维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2005)02－0216－04

实验性兔脉络膜新生血管模型研究

乔 岗，周希瑗，张孝明，胡晓鹏，邓 鑫，李 琳

(重庆医科大学第二临床学院眼科，重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨氩激光创建有色家兔脉络膜新生血管(choroidal neovascularization,CNV)模型的可行性,初步探讨 CNV 的有关发生机制,为其进一步防治研究奠定基础。方法:健康有色家兔 20 只(40 只眼),每只兔一眼为实验眼,另眼为对照眼。以波长 514.5 nm 的氩绿激光(光斑直径 50um,功率 0.7W,时间 0.1s),在距视盘 2～3 个视盘直径的颞侧髓线上下视网膜处密集照射 20 个点。分别于光凝后 3,7,14,21,30 天进行眼底荧光造影(fundus fluorescein angiography,FFA)及脉络膜造影(indocyanine green angiography,ICGA)。检查后处死动物(4 只/次),摘除眼球取眼后段组织制作石蜡切片。常规 HE 染色及用免疫组化(S－P 法)检测血管内皮生长因子(VEGF)在视网膜的表达。结果:光凝后 7 天出现 CNV,兔 CNV 发生率尚(63.8%),眼底造影和光镜下均有相应改变,FFA 表现为视网膜血管无关的荧光素渗漏,ICGA 见 CNV 充盈;光镜下可见到 CNV 结构;光凝后 2 周开始 VEGF 在视网膜神经节细胞以及内核层有表达。结论:氩激光诱导有色家兔 CNV 模型成模时间短,成模率较高;VEGF 参与了 CNV 的形成进程。

【关键词】脉络膜新生血管;激光;血管内皮生长因子

【中国图书分类法分类号】R322.1^{+2};R77 【文献标识码】A 【收稿日期】2004－09－23

Study on experimental model of argon laser－induced choroidal neovascularization in the rabbits

QIAO Gang, et al

(*Department of Ophthalmology, the Second College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To evaluate the feasibility of argon laser－induced choroidal neovascularization(CNV) model in the pigmental rabbits in order to establish the foundation for studying the mechanism of CNV and for the development of treatment for CNV. *Methods*: Experimental eyes in 20 rabbits were received a series of 20 argon green laser(514.5nm) lesions per eye (700 mW,50um,0.1s). Fundus fluorescein angiography(FFA) and indocyanine green angiography (ICGA) were performed, then the rabbits were sacrificed immediately, the eyes were enucleated and processed for histopathologic and immunohistochemistry examination on days 3,7,14,21,30. *Results*: CNV first appeared on day 7 after photocoagulation, reaching the peak on day 21. The incidence of CNV was 63.0%. Disciform leakage staining appeared in the FFA. ICGA showed that the disciform area was filled with CNV. CNV was ascertained by light microscopy. The immunohistochemistry examination of VEGF was positive in ganglion cell layer and inner nuclear layer of retina from 2w after photocoagulation. *Conclusion*: The present studies demonstrated that argon laser photocoagulation could be used to produce choroidal neovascularization experimental model in the pigmental rabbits. CNV can be induced rapidly by the method, persists for a long period and at a high successful rate. VEGF plays a role in the formation of CNV.

【Key words】Choroidal neovascularization; Laser; VEGF

脉络膜新生血管(choroidal neovascularization, CNV)见于老年性黄斑变性等许多严重的眼底疾病。由于 CNV 常发生于黄斑区,能引起反复性出血、渗出,最终导致瘢痕形成和视力丧失,是预后不好的特征之一[1]。目前研究 CNV 的动物模型较多,各有其优缺点,本文通过激光光凝有色家兔的视网膜建立 CNV 模型,分析其相关特点。

