

# 光化学法建立视网膜分支静脉阻塞大鼠模型及相关研究

龙 盘<sup>1</sup>, 严伟明<sup>1</sup>, 陈 涛<sup>1</sup>, 王建丛<sup>1</sup>, 李曼红<sup>2</sup>, 薛军辉<sup>1</sup>, 安 晶<sup>3</sup>, 张作明<sup>1</sup>

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(No. 81500724); 陕西省科学技术研究与发展计划项目(No. 2016SF-063); 陕西省科技资源开放共享平台项目(No. 2015FWPT-02)

**作者单位:**<sup>1</sup>(710032)中国陕西省西安市,空军军医大学航空航天临床医学教研室;<sup>2</sup>(710032)中国陕西省西安市,空军军医大学西京医院眼科;<sup>3</sup>(710049)中国陕西省西安市,西安交通大学神经生物研究所

**作者简介:**龙盘,在读硕士研究生,研究方向:新生血管性疾病。通讯作者:安晶,毕业于第四军医大学,博士,西安交通大学神经生物研究所博士后,伦敦大学访问学者,研究方向:眼科遗传性疾病基因治疗. anjing@mail.xjtu.edu.cn; 张作明,博士,教授,博士研究生导师,研究方向:视觉电生理. zhangzm@fmmu.edu.cn

收稿日期:2017-10-01 修回日期:2018-03-29

## Establishment of rat model of retinal branch vein occlusion by photochemical method and correlational research

Pan Long<sup>1</sup>, Wei-Ming Yan<sup>1</sup>, Tao Chen<sup>1</sup>, Jian-Cong Wang<sup>1</sup>, Man-Hong Li<sup>2</sup>, Jun-Hui Xue<sup>1</sup>, Jing An<sup>3</sup>, Zuo-Ming Zhang<sup>1</sup>

**Foundation items:** National Natural Science Foundation of China (No. 81500724); The Social Development of Science and Technology Research Project of Shaanxi (No. 2016SF-063); Foundation of Open Sharing Platform of Science and Technology of Shaanxi Province, China (No. 2015FWPT-02)

<sup>1</sup>Department of Aerospace Clinical Medicine, Medical University of the Air Force, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China;

<sup>2</sup>Department of Ophthalmology, Xijing Hospital, Medical University of the Air Force, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China;

<sup>3</sup>Institute of Neurobiology, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, Shaanxi Province, China

**Correspondence to:** Jing An. Institute of Neurobiology, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, Shaanxi Province, China. anjing@mail.xjtu.edu.cn; Zuo-Ming Zhang. Department of Aerospace Clinical Medicine, Medical University of the Air Force, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China. zhangzm@fmmu.edu.cn

Received:2017-10-01 Accepted:2018-03-29

## Abstract

• **AIM:** To investigate the natural course and adverse event of branch retinal vein occlusion (BRVO) rat model induced by laser photochemical method.

• **METHODS:** Thirty SD (Sprague Dawley) rats were administrated Bangladesh *via* tail vein. Then 532nm laser (80mW, 100μm and 100ms) was performed on retinal

vein secondary bifurcation of bitamporal optic disk for 50 spots. Electroretinogram (ERG), fundus fluorescein angiography (FFA), optical coherence tomography (OCT) and fundus (fluorescein) photograph were applied on 1, 3, 5, 7, 10, 14 and 21d after BRVO model constructed. Two rats were sacrificed, respectively, on 1, 5 and 21d after photocoagulation to carry on HE (Hematoxylin - Eosin stain) and VEGF-α (vascular endothelial growth factor - α) immunohistochemical staining.

• **RESULTS:** There were three rats died, three rats with severe retinal detachment for excessive bleeding, one rat with retinal sunken, and one rat with cataract. FFA and fundus (fluorescein) photograph showed that the successful BRVO rat model was 73% (22/30). It was found that the near-end photocoagulation vein became coarse, far-end became diminution on 1d and the photocoagulation vein total recanalization was on 3-7d. ERG showed the amplification of b wave (dark-adaptation 3.0 response) decreased to  $0.694 \pm 0.042$  of control eyes and on 5-7d decreased to rock bottom about  $0.487 \pm 0.064$  of control eyes. Then it increased all the time to  $0.708 \pm 0.0465$  of control eyes on 21d. OCT and HE staining found that retinal ganglion cells and outer nuclear layer became edema on 1d *in vivo* and *in vitro*. It was observed that the thickness of retina on photocoagulation vein (0μm or 250μm) decreased from 5d and there were 3-4 layer cells in ONL on 21d. The expression of VEGF-α at injured site were significantly more than control eyes on 1d and there were no significant difference on 5d; But the expression of VEGF-α were slightly less than control eyes on 21d.

• **CONCLUSION:** Photochemical method was a feasible method to establish BRVO rat model. The evolution and development of the BRVO model could partly mimic human BRVO phenomenon. At the same time, it should be improved to increase the successful model rate.

