

# Ripasudil对PDGF-BB诱导人肺动脉平滑肌细胞增殖和迁移的影响

孙德芳,孔辉,解卫平,王虹\*

南京医科大学第一附属医院呼吸与危重症学科,江苏 南京 210029

**[摘要]** 目的:研究Rho激酶抑制剂ripasudil对血小板源性生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)-BB诱导人肺动脉平滑肌细胞(human pulmonary arterial smooth cells, HPASMCs)增殖和迁移的影响及其相关机制。方法:培养HPASMCs,随机分为control组、PDGF-BB组、PDGF-BB+ripasudil组、ripasudil组。采用CCK-8法检测细胞活力;EdU掺入法检测HPASMCs增殖;Transwell实验检测HPASMCs迁移;Real-time PCR检测基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)-2 mRNA表达;Western blot检测MMP-2蛋白表达以及肌球蛋白磷酸酶目标亚基1(myosin phosphatase target subunit 1, MYPT1)、细胞外调节蛋白激酶1/2(extracellular regulated protein kinases 1/2, ERK1/2)、p38激酶和蛋白激酶B(protein kinase B, PKB/Akt)的磷酸化。结果:与control组相比,ripasudil能显著抑制PDGF-BB诱导HPASMCs增殖及迁移( $P < 0.01$ ),降低MMP-2 mRNA及蛋白的表达( $P < 0.05$ ),下调MYPT1、ERK1/2、p38及Akt的磷酸化( $P < 0.05$ )。结论:Ripasudil抑制PDGF-BB诱导的HPASMCs增殖和迁移,可能与下调MYPT1、ERK1/2、p38及Akt的磷酸化有关。Ripasudil可能是治疗肺动脉高压的潜在药物。

**[关键词]** ripasudil;肺动脉高压;Rho激酶;Rho激酶抑制剂

**[中图分类号]** R544.1

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2018)07-878-07

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20180703

## Effects of ripasudil on proliferation and migration of human pulmonary arterial smooth cells induced by platelet-derived growth factor-BB

Sun Defang, Kong Hui, Xie Weiping, Wang Hong\*

Department of Pulmonary and Critical Care Medicine, the First Affiliated Hospital of NMU, Nanjing 210029, China

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effects of ripasudil on proliferation and migration of human pulmonary arterial smooth cells (HPASMCs) induced by platelet-derived growth factor (PDGF)-BB and the mechanisms underlying. **Methods:** Cultured HPASMCs were divided into four groups: the control group, the PDGF-BB-treated group, the PDGF-BB and ripasudil-treated group and the ripasudil-treated group. CCK-8 was applied to investigate cell viability and EdU assay was used to evaluate the proliferation of HPASMCs. Transwell assay was employed to examine cell migration. The expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) was determined by real-time PCR and Western blot. The levels of phosphorylated myosin phosphatase target subunit 1 (MYPT1), extracellular regulated protein kinases 1/2 (ERK1/2), p38, and protein kinase B (PKB/Akt) were detected by Western blot. **Results:** Compared with the control group, ripasudil blocked the proliferation and migration of HPASMCs challenged by PDGF-BB ( $P < 0.01$ ). Ripasudil suppressed PDGF-BB-induced upregulation of MMP-2 ( $P < 0.05$ ). Moreover, ripasudil inhibited PDGF-BB-induced phosphorylation of MYPT1, ERK1/2, p38, and Akt ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Ripasudil significantly inhibited PDGF-BB-induced proliferation and migration of HPASMCs, which might be attributed to the inhibition of MYPT1, ERK1/2, p38 and Akt. Ripasudil, a Rho kinase inhibitor, might be a potential therapeutic option in PAH.

**[Key words]** ripasudil; pulmonary arterial hypertension; Rho kinase; Rho kinase inhibitors

[Acta Univ Med Nanjing, 2018, 38(07): 878-884]

**[基金项目]** 国家科技重大专项(2015ZX10003001);江苏省卫生厅重点项目(H201601)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: hongwang@njmu.edu.cn

