

- the treatment of cognitive impairments in people with schizophrenia[J]. *Am J Psychiatry*, 2008, 165(1): 82-89.
- [4] Lee BJ, Lee JG, Kim YH. A 12-week, double-blind, placebo-controlled trial of donepezil as an adjunct to haloperidol for treating cognitive impairments in patients with chronic schizophrenia[J]. *J Psychopharmacol*, 2007, 21(4): 421-427.
- [5] Akhondzadeh S, Gerami M, Noroozian M, et al. A 12-week, double-blind, placebo-controlled trial of donepezil adjunctive treatment to risperidone in chronic and stable schizophrenia [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2008, 32(8): 1810-1815.
- [6] Keefe RS, Malhotra AK, Meltzer HY, et al. Efficacy and safety of donepezil in patients with schizophrenia or schizoaffective disorder: significant placebo/practice effects in a 12-week, randomized, double-blind, placebo-controlled trial [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2008, 33(6): 1217-1228.
- [7] Rosse RB, Deutsch SI. Adjuvant galantamine administration improves negative symptoms in a patient with treatment-refractory schizophrenia [J]. *Clin Neuropharmacol*, 2002, 25(5): 272-275.
- [8] Conley RR, Boggs DL, Kelly DL, et al. The effects of galantamine on psychopathology in chronic stable schizophrenia[J]. *Clin Neuropharmacol*, 2009, 32(2): 69-74.
- [9] Wang D, Noda Y, Zhou Y, et al. Synergistic effect of combined treatment with risperidone and galantamine on phencyclidine-induced impairment of latent visuospatial learning and memory: Role of nAChR activation-dependent increase of dopamine D1 receptor-mediated neurotransmission [J]. *Neuropharmacology*, 2007, 53(3): 379-389.
- [10] Risch SC, Horner MD, McGurk SR, et al. Donepezil effects on mood in patients with schizophrenia and schizoaffective disorder[J]. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2006, 9(5): 603-605.
- [11] Caroff SN, Campbell EC, Havey J, et al. Treatment of tardive dyskinesia with donepezil: a pilot study[J]. *J Clin Psychiatry*, 2001, 62(10): 772-775.
- [12] Bergman J, Dwolatzky T, Brettholz I, et al. Beneficial effect of donepezil in the treatment of elderly patients with tardive movement disorders [J]. *J Clin Psychiatry*, 2005, 66(1): 107-110.
- [13] Hardan AY, Handen BL. A retrospective open trial of adjunctive donepezil in children and adolescents with autistic disorder[J]. *J Child Adolesc Psychopharmacol*, 2002, 12(3): 237-241.
- [14] Yoo JH, Valdovinos MG, Williams DC. Relevance of donepezil in enhancing learning and memory in special populations: a review of the literature [J]. *J Autism Dev Disord*, 2007, 37(10): 1883-1901.
- [15] Meagher D. Motor subtypes of delirium: past, present and future[J]. *Int Rev Psychiatry*, 2009, 21(1): 59-73.

收稿日期: 2009-07-30 修回日期: 2009-10-27 编辑: 许卓文

## Rho/Rho 激酶系统在缺血性脑血管病中的作用

刘康, 丁素菊

(第二军医大学长海医院 神经内科, 上海 200433)

**关键词:** 脑血管意外; 肌球蛋白轻链; 肌球蛋白轻链激酶; 动脉粥样硬化

**中图分类号:** R743

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1004-583X(2010)03-0271-03

Rho 作为 Ras 同源物于 1985 年首先被克隆出来, 此后的研究发现 Rho 作为信号转导调节分子联系细胞表面受体与肌动蛋白细胞骨架, 在细胞代谢过程中发挥重要作用。近年来, 越来越多的研究发现 Rho/Rho 激酶系统在多种脑血管意外的发生发展中扮演了重要的角色, 也成为脑血管病药物治疗的新靶点。

