

重组微纤维蛋白溶酶对大鼠急性脑梗死的治疗作用

付洁鹰², 任建平¹, 邹莉波², 卞广兴¹, 栗瑞福¹, 吕秋军^{1*}

(1. 军事医学科学院 放射与辐射医学研究所, 北京 100850; 2. 沈阳药科大学 生命科学与生物制药学院, 辽宁 沈阳 110016)

摘要: 研究了重组微纤维蛋白溶酶 (recombinant microplasm in, μ -plasm in) 对大鼠急性脑梗死的治疗作用及其安全性, 并与目前临床应用的重组组织型纤溶酶原激活物 (recombinant tissue plasminogen activator, rt-PA) 进行比较。采用大鼠自体血栓注入脑中动脉法造大鼠中动脉阻塞 (middle cerebral artery occlusion, MCAO) 模型及动脉导管法给药, 12 h 后对神经功能症状进行评分, 计算脑梗死体积, 测定出血时间 (bleeding time, BT), 血清中纤维蛋白 (原) 降解产物 (fibrin degradation product, FDP) 含量, 血浆中凝血酶时间 (thrombin time, TT)、凝血酶原时间 (prothrombin time, PT) 及纤维蛋白原 (fibrinogen, FIB) 含量。另外, μ -plasm in 可显著降低神经功能缺损评分和脑梗死体积; 显著升高 FDP 含量; 对 BT、TT 及 PT 均无显著影响; FIB 含量与模型组比较有一定下降, 而与假手术组比较无显著差异。结果提示, μ -plasm in 对大鼠急性脑梗死有很好的治疗作用, 对纤溶系统和凝血系统没有显著影响, 提示 μ -plasm in 可能不会引起出血反应, 其安全性可能优于 rt-PA。

关键词: 重组微纤维蛋白溶酶; 重组组织型纤溶酶原激活物; 脑梗死; 大鼠中动脉阻塞; 出血

中图分类号: R965 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2007)12 - 1266 - 05

Effect of recombinant microplasm in on acute cerebral infarction in rats

FU Jie-ying², REN Jian-ping¹, ZOU Li-bo², BIAN Guang-xing¹, LI Rui-fu¹, LÜ Qiu-jun^{1*}

(1. Institute of Radiation and Irradiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China;

2. School of Life Science and Biological Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract: The effect of recombinant microplasm in (μ -plasm in) on acute cerebral infarction was evaluated in rats, and compared with recombinant tissue plasminogen activator (rt-PA). After the model of middle cerebral artery occlusion (MCAO) was established by autologous blood clots, different doses of μ -plasm in (2.5, 5, and 10 mg·kg⁻¹) were administered into the thrombus intra-arterial. Twelve hours after administration of μ -plasm in, the neurological deficit score of rats was recorded and the infarct volumes were determined. Bleeding time (BT), fibrin degradation product (FDP) concentration in serum and thrombin time (TT), prothrombin time (PT) and fibrinogen (FIB) concentration in plasma were tested after administration. Intra-arterial administration of μ -plasm in could reduce significantly neurological deficit score and infarct volumes in MCAO rats. FDP concentration increased significantly as compared with model group. There were no significant differences in TT, PT and BT. FIB concentration reduced markedly as compared with model group, but had no significant difference as compared with sham group. The results suggest that μ -plasm in is effective in treatment of rat acute cerebral infarction, and has no significant influence on fibrinolytic system and blood clotting system, indicating that μ -plasm in may be useful for treatment of acute cerebral infarction, and not lead to hemorrhage. μ -Plasm in seems to be distinguished from clinical used rt-PA by its no hemorrhage effect.

Key words: recombinant microplasm in; recombinant tissue plasminogen activator; cerebral infarction; middle cerebral artery occlusion; hemorrhage

收稿日期: 2007-06-08.