肺动脉高压(pulmonary arterial hypertension, PAH)是一类由各种因素引起的肺血管阻力进行性增高的肺循环疾病,预后差<sup>[1]</sup>。过去20年,以前列腺素类、内皮素受体拮抗剂及5型磷酸二酯酶抑制剂为代表的靶向治疗使PAH的5年生存率提升至57%<sup>[2]</sup>。近年来,Rho相关卷曲螺旋形成蛋白激酶(Rho associated coiled coil forming protein kinase, ROCK,Rho激酶)已成为治疗PAH的新型治疗靶点。Rho/ROCK通路、丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase,MAPK)通路、PI3K/Akt通路是调控细胞增殖和迁移的重要通路。Rho/ROCK通路中Rho激酶可被血小板源性生长因子(platelet derived growth factor,PDGF)-BB活化,激活下游底物肌球蛋白磷酸酶目标亚基1(myosin phosphatase target subunit 1,MYPT1)等,促进肺动脉平滑肌细胞(pulmonary arterial smooth cells,PASMCs)增殖及迁移<sup>[3]</sup>,参与肺血管重塑,促使PAH发生发展。PDGF-BB同时通过激活Rho/ROCK通路和MAPK通路促进血管平滑肌细胞产生基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases,MMPs),降解细胞外基质(extracellular matrix,ECM),促使细胞迁移<sup>[4]</sup>。Rho激酶抑制剂fasudil(法舒地尔)、Y27632等已被证实具有显著的治疗PAH潜力,其中法舒地尔已进入临床研究阶段<sup>[5]</sup>。目前Rho激酶抑制剂已有170余种<sup>[6]</sup>,但被用于研究治疗PAH的药物甚少,这限制了Rho激酶抑制剂降低肺动脉压力疗效的探究。法舒地尔通过气道给药治疗PAH减少了体循环压力降低等不良反应<sup>[5]</sup>,故而寻找疗效更佳的Rho激酶抑制剂意义重大。Ripasudil是近年新研发的Rho激酶抑制剂<sup>[7]</sup>,于2014年在日本被批准用于治疗青光眼,对Rho激酶靶点的选择性优于法舒地尔及Y27632<sup>[8]</sup>,可能具有治疗PAH潜力。目前,尚无有关ripasudil治疗PAH或作用相关肺血管细胞的研究。本研究探讨了ripasudil对PDGF-BB诱导的人肺动脉平滑肌细胞(human pulmonary arterial smooth cells,HPASMCs)增殖、迁移的影响及其相关机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

人肺血管平滑肌细胞(HPASMCs)、平滑肌细胞培养基、胎牛血清(ScienCell公司,美国),PDGF-BB(RD公司,美国),ripasudil(中国药科大学),CCK8试剂盒(同仁公司,日本),EdU细胞增殖检测试剂盒(广州锐博公司),结晶紫染液(上海碧云天生物技

术公司),RT-PCR试剂盒(TaKaRa公司,日本),MMP-2 PCR引物(上海捷瑞生物工程有限公司),GAPDH抗体(Proteintech公司,美国),p-MYPT1、MYPT1抗体(Bioworld公司,美国),MMP-2、p-Akt、Akt、p-ERK1/2、ERK1/2、p-p38、p38抗体(CST公司,美国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞培养、分组

HPASMCs常规培养在含1%平滑肌细胞生长因子和2%胎牛血清的平滑肌细胞培养基中,置于37℃、含5%CO<sub>2</sub>培养箱中。隔天换液,按1:3比例传代,6~10代细胞用于实验。

#### 1.2.2 CCK8细胞活力检测

取对数生长期HPASMCs以 $1 \times 10^4$ 个/孔接种于96孔板。待细胞贴壁长至60%时,去除血清饥饿24h。将细胞分为6组:control组(空白培养基),PDGF-BB组(PDGF-BB 20 ng/mL),PDGF-BB+ripasudil组根据药物不同浓度共4组(ripasudil先于PDGF-BB 30 min加入,PDGF-BB 20 ng/mL,ripasudil分别为0.01、0.10、1.00、10.00  $\mu\text{mol/L}$ );研究药物单独对细胞活力影响时,分为5组,control组,ripasudil组(剂量同前)。每组设5个复孔。各组细胞培养48h后,加10  $\mu\text{L}$ /孔CCK8试剂,孵育3~4h后,以酶标仪检测样品在波长为450 nm时的吸光度。

#### 1.2.3 EdU细胞增殖检测

待细胞生长至对数生长期后制成浓度为 $2 \times 10^4$ 个/mL无血清培养基细胞悬液,接种于细胞培养板片,每个孔接种500  $\mu\text{L}$ 细胞悬液;贴壁生长至60%时,去除血清饥饿24h,弃去培养基,分为4组,control组(空白培养基),PDGF-BB组(20 ng/mL),PDGF-BB+ripasudil组(ripasudil先于PDGF-BB 30 min加入,PDGF-BB 20 ng/mL,ripasudil 10  $\mu\text{mol/L}$ )及ripasudil组(10  $\mu\text{mol/L}$ ),作用48h后按EdU试剂盒说明书操作,荧光显微镜下观察并拍照,计算EdU的标记率。

#### 1.2.4 Transwell迁移实验

待细胞生长至对数生长期后制成浓度为 $4 \times 10^5$ 个/mL无血清培养基细胞悬液,在24孔板底部分别加入600  $\mu\text{L}$ 无血清培养基,Transwell小室加入100  $\mu\text{L}$ 的细胞悬液,分组及各药物浓度同EdU实验,培养24h后,将上室未迁移的细胞擦去,以95%酒精固定,结晶紫染色,显微镜下随机取5个视野计数。

