

## Rho激酶及其抑制剂的研究进展

段为钢<sup>1</sup>, 袁胜涛<sup>2</sup>, 廖红<sup>1</sup>, 严明<sup>1</sup>, 张陆勇<sup>1\*</sup>

(中国药科大学 1. 新药筛选中心, 2. 江苏省药效研究与评价服务中心, 江苏 南京 210009)

**摘要:** Rho激酶是近十年来发现参与细胞运动的主要激酶之一,对细胞的分裂、收缩、粘附、迁移、分泌等活动具有重要调节作用。Rho激酶的高表达或过度激活与许多心脑血管疾病的发生发展密切相关,Rho激酶现在已经成为新药研发的重要靶点,而Rho激酶抑制剂的不断发现为心血管、神经系统等疾病的治疗提供了新的希望。为此,本文就Rho激酶及其抑制剂的研究做一简要综述。

**关键词:** Rho激酶; 抑制剂; 新药筛选

中图分类号: R916 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2007)10-1013-10

## Advances in the study of Rho kinase and its inhibitors

DUAN Weigang<sup>1</sup>, YUAN Sheng-tao<sup>2</sup>, LIAO Hong<sup>1</sup>, YAN Ming<sup>1</sup>, ZHANG Lu-yong<sup>1\*</sup>

(1. New Drug Screening Center, 2. Jiangsu Center for Pharmacodynamics Research and Evaluation, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

**Abstract:** Rho kinase, also named Rho associated kinase, is one of the important kinases found in recent ten years, which regulates cell movement including cytodieresis, contraction, adherence, migration, secretion, etc. The Rho kinase up-regulation in activity or in expression involves the progress of cardio-cerebro-vascular disorders, and Rho kinase has been regarded as a key target in drug discovery and development. With more and more Rho kinase inhibitors popping up, Rho kinase inhibitors are becoming a promising solution to cardiovascular diseases, neural disorders and other diseases. The article reviews the advances in the study of Rho kinase pathway and its inhibitors, other information associated with Rho kinase is also discussed.

**Key words:** Rho associated kinase; inhibitor; drug screening

Rho激酶(Rho associated kinase, ROCK),是参与细胞有丝分裂粘附、细胞骨架调整、肌肉细胞收缩、肿瘤细胞浸润等一系列细胞生命现象的重要酶<sup>[1]</sup>。自1996年以来<sup>[2]</sup>,已发现的ROCK分为ROCK I(ROCK $\beta$ )和ROCK II(ROCK $\alpha$ )。前者主要存在于非神经组织如心脏、肺、骨骼肌等细胞;后者主要存在于中枢神经系统,如海马锥体神经元、大

脑皮质、小脑浦肯野细胞等。

### 1 ROCK的结构

#### 1.1 ROCK的一级结构

ROCK I和ROCK II属于丝/苏氨酸蛋白激酶。完整的ROCK I和ROCK II约含有1300个氨基酸,分子质量在160 kD左右,蛋白质的一级结构有65%的同源性,自N端依次含有激酶催化结构域(kinase domain/catalytic domain, CD)、Rho蛋白结合结构域(Rho-binding domain, RBD)、PH结构域(pleckstrin-homology domain)和半胱氨酸富集结构域(cysteine-rich repeat domain, CRD)(图1A),其中催化结构域的同源性高达92%<sup>[1,3]</sup>。ROCK的晶体结构已经阐明<sup>[4]</sup>,机体的ROCK以同源二聚体的形

收稿日期: 2007-05-17.

基金项目: 国家科技部“十五”重大计划资助项目(2004AA2Z3785); 江苏省教育厅“江苏省研究生培养创新工程”(02705024); 教育部新世纪优秀人才支持计划。

\* 通讯作者 Tel: 86-25-85391036, Fax: 86-25-85303260, E-mail: drugscreen@126.com

式存在,静息状态下没有活性,二聚体的形成通过 PH 结构域相互缠绕实现 (图 1B, C)<sup>[5]</sup>。ROCK 与 citron 激酶、蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA) 等蛋白激酶的结构也有很高的相似性,其催化结构域均属于 ACG 激酶家族 (ACG kinase family)。

### 1.2 ROCK 的晶体结构

部分功能区的晶体结构报道较早,最近 ROCK 全片段的晶体结构已经构建,整体晶体结构参见图 1B。

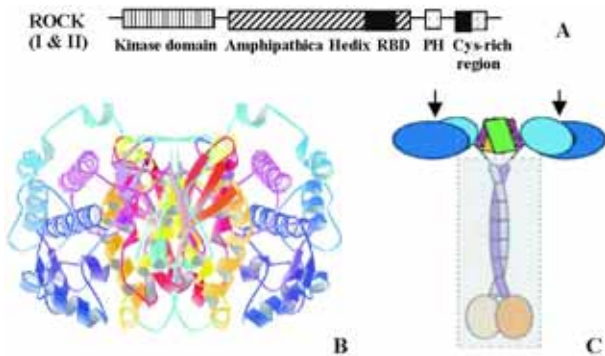


图 1 A: ROCK 的一级功能结构; B: ROCK 的晶体结构<sup>[4]</sup>; C: ROCK 整体结构示意图<sup>[5]</sup>

在晶体结构研究中,ROCK 抑制剂法苏地尔、H-1152P (二甲基法苏地尔, dimethylfasudil) 和 Y-27632 对 ROCK 的结合方式已有确切的分析<sup>[6]</sup>。ROCK 抑制剂结构中芳香区的药效团 (pharmacophore) 与嘌呤的结构相似,能与酶 ATP 腺嘌呤结合位点结合,而药效团的连接区 (linker, 相当于异喹啉类中的磺酰基团部位) 和饱和环占据着核糖结合位点,已开发的 ROCK 抑制剂一般对磷酸结合位点没有亲和力。

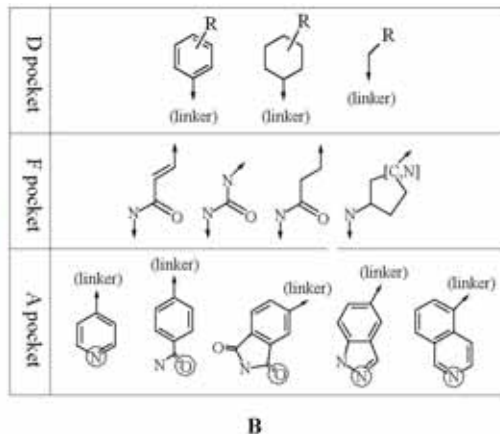


图 2 A: ROCK 与 ATP 结合模式图; B: ROCK 抑制剂的主要药效团<sup>[5]</sup>

根据已有的抑制剂信息和 ROCK 的空间结构信息,ROCK 与 ATP 结合的精细结构可以分为 A, F 和 D 区,这三个区共同形成与 ATP 结合的口袋结构 (图 2)<sup>[5]</sup>。A 区为口袋的底部,结构平坦,具有较强的疏水性,ATP 的嘌呤基团在此区域结合,此区的 Met167 残基的 NH 与 ATP 嘌呤基的 N1 形成氢键。位于 A 区上的 F 区也是一个疏水的平面结构,此区与 ATP 的戊糖环 (核糖结构) 结合。D 区具有 5 个特异性的结合位点,由 Ile 93: Arg 95, Ala 97: Gly 99, Gly 170: Leu 172, Asp 209: Asn 214, Asp 227: Phe 228 构成。此区的远端敞口于酶分子的表面,是一个自由度较大的区域,ATP 的焦磷酸尾巴在此位置漂移,将口袋附近的丝氨酸/苏氨酸磷酸化。

