

健脾祛瘀法对血脂异常 ApoE 基因缺失小鼠色素上皮 VEGF 及 VEGFR2 的影响

刘小虎¹, 曾庆华¹, 莫 亚², 唐春艳¹, 谢礼丹¹, 王 毅³

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 30973774)

作者单位: ¹(610075) 中国四川省成都市, 成都中医药大学眼科教研室; ²(610072) 中国四川省成都市, 成都中医药大学附属医院²眼科; ³病理科

作者简介: 刘小虎, 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 中医药对老年性眼病的防治研究。

通讯作者: 曾庆华, 女, 教授, 主任医师, 博士研究生导师, 研究方向: 中医药对老年性眼病的防治研究. zqhmyw@126.com

收稿日期: 2012-02-10 修回日期: 2012-04-23

Effects of jianpiquyu method on the VEGF/VEGFR2 pathway in RPE of ApoE^{-/-} mice by dyslipidemia

Xiao-Hu Liu¹, Qing-Hua Zeng¹, Ya Mo², Chun-Yan Tang¹, Li-Dan Xie¹, Yi Wang³

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 30973774)

¹Department of Ophthalmology, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, Sichuan Province, China;

²Department of Ophthalmology; ³Department of Pathology, Teaching Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610072, Sichuan Province, China

Correspondence to: Qing-Hua Zeng. Department of Ophthalmology, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, Sichuan Province, China. zqhmyw@126.com

Received: 2012-02-10 Accepted: 2012-04-23

Abstract

• AIM: To research tissue and ultrastructure in retinal pigment epithelium (RPE) of apolipoprotein E-deficient (ApoE^{-/-}) mice effected by dyslipidemia in using jianpiquyu method, and to explore the effects on the VEGF/VEGFR2 pathway.

• METHODS: Thirty-six 2-month-old ApoE^{-/-} mice were randomly divided into three groups: the group of normal chow (group A); the group of high fat chow (group B), the group of treatment (group C), twelve mice in each group. Animals were killed after five months feeding and animal body mass, blood lipid and hemorheology levels were detected. RPE was observed by light microscopy, transmission electron microscopy and immunohistochemistry. And the VEGF were analysed by Western blot.

• RESULTS: The animal body mass, lipid and hemorheology levels in group B were significantly higher than those of group A and group C ($P < 0.05$). The thickness of RPE in

group A was statistically higher than that of group B and group C ($P < 0.05$), but there was not statistically significant difference between group B and group C ($P > 0.05$). VEGF and VEGFR2 dyeing area and intergral optical density in group B were higher than those of group A and group C ($P < 0.05$). Protein expression in retina in group B was higher than that of group A and group C ($P < 0.05$).

• CONCLUSION: It plays a positive role in ameliorating biochemical indicators such as lipid and hemorheology levels in dyslipidemia ApoE^{-/-} mice by using jianpiquyu method. It also plays a regulatory function in the VEGF/VEGFR2 pathway in this age-related macular degeneration (AMD) animal model.

• KEYWORDS: dyslipidemia; ApoE^{-/-}; jianpiquyu method; age-related macular degeneration; VEGF

Liu XH, Zeng QH, Mo Y, et al. Effects of jianpiquyu method on the VEGF/VEGFR2 pathway in RPE of ApoE^{-/-} mice by dyslipidemia. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2012;12(6):1033-1037

摘要

目的: 通过观察血脂异常 ApoE 缺失 (apolipoprotein E-deficient, ApoE^{-/-}) 小鼠视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) 组织及超微结构, 探讨健脾祛瘀法对其 RPE 层 VEGF/VEGFR2 信号传导通路的影响。

方法: 随机将 36 只 2 月龄 ApoE^{-/-} 小鼠分为 3 组, 即: 普食组 (A 组)、高脂组 (B 组)、治疗组 (C 组), 每组动物 12 只, 喂养 5mo 后检测其体质量、血脂、血流变, RPE 层行光镜、免疫组织化学、透射电镜观察, Western-blot 检测 VEGF 表达。