#### 1.2.5 Real-time PCR

取对数生长期HPASMCs接种于6孔板,长至

70%时,饥饿24 h后,分组及药物浓度同EdU实验。药物作用48 h后,TRIzol法抽提各组细胞总RNA,以 $\beta$ -actin为内参,按试剂盒说明进行RT-PCR。引物序列:MMP-2上游引物:5'-AACTACAACCTTCTTC-CCTCGCAA-3',下游引物:5'-CAAAGGCATCATC-CACTGTCTCT-3'。 $\beta$ -actin上游引物:5'-GGGAAAT-CGTGCGTGACATTAAGG-3',下游引物:5'-GCT-GATGATCTTGAGGCTGTTGTC-3'。

### 1.2.6 Western blot

取对数生长期的HPASMCs接种于6孔板,长至70%时,饥饿24 h,分组及药物浓度同EdU实验,作用48 h后,提取总蛋白,BCA测定蛋白含量,加入蛋白上样缓冲液后100℃煮10 min。SDS-PAGE进行电泳分离后,采用湿转膜法转至PVDF膜上,5%牛血清白蛋白(BSA)室温封闭2 h,加入一抗(MMP-2、GAPDH抗体稀释比例为1:1 000)4℃孵育过夜, TBST洗膜3次,每次10 min,加入二抗(抗体稀释比例为1:1 000),孵育1 h, TBST洗膜3次,每次10 min。加入发光反应液,凝胶电泳成像系统进行读片分析。以同样方法在PDGF-BB作用15 min后检测p-MYPT1、MYPT1、p-ERK1/2、ERK1/2、p-p38、p38、p-Akt、Akt蛋白表达水平。

### 1.3 统计学方法

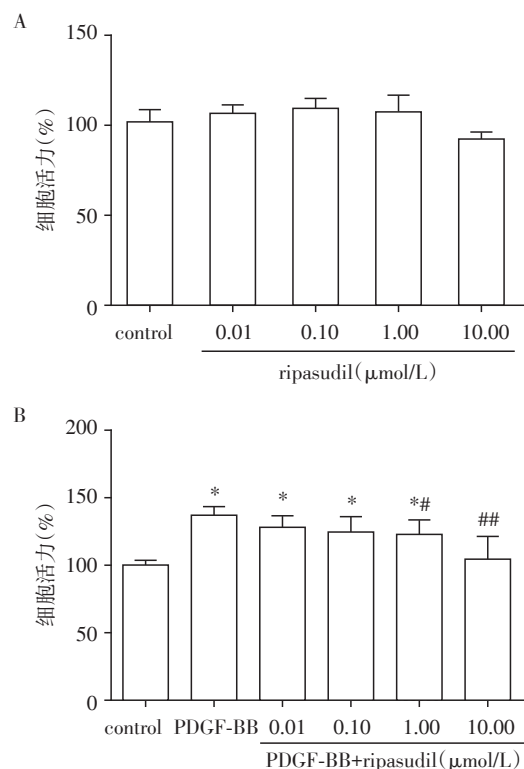
采用SPSS 22.0进行统计学分析,计量数据用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间均数比较采用LSD法。实验重复3次或以上。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 Ripasudil对PDGF-BB诱导HPASMCs细胞活力及细胞增殖的影响

CCK8实验结果显示,ripasudil在10  $\mu$ mol/L及以下浓度对细胞活力的影响与control组相比,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ,图1A),表明10  $\mu$ mol/L ripasudil对HPASMCs无细胞毒性。与control组对比,PDGF-BB显著增强HPASMCs活力( $P < 0.01$ ,图1B)。PDGF-BB+ripasudil组中1  $\mu$ mol/L对细胞活力的影响与PDGF-BB组相比,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),在10  $\mu$ mol/L时明显抑制PDGF-BB诱导的细胞活力增强( $P < 0.01$ ),且与control组无统计学差异( $P > 0.05$ ),提示ripasudil能浓度依赖性地抑制PDGF-BB诱导的细胞活力增强并在10  $\mu$ mol/L可以逆转。故后续研究采用10  $\mu$ mol/L浓度开展。EdU实验结果显示,PDGF-BB组细胞增殖数与control组

相比差异有统计学意义( $P < 0.01$ ,图2)。PDGF-BB+ripasudil组细胞增殖数与PDGF-BB组相比,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),与control组相比差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。ripasudil单独作用与control组相比,对HPASMCs增殖无影响( $P > 0.05$ )。以上结果证实PDGF-BB显著促进HPASMCs增殖,并提示ripasudil在10  $\mu$ mol/L浓度时能逆转PDGF-BB诱导的HPASMCs增殖。

