

# MLCK 和 ROCK 对细胞骨架和细胞行为的影响

杨本艳姿 王红兵\* 杨力 吴泽志

(重庆大学生物工程学院, 重庆 400044)

**摘要** 肌球蛋白轻链激酶(myosin light chain kinase, MLCK)和 ROCK/ROK/Rho 激酶(Rho kinase, ROCK)是肌细胞和非肌细胞中调节肌球蛋白轻链磷酸化的两种重要激酶, 肌球蛋白轻链磷酸化调节肌球蛋白的收缩参与了诸如细胞运动、粘附、组织修复和癌症转移和疾病发生等重要的生命活动。在这些重要的生命活动中, 同样是催化肌球蛋白磷酸化的这两种激酶, MLCK 和 ROCK 定位在不同的细胞区域, 以不同的作用方式通过对细胞骨架的影响实现对细胞功能的精细调控。

**关键词** ROCK; MLCK; 肌球蛋白轻链磷酸化; 细胞骨架

细胞骨架是指真核细胞胞质中错综复杂的纤维状网络结构, 主要由三类蛋白纤维构成, 微管、微丝和中间纤维, 它们相互交叉贯穿在整个细胞之中。这种网络结构对于维持细胞的形态结构及内部结构的有序性, 以及在细胞运动、物质运输、能量转换、信息传递和细胞分化等方面起重要作用。细胞骨架的网络结构特征及其结构状态的高度动态变化, 蕴涵着调节分子间相互作用的丰富信息, 在不同的信号调节回路中, 上下游信号间的反馈联系以及基于细胞骨架对不同信号的调节作用, 最终使得调节分子对细胞行为的调控既适当而又及时。其中, 与骨架收缩活动直接相关的肌球蛋白轻链(myosin light chain, MLC)磷酸化的调节就是一个涉及调节因子间在时空上协同作用的例子。磷酸化的肌球蛋白 II 是细胞骨架活性及细胞功能的重要效应因子<sup>[1,2]</sup>。它不仅直接参与细胞分裂过程中母细胞分裂成子细胞的过程, 也是细胞锚着时在粘着斑处产生张力所必需的调控因子, 同时在细胞迁移过程中收缩力的产生也与其功能有关。肌球蛋白 II 的活性主要受到 MLC 磷酸化的控制。肌球蛋白轻链激酶(myosin light chain kinase, MLCK)和 ROCK/ROK/Rho 激酶(Rho kinase, ROCK)是在体内和体外使 MLC 磷酸化的两种重要激酶。MLCK 和 ROCK 是如何在同一个细胞内调节 MLC 磷酸化的, 关系到细胞功能与其骨架结构不同组分之间的时空关系如何实现协调的问题, 最近的一些研究应用了细胞和分子生物学, 以及生物物理学的一些新技术, 获得了一些新发现, 使人们对由骨架网络影响细胞功能过程中的精细调控机制有了进一步的认识。本文就 MLCK 和 ROCK 对不同空间分布的 MLC 磷酸化的反馈调节作用, 及其对细胞功能的影响研究进展

作一个综述。

## 1 MLCK 和 ROCK 对 MLC 磷酸化的作用机制和调节方式

### 1.1 MLCK 和 ROCK 作用的枢纽分子——肌球蛋白 II

肌球蛋白 II 是 MLCK 和 ROCK 共同作用的下游分子, 由 6 条多肽链组成, 包括一对重链和一对轻链, 其结构分为三部分: (1)一对含有催化位点的球状头部; (2)一对颈部, 每个颈部都由一个连续的  $\alpha$  螺旋和两条相关轻链组成; (3)一个长的杆状尾部, 由两条重链的长  $\alpha$  螺旋部分互相缠绕形成。头部结构域含有一个与肌动蛋白纤维结合的位点和一个结合并水解 ATP 的位点, ATP 水解释放的能量用以驱动肌球蛋白马达, 长杆状尾部利于蛋白质形成纤维而起构建作用。当头部与肌动蛋白纤维牢固地结合时, 由 ATP 水解释放的能量诱导在头部发生小的构象改变, 然后由相邻的  $\alpha$  螺旋颈部的摇动放大约 20 倍, 伸长的颈部作为坚硬的“杠杆臂”, 引起附着的肌动蛋白纤维滑动更远的距离, 缠绕在颈部的轻链则提供杠杆的刚性。肌球蛋白分子冲程的长度与其颈部的长度成正比<sup>[3]</sup>。MLC 磷酸化时肌球蛋白 II 长的杆状尾部伸直, 利于形成纤维状。在骨骼肌细胞中组装的肌球蛋白 II 纤维是可收缩性装置中高度稳定的组分, 不过在大多数非肌肉细胞中形成的肌球蛋白 II 纤维常常表现为瞬时结构, 在需要的时间和地点组装, 完成使