* 通讯作者 Tel / Fax: 86 - 10 - 66932201, E-mail: luqj66@yahoo.com.cn

缺血性脑中风,又称脑卒中,俗称中风,包括脑出血、脑血栓和脑梗死等。我国每年脑卒中发病率为250/10万,居世界第2位,其中绝大多数是由于血栓阻塞脑血管,即脑血栓和脑梗死,引起的后果也很严重。溶栓法被认为是目前最有效治疗脑血栓和脑梗死的方法。1996年美国食品与药品管理局(FDA)批准对急性缺血性卒中患者使用rt-PA。rt-PA是目前唯一被证实对缺血性卒中有效的治疗药物^[1],但其仍然存在很大的风险性,其中以出血并发症最为严重。溶栓治疗后脑内出血转变的确切机制尚不十分清楚,可能与以下几点有关:(1)溶栓药引起的继发性纤溶亢进和凝血障碍;(2)缺血早期血管壁已经受损,恢复血供后,由于通透性增高而使血液渗出;(3)梗死后期血脑脊液屏障的通透性增加而伴有再灌注出血。

传统溶栓治疗大多采取rt-PA、尿激酶等溶栓药物静脉滴注,这种方法应用方便,但容易引起全身性纤溶亢进和凝血障碍,会发生严重的出血反应,特别是脑出血。因此目前如何解决溶栓过程中出现的出血反应是溶栓疗法要解决的难题之一。国外有研究发现^[2]动脉给予纤溶酶(plasmin)对家兔血栓有一定的溶栓作用,并且不易引起出血,但纤溶酶在血中的半衰期只有0.02s,可能溶栓效果不是很好。Nagai等^[3]报道将人微纤溶酶的5个“kringle”片段切除,得到人重组微纤维蛋白溶酶,降低了 α_2 抗纤溶酶对其的抑制速度,半衰期可达4s。这让溶栓疗法取得了新的突破,但5个“kringle”片段全部切除后人重组微纤维蛋白溶酶对纤维蛋白就失去了特异亲和性。本实验药物 μ -plasmin是采用美国PTI公司独特的重折叠技术在大肠杆菌中制备的,之后又经上海富纯中南生物技术有限公司进一步改进了分子结构并提高了纯度,与国外报道的人重组微纤维蛋白溶酶^[3]在结构上有明显差别(保留了其中一个“kringle”片段,即“kringle-5”片段),这使得 μ -plasmin对纤维蛋白仍具有一定亲和性,溶栓作用更强,并且还对空间结构进行了一定改造,使半衰期进一步延长,可达15s,可直接注射到血栓部位定向溶解血栓,溶栓后进入血液可被 α_2 抗纤溶酶所抑制,因此不会导致纤溶系统亢进,可能不会引起出血反应。

本实验采用大鼠自体血栓注入脑中动脉法制造MCAO模型,通过动脉导管法给予 μ -plasmin,并与目前临床应用的rt-PA静脉溶栓进行比较,以此来考察 μ -plasmin对大鼠急性脑梗死的治疗作用以及

发生出血的危险性。

材料与方 法

实验动物 健康雄性 Sprague-Dawley (SD)大鼠,体重280~320g,北京维通利华实验动物技术有限公司提供,许可证号:SCXK(京)2002.0003。

药品与试剂 重组微纤维蛋白溶酶(recombinant microplasm in, μ -plasm in)注射液($6\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$),上海富纯中南生物技术有限公司生产(批号:070207),用 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 枸橼酸(pH 3.5)稀释;重组组织型纤溶酶原激活物(Actilyse, rt-PA),德国勃林格殷格翰公司(批号:505636),用时无菌注射用水配制为所需浓度;红四氮唑(triphenyltetrazolium chloride, TTC):北京化学试剂公司生产;冻干人凝血酶:上海太阳生物技术有限公司生产(批号:TT50002);氯化钙(calcium chloride, CaCl_2):浙江城南化工厂生产(批号:20060923);二磷酸腺苷(adenosine diphosphate, ADP):Sigma公司(批号:N0960);纤维蛋白(原)降解产物(fibrin degradation product, FDP)含量、凝血酶时间(thrombin time, TT)、凝血酶原时间(prothrombin time, PT)纤维蛋白原(fibrinogen, FIB)检测试剂盒,上海太阳生物技术有限公司。

仪器 TCF-II型注射泵(北京思路高科技发展有限公司);PABER-I型血凝和血小板聚集测定仪(北京世帝科学仪器公司);MPIAS-1000型多媒体图像分析系统;Multiskan MK3型酶标仪(美国Thermo公司)。

实验分组 动物随机分为6组:假手术组($n=10$),模型组($n=15$),重组微纤维蛋白溶酶(μ -plasmin) $2.5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组($n=12$)、 $5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组($n=11$)、 $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组($n=10$),阳性对照组(rt-PA $5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, $n=12$)。