• **KEYWORDS:** branch retinal vein occlusion; photochemical method; natural course; adverse event; vascular endothelial growth factor-α

**Citation:** Long P, Yan WM, Chen T, *et al.* Establishment of rat model of retinal branch vein occlusion by photochemical method and correlational research. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2018; 18 (5):801-806

## 摘要

**目的:**观察光化学法构建视网膜分支静脉阻塞(branch retinal vein occlusion, BRVO)大鼠模型的自然病程和不良事件。

**方法:**选取30只SD(Sprague Dawley)大鼠尾静脉注射孟加拉红1min后,532nm激光(80mW,100 $\mu$ m,100ms)于视盘颞侧视网膜静脉二级分叉处进行单光点光凝50点建立BRVO模型。分别于1、3、5、7、10、14和21d检测全视野视网膜电图(electroretinogram, ERG)、荧光素眼底血管造影(fundus fluorescein angiography, FFA)和相干光断层扫描(optical coherence tomography, OCT)。于1、5和21d各时间点随机处死2只大鼠行HE病理和血管内皮生长因子- $\alpha$ (vascular endothelial growth factor- $\alpha$ , VEGF- $\alpha$ )免疫组化染色。

**结果:**光凝后,3只大鼠死亡,3只严重出血导致视网膜大部分脱离,1只出现视网膜凹陷,1只白内障。FFA和眼底(荧光)彩照发现BRVO大鼠模型造模成功率为73%(22/30),1d时近端变粗,远端变细,3~7d光凝血管完全再通。ERG示光凝1d后暗适应3.0反应b波降低至正常眼的0.694 $\pm$ 0.042倍,5~7d下降至最低点约为正常眼0.487 $\pm$ 0.064倍,之后开始上升,21d上升至初始值0.708 $\pm$ 0.0465倍。OCT和HE病理切片分别在体和离体水平发现第1d视网膜节细胞层和外核层水肿,3~5d水肿消失且激光光凝点视网膜附近250 $\mu$ m外核层开始凋亡变薄,到21d外核层变薄只剩3~4层细胞。免疫组化发现激光光凝部位VEGF- $\alpha$ 第1d表达水平大于光凝前,第5d光凝处VEGF- $\alpha$ 表达量无明显差异,21d光凝处VEGF- $\alpha$ 表达略低于光凝前。

**结论:**激光光凝制作BRVO模型是一种切实可行的方法,其疾病的演变和发展可以部分模拟人体BRVO的进程。同时由于造模成功率较低以及激光光凝相关并发症较多,在实际使用中有待进一步改进方法。

**关键词:**视网膜分支静脉阻塞;光化学法;自然病程;不良事件;血管内皮生长因子- $\alpha$

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2018.5.07

**引用:**龙盘,严伟明,陈涛,等.光化学法建立视网膜分支静脉阻塞大鼠模型及相关研究.国际眼科杂志2018;18(5):801-806

## 0 引言

视网膜静脉阻塞(retinal vein occlusion, RVO)是仅次于糖尿病性视网膜血管病变的血管性疾病,按照阻塞部位的不同可以分为视网膜分支静脉阻塞(branch retinal vein occlusion, BRVO)和视网膜中央静脉阻塞(central retinal vein occlusion, CRVO)。由于CRVO发病急,治疗时间窗非常窄,往往治疗效果不显著;而BRVO的治疗时间窗较宽,预后与治疗息息相关,BRVO患者及时治疗预后好的可以恢复正常,预后差的可能会严重影响视网膜功能甚至失明,所以早期发现并选择合适的治疗方法就尤为重要。我国调查研究显示,BRVO发病率远高于CRVO<sup>[1]</sup>。所以构建成熟的BRVO大鼠模型并进一步研究疾病进展及相关机制对于临床指导治疗及判断预后起到重要作用。对于BRVO模型,研究者尝试用物理方法外科干预视网膜静脉、局部凝血酶注射等方法制备,但是由于其创伤较大、全身严重不良反应重以及阻塞静脉不可控等因素未能取得很好的应用。近年来,随着激光技术的进步,光化学法被用于制作BRVO模型,其原理是利

用激光激发光敏剂后产生的热效应阻塞血管<sup>[2]</sup>,具有成功率高、创伤小、损伤精确可视化等优点,但是眼底形态和功能的变化却少有报道,同时关于不良事件以及模型病情进展研究甚少。本文通过全视野视网膜电生理图(electroretinogram, ERG)、荧光素眼底血管造影(fundus fluorescein angiography, FFA)、眼底彩照、相干光断层扫描(optical coherence tomography, OCT)、HE病理染色和VEGF- $\alpha$ 免疫组化染色对BRVO模型的疾病进展和相关机制及可能发生的不良事件进行报道。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** 健康成年雄性SD大鼠30只,体质量200~250g,大鼠购买于第四军医大学动物实验中心(动物许可证:2014270138S)。所有大鼠均饲养于23 $\pm$ 3 $^{\circ}$ C,湿度60% $\pm$ 5%,12h(亮)/12h(暗)的环境中,自由进食进水。实验开始前使用经裂隙灯显微镜和眼底相机排除大鼠双眼屈光介质以及眼底异常。动物实验符合空军军医大学动物伦理委员会标准。

**1.1.2 实验试剂及主要设备** 主要试剂:孟加拉红钠盐(成都艾科达试剂有限公司,201611201),戊巴比妥钠(Merck,德国),速眠新注射液(吉林兽用药品厂),荧光素钠注射液(广州白云山明兴制药有限公司,151001),VEGF- $\alpha$ 小鼠单克隆抗体(Abcam,美国,ab1316)。主要设备:滤过器(Puradisc,英国),眼底照相及相干光断层扫描仪(Optoprobe,北京夏禹),眼底荧光造影设备(HRAplus II,德国海德堡),全视野视网膜电图仪(ROLAND,德国),量子芯片多波长激光仪(VISION ONE,美国),光学显微镜(Olympus-BX41,日本)。

