

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.05.008

不同剂量熊果酸干预糖尿病小鼠视网膜病变的作用及机制研究*

闫利锋 李传旭 周 瑾 郭梦翔 黄业贤 项道满[△]

(广州市妇女儿童医疗中心眼科 广东 广州 510623)

摘要 目的:探究不同剂量熊果酸(UA)干预糖尿病小鼠视网膜病变的作用及机制。**方法:**选取雄性健康 C57BL/6 小鼠 60 只,其中 50 只按 50 mg/kg 的剂量一次性往小鼠尾静脉注射新鲜配置的四氯嘧啶生理盐水溶液构建小鼠糖尿病视网膜病变模型,随机分为 5 组,每组 10 只,分别为模型组、阳性对照组(小鼠玻璃体注射 3 μ L 40 mg/mL 的曲安奈德),低剂量 UA 干扰组(小鼠玻璃体注射 3 μ L 剂量为 0.5 μ g/ μ L 的 UA)、中剂量 UA 干扰组(小鼠玻璃体注射 3 μ L 剂量为 1.0 μ g/ μ L 的 UA),高剂量 UA 干扰组(小鼠玻璃体注射 3 μ L 剂量为 2.0 μ g/ μ L 的 UA),余下 10 只小鼠作为正常对照组。观察各组小鼠对胰岛素敏感性、视网膜内糖代谢情况、小鼠视网膜神经节细胞(RGCs)凋亡情况,比较各组小鼠视网膜组织中血管内皮生长因子(VEGF)、环氧合酶-2(COX-2)、基质金属蛋白酶 2(MMP-2)蛋白及其 mRNA 的表达情况。**结果:**建模后,正常对照组胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)、视网膜含糖量、葡萄糖转运体-1(GLUT-1)与葡萄糖转运体-3(GLUT-3)含量、RGCs 凋亡率、视网膜组织中 VEGF、COX-2、MMP-2 蛋白及其 mRNA 的表达量低于模型组($P<0.05$);经干扰后,阳性对照组、不同剂量 UA 干扰组 HOMA-IR、视网膜含糖量、GLUT-1、GLUT-3 的含量、RGCs 凋亡率、视网膜组织中 VEGF、COX-2、MMP-2 蛋白及其 mRNA 的表达量低于模型组($P<0.05$),且随 UA 干扰剂量的升高而降低($P<0.05$)。**结论:**UA 能够降低 HOMA-IR 和视网膜糖代谢能力,抑制 RGCs 的凋亡,对 VEGF、COX-2、MMP-2 蛋白及其 mRNA 的表达具有一定的抑制作用,高剂量 UA 对糖尿病小鼠视网膜病预防治疗效果较好。

关键词:熊果酸;糖尿病小鼠;视网膜病变;胰岛素敏感性;糖代谢;凋亡;血管内皮生长因子;环氧合酶-2;基质金属蛋白酶 2

中图分类号:R-33;R587.2;R774 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2020)05-838-05

Effect and Mechanism of Different Doses of Ursolic Acid on Retinopathy in Diabetic Mice*

YAN Li-feng, LI Chuan-xu, ZHOU Jin, GUO Meng-xiang, HUANG Ye-xian, XIANG Dao-man[△]

(Department of Ophthalmology, Guangzhou Women and Children Medical Center, Guangzhou, Guangdong, 510623, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect and mechanism of different dose of ursolic acid on retinopathy in diabetic mice.

