

# 利鲁唑对体外培养人脐静脉内皮细胞及小鼠视网膜新生血管形成的影响

吴海星, 张学东

## Effects of riluzole on retinal neovascularization and *in vitro* cultured human umbilical vein endothelial cells

Wu Hai-xing, Zhang Xue-dong

Department of Ophthalmology, First Hospital of Chongqing University of Medical Science, Chongqing 400010, China

Wu Hai-xing ★, Master, Department of Ophthalmology, First Hospital of Chongqing University of Medical Science, Chongqing 400010, China  
starfish1314@tom.com

Correspondence to: Zhang Xue-dong, Professor, Department of Ophthalmology, First Hospital of Chongqing University of Medical Science, Chongqing 400010, China  
zxued@sina.com

Received: 2008-04-11  
Accepted: 2008-05-22

重庆医科大学附属第一医院眼科, 重庆市 400016

吴海星★, 女, 1979年生, 湖北省通城县人, 汉族, 2008年重庆医科大学毕业, 硕士, 主要从事眼底病的研究。  
starfish1314@tom.com

通讯作者: 张学东, 教授, 重庆医科大学附属第一医院眼科, 重庆市 400016  
zxued@sina.com

中图分类号: R392  
文献标识码: A  
文章编号: 1673-8225 (2008)33-06416-05

收稿日期: 2008-04-11  
修回日期: 2008-05-22  
(54200804110014/W·A)

### Abstract

**BACKGROUND:** Studies show that riluzole can greatly inhibit protein kinase C- in mediating vascular endothelial cell growth factor effects on endothelial cells, so we presume it can be used in inhibiting retinal neovascularization.

**OBJECTIVE:** To explore the inhibitory effects of riluzole on the proliferation of human umbilical vein endothelial cells and retinal neovascularization, and investigate potential mechanism of its effects.

**DESIGN, TIME AND SETTING:** Single-sample observation and randomized controlled animal trial were performed at the Animal Laboratory and Basic Study Laboratory of Chongqing University of Medical Sciences from August to December 2007.

**MATERIALS:** Thirty 3-day-old healthy C57BL/6 mice (60 eyes), irrespective of gender, were selected to model proliferative retinopathy induced by hyperoxia. Raw material of riluzole was product of Venturepharm Laboratories Limited, Beijing (No. 060630, content 98.5%).

**METHODS:** Human umbilical vein endothelial cells were cultured, and randomly divided into 3 groups. The mice in hyperoxia model group and riluzole group were modeled, and riluzole group was additionally intraperitoneally injected 10 mg/kg per day riluzole; control group was intraperitoneally injected normal saline.

**MAIN OUTCOME MEASURES:** Effect of riluzole on proliferation of endothelial cell proliferation induced by vascular endothelial growth factor was observed using MTT assay; The inhibitory effects of riluzole on retinal neovascularization were evaluated by counting the endotheliocyte nuclei of new vessels beyond the inner limiting membrane in sections with HE staining. The expression of retinal protein kinase C- and vascular endothelial growth factor were detected with SABC immunohistochemistry.

**RESULTS:** The riluzole of 0.1-10 μmol/L inhibited proliferation of human umbilical vein endothelial cells in a dose-effect dependent manner. The number of the endotheliocyte nuclei of new vessels beyond the inner limiting membrane was obviously less in eyes of normal control and riluzole groups than in the hyperoxia group ( $P < 0.01$ ). Immunohistochemistry of retinal sections revealed protein kinase C- and vascular endothelial growth factor were overexpressed in the retina of the hyperoxia group compared with control group, while the expressions in riluzole group were significantly reduced.

**CONCLUSION:** Retinal neovascularization is inhibited by intraperitoneal injections of riluzole, and the protein kinase C- and vascular endothelial growth factor expression in retina is partially inhibited. The mechanism of inhibitory effect of riluzole may contribute to inhibiting the activity of protein kinase C- and thus the expression of some important growth factor.