收稿日期: 2008-11-26 接受日期: 2009-06-12

国家自然科学基金(No.30870608) 和国家 111 计划(No.B0623)资助

项目

\* 通讯作者。Tel: 023-66885061, E-mail: whbdzx@yahoo.com.cn

命后去组装。肌球蛋白 II 功能的这一特点以其磷酸化活性调节的时空背景和细胞骨架的反馈信息为调控基础。

## 1.2 MLCK 与 ROCK 对 MLC 磷酸化的调节

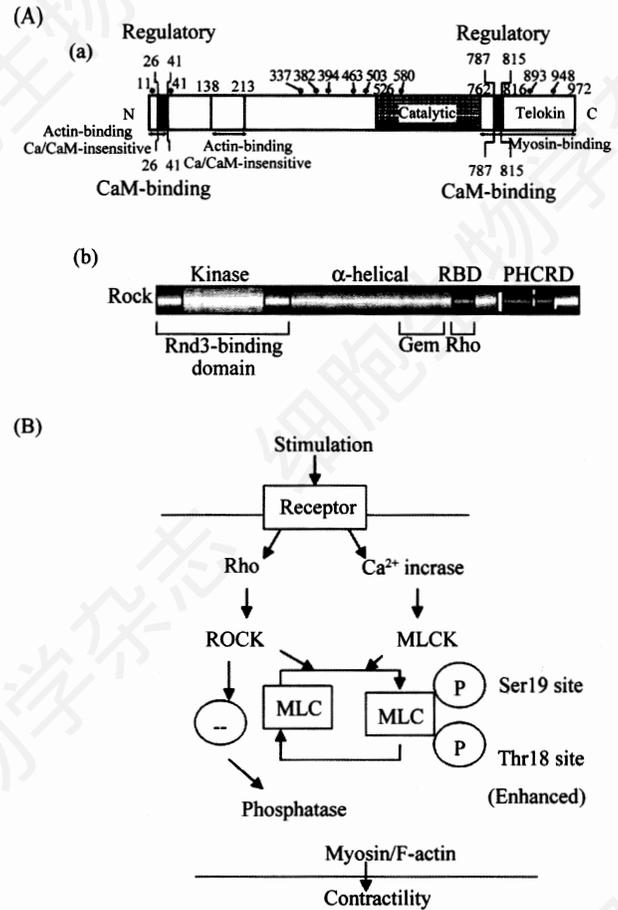
MLC 的磷酸化水平受 MLCK 和肌球蛋白磷酸酶的调节。MLCK 广泛存在于各种真核细胞及非肌细胞中,是磷酸化 MLC 的重要激酶。在不同的信号转导途径中受到激活或抑制,从而发挥不同的生理功能。MLCK 对 MLC 磷酸化的作用位点为 Ser19 和 Thr18,MLC 磷酸化促进肌球蛋白 II 装配成肌球蛋白纤维并激活 ATP 酶的活性,稳定肌动蛋白-肌球蛋白的相互作用,促进细胞收缩。MLCK 对肌球蛋白轻链的磷酸化作用受到  $Ca^{2+}$ /钙调蛋白的调节<sup>[4]</sup>。肌球蛋白磷酸酶与 MLCK 的作用相反,它通过使 MLC 去磷酸化,调节肌球蛋白 II 的功能,肌球蛋白磷酸酶靶向的大亚基(MBS)是调节肌球蛋白磷酸酶的一个重要的调节子,它的磷酸化可抑制肌球蛋白磷酸酶的活性<sup>[5]</sup>。

RhoA 的效应分子 ROCK<sup>[6]</sup>是磷酸化肌球蛋白和调节肌球蛋白功能的另一个重要调节子,它使肌球蛋白磷酸酶的肌球蛋白结合位点(MBS)磷酸化,抑制肌球蛋白磷酸酶活性,从而增加了肌球蛋白 II 的磷酸化水平,诱导 RhoA 介导的应力纤维和粘着斑装配。在平滑肌和非肌细胞中,ROCK 还能直接磷酸化 MLC 刺激肌球蛋白收缩。除此之外,也曾有报道说 ROCK 促进细胞内  $Ca^{2+}$  浓度的增加<sup>[7]</sup>,激活了  $Ca^{2+}$ /钙调蛋白依赖的 MLCK,接着在 MLCK 的作用下,引起 MLC 的 Ser19 磷酸化和 Thr18 较低程度磷酸化(图 1)。由此可见,ROCK 增加 MLC 的磷酸化有两种途径:一是抑制肌球蛋白磷酸酶的活性,另一种途径是直接磷酸化 MLC<sup>[8]</sup>。

ROCK 和 MLCK 通过调节 MLC 磷酸化水平直接对细胞骨架排列产生影响。那么,细胞骨架重组对它们的活性调节可能也存在反馈影响。

## 1.3 骨架张力通过对 MLCK 和 ROCK 的反馈调节影响 MLC 磷酸化

细胞形态由骨架张力和跨膜粘附结构共同决定,整合素把细胞内骨架和胞外基质纤维连结起来形成一个连续性结构体系。细胞形态调整变化时,细胞内外骨架纤维重组协同进行。在细胞骨架纤维上存在着由微丝收缩产生的等张张力,即预张力,而对抗微丝张力的骨架组分是具有刚性支撑作用的微管和与整合素连结的胞外基质,在这两大组分的相互作用



**Fig.1 Domain structures and signal pathway of MLCK and ROCK**

A: domain structures of MLCK and ROCK. a: MLCK<sup>[9]</sup>; b: ROCK<sup>[10]</sup>. B: signal pathway of MLCK and ROCK.