### 1.2 方法

**1.2.1 建立模型** 孟加拉红钠盐用生理盐水配制,质量浓度为50mg/mL,经0.22 $\mu$ m无菌滤膜过滤,4 $^{\circ}$ C避光保存。右眼为实验眼,左眼为正常对照眼。1%戊巴比妥钠3mg/kg和100%速眠新0.5~0.8mL/kg腹腔注射麻醉,右眼经托吡卡胺滴眼液充分扩瞳。尾静脉注射孟加拉红50mg/kg,1min待孟加拉红循环至视网膜静脉后放置角膜接触三面镜。显微镜下于视盘颞侧第一个视网膜静脉主干分叉处进行532nm激光光凝,光凝能量80mW,光斑大小100 $\mu$ m,持续时间100ms,单点光凝50点(先光凝25点,30s后再光凝25点)。50点后,镜下观察光凝血管变黑和血流停滞。

### 1.2.2 观察指标

**1.2.2.1 ERG** 视网膜电生理检查于光凝前(0d)和光凝后第1、3、5、7、10、14和21d麻醉12只大鼠后(方法同前),托吡卡胺散瞳,根据本实验室已经建立的标准化方法<sup>[3]</sup>,实验项目为国际电生理标准5项:暗适应0.01反应,暗适应3.0反应,震荡电位Ops反应,明适应3.0反应,Flicker反应。其中暗适应3.0反应代表了部分视锥细胞和大部分视杆细胞的综合功能,可以反应视网膜的整体功能,因此实验中我们采用暗适应3.0来统计分析视网膜的整体功能。其中统计指标为暗适应3.0反应b波振幅(从波谷到波峰的垂直距离)和b波峰值(刺激点到达最大振幅所用时间)。

**1.2.2.2 FFA** 荧光素钠血管造影于光凝后第1、3、7、

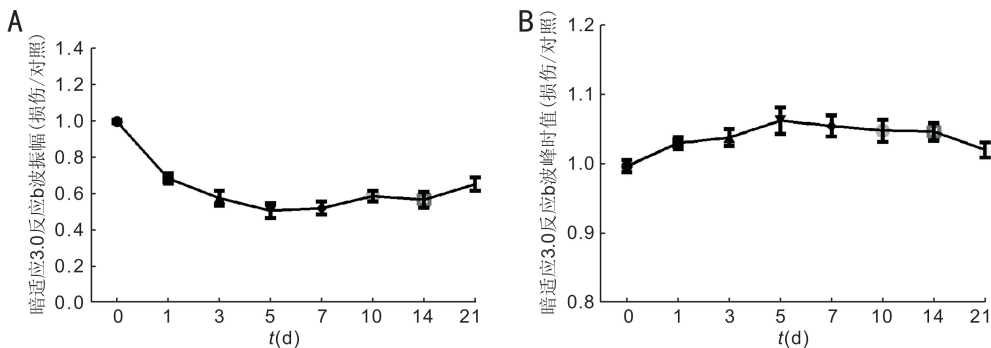


图1 不同时间点暗适应3.0反应 A:b波振幅;B:b波峰值。

10、14和21d麻醉大鼠6只后(方法同前)实施,托吡卡胺散瞳,10%荧光素钠(2mL/kg)腹腔注射。调整焦距和亮度,待荧光素钠循环至眼底,以视盘和激光光凝点为中心进行荧光素钠血管造影检查,观察眼底视网膜静脉阻塞、侧枝循环建立以及损伤血管再通情况。

**1.2.2.3 眼底(荧光)彩照和OCT** 眼底(荧光)彩照和OCT检查于光凝后第1、3、5、7、10、14和21d麻醉大鼠12只后(方法同前),托吡卡胺散瞳,以视盘和激光光凝点为中心进行OCT观察。之后再行眼底拍照,在视盘区域和激光光凝损伤区域观察眼底的变化情况;之后行尾静脉注射1%荧光素钠(5mL/kg)进行眼底荧光彩照检查,观察眼底视网膜静脉阻塞情况。利用OCT测量软件(optoprobe, version 2.0),测量目标阻塞静脉及其颞侧250 $\mu$ m处视网膜整体及各层厚度。

**1.2.2.4 HE病理染色** 光凝1、5、21d后,每个时间点随机取2只大鼠,待大鼠深麻醉后,剪开右心耳,左心室心脏灌注4%甲醛200mL,立即取出双侧眼球并用墨汁标记颞侧,放入专用的眼球固定液中固定24h(4 $^{\circ}$ C),摘除晶状体和角膜。按照实验室常规方法脱水包埋制作石蜡包块,于标记侧做5张4 $\mu$ m切片。HE常规染色,光学显微镜下观察。统计视网膜外核层细胞层数以及神经节细胞的密度。

