

虫草素对高糖培养的恒河猴脉络膜-视网膜血管内皮细胞血管新生的影响

朱小丽*, 孙小凤*, 赖铭莹

基金项目: 深圳市知识创新计划基础研究项目 (No. JCYJ20130402145545766); 深圳市科技计划项目 (No. 201202144)

作者单位: (518000) 中国广东省深圳市, 深圳市眼科医院 暨南大学附属深圳市眼科医院 深圳眼科学重点实验室

作者简介: 朱小丽, 女, 副主任护师, 护士长, 研究方向: 眼科护理; 孙小凤, 女, 毕业于暨南大学, 硕士, 主治医师, 研究方向: 眼底病。

注: * 朱小丽和孙小凤对本文贡献一致。

通讯作者: 赖铭莹, 毕业于中山大学眼科中心, 博士, 主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向: 青光眼、眼底病. laimydoc@163.com

收稿日期: 2016-01-27 修回日期: 2016-06-14

Anti-angiogenic mechanism of cordycepin on rhesus macaque choroid - retinal endothelial cell line cultured in high glucose condition

Xiao-Li Zhu*, Xiao-Feng Sun*, Ming-Ying Lai

Foundation items: Shenzhen Knowledge Innovation Program of Basic Research (No. JCYJ20130402145545766); Shenzhen Science and Technology Plan Project (No. 201202144)

Shenzhen Eye Hospital Affiliated to Jinan University, Shenzhen Key Laboratory of Ophthalmology, Shenzhen 518000, Guangdong Province, China

Co-first authors: * : Xiao-Li Zhu and Xiao-Feng Sun.

Correspondence to: Ming - Ying Lai. Shenzhen Eye Hospital Affiliated to Jinan University, Shenzhen Key Laboratory of Ophthalmology, Shenzhen 518000, Guangdong Province, China. laimydoc@163.com

Received: 2016-01-27 Accepted: 2016-06-14

Abstract

• **AIM:** To investigate the angiogenesis effect and protective mechanism of cordycepin on rhesus macaque choroid-retinal endothelial (RF/6A) cell line cultured in high glucose condition.

• **METHODS:** Cultured RF/6A cells were divided into normal control group, high glucose group and high glucose (HG) + different concentration cordycepin groups (HG+10 μ g/mL group, HG+50 μ g/mL group, HG+100 μ g/mL group). The cell proliferation was assessed using cholecystokinin octapeptide dye after treated for 48h. The cell migration was investigated by a Transwell assay. The tube formation was measured on Matrigel. Furthermore, the impact of cordycepin on high glucose - induced

activation of VEGF and VEGF receptor 2 (VEGFR-2) was tested by Western blot analysis.

• **RESULTS:** Compared with normal control group, cell viability markedly increased in high glucose group ($P < 0.05$). Cordycepin inhibited RF/6A cell proliferation in a dose-dependent fashion: 10.2 \pm 0.9%, 23.4 \pm 1.5% and 31.1 \pm 1.2% inhibition as the concentrations of cordycepin were 10, 50 and 100 μ g/mL, respectively. The difference had statistically significant ($P < 0.05$) compared with high glucose group. The number of cell migration were 55.6 \pm 2.70, 87.4 \pm 2.40, 65.4 \pm 2.7, 57.8 \pm 2.38, 62.4 \pm 2.77 in normal control group, high glucose group and HG+10 μ g/mL group, HG+50 μ g/mL group, HG+100 μ g/mL group respectively. Migration of RF/6A conspicuously increased in high glucose group ($P < 0.05$) compared with normal control group; while showing a gradually reducing trend with the increase of cordycepin dose and a statistically significant difference compared with high glucose group ($P < 0.05$). The number of tube formation were 18.7 \pm 2.08, 25.7 \pm 1.52, 19.9 \pm 1.57, 16.3 \pm 2.51, 5.67 \pm 1.72 in the abovementioned group. Similarly showing a gradually reducing trend with the increase of cordycepin dose and a statistically significant difference with high glucose group ($P < 0.05$). In addition, the number of tube formation of RF/6A in high glucose group significant increased compared with normal control group ($P < 0.05$). The expression of VEGF and VEGFR-2 dramatically increased in high glucose group vs normal control group, oppositely gradually decreased with the increase of cordycepin concentrations, and had a statistically significant difference vs high glucose group ($P < 0.05$).