Wu HX, Zhang XD. Effects of riluzole on retinal neovascularization and *in vitro* cultured human umbilical vein endothelial cells. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu 2008;12(33):6416-6420  
[www.zglckf.com/zglckf/ejournal/upfiles/08-33/33k-6416(ps).pdf]

### 摘要

**背景:** 研究已证实利鲁唑具有较强的抑制蛋白激酶 C- 单体介导血管内皮细胞生长因子促内皮细胞增殖效应的作用, 因此推测其可用于抑制视网膜新生血管的形成。

**目的:** 观察利鲁唑对培养的人脐静脉内皮细胞增殖及小鼠视网膜新生血管形成的抑制及其作用途径。

**设计、时间及地点:** 单一样本观察及随机对照动物实验, 于 2007-08/12 在重庆医科大学动物实验室及基础研究实验室完成。

**材料:** 清洁级出生第 3 天的健康 C57BL/6 小鼠 30 只 60 眼, 雌雄不限, 以改良法建立高氧诱导血管增生性视网膜病变小鼠模型。利鲁唑原料物质为北京万全医药科技有限公司产品, 批号: 060630, 含量 ≥ 98.5%。

**方法:** 常规传代培养人脐静脉内皮细胞, 随机分为 3 组。高氧模型组及利鲁唑治疗组为造模小鼠, 利鲁唑治疗组小鼠腹腔注射利鲁唑 10 mg/(kg·d), 正常对照组小鼠腹腔注射等量等渗的生理盐水。

**主要观察指标:** 以四甲基偶氮唑盐比色法检测利鲁唑对血管内皮生长因子诱导的人脐静脉内皮细胞增殖的影响。以组织切片苏木精-伊红染色观察并计数突破视网膜内界膜的血管内皮细胞核数目。以 SABC 法免疫组织化学染色观察视网膜组织中蛋白激酶 C-β II 及血管内皮生长因子的表达。

**结果:** 利鲁唑在 0.1~10 μmol/L 浓度范围内, 可抑制培养的人脐静脉内皮细胞增殖, 且呈剂量效应依赖关系。高氧模型组视网膜组织切片上见较多突破视网膜内界膜的血管内皮细胞核, 治疗组突破视网膜内界膜的内皮细胞核数目明显减少 ( $P < 0.01$ ), 免疫组织化学染色检测高氧模型组小鼠视网膜蛋白激酶 C-β II 及血管内皮生长因子表达比正常对照组明显增强, 治疗组比模型组明显减弱。

**结论:** 利鲁唑腹腔注射能抑制氧致视网膜新生血管的形成, 对视网膜蛋白激酶 C-β II 及血管内皮生长因子的表达有抑制作用, 利鲁唑对体外培养人脐静脉内皮细胞增殖的抑制作用与其抑制蛋白激酶 C-β II 的活性进而抑制血管生长因子的表达有关。

**关键词:** 视网膜新生血管化; 利鲁唑; 蛋白激酶 C; 组织构建

吴海星, 张学东. 利鲁唑对体外培养人脐静脉内皮细胞及小鼠视网膜新生血管形成的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(33):6416-6420  
[www.zglckf.com/zglckf/ejournal/upfiles/08-33/33k-6416(ps).pdf]

## &gt;&gt; 本文导读 &lt;&lt;

**应用要点:** 将利鲁唑具有的 PKC- $\beta$  II 抑制作用应用于针对视网膜新生血管的新生, 优点在于利鲁唑可口服给药, 降低反复玻璃体注射治疗带来的副作用。利鲁唑用于临床时间已久, 药代动力学特征明确, 大剂量使用不良反应少且轻微, 投入 II 期临床实验要比研究合成新的药物简单安全得多。

