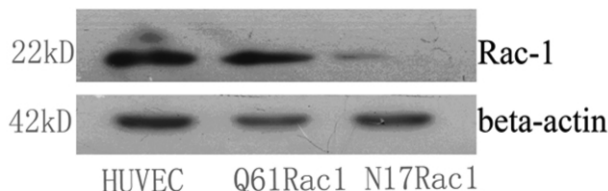


图 2 pull-down 分析检测感染前后细胞内 Rac1 活性变化

Fig.2 The expression of activated-Rac1 in normal and infected HUVEC were detected by pull-down assay

2.2 LPS 刺激转染前后内皮细胞通透性改变

120 ng/ml LPS 与感染前后内皮细胞共培养, 分别于不同时间检测细胞内皮通透性改变, 结果发现, LPS 刺激后, 正常 HUVEC 和 Q61LRac1 感染细胞的单层通透性改变呈明显的时间依赖性增加, 于刺激后 2h 左右达到峰值。而 T17NRac1 感染组细胞的单层通透性改变缓慢, 无显著性差异, 见图 3。

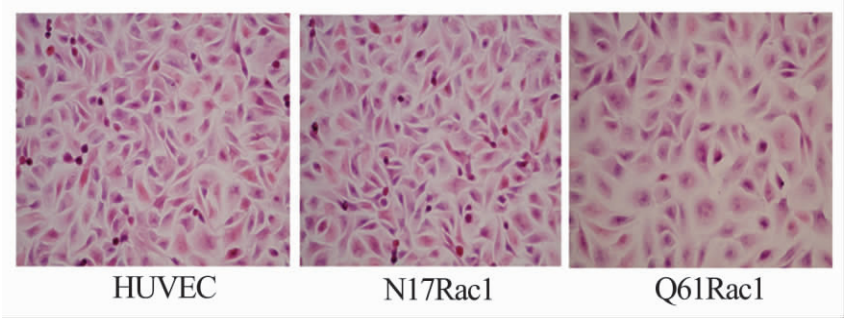


图 3 LPS 刺激前后 ,HUVEC 单层通透性改变

Fig.3 The curve of monolayer permeability with LPS treatment in HUVEC expressed with different activated Rac1

2.3 LPS 刺激转染前后内皮细胞 F-actin 改变

荧光倒置显微镜下观察 F-actin 染色结果发现 ,LPS 刺激后 ,Q63LRac1 感染细胞和正常 HUVEC 细胞均呈明显的向心性回缩 ,F- 肌动蛋白解聚 ,微丝网状有序排列消失 ,F-actin 重构

并在 EC 周边形成大量应力纤维。而 T17NRac1 感染细胞中 , F- 肌动蛋白分布均匀 ,着色微丝在 EC 内呈网状有序排列 ,细胞周边偶有应力纤维形成 ,见图 4。

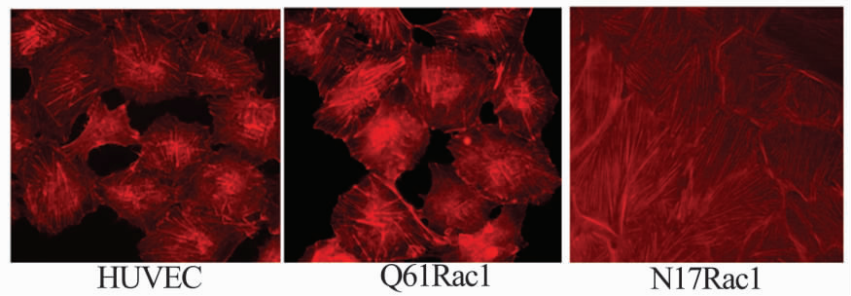


图 4 Rodamine-Phalloidin 染色检测细胞中 F-actin 分布

Fig.4 Rodamine-Phalloidin staining shows F-actin distribution in normal or infected HUVEC treatment with LPS

2.4 LPS 刺激感染前后内皮细胞 ERK 基因表达改变

Western blot 分析发现 ,LPS 刺激后 ,各感染组细胞中 ERK1 ,ERK2 表达均无明显增加。但与 T17NRac1 感染细胞相比 ,正常 HUVEC 和 Q63LRac1 感染细胞中 p-ERK 蛋白表达明显增加 ,见图 5。