Methods: 60 male healthy C57BL/6 mice were selected, among them, 50 mice were injected with a dose of 50mg/kg to the tail vein was injected the fresh-configured four-chlorofluorocarbon saline solution of mice to construct a diabetic retinopathy model, randomly divided into 5 groups, 10 mice in each group, they were model group, positive control group (Mice were vitreous injected with 3 μ L 40 mg/ml of triamcinolone), low dose UA interference group (Mice were vitreous injected with 3 μ L 0.5 μ g/ μ L of UA), mid dose UA interference group (Mice were vitreous injected with 3 μ L 1.0 μ g/ μ L of UA), high dose UA interference group (Mice were vitreous injected with 3 μ L 2.0 μ g/ μ L of UA), the remaining 10 mice as normal control group. The insulin sensitivity, glucose metabolism in retina and apoptosis of retinal ganglial cells (RGCs) were observed. The expressions of vascular endothelial growth factor (VEGF), cyclooxygenase-2 (COX-2) and matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and mRNA in retinal tissues of mice in each group were compared. **Results:** After modeling, insulin resistance index (HOMA-IR), retinal glucose content, glucose transporter-1 (GLUT-1) and glucose transporter-3 (GLUT-3) content, apoptosis rate of RGCs, expression levels of VEGF protein, COX-2 protein, MMP-2 protein and mRNA of retinal tissues in the normal control group were lower than those in the model group ($P<0.05$). After interference, HOMA-IR, retinal sugar content, GLUT-1 and GLUT-3 content, apoptosis rate of RGCs, expression levels of VEGF protein, COX-2 protein, MMP-2 protein and mRNA of retinal tissues in positive control group, different dose of UA interference group were lower than those in model group ($P<0.05$), and decreased with the increase of UA interference dose ($P<0.05$). **Conclusion:** UA can reduce HOMA-IR and retinal glucose metabolism, inhibit the apoptosis of RGCs, inhibit the expression of VEGF, COX-2, MMP-2 protein and mRNA, High dose of UA has a good effect on the prevention and treatment of retinopathy in diabetic mice.

Key words: Ursolic acid; Diabetic mice; Retinopathy; Insulin sensitivity; Glucose metabolism; Apoptosis; Vascular Endothelial growth Factor; Cyclooxygenase-2; Matrix metalloprotease 2

* 基金项目:广东省医学科研基金项目(B2018135)

作者简介:闫利锋(1973-),女,博士,副主任医师,研究方向:视网膜病变,E-mail: yanlifeng197310@163.com

[△] 通讯作者:项道满(1964-),男,博士,主任医师,研究方向:小儿眼科疾病,E-mail: xiangdm35@126.com

(收稿日期:2019-11-28 接受日期:2019-12-23)

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R587.2; R774 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2020)05-838-05

前言

目前糖尿病已成为威胁人类健康的非传染性疾病之一,随着患者病情的不断加重,糖尿病患者心脏、血管、眼睛、肾脏、神经等均会受到不同程度的损害^[1],其中糖尿病视网膜病变作为糖尿病的微血管并发症,是一种较为严重的致盲性眼底病变^[2]。糖尿病视网膜病变作为视网膜新生血管性疾病,随着疾病的发展进程,后期可能形成新生血管性视网膜病变,玻璃体反复出血,导致增生性玻璃体视网膜病变的发生,从而患者出现严重的视力降低现象,严重者可能导致失明^[3]。目前糖尿病视网膜病变的发病率呈现逐年上升的趋势,但是治疗效果较差,因此对于糖尿病视网膜病变的发生机制及作用机理的研究已成为国内外学者研究的重点。熊果酸(Ursolic acid, UA)作为中草药的一种有效成分,具有多种生物学效应,药理研究表明其具有镇咳、平喘、祛痰,抗炎、抗溃疡,保护缺血再灌注引起的组织损伤等活性,其在新生血管形成过程中发挥着重要作用^[4]。UA能够通过抑制血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)的表达来减少新生血管的形成,还可通过减少环氧化酶-2(Cyclooxygenase, COX-2)的分泌而减少前列腺素2的产生,促进血管内皮细胞的凋亡,除此之外还可以通过下调基质金属蛋白酶2(Matrix metalloproteinases-2, MMP-2)的表达来降低细胞外基质和基质膜的降解,抑制血管腔的形成^[5,6]。故UA对于血管的生成具有较强的抑制作用,但UA在糖尿病视网膜病变中的作用机制尚不十分明确,因此本研究建立了糖尿病小鼠视网膜病变模型,并给予不同剂量的UA进行干预,拟探明其在糖尿病视网膜病变中的作用机制,研究结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 选取10~12周龄,清洁级的健康雄性C57BL/6小鼠60只,体重19~23 g,平均体重(21.08±1.02)g,实验动物由广州市微生物研究所提供,动物许可证号为SYXK(粤)2018-0194。

