

多西环素对人翼状胬肉成纤维细胞血管生成拟态形成的影响

贺梦璇,张俊芳,杨铃,秦柏,顾宏卫,管怀进,石海红

引用:贺梦璇,张俊芳,杨铃,等.多西环素对人翼状胬肉成纤维细胞血管生成拟态形成的影响.国际眼科杂志 2021;21(9):1515-1519

作者单位:(226001)中国江苏省南通市,南通大学附属医院眼科
作者简介:贺梦璇,南通大学在读硕士研究生,研究方向:眼表疾病和眼科病理。

通讯作者:石海红,毕业于南通大学医学院,主任医师,硕士研究生导师,研究方向:眼外伤、眼表疾病及眼科病理. shihaihong2@163.com

收稿日期:2020-12-20 修回日期:2021-07-23

摘要

目的:探讨多西环素(DOX)对人翼状胬肉成纤维细胞(HPFs)血管生成拟态(TM)形成的影响及其可能的分子机制。

方法:采用波形蛋白(Vimentin)和角蛋白(CK)免疫细胞化学染色鉴定原代培养的HPFs。分别设置对照组、DOX低、中、高浓度(50、100、200mg/L)组,应用CCK-8法和划痕实验检测各组HPFs活力及迁移能力,利用细胞三维培养及过碘酸-雪夫(PAS)染色观察各组细胞VM生成情况,并通过Western blot法检测各组细胞基质金属蛋白酶(MMP)-9及血管内皮生长因子(VEGF)的表达情况。

结果:免疫细胞化学染色结果显示,细胞呈梭形且Vimentin阳性表达,CK阴性表达,符合成纤维细胞特性。与对照组相比,DOX组细胞活力、迁移能力、VM密度及MMP-9和VEGF蛋白的表达均显著降低($P<0.05$),DOX各浓度组组间相比均有差异($P<0.05$)。相关性分析提示HPFs形成的VM密度与MMP-9和VEGF蛋白表达水平呈显著正相关($r=0.949, 0.960$,均 $P<0.05$)。

结论:DOX可通过减少MMP-9及VEGF的表达抑制HPFs的活力及迁移能力,减少VM的形成,提示MMP-9和VEGF可能是翼状胬肉形成VM的分子机制。

关键词:翼状胬肉;血管生成拟态;三维培养;多西环素;基质金属蛋白酶-9;血管内皮生长因子

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2021.9.04

Effect of Doxycycline on vasculogenic mimicry in human pterygium fibroblasts

Meng-Xuan He, Jun-Fang Zhang, Ling Yang, Bai Qin, Hong-Wei Gu, Huai-Jin Guan, Hai-Hong Shi

Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Hai-Hong Shi. Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu

Province, China. shihaihong2@163.com

Received:2020-12-20 Accepted:2021-07-23

Abstract

• **AIM:** To investigate the effects of doxycycline (DOX) on vasculogenic mimicry (VM) in human pterygium fibroblasts (HPFs) and its molecular mechanisms.

• **METHODS:** Primary cultured HPFs were identified by Vimentin and CK through immunocytochemical staining. HPFs were divided into control group and DOX group including low, medium and high concentrations (50, 100, 200mg/L). The activity and migration of HPFs were detected by cell counting kit-8 (CCK-8) and wound healing assay. The density of VM was observed by three-dimensional cell culture and periodic acid schiff (PAS) staining and compared the differences of VM formation in each group. Western blot was used to analyze the expression of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and vascular endothelial growth factor (VEGF).

• **RESULTS:** Immunocytochemical staining results showed that the cells were spindle shaped, meanwhile, they were positive for Vimentin and negative for CK, which were consistent with the characteristics of fibroblasts. Compared with the control group, the cell activity, mobility, VM density and the expression of MMP-9 and VEGF proteins in the DOX group were significantly decreased ($P<0.05$). Compared among different concentrations of DOX groups, the differences were statistically significant ($P<0.05$). Correlation analysis indicated that VM density formed by HPFs was significantly positively correlated with the protein expression of MMP-9 and VEGF ($r=0.949, 0.960$, all $P<0.05$).

