

凝血酶对血管内皮细胞核因子 κB 活化及基质金属蛋白酶 2 表达的影响

王 敏¹, 张耐勤², 崔连群¹, 王晓军¹, 韩秋霞²

(1. 山东大学临床医学院省立医院, 山东省济南市 250021;

2. 山东科技大学信电学院生物医学系, 山东省济南市 250031)

[关键词] 细胞生物学; 凝血酶对核因子 κB 及基质金属蛋白酶 2 表达的影响; 免疫细胞化学和免疫印迹法; 凝血酶; 核因子 κB ; 基质金属蛋白酶; 水蛭素

[摘要] 研究凝血酶是否通过激活核因子 κB 信号传导途径, 诱导体外培养的人脐静脉内皮细胞上调基质金属蛋白酶 2 表达, 以及重组水蛭素对该途径是否有拮抗作用。体外培养人脐静脉内皮细胞, 用免疫细胞化学和免疫印迹法分析核因子 κB 活化时由细胞浆至细胞核的动态改变, 用逆转录聚合酶链反应法评价基质金属蛋白酶 2 mRNA 的表达。结果发现, 凝血酶诱导脐静脉内皮细胞后 15 min 即有核因子 κB 的活化, 30 min 核内大量活化; 凝血酶诱导脐静脉内皮细胞表达基质金属蛋白酶 2 mRNA, 较高表达在 6~24 h。重组水蛭素可以抑制该过程。结果提示, 通过参与核因子 κB 激活传导信号途径, 凝血酶诱导脐静脉内皮细胞上调基质金属蛋白酶 2 mRNA 表达。水蛭素可以有效地抑制凝血酶诱导脐静脉内皮细胞上调基质金属蛋白酶 2 表达, 但不能完全抑制核因子 κB 的活化。

[中图分类号] Q2

[文献标识码] A

The Role of Nuclear Factor- κB in the Thrombin Induced Expression of Matrix Metalloproteinase-2 in Human Umbilical Vein Endothelial Cells

WANG Min, ZHANG Nai-Qin, CUI Liang-Qun, WANG Xiao-Jun, and HAN Qiu-Xia

(Shengli Hospital of Clinic and Medicine College, Shandong University, Jinan 250021, China)

[KEY WORDS] Thrombin; Nuclear Factor- κB ; Matrix Metalloproteinase; Hirudin; Human Umbilical Vein Endothelial Cell; Atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** To investigate whether thrombin could activate the signaling pathway-nuclear factor- κB (NF- κB) and upregulate the expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) on human umbilical vein endothelial cells (hUVEC) in vitro.

Methods hUVEC was stimulated with thrombin, adding to hirudin and heparin according to separate groups. Immunocytochemistry and Western blot analyses were used to detect the activation of NF- κB , which means the transfer of NF- κB from cytoplasm to nucleus. The expression of MMP-2 was determined with reverse transcriptase-polymerase chain reactin (RT-PCR).

Results It was found that thrombin could rapidly induce the activation of NF- κB in hUVEC. Baseline NF- κB nuclear binding in hUVEC increase by more than 14.13% and 31.29% at 15 min and 30 min respectively. Thrombin significantly increased MMP-2 mRNA expression and production in hUVEC with time-dependent pattern (1~48 h). Hirudin was able to inhibit the activation of NF- κB and expression of MMP-2 in hUVEC.

Conclusion Thrombin could activate the signal pathway-NF- κB and had remarkable effect on hUVEC expression of MMP-2, which may thereby influence the pathogenesis of atherosclerosis.