1.1.2 试剂与仪器 UA(固体)(纯度≥90%),二甲基亚砜(Dimethyl Sulfoxide, DMSO),四氯喹啉均购自美国Sigma公司,醋酸曲安奈德注射液(天津金耀药业有限公司,国药准字H20065207),DNA断裂的原位末端标记法(In situ end labeling method for DNA fracture, TUNEL)试剂盒购自美国罗氏公司,VEGF、COX-2、MMP-2抗体购自abcam公司,Western Blotting所用试剂均购自Bio-Rad公司,全自动生化分析仪购自北京迈润医疗医疗器械有限公司。

1.2 方法

1.2.1 小鼠糖尿病视网膜病变模型的构建 建模前将小鼠养殖于动物房中3天,使小鼠适应动物房中的环境,对小鼠进行禁食16 h后,按照50 mg/kg的剂量一次性往50只小鼠尾静脉注射新鲜配置的四氯喹啉生理盐水溶液构建小鼠糖尿病视网膜病变模型。50只小鼠随机分为5组,每组10只,分别为模型

组、阳性对照组(小鼠玻璃体注射3 μL 40 mg/mL的曲安奈德),低剂量UA干扰组(小鼠玻璃体注射3 μL 剂量为0.5 μg/μL的UA)、中剂量UA干扰组(小鼠玻璃体注射3 μL 剂量为1.0 μg/μL的UA),高剂量UA干扰组(小鼠玻璃体注射3 μL 剂量为2.0 μg/μL的UA),将剩余的10只小鼠作为正常对照组。

1.2.2 胰岛素敏感性检测 采集小鼠糖负荷前的血清标本,利用全自动生化分析仪测定血清中葡萄糖(glucose, FBG)、胰岛素(insulin, FBI)含量,并计算胰岛素抵抗指数:HOMA-IR=FBG×FBI/22.5。

1.2.3 视网膜内糖代谢分析 取小鼠的视网膜组织,加入适量的PBS缓冲液,利用匀浆机将组织充分匀浆,取匀浆混悬液进行离心,4000 rpm 离心10 min,离心半径10 cm,取上清,采用Elisa试剂盒测定小鼠视网膜的含糖量,葡萄糖转运体-1(Glucose transporter-1, GLUT-1)及葡萄糖转运体-3(Glucose transporter-3, GLUT-3)的含量。

1.2.4 小鼠视网膜神经节细胞(Retinal ganglial cells, RGCs)凋亡情况的检测 UA干预治疗糖尿病小鼠视网膜病变结束后,处死各组小鼠并摘取眼球组织,按照石蜡切片的操作步骤,制备石蜡切片,制备好的切片经二甲苯脱蜡处理,再经梯度酒精水化后,进行染色处理,严格TUNEL试剂盒操作说明进行,光学显微镜下检测RGCs凋亡细胞的数量,细胞核呈现棕黄色或棕褐色表明细胞处于凋亡状态。

