

·综述 General review·

Rho/Rho 激酶信号通路与支架内再狭窄的研究

郑 辉, 郭富强

【摘要】 血管支架作为一种有效治疗心脑血管硬化手段得到广泛的研究和应用。血管支架内再狭窄的发生难以避免。支架内再狭窄是由血管平滑肌分化、迁移,细胞外基质的过度生成所致的病理生理过程。Rho 激酶参与支架植入引起的新生内膜增生的调节。长期抑制 Rho 激酶的表达可阻止新生内膜的增生,可能成为防止支架内再狭窄的一种方法。

【关键词】 Rho 激酶; 支架; 支架内再狭窄; 法舒地尔; Y-27632

中图分类号:R 文献标志码:A 文章编号:1008-794X(2012)-02-0172-04

Studies on Rho/Rho-kinase signalling pathways and in-stent restenosis ZHENG Hui, GUO Fu-qiang.
Department of Neurology, Sichuan Academy of Medical Sciences & Sichuan Provincial People's Hospital,
Chengdu, Sichuan Province 610072, China

Corresponding author: GUO Fu-qiang, E-mail: guofuqiang2007@126.com

【Abstract】 As an effective treatment for cardiac and cerebral angiosclerotic disorders, intravascular stent placement has been widely employed in researches and clinical practice. However, the occurrence of in-stent restenosis is still a serious problem which is hardly to be avoided. Rho-kinase regulates VSMC proliferation and migration after stenting, and it plays an important role in the neointimal formation. Long-term inhibition of Rho-kinase can suppress the in-stent neointimal formation through multiple mechanisms. Inhibition of the Rho/Rho kinase pathway may provide a useful strategy to prevent the occurrence of in-stent restenosis. (J Intervent Radiol, 2012, 21: 172-175)

【Key words】 Rho-kinase; stent; in-stent restenosis; fasudil; Y-27632

近年来,随着血管内技术的发展和支架技术的安全性和有效性的提高,支架植入术已经成为冠状动脉、颅内动脉狭窄的主要治疗方法之一,能够明确改善狭窄有关的症状及预后,并预防缺血性事件的发生^[1],但术后支架内再狭窄(in-stent restenosis, ISR)的发生仍是目前临床无法解决的难题^[2],有 20%~30%患者 6 个月内发生 ISR^[3]。药物涂层支架的使用可显著降低再狭窄的发生,再狭窄率少于 10%^[4],但是远期再狭窄率与金属裸支架并无差别^[5]。内膜增生是支架内再狭窄的主要机制,且新生内膜形成是由血管平滑肌细胞转移、增殖以及细胞外基质沉积引起^[4,6]。最近研究表明,支架内血栓形成可促进内膜增生^[7]。Rho/Rho 激酶能够调节多数细胞功能,促进新生内膜形成、缩窄性重构、血栓形成、肌动蛋白骨架重构、细胞黏附和转移、细胞因子基因表达以及细胞周期调控^[8]。对 Rho 激酶抑制剂的进一步

研究,有可能为防止 ISR 提供一个新的治疗方案。现就 Rho 激酶与 ISR 发生的关系以及 Rho 激酶抑制剂在防治 ISR 的研究作一综述。

1 Rho/Rho 激酶信号通路

Rho 是哺乳类动物 *ras* 基因超家族的一个亚群,被称为小 GTP 结合蛋白(小 G 蛋白)。Rho 家族成员包括:Rho、Rac、Cdc42,调节细胞骨架重组与基因表达。其中,RhoA、RhoB 和 RhoC 的效应区有相同的氨基酸序列,它们有相同的细胞内作用靶点。Rho 如同一个分子开关,在与 GDP 结合失活或与 GTP 结合激活 2 种状态中循环^[6]。Rho 激酶是 Rho 最主要和最直接的下流效应分子。Rho 激酶为丝/苏氨酸蛋白激酶,其主要作用底物是肌球蛋白轻链脱磷酸化酶(MLCP)的肌球蛋白结合亚基(MBS)、ERM 蛋白家族、内收蛋白、中间丝蛋白、钠-氢交换因子及 LM 激酶等^[9-10]。Rho 激酶能向上调节促炎症反应和促血栓形成因子,包括激活蛋白-1、核因子-