**倚赖和不足:** 理论上利鲁唑作为 PKC 抑制剂全身应用会干扰机体血管再生的整体调节, 如创伤愈合、组织修复。因此实验还需进一步寻找更安全有效的眼科用药途径和使用剂量。

**同行评价:** 抑制针对视网膜新生血管的形成是国内外学者一直进行探索的热点。文章通过利鲁唑培养内皮细胞以及观察其抑制新生血管作用验证其可行性在国内具有创新性, 而且有应用意义。

## 0 引言

目前对眼内新生血管的治疗临床上主要采用激光光凝和冷凝视网膜及晚期外科手术干预等<sup>[1-2]</sup>, 但远期效果不佳, 视力恢复不明显, 且伴随的手术并发症多。随着现代分子生物学及基因工程技术的进步, 衍生出许多以分子为目标的药物治疗方法, 目前临床已批准使用的有: Pegaptanib, 它是血管内皮生长因子165的特异性抗体, 可特异性地与血管内皮生长因子165结合, 阻断其与受体的结合, 从而抑制其促新生血管作用。该药价格相当昂贵, 临床应用不普遍, 且其临床疗效及长期安全性有待进一步观察<sup>[3]</sup>。Bevacizumab即Avastin是全长的血管内皮生长因子单克隆抗体, 能结合和阻断所用血管内皮生长因子异构体, 其短期安全性和有效性在动物实验、体外和临床中均有证实<sup>[4]</sup>, 但长期效果尚待进一步研究, 有过一过性幻视、视网膜色素上皮层撕裂的报道<sup>[5]</sup>, 在国内仍未被批准用于临床。血管内皮细胞生长因子反义寡聚脱氧核苷酸, 如血管内皮生长因子As PS-ODNs<sup>[6]</sup>、血管内皮细胞生长因子短肽cDNA等基因治疗也限于病毒载体及转基因产物对眼组织的毒性、免疫原性, 探讨最安全有效的给药途径、用药剂量、间隔时间, 如何提高转染率及稳定表达等问题仍需进一步研究, 目前大多数研究仍局限于动物实验, 进行临床应用还需要克服许多实际困难。

利鲁唑是美国食品药品监督管理局批准使用于临床肌萎缩侧索硬化患者的药物, 被发现具备特异性的蛋白激酶C- $\beta$  II抑制活性<sup>[2]</sup>, 可减少血管内皮细胞的增殖。本实验通过培养人脐静脉内皮细胞、建立高氧诱导视网膜病变动物模型, 给予腹腔注射利鲁唑, 拟观察其对内皮细胞增殖及视网膜新生血管形成的抑制作用。

## 1 材料和方法

**设计:** 单一样本观察及随机对照动物实验。

**时间及地点:** 实验于2007-08/12在重庆医科大学动物实验室及基础研究实验室完成。

**材料:** 清洁级出生第3天的健康C57BL/6小鼠3窝共30只60眼, 雌雄不限, 每窝配哺乳母鼠2只(由解放军

第三军医大学大坪医院实验动物中心提供, 实验动物许可证号: SCXK(渝)20070001)。

试剂及仪器	来源
利鲁唑原料物质(批号: 060630, 含量 $\geq$ 98.5%)	北京万全医药科技有限公司
兔抗小鼠血管内皮生长因子、PKC- $\beta$ II一抗及其他生化试剂	武汉博士德生物工程有限公司
人脐静脉内皮细胞株	货号: KG110
RPMI-1640	美国 GIBCO 公司
含体积分数为 0.1 的新生小牛血清	杭州四季青生物工程材料有限公司
2.5 g/L 胰蛋白酶	美国 GIBCO 公司
血管内皮生长因子	北京中衫公司
四甲基偶氮唑蓝	北京中衫公司

## 实验方法:

**不同浓度液体试剂配制:** 利鲁唑粉剂用盐酸溶液溶解后再以生理盐水稀释。

人脐静脉内皮细胞传代培养及四甲基偶氮唑盐比色法实验: 常规传代培养人脐静脉内皮细胞, 取对数生长长期的人脐静脉内皮细胞2.5 g/L胰酶消化、离心后制成单细胞悬液, 以 $5 \times 10^2$ 个/孔接种于96孔培养板, 分成空白对照组(不含细胞)、阴性对照组(只含细胞)、血管内皮生长因子对照组(含血管内皮生长因子100  $\mu$ g/L, 不含利鲁唑)及4个利鲁唑不同浓度组(血管内皮生长因子100  $\mu$ g/L+利鲁唑), 共7个组, 每组设6个复孔, 在含体积分数为0.1的小牛血清、RPMI-1640的培养液中培养96 h(体积分数为0.05的CO<sub>2</sub>、37  $^{\circ}$ C), 四甲基偶氮唑蓝比色法按常规操作, 按参考波长490 nm, 应用酶标仪测定各孔吸光度值(A值)。

