

# Rho 激酶及其抑制剂在缺血性脑血管病的研究进展

张昆仑,李丽敏 综述 赵迎春 审校

南京医科大学附属上海松江中心医院神经内科,上海市 201699

**摘要:** Rho/Rho 激酶信号通路是体内普遍存在的一条信号通路,其通过与多种信号分子的广泛联系参与细胞运动、迁移、凋亡、基因转录、神经再生等生物学过程,在缺血性脑血管病的发生发展中起重要作用。Rho 激酶抑制剂能有效抑制该通路从而舒张痉挛血管,增加缺血区域血流,减轻局部炎症反应,保护内皮功能,促进轴突再生,改善神经功能。

**关键词:** Rho 激酶; Rho 激酶抑制剂; 短暂性脑缺血发作; 脑梗死; 轴突再生; 脑保护

DOI: 10.16636/j.cnki.jinn.2016.04.016

缺血性脑血管病是一种致死率、致残率很高的常见病、多发病,其相应供血区脑组织由于缺血、缺氧而出现坏死或软化,并引起短暂或持久的局部或弥漫性脑损害。Rho 激酶是 Rho 蛋白的重要下游底物,参与血管平滑肌收缩、内皮功能调节、炎症细胞浸润、细胞凋亡等多种生物学过程,在缺血性脑血管病的发生、发展等过程中起重要作用<sup>[1]</sup>。

## 1 Rho 激酶的基本结构和生物学功能

### 1.1 Rho 激酶的基本结构

Rho 激酶 (Rho associated coiled-coil kinase, ROCK) 属于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶超家族,是小 GTP 结合蛋白 Rho 的重要下游底物<sup>[2]</sup>。已发现的 Rho 激酶分为 ROCK I (ROCK  $\beta$  或 p160ROCK) 和 ROCK II (ROCK  $\alpha$ ) 两种亚型,前者主要存在于肺、肝、脾、肾和睾丸等非神经组织,后者主要在脑、肌肉、心脏等组织表达。完整的 ROCK I 和 ROCK II 约含有 1300 个氨基酸,分子量在 160 kD 左右。蛋白质的一级结构有 65% 的同源性,自 N 端依次为激酶催化结构域 (kinase domain/catalytic domain, CD)、包含 Rho 蛋白结合域 (Rho-binding domain, RBD) 的卷曲螺旋区和包含半胱氨酸富集区的 PH 结构域 (pleckstrin homology domain),其中催化结构域的同源性高达 92%<sup>[3]</sup>。机体的 Rho 激酶以同源二聚体的形式存在<sup>[4]</sup>。当活化的小 GTP 结合蛋白 Rho 与 Rho 激酶相互结合时,可以改变 Rho 激酶的构型,消除其自抑制作用而激活 Rho 激酶<sup>[4]</sup>。激活

的 Rho 激酶通过磷酸化下游效应分子,而发挥生物学功能。

### 1.2 Rho 激酶的生物学效应

在缺血性脑血管病的发病过程中有多种因子可激活 Rho/Rho 激酶信号通路,如内皮素 1、血管紧张素 II、白介素 1、肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 及凝血酶等<sup>[5-7]</sup>。激活的 Rho 激酶可以磷酸化多种下游效应器发挥其生物学功能:①抑制肌球蛋白轻链磷酸酶 (myosin light chain phosphatase, MLCP) 的活性来上调肌球蛋白轻链 (myosin light chain, MLC) 磷酸化水平<sup>[8]</sup>;②直接将 MLC 磷酸化;③激活单丝氨酸蛋白激酶 (LIM Kinase) 进而抑制丝切蛋白活性来稳定肌动蛋白多聚体;④激活脑衰反应调节蛋白-2 (CRMP-2) 引起生长锥塌陷;⑤激活钠氢交换体 (sodium-hydrogen exchanger, NHE) 形成黏着斑;⑥磷酸化埃兹蛋白/根蛋白/膜突蛋白家族 (ezrin/radixin/moesin, ERM) 通过 ERM 蛋白的桥接作用,可将肌动蛋白微丝与细胞膜相连<sup>[34]</sup>。由于以上底物均参与细胞运动,故 Rho 激酶也被认为是调节细胞运动的重要激酶之一。此外,Rho 激酶也可以抑制内皮型一氧化氮合酶 (eNOS) 活性,在炎症、氧化应激、血栓形成和纤维化等过程中起重要作用<sup>[9,12]</sup>。