κ B、NAD(P)H、白细胞介素(IL)-1 β 、IL-6、单核细胞趋化蛋白 1(MCP-1)、巨噬细胞游走抑制因子、干扰素- γ 、AngII、纤溶酶原激活物抑制剂(PAI)-1、组织因子、转化生长因子(TGF)- β 1、Bcl-2 等,可通过多种途径影响细胞信号转导系统,参与血管损伤后内膜增殖和再狭窄的调控过程^[9,11]。

2 支架置入后诱导 Rho 激酶活化促进内膜增生

Matsumoto 等^[12]首先报道了 Rho 激酶在 ISR 中所起的作用和 Rho 激酶抑制剂在防治 ISR 中的潜在效果。他们在 34 只雄性小型猪的左冠状动脉进行支架置入,分为两组,每组 17 只。对照组术前 2 d 及术后 28 d 只给予口服阿司匹林(325 mg/d)和抵克立得(500 mg/d),治疗组在术前 2 d 及术后 28 d 给予口服 Rho 激酶抑制剂法舒地尔 30 mg·kg⁻¹·d⁻¹。在术后 28 d,支架置入部位巨噬细胞聚集、胶原蛋白沉积、TGF- β 1 表达相关性冠状动脉直径减少与内膜增生,而法舒地尔能够显著抑制。在术后 7 d,法舒地尔能够显著增加新生内膜 TUNEL 阳性凋亡细胞,同时减少 Brdu 阳性增殖细胞。1 周后对 Rho 激酶降解物进行蛋白印迹分析(每组 6 只),ERM 蛋白磷酸化(Rho 激酶活化标志物)、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)及 bcl-2 的表达在支架置入对照组明显升高,而法舒地尔治疗组显著抑制。组织免疫研究显示 Rho 激酶抑制剂抗炎反应防止 ISR 的机制与直接抑制巨噬细胞聚集和接抑制促炎分子的表达(如:MCP-1)。该实验研究证实支架置入直接刺激动脉血管壁引起 Rho 激酶活化,长期应用 Rho 激酶抑制剂通过减低血管炎症反应、增加凋亡及减少细胞外基质沉积等多种机制抑制支架内再狭窄。

3 RhoA 介导支架置入术后再狭窄

RhoA 是 Rho 蛋白家族知名成员,RhoA 是血管平滑肌细胞增殖、转移、凋亡的主要调控子^[6,13]。活化 RhoA 能够降低鼠主动脉平滑肌细胞 P27 水平,并且 SHR 鼠主动脉 RhoA 活化增强与 P27 表达下调有关^[14]。Guérin 等^[14]为了评价 RhoA 活性在 ISR 内膜形成和血管平滑肌细胞(VSMC)增殖、迁移的病理过程中的作用,在进行冠状动脉手术的患者取胸廓内动脉 2~3 cm 生理盐水浸泡冰冻送实验室。一部份作为对照,一部分置入支架后均用保温箱培养基培养,并进行组织形态学和药理学研究。发现动脉支架置入 P27 的下调与 VSMC 的增殖密切相

关。在支架置入的血管 P27 表达明显下降并伴随高 RhoA 活性,RhoA 抑制剂法舒地尔(10 μ mol/L)、Y-27632(10 μ mol/L)能阻止 P27 表达的下降和内膜增生。研究表明,RhoA 是控制 VSMC 转移、分化主要的调控子。支架置入引起 RhoA 持续活化,Rho 激酶抑制剂法舒地尔、Y-27632 具有抑制 RhoA 表达的作用及抑制 P27 表达下调,在抗再狭窄方面起着关键作用。用法舒地尔抑制 RhoA 的效应器 Rho 激酶能显著的降低新生内膜形成。就目前的抑制剂,RhoA 活性仍然升高,但是 P27 的表达保持较高水平,说明 Rho 激酶至少部分是由 RhoA 相关调控 P27 的表达以及血管平滑肌细胞增殖。

