

[文章编号] 1674-8115(2011)08-1082-04

· 论著 ·

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

王 帅, 宋蓓雯, 吴 强

(上海交通大学附属第六人民医院眼科, 上海 200233)

[摘要] 目的 探讨光化学法诱导色素兔视网膜静脉阻塞模型的方法和特点。方法 将 16 只健康青紫蓝兔随机分为 A、B 两组, 每组 8 只。经兔耳缘静脉注入孟加拉红(50 mg/kg)后应用倍频 532 激光光凝视网膜静脉,A 组激光能量 150 mW 光凝双侧视网膜静脉主干 15 点后,300 mW 再照射 15 点;B 组激光能量 150 mW 光凝双侧视网膜静脉主干 40 点后,300 mW 再照射 40 点。分别于术前和光凝后 15 min、1 d、3 d、7 d、14 d、21 d、28 d 行眼底照相和眼底荧光造影检查, 并于光凝后 1 d 时两组各处死 1 只动物, 其余于光凝后 28 d 处死, 摘除眼球行光学显微镜检查。结果 两组均成功诱导视网膜静脉阻塞模型, 光凝后第 1 天 B 组产生视网膜动、静脉阻塞。光凝后第 7 天, A 组阻塞静脉全部再通, B 组有部分阻塞静脉再通。病理检查结果显示: 光凝后第 1 天, 两组视网膜静脉内均见血栓形成; 光凝后第 28 天, B 组视盘周围视网膜萎缩, 结构不清。结论 利用孟加拉红光化学法制作兔视网膜静脉阻塞模型操作简便, 随着局部视网膜静脉接受光凝次数的增加, 视网膜动脉亦可出现阻塞现象。

[关键词] 光化学法; 视网膜静脉阻塞; 动物模型

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2011.08.007

[中图分类号] R774; R-332

[文献标志码] A

Establishment of pigmented rabbit model of retinal vein occlusion by excitation of Rose Bengal with double-frequency laser (532nm)

WANG Shuai, SONG Bei-wen, WU Qiang

(Department of Ophthalmology, the Sixth People's Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200233, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the characteristics of pigmented rabbit retinal vein occlusion induced by photochemical method. **Methods** Sixteen healthy pigmented rabbits were randomly divided into group A and group B, with 8 rabbits in each group. Laser photocoagulation with double-frequency laser (532 nm) on the trunk retinal vein was performed after the injection of Rose Bengal solution (50 mg/kg) via ear marginal vein. Laser reference parameters of group A were as follows: power 150 mW for 15 shots and then 300 mW for another 15 shots. Laser reference parameters of group B were as follows: power 150 mW for 40 shots and then 300 mW for another 40 shots. Fundus photograph and fundus fluorescein angiography were performed before photocoagulation and 15 min, 1 d, 3 d, 7 d, 14 d and 28 d after photocoagulation. One rabbit was sacrificed in each group 1 d after photocoagulation, and the rest were killed 28 d after photocoagulation for light microscopy. **Results** Retinal vein occlusion models were successfully established in both groups, and retinal artery occlusion was also induced in group B 1 d after photocoagulation. Seven days after photocoagulation, venous recanalization was detected in all occluded veins in group A and in part of the occluded veins in group B. Histopathological examinations indicated that venous thrombus formed in retinal veins in both groups 1 d after photocoagulation, and there was retinal atrophy around the papillary disc 28 d after photocoagulation. **Conclusion** It is convenient to establish rabbit model of retinal vein occlusion by Rose Bengal photochemical method. With the increase of photocoagulation shots on regional retinal vein, the retinal artery could be occluded as well.

