

DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.01.011

姜黄素抑制小鼠脉络膜新生血管的实验研究*

林小俊 谢 平 袁冬青 刘庆淮[△]

(南京医科大学第一附属医院 眼科 江苏 南京 210029)

摘要 目的: 观察姜黄素对激光诱导的小鼠脉络膜新生血管 (choroidal neovascularization, CNV) 形成的影响。**方法:** 60 只雄性 C57BL/6 小鼠, 随机分为对照组、10 mg/kg 姜黄素治疗组、30 mg/kg 姜黄素治疗组, 每组 20 只。采用激光诱导产生小鼠 CNV 模型。由光凝前 3 天开始, 至光凝后 14 天, 两个治疗组每天分别给予腹腔注射相应剂量的姜黄素, 对照组腹腔注射二甲亚砜溶液 (溶剂)。光凝后第 3 天通过免疫组化和 ELISA 检测血管内皮生长因子 (vessel endothelial growth factor, VEGF) 的表达; 第 14 天通过组织学检查以及荧光素标记的葡聚糖的血管灌注检测 CNV 的面积, 荧光血管造影评价 CNV 的渗漏程度。**结果:** 光凝后第 14 天, 组织学检查显示姜黄素能够有效缩小激光诱导的 CNV; 荧光素标记的葡聚糖血管灌注后测量色素上皮-脉络膜铺片上 CNV 的面积, 和对照相比, 姜黄素能显著减小激光诱导的 CNV 的面积 ($P < 0.05$); 荧光血管造影显示姜黄素能有效抑制 CNV 的渗漏 ($P < 0.05$)。和 10 mg/kg 姜黄素治疗组相比, 30 mg/kg 姜黄素治疗组小鼠 CNV 面积缩小和渗漏程度减弱 ($P < 0.05$)。光凝后第 3 天, VEGF 免疫组化和 ELISA 结果显示姜黄素显著抑制色素上皮-脉络膜复合体中 VEGF ($P < 0.01$) 的表达, 高剂量组有更强的抑制作用 ($P < 0.01$)。**结论:** 姜黄素可以有效地抑制小鼠 CNV 的形成, 下调 VEGF 的表达可能是姜黄素抑制 CNV 的作用机制之一。因此我们推测姜黄素对并发 CNV 的 AMD 患者可能具有治疗作用。

关键词: 脉络膜新生血管; 年龄相关性黄斑变性; 激光; 姜黄素; VEGF

中图分类号: Q95-3, R77 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2014)01-52-05

Suppression of Laser-Induced Choroidal Neovascularization by Curcumin in Mice*

LIN Xiao-jun, XIE Ping, YUAN Dong-qing, LIU Qing-huai[△]

(The First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu, 210029, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of curcumin on laser injury-induced choroidal neovascularization (CNV) in mice. **Methods:** CNV was induced by laser injury in C57BL/6N mice, which were pretreated with intraperitoneal injections of curcumin daily for 3 days, and the drug treatments were continued until the end of the study. The CNV area was analyzed by fluorescein-labeled dextran angiography of retinal pigment epithelium (RPE)-choroid flat mounts on day 14 after laser photocoagulation. Leakage from the CNV was also measured by fluorescein angiography (FA). RPE-choroid level of vascular endothelial growth factor (VEGF) was examined by ELISA on day 3. Immunostaining of VEGF was also performed on cryo-sections of CNV lesions. **Results:** Curcumin-treatment significantly suppressed the CNV area ($P < 0.05$) and CNV leakage ($P < 0.05$). Compared with that in 10mg/kg Curcumin-treated group, the CNV area and CNV leakage was significantly less in 30mg/kg Curcumin-treated group mice ($P < 0.05$). Curcumin treatment led to significant inhibition the RPE-choroid levels of VEGF ($P < 0.01$). **Conclusion:** Curcumin treatment led to the suppression of CNV development, via suppression of the upregulation of VEGF after the laser injury. This provides molecular and cellular evidence of the validity of curcumin supplementation as a therapeutic strategy for the suppression of age-related macular degeneration (AMD)-associated CNV.

