

全反式维甲酸对兔颈动脉粥样硬化斑块中 TGF- β 1、IL-10、MMP-2 和 MMP-9 表达的影响

吴伟烽[#], 李翔[#], 刁胜朋, 危智盛, 刘爱群, 黄叶青, 张蓓, 古玉梅, 彭忠兴*, 洪铭范*
广东药科大学附属第一医院神经科, 广东 广州 510080

摘要: **目的** 采用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 法探索全反式维甲酸 (ATRA) 对兔颈动脉粥样硬化斑块组织炎症因子表达的影响。**方法** 选取 24 只纯种雄性新西兰白兔随机分为对照组、模型组、ATRA 组。对照组给予基础饲料、其余两组给予高脂饲料, 共饲养 12 周。饲养 4 周后, ATRA 组 ig 5 mg/kg 的 ATRA, 模型组和对照组 ig 等量溶剂, 每天 1 次, 至 12 周末处死各组动物。取颈动脉粥样硬化斑块组织, 进行 HE 染色, 显微镜下观察管壁结构; 提取组织 RNA, qRT-PCR 法测定组织中转化生长因子- β 1 (TGF- β 1)、白细胞介素-10 (IL-10)、基质金属蛋白酶-2 (MMP-2) 和基质金属蛋白酶-9 (MMP-9) mRNA 的相对表达量。**结果** 模型组可见典型的 AS 斑块, 可见薄层的纤维帽及大的脂质核心, 以及大量炎症细胞浸润, 内弹力纤维膜断裂; ATRA 组内皮细胞形态基本完整, 可见少量炎症细胞浸润。与对照组比较, 模型组中 TGF- β 1 和 IL-10 mRNA 的相对表达量明显降低 ($P < 0.05$), 而 MMP-2 和 MMP-9 mRNA 的相对表达量明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, ATRA 组的 TGF- β 1 和 IL-10 mRNA 的相对表达量明显升高 ($P < 0.05$), MMP-2 和 MMP-9 mRNA 的相对表达量明显降低 ($P < 0.05$)。**结论** ATRA 可通过调节炎症因子的表达抗动脉粥样硬化。

关键词: 全反式维甲酸; 炎症反应; 动脉粥样硬化; 转化生长因子- β 1 (TGF- β 1); 白细胞介素-10 (IL-10); 基质金属蛋白酶-2 (MMP-2); 基质金属蛋白酶-9 (MMP-9)

中图分类号: R962.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2018) 09- 1606 - 05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.09.008

Effect of ATRA on expression of TGF- β 1, IL-10, MMP-2, and MMP-9 in carotid atherosclerotic plaques in rabbits

WU Weifeng, LI Xiang, DIAO Shengpeng, WEI Zhisheng, LIU Aiqun, HUANG Yeqing, ZHANG Bei, GU Yumei, PENG Zhongxing, HONG Mingfan

Department of Neurology, the First Affiliated Hospital of Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510080, China

Abstract: Objective To investigate the effects of all-trans retinoic acid (ATRA) on the inflammatory response in carotid atherosclerotic plaques of rabbit model by using fluorescent quantitative PCR. **Methods** Twenty-four white purebred male New Zealand rabbits were randomly divided into control group, model group, and ATRA group. The rabbits in the control group were treated with basal feed, while the other two groups were fed with high fat diet. Four weeks later, ATRA group received ATRA ravage at a 5 mg dose once a day and model group received saline ravage at the same dose once a day. After 12 weeks, all rabbits were sacrificed and the carotid atherosclerotic plaques of rabbit were extracted. HE staining was performed and the wall structure was observed under microscope. With the mRNA of GAPDH as internal reference, the relative mRNA expression of TGF- β 1, IL-10, MMP-2, and MMP-9 were detected by qRT-PCR. **Results** The typical AS plaque, thin fibrous cap and large lipid core, infiltration of inflammatory cells and breakage of elastic fibrous membrane were observed in the model group. The endothelial cells in the ATRA group were basically intact with a small amount of inflammatory cells infiltration. Compared with control group, the relative mRNA expression of TGF- β 1 and IL-10 were decreased obviously in model group ($P < 0.05$), while MMP-2 and MMP-9 mRNA were increased significantly ($P < 0.05$).

