

不同能量半导体激光对大鼠脉络膜新生血管形成的影响

廖华萍 张士胜 孙悦 王康孙 王玲

Influence of different power on diode laser-induced choroidal neovascularization model in rats

Liao Huaping, Zhang Shisheng, Sun Yue, Wang Kangsun, Wang Ling. Department of Ophthalmology, Ruijin Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200025, China

Abstract Objective Choroidal neovascularization (CNV) is the main cause of blindness in over 50-years-old population. To establish an available CNV animal model is helpful for us to understand the pathogenesis and management of CNV. Purpose of present study was to observe the role of coagulation with different power of diode laser in laser-induced choroidal neovascularization model of Brown Norway (BN) rats. **Methods** Coagulation of 810 nm diode laser (8-10 spots for each eye) was performed in 36 male BN rats with the spot diameter 75 μm , shutter time 0.1 s, power 120 mW, 140 mW and 160 mW, respectively, while 6 normal BN rats were used as contrast. CNV was evaluated by fundus examination, fundus fluorescein angiography (FFA), indocyanine green angiography (ICGA) and light microscope on day 1, 7, 14, 21, 28 and 56 after photocoagulation. **Results** CNV formed on the 7th day after photocoagulation in 120 mW, 140 mW and 160 mW groups and reached the peak on the 21st day according to FFA and ICGA manifestation. Incidence of CNV in 120 mW, 140 mW and 160 mW group was 51.3%, 91.8%, 88.3% on FFA findings and 51.3%, 92.7%, 93.7% on ICGA findings, respectively. In 7 days after photocoagulation, inflammatory cells increased and CNV formed at the lesion. Photocoagulation plaque became thicker with pigment cells proliferating and migrating on 14 days. After that time, inflammatory cells decreased and more collagen fibers emerged. The CNV reminded till the 56th day after photocoagulation.

Conclusion CNV model of BN rats can be successfully created using the different power of diode laser (from 120 through 160 mW). CNV rate under the laser coagulation with 140 mW is higher, indicating that the power of 140 mW may be a suitable parameter for diode laser-induced choroidal neovascularization model of BN rats.

Key words laser; choroidal neovascularization; animal model

摘要 目的 观察不同能量的半导体激光对诱导棕色挪威 (BN) 大鼠脉络膜新生血管 (CNV) 形成的影响。 **方法** 雄性 BN 大鼠 42 只随机分组, 将其中的 36 只根据激光功率不同平均分为 3 个实验组, 其余 6 只作为正常对照组。采用 810 nm 半导体激光光凝大鼠双眼视网膜, 光斑直径 75 μm , 曝光时间 0.1 s, 激光功率分别为 120、140 和 160 mW, 于光凝后 1、7、14、21、28、56 d 进行荧光素眼底血管造影 (FFA) 和吲哚菁绿血管造影 (ICGA) 检查, 随后于每个时间点每组各处死 2 只大鼠, 摘除眼球在光学显微镜下检查 CNV 形成情况。 **结果** 不同能量半导体激光光凝 BN 大鼠视网膜后 7 d CNV 开始形成, 21 d 达高峰, 此时根据 FFA 和 ICGA 计算的 3 组 CNV 的成模率分别为 51.3%、91.8%、88.3% 及 51.3%、92.7%、93.7%, 56 d 时 CNV 有所减少。光凝后 7 d 可见光凝斑周围炎性细胞增多, CNV 形成; 14 d 光凝斑增厚, 色素细胞增生、移行; 21 d 时 140 mW 及 160 mW 组多数光凝斑增厚, 可见明显 CNV; 随后炎性细胞减少, 胶原纤维增多, 56 d 时仍可见 CNV 结构。 **结论** 功率分别为 120、140、160 mW 的 810 nm 半导体激光均能成功诱导 BN 大鼠形成 CNV, 140 mW 组成模率高且受干扰因素少, 是建立 BN 大鼠 CNV 模型比较理想的参数。