关系中,承载压力的刚性支杆将承载拉力的柔性构件拉直、拉紧,与此同时那些承载拉力的构件又将刚性支杆压紧,从而使整个结构保持平衡。中间纤维将拉力构件和压力构件连结起来整合为一个结构功能整体,在这一结构体系中因为预先存在张力并具有一定形状,故当外力作用于细胞时细胞可立即响应,同时使外力在这一结构体系中得以分散和平衡,因而骨架网络又被称为张力整合性结构<sup>[11]</sup>。张力整合性结构的关键特征是其机械稳定性并非由于各个构体的强度,而是来自整个结构分散和平衡机械应力的方式。细胞骨架的张力整合特性除了可解释细胞形状稳定性控制,还能解释在分子水平使力学和生物化学整合的合理性。

按照 Ingber<sup>[11]</sup>所提出的细胞张力整合模型,细胞形态是细胞内部力平衡所决定的,而这样的力平衡能转化为细胞功能的关键调节信息。由于许多控制蛋

白质合成、能量转换和细胞生长所需的酶和其他物质都固定在细胞骨架上,改变细胞骨架的几何形状和受力情况会影响生化反应甚至基因表达。细胞骨架的张力整合性是细胞形变的主要决定因素,也是其功能高度协调的基础,其中,骨架的收缩活动是预张力的重要调节方式。因此,那些参与骨架收缩调节的活性因子,如 MLCK 和 ROCK,也参与调节骨架预张力。RhoA-ROCK 参与了诸如细胞铺展,整合素聚集和粘着斑形成等细胞和胞外基质(extracellular matrix, ECM)粘附中的很多相关进程,其诱导产生的骨架张力在调节粘着斑成熟的相关信号通路中起重要作用<sup>[12,14]</sup>。ROCK 对细胞骨架的调节作用不是单向的,不同的骨架状态也对 ROCK 起着反馈调节作用。Bhadriraju 等<sup>[13]</sup>用蛋白质印章技术在 PDMS 上制作一些可供细胞粘附的“小岛”,这些“小岛”的面积不足以使细胞完全铺展,用以限制细胞的铺展面积。检测结果发现悬浮细胞和铺展面积受限细胞的 ROCK 活性都很低,同时 MLC 的磷酸化水平也低。反之,如果让细胞在基质上充分铺展,ROCK 和肌球蛋白的活性就会恢复。用细胞松弛素 D 或 blebbistatin 处理细胞,在破坏骨架张力的同时也抑制了 ROCK 的活性。以上结果提示在骨架张力,粘着斑的成熟和 ROCK 信号之间存在反馈通路,它在力-化学信号转导过程中起作用。

有研究报道基质硬度的变化也会影响细胞粘附及 RhoA-ROCK 耦合<sup>[13]</sup>。培养在不同硬度基质上的细胞,相同的能量消耗在软基底上产生较弱的力反馈,而在硬基底上,强烈的力反馈可能会激活应力敏感的离子通道或者其他张力敏感蛋白质如整合素和 Rho,引起微丝收缩及骨架张力变化。骨架张力调节分为二个阶段,首先由 MLCK 在骨架快速收缩和粘着斑形成等过程中起短暂的起始作用,接着激活 ROCK 信号通路<sup>[15]</sup>,产生持续张力来维持细胞形态、粘附、运动、增殖等生命活动。在平滑肌细胞中,MLCK 磷酸化/去磷酸化过程参与了从胞质中的不同钙浓度到力的产生等许多钙信号传递过程。激酶在其中的作用主要是调节信号的幅度,磷酸酶决定信号的宽度和信号的范围,所以收缩水平和力的大小取决于这两种酶之间的平衡<sup>[16]</sup>。ROCK 对肌球蛋白磷酸酶的抑制作用可间接调节 MLC 的磷酸化,从而影响到 MLCK 的活性<sup>[17]</sup>,骨架对 ROCK 的反馈调节可能也间接影响 MLCK 活性。但由于 MLCK 在其中所起的作用短暂,所以至今骨架对 MLCK 反馈影响机制仍不清楚。

近来的研究发现,ROCK 和 MLCK 在调节肌球蛋白轻链磷酸化时,对不同空间分布的肌球蛋白起不同的作用。正是由于这些调节分子在空间上不同位置所起的作用不同,从而使依赖于调节分子高度协作的诸如细胞形态调整,收缩力的产生,迁移运动等细胞生物学行为的实现过程存在相互联系的调控机制。

