

# 玻璃体腔注射熊果酸对小鼠氧诱导视网膜新生血管的抑制作用

贺玲 郑晓龙 张杰 张善峰 余晓红 田芳

**【摘要】** 背景 视网膜新生血管疾病严重影响视功能,目前虽然有较多的抗新生血管药物,但多针对单一的干预靶点,疗效有限。研究证实,熊果酸具有多种生物学效应,其中包括抗血管新生作用,但其对眼科血管疾病的疗效尚不清楚。目的 观察熊果酸对小鼠氧诱导视网膜新生血管形成的抑制作用。方法 采用随机数字表法将 7 日龄清洁级 C57BL/6J 小鼠 60 只随机分为 6 个组,即空白对照组、PBS 对照组、阳性对照组和低、中、高剂量熊果酸组。空白对照组小鼠在正常环境中饲养,其他各组小鼠与哺乳的母鼠置于体积分数(75±2)%的高氧环境中连续饲养 5 d,小鼠 12 日龄时将模型小鼠及其哺乳母鼠返回正常空气环境中,以诱导视网膜新生血管产生。造模成功后按照分组不同分别于小鼠玻璃体腔注射无菌 PBS 3 μl、曲安奈德注射液(1 ml:40 mg)3 μl 或 1.5、3.0、6.0 μg 熊果酸各 3 μl。小鼠 17 日龄时过量麻醉法处死,摘除双侧眼球制备视网膜组织切片。采用组织病理学方法检查各组小鼠视网膜血管新生情况,计数突破视网膜内界膜的新生血管内皮细胞核数目;采用逆转录 PCR (RT-PCR)法分别检测和比较各组小鼠视网膜组织中血管内皮生长因子(VEGF)mRNA、环氧合酶-2(COX-2)mRNA 及基质金属蛋白酶-2(MMP-2)mRNA 的相对表达量。结果 视网膜切片后苏木精-伊红染色显示,PBS 对照组小鼠视网膜中突破内界膜的新生血管内皮细胞核数为(18.65±3.24)个/视野,明显高于空白对照组的(0.78±0.11)个/视野,差异有统计学意义( $t=2.24, P<0.05$ );中剂量熊果酸组、高剂量熊果酸组小鼠视网膜突破内界膜的新生血管内皮细胞核数分别为(13.32±1.87)个/视野和(8.93±1.09)个/视野,明显少于 PBS 对照组和低剂量熊果酸组的(18.65±3.24)个/视野和(15.44±2.02)个/视野,差异均有统计学意义(均  $P<0.05$ ),而高剂量熊果酸组小鼠视网膜突破内界膜的新生血管内皮细胞核数与阳性对照组的(9.14±1.13)个/视野接近,差异无统计学意义( $t=1.17, P>0.05$ )。RT-PCR 检测表明,PBS 对照组小鼠视网膜组织中 COX-2 mRNA、VEGF mRNA 和 MMP-2 mRNA 相对表达量均明显高于空白对照组,差异均有统计学意义( $t=13.45、12.49、14.32$ ,均  $P<0.05$ ),且高剂量熊果酸组小鼠视网膜组织中 COX-2 mRNA、VEGF mRNA 和 MMP-2 mRNA 相对表达量均明显低于 PBS 对照组和低剂量熊果酸组,差异均有统计学意义(均  $P<0.05$ ),而高剂量熊果酸组与阳性对照组的差异均无统计学意义(均  $P>0.05$ )。结论 熊果酸以剂量依赖的方式下调氧诱导的缺血小鼠视网膜组织中 VEGF、COX-2 及 MMP-2 的表达,从而抑制视网膜新生血管的产生。

**【关键词】** 视网膜; 新生血管; 熊果酸; 环氧合酶; 血管内皮生长因子; 基质金属蛋白酶; C57BL/6J 小鼠

**Inhibitory effect of ursolic acid on high oxygen-induced mouse retinal neovascularization by intravitreal injection** He Ling, Zheng Xiaolong, Zhang Jie, Zhang Shanfeng, Yu Xiaohong, Tian Fang. Department of Ophthalmology, NO. 371 Hospital of PLA, Xinxiang 453000, China

Corresponding author: He Ling, Email: heling19711101@163.com

**[Abstract] Background** Retinal neovascular diseases affect visual function. Although many drugs have been used to manage the visual diseases, their effectiveness is less than satisfactory. Studies showed that ursolic acid has multiple biological effects including anti-vascularization. However, the effect of ursolic acid on retinal neovascular

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.01.006

基金项目:新乡市重点科技攻关计划项目(ZG12013)

作者单位:453000 新乡,解放军第三七一中心医院眼科(贺玲、郑晓龙、张杰、余晓红、田芳);450000 郑州大学基础医学院(张善峰)