4 Rho 激酶参与球囊血管成形术后缩窄性重构及内膜增生

Iso 等^[8]为寻找可以用于口服的药物或者不依赖于支架的药物传递系统来防止介入术后再次狭窄,他们在 11 只猪的左冠状动脉用球囊扩张损伤冠状动脉狭窄造模。造模 2 周后,球囊损伤的动脉中层内膜增生,缩窄性重构,Rho 激酶 mRNA 表达增加。在造模后 2 至 3 周,将小猪分为实验组($n=6$)和对照组($n=5$),用 Infusa Sleeve 导管血管内局部给予 Y-27632。用血管造影术和血管内超声量化分析损伤血管在用药前、用药后即刻及用药后变化。在用药后 4 周处死动物,用于病理生理学研究。研究表明在药物组用 Rho 激酶抑制剂能够显著抑制内膜区域增长和缩窄性重构。组织学观察显示,与对照组比较,实验组 Y-27632 能够显著减少血管内膜、外膜及基质蛋白区域,在动脉壁能显著减少增殖活性和显著增加细胞 P27^{kip1} 表达。研究结果表明,血管损伤部位 Rho 激酶表达显著增加,局部应用 Rho 激酶抑制剂 Y-27632 能够抑制冠状动脉球囊血管成形术后缩窄性重构和内膜增生。同时研究还表明 Rho 激酶抑 Y-27632 通过抑制外膜生长和胶原蛋白聚集抑制球囊缩窄性重构,通过抑制 P27^{kip1} 表达下调抑制内膜形成。p27^{kip1} 是一个非特异性细胞周期依赖激酶抑制因子,主要作用于 G1 期 cyclin-dck 复合物,使细胞停滞在 G1 期^[13]。从而调整细胞周期的进展速度^[6]。正常血管壁组织有较高水平的 p27-mRNA 表达,在支架置入及球囊损伤动脉 Rho 激酶活化,Rho 激酶 mRNA 表达增加,并伴随 P27 表达下调及新生内膜形成^[9,13,16]。Rho 激酶活化引起 p27 表达下调,导致细胞周期蛋白进展加速^[6]。Rho 激酶抑制剂能够抑制 Rho 激酶活性及 ROCK mRNA 表

达增加,上调 P27 表达^[9,13]。由此说明,Rho 激酶抑制剂的抗增殖特性主要归因于上调 P27^{kip1} 表达^[6,8]。

支架置入及球囊损伤引起细胞外基质沉积增加^[8,12],细胞外基质被认为是支架内再狭窄的主要成分,而新生内膜实质部分组成是基质而不是细胞^[17]。TGF- β 是胶原蛋白合成的强大刺激物,并且可引起再狭窄病变的形成^[18-19]。在单纯球囊成形术与支架置入术对比研究中,支架置入动脉胶原蛋白沉积和 TGF- β 表达显著增加^[20-21]。Rho 激酶抑制剂法舒地尔能够显著抑制支架置入部位胶原蛋白沉积及血管内膜与外膜 TGF- β 的表达,说明 Rho 激酶在促 TGF- β 表达至胶原蛋白沉积增加与 ISR 的形成密切相关。抑制 TGF- β 的方法有可能用于预防支架内再狭窄的形成^[8,12]。

5 Rho 激酶介导支架内血栓形成促进 ISR 发生

最近,支架内血栓形成在 ISR 的作用引起广泛关注。认为药物洗脱支架置入后晚期支架内血栓形成与 ISR 相关^[7]。支架内血栓形成的机制可能与支架或者支架成分有关,洗脱药物引起愈合延迟或再内皮化延迟;支架置入后晚期支架贴壁不良,血小板聚集增加;炎症反应引起支架暴露;非侵蚀性聚合物长期存留在血管壁内引起血管局部高敏反应及潜在血栓性。血小板激活和血栓形成被认为 ISR 的最初触发装置^[22]。支架内血栓形成和炎症反应在人类新生内皮增生的形成起着主要作用。在支架置入后第 3 天胶原蛋白在局部沉积及血栓形成。附壁血栓为平滑肌细胞群集提供了支撑。血管损伤伴随炎症反应,血小板和白细胞黏附,释放生长因子、细胞因子,引起平滑肌细胞活化。血栓形成通过平滑肌细胞增殖引起 ISR 相对的增强^[7]。

Rho/Rho 激酶信号通路参与内皮细胞屏障功能、炎性反应、血小板活化、血栓形成的调节^[10]。Rho 激酶能上调血栓性分子(如血小板活化因子[PAI])和组织因子以及促纤维分子(如 TGF- β 1 及 Bcl-2),与 p38MAP 激酶正性调节由凝血酶诱导的组织因子表达。Rho/Rho 激酶抑制剂能够阻止 Akt 活化和组织因子产生。凝血酶是内皮细胞浸润的强效独立刺激因子^[6],Rho 激酶抑制剂通过抑制凝血酶进入血管壁,抑制血栓形成^[17]。同时 Rho 激酶抑制剂如 Y-27632 通过降低 PAI 表达^[23]及抑制 Rho/Rho 激酶信号通路参与 α 1-酸性糖蛋白(AGP)诱导的血小板形变来抑制血栓形成^[24]。目前尚无 Rho/Rho 激酶通路通过向上调节支架内血栓形成促进内膜增生