• **CONCLUSION:** Cordycepin can suppress the proliferation, migration and tube formation of RF/6A in high glucose condition, might via inhibiting expression of VEGF and VEGFR-2.

• **KEYWORDS:** Cordycepin; high glucose condition; rhesus macaque choroid-retinal endothelial (RF/6A) cell line; vascular endothelial growth factor; neovascularization

Citation: Zhu XL, Sun XF, Lai MY. Anti-angiogenic mechanism of cordycepin on rhesus macaque choroid-retinal endothelial cell line cultured in high glucose condition. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2016;16(7):1237-1241

摘要

目的: 观察虫草素对高糖培养的恒河猴脉络膜-视网膜血管内皮细胞 (RF/6A) 血管新生作用的影响, 探讨其可能的作用机制。

方法:培养 RF/6A 细胞,分为正常对照组(NC组)、高糖对照组(HG组)、高糖加不同浓度的虫草素组(HG+10 μ g/mL组、HG+50 μ g/mL组、HG+100 μ g/mL组)。采用 CCK8 法检测各组细胞的增殖活性;采用 Transwell 实验检测各组细胞的迁移;采用 Matrigel 检测各组管腔形成的情况;采用 Western-blot 检测各组细胞中 VEGF 和 VEGFR2 蛋白表达的情况。

结果:与 NC 组相比,HG 组 RF/6A 的增殖活性增加($P < 0.05$)。不同浓度的虫草素对 RF/6A 的增殖均有抑制作用,随着虫草素浓度增加,细胞活性下降。HG+10 μ g/mL 组、HG+50 μ g/mL 组、HG+100 μ g/mL 组的增殖活性抑制率分别为(10.2 \pm 0.9)%、(23.4 \pm 1.5)%、(31.1 \pm 1.2)% ,与 HG 组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。NC 组、HG 组、HG+10 μ g/mL 组、HG+50 μ g/mL 组、HG+100 μ g/mL 组细胞迁移个数分别为 55.6 \pm 2.70、87.4 \pm 2.40、65.4 \pm 2.7、57.8 \pm 2.38、62.4 \pm 2.77 个。与 NC 组相比,HG 组迁移细胞数量增加($P < 0.05$);不同浓度虫草素组细胞迁移数量随着虫草素浓度的增加而减少,与 HG 组相比,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。NC 组、HG 组、HG+10 μ g/mL 组、HG+50 μ g/mL 组、HG+100 μ g/mL 组的细胞管腔形成个数分别为 18.7 \pm 2.08、25.7 \pm 1.52、19.9 \pm 1.57、16.3 \pm 2.51、5.7 \pm 1.72 个。与 NC 组相比,HG 组细胞管腔形成个数增加($P < 0.05$);不同浓度虫草素组细胞管腔形成个数随着虫草素浓度的增加而减少,与 HG 组相比,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。与 NC 组相比,HG 组 VEGF 和 VEGFR2 蛋白表达的量增加($P < 0.05$);不同浓度虫草素组中细胞内 VEGF 和 VEGFR2 蛋白表达的量均低于高糖对照组($P < 0.05$)。

结论:虫草素可能通过抑制高糖下 VEGF 和 VEGFR2 蛋白的表达,抑制 RF/6A 细胞增殖、迁移和管腔形成,进而抑制血管新生。

关键词:虫草素;高糖培养;恒河猴脉络膜-视网膜血管内皮细胞;血管内皮生长因子;血管新生

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2016.7.08

引用:朱小丽,孙小凤,赖铭莹. 虫草素对高糖培养的恒河猴脉络膜-视网膜血管内皮细胞血管新生的影响. 国际眼科杂志 2016;16(7):1237-1241

0 引言

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是糖尿病最常见和严重的微血管并发症之一。DR 发病机制复杂,其中以血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factors, VEGF)为主的促血管生长因子在眼部的过度表达是导致 DR 发生、发展的重要因素^[1]。在 DR 病理过程中,高糖可导致视网膜血管内皮细胞过度分泌 VEGF,引起血管内皮细胞损伤,血管通透性增加,毛细血管闭塞,促进视网膜组织的缺血缺氧,最终引起新生血管的形成^[2-3]。过度分泌的 VEGF 与其受体(主要是 VEGFR2 受体)结合磷酸化后,激活下游信号通路,诱导内皮细胞的增殖、迁移和管腔形成,导致新生血管形成增加^[4]。虫草素是冬虫夏草中提取的单体,是虫草制剂作用的核心成分,最早用于肿瘤的治疗,近年来它的抗新生血管活性也逐渐受到关注。吉川纪子^[5]于 2005 年通过体内实验发现,虫草素具有剂量依赖性抑制血管新生作用。蔡伟等^[6]研究结果证明,虫