通信作者:贺玲,Email: heling19711101@163.com

diseases is unclear now. **Objective** This study was to observe the inhibitory effect of ursolic acid on the high oxygen-induced mouse retinal neovascularization after intravitreal injection. **Methods** Sixty clean 7-day-old C57BL/6J mice were divided into the blank control group, PBS control group, positive control group (triamcinolone) and low, moderate and high dose (1.5, 3.0 and 6.0  $\mu\text{g}$ ) ursolic acid groups randomly. The blank control group mice were raised in normal environment, and the mice from other groups were fed in the environment with  $\text{O}_2$  concentration at  $(75\pm 2)\%$  for 5 days together with the maternal mice. The mice then were back to the normal air environment to induce retinal neovascularization. Then, the drugs were intravitreally immediately injected in the mice of the different groups. The mice were sacrificed at the 17-day old for the preparation of retinal sections. Retinal new blood vessel was examined by haematoxylin and eosin stain under the light microscope, and the number of vascular endothelial cell nucleus breaking the inner limiting membrane was counted. The gene expressions of vascular endothelial growth factor (VEGF), cyclooxygenase-2 (COX-2) and matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in the mouse retinas were quantitatively assayed using reverse transcription PCR. **Results** The number of endothelial nuclei newly-generated vessel breaking internal limiting membrane in the mice of PBS control group was  $(18.65\pm 3.24)/\text{field}$ , which was more than  $(0.78\pm 0.11)/\text{field}$  of the blank control group obviously ( $t=2.24, P<0.05$ ). The number of endothelial nuclei newly-generated breaking internal limiting membrane in the moderate- or high-dose ursolic acid group was less than that of moderate group obviously, it was statistically significant ( $P<0.05$ ). The number of vascular endothelial cell nuclei breaking internal limiting membrane in high high-dose group was  $(13.32\pm 1.87)/\text{field}$  and  $(8.93\pm 1.09)/\text{field}$ , showing significant decreases in comparison with the PBS control group and low-dose ursolic acid group  $(18.65\pm 3.24)/\text{field}$   $(15.44\pm 2.02)/\text{field}$  (all at  $P<0.05$ ). However, no significant difference were seen in the number of new vascular endothelial cell nucleus between the high-dose ursolic acid group and the positive control group  $(9.14\pm 1.13)/\text{field}$  ( $t=1.17, P>0.05$ ). The relative expressions of COX-2 mRNA, VEGF mRNA and MMP-2 mRNA in the mouse retinas were higher in the PBS control group than those in the blank control group ( $t=13.45, 12.49, 14.32$ , all at  $P<0.05$ ), and those in the moderate-dose or high-dose ursolic acid group were lowed in comparison with the PBS control group and the low-dose ursolic acid group (all at  $P<0.05$ ), but there were no significant differences between the high-dose ursolic acid group and the positive control group (all at  $P>0.05$ ). **Conclusions** Ursolic acid can suppress retinal neovascularization by down-regulating the expressions of VEGF, COX-2 and MMP-2 in oxygen-induced retinopathy of mouse in dose-dependent manner.

[**Key words**] Retina; Neovascularization; Ursolic acid; Cyclooxygenase; Vascular endothelial growth factor; Matrix metalloproteinase; Mouse, C57BL/6J

视网膜血管性疾病包括糖尿病视网膜病变、年龄相关性黄斑变性、视网膜静脉阻塞、视网膜静脉周围炎以及早产儿视网膜病变等,其主要病理改变是视网膜新生血管形成或出血,造成视功能异常,严重影响患者的生活质量。对视网膜血管性疾病进行病情监测,及时发现病情进展情况并进行干预,减少新生血管的产生,挽救患者的视功能显得尤为重要。熊果酸是中草药提取物,对多种恶性肿瘤细胞的生长具有抑制作用,可通过多种途径,主要是通过抑制促新生血管形成因子的作用而抑制血管内皮细胞的增生<sup>[1-2]</sup>,但熊果酸是否对眼科新生血管性疾病有治疗作用鲜有研究进行证实。本实验探讨熊果酸对氧诱导的视网膜缺氧小鼠模型中视网膜新生血管的作用及其作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 主要试剂及仪器 熊果酸(美国 Sigma 公司);

醋酸曲安奈德注射液(昆明积大制药有限公司);血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)、基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2)抗体(北京博奥森生物技术有限公司);Trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司);逆转录 PCR(reverse transcription PCR, RT-PCR)试剂盒(加拿大 Fermentas 公司);免疫印迹实验试剂(上海碧云天生物公司)。自制动物实验舱;测氧仪(上海精密仪器厂)。

