

· 论著 ·

细胞外信号调节激酶 1/2 与 Rho 激酶作用
对脑梗死后神经血管单元的影响吕欣欣¹, 张瑞雪², 唐吉友³

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神经内科, 山东省济南市 250000

摘要:目的 研究脑梗死后细胞外信号调节激酶 1/2 (ERK_{1/2}) 和 Rho 激酶 (ROCK) 两条信号通路通过相互作用激活下游效应分子多聚 ADP 核糖聚合酶-1 (PARP-1) 来调控脑梗死后神经血管单元。方法 该实验分为两个部分: 35 只 SD 大鼠随机分为假手术组 (S) 和脑梗死组 (M), 脑梗死组根据脑梗死后时间不同又分为 1 h、3 h、12 h、24 h、3 d 和 7 d 六个亚组, 分别采用 western blot 检测假手术组及脑梗死组各亚组 ERK_{1/2}、ROCK 蛋白表达水平。35 只 SD 大鼠随机分为对照组、模型组、U0126 组、Fasudil 组和 U0126 + Fasudil 组, 分别检测神经功能、脑梗死面积以及 ROCK、ERK_{1/2} 及 PARP-1 的蛋白表达水平。结果 假手术组各个时间点总 ERK_{1/2} 和 p-ERK_{1/2} 表达相同。脑梗死组总 ERK_{1/2} 表达不变, p-ERK_{1/2} 表达先降低后升高, 24 h 时达最高峰。脑梗死组 ROCK 的表达随时间的延长逐渐升高, 12 h 表达达高峰, 随后表达下降。模型组与对照组相比, p-ERK_{1/2}、ROCK 及 PARP-1 的表达显著提高 ($P < 0.05$); 与模型组相比, Fasudil 组 p-ERK_{1/2} 的表达下降 ($P < 0.05$), 而 U0126 组 ROCK 表达无变化 ($P > 0.05$), Fasudil 组、U0126 组及 Fasudil 组 + U0126 组 PARP-1 的表达显著下降 ($P < 0.05$), 其中以 U0126 + Fasudil 组下降最为显著。结论 ERK_{1/2} 和 ROCK 都参与了脑梗死后脑组织的损伤, ERK_{1/2} 可能作为 ROCK 的下游效应分子, 与 ROCK 共同调节 PARP-1 的表达进而调控脑梗死后神经血管单元的存亡。

关键词: 脑梗死; 神经保护; 神经血管单元; 细胞外信号调节激酶 1/2; Rho 激酶; 多聚 ADP 核糖聚合酶-1; 大鼠

Regulatory effect of interaction between extracellular signal-regulated kinase 1/2 and Rho-associated kinase on neurovascular unit after cerebral infarction

LV Xin-Xin, ZHANG Rui-Xue, TANG Ji-You. Taishan Medical College, Taian, Shandong 271000, China

Corresponding author: TANG Ji-You, Email: tangjiyou@sohu.com.

Abstract: Objective To investigate the regulatory effect of interaction between extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK_{1/2}) and Rho-associated kinase (ROCK) on the neurovascular unit by activating poly (ADP ribose) polymerase-1 (PARP-1) after cerebral infarction. **Methods** Thirty-five Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into sham-operation group and middle cerebral artery occlusion (MCAO) group. Each group was further divided into 1 hrs, 3 hrs, 12 hrs, 24 hrs, 3 days, and 7 days subgroups according to the time points when examination was performed after operation. The protein expression levels of ERK_{1/2} and ROCK were measured by Western blot. Another 35 SD rats were randomly divided into control group, model group, Fasudil group, U0126 group, and Fasudil + U0126 group, and neurological function, infarct area, and the protein expression levels of ERK_{1/2}, ROCK, and PARP-1 were measured. **Results** For the sham-operation group, the expression of total ERK_{1/2} and phosphorylated ERK_{1/2} (p-ERK_{1/2}) remained unchanged over time. For the MCAO group, the expression of total ERK_{1/2} remained unchanged, while the expression of p-ERK_{1/2} first decreased, then increased, and reached the peak level at 24 hrs after operation. The ROCK expression of MCAO group gradually increased over time, reached the peak level at 12 hrs, and then fell. Compared with the control group, the model group had significantly increased expression of p-ERK_{1/2}, ROCK, and PARP-1 ($P < 0.05$). Compared with the model group, the Fasudil group

