

柚皮铜配合物对激光诱发大鼠脉络膜新生血管形成的抑制作用

邵雁¹, 杭丽², 于海涛⁴, 杨学文³, 丁淑华², 徐新荣²

基金项目:江苏省中医药领军人才培养工程资助项目(No. LJ200911);江苏省中医药局2011-2012年度资助项目(No. LZ11041)

作者单位:¹(210029)中国江苏省南京市,南京中医药大学;
(210029)中国江苏省南京市,南京中医药大学附属江苏省中医院²眼科;³检验科;⁴(210029)中国江苏省南京市,南京中医药大学药学院

作者简介:邵雁,在读硕士研究生,研究方向:眼底病。

通讯作者:徐新荣,博士,主任医师,硕士研究生导师,研究方向:眼底病. xinrong_xu@aliyun.com

收稿日期:2013-09-02 修回日期:2013-12-12

Inhibitory effects of naringenin and its complex of copper (II) with free ligand on formation of choroidal neovascularization in rats induced by laser

Yan Shao¹, Li Hang², Hai-Tao Yu⁴, Xue-Wen Yang³, Shu-Hua Ding², Xin-Rong Xu²

Foundation items: Research Program for TCM Leading Talents of Jiangsu Province(No. LJ200911); 2011-2012 Administration of TCM of Jiangsu Province Research Program(No. LZ11041)

¹Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China; ²Department of Ophthalmology; ³Clinical Laboratory, Jiangsu Province Hospital of TCM, Affiliated Hospital of Nanjing University of TCM, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China; ⁴College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Xin-Rong Xu. Department of Ophthalmology, Jiangsu Province Hospital of TCM, Affiliated Hospital of Nanjing University of TCM, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. xinrong_xu@aliyun.com

Received: 2013-09-02 Accepted: 2013-12-12

Abstract

• AIM: To observe the inhibitory effects of formation of choroidal neovascularization (CNV) in rats induced by laser by naringenin and complex of copper (II) with free ligand.

• METHODS: A total of 24 male Brown-Norway rats were selected including 18 rats as CNV model and 6 as normal comparison. A total of 18 model rats were divided randomly into control, naringenin and its complexes of copper group with 6 rats in each group. Naringenin and its complexes [20mg/(kg·d)] were given once-daily through intraperitoneal (i.p.) injection

after laser treatment for 30d in two experimental groups, respectively. Complex samples of retina, choroid membrane and sclera in each group were taken after 30d of the establishment of animal model. The sizes of CNV lesions were observed under fluorescence microscope. Samples of choroid in each group were taken. The expression of protein and mRNA of COX-2, VEGF, PI3K, MAPK, MMP-2 and MMP-9 were examined by Western blotting and RT-PCR method at 30d.

• RESULTS: The animals treated with naringenin and its complexes of copper showed significant decrease in their average CNV sizes, compared with that of the vehicle-treated animals ($P < 0.01$), especially with naringenin's and its complexes of copper group. Compared with the vehicle-treated animals, the mRNA and protein expressions of VEGF, COX-2 and so on were significantly higher than that in the model control group ($P < 0.01$). The expression of gene and protein in each experimental group both decreased when compared with model group. Except PI3K, MMP-9, the reduction degree in the naringenin and its complexes of copper group were larger than that in the single naringenin group ($P < 0.05$). The differences of reduction degree were statistically significant.

• CONCLUSION: These results indicate that the biological activity of naringenin can be enhanced by the formation of its complexes, and that complexes of naringenin have stronger inhibition effect on the formation of CNV in rats induced by laser.

• KEYWORDS: naringenin; complexes of Cu; choroidal neovascularization; COX-2

Citation: Shao Y, Hang L, Yu HT, et al. Inhibitory effects of naringenin and its complex of copper (II) with free ligand on formation of choroidal neovascularization in rats induced by laser. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2014;14(1):23-27

摘要

目的:观察柚皮铜配合物对激光诱发大鼠脉络膜新生血管形成的抑制作用。

方法:选取雄性Brown-Norway大鼠24只,其中18只建立大鼠脉络膜新生血管模型,6只12眼作正常对照。动物模型随机分为模型对照组和2个不同给药实验组,每组6只。模型建立后,实验组大鼠腹腔注射同等剂量的柚皮素、柚皮铜配合物[20mg/(kg·d)],对照组不给药。于造模后30d取各组视网膜-脉络膜-巩膜复合体标本,在荧光显微镜下观察脉络膜新生血管的面积,采集各组大鼠的脉络膜标本,采用RT-PCR及Western blot方法检测各