Key words: CNV; AMD; Laser; Curcumin; VEGF

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3, R77 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)01-52-05

前言

年龄相关性黄斑变性 (age-related macular degeneration, AMD) 是发达国家老年人群中首要的致盲眼病。因临床表现不同而分成萎缩性与渗出性两型。流行病学调查显示后者发病率

仅为前者的 1/15-1/10, 但却可导致严重的视力丢失^[1]。渗出型 AMD 以脉络膜新生血管 (choroidal neovascularization, CNV) 为特征, 其本质为脉络膜未成熟的血管, 穿过 Bruch 膜生长进入视网膜色素上皮层或视网膜神经上皮层下。临床表现为色素上皮层脱离, 视网膜下出血和盘状纤维血管瘢痕^[2]。基于血管内皮

* 基金项目: 国家自然科学基金(面上项目)(81170855)

作者简介: 林小俊 (1981-), 男, 主治医师, 主要研究方向: 眼底病, 电话: 025-83718836,

E-mail: linxiaojun7954@163.com

[△] 通讯作者: 刘庆淮, E-mail: liuqh0545@126.com

(收稿日期: 2013-06-11 接受日期: 2013-07-11)

生长因子(vessel endothelial growth factor, VEGF)是 CNV 形成的重要启动因子这一理论,近年来,玻璃体腔注射抗 VEGF 药物应运而生,为 CNV 的治疗开辟了新的方向和途径,并取得了很好的效果^[3]。但随着玻璃体腔内注射的次数增加,出现眼内炎,视网膜脱离,青光眼等并发症的风险也不断增加。因此抗 VEGF 药物的长期效果和安全性尚且有待进一步证实^[4]。

因此膜肿瘤量姜黄素是一种从姜黄属植物姜黄根茎中提取的低分子量的植物多酚。近几年,广泛的体内和体外实验表明姜黄素具有多种生物活性,包括抗癌、抗氧化、抗炎和抗血管生成作用,近年来的研究证实其对高氧诱导的视网膜病变血管生成具有抑制作用^[5],也有研究显示姜黄素可以降低 VEGFmRNA 及 VEGF 蛋白在兔角膜新生血管模型中的表达^[6]。因此,可以推测姜黄素可能是一种治疗 CNV 的潜在药物。本研究通过给予激光诱导的 CNV 小鼠模型腹腔注射姜黄素,拟观察姜黄素对 CNV 的防治作用,并评价不同浓度的姜黄素对 CNV 的抑制效果。

1 材料和方法

1.1 激光诱导 CNV 小鼠模型的制备

雄性 8 周龄 C57BL/6 小鼠 60 只(南京医科大学实验动物中心),散瞳后以 3.0mL/kg 腹腔注射 10% 水合氯醛,深度麻醉小鼠。以手持型盖玻片作为前置镜,距视盘 2~3 个视盘直径(DD),用多波长氩离子激光机(美国科医人公司 Lumenis1000)围绕双眼视盘各均匀光凝 3 个点。参数:波长 532 nm,光斑直径 75 μ m,曝光时间 100ms,功率 120mW(光凝时产生气泡为击穿 bruch 膜标志)。

1.2 分组和方法

模型动物随机分为对照组、姜黄素 10 mg/kg 治疗组和 30mg/kg 治疗组,每组各 20 只。姜黄素(C1386, Sigma-Aldrich 公司),采用前述两种剂量于视网膜光凝前第三天开始腹腔注射给药,每日一次,连续注射 14 天。对照组腹腔注射二甲亚砜溶液(溶剂)。

1.3 CNV 的抑制效应观察

1.3.1 眼底照相和荧光血管造影(FP 和 FFA) 在激光造模后第 14 天,每组各取小鼠 4 只(8 只眼),进行荧光素血管造影检查。小鼠全身麻醉和散瞳行眼底检查,采用数字眼底照相机(海德堡眼底血管造影仪 II)眼底照相,在激光损伤区域,通过荧光素血管造影评价 CNV 的渗漏程度。小鼠腹腔注射荧光素钠(10%,0.1 毫升/公斤;美国爱尔康公司),用高性能数字影像系统 VK-2(日本科瓦公司)记录眼底血管造影照片。荧光渗漏定义为高荧光病变,随时间推移逐渐增大,晚期不消退。造影进行分级如下^[7]:0-无渗漏,1-轻微的泄漏,2-中度泄漏,3-重度的泄漏。双盲下两位研究者分别对渗漏灶进行判定分级。

1.3.2 荧光素标记的葡聚糖血管灌注 在激光造模后第 14 天,每组各取小鼠 4 只(8 只眼),在荧光素标记的葡聚糖(货号 FD2000S-1G,美国 Sigma 公司)灌注后的色素上皮和脉络膜平铺片上观察 CNV 病损的面积。将小鼠深度麻醉,通过左心室灌注 1 毫升含有 50 毫克/毫升的荧光素标记的葡聚糖的磷酸盐缓冲液(PBS)。然后处死小鼠,摘除眼球并固定在 4%多聚甲醛溶液(PFA)1 小时。在 PBS 中洗涤后,眼前段被切除,分离去除

视网膜。RPE- 脉络膜 - 巩膜做从边缘到赤道的四径向切口,将 RPE 层向上平铺于载玻片。显微镜下检查铺片,记录 CNV 的面积(Image J for Windows 分析软件)。

