文章编号：1004-0374(2010)08-0755-06

抗凝血蛋白的抗凝溶栓机制

顾 峰，胡宗利*，陈国平，胡功铃，解巧利
（重庆大学生物工程学院，重庆 400030）

摘 要：自然界中存在着大量具有抗凝溶栓活性的生物大分子，如水蛭素、蚓激酶等。这些生物大分子主要是通过抑制凝血酶及凝血因子活性，水解纤维蛋白或纤溶酶原，或是抑制血小板聚集来达到抗凝溶栓的作用。该文对这些活性物质的抗凝溶栓机制进行综述。

关键词：凝血机制；抗凝血蛋白；抗凝溶栓机制
中图分类号：Q553；R973 **文献标识码：**A

Anticoagulant protein: anticoagulant and thrombolysis mechanism

GU Feng, HU Zong-li*, CHEN Guo-ping, HU Gong-ling, XIE Qiao-li
(College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing 400030, China)

Abstract: Many bioactive substances were obtained from natural sources, such as Hirudin and Lumbrokinase. These bioactive substances have anti-thrombin activities, anti-platelet aggregative activities and fibrinolytic activities. This paper reviews the anticoagulant and thrombolysis mechanism of these anticoagulant proteins.

Key words: blood clotting mechanism; anticoagulant protein; anticoagulant and thrombolysis mechanism

1 凝血、抗凝和纤溶机理

1.1 凝血机理

当体内抗凝纤溶系统功能逐渐降低，血液中凝血与抗凝血功能失去平衡时则出现凝血，即血栓(图1)。凝血是一系列凝血因子相继被酶解激活，最终形成血凝块的过程。整个过程涉及许多凝血因子，迄今为止，共发现有12个经典的凝血因子(coagulation factor, F)(FI~FV, FVII~XIII)和2个激肽系统因子，即激肽释放酶原(prekallikrein, PK)与高相对分子质量激肽原(high molecular weight kininogen, HMWK)直接参与凝血过程的级联反应(表1)。

凝血过程的激活有三条途径：第一是内源性途径。当血管壁损伤时，内皮下组织成分(胶原等)暴露，使XII因子(FXII)激活成XIIa因子(FXIIa)，进而激活激肽释放酶原使其转变为激肽释放酶(Kallikrein, K)，后者与HMWK又可反馈激活FXII，同时，激活XI因子(FXI)，经过一系列级联反应激活X因子(FX)，使之变成Xa因子(FXa)。现研究认为，起始凝血酶也可直接激活FXI，使其变成FXIa。第二是外源性途径。当组织和血管损伤后，

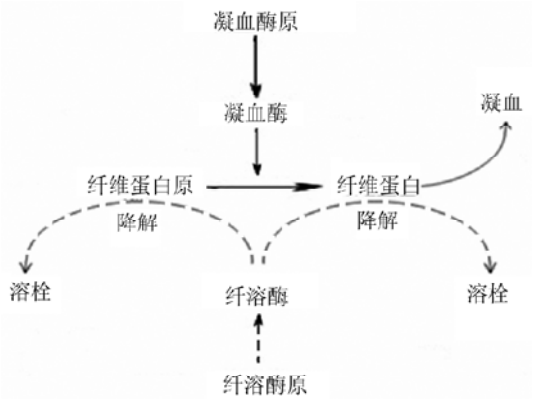

图1 人体凝血与抚凝溶栓平衡系统
注：实线为凝血途径，虚线为抗凝纤溶途径

收稿日期：2010-03-11；**修回日期：**2010-04-11
基金项目：重庆市攻关项目(CSTC, 2009AB5174)；教育部春晖计划(Z2008-1-63004)；重庆大学研究生创新团队建设项目(200909B1007)
***通讯作者:** E-mail: huzongli@cqu.edu.cn