1.1.2 实验动物及分组 60 只清洁级健康 7 日龄 C57BL/6J 小鼠,雌雄不限,体质量  $(4.69\pm 0.68)\text{g}$ 。实验动物购于河南省实验动物中心。于造模前 3 d 给予实验小鼠质量分数 0.25% 氯霉素滴眼液点眼,每天 3 次。检查所有小鼠双眼附属器和眼前段,排除眼部病变。采用随机数字表法将 60 只小鼠随机分为空白对照组、PBS 对照组(模型对照组)、低剂量熊果酸组、中剂量熊果酸组、高剂量熊果酸组和阳性对照组,每组

10 只小鼠 20 只眼。

## 1.2 方法

**1.2.1 动物模型的建立** PBS 对照组、低剂量熊果酸组、中剂量熊果酸组、高剂量熊果酸组和阳性对照组共 50 只 C57BL/6J 小鼠及其哺乳母鼠(每组 2 只哺乳母鼠)放至连接测氧仪的动物实验舱中,舱内 O<sub>2</sub> 体积分数稳定在 (75±2)% ,温度为 (23±2)℃ ,湿度为 (55±2)% ,每日光照 12 h。待小鼠 12 日龄时将小鼠及其哺乳母鼠返回正常环境饲养 5 d。空白对照组小鼠始终在正常环境中饲养。

**1.2.2 药物干预及取材** 各组立即(12 日龄)给予相应的干预措施。PBS 对照组小鼠玻璃体腔注射 PBS 3 μl;阳性对照组小鼠玻璃体腔注射醋酸曲安奈德注射液 3 μl;不同剂量熊果酸组小鼠分别在玻璃体腔注射 1.5、3.0、6.0 μg 熊果酸,各 3 μl。待小鼠 17 日龄时采用过量乙醚麻醉法处死小鼠,摘除小鼠一侧眼球,立即浸泡于质量分数 4% 多聚甲醛溶液中固定,以备视网膜组织病理学观察。同法摘除对侧眼球,于无菌条件下行视网膜组织取材,立即于液氮中保存,用 RT-PCR 法检测小鼠视网膜组织中 VEGF、COX-2 及 MMP-2 mRNA 的表达。

**1.2.3 视网膜组织的组织病理学观察** 固定的眼球标本常规脱水、透明、浸蜡,石蜡包埋,4 μm 厚连续切片,每组小鼠任意选取 20 张切片行苏木精-伊红染色,每组任意选取 10 张切片于 400 倍光学显微镜下观察小鼠视网膜新生血管的形态学变化,并计数突破视网膜内界膜的血管内皮细胞核数目,仅计数与内界膜有联系的血管内皮细胞核。

**1.2.4 RT-PCR 测定视网膜组织中 VEGF、COX-2、MMP-2 mRNA 的相对表达量** 按照试剂盒说明提取视网膜组织中总 RNA,将 RNA 逆转录成 cDNA,反应程序为 42℃ 孵育 50 min,95℃ 加热 5 min,然后进行 PCR 扩增。VEGF 上游引物为 5'-TCTCGCTCCGTAGT AGCCGTGGTC-3',下游引物为 5'-TCTCCTCTTCCTTC CTCCCCTCT-3';COX-2 上游引物为 5'-ATTACTGCTG AAGCCACC-3',下游引物为 5'-CTCCACCAATGACC TGATA-3';MMP-2 上游引物为 5'-CGTCCTGTGCTGC CTGTTGG-3',下游引物为 5'-GCATCTTCTTGAGGAT ATCTTTC-3';GAPDH 上游引物为 5'-ACCACAGTCCA TGCCATCA-3',下游引物为 5'-GGTCCTCAGTGTAGC CCAAG-3'。反应程序:94℃ 预变性 10 min,94℃ 变性 1 min,55℃ 退火 1 min,72℃ 延伸 1 min,循环 35 次,72℃ 再延伸 15 min。取 PCR 产物 5 μl,质量分数 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,80 V 电泳 40 min,溴化乙锭染

色,凝胶成像仪成像并用 Quantity One 软件进行灰度分析,以基因产物与内参 GAPDH 的灰度比值作为目的基因 mRNA 的表达值。

## 1.3 统计学方法

采用 SPSS 10.0 统计学软件进行统计分析。本研究计量指标的数据资料经 W 检验证实呈正态性分布,以  $\bar{x} \pm s$  表示。采用完全随机分组单因素干预多水平实验设计,空白对照组、PBS 对照组、阳性对照组和低、中、高剂量熊果酸组间小鼠视网膜中突破内界膜的新生血管数目的差异比较、各组间小鼠视网膜中 VEGF mRNA、COX-2 mRNA 及 MMP-2 mRNA 相对表达量的差异比较均采用单因素方差分析,组间的多重比较采用 LSD-t 检验。采用双尾检测法,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组小鼠视网膜组织切片中新生血管的生长情况