草素能抑制结肠癌细胞质中 VEGF 的表达。但虫草素对 VEGF 和 VEGFR2 在血管内皮细胞上表达的影响还没有报道。本研究拟将体外培养的 RF/6A 置于高糖环境下,观察虫草素对其增殖活性、迁移、管腔形成及 VEGF 和 VEGFR2 蛋白表达的影响,为虫草素应用于 DR 提供实验研究的支持。

1 材料和方法

1.1 材料 RF/6A 细胞(中科院上海细胞库);虫草素(美国 Sigma 公司);DMEM 培养基(美国 Hyclone 公司);胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、0.25% 胰蛋白酶-ETDA 消化液(美国 Gibco);青霉素、链霉素(Cyagen 公司);CCK8 试剂盒(日本同仁公司);Transwell 小室(美国 Corning 公司);苏木精染色液(上海碧云天生物科技公司);Matrigel(美国 BD 公司);兔抗人 VEGF 多克隆抗体(美国 NovusBiologicals 公司);KDR 多克隆抗体(德国 Global Biotech 公司);山羊抗兔 IgG HRP(美国 Abcam 公司);细胞恒温 CO₂ 细胞培养箱(美国 Thermo 公司);酶标仪(美国 BioTek 公司);荧光倒置显微镜(德国 Leica 公司);凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司);电泳仪(美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 方法

1.2.1 RF/6A 细胞的培养 采用含 10% FBS 和 1% 青链霉素双抗的 25mmol/L 高糖 DMEM 培养液和 5.5mmol/L 正常 DMEM 培养液分别作为生长培养基。将 RF/6A 细胞接种到 75cm² 培养瓶内,制成密度为 5 \times 10⁵/瓶的细胞悬液,置于恒温 37 $^{\circ}$ C、体积分数 5% CO₂ 培养箱内培养,待细胞铺满瓶底后,用 0.25% 胰蛋白酶-ETDA 消化,按 1:2 或 1:3 分瓶传代,取生长良好的第 3~4 代细胞,用于下一步实验。

1.2.2 细胞分组 将细胞分为 5 组,分别为 NC 组:5.5mmol/L 葡萄糖的 DMEM 培养下的正常对照组;HG 组:25mmol/L 高糖 DMEM 培养下的高糖对照组;HG+10 μ g/mL 组:在高糖组中加入 10 μ g/mL 虫草素;HG+50 μ g/mL 组:在高糖组中加入 50 μ g/mL 虫草素;HG+100 μ g/mL 组:在高糖组中加入 100 μ g/mL 虫草素。

1.2.3 CCK8 检测 RF/6A 细胞增殖活性 取对数生长期 RF/6A 细胞用于实验。按分组分别加入正常和高糖的 DMEM 培养液,制成细胞浓度为 5 \times 10⁴ 个/mL 的细胞悬液,每孔 100 μ L,接种于 96 孔板上,每组 6 个复孔,共 5 组,边缘孔均用无菌 PBS 填充,置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱内孵育。24h 后将其中三组的高糖培养基吸干,分别加入含不同浓度虫草素(10、50、100 μ g/mL)的高糖 DMEM 100 μ L,各组培养 48h 后,吸去孔中的培养基,每天同一时间向每孔内加入含 10% 的 CCK8 (cell counting kit-8, CCK8)溶液的 DMEM 培养液 100 μ L 后放入恒温 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱继续培养 2h,按操作说明用自动酶标仪测 450nm 波长下吸光度 A 值。相同条件下重复实验 3 次。细胞活性抑制率(%)=[(实验组平均 A 值-对照组平均 A 值)/对照组平均 A 值] \times 100%。

1.2.4 Transwell 小室检测 RF/6A 细胞移行 Transwell 小室置于含 10% FBS 的 DMEM 培养液 600 μ L 的 24 孔板中,正常组为 5.5mmol/L 葡萄糖的 DMEM 培养液,高糖组和虫草素组为 25mmol/L 葡萄糖的 DMEM 培养液,接种 RF/6A 细胞于上室,密度为 6 \times 10³/孔。每孔上室按不同分组加入含相应浓度虫草素的无血清培养基 100 μ L。

