

ERK1/2 与 ROCK 对话调控对脑梗死后神经血管单元的影响

吕欣欣¹ 张瑞雪² 综述 唐吉友³ 审校

1. 泰山医学院, 山东省泰安市 271000

2. 山东大学, 山东省济南市 250000

3. 山东大学附属千佛山医院, 山东省济南市 250000

摘要: 神经保护是治疗脑梗死的重要方法之一, 目前对神经保护的认识已从单一神经元的保护提高到了对神经血管单元多成分保护的水平。脑缺血后一系列信号转导通路的调控进一步介导了缺血区脑细胞的损伤。在众多信号通路中, ERK1/2 和 ROCK 这两条信号通路因与细胞的增殖、分化及凋亡密切相关, 在脑梗死后神经细胞损伤机制中扮演着重要的角色。聚腺苷二磷酸核糖聚合酶 (PARP-1) 作为 ERK1/2 和 ROCK 共同的下游靶点蛋白, 是神经血管单元各成分中细胞死亡调控的关键效应蛋白。因此, 探讨 ERK1/2 和 ROCK 对其下游靶点蛋白 PARP-1 的调控机制, 对临床脑梗死的神经保护治疗具有重要的指导意义。

关键词: 脑梗死; 神经血管单元; 神经保护; 信号通路; 对话; 细胞外信号调节激酶 1/2; Rho 激酶; 聚腺苷二磷酸核糖转移酶-1

随着脑梗死发病率的急剧升高, 其预防和治疗越来越受到人们的高度重视。过去 30 年的基础和临床研究显示, 脑梗死后的治疗主要包括两条治疗策略^[1]: 一是“血管途径”, 主要致力于在缺血后 4.5 h 内溶栓恢复缺血区的血流; 二是“细胞途径”, 此途径是基于脑梗死后不同信号通路之间的相互作用, 防止其通过一系列下游效应分子而导致缺血区细胞的损害。“血管途径”是目前最常用且有效的治疗措施, 但不适用于超过治疗“时间窗”的脑梗死, 因此, “细胞途径”对防治脑梗死的进展和保护脑组织显得尤为重要。然而, 多年来无数神经保护措施却没有几个经得住临床实践的验证。近年来研究发现, 脑梗死后不但累及神经元, 而且累及神经胶质细胞、血脑屏障以及小胶质细胞和细胞外基质等, 即神经血管单元。因此, 尽早恢复神经血管单元的正常功能是治疗脑梗死的一个最有效的策略^[2], 但因脑梗死后神经血管单元损伤的分子和病理机制尚不清楚, 使脑保护至今没有真正有效的临床治疗措施。为此, 本文就急性脑梗死后神经血管单元中主要的两条信号调节通路即细胞外信号调节激酶 (extracellular signal-regulated kinases 1/2, ERK1/2) 和 Rho 激酶 (rho-associated coiled-coil-

forming kinase, ROCK) 以及与脑梗死后神经血管单元的关系做一简单的概述。

1 ERK1/2 与脑梗死

ERK1/2 是广泛存在于细胞内的一种信号调节激酶, 被磷酸化激活, 激活后参与细胞的增殖、生长和发育等生物学功能。众多研究发现, 脑缺血 ERK1/2 信号转导通路发生改变, 并且与神经细胞的生存和死亡相关。Sung 等^[3] 研究发现, 脑缺血后 24 h p-ERK 表达水平下降, Nicotinamide 通过上调 Raf-MEK-ERK 信号级联反应使下游蛋白分子磷酸化最终减少细胞凋亡, 缩小脑梗死体积, 提高神经细胞抗脑缺血的能力。另有研究发现, 瑞芬太尼 (remifentanyl)、右旋美托咪啶 (dexmedetomidine) 及槐定碱 (sophoridine) 分别在短暂局灶缺血再灌注模型和永久性脑缺血模型中上调 ERK1/2 的表达, 均能降低神经功能评分, 减轻脑水肿、神经坏死以及减少梗死体积^[4-6]。然而, Chen 等^[7] 研究发现, 芍药提取物芍药苷 (paeoniflorin, PF) 抑制缺血后血管平滑肌 (vascular smooth muscle cells, VSMC) 内膜增生, 从而降低缺血再灌注大鼠脑缺血损伤, 与降低 Ras/MEK/ERK 信号通路有关。另有研究证明脑缺血区 p-ERK 的水平增高, 应用 ERK1/2 阻断剂可

