

## Rho Kinases and Ischemic Cerebrovascular Diseases

Chenyu Lin<sup>1,2,3</sup>, Ning Wang<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>College of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei

<sup>2</sup>Institute for Pharmacodynamics and Safety Evaluation of Chinese Medicine, Anhui Academy of Chinese Medicine, Hefei

<sup>3</sup>China Key Laboratory of Xin'an Medicine, Ministry of Education, Hefei

Email: [linchenyu0427@163.com](mailto:linchenyu0427@163.com), [wnhefei@163.com](mailto:wnhefei@163.com)

Received: Dec. 15<sup>th</sup>, 2013; revised: Jan. 13<sup>th</sup>, 2014; accepted: Jan. 20<sup>th</sup>, 2014

Copyright © 2014 Chenyu Lin, Ning Wang. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. In accordance of the Creative Commons Attribution License all Copyrights © 2014 are reserved for Hans and the owner of the intellectual property Chenyu Lin, Ning Wang. All Copyright © 2014 are guarded by law and by Hans as a guardian.

**Abstract:** Rho kinases (Rho associated kinases, ROCK) are involved in various signaling pathways in the pathogenesis of cerebral ischemia. The article outlines the role of ROCK in ischemic cerebrovascular diseases, which provides theoretical reference for ischemic cerebrovascular diseases.

**Keywords:** Rho Kinases; Cerebral Ischemia; RhoA; Rac 1

## Rho 激酶与缺血性脑血管疾病

林辰雨<sup>1,2,3</sup>, 汪 宁<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>安徽中医药大学药学院中药药理系, 合肥

<sup>2</sup>安徽中医药科学院中药药效与安全性评价研究所, 合肥

<sup>3</sup>新安医学省部共建教育部重点实验室, 合肥

Email: [linchenyu0427@163.com](mailto:linchenyu0427@163.com), [wnhefei@163.com](mailto:wnhefei@163.com)

收稿日期: 2013 年 12 月 15 日; 修回日期: 2014 年 1 月 13 日; 录用日期: 2014 年 1 月 20 日

**摘 要:** Rho 激酶(Rho associated kinases, ROCK)通过调控脑缺血的发病过程中多条信号通路, 在脑缺血的发病中发挥着重要作用。本文概述了 ROCK 在缺血性脑血管疾病中的相关作用, 为缺血性脑血管疾病提供相应的理论参考。

**关键词:** Rho 激酶; 脑缺血; RhoA; Rac 1

### 1. ROCK 生物学特性

Rho 蛋白(Ras homologous protein)为小分子鸟苷酸结合蛋白, 具有 GTP 酶活性, 是 Ras 蛋白超家族成员之一。其主要的特征性成员为 RhoA、Rac 1、Cdc42, 在肌动蛋白细胞骨架的调控中起着重要的作用<sup>[1]</sup>。

RhoA 调控肌动蛋白应力纤维(stress fiber)的组装; Cdc42 参与丝状伪足的形成; Rac1 调节层状伪足的生成和活性氧的产生<sup>[2]</sup>。此外, RhoA、Rac1、Cdc42 还

\*通讯作者。

可调节以整合素为基础的黏附复合体的形成<sup>[3]</sup>。Rho 激酶, 又称 Rho 相关激酶(Rho associated kinases, ROCK), 属于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族成员之一, 是研究最多的 RhoA 下游信号分子之一。Rho 激酶有两种异构体 ROCK II (ROCK $\alpha$ )和 ROCK I (ROCK $\beta$ )。Rho 激酶的下流效应分子很多, 研究最多的 Rho 激酶作用的底物之一是肌球蛋白轻链磷酸化酶(myosin light chain phosphatase, MLCP)。Rho 激酶调节 MLC 的磷酸化水平是通过直接磷酸化肌球蛋白轻链(myosin

light chain, MLC)及使 MLCP 失活两种途径实现, 导致 MLC 磷酸化水平升高和平滑肌细胞收缩, 发生血管痉挛<sup>[4]</sup>。此外, 内皮型一氧化氮合酶(endothelial NO synthase, eNOS)也是 Rho 激酶的重要作用底物之一。