37℃、5% CO₂ 培养箱培养 24h 后,取出小室,弃去培养液,用棉签轻轻擦掉小室上层未迁出的细胞,4% 多聚甲醛固定小室 20min,将小室适当风干后,0.1% 结晶紫染色 20min,PBS 洗 3 次。细胞在 400 倍显微镜下随机取 5 个视野照相,所得细胞数的平均值用以统计分析。每组 3 个复孔,重复实验 3 次。

1.2.5 Matrigel 检测内皮细胞管腔形成 在 4℃ 下提前融化 Matrigel。取 96 孔板,每孔内缓慢加入 100μL 液态 Matrigel(所有操作均在冰上进行)。消化 RF/6A 细胞,用正常和高糖 DMEM 培养基分别稀释为 2×10⁵ 个/mL 细胞悬液。每孔加入 50μL,设 3 个复孔,按不同分组每孔加入相应浓度的虫草素。孵育 12h 后在显微镜下观察,随机取 5 个不同视野照相,对形成的完整管腔计数,取平均值。每组设 3 个复孔,重复实验 3 次。

1.2.6 Western-Blot 法检测各组 RF/6A 细胞中 VEGF 和 VEGFR2 蛋白的表达 六孔板正常和高糖 DMEM 培养液培养 RF/6A 细胞,虫草素组每孔中加入不同浓度的虫草素(10、50、100μg/mL),高糖组和正常组不加虫草素,药物作用 48h 后,收集细胞。冰上超声波粉碎仪粉碎细胞,12000r/min,4℃ 离心 30min,收集、测定并调节上清蛋白浓度后,SDS-PAGE 电泳(150V 电压)后转移至 PVDF 膜,5% BSA 室温下封闭 2h,VEGF 及 VEGFR2 一抗(分别为 1:1000,1:500)4℃ 下孵育过夜,TBST 清洗 3 次,再以相应的辣根过氧化物酶标记的二抗(均为 1:5000)37℃ 摇床孵育 1h,TBST 清洗 3 次。ECL 显影液显色,用 Bio-Rad 凝胶成像系统成像后,图片用 Image J 软件分析条带的信号强弱,以 GAPDH 为内参照,计算蛋白的相对表达量。

统计学分析:采用 SPSS 19.0 统计学软件进行统计分析。所得实验数据均以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,将数据进行正态分布检验和方差齐性检验后,采用单因素方差分析,组间两两比较用 Bonferroni 方法分析,以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 虫草素对 RF/6A 细胞增殖活性的影响 CCK8 结果显示,与 NC 组比较,HG 组 RF/6A 细胞增殖活性明显提高,差异具有统计学意义($P<0.05$)。虫草素对 RF/6A 增殖有抑制作用,与 HG 组相比,HG+10μg/mL 组、HG+50μg/mL 组、HG+100μg/mL 组细胞活性抑制率分别为(10.2±0.9)%、(23.4±1.5)%、(31.1±1.2)%。随着虫草素浓度的增加,细胞活性下降,与 HG 组比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。各组间比较差异具有统计学意义($F_{\text{组间}}=90.283, P<0.05$,图 1)。

2.2 虫草素对 RF/6A 细胞迁移的影响 Transwell 实验结果显示,NC 组、HG 组、HG+10μg/mL 组、HG+50μg/mL 组、HG+100μg/mL 组细胞迁移个数分别为 55.6±2.70、87.4±2.40、65.4±2.7、57.8±2.38、62.4±2.77 个,各组间比较差异具有统计学意义($F=185.651, P<0.05$)。与 NC 组相比,HG 组细胞迁移个数明显增加($P<0.05$),与 HG 组相比,不同浓度虫草素对 RF/6A 细胞的迁移均有抑制作用,且随着虫草素浓度的增加,移行细胞个数逐渐减少,差异有统计学意义($P<0.05$,图 2)。

2.3 虫草素对 RF/6A 细胞管腔形成的影响 Matrigel 实验结果显示,NC 组、HG 组、HG+10μg/mL 组、HG+50μg/mL 组、HG+100μg/mL 组细胞的管腔形成个数分别为 18.7±

