

姜黄素及 Avastin 抑制鼠角膜碱烧伤新生血管对比

吴 艺¹, 廖文雄¹, 陆守权¹, 李金生², 古爱平¹, 李 华¹

基金项目: 2011 年广东省中医药局建设中医药强省课题基金 (No. 20111105)

作者单位: ¹(510317) 中国广东省广州市, 广东省第二人民医院眼科; ²(513400) 中国广东省连州市中医院眼科

作者简介: 吴艺, 男, 副主任医师, 眼科主任, 广东省眼科学术委员会成员, 研究方向: 眼外伤。

通讯作者: 廖文雄, 男, 主治医师, 研究方向: 眼外伤。liaowenxiong0630@126.com

收稿日期: 2013-03-19 修回日期: 2013-05-27

A comparison about the inhibitory effect of curcumin and Avastin on the rat corneal neovascularization

Yi Wu¹, Wen-Xiong Liao¹, Shou-Quan Lu¹, Jin-Sheng Li², Ai-Ping Gu¹, Hua Li¹

Foundation item: Research Fund of Chinese Medical Bureau of Guangdong Province for Chinese Medicine Research, China (No. 20111105)

¹Department of Ophthalmology, Guangdong No. 2 Provincial People's Hospital, Guangzhou 510317, Guangdong Province, China; ²Department of Ophthalmology, Lianzhou Hospital of TCM, Lianzhou 513400, Guangdong Province, China

Correspondence to: Wen-Xiong Liao. Department of Ophthalmology, Guangdong No. 2 Provincial People's Hospital, Guangzhou 510317, Guangdong Province, China. liaowenxiong0630@126.com

Received: 2013-03-19 Accepted: 2013-05-27

Abstract

• **AIM:** To compare the inhibitory effect of curcumin and Avastin on the rat corneal neovascularization (CNV), and approach the mechanism of the curcumin's inhibition.

• **METHODS:** CNV was established in thirty SD rats by alkaline burning. Rats were divided equally to group A and group B at random. In group A, right eyes were experimental group A1, treated by 40 μmol/L curcumin solution, and left eyes were control group A2, treated by 0.09% sodium chloride. In group B, right eyes were experimental group B1, treated by 5g/L avastin, and left eyes were control group B2, treated by 0.09% sodium chloride. Cornea and aqueous humor were collected by time spot. The capillary vessels were study, and the expressions of VEGF were detected by Enzyme-Linked immunosorbent Assay (ELISA).

• **RESULTS:** No toxic effects of the drugs were found. The capillary vessels in experimental group were less than those of control group ($P < 0.01$). No statistical different of the capillary vessels between two drugs were

found. The expressions of VEGF in experimental group were less than those in control group ($P < 0.01$). The expressions of VEGF in B1 group were less than in group A1.

• **CONCLUSION:** The inhibitory effect to CNV of curcumin and avastin have no statistical different in the experiment, but curcumin has the less inhibitory effect to the expressions of VEGF than avastin. Curcumin may have other mechanism in the inhibitory action on CNV.

• **KEYWORDS:** curcumin; Avastin; corneal neovascularization; vascular endothelial growth factor

Citation: Wu Y, Liao WX, Lu SQ, et al. A comparison about the inhibitory effect of curcumin and Avastin on the rat corneal neovascularization. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2013;13(6): 1087-1089

摘要

目的: 通过对比姜黄素与 Avastin 抑制大鼠碱烧伤后角膜新生血管 (corneal neovascularization, CNV) 及血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 表达水平的影响, 进一步探讨姜黄素抑制 CNV 形成的机制。

方法: 选取 SD 大白鼠共 30 只, 建立碱烧伤模型, 随机将大鼠分成 A、B 两组, 各 15 只, A 组中右眼为实验组 A1 组, 左眼为空白对照组 A2; B 组中右眼为实验组 B1, 左眼为空白对照组 B2。A1 组给予 40 μmol/L 姜黄素配置成的滴眼液, A2 组滴用生理盐水; B1 组给予 5g/L Avastin 滴眼液, B2 组滴用生理盐水。根据不同时间点取角膜组织进行病理切片研究、抽取房水进行 ELISA 测定, 计算出每视野计数微新生血管及房水中 VEGF 含量。对以上指标进行对比分析研究。

结果: 两种药物均未发现在角膜水肿、角膜修复等方面的毒副作用。对新生血管的影响, 两种药物 CNV 计数均明显低于空白对照组 ($P < 0.01$), 两种药物之间对新生血管影响的对照, 平均 CNV 计数无显著性区别。A1 组与 A2 组对比、B1 组与 B2 组对比, 实验组 VEGF 均明显低于对照组, 有高度显著性统计学意义 ($P < 0.01$), A1 组与 B1 组对照, 平均 VEGF 含量 A1 组高于 B1 组, 有统计学意义 ($P < 0.05$)。