1.3.3 组织病理学检查 小鼠激光光凝后第 14 天, 每组各取小鼠 3 只(6 只眼)。用 4% PFA 固定眼球 24 小时后,30%蔗糖于 4℃ 脱水 6 小时后冰冻包埋。做 8 μ m 厚度的切片,分别用 1% 的苏木精-伊红(HE)染色。通过奥林巴斯 B $\times$ 41 显微镜和 DP72 数码照相机观察和记录 CNV 形态。

1.4 VEGF 的免疫组化和 ELISA 检测

在激光造模后第三天,每组取 9 只小鼠,处死并摘取双眼眼球,沿角巩膜缘剪开,去除角膜、晶状体及玻璃体,剥离视网膜,制成 RPE- 脉络膜眼杯。其中三只小鼠的眼杯,用 4% PFA 固定 8 小时后,在 4℃ 下 30%蔗糖脱水 6 小时后 O.C.T.包埋。将眼杯做成厚度为 8 μ m 的冰冻切片,5%的 BSA 封闭 1 小时,加入一抗抗-VEGF(1:200, Catalog No. ab46154, Rabbit polyclonal to mouse VEGF, Abcam, USA)孵育 24 小时。PBS 洗涤 3 次,每次 5 分钟,加入 Alexa 546 标记的二抗(Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.)以及 DAPI 孵育 1 小时。再次 PBS 洗片后置于荧光显微镜下观察。收集剩余六只小鼠的 RPE- 脉络膜复合体,提取蛋白。用小鼠 ELISA 试剂盒(型号 Quantikine; R&D Systems)检测样本中 VEGF 的蛋白水平。在 450 nm 处,以 570 nm 处的吸收分光光度计读数(BIO-RAD 酶标仪 680, 英国),定量分析 VEGF 的蛋白水平。

1.5 统计学方法

应用 SPSS13.0 统计软件进行统计学分析处理。结果以“平均值 $\pm$ 标准差”形式来表示。采用单因素方差分析,进行组间比较。 $P < 0.05$ 时,差异有统计学意义。

2 结果

2.1 姜黄素抑制 CNV 的发展

本研究对荧光素标记的葡聚糖血管灌注后 RPE- 脉络膜铺片分析显示:在 CNV 造模后第 14 天,姜黄素治疗组较对照组 CNV 的面积均显著减少,且 30 mg/kg 姜黄素治疗组 CNV 面积明显小于 10 mg/kg 姜黄素治疗组(图 1)。在 CNV 造模后第 14 天, 对照组平均 CNV 的面积为 $21,208.53 \pm 882.26 \mu\text{m}^2$ ($n=22$);10 mg/kg 姜黄素治疗组 CNV 平均面积为 $17,612.34 \pm 806.66 \mu\text{m}^2$ ($n=18$);30 mg/kg 姜黄素治疗组 CNV 平均面积为 $14,223.65 \pm 682.62 \mu\text{m}^2$ ($n=16$)。如图 2 所示,造模后 14 天姜黄素治疗组的 CNV 面积分别减少了 17%,33% ($P < 0.05$)。在造模后第 14 天,与 10 mg/kg 的剂量相比,30 mg/kg 姜黄素对 CNV 的抑制效果更加显著($P < 0.05$)。

2.2 姜黄素减少 CNV 的渗漏

在眼底照片上所有的激光斑呈中央去色素呈火山口状,边缘伴色素沉着(图 3)。在激光光凝后 14 天,FFA 可见所有激光斑均有渗漏。对照组、10 mg/kg 姜黄素治疗组和 30 mg/kg 姜黄素治疗组荧光素渗漏强度分级依次为 2.75 ± 0.375 , 2.125 ± 0.218 , 1.375 ± 0.468 (图 4)。两两比较差异有统计学意义($P < 0.05$, $n=18$)。

2.3 组织病理学检查

激光造模后 14 天,在激光斑处观察到纤维血管组织,包括

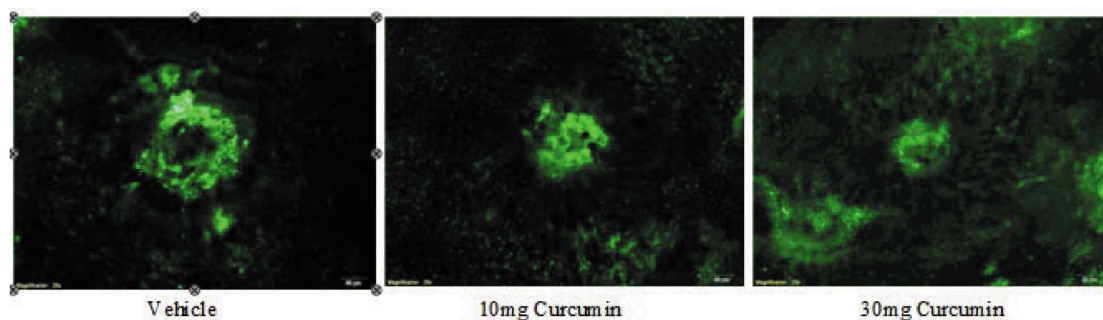


图 1 荧光素标记的葡聚糖血管灌注后脉络膜新生血管图像

Fig.1 Representative micrographs of CNV lesions in the RPE-choroid flat mounts by fluorescein-labeled dextran perfusion