在 ATP 结合口袋中,基团较大的芳香环,如法苏地尔和羟基法苏地尔中的异喹啉环和 Y-27632 的 4-氨基吡啶环位于口袋的底部 (A 区) 结合;中间连接结构与对应的 ATP 戊糖环部位 (F 区) 结合。但这几个抑制剂对在 ATP 结合外口袋区 (D 区) 的相互作用不大。

### 2 ROCK 参与的信号通路

ROCK 主要存在于细胞浆,调整细胞骨架成分运动;除此以外在细胞核也有分布,这与基因表达调控有关<sup>[7]</sup>。ROCK 的活性受细胞外信号和某些胞浆蛋白的调节<sup>[8]</sup>。细胞外的某些激动剂 (如  $\alpha$  受体激动剂去甲肾上腺素) 作用于 G 蛋白偶联受体后,一方面通过某些机制使胞浆内的钙离子升高,通过钙依赖途径促进肌球蛋白轻链 (MLC) 磷酸化实现骨架蛋白的收缩;另一方面, G 蛋白偶联受体还可以将 Rho 蛋白,主要是 Rho A, 活化成 Rho-GTP, 通过后者与 ROCK 的 Rho 蛋白结合域结合,暴露 ROCK 的催化活性中心将 ROCK 激活,同时发生定向转位与

MLC靠近。ROCK的激活本身可以将MLC磷酸化而发生肌丝收缩作用,同时也能将肌球蛋白轻链磷酸酶(MLCP)磷酸化,从而使MLCP失活,阻止了磷酸化的MLC脱磷酸失活,间接促进MLC磷酸化而促进肌丝收缩(图3)。ROCK参与MLC的磷酸化调控是ROCK信号通路的经典途径,此外还参与其他细胞运动的信号通路调节,详见 <http://www.genome.jp/kegg/pathway/mo/mo04810.html>。

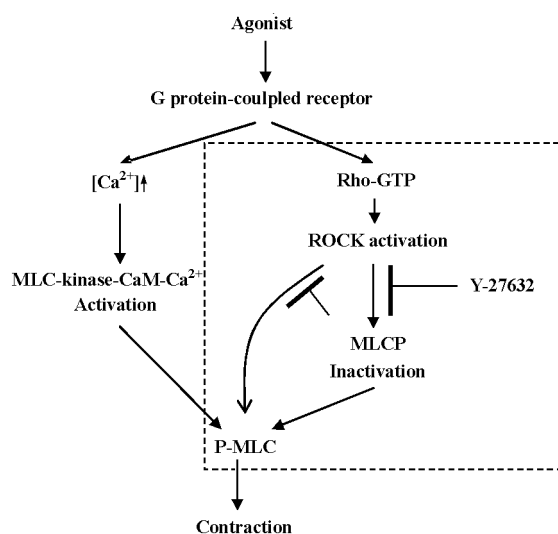


图3 ROCK的经典信号通路

### 3 ROCK活性的调节机制

静息状态下的ROCK没有酶活性,因为ROCK的激酶活性存在一种自我抑制机制,即ROCK的RBD, PHD和CRD等结构域能通过一种返折机制将ROCK的催化活性中心覆盖,使其不能与ATP及其下游底物大分子多肽/蛋白结合。ROCK的活性调节机制参见图4<sup>[9]</sup>。

在生理条件下,Rho蛋白(特别是RhoA)与ROCK的RBD结合后,改变了ROCK的空间结构,活性中心暴露从而表现催化活性,而RhoE也可以与Rho蛋白结合结构域结合,但不能暴露ROCK的活性中心,可以阻碍RhoA与其结合,对ROCK活性起到抑制作用<sup>[10]</sup>。除此以外,其他物质,如花生四烯酸(arachidonic acid, AA)也能与ROCK的PHD结合,同样能通过变构效应暴露ROCK的CD。另外,参与细胞凋亡的caspase-2, 3也能将ROCK(ROCK1)的返折部分水解,将ROCK降解成只含有CD的ROCK,表现出持久的激酶活性<sup>[11]</sup>,甚至有人证实细胞凋亡产生的凋亡小泡是ROCK激活所致。粒酶B(granzyme B)也能将ROCK活化,机制与

caspase相似<sup>[12]</sup>。肉毒杆菌C3外毒素(*Clostridium botulinum* C3 exoenzyme)能将Rho-GTP转化成Rho-GDP,从而抑制了Rho-GTP与ROCK的RBD结合,也产生ROCK抑制作用<sup>[13]</sup>。而溶血磷脂酸(lysophosphatidic acid, LPA)能通过激活RhoA转而激活ROCK<sup>[2]</sup>。已知经典的ROCK抑制剂如Y-27632和法苏地尔均能直接与ROCK-CD结合,抑制酶的活性<sup>[9]</sup>。ROCK-CD也是目前小分子ROCK抑制剂的作用区。

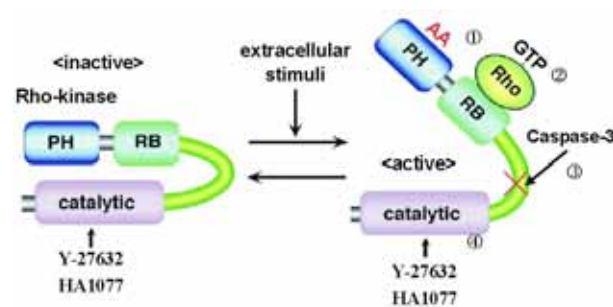


图4 ROCK活性的调节机制

### 4 ROCK的底物

ROCK的经典底物是MLC和MLCP,也是最早发现的天然底物。由于这两个蛋白都是参与细胞运动的主要蛋白质分子,因而也认为ROCK是调节细胞运动的重要激酶之一。ROCK属于苏氨酸/丝氨酸蛋白激酶,磷酸化底物的部位一般都是苏氨酸或丝氨酸,所以常称之为Rho-associated coiled-coil forming protein serine/threonine kinase,以区别于酪氨酸激酶(protein tyrosine kinase, PTK)。尽管如此,ROCK偶尔也能将底物中的酪氨酸进行磷酸化。目前已发现的ROCK底物至少有25种,其ROCK的磷酸化位点和主要作用参见表1。