结果: 7 月龄 ApoE^{-/-} 小鼠 B 组体质量、血脂、血流变指标均高于 A 组和 C 组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。A 组 RPE 厚度明显高于 B 组和 C 组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 但 B 组与 C 组之间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。B 组 RPE 层 VEGF 及 VEGFR2 染色面积及积分光密度均高于 A 组和 C 组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。B 组视网膜 VEGF 蛋白的相对表达量明显高于 A 组和 C 组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

结论: 健脾祛瘀法对改善血脂异常 ApoE^{-/-} 小鼠的血脂、血流变等生化指标有积极作用, 并且提示对该 AMD 动物模型中 RPE 层 VEGF/VEGFR2 信号传导通路有一定调控作用。

关键词: 血脂异常; ApoE^{-/-}; 健脾祛瘀法; 年龄相关性黄斑变性; 血管内皮生长因子

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2012.06.06

刘小虎,曾庆华,莫亚,等.健脾祛瘀法对血脂异常 ApoE 基因缺失小鼠色素上皮 VEGF 及 VEGFR2 的影响.国际眼科杂志 2012;12(6):1033-1037

0 引言

在我国,由于人口老年化进程的加剧和饮食结构的变化,其他致盲原因得到或加强了控制,年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration, AMD)日益成为重要致盲的眼病。AMD 发病机制尚未明确,遗传因素和环境因素的共同作用是 AMD 主要的发病机制^[1],血脂异常作为重要危险因素之一,越来越受到研究者关注。AMD 的安全有效治疗仍处于相对匮乏状态,尤其 AMD 后期血管新生更为棘手,针对血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)自身及其信号传导通路的 VEGF 抑制剂已成为当今的研究热点。前期研究^[2]表明,以健脾祛瘀法原则组方之黄斑康对 C57BL 小鼠 AMD 模型具有改善血液生化等指标,一定程度改善 RPE 层-Bruch 膜-脉络膜毛细血管复合体(RPE-Bruch membrane-choriocapillaris complex, RBCC)病变的作用。本次研究通过建立 ApoE^{-/-}小鼠 AMD 动物模型进一步探讨健脾祛瘀法对 VEGF/VEGFR2 信号传导通路的影响,探寻其作用机制,以期为中医药防治 AMD 提供新的思路与方法。

1 材料和方法

1.1 材料 实验用 2 月龄 ApoE^{-/-}小鼠由北京大学实验动物中心(美国 Jackson 实验室引进)提供。普通饲料和高脂饲料均由成都达硕动物实验有限公司提供。健脾祛瘀中药配方颗粒(生蒲黄、白术、丹参、牡丹皮、郁金等组成)由四川新绿色药业科技发展股份有限公司提供,产品批号:1009049。血脂试剂盒由浙江伊利康生物技术有限公司提供,产品批号:20080023 号。血液流变学试剂盒由北京赛科希德 SA-6004 提供。兔抗 VEGF 和 VEGFR2 多克隆抗体购于英国 Abcam 公司,相应的二抗及试剂盒购于北京中杉生物技术有限公司。实验根据赫尔辛基宣言和保护及运用动物的指导原则进行。

1.2 方法

1.2.1 实验分组及动物模型的建立 实验分为 3 组:普食组(A 组, $n=12$)、高脂组(B 组, $n=12$)、治疗组(C 组, $n=12$)。前 4mo A 组动物予标准啮齿类动物饲料,其余两组动物予高脂饲料,后 1mo C 组予健脾祛瘀中药配方颗粒,温开水稀释后灌胃,给药量按人与动物的体表面积计算法计算,每只小鼠灌胃 0.18g/mL/100g/d, A 组和 B 组予等量生理盐水灌胃,均 2 次/d。各组均予标准啮齿类动物饲料,饲料与水均自由摄取。所有动物在独立通风笼盒(IVC)动物房中饲养,每周称体质量,共饲养 5mo 至 7 月龄。造模方法参见前期实验^[3]。

