

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.28.001

IL-1 β 下调 Rho 激酶活性介导脓毒症大鼠血管钙失敏的机制研究*梁家林¹, 刘良明^{2 Δ} , 李 涛²

(1. 空军杭州航空医学鉴定训练中心医学疗养部, 杭州 310013; 2. 第三军医大学大坪医院野战外科研究所二室/创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室, 重庆 400042)

[摘要] **目的** 探讨白细胞介素(IL)-1 β 下调 Rho 激酶活性介导脓毒症大鼠血管钙失敏的机制。**方法** SD 大鼠 32 只,按随机数字表完全随机分为假手术组、盲肠结扎穿孔(CLP) 3 h 组、CLP 6 h 组、CLP 12 h 组,每组 8 只。经 CLP 复制脓毒症大鼠模型,检测不同时点血浆 IL-1 β 浓度及肠系膜上动脉(SMAs)钙敏感性,分析二者之间的相关性。培养 SMAs 来源的血管平滑肌细胞(VSMCs)并与不同浓度重组人 IL-1 β 孵育 24 h,观察 IL-1 β 对其肌球蛋白轻链(MLC₂₀)磷酸化水平、Rho 激酶活性、G 蛋白表达水平及 RhoGEFs 活性的影响。**结果** 经 CLP 3 h 后 SMAs 钙敏感性开始下降($P < 0.05$),而血浆 IL-1 β 在 CLP 6 h 后开始上升($P < 0.05$),SMAs 钙敏感性变化趋势与血浆 IL-1 β 浓度变化呈明显负相关($P < 0.05$)。IL-1 β 可降低 VSMCs MLC₂₀ 磷酸化水平及 Rho 激酶活性($P < 0.05$),上调 G α 11 表达而下调 G α 12 表达($P < 0.05$),但对 G α q 和 G α 13 表达无明显作用($P > 0.05$)。IL-1 β 可明显降低 RhoGEF 和 PDZ-RhoGEF 活性($P < 0.05$),升高 p63 RhoGEF 活性($P < 0.05$)。**结论** IL-1 β 通过下调 G α 12 表达,引起 PDZ-RhoGEF 和 Rho 激酶的活性下降,导致 MLC₂₀ 磷酸化水平下降从而介导脓毒症大鼠血管钙失敏的发生;另外也能通过上调 G α 11 表达,引起 p63 RhoGEF 活性增加而介导脓毒症大鼠血管钙敏感性增加,但总效应是使钙敏感性降低。

[关键词] 脓毒症;白细胞介素 1 β ;钙失敏;G 蛋白;RhoGEF**[中图分类号]** R631+.2**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2017)28-3889-04

Study on mechanism of IL-1 β mediating vascular calcium desensitization in septic rats through down-regulating Rho kinase activity*

Liang Jialin¹, Liu Liangming^{2 Δ} , Li Tao²

(1. Department of Medical Rehabilitation, Hangzhou Aeromedical Identification and Training Center of Air Force, Hangzhou, Zhejiang 310013, China; 2. Second Department, Institute of Field Surgery Research/State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Daping Hospital, Third Military University, Chongqing 400042, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the mechanism of interleukin-1 β (IL-1 β) mediating the vascular calcium desensitization of septic rats by down-regulating Rho kinase activity. **Methods** Thirty-two SD rats were randomly divided into the sham operation group, cecal ligation and puncture (CLP) 3 h group, CLP 6 h group and CLP 12 h group, 8 cases in each group. The septic rat was duplicated by CLP. Then the plasma IL-1 β level and calcium sensitivity of superior mesenteric arteries (SMAs) were detected at different time points. Their correlation was analyzed. VSMCs derived from SMAs were cultured and incubated with different concentrations of human recombinant IL-1 β for 24 h. Then the influences of IL-1 β on the MLC₂₀ phosphorylation level, Rho kinase activity, G protein expression level and RhoGEF activity were observed. **Results** The calcium sensitivity of SMAs after CLP 3 h began to decrease ($P < 0.05$), while plasma IL-1 β level began to increase after CLP 6 h ($P < 0.05$), the change trend of SMAs calcium sensitivity was negatively correlated with plasma IL-1 β level change ($P < 0.05$). IL-1 β could decrease the phosphorylation level of VSMCs myosin light chain (MLC₂₀) and Rho kinase activity ($P < 0.05$), up-regulate G α 11 expression and down-regulate G α 12 expression, but had no obvious effect on G α q and G α 13 expression ($P > 0.05$). IL-1 β could significantly reduce RhoGEF and PDZ-RhoGEF activity ($P < 0.05$) but significantly increase p63 Rho GEF activity ($P < 0.05$). **Conclusion** IL-1 β induces the decrease of PDZ-RhoGEF and Rho kinase activity by down-regulating G α 12 expression, causes the decrease of MLC₂₀ phosphorylation level, thus mediates the occurrence of calcium desensitization in septic rat; in addition, IL-1 β may cause the increase of p63 RhoGEF activity by up-regulating G α 11 expression, thus mediates the increase of vascular calcium sensitivity in septic rats, but the total effect is the decrease of calcium sensitivity.

