

# 细胞外基质成分对肝星形细胞 MMP-2、TIMPs和 MT1-MMP表达的影响

李从岩<sup>1</sup>, 李一雷<sup>2</sup> (1. 吉林大学再生医学科学研究所, 长春 130021; 2. 吉林大学基础医学院病理生物学教育部重点实验室, 长春 130021)

摘要: 目的 研究细胞外基质 (ECM) 的组成和结构变化对基质金属蛋白酶 -2 (MMP-2)、膜型基质金属蛋白酶 -1 (MT1-MMP) 及基质金属蛋白酶组织抑制物 (TIMPs) 表达及活性的影响, 探讨 MMP-2、TIMPs 和 MT1-MMP 对细胞外基质降解的调节作用。方

作者简介: 李从岩, 男, 博士在读, 讲师

Tel: 13104301908

E-mail: leecongyan@yahoo.com.cn

法 将人肝星状细胞分别培养于不同的细胞外基质中,采用酶谱分析测定 MMP-2; Western blot测定 MT1-MMP的表达量;反向酶谱分析测定 TIMPs的表达量; RT-PCR测定 MMP-2、TIMPs和 MT1-MMP的 mRNA表达量。结果 I型胶原表面和内部培养的人肝星形细胞(HSC)的 MMP-2酶原及 MMP-2, TIMP-2, MT1-MMP及其 mRNA表达明显增强,而未聚合的 I型胶原单体分子则无此作用,类似于基底膜成分的 Matrigel对 MMP-2的表达也没有明显影响。结论 在不同的细胞外基质成分中, HSC的 MMP-2, TIMPs和 MT1-MMP表达量不同;在细胞外基质降解的过程中, MMP-2、TIMPs和 MT1-MMP可能一起对细胞外基质的合成和降解进行调节。

关键词:细胞外基质;基质金属蛋白酶-2(MMP-2);膜型基质金属蛋白酶 1(MT1-MMP);基质金属蛋白酶组织抑制物(TIMPs);肝星形细胞(HSC); I型胶原

中图分类号:R34 文献标识码:A 文章编号:1007-7693(2008)05-0389-05

## Effects of Extracellular Matrix on Expression of MMP-2, TIMPs and MT1-MMP of Hepatic Stellate Cells

LI Cong-yan<sup>1</sup>, LI Yi-lei<sup>2</sup> (1. Institute of Frontier Medical Sciences, Jilin University, Changchun 130021, China; 2. The Key Laboratory of Pathobiology, School of Basic Medical Sciences, Jilin University, Changchun 130021, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To study the effects of extracellular matrix (ECM) on expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), membrane type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases (TIMPs) of HSC, and inquire into the modulation of MMP-2, MT1-MMP and TIMPs on the degradation of ECM. **METHODS** Human hepatic stellate cells were cultured in different components of extracellular matrix. Employ the methods of zymogram analysis to determine the expression of MMP-2, western blot to determine MT1-MMP, reverse zymogram analysis to determine the expression of TIMPs, RT-PCR to determine the expression of mRNA of MMP-2, MT1-MMP and TIMPs. **RESULTS** Human HSCs cultured in the type I collagen gel and on its surface, pro-MMP-2 and its mRNA, MMP-2 and its mRNA, TIMP-2 and its mRNA, MT1-MMP and its mRNA are obviously increased, but not in the unpolymerized collagen I, as same as the basement membrane components Matrigel. **CONCLUSION** In different components of ECM, there were different expressions of MMP-2, MT1-MMP and TIMP-2. We assumed that MMP-2, MT1-MMP and TIMP-2 might give the synthesis and degradation of ECM a modulation together.