### 1 Rho/Rho 激酶

Rho 蛋白为小分子鸟苷酸结合蛋白(又称小 G 蛋白), 是 Ras 蛋白超家族成员。目前已从哺乳动物中分离出 20 种 Rho 家族成员<sup>[1]</sup>。Rho 蛋白家族分为 3 大类: Rho、Rac、Cdc42, 其中 Rho 由 RhoA、RhoB 和 RhoC 组成。它们最具特色的功能是对肌动蛋白动力学的调节。RhoA 调节肌动蛋白应力纤维(stress fiber)的装配, 而 Rac 和 Cdc42 则调节肌动蛋白聚合成特殊的外周结构: Cdc42 促进丝状伪足的形成; Rac 调节层状伪足的生长及膜皱缩。RhoA、Rac 和 Cdc42 还

参与整合素为基础的黏附复合体, 如黏着斑(focal adhesion)的装配<sup>[2]</sup>。越来越多的证据表明, Rho 超家族是肌动蛋白依赖的调节细胞功能的另一重要因子。肌动蛋白细胞骨架不仅在细胞骨架调节、细胞形状改变及移行中起重要作用, 在细胞的各种生物活动如平滑肌细胞收缩、血管平滑肌细胞增殖、细胞黏附、血小板集聚、接触抑制、生长和凋亡中也起关键作用<sup>[3]</sup>。在细胞代谢进程中, Rho 蛋白具有三磷酸鸟苷(GTP)酶活性, 其作为许多膜受体, 如 G 蛋白耦联受体的下游效应蛋白, 在细胞信号转导通路中作为信号转换器或分子开关以 GTP 结合形式(活性状态)和二磷酸鸟苷(GDP)结合形式(非活性状态)存在, 通过两者间的相互转换, 引发或终止细胞级联活化反应, 产生多种生物学效应<sup>[4]</sup>。在静息状态下, RhoA 是以 GDP 结合的形式存在于细胞质中, 当细胞受到细胞外信号刺激时, 胞质内的 RhoA 复合物被 Rho 鸟嘌呤核苷酸交换因子(Rho GEFs)激活后可促使 RhoA 结合的核苷酸交换(GTP 代替 GDP), 使 RhoA 从复合物中释放出来, 转位到细胞膜<sup>[5]</sup>。所有 Rho 蛋白都是在它们的羧基末端被异戊烯化<sup>[6]</sup>, 通过这种异戊烯化作用引起活性 GTP 结合形式的 Rho 蛋白移位到胞膜, 继而和它的效应蛋白作用产生下游反应。

Rho 激酶又称 Rho 相关激酶, 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形式存在(Rhoka/Rhock2 和 Rhokl3/Rhock1), 是目前功能研究最为清楚的 Rho 下游靶效应分子。分子结构包括氨基端催化结构

通信作者: 丁素菊, Email: Dingsuju@hotmail.com

域、中央的 Rho 结合的卷曲螺旋结构域和羧基端 pH 结构域。在静息状态下, Rho 激酶的 Rho 结合结构域和 pH 结构域、Rho 激酶的催化结构域相互作用, 从而抑制了激酶的活性。当激活状态的 Rho 与 Rho 激酶的结合结构域相互作用时改变了 Rho 激酶的构型, Rho 激酶被激活<sup>[7]</sup>, 接受 Rho 传递的活化信号, 发生多个氨基酸位点的磷酸化而激活, 并引导其下游一系列磷酸或脱磷酸化反应。如通过调节肌球蛋白轻链水平而参与血管平滑肌收缩的调节, 进而参与了心脑血管疾病的发病机制; 此外研究发现, 转化生长因子<sub>1</sub> (TGF-<sub>1</sub>) 诱导的血管平滑肌过度分化也是依赖于 Rho 激酶信号通路来调节<sup>[8]</sup>。

## 2 Rho/Rho 激酶与缺血性脑血管病

以往有较多研究证实 Rho/Rho 激酶在蛛网膜下腔出血后脑血管痉挛的发病机制中发挥重要作用。佟怀宇等<sup>[9]</sup>研究发现应用 Rho 激酶抑制剂 Fasudil 可有效改善蛛网膜下腔出血 (SHA) 后脑血管痉挛, 并可经数字减影血管造影 (DSA) 证实。但对于 Rho/Rho 激酶在缺血性脑血管病中的作用却鲜有相关研究报道。

