维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2006)01-0026-05

TIMP-3 对内皮细胞增殖抑制作用的研究

李生伟[1],甘 霖[2],王一如[3],刘长安[1],龚建平[1],李 钺[1],李友伟[1]

(1. 重庆医科大学附属第二医院肝胆外科,重庆 400010;2. 重庆市肿瘤医院,肿瘤研究所,重庆 400030;
3. 重庆医科大学检验系,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨 TIMP-3 对内皮细胞增殖的抑制作用及特点。方法:采用形态学观察、MTT 法、[3H]-TdR 掺入法流式细胞仪分析等技术方法观测不同浓度 TIMP-3 作用下人脐静脉内皮细胞增殖活性的变化。结果:①不同浓度(10~100ng/ml)的 TIMP-3 处理 HUVEC 细胞不同时间(1~7 天)后,生长均有显著抑制作用且呈现明显的剂量和时效依赖关系。②经 TIMP-3 处理后,HUVEC 细胞增殖活性降低,主要表现为有丝分裂计数降低,细胞的生长抑制率及移行抑制率增加。③细胞生长减慢,TIMP-3 能有效抑制 G_1、S 期的细胞;抑制细胞从 G_2 期进入 M 期;同时促进细胞的凋亡等。结论:TIMP-3 具有抑制内皮细胞增殖、迁移、促进细胞凋亡,进而抑制血管生成的作用。

【关键词】TIMP-3;内皮细胞;细胞增殖;细胞凋亡
【中国图书分类法分类号】R543.3 【文献标识码】A 【收稿日期】2005-08-05

Inhibitory effects of TIMP-3 on endothelial cell proliferation

LI Shengwei, et al

(*Department of Hepatobiliary Surgery, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the inhibitory effect of TIMP-3 on endothelial cell (EC) proliferation. *Methods*: The inhibition of EC proliferation was analyzed by light microscopy, MTT, [3H]-TdR up-take, and flow cytometry et al. *Results*: A concentration-dependent and time-dependent proliferation inhibition and survival were demonstrated in the HUVEC incubated for 1~7days in the presence of TIMP-3. The proliferation inhibition was shown as the lessened cell growth, decreased counting of mitotic cells. TIMP-3 could also aggravate the increase of apoptotic cells and cell ratio in G_2/M phase. *Conclusion*: TIMP-3 has significant inhibitory influence on EC proliferation, migration and can promote apoptosis of cells.

【Key words】 TIMP-3; Endothelial cell; Proliferation; Apoptosis

组织基质金属蛋白酶抑制因子-3(Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-3, TIMP-3)是一种结合细胞外基质(Extracellular Matrix, ECM)的非可溶性蛋白,它可以通过对基质金属蛋白酶(Matrix Metalloproteinases, MMPs)的特异性抑制而阻止 ECM 的降解。近年来人们对 TIMP-3 的其它生物学特性也作了较广泛的研究,如它在细胞生长、凋亡中的作用,对肿瘤的负性调控机制等。研究发现,TIMP-3 可诱导细胞的凋亡,然而它对细胞增殖抑制作用,似乎存在着细胞类型依赖性。在血管生成的过程中,细胞外基质的降解、内皮细胞的迁移、增殖,发挥着重要作用[1]。因此,研究 TIMP-3 对内皮细胞生长的调控作用,不仅有利于阐明 TIMP-3 抑制血管生长的作用机制;也为深入探讨 TIMPS 在临床心血管疾病、肿瘤、移植排斥等的运用提供了理论基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

正常妊娠足月分娩的新生儿脐带由重庆医科大学附属第二医院妇产科提供,重组人 TIMP-3 因子购自 RnD 公司,MTT、DMSO 购自 Amersco 公司,^{3}H-TdR 购自上海原子能公司,DMEM/F12 培养基及胎牛血清(FBS)为 Hyclone 产品,其它试剂均购于国内外相关公司,实验所需仪器设备如恒温培养箱(SHEL LAB 2323)、超净工作台(上海博迅)、倒置相差

作者介绍:李生伟(1963-),男,博士,主任医师,
主要研究方向:肝移植免疫排斥反应。

基金资助:重庆市卫生局科研基金(渝卫科教[2001]-01-2-072)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