[Key words] sepsis; interleukin-1 beta; calcium desensitization; G protein; RhoGEF

脓毒症、脓毒性休克是重症监护室最常见的并发症之一,尽管对其研究投入了大量的人力、物力,但其病死率始终居高不下^[1]。血管低反应性(即血管对血管活性药物的反应性下降甚至不反应)是导致其高病死率的重要原因^[2]。目前认为血管

低反应性的发生机制主要有:(1)受体失敏,血管舒、缩相关受体如血管肾上腺素能受体^[3]等表达下降和(或)亲和力下降;(2)膜超极化,钾通道的过度激活使得血管平滑肌细胞(VSMCs)膜的超极化^[4];(3)钙失敏假说,即 VSMCs 肌肉收缩

相关蛋白对钙的敏感性降低,引起力/钙比下降^[5]。

脓毒症伴随着细胞因子如肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素(IL)-1 β 、IL-6 等的瀑布式释放,体内、外研究均证实 IL-1 β 能够介导脓毒症血管收缩反应性降低,作用机制有 NO 依赖性和 NO 非依赖性机制^[6],但是针对以上机制进行矫治却只能部分逆转 IL-1 β 介导的血管低反应性,提示还存在着其他重要机制^[7]。

基础研究显示,Rho 激酶能磷酸化 CPI-17 和肌球蛋白轻链磷酸酯酶(myosin light chain phosphatase,MLCP),磷酸化的 CPI-17 和 MLCP 均能抑制 MLCP 的活性,使得肌球蛋白轻链激酶(myosin light chain kinase,MLCK)和 MLCP 的活性比值上升,使肌球蛋白轻链(MLC₂₀)磷酸化水平增加,使 VSMCs 收缩增加^[8]。Rho 激酶的活性受 RhoA 调控,RhoA 又主要受 RhoGEFs 调控,而 RhoGEFs 的活性受 G α q/11 和 G α 12/13 两大家族调节^[9]。VSMCs 主要存在的 RhoGEFs 有 PDZ-RhoGEF、p115 RhoGEF、p63 RhoGEF 和 LARG,G α q/11 调节 LARG 和 p63 RhoGEF 的活性,而 G α 12/13 调节 PDZ-RhoGEF、LARG 和 p115 RhoGEF 的活性^[10]。IL-1 β 是否通过 Rho 激酶介导脓毒症大鼠血管的钙失敏发生?如果是,它又是通过调节哪种或哪几种 G 蛋白的活性进而引起下游相应的 RhoGEF 活性改变,进而引起 Rho 激酶活性下降而导致血管钙失敏。笔者前期研究显示,IL-1 β 通过下调 PKC、Rho 激酶活性引起血管钙失敏,从而介导内毒素休克家兔血管低反应性的发生,而且发现 Rho 激酶较 PKC 发挥更重要的作用^[11]。本研究重点探索 IL-1 β 是如何调节 Rho 激酶活性,但因为商品化的抗兔抗原一抗很难获得,难以开展分子机制研究,而抗大鼠抗原的一抗却很丰富,因此,本研究以脓毒症大鼠为动物模型研究 IL-1 β 调节 Rho 激酶活性的作用机制。