### 5 ROCK激活的生物效应

多种细胞均表达ROCK,ROCK激活后的直接作用是导致细胞骨架收缩。对于不同的细胞可能产生不同的效应,常见组织细胞的ROCK激活效应参见表2。

### 6 ROCK及ROCK抑制剂与疾病

由于ROCK对细胞骨架活动的调节如此重要,ROCK的高表达和ROCK的过度激活均可导致疾病,因而参与了多种疾病的病理过程。目前尚未发现ROCK低表达或活性不足所导致的疾病。

#### 6.1 心血管疾病

ROCK抑制剂Y-27632、法苏地尔、羟基法苏地尔(hydroxy-fasudil)能减轻心肌缺血再灌注损伤,

表 1 ROCK底物一览表

底物	磷酸化位点	Ref.	备注
1 a-Adducin	Thr445, 480	[ 14 ]	一种能与钙调蛋白结合的细胞膜骨架蛋白
2 Calponin	Thr170, Ser175, Thr180, 184, 259	[ 15 ]	参与肌丝运动的钙结合蛋白
3 Collapsin response mediator protein-2 ( CRMP-2)	Thr555	[ 16 ]	参与神经生长分化的蛋白
4 CPI-17	Thr38	[ 17 ]	能抑制磷蛋白磷酸酶和 MLCP
5 Desmin	Thr16, 75, 76	[ 18 ]	PKA, PKC, cdc2 kinase
6 Endophilin A1	Thr14	[ 19 ]	能与 synaptojanin和 dynamin 1 结合
7 ERK1 /2 extracellular signal- regulated MAP kinases	Thr202/Tyr204	[ 20 ]	参与细胞的有丝分裂和减数分裂等
8 ERM	Thr567 ( ezrin ), Thr564 ( radixin ), T-558 ( moesin)	[ 21 ]	Membrane-organizing extension spike protein
9 Focal adhesion kinase-1 ( FAK-1 )	Tyr397	[ 20 ]	一种参与细胞粘附和迁移的激酶
10 Glial fibrillary acidic protein ( GFAP)	Thr7, Ser13, Ser34	[ 22 ]	神经胶质细胞中的一种中间丝蛋白
11 I kappa B kinase	Ser536	[ 23 ]	一种磷酸化 I kappa B的丝 苏氨酸激酶
12 LIM-kinase 1	Thr508	[ 24 ]	参与细胞骨架重塑
13 LIM-kinase 2	Thr505	[ 25, 26 ]	A member of the LIM-kinase family
14 MAP2	Ser1796	[ 27 ]	
15 MLC	Ser18,19	[ 28 ]	Muscle contraction
16 MLCP, myosin phosphatase target subunit 1 ( MYPT1 )	Thr695, 853, 697, Ser854, Thr855, 686 850	[ 29 - 31 ]	Regulation muscle contraction
17 Nal /H1 exchanger NHE1		[ 32 ]	
18 Nal /H1 exchanger NHE3		[ 33 ]	
19 Neurofilament protein ( NF-L)	Ser26 and Ser57	[ 34 ]	神经微丝蛋白
20 Occludin		[ 35 ]	An integral membrane protein localizing at tight junctions ( zonula occludens)
21 Phosphatidylinositol 4-hosphate 5-kinase ( PIP5K)		[ 36 ]	
22 Rac1		[ 37 ]	一种 rac GTP结合蛋白,参与细胞伪足形成, 从而影响细胞的运动
23 S6 ribosomal protein	Ser235 /Ser236	[ 38 ]	一种参与基因转录的蛋白
24 Tau	Thr245, Thr377, Ser409	[ 29 ]	参与神经细胞微管蛋白单体装配成微管, 维持细胞骨架轴突运输
25 Vimentin	Ser38, Ser71	[ 39, 40 ]	一种中间丝蛋白,参与细胞有丝分裂后期的 细胞结构功能的维持

表 2 ROCK激活的生物效应及其抑制剂可能的临床应用

	ROCK激活	ROCK抑制剂	抑制剂的临床应用
平滑肌			
血管平滑肌	收缩	松弛	抗高血压
支气管平滑肌	收缩	松弛	抗哮喘,慢阻肺
胃肠道平滑肌	收缩	松弛	缓解胃肠痉挛
海绵体平滑肌	收缩	松弛	抗男性 ED
睫状肌	收缩	松弛,促进房水回流	抗青光眼
神经细胞			
突起	抑制生长	促进	促进神经损伤后恢复
递质	促进合成释放?	抑制	镇痛?
胶质细胞	促进迁移	抑制迁移	有助于神经损伤恢复
免疫细胞			
	促进运动,分泌	抑制	抗炎作用
肿瘤细胞			
	促进运动,转移	抑制	抑制肿瘤转移

对抗高血压等<sup>[41]</sup>; ROCK也参与了男性性活动的神经血管反应, ROCK抑制剂能改善男性功能障碍(erectile dysfunction)<sup>[42]</sup>。

## 6.2 神经系统疾病

在脊髓损伤<sup>[43]</sup>、阿尔茨海默病<sup>[27]</sup>、神经炎症脊髓脱鞘等中枢神经疾病<sup>[44, 45]</sup>、中风和兴奋性毒性<sup>[46, 47]</sup>等疾病均存在 ROCK表达上调现象, 而使用 ROCK抑制剂能够促进神经突起生长, 促进损伤后神经功能恢复。ROCK抑制剂也能减轻某些神经性疼痛<sup>[48]</sup>。

## 6.3 纤维化疾病

Rho A-ROCK信号途径参与许多纤维化、硬化性疾病。如 ROCK抑制剂能抑制肝脏、肺、肾脏纤维化<sup>[49-51]</sup>。

## 6.4 肿瘤

肿瘤的浸润和转移依赖 ROCK的激活, ROCK抑制剂能抑制肿瘤转移<sup>[52]</sup>。

## 7 ROCK抑制剂的化学结构

到目前为止, 发现的 ROCK抑制剂, 均为小分子有机化合物。法苏地尔和 Y-27632是最早发现的小分子 ROCK抑制剂<sup>[53]</sup>, 因为其松弛平滑肌的作用不能完全用经典的钙拮抗剂来解释, 最初曾把它们的作用归结为细胞内钙拮抗剂。到现在为止, 按照化学结构的特征, 至少已经发现了 4类 ROCK抑制剂, 这些抑制剂的研究主要集中在日本。相应化合物的结构见图 5。