核因子 κB (nuclear factor- κB) 是广泛存在于真核细胞内的一个重要的细胞核转录因子, 它能影响和控制多种基因的表达调控, 在机体生理和病理条件下发挥重要功能。越来越多的证据表明, 在动脉粥样硬化斑块的发生、发展过程中受到核因子 κB 的调控^[1]。凝血酶活化后除参与凝血过程, 还使血管内

皮通透性增强、形态改变导致内皮屏障作用减弱^[2,3], 同时释放多种细胞因子和水解酶^[4,5], 进而参与多种复杂动脉粥样硬化斑块的发生、发展过程。本研究旨在探讨凝血酶对体外培养的人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cell, hUVEC) 核因子 κB 的活化及基质金属蛋白酶 2 (matrix metalloproteinase-2, MMP-2) mRNA 表达的影响, 以及重组水蛭素的抑制作用。

[收稿日期] 2003-12-29 [修回日期] 2004-04-01

[作者简介] 王敏, 博士, 教授, 从事心血管病临床及研究工作, 研究方向是冠心病及再狭窄机理。现工作单位是山东科技大学生物医学系, E-mail 为 minwang859@hotmail.com 和 wangm@ustc.edu.cn。张耐勤, 副主任医师, 从事临床及实验室工作。崔连群, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向是冠心病介入及再狭窄机理。

1 材料与方法

1.1 材料

凝血酶、胶原酶 I 型和胰蛋白酶为 Sigma 公司产品;重组水蛭素由山东阿华生物药物有限公司馈赠;Ⅷ相关抗原及鼠抗人核因子 κ B p65 抗体和 SABC(streptavidin biotin complex)试剂盒为武汉博士德公司产品。逆转录聚合酶链反应(reverse transcriptase-polymerase chain reactin, RT-PCR)检测细胞因子试剂盒为贝西生物技术公司产品。DEPC(焦碳酸二乙酯)、SDS(十二烷基磺酸钠)、甘氨酸、丙烯酰胺为上海 Sanson 生物工程公司产品。高分子量蛋白标准为 Gibco 公司产品。醋酸纤维膜为 Boehringer Mannheim 公司产品。Tris 碱为 Boehringer Mannheim 公司产品。TEMED(四甲基乙二胺)、DTT(二巯基苏糖醇)为 Serva 公司产品。

1.2 细胞体外培养

无菌取分娩 4 h 内健康新生儿脐带,用 D-Hanks 液冲洗脐静脉腔,注入 0.1% 胶原酶溶液,封闭两端置 37℃ 的 D-Hanks 液中,消化 10 min。离心,弃上清液。加入含 20% 胎牛血清 DMEM 培养基,调整细胞密度为 2×10^5 个/L,接种于培养瓶中,37℃ 的 CO₂ 孵育箱内培养。用 Ⅷ因子相关抗原免疫细胞化学鉴定内皮细胞。实验用第 2~5 代细胞。

1.3 免疫细胞化学分析

用培养基调整细胞密度为 2×10^5 个/L,以每孔 10 mL 接种在 6 孔培养板内的盖玻片上,培养 24~48 h 后培养板内已有 80% 细胞呈汇合状态,换无血清 DMEM 同步培养 24 h。实验分 4 组:凝血酶(4.0 ku/L)组、凝血酶(4.0 ku/L) + 水蛭素(6.0 ku/L)组、凝血酶(4.0 ku/L) + 肝素(6.0 ku/L)组及以相同时间正常培养的 hUVEC 为对照组。每组实验重复 3 次。用链霉亲和素—生物素—过氧化物酶复合物(streptavidin biotin complex, SABC)法进行免疫细胞化学分析。上述各组分别在 15 min、30 min 和 24 h 后取出盖玻片,冷丙酮固定,吹干。将盖玻片固定在洁净的载玻片上,加含 0.5% H₂O₂ 的甲醇,以灭活内源性过氧化物酶,蒸馏水洗涤,再滴加正常山羊血清封闭液。滴加鼠抗人核因子 κ B p65 多克隆抗体(一抗),阴性对照滴加 PBS,4℃ 过夜。PBS 洗 3 次,依次滴加生物素化山羊抗兔 IgG(二抗)、SABC 试剂, PBS 各洗 3 次。DAB(联苯二胺)显色,蒸馏水洗涤。镜下观察核因子 κ B 阳性细胞为棕褐色染色由胞浆移入胞核;用蒸馏水洗涤、脱水、透明、封片。镜下观察并照像,计数 100 个细胞中的阳性细胞数,随机选择 5 个视野,计算均值 $\times 100\%$ 为阳性细胞的比率。

