

ERK1/2通路参与大鼠肠系膜动脉平滑肌细胞 ET_B受体上调表达

罗国刚¹, 曹永孝², 徐仓宝^{2,3}, 马爱群^{1*}, Lars Edvinsson^{2,3}

(西安交通大学 医学院 1. 第一附属医院, 2. 药理学系 环境与疾病相关基因教育部重点实验室, 陕西 西安 710061;
3. Division of Experimental Vascular Research, Institution of Medicine, Lund University, 221 84, Sweden)

摘要: 目的 探讨细胞外信号调节激酶 1/2 (ERK1/2) 信号转导通路在血管平滑肌细胞内皮素-B型受体 (ET_B) 上调中的作用。方法 用大鼠肠系膜上动脉离体培养模型, 以敏感的离体小血管张力描记技术记录血管张力变化, 实时 PCR 定量 ET_B 受体 mRNA, PhosphoELISA 法测定细胞内磷酸化的 ERK1/2 蛋白水平。结果 大鼠肠系膜上动脉培养 3 h, 细胞内 ERK1/2 蛋白磷酸化水平明显增高, 培养 24 h ET_B 受体 mRNA 表达水平显著上调, 选择性 ET_B 受体激动剂蛇毒类似物 (sarafotoxin 6c, S6c) 引起的收缩增强; 与特异性 ERK1/2 通路阻滞剂 SB386023 共同孵育 24 h, S6c 引起的最大收缩 E_{max} 明显下降, ET_B 受体 mRNA 水平也显著降低。结论 ERK1/2 信号转导通路参与大鼠肠系膜上动脉离体平滑肌细胞 ET_B 受体上调过程。

关键词: 信号转导; 细胞外信号调节激酶 1/2; ET_B 受体; 血管平滑肌; 蛋白磷酸化

中图分类号: R963 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2006)03 - 0257 - 06

ERK1/2 pathway involved in the expression of ET_B receptors of the culturing smooth muscle cells of rat mesenteric artery

LUO Guo-gang¹, CAO Yong-xiao², XU Cang-bao^{2,3}, MA Ai-qun^{1*}, EDVINSSON Lars^{2,3}

(1. First Hospital, 2. Department of Pharmacology, Key Laboratory of Environment and Genes Related to Diseases, Ministry of Education, Medical School of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China;
3. Division of Experimental Vascular Research, Institution of Medicine, Lund University, 221 84, Sweden)

Abstract: Aim To determine the involvement of extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) pathway in the expression of endothelin receptor type B (ET_B) during culture. **Methods** SB386023, a specific inhibitor for ERK1/2 pathway, was used to define the intracellular signaling pathway for the up-regulation of ET_B receptors and sarafotoxin 6c (S6c), a selective agonist for ET_B receptors, induced contraction in isolated rat superior mesenteric arteries. The contraction was recorded by a sensitive *in vitro* myograph and the receptor mRNA was quantified by a real-time PCR. The phosphorylated ERK1/2 proteins were analyzed by phosphoELISA assay. **Results** S6c induced strong contractile responses of the artery after culture for 24 h, while there was no response to S6c in fresh vessel segments. The enhanced contractile response to S6c paralleled with an increase of mRNA for ET_B receptors. The phosphorylated ERK1/2 proteins significantly increased after culture for 3 h. After co-culture with SB386023 for 24 h, S6c-induced contractions significantly decreased with reduction of E_{max} from (217 ± 14)% to (127 ± 23)% ($P < 0.01$). This response paralleled with a decreased level of ET_B receptor mRNA. **Conclusion** ERK1/2 pathway was involved in the up-regulation of ET_B receptors on smooth muscle cells isolated from rat mesenteric arteries during culture.

Key words: signal transduction; ERK1/2; ET_B receptor; vascular smooth muscle; protein phosphorylation

收稿日期: 2005-04-22.

基金项目: 瑞典国家基金委 (Swedish Research Council No. 5958); 瑞典心肺研究基金会 (Swedish Heart-Lung Foundation) 资助项目.