## 2 MLCK 和 ROCK 对细胞行为的影响

### 2.1 MLCK 和 ROCK 对细胞迁移的调节

关于 MLCK 和 ROCK 不同作用的证据最初是在细胞迁移过程中发现的,Smith 等<sup>[18]</sup>在研究白细胞整合素 LFA-1 与 ICAM-1 介导 T 细胞粘附、极化和随机迁移的信号通路中发现,这些事件的发生都依赖于 MLCK 和 ROCK 调节肌动球蛋白骨架的动态变化。其中最重要的一个发现就是这两种激酶在空间上是分离的。MLCK 集中在前导端与 F-actin 共定位,而 ROCK 则更多的分布在 T 细胞尾部。它们对 T 细胞迁移影响不同,MLCK 的活性对粘附和前端端的移动起重要作用,ROCK 的活性则是尾部的分离所必需的。这两种激酶之间的相互协同作用使 T 细胞向前移动。

Totsukawa 等<sup>[19]</sup>在对成纤维细胞迁移的研究也指出 MLCK 和 ROCK 在调节 MLC 磷酸化时,在 MLC 所处的不同空间分布中起着不同的作用。在细胞迁移中 MLCK 诱导细胞周边和前端肌球蛋白轻链磷酸化,ROCK 诱导细胞中心肌球蛋白轻链磷酸化。肌球蛋白 II 在细胞周边的磷酸化有两种功能,第一,阻止由肌动蛋白多聚化产生的突触,以便于细胞迁移。MLCK 活性抑制后,在细胞周边不能装配成熟的粘着斑,细胞的中心仍保有粘着斑。观察发现沿着细胞周边产生突触,使细胞的翻转更频繁,但其迁移却不明显。第二,位于细胞周边的肌球蛋白 II 磷酸化对在运动细胞的前端装配成熟的粘附结构是必需的。虽然 MLCK 活性被抑制后,在细胞每个突触位点的末端都形成一个小的类似于粘着斑的结构,但均未装配成大片的成熟粘附结构,MLCK 被抑制后产生的突触与对照组细胞相比回缩频率更高。这说明装配或形成大片包含纽蛋白和斑连蛋白的成熟粘着斑,可以在移动细胞的前导端稳定膜突触。

在对 ROCK 的抑制剂 Y-27632 和 MLCK 的抑制剂 BATI 动力学机制的研究中<sup>[20]</sup>,发现粘着斑在细胞前导端装配,并沿着细胞的长轴不断向后方移动。用 BATI 多肽处理后,细胞在短时间内仍可形成大量

点状的“紧密接触点”，但已存在的粘着斑却很少沿着细胞长轴延伸。Y-27632不但抑制新粘着斑的形成，也影响原有成熟粘着斑的运动。随着细胞的不断向前迁移，这些残留的粘着斑最终集中在细胞的中心区域<sup>[21]</sup>。成熟的粘着斑是一种相对稳定的结构，它可能在细胞的迁移机制中起到“刹车”作用。在ROCK被抑制的细胞中这个“刹车”作用丧失，所以在ROCK的作用被抑制后，细胞移动得更快，移动轨迹也更直。

## 2.2 MLCK和ROCK对细胞收缩行为的影响

肌球蛋白II产生的收缩力不仅为细胞的迁移中提供动力，在维持细胞形态，促进伤口愈合，介导胞外基质和细胞信号转导中也起着重要的作用。Beningo等<sup>[22]</sup>用一些药物干扰肌球蛋白II产生的收缩活动，并通过牵引力显微镜分析来研究收缩力对纤原蛋白的影响。在加入肌球蛋白II的特异性抑制剂blebbistatin后，他们发现收缩力的产生主要依赖肌球蛋白II的功能，抑制ROCK的活性后收缩力在很大程度上被抑制，而MLCK被抑制后则对收缩力的影响不明显。这说明ROCK和MLCK在调节肌球蛋白II功能中起着不同的作用，肌球蛋白II和ROCK是细胞产生收缩力所必需的，而MLCK在这个过程中并不是必需的，MLCK调节肌球蛋白II所产生的力可能是用来保持与细胞内结构相互平衡的，它并不像收缩力那样传递到基质中去。另外一些由小GTPase调节的肌球蛋白II亚基，也可能在纤原细胞的迁移中对收缩力的调节起作用。

当融合的上皮细胞层受到损伤时，肌动蛋白纤维会像绳索一样从一个细胞延长至另一个细胞，沿着伤口的周围形成一个环。这种肌动蛋白环的功能可以像一个“收拢的荷包(purse-string)”一样促进伤口闭合。John等<sup>[23]</sup>的工作主要是研究MLCK和ROCK在purse-string伤口愈合中的作用。他们在消化道上皮细胞层中制造几个细胞和单个细胞的损伤，损伤2min后在活细胞观测到中 $\beta$ 肌动蛋白绿色荧光的增强，这说明在损伤2min后就启动了一个快速的肌动蛋白环装配，这个过程持续8min形成一个圆形的环，接下来就是伤口的收缩和愈合。John和他的同事们将这个过程分为两个时相：圆环的装配和伤口收缩。圆环装配过程中激活的Rho和ROCK定位在伤口边缘。与装配相中重要作用一致，ROCK被抑制后阻止了肌动蛋白环的装配和伤口闭合，而在肌动蛋白环装配后对ROCK的抑制就完全不影响伤口的闭合。