**2.1.1 视网膜新生血管的形态学表现** 光学显微镜下空白对照组小鼠视网膜内界膜平整,少有血管内皮细胞核突入玻璃体腔,未发现与内界膜相连的伸入到玻璃体腔中的新生血管。PBS 对照组小鼠视网膜中可见较多突破内界膜的血管内皮细胞核,或单独出现,或成簇出现,并可见视网膜内界膜下的细胞增生,排列紊乱。不同剂量熊果酸组小鼠视网膜可见少数突破内界膜的血管内皮细胞核,与 PBS 对照组相比,低剂量熊果酸组小鼠视网膜中突破内界膜的血管内皮细胞核数目稍减少,可见新生血管腔形成,视网膜内界膜欠平整;中剂量熊果酸组可见突破内界膜血管内皮细胞核数目较低剂量熊果酸组减少,仍可见新生血管腔形成;而高剂量熊果酸组小鼠视网膜内界膜结构清晰,突破内界膜的血管内皮细胞核数目明显减少,仅见少量的新生血管内皮细胞(图 1)。

**2.1.2 各组小鼠视网膜突破内界膜的血管内皮细胞核数比较** 空白对照组、PBS 对照组、阳性对照组及高、中、低剂量熊果酸组小鼠突破视网膜内界膜的血管内皮细胞核数总体差异有统计学意义 ( $F = 192.970$ ,  $P = 0.001$ )。PBS 对照组小鼠视网膜中突破内界膜的血管内皮细胞核数目明显多于空白对照组,差异有统计意义 ( $t = 2.24$ ,  $P < 0.05$ );高剂量熊果酸组小鼠视网膜中突破内界膜的血管内皮细胞核数与阳性对照组相比差异无统计学意义 ( $t = 1.17$ ,  $P > 0.05$ );与 PBS 对照组相比,高剂量熊果酸组、中剂量熊果酸组小鼠突破视网膜内界膜的血管内皮细胞核数目显著降低,差异均有统计学意义 ( $t = 8.99, 4.55$ , 均  $P < 0.05$ ),同时均低于低剂量组(均  $P < 0.05$ )(表 1)。



