

甘草甜素对小鼠角膜急性碱烧伤后新生血管的抑制作用

王培红¹, 李凌菡¹, 周永莹¹, 应 铭², 王玉川², 李 静², 李 轩^{1,2}

引用:王培红,李凌菡,周永莹,等. 甘草甜素对小鼠角膜急性碱烧伤后新生血管的抑制作用. 国际眼科杂志 2020; 20(12): 2034-2038

基金项目:国家自然科学基金项目(No.81170828,81670837);天津市应用基础与前沿技术研究计划项目(No.15JCZDJC35300);天津市卫计委科技攻关项目(No.14KG133)

作者单位:¹(300020)中国天津市,天津医科大学眼科临床学院;²(300020)中国天津市眼科医院 天津市眼科研究所 天津市眼科学与视觉科学重点实验室

作者简介:王培红,在读硕士研究生,研究方向:角膜新生血管。

通讯作者:李轩,博士,主任医师,博士研究生导师,研究方向:角膜病及眼表疾病. xuanli08@yahoo.com

收稿日期:2020-02-12 修回日期:2020-11-03

摘要

目的:研究甘草甜素(Gly)对小鼠角膜急性碱烧伤后角膜新生血管(CNV)的抑制作用。

方法:采用碱烧伤法制备小鼠碱烧伤模型60只,随机平均分为Gly组和PBS组,分别隔天结膜下注射2g/L Gly溶液或PBS溶液,共14d。裂隙灯显微镜下观察角膜炎症反应和CNV。实验结束后取角膜行HE染色法和免疫组织化学法CD34及髓过氧化物酶(MPO)染色并计算角膜微血管密度(MVD)及中性粒细胞数。

结果:造模后第7、14d Gly组CNV面积分别是 4.16 ± 0.00 、 $7.33 \pm 0.13 \text{mm}^2$,显著低于PBS组(7.58 ± 0.20 、 $9.24 \pm 0.08 \text{mm}^2$,均 $P < 0.05$)。HE病理染色显示正常小鼠角膜结构完整,未见新生血管形成及炎症细胞浸润;Gly组角膜新生血管数量及炎症细胞浸润较少,胶原排列较规则,而PBS组角膜基质中可见大量炎症细胞浸润及新生血管。免疫组织化学CD34染色结果显示Gly组MVD为 11.13 ± 1.46 条/ mm^2 ,显著低于PBS组(34.08 ± 2.46 条/ mm^2 , $P < 0.001$);免疫组织化学MPO染色结果显示Gly组中性粒细胞计数为每200倍视野 17.50 ± 1.98 个,明显少于PBS组(59.56 ± 4.79 个, $P < 0.001$)。

结论:Gly能减轻小鼠角膜急性碱烧伤模型中的角膜炎症反应,并抑制角膜新生血管形成,这为临床上有效防治角膜新生血管类疾病提供了一种新的思路。

关键词:甘草甜素;HMGB1抑制剂;角膜新生血管;碱烧伤;炎症反应

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2020.12.04

Inhibition of Glycyrrhizin on acute alkali burn induced corneal neovascularization in mice

Pei-Hong Wang¹, Ling-Han Li¹, Yong-Ying Zhou¹, Ming Ying², Yu-Chuan Wang², Jing Li², Xuan Li^{1,2}

Foundation items: National Natural Science Foundation of China

(No.81170828,81670837); Tianjin Applied Basic and Frontier Technology Research Program (No.15JCZDJC35300); Tianjin Health and Family Planning Commission Science and Technology Research Project (No.14KG133)

¹Clinical College of Ophthalmology, Tianjin Medical University, Tianjin 300020, China; ²Tianjin Institute of Ophthalmology, Tianjin Key Laboratory of Ophthalmology and Visual Science, Tianjin Eye Hospital, Tianjin 300020, China

Correspondence to: Xuan Li. Clinical College of Ophthalmology, Tianjin Medical University, Tianjin 300020, China; Tianjin Institute of Ophthalmology, Tianjin Key Laboratory of Ophthalmology and Visual Science, Tianjin Eye Hospital, Tianjin 300020, China. xuanli08@yahoo.com

Received:2020-02-12 Accepted:2020-11-03

Abstract

• AIM: To evaluate the inhibitory effect of glycyrrhizin (Gly) on acute alkali burn induced corneal neovascularization (CNV) in mice.