• **CONCLUSION:** DOX can inhibit HPFs activity, migration, VM density by reducing the expression of MMP-9 and VEGF, suggesting that MMP-9 and VEGF may be the molecular mechanisms of VM formation in pterygium.

• **KEYWORDS:** pterygium; vasculogenic mimicry; three-dimensional culture; doxycycline; matrix metalloproteinase-9; vascular endothelial growth factor

Citation: He MX, Zhang JF, Yang L, et al. Effect of Doxycycline on vasculogenic mimicry in human pterygium fibroblasts. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2021;21(9):1515-1519

0 引言

翼状胬肉是最常见的眼表疾病之一,临床表现为新生组织不断生长、增厚,呈三角形逐渐侵入角膜,不仅影响美

观,还可导致干眼、角膜散光^[1],如覆盖瞳孔区则严重影响患者视力。翼状胬肉具有许多肿瘤样特性,如轻度发育不良、局部浸润、高复发率、杂合性丢失、微卫星不稳定性及P53基因突变等^[2],故可认为其是一种肿瘤样病变。血管生成拟态(vasculogenic mimicry, VM)是肿瘤缺乏血液和氧气供应时,肿瘤细胞通过自身变形及细胞外基质重塑进而形成的类似血管样的通道,是一种不依赖血管内皮细胞的微循环形式^[3]。这一结构在眼脉络膜恶性黑色素瘤中首次被发现^[4],是一种新的血液供应模式。研究发现,VM也存在于翼状胬肉组织中,参与胬肉的营养供应^[5]。多西环素(doxycycline, DOX)作为基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMPs)的广谱抑制剂,具有抑制细胞外基质降解及重塑的能力。本研究利用人翼状胬肉成纤维细胞(human pterygium fibroblasts, HPFs)构建翼状胬肉体外VM模型,探讨DOX对翼状胬肉VM形成的影响及其可能的分子机制,为翼状胬肉的防治提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样本采集 收集2019-09于南通大学附属医院眼科行翼状胬肉切除术的患者8例,其中男4例,女4例,年龄63.00±2.07岁,均为翼状胬肉初发性进展期,排除其他眼表疾病和全身疾病。收集手术切除的新鲜翼状胬肉头顶部上下皮组织。本研究通过南通大学附属医院伦理委员会审查批准,患者均签署知情同意书。

1.1.2 主要试剂与仪器 主要试剂:胎牛血清、青霉素-链霉素混合液、0.25%胰蛋白酶-EDTA、DMEM/F12培养基、DMSO(美国,Gibco公司),强力霉素(美国,Selleck公司),CCK-8试剂盒(日本,Dojindo公司),Matrigel胶(美国,Becton Dickinson公司),过碘酸-雪夫(periodic acid schiff, PAS)染色试剂盒(中国,索莱宝公司),鼠抗人波形蛋白(Vimentin)单克隆抗体、鼠抗人角蛋白(CK)单克隆抗体、鼠抗人血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)多克隆抗体(英国,Abcam公司),兔抗人MMP-9多克隆抗体(美国,Genetex公司),抗鼠/兔通用型免疫组织化学检测试剂盒(中国,基因科技股份有限公司),细胞蛋白抽提试剂盒、BCA蛋白浓度检测试剂盒、SDS-PAGE凝胶配制试剂盒、抗体稀释液及增强化学发光反应检测试剂盒(中国,索莱宝公司)。主要仪器:紫外分光光度计(NanoDrop 2000c;美国,Thermo公司),DM3000光学显微镜及显微摄像系统(德国,Leica公司),高速冷冻离心机(德国,Eppendorf公司)。

1.2 方法

1.2.1 HPFs原代培养、鉴定及实验分组 将手术切除的新鲜翼状胬肉头顶部上皮组织用含1%青霉素-链霉素的PBS缓冲液漂洗3次,剪碎,加入0.08%胰蛋白酶-EDTA,室温消化8min,完全培养基终止消化,1500r/min离心5min弃上清,将组织小块均匀接种于培养瓶内,将培养瓶底朝上置于37℃、5%CO₂培养箱中,24h后待组织小块贴壁,加入适量完全培养基,缓慢翻转培养瓶,静置培养,每3d换液一次。采用鼠抗人Vimentin单克隆抗体、鼠抗人CK单克隆抗体免疫细胞化学染色进行细胞鉴定,具体实验步骤根据试剂说明书操作。本研究取2~5代细胞用于实验,分为对照组(正常培养)、DOX终浓度分别为50、100、200mg/L的低、中、高实验组进行下游实验。