1.4 免疫印迹杂交

实验分组同上。各组均再分别于用药后 15

min、30 min 终止培养。将加药后的各组血管内皮细胞用 2 000 r/min 离心收集。使细胞悬浮于细胞裂解缓冲液中,冰浴 15 min,离心,收集细胞,再将细胞悬浮于细胞裂解缓冲液中,用匀浆器使 90% 以上的细胞破裂,收集上清液中的核蛋白,4℃、10 000 g 离心 5 min,考马斯亮蓝法测定蛋白浓度后,取上清保存于 -70℃ 备用。每个样本以 30 μ g/泳道上样,SDS-PAGE 电泳,置含 10% 丙烯酰胺的 SDS-PAGE 于 Tris-甘氨酸电泳缓冲液中,电泳电压开始为 100 V/cm,溴酚蓝进入分离胶后,将电压增至 200 V/cm,待染料到达分离胶底部时停止电泳,从电泳装置上卸下凝胶转至电转印装置。在转膜缓冲液中,以电压 100 V、1 h 将电泳后蛋白转至醋酸纤维膜上。转膜结束后,用含 5% 脱脂奶粉的洗膜缓冲液,室温下轻轻震荡封闭 60 min。滴加稀释的鼠抗人核因子 κ B p65 多克隆抗体(一抗)于封闭液中室温下摇床封闭 30 min,使一抗与相应抗原蛋白充分结合。经洗膜液数次洗膜后,滴加与辣根过氧化物酶标记的二抗孵育 1 h,再用洗膜液洗膜 2 h。吸干滴水后,将膜于 DAB 试剂中温浴 2~3 min,显色,待显色适度时,用水漂洗终止显色反应,拍摄滤膜照片。分析显色条带的分子量大小,并根据信号强弱用影像软件 Smart View 分析蛋白表达量的相对值。

1.5 逆转录聚合酶链反应

将细胞按 2×10^5 /L 接种于 25 mL 培养瓶。实验分组同上。各组均按照用药后不同终止培养时间再分为不同亚组。每组实验重复 3 次。细胞用无钙镁离子 PBS 冲洗 2 遍,用刮棒将细胞刮下,离心、弃上清液。加入 Trizol 变性液吹打细胞,加入 2 mol/L 乙酸钠、水饱和酚以及氯仿,混匀。旋涡振荡器混匀 10 s,冰浴 10 min,离心(10 000 g \times 10 min,4℃)。取上清液,加入等体积的异丙醇, -20℃ 放置 1 h。离心,弃上清液,用 Trizol 变性液重溶,加入等体积的异丙醇混匀, -20℃ 放置 1 h。离心,弃上清液,加入适量 0.1% DEPC 水,混匀。取 2 μ L 总 RNA,稀释 100 倍后在紫外分光光度计下测定 A260 及 A280,计算所提总 RNA 含量。

逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)按试剂盒说明书操作。分别加入总 RNA、MMLV 逆转录酶、逆转录反应体系、随机引物、去 RNase 水,快速离心混匀,37℃、1 h,95℃ 灭活 MMLV 10 min,快速离心混匀使蒸气沉于管底。加入 PCR 反应体系、上下游引物、超净水进行 PCR 反应。PCR 循环条件:94℃ 变性 1 min \rightarrow 58℃ 退火 1 min \rightarrow 72℃ 延伸 1 min,循环 30 次,末次延长 7 min。PCR 扩增 MMP-2 cDNA,并同时扩

增 β -actin 作为内参照。MMP-2 引物为 5'-ACCTG-GATGCCCTCGTG-GAC-3' 和 5'-TGTGGCAGCACCAGGCAGC-3', 扩增片段长度为 447 bp; β -actin 引物为 5'-ATCATGTTTGAGACCTTCAACA-3' 和 5'-CATCTCTTCCTCGAAGTCCA-3', 扩增片段长度为 300 bp。