表1 凝血因子种类及功能

因子	同义名	功能
FI	纤维蛋白原	最终底物
FII	凝血酶原	蛋白酶原
FIII	组织因子	辅因子
FIV	Ca^{2+}	辅因子
F V	前加速素	辅因子
FVII	前转变素	蛋白酶原
FVIII	抗血友病因子	辅因子
F IX	血浆凝血激酶	蛋白酶原
F X	Stuart-Prower因子	蛋白酶原
FXI	血浆凝血激酶前质	蛋白酶原
FXII	接触因子	蛋白酶原
FXIII	纤维蛋白稳定因子	转谷氨酰胺酶原
P K	激肽释放酶原	蛋白酶原
H M W K	高相对分子质量激肽原	辅因子

释出组织因子(tissue factor,TF)与VII因子(F VII)或激活的VIIa(F VIIa)形成复合物，从而激活FX和F IX。第三是凝血共同途径。激活的FXa 与PF3、Ca^{2+}、Va 因子(FVa)形成凝血酶原酶。凝血酶原酶使凝血酶原转变为凝血酶。凝血酶使纤维蛋白原转变为可溶性纤维蛋白单体，同时，激活X III因子(FX III)从而使可溶性纤维蛋白单体发生分子交联，形成不溶性稳定的纤维蛋白(fibrin,Fb)，即凝血[3]。

此外，血小板的黏附、释放、聚集、收缩和吸附凝血因子也是凝血过程的起始和促进因素，当血管局部受损伤时，血小板促进血栓形成(图2)[4,5]。

1.2 抗凝机理

为确保机体内的凝血作用保持适度，血浆及血管内皮和其他组织中存在着许多抗凝物质，它们通过抑制或灭活凝血因子的活性达到抵御血液凝固的目的。关键的抑制物包括：(1)抗凝血酶，也叫抗凝血酶III(antithrombin III,AT-III)和肝素。抗凝血酶能抑制凝血酶、FXa 和其他活化的凝血因子，在血管内壁受损时，肝素与抗凝血酶能改变抗凝血酶的空间构象，使得其更易于接近靶酶。此外，肝素辅因子II也能灭活凝血酶和FXa。(2)蛋白C 系统，包括蛋白C 、蛋白S 、凝血酶调节蛋白(thrombomodulin)、活化蛋白C 抑制物(activated protein c inhibitor，APCI)、蛋白Z。在凝血酶与凝血酶调节蛋白所形成的复合物作用下，蛋白C 被激活并与蛋白S 协同，降解和灭活FVa、FVIIIa。并且活化蛋白C 能促使内皮细胞释放纤溶酶原激活物，激活纤溶系统，从而发挥抗凝血和促纤溶作用。同时，活化蛋白C 也受活化蛋白C 抑制物的抑制。(3)组织因子途径抑制物(tissue factor pathway inhibitor，TFPI)。TFPI是组织因子(TF)的生理抑制剂，有两种同族异形体即TFPI-1 和TFPI-2。前者有抑制TF-FVIIa复合物和FXa的作用，后者有抑