注:造模后 14 天, FITC-葡聚糖血管灌注后色素上皮-脉络膜铺片 CNV 病灶的显微照片。CNV 显示绿色荧光。比例尺 = 50 微米。

Note: Representative micrographs of CNV lesions in the RPE choroid flat mounts from vehicle-treated mice and curcumin-treated mice on day 14 after laser photocoagulation. CNV is indicated by green fluorescence and FITC-dextran angiography. Scale bar = 50 μ m.

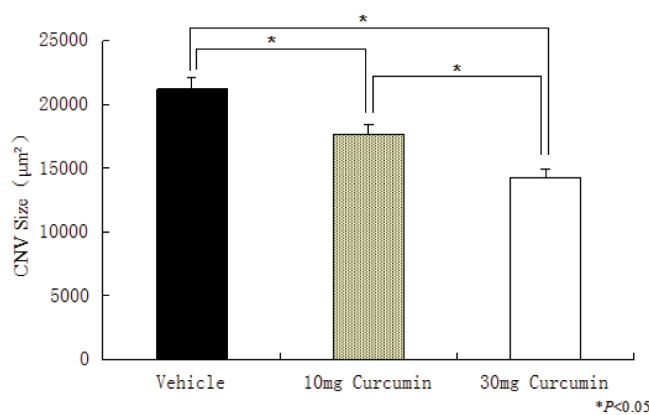


图 2 CNV 面积的统计直方图

Fig.2 Histogram of the comparison of CNV size

注:造模后第 14 天 CNV 面积定量分析:对照组, n= 22; 10 mg / kg 姜黄素治疗组, n=18; 30 mg / kg 姜黄素组, n= 16。*P<0.05。

Note: Quantitative analysis of CNV size in RPE-choroid flat mounts on day 14: Vehicle, n = 22 spots; 10 mg/kg curcumin, n = 18 spots; 30 mg/kg curcumin, n = 16 spots. *P<0.05.

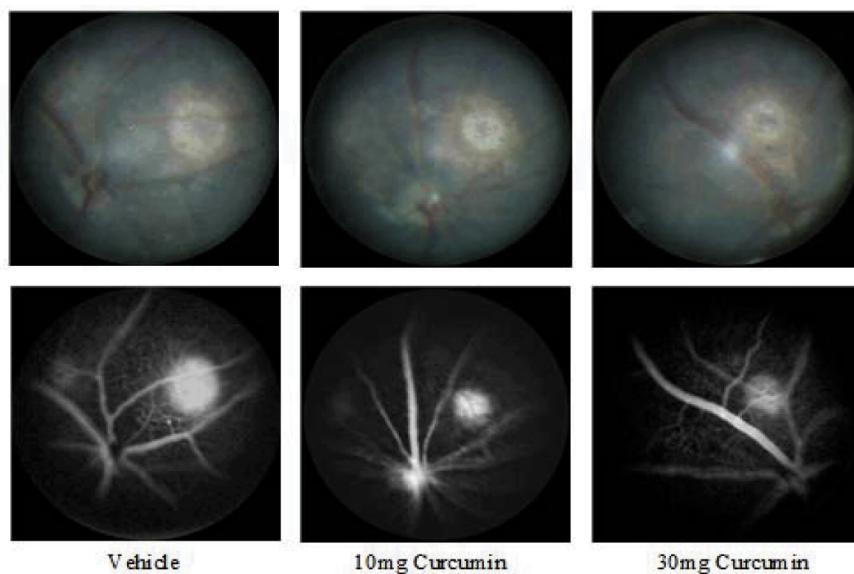


图 3 CNV 眼底照相和荧光血管造影图像

Fig.3 Fundus photography and Fluorescein angiography of CNV

注:图 3 造模后第 14 天对照组和治疗组眼底照片及荧光造影照片。

Note: Fluorescein angiography (FA) of CNV lesions: Representative images of fundus and late-phase FA of vehicle-treated and curcumin-treated mice on day 14 after laser photocoagulation.

