·论著·

水蛭素调控RhoA/ROCK信号通路对氧糖剥夺/复氧诱导的脑微血管内皮细胞损伤的保护作用

徐国栋，董晓莉，梁晓辉，马良
（河北省人民医院神经介入科，石家庄 050000）

摘要 **目的** 探讨水蛭素调控Ras同源基因家族成员（Rho）A/Rho激酶（ROCK）信号通路对氧糖剥夺/复氧（OGD/R）诱导的人脑微血管内皮细胞（HBMVEC）损伤的保护作用。**方法** 利用HBMVEC构建OGD/R损伤模型，并分为模型组、低浓度水蛭素组、高浓度水蛭素组、水蛭素+Ov-NC组、水蛭素+Ov-RhoA组，未行OGD/R诱导的细胞为对照组。用集落形成实验检测细胞增殖，用流式细胞术检测凋亡，用乳酸脱氢酶（LDH）比色法测定细胞毒性，用基质胶进行血管形成实验，用Western blotting检测细胞中RhoA和ROCK蛋白的表达。**结果** 与对照组相比，模型组HBMVEC集落形成数、血管长度减少，细胞凋亡率、细胞毒性、RhoA和ROCK蛋白表达升高（$P < 0.05$）；与模型组相比，低浓度水蛭素组HBMVEC集落形成数、血管长度增加，细胞凋亡率、细胞毒性、RhoA和ROCK蛋白表达降低（$P < 0.05$）；与低浓度水蛭素组相比，高浓度水蛭素组HBMVEC集落形成数、血管长度增加，细胞凋亡率、细胞毒性、RhoA和ROCK蛋白表达降低（$P < 0.05$）；与水蛭素+Ov-NC组比较，水蛭素+Ov-RhoA组HBMVEC集落形成数、血管长度减少，细胞凋亡率、细胞毒性、RhoA和ROCK蛋白表达提高（$P < 0.05$）。**结论** 水蛭素通过调控RhoA/ROCK信号通路对OGD/R诱导的HBMVEC损伤发挥保护作用。

关键词 水蛭素；RhoA/ROCK；氧糖剥夺/复氧；人脑微血管内皮细胞；损伤
中图分类号 R743.3 **文献标志码** A **文章编号** 0258-4646（2026）04-0335-06
网络出版地址 https://link.cnki.net/urlid/21.1227.R.20260414.1625.028
DOI：10.12007/j.issn.0258-4646.2026.04.008

Protective effect of hirudin against oxygen-glucose deprivation/reoxygenation-induced brain microvascular endothelial cell damage via RhoA/ROCK signaling pathway modulation

XU Guodong，DONG Xiaoli，LIANG Xiaohui，MA Liang
（Department of Neurointervention，Hebei General Hospital，Shijiazhuang 050000，China）

Abstract **Objective** To investigate whether hirudin protects against oxygen-glucose deprivation/reoxygenation（OGD/R）-induced human brain microvascular endothelial cell（HBMVEC）damage by modulating the Ras homolog gene family member A（RhoA）/Rho kinase（ROCK）pathway. **Methods** An in vitro model of OGD/R-induced cerebral damage was established using HBMVEC. The OGD/R-damaged cells were grouped into model，low-concentration hirudin，high-concentration hirudin，hirudin+Ov-NC，and hirudin+Ov-RhoA groups. Cells that were not subjected to OGD/R were used as the control. Cell proliferation and apoptosis were evaluated using colony formation and flow cytometric assays，respectively. Cytotoxicity was determined using the lactate dehydrogenase colorimetric method. Vascular formation was assessed using the Matrigel assay. The Western blotting was used to measure the cellular RhoA and ROCK protein levels. **Results** In the model group，the colony formation number and vascular length were lower whereas the apoptotic rate，cytotoxicity，and RhoA and ROCK protein levels were higher than those of the control group（$P < 0.05$）. Compared with the model group，the low-concentration hirudin group showed increased colony formation and vascular length and decreased apoptotic rate，cytotoxicity，and RhoA and ROCK protein levels（$P < 0.05$）. Compared with the low-concentration hirudin group，the high-concentration hirudin group exhibited increases in colony formation and vascular length and decreases in the apoptotic rate，cytotoxicity，and RhoA and ROCK protein levels（$P < 0.05$）. Compared with the values in the hirudin+Ov-NC group，the colony formation number and vascular length were lower whereas the apoptotic rate，cytotoxicity，and RhoA and ROCK protein levels were higher in the hirudin+Ov-RhoA group（$P < 0.05$）. **Conclusion** Hirudin exerts a protective effect against OGD/R-induced HBMVEC damage by modulating the RhoA/ROCK signaling pathway.

