

人尿激酶原突变体的构建及其特性的研究

The Construction and Characterization of Human Prourokinase Mutant

于永生^{1,2}, 周艳荣², 卢建申², 吴晓洁², 李青旺¹, 邓继先^{2*}

YU Yong-Sheng^{1,2}, ZHOU Yan-Rong², LU Jian-Shen², WU Xiao-Jie², LI Qing-Wang¹ and DENG Ji-Xian^{2*}

1. 西北农林科技大学动物科技学院, 杨凌 712100

2. 军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100071

1. College of Animal Science and Technology, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100, China

2. Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Science, Beijing 100071, China

摘 要 由于人尿激酶原 (pro-UK) 存在凝血酶和纤溶酶原激活剂抑制剂 (PAI-1) 的作用位点, 在生产和治疗过程中容易失去活性。采用 PCR 介导的定点突变技术对 pro-UK 基因进行了突变, 构建了 3 种人 pro-UK 突变体, 分别将蛋白序列中的凝血酶作用位点 Arg¹⁵⁶ 突变成 His¹⁵⁶, 构建成 pro-UKM1; 将 PAI-1 的作用位点 Arg¹⁷⁸、Arg¹⁷⁹、Arg¹⁸¹ 突变为 Lys¹⁷⁸、Lys¹⁷⁹、His¹⁸¹ 构建成 pro-UKM2; 同时将凝血酶和 PAI-1 的作用位点突变构建成 pro-UKM3。分别在 CHO 细胞中获得稳定表达。并对 3 种突变体进行了 SDS-PAGE 纤维蛋白自显影和 Western blot 分析, 证明 3 种细胞表达的 pro-UKM 与天然尿激酶原带型一致, 绝大多数为单链。体外溶栓试验表明, pro-UKM1 对凝血酶有抵抗性, pro-UKM2 对 PAI 有抵抗性, pro-UKM3 能有效抵抗凝血酶和 PAI 的活性抑制。特别是 pro-UKM3 具有开发成新型溶血栓药物的潜力。

关键词 PCR 点突变, 人尿激酶原突变体, 凝血酶, 纤溶酶原激活剂抑制剂

中图分类号 Q813.2 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)04-0573-06

Abstract It is very easy for the pro-UK to lose its biological activity because of the digestion of pro-UK by the thrombin or the inhibition of pro-UK by the PAI-1. So three pro-UK mutant (pro-UK) genes were constructed in this experiment with the PCR point-mutant method. The thrombin cleavage site Arg¹⁵⁶ in pro-UK was mutated into His¹⁵⁶, and named as pro-UKM1; PAI binding sites Arg¹⁷⁸, Arg¹⁷⁹, Arg¹⁸¹ were mutated into Lys¹⁷⁸, Lys¹⁷⁹, His¹⁸¹, named as pro-UKM2; The mutant containing His¹⁵⁶, Lys¹⁷⁸, Lys¹⁷⁹, His¹⁸¹ as pro-UKM3. Three mutants were expressed in CHO cells respectively and analyzed with SDS-PAGE fibrin plate assay and western blot. The results showed that the three mutants and the native pro-UK have the same single electrophoresis band indicating most of the pro-UK was single chain. In vitro plasma clot lysis assays indicated that the pro-UKM1 have the ability to resistant against thrombin digestion; pro-UK2 could resist against PAI inhibition; while pro-UK3 improved resistances against both thrombin and PAI. It looks very promising that the pro-UK3 can be a new medicine of dissolving thrombus.

Key words PCR point-mutant, human pro-urokinase mutant, thrombin, plasminogen activator inhibitor

Received: March 11, 2005; Accepted: April 27, 2005.

This work was supported by a grant from the State 863 High Technology R&D Project of China (No. 2002AA206621).