血管腔、紊乱的色素团块以及吞噬细胞的浸润。组织学图像显示各组激光斑处外核层排列紊乱,光感受器消失,RPE屏障破坏,以及增厚的脉络膜纤维血管组织。姜黄素治疗组的 CNV 组织的直径和中心厚度小于对照组(图 5)。

2.4 姜黄素抑制 VEGF 的表达

为了探讨姜黄素抑制 CNV 的分子机制,CNV 造模后第三天,用免疫组化和 ELISA 分析了与 CNV 发病密切相关的 VEGF 的表达。通过免疫组化,在激光损伤部位可以观察到较强的 VEGF 阳性免疫反应;与对照组相比,姜黄素能显著减少激光损伤部位 VEGF 免疫染色(图 6)。ELISA 结果显示:与对

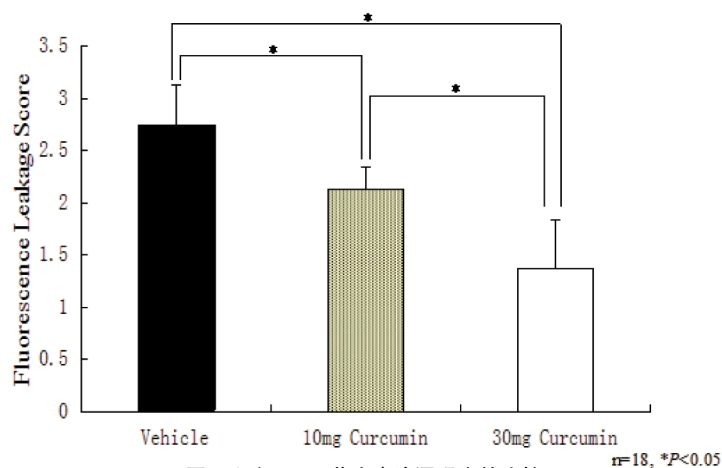


图 4 组间 CNV 荧光素渗漏强度的比较

Fig.4 Histogram of the comparison of CNV score

注:半定量分析对照组和不同剂量治疗组 CNV 的荧光强度(n = 18, *P < 0.05)。

Note: Comparison of semi-quantitative CNV FA score between vehicle- and curcumin-treated mice (n = 18 spots, *P < 0.05).



图 5 CNV 组织学检查

Fig.5 Histology of CNV Lesions

注:造模后第 14 天,光镜下 CNV 组织的 HE 染色图像,显示了对照组和姜黄素治疗组的 CNV 病灶的中心区域。比例尺 = 100 微米。

Note:Haematoxylin-eosin-stained light micrograph of CNV lesions on Day 14 after laser photocoagulation. Each photograph shows the central area of CNV lesions in vehicle-treated or curcumin-treated mice. Scale bar = 100 μ m.

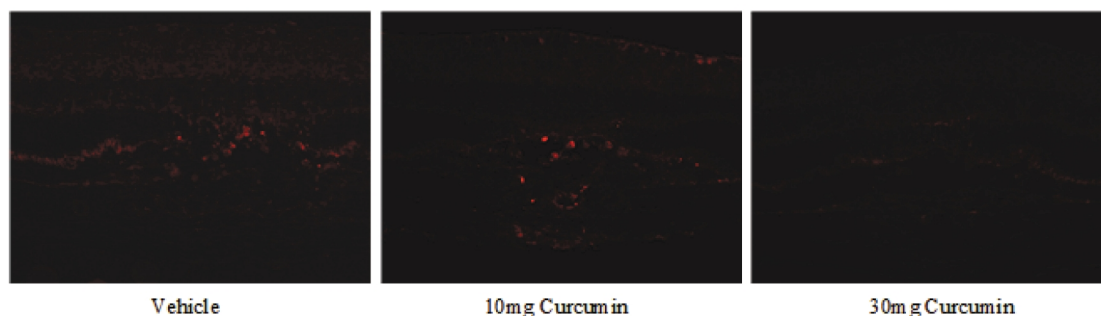


图 6 激光损伤部位 VEGF 免疫组化

Fig. 6 Immunohistochemistry of VEGF in Laser Lesions

注:造模后第 3 天,CNV 组织 VEGF 免疫染色。相比对照组,姜黄素治疗组明显降低血管内皮生长因子的免疫反应。比例尺 = 100 微米。

Note: Immunohistochemistry of VEGF (red) in cryosections on Day 3. Significantly higher levels of VEGF were expressed at the photocoagulated sites. Curcumin apparently decreased VEGF immunoreactivity compared to vehicle treatment. Scale bar = 100 μ m.