## 2 Rho 激酶抑制剂的种类及作用

按照化学结构特征可以将 Rho 激酶抑制剂分为 5 种,分别为异喹啉类、吡啶类、吲唑类、吡唑类和其他<sup>[10]</sup>。它们均为小分子有机化合物,主要是

基金项目:上海市卫计委课题资助项目(201540141)

收稿日期:2016-04-25;修回日期:2016-08-12

作者简介:张昆仑(1990-),男,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,硕士生导师,主要从事脑血管病和帕金森病研究。Email:zhaoyingchun9077@163.com。

通过与 Rho 激酶催化结构域的 ATP 结合位点相结合,从而起到抑制 Rho 激酶的磷酸化作用<sup>[10]</sup>。法舒地尔是目前唯一在临床上应用的异喹啉类 Rho 激酶抑制剂,在神经系统疾病中主要通过抑制 Rho 激酶发挥以下药理作用:抑制钙敏化效应,扩张血管改善脑组织微循环;抑制炎症细胞的迁移和浸润,减少炎症介质的产生;抑制脑神经细胞受损,促进神经元轴突生长<sup>[8, 19, 25]</sup>。

### 3 Rho 激酶及其抑制剂与短暂性脑缺血发作

目前认为,短暂性脑缺血发作(transient ischemic attack, TIA)的发病主要与动脉痉挛狭窄、微栓塞及微血栓形成等有关。研究发现,Rho 激酶一方面可以通过直接磷酸化 MLC 产生血管平滑肌收缩效应;另一方面也可以通过抑制 MLCP 活性而导致其无法使 MLC 脱磷酸从而使血管持续性收缩<sup>[8]</sup>。同时也有研究报道,脑实质小动脉内压力增高时,P2Y 受体通过耦联的 Rho/Rho 激酶信号通路激活 TRPM4 通道引起肌纤维去极化,进一步激活电压依赖性钙离子通道使  $\text{Ca}^{2+}$  内流而激活肌球蛋白轻链激酶(MLCK),导致血管收缩<sup>[11]</sup>。在病理情况下这种多重效应可能导致血管的痉挛,诱发 TIA。此外,Rho 激酶还可通过减少内皮型一氧化氮合酶(eNOS)及细胞间黏附分子-1(ICAM-1)的表达,引起血管内皮损伤,来参与动脉粥样硬化的发展及 TIA 发作<sup>[12, 13]</sup>。Nakakuki 等<sup>[14]</sup>研究发现,CRP 也可激活 Rho/Rho 激酶,而后者能进一步激活 NF- $\kappa$ B,使纤溶酶原激活物抑制剂-1(PAI-1)表达增加,从而抑制纤维蛋白的溶解并促进血栓的形成和发展。

在 TIA 治疗方面,Lida 等<sup>[15]</sup>研究发现 Rho 激酶抑制剂法舒地尔和 Y27632 可以浓度依赖性减少一种血栓素类似物 U46619 诱导的血小板聚集以及炎症因子 sCD40 释放和血小板衍生因子(PDGF)的分泌,进而减少 TIA 的发作。研究也表明他汀类降脂药可以通过抑制 Rho 激酶活性,降低血脂及炎症因子 IL6、IL8、C 反应蛋白(CRP)的水平,减轻对血管内皮的损伤<sup>[16]</sup>。此外在生理或病理因素刺激下内皮祖细胞可动员到外周血中参与血管的修复<sup>[17]</sup>。有研究报道在培养基中加入 Y27632 能显著提高功能性内皮祖细胞数目,同时发现法舒地尔能提高内皮祖细胞的迁移,促进新生血管的形成,有助于 TIA 后的血管修复及血流恢复<sup>[18]</sup>。2013 年吴铁松等<sup>[19]</sup>应用奥扎格雷联合法舒地尔治疗 TIA 患者后发现该方案能显著改善脑

血流,恢复脑动脉流速,降低神经元特异性烯醇化酶(NSE)、脂蛋白相关磷脂酶 A2(LP-PLA2)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )和超敏 C 反应蛋白等炎症因子,对 TIA 有较好的治疗效果。也有临床报道盐酸法舒地尔联合低分子肝素治疗 TIA,治愈率及有效率均显著提高<sup>[20]</sup>。

