

人参皂甙 Rg3 对高糖条件下人视网膜血管内皮细胞的作用研究

曹 亮,宋 愈,吴 莹,黄黎黎

作者单位:(226000)中国江苏省南通市第一人民医院眼科
作者简介:曹亮,硕士,主治医师,研究方向:白内障、青光眼、眼底病。
通讯作者:宋愈,教授,硕士研究生导师,研究方向:白内障、青光眼、眼底病. songyudoc@yahoo.cn
收稿日期:2013-07-03 修回日期:2013-09-15

Effects of ginsenoside Rg3 on human retinal capillary endothelial cells cultured in normal and high glucose conditions

Liang Cao, Yu Song, Ying Wu, Li-Li Huang

Department of Ophthalmology, the First People's Hospital of Nantong, Nantong 226000, Jiangsu Province, China
Correspondence to: Yu Song. Department of Ophthalmology, the First People's Hospital of Nantong, Nantong 226000, Jiangsu Province, China. songyudoc@yahoo.cn
Received:2013-07-03 Accepted:2013-09-15

Abstract

• **AIM:** To investigate the angiogenesis effect and mechanism of ginsenoside Rg3 on human retinal capillary endothelial cells (HRCECs) cultured in normal and high glucose conditions.
• **METHODS:** We cultured HRCEC both in normal and high glucose conditions. Each condition we treated the cells with 0.1mmol/L ginsenoside Rg3 and 0.5mmol/L ginsenoside Rg3. The effect of ginsenoside Rg3 on HRCEC proliferation was tested by methylthiazoletrazolium (MTT) assay 24h, 48h and 72h after the treatment; The effect of cell migration was tested by transwell; The effect of tube formation was tested by Matrigel; Western-Blot and real-time quantitative RT-PCR were used to detect the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) protein and mRNA. Data were statistically analyzed by ANOVA method.
• **RESULTS:** Ginsenoside Rg3 could inhibit proliferation, migration and tube formation of HRCEC in both conditions, depending on the concentration and time. Ginsenoside Rg3 could decrease the expression of VEGF mRNA and protein in both conditions.
• **CONCLUSION:** Ginsenoside Rg3 could inhibit VEGF expression, thus suppress the proliferation, migration, and tube formation of HRCEC in normal and high glucose conditions.
• **KEYWORDS:** human retinal capillary endothelial cell; ginsenoside Rg3; vascular endothelial growth factor

万方数据

Citation: Cao L, Song Y, Wu Y, et al. Effects of ginsenoside Rg3 on human retinal capillary endothelial cells cultured in normal and high glucose conditions. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2013;13(10):1965-1969

摘要

目的:观察正常和高糖条件下人参皂甙 Rg3 对人视网膜血管内皮细胞血管新生作用的影响。
方法:在正常和高糖条件的培养基中,分别加入 0.1mmol/L 和 0.5mmol/L 的人参皂甙 Rg3,在 24h,48h 和 72h 用 MTT 检测细胞的增殖情况,用 Transwell 小室检测细胞迁徙情况,用 Matrigel 检测细胞管腔形成的情况,用实时定量 RT-PCR 和 Western-Blot 检测细胞中血管内皮生长因子 mRNA 和蛋白的表达情况。
结果:在正常和高糖条件下,人参皂甙 Rg3 对于人视网膜血管内皮细胞增殖、细胞迁徙和细胞内皮管腔形成均具有抑制作用,且呈浓度与时间依赖性;且人参皂甙 Rg3 具有抑制人视网膜血管内皮细胞 VEGF 蛋白和 mRNA 表达的作用。
结论:通过抑制 VEGF 的表达,人参皂甙 Rg3 可抑制人视网膜血管内皮细胞增殖、迁徙和管腔形成,进而抑制新生血管的形成。
关键词:视网膜血管内皮细胞;人参皂甙 Rg3;血管内皮生长因子
DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2013.10.06

