

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2007)15-04-0256-05

血管紧张素 AT_2 型受体基因可调控体外培养的血管平滑肌细胞基质金属蛋白酶2的表达景涛¹, 何国祥¹, 王海东², 刘建平¹, 苗莉¹, 冉肇力¹

(第三军医大学西南医院 1. 心内科, 重庆介入心脏病学研究所, 2. 胸心外科, 重庆市 400038)

[关键词] 病理学与病理生理学; 血管紧张素 AT_2 型受体; 血管紧张素 AT_1 型受体; 血管平滑肌细胞; 强力霉素; 基因; 基质金属蛋白酶

[摘要] 目的 利用强力霉素—开放可调控哺乳动物表达系统, 对外培养血管平滑肌细胞的血管紧张素 AT_2 型受体表达进行有效调控, 在此基础上对基质金属蛋白酶2的表达受血管紧张素 AT_1 及其受体拮抗剂的影响进行研究。方法 建立强力霉素可调控表达血管紧张素 AT_2 型受体基因的双重稳定大鼠血管平滑肌细胞。观察该血管平滑肌细胞中血管紧张素 AT_2 型受体受调控表达情况, 以及血管紧张素 AT_1 及其1型、2型其受体拮抗剂干预上述细胞后基质金属蛋白酶2的表达情况变化。结果 强力霉素—开放可调控哺乳动物表达系统可成功介导血管紧张素 AT_2 型受体基因在原代培养大鼠主动脉血管平滑肌细胞的表达, 该表达受到强力霉素给予/去除的紧密调控; 强力霉素干预可在48 h内迅速诱导该血管平滑肌细胞表达血管紧张素 AT_2 型受体, 该表达在强力霉素干预后72 h进一步增强($P < 0.01$)。血管紧张素 AT_2 型受体基因的可调控表达抑制由于血管紧张素 AT_1 干预后引起的基质金属蛋白酶2表达的增强($P < 0.01$)。这一作用被血管紧张素 AT_1 型受体拮抗剂进一步增强($P < 0.01$); 而被加入2型受体拮抗剂干预取消; 同时给予上述两种拮抗剂时基质金属蛋白酶2的表达与基础状态时的情况一致。结论 血管紧张素 AT_1 干预增强基质金属蛋白酶2的表达, 该作用是通过血管紧张素 AT_1 型受体介导的; 经强力霉素诱导表达血管紧张素 AT_2 型受体基因可以明显抑制这一生物学作用, 说明血管紧张素 AT_2 型受体基因经诱导后表达可以有效调控血管平滑肌细胞细胞外基质合成和降解。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The Effect of Conditional Expression of Angiotensin AT_2 Type 2 Receptor Gene on the mRNA and Protein Expression of Matrix Metalloproteinases 2 in Rat Cultured Vascular Smooth Muscle CellsJING Tao¹, HE Guo-Xiang¹, WANG Hai-Dong², LIU Jian-Ping¹, MIAO Li¹, and RAN Bo-Li¹

(1. Department of Cardiology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, & Chongqing Institute of Interventional Cardiology; 2. Department of Cardiothoracic Surgery, Chongqing 400038, China)

[KEY WORDS] Pathophysiology; Angiotensin AT_1 Receptor; Angiotensin AT_2 Receptor; Vascular Smooth Muscle Cell; Doxycycline; Gene; Matrix metalloproteinases

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of angiotensin AT_2 (Ang AT_2) and its receptor antagonist on the matrix metalloproteinases 2 (MMP-2) mRNA and protein expression in double stable AT2R expression cell lines of VSMC. **Methods** To establish the double stable cells of rat vascular smooth muscle cells (VSMC), in which the expression levels of AT2R is tightly controlled by doxycycline (Dox). The VSMC were treated with Ang AT_1 , Dox, CV-11974, PD123319. The effect of overexpression of AT2R on the mRNA and protein expression of MMP-2 in VSMC were detected and the effects of AT1R antagonist (CV-11974) and AT2R antagonist (PD123319) on aforementioned target were studied. **Results** The doxycycline (Dox) on gene expression system can generate high level and regulable expression of AT2R which tightly controlled by addition/removal Dox. The expression of AT2R were induced obviously in double stable VSMC within 48 h by addition Dox and further, which enhanced after 72 h ($P < 0.01$). In the well established double stable VSMC lines, addition of Ang AT_1 resulted in an increase of the expression of the MMP-2 ($P < 0.01$). The MMP-2 expression was decreased by treatment with Dox ($P < 0.01$). Dox-induced decreased expression of MMP-2 were further enhanced by CV-11974 ($P < 0.01$), and were removed by PD123319. There are no difference in expression of MMP-2 between CV-11974, PD123319 simultaneously group with control group. **Conclusion** The enhancement effect of Ang AT_1 on the expression of MMP-2 is mediated by AT1R and inhibited by AT2R expression. It is suggested that the regulable expression of AT2R can control the synthesis and degradation of Extracellular matrix effectively.