组大鼠脉络膜组织中 VEGF、COX-2、PI3K、MAPK、MMP-2、MMP-9 mRNA 与蛋白的表达。

结果:与模型对照组相比,各实验组大鼠新生血管面积均减少,但柚皮铜配合物组较柚皮素组更明显,差异均具有显著统计学意义($P<0.01$);模型组基因和蛋白表达水平均高于正常对照组,差异均有统计学意义($P<0.01$);各实验组基因及蛋白表达水平与模型组相比均有所下降,除 PI3K、MMP-9 外,柚皮铜配合物组下降幅度大于柚皮素组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。

结论:相较于柚皮素,柚皮铜配合物有更好的生物活性,对激光诱发大鼠脉络膜新生血管的形成有更显著的抑制作用。

关键词:柚皮素;柚皮铜配合物;脉络膜新生血管;COX-2
DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2014.01.06

引用:邵雁,杭丽,于海涛,等.柚皮铜配合物对激光诱发大鼠脉络膜新生血管形成的抑制作用.国际眼科杂志 2014;14(1):23-27

0 引言

脉络膜新生血管(choroidal neovascularization, CNV)是来自于脉络膜血管的增殖性改变,常见于湿性年龄相关性黄斑变性(wet age-related macular degeneration, AMD)。CNV 可严重影响患者的视功能,因其常发生于黄斑区,可引起反复出血、渗出。CNV 的发生和发展是一个极为复杂的过程,其涉及了多种细胞因子、炎症介质及多条信号通路^[1]。我们研究对血管生成及炎症密切相关的因子,包括环氧化酶、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)等,已被证明能在人体和动物组织中从基因水平影响和调控 CNV。其中,与炎症关系紧密的环氧化酶-2(cyclo oxygenase-2, COX-2)在 CNV 的发生发展中起着至关重要的作用^[2-3]。有研究表明,COX-2 基因敲除小鼠表现出可显著减少激光诱导 CNV 的形成,考虑可能与 VEGF 的表达降低有关^[4]。磷脂酰肌醇-3 羟基激酶(phospho inositide 3 kinase, PI3K)/AKT 及丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路均可调节许多细胞功能,基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)的活化亦被证实与早期 AMD 相关^[5]。我们以建立激光大鼠模型为依据,以形态学的方法观察造模后新生血管的变化,采用 Real Time-PCR 及 Western blot 检测相关基因、蛋白在 CNV 中的表达情况,以揭示基因及蛋白表达与 CNV 之间的关系,并为临床治疗 CNV 提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 Real Time-PCR 主要试剂与仪器 RT buffer, dNTP Mix, RT Random Primers, Multiscribe Reverse Transcriptase, RNase inhibitor, Nuclease-free H₂O (Life technologies 公司),引物(大鼠来源,life technologies 公司)。

1.1.2 Western blot 主要试剂与仪器 Protease Inhibitor Cocktail (Thermo, Prod#78410), β -actin (Cell Signaling β -actin, 货号 8H10D10), COX-2 (Cell Signaling COX2, 货号 D5H5), VEGF (R&D, 货号 AF564-100ug), MAPK (Cell Signaling, 货号 p38 MAPK (D13E1)), PI3K (Santa cruz, 货号 pi3-kinase p85 α (b-9)sc1637), MMP-2 (SIGMA, 货号 AV33090-100ug), MMP-9 (SIGMA, 货号 AV20016-

100ug), Goat anti mouse HRP (Santa cruz, 货号 sc-2005), Goat anti rabbit HRP (Santa cruz, 货号 sc-2030), Donkey anti goat HRP (Santa cruz, 货号 sc-2020), Bio-Rad Mini-protein Tetra 小型垂直电泳系统, pvdF 膜 (GE health RPN303F)。

1.1.3 脉络膜铺片荧光显微镜观察主要试剂与仪器 异硫氰酸葡聚糖(FITC-D, 购自美国 Sigma 公司), 40g/L 多聚甲醛、无水乙醇、二甲苯(本院病理科), OLYMPUS BX51 荧光显微镜(本院检验科)。

