

姜黄素抑制 BN 大鼠脉络膜新生血管的机制研究

陈水龄¹, 亢泽峰², 褚文丽², 郝雪莲², 陶方方¹, 张明明², 李书娇²

引用:陈水龄,亢泽峰,褚文丽,等. 姜黄素抑制 BN 大鼠脉络膜新生血管的机制研究. 国际眼科杂志 2023;23(4):537-545

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81574032)

作者单位:¹(100091)中国北京市,中国中医科学院西苑医院眼科;²(100040)中国北京市,中国中医科学院眼科医院

作者简介:陈水龄,博士研究生,住院医师,研究方向:中西医结合治疗眼底病。

通讯作者:亢泽峰,博士研究生,主任医师,研究方向:中西医结合治疗眼科疾病. zefeng2531@163.com

收稿日期:2022-05-12 修回日期:2023-03-17

摘要

目的:探讨姜黄素抑制 BN 大鼠脉络膜新生血管(CNV)的机制。

方法:激光光凝诱导 BN 大鼠 36 只建立 CNV 模型,随机分为 6 组,每组 6 只。正常组 BN 大鼠正常饲养,不做干预;实验组 BN 大鼠行 532nm 倍频激光光凝后,根据不同分组分别干预 14d:模型组:生理盐水灌胃 14d;雷珠单抗组:光凝后第 2d 玻璃体腔注射雷珠单抗注射液(10mg/mL, 0.2mL/支)1 次 5 μ L。姜黄素组:低[100mg/(kg·d)]、中[200mg/(kg·d)]、高[400mg/(kg·d)]剂量的姜黄素混悬液分别灌胃 14d。光凝 14d 后进行眼底照相、FFA 与 ICGA 检查。制作 BN 大鼠 CNV 眼组织病理学标本,采用 HE 染色法观察不同组 CNV 中央厚度。制作 BN 大鼠 CNV 眼组织病理学标本,采用免疫组织化学法观察不同组 CNV 眼组织中 AKT/p-AKT/HIF-1 α /VEGF 信号通路各因子蛋白的表达情况。采用 RT-qPCR 法检测 CNV 眼组织中 AKT/HIF-1 α /VEGF 信号通路各因子 mRNA 的相对表达量。采用蛋白免疫印迹(Western blot)法检测 CNV 眼组织中 AKT/p-AKT/HIF-1 α /VEGF 信号通路各因子蛋白的相对表达量。

结果:模型组,雷珠单抗组,姜黄素低、中、高剂量组 CNV 生成率分别为 78.18%、73.21%、77.19%、75.86%、74.55%,均大于 70%;荧光素渗漏平均光密度值分别为 182.12 \pm 6.59、119.22 \pm 8.03、166.45 \pm 8.33、164.34 \pm 5.69、149.22 \pm 6.45;雷珠单抗组较模型组显著降低($P<0.05$);姜黄素低、中、高剂量组较雷珠单抗组显著升高($P<0.05$),其中姜黄素高剂量组较模型组显著降低($P<0.05$)。HE 染色结果显示:正常组 BN 大鼠视网膜组织各层结构清晰、排列整齐。光凝后 14d,雷珠单抗组 CNV 中央厚度较模型组显著减少($P<0.05$);姜黄素高剂量组较模型组显著减少($P<0.05$),较雷珠单抗组显著增加($P<0.05$)。免疫组化结果显示:正常组 BN 大鼠视网膜组织结构中 AKT、p-AKT、HIF-1 α 、VEGF 因子表达呈阴性,未见棕黄色反应物。光凝后 14d,模型组 AKT、p-AKT、HIF-1 α 、VEGF 因子的表达高于正常组($P<0.05$);雷珠单抗组低于模型组($P<0.05$);姜黄素高剂量组的表达较模型组显著降低($P<$

0.05),较雷珠单抗组显著增加($P<0.05$)。mRNA 结果显示:光凝后 14d,模型组 AKT、HIF-1 α 和 VEGF mRNA 相对表达量均高于正常组($P<0.05$);雷珠单抗组均低于模型组($P<0.05$);姜黄素高剂量组较模型组显著降低($P<0.05$),较雷珠单抗组显著增加($P<0.05$)。Western blot 结果显示:光凝后 14d,AKT 蛋白各实验组间比较差异无统计学意义。p-AKT 蛋白相对表达量模型组较正常组显著增加($P<0.05$);雷珠单抗组较模型组显著降低($P<0.05$);姜黄素高剂量组较模型组显著降低($P<0.05$)。HIF-1 α 和 VEGF 蛋白相对表达量模型组较正常组显著增加($P<0.05$),雷珠单抗组较模型组显著降低($P<0.05$),HIF-1 α 蛋白相对表达量姜黄素高剂量组较模型组显著降低($P<0.05$),较雷珠单抗组显著增加($P<0.05$)。VEGF 蛋白相对表达量姜黄素中、高剂量组较模型组显著降低($P<0.05$)。

结论:400mg/(kg·d)的姜黄素具有抑制 BN 大鼠实验性 CNV 的作用。姜黄素抑制 BN 大鼠实验性 CNV 的机制可能与降低 AKT/p-AKT/HIF-1 α /VEGF 信号通路的活性密切相关。

关键词:脉络膜新生血管;姜黄素;棕色挪威(BN)大鼠;血管内皮生长因子;缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α);蛋白激酶 B(AKT)

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2023.4.02

Mechanism of curcumin inhibiting choroidal neovascularization in brown Norway rat

Shui-Ling Chen¹, Ze-Feng Kang², Wen-Li Chu², Xue-Lian Hao², Fang-Fang Tao¹, Ming-Ming Zhang², Shu-Jiao Li²

Foundation item:National Natural Science Founding of China (No. 81574032)

¹Department of Ophthalmology, Xiyuan Hospital of China Academy of Chinese Medical Science, Beijing 100091, China; ²Eye Hospital of China Academy of Chinese Medical Science, Beijing 100040, China

Correspondence to:Ze-Feng Kang. Eye Hospital of China Academy of Chinese Medical Science, Beijing 100040, China. zefeng2531@163.com

Received:2022-05-12 Accepted:2023-03-17

Abstract

• AIM: To investigate the mechanism of curcumin inhibiting the choroidal neovascularization (CNV) of brown Norway (BN) rats.