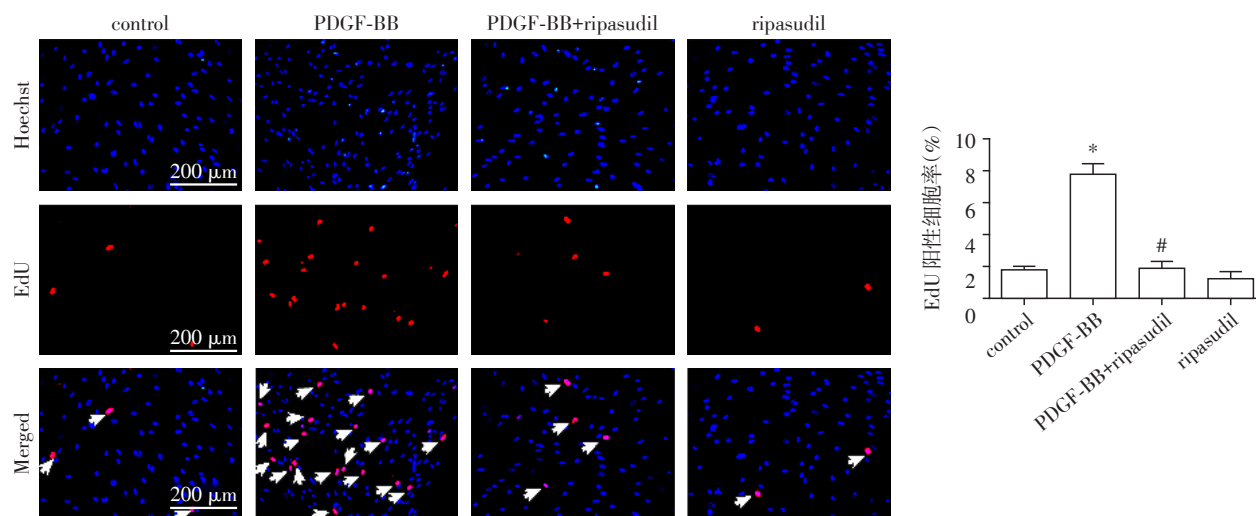


A: CCK8检测药物毒性( $n=4$ ); B: CCK8检测细胞活力,与control组比较,\* $P < 0.01$ ;与PDGF-BB组比较,\* $P < 0.05$ ,# $P < 0.01$ ( $n=6$ )。

图1 Ripasudil对PDGF-BB诱导的HPASMCs活力的影响  
Figure 1 Effects of ripasudil on the viability of HPASMCs challenged by PDGF-BB

### 2.2 Ripasudil对PDGF-BB诱导HPASMCs迁移能力的影响

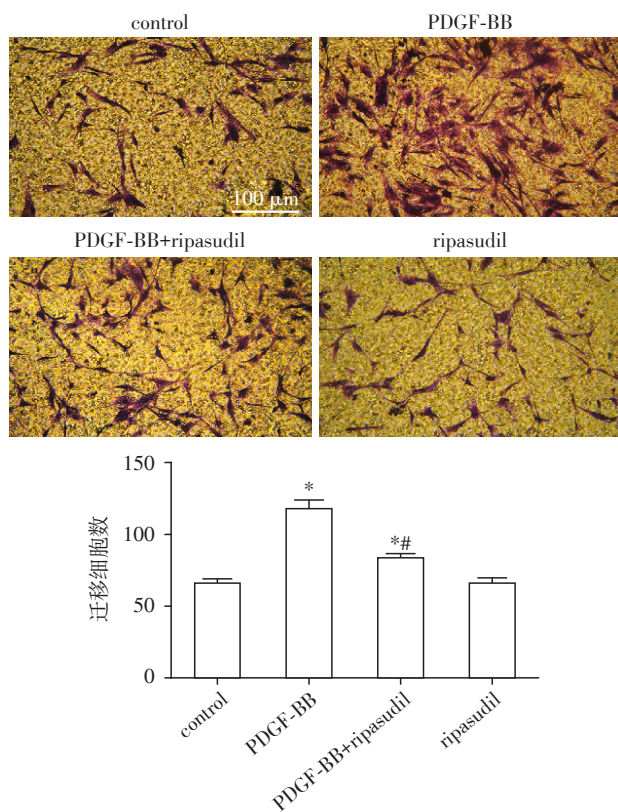
Transwell细胞迁移实验显示PDGF-BB组细胞迁移数与control组相比有统计学差异( $P < 0.01$ ,图3),说明PDGF-BB能显著促进HPASMCs迁移。PDGF-BB+ripasudil组细胞迁移数分别与PDGF-BB组、control组相比有统计学差异( $P < 0.01$ )。ripasudil组与control组相比差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。这表明ripasudil可以明显抑制PDGF-BB诱导的HPASMCs迁移,但未逆转,并其单独作用对细胞迁移无影响。



EdU实验检测细胞增殖( $\times 200$ ),与control组比较,\* $P < 0.01$ ;与PDGF-BB组比较,# $P < 0.01$ ( $n=4$ )。

图2 Ripasudil对PDGF-BB诱导的HPASMCs增殖的影响

Figure 2 Effects of ripasudil on the proliferation of HPASMCs challenged by PDGF-BB



Transwell实验检测细胞迁移( $\times 100$ ),与control组比较,\* $P < 0.01$ ;与PDGF-BB组比较,# $P < 0.01$ ( $n=3$ )。