* 通讯作者 Tel / Fax: 86 - 29 - 85261809, E-mail: maaiqun@medmail.com.cn

内皮素-1 (endothelin-1, ET-1)是目前所知最强的血管收缩剂,可激动 ET_A 和 ET_B 两个 G蛋白耦联受体 (G-protein coupled receptors, GPCR)。生理状态下 ET_B 受体主要表达于血管内皮细胞,通过释放一氧化氮 (NO)和前列环素 (PGI_2)而舒张血管^[1],少量表达于平滑肌细胞介导收缩^[2]。但在高血压、动脉粥样硬化、缺血性脑梗死和蛛网膜下腔出血、急性心肌梗死、充血性心衰等病理状态下,平滑肌上 ET_B 受体表达水平明显上调,介导的收缩加强,对炎性刺激因子反应性增高^[3-7]。本研究室通过大鼠肠系膜上动脉离体培养、实验性脑缺血和蛛网膜下腔出血等体外模型模拟出 ET_B 受体病理状态下的上调变化过程^[8,9],但目前并不清楚引发上调确切的细胞内机制。细胞外信号调节激酶 1/2 (extracellular signal-regulated kinase type 1/2, ERK1/2)信号转导通路普遍存在于真核细胞内,参与细胞的增生、分化、运动和凋亡等过程^[10]。ERK1/2信号转导通路在上述病理状态下的作用以及 ERK1/2通路是否参与 ET_B 受体上调,相关报道甚少。

本研究采用大鼠肠系膜上动脉体外培养模型,应用特异性 ERK1/2通路阻滞剂 SB386023和选择性 ET_B 受体激动剂蛇毒类似物 sarafotoxin 6c (S6c),观察 ERK1/2信号转导通路对 ET_B 受体介导的收缩及其 mRNA水平变化的影响,以揭示引起 ET_B 受体上调的细胞内机制。

材料和方法

动物 雄性 Sprague-Dawley (SD)大鼠, SPF级, 体重 250 ~ 300 g,由瑞典 Lund大学动物中心提供。

药品 ET-1和 S6c为澳大利亚 Auspep Parkville 公司产品, SB386023为 Sigma公司产品, PhosphoELISA试剂盒由 BioSource International, Inc. CA, USA提供。蛋白酶抑制合剂 (protease inhibitor cocktail, Sigma)。

设备 RNAPro™, Q-BIOgene, CA, USA 产品; PowerLab, AD Instruments, Hastings, UK 产品; Perkin-Elmer Real-time PCR仪, PE, GeneAmp 5700 sequence detection system 产品; FastPrep 仪, Q-BIOgene, CA, USA 产品。

血管制备和培养 大鼠 CO_2 麻醉后处死,取肠系膜上动脉主干,置于冷的钠盐缓冲液中,光镜下分离血管周围组织。0.1% Triton X-100血管内灌注 10 s,去除血管内皮,再用缓冲液冲洗 10 s,然后切成长约 1 mm 的血管段。培养组血管段置于 96孔

培养板内,每孔盛改良的 DMEM培养液 (加青霉素 $100 \text{ u} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和链霉素 $100 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) $300 \text{ } \mu\text{L}$,于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温箱通湿化的含 5% CO_2 的 O_2 ,使 pH 值保持在 7.40 左右^[11]。ERK1/2通路阻滞剂 SB386023 溶解于二甲基亚砜 (dimethyl sulphoxide, DMSO), SB386023和 DMSO用 DMEM培养液稀释到所需浓度 $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 后,加入培养孔中与离体血管段共同培养 24 h。操作规程经瑞典 Lund大学伦理委员会批准。

血管张力测定 新鲜的和培养的血管段置于含钠盐缓冲液的 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温浴槽中,浴槽中持续通含 5% CO_2 的 O_2 , pH 值保持在 7.4 左右。实验所用的血管段套在两个 L形的细金属丝上,其中一个与 Grass FT-03型传感器相联,并接入 PowerLab以持续记录血管收缩张力,每个血管段逐渐给予 2.0 ~ 2.5 mN的初张力后并稳定至少 1 h,其间每 15 min更换 1次缓冲液,然后用高钾 ($60 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)溶液检验血管收缩活性,使血管收缩两次并以此作为血管活性药物收缩强度的参照标准,高钾收缩血管张力超过 1.0 mN的血管段用于实验。 ET_B 受体激动剂 S6c溶于含牛血清 (0.1%, w/v)的无菌蒸馏水中,浓度累加法逐次加入 S6c后血管即刻收缩,数秒内即达到最大收缩值,当收缩曲线达到最高不再继续上升,保持稳定约数秒后即加入下一浓度的 S6c,从而取得累积浓度-反应曲线^[12]。钠盐缓冲液 ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$): NaCl 119; NaHCO_3 15; KCl 4.6; MgCl_2 1.2; NaH_2PO_4 1.2; CaCl_2 1.5;葡萄糖 5.5;高钾缓冲液中除 KCl换为 $60 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 以外,其他成分均相同^[11]。