**动物模型建立:** 将30只C57BL/6小鼠随机分为正常对照组、高氧模型组及利鲁唑治疗组, 每组各10只20眼。每组小鼠分别与其两只哺乳母鼠共同饲养3 d。自出生后第7天开始, 高氧组与治疗组分别与其哺乳母鼠1只放入自制的密闭氧箱, 氧箱一端连接鼻饲输氧管, 通入100%浓度湿化的医用纯氧, 调节氧气流量0.6~0.8 L/min, 另一端连接出气管, 每日2次打开氧箱用测氧仪测量箱内氧分压, 保持箱内氧气浓度为(75 $\pm$ 2)% , 每日1次更换鼠饲料、垫料、水及哺乳母鼠, 控制室温(23 $\pm$ 2)  $^{\circ}$ C。5 d后返回自然环境继续饲养, 治疗组小鼠开始每日1次腹腔注射10 mg/kg利鲁唑溶液, 对照组小鼠注入等量等渗的生理

盐水。正常对照组小鼠始终置于正常空气中饲养。

**取材及检测：**出生后第17天脊髓离断处死3组小鼠，摘除眼球，标记方向并编号，以40 g/L多聚甲醛固定，48 h后常规脱水、包埋，矢状面平行视神经连续切片，厚度6 μm，行苏木精-伊红染色计数突破视网膜内界膜的血管内皮细胞核数目(仅计数与内界膜有联系的内皮细胞核)，统计平均每只眼球每张切片突破内界膜的内皮细胞核数。行视网膜链菌素生物素-过氧化物酶标记物法(SABC法)蛋白激酶C-β II及血管内皮生长因子免疫组织化学染色，观察利鲁唑治疗对小鼠视网膜蛋白激酶C-β II、血管内皮生长因子表达的影响。

**主要观察指标：**①利鲁唑对血管内皮生长因子诱导的人脐静脉内皮细胞生长的影响。②视网膜新生血管内皮细胞核计数。③利鲁唑对视网膜蛋白激酶C-β II及血管内皮生长因子表达的影响。

**设计、实施、评估者：**均为第一作者，作者接受过动物实验培训，并持有实验动物从业人员岗位证书。

**统计学方法：**各组间比较采用SPSS 13.0统计软件的完全随机设计的两独立样本均数t检验进行统计学处理。

## 2 结果

**2.1 实验动物数量分析** 实验选用小鼠30只，分为3组，实验过程中未出现小鼠营养不良或死亡现象，成模率100%。30只小鼠均计入统计学分析。

**2.2 利鲁唑对血管内皮细胞生长因子诱导的人脐静脉内皮细胞生长的影响** 见表1。

VEGF (μg/L)	Riluzole (μmol/L)	A ( $\bar{x} \pm s$ )	Inhibition rate(%)
0	0	0.512 5±0.068 4	
100	0	0.620 5±0.207 9	
100	0.01	0.528 7±0.140 5	14.79
100	0.1	0.368 1±0.103 4	40.68 <sup>a</sup>
100	1	0.344 7±0.073 4	44.45 <sup>a</sup>
100	10	0.326 5±0.067 6	47.39 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>P < 0.05, <sup>b</sup>P < 0.01, vs. control group

### 利鲁唑浓度在0.1~10 μmol/L范围内：

随着药物浓度增加，四甲基偶氮唑蓝比色法检测的A值逐渐下降，与对照组比较有显著差异，表明利鲁唑对血管内皮细胞生长因子诱导的人脐静脉内皮细胞增殖有明显抑制作用，且呈剂量效应依赖关系。