1.2.2 血液生化指标检测 禁食 12h,股静脉采血。采用日立 7170 全自动生化分析仪分析血浆总胆固醇(total plasma cholesterol, TC),低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)。R-80A 血液黏度仪检测全血低切黏度、全血高切黏度。

1.2.3 Masson 三色染色观测 RPE 层厚度 每组取 10 只左眼,保留约 2~3mm 长视神经组织,并在 100mL/L 多聚甲醛 PBS 缓冲液中固定整晚,常规乙醇脱水,石蜡包埋,于后极部视神经周围切片,制 4~5 μ m 的组织切片,常规脱蜡脱水后,行 Masson 三色染色。每张切片在视网

膜后极部连续取 5 个视野,在 Olympus BX50 光学显微镜 200 倍下观察,运用 Mias-2000 型图形图像分析系统,测量 RPE 层厚度进行分析。

1.2.4 免疫组织化学染色观测 RPE 层 VEGF 及 VEGFR2 染色面积及积分光密度 每组取 10 只左眼(与 Masson 三色染色为同一只眼球),于眼球后极部切成 7 μ m 厚的组织切片,涂上多聚-L-赖氨酸,经脱蜡和 1000mL/L 乙醇处理后,用 30mL/L 过氧化氢液浸泡切片 20min 去除内源性过氧化物酶活性,然后用 700mL/L 乙醇再水合和 PBS 液清洗。标本经正常兔血清处理 30min 以阻滞黏附的非特定抗体,再用兔抗鼠 VEGF 及 VEGFR2 多克隆抗体在 4 $^{\circ}$ C 温度下孵育 12h。每张切片在视网膜后极部连续取 5 个视野,在 Olympus BX50 光学显微镜 200 倍下观察,运用 Mias-2000 型图形图像分析系统,测量 RPE 层 VEGF 及 VEGFR2 染色面积及积分光密度进行分析。

1.2.5 Western-blot 检测视网膜 VEGF 蛋白表达 每组取 5 只右眼,取视网膜组织提取蛋白,然后进行上样、电泳、转膜,一抗和二抗孵育,最后入暗室行发光、显影、定影、曝光。以 β -actin 作为内参照进行校正,检测视网膜 VEGF 蛋白的相对表达量。

1.2.6 电镜观察 RPE 层超微结构的变化 每组取 2 只右眼,经 30mL/L 戊二醛预固定,10g/L 四氧化锇再固定,丙酮逐级脱水, Epon812 包埋,半薄切片光学定位,超薄切片,醋酸铀及枸橼酸铅双重染色,日立 H-600IV 型透射电镜观察 PRE 层超微结构的变化。

统计学分析:用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,先行正态性检验及方差齐性检验,计量资料之间的比较采用单因素方差分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况观察 7 月龄 A 组小鼠进食减少,体质量尚平稳,白毛杂生,反应较前迟钝,被毛欠光泽。B 组小鼠进食明显减少,体肥懒动,反应迟钝,肌肉松弛,白毛丛生,被毛枯槁。C 组小鼠较 6 月龄时进食稍增,被毛渐复光泽,活动稍增。

2.2 各组小鼠体质量和血脂与血流变的比较 2 月龄时各组小鼠体质量相当,差异无统计学意义($P>0.05$)。随着饲养时间的增加,各组小鼠体质量均有所增加,6 月龄时 B 组、C 组体质量均明显高于 A 组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。C 组在中药灌胃及普通饲料饲养 1mo 后,体质量明显下降,与 B 组相比差异具有统计学意义($P<0.05$)。B 组 TC 和 LDL 与全血低切黏度、全血高切黏度指标均明显高于 A 组和 C 组,差异具有统计学意义($P<0.05$,表 1)。