大鼠 MCAO 模型 实验当天取大鼠静脉血2 mL,放入消毒的小玻璃瓶中,然后分别加入凝血酶($250\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$)、 CaCl_2 ($0.05\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、ADP ($0.2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)各20 μL ,用玻璃棒迅速混匀,用5 mL注射器将血液注入直径3 mm的输血管中^[4,5],于37℃水浴中反应1 h,之后从水浴中取出放置于4℃(2 h),最后用注射器将血栓打入生理盐水中,得到直径为1 mm的栓条,将栓条切成长度和直径均为1 mm大小的栓子,再用生理盐水清洗2次,置于生理盐水中待用。

3%戊巴比妥钠腹腔麻醉($50\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),分离

右侧颈总、颈内、颈外及翼腭动脉。将翼腭动脉及颈外动脉远心端结扎,用动脉夹在颈总动脉分叉处夹闭颈总动脉,用 1 mL 注射器吸入 6 个栓子,通过 5 号针头将血栓由颈外动脉注入,再放开动脉夹,使血流将栓子进一步冲入中动脉,结扎颈外动脉近心端,缝合切口,则模型造好^[6]。假手术组不注入血栓,其他操作相同。整个手术过程使动物体温保持在 (37 ± 0.5) °C。

给药溶栓 造模成功 10 min 后,用 TCI-II 型注射泵进行给药,给药速度为 6.0 mL · h⁻¹, μ-plasm in 组、假手术组、模型组由颈总动脉插入导管至颈内动脉内给药, μ-plasm in 的剂量分别为 2.5、5 及 10 mg · kg⁻¹,假手术组、模型组给予等体积的生理盐水,阳性药 rt-PA 采用临床给药方式,由颈外静脉给药,剂量为 5 mg · kg⁻¹^[6]。

神经功能症状观察及评分 在术后 12 h 观察大鼠的神经功能症状,进行评分^[7]。根据本实验具体标准为 0 分:无异常;1 分:左侧前肢屈曲;2 分:左侧前肢抓力下降;3 分:自发旋转运动;4 分:无法自主行走,需给予一定刺激才能行走;5 分:对外界刺激无反应,意识丧失。

脑梗死体积的测定 神经症状观察完毕后处死大鼠,取大脑,先放入 -20 °C 冷冻 20 min,然后将大脑均匀切成 7 片,每片厚度 2 mm,放入 2% TTC 染液中,37 °C 水浴染色 15 min,染色后正常脑组织呈红色,梗死部分呈白色,福尔马林 (10% 甲醛) 固定 24 h,各组大脑切片用数码相机 (索尼,日本) 拍照,然后用 MPIAS-1000 型多媒体图像分析系统 (北京) 测量脑梗死面积,最后用梗死面积之和乘以每片厚度 (2 mm) 即为脑梗死体积^[8]。

出血时间的测定 分别在栓前以及给药后 15、30 及 60 min 测定出血时间。具体方法^[9]如下,用手术刀片在距尾部尖端 5 mm 处划开一个长 5 mm、深 1 mm 的小口 (不要割破血管),从第一滴血流出开始计时,每隔 15 s 用小片滤纸将血液轻轻吸干,直到出血停止,记录出血时间。

血浆 TT、PT 及 FIB 含量的测定 各组在术后 12 h 静脉取血,置于含有 1/10 体积 0.109 mol · L⁻¹ 枸橼酸钠抗凝液 (1 份抗凝液 + 9 份全血) 的离心管中,轻轻颠倒混匀,2 500 r · min⁻¹ 离心 15 min,取上层血浆。利用 PABER-I 型血凝和血小板聚集测定仪和各试剂盒按试剂盒说明书所示的操作方法测定血浆中 TT、PT 及 FIB 含量。测定 FIB 时先测标准品,然后应用 OriginPro 7.0 软件制作标准曲线,根据

标准曲线计算出 FIB 含量。

ELISA 法检测血清 FDP 含量 各组在术后 12 h 静脉取血,3 000 r · min⁻¹ 离心 15 min,取上层血清。根据 FDP 检测试剂盒说明书所示的操作方法,用酶标仪在 492 nm 处测定吸收度值,再根据标准品的吸收度值应用 OriginPro 7.0 软件制作标准曲线,根据标准曲线计算出 FDP 含量。