### 7.1 异喹啉类 (isoquinoline series)

法苏地尔对 ROCK有中度抑制作用(化合物 1) ( $K_i = 330 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )<sup>[53]</sup>。这类化合物的结构特点是具有一个异喹啉结构和哌嗪环, 两者通过磺酰基相连。羟基法苏地尔(化合物 2)是法苏地尔的主要体内代谢产物, 它的活性比母药法苏地尔略强<sup>[5, 54, 55]</sup>。通过对异喹啉磺酰胺类母核的结构优化, 得到了化合物 H-1152P(化合物 3)<sup>[1, 56]</sup>, 又名二甲基法苏地尔, 是迄今为止作用最强的 ROCK抑制剂。由于此化合物的作用很强, 已经成为体外研究 ROCK的常用工具药。随着含有 5-氨基异喹啉骨架的 ROCK抑制剂不断发现, 化合物 4对 ROCK的抑制强度也达到纳摩尔级<sup>[5, 54, 55]</sup>。此类小分子是目前研究最热的一类, 构效关系研究已经取得了很大进展。

### 7.2 4-氨基吡啶类 (4-aminopyridine series)

Y-27632(化合物 5)是在细胞生物学和药理学研究中广为应用的 ROCK抑制剂, 是 4-氨基吡啶类

的杰出代表。此类结构除 4-氨基吡啶母核外, 在分子的中心位置还含有一个环己烷或苯环结构, 在环己烷的 4位具有一基本的侧链结构。Y-27632对 ROCK只有中等强度的抑制作用,  $IC_{50}$ 在  $0.3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 左右<sup>[53]</sup>。经结构优化, 发现了其他抑制作用很强的化合物如 Y-30141(化合物 6)、化合物 7和化合物 8<sup>[5, 54, 55]</sup>。将 1H-吡咯并[2, 3-b]吡啶-4-胺或 1H-吡咯并[3, 4-b]吡啶-4-胺代替 4-氨基吡啶, 对 ROCK的抑制作用将进一步增强(如 Y-30141强于 Y-27632)。氢键供体和双环体系中的氢键接受者共存的铰链结构有增强抑制活性的作用。Y-27632的手性结构研究表明, R型对映体只比 S型对映体的活性略高<sup>[1, 57]</sup>, 故推测此位的手性碳不是关键部位。

### 7.3 吲唑类 (indazole series)

将 5-氨基或 5-烷氧基-1H-吲唑作为骨架也可以合成很多强效的 ROCK抑制剂, 如化合物 9、10和 11<sup>[5, 54, 55]</sup>。与骨架母核相连的可以是苯并四氢吡咯(benzyl-pyrrolidine)、氨基喹唑啉(amino quinazoline)或嘧啶基-苯胺(pyrimidine-aniline)等基团。

### 7.4 酰胺和脲类 (amide and urea series)

已经发现很多 ROCK抑制剂以脲作为药效团。然而, 以此为结构母核的文献报道不多。此类化合物的代表是化合物 12、13<sup>[5, 54, 55]</sup>, 这两个化合物具有一个邻苯二甲酰亚胺(phthalimide)和一个脲基(carbamido group)构成一个绞合结构。此结构的特异性有望开辟具有新特征的 ROCK抑制剂, 以增加细胞穿透力和组织特异性, 但尚无这方面活性方面的文献报道。根据结构分析, 由于作用于 ATP结合位点的 ROCK抑制剂功能分为疏水的芳香环区、亲水的外口袋区和连接这两个区的连接区(见晶体结构内容), 推测此类化合物的结构以连接结构为特征进行分类, 而非嘌呤结合区(如前面几类)。

除上述结构外, 新发现的 ROCK抑制剂 Rockout (3-(pyridin)-1H-indole)具有新的结构特征(图 5, 化合物 14), 虽然对 ROCK的  $IC_{50}$ 高达  $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 但此化合物仍有较好的细胞活性, 药理作用与 Y-27632相似<sup>[58]</sup>。Rockout含有吲唑和吡啶结构, 但其结构特征不同于吲唑类和 4-氨基吡啶类, 由于缺乏分子对接的数据, 尚不清楚 Rockout与 ROCK的作用方式。

