

青蒿琥酯对高糖环境下人视网膜微血管内皮细胞增殖及 VEGF 表达的影响

刘逸^{1,2}, 彭辉灿¹, 唐虹¹

作者单位:¹(421001)中国湖南省衡阳市,南华大学附属第二医院眼科;²(421200)中国湖南省衡阳县人民医院

作者简介:刘逸,男,在职硕士研究生,研究方向:眼底病学。

通讯作者:彭辉灿,教授,硕士研究生导师,《国际眼科杂志》编委,研究方向:眼底病. penghuican@sina.com

收稿日期:2012-08-20 修回日期:2013-01-25

Effects of artesunate on proliferation and expression of VEGF in human retinal capillary endothelial cells treated with high glucose

Yi Liu^{1,2}, Hui-Can Peng¹, Hong Tang¹

¹Department of Ophthalmology, the Second Affiliated Hospital of University of South China, Hengyang 421001, Hunan Province, China; ²People's Hospital of Hengyang County, Hengyang County 421200, Hunan Province, China

Correspondence to: Hui-Can Peng. Department of Ophthalmology, the Second Affiliated Hospital of University of South China, Hengyang 421001, Hunan Province, China. penghuican@sina.com
Received:2012-08-20 Accepted:2013-01-25

Abstract

• **AIM:** To study the effect of artesunate (ART) on proliferation and expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in cultured human retinal capillary endothelial cells *in vitro* under the condition of high glucose.

• **METHODS:** Human retinal capillary endothelial cells (HRCECs) extraction was taken from fresh human eye and cultured *in vitro*. The cells of good growth in 3rd-4th generation were used into the experiment. The experimental subjects were divided into low glucose control group, high glucose control group and high glucose+different concentrations ART (15μg/mL, 30μg/mL, 60μg/mL, and 120μg/mL) groups. The effect of ART on the proliferation of HRCECs for 24 and 48 hours was measured by MTT assay. The effect of ART on the expression of VEGF in HRCECs was detected by immunocytochemistry.

• **RESULTS:** The results from MTT assay showed that high glucose significantly increased the proliferation of HRCECs ($P>0.05$) and treatment of HRCECs with ART at the concentrations 15μg/mL, 30μg/mL, 60μg/mL, 120μg/mL for 24 and 48 hours caused a time- and dose-dependent inhibition in the proliferation of HRCECs ($P<0.05$). The

expression of VEGF in high glucose group was significantly higher than that in the low glucose control group ($P<0.05$). Compared with the high glucose control group, the expressions of VEGF in high glucose + different concentrations ART (15μg/mL, 30μg/mL, 60μg/mL) groups were decreased in a dose-dependent manner ($P<0.05$).

• **CONCLUSION:** ART concentration-dependently inhibits high glucose-induced proliferation and VEGF overexpression in HRCECs, indicating that ART-inhibited the proliferation of HRCECs exerted by high glucose environment might be related to the inhibition of VEGF expression.

• **KEYWORDS:** artesunate; human retinal capillary endothelial cells; proliferation; vascular endothelial growth factor

Citation: Liu Y, Peng HC, Tang H. Effects of artesunate on proliferation and expression of VEGF in human retinal capillary endothelial cells treated with high glucose. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2013;13(2):252-255

摘要

目的:研究青蒿琥酯(artesunate)对体外高糖环境下培养的人视网膜微血管内皮细胞(human retinal capillary endothelial cells, HRCECs)的增殖及血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)表达的影响。

方法:从新鲜人眼球提取 HRCECs,进行体外培养。取第 3~4 代生长良好的细胞用于实验,实验分为低糖对照组、高糖对照组、高糖+不同浓度青蒿琥酯组(15, 30, 60, 120μg/mL),用噻唑蓝(MTT)比色法检测 HRCECs 的增殖,通过免疫细胞化学法观察各分组 HRCECs 中 VEGF 的表达。