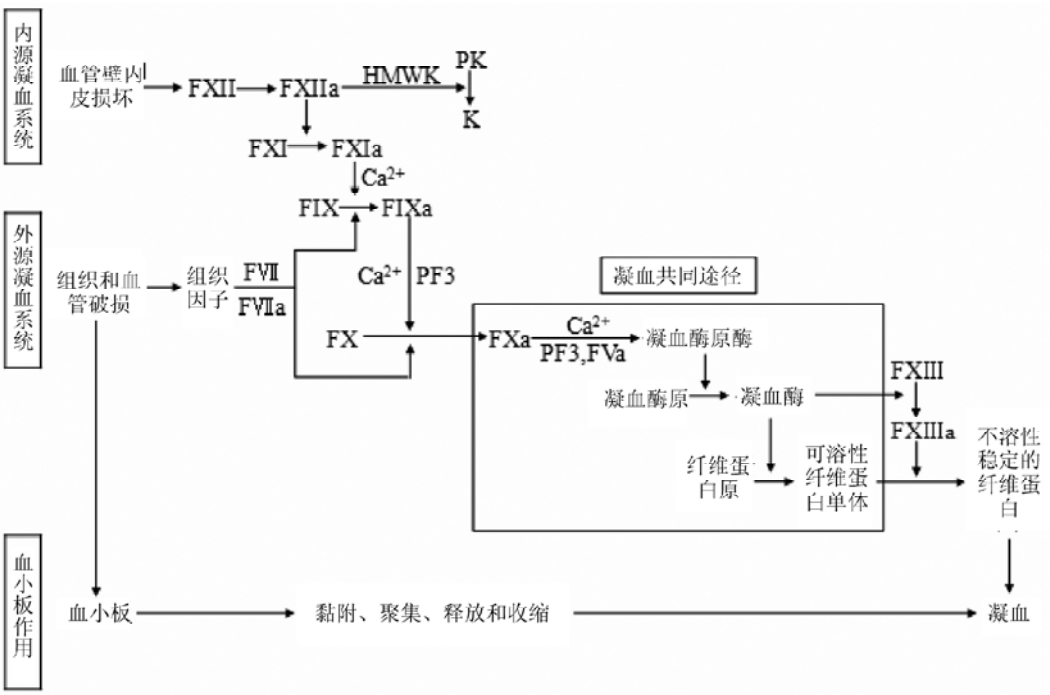

图2 人体凝血激活系统

制其他丝氨酸蛋白酶和胰蛋白酶等的作用[6-8]。

1.3　纤溶机理

血液中除了有抗凝系统之外还存在纤溶系统。所谓纤溶系统，是指能将血液凝固产生的纤维蛋白重新溶解的系统，主要由下列成分组成：(1)纤溶酶原激活剂(plasminogen activator,PA)；(2)纤溶酶原(plasminogen,PLG)和纤溶酶(plasmin,PL)；(3)纤溶抑制剂(fibrinolyticinhibitor)；(4)纤维蛋白(原)降解产物。纤维蛋白溶解过程分为两个基本过程，即纤维蛋白酶原激活和纤维蛋白溶解[9,10]。

2　抗凝溶栓蛋白的种类和作用机理

除了血浆中的抗凝溶栓物质以外，自然界中还存在大量具有抗凝溶栓功能的活性物质。近年来，随着基因工程技术和单克隆抗体技术的发展，对这些活性物质的基因重组、生物表达等成为研究的热点，部分已经成为临床用药。尽管这些抗凝溶栓物质的来源、分子性质和结构差别很大，但它们的抗凝溶栓作用都集中表现为以下三个方面：抑制凝血酶和凝血因子活性、溶解纤维蛋白(原)以及抑制血小板的凝聚。

2.1　凝血酶和凝血因子抑制剂

凝血酶在凝血过程中起着中心作用，主要体现在：(1)将纤维蛋白原转变成纤维蛋白；(2)激活因子V、VIII及XI；(3)刺激血小板反应；(4)激活血管内皮细胞。因此，凝血酶抑制剂是调节凝血过程的有效工具。凝血酶有4个结合位点：纤维蛋白结合位点、非活性底物识别位点、酶活性中心和肝素结合位点[11,12]。

