

·综述·

水蛭素抗凝血和抗肿瘤转移的研究进展

严令耕¹, 黄臣虎¹, 陆茵^{1, 2}, 孙志广^{1, 3} (1. 南京中医药大学药学院, 南京 210029; 2. 江苏省方剂重点研究实验室, 南京 210046; 3. 江苏省中医院, 南京 210029)

摘要: 据国内外近20年文献, 概述水蛭素抗凝血和抗肿瘤转移研究进展, 主要阐述重组水蛭素与天然水蛭素的结构以及在抗凝血作用方面与肝素、枸橼酸钠等的不同点, 水蛭素能抑制肿瘤细胞的增值和转移, 并通过抑制凝血酶活性产生抗肿瘤作用的机制, 是一种具有良好应用前景的药物。

关键词: 水蛭素; 抗凝血; 肿瘤转移

中图分类号: R285.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-9783 (2010) 06-0667-04

水蛭素在 1905 年首次从水蛭中提取出来, 是第一个用于人类的抗凝血剂。根据水蛭素抗凝蛋白序列合成重组水蛭素, 重组水蛭素来匹卢定是第一个被批准用于临床的凝血酶抑制剂, 1997 年和 1998 年先后被欧洲医学评价机构及美国 FDA 批准, 用于治疗肝素诱导引起的血小板减少症并发的血栓形成^[1-2]。随后另一个重组水蛭素地西卢定也被批准用于矫形外科术后血栓形成的预防。水蛭素的抗凝血作用, 用于血栓形成具有良好的效果, 近年发现水蛭素和重组水蛭素还具有良好的抗肿瘤转移的作用。

1 水蛭素的结构

20 世纪 60 年代, 通过分离和纯化天然水蛭素, 得出水蛭素是由 65 个氨基酸残基组成, 分子量为 7 kD, 其结构式中 N 端有 3 个二硫键, 使 N 端肽链绕迭成密集形核心环肽结构。C 端富含酸性氨基酸残基, 具亲水性, 游离在分子表面。肽链中部还有一个由 Pro-Lys-Pro 组成的特殊序列, 不被一般蛋白酶所降解。重组水蛭素是基因工程的产物, 在 Tyr-63 位置上缺少硫酸盐基团, 虽然这种结构的改变导致与凝血酶的亲和力下降, 但重组水蛭素仍然是凝血酶的特别抑制剂^[3]。重组水蛭素与天然水蛭素具有相同的功效, 质量更加稳定和可控, 而且成本低, 产量大, 因此得到广泛应用。

2 水蛭素抗凝血作用

与肝素、枸橼酸钠等其他抗凝血药物不同, 水蛭素抑制凝血酶活性不依赖任何辅助因子^[4], 它与凝血酶以非共价键的形式形成 1:1 不可逆的复合物, 水蛭素与肝素及肝素-肝素辅因子 II 抑制凝血酶活性的不同之处还在于水蛭素能抑制游离的和血栓中的凝血酶^[5-6], 与凝血酶绑定纤维蛋白裂解产物一样^[7], 相反, 肝素抗凝血酶复合物对接近和激活血栓中的凝血酶作用较弱, 这可以解释为什么水蛭素在实验模型中对血管壁血栓的溶解能力比肝素强^[8]。另外一个重要的不同点是水蛭素与血浆蛋白没有相互作用^[9], 而肝素能结合血浆蛋白, 可以解释肝素应用的局限性, 如不能预测肝素的量效关系以及肝素效果的抵抗性。水蛭素阻止凝血酶产生的效果没有肝素强, 但在抑制凝血酶激活方面比肝素强^[10]。水蛭素引起的出血或血小板减少等副作用明显少于肝素, 正越来越广泛地被应用于治疗血栓形成的临床中。

Zheng 进一步研究发现水蛭素能通过阻断自然杀伤细胞逆转血小板对纤维蛋白素原的作用, 从而产生抗凝血作用^[11]。Beier 发现血液中纤溶酶原激活物抑制剂 1 表达的增加、纤维蛋白沉淀、脂多糖导致的肝损伤都能完全被水蛭素抑制, 或者通过阻断有丝分裂原 (细胞分裂剂) 激活蛋白信号通路发挥作