图3 Ripasudil对PDGF-BB诱导的HPASMCs迁移的影响

Figure 3 Effects of ripasudil on the migration of HPASMCs challenged by PDGF-BB

### 2.3 Ripasudil对PDGF-BB诱导HPASMCs的MMP-2表达的影响

与control组相比,在PDGF-BB作用后,MMP-2

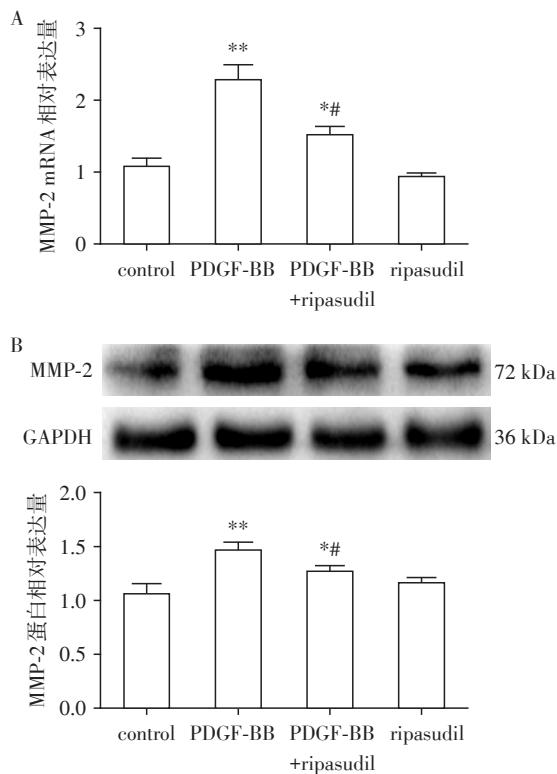
mRNA( $P < 0.01$ ,图4A)及蛋白( $P < 0.01$ ,图4B)表达有统计学差异。PDGF-BB+riipasudil组MMP-2表达与PDGF-BB组及control组相比有统计学差异( $P < 0.05$ )。结果表明PDGF-BB明显提高HPASMCs中MMP-2的表达,这可被riipasudil抑制,但未逆转。

### 2.4 Ripasudil对PDGF-BB诱导HPASMCs的MYPT1、ERK1/2、p38及Akt磷酸化水平影响

与control组相比,PDGF-BB作用15 min后p-MYPT1、p-ERK1/2、p-p38及p-Akt磷酸化水平明显增加,有统计学差异( $P < 0.05$ ,图5)。与PDGF-BB组相比,PDGF-BB+riipasudil组p-MYPT1、p-ERK1/2、p-p38及p-Akt磷酸化水平明显下调,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。与control组相比,PDGF-BB+riipasudil组p-MYPT1磷酸化水平差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),p-ERK1/2、p-p38及p-Akt磷酸化水平差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。这提示riipasudil能逆转PDGF-BB诱导的p-MYPT1上调,完全抑制了PDGF-BB诱导的Rho激酶活性的增高,并显著抑制PDGF-BB诱导的p-ERK1/2、p-p38及p-Akt上调,部分抑制了ERK1/2、p38及Akt通路的激活。

## 3 讨论

PAH是以肺血管阻力进行性增高为特征、最终导致右心衰竭或死亡的一组疾病。肺血管重构在PAH形成过程中起重要作用,主要包括肺血管细胞增殖、凋亡失调以及细胞迁移增强。肌球蛋白轻链(myosin light chain,MLC)磷酸化后能促进肌球蛋白-肌球蛋白交联桥形成,参与细胞增殖、迁移及收缩