* Corresponding author. Tel: 86-10-63820026; E-mail: dengjx56@yahoo.com.cn

国家高技术发展计划(863)重大专项(No. 2002AA206621)

人尿激酶原(pro-UK)是一种单链丝氨酸蛋白酶原,由 411 个氨基酸残基组成,分子质量 54kD。pro-UK 的一个突出特征是其具有较高的内在活性,其内在活性比其它丝氨酸蛋白酶原如胰蛋白酶原和胰凝乳蛋白酶原高 10000 倍以上,表现为对人工合成的底物和纤维蛋白溶解酶原(Plasminogen,简称纤溶酶原)的激活作用。pro-UK 作为第二代溶栓药物,可选择性地在纤维蛋白表面活化纤溶酶原,溶解血栓,而对血液中的纤溶酶原、纤维蛋白原和抗纤溶酶原等作用很小,因此在溶栓治疗中出血副作用很小^[1]。

pro-UK 经激肽释放酶(kallikrein)或纤溶酶原激活在 Lys¹⁵⁸-Ile¹⁵⁹ 断开形成双链尿激酶(urokinase, UK)。pro-UK 和 UK 均能激活纤维蛋白溶解酶原(plasminogen,简称纤溶酶原),使之成为纤溶酶(plasmin)纤溶酶可将血栓处的纤维蛋白和其他血浆蛋白降解,因而 pro-UK 和尿激酶均可用于血栓梗塞的治疗。但是尿激酶对纤维蛋白没有选择性,可非特异性地激活血循环中的纤溶酶原,产生较高浓度的游离的纤溶酶,从而产生系统性的纤溶状态,引起出血或中风等副作用。与 UK 相比,pro-UK 的一个显著特征是在低剂量时更具有选择性,在低浓度时它对结合在纤维蛋白表面的纤溶酶原具有激活作用而对游离的纤溶酶原的激活作用很弱。在临床治疗血栓时,为了保证溶栓效果而使用较高的剂量,pro-UK 就丧失了其低剂量时的特异性。

凝血酶(Thrombin)可催化 pro-UK 的 Arg¹⁵⁶-Phe¹⁵⁷ 之间肽键的水解,产生凝血酶断裂型的 UK 双链,该双链仅具有微弱的激活纤溶酶原的活性,并且可有效抵抗纤溶酶对其的活化。研究发现凝血酶具有作用位点专一性,只能水解 Arg/Lys-Xaa 间的肽键^[2]。但到目前位置,未见对凝血酶作用位点突变的文献报道。另外,研究发现,pro-UK 表面可变频环中的许多带正电荷氨基酸残基(R178RHRGCS184)可与 PAI-1 分子中的带负电荷氨基酸残基形成“盐桥”,该盐桥在 pro-UK 与 PAI-1 结合过程中起决定性作用,有研究者用苯甲酰甲醛处理尿激酶原,可导致 Arg 残基改变,研究结果表明改变 4 个 Arg 残基可使衍生物在血浆中最稳定,且具有更高的溶栓活性,推测该 4 个 Arg 残基中有 3 个位于尿激酶原表面的可变频环(R¹⁷⁸RHRGCS¹⁸⁴)中,另外的一个 Arg 残基可能就是 Arg¹⁵⁶^[3]。David 等将 pro-UK Arg¹⁷⁹-Ser¹⁸⁴ 段删除,获得突变体在 PAI-1 存在时仍保存 90% 左右的活

性,但未确定氨基酸的具体位置^[4]。

本试验的目的是为了解决以上问题,对 pro-UK 基因进行改造,获得具有优良溶解血栓作用的 pro-UK 突变体。对天然 pro-UK 的氨基酸序列的第 156 的精氨酸(Arg¹⁵⁶)进行突变为组氨酸(His)称为尿激酶原突变体 1(pro-UKM1);对第 178, 179, 181 位的精氨酸(Arg¹⁷⁸、Arg¹⁷⁹、Arg¹⁸¹)进行突变为 Lys¹⁷⁸、Lys¹⁷⁹、His¹⁸¹ 称为尿激酶原突变体 2(pro-UKM2);还将第 156 和第 178, 179, 181 位的精氨酸(Arg¹⁵⁶、Arg¹⁷⁸、Arg¹⁷⁹、Arg¹⁸¹)位点突变成了 Lys¹⁵⁶、Lys¹⁷⁸、Lys¹⁷⁹、His¹⁸¹, 这一突变体称为尿激酶原突变体 3(pro-UKM3)。分别在中国仓鼠卵巢(CHO)细胞中进行了表达,并对其特性进行了研究。这些突变体可使其对凝血酶和 PAI-1 的抵抗力提高,从而延长 pro-UK 在血浆中的存活时间和降低 pro-UK 的临床使用量。

