

行政院國家科學委員會補助  
大專學生參與專題研究計畫研究成果報告

\* \*\*\*\*\*  
\* 計 畫  
\* : 基質金屬蛋白?抑制蛋白與翼狀贅片細胞增生的相關性  
\* 名 稱  
\* \*\*\*\*\*

執行計畫學生： 林妤倩  
學生計畫編號： NSC 100-2815-C-040-024-B  
研究期間： 100年07月01日至101年02月28日止，計8個月  
指導教授： 鄭雅文

處理方式： 本計畫可公開查詢

執行單位： 中山醫學大學醫學系

中華民國 101年03月30日

## 研究成果報告

### (一)摘要

眼翳病(ptyerygium)是因為結膜細胞不正常增生以及血管新生所造成，被認為和眼睛輪部的上皮幹細胞(limbal epithelial stem cell)有關。已知眼翳細胞中含有高表現量的基質金屬蛋白水解酶(matrix metalloproteinases; MMPs)，此酵素可降解或改變細胞外基質(extracellular matrix; ECM)。由於細胞外基質會將細胞黏著在一起構成組織，而不正常增生的細胞生長密度相當高，不會受限於鄰近細胞的存在，但細胞要轉移前，必須降低細胞的生長密度，因此MMPs 表現量越高，越有利於不正常增生的細胞轉移。但事實上，眼翳細胞會增生，但並不會轉移到其他組織，經實驗室教授發現，此現象和眼翳細胞內TIMP-1(tissue inhibitor of MMP-1)的高表現量有關，顯示出TIMP-1 有抑制細胞轉移的功能。同時，也發現TIMP-1和MMP 表現量之間的不平衡，在不同細胞中會抑制凋亡(anti-apoptosis)或促進增生(proliferation)，但其機轉仍然不清楚。本計畫由5位患者之翼狀贅片組織之body及head部分培養出細胞，初步結果發現有四株由head部分所養出的翼狀贅片細胞之TIMP基因及蛋白表現高於由同一患者由body部分所養出之細胞，另一位患者之body及head所養出之細胞之TIMP表現並無差異。此外，進一步分析這十株細胞之細胞周期發現在TIMP表現高的4株head細胞中有3株細胞增生速度較其由body中培養出之細胞株快，當轉染或抑制TIMP的表現後，細胞增生的速度易隨之改變。進一步分析發現這3株細胞株的細胞增生速度加快與其ras蛋白的過度表現有關，根據上述研究結果發現，翼狀贅片細胞中的TIMP蛋白表現除可抑制細胞轉移的功能外亦可藉由活化ras而促進細胞的增生。

## (二)文獻回顧與探討

### 2.1. 眼翳的形成原因

眼翳是很常見的眼科疾病，影響了世界上7-13%的人口(Bai et al., 2010)。眼翳的特徵包含了組織型態改變(tissue remodeling)、細胞增生、血管新生、發炎等(Girolamo et al.,2003)。一般認為眼翳的增長是源自於眼球輪部上皮幹細胞(limbal epithelial stem cell)的活化和增生，而後造成結膜細胞不正常增生以及過度的血管新生。有研究發現幹細胞一旦離開其生長的周圍環境(niche)，這些細胞會失去自我更新的能力，且增生的能力會變高，一般認為造成眼翳的輪部上皮幹細胞也可能是因為如此，當受到UV的刺激時，輪部上皮幹細胞脫離focal limbus，由於離開原先生長的環境，環境中許多的因子改變，幹細胞便失去本性，而異常的增生及活化 (Bai et al., 2010)。流行病學的數據顯示UV在眼翳形成的過程中扮演極重要的角色。除了UV之外，其他包括免疫反應、病毒感染和基因因子，都被認為和眼翳的形成有關 (Tsai et al., 2005)。此外，也有研究指出眼翳可能是因為修補傷口(wound healing)的功能失去控制，導致細胞凋亡的能力產生變化(Girolamo et al.,2003)。截至目前為止，有關眼翳生成的機轉有很多解釋，但仍然沒有明確的答案。