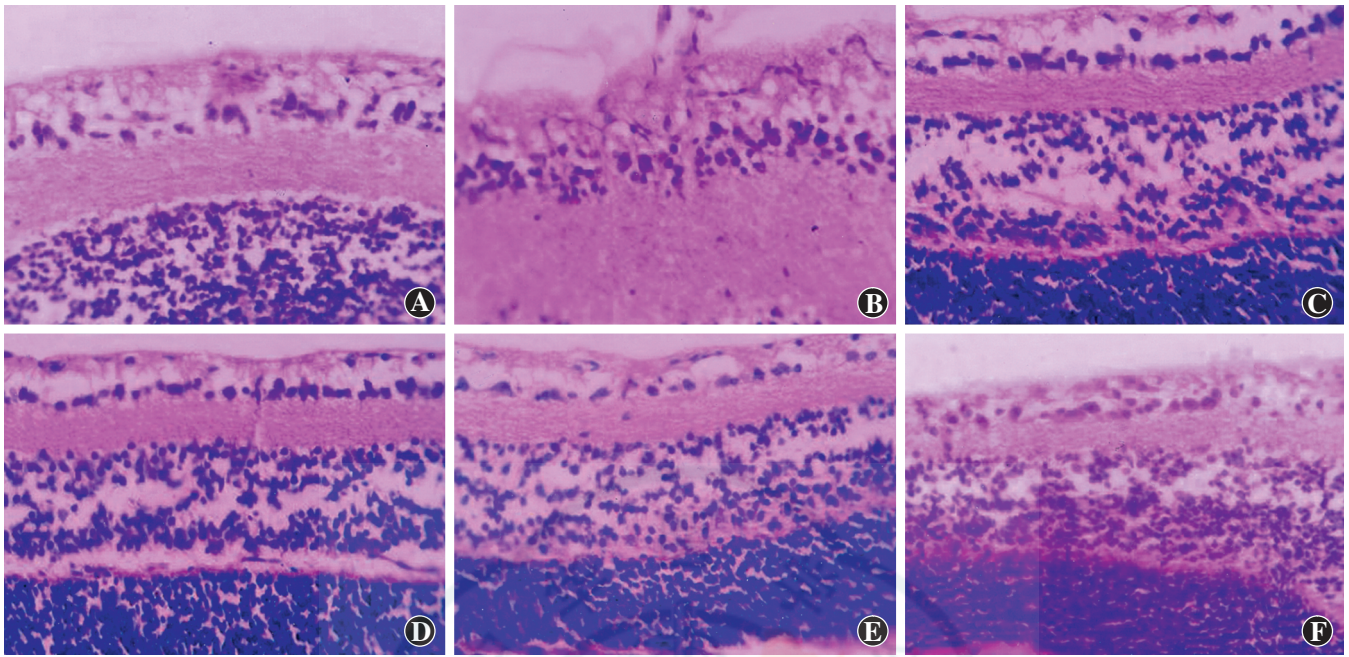


图 1 各组小鼠视网膜组织切片中新生血管生长情况 (HE ×400) A:空白对照组未见新生血管生长 B:PBS 对照组小鼠视网膜中可见与视网膜内界膜相连的新生血管生长 C:低剂量熊果酸组可见以出芽方式生长的新生血管内皮细胞 D:中剂量熊果酸组新生血管芽生长较最低剂量熊果酸组减少 E:高剂量熊果酸组仅见极少量新生血管内皮细胞 F:阳性对照组很少见新生血管内皮细胞

表 1 各组小鼠视网膜中突破内界膜的血管内皮细胞核数比较 ( $\bar{x} \pm s$ , 个/视野)

组别	样本量	血管内皮细胞核数
空白对照组	10	0.78±0.11
PBS 对照组	10	18.65±3.24 <sup>a</sup>
阳性对照组	10	9.14±1.13
低剂量熊果酸组	10	15.44±2.02
中剂量熊果酸组	10	13.32±1.87 <sup>bc</sup>
高剂量熊果酸组	10	8.93±1.09 <sup>bc</sup>
F		192.970
P		0.001

注:与空白对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 PBS 对照组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与低剂量组比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验)

## 2.2 各组小鼠视网膜组织中 COX-2 mRNA 的相对表达量

空白对照组、PBS 对照组、阳性对照组及高、中、低剂量熊果酸组间小鼠视网膜中 COX-2 mRNA 的相对表达量明显不同,差异有统计学意义 ( $F = 80.036, P = 0.000$ )。其中 PBS 对照组小鼠视网膜组织中 COX-2 mRNA 相对表达量明显高于空白对照组,差异有统计学意义 ( $t = 13.45, P < 0.05$ ),高剂量熊果酸组小鼠视网膜组织中 COX-2 mRNA 相对表达明显低于 PBS 对照组和低剂量熊果酸组,差异均有统计学意义 ( $t = 7.05、5.83, 均 P < 0.05$ ),但阳性对照组小鼠视网膜组织中 COX-2 mRNA 相对表达与高剂量熊果酸组比较,差异无统计学意义 ( $t = 0.85, P > 0.05$ ) (图 2,表 2)。

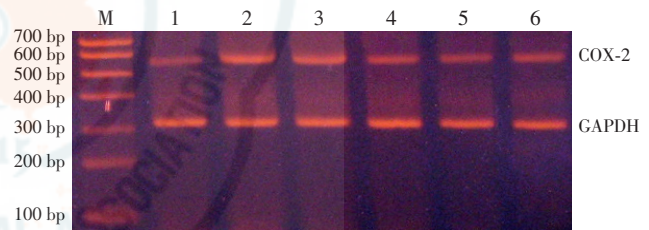


图 2 各组小鼠视网膜组织中 COX-2 mRNA 的表达 M:蛋白分子标志 1:空白对照组 2:PBS 对照组 3:低剂量熊果酸组 4:中剂量熊果酸组 5:高剂量熊果酸组 6:阳性对照组 COX:环氧合酶 GAPDH:磷酸甘油醛脱氢酶

## 2.3 各组小鼠视网膜组织中 MMP-2 mRNA 的相对表达量

空白对照组、PBS 对照组、阳性对照组及高、中、低剂量熊果酸组间小鼠视网膜中 MMP-2 mRNA 的相对表达量比较趋势与 COX-2 mRNA 表达相似,差异有统计学意义 ( $F = 49.499, P = 0.001$ ),其中 PBS 对照组小鼠视网膜组织中 MMP-2 mRNA 的相对表达量明显高于空白对照组,差异有统计学意义 ( $t = 14.32, P < 0.05$ ),高剂量熊果酸组小鼠视网膜组织中 MMP-2 mRNA 的相对表达量明显低于 PBS 对照组和低剂量熊果酸组,差异均有统计学意义 ( $t = 9.26、5.37, 均 P < 0.05$ ),而阳性对照组与高剂量熊果酸组间小鼠视网膜组织中 MMP-2 mRNA 相对表达量的差异无统计学意义 ( $t = 0.84, P > 0.05$ ) (图 3,表 2)。