结果:MTT 比色法检测细胞增殖结果显示:与低糖组比较,高糖显著促进 HRCECs 增殖($P>0.05$);15, 30, 60, 120μg/mL 青蒿琥酯处理 24h 或 48h,可时间和浓度依赖性地抑制高糖环境下 HRCECs 的增殖($P<0.05$)。免疫细胞化学法检测 VEGF 表达结果显示:与低糖对照组相比,高糖对照组 VEGF 表达明显增加($P<0.05$);高糖+不同浓度青蒿琥酯(15, 30, 60μg/mL)组与高糖对照组相比 VEGF 表达明显下降($P<0.05$),高糖+不同浓度青蒿琥酯组之间两两比较均具有统计学差异($P<0.05$),且随着药物浓度的提高,VEGF 的表达量逐渐减少。

结论:青蒿琥酯呈浓度依赖性地抑制高糖环境下 HRCECs 的增殖以及 VEGF 的表达,表明青蒿琥酯抑制高糖环境诱导 HRCECs 增殖可能与其抑制 VEGF 表达有关。

关键词:青蒿琥酯;人视网膜微血管内皮细胞;增殖;血管内皮生长因子

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2013.02.08

引用:刘逸,彭辉灿,唐虹.青蒿琥酯对高糖环境下人视网膜微血管内皮细胞增殖及 VEGF 表达的影响.国际眼科杂志 2013; 13(2):252-255

0 引言

糖尿病患者严重的并发症之一是糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR),增殖型糖尿病视网膜病变(PDR)标志性的病理改变是出现新生血管^[1],因此预防和治疗糖尿病视网膜新生血管已成为重点。目前发现调控血管形成的因子中最强有力的是血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)^[2],而在 PDR 患者房水或玻璃体腔中,发现促血管新生因子水平如 VEGF、生长因子、细胞因子等显著升高,其中 VEGF 的作用尤为重要,涉及病变整个过程^[3]。青蒿琥酯(artesunate)是从传统中草药黄花蒿中提取的倍半萜内酯类化合物青蒿素的水溶性衍生物,临床用于抢救和治疗脑型疟疾和恶性疟疾等,其毒、副作用较少^[4]。近年来研究发现,青蒿琥酯具有抗血管生成的作用^[5],抑制角膜新生血管的生长^[6]。本研究将不同浓度的青蒿琥酯作用于原代培养的人视网膜微血管内皮细胞,观察其对细胞增殖及 VEGF 表达的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 青蒿琥酯(桂林南药股份有限公司);二甲基亚砜(DMSO)和噻唑蓝(MTT)(Amresco 公司);胰蛋白酶、二乙烯四乙酸二钠(EDTA)和谷氨酰胺(美国 Sigma 公司);胎牛血清(杭州四季青公司);DMEM 培养液、即用型 SABC(兔 IgG)试剂盒和 DAB 显色试剂盒(武汉博士德公司);兔抗人 VIII 因子 IgG(北京中杉金桥生物技术公司)、兔抗人 VEGF 抗体(北京博奥森生物技术公司)。

1.2 方法

1.2.1 HRCECs 培养 从手术室获取术后的新鲜人眼球,参考文献^[7]的培养方法进行 HRCECs 原代培养。在 50mL/L CO₂, 37℃ 培养箱内进行细胞培养,每 2d 换液 1 次,用细胞刮去除杂细胞,待细胞汇合 80% 以上后,按 1:2 进行传代培养。

1.2.2 HRCECs 鉴定 (1)形态学:相差倒置显微镜观察细胞生长特性、形态特征。(2)第 VIII 因子相关抗原免疫组化检查:将 20mm×20mm 盖玻片置于 6 孔板内,每孔接种 2mL,密度为 5×10⁴个/mL 的细胞悬液,置于 50mL/L CO₂, 37℃ 的培养箱中培养 48h。待细胞生长爬满盖玻片后取出,免疫细胞化学染色二步法检测第 VIII 因子相关抗原。阴性对照:PBS 代替一抗。显微镜下观察、采集图像。