MLCK的募集和激活发生在肌动蛋白环完全装配之后，与环的收缩同时发生。MLCK被抑制后先是减缓肌动蛋白环的收缩进而使环收缩停止，但不阻止肌动蛋白环的装配。MLCK被抑制后也延缓消化道上皮细胞屏障功能的恢复。这些结果提示在伤口愈合过程中，Rho和ROCK主要作用是肌动蛋白环的装配而MLCK的活性则主要作用于环的收缩。

## 2.3 MLCK和ROCK对细胞形态和凋亡的影响

Verena等<sup>[24]</sup>用ROCK的抑制剂Y-27632处理HT1080细胞，观察对其形态的影响。加入抑制剂前，细胞有明显的极化形态，富含肌动蛋白束的细胞膜皱褶在前端，可收缩的尾部在另一端，MLC在胞浆内弥散分布，但在细胞前端膜皱褶处有较集中的分布。Y-27632处理后，HT1080细胞变长，呈镰刀形，伪足富含F-actin，MLC在细胞膜皱褶处，伪足和胞浆中都有分布。同时，细胞粘附力增强，在二维培养系统中迁移更快，对血清诱导的趋化行为无明显变化。

Shoemaker等<sup>[25]</sup>在鸡胚胎纤原细胞中用MLCK的反义探针处理后发现产生带突触的圆细胞。本课题组在对肝癌细胞的迁移研究中发现，用MLCK抑制剂ML-7处理后，细胞表现出一种完全不同于ROCK抑制剂Y-27632处理后的形态特征：细胞变圆，突触消失，F-actin和MLC弥散分布。同时，细胞的粘附性能，迁移和趋化行为都被削弱了，在 $6\mu\text{mol/L}$  ML-7的作用下细胞的长短径比下降了约50%，其迁移速率由 $0.15\mu\text{min}^{-1}$ 下降至 $0.06\mu\text{min}^{-1}$ ，当ML-7的浓度增加至 $20\mu\text{mol/L}$ 时，细胞趋近于圆形，丧失迁移能力。

肌球蛋白II的活性对于应力纤维粘着斑的形成是必需的，而且它还与整合素介导的一些信号通路相关。Connell等<sup>[26]</sup>主要研究了肌动球蛋白收缩和MLCK以及ROCK对正常和转染了Ras的MCF-10A上皮细胞存活的影响。他们用MLCK的抑制剂(ML-7和ML-9)或是表达显性负相关的MLCK处理细胞，导致正常细胞或转染了Ras MCF-10A细胞凋亡。相反的，用ROCK的抑制剂Y-27632处理细胞后并不引起这些细胞凋亡。在用整合素激活抗体预处理细胞后，MLCK抑制所引起的凋亡就可被逆转，可能是由于对粘着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)活性的依赖，通过参与整合素依赖的信号通路并激活一些生存信号。最近发现Ras对ERK的级联激活依赖于MLCK<sup>[27]</sup>，而不是ROCK。Li等<sup>[28]</sup>在他们的研究中指出ROCK的活性对于另外一些类型细胞的存活是必需的，这说明MLCK和ROCK对细胞存活的作用因

细胞类型的不同而异。

## 2.4 MLCK 和 ROCK 与疾病的关系

MLCK 和 Rho/ROCK 信号通路参与了一些疾病的发生发展进程, 在很多疾病或损伤中都发现 MLCK 和 Rho/ROCK 信号的异常表达, 它们已经越来越广泛的被作为疾病治疗的靶向蛋白, 在多个疾病领域满足医疗需要。

**2.4.1 MLCK 与疾病** 在各种动物疾病模型和人类临床疾病样本中都发现 MLCK 的水平和活动的增加<sup>[29]</sup>。组织屏障包括上皮细胞和血管内皮细胞层对于维持有机体的内环境稳定是至关重要, 内皮细胞或上皮屏障功能障碍是许多疾病发生的一个关键环节。MLCK 通过调节细胞收缩过程调节屏障功能。目前研究已证实的由于 MLCK 表达异常破坏组织屏障功能引起的疾病有急性肺损伤<sup>[30,31]</sup>(acute lung injury, ALI), 克罗恩病<sup>[32]</sup>(Crohn's disease, CD)等。此外, 研究发现非洲人民和非裔美国人容易得严重的哮喘病与它们 MLCK 基因 17 MYLK 的遗传变异有关<sup>[33]</sup>, MLCK 异常表达还与肿瘤侵袭转移<sup>[34]</sup>、动脉粥样硬化<sup>[35]</sup>、心肌肥大等<sup>[36]</sup>一些疾病的发生相关。