1.2.5 实时荧光定量PCR检测视网膜组织中VEGF、COX-2及MMP-2的mRNA表达 称取100 mg眼球组织,液氮中快速研磨成粉末状,利用Trizol试剂提取总RNA,获得的RNA立即放置于冰上,利用紫外分光光度计,检测RNA的剂量与质量。取1 μg RNA(剩余RNA储存于-80℃冰箱),利用TransScript Two-Step RT-PCR SuperMix试剂盒说明书将RNA反转得到cDNA, -20℃冰箱保存。qRT-PCR扩增采用TransStart Top Green qPCR SuperMix试剂盒,PCR反应体系参照说明书进行,上下游引物(10 μM)各0.4 μL,模板0.5 μL, STBR Premix Ex Taq Mix 10 μL, 总体积为20 μL。反应条件:95℃ 3 min, 95℃ 30 s, 60℃ 30 s(每次循环后采集荧光),进行40个循环。数据分析利用Bio-Rad CFX Manager软件,根据溶解曲线判断RT-PCR产物的特异性,相对定量分析采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法进行分析。定量PCR所用引物:VEGF上游引物序列5'-TCTCGCGTCCGTAGTACCGTGGTC-3',下游引物序列5'-TCTCCTCTTCCTTCCTC-3';COX-2上游引物序列5'-ATTACTGCTCAACGGGACC-3',下游引物序列5'-CTCCACCAATGACCTGATA-3';MMP-2上游引物序列5'-CGTCCTGTGCTGCCTGTTGG-3',下游引物序列5'-GCATCTTCTTGAGGGTATCTTTC-3';其内参引物GAPDH上游引物序列5'-AC-CACAGTCCATGCCATCA-3',下游引物序列5'-GGTC-CTCAGTGTAGCCCAAG-3',每个样品重复3次。

1.2.6 Western Blotting检测视网膜组织中VEGF、COX-2及MMP-2的蛋白表达 取眼球组织100 mg,加入1 mL裂解液,在低温匀浆机中匀浆,之后转移至1.5 mL离心管中,4℃低

温离心机中 12000 rpm 离心 10 min, 取上清, 利用 BCA 试剂盒检测蛋白浓度 (严格按照说明书操作进行)。利用 SDS-PAGE 电泳后, 转膜, 脱脂奶粉封闭, 4℃ 孵育一抗过夜, 过夜后的膜利用 PBST 洗三次, 每次 10 min, 室温条件下孵育二抗 1 小时, 孵育二抗的膜利用 PBST 洗三次, 每次 10 min, 利用发光液显色, 使用化学发光凝胶成像系统进行图像扫描机数据分析, 蛋白含量使用条带的灰度值进行表示, 各组与内参蛋白 GAPDH 的比值表示蛋白的相对表达量。

1.3 统计学分析

所有数据使用 SPSS24.0 统计软件学进行处理, 计量资料

用平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 符合正态分布的数据组间比较采用 t 检验。检验标准设置为 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 胰岛素敏感性及视网膜内糖代谢、RGCs 凋亡情况分析

正常对照组 HOMA-IR、视网膜含糖量、GLUT-1、GLUT-3、RGCs 凋亡率低于模型组; 阳性对照组、不同剂量 UA 干扰组 HOMA-IR、视网膜含糖量、GLUT-1、GLUT-3、RGCs 凋亡率低于模型组, 且随 UA 干扰剂量的升高而降低 (均 $P<0.05$)。结果详见表 1。

表 1 胰岛素敏感性与视网膜内糖代谢、RGCs 凋亡情况分析($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Analysis of insulin sensitivity, intraretinal glucose metabolism and RGCs apoptosis($\bar{x} \pm s$)

Groups	n	HOMA-IR	Retinal sugar content (nmol/mg protein)	GLUT-1 (nmol/mg protein)	GLUT-3 (nmol/mg protein)	RGCs apoptosis rate (%)
Normal control group	10	2.56± 0.35*	37.92± 4.19*	12.83± 2.26*	5.32± 0.62*	8.36± 0.92*
Model group	10	4.94± 0.51	196.26± 33.41	49.82± 5.92	19.92± 2.37	29.92± 4.82
Positive control group	10	3.71± 0.31*	92.91± 21.02*	37.82± 4.01*	13.02± 1.23*	19.02± 3.02*
Low dose UA interference group	10	4.19± 0.27*	99.17± 23.06*	45.13± 3.28*	17.21± 1.02*	25.92± 2.88*
Mid dose UA interference group	10	3.51± 0.22**	92.93± 19.17**	36.93± 2.99**	13.92± 0.82**	17.93± 2.01**
High dose UA interference group	10	2.86± 0.19***	44.93± 18.92***	24.99± 1.02***	8.24± 0.27***	8.92± 0.71***

Note: compared with the model group, * $P<0.05$; compared with the low dose UA interference group, ** $P<0.05$; compared with mid dose UA interference group, *** $P<0.05$.

