

Rho激酶与支架内再狭窄

王建红 综述, 李敬诚 审校

(中国人民解放军第三军医大学附属大坪医院神经内科, 重庆市 410010)

[关键词] Rho激酶; 支架; 支架内再狭窄

[摘要] 目的 支架内再狭窄与血管平滑肌分化、迁移, 细胞外基质的过度增值所致新生内膜增生密切相关。Rho激酶参与支架置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。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Rho-kinase and In-stent Restenosis

WANG Jian-Hong and LI Jing-Cheng

(Department of Neurology, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

[KEY WORDS] Rho-kinase, Stent, In-stent Restenosis

[ABSTRACT] ISR is essentially due to vascular smooth muscle cell (VSMC) proliferation and migration, and excessive extracellular matrix production, leading to neointima formation. Rho-kinase, a major regulator of VSMC proliferation and migration, after stenting plays its role in the neointimal formation. Long-term inhibition of Rho-kinase suppresses in-stent neointimal formation by multiple mechanisms. Inhibition of the Rho/Rho kinase pathway should provide a useful strategy to prevent ISR.

血管内支架成形术作为一种微创、安全及有效的方法已广泛应用于治疗心脏、颅内动脉狭窄^[1]。但术后支架内再狭窄 (in-stent restenosis, ISR) 的发生仍是临床面临的挑战^[2], 有 20% ~ 30% 的患者 6 个月内发生 ISR^[3]。使用药物涂层支架也可能出现再狭窄, 虽然发生率可少于 7%, 但是远期再狭窄率与普通金属裸支架并无差别^[4]。ISR 的发生机制尚未完全明了。近年来, 有关 Rho 激酶与 ISR 关系的研究进展尤其引人注意, 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 激酶可通过多种途径参与术后支架内再狭窄的形成过程

ISR 是一种复杂的病理生理过程, 与多种因素密切相关。置入支架对动脉血管壁的直接损伤, 还有支架周围诱导血管平滑肌分化、迁移、增殖的细胞因子和生长因子的激活所致的炎症反应, 最终引起血管新生内膜形成而发生 ISR^[5,6]。Rho 激酶通过作用于血管平滑肌收缩、内皮功能及炎症过程参与动脉粥样硬化形成及血管痉挛^[7]。Rho 激酶是

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 (myosin-binding subunit, MBS)、ERM 蛋白 (ezrin/radixin/moesin)、内收蛋白 (adducin)、中间丝蛋白、LM 激酶及钠-氢交换因子等。Rho 激酶能向上调节促炎症反应和促血栓形成因子, 包括 NAD(P)H、Ang^②、白细胞介素 iv β (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、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^[8]。

2 支架置入刺激动脉血管壁引起 Rho 激酶活化

Matsumoto 等^[9]第一个报道了 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 只猪的冠状动脉进行支架置入, 分为两组, 每组 17 只。对照组术前 2 天及术后 28 天只给予口服阿司匹林 (325 mg/d) 和抵克立得 (500 mg/d), 治疗组加用口服 Rho 激酶抑制剂 fasudil 30 mg/(kg·d)。1 周后对 Rho 激酶降解物进行蛋白印迹分析 (每组 6 只), 4 周后进行组织学研究 (每组 6 只) 和免疫染色 (每组 5 只)。ERM 蛋白磷酸化 (Rho 激酶活化标志物) 蛋白印迹分析显示支架置入对照组明显升高, 而 fasudil 治疗组显著抑制。该实验证实支架置入直接刺激动脉血管壁引起 Rho 激酶活化, 但其引起 Rho 激酶向上调节的分子机制还有待阐明。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抑制促炎症反应细胞如 MCP-1 有关。