扩增产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。用凝胶成像分析系统测出阳性表达产物和 β -actin 的表达强度, 按公式计算相对系数: 相对系数 = 表达产物强度 \div β -actin 的表达强度。

1.6 统计学处理

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组均数间差异性检验用单因素方差分析, 组间两两比较用 q 检验。

2 结果

2.1 人脐静脉内皮细胞核因子 κ B 蛋白免疫细胞化学染色

当 hUVEC 未受凝血酶诱导时, 核因子 κ B 只是在细胞浆表达, 免疫细胞化学染色发现胞浆内呈现棕褐色; 凝血酶刺激 15 min, 核因子 κ B 转为活化态, 表现为棕褐色染色由胞浆移入胞核, 开始集中在胞核一侧, 部分胞核由圆形变为肾形、新月形; 凝血酶刺激 30 min, 棕褐色染色广泛出现在胞核内, 胞核阳性率明显增加。水蛭素干预组胞核内棕褐色染色明显较凝血酶组减少, 胞核阳性率降低 (图 1, Figure 1)。24 h 后各组未见核因子 κ B 表达。

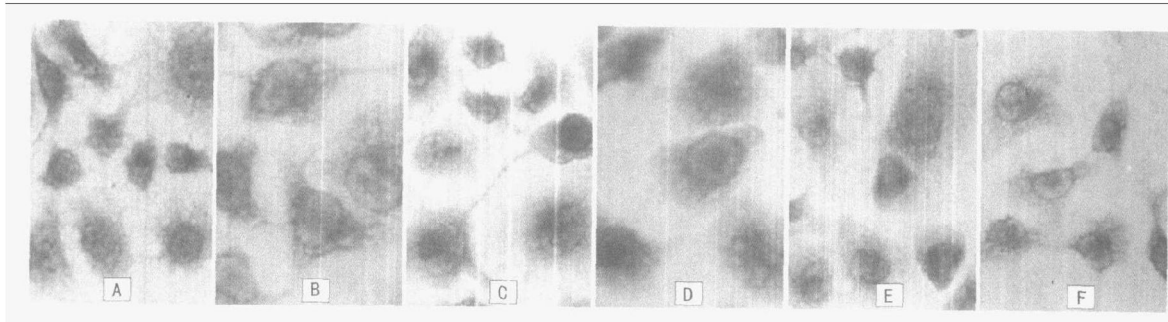


图 1. 人脐静脉内皮细胞免疫细胞化学分析 A 为对照组 15 min; B 为对照组 30 min; C 为凝血酶组 15 min; D 为凝血酶组 30 min; E 为凝血酶 + 水蛭素组 15 min; F 为凝血酶 + 水蛭素组 30 min。

Figure 1. Immunocytochemistry analyse of human umbilical vein endothelial cell

2.2 人脐静脉内皮细胞表达核因子 κ B

核提取物经蛋白电泳分析可见清晰蛋白条带。hUVEC 未受凝血酶刺激时, 核内提取物无核因子 κ B p65。凝血酶诱导 15 min, 核内可见核因子 κ B p65 蛋白表达, 光密度扫描值较对照组升高 14.13%; 凝血酶诱导 30 min, 核因子 κ B p65 蛋白表达增多, 较对照组升高 31.29%。加入水蛭素、肝素后均表现为核因子 κ B p65 表达减弱, 15 min 和 30 min 时水蛭素组较凝血酶组分别下降 9.9% 和 20.9%, 肝素组分别下降 7.9% 和 18.8% (表 1 和图 2, Table 1 and Figure 2)。各组 24 h 时深色条带均消失。