收稿日期: 2014-03-04; 修回日期: 2014-05-27

作者简介: 吕欣欣 (1987-), 女, 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。Email: tangjiyou@sohu.com.

had significantly reduced expression of p-ERK_{1/2} ($P < 0.05$), the U0126 group had unchanged expression of ROCK ($P > 0.05$), and the Fasudil group, U0126 group, and Fasudil + U0126 group, especially Fasudil + U0126 group, had significantly reduced expression of PARP-1 ($P < 0.05$). **Conclusions** Both ERK_{1/2} and ROCK are involved in the brain damage after cerebral infarction. ERK_{1/2}, as a downstream effective molecule of ROCK, may regulate the expression of PARP-1 together with ROCK and thus adjust the survival of neurovascular unit after cerebral infarction.

Key words: cerebral infarction; neuroprotection; neurovascular unit; extracellular signal-regulated kinase 1/2; Rho-associated kinase; poly (ADP ribose) polymerase-1; rats

脑梗死因具有极高的致死率和致残率已成为研究的焦点。目前,脑梗死的治疗的主要措施是静脉溶栓恢复缺血区的血流^[1],因溶栓存在严格的时间窗限制和溶栓后再出血的风险,所以临床应用中受到一定的限制,因此迫切需要寻求一种更有效的治疗脑梗死的方法。以细胞信号通路为基础的神经保护是一种治疗脑梗死的有效措施,Rho 激酶 (Rho-associated kinase, ROCK) 和细胞外信号调节激酶 1/2 (extracellular signal regulated kinase 1/2, ERK_{1/2}) 介导的信号通路通过参与调节脑梗死后神经细胞的生长,在脑梗死后神经保护中发挥重要的作用。聚腺苷二磷酸核糖聚合酶-1 (poly ADP ribose polymerase-1, PARP-1) 作为 ERK_{1/2} 和 ROCK 共同的下游靶点蛋白,是神经血管单元各成分中细胞生长调控的关键效应蛋白。因此,探讨 ERK_{1/2}、ROCK 对其下游靶点蛋白 PARP-1 的表达的调控及其具体机制,对临床脑梗死的神经保护治疗具有重要的指导意义。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物与分组 健康雄性 SD 大鼠 (体重 250 ~ 300 g), 由山东中医药动物实验中心提供。本实验分两个部分,一、SD 雄性大鼠 35 只,体重 250 ~ 300 g,随机分为假手术组 (S),脑梗死组 (M)。各组根据不同的时间点分为 1 h、3 h、12 h、24 h、3 d 和 7 d 共 6 个亚组,每组 5 只。二、SPF 级雄性 SD 大鼠 35 只,随机分为对照组 (S),模型组 (M),U0126 组 (U),Fasudil 组 (F),U0126 + Fasudil (U + F) 组,每组 8 只大鼠。

1.1.2 主要试剂 兔抗大鼠多克隆磷酸化 ERK_{1/2} 抗体、兔抗大鼠多克隆总 ERK_{1/2} 抗体 (cell signaling, USA), 山羊抗大鼠多克隆 ROCK 抗体 (Santa cruz, USA), 兔抗大鼠多克隆 PARP-1 抗体 (abcam, Britain), ERK_{1/2} 受体阻断剂 U0126 (selleck, USA), ROCK 阻断剂 Fasudil (法舒地尔,碧云天生物有限公司),TTC 染色剂 (sigma, USA)。

1.2 方法

1.2.1 大脑中动脉模型的制作 雄性 SD 大鼠,体重约 280 ~ 300 g,10% 水合氯醛 0.3 ml/kg 腹腔注射麻醉。根据 Zea-longa 改良线栓法^[2]制作右侧大脑中动脉缺血模型:依此分离颈总、颈内及颈外动脉,结扎颈外动脉及颈总动脉近心端,动脉夹夹闭颈内动脉远端,一根头端沾有硅胶的鱼线从颈总动脉近分叉处缓慢插入颈内动脉,直到略感阻力,即大脑中动脉和大脑前动脉分叉处,进线 18 ± 0.5 mm。整个实验保持大鼠体温 37 ± 0.5 °C。对照组进行相同手术,但不插线,其余步骤同制作大脑中动脉模型。