基金项目: 山东省科技发展计划项目 (2010GSF10244)

收稿日期: 2013-08-01; 修回日期: 2013-10-27

作者简介: 吕欣欣 (1987-), 女, 泰山医学院在读研究生, 主要从事脑血管病的基础与临床研究。

通讯作者: 唐吉友 (1963-), 男, 博士生导师, 主任医师, 主要从事脑血管病、癫痫、睡眠障碍的研究。

以减少卒中后细胞凋亡,降低促炎性因子的表达,减轻缺血后神经功能损伤^[8],这表明 ERK1/2 调控参与了缺血区神经血管单元的损伤。

ERK1/2 信号途径的激活对脑缺血有双重作用。一方面,ERK 通路的激活能增加炎症反应^[9,10],通过上调 IL-1 β 从而促进凋亡的发生;另一方面,通过上调抑制凋亡蛋白 Bcl-2 或阻滞促凋亡因子 Bad 抑制细胞凋亡。ERK1/2 的这种双重作用源于其细胞外刺激信号分子和细胞膜表面受体的多样性。氧化应激、炎症因子等激活 ERK1/2,加重脑梗死后神经血管单元的损害。但是,神经生长因子或者其它神经保护因子激活 ERK1/2 后,可以发挥神经保护作用,因此,在脑梗死治疗中,如何有效地调控 ERK1/2 的激活,保护神经血管单元,避免此通路激活后带来的损伤效应,是值得探讨的课题。

2 ROCK 与脑梗死后神经损伤

Rho 蛋白属于 Ras 家族中的一员,是小分子 GTP 酶,有 GDP-Rho 和 GTP-Rho 两种形式^[11]。ROCK 是 Rho 蛋白最重要的下游分子,与 Rho-GTP 结合后被激活。ROCK 激活后,影响肌动蛋白微丝骨架的构建,与细胞的增殖、迁移、趋化、黏附和凋亡有密切关系。有研究发现,在大鼠缺血再灌注后 RhoA 蛋白表达增高,给予 db-cAMP 激活磷酸激酶 A(PKA)后可降低 RhoA 的表达,促进神经轴突的生长及神经功能的修复^[12]。在急性脑缺血模型中,Rho 信号通路激活,使一氧化氮合酶(eNOS)的表达下降,而应用 ROCK 抑制剂法舒地尔后,能够上调 eNOS 表达及 NO 产生,NO 扩张血管、抑制血小板聚集以及改善缺血区供血,减少脑梗死面积,促进神经功能恢复。进一步研究发现在 eNOS 基因敲除小鼠中即使使用 ROCK 抑制剂也未出现神经保护作用,证明 ROCK 参与脑梗死后缺血区的损伤与调节 NO 表达有关^[13]。Yagita 等^[14]将 ROCK 底物 P-内收蛋白(P-adducin)作为评价 ROCK 活性的指标,结果发现缺血后 6 h P-adducin 在缺血区表达明显增加,在同一区域还观察到微循环障碍,应用法舒地尔后能够改善微循环,减少脑梗死面积,说明脑缺血后内皮细胞 ROCK 被激活并参与微循环障碍。

Rho/ROCK 信号通路还涉及急性缺血后的炎症反应,如细胞迁移、白细胞黏附、细胞间黏附分子及内皮通透性等。临床报道,急性缺血卒中患者多

核白细胞 ROCK 活性增强,这种炎症反应必然导致脑缺血后继发性神经损伤。也有学者认为 ROCK 信号通路参与血脑屏障的破坏^[15]。Rho 还通过不同下游分子激活核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B),后者通过调控多种基因的表达参与缺血后炎症反应和神经元凋亡,在缺血性脑损伤中起重要作用。

3 ERK1/2 和 ROCK 对话对脑梗死后神经血管单元的影响

3.1 ERK1/2 和 ROCK 信号通路的对话

脑梗死后 ERK1/2 和 ROCK 信号通路均参与细胞的增殖、凋亡、移动及炎症反应,那么 ERK1/2 和 ROCK 信号通路必然存在一定的交互作用。Zhao 等^[16]研究发现,ROCK 通过调节细胞周期蛋白和增殖细胞核抗原的表达可使体外培养的平滑肌细胞增殖,这一作用可以被 U0126 阻断,说明 ROCK 介导血管平滑肌的增殖与 ERK 密切相关。有实验显示,血管紧张素 II 诱导肠系膜上动脉的收缩和血小板生长因子(PDGF)介导恶性胶质瘤的增殖的过程都通过 ERK1/2 介导,这种作用均可以被 ROCK 阻断剂 Y-27632 阻断,推测 ROCK 可能是 ERK1/2 的上游分^[17,18]。还有研究证实尿激酶型纤溶酶原激活剂刺激肿瘤细胞的迁移,外力诱导人牙周膜成纤维细胞骨桥蛋白表达以及磷酸鞘氨醇(S1P)介导的鼠胚胎神经的生成都与 Rho/ROCK 和 Ras-ERK 信号通路的相互作用有关^[19-21]。