1 材料与方法

1.1 细胞和试剂

人 pro-UK 全长 cDNA、pro-UK 兔免疫血清和重组人 pro-UK 分别由张正光研究员和胡显文博士惠赠,CHO 细胞由本室保存;各种限制酶和工具酶均购于宝生物工程公司;凝血酶、纤维蛋白原购于中国药品生物制品检定所;脂质体购于 Invitrogen 公司;大肠杆菌感受态 DH5 α 购于天为时代公司;DMEM 培养基、丙酮酸钠、双抗(青霉素与链霉素)溶液均购于 Gibco 公司;其余试剂均为分析纯。

1.2 proUK cDNA 突变体的构建

采用 PCR 介导的定点突变技术进行突变体的构建^[5];序列分析由上海博亚公司完成。

1.3 细胞转染

按照 LipofectamineTM2000 产品说明书,前一天传代 CHO 细胞生长到 60% ~ 80% 的覆盖率时,将脂质体与 DNA 按比例混合,静放 15min 后加入无血清培养基洗过的细胞上,4 ~ 6 h 后补血清到 10%,24h 后转染细胞用于筛选。

1.4 突变体表达产物的测定

纤溶活性检测采用琼脂糖-纤维蛋白溶圈法^[6];抗原性检测采用抗原-抗体中和实验。冷却煮沸的 10 mL 1% 琼脂糖 PBS 溶液至 40℃ 左右,加入 PBS 溶解的牛纤维蛋白原(10mg/mL)和凝血酶(1.68BPU/mL)各 1 mL,混匀,制作琼脂糖-纤维蛋白平板,冷却后采用自制的打孔器进行打孔,每孔内加转染

各突变体的细胞培养上清液 $8\mu\text{L}$ 置于 37°C 湿盒中过夜, 10h 后观察溶圈, 抗原性检测采用抗原-抗体中和实验, 将收集的各导入突变体的细胞培养上清液与兔抗血清混匀, 37°C 处理 30min, 然后采用琼脂糖-纤维蛋白溶圈法检测纤溶活性。

1.5 SDS-PAGE 纤维蛋白自显影分析

按刘世辉^[7]的方法操作。将收集的转染各突变体的细胞培养上清与等体积的蛋白上样缓冲液混匀, 置于 37°C 1h, 然后进行 SDS-PAGE, 电泳结束后, 将胶在 2.5% Triton-100 中轻摇振荡 1h, 用水冲洗后, 在胶上铺上一层纤维蛋白琼脂糖, 置于湿盒中在 37°C 过夜, 观察溶带位置, 与尿激酶原比较。

1.6 Western blot 分析

按常规方法进行。将收集的上清进行还原 SDS-PAGE, 电转移至聚偏氟乙烯膜上, 将膜用 10% 脱脂奶粉的 TBST (50 mmol/L Tris-HCl, 0.15 mol/L NaCl, pH7.5) 液封闭 1h, 再加兔抗 proUK 血清 (1:500) 温育 1h, 充分洗涤后, 将膜置于用 TBST 液稀释为 1:2000 的辣根过氧化物酶标记的二抗中温育 1h, 再次充分洗涤后用化学发光试剂盒检测, X 光片显影。

1.7 凝血酶抵抗力实验

根据张彦斌等^[8]的方法改进。在冰浴上混合 $400\mu\text{L}$ 新鲜人血浆和 $500\mu\text{L}$ 含 1.0bp 单位凝血酶 (牛血的) TNTC 缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl, 0.16 mol/L NaCl, 0.01% Tween-80, 30 mmol/L CaCl_2 , pH7.4), 迅速加入 $100\mu\text{L}$ 不同浓度的 M1 上清, 混匀后用注射

器加入到小试管底部, 每管 $100\mu\text{L}$ 。将小试管置 37°C 温孵 30min。凝块形成后, 编号称重, 小心加入 $100\mu\text{L}$ TNTC 缓冲液, 封口, 于 37°C 保温 12 h, 吸净管中的溶液, 称重, 两次重量之差即为血凝块溶解的量。

