研究进展

延长溶栓时间窗在缺血性脑卒中 tPA 治疗的临床前研究进展

陶依然,刘婷婷,孙芳玲,艾厚喜,郭德玉,王　文*

(首都医科大学宣武医院实验动物室,北京　100053)

【摘要】 脑卒中(stroke)是中老年人常见疾病,其具有高发病率、高死亡率和高致残率等特点,已严重威胁人类健康。目前为止,溶栓治疗是缺血性脑卒中最有效的治疗方法,组织型纤溶酶原激活剂(tissue type plasminogen activator, tPA)是唯一被美国 FDA 批准用于治疗脑卒中的溶栓药物。然而 tPA 的时间窗只有 4.5 h,很少一部分人会在时间窗内接受溶栓治疗,并且当 tPA 的治疗时间窗超过 4.5 h,会显著增加出血性转化(hemorrhagic transformation, HT)的发生率,从而导致脑卒中患者死亡率显著增加。在临床上通常使用联合用药的治疗策略来延长 tPA 的治疗时间窗,从而减少溶栓带来的不利影响。HT 是急性缺血性卒中患者使用组织型纤溶酶原激活剂溶栓治疗后最严重的并发症,极大地限制了 tPA 的临床应用。本文主要综述了在动物试验中与 tPA 联合使用能扩大 tPA 的治疗时间窗并且不增加出血性转化风险的药物,旨在为提高 tPA 的整体疗效提供研究基础。

【关键词】 脑卒中;溶栓时间窗;组织型纤溶酶原激活剂;出血性转化

【中图分类号】R-33　　【文献标识码】A　　【文章编号】1671-7856(2018) 08-0118-06

doi: 10.3969/j.issn.1671 -7856. 2018.08.021

Preclinical research progress of enlarging thrombolysis time window of ischemic stroke with tissue type plasminogen activator treatment

TAO Yiran, LIU Tingting, SUN Fangling, AI Houxi, GUO Deyu, WANG Wen*

(Department of Experimental Animal Center, Xuanwu Hospital of Capital Medical University, Beijing 100053, China)

【Abstract】 Stroke is a common disease in the elderly. The high morbidity, mortality and disability of stroke have threatened human health seriously. So far, thrombolytic therapy is the most effective treatment for cerebral ischemic stroke, and tPA is the only thrombolytic drug for the treatment of stroke which has been approved by the US FDA. However, the time window of tPA is only 4.5 hours and very few people could receive thrombolysis during this period. Moreover, when the therapeutic time window of tPA is more than 4.5 hours, the incidence of hemorrhagic transformation will significantly increase, then leads to the rapid increase of the mortality of stroke. Clinically, the method of combination therapy is usually used to prolong the therapeutic window of tPA, which is in order to reduce the adverse effects of thrombolysis. HT is one the most serious complications of patients who take the tPA thrombolytic therapy and it limits the clinical application greatly. This article reviews the therapeutic drugs that can be used in combination therapy to expand the therapeutic time window of tPA and at the same time don't increase the probability of hemorrhagic transformation during animal experiment. We aim to provide a research basis for improving the overall effect of tPA.

【Keywords】 stroke; thrombolytic time window; tissue type plasminogen activator; tPA; hemorrhagic transformation