**KEY WORDS:** extracellular matrix (ECM); matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), membrane type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP); tissue inhibitors of matrix metalloproteinases (TIMPs); hepatic stellate cells (HSCs); type I collagen gel

细胞外基质(extracellular matrix, ECM)在维持正常组织结构与功能及细胞生长、分化过程中起到非常重要的作用。ECM的降解主要依靠蛋白水解酶,而基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)家族在四类蛋白水解酶中是最为重要的一组蛋白水解酶。目前已至少发现了20种,它们几乎能降解ECM的所有成分。近年发现活化的肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs)不仅能合成分泌基质金属蛋白酶-2(MMP-2),而且能合成膜型基质金属蛋白酶-1(MT1-MMP)和基质金属蛋白酶组织抑制物-2(TIMP-2)<sup>[1-3]</sup>,而且它们之间的关系也正在逐步被阐明<sup>[4-6]</sup>。为了解MMP-2, MT1-MMP, TIMPs和细胞外基质降解之间的调节作用,笔者试图利用生物化学和分子生物学等技术手段,研究细胞外基质成分对HSC的MMP-2, MT1-MMP和TIMPs表达的影响,从而了解ECM组成和结构的改变所导致的相应细胞MMP-2, MT1-MMP和TIMPs表达量的变化,探讨MMP-2, MT1-MMP及TIMPs对细胞外基质降解的调节作用。

### 1 仪器、材料与试剂

人肝脏星形细胞系L90,由Tohoku大学医学院Dr. Murakami惠赠。porcine type I collagen(Nitta Gelatin, Osaka, Japan), Collagenase(Nitta Gelatin, Osaka, Japan), Matrigel

(Becton Dickinson Labware), KR-20000T高速低温离心机(Kubota日本), RF-540荧光分光光度计(Shimida日本), ATTA电泳装置(日本), PCR扩增仪(日本), LSM4倒置激光扫描显微镜 Carl Zeiss(德国),微量低温高速离心机(日本),其它试剂均为国产或进口分析纯。

### 2 方法

#### 2.1 细胞培养

人肝脏星形细胞培养于含10%小牛血清和抗菌素的DMEM中,培养条件为37℃, 5% CO<sub>2</sub>, 空气湿度95%。按1:3的比例传代。

#### 2.2 细胞外基质成分包被培养皿后的细胞培养分组

为观察细胞外基质的不同成分与不同结构对肝脏星形细胞MMP-2、MT1-MMP和TIMPs表达的影响,待细胞融合数接近80%后用0.25%胰蛋白酶37℃消化2 min,收集被消化的细胞悬液,经离心洗涤,按下列各组操作。

**2.2.1 对照组 (on polystyrene)** 将1 mL浓度为 $1 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$ 的细胞直接接种于未包被任何细胞外基质成分的培养皿中。

**2.2.2 未聚合的 I型胶原单体 (on monomeric type I collagen)** 用 $0.001 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ HCl}$ 将 I型胶原溶液稀释至终

浓度为  $0.3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , pH 3.0, 将此溶液平铺于培养皿内 30 min, 弃去胶原溶液后室温干燥 60 min。取  $1 \text{ mL}$  浓度为  $1 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$  的细胞悬液平铺于其表面。

**2.2.3 聚合的 I 型胶原表面 (on type I collagen gel)** 用无血清的  $2 \times \text{DMEM}$  将浓度为  $3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 I 型胶原溶液调至终浓度为  $1.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 取  $1.5 \text{ mL}$  平铺于培养皿表面, 室温静置 60 min 待其聚合。取  $1 \text{ mL}$  浓度为  $1 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$  的细胞悬液平铺于其表面。

**2.2.4 聚合的 I 型胶原内部 (in type I collagen gel)** 细胞悬液与溶于  $\text{DMEM}$  的 I 型胶原溶液按 1:1 比例混合, 使细胞终浓度为  $5 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$  取  $0.2 \text{ mL}$  混合物平铺于已聚合的 I 型胶原表面, 静置 2 h 待其聚合后加入  $1 \text{ mL}$  培养液。