## 2.4 各组小鼠视网膜组织中 VEGF mRNA 的相对表达量



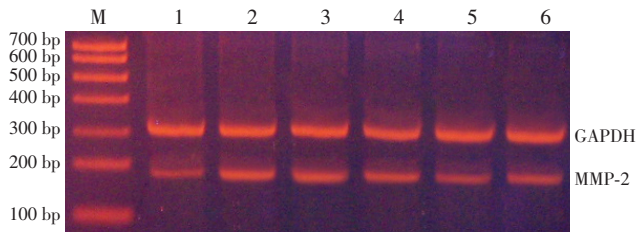


图 3 各组小鼠视网膜组织中 MMP-2 mRNA 的表达 M: 蛋白分子标志 1: 空白对照组 2: PBS 对照组 3: 低剂量熊果酸组 4: 中剂量熊果酸组 5: 高剂量熊果酸组 6: 阳性对照组 GAPDH: 磷酸甘油醛脱氢酶; MMP: 基质金属蛋白酶

空白对照组、PBS 对照组、阳性对照组及高、中、低剂量熊果酸组间小鼠视网膜中 VEGF mRNA 的相对表达量总体明显不同, 差异有统计学意义 ( $F = 51.058, P = 0.001$ ), 其中 PBS 对照组小鼠视网膜组织中 VEGF mRNA 的表达明显高于空白对照组, 差异有统计学意义 ( $t = 12.49, P < 0.05$ ), 高剂量熊果酸组小鼠视网膜组织中 VEGF mRNA 表达明显低于 PBS 对照组和低剂量熊果酸组, 差异均有统计学意义 ( $t = 9.49, 8.17$ , 均  $P < 0.05$ ), 但阳性对照组与高剂量熊果酸组间比较, 小鼠视网膜组织中 VEGF mRNA 相对表达量的差异无统计学意义 ( $t = 0.32, P > 0.05$ ) (图 4, 表 2)。

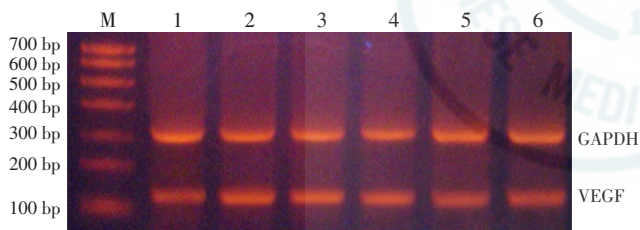


图 4 各组小鼠视网膜组织中 VEGF mRNA 的表达 M: 蛋白分子标志 1: 空白对照组 2: PBS 对照组 3: 低剂量熊果酸组 4: 中剂量熊果酸组 5: 高剂量熊果酸组 6: 阳性对照组 GAPDH: 磷酸甘油醛脱氢酶 VEGF: 血管内皮生长因子

表 2 各组小鼠视网膜中 COX-2、MMP-2 和 VEGF mRNA 的相对表达量 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	样本量	COX-2 mRNA	MMP-2 mRNA	VEGF mRNA
空白对照组	10	0.113±0.017 <sup>a</sup>	0.174±0.027 <sup>a</sup>	0.313±0.041 <sup>a</sup>
PBS 对照组	10	0.717±0.141	0.833±0.143	1.069±0.187
阳性对照组	10	0.411±0.077	0.402±0.087	0.481±0.071
低剂量熊果酸组	10	0.651±0.136	0.751±0.213	0.991±0.189
中剂量熊果酸组	10	0.449±0.071	0.631±0.112	0.741±0.141
高剂量熊果酸组	10	0.387±0.045 <sup>ab</sup>	0.373±0.065 <sup>ab</sup>	0.471±0.069 <sup>ab</sup>
<i>F</i>		80.036	49.499	51.058
<i>P</i>		0.000	0.001	0.001

注: 与 PBS 组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与低剂量熊果酸组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$  (单因素方差分析, LSD-*t* 检验) COX: 环氧合酶; MMP: 基质金属蛋白酶; VEGF: 血管内皮生长因子

### 3 讨论

视网膜血管性疾病常可引起新生血管形成, 后者容易发生血管壁渗漏、血管破裂出血, 从而导致周围组织的结缔组织增生, 形成视网膜和/或玻璃体机化物, 严重者导致增生性玻璃体视网膜病变, 使视功能受损, 甚至导致失明或眼球萎缩。视网膜新生血管在血管内皮细胞穿透基底膜及新生血管管腔形成中与肿瘤新生血管的病理机制有很多相似之处。目前临床上治疗新生血管的药物种类繁多, 如 MMP-2 抑制剂、COX-2 抑制剂、VEGF 拮抗剂等, 但都是针对单一靶点的研究, 临床上缺乏多靶点多途径抑制新生血管的药物研究。

曲安奈德属于糖皮质激素类药物, 具有显著且持久的抗炎和免疫抑制作用, 其作用机制主要是抑制炎症细胞聚集及间接抑制血管生成因子在局部组织中的表达, 从而抑制血管内皮细胞的增生和移行, 近年来用于眼科多种疾病的治疗, 但其效果并不理想, 且易产生严重的并发症, 如眼压升高、白内障、感染性眼内炎及非感染性眼内炎等<sup>[3]</sup>。因此, 曲安奈德较少单独使用, 而是作为光凝治疗的辅助手段<sup>[4]</sup>。鉴于曲安奈德显著且持久的抑制新生血管作用<sup>[5]</sup>, 本实验采用曲安奈德作为阳性对照。