• **METHODS:** CNV model of 36 BN rats was established through laser photocoagulation induction, and they were divided into 6 groups with 6 rats in each group. Normal group was fed normally with no intervention, while 532nm laser photocoagulation was used to establish a experimental CNV model in BN rats. Rats after modeling were respectively intervened for 14d and divided into model group, ranibizumab group, curcumin low [100mg/(kg·d)], medium [200mg/(kg·d)], and high [400mg/(kg·d)] dose group. The model group was given intragastric administration of saline for 14d, ranibizumab (10mg/mL, 0.2mL/dose) was injected at 2d after photocoagulation with 5μL once for rats in ranibizumab group, and different concentrations of curcumin were intragastrically administrated to the rats in low, medium and high groups for 14d. Fundus photography, fundus fluorescein angiography (FFA) and indocyanine green angiography (ICGA) examination were performed at 14d after photocoagulation. Ocular histopathological specimens of rats with CNV were made, and the central thickness of CNV were observed by HE staining. Ocular histopathological specimens were made, and the expressions of AKT/p-AKT/HIF-1α/VEGF signaling pathway-related proteins were observed by immunohistochemistry. The mRNA relative expressions of AKT/HIF-1α/VEGF factor in CNV tissues were detected by RT-qPCR, and the protein expressions of AKT/p-AKT/HIF-1α/VEGF factor in CNV tissues were detected by Western-blot.

• **RESULTS:** CNV generation rates in the model group, the ranibizumab group, and the low, medium and high-dose curcumin groups were 78.18%, 73.21%, 77.19%, 75.86%, 74.55%, respectively, which were higher than 70%. The average absorbance were 182.12±6.59, 119.22±8.03, 166.45±8.33, 164.34±5.69, 149.22±6.45, respectively; the ranibizumab group was significantly lower than the model group ($P<0.05$); the low-dose, medium-dose and high-dose groups were significantly higher than the ranibizumab group ($P<0.05$), and the curcumin high-dose group was significantly lower than the model group ($P<0.05$). HE staining showed that the retinal tissue structure of BN rats in normal group was clear and neatly arranged. The central thickness of CNV in the ranibizumab group was significantly reduced at 14d after photocoagulation compared with the model group ($P<0.05$); While the curcumin high-dose group was significantly reduced compared with the model group ($P<0.05$), but increased when compared with ranibizumab group ($P<0.05$). Immunohistochemistry results showed that AKT, p-AKT, HIF-1α, and VEGF factors were negatively expressed in the retinal tissue structure of BN rats in the normal group, and no brown-yellow reactants were found. The expression of AKT, p-AKT, HIF-1α, and VEGF factors in the model group were higher than that in the normal group at 14d after photocoagulation ($P<0.05$); the ranibizumab group was lower than the model group ($P<0.05$). While the expression of the curcumin high-dose group was significantly decreased compared with the model group ($P<0.05$), but significantly increased

when compared with ranibizumab group ($P<0.05$). The mRNA results showed that the relative expression levels of AKT, HIF-1α and VEGF mRNA in the model group at 14d after photocoagulation were higher than those of the normal group ($P<0.05$); the ranibizumab group was lower than the model group ($P<0.05$). While curcumin high-dose group was significantly decreased compared with the model group ($P<0.05$), but significantly increased when compared with ranibizumab group ($P<0.05$). Western-blot results showed that there was no significant difference in the relative expression of AKT protein among each experimental groups at 14d after photocoagulation. The relative expression of p-AKT protein in the model group was significantly higher than that in the normal group ($P<0.05$); the ranibizumab group was significantly lower than the model group ($P<0.05$); the curcumin high-dose group was significantly lower than the model group ($P<0.05$). The relative expression levels of HIF-1α protein were significantly higher in the model group than in the normal group ($P<0.05$), and the ranibizumab group was lower than in the model group ($P<0.05$). The relative expression levels of HIF-1α protein was lower in the curcumin high-dose group than in the model group ($P<0.05$) but higher than ranibizumab group ($P<0.05$). The relative expression level of VEGF protein was significantly lower in the curcumin medium/high-dose group than in the model group ($P<0.05$).

• **CONCLUSION:** Curcumin at 400mg/(kg·d) has an inhibitory effect on CNV in BN rats. The mechanism may be closely related to inhibiting the activation of AKT/p-AKT/HIF-1α/VEGF signaling pathways.

• **KEYWORDS:** choroidal neovascularization; curcumin; brown Norway (BN) rat; vascular endothelial growth factor; hypoxia-inducible factor-1α (HIF-1α); protein kinase B (AKT)

Citation: Chen SL, Kang ZF, Chu WL, *et al.* Mechanism of curcumin inhibiting choroidal neovascularization in brown Norway rat. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2023;23(4):537-545

0 引言

脉络膜新生血管(choroidal neovascularization, CNV)是多种眼底疾病后期的病理表现。CNV的形成与血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)密切相关。缺氧诱导因子-1α(hypoxia-inducible factor-1α, HIF-1α)相关信号通路是参与调控这些细胞与因子活性的重要信号通路^[1]。姜黄素是一种中药单体,它是从姜科植物姜黄、郁金、莪术中提取的一种多酚类化合物,是其发挥药理作用的主要成分,多项研究证实姜黄素药理作用广泛^[2-3],主要有抗炎、抗氧化、抗新生血管及抗肿瘤等^[4],本研究拟探讨姜黄素抑制棕色挪威(brown Norway, BN)大鼠 CNV 的生成及作用机制,为 CNV 的防治研究提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 选取 8 周龄雄性 SPF 级 BN 大鼠 36 只(随机取任意一眼进行实验),体质量 200±20g,购自北京

维通利华实验动物有限公司。动物许可证号: SCXK(京) 2016-0006。实验动物及实验条件符合国家科学技术委员会颁布的《实验动物管理条例》。实验前适应性饲养 3~7d。实验前均常规裂隙灯检查,确保实验用大鼠双眼前节及眼底正常。

1.1.2 主要试剂 姜黄素(美国 Sigma),荧光素钠注射液(爱尔康,历设得),吲哚菁绿注射液(丹东医创药业)。免疫组化试剂盒(北京中杉金桥)。一抗: anti-AKT 和 anti-p-AKT(美国 Cell Signaling Technology), anti-HIF-1 α 和 anti-VEGF-A(美国 Abcam)。RT-qPCR 试剂盒(北京康为世纪生物科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 532nm 倍频激光建立 CNV 模型 大鼠麻醉后散瞳,固定在裂隙灯前,暴露实验眼,眼前放置盖玻片。532nm 倍频激光围绕视盘 2~3 视盘(optic disk, PD)的距离,在血管之间光凝 8~10 点,光斑直径 50 μ m,曝光时间 0.05s,功率 300mW,聚焦于 Bruch 膜,有气泡产生或伴有轻度出血标志着 Bruch 膜被击破,记为有效光凝点;光凝点严重出血或未击破 Bruch 膜视为无效光凝点。