1.8 血浆 PAI-1 抗性实验

取心肌梗塞患者血样, 添加枸橼酸钠抗凝, 3 000 r/min 离心 15min 分离血浆, 按 1:10 的比例加入 M3 培养上清, 混合均匀, 记作 M 液。在冰浴上混合 $300\mu\text{L}$ 新鲜人血浆和 $700\mu\text{L}$ TNTC 缓冲液, 迅速混匀后用注射器加入到小试管 (预先称重) 底部, 每管 $100\mu\text{L}$ 。将小试管置 37°C 温孵 30 min。凝块形成后, 小心加入不同剂量的 M 液, 对照管加入等量于实验管所加 M 液中的心肌梗塞病人血浆, 封口, 于 37°C 保温 12 h, 吸净管中的溶液, 对实验管和对照管分别称重, 该重量与空管重量之差为血凝块量, 血凝块重量之差即为血凝块溶解的量。

2 结果

2.1 pro-UK 基因的突变体及其重组表达载体的构建

采用 PCR 介导的定点突变技术构建了 pro-UK 突变体, 在引物 B 和引物 C 合成中将 Arg^{156} 突变成 His^{156} , 在引物 E 和引物 F 合成中将 pro-UK 基因的第 178, 179, 181 位的精氨酸 (Arg^{178} 、 Arg^{179} 、 Arg^{181}) 突变成了 Lys^{178} 、 Lys^{179} 、 His^{181} , 引物序列如表 1、表 2。

表 1 PCR 扩增所用的引物及其序列

Table 1 Primer sequences used for PCR amplification

Primer	Primer sequence
A5'	-CTC GGT ACC ATG AGA GCC CTG CTG GCG CGC -3'
B5'	-CCC AAT AAT CTT AAA GTG GGG CCT CAG AGT CT- 3'
C5'	-AG ACT CTG AGG CCC CAC TTT AAG ATT ATT GGG-3'
D5'	-TCT GAT ATC AGA GGG CCA GGC CAT TCT CTT CC- 3'
E5'	-GT GAC AGA GCC CCC ATG GTG CTT CTT GTA GAT- 3'
F5'	-ATC TAC AAG AAG CAC CAT GGG GGC TCT GTC AC- 3'

表 2 PCR 介导突变的模板与引物

Table 2 Templets and primers of PCR-mediated mutant

Mutant mane	PCR Reaction	
	I	II
pro-UKM1	Templet pro-UK cDNA, Primer A, B	Templet :A/B, C/D; Primer : A, D
	Templet pro-UK cDNA, Primer C, D	
pro-UKM2	Templet pro-UK cDNA, Primer A, E	Templet :A/E, F/D; Primer : A, D
	Templet pro-UK cDNA, Primer F, D	
pro-UKM3	Templet pro-UKM1 cDNA, Primer A, E	Templet :A1/E1, F1/D1; Primer : A, D
	Templet pro-UKM1 cDNA, Primer F, D	

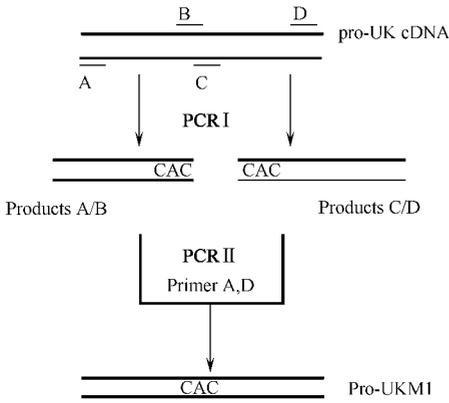


图1 构建 Pro-UKM1 cDNA

Fig.1 The strategy of construction of Pro-UKM1 cDNA

以 pro-UK M1 cDNA 的获得为例介绍各突变体 cDNA 的获得:首先合成含有突变碱基 CAC(编码

His¹⁵⁶)的引物 C 和与其大多数碱基互补的引物 B,以及 pro-UK cDNA 两端互补的引物 A 和 D,再以 pro-UK cDNA 为模板,用 A 与 B、C 与 D 分别进行第一轮 PCR 反应,然后以二者 PCR 产物为模板,A 和 D 为引物进行第二轮 PCR,即获得 pro-UKM1。按表 1 的引物和图 1 的步骤分别获得了突变体 pro-UKM2,以 pro-UKM2 为模板,按表 1 的引物和图 1 的步骤分别获得了突变体 pro-UK M3。再分别采用 *Kpn* I + *Eco*R V 分别酶切突变体和表达载体 pcDNA3.1,回收酶切产物后,二者进行连接,将连接产物转化大肠杆菌感受态 DH5 α ,提取质粒进行酶切鉴定,将酶切鉴定正确的质粒进行突变体的 DNA 序列分析,序列测定结果表明 pro-UK cDNA 发生预期突变,M3 的测序结果见图 2 所示,突变区域位于 744-746、810-821。

