文章编号:1000-5404(2005)21-2111-04

论著

巨噬细胞炎性蛋白4的非融合表达载体的构建和表达

李树钧[1], 钱桂生[1], 戚好文[2], 黄桂君[1] ([1]第三军医大学新桥医院全军呼吸内科研究所,全军呼吸病研究重点实验室,重庆 400037, [2]第四军医大学西京医院呼吸内科, 西安 710032,)

提 要: 目的 探索如何抑制嗜酸性粒细胞的趋化作用,选择β-趋化因子巨噬细胞炎性蛋白4(MIP4)的突变体(Met-MIP4)作为趋化因子受体3的拮抗剂,将Met-MIP4基因在原核细胞中进行非融合表达。**方法** 设计MIP4基因的PCR引物并进行氨基酸突变,将MIP4 N末端的丙氨酸突变为蛋氨酸。以正常人肺cDNA文库为模板,PCR方法获取Met-MIP4基因。克隆入载体pUC19,测序验证序列已得到突变。将正确的基因插入到非融合表达载体pBV220中进行表达。**结果** PCR产物为220 bp左右的片段,连接入pUC19质粒后测序验证获得正确突变。构建的pBV220非融合表达载体在大肠杆菌DH5-α中表达,经Tricine-SDS-PAGE凝胶电泳显示有大小约8×10^3的非融合蛋白表达。**结论** 成功突变并克隆了β-趋化因子MIP4基因。Tricine-SDS-PAGE表明,非融合的Met-MIP4突变体已得到表达,为进一步研究其对哮喘的生物治疗奠定了基础。

关键词: 趋化因子;基因克隆;基因表达;表达载体
中图法分类号: R392.12; R394-33; R394.2 **文献标识码**: A

Expression of mutated β-chemokine macrophage inflammatory protein 4 in pBV220 vector

LI Shu-jun[1], QIAN Gui-sheng[1], QI Hao-wen[2], HUANG Gui-jun[1] ([1]Institute of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, [2]Department of Respiratory Diseases, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

Abstract: Objective To screen for antagonist of eosinophils chemotaxis, the gene encoding for β-chemokine macrophage inflammatory protein 4 (MIP4), a potential antagonist of chemokine receptor 3, was mutated, cloned and expressed in *E. coli*. **Methods** The PCR primers for MIP4 were designed with the alteration of methionine to alanine at N-terminal of MIP4 gene. The coding sequence of Met-MIP4 was amplified with normal adult human lung cDNA library as the template. The interested sequence was cloned into pUC19 cloning vector and sequenced, and then cloned into pBV220 expression vector. The target protein was expressed. **Results** A fragment of about 220 bp was amplified from PCR and the sequencing result indicated that Met-MIP4 gene was properly mutated. The sequence was cloned into pBV220 expression vector. SDS-PAGE gel electrophoresis revealed that the protein of MIP4 about 8×10^3 was correctly expressed in *E. coli*. **Conclusion** The Met-MIP4 gene was properly mutated with the alteration of methionine to alanine at N-terminal. The MIP4 was expressed in *E. coli* and it may serve as a novel antagonist against chemokine receptor 3.

Key words: chemotactic factor; gene cloning; gene expression; expression vector

过敏反应的特征是被激活的嗜酸性粒细胞、Th2细胞滤过到组织,β-趋化因子受体(CC chemokine receptor 3, CCR3)在这个过程中起到主要作用。趋化性细胞因子是一族对各种白细胞亚类具有显著趋化作用的细胞因子,其分子质量一般(8~10)$\times10^3$,可分为CXC和CC两个主要亚家族。趋化性细胞因子受体有7个跨膜片段,受体的胞内侧是与G蛋白耦联的,G蛋白的α和β-亚单位作为信号效应器而激活细胞内的生物学效应。根据配体亚家族,其受体被分为CCR、CXCR、CX_3CR和XCR[1]。CC或β-趋化因子受体CCR3,特异地表达于嗜酸性粒细胞、Th2细胞表面[2],已经在几种动物模型中证明通过同源重组减少eotaxin并用这种配体的抗体或注射受体拮抗剂Met-RANTES可以减少过敏性炎症[3]。我们表达的是一种改型的