[Key words] photochemistry; retinal vein occlusion; animal model

视网膜静脉阻塞是临幊上常见的视网膜血管性疾病, 可以引起黄斑水肿、玻璃体出血、新生血管性青光眼及视网膜脱落等并发症, 对患者视功能的损害较为

严重, 是全世界仅次于糖尿病视网膜病变的第二大致盲性眼底血管疾病。最新研究^[1]显示, 亚洲人视网膜静脉阻塞的发病率约为 5.7%。尽管目前临幊上治疗

[基金项目] 上海交通大学医工(理)交叉重点课题(YG2009ZD203) (Shanghai Jiaotong University Foundation, YG2009ZD203)。

[作者简介] 王 帅(1981—), 男, 住院医师, 博士; 电子信箱: owenhuacha@hotmail.com。

[通信作者] 吴 强, 电子信箱: wyan559@hotmail.com。

视网膜静脉阻塞的方法较多,但治疗效果均不佳。

采用动物模拟人视网膜静脉阻塞的形成,对于研究视网膜静脉阻塞的产生机制、发展转归及组织学结构都有重要价值,并为临床研发新型、安全、有效的防治方法提供了平台。目前制作视网膜静脉阻塞模型方法较多,如血管结扎法、透热法和光化学法。由于光化学法只损伤视网膜血管内皮细胞,通过一系列级联反应导致血小板聚集形成血栓,与人视网膜分支静脉阻塞的静脉血栓成分及形成机制相近似,操作简便且对动物眼球损伤小,成为目前制作视网膜静脉阻塞模型的主要方法。

虽然兔子的眼球在解剖尤其是视网膜结构上与人类不同,但由于其价格低廉、眼球较大、视乳头水平两侧有髓神经纤维表面的视网膜动、静脉血管利于观察,在视网膜静脉阻塞的治疗研究中仍被大多数学者作为模型动物。目前,对于应用光化学法制作兔视网膜静脉阻塞模型的激光参数不一,本实验利用倍频 532 激光激发孟加拉红的光化学法诱导色素兔视网膜静脉阻塞的形成,观察不同能量参数制作兔视网膜静脉阻塞模型的特点及其病程转归,为制作兔视网膜静脉阻塞模型提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康成年青紫蓝兔 16 只,体质量 2.0~2.5 kg,雌雄不拘,动物生产许可证号为 SCXK(沪)2007-0011,使用许可证号为 SYXK(沪)2006-0010,实验在上海交通大学附属第六人民医院实验动物中心进行。实验前均经裂隙灯显微镜及眼底检查,排除动物双眼屈光介质或眼底异常。

1.1.2 实验试剂及主要设备 孟加拉红钠盐(Sigma,美国),氯胺酮注射液(福建古田药业有限公司),氯丙嗪注射液(上海禾丰制药有限公司),荧光素钠注射液(Cardinal Health Manufacturing Services B. V.,美国);滤过器(Millex,爱尔兰),眼底照相及眼底荧光造影设备(FF450plusIR,德国蔡司),倍频 532 激光(德国蔡司,VISULAS532S),光学显微镜(Olympus-BX41,日本)。

1.2 建立模型

孟加拉红钠盐用生理盐水配制,质量浓度为 50 mg/mL,经 0.22 μm 无菌滤膜过滤,4 ℃避光保存。随机将动物分为 A、B 两组,每组 8 只,均设右眼为实验眼。经托吡卡胺滴眼液充分扩瞳后,氯胺酮 50 mg/kg 和氯丙嗪 25 mg/kg 混合液肌肉注射麻醉,右眼滴入爱尔卡因表面麻醉,放置角膜接触三面镜。经耳缘静脉一次性注射孟加拉红 50 mg/kg,距视盘

边缘约 1 mm 内选择视网膜静脉主干,激光光凝 A、B 两组实验兔。A 组激光能量 150 mW 光凝双侧视网膜静脉主干 15 点后,300 mW 再光凝 15 点;B 组激光能量 150 mW 光凝双侧视网膜静脉主干 40 点后,300 mW 再光凝 40 点。两组均曝光 0.5 s,光斑大小 100 μm。光凝位置为单点光凝,光凝后 15 min 行眼底荧光造影及眼底拍照,确认静脉阻塞。

1.3 观察指标

1.3.1 眼底观察和荧光造影 于光凝后第 1、3、7、14 和 28 天麻醉动物后(方法同前),托吡卡胺散瞳,行眼底拍照,观察眼底的变化情况;并在耳缘静脉注射荧光素钠(0.1 mL/kg)行眼底荧光造影检查,观察眼底视网膜静脉阻塞情况。

