

莪术醇抑制 VEGF 诱导的新生血管生成的实验研究

郝雨檬^{1,2}, 王彩霞¹, 马景学¹, 李雪景¹, 尚庆丽¹

引用: 郝雨檬, 王彩霞, 马景学, 等. 莪术醇抑制 VEGF 诱导的新生血管生成的实验研究. 国际眼科杂志 2023;23(3):379-384

基金项目: 河北省自然科学基金项目 (No. H2021206009, H2022206287)

作者单位:¹(050000) 中国河北省石家庄市, 河北医科大学第二医院眼科;²(050051) 中国河北省石家庄市, 中国人民解放军联勤保障部队第九八〇医院眼科

作者简介: 郝雨檬, 毕业于河北医科大学, 硕士, 住院医师, 研究方向: 眼底病。

通讯作者: 尚庆丽, 毕业于河北医科大学, 博士, 教授, 主任医师, 研究方向: 眼底病. qinglishang2013@sina.cn

收稿日期: 2022-06-20 修回日期: 2023-02-07

摘要

目的: 研究莪术醇对血管内皮生长因子 (VEGF) 诱导的新生血管生成的作用及机制。

方法: 体外培养人脐静脉血管内皮细胞, 用 50ng/mL VEGF 和不同浓度莪术醇进行分组处理, 采用 CCK-8 和 EdU 实验检测细胞增殖, Transwell 实验分析细胞迁移能力, 管腔形成实验分析内皮细胞血管生成能力, Western blot 检测 Akt/mTORC1 通路变化。

结果: CCK-8 实验结果显示, 400、800 μ mol/L 莪术醇+VEGF 组细胞 OD450 值明显低于 VEGF 组 (均 $P < 0.01$)。EdU 结果显示, 400 μ mol/L 莪术醇+VEGF 组细胞增殖率明显低于 VEGF 组 ($P < 0.001$)。Transwell 实验和管腔形成实验结果显示, 与 VEGF 组比较, 400 μ mol/L 莪术醇+VEGF 组迁移细胞数减少, 管腔形成的分支数量和分支长度下降 (均 $P < 0.001$)。Western blot 结果显示, 莪术醇可显著减少细胞中 Akt/mTORC1 下游靶点 p-Akt 和 p-S6 的表达。

结论: 莪术醇可抑制 VEGF 诱导的血管内皮细胞的增殖、迁移和管腔形成, 具有强的抑制血管生成的作用, 可进一步用于眼底新生血管的治疗研究。

关键词: 莪术醇; 新生血管生成; 血管内皮生长因子 (VEGF); Akt/mTORC1 通路

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2023.3.06

Experimental study of curcumol inhibiting vascular endothelial growth factor - induced neovascularization

Yu-Meng Hao^{1,2}, Cai-Xia Wang¹, Jing-Xue Ma¹, Xue-Jing Li¹, Qing-Li Shang¹

Foundation items: Natural Science Foundation of Hebei Province (No.H2021206009, H2022206287)

¹Department of Ophthalmology, the Second Hospital of Hebei

Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China; ²Department of Ophthalmology, No.980 Hospital of Joint Logistic Support Force of People's Liberation Army of China, Shijiazhuang 050051, Hebei Province, China

Correspondence to: Qing-Li Shang. Department of Ophthalmology, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China. qinglishang2013@sina.cn

Received: 2022-06-20 Accepted: 2023-02-07

Abstract

• AIM: To study the role and mechanism of curcumol in neovascularization induced by vascular endothelial growth factor (VEGF).

• METHODS: Human umbilical vein endothelial cells were cultured *in vitro* and treated with 50ng/mL VEGF and curcumol at different concentrations. Cell proliferation was detected by CCK-8 and EdU assay, the migration ability of cells was analyzed by Transwell assay, the angiogenesis ability of endothelial cells was analyzed by tube formation assay, and the change of Akt/mTORC1 signal pathway was detected by Western blot.

• RESULTS: CCK-8 results showed that the OD450 value of cells in 400 and 800 μ mol/L curcumol+VEGF group was significantly lower than that in VEGF group (all $P < 0.01$). EdU results showed that the rate of cell proliferation in 400 μ mol/L curcumol + VEGF group was significantly lower than that in VEGF group ($P < 0.001$). Transwell assay and the formation assay results showed that the number of migratory cells in 400 μ mol/L curcumol+VEGF group was decreased, and the number and length of tube branches were also reduced compared with VEGF group (all $P < 0.001$). Western blot results showed that curcumol significantly inhibited the expression of p-Akt and p-S6, which were downstream targets of Akt/mTORC1 pathway in cells.