### 2.1 Rho/Rho 激酶与短暂性脑缺血发作 (TIA)

TIA 是指由于某种因素造成脑动脉一过性或短暂性供血障碍而导致相应供血区域局灶性可逆性神经功能缺损。但有相当部分患者可发展为严重的脑梗死, 多遗留神经功能缺损。目前研究发现 97% 的 TIA 患者在 3 小时内症状缓解, 症状持续超过 3 小时的 TIA 患者中 95% 可有影像学及病理学改变。因此对 TIA 患者早期有效干预治疗非常重要。脑血管痉挛 (CVS) 学说为 TIA 发作的重要学说, 血管平滑肌异常收缩在 CVS 的病理发生中起着关键作用, 而肌球蛋白轻链 (MLC) 磷酸化是平滑肌收缩的主要调节机制, 受  $Ca^{2+}$  或钙调素 (CaM) 依赖性肌球蛋白轻链激酶 (MLCK) 和 MLC 磷酸酶 (MLCP) 两种酶活性平衡的控制<sup>[5]</sup>。在外界因素刺激下, 细胞内  $Ca^{2+}$  浓度增加致 MLCK 激活, 活化的 MLCK 在 Thr18/Ser19 两位点使 MLC 双磷酸化, 产生平滑肌收缩, MLCP 可使 MLC 去磷酸化, 导致平滑肌细胞舒张; 而 Rho 激酶可通过抑制肌球蛋白轻链磷酸酶 (MLCP) 的活性来上调 MLC 磷酸化水平, 进而以不依赖  $Ca^{2+}$  的方式进一步增强平滑肌收缩, 参与 CVS 发生, 这种现象被称之为“钙敏化 (Ca sensitization)”。故有效抑制 Rho 激酶活性可能为 CVS 的预防开辟一条新途径<sup>[10]</sup>。目前针对 CVS 应用钙离子拮抗剂较多, 传统的钙通道阻滞剂只能抑制钙离子进入细胞内, 而对于肌质网释放的高浓度钙离子导致血管痉挛及神经递质 (如血栓烷 A<sub>2</sub>、5-羟色胺等) 释放导致的血管痉挛无效, 即钙通道阻滞剂并不能完全控制 CVS。法舒地尔 (Fasudil) 作为 Rho 激酶抑制剂, 抑制平滑肌收缩的最终阶段肌球蛋白轻链的磷酸化, 从根本上抑制血管痉挛的发生, 选择性高, 只作用于痉挛血管, 无“盗血”现象, 且对血压影响不明显, 不会导致低灌注发生, 也不会影响心肌收缩力<sup>[11]</sup>。近年来研究表明, Fasudil 还能通过抑制内皮细胞合成分泌内皮素 (ET) 和 NO, 使 ET 和 NO 的平衡状态得到改善, 从而增强内皮介导的舒血管作用<sup>[12]</sup>。闫斌等<sup>[13]</sup>也研究发现 Fasudil 可安全有效的控制 CVS 发生、发展, 从不同的途径抑制 TIA 的发作, 疗效显著。