**2.4.2 ROCK与疾病** Rho/ROCK通路不仅在肾细胞结构维持和功能中起着重要作用<sup>[37]</sup>, 还参与许多器官的纤维化病变进程<sup>[38]</sup>。最近研究发现<sup>[39]</sup>, 一种 Rho 激酶的选择性抑制剂, fasudil, 可改善肾功能损伤如高血压引起的肾小球硬化, 单侧输尿管梗阻等。动物实验发现, Rho 激酶抑制剂能有效地抑制冠状动脉痉挛, 长期抑制 Rho 激酶的作用可阻止冠状动脉粥样硬化病变的发展。最近的临床研究还表明<sup>[40]</sup>, Rho 激酶抑制剂对冠状动脉痉挛患者心绞痛和对运动诱发心肌缺血患者的心绞痛有稳定的疗效。Rho 激酶可能还参与了其他形式心血管疾病的发病过程。在中枢神经系统的各种疾病中也发现了异常激活的 Rho/ROCK 信号。成年脊椎动物大脑和脊髓的损伤激活 ROCK 信号, 抑制神经生长和发芽。哺乳动物脊髓损伤后, 抑制 ROCK 可加快再生和增强功能恢复, 并在中风、炎症和脱髓鞘疾病, 老年痴呆症和神经性疼痛的动物模型中也被证明是有效的<sup>[41]</sup>。也有报道指出 ROCK 参与肌动蛋白细胞骨架组织, 并与若干人类肿瘤的发生和发展相联系<sup>[42]</sup>。

## 3 小结与展望

什么机制使 MLCK 和 ROCK 这两种肌球蛋白磷酸化激酶可以在不同细胞、不同定位起不同的作用:

一个可能就是其上游信号分子激活各激酶时在不同的位点上工作; 同时, 钙信号在细胞内的时空特性为 MLC 磷酸化调节的多样性提供了支持, MLCK 对 MLC 的磷酸化作用受到  $Ca^{2+}$ /钙调蛋白的调节, 融合生长的细胞在相互作用过程中, 细胞游离面与细胞间接触面钙流强弱存在明显差异, 细胞接触边缘钙信号最强, 细胞游离缘和中央区很弱, 钙离子的瞬时激发依赖细胞接触时质膜上钙离子通道打开导致的钙离子流, 同时钙离子流随时间出现震荡变化<sup>[43]</sup>; 另外, ROCK 和 MLCK 在细胞内的定位也可以部分解释它们在空间上的不同调节行为。此外, 根据动力学数据, MLCK 对基质的磷酸化比 ROCK 快 2~7 倍, ROCK 的米氏常数比 MLCK 低 15~20 倍<sup>[44]</sup>。这说明 MLCK 有较高的  $K_m$  值可诱发直接的收缩, 它可能需要 MLCK 和肌球蛋白更紧密的接触。

综上所述, MLCK 和 ROCK 对不同空间分布的 MLC 轻链磷酸化作用具有不同影响, 从而更有效和更精确地调节细胞收缩与铺展、粘附与迁移等生物学行为的活动。而骨架的张力整合作用把骨架结构与骨架活动调节分子间的反馈信息联系起来, 这些调控方式能对细胞生命活动中骨架相关组分, 以及调节分子间相互作用的关系做出了合理解释。随着对信号分子如何识别不同空间分布的 MLC, 以及不同部位 MLC 磷酸化相对应的生理作用的深入了解, 可用于指导通过改变细胞收缩行为来解决一些由于胞外基质物理性状和细胞骨架结构改变而引起的临床相关疾病治疗对策的制定和药物设计。

## 参考文献(References)

- [1] Matsumura F, Hartshorne DJ. Myosin phosphatase target subunit: Many roles in cell function, *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 369(1): 149-156
- [2] Goekeler ZM, Bridgman PG, Wysolemski RB. Nonmuscle myosin II is responsible for Maintaining endothelial cell basal tone and stress fiber integrity, *Am J Physiol Cell Physiol*, 2008, 295(4): C994-C1006
- [3] 王喜忠, 丁明孝, 张传茂, 等译. *分子细胞生物学*, 第 3 版, 北京: 高等教育出版社, 2005, 370
- [4] Mammoto A, Mammoto T, Ingber DE. Rho signaling and mechanical control of vascular development, *Curr Opin Hematol*, 2008, 15(3): 228-234
- [5] Murthy KS. Signaling for contraction and relaxation in smooth muscle of the gut, *Annu Rev Physiol*, 2006, 68: 345-374
- [6] Mckenzie JA, Ridley AJ. Roles of Rho/ROCK and MLCK in TNF- $\alpha$ -induced changes in endothelial morphology and permeability, *J Cell Physiol*, 2007, 213(1): 221-228
- [7] Gutjahr MC, Rossy J, Niggli V. Role of Rho, Rac and Rho-