照组相比,姜黄素治疗组 RPE- 脉络膜复合体中 VEGF 的表达受到明显的抑制。对照组、10mg/kg 姜黄素治疗组、30mg/kg 姜黄素治疗组的 VEGF 含量分别为 217.83 ± 11.79 pg/mg, 165.83 ± 9.16 pg/mg 和 130.62 ± 8.26 pg/mg。如图 7 所示造模后第 3 天 10mg/kg、30mg/kg 姜黄素治疗组的 VEGF 含量较对照组分别减少了 24%和 40%($P < 0.01, n = 6$)。与 10 mg/kg 的剂量相比,30 mg/kg 姜黄素对 VEGF 的抑制效果更加显著($P < 0.01, n = 6$)。

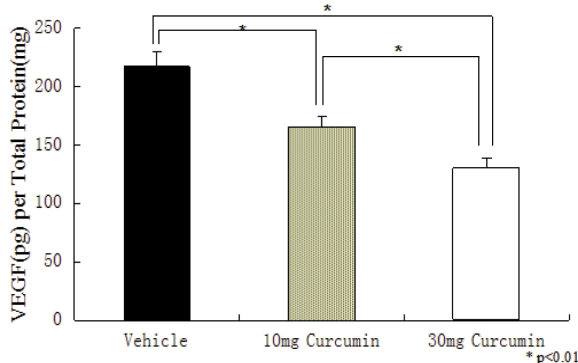


图 7 VEGF 蛋白含量的比较

Fig.7 Histogram of the comparison of VEGF protein

注:姜黄素抑制 VEGF 的产生。造模后第 3 天,姜黄素显著抑制 RPE- 脉络膜中 VEGF($n = 6, * P < 0.01$)的表达。

Note: VEGF protein levels in the choroid-RPE were quantitatively measured by ELISA. VEGF levels on Day 3 were significantly suppressed by curcumin treatment. ($n = 6, * P < 0.01$).

3 讨论

VEGF 在湿性 AMD 患者 CNV 的形成过程中发挥了重要作用^[8]。VEGF 属于血小板源性生长因子(PDGF)超家族中的成员,而 VEGF 家族中又包括 VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D 及胎盘样生长因子(PLGF),其中以 VEGF-A 研究最为广泛^[9]。VEGF 与其受体 VEGFR-1、VEGFR-2 结合后促使下游大量蛋白活化,使血管内皮细胞生长、分化和增生,增加血管的通透性,也是重要的炎症细胞趋化因子。Spilsbury 等在大鼠视网膜下腔注射能表达 VEGF164 的腺病毒载体,注射后 10 d 即可发现 RPE 细胞内 VEGF mRNA 高表达且血管通透性增高,80 d 后可见从脉络膜毛细血管处长出新生血管,逐渐形成脉络膜新生血管并致光感受器死亡^[10]。该研究结果与湿性 AMD 的自然病程类似。根据 VEGF 在 CNV 形成中所起的关键性作用,近年来,抗 VEGF 疗法用于治疗湿性 AMD 取得了突破性的进展。它作用于 VEGF 或 VEGF 信号通路中的某个环节,通过遏制 CNV 生长和减轻异常血管渗漏以保存和提高视力,是已知的最有效的治疗 AMD 方法之一^[11]。

姜黄素是一种天然的抗氧化剂,可作为抗突变及和抗癌剂,具有安全、无显著不良反应等特点。大量研究表明,姜黄素可抑制体内、外肿瘤细胞的生长,同时具有抗新生血管生成的作用^[12]。姜黄素抑制血管生成的机制尚未完全明确,但 Thaloor 等的研究发现,姜黄素可以对人视网膜血管内皮细胞(HUVEC)的血管生成产生明显的抑制作用^[13]。并认为姜黄素可通过调节

金属蛋白酶活性,从而抑制血管生成。在我们的研究中,姜黄素在激光诱导 CNV 早期,能显著减少 VEGF 的表达,与文献报道结果一致。Mrudula 等的研究发现,在喂食姜黄素的糖尿病大鼠的视网膜组织中,VEGF 的表达水平要低于正常喂养组。并分析认为姜黄素可以下调低氧诱导因子 1 (HIF-1),从而抑制 VEGF 的表达^[14]。Premanand 等在体外实验中,观察到姜黄素可以诱导 RPE 细胞的凋亡,减少 VEGF 的释放^[15]。因此,我们推测姜黄素可以通过抑制 VEGF 的表达,来抑制 CNV 的发生发展。