1.3.2 光学显微镜观察 激光光凝后第 1 天,每组随机取 1 只动物,用过量氯胺酮处死,立即摘出眼球并剖开,放入眼球固定液中固定 48 h,按照常规病理制片方法制片、苏木精-伊红染色,光学显微镜下观察。光凝后第 28 天用过量氯胺酮处死剩余动物,固定及制片方法同上,光学显微镜下观察。

2 结 果

2.1 眼底观察

两组视网膜静脉在接受光凝时,均表现为静脉管壁痉挛闭塞,而 A 组动脉管壁无明显变化,B 组视网膜动脉在光凝静脉同时出现痉挛变细现象。

2.1.1 A 组动物的眼底变化 光凝后 15 min,光凝处视网膜静脉闭塞,远端视网膜静脉轻度迂曲。光凝后第 1 天,8 只眼均出现视网膜光凝处点片状出血,局部视网膜水肿,静脉血管迂曲(图 1A)。光凝后第 3 天,剩余 7 只眼视网膜出血部分吸收,出现侧支循环。光凝后第 7 天,视网膜浅层出血大部分吸收,侧支血管存在,光凝处静脉管径仍细窄。光凝后第 14~28 天,侧支循环逐渐消退,光凝处静脉管径逐步恢复正常,但形态较未光凝前变平直,部分眼球出现光凝处视网膜色素改变。

2.1.2 B 组动物的眼底变化 光凝后 15 min,光凝处视网膜静脉闭塞,远端视网膜静脉迂曲,伴行视网膜动脉管径变细。光凝后第 1 天,其中 5 只眼出现沿视盘两侧翼状有髓神经纤维的火焰状出血,视网膜动脉管径显著缩小,静脉管径变粗,形态迂曲;视神经两侧翼状有髓神经纤维视网膜水肿(图 1B),剩余 3 只眼视网膜点片状出血。光凝后第 3 天,剩余 7 只眼视网膜出血部分吸收,视神经两侧翼状有髓神经纤维视网膜水肿,玻璃体内见少量出血。光凝后第 7 天,视网膜浅层出血仍有少量残留,玻璃体出血吸收,视网膜水

肿渐消退。光凝后第 14~28 天, 视网膜浅层出血吸收, 双侧有髓神经纤维视网膜色淡; 视网膜动、静脉血管管径变细, 形态变平直, 侧支血管逐渐消失。

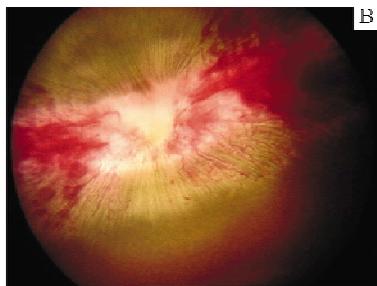
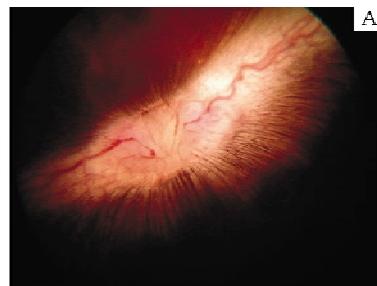
2.2 眼底荧光造影观察

2.2.1 A 组动物的眼底荧光造影 光凝后第 1 天, 8 只眼双侧视网膜动、静脉均无荧光素显影, 近端血管见血栓形成或静脉主干内无荧光素显影, 荧光素渗漏至周围视网膜(图 2A)。光凝后第 3 天, 光凝区静脉管壁内无荧光素充盈, 阻塞静脉近端血栓体积减少, 周围网膜仍见低荧光及视网膜渗漏, 侧支代偿小血管迂曲。光凝后第 7 天, 静脉充盈时间仍延迟, 阻塞静脉血管再通, 有荧光素显影, 静脉管径细窄仍未恢复, 侧支代偿小血管存在。光凝后第 14~28 天, 光凝区血管再通, 静脉管径恢复正常, 侧支循环消失, 形态变平直。