2.2 视网膜组织中 VEGF、COX-2 及 MMP-2 的 mRNA 表达

正常对照组 VEGF、COX-2 及 MMP-2 mRNA 的表达量低于模型组; 阳性对照组、不同剂量 UA 干扰组 VEGF、COX-2 及

MMP-2 mRNA 的表达量明显低于模型组, 且随 UA 干扰剂量的升高而降低 (均 $P<0.05$), 结果详见表 2。

表 2 视网膜组织中 VEGF、COX-2 及 MMP-2 的 mRNA 表达($\bar{x} \pm s$)

Table 2 mRNA Expression of VEGF, COX-2 and MMP-2 in retina tissues($\bar{x} \pm s$)

Groups	n	VEGFmRNA	COX-2mRNA	MMP2mRNA
Normal control group	10	0.33± 0.03*	0.16± 0.02*	0.15± 0.03*
model group	10	1.09± 0.16	0.78± 0.15	0.86± 0.14
Positive control group	10	0.45± 0.03*	0.44± 0.07*	0.43± 0.12*
Low dose UA interference group	10	0.92± 0.16*	0.68± 0.11*	0.76± 0.05*
Mid doseUA interference group	10	0.74± 0.05**	0.51± 0.12**	0.62± 0.06**
High dose UA interference group	10	0.51± 0.02***	0.42± 0.04***	0.44± 0.09***

Note: compared with the model group, * $P<0.05$; compared with the low dose UA interference group, ** $P<0.05$; compared with mid dose UA interference group, *** $P<0.05$.

2.3 视网膜组织中 VEGF、COX-2 及 MMP-2 的蛋白表达

正常对照组 VEGF、COX-2 及 MMP-2 的表达量低于模型组; 阳性对照组、不同剂量 UA 干扰组 VEGF、COX-2 及 MMP-2 的表达量低于模型组, 且随 UA 干扰剂量的升高而降低 (均 $P<0.05$), 结果详见表 3。

3 讨论

糖尿病视网膜病变作为糖尿病并发症中最为严重的微血管病变之一, 也是糖尿病并发症在眼部的主要表现形式^[7,8]。长期处于高血糖损伤状态下, 患者的视网膜组织形态与视网膜微

血管渗透性改变, 血管生成素被诱导合成进而导致大量新生血管生成, 对视网膜屏障造成破坏, 严重者对患者视力造成损坏, 对患者日常工作、生活造成较大不便, 严重影响糖尿病患者生活质量^[9,10]。研究表明, 血糖、血压等多种因素影响糖尿病视网膜病变的发生, 但是关于糖尿病视网膜病变的发病机制至今尚未阐明^[11,12]。UA 广泛存在于天然植物中, 是一类具有较强药理活性的物质, UA 对于糖尿病引起的各种并发症具有一定的抑制作用^[13], 其通过抗氧化、降糖、降脂、抑制醛糖还原酶的活性, 对抗高浓度葡萄糖的氧化应激反应^[14,15], 来减少糖尿病导致的肾病、心肌纤维化、肝损伤、心脏缺血等并发症的发生^[16-18]。

表 3 视网膜组织中 VEGF、COX-2 及 MMP-2 的蛋白表达($\bar{x} \pm s$)Table 3 Expression of VEGF, COX-2 and MMP-2 in retina tissues($\bar{x} \pm s$)

Groups	n	VEGF	COX-2	MMP2
Normal control group	10	0.14± 0.03*	0.11± 0.02*	0.24± 0.04*
Model group	10	0.78± 0.14	0.41± 0.04	0.63± 0.18
Positive control group	10	0.39± 0.03*	0.28± 0.03*	0.42± 0.07*
Low dose UA interference group	10	0.53± 0.07*	0.36± 0.03*	0.53± 0.06*
Mid dose UA interference group	10	0.42± 0.08*#	0.29± 0.02*#	0.44± 0.07*#
High dose UA interference group	10	0.32± 0.06*#&	0.22± 0.03*#&	0.37± 0.04*#&

Note: compared with the model group, * $P<0.05$; compared with the low dose UA interference group, # $P<0.05$; compared with mid dose UA interference group, & $P<0.05$.