2.3 各组 RPE 厚度和 VEGF 与 VEGFR2 染色面积及积分光密度的比较 A 组 RPE 厚度明显高于 B 组和 C 组,差异具有统计学意义($P<0.05$),但 B 组与 C 组之间差异无统计学意义($P>0.05$,图 1)。B 组 RPE 层 VEGF 及 VEGFR2 染色面积及积分光密度均高于 A 组和 C 组,差异具有统计学意义($P<0.05$,表 2,图 2)。

2.4 视网膜 VEGF 蛋白表达的变化 Western-blot 结果显示,内参照 β -actin 蛋白在各组的显影条带较为一致。B 组视网膜 VEGF 蛋白的相对表达量明显高于 A 组和 C 组,差异具有统计学意义($P<0.05$,表 2)。

2.5 各组 RPE 超微结构的变化 7 月龄 A 组小鼠 PRE 基底膜皱褶减少,胞质内线粒体轻度肿胀,可见核边聚现

表 1 各组小鼠体质量和血脂与血流变的比较

$\bar{x} \pm s$

分组	体质量(g)			TC (mmol/L)	LDL (mmol/L)	全血黏度 (mPa. S)	
	2 月龄	6 月龄	7 月龄			低切黏度	高切黏度
A 组	23.74±0.64	31.90±1.30 ^a	32.18±1.59 ^a	9.63±0.18 ^a	1.12±0.15 ^a	26.76±3.86 ^a	5.18±0.30 ^a
B 组	23.80±0.93	33.58±1.81	34.27±1.16	10.53±0.30	1.90±0.13	34.61±3.66	5.64±0.24
C 组	23.98±0.62	33.28±0.53 ^a	31.58±1.51 ^a	6.67±0.52 ^{a,c}	1.54±0.11 ^a	29.05±2.75 ^a	5.06±0.24 ^a