收稿日期: 2017-11-19

基金项目: 广东药学院科技处-附属第一医院联合自然科学基金培育基金项目 (GYFYLH201322); 广州市越秀区科技计划项目 (2017-WS-010)

第一作者: 吴伟烽, 住院医师, 研究方向为脑血管病。Tel: 13824412067 E-mail: wuweifengcool@163.com

李翔, 硕士研究生, 研究方向为脑血管病。Tel: (020)61337324

*通信作者: 彭忠兴, 男, 主任医师, 硕士生导师。Tel: (020)61337324 E-mail: pzx802@163.com

洪铭范, 男, 教授/主任医师, 硕士生导师。Tel: (020)61337324 E-mail: hmf9001@163.com

Compared with model group, the relative mRNA expression of TGF- β 1 and IL-10 were increased significantly in ATRA group ($P < 0.05$), while MMP-2 and MMP-9 mRNA decreased obviously ($P < 0.05$). **Conclusion** ATRA can exert anti-atherosclerosis effect by regulating the expression of inflammatory factors.

Key words: all-trans retinoic acid; inflammation, atherosclerosis; TGF- β 1; IL-10; MMP-2; MMP-9

炎症反应在动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)的发展过程中起重要作用^[1], AS斑块内的炎症反应过程释放多种细胞因子,促进炎性细胞分泌基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)降解细胞外基质,使斑块的纤维帽变薄,导致斑块的破裂或糜烂,继发血栓形成,最终导致心脑血管事件的发生^[2]。因此,调节炎症反应是维持AS斑块稳定、减少心脑血管事件发生的重要环节。全反式维甲酸(all-trans retinoic acid, ATRA)具有调控多种炎症细胞的功能,临床上用于治疗皮肤病、血液病、肿瘤及血管相关疾病等,目前鲜有ATRA对颈动脉AS斑块作用的研究。本课题组前期研究证实^[3], ATRA具有提升血清抗炎因子、降低促炎因子水平的作用,本研究通过实时荧光定量PCR(qRT-PCR)法进一步观察ATRA对AS斑块组织炎症因子表达的影响,探索ATRA抗AS的作用机制。

1 材料

1.1 实验动物

普通级纯种雄性新西兰白兔24只,购于广州中医药大学(大学城)实验动物中心,实验动物生产许可证号SYXK(粤)2013-0085,80 d龄,体质量(2.0 \pm 0.3) kg,自由饮水,单笼室温饲养。

1.2 主要仪器

台式冰冻高速离心机(美国 Thermo 公司); 5P-72 超速离心机(日本日立 Hitachi); MultiskanMK3 酶标仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); C1000 Thermal cycler 普通 PCR 仪(美国 BIO-RAD 公司); 7300 荧光定量仪(美国 ABI 公司); QL-901 微型振荡器(海门市麒麟医用仪器厂)。

1.3 药品和主要试剂

ATRA(山东良福制药有限公司,质量分数>98%,批号 H20083494)。基础饲料(广州花东信华实验动物养殖场);高脂饲料(自行配置:2%胆固醇、0.5%猪胆盐、15%蛋黄粉、10%猪油、72.5%基础饲料);Trizol(美国 Invitrogen 公司);DEPC(美国 Sigma 公司);DNase I(批号 M610A,美国 Promega 公司);SYBR Premix EX Taq^v II Kit(批号 RR820A,日本 TaKaRa 公司);Prime Script

TMRT reagent Kit(批号 RR047A,日本 TaKaRa 公司)。

2 方法

2.1 动物模型的建立

采用本课题组前期已经成功造模的方法制备兔动脉粥样硬化模型^[3],将24只新西兰白兔随机分为对照组6只,模型组8只,ATRA组10只,对照组予每天150 g普通饲料饲养,模型组和ATRA组均予每天150 g高脂饲料饲养,均自由饮水,饲养12周。饲养4周后,ATRA组开始予5 mg/kg^[4]的ATRA溶于1.5 mL植物油中ig给药;模型组和对照组ig等量溶剂。实验至第12周末时处死各组动物。

2.2 血管取样及染色

第12周末处死动物,截取1.0 cm左右的颈动脉病变血管切为3~4段,10%甲醛缓冲溶液固定,石蜡包埋,并将病变血管横切面(3~4 μ m)行HE染色,显微镜下观察管壁结构。