1 材料和方法

1.1 动物

健康有色家兔 20 只(40 只眼),雌雄不限,体重 2～3kg,由重庆医科大学动物中心提供。实验前经裂隙灯、眼底镜检

作者介绍:乔 岗(1978－),男,硕士,主要研究方向:眼底病。

维普资讯 http://www.cqvip.com

查双眼无异常。每只兔随机选一眼为实验眼，另眼为对照眼。

1.2 试剂

10%荧光素钠注射液(广西梧州制药股份有限公司产品)；吲哚青绿(辽阳第三制药厂产品)；免抗人 VEGF、(即用型)、免疫组化试剂 SP(即用型)超敏试剂盒，DAB 显色剂均购自福州迈新生物技术开发公司；阳性对照为已知 VEGF 表达阳性组织，PBS 代替一抗作阴性对照。

1.3 仪器设备

氩激光机(美国 Coherent 公司产品)；荧光素眼底血管造影(fundus fluorescein angiography，FFA)和吲哚青绿血管造影(indocyanine green angiography，ICGA)摄像机(德国 Heidelberg 公司产品)。

1.4 激光光凝

用 1%阿托品散瞳，3%戊巴比妥钠(1mg/kg)行耳缘静脉麻醉后，术眼安置三面镜，以波长 514.5nm 的氩绿激光(光斑直径 50μm，功率 0.7W，时间 0.1s)，在距视盘 2～3 个视盘直径的颞侧髓线上下(图 1 视网膜处密集照射 20 个点，光斑间隔 300μm)。

1.5 眼底观察

在光凝后即刻、1d、3d 及 FFA 前用直接检眼镜检查眼底，并记录光斑反应、出血情况、渗出及瘢痕形成过程，同时作眼底彩色照相。

1.6 FFA 及 ICGA 观察

分别于光凝后 3 天、1 周、2 周、3 周、1 月，作 FFA 及 ICGA 检查。散瞳及麻醉方法同前，于耳缘静脉 2～4s 内推注吲哚青绿 2.5ml，连续拍照，10min 后换用 10%荧光素钠注射液 3.0ml 耳缘静脉内推注，继续行 FFA 检查。

1.7 阅片 CNV 的 FFA 标准[2]

①在造影早期(动脉前期或动脉期)即显影；②与视网膜血管系统没有联系；③荧光素迅速渗漏，有一定的积存范围，后期形成高荧光区。CNV 的 ICGA 标准：CNV 充盈状态分有(+)和无(-)。

1.8 组织学观察

造影完毕的动物 6h 后待其体内荧光染料大部分排出后，于耳缘静脉注射空气处死(4 只/次)，立即摘取眼球，沿角巩膜缘剪开巩膜，去除角膜及晶状体，眼后段组织浸泡在 4%的多聚甲醛中固定 6h，常规脱水，行全层石蜡包埋，制 5～7μm 切片，作 HE 及免疫组化染色。

2 结 果

2.1 眼底观察

在进行光凝时，视网膜产生浓灰白色斑(共 400 个光斑)，27%(109/400)的光斑有明显出血；光凝后 1～3d，视网膜组织水肿、隆起；光凝后 1 周，水肿减轻部分光斑出现黄白色渗出物；光凝后 2 周时，渗出



图 1 正常有色家兔眼底彩照，见视乳头、髓线等结构



图 2 光凝后 3 周眼底彩照，见光凝斑呈灰黄色改变，以及陈旧性出血痕迹



图 3 光凝后 3 周的 FFA 图像，见到高荧光渗漏



图 4 光凝后 2 周 ICGA 图像见 CNV 充盈

维普资讯 http://www.cqvip.com

物增多，出血大部分吸收；光凝后 3 周及 1 月，渗出区逐渐扩大，有灰黄色斑痕形成(图 2)。

2.2 FFA 及 ICGA 观察

表 1 不同时间段 CNV 的出现结果

光凝后	存活兔数目(只)	出现 CNV 的光斑数(个)	出现 CNV 的兔眼(只)
3 天	20	15(3.8)	2(10)
1 周	16	26(8.2)	6(37.5)
2 周	12	105(43.7)	8(66.7)
3 周	8	102(63.8)	7(87.5)
1 月	4	50(62.5)	3(75)