2.1.1　水蛭素(hirudin)及其衍生物

水蛭素是从医用水蛭中提取的一种抗凝蛋白肽类物质。1884年，欧洲的John Haycraft博士发现欧洲医用水蛭会分泌出某种阻止血液凝结的物质以利于水蛭吸食血液消化。1955年Markwardt首先从水蛭唾液腺中分离出这种蛋白物质，并命名为水蛭素。水蛭素是一条含65个氨基酸的单链多肽，相对分子质量为7 k。水蛭素分子的N末端有三对二硫键(Cys6-Cys14、Cys16-Cys28、Cys32-Cys39)，使N末端肽链绕迭成密集的环肽结构，对蛋白结构起稳定作用。其N末端含活性中心，能识别底物即凝血酶碱性氨基酸富集位点，并与之结合。C末端有6个为酸性氨基酸。水蛭素肽链中部还有一个由Pro-Lys-Pro组成的特殊序列，不被一般蛋白酶降解，从而维持水蛭素分子的稳定性，并引导水蛭素分子以正确的方向与凝血酶分子结合[13,14]。水蛭素是一种凝血酶特异性抑制剂，它作用于凝血酶中非活性底物识别位点和酶活性中心两个位点，与凝血酶1∶1结合形成复合物。这种特异性的结合是一个二相的过程，水蛭素C末端的酸性氨基酸与凝血酶的碱性部位结合，封闭凝血酶的非活性底物识别位点，使凝血酶构型发生轻微改变，进而水蛭素N末端与凝血酶的酶活性中心结合，从而抑制了凝血酶的催化活性[15]。由此对凝血酶产生机制起负反馈作用，阻断凝血过程的级联反应，抑制凝血酶诱导的血小板活性。水蛭素除了与血浆中游离的凝血酶结合外，还能中和与纤维蛋白结合的凝血酶。因此，水蛭素能高效抗凝血，并防止凝血酶催化的凝血因子活化及血小板反应等。

比伐卢定(bivalirudin)是一种半合成的、含20个氨基酸的凝血酶二价抑制剂，它对凝血酶的抑制是直接的、特异的和可逆的。比伐卢定的结构为：四肽D-Phe-Pro-Arg-Pro(凝血酶活性中心结合区)+四个甘氨酸(连接区)+水蛭素C端十二肽类似物(凝血酶纤维蛋白结合位点结合区)。比伐卢定与水蛭素一样，也能同凝血酶结合形成1∶1复合物，但它抑制凝血酶活性的作用较为短暂，因为一旦结合，凝血酶就劈开比伐卢定N端的Pro-Arg键，从而大大降低了其对凝血酶的抑制。比伐卢定比水蛭素更安全、有效，应用范围更广泛，这可能就与它只能短暂抑制凝血酶的活性有关。临床研究证实，采用同样导管插入术，比伐卢定与肝素相比，降低了局部缺血和出血并发症的风险，该风险的降低即使在高危患者中仍然显著[16,17]。

2.1.2　线虫抗凝肽(nematode anticoagulant peptide, NAP)

线虫抗凝肽是一系列小分子非酶性多肽类物质，分离自犬钩口线虫(*Ancylostoma caninum*)成虫体内。20世纪80年代初期，Hotez等就发现钩口线虫的头腺分泌的蛋白水解酶能将纤维蛋白原降解为5个小的多肽片断，抑制人体血浆凝固，促进纤维蛋白凝块的溶解[18]。1993年从犬钩虫中分离出首个抗凝血肽，其后证实该抗凝血肽可显著延长凝血酶原时间(PT)和活化部分凝血酶原激酶时间(APTT)，其延长PT比重组蜱抗凝肽rTAP和重组水蛭素rHIR更有效，由此被认为是最有效的天然抗凝血分子之一[19]。研究表明，犬钩口线虫分离的抗凝