1.2.2 CCK-8法检测细胞活力 将处于对数生长阶段的

HPFs消化后以 0.6×10^4 个/孔的数量均匀接种在96孔板内,每孔终体积100 μ L,每组设置6个复孔,24h后进行细胞分组处理,同时设置只加培养基的空白对照组。分组处理48h后,每孔加入10 μ L的CCK-8溶液,置细胞培养箱避光孵育2h后,用酶标仪于450nm处测定每个孔的吸光度(OD值),计算平均值。

1.2.3 划痕实验检测细胞迁移能力 将处于对数生长阶段的HPFs消化后以 1×10^5 个/孔接种于6孔板中,待细胞融合度接近100%时,用200 μ L无菌枪头在每个孔垂直、力道均匀地划过2~3道竖线,PBS洗去悬浮细胞,然后换用无血清培养基分组培养,并于划痕后0、48h通过显微镜拍照观察,计算细胞在各个时间点向划痕处移动的相对距离。

1.2.4 细胞三维培养及PAS染色 将预先4℃过夜融化的Matrigel胶以每孔50 μ L加至96孔板,十字晃动,使之均匀分布避免产生气泡。为防止Matrigel胶不均匀凝固,所有操作必须在冰上进行。将包被好的96孔板置于37℃孵箱内30min使其固化。细胞分组处理48h后消化重悬,以 0.8×10^4 个/孔种于Matrigel胶上,置细胞培养箱内培养5h后,倒置显微镜下观察细胞的管状结构排列及成管的完整程度,随机选取5个不同视野计数成管的数量,取每个视野均值。观察完成后,将上述培养5h后的细胞行PAS染色。染色步骤为0.5%高碘酸氧化5min,蒸馏水稍洗,Schiff氏液避光染色10min,0.5%偏重亚硫酸钠分化2~5s,水洗2次,阳性表现为紫红色。

1.2.5 Western blot检测MMP-9和VEGF的表达 收集分组处理48h后的细胞,利用细胞蛋白抽提试剂盒提取总蛋白,BCA法测定蛋白浓度,制备10% SDS-PAGE凝胶,每孔加入20 μ g蛋白样品,常规电泳、转膜、封闭,随后分别加入兔抗人MMP-9抗体(1:500)、鼠抗人VEGF抗体(1:3000)、鼠抗人GAPDH抗体(1:5000)4℃孵育,12h后,TBST漂洗,加入相应二抗(1:5000)室温孵育1h,化学发光法显影,成像系统拍照,Image J软件分析各组灰度值。

统计学分析:采用SPSS 23.0软件进行统计学分析。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,对照组与不同浓度DOX组的比较采用单因素方差分析,方差齐时选择LSD-*t*法,方差不齐时选择近似*F*检验Welch法,多重比较选择Tamhane T2法。双变量相关性分析采用Spearman等级相关分析。以*P*<0.05为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 HPFs原代培养及鉴定 翼状胬肉组织块接种后约10d可见成纤维细胞从组织块边缘爬出,细胞形态多为长梭形、三角形,逐渐向四周延伸,其间夹杂部分圆形上皮细胞(图1A)。当细胞传至第2代已基本纯化,呈长梭形,细胞长满后呈旋涡状(图1B)。免疫细胞化学染色结果显示CK表达阴性(图1C),Vimentin表达阳性,细胞质内呈棕黄色染色(图1D),符合成纤维细胞特性。

2.2 DOX对HPFs活力的影响 CCK-8实验结果显示,对照组、DOX低、中、高浓度组HPFs的OD值分别为1.14±0.09、0.91±0.09、0.71±0.05、0.23±0.02,差异有统计学意义(*F*=447.888,*P*<0.05),且DOX处理组之间两两相比,差异亦均有统计学意义(*P*<0.05),表明DOX抑制HPFs活力呈剂量依赖性。