2.3 RNA的提取

实验动物处死后,沿颈部中线依次切开皮肤、筋膜,钝性分离组织,显露颈动脉,去除血管外膜的脂肪及筋膜等组织,暴露动脉粥样硬化斑块组织,取适量斑块组织至EP管,加1 mL Trizol,研磨后充分振荡混匀,室温静置5 min。加入氯仿0.2 mL,振荡器振荡15 s,室温孵育3 min,4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min离心15 min,取上清液至新EP管。加入与上清液等体积的异丙醇,混匀后-20 $^{\circ}$ C孵育20~30 min,4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min离心10 min,弃上清液。加入75%乙醇(含DEPC水)800 μ L洗涤沉淀1次,4 $^{\circ}$ C、7 500 r/min离心5 min,弃乙醇。真空干燥5 min,加DEPC处理水50 μ L溶解RNA,-80 $^{\circ}$ C冰箱保存备用。

2.4 引物的设计合成

转化生长因子- β 1(TGF- β 1)、白细胞介素-10(IL-10)、基质金属蛋白酶-2(MMP-2)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)、GAPDH引物的设计与合成由美国英杰生命技术有限公司提供。序列见表1。

2.5 去基因组

使用RNase-free的DNase I,按如下反应体系:

RNA 20 μL , DNase I 20 μL , $10\times$ buffer 10 μL , RNase inhibitor 0.5 μL , RNase-free ddH₂O 49.5 μL , 共 100 μL 。37 $^{\circ}\text{C}$ 消化 30 min, 65 $^{\circ}\text{C}$ 灭活 10 min。加入等体积苯酚, 混匀后 10 000 r/min 离心 5 min 后取上清; 上清加入等体积的氯仿, 混匀后 10 000 r/min

离心 10 min 后取上清; 上清加入等体积异丙醇, 轻柔混匀, -20 $^{\circ}\text{C}$ 静置 15 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 10 000 $\times g$ 离心 10 min 后弃上清, 收集 RNA 沉淀; 用 75%乙醇洗涤沉淀 2 次, 超净台风干后加入 15~40 μL DEPC 水溶解沉淀。

表 1 TGF- β 1、IL-10、MMP-2、MMP-9、GAPDH 引物序列
Table 1 Primers of TGF- β 1, IL-10, MMP-2, MMP-9, and GAPDH

基因	引物序列	大小
TGF- β 1	正向引物 5'-GCCCACTGTTCTCTGTGACAA-3'	101 bp
	反向引物 5'-TTCATGCTGTGAATGGTGGC-3'	
IL-10	正向引物 5'-CTGCGACAATGTCACCGATT-3'	106 bp
	反向引物 5'-TGGCTTTGTAGACGCCTTCCT-3'	
MMP-2	正向引物 5'-AGCTCCCGGAGAAGATCGAC-3'	101 bp
	反向引物 5'-CAGGGTGCTGGCTGAATACAC-3'	
MMP-9	正向引物 5'-TGACAGCGACAAGAAGTGGG-3'	104 bp
	反向引物 5'-CAGAGGAGTGATCCAAGCCC-3'	
GAPDH	正向引物 5'-ATCACCATCTCCAGGAGCG-3'	104 bp
	反向引物 5'-GCCTTCTCCATGGTGGTGAA-3'	

2.6 逆转录 PCR

取 4 μL RNA 模板做逆转录 PCR, 反应体系: RNA 4 μL , RNase-free ddH₂O 10 μL , $5\times$ PrimeScript TM Buffer (for real time) 2 μL , PrimeScript TM RT Enzyme Mix I 1 μL , Oligo dT Primer (50 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL , Random 6 mers (100 $\mu\text{mol/L}$) 2 μL , 共 20 μL 。反应条件为 37 $^{\circ}\text{C}$ 15 min, 然后 85 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 循环 30 次。

2.7 qRT-PCR 反应

采用如下反应体系 (ddH₂O 18.5 μL , $10\times$ PCR buffer 2.5 μL , dNTPs 0.5 μL , TAQ 0.5 μL , 共 25 μL) 进行 qRT-PCR。反应条件为 93 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 然后 93 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 25 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 25 s, 循环 40 次。记录每个反应管内的荧光信号达到设定域值时所经

历的循环数, 即 C_t 值, 以 GAPDH 为内参, 待测样本的相对表达量为 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 。