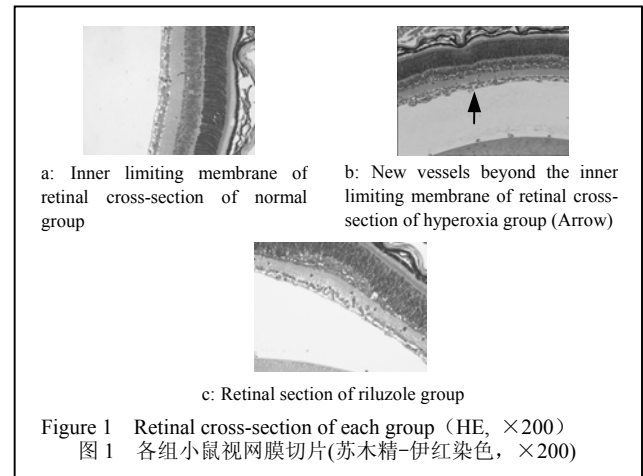
### 利鲁唑浓度在0.01 μmol/L时：

对细胞增殖的抑制作用不明显。

## 2.3 视网膜新生血管内皮细胞核计数

### 苏木精-伊红染色切片：

见图1。可清晰显示视网膜的各层结构，切片及染色效果好。



### 正常对照组：

50张切片中视网膜内界膜完整，细胞排列整齐，未发现或仅有极少数切片中发现突破视网膜内界膜长入玻璃体的血管内皮细胞核，平均每张切片新生血管内皮细胞核数为(0.28±0.66)。

### 高氧模型组：

50张切片中可见较多突破内界膜的血管内皮细胞核，平均每张切片(31.14±10.00)个，内界膜下内皮细胞排列紊乱，部分切面可见管腔形成。与正常对照组相比差异有显著统计学意义( $t=21.77, P < 0.001$ )。

### 治疗组：

50张切片上可见部分突破内界膜的内皮细胞核，平均每张切片(6.50±3.26)个，内界膜下细胞增殖较高氧模型组明显减少。两组差异有显著统计学意义( $t=16.66, P < 0.001$ )，表明利鲁唑治疗可有效抑制高氧诱导的小鼠视网膜新生血管形成。

## 2.4 利鲁唑对视网膜蛋白激酶C-β II及血管内皮细胞生长因子表达的影响

### 血管内皮细胞生长因子免疫组织化学显示：

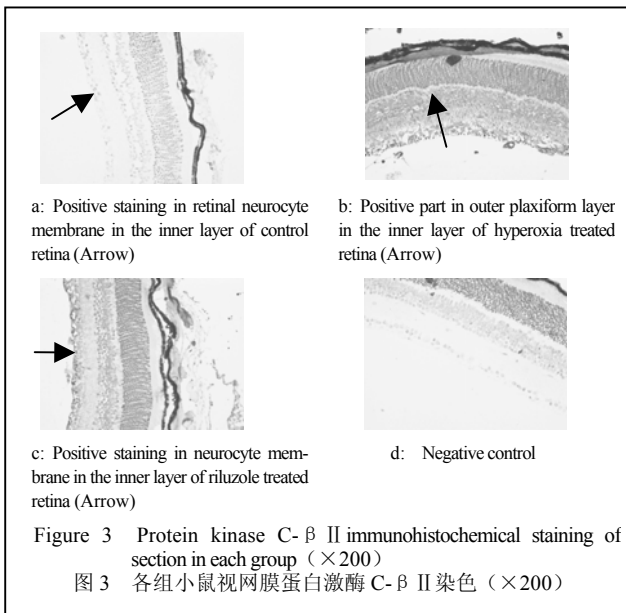
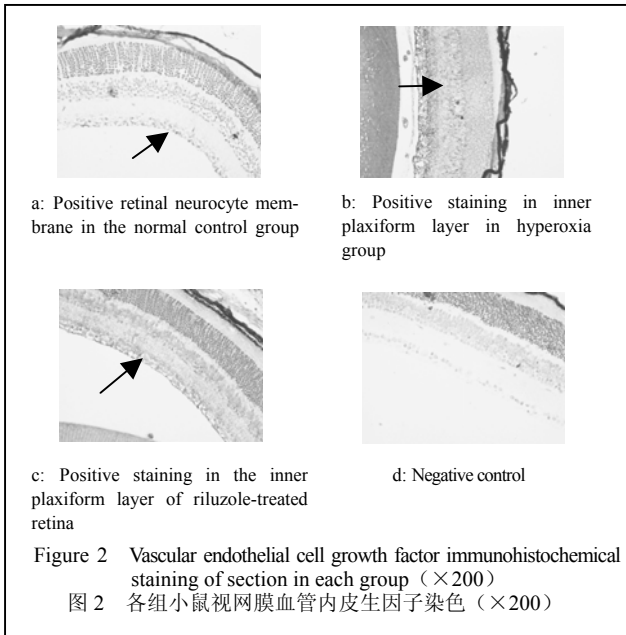
见图2。血管内皮细胞生长因子阳性反应表现为细胞胞浆中棕黄色颗粒，主要位于视网膜内界膜下的神经节细胞层，内丛状层和内核层的某些细胞，视网膜内、外核层呈现蓝色，各层结构清晰可辨。