引用:曹亮,宋愈,吴莹,等. 人参皂甙 Rg3 对高糖条件下人视网膜血管内皮细胞的作用研究. 国际眼科杂志 2013;13(10):1965-1969

0 引言

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是糖尿病的常见并发症,随着我国生活水平的提高,其发病率和致盲率也呈逐年上升趋势。目前,DR 尚无有效的治疗方法,早期诊断并积极治疗以延缓其进展至关重要,玻璃体腔注射抗血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)药物最近取得了一定进展^[1],但远期效果尚有待进一步观察。人参皂甙 Rg3 是从中药人参中提取的有效单体成分,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^[2]。在本研究,拟将体外培养的人视网膜血管内皮细胞置于正常和高糖环境下,观察人参皂甙 Rg3 对其增生、移行、管腔形成和对 VEGF 表达的影响,为人参皂甙 Rg3 应用于糖尿病视网膜病变提供实验研究的支持。

1 材料和方法

1.1 材料 人视网膜血管内皮细胞(human retinal vascular

endothelial cells, HRCEC):购自江苏省南通市百奥迈科生物有限公司。实验药物:人参皂甙 Rg3,为成品药物参一胶囊,胶囊内容物为白色粉末(吉林亚泰制药股份有限公司),将粉剂溶于二甲基亚砷(DMSO),常温保存,使用前用相应培养基配制成所需浓度,DMSO终浓度<0.1%。主要试剂和仪器:葡萄糖(美国Sigma公司);噻唑蓝(MTT)(美国Sigma公司);Transwell小室(美国Corning公司);Matrigel(美国BD公司);兔抗人VEGF多克隆抗体(武汉博士德公司);细胞总蛋白抽提试剂盒及逆转录反应试剂盒(美国Invitrogen公司);酶标仪、紫外分光光度计(德国Eppendorf公司);实时荧光定量PCR仪(美国Applied Biosystems公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞分组 将细胞分为6组,分别为组A:正常条件下培养的正常对照组;组B:在组A基础上,培养基中加入0.1mmol/L人参皂甙 Rg3;组C:在组A基础上,培养基中加入0.5mmol/L人参皂甙 Rg3;组D:培养基中加入25mmol/L葡萄糖的高糖组;组E:在组D基础上,培养基中加入0.1mmol/L人参皂甙 Rg3;组F:在组D基础上,培养基中加入0.5mmol/L人参皂甙 Rg3。

1.2.2 MTT检测细胞增殖 取对数生长期HRCEC细胞用于实验,弃上清,2.5g/L胰酶消化,加入含100mL/L胎牛血清的内皮细胞培养基,制成细胞浓度为 5×10^4 个/mL的细胞悬液,按分组,每组各取200μL接种于96孔板,孵育24h后弃液,按上述分组分别加入各自所需培养液。各组在培养24h,48h和72h后,每孔加入5g/L MTT 20μL,孵育4h,弃培养基,用滤纸吸干水分,加入DMSO 150μL,振荡10min,按操作说明用自动酶标仪测570nm波长吸光度A值。相同条件下重复实验3次。抑制率(%)=[(实验组平均A值-对照组平均A值)/对照组平均A值]×100%。

1.2.3 Transwell小室检测细胞移行 预先加内皮细胞培养基到培养孔和Transwell小室内孵育过夜,弃液后加含100mL/L胎牛血清的内皮细胞培养液600μL到培养孔中,置Transwell小室于培养孔中,接种HRCEC细胞于上室,每孔细胞数约为 5×10^5 个。每孔上室按不同分组加入相应的无血清培养基100μL。培养24h取出小室,用棉签轻轻擦去小室内聚碳酸酯膜上表面的细胞。4%多聚甲醛固定小室20min,PBS洗3次。小心将聚碳酸酯膜自上室基底用刀片切割下来,苏木素染色1min,清水漂洗。二甲苯透明2~3min。中性树脂封片。附着于聚碳酸酯膜下表面的细胞在显微镜下随机取5个视野照相。所得照片应用IPP6.0图像分析软件对Transwell移行细胞进行计数,取平均值。每组3个复孔,重复实验3次。