1.2.2 实验分组 将 36 只 BN 大鼠随机分为 6 组,每组 6 只。正常组 BN 大鼠正常饲养,不做干预;实验组 BN 大鼠行 532nm 倍频激光光凝后,根据不同分组分别干预 14d,具体分组如下:模型组:生理盐水灌胃,每次 1.5mL,每天 2 次,光凝后第 2d 开始,共 14d;雷珠单抗组:光凝后第 2d 玻璃体腔注射雷珠单抗注射液(10mg/mL, 0.2mL/支) 1 次 5 μ L。雷珠单抗注射方法:10%水合氯醛麻醉 BN 大鼠后,光凝眼充分散瞳,聚维酮碘消毒,生理盐水冲洗眼表,用微量注射器距颞侧角巩缘后 2mm 处睫状体平坦部垂直巩膜进针后更换注射角度,使之与眼轴成 45°角穿刺入玻璃体腔,缓慢推入 5 μ L,留针 30s 后拔出针头,立即用消毒棉签轻压注射点止血,局部涂左氧氟沙星眼膏避免感染。姜黄素组:低[100mg/(kg·d)],中[200mg/(kg·d)],高[400mg/(kg·d)]剂量的姜黄素混悬液分别灌胃,每次 1.5mL,每天 2 次,光凝后第 2d 开始,共 14d。

1.2.3 眼底照相和 FFA 及 ICGA 观察 CNV 变化 光凝 14d 后进行眼底照相、FFA 和 ICGA 检查。麻醉后散瞳,拍摄眼底照相。荧光素钠和吲哚菁绿的混合液腹腔注射,计时,分别采集 FFA 早期像、FFA 晚期像和 ICGA 晚期像。取 FFA 晚期像计算 CNV 的生成率(生成率=荧光渗漏激光斑数/激光斑总数 \times 100%),荧光渗漏光斑定义为 FFA 早期有高荧光,晚期荧光积存不消退;ICGA 呈充盈状态。以荧光素渗漏平均光吸光度值(absorbance, A)评价 CNV 的发展和渗漏程度。

1.2.4 制备病理学标本和 HE 染色 正常组在第 14d 行眼底照相、FFA 与 ICGA 检查,检查后第 2d 过量麻醉,分离眼部肌肉组织,剪断视神经,快速取出眼球,去除多余的肌肉和结膜组织。多聚甲醛预固定结束以后,沿角巩膜缘剪开角膜组织,离断悬韧带,去除眼前节和玻璃体组织,将眼杯置于多聚甲醛溶液中,4℃ 冰箱固定 24h 以上。各实验组分别在激光光凝后第 14d 行眼底照相、FFA 与 ICGA 检查,检查后第 2d 过量麻醉,取材与固定方法同上。石蜡包埋切片,HE 染色,脱蜡,苏木素-伊红染色,脱水、透明、封片、固定,拍摄照片。

1.2.5 免疫组织化学检测各组样本中 AKT 和 HIF-1 α 及 VEGF 的表达 石蜡切片脱蜡水化,胰酶修复,阻断内源性过氧化物酶,依次滴加一抗,反应增强液,二抗, DAB 显色液显色后,自来水冲洗终止显色,复染,脱水、透明、封片、固定,镜下观察,拍摄照片。

1.2.6 RT-qPCR 检测各组样本中 AKT 和 HIF-1 α 及 VEGF mRNA 的表达 采用 RT-qPCR 法检测实验各组样本中 AKT、HIF-1 α 和 VEGF mRNA 的表达。制备视网膜脉络膜复合体组织样本:各组 BN 大鼠干预 14d 后过量麻醉,分离眼部肌肉,剪断视神经,快速取出眼球;沿角巩膜缘去除角膜组织,离断悬韧带,剥除虹膜、晶状体和玻璃体等组织,暴露出眼杯,以视神经乳头为中心用剪刀将眼球壁均匀地剪成两等份,仔细剥离眼球壁,提取视网膜脉络膜复合物。按照试剂盒步骤提取超纯 RNA 逆转录合成 cDNA,以 GAPDH 为内参,得到目的基因表达的相对定量值,进行统计学分析。其中引物由睿博兴科生物技术有限公司设计与合成,具体序列如下: GAPDH - F: ATCCCAGAGCTGAACGGGAA, GAPDH - R: ACCTGGTCCTCAGTGTAGCC, AKT1 - F: GCTGAGCCCACCTTTCAAGC, AKT1 - R: GATCAGCGCGGTGTGATGGTG, HIF-1 α - F: GCTTCCACAAGAGCCGGAAA, HIF-1 α - R: GATGATGCCAGAGCGGCTAC; VEGF - F: AACCTCACCAAAGCCAGCAC, VEGF - R: AACCGGGATTCTTTCGCGCTT。

1.2.7 Western blot 法检测各组样本中 AKT 和 HIF-1 α 及 VEGF 蛋白的表达 获取大鼠视网膜脉络膜复合物样本(同 1.2.6),采用常规 Western blot 法检测各组样本中 AKT 和 HIF-1 α 及 VEGF 蛋白的表达,提取总蛋白,BCA 法计算蛋白浓度,制备蛋白 SDS-PAGE 胶,聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜(湿转),抗体孵育,曝光显影,测定条带灰度值,以 β -actin 条带的光密度值校正,得到目的蛋白的相对表达量,进行统计分析。

统计学分析:采用 GraphPad Prism 6.0 软件进行统计学分析。计量资料以均数 \pm 标准差表示。各组 BN 大鼠检测指标总体差异比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 LSD-*t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 BN 大鼠眼底照相和 FFA 及 ICGA 比较 正常组大鼠眼底照相可见视网膜呈现出均匀一致的灰白色,视盘呈圆形在视网膜中央,视网膜的血管光滑完整呈放射状分布;FFA 图像显示视盘圆形居中,视网膜血管被荧光素充盈呈高反射,走行自如,管壁光滑完整;ICGA 图像显示脉络膜血管呈网织状(图 1)。

模型组呈典型的白色瘢痕,FFA 早期光斑处呈强荧光,晚期荧光素渗漏较多;ICGA 晚期呈花瓣状充盈,CNV 稳定。各实验组 CNV 生成率均大于 70%。各实验组荧光素渗漏 A 值比较差异有统计学意义($F = 33.715, P < 0.01$)。雷珠单抗组 FFA 和 ICGA 晚期荧光素渗漏较模型组明显减少,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。姜黄素低、中剂量组 FFA 和 ICGA 晚期荧光素渗漏较模型组减少,但差异均无统计学意义($P > 0.05$),与雷珠单抗组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$);姜黄素高剂量组 FFA 和 ICGA 晚期荧光素渗漏较雷珠单抗组显著增加,较模型组明显减少,差异均有统计学意义($P < 0.05$),见表 1,图 2。