• CONCLUSION: Curcumol can inhibit VEGF-induced cell proliferation, migration and tube formation of vein endothelial cells, and has a strong inhibitory effect on angiogenesis, which can be further studied in the treatment of ocular fundus neovascularization.

• KEYWORDS: curcumol; neovascularization; vascular endothelial growth factor(VEGF); Akt/mTORC1 pathway

Citation: Hao YM, Wang CX, Ma JX, et al. Experimental study of curcumol inhibiting vascular endothelial growth factor - induced neovascularization. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2023;23(3):379-384

0 引言

新生血管生成在多种疾病致病中发挥重要作用, 主要包括肿瘤血管、眼底新生血管、冠状动脉斑块新生血管

等^[1]。眼底新生血管包括视网膜新生血管(retinal neovascularization, RNV)和脉络膜新生血管(choroidal neovascularization, CNV)常发生于糖尿病视网膜病变、年龄相关性黄斑变性、病理性近视等致盲性眼病中,是视力丧失的重要原因。眼底新生血管的发生机制尚不明确,与基因异常、缺氧、氧化应激、炎症等因素均相关,是多种细胞和因子共同作用的结果,其中血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)发挥关键作用^[2-3]。目前临床主要采用玻璃体腔注射抗 VEGF 药物治疗 RNV 和 CNV,但存在作用靶点单一、复发率高、反复注射引起纤维瘢痕化和视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)萎缩等问题^[4]。中药及中药单体安全、高效、价廉、多靶点,可为药物防治眼底新生血管提供新的思路和方法。莪术醇(Curcumol),分子式 $C_{15}H_{24}O_2$,倍半萜类,是中药莪术的主要活性成分,具有抗肿瘤、抗炎、抗纤维化等多种生物活性,临床应用广泛,但在新生血管生成中的作用尚不明确^[5-6]。人脐静脉血管内皮细胞(HUVECs)是体外常用的内皮细胞模型,也是 RNV 和 CNV 体外研究常用的细胞模型^[7-9]。本研究利用 HUVECs 体外分析莪术醇对新生血管生成的抑制作用,为后续其应用于眼底新生血管的治疗研究提供理论和技术支持。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 HUVECs 细胞购自湖北丰辉生物科技有限公司。

1.1.2 主要试剂及仪器 莪术醇(HY-N0104,美国 MedChemExpress 公司), VEGF(100-20,美国 PeproTech 公司), DMEM 培养基(美国 Gibco 公司),胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)(以色列 Biological Industries 公司), CCK-8 检测试剂盒(HY-K0301,美国 MedChemExpress 公司), EdU-594 细胞增殖检测试剂盒(C0078,碧云天生物技术公司), Transwell 小室(8.0 μm , 24 孔, 3422, 美国 Corning 公司), Matrigel 基质胶(356234, 美国 Corning 公司), β -actin(20536-1-AP, 武汉三鹰生物技术公司), Akt(4691)、p-Akt(4060)、S6(2217)和 p-S6(4858)抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司)。细胞培养箱、低温高速离心机(美国 Thermo 公司),倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司),激光共聚焦显微镜(德国 Carl Zeiss 公司),酶标仪(美国 BioTek 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及分组 HUVECs 细胞用含 10% FBS 和 1%青-链霉素的 DMEM 培养基,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的恒温培养箱中培养,待细胞生长至 90%融合时,采用 0.25%胰酶消化,1:2 传代,取对数生长期的细胞进行实验。莪术醇用二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)配制为 400mmol/L 储备液,使用时用培养基稀释为相应浓度。将细胞分为对照组、VEGF 组、莪术醇+VEGF 组,实验组培养基中分别加入相应浓度莪术醇和/或 50ng/mL VEGF,对照组加入 0.1%DMSO。

1.2.2 CCK-8 法检测细胞增殖 取 1×10^4 /mL 细胞接种于 96 孔板中,过夜培养后用无 FBS 的培养基饥饿 24h,分别用各浓度莪术醇和 VEGF 处理 24h,各孔更换新鲜培养基,向每孔加入 10 μL CCK-8 溶液,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱内孵育 1h,酶标仪测定 450nm 处吸光度。

1.2.3 EdU 实验检测细胞增殖 取 1×10^4 /mL 细胞接种于

96 孔板中,过夜培养后用无 FBS 的培养基饥饿 24h,分别用各浓度莪术醇和 VEGF 处理 24h,加入等体积的 10mmol/L EdU,继续孵育 2h;然后用 4%多聚甲醛固定,0.3% Triton X-100 通透,加入 50 μL 反应液,室温避光孵育 30min, Hoechst 33342 溶液进行细胞核染色,荧光显微镜下观察并拍照,增殖细胞(EdU 阳性)在荧光显微镜下呈现红色荧光。