• METHODS: Corneal neovascularization was established in mice by alkali burn. Sixty mice were then randomly distributed into normal group, Gly group and phosphate buffer solution (PBS) group. The mice were treated with subconjunctival injection of 2g/L Gly solution or vehicle alone every other day for 14d. Corneal inflammation and neovascularization were monitored with a slit lamp microscope. At the end of treatment, the corneas were harvested for hematoxylin-eosin (HE) staining as well as immunohistochemical of CD34 and myeloperoxidase (MPO) staining, microvessel density (MVD), neutrophils were then calculated.

• RESULTS: At the 7 and 14d, the CNV area of Gly group were 4.16 ± 0.00 and $7.33 \pm 0.13 \text{mm}^2$ respectively, which were lower than those in PBS group (7.58 ± 0.20 and $9.24 \pm 0.08 \text{mm}^2$; all $P < 0.05$). The HE pathological staining showed that there were no changes in morphology as well as no neovascularization or inflammatory cell infiltration in the cornea of control group. In the Gly group, blood vessels and inflammatory cell infiltration nearly diminished with collagen in normal shape. While in the PBS group, extensive infiltration of inflammatory cells and neovascularization was examined in the corneal stroma. The immunohistochemical CD34 staining performed that the MVD in the Gly group was 11.13 ± 1.46 bars per square millimeter, which was lower than that in PBS group (34.08 ± 2.46) bars per square millimeter ($P < 0.001$). Additionally, the immunohistochemical MPO staining showed that the number of neutrophils in Gly group was 17.50 ± 1.98 cells per 200-fold field of view, lower than that in PBS group (59.56 ± 4.79 , $P < 0.001$).

• CONCLUSION: Gly can eliminate corneal inflammation and inhibit corneal neovascularization in mice with acute

corneal alkali burn, which provides a new idea for clinical prevention and treatment of corneal neovascularization.

• KEYWORDS: Glycyrrhizin; HMGB1 inhibitor; corneal neovascularization; alkali burn; inflammation

Citation: Wang PH, Li LH, Zhou YY, *et al.* Inhibition of Glycyrrhizin on acute alkali burn induced corneal neovascularization in mice. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2020;20(12):2034-2038

0 引言

角膜是位于眼球最前部的透明、无血管的组织,在眼的屈光系统中占有重要地位。正常角膜能够维持透明无血管并处于“免疫赦免”状态,角膜损伤修复过程伴随新生血管的形成对感染的清除及组织损伤修复具有一定意义。但当角膜促血管生成因子和抑血管生成因子平衡被打破后,新生血管萌芽并异常侵入角膜基质^[1]。新生血管长入角膜缘内1.0~2.0mm时,称为角膜新生血管(corneal neovascularization, CNV)^[2]。CNV是目前最主要的致盲原因之一,是难治性角膜疾病及角膜移植晚期最棘手的难题,也是角膜移植排斥反应发生的高危因素^[3]。CNV形成的确切机制尚不清楚,目前有炎症、缺氧及细胞因子等假说^[4-5]的提出,为进一步明确其形成机制提供了理论依据。血管内皮生长因子(VEGF)在新生血管生成的过程中占据主导地位,它与受体结合后发挥其生物学效应,从而促进新生血管的形成^[6],因此抗VEGF疗法是目前眼科血管相关性疾病的主要疗法。然而,炎症反应是导致血管异常增生的关键因素^[7],无论是在角膜新生血管的临床治疗还是在动物实验中,抗VEGF疗法均效果欠佳。因此,有效防治CNV仍是眼科学的一大难题。高迁移率族蛋白B1(high mobility group box 1 protein, HMGB1)是一种由坏死细胞释放,在炎症级联反应中发挥重要作用的细胞因子。研究表明, HMGB1在角膜炎、葡萄膜炎、青光眼和视网膜变性疾病中可作为炎症因子参与并加重炎症反应^[8]。因此,抑制HMGB1的表达可为疾病的治疗提供一种新的思路。目前, HMGB1在CNV中的研究仍鲜有报道。本研究探讨HMGB1抑制剂甘草甜素(Glycyrrhizin, Gly)对小鼠角膜碱烧伤后CNV的抑制作用。