关键词 激光; 脉络膜新生血管; 动物模型

分类号 R 773.4 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)11-0965-04

本课题为上海市重点学科建设项目 (S30205)、上海市科委基础重点项目 (08JC1415600) 资助

作者单位: 200025 上海交通大学医学院附属瑞金医院眼科 (廖华萍、孙悦、王玲); 200025 上海瑞视医院眼科 (张士胜、王康孙)

通讯作者: 王玲 (Email: lwang@rjeye.com)

脉络膜新生血管 (choroidal neovascularization, CNV) 可发生于年龄相关性黄斑变性 (age-related macular degeneration, AMD)、中心性渗出性脉络膜视网膜病变和高度近视等多种眼底疾病。CNV 常好发于黄斑区域, 大多为来自脉络膜血管的增生血管, 能破坏视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) 和感觉神经层, 导致视力严重受损, 尤其是 AMD, 已经成为西方发达国家 55 岁以上老年人群致盲的首要原因^[1-2]。建立便捷、有效的 CNV 模型对探索 CNV 的发病机制、转归及有效治疗具有重要意义。

1 材料与方 法

1.1 实验动物

雄性棕色挪威 (Brown Norway, BN) 大鼠 42 只, 体重 (200 ± 20) g, 由北京维通利华动物实验有限公司提供。实验前所有大鼠双眼均经裂隙灯显微镜及眼底检查, 排除屈光介质和眼底异常。

1.2 实验方法

1.2.1 视网膜光凝 42 只 BN 大鼠, 随机数字表法将动物随机分组, 其中 36 只鼠 72 眼等分为 3 个实验组, 6 只鼠作为对照组。经 3% 戊巴比妥钠 (40 mg/kg) 腹腔注射麻醉, 复方托吡卡胺滴眼液充分散瞳后, 通过裂隙灯和三面镜将半导体激光 (波长 810 nm) 导入大鼠眼内, 避开大血管, 准确聚焦, 围绕视盘进行视网膜光凝, 每只眼 8 ~ 10 点; 光斑直径 75 μm, 曝光时间 0.1 s, 激光功率分别为 120、140、160 mW。

1.2.2 荧光素眼底血管造影 (fundus fluorescein angiography, FFA) 与吲哚菁绿血管造影 (indocyanine green angiography, ICGA) 检查 分别于激光光凝后 1、7、14、21、28、56 d 对 BN 大鼠进行 FFA 和 ICGA 检查, 同 1.2.1 的方法麻醉、扩瞳后, 尾静脉注射 10% 荧光素钠 0.2 mL (1.0 mL/kg, 广西梧州制药股份有限公司) 和吲哚菁绿 0.1 mL (0.5 mL/kg, 辽阳第三制药厂), 激光扫描检眼镜 (Rodensstock Instruments) 下进行同步动态造影观察。

1.2.3 光学显微镜检查 经上述检查后各组分别给予过量 3% 戊巴比妥钠随机处死 BN 大鼠 2 只, 迅速摘取眼球, 置于固定液中, 室温过夜, 取材时垂直于角膜切除两侧眼球壁各 1 mm, 去除晶状体, 经梯度乙醇脱水, 石蜡包埋, 矢状位平行视神经, 垂直于视网膜连续切片, 片厚 4 μm, 选取有激光斑者苏木精 - 伊红染色后光镜观察。

2 结 果

2.1 眼底观察

BN 大鼠 72 只实验眼, 共光凝 672 点, 其中 536 点光凝时有气泡感或伴有轻响, 占 79.8%。196 点光凝后见不同程度出血, 多数为局限的视网膜内和视网膜下出血, 49 点出现玻璃体出血, 均出现于 160 mW 组。光凝后 1 d, 激光部位视网膜呈白垩色, 160 mW 组部分位点受出血影响眼底看不清; 光凝后 7 d 见视网膜水肿, 出血开始吸收, 少量色素形成; 14 d 视网膜水肿减退, 出血有较明显吸收; 21 d 色素明显, 瘢痕形成, 大部分出血吸收, 未吸收者大部分在 160 mW 组中; 56 d 时可见激光瘢痕及明显色素增生, 160 mW 组仍有出血, 色暗红。