1.2 方法 造模:健康雄性 Brown-Norway 大鼠(北京维通利华公司), 体质量 150~180g, 采用氮黄激光, 距视盘 2~4 盘径, 围绕视盘在视网膜大血管间光凝 8 个点, 看到 Bruch 膜被击破后产生小气泡为合格光凝点, 有视网膜、脉络膜或玻璃体出血者剔除。实验大鼠均在室温恒定(21℃)下普通喂养, 自由进食、进水。动物分组:模型对照组 6 只(激光)、柚皮素对照组 6 只(激光+柚皮素)、柚皮铜配合物组 6 只(激光+柚皮铜配合物)、正常对照组 6 只(不作处理)。柚皮铜配合物制备及给药方法:柚皮素(CAS:67604-48-2, 纯度>98%), 为北京百灵威科技有限公司产品。其他试剂为分析纯。柚皮铜配合物的合成:柚皮素 272mg 溶于 4mL 甲醇, 一水合醋酸铜溶于 25mL 甲醇, 将醋酸铜甲醇溶液缓慢加入柚皮素的甲醇溶液, 立刻出现浅绿色不溶物, 在室温搅拌 4h 后, 离心分离, 用甲醇和水分别洗涤沉淀, 真空干燥 48h。柚皮素、柚皮铜配合物均用腹腔注射法给药, 溶剂为二甲基亚砜(DMSO), 20mg/(kg·d), 1 次/d, 持续 1mo。

1.2.1 脉络膜铺片荧光显微镜观察 观察期满, 实验动物(每组 2 只)进行异硫氰酸葡聚糖(FITC-D)100mg 溶于 1mL 的磷酸盐缓冲液(PBS)中舌下静脉灌注(0.2mL/只)。灌注结束 30min 后摘除大鼠眼球固定于 40g/L 多聚甲醛溶液中 1h, 显微镜下沿赤道部打开眼球, 去除前节, 揭除视网膜神经层, 获得视网膜色素上皮-脉络膜-巩膜复合体标本, 以视神经为中心, 放射状剪开标本, 乙醇脱水、二甲苯透明后, 将 RPE 面向下置于盖玻片上, 封片、烤片。标本置于荧光显微镜 40 倍光镜下观察、拍片及图像分析。

1.2.2 Real time-PCR 各组取眼球 4 只, 提取视网膜、脉络膜总 RNA(按 PURELINK RNA MINI KIT 说明书进行), 对组织匀浆液进行总 RNA 的快速抽提, 最后用 RNase-Free 超纯水 150 μ L 溶解 RNA, 测 RNA 浓度, 每 20 μ L 反转录体系中加入 1 μ g 总 RNA 进行反应, 测 cDNA 浓度, PCR 扩增以 cDNA 为模板, 以 β -actin 为内参基因。引物序列见表 1。

配制反应体系后进行实时定量 PCR。反应程序为:50℃ 2min 激活 UNG 酶去除残余的产物污染, 95℃ 10min 扩增, 95℃ 15s 变性, 60℃ 1min 退火及延伸, 重复 40 个循环, 每个循环结束后采集荧光信号, 最后绘制溶解曲线。所有标本检测均重复 3 次。用标准曲线的相对定量法进行结果计算。

1.2.3 Western blotting 各组取眼球 4 只, 每 100mg 脉络膜组织中加入 1mL PBS, 匀浆器研磨均匀提取总蛋白; 取 50 μ g 蛋白行 SDS-PAGE 分离蛋白, 将蛋白质转移至甲醇激活的 PVDF 膜, 100g/L 脱脂奶室温封闭 2h, 一抗 4℃ 反应过夜, TBST 漂洗 3 次, 5min/次; 加入相应的二抗, 37℃ 下反应 1h 后, 用 TBST 漂洗 3 次, 5min/次; 进行化学发光反应、显影、定影。以等量的 β -actin 蛋白质作对照,