1.2.2 干预措施 对照组、模型组、U0126 组、Fasudil 组、U0126 + Fasudil 组分别在模型制作前 30 min 及造模后 12 h 给予大鼠尾静脉注射 DMSO、DMSO、ERK_{1/2} 抑制剂 U0126 (30 mg/kg ^[3])、ROCK 抑制剂 Fasudil (10 mg/Kg ^[4])、联合应用抑制剂 U0126 + Fasudil。

1.2.3 神经功能评分 术后 24 h 进行大鼠神经功能评分,依据评分标准^[2]:0 分:无神经功能缺损;1 分:提尾时,大鼠脑梗死对侧 (左侧) 前爪不能伸展;2 分:对侧前爪 (左侧) 抓地力下降;3 分:大鼠自发向跟各方向转圈,提尾时向对侧 (左侧) 转圈;4 分:大鼠自发向对侧 (左侧) 转圈;5 分:大鼠昏迷或死亡。

1.2.4 TTC 染色 大鼠行神经功能评分后,在 10% 的水合氯醛麻醉下断头取脑, -20 °C 冰箱冷冻 10 min 后连续冠状切片 (厚 2.0 mm, 6 片),TTC (2%, 由 1% PBS 配制) 37 °C 恒温箱中避光染色 30 min 后置于多聚甲醛溶液中固定 24 h,切片在蓝色背景下进行正反两面拍照, image-plus 图像处理软件计算脑梗死面积。

1.2.5 western blot 检测 评分后断头取脑,分离右侧大脑皮质,取 100 mg 大脑皮质溶解于 1 ml RIPA (细胞裂解液) + 10 μl PMSF (蛋白酶抑制剂)

(碧云天生物有限公司, 中国) 混合溶液中, 然后碾磨、离心、取上清、测蛋白浓度 (蛋白浓度测定盒 (BCA), 碧云天生物有限公司, 中国)。蛋白浑浊液和上样缓冲液按 5:1 混合后 95℃ 变性 5 min, 取 50 μg 蛋白样品上样, 凝胶电泳、280 mA 恒流下转移到 PVDF 膜上、在 5% 脱脂奶粉中封闭 1 h, 然后加一抗 [抗磷酸化 ERK_{1/2} (1:1000)、总 ERK_{1/2} (1:1000)、ROCK (1:200)、PARP-1 (1:200)、GAPDH (1:1000) 抗体] 孵育 4℃ 过夜, 二抗 (1:5000) 常温孵育 1 h, ECL (Millipore, USA) 发光试剂盒检测蛋白浓度, Image J 图像处理软件分析灰度值。

1.3 统计学分析

计量资料用平均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析, 多组间比较采用单因素方差分析, 两组间比较应用 LSD-Post Hoc 检验。P < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 脑梗死后各时间点 ERK_{1/2} 和 ROCK 在缺血侧大脑皮质的表达变化

脑梗死后各时间点的总 ERK_{1/2} 表达不变, 而磷酸化的 ERK_{1/2} (p-ERK_{1/2}) 随着时间的延长表达逐渐升高, 24 h 时达最高峰 (P < 0.01), 随后 ERK_{1/2} 的磷酸化水平逐渐降低。与假手术组相应时间点比较 (由于假手术组各亚组蛋白表达相同, 下面图 1 中用 S 组表示假手术组各个时间点蛋白水平), 脑梗死组 1 h、3 h p-ERK_{1/2} 的活性显著降低 (P < 0.05), 12 h、24 h ERK_{1/2} 的磷酸化水平明显高于假手术组 (P < 0.05), 24 h 磷酸化水平脑梗死后 3 d 和 7 d p-ERK_{1/2} 蛋白的水平仍高于假手术组 (P < 0.05)。见图 1、图 2。

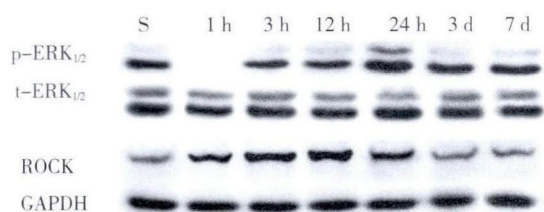


图 1 脑梗死后不同时间点 ERK_{1/2} 和 ROCK 的表达变化

ROCK Western blot 结果显示: 脑梗死后 ROCK 的表达逐渐升高, 12 h 表达达高峰, 随后表达下降。与假手术组相比, 3 h、12 h 组 ROCK 水平明显升高 (P < 0.05), 12 h 组 ROCK 的表达最高 (P < 0.05), 脑梗死 24 h 组 ROCK 表达仍高于对照组