显微镜（Olypums）、酶联免疫检测仪（Bio-Rad 550 型）、液体闪烁计数仪、流式细胞仪等均为我院自备。

1.2 实验方法

1.2.1 人脐静脉内皮细胞（HUVEC）的分离和体外培养

取 20cm 长正常妊娠足月分娩的新生儿脐带放入 4℃含青霉素、链霉素的脐带保存液中。于无菌条件下分离出脐动、静脉，先结扎两条脐动脉防红细胞污染，在静脉两端套一输液用导管，再用 60ml 注射器吸取含双抗的 D-Hanks 液反复灌注洗净脐静脉内的血液，直至洗出液无色透明为止。

然后从另一端灌入预热 37℃约 15～20ml 0.1%胶原酶消化液至另一端无 D-Hanks 液流出，用止血钳封住一端使血管充盈后夹闭另一端，放入装有转移液的瓶中，37℃孵育 15min，期间可不时晃动。取出脐带轻弹几下，收集脐静脉内液体，1000r/min 离心 10min 后弃上清，加入 37℃的 10ml 含 20%FBS 的 DMEM/F12 培养液，制成细胞悬液。将细胞接种于 1%明胶预处理的培养瓶中（明胶已吸取），置于 37℃、5% CO_2 饱和湿度（95%）培养箱中静置培养过夜。每 2～3 天换液 1 次，约 3～4 天经 0.05%胰蛋白酶、0.02%EDTA 消化液 3～5ml 消化后传代。

1.2.2 内皮细胞核分裂指数的测定 以不同浓度（25、50、100ng/ml）的 TIMP-3 和常规对照组细胞分别于处理后 1～7 天常规固定、HE 染色在倒置显微镜下进行观察细胞特征；随机观察 500 个细胞，并且计算其中具有核分裂像的细胞所占百分比，即为内皮细胞核分裂指数，每时相点观察 6 次取平均值。

1.2.3 MTT 比色法测定内皮细胞增殖曲线 最适细胞浓度的测定：调整细胞浓度为 1×10^3/ml、5×10^3/ml、1×10^4/ml、5×10^4/ml、1×10^5/ml 分别接种于 96 孔培养板中（100μl/孔），每个浓度 6 个平行孔，37℃培养 48h 后，加入 MTT 溶液（5mg/ml）20μl/孔。37℃，5% CO_2 条件下孵育 4h，终止培养，吸弃孔内培养上清液。加入 150μl DMSO/孔，振荡 10min，使结晶物充分溶解。以空白组调零并测定各孔平均吸光度值（OD 值），确定最适细胞浓度为：1×10^4/ml，即 1×10^3 个细胞/孔。

以 1×10^3 个细胞/孔，将传代内皮细胞接种于 96 孔培养板中。同时设试剂对照组（不加入细胞）、试验组和细胞对照组。试验组又分为 5 组，每组均为 6 个平行孔（100μl/孔）。37℃培养 12h 后，吸弃培养液，试验组分别加入 1ng/ml、10ng/ml、25ng/ml、50ng/ml、100ng/ml 的 TIMP-3 及相应浓度条件培养液，对照组仅加入培养液。继续培养 1 天、2 天、3 天和 4 天，后终止培养，MTT 法检测 OD 值同前，并记录结果。

以时间为横轴，光吸收值为纵轴绘制各组细胞生长曲线。同时计算试验组细胞抑制率：细胞抑制率（%）=［（细胞对照组 OD 值－试验组 OD 值）/细胞对照组 OD 值］×100%

1.2.4 [^{3}H]-TdR 掺入法 实验分组及操作方法与 MTT 比色法相同，但是在 MTT 比色法中所述加入各浓度梯度 TIMP-3 后，37℃培养 48h，再加入 5μCi[methyl-^{3}H]-TdR/孔，继续培养 12h，PBS 清洗细胞 2 次，胰酶消化细胞，用预冷的 10%三氯乙酸沉淀 DNA，再用 0.5mol/L NaOH 提取之，0.5mol/L HCl 中和 NaOH。玻璃纤维滤纸滤出 DNA 提取物，烘干，最后以液闪记数仪测定每分钟放射脉冲数。