收稿日期: 2010-05-03

作者简介: 严令耕 (1971-), 男, 博士研究生, 研究方向为肿瘤血管生成与肿瘤转移。Email: ylgcn@163.com。陆茵, 教授、博士生导师, 长期从事肿瘤血管生成与肿瘤转移的研究。Email: luyingreen@126.com。
基金项目: 国家自然科学基金项目 (30772766); 江苏省自然科学基金项目 (BK2007239)。

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

用^[12]。凝血酶对 DNA 合成的抑制作用也能被水蛭素和抗凝血酶抵抗^[13]。Busch 研究发现比伐卢定能减少血小板和单核细胞的激活,抑制血栓的形成^[14]。可见水蛭素主要通过抑制凝血酶活性或影响血小板、自然杀伤细胞、单核细胞的活性和功能而产生抗凝血作用。

3 水蛭素的抗肿瘤转移作用

3.1 抑制肿瘤细胞的增值和转移 水蛭素能抑制多种肿瘤细胞的生长和增值。提前给予水蛭素可抑制 A549 人非小细胞肺癌和 MDAMB231 人乳腺癌细胞在裸鼠植入和生长,但并不抑制肿瘤接种 4~8 d 后的肿瘤植入和生长。水蛭素能延长尾静脉注射 A549 肿瘤细胞的实验性肺转移模型小鼠的存活期,抑制 B16F10 黑色素瘤细胞和 4T1 乳腺癌细胞在同源基因小鼠上的肿瘤植入和生长,能诱导 B16F10 黑色素瘤细胞和 4T1 乳腺癌细胞肿瘤结节坏死。水蛭素能减少绿色荧光蛋白 (GFP) 标签的 B16F10 移植肿瘤细胞进入血液,减少自发性转移模型肺部结节数^[15]。研究者比较了水蛭素治疗的 TRAMP 小鼠和 PBS 处理的小鼠,使用 ki-67 染色法监测细胞增值情况,显示水蛭素抑制 TRAMP 小鼠 (C57BL/6 and C57BL/6 FVB) 的前列腺癌的生长,肿瘤体积、肿瘤百分比和前列腺肿瘤的重量都分别下降,前列腺癌的发生率也降低,证明水蛭素对肿瘤浸润有良好的拮抗作用,对肿瘤有丝分裂也有抑制作用^[17]。研究发现,水蛭素能减少肺癌病人支气管肺泡灌洗液诱导的 MCF-7、A-431、Sk-Mel-28 等肿瘤细胞的增值^[16];使用水蛭素治疗,最初治疗组小鼠肺部肿瘤数量与对照组是一样的,但肿瘤细胞的扩散及随后的驻留在抗凝小鼠肺部明显被抑制^[18]。Esser 考察了聚乙二醇-水蛭素对体内胰腺癌模型的作用,认为其半衰期长,有希望在肿瘤治疗中替代地西卢定 (desirudin),研究显示其有可能用于胰腺癌的治疗,能抑制肿瘤生长和血栓形成^[19]。Wang 研究发现,水蛭素能明显抑制大鼠瓦克癌的生长,并能明显升高 SOD,降低 MDA^[20]。Brüggemann 使用水蛭素预先处理的大鼠,发现其能抑制肿瘤转移的形成^[21]。因此,水蛭素预处理后肿瘤细胞的生长和增值被抑制,已经形成的肿瘤使用水蛭素后也能被抑制。

3.2 通过抑制凝血酶活性产生抗肿瘤作用 凝血酶可以在多个方面影响肿瘤进程,其能促进肿瘤细胞与血小板、内皮细胞、纤维结合蛋白 (Fibrinectin) 以及 Von Willebrand factor (vWF) 的黏附^[22-24],还能促进肿