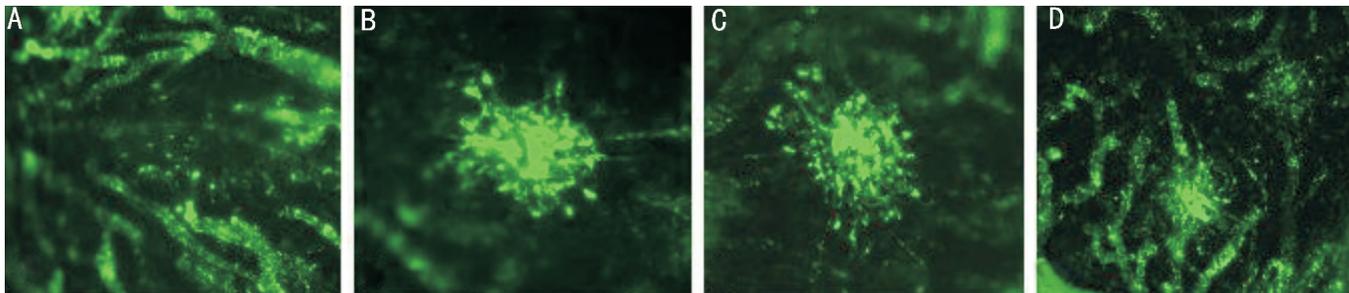


图1 脉络膜铺片结果(×40) A:正常对照组;B:模型对照组;C:柚皮素组;D:柚皮铜配合物组。

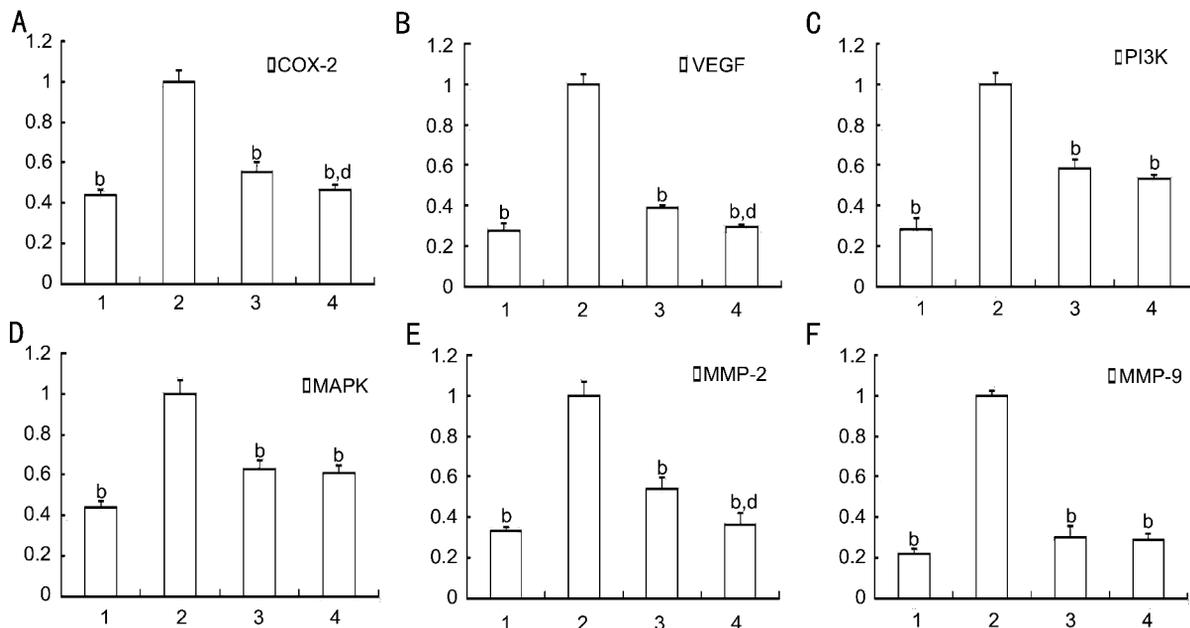


图2 VEGF,COX-2,PI3K,MAPK,MMP-2,MMP-9的mRNA表达RT-PCR检测结果 A:COX-2;B:VEGF;C:PI3K;D:MAPK;E:MMP-2;F:MMP-9。注:1为正常对照组,2为模型对照组,3为柚皮素组,4为柚皮铜配合物组;^b $P < 0.01$ vs 模型对照组;^d $P < 0.01$ vs 柚皮素组。

表1 引物序列

成份	引物序列
β -actin-f	5'-CCCATCTATGAGGGTTACGC-3'
β -actin-r	5'-TTTAATGTCAACGACGATTTTC-3'
cox2-f	5'-TACGAAGACCCTGCCTAGCA-3'
cox2-r	5'-GTTGGTGGCAAGTGAAGCTG-3'
VEGF-f	5'-CTTGCAGATGTGACAAGCCAAG-3'
VEGF-r	5'-GGTGTGGTGTGACATGGTTA-3'
PI3K-f	5'-CAGCACCTCGTATGGCTCAAT-3'
PI3K-r	5'-GTCCTCACTCTTGATCCCCAG-3'
MMP2-f	5'-CCGTTATGAGACCCTGAGCC-3'
MMP2-r	5'-CAGACCAATCGTGCCTCCAT-3'
MMP9-f	5'-CGGATCCCCAACCTTTACC-3'
MMP9-r	5'-AGCCAGCTGAGTTCAATCCC-3'
P38 MAPK-f	5'-GTTGTCCTCCCTCCTCGTTC-3'
P38 MAPK-r	5'-GTTACCGCTCGACTTGTGCT-3'