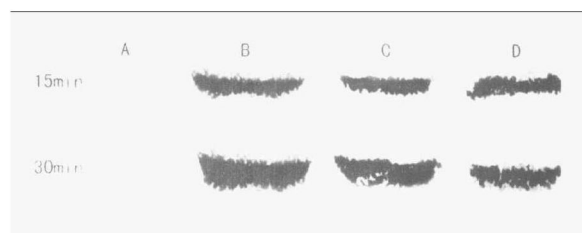


图 2. 不同时间凝血酶诱导人脐静脉内皮细胞表达核因子 κ B 以及水蛭素和肝素的干预作用 A 为对照组; B 为凝血酶组; C 为凝血酶 + 水蛭素组; D 为凝血酶 + 肝素组。

Figure 2. Effect of hirudin and heparin on thrombin Induced hUVEC in expression of NF- κ B in different times

表 1. 水蛭素、肝素干预不同时间对人脐静脉内皮细胞表达核因子 κ B 的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1. Effect of hirudin and heparin on thrombin Induced hUVEC in expression of NF- κ B

分 组	15 min	30 min
空白对照组	282 \pm 19	284 \pm 16
凝血酶组	322 \pm 33 ^a	393 \pm 34 ^a
凝血酶 + 水蛭素组	290 \pm 30 ^b	295 \pm 25 ^b
凝血酶 + 肝素组	296 \pm 25 ^b	303 \pm 33 ^b

a: $P < 0.05$, 与对照组比较; b: $P < 0.05$, 与凝血酶组比较。

2.3 人脐静脉内皮细胞表达基质金属蛋白酶 2

对照组 (0 h) hUVEC 无 MMP-2 mRNA 表达; 凝血酶加入 hUVEC 后 1 h 可见 MMP-2 表达, 较对照组升高 26.8% ($P < 0.05$); 高表达持续在 6 ~ 24 h, 较对照组升高 36.3% ~ 67.2% ($P < 0.01$); 48 h 表达明显减弱, 较对照组升高 29.6% ($P < 0.05$; 表 2 和图 3, Table 2 and Figure 3)。

6 h 时水蛭素、肝素均能够抑制凝血酶诱导 hU-

VEC MMP-2 的表达, 24 h 水蛭素仍能完全抑制, 但肝素的抑制作用不完全, 仍有较低浓度的 MMP-2 表达, 较水蛭素组高出 18.9% ($P < 0.05$; 表 3 和图 4, Table 3 and Figure 4)。

表 2. 不同时间凝血酶对人脐静脉内皮细胞表达基质金属蛋白酶 2 mRNA 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 2. Effect of thrombin on hUVEC expression of MMP-2 mRNA

时间 (h)	相对系数
0 (对照组)	0.002 ± 0.19
1	0.268 ± 0.16^a
6	0.363 ± 0.11^b
24	0.672 ± 0.14^b
48	0.296 ± 0.14^a

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与对照组比较。

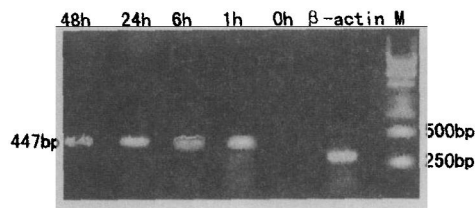


图 3. 不同时间凝血酶诱导人脐静脉内皮细胞表达基质金属蛋白酶 2 mRNA 的影响

Figure 3. Effect of thrombin on hUVEC expression of MMP-2 mRNA in different times

表 3. 水蛭素、肝素干预不同时间对人脐静脉内皮细胞表达基质金属蛋白酶 2 mRNA 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 3. Effect of hirudin and heparin on thrombin induced hUVEC in expression of MMP-2 mRNA

分 组	6 h	24 h
空白对照组	0.049 ± 0.03	0.065 ± 0.05
凝血酶组	0.216 ± 0.12^a	0.378 ± 0.11^b
凝血酶 + 水蛭素组	0.072 ± 0.02^c	0.085 ± 0.04^d
凝血酶 + 肝素组	0.053 ± 0.04^c	0.189 ± 0.07^c