3.2 ERK 和 ROCK 共同的下游效应分子 PARP-1

聚腺苷酸二磷酸核糖转移酶-1(Poly(ADP-ribose) polymerase 1, PARP-1)是 ROCK 和 ERK1/2 的共同下游效应分子,存在于真核细胞核内,参与 DNA 损伤后的修复。研究表明,PARP-1 反馈下调 ERK1/2 的活性,促进细胞凋亡,在 N-甲基-D-亚硝基-L-亚硝基胍诱导人宫颈癌细胞中,PARP-1 激活,PAR 复合物聚集降低 ERK1/2 的激活,促进细胞凋亡,此作用可以被 PARP-1 阻断剂 PJ34 阻断^[22]。通过定点突变鉴别 PARP-1 基因上可能的 3 个位点 T368、S372 和 T373,发现其中 S372 和 T373 是 ERK1/2 直接磷酸化位点^[23],由此证明 ERK1/2 可以直接磷酸化 PARP-1 并使其激活,应用 ERK1/2 阻滞剂能够显著降低 PARP-1 的激活。尽管 Rho 是如何通过一系列下游分子作用 PARP-1 还不清楚,但是有研究显示,ROCK/caspase-3/

PARP-1 信号通路是介导心肌缺血再灌注损伤的重要通路。进一步推测 ERK1/2 和 ROCK 都可以通过调节 PARP-1 的激活使其发挥损伤或保护作用。

3.3 PARP-1 在脑梗死中的作用

脑缺血后,一系列 NO 自由基和超氧自由基引起 DNA 断裂,诱导 PARP-1 过度表达,进一步加重脑损伤,其机制可能是:① PARP-1 通过消耗 NAD^+ ,降低 ATP,导致细胞代谢所需能量匮乏促进细胞死亡。② PARP-1 催化 PAR 聚合物的生成,促进线粒体释放细胞凋亡诱导因子 (apoptosis-inducing factor, AIF) 并向细胞核转位引起细胞死亡。③ PARP-1 作为核转录因子 kappaB (NF- κ B) 和激活蛋白-1 (activator protein-1, AP-1) 的辅助因子,参与 NF- κ B 和 AP-1 调控的炎症基因表达,促进炎症反应加重细胞死亡^[24]。

脑缺血后过度激活 PARP-1 介导的细胞毒性存在于神经血管单元的各成分中,虽然刺激 PARP-1 激活的因子种类、发生的时间及作用机制不同,但最终导致神经血管单元各组成部分的功能紊乱及细胞毒性将直接或间接影响神经元的功能^[1]。进一步研究显示,用 Cilostazol 能阻断局灶性脑缺血大鼠大脑皮质缺血半暗带区 PARP-1 的激活,可以显著改善神经功能的评分,减少脑梗死面积^[25]。但也有研究发现,在 NDA^+ 充足的情况下,活化的 PARP-1 可通过 DNA 修复作用促进神经细胞存活,抑制 PARP-1 会使神经细胞对 DNA 损伤的敏感性增强而容易死亡^[26]。鉴于脑缺血后 PARP-1 对神经血管单元存在不同的影响机制,如何调控 PARP-1 的活性更有利于脑缺血后神经血管单元的保护有待于进一步研究。

4 ERK1/2 和 ROCK 信号通路对话对脑梗死后神经血管单元调控的意义

在脑梗死发生后,如何有效的保护神经血管单元是目前研究的焦点。Enzmann 等^[27]研究证实,多形核粒细胞 (polymorphonuclear granulocytes, PMN) 在缺血的早期并不侵入脑实质而是局限于血管腔及血管周围,所以早期控制脑损伤要高度重视血管及其间质而不是神经元,强调把神经血管单元看成一个协调统一的整体。ERK1/2 和 ROCK 这两条重要的信号通路是贯穿这个整体的网络,保证这两条信号通路协调一致正常工作,是神经血管单元发挥正常功能的基础。研究显示在脑梗死后 ERK1/2 和 ROCK 发生改变,那么干扰这些信号通路对减轻脑