将胶片进行扫描,每个样本重复3次。用Quantity One凝胶图像处理系统进行结果分析。

统计学分析:采用SPSS 15.0统计软件,多组样本均数比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般结果 所有实验动物均正常存活,且无眼部感染及其他并发症。

2.2 脉络膜铺片荧光显微镜观察 正常对照组荧光显示自视盘发出的大血管向四周呈放射状均匀分布,直至视网膜周边部。造模动物表现大血管显著扩张,局部无灌注区,新生血管形成。我们的研究得到的CNV面积:模型对照组为 $(34.56 \pm 1.76) \times 103 \mu\text{m}^2$,柚皮素组为 $(20.90 \pm 1.47) \times 103 \mu\text{m}^2$,柚皮铜配合物组为 $(13 \pm 1.43) \times 103 \mu\text{m}^2$ 。与模型组相比,柚皮素和柚皮铜配合物组CNV面积均显著变小(图1)。三组相比,差异有统计学意义($P < 0.01$)。其中,模型组分别与柚皮素组、柚皮铜配合物组相比,差异均有统计学意义($P < 0.01$),说明柚皮素及柚皮铜配合物可明显减少CNV面积,对CNV有一定的抑制作用。柚皮素组与柚皮铜配合物组相比差异有统计学意义($P < 0.01$),说明柚皮铜组抑制CNV作用优于柚皮素组。

2.3 VEGF, COX-2, PI3K, MAPK, MMP-2, MMP-9 mRNA的表达 COX-2, VEGF, PI3K, MAPK, MMP-2, MMP-9 mRNA表达的检测结果见图2。单因素方差分析的结果显示各基因表达模型组与正常组相比差异均具有统计学意义($P < 0.01$),故进一步两两比较。在COX-2, VEGF, PI3K, MAPK, MMP-2, MMP-9 mRNA中,柚皮素、柚

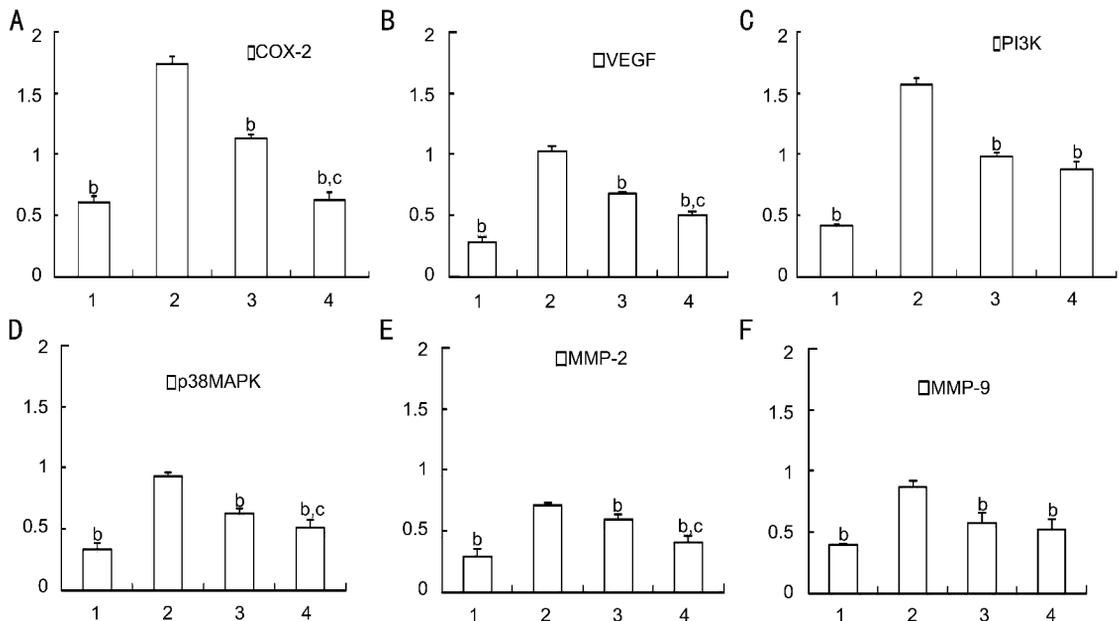


图3 COX-2, VEGF, PI3K, MAPK, MMP-2, MMP-9 蛋白表达的 Western blot 检测结果 A: COX-2; B: VEGF; C: PI3K; D: MAPK; E: MMP-2; F: MMP-9。注: 1 为正常对照组, 2 为模型对照组, 3 为柚皮素组, 4 为柚皮铜配合物组; ^b $P < 0.01$ vs 模型对照组; ^c $P < 0.05$ vs 柚皮素组。