UA 对于糖尿病导致的多种并发症具有一定的治疗与预防作用,其对小鼠视网膜病变的影响文献报道较少,因此本研究主要探究不同剂量 UA 对糖尿病小鼠视网膜病变的影响及作用机制。

本研究结果表明,正常对照组 HOMA-IR、视网膜含糖量、GLUT-1、GLUT-3、视网膜凋亡率低于模型组;经干扰后,阳性对照组、不同剂量 UA 干扰组 HOMA-IR、视网膜含糖量、GLUT-1、GLUT-3、视网膜凋亡率低于模型组,且 UA 干扰剂量越高,HOMA-IR、视网膜含糖量、GLUT-1、GLUT-3、视网膜凋亡率越低,提示 UA 具有降低胰岛素敏感性,减少视网膜内糖含量的作用。2 型糖尿病患者共同的病理特征是胰岛素抵抗^[19],胰岛素抵抗能够导致视网膜局部产生持续性高糖的发生,进而使炎症反应、氧化应激反应被激活,形成新生血管,导致视网膜损伤的发生,胰岛素抵抗也是导致患者发生多种并发症的主要原因^[20,21]。UA 作为一种五环三萜类化合物,其具有多种生物活性,其可以调节胰岛素与糖脂代谢过程^[22]。糖尿病小鼠患有视网膜病变后,视网膜中含糖量较高,胰岛素敏感性较高,UA 干预后,胰岛素敏感性降低,视网膜含糖量也出现降低的趋势。GLUT 能够参与体内葡萄糖的代谢过程,GLUT-1 与 GLUT-3 能够介导葡萄糖通过血-视网膜屏障^[23,24],其含量高低在一定程度上能够反映视网膜病变情况,UA 介导后 GLUT-1 与 GLUT-3 含量明显降低,提示 UA 对于糖尿病小鼠视网膜病变具有预防作用。RGCs 的数量与功能在一定程度上能够反映糖尿病视网膜病变的疾病进程与病情严重程度^[25],本研究结果表明,UA 干扰后小鼠 RGCs 凋亡率降低,且 UA 剂量越高,小鼠 RGCs 凋亡率越低,提示 UA 具有明显抑制视网膜神经节细胞凋亡的作用。本研究结果还显示正常对照组视网膜组织中 VEGF、COX-2 及 MMP-2 及其 mRNA 表达量明显低于模型组,干扰后阳性对照组、不同剂量 UA 干扰组视网膜组织中 VEGF、COX-2 及 MMP-2 及其 mRNA 表达量明显低于模型组,且随 UA 干扰剂量的升高而降低,提示 UA 对视网膜新生血管的形成具有抑制作用,究其原因,VEGF 能够通过多种细胞因子作用于血管内皮细胞,通过刺激细胞外基质的降解,诱导内皮细胞发生增殖、分化、迁徙以及成管,UA 通过抑制 VEGF 的表达,减少新生血管的生成,抑制视网膜病变的产生^[26]。MMP-2 是促进视网膜新生血管形成的重要调节因子,UA 通过破坏基底膜与降解细胞外基质来抑制新生血管的形成,抑制血