研究已证实熊果酸具有多种生物学效应, 如抗肿瘤、抗新生血管生成、抗氧化、抗抑郁、降血脂、抗病毒及抗菌作用等, 且不良反应少<sup>[6]</sup>, 它对血管形成的抑制作用是多方面的, 如抑制血管内皮细胞的增生、迁移和小管的形成及影响血管生成过程中细胞因子的表达<sup>[7-8]</sup>。Sohn 等<sup>[9]</sup>研究发现, 熊果酸有较强的抑制血管生成的作用, 且其效果呈剂量依赖性, 但其作用机制仍不清楚。张奕颖等<sup>[10]</sup>研究发现, 熊果酸可诱导人胃癌细胞系 SGC-7901 的凋亡, 其机制可能是通过抑制 COX-2 的表达, 减少前列腺素 E2 合成。Kanjoormana 等<sup>[2]</sup>的研究也发现, 熊果酸处理组的小鼠黑色素细胞瘤中 VEGF、神经氨酸酶和促炎性因子水平明显下降, 并且 VEGF mRNA 和诱导型一氧化氮合成酶 (induced nitric oxide synthase, iNOS) mRNA 表达下降, MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达下降。李海军等<sup>[11]</sup>研究发现, 熊果酸可能通过下调 MMP-2 的分泌而抑制其基底膜的作用, 从而抑制肝癌细胞的侵袭和转移。以往的研究也证实, VEGF、MMP-2、COX-2 在视网膜新生血管性疾病的发生和发展过程中起着关键作用<sup>[12-17]</sup>。因此, 熊果酸是很强的血管生成抑制剂, 但抗血管生成作用机制尚未完全阐明, 根据其化学结构与糖皮质激素类似,

推测其可能通过与糖皮质激素受体或者类似的核受体相结合而发挥作用。熊果酸具有抗新生血管、抗溃疡、抗炎、提高机体免疫力的特性<sup>[18-20]</sup>,且与上述其他药物比较,熊果酸在临床上不良反应少,靶点多,可用于氧诱导的缺氧视网膜病变的治疗,但相关研究尚未见报道。

本实验表明,模型对照组小鼠视网膜组织可见大量血管内皮细胞突破内界膜,形成新生血管腔;而空白对照组内界膜结构均一,血管内皮细胞排列整齐,偶见血管内皮细胞突破内界膜。氧诱导的视网膜缺血小鼠玻璃体腔注射不同剂量的熊果酸后,随着剂量的增加,视网膜中突破内界膜的血管内皮细胞核数目逐渐减少,新生血管腔形成也逐渐减少。高剂量熊果酸组小鼠视网膜中突破内界膜的血管内皮细胞核数目与使用曲安奈德的阳性对照组接近,而明显少于 PBS 对照组,与此同时,玻璃体腔注射 PBS 的小鼠视网膜中 COX-2、VEGF 和 MMP-2 mRNA 相对表达量与空白对照组小鼠相比异常增高,而中剂量熊果酸组、高剂量熊果酸组小鼠视网膜中 COX-2、VEGF 和 MMP-2 mRNA 相对表达量均明显低于 PBS 对照组,表明 3.0 μg、6.0 μg 熊果酸玻璃体腔注射可明显下调小鼠氧诱导的缺氧视网膜中 COX-2、VEGF 和 MMP-2 mRNA 的相对表达,6.0 μg 熊果酸的作用更强。

综上所述,熊果酸抑制氧诱导视网膜新生血管形成的作用机制可能是与降低视网膜中 VEGF 的表达,阻止血管内皮细胞的增生和移行,并通过抑制 COX-2 的产生,使前列腺素 E<sub>2</sub> 减少,促使内皮细胞凋亡及减少 MMP-2 的表达,使细胞外基质的降解减少,抑制血管腔的形成等作用有关,且熊果酸的作用效果具有剂量依赖性。熊果酸有望成为治疗视网膜血管性疾病的药物,但其临床应用的最佳给药方式、给药时间及最优剂量仍需进一步研究。熊果酸对于新生血管的抑制作用从单一靶点的研究向多靶点领域发展,在临床上具有广阔的应用前景,有望成为理想的抗视网膜新生血管药物。

