

· 综述 ·

## Rho/Rho 激酶与蛛网膜下腔出血后脑血管痉挛

张金华, 闫福岭

**摘要** 脑血管痉挛是蛛网膜下腔出血最严重的并发症之一,其发病机制尚不十分清楚。近年来,Rho/Rho 激酶通路在蛛网膜下腔出血后脑血管痉挛中的作用受到越来越多的关注。Rho/Rho 激酶通路通过多种机制影响脑血管痉挛的发生和发展。选择性 Rho 激酶抑制剂对脑血管痉挛的有益作用已在动物实验和临床研究中得到证实。文章综述了 Rho/Rho 激酶通路的作用机制及其在脑血管痉挛治疗方面的作用。

**关键词** Rho/Rho 激酶;蛛网膜下腔出血;脑血管痉挛

### Rho/Rho-Kinase and Cerebral Vasospasm After Subarachnoid Hemorrhage

Jin-Hua Zhang<sup>1</sup>, Fu-Ling Yan<sup>2</sup>

<sup>1</sup>School of Clinical Medicine, Southeast University, Nanjing 210009, China; <sup>2</sup>Department of Neurology, Zhongda Hospital, Southeast University, Nanjing 210009, China

**Abstract** Cerebral vasospasm is one of the most serious complications of subarachnoid hemorrhage, and its pathogenesis remains unclear. In recent years, the role of Rho/Rho-kinase pathway in cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage is increasingly receiving attention. Rho/Rho-kinase pathway affects the occurrence and development of cerebral vasospasm through multiple mechanisms. The beneficial effects of the selective Rho-kinase inhibitor on cerebral vasospasm have also been confirmed in animal experiments and clinical research. This article reviews the action mechanism of Rho/Rho-kinase pathway and its effect in the treatment of cerebral vasospasm.

**Key Words** Rho/Rho-kinase; subarachnoid hemorrhage; cerebral vasospasm

脑血管痉挛(cerebral vasospasm, CVS)是蛛网膜下腔出血(subarachnoid hemorrhage, SAH)最严重的并发症之一,是SAH患者病残率和病死率居高不下的主要因素<sup>[1]</sup>。SAH后数天到2周发生的迟发性CVS引起的脑缺血可导致患者永久性功能丧失,甚至死亡,是影响预后和生存质量的重要因素<sup>[2]</sup>。自从Ecker等<sup>[3]</sup>于1951年首次报道SAH后出现CVS现象以来,有关CVS的发病机制不断有新的研究发现,尤其是有关Rho/Rho 激酶通路在CVS发生中的作用研究取得了一些进展。

#### 1 Rho/Rho 激酶

Rho 广泛存在于哺乳动物的组织细胞内,1985

年被确认为哺乳动物 Ras 基因的同系物(Ras homologue),属于 Ras 超家族,因具有内在 GTP 酶活性,且相对分子质量只有(20~30)×10<sup>3</sup>(20~30 kD),因此又被称为小 G 蛋白,即小鸟苷酸调节蛋白(small guanine nucleotide regulatory protein)<sup>[4]</sup>。Rho 激酶(Rho-binding kinase)是 Rho 蛋白的重要下游底物,属于丝/苏氨酸蛋白激酶,可与 Rho·GTP 结合,在介导血管壁细胞间信号转导中起着重要作用<sup>[5,6]</sup>。

##### 1.1 Rho 的结构和功能

Rho 蛋白至少包括 6 个亚型,即 Rho (RhoA、RhoB 和 RhoC)、Rac (Rac1、Rac2、Rac3 和 RhoG)、Cdc42 (Cdc42Hs、G25K 和 TC10)、Rnd (RhoE/Rnd3、Rnd1/Rho6 和 Rnd2/Rho7)、RhoD 和 TIF。Rho 蛋白可呈胞质游离型和膜结合型两种状态,且与 GDP 结合时呈失活状态,与 GTP 结合时呈激活状态,激活