与正常对照组比较，高氧组视网膜血管内皮细胞生长因子表达明显增强，治疗组的血管内皮细胞生长因子阳性细胞数和强度均比高氧组有所减少。

### 蛋白激酶C-β II免疫组织化学显示：

见图3。蛋白激酶C-β II的阳性反应为胞浆中的棕黄色表达，主要位于神经节细胞胞浆和内外丛状层轴突。

切片中视网膜各层结构清晰，与正常组比较，高氧组视网膜蛋白激酶C-β II表达明显增强，治疗组表达较高氧组有所减少。



### 3 讨论

血管内皮细胞生长因子目前被认为是增殖性视网膜病变促进新生血管形成最主要的刺激因子, 在血管发育及对缺氧环境的反应过程中, 许多细胞都可产生血管内皮细胞生长因子。与许多其他生长因子一样, 血管内皮细胞生长因子通过与其同源酪氨酸激酶受体: Flk-1及Flt-1结合发挥作用, 其中Flk-1介导血管内皮细胞生长因子诱导的内皮细胞增殖, Flt-1可能促进细胞迁移及内皮细胞-细胞之间或细胞-基质之间的相互作用。在血管内皮细胞生长因子受体下游的信号传导通路中, 蛋白激酶C被证实在介导内皮细胞增殖中发挥主要作用<sup>[7-8]</sup>。作为一种磷脂依赖性丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 蛋白激酶C

广泛参与细胞内生物信息传递, 离子通道调节, 细胞的增殖、分化和分泌等多种生物学过程, 是重要的信号传导介质<sup>[9]</sup>。

蛋白激酶C是一个具有至少11种同工酶的大家族, 不同的同工酶显示不同的酶学特征、不同的组织表达及特定的细胞定位, 在不同细胞对外来信号刺激的应答反应的调控作用中发挥不同的生理功能。视网膜的3种细胞类型, 即色素上皮细胞、周细胞和视网膜微血管内皮细胞均有蛋白激酶C高表达, 认为蛋白激酶C信号传导通路在调节视网膜生物学过程中起重要作用<sup>[10]</sup>。研究证实, 在蛋白激酶C的11种同工酶中蛋白激酶C- $\beta$ 在大鼠视网膜血管中含量最高, 且优先被激活。蛋白激酶C- $\beta$ 激活后, 通过磷酸化*raf-1*, 启动丝裂素活化蛋白激酶信号传导系统, 改善毛细血管渗漏。丝裂素活化蛋白激酶系统激活后, 尚可进一步调节*c-fos*和*c-Jun*表达, 形成活化蛋白-1, 促进细胞外基质基因表达, 导致毛细血管基底膜增厚。蛋白激酶C- $\beta$ 由两个单体- $\beta$  I和 $\beta$  II组成, 其中蛋白界膜C- $\beta$  II单体已被证实是介导血管内皮细胞生长因子促内皮细胞增殖效应的主要家族成员<sup>[8]</sup>, 糖尿病引起的蛋白激酶C活化在视网膜中活化主要是蛋白激酶C- $\beta$  II、 $\delta$ , 蛋白激酶C与高血糖状态下血管细胞功能异常有关, 包括内皮细胞通透性增高、细胞收缩、基质膜增多、细胞增殖, 以及一些生长因子及激素信号的传导(转化生长因子 $\beta$ 、血管内皮细胞生长因子、血管紧张素、内皮素等)。因此采用选择性蛋白激酶C- $\beta$  II抑制剂既可有效减少增殖型视网膜病变中的内皮细胞增殖, 又可避免广泛抑制蛋白激酶C家族所引起的有害副作用, 如细胞凋亡等。LY333531 (Ruboxistaurin) 即是最近的研究热点之一, 作为一种高选择性的蛋白激酶C- $\beta$  II抑制剂, 大量体外和动物模型实验均显示其能有效降低内皮细胞增生、血管新生和血管通透性, 且副作用鲜见<sup>[11-12]</sup>。在人类有小样本(29例, <10年的糖尿病患者)证明视网膜血流和平均循环时间改善<sup>[13]</sup>, 另有252个受试者给予Ruboxistaurin临床研究表明, 其具有很好的耐受性并且能减低视力丧失的危险性, 但是不能够组织糖尿病视网膜病情进展<sup>[14]</sup>。但一项在糖尿病视网膜病变患者中进行的更大规模的随机对照III期临床实验中, LY333531显示出的效应却较温和, 结果差强人意<sup>[15]</sup>, 表示需要继续寻找更加有效的药物。