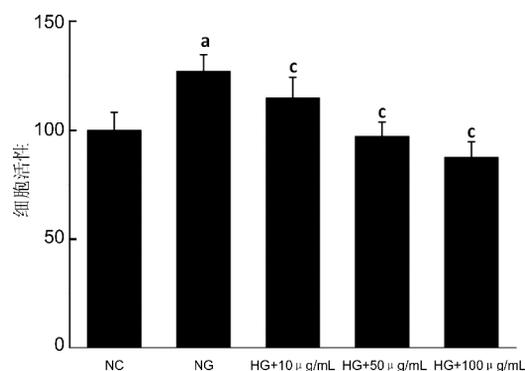


图 1 虫草素对高糖下 RF/6A 细胞活性的抑制作用 ^a $P<0.05$ vs NC 组;^c $P<0.05$ vs HG 组。

2.08、25.7±1.52、19.9±1.57、16.3±2.51、5.7±1.72 个,各组间比较差异具有统计学意义($F=58.207, P<0.01$)。与 NC 相比,HG 组细胞管腔形成个数明显增加($P<0.05$)。与 HG 组相比,不同浓度虫草素对 RF/6A 细胞的管腔形成均有抑制作用,且随着虫草素浓度的增加,管腔形成个数逐渐减少,差异有统计学意义($P<0.05$,图 3)。

2.4 各组 RF/6A 细胞中 VEGF 和 VEGFR2 蛋白的表达

Western-Blot 实验结果显示,与 NC 组相比,HG 组 VEGF 和 VEGFR2 蛋白表达相对增多($P<0.05$)。与 HG 组相比,不同浓度虫草素对 RF/6A 细胞 VEGF 和 VEGFR2 蛋白表达均有抑制作用($P<0.05$),随着虫草素浓度的提高,VEGF 和 VEGFR2 蛋白表达的量下降。各组间比较差异具有统计学意义($F=217.074, P<0.01$,图 4)。

3 讨论

DR 是糖尿病最常见的眼部微血管并发症,它已成为大多数发达国家工作年龄人群致盲的首要原因。高血糖被认为是 DR 的危险因素,且高血糖的严重程度和持续时间与 DR 患病率和严重程度直接相关^[7]。长期慢性高血糖,机体血管渗透性紊乱,视网膜组织缺血缺氧,从而促进大量 VEGF 产生。VEGF 被认为是眼内促新生血管生长因子中的最关键因子,在 DR 的发生发展中扮演非常重要的角色,参与了 DR 形成的各个环节^[8]。血管的新生包括血管内皮基质降解、内皮细胞移行、内皮细胞增殖、内皮细胞管道化分支形成血管环和形成新的基底膜等步骤。抑制 VEGF 的产生及其受体的过度表达可以延缓 DR 病变的发生发展^[9],因此可以抑制 VEGF 表达的药物有望成为糖尿病视网膜病变的有效治疗药物。

虫草素是我国传统中草药中的滋补珍品,是从蛹虫草中提取的一种核苷类抗生素,具有抗肿瘤、抗新生血管、抗白血病、抗菌、免疫调节、清除体内自由基、降血糖、降血脂等多种生物活性和药理作用^[10]。目前多用于抗肿瘤和肾病的治疗,据报道虫草素对糖尿病肾病的治疗取得良好的疗效,可通过下调 TGF-β 的表达抑制高糖诱导的大鼠肾小管上皮细胞转分化的发生^[11-12]。Yoo 等^[13]就冬虫夏草水提取物(cordyceps militaris extract, CME)的抗新生血管及抗肿瘤作用做了有益的探讨,结果发现不管在体内还是体外,虫草素均能通过下调基质金属蛋白酶 MMP-2 的表达,发挥抗新生血管和抗肿瘤的作用,而 MMP-2 对 VEGF、VEGFR2 蛋白的表达具有抑制作用。Won 等^[10]研究也证明了虫草素具有抗炎及抗新生血管的活性。