瘤细胞的生长,促进基质血管生成及最终促进肿瘤转移^[25-26]。水蛭素是凝血酶的特异抑制剂,其抗肿瘤活性可能是通过抑制凝血酶活性而产生的。

Niers 研究发现,水蛭素对肺部 B16 黑色素瘤有很强的抑制作用,但对 K1735 和 CT26 肿瘤细胞的生长影响不大,认为水蛭素抑制凝血酶可能通过关闭血小板激活因子 par-1 信号通路而减少肿瘤转移,因为只有 B16 黑色素瘤表达 par-1 信号通路,并发现对肺部 B16 黑色素瘤的抑制作用与 CD24 有关^[27]。Guo RR 进行的体外实验显示,水蛭素明显抑制凝血酶的活性,而且对初期种植的 B16 黑色素瘤细胞的小鼠给予水蛭素,能明显延迟肿瘤的生长,抑制实验性肺转移的发生。随后给予长春碱脂质体可进一步抑制肿瘤的生长和转移,显示水蛭素加上长春碱脂质体有显著的抗肿瘤转移作用^[28]。Chang MC 发现水蛭素片段在 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}$ 浓度时抑制 SAS 肿瘤细胞诱导的血小板聚集,延长潜伏期^[29]。Hu L 认为水蛭素抑制野生型和 empty vector (EV) 细胞生长,与凝血酶上调组织蛋白酶 D 程度一致^[30]。Henrikson 发现凝血酶促进侵袭的作用可以被水蛭素抑制^[31]。Darmoul 使用水蛭素与凝血酶共同孵育,观察到凝血酶诱导的结肠癌细胞生长被强烈抑制^[32]。而 Im 等人证明水蛭素可以阻断肿瘤细胞在肺血管内部与血小板和纤维蛋白原相互作用以及肿瘤细胞在血管上的伸展^[18]。Palumbo 等人证明水蛭素能阻断凝血酶通过纤维蛋白原依赖的途径影响肿瘤转移^[33]。Langer 发现血友病大鼠 B16F10 肺转移在使用单剂量凝血 FVIII 因子后明显增加,而使用重组水蛭素后,其肺结节数量明显减少,显示即使在 FVIII 因子缺失时,凝血酶的产生也能促进了肺转移^[34]。Niimi 认为血栓调节蛋白和凝血酶提高了小鼠乳房肿瘤细胞的侵袭能力,实验研究证明水蛭素能抑制血栓调节蛋白和凝血酶的刺激作用而产生抗肿瘤作用^[35]。Schiller 发现凝血酶在 0.3, 3 U/mL 浓度时能提高 HL-60 细胞的增值,但这种作用能被水蛭素逆转^[36]。水蛭素通过抑制凝血酶的活性及影响血小板激活因子 par-1 信号通路、纤维蛋白原、血栓调节蛋白等因素产生抗肿瘤作用。但也有实验显示水蛭素不能抑制肿瘤生长,如 Bereczky 对 SCID 小鼠抗凝预处理 3 d,将 HT168-M1 黑色素瘤细胞注射到尾静脉中,发现肝素在 20~200 IU/kg 剂量范围内,能抑制肺结节的形成和肝转移的发生,而水蛭素无效,说明水蛭素抗肿瘤的作用对肿瘤细胞的种类有选择性,可能不同的肿瘤细胞上的受体不同,也会影响水蛭素抗肿瘤作用的发挥^[37]。

4 讨论

水蛭是一味传统中药,“主逐恶血、瘀血、月闭、破血消积聚。”医圣张仲景用其祛邪扶正,治疗“瘀血”、“水结”之证,显示了其独特的疗效。张锡纯赞此药“凡破血之药,多伤气分,惟水蛭味咸专入血分,于气分丝毫无损。且服后腹不疼,并不觉开破,而瘀血默然于无形,真良药也。”

水蛭素和重组水蛭素在临床和实验研究中均被证实具有良好的抗凝作用,但与肝素、枸橼酸钠等其他抗凝血药物作用机理不同,其抑制凝血酶活性不依赖任何辅助因子;同时水蛭素和重组水蛭素通过抗凝血酶活性发挥抗肿瘤增值和转移作用。我们在研究活血化瘀中药对肿瘤转移的干预影响中,在考虑中药发挥抗凝血酶活性的时候,可以与水蛭素进行比较,或将水蛭素作为阳性药来研究中药抗肿瘤的作用机制。

