

# Rho 激酶及其抑制剂在出血性脑血管疾病研究中相关进展

李丽敏<sup>1</sup> 蒋萍<sup>1</sup> 综述 赵迎春<sup>1</sup> 周海燕<sup>2</sup> 审校

1. 南京医科大学附属上海松江中心医院神经内科,上海市 201600

2. 上海交通大学医学院附属瑞金医院神经内科,上海市 200025

**摘要:** Rho 激酶是鸟苷酸结合调节蛋白 Rho 的主要效应底物,在细胞活动中具有重要的调节作用,如细胞迁移和增殖、细胞收缩等。Rho 激酶与出血性脑血管病后继发脑损伤及脑血管痉挛的发生相关,而 Rho 激酶抑制剂可有效减轻脑出血后脑水肿、炎症反应及神经细胞凋亡,促进神经功能恢复,对蛛网膜下腔出血后脑血管痉挛具有神经保护作用。Rho 激酶抑制剂为出血性脑血管病的药物治疗开辟了新途径。

**关键词:** Rho 激酶/Rho 激酶抑制剂;法舒地尔;脑出血,蛛网膜下腔出血;脑血管痉挛;神经保护

Rho 激酶最初是作为小三磷酸鸟苷 (guanosine triphosphate, GTP) 结合蛋白 Rho 的第一个下游效应物于 1996 年被发现<sup>[1]</sup>,它广泛分布于哺乳类动物的组织细胞中,参与多种细胞生理和病理过程,包括细胞增殖迁移、细胞收缩、胞质分裂、细胞生长和凋亡、炎症反应、外伤、缺血、肿瘤、变性等<sup>[2]</sup>。最近的研究表明它在出血性脑血管病的发生发展中起关键作用<sup>[3-5]</sup>。Rho 激酶抑制剂通过抑制 Rho 激酶活性,可抑制炎症反应、抗血管痉挛及促进神经损伤后修复,具有神经保护作用<sup>[5-7]</sup>。本文就 Rho 激酶及其抑制剂在出血性脑血管病研究中的相关进展作一综述。

## 1 Rho 激酶及其抑制剂

### 1.1 Rho 激酶结构

Rho 激酶,又称 Rho 相关激酶、Rho 相关卷曲螺旋形成蛋白激酶 (Rho associated coiled-coil forming protein kinase, ROCK),是小 GTP 结合蛋白 Rho 的主要效应底物,为一种分子量为 160 kDa 的丝氨酸/苏氨酸 (Ser/Thr) 蛋白激酶,它广泛分布于哺乳类动物的组织细胞中<sup>[1]</sup>。ROCK 有两种亚型,包括 ROCK-I (ROK $\beta$ /p160ROCK) 和 ROCK-II (ROK $\alpha$ )。其中 ROCK-I 优先在非神经组织中表达,如肺、肝、脾、肾和睾丸,而 ROCK-II 主要富集在脑和心脏组织<sup>[8]</sup>。Rho 激酶/ROCK 包括一个 N 末端激酶结构域或催化域 (CD),一个卷曲螺旋结构域如 Rho 结合结构域 (RBD),和一个 C 末端富含半胱氨酸的 PH 结构域。该结构与其活性状态的转化密

切相关,螺旋区的 C 端与 GTP 相互作用,使 Rho 激酶的磷酸转移酶活性激活,呈现活化状态;而若与二磷酸鸟苷 (guanosine diphosphate, GDP) 结合时则失去活性。这两种状态的相互转换,起到向下游传递信号的分子开关作用。

### 1.2 Rho 激酶的功能

自 1985 年首次发现 Rho 基因,1996 年鉴别出 Rho 的下游效应器——Rho 激酶以来,对 Rho 基因产物及其信号传导通路进行了广泛研究。Rho 激酶在不同的细胞功能中起着重要作用,如细胞迁移和增殖,细胞收缩,胞质分裂,基因表达调控,肌动蛋白细胞骨架重建,细胞黏附,抑制神经元轴突的伸长,细胞生长和凋亡<sup>[9]</sup>;其在多种病理因素如出血、缺血、炎症、肿瘤、变性等损伤中均起重要作用;Rho 激酶已被证明在核激活因子 (NF- $\kappa$ B) 和肿瘤坏死因子 (TNF) 等多种炎症介质参与的脑出血后炎症反应中起重要的作用<sup>[10]</sup>。目前对其可能作用机制已有部分研究结论。Shinokawa 等<sup>[11]</sup>研究发现 Rho 激酶参与肌球蛋白轻链的磷酸化调控是 Rho 激酶信号通路的经典途径。它使肌球蛋白轻链磷酸酶失活,血管痉挛,促进炎症因子的产生及细胞凋亡,使神经突触裂解,抑制内皮型一氧化氮合酶 (eNOS) 的产生及其表达<sup>[11,12]</sup>。Rho 激酶通过磷酸化一系列下游目标物发挥生物学功能,如肌球蛋白轻链 (MLC)、LIMK (Lim-1/1 Isl-1 Mec-3 kinase)、内收蛋白 (adducin)、钙调节蛋白 (calponin)、波形蛋白 (vimentin)、ERM (ezrin/radixin/moesin) 家