作者简介:李树钧(1963-),男,安徽省芜湖市人,博士,副主任医师,副教授,主要从事哮喘和肺癌方面的研究,发表论文10余篇。电话:(023)68755320

收稿日期:2004-11-30;修回日期:2005-04-12

MIP4。与 Met-RANTES 或 Aop-RANTES 相比，Met-MIP4 是一种更强的 CCR3 拮抗剂。这种新型拮抗剂在 1 nmol/L 浓度时能完全抑制嗜酸性粒细胞的趋化活性[4]。而未改型的 MIP4，作为一个 T 细胞趋化剂通过一个未知的受体起作用，也能抑制 CCR3 受体，但作用较弱[5,6]。因而改型的 MIP4 有望成为抗哮喘和其他过敏性疾病的药物。

1 材料与方法

1.1 材料

克隆载体 pUC19，表达质粒 pRSET-A、pBV220 和 *E. coli* JM109，DH5-α 新桥医院全军呼吸内科研究所提供。正常人肺组织由新桥医院胸外科提供。DNA 重组所用各种限制性内切酶、T4 DNA 连接酶 及反转录酶和 PCR 反应系统（*Taq* DNA 聚合酶、dNTP，10×PCR 缓冲液及 $MgCl_2$），购自华美生物工程公司。Trizol 购自 Gibcol 公司。

1.2 方法

1.2.1 正常人肺 cDNA 的获得 首先提取 RNA，取新鲜手术切除肺组织标本 50 mg，置于匀浆器中，加入 1 ml Trizol，冰浴条件下匀浆，匀浆液倒入 1.5 ml 试管中，加入 0.2 ml 氯仿，静置 15 min，4 ℃，12 000×*g*，离心 15 min，取上清加入 0.5 ml 异丙醇，静置 20 min，4 ℃，12 000×*g*，离心 10 min。沉淀重悬于 750 ml/L 乙醇，4 ℃，7 500×*g*，离心 5 min，将其溶于无 RNA 酶水中，紫外分光光度计定量。总 RNA 定量为 0.689 g/L，取 3 μl 模板加入 1 μl oligo dT，70 ℃孵育 5 min，迅速置于冰中，加入 M-MLV 5×buffer 5 μl，10 mmol/L dNTP 1 μl，RNA 酶抑制剂 1 μl，M-MLV 反转录酶 1 μl，加无 RNA 酶水至 25 μl，42 ℃ 60 min，即得 cDNA。

1.2.2 MIP4 突变体基因的扩增 引物设计以文献[4，5]设计两条引物，5′引物引入 *Bam*H Ⅰ酶切，3′引物引入 *Eco*R Ⅰ酶切：P1，5′-CTGGATCCATGCAAGTTGTACCAACAAAGAGC-3′；P2，5′-GGAATTCGGCATTCAGCTTCAGGTCGCTG-3′。

以上述反转录获得的人正常肺组织 cDNA 为模板，PCR 反应条件为 94 ℃变性 5 min，94 ℃ 30 s，54 ℃ 30 s，72 ℃ 1 min，35 个循环，加 72 ℃延伸 7 min。扩增产物用上海华舜 DNA 纯化试剂盒回收纯化。

1.2.3 pUC19 和 MIP4 突变体克隆及序列测定 纯化的扩增产物和 pUC19 质粒用 *Eco*R Ⅰ和 *Bam*H Ⅰ双酶切，T4 DNA 连接酶连接后，转化入大肠杆菌 JM109 中，加入 X-gal，IPTG，挑取白色克隆，用上海华舜试剂盒提取质粒，用 *Eco*R Ⅰ 和 *Bam*H Ⅰ双酶切鉴定，ABI 373 自动测序仪测定 DNA 序列。

1.2.4 原核表达载体 pRSET-Met-MIP4 的构建 pRSET-A 空载体以及测序证实连有 Met-MIP4 的重组 pUC19 质粒经 *Eco*R Ⅰ和 *Bam*H Ⅰ双酶切，回收切下的目的片段与切开的 pRSET A 载体，用 T4 DNA 连接酶连接后，转化入大肠杆菌 JM109（DE3）中，挑取克隆，用上海华舜试剂盒提取质粒，经 *Eco*R Ⅰ 和 *Bam*H Ⅰ 双酶切鉴定获得阳性克隆。

1.2.5 pRSET-Met-MIP4 融合蛋白的表达 重组的 pRSET-Met-MIP4 阳性克隆重新转化大肠杆菌 JM109（DE3）中，于含氨苄青霉素（100 mg/L）的培养基中，37 ℃培养过夜，转接后培养至 A_{600} = 0.5 左右，加入 IPTG（异丙基-D-硫代半乳糖苷）至终浓度为 0.2 mmol/L，24 ℃诱导（为增加可溶性）培养 2 h。常规方法收菌，进行 SDS-PAGE 凝胶电泳观察融合蛋白的表达。