[收稿日期] 2009-12-19 [修回日期] 2010-04-13

[作者简介] 王建红, 主治医师, 硕士, 研究方向为缺血性脑血管病介入诊断及治疗。联系电话为 023-68757873。E-mail 为 w462481204@163.com。通讯作者李敬诚, 主任医师, 博士研究生导师, 研究方向为缺血性脑血管病介入诊断及治疗, 联系电话为 023-68757874。E-mail 为 lijingcheng@yahoo.com.cn。

Gu•rin等^[10]为了评价 RhoA 活性在 ISR 内膜形成和 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乳房内动脉 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。认为动脉支架置入 P27 的下调与 VSMC 的增殖密切相关, p27 是一个非特异性细胞周期蛋白抑制因子,主要作用于 G₁ 期 cyclin2cdk 复合物,使细胞不能通过 G₁ 期进入 S 期。ISR 病变的 P27 表达明显下降并伴随高 RhoA 活性, RhoA 抑制剂能阻止 P27 表达的下降和 VSMC 增殖。在支架置入的血管,低浓度的雷帕霉素对新生内膜增厚的抑制作用往往伴随明显的 RhoA 活性降低。雷帕霉素药物洗脱支架 (sirolimus eluting stent SES) 能抑制 RhoA 和雷帕霉素靶蛋白活性,并能增强 P27 表达,在减少 ISR 方面动物模型和临床实验都取得了可喜的成果。

SISR 试验^[11]纳入 384 例发生支架内再狭窄的患者,进行了一项前瞻性、多中心、随机试验证实与血管内放射治疗相比, SES 在治疗裸金属支架内再狭窄方面有较佳的临床和血管造影预后。Sheiban 等^[12]对 138 例应用裸支架治疗后出现 ISR 的患者行 SES 治疗长期随访,靶血管血运重建发生在 6 12 和 24 个月分别为 4.2%, 11.2% 和 15.9%, 认为 SES 治疗 ISR 是安全和有效的。这些在临床实验取得的可喜成果为 ISR 发病机制的研究提供了有力的证据。

3 Rho 激酶参与白细胞介素 1 β 介导的动脉痉挛、狭窄的发生

Sardella 等^[13]研究了 59 例随机置入裸金属支架 (bare-metal stents BMS)、SES 和紫杉醇药物洗脱支架 (paclitaxel eluting stent PES) 的稳定型心绞痛患者,术后 20 分钟测定冠状窦 IL-1 β 和 IL-6 浓度, 3 种支架置入患者测定值均较术前明显增高, 认为支架置入术所致的斑块破裂和内皮损伤可引起局部促炎症细胞因子 IL-1 β 和 IL-6 的释放, 与术后发生 ISR 密切相关。

利用小型雄性家猪基础研究^[14 15]表明, Rho 激酶参与 IL-1 β 介导的冠状动脉痉挛的发生, 其可能是通过增加肌球蛋白结合亚基磷酸化水平, 抑制肌球蛋白轻链磷酸酶活性及加强钙增敏途径所致。研究发现正常冠状动脉血管壁组织可见 Rho 激酶 mRNA 表达; 用一定量 IL-1 β 诱导冠状动脉内膜增殖, 造成血管管腔狭窄, 在此过程中 Rho 激酶 mRNA 的表达明显上调, 表达强度至少增加 3 倍以上, 说明 IL-1 β 能够促进 Rho 激酶的表达, Rho 激酶的表达与冠状动脉狭窄的发生有关。Rho 激酶在 mRNA 水平和蛋白水平上调; 抑制 Rho 激酶活性可抑制血管平滑肌细胞的 DNA 增生和迁移。向血管损伤处转染显性失活的 Rho 激酶基因, 可抑制新生内膜的形成。该实验结果还证实, 正常血管壁组织有较高水平的 p27 mRNA 表达, 用 IL-1 β 诱导后 Rho 激酶 mRNA 的表达明显增强, 而 p27 mRNA 的表达则明显减弱。提示 Rho 激酶向下调节 p27 的表达是其促进冠状动脉狭窄的机制之一。雷帕霉素增强 p27 的活性从而抑制细胞的增殖, 而