1 材料和方法

1.1 材料 SPF级健康8~10周龄的雄性C57BL/6J小鼠90只,体质量18~25g,协和医学院血液学研究所提供。本研究严格遵循《实验动物管理条例》(2017修订版)的规定。甘草甜素(日本Sigma公司),使用PBS配制成浓度为2g/L的溶液^[9],左氧氟沙星滴眼液(日本参天制药有限公司),盐酸丙美卡因滴眼液(比利时Alcon公司),CD34单克隆抗体(1:1000稀释,sc-18917, Santa Cruz公司),髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)抗体试剂盒(即用型,GT203207,上海基因科技有限公司),眼科手术显微镜(德国ZEISS公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验动物分组及处理 裂隙灯显微镜下观察排除眼前节及附属器病变。采用随机数字表法将造模成功的60只C57BL/6J小鼠随机分为Gly组和PBS组,每组各30只。正常对照组(30只)给予生理盐水隔天结膜下注射,Gly组给予2g/L甘草甜素溶液,PBS组给予PBS溶液。所有药物用量均为10 μ L/次,共计14d。

1.2.2 角膜碱烧伤模型制作 60只C57BL/6J小鼠右眼制作碱烧伤模型^[10]。造模方法为两组小鼠按照10mL/kg标准腹腔注射50g/L水合氯醛进行麻醉,生理盐水冲洗右侧结膜囊,用盐酸丙美卡因滴眼液局部点眼3次。将直径2.0mm的单层圆形滤纸片浸于1mol/L氢氧化钠溶液中60s,去除多余液体后迅速贴于小鼠角膜中央,计时40s后取下,立即用生理盐水冲洗1min。造模前后3d所有小鼠常规应用左氧氟沙星滴眼液以防感染,4次/d,1滴/次。每日裂隙灯显微镜下观察各组小鼠眼表情况。排除发生角膜感染、穿孔及前房出血等并发症,并及时补充造模小鼠。

1.2.3 角膜炎症反应评分 造模后第3、7、14d在裂隙灯显微镜下观察小鼠角膜炎症反应情况。炎症指数计算方法参考文献[11]。角膜缘血管环充血程度:(1)无充血,0分;(2)角膜缘血管环轻度充血但宽度小于1mm,1分;(3)角膜缘血管环中度充血且宽度1~2mm,2分;(4)角膜缘血管环重度充血且宽度超过2mm,3分。中央角膜水肿程度:(1)无水肿,0分;(2)有但虹膜纹理清晰,1分;(3)有且虹膜纹理不清晰;有且瞳孔不可见,3分。周围角膜水肿程度:(1)无水肿,0分;(2)有但虹膜纹理清晰,1分;(3)有且虹膜纹理不清晰;有且虹膜不可见,3分。炎症指数为角膜缘血管环充血程度、中央角膜水肿程度和外周角膜水肿程度三项得分总和除以9的数值。评分由同一人完成,采用单盲观察法。

1.2.4 角膜CNV面积 造模后每天在裂隙灯显微镜下观察角膜情况并拍照,测量并计算第7、14d的CNV面积。测量时以新生血管连续弯曲度最小且朝向角膜中央的最长血管为准。CNV面积(mm^2)= $C/12 \times \pi \times [r^2 - (r-l)^2]$ 。其中,C表示新生血管侵及的圆周钟点数,r表示角膜半径,l表示新生血管的平均长度^[12]。

1.2.5 组织病理学检查 造模后第14d,将每组小鼠用颈椎脱臼法处死,摘除眼球,经40g/L多聚甲醛固定液固定,石蜡包埋后做垂直于角膜表面连续4 μ m切片。HE染色观察角膜组织结构,免疫组织化学染色检测中性粒细胞数及血管内皮微血管数。显微镜下观察并拍摄图像,使用Image Pro Plus 6.0对血管内皮及中性粒细胞进行计数,计算中性粒细胞数及微血管密度(micro vascular density, MVD)。中性粒细胞计数方法:每组随机选取角膜切片,在200倍显微镜下随机计数4个不重复视野中MPO染色阳性的中性粒细胞数,取平均数即为中性粒细胞数。MVD计算方法^[3]:每组随机选取角膜切片,在400倍显微镜下随机计数5个不重复视野中CD34染色阳性的微血管数,取平均数后除以400倍镜的视野面积(0.24 mm^2),即MVD=(400倍视野下的微血管数/0.24)条/ mm^2 。计数由同一人完成,采用单盲观察法。

统计学分析:采用SPSS 20.0统计学软件分析数据。服从正态分布的计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 描述,两组间检测结果比较采用独立样本t检验,两组内比较采用配对样本t检验;不同时间点两组间角膜炎症指数比较采用单因素重复测量方差分析,当差异有统计学意义时,进一步采用SNK-q法进行组内两两比较。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 角膜炎症指数情况 两组小鼠造模后不同时间点角膜炎症指数比较,具有组间差异性和时间差异性($F_{\text{时间}} =$