- kinase in phosphorylation of myosin light chain, development of polarity and spontaneous migration of Walker 256 carcinoma cells, *Exp Cell Res*, 2005, 308(2): 422-438
- [8] Tsai MH, Jiang MJ. Rho-kinase-mediated regulation of receptor-agonist-stimulated smooth muscle contraction, *Pflugers Arch*, 2006, 453(2): 223-232
- [9] Nakamura A, Xie C, Zhang Y *et al.* Role of non-kinase activity of myosin light-chain kinase in regulating smooth muscle contraction. A review dedicated to Dr. Setsuro Ebashi, *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 369(1): 135-143
- [10] Chardin P. GTPase regulation: getting aRnd Rock and Rho inhibition, *Curr Biol*, 2003, 13(18): R702-R704
- [11] Ingber DE. The architecture of life, *Sci Am*, 1998, 278(1): 48-57
- [12] Yeung T, Georges PC, Flanagan LA, *et al.* Effects of substrate stiffness on cell morphology, cytoskeletal structure, and adhesion, *Cell Motil Cytoskeleton*, 2005, 60(1): 24-34
- [13] Bhadriraju K, Yang M, Alom Ruiz S, *et al.* Activation of ROCK by RhoA is regulated by cell adhesion, shape, and cytoskeletal tension, *Exp Cell Res*, 2007, 313(16): 3616-3623
- [14] Galbraith CG, Yamada KM, Sheetz MP. The relationship between force and focal complex development, *J Cell Biol*, 2002, 159(4): 695-705
- [15] Nelson CM, Pirone DM, Tan JL, *et al.* Vascular endothelial-cadherin regulates cytoskeletal tension, cell spreading and focal adhesion by stimulating RhoA, *Mol Biol Cell*, 2004, 15(6): 2943-2953
- [16] Fajmut A, Brument M. MLC-kinase/phosphatase control of Ca<sup>2+</sup> signal transduction in airway smooth muscles, *J Theor Biol*, 2008, 252(3): 474-481
- [17] Sward K, Dreja K, Susnjar M, *et al.* Inhibition of Rho-associated kinase blocks agonist-induced Ca<sup>2+</sup> sensitization of myosin phosphorylation and force in guinea-pig ileum, *J Physiol*, 2000, 552 Pt1: 33-49
- [18] Smith A, Bracke M, Leitinger B *et al.* LFA-1-induced T cell migration on ICAM-1 involves regulation of MLCK-mediated attachment and ROCK dependent detachment, *J Cell Sci*, 2003, 116(Pt15): 3123-3133
- [19] Totsukawa G, Wu Y, Sasaki Y *et al.* Distinct roles of MLCK and ROCK in the regulation of membrane protrusions and focal adhesion dynamics during cell migration of fibroblasts, *J Cell Biol*, 2004, 164(3): 427-439
- [20] Smilenov LB, Mikhailov A, Pelham RJ, *et al.* Focal adhesion motility revealed in stationary fibroblasts, *Science*, 1999, 286(5442): 1172-1174
- [21] Katoh K, Kano Y, Ookawara S. Rho-kinase dependent organization of stress fibers and focal adhesions in cultured fibroblasts, *Genes Cells*, 2007, 12(5): 2623-2638
- [22] Beningo KA, Hamao K, Dembo M, *et al.* Traction forces of fibroblasts are regulated by the Rho-dependent kinase but not by the myosin light chain kinase, *Arch Biochem Biophys*, 2006, 456(2): 224-231
- [23] Russo JM, Florian P, Shen L, *et al.* Distinct temporal-spatial roles for rho kinase and myosin light chain kinase in epithelial purse-string wound closure, *Gastroenterology*, 2005, 128(4): 987-1101
- [24] Verena N, Manuela S, Alexandra N. Differential roles of Rho-kinase and myosin light chain kinase in regulating shape, adhesion, and migration of HT1080 fibrosarcoma cells, *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 343(2): 602-608
- [25] Shoemaker MO, Lau W and Shattuck RL *et al.* Use of DNA sequence and mutant analyses and antisense oligodeoxynucleotides to examine the molecular basis of nonmuscle myosin light chain kinase autoinhibition, calmodulin recognition, and activity, *J Cell Biol*, 1990, 111(3): 1107-1125
- [26] Connell LE, Helfman DM. Myosin light chain kinase plays a role in the regulation of epithelial cell survival, *J Cell Sci*, 2006, 119(Pt11): 2269-2281
- [27] Helfman, DM, Pawlak, G. Myosin light chain kinase and auto-myosin contractility modulate activation of the ERK cascade downstream of oncogenic Ras, *J Cell Biochem*, 2005, 95(5): 1069-1080
- [28] Li X, Liu L, Tupper JC, *et al.* Inhibition of protein geranylgeranylation and RhoA/RhoA kinase pathway induces apoptosis in human endothelial cells, *J Biol Chem*, 2002, 277(18): 15309-15316
- [29] Behanna HA, Watterson DM, Ranaivo HR. Development of a novel bioavailable inhibitor of the calmodulin-regulated protein kinase MLCK: a lead compound that attenuates vascular leak, *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1763(11): 1266-1274
- [30] Kamp R, Sun X, Garcia JG. Making genomics functional: deciphering the genetics of acute lung injury, *Proc Am Thorac Soc*, 2008, 5(3): 348-353
- [31] Tinsley JH, Yuan SY, Wilson E. Isoform-specific knockout of endothelial myosin light chain kinase: closing the gap on inflammatory lung disease, *Trends Pharmacol Sci*, 2004, 25(2): 64-66
- [32] Ye D, Ma TY. Cellular and molecular mechanisms that mediate basal and tumour necrosis factor- $\alpha$ -induced regulation of myosin light chain kinase gene activity, *J Cell Mol Med*, 2008, 12(4): 1331-1346
- [33] Flores C, Ma SF, Maresco K, *et al.* A variant of the myosin light chain kinase gene is associated with severe asthma in African Americans, *Genet Epidemiol*, 2007, 31(4): 296-305
- [34] Minamiya Y, Nakagawa T, Saito H, *et al.* Increased expression of myosin light chain kinase m RNA is related to metastasis in non-small cell lung cancer, *Tumour Biol*, 2005, 26(3): 153-157
- [35] Kohama K, Nakamura A. Targeting of myosin light chain kinase in vascular smooth muscle cells, and its implication for drug discovery, *Nippon Yakurikaku Zasshi*, 2001, 118(4): 269-276
- [36] Liu X, Shao Q, Dhalla NS. Myosin light chain phosphorylation in cardiac hypertrophy and failure due to myocardial infarction, *Mol Cell Cardiol*, 1995, 27(12): 2613-2621
- [37] Nishikimi T, Matsuoka H. Molecular mechanisms and therapeutic strategies of chronic renal injury: renoprotective effect of Rho-kinase inhibitor in hypertensive glomerulosclerosis, *J Pharmacol Sci*, 2006, 100(1): 22-28
- [38] Moriyama T, Nagatoya K. The Rho-ROCK system as a new therapeutic target for preventing interstitial fibrosis, *Drug News Perspect*, 2004, 17(1): 29-34
- [39] Hayashi K, Wakino S, Kanda T, *et al.* Molecular mechanisms and therapeutic strategies of chronic renal injury: Role of Rho-kinase in the development of renal injury, *J Pharmacol Sci*, 2006, 100(1): 29-33