**2.2.5 Matrigel 表面 (on Matrigel)** 用无血清的  $\text{DMEM}$  将 Matrigel 溶液浓度调至  $2.8 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 取  $1.5 \text{ mL}$  平铺于培养皿表面, 静置 60 min 待其聚合。取  $1 \text{ mL}$  浓度为  $1 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$  的细胞悬液平铺于表面。

每组均设 3 个平行样品, 并经多次重复试验。

### 2.3 酶谱分析

常规 10% SDS-PAGE 凝胶电泳。电泳完成后, 为去除底物胶中过量的 SDS, 将底物胶置于洗涤缓冲液 ( $2.5\% \text{ Triton X-100}$ ,  $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Tris}$ , pH 7.6) 中室温缓慢摇摆 60 min, 中间换液一次, 以去除 SDS; 将底物胶用孵育缓冲液 ( $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Tris HCl}$ ,  $150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaCl}$ ,  $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ CaCl}_2$ , pH 7.8) 清洗 3 次, 然后将底物胶置于孵育缓冲液中  $37^\circ\text{C}$  缓慢摇摆 18 h; 孵育结束后经考马斯亮蓝染色 90 min 及脱色液 (45% 甲醇, 10% 冰乙酸) 脱色 90 min。干燥封胶。利用图像分析程序, 对酶谱分析结果进行灰度扫描, 其值用  $\text{Pixel} \times \text{mm}^2$  表示。从而对各组细胞的酶活性进行定量比较。每组细胞均设 3 个平行样本, 并经多次重复实验。

### 2.4 反向酶谱分析

底物胶的配制与电泳过程同上。底物胶经洗涤缓冲液清洗及 SDS 置换之后, 置于  $10 \text{ mL}$  反向孵育缓冲液中, 加入 10 倍浓缩的纤维母细胞条件培养液  $0.5 \text{ mL}$ 。  $37^\circ\text{C}$  缓慢摇摆 2 h, 底物胶中含有 TIMP 的区域因 TIMP 的存在而使底物的降解受到抑制, 经考马斯亮蓝染色 90 min 及脱色液 (45% 甲醇, 10% 冰乙酸) 脱色 90 min, 从而在染色后显示出清晰的条带。

### 2.5 逆转录多聚酶链反应 (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)<sup>[7]</sup>

**2.5.1 采用异硫氰酸胍法提取细胞总 RNA** 提取的 RNA 样品经电泳分析, 清晰可见 28S 及 18S 核糖体 RNA 条带, 证明样品的完整性。

**2.5.2 合成 cDNA 第一链** 所有按上述方法提取的总 RNA 样品, 都利用 cDNA 合成试剂盒 (Pharmacia, Biotech, Osaka, Japan) 进行 cDNA 第一链的合成。

**2.5.3 cDNA 扩增** 所使用的引物包括:

MMP-2: 有意链引物:  $5' \text{-TGG GCA ACA AAT ATG AGA GC-3'}$ 。反意链引物:  $5' \text{-CGG CAT CCA GGT TAT CGG GG-}$

$3'$ 。MMP-2 扩增产物的全长为 791 bp。

内部参照:  $\beta$ -actin: 有意链引物:  $5' \text{-GCC CAG AGC AAG AGA GGC AT-3'}$ 。反意链引物:  $5' \text{-GGC CAT CTC TTG CTC GAA GT-3'}$ 。全长 513 bp。

MTI-MMP: 有意链引物:  $5' \text{-ATC AAC ACT GCC TAC GAG AG-3'}$ ; 反意链引物,  $5' \text{-GCC CAC CGC CAG CAC CAG GA-3'}$ 。MTI-MMP 扩增产物的全长为 567 bp。

TIMP-2: 有意链引物,  $5' \text{-GTG GAC TCT GGA AAC GAC AT-3'}$ ; 反意链引物,  $5' \text{-CCA GGA AGG GAT GTC AGA GC-3'}$ 。TIMP-2 扩增产物的全长为 583 bp。