2.2 FFA 及 ICGA 表现

光凝后 7 d, 各组部分光凝点轻度点状荧光素渗漏; 14 d 时荧光素渗漏点增多增强; 21 d 时有明显荧光素渗漏的光凝斑数达到高峰, 典型者早期即呈强荧光, 晚期继续扩大为边界清晰的高荧光区 (图 1); 28 d 时荧光素渗漏的光斑数量和程度基本稳定; 56 d 时荧光素渗漏数及渗漏范围较前有所减少。ICGA 与 FFA 情况基本一致 (图 2)。以荧光素渗漏作为 CNV 成功标志, 表现为: (1) 21 d CNV 成模率最高, 根据 FFA 和 ICGA 计算的 3 组 CNV 成模率分别为 51.3%、91.8%、88.3% 及 51.3%、92.7%、93.7%。(2) 140 mW 组和 160 mW 组 CNV 成模率明显高于 120 mW 组, 但 140 mW 组与 160 mW 组间差异不大。(3) ICGA 与 FFA 基本一致, 但 ICGA 计算的 CNV 成模率略高于 FFA, 以 160 mW 组差别最明显。所有对照眼 FFA 及 ICGA 均未见荧光素渗漏。

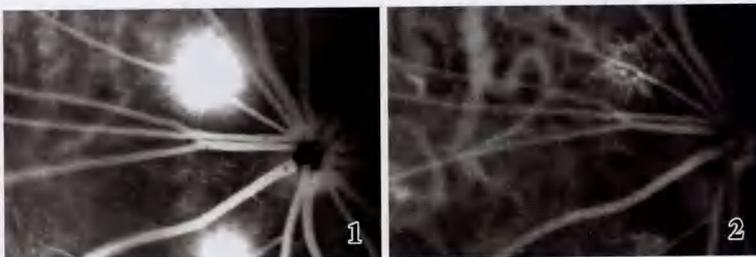


图 1 BN 大鼠视网膜光凝 21 d, FFA 显示激光部位出现荧光素渗漏, 提示 CNV 形成 (光斑直径 75 μm, 曝光时间 0.1 s, 功率 140 mW) 图 2 BN 大鼠视网膜光凝 21 d, ICGA 显示光凝部位出现渗漏, 提示 CNV 形成 (光斑直径 75 μm, 曝光时间 0.1 s, 功率 140 W)

Fig. 1 In 21 days after retinal photocoagulation (75 μm, 0.1 s, 140 mW) in BN rat, fluorescein leakage appeared in the photocoagulation lesion Fig. 2 In 21 days after retinal photocoagulation (75 μm, 0.1 s, 140 mW) in BN rat, indocyanine green leakage appeared in the lesion

2.3 光学显微镜检查

光凝后 1 d 光凝斑处视网膜结构紊乱,120 mW 组大部分 Bruch 膜保持完整,140 mW 组及 160 mW 组则大部分可见 Bruch 膜连续性破坏;7 d 可见光凝斑周围视网膜水肿,结构紊乱,炎性细胞增多,CNV 形成;14 d 视网膜水肿减轻,光凝斑增厚,色素细胞增生、移行,可

见 CNV;21 d 视网膜下光凝斑局部仍较厚,140 mW 组及 160 mW 组多数光凝斑可见 CNV 形成(图 3~5);28 d 仍可见 CNV,炎性细胞较少,胶原纤维增多;56 d,光凝斑局部变薄,伴少量炎性细胞及大量胶原纤维,可见 CNV。对照眼的视网膜及脉络膜各层组织结构清晰、完整。