1.2.4 Matrigel检测内皮细胞管腔形成 按Matrigel说明书操作,4℃融化Matrigel过夜。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HRCEC细胞,用含100mL/L胎牛血清的内皮细胞培养基稀释至 2×10^5 个/mL,每孔均加入细胞悬液50μL,按不同分组,每孔再加入相应的无血清培养基50μL。孵育12h后在相差显微镜下观察,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。

1.2.5 实时荧光定量RT-PCR法 将HRCEC细胞按 $10^6 \sim 10^7$ 个/mL密度接种于培养皿,每皿加入含100mL/L胎牛血清的内皮细胞培养基,培养贴壁,换无血清培养基

培养4h。按不同分组加入相应培养基培养24h。按说明书,Trizol抽提细胞总RNA。紫外分光光度计测定A260计算RNA含量。按一步法逆转录反应试剂盒说明书操作。VEGF上游引物:5'-GCAGAATCATCACGAAGTGG-3',下游引物:5'-GCATGGTGATGTTGGACTCC-3',产物长度212bp;管家基因U6上游引物:5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3',下游引物:5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3',产物长度94bp。RT-PCR总反应体系为25μL:其中RNA 5μL,2×Master Mix 12.5μL,50×SYBR Green I 0.5μL,上下游引物各0.5μL(各10μmol/L),加DEPC处理水至25μL。具体反应条件参照说明书,其中扩增45次。循环结束后进行产物的熔解曲线测定。每个样品的VEGF相对于U6的表达水平根据 $2^{-\Delta Ct}$ 计算, $\Delta Ct = Ct(VEGF) - Ct(U6)$ 。实验组的VEGF相对于对照组的表达水平采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 分析相对含量,其中 $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(药物组) - \Delta Ct(对照组)$ 。

1.2.6 Western-Blot法检测VEGF蛋白质的表达 按1.2.5相同方法获得细胞。按总蛋白抽提试剂盒说明书抽提总蛋白,按BCA蛋白质定量试剂盒说明书测定样品蛋白浓度。SDS-PAGE电泳转膜(PVDF膜),50mL/L BSA封闭,VEGF一抗、二抗分别与膜孵育,显色。化学发光法检测,图片扫描至电脑,Image J分析软件测定条带灰度值。目的蛋白灰度值除以内参β-actin灰度值行半定量分析。

统计学分析:采用SPSS 13.0统计学软件进行统计分析。实验测试指标的数据资料经W检验呈正态分布,经Levene检验方差齐,以 $\bar{x} \pm s$ 表示。细胞移行、细胞管腔形成、RT-PCR和Western-Blot的实验数据行单因素方差分析,细胞增殖的试验数据行两因素方差分析,各因素和组间的多重比较采用LSD-t检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 人参皂甙 Rg3对HRCEC细胞增殖的影响 MTT比色法结果显示,无论在正常培养基中或是高糖培养基中,均可观察到人参皂甙 Rg3对于HRCEC增殖的抑制作用,且呈浓度与时间依赖性(表1)。各组间A值差异有统计学差异($F_{正常组浓度} = 30.306, F_{高糖组浓度} = 37.054, F_{正常组时间} = 88.569, F_{高糖组时间} = 129.070, P < 0.05$)。

2.2 人参皂甙 Rg3对HRCEC细胞移行的影响 Transwell小室结果显示,A,B,C,D,E,F组HRCEC细胞的移行细胞数分别为 $110.57 \pm 3.33, 93.13 \pm 3.52, 77.69 \pm 3.09, 128.82 \pm 4.01, 89.77 \pm 3.52, 74.90 \pm 4.55$ 个(表2,图1)。各组间移行细胞数比较,差异有统计学意义($F_{正常组组间} = 73.741, F_{高糖组组间} = 122.158, P < 0.05$)。无论在正常培养基中或是高糖培养基中,随着人参皂甙 Rg3浓度的增加,移行细胞数逐渐减少。