[收稿日期] 2006-03-02 [修回日期] 2007-04-10

[基金项目] 国家自然科学基金(30400180)资助

[作者简介] 景涛, 博士, 主治医师, 主要从事冠心病的发病机制及防治研究, 联系电话为 023-8765171, E-mail 为 a65427862@public.cta.cq.cn。何国祥, 教授, 博士研究生导师, 主要从事冠心病的发病机制及防治研究, 联系电话为 023-8765171。通讯作者王海东, 博士, 主治医师, 主要从事冠心病的发病机制及防治研究, 联系电话为 023-8765330, E-mail 为 xwkwhd@sina.com。

血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMC)从血管中膜向内皮下迁移,并以自分泌、旁分泌形式分泌大量细胞因子和血管活性物质,是血管损伤后共同的病理生理过程^[1,2]。VSMC 迁移时,一方面分泌大量细胞外基质(extracellular matrix, ECM),一方面又产生基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMP)使 ECM 不断降解,因此血管再狭窄的过程也是基质重建的过程^[3]。另外,血管损伤后,局部血管壁血管紧张素(ANG)的基因表达及蛋白合成均增加^[4]。ANG 有 1 型受体(angiotensin I type receptor, AT1R)和 2 型受体(angiotensin II type receptor, AT2R)两种主要受体亚型,其中 AT2R 主要在胚胎组织中表达,在成年组织中表达量极低或没有表达^[5]。ANG 通过 AT1R 介导增加 VSMC 迁移能力^[6]。由于近年来的研究表明,AT2R 可能介导与 AT1R 相拮抗的生物学功能^[7],因此,本研究利用可调控 AT2R 基因哺乳动物表达系统,将 AT2R 基因导入 VSMC 使其在一定条件下进行可调控表达,在此基础上了解 AT2R 基因转染条件表达对外体培养 VSMC 中 MMP-2 表达的影响及其在再狭窄防治中的意义。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

ANG 美国 Sigma 公司, CV11974(日本 Takeda 制药公司赠送); PD133319(Univ. Emory, Dr. Zhao 惠赠), RNA-PCR 试剂盒(大连 TaKaRa 公司), 大鼠 MMP-2 引物(上海基康公司), 大鼠 GAPDH(上海基康公司), 羊多克隆 AT2R 抗体(美国 Santa Cruz 公司), 羊 MMP-2 多克隆抗体(美国 SantaCruz 公司), 鼠抗人 α -SM-actin 单克隆抗体(福建迈新生物技术公司)。

1.2 可调控的哺乳动物表达系统的建立

采用同源重组方法将 AT2R 目的基因片段克隆于含 TetO 重复序列的表达载体 pUHD 10-3 中,从而建立由调控质粒 pUHD 17-1hyg、哺乳动物表达质粒 pUHD 10-3/AT2R、荧光报告质粒 pUHC 13-3 以及提供新霉素筛选抗性的简单质粒 pSV2neo 四种成分组成的受强力霉素(doxycycline, Dox)调控的哺乳动物表达系统(Dox-On 系统)。