CNV 是导致 AMD 患者严重和不可逆的视力损伤的最主要原因,本研究评估了姜黄素治疗激光诱导小鼠 CNV 模型的疗效。与对照组相比,姜黄素治疗组的小鼠有较小的 CNV 面积及较少的荧光渗漏。这表明姜黄素可有效地抑制实验性 CNV 的发生。姜黄素治疗的剂量反应表明,30 mg/kg 的剂量与 10 mg/kg 的剂量相比,具有较高的抑制 CNV 效果,由此可见,姜黄素治疗 CNV 存在剂量依赖性,较高剂量的姜黄素具有更显著的 CNV 抑制作用。在既往的文献中我们观察到,小鼠腹腔内注射姜黄素的浓度范围为 10 mg/kg 至 100 mg/kg^[16,17]。为了选择最佳的小鼠腹腔注射浓度,我们曾做了剂量反应试验。我们使用 10 mg/kg、30 mg/kg 和 90 mg/kg 的剂量来评估姜黄素的治疗价值。结果显示姜黄素在上述的剂量都能明显减少 CNV 的面积。与 10 mg/kg 的剂量相比,30 mg/kg 和 90 mg/kg 的治疗组的抑制作用更强。尽管 90 mg/kg 姜黄素治疗组的 CNV 面积看上去要小于 30 mg/kg 注射组,但两者数据之间没有统计学意义。在实验中,我们也观察了三个剂量的姜黄素注射后在腹腔的沉积情况。10 mg/kg 和 30 mg/kg 注射的小鼠的腹膜上没有观察到姜黄素的沉积,而注射 90 mg/kg 姜黄素的小鼠腹膜上都存在姜黄素的沉积。这说明姜黄素在 90 mg/kg 的注射剂量上不能被完全吸收。因此本研究选择了 10 mg/kg 和 30 mg/kg 来评估姜黄素对小鼠 CNV 的影响。

姜黄素目前已经应用于临床,在治疗类风湿性关节炎、慢性前葡萄膜炎、眼眶炎性假瘤等疾病的实验研究中,姜黄素起到了有效的抗炎作用^[18,19],同时高剂量的姜黄素在人体的使用中未观察到明显的副作用,证明姜黄素对人体是安全有效的^[20]。本研究结果表明,姜黄素可以明显抑制激光诱导的脉络膜新生血管形成,并通过下调 VEGF 的表达起作用。因此,我们推测其可能成为一种临床治疗湿性 AMD 的新型药物。姜黄素抑制 VEGF 的表达从而抑制 CNV 的生长的作用机制仍不明确,需要进一步的研究证实。此外,姜黄素在人体中抑制 CNV 的最佳治疗浓度和用药方式仍需待进一步探讨。

参考文献(References)

- [1] Lim LS, Mitchell P, Seddon JM, et al. Age-related macular degeneration[J]. Lancet, 2012, 379(9827): 1728-1738
- [2] Fine SL, Berger JW, Maguire MG, et al. Age-related macular degeneration[J]. N Engl J Med, 2000, 342: 483-492
- [3] 卜荔,李寿玲.抗 VEGF 药物治疗新生血管性眼病的研究进展[J].临床眼科杂志,2011, 19(1): 91-93
- Bu Li, Li Shou-ling. Research progress on anti-VEGF Treatment for the ocular neovascular diseases[J]. Journal of Clinical Ophthalmology, 2011, 19(1): 91-93

(下转第 12 页)

- [9] Mizel SB, Graff AH, Sriranganathan N, et al. Flagellin-F1-V fusion protein is an effective plague vaccine in mice and two species of nonhuman primates[J]. Clin Vaccine Immunol, 2009, 16(1): 21-28
- [10] Bargieri DY, Rosa DS, Braga CJ, et al. New malaria vaccine candidates based on the Plasmodium vivax Merozoite Surface Protein-1 and the TLR-5 agonist Salmonella Typhimurium FliC flagellin[J]. Vaccine, 2008, 26(48): 6132-6142
- [11] Treanor JJ, Taylor DN, Tussey L, et al. Safety and immunogenicity of a recombinant hemagglutinin influenza-flagellin fusion vaccine (VAX125) in healthy young adults[J]. Vaccine, 2010, 28(52): 8268-8274
- [12] Taylor DN, Treanor JJ, Sheldon EA, et al. Development of VAX128, a recombinant hemagglutinin (HA) influenza-flagellin fusion vaccine with improved safety and immune response [J]. Vaccine, 2012, 30(39): 5761-5769
- [13] Turley CB, Rupp RE, Johnson C, et al. Safety and immunogenicity of a recombinant M2e-flagellin influenza vaccine (STF2.4xM2e) in healthy adults[J]. Vaccine, 2008, 29(32): 5145-5152
- [14] Smith KD, Andersen-Nissen E, Hayashi F, et al. Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility[J]. Nat Immunol, 2003, 4(12): 1247-1253
- [15] Nempoint C, Cayet D, Rumbo M, et al. Deletion of flagellin's hypervariable region abrogates antibody-mediated neutralization and systemic activation of TLR5-dependent immunity [J]. J Immunol, 2008, 181(3): 2036-2043
- [16] Song L, Zhang Y, Yun NE, et al. Superior efficacy of a recombinant flagellin:H5N1 HA globular head vaccine is determined by the placement of the globular head within flagellin [J]. Vaccine, 2009, 27(42): 5875-5884
- [17] Huleatt JW, Jacobs AR, Tang J, et al. Vaccination with recombinant fusion proteins incorporating Toll-like receptor ligands induces rapid cellular and humoral immunity[J]. Vaccine, 2007, 25(4): 763-775
- [18] Huleatt JW, Nakaar V, Desai P, et al. Potent immunogenicity and efficacy of a universal influenza vaccine candidate comprising a recombinant fusion protein linking influenza M2e to the TLR5 ligand flagellin[J]. Vaccine, 2008, 26(2): 201-214
- [19] Hong SH, Byun YH, Nguyen CT, et al. Intranasal administration of a flagellin-adjuvanted inactivated influenza vaccine enhances mucosal immune responses to protect mice against lethal infection[J]. Vaccine, 2012, 30(2): 466-474