Keywords hirudin；RhoA/ROCK；oxygen-glucose deprivation/reoxygenation；human brain microvascular endothelial cell；damage

基金项目：河北省医学适用技术跟踪项目（GZ2024006）
作者简介：徐国栋（1983-），男，副主任医师，硕士.
通信作者：董晓莉，E-mail：xgd0606@163.com
收稿日期：2025-03-07
网络出版时间：2026-04-15 13:28:55

缺血性脑卒中是由于脑血流突然丢失致脑组织永久性梗死，从而导致正常神经功能受损[1]。血脑屏障（blood-brain barrier，BBB）可以调节血脑界面处液体、溶质和细胞的运输，并保持中枢神经系统的平衡。在缺血性脑卒中时，BBB的破坏会导致脑稳态严重受损。人体BBB包含4种关键细胞：星形胶质细胞、周细胞、神经元和脑微血管内皮细胞（human brain microvascular endothelial cell，HBMVEC）[2]。其中，HBMVEC是BBB的核心，可构成维持脑稳态的独特细胞屏障。当发生缺血性脑卒中时，BBB的完整性被破坏，而HBMVEC是脑缺血损伤最先受到影响的细胞。因此，修复HBMVEC的功能障碍是改善脑缺血损伤的重要手段之一[3]。

水蛭最早记载于《神农本草经》，在中药中具有破血、散瘀、通络的功效。天然水蛭素是从水蛭唾液腺中分离的一种多肽，由64~66个氨基酸组成，分子量约为7×10^3[4]。研究[5]表明，脑内注射水蛭素可通过细胞外信号调节激酶1/2和丝氨酸/苏氨酸激酶，缓解短暂性大脑中动脉闭塞大鼠模型的认知障碍和氧化应激，促进海马神经再生，从而减轻短暂性大脑中动脉闭塞大鼠模型的认知缺陷。Ras同源基因家族成员（Ras homolog gene family member，Rho）A/Rho激酶（Rho kinase，ROCK）信号通路作为细胞内重要的信号转导通路，对细胞增殖、凋亡、坏死等生理病理反应有重要的调控作用[6]。RhoA/ROCK信号通路参与脑神经元发育，其上调在促进神经炎症和介导脑损伤中具有重要作用[7]。已有研究[8]表明，羟考酮通过RhoA/ROCK/肌球蛋白轻链2信号减轻氧糖剥夺/复氧（oxygen-glucose deprivation/reoxygenation，OGD/R）诱导的HBMVEC通透性损伤和细胞凋亡。本研究拟探讨水蛭素对OGD/R诱导的HBMVEC损伤的影响，并验证RhoA/ROCK信号通路在此过程中的作用。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　细胞：HBMVEC（CP-H124）购自武汉普诺赛生命科技有限公司，用添加内皮细胞生长补充剂和5%胎牛血清的内皮细胞培养基，于37 ℃、5% CO_2培养箱中培养。

1.1.2　主要试剂：水蛭素（HY-P2813）、超敏ECL化学发光试剂盒（HY-K2005）购自美国Med Chem Express公司；RhoA过表达质粒（Ov-RhoA）和阴性对照质粒（Ov-NC）购自赛业（苏州）生物科技有限公司；生长因子减量的Matrigel基质胶（356238）购自美国Corning公司；乳酸脱氢酶（lactatedehydrogenase，LDH）细胞毒性检测试剂盒（C0016）、Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒（C1062S）购自上海碧云天生物技术股份有限公司；BCA蛋白浓度测定试剂盒（C0050）、RIPA裂解液（C0045）购自美国TargetMol公司；lipofectamine™ 2000转染试剂（11668500）购自美国Thermo Fisher Scientific公司；ROCK2+ROCK1单抗（ab45171）、GAPDH单抗（ab9485）、RhoA单抗（ab187027）、羊抗兔IgG二抗（ab97051）均购自英国abcam公司。