Rho 激酶是通过向下调节 p27 的活性而促进细胞的增殖, p27 是雷帕霉素和 Rho 激酶作用途径的一个交叉点, 雷帕霉素可能是通过增强 p27 的活性而减弱 Rho 激酶对 p27 的调节, 从而抑制细胞增殖的。该实验在动物模型方面为 SES 减少 ISR 提供了有力的证据。

4 抑制 Rho 激酶活性可改善支架置入后血管紧张素 II 诱致的血管损伤

肾素-血管紧张素系统 (renin-angiotensin system, RAS) 的过度激活在 ISR 的发生、发展过程中起着十分重要的作用, 血管紧张素 II (angiotensin II, Ang-II) 具有多种生物学作用而在 RAS 中占据极其重要的地位。Groenewegen 等^[16]将 25 只接受腹主动脉支架置入的大鼠随机分为对照组 (n=8), Ang-II 输入组 [n=9, 200 μ g/(kg·min)], Ang-II 受体 1 (AT-1) 阻滞剂组 [n=9, 14.4 mg/(kg·d)]。4 周后进行组织学分析, 内皮功能由离体胸主动脉血管环测定。Ang-II 输入组较对照组新生内膜面积明显增加 (分别为 $0.88 \pm 0.21 \text{ mm}^2$ 比 $0.66 \pm 0.16 \text{ mm}^2$, $P < 0.05$)。新生内膜厚度也明显增厚 ($171 \pm 44 \mu\text{m}$ 比 $120 \pm 25 \mu\text{m}$, $P < 0.05$)。Ang-II 受体 1 阻滞剂较对照组不减少新生内膜的面积和厚度。其结论认为超生理 Ang-II 水平可加重支架置入大鼠血管新生内膜的形成并降低血管内皮功能。

Kanda 等^[17]应用 p27 缺乏的小鼠评价 p27 和 Rho 激酶对血管紧张素 II 诱致的血管损伤所起的作用。在野生小鼠和 P27 缺乏小鼠输注血管紧张素 II (每分钟 1500 ng/kg SC) 可使收缩压同等程度升高 (分别为 $159 \pm 5 \text{ mmHg}$ 和 $157 \pm 5 \text{ mmHg}$, $P > 0.05$)。血管紧张素 II 输注于野生小鼠可增加主动脉中层厚度, 增生细胞数目和脉管系统内单核细胞/巨噬细胞浸润。然而在 p27 缺乏小鼠中, 此种改变比野生小鼠者更为突出。应用 fasudil (选择性 Rho 激酶抑制剂) 治疗野生小鼠未使血压改变, 但是上调 p27 表达、减少主动脉中层厚度、减少增生细胞数目和防止单核细胞/巨噬细胞浸润。在 p27 缺乏小鼠中, fasudil 此种保护性作用减弱。抑制 Rho 激酶活性还能阻止 MCP-1 表达, 有可能是 fasudil 在输注 Ang-II 的 p27 缺乏小鼠中抗血管平滑肌细胞增殖和迁移作用的主要机制。总之, p27 构成一个血管紧张素 II 诱致的单核细胞/巨噬细胞浸润和血管重塑的重要调节剂, 并由 Rho 激酶刺激部分地介导。抑制 Rho 激酶活性通过 p27 依赖性和 p27 非依赖性机制改善血管紧张素 II 诱致的血管损伤, 减少血管增生和巨噬细胞浸润。

