

## 水蛭素防治脑出血的药理作用研究进展

孙明燕, 王怀敏\*, 孙明玉, 刘备

重庆市大足区人民医院 神经外科, 重庆 402360

**摘要:** 脑出血的发病急、进展迅速、预后较差, 成为威胁人类健康的重大疾病之一。水蛭素是从水蛭的唾液腺中分离出来的多肽, 可通过抗凝血酶活性、抑制细胞凋亡、减轻氧化应激反应、降低炎症反应、抑制水通道蛋白 4 的表达、阻止胶质纤维酸性蛋白的上调、抑制血小板反应蛋白表达、调节  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATP 酶的活性对脑出血发挥防治作用。综述了水蛭素防治脑出血的药理作用研究进展, 为水蛭素临床治疗脑出血提供依据。

**关键词:** 水蛭素; 脑出血; 凝血酶; 细胞凋亡; 氧化应激反应; 炎症反应; 水通道蛋白 4; 胶质纤维酸性蛋白; 血小板反应蛋白;  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATP 酶

中图分类号: R971 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2024)04-1081-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2024.04.047

## Research progress on pharmacological effects of hirudin in prevention and treatment of cerebral hemorrhage

SUN Mingyan, WANG Huaimin, SUN Mingyu, LIU Bei

Department of Neurosurgery, The People's Hospital of Dazu District, Chongqing, Chongqing 402360, China

**Abstract:** Cerebral hemorrhage is one of the major diseases threatening human health because of its rapid onset, rapid progression, and poor prognosis. Hirudin is a peptide isolated from the salivary glands of *Hirudo niponica* Whitman. Hirudin can play a prevention and treatment role in cerebral hemorrhage by inhibiting thrombin activity, inhibiting cell apoptosis, reducing oxidative stress reaction, reducing inflammatory reaction, inhibiting the expression of aquaporin 4, inhibiting the upregulation of glial fibrillary acidic protein, inhibiting platelet reactive protein expression, and regulating the activity of  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  ATPase. This article reviews the pharmacological research progress of hirudin in prevention and treatment of cerebral hemorrhage, providing a basis for the clinical treatment of cerebral hemorrhage with hirudin.

**Key words:** hirudin; cerebral hemorrhage; thrombin; cell apoptosis; oxidative stress reaction; inflammatory reaction; aquaporin 4; glial fibrillary acidic protein; platelet reactive protein;  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase

脑出血是指非外伤性脑实质出血, 通常在活动中突然发病, 伴有头痛、血压升高、意识障碍, 严重者可因脑疝、颅内压增高、脑水肿等导致死亡<sup>[1]</sup>。脑出血的发病急、进展迅速、预后较差, 已经成为威胁人类健康的重大疾病之一。水蛭素是从水蛭的唾液腺中分离出来的多肽, 由 65~66 个氨基酸残基组成, 相对分子质量约为 7000, 具有抗凝、抗血小板聚集、调血脂、抗血栓、抗肿瘤、抗纤维化、伤口修复等作用, 临床可用于糖尿病并发症、脑出血、免疫球蛋白 A (IgA) 肾病、急性肺损伤、心肌

梗死等多种病变的治疗<sup>[2-3]</sup>。水蛭素可通过抗凝血酶活性、抑制细胞凋亡、减轻氧化应激反应、降低炎症反应、抑制水通道蛋白 4 的表达、阻止胶质纤维酸性蛋白的上调、抑制血小板反应蛋白表达、调节  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATP 酶的活性对脑出血发挥防治作用。本文综述了水蛭素防治脑出血的药理作用研究进展, 为水蛭素临床治疗脑出血提供依据。

### 1 抗凝血酶活性

水蛭素对凝血酶的高度特异性抑制作用与其化学结构密切相关, 在水蛭素的 N 端 (Cys6-Cys14、

收稿日期: 2023-11-18

基金项目: 重庆市大足区科技计划项目 (DZKJ2017ACC1029)