File:YUYS_G-1.AB1 Sequence Name:YuYs Run ended:May 28,2004
 750 760 770 780 790 800 800 810 820 820
 :CCCACTTTAAGATTATTGGGGGA GAATTCA CCA C CAT CGA GAA CCA G CCCTGGTTT GCGGCCATCTA CAA GAA GCA CCAT:

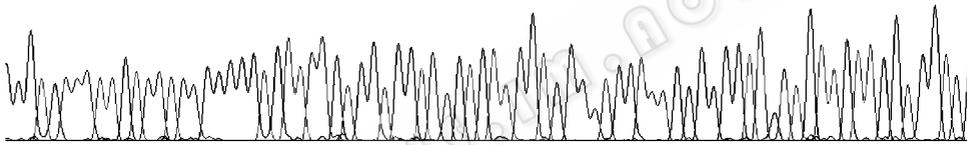


图2 对 Pro-UKM3 突变区域的序列测定

Fig.2 The mutation region of Pro-UKM3

2.2 pro-UK 突变体在 CHO 细胞中的表达

采用脂质体介导的基因转移技术分别将含有 pro-UK 突变体的重组表达质粒转染 CHO 细胞,利用浓度为 800 μ g/mL 的 G418 进行抗性克隆的筛选,将各抗性克隆用 0.25% 胰蛋白酶传至 24 孔板,培养后,收集上清,用琼脂糖-纤维蛋白溶圈法检测活性,挑选高表达孔,将细胞胰酶消化后传至 6 孔板,再培养,再次挑选高表达株细胞,最后以重组 pro-UK 半成品为对照,测定了所获得的各表达突变的细胞培养上清的溶纤维蛋白活性,三种突变体都具有溶纤维蛋白活性(图 3)。

制作琼脂糖-纤维蛋白平板后,采用自制的打孔器进行打孔,一组每孔内加表达株细胞培养上清液 8 μ L,另一组每孔中加经过 pro-UK 抗体于 37 $^{\circ}$ C 处理 30min 的同样细胞培养上清液 10 μ L,同时置于 37 $^{\circ}$ C 湿盒中过夜,10h 后观察溶圈,结果如图 4 所示,所获得的细胞株上清液均产生溶圈,而经过抗 pro-UK 抗体处理过的上清均未产生可见溶解圈。由于培养的细胞密度不同,所表达的尿激酶原的量

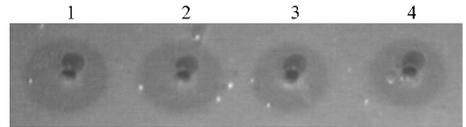


图3 pro-UK 及其突变体的纤维蛋白溶解分析

Fig.3 Fibrin plate assay of pro-UK and its mutants

1: control pro-UK 2: M1; 3: M2 4: M3.

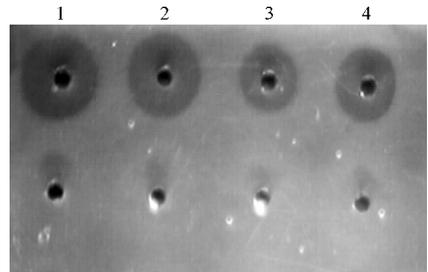


图4 pro-UK 及其突变体的抗原性检测

Fig.4 Assay of pro-UK and its mutant antigenic specificity

1: control pro-UK 2: M1 3: M2 4: M3.