1.3 细胞培养

采用酶消化法培养 VSMC 培养和细胞呈特征性“峰”“谷”状生长;特异性鼠抗人 α 平滑肌肌动蛋白免疫组织化学染色证实为 VSMC。

1.4 实验分组

实验分为未转染对照组、未转染 VSMC+ ANG 10^{-7} mol/L 组、转染 VSMC 组、转染 VSMC+ ANG 10^{-7} mol/L 组、转染 VSMC+ ANG 10^{-7} mol/L+ Dox 1 g/L 组、转染 VSMC+ ANG 10^{-7} mol/L+ Dox 1 g/L+ CV-11974 10^{-7} mol/L 组和转染 VSMC+ ANG 10^{-7} mol/L+ Dox 1 g/L+ PD123319 10^{-7} mol/L 组;转染 VSMC+ ANG 10^{-7} mol/L+ Dox 1 g/L+ CV11974 10^{-7} mol/L+ PD123319 10^{-7} mol/L 组,共 8 组。

1.5 双重稳定血管平滑肌细胞的建立及血管紧张素 II 型受体基因和蛋白的表达检测

采用酶消化法原代培养大鼠主动脉 VSMC, 采用常规分子生物学方法连续两个回合转染体外培养的 VSMC, 并分别采用闪烁计数仪检测不同细胞克隆荧光素酶活性改变以及 RT-PCR 方法检测 AT2R 目的基因片段的 mRNA 表达情况,根据各个细胞克隆受 Dox 调控表达的程度,选择高诱导表达 AT2R 目的基因但低背景的背景细胞,作为双重稳定 VSMC。采用免疫印迹方法检测蛋白表达,采用凝胶成像系统进行图像分析。

1.6 血管平滑肌细胞基质金属蛋白酶 2 mRNA 表达的检测

用 TripureTM 试剂盒提取 RNA;应用 premier primer 5.0 软件设计特异性引物, MMP-2 引物长度为 490 bp,退火温度 50℃,正义 5'-TCA ACG GTC GGG AAT ACA-3';反义 5'-GCT GCC ACC AAT AGG-3'。GAPDH 引物长度为 294 bp,退火温度 50~60℃,正义 5'-GTG ACT TCA ACA GCA ACT CCC ATT G-3';反义 5'-GTT ATG GGG TCT GGG ATG GAA TTG TG-3'。PCR 扩增产物 1.2% 琼脂糖凝胶常规电泳,结果行凝胶扫描留存,并行图像分析 mRNA 表达量用 INT 表示。

1.7 血管平滑肌细胞基质金属蛋白酶 2 蛋白表达的检测

按 SP 试剂盒使用说明进行免疫组化染色,一抗工作浓度分别为 1:100,阴性对照用 PBS 代替一抗工作液。显微镜下观察及图像分析:每张玻片随机检测 5 个视野的吸光度值 $A \times 100$,计算均值和标准差。

1.8 统计学分析

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 11.0 进行统计分析,用 student's *t* 检验或单因素方差分析比较组间差异显著性。以 $P < 0.05$ 为差异具有显著性, $P < 0.01$ 为差异具有非常显著性。

2 结果

2.1 血管紧张素 AT_2 型受体蛋白在双重稳定血管平滑肌细胞中的表达

实验结果表明,未转染对照组检测不到AT₂R蛋白的表达,转染组中未经Dox干预的细胞未见到明显的AT₂R蛋白的表达(1.894 ± 1.482 ,与对照组比较, $P > 0.05$),转染后经Dox 1 g/L干预48 h后可以见到在双重稳定VSMC细胞中AT₂R蛋白被显著诱导表达(111.876 ± 9.912 ,与对照组比较, $P < 0.01$),这种表达在Dox干预后72 h进一步增强(156.477 ± 20.641 ,与48 h组比较, $P < 0.01$;图1)。

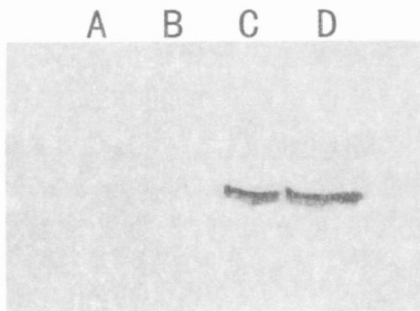


图1. 血管紧张素 AT_2 型受体蛋白表达检测结果(免疫印迹法) A为未转染对照组, B为转染后未经Dox干预组, C为转染后经Dox 1g/L干预48 h组, D为转染后经Dox 1 g/L干预72 h组。