### 2.2. 眼翳細胞造成的影響、治療方式

眼翳外觀上呈翼型(wing-shaped)，又名翼狀贅片，由於細胞不正常增生，通常會從眼球的輪狀部位其近鼻側開始往外生長，會逐漸遮蔽眼球，影響到患者的視力，也會造成散光。若擴散至視軸(visual axis)時，則可能導致視力喪失。一般來說，醫生會幫患者開刀移除眼翳，但其復發率高達61-82%。若開刀時配合上其它的治疗方法，譬如說自身結膜移植 (conjunctival autograft)、羊膜移植(amniotic membrane grafts)、β射線以及mitomycin C的治療，則眼翳的復發率可降低至2-31%，此時眼翳的復發率反而和年齡以及居住的地理位置有較大的關係(Molykutty et al., 2006)此外，眼翳病的一大特色即是細胞外基質的型態改變，包括彈性組織的變性以及Bower's layer的損壞 (Tsai et al., 2010)。

### 2.3. 眼翳和UV 的關係

流行病學的數據顯示出陽光的曝曬和眼翳的產生有強烈的相關性，也是目前最廣為接受的成因，但其致病機轉至今仍無法完整地解釋出來。眼翳好發於生活在赤道附近的居民，以及長期在外工作曝曬於陽光下的勞工，如郵差、農夫、和漁夫等 (Molykutty et al., 2006)。事實上，許多眼睛的疾病都和陽光曝曬有關，如老年黃斑病變(age-related macular degeneration)、高齡所致的白內障(senile cataract)、及眼翳(ptyerygium)等。過去有研究針對這些眼睛疾病和不同波長的光之間的關係進行研究，發現眼翳只和UV 這種高能量的輻射暴露有關，找不到眼翳和可見光(400-700 nm)暴露有關的證據。再進一步研究發現，UVB(290-320 nm)比起UVA(320-340 nm)對於眼翳的影響更強(Taylor et al., 1992)。雖然陽光曝曬和眼翳相關的證據，根源於流行病學的調查，但是有關皮膚和UV 之間的研究，已顯示出UV 可以促進發炎性細胞激素(inflammatory cytokines)以及基質金屬蛋白水解酶(matrix metalloproteinases; MMPs)的表現，導致彈性結締組織產生改變 (Girolamo et al., 2003)。

### 2.4. 基質金屬蛋白水解酶(MMP) 在眼翳中扮演的角色

MMPs是一個蛋白水解酶的家族，包含了至少20種酵素，雖然MMPs內的酵素有些在功能上有部分重疊，但大致可分為五類，包括了collagenases(MMP-1,8,13), gelatinases(MMP-2,9)、stromelysins(MMP-3,10,21,22)、membrane-bound MMPs以及其他，當中最特別的是膠原蛋白酶，可以改變膠原中最豐富的纖維狀膠原，也就是collagen I, II, III。MMP最主要的功能即是修飾或降解組織的細胞外基質(extracellular matrix; ECM)，如膠原蛋白、層狀蛋白(laminin)、纖維網蛋白(fibronectin)，和許多病症息息相關，譬如關節炎、狹心症(coronary artery disease)、血管新生、腫瘤的侵入及轉移。ECM被降解後會釋放出不同的細胞激素，如:血管內皮的生長因子(vascular endothelial growth factor)、纖維母細胞的生長因子(basic fibroblast growth factor)等，能夠刺激眼翳細胞轉移、增生，並使細胞血管新生。

在所有MMP 當中，存在最普遍的是MMP-1，MMP-1 和其他MMP 一樣會受到轉錄因子、輔酶活性、酵素抑制的調控。雖然有許多MMP 和眼翳形成有關，但大多數機制仍不清楚。過去實驗室教授針對MMP-9,MMP-10 和眼翳的關係進行研究，發現兩種MMP 在眼翳中的表現量都比正常的結膜和輪部細胞高，特別是MMP-10。高濃度的MMP-9 能夠將基底膜的組成物分解，如半胞橋小體(hemidesmosome)，而MMP-10 能夠使collagen IV、vitronectin、纖維網蛋白、蛋白多糖(proteoglycan)變性 (Tsai et al., 2010; Bai et al., 2010; Girolamo et al., 2003)。

### **2.5. UVB 暴露對MMP 的影響**

正常的結膜、輪狀部位、角膜組織和病兆組織比較下，發現正常的組織其MMP-1的表現明顯較低。過去有研究針對正常的結膜上皮細胞、眼翳纖維母細胞、輪部上皮細胞做UVB輻射處理，發現只有輪部上皮細胞內的MMP-1基因會受到輻射的誘發，另外兩種細胞的MMP-1並不會受到影響 (Girolamo et al.,2003)。