[基金项目]国家自然科学基金(81573633,81503049)。

[作者简介]陶依然(1994—),女,硕士研究生,专业:药理学。E-mail:648056058@qq.com

[通信作者]王文(1968—),男,研究员,研究方向:神经药理,中药药理。E-mail:lzwwang@163.com

美国国立卫生研究院(national institutes of health, NIH)最初认为组织型纤溶酶原激活剂(tissue type plasminogen activator, tPA)治疗急性脑梗死的溶栓治疗时间窗应在 3 h 内。2008 年欧洲急性卒中协作研究Ⅲ(the european cooperative acute stroke study, ECASS-3)试验研究结果显示,tPA 的有效治疗时间窗可延长至 4.5 h[1]。如果超过 tPA 的治疗时间窗进行溶栓治疗则会产生一系列的副作用,比如神经毒性、水肿、出血性转化等[2]。目前,出血反应是溶栓药普遍存在的不良反应之一,严重的出血性转化(hemorrhagic transformation, HT)可以导致脑卒中患者死亡率显著增加[3]。HT 是指由于脑梗死后缺血区重新恢复血流供应引起的继发性出血[4]。HT 的机制很复杂,目前尚不明确,主要认为与血脑屏障受损、细胞质基质降解、血管新生、高血压、炎症反应等有关。tPA 治疗引起的 HT 与血脑屏障(blood brain barrier, BBB)通透性增加及相关的微血管的破损有关[5]。血脑屏障的破坏是 HT 发生的基础,血脑屏障包括毛细血管的基底膜和内皮细胞间的紧密连接。失去血流供应时,血脑屏障完整性受损。基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMPs)是细胞内基质的主要降解酶,与血管壁细胞外基质的破坏和重建有密切的关系。脑缺血患者基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)和基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2)表达量显著增加,溶栓后 MMP 及其抑制剂比例严重失调,使得细胞质基质中层粘连蛋白 laminin 和组成 BBB 的紧密连接蛋白(ZO-1, occludin)等被降解,从而导致出血。缺血早期微血管内皮细胞上出现白细胞粘附受体,微血管完整性改变,微血管生成被激活,提示血管新生参与了 HT 的过程[6]。同时高血压,炎症因子等也与 HT 有关。寻找具有治疗时间窗长、副作用小的脑卒中有效治疗药物对于脑卒中患者具有非常重要的意义。

由于扩大 tPA 治疗时间窗引起的 HT 与血脑屏障通透性增加及相关的微血管破损有关,所以可以通过药物靶向性阻止血脑屏障破坏和促进血管新生来减轻 HT。本文主要结合 HT 的相关机制,探讨在临床前研究中可减轻超过 tPA 治疗时间窗(中风发作后 4.5 h)而带来不良反应的药物。其中包括保护血脑屏障的药物(例如,米诺环素,西洛他唑,法舒地尔,坎地沙坦和内酯)和促血管新生的药物(如香豆素衍生物 IMM-H004 和粒细胞集落刺激因子)等。

1　血脑屏障保护剂

1.1　米诺环素

米诺环素是一种四环素衍生物,临床用于治疗痤疮。研究表明米诺环素是一个很好的 MMP 抑制剂[7],具有神经保护作用。米诺环素(3 mg/kg,静脉注射,卒中后 4 h)和 tPA(10 mg/kg,静脉注射,卒中后 6 h)联合使用能减少梗死体积,并在中风后 24 h 后改善脑出血情况[8]。米诺环素与 tPA 联合使用不仅可以扩大时间窗还能降低神经功能评分,降低死亡率[9]。米诺环素的神经保护机制尚不明确,可能与其抗炎、抗氧化和抗凋亡作用有关[10]。米诺环素通过抑制缺氧诱导因子 HIF-1α 介导的细胞反应,保护血脑屏障[11],减少小胶质细胞活化,抑制基质金属蛋白酶的表达,减少神经元的凋亡[12]。

1.2　西洛他唑

西洛他唑是 FDA 批准治疗间歇性跛行的药物[13]。在小鼠大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型中[14],再灌注后 6 h 给予 tPA(10 mg/kg,静脉注射)和西洛他唑(10 mg/kg,静脉注射)联合治疗能减轻 HT,将时间窗扩大到 18 h,连续 7 d 给药能减轻脑水肿,降低发病率和死亡率,提高神经功能。此外,西洛他唑能降低 tPA 治疗延迟引起的 MMP-9 活性上调,抑制微血管内皮细胞之间的紧密连接蛋白 claudin-5 的减少[15],保护血脑屏障不被破坏来减少 HT 的风险。在体外试验中,西洛他唑可以通过影响 cAMP 去阻止 tPA 引起的内皮细胞和周细胞损伤。

1.3　GM6001

GM6001 是一种广谱的 MMP 蛋白抑制剂,能够与 MMPs 的活性位点结合阻止金属基质酶前体向金属基质酶转化[16]。在大鼠 MCAO 造模后 6 h 给予 GM6001(100 mg/kg,腹腔注射)和 tPA(10 mg/kg,静脉注射)联合治疗,可降低 tPA 引起的脑血红蛋白含量升高,并降低 HT[17]。免疫印迹结果显示再灌注后 42 h 联合治疗能减少 MMP-9 含量,并且降解封闭蛋白 occludin 和紧密连接蛋白 ZO-1,但是对紧密连接蛋白 claudin-5 表达无影响[17]。单独用 GM6001 治疗也能明显提高缺血再灌注大鼠的存活率并改善大鼠神经功能。体外实验结果显示,GM6001 能阻止 tPA 引起的内皮细胞减少和跨内皮电阻损坏。该药物的其他潜在机制有待深入研究,如对肿瘤坏死因子 TNF-α 和肿瘤坏死因子转换酶