**1.2.2.5 VEGF- $\alpha$ 免疫组化** 光凝第1、5、21d后,于每个时间点选取2张4 $\mu$ m切片。二甲苯脱蜡后,柠檬酸-柠檬酸钠抗原热修复5min(微波炉中火5min,冷却后,高火5min),3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>灭活内源性过氧化氢酶10min,5% BSA室温封闭2h,小鼠单克隆抗体VEGF- $\alpha$ (1:200)4 $^{\circ}$ C孵育过夜,PBS洗涤3 $\times$ 5min,山羊抗小鼠二抗(1:500)室温孵育2h,DAB显色5min,苏木精复染细胞核15min,充分冲洗,梯度酒精脱水,二甲苯通透,中性树脂封片,之后于光学显微镜下观察黄褐色沉积。

统计学分析:采用SPSS19.0软件进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示。不同时间点的统计学分析采用重复测量数据的方差分析,各时间点差异的两两比较采用LSD-t检验,检验水准定为 $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

**2.1 造模情况** 本研究共选取30只SD大鼠,其中激光后死亡3只,大约死于光凝后1~2h。3只视网膜眼底出血严重,造成视网膜大部分脱离;1只出现视网膜凹陷;1只出现白内障。FFA和眼底(荧光)彩照发现BRVO大鼠模型造模成功率为73%(22/30)。

**2.2 ERG改变** 如图1所示,光凝后暗适应3.0反应b波振幅降低至正常眼的0.694 $\pm$ 0.042倍,5~7d下降至最低

点约为正常眼的0.487 $\pm$ 0.064倍,之后开始上升,21d上升至初始值的0.708 $\pm$ 0.0465倍。而暗适应3.0反应b波的峰值前5d一直延长,约为正常眼的1.068 $\pm$ 0.031倍,其后开始恢复,最终21d时基本恢复正常水平。

**2.3 FFA改变** FFA发现光凝后血管成功阻塞,1d时近端变粗,远端变细,光凝处局部无灌注;3d时血管开始再通,同时无灌注区缩小,损伤部位血管有荧光素钠着染,同时光凝血管的主支和分支变细。一般5d光凝血管就完全再通,其出血发生最多的时间为5~7d血管开始再通的时候(图2)。

**2.4 眼底(荧光)彩照和OCT改变** 眼底(荧光)彩照结果提示和FFA相类似。OCT发现光凝1d后视网膜节细胞层,内丛状层和外核层水肿,有5只BRVO大鼠有轻度视网膜脱离,血管结构均有一定程度紊乱。3~5d水肿减少同时伴随BRVO处视网膜及其附近250 $\mu$ m外核层开始凋亡变薄,到21d时BRVO处外核层变薄甚至消失。损伤血管区域和距离损伤血管250 $\mu$ m视网膜整体厚度于光凝后1d水肿增厚,3~5d视网膜厚度开始减少至:BRVO处视网膜厚度132.3 $\pm$ 11.28 $\mu$ m;BRVO颞侧250 $\mu$ m视网膜厚度145.4 $\pm$ 18.36 $\mu$ m,之后保持稳定,见图3。

**2.5 HE病理改变** HE病理切片发现第1d视网膜神经节细胞层和内丛状层严重水肿,内核层和外核层也有轻度水肿。同时伴有视网膜结构的紊乱,外核层和内核层均有血管的异常长入。5d时视网膜尤其是外核层开始变薄,同时节细胞密度也减少,21d时视网膜外核层显著变薄,仅剩3~4层细胞,内核层无明显变化,神经节细胞密度降低。采用重复测量数据方差分析,我们发现外核层细胞层数在不同观测时间点差异有统计学意义( $F=78.1, P=0.003$ );不同时间点视网膜外核层细胞层数量小于光凝前视网膜外核层细胞层数量(18.5 $\pm$ 1.2层),差异均有统计学意义( $t_{0d\ vs\ 1d}=5.409, P_{0d\ vs\ 1d}<0.01; t_{0d\ vs\ 5d}=14.14, P_{0d\ vs\ 5d}<0.01; t_{0d\ vs\ 21d}=18.86, P_{0d\ vs\ 21d}<0.01$ )。神经节细胞密度在不同观测时间点差异也有统计学意义( $F=96.1, P=0.002$ ),不同观测时间点视网膜神经节细胞密度均小于正常对照视网膜神经节细胞密度(0d, 1000 $\pm$ 120个/mm<sup>2</sup>),差异均有统计学意义( $t_{0d\ vs\ 1d}=3.789, P_{0d\ vs\ 1d}<0.01; t_{0d\ vs\ 5d}=5.057, P_{0d\ vs\ 5d}<0.01; t_{0d\ vs\ 21d}=5.309, P_{0d\ vs\ 21d}<0.01$ ),见图4。

**2.6 免疫组化改变** 免疫组化染色示VEGF- $\alpha$ 主要表达于视网膜神经节细胞层、内丛状层、外界膜以及视网膜感光细胞层外节等位置。激光光凝部位视网膜神经节细胞层和外界膜处VEGF- $\alpha$ 1d时表达增加;5d光凝处VEGF- $\alpha$