收稿日期:2015-05-14;修回日期:2015-08-03

作者简介:李丽敏(1986-),女,在读研究生,主要从事脑血管病研究。

通讯作者:赵迎春(1965-),男,教授,主任医师,研究生导师,主要从事脑血管病和帕金森病研究。Email: zhaoyingchun9077@163.com。

族蛋白等<sup>[13]</sup>。

### 1.3 Rho 激酶抑制剂功能及作用机制

到目前为止,发现的 Rho 激酶抑制剂均为小分子有机化合物,Fasudil 和 Y-27632 是最早发现的小分子 Rho 激酶抑制剂<sup>[14]</sup>,法舒地尔作为一种新型 Rho 激酶抑制剂,是目前唯一一种应用于临床的 Rho 激酶抑制剂,1995 年首先在日本被用来防治蛛网膜下腔出血后的脑血管痉挛,而其他 Rho 激酶抑制剂如 Y-27632、H-1077、H-1152 等仅限于实验研究。Y-27632、HA-1077 等可以与 ATP 以竞争的方式特异性抑制 Rho 激酶的活性,它们与 ATP 竞争 Rho 激酶催化区域的 ATP 结合位点,从而抑制 Rho 激酶的活性<sup>[15]</sup>。通过抑制磷酸化过程起到下列作用:①抑制炎症细胞的迁移和浸润,减少炎症介质的产生,减轻炎症反应损伤;②扩张痉挛的血管,增加血流量,改善缺血区循环;③促进一氧化氮合酶及其表达,促进 NO 的合成,下调纤溶酶原激活剂抑制物-1 表达,抑制平滑肌增生,减少氧自由基形成,并可清除氧自由基<sup>[16]</sup>;④促使神经轴突及神经元再生,促进神经损伤后修复。法舒地尔是治疗脑血管痉挛的一种强效血管扩张药,可通过抑制 Rho 激酶系统而解除血管痉挛,并且还能在无钙离子的情况下,抑制肾上腺素能受体激活导致的血管痉挛<sup>[17]</sup>。目前 Rho 激酶抑制剂临床应用范围很广,如神经系统疾病、心血管系统疾病、肿瘤等。在神经系统疾病中,尤其在蛛网膜下腔出血及脑出血方面研究较多。

## 2 Rho 激酶抑制剂与出血性脑血管病

### 2.1 Rho 激酶抑制剂与蛛网膜下腔出血

目前蛛网膜下腔出血(subarachnoid hemorrhage, SAH)后脑血管痉挛(cerebral vasospasm, CVS)的发生机制尚未完全阐明,但研究表明其与众多病理过程有关,包括血管内皮损伤、平滑肌收缩、高黏滞反应和炎症反应等<sup>[18]</sup>。而以上病理过程的重要原因之一为 Rho 激酶异常活跃,故治疗 SAH 后 CVS 的关键之一是抑制 Rho 激酶的活性。法舒地尔作为 Rho 激酶抑制剂的新型代表性药物,通过抑制 Rho 激酶系统,从而激活肌球蛋白磷酸激酶,激活肌球蛋白轻链激酶去磷酸化,靶向性抑制炎症细胞骨架蛋白的运动,使痉挛的血管平滑肌松弛,增加脑血流量,改善脑缺血症状<sup>[19]</sup>,并可增加内皮细胞一氧化氮合酶的表达,预防缺血导致的再灌注损伤,减轻神经功能缺失,缩小脑缺血灶体积<sup>[20]</sup>。另