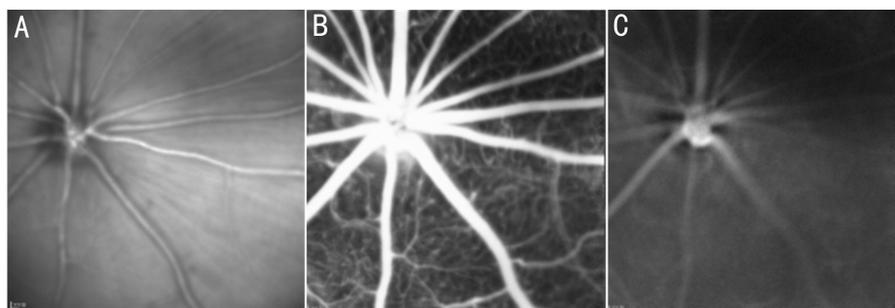


图1 光凝后14d正常组大鼠眼底照相和FFA及ICGA比较 A:眼底照相;B:FFA晚期图;C:ICGA晚期图。

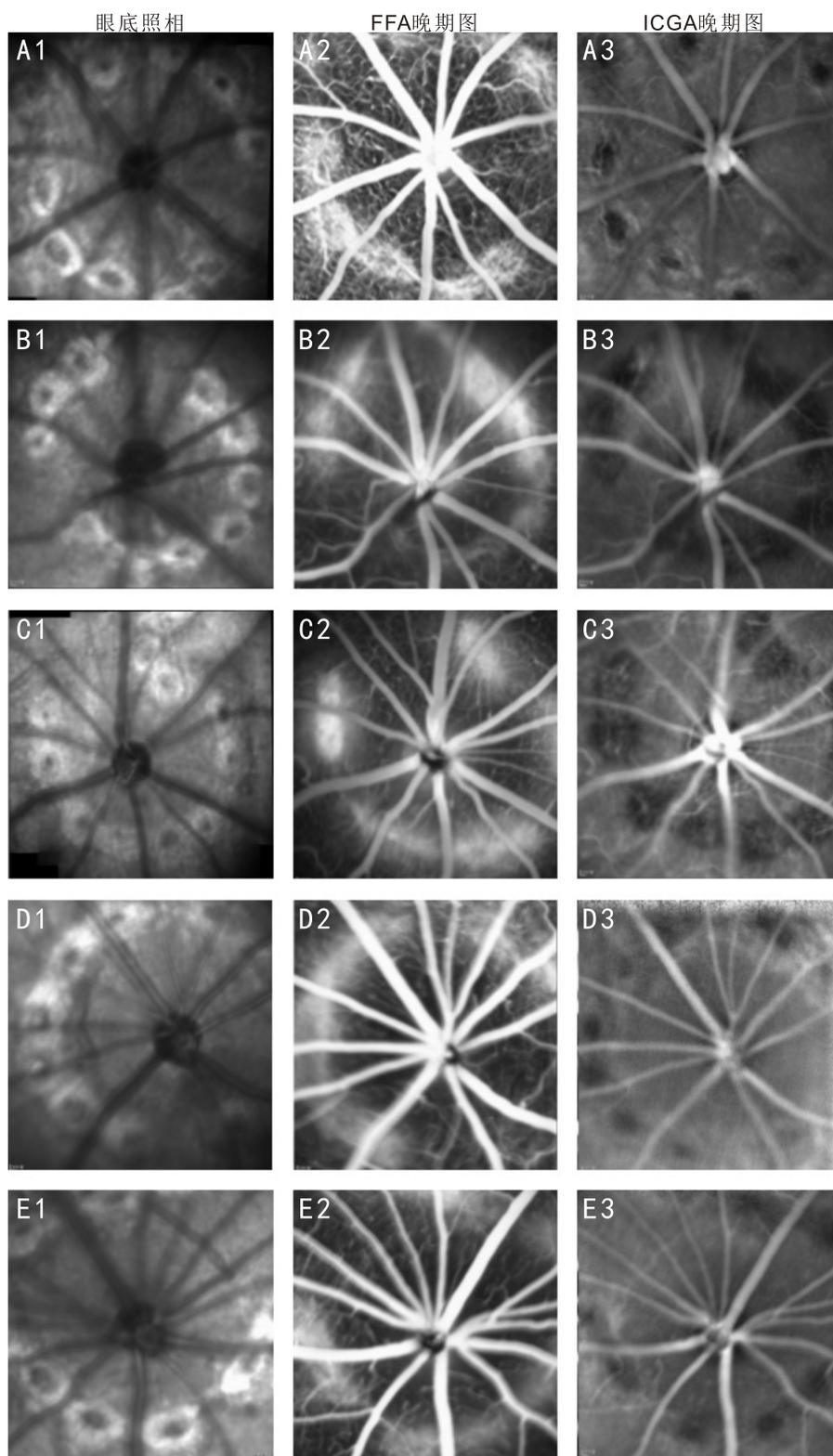


图2 光凝后14d各实验组大鼠眼底照相和FFA及ICGA比较 A:模型组;B:雷珠单抗组;C:姜黄素低剂量组;D:姜黄素中剂量组;E:姜黄素高剂量组。

表 1 各实验组大鼠激光后 CNV 生成率与荧光素渗漏 A 值变化

n=6

组别	渗漏光斑数/激光光斑数(个)	CNV 的生成率(%)	A 值($\bar{x}\pm s$)	CNV 中央厚度($\bar{x}\pm s, \mu\text{m}$)
模型组	43/55	78.18	182.12±6.59	62.59±6.21
雷珠单抗组	41/56	73.21	119.22±8.03 ^a	30.04±3.57 ^a
姜黄素低剂量组	44/57	77.19	166.45±8.33 ^c	56.87±5.65 ^c
姜黄素中剂量组	44/58	75.86	164.34±5.69 ^c	53.55±7.29 ^c
姜黄素高剂量组	41/55	74.55	149.22±6.45 ^{a,c}	47.74±3.27 ^{a,c}

注:模型组:生理盐水灌胃 14d;雷珠单抗组:光凝后第 2d 玻璃体腔注射雷珠单抗注射液 5 μL 1 次;姜黄素低剂量组:100mg/(kg·d)姜黄素混悬液灌胃 14d;姜黄素中剂量组:200mg/(kg·d)姜黄素混悬液灌胃 14d;姜黄素高剂量组:400mg/(kg·d)姜黄素混悬液灌胃 14d;^a $P<0.05$ vs 模型组;^c $P<0.05$ vs 雷珠单抗组。

2.2 各组 BN 大鼠 CNV 中央厚度比较 正常组大鼠视网膜各层组织结构清晰明朗、排列整齐有序。各实验组大鼠 CNV 中央厚度比较差异有统计学意义 ($F = 15.873, P < 0.01$)。雷珠单抗组 CNV 中央厚度较模型组显著减少,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。姜黄素低、中剂量组较模型组减少,但差异均无统计学意义 ($P > 0.05$),与雷珠单抗组比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。姜黄素高剂量组较模型组显著减少,较雷珠单抗组显著增加,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$),见表 1,图 3。

2.3 免疫组织化学检测各组 BN 大鼠视网膜组织结构中 AKT 和 HIF-1 α 及 VEGF 蛋白表达及定位

2.3.1 各组 BN 大鼠视网膜组织结构中 AKT 因子表达比较 正常组大鼠视网膜组织结构中 AKT 因子表达呈阴性,未发现棕黄色反应物。各实验组大鼠视网膜组织结构中 AKT 因子表达比较差异有统计学意义 ($F = 18.251, P < 0.01$)。雷珠单抗组 AKT 因子表达较模型组显著降低,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);姜黄素低、中剂量组的表达与模型组比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$),与雷珠单抗组比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$);姜黄素高剂量组的表达较模型组显著降低,较雷珠单抗组显著增加,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$),见表 2,图 4。