1 材料与方 法

1.1 实验动物 实验动物使用通过第三军医大学伦理委员会批准并严格按照规定执行。SPF 级成年健康雌性 SD 大鼠,体质量(210 \pm 10)g,由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供。

1.2 主要试剂与仪器 大鼠 IL-1 β ELISA 试剂盒(NeoBioscience 公司),重组大鼠 IL-1 β (PeproTech 公司),兔抗大鼠 p63 RhoGEF 抗体(Proteintech 公司),山羊抗大鼠 PDZ-RhoGEF 抗体(Santa Cruz 公司),兔抗大鼠 G α 12、G α 13、G α q 抗体及小鼠抗大鼠 G α 11 抗体(Santa Cruz 公司),兔抗大鼠 MYPT1 抗体及磷酸化 MYPT1 抗体(Thr850,Millipore 公司),小鼠抗人 β -actin 抗体(Pierce 公司),RhoGEF exchange assay biochem 试剂盒(Cytoskeleton 公司),逆转录试剂盒及 PCR 反应混合试剂(Promega 公司),DMEM/F12 1:1 及新西兰胎牛血清(Hyclone 公司),配制 Krebs-Henseleit 重碳酸盐缓冲液(K-H 液)的试剂均为国产分析纯。Power lab 八道生理记录仪及压力传感器(AD Instrument 公司),恒温离体器官灌流槽(Letica 公司),垂直板状电泳仪(Bio-Rad 公司),多功能读板机(Bio-TEDSynergy HT),CO₂ 细胞培养箱(SHEL/JB)。

1.3 方 法

1.3.1 脓毒症模型的复制及标本获取 SD 大鼠 32 只,按随机数字表完全随机分为假手术组、盲肠结扎穿孔(CLP) 3 h 组、CLP 6 h 组、CLP 12 h 组,每组 8 只。采用 CLP 复制脓毒症模型,参考文献^[12],并适当调整:(1)1 mL/kg 3%戊巴比妥

钠腹腔麻醉;(2)开腹(从腹白线处),切口长约 3.0 cm,找到盲肠,清除肠系膜(注意避免损伤血管),用 4 号线在离盲端 1.5 cm 处结扎盲肠,再用三棱锥在结扎盲端中央处穿孔,使成前端大小约 0.5 cm \times 0.5 cm \times 0.5 cm 而后端大小约 0.4 cm \times 0.4 cm \times 0.4 cm 的三角形孔;(3)依次用 4 号线和 1 号线关腹。假手术组大鼠只进行麻醉和开、关腹操作。在 CLP 手术后 3、6、12 h(补适量 3%戊巴比妥钠麻醉大鼠),开腹经腹主动脉取 1.5 mL 动脉血,加 1 U 肝素抗凝,离心(3 000 g \times 10 min,4 $^{\circ}$ C),取上清液,即为血浆,分装保存于一 80 $^{\circ}$ C 冰箱用于 IL-1 β 测定;小心游离出肠系膜上动脉(SMAs)主干,用角膜剪剪除周围结缔组织(一定要注意保护血管内皮完整),制成长 2~3 mm 的血管环,用于 Ca²⁺ 反应性测定。另取各组 SMAs 分支,用 RIPA 裂解液提取各组总蛋白。

1.3.2 IL-1 β 体外单因素处理及标本获取 按文献^[13]所述培养 SMAs 来源的 VSMCs。实验分为对照组、1 ng/mL IL-1 β 组、10 ng/mL IL-1 β 组和 100 ng/mL IL-1 β 组,每组各 6 瓶细胞。待 VSMCs 传代细胞(第三代)生长 100%融合后,磷酸盐缓冲液(PBS)洗 2 次,加入 DMEM/F12 每瓶 2 mL 饥饿细胞 12 h 后,加入等体积生理盐水(对照组)或使终浓度为上述浓度的 IL-1 β 溶液孵育 24 h。用 RIPA 裂解液提取各组细胞的总蛋白。