表达的影响等[17-18]。

1.4 法舒地尔

法舒地尔是一个 Rho 激酶抑制剂,即细胞内钙离子拮抗剂,在日本作为蛛网膜下腔出血后发生脑血管痉挛的治疗药物销售[19]。与 MCAO 造模后 6 h 单独使用 tPA(10 mg/kg,静脉注射)对大鼠进行治疗相比,tPA 联合法舒地尔(3 mg/kg,腹腔注射)治疗可以改善再灌注 18 h 后的 HT。降低再灌注 7 d 后的大鼠的死亡率,改善神经功能。体外研究结果表明,法舒地尔与 tPA 联合治疗可以通过降低 MMP-9 活性减轻人脑微血管内皮细胞损伤[20]。此外,乳酸脱氢酶相关实验还表明,法舒地尔不仅能对抗 tPA 诱导的急性和亚急性脑损伤也能保护受损内皮细胞[20]。法舒地尔长期神经血管保护作用和改善 tPA 诱导的 HT 确切分子机制和与 tPA 联合应用时的最佳剂量还有待进一步研究[20]。

1.5 坎地沙坦

坎地沙坦是一种血管紧张素 Ⅱ AT1 受体拮抗剂,可以减少由缺血性脑卒中引起的损伤[21-22]。在脑缺血动物模型中,在卒中后 3 h 给予坎地沙坦(1 mg/kg)和卒中后 6 h 给予 tPA(10 mg/kg,静脉注射)联合治疗,能减少脑出血并改善神经功能[23]。研究显示,与对照组相比,联合治疗可以减轻 tPA 治疗脑缺血大鼠后的引起的颅内出血,并且降低金属基质蛋白酶-3(matrix metalloproteinase-3,MMP-3)含量,但对 MMP-9 无影响。此外,坎地沙坦和 tPA 联合治疗能降低核因子 κB(nuclear factor kappaB,NF-κB)与肿瘤坏死因子 TNF-α 的表达水平。坎地沙坦的治疗还能增强内皮型一氧化氮合酶的活性,其对血管功能的调节至关重要的,最终起到卒中后的神经保护作用[24]。

1.6 苔藓虫素

苔藓虫素是自海洋生物草苔虫中提取的一种 PKC 活化剂,在中老年雌性大鼠 MCAO 造模后 6 h 给予治疗能显著降低缺血性脑损伤[25]。通过注入自体血栓制作雌性大鼠 MCAO 模型,造模后 2 h 给予苔藓抑素(2.5 mg/kg,静脉注射)能减少延迟 tPA(5 mg/kg,静脉注射)治疗引起的脑肿胀、脑出血和 24 h 内的死亡率[26]。苔藓虫素也能减轻血脑屏障的破坏和出血性转化,并下调 MMP-9 的表达,上调 PKCε 表达[26]。MMP-9 调控蛋白激酶 C 的机制[27]可能在苔藓虫素减少延迟 tPA 引起的 HT 和血脑屏障破坏起到了有益的作用。

2 促血管新生药物

因为血管破裂是脑出血的主要原因,血脑屏障的破坏是次要原因[28]。所以除保护血脑屏障的完整性外,促进新生血管也可能减弱延迟 tPA 引起的 HT。新生的血管可为神经的新生提供神经营养因子,并为新生的神经细胞迁移到缺血周边区域提供依附的支架,是梗死周边区域脑组织抗损伤和神经元修复的结构基础[28]。此外,研究表明血管新生发生在缺血区,有助于改善梗死、脑血流和神经元功能的恢复[29]。