以上研究围绕着抗凝血、抗肿瘤细胞的增值和转移的作用,从多系统、多器官、多靶点对水蛭素及重组水蛭素进行了广泛研究,但是未见有结合中医药理论进行研究的报道。水蛭是活血化瘀类中药的代表性药物,我们认为,在研究其抗肿瘤功能的同时,可采用血瘀动物模型作为研究工具,在中医理论指导下,从多层次、多方位研究水蛭素及重组水蛭素对血液系统和肿瘤的作用。

参考文献:

- [1] Greinacher A, Warkentin TE. The direct thrombin inhibitor hirudin [J]. *Thromb Haemost*, 2008, 99 (5) : 819-829.
- [2] EL-Rashdy M, Redwan. Animal-derived pharmaceutical proteins[J]. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*, 2009, 30 (3) : 262.
- [3] Stone SR, Hofsteenge J. Kinetics of the inhibition of thrombin by hirudin[J]. *Biochemistry*, 1986, 25 (10) : 4622-4628.
- [4] Markwardt F, Kaiser B, Richter M, et al. Haemostatic effects of batroxobin with regard to hirudin treatment[J]. *Thromb Res*, 1992, 68 (6) : 475-482.
- [5] Hogg PJ, Jackson CM. Fibrin monomer protects thrombin from inactivation by heparin-antithrombin III: implications for heparin efficacy [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1989, 86 (10) : 3619-3623.
- [6] Weitz JI, Hudoba M, Massel D, et al. Clot-bound thrombin is protected from inhibition by heparin- antithrombin III but is susceptible to inactivation by antithrombin III-independent inhibitors[J]. *J Clin Invest*, 1990, 86 (2) : 385-391.
- [7] Weitz JI, Leslie B, Hudoba M, et al. Thrombin binds to soluble fibrin degradation products where it is protected from inhibition by heparin-antithrombin but susceptible to inactivation by antithrombin-independent inhibitors[J]. *Circulation*, 1998, 97 : 544-552.
- [8] Meyer BJ, Badimon JJ, Chesebro JH, et al. Dissolution of mural thrombus by specific thrombin inhibition with 1-hirudin: comparison