1.2　方法

1.2.1　细胞模型构建与分组培养：用含5% CO_2+95%空气培养箱培养的HBMVEC作为对照组[9]。将HBMVEC在缺氧条件下（培养箱气体含1% O_2+5% CO_2+94% N_2）用无葡萄糖培养基培养6 h后，在完全培养基中复氧24 h，获得OGD/R细胞模型。再将OGD/R细胞分为模型组、低浓度水蛭素组、高浓度水蛭素组、水蛭素+Ov-NC组、水蛭素+Ov-RhoA组。低浓度水蛭素组、高浓度水蛭素组分别采用40、80 μg/mL水蛭素处理[10]；水蛭素+Ov-RhoA组用80 μg/mL水蛭素处理的同时，转染Ov-RhoA；水蛭素+Ov-NC组用80 μg/mL水蛭素处理的同时，转染Ov-NC。

1.2.2　集落形成实验[11]：将各组HBMVEC接种至96孔板（5×10^3/孔），每3 d更换1次培养基。培养10 d后，直至可以观察到集落，终止培养。用5 mL甲醇固定集落15 min，0.5%结晶紫染色20 min，在显微镜下计数超过10个细胞的集落数。

1.2.3　流式细胞术检测细胞凋亡：收集各组细胞，1000 *g*离心5 min，弃上清，加入195 μL Annexin V-FITC结合液重悬细胞，加入5 μL Annexin V-FITC和10 μL碘化丙啶染色液混匀，室温避光孵育10~20 min，随后置于冰浴中，在流式细胞仪中分选Annexin V和碘化丙啶双阳性细胞，使用FlowJO软件分析阳性细胞百分比。

1.2.4　LDH比色法评估细胞损伤：将细胞接种至96孔板并于检测前1 h取出，将10% LDH释放试剂添加到样品最大酶活性对照孔。在细胞培养箱中孵育

1 h，400 *g*离心5 min。将120 μL细胞上清加入60 μL LDH检测工作液中，室温避光孵育30 min，在490 nm处读取光密度（optical density，OD）。细胞毒性（%）=（处理样品OD值−对照样品OD值）/（细胞最大酶活性OD值−对照样品OD值）× 100。

1.2.5　血管形成实验：将各组HBMVEC接种至24孔板（已预先加入60 μL生长因子减量的Matrigel基质胶），孵育6 h。在显微镜下观察Matrigel中血管形成情况，随机选择3个视野，由不知情的操作者使用Image J软件Angiogenesis Analyzer插件评估血管长度。

1.2.6　Western blotting检测RhoA和ROCK蛋白表达：用RIPA裂解液提取各组细胞总蛋白，BCA蛋白定量。蛋白上样后，进行10%SDS-PAGE电泳，转移至聚偏氟乙烯膜，用5%脱脂牛奶封闭，加入RhoA、ROCK一抗，4 ℃下孵育过夜。次日，TBST洗膜3次，加入二抗室温摇床孵育1 h。ECL发光，用ImageJ软件对蛋白条带进行可视化分析。