物质包括一系列小分子多肽，约为75～85个氨基酸，拥有22%的共同序列，将其命名为钩虫抗凝肽(ancylostoma caninum anticoagulant peptide,AcAp)或线虫抗凝肽(nematode anticoagulant peptide,NAP)[20]。目前已发现的NAP家族成员主要包括NAP1、NAPc2、NAPc3、NAPc4、NAP5、NAP6、NAP7等。其中NAP1、NAP5、NAP6为直接凝血酶抑制剂(DTI)，NAPc2为组织因子途径抑制剂(TFPI)，对NAPc3、NAPc4和NAP7的研究较少，其抗凝机制尚不清楚[21,22]。线虫抗凝肽及其重组产物具有明显的抗凝血作用，其抗凝效应已引起人们的重视并探讨应用于临床实践，rNAPc2和rNAP5的临床或临床前试验表明它们具有广阔的应用前景。在欧洲和美国，rNAPc2作为一种凝血因子Xa的间接抑制剂已进入临床试验阶段[23-26]。NAP5已经通过Beagle犬动、静脉血栓症模型证实其抗凝效果具有剂量依赖性，部分凝血酶原时间和活化凝血时间随NAP5剂量的增加而延长[27-28]。NAP5由77个氨基酸组成，相对分子质量为8.7 k，含10个半胱氨酸，形成5对二硫键(C6-C50、C15-C42、C21-C37、C25-C69、C50-C63)，二硫键决定其二级结构，从而决定其生物活性。NAP5是Xa因子的高效特异性抑制剂，与Xa的反应区域在37~42位氨基酸(即-C-R-S-R-G-C-)，作用位点在第40和41位氨基酸之间[23,29]。可选择性地直接与凝血因子X/Xa的活性位点结合来抑制其活性，具有丝氨酸蛋白酶抑制剂作用，可100%抑制Xa的活性，最终抑制凝血酶原酶的形成,具有良好的临床应用前景[24,27]；但是线虫抗凝肽只能作用于凝血过程中凝血酶原激活过程的某些因子或途径，而对已经存在的凝血酶的凝血作用无能为力。

2.2 纤溶酶原和纤维蛋白为底物的抗凝剂

2.2.1 蚓激酶(lumbrokinase,LK)

蚓激酶是从蚯蚓体内分离出的一组具有溶解纤维蛋白及激活纤溶酶原作用的丝氨酸蛋白酶，也称蚯蚓纤溶酶(earthworm fibrinolytic enzymes,EFE)。1983年由日本Mihara等首次从粉正蚓中提取出，至今已从不同种类蚯蚓体内提纯出多种具有此活性的蛋白组分[30]。蚓激酶与纤维蛋白具有特殊亲和力，不仅水解富含纤溶酶原的纤维蛋白，还可以水解不含纤溶酶原的纤维蛋白，使纤维蛋白迅速降解；还可以水解纤维蛋白原。而且能间接激活纤溶酶原形成纤溶酶，同时刺激血管内皮细胞释放t-PA，增强t-PA活性，并水解凝血因子I，抑制血小板聚集[31]。有研究认为蚓激酶对凝血过程的影响仅表现为对内、外源性凝血系统的后期阶段起作用，其对凝血因子II、V、VII、VIII、IX、XI、XII无明显影响，但对纤维蛋白原(凝血因子I)的水平有显著影响[32]。药理学研究证实蚓激酶是一类具有强烈溶栓、抑制血栓形成的蛋白酶，毒副作用很小，极具开发价值。

1995年，蚓激酶经国家卫生部批准生产，以其降低血液黏稠度、减少血小板聚集、改善微循环、体内外良好的溶栓抗凝作用且不良反应小的优势，已大量应用于临床，治疗多种血栓性疾病，并取得较好的疗效。

2.2.2 纳豆激酶(nattokinase,NK)

纳豆激酶是由纳豆菌产生的一种具有强烈溶栓功能的蛋白酶，是一种枯草杆菌蛋白酶。1987年，日本学者须见洋行等首先发现纳豆中有一种具有强纤溶作用的蛋白酶，后定名为纳豆激酶。纳豆激酶是一种碱性丝氨酸蛋白酶，由275个氨基酸残基组成，呈单链结构，无二硫键。活性部位在Asp32、 His64和Ser221处，与底物的结合部位在Ser125、Leu126和Gly127处。具有底物专一性，最敏感的底物是血浆纤溶酶的底物，对凝血酶底物和激肽释放酶底物也有一定作用，说明纳豆激酶有其特异的蛋白水解作用和识别位点[33-35]。纳豆激酶对纤维蛋白尤其是交联形式的纤维蛋白很敏感，作为一种丝氨酸蛋白酶，可将交联纤维蛋白直接水解成小肽和氨基酸发挥溶栓作用。研究表明纳豆激酶的纤溶活性是纤维蛋白溶酶的4倍[36,37]。体外实验中，把酶提取液滴加到纤维蛋白平板上，短时间内即可出现透明的溶解圈，溶栓效果显著；体内实验中，纳豆激酶对兔血液凝固系统的影响，显示纳豆激酶显著降低兔血液中纤维蛋白原含量，表明其有直接降解血栓的作用。纳豆激酶同时还可促进血管内皮细胞产生组织型纤溶酶原激活剂(t-PA)，t-PA催化纤溶酶原转变成纤溶酶，以使积累的纤维蛋白或血栓溶解[38]。