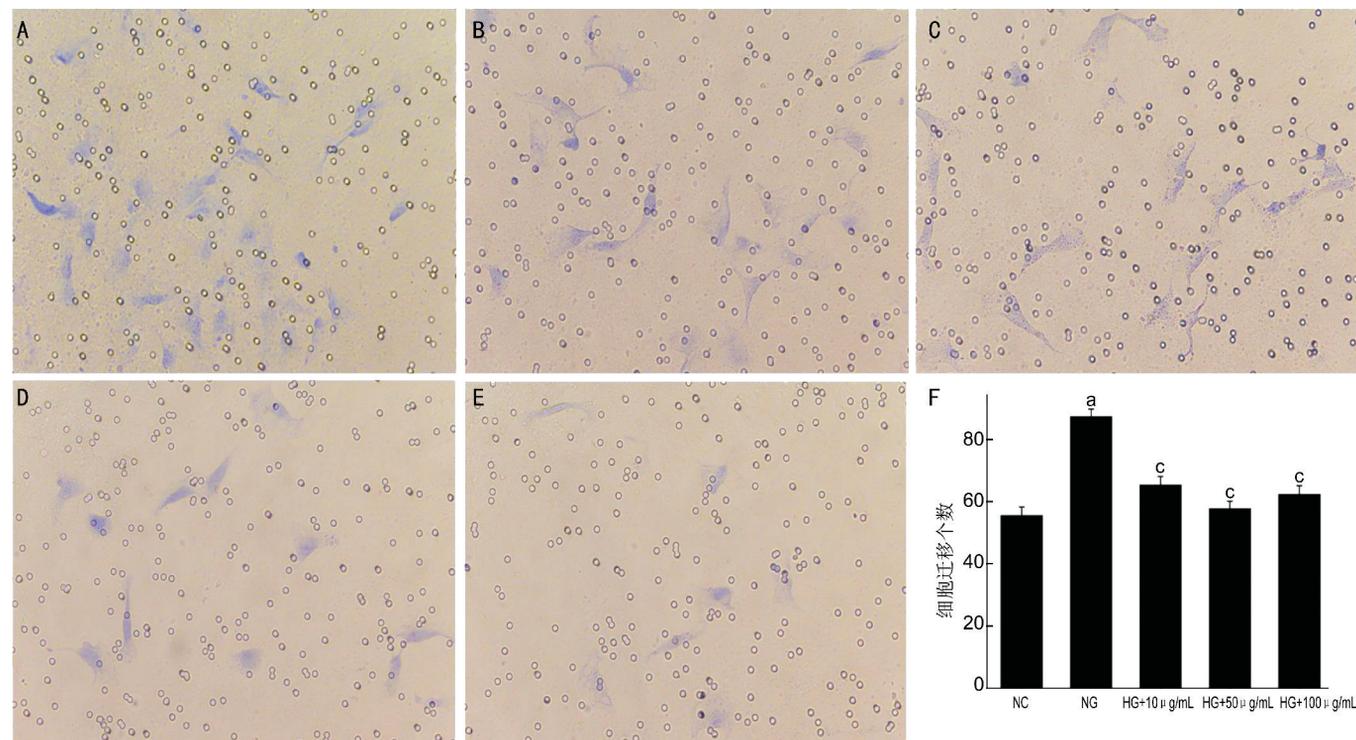


图2 虫草素对高糖下RF/6A细胞迁移的抑制作用(×400) A:NC组;B:HG组;C:HG+10μg/mL组;D:HG+50μg/mL组;E:HG+100μg/mL组;F:虫草素对RF/6A细胞迁移抑制作用的条形图(^a*P*<0.05 vs NC组;^c*P*<0.05 vs HG组)。