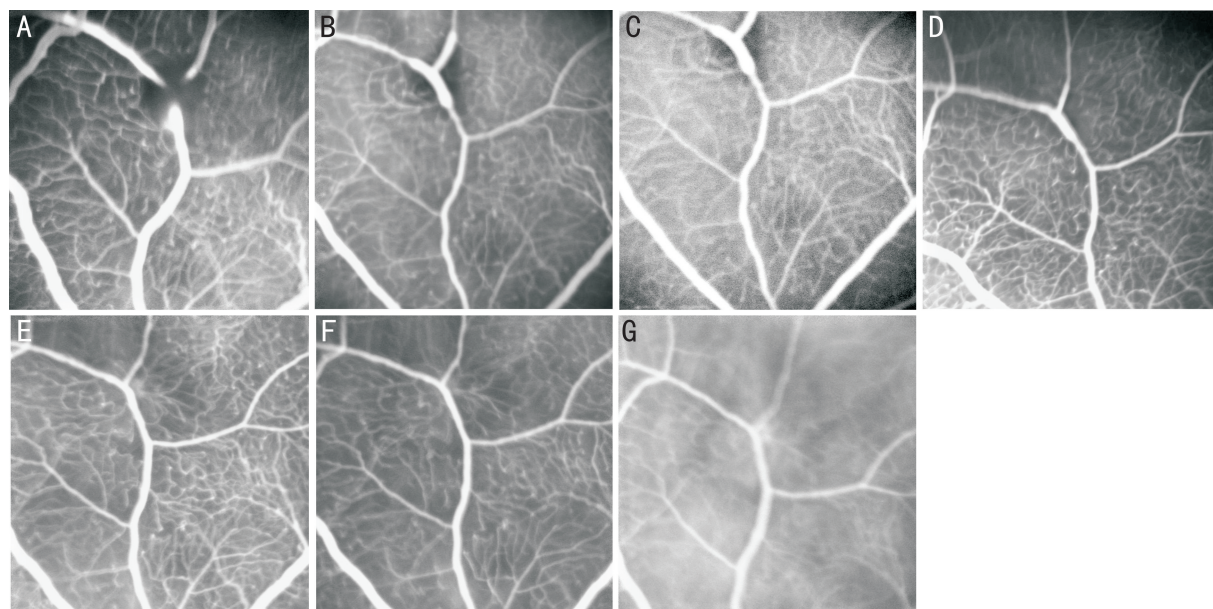


图2 视网膜荧光素钠血管造影表现 A:1d;B:3d;C:5d;D:7d;E:10d;F:14d;G:21d。

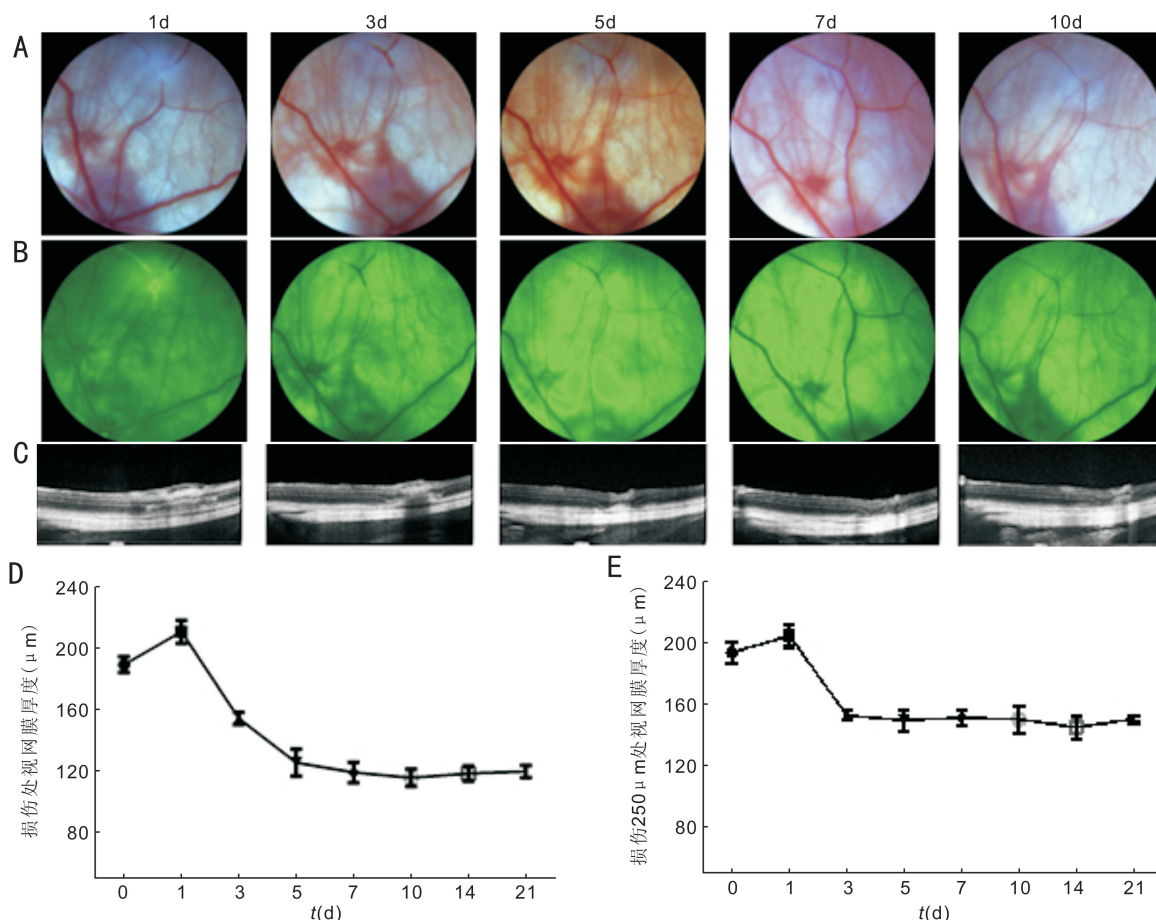


图3 眼底(荧光)彩照和OCT结果 A:眼底彩照;B:眼底荧光彩照;C:OCT典型图;D:BRVO处视网膜厚度变化;E:BRVO颞侧250 $\mu$ m视网膜厚度变化。