管内皮细胞的增殖、迁移以及管腔的形成,抑制视网膜新生血管的形成^[27]。COX-2 也在糖尿病视网膜病变的发生发展等过程中起着关键作用,UA 可以通过抑制 COX-2 的表达量,抑制其活性,阻止 COX-2 的转录、翻译过程,抑制细胞内血管内皮细胞的凋亡^[28]。UA 通过抑制糖尿病小鼠视网膜病变血管中 VEGF、COX-2 及 MMP-2 的转录与表达过程,抑制新生血管的形成,缓解疾病的进程^[29,30]。

综上所述,不同剂量 UA 对于视网膜病变的进程具有不同的抑制作用,高剂量 UA 的抑制作用更为明显。其抑制作用可能与降低胰岛素敏感性与视网膜内糖代谢,抑制 RGCs 的凋亡,抑制 VEGF、COX-2 及 MMP-2 的转录与翻译过程有关。

参考文献(References)

- [1] Migdalis I, Leslie DJ, Papanas N, et al. Diabetes Mellitus [J]. Int J Endocrinol, 2017, 2014(9): 95-111
- [2] Gorusupudi A, Chang FY, Nelson K, et al. n-3 PUFA Supplementation Alters Retinal Very-Long-Chain-PUFA Levels and Ratios in Diabetic Animal Models [J]. Mol Nutr Food Res, 2019, 63 (15): e1801058
- [3] Dow C, Mancini F, Rajaobelina K, et al. Diet and risk of diabetic retinopathy: a systematic review [J]. Eur J Epidemiol, 2017, 33 (4): 141-156
- [4] Chan EWC, Soon CY, Tan JBL, et al. Ursolic acid: An overview on its cytotoxic activities against breast and colorectal cancer cells [J]. J Integr Med, 2019, 31(3): 155-160
- [5] Zhao R, Li T, Zheng G, et al. Simultaneous inhibition of growth and metastasis of hepatocellular carcinoma by co-delivery of ursolic acid and sorafenib using lactobionic acid modified and pH-sensitive chitosan-conjugated mesoporous silica nanocomplex[J]. Biomaterials, 2017, 143(2): 1-16
- [6] Alves Monteath SAF, Maciel MAM, Vega RG, et al. Ultrasound-assisted Extraction of Ursolic Acid from the Flowers of Ixora coccinea Linn (Rubiaceae) and Antiproliferative Activity of Ursolic Acid and Synthesized Derivatives[J]. Pharmacogn Mag, 2017, 13(50): 265-269
- [7] Sorrentino FS, Matteini S, Bonifazzi C, et al. Diabetic retinopathy and endothelin system: microangiopathy versus endothelial dysfunction [J]. Eye, 2018, 32(7): 1157-1163
- [8] Ye Z, Li ZH, He SZ. miRNA-1273g-3p Involvement in Development of Diabetic Retinopathy by Modulating the Autophagy-Lysosome Pathway[J]. Med Sci Monit, 2017, 23(3): 5744-5751