VaHPREST 试验^[18]入选 250 例接受经皮冠状动脉介入治疗包括 PTCA 和对复杂的 B2 型 (在研究组中占 43%, 在安慰剂组中占 46%) 和 C 型 (在研究组中占 54%, 在安慰剂组中占 57%) 病变 (根据 ACC/AHA 分类) 的病人, 均行 PTCA 后支架置入治疗。随机分为缬沙坦组和安慰剂组。6 月后复查造影, 缬沙坦组支架内再狭窄率为 19.2%, 而对照组为 38.6% ($P < 0.005$)。需再次介入干预的比率分别为 12.1% 与 28.7% ($P < 0.005$)。Valvace 试验^[19]入选 700 例患者, 病变为 B2/C 型复杂病变, 结果总的支架内再狭窄

率在缬沙坦组和对照组分别为 19.5% 与 34% ($P < 0.005$)。亚组分析示急性冠状动脉综合征患者的再狭窄发生率分别为 14% 与 43% ($P < 0.0001$), 在稳定型心绞痛组为 28% 与 27.5%; 糖尿病组则为 24% 与 43%, ($P < 0.001$)。缬沙坦是一种具有特异性、高度选择性的血管紧张素 ② AT1受体直接拮抗剂, 其防治急性冠状动脉综合征支架术后再狭窄及再次血运重建的发生率优于转换酶抑制剂。李贵生等^[20]认为缬沙坦洗脱支架在实验兔主动脉中应用可抑制血管内膜增生, 可能具有防治支架术后再狭窄的作用。

5 抑制 Rho 激酶活性药物具有潜在的抗 ISR 应用前景

Rho 的激动剂包括 Ang ② 、5 羟色胺、凝血酶、内皮素 1、去甲肾上腺素、血小板源性生长因子、ATP/ADP 和尾加压素 ④ 等。这些激动剂激活 Rho 作用于其靶效应器 Rho 激酶通过对肌球蛋白磷酸酶的抑制引起血管平滑肌的收缩, 产生相应的生物学效应。相应的, 血管紧张素转化酶抑制剂、Ang ② 受体阻滞剂、5 羟色胺能受体阻滞剂、钙通道阻滞剂、硝酸盐、 β -受体阻滞剂、内皮素 1 阻滞剂和 U ⑤ 阻滞剂等作为 Rho 的激动剂的阻滞剂具有抑制 Rho 激酶活性的作用^[18]。它们都具有潜在的抗 ISR 的应用前景, 但尚缺乏临床及动物模型的证实。

另外, 动物研究表明普罗布考可能通过抑制胰岛素样生长因子 1 受体和血管内皮生长因子表达来减轻内膜增生, 扩大管腔, 显著减少血管再狭窄的发生^[21]; 小剂量辛伐他汀对血管平滑肌细胞的增殖和迁移无促进作用, 大剂量辛伐他汀抑制血管平滑肌细胞的增殖和迁移, 且随着时间延长和浓度增加其抑制作用增强, 这种作用不依赖辛伐他汀的调脂性^[22]。他汀类药物可减少类异戊二烯中间产物的形成, 抑制 Rho 激酶的异戊二烯化, 第一个临床实验表明口服大剂量阿伐他汀 (80 mg/d) 能迅速抑制致粥样硬化的 Rho/ROCK 途径^[23]; 与 Rho 激酶抑制剂 fasudil 有着更好的抗 ISR 应用前景。但大多数研究还处于理论阶段, 还有待进一步大规模、多中心、前瞻性的临床研究。

[参考文献]