## 8 ROCK抑制剂的选择性

由于蛋白激酶 ATP结合位点区域氨基酸序列有高度的同源性, 开发选择性很高的 ROCK抑制剂不是一件容易的事。据已有的资料, 目前的 ROCK

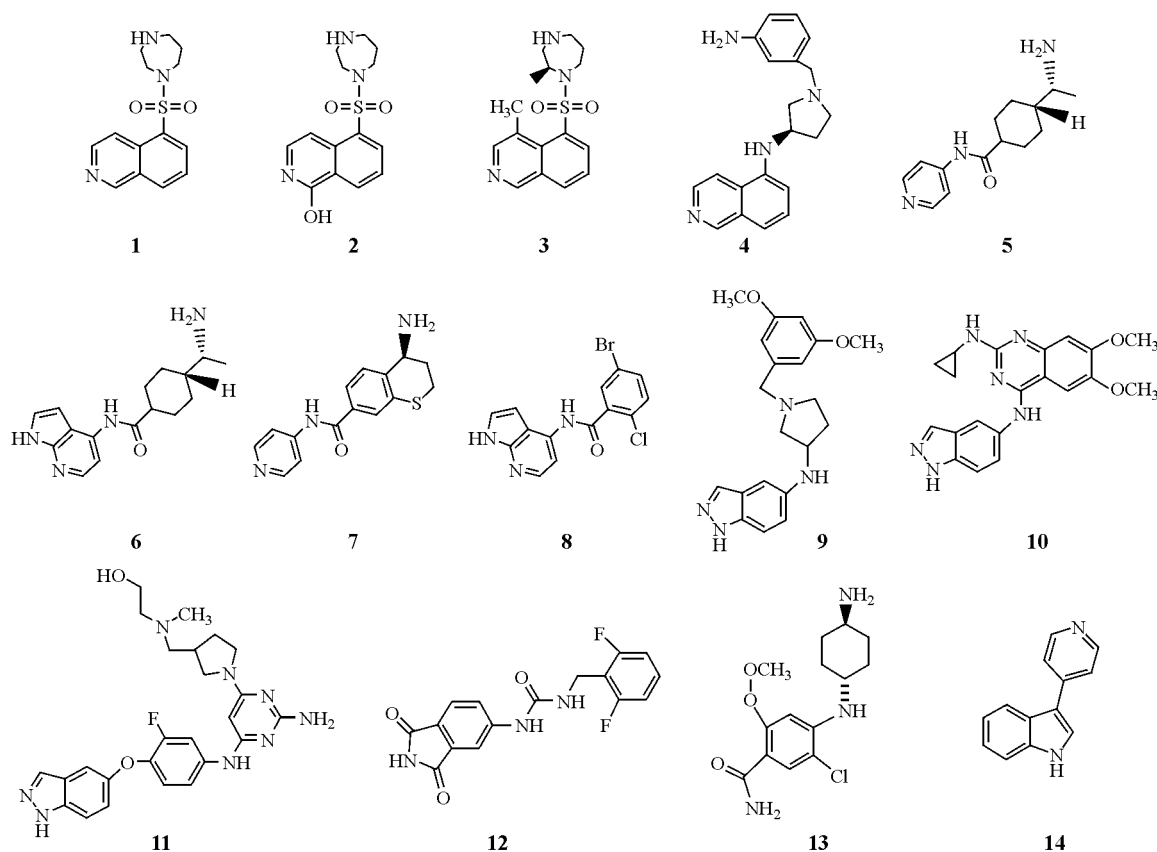


图 5 ROCK抑制剂的化学式

抑制剂都是作用于催化结构域的 ATP 结合位点,对 ROCK 亚型的抑制作用也报道很少。但这并不奇怪,因为 ROCK I 和 ROCK II ATP 结合位点的同源性高达 90%<sup>[1,3]</sup>。对 ROCK 亚型抑制作用的研究报道只有 Y-27632 和 Y-30141,两者对 ROCK I 和 ROCK II 的抑制作用几乎没有区别<sup>[59]</sup>。

另外, ROCK 抑制剂对其他蛋白激酶的选择性抑制差别报道也不多。有报道称,在测试 25 种蛋白激酶的抑制试验中, Y-27632 对其中的 21 种有不同程度的抑制作用。Y-27632 除了抑制 ROCK 外,对蛋白激酶 N 有同等强度的抑制作用,对 MSK1 (mitogen- and stress-induced kinase 1), MAPKAPK1 b (mitogen-activated protein kinase activated protein kinase 1b), citron kinase 和 PHK (phosphorylase kinase) 也有较弱的抑制作用(弱 10 ~ 50 倍不等)<sup>[60]</sup>。对于与 Y-27632 结构相似的抑制剂 Y-30141,其选择性抑制方面也与 Y-27632 相似, Y-30141 对蛋白激酶 A、PKN 和 citron kinase 也有中等程度的抑制作用<sup>[61]</sup>。在 27 个激酶抑制实验中,法苏地尔对其中的 19 个激酶有较强的抑制作

用<sup>[60]</sup>。对 PRK2/PKN, MSK1, S6K, MAPKAPK1 b 和 PKA, 法苏地尔的抑制作用约为前述 19 个激酶的 1/10,而对 AMPK (AMP-activated protein kinase) 和 PHK 的抑制作用中等,这表明法苏地尔的选择性比 Y-27632 要低<sup>[60]</sup>。H-1152 对 PKA、蛋白激酶 C 和 MLC 激酶 (MLC kinase) 有选择性的抑制作用(400 到 1 000 倍不等),但对 PKN 的抑制作用尚不清楚<sup>[62,63]</sup>。根据现有的材料,还不能在 ROCK 抑制剂的选择性方面得出确切的结论,但已提示,从不同类型的化合物中优化 ROCK 抑制剂在选择性方面可能具有一定的意义。

### 9 ROCK 抑制剂筛选模型

理论上说,表 1 中的底物都可以用来作为 ROCK 的底物构建 ROCK 抑制剂筛选模型。在实际应用中,为了提高体系的稳定性,减少实验成本,酶常采用重组的 ROCK 催化功能域,底物也不采用完整的底物蛋白。由于 S6 多肽的结构特点,在目前已经建立的筛选模型中,多采用 S6 多肽作为模型的底物,其中 S6 多肽已从 19 肽优化到 11 肽 (AKRRRLSSLRA)<sup>[64,65]</sup>。

### 9.1 基于体外酶活性检测的筛选模型

由于激酶催化的反应是将底物磷酸化,根据酶学反应的特点,底物的减少和产物的增多均可以用来表示酶促反应的速度。在激酶反应体系中 ATP 一般是过量的,检测 ATP 的减少会带来较大误差。因此在实际应用中采用产物增加来衡量反应的速度,即用一定时间内底物磷酸化的多少作为衡量酶活性的指标。

**9.1.1 基于同位素检测的筛选模型** 1996年发现 ROCK后,日本对 ROCK的功能展开了多种生物学研究和药物开发的应用研究。在研究 ROCK生物学功能时,常常采用同位素 [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP 或 [ $\gamma$ - $^{33}$ P]ATP<sup>[38]</sup>,标记的都是 ATP 的末端活性磷酸根。反应后分析底物分子如 MLC 或 MLCP 中沾染同位素磷的量来衡量产物生成的量。

酶是生物催化剂,均具有催化中心,ROCK 的催化中心就是将 ATP 中的磷酸根转移到底物的功能域,此功能结构域位于 ROCK N 端 500 左右氨基酸 (ROCK I 76-338; ROCK II 92-354)<sup>[31]</sup>。本课题组的研究表明,重组的 ROCK-CD 具有良好的催化活性<sup>[64,65]</sup>。因而采用重组的 ROCK-CD 可以用于 ROCK 抑制剂的筛选。Takami 等<sup>[51]</sup>将同位素法 [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP 模型成功改造成亲和闪烁法 (scintillation proximity assay, SPA) 高通量筛选,筛选了上万个化合物,发现了一系列结构各异的 ROCK 抑制剂。

**9.1.2 基于荧光标记的筛选模型** 作者利用荧光偏振原理构建了非同位素筛选模型<sup>[64]</sup>。以荧光标记的 S6 核糖蛋白 11 肽为底物,ROCK 催化多肽底物磷酸化后能够与一大分子抗体结合,分子体积的变化导致荧光分子的偏振值 (fluorescence polarization, FP) 发生显著变化,FP 的变化与磷酸化底物生成的量成正相关,由此可以判断 ROCK 的活性情况。作者利用此模型已经成功筛选了 3 000 多个未知化合物<sup>[64]</sup>,发现了 5 个阳性化合物。

### 9.2 基于生物活性的筛选模型

ROCK 抑制可诱导 PC12 细胞、NG108-15 细胞、NIE-115 细胞等生长神经样突起,可抑制上皮细胞迁移,抑制肌肉细胞收缩。那么筛选出的 ROCK 抑制剂也应具有相应的生物学活性。PC12 细胞神经样突起生长模型已经成为 ROCK 抑制剂生物活性筛选的重要方法之一,作者<sup>[64]</sup>建立的 ROCK 抑制剂筛选模型也采用 PC12 细胞神经样突起模型验证了 ROCK 抑制剂的活性。随着高内涵筛选技术 (high

content screening) 的发展,甚至有人发展了一些细胞筛选方法,根据 ROCK 抑制表现出来的细胞水平上的活性直接筛选 ROCK 抑制剂<sup>[58]</sup>。