### **2.6. TIMP 對眼翳的影響**

MMP 會受到TIMPs( tissue inhibitors of metalloproteinases)的抑制，因此MMP 和TIMP 之間的平衡非常重要，會影響到蛋白水解和組織侵入的發展。過去，實驗室的教授同時針對眼翳和正常結膜細胞內的TIMP 蛋白做比較，發現眼翳組中，有72%的病患其翼狀贅片組織有TIMP 大量表現的現象，而在正常結膜組，只有10%，因此TIMP 在眼翳細胞中的過度表現可能與其疾病發展有關。此外，實驗室亦進一步從眼翳病患中建立PECs(primary cultured epithelial cells)，發現有5/7 具有TIMP-1 高表現量，其餘2/7 沒有TIMP 的表現或表現量很低。比較剔除TIMP基因和沒有剔除的兩組，發現眼翳細胞的轉移(migration)的能力從20%上升到70%，其侵入(invasion)的能力從42%上升到78%。因此，TIMP-1 的表現量越高，眼翳細胞轉移和侵入的能力會隨之下降。此外，TIMP 蛋白和Ras 的活化有關，當Ras 接上細胞表面的CD63 和 $\beta$ -1 integrin 時，能夠促進細胞增生，並抑制凋亡(Tsai et al., 2010)。

目前由實驗室過去的研究知道TIMP 的表現量影響了細胞增生，以及抑制凋亡的能力，但其機轉上尚未做進一步的研究。因此，此次計畫即是針對TIMP 與細胞增生這一部份的關係，做進一步的深入探討。

### **2.7. 翼狀贅片 head 和body 之間的差異性**

由於翼狀贅片head相較於body部分其正常的角膜及結膜的上皮組織，都相對較厚，且翼狀贅片head和body的黏附程度大不相同，翼狀贅片head明顯地緊密貼附在眼球上(Satoru Kase et al.,2007)。關於眼翳初期的生成，一般認為和輪部的幹細胞增生有關，但此觀點仍存在著爭議性。過去有研究針對翼狀贅片head(角膜上)、翼狀贅片neck(輪部)和翼狀贅片body(結膜上)三個處於不同位置的眼翳上皮細胞，進行生長和轉移的型態的觀察，提出了不同的想法。其研究結果顯示翼狀贅片head 上皮細胞形成群落的效率比body 來得高，翼狀贅片head 在細胞生長和侵入的過程，以及術後的復發都扮演重要的角色。MMP-2 和MMP-9 只在翼狀贅片head 內偵測到，而翼狀贅片body 內則不存在這兩個酵素，由於翼狀贅片head 內有活化的MMP-2 和MMP-9，利於降解基底膜或結締組織的組成物，因此翼狀贅片head 的生長速度以及轉移到受傷部位的速度都比翼狀贅片 body 來得快。此外，總括來看，這些數據意謂著翼狀贅片head epithelium 很可能就是帶動眼翳增生以及侵入的部位，扮演了stem-like cells 的角色 (Bai et al., 2010)。