### 4 Rho 激酶及其抑制剂与脑梗死

脑梗死可诱发神经细胞及线粒体损伤,造成缺血后继发性脑损害。大量研究表明,细胞凋亡是脑缺血再灌注损伤后神经元死亡的重要方式之一<sup>[21]</sup>。细胞凋亡涉及细胞骨架的形态学改变,Rho/Rho 激酶信号通路是细胞骨架肌动蛋白收缩的重要调节通路,在细胞凋亡形态学变化过程中起着重要作用。而在细胞凋亡过程中凋亡蛋白酶(Caspases)扮演着始动因子的作用,Caspases-3 可将 ROCK 的自我抑制性 C 端水解掉而激活 ROCK 进而调控肌动蛋白-肌球蛋白介导细胞皱缩,参与细胞凋亡过程<sup>[22]</sup>。

Rho 激酶与脑梗死后的炎症介质释放有关,其可作为 p38 和 JNK 信号通路的上游信号分子,参与 TNF- $\alpha$  诱导炎症因子 IL-6 的合成和释放。薛松等<sup>[23]</sup>研究发现盐酸法舒地尔能抑制 c-jun 磷酸化水平,从而推测 Rho 激酶可能通过介导 JNK 信号通路下游效应器 c-jun 的激活而导致脑缺血再灌注诱导的神经元损伤。2013 年黄龙坚等<sup>[24]</sup>发现 Y-27632 可抑制大鼠脑缺血再灌注后 JAK-sTAT 信号传导通路的活化,通过减轻细胞凋亡,抑制脑缺血再灌注后的快速级联反应,从而起到神经保护作用。

众所周知,血脑屏障作为神经血管单元的一部分对维持脑组织内环境稳定具有重要生物学意义,脑缺血再灌注后许多因素介导血脑屏障的破坏。2013 年 Cui 等<sup>[25]</sup>发现盐酸法舒地尔可以改善小鼠脑缺血再灌注损伤后血脑屏障通透性以及上调 GAP-43(growth associated protein-43)和紧密连接蛋白-5(claudin-5)的表达。2014 年 Gibson 等<sup>[26]</sup>发现 Rho 激酶抑制剂可以通过调节血管内皮细胞氧化应激和紧密连接蛋白的表达来修复损伤的血脑屏障。

此外,研究表明 Rho 激酶与轴突再生密切相关,已知中枢神经系统髓鞘中含有丰富的轴突生长抑制因子,如勿动蛋白 A(Nogo-A)、少突胶质细胞髓鞘糖蛋白(OMGP)、髓鞘相关蛋白(MAG)。脑梗

死后脑组织缺血缺氧,这些抑制因子被激活后作用于共同的受体 NgR(一种和糖基磷脂酰肌醇相连接的轴突表面蛋白),进而激活下游的 Rho 激酶调节生长锥中的微丝,使生长锥溃变,抑制轴突再生<sup>[27]</sup>。梁燕等<sup>[28]</sup>通过建立大脑中动脉缺血再灌注(MACO)大鼠模型,发现法舒地尔可降低 Rho 激酶及 Nogo-A 的表达,推测法舒地尔可能通过调节 Rho 激酶活性并进一步影响 Nogo-A/NgR 而实现轴突再生。2015 年 Yu 等<sup>[29]</sup>通过建立视神经损伤动物模型研究视神经损伤后病理变化过程以及法舒地尔对损伤的视神经的作用时发现法舒地尔能够有效减轻损伤神经的轴突肿胀和线粒体空泡化,提示法舒地尔可能通过抑制 Rho 激酶活性达到减轻神经损伤的作用。

Rho 激酶还与胶质细胞功能密切相关。Fu 等<sup>[30]</sup>报道 Y27632 及盐酸法舒地尔可以通过影响 ERK 信号通路,增强小鼠小胶质细胞的吞噬能力。星形胶质细胞作为脑组织中分布最为广泛的一类胶质细胞,其通过终足连接血管与神经参与能量传递,神经递质的摄取和循环,抗氧化活性,营养因子合成,内环境平衡等过程<sup>[31]</sup>。研究表明,脑梗死后星形胶质细胞过度激活、增生,同时终足收缩,形成胶质瘢痕,并分泌神经生长抑制因子抑制神经元的再生。而法舒地尔可以促进终足的形成,减少反应性星形胶质细胞的胶质化及胶质瘢痕的形成,从而促进神经元的修复和存活<sup>[32]</sup>。