1.2.4 Transwell 迁移实验分析细胞迁移 用无 FBS 培养基培养细胞 24h,重悬细胞为 2×10^5 /mL,加入不同浓度莪术醇,向 Transwell 小室的上室加入 100 μL 细胞悬液,下室加入 600 μL 含 10% FBS 和/或 50ng/mL VEGF 的培养基,培养 24h;取出小室,加入 4%多聚甲醛固定,0.1%结晶紫染色细胞,棉签擦除小室内面未穿过的细胞,PBS 洗净,显微镜下随机选取 5 个视野计算迁移细胞数。

1.2.5 管腔形成实验分析血管生成 将 Matrigel 胶放入 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜融化,加入预冷的 48 孔板中,每孔 100 μL ,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中凝固 1h。取对数生长期细胞制成 2.5×10^5 /mL 的细胞悬液,各组加入不同浓度的莪术醇和 VEGF 处理,各取 100 μL 加入到 Matrigel 胶的孔板中,培养 24h,显微镜下观察管腔形成情况,随机选取 5 个视野,Image J 软件计算管腔的分支数量和长度。

1.2.6 Western blot 分析 p-Akt 和 p-S6 表达 收集 HUVECs 细胞,提取总蛋白,BCA 法测定样本蛋白含量。SDS-PAGE 分离蛋白,随后将蛋白质转印至 PVDF 膜上,5%脱脂奶粉室温封闭 1h,分别加入抗 p-Akt(1:1000)、抗 p-S6(1:2000)、抗 Akt(1:2000)、抗 S6(1:2000)和抗 β -actin(1:1000)一抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;TBST 洗涤 3 次,加入 HRP 标记的二抗,室温作用 1h, TBST 洗涤 3 次后加入 ECL 反应液, BIO-RAD 凝胶成像系统进行拍照; Image J 软件对蛋白条带进行灰度分析,通过分析目的蛋白与内参对照灰度比值计算目的蛋白相对表达量。

统计学分析:应用 SPSS 25.0 进行统计学分析。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各组各检测指标的总体差异比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组细胞增殖能力比较 CCK-8 实验结果显示,各组细胞 OD450 值总体比较差异有统计学意义($F = 18.346$, $P < 0.001$);其中,VEGF 组 OD450 值显著高于对照组,差异有统计学意义($t = 3.80$, $P < 0.01$);50、100、200 $\mu\text{mol/L}$ 莪术醇+VEGF 组 OD450 值与 VEGF 组比较差异无统计学意义($t = -0.49$, -0.71 , -1.10 , 均 $P > 0.05$),400、800 $\mu\text{mol/L}$ 莪术醇+VEGF 组 OD450 值显著低于 VEGF 组,差异有统计学意义($t = -3.49$, $P < 0.01$; $t = -8.58$, $P < 0.001$),见图 1。但 800 $\mu\text{mol/L}$ 莪术醇+VEGF 组 OD450 值低于对照组,可能会抑制正常细胞功能,故后续实验仅采用 200、400 $\mu\text{mol/L}$ 莪术醇处理细胞。

EdU 实验结果显示,各组细胞增殖率总体比较差异有统计学意义($F = 27.814$, $P < 0.001$);其中,VEGF 组细胞增殖率高于对照组,差异有统计学意义($t = 6.11$, $P < 0.001$);200 $\mu\text{mol/L}$ 莪术醇+VEGF 组细胞增殖率与 VEGF 组比较差异无统计学意义($t = -1.41$, $P > 0.05$);400 $\mu\text{mol/L}$ 莪术醇+VEGF 组细胞增殖率显著低于 VEGF 组,差异有统计学意义($t = -7.83$, $P < 0.001$),见图 2。