1.2.5 内皮细胞迁移抑制的观察 盖玻片（18mm×18mm）作上下边中点连线标记，在 6 孔培养板中每孔先后放入 2 张盖玻片，使两者标记的中线重叠。选择第 3 代对数生长期细胞，胰酶消化，用含 2%胎牛血清的培养液制成单细胞悬液，以 1×10^5 个/孔的细胞密度种在该 6 孔培养板中，培养箱中静置培养 2 天后取出，夹出上层盖玻片（将这些爬有细胞的盖玻片留着等固定染色后观察贴壁细胞情况），显微镜下可见下层盖玻片的右侧半就呈现边界清晰的一个矩形空白区，吸去每孔中的培养液。设对照组（加入 2%胎牛血清的 DMEM/F12 培养液），试验组为含 2%胎牛血清的 50、100ng/ml TIMP-3，每组 3 个孔。继续培养 24h 后，在倒置显微镜低倍镜下（×10 倍）观察进入空白区的细胞的数量及其形态，并在高倍镜下（×40 倍）每边选 5 个视野，计数进入空白区的细胞数，重复 3 次。按以下公式计算移行抑制率：

内皮细胞移行抑制率（%）=（对照组移行细胞数－试验组移行细胞数）/对照组移行细胞数×100%

1.2.6 细胞周期及凋亡的检测 取第 3 代 HUVEC 对数生长期 2×10^4/ml 细胞悬液，换含 2%FBS 的培养液培养 24h 使细胞同步于 G_0 期，将 HUVEC 随机分为（1）正常对照组（2）50ng/ml TIMP-3 组。常规培养 48h、72h，消化离心弃上清液后吹打成均匀细胞悬液，用 70%乙醇 2ml 固定，各组细胞染色前离心取固定液，再用 PBS 液洗两次，调整细胞浓度为 1.0×10^6，加入 PI 染色液 1.0ml 于 4℃染色 30min 后行流式细胞仪分析，测定 G_0 期/G_1 期、S 期、G_2 期/M 期值及凋亡细胞。

1.3 统计学分析

计量数据以均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示。应用 SAS 统计软件进行统计处理。两组间差异用 t 检验，多组间比较用方差分析。$P<0.05$ 表示差异具有显著性。

2 结 果

2.1 内皮细胞核分裂指数的影响

在倒置显微镜观察，原代细胞接种 1 天后已经大部分形成贴壁生长。细胞呈团块状、椭圆形或成团聚集，仅见少数细胞伸展，2～3 天后分裂最旺盛、生长最快，细胞呈变成梭形或多角形。5～6 天后逐渐融合，呈典型的卵石状镶嵌排列。传代细胞的生长方式及形态变化与原代培养细胞类似，汇合后细胞也呈多角形，卵石状排列，见图 1。

经 TIMP-3 处理后，胞体呈长梭形、胞浆伸展，细胞折光性下降，且排列稀疏，细胞碎片增加。HE

维普资讯 http://www.cqvip.com



图 1 HUVEC 培养呈"铺路石样"×100

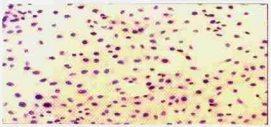


图 3 HUVEC TIMP-3 处理 HE 染色×100

染色可见褪变细胞的形态，主要表现为核浓缩、核固缩及核溶解，核分裂相明显减少，核分裂指数显著降低，见表 1，图 2，3。可见类似凋亡细胞和凋亡小体的变化，此种形态学变化随着 TIMP-3 作用剂量的增加或时间的延长而加重。

2.2 TIMP-3 对 HUVEC 增殖动力学的影响

不同浓度的 TIMP-3 处理 HUVEC 后，细胞的生长受到明显的抑制。其影响主要表现为（以 OD 值代表细胞生长情况绘制细胞生长曲线可见）见图 4、表 2，（1）与对照组相比 10～100ng/ml 浓度的 TIMP-3 对 HUVEC 细胞生长均有显著抑制作用，且 TIMP-3 浓度越高，这种抑制作用越明显，呈现明显的剂量依赖关系。（2）经 TIMP-3 处理后 1～4 天，HUVEC 细胞的生长受到明显的抑制，1 天后细胞总数即较对照组明显减少，且作用时间越长，差异越明显，即呈现时效依赖关系。见图 5、6。