2.2 血管紧张素 AT_2 型受体可调控表达对双重稳定血管平滑肌细胞中基质金属蛋白酶2 mRNA的表达的影响

未转染对照组中存在着很弱的MMP-2基础表达(79.263 ± 6.228),给予Ang I 的刺激后MMP-2表达显著上调(185.359 ± 8.486);在转染后经过筛选建立的双重稳定细胞中,MMP-2的基础表达情况与未转染对照组无区别(77.059 ± 6.599 , $P > 0.05$);并且其在接受Ang I 刺激后MMP-2表达增加的情况也与未转染VSMC中一致(185.660 ± 5.297 , $P > 0.05$);在双重稳定VSMC接受Dox干预下表达AT₂R后,由Ang I 刺激引起的MMP-2表达增加的现象受到抑制(137.594 ± 9.375),AT₁R拮抗剂CV-11974的干预使MMP-2的表达进一步减少(92.7983 ± 7.099),与对照组比较,此时MMP-2的表达量仍旧高于对照组($P < 0.01$),结果提示Ang I 在AT₁R介导下促进MMP-2表达增加,而AT₁R拮抗剂在一定程度上对AT₂R的作用发挥具有协同效应;在双重稳定细胞使用AT₂R拮抗剂干预的结果(184.618 ± 7.123)与双重稳定VSMC未接受Dox干预而给予Ang I 刺激时结果一致(185.660 ± 5.297 , $P > 0.05$),细

胞中MMP-2均表现较高程度的表达,提示AT₂R介导对MMP-2负向调节的作用;同时采用AT₁R拮抗剂和AT₂R拮抗剂干预双重稳定VSMC则Ang I 由AT₁R及AT₂R介导产生的对MMP-2表达的生物学效应完全被解除(78.7461 ± 6.143)。结果说明,AT₂R的表达可以抑制由Ang I 刺激产生的MMP-2表达增强,后者是通过AT₁R的介导发挥作用;AT₂R在介导Ang I 这一生物学效应上具有与AT₁R相拮抗的作用;在VSMC同时表达AT₁R和AT₂R的情况下,使用AT₁R拮抗剂阻断AT₁R的生物学效应可能通过使Ang I 更多地与AT₂R结合而发挥作用,进而表现出以AT₂R介导的生物学效应(图2)。

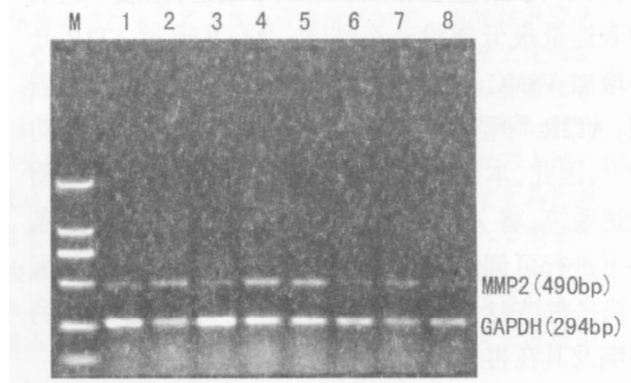


图2. 血管紧张素 AT_2 型受体可调控表达对双重稳定血管平滑肌细胞中基质金属蛋白酶2 mRNA表达的影响 M为marker, 1为未转染对照组, 2为未转染VSMC+ Ang I 10^{-7} mol/L组, 3为转染组, 4为转染组+ Ang I 10^{-7} mol/L, 5为转染组+ Ang I 10^{-7} mol/L+ Dox 1 g/L, 6为转染组+ Ang I 10^{-7} mol/L+ Dox 1 g/L+ CV-11974 10^{-7} mol/L组, 7为转染组+ Ang I 10^{-7} mol/L+ Dox 1 g/L+ PD123319 10^{-7} mol/L组, 8为转染组+ Ang I 10^{-7} mol/L+ Dox 1 g/L+ CV-11974 10^{-7} mol/L+ PD123319 10^{-7} mol/L组。