(P < 0.05), 脑梗死 1 h、3 d 及 7 d 组 ROCK 蛋白的表达同对照组相比无统计意义 (P > 0.05)。

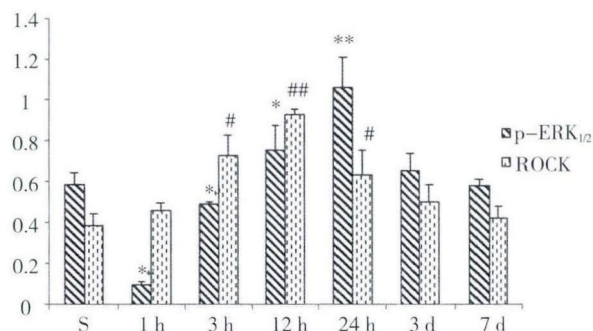


图 2 脑梗死后不同时间点 ERK_{1/2} 和 ROCK 的表达变化。* 和 ** 为与对照组相比, p-ERK_{1/2} 的表达先降低后升高再降低 (P < 0.05; P < 0.01), ROCK 的表达先升高后降低 (# P < 0.05; ## P < 0.01)。

2.2 脑梗死后 24 h 不同组间神经功能评分

脑梗死后 24 h 神经功能评分, 与对照组相比, 模型组、U0126 组、Fasudil 组及 U0126 + Fasudil 神经功能评分增加, 有统计学意义 (P < 0.05)。与模型组相比, U0126 组及 Fasudil 组神经功能评分降低 (P < 0.05; P < 0.05), U0126 + Fasudil 组神经功能评分明显降低 (P < 0.01)。与 U0126 组或 Fasudil 组相比, U0126 + Fasudil 组神经功能评分降低具有统计学意义 (P < 0.05)。见表 1。

表 1 各组大鼠神经功能缺损评分 ($\bar{x} \pm s$; n = 8)

	S	M	F	U	U + F
神经功能评分	0	2.6 ± 0.5 [#]	1.9 ± 0.6 ^{**}	2.1 ± 0.6 ^{**}	1.4 ± 0.5 ^{**+*}

注: # 为与对照组相比, P < 0.05; * 为与模型组相比, P < 0.05; ** 为与模型组相比, P < 0.01; + 为与 F 相比, P < 0.05; ^Δ 为与 U 组相比, P < 0.05

2.3 脑梗死面积

脑梗死面积的测定结果显示, 对照组染色未见脑梗死; 模型组脑梗死面积占整个脑组织面积比例为 26.6 ± 1.5; 与模型组相比, U0126 组、Fasudil 组脑梗死面积较模型组明显减小 (P < 0.05), 分别为 23.1 ± 1.3 和 22.6 ± 1.7; U0126 + Fasudil 组脑梗死面积为 14.6 ± 0.9, 显著低于模型组 (P < 0.05)、U0126 组 (P < 0.05) 及 Fasudil 组 (P < 0.05)。见图 3、图 4。

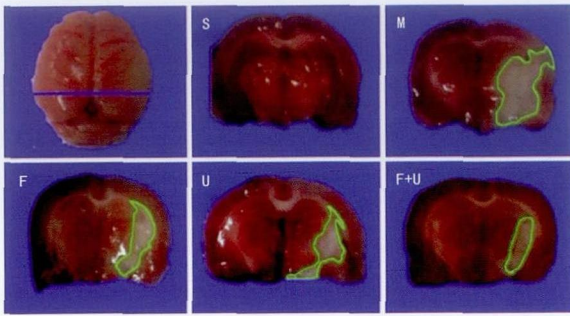


图3 TTC染色示,红色为正常组织,白色为梗死部分。

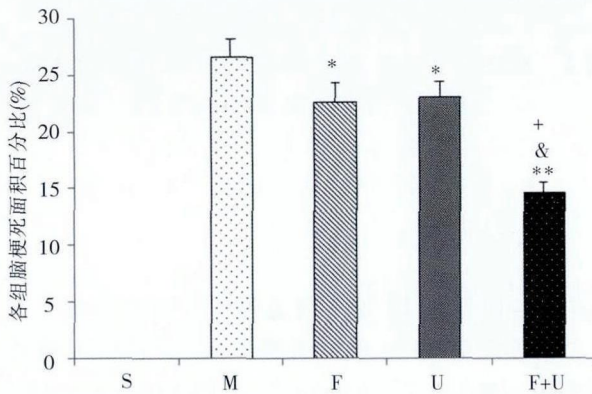


图4 各组脑梗死面积百分比比较。*和**为与MCAO组相比, $P < 0.05$, $P < 0.01$; +为与Fasudil组相比, $P < 0.05$; &为与U0126组相比, $P < 0.05$ 。