### **2.8. MMPs 和TIMPs 在不同細胞中的表現量：**

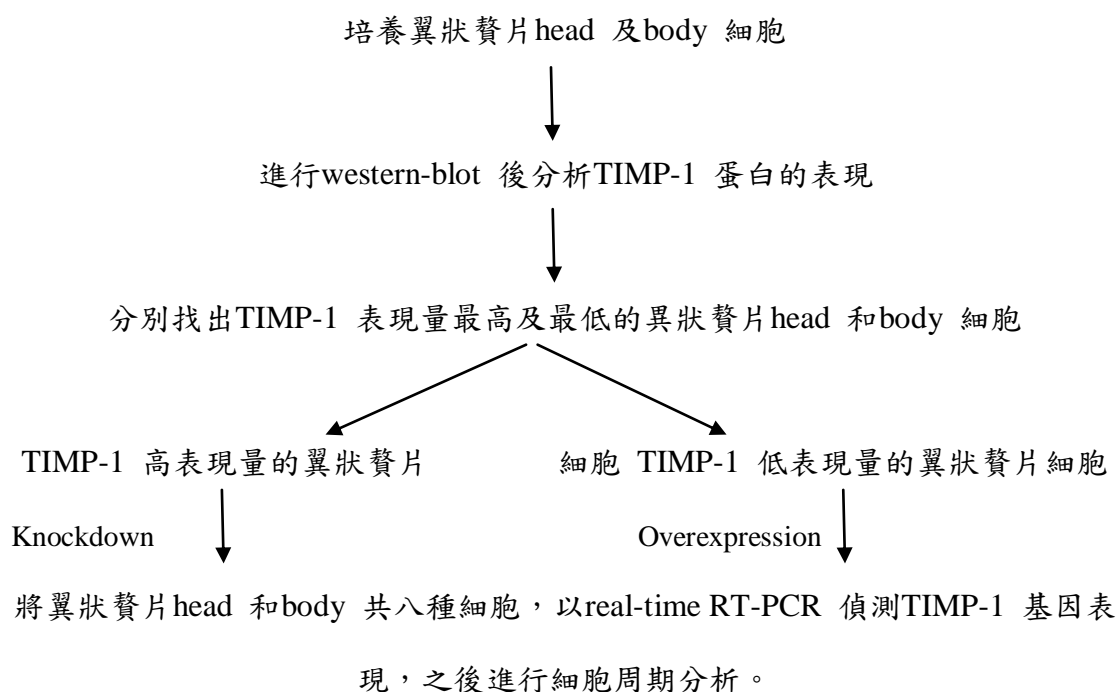
眼球內的結締組織受到MMPs 和TIMPs 之間的平衡所影響，包括組織降解和型態上的改變。經研究發現，和正常的結膜纖維母細胞(conjunctival fibroblasts)比較下，翼狀贅片head fibroblasts, 翼狀贅片body fibroblasts, 以及結膜纖維母細胞中所含ead fibroblasts 其MMP-1,MMP-3 轉錄的表現非常顯著，但翼狀贅片body fibroblasts 則沒有明顯的差別。另外，也同時發現MMP-2，TIMP-1，TIMP-2 在這三種細胞中的轉錄表現量也沒有明顯的差異。上皮纖維母細胞受到UV 的暴露和MMP-1 及MMP-3 的過度表現有關，且翼狀贅片head fibroblasts 內的MMP-1 和MMP-3 濃度高時，翼狀贅片 head fibroblasts 溶解膠原的能力也相對較高。因

此推測UV 和翼狀贅片 head fibroblasts 以及眼翳侵入角膜的病症有很大的關聯性 (Li DQ et al., 2001) 。

### (三)研究方法及步驟

過去實驗室教授的研究指出剔除TIMP-1 基因的眼翳上皮細胞(ptyerygium epithelial cells; PECs) 和正常的PECs 比較下，其侵入(invasion)及轉移(migration)的能力提高;相反地，TIMP-1 基因過度表現的PECs，其入侵及轉移的能力較低。同時，也發現TIMP-1 的表現量和眼翳細胞(Pterygium cell; Pt cell)的增生有關，具有抑制細胞凋亡和促進細胞增生的功能。TIMP 蛋白和Ras 的活化有關，當Ras 接上細胞表面的CD63 和 $\beta$ -1 integrin 時，會促進細胞增生，並抑制凋亡。

實驗流程圖：



實驗目標：

- (1)找出TIMP-1 蛋白抑制細胞凋亡以及促進細胞增生的機轉
- (2)比較翼狀贅片head 和 body 其TIMP 表現量是否有差異，是否影響其增生。

#### 3.1. 翼狀贅片head 及body 細胞株之培養：

由眼科手術取下所建立的翼狀贅片head 及body 細胞株 (Tsai et al., 2010)，儲存於液態氮中，經活化培養後，以Dulbecco's modified Eagle medium(DMEM)添加



fetal bovine serum (FBS)作為培養基，置於5% CO<sub>2</sub> 的37°C培養箱中進行培養。繼代培養時，先用PBS 清洗1~2 次，再加入胰蛋白酶，使細胞浮在培養液中，接著分到新的培養皿中。之後，固定更換DMEM，確定翼狀贅片head 及body細胞株和剛建立培養時的狀態一樣，且未受細菌污染時，即可進一步分析細胞株內的TIMP-1 蛋白表現量。

### **3.2. 以聚丙烯醯胺膠體電泳(SDS-PAGE)偵測目標蛋白TIMP-1 之位置：**

將翼狀贅片 head 及body 分別以protein lysis buffer 水解，然後將水解出的蛋白，利用SDS-PAGE 測定蛋白變性後的分子量。取20μg 蛋白進行SDS-PAGE (12.5% polyacrylamide gel,1.5 mm thick) 進行蛋白電泳，使用Bio-Rad 蛋白定量試劑來定量濃度。完成膠體電泳後，將蛋白轉移至PVDF membrane 上。