2.3.2 各组 BN 大鼠视网膜组织结构中 p-AKT 因子表达比较 正常组大鼠视网膜组织结构中 p-AKT 因子的表达呈阴性,未见棕黄色反应物。各组 BN 大鼠视网膜组织结构中 p-AKT 因子表达比较差异有统计学意义 ($F = 34.678, P < 0.01$)。雷珠单抗组 p-AKT 因子表达较模型组显著降低,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);姜黄素低、中剂量组 p-AKT 因子的表达与模型组比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$),与雷珠单抗组比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$);姜黄素高剂量组 p-AKT 因子的表达较模型组显著降低,较雷珠单抗组显著增加,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$),见表 2,图 5。

2.3.3 各组 BN 大鼠视网膜组织结构中 HIF-1 α 因子表达比较 正常组大鼠视网膜组织结构中 HIF-1 α 因子的表达呈阴性,未见棕黄色反应物。各组 BN 大鼠视网膜组织结构中 HIF-1 α 因子表达比较差异有统计学意义 ($F = 16.073, P < 0.01$)。雷珠单抗组 HIF-1 α 因子表达较模型组降低,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);姜黄素低、中剂量组的表达与模型组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$),与雷珠单抗组比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$);姜黄素高剂量组 HIF-1 α 因子的表达较模型组降低,较雷珠单抗

组显著增加,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$),见表 2,图 6。

2.3.4 各组 BN 大鼠视网膜组织结构中 VEGF 因子表达比较 正常组大鼠视网膜组织结构中 VEGF 因子的表达呈阴性,未见棕黄色反应物。各组 BN 大鼠视网膜组织结构中 VEGF 因子表达比较差异有统计学意义 ($F = 15.118, P < 0.01$)。雷珠单抗组 VEGF 因子低于模型组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);姜黄素低、中剂量组 VEGF 因子的表达与模型组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$),与雷珠单抗组比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$);姜黄素高剂量组 VEGF 因子的表达较模型组降低,较雷珠单抗组显著增加,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$),见表 2,图 7。

2.4 各组 BN 大鼠视网膜组织结构中 AKT 和 HIF-1 α 及 VEGF mRNA 相对表达量比较 各组 BN 大鼠视网膜组织结构中 AKT、HIF-1 α 和 VEGF mRNA 相对表达量比较差异均有统计学意义 ($F = 36.824, 30.155, 52.410$, 均 $P < 0.01$)。模型组中 AKT、HIF-1 α 和 VEGF mRNA 相对表达量均高于正常组,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$);雷珠单抗组均低于模型组,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$);姜黄素低、中剂量较模型组均差异无统计学意义 ($P > 0.05$),与雷珠单抗组比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$);姜黄素高剂量组较模型组显著降低,较雷珠单抗组显著增加,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$),见表 3。

2.5 Western blot 法检测各组 BN 大鼠视网膜组织结构中 AKT 和 HIF-1 α 及 VEGF 蛋白相对表达量比较 各组 BN 大鼠视网膜组织结构中 AKT、p-AKT、HIF-1 α 、VEGF 蛋白表达量比较差异均有统计学意义 ($F = 11.639, 22.047, 33.276, 41.603$, 均 $P < 0.05$)。AKT 蛋白表达量各实验组均高于正常组,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$),各实验组两两比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。p-AKT、HIF-1 α 、VEGF 蛋白表达量模型组高于正常组,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$),雷珠单抗组低于模型组,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。p-AKT、HIF-1 α 蛋白表达量姜黄素低、中剂量组与模型组比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$),VEGF 蛋白表达量姜黄素低剂量组与模型组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。p-AKT 姜黄素高剂量组较模型组降低,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),HIF-1 α 较雷珠单抗组增加,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),VEGF 蛋白表达量姜黄素低剂量与模型组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$),姜黄素中、高剂量组较模型组降低,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$),见表 4,图 8。

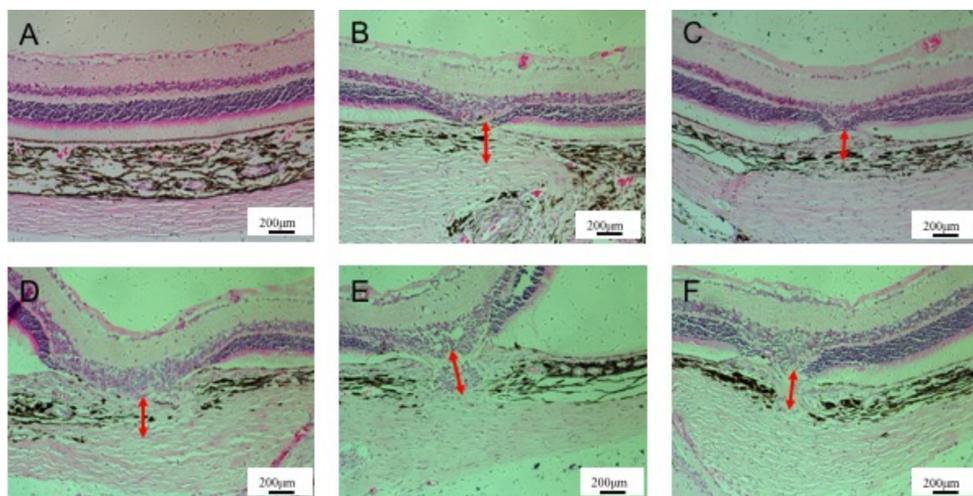


图3 光凝后14d各组BN大鼠视网膜HE染色 A:正常组;B:模型组;C:雷珠单抗组;D:姜黄素低剂量组;E:姜黄素中剂量组;F:姜黄素高剂量组;红色箭头代表CNV中央厚度。

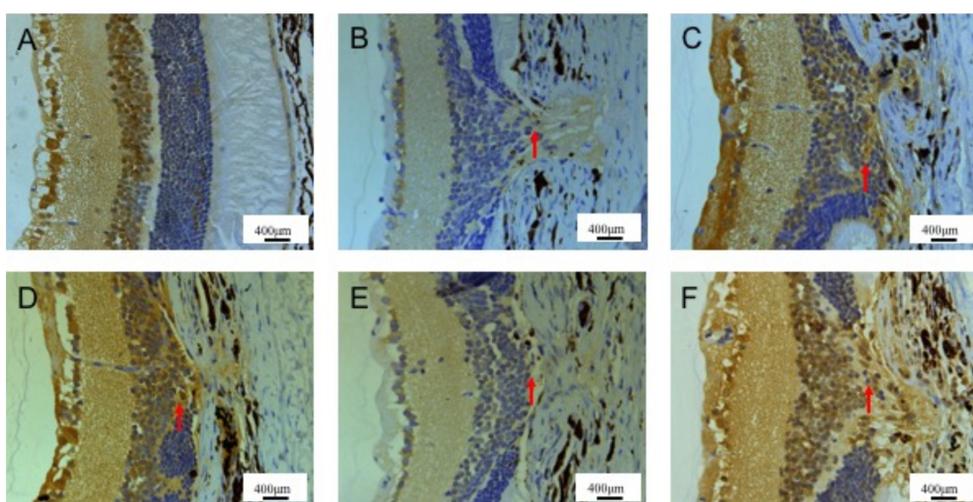


图4 光凝后14d各组BN大鼠AKT免疫组化图像 A:正常组;B:模型组;C:雷珠单抗组;D:姜黄素低剂量组;E:姜黄素中剂量组;F:姜黄素高剂量组;红色箭头代表AKT表达阳性。