在以上的筛选模型中,体外酶活性检测的筛选常处于第一阶段以获得一定的先导化合物,一般将抑制活性 ( $IC_{50}$ ) 不高于  $3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  作为阳性标准<sup>[51]</sup>,然后将筛选出的先导化合物进行基于细胞水平的筛选。有时为了减少漏筛,可根据具体情况把  $IC_{50}$  调整到  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  或更高。须指出的是,ROCK 抑制剂体外筛选的  $IC_{50}$  往往较细胞筛选模型的要低,究其原因可能与细胞内 ATP 的竞争、化合物的稳定性以及细胞对化合物代谢等因素有关,对此要有正确的评价,其中内源性 ATP 的竞争作用不容忽视。

### 10 ROCK 抑制剂与临床

在已经开发的 ROCK 抑制剂中,法苏地尔已经上市多年,因此在药物安全性和药代动力学方面已获得了较多的资料。法苏地尔早在 ROCK 发现以前就被日本学者发现,具有较强的平滑肌松弛作用,对肌球蛋白轻链激酶 (MLCK) 具有抑制作用。虽然对 MLCK 的抑制作用能够在一定程度上解释其生物学效应,但直到 ROCK 发现以后,它的作用机制才被真正阐明。

法苏地尔最初以治疗蛛网膜下隙出血 (subarachnoid hemorrhage) 药物在日本上市,临床实践表明人体对此药有较好的反应性。法苏地尔对包括心绞痛、高血压、冠脉血管痉挛、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<sup>[66]</sup>。此药口服吸收有效<sup>[1]</sup>,半衰期很短,在体内很快转化为羟基法苏地尔。法苏地尔和羟基法苏地尔的脑穿透能力较低,因此将它们做成脂质体制剂经鞘内注射可以增加脑内的血药浓度,以减少不良反应,增加疗效<sup>[67]</sup>。

与法苏地尔相似,Y-27632 口服有效<sup>[51]</sup>,但代谢非常快,对中枢的穿透能力也较差。因此不适合用来治疗中枢性神经疾病。通过脑室注射,Y-27632 能降低 PDAPP 小鼠脑内的  $A\beta_{42}$  含量,减轻阿尔茨海默病的病程<sup>[68]</sup>。到目前为止,除法苏地尔、Y-27632 和 H-1152 外,尚未见其他 ROCK 抑制剂的在体研究报道。

### 11 展望

理论上说,由于 ROCK 的分布广泛,底物繁多,抑制不同组织细胞中的 ROCK 产生相应的生理功能也会很多,那么 ROCK 抑制剂潜在的不良反应也

是可以想象的。值得注意的是,现在已开发的 ROCK 抑制剂都是针对 ROCK ATP 结合位点的,由于 ROCK 与其他蛋白激酶的高度同源性,因此对 ROCK 的选择性有限是可以理解的,这也不可避免地会带来新的不良反应。增加 ROCK 抑制剂的特异组织亲和力,改善 ROCK 抑制剂的药代动力学行为有望能克服此类问题。

目前开发的小分子 ROCK 抑制剂除法苏地尔已经上市外,尚未见新的此类 ROCK 抑制剂上市。根据 ROCK 的结构信息和其参与的信号通路,以下途径有望成为 ROCK 抑制剂开发的新方向: 1) 为了增强 ROCK 作用的特异性,开发以多肽或多肽类似物为导向的 ROCK 抑制剂可能是以后开发的新思路之一; 2) 抑制 Rho 蛋白激活 ROCK 也是值得探索的策略,其他作用于 Rho A-ROCK-MLC 信号通路的化合物也能产生类似 ROCK 抑制剂的作用; 3) ROCK 的 CRD 是 ROCK 定向转位的功能区,阻碍 ROCK 转位能阻止某些底物磷酸化,因而也可能是开发 ROCK 抑制剂的新策略。

## References

- [ 1 ] Mueller BK, Mack H, Teusch N. Rho kinase, a promising drug target for neurological disorders [ J ]. *Nat Rev Drug Discov*, 2005, 4: 387 - 398.
- [ 2 ] 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 [ J ]. *Embo J*, 1996, 15: 2208 - 2216.
- [ 3 ] Riento K, Ridley AJ. Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour [ J ]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003, 4: 446 - 456.
- [ 4 ] Yamaguchi H, Miwa Y, Kasa M, et al. Structural basis for induced-fit binding of Rho-kinase to the inhibitor Y-27632 [ J ]. *J Biochem ( Tokyo)*, 2006, 140: 305 - 311.
- [ 5 ] Takami A, Iwakubo M, Okada Y, et al. Design and synthesis of Rho kinase inhibitors ( I ) [ J ]. *Bioorg Med Chem*, 2004, 12: 2115 - 2137.
- [ 6 ] Breitenlechner C, Gassel M, Engh R, et al. Structural insights into AGC kinase inhibition [ J ]. *Oncol Res*, 2004, 14: 267 - 278.
- [ 7 ] Tanaka T, Nishimura D, Wu RC, et al. Nuclear Rho kinase, ROCK2, targets p300 acetyltransferase [ J ]. *J Biol Chem*, 2006, 281: 15320 - 15329.
- [ 8 ] Ishizaki T. Rho-mediated signal transduction and its physiological roles [ J ]. *Nippon Yakurigaku Zasshi*, 2003, 121: 153 - 162.
- [ 9 ] Amano M, Fukata Y, Kaibuchi K. Regulation and functions of Rho-associated kinase [ J ]. *Exp Cell Res*, 2000, 261: 44 - 51.
- [ 10 ] Riento K, Guasch RM, Garg R, et al. RhoE binds to ROCK I and inhibits downstream signaling [ J ]. *Mol Cell Biol*, 2003, 23: 4219 - 4229.
- [ 11 ] Chang J, Xie M, Shah VR, et al. Activation of Rho-associated coiled-coil protein kinase 1 ( ROCK-1 ) by caspase-3 cleavage plays an essential role in cardiac myocyte apoptosis [ J ]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 14495 - 14500.
- [ 12 ] Sebbagh M, Hamelin J, Bertoglio J, et al. Direct cleavage of ROCK II by granzyme B induces target cell membrane blebbing in a caspase-independent manner [ J ]. *J Exp Med*, 2005, 201: 465 - 471.
- [ 13 ] Busca R, Bertolotto C, Abbe P, et al. Inhibition of Rho is required for cAMP-induced melanoma cell differentiation [ J ]. *Mol Biol Cell*, 1998, 9: 1367 - 1378.
- [ 14 ] Fukata Y, Oshiro N, Kinoshita N, et al. Phosphorylation of adducin by Rho-kinase plays a crucial role in cell motility [ J ]. *J Cell Biol*, 1999, 145: 347 - 361.
- [ 15 ] Kaneko T, Amano M, Maeda A, et al. Identification of calponin as a novel substrate of Rho-kinase [ J ]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 273: 110 - 116.
- [ 16 ] Arimura N, Inagaki N, Chihara K, et al. Phosphorylation of collapsin response mediator protein-2 by Rho-kinase. Evidence for two separate signaling pathways for growth cone collapse [ J ]. *J Biol Chem*, 2000, 275: 23973 - 23980.
- [ 17 ] Koyama M, Ito M, Feng J, et al. Phosphorylation of CPI-17, an inhibitory phosphoprotein of smooth muscle myosin phosphatase, by Rho-kinase [ J ]. *FEBS Lett*, 2000, 475: 197 - 200.
- [ 18 ] Inada H, Goto H, Tanabe K, et al. Rho-associated kinase phosphorylates desmin, the myogenic intermediate filament protein, at unique amino-terminal sites [ J ]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 253: 21 - 25.
- [ 19 ] Kaneko T, Maeda A, Takefuji M, et al. Rho mediates endocytosis of epidermal growth factor receptor through phosphorylation of endophilin A1 by Rho-kinase [ J ]. *Genes Cells*, 2005, 10: 973 - 987.
- [ 20 ] Torsoni AS, Marin TM, Velloso LA, et al. RhoA/ROCK signaling is critical to FAK activation by cyclic stretch in cardiac myocytes [ J ]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005, 289: H1488 - 1496.
- [ 21 ] Jeon S, Kim S, Park JB, et al. RhoA and Rho kinase-dependent phosphorylation of moesin at Thr558 in hippocampal neuronal cells by glutamate [ J ]. *J Biol Chem*, 2002, 277: 16576 - 16584.
- [ 22 ] Kosako H, Amano M, Yanagida M, et al. Phosphorylation of glial fibrillary acidic protein at the same sites by cleavage furrow kinase and Rho-associated kinase [ J ]. *J Biol Chem*, 1997, 272: 10333 - 10336.
- [ 23 ] Anwar KN, Fazal F, Malik AB, et al. RhoA/Rho-associated kinase pathway selectively regulates thrombin-induced intercellular adhesion molecule-1 expression in endothelial cells via activation of I kappa B kinase beta and phosphorylation of RelA/p65 [ J ]. *J Immunol*, 2004, 173: 6965 - 6972.