2.3 人参皂甙 Rg3对HRCEC细胞管腔形成的影响 Matrigel实验结果显示,A,B,C,D,E,F组HRCEC细胞的完整管腔形成数分别为 $28.0 \pm 2.5, 19.3 \pm 2.3, 14.1 \pm 2.1, 26.2 \pm 1.8, 14.8 \pm 2.1, 8.1 \pm 1.9$ 个(表3,图2)。各组间HRCEC细胞的完整管腔形成数比较,差异有统计学意义($F_{正常组组间} = 27.831, F_{高糖组组间} = 66.935, P < 0.05$)。无论在正常培养基中或是高糖培养基中,随着人参皂甙 Rg3浓度的增加,HRCEC细胞形成的管腔也相应减少。

表 1 人参皂甙 Rg3 对正常和高糖环境下人视网膜血管内皮细胞增殖的影响

分组	A570 值($\bar{x}\pm s$)			抑制率(%)		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h
组 A(正常)	0.206±0.004	0.490±0.010	0.765±0.013			
组 B(正常+0.1mol/L 人参皂甙 Rg3)	0.181±0.004	0.405±0.009	0.545±0.010	12.1	17.3	28.8
组 C(正常+0.5mol/L 人参皂甙 Rg3)	0.139±0.007	0.270±0.008	0.373±0.010	32.5	44.9	51.2
组 D(高糖)	0.175±0.009	0.389±0.011	0.539±0.015			
组 E(高糖+0.1mol/L 人参皂甙 Rg3)	0.159±0.005	0.333±0.012	0.448±0.008	9.1	14.4	16.9
组 F(高糖+0.5mol/L 人参皂甙 Rg3)	0.127±0.009	0.234±0.009	0.301±0.011	27.4	39.8	44.2

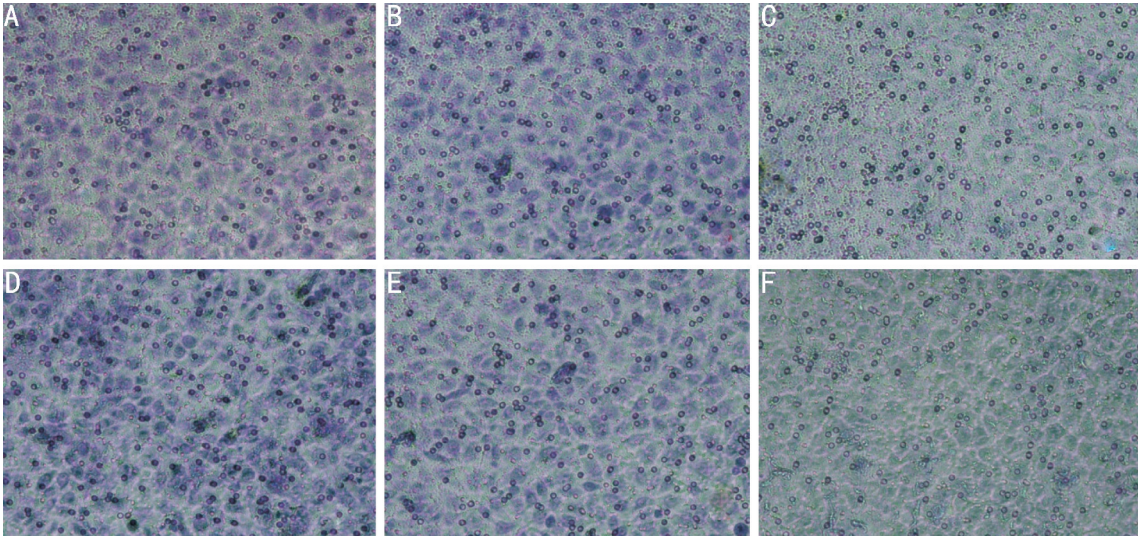


图 1 人参皂甙 Rg3 对正常和高糖环境下人视网膜血管内皮细胞移行的影响 A: 正常; B: 正常+0.1mmol/L Rg3; C: 正常+0.5mmol/L Rg3; D: 高糖; E: 高糖+0.1mmol/L Rg3; F: 高糖+0.5mmol/L Rg3。