TIMP-1: 有意链引物,  $5' \text{-GGG GCT TCA CCA AGA CCT AC-3'}$ ; 反意链引物:  $5' \text{-AAG AAA GAT GGG AGT GGG AA-3'}$ 。TIMP-1 扩增产物的全长为 279 bp。

利用 Super Tag Premix Kit 试剂盒 (Sawady, Tec. Inc., Tokyo, Japan) 进行扩增反应。①将第一链 cDNA 合成产物加热至  $90^\circ\text{C}$  5 min 以灭活逆转录酶。②在  $0.5 \text{ mL}$  EP 管中加入下列成分:  $3 \mu\text{L}$  cDNA,  $1 \mu\text{L}$  ( $20 \sim 40 \text{ pmol}$ ) upstream primer,  $1 \mu\text{L}$  ( $20 \sim 40 \text{ pmol}$ ) downstream primer,  $47 \mu\text{L}$  Mix, 2 滴矿物油。③样品在经过  $94^\circ\text{C}$ , 5 min 变性后, 按下列反应条件进行扩增: 1、MMP-1, TIMP-1 和 MTI-MMP:  $92^\circ\text{C}$ , 60 s,  $56^\circ\text{C}$ , 45 s,  $72^\circ\text{C}$ , 90 s。循环 30 次。2、MMP-2, TIMP-2:  $92^\circ\text{C}$ , 60 s,  $60^\circ\text{C}$ , 45 s,  $72^\circ\text{C}$ , 90 s。循环 30 次。④最后一次循环后扩增产物置于  $72^\circ\text{C}$  5 min。⑤样品经酚-氯仿抽提以去除矿物油。  $-70^\circ\text{C}$  保存, 备电泳分析。

**2.5.4 PCR 产物的分析** 取  $5 \mu\text{L}$  PCR 扩增产物, 在 2% 的琼脂糖凝胶水平电泳上做扩增产物检测分析。采用多光源扫描仪扫描凝胶, 用下列公式计算 MMP-2、TIMPs 和 MTI-MMP 的 mRNA 表达水平。

$$\text{产物的含量} = \frac{\text{相应 MMP 扩增产物的吸光度值}}{\beta\text{-actin 扩增产物的吸光度值}}$$

### 2.6 Western 免疫印迹法

细胞 (MTI-MMP) 经裂解液提取蛋白, 蛋白加热变性后在 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶中电泳分离, 然后采用半干法将凝胶中蛋白电转印到聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene difluoride, PVDF) 膜上。用 5% 的脱脂奶粉封闭后, 先后加特异性第一抗体和相对直的第二抗体, 最后经化学发光法在 X 片上显影并扫描结果条带, 测定光密度值。

## 3 结果

### 3.1 培养于不同的基质成分中的肝脏星形细胞 MMP-2 酶原和 MMP-2 RNA 的表达

直接培养于培养皿表面的人 HSCs 有稳定的 MMP-2 酶原及 MMP-2 的表达。但培养于聚合的 I 型胶原表面和内部的人 HSC MMP-2 酶原及 MMP-2 表达明显增强。而同样为 I 型胶原, 但因结构不同, 尚未聚合的 I 型胶原单体分子则无此作用。而类似于基底膜成分的 Matrigel, 其成份包括层粘连蛋白 (56%)、IV 型胶原 (31%) 以及少量其它基质分子, 但不含 I 型胶原, 也对 MMP-2 酶原及 MMP-2 的表达没有影响。细胞裂解液检测结果与条件培养基一致。见表 1 和表 2, 图 1 和图 2。