外,法舒地尔还可有效降低血液黏稠度、血细胞比容和抗血小板聚集,从而改变血流动力学,增加脑部血流量,促进脑循环,起到脑保护作用<sup>[21]</sup>。

SAH 后并发 CVS 是死亡和致残的主要原因,约 20%~30% 的 SAH 患者出现 CVS,引起迟发性缺血性损伤,可继发脑梗死。故防治 SAH 后 CVS 的发生尤为重要,除了维持血容量和血压、使用尼莫地平钙离子拮抗剂、早期手术等措施外,目前有临床研究发现 Rho 激酶抑制剂对 SAH 后 CVS 具有防治及神经保护作用,也被证实较尼莫地平有更好的疗效和安全性<sup>[7]</sup>。Satoh 等<sup>[5]</sup>研究表明盐酸法舒地尔作为一种选择性 Rho 激酶抑制剂,可以作为 SAH 患者的有效治疗药物,其作用机制可能是预防脑血管痉挛和高黏滞血症。Iwabuchi 等<sup>[22]</sup>对 20 例 SAH 后 CVS 患者应用盐酸法舒地尔,发现它可诱导近端动脉扩张,改善脑微循环,并且该团队于今年临床研究证实:动脉内应用盐酸法舒地尔是治疗 SAH 后 CVS 的安全有效措施,预防性给药可能会防止症状性脑血管痉挛的发生<sup>[23]</sup>。此外,Saito 等<sup>[24]</sup>报道 237 例动脉瘤性蛛网膜下腔出血患者应用盐酸法舒地尔治疗后,脑循环时间明显低于治疗前,表明法舒地尔能有效预防动脉瘤性蛛网膜下腔出血后症状性血管痉挛。但上述研究多数仅限于现象研究,对其机制未能完全阐明。在动物模型研究中,Takanashi 等<sup>[25]</sup>对大鼠蛛网膜下腔出血模型应用法舒地尔,发现法舒地尔可使大鼠基底动脉收缩程度显著降低,从而推测法舒地尔治疗 SAH 后 CVS 具有明显的潜在临床应用价值。同样,Wang 等<sup>[26]</sup>在对脑血管痉挛大鼠模型的研究发现,Rho 激酶抑制剂在减轻血管痉挛方面有明显的效果,抑制 Rho 激酶活性后可激活血管舒张通路,改善脑血管痉挛,与 Takanashi 等<sup>[25]</sup>的研究相吻合。而张晓东等<sup>[27]</sup>通过动物实验,证实其重要作用机制之一可能是 eNOS 在动脉管壁上的表达增加,从而法舒地尔能有效缓解 SAH 后的 CVS。

### 2.2 Rho 激酶抑制剂与脑出血

脑出血是指非外伤性脑实质内血管破裂引起的出血,占全部脑卒中的 20%~30%。目前临床上内科治疗措施主要是安静卧床、脱水降低颅内压、保持呼吸道通畅、调整血压血糖、止血等,但临床疗效不佳。近年来,Rho 激酶抑制剂(尤其是法舒地尔)在治疗脑出血方面研究逐渐增多。Rho 激酶抑制剂被提示用于治疗脑出血有益。多项对法

舒地尔的临床研究证明了法舒地尔能有效地减轻脑出血后脑水肿,保护血脑屏障,减轻炎症细胞的浸润及神经细胞的凋亡,促进神经功能恢复<sup>[3,4]</sup>。2010年,刘正娇等<sup>[6]</sup>报道盐酸法舒地尔能够明显改善脑出血大鼠的神经功能缺损程度,减轻神经纤维髓鞘脱失及轴突断裂等病理变化,改善神经功能,可能有一定脑保护作用。2011年,宋明浩等<sup>[28]</sup>对78例脑出血后应用法舒地尔临床分析,发现法舒地尔组患者的GCS评分、GOS评分明显好于常规治疗组,法舒地尔治疗组脑水肿带体积及并发脑梗死体积明显低于常规治疗组。2012年,Huang等<sup>[29]</sup>研究发现Rho激酶抑制剂能保持脑出血大鼠模型血脑屏障的完整性,减轻血管性脑水肿,减轻脑出血后继发性脑损伤。2014年,Lee等<sup>[30]</sup>通过建立脑出血大鼠模型研究证明法舒地尔通过启动Wharton氏胶质源性骨髓间充质干细胞(Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stromal Cells, MSCs)来改善脑出血后神经功能恢复,其潜在的机制可能是通过上调胶质源性神经营养因子(glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF),促进向神经元样细胞分化。2014年,余波等<sup>[31]</sup>报道90例高血压脑出血术后患者醒脑静联合盐酸法舒地尔治疗与单独应用醒脑静者比较,可有效缓解脑血管痉挛,促进意识恢复。