尽管研发新的具有PKC- $\beta$  II抑制活性的药物是较传统常用的研究方向, 但如果可以在临床已在使用的药物中发掘到PKC- $\beta$  II抑制活性, 却可能是一种更为经济、快速的方法。

利鲁唑(2-氨基-6-三氟甲氧基-苯并噻唑)是苯噻唑类化合物, 起初是作为一种谷氨酸拮抗剂, 被美国食品药品监督管理局批准广泛用于肌萎缩侧索硬化患者的治疗。利鲁唑的神经保护作用并非直接作用于谷氨酸受

体, 而是通过减少神经末梢释放神经递质, 如谷氨酸、乙酰胆碱等引起。利鲁唑还可抑制电压门控 $\text{Na}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 通道的开放, 减少细胞内向电流, 并激活新的背景 $\text{K}^+$ 通道, 增加细胞外向电流, 从而降低细胞兴奋性。利鲁唑的这种抗兴奋效应常被用来防治缺血、慢性神经变性等引起的神经元坏死<sup>[16-17]</sup>。除此之外, 有研究发现利鲁唑可抑制培养的皮层细胞丛的蛋白激酶C- $\beta$  II活性, 可降低体外纯化的蛋白激酶C- $\beta$  II活性<sup>[18]</sup>, 还可抑制蛋白激酶C活化物—PMA诱导的人脐静脉内皮细胞的增殖反应<sup>[19]</sup>, 均证实了利鲁唑具有较强的蛋白激酶C- $\beta$  II抑制作用。韩国的Yoo等<sup>[20]</sup>研究发现利鲁唑可用作糖尿病视网膜病变的抗血管内皮细胞生长因子治疗, 尤其是减少视网膜出血。

实验结果亦显示, 利鲁唑可有效抑制血管内皮细胞生长因子诱导的血管内皮细胞增殖, 减少高氧诱导视网膜病变小鼠视网膜的异常血管形成, 与已有的研究结果一致<sup>[19]</sup>。利鲁唑还可显著减少小鼠视网膜组织中蛋白激酶C- $\beta$  II、血管内皮细胞生长因子的表达, 以上均提示利鲁唑可能同样可对人类增殖性视网膜病变起到有效的抑制作用。由于蛋白激酶C广泛参与人体多种正常的细胞内信号传递, 使得蛋白激酶C抑制剂使用于人体可能产生的副作用成为评价其临床应用可行性的重要指标。利鲁唑自从1996年被美国食品药品监督管理局批准使用于临床以来, 其副作用已得到广泛研究, 主要包括: 嗜睡、厌食、乏力、紧张等, 且均为少见的轻微反应, 因此针对利鲁唑进行II期临床实验要比研究新的药物简单得多。本实验结果说明PKC- $\beta$  II抑制剂利鲁唑对新生血管形成具有明显的抑制作用, 虽然其确切机制尚不甚明确, 但这不妨碍将其看作一种有效控制视网膜新生血管的全新、有希望的治疗途径, 并进一步进行必要的临床研究。

#### 4 参考文献

1 Yu B,Dong XG.Zhonghua Yandibing Zazhi 2005;(21)5:332-333  
于滨,董晓光.二极管激光治疗三胞胎早产儿视网膜病变疗效观察[J].中华眼底病杂志,2005,21(5):332-333

2 Gao L,Zhao XQ, Wilson Yip,et al. Zhonghua Yandibing Zazhi 2005; 21(5):337-340  
高磊,赵秀芹,Wilson Yip,等.早产儿视网膜病变[J].中华眼底病杂志, 2005, 21(5):337-340