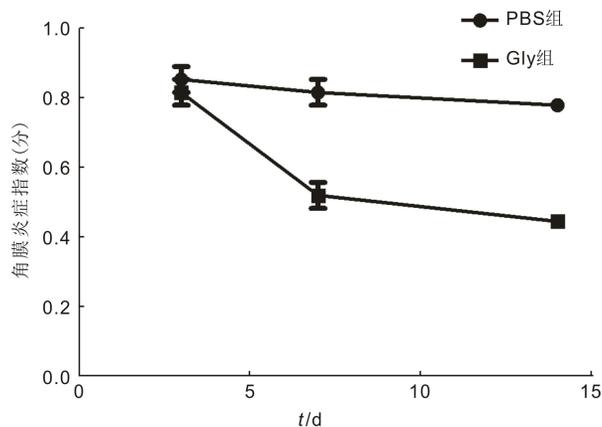


图1 碱烧伤后不同时间点小鼠角膜炎症指数。

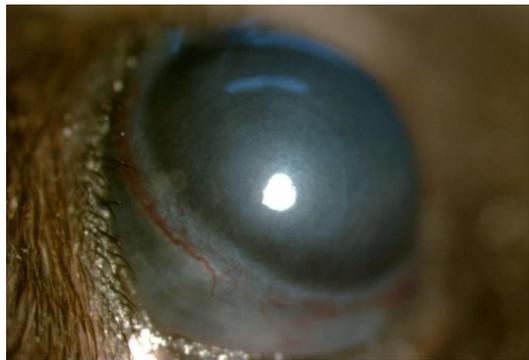


图2 碱烧伤实验小鼠造模后角膜情况(×16)。

表1 两组小鼠碱烧伤后角膜炎症指数的比较 ($\bar{x} \pm s$, 分)

分组	眼数	造模后第3d	造模后第7d	造模后第14d
Gly组	9	0.82±0.06	0.52±0.06	0.44±0.00
PBS组	9	0.85±0.06	0.82±0.06	0.78±0.00
<i>t</i>		1.414	7.060	9.739
<i>P</i>		>0.05	<0.05	<0.05

82.129, $P_{\text{时间}} < 0.001$; $F_{\text{组间}} = 200.97$, $P_{\text{组间}} < 0.001$; $F_{\text{组间} \times \text{时间}} = 39.848$, $P_{\text{组间} \times \text{时间}} < 0.001$, 见表1、图1。造模后第3d, Gly组角膜炎症指数与PBS组接近, 差异无统计学意义($t = 1.414$, $P > 0.05$); 造模后第7、14d, Gly组角膜炎症指数低于PBS组, 差异有统计学意义($t = 7.060$, $P < 0.05$; $t = 9.739$, $P < 0.05$), 表明Gly组炎症反应轻于PBS组。随着时间的延长, Gly组角膜炎症反应减轻, 造模后第7d角膜炎症指数与第3d比较, 差异有统计学意义($P < 0.001$), 第14d角膜炎症指数分别与第3、7d比较, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。PBS组造模后第7d角膜炎症指数与第3d比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$), 第14d角膜炎症指数分别与第3、7d比较, 差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 角膜新生血管生长情况 造模成功的标准: 角膜浅层水肿, 明显混浊, 呈磨玻璃样; 角膜实质受损伤, 虹膜可见, 但纹理不清, 瞳孔隐可见; 角膜缘和结膜部分缺血坏死^[13], 见图2。两组小鼠造模后第3d, 角膜缘见血管明显扩张, 新生血管开始萌芽; 第7d, 有新生血管长入烧伤区, 新生血管面积明显增大, PBS组角膜新生血管范围较大, Gly组新生血管分布稀疏, Gly组CNV面积($4.16 \pm 0.00 \text{mm}^2$)低于PBS组($7.58 \pm 0.20 \text{mm}^2$), 差异有统计学意义($t = -52.290$, $P < 0.001$); 第14d, PBS组新生血管呈垂柳状生长, 已达角膜中央, Gly组仅见少量较长的新生血管,

小血管基本萎缩, Gly组CNV面积($7.33 \pm 0.13 \text{mm}^2$)小于PBS组($9.24 \pm 0.08 \text{mm}^2$), 差异有统计学意义($t = -39.376$, $P < 0.05$), 见图3。随着时间的延长, Gly组CNV面积增大, 造模后第14d与第7d比较, 差异有统计学意义($t = -76$, $P < 0.001$); PBS组第14d与第7d比较, 差异有统计学意义($t = -23.64$, $P < 0.001$), 见图4。