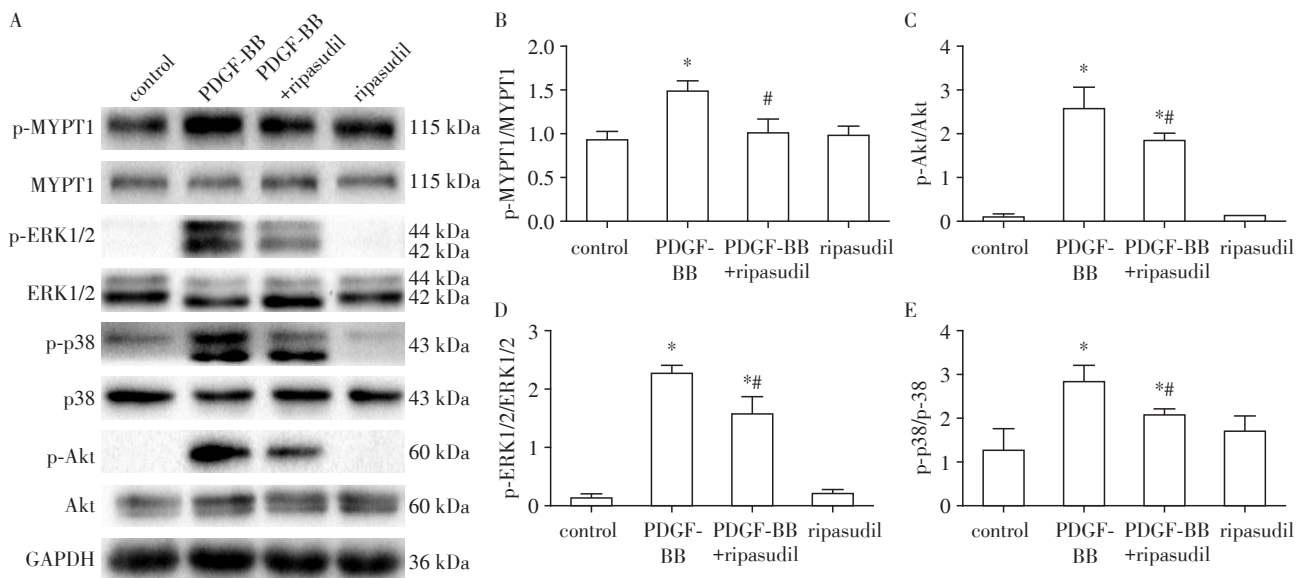


A: RT-PCR 检测 MMP-2 mRNA。B: Western blot 检测 MMP-2 蛋白量。与 control 组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ; 与 PDGF-BB 组比较, # $P < 0.05$  ( $n=3$ )。

**图4 Ripasudil 对 PDGF-BB 诱导的 HPASMCs MMP-2 表达的影响**

**Figure 4 Effects of ripasudil on the expression of MMP-2 of HPASMCs challenged by PDGF-BB**

等生物学过程。肌球蛋白轻链磷酸酶(myosin light chain phosphatase, MLCP)活化后可使 MLC 去磷酸化。Rho 激酶活化后通过磷酸化 MYPT-1, 可使 MLCP 失活, 从而上调 MLC 的磷酸化水平。Rho 激酶抑制剂可通过与 ATP 竞争 Rho 激酶上 ATP 结合位点, 抑制 Rho 激酶活化。目前研究的 Rho 激酶抑制剂主要有法舒地尔、Y27632、氮杂吡啶-1 等, 在多种肺动脉高压动物模型上治疗效果显著, 已成为治疗 PAH 的新途径。法舒地尔对 ROCK1 与 ROCK2 半数抑制浓度 ( $IC_{50}$ ) 为 290 nmol/L 与 350 nmol/L。Y27632 对 ROCK1 与 ROCK2 的  $IC_{50}$  为 110 nmol/L 与 170 nmol/L。Ripasudil 是新型 Rho 激酶抑制剂, 为法舒地尔的衍生物, 对 ROCK1 与 ROCK2 的  $IC_{50}$  分别为 51 nmol/L 与 19 nmol/L, 比法舒地尔与 Y27632 对 Rho 激酶具有更高的选择性<sup>[9]</sup>。用于治疗眼高压时, 在改变小梁网细胞形态、破坏肌动蛋白束及增加施莱姆氏管内皮细胞通透性等方面, 同浓度 ripasudil 效果明显优于法舒地尔及 Y27632, 且低浓度 ripasudil 与相对较高浓度法舒地尔及 Y27632 作用效果相似<sup>[8]</sup>。在人视网膜微血管内皮细胞上, 30  $\mu$ mol/L ripasudil 抑制了血管内皮生长因子诱导的细胞增殖、迁移及 MYPT-1 的磷酸化, 效果优于同浓度法舒地尔。同时在高压氧诱导的视网膜病变小鼠上也证实 0.4% ripasudil 明显抑制 MYPT-1 的磷酸化, 而同浓度法舒地尔无抑制作用<sup>[10]</sup>。故而 ripasudil 对 Rho 激酶的抑制作用



与 control 组比较, \* $P < 0.05$ ; 与 PDGF-BB 组比较, # $P < 0.05$  ( $n=3$ )。

**图5 Ripasudil 对 PDGF-BB 诱导的 HPASMCs 的 p-MYPT1、p-ERK1/2、p-p38 及 p-Akt 磷酸化水平的影响**

**Figure 5 Effects of ripasudil on the expression of p-MYPT1, p-ERK1/2, p-p38 and p-Akt of HPASMCs challenged by PDGF-BB**

优于法舒地尔及Y27632,在抑制细胞增殖及迁移方面具有更大潜力。本研究也证实了ripasudil明显抑制了PDGF-BB诱导的HPASMCs增殖及迁移,具有治疗PAH潜力。