## 2. Rho 激酶与缺血性脑血管疾病

ROCK 在缺血性脑卒中的可能发病机制是通过抑制肌球蛋白轻链磷酸化酶的表达, 上调肌球蛋白轻链磷酸化水平, 从而增强血管平滑肌收缩, 加重脑梗死部位的缺血缺氧, 进而导致中心坏死区的扩大, 缺血半暗带的缩小<sup>[5]</sup>。Rho 激酶还被认为在血流动力学异常, 炎症反应过程和许多细胞的功能中起着重要作用<sup>[6-10]</sup>, 如中性粒细胞和单核细胞的移行, eNOS 下降引起的内皮细胞损伤。

### 2.1. Rho 激酶在脑缺血疾病中的作用机制

#### 2.1.1. Rho 激酶介导氧化应激的影响

氧化应激在缺血性脑疾病中起着重要作用, 活性氧通过促进脂质氧化、促炎基因的表达和内皮型一氧化氮(NO)的氧化失活而损伤内皮细胞功能。RhoA 的活化后可诱导 Rho 激酶的激活, 进而促进活性氧的生成, 引起内皮细胞的损伤, 增加血脑屏障的通透性, 诱导脑水肿。同时, 活性氧还可直接损伤神经细胞膜, 引起脑细胞实质水肿。Rac 1, 作为 Rho 激酶家族小 GTP 结合蛋白, 在缺血诱导脑微血管内皮细胞氧化应激的过程中也起着重要调控的作用。p114 Rho 鸟苷酸交换因子(p114 Rho guanine nucleotide exchange factors, p114 Rho GEFs)可诱导 Rac 1 蛋白活化, 进而诱导 NADPH 氧化酶的激活促进活性氧的产生, 诱导氧化应激反应<sup>[6]</sup>。缺氧/再给氧可诱导猪脑微血管内皮细胞中 Rac-1(NADPH 氧化酶活化剂)向胞膜转移, 应用阿托伐他汀抑制 Rac-1 的活性可阻止缺血/再灌注诱导的 BBB 的损伤。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 可增加猪脑微血管内皮细胞的通透性, 应用 Rho 激酶抑制剂可完全阻滞 ROS 诱导的内皮通透性的增加和肌动蛋白细胞骨架的磷酸化, 减少 BMEC 的损伤和 BBB 的通透性。

#### 2.1.2. Rho 激酶介导细胞骨架变化

作为 ROCK 的上游信号分子, RhoA 在内皮细胞的完整和通透性的调节中起着重要的作用<sup>[8,9]</sup>。脑缺血可诱导 RhoA 的活化, 进而促进其效应蛋白 Rho 激酶

的激活, 促进应力纤维的形成, 进而引起肌球蛋白轻链的磷酸化, 降低 NO 的生物活性<sup>[8-10]</sup>。由于肌球蛋白轻链可破坏细胞连接进而增加内皮细胞的通透性, 同时 NO 在维持内皮细胞完整性中起着重要的作用。因此, 脑缺血可通过激活 ROCK, 诱导细胞通透性增加, 加重缺血性脑血管疾病的发生。

#### 2.1.3. Rho 激酶介导炎症反应

ROCK 在血流动力学异常和炎症反应过程起着重要的作用。RhoA 作为细胞骨架肌动蛋白调节剂, 可以被一些炎症底物如脂多糖(LPS)激活, 进而诱发 ROCK 的活化, 促进一系列炎症反应的发生<sup>[11]</sup>。炎症反应可以促进中性粒细胞和单核细胞移行进入缺血损伤区域。以往研究表明, 缺血性中风患者血液中白细胞的 ROCK 活性会显著升高<sup>[12]</sup>。