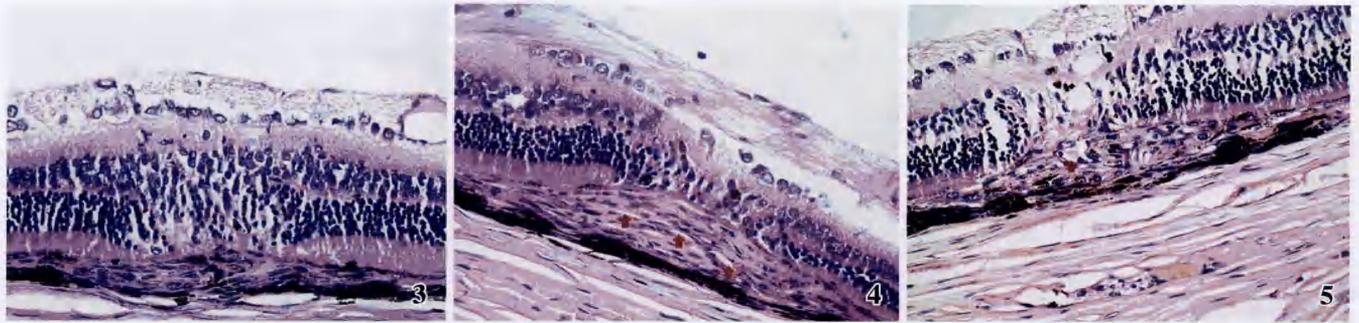


图 3 120 mW 组激光光凝后 21 d,激光斑部位外颗粒层消失,RPE 连续性破坏,未见明显 CNV 形成(HE × 400) 图 4 140 mW 组激光光凝后 21 d,激光斑部位内、外颗粒层几乎消失,RPE 连续性破坏,色素细胞、纤维细胞增生,其中可见明显 CNV 结构(↑)(HE × 400) 图 5 160 mW 组激光光凝后 21 d,梭形增生斑块中可见较多 CNV,其中可见由内皮细胞围成的较大的新生血管管腔(↑)(HE × 400)

Fig. 3 In 21 days after retinal photocoagulation (75 μ m, 0.1 s, 120 mW) in BN rat, the outer nuclear layer disappeared, and the retinal pigment epithelium destroyed. No obvious CNV was found at the site of photocoagulation (HE \times 400) Fig. 4 In 21 days after retinal photocoagulation (75 μ m, 0.1 s, 140 mW) in BN rat, retinal outer nuclear layer and inner nuclear layer almost disappeared, and the destroy of retinal pigment epithelium, proliferation of pigment cells and fibrocytes were noted. Obvious CNV can be found at the site of photocoagulation (red arrow) (HE \times 400) Fig. 5 In 21 days after retinal photocoagulation (75 μ m, 0.1 s, 160 mW) in BN rat, lots of CNV and some larger lumina of new vessels could be found (red arrow), which were noted in the fusiform proliferated plaques (HE \times 400)

3 讨论

CNV 动物模型是研究 CNV 发生、发展及防治的重要手段,建立 CNV 模型的方法主要有视网膜下注射生长因子等药物^[3-4]、转基因动物^[5]以及激光光凝诱导^[6-8]等。尽管前 2 种方法均具有相当重要的意义,但由于制备技术难度较大、费用高,难以推广应用,目前应用较多的方法仍是激光光凝诱导。

激光光凝诱导法最早由 Ryan^[6]通过氩离子激光光凝猴视网膜成功建立 CNV 模型而提出。Shen 等^[7]经过改进,应用强光光凝猴黄斑区使成模率达到 89%。猴的视网膜脉络膜循环以及黄斑部解剖与人类极其相似,因此这种动物模型得到了一致认可,但由于来源有限且价格昂贵,不适合进行大样本的基础研究。Dobi 等^[8]首次应用氩离子激光光凝色素鼠的视网膜,成功诱导了 CNV。同时,由于大鼠来源广、费用相对较低廉,成模时间早,成模率高、持续时间长且操作方便,而且与人类 AMD 等 CNV 病变具有相似的细胞成分和病理过程,该模型得到了广泛应用^[9-10]。本研究采用不同能量的 810 nm 半导体激光器光凝 BN 大鼠视网膜,探讨其对 CNV 形成的影响,从而为选择理想的造模参数提供基础依据。