作者单位:210009 南京,东南大学临床医学院(张金华);210009 南京,东南大学附属中大医院神经内科(闫福岭)

后转移到细胞膜处,在  $Ca^{2+}$  依赖性平滑肌收缩中起着重要作用<sup>[7]</sup>。Rho 蛋白活性受 3 种细胞因子调节(图 1): (1) 鸟苷酸交换因子(guanine nucleotide exchange factors, GEF): 调控小 G 蛋白 GDP/GTP 的转换,促使 Rho·GDP 转变为 Rho·GTP。Rho·GTP 通过其 C 端与特异性靶区作用而定位于胞膜; (2) GTP 酶激活蛋白(GTPase activating proteins, GAP): 增加 RhoGTPase 的内在 GTP 酶活性,水解 GTP 为 GDP,使其转变为无活性的 Rho·GDP 结合状态; (3) GDP 解离抑制因子(GDP dissociation inhibitor, GDI): 抑制 GDP/GTP 的转换和 GTP 的水解,从而抑制 Rho 蛋白的激活<sup>[8]</sup>。

在静息细胞的细胞液中,Rho 蛋白与 GDI 形成复合体——Rho·GDP-GDI。当细胞被细胞外信号刺激活化时,GEF 激活 Rho·GDP-GDI 复合体,GDP 转变为 GTP。Rho·GTP 从 Rho·GDP-GDI 复合体中解离并移位至细胞膜发挥作用,GDI 则留在胞液中。当细胞恢复到静息状态时 GDI 通过与 Rho·GDP 结合将其从膜上解离移向胞质<sup>[8,9]</sup>。

## 1.2 Rho 激酶的结构与功能

Rho 激酶包括 3 个结构域:N 末端催化结构域、卷曲螺旋结构域和 C 末端结构域。其中,C 末端结构域又包括 Rho 结合结构域和 PH 结构域。研究表明 C 末端结构域负向调节激酶活性<sup>[10]</sup>,即在静息状态下,Rho 结合结构域和 PH 结构域与 N 末端的催化结构域相互作用,从而抑制激酶的活性。激活状态的 Rho(Rho·GTP)与 Rho 结合结构域相互作用,使 Rho 激酶构型发生改变,从而解除 C 末端结构域对激酶的抑制,使激酶活化<sup>[11]</sup>。目前已发现了 2 种 Rho 激酶同工酶:Rho 激酶  $\alpha$  和 Rho 激酶  $\beta$ ,二者有 64% 的同源性,并且 90% 的激酶结构域相同<sup>[11]</sup>,前者主要在脑内表达,后者主要在非神经元组织(包括心、肺、骨骼肌等)表达。

## 2 SAH 后 CVS 的发生机制

迟发性 CVS 是 SAH 的最常见也是最严重的并发症之一。SAH 后 CVS 时血液血管活性物质发生一系列变化,导致血管平滑肌细胞异常收缩。这些变化包括:氧合血红蛋白(oxyhemoglobin, OxyHb)增高<sup>[12]</sup>和内皮素-1(endothelin-1, ET-1)增高<sup>[13]</sup>、内皮细胞合成 NO 减少<sup>[14]</sup>、钾离子通道活性下降<sup>[14,15]</sup>、蛋白激酶 C(protein kinase C, PKC)激活<sup>[12,14,16]</sup>等。以上因素都参与了 SAH 后 CVS 的发生过程。

此外,有实验证明,SAH 后基底动脉 Rho 激酶表达和活性均增高<sup>[17]</sup>。Rho/Rho 激酶通路对平滑肌收缩的影响已成为目前研究的热点之一。这一通路在 SAH 后血管平滑肌异常收缩中起着重要作用。