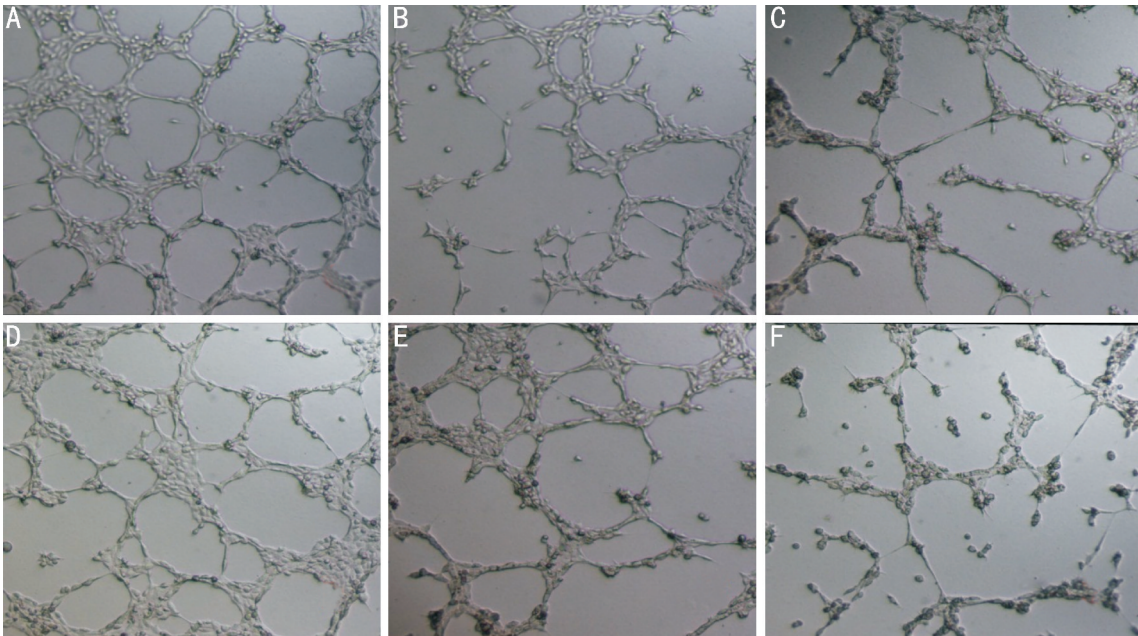


图 2 人参皂甙 Rg3 对正常和高糖环境下人视网膜血管内皮细胞管腔形成的影响 A: 正常; B: 正常+0.1mmol/L Rg3; C: 正常+0.5mmol/L Rg3; D: 高糖; E: 高糖+0.1mmol/L Rg3; F: 高糖+0.5mmol/L Rg3。

2.4 实时荧光定量 RT-PCR 实验结果 A,B,C,D,E,F 组 HRCEC 细胞 VEGF mRNA 相对表达量分别为 1.00±0.05,0.82±0.05,0.63±0.04,2.97±0.11,2.07±0.11,1.23±0.07(表 4)。各组间 VEGF mRNA 表达比较,差异有统计学意义($F_{\text{正常组组间}}=46.682,F_{\text{高糖组组间}}=234.186,P<0.05$)。添加人参皂甙 Rg3 之后,无论是正常组或是高糖组,VEGF mRNA 均呈下降趋势,且呈浓度依赖性。