2.8 统计分析

使用 SPSS 19.0 和 Graphpad Prism 5 软件进行统计分析, 计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示; 两组比较采用 t 检验; 对 3 组及以上数据采用单因素方差分析。

3 结果

实验过程中对照组、模型组无死亡, ATRA 组因 ig 不当导致死亡 2 只。实验结束时各组新西兰兔体质量差别无统计学意义, 各组动物数为: 对照组 6 只, 模型组 8 只, ATRA 组 8 只。

3.1 组织病理学检查结果

组织病理学镜下检查发现 (图 1), 对照组兔颈

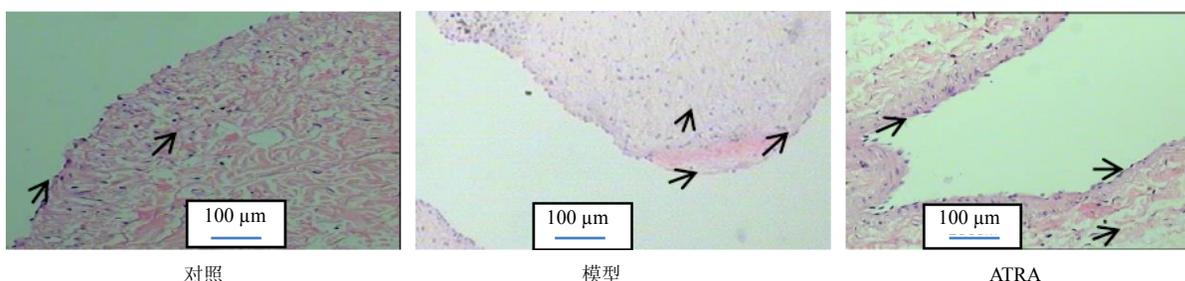


图 1 实验 12 周各组兔颈动脉血管 HE 染色

Fig. 1 Morphology of rabbit carotid artery in different groups at 12 weeks

动脉的内皮细胞形态规整,内弹力纤维膜清晰可见,排列整齐,中膜平滑肌细胞排列整齐,形态规则,未见明显斑块形成;模型组可见典型的AS斑块,可见薄层的纤维帽及大的脂质核心,以及大量炎症细胞浸润,内弹力纤维膜断裂,平滑肌细胞迁移至内膜下,动脉中膜可见泡沫细胞及胆固醇结晶。ATRA组内皮细胞形态基本完整,纤维弹力膜清晰可见,少量平滑肌细胞迁移至内膜下,中膜平滑肌细胞排列基本整齐,可见少量泡沫细胞形成及炎症细胞浸润。

3.2 TGF- β 1、IL-10、MMP-2、MMP-9 mRNA的相对表达量

TGF- β 1、IL-10、MMP-2、MMP-9和GAPDH的扩增效率均在95%以上,溶解曲线呈单峰,特异

性强,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法进行后续样本扩增分析。以GAPDH为内参,计算兔颈动脉粥样硬化斑块中TGF- β 1、IL-10、MMP-2和MMP-9 mRNA的相对表达量。

与对照组比较,模型组兔颈动脉组织中TGF- β 1和IL-10 mRNA的相对表达量明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组比较,ATRA组的TGF- β 1和IL-10 mRNA的相对表达量显著升高,有显著性差异($P < 0.05$)。与对照组比较,模型组兔颈动脉组织中MMP-2和MMP-9 mRNA的相对表达量升高明显,差异具有显著性($P < 0.05$)。与模型组比较,ATRA组的MMP-2和MMP-9 mRNA的相对表达量明显降低,具有统计学差异($P < 0.05$)。结果见表2。

表2 各组TGF- β 1、IL-10、MMP-2、MMP-9 mRNA的相对表达量($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Relative expressions of TGF- β 1, IL-10, MMP-2, and MMP-9 mRNA in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量	TGF- β 1/GAPDH	IL-10/GAPDH	MMP-2/GAPDH	MMP-9/GAPDH
对照	—	60.41 \pm 25.85	46.80 \pm 13.67	18.04 \pm 10.52	3.76 \pm 1.64
模型	—	19.18 \pm 7.69 [#]	6.94 \pm 2.19 [#]	55.31 \pm 21.15 [#]	42.82 \pm 16.18 [#]
ATRA	5 mg·kg ⁻¹	46.82 \pm 20.97 [*]	36.98 \pm 13.66 [*]	21.46 \pm 10.85 [*]	10.43 \pm 5.13 [*]