也不同,所以图 4 中溶圈大小不同。以重组 pro-UK 半成品为对照,测定了各突变体的表达量,M1、M2、M3 分别为 100u/mL、50u/mL、70u/mL。为了便于对突

变体的比较,以下的性质分析,统一将其表达量调整到 50u/mL。

2.3 突变体细胞株表达产物的初步性质分析

SDS-PAGE 纤维蛋白自显影分析显示, pro-UK 突变体细胞的表达产物与标准 pro-UK 的电泳带一致,为单一条带。Western blot 分析结果表明,突变体的细胞表达产物在还原条件下,大部分为单一条带,与标准 pro-UK 的电泳带一致,说明表达产物与标准 pro-UK 相同,并以单链形式存在(图 5),未发生大量水解,保持了尿激酶原的分子结构。体外溶栓试验表明, pro-UKM1 可有效抵抗凝血酶对尿激酶原的灭活(图 6);对 PAI-1 抗性鉴定结果显示, pro-UKM2 可有效抵抗 PAI 对尿激酶原溶解纤维蛋白的抑制(图 7); pro-UKM3 可同时抵抗凝血酶和 PAI 对纤溶活性的抑制(图 8)。

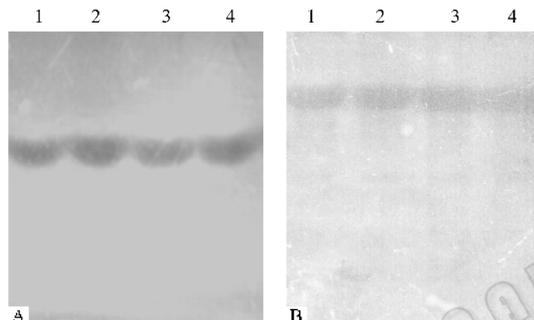


图 5 SDS-PAGE 纤维蛋白自显影分析和 Western blot 检测

Fig.5 Fibrin plate assay after SDS-PAGE(A) and Western blot of purified pro-UK mutant(B)
1 pro-UK 2 M1 3 M2 4 M3.

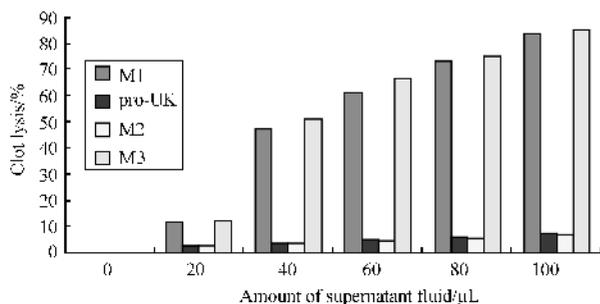


图 6 突变体体外溶解含凝血酶的血凝块

Fig.6 Lysis *in vitro* of human blood clots after inhibition with thrombin

3 讨论

本研究对 pro-UK 基因进行突变改造,以期获得具有优良溶解血栓作用的 pro-UKm,它具有天然 pro-UK 的氨基酸序列,仅是局部某些氨基酸发生变化。

pro-UK 对纤维蛋白有高度特异性和良好的溶

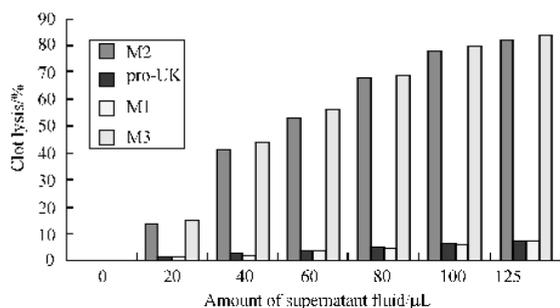


图 7 突变体体外溶解含 PAI 的血凝块

Fig.7 Lysis *in vitro* of human blood clots after inhibition with PAI

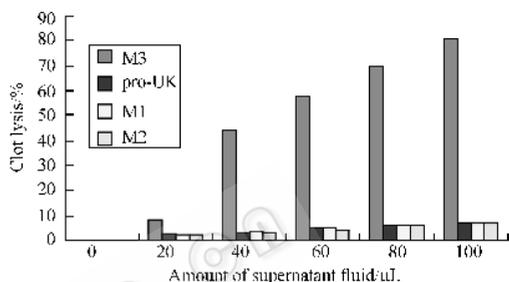


图 8 突变体体外溶解含凝血酶和 PAI 的血凝块

Fig.8 Lysis *in vitro* of human blood clots after inhibition with thrombin and PAI