^a $P < 0.05$ vs B 组; ^c $P < 0.05$ vs A 组。

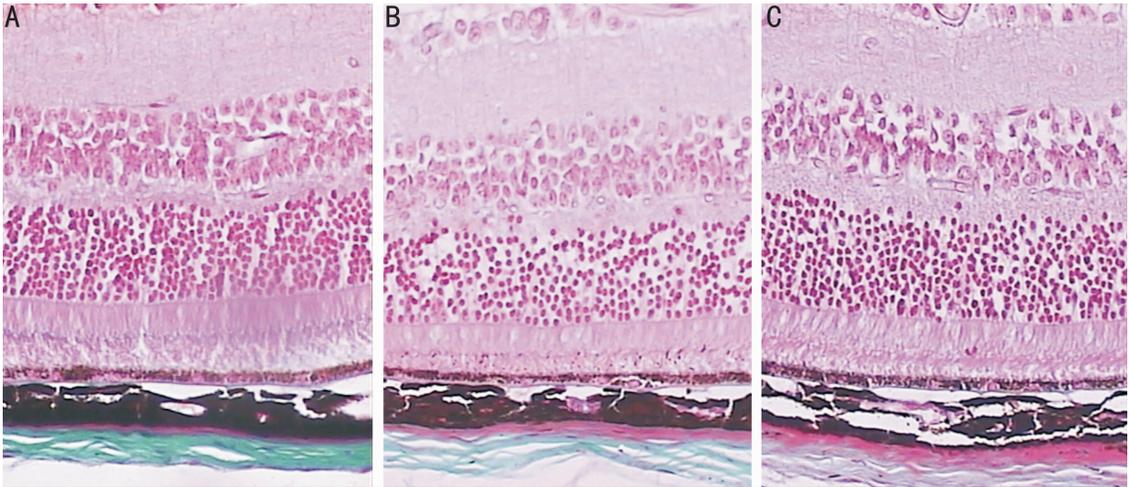


图 1 各组小鼠 PRE 层 Masson 染色观察 (×200) A:A 组;B:B 组;C:C 组。

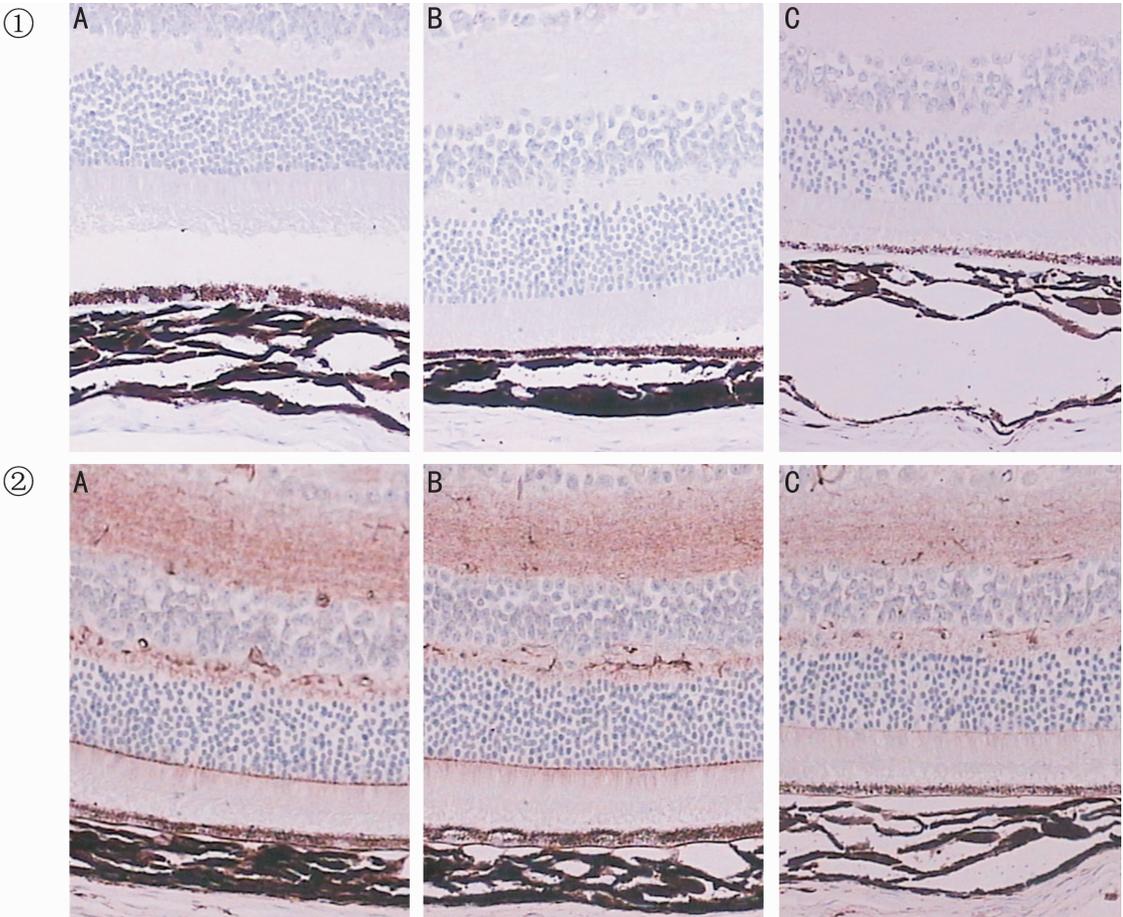


图 2 各组小鼠 VEGF 和 VEGFR2 染色 (×200) ①:VEGF;②:VEGFR2;A:A 组;B:B 组;C:C 组。

象。B 组小鼠 RPE 基底膜皱褶变短且减少,胞质内线粒体肿胀,可见核边聚,胞浆中可见大量空泡,所含黑色素颗粒明显减少。C 组小鼠 PRE 基底膜皱褶减少,胞质内线粒体轻度肿胀,可见核边聚,胞浆可见少量空泡(图 3)。