2.2.2 B 组动物的眼底荧光造影 光凝后第 1 天, 8 只眼双侧视网膜动、静脉均无荧光素显影, 周围视网膜荧光素渗漏较重(图 2B); 光凝后第 3 天, 视网膜动、静脉仍无荧光素显影。光凝后第 7 天, 5 只眼视网膜动、静脉均显示部分再通, 管径细窄, 但再通范围距离不同; 2 只眼双侧视网膜动、静脉内仍无荧光素显影。光凝后第 14~28 天, 视网膜动、静脉均再通, 但再通范围有差异, 血管形态较光凝前变细变平直。

2.3 眼底组织病理学观察

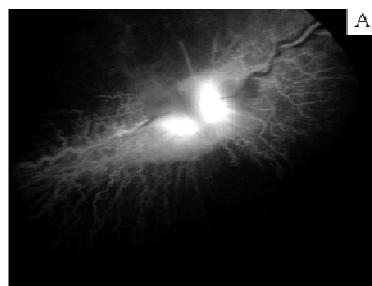
光凝后第 1 天, 两组血管壁均完整, A 组视网膜静脉可见红细胞、白细胞及血小板组成的血栓, B 组视网膜动、静脉内均可见红细胞、白细胞及血小板组成的血栓; 光凝后第 28 天, A 组部分光凝处可见视网膜色素细胞增殖, B 组视盘附近视网膜萎缩(图 3)。



A. 光凝处视网膜轻度水肿,光凝远端视网膜静脉迂曲扩张;B. 双侧有髓神经纤维层见大片火焰状出血。

图 1 光凝后第 1 天眼底变化观察

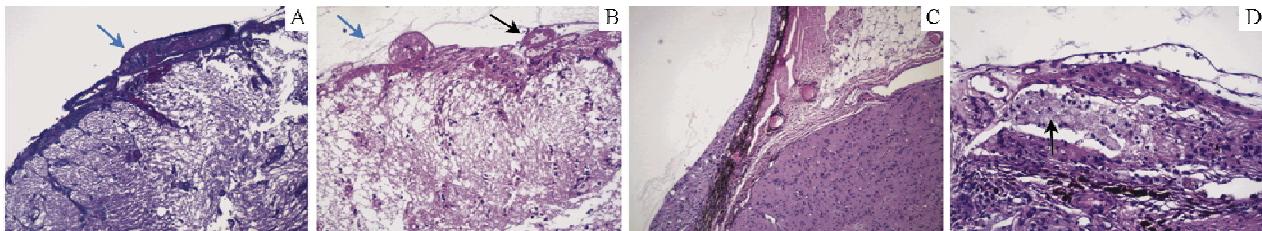
Fig 1 Observation of retinal changes 1 d after photocoagulation



A. 视网膜双侧静脉内血栓形成,鼻侧静脉主干阻塞,颞侧部分静脉阻塞;B. 视网膜动、静脉均无荧光素充盈。

图 2 光凝后第 1 天眼底荧光造影观察

Fig 2 Observation of fundus fluorescein angiography 1 d after photoocoagulation



A. A 组光凝后第 1 天,箭头指示处见静脉管壁完整, 内有白细胞和红细胞, 视网膜神经纤维层水肿(苏木精 - 伊红染色 $\times 200$) ; B. B 组光凝后第 1 天, 蓝箭头所指静脉管壁完整, 黑箭头示动脉内有红细胞和白细胞(苏木精 - 伊红染色 $\times 200$) ; C. B 组光凝后第 28 天, 视盘附近视网膜萎缩, 原有结构消失(苏木精 - 伊红染色 $\times 40$) ; D. A 组光凝后第 28 天, 箭头示视网膜内色素上皮细胞增生(苏木精 - 伊红染色 $\times 200$)。