1.3.3 脓毒症大鼠血管钙敏感性、血浆 IL-1 β 水平变化及相关性分析 取 1.3.1 制备的血管环,分别测定各组血管环对 Ca²⁺ 的敏感性,方法同文献^[5]。以张力(收缩力/血管环重量)为量化标准,用最大张力(E_{max})来评价血管钙敏感性。将 1.3.1 所得的血浆从-80 $^{\circ}$ C 冰箱中取出,按大鼠 IL-1 β ELISA 试剂盒操作说明,测量各组在 450 nm 处吸光度(A)值。用 CurveExpert 1.3 软件进行曲线拟合,得出标准曲线和公式,求出各组血浆的 IL-1 β 浓度。用各组的 E_{max} 值和 IL-1 β 浓度进行相关性分析,得出二者之间是否存在相关性。

1.3.4 IL-1 β 对大鼠 VSMCs MLC₂₀ 磷酸化水平及 Rho 激酶活性的影响 取 1.3.2 处理好的总蛋白(每组 n=3),用蛋白质印迹法(Western blot)检测,以磷酸化 MLC₂₀(MLC₂₀-p)/非磷酸化 MLC₂₀(MLC₂₀)表示 MLC₂₀ 磷酸化水平,以磷酸化 MYPT1(Rho 激酶底物,MYPT1-p)/非磷酸化 MYPT1(MYPT1)表示 Rho 激酶活性。

1.3.5 IL-1 β 对大鼠 VSMCs 的 G α 11、G α q、G α 12、G α 13 的表达影响 取 1.3.2 处理好的总蛋白(每组 n=3),用 Western blot 检测各组的 G α 11、G α q、G α 12、G α 13 表达。

1.3.6 IL-1 β 对大鼠 VSMCs 的 RhoGEF、PDZ-RhoGEF 和 p63 RhoGEF 活性的影响 取 1.3.2 处理好的总蛋白(每组 n=3),应用 RhoGEF exchange assay biochem kit 检测各组的 RhoGEF、PDZ-RhoGEF 和 p63-RhoGEF 活性。RhoGEF 活性用总蛋白直接检测。p63 RhoGEF 和 PDZ-RhoGEF 活性检测如下:(1)免疫沉淀,联合总蛋白、Protein A/G 20 μ L、PDZ-RhoGEF 或 p63 RhoGEF 一抗 1 μ g,在 4 $^{\circ}$ C 孵育 24 h,离心(3 000 g \times 5 min,4 $^{\circ}$ C),去上清液得沉淀,用 1 mL RIPA 裂解液洗沉淀,离心(3 000 g \times 5 min,4 $^{\circ}$ C),去上清液,重复 2 次,得到的沉淀即为与磁珠结合的抗原抗体复合物;(2)洗脱,沉淀中加入 30~50 μ L 洗脱缓冲液(0.2 mol/L 甘氨酸,pH 2.5),轻轻地盖上盖子并混匀,立即离心(3 000 g \times 3 min,4 $^{\circ}$ C),小心的转移上清液(避免转移任何免疫介质),立即在每 20 μ L

上清液中加入 1 μL 1.5 mol/L Tris, pH 9.0 以中和洗脱液;
(3)按照试剂盒操作步骤进行活性检测,以测得的荧光值-基
底荧光值代表 RhoGEF 的活性。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行处理,计量
资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间数据采用单因素 χ^2 分析,采用 Pear-
son 进行相关性分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 脓毒症大鼠血管钙敏感性及血浆 IL-1β 浓度变化 在
CLP 后 3、6 和 12 h,大鼠 SMAs 对 Ca^{2+} 敏感性的量-效曲线均
出现右移,Emax 均降低($P < 0.05$),见图 1A。血浆 IL-1β 水平
在 CLP 后 6 h 和 12 h 均明显升高($P < 0.05$),见图 1B。血浆
IL-1β 水平与同时期 SMAs 的钙敏感性呈明显负相关
($r = -0.821, P < 0.05$)。