3 讨论

3.1 血脂异常与 AMD 的关系 AMD 病变的主要特征包括 RPE 损伤、Bruch 膜增厚伴随脂质的沉积和脉络膜毛细血管的衰变。血管模型学说^[4]认为随着年龄的增长,脂质

表2 各组小鼠 PRE 厚度、VEGF 与 VEGFR2 染色面积及积分光密度、视网膜 VEGF 表达量的比较

分组	PRE 厚度 (μm)	VEGF		VEGFR2		VEGF 蛋白 相对表达量
		染色面积(μm^2)	积分光密度	染色面积(μm^2)	积分光密度	
A 组	7.53 \pm 0.99 ^a	18082.25 \pm 1558.11 ^a	8744.22 \pm 789.58 ^a	17741.88 \pm 1597.31 ^a	8059.55 \pm 959.82 ^a	0.87 \pm 0.16 ^a
B 组	4.98 \pm 0.50	21638.21 \pm 2663.58	10869.51 \pm 1348.12	23468.02 \pm 2337.81	12605.32 \pm 2109.10	1.32 \pm 0.43
C 组	5.08 \pm 0.40	18985.93 \pm 2104.71 ^a	8724.31 \pm 1280.59 ^a	19732.98 \pm 3068.57 ^a	9023.40 \pm 1540.57 ^a	0.90 \pm 0.24 ^a