1.2.3 实验分组 (1)MTT 实验分组:0 组:不加细胞只加培养基的调零组;Q_L 组:低糖对照组;Q_H 组:高糖对照组;Q₁ 组:高糖+15μg/mL 青蒿琥酯组;Q₂ 组:高糖+30μg/mL 青蒿琥酯组;Q₃ 组:高糖+60μg/mL 青蒿琥酯组;Q₄ 组:高糖+120μg/mL 青蒿琥酯组。(2)免疫细胞化学实验分组:Z_L 组:低糖对照组;Z_H 组:高糖对照组;Z₁ 组:高糖+15μg/mL 青蒿琥酯组;Z₂ 组:高糖+30μg/mL 青蒿琥酯组;Z₃ 组:高糖+60μg/mL 青蒿琥酯组。葡萄糖浓度:高糖为 25mmol/L,低糖为 5.5mmol/L。

1.2.4 MTT 比色法测定 HRCECs 增殖 选取第 3~4 代

对数生长良好的细胞,倒去上清,用 PBS 液洗涤两次,加入 2.5g/L 胰蛋白酶消化,在相差显微镜下观察,当细胞开始变圆收缩,细胞间隙变大时,倒出消化液,分别加入含 100mL/L 胎牛血清高糖或低糖 DMEM 培养液终止消化,制成高糖或低糖细胞悬液,将细胞浓度调整为 3.5×10⁴个/mL。实验共分 7 组,调零组 1 组,低糖 1 组,高糖 5 组,每组 6 个复孔,每孔 180 μL 细胞悬液加入到两个 96 孔板中。将两个 96 孔板置于 50mL/L CO₂, 37℃ 培养箱内培养 12h,细胞贴壁后取出, Q₁ ~ Q₄ 组分别加入 20μL 不同浓度青蒿琥酯,使青蒿琥酯终浓度为 15, 30, 60, 120μg/mL。培养 20h 和 44h 后,分别随机取出一个 96 孔板,每孔加入 5g/L MTT 液 20μL,培养 4h 后终止培养,倒去培养基,用滤纸吸干水分,每孔加 150μL DMSO 原液,振荡 10min,当蓝紫色结晶完全溶解后,用自动酶标仪选取 570nm 波长,检测每孔的吸光度 A 值,根据公式:细胞抑制率(%)=[1-(试验组平均 A 值-空白组平均 A 值)/(对照组平均 A 值-空白组平均 A 值)]×100%,计算出细胞抑制率。以上实验重复 3 次。

1.2.5 免疫细胞化学法检测 VEGF 表达的影响 将 20mm×20mm 盖玻片消毒灭菌并做好标记,放入无菌的 6 孔板中,每孔接种 2mL,密度为 5×10⁴个/mL 的细胞悬液,置于 50mL/L CO₂, 37℃ 的培养箱中培养 24h,倒去培养液。实验共分 5 组,每组 2 个复孔,每孔 2mL,低糖对照组 Z_L:含低糖 5.5mmol/L、100mL/L 胎牛血清的 DMEM 培养;高糖对照组 Z_H:含高糖 25mmol/L、100mL/L 胎牛血清 DMEM 培养;高糖加药组 Z₁, Z₂, Z₃:含高糖 25mmol/L、100mL/L 胎牛血清 DMEM 培养+青蒿琥酯终浓度分别为 15, 30, 60μg/mL 组。继续培养 48h 后取出盖玻片, PBS 液漂洗细胞 2 次, 4% 多聚甲醛室温固定 30min, PBS 液冲洗 3 次, 3% 过氧化氢-甲醇室温浸泡 15min, 以封闭内源性过氧化物酶, PBS 液洗涤后加入 5% BSA 湿盒中室温封闭 20min, 滤纸吸去多余液体, 加入一抗(兔抗人 VEGF 1:200), 并以磷酸盐缓冲液代替一抗为阴性对照, 4℃ 湿盒中过夜, 37℃ 复温 45min, PBS 液洗涤, 滴加二抗 37℃ 孵育 30min, SABC 法染色, DAB 显色, 苏木素复染, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片, 镜下观察。阳性染色为胞浆或胞膜有棕黄或棕褐色颗粒状物质沉积。对各组进行灰度值测定, 以背景灰度值与阳性灰度值之差作为每组灰度值。以上实验重复 2 次。按细胞图像分析系统(重庆天海医疗设备有限公司, 型号为 PIPS-2020)测定免疫细胞化学的要求进行系统设置和操作, 对各组进行灰度值测定, 在×400 下随机测量 100 个阳性细胞的平均灰度值(背景灰度值-阳性灰度值), 阳性表达越多, 值越大。