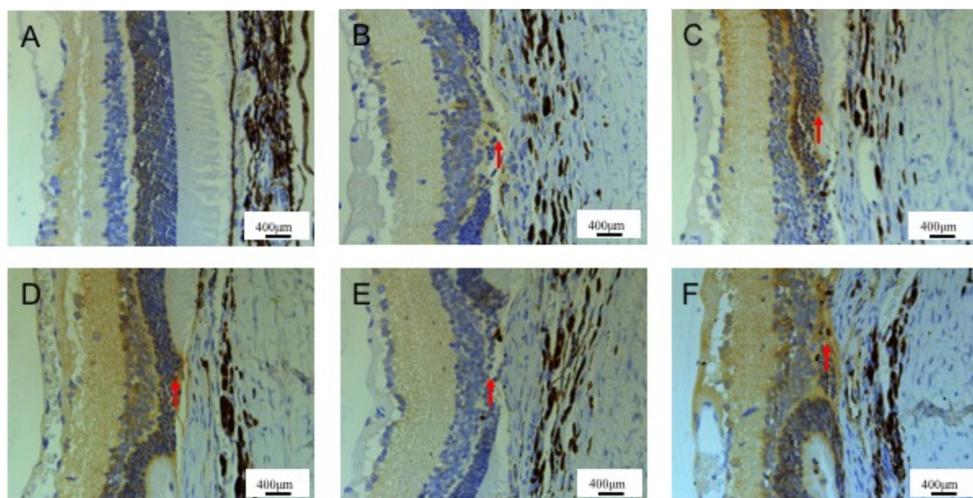


图5 光凝后14d各组BN大鼠p-AKT免疫组化图像 A:正常组;B:模型组;C:雷珠单抗组;D:姜黄素低剂量组;E:姜黄素中剂量组;F:姜黄素高剂量组;红色箭头代表p-AKT表达阳性。

3 讨论

抗VEGF疗法是目前治疗眼部新生血管性疾病的主要方案。但是在对疾病进行抗VEGF的治疗过程中,VEGF的生理作用也会受到抑制,可能会导致一些相关的问题^[5],如视网膜萎缩、视网膜色素上皮撕裂、系统性不良

反应等,其中视网膜萎缩已成为相关眼部疾病治疗后期视力下降的主要原因之一。

目前,中药单体在抗新生血管方面的研究较多,姜黄素是从姜科植物姜黄、郁金和莪术中提取的一种多酚类化合物,是姜黄发挥药理作用的主要成分,分子式为 $C_{21}H_{20}O_6$,

表 2 免疫组织化学检测各实验组大鼠视网膜组织结构中 AKT 和 HIF-1 α 及 VEGF 蛋白表达比较 (n=6, $\bar{x}\pm s$)

组别	AKT	p-AKT	HIF-1 α	VEGF
模型组	161.17 \pm 7.73	154.10 \pm 5.32	180.94 \pm 12.55	132.09 \pm 2.84
雷珠单抗组	112.85 \pm 9.18 ^a	112.15 \pm 3.37 ^a	124.39 \pm 5.77 ^a	94.39 \pm 3.76 ^a
姜黄素低剂量组	157.05 \pm 10.80 ^c	150.66 \pm 2.83 ^c	175.88 \pm 11.69 ^c	122.77 \pm 7.57 ^c
姜黄素中剂量组	148.97 \pm 3.78 ^c	142.22 \pm 8.29 ^c	170.66 \pm 12.44 ^c	120.07 \pm 9.90 ^c
姜黄素高剂量组	135.94 \pm 6.15 ^{a,c}	126.52 \pm 4.13 ^{a,c}	153.21 \pm 3.32 ^{a,c}	112.03 \pm 4.68 ^{a,c}
F	18.251	34.678	16.073	15.118
P	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注:模型组:生理盐水灌胃 14d;雷珠单抗组:光凝后第 2d 玻璃体腔注射雷珠单抗注射液 5 μ L 1 次;姜黄素低剂量组:100mg/(kg·d) 姜黄素混悬液灌胃 14d;姜黄素中剂量组:200mg/(kg·d) 姜黄素混悬液灌胃 14d;姜黄素高剂量组:400mg/(kg·d) 姜黄素混悬液灌胃 14d; ^aP<0.05 vs 模型组; ^cP<0.05 vs 雷珠单抗组。

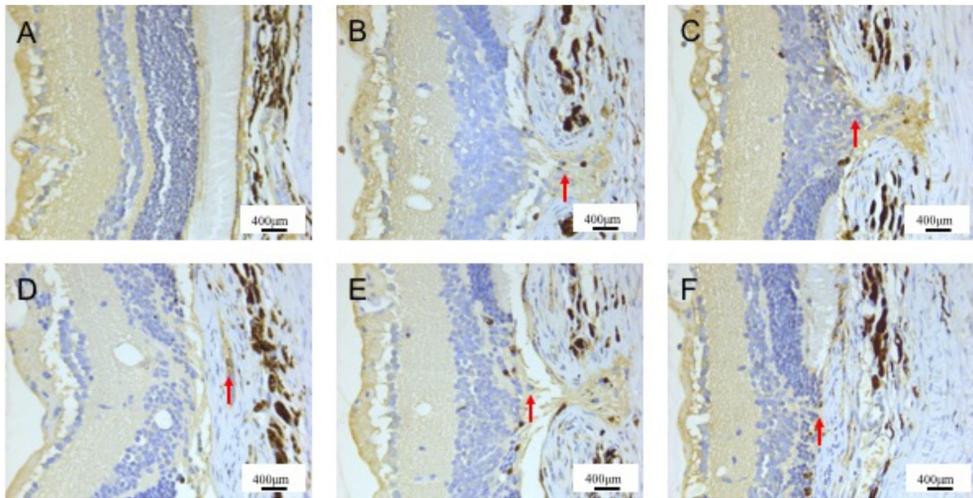


图 6 光凝后 14d 各组 BN 大鼠 HIF-1 α 免疫组化图像 A:正常组;B:模型组;C:雷珠单抗组;D:姜黄素低剂量组;E:姜黄素中剂量组;F:姜黄素高剂量组;红色箭头代表 HIF-1 α 表达阳性。