- [9] Fiori A, Terlizzi V, Kremer H, et al. Mesenchymal stromal/stem cells as potential therapy in diabetic retinopathy[J]. Immunobiology, 2018, 223(12): 729-743
- [10] Choi AY, Cho H, Kim YC. Effect of two different doses of intravitreal bevacizumab with temporal retina-sparing laser photocoagulation for retinopathy of prematurity[J]. IJO, 2018, 11(1): 166-169
- [11] 孙佩翠, 李强. 血脂与糖尿病视网膜病变的关系研究进展[J]. 中国实用内科杂志, 2018, 38(6): 569-572
- [12] 李磊, 孔倩倩, 王丽, 等. 2型糖尿病患者视网膜病变的危险因素分析[J]. 检验医学与临床, 2019, 16(11): 1503-1505
- [13] Shih-Hsiang Lo, Yingxiao Li, Kai Chun Cheng, et al. Ursolic acid activates the TGR5 receptor to enhance GLP-1 secretion in type 1-like diabetic rats[J]. N-S Arch Pharmacol, 2017, 390(11): 1097-1104
- [14] Ricardo Guzmán-Ávila, Virginia Flores-Morales, Paolo Paoli, et al. Ursolic acid derivatives as potential antidiabetic agents: In vitro, in vivo, and in silico studies[J]. Drug Develop Res, 2018, 79(2): 70-80
- [15] 尹江宁, 汪华君, 卢国元, 等. 熊果酸对糖尿病肾病大鼠足细胞损伤的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(17): 132-138
- [16] 王国权, 庞素秋, 邱飞, 等. 熊果酸对心肌缺血再灌注损伤的 H9c2 细胞的保护作用(英文)[J]. 华侨大学学报(自然科学版), 2018, 2018(1): 62-69
- [17] 孙澄明, 戚荣鑫, 张茜, 等. 熊果酸在肿瘤治疗中的研究进展 [J]. 现代生物医学进展, 2016, 16(22): 4393-4397
- [18] Detterich J A. Myocardial fibrosis: The heart of diastole?[J]. Blood, 2017, 130(2): 104-105
- [19] 李艳, 刘佳, 王广. 游离脂肪酸与 2 型糖尿病患者胰岛素抵抗的相关性研究[J]. 临床内科杂志, 2018, 35(9): 634-635
- [20] Barazzoni R, Deutz NEP, Biolo G, et al. Carbohydrates and insulin resistance in clinical nutrition: Recommendations from the ESPEN expert group[J]. Clin Nutr, 2017, 36(2): 355-363
- [21] Jing J, Pan Y, Zhao X, et al. Insulin Resistance and Prognosis of Nondiabetic Patients With Ischemic Stroke: The ACROSS-China Study (Abnormal Glucose Regulation in Patients With Acute Stroke Across China)[J]. Stroke, 2017, 48(4): 887-893
- [22] 赖颖, 马朋, 姚玲, 等. 熊果酸改善自然衰老大鼠糖脂代谢紊乱与自噬能力的研究[J]. 天然产物研究与开发, 2019, 31(5): 858-863
- [23] 王琼, 黄伟, 吴洪阳, 等. 针刺百会、人中穴对急性脑缺血大鼠模型葡萄糖转运蛋白 1、3 的影响[J]. 广州中医药大学学报, 2018, 35(1): 86-92
- [24] Sims H, Smith KH, Bramlage P, et al. Sotagliflozin: a dual sodium-glucose co-transporter-1 and -2 inhibitor for the management of Type 1 and Type 2 diabetes mellitus[J]. Diabet Med, 2018, 35(8): 1037-1048
- [25] 龚祎, 伍海建, 陈浙一. 熊果酸对糖尿病视网膜病变小鼠视网膜损伤的保护作用[J]. 中国临床药理学杂志, 2019, 35(12): 1260-1262
- [26] Chen J, Fu Y, Day DS, et al. VEGF amplifies transcription through ETS1 acetylation to enable angiogenesis[J]. Nature Communications, 2017, 8(1): 383-389
- [27] Fang CY, Wu CZ, Chen PN, et al. Antimetastatic potentials of salvianolic acid A on oral squamous cell carcinoma by targeting MMP-2 and the c-Raf/MEK/ERK pathway[J]. Environ Toxicol, 2018, 33(5): 545-554
- [28] Fardid R, Salajegheh A, Mosleh-Shirazi MA, et al. Melatonin Ameliorates the Production of COX-2, iNOS, and the Formation of 8-OHdG in the Non-Targeted Lung Tissue after Pelvic Irradiation[J]. Cell J, 2017, 19(2): 324-331
- [29] Ławicki S, Zajkowska M, Głążewska EK, et al. Plasma levels and diagnostic utility of VEGF, MMP-2 and TIMP-2 in the diagnostics of breast cancer patients[J]. Biomarkers, 2017, 22(2): 157-164
- [30] Sun YZ, Cai N, Liu NN. Celecoxib Down-Regulates the Hypoxia-Induced Expression of HIF-1 α and VEGF Through the PI3K/AKT Pathway in Retinal Pigment Epithelial Cells [J]. Cellular Physiol Biochem, 2017, 44(4): 1640-1650