表达水平和光凝前相似;21d光凝处 VEGF- $\alpha$  表达略低于光凝前(图5)。

### 3 讨论

本研究成功构建了 BRVO 大鼠模型,通过 FFA、眼底(荧光)眼底彩照和 OCT 检测证实了 BRVO 大鼠模型造模成功。同时研究了 BRVO 模型大鼠的不良事件以及阻塞血管相关进展情况,发现阻塞血管再通以及损伤视网膜无灌注区的变化趋势,同时于在体和离体水平观察了视网膜

的相关核层和整体厚度变化,发现损伤后阻塞血管处视网膜短暂水肿过后随之而来的是感光细胞层和视网膜整体的凋亡变薄,且受影响的区域为阻塞血管回流的区域。同时免疫组化染色发现了 VEGF- $\alpha$  在视网膜静脉阻塞之后短时间内先急速增加而后开始下降的一个趋势。这些发现对于更加全面地认识 BRVO 大鼠模型提供了一些重要的信息。

BRVO 模型的建立在历史上有过很多尝试,有外科手

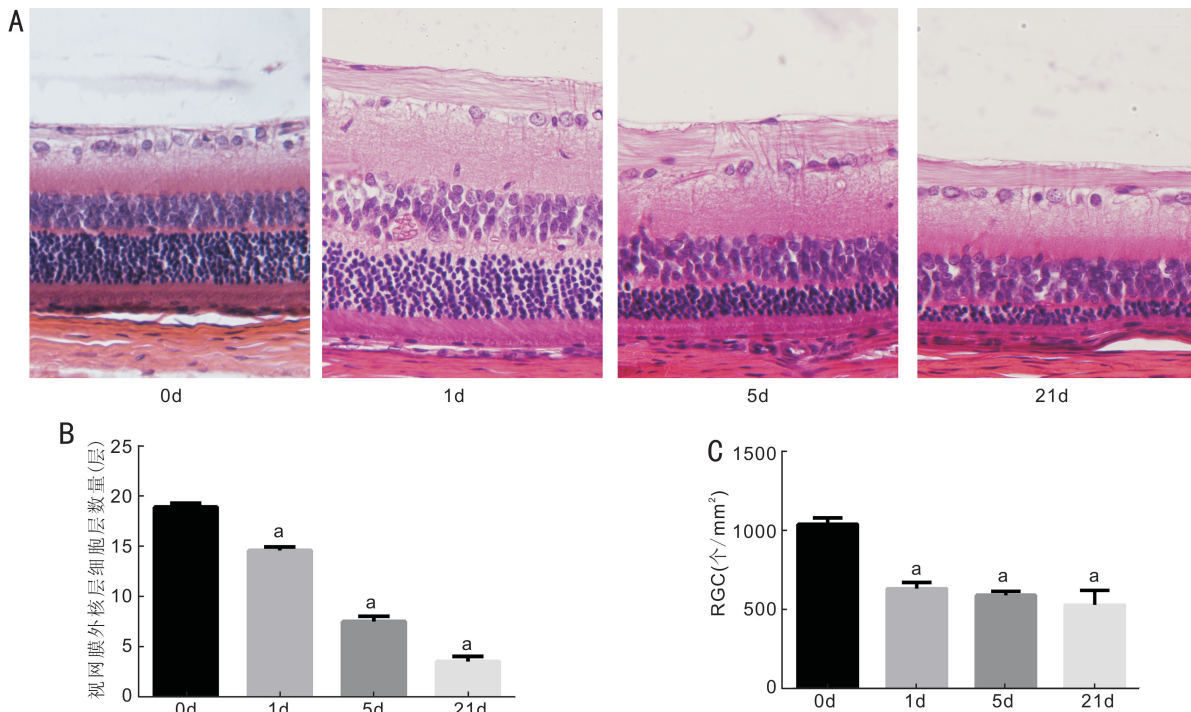


图4 HE染色结果 A:视网膜HE染色典型结果( $\times 400$ ); B:外核层细胞层数变化; C:视网膜节细胞密度; <sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 0d。