2.3 DOX对HPFs迁移能力的影响 细胞划痕实验结果显示,对照组、DOX低、中、高浓度组HPFs的迁移距离分

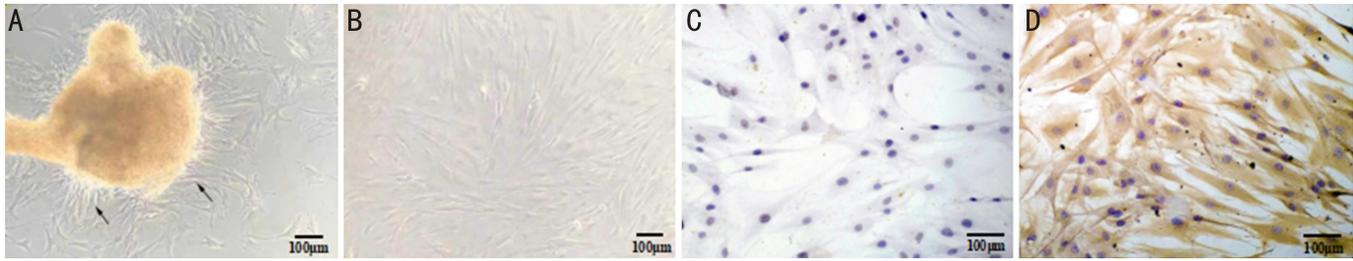


图1 HPFs 原代培养及鉴定 A:翼状胬肉组织块边缘成纤维细胞(箭头示)向四周生长;B:经传代纯化后的 HPFs 呈旋涡状生长;C:CK 表达阴性;D:Vimentin 表达阳性,细胞质呈棕黄色。