2.4 U0126、Fasudil对脑梗死后p-ERK_{1/2}表达的影响

脑梗后24h模型组p-ERK_{1/2}表达与对照组相比明显增加($P < 0.01$); Fasudil组p-ERK_{1/2}的表达较模型组下降,仍高于对照组($P < 0.05$); U0126组p-ERK_{1/2}的表达较模型组显著下降($P < 0.05$),与对照组相当($P > 0.05$); U0126 + Fasudil组与对照组相比,p-ERK_{1/2}的表达显著减低($P < 0.05$)。见图5、图6。



图5 U0126及Fasudil对脑梗死后p-ERK_{1/2}表达的影响。

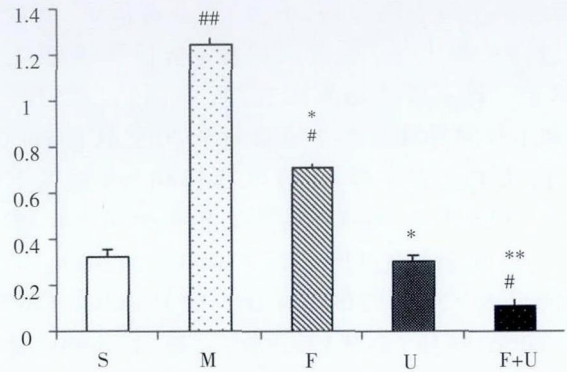


图6 与S组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 与MCAO组相比, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ 。

2.5 U0126及Fasudil对脑梗死后ROCK表达的影响

与对照组相比,模型组ROCK的表达上升($P < 0.05$);应用Fasudil后,ROCK的表达显著降低,低于对照组($P < 0.05$); U0126组ROCK的表达与模型组相比差异无统计学意义($P > 0.05$); Fasudil + U0126组ROCK的表达与模型组相比明显降低($P < 0.05$),与Fasudil组相比差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图7、图8。

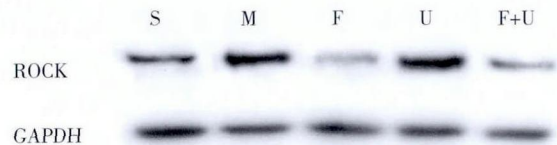


图7 U0126及Fasudil对脑梗死后ROCK表达的影响。

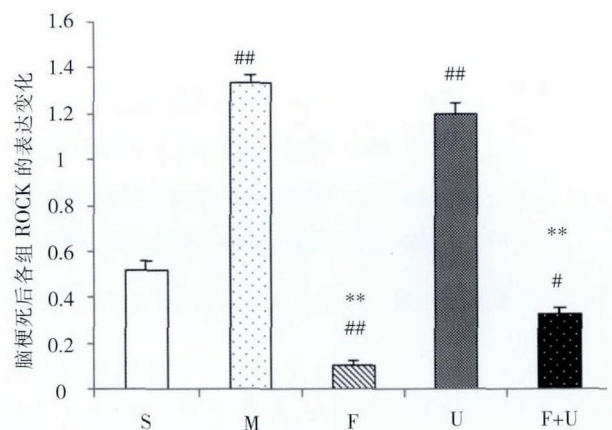


图8 U0126及Fasudil对脑梗死后ROCK表达的影响。#和##为与S组相比, $P < 0.05$, $P < 0.01$; **和*为与MCAO组相比, $P < 0.01$, $P < 0.05$ 。

2.6 U0126 及 Fasudil 对脑梗死后 PARP-1 表达的影响

脑梗后 24 h 模型组 PARP-1 的表达量增多,与对照组相比显著提高 ($P < 0.05$); Fasudil 组及 U0126 组与模型组相比, PARP-1 的表达均降低 ($P < 0.05$, $P < 0.05$); Fasudil + U0126 组 PARP-1 的表达量最低,与单独应用 Fasudil 或 U0126 组相比有显著差异 ($P < 0.05$)。见图 9、图 10。