(上接第56页)

- [4] VEGF Inhibition Study in Ocular Neovascularization (V.I.S.I.O.N.) Clinical Trial Group. Year 2 efficacy Results of 2 randomized controlled clinical trials of pegaptanib for neovascular Age-Related macular degeneration[J]. Ophthalmology, 2006, 113: 1508
- [5] 李婧,邢怡桥,贺涛,等. 姜黄素对氧诱导的视网膜新生血管形成的影响[J]. 中华眼底病杂志, 2010, 26(3): 227-230
- Li Jing, Xing Yi-qiao, He Tao, et al. Effects of curcumin on the oxygen-induced retinal neovascularization[J]. Chin J Ocul Fundus Dis, 2010, 26(3): 227-230
- [6] Kim JS, Choi JS, Chung SK. The effect of curcumin on corneal neovascularization in rabbit eyes[J]. Curr Eye Res, 2010, 35(4): 274-280
- [7] Takehana Y, Kurokawa T, Kitamura T, et al. Suppression of laser-induced choroidal neovascularization by oral tranilast in the rat [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1999, 40: 459-466
- [8] Grisanti S, Tatar O. The role of vascular endothelial growth factor and other endogenous interplayers in age-related macular degeneration[J]. Prog Retin Eye Res, 2008, 27: 372-390
- [9] Miller JW, Le Couter J, Strauss EC, et al. Vascular endothelial growth factor a in intraocular vascular disease [J]. Ophthalmology, 2013, 120(1): 106-114
- [10] Spilsbury K, Garrett KL, Shen WY, et al. Overexpression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the retinal pigment epithelium leads to the development of choroidal neovascularization [J]. Am J Pathol, 2000, 157(1): 135-144
- [11] Ciulla TA, Rosenfeld PJ. Antivascular endothelial growth factor therapy for neovascular age-related macular degeneration[J]. Curr Opin Ophthalmol, 2009, 20: 158-165
- [12] Zhou H, Beevers CS, Huang S. The targets of curcumin [J]. Curr Drug Targets, 2011, 12: 332-347
- [13] Motterlini R, Foresti R, Bassi R, et al. Curcumin, an antioxidant and anti-inflammatory agent, induces heme oxygenase-1 and protects endothelial cells against oxidative stress[J]. Free Radic Biol Med, 2000, 28(8): 1303-1312
- [14] Mrudula T, Suryanarayana P, Srinivas PN, et al. Effect of curcumin on hyperglycemia-induced vascular endothelial growth factor expression in streptozotocin-induced diabetic rat retina[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 361: 528-532
- [15] Premanand C, Rema M, Sameer MZ, et al. Effect of curcumin on proliferation of human retinal endothelial cells under in vitro conditions[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2006, 47: 2179-2184
- [16] Kulkarni SK, Bhutani MK, Bishnoi M. Antidepressant activity of curcumin: involvement of serotonin and dopamine system[J]. Psychopharmacology, 2008, 201(3): 435-442
- [17] Yu WG, Xu G, Ren GJ, et al. Preventive action of curcumin in experimental acute pancreatitis in mouse [J]. Indian J Med Res, 2011, 11(5): 717-724
- [18] Allegri P, Mastromarino A, Neri P. Management of chronic anterior uveitis relapses: efficacy of oral phospholipidic curcumin treatment. Long-term follow-up[J]. Clin Ophthalmol, 2010, 21: 1201-1206
- [19] Lal B, Kapoor AK, Agrawal PK, et al. Role of curcumin in idiopathic inflammatory orbital pseudotumours[J]. Phytother Res, 2000, 14: 443-447
- [20] Nita Chainani-WU, D.M.D., M.P. H. Safety and Anti-Inflammatory Activity of Curcumin: A Component of Tumeric [J]. The Journal of Alternative and Complementary Medicine, 2003, 9(1): 191-198