- [40] Shimokawa H. Rho-kinase as a novel therapeutic target in treatment of cardiovascular diseases, *J Cardiovasc Pharmacol*, 2002, 39(3): 319-327
- [41] Mueller BK, Mack H, Teusch N. Rho kinase, a promising drug target for neurological disorders, *Nat Rev Drug Discov*, 2005, 4(5): 387-398
- [42] Kamai T, Tsujii T, Arai K, *et al.* Significant association of Rho/ROCK pathway with invasion and metastasis of bladder cancer, *Clin Cancer Res*, 2003, 9(7): 2632-2641
- [43] Hashido M, Hayashi K, Hirose K, *et al.* Ca<sup>2+</sup> lightning convey cell-cell contact information inside the cells, *EMBO Rep*, 2006, 7(11): 1117-1123
- [44] Guerriero V Jr, Rowley DR, Means AR, *et al.* Production and characterization of an antibody to myosin light chain kinase and intracellular localization of the enzyme, *Cell*, 1981, 27(3 Pt 2): 449-58

## MCLK and ROCK Influence on Cytoskeleton and Cell Behaviors

Yan-Zi Yangben, Hong-Bing Wang\*, Li Yang, Ze-Zhi Wu

(College of Bioengineerin, Chongqing University, Chongqing 400044, China)

**Abstract** Myosin light chain kinase and Rho kinase are two major enzymes controlling myosin light chain (MLC) phosphorylation in both muscle cells and non-muscle cells. MLC phosphorylation is the key reaction to regulate myosin contraction, which involved in many vital progresses, such as cell migration, adhesion, tissue repair, cancer metastasis and disease development etc. Although both of these two kinases could phosphorylate MLC and regulated cytoskeleton reorganization, there are distinct differences between their special location and the way to regulate cell function precisely by the cytoskeleton arrangement.

**Key words** myosin light chain kinase; Rho kinase; myosin light chain phosphorylation; cytoskeleton

Received: November 26, 2008 Accepted: June 12, 2009

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30870608) and the 111 Project (No.B0623)

\*Corresponding author. Tel: 86-23-66885061, E-mail: whbdzx@yahoo.com.cn

---

## 本刊将于 2010 年 2 月更名为《中国细胞生物学学报》

经新闻出版总署批准,《细胞生物学杂志》将于 2010 年第一期(2010 年 2 月)起更名为《中国细胞生物学学报》。更名后的《中国细胞生物学学报》作为中国细胞生物学学会会刊、旗下唯一的中文期刊,将继续坚持“提高与普及兼顾”的办刊方针,邀请著名专家撰文介绍国内外细胞生物学研究热点,扩大研究论文的刊登比例,提高综述文章的质量,增加介绍细胞生物学领域的新技术、新方法以及细胞生物学教学方面的文章;宣传和报道我国细胞生物学领域的最新进展,中国细胞生物学学会(包括会员)及各省市细胞生物学学会(包括会员)的各种活动和信息,竭诚为广大会员及从事细胞生物学研究的科研人员服务,使《中国细胞生物学学报》成为国内生命科学领域领先的中文期刊。