皮铜配合物组与模型组之间差异均有显著统计学意义 ($P < 0.01$), 且柚皮素、柚皮铜配合物组基因表达均接近正常组。柚皮铜配合物组各基因表达均稍低于柚皮素组, 除 PI3K, MAPK, MMP-9 mRNA 外, 其余基因在柚皮素组与柚皮铜配合物组间差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。

2.4 VEGF, COX-2, PI3K, MAPK, MMP-2, MMP-9 蛋白的表达 COX-2, VEGF, PI3K, MAPK, MMP-2, MMP-9 蛋白表达的 Western blot 检测结果见图 3, 4。模型对照组 VEGF、COX-2、PI3K、MAPK、MMP-2、MMP-9 的蛋白表达均高于正常对照组, 组间差异均具有统计学意义 ($P < 0.01$); 柚皮素、柚皮铜配合物组蛋白表达均明显低于模型对照组, 分别与模型组相比, 差异均具有显著统计学意义 ($P < 0.01$)。柚皮铜配合物组各蛋白表达均低于柚皮素组, 除 PI3K, MMP-9 外, 柚皮铜配合物组与柚皮素组蛋白表达差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。

3 讨论

本实验动物采用了成熟的激光造模技术, 是通过对视网膜和脉络膜产生热效应造成 Bruch 膜破坏, 从而使其在炎症修复过程中产生新生血管^[6]。FITC-D 作为一种大分子的造影剂, 能充盈脉络膜大血管而少有渗漏, 通过脉络膜铺片技术, 我们观察到了正常脉络膜大血管及 CNV 的形态, 研究初步显示了组间形态学上的差异。

柚皮素是中草药枳实、枳壳的主要有效成分, 属天然黄酮类药物, 具有抗炎、抗氧化和改善组织血流的作用。我们的前期研究显示, 柚皮素能改善脉络膜血流, 抑制 COX-2、iNOS 的表达, 从而下调 VEGF 表达, 抑制 CNV 形成^[7]。铜在生物体内有清除自由基的作用, 参与构成铜锌-超氧化物歧化酶 (CuZn-SOD), 是许多金属酶的辅助因子, 在动物机体的抗氧化反应中发挥着重要的作用。研究显示, 铜元素的抗氧化作用, 对 AMD 的防治有意义^[8]。现代研究证实, 中药有效化学成分既不单纯是有机分子, 也不单纯是微量元素, 而主要是由两者组成的配位化合物, 其药理活性比单独使用某种元素或有机成分更强。汉黄芩素铜、钴、镍配合物较汉黄芩素有较高的抑菌活性, 其中

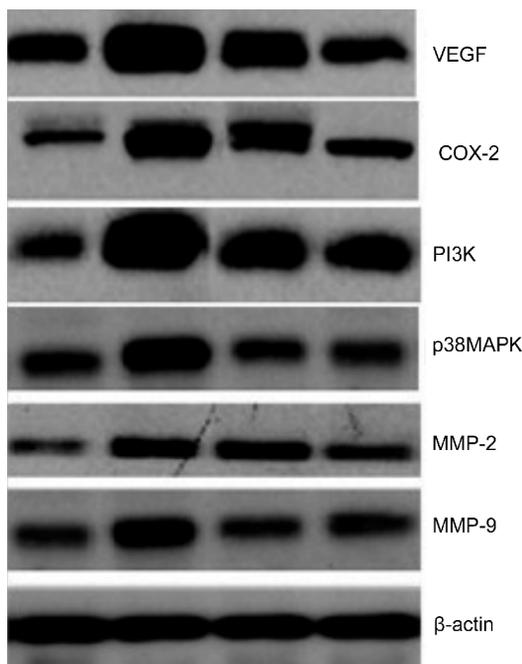


图4 VEGF, COX-2, PI3K, MAPK, MMP-2, MMP-9 蛋白表达 Western blot 检测结果。

铜配合物最强^[9]。杨正银等合成了柚皮素与 Cu, Zn, Ni 过渡金属离子的配合物, 但都未得到晶体结构^[10]。我们前期的研究已合成了柚皮铜配合物, 并对该产物进行了结构鉴定、表征, 确定了其组成、配位方式及物理化学性质。在预实验中, 相较于柚皮素, 柚皮铜配合物有更好的生物活性。

