

# Rho 激酶抑制剂治疗缺血性脑卒中的研究进展

于芳莘<sup>1</sup> 综述 赵迎春<sup>2</sup> 审校

1. 上海交通大学附属第一人民医院松江分院老年干部科,上海市 201600

2. 上海交通大学附属第一人民医院松江分院神经内科,上海市 201600

**摘要:** Rho 相关蛋白激酶 (ROCK) 作为丝氨酸/苏氨酸激酶家族的一个成员,是小 GTP 酶 Rho 的下游第一个效应器。ROCK 接受来自于 G 蛋白偶联受体的信号,参与调控诸多重要的细胞活动。本文就 ROCK 的结构、分布、调控及生物学效应作简要介绍,并着重阐述其在缺血性脑卒中发病中的作用及其抑制剂治疗缺血性脑卒中的最新进展。

**关键词:** Rho 激酶;急性缺血性脑卒中;法舒地尔

DOI:10.16636/j.cnki.jinn.2016.05.026

自 1985 年 Madaule 等<sup>[1]</sup> 首次发现 Rho 基因后,对其基因产物 Rho 蛋白及其信号转导通路已进行了广泛深入的研究。研究发现,Rho 激酶 (Rho-kinase, ROCK) 的活化参与了急性缺血性卒中的发病与进展,在缺血性脑卒中急性期应用 Rho 激酶抑制剂用后不仅能缩小梗死灶面积,而且能改善患者神经功能缺损。

## 1 Rho/ROCK 的分子生物学特征

Rho/ROCK 信号通路主要由小 GTP 酶超家族 (主要是指 Rho)、与 Rho 相连的 ROCK 和效应分子三部分组成。

### 1.1 Rho 蛋白

Rho 蛋白分子量约 20 ~ 30 Kd,由氨基酸序列高度同源的 3 种异构体组成: RhoA、RhoB、RhoC。Rho 蛋白以活化的 Rho-GTP 形式和非活化的 Rho-GDP 形式两种状态存在于细胞质和膜上,其功能与信息转导、细胞的生长、分化、迁移以及炎症细胞的黏附、吞噬等有关。

### 1.2 ROCK

ROCK 属于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族成员,以两种同源性极高的异构体存在: ROCK I 和 ROCK II,是最主要的 Rho 蛋白下游底物。Rho 相关激酶的空间结构从 N 末端到 C 末端的排列依次为催化结构域 (kinase domain), Rho 蛋白结合结构域 (Rho-binding domain, RBD)、PH 同源结构域 (pleckstrin-homology domain, PHD)、半胱氨酸富集

结构域 (cysteine-rich domain, CRD)<sup>[2]</sup>。在静息状态下,RBD、PHD 与激酶的催化区域相互作用,抑制激酶活性。在激活状态下时,激活态的 Rho G 蛋白与 RBD 结合并相互作用,改变了 ROCK 构型,从而解除了 RBD 与 PHD 对 Rho 相关激酶的抑制,使 ROCK 被激活。某些化学制剂,如 Y27632、法舒地尔 (fasudil, 又称 HAI077 和 HT877) 或羟化法舒地尔 (hydroxyfasudil) 等,能够特异性地与 ATP 竞争 ROCK 催化区的 ATP 结合位点,从而抑制 ROCK 的活性。

### 1.3 ROCK 的生物学效应

ROCK 接受来自于 G 蛋白偶联受体的信号,或被机械刺激激活,参与调控诸多重要的细胞活动<sup>[3]</sup>,如促进张力丝和黏着斑的形成,参与细胞间连接和细胞极性形成;调节细胞骨架动力学,参与调控细胞迁移、运动和摄取;活化肌球蛋白轻链 (myosin light-chain, MLC),参与非  $Ca^{2+}$  依赖的细胞收缩;磷酸化 ERM (ezrin-radixin-moesin) 家族,参与信号的跨膜传递。ROCK 的下游底物很多,目前研究最多也最清楚的是肌球蛋白轻链磷酸化酶 (myosin light-chain phosphatase, MLCP)。MLCP 包括 3 个亚基:肌球蛋白结合亚基 (myosin-binding subunit, MBS),37 kDa 的 1 型磷酸化酶催化亚基和肌球蛋白结合亚基 (MBS130k) (即磷酸酶靶蛋白 I (MYPT-1) 调节亚基)。ROCK 激活后可磷酸化 MBS,使 MLCP 活性受抑制,导致平滑肌细胞收缩,