#### 2.1.4. Rho 激酶调节磷脂酰肌醇的代谢

磷脂酰肌醇的代谢需要 RhoA 的调节。相关研究表明, RhoA 参与血小板上凝血酶受体(G 蛋白偶联受体之一)和溶血磷脂酸受体激活磷脂酰肌醇 3 羟基激酶(PI3K)的激活。RhoA 通过调节 PI3K 活性间接控制细胞的代谢、增生和生存。同时磷脂酰肌醇 4,5,二磷酸直接激活蛋白激酶 B, 后者通过糖原合成激酶 3、果糖磷酸激酶及一个引导潜在的生存信号调节细胞生存<sup>[13]</sup>。G 蛋白活性突变成员之一抑制型 G 蛋白 3 通过依赖于 RhoA 通路引起神经元和星形胶质细胞凋亡, 从而加重脑卒中的临床过程。

#### 2.1.5. Rho 激酶调节 eNOS 的表达

相关研究表明, 急性脑缺血可诱导 Rho 激酶的激活进而下调 eNOS 的表达, 间接导致脑缺血周围区的微循环功能障碍, 扩大缺血损伤区范围<sup>[14]</sup>。脑缺血损伤可活化神经元中的 ROCK, 抑制磷脂酰肌醇 3 激酶合成, 下调 eNOS 蛋白的表达, 进一步造成神经元的磷脂膜, 细胞骨架蛋白, 核酸等重要结构的解体, 最终导致神经元细胞损伤, 凋亡<sup>[15]</sup>。加重脑缺血的发病过程。

#### 2.1.6. Rho 激酶调节基质金属蛋白酶 9 的表达

基质金属蛋白酶 9(matrix metalloproteinase 9, MMP9)是细胞外蛋白降解酶系之一, 活化后的 MMP-9 可诱导 BBB 基底膜受损, 加重脑卒中的发生。研究表明, ROCK 的激活可诱导 MMP9 表达的增加,

导致基底膜的降解, BBB 通透性的增加, 加重脑卒中的发病过程<sup>[16]</sup>。

## 2.2. Rho 激酶抑制剂的脑保护作用

Rho 激酶在缺血性脑疾病中的病理发生过程中起着重要的调控作用, 其活性的抑制可逆转相关病理的发生。因此, 有关 Rho 激酶抑制剂的研究引起了越来越多的关注, 相关研究表明 Rho 激酶抑制剂在缺血性脑卒中的防治作用中发挥着重要的作用。Rikitake 等研究表明, ROCK 抑制剂(盐酸法舒地尔和 Y27632)均可抑制内皮细胞 ROCK 的表达, 扩展血管, 促进局部微循环, 保护内皮细胞的活力, 减少脑卒中后脑梗死体积的扩大, 促进神经功能改善<sup>[17]</sup>。同时, 相关研究还表明, ROCK 抑制剂(法舒地尔)可通过下调大鼠脑缺血再灌注损伤后 S100B 蛋白的表达, 进而抑制脑卒中后的炎症反应和 BBB 破坏<sup>[17]</sup>。Rho 激酶抑制剂还可抑制中性粒细胞和单核细胞浸润来阻止炎症反应的发生, 抑制 Ca<sup>2+</sup>的超载, 减少中性粒细胞和脑血管内氧自由基的产生, 促进神经轴突再生与神经网络的重建, 减少迟发性神经元损害<sup>[18]</sup>。

## 3. 展望

综上所述, ROCK 信号传导通路在缺血性脑卒中发病过程的多个方面起着重要的作用。有关 ROCK 信号通路的研究将为临床治疗缺血性脑卒中、神经损伤以及其他神经系统疾病提供新的治疗靶点。应用于临床的 Rho 激酶抑制剂, 对缺血性脑卒中及其他心脑血管疾病的治疗疗效显著, 为临床防治缺血性脑卒中展示了广泛的前景。对于缺血性脑血管疾病, 进一步研究 Rho 激酶信号通路, 明确 Rho 激酶各区域的结构和相互作用关系以及脑损伤后 Rho 激酶激活及调节机制, 使缺血性脑血管疾病能得到更好有效治疗具有重要意义。