作者简介: 孙明燕 (1993—), 女, 护师, 本科, 研究方向为神经外科护理。E-mail: sunmingyan0925@163.com

\*通信作者: 王怀敏 (1987—), 主管护师, 本科, 研究方向为神经外科护理。E-mail: 594200503@qq.com

Cys16-Cys28、Cys32-Cys39) 有 3 对二硫键, 可以与凝血酶活性位点结合, 此外含有的 C 端富含酸性氨基酸残基, 可与凝血酶的纤维蛋白原结合位点结合, 可显著抑制凝血酶的抗凝作用<sup>[4]</sup>。Karabiyikoglu 等<sup>[5]</sup>通过脑内注射水蛭素治疗大鼠中动脉开口建立的脑出血大鼠模型, 结果显示脑内持续泵入 2 U 水蛭素有助于降低脑组织缺血区域的凝血酶数量, 显著降低皮质脑水肿的体积, 显著改善脑组织的血流动力学指标, 结果证实水蛭素可以发挥直接抗凝血酶活性, 有效预防心脑血管再血栓形成。

## 2 抑制细胞凋亡

### 2.1 调节细胞凋亡相关蛋白分泌

细胞凋亡参与脑出血神经细胞损伤, 脑出血可促使凝血酶释放, 与血管内皮细胞、胶质细胞、神经元上的凝血酶受体结合, 介导 B 淋巴细胞瘤 2 (Bcl-2) /B 淋巴细胞瘤相关 X 蛋白 (Bax) 等多种信号通路, 促使神经细胞凋亡<sup>[6]</sup>。殷萍等<sup>[7]</sup>研究证实, 100 U 水蛭素能显著减少实验性脑出血大鼠的神经凋亡细胞, 提高 Bcl 阳性细胞, 减少半胱天冬酶 (Caspase) -3 阳性细胞, 表明水蛭素可通过调节凋亡相关蛋白的表达抑制神经细胞的凋亡, 降低神经组织的损伤。

### 2.2 抑制蛋白激酶 C 同工酶 (PKC) 表达

PKC 能促使蛋白质磷酸化, 参与细胞增殖、突触塑性的多种病理进程, 可诱导细胞信号转导, 促进神经元凋亡和死亡, 加重脑出血后神经损伤<sup>[8]</sup>。田力等<sup>[9]</sup>使用水蛭素干预尾状核建立的实验性大鼠脑出血, 结果表明 10 U 水蛭素能促使脑出血周围的脑水肿吸收, 显著抑制 TUNEL 染色阳性细胞和 PKC 同工酶阳性的表达, 结果证实水蛭素可以通过抑制 PKC 的表达以抑制细胞凋亡, 发挥神经保护作用。

### 2.3 抑制 Janus 激酶 2 (JAK2) /转录激活因子 3 (STAT3) 信号通路激活

JAK2/STAT3 信号通路在细胞凋亡、分化、增殖中具有重要作用, 能识别细胞刺激后, 促进 JAK2、STAT3 磷酸化, 并迁移至细胞核内, 以诱导细胞凋亡<sup>[10]</sup>。李红等<sup>[11]</sup>使用水蛭素干预脑出血大鼠, 结果显示, 15 U 水蛭素能显著降低大鼠的神经行为评分和脑组织的含水量, 阻止脑系数增加, 明显降低脑细胞的凋亡率, 降低脑组织中 p-STAT3、p-JAK2 的表达, 表明水蛭素可通过抑制 JAK2/STAT3 信号通路阻止脑细胞凋亡, 发挥神经保护作用。

## 3 减轻氧化应激反应

细胞外信号调节激酶 (ERK) 1/2 可促使过氧化氢的磷酸化, 细胞外刺激细胞, 促使细胞氧化应激损伤<sup>[12]</sup>。Xia 等<sup>[13]</sup>研究证实, 脑内注射 10 U 水蛭素能显著减轻脑组织缺血后的梗死体积, 可有效促进 ERK 1/2 和丝氨酸-苏氨酸激酶的磷酸化, 进而显著减轻大鼠机体内的氧化应激反应, 降低海马神经的氧化损伤, 调节细胞代谢。