**基金项目:**上海市卫生计生委面上项目 (201540141);上海市松江区科技攻关项目 (13SJGGYY05)

**收稿日期:**2016-07-15;**修回日期:**2016-10-09

**作者简介:**于芳莘 (1979-),女,医学硕士,副主任医师,讲师。主要从事脑血管病的基础和临床研究。

**通讯作者:**赵迎春 (1965-),男,医学硕士,硕士生导师,主任医师,教授。主要从事脑血管病及帕金森病的基础和临床研究。E-mail: zhaoyingchun9077@163.com。

产生严重的血管痉挛,而 ROCK 的这种作用可以被 Rho 激酶抑制剂所逆转。此途径也已被证实是蛛网膜下腔出血后迟发性脑血管痉挛的机制之一,也是 Rho 激酶抑制剂治疗脑血管痉挛的理论依据<sup>[4]</sup>。另外一个研究较多且较清楚的是内皮源性一氧化氮合酶(endothelial NO synthase, eNOS),缺血、低氧等可使 ROCK 活化,使 eNOS 表达下调,引起血管收缩;内皮功能及屏障受损,加重组织缺血<sup>[5]</sup>。

## 2 ROCK 及其抑制剂与缺血性脑卒中

早期, Rho 激酶抑制剂在神经系统主要用于蛛网膜下腔出血后迟发性脑血管痉挛的治疗。但是后来实验证明, ROCK 不仅仅表达在血管平滑肌还广泛分布在神经系统的其它组织。对于急性缺血性脑卒中, Rho 激酶抑制剂不但可以缩小缺血灶面积,减轻梗死灶周围炎症反应,还能改善神经功能缺损。

### 2.1 Rho 激酶抑制剂可增加脑梗死区域血流,缩小梗死面积

急性缺血性脑卒中的病灶由核心缺血区及外周半暗带组成,急性期治疗的目的是挽救梗死核心区外围的缺血半暗带。研究表明,在梗死后早期血管损伤,缺血灶周围血流急剧下降导致的微循环障碍是脑梗死面积进一步扩大的主要原因<sup>[6]</sup>。缺血、缺氧导致血管内皮的 ROCK 活化,通过磷脂酰-肌醇-3 激酶/Akt 途径抑制了 eNOS 的活性,使血管 eNOS 表达降低<sup>[7]</sup>。NO 的代谢产物下调使得内皮血管性血友病因子(von Willebrand factor, vWF)的表达增加。而 vWF 的不正常升高与内皮细胞促凝活性增加相关,与血管壁血栓形成及微循环障碍相关<sup>[8,9]</sup>。在大脑中动脉栓塞(middle cerebral artery infarction, MCAI)大鼠, vWF 在缺血半暗带均出现高表达,缺血 6 h 后在 vWF 阳性的内皮细胞上磷酸化的内收蛋白表达明显升高,并可持续 24 h。但应用法舒地尔治疗后 vWF 表达明显降低,可使缺血半暗带区域毛细血管扩张,微循环改善,缩小梗死核心区面积,降低了死亡率<sup>[10]</sup>。

应用法舒地尔治疗 MCAI 小鼠,梗死区域及非梗死区域血流均增加,并缩小了 33% 的梗死面积,神经功能缺损评分改善达 37%。应用另一种 Rho 激酶抑制剂 Y-27632 也显示出了类似的效果<sup>[11]</sup>。使用新一代 Rho 激酶抑制剂羟化法舒地尔治疗缺血性脑卒中大鼠后脑皮质血流明显增加,且增加程度与药物浓度呈正相关<sup>[12]</sup>。在伴高脂血症的

MCAI 大鼠,法舒地尔治疗后大鼠的灌注缺损面积较对照组减少接近 50%,且缺血前单次给药与缺血后每日给药疗效相当。实验还发现法舒地尔治疗组大鼠脑缺血后即使平均动脉压下降 10% ~ 15%,再灌注面积仍较对照组增加<sup>[13]</sup>。另外,法舒地尔还能降低脑梗死大鼠血液粘稠度,增加梗死灶的血流速度<sup>[14]</sup>。上述实验结果可能与 Rho 激酶抑制剂抑制了脑和血管 ROCK 活性,增加了 eNOS 的表达及活性,降低了血管紧张度<sup>[15]</sup>,减轻了内皮细胞氧化应激<sup>[16]</sup>,减少了白细胞黏附<sup>[17]</sup>以及改善了红细胞的变形能力<sup>[18]</sup>等机制相关。