- [ 24 ] Ohashi K, Nagata K, Maekawa M, et al. Rho-associated kinase ROCK activates LIM-kinase 1 by phosphorylation at threonine 508 within the activation loop [ J ]. *J Biol Chem*, 2000, 275: 3577 - 3582.
- [ 25 ] Togashi H, Nagata K, Takagishi M, et al. Functions of a Rho-specific guanine nucleotide exchange factor in neurite retraction. Possible role of a proline-rich motif of KIAA0380 in localization [ J ]. *J Biol Chem*, 2000, 275: 29570 - 29578.
- [ 26 ] Sumi T, Matsumoto K, Nakamura T. Specific activation of LIM kinase 2 via phosphorylation of threonine 505 by ROCK, a Rho-dependent protein kinase [ J ]. *J Biol Chem*, 2001, 276: 670 - 676.
- [ 27 ] Amano M, Kaneko T, Maeda A, et al. Identification of Tau and MAP2 as novel substrates of Rho-kinase and myosin phosphatase [ J ]. *J Neurochem*, 2003, 87: 780 - 790.
- [ 28 ] Amano M, Ito M, Kimura K, et al. Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase ( Rho-kinase ) [ J ]. *J Biol Chem*, 1996, 271: 20246 - 20249.
- [ 29 ] Watanabe Y, Faraci FM, Heistad DD. Activation of Rho-associated kinase during augmented contraction of the basilar artery to serotonin after subarachnoid hemorrhage [ J ]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005, 288: H2653 - 2658.
- [ 30 ] Binukova AA, Smurova K, Binukov KG, et al. Role of Rho GTPases in thrombin-induced lung vascular endothelial cells barrier dysfunction [ J ]. *Microvasc Res*, 2004, 67: 64 - 77.
- [ 31 ] Wilson DP, Susnjar M, Kiss E, et al. Thromboxane A<sub>2</sub>-induced contraction of rat caudal arterial smooth muscle involves activation of Ca<sup>2+</sup> entry and Ca<sup>2+</sup> sensitization: Rho-associated kinase-mediated phosphorylation of MYPT1 at Thr855, but not Thr697 [ J ]. *Biochem J*, 2005, 389: 763 - 774.
- [ 32 ] Tomioka T, Ishizaki T, Narumiya S, et al. p160ROCK mediates RhoA activation of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger [ J ]. *Embo J*, 1998, 17: 4712 - 4722.
- [ 33 ] Szasz K, Kurashima K, Kapus A, et al. RhoA and rho kinase regulate the epithelial Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger NHE3. Role of myosin light chain phosphorylation [ J ]. *J Biol Chem*, 2000, 275: 28599 - 28606.
- [ 34 ] Hashimoto R, Nakamura Y, Goto H, et al. Domain- and site-specific phosphorylation of bovine NF-L by Rho-associated kinase [ J ]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 245: 407 - 411.
- [ 35 ] Hirase T, Kawashima S, Wong EY, et al. Regulation of tight junction permeability and occludin phosphorylation by RhoA-p160ROCK-dependent and -independent mechanisms [ J ]. *J Biol Chem*, 2001, 276: 10423 - 10431.
- [ 36 ] Yang SA, Carpenter CL, Abrams CS. Rho and Rho-kinase mediate thrombin-induced phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase trafficking in platelets [ J ]. *J Biol Chem*, 2004, 279: 42331 - 42336.
- [ 37 ] Yamaguchi Y, Katoh H, Yasui H, et al. RhoA inhibits the nerve growth factor-induced Rac1 activation through Rho-associated kinase-dependent pathway [ J ]. *J Biol Chem*, 2001, 276: 18977 - 18983.
- [ 38 ] Tumer MS, Fen L, Trauger JW, et al. Characterization and purification of truncated human Rho-kinase II expressed in Sf21 cells [ J ]. *Arch Biochem Biophys*, 2002, 405: 13 - 20.
- [ 39 ] Inada H, Togashi H, Nakamura Y, et al. Balance between activities of Rho kinase and type 1 protein phosphatase modulates turnover of phosphorylation and dynamics of desmin/vimentin filaments [ J ]. *J Biol Chem*, 1999, 274: 34932 - 34939.
- [ 40 ] Goto H, Kosako H, Tanabe K, et al. Phosphorylation of vimentin by Rho-associated kinase at a unique aminoterminal site that is specifically phosphorylated during cytokinesis [ J ]. *J Biol Chem*, 1998, 273: 11728 - 11736.
- [ 41 ] Bao W, Hu E, Tao L, et al. Inhibition of Rho-kinase protects the heart against ischemia/reperfusion injury [ J ]. *Cardiovasc Res*, 2004, 61: 548 - 558.
- [ 42 ] Chitale K, Webb RC, Mills TM. The ups and downs of Rho-kinase and penile erection: upstream regulators and downstream substrates of Rho-kinase and their potential role in the erectile response [ J ]. *Int J Impot Res*, 2003, 15: 105 - 109.
- [ 43 ] Fournier AE, Takizawa BT, Strittmatter SM. Rho kinase inhibition enhances axonal regeneration in the injured CNS [ J ]. *J Neurosci*, 2003, 23: 1416 - 1423.
- [ 44 ] Honing H, van den Berg TK, van der Pol SM, et al. RhoA activation promotes transendothelial migration of monocytes via ROCK [ J ]. *J Leukocyte Biol*, 2004, 75: 523 - 528.
- [ 45 ] Hendriks JJ, Alblas J, van der Pol SM, et al. Flavonoids influence monocytic GTPase activity and are protective in experimental allergic encephalitis [ J ]. *J Exp Med*, 2004, 200: 1667 - 1672.
- [ 46 ] Tushima Y, Satoh S, Ikegaki I, et al. A new model of cerebral microthrombosis in rats and the neuroprotective effect of a Rho-kinase inhibitor [ J ]. *Stroke*, 2000, 31: 2245 - 2250.
- [ 47 ] Kitaoka Y, Kitaoka Y, Kumai T, et al. Involvement of RhoA and possible neuroprotective effect of fasudil, a Rho kinase inhibitor, in NMDA-induced neurotoxicity in the rat retina [ J ]. *Brain Res*, 2004, 1018: 111 - 118.
- [ 48 ] Tatsumi S, Mabuchi T, Katano T, et al. Involvement of Rho-kinase in inflammatory and neuropathic pain through phosphorylation of myristoylated alanine-rich C-kinase substrate (MARCKS) [ J ]. *Neuroscience*, 2005, 131: 491 - 498.
- [ 49 ] Murata T, Arai S, Nakamura T, et al. Inhibitory effect of Y-27632, a ROCK inhibitor, on progression of rat liver fibrosis in association with inactivation of hepatic stellate cells [ J ]. *J Hepatol*, 2001, 35: 474 - 481.
- [ 50 ] Shimizu Y, Dobashi K, Izuka K, et al. Contribution of