### 2.2 Rho/Rho 激酶与高血压病

高血压病作为缺血性脑卒中的独立危险因素对于缺血性卒中的发生起着重要作用。研

究证实血管平滑肌的收缩状态决定血管腔的大小, 血管平滑肌紧张度的异常增大参与了血管疾病的发生机制, 而高血压最重要的发病机制就是血管阻力的增加, 但是其分子机制还未完全阐明。Rho/Rho 激酶信号通路可以通过对血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 的各种作用介导血管紧张度的改变, 调节血管阻力甚至参与高血压的发生和发展<sup>[14]</sup>。一些研究发现使用 Rho 激酶抑制剂 Y-27632 降低了多种系统性高血压大鼠 (SHRs) 模型的全身血压<sup>[15]</sup>。对比而言, 同等剂量的 Y-27632 对原来是正常血压的动物并没有显著影响, 提示了 Rho/Rho 激酶信号通路很大程度上参与了高血压的发病机制。通过对孤束核使用 Rho 激酶抑制剂或显性失活 Rho 突变体, 导致 SHRs 心率和血压的持续下降, 但对正常血压的 Wistar-Kyoto 大鼠却没有影响, 提示了 Rho 激酶可能参与了高血压的交感神经系统的调节机制<sup>[16]</sup>。在一些其他研究中, 长期给予非低血压剂量的 fasudil 治疗可以明显抑制 SHRs 冠状血管病变形成<sup>[17]</sup>, 充分说明了 Rho 激酶参与了高血压的血管疾病的发生机制。

### 2.3 Rho/Rho 激酶与动脉粥样硬化 (AS)

脑动脉粥样硬化是缺血性脑卒中的主要致病病因, AS 是一种炎症性的病理过程, 其中的主要机制是内膜损伤反应。内皮细胞 (EC) 受损是 AS 发生的始动因素。巨噬细胞、VSMC 的增殖和迁移在动脉粥样硬化中起到重要的作用<sup>[3]</sup>。经研究发现 Rho 激酶可通过不同的信号转导途径激活, 使 MLC 磷酸化及整合素聚集, 导致 EC 通透性增加, EC 屏障功能受损, 细胞迁移、黏附, 炎症反应的发生<sup>[18]</sup>。Rho 家族中的 Rac、Cdc42 可通过调整单核/巨噬细胞的形态, 增强其穿过 EC 的活性, 有利于单核/巨噬细胞、氧化的低密度脂蛋白、炎性因子等易于通过血管内皮细胞, 进而产生生长因子, 刺激中膜平滑肌细胞增生, 并迁移入内膜, 这种平滑肌细胞有低密度脂蛋白受体, 可摄取低密度脂蛋白而成为肌源性泡沫细胞, 参与 AS 的形成<sup>[3]</sup>。而 TGF-<sub>1</sub> 通过激活细胞内的 Rho/Rho 激酶信号传导途径, 刺激肌动蛋白的重组。使被抑制的细胞增殖, 并且调控血管中膜的平滑肌细胞的基因过渡的表达, 参与动脉粥样硬化的发展<sup>[8]</sup>。另外, Rho 激酶也通过蛋白激酶 C 途径向下调节内皮细胞一氧化氮合酶的表达来参与 AS 的发展<sup>[19]</sup>。在实验中应用 Rho 激酶抑制剂通过观测不同类型的细胞向血管内皮细胞下的迁移活性时发现, 在 AS 的发生、发展过程中, Rho 激酶抑制剂在特殊的条件 (易形成 AS 的应激环境) 下通过调整肌球蛋白 的活性, 可以通过阻止巨噬细胞、血管平滑肌细胞向血管内皮下的迁移, 防止动脉粥样斑块的形成及使受损的斑块退化<sup>[20]</sup>。

### 2.4 Rho/Rho 激酶与缺血性脑卒中

缺血性脑卒中最核心的问题是神经细胞损伤引起的神经功能障碍, 在缺血中心区缺血引发的缺血性级联反应而出现脑梗死。缺血性级联反应主要包括: 细胞内钙超载; 兴奋性氨基酸的大量释放; 自由基的产生; 梗死后炎症反应。而缺血半暗带的脑组织处于电衰竭与能量衰竭之间状态, 局部存在大动脉残余血流和 (或) 侧支循环, 脑缺血程度较轻, 仅功能缺损, 具有可逆性。Rho/Rho 激酶信号传导途径可通过抑制 MLCP 的活性来上调 MLC 磷酸化水平, 而进一步增强血管平滑肌收缩, 加重梗死部位的缺血缺氧, 特别是缺血半暗带区域的脑组织缺血, 而导致中心坏死区的扩大, 缺血半暗带的缩小。同时 Rho 激酶