图 2 HUVEC 体外培养"凋亡样"×100

2.3 内皮细胞迁移能力的变化

加入 50、100ng/ml TIMP-3 的试验组与对照组相比，细胞移行数明显减少（$P<0.05$），移行抑制率为：74.2%±5.28%、89.5%±6.47%。

2.4 TIMP-3 对细胞周期的影响

细胞周期时相显示：与对照组相比，经 50ng/ml

表 1 TIMP-3 处理不同时间后 HUVEC 细胞核分裂指数的改变(%)

Group	Time (d)						
	1	2	3	4	5	6	7
Control	8.23±1.07	9.23±1.28	11.57±0.86	10.32±1.10	9.81±1.63	9.21±1.45	8.65±1.20
50ng/ml TIMP-3	3.14±0.78*	4.06±1.15*	2.12±0.65*	2.23±0.98*	3.26±0.59*	4.18±0.87*	3.11±0.64*

*: $P<0.05$ vs Control

表 2 TIMP-3 对 HUVEC 细胞生长曲线的影响

Group TIMP-3 (ng/ml)	Time (d)			
	1	2	3	4
control	0.241±0.017	0.262±0.027	0.443±0.032	0.685±0.027
1	0.235±0.009	0.248±0.016	0.410±0.008	0.637±0.038
10	0.200±0.013*	0.197±0.022*	0.323±0.017*	0.480±0.014*
25	0.155±0.008*	0.140±0.015*	0.222±0.020*	0.315±0.021*
50	0.126±0.015*	0.110±0.012*	0.176±0.011*	0.224±0.009*
100	0.088±0.008*	0.079±0.007*	0.108±0.013*	0.173±0.015*

*: $P<0.05$ vs Control

维普资讯 http://www.cqvip.com

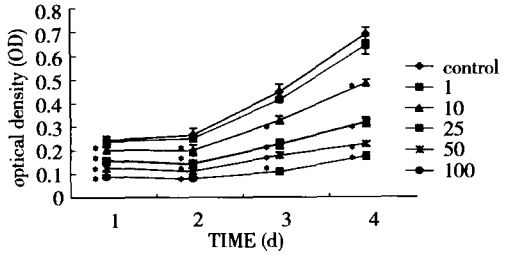


图 4 TIMP-3 处理组及对照组对 HUVEC 细胞的生长曲线

*: $P<0.05$ vs Control

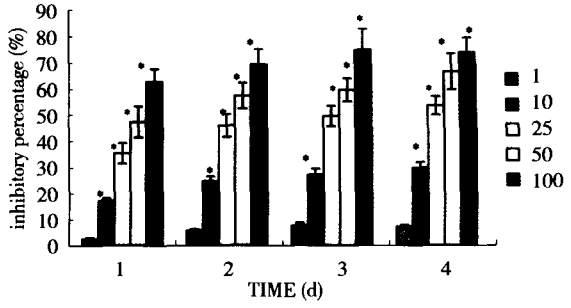


图 5 MTT 法测不同浓度 TIMP-3 对 HUVEC 抑制率影响（%）

*: $P<0.05$ vs Control

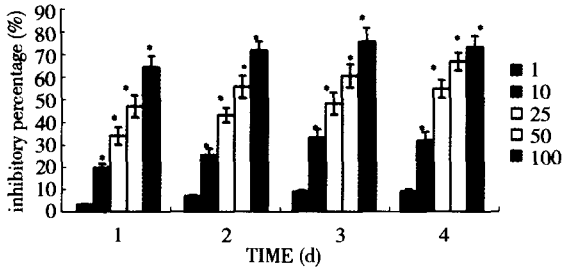


图 6 [^{3}H]-TdR 掺入法测不同浓度 TIMP-3 对 HUVEC 抑制率影响（%）

*: $P<0.05$ vs Control

TIMP-3 处理 48h 后，细胞周期时相显示：G_0/G_1 期的细胞比例由 47.84%下降至 32.75%，G_2/M 期细胞由 18.64%增加至 36.83%，凋亡细胞比例明显增加（由 1.06%上升至 3.04%）并且此种影响与作用时间有关，以 TIMP-3 处理后 72h 更明显，见表 3，见图 7，8。