1.3　统计学分析

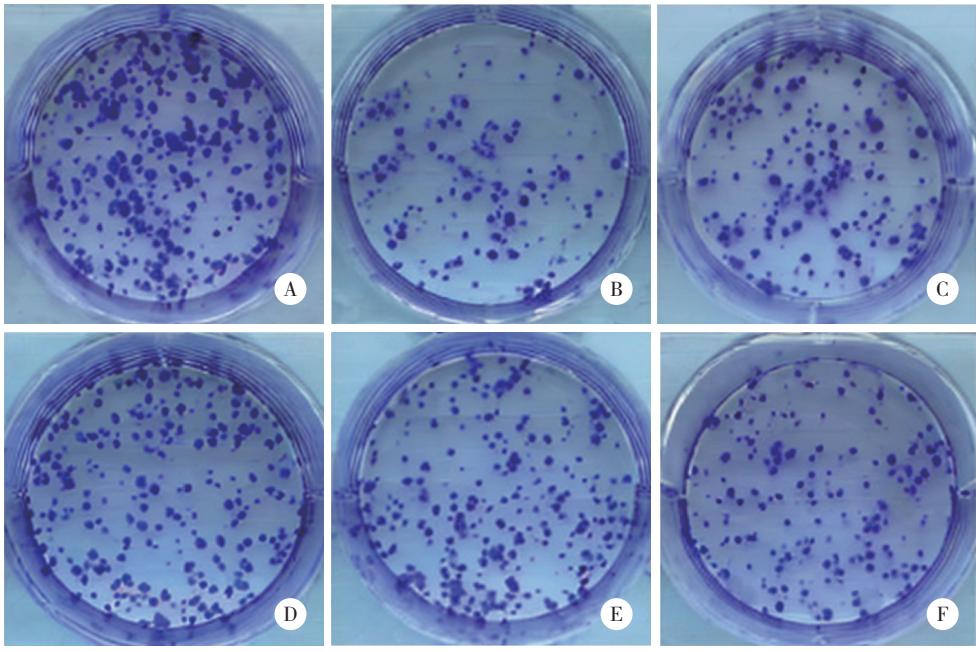
采用SPSS 26.0软件进行统计学分析。计量资料以$\bar{x} \pm s$表示，多组比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用Tukey's多重检验。$P < 0.05$为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　各组HBMVEC增殖能力比较

集落形成实验结果显示，模型组细胞集落形成数较对照组明显减少；低浓度水蛭素组细胞集落形成数较模型组明显增加；高浓度水蛭素组细胞集落形成数较低浓度水蛭素组明显增加；水蛭素+Ov-RhoA组细胞集落形成数较水蛭素+Ov-NC明显减少，差异均有统计学意义（均$P < 0.05$）。见图1、表1。

2.2　各组HBMVEC凋亡率比较



A，control group；B，model group；C，low-concentration hirudin group；D，high-concentration hirudin group；E，hirudin+Ov-NC group；F，hirudin+Ov-RhoA group.

图1　各组HBMVEC集落形成实验结果　×10

Fig.1　Colony formation assay results of HBMVEC in each group　×10

流式细胞术结果显示，模型组HBMVEC凋亡率较对照组升高；低浓度水蛭素组HBMVEC凋亡率较模型组降低；高浓度水蛭素组HBMVEC凋亡率较低浓度水蛭素组降低；水蛭素+Ov-RhoA组HBMVEC凋亡率较水蛭素+Ov-NC组升高，差异均有统计学意义（均$P < 0.05$）。见表1、图2。

2.3　各组HBMVEC细胞毒性测定

LDH比色法结果显示，与对照组相比，模型组HBMVEC细胞毒性升高；与模型组比较，低浓度水蛭素组HBMVEC细胞毒性降低；与低浓度水蛭素

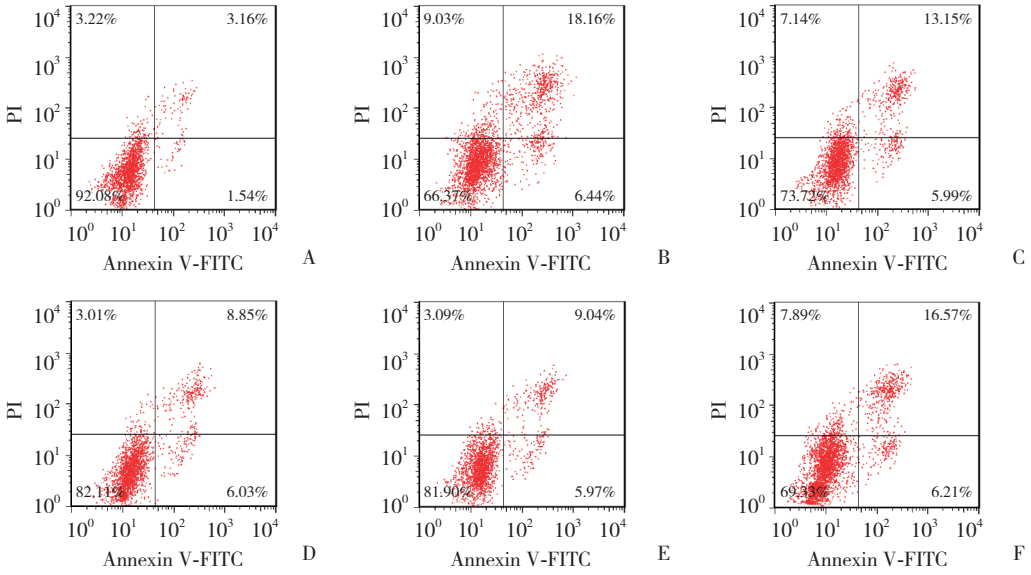
组比较，高浓度水蛭素组HBMVEC细胞毒性降低；与水蛭素+Ov-NC组比较，水蛭素+Ov-RhoA组HBMVEC细胞毒性升高，差异均有统计学意义（均$P<0.05$）。见表1。