梗死后脑组织损伤有效。ROCK 抑制剂 (法舒地尔) 能够很好的改善缺血的症状和神经功能,已经应用于临床并取得了一定的临床效果^[28]。但是,对脑梗死后神经血管单元的保护仍是目前临床治疗的难点,单一的阻滞 ROCK 的信号转导并不能阻断细胞 DNA 的损伤,起不到有效脑保护的作用。ERK1/2 阻滞剂 U0126 可以显著降低脑梗死面积,减少神经缺损功能评分^[8],但 ERK 功能的双重性,使我们不得不考虑不能用单一的阻断剂治疗脑梗死与脑梗死相关信号途径的相互调控更有利于神经细胞的保护和修复。这些研究都是从单一信号途径的激活或抑制对脑缺血的影响,未涉及不同信号通路之间的相互作用所造成神经组织的病理生理变化,脑梗死后 ERK1/2、ROCK 及 PARP-1 信号之间的平衡被打破,用单一的 ERK1/2、ROCK 或 PARP-1 抑制剂不能达到或实现它们功能的最佳状态,发挥其最佳脑保护的作用。因此,在脑梗死后不同阶段通过调控 ERK1/2 和 ROCK 的活性,使下游信号分子 PARP-1 的激活或灭活更有利于保护神经细胞以及促进神经功能的修复,为下一步从多个途径和靶点治疗脑梗死提供依据。

总之,脑梗死后的神经保护已从对神经元扩展到神经血管单元的保护,处于 ERK1/2 和 ROCK 下游的 PARP-1 是神经血管单元各成分中细胞死亡的关键效应分子,脑梗死能诱导缺血区神经血管单元各成分细胞核内 PARP-1 的激活,从而加重脑损害,而早期应用 PARP-1 抑制剂能减少脑梗死体积,但 PARP-1 具有双重作用和时间依赖性。如何通过上游信号通路调控 PARP-1 激活更有利于保护脑组织是将来研究的焦点。

参考文献

- [1] Moroni F, Chiarugi A. Post-ischemic brain damage: targeting PARP-1 within the ischemic neurovascular units as a realistic avenue to stroke treatment. *FEBS J*, 2009, 276(1): 36-45.
- [2] Zhang L, Zhang ZG, Chopp M. The neurovascular unit and combination treatment strategies for stroke. *Trends Pharmacol Sci*, 2012, 33(8): 415-422.
- [3] Sung JH, Kim MO, Koh PO. Nicotinamide Prevents the Down-Regulation of MEK/ERK/p90 RSK Signaling Cascade in Brain Ischemic Injury. *J Veterinar Med Sci*, 2012, 74(1): 35-41.
- [4] Jeong S, Kim SJ, Jeong C, et al. Neuroprotective effects of remifentanyl against transient focal cerebral ischemia in rats. *J*