2.3 角膜病理形态改变 造模后第14d, 用小鼠角膜组织制片并行HE染色, 显微镜下观察可见正常对照组角膜结构完整, 未见新生血管形成及炎症细胞浸润; Gly组角膜新生血管数量及炎症细胞浸润较少, 胶原排列较规则; PBS组角膜基质可见大量炎症细胞浸润及新生血管, 见图5。

2.4 角膜组织微血管密度 微血管密度(MVD)是评价血管生成的指标, CD34作为血管内皮细胞的特异性标记物^[14], 它的表达有助于进行MVD的定量分析, 显色为棕黄色或棕褐色, 无背景着色。造模后第14d, 两组角膜基质层中均可观察到呈棕褐色CD34表达阳性的微血管(图6), 但Gly组MVD(11.13 ± 1.46 条/ mm^2)低于PBS组(34.08 ± 2.46 条/ mm^2), 差异有统计学意义($t = 24.260$, $P < 0.001$)。

2.5 角膜组织中中性粒细胞的浸润情况 MPO是中性粒细胞的特异性蛋白, 检测MPO的表达可反应角膜内中性粒细胞浸润的情况。免疫组织化学染色结果显示, 正常角膜基质层中无中性粒细胞浸润。造模后第14d, 两组角膜基质层中均可观察到呈棕褐色MPO表达阳性的中性粒细胞, 见图7。中性粒细胞主要聚集在角膜基质中的新生血管周围; Gly组角膜基质层的中性粒细胞数量为每200倍视野 17.50 ± 1.98 个, 较PBS组(59.56 ± 4.79 个)明显减少, 差异有统计学意义($t = 22.953$, $P < 0.001$)。

3 讨论

CNV可能由多种病因引起, 如配戴隐形眼镜、角膜感染和炎症、化学损伤及角膜缘干细胞缺乏等导致的眼表疾病等^[15-16]。其中在诸多的角膜外伤中, 碱性化学物质烧伤引起的CNV与视力丧失的关系最为密切。碱烧伤产生的变性蛋白可作为抗原刺激机体产生特异性抗体并形成免疫复合物, 诱导中性粒细胞及淋巴细胞的早期浸润并产生趋化因子, 加速巨噬细胞的浸润, 巨噬细胞产生的VEGF能够诱导新生血管的形成。

HMGB1是危险相关分子模式(DAMPs)或警告素家族的成员之一, 是炎症性疾病的迟发调节因子。细胞坏死后, HMGB1由细胞核释放至细胞质, 最后释放到胞外。在细胞外, HMGB1作为一种促炎细胞因子, 通过结合高级糖化终产物(RAGE)、toll样受体(TLR)-2和TLR-4而发挥其生物学效应。研究表明, HMGB1在组织损伤中可能发挥促血管生成因子的作用, 具有直接或间接促血管生成活性, 能刺激内皮细胞的萌发、增殖和趋化^[17]。

Gly是一种天然的三萜乙二醇结合物, 主要存在于甘草的根和茎中, 由于其具有抗炎、抗病毒、抗肿瘤和免疫调节等多种药理作用^[18-19]。在日本, Gly被用于治疗肝病尤其是慢性肝炎^[20]; 也有报道表明Gly具有抑制多种病毒的作用, 如HIV-1^[21]、雏鸭病毒性肝炎病毒(DHV)^[22]、SARS相关性冠状病毒FFM-1和FFM-2^[23]。最新研究结果表明, Gly有望单独或与其他药物联合治疗2019新型冠状病毒^[24]。Gly是HMGB1的特异性抑制剂, 可以抑制