## 基金项目

国家自然科学基金(NO 81374005)。

## 参考文献 (References)

[1] Hall, A. (1998) Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science*,

- 279, 509-514.
- [2] Nakamura, F. (2013) FilGAP and its close relatives: A mediator of Rho-Rac antagonism that regulates cell morphology and migration. *Biochemical Journal*, **453**, 17-25.
- [3] Doran, J.D., Liu, X., Taslimi, P., et al. (2004) New insights into the structure function relationships of Rho associated kinase: A thermodynamic and hydrodynamic study of the dimer to monomer transition and its kinetic implications. *Biochemical Journal*, **384**, 255-262.
- [4] Catharine, A. and Bryan, B.A. (2011) Rho kinase proteins—Pleiotropic modulators of cell survival and apoptosis. *Anticancer Research*, **31**, 3645-3657.
- [5] Naraoka, M., Munakata, A., Matsuda, N., Shimamura, N. and Ohkuma, H. (2013) Suppression of the Rho/Rho-Kinase pathway and prevention of cerebral vasospasm by combination treatment with statin and fasudil after subarachnoid hemorrhage in rabbit. *Translational Stroke Research*, **4**, 368-374.
- [6] Heasman, S.J. and Ridley, A.J. (2008) Mammalian Rho GTPases: New insights into their functions from *in vivo* studies. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **9**, 690-701.
- [7] Diebold, B.A., Fowler, B., Lu, J., et al. (2004) Antagonistic cross talk between Rac and Cdc42 GTPases regulates generation of reactive oxygen species. *The Journal of Biological Chemistry*, **279**, 28136-28142.
- [8] Sahai, E. and Marshall, C.J. (2002) Rho-GTPases and cancer. *Nature Reviews Cancer*, **2**, 133-142.
- [9] Van Aelst, L. and D'Souza-Schorey, C. (1997) Rho GTPases and signalling networks. *Genes & Development*, **11**, 2295-2322.
- [10] Takemoto, M., Sun, J., Hiroki, J., Shimokawa, H. and Liao, J.K. (2002) Rho-kinase mediates hypoxia-induced downregulation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*, **106**, 57-62.
- [11] Joshi, A.D., Dimitropoulou, C., Thangjam, G., Snead, C. and Feldman, S. (2013) Hsp90 inhibitors prevent LPS-induced endothelial barrier dysfunction by disrupting RhoA signaling. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, **23**, 45-53.
- [12] Lees, K.R., Diener, H.C., Asplund, K., et al. (2003) UK 279, 276, a neutrophil inhibitory glycoprotein, in acute stroke: Tolerability and pharmacokinetics. *Stroke*, **34**, 1704-1709.
- [13] Shi, J. and Wei, L. (2007) Rho kinase in the regulation of cell death and survival. *Archivum Immunologiae et Therapia Experimentalis*, **55**, 61-75.
- [14] Shin, H.K., Salomone, S., Potts, E.M., et al. (2007) Rhokinase inhibition acutely augments blood flow in focal cerebral ischemia via endothelial mechanisms. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, **27**, 998-1009.
- [15] Shibuya, M., Hirai, S., Seto, M., et al. (2005) Effects of fasudil in acute ischemic stroke: Results of a prospective placebo controlled double blind trial. *Journal of the Neurological Sciences*, **15**, 31-39.
- [16] Wang, S., Lee, S.R., Guo, S.Z., et al. (2006) Reduction of tissue plasminogen activator induced matrix metalloproteinase9 by simvastatin in astrocytes. *Stroke*, **37**, 1910-1912.
- [17] Rikitake, Y., Kim, H.H., Huang, Z., et al. (2005) Inhibition of Rhokinase (ROCK) leads to increased cerebral blood flow and stroke protection. *Stroke*, **36**, 2251-2257.
- [18] 刘康, 丁素菊, 吴涛, 等 (2011) Rho 激酶抑制剂对大鼠脑缺血损伤的脑保护作用及 S100B 蛋白表达的影响. *临床神经病学杂志*, **2**, 111-113.