统计学分析:采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析, 各组实验数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间均数的比较用单因素方差分析, 组间均数的比较用 SNK-q 检验, 以 $\alpha = 0.05$ 为检验水准。

2 结果

2.1 HRCECs 的培养和鉴定 在倒置相差显微镜下观察细胞形态:HRCECs 呈现铺路石样单层贴壁生长(图 1)。运用免疫细胞化学方法鉴定:经第 VIII 因子相关抗原抗体染色, HRCECs 胞浆中有棕黄色着色(图 2), 阴性对照组无着色, 均证实体外成功培养出 HRCECs。

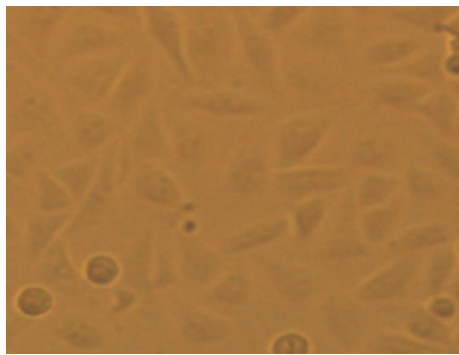


图1 HRCECs融合成单层犹如铺路石样。

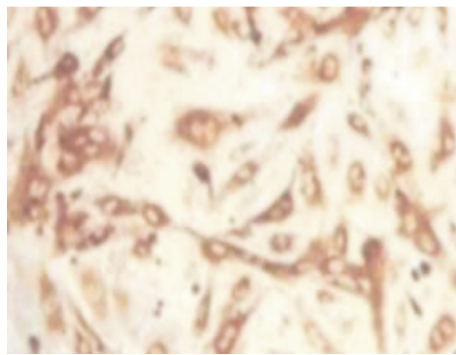


图2 HRCECsⅧ因子相关抗原抗体染色阳性。

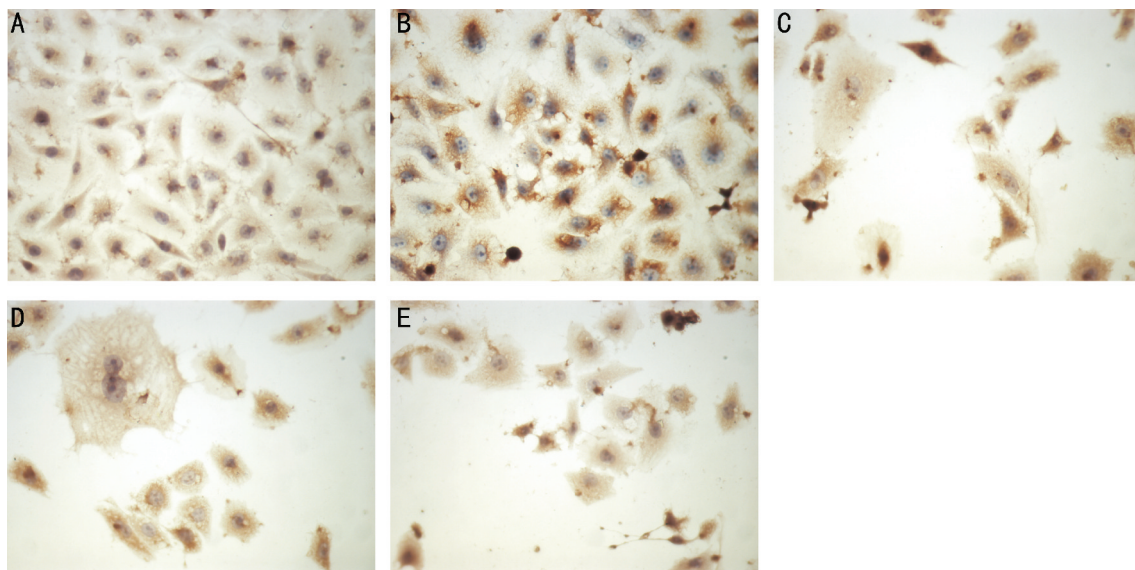


图3 青蒿琥酯对视网膜血管内皮细胞 VEGF 表达的影响(SABC 法×400) A:Z_L组;B:Z_H组;C:Z₁组;D:Z₂组;E:Z₃组。

2.2 MTT 检测青蒿琥酯对 HRCECs 增殖的影响 MTT 比色法检测细胞增殖,结果如表 1 所示:与低糖组比较,高糖明显促进 HRCECs 增殖;不同浓度青蒿琥酯处理高糖环境下的 HRCECs 24h 或 48h,发现青蒿琥酯呈时间和浓度依赖性地抑制高糖环境下 HRCECs 的增殖:15,30,60,120 μ g/mL 青蒿琥酯作用 24h 后,抑制率分别为 23.96%,24.50%,33.52%,51.16%;作用 48h 后,抑制率分别为 35.17%,64.58%,82.98%,85.42% ($P < 0.05$)。同种药浓度不同时间组间比较,除高糖+15 μ g/mL 青蒿琥酯组 24h 与 48h 组比较,差异无显著性外,其余各组差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。同时间不同药浓度组间比较,作用 24h 时,青蒿琥酯 15,60,120 μ g/mL 组之间两两比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$),青蒿琥酯 15 μ g/mL 与 30 μ g/mL 组之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。