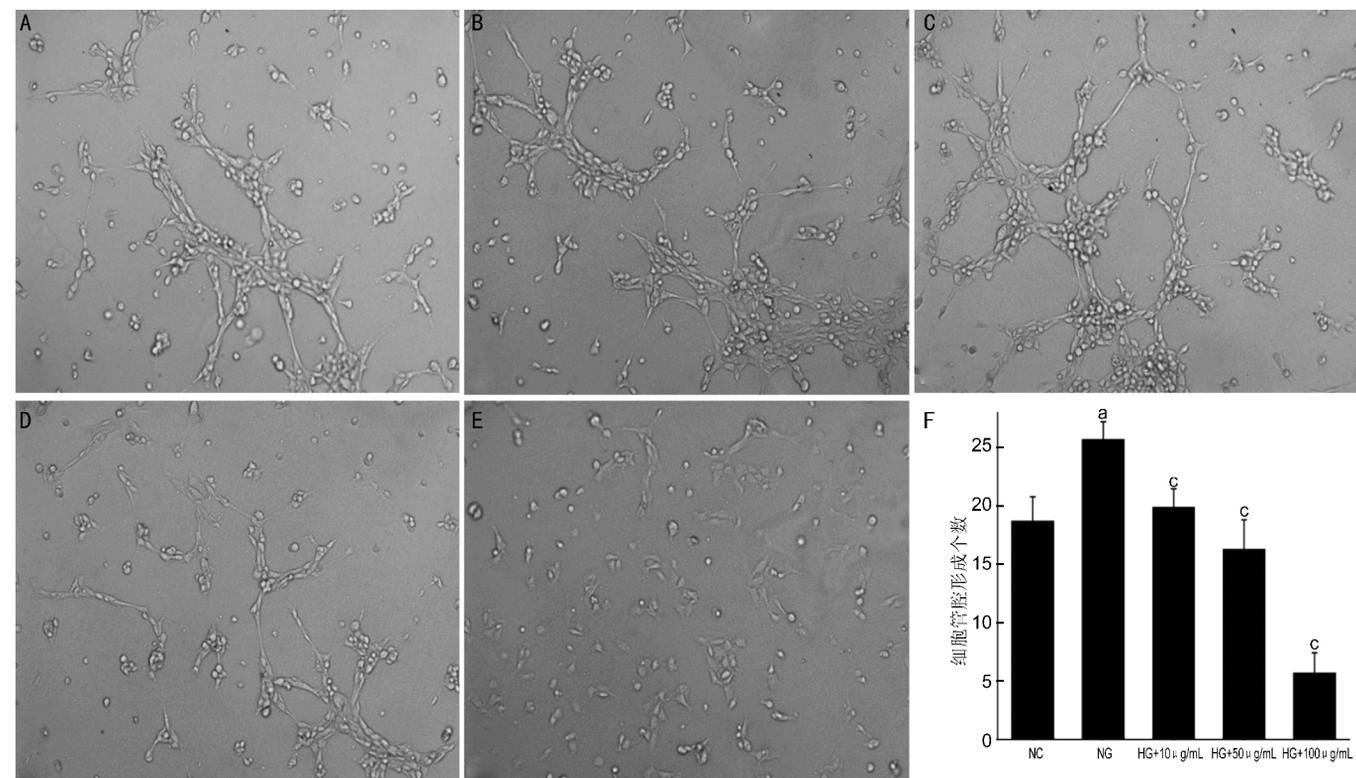


图3 虫草素对高糖下RF/6A细胞管腔形成的抑制作用(×200) A:NC组;B:HG组;C:HG+10μg/mL组;D:HG+50μg/mL组;E:HG+100μg/mL组;F:虫草素对RF/6A细胞管腔形成抑制作用的条形图(^a*P*<0.05 vs NC组;^c*P*<0.05 vs HG组)。

本实验依据相关的文献^[11,14-15]及预实验的结果,选定了10、50、100μg/mL共3个质量浓度进行实验,以证明虫草素对体外高糖条件下RF/6A细胞血管新生的作用,并探讨其可能的作用机制。结果发现,高糖条件下,不同浓度的虫草素对RF/6A增殖、迁移、管腔形成均有抑制作用。而新生血管的生成包括细胞增殖、细胞迁移和管腔形成等过程,因此虫草素在体外高糖环境下能够抑制血管的

新生。VEGF有两种主要受体(VEGFR1和VEGFR2),其中VEGFR2存在于血管和淋巴管内皮等处。在生理和病理血管新生中,VEGFR2均是主要的信号转导蛋白,通过自身磷酸化触发下游一系列信号通路,促进血管的发生。为进一步探讨虫草素抑制高糖下RF/6A细胞血管新生的作用机制,本实验采用Western-Blot的方法检测VEGF和VEGFR2蛋白的表达。与正常组比较,高糖组中的VEGF

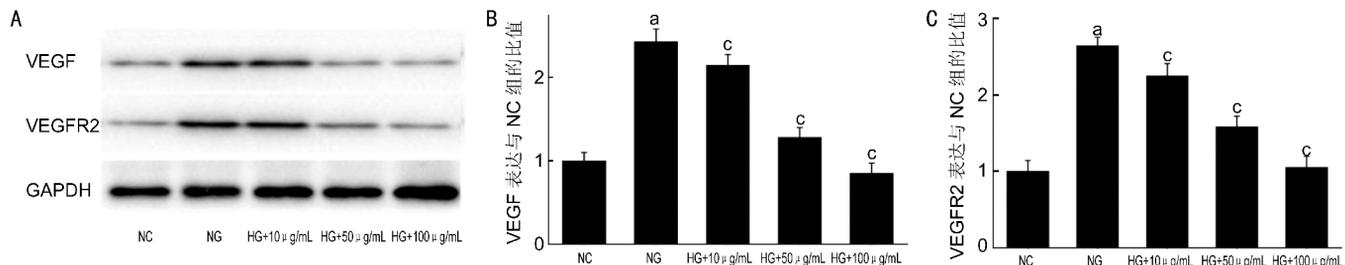


图4 各组 RF/6A 细胞中 VEGF 和 VEGFR2 蛋白的表达 A:各组 RF/6A 细胞中 VEGF 和 VEGFR2 蛋白电泳条带;B:VEGF 表达条形图;C:VEGFR2 表达条形图(^a $P < 0.05$ vs NC 组;^c $P < 0.05$ vs HG 组)。