2.3 血管紧张素 AT_2 型受体可调控表达对双重稳定血管平滑肌中基质金属蛋白酶2蛋白表达的影响

结果显示,未转染对照组中,可以见到少许VSMC胞浆内存在MMP-2棕黄色阳性着色,其染色强度很弱、在胞浆中散在分布(图3A);转染后获得的双重稳定VSMC基础状态下少数细胞在胞浆内也存在很弱的MMP-2棕黄色阳性着色,两者间比较差异无显著性(图3B);给予Ang I 干预后,上述两组中MMP-2阳性着色的VSMC的数量及强度均显著增加($P < 0.01$;图3C);而在双重稳定VSMC给予Dox干预后,MMP-2阳性表达显著减弱(图3D);这一减弱的趋势被AT₁R拮抗剂CV-11974进一步增强;而被加入AT₂R拮抗剂干预而取消;同时给予AT₁R拮抗剂和AT₂R拮抗剂时MMP-2的表达恢复基础状态时的表达强度(表1)。

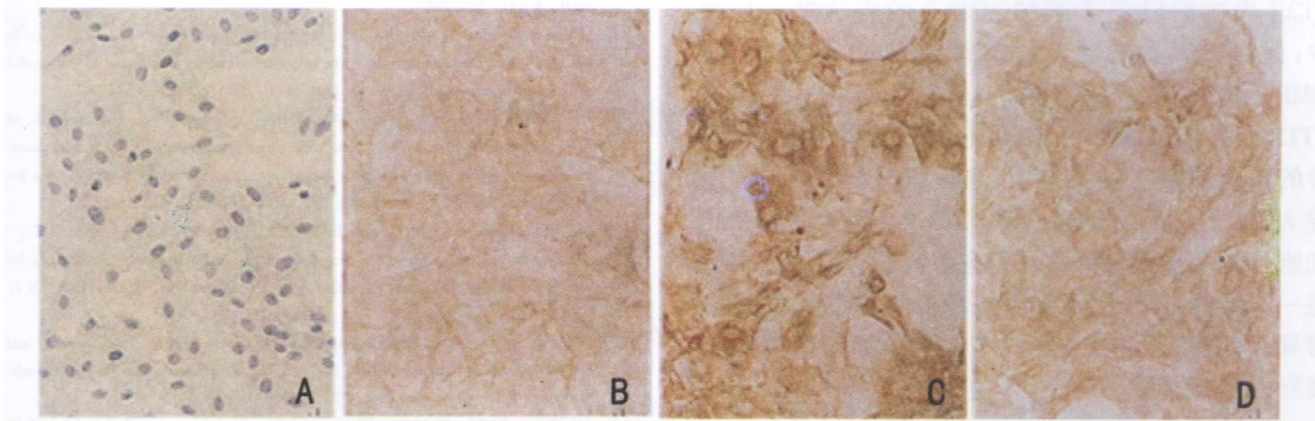


图 3. 双重稳定血管平滑肌细胞中基质金属蛋白酶 2 免疫细胞化学染色 (SP×200) A 为阴性对照(苏木素复染); B 为双重稳定 VSMC 细胞中 MMP-2 的表达; C 为双重稳定 VSMC 细胞中 Ang II 10^{-7} mol/L 刺激后 MMP-2 的表达; D 为 Ang II 10^{-7} mol/L+ Dox 1 g/L 刺激后, 双重稳定 VSMC 细胞中 MMP-2 的表达。

表 1. 血管紧张素 II 型受体可调控表达对双重稳定血管平滑肌细胞中基质金属蛋白酶 2 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

分 组	吸光度值
未转染	0.026 ± 0.015
未转染+ Ang II组	0.155 ± 0.015 ^a
转染 Dox(-)	0.023 ± 0.010
转染 Dox(-) + Ang II组	0.149 ± 0.023 ^a
转染+ Dox (1 g/L)	
Ang II组	0.106 ± 0.008 ^{ab}
Ang II+ CV 组	0.050 ± 0.019 ^{ab}
Ang II+ PD 组	0.153 ± 0.017 ^a
Ang II+ CV+ PD 组	0.024 ± 0.009 ^b

a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.01$, 与转染 Ang II 组比较 ($n = 10$)。