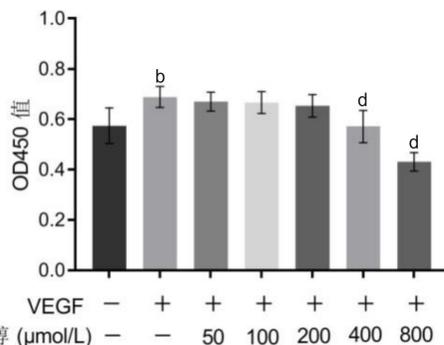


图1 CCK-8 实验中各组细胞 OD450 值比较 ^b $P < 0.01$ vs 对照组; ^d $P < 0.01$ vs VEGF 组。

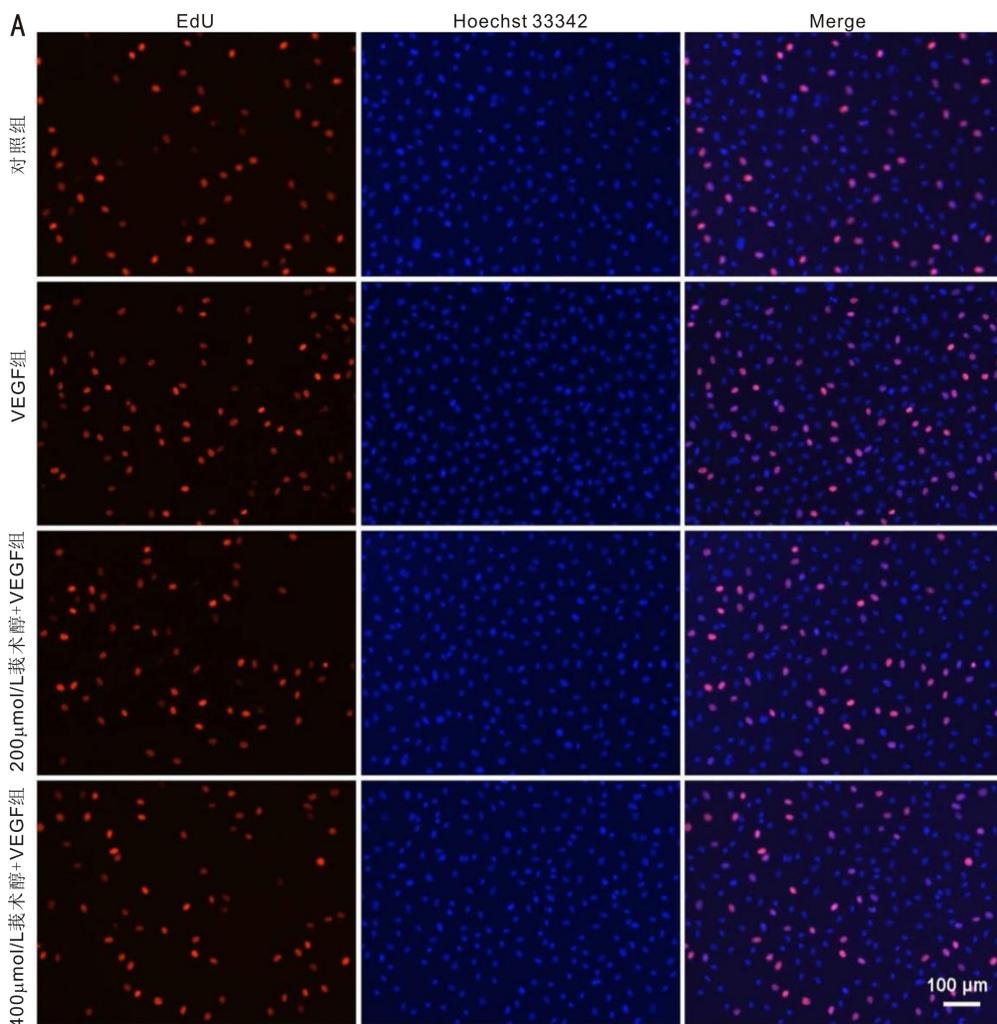


图2 各组细胞 EdU 染色结果比较 A: 各组细胞 EdU 染色的荧光显微镜像, 红色示 EdU 染色阳性细胞, 蓝色示 Hoechst 33342 细胞核染色; B: 定量比较各组细胞增殖率, ^b $P < 0.01$ vs 对照组; ^d $P < 0.01$ vs VEGF 组。

2.2 各组细胞迁移率比较 Transwell 实验结果显示, 各组细胞迁移数总体比较差异有统计学意义 ($F = 49.132, P < 0.001$); 其中, VEGF 组迁移细胞数相对对照组明显增加, 差异有统计学意义 ($t = 9.65, P < 0.001$); 200 μmol/L 莪术

醇+VEGF 组细胞迁移数与 VEGF 组比较差异无统计学意义 ($t = 2.09, P > 0.05$); 400 μmol/L 莪术醇+VEGF 组迁移细胞数相比 VEGF 组明显降低, 差异有统计学意义 ($t = -9.34, P < 0.001$), 见图 3。