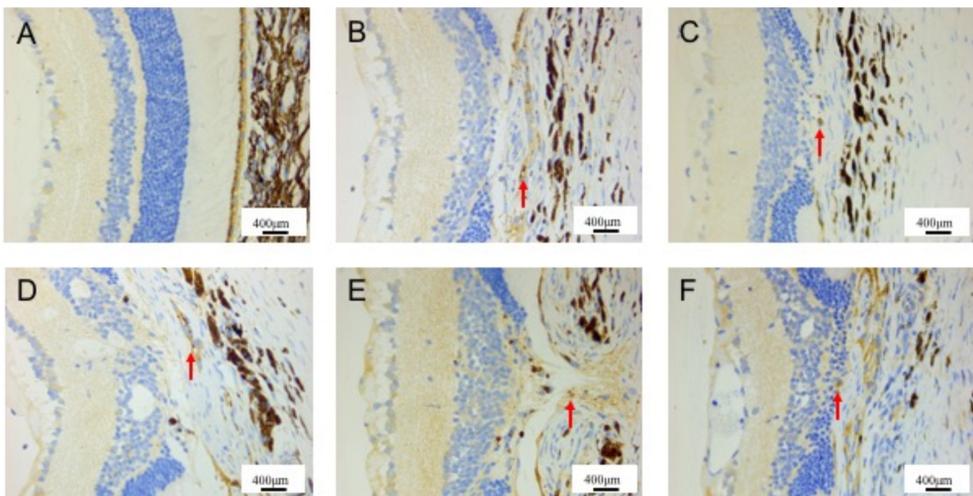


图 7 光凝后 14d 各组 BN 大鼠 VEGF 免疫组化图像 A:正常组;B:模型组;C:雷珠单抗组;D:姜黄素低剂量组;E:姜黄素中剂量组;F:姜黄素高剂量组;红色箭头代表 VEGF 表达阳性。

具有抗肿瘤^[6]、抗炎^[7]、抗幽门螺杆菌^[8]、降血脂^[9-10]及抗新生血管生成^[11]等作用,尤其在眼科新生血管类疾病,如抑制角膜新生血管^[12-13]、抑制糖尿病性视网膜新生血管^[14-15],但在 CNV 方面的研究较少^[16-17]。

CNV 的形成与 VEGF 密切相关,VEGF 是目前已知促进 CNV 形成的重要因子,HIF-1 α 相关信号通路是参与调控这些细胞与因子活性的重要信号通路。VEGF 具有选择性增强血管内皮细胞有丝分裂的能力,促进血管内皮

细胞的增殖,增加血管尤其是微小血管的渗透性,使血浆大分子物质进入细胞外基质中形成纤维蛋白凝胶,支持新生血管和基质细胞生长的生物功能。以往的研究结果证实,经手术取出 ARMD 患者的 CNV 中,有 VEGF 等多种生长因子表达;而激光诱导的 CNV 模型中,也有相同生长因子的表达。

本研究结果证实姜黄素高剂量组 FFA 晚期荧光素渗漏和 HE 染色 CNV 中央厚度较模型组显著减少。免疫组

表3 各组BN大鼠视网膜组织结构中AKT和HIF-1 α 及VEGF mRNA相对表达量比较 (n=3, $\bar{x}\pm s$)

组别	AKT	HIF-1 α	VEGF
正常组	1	1	1
模型组	2.17 \pm 0.282 ^a	2.71 \pm 0.29 ^a	3.08 \pm 0.27 ^a
雷珠单抗组	1.05 \pm 0.16 ^c	1.26 \pm 0.16 ^c	1.40 \pm 1.17 ^c
姜黄素低剂量组	2.11 \pm 0.16 ^{a,e}	2.46 \pm 0.31 ^{a,c}	3.05 \pm 0.21 ^{a,e}
姜黄素中剂量组	1.94 \pm 0.12 ^{a,e}	2.15 \pm 0.24 ^{a,c}	2.54 \pm 0.27 ^{a,e}
姜黄素高剂量组	1.51 \pm 0.15 ^{a,c,e}	1.92 \pm 0.10 ^{a,c,e}	1.99 \pm 0.20 ^{a,c,e}
F	36.824	30.155	52.410
P	<0.01	<0.01	<0.01

注:正常组:正常饲养,不做干预;模型组:生理盐水灌胃14d;雷珠单抗组:光凝后第2d玻璃体腔注射雷珠单抗注射液5 μ L 1次;姜黄素低剂量组:100mg/(kg·d)姜黄素混悬液灌胃14d;姜黄素中剂量组:200mg/(kg·d)姜黄素混悬液灌胃14d;姜黄素高剂量组:400mg/(kg·d)姜黄素混悬液灌胃14d;^aP<0.05 vs 正常组;^cP<0.05 vs 模型组;^eP<0.05 vs 雷珠单抗组。

表4 Western blot法检测各组BN大鼠视网膜组织结构中AKT和HIF-1 α 及VEGF蛋白相对表达量比较 (n=3, $\bar{x}\pm s$)

组别	AKT	p-AKT	HIF-1 α	VEGF
正常组	0.239 \pm 0.08	0.421 \pm 0.07	0.343 \pm 0.07	0.156 \pm 0.07
模型组	1.10 \pm 0.15 ^a	1.05 \pm 0.02 ^a	1.06 \pm 0.09 ^a	1.07 \pm 0.07 ^a
雷珠单抗组	0.96 \pm 0.11 ^a	0.71 \pm 0.06 ^{a,c}	0.46 \pm 0.09 ^c	0.49 \pm 0.06 ^{a,c}
姜黄素低剂量组	1.13 \pm 0.21 ^a	0.92 \pm 0.06 ^a	1.02 \pm 0.09 ^{a,c}	0.97 \pm 0.11 ^{a,c}
姜黄素中剂量组	1.01 \pm 0.13 ^a	0.80 \pm 0.06 ^a	0.90 \pm 0.03 ^{a,c}	0.78 \pm 0.02 ^{a,c,e}
姜黄素高剂量组	1.03 \pm 0.13 ^a	0.74 \pm 0.10 ^{a,c}	0.77 \pm 0.04 ^{a,c,e}	0.65 \pm 0.08 ^{a,c,e}
F	11.639	22.047	33.276	41.603
P	0.005	<0.01	0.002	<0.01

注:正常组:正常饲养,不做干预;模型组:生理盐水灌胃14d;雷珠单抗组:光凝后第2d玻璃体腔注射雷珠单抗注射液5 μ L 1次;姜黄素低剂量组:100mg/(kg·d)姜黄素混悬液灌胃14d;姜黄素中剂量组:200mg/(kg·d)姜黄素混悬液灌胃14d;姜黄素高剂量组:400mg/(kg·d)姜黄素混悬液灌胃14d;^aP<0.05 vs 正常组;^cP<0.05 vs 模型组;^eP<0.05 vs 雷珠单抗组。