注：括号内为 CNV 出现例数占该时间段总例数的百分率

FFA：光凝后 3 天，少数光斑可见脉络膜期及动脉早期出现点状荧光素渗漏；光凝后 1 周，8.2%(26/320)的光斑于脉络膜期及及动脉早期出现点状荧光素渗漏；光凝后 2 周，43.7%(105/240)的光斑有荧光素渗漏，FFA 后期呈现高荧光区；光凝后 3 周，63.8%(102/160)的光斑出现清晰的不规则条状及颗粒状荧光，FFA 后期形成边界稍模糊呈花瓣状的高荧光区(图 3)。光凝 1 月后光凝斑荧光素渗漏率无明显增加。光凝时有出血的光斑中有荧光素渗漏的占 49%(53/109)，无光斑表面出血的光斑中荧光素渗漏发生率为 68%(199/291)，荧光素渗漏均出现于光斑黄白色渗出灶处。

ICGA 检查证实有早期荧光素渗漏的光凝斑均有 CNV 充肥(图 4)。

2.3 组织学观察

HE 染色：正常有色家兔视网膜脉络膜各层组织结构清晰、完整(图 5)。光凝后 1 周，光镜下可见视网膜色素上皮(retinal pigment epithelial，RPE)层、Bruch 膜破裂、外核层缺损、内核层部分消失、脉络膜毛细血管从损伤、色素脱失，可见到色素性巨噬细胞和迁移增殖的 RPE 细胞。并有毛细血管样物质突向视网膜下形成早期的 CNV；光凝后 2 周(图 6)RPE 细胞迁移增生明显，CNV 增厚，可见新生血管的骨腔；光凝后 3 周，新生血管膜明显增厚，其上的色素上皮修复接近完整；光凝后 1 月，新生血管膜形态和厚度基本稳定，变化同前。

免疫组化染色：光凝后 1 周视网膜和脉络膜各层几乎均无 VEGF 的阳性表达；光凝后 2 周视网膜神经节细胞层有 VEGF 阳性表达，胞浆呈棕色着染(图 7)；光疑后 3 周视网膜神经节细胞从出现强阳性染色，内核层也有着色；光凝后 1 月视网膜各层染色减弱。



图 5 正常有色家兔视网膜脉络膜各层组织结构清晰、完整。HE 染色×200

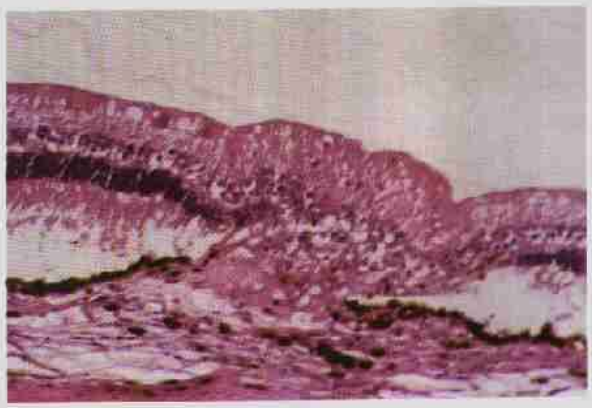


图 6 光凝后 2 周，CNV 结构明显增生。HE 染色×200



图 7 VEGF 免疫组化染色(×200)：光凝后 2 周，神经节细胞层细胞有阳性染色

3 讨 论

脉络膜新生血管(CNV)见于年龄相关性黄斑变性(AMD)、眼组织胞浆菌病、眼底血管样条纹、病理性近视、眼顿挫伤伴有脉络膜撕裂等，具各自的始动因素大相径庭，但这些疾病均有一个较为共同的病理特点，即都有 RPE、Bruch 膜，脉络膜毛细血管复合体的改变[3]。激光诱导的 CNV 模型正是基于这一病理改变为基础的。