### **3.3. 以西方墨點法(Western blot analysis)標定TIMP-1 蛋白：**

將黏附蛋白的PVDF membrane 放入5 % non-fat milk/TBST 內，用來限制住非特異性的連接部位(nonspecific binding sites)，然後置於室溫下緩緩搖動一小時。之後，將牛奶倒掉，加入欲測蛋白之一級抗體，放在室溫反應一小時，讓抗體固定於membrane 上有TIMP-1 蛋白的位置，然後用含有0.1% TBS-Tween 20 清洗三次，再加入二級抗體 (anti-mouse 或anti-rabbit IgG)，具有特定酵素或放射物質用來標記一級抗體的位置。室溫反應一小時後，重複TBST 清洗membrane 的步驟，用來移除非特異性的連接部位。接著在暗房中，用ECL 和membrane 反應 2分鐘，以 X 光片感光顯影後，蛋白的位置會產生化學發光。

### **3.4. 以Densitometer 來分析TIMP-1 蛋白表現量：**

(1)比較翼狀贅片 head 及body 細胞內的TIMP-1 蛋白表現量是否有不同。(2)在翼狀贅片head 和body 中，分別找出TIMP-1 表現量最高和最低的Pt cell。TIMP-1 表現量高的Pt head 記為Pt head(H)

TIMP-1 表現量高的Pt body 記為Pt body(H)

TIMP-1 表現量低的Pt head 記為Pt head(L)

TIMP-1 表現量低的Pt body 記為Pt body(L)

### 3.5. TIMP-1 基因剔除(knockout)細胞株之建立方式如下：

將兩條互補的TIMP-1 干擾引子，接合至pcDNA3.1 / Myc-HisA(-) / HU6 的質體上，接著轉植(transformation)到勝任細胞(Competent Bacterial Cell)中培養。然後抽取載體的DNA，用DOTAP 試劑將載體DNA 轉染(transfection)至Pt head(H) 、Pt body(H)當成正控制組，之後加入含有 G418 的培養基，來挑選出穩定表現上述基因的細胞。

經knockout 的Pt head (H)記為Pt head(H, -)

經knockout 的Pt body(H)記為Pt body(H, -)

### 3.6. TIMP-1 基因過度表現(overexpression)細胞株之建立方式如下：

利用PCR 反應放大TIMP-1 之全長基因，將此基因片段純化後與質體進行接合。將接合後的產物轉植到 JM109 competent cells，經過培養後，萃取載體DNA 並使用DNA 定序儀確認接入的基因，其方向性和序列是否正確。將轉植後的載體以DOTAP 轉染至TIMP-1 表現量低的Pt head(L)和Pt body(L)，之後，加進含有 G418 的培養基，來挑選出穩定表現上述基因的細胞。

經overexpression 的Pt head (L)記為Pt head(L, +)

經overexpression 的Pt body(L)記為Pt body(L, +)

### 3.7. 以real-time RT-PCR 偵測TIMP-1 基因表現

將細胞收下後，加入1 ml TRIzol 來水解細胞，並置於室溫下反應。等細胞全數水解後加入DEPC-chloroform(氯仿)，混合均勻之後離心，取出上清液加入 isopropanol，置於室溫15 分鐘。等RNA 沉澱出來，再用75%酒精清洗殘留的雜質，經離心後去除上清液，留下RNA 沉澱物。接著，加入DEPC H<sub>2</sub>O 溶解RNA。取5µg RNA 用oligo dT 為primer，置於72°C上10 分鐘，使oligo dT 和RNA模板接合，再加入4µl 反轉錄酵素反應buffer、1µl 0.1M DTT 及1µl 10 mM dNTP，置於42°C作用2 分鐘。之後，再加入1µl 反轉錄酵素，置於42°C作用1 小時，反應產生的cDNA 用來做PCR 分析。為了要量化TIMP 的表現情形，RNA 經過反轉錄作用後，利用SYBRN GREEN Kit 進行PCR。