还可通过介导缺氧或凝血酶引起的内皮型 NOS (endothelial NOS, eNOS) 表达下调<sup>[21]</sup>, 使 NO 扩张血管增加脑缺血区血流量、抑制血小板聚集、抑制小血管缺血后炎症反应的脑保护作用下降。有研究发现大鼠大脑中动脉阻塞后, 出现三磷酸腺苷 (ATP) 耗竭, 缺血造成细胞内钙离子增多, 引发级联反应, 与迟发性细胞死亡或凋亡有关, 应用 Fasudil 在各时段增加局部脑血流量, 可延缓缺血脑组织进入不可逆的细胞死亡过程, 体现脑保护作用<sup>[22]</sup>。Rikitake 等<sup>[23]</sup>在大脑中动脉闭塞大鼠中应用不同剂量 Fasudil 抑制 Rho 激酶活性, 结果显示, 内皮型一氧化氮酶 mRNA 及其蛋白表达随 Fasudil 浓度的增加而增加, 相应的 eNOS 活性和 NO 含量也增加, 从而使脑梗死体积较未治疗组缩小 33%, 神经功能评分提高 37%。而在 eNOS 缺陷小鼠中未能观察到神经保护作用, 表明 Fasudil 主要通过抑制 eNOS 表达下调, 增加 eNOS 活性和 NO 产生。Fasudil 在缺血-再灌注过程中有改善脑组织代谢的作用, 其不影响细胞内钙离子的运转, 能加速  $Ca^{2+}$  浓度的恢复, 减少线粒体内钙的聚集, 维持线粒体正常功能, 保持氧化代谢, 从而减少乳酸的产生和促进乳酸的氧化, 纠正酸中毒<sup>[24]</sup>。Rho 激酶抑制剂还可抑制梗死后炎症反应。Bao 等<sup>[21]</sup>和 Doe 等<sup>[25]</sup>发现, Rho 激酶抑制剂可减少炎症细胞因子的产生, 并可能通过抑制巨噬细胞、白细胞介素 6 (IL-6) mRNA 的转录, 减少 IL-6、IL-1 和 TNF 产生, 其具体机制不清。而 IL-1、TNF 可刺激 IL-8 释放, IL-8 表达主要通过核转录因子 B 调节, 而 Rho 家族在 NF- $\kappa$ B 依赖基因和白细胞迁移中起着重要作用<sup>[26]</sup>。

综上所述, Rho/Rho 激酶系统在多种缺血性脑血管病发病机制中起着重要作用, 但其具体作用途径还有待进一步研究。同时 Rho 激酶抑制剂也已显示出对脑血管病良好的预防和保护作用, Rho 激酶已日益成为脑血管病药物治疗的新位点, 临床应用前景广阔。