真核细胞G1期到S期的过程由细胞周期依赖激酶(CDKs)调控。CDKs抑制因子包括p21<sup>Waf1/Cip1</sup>、p27<sup>Kip1</sup>。在小鼠胚胎成纤维细胞中,Rho激酶可通过ERK通路上调细胞周期蛋白(cyclin)D1与p21<sup>Cip1</sup>,通过激活LIM激酶2(LIM kinase 2, LIMK2)上调cyclin A,并下调p27<sup>Kip1</sup>,该作用不依赖ERK通路<sup>[11]</sup>。Y27632作用后可降低LIMK磷酸化、cyclin A、D1及p21,上调p27<sup>Kip1</sup>,进一步证实Rho激酶对细胞增殖的调控。MAPK通路是促进细胞增殖的经典通路,包括ERK1/2、p38等蛋白激酶,可被PDGF-BB激活,促进肺血管重构,在PAH发展过程中起重要作用<sup>[12]</sup>。p38及其下游激活转录因子2(activating transcription factor 2, ATF-2)激活后也可调控cyclin A2、D1<sup>[13]</sup>。虽然ERK同样可以激活ATF-2,但cyclin A的表达不依赖于ERK通路,说明ERK与p38对ATF-2的激活有差异。PI3K/Akt通路同样在促进细胞增殖中发挥重要作用,参与了PDGF-BB诱导的PASCs增殖<sup>[14]</sup>,可通过多种途径调节细胞周期,包括磷酸化p21,阻碍其与CDKs结合,下调p27<sup>Kip1</sup>,上调cyclin D1,并抑制cyclin D和E的降解。有研究显示cyclin A可以调节Akt<sup>[15]</sup>,但暂无关于Akt通路是否介导调节cyclin A的研究。以上说明各通路之间对细胞增殖相关蛋白的调控并不完全重叠,可能有其特有的下游调控蛋白。研究显示Y27632作用后可以逆转缺氧引起的肺动脉内皮细胞的活力增加与增殖,下调细胞周期蛋白A、D1<sup>[16]</sup>。本研究中,ripasudil虽然部分抑制了ERK1/2、p38及Akt通路,但可逆转Rho激酶介导的MYPT1磷酸化升高,故其可能是通过抑制Rho激酶下游特有的细胞增殖关键蛋白从而逆转PDGF-BB诱导的细胞增殖,且不被ERK、p38及Akt通路所介导。这也证明了细胞增殖过程是多个通路共同作用的结果。

MMPs可由PASCs产生,降解ECM,促进细胞迁移,在肺血管重构中起重要作用<sup>[17]</sup>。在大鼠主动脉平滑肌细胞上,MMP非选择性抑制剂可以阻断PDGF-BB诱导的迁移<sup>[4]</sup>,这表明MMPs是细胞迁移的关键。MMP-2是MMPs家族中重要成员,可由Rho/ROCK、ERK1/2、p38及Akt通路介导所产生<sup>[4,18]</sup>。在纤维肉瘤细胞上,Akt、ERK1/2、p38抑制剂分别作用后,都可以逆转细胞侵袭及迁移<sup>[18]</sup>,这显示3条通路

在细胞迁移上都起关键作用。本研究中在Rho激酶活性被ripasudil下调至正常后,MMP-2表达与control组相比仍升高,这可能是通过ERK1/2、p38及Akt通路的部分激活促进其表达,进而促进细胞迁移。这表明Rho/ROCK通路是介导MMP-2产生及细胞迁移中的通路之一,其中Rho激酶活性升高完全抑制后,并不能完全逆转MMP-2表达升高及细胞迁移,但这也需要Rho激酶基因敲除等更精确的实验进行证实。

信号通路存在广泛的“crosstalk”。在血管平滑肌细胞中,经PDGF-BB作用,Rho激酶敲除后能下调ERK磷酸化,Rho激酶上调能促进ERK磷酸化,这显示Rho激酶是ERK通路上游之一<sup>[19]</sup>。在不同细胞中,Rho/ROCK通路与PI3K/Akt通路之间关系各异<sup>[20]</sup>。ROCK1缺失后使肥大细胞中Akt及ERK1/2磷酸化水平下调,表明Akt及ERK1/2可能是ROCK1下游之一<sup>[21]</sup>。但在Hela细胞中,PI3K/Akt的下游雷帕霉素靶蛋白(mTOR)可能参与调节RhoA<sup>[22]</sup>。溶血磷酸酯通过活化Rho激酶,进而激活p38,可促进人脐静脉内皮细胞表达白介素-8及单核细胞趋化因子-1<sup>[23]</sup>。本研究发现,ripasudil可同时抑制MYPT1、ERK1/2、p38、Akt的磷酸化,其中对于ERK1/2、p38及Akt通路的抑制是否是通过抑制Rho激酶活性介导,需要研究进一步证实。

本研究结果显示,新型Rho激酶抑制剂ripasudil可明显抑制PDGF-BB诱导的人肺动脉平滑肌细胞的增殖及迁移,下调MMP2表达,降低MYPT1、Akt、ERK1/2、p38的磷酸化水平,其作用机制可能是通过抑制Rho/ROCK、ERK1/2、p38及Akt信号通路。今后将在动物模型上证实其治疗效果并与法舒地尔等药物进行比较。作为Rho激酶抑制剂,ripasudil有望成为治疗PAH的新型药物。

#### [参考文献]

- [1] Galie N, Humbert M, Vachiery JL, et al. 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: The Joint Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS) : Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC), International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT) [J]. *Eur Respir J*, 2015, 46(4): 903-975
- [2] Benza RL, Miller DP, Barst RJ, et al. An evaluation of long-term survival from time of diagnosis in pulmonary arterial hypertension from the REVEAL Registry [J]. *Chest*,