2.3 血小板聚集抑制剂

在血液凝固过程中，血小板提供的富含丝氨酸磷脂蛋白，使得凝血过程中的一系列反应得以进行。它对凝血因子和Ca^{2+}有较强的亲和力，为凝血酶原的激活提供了极为有利的条件，促进血液进一步凝固。

RGD肽是一种血小板膜糖蛋白GP Ⅱb/IIIa 受体拮抗剂，是含有精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(Arg-Gly-Asp)序列的短肽，是细胞外基质和血液中多种粘附蛋白所共有的细胞粘附识别位点[39]。血小板膜糖蛋白GP IIb/IIIa复合物在血小板活化后形成黏附分子受体，其能识别纤维蛋白原配体上的RGD序列而与纤维蛋白原结合，是血小板聚集和血栓形成的最后共同通路。利用RGD肽竞争性地阻断GP IIb/IIIa 与纤维蛋白原的结合，从而抑制血小板的聚集，是防治血栓性疾病的一种有效手段。RGD肽临床上显示了良好的抗血小板活性。RGD肽只有三个氨基酸，非常容易在体内降解，所以一般人们都将其与其他多肽相互融合以发挥其强大功能。国内通过基因工程合成的含RGD 多肽也具有显著的抗血小板聚集作用[40,41]。1991年，Church等[40]用化学合成的方法将RGD序列与hirudin53-64进行连接，得到嵌合肽RGD-hirudin53-64,其中hirudin53-64即水蛭素C末12肽(hirugen)，为水蛭素最小的活性单位。结果表明，嵌合肽具有抗凝和血小板功能[42]。

3　展望

传统止血中药的研究已经有了几千年的历史，但抗凝溶栓蛋白的临床应用才几十年。大自然中存在着大量的抗凝溶栓活性物质，但提取的工艺复杂，成本高昂，原料来源有限，所以通过分子生物学与基因工程技术的手段来获得这些活性物质显得尤为重要。目前为止，蛋白药物研究者已经从水蛭、蚯蚓、毒蛇等生物体内克隆出很多抗凝溶栓蛋白的cDNA，进行了生物表达和活性检测，并且很多重组多功能蛋白也被成功的表达。理想的抗凝溶栓药物应该具有安全有效、特异性强、半衰期长、复发率低、无出血等副反应、价格合理等特点，相信随着分子生物学与基因工程技术的不断完善，会有更多安全有效的抗凝溶栓重组蛋白，新型抗凝溶栓蛋白药物的开发和研制有着很大的空间和潜力。

[参　考　文　献]

[1] Verstraete M. Third-generation thrombolytic drugs. Am J Med, 2000, 109(1): 52-8

[2] Zavalova LL, Basanova AV, Baskova IP. Fibrinogen-fibrin system regulators from bloodsuckers. Biochemistry: Mosc, 2002, 67(1): 135-42

[3] Harker LA, Hanson SR, Kelley AB. Antithrombotic strategies targeting thrombin activities, thrombin receptor sand thrombin generation. Thromb Haemost, 1997, 78(1): 736-41

[4] Madan M, Berkowitz SD, Tcheng JE. Glycoprotein IIb/IIIa integrin blockade. Circulation, 1998, 98(23): 2629-35

[5] Zokai K, Piazolo L, Harenberg J. Effect of thrombin inhibitors and a glycoprotein IIb/IIIa receptor antagonist in an ex vivo human experimental thrombosis model. Semin Thromb Hemost, 2001, 27(5): 531-6