作用 48h 时,青蒿琥酯 15,30,60 μ g/mL 组之间两两比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$),青蒿琥酯 60 μ g/mL 组与 120 μ g/mL 组之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.3 免疫细胞化学检测青蒿琥酯对视网膜血管内皮细胞 VEGF 表达的影响 HRCECs 的 VEGF 表达主要位于细胞浆内,其阳性表现是棕黄色颗粒。各组灰度值测定结果见表 2,与低糖对照组相比,高糖对照组的 VEGF 表达呈明显增加 ($P < 0.05$),胞膜及胞浆内阳性棕黄色颗粒较密集,颜色较深。与高糖对照组相比,加药组作用 HRCECs 48h,其 VEGF 表达明显下降,呈浓度依赖性 ($P < 0.05$)。随着药物作用浓度的增加,胞浆内阳性棕黄色颗粒逐渐减少,颜

表 1 青蒿琥酯对 HRCECs 增殖的抑制作用 $n=6$

分组	A_{570} 值($\bar{x} \pm s$)		细胞抑制率(%)	
	24h	48h	24h	48h
Q _L 组	0.360 \pm 0.035	0.647 \pm 0.057	/	/
Q _H 组	0.570 \pm 0.036	0.853 \pm 0.088	/	/
Q ₁ 组	0.443 \pm 0.019	0.476 \pm 0.091	23.96	35.17
Q ₂ 组	0.381 \pm 0.024	0.274 \pm 0.039	24.50	64.58
Q ₃ 组	0.326 \pm 0.031	0.131 \pm 0.013	33.52	82.98
Q ₄ 组	0.257 \pm 0.027	0.118 \pm 0.015	51.16	85.42

表 2 青蒿琥酯对视网膜血管内皮细胞 VEGF 表达的平均灰度值 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

分组	VEGF 灰度值
Z _L 组	23.52 \pm 3.89
Z _H 组	80.93 \pm 2.37
Z ₁ 组	64.62 \pm 4.33
Z ₂ 组	53.24 \pm 2.45
Z ₃ 组	33.23 \pm 2.42