实时定量 PCR 新鲜或培养后离体血管在 1 ml的 RNAPro™溶液中用 FastPrep仪磨碎、匀浆。按 FastPrep程序提取总 RNA,按 Gene Amp RT试剂盒说明书方法,用 Perkin-Elmer 2400 PCR仪逆转录总 RNA成 cDNA。实时定量 PCR采用 GeneAmp SYBR PCR试剂盒,Perkin-Elmer Real-time PCR仪自动检测 PCR每一扩增周期结合在 DNA双链上的 Sybrgreen 荧光染料。引物序列根据基因数据库,应用引物表达-2软件设计 (PE Applied Biosystems),所有引物由 TAG Copenhagen A/S (Denmark)公司合成^[11]。大鼠 ET_B 受体序列为前引物: 5'-GATACG ACAACTTCCGCTCCA-3',后引物: 5'-GTCCACGATG AGGACAATGAG-3'。管家基因 (house keeping gene) EF-1 (elongation factor-1)作为内对照,前引物: 5'-GCAAGCCCATGTGTGTTGAA-3',后引物: 5'-TGATG

ACACCCACAGCAACTG-3'。PCR反应体系为 50 μL, 开始 50 °C 2 min, 95 °C 10 min, 然后在 95 °C 15 s 和 60 °C 1 min 循环 40 次, 反应结束后采用分离曲线分析法以确定 PCR 反应产物的特异性。数据定量分析采用 PCR 循环阈值 (C_T) 比较法, 以 EF-1 的 C_T 值为内对照, 计算 ET_B受体 mRNA 的相对表达量。标准曲线根据 C_T = lg[浓度 / (1 + E)] 方程绘制, E 代表扩增效率, 根据标准曲线的斜率计算而得, 理想斜率为 3.3, 扩增效率理想为 100%。标准曲线验证 ET_B受体和 EF-1 的 cDNA 在 PCR 反应体系中扩增效率相同。统计分析采用配对 t 检验, 显著性概率取 P < 0.05。

ERK1/2 磷酸化水平测定 血管平滑肌置于提取缓冲盐 0.5 mL 中, 加入 1 mmol·L⁻¹ PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride) 和蛋白酶抑制合剂, 用 FastPrep 仪磨碎、匀浆, 按照 PhosphoELISA 试剂盒提供的步骤进行: 标本先煮沸 5 min, 使蛋白变性, 然后取样本 100 μL 加入预先包被的 96 孔板中, 室温下孵育 2 h 后, 吸除样本并用缓冲液清洗, 然后在孔中加磷酸化的 ERK1/2 抗体 (一抗) 100 μL, 在室温下孵育 1 h。吸除一抗, 缓冲液冲洗, 在每孔中加入抗-兔 IgG-HRP (anti-Rabbit IgG-HRP) 共轭的二抗, 室温下孵育 30 min。吸除二抗后, 再加入 stabilized chromogen 染料 100 μL, 暗室中室温孵育 30 min 产生蓝颜色, 然后在每一孔中加入终止液 100 μL 终止反应, 在 450 nm 的波长下比色读数^[13]。总蛋白量测定采用 Lowry's 法。

统计分析 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表达, 血管段的收缩反应以相对于 60 mmol·L⁻¹ 钾引起收缩的百分数表达, E_{max} 代表激动剂所引起的最大收缩, pD₂ 代表引起 50% 最大收缩所需激动剂浓度的负对数, 显著性概率取 P < 0.05。

结果

1 血管培养后 S6c 引起的收缩和 ET_B受体 mRNA 变化

新鲜的大鼠肠系膜动脉血管环对 S6c 不引起收缩, 培养 24 h 后, 可见血管收缩明显增强, E_{max} 为 60 mmol·L⁻¹ 钾引起收缩的 (239 ± 26)% (图 1, 表 1)。新鲜的大鼠肠系膜动脉血管环 ET_B受体 mRNA 相对表达水平量为 EF-1 的 (0.037 6 ± 0.003 8)%, 培养 24 h 后 ET_B受体 mRNA 相对表达水平量增高为 (0.081 6 ± 0.017 4)% (P < 0.01), 见图 2。