血栓功能,现正在开发成溶栓新药。但 pro-UK 蛋白结构上存在一些蛋白酶敏感位点,在生产过程中和治疗中显得有些不尽如人意,如在生产培养过程中易降解成尿激酶^[9],失去了对纤维蛋白的选择性。在治疗中受血栓附近高浓度的凝血酶和栓塞病人血液中高浓度的 PAI 作用,使 pro-UK 活性迅速降低,使其半衰期缩短,影响了 pro-UK 治疗血栓的作用,这样就需要增大使用剂量。研究发现凝血酶具有作用位点专一性,只能水解 Arg/Lys-Xaa 间的肽键。新形成的血栓中凝血酶浓度较高,使 pro-UK 活性迅速降低,从而影响了 pro-UK 治疗血栓的效果^[10]。设计凝血酶抗性的突变体 pro-UKM1 的原理是消除该专一位点,将强正电性氨基酸 Arg¹⁵⁶突变为弱正电性 His¹⁵⁶,从而使凝血酶不能水解单链尿激酶原。体外溶栓试验结果表明, M1 的特性符合预期的要求,可以溶解富含凝血酶的血凝块。

pro-UK 的催化活性至少受到 4 种丝氨酸蛋白酶抑制剂的调控,分别是纤溶酶原激活剂抑制剂(plasminogen activator inhibitor, PAI)1、2、3 和微管连接蛋白-1(nexin 1)。其中 PAI-1 是其主要的抑制剂,PAI-1 作用位点是 Arg¹⁷⁸、Arg¹⁷⁹、Arg¹⁸¹。构建 Pro-UKM2 的设想是采用分子生物学手段改造 pro-UK,降低表面可变环的正电荷,防止其与 PAI-1 形成“盐

桥”,从而削弱 PAI-1 对活性的抑制。将 Pro-UKM2 与心肌梗塞患者血浆共孵浴后,Pro-UKM2 仍具有溶解纤维蛋白的能力,验证了我们的最初设想。

这些突变体可使其对凝血酶和/或 PAI-1 的抵抗力提高,从而延长 pro-UK 在血浆中的存活时间和降低 pro-UK 的临床使用量。特别是组合突变体 Pro-UKM3 同时可以抵抗凝血酶和 PAI-1 的灭活,具有进一步研究和发展成新型溶血栓药物的潜力。目前本研究小组正在建立该突变体的多拷贝、高表达的细胞工程株,以对其进行进一步的深入研究。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Petersen LC, Lund LR, Nielsen LS *et al.* One-chain urokinase type plasminogen activator from human sarcoma cells is a proenzyme with little intrinsic activity. *J Biol Chem*, 1988, **263**:11189 - 11195
- [2] Chang JY. Thrombin specificity, requirement for apolar amino acids adjacent to the thrombin cleavage site of polypeptide substrate. *Eur J Biochem*, 1985, **151**:217 - 224
- [3] Moukhametova LI, Aisina RB, Yu LG *et al.* Properties of the urokinase-type plasminogen activator modified with phenylglyoxal. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2002, **28**(4):278 - 283
- [4] Adams DS, Griffin LA, Nachajko WR *et al.* A synthetic DNA

encoding a modified human urokinase resistant to inhibition by serum plasminogen activator inhibitor. *J Biol Chem*, 1991, **266**(13):8476 - 8482

- [5] Wu NH(吴乃虎). The theory of gene engineer(基因工程原理). Beijing: The science press(科学出版社), 2002
- [6] Han SW(韩素文), Yu WY(俞炜源), Li XZ(李秀珍) *et al.* Study on plasminogen activators secreted by various cultured cell. *Bull Acad Mil Med Sci(军事医学科学院院刊)*, 1987, **12**(2):101 - 108
- [7] Liu SH(刘世辉). Studies on tissue-type plasminogen activator mutants: their construction, expression and biological properties. Beijing: Academy of Military Medical Sciences, 1993
- [8] Zhang YH(张彦斌), Xu CF(徐长法). Construction, expression, purification and characterization of a thrombin-activated single-chain urokinase-type plasminogen activator. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology(中国生物化学与分子生物学报)*, 1999, **15**(3):403 - 408
- [9] Gao LH(高丽华), Hu XW(胡显文), Xu ZP(胥照平) *et al.* Stability of u-PA in cell culture supernatant. *Bull Acad Mil Med Sci(军事医学科学院院刊)* 2003, **27**(5):395 - 397
- [10] Han H(韩勃), Li HY(李红云), Zhang SH(张社华). Change of PAI-1 level in patients with coronary heart disease. *Acta Academiae Medicinae Qing Dao Universitatis(青岛大学医学院学报)*, 2000, **36**(2):93 - 94