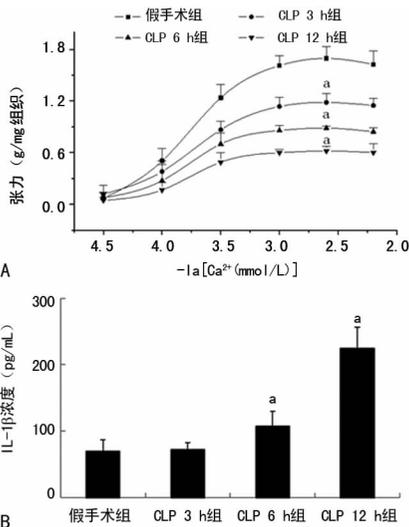


图 1 脓毒症大鼠血管钙敏感性及血浆 IL-1β 浓度变化

2.2 IL-1β 对大鼠 VSMCs MLC₂₀ 磷酸化水平及 Rho 激酶活性的影响 与对照组相比,IL-1β 能明显降低大鼠 VSMCs
MLC₂₀-p/MLC₂₀ 及 MYPT1-p/MYPT1 ($P < 0.05$)。见图 2。

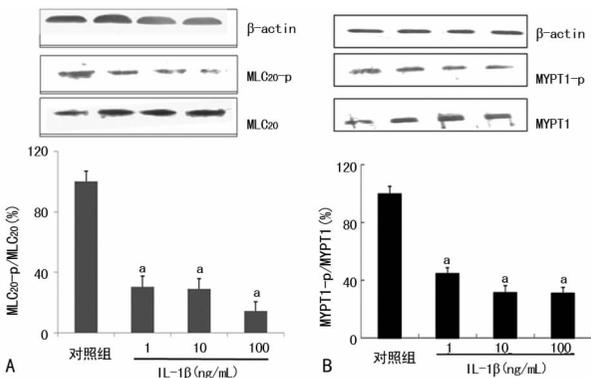


图 2 IL-1β 对大鼠 VSMCs MLC₂₀ 磷酸化水平及 Rho 激酶活性的影响

2.3 IL-1β 对大鼠 VSMCs 的 Gαq、Gα11、Gα12、Gα13 表达水平的影响 以 G 蛋白/内参 β-actin 表示各 G 蛋白的表达水平。
与对照组相比,VSMCs 的 Gα11 表达水平在各浓度 IL-1β 孵育
后明显升高($P < 0.05$),Gα12 表达水平明显降低($P < 0.05$),
Gα13 和 Gαq 表达水平无明显改变($P > 0.05$)。见图 3。

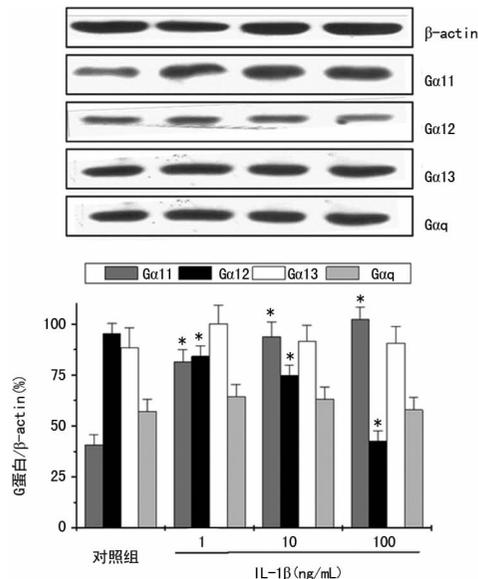


图 3 IL-1β 对大鼠 VSMCs 的 Gαq、Gα11、Gα12、Gα13 表达水平的影响

2.4 IL-1β 对大鼠 VSMCs 的 RhoGEF、p63 RhoGEF 和 PDZ-RhoGEF 活性的影响 与对照组相比,VSMCs 的 RhoGEF 和
PDZ-RhoGEF 活性在各浓度 IL-1β 组明显降低($P < 0.05$),p63
RhoGEF 活性却明显升高($P < 0.05$)。见图 4。