2 实时定量 PCR 的标准曲线和凝胶电泳

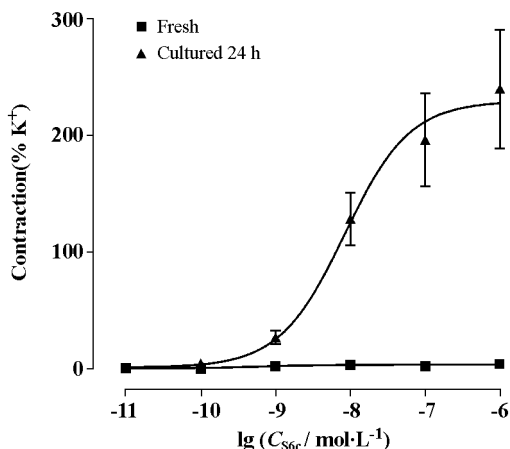


Figure 1 S6c-induced concentration-contraction response on fresh and organ culture 24 h of rat mesenteric artery

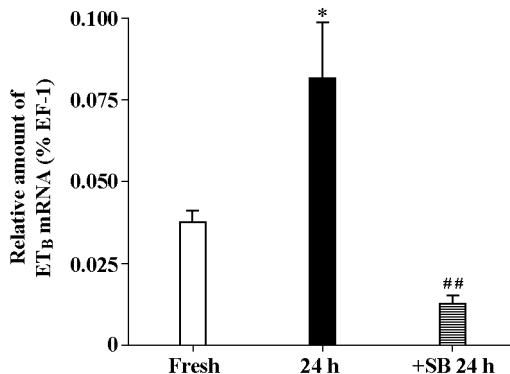


Figure 2 ET_B mRNA expression level following organ culture and co-incubation of rat mesenteric artery with SB386023 for 24 h. 24 h: Cultured 24 h; +SB 24 h: Cultured 24 hours with SB386023. * P < 0.05 vs fresh artery; ## P < 0.01 vs cultured 24 h

Table 1 The variation of S6c-induced contraction on organ cultured mesenteric artery ring of rats

Group	n	Contraction induced by K ⁺ /mN	Contraction induced by S6c	
			E _{max} (% K ⁺)	pD ₂
Fresh	8	2.81 ± 0.97	0 ± 0	-
Cultured 24 h	11	2.90 ± 1.13	239 ± 26	8.07 ± 0.02
Cultured + SB386023	10	2.65 ± 0.78	127 ± 23*	8.48 ± 0.05
Cultured + DMSO	10	2.93 ± 1.05	217 ± 14	7.98 ± 0.04

$\bar{x} \pm s$. * P < 0.01 vs cultured 24 h

ET_B受体 mRNA 标准曲线上 EF-1 的斜率为 3.275, ET_B的斜率为 3.252, 接近理想值 3.3, 两者的相关系数分别为 0.99 和 0.98 (图 3)。凝胶电泳显示 PCR 产物为单一带, 无非特异性扩增产物出现。产物大小 ET_B为 86 bp, EF-1 为 96 bp, bp 值与设计

值相符(图 4)。

3 血管培养后 ERK1/2蛋白磷酸化水平的变化

新鲜血管 ERK1/2蛋白磷酸化水平的吸收度(A)值为 5.99 ± 0.71 ,大鼠肠系膜上动脉离体培养 3 h, ERK1/2蛋白磷酸化水平明显增高, A值增高至 12.96 ± 0.28 ($P < 0.01$),见图 5。