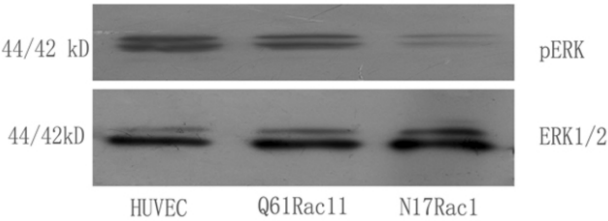


图 5 Western blot 分析 LPS 刺激后细胞内 ERK1/2 和 p-ERK 蛋白表达
Fig.5 Expressions of ERK1/2 and p-ERK in normal and infected HUVEC treatment with LPS

2.5 PD98059 抑制 Rac1 介导的细胞通透性增高及 F-actin 改变

Rodamine-Phalloidin 染色发现 ,加入 PD98059 后正常 HUVEC 和活化型 Rac1 感染细胞中 ,LPS 诱导的 F-actin 应力纤维解聚重排 ,Rac1 介导的细胞内皮通透性增高得到显著抑制 ,见图 6。

3 讨论

LPS 通过特异性激活细胞内下游分子引起内皮细胞收缩 ,

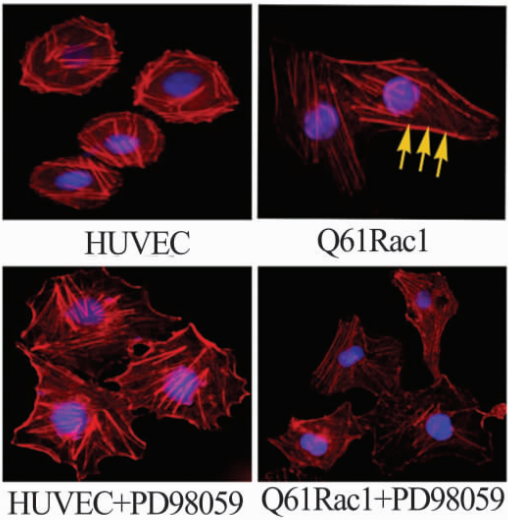


图 6 Rodamine-Phalloidin 染色分析 PD98059 抑制后 ,LPS 刺激细胞中 F-actin 重构

Fig.6 F-actin/stress fiber depolymerized were investigated by Rodamine-Phalloidin staining after treatment with PD98059

导致细胞裂隙形成 ,引起内皮通透性增高 ,是血管炎性病理损伤的机制之一^[12-14]。阐明 LPS 诱导内皮细胞收缩的分子通路 ,将为临床感染性疾病的治疗工作提供有力的实验依据。本研究应用逆转录病毒为载体 ,将持续活化型和主导抑制型 Rac1 分别导入 HUVEC 中 ,筛选并得到了稳定表达上述两种蛋白的感染

细胞。同时应用 LPS 分别刺激上述细胞,检测内皮通透性和 F-actin 的改变。结果发现,LPS 刺激后,持续活化型 HUVEC 中,内皮通透性显著增加,F-actin 重构,形成大量应力纤维。而主导抑制型 HUVEC 中,内皮通透性和 F-actin 均无明显改变。结果提示,LPS 引起的内皮细胞通透性增加与 Rac1 活性密切相关。Rac1 是 LPS 诱导的 HUVEC 通透性增高的主要下游信号调控分子。

MAPK 信号通路是细胞内重要的信号通路之一,由 ERKs、p38 和 JNKs 三大亚类分子组成,对细胞生长、增殖和分化具有重要作用^[15]。胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase,ERK)是将信号从表面受体传导至细胞核的关键。磷酸化激活的 ERK1/2 由胞质转位到核内,进而介导 Elk-1、ATF、NF- κ B、Ap-1、c-fos 和 c-Jun 的转录活化,参与细胞增殖与分化、细胞形态维持、细胞骨架的构建、细胞凋亡和细胞的恶变等多种生物学反应^[16,17]。研究发现,炎症状态下 MAPK 信号通路的激活对多种促炎与抑炎基因的转录具有重要调节作用,其中 ERK 通路可能是 Rac1 介导的细胞内信号传递主要通路之一^[18,19]。Rac1 与 raf 协同作用,通过磷酸化激活 MEK/ERK,促进心肌细胞肥大^[20]。Lin LY 等的研究表明 Rac1/ERK 活化在 LPS 诱导的人主动脉平滑肌细胞的 TLR4 表达增加中有重要的作用^[21]。为进一步探讨 LPS 引起内皮细胞通透性改变的分子机制,本研究检测了细胞中 ERK 通路的改变情况,发现 LPS 刺激后,各组细胞中 ERK1、ERK2 总蛋白表达均无明显增加。同时,正常 HUVEC 和持续活化型 Rac1 感染细胞中 p-ERK 明显增加且入核,而主导抑制型 Rac1 感染细胞中 p-ERK 表达变化不明显,且主要在胞浆中表达。应用 PD98059 阻断 ERK 蛋白的活化后发现,活化型 Rac1 感染细胞中 LPS 诱导的 F-actin 的重构现象消失,同时 p-ERK 表达下降,而 ERK1、ERK2 总蛋白表达均无明显变化。该现象进一步证实 LPS 诱导的内皮细胞通透性增加是经过 Rac1-MAPK/ERK 通路介导的,而 LPS 诱导的 MAPK/ERK 通路激活主要是通过 ERK 蛋白的磷酸化完成的。