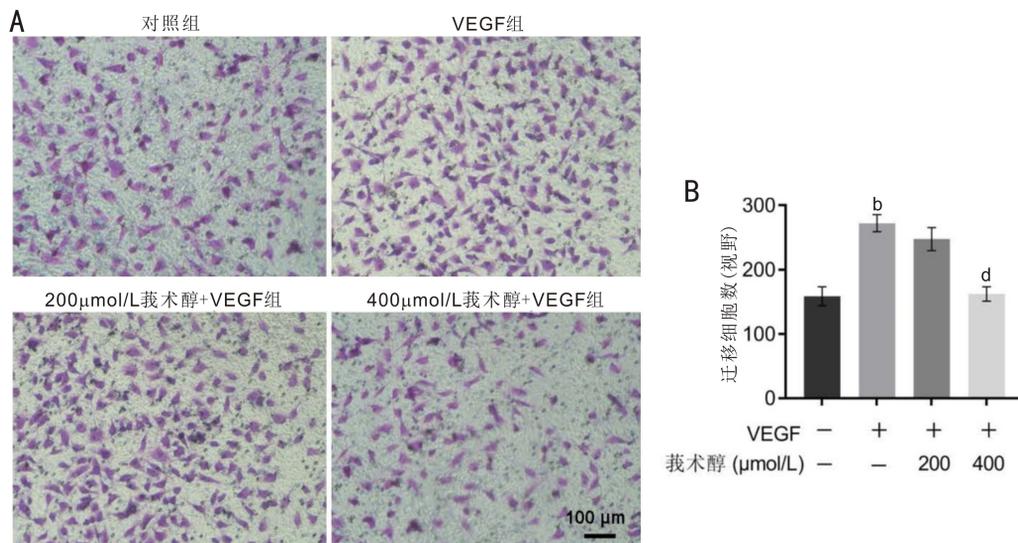


图3 Transwell 实验中各组细胞迁移比较 A: 各组迁移细胞的显微镜像; B: 定量比较各组迁移细胞数, ^b $P < 0.01$ vs 对照组; ^d $P < 0.01$ vs VEGF 组。

2.3 各组细胞管腔形成能力比较 管腔形成实验结果显示, 各组细胞形成管腔的分支数量和分支长度总体比较差异均有统计学意义 ($F = 32.585, 23.179$, 均 $P < 0.001$); 其中, VEGF 组形成管腔的分支数量和分支长度高于对照组, 差异均有统计学意义 ($t = 7.23, 5.99$, 均 $P < 0.001$); 200 $\mu\text{mol/L}$ 莪术醇+VEGF 组细胞形成管腔的分支数量和分支长度与 VEGF 组比较差异无统计学意义 ($t = -0.22, -0.57$, 均 $P > 0.05$); 400 $\mu\text{mol/L}$ 莪术醇+VEGF 组细胞形成管腔的分支数量和分支长度明显低于 VEGF 组, 差异有统计学意义 ($t = -6.97, -6.33$, 均 $P < 0.001$), 见图 4。

2.4 各组细胞 p-Akt 和 p-S6 表达水平比较 为了分析莪术醇作用于血管生成的信号通路机制, 本研究检测 Akt/mTORC1 信号通路的关键效应因子 p-Akt (S473) 和 p-S6 (S235/236) 的相对表达水平。Western blot 检测结果显示, 各组细胞 Akt 和 S6 相对表达水平总体比较, 差异无统计学意义 ($F = 3.938, 4.581$, 均 $P > 0.05$), p-Akt 和 p-S6 相对表达水平总体比较, 差异有统计学意义 ($F = 10.113, 5.407$, 均 $P < 0.05$); 其中, 与对照组相比, VEGF 组细胞 p-Akt 和 p-S6 相对表达水平差异无统计学意义 ($t = 0.10, -0.78$, 均 $P > 0.05$), 而 400 $\mu\text{mol/L}$ 莪术醇+VEGF 组细胞 p-Akt 和 p-S6 相对表达水平较 VEGF 组明显降低, 差异有统计学意义 ($t = -3.45, -2.90$, 均 $P < 0.05$), 见图 5。

3 讨论

目前抗 VEGF 药物治疗作为 RNV 和 CNV 的一线治疗方案, 虽取得一定疗效, 但治疗的局限性也很明显: (1) 药物作用靶点单一, 作用时间短, 停药后易复发, 需要多次注射, 有高于 50% 的患者在持续抗 VEGF 治疗 1a 后仍存在活动性病灶; (2) 反复注射引起的副作用, 尤其是纤维瘢痕化和 RPE 萎缩, 使患者术后视力恢复不良; (3) 此类药物价格昂贵^[4,10]。因此, 寻找新的治疗药物和方案显得尤为迫切, 安全、高效、价廉、多靶点的中药及中药单体是一个重要选择。