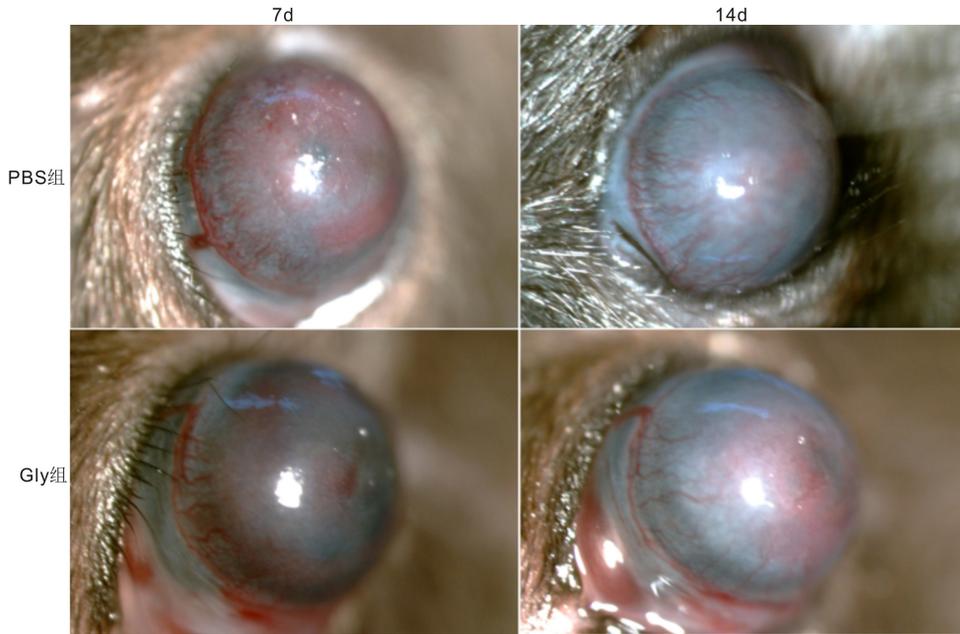


图3 碱烧伤实验小鼠造模后角膜新生血管生长情况($\times 16$)。

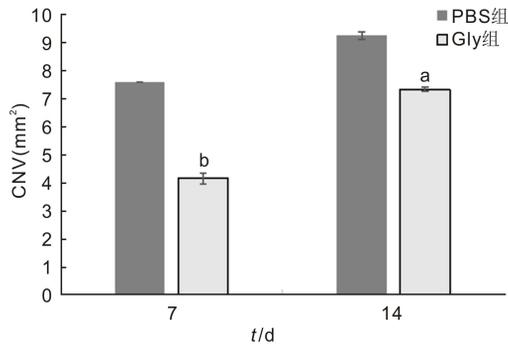


图4 碱烧伤后不同时间点小鼠角膜新生血管生长情况 $^a P < 0.05$, $^b P < 0.01$ vs PBS 组。

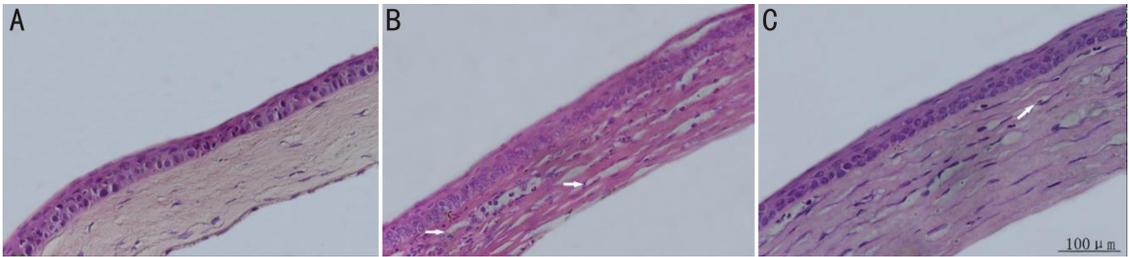


图5 碱烧伤实验小鼠造模后第14d角膜组织的HE染色结果($\times 200$) A:正常对照组;B:PBS组;C:Gly组。箭头示新生血管。

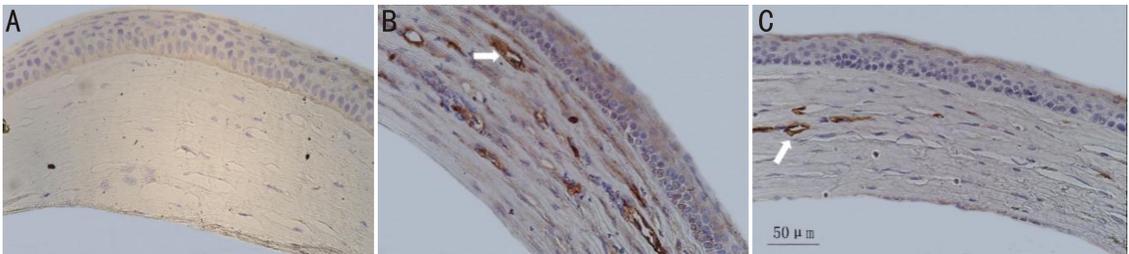


图6 碱烧伤实验小鼠造模后第14d免疫组织化学染色法检测角膜组织中CD34表达($\times 400$) A:正常对照组;B:PBS组;C:Gly组。箭头示CD34阳性的血管内皮细胞。



图7 碱烧伤实验小鼠造模后第14d免疫组织化学染色法检测角膜组织中MPO的表达($\times 200$) A:正常对照组;B:PBS组;C:Gly组。箭头示浸润的中性粒细胞。