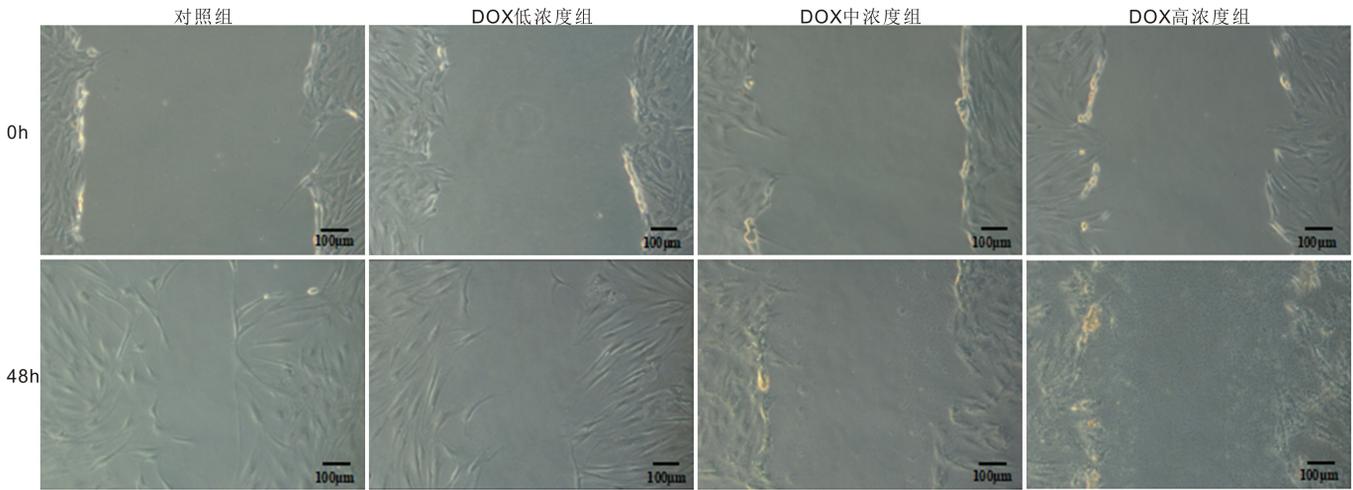


图2 DOX 对 HPFs 迁移能力的影响。

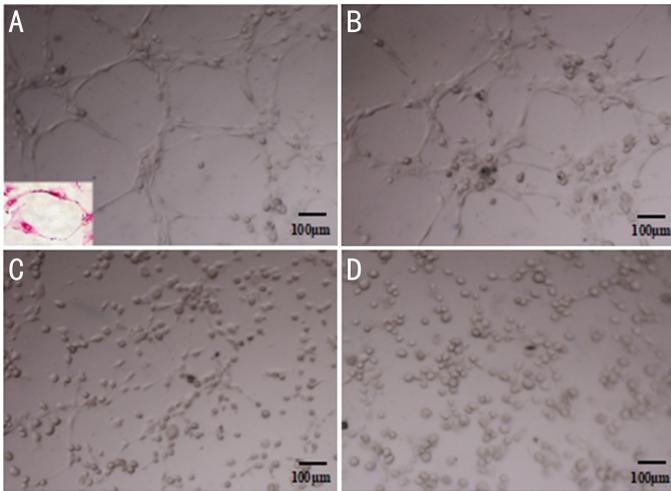


图3 DOX 对 HPFs 血管生成拟态的影响 A:对照组,形成网格样、环状管腔结构,PAS 染色呈阳性;B:DOX 低浓度组,管腔结构完整,周径变小,数量减少;C:DOX 中浓度组,部分细胞形成树枝样结构,不能形成完整的管腔,管腔数较少;D:DOX 高浓度组,无明显管腔结构形成;E:各组细胞 VM 密度的比较,^a $P < 0.05$ vs 对照组;^b $P < 0.05$ vs 50mg/L DOX 组;^c $P < 0.05$ vs 100mg/L DOX 组。

别为 0.21 ± 0.01 、 0.15 ± 0.00 、 0.04 ± 0.01 、 -0.01 ± 0.00 mm, 各浓度 DOX 组细胞迁移距离均明显低于对照组,差异具有统计学意义 ($F = 778.511, P < 0.05$)。三组 DOX 组组间相比,迁移距离差异亦具有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。200mg/L DOX 组因药物浓度较高,细胞质减少,细胞变小,故划痕间距增加。结果表明,DOX 具有抑制 HPFs 细胞迁移的作用,且呈剂量依赖性,见图 2。

2.4 DOX 对 HPFs 血管生成拟态的影响 细胞三维培养结果显示,HPFs 能够黏附于 Matrigel 胶表面,通过细胞自身变性、彼此相连形成大小不等的网格样、环状管腔结构。对照组 PAS 染色呈阳性,提示管腔样结构是由 HPFs 构成,即 VM。可见对照组及 DOX 低浓度组形成的管腔均完整(图 3A、3B),当 DOX 浓度大于 50mg/L 时,开始出现不

完整的管腔形态,部分细胞形成树枝样结构(图 3C、3D)。对照组、DOX 低、中、高浓度组形成的 VM 密度分别为每 10 倍视野 37.33 ± 2.08 、 28.33 ± 1.53 、 12.00 ± 1.00 、 1.67 ± 0.58 个,差异有统计学意义 ($F = 384.889, P < 0.05$, 图 3E),且 DOX 处理组之间两两相比,差异亦均有统计学意义 ($P < 0.05$)。结果表明,随着 DOX 浓度的增加,VM 逐渐变小,数量逐渐减少,直至不能形成完整的管腔结构。

2.5 DOX 对 HPFs 中 MMP-9 和 VEGF 表达的影响 Western blot 检测结果显示,对照组、DOX 低、中、高浓度组细胞 MMP-9 和 VEGF 蛋白相对表达量差异均具有统计学意义 ($F = 94.239, P < 0.05$; $F = 396.281, P < 0.05$)。结果表明,随着 DOX 浓度增高,MMP-9 及 VEGF 蛋白表达下调,见图 4。