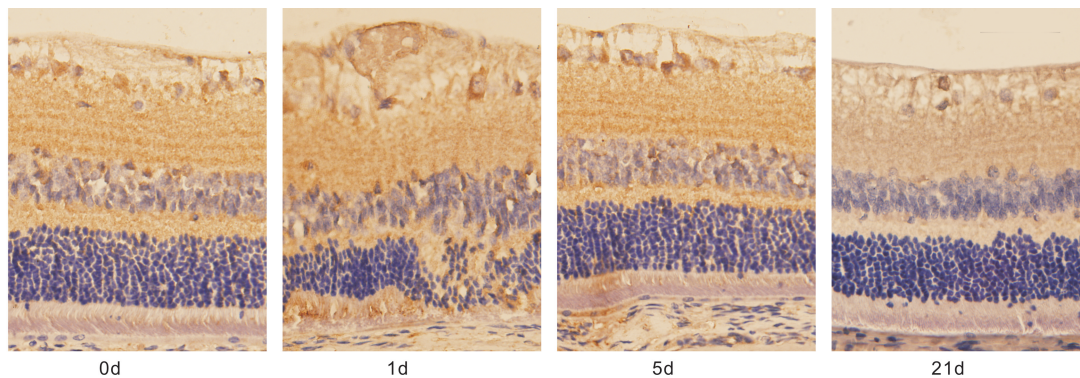


图5 VEGF- $\alpha$ 免疫组化染色典型图( $\times 400$ )。

术法、凝血酶法等一系列方法,但都由于造模成功率低未得到广泛应用<sup>[4]</sup>。1987年,Nanda等<sup>[5]</sup>首先利用氩光激光激发孟加拉红制作成功兔BRVO模型,这种方法被称为光化学法,它利用光敏剂吸收特定波长激光的能量,损伤内皮细胞,引发激光光凝区域发生内皮细胞相关的血小板级联放大反应导致血栓形成<sup>[6]</sup>。但是具体操作起来,仍有一定难度和问题:(1)光凝血管位置和血管大小的选择,我们选择了视网膜中心静脉第一个分叉处,这样减少了光凝过程中由于操作出现的稳定性问题;同时选择了相对较细的分支血管,太粗由于血流速度快易自发性快速再通,太细光凝50点会导致血管外膜和血管周围视网膜的损伤。(2)光凝点数量的选择,太多容易造成出血,太少会导致血栓很快被溶解导致再通造模失败。我们利用孟加拉红尾静脉注射,1min后待其循环至视网膜静脉进行先光凝25点左右,待其血液停滞血管变黑;然后等30s左右再补足激光光凝点至50点;(3)操作人员的稳定性,包括激光操作人员和扶大鼠眼睛的人员,对团队的配合和协作有较高要求。

关于光化学法制备BRVO大鼠模型,国内外均有报道,但是一直以来没有标准的造模参数<sup>[7-13]</sup>。本实验采用532nm激光(80mW,200ms,100 $\mu$ m)成功制作出了视网膜

单分支静脉阻塞的模型。现将此模型的优缺点阐述如下:优点:(1)造模方法简单,可以批量制作;(2)造模方法参数清楚,阻塞目标静脉可视可控,模型均一可控;(3)全身不良反应相对较少。缺点:(1)光凝后大鼠死亡率约为20%~30%,眼球局部急性反应耐受不良,可能与光凝所致的疼痛导致的心律失常有关;(2)该模型不能模拟BRVO发生的基础性疾病和危险因素,同时BRVO模型大鼠在3~5d会有自发性再通,尤其是光凝血管为大血管的时候,再通时间更早;(3)人体的BRVO更多的是一种长期基础病引发的眼部血管并发症,持续时间更久,往往是多部位发病,而不仅仅是眼科的血管阻塞反应,所以这种光化学法造模只是模拟出了结果,却不能模拟出疾病的病因;(4)临床上常用激光治疗BRVO,可以抑制新生血管所致的黄斑水肿以及远视力下降,而我们这里用激光制作BRVO模型,就不能排除激光本身对于BRVO的治疗作用<sup>[14]</sup>;同时,激光的热效应也会导致相应位置视网膜外层发生凋亡,会对实验结果造成一定影响。

目前,关于BRVO的治疗方法非常有限,比较公认的有效方法为抗VEGF- $\alpha$ 和糖皮质激素植入物<sup>[15]</sup>,其中以抗VEGF- $\alpha$ 类药物效果显著且副作用少<sup>[16]</sup>。但是也有部分患者使用抗VEGF- $\alpha$ 以后,虽然黄斑水肿有效遏制了,

但是视网膜的总体功能却没有得到恢复,且无灌注区也没有有效减小<sup>[17-18]</sup>,另外还有部分患者对抗 VEGF- $\alpha$  治疗不敏感,因此,抗 VEGF- $\alpha$  治疗效果与多种因素有关<sup>[19-20]</sup>。我们对 BRVO 模型进行 VEGF- $\alpha$  免疫组化染色发现,激光光凝阻塞静脉处早期有大量 VEGF- $\alpha$ ,但是其持续时间却是比较短暂,往往是 1~3d,到后期静脉阻塞处 VEGF- $\alpha$  反而是有所降低的,这对于后期在阻塞位置建立侧枝循环恢复周围视网膜血供反而是不利的。这可能与 VEGF- $\alpha$  的多功能有关,参与了早期的炎症应激反应和后期的有效侧枝循环的建立<sup>[21]</sup>。所以我们认为部分 BRVO 患者使用抗 VEGF- $\alpha$  效果不佳可能是由于没有在静脉阻塞的早期使用。同时我们也发现激光光凝静脉 5d 后,视网膜外核层和内核层会有新生血管长入,使得视网膜结构紊乱。我们认为这也与静脉阻塞诱导所致的 VEGF- $\alpha$  过量分泌有关,静脉阻塞导致的细胞缺血缺氧使得细胞能量代谢紊乱,细胞水肿渗出诱导 VEGF- $\alpha$  分泌,而视网膜外核层和内核层内可能会由于 VEGF- $\alpha$  的浓度诱导,会长入新生血管,这样导致视网膜三级神经传递的部分环节出现问题,所以对于视网膜功能的恢复是不利的。