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与对照组比较; c: $P < 0.05$, d: $P < 0.01$, 与凝血酶组比较。

3 讨论

凝血酶是一种重要的血管活性物质, 除了凝血作用外, 还对血管壁平滑肌细胞^[6]、内皮细胞^[7]及单核细胞等有广泛的影响^[8,9]。它还能促进血管壁非细胞成分的累积及血管内膜合成和释放炎症反应因

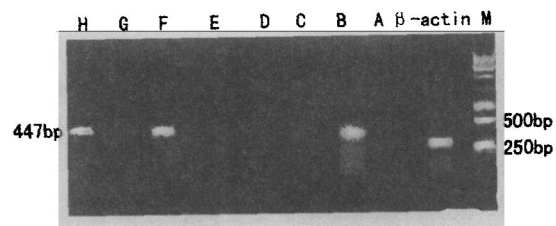


图 4. 水蛭素、肝素干预不同时间对人脐静脉内皮细胞表达基质金属蛋白酶 2 mRNA 的影响 A 为对照组 6 h; B 为凝血酶组 6 h; C 为凝血酶 + 水蛭素组 6 h; D 为凝血酶 + 肝素组 6 h; E 为对照组 12 h; F 为凝血酶组 12 h; G 为凝血酶 + 水蛭素组 12 h; H 为凝血酶 + 肝素组 12 h。

Figure 4. Effect of hirudin and heparin on thrombin induced hUVEC in expression of MMP-2 mRNA

子, 调节血浆白细胞及血管壁细胞的炎症反应, 因此在研究动脉粥样硬化斑块的发生发展过程中日益受到重视。本研究发现, 凝血酶使 hUVEC 核因子 κB 活性明显增加, 其活化的特点是有一定的时间性, 作用快, 维持时间短; 凝血酶能显著诱导 hUVEC 上调 MMP-2 mRNA 的表达, 在一定的浓度范围内, 二者呈一定的时间依赖关系; 水蛭素能抑制凝血酶诱导 hUVEC 表达 MMP-2 mRNA; 对核因子 κB 活化有一定的抑制作用, 但不完全彻底。

近十余年来, 人们发现核因子 κB 能与多种细胞基因的启动子和增强子序列位点发生特异性结合, 并促进基因转录和表达, 参与众多与免疫和炎症反应有关的基因转录调控。动脉粥样硬化一系列过程均有核转录因子核因子 κB 参与^[10]。有人用免疫荧光和免疫组织化学法证实动脉粥样斑块中纤维变性增厚的内膜和中膜以及粥样瘤处的平滑肌细胞、单核细胞和内皮细胞的核、浆内有核因子 κB 存在, 正常血管壁细胞则仅见于胞浆内。本研究发现, 免疫细胞化学染色可以观察到核因子 κB 激发的动态演变过程, Western blot 的结果也与之相符, 说明核因子 κB 参与了凝血酶对 hUVEC 的作用过程。然而由于细胞间信号转达的复杂性, 目前尚不能清楚地确定凝血酶作用于核因子 κB 信号通路的具体部位和环节。

在动脉粥样硬化的病变中, 动脉壁基质的增多和沉积也是其病变加重的一个关键环节, 动脉粥样硬化的病理特点是动脉内膜基质成分沉积、内膜增厚及中膜平滑肌细胞迁移增殖, 在增厚的内膜中 MMP-2 水平显著升高, 并与病变程度相关。其含量分布依次为粥样斑块 > 脂质斑块 > 正常内膜。研究表明 MMP-2 是平滑肌细胞迁移增殖, 穿过内膜弹力