## 4 降低炎症反应

### 4.1 阻止炎症细胞高表达

脑出血后可继发脑水肿和脑损伤, 血脑屏障破坏可造成血管源性脑水肿, 脑组织 CD34 阳性微血管、中性粒细胞、RCA-1 阳性细胞的高表达能加重血脑屏障的破坏, 加重血管源性脑水肿的发生<sup>[14]</sup>。刘春梅等<sup>[15]</sup>使用水蛭素治疗脑出血大鼠发现 10 U 水蛭素可显著降低 RCA-1 阳性细胞和中性粒细胞数量, 减少 CD34 阳性微血管数量, 结果表明水蛭素可通过减轻炎症反应以降低血脑组织屏障的损伤, 从而降低继发性脑损伤。

### 4.2 抑制核因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 信号通路激活

NF- $\kappa$ B 是典型的炎症信号通路, 能调节白细胞介素 (IL) -2、IL-8、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、诱导型 NO 合成酶 (iNOS)、环氧合酶-2 (COX-2)、胶质纤维酸性蛋白 (GFAP) 等多种炎症介质的分泌, 扩大脑出血部位炎症反应, 加重神经细胞损伤<sup>[16]</sup>。杨文海等<sup>[17]</sup>使用水蛭素干预大鼠脑出血, 结果 20 U 水蛭素能显著降低大鼠水肿, 显著降低血肿周围 NF- $\kappa$ B p65 阳性细胞数量, 表明水蛭素能通过阻止 NF- $\kappa$ B 的活化减轻脑组织损伤, 发挥神经保护作用。

## 5 抑制水通道蛋白 4 (AQP4) 的表达

AQP4 主要分布于星形胶质细胞上的胶质介膜上, 是血脑屏障的第二道屏障, 能调节脑内水含量, 高表达能促进脑内水的转运, 加重脑水肿的发生<sup>[18]</sup>。朱加应等<sup>[19]</sup>使用水蛭素治疗大鼠脑出血, 发现 15 U 水蛭素能呈时间相关性降低脑组织中的含水量, 有助于抑制 AQP4 mRNA 和蛋白在脑组织中的表达, 结果证实水蛭素可通过促进 AQP4 的表达以降低脑出血脑水肿程度。滕伟禹等<sup>[20]</sup>研究也证实, 实验性脑出血后可促使脑组织中 AQP4 mRNA 的表达提高, 经 3  $\mu$ L 水蛭素干预后, 显著抑制脑组织中 AQP4 mRNA 的表达, 进一步降低脑组织的含水量。

## 6 阻止 GFAP 的上调

GFAP 是星形胶质细胞的骨架成分, 其水平与

脑损伤程度密切相关,多种应激因素可促使星形胶质细胞肿胀损伤,释放过度 NO 和谷氨酸,可造成星形胶质细胞的继发性损伤<sup>[21]</sup>。吴瑛等<sup>[22]</sup>使用水蛭素治疗胶原酶诱导建立的脑出血大鼠模型,结果显示 2 U/kg 水蛭素能显著减轻脑出血部位组织坏死、疏松、水肿、变性、肿胀等病理改变,显著降低 GFAP 染色的星形胶质细胞,结果证实水蛭素可通过阻止 GFAP 上调阻滞反应性胶质化进程,降低脑组织的损伤。张颖等<sup>[23]</sup>使用水蛭素治疗实验性脑出血急性期大鼠模型,结果 10 U 水蛭素能显著降低大鼠脑出血周围水肿、胶质细胞肿胀、细胞周围间隙变大、神经细胞坏死等病理变化,有效降低 GFAP 阳性细胞,结果表明水蛭素可通过阻止 GFAP 上调发挥神经保护作用。

### 7 抑制血小板反应蛋白(TSP)表达

TSP 能调节细胞基质蛋白酶,脑出血可促使大量 TSP 的分泌,进一步促使基质金属蛋白酶(MMP)的分泌,加重继发性脑水肿的发生<sup>[24]</sup>。Yang 等<sup>[25]</sup>使用水蛭素干预自发性脑出血大鼠,结果显示 20 U 水蛭素能抑制自发性出血引起的 TSP-1、TSP-2 mRNA 的表达,有助于降低血脑屏障损伤。