莪术醇是中药莪术 (蓬莪术, 广西莪术和温郁金等的干燥根茎) 的挥发油中提取的单体, 是莪术油中含量最高的有效成分^[5]。现代药理学研究显示, 莪术醇具有较强的抗癌作用, 且具有低毒和不引起白细胞数量减少等优点,

对临床多种肿瘤如肝癌、乳腺癌、胃癌和血液系统恶性肿瘤等均有一定的治疗作用^[11-12]。研究证实, 莪术醇可靶向并抑制许多异常激活的细胞生长或存活相关的信号通路, 从而诱导多种肿瘤细胞的凋亡或死亡, 如 PI3K/Akt/mTOR、Wnt、ERK/NF- κ B 信号通路等^[13-15]。因此莪术醇可能通过抑制多种细胞生长信号通路, 从而发挥抑制新生血管形成的功效。目前关于莪术醇对血管内皮细胞的作用研究还非常少, 南京中医药大学的研究显示莪术醇可抑制肝窦内皮细胞毛细血管化, 是肝纤维化的潜在治疗药物^[16-17]。另有研究显示, 莪术油可以抑制高糖下的人视网膜血管内皮细胞的增殖和 VEGF 表达, 具有抗视网膜新生血管的作用^[18]。本研究重点分析了中药单体莪术醇对新生血管生成的抑制作用及机制, 探讨其应用于眼底新生血管治疗的可能性。

内皮细胞的增殖、迁移及管腔形成是血管生成的必经过程, VEGF 在这一过程中起关键作用。既往关于 CNV 的研究中, 恒河猴脉络膜血管内皮细胞 RF/6A 经常作为细胞模型, 但 2018 年 Makin 等^[19]证实 RF/6A 细胞已不再具有关键的内皮细胞性质。目前 HUVECs 仍是 CNV 体外研究常用的细胞模型, 同时在 RNV 的研究中, HUVECs 细胞模型也应用广泛。本研究采用体外 VEGF 诱导 HUVECs 细胞增殖、迁移及管腔形成, 观察莪术醇对上述过程的影响和机制, 为莪术醇应用于临床治疗眼底新生血管提供体外实验基础。本研究结果显示, 莪术醇可有效抑制 HUVECs 的增殖、迁移和管腔形成。分析不同浓度莪术醇的作用效果发现, 当莪术醇浓度 $\leq 200 \mu\text{mol/L}$ 时无明显抑制效果, 而当浓度为 400、800 $\mu\text{mol/L}$ 时, 莪术醇可以有效抑制内皮细胞增殖, 但 800 $\mu\text{mol/L}$ 莪术醇使内皮细胞活性明显低于未加 VEGF 的对照组, 可能对内皮细胞的正常功能造成影响, 因此后面的细胞实验中未再采用此浓度, 400 $\mu\text{mol/L}$ 莪术醇可能是更安全且有效的, 这为以后动物实验探索体内给药浓度提供了依据。

为了探究莪术醇抑制新生血管生成的分子机制, 本研究检测了 Akt/mTORC1 通路, 其是调节细胞生长、代谢、分化的关键信号通路, Akt 磷酸化后可激活 mTORC1, S6 为 mTORC1 下游的主要效应因子, 磷酸化后可促进蛋白质合