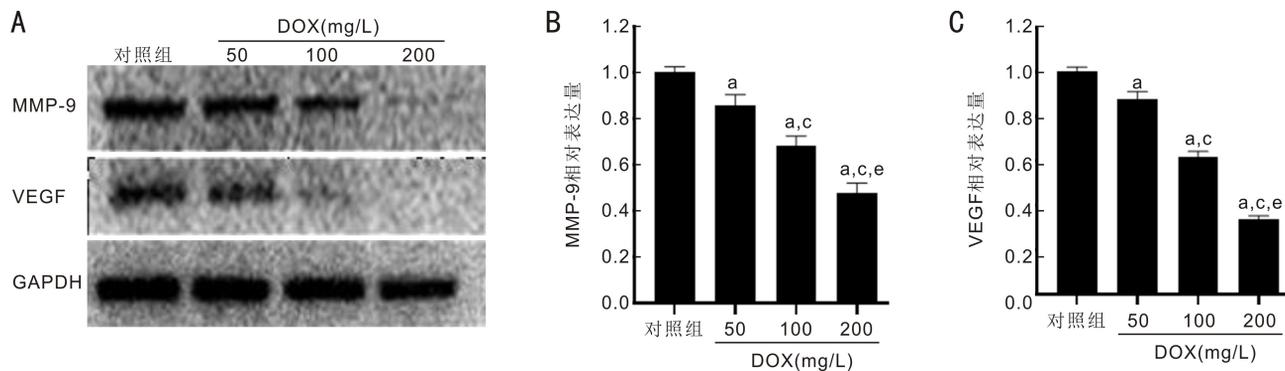


图4 DOX对HPFs中MMP-9及VEGF表达的影响 A:Western blot 检测结果;B:MMP-9相对表达量化分析结果;C:VEGF相对表达量化分析结果。^a $P < 0.05$ vs 对照组;^b $P < 0.05$ vs 50mg/L DOX组;^c $P < 0.05$ vs 100mg/L DOX组。

2.6 HPFs 血管生成拟态与 MMP-9 和 VEGF 表达的相关性 双变量相关性分析显示,HPFs 形成的 VM 密度与 MMP-9 和 VEGF 蛋白的表达水平呈显著正相关($r = 0.949, 0.960$, 均 $P < 0.05$)。

3 讨论

翼状胬肉是眼科的常见病和多发病,据最新统计,我国 40 岁及以上人群翼状胬肉患病率为 13.4%^[6],处于较高水平,且随着年龄的增长而不断升高,多见于户外劳动者,以渔民、农民发病最多,可能与粉尘、日光、烟雾等长期慢性刺激有关^[7],但具体病因和发病机制尚未完全清楚^[8]。李永平等^[5]利用 CD34/PAS 双染首次在翼状胬肉组织中发现 VM 结构,主要表现为 PAS 阳性的细胞外基质包绕在成纤维细胞伸出的突起表面形成管道状结构。随后陈俊杰等^[9]证明 VM 在进展期翼状胬肉中的阳性率明显高于静止期。目前,关于翼状胬肉 VM 调控的相关机制尚未见报道。

VM 是近年发现的存在于肿瘤中的一种新的微循环形式,其与常规的血管结构不同,主要特点包括 VM 管道由肿瘤细胞及细胞外基质构成;管道内壁没有血管内皮细胞;血液可在无内皮管道中流动;VM 周围没有明显的炎症细胞浸润及坏死^[10]。研究表明,VM 表达阳性的肿瘤存在更强的侵袭、转移和耐药能力且预后更差^[11]。肿瘤 VM 调控的机制较为复杂,有研究表明,MMPs 几乎能降解肿瘤细胞外基质的各种蛋白成分,是肿瘤侵袭周围组织并向远处转移过程中最为关键的因子,与 VM 现象呈显著正相关^[12-13]。Xu 等^[14]在脉络膜黑色素瘤组织中发现,VM 阳性组织 VEGF 表达明显高于 VM 阴性组织,且 VEGF 可以提高人类脉络膜黑色素瘤细胞迁移、侵袭及 VM 形成能力,VM 与 VEGF 表达亦呈显著正相关。与肿瘤组织相同,翼状胬肉组织中 MMP-9 和 VEGF 的表达也明显增加^[15-16]。MMP-9 可以降解胬肉细胞外基质 IV 型、V 型胶原、弹性蛋白及明胶,导致前弹力层溶解,使胬肉向角膜及深层浸润^[17]。VEGF 主要通过增加血管通透性、促进细胞外基质变性、提高血管内皮细胞迁移及增殖能力等促进翼状胬肉血管形成^[18]。MMP-9 和 VEGF 的高表达为翼状胬肉形成 VM 提供了一定的分子基础。

DOX 不仅是一种长效的四环素类抗生素,而且还是 MMPs 的广谱抑制剂,具有抗菌、抗炎、抑制细胞增殖、免疫调节、抑制蛋白水解、减少血管生成等作用^[19],可有效抑制肿瘤的生长和转移、保护因脑梗而缺血的神经^[20],参与类风湿关节炎^[21]、牙周病^[22]等多种疾病的治疗。Meng