与对照组比较: [#] $P < 0.05$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$

[#] $P < 0.05$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ vs model group

4 讨论

研究发现,不稳定斑块的破裂是导致脑梗死的主要原因,斑块的稳定性同脂质核心大小、纤维帽的厚薄等因素有关,脂质核心越大,纤维帽的厚度越薄,则斑块越不稳定^[5],不稳定斑块中炎症细胞活化浸润和细胞因子的合成释放增加,导致纤维帽中胶原纤维降解,使纤维帽变薄,最终斑块破裂,导致脑血管事件的发生^[2]。由此可见,炎症反应在AS斑块的形成、发生、发展及最终导致脑梗死的过程中发挥了关键作用。

本研究发现,在高脂饲养12周后兔的颈动脉组织病理学镜下检查可见典型的AS斑块形成,可见薄层的纤维帽及大的脂质核心,大量炎症细胞浸润,内弹力纤维膜断裂,平滑肌细胞迁移至内膜下,动脉中膜可见泡沫细胞及胆固醇结晶,证实AS斑块中炎症反应增强并引发一系列的反应,导致胶原纤维降解,纤维帽变薄,纤维膜断裂,最终斑块破裂,可见炎症反应在AS斑块的发生发展中具有重要作用。经过ATRA治疗后,动脉中膜平滑肌细胞排列整齐,泡沫细胞及炎症细胞浸润减少,内皮细胞形

态恢复完整,内弹力纤维膜变得清晰完好,未见AS斑块。提示ATRA抑制炎症反应、抑制内膜增生及平滑肌细胞的迁移,但具体机制尚未清楚。

ATRA是维生素A的天然衍生物,其在炎症反应中发挥独特的调控作用,使其广泛应用于治疗皮肤病、血液病、肿瘤及血管相关疾病等方面。然而,在治疗颈AS斑块方面,尚无ATRA的临床研究。目前,国外有动物实验探讨ATRA抗AS的可行性。在高脂饲养的兔子中,连续喂养ATRA(5 mg/kg)8周可显著降低血脂和改善动脉损伤,抑制纤维蛋白原和血小板结合沉积到动脉内皮细胞中^[4]。此外,ATRA可通过降低血脂,从而改善兔血管内皮的舒张功能^[6],前期研究显示,ATRA具有提升血清抗炎因子、降低促炎因子水平的作用^[3],本研究通过检测兔颈AS斑块组织中有关炎症因子的相对表达量变化,进一步探索ATRA的抗AS的作用。

TGF- β 1是一种多功能的细胞因子,在免疫调节、胚胎发育、伤口愈合、器官纤维化等过程中发挥重要作用。研究发现,TGF- β 1能调节AS斑块内的炎症反应,在AS斑块的进展过程中发挥重要作用

用^[7]。以往的临床研究也证实, TGF- β 1 的血浆水平与动脉粥样硬化性脑梗塞的发生有关, 低血浆水平的 TGF- β 1 可能导致 AS 的进展加剧、颈 AS 斑块的易损性增加, 最终导致脑梗死的发生^[8]。本研究发现, 模型组 TGF- β 1 mRNA 的相对表达量明显下降, 经过 ATRA 治疗后, TGF- β 1 mRNA 的相对表达量显著增加, 提示 ATRA 可能通过增加 TGF- β 1 mRNA 的表达, 提高其血清浓度, 起到抗 AS 的作用。

IL-10 是一种主要由巨噬细胞和 Th2 细胞分泌的细胞因子, 主要通过抑制巨噬细胞的活化和抑制 MMP、促炎细胞因子和环氧化酶在脂质及活化巨噬泡沫细胞中的表达而起抗 AS 的作用^[9]。此外, IL-10 还能改变 AS 过程中巨噬细胞代谢脂质的能力。在高血脂大鼠中, 通过骨髓细胞转导生成巨噬细胞后发现高表达的 IL-10 具有强力的抗 AS 的作用^[10]。本研究发现, 模型组 IL-10 mRNA 的相对表达量较对照组显著降低, 经 ATRA 治疗后, IL-10 mRNA 的相对表达量明显升高, 提示 ATRA 可通过调节 IL-10 的表达从而增强其抑制巨噬细胞活化的作用而起到抗 AS 的作用。