统计学分析 实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用 SPSS 11.0 软件包进行单因素方差 (one way ANOVA) 分析,再进一步应用 Dunnett's 检验比较各组组间差异。

结果

1 重组微纤维蛋白溶酶对神经功能缺损评分及死亡率的影响

假手术组动物神经功能均未出现异常,而模型组动物神经功能症状明显,评分可达 4.1 (表 1)。μ-plasm in 各剂量组与模型组比较有显著差异,评分显著降低。模型组动物有 5 只死亡,μ-plasm in 2.5 mg · kg⁻¹ 组有 2 只死亡,5 mg · kg⁻¹ 组有 1 只死亡,10 mg · kg⁻¹ 组没有出现死亡,阳性对照组 (rt-PA 5 mg · kg⁻¹) 有 2 只死亡。结果见表 1。

Table 1 Effect of μ-plasm in on neurological deficit score and mortality at 12 h after administration in MCAO rats

Group	Dose /mg · kg ⁻¹	Survival /n	Death /n	Mortality /%	Neurological deficit score
Sham		10	0	0.0	0.0 ± 0.0
Model		10	5	33.3	4.1 ± 0.7
μ-Plasm in	2.5	10	2	16.7	3.0 ± 0.8**
	5	10	1	9.1	1.9 ± 0.9***
	10	10	0	0.0	1.1 ± 0.6***
rt-PA	5	10	2	16.7	1.5 ± 0.8***

$\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs model group

2 重组微纤维蛋白溶酶对脑梗死体积的影响

假手术组动物脑部未见梗死,模型组脑梗死体积较大,μ-plasm in 各剂量组脑梗死体积显著降低 ($P < 0.001$),并随给药剂量增大而递减,μ-plasm in 10 mg · kg⁻¹ 组梗死体积最小,疗效最好,结果见表 2。

3 重组微纤维蛋白溶酶对脑出血发生率的影响

取脑时观察所有受试动物的脑出血发生率,结果显示假手术组、模型组、μ-plasm in 各剂量组均未

见脑出血,而阳性对照组有2例脑出血,并且死亡。

4 重组微纤维蛋白溶酶对出血时间的影响

与栓前出血时间相比, μ -plasm in各剂量组在给药后15、30及60 min各时间点出血时间均无显著变化,而rt-PA组在给药后各时间点出血时间显著延长,结果见表3。

Table 2 Effect of μ -plasm in on infarct volumes of cerebrum at 12 h after administration in MCAO rats

Group	Dose /mg·kg ⁻¹	Infarct volume /mm ³
Sham		0.0 ± 0.0
Model		346.2 ± 20.4
μ -Plasm in	2.5	205.1 ± 41.4***
	5	146.1 ± 31.1***
	10	75.8 ± 24.6***
rt-PA	5	106.4 ± 22.3***

n = 10, $\bar{x} \pm s$. *** *P* < 0.001 vs model group

Table 3 Effect of μ -plasm in on bleeding time after administration in MCAO rats

Group	Dose /mg·kg ⁻¹	Bleeding time /s			
		Pretreatment	15 min	30 min	60 min
μ -Plasm in	2.5	103 ± 20	102 ± 18	105 ± 21	107 ± 20
	5	106 ± 12	109 ± 11	107 ± 9	108 ± 12
	10	111 ± 23	114 ± 20	113 ± 19	115 ± 19
rt-PA	5	104 ± 7	137 ± 9***	135 ± 7***	137 ± 8***

n = 10, $\bar{x} \pm s$. *** *P* < 0.001 vs pretreatment group

5 重组微纤维蛋白溶酶对 TT、PT及 FIB含量的影响

与假手术组比较,模型组和 μ -plasm in各剂量组的TT、PT均无显著变化,rt-PA组的TT、PT显著延长(表4)。

Table 4 Effect of μ -plasm in on TT, PT and FIB concentration at 12 h after administration in MCAO rats