上述研究提示 Rho GTP 酶/MAPK 通路在炎症介质介导的 EC 单层通透性增高的过程中起主要的信号转导作用,阐明 Rho GTP 酶/MAPK 在这一病理过程中的信号转导作用,将为全身性炎症反应综合征防治提供新的策略。

参考文献(References)

- [1] Goeckeler ZM, Wysolmerski RB. Myosin light chain kinase-regulated endothelial cell contraction: the relationship between isometric tension, actin polymerization, and myosin phosphorylation[J]. J cell biol, 1995, 130(3): 613-627
- [2] He F, Peng J, Deng XL, et al. RhoA and NF- κ B are involved in lipopolysaccharide-induced brain microvascular cell line hyperpermeability[J]. Neuroscience, 2011, 188: 35-47
- [3] Kim JY, Lee YG, Kim MY, et al. Src-mediated regulation of inflammatory responses by actin polymerization [J]. Biochem Pharmacol, 2010, 79(3): 431-443
- [4] Koss M, Pfeiffer GR, Wang Y, et al. Ezrin/radixin/moesin proteins are phosphorylated by TNF-alpha and modulate permeability increases in human pulmonary microvascular endothelial cells [J]. J Immunol,

2006, 176(2): 1218-1227

- [5] Liu J, Abate W, Xu J, et al. Three-dimensional spheroid cultures of A549 and HepG2 cells exhibit different lipopolysaccharide (LPS) receptor expression and LPS-induced cytokine response compared with monolayer cultures[J]. Innate Immun, 2011, 17(3): 245-255
- [6] Maeda K, Sakonju I, Kanda A, et al. Priming effects of lipopolysaccharide and inflammatory cytokines on canine granulocytes [J]. J Vet Med Sci, 2010, 72(1): 55-60
- [7] Wang Q, Doerschuk CM. The p38 mitogen-activated protein kinase mediates cytoskeletal remodeling in pulmonary microvascular endothelial cells upon intracellular adhesion molecule-1 ligation [J]. J Immunol, 2001, 166(11): 6877-6884
- [8] Mong PY, Petruccio C, Kaufman HL, et al. Activation of Rho kinase by TNF-alpha is required for JNK activation in human pulmonary microvascular endothelial cells[J]. J Immunol, 2008, 180(1): 550-558
- [9] Umapathy NS, Zemskov EA, Gonzales J, et al. Extracellular beta-nicotinamide adenine dinucleotide (beta-NAD) promotes the endothelial cell barrier integrity via PKA-and EPAC1/Rac1-dependent actin cytoskeleton rearrangement[J]. J Cell Physiol, 2010, 223(1):215-223
- [10] 韩雅玲, 于海波, 闫承慧, 等. 血清反应因子参与 RhoA 诱导的人血管内皮细胞肌动蛋白骨架重构[J]. 生理学报, 2005, 57(3): 295-302
- [11] HAN Ya-Ling, YU Hai-Bo, YAN Cheng-Hui, et al. Serum response factor participates in RhoA-induced endothelial cell F-actin rearrangements[J]. Acta Physiologica Sinica, 2005, 57(3): 295-302
- [12] Essler M, Amano M, Kruse HJ, et al. Thrombin inactivates myosin light chain phosphatase via Rho and its target Rho kinase in human endothelial cells[J]. J Biol Chem, 1998, 273: 21867-21874
- [13] Amano M, Chihara K, Kimura K, et al. Formation of actin stress fibers and focal adhesions enhanced by Rho-kinase[J]. Science, 1997, 275(5304): 1308-1311
- [14] Bogatcheva NV, Zemskova MA, Kovalenkov Y, et al. Molecular mechanisms mediating protective effect of cAMP on lipopolysaccharide (LPS)-induced human lung microvascular endothelial cells (HLMVEC) hyperpermeability [J]. J Cell Physiol, 2009, 221 (3): 750-759
- [15] Antonov A, Snead C, Gorshkov B, et al. Heat shock protein 90 inhibitors protect and restore pulmonary endothelial barrier function[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2008, 39(5): 551-559
- [16] Zemans RL, Arndt PG. Tec kinases regulate actin assembly and cytokine expression in LPS-stimulated human neutrophils via JNK activation[J]. Cell Immunol, 2009, 258(1):90-97
- [17] Sandmann G, Siess W, Essler M. Lysophosphatidic acid is the unique platelet-activating substance in human malignant ascites [J]. Eur J Med Res, 2003, 8(9): 397-404
- [18] Berk BC, Abe JI, Min W, et al. Endothelial atheroprotective and anti-inflammatory mechanisms[J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2001, 947: 93-111
- [19] Xu J, Liu X, Jiang Y, et al. MAPK/ERK signaling mediates VEGF-induced bone marrow stem cell differentiation into endothelial cell[J]. Journal of cellular and molecular medicine, 2008, 12: 2395-2406