的完整性研究。但据前所述,Rho/Rho 激酶通路可能通过向上调节支架内血栓形成促进 ISR 发生,Rho 激酶抑制剂通过下调血栓性因子的表达抑制支架内血栓形成防治 ISR,为防治 IRS 提供新的思路。

6 Rho 激酶抑制剂的抗 ISR 应用

Rho 激酶抑制剂激酶涵盖了广泛的传统心血管药物的药理学作用,包括他汀类、血管紧张素转化酶抑制剂(ACEI)、血管紧张素 II 受体阻滞剂、钙通道阻滞剂、 β -受体阻滞剂,以及凝血酶、5-羟色胺、内皮素受体阻滞剂。Rho 激酶抑制剂还具有抑制肝脏胆固醇合成的作用。研究表明 Rho 激酶抑制剂可以用来治疗各种心血管疾病^[10]。法舒地尔(HA-1077)于 1995 在日本首次被批准用于临床的 Rho 激酶抑制剂,通过竞争性抑制 ATP 与 Rho 激酶结合选择性抑制 Rho 激酶活性^[6]。作为蛋白激酶抑制剂,法舒地尔还在细胞水平调节细胞增殖、迁移、黏附、骨架重排、胞质移动、炎症细胞运动等,在分子基因水平调节炎症、血栓形成、氧化、纤维化等相关的多种因子。临床应用证实,法舒地尔对包括心绞痛、高血压、冠脉痉挛、冠脉再通手术后再狭窄和动脉粥样硬化在内的心血管疾病均有较好的治疗作用^[23]。就目前的研究表明法舒地尔可通过多种机制参与抑制支架术后内膜形成,包括抑制血管炎性反应,抑制平滑肌增殖,增加凋亡,以及减少胶原蛋白沉积^[10,12-13]。但是法舒地尔抗 ISR 作用还未得到广泛认可,尚需进一步的动物实验及临床研究。

Y-27632 是吡啶衍生物化合物的一种,通过非选择竞争性抑制 ATP 结合到 RHCK1 和 ROCK2 的催化位点发挥强效的 Rho 激酶抑制作用^[6,10]。支架置入术及球囊血管成形术后再狭窄的研究中,Y-27632 能显著抑制新生内膜形成,抑制 P27 表达下调^[8,16]。在血管平滑肌细胞中,Y-27632 抑制血管源性生长因子(PDGF)-BB 诱导细胞外信号调节激酶 1/2(ERK/2)活化及血管平滑肌细胞增殖^[6]。Y-27632 同时是 Rho 依赖蛋白激酶 C 相关激酶 2 的强效抑制剂。引起肌球蛋白轻链磷酸化、血管平滑肌松弛和血管舒张。Y-27632 还具有抑制 Rho 介导的细胞转化、肿瘤细胞浸润、中性粒细胞趋化^[9]。由此可知 Y-27632 在 ISR 的治疗中具有潜在的治疗作用。其他新型 Rho 激酶抑制剂的研究还处于实验阶段,尚缺乏抗 ISR 理论,对新型 Rho 激酶抑制剂的研究可能为防治 ISR 提供新的指导。最近,Rho 激酶及其与法舒地尔结合位点的三维晶体结构已经确定,能更好