### 2.2 Rho 激酶抑制剂可减轻脑梗死灶周围组织的炎症反应

在缺血性脑卒中急性期,炎症反应是缺血缺氧导致内皮功能损伤后的继发性损伤, Rho 激酶抑制剂在炎症的不同阶段参与了神经炎症反应的整个过程。在急性梗死灶周围活化的胶质细胞通过表达一些前炎基因产物,如细胞因子、趋化因子、细胞黏附分子以及产生炎症介质和自由基的酶等参与炎症反应<sup>[19,20]</sup>。同时前炎介质溶血磷脂酰胆碱(lysophosphatidylcholine, LPC)分泌磷脂酶 A2 群 X(secretory phospholipase A2 group X, sPLA2-X),通过活化 LPC 受体 G 蛋白偶联受体(G-protein-coupled receptor 132, G2A)和促进 CC 趋化因子单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)以及它的受体(CCR2)的表达,导致炎症级联反应的发生,加重梗死后脑组织的损伤<sup>[21,22]</sup>。在脑胶质细胞体外实验,应用 Rho 激酶抑制剂(ALX-270-423)阻断 G 蛋白偶联受体 G2A 后,抑制 MCP-1 及其受体 CCR2 的表达,可减轻脑梗死灶周围的炎症反应,缩小梗死面积<sup>[23]</sup>。

在正常大鼠脑组织内几乎或很少见到中性粒细胞,而在脑梗死大鼠的梗死侧出现大量的中性粒细胞浸润,使用羟化法舒地尔可以减少中性粒细胞的浸润<sup>[13]</sup>。在 MCAI 大鼠,梗死侧皮质及纹状体前炎因子单核细胞趋化因子(monocyte chemotactic factor-1, MCP-1)mRNA 表达增加<sup>[24]</sup>。临床发现急性缺血性脑卒中患者血清 MCP-1 浓度升高,并且与病情严重程度密切相关,应用法舒地尔治疗可使其显著降低<sup>[25,26]</sup>。此外,急性缺血性脑卒中患者使用羟化法舒地尔后血清炎症因子 IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-12 以及 IL-18 的浓度显著降低,可以减轻梗死后局部神经组织炎症反应,改善预后<sup>[27,28]</sup>。

黏附分子作为一类介导细胞与细胞、细胞与基质间黏附作用的膜表面糖蛋白,也是炎症反应的重要参与分子。使用羧基法舒地尔可以使血管细胞黏附分子(vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)、细胞间黏附分子(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)表达下降,减轻脑梗死区域的炎症反应,改善神经功能缺损<sup>[29]</sup>。

### 2.3 Rho 激酶抑制剂有助于缺血性卒中的神经功能恢复

在成人中枢神经系统,轴索再生、芽生以及新神经网络的形成被神经突增生抑制蛋白所阻断<sup>[30]</sup>。急性缺血性卒中后,因缺氧激活了 ROCK 途径导致髓鞘源性轴索生长抑制剂限制了轴索的再生<sup>[31,32]</sup>。动物实验发现脑梗死大鼠发病后第 5 天,81% 的大鼠出现中至重度神经功能缺损症状,但使用法舒地尔后只有 33.3% 的脑梗死大鼠出现了中至重度神经功能缺损症状。并且,重度神经功能缺损大鼠比例也从 50% 下降至 6.7%<sup>[14]</sup>。Shin 等<sup>[12]</sup>报道,在动物实验脑缺血后 1 周海马区域神经元数量较正常减少 90%,而使用 Rho 激酶抑制剂羧基法舒地尔可使该区域的死亡神经元数量显著减少。Liu 等<sup>[33]</sup>报道,MCAI 大鼠应用 Rho 激酶抑制剂法舒地尔治疗后神经功能缺损明显改善。上述实验结果可能与抑制 ROCK 途径,发挥了对神经组织功能的恢复促进作用有关。