Rho 激酶还与认知功能障碍的发生相关。有报道证实,长期抑制 Rho 激酶活性可促进海马神经元再生并改善慢性缺血性脑供血不足大鼠的空间学习记忆能力<sup>[33]</sup>。长时程增强(LTP)效应被普遍视为构成学习与记忆基础的主要分子机制之一,Huang 等<sup>[34]</sup>研究发现利用盐酸法舒地尔长期抑制 Rho 激酶活性可通过上调 GABA<sub>A</sub> 和 GABA<sub>B</sub> 的表达诱导 LTP,同时又能减少 GABA 能神经元磷酸化水平来提高 LTP 诱导的频率和幅值,从而改善大脑前循环缺血导致的认知功能障碍。

## 5 总结与展望

综上所述,在缺血性脑血管病的发生发展过程中,Rho/Rho 激酶信号通路通过多种机制参与其病理生理反应过程。抑制该信号通路能有效改善脑组织血供,抑制炎症介质的释放,促进神经轴突再生,减轻认知功能障碍,改善神经胶质细胞功能。随着基础及临床研究的不断深入,Rho 激酶抑制剂

在临床防治缺血性脑血管病方面将会有更广阔的前景。

## 参 考 文 献

- [1] Wang QM, Liao JK. Rocks as immunomodulators of stroke. *Expert Opin Ther Targets*, 2012, 16(10): 1013-1025.
- [2] Matsui T, Amano M, Yamamoto T. Rho-associated kinase, a novel serine/threonine kinase, as a putative target for small GTP binding protein Rho. *EMBO J*, 1996, 15(9): 2208-2216.
- [3] 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 Letters*, 1996, 392(2): 189-193.
- [4] 段为钢,袁胜涛,廖红,等. Rho 激酶及其抑制剂的研究进展. *药理学学报*, 2007, 42(10): 1013-1022.
- [5] Loirand G, Pacaud P. Involvement of Rho GTPases and their regulators in the pathogenesis of hypertension. *Small GTPases*, 2014, 5(4): 1-10.
- [6] Xu C, Wu X, Hack BK, et al. TNF causes changes in glomerular endothelial permeability and morphology through a Rho and myosin light chain kinase-dependent mechanism. *Physiol Rep*, 2015, 3(12): 1-16.
- [7] Rafferty BJ, Unger BL, Perey AC, et al. A novel role for the Rho-associated kinase, ROCK, in IL-1 stimulated intestinal epithelial cell responses. *Cell Immunol*, 2012, 280(2): 148-155.
- [8] Amano M, Ito M, Kimura K, et al. Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho kinase). *J Biol Chem*, 1996, 271(34): 20246-20249.
- [9] Sugimoto M, Nakayama M, Goto TM, et al. Rho-kinase phosphorylates eNOS at threonine 495 in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 361(2): 462-467.
- [10] 徐利保,王天晓,孙薇,等. Rho 激酶抑制剂的研究进展. *国际药理学杂志*, 2008, 35(6): 429-432.
- [11] Li Y, Brayden JE. Rho kinase activity governs arteriolar myogenic depolarization. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2015, 2015: 1-13.
- [12] McGown CC, Browne NJ, Hellewell PG, et al. ROCK induced inflammation of the microcirculation during endotoxemia mediated by nitric oxide synthase. *Microvasc Res*, 2011, 81(3): 281-288.
- [13] Jung CH, Lee WJ, Hwang JY, et al. The role of Rho/Rho-kinase pathway in the expression of ICAM-1 by linoleic acid in human aortic endothelial cells. *Inflammation*, 2012, 35(3): 1041-1048.
- [14] Nakakuki T, Ito M, Iwasaki H, et al. Rho/Rho-kinase