维普资讯 http://www.cqvip.com

研究采用高功率(0.7w)、小光斑(50μm)、短曝光时间(0.1s)的氩绿激光光凝兔视网膜,破坏 RPE 和 Bruch 膜诱发 CNV。

CNV 发生的这一过程很复杂,RPE、Bruch 膜,脉络膜毛细血管复合体受到激光的热效应、机械损伤效应和光化学效应等生物效心的影响,开始了伴有炎性反应的增生修复过程[4]。RPE 迁移增生,巨噬细胞、成纤维细胞等也参与这一过程,分泌多种生长因子和酶,同时脉络膜毛细血管阻塞导致缺氧进一步刺激生长因子如 VEGF 等的大量分泌,进一步促使 CNV 产生。本文用免疫组化方法观察了光凝后不同时间 VEGF 在视网膜中的表达,提示 VEGF 的表达和 CNV 的发生和增殖在时间上是相关的,光凝后三周 VEGF 的表达和 CNV 的生长均达到了高峰,初步印证了生长因子对 CNV 的促进作用。

通过直接眼底观察到光凝斑从损伤、水肿、渗出到修复过程的眼底改变。FFA 证实从光凝后一周开始就出现了较明显的动脉早期的高荧光渗漏,该渗漏与视网膜血管系统没有联系,ICGA 也见到视网膜下生血管的充盈;同期的组织学观察见到了光镜下的 CNV 结构改变。第二周渗漏光斑增加、增强;从第三周到 1 月时基本稳定,结合光镜下的组织学改变考虑,这一时期 CNV 上的色素上皮修复明显,当色素细胞围绕 CNV 成功,CNV 就停止增长[5],即表现为 FFA/ICGA 荧光渗漏稳定或减弱。

目前用于激光诱导的 CNV 模型动物有猕猴、猪、BN 大鼠、色素鼠、兔等,各有其优缺点。猴的 CNV 模型与人类疾病改变极为相似[6],并且光镜、电镜下组织学改变一致,眼底荧光血管造影中还具有渗漏荧光素的特征,新生血管的发生率达 30%～40%,这种新生血管一般发生在激光光凝后 4 周,持续 2～52 周。但因动物来源和试验难度大,应用较少。BN 大鼠成模率较高,可达 76%,成模时间短(21 天稳定),是一种较好的模型[7],但动物眼球较小,操作相对难度大,不便于活体的直接眼底观察,动物来源也并非广泛。色素鼠等成模率低(46%),也有眼球小等缺点。我们采用有色健康家兔建立模型,其视网膜结构和色素成分与人相似,其光凝斑的 CNV 发生率较高,达 63.8%,光镜下可见到明确的 CNV 结构,并且动物来源广泛、廉价,眼球大小接近于人,便于操作和观察,缺点在于与人的造影结果相比其荧光素渗潜心特点欠典型,总体来看仍不失为一种有价值的动物模型。

参 考 文 献

[1] Husain D, Ambati B, Adamis AP, et al. Mechanisms of age-related macular degeneration[J]. Ophthalmol Clin North Am, 2002;15(1):87-91.

[2] 白建伟,惠延年,张 鹏,等.氩激光诱发兔视网膜下新生血管的眼底荧光血管造影[J].第四军医大学学报,1997;18(3):278-230.

[3] Semkova I, Peters S, Welsandt G, et al. Investigation of laser-indued choroidal neovascularization in the rat[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003;44(12):5349-5354.

[4] Ohno-Matsui K. Molecular mechanism for choroidal neovascularization in age-related macular degeneration[J]. Nippon Ganka Gakkai Zasshi, 2003;107(11):657-673.

[5] Ida H, Tobe T, Nambu H, et al. RPE cells modulate subretinal neovascularization, but do not cause regression in mice with sustained expression of VEGF[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003;44(12):5430-5437.

[6] Krzystolik MG, Afshari MA. Adamis AP, et al. Prevention of experimental choroidal neovascularization with intravitreal anti-vascular endothelial growth factor antibody fragment[J]. Arch Ophthalmol, 2002;120(3):338-346.

[7] Kamizuru H, Kimura H, Yasukawa T, et al. Monoclonal antibody-mediated drug targeting to choroidal neovascularzation in the rat[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2001;42(11):2664-2672.