- small GTPase Rho and its target protein rock in a murine model of lung fibrosis [ J ]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001, 163: 210 - 217.
- [ 51 ] Nagatoya K, Moriyama T, Kawada N, et al. Y-27632 prevents tubulointerstitial fibrosis in mouse kidneys with unilateral ureteral obstruction [ J ]. *Kidney Int*, 2002, 61: 1684 - 1695.
- [ 52 ] Nakajima M, Hayashi K, Egi Y, et al. Effect of Wf536, a novel ROCK inhibitor, against metastasis of B16 melanoma [ J ]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2003, 52: 319 - 324.
- [ 53 ] 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: 990 - 994.
- [ 54 ] Iwakubo M, Takami A, Okada Y, et al. Design and synthesis of Rho kinase inhibitors ( III ) [ J ]. *Bioorg Med Chem*, 2007, 15: 1022 - 1033.
- [ 55 ] Iwakubo M, Takami A, Okada Y, et al. Design and synthesis of Rho kinase inhibitors ( II ) [ J ]. *Bioorg Med Chem*, 2007, 15: 350 - 364.
- [ 56 ] Tamura M, Nakao H, Yoshizaki H, et al. Development of specific Rho-kinase inhibitors and their clinical application [ J ]. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1754: 245 - 252.
- [ 57 ] Gingras K, Avedissian H, Thouin E, et al. Synthesis and evaluation of 4-( 1-aminoalkyl )-N-( 4-pyridyl ) cyclohexanecarboxamides as Rho kinase inhibitors and neurite outgrowth promoters [ J ]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2004, 14: 4931 - 4934.
- [ 58 ] Yarrow JC, Totsukawa G, Charras GT, et al. Screening for cell migration inhibitors via automated microscopy reveals a Rho-kinase inhibitor [ J ]. *Chem Biol*, 2005, 12: 385 - 395.
- [ 59 ] Sebbagh M, Renvoize C, Hamelin J, et al. Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing [ J ]. *Nat Cell Biol*, 2001, 3: 346 - 352.
- [ 60 ] Davies SP, Reddy H, Caivano M, et al. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors [ J ]. *Biochem J*, 2000, 351: 95 - 105.
- [ 61 ] Ishizaki T, Uehata M, Tamechika I, et al. Pharmacological properties of Y-27632, a specific inhibitor of Rho-associated kinases [ J ]. *Mol Pharmacol*, 2000, 57: 976 - 983.
- [ 62 ] 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 [ J ]. *Pharmacol Ther*, 2002, 93: 225 - 232.
- [ 63 ] Ikenoya M, Hidaka H, Hosoya T, et al. Inhibition of Rho-kinase-induced myristoylated alanine-rich C kinase substrate ( MARCKS ) phosphorylation in human neuronal cells by H-1152, a novel and specific Rho-kinase inhibitor [ J ]. *J Neurochem*, 2002, 81: 9 - 16.
- [ 64 ] Duan W, Sun L, Liu J, et al. Establishment and application of a high throughput model for Rho kinase inhibitors screening based on fluorescence polarization [ J ]. *Biol Pharm Bull*, 2006, 29: 1138 - 1142.
- [ 65 ] Duan W, Wang S, Chen M, et al. Harvest active recombinant Rho kinase from *Escherichia coli* [ J ]. *Biol Pharm Bull*, 2006, 29: 38 - 42.
- [ 66 ] Hirooka Y, Shimokawa H. Therapeutic potential of Rho-kinase inhibitors in cardiovascular diseases [ J ]. *Am J Cardiovasc Drugs*, 2005, 5: 31 - 39.
- [ 67 ] Ishida T, Takanashi Y, Doi H, et al. Encapsulation of an antivasospastic drug, fasudil, into liposomes, and *in vitro* stability of the fasudil-loaded liposomes [ J ]. *Int J Pharm*, 2002, 232: 59 - 67.
- [ 68 ] Zhou Y, Su Y, Li B, et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs can lower amyloidogenic A $\beta$ 42 by inhibiting Rho [ J ]. *Science*, 2003, 302: 1215 - 1217.