Group	Dose /mg·kg ⁻¹	TT/s	PT/s	FIB /mg·dL ⁻¹
Sham		36.6 ± 3.5	15.5 ± 3.8	16.5 ± 1.0
Model		36.5 ± 2.4	15.4 ± 1.4	18.6 ± 3.2 [▲]
μ -Plasm in	2.5	37.7 ± 5.4	15.9 ± 1.6	16.3 ± 2.5 [*]
	5	36.6 ± 4.7	16.4 ± 1.0	15.0 ± 2.9 ^{**}
	10	38.3 ± 8.6	14.2 ± 1.0	14.9 ± 2.4 ^{**}
rt-PA	5	115.4 ± 13.8 ^{▲▲▲}	73.4 ± 9.4 ^{▲▲▲}	5.9 ± 0.6 ^{▲▲▲}

n = 10, $\bar{x} \pm s$. [▲] *P* < 0.05, ^{▲▲▲} *P* < 0.001 vs sham group; ^{*} *P* < 0.05, ^{**} *P* < 0.01, ^{***} *P* < 0.001 vs model group

与模型组比较, μ -plasm in各剂量组和rt-PA组的FIB含量显著降低;与假手术组比较, μ -plasm in各剂量组FIB含量有降低趋势,但无显著差异,rt-PA组的FIB含量则显著降低(表4)。

6 重组微纤维蛋白溶酶对 FDP含量的影响

与假手术组比较,模型组FDP含量显著升高;与模型组比较, μ -plasm in各剂量组及rt-PA组的FDP含量均显著升高, μ -plasm in组的FDP含量随剂量的递增而逐渐升高,结果见图1。

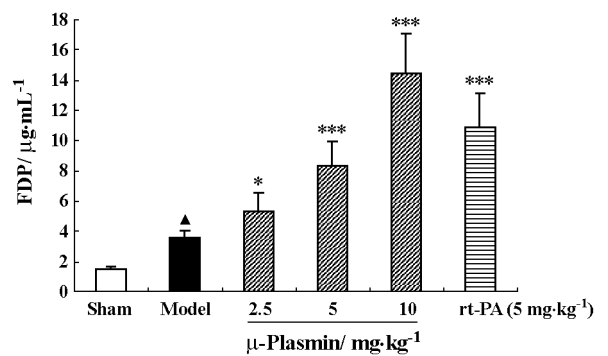


Figure 1 Effect of μ -plasm in on FDP concentration at 12 h after administration in MCAO rats. *n* = 10, $\bar{x} \pm s$. [▲] *P* < 0.05 vs sham group; ^{*} *P* < 0.05, ^{***} *P* < 0.001 vs model group

讨论

研究脑血栓溶栓治疗需要建立稳定的MCAO模型,本实验采用大鼠自体血液加入凝血酶、CaCl₂、ADP,凝血酶和Ca²⁺是凝血过程必需的凝血因子,ADP可以促进血小板聚集和血栓的形成^[10],形成的血栓直接注入脑中动脉,造成MCAO模型,该模型制作简单,能形成稳定的脑中动脉区梗死,模型成功率高,而且血栓不易自溶,是一种用于溶栓研究的较理想的模型。

近些年来随着影像技术以及介入治疗的发展,动脉溶栓越来越受到人们的关注,其中经导管动脉内溶栓是最为常用的方法。经导管动脉内溶栓是将溶栓药物经导管直接注射于血栓近端血管或血栓内进行溶栓,药物用量小,出血反应少。结果显示, μ -plasm in各剂量组均能显著改善栓塞后大鼠的神经功能症状,神经功能缺损评分显著降低,能显著降低脑梗死体积,血清中FDP含量显著升高,并且 μ -plasm in各剂量组的动物死亡率与模型组比较均有所降低, μ -plasm in 10 mg·kg⁻¹组动物无死亡。溶栓治疗最严重的并发症是颅内出血,Adnan等^[11]

临床报道颅内出血发生率平均为 25%,如何降低甚至消除出血反应已经成为当前溶栓疗法的主要研究热点。本实验中 μ -plasmin 各剂量组给药后各时间点出血时间无显著变化,解剖脑部后没有发现脑出血,而阳性药 rt-PA 可显著延长出血时间,解剖脑部后有 2 只出现脑出血; μ -plasmin 各剂量组对 TT、PT 无显著影响,而 rt-PA 可使 TT、PT 显著延长,上述结果说明 μ -plasmin 对纤溶系统和凝血功能无显著影响,而 rt-PA 可引起纤溶系统亢进和凝血功能障碍。纤维蛋白原 (FIB) 是一种大分子糖蛋白 (341 000),其水平升高是血栓形成的重要危险因素^[12]。但另一方面,如果 FIB 水平过低会引起凝血系统障碍,血液黏滞性下降,血管通透性增强,这会增加出血的危险性,可能会导致出血。本实验中 μ -plasmin 各剂量组的 FIB 含量与模型组比较有显著降低,但与假手术组比较无显著差异,说明其含量仍在正常范围内,提示 μ -plasmin 不仅可以降低血浆中的 FIB 含量,有利于溶解血栓,另一方面其下降程度不是很大,又不会增加出血危险性。而 rt-PA 可使 FIB 显著降低,与假手术组比较也有显著差异,增加了发生出血的危险性。