### 3.8.翼狀贅片細胞周期分析

收取基因轉染的細胞，加入70% 酒精 並置於4°C 反應18 小時，接著以PBS清洗後離心，RNase處理後用PI染色，最後使用流式細胞儀分析細胞週期。

#### **(四)結果**

##### **4.1. 翼狀贅片head 及body 細胞株之建立及其TIMP蛋白表現情形**

本研究共由5位翼狀贅片患者之檢體中建立翼狀贅片head 及body細胞株各五株，並以real-time RT PCR及西方墨點法分析其TIMP的基因及蛋白表現量，結果如Figure 1所示。本計畫由5位患者之翼狀贅片組織之body及head部分培養出細胞，初步結果發現有四株由head部分所養出的翼狀贅片細胞之TIMP基因及蛋白表現均高於由同一患者由body部分所養出之細胞，另一位患者之body及head所養出之細胞之TIMP表現並無差異。

##### **4.2. TIMP表現與細胞增生的相關性**

此外，進一步分析這十株細胞之細胞周期，結果發現在TIMP表現高的4株head細胞中有3株細胞增生速度較其由body中培養出之細胞株快 (Figure 2)，而在body及head細胞TIMP表現無差異之細胞其細胞生長速度亦無統計上的差異。

##### **4.3. TIMP蛋白轉染或剔除之細胞株建立及其TIMP蛋白表現量及細胞增生分析**

本研究進一步利用5株由head培養出之翼狀贅片細胞做進一步分析，分別在表現量低的一株細胞及表現量高的4株細胞中轉染或剔除TIMP的表現後，分析其TIMP蛋白表現量及細胞增生，結果發現當TIMP的表現被抑制後細胞增生的速度亦隨之下降，反之，當增加TIMP的表現後細胞增生的速度亦隨之上升(Figure 3)。

##### **4.4. TIMP與ras蛋白表現之相關性分析**

本研究進一步分析TIMP是否藉由活化ras蛋白而促進細胞增生，分析上述所建立之十株翼狀贅片細胞之TIMP與ras蛋白表現的相關性，結果發現這3株TIMP表現量高且細胞增生速度較快之細胞株其ras蛋白的表現量亦較高(Figure 4)，根據上述研究結果發現，翼狀贅片細胞中的TIMP蛋白表現除可抑制細胞轉移的功能外亦可藉由活化ras而促進細胞的增生。

## (五)討論

本實驗室過去分析翼狀贅片細胞和正常結膜細胞內的TIMP 蛋白表現，發現翼狀贅片細胞及組織有TIMP 大量表現的現象，而在正常結膜組織及細胞則表現量較低，因此推測TIMP 在翼狀贅片細胞中的過度表現可能與其疾病發展有關 (Tsai et al., 2011)。此外，實驗室也進一步利用細胞實驗發現翼狀贅片細胞的轉移 (migration) 的能力與侵入 (invasion) 的能力與TIMP 蛋白表現有關 (Tsai et al., 2011)。過去的研究發現，翼狀贅片 head 轉移的現象較低，細胞間的黏附較 body 緊密，且head 形成群落的速度較body 快許多 (Satoru Kase et al., 2007)。因此本實驗中進一步將翼狀贅片組織區分為由head及body 兩部分，並由這兩部分分別培養出細胞株，結果發現TIMP在head 所培養出的細胞株中的表現量高於從body中所培養出的細胞株 (Figure 2)，且TIMP蛋白表現高者其細胞生長速度較快，因此推測TIMP 在翼狀贅片head 中的表現量可能是導致其轉移的現象較低，細胞間的黏附較 body 緊密，且head 形成群落的速度較body 快許多的原因之一。

TIMP和Ras 的活化有關，當Ras 接上細胞表面的CD63 和 $\beta$ -1 integrin 時，能夠促進細胞增生，並抑制凋亡 (Stetler-Stevenson et al., 2008)。本研究的研究結果也發現TIMP表現量高且細胞增生速度較快之細胞株其ras蛋白的表現量亦較高。

MMP最主要的功能即是修飾或降解組織的細胞外基質 (extracellular matrix; ECM)，能夠刺激眼翳細胞轉移、增生，並使細胞血管新生。本實驗室過去亦發現

MMP-9, MMP-10 在眼翳中的表現量都比正常的結膜和輪部細胞高，特別是MMP-10。因此根據本研究之研究結果推測翼狀贅片細胞會大量增生但其轉移能力較低，可能是因為TIMP抑制了MMP活性但卻活化ras表現所致。因此，若要抑制翼狀贅片的增生，將可朝抑制ras蛋白活性方向進行。