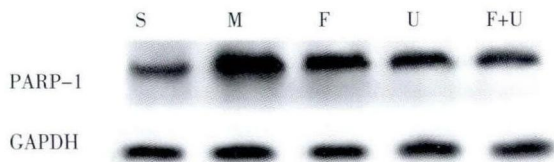


图 9 U0126 及 Fasudil 对脑梗死后 PARP-1 表达的影响。

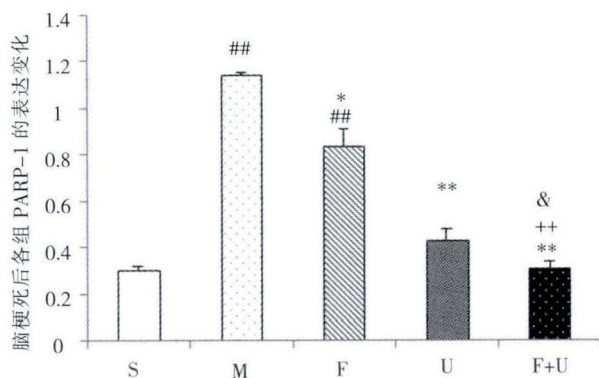


图 10 U0126 及 Fasudil 对脑梗死后 PARP-1 表达的影响。* 和 ** 为与 S 组相比, $P < 0.05$, $P < 0.01$; ** 和 * 为与 MCAO 组相比, $P < 0.01$, $P < 0.05$; ++ 为与 Fasudil 组相比, $P < 0.01$; & 为与 U0126 组相比, $P < 0.05$ 。

3 讨论

ERK_{1/2} 是细胞内重要的信号调节激酶,参与细胞的生长、增殖及分化过程,并且在中枢神经系统中广泛表达,调节神经细胞对外界刺激信号的反应。ERK_{1/2} 激活具有双重作用,既能够调节细胞生长,也可以诱导细胞死亡^[5]。一方面 ERK_{1/2} 通过介导基质金属蛋白酶 (MMP-9) 和组织蛋白酶组织抑制因子 (TIMP-1) 及炎症因子的表达,加重脑缺血损伤^[3,6,7]。另有研究表明槐定碱 (sophoridine) 及 Dex 能够上调 ERK_{1/2} 的表达进而减轻脑水肿、神经坏死以及减少梗死体积^[8,9]。我们的研究采用永久性大脑中动脉缺血模型,结果显示, p-ERK_{1/2} 的表

达在脑梗死早期下降,脑梗死后 24 h 明显增加, U0126 能够阻断 p-ERK_{1/2} 的激活,降低脑梗死面积,改善神经功能。由此我们推断在脑梗死早期 ERK_{1/2} 的表达上调,有助于保护脑缺血急性期神经功能损伤,在脑梗死后期, p-ERK_{1/2} 的过表达反而加重神经功能损伤,因此阻断此通路对脑梗死有保护意义。

Rho/ROCK 信号通路通过调节细胞肌动蛋白微丝骨架的聚合状态,调控细胞黏附、迁移、增殖与凋亡。前期实验发现缺血后 6 h ROCK 底物 P-内收蛋白 (P-adducin) 在缺血区表达明显增加^[10]。RhoA 蛋白破坏轴突生长锥,损伤神经的恢复^[11]。ROCK 通过降低一氧化氮合酶 (eNOS) 的表达影响血管舒张^[12]、调节急性缺血后的炎症反应、破坏血脑屏障^[13] 参与脑梗死的发生和发展过程。我们的实验显示,脑梗死后 ROCK 的表达升高,在脑梗死后 12 h ROCK 的表达达高峰,持续一段时间后下降,可能因为我们的实验采用的是永久性脑梗死模型,所以 ROCK 表达变化在时间上存在一定的差异,本实验应用 ROCK 阻断剂,显著降低神经功能损伤,与之前的研究相一致^[4,12,14]。ROCK 通过以上多条途径参与脑梗死后神经血管的损伤,因此,早期应用 ROCK 阻断剂对脑梗死的治疗有一定的临床意义。

ERK_{1/2} 和 ROCK 这两条信号通路同时参与地塞米松诱导去甲肾上腺素介导的血管平滑肌收缩、前列环素 PGE₂ 调节细胞表面趋化因子 7 抗体表达介导人类单核细胞的迁移^[15,16]。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 ERK_{1/2} 介导,这种作用均可以被 ROCK 阻断剂 Y-27632 阻断,推测 ROCK 可能是 ERK_{1/2} 的上游分^[17,18]。我们的研究也证明了 ERK_{1/2} 很可能作为 ROCK 的下游效应分子,参与到脑梗死后信号通路的调控。