3 Shen LJ,Hui YN.Guoji Yanke ZL 2006;30(3):145-148  
沈丽君,惠延年.Macugen的临床应用[J].国际眼科纵览,2006,30(3): 145-148

4 Fung AE, Rosenfeld PJ, Reichel E. The International Intravitreal Bevacizumab Safety Survey: using the internet to assess drug safety worldwide.Br J Ophthalmol 2006;90(11):1344-1349

5 Nicolò M, Ghiglione D, Calabria G. Retinal pigment epithelial tear following intravitreal injection of bevacizumab(avastin).Eur J Ophthalmol 2006;16(5):770-773

6 Bhisitkul RB,Robinson GS,Moulton RS,et al.An antisense oligodeoxynucleotide against vascular endothelial growth factor in a nonhuman primate model of iris neovascularization.Arch Ophthalmol 2005;123:214-219

7 Xia P, Aiello LP, Ishih H, et al. Characterization of vascular endothelial growth factor's effect on the activation of protein kinase C, its isoforms ,and endothelial cell growth. J Clin Invest 1996;98:2018-2026

8 Takahashi T, Ueno H, Shibuya M.VEGF activates protein kinase C-dependent, but Ras-independent Raf-MEK-MAP kinase pathway for DNA synthesis in primary endothelial cells.Oncogene 1999;18:2221-2230

9 Sun JY, Huang WG, Wang JL, et al.Di-st Junyi Daxue xuebao 2002; 23 (13): 1242-1245  
孙景豫,黄维国,王锦玲,等. 佛波酯对体外培养大鼠前庭上皮PKC表达的影响[J].第四军医大学学报,2002,23(13):1242-1245

10 Moriarty P, Dickson AJ, Erichsen JT, et al. Protein kinase C isoenzyme expression in retinal cells. Ophthalmic Res 2000;32(2-3):57-60

11 Frank RN. Potential new medical therapies for diabetic retinopathy. Protein kinase C inhibitor. Am J Ophthalmol 2002;133:693-698

12 Kim H, Sasaki T, Maeda K, et al. Protein kinase C  $\beta$  selective inhibitor LY333531 attenuates diabetic hyperalgesia througy ameliorating cGMP level of dorsal root ganglion neurons.Diabetes 2003;52:2102-2109

13 Aiello LP,Clermont A,Arora V,et al.Inhibition of PKC beta by oral administration of ruboxistaurin is well tolerated and ameliorates diabetes-induced retinal hemodynamic abnormalities in patients.Invest Ophthalmol Vis Sci 2006;47(1):86-92

14 The PKC-DRS Study Group.The effect of ruboxistaurin on visual loss in pathents with moderately severe to very severe nonproliferative diabetic retinopathy:initial results of the Protein Kinase C beta Inhibitor Diabetic Retinopathy Study (PKC-DRS) multicenter randomized clinical trial.Diabetes 2005;54(7):2188-2197

15 Aiello LP, Bursell SE, Clermont A. Protein kinase C beta selective inhibitor LY333531 ameliorates abnormal retinal hemodynamics in patients with diabetes. Diabetes 1999;48(Suppl 1):a19-26

16 Schiefer J, Landwehrmeyer GB, Luesse HG, et al. Riluzole prolongs survival time and alters nuclear inclusion formation in a transgenicmouse model of Huntington's disease. Movement Disorders 2002; 17:748-757

17 Ettaiche M, Fillacier K, Widmann C, et al. Riluzole improves functional recovery after ischemia in the rat retina. Invest Ophthalmol Vis Sci 1999; 40:729-736

18 Noh KM, Hwang JY, Shin HC, Koh JY.A novel neuroprotective mechanism of riluzole: Direct inhibition of protein kinase C. Neurobiol Dis 2000;7:375-383

19 Yoo MH, Hyun HJ,et al. Riluzole inhibits VEGF-induced endothelial cell proliferation in vitro and hyperoxia-induced abnormal vessel formation in vivo. Invest Ophthalmol Vis Sci 2005;46(12):4780-4787

20 Yoo MH, Yoon YH, Chung H,et al. Insulin increases retinal hemorrhage in mild oxygen-induced retinopathy in the rat:inhibition by riluzole. Invest Ophthalmol Vis Sci 2007;48(12):5671-5676