## (六)参考文献

1. Bai H, Teng Y, Wong L et al. Proliferative and migratory aptitude in pterygium. *Histochem Cell Biol* 2010;134:527–535.
2. Girolamo ND, McCluskey P, Lloyd A et al. Expression of MMPs and TIMPs in Human Pterygia and Cultured Pterygium Epithelial Cells. *Investigative Ophthalmology Vis Sci.* 2000 ;41:671–679.
3. Girolamo ND, Wakefield D , Coroneo MT. Differential Expression of Matrix Metalloproteinases and Their Tissue Inhibitors at the Advancing Pterygium Head. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000;41:4142–4149.
4. Girolamo ND, Coroneo MT, Wakefield D. UVB-Elicited Induction of MMP-1 Expression in Human Ocular Surface Epithelial Cells Is Mediated through the ERK1/2 MAPK-Dependent Pathway. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44:4705 –4714.
5. Li DQ, Lee SB, Gunja-Smith Z et al. Overexpression of collagenase (MMP-1) and stromelysin (MMP-3) by pterygium head fibroblasts. *Arch Ophthalmol.* 2001 Jan ;119(1):71-80.
6. Molykutty J, Dushku N, Jaworski C et al. Microarray and protein analysis of human pterygium. *Molecular Vision* 2006; 12:55-64.
7. Satoru K, Mitsuhiko O, Izuru S et al. Immunolocalisation of E-cadherin and b-catenin in human pterygium. *Br J Ophthalmol* 2007;91:1209–1212.
8. Stetler-Stevenson WG. Tissue inhibitors of metalloproteinases in cell signaling: metalloproteinase independent biological activities. *Sci Signal* 2008;1:re6.
9. Taylor HR, West S, Rosenthal FS. The Long-term Effects of Visible Light on the Eye. *Arch Ophthalmol.* 1992;110:99-104.
10. Tsai YY, Cheng YW, Lee H et al. Oxidative DNA damage in pterygium. *Molecular Vision* 2005; 11:71-5.

11. Tsai YY, Lee H, Cheng YW et al. Effect of TIMP-1 and MMP in pterygium invasion. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010 Jul;51(7):3462-7.