- Neurosurg Anesthesiol, 2012, 24(1): 51-57.
- [5] Zhu YM, Wang CC, Chen L, et al. Both PI3K/Akt and ERK1/2 pathways participate in the protection by dexmedetomidine against transient focal cerebral ischemia/reperfusion injury in rats. Brain Res, 2013, 1494: 1-8.
- [6] Liu Z, He D, Zhang X, et al. Neuroprotective effect of early and short-time applying sophoridine in pMCAO rat brain: Down-regulated TRAF6 and up-regulated p-ERK1/2 expression, ameliorated brain infarction and edema. Brain Res Bull, 2012, 88(4): 379-384.
- [7] Chen YF, Wu KJ, Wood WG. Paeonia lactiflora Extract Attenuating Cerebral Ischemia and Arterial Intimal Hyperplasia Is Mediated by Paeoniflorin via Modulation of VSMC Migration and Ras/MEK/ERK Signaling Pathway. J Evid Based Complementary Altern Med, 2013, 2013: 1-12.
- [8] Wang ZQ, Chen XC, Yang GY, et al. U0126 prevents ERK pathway phosphorylation and interleukin-1 β mRNA production after cerebral ischemia. Chin Med Sci J, 2004, 19(4): 270-275.
- [9] Kaminska B. MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy—from molecular mechanisms to therapeutic benefits. Biochim Biophys Acta, 2005, 1754(1-2): 253-262.
- [10] Maddahi A, Edvinsson L. Cerebral ischemia induces microvascular pro-inflammatory cytokine expression via the MEK/ERK pathway. J Neuroinflammation, 2010, 7(1): 14.
- [11] Surma M, Wei L, Shi J. Rho kinase as a therapeutic target in cardiovascular disease. Future Cardiol, 2011, 7(5): 657-671.
- [12] Niu L, Zhou J, Huang Y, et al. db-Cyclic adenosine monophosphate promotes axon regeneration and motor function recovery in cerebral ischemia-reperfusion rats. Neurol India, 2010, 58(2): 195-200.
- [13] Rikitake Y, Kim HH, Huang Z, et al. Inhibition of Rho Kinase (ROCK) Leads to Increased Cerebral Blood Flow and Stroke Protection. Stroke, 2005, 36(10): 2251-2257.
- [14] Yagita Y, Kitagawa K, Sasaki T, et al. Rho-kinase activation in endothelial cells contributes to expansion of infarction after focal cerebral ischemia. J Neurosci Res, 2007, 85(11): 2460-2469.
- [15] Yamamoto M, Ramirez SH, Sato S, et al. Phosphorylation of Claudin-5 and Occludin by Rho Kinase in Brain Endothelial Cells. Am J Pathol, 2008, 172(2): 521-533.
- [16] Zhao Y, Lv M, Lin H, et al. Rho-associated protein kinase isoforms stimulate proliferation of vascular smooth muscle cells through ERK and induction of cyclin D1 and PCNA. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 432(3): 488-493.
- [17] Matrougui K, Tanko LB, Loufrani L, et al. Involvement of Rho-kinase and the actin filament network in angiotensin II-induced contraction and extracellular signal-regulated kinase activity in intact rat mesenteric resistance arteries. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2001, 21(8): 1288-1293.
- [18] Zohrabian VM, Forzani B, Chau Z, et al. Rho/ROCK and MAPK signaling pathways are involved in glioblastoma cell migration and proliferation. Anticancer Res, 2009, 29(1): 119-123.
- [19] Jo M. Cooperativity between the Ras-ERK and Rho-Rho Kinase Pathways in Urokinase-type Plasminogen Activator-stimulated Cell Migration. J Biol Chemistry, 2002, 277(14): 12479-12485.
- [20] Hong SY, Jeon YM, Lee HJ, et al. Activation of RhoA and FAK induces ERK-mediated osteopontin expression in mechanical force-subjected periodontal ligament fibroblasts. Mol Cell Biochem, 2009, 335(1-2): 263-272.
- [21] Harada J, Foley M, Moskowitz MA, et al. Sphingosine-1-phosphate induces proliferation and morphological changes of neural progenitor cells. J Neurochem, 2004, 88(4): 1026-1039.
- [22] éthier C, Labelle Y, Poirier GG. PARP-1-induced cell death through inhibition of the MEK/ERK pathway in MNNG-treated HeLa cells. Apoptosis, 2007, 12(11): 2037-2049.
- [23] Kauppinen TM. Direct phosphorylation and regulation of poly (ADP-ribose) polymerase-1 by extracellular signal-regulated kinases 1/2. Proc Nat Acad Sci, 2006, 103(18): 7136-7141.
- [24] 郑叶祥, 刘晨, 李智文. PARP-1 在脑缺血损伤中的作用及其对脑保护治疗意义. 海峡药学, 2011, 23(8): 12-15.
- [25] Lee JH, Park SY, Shin HK, et al. Poly (ADP-ribose) polymerase inhibition by cilostazol is implicated in the neuroprotective effect against focal cerebral ischemic infarct in rat. Brain Res, 2007, 1152: 182-190.
- [26] Nagayama T, Simon RP, Chen D, et al. Activation of poly (ADP-ribose) polymerase in the rat hippocampus may contribute to cellular recovery following sublethal transient global ischemia. J Neurochem, 2000, 74(4): 1636-1645.
- [27] Enzmann G, Mysiorek C, Gorina R, et al. The neurovascular unit as a selective barrier to polymorphonuclear granulocyte (PMN) infiltration into the brain after ischemic injury. Acta Neuropathol, 2012, 125(3): 395-412.
- [28] Yamashita K, Kotani Y, Nakajima Y, et al. Fasudil, a Rho kinase (ROCK) inhibitor, protects against ischemic neuronal damage in vitro and in vivo by acting directly on neurons. Brain Res, 2007, 1154: 215-224.