- with heparin and aspirin[J]. *Circulation*, 1998, 97 : 681-685.
- [9] Glusa E, Markwardt F. Platelet functions in recombinant hirudin-anticoagulated blood[J]. *Haemostasis*, 1990, 20 (2) : 112-118.
- [10] Zeymer U. Recombinant Hirudins: An overview of recent developments [J]. *BioDrugs*, 1998, 10 (6) : 425-436.
- [11] Zheng S, Shen J, Jiao Y, et al. Platelets and fibrinogen facilitate each other in protecting tumor cells from natural killer cytotoxicity[J]. *Cancer Science*, 2009, 100 (5) : 859-865.
- [12] Beier JI, Guo LP, von Montfort C, et al. New role of resistin in lipopolysaccharide-induced liver damage in mice[J]. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2008, 325 (3) : 801-808.
- [13] Kar S, Wang MF, Carr BI, et al. a-Thrombin inhibits DNA synthesis in rat hepatocytes but not in hepatoma cells by receptor activation and proteolysis [J]. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2007, 304 : 189-197.
- [14] Busch G, Steppich B, Sibbing D, et al. Bivalirudin reduces platelet and monocyte activation after elective percutaneous coronary intervention[J]. *Thrombosis and Haemostasis*, 2009, 101 (2) : 340-344.
- [15] Hu L, Lee M, Campbell W, et al. Role of endogenous thrombin in tumor implantation, seeding, and spontaneous metastasis[J]. *Blood*, 2004, 104 (9) : 2746-2751.
- [16] Hernández-Rodríguez NA, Correa E, Contreras-Paredes A, et al. Evidence that thrombin present in lungs of patients with pulmonary metastasis may contribute to the development of the disease[J]. *Lung Cancer*, 1999, 26 : 157-167.
- [17] Hu L, Ibrahim S, Liu C, et al. Thrombin Induces Tumor Cell Cycle Activation and Spontaneous Growth by Down-regulation of p27Kip1, in Association with the Upregulation of Skp2 and MiR-222[J]. *Cancer Res*, 2009, 69 (8) : 3374-3381.
- [18] Im JH, Fu WL, Wang H, et al. Coagulation facilitates tumor cell spreading in the pulmonary vasculature during early metastatic colony formation[J]. *Cancer Res*, 2004, 64 (23) : 8613-8619.
- [19] Esser N, Fiedler U, Graeser R, et al. Antitumor efficacy of PEG-Hirudin (LU 87981), administered three times weekly, in an orthotopic AsPC-1 pancreas carcinoma model [J]. *Mol Cancer Ther*, 2009, 8 (12) : 183.
- [20] Wang J, Han JQ, Li B, et al. Pharmacodynamics of compound hirudin[J]. *Shandong Daxue Xuebao (Yixueban)*, 2007, 45 (8) : 852-854.
- [21] Brüggemann LW, Versteeg HH, Reitsma PH, et al. High factor VIIa levels do not promote tumor metastasis [J]. *Thromb Haemost*, 2008, 99 (4) : 787-788.
- [22] Nierodzik ML, Kajumo F, Karparkin S, et al. Effect of thrombin treatment of tumor cells on adhesion of tumor cells to platelets in vitro and metastasis in vivo[J]. *Cancer Res*, 1992, 52 : 3267-3272.
- [23] Klepfish A, Greco MA, Karparkin S, et al. Thrombin stimulates melanoma tumor cell binding to endothelial cells and subendothelial matrix[J]. *Int J Cancer*, 1993, 53 (6) : 978-982.
- [24] Caunt M, Huang YQ, Brooks PC, et al. Thrombin induces neovascularization in the chick chorioallantoic membrane [J]. *Thromb Haemost*, 2003, 1 (10) : 2097-2102.

- [25] Wojtukiewicz MZ, Tang DG, Nelson KK, et al. Thrombin enhances tumor cell adhesive and metastatic properties via increased albb expression on the cell surface[J]. *Thromb Res*, 1992, 68 (3) : 223-245.
- [26] Wojtukiewicz MZ, Tang DG, Ciarelli JJ, et al. Thrombin increases the metastatic potential of tumor cells[J]. *Intl J Cancer*, 1993, 54 (5) : 793-806.
- [27] Niers TM, Brüggemann LW, Klerk CP, et al. Differential effects of anticoagulants on tumor development of mouse cancer cell lines B16, K1735 and CT26 in lung[J]. *Clin Exp Metastasis*, 2009, 26 (3) : 171-178.
- [28] Guo RR, Liu Y, Lu WL, et al. A recombinant peptide, hirudin, potentiates the inhibitory effects of stealthy liposomal vinblastine on the growth and metastasis of melanoma [J]. *Biol Pharm Bull*, 2008, 31 (4) : 696-702.
- [29] Chang MC, Chan CP, Ho YS, et al. Signaling pathways for induction of platelet aggregation by SAS tongue cancer cells a mechanism of hematogenous metastasis[J]. *J Oral Pathol Med*, 2009, 38 (5) : 434-440.
- [30] Hu L, Roth JM, Brooks P, et al. Thrombin up-regulates cathepsin D which enhances angiogenesis, growth, and metastasis[J]. *Cancer Res*, 2008, 68 (12) : 4666-4673.
- [31] Henrikson KP, Salazar SL, Fenton JW, et al. Role of thrombin receptor in breast cancer[J]. *Br J Cancer*, 1999, 79 (3-4) : 401-406.
- [32] Darmoul D, Gratio V, Devaud H, et al. Aberrant expression and activation of the thrombin receptor protease-activated receptor-1 induces cell proliferation and motility in human colon cancer cells[J]. *American Journal of Pathology*, 2003, 162 : 1503-1513.
- [33] Palumbo JS, Degen JL. Fibrinogen and tumor cell metastasis[J]. *Haemostasis*, 2001, 31 (1) : 11-15.
- [34] Langer F, Amirkhosravi A, Ingersoll SB, et al. Experimental metastasis and primary tumor growth in mice with hemophilia A [J]. *J Thromb Haemost*, 2006, 4 (5) : 1056-1062.
- [35] Niimi S, Harashima M, Takayama K, et al. Thrombomodulin enhances the invasive activity of mouse mammary tumor cells [J]. *J Biochem*, 2005, 137 (5) : 579-586.
- [36] Schiller H, Bartscht T, Arlt A, et al. Thrombin as a survival factor for cancer cells: thrombin activation in malignant effusions in vivo and inhibition of idarubicin-induced cell death in vitro[J]. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 2002, 40 (8) : 329-335.
- [37] Bereczky B, Gilly R, Rúsó E, et al. Selective antimetastatic effect of heparins in preclinical human melanoma models is based on inhibition of migration and microvascular arrest[J]. *Clin Exp Metastasis*, 2005, 22 (1) : 69-76.