本实验结果显示:激光能量越大,CNV 成模率越高,且形成 CNV 的部位光凝时都有气泡感或伴有不同程度的出血。通常,影响激光诱导 CNV 成功率的主要因素有激光的波长和能量水平。在一定范围内,随着激光波长的增加,组织穿透能力增强,因此,半导体激光较短波长激光如氩离子激光、氪离子激光等能更多地作用于脉络膜组织,提高 CNV 的发生率;本实验采用的激光光斑直径、曝光时间一致,功率分别为 120、140、160 mW,所以能量水平也依次递增,能量较高的 140 mW 组和 160 mW 组较低能量 120 mW 组成模率显著增高,21 d 时均达到 90% 以上,但 140 mW 和 160 mW 之间差异无统计学意义,说明激光能量升高到一定水平,足以破坏 Bruch 膜,升高能量对提高 CNV 发生率无明显作用。激光诱导 CNV 的形成是一个伴有炎症反应的增生修复过程,适当的高能量激光直接破坏动物 Bruch 膜,或者通过慢性细胞作用过程逐渐溶解 Bruch 膜,同时局部中性粒细胞、巨噬细胞等增多,RPE 细胞增生,释放出多种细胞生长因子,如 VEGF、TGF、TNF 等共同作用,促进受损的脉络膜血管组织增生形成 CNV^[9]。

另外,本研究发现:实验中 FFA 与 ICGA 显示 CNV 病变的部位和高峰时间基本一致,但根据二者结

果所统计的 CNV 发生率存在差异。120 mW 组无明显差异,140 mW 组和 160 mW 组中,ICGA 显示的发生率高于 FFA,尤以 160 mW 组最为明显,而 140 mW 组在 21 d 前后差异较为显著。其原因可能是激光光凝时不同能量的激光导致的局部出血程度不一,随着能量的增加,出血点和出血量均有所增加,其中 49 处玻璃体出血都发生在 160 mW 组。与荧光素钠相比,吲哚菁绿与血红蛋白结合率高且最大吸收波长为红外波,因而对黑色素、出血和渗出物的穿透力更强。120 mW 组出血点与出血量均较少,所以 FFA 与 ICGA 差异不明显;140 mW 组和 160 mW 组出血点相对较多,特别是 160 mW 组出血量大,吸收慢,因此 FFA 检查时可能遮蔽了较弱小的 CNV 荧光,而 ICGA 并不受出血影响,能比较清晰地显示早期较小 CNV 或者是 FFA 所不能显示的较大出血部位的 CNV;激光后较晚期 CNV 渗漏范围缩小,且增生的 RPE 细胞可能包绕新生血管,加之 160 mW 组中较大出血尚未能很好地吸收,同样可能造成荧光遮蔽,但不会影响 ICGA 显影。

徐建锋等^[11]应用 532 nm 倍频激光(180 mW, 75 μm , 0.1 s)光凝 BN 大鼠视网膜,发现光凝后 21 d CNV 成模率达最高(70%),并能稳定于 56 d。王康等^[12]应用 810 nm 半导体激光光凝 C57BL/6J 小鼠视网膜,所用参数为 180 mW, 75 μm , 0.1 s, 激光后 1 周, CNV 增生活跃,4 周时 CNV 趋向瘢痕化。张励等^[13]通过 LUMENIS 型多波长激光机,利用波长为 647 nm 的氦激光,选择 3 组不同能量(激光功率分别为 700、500、360 mW;光斑直径和曝光时间均分别为 50 μm 、0.05 s)的激光光凝青紫蓝兔,21 d 时 CNV 形成率最高,其中高能量组成模率较其他 2 组高。由此可见,使用不同类型的激光可在多种实验动物上诱导出 CNV,而 CNV 出现及达到高峰的时机略有不同。本研究显示,应用功率为 120、140、160 mW 的 810 nm 半导体激光均能成功诱导 BN 大鼠形成 CNV,其中 140 mW 组