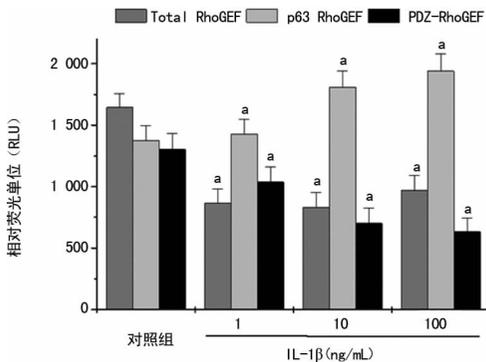


图 4 IL-1β 对大鼠 VSMCs 的 RhoGEF 及 p63 RhoGEF 和 PDZ-RhoGEF 活性的影响

3 讨 论

研究显示,Rho 激酶是调节血管钙敏感性的重要作用分子,Rho 激酶是一种丝氨酸/苏氨酸激酶,其调节机制为:(1)直接磷酸化 MLC₂₀; (2)磷酸化 CPI-17 从而抑制 MLCP 进而抑制 MLC₂₀ 去磷酸化; (3)直接抑制 MLCP,最终使 MLC₂₀ 的 Ser-19 位点磷酸化,增加肌球蛋白与肌动蛋白结合,使粗肌丝横桥上的 ATP 酶活性得到提高,启动横桥摆动,增强肌丝滑行能力使血管平滑肌收缩^[14]。

笔者前期研究结果提示,IL-1β 能通过下调 Rho 激酶活性介导内毒素休克家兔血管钙失敏的发生,为进一步探索其调节机制,结合实际,本研究利用脓毒症大鼠模型及大鼠 SMAs 来源的 VSMCs 重点研究了 IL-1β 是如何下调 Rho 激酶活性从而介导脓毒症血管钙失敏发生的。尽管前期实验提示 IL-1β 能通过下调 Rho 激酶活性介导内毒素休克家兔血管钙失敏发生,但首先还是要验证 IL-1β 是否通过下调 Rho 激酶活性介导

脓毒症大鼠血管钙失敏的发生,结果得到了验证。值得注意的是,CLP 3 h 后血管钙敏感性开始下降,而血浆 IL-1 β 却在 CLP 6 h 后开始升高,这是因为脓毒症后血浆 IL-1 β 升高晚于 TNF- α 等其他细胞因子升高,而 TNF- α 等其他细胞因子对血管钙敏感性也可能有调节作用。结果显示在血浆 IL-1 β 水平升高后血管钙敏感性进一步降低,相关性分析显示二者呈明显负相关,在整体水平提示 IL-1 β 可能介导脓毒症大鼠血管钙敏感性下降。为排除脓毒症时其他细胞因子的影响,进一步确认其介导作用,笔者在离体水平培养 SMA 来源的 VSMCs,并利用 IL-1 β 单独作用于它们,结果显示 IL-1 β 能明显降低 VSMCs 的 MLC₂₀磷酸化水平及 Rho 激酶活性,而 MLC₂₀磷酸化水平及 Rho 激酶活性是反映钙敏感性的重要指标,从而在离体水平验证了 IL-1 β 能通过下调 Rho 激酶活性介导脓毒症大鼠血管钙失敏发生。

那么 IL-1 β 是如何调节 Rho 激酶活性而介导脓毒症大鼠血管钙失敏发生的呢?本研究检测了 VSMCs 上调 Rho-GEF 活性的 G 蛋白的表达水平,并通过检测其下游的相应 RhoGEF 活性来反映其自身的活性水平。结果显示,IL-1 β 对 G 蛋白的表达调控存在差异性:下调 G α 12 的表达,上调 G α 11 的表达,对 G α 13 和 G α q 表达却无明显作用。不难理解的是下调 G α 12 的表达,因为 IL-1 β 能介导脓毒症血管钙失敏发生,而 G 蛋白表达水平与钙敏感性是正相关的。对于上调 G α 11 的表达就不好解释了,有报道 TNF- α 能上调 VSMCs G α q 家族表达^[19],G α 11 是 G α q 家族成员,TNF- α 与 IL-1 β 在功能上存在相似性,故 IL-1 β 上调 G α 11 的表达是有可能的。检测了 G 蛋白表达水平,但不知其活性状态,目前对于 G 蛋白活性状态的检测较困难,为此笔者检测了其下游相应 RhoGEF(PDZ-Rho-GEF,p63 RhoGEF 活性)和总 RhoGEF 活性以反映 G 蛋白活性状态,结果其活性水平与其相应的上游 G 蛋白表达变化方向一致,且总 RhoGEF 活性下降,提示 IL-1 β 通过 G α 12/PDZ-RhoGEF/RhoA/Rho 激酶介导血管钙失敏的发生,另外通过 G α 11/p63 RhoGEF/RhoA/Rho 激酶上调血管钙敏感性。