关于Rho激酶对脑出血的影响机制的研究提示Rho/Rho激酶参与脑出血的发生发展过程。脑出血后脑组织缺血缺氧,血液中致痉挛物质可激活细胞表面受体,使Rho蛋白转位至细胞膜并与GTP结合活化,激活Rho激酶,可磷酸化肌球蛋白轻链,使血管平滑肌收缩,引起血管痉挛;炎症细胞因子等物质释放,致神经细胞凋亡,引起脑出血后继发性缺血性脑损伤;Rho/Rho激酶还可引发氧化应激,诱导生成氧自由基,损伤神经与内皮细胞。故阻滞脑出血后Rho激酶激活,可以抑制血管收缩、炎症因子释放,起到神经保护作用<sup>[32]</sup>。Rho激酶抑制剂能双重抑制磷酸化,通过抑制多种蛋白激酶发挥作用,如Rho激酶、肌球蛋白链激酶及蛋白激酶<sup>[33]</sup>,进而抑制炎症反应、自由基形成,促进神经损伤后修复。

### 3 总结与展望

临床和基础研究表明Rho激酶与出血性脑血管病后继发脑损伤、脑血管痉挛密切相关。Rho激酶抑制剂可有效减轻脑出血后脑水肿、炎症反应及神

经细胞凋亡,促进神经功能恢复;可预防SAH后CVS并具有神经保护作用。迄今,Rho激酶抑制剂在出血性脑血管疾病(尤其为脑出血方面)的研究有待进一步深入,但相信随着对Rho激酶抑制剂的持续研发及其机制进一步阐明,其临床应用会不断拓展,将来有可能成为一种高效的神经保护剂。

### 参考文献

- [1] Matsui T, Amano M, Yamamoto T. Rho-associated kinase, a novel serine/threonine kinase, as a putative target for the small GTP binding protein Rho. *EMBO J*, 1996, 15(9): 2208-2216.
- [2] Wettschurek N, Offermanns S. Rho/Rho-kinase mediated signaling in physiology and pathophysiology. *J Mol Med*, 2002, 80: 629-638.
- [3] 魏志刚. 脑出血微创术后应用蛋白激酶抑制剂法舒地尔减轻脑损伤的疗效观察. *中国实用医药*, 2010, 12(5): 106-107.
- [4] 包长顺, 曾瑜, 王斌, 等. 盐酸Rho激酶抑制剂治疗脑出血患者的疗效观察. *中国实用神经疾病杂志*, 2014, 17(23): 91-93.
- [5] Shin-ichi S, Takayasu M, Kawasaki K, et al. Antivasospastic Effects of Hydroxyfasudil, a Rho-kinase Inhibitor, After Subarachnoid Hemorrhage. *Pharmacol Sci*, 2012, 118(1): 92-98.
- [6] 刘正娇, 李东芳, 贾晓涛. ROCK抑制剂对脑出血大鼠脑白质损伤的影响. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2011, 9(1): 77-79.
- [7] Zhao JZ, Zhou DB, Guo J, et al. Efficacy and Safety of Fasudil in Patients With Subarachnoid Hemorrhage: Final Results of a Randomized Trial of Fasudil Versus Nimodipine. *Neurol Med Chir*, 2011, 51(10): 679-683.
- [8] Nakagawa O, Fujisawa K, Ishizaki T, et al. ROCK-I and ROCK-II, two isoforms of rho-associated coiled-coil forming protein serine/threonine kinase in mice. *FEBS Letter*, 1996, 392: 189-193.
- [9] Amano M, Nakayama M, Kaibuchi K. Rho-kinase/ROCK: a key regulator of the cytoskeleton and cell polarity. *J Cytoskeleton*, 2010, 67(9): 545-554.
- [10] Ma Q, Manaenko A, Khatibi NH, et al. Vascular adhesion protein 1 inhibition provides antiinflammatory protection after an intracerebral hemorrhagic stroke in mice. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2011, 31: 881-893.
- [11] Shinokawa FL. Rho-kinase as a novel therapeutic target in treatment of cardiovascular diseases. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2002, 39(3): 319-327.
- [12] Sugimoto M, Nakayama M, Goto TM, et al. Rho-kinase phosphorylates eNOS at threonine 495 in endothelial cells.