综上,我们分析了 BRVO 大鼠模型建立过程中的细节问题,对 BRVO 的优缺点以及以模型为基础对 BRVO 的发展过程及分子机制进行了探讨。我们认为光化学法制作 BRVO 模型是一种切实可行的方法,其疾病的演变和发展可以部分模拟人体 BRVO 的进程。同时由于造模成功率较低以及激光光凝相关并发症较多,在实际使用中有待进一步改进方法。下一步模拟一种慢性的长期的 BRVO 模型将是我们探索的重点。

#### 参考文献

- 1 Xu L, Liu WW, Wang YX, et al. Retinal vein occlusions and mortality: the Beijing Eye Study. *Am J Ophthalmol* 2007;144(6):972-973
- 2 Banks JG, Board RG, Carter J, et al. The cytotoxic and photodynamic inactivation of micro-organisms by Rose Bengal. *J Appl Bacteriol* 1985;58(4):391-400
- 3 张作明,顾永昊,郭群,等. 小鼠与大鼠视网膜电图和闪光视觉诱发电位记录标准化方案建议. *眼科新进展* 2004;24(2):81-83
- 4 Yamamoto T, Kamei M, Kunavisarut P, et al. Increased retinal toxicity of intravitreal tissue plasminogen activator in a central retinal vein occlusion model. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2008;246(4):509-514
- 5 Nanda SK, Hatchell DL, Tiedeman JS, et al. A new method for vascular occlusion. Photochemical initiation of thrombosis. *Arch Ophthalmol* 1987;105(8):1121-1124

- 6 Hayashi A, Kim HC, de Juan EJ. Alterations in protein tyrosine kinase pathways following retinal vein occlusion in the rat. *Curr Eye Res* 1999;18(3):231-239
- 7 Fuma S, Nishinaka A, Inoue Y, et al. A pharmacological approach in newly established retinal vein occlusion model. *Sci Rep* 2017;7:43509
- 8 Ieki Y, Nishiwaki H, Miura S, et al. Quantitative evaluation for blood-retinal barrier breakdown in experimental retinal vein occlusion produced by photodynamic thrombosis using a new photosensitizer. *Curr Eye Res* 2002;25(5):317-323
- 9 Zhang H, Sonoda KH, Qiao H, et al. Development of a new mouse model of branch retinal vein occlusion and retinal neovascularization. *Jpn J Ophthalmol* 2007;51(4):251-257
- 10 王帅,宋蓓雯,吴强. 倍频 532 激光激发孟加拉红建立色素兔视网膜静脉阻塞模型. *上海交通大学学报(医学版)* 2011;31(8):1082-1085
- 11 高小明,陈辉,高小伟,等. 光动力血栓法制作实验性视网膜分支静脉阻塞模型. *眼科研究* 2005;23(5):488-490
- 12 孙红,袁志兰,袁孝如,等. 氩激光光凝建立兔视网膜静脉阻塞模型及其评价. *中国实验动物学报* 2006;14(3):197-200
- 13 张晓丽,胡运韬,马志中,等. 应用光动力学方法制作实验性视网膜静脉阻塞模型. *中华眼科杂志* 2003;39(4):31-34
- 14 Sun C, Li XX, He XJ, et al. Neuroprotective effect of minocycline in a rat model of branch retinal vein occlusion. *Exp Eye Res* 2013;113(8):105-116
- 15 龙盘,吴一冰,赵健,等. 视网膜静脉阻塞药物治疗方法和进展. *国际眼科杂志* 2017;17(11):2055-2059
- 16 Campochiaro PA, Sophie R, Pearlman J, et al. Long-term outcomes in patients with retinal vein occlusion treated with ranibizumab: the retain study. *Ophthalmology* 2014;121(1):209-219
- 17 Karagiannis DA, Karampelas MD, Soumplis VM, et al. Recurrence of macular edema in retinal vein occlusions after treatment with intravitreal ranibizumab (Lucentis). *Can J Ophthalmol* 2011;46(6):486-490
- 18 Deonandan R, Jones S. Anti-vascular endothelial growth factor drugs for the treatment of retinal conditions: a review of the safety. Ottawa (ON): Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health 2017
- 19 Jaisle GB, Szurman P, Feltgen N, et al. Predictive factors for functional improvement after intravitreal bevacizumab therapy for macular edema due to branch retinal vein occlusion. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2011;249(2):183-192
- 20 Campochiaro PA, Heier JS, Feiner L, et al. Ranibizumab for macular edema following branch retinal vein occlusion: six-month primary end point results of a phase III study. *Ophthalmology* 2010;117(6):1102-1112
- 21 Bracha P, Moore NA, Ciulla TA, et al. The acute and chronic effects of intravitreal anti-vascular endothelial growth factor injections on intraocular pressure: A Review. *Surv Ophthalmol* 2017[Epub ahead of print]