### 2.1 Rho/Rho 激酶通路在 CVS 发生中的作用

传统观点认为,平滑肌收缩的主要机制是在  $Ca^{2+}$ /钙调蛋白(calmodulin, CaM)参与下肌球蛋白轻链激酶(myosin light chain kinase, MLCK)催化肌球蛋白轻链(myosin light chain, MLC)的 Ser19 位点磷酸化,磷酸化的 MLC 能分解足够的 ATP,通过与肌动蛋白相互作用使平滑肌收缩。同时,平滑肌细胞中还存在肌球蛋白轻链磷酸酶(myosin light chain phosphatase, MLCP),其作用与 MLCK 相反,当细胞内  $Ca^{2+}$  浓度下降、MLCK 失去活性后,MLCP 使磷酸化的 MLC 去磷酸化,肌球蛋白与肌动蛋白相互脱离,导致平滑肌松弛<sup>[18-20]</sup>。但是,在生理情况下,  $Ca^{2+}$  浓度升高和 MLC 的钙依赖性磷酸化均在瞬间发生,当细胞内  $Ca^{2+}$  浓度降低至静息水平时,某些部位平滑肌,特别是括约肌和血管平滑肌并未松弛,而是维持一定的张力。这种低  $Ca^{2+}$  时平滑肌张力的持续状态(sustained tension)使得器官能对抗外加负荷保持原有形状,因此具有重要的生理意义。这一现象是钙依赖性学说无法解释的,提示在平滑肌收缩过程中还存在其他不依赖钙的调节途径<sup>[21-23]</sup>。目前已发现,平滑肌收缩的非钙依赖性调节是多种因素、多条途径参与的过程。其中,最受关注的是 Rho/Rho 激酶通路的作用。MLCP 活性可直接影响 MLC 的磷酸化状态。MLCP 由 3 个亚基组成:130 kD 的肌球蛋白结合亚基,38 kD 的催化亚基和功能未明的 20 kD 小亚基。Rho 激酶可磷酸化 MLCP 的肌球蛋白结合亚基(图 1),从而抑制 MLCP 的活性,导致 MLC 去磷酸化减少<sup>[24]</sup>,使平滑肌收缩增强,相当于增加了收缩或调节装置对  $Ca^{2+}$  的敏感性。有些学者把这种现象称之为“钙敏化”(  $Ca^{2+}$  sensitization)<sup>[11]</sup>。激酶和磷酸酶活性分析显示,介导钙敏化的主要是 MLCP 抑制,而不是 MLCK 激活,而且平滑肌细胞的钙敏化反映了 MLCP 活性被抑制的程度<sup>[25]</sup>。此外,Rho 激酶还能直接磷酸化 MLC 的 Ser19 位点。与 MLCK 相比,Rho 激酶磷酸化 MLC 的  $K_m$  值更低,且磷酸化的程度与肌球蛋白  $Mg^{2+}$ -ATP 酶活性呈线性相关<sup>[26]</sup>。即 Rho 激酶可通过使 MLCP 失活和直接磷酸化 MLC 这 2 种途径调节 MLC 的磷酸化水平,从而介导血管平滑肌的异常

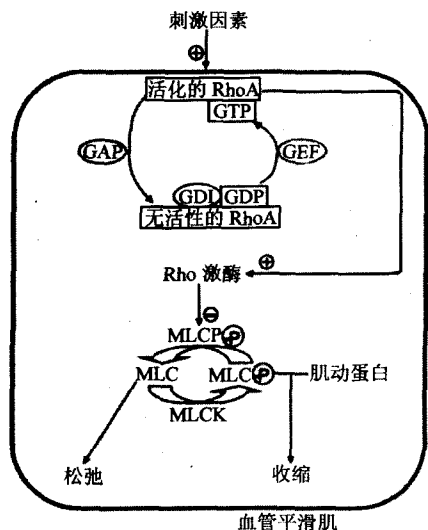


图1 Rho/Rho 激酶通路在血管平滑肌异常收缩中的作用

血管平滑肌细胞中的 Rho 调节方式包括:(1) GEF, 促进 GDP 转变成 GTP, 而激活 Rho 激酶;(2) GAP, 通过增加 Rho 激酶自身鸟苷三磷酸酶的活性使 Rho 激酶转变成与 GDP 结合的形式, 导致 Rho 激酶灭活;(3) GDI, 抑制 Rho 激酶与结合的 GDP 解离, 使 Rho 激酶保持失活状态。受到刺激(如收缩受体作用、压力和拉伸等)后, 与 GTP 结合的 Rho 激酶被激活, 从而磷酸化与肌球蛋白结合的 MLCP 亚单位而使其灭活。MLC 磷酸化由 MLCK 调节。MLCP 通过去磷酸抑制 MLC 的活化。磷酸化的 MLC 与肌动蛋白连接引起血管平滑肌收缩