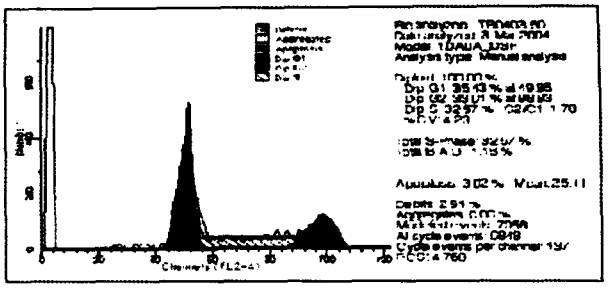


图 7 流式细胞仪对 TIMP-3 处理后 48h 内皮细胞分析结果

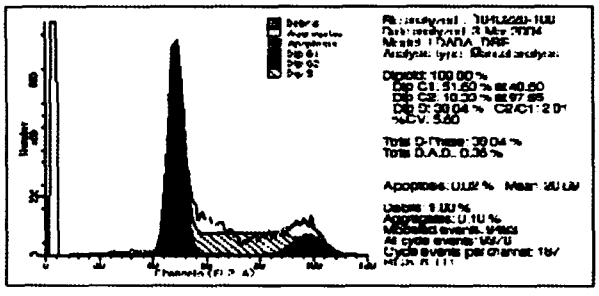


图 8 流式细胞仪对对照组内皮细胞分析结果

3 讨 论

血管生成（angiogenesis）是指在原有的毛细血管或微静脉基础上通过血管内皮细胞的增殖和迁移，从已存在的血管处以出芽或套迭的方式生成新的、以毛细血管为主的血管系统，在该过程中，内皮细胞的增殖和迁移起着重要作用。本研究旨在通过 TIMP-3 作用于 HUVEC，证实其对血管内皮细胞增殖和迁移的抑制作用。最近人们研究发现 TIMP-3 除了通过抑制 MMPS 而调控肿瘤生长、侵袭和转移外，还可以诱导细胞凋亡，然而在其对细胞增殖抑制研究方面却存在着较大的分歧，如有研究发现，TIMP-3 可以刺激成纤维细胞的增殖；而 Baker[2]却证实，它可以大大抑制平滑肌细胞的增殖，说明 TIMP-3 对细胞的生长作用存在细胞

表 3 不同浓度 TIMP-3 对 HUVEC 细胞周期的影响(%)

Group	n	cells			
		G_0/G_1	S	G_2/M	apoptosis
Control	6	47.84±0.231	33.52±0.253	18.64±0.116	1.06±0.682
50ng/ml TIMP-3 (48h)	6	35.75±1.845*	30.42±2.024	33.83±1.865*	3.04±1.479*
50ng/ml TIMP-3 (72h)	6	23.17±0.650*	29.08±0.725*	38.75±0.847*	5.65±0.663*

*: $P<0.05$ vs Control

维普资讯 http://www.cqvip.com

类型倚赖性。

基于 TIMP-3 在血管生成中的重要作用，本课题组研究观察了 TIMP-3 对 HUVEC 作用的量效和时效关系，结果发现，不同浓度（10～100ng/ml）的 TIMP-3 处理 HUVEC 后，细胞受到明显的增殖抑制作用。这种作用呈明显的剂量倚赖性和时效依赖性：即 TIMP-3 浓度越高，作用时间越长，这种抑制作用越明显，细胞总数减少越显著。TIMP-3 还能有效的抑制内皮细胞的迁移。HE 染色表现出细胞核分裂像减少，核分裂指数降低，细胞生长缓慢，有丝分裂减弱及细胞凋亡的形态学改变。

同时，FCM 细胞周期检测结果提示，经 TIMP-3 处理后 HUVEC 在 DNA 合成前期及 DNA 合成期细胞明显减少，而在 G_2/M 期细胞则出现了增多蓄积，考虑到细胞于 DNA 合成后期（G_2）对外界条件变化较敏感（如：易因温度、pH 值、理化及细胞因子的影响而受干扰），而有丝分裂期（M）细胞整个持续时间很短，也较稳定，不易受各种理化及细胞因子的影响而发生变化，因此分析可得到这样的结论：TIMP-3 主要是通过负性调控 G_1 至 G_2 期的 HUVEC，抑制细胞从 G_2 期进入 M 期；同时促进细胞的凋亡。TIMP-3 对内皮细胞周期的具体作用机制尚待进一步探讨。综上所述，TIMP-3 具有抑制内皮细胞增殖、迁移、促进细胞凋亡，进而抑制血管生成的作用。