^a $P < 0.05$ vs B 组。

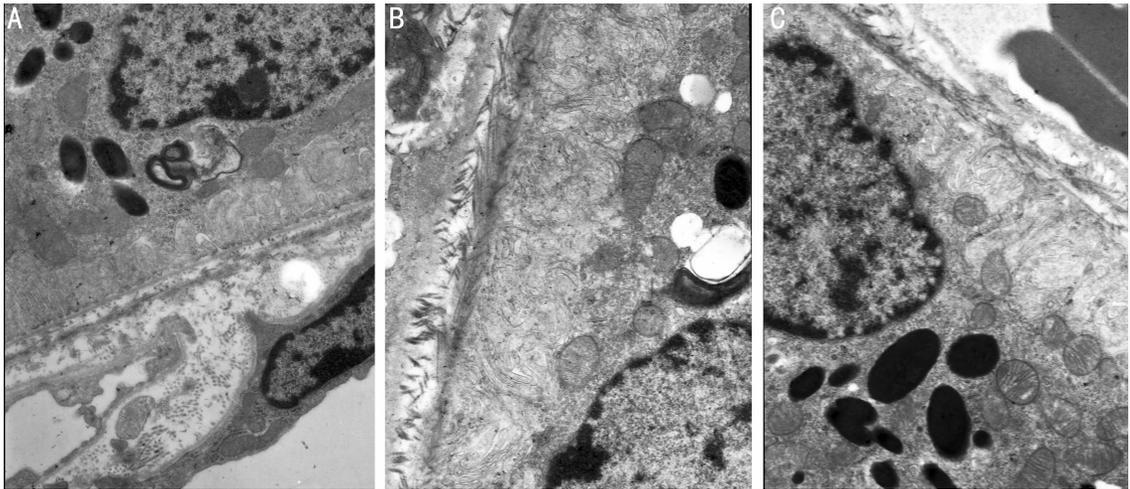


图3 各组小鼠超微结构变化($\times 10\ 000$) A:A组;B:B组;C:C组。

进行性渗入脉络膜组织,致脉络膜血管管径变小、眼血流持续降低及流体静压升高危害 RPE 对外层脂质的处理和脂蛋白的清除,引起玻璃膜疣形成、色素改变、萎缩,以及 Bruch 膜的钙化、破裂,同时由于脉络膜血流降低,致局部缺血、缺氧使 RPE 分泌血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)增加,致脉络膜新生血管形成。高脂血症对 RBCC 各部分均有影响,且导致的 RBCC 病理学和细胞学方面的变化与 AMD 的病理改变具有一致性^[5]。Lee 等^[6]实验研究认为,RPE 厚度明显变薄可能与 RPE 细胞出现的脂质有关。脂质进入细胞线粒体,经氧化分解生成大量的氧自由基,加重了线粒体的损伤程度,形成大量的过氧化脂质,导致 RPE 细胞丢失,而 RPE 细胞无再生能力,因此 RPE 细胞层变薄,这与我们本次研究一致。治疗组 PRE 厚度比高脂组稍有增厚,但差异无统计学意义,我们推测健脾祛瘀中药通过调节血脂、改善血液流变学和血管内皮功能等作用,从而减缓 RPE 损伤程度及进程,对于已经严重损伤的 RPE 细胞修复乏术,故已经变薄的 RPE 层未能重新显著增厚。

3.2 中医对 AMD 及血脂异常的认识 祖国医学认为 AMD 属“视瞻昏渺”的范畴。病位在 RBCC 等组织,该组织既富有心所主的血脉,又富有肾所主的色素,且黄斑色黄属脾^[7],故本病与脾、肾、心三脏密切相关。随着年龄增长,机体脏腑功能衰退,水津输布失常,聚而成痰成瘀,痰瘀互结,相兼为病^[8],其本质是本虚标实、虚实夹杂。曾庆华等^[9]对 115 例 AMD 患者进行中医证候分型分析,发现 AMD 中医证候演变具有一定规律:AMD 干性早期为痰浊蕴结型;AMD 湿性早中期为痰凝瘀滞型;AMD 地图状萎缩期和盘状瘢痕期同属肝肾亏虚型。梁晋普等^[10]认为,高脂血症的关键病机可以概括为痰瘀互结,而病理过程的进一步发展,痰瘀胶结沉积血府,脉道失柔则是高脂血症发展为心脑血管动脉硬化的病理演化过程。故本次研究

通过建立血脂异常性 AMD 动物模型,并按循经选药原则组方,具体由生蒲黄、白术、丹参、牡丹皮、郁金等药物组成,共奏健脾祛瘀之功,探讨健脾祛瘀法对增龄性痰瘀互结为主要病机的 AMD 的作用机制。

3.3 VEGF/VEGFR2 信号通路与 AMD 研究显示^[11],有许多因子参与血管新生的过程,其中 VEGF-VEGFR 系统在体内各种血管新生过程中的重要性已经成为共识。针对 VEGF 自身及其信号传导通路的 VEGF 抑制剂已成为当今的研究热点。Sanjeeva 等研究发现 ApoE4 等位基因的存在与接受抗 VEGF 治疗的新生血管性 AMD 患者视力得到提高之间存在显著相关性^[12]。Marina 和 Anchor 两大临床研究评价了 ranibizumab 对新生血管性 AMD 的治疗效果^[13,14]。研究发现随访视力保持稳定者约占 90%,约 30% 患者视力较对照组明显提高,另有约 10% 患者视力继续下降。但其应用的长期有效性和安全性尚难以确定,有待大规模、前瞻性、随机和长期的临床试验加以证实。再者,VEGF 抑制剂药物大多价格昂贵,从药物经济学方面考虑定会加重患者及社会的经济负担。VEGF 是内皮细胞特异性的有丝分裂因子,可诱导内皮细胞的增殖、迁移,刺激 VEGFR2 介导新生血管内皮细胞 DNA 合成和增殖,VEGFR2 是 VEGF 的主要功能受体,它作为一种酪氨酸激酶受体与 VEGF 结合,形成二聚体及酪氨酸发生自身磷酸化,激活并将细胞膜/细胞质激酶级联反应信号传递到细胞核,可引发内皮细胞的一系列变化,包括血管内皮细胞增殖、存活、细胞骨架重排、细胞迁移以及基因表达等,并最终引起血管增生,促进新生血管形成并维持其完整性。随着病情的发展,组织缺氧加重,RPE 细胞功能进一步受损,VEGF 分泌增加,作用于 VEGFR2 受体,VEGF/VEGFR2 信号传导通路形成,导致内皮细胞分裂、增生、移行,形成新生血管。但由于 VEGF 家族不仅存在于病理性新生血管形成过程中,而且还在正常血管发育及其他生命