#### 参考文献:

- [1] Burridge K, Wennerberg K. Rho and Rac take center stage[J]. Cell, 2004, 116(2): 167-179.
- [2] 尚可, 袁展群, 刘勇. Rho/Rho 激酶信号通路与高血压病[J]. 高血压杂志, 2006, 14(4): 254-256.
- [3] 马小欣, 赵慧颖, 徐宝华. Rho/Rho 激酶与动脉粥样硬化及冠心病的关系[J]. 中国微循环, 2007, 11(2): 138-141.
- [4] 高辉, 樊均明. Rho GTP 酶/Rho 激酶系统与肾间质纤维化[J]. 临床荟萃, 2005, 20(15): 896-898.
- [5] Somlyo AP, Somlyo AV.  $Ca^{2+}$  sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin: modulated by G proteins, kinases and myosin phosphatase[J]. Physiol Rev, 2003, 83(4): 1325-1358.
- [6] Williams CL. The polybasic region of Ras and Rho family small GTPases: a regulator of protein interactions and membrane association and a site of nuclear localization signal sequences[J]. Cell Signal, 2003, 15(12): 1071-1080.
- [7] Shimokawa H. Rho-kinase as a novel therapeutic target in treatment of cardiovascular diseases [J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2002, 39(3): 319-327.
- [8] Deaton RA, Su C, Valencia TG, et al. Transforming growth factor- $\beta$ 1-induced expression of smooth muscle marker genes involves activation of PKN and p38 MAPK[J]. J Biol Chem, 2005, 280(35): 31172-31181.
- [9] 佟怀宇, 余新光, 许百男. 盐酸法舒地尔治疗蛛网膜下腔出血后迟发脑血管痉挛[J]. 军医进修学院学报, 2002, 23(1): 53-56.
- [10] 赵伟疆. Rho 激酶与脑血管痉挛[J]. 基础医学与临床, 2005, 25(10): 896-900.
- [11] Zhao J, Zhou D, Guo J, et al. Effect of fasudil hydrochloride, a protein kinase inhibitor, on cerebral vasospasm and delayed cerebral ischemic symptoms after aneurysmal subarachnoid hemorrhage[J]. Neurol Med Chir (Tokyo), 2006, 46(9): 421-428.
- [12] 刘惠良, 齐晓勇, 张至, 等. Rho 激酶抑制剂治疗左心疾病相关的肺动脉高压临床研究[J]. 临床荟萃, 2009, 24(11): 974-976.
- [13] 闫斌, 郭月叶, 郭雅聪, 等. 低分子肝素钙联合盐酸法舒地尔治疗短暂性脑缺血发作疗效分析[J]. 中国实用神经病学杂志, 2007, 10(3): 73-74.
- [14] Wetschurck N, Offermanns S. Rho/Rho-kinase mediated signaling in physiology and pathophysiology[J]. J Mol Med, 2002, 80(10): 629-638.
- [15] Uehata M, Ishizaki T, Satoh H, et al. Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension[J]. Nature, 1997, 389(6654): 990-994.
- [16] Ito K, Hirooka Y, Sakai K, et al. Rho/Rho-kinase pathway in brain stem contributes to blood pressure regulation via sympathetic nervous system: possible involvement in neural mechanisms of hypertension[J]. Circ Res, 2003, 92(12): 1337-1343.
- [17] Shimokawa H, Morishige K, Miyata K, et al. Long-term inhibition of Rho-kinase induces a regression of arteriosclerotic coronary lesions in a porcine model in vivo[J]. Cardiovasc Res, 2001, 51(1): 169-177.
- [18] Riento K, Ridley AJ. Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003, 4(6): 446-456.
- [19] Shimokawa H, Takeshita A. Rho-Kinase is an important therapeutic target in cardiovascular medicine [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005, 25(9): 1767-1775.
- [20] Nakayama M, Amano M, Katsumi A, et al. Rho-kinase and myosin II activities are required for cell type and environment specific migration[J]. Genes Cells, 2005, 10(2): 107-117.
- [21] Bao W, Hu E, Tao L, et al. Inhibition of Rho-kinase protects the heart against ischemia/reperfusion injury [J]. Cardiovasc Res, 2004, 61(3): 548-558.
- [22] 佟怀宇, 余新光, 许百男. 盐酸法舒地尔对大鼠脑缺血-再灌注损伤的保护作用[J]. 军医进修学院学报, 2002, 23(3): 167-169.
- [23] Rikitake Y, Kim HH, Huang Z, et al. Inhibition of Rho kinase (ROCK) leads to increased cerebral blood flow and stroke protection[J]. Stroke, 2005, 36(10): 2251-2257.
- [24] 黄维惠. 盐酸法舒地尔治疗急性缺血性脑血管病的临床疗效[J]. 中国全科医学, 2007, 10(5): 415-429.
- [25] Doe C, Bentley R, Behm DJ, et al. Novel Rho kinase inhibitors with anti-inflammatory and vasodilatory activities [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2007, 320(1): 89-98.
- [26] Zhao D, Pothoulakis C. Rho GTPases as therapeutic targets for the treatment of inflammatory diseases[J]. Expert Opin Ther Targets, 2003, 7(5): 583-592.

收稿日期: 2009-10-30 修回日期: 2009-12-09 编辑: 许卓文