[6] Abildgaard U. Antithrombin—early prophecies and present challenges. Thromb Haemost, 2007, 98(1): 97-104

[7] Gale AJ, Griffin JH. Characterization of a thrombomodulin binding site on protein C and its comparison to an activated protein C binding site for factor Va. Proteins, 2004, 54(3): 433-41

[8] Chand HS, Foster DC, Kisiel W. Structure, function and biology of tissue factor pathway inhibitor-2. Thromb Haemost, 2005, 94(6): 1122-30

[9] Sidelmann JJ, Gram J, Jespersen J, et al. Fibrin clot formation and lysis: basic mechanisms. Semin Thromb Hemost, 2000, 26(6): 605-18

[10] Samson AL, Medcalf RL. Tissue-type plasminogen activator: a multifaceted modulator of neurotransmission and synaptic plasticity. Neuron, 2006, 50(5): 673-8

[11] Kikelj D. Peptidomimetic thrombin inhibitors. Pathophysiol Haemost Thromb, 2003/2004, 33(5-6): 487-91

[12] Bode W. Structure and interaction modes of thrombin. Blood Cells Mol Dis, 2006, 36(2): 122-30

[13] Wallis RB. Hirudins: from leeches to man. Semin Thromb Hemost, 1996, 22(2): 185-96

[14] Koh CY, Kini RM. Molecular diversity of anticoagulants from haematophagous animals. Thromb Haemost, 2009, 102(3): 437-53

[15] Agnelli G, Pascucci C, Cosmi B, et al. The comparative effects of recombinant hirudin and standard heparin on thrombus growth in rabbits. Thromb Haemost, 1990, 63(2): 204-7

[16] Bittl JA, Feit F. A randomized comparison of bivalirudin and heparin in patients undergoing coronary angioplasty for postinfarction angina. Hirulog Angioplasty Study Investigators. Am J Cardiol, 1998, 82(8B): 43-9

[17] Simsir SA, Schwarz ER, Czer LS, et al. Heart transplantation using bivalirudin as anticoagulant. Interact Cardiovasc Thorac Surg, 2010, 10(1): 150-1

[18] Cappello M, Clyne LP, McPhedran P, et al. Ancylostoma factor Xa inhibitor: partial purification and its identification as a major hookworm-derived anticoagulant *in vitro*. J Infect Dis, 1993, 167(6): 1474-7

[19] Cappello M, Vlasuk GP, Bergum PW, et al. Ancylostoma caninum anticoagulant peptide: a hookworm-derived inhibitor of human coagulation factor Xa. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92(13): 6152-6

[20] de Pont AC, Moons AH, de Jonge E, et al. Recombinant nematode anticoagulant protein c2, an inhibitor of tissue factor/factor VIIa, attenuates coagulation and the interleukin-10 response in human endotoxemia. J Thromb Haemost, 2004, 2(1): 65-70

[21] de Jonge E, Friederich PW, Vlasuk GP, et al. Activation of coagulation by administration of recombinant factor VIIa elicits interleukin 6 (IL-6) and IL-8 release in healthy human subjects. Clin Diagn Lab Immunol, 2003, 10(3): 495-7