表1　各组HBMVEC集落形成数、细胞凋亡率、细胞毒性、血管长度及RhoA、ROCK蛋白表达比较

Tab.1　Comparison of colony formation, apoptosis rate, cytotoxicity, blood vessel length, and RhoA and ROCK protein expression of HBMVEC in each group

Group	Number of colonies formed	Apoptosis rate (%)	Cytotoxicity (%)	Blood vessel length (%)	RhoA	ROCK
Control	174.37 ± 21.61	4.72 ± 0.78	1.02 ± 0.11	106.37 ± 11.74	0.35 ± 0.05	0.27 ± 0.04
Model	52.52 ± 5.82[1)]	24.75 ± 3.04[1)]	2.35 ± 0.28[1)]	32.84 ± 4.35[1)]	1.04 ± 0.11[1)]	0.98 ± 0.11[1)]
Low-concentration hirudin	85.27 ± 9.46[2)]	19.08 ± 2.43[2)]	1.94 ± 0.23[2)]	54.95 ± 6.23[2)]	0.82 ± 0.10[2)]	0.75 ± 0.09[2)]
High-concentration hirudin	116.43 ± 13.58[3)]	14.98 ± 1.75[3)]	1.53 ± 0.18[3)]	77.34 ± 8.75[3)]	0.56 ± 0.07[3)]	0.53 ± 0.08[3)]
Hirudin+Ov-NC	117.86 ± 14.74[4)]	15.06 ± 1.86[4)]	1.56 ± 0.19[4)]	76.49 ± 8.54[4)]	0.57 ± 0.08[4)]	0.52 ± 0.07[4)]
Hirudin+Ov-RhoA	62.34 ± 8.39[5)]	22.68 ± 2.65[5)]	2.29 ± 0.26[5)]	41.46 ± 5.06[5)]	0.96 ± 0.12[5)]	0.90 ± 0.12[5)]
F	67.746	56.943	33.465	71.583	51.235	54.066
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

1) $P<0.05$ vs. control group; 2) $P<0.05$ vs. model group; 3) $P<0.05$ vs. low-concentration hirudin group; 4) $P<0.05$ vs. high-concentration hirudin group; 5) $P<0.05$ vs. hirudin+Ov-NC group. $n=6$.



A, control group; B, model group; C, low-concentration hirudin group; D, high-concentration hirudin group; E, hirudin + Ov-NC group; F, hirudin + Ov-RhoA group.

图2　各组HBMVEC流式细胞分析结果

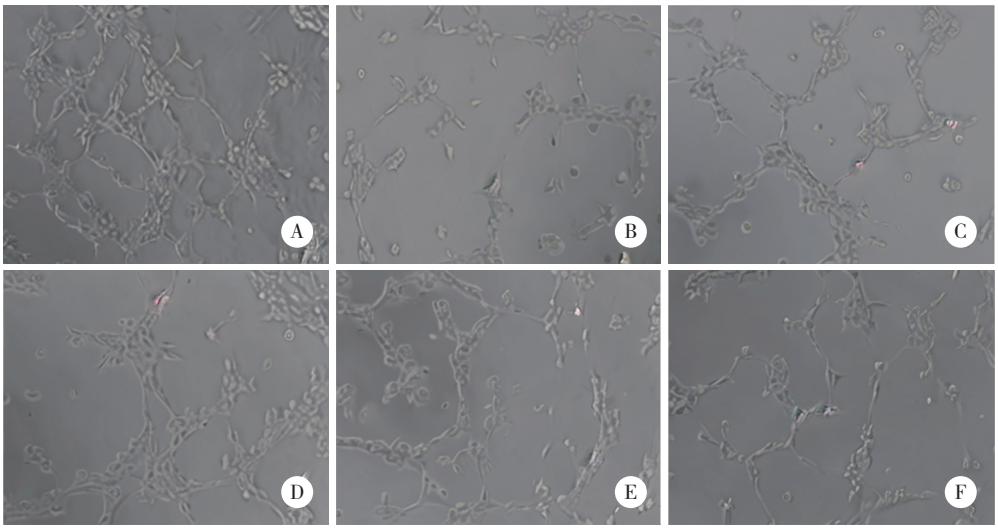
Fig.2　Flow cytometric analysis results of HBMVEC in each group