2.1 香豆素衍生物 IMM-H004

香豆素类化合物是一类重要的具有多种生物活性的有机杂环化合物,具有调节植物生长、抗菌抗病毒、抗凝血、松弛平滑肌、吸收紫外线和抗辐射等多种生物活性[30]。在卒中后 6 h tPA(10 mg/kg,静脉注射)与 IMM-H004(6 mg/kg,静脉注射)联合治疗能减少出血、大鼠脑梗死体积和脑水肿[31]。同样有研究表明,在用线栓法制备的大鼠脑缺血模型中,联合治疗能减少 tPA 引起的 HT 和梗死体积[32]。脑缺血 7 d 后,IMM-H004 能促进血管生成,改善血管内皮细胞的完整性,改善脑血流。体外实验表明,IMM-H004 可以增加 ATP 和 PKA 的水平,并且在 HBMECs 和 PC12 细胞中激活 Akt 和 PI3K,通过调节 cAMP/PKA 和 PI3K/Akt 信号通路促进血管新生[31]。作者认为,IMM-H004 能减少 tPA 治疗引起的出血性转化与促进血管新生有关[31]。

2.2 粒细胞集落刺激因子

粒细胞集落刺激因子(granulocyte colony-stimulating factor,G-CSF)是能在体内外调节造血干细胞存活、增殖、分化以及成熟白细胞功能的一组糖蛋白生长因子[32]。有研究表明,在诱导大鼠脑卒中后,将时间窗扩大到 6 h 给予 G-CSF(300 μg/kg,静脉注射)与 tPA(10 mg/kg,静脉注射)联合治疗 7 d 与单独使用 tPA 相比,能改善大鼠神经功能和运动能力。此外使用 G-SCF 治疗也降低了死亡率,减少延迟使用 tPA 引起的 HT 和血红蛋白减少[33]。此外,能明显增加缺血侧大脑 Ang-2、vWF、磷酸化 eNOS、CD34+内皮细胞和 VEGFR-2 的含量,并且改善大鼠 24 h 后神经系统功能。因此,G-CSF 通过促进内皮干细胞血管新生和修复的机制来降低延迟 tPA 引起的 HT 从而提高卒中后的神经功能[33]。值得注意的是,在临床研究中发现生长因子如 VEGF、

Ang-1 和 G-CSF 能增强动脉再通和提高 tPA 治疗急性缺血性脑卒中患者的临床预后[34]。以上这些研究结果表明,G-CSF 可以减少延迟 tPA 治疗引起的 HT。目前,关于 G-CSF 疗效评价仅局限于急性脑卒中,其对脑血管保护的长期疗效还不清楚。G-CSF 在脑卒中模型中的最佳剂量还在研究中[35],并评价其联合治疗的效果,以期进一步提高该方法的临床应用前景。

3　其他

目前,关于自由基与抗氧化剂[36]在延迟 tPA 治疗时间窗中的作用也进行了研究。此外,促红细胞生成素在急性脑缺血中也被证实能改善神经功能。维生素 C 与十二氟戊烷乳剂(dodecafluoropentane emulsion,DDFPe)等也有较多研究,但这些研究仅证明了这些药物干预措施能改善中风,关于其对 HT 的影响目前尚未确定。

3.1　维生素 C

局灶性缺血脑损伤后谷胱甘肽和抗坏血酸水平降低,自由基形成增加,从而加重血脑屏障的破坏,补充维生素 C 可以来改善缺血性脑损伤后的预后[36]。研究证明,维生素 C 具有中和自由基,特别是在脑实质中保护内皮细胞功能和抗氧化的作用,能对抗延迟 tPA 引起的不良反应[37]。脑卒中后 5 h,低剂量 tPA(1 mg/kg)和维生素 C(500 mg/kg)联合治疗组大鼠与单独给予 tPA 组大鼠相比,卒中后 48 h 脑梗死体积和水肿明显减少。同时,联合治疗也能减少延迟 tPA 引起的 MMP-9 水平增加和血脑屏障的损坏[37]。维生素 C 可能是通过中和自由基,来保护血脑屏障,从而减轻延迟 tPA 带来的不良反应和发挥神经保护作用的功效,表明其具有扩大 tPA 治疗窗的辅助治疗药物的潜力。

3.2　DDFPe

DDFPe 纳米质粒是一种氧运输蛋白,在脑缺血模型中可发挥脑保护作用。在新西兰兔脑卒中栓塞模型中检测 DDFPe(0.3 mL/kg)能否延长 tPA 治疗时间窗(0.9 mg/kg,卒中后 9 h 给予)[38],结果显示联合治疗能将 tPA 治疗时间窗有效延长至 9 h,并没有增加出血转化的风险。并且能改善在 24 h 后的神经功能评分和脑梗死体积。但是其研究者只研究了 9 h 这个时间点,关于其他时间点的疗效和其他动物模型还有待进一步研究[38]。其作用机制可能是在在血细胞不足的时候改善了氧气的运输,具体机制还有待研究。