## 参考文献

- [1] Messner B, Zeller I, Ploner C, et al. Ursolic acid causes DNA-damage, p53-mediated, mitochondria- and caspase-dependent human endothelial cell apoptosis, and accelerates atherosclerotic plaque formation in vivo[J]. *Atherosclerosis*, 2011, 219(2): 402-408. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2011.05.025.
- [2] Kanjoormana M, Kuttan G. Antiangiogenic activity of ursolic acid[J]. *Integr Cancer Ther*, 2010, 9(2): 224-235. doi: 10.1177/1534735410367647.
- [3] 秦梅, 岳晓丽, 方丽, 等. 曲安奈德对核因子-κB、血管内皮细胞生长因子在大鼠视网膜新生血管中表达的影响[J]. *蚌埠医学院学报*, 2012, 37(5): 512-515.
- [4] 张美娟, 顾月清. 用于治疗糖尿病视网膜病变的抗血管新生药物[J]. *药学进展*, 2011, 35(8): 344-351.
- [5] 沈胤枕, 许迅. 糖尿病黄斑水肿的治疗现状[J]. *中华眼底病杂志*, 2013, 29(1): 108-111. doi: 10.3760/cma.j.issn.1005-1015.2013.01.033.
- [6] Kuttan G, Pratheeshkumar P, Manu KA, et al. Inhibition of tumor progression by naturally occurring terpenoids[J]. *Pharm Biol*, 2011, 49(10): 995-1007. doi: 10.3109/138880209.2011.559476
- [7] Pinon A, Limami Y, Micallef L, et al. A novel form of melanoma apoptosis resistance; Mela-nogenesis up-regulation in apoptotic B16-F0 cells delays ursolic acid-triggered cell death[J]. *Exper Cell Res*, 2011, 317(12): 1669-1676. doi: 10.1016/j.yexcr.2011.04.014
- [8] Kurek A, Grudniak AM, Szwed M, et al. Oleanolic acid and ursolic acid affect peptidoglycan metabolism in *Listeria monocytogenes*[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2010, 97(11): 61-68. doi: 10.1007/s10482-009-9388-6.
- [9] Sohn KH, Lee HY, Chung HY, et al. Anti-angiogenic activity of triterpene acids[J]. *Cancer Lett*, 1995, 94(2): 213-218. doi: http://dx.doi.org/10.1016/0304-3835(95)03856-R
- [10] 张奕颖, 邓涛, 胡志芳, 等. 熊果酸抑制胃癌细胞 SGC7901 增殖和诱导细胞凋亡的机制[J]. *癌症*, 2006, 25(4): 432-437.
- [11] 李海军, 方全华, 王辉, 等. 熊果酸对肝癌细胞株 Bel-7404 转移及侵袭能力的影响[J]. *中华实验外科杂志*, 2010, 27(2): 172-176.
- [12] 胡金芳, 邱志权, 霍璇, 等. 小鼠视网膜血管内皮细胞生长因子与视网膜新生血管的相关性研究[J]. *药物评价研究*, 2012, 35(4): 250-252.
- [13] 刘宁宁, 赵宁, 柳力敏, 等. 环氧化酶-2 和存活素在视网膜新生血管中的表达[J]. *国际眼科杂志*, 2013, 13(1): 46-48. doi: 10.3980/j.issn.1672-5123.2013.01.09.
- [14] Zhang L, Gong B, Hatala DA, et al. Retinal ischemia and reperfusion causes capillary degeneration; similarities to diabetes[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2007, 48(1): 361-367. doi: 10.1167/iovs.06-0510
- [15] Bekowitz BA, Roberts R, Luan H, et al. Drug intervention can correct subnormal retinal oxygenation response in experimental diabetic retinopathy[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2005, 46: 2954-2960.
- [16] 姜双, 底煜, 陈晓隆, 等. MMP-2 和 VEGF 在视网膜新生血管中的表达及意义[J]. *眼科研究*, 2009, 27(12): 1089-1093. doi: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2009.12.008.
- [17] 李瑾, 郝玉华. 实验性脉络膜新生血管中环氧化酶-2、血管内皮生长因子和基质金属蛋白酶-2 的表达[J]. *眼科研究*, 2010, 28(9): 836-840. doi: 10.3969/j.issn.1003-0808.2010.09.011.
- [18] 贺玲, 郑晓龙. 熊果酸抑制新生血管研究进展[J]. *新乡医学院学报*, 2013, 30(3): 230-232.
- [19] 王杰军, 王兵, 郭静, 等. 熊果酸体外抑制血管形成的研究[J]. *第二军医大学学报*, 2000, 21(11): 1071-1073. doi: 10.3321/j.issn.0258-879X.2000.11.023.
- [20] 李希波, 孙雪飞, 尹秋伟, 等. 熊果酸体内抗肿瘤作用机制探讨[J]. *山东大学学报*, 2007, 45(2): 188-191. doi: 10.3969/j.issn.1671-7554.2007.02.021.

(收稿日期: 2014-07-28)

(本文编辑: 尹卫靖 杜娟)