- Biochem Biophys Res Commun, 2007, 361: 462-467.
- [13] Pan PC, Shen MY, Yu HD, et al. Advances in the development of Rho-associated protein kinase (ROCK) inhibitors. Drug Discov Today, 2013, 18: 1323-1333.
- [14] Uehata M, Ishizaki T, Satoh H, et al. Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho associated protein kinase in hypertension. Nature, 1997, 389: 990-994.
- [15] Log C, Wallez V, Scalbert E, et al. Rho-kinase inhibitors: pharmacomodulations on the lead compound Y-32885. J Enzyme Inhib Med Chem, 2002, 17(6): 381-390.
- [16] 邓志宽, 黄华, 帅杰. Rho 激酶抑制剂及其在神经系统疾病中的应用. 国际脑血管病杂志, 2007, 15(7): 553-556.
- [17] 张思彬, 宋玉文, 刘晓谦. 胆红素氧化代谢产物在蛛网膜下腔出血后脑血管痉挛的研究进展. 国际神经病学神经外科学杂志, 2014, 41(4): 381-384.
- [18] Kai Y, Maeda Y, Sasaki T, et al. Basic and translational research on proteinase-activated receptors: the role of thrombin receptor in cerebral vasospasm in subarachnoid hemorrhage. J Pharmacol Sci, 2008, 108(4): 426-432.
- [19] Ma ZH, Zhang JP, Du RP, et al. Rho kinase inhibition by fasudil has anti-inflammatory effects in hypercholesterolemic rats. Biol Pharm Bull, 2011, 34(11): 1684-1689.
- [20] Li Q, Huang XJ, He W, et al. Neuroprotective potential of fasudil mesylate in brain ischemia-reperfusion injury of rats. Cell Mol Neurobiol, 2009, 29(2): 169-180.
- [21] Amin HS, Ogilvy CS, Barker FG. Does intracisternal thrombolysis prevent vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage? A meta analysis. Neurosurgery, 2004, 54(2): 326-335.
- [22] Iwabuchi S, Yokouchi T, Hayashi M, et al. Intra-arterial administration of fasudil hydrochloride for vasospasm following subarachnoid hemorrhage—Analysis of time-density curve with digital subtraction angiography. Neurol Med Chir, 2006, 46(11): 535-539.
- [23] Iwabuchi S, Yokouchi T, Hayashi M, et al. Prophylactic intra-arterial administration of fasudil hydrochloride for vasospasm following subarachnoid hemorrhage. Acta Neurochir, 2015, 120: 167-169.
- [24] Saito A, Inoue M, Kon H, et al. Effectiveness of Intraarterial Administration of Fasudil Hydrochloride for Preventing Symptomatic Vasospasm After Subarachnoid Hemorrhage. Acta Neurochir, 2015, 120: 297-301.
- [25] Takanashi Y, Ishida T, Meguro T, et al. Intrathecal application with liposome-entrapped Fasudil for cerebral vasospasm following subarachnoid hemorrhage in rats. J Clin Neurosci, 2001, 8(6): 557-561.
- [26] Wang CJ, Lee PY, Wu BN, et al. Alteration of basilar artery rho-kinase and soluble guanylyl cyclase protein expression in a rat model of cerebral vasospasm following subarachnoid hemorrhage. Biomed Res Int, 2014, 2014: 531508.
- [27] 张晓东, 张明, 吴海涛, 等. 法舒地尔对蛛网膜下腔出血大鼠血管保护作用的机制研究. 重庆医科大学学报, 2010, 35(5): 678-681.
- [28] 宋明浩, 李志祥, 马文斌. 法舒地尔对脑出血后脑保护作用的临床分析. 中华神经外科疾病研究杂志, 2011, 10(5): 462-463.
- [29] Huang B, Krafft PR, Ma QY, et al. Fibroblast growth factors preserve blood-brain barrier integrity through RhoA inhibition after intracerebral hemorrhage in mice. Neurobiol Dis, 2012, 46(1): 204-214.
- [30] Lee HS, Kim KS, Lim HS, et al. Priming Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stromal/Stem Cells With ROCK Inhibitor Improves Recovery in an Intracerebral Hemorrhage Model. J Cell Biochem, 2015, 116(2): 310-319.
- [31] 余波, 史楠, 崔建忠, 等. 醒脑静联合盐酸法舒地尔在高血压脑出血术后的疗效观察. 中国医院药学杂志, 2014, 34(18): 1589-1592.
- [32] Wang KW, Cho CL, Chen HJ, et al. Molecular biomarker of inflammatory response is associated with rebleeding in spontaneous intracerebral hemorrhage. Eur Neurol, 2011, 66(6): 322-327.
- [33] 孟祥军, 齐杰, 田莉. 盐酸法舒地尔的合成、药理和临床研究进展. 沈阳医学院学报, 2010, 12(1): 45-50.