3.3　促红细胞生成素

促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)是由肾脏和肝脏分泌的一种激素样物质,能够促进红细胞生成,对心脏、神经等组织器官具有抗凋亡,促进血管再生等作用[39]。有研究表明重组人类促红细胞生成素对急性脑缺血有很好的治疗效果[40]。局部血管内注射 tPA 联合低剂量截短寡糖链的 Neuro-EPO 可以减少大鼠脑缺血再灌注 24 h 的病死率,改善神经功能,同时减少脑水肿和脑出血。而且 Neuro-EPO 没有 EPO 的红细胞生成功能,从而避免了血细胞比容增加导致的血液动力学改变[41]。目前认为大脑中动脉低剂量注射促红细胞生成素可能是通过激活 AKT 和 ERK 通路发挥神经保护作用,具体机制还有待进一步研究。

4　总结与展望

本文探讨了可以延长 tPA 溶栓治疗时间窗的药物,以及能够降低晚期溶栓治疗引起的出血转化风险的药物。延长时间窗进行溶栓治疗不仅可以通过药物和干细胞来实现,也可以通过其他非药物途径。通过脑成像技术可以确定出血转化风险高的患者和临床预后不良的患者,预测溶栓后的出血风险以改善 tPA 的治疗时间窗和治疗方法,提高安全性[42]。以前的试验还表明,血管内手术,例如动脉取栓,能改善卒中患者静脉溶栓。近期,最新的一项研究表明,灌注成像可筛选出颈内动脉颅内段或大脑中动脉近段闭塞引起的急性缺血性卒中患者。这部分患者在超出 tPA 溶栓时间窗(发病 6 ~ 24 h)的情况下仍可通过血管内血栓切除术清除血栓改善临床结局[43]。取栓加溶栓治疗相比溶栓已被证明可以改善功能预后,降低患者的死亡率[44-45]。今后有可能在成像技术的指导下把握好治疗时间窗,根据不同的个体情况,联合应用溶栓和神经保护疗法,以便能安全、有效的改善缺血性脑卒中患者的功能恢复。

参考文献:

[1] Hacke W, Kaste M, Bluhmki E, et al. Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke[J]. N Engl J Med, 2008, 359(13): 1317 - 1329.

[2] Nguyen H, Liska MG, Crowley MG, et al. Stem Cell-Paved Biobridge: A Merger of Exogenous and Endogenous Stem Cells Toward Regenerative Medicine in Stroke[OL]. https://link.

springer. com/chapter/10. 1007% 2F978 - 3 - 319 - 66679 - 2 _8.

[3] Leigh R, Jen SS, Hillis AE, et al. Pretreatment blood-brain barrier damage and post-treatment intracranial hemorrhage in patients receiving intravenous tissue-type plasminogen activator [J]. Stroke, 2014, 45(7):2030 - 2035.

[4] Nagaraja N, Tasneem N, Shaban A, et al. Cerebral Microbleeds are an Independent Predictor of Hemorrhagic Transformation Following Intravenous Alteplase Administration in Acute Ischemic Stroke[J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2018, 27(5): 1403 - 1411.

[5] Renú A, Laredo C, Tudela R, et al. Brain hemorrhage after endovascular reperfusion therapy of ischemic stroke: a threshold-finding whole-brain perfusion CT study[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2017, 37(1):153 - 165.

[6] Venkat P, Shen Y, Chopp M, et al. Cell-based and pharmacological neurorestorative therapies for ischemic stroke[J]. Neuropharmacology, 2018, 134(Pt B):310 - 322.

[7] Koistinaho J, Koistinaho M. Minocycline, A Tetracycline Derivative, as a Potential Protective Agent for Acute Stroke[OL]. https://link. springer. com/book/10. 1007/978 - 1 - 4614 - 8915 - 3.

[8] Murata Y, Rosell A, Scannevin RH, et al. Extension of the thrombolytic time window with minocycline in experimental stroke [J]. Stroke, 2008, 39(12):3372 - 3377.