HMGB1的细胞因子活性、HMGB1刺激的细胞增殖和迁移以及HMGB1诱导的血管形成并减轻炎症反应^[25]。近年来,炎症与新生血管的研究逐渐成为新生血管形成机制及其治疗的主要方向。有研究表明抑制NF- κ B通路可以抑制肿瘤坏死因子(TNF- α)、趋化因子配体CCL₂和CXCL₅及VEGF的产生,减少单核细胞和中性粒细胞的聚集,从而减轻炎症反应,抑制病理性新生血管的形成^[26]。邹志康等^[3]通过观察大鼠角膜急性碱烧伤后炎症反应评分和新生血管生长并通过HE染色及免疫组织化学染色CD34计算MVD,发现吡非尼酮能减轻大鼠角膜急性碱烧伤后的角膜炎症反应,并抑制CNV形成。Shah等^[27]研究表明Gly作为中药甘草的主要成分能够抑制兔CNV生成并改善碱烧伤导致的角膜基质排列紊乱,但其作用机制等仍缺乏更多的证据支持。

本研究采用与人类功能基因同源性更高的C57BL/6J小鼠来制作碱烧伤动物模型,能更好地模拟人角膜碱烧伤后的病理状态,便于观察新生血管的生长状况。小鼠碱烧伤诱导的CNV模型属于炎症性模型,是研究炎症性新生血管的发生机制和治疗的重要手段^[28]。从造模后第7d开始,Gly能明显减轻碱烧伤后角膜的炎症反应程度;造模后第14d,Gly组的角膜仅见少量较长的CNV,小细血管基本萎缩,角膜透明度增加。病理切片证实,造模后第14d,Gly组角膜各层结构完整存在,基质层排列较规则,炎症细胞浸润较少,基质层内仅见少量新生血管生成。另外,CD34作为微血管标记,主要表达于微血管的内皮细胞内,是新生血管计数的良好指标。结果显示,造模后第14d,Gly组角膜基质中仅见少量CD34阳性的血管内皮细胞,而PBS组角膜基质中见大量标记阳性的血管内皮细胞。此外,本研究还通过角膜炎症指数及免疫组织化学法行MPO染色中性粒细胞并计数来反映角膜的炎症反应情况。MPO作为一种中性粒细胞特异的氧化酶,不仅能特异性地标记中性粒细胞,而且能够较好地反映中性粒细胞活性及机体组织炎症的严重程度。结果显示,造模后第14d,Gly组角膜基质中仅有少量MPO阳性的中性粒细胞,而PBS组角膜基质中可见大量标记阳性的中性粒细胞。

综上所述,本研究结果表明Gly能明显减轻小鼠角膜急性碱烧伤模型中的角膜炎症反应,抑制角膜新生血管的形成,这有望为临床防治CNV类疾病提供一种新的思路。

参考文献

- 1 Abdelfattah NS, Amgad M, Zayed AA, et al. Molecular underpinnings of corneal angiogenesis: advances over the past decade. *Int J Ophthalmol* 2016; 9(5): 768-779
- 2 袁检宝. 角膜损伤修复与基质重塑的研究进展. *中华实验眼科杂志* 2018; 36(4): 317-320
- 3 邹志康, 吴共发, 邱丽贞, 等. 吡非尼酮抑制大鼠角膜急性碱烧伤后新生血管的实验研究. *中华眼科医学杂志(电子版)* 2018; 8(5): 28-34
- 4 Lu P, Li L, Liu G, et al. Opposite roles of CCR2 and CX3CR1 macrophages in alkali-induced corneal neovascularization. *Cornea* 2009; 28(5): 562-569
- 5 VonMarschall Zofia, Cramer T, Höcker M, et al. Dual mechanism of vascular endothelial growth factor upregulation by hypoxia in human hepatocellular carcinoma. *Gut* 2001; 48(1): 87-96
- 6 Kim WJ, Jeong HO, Chung SK. The effect of bevacizumab on corneal neovascularization in rabbits. *Korean J Ophthalmol* 2010; 24(4): 230-236
- 7 Murthy RC, McFarland TJ, Yoken J, et al. Corneal transduction to inhibit angiogenesis and graft failure. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44