收缩。如图 1 所示<sup>[10]</sup>。

此外, 由内皮细胞 NO 合酶(nitric oxide synthase, NOS)合成的一氧化氮(nitric oxide, NO)可增高缺血区脑血容量、抑制血小板聚集、抑制小血管缺血后炎症反应, 从而间接发挥脑保护效应。Rho 激酶激活介导的 CVS 引起的缺氧可使内皮型 NOS(endothelial NOS, eNOS)表达下调<sup>[27]</sup>, 导致 NO 合成减少, 从而影响 NO 发挥脑保护效应。

### 3 SAH 后 CVS 的治疗

由于 SAH 发病机制复杂, 其治疗也应采取综合治疗方法。包括钙离子阻滞药尼莫地平、Rho 激酶抑制剂、3H 疗法[即高血压(hypertension)、高血容量(hypervolemia)和血液稀释(hemodilution)疗法]、自由基清除剂、手术治疗和基因治疗等。目前, 选择性 Rho 激酶抑制剂的应用已取得了显著的临床效果。

#### 3.1 Rho 激酶抑制剂

法舒地尔(fasudil, FSD)和 Y-27632 都是选择性 Rho 激酶抑制剂(Rho-kinase inhibitor, RKI), 通过与 GTP 结合竞争性抑制 Rho 激酶活性<sup>[19]</sup>, 使平滑肌松弛, 扩张脑动脉, 特别是脑内中、小动脉。作为一种新型作用于血管平滑肌的细胞内  $Ca^{2+}$  拮抗药, FSD 已逐步应用于临床<sup>[28,29]</sup>。大规模临床试验表明,

FSD 对动脉瘤性 SAH 后 CVS 安全、有效, 而且耐受性好<sup>[30]</sup>。

法舒地尔和 Y27632 都可选择性抑制 Rho/Rho 激酶通路。目前已应用于临床的 AT877, 即盐酸法舒地尔(hydroxyfasudil), 是法舒地尔经口腔吸收后的活性代谢产物<sup>[31]</sup>, 也是真正发挥作用的有效成分, 而且对 Rho 激酶有更强的选择性作用。AT877 可在 1 nmol/L 的 ET-1 和 20 mmol/L 的 KCl 预处理的离体无损伤的兔基底动脉中引起浓度依赖性并伴有 MLC 去磷酸化的动脉舒张。在基底动脉中, AT877 可抑制由 ET-1、GTP $\gamma$ S 或 Rho 激酶催化亚基诱导的血管收缩<sup>[31]</sup>。Tanaka 等<sup>[32]</sup>报道了 23 例动脉瘤性 SAH 患者, 动脉内注射盐酸法舒地尔后, 血管造影显示所有患者脑血管痉挛均显著改善, 44.1% 的患者临床症状立即好转。3 个月后随访, 65.2% 的患者恢复良好或格拉斯哥量表仅显示轻度功能障碍。这说明, 盐酸法舒地尔可有效扩张痉挛的脑动脉, 改善患者的临床症状。此外, 还有报道显示, 鞘内注射 FSD 在脑脊液中保持有效的治疗浓度, 可显著减少血管痉挛的发生。