万方数据

2.5 VEGF 蛋白质的表达 Western-Blot 实验结果显示: A,B,C,D,E,F 组 HRCEC 细胞 VEGF 蛋白质相对表达量分别为 0.54±0.03,0.42±0.02,0.30±0.02,0.88±0.03,0.69±0.02,0.57±0.02(表 5,图 3)。各组间 VEGF 蛋白质表达比较,差异有统计学意义($F_{\text{正常组组间}}=76.235,F_{\text{高糖组组间}}=129.353,P<0.05$)。添加人参皂甙 Rg3 之后,无论是正常组或是高糖组,VEGF 蛋白质表达均呈下降趋势,且呈浓度依赖性。

表 2 人参皂甙 Rg3 对正常和高糖环境下人视网膜血管内皮细胞移行的影响 $\bar{x} \pm s$

分组	细胞移行数
组 A(正常)	110.57±3.33
组 B(正常+0.1mmol/L 人参皂甙 Rg3)	93.13±3.52
组 C(正常+0.5mmol/L 人参皂甙 Rg3)	77.69±3.09
组 D(高糖)	128.82±4.01
组 E(高糖+0.1mmol/L 人参皂甙 Rg3)	89.77±3.52
组 F(高糖+0.5mmol/L 人参皂甙 Rg3)	74.90±4.55

表 3 人参皂甙 Rg3 对正常和高糖环境下人视网膜血管内皮细胞管腔形成数的影响 $\bar{x} \pm s$

分组	管腔数
组 A(正常)	28.0±2.5
组 B(正常+0.1mmol/L 人参皂甙 Rg3)	19.3±2.3
组 C(正常+0.5mmol/L 人参皂甙 Rg3)	14.1±2.1
组 D(高糖)	26.2±1.8
组 E(高糖+0.1mmol/L 人参皂甙 Rg3)	14.8±2.1
组 F(高糖+0.5mmol/L 人参皂甙 Rg3)	8.1±1.9

表 4 人参皂甙 Rg3 对正常和高糖环境下人视网膜血管内皮细胞 VEGF mRNA 表达的影响 $\bar{x} \pm s$

分组	VEGF
组 A(正常)	1.00±0.05
组 B(正常+0.1mmol/L 人参皂甙 Rg3)	0.82±0.05
组 C(正常+0.5mmol/L 人参皂甙 Rg3)	0.63±0.04
组 D(高糖)	2.97±0.11
组 E(高糖+0.1mmol/L 人参皂甙 Rg3)	2.07±0.11
组 F(高糖+0.5mmol/L 人参皂甙 Rg3)	1.23±0.07

表 5 人参皂甙 Rg3 对正常和高糖环境下人视网膜血管内皮细胞 VEGF 蛋白质表达的影响 $\bar{x} \pm s$

分组	VEGF
组 A(正常)	0.54±0.03
组 B(正常+0.1mmol/L 人参皂甙 Rg3)	0.42±0.02
组 C(正常+0.5mmol/L 人参皂甙 Rg3)	0.30±0.02
组 D(高糖)	0.88±0.03
组 E(高糖+0.1mmol/L 人参皂甙 Rg3)	0.69±0.02
组 F(高糖+0.5mmol/L 人参皂甙 Rg3)	0.57±0.02

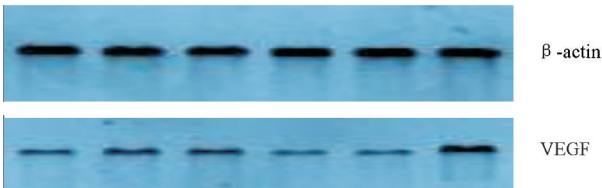


图 3 人参皂甙 Rg3 对正常和高糖环境下人视网膜血管内皮细胞 VEGF 蛋白表达的影响 注:从左至右的泳道依次为:高糖组;高糖+0.1mmol/L Rg3 组;高糖+0.5mmol/L Rg3 组;正常组;正常+0.1mmol/L Rg3 组;正常+0.5mmol/L Rg3 组。