3 讨论

血管损伤后新生内膜形成的过程,也是基质重建的过程,众多的生长因子和细胞因子参与这一过程^[5]。其中,血管局部存在的肾素-血管紧张素系统(renin-angiotensin system, RAS)参与再狭窄发生的全过程,是促进再狭窄发生十分重要的因素之一^[8,9]。由于 AT1R 在生长发育过程中始终保持较高水平的稳定表达,并且在血管损伤后表达进一步增加,而 AT2R 在血管损伤后仅重新出现极少量的表达^[10],因此使损伤血管增强表达 AT2R 可能有利于再狭窄的防治。不过,正常情况下 AT2R 主要在胚胎组织中表达,而在成年组织中表达量极低或没有表达^[5]。在这种情况下导入 AT2R 基因后,如果其表达处于无调控状态,将可能造成严重后果。基于这一认识,本研究使 VSMC 在给予 Dox 后可控制

性地增强表达 AT2R,一方面可以利用 AT2R 发挥其拮抗 AT1R 生物学效应的有利作用;同时,又可以最大程度地减少这种由于过度表达成熟组织细胞本来并不表达的 AT2R 后,可能带来的各种潜在的不利影响。

细胞周围的细胞外基质(ECM)的迅速降解被认为是组织中细胞迁移的先决条件,也是 VSMC 从中膜向内膜迁移的关键^[11]。MMP^[12]是一种能特异性降解 ECM 各成分的一种内源性锌依赖性酶家族,对 ECM 有广泛的降解作用。胶原是 ECM 的主要成分,血管壁细胞间胶原以 IV 型为主,Ⅰ型胶原参与基底膜的形成。MMP-2 是Ⅰ型胶原酶(明胶酶)的主要成员,其主要降解底物为Ⅰ(Ⅱ和Ⅲ)型胶原。在再狭窄病变中大量平滑肌细胞,失去了收缩功能,以自分泌、旁分泌方式分泌大量 MMP,降解细胞外基质。平滑肌细胞分泌的 MMP-2、MMP9 可有效降解基底膜,为细胞迁移清扫道路^[13]。研究表明^[14],在球囊损伤后 1 周的新生内膜中出现 MMP 染色阳性,此后明确定位于新生内膜管腔面,并在 VSMC 迁移、增生过程中一直存在,应用 MMP 抑制剂可使 VSMC 向内膜的迁移显著减少,说明 MMP-2 对 VSMC 的迁移具有重要作用。Uzui 等^[15]也证明 MMP-2 是 VSMC 通过基底膜屏障所必需。本实验在转录和翻译水平的结果均表明,在 Ang II 刺激后, MMP-2 表达显著升高,提示 MMP-2 参与了由 Ang II 刺激产生的 VSMC 迁移的过程,采用 Dox 干预使该双重稳定 VSMC 表达 AT2R 蛋白后, Ang II 刺激所引起的 MMP-2 表达升高得到显著抑制,说明 AT2R 可以通过减少 MMP-2 表达来减少细胞外基质的降解,从而减少 VSMC 迁移。实验同时显示 AT1R 拮抗剂 CV-11974 可使

AT2R 表达后已经下调的 MMP-2 的表达进一步减少;而 AT2R 拮抗剂 PD123319 则解除了 AT2R 对 MMP-2 表达的抑制作用。结果提示 Ang Ⅱ通过 AT1R 介导增强 MMP-2 的表达,而 AT2R 对 AT1R 介导的该效应具有拮抗作用,说明外源性给予 Dox 诱导 AT2R 表达后可以通过调节 MMP-2 表达,对 VSMC 细胞外基质形成和降解进行有效调控。以上结果为进一步将稳定表达 AT2R 的 VSMC 在体引入损伤血管局部,进而了解其在再狭窄防治中的作用奠定了良好的实验基础。

[参考文献]