1.2.6 原核非融合表达载体的 MIP4 突变体基因的扩增 以文献重新设计两条引物，5′引物引入 *Eco*RⅠ酶切，3′引物引入 *Sal* Ⅰ酶切：P1，5′-GGAATTCATGCAAGTTGTACCAACAAAGAGC-3′；P2，5′-CAGTCGACTCAGGCATTCAGCTTCAGGTCGCTG-3′。

以连有 Met-MIP4 的重组 pUC19 质粒为模板，PCR 反应条件为 94 ℃变性 5 min，94 ℃ 30 s，54 ℃ 30 s，72 ℃ 1 min，35 个循环，加 72 ℃延伸 7 min。扩增产物用上海华舜 DNA 纯化试剂盒回收纯化。

1.2.7 pUC19 和 MIP4 突变体克隆及序列测定 纯化的扩增产物和 pUC19 质粒用 *Eco*R Ⅰ和 *Sal* Ⅰ双酶切，T4 DNA 连接酶连接后，转化入大肠杆菌 JM109 中，加入 X-gal，IPTG，挑取白色克隆，用上海华舜试剂盒提取质粒，用 *Eco*R Ⅰ和 *Sal* Ⅰ双酶切鉴定，ABI 373 自动测序仪测定 DNA 序列。

1.2.8 原核非融合表达载体 pBV220-Met-MIP4 的构建 pBV220 载体和测序证实连有 Met-MIP4 的重组 pUC19 质粒纯化的 PCR 产物经 *Eco*R Ⅰ和 *Sal* Ⅰ双酶切，回收切下的目的片段与切开的 pBV220 载体用 T4 DNA 连接酶连接后，转化入大肠杆菌 DH5-α 中，挑取克隆，用上海华舜试剂盒提取质粒，经 *Eco*R Ⅰ 和 *Sal* Ⅰ 双酶切鉴定获得阳性克隆。

1.2.9 MIP4 突变体原核非融合表达载体的表达 阳性克隆的剩余部分重新转接含氨苄青霉素（100 mg/L）的培养液中，24 ℃培养至 $D(400)$ = 0.5 左右，42 ℃诱导 4 h，进行小分子肽 Tricine-SDS-PAGE 凝胶电泳[7]。

2 结果

2.1 MIP4 突变体基因扩增

以人正常肺组织 cDNA 为模板，PCR 扩增，所扩增产物在 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳观察，与预期 222 bp 基本一致。

2.2 重组 MIP4 突变体克隆的酶切鉴定

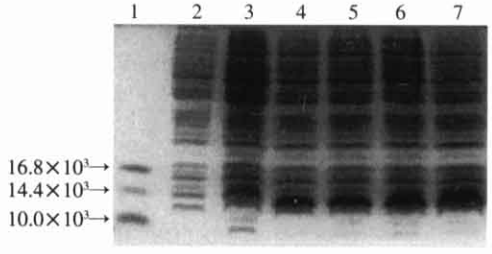
PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳，获得约 220 bp 的片段，胶回收后用 *Eco*R Ⅰ和 *Sal* Ⅰ双酶切，酶切产物连入 pUC19 中，转化入大肠杆菌 JM109，挑取阳性克隆，再次用 *Eco*R Ⅰ和 *Sal* Ⅰ双酶切，得到约 220 bp 的片段。

2.3 重组 MIP4 突变体克隆的序列测定

将获得的阳性克隆经 *Eco*R Ⅰ和 *Sal* Ⅰ双酶切鉴定。应用通用引物测序，所得获基因序列与文献报道相符，第一个氨基酸的编码已获得突变。

2.4 pRSET-Met-MIP4 融合蛋白的表达

用 *Eco*R Ⅰ和 *Bam*H Ⅰ双酶切连有插段的克隆载体 pUC19，琼脂糖凝胶电泳分离，回收目的片段，与相同酶切表达载体 pRSET A 连接，转化入大肠杆菌 JM109（DE3）中。经相同酶切鉴定，获得正确的重组 pRSET-Met-MIP4 表达载体。转化入大肠杆菌 JM109（DE3）中，经 IPTG 于 24 ℃条件下诱导 2 h。常规方法收菌行 SDS-PAGE，电泳结果显示诱导后约 12×10^3 的新生蛋白条带出现（图 1），与预期的蛋白分子质量相近。