3 讨论

近年来,糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)的发病率不断提高,目前已成为我国的主要致盲原因之一,其基本病理改变为血-视网膜屏障功能破坏,新生血

管形成,后期新生血管可致玻璃体积血及视网膜脱离等。DR 的发病机制非常复杂,目前尚未完全明确。一般认为:高血糖通过经典的多元醇途径、糖基化终末产物途径、蛋白激酶 C 途径和己糖胺途径来促进 DR 的进展。

近年来,多种细胞因子如 VEGF, HIF-1 和肿瘤坏死因子等在 DR 中的作用正越来越受到重视^[2]。新生血管的生成一般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。其中的关键因子为 VEGF^[3-5]。目前用于眼部的 VEGF 抑制剂主要有 3 种:贝伐单抗(Avastin)^[6]、哌加他尼钠(Macugen)^[7] 和兰尼单抗(Lucentis)^[8]。虽然上述 VEGF 抑制剂在临床上均表现出了较好的治疗效果,但也有发现了一些副作用,如高血压、视网膜脱离、眼内炎等,还有研究发现 VEGF 抑制剂可减少病理性新生血管,也影响了正常的新生血管生成^[9-11]。

人参是我国传统中草药中的滋补珍品,人参皂甙 Rg3 是从人参中提取的有效单体。分子式为 C₄₂H₇₂O₁₃, 分子量为 784.30, 非水溶性,但可溶于二甲亚砜。对于 Rg3 的研究虽然只有 20 余年,但其抗新生血管的作用正越来越受到人们的重视^[12]。

我们利用培养的 HRCEC,将其置于正常和高糖环境中。另外,血管形成的过程为内皮细胞分裂增生形成突起的幼芽,随着内皮细胞向前移动及后续细胞的增生而形成一条细胞索,数小时后便可出现管腔,形成新生的毛细血管,进而彼此吻合构成毛细血管网。因此,本文从 HRCEC 细胞增殖、细胞迁徙和细胞内皮管腔形成进行了系列研究。结果发现,无论在正常培养基中或是高糖培养基中,均可观察到人参皂甙 Rg3 对于 HRCEC 增殖的抑制作用,且呈浓度与时间依赖性。王吉等^[13] 研究发现:Rg3 能抑制胃癌细胞条件培养液诱导的血管内皮细胞增殖,其机制可能是通过下调增殖期血管内皮细胞相关因子受体的表达,使血管内皮细胞对肿瘤细胞分泌的生长因子的敏感度降低,从而影响血管内皮细胞的增殖。罗贤令等^[14] 发现,人参皂甙 Rg3 可抑制高糖下视网膜血管内皮细胞的增殖,本实验亦获得了与之相似的结果。

无论在正常培养基中或是高糖培养基中,随着人参皂甙 Rg3 浓度的增加,移行细胞数逐渐减少,提示人参皂甙 Rg3 可以减少细胞迁徙,Shinkal 等^[15] 通过体外抗浸润实验表明,Rg3 可以明显抑制小鼠肝癌细胞、黑色素瘤细胞、人小细胞肺癌和人胰腺癌细胞的单层浸润,推测 Rg3 还可以通过抑制内皮细胞的迁徙来抑制新生血管的生成。这样,人参皂甙 Rg3 最终表现为抑制了内皮细胞管腔的形成,并且在浓度与时间上也表现出一定的依赖性。前已述及,影响 DR 的细胞因子有很多,限于条件,本研究仅选取了 VEGF 这一关键因子作为主要指标,结果发现人参皂甙 Rg3 具有抑制 HRCEC 细胞 VEGF 蛋白和 mRNA 表达的作用。提示人参皂甙 Rg3 可能通过改变 VEGF 的表达,从而在形态上影响内皮细胞成管行为。潘子明等^[16] 和朱浩等^[17] 认为 Rg3 是通过下调肿瘤细胞 VEGF mRNA 及蛋白