结论: 姜黄素的 VEGF 抑制能力可能不如 Avastin, 但在整体抗 CNV 的能力上并不输于 Avastin, 说明姜黄素还参与了干预角膜碱烧伤 CNV 形成的其他机制。

关键词: 姜黄素; Avastin; 角膜新生血管; 血管内皮生长因子

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2013.06.06

引用: 吴艺, 廖文雄, 陆守权, 等. 姜黄素及 Avastin 抑制鼠角膜碱烧伤新生血管对比. *国际眼科杂志* 2013;13(6): 1087-1089

0 引言

角膜是屈光间质的重要组成部分,多种因素均可导致角膜新生血管(corneal neovascularization, CNV)的形成,眼部化学伤后的角膜新生血管可严重影响角膜透明性,并破坏角膜“免疫赦免”的状态,故其是化学伤后近期视力下降以及远期角膜移植失败的主要原因之一,在发达国家,新生血管化引起的眼部疾病已占失明原因的首位^[1]。如在美国,CNV 占全部眼科就诊人数的4.14%。在我国,眼外伤(尤其是严重化学伤)引起的CNV约占整个角膜疾病的10%,所引起的盲目已成为我国眼科学目前面临的最突出的问题之一。而至今为止其防治方法的效果均不能让人满意。诸多研究表明,多种中药提取成分均具有体外抑制新生血管形成的作用,但中药提取物用于化学伤后CNV防治的相关研究则少见,其中有报道指出姜黄素存在抑制CNV的作用。本实验通过对比姜黄素与Avastin抑制大鼠碱烧伤后CNV及血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)表达水平的影响,进一步探讨姜黄素抑制CNV形成的机制。

1 材料和方法

1.1 材料 实验动物:健康的SPF级SD大白鼠共30只,雄性18只,雌性12只,体质量200~300g,购于广东省医学实验中心,合格证:SCXK(粤)2012-0005号。主要试剂:100g/L水合氯醛、10g/L地卡因眼液、1mol/L氢氧化钠溶液、40 μ mol/L姜黄素溶液、5g/L Avastin溶液、大鼠VEGF ELISA试剂(产品编号HY17200)。

1.2 方法

1.2.1 模型建立 采用100g/L水合氯醛3mL/kg腹腔注射麻醉,所有实验大鼠均裂隙灯下检查眼前节无病变。10g/L地卡因眼液表面麻醉,将统一规格直径3.0mm的单层圆形滤纸浸入浓度为1mol/L氢氧化钠溶液20s,吸干滤纸上残余溶液后将其准确贴附于双眼角膜中央表面40s,取下滤纸后立即用生理盐水冲洗2min。烧伤术后即观察大鼠角膜,如烧灼区域呈灰白色混浊,确认中度碱烧伤模型建立。术后双眼点红霉素眼膏3d预防感染。

1.2.2 分组处理 随机将大鼠分成A、B组,各15只,其中每组右眼使用药物处理,标记为A1、B1组,左眼不使用任何药物处理,标记为A2、B2组。A1组给予40 μ mol/L姜黄素配置成的滴眼液,A2组滴用生理盐水。B1组给予5g/L Avastin滴眼液,B2组滴用生理盐水。给药在碱烧伤当天开始至烧伤后4d,每2h 1次,此后每4h 1次。

1.2.3 观察指标 (1)烧伤后1,3,5,7,15d每日随机处死3只白鼠,抽取房水、取角膜组织进行常规石蜡包埋。(2)显微镜下观察并逐个视野计数微新生血管,分别计算角膜八个等分角膜缘处视野,计算平均新生血管数。(3)房水VEGF表达的检测:用VEGF ELISA试剂盒检测房水中的蛋白含量:将所有的试剂充分混匀;样品倍比稀释后,样品150 μ L与样品稀释液50 μ L于室温下混匀2h;去上清液,每孔加满洗涤液,振荡30s,甩去洗涤液,用吸水纸拍干,重复3次,加入辣根过氧化物酶标记的待测物多克隆抗体(VEGF抗体)后轻振荡混匀,室温下静置2h,洗涤3次同上;加入底物显色液,混匀,避光静置15min,加入反应终止液混匀;立即用酶标仪在波长450nm条件下检测各孔吸光度,计算相应的VEGF蛋白含量。

表1 鼠角膜烧伤后微血管计数 ($\bar{x}\pm s$,支/视野, $n=3$)