胶原纤维是 AS 斑块纤维帽的主要组成成分, 胶原含量越少, 纤维帽厚度越薄, 则斑块越不稳定。MMP 是主要由泡沫巨噬细胞及血管平滑肌细胞分泌的一组内肽酶家族, 能够广泛降解包括胶原纤维、连接蛋白、弹性蛋白和蛋白多糖等在内的多种细胞外间质, 对于维持血管壁的完整性与功能有重要作用。国外实验研究发现在大鼠 AS 的早期阶段, 巨噬细胞浸润后, MMP-2 和 MMP-9 的表达及活性明显增加^[11]; 临床研究中发现动脉粥样硬化性脑梗死患者人群血清中 MMP-2 和 MMP-9 的水平也明显高于正常人群^[12], 显示 MMP-2 和 MMP-9 参与了 AS 的发生和发展过程。本实验发现在兔颈 AS 的斑块中, ATRA 干预治疗能够下调 AS 斑块组织中 MMP-2 和 MMP-9 mRNA 的相对表达量, 有助于减少细胞外基质的降解, 起到抗 AS 和稳定斑块的作用。

AS 斑块组织中, ATRA 能够调节细胞因子 TGF- β 1、IL-10、MMP-2 和 MMP-9 mRNA 的相对表达量, 进一步证实 ATRA 的抗 AS 作用, 但其具体的机制尚未完全明确, 有待后续的研究。

参考文献

- [1] Conti P, Shaik-Dasthagirisab Y. Atherosclerosis: a chronic inflammatory disease mediated by mast cells [J]. *Cent Eur J Immunol*, 2015, 40(3): 380-386.
- [2] Tousoulis D, Oikonomou E, Economou E K, et al. Inflammatory cytokines in atherosclerosis: current therapeutic approaches [J]. *Eur Heart J*, 2016, 37(22): 1723-1732.
- [3] 彭忠兴, 李翔, 刁胜朋, 等. ATRA 对兔颈动脉粥样硬化斑块和炎症反应的影响 [J]. *广东药学院学报*, 2016, 32(5): 639-642.
- [4] Zhou B, Pan Y, Hu Z, et al. All-trans-retinoic acid ameliorated high fat diet-induced atherosclerosis in rabbits by inhibiting platelet activation and inflammation [J]. *J Biomed Biotechnol*, 2012, 2012: 1-9.
- [5] Finn A V, Nakano M, Narula J, et al. Concept of vulnerable/unstable plaque [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, 30(7): 1282-1292.
- [6] 丁延辉, 丁俊丽, 周青, 等. 全反式维甲酸对实验性动脉粥样硬化兔动脉血管内皮依赖性舒张功能的影响 [J]. *安徽医科大学学报*, 2017, 52(1): 7-12.
- [7] Toma I, McCaffrey T A. Transforming growth factor- β and atherosclerosis: interwoven atherogenic and atheroprotective aspects [J]. *Cell Tissue Res*, 2012, 347(1): 155-175.
- [8] 彭忠兴, 甄毅锋, 陈瑞芳, 等. 转化生长因子- β 1 和斑块稳定性与动脉粥样硬化脑梗死关系的研究 [J]. *实用医学杂志*, 2011, 27(22): 4043-4045.
- [9] Sapan H B, Paturusi I, Jusuf I, et al. Pattern of cytokine (IL-6 and IL-10) level as inflammation and anti-inflammation mediator of multiple organ dysfunction syndrome (MODS) in polytrauma [J]. *Int J Burns Trauma*, 2016, 6(2): 37-43.
- [10] Han X, Kitamoto H, Wang H, et al. Interleukin-10 overexpression in macrophages suppresses atherosclerosis in hyperlipidemic mice [J]. *FASEB J*, 2010, 24(8): 2869-2880.
- [11] Wågsäter D, Zhu C, Björkegren J, et al. MMP-2 and MMP-9 are prominent matrix metalloproteinases during atherosclerosis development in the Ldlr^{-/-} Apob100/100 mouse [J]. *Int J Mol Med*, 2011, 28(2): 247-253.
- [12] Nie S W, Wang X F, Tang Z C. Correlations between MMP-2/MMP-9 promoter polymorphisms and ischemic stroke [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2014, 7(2): 400-404.