质的表达,从而抑制肿瘤新生血管的形成。

当然,本实验仅从体外实验着手,初步探讨了人参皂甙 Rg3 对于人视网膜血管内皮细胞高糖条件下的作用,人参皂甙 Rg3 和其他多种促血管生成因子和血管生成抑制因子之间的相互作用尚未完全明确,但仍为人参皂甙 Rg3 用于体内实验提供了一定参考,为临床治疗糖尿病视网膜病变提供了新的思路。

参考文献

1 Ho AC, Scott IU, Kim SJ, *et al.* Anti-vascular endothelial growth factor pharmacotherapy for diabetic macular edema: a report by the American Academy of Ophthalmology. *Ophthalmology* 2012;119(10):2179-2188
2 李兆艾,智明春,李小丽,等. 人参皂甙与孕三烯酮对大鼠子宫内膜异位症病灶作用的对照研究. 中华妇产科杂志 2007;42(6):417-418
3 Campochiaro PA. Retinal and choroidal neovascularization. *J Cell Physiol* 2000;184:301-310
4 Folkman J. Angiogenesis. *Annu Rev Med* 2006;57:1-18
5 Folkman J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol* 2002;29(6 Suppl 16):15-18
6 钱彤,黎晓新,尹虹,等. 玻璃体腔注射 avastin 治疗视网膜分支静脉阻塞继发黄斑水肿疗效观察. 眼科研究 2010;28(1):79-82
7 Querques G, Bux AV, MartineUi D, *et al.* Lamellar macular hole following intravitreal pegaptanib sodium (Macugen) injection for diabetic macular edema. *Int Ophthalmol* 2011;31(6):525-527
8 Rouvas AA,Papakostas TD, Ntouraki A,*et al.* Photodynamic therapy, ranibizumab, and maibizumab with photodynamic therapy for the treatment of polypoidal choroidalvasculopathy. *Retina* 2010;31(3):464-474

9 Simo R, Hernandez C. Intravitreal anti-VEGF for diabetic retinopathy:hopes and fears for a new therapeutic strategy. *Diabetologia* 2008;51(9):1574-1580
10 Inan UU, Avci B, Kusbeci T, *et al.* Preclinical safety evaluation of intravitreal injection of full-length humanized vascular endothelial growth factor antibody in rabbit eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48(4):1773-1781
11 Avery RL, Pearlman J, Pieramici DJ, *et al.* Intravitreal bevacizumab (Avastin) in the treatment of proliferative diabetic retinopathy. *Ophthalmology* 2006;113(10):1695-1705
12 Chen MW, Yang L, Ni L, *et al.* The effect of 20(R)-ginsenoside Rg3 on the differential expression of cell signaling genes and other related genes in human lung adenocarcinoma cell line A549. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi* 2005;28:37-40
13 王吉,史桂英,袁耀宗,等. 人参皂甙 Rg3 在体外对胃癌细胞生长和凋亡的影响. 上海交通大学学报(医学版) 2009;29(11):1336-1340
14 罗贤令,彭辉灿,刘翀. 人参皂苷 Rg3 对高糖下视网膜血管内皮细胞增殖及 ICAM-1 表达的影响. 国际眼科杂志 2009;9(10):1865-1867
15 Shinkal K, Akedo H, Mukal M, *et al.* Inhibition of *in vitro* tumor cell invasion by ginsenoside Rg3. *Ginseng Rev* 1996;87:357-362
16 潘子明,叶大风,谢辛,等. 人参皂甙 Rg3 对卵巢癌的严重联合免疫缺陷鼠的抗肿瘤血管生成作用的研究. 中华妇产科杂志 2002;37(4):202-204
17 朱浩,岳志健,周晓平,等. 人参皂苷 Rg3 对大鼠脑胶质瘤 VEGF 表达的影响. 中国神经肿瘤杂志 2008;6(2):119-122