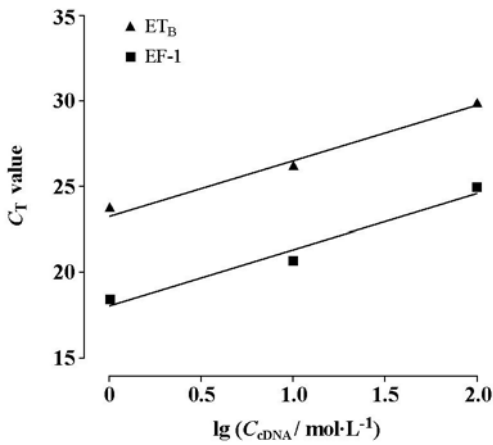


Figure 3 The standard curve of real-time PCR

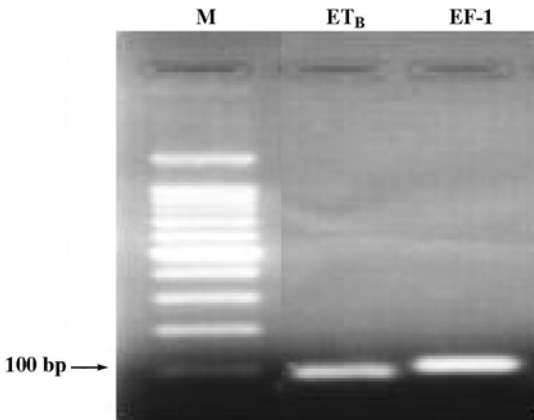


Figure 4 The gel electrophoresis of amplified reaction on real-time PCR

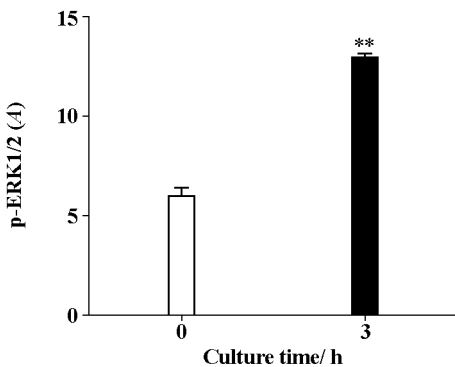


Figure 5 The variation of ERK1/2 kinase phosphorylation in smooth muscle cell of rat mesenteric artery following culture. ** $P < 0.01$ vs control (0 h)

4 SB386023对培养动脉 ET_B受体介导的收缩和 mRNA表达水平的影响

大鼠肠系膜上动脉与 1×10^{-5} mmol·L⁻¹ SB386023 或 DMSO 对照共同培育 24 h 后, SB386023 组 S6c 产生的收缩显著降低, E_{max} 由对照的 $(217 \pm 14)\%$ 降至 $(127 \pm 23)\%$ ($P < 0.01$), pD_2 的变化无显著性 (7.98 ± 0.04 vs 8.48 ± 0.05 , $P > 0.05$,见图 6和表 1)。SB386023 不影响由 K⁺引起的收缩,两组分别为 (2.93 ± 1.05) mN 与 (2.65 ± 0.78) mN。大鼠肠系膜上动脉与 SB386023 共培育 24 h 后, ET_B受体的 mRNA 相对表达水平量为 EF-1 的 $(0.0127 \pm 0.0026)\%$,与不加 SB386023 共培养的 mRNA 相对表达水平 $(0.0816 \pm 0.017)\%$ 比较,显著降低 ($P < 0.01$)。

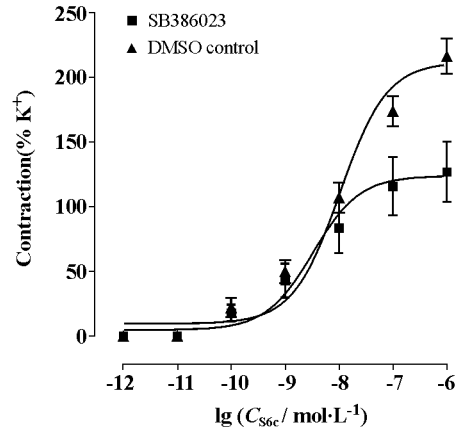


Figure 6 The effect of SB386023 on S6c-induced contraction of cultured rat mesenteric artery

讨论

生理状态下少量表达于血管平滑肌细胞膜上的 ET_B受体,在高血压、动脉粥样硬化、缺血性心、脑血管疾病、蛛网膜下腔出血以及充血性心衰等病理状态下表达水平明显增高,介导的血管收缩明显增强,但确切的细胞内变化机制并不清楚。本研究室将血管置于不含营养物质、只含一些基本离子保持相对稳定 pH 值的无血清 DMEM 培养液中,离体培养后引发的 ET_B受体上调变化非常类似上述病理过程,从而能够简便精确地探讨 ET_B受体表达变化的细胞内信号转导机制^[8,9]。

丝裂原激活的蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号转导通路广泛参与调节真核细胞的分化、增生、分裂和凋亡等生命过程,在哺乳动物细胞内有 3 条主要通路: ① 细胞外信号调节激酶 ERK1/2 通路; ② p38 信号通路; ③ JNK 通