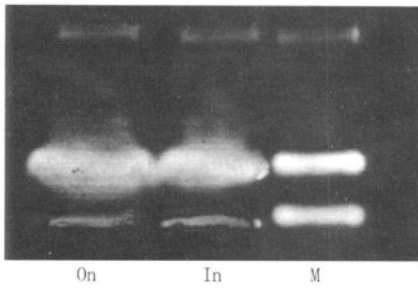


图1 培养于条件培养基中人HSCs的MMP-2的酶谱分析  
On:I型胶原表面;In:I型胶原内部;M:MMPs marker

Fig 1 Zymographic detection of MMP-2 in conditioned Media from human HSC culture

On; on type I collagen gel; In; in type I collagen gel; M; MMPs marker

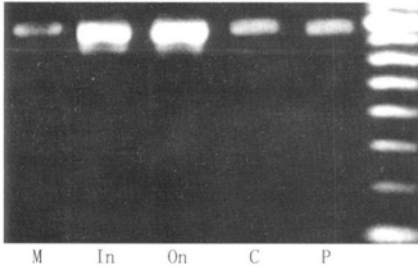


图2 培养于不同底物人HSCs的MMP-2 mRNA的表达

P:聚丙烯;C:单体I型胶原;On:I型胶原表面;In:I型胶原内部;M:Matrigel表面

Fig 2 Expression of MMP-2 mRNA in human HSCs cultured on different Kinds of substrates

P: on polystyrene. C: on monomeric type I collagen; On: on type I collagen gel; In: in type I collagen gel; M: on Matrigel

### 3.2 人HSCs的MT1-MMP及其mRNA的表达

体外培养的人HSCs可表达MT1-MMP及其mRNA。在聚合的I型胶原表面和内部培养的HSCs MT1-MMP及其mRNA的表达明显增强,与对照组及I型胶原单体组对比有显著性差异。而聚合的I型胶原表面组及内部组间无差异。见表1和表2,图3。

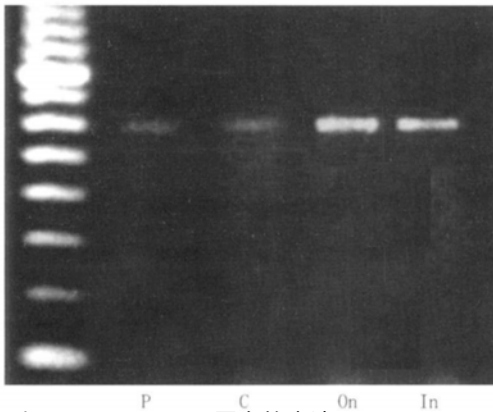


图3 人HSCs MT1-MMP蛋白的表达

P:聚丙烯;C:单体I型胶原;On:I型胶原表面;In:I型胶原内部

Fig 3 Expression of MT1-MMP in human HSCs

P: on polystyrene; C: on monomeric type I collagen; On: on type I collagen gel; In: in type I collagen gel

### 3.3 人HSCs的TIMP-1和TIMP-2及其mRNA的表达

在体外培养的HSCs中稳定表达TIMP-1和TIMP-2及其

mRNA。I型胶原单体及聚合的I型胶原对HSCs TIMP-1及其mRNA的表达无明显影响。而培养于聚合的I型胶原表面和内部HSCs TIMP-2及其mRNA表达明显增强,与直接培养于培养皿表面和I型胶原单体表面的HSCs组间有显著性差异。而培养于聚合I型胶原表面组与内部组之间无显著性差异。见表1和表2,图4。

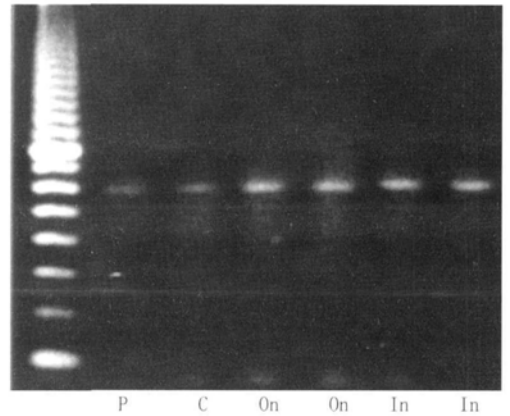


图4 人HSCs TIMP-1 mRNA的表达

P:聚丙烯;C:单体I型胶原;On:I型胶原表面;In:I型胶原内部

Fig 4 Expression of TIMP-1 mRNA in human HSCs

P: on polystyrene; C: on monomeric type I collagen; On: on type I collagen gel; In: in type I collagen gel