[9] Machado LS, Sazonova IY, Kozak A, et al. Minocycline and tissue-type plasminogen activator for stroke: assessment of interaction potential[J]. Stroke, 2009, 40(9):3028 - 3033.

[10] Naderi Y, Sabetkasaei M, Parvardeh S, et al. Neuroprotective effects of pretreatment with minocycline on memory impairment following cerebral ischemia in rats[J]. Behav Pharmacol, 2017, 28(2 and 3-Spec Issue):214 - 222.

[11] Yang F, Zhou L, Wang D, et al. Minocycline ameliorates hypoxia-induced blood-brain barrier damage by inhibition of HIF-1a through SIRT-3/PHD-2 degradation pathway[J]. Neuroscience, 2015, 304:250 - 259.

[12] Matsukawa N, Yasuhara T, Hara K, et al. Therapeutic targets and limits of minocycline neuroprotection in experimental ischemic stroke[J]. Bmc Neurosci, 2009, 10:126.

[13] Hong H, Mackey WC. The limits of evidence in drug approval and availability: a case study of cilostazol and naftidrofuryl for the treatment of intermittent claudication[J]. Clin Ther, 2014, 36 (8):1290 - 1301.

[14] Ishiguro M, Mishiro K, Fujiwara Y, et al. Phosphodiesterase-III inhibitor prevents hemorrhagic transformation induced by focal cerebral ischemia in mice treated with tPA[J]. PLoS One, 2010, 5(12):e15178.

[15] Hao JL, Nagano T, Nakamura M, et al. Galardin inhibits collagen degradation by rabbit keratocytes by inhibiting the activation of pro-matrix metalloproteinases[J]. Exp Eye Res, 1999, 68 (5):565 - 572.

[16] Breschi L, Martin P, Mazzoni A, et al. Use of a specific MMP-inhibitor (galardin) for preservation of hybrid layer[J]. Dent Mater, 2010, 26(6):571 - 578.

[17] Mishiro K, Ishiguro M, Suzuki Y, et al. A broad-spectrum matrix metalloproteinase inhibitor prevents hemorrhagic complications induced by tissue plasminogen activator in mice[J]. Neuroscience, 2012, 205(2):39 - 48.

[18] 张艳利. TNF-α、VEGF 及 ET-1 在高血压脑出血血肿周围脑组织中的表达及其相关性的研究[D]. 河北医科大学, 2015.

[19] Shibuya M, Suzuki Y, Sugita K, et al. Effect of AT877 on cerebral vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. Results of a prospective placebo-controlled double-blind trial[J]. J Neurosurg, 1992, 76(4):571 - 577.

[20] Ishiguro M, Kawasaki K, Suzuki Y, et al. A Rho kinase (ROCK) inhibitor, fasudil, prevents matrix metalloproteinase-9-related hemorrhagic transformation in mice treated with tissue plasminogen activator[J]. Neuroscience, 2012, 220(38):302 - 312.

[21] Fu H, Hosomi N, Pelisch N, et al. Therapeutic effects of postischemic treatment with hypotensive doses of an angiotensin II receptor blocker on transient focal cerebral ischemia[J]. J Hypertens, 2011, 29(11):2210 - 2219.

[22] Ishrat T, Pillai B, Ergul A, et al. Candesartan Reduces the Hemorrhage Associated with Delayed Tissue Plasminogen Activator Treatment in Rat Embolic Stroke[J]. Neurochem Res, 2013, 38(12):2668 - 2677.

[23] Suzuki Y, Nagai N, Umemura K, et al. Stromelysin-1 (MMP-3) is critical for intracranial bleeding after t-PA treatment of stroke in mice[J]. J Thromb Haemost, 2007, 5(8):1732 - 1739.

[24] Atochin DN, Huang PL. Endothelial nitric oxide synthase transgenic models of endothelial dysfunction [J]. Pflugers Arch, 2010, 460(6):965 - 974.

[25] Tan Z, Turner RC, Leon RL, et al. Bryostatin improves survival and reduces ischemic brain injury in aged rats after acute ischemic stroke[J]. Stroke, 2013, 44(12):3490 - 3497.

[26] Tan Z, Lucke-Wold BP, Logsdon AF, et al. Bryostatin extends tPA time window to 6 h following middle cerebral artery occlusion in aged female rats [J]. Eur J Pharmacol, 2015, 764: 404 - 412.