### 8 调节 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATP 酶的活性

脑出血时可释放大量凝血酶,发挥神经毒性作用,抑制星形胶质细胞上 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATP 酶的活性,促使细胞内钠离子内流和钾离子外流,造成血脑屏障损伤,加重脑水肿形成<sup>[26]</sup>。夏鹰等<sup>[27]</sup>使用水蛭素干预大鼠脑出血,结果 20 U 水蛭素呈时间相关性降低血肿周围脑组织的含水量,干预 8 h 后脑组织中钠离子的水平显著降低,钾离子水平显著升高,显著降低脑组织的血脑屏障通透性,结果表明水蛭素能通过调节 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATP 酶的活性减轻脑组织损伤。

### 9 结语

水蛭素可通过抗凝血酶活性、抑制细胞凋亡、减轻氧化应激反应、降低炎症反应、抑制水通道蛋白 4 的表达、阻止胶质纤维酸性蛋白的上调、抑制血小板反应蛋白表达、调节 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATP 酶的活性发挥多途径的脑出血防治作用。目前虽有水蛭素用于脑出血的临床报道,但整体的证据不足,还需多中心、多样本等临床研究进行论证。水蛭素目前用于脑出血治疗的局限性较大,大部分以基础研究研究为主,对人体的毒效关系、药理作用机制尚需进一步研究确认。总之,水蛭素防治脑出血的前景较好,有望为脑出血的临床治疗提供补充。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

### 参考文献

- [1] Magid-Bernstein J, Girard R, Polster S, et al. Cerebral hemorrhage: Pathophysiology, treatment, and future directions [J]. *Circ Res*, 2022, 130(8): 1204-1229.
- [2] Chen J, Xie X, Zhang H, et al. Pharmacological activities and mechanisms of hirudin and its derivatives - A review [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 660757.
- [3] Müller C, Lukas P, Böhmert M, et al. Hirudin or hirudin-like factor - that is the question: insights from the analyses of natural and synthetic HLF variants [J]. *FEBS Lett*, 2020, 594(5):841-850.
- [4] Lin Q, Long C, Wang Z, et al. Hirudin, a thrombin inhibitor, attenuates TGF- $\beta$ -induced fibrosis in renal proximal tubular epithelial cells by inhibition of protease-activated receptor 1 expression via S1P/S1PR2/S1PR3 signaling [J]. *Exp Ther Med*, 2022, 23(1): 3.
- [5] Karabiyikoglu M, Hua Y, Keep R F, et al. Intracerebral hirudin injection attenuates ischemic damage and neurologic deficits without altering local cerebral blood flow [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2004, 24(2): 159-166.
- [6] Chen S, Peng J, Sherchan P, et al. TREM2 activation attenuates neuroinflammation and neuronal apoptosis via PI3K/Akt pathway after intracerebral hemorrhage in mice [J]. *J Neuroinflammation*, 2020, 17(1): 168.
- [7] 殷萍, 魏亚芬. 水蛭素对大鼠实验性脑出血神经细胞凋亡及 Bcl-2、Caspase-3 表达影响的研究 [J]. *中国中医急症*, 2013, 22(11): 1912-1913.
- [8] Wickman G, Lan C, Vollrath B. Functional roles of the rho/rho kinase pathway and protein kinase C in the regulation of cerebrovascular constriction mediated by hemoglobin: relevance to subarachnoid hemorrhage and vasospasm [J]. *Circ Res*, 2003, 92(7): 809-816.
- [9] 田力, 刘海峰, 滕伟禹. 实验性大鼠脑出血后细胞凋亡与蛋白激酶 C 同工酶表达的关系及水蛭素的干预作用 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2007, 15(12): 896-898.
- [10] Ji N, Wu L, Shi H, et al. VSIG4 attenuates NLRP3 and ameliorates neuroinflammation via JAK2-STAT3-A20 pathway after intracerebral hemorrhage in mice [J]. *Neurotox Res*, 2022, 40(1): 78-88.
- [11] 李红, 吴黎黎, 高青, 等. 水蛭素对脑出血大鼠蛋白酪氨酸激酶 2/信号转导和转录激活因子 3 信号通路的影响 [J]. *中国脑血管病杂志*, 2017, 14(12): 638-643.
- [12] Maddahi A, Povlsen G K, Edvinsson L. Regulation of enhanced cerebrovascular expression of proinflammatory mediators in experimental subarachnoid hemorrhage via the mitogen-activated protein kinase kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway [J]. *J Neuroinflammation*,