## 4 讨论

培养于聚合的I型胶原表面和内部的人HSC的TIMP-2、MMP-2和MT1-MMP表达明显增强,而未聚合的I型胶原单体分子则无此作用,类似于基底膜成分的Matrigel对MMP-2的表达也没有明显影响。表明ECM成分及其不同空间结构可以调节肝脏星形细胞MMPs的表达与活化,与文献<sup>[4-6]</sup>报道的结果相一致。

培养于不同的细胞外基质中的TIMP-2、MMP-2和MT1-MMP三者之间存在一定的对应关系,表明MMP-2的活化与TIMP-2和MT1-MMP密切相关。有报道称,通过3D晶体结构的测定已经证实TIMP-2、MMP-2和MT1-MMP三者之间的结合位点<sup>[3]</sup>。首先是细胞膜上激活的MT1-MMP和TIMP-2的氨基端结合,然后MT1-MMP通过其血红素结构域相互靠拢而形成二聚体或是多聚体,接着pro-MMP-2与TIMP-2的羧基端结合,MT1-MMP剪切pro-MMP-2的诱饵蛋白激活MMP-2,最后MMP-2从复合体中解离而发挥生物学活性<sup>[4-6]</sup>。

另外,I型胶原是细胞外基质中最重要的一种胶原蛋白,由本文研究数据显示,当细胞外基质中I型胶原成分增加时,TIMP-2和MT1-MMP三者的表达就会同时增强,进而通过一系列的结合作用活化MMP-2,活化的MMP-2对I型胶原和其它ECM组分产生水解作用;而当I型胶原含量降低时,MMP-2的表达量也会随之下降,减缓对I型胶原和其它组分的降解,使ECM各组分之间保持一种动态的平衡。由此我们认为,很可能是TIMP-2、MMP-2和MT1-MMP三者之间相互协调,通过MMP-2激活途径来调节ECM成分组成,保持ECM的动态平衡。

表 1 各组 pro-MMP-2, MMP-2, MTI-MMP, TIMP-1 和 TIMP-2 蛋白的表达 ( $n=8, \bar{x} \pm s$ )

Tab 1 Expression of pro-MMP-2, MMP-2, MTI-MMP, TIMP-1 and TIMP-2 protein ( $n=8, \bar{x} \pm s$ )

	Pro-MMP-2	MMP-2	MTI-MMP	TIMP-1	TIMP-2
On polystyrene	1.01 $\pm$ 0.08	0.29 $\pm$ 0.05	0.20 $\pm$ 0.03	0.103 $\pm$ 0.021	0.158 $\pm$ 0.022
On monomeric type I collagen	1.10 $\pm$ 0.12	0.30 $\pm$ 0.07	0.22 $\pm$ 0.04	0.111 $\pm$ 0.022	0.152 $\pm$ 0.018
On type I collagen gel	3.29 $\pm$ 0.21 <sup>1)</sup>	1.15 $\pm$ 0.11 <sup>1)</sup>	0.65 $\pm$ 0.07	0.109 $\pm$ 0.015	0.355 $\pm$ 0.021 <sup>1)</sup>
In type I collagen gel	3.26 $\pm$ 0.24 <sup>1)</sup>	1.16 $\pm$ 0.09 <sup>1)</sup>	0.66 $\pm$ 0.06	0.102 $\pm$ 0.012	0.362 $\pm$ 0.015 <sup>1)</sup>
On Matrigel	0.91 $\pm$ 0.07	0.23 $\pm$ 0.04	0.18 $\pm$ 0.02	0.099 $\pm$ 0.011	0.138 $\pm$ 0.012