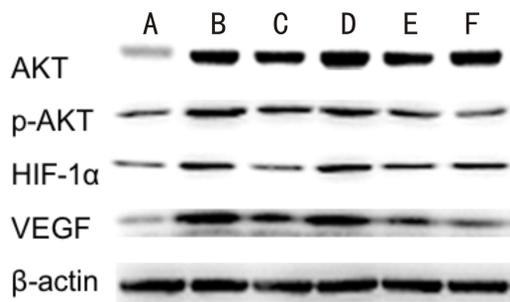


图8 光凝后14d各组BN大鼠视网膜组织结构中AKT和HIF-1 α 及VEGF蛋白Western blot结果 A:正常组;B:模型组;C:雷珠单抗组;D:姜黄素低剂量组;E:姜黄素中剂量组;F:姜黄素高剂量组。

化高剂量组视网膜脉络膜复合物中AKT、p-AKT、HIF-1 α 、VEGF因子的表达较模型组显著减少。姜黄素高剂量组较模型组AKT、HIF-1 α 和VEGF mRNA相对表达量显著降低。p-AKT蛋白相对表达量姜黄素高剂量组较模型组降低;HIF-1 α 蛋白相对表达量姜黄素高剂量组较模型组降低;VEGF蛋白相对表达量姜黄素中、高剂量组较模型组降低。

综上所述发现姜黄素可抑制BN大鼠CNV的形成,但是需要达到一定的剂量,即400mg/(kg·d)。此外,鉴于姜黄素水溶性差,在体内吸收少、代谢快,生物利用度低,限制其临床应用的缺点,目前有研究用姜黄素壳聚糖脂质

体^[18]及纳米颗粒^[19]抑制角膜新生血管的形成,羧甲基壳聚糖载姜黄素缓释药膜^[20-21]有效地防治后发性白内障、含有姜黄素的巩膜塞^[22-23]有效治疗增生性玻璃体视网膜病变等,以上方式均能增加其生物利用度,但是研究数量相对较少,也缺乏临床研究。

参考文献

- Li Y, Zhao L, Qi YF, et al. MicroRNA-214 upregulates HIF-1 α and VEGF by targeting ING4 in lung cancer cells. *Mol Med Report* 2019;19(6):4935-4945
- Cin KY. The spice for joint inflammation: anti-inflammatory role of curcumin in treating osteoarthritis. *Drug Des Devel Ther* 2016; 10:3029-3042
- Kim Y, Clifton P. Curcumin, cardiometabolic health and dementia. *Int J Environ Res Public Health* 2018;15(10):2093
- Radomska - Leśniewska DM, Osiecka - Iwan A, Hyc A, et al. Therapeutic potential of curcumin in eye diseases. *Cent Eur J Immunol* 2019;44(2):181-189
- 陈有信, 汤加. 抗血管内皮生长因子治疗眼部新生血管性疾病问题与挑战. *中华实验眼科杂志* 2019;37(1):1-4
- Slika L, Patra D. Traditional uses, therapeutic effects and recent advances of curcumin: a mini-review. *Mini Rev Med Chem* 2020; 20(12):1072-1082
- Kotha RR, Luthria DL. Curcumin: biological, pharmaceutical, nutraceutical, and analytical aspects. *Molecules* 2019;24(16):2930
- Mohammadi A, Khanbabaie H, Zandi F, et al. Curcumin: a therapeutic strategy for targeting the Helicobacter pylori-related diseases.

Microb Pathog 2022;166:105552

9 Morrone Mda S, Schnorr CE, Behr GA, *et al.* Curcumin Supplementation Decreases Intestinal Adiposity Accumulation, Serum Cholesterol Alterations, and Oxidative Stress in Ovariectomized Rats. *Oxid Med Cell Longev* 2016;2016: 5719291

10 Sivani BM, Azzeh M, Patnaik R, *et al.* Reconnoitering the therapeutic role of curcumin in disease prevention and treatment: lessons learnt and future directions. *Metabolites* 2022;12(7):639

11 Palange AL, Di Mascolo D, Carallo C, *et al.* Lipid - polymer nanoparticles encapsulating curcumin for modulating the vascular deposition of breast cancer cells. *Nanomedicine* 2014;10(5):991-1002

12 Kuo CN, Chen CH, Chen SN, *et al.* Anti - angiogenic effect of hexahydrocurcumin in rat corneal neovascularization. *Int Ophthalmol* 2018; 38(2):747-756

13 Zhang YK, Li JM, Qin L. Suppression of corneal neovascularization by curcumin via inhibition of Wnt/ β -catenin pathway activation. *Int J Ophthalmol* 2017;10 (12): 1791-1797

14 项彪, 潘颖喆, 谢安琪, 等. 姜黄素对高糖诱导的人视网膜血管内皮细胞增殖及 VEGF 和 NF- κ B p65 表达的抑制作用. *国际眼科杂志* 2022;22(5):764-768

15 Nebbioso M, Franzone F, Greco A, *et al.* Recent advances and disputes about curcumin in retinal diseases. *Clin Ophthalmol* 2021;15:

2553-2571

16 林小俊, 谢平, 袁冬青, 等. 姜黄素抑制小鼠脉络膜新生血管的实验研究. *现代生物医学进展* 2014;14(1):52-56, 12

17 陈水龄, 亢泽峰, 褚文丽, 等. 姜黄素通过 AKT/HIF-1 α /VEGF 信号通路在体外抑制脉络膜新生血管的机制. *国际眼科杂志* 2022; 22(4):541-548

18 张伟莉, 吴志鸿, 杜丽娜, 等. 姜黄素壳聚糖脂质体治疗兔角膜碱烧伤. *国际药学研究杂志* 2016;43(4):705-710

19 Pradhan N, Guha R, Chowdhury S, *et al.* Curcumin nanoparticles inhibit corneal neovascularization. *J Mol Med (Berl)* 2015; 93(10): 1095-1106

20 胡艳红, 陈胜, 胡俊, 等. 羧甲基壳聚糖载姜黄素缓释药膜抑制兔后发性白内障的实验研究. *山西中医学院学报* 2017;18(4):10-13

21 胡艳红, 陈胜, 黄秀榕, 等. 羧甲基壳聚糖载姜黄素缓释药膜的制备及其体外缓释动力学研究. *齐齐哈尔医学院学报* 2016;37(28): 3512-3514

22 Zhang J, Zhou N, Zhang B, *et al.* Effect of Biodegradable Scleral Plugs Containing Curcumin on Proliferative Vitreoretinopathy. *Ophthalmic Res* 2018;59(1):30-36

23 Zhang J, Sun H, Zhou N, *et al.* Preparation and Evaluation of Biodegradable Scleral Plug Containing Curcumin in Rabbit Eye. *Curr Eye Res* 2017;42(12):1597-1603