Watanabe 等<sup>[33]</sup>在实验中分别将自体动脉血(实验组)和人工脑脊液(对照组)注入麻醉兔的小脑延髓池, 2 天后检测到实验组基底动脉张力是对照组的 4 倍, 而 AT877 可显著削弱这种致血管痉挛作用。Hashiba 等<sup>[34]</sup>用等长张力记录器研究离体狗基底动脉环的张力显示, Y27632 可呈剂量依赖性方式抑制 SAH 后 CVS 的发生。这表明, Rho 激酶抑制剂可减轻 SAH 后 CVS 程度。

### 4 展望

SAH 引起的 CVS 是一个非常复杂的病理过程, 是多种病理学机制综合作用的结果。临床上, 很多 SAH 患者根本没有用抗血管痉挛药也未出现 CVS, 而有些患者虽然应用了脑血管痉挛拮抗剂却仍然出现 CVS。虽经多方面研究, CVS 的发生机制目前仍不十分清楚, 亦未形成完善的治疗方案。Rho/Rho 激酶系统广泛参与了多种脑血管病, 但其确切作用还需进一步研究。因此, 有关 Rho/Rho 激酶系统在 CVS 发生机制中的作用和 RKI 用于 CVS 治疗的深入研究, 将有助于提高迟发性 CVS 的临床防治水平, 同时也为新药的开发提供新的思路和作用靶点。