2.4　各组HBMVEC血管形成比较

血管形成实验结果显示，模型组血管长度较对照组减少；低浓度水蛭素组血管长度较模型组增加；高浓度水蛭素组血管长度较低浓度水蛭素组增加；水蛭素+Ov-RhoA组血管长度较水蛭素+Ov-NC组减少，差异均有统计学意义（均$P<0.05$）。见图3、表1。

2.5　各组HBMVEC中RhoA和ROCK蛋白表达比较

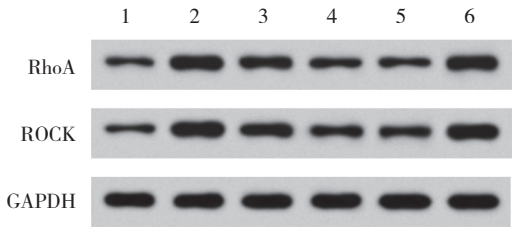
与对照组比较，模型组RhoA和ROCK蛋白表达水平升高；与模型组比较，低浓度水蛭素组RhoA和ROCK蛋白表达水平降低；与低浓度水蛭素组比较，高浓度水蛭素组RhoA和ROCK蛋白表达水平降低（$P<0.05$）；与水蛭素+Ov-NC组比较，水蛭素+Ov-RhoA组RhoA和ROCK蛋白表达水平升高，差异均有统计学意义（均$P<0.05$），见图4、表1。



A, control group; B, model group; C, low-concentration hirudin group; D, high-concentration hirudin group; E, hirudin+Ov-NC group; F, hirudin+Ov-RhoA group.

图3　各组HBMVEC血管形成比较　×100

Fig.3　Comparison of HBMVEC blood vessel formation in each group　×100



1, control group; 2, model group; 3, low-concentration hirudin group; 4, high-concentration hirudin group; 5, hirudin+Ov-NC group; 6, hirudin + Ov-RhoA group.

图4　Western blotting检测HBMVEC中RhoA和ROCK蛋白表达

Fig.4　Western blotting detection of RhoA and ROCK protein expression in HBMVEC

3　讨论

HBMVEC通过紧密连接蛋白促进相互连接，形成紧密封闭的屏障结构，从而有效限制极性和毒性物质穿过BBB[12]。HBMVEC在维持BBB的通透性和完整性方面发挥着关键作用，一旦发生缺血性脑卒中，细胞因子、趋化因子和活性氧等外部刺激会损害HBMVEC的紧密连接蛋白，导致紧密连接功能丧失，从而导致血管源性水肿、出血性转化和死亡[13]。BBB的正常功能受损后，毒性物质渗入中枢神经系统，导致病情加剧。因此，减轻HBMVEC损伤对于维持缺血性脑卒中BBB的完整性非常重要，研究与HBMVEC功能保护相关的药物靶点及其机制对缺血性脑卒中的治疗具有重要的意义[14]。

水蛭素是一种天然凝血酶抑制剂，近年来，对水蛭素及其衍生物的研究迅速兴起，尤其在伤口修复、抗纤维化、抗糖尿病并发症等方面的研究尤为突出。此外，水蛭素还具有抗血栓、抗肿瘤、抗高尿酸血症等作用，对脑出血、急性肺损伤、心肌梗死等疾病具有潜在的药理活性[15]。将水蛭素封装在抗氧化纳米颗粒中，可以保护和延长水蛭素的生物活性，将其给予大脑中动脉闭塞小鼠模型，可减少小鼠脑梗死体积，减轻氧化应激，抑制出血转化，并防止BBB破坏[16]。水蛭素还能通过抑制NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3炎症小体介导的神经炎症，缓解急性缺血性脑卒中[17]。本研究检测了水蛭素对OGD/R诱导的HBMVEC损伤的影响，发现水蛭素可促进OGD/R诱导的HBMVEC增殖及血管形成，减轻细胞毒性，并抑制细胞凋亡，且高浓度水蛭素的效果优于低浓度水蛭素，提示水蛭素对OGD/R诱导的HBMVEC损伤具有治疗效果，与其他研究[5,16-17]结果一致。