综上所述,IL-1 β 可通过下调 Rho 激酶的活性介导脓毒症大鼠血管钙敏感性降低,进一步研究发现,IL-1 β 一方面通过下调 G α 12 表达,下调 PDZ-RhoGEF 活性而下调 Rho 激酶活性;另一方面通过上调 G α 11 表达,上调 p63 RhoGEF 活性而上调 Rho 激酶活性,但两方面途径的总效用使总 RhoGEF 活性下降,进而使 Rho 激酶活性下降而介导脓毒症血管钙失敏的发生。

参考文献

- [1] Simpson SQ, Gaines M, Hussein Y, et al. Early goal-directed therapy for severe sepsis and septic shock: a living systematic review[J]. *J Crit Care*, 2016, 29(36): 43-48.
- [2] Kimmoun A, Ducrocq N, Levy B. Mechanisms of vascular hyporesponsiveness in septic shock[J]. *Curr Vasc Pharmacol*, 2013, 11(2): 139-149.
- [3] Liang JL, Yang GM, Li T, et al. Interleukin 1 β attenuates vascular α 1 adrenergic receptors expression following lipopolysaccharide-induced endotoxemia in rabbits: involvement of JAK2-STAT3 pathway[J]. *J Trauma Acute Care Surg*, 2014, 76(3): 762-770.
- [4] Gao Y, Yang Y, Guan Q, et al. IL-1 β modulate the Ca²⁺-activated big-conductance K channels (BK) via reactive Oxygen species in cultured rat aorta smooth muscle cells[J]. *Mol Cell Biochem*, 2009, 338(1/2): 59-68.
- [5] Xu J, Yang G, Li T, et al. Involvement of Cpi-17 and zipper-interacting protein kinase in the regulation of protein kinase C-alpha, protein kinase C-epsilon on vascular calcium sensitivity after hemorrhagic shock[J]. *Shock*, 2010, 33(1): 49-55.
- [6] Takizawa S, Ozaki H, Karaki H. Interleukin-1beta-induced, nitric oxide-dependent and -independent inhibition of vascular smooth muscle contraction[J]. *Eur J Pharmacol*, 1997, 330(2/3): 143-150.
- [7] Soler M, Camacho M, Vila L. Imidazoleoxyl N-Oxide prevents the impairment of vascular contraction caused by interleukin-1beta through several mechanisms[J]. *J Infect Dis*, 2003, 188(6): 927-937.
- [8] Hodge RG, Ridley AJ. Regulating Rho GTPases and their regulators[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2016, 17(8): 496-510.
- [9] Somlyo AP, Somlyo AV. Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase[J]. *Physiol Rev*, 2003, 83(4): 1325-1358.
- [10] Kather JN, Kroll J. Rho guanine exchange factors in blood vessels: Fine-tuners of angiogenesis and vascular function[J]. *Exp Cell Res*, 2013, 319(9): 1289-1297.
- [11] Liang JL, Yang GM, Li T, et al. Effects of interleukin-1 β on vascular reactivity after lipopolysaccharide-induced endotoxic shock in rabbits and its relationship with PKC and Rho kinase[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2013, 62(1): 84-89.
- [12] Rittirsch D, Huber-Lang MS, Flierl MA, et al. Immunodescription of experimental sepsis by cecal ligation and puncture[J]. *Nat Protoc*, 2009, 4(1): 31-36.
- [13] Yang GM, Xu J, Li T, et al. Role of vasopressin receptor in AVP-induced restoration of vascular hyporeactivity and its relationship to MLCP-MLC(20) phosphorylation pathway[J]. *J Surgical Res*, 2010, 161(2): 312-320.
- [14] Puetz S, Lubomirov LT, Pfitzer G. Regulation of smooth muscle contraction by small GTPases[J]. *Physiology*, 2009, 24(6): 342-356.
- [15] Hotta K, Emala CW, Hirshman CA. TNF-alpha upregulates G(i)alpha and G(q)alpha protein expression and function in human airway smooth muscle cells[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 1999, 276(3): L405-411.