编辑：梁进校

(上接第666页)

参考文献：

- [1] 中华医学会心血管病学分会、中华心血管病杂志编辑委员会. 慢性稳定性心绞痛诊断与治疗指南[J]. *中华心血管病杂志*, 2007, 35 (3) : 195-206.
- [2] 中华医学会心血管病学分会、中华心血管病杂志编辑委员会. 不稳定心绞痛和非 ST 段抬高心肌梗死诊断与治疗指南[J]. *中华心血管病杂志*, 2007, 35 (4) : 295-304.
- [3] 中华医学会心血管病学分会、中华心血管病杂志编辑委员会、中国循环杂志编辑委员会. 急性心肌梗死诊断与治疗指南[J]. *中华心血管病杂志*, 2001, 29 (12) : 710-725.
- [4] 国家中医药管理局. 中医病证诊断疗效标准[s]. 南京：南京大学出版社, 1994 : 18-19.
- [5] 田德禄. 中医内科学[M]. 北京：人民卫生出版社, 2002, 117-125.
- [6] 邓铁涛. 冠心病的辨证论治[J]. *中华内科杂志*, 1977, (1) : 40.
- [7] 张页, 沈绍功. 补气祛瘀方治疗冠心病心绞痛的临床研究[J]. *中国中医急症*, 1999, 8 (3) : 207-211.
- [8] 沈绍功. 诊治冠心病的新思路[J]. *中国中医急症*, 1999, 8 (2) : 51-53.
- [9] 文川, 程伟. 206 例心绞痛患者问诊资料与中医辨证关系的探讨[J]. *湖北中医杂志*, 2002, 24 (10) : 3-4.
- [10] 王东生, 袁肇凯, 李建玲, 等. 冠心病痰瘀病理临床研究[N]. *山东中医药大学学报*, 2003, 27 (2) : 109-122.
- [11] 韩学杰, 沈绍功. 高脂血症 (痰瘀互结证) 是冠心病心绞痛的始动和诱发因素[J]. *中华综合临床医学杂志*, 2003, 8 (3) : 46.
- [12] 何川, 王伟, 刘剑平, 等. 甘油三酯与冠心病的关系研究[J]. *四川医学*, 2003, 24 (8) : 482-483.
- [13] 徐燕玲, 潘志红. 高甘油三酯血症是冠心病独立的危险因素[J]. *中国老年学杂志*, 2001, 21 (1) : 77-78.
- [14] Ross R. Atherosclerosis an inflammatory disease[J]. *New Engl J Med*. 1999, 340 (2) : 115.
- [15] Nader R, Paul MR. 炎症标志物与冠心病[J]. *世界医学杂志*, 2003, 7 (9) : 72.
- [16] 洪永敦, 黄衍寿, 吴辉, 等. 冠心病中医证候与炎症因子关系的临床研究[J]. *广州中医药大学学报*, 2005, 22 (2) : 81-86.

编辑：梁进校