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,通过消耗 NAD⁺ 和促进线粒体释放细胞凋亡诱导因子 (apoptosis-inducing factor, AIF) 及调控的炎症基因表达促进细胞死亡。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^[19]。抑制缺血半暗带区 PARP-1 的激活,可以显著减少脑梗死面积,改善神经功能^[20]。本研究发现:ERK_{1/2} 阻断剂及 ROCK 阻断剂都能够降低 PARP-1 的表达,减少脑梗死面积,提高神经功能评分,说明 ERK_{1/2} 和 ROCK 这两条信号通路都通过 PARP-1 发挥脑梗死后的调控作用。并且已有研究显示 PARP-1 上有 ERK_{1/2} 直接磷酸化位点^[21],关于 ROCK 如何通过 PARP-1 发挥作用需进一步研究。

总之,脑缺血后,ERK_{1/2} 和 ROCK 通过介导炎症因子的激活、细胞因子诱导的细胞外基质蛋白酶表达等途径,导致包括神经元、血脑屏障、胶质细胞、细胞外基质等结构的神经血管单元损伤,同时 ERK_{1/2} 作为 ROCK 的下游效应分子,与 ROCK 共同调节 PARP-1 的表达进而调控脑梗死后神经血管单元的存亡。

参 考 文 献

- [1] Montaño A, Staff I, McCullough LD, et al. Community implementation of intravenous thrombolysis for acute ischemic stroke in the 3 to 4.5 hour window. *Am J Emerg Med*, 2013, 31(12): 1707-1709.
- [2] Menzies SA, Hoff JT, Betz AL. Middle cerebral artery occlusion in rats: a neurological and pathological evaluation of a reproducible model. *Neurosurgery*, 1992, 31(1): 100-106.
- [3] Maddahi A, Chen Q, Edvinsson L, et al. Enhanced cerebrovascular expression of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 via the MEK/ERK pathway during cerebral ischemia in the rat. *BMC Neurosci*, 2009, 10(11): 56-68.
- [4] 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.
- [5] Sawe N, Steinberg G, Zhao H. Dual roles of the MAPK/ERK_{1/2} cell signaling pathway after stroke. *J Neurosci Res*, 2008, 86(8): 1659-1669.
- [6] Maddahi A, Edvinsson L. Cerebral ischemia induces microvascular pro-inflammatory cytokine expression via the MEK/ERK pathway. *J Neuroinflammation*, 2010, 7(1): 14.
- [7] 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.
- [8] 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-ERK_{1/2} expression, ameliorated brain infarction and edema. *Brain Res Bull*, 2012, 88(4): 379-384.
- [9] Zhu YM, Wang CC, Chen L, et al. Both PI3K/Akt and ERK_{1/2} pathways participate in the protection by dexmedetomidine against transient focal cerebral ischemia/reperfusion injury in rats. *Brain Res*, 2013, 1494: 1-8.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] Rikitake Y, Kim H H, Huang Z, et al. Inhibition of Rho Kinase (ROCK) Leads to Increased Cerebral Blood Flow and Stroke Protection. *Stroke*, 2005, 36(10): 2251-2257.
- [13] 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.
- [14] Shin HK, Salomone S, Ayata C. Targeting cerebrovascular Rho-kinase in stroke. *Expert Opin Ther Targets*, 2008, 12(12): 1547-1564.
- [15] Zhang T, Shi WL, Tasker JG, et al. Dexamethasone induces rapid promotion of norepinephrine-mediated vascular smooth muscle cell contraction. *Mol Med Rep*, 2013, 7(2): 549-554.
- [16] Allaire MA, Dumais N. Involvement of the MAPK and RhoA/ROCK pathways in PGE2-mediated CCR7-dependent monocyte migration. *Immunol Lett*, 2012, 146(1-2): 70-73.
- [17] 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.
- [18] Jo M. Cooperativity between the Ras-ERK and Rho-Rho Kinase Pathways in Urokinase-type Plasminogen Activator-stimulated Cell Migration. *J Biol Chem*, 2002, 277(14): 12479-12485.
- [19] 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.
- [20] 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.
- [21] 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.