色逐渐变淡,加药组各组间两两比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$,图 3)。

3 讨论

PDR 标志性的病理改变是出现新生血管,新生血管形成是一个极其复杂的过程,其机制尚未完全清楚。长期慢性高血糖症是 DR 的发病基础,可引起视网膜细胞缺

血、缺氧,导致细胞受损、白细胞停滞、细胞因子和细胞黏附分子活化、微血栓形成,尤其是引起 VEGF 的高表达^[8]。

研究证明 VEGF 可改善血液动力学,增加血管的通透性,从多种途径刺激内皮细胞的复制,其细胞形态呈细长状,促使内皮细胞发生移位;VEGF 还可通过改变某些基因的激活状态,诱导组织因子、间质胶原酶和其他内皮细胞蛋白酶的表达,使内皮细胞纤维蛋白溶解酶原激活剂及其抑制剂 PAI-1 的表达上调,并最终导致新生血管的形成^[9]。VEGF 发挥其生物学作用是通过与细胞表面 VEGFR 结合而实现的,有研究证实与大脑来源的血管内皮细胞比较,VEGFR 在视网膜血管内皮细胞表面的表达明显增高,推测视网膜特殊的微环境引起视网膜微循环对 VEGF 的高敏感性。正常情况下,为维持眼部血管的完整性,视网膜内皮细胞、周细胞以及色素上皮细胞的 VEGF 呈低表达状态,但过度表达 VEGF 将会促进血管增殖。目前认为高血糖、氧化应激、缺氧和炎症反应从不同的方面都促使内皮细胞分泌 VEGF 增加,在糖尿病视网膜病变的单纯期,眼内 VEGF 的表达就已增加^[10],随着眼部病情的加重、病程的延长,VEGF 的表达逐渐增高^[11]。在糖尿病视网膜病变新生血管形成的发展过程中,VEGF 是最重要的关键因子^[10],涉及到 DR 病变以及新生血管形成的整个过程^[12]。

由于 VEGF 的高表达是眼部病理性新生血管形成的必要条件,近年来人们针对 VEGF 研发抗眼部新生血管性疾病的药物,取得了一定的成效。抗 VEGF 可抑制眼部新生血管的形成,使新生血管萎缩;同时通过降低血管的通透性,减少血管渗漏。

青蒿琥酯是倍半萜内酯药物青蒿素的水溶性衍生物,化学名为二氢青蒿素-10- α -丁二酸单酯,分子式为 $C_{19}H_{28}O_8$,分子量为 384.43。已有大量文献报道证实青蒿琥酯有抗疟疾、抗菌、抗纤维化、抗心律失常、抗肿瘤等作用,并已有研究证明青蒿琥酯有抗新生血管生成的作用^[5],对血管内皮细胞中 VEGF 的表达有显著的抑制作用,可有效抑制角膜新生血管的生长^[6]。

Zhou 等^[13]研究了青蒿琥酯对慢性髓样白血病小鼠肿瘤 VEGF 表达的影响,结果青蒿琥酯不仅能够抑制肿瘤的生长,而且能降低 VEGF 的表达。周慧君等^[14]发现在假孕大鼠蜕膜瘤模型中,青蒿琥酯能抑制 VEGF 因子表达,减少假孕大鼠蜕膜瘤和骨髓的血管密度;对蜕膜组织丰富的血管有明显抑制作用,使胚胎的血液供应和营养减少,使胚胎发育受阻,最终胚胎被吸收或排出。青蒿琥酯还能显著抑制人脐静脉血管内皮细胞的增殖、迁移和小管形成 3 个环节,降低 VEGF 及其受体蛋白的表达。孙京华等^[6]观察了青蒿琥酯球结膜下注射对角膜新生血管的影响,结果发现青蒿琥酯治疗组的角膜新生血管的长度和面积比对照组明显减少,青蒿琥酯可以有效抑制角膜新生血管生长,提示青蒿琥酯抑制炎症性角膜新生血管生成的机制可能是下调细胞因子 VEGF 和 NF- κ B 的表达。

本实验采用 MTT 比色法检测细胞增殖,发现与低糖组相比,高糖明显促进 HRCECs 增殖。15,30,60,120 μ g/mL 的青蒿琥酯处理高糖环境下的 HRCECs,作用 24h 和 48h 后发现,与高糖组相比,高糖+不同浓度青蒿琥酯组吸光度 A 值明显降低,对高糖环境下 HRCECs 的增殖明显抑