活动中起作用,因此,若单一性下调 VEGF,抑制 VEGF/VEGFR2 信号通路,其作用恐会影响整体的正常生理功能。若能调控 VEGF/VEGFR2 信号通路,使其居于正常范围,将意义深远。本次研究发现健脾祛瘀法对该 AMD 动物模型的 RPE 层 VEGF 及 VEGFR2 的表达有一定的下调作用,并可使 RPE 细胞组织及超微结构发生轻微改善,治疗组动物体质量、血脂、血液流变学指标及精神、纳食、活动等整体情况亦有改观,故我们推测健脾祛瘀法对该动物模型 RPE 层 VEGF/VEGFR2 信号传导通路有一定的调控作用。

综上所述,本次研究成功建立血脂异常性 AMD 动物模型,研究发现健脾祛瘀法对改善血脂异常 ApoE^{-/-}小鼠的血脂、血液流变学等生化指标有积极作用,对该模型的 RPE 层 VEGF 及 VEGFR2 的表达有一定的下调作用。此提示健脾祛瘀法对该动物模型 RPE 层 VEGF/VEGFR2 信号传导通路有一定的调控作用,可能为中医药早期防治 AMD 和延缓病情发展提供新的思路和方法。

参考文献

- 1 Nolan JM, Stack J, O'Donovan O, *et al.* Risk factors for age-related maculopathy are associated with a relative lack of macular pigment. *Exp Eye Res* 2007;84(1):61-74
- 2 王春晖,曾庆华. 黄斑康对实验性血脂异常小鼠色素上皮-玻璃膜-脉络膜毛细血管复合体影响的研究. *中国中医眼科杂志* 2006;16(4):212-216
- 3 莫亚,曾庆华,谢礼丹,等. 血脂异常对 ApoE 基因缺失小鼠视网膜及 Bruch 膜的影响. *国际眼科杂志* 2011;11(9):1518-1520

- 4 Friedman E. Update of the vascular model of AMD. *Br J Ophthalmol* 2004;88:161-163
- 5 Fujihara M, Bartels E, Nielsen LB, *et al.* A human apoB100 transgenic mouse expresses human apoB100 in the RPE and develops features of early AMD. *Exp Eye Res* 2009;88(6):1115-1123
- 6 Lee SJ, Kim JH, Kim JH, *et al.* Human apolipoprotein E2 transgenic mice show lipid accumulation in retinal pigment epithelium and altered expression of VEGF and bFGF in the eyes. *J Microbiol Biotechnol* 2007;17(6):1024-1030
- 7 罗国芬,陈达夫. 中医眼科六经法要. 成都:四川省科学技术出版社 1985:51
- 8 曾庆华,王丽英,张玲,等. 年龄相关性黄斑变性发生机制与中医辨证分型的关系. *四川中医* 2004;22(2):13-14
- 9 曾庆华,莫亚,陈丽,等. 年龄相关性黄斑变性 115 例中医证候分型. *中国中医眼科杂志* 2009;19(5):274-277
- 10 梁晋普,杨惠民,盛彤,等. 载脂蛋白 E 基因多态性与高脂血症痰瘀证患者血脂水平关系的研究. *中华中医药杂志* 2008;23(7):633-635
- 11 Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003;9:669-676
- 12 Wickremasinghe SS, Xie J, Lim J, *et al.* Variants in the APOE Gene Are Associated with Improved Outcome after Anti-VEGF Treatment for Neovascular AMD. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52(7):4072-4079
- 13 Rosenfeld PJ, Brown DM, Heier JS, *et al.* Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 2006;355(14):1419-1431
- 14 Brown DM, KaiserPK, Michels M, *et al.* Ranibizumab versus verteporfin for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 2006;355(14):1432-1444