- [1] Zargham R, Thibault G. α 8beta1 Integrin expression in the rat carotid artery: involvement in smooth muscle cell migration and neointima formation [J]. *Cardiovasc Res*, 2005, **65** (4): 813-822.
- [2] 景涛,何国祥,刘建平,王海东,吴昊,王耿,等.坎地沙坦,PD123319 及金雀异黄素对大鼠血管平滑肌细胞迁移影响[J].中国新药与临床杂志,2005, **24** (1): 34-38.
- [3] Newby AC. Matrix metalloproteinases regulate migration, proliferation, and death of vascular smooth muscle cells by degrading matrix and non-matrix substrates [J]. *Cardiovasc Res*, 2006, **69** (3): 614-624.
- [4] 刘建平,唐波,何国祥.外加电场诱导大鼠血管平滑肌细胞形态及迁移行为变化与血管紧张素 Ⅱ受体和血小板源生长因子受体的关系[J].中国动脉硬化杂志,2006, **14** (3): 189-193.
- [5] Takeda Matsubara Y, Matsubara K, Ochi H, Ito M, Iwai M, Horiuchi M. Expression of endothelial angiotensin Ⅱreceptor mRNA in pregnancy-induced hypertension [J]. *Am J Hypertens*, 2003, **16** (12): 993-999.
- [6] Jing T, He GX, Liu JP, Wang G, Wu H, Wang HD. Role of angiotensin Ⅱand angiotensin Ⅱreceptors in vascular smooth muscle cell migration in vitro [J]. *Chin Med J*, 2002, **115** (5): 649-653.
- [7] Jugdutt BI, Menon V. Upregulation of angiotensin Ⅱtype 2 receptor and limitation of myocardial stunning by angiotensin Ⅱtype 1 receptor blockers during reperfused myocardial infarction in the rat [J]. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 2003, **8** (3): 217-226.
- [8] Okumura M, Iwai M, Ide A, Mogi M, Ito M, Horiuchi M. Sex difference in vascular injury and the vasoprotective effect of valsartan are related to differential AT2 receptor expression [J]. *Hypertension*, 2005, **46** (3): 577-583.
- [9] Browatzki M, Larsen D, Pfeiffer CAM, Gehrke SG, Schmidt J, Kranzhofer A, et al. Angiotensin Ⅱstimulates matrix metalloproteinase secretion in human vascular smooth muscle cells via nuclear factor-kappaB and activator protein 1 in a redox-sensitive manner [J]. *J Vasc Res*, 2005, **42** (5): 415-423.
- [10] Sales VL, Sukhova GK, Lopez-Ilasaca MA, Libby P, Dzau VJ, Pratt RE. Circulation. Angiotensin type 2 receptor is expressed in murine atherosclerotic lesions and modulates lesion evolution [J]. *Circulation*, 2005, **112** (21): 3328-3336.
- [11] Newby AC. Matrix metalloproteinases regulate migration, proliferation, and death of vascular smooth muscle cells by degrading matrix and non-matrix substrates [J]. *Cardiovasc Res*, 2006, **69** (3): 614-624.
- [12] 杨晓云,王琳,曾和松,周宁,卜军,袁永辉.辛伐他汀对兔动脉粥样硬化斑块中核因子 ⅡB-DNA 结合活性和基质金属蛋白酶 1 及 3 表达的影响[J].中国动脉硬化杂志,2006, **14** (4): 277-280.
- [13] Newby AC. Dual role of matrix metalloproteinases (matrixins) in intimal thickening and atherosclerotic plaque rupture [J]. *Physiol Rev*, 2005, **85** (1): 1-31.
- [14] Ha KT, Lee TK, Kwak KH, Kim JK, Kim DI, Choi DY, et al. Inhibitory effect of ChorDeung-San on human aortic smooth muscle cell migration induced by TNF- α through inhibition of matrix metalloproteinase-2 and -9 activity [J]. *Vascul-Pharmacol*, 2004, **41** (3): 83-90.
- [15] Oak MH, El-Bedoui J, Anglard P, Schinri-Kerth VB. Red wine polyphenolic compounds strongly inhibit pro-matrix metalloproteinase-2 expression and its activation in response to thrombin via direct inhibition of membrane type 1-matrix metalloproteinase in vascular smooth muscle cells [J]. *Circulation*, 2004, **110** (13): 1861-867.
- [16] Uzui H, Lee JD, Shimizu H, Tsutani H, Ueda T. The role of protein tyrosine phosphorylation and gelatinase production in the migration and proliferation of smooth muscle cells [J]. *Atherosclerosis*, 2000, **149** (1): 51-59.
- [17] Stieger K, Le Meur G, Lasne F, Weber M, Deschamps JY, Nivard D, et al. Long-term doxycycline-regulated transgene expression in the retina of nonhuman primates following subretinal injection of recombinant AAV vectors [J]. *Mol Ther*, 2006, **13** (5): 967-975.

(此文编辑 李小玲)