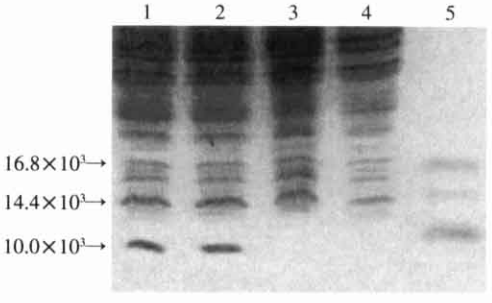
1: Protein marker; 2: pRSET-A vector in *E. coli* induced by IPTG; 3: Expression of fusion protein Met-MIP4 without IPTG induction; 4-7: Expression of fusion protein Met-MIP4 induced by IPTG

图 1　MIP4 突变体原核表达载体 pRSET A 的融合表达

Fig 1　Expression of fusion protein Met-MIP4 in pRSET-A vector on SDS-PAGE

2.5　MIP4 突变体原核非融合表达载体的表达

用 *Eco*R Ⅰ和 *Sal* Ⅰ双酶切纯化的 PCR 产物，琼脂糖凝胶电泳分离，回收目的片段，与相同酶切 pBV220 表达载体连接，转化入大肠杆菌 DH5-α 中。诱导表达后，作 Tricine-SDS-PAGE 蛋白电泳显示约 8×10^3 的新生表达条带（图 2）



1, 2: Expression of protein Met-MIP4 induced by 42 ℃; 3: Expression of protein Met-MIP4 without 42 ℃ induction; 4: pBV220 vector in *E. coli* induced by 42 ℃; 5: Protein marker

图 2　MIP4 突变体原核表达载体 pBV220 的非融合表达

Fig 2　Expression of protein Met-MIP4 in pBV220 on Tricine-SDS-PAGE

3　讨论

我们通过 MIP4 氨基末端的丙氨酸改造为蛋氨酸，成功地突变了 Met-MIP4，通过序列测定，完全符合序列设计。并且成功地进行了融合表达。文献证实 Met-MIP4 是一种强力和特异的 CCR3 拮抗剂，在 1 nmol/L浓度时就能完全阻滞最强力的 CCR3 激动剂 eotaxin 和 MCP4 引起的嗜酸细胞趋化。Met-MIP4 在 1 μmol/L浓度时能完全抑制通过 CCR3 的信号，而不像 Met-RANTES 或 Aop-RANTES 有部分激活受体作用。我们通过合成强力和特异的 CCR3 拮抗剂 Met-MIP4，准备进行进一步的嗜酸细胞功能和通过 CCR3 的信号实验、以及在哮喘动物模型上进行实验。

在 IL-2 和 IL-4 存在的情况下，eotaxin 通过 T 细胞的 CCR3 激活 T 细胞趋化和粘附活性[8]。Eotaxin 还可以通过 ERK2 和 p38 导致嗜酸细胞趋化和脱颗粒[9]，说明 eotaxin 能够明显地影响嗜酸细胞的功能。趋化因子与趋化因子受体结合，引起胞内钙离子浓度的升高，趋化因子 RANTES 诱导 T 细胞内钙离子的双相流动，第 1 峰的出现与 T 细胞的趋化性相关，呈钙离子的短暂增高，第 2 峰钙离子流的释放和保持，其出现与钙离子通道的打开，IL-2 受体的表达，细胞因子的释放和 T 细胞的增殖有关。趋化因子作用于趋化因子受体后偶联的 G 蛋白构型改变激活腺苷酸环化酶，引起 cAMP 水平增高，从而活化 PKA 产生多种效应。利用 cAMP 依赖性 PKA 抑制剂 H-89，可完全阻断 eotaxin 诱导的 T 淋巴细胞的粘附，说明 cAMP 参与其信号传递[10]。而突变的 Met-MIP4 能拮抗 CCR3 受体的活性，阻断其介导的信号途径[11]，抑制过敏性炎性反应。用金刚烷胺抑制病毒的复制来抑制 p38 有丝分裂素活化蛋白（MAP）激酶的活化，使 RANTES 的产生受抑制，因此金刚烷胺可以控制流感病毒引起哮喘恶化[12]。