和 160 mW 组成模率高,由于 140 mW 组较 160 mW 组出血少、易于吸收、对模型随访及以后的治疗造成的干扰因素少,是建立 BN 大鼠 CNV 模型比较理想的参数,可为 CNV 相关研究提供另一种选择。

参考文献

- Dolan BJ. Choroidal neovascularization not associated with age-related macular degeneration[J]. *Optom Clin*, 1996, 5(1): 55-76
- Ambati J, Ambati BK, Yoo SH, et al. Age-related macular degeneration: etiology, pathogenesis, and therapeutic strategies[J]. *Surv Ophthalmol*, 2003, 48(3): 257-293
- Soubrane G, Cohen SY, Delayre T, et al. Basic fibroblast growth factor experimentally induced choroidal angiogenesis in the minipig[J]. *Curr Eye Res*, 1994, 13(3): 183-195
- Ni M, Holland M, Jarstadmarken H, et al. Time-course of experimental choroidal neovascularization in Dutch-Belted rabbit: clinical and histological evaluation[J]. *Exp Eye Res*, 2005, 81(3): 286-297
- Lebherz C, Maguire AM, Auricchio A, et al. Nonhuman primate models for diabetic ocular neovascularization using AAV2-mediated overexpression of vascular endothelial growth factor[J]. *Diabetes*, 2005, 54(4): 1141-1149
- Ryan SJ. Subretinal neovascularization after argon laser photocoagulation [J]. *Albrecht Von Graefe's Arch Klin Exp Ophthalmol*, 1980, 215(1): 29-42
- Shen WY, Lee SY, Yeo J, et al. Predilection of the macular region to high incidence of choroidal neovascularization after intense laser photocoagulation in the monkey [J]. *Arch Ophthalmol*, 2004, 122(3): 353-360
- Dobi ET, Puliafito CA, Destro M. A new model of experimental choroidal neovascularization in the rat [J]. *Arch Ophthalmol*, 1989, 107(2): 264-269
- Miller H, Miller B, Ishibashi T, et al. Pathogenesis of laser-induced choroidal subretinal neovascularization [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1990, 31(5): 899-908
- Shen WY, Yu MJ, Barry CJ, et al. Expression of cell adhesion molecules and vascular endothelial growth factor in experimental choroidal neovascularization in the rat [J]. *Br J Ophthalmol*, 1998, 82(9): 1063-1071
- 徐建锋, 王雨生, 杨秀梅, 等. 倍频激光诱导的大鼠脉络膜新生血管中 CD105 的表达[J]. *眼科研究*, 2007, 25(3): 193-196
- 王康, 王康孙, 王玲, 等. 激光诱导小鼠脉络膜新生血管模型中 CD105 的表达[J]. *眼科研究*, 2004, 22(1): 21-23
- 张励, 冯红燕, 罗海华, 等. 不同强度的激光诱导建立兔脉络膜新生血管模型[J]. *中国激光医学杂志*, 2008, 17(3): 224-225

(收稿:2008-12-08 修回:2009-09-22)

(本文编辑:尹卫靖)

读者·作者·编者

本刊对中英文摘要的写作要求

论著正文前附 300 字内的中文摘要,包括目的、方法、结果、结论四要素,关键词 3~8 个;英文摘要应比中文摘要详细,300 个实词左右。英文摘要的目的部分应概括写出本研究的研究背景和目的;方法部分应写明研究对象的数目、来源、分组情况及所用的研究方法和工具;结果部分应包括研究结果的主要形态学改变、染色的具体形态和具体数据。英文摘要的方法和结果部分内容的描述应用一般过去时态。英文关键词 3~8 个,应与中文关键词一致。

综述的中英文摘要不用四要素的写法,可写成指示性文摘,亦给出中英文关键词各 3~8 个;摘要用第三人称撰写,不用“本文”、“作者”等作主语。

(本刊编辑部)