(下转第 1667 页)

- (1):75-80
- Yong LI, Jun CHENG, Wen-li ZHU, et al. Study of serum Hcy and polymorphisms of Hcy metabolic enzymes in 192 families affected by congenital heart disease[J]. Journal of Peking University(Health sciences), 2005, 37(1):75-80 (In Chinese)
- [6] Dorszewska J, Winczewska Wiktoria A, Sniezawska A. Homocysteine and asymmetric dimethylarginine (ADMA) in epilepsy[J]. Przegl Lek, 2009,66(8): 448-452
- [7] Upchurch GR JR, Welch GN, Fabian AJ, et al. Homocysteine decreases bioavailable nitric oxide by a mechanism involving glutathione peroxidase[J]. J Biol chem, 1997, 272(27):17012-17017
- [8] Wang X, Cui L, Joseph J, et al. Homocysteine induces cardiomyocyte dysfunction and apoptosis through p38 MAPK-mediated increase in oxidant stress [J]. J Mol Cell Cardiol, 2011
- [9] Linnebank M, Moskau S, Semmler A, Widman G, et al. Antiepileptic drugs interact with folate and vitamin B12 serum levels[J]. Ann Neurol, 2011, 69(2): 352-359
- [10] 王小花, 张同霞, 赵秀鹤, 等. 抗癫痫药物对血中同型半胱氨酸、叶酸、维生素 B12 浓度的影响[J]. 山东大学学报(医学版) 2007, 45(4):357-359
- Wang Xiao-hua, Zhang Tong-xia, Zhao Xiu-he, et al. Effect of anti-epileptic drugs on the blood levels of homocysteine, folate and vitamin B12[J]. Journal of Shandong University(Health Sciences), 2007, 45(4):357-359 (In Chinese)
- [11] Patsalos PN, Perucca E. Clinically important drug interactions in epilepsy: interactions between antiepileptic drugs and other drugs [J]. Lancet Neurol, 2003, 2(8):473-481
- [12] Attilakos A, Papakonstantinou E, Schulpis K, et al. Early effect of sodium valproate and carbamazepine monotherapy on homocysteine metabolism in children with epilepsy [J]. Epilepsy Res, 2006, 71(2-3): 299-232
- [13] Verrotti A, Pascarella R, Trotta D, et al. Hyperhomocysteinemia in children treated with sodium valproate and carbamazepine [J]. Epilepsy Res, 2000, 41(3):253-257
- [14] Gidal BE, Tamura T, Hammer A, et al. Blood homocysteine, folate and vitamin B-12 concentrations in patients with epilepsy receiving lamotrigine or sodium valproate for initial monotherapy [J]. Epilepsy Res, 2005, 64(3):161-166
- [15] Khanna S, Kapoor P, Pillai KK, et al. Homocysteine in neurological disease: a marker or a cause [J]. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2011, 10(3): 361-369
- [16] Kurul S, Unalp A, Yiş U. Homocysteine levels in epileptic children receiving antiepileptic drugs [J]. J Child Neurol, 2007, 22 (12): 1389-1392

(上接第 1612 页)

- [19] Liu HW, Halayko AJ, Fernandes DJ, et al. The RhoA/Rho kinase pathway regulates nuclear localization of serum response factor [J]. American journal of respiratory cell and molecular biology, 2003, 29(1): 39-47
- [20] Angela C, Fong HP, Stephen JF, et al. Regulation of Mitogen-Activated Protein Kinases in Cardiac Myocytes through the Small G Protein Rac1[J]. Molecular and Cellular Biology, 2001, 21(4): 1173-1184
- [21] Lin FY, Chen YH, Tasi JS, et al. Endotoxin Induces Toll-Like Receptor 4 Expression in Vascular Smooth Muscle Cells via NADPH Oxidase Activation and Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Pathways [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006, 26 (12): 2630-2637