- 2012, 142(2):448-456
- [3] Liu A J, Ling F, Wang D, et al. Fasudil inhibits platelet-derived growth factor-induced human pulmonary artery smooth muscle cell proliferation by up-regulation of p27kip(1) via the ERK signal pathway [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2011, 124(19):3098-3104
- [4] Cui Y, Sun YW, Lin HS, et al. Platelet-derived growth factor-BB induces matrix metalloproteinase-2 expression and rat vascular smooth muscle cell migration via ROCK and ERK/p38 MAPK pathways [J]. *Mol Cell Biochem*, 2014, 393(1-2):255-263
- [5] Antoniu SA. Targeting RhoA/ROCK pathway in pulmonary arterial hypertension [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2012, 16(4):355-363
- [6] Feng Y, Lograsso PV, Defert O, et al. Rho kinase (ROCK) inhibitors and their therapeutic potential [J]. *J Med Chem*, 2016, 59(6):2269-2300
- [7] Garnock-Jones KP. Ripasudil: first global approval [J]. *Drugs*, 2014, 74(18):2211-2215
- [8] Kaneko Y, Ohta M, Inoue T, et al. Effects of K-115 (Ripasudil), a novel ROCK inhibitor, on trabecular meshwork and Schlemm's canal endothelial cells [J]. *Sci Rep*, 2016, 6:19640
- [9] Isobe T, Mizuno K, Kaneko Y, et al. Effects of K-115, a rho-kinase inhibitor, on aqueous humor dynamics in rabbits [J]. *Curr Eye Res*, 2014, 39(8):813-822
- [10] Yamaguchi M, Nakao S, Arita R, et al. Vascular normalization by ROCK inhibitor: therapeutic potential of ripasudil (K-115) eye drop in retinal angiogenesis and hypoxia [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2016, 57(4):2264-2276
- [11] Croft DR, Olson MF. The Rho GTPase effector ROCK regulates cyclin A, cyclin D1, and p27Kip1 levels by distinct mechanisms [J]. *Mol Cell Biol*, 2006, 26(12):4612-4627
- [12] Awad KS, West JD, De Jesus Perez V, et al. Novel signaling pathways in pulmonary arterial hypertension (2015 Grover Conference Series) [J]. *Pulm Circ*, 2016, 6(3):285-294
- [13] Zhou H, Cai L, Zhang X, et al. ARHGEF39 promotes tumor progression via activation of Rac1/P38 MAPK/ATF2 signaling and predicts poor prognosis in non-small cell lung cancer patients [J]. *Lab Invest*, 2018, 98(5):670-681
- [14] Xiao Y, Peng H, Hong C, et al. PDGF promotes the warburg effect in pulmonary arterial smooth muscle cells via activation of the PI3K/AKT/mTOR/HIF-1alpha signaling pathway [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 42(4):1603-1613
- [15] Liu P, Begley M, Michowski W, et al. Cell-cycle-regulated activation of Akt kinase by phosphorylation at its carboxyl terminus [J]. *Nature*, 2014, 508(7497):541-545
- [16] Qiao F, Zou Z, Liu C, et al. ROCK2 mediates the proliferation of pulmonary arterial endothelial cells induced by hypoxia in the development of pulmonary arterial hypertension [J]. *Exp Ther Med*, 2016, 11(6):2567-2572
- [17] Xu T, Liu S, Ma T, et al. Aldehyde dehydrogenase 2 protects against oxidative stress associated with pulmonary arterial hypertension [J]. *Redox Biol*, 2017, 11:286-296
- [18] Yu SM, Kim SJ. Salinomycin causes migration and invasion of human fibrosarcoma cells by inducing MMP-2 expression via PI3-kinase, ERK-1/2 and p38 kinase pathways [J]. *Int J Oncol*, 2016, 48(6):2686-2692
- [19] Shimizu T, Fukumoto Y, Tanaka S, et al. Crucial role of ROCK2 in vascular smooth muscle cells for hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013, 33(12):2780-2791
- [20] Song GL, Jin CC, Zhao W, et al. Regulation of the RhoA/ROCK/AKT/beta-catenin pathway by arginine-specific ADP-ribosyltransferase 1 promotes migration and epithelial-mesenchymal transition in colon carcinoma [J]. *Int J Oncol*, 2016, 49(2):646-656
- [21] Kapur R, Shi J, Ghosh J, et al. ROCK1 via LIM kinase regulates growth, maturation and actin based functions in mast cells [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(13):16936-16947
- [22] Jacinto E, Loewith R, Schmidt A, et al. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive [J]. *Nat Cell Biol*, 2004, 6(11):1122-1128
- [23] Liu H, Chen X, Han Y, et al. Rho kinase inhibition by fasudil suppresses lipopolysaccharide-induced apoptosis of rat pulmonary microvascular endothelial cells via JNK and p38 MAPK pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2014, 68(3):267-275

[收稿日期] 2018-03-29