#### 参考文献

- Loch Macdonald R. Management of cerebral vasospasm. *Neurosurg*

- Rev, 2006, 29: 179 - 193.
- 2 Sasaki Y, Suzuki M, Hidaka H. The novel and specific Rho-kinase inhibitor (S)-(+)-2-methyl-1-[(4-methyl-5-isoquinoline)sulfonyl]-homopiperazine as a probing molecule for Rho-kinase-involved pathway. *Pharmacol Ther*, 2002, 93: 225 - 232.
  - 3 Ecker A, Riemenschneider PA. Arteriographic demonstration of spasm of the intracranial arteries, with special reference to saccular arterial aneurysms. *J Neurosurg*, 1951, 8: 660 - 667.
  - 4 Madaule P, Axel R. A novel ras-related gene family. *Cell*, 1985, 41: 31 - 40.
  - 5 Riento K, Ridley AJ. Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003, 4: 446 - 456.
  - 6 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: 2208 - 2216.
  - 7 Kaibuchi K, Kuroda S, Amano M. Regulation of the cytoskeleton and cell adhesion by the Rho family GTPases in mammalian cells. *Annu Rev Biochem*, 1999, 68: 459 - 486.
  - 8 Somlyo AP, Somlyo AV. Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. *J Physiol*, 2000, 522: 177 - 185.
  - 9 Narumiya S. The small GTPase Rho: cellular functions and signal transduction. *J Biochem*, 1996, 120: 215 - 228.
  - 10 Chrissobolis S, Sobey CG. Recent evidence for an involvement of rho-kinase in cerebral vascular disease. *Stroke*, 2006, 37: 2174 - 2180.
  - 11 Doran JD, Liu X, Taslimi P, et al. 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. *Biochem J*, 2004, 384: 255 - 262.
  - 12 Wickman G, Lan C, Vollrath B. Functional roles of the rho/rho kinase pathway and protein kinase C in the regulation of cerebrovascular constriction mediated by hemoglobin: relevance to subarachnoid hemorrhage and vasospasm. *Circ Res*, 2003, 92: 809 - 816.
  - 13 Lan C, Das D, Wloskowitz A, et al. Endothelin-1 modulates hemoglobin-mediated signaling in cerebrovascular smooth muscle via RhoA/Rho kinase and protein kinase C. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004, 286: H165 - H173.
  - 14 Sobey CG, Faraci FM. Subarachnoid haemorrhage: what happens to the cerebral arteries? *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 1998, 25: 867 - 876.
  - 15 Kwan AL, Lin CL, Wu CS, et al. Delayed administration of the K<sup>+</sup> channel activator cromakalim attenuates cerebral vasospasm after experimental subarachnoid hemorrhage. *Acta Neurochir (Wien)*, 2000, 142: 193 - 197.
  - 16 Laher I, Zhang JH. Protein kinase C and cerebral vasospasm. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2001, 21: 887 - 906.
  - 17 Sato M, Tani E, Fujikawa H, et al. Involvement of Rho-kinase-mediated phosphorylation of myosin light chain in enhancement of cerebral vasospasm. *Circ Res*, 2000, 87: 195 - 200.
  - 18 Garitkevich V, Hasse V, Pfitzer G. Ca<sup>2+</sup>-dependent and Ca<sup>2+</sup>-independent regulation of smooth muscle contraction. *J Muscle Res Cell Motil*, 2002, 23: 47 - 52.
  - 19 Rembold CM. Regulation of contraction and relaxation in arterial smooth muscle. *Hypertension*, 1992, 20: 129 - 137.
  - 20 Walsh MP. The Ayerst Award Lecture 1990. Calcium-dependent mechanisms of regulation of smooth muscle contraction. *Biochem Cell Biol*, 1991, 69: 771 - 800.
  - 21 Weber LP, Van Lierop JE, Walsh MP. Ca<sup>2+</sup>-independent phosphorylation of myosin in rat caudal artery and chicken gizzard myofilaments. *J Physiol*, 1999, 516: 805 - 824.
  - 22 Coirault C, Blanc FX, Chemla D, et al. Biomechanics and bio-energetics of smooth muscle contraction. Relation to bronchial hyperreactivity. *Rev Mal Respir*, 2000, 17: 549 - 554.
  - 23 Morano I. Tuning smooth muscle contraction by molecular motors. *J Mol Med*, 2003, 81: 481 - 487.
  - 24 Feng J, Ito M, Kureishi Y, et al. Rho-associated kinase of chicken gizzard smooth muscle. *J Biol Chem*, 1999, 274: 3744 - 3452.
  - 25 Pfitzer G. Invited review: regulation of myosin phosphorylation in smooth muscle. *J Appl Physiol*, 2001, 91: 497 - 503.
  - 26 Amano M, Ito M, Kimura K, et al. Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *J Biol Chem*, 1996, 271: 20246 - 20249.
  - 27 Bao W, Hu E, Tao L, et al. Inhibition of Rho-kinase protects the heart against ischemia/reperfusion injury. *Cardiovasc Res*, 2004, 61: 548 - 558.
  - 28 Egge A, Waterloo K, Sjöholm H, et al. Systematic review of the prevention of delayed ischemic neurological deficits with hypertension, hypervolemia, and hemodilution therapy following subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg* 98: 978-984, May, 2003. *J Neurosurg*, 2004, 100: 359 - 360.
  - 29 Shibuya M, Hirai S, Seto M, et al; Fasudil Ischemic Stroke Study Group. Effects of fasudil in acute ischemic stroke: results of a prospective placebo-controlled double-blind trial. *J Neurol Sci*, 2005, 238: 31 - 39.
  - 30 Suzuki Y, Shibuya M, Satoh S, et al. A postmarketing surveillance study of fasudil treatment after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Surg Neurol*, 2007, 68: 126 - 132.
  - 31 Nakamura K, Nishimura J, Hirano K, et al. Hydroxyfasudil, an active metabolite of fasudil hydrochloride, relaxes the rabbit basilar artery by disinhibition of myosin light chain phosphatase. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2001, 21: 876 - 885.
  - 32 Tanaka K, Minami H, Kota M, et al. Treatment of cerebral vasospasm with intra-arterial fasudil hydrochloride. *Neurosurgery*, 2005, 56: 214 - 223.
  - 33 Watanabe Y, Faraci FM, Heistad DD. Activation of Rho-associated kinase during augmented contraction of the basilar artery to serotonin after subarachnoid hemorrhage. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005, 288: H2653 - H2658.
  - 34 Hashiba Y, Tosaka M, Saito N, et al. Vasorelaxing effect of the Rho-kinase inhibitor, Y-27632, in isolated canine basilar arteries. *Neurol Res*, 2007, 29: 485 - 489.

(收稿日期:2008-04-24)