路(c-Jun-N-terminal kinase, JNK)^[14]。ERK1/2通路多是由细胞外促有丝分裂原刺激而活化, p38和JNK通路多是由各种应激刺激如细胞因子而活化, 也称为应激激活的蛋白激酶(stress-activated protein kinases, SAPK)^[15]。本研究选用外周阻力血管肠系膜上动脉, 与ERK1/2通路特异性阻滞剂SB386023体外共同培养24h后, ET_B受体mRNA表达水平明显降低, 介导的收缩减弱, 而对K⁺使细胞膜去极化产生的收缩过程没有影响, 说明ERK1/2信号转导通路参与了ET_B受体上调的细胞内调控, 并通过上调的ET_B受体介导收缩加强。相关研究报道, 只有ERK1/2通路特异性的阻滞剂能降低ET_B受体mRNA表达水平和介导的收缩反应, 而p38和JNK通路阻滞剂对ET_B受体上调没有影响^[16], 这与本研究结果一致。本研究室已经证实大鼠大脑中动脉、基底动脉离体培养后, 细胞内ERK1/2蛋白磷酸化即明显升高^[17], 本试验进一步证实, 大鼠肠系膜上动脉体外培养后细胞内ERK1/2信号通路很快被激活, ERK1/2蛋白在离体培养后3h磷酸化水平就显著增高。然而特异性的ERK1/2通路阻滞剂并不能完全阻断ET_B受体的上调和收缩加强, 可能细胞内Rho激酶、Akt激酶或蛋白激酶B等信号转导机制也参与了ET_B受体的表达调控^[18,19]。

从细胞外信号分子的刺激到细胞核内转录因子的变化, 整个细胞内信号转导过程实质上就是细胞内一系列关键酶磷酸化引起的级联反应。高血压、动脉粥样硬化、脑梗死、蛛网膜下腔出血、心肌梗死等多种疾病进程中, 血管内皮细胞层受损, 病理性损害因子如内皮源性、血小板源性、成纤维细胞源性等生长因子直接作用于平滑肌细胞酪氨酸激酶受体, 活化Src激酶和Ras-GTP^[20,21], 进一步磷酸化下游因子Raf家族而激活MEK1/2(MAPK激酶), 再进一步使ERK1/2蛋白磷酸化后引起细胞核内NF-κB, AP-1, c-Myc和Ets-1等转录因子(TF)活化, 使ET_B受体mRNA转录水平、蛋白翻译过程增强, 表达在平滑肌细胞上的受体密度增大, 介导的收缩反应显著增强。可见ET_B受体上调是循着Src-Ras-Raf-MEK-ERK1/2-TF这条重要的细胞内信号转导通路进行^[22,23], SB386023正是该通路下游关键激酶Raf家族中raf1的特异性阻滞剂。本研究中, 当SB386023阻断raf1的磷酸化过程, ERK1/2通路下游的核转录因子不能被激活, ET_B受体的转录、翻译水平也随之降低, 介导的收缩反应自然减弱。

同步研究还显示, ERK1/2通路直接加强平滑

肌细胞收缩反应, 可见ERK1/2信号转导通路在多个水平参与血管疾病的病理过程。如果以特异性的ERK1/2通路拮抗剂阻断ET_B受体的进一步上调和收缩加强, 而用于治疗脑血管疾病, 将得到多重收益。事实上, 动物实验和前期临床试验都已显示ERK1/2通路阻滞剂明显的神经元保护作用, 能明显减小脑梗死面积^[24]。