时间(d)	A1组	A2组	B1组	B2组
1	0	0	0	0
3	8.1 \pm 1.0	9.3 \pm 1.5	7.9 \pm 1.2	9.1 \pm 1.3
5	12.5 \pm 1.7	18.4 \pm 2.2	12.7 \pm 1.8	19.2 \pm 1.5
7	14.5 \pm 1.7	22.8 \pm 3.1	15.1 \pm 2.0	23.5 \pm 2.9
15	23.1 \pm 2.3	33.4 \pm 2.8	24.0 \pm 3.0	34.6 \pm 3.1

表2 鼠角膜烧伤后房水 VEGF 含量 ($\bar{x}\pm s$,pg/mL, $n=3$)

时间(d)	A1组	A2组	B1组	B2组
1	312 \pm 65	323 \pm 75	285 \pm 69	321 \pm 71
3	395 \pm 67	510 \pm 76	378 \pm 71	498 \pm 78
5	454 \pm 75	657 \pm 87	408 \pm 78	648 \pm 86
7	512 \pm 84	721 \pm 91	445 \pm 86	718 \pm 92
15	852 \pm 101	1151 \pm 121	751 \pm 109	1202 \pm 115

统计学分析:采用SPSS 11.0软件依据资料类型进行Student-*t*统计学检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 角膜修复情况及毒副作用 所有大鼠烧伤后1~3d均有明显的角膜水肿,3d后角膜水肿逐渐减退,7d时角膜水肿消失,均无出现角膜溃疡等感染性改变。实验期间未发现实验组在角膜水肿、角膜修复等方面的毒副作用。

2.2 CNV变化 所有大鼠烧伤后1d没有CNV的生长,角膜缘充血;从3d开始可见CNV生长,5d时就可以看见角膜缘处新生血管芽呈毛刷状增生,侵入角膜透明区,于4~7d CNV增生明显,15d后CNV计数趋向平稳。A1组与A2组对比($P=0.02325$)、B1组与B2组对比($P=0.02246$),实验组CNV计数均低于对照组($P<0.05$);A1组与B1组对照,平均CNV计数无显著性区别($P=0.107$,表1)。

2.3 房水 VEGF 含量 A1组与A2组对比($P=0.013218$)、B1组与B2组对比($P=0.017053$),实验组VEGF均明显低于对照组,具有统计学意义($P<0.05$)。A1组与B1组对照,平均VEGF含量A1组高于B1组($P=0.013198$),差异有统计学意义($P<0.05$,表2)。

3 讨论

角膜碱烧伤时,由于碱性离子的快速渗透性和胶原酶的联合作用,溶解胶原蛋白,使损伤迅速向深部组织扩展,使细胞分解坏死,导致诸多并发症其中包括CNV的形成,CNV的形成则是碱烧伤后角膜透明度下降的主要因素之一。CNV的形成机制复杂,受VEGF^[2,3]、神经生长因子^[4]、细胞金属蛋白酶等多种因素影响,其中VEGF起着核心的作用。

VEGF是一种具有自分泌和旁分泌机制的生长因子,具有促进血管内皮细胞增殖和促进血管渗漏的作用,在正常血管发生中发挥着重要作用^[5,6]。研究表明,VEGF不仅在视网膜缺血性新生血管的产生过程中起着主要介导作用,同时在其他类型的眼部新生血管生成中,如角膜新生血管、脉络膜新生血管等,均扮演着重要角色^[7]。本研究结果显示,在碱烧伤后短期内房水中即开

始 VEGF 表达的持续增强,表明 VEGF 在新生血管产生前即参与到修复反应中,并诱发了后期新生血管的生成。实验中观察到,随烧伤后时间的推移,CNV 与 VEGF 表达增高趋势一致。

抗 VEGFmAb 贝伐单抗 (Bevacizumab), 又称 rhuMab-VEGF, 商品名 Avastin, 是人源化的抗 VEGF 抗体。贝伐单抗对 VEGF-A 的所有亚型都具有亲和力, 其抗新生血管的主要机制为阻止 VEGF 与内皮细胞表面的 VEGFR-1 和 VEGFR-2 受体结合, 使内源化 VEGF 的生物活性失效, 从而阻止血管渗漏和新生血管的形成^[8]。在国外的临床应用已经证实其能有效治疗糖尿病视网膜病变等眼内新生血管疾病^[9,10]。