### 2.4 Rho 激酶抑制剂的临床应用研究

Rho 激酶抑制剂目前已广泛应用于各种心脑血管疾病。Y27632 作为一吡啶类衍生物的二盐酸盐,通过载体的易化扩散被细胞摄取,作用于 ROCK 催化的 ATP 抑制 ROCK 活性。法舒地尔是一种新型异喹啉磺酰胺衍生物,通过阻断钙通道抑制 ROCK 活性,用于预防和改善蛛网膜下腔出血后继发的脑血管痉挛及脑缺血<sup>[34]</sup>。但临床发现使用法舒地尔及 Y27632 治疗时,因其会导致颅内出血、白细胞减少、肝肾功能损伤等一些副反应而应用受到限制。随后在法舒地尔的研发过程中得到的它的代谢产物羧基法舒地尔,它是一种新型蛋白酶抑制剂,羧基法舒地尔作为法舒地尔的活性代谢产物,对 ROCK 的抑制作用远大于法舒地尔,且副作用较少,具有较宽的治疗时间窗<sup>[35]</sup>,已在临床得到了广泛应用。并且,实验证实羧基法舒地尔在改善梗死区域血流量,减轻炎症反应所致的脑损伤,潜在及长期保护神经元作用均较法舒地尔更有

效<sup>[12]</sup>。鉴于急性缺血性脑卒中进程中,ROCK 活性在发病后 24 ~ 72 h 达到高峰,故在急性期的前段使用 Rho 激酶抑制剂治疗脑梗死效果可能更好。

### 3 总结与展望

Rho/ROCK 信号转导通路在急性缺血性脑卒中发病中可能参与多种生物学效应:血管收缩使梗死区域血流减少、氧自由基生成、细胞凋亡、激活炎症过程以及对细胞定向分化、神经髓鞘的形成、轴突和树突的定向迁移和联络的影响等,甚至可以认为它是缺血性神经损伤的细胞分子水平机制的中心枢纽之一。Rho 激酶抑制剂对急性缺血性脑卒中具有脑保护作用。随着 Rho/ROCK 信号转导通路中繁多的下游效应分子和调节方式的研究深入,特异性 Rho 激酶抑制剂如脂质体法舒地尔等新制剂的开发应用可能会给缺血性脑卒中治疗带来新的希望。