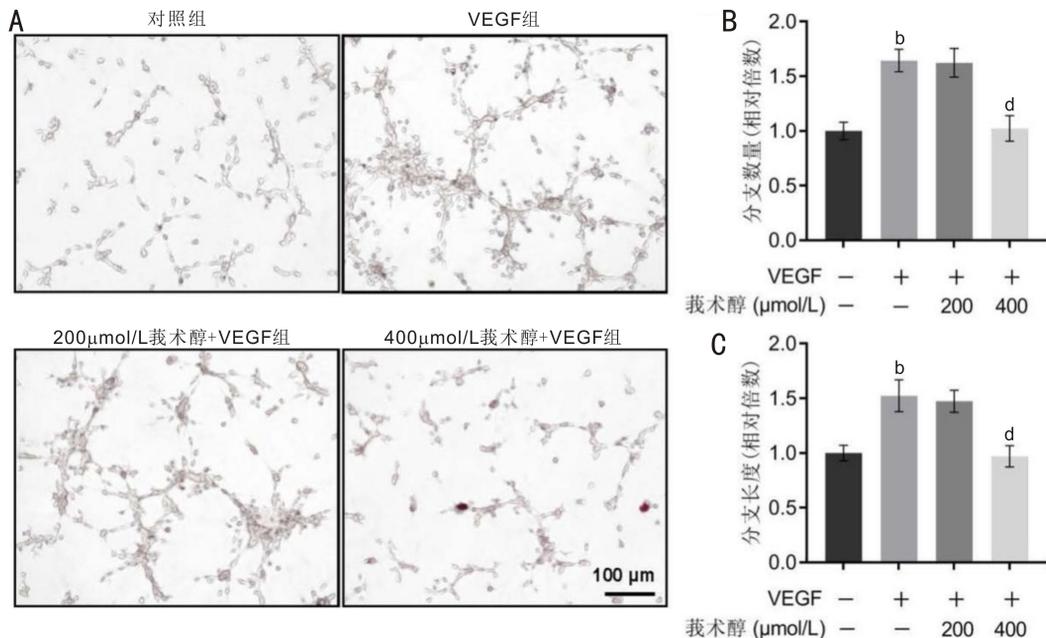


图4 各组细胞管腔形成情况 A:各组细胞形成管腔的显微镜像;B:定量比较各组细胞形成管腔的分支数量;C:定量比较各组细胞形成管腔的分支长度。^a $P < 0.01$ vs 对照组;^d $P < 0.01$ vs VEGF 组。

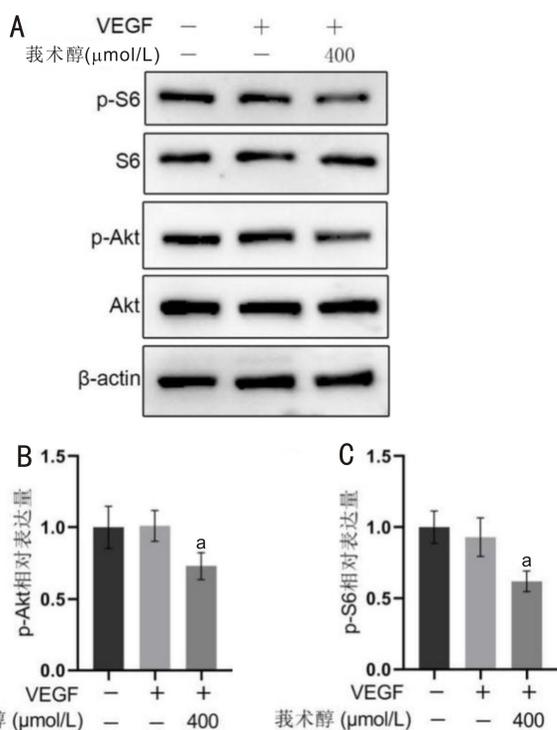


图5 Western blot 检测各组细胞 p-Akt 和 p-S6 蛋白表达水平 A:各组细胞蛋白表达电泳图;B:定量比较各组细胞 p-Akt 相对表达水平,用 p-Akt/Akt 灰度值比值反映 p-Akt 相对表达水平;C:定量比较各组细胞 p-S6 相对表达水平,用 p-S6/S6 灰度值比值反映 p-S6 相对表达水平。^a $P < 0.05$ vs VEGF 组。

成,同时 p-Akt 可调控细胞存活和增殖。Akt/mTORC1 通路在新生血管生成中发挥重要作用,在 RNV 和 CNV 动物模型中,通过玻璃体腔注射或口服抑制剂阻止 Akt/mTORC1 活化可显著抑制新生血管形成^[20-21]。此外,研究者也在尝试将 mTOR 抑制剂应用于年龄相关性黄斑变性的临床治疗,可通过其多种药理作用,包括抗炎、抗增殖、抗迁移和诱导自噬,在改善 CNV 和保护 RPE 方面发挥显著功效^[22-23]。本研究结果显示莪术醇可以有效抑制内皮

细胞中 Akt 和 S6 的磷酸化,抑制 Akt/mTORC1 通路活化,提示莪术醇抑制血管生成的一个可能机制是调控 Akt/mTORC1 通路。

本研究证实,莪术醇可在体外有效抑制 VEGF 诱导的血管内皮细胞增殖、迁移和血管形成,并抑制 Akt/mTORC1 通路活化,具有抑制新生血管的潜在作用。但本研究只是对莪术醇抑制新生血管作用的初步探索,应进一步在动物模型中深入分析莪术醇对 RNV 和 CNV 形成的作用与机制及其最佳给药途径和剂量、安全性、药代动力学特征等,为莪术醇在眼底新生血管疾病中的科学使用提供更多依据。