制,差异有统计学意义($P<0.05$),并存在时间和浓度的依赖性($P<0.05$),且随着青蒿琥酯作用时间的延长,青蒿琥酯药物浓度的逐步增加,青蒿琥酯对 HRCECs 增殖的抑制作用更为明显。免疫细胞化学法检测 VEGF 的表达,其结果显示与低糖组相比,高糖组 VEGF 的表达明显增加($P<0.05$),此结果与高糖促进内皮细胞 VEGF 表达的作用相符。与高糖组相比,高糖+不同浓度青蒿琥酯(15,30,60 μ g/mL)组作用 48h VEGF 表达明显下降,差异有统计学意义($P<0.05$);高糖+不同浓度青蒿琥酯组之间两两比较均具有统计学差异($P<0.05$),且随着青蒿琥酯药物浓度的逐渐增加,VEGF 表达量逐渐减少,呈浓度依赖性。我们推测青蒿琥酯抑制高糖下 HRCECs 的增殖可能是通过下调 VEGF 的表达而发生作用,但青蒿琥酯下调 VEGF 表达的具体机制还需开展更深入的研究。

综上所述,青蒿琥酯能抑制高糖环境下 HRCECs 的增殖并下调其 VEGF 的表达,为增殖型糖尿病视网膜病变的防治开辟了新的方向。

参考文献

- 1 Campo L, Turley H, Han C. Angiogenin is up-regulated in the nucleus and cytoplasm in human primary breast carcinoma and is associated with markers of hypoxia but not survival. *Am J Pathol* 2005; 205(5):585-591
- 2 Ferrara N, Houck K, Jakeman L, et al. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocr Rev* 1992;13(1):18-32
- 3 Arevalo JF, Garcia-Amaris RA. Intravitreal bevacizumab for diabetic retinopathy. *Curr Diabetes Rev* 2009;5(1):39-46
- 4 Benakis A, Paris M, Loutan L, et al. Pharmacokinetics of artemisinin and artesunate after oral administration in healthy volunteers. *Am J Trop Med Hyg* 1997;56(1):17-23
- 5 陈欢欢,周慧君.青蒿琥酯的抗血管生成作用.药学学报 2004;39(1):29-33
- 6 孙京华,王慧.青蒿琥酯对大鼠角膜新生血管的影响.眼外伤职业眼病杂志 2007;29(3):172-175
- 7 Capetandes A, Gerritsen ME. Simplified methods for consistent and selective culture of bovine retinal endothelial cells and pericytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990;31(9):1738-1744
- 8 Grant MB, Afzal A, Spoerri P, et al. The role growth factors in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Expert Opin Investig Drugs* 2004;13:1275-1293
- 9 Binu S, Soumya SJ, Kumar VB, et al. Poly-ADP-ribosylation of vascular endothelial growth factor and its implications on angiogenesis. *Adv Exp Med Biol* 2012;749:269-278
- 10 Starita C, Patel M, Katz B, et al. Vascular endothelial growth factor and the potential therapeutic use of pegaptanib (macugen) in diabetic retinopathy. *Dev Ophthalmol* 2007;39:122-148
- 11 Noma H, Funatsu H, Yamashita H, et al. Regulation of angiogenesis in diabetic retinopathy: possible balance between vascular endothelial growth factor and endostatin. *Arch Ophthalmol* 2002;120(8):1075-1080
- 12 戎健,邱鸿鑫,汪恕萍. II 型糖尿病患者血红蛋白晚期糖基化终末产物与视网膜病变的关系.中华眼底病杂志 2000;3:147-149
- 13 Zhou HJ, Wang WQ, Wu GD, et al. Artesunate inhibits angiogenesis and downregulates vascular endothelial growth factor expression in chronic myeloid leukemia K562 cells. *Vascul Pharmacol* 2007;47(2-3):131-138
- 14 周慧君,吴慧玲,王玮琴,等.青蒿琥酯和体内主要代谢物二氢青蒿素的抗新生血管生成作用研究进展.云南大学学报(自然科学版) 2004;26(6A):18-27