和 VEGFR2 蛋白表达明显增多,高糖促进了 VEGF 和 VEGFR2 蛋白的表达。不同浓度梯度的虫草素均能下调高糖培养的血管内皮细胞 VEGF 和 VEGFR2 的表达,且随着作用浓度的增加,虫草素抑制血管内皮细胞 VEGF 和 VEGFR2 蛋白表达的作用增强。提示虫草素可能通过改变 VEGF 和 VEGFR2 的表达,从而影响血管新生。因此虫草素抑制细胞 VEGF 和 VEGFR2 表达可能是其抑制血管新生作用的一个重要机制。

本实验首次将虫草素运用于眼科研究,从体外实验着手初步探讨了虫草素对体外高糖培养的 RF/6A 细胞增殖、迁移、管腔形成和 VEGF、VEGFR2 蛋白表达的影响,为虫草素用于体内实验提供了一定参考,为临床治疗 DR 提供了新的思路。但虫草素如何下调 VEGF 和 VEGFR2 蛋白表达的机制需要进一步研究证实。

参考文献

- 1 张承芬. 眼底病学. 北京:人民卫生出版社 2010;284-285
- 2 Rousseau S, Houle F, Huot J. Integrating the VEGF signals leading to actin-based motility in vascular endothelial cells. *Trends Cardiovasc Med* 2000;10(8):321-327
- 3 Campochiaro PA. Retinal and choroidal neovascularization. *J Cell Physiol* 2000;184(3):301-310
- 4 Nakamura S, Morimoto N, Tsuruma K, et al. Tissue kallikrein inhibits retinal neovascularization via the cleavage of vascular endothelial growth factor-165. *Arterioscler Thromb Vase Biol* 2011;31(5):1041-1048
- 5 吉川纪子. 虫草素抑制血管新生的作用. 国际中医中药杂志 2006;28(3):171

- 6 蔡伟,叶青,唐亮,等. 虫草素及虫草多糖对结直肠癌转移的预防作用和调控血管内皮生长因子表达的研究. *上海医学* 2011;34(8):624-628
- 7 Cernák M, Markovic O, Cernák A. The treatment of the rubeosis of the iris and the neovascular glaucoma in proliferative diabetic retinopathy by means of anti-VEGF. *Cesk Slov Oftalmol* 2008;64(6):234-236
- 8 Koleva-Georgieva DN, Sivkova NP, Terzieva D. Serum inflammatory cytokines IL-1beta, IL-6, TNF-alpha and VEGF have influence on the development of diabetic retinopathy. *Folia Med* 2011;53(2):44
- 9 Hernandez C, Simo R. Strategies for blocking angiogenesis in diabetic retinopathy: from basic science to clinical practice. *Exp Opin Invest Drugs* 2007;16(8):1209-1226
- 10 Won SY, Park EH. Anti-inflammatory and related pharmacological activities of cultured mycelia and fruiting bodies of *Cordyceps militaris*. *J Ethnopharmacol* 2005;96(3):555-561
- 11 梁泽智,祝胜郎,陈结慧,等. 虫草素通过下调 TGF-β 抑制高糖诱导的大鼠肾小管上皮细胞转分化. *中国中西医结合肾病杂志* 2014;25(9):773-776
- 12 潘明明,张明辉,倪海峰,等. 冬虫夏草菌粉对 5/6 肾大部切除大鼠肾脏纤维化的抑制作用及机制. *中华肾脏病杂志* 2013;29(5):347-351
- 13 Yoo HS, Shin JW, Cho JH. Effects of *Cordyceps militaris* extract on angiogenesis and tumor growth. *Acta Pharmacol Sin* 2004;25(5):657-665
- 14 Chang W, Lim S, Song H, et al. Cordycepin inhibits vascular smooth muscle cell proliferation. *Eur J Pharmacol* 2008;597(1-3):64-69
- 15 Xiao L, Ge Y, Sun L, et al. Cordycepin inhibits albumin-induced epithelial-mesenchymal transition of renal tubular epithelial cells by reducing reactive oxygen species production. *Free Radic Res* 2012;46(2):174-183