姜黄素类 (curcuminoids) 化合物主要是从姜科姜黄属等药用植物中分离得到的一类化合物。它以庚烷为母体, 在 1,7 位有芳基取代。大量研究显示, 姜黄素为可作用于多个分子靶点发挥抗血管生成作用, 如蛋白激活物 1 (AP-1), PrK, HIF-1, NF- κ B, IKK, TNF, MAPKs, VEGF, PDGF 等^[11-13]。Park 等^[14] 研究证实姜黄色素可抑制永生性人脐静脉内皮细胞 ECV304 的增殖; Gururaj 等^[15] 报道姜黄色素在体外可诱导人脐静脉内皮细胞 (HUVECs) 的凋亡, 当将姜黄色素注射到 EAT 荷瘤小鼠腹腔后, 能够显著减少腹水的形成 (下降 66%) 及腹膜血管生成。

在眼科动物实验中, 姜黄素能抑制 F4/80 阳性巨噬细胞及 GR-1 阳性粒细胞的浸润, 从而减低 VEGF 的表达^[16]。与 Avastin 相比, 姜黄素的抗新生血管作用机制更为复杂。

本研究中, 姜黄素处理组 A1 房水中的 VEGF 含量较 Avastin 处理组高, 但从 CNV 形成的情况看, 两者之间并无显著性区别。这说明姜黄素对 VEGF 表达的抑制能力有可能不如 Avastin, 但从本次研究看, 在整体抗 CNV 形成的能力上并不输于 Avastin, 说明了姜黄素的其他抗新生血管机制可能占有比较重要的影响, 值得进一步研究。

参考文献

- Lloyd PA, Jill MN, Bruce A, et al. Hypoxic regulation of vascular endothelial growth factor in retinal cells. *Arch Ophthalmol* 1995; 113 (12):1538-1544
- Myoken Y, Kayda Y, okamoto T, et al. Vascular endothelial cell growth factor (VEGF) produced by A-431 human epidermoid carcinoma cells and identification of VEGF membrane binding sites. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88(13):5819
- Folkman J, Haudenschild C. Angiogenesis *in vitro*. *Nature* 1980; 288

(5791):551

- Calza L, Giardino L, Giuliani A, et al. Nerve growth factor control of neuronal expression of angiogenic and vasoactive factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(7):4160-4165
- Adamis AP, Shima DT, Tolentino MJ, et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor prevents retinal ischemia-associated iris neovascularization in a nonhuman primate. *Arch Ophthalmol* 1996; 114 (1):66-71
- Amano S, Rohan R, Kuroki M, et al. Requirement for vascular endothelial growth factor in wound and inflammation-related corneal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; 39(1):18-22
- Charland S, Boucher MJ, Houde M, et al. Somatostatin inhibits Akt phosphorylation and cell cycle entry, but not p42/p44 mitogen-activated protein (MAP) kinase activation in normal and tumoral pancreatic acinar cells. *Endocrinology* 2001; 142(1):121-128
- Adamis AP, Shima DT. The role of vascular endothelial growth factor in ocular health and disease. *Retina* 2005; 25(2):111-118
- Avery RL, Pieramici DJ, Rabena MD, et al. Intravitreal bevacizumab (Avastin) for neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 2006; 113(3):363-372
- Davidorf FH, Mouser JG, Defick RJ. Rapid improvement of rubeosis iridis from a single bevacizumab (Avastin) injection. *Retina* 2006; 26 (3):354-356
- Kunnumakkara AB, Anand P, Aggarwal BB, et al. Curcumin inhibits proliferation, invasion, angiogenesis and metastasis of different cancers through interaction with multiple cell signaling proteins. *Cancer Lett* 2008; 269(2):199-225
- Aggarwal S, Ichikawa H, Takada Y, et al. Curcumin (diferuloylmethane) down-regulates expression of cell proliferation and antiapoptotic and metastatic gene products through uppression of I kappa B alpha kinase and akt activation. *Mol Pharmacol* 2006; 69(1):195-206
- Binion DG, Otterson MF, Rafiee P, et al. Curcumin inhibits VEGF-mediated angiogenesis in human intestinal microvascular endothelial cells through COX-2 and MAPK inhibition. *Gut* 2008; 57(11):1509-1517
- Park MJ, Kim EH, Park IC, et al. Curcumin inhibits cell cycle progression of immortalized human umbilical vein endothelial (ECV304) cells by up-regulating cyclin-dependent kinase inhibitor, p21WAF1/CIP1, p27KIP1 and p53. *Int J Oncol* 2002; 21(2):379-383
- Gururaj AE, Belakavadi M, Venkatesh DA, et al. Molecular mechanisms of anti-angiogenic effect of curcumin. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 297(4):934-942
- Xie P, Zhang W, Yuan S, et al. Suppression of experimental choroidal neovascularization by curcumin in mice. *PLoS One* 2012; 7 (12):e53329