注: <sup>1)</sup>  $P < 0.01$ , 相比于聚丙烯组、I型胶原单体组和 Matrigel组

Note: <sup>1)</sup>  $P < 0.01$ , compared with on polystyrene, monomeric type I collagen and Matrigel

表 2 各组 pro-MMP-2, MMP-2, MTI-MMP, TIMP-1 和 TIMP-2 mRNA 的表达 ( $n=8, \bar{x} \pm s$ )

Tab 2 Expression of pro-MMP-2, MMP-2, MTI-MMP, TIMP-1 and TIMP-2 mRNA of each group ( $n=8, \bar{x} \pm s$ )

	Pro-MMP-2	MMP-2	MTI-MMP	TIMP-1	TIMP-2
On polystyrene	121.24 $\pm$ 10.18	58.23 $\pm$ 3.45	42.20 $\pm$ 3.73	191.13 $\pm$ 46.21	206.32 $\pm$ 34.98
On monomeric type I collagen	130.46 $\pm$ 12.02	60.30 $\pm$ 4.07	44.29 $\pm$ 4.12	179.34 $\pm$ 46.52	219.21 $\pm$ 51.01
On type I collagen gel	349.77 $\pm$ 29.21 <sup>1)</sup>	245.86 $\pm$ 39.34 <sup>1)</sup>	132.65 $\pm$ 15.07 <sup>1)</sup>	189.56 $\pm$ 39.89	583.21 $\pm$ 51.69 <sup>1)</sup>
In type I collagen gel	356.98 $\pm$ 31.84 <sup>1)</sup>	232.57 $\pm$ 30.43 <sup>1)</sup>	128.66 $\pm$ 10.36 <sup>1)</sup>	184.75 $\pm$ 38.56	601.32 $\pm$ 45.62 <sup>1)</sup>
On Matrigel	109.11 $\pm$ 7.66	46.89 $\pm$ 6.04	38.18 $\pm$ 5.42	174.83 $\pm$ 31.88	201.56 $\pm$ 35.75

注: <sup>1)</sup>  $P < 0.01$ , 相比于聚丙烯组、I型胶原单体组和 Matrigel组

Note: <sup>1)</sup>  $P < 0.01$ , compared with on polystyrene, monomeric type I collagen and Matrigel

## REFERENCES

- [1] BENYON RC, HOVELL CJ, DA GACA M, *et al.* Progelatinase A is produced and activated by rat hepatic stellate cells and promotes their proliferation[ J]. *Hepatology*, 1999, 30: 977-986.
- [2] WANG DR, SATO M, SATO T, *et al.* Regulation of matrix metalloproteinase expression by extracellular matrix components in cultured hepatic stellate cells[ J]. *Comp Hepatol*, 2004, 14 (Supp11): S20.
- [3] FEMANDEZ C, BODE W, HUBER R, *et al.* Crystal structure of the complex formed by the membrane type 1-matrix metalloproteinase with the tissue inhibitor of metalloproteinase-2, the soluble progelatinase A receptor[ J]. *EMBO J*, 1998, 17: 5238-5248.
- [4] VISSE R, NAGASE H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry[ J]. *Circ Res*, 2003, 92: 827-839.
- [5] MORGUNOVA E, TUUTTILA A, BERGMANN U, *et al.* Structural insight into the complex formation of latent matrix metalloproteinase-2 with tissue inhibitor of metalloproteinase-2 [ J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 7414-7419.
- [6] BUTLER GS, BUTLER MJ, ATKINSON SJ, *et al.* The TIMP-2 membrane type 1 metalloproteinase receptor regulates the concentration and efficient activation of progelatinase A. A kinetic study[ J]. *J Bio Chem*, 1998, 273: 871-880.
- [7] LU SD. Current protocols for molecular biology (现代分子生物学实验技术) [ M ]. 2nd ed. Beijing: Peking Union Medical College Press, 1999.

收稿日期: 2008-04-10