References

- [1] Szok D, Hansen-Schwartz J, Edvinsson L. In depth pharmacological characterization of endothelin B receptors in the rat middle cerebral artery [J]. *Neurosci Lett*, 2001, 314: 69 - 72.
- [2] Uddman E, Möller S, Adner M, et al. Cytokines induce increased ET(B) receptor-mediated contraction [J]. *Eur J Pharmacol*, 1999, 376: 223 - 232.
- [3] Hansen-Schwartz J, Szok D, Edvinsson L. Expression of ET(A) and ET(B) receptor mRNA in human cerebral arteries [J]. *Br J Neurosurg*, 2002, 16: 149 - 153.
- [4] Wackenfors A, Emilson M, Ingemansson R, et al. Ischemic heart disease induce upregulation of endothelin receptor mRNA in human coronary arteries [J]. *Eur J Pharmacol*, 2004, 484: 103 - 109.
- [5] Pemow J, Bohm F, Johansson BL, et al. Enhanced vasoconstrictor response to endothelin-B-receptor stimulation in patients with atherosclerosis [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2000, 36: S418 - S420.
- [6] Iwasa S, Fan J, Shimokama T, et al. Increased immunoreactivity of endothelin-1 and endothelin B receptor in human atherosclerotic lesions. A possible role in atherogenesis [J]. *Atherosclerosis*, 1999, 146: 93 - 100.
- [7] Yue TL, Gu JL, Wang C, et al. Extracellular signal-regulated kinase plays an essential role in hypertrophic agonist, endothelin-1 and phenylephrine-induced cardiomyocyte hypertrophy [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275: 37895 - 37901.
- [8] Stenman E, Malmisjo M, Uddman E, et al. Cerebral ischemia upregulates vascular endothelin ET(B) receptors in rat [J]. *Stroke*, 2002, 33: 2311 - 2316.
- [9] Hansen-Schwartz J, Hoel NL, Zhou M, et al. Subarachnoid hemorrhage enhances endothelin receptor expression and function in rat cerebral arteries [J]. *Neurosurg*, 2003, 52: 1188 - 1195.
- [10] Lennmyr E, Karlsson S, Gerwins P, et al. Activation of mitogen-activated protein kinases in experimental cerebral ischemia [J]. *Acta Neurol Scand*, 2002, 106: 333 - 340.
- [11] Luo GG, Xu CB, Cao YX, et al. Transcriptional up-regulation in expression of 5-HT_{2A} and transcriptional down-regulation of AT₁ receptors during organ culture of rat mesenteric artery [J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2004, 95: 280 - 287.
- [12] Cao YX, He LC, Xu CB, et al. Alteration in contractile response to noradrenaline, 5-hydroxytryptamine, sarafor

toxin 6c, and angiotensin II in rat mesenteric artery during organ culture [J]. Acad J XJTU, 2004, 16: 155 - 159.

- [13] Hedge J, Oxhorn B, Carty M, et al. Phosphorylation of caldesmon by ERK MAP kinases in smooth muscle [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2000, 278: 718 - 726.
- [14] Lewis TS, Shapiro PS, Ahn NG. Signal transduction through MAP kinase cascades [J]. Adv Cancer Res, 1998, 74: 49 - 139.
- [15] Irving EA, Bamford M. Role of mitogen- and stress-activated kinases in ischemic injury [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2002, 22: 631 - 647.
- [16] Uddman E, Henriksson M, Eskesen K, et al. Role of mitogen-activated protein kinases in endothelin ET_B receptor up-regulation after organ culture of rat mesenteric artery [J]. Eur J Pharmacol, 2003, 482: 39 - 47.
- [17] Henriksson M, Xu CB, Edvinsson L. Importance of ERK1/2 in up-regulation of endothelin type B receptors in cerebral arteries [J]. Br J Pharmacol, 2004, 142: 1155 - 1161.
- [18] Cattaruzza M, Eberhardt I, Hecker M. Mechanosensitive transcription factors involved in endothelin B receptor expression [J]. J Biol Chem, 2001, 276: 36999 - 37003.
- [19] Shiojima I, Walsh K. Role of Akt signaling in vascular homeostasis and angiogenesis [J]. Circ Res, 2002, 90: 1243 - 1250.
- [20] Kusaka G, Kimura H, Kusaka I, et al. Contribution of Src tyrosine kinase to cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage [J]. J Neurosurg, 2003, 99: 383 - 390.
- [21] Chang F, Steelman LS, Lee JT, et al. Signal transduction mediated by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway from cytokine receptors to transcription factors: potential targeting for therapeutic intervention [J]. Leukemia, 2003, 17: 1263 - 1293.
- [22] Henriksson M, Stenman E, Edvinsson L. Intracellular pathways involved in up-regulation of vascular endothelin type B receptors in cerebral arteries of the rat [J]. Stroke, 2003, 34: 1479 - 1483.
- [23] Schönwasser DC, Marais RM, Marshall CJ, et al. Activation of the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway by conventional, novel and atypical protein kinase C isoforms [J]. Mol Cell Biol, 1998, 18: 790 - 798.
- [24] Namura S, Iihara K, Takami S, et al. Intravenous administration of MEK inhibitor U0126 affords brain protection against forebrain ischemia and focal cerebral ischemia [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98: 11569 - 11574.