- (5): 1837-1842
- 8 Abu El-Asrar AM, Alam K, Garcia-Ramirez M, et al. Association of HMGB1 with oxidative stress markers and regulators in PDR. *Mol Vis* 2017; 23: 853-871
- 9 Ekanayaka SA, McClellan SA, Barrett RP, et al. Glycyrrhizin Reduces HMGB1 and Bacterial Load in Pseudomonas aeruginosa Keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2016; 57(13): 5799-5809
- 10 Giacomini C, Ferrari G, Bignami F, et al. Alkali burn versus suture-induced corneal neovascularization in C57BL/6 mice: an overview of two common animal models of corneal neovascularization. *Exp Eye Res* 2014; 121: 1-4
- 11 Zhang Z, Ma JX, Gao G, et al. Plasminogen kringle 5 inhibits alkali-burn-induced corneal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46(11): 4062-4071
- 12 王朋, 王雪, 吴志鸿, 等. 姜黄素对碱烧伤诱导的兔眼角膜新生血管抑制作用的实验研究. *中华眼科医学杂志(电子版)* 2019; 9(2): 53-59
- 13 Subash M, Sheth HG. Rapid, accurate and easy pH assessment in ocular chemical injury. *J Emerg Med* 2011; 41(3): 301
- 14 Bujor IS, Cioca A, Ceaușu RA, et al. Evaluation of Vascular Proliferation in Molecular Subtypes of Breast Cancer. *In Vivo* 2018; 32(1): 79-83
- 15 Lim P, Fuchsluger TA, Jurkunas UV. Limbal stem cell deficiency and corneal neovascularization. *Semin Ophthalmol* 2009; 24(3): 139-148
- 16 Hamill CE, Bozorg S, Peggy Chang HY, et al. Corneal alkali burns: a review of the literature and proposed protocol for evaluation and treatment. *Int Ophthalmol Clin* 2013; 53(4): 185-194
- 17 Jiang Y, Wang X, Jiang X, et al. Influence of HMGB1 and MSCs transplantation on rat cardiac angiogenesis with acute myocardial infarction. *Pak J Pharm Sci* 2016; 29(4 Suppl): 1391-1396
- 18 Huan CC, Wang HX, Sheng XX, et al. Glycyrrhizin inhibits porcine epidemic diarrhea virus infection and attenuates the proinflammatory responses by inhibition of high mobility group box-1 protein. *Arch Virol* 2017; 162(6): 1467-1476
- 19 Hibasami H, Iwase H, Yoshioka K, et al. Glycyrrhetic acid (a metabolic substance and aglycon of glycyrrhizin) induces apoptosis in human hepatoma, promyelocytic leukemia and stomach cancer cells. *Int J Mol Med* 2006; 17(2): 215-219
- 20 Li JY, Cao HY, Liu P, et al. Glycyrrhizic acid in the treatment of liver diseases: literature review. *Biomed Res Int* 2014; 2014: 872139
- 21 Sun ZG, Zhao TT, Lu N, et al. Research Progress of Glycyrrhizic Acid on Antiviral Activity. *Mini Rev Med Chem* 2019; 19(10): 826-832
- 22 Okda FA, Yassein S, Ahmed AR, et al. Some Haematological and Biochemical Investigations on Duck Virus Hepatitis following Administration of Glycyrrhizin. *ISRN Pharmacol* 2013; 2013: 849412
- 23 Cinatl J, Morgenstern B, Bauer G, et al. Glycyrrhizin, an active component of liquorice roots, and replication of SARS-associated coronavirus. *Lancet* 2003; 361(9374): 2045-2046
- 24 Bailly C, Vergoten G. Glycyrrhizin: An alternative drug for the treatment of COVID-19 infection and the associated respiratory syndrome? *Pharmacol Ther* 2020; 214: 107618
- 25 Smolarczyk R, Cichoń T, Matuszczak S, et al. The role of Glycyrrhizin, an inhibitor of HMGB1 protein, in anticancer therapy. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2012; 60(5): 391-399
- 26 Lennikov A, Mirabelli P, Mukwaya A, et al. Selective IKK2 inhibitor IMD0354 disrupts NF- κ B signaling to suppress corneal inflammation and angiogenesis. *Angiogenesis* 2018; 21(2): 267-285
- 27 Shah SL, Wahid F, Khan N, et al. Inhibitory Effects of Glycyrrhiza glabra and Its Major Constituent Glycyrrhizin on Inflammation-Associated Corneal Neovascularization. *Evid Based Complement Alternat Med* 2018; 2018: 8438101
- 28 Shi H, Yu HJ, Wang HY, et al. Topical administration of peroxiredoxin-6 on the cornea suppresses inflammation and neovascularization induced by ultraviolet radiation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012; 53(13): 8016-8028