TIMPS 是 MMPS 的特异内源性抑制因子，迄今为止，共发现 4 种分别为 TIMP-1TIMP-2TIMP-3 和 TIMP-4。TIMPS 可通过对 MMPS 的抑制而阻止细胞外基质（Extracellular Matrix, ECM）的降解，进而抑制内皮细胞的迁移。同时 TIMP-3 又具有其独特的抑制血管生成的作用，其机理主要为下述两方面：第一，TIMP-3 对 MMPS 的特异性抑制作用：MMPS 是人体内重要的血管生成诱导和调控因子[3,4]，它能诱导血管内皮细胞生长因子（VEGF）的生成进而刺激内皮细胞合成蛋白酶[5]，促进了内皮细胞的增殖和迁移。TIMP-3 能特异的抑制 MMPS，进而有效的阻止了内皮细胞的增殖和迁移；在我们课题组同时进行的动物体内实验中此种作用也得到了证实[6]，在许多恶性肿瘤的增殖中，MMPS 呈现明显的高表达特征，如在膀胱移行细胞癌患者肿瘤细胞中MMP2 和 MMP9 大量释放[7]，实验证明 MMPS 在肿瘤增殖分化的调控及浸润与转移等方面，都起到了显著的协同促进作用。可以推测，导入外源性 TIMPS 因子将能有效抑制上述过程的发生、发展。第二，TIMP-3 具有促进 HUVEC 凋亡的作用：TIMP-3 稳定了细胞表面 TNF-α 受体 -1、Fas 和 TNF-α 相关凋亡诱导配体的受体 -1（TRAIL-1），从而活化了 Fas 相关死亡结构域（Fas-associated death domain，FADD）依赖的Ⅱ型凋亡途径[8]，促进了细胞凋亡的发生；在我们进行的相关动物实验中[9]，TIMP-3 高表达动物模型的 Fas 免疫组化染色及 TUNEL 法相关细胞凋亡的实验结果均为强阳性，较对照组表达明显增高，这也与我们的本次实验结果吻合。

目前，在心血管疾病、肿瘤的发生和发展、移植物的慢性排斥或失功等方面的研究中，TIMP-3 抑制血管生成的作用受到了较广泛的关注。尤其是在慢性排斥反应（Chronic Rejection CR）中移植物远期失功的主要原因即是移植物中小血管内膜下细胞过度增生、迁移、坏死及纤维化而使血管壁增厚，血管逐渐闭塞、消失，最终使移植物“失功”。由此，我们可试图利用 TIMPS 的这些独特生物学作用在器官移植物抗慢性排斥反应中作一些新的探索和尝试。因为 TIMPS 既可抑制 MMPS 的活性，维持血管 ECM 的完整性，阻碍细胞向内膜的迁移，又可阻止内皮细胞的增殖，进而防止了移植物中小血管的狭窄、闭塞，减缓了 CR 发展过程。

参 考 文 献

[1] Pepper MS. Role of the Matrix Metalloproteinase and Plasminogen Activator-Plasmin Systems in Angiogenesis [J]. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2001;21(2):1104-1110.

[2] Baker AH, Zaltsman AB, George SJ, et al. Divergent Effects of Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1, -2, or -3 Overexpression on Rat Vascular Smooth Muscle Cell Invasion, Proliferation, and Death In Vitro [J]. J Clin Invest, 1998;101(5):1478-1487.

[3] Deryugina EI, Soroceanu Land Strongin AY. Up-Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor by Membrane-type 1 Matrix Metalloproteinase Stimulates Human Glioma Xenograft Growth and Angiogenesis [J]. Cancer Research, 2002;62(11):580-588.

[4] DeClerck YA, Mercurio AM, Stack MS, et al. Proteases, Extracellular Matrix, and Cancer [J]. American Journal of Pathology, 2004;164(7):1131-1139.