等^[23]研究发现,腹腔注射 DOX(0.1mL/d)的肝癌裸鼠,肿瘤血管数及 VM 管腔数均较少,肿瘤生长缓慢,裸鼠存活时间延长;在体外培养的肝癌细胞 VM 模型中,DOX 可明显减少 VM 的形成,降低 MMPs 的表达,推测 DOX 对肝癌 VM 的抑制作用可能与其降低 MMPs 的表达有关。Rúa 等^[24]在一项随机双盲安慰剂对照的临床试验中发现口服 DOX(200mg/d)可降低部分患者翼状胬肉体积,而具体的作用机制尚未行进一步研究。

本研究发现 DOX 能显著抑制 HPFs 的活力及迁移能力,降低 HPFs 的 MMP-9 及 VEGF 表达,在运用 Matrigel 胶构建的三维培养 HPFs 模型中观察到 HPFs 能在体外形成 VM,这与李永平等^[5]研究发现的翼状胬肉 VM 结构是由成纤维细胞构成的结论一致。MMP-9 及 VEGF 作为细胞迁移和侵袭的重要元素,本研究结果提示 DOX 可能通过下调 MMP-9 及 VEGF 的表达减慢 HPFs 分解细胞外基质的速度,抑制细胞迁移的能力,进而减少 HPFs 构建的 VM 数量。当 DOX 浓度增加时,MMP-9 和 VEGF 表达降低,VM 的形成明显受到抑制。相关性分析显示,MMP-9 和 VEGF 的表达与 VM 密度呈显著正相关。大量研究表明,进展期翼状胬肉组织中 MMP-9 和 VEGF 的表达明显高于静止期,复发型翼状胬肉中这两个分子的表达又明显高于初发型,即 MMP-9 和 VEGF 的高表达与翼状胬肉的发生发展密切相关^[25-28]。故我们推测 VM 也与翼状胬肉的进展密切相关,VM 阳性的翼状胬肉组织具有更强的促进胬肉基质蛋白降解、溶解角膜前弹力层及新生血管的能力,极大地促进翼状胬肉的进展。这与 VM 阳性的肿瘤组织存在更强的侵袭及转移能力一致。

综上所述,DOX 可通过减少 MMP-9 及 VEGF 的表达抑制 HPFs 的活力及迁移能力,减少 VM 的形成,提示 MMP-9 和 VEGF 可能参与翼状胬肉表达 VM 的分子机制。但本研究仍存在不足,此次研究我们利用 DOX 作为降低 MMP-9 及 VEGF 表达的干预措施,仅在体外细胞水平上进行实验,鉴于体内外研究可能具有差异,将进一步进行活体实验并进行毒理学方面的研究,为寻找新方法防治翼状胬肉提供可靠依据。

参考文献

- 1 Garg P, Sahai AS, Shamshad MA, et al. A comparative study of preoperative and postoperative changes in corneal astigmatism after pterygium excision by different techniques. *Indian J Ophthalmol* 2019; 67 (7): 1036
- 2 Wanzeler ACV, Barbosa IAF, Duarte B, et al. Mechanisms and biomarker candidates in pterygium development. *Arq Bras Oftalmol* 2019;

82(6): 528-536

3 Fernández-Cortés M, Delgado-Bellido D, Oliver FJ. Vasculogenic mimicry: become an endothelial cell "but not so much". *Front Oncol* 2019; 9: 803

4 Maniotis AJ, Folberg R, Hess A, et al. Vascular channel formation by human melanoma cells *in vivo* and *in vitro*: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol* 1999; 155(3): 739-752

5 李永平, 朱哲, 张文忻. 翼状胬肉组织中血管拟态的初步研究. *中华眼科杂志* 2007; 10: 872-875

6 杨梅, 管宇, 康丽华, 等. 中国 40 岁及以上人群翼状胬肉患病率 meta 分析. *中华实验眼科杂志* 2019; 37(3): 190-196

7 Zhou WP, Zhu YF, Zhang B, et al. The role of ultraviolet radiation in the pathogenesis of Pterygia (Review). *Mol Med Rep* 2016; 14(1): 3-15