[22] Stassens P, Bergum PW, Gansemans Y, et al. Anticoagulant repertoire of the hookworm Ancylostoma caninum. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(5): 2149-54
[23] Harrison LM, Nerlinger A, Bungiro RD, et al. Molecular characterization of Ancylostoma inhibitors of coagulation factor Xa. Hookworm anticoagulant activity *in vitro* predicts parasite bloodfeeding *in vivo*. J Biol Chem, 2002, 277(8): 6223-9
[24] Mieszczanek J, Harrison LM, Vlasuk GP, et al. Anticoagulant peptides from Ancylostoma caninum are immunologically distinct and localize to separate structures within the adult hookworm. Mol Biochem Parasitol, 2004, 133(2): 319-23
[25] Lee A, Agnelli G, Büller H, et al. Dose-response study of recombinant factor VIIa/tissue factor inhibitor recombinant nematode anticoagulant protein c2 in prevention of postoperative venous thromboembolism in patients undergoing total knee replacement. Circulation, 2001, 104(1): 74-8
[26] Weltermann A, Kyrle PA, Eichinger S. Novel anticoagulants for the prevention and treatment of venous thromboembolism. Wien Med Wochenschr, 2003, 153(19-20): 426-33
[27] Rebello SS, Blank HS, Lucchesi BR. Antithrombotic efficacy of single subcutaneous administration of a recombinant nematode anticoagulant peptide (rNAP5) in a canine model of coronary artery thrombolysis. Thromb Res, 2000, 98(6): 531-40
[28] Duggan BM, Dyson HJ, Wright PE. Inherent flexibility in a potent inhibitor of blood coagulation, recombinant nematode anticoagulant protein c2. Eur J Biochem, 1999, 265(2): 539-48
[29] Théroux P. Inhibition of the platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor with tirofiban in unstable angina and non-Q-wave myocardial infarction. Platelet Receptor Inhibition in Ischemic Syndrome Management in Patients Limited by Unstable Signs and Symptoms (PRISM-PLUS) Study Investigators. N Engl J Med, 1998, 338(21): 1488-97
[30] Mihara H, Sumi H, Yoneta T, et al. A novel fibrinolytic enzyme extracted from the earthworm, Lumbricus rubellus. Jpn J Physiol, 1991, 41(3): 461-72
[31] Ryu GH, Park S, Kim M, et al. Antithrombogenicity of lumbrokinase-immobilized polyurethane. J Biomed Mater Res, 1994, 28(9): 1069-77
[32] Chen H, Takahashi S, Imamura M, et al. Earthworm fibrinolytic enzyme: anti-tumor activity on human hepatoma cells *in vitro* and *in vivo*. Chin Med J: Engl, 2007, 120(10): 898-904
[33] Sumi H, Hamada H, Tsushima H, et al. A novel fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese Natto; a typical and popular soybean food in the Japanese diet. Experientia, 1987, 43(10): 1110-1
[34] Fujita M, Hong K, Ito Y, et al. Transport of nattokinase across the rat intestinal tract. Biol Pharm Bull, 1995, 18(9): 1194-6
[35] Fujita M, Nomura K, Hong K, et al. Purification and characterization of a strong fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese natto, a popular soybean fermented food in Japan. Biochem Biophys Res Commun, 1993, 197(3): 1340-7
[36] Suzuki Y, Kondo K, Matsumoto Y, et al. Dietary supplementation of fermented soybean, natto, suppresses intimal thickening and modulates the lysis of mural thrombi after endothelial injury in rat femoral artery. Life Sci, 2003, 73(10): 1289-98
[37] Suzuki Y, Kondo K, Ichise H, et al. Dietary supplementation with fermented soybeans suppresses intimal thickening. Nutrition, 2003, 19(3): 261-4
[38] Gong M, Lin HB, Wang Q, et al. Effect of nattokinase on restenosis after percutaneous transluminal angioplasty of the abdominal artery in rabbits. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao, 2008, 28(9): 1538-41
[39] Schrör K. Anti-integrins—new platelet function inhibitors for therapy and prevention of acute coronary syndrome. Wien Klin Wochenschr, 1999, 111(3): 90-7
[40] Church FC, Phillips JE, Woods JL. Chimeric antithrombin peptide. Characterization of an Arg-Gly-Asp(RGD)-and hirudin carboxyl terminus-containing synthetic peptides. J Biol Chem, 1991, 266(18): 11975-9
[41] Mo W, Zhang YL, Chen HS, et al. A novel hirudin derivative characterized with anti-platelet aggregations and thrombin inhibition. J Thromb Thrombolysis, 2009, 28(2): 230-7
[42] Mann KG. The coagulation explosion. Ann N Y Acad Sci, 1994, 714: 265-9