本实验结果显示 μ -plasmin 对大鼠脑中动脉血栓具有很好的溶栓作用,对大鼠急性脑梗死具有治疗作用,而且 μ -plasmin 不会影响纤溶系统和凝血功能,这大大降低甚至可以消除出血反应,安全性可能会优于传统治疗药物 rt-PA。它是通过改变 plasmin 的分子结构得到的,但发挥溶栓作用的活性部位并没有改变,仍与 plasmin 相同,所以根据本实验结果其作用机制可能是直接降解血栓的主要成分纤维蛋白,最终溶解血栓,还可在一定程度上降低纤维蛋白原含量从而抑制血栓形成。因此 μ -plasmin 很有希望成为一种新型的溶栓药物,以此来解决目前溶栓药物应用时出现出血的不良反应,这将会推动溶栓疗法的发展,并会给很多患者带来福音。

References

- [1] Davalos A. Thrombolysis in acute ischemic stroke: successes, failures, and new hopes [J]. *Cerebrovasc Dis*, 2005, 20: 135 - 139.
- [2] Marder VJ, Landskroner K, Novokhatny V, et al. Plasmin induces local thrombolysis without causing hemorrhage: a comparison with tissue plasminogen activator in the rabbit [J]. *Thromb Haemost*, 2001, 86: 739 - 745.
- [3] Nagai N, Demarsin E, Vanhoef B, et al. Recombinant human microplasmin: production and potential therapeutic properties [J]. *J Thromb Haemost*, 2003, 1: 307 - 313.
- [4] Chan KC, Yin MC, Chao WJ. Effect of diallyl trisulfide-rich garlic oil on blood coagulation and plasma activity of anticoagulation factors in rats [J]. *Food Chem Toxicol*, 2007, 45: 502 - 507.
- [5] Li DY, Chen K, Sinha N, et al. The effects of PPAR-gamma ligand pioglitazone on platelet aggregation and arterial thrombus formation [J]. *Cardiovasc Res*, 2005, 65: 907 - 912.
- [6] Lecinana MA, Gutierrez M, Roda JM, et al. Effect of combined therapy with thrombolysis and citicoline in a rat model of embolic stroke [J]. *J Neurol Sci*, 2006, 247: 121 - 129.
- [7] Caso JR, Moro MA, Lorenzo P, et al. Involvement of IL-1 β in acute stress-induced worsening of cerebral ischaemia in rats [J]. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2007, 2: 1 - 7.
- [8] Vakili A, Khorasani MZ. Post-ischemic treatment of pentoxifyline reduces cortical and striatal infarct volume in transient model of focal cerebral ischemia in rat [J]. *Brain Res*, 2007, 1144: 186 - 191.
- [9] Mimura N, Kobayashi K, Nakamura Y, et al. Metabolism of medroxyprogesterone acetate (MPA) via CYP enzymes *in vitro* and effect of MPA on bleeding time in female rats in dependence on CYP activity *in vivo* [J]. *Life Sci*, 2003, 73: 3201 - 3212.
- [10] Kong XY, Gong PL. Effect of phenolic alkaloids of *Menispermum dauricum* on thrombosis and platelet aggregation [J]. *Acta Pharm Sin* (药理学报), 2005, 40: 916 - 919.
- [11] Qureshi AI, Ali Z, Suri MF, et al. Intra-arterial third-generation recombinant tissue plasminogen activator (alteplase) for acute ischemic stroke [J]. *Neurosurgery*, 2001, 49: 41 - 50.
- [12] Ajjan R, Grant PJ. Coagulation and atherothrombotic disease [J]. *Atherosclerosis*, 2006, 186: 240 - 259.