8 靳怀运, 王剑锋. 翼状胬肉发病机制研究进展. *国际眼科杂志* 2016; 16(6): 1080-1083

9 陈俊杰, 蓝育青, 吴共发, 等. 血管生成拟态与翼状胬肉进行期及静止期的相关性研究. *国际眼科杂志* 2015; 15(3): 414-417

10 Luo QX, Wang J, Zhao WY, et al. Vasculogenic mimicry in carcinogenesis and clinical applications. *J Hematol Oncol* 2020; 13(1): 19

11 Zhang J, Qiao L, Liang N, et al. Vasculogenic mimicry and tumor metastasis. *J BUON* 2016; 21(3): 533-541

12 Meng J, Chen S, Lei YY, et al. Hsp90 β promotes aggressive vasculogenic mimicry via epithelial - mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2019; 38(2): 228-243

13 Liang X, Sun R, Zhao X, et al. Rictor regulates the vasculogenic mimicry of melanoma via the AKT-MMP-2/9 pathway. *J Cell Mol Med* 2017; 21(12): 3579-3591

14 Xu X, Zong Y, Gao Y, et al. VEGF induce vasculogenic mimicry of choroidal melanoma through the PI3k signal pathway. *Biomed Res Int* 2019; 2019: 3909102

15 李盈龙, 马应, 王李松, 等. 翼状胬肉中 MMP-9、TIMP-1 及 VEGF 的表达及意义. *安徽医科大学学报* 2016; 51(10): 1490-1494

16 黄燕, 徐三荣, 李梅, 等. CD44、SOX9、MMP9、Vimentin 在翼状胬肉中的表达及其意义. *眼科新进展* 2016; 36(3): 257-260, 264

17 Kapoor C, Vaidya S, Wadhwan V, et al. Seesaw of matrix metalloproteinases (MMPs). *J Cancer Res Ther* 2016; 12(1): 28-35

18 Apte RS, Chen DS, Ferrara N. VEGF in signaling and disease: beyond discovery and development. *Cell* 2019; 176(6): 1248-1264

19 Ali I, Alfarouk KO, Reshkin SJ, et al. Doxycycline as potential anti-cancer agent. *Anticancer Agents Med Chem* 2017; 17(12): 1617-1623

20 Burggraf D, Trinkl A, Dichgans M, et al. Doxycycline inhibits MMPs via modulation of plasminogen activators in focal cerebral ischemia. *Neurobiol Dis* 2007; 25(3): 506-513

21 Shehwaro N, Langlois AL, Gueutin V, et al. La doxycycline ou comment faire du neuf avec du vieux? *Therapies* 2014; 69(2): 129-141

22 Piacentini M, Borghetti RL, Zancanaro de Figueiredo MA, et al. Doxycycline: an option in the treatment of ulcerated oral lesions? *J Clin Pharm Ther* 2019; 44(6): 838-843

23 Meng J, Sun BC, Zhao XL, et al. Doxycycline as an inhibitor of the epithelial - to - mesenchymal transition and vasculogenic mimicry in hepatocellular carcinoma. *Mol Cancer Ther* 2014; 13(12): 3107-3122

24 Rúa O, Larráyoiz IM, Barajas MT, et al. Oral doxycycline reduces pterygium lesions; results from a double blind, randomized, placebo controlled clinical trial. *PLoS One* 2012; 7(12): e52696

25 Zeng J, Jiang D, Liu X, et al. Expression of matrix metalloproteinase in human pterygia. *Yan Ke Xue Bao* 2004; 20(4): 242-245

26 梁丽芳, 陆晓和. 基质金属蛋白酶、血管内皮生长因子在翼状胬肉中的表达及相关性. *山东医药* 2012; 52(25): 53-54

27 Malozhen SA, Trufanov SV, Krakhmaleva DA. Pterygium; etiology, pathogenesis, treatment. *Vestn Oftalmol* 2017; 133(5): 76-83

28 朱捷, 谢汤寿, 蔡志玲, 等. Cox-2、VEGF 在翼状胬肉中的表达及临床意义. *福建医药杂志* 2017; 39(2): 73-75