- 2012, 21(9): 274.
- [13] Xia X F, Li M, Wei R X, *et al.* Intracerebral hirudin injection alleviates cognitive impairment and oxidative stress and promotes hippocampal neurogenesis in rats subjected to cerebral ischemia [J]. *Neuropathology*, 2023, 14(28): 6137-6150.
- [14] Wang Z, Wang K Y, Wu Y, *et al.* Potential role of CD34 in cerebral vasospasm after experimental subarachnoid hemorrhage in rats [J]. *Cytokine*, 2010, 52(3): 245-251.
- [15] 刘春梅, 周俊山. 水蛭素对脑出血大鼠血肿周围脑组织 CD34 阳性微血管、RCA-1 阳性细胞和中性粒细胞数量的影响 [J]. 国际脑血管病杂志, 2010, 18(10): 740-744.
- [16] Zeng J, Chen Y, Ding R, *et al.* Isoliquiritigenin alleviates early brain injury after experimental intracerebral hemorrhage via suppressing ROS- and/or NF- $\kappa$ B-mediated NLRP3 inflammasome activation by promoting Nrf2 antioxidant pathway [J]. *J Neuroinflammation*, 2017, 14(1): 119.
- [17] 杨文海, 宁显忠, 王媛媛, 等. 核转录因子  $\kappa$ B 在大鼠脑出血后血肿周围组织中的表达及水蛭素的保护作用 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2008, 6(12): 1436-1437.
- [18] Chiu C D, Chen C C, Shen C C, *et al.* Hyperglycemia exacerbates intracerebral hemorrhage via the downregulation of aquaporin-4: Temporal assessment with magnetic resonance imaging [J]. *Stroke*, 2013, 44(6): 1682-1689.
- [19] 朱加应, 伍国锋, 刘伯仁, 等. 脑出血后水蛭素干预对水通道蛋白 4 表达的影响 [J]. 诊断学理论与实践, 2009, 8(5): 510-514.
- [20] 滕伟禹, 田力, 刘宏丽, 等. 水蛭素、尼膜同对大鼠实验性脑出血后 AQP4mRNA 表达及脑水肿的作用研究 [J]. 中国现代医学杂志, 2006, 16(9): 1290-1293.
- [21] Yang S, Hu C. Prediction of recurrent hemorrhage in postoperative patients with cerebral hemorrhage by bedside GFAP combined with UCH-L1: A case report [J]. *Asian J Surg*, 2023, 84(23): 642-645.
- [22] 吴瑛, 任安乐. 大鼠脑出血急性期给予水蛭素后血肿周围组织胶质纤维酸性蛋白的表达 [J]. 兰州大学学报: 医学版, 2009, 35(1): 1-4.
- [23] 张颖, 冯加纯, 吴江, 等. 水蛭素对大鼠实验性脑出血急性期保护作用的研究 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31(1): 69-72.
- [24] Wang B, Li X, Yu N, *et al.* Intracerebral hemorrhage alters  $\alpha$ 2 $\delta$ 1 and thrombospondin expression in rats [J]. *Exp Ther Med*, 2022, 23(5): 327.
- [25] Yang A L, Zhou HJ, Lin Y, *et al.* Thrombin promotes the expression of thrombospondin-1 and -2 in a rat model of intracerebral hemorrhage [J]. *J Neurol Sci*, 2012, 323(1-2): 141-146.
- [26] He Q, Li Z, Li T, *et al.* ATP stimulation promotes functional recovery after intracerebral haemorrhage by increasing the mBDNF/proBDNF ratio [J]. *Neuroscience*, 2021, 459: 104-117.
- [27] 夏鹰, 陈衔城, 季耀东, 等. 水蛭素和重组链激酶联合应用于脑出血血肿腔中的实验研究 [J]. 中华神经外科疾病研究杂志, 2004, 3(3): 245-248.

[责任编辑 解学星]