参考文献

- Liu CH, Wang ZX, Sun Y, *et al.* Animal models of ocular angiogenesis: from development to pathologies. *FASEB J* 2017; 31(11): 4665-4681
- Mitchell P, Liew G, Gopinath B, *et al.* Age-related macular degeneration. *Lancet* 2018; 392(10153): 1147-1159
- Deng YH, Qiao LF, Du MY, *et al.* Age-related macular degeneration: Epidemiology, genetics, pathophysiology, diagnosis, and targeted therapy. *Genes Dis* 2022; 9(1): 62-79
- Mettu PS, Allingham MJ, Cousins SW. Incomplete response to Anti-VEGF therapy in neovascular AMD: exploring disease mechanisms and therapeutic opportunities. *Prog Retin Eye Res* 2021; 82: 100906
- 王莉,徐锐,王常伟,等. 莪术醇的抗癌作用研究进展. *国际药理学研究杂志* 2019; 46(3): 176-181
- Hashem S, Nisar S, Sageena G, *et al.* Therapeutic effects of curcumin in several diseases; an overview. *Nutr Cancer* 2021; 73(2): 181-195
- Song JH, Lee K, Park SW, *et al.* Lactic acid upregulates VEGF expression in macrophages and facilitates choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2018; 59(8): 3747-3754
- Zhao N, Gui X, Fang Q, *et al.* Graphene quantum dots rescue angiogenic retinopathy via blocking STAT3/Periostin/ERK signaling. *J Nanobiotechnology* 2022; 20(1): 174
- 陈水龄,亢泽峰,褚文丽,等. 姜黄素通过 AKT/HIF-1 α /VEGF 信号通路在体外抑制脉络膜新生血管的机制. *国际眼科杂志* 2022; 22(4): 541-548
- 欧阳灵艺,邢怡桥. 抗 VEGF 药物在湿性年龄相关性黄斑变性中

的应用进展. 国际眼科杂志 2020; 20(1): 74-78

11 聂添情, 孟祥伟, 应宇晨, 等. 莪术醇及其衍生物的抗肿瘤活性研究进展. 中草药 2020; 51(21): 5613-5621

12 Wei W, Rasul A, Sadiqa A, et al. Curcumol: from plant roots to cancer roots. *Int J Biol Sci* 2019; 15(8): 1600-1609

13 Li S, Zhou GR, Liu W, et al. Curcumol inhibits lung adenocarcinoma growth and metastasis via inactivation of PI3K/AKT and Wnt/-catenin pathway. *Oncol Res* 2021; 28(7): 685-700

14 Ning N, Liu SL, Liu XH, et al. Curcumol inhibits the proliferation and metastasis of melanoma via the miR-152-3p/PI3K/AKT and ERK/NF- κ B signaling pathways. *J Cancer* 2020; 11(7): 1679-1692

15 Sheng W, Xu WJ, Ding J, et al. Curcumol inhibits the malignant progression of prostate cancer and regulates the PDK1/AKT/mTOR pathway by targeting miR9. *Oncol Rep* 2021; 46(5): 246

16 Yang X, Wang ZM, Kai J, et al. Curcumol attenuates liver sinusoidal endothelial cell angiogenesis via regulating Glis-PROX1-HIF-1 α in liver fibrosis. *Cell Prolif* 2020; 53(3): e12762

17 Gao LY, Yang X, Liang BY, et al. Autophagy-induced p62 accumulation is required for curcumol to regulate KLF5-mediated angiogenesis in liver sinusoidal endothelial cells. *Toxicology* 2021;

452; 152707

18 唐虹, 彭辉灿, 程启琳, 等. 莪术油对高糖下视网膜血管内皮细胞增殖及 VEGF 表达的影响. 国际眼科杂志 2012; 12(12): 2268-2271

19 Makin RD, Apicella I, Nagasaka Y, et al. RF/6A chorioretinal cells do not display key endothelial phenotypes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2018; 59(15): 5795-5802

20 Lee SHS, Chang H, Kim JH, et al. Inhibition of mTOR via an AAV-delivered shRNA tested in a rat OIR model as a potential antiangiogenic gene therapy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2020; 61(2): 45

21 Ma J, Sun Y, López FJ, et al. Blockage of PI3K/mTOR pathways inhibits laser-induced choroidal neovascularization and improves outcomes relative to VEGF-A suppression alone. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2016; 57(7): 3138-3144

22 Xia WY, Li C, Chen QJ, et al. Intravenous route to choroidal neovascularization by macrophage-disguised nanocarriers for mTOR modulation. *Acta Pharm Sin B* 2022; 12(5): 2506-2521

23 Sasore T, Kennedy B. Deciphering combinations of PI3K/AKT/mTOR pathway drugs augmenting anti-angiogenic efficacy *in vivo*. *PLoS One* 2014; 9(8): e105280