(七)圖

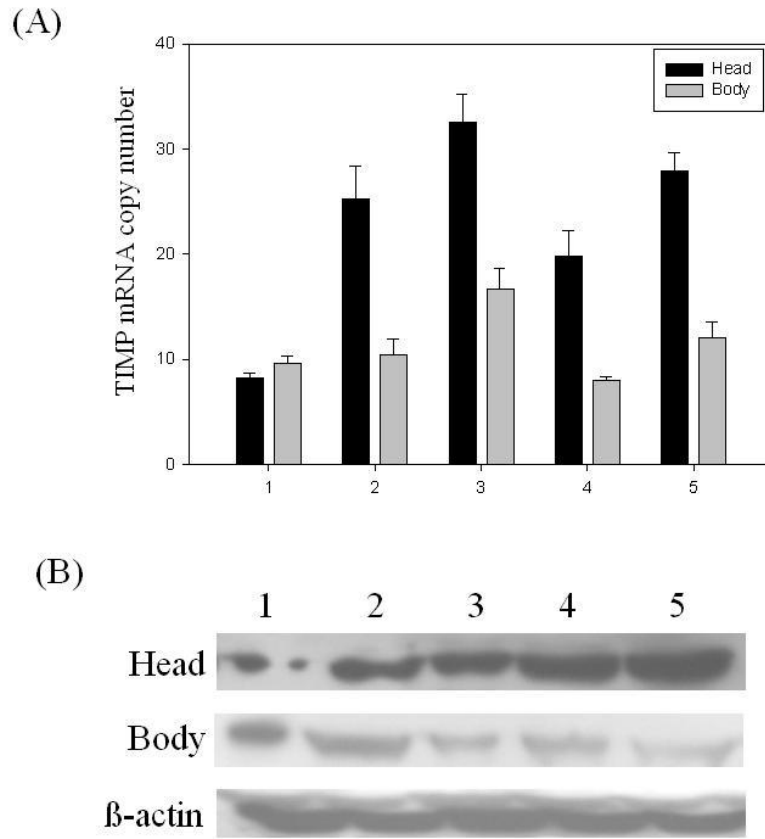


Figure 1. 翼狀贅片組織培養之 head 及 body 細胞株之 TIMP 基因及蛋白表現。



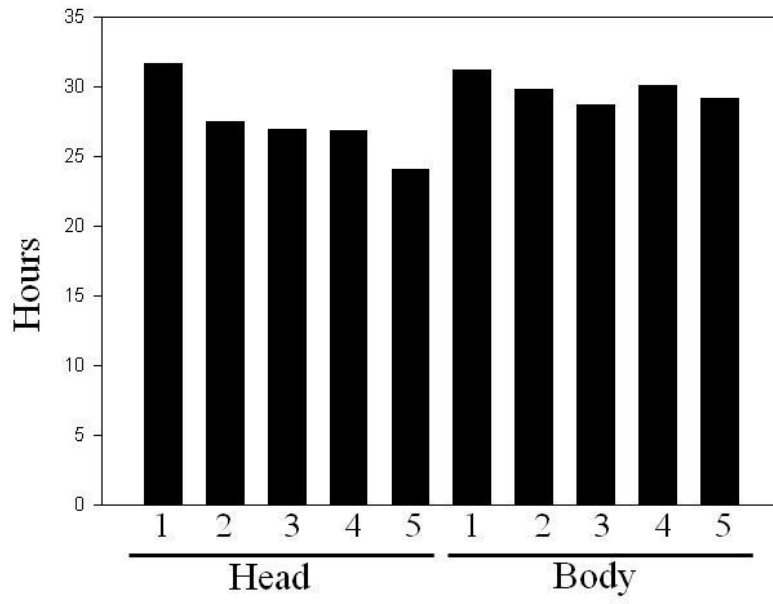


Figure 2. 細胞生長複製周期分析。

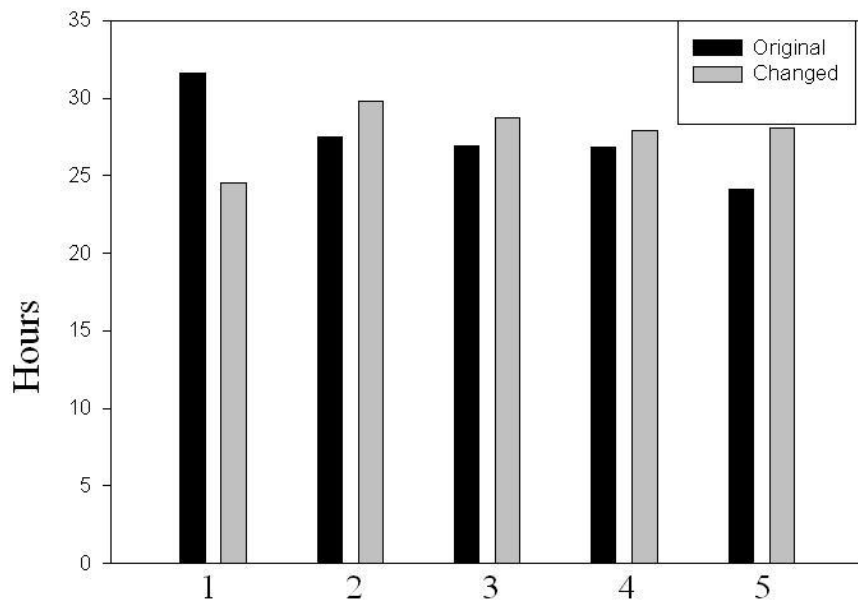


Figure 3. 在 5 株由 head 培養出之翼狀贅片細胞中分別將表現量低的一株細胞及表現量高的 4 株細胞中轉染或剔除 TIMP 的表現後，分析其細胞生長複製周期。

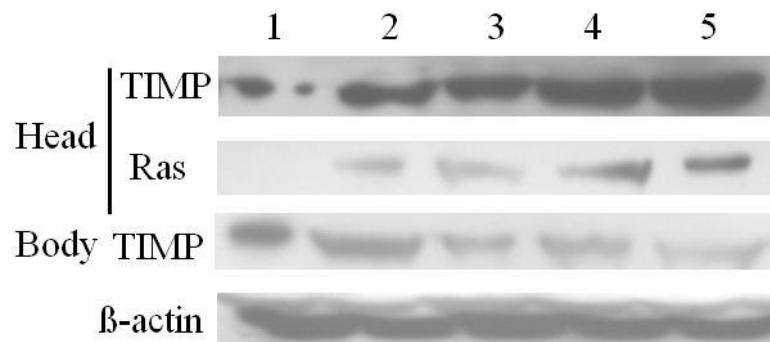


Figure 4. 翼狀贅片組織培養之 head 及 body 細胞株之 TIMP 及 Ras 蛋白表現之相關性分析。