- [1] Fields JD, Liu KC, Banwell SL, et al. Indications and applications of arterial stents for stroke prevention in atherosclerotic intracranial stenosis [J]. *Curr Cardiol Rep*, 2010 **12** (1): 20-28
- [2] Kim MS, Dean LS. In-Stent Restenosis [J]. *Cardiovasc Ther*, 2010 Apr 9 [Epub ahead of print]
- [3] Sprague EA. In vivo cardiovascular assays for drug discovery: evolution of the drug-eluting stent [J]. *Curr Opin Investig Drugs*, 2007 **8** (3): 219-225
- [4] 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** (10): 1 020-029
- [5] Huang Y, Sahi K, Wang L, et al. Use of a tacrolimus-eluting stent to inhibit neointimal hyperplasia in a porcine coronary model [J]. *J Invasive Cardiol*, 2005 **17** (3): 142-148
- [6] Zanghan R. Preventing restenosis after angioplasty: a multistage approach [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2008 **114** (4): 257-264
- [7] Dong M, Yan BP, Yu CM. Current status of rho-associated kinases (ROCKs) in coronary atherosclerosis and vasospasm [J]. *Cardiovasc Hematol Agent Med Chem*, 2009 **7** (4): 322-330
- [8] Shimokawa H, Takeshita A. Rho-kinase is an important therapeutic target in cardiovascular medicine [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005 **25** (9): 1 767-775
- [9] Matsumoto Y, Uwatoku T, Oikawa 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** (1): 181-186
- [10] Guérin P, Sauzeau V, Rolland-Dekinderen M, et al. Stent implantation activates RhoA in human arteries: inhibitory effect of rapamycin [J]. *J Vasc Res*, 2005 **42** (1): 21-28
- [11] Holmes DR Jr, Teirstein P, Satler L, et al. Sirolimus-eluting stents vs vascular branch therapy for in-stent restenosis within bare metal stents: The SISR randomized trial [J]. *JAMA*, 2006 **295** (11): 1 264-273
- [12] Sheiban I, Chiribiri A, Beninati S, et al. Sirolimus-eluting stents for the treatment of bare metal in-stent restenosis: long-term clinical follow up [J]. *J Invasive Cardiol*, 2007 **19** (4): 174-180
- [13] Sarduella G, Mariani Alessandro M, et al. Early elevation of interleukin-1 beta and interleukin-6 levels after bare or drug-eluting stent implantation in patients with stable angina [J]. *Thromb Res*, 2006 **117** (6): 659-664
- [14] 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** (1): 50-53
- [15] 苗志林, 曾定尹, 孙喜琢, 等. 白介素-1 β 诱导小型猪冠状动脉内膜增殖时 Rho 激酶表达与雷帕霉素干预的研究 [J]. *中华心血管病杂志*, 2006 **34** (5): 445-449
- [16] Groenewegen HC, VanderHarst P, Roks AJ, et al. Effects of angiotensin II and angiotensin II type 1 receptor blockade on neointimal formation after stent implantation [J]. *Int J Cardiol*, 2008 **126** (2): 209-215
- [17] Kanda T, Hayashi K, Wakino S, et al. Role of Rho-kinase and p27 in angiotensin II-induced vascular injury [J]. *Hypertension*, 2005 **45** (4): 724-729
- [18] Peters S, Gotting B, Tümmel M, et al. Valsartan for prevention of restenosis after stenting of type B2 /C lesions: the VAL2PREST trial [J]. *J Invasive Cardiol*, 2001 **13** (2): 93-97
- [19] Peters S, Tümmel M, Meyers W. Valsartan versus ACE inhibition after bare metal stent implantation: results of the VALVACE trial [J]. *Int J Cardiol*, 2005 **98** (2): 331-335
- [20] 李贵华, 王雷, 贾三庆, 等. 缬沙坦涂层支架对实验兔血管局部内膜增生及血管紧张素 ② 型受体表达的影响 [J]. *中国介入心脏病学杂志*, 2007 **15** (2): 107-110
- [21] 梅斌, 章军建, 刘煜敏. 普罗布考对兔颈动脉血管成形术后血管内膜生长因子的影响及其对再狭窄的干预作用 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2008 **16** (10): 775-777
- [22] 张丽丽, 戴秋艳. 辛伐他汀对血管平滑肌细胞增殖和迁移的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2008 **16** (12): 943-947
- [23] Nohria A, Prsic A, Liu PY, et al. Statins inhibit Rho kinase activity in patients with atherosclerosis [J]. *Atherosclerosis*, 2009 **205** (2): 517-521

(此文编辑 李小玲)