Thivierge 等[13]研究发现，在缺乏 STAT 6 的小鼠中，IL-13 不能引起哮喘的发生。仅仅在上皮细胞重新构建 STAT-6，足以使 IL-13 诱导 AHR 和黏液过度分泌，说明 IL-13 直接作用于上皮细胞并引起典型的哮喘特征。IL-13 在诱导气道上皮细胞表达 eotaxin 中有很强的作用。Eotaxin 特异地趋化嗜酸性粒细胞到达炎症部位。在 Th2 细胞因子中，IL-13 是诱导 eotaxin 的最有效的细胞因子，它上调 eotaxin 的 mRNA 和蛋白[14]。IL-13 选择性诱导人内皮细胞表达血管细胞粘附分子 1（VCAM-1），这导致了 α4β1 整合素阳性的 T 细胞、单核细胞和嗜酸性粒细胞粘附于血管内皮，接着跨膜、到达炎症部位。

在哮喘气道炎症调控机制中，不同的趋化因子激活不同的细胞与分子途径，以协调方式构成复杂的细胞因子网络。在众多的趋化因子中，迄今只有 eotaxin 被证明具有特异性激活嗜酸性粒细胞作用，对中性粒细胞、巨噬细胞、淋巴细胞等均无活性。因此对 eotaxin 的研究，不仅有助于从嗜酸性粒细胞趋化的角度探讨哮喘特异性气道炎症的本质，亦可能在特异地阻断嗜酸性粒细胞募集的环节上，探讨新的不干预正常的细胞/因子活性的平喘药物[15]。而 eotaxin 的受体正是 CCR3。因此 CCR3 受体拮抗剂 Met-MIP4，不会影响其他细胞的功能，可望成为一类新型高特异性抗过敏药物。

参考文献：

[1] Premack B A, Schall T J. Chemokine receptors: gateways to inflamma-

tion and infection[J]. Nat Med, 1996, 2(11): 1174-1178.
[2] Ponath P D, Qin S, Post T W, *et al*. Molecular cloning and characterization of a human eotaxin receptor expressed selectively on eosinophils [J]. J Exp Med, 1996, 183(6): 2437-2448.
[3] Elsner J, Petering H, Hochstetter R, *et al*. The CC chemokine antagonist Met-RANTES inhibits eosinophil effector functions through the chemokine receptors CCR1 and CCR3[J]. Eur J Immunol, 1997, 27(11): 2892-2898.
[4] Nibbs R J, Salcedo T W, Campbell J D, *et al*. C-C chemokine receptor 3 antagonism by the β-chemokine macrophage inflammatory protein 4, a property strongly enhanced by an amino-terminal alanine-methionine swap[J]. J Immunol, 2000, 164(3): 1488-1497.
[5] Adema G J, Hartgers F, Verstraten R, *et al*. A dendritic-cell-derived C-C chemokine that preferentially attracts naive T cells[J]. Nature, 1997, 387(6634): 713-717.
[6] Hieshima K, Imai T, Baba M, *et al*. A novel human CC chemokine PARC that is most homologous to macrophage-inflammatory protein-1 alpha/LD78 alpha and chemotactic for T lymphocytes, but not for monocytes[J]. J Immunol, 1997, 159(3): 1140-1149.
[7] 蔡在龙,陈世敏,冯伟华,等. 一种改良的分离小分子蛋白质的电泳方法——Tricine-SDS-PAGE[J]. 第二军医大学学报, 1999, 20(9): 696-697.
[8] Jinquan T, Quan S, Jacobi H H, *et al*. Cutting edge: expression of the NF of activated T cells in eosinophils: regulation by IL-4 and IL-5[J]. J Immunol, 1999, 163(1): 21-24.
[9] Shyamala V, Khoja H. Interleukin-8 receptors R1 and R2 activate mitogen-activated protein kinases and induce c-fos, independent of Ras and Raf-1 in chinese hamster ovary cells[J]. Biochemistry, 1998, 37(45): 15918-15924.
[10] Kampen G T, Stafford S, Adachi T, *et al*. Eotaxin induces degranulation and chemotaxis of eosinophils through the activation of ERK2 and P38 mitogen-activated protein kinases[J]. Blood, 2000, 95(6): 1911-1917.
[11] Foster P S, Mould A W, Yang M, *et al*. Elemental signals regulating eosinophil accumulation in the lung[J]. Immunol Rev, 2001, 179: 173-181.
[12] Asai Y, Hashimoto S, Kujime K, *et al*. Amantadine inhibits RANTES production by influenzavirus-infected human bronchial epithelial cells [J]. Br J Pharmacol, 2001, 132(4): 918-924.
[13] Thivierge M, Stankova J, Rola Pleszczynski M. IL-13 and IL-4 up-regulate cysteinyl leukotriene 1 receptor expression in human monocytes and macrophages[J]. J Immunol, 2001, 167(5): 2855-2860.
[14] Kuperman D A, Huang X, Koth L L, *et al*. Direct effects of interleukin-13 on epithelial cells cause airway hyperreactivity and mucus overproduction in asthma[J]. Nat Med, 2002, 8(8): 885-889.
[15] Saeki T, Ohwaki K, Naya A, *et al*. Identification of a potent and nonpeptidyl ccr3 antagonist[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 281(3): 779-782.