- pathway contributes to C-reactive protein-induced plasminogen activator inhibitor-1 expression in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25(10): 2088-2093.
- [15] Iida Y, Doi T, Tokuda H, et al. Rho-kinase regulates human platelet activation induced by thromboxane A2 independently of p38 MAP kinase. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2015, 94: 73-81.
- [16] Sawada N, Liao JK. Rho/Rho-associated coiled-coil forming kinase pathway as therapeutic targets for statins in atherosclerosis. *Antioxid Redox Signal*, 2014, 20(8): 1251-1267.
- [17] 惠娟, 韩军良. 脑缺血损伤后血管再生的研究进展. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2015, 42(2): 193-196.
- [18] You JC, Ahn HY, Kim HK, et al. The Rho kinase inhibitor fasudil augments the number of functional endothelial progenitor cells in ex vivo cultures. *Int J Mol Med*, 2011, 28(3): 357-363.
- [19] 吴铁松, 谢展雄, 何文平. 奥扎格雷联合法舒地尔对短暂性脑缺血发作患者脑血流及 Lp-PLA2 活性、NSE、炎症因子的影响. *安徽医药*, 2013, 17(8): 1370-1371.
- [20] 何建中, 王亮, 林俊. 盐酸法舒地尔治疗短暂性脑缺血发作的疗效观察. *北京医学*, 2010, 32(4): 319-320.
- [21] Broughton BR, Reutens DC, Sobey CG. Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. *Stroke*, 2009, 40(5): 331-339.
- [22] Ark M, Ozdemir A, Polat B. Ouabain-induced apoptosis and Rho kinase: a novel caspase-2 cleavage site and fragment of ROCK-2. *Apoptosis*, 2010, 15(12): 1494-1506.
- [23] 薛松, 荣良群, 魏秀娥, 等. Rho 激酶抑制剂对大鼠脑缺血/再灌注后 c-jun 磷酸化的实验研究. *医药前沿*, 2012, 2(2): 90-91.
- [24] 黄龙坚, 黄建民, 王凯华. Rho 激酶抑制剂对大鼠脑缺血再灌注后 JAK2/STAT3 信号传导通路的影响. *神经疾病与精神卫生*, 2013, 13(6): 603-606.
- [25] Cui Q, Zhang Y, Chen H, et al. Rho kinase: a new target for treatment of cerebral ischemia/reperfusion injury. *Neural Regen Res*, 2013, 8(13): 1180-1189.
- [26] Gibson CL, Srivastava K, Sprigg N, et al. Inhibition of Rho-kinase protects cerebral barrier from ischemia-evoked injury through modulations of endothelial cell oxidative stress and tight junctions. *J Neurochem*, 2014, 129(5): 816-826.
- [27] Koch JC, Tonges L, Barski E, et al. ROCK2 is a major regulator of axonal degeneration, neuronal death and axonal regeneration in the CNS. *Cell Death Dis*, 2014, 5(5): 1225-1236.
- [28] 梁燕, 娄季宇, 白宏英, 等. 法舒地尔对大鼠脑缺血再灌注后 Rho 激酶、Nogo-A 表达的影响. *中国实用神经疾病杂志*, 2011, 14(3): 27-29.
- [29] Yu JL, Lan SY, Wang RJ, et al. Fasudil alleviates traumatic optic neuropathy by inhibiting Rho signaling pathway. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(8): 13377-13382.
- [30] Fu PC, Tang RH, Yu ZY, et al. Rho-associated kinase inhibitors promote microglial uptake via the ERK signaling pathway. *Neurosci Bull*, 2016, 32(1): 83-91.
- [31] Maragakis NJ, Rothstein JD. Mechanisms of disease: astrocytes in neurodegenerative disease. *Nat Clin Pract Neurol*, 2006, 2(12): 679-689.
- [32] Abeyasinghe HC, Phillips EL, Chin-Cheng H, et al. Modulating astrocyte transition after stroke to promote brain rescue and functional recovery: Emerging Targets Include Rho Kinase. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(3): 288-305.
- [33] Christie KJ, Turbic A, Turnley AM. Adult hippocampal neurogenesis, Rho kinase inhibition and enhancement of neuronal survival. *Neuroscience*, 2013, 247: 75-83.
- [34] Huang L, Zhao LB, Yu ZY, et al. Long-term inhibition of Rho-kinase restores the ltp impaired in chronic forebrain ischemia rats by regulating GABAa and GABAb receptors. *Neuroscience*, 2014, 277: 383-391.