[5] Qi JH, Anand-Apte B. Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-3 (TIMP-3) Suppresses VEGF Receptor-2 Mediated Signaling

（下转第 34 页）

维普资讯 http://www.cqvip.com



图 6 实验组术后 3 月 TEM×2100
基质胶原纤维较整齐

3 讨 论

本实验 CNV 定量分析及 TEM 结果表明,PEDF 能显著的抑制大鼠穿透性角膜移植术后新生血管的生成。我们推测 PEDF 抑制血管生成可能机制是通过 Fas 和 FasL 介导的细胞凋亡起作用的。Mori 等[4]研究结果也证实了这点,他们通过 PEDF 基因转移的腺病毒载体对光感受器上表达 VEGF 的转基因小鼠的已经建立的新生血管的效应进行了研究。结果显示 PEDF 是通过促进新生血管内皮细胞的凋亡而引起新生血管的退化,从而达到抑制新生血管形成的作用。

Fas 是肿瘤坏死因子(TNF)受体超家族成员,是一个跨膜受体,可与跨膜蛋白 FasL 结合,激活 caspase 依赖的凋亡联级反应[5],从而导致细胞凋亡。研究表明,PEDF 能诱导内皮细胞 Fas 的表达,但 PEDF 起作用需依赖两个因素:(1) 内皮细胞上必须有 Fas 受体的表达;(2)细胞内表达生存信号的蛋白如:Bcl-2、survivin 的局部浓度不能过高,不足以对抗 Fas 诱导的凋亡反应。即新生血管的生长或消退取决于 PEDF 激发的 Fas-FasL 活化所产生的凋亡信号与新生血管诱导剂所产生的抗凋亡信号之间的力量对比[6]。因此,本实验免疫组化染色 PEDF 在术后早期对照组和实验组表达虽均呈增强趋势,但 VEGF 等促新生血管生成的作用还是高于 PEDF 抑制生成的作用,故朝新生血管生成方向发展,当抑制因素起主要作用时新生血管则向萎缩方向发展。实验组保持较强表达一段时间后也开始下降。在术后 2w、3w、1 月、2 月时,实验组 PEDF 的表达高于对照组,因而实验组抑制新生血管生成作用较强,CNV 也低于对照组。

总之,PEDF 能有效的降低角膜移植术后新生血管生成的作用,但对于其治疗的最佳剂量、浓度、长期应用的毒副作用本课题将进一步研究,对其作用的具体机理还需进一步的探讨。

参 考 文 献

[1] Karakousis PC, John SK, Behling KC, et al. Localization of pigment epithelium derived factor (PEDF) in developing and adult human ocular tissues [J]. Mol Vis, 2001;7: 154-163.

[2] Williams KA, Coster DJ. Penetrating corneal transplantation in the inbed ratza new model[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1985; 26(1):23-30.

[3] 高晓晖,楼月芳,奚寿增,等.软骨源抑制因子抑制角膜新生血管的实验研究[J].中华眼科杂志,1999;35(1):22-24.

[4] Mori K, Gehlbach P, Ando A, et al. Regression of ocular neovascularization in response to increased expression of pigment epithelium-derived factor[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2002;43 (7):2428-2434.

[5] Nagata S, Golstein P. The Fas death factor[J]. Science, 1995; 267(5203):1449-1456.

[6] Volpert OV, Zaichuk T, Zhou W, et al. Inducer-stimulated Fas targets activated endothelium for destruction by anti-angiogenic thrombospondin-1 and pigmen epithelium-derived factor [J]. Nat Med, 2002;8(4):349-357.

(上接第 30 页)

Independent of Metalloproteinase Inhibition[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2002;43(18): 2753-2761.

[6] 甘 霖,李生伟,龚建平,等.同系与异系移植 MMPS、TIMPS 表达的比较实验研究[J].中国现代普通外科进展,2005; 8(4):209-211.

[7] 彭东涛,苟 欣,何梓铭.膀胱癌组织中 MMP9、MMP2 与 PCNA 及临床指标的研究 [J]. 重庆医科大学学报, 2003;28 (4):467-469.

[8] Bond M, Murphy G, Bennett MR, et al. Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-3 Induces a Fas-associated Death Domain-dependent Type II Apoptotic Pathway[J]. Biol. Chem, 2002; 277(3):13787-13795.

[9] 李生伟,甘 霖,龚建平,等. TIMP-3 质粒-脂质复合体防止慢性排斥移植物动脉硬化的实验研究 [J]. 中国现代普通外科进展, 2005;8(3): 164-168.