(编辑 陈聪连)

(上接2106页)

2.3 溶栓治疗并发症

溶栓200例,轻度出血8例,其中皮下出血3例,牙龈出血3例,鼻腔出血2例。无中、重度出血,经对症处理出血停止。

3 讨论

尿激酶广泛用于临床上治疗脑血栓、心肌梗死、栓塞性脉管炎等致命性疾病。在有条件的国家和地区,已开展院前溶栓治疗[1],以达到防止梗死扩展的目的。在冠状动脉完全闭塞后30 min之内,不管采用什么方法开通闭塞血管,都可阻止心肌梗死的发生。急性心肌梗死症状发生2 h内,是治疗的黄金时间。院前溶栓临床试验汇总分析显示,其溶栓开始时间比入院后溶栓平均提前约1 h,病死率也降低17%[2]。时间是选择再灌注治疗方式的极为重要的因素。溶栓越早,梗死面积越小,特别是2 h内溶栓效果更佳[3],1 h内溶栓再通率最高。病死率可降低40%。

本研究AMI静脉溶栓治疗结果显示,冠脉总再通率73%,溶栓越早,再通率越高;溶栓越晚,再通率越低。即临床所谓的"溶栓治疗的时间性"。因为心肌梗死面积或范围与梗死相关血管完全闭塞的时间有关,梗死相关血管持续闭塞30 min以内,临床表现不稳定性心绞痛。持续闭塞30 min至2 h,梗死只限于心内膜下。持续闭塞2 h以上,梗死可扩展到全层2/3。故AMI后为了溶解血栓,开通闭塞血管,及早静脉溶栓治疗应是临床上主要治疗方法。4周病死率为6.8%。明显低于传统的内科治疗方法。文献[4]指出病死率降低的程度与时间呈非线性关系,症状发作后1 h内溶栓,病死率降低约47%;而2 h后溶栓病死率降低的程度迅速下降到25%左右,并呈平台期持续至12 h。晚期溶栓(6~12 h)也能得益,病死率相对降低25.6%。12 h后溶栓对存活收益不明显。但也有学者认为:只要有持续性胸痛及心电图改变,症状发作后12~24 h也可行溶栓治疗。传统的观点认为心肌梗死时间超过6 h后,不再作为溶栓的适应证。但从实验结果看则不尽然。虽然6 h内溶栓冠脉再通率最高,但发病6~12 h,甚至12~24 h,溶栓仍能降低死亡率,改善预后。

溶栓治疗最严重并发症是出血,颅内出血发生率为0.26%~2.17%,平均为0.39%[5]。因此,尿激素静脉溶栓治疗操作方便、安全,可作为AMI的一种最有效治疗方法之一。

关键词:尿激酶;急性心肌梗死;溶栓治疗
中图法分类号:R542.220.5 文献标识码:B

参考文献:

[1] Bonnefoy E, Lapostolle F, Leizorovicz A, *et al*. Primary angioplasty versus prehospital fibrinolysis in acute myocardial infarction: a randomised study[J]. Lancet, 2002, 360(9336): 825-829.
[2] Morrison L J, Verbeek P R, McDonald A C, *et al*. Mortality and prehospital thrombolysis for acute myocardial infarction: a meta-analysis [J]. JAMA, 2000, 283(20): 2686-2692.
[3] 李为民,范长青,王柱照,等. 心电图QRS计分及ST段计分法对溶栓疗法时间窗口的评价[J]. 中华心血管病杂志, 1998, 26(3): 232-233.
[4] Neuhaus K L, Tebbe U, Gottwik M, *et al*. Intravenous recombinant tissue plasminogen activator (rt-PA) and urokinase in acute myocardial infarction: results of the German Activator-Urokinase Study (GAUS) [J]. J Am Coll Cardiol, 1988, 12(3): 581-587.
[5] 黄德嘉. 急性心肌梗死再灌注治疗策略的选择——欧洲心脏病学会指南导读[J]. 中华心血管病杂志, 2004, 32(3): 195-196.

(编辑 陈聪连)