RhoA是一种小分子量的GTP酶蛋白，属于Rho GTP酶家族，该家族包括Rho、Rac、Cdc42等成员。Rho与GDP结合时无活性，而通过鸟嘌呤交换因子与GTP结合后被激活。GTP结合激活的Rho可激活其下游效应物ROCK。ROCK属于丝氨酸/苏氨酸激酶家族，此家族包括2种亚型：ROCK1和ROCK2。

ROCK1转录本主要在非神经元组织中表达，而ROCK2在脑和骨骼肌中更丰富[18]。缺血性卒中后血管内皮细胞中RhoA/ROCK信号通路的激活可能引起一氧化氮合酶3磷酸化水平降低，从而导致一氧化氮生成减少，血流减少。此外，RhoA/ROCK信号通路的激活会引发一系列以氧化应激增强和炎症反应引发为特征的级联事件，加速神经炎症的进程[19]。研究[20]表明，寡聚β淀粉样蛋白和Tau通过调控RhoA/ROCK信号通路改变细胞黏附特性，并诱导脑内皮细胞炎症反应。因此，本研究采用Western blotting检测了HBMVEC中RhoA和ROCK蛋白的表达，结果表明，OGD/R诱导的HBMVEC中RhoA和ROCK蛋白表达水平较未损伤细胞明显升高；40和80 μg/mL水蛭素处理能抑制HBMVEC中RhoA和ROCK的蛋白表达，且80 μg/mL浓度的影响更大；在水蛭素处理的基础上过表达RhoA后，RhoA和ROCK蛋白表达上调，水蛭素对OGD/R诱导的HBMVEC损伤的保护作用被消除。表明水蛭素对OGD/R诱导的HBMVEC损伤的保护作用可能是通过抑制RhoA/ROCK信号通路实现的。

综上所述，水蛭素可能通过抑制RhoA/ROCK信号通路对OGD/R诱导的HBMVEC损伤发挥保护作用，本研究为水蛭素成为治疗和预防缺血性脑卒中的潜在药物提供了依据。

参考文献：

[1] 庞娟，杨维，殷俊茹，等. miR-92a-3p通过抑制SIRT1参与缺血性脑卒中的发生[J]. 中国医科大学学报，2025，54(11)：977-981. DOI：10.12007/j.issn.0258-4646.2025.11.003.

[2] STONE NL，ENGLAND TJ，O'SULLIVAN SE. A novel transwell blood brain barrier model using primary human cells [J]. Front Cell Neurosci，2019，13：230. DOI：10.3389/fncel.2019.00230.

[3] SUN XM，LIU B. Donepezil ameliorates oxygen-glucose deprivation/reoxygenation-induced brain microvascular endothelial cell dysfunction via the SIRT1/FOXO3a/NF-κB pathways [J]. Bioengineered，2022，13(3)：7760-7770. DOI：10.1080/21655979.2022.2045833.

[4] MA Y，WU SB，ZHAO FY，et al. Hirudin inhibits glioma growth through mTOR-regulated autophagy [J]. J Cell Mol Med，2023，27(18)：2701-2713. DOI：10.1111/jcmm.17851.

[5] XIA XF，LI M，WEI RX，et al. Intracerebral hirudin injection alleviates cognitive impairment and oxidative stress and promotes hippocampal neurogenesis in rats subjected to cerebral ischemia [J]. Neuropathology，2023，43(5)：362-372. DOI：10.1111/neup.12897.

[6] 杨英阁，张晋雷，孙岩，等. miR-202-5p通过靶向抑制ROCK1表达减轻急性呼吸窘迫综合征新生大鼠肺损伤[J]. 中国医科大学学报，2025，54(9)：814-820. DOI：10.12007/j.issn.0258-4646.2025.09.009.