的促进了更具选择性的 Rho 激酶抑制剂的研发^[10]。

参考文献

- [1] Chaturvedi S, Yadav JS. The role of antiplatelet therapy in carotidstenting for ischemic stroke prevention[J]. *Stroke*, 2006, 37: 1572 - 1577.
- [2] Kim MS, Dean LS. In-stent restenosis[J]. *Cardiovasc Ther*, 2011, 29: 190 - 198.
- [3] Sprague EA. In vivo cardiovascular assays for drug discovery: evolution of the drug-eluting stent[J]. *Curr Opin Investig Drugs*, 2007, 8: 219 - 225.
- [4] Ge H, Zhou Y, Hanying M, et al. Influence of drug-eluting stent on inflammation during restenosis in a porcine coronary model[J]. *Acta Cardiol*, 2010, 65: 31 - 35.
- [5] Mauri L, Hsieh WH, Massaro JM, et al. Stent thrombosis in randomized clinical trials of drug-eluting stents [J]. *N Engl J Med*, 2007, 356: 1020 - 1029.
- [6] Loirand G, Guerin P, Pacaud P, et al. Rho kinases in cardiovascular physiology and pathophysiology [J]. *Circ Res*, 2006, 98: 322 - 334.
- [7] Huang Y, Venkatraman SS, Boey FY, et al. In vitro and in vivo performance of a dual drug-eluting stent (DDES)[J]. *Biomaterials*, 2010, 31: 4382 - 4391.
- [8] Iso Y, Suzuki H, Sato T, et al. Rho-kinase inhibitor suppressed restenosis in porcine coronary balloon angioplasty [J]. *Int J Cardiol*, 2006, 106: 103 - 110.
- [9] Dong M, Yan BP, Liao JK, et al. Rho-kinase inhibition: a novel therapeutic target for the treatment of cardiovascular diseases[J]. *Drug Discov Today*, 2010, 15: 622 - 629.
- [10] Shimokawa H, Rashid M. Development of Rho-kinase inhibitors for cardiovascular medicine[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2007, 28: 296 - 302.
- [11] Shimokawa H, Takeshita A. Rho-kinase is an important therapeutic target in cardiovascular medicine[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25: 1767 - 1775.
- [12] Matsumoto Y, Uwatoku T, Oi K, et al. Long-term inhibition of Rho-kinase suppresses neointimal formation after stent implantation in porcine coronary arteries: involvement of multiple mechanisms[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, 24: 181 - 186.
- [13] Seasholtz TM, Zhang T, Morissette MR, et al. Increased expression and activity of RhoA are associated with increased DNA synthesis and reduced p27 (Kip1) expression in the vasculature of hypertensive rats[J]. *Circ Res*, 2001, 89: 488 - 495.
- [14] Guérin P, Sauzeau V, Rolli-Derkinderen M, et al. Stent implantation activates RhoA in human arteries: inhibitory effect of rapamycin[J]. *J Vasc Res*, 2005, 42: 21 - 28.
- [15] Halayko AJ, Solway J. Molecular mechanisms of phenotypic plasticity in smooth muscle cells[J]. *J Appl Physiol*, 2001: 358 - 368.
- [16] 关启刚, 曾定尹, 孙喜琢, 等. Rho 激酶在小型猪白介素-1 β 介导的冠状动脉痉挛中的作用机制[J]. *中华心血管病杂志*, 2006, 34: 50 - 53.
- [17] Chung IM, Gold HK, Schwartz SM, et al. Enhanced extracellular matrix accumulation in restenosis of coronary arteries after stent deployment[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2002, 40: 2072 - 2081.
- [18] Libby P, Edelman E. Restenosis: involvement of growth factors and cytokines. Topol EJ, eds. *Textbook of Interventional Cardiology*[M]. 3rd ed. Philadelphia, Pa: Saunders, 1999: 346 - 357.
- [19] Ward MR, Agrotis A, Kanellakis P, et al. Tranilast prevents activation of transforming growth factor-beta system, leukocyte accumulation, and neointimal growth in porcine coronary arteries after stenting[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, 22: 940 - 948.
- [20] Li C, Cantor WJ, Nili N, et al. Arterial repair after stenting and the effects of GM6001, a matrix metalloproteinase inhibitor[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2002, 39: 1852 - 1858.
- [21] Chamberlain J. Transforming growth factor-beta: a promising target for anti-stenosis therapy[J]. *Cardiovasc Drug Rev*, 2001, 19: 329 - 344.
- [22] Fleming IN, Elliott CM, Exton JH. Differential translocation of rho family GTPases by lysophosphatidic acid, endothelin-1, and platelet-derived growth factor [J]. *J Biol Chem*, 1996, 271: 33067 - 33073.
- [23] Richter GM, Palmaz JC, Noeldge G, et al. Relationship between blood flow, thrombus, and neointima in stents[J]. *J Vasc Interv Radiol*, 1999: 598 - 604.
- [24] 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 [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25: 2088 - 2093.
- [25] Gunnarsson P, Levander L, Pålsson P, et al. Alpha(1)-acid glycoprotein (AGP)-induced platelet shape change involves the Rho/Rho kinase signalling pathway[J]. *Thromb Haemost*, 2009, 102: 694 - 703.
- [26] Hirooka Y, Shimokawa H. Therapeutic potential of rho-kinase inhibitors in cardiovascular diseases[J]. *Am J Cardiovasc Drugs*, 2005, 5: 31 - 39.

(收稿日期:2011-08-09)

(本文编辑:俞瑞纲)