本研究结果表明, 柚皮铜配合物抑制 CNV 形成显著体现于基因转录水平及蛋白表达水平。COX-2 作为一种诱导型酶, 在生理状态下多数组织内检测不到, 只有激素、生长因子、炎性因子和细胞因子等可诱导其表达, 其可催化从膜结合的花生四烯酸产生类二十烷酸, 转化为前列腺素 (PGD₂, PGE₂, PGF₂), 前列环素 (PGI₂) 和血栓素 (TXA₂) 等, COX-2 的生物学功能通过这几种活性分子实

现。有研究显示,局部使用酮咯酸可通过抑制视网膜 PGE₂ 和 VEGF 的表达而显著抑制 CNV,该研究体现了在 CNV 形成中环氧化酶和前列腺素的作用^[11]。COX-2 与新生血管的生成密切相关,且可调节 VEGF 的表达。有研究采用 COX-2 基因缺乏的大鼠 Müller 细胞证实 COX-2 和至少一个前列腺素类产物参与 VEGF 的生成^[12]。基于 VEGF 的抑制剂,不仅抑制可实验 CNV 的增长,但也能抑制相关的炎症和纤维化反应^[13]。PI3K 信号通路可调节许多细胞功能,其包括细胞增殖、分化、翻译、运动和凋亡。其中,PI3K/AKT 通路是 PI3K 主要介导的下游信号传递途径。MAPK 是生物体内重要的信号转导系统之一,参与介导生长、发育、分裂、分化、死亡以及细胞间的功能同步等多种细胞过程。其中 P38 是 MAPK 家族控制炎症反应最重要的通路,在细胞增殖、分化和凋亡中均起重要作用。COX-2 可通过 PI3K/AKT 信号通路或 P38MAPK 途径参与细胞凋亡。COX-2 定位在细胞内质网和核膜,通过催化细胞产生 PGE₂,使核内信号转导通路 MAPK 活化蛋白水平增加 4~5 倍,抑制细胞的凋亡。COX-2 能够活化丝氨酸-苏氨酸激酶,从而激活 AKT 信号转导通路,celecoxib 能够呈剂量依赖性地抑制血管内皮祖细胞(endothelial progenitor cell, EPC)中 AKT 的磷酸化,促使 EPC 的凋亡^[14]。研究显示,在 ROP 或巨细胞病毒动物模型中 Brimonidine 对视网膜和脉络膜新生血管有效可能是通过抑制缺血激活途径,此途径涉及 PI3K/Akt 信号转导通路激活诱导缺氧诱导因子(HIF)-1 及 VEGF 的表达^[15]。多研究结果显示,COX-2 可调控 MMPs 介导的内皮细胞移行。MMPs 是一组属于 Zn²⁺ 依赖的中性蛋白酶,大量实验研究表明,MMPs 在某些神经细胞和炎性细胞中大量表达或活性异常增高,从而引起血脑屏障破坏、炎性细胞浸润、髓鞘降解、神经元以及轴索损伤等。其中参与基质降解及促进内皮细胞移行的关键酶有 MMP-2 和 MMP-9,其已被证明作为 CNV 的形成和发展的不可缺少的要素^[16]。研究表明,雷公藤红素可通过改变细胞外基质降解来阻止血管生成和发展,在基因和蛋白水平下调 MMP-9,通过降低角膜 VEGF 和 MMP-9 表达来抑制 CNV^[17]。上述研究结果均证实 COX-2 在一定程度上可调控 VEGF, PI3K, MAPK, MMP-2, MMP-9 基因及蛋白的表达。

本研究中 VEGF, COX-2, PI3K, MAPK, MMP-2, MMP-9 基因及蛋白在正常组中均有所表达,但模型组表达明显高于正常组,表明局部激光可增加 VEGF, COX-2, PI3K, MAPK, MMP-2, MMP-9 mRNA 转录和蛋白合成,考虑可能机制为热损伤导致 Bruch 膜破坏,组织缺血缺氧、细胞损伤,诱导 COX-2 及 VEGF 表达,从而促使血管内皮细胞移行,PI3K/AKT 通路及 MAPK 通路激活。结果显示,从基因转录及蛋白表达水平而言,柚皮素与柚皮铜配合物组表达比模型组均显著下调,但柚皮铜配合物组更接近正常对照组的表达,故可初步认为柚皮铜配合物有较好的生物活性。柚皮铜配合物组脉络膜铺片 CNV 面积最小,COX-2 在基因及蛋白表达上均接近于正常组,故我们认为柚皮铜配合物可显著抑制 CNV,考虑机制为下 COX-2。我们的研究初步认为柚皮铜配合物与柚皮素作用一致对 CNV 有一定的抑制作用,但柚皮铜配合物对 CNV 的抑制作用效果较好,机制可能为铜离子增加了柚皮素的生物活性。