### 参 考 文 献

- [1] Madaule P, Axel R. A novel rac-related gene family. *Cell*, 1985, 41(1): 31-40.
- [2] Matsui T, Amano M, Yamamoto T, et al. 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] Amano M, Nakayama M, Kaibuchi K. Rho-kinase/ROCK: a key regulator of the cytoskeleton and cell polarity. *Cytoskeleton (Hoboken)*, 2010, 67(9): 545-554.
- [4] 李丽敏,蒋萍,赵迎春,等. Rho 激酶及其抑制剂在出血性脑血管疾病研究中相关进展. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2015, 42(4): 366-369.
- [5] Mabuchi T, Kitagawa K, Ohtsuki T, et al. Contribution of microglia/macrophages to expansion of infarction and response of oligodendrocytes after focal cerebral ischemia in rats. *Stroke*, 2000, 31(7): 1735-1743.
- [6] Wolfgram S, Dendorfer A, Rikitake Y, et al. Inhibition of Rho-kinase leads to rapid activation of phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase Akt and cardiovascular protection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, 24(10): 1842-1847.
- [7] Zhang L, Zhang ZG, Ding GL, et al. Multitargeted effects of statin-enhanced thrombolytic therapy for stroke with recombinant human tissue-type plasminogen activator in the rat. *Circulation*, 2005, 112(22): 3486-3494.
- [8] Tsai HM. Platelet activation and the formation of the platelet plug: deficiency of ADAMTS13 causes thrombotic thrombocytopenic purpura. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, 23(3): 388-396.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] Satoh S, Utsunomiya T, Tsurui K, et al. Pharmacological profile of hydroxyfasudil as a selective rho kinase inhibitor on ischemic brain damage. *Life Sci*, 2001, 69(12): 1441-1453.
- [12] Shin HK, Huang PL, Ayata C. Rho-kinase inhibition improves ischemic perfusion deficit in hyperlipidemic mice. *J Cerebr Blood Flow Metabol*, 2014, 34(2): 284-287.
- [13] Satoh S, Tushima Y, Hitomi A, et al. Wide therapeutic time window for Rho-kinase inhibition therapy in ischemic brain damage in a rat cerebral thrombosis model. *Brain Res*, 2008, 1193: 102-108.
- [14] Seo J, Cho DH, Lee HJ, et al. Citron Rho-interacting kinase mediates arsenite-induced decrease in endothelial nitric oxide synthase activity by increasing phosphorylation at threonine 497: Mechanism underlying arsenite-induced vascular dysfunction. *Free Radic Biol Med*, 2016, 90: 133-144.
- [15] 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.
- [16] Slotta JE, Braun OO, Menger MD, et al. Fasudil, a Rho-kinase inhibitor, inhibits leukocyte adhesion in inflamed large blood vessels in vivo. *Inflamm Res*, 2006, 55(9): 364-367.
- [17] Thuet KM, Bowles EA, Ellsworth ML, et al. The Rho kinase inhibitor Y-27632 increases erythrocyte deformability and low oxygen tension-induced ATP release. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2011, 301(5): H1891-H1896.
- [18] Jin R, Yang GJ, Li GH. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells. *J Leukoc Biol*, 2010, 87(5): 779-789.
- [19] del Zoppo G, Ginis I, Hallenbeck JM, et al. Inflammation and stroke: putative role for cytokines, adhesion molecules and iNOS in brain response to ischemia. *Brain Pathol*, 2000, 10(1): 95-112.
- [20] Bose S, Cho J. Role of chemokine CCL2 and its receptor CCR2 in neurodegenerative diseases. *Archiv Pharm Res*, 2013, 36(9): 1039-1050.
- [21] Amantea D, Nappi G, Bernardi G, et al. Post-ischemic brain damage: patho-physiology and role of inflammatory mediators. *FEBS J*, 2009, 276(1): 13-26.
- [22] Inose Y, Kato Y, Kitagawa K, et al. Activated microglia in ischemic stroke penumbra upregulate MCP-1 and CCR2 expression in response to lysophosphatidylcholine derived from adjacent neurons and astrocytes. *Neuropathology*, 2015, 35(3): 209-223.
- [23] Yan YP, Sailor KA, Lang BT, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 plays a critical role in neuroblast migration after focal cerebral ischemia. *J Cerebr Blood Flow Metab*, 2007, 27(6): 1213-1224.
- [24] 郭秀凤,李运刚,李化勇,等.急性脑梗死患者血浆单核细胞趋化因子-1和组织因子的变化.中华脑年心脑血管病杂志,2008,10(10):790.
- [25] 李海涛.法舒地尔联合鼠神经生长因子对急性脑梗死患者血浆 Lp-PLA2 和 MCP-1 的影响.中国实用医药,2013,8(19):47-49.
- [26] 唐华,赵合庆.添加盐酸法舒地尔治疗急性脑梗死时血清炎症因子的变化及疗效评价.中国临床神经科学,2009,17(3):307-309.
- [27] 赵海清,陈传磊,陈澎,等.盐酸法舒地尔对脑梗死患者的疗效及对血清中 IL-6、IL-12 和 IL-18 影响的研究.中国现代医学杂志,2012,22(18):49-52.
- [28] 尹变利.盐酸法舒地尔对急性脑梗死老年患者血清中血管细胞间黏附分子-1、细胞间黏附分子-1、内皮素-1 和一氧化氮水平的影响.中华老年学杂志,2015,35(6):1573-1575.
- [29] Gonzenbach RR, Schwab ME. Disinhibition of neurite growth to repair the injured adult CNS: focusing onNogo. *Cellular Mol Life Sci*, 2008, 65(1): 161-176.
- [30] Craveiro LM, Weinmann O, Roschitzki B, et al. Infusion of anti-Nogo-A antibodies in adult rats increases growth and synapse related proteins in the absence of behavioral alterations. *Exp Neurol*, 2013, 250: 52-68.
- [31] Wang H, Xiong Y, Mu D. PirB restricts neuronal regeneration in developing rat brain following hypoxia-ischemia. *Mol Med Rep*, 2012, 6(2): 339-344.
- [32] Liu YH, Zhao Y, Huang FZ, et al. Combination of early constraint-induced movement therapy and fasudil enhances motor recovery after ischemic stroke in rats. *Int J Neurosci*, 2016, 126(2): 168-173.
- [33] Satoh S, Takayasu M, Kawasaki K, et al. Antispasmodic effects of hydroxyfasudil, a Rho kinase inhibitor, after subarachnoid hemorrhage. *J Pharmacol Sci*, 2012, 118(1): 92-98.
- [34] Fukuta T, Asai T, Sato A, et al. Neuroprotection against cerebral ischemia/reperfusion injury by intravenous administration of liposomal fasudil. *Int J Pharm*, 2016, 506(1-2): 129-137.