[27] Ding Q, Chai H, Mahmood N, et al. Matrix metalloproteinases modulated by protein kinase Cε mediate resistin-induced migration of human coronary artery smooth muscle cells[J]. J Vasc Surg, 2011, 53(4):1044 - 1051.

[28] Keep RF, Zhou N, Xiang J, et al. Vascular disruption and blood-brain barrier dysfunction in intracerebral hemorrhage[J]. Fluids Barriers CNS, 2014, 11(1):18.

[29] 郭真真. 丰富环境对脑缺血再灌注损伤后脑血流和血管新生的影响[D]. 复旦大学, 2014.

[30] 高立东, 朱惠泽, 赵莹, 等. 香豆素类化合物的抑菌活性研究进展[J]. 生物技术进展, 2017, 7(2):116 - 120.

[31] Zuo W, Chen J, Zhang S, et al. IMM - H004 prevents toxicity induced by delayed treatment of tPA in a rat model of focal cere-

bral ischemia involving PKA - and PI3K - dependent Akt activation[J]. Eur J Neurosci, 2014, 39(12):2107 - 2118.

[32] Metcalf D. The molecular biology and functions of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factors[J]. Blood, 1986, 67(2):257 - 267.

[33] Dela Peña IC, Yang S, Shen G, et al., Abstract TP350: Extension of tPA Treatment Window With Granulocyte-colony Stimulating Factor in a Thromboembolic Rat Model of Stroke[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(6): E1635.

[34] Sobrino T, Millán M, Castellanos M, et al. Association of growth factors with arterial recanalization and clinical outcome in patients with ischemic stroke treated with tPA[J]. J Thromb Haemost, 2010, 8(7):1567 - 1574.

[35] Yen JH. Immunomodulatory effect of G-CSF on the CNS infiltrating monocytes in ischemic stroke[J]. Brain Behav Immun, 2017, 60:13 - 14..

[36] Ticinesi A, Meschi T, Lauretani F, et al. Nutrition and Inflammation in Older Individuals: Focus on Vitamin D, n-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Whey Proteins:[J]. Nutrients, 2016, 8(4):186.

[37] Allahtavakoli M, Amin F, Esmaeeli-Nadimi A, et al. Ascorbic Acid Reduces the Adverse Effects of Delayed Administration of Tissue Plasminogen Activator in a Rat Stroke Model[J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2015, 117(5):335 - 339.

[38] Culp WC, Brown AT, Lowery JD, et al. Dodecafluoropentane Emulsion Extends Window for tPA Therapy in a Rabbit Stroke Model[J]. Mol Neurobiol, 2015, 52(2):979 - 984.

[39] 钟克波, 赖彦华, 毕民平. BNIP3 在 rhEPO 促进大鼠部分肝切除后肝再生中的作用[J]. 中国比较医学杂志, 2013, 23(5):50 - 54.

[40] Korninger C, Collen D. Studies on the specific fibrinolytic effect of human extrinsic (tissue-type) plasminogen activator in human blood and in various animal species in vitro[J]. Thromb Haemost, 1981, 46(2):561 - 565.

[41] Gao Y, Mengana Y, Cruz YR, et al. Different expression patterns of Ngb and EPOR in the cerebral cortex and hippocampus revealed distinctive therapeutic effects of intranasal delivery of Neuro-EPO for ischemic insults to the gerbil brain[J]. J Histochem Cytochem, 2011, 59(2):214 - 227.

[42] Bentley P, Ganesalingam J, Carlton Jones AL, et al. Prediction of stroke thrombolysis outcome using CT brain machine learning[J]. Neuroimage Clin, 2014, 4:635 - 640.

[43] Nogueira RG, Jadhav AP, Haussen DC, et al. Thrombectomy 6 to 24 Hours after Stroke with a Mismatch between Deficit and Infarct[J]. N Engl J Med, 2018, 378(1):11 - 21.

[44] Berkhemer OA, Fransen PS, Beumer D, et al. A randomized trial of intraarterial treatment for acute ischemic stroke[J]. N Engl J Med, 2015, 372(1):11 - 20.

[45] Minnerup J, Wersching H, Teuber A, et al. Outcome After Thrombectomy and Intravenous Thrombolysis in Patients With Acute Ischemic Stroke: A Prospective Observational Study[J]. Stroke, 2016, 47(6):1584 - 1592.

〔收稿日期〕2017 - 10 - 25