纤维、基底膜等屏障的一种必需物质。在对内膜损伤的反应及粥样病变形成的过程中起关键作用,并影响病程的发展及并发症的产生,如管腔狭窄、管壁破裂及血栓形成等。在动脉粥样硬化病变中,可检测到多种 MMP 存在于病变的巨噬细胞、淋巴细胞、平滑肌细胞和内皮细胞中^[11]。Calis 等^[12]在体外实验发现凝血酶能够直接激活 MMP-2,并且促使培养的血管平滑肌细胞释放 MMP-2,认为凝血酶通过活化 MMP-2 降解基质促使平滑肌细胞迁移、斑块内血栓溶解和出血,最终导致动脉硬化的发生和硬化斑块的不稳定。反过来,斑块急性破裂在损伤血管局部产生凝血酶,有助于 MMP-2 激活;进一步促进动脉粥样硬化的发展。因此激活的 MMP 与凝血系统的相互作用在动脉硬化发生发展中是一重要的正反馈因素。本研究发现,凝血酶使 MMP-2 基因转录 1 h 出现,6~24 h 保持较高水平,说明凝血酶有促进内皮细胞上调 MMP-2 表达的作用。这可能是凝血酶诱发动脉粥样硬化的原因之一。

水蛭素是作用最强的特异性凝血酶抑制剂,它与凝血酶以等摩尔比形成非共价键紧密结合的稳定复合物,从而使凝血酶失活。本研究发现,水蛭素较肝素更具抑制 hUVEC 表达 MMP-2 的能力,但对抑制凝血酶诱导 hUVEC 活化核因子 κ B 的能力有限,仅发生于早期。凝血酶、水蛭素与核因子 κ B 及 MMP-2 关系的研究,将有助于找到治疗动脉粥样硬化及其并发症新的有效的途径。

[参考文献]

- [1] Collins T, Cybulsky ML. NF- κ B: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis? *J Clin Invest*, 2001, 107: 255-264
- [2] Schaphorst KL, Pvalko FM, Patterson CE. Thrombin-mediated focal adhesion plaque reorganization in endothelium: role of protein phosphorylation. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1997, 17: 443-455
- [3] Moore TM, Norwood NR, Creighton JR, Babal P, Brough GH, Shasby DM, et al. Receptor-dependent activation of store-operated calcium entry increases endothelial cell permeability. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2000, 279: L691-L698
- [4] Shimizu S, Gabazza EC, Hayashi T, Ido M, Adachi Y, Suzuki K. Thrombin stimulates the expression of PDGF in lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2000, 279: L503-L510
- [5] Papadimitriou E, Manolopoulos VG, Hayman GT, Maragoudakis ME, Unsworth BR, Fenton JW, Lelkes PI. Thrombin modulates vectorial secretion of extracellular matrix proteins in cultured endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 1997, 272: C1112-C1122
- [6] 王敏,崔连群,张承俊,王晓军,烟玉琴,秦凤菊. 水蛭素对凝血酶诱导的血管平滑肌细胞增殖的影响. *中国动脉硬化杂志*, 2003, 11 (7): 609-612
- [7] 王敏,崔连群,张承俊,王晓军,烟玉琴,秦凤菊. 凝血酶诱导血管内皮细胞生长因子的表达及水蛭素的抑制作用. *中国新药杂志*, 2004, 13 (3): 226-230
- [8] Cam P, George AS, Nageswara M, Marschall SR. New tricks for old dogs non-thrombotic effects of thrombin in vessel wall biology. *Circulation Research*, 2001, 88: 987
- [9] Minami T, Sugiyama A, Wu SQ, Abid R, Kodama Y, Aird WC. Thrombin and phenotypic modulation of the endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, 24 (1): 41-53
- [10] Blumberg PM. The beginning of the end: IKK and NF- κ B activation. *J Biol Chem*, 1999, 274 (39): 27 339-342
- [11] 于强,杨向红. 基质金属蛋白酶与动脉粥样硬化及斑块破裂的关系. *中国动脉硬化杂志*, 2003, 11 (6): 592-595
- [12] Galis ZS, Krausz R, Fenton JW, Libby P. Thrombin promotes activation of matrix metalloproteinase-2 produced by cultured vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997, 17: 483-489

(此文编辑 文玉珊)