[7] LU WZ，CHEN ZW，WEN JY. The role of RhoA/ROCK pathway in the ischemic stroke-induced neuroinflammation [J]. Biomed Pharmacother，2023，165：115141. DOI：10.1016/j.biopha.2023.115141.

[8] SHAO F，HAN D，SHEN YH，et al. Oxycodone relieves permeability damage and apoptosis of oxygen-glucose deprivation/reoxygenation-induced brain microvascular endothelial cells through ras homolog family member A (RhoA) /Rho-associated coiled-coil containing kinases (ROCK) /myosin light chain 2 (MLC2) signal [J]. Bioengineered，2022，13(3)：5205-5215. DOI：10.1080/21655979.2022.2037371.

[9] YANG L，DU H，ZHANG XJ，et al. Circ VRK1/microRNA-17/PTEN axis modulates the angiogenesis of human brain microvascular endothelial cells to affect injury induced by oxygen-glucose deprivation/reperfusion [J]. BMC Neurosci，2023，24(1)：8. DOI：10.1186/s12868-023-00774-8.

[10] 刘依，尹玉洁，韩宁馨，等. 水蛭素对缺氧诱导心脏微血管内皮细胞间质转分化的作用及机制研究[J]. 疑难病杂志，2024，23(9)：1120-1126. DOI：10.3969/j.issn.1671-6450.2024.09.018.

[11] LI QF，NONG AN，HUANG ZJ，et al. Exosomes containing miR-122-5p secreted by LPS-induced neutrophils regulate the apoptosis and permeability of brain microvascular endothelial cells by targeting OCLN [J]. Am J Transl Res，2021，13(5)：4167-4181.

[12] KADRY H，NOORANI B，CUCULLO L. A blood-brain barrier overview on structure，function，impairment，and biomarkers of integrity [J]. Fluids Barriers CNS，2020，17(1)：69. DOI：10.1186/s12987-020-00230-3.

[13] YANG CJ，HAWKINS KE，DORÉ S，et al. Neuroinflammatory mechanisms of blood-brain barrier damage in ischemic stroke [J]. Am J Physiol Cell Physiol，2019，316(2)：C135-C153. DOI：10.1152/ajpcell.00136.2018.

[14] LI GL，MA YC，ZHANG SJ，et al. A mechanistic systems biology model of brain microvascular endothelial cell signaling reveals dynamic pathway-based therapeutic targets for brain ischemia [J]. Redox Biol，2024，78：103415. DOI：10.1016/j.redox.2024.103415.

[15] CHEN JR，XIE XF，ZHANG HQ，et al. Pharmacological activities and mechanisms of hirudin and its derivatives-a review [J]. Front Pharmacol，2021，12：660757. DOI：10.3389/fphar.2021.660757.

[16] MEI T，ZHANG P，HU Y，et al. Engineering hirudin encapsulation in pH-responsive antioxidant nanoparticles for therapeutic efficacy in ischemic stroke model mice [J]. Biomaterials，2025，314(1)：122860. DOI：10.1016/j.biomaterials.2024.122860.

[17] LI WQ，QIN ZS，CHEN S，et al. Hirudin alleviates acute ischemic stroke by inhibiting NLRP3 inflammasome-mediated neuroinflammation：in vivo and in vitro approaches [J]. Int Immunopharmacol，2022，110：108967. DOI：10.1016/j.intimp.2022.108967.

[18] KIMURA T，HORIKOSHI Y，KURIYAGAWA C，et al. Rho/ROCK pathway and noncoding RNAs：implications in ischemic stroke and spinal cord injury [J]. Int J Mol Sci，2021，22(21)：11573. DOI：10.3390/ijms222111573.

[19] PINOȘANU EA，PÎRȘCOVEANU D，ALBU CV，et al. RhoA/ROCK，mTOR and secretome-based treatments for ischemic stroke：new perspectives [J]. Curr Issues Mol Biol，2024，46(4)：3484-3501. DOI：10.3390/cimb46040219.

[20] HOSSEN F，GENG X，SUN GY，et al. Oligomeric amyloid-β and tau alter cell adhesion properties and induce inflammatory responses in cerebral endothelial cells through the RhoA/ROCK pathway [J]. Mol Neurobiol，2024，61(11)：8759-8776. DOI：10.1007/s12035-024-04138-z.

（编辑　王又冬）