综上所述,柚皮铜配合物对实验性大鼠 CNV 中 COX-2 高表达存在良性影响,并能有效的干预,从而起到抑制 CNV 的形成、改善眼底状态、保护视网膜组织的作用。本

实验可初步证实,不管在宏观还是微观方面,柚皮铜配合物对 CNV 的抑制作用均强于柚皮素。CNV 作为一种累及黄斑区的致盲性疾病,目前西医的治疗手段效果不显且副作用大,柚皮铜配合物作为传统中药合成的配合物,有着显著的抗炎和抑制 CNV 的作用,而且中草药枳实资源丰富,在 CNV 的治疗方面有着广阔的开发前景。但其作用于 CNV 的具体有效成分及抑制 CNV 生成的机制等尚不完全明确,还有待进一步的研究。

参考文献

- 1 朱洁,王雨生,惠延年. 脉络膜新生血管的生成和抑制. 眼科新进展 2004;24(1):57-59
- 2 蔡岩,王雨生,徐建锋,等. 环氧化酶-2 和血管内皮生长因子在激光诱导的大鼠脉络膜新生血管中表达的相关性. 眼科新进展 2009;29(4):241-244
- 3 蔡岩,王雨生. 环氧化酶-2 与脉络膜新生血管. 眼科研究 2010;28(1):86-89
- 4 Rezaei KA, Toma HS, Cai J, et al. Reduced choroidal neovascular membrane formation in cyclooxygenase-2 null mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52(2):701-707
- 5 Hartnett ME, Lappas A, Darland D, et al. Retinal pigment epithelium and endothelial cell interaction causes retinal pigment epithelial barrier dysfunction via a soluble VEGF-dependent mechanism. *Exp Eye Res* 2003;77(5):593-599
- 6 Chappelov AV, Tan K, Waheed NK, et al. Panretinal photocoagulation for proliferative diabetic retinopathy: pattern scan laser versus argon laser. *Am J Ophthalmol* 2012;153(1):137-142
- 7 Ji J, Xu XR, Chiou GCY. Effects of naringin in on ocular blood flow and choroidal neovascularization in experimental animals. *Int J Ophthalmol* 2009;9(1):1-4
- 8 Jeslin Kanaga Inba P, Annaraj B, Thalamuthu S, et al. Cu(II), Ni(II), and Zn(II) Complexes of Salan-Type Ligand Containing Ester Groups; Synthesis, Characterization, Electrochemical Properties, and *In Vitro* Biological Activities. *Bioinorg Chem Appl* 2013;2013:439848
- 9 胡道道,房喻,马宁,等. 汉黄芩素与铜(II)、钴(II)、镍(II)固体配合物的合成、表征及抑菌活性研究. 陕西师大学报 1994;22(1):31-34
- 10 Wang HL, Yang ZY, Wang BD. Synthesis, characterization and the antioxidative activity of copper(II), zinc(II) and nickel(II) complexes with naringenin. *Transition Metal Chemistry* 2006;31(4):470-474
- 11 Kim SJ, Toma HS, Barnett JM, et al. Ketorolac inhibits choroidal neovascularization by suppression of retinal VEGF. *Exp Eye Res* 2010;91(4):537-543
- 12 Yanni SE, McCollum GW, Penn JS. Genetic Deletion of COX-2 Diminishes VEGF Production in Mouse Retinal Müller Cells. *Exp Eye Res* 2010;91(1):34-41
- 13 Cao J, Zhao L, Li Y, et al. A Subretinal Matrigel Rat Choroidal Neovascularization (CNV) Model and Inhibition of CNV and Associated Inflammation and Fibrosis by VEGF Trap. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51(11):6009-6017
- 14 Colleselli D, Bijuklic K, Mosheimer BA, et al. Inhibition of cyclooxygenase (COX-2) affects endothelial progenitor cell proliferation. *Exp Cell Res* 2006;312(15):2933-2941
- 15 Kusari J, Padillo E, Zhou SX, et al. Effect of Brimonidine on Retinal and Choroidal Neovascularization in a Mouse Model of Retinopathy of Prematurity and Laser-Treated Rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52(8):5424-5431
- 16 Ma DH, Chen JK, Kim WS, et al. Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitors of metalloproteinase 1 and 2 in inflammation-induced corneal neovascularization. *Ophthalmic Res* 2001;33(6):353-362.
- 17 Li Z, Yao L, Li J, et al. Celastrol nanoparticles inhibit corneal neovascularization induced by suturing in rats. *Int J Nanomedicine* 2012;7:1163-1173