图 3 光凝后眼底组织病理学观察

Fig 3 Observation of histopathological results after photoocoagulation

3 讨 论

1987 年, Nanda 等^[2]首先应用 300 W 氩弧灯(波长 550 nm)激发孟加拉红产生单态氧破坏视网膜血管内皮细胞成功诱导兔视网膜血管阻塞模型。Ma 等^[3]利用氩激光(波长 514 nm)激发孟加拉红制作兔视网膜静脉阻塞模型,发现其可以导致兔视网膜静脉完全阻塞。Ameri 等^[4]应用氩激光制造出兔眼视网膜中央静脉阻塞模型,并报道在静脉阻塞基础上会继发视网膜动脉阻塞的血流改变。虽然氩绿激光和倍频 532 激光波长不同,但在诱导视网膜血管阻塞及对视网膜损伤方面,两者并未显示明显差异^[5-7]。预实验中,我们参考较大能量光凝如 480 mW^[8],发现容易引起视网膜静脉管壁破裂出血,而应用较小能量(100~120 mW)^[9]第 2 天视网膜静脉自行再通率高,我们参考 Ameri 等^[4]的能量参数 150 mW 先行光凝用以闭塞血管,再增加能量至 300 mW 用以防止血管即刻再通。光凝时,尽可能光凝视网膜静脉主干的同一位点,光凝共计 20 点,静脉阻塞的成模率仍然较低,分组后我们增加光凝点数,光凝后静脉阻塞成模率及稳定性大大提高。

通过对两组的观察,我们发现兔眼视网膜静脉阻塞可以分为两种情况。一种是应用较少次数光凝视网膜静脉的 A 组,表现为单纯视网膜静脉阻塞,其病程及病理组织特点是视网膜静脉阻塞第 1 天后血栓形成,病理切片见视网膜静脉血管内有白细胞聚集;在光凝后第 3 天时血栓仍然存在但体积明显减少,第 7 天时阻塞静脉血管恢复再通,与 Wu 等^[10]利用光化学法制造兔视网膜静脉阻塞病程及血栓成分一致。在第 28 天时,发现光凝处有色素细胞增殖^[4]。另一种情况是应用较多次数光凝视网膜静脉的 B 组,表现为视网膜动、静脉阻塞,其病程特点是经光凝后第 1 天,视网膜动、静脉均阻塞,两种血管阻塞维持时间部分稳定在光凝后第 7 天,第 14 天时阻塞视网膜动脉静脉均再通,再通范围不一,第 28 天时病理切片见视盘附近视网膜萎缩。

兔眼视网膜静脉接受光凝后产生视网膜动、静脉阻塞,由 Ameri 等^[4]首先报道,本研究通过对 B 组光凝后 15 min 的视网膜血管造影观察发现,其动脉期充盈时间明显延迟,视网膜动脉出现不同程度痉挛,光凝第 1 天后视网膜组织病理学切片可见其动脉血管也有白细胞存在,我们认为在视网膜静脉完全阻塞后,动脉血流速度急剧减缓,兔视网膜动、静脉伴行且距离较近,在激光的激发下视网膜动脉内

光敏剂产生的单线态氧也可能破坏动脉血管内皮细胞合并动脉内血流缓慢,加上免凝血酶原时间和部分凝血活酶时间明显短于人类^[11-13],导致其可能形成血栓。另外一种可能原因是兔视网膜血管受交感神经控制,尽管在视网膜静脉管壁上有少量的交感神经分布,但在视网膜动脉上有较多交感神经分布^[14],光凝血管壁引起的支配视网膜动脉血管的交感神经兴奋,引起动脉痉挛也可能加重动脉内血栓的形成。

综上所述,本研究通过倍频 532 激光激发孟加拉红可以制造出兔眼视网膜静脉阻塞模型,在增加光凝次数以后会出现视网膜动脉阻塞现象,但模型的维持时间较短,血管再通率较高,在模型制作方法上需要我们一步改进,以制造出更为稳定的视网膜静脉阻塞模型,为评估视网膜静脉阻塞的新型治疗方法提供帮助。

[参考文献]

- [1] Rogers S, McIntosh RL, Cheung N, et al. The prevalence of retinal vein occlusion: pooled data from population studies from the United States, Europe, Asia, and Australia [J]. Ophthalmology, 2010, 117(2): 313~319.
- [2] Nanda SK, Hatchell DL, Tiedeman JS, et al. A new method for vascular occlusion. Photochemical initiation of thrombosis [J]. Arch Ophthalmol, 1987, 105(8): 1121~1124.
- [3] Ma J, Ke Y, Wu D, et al. Experimental study on relationship between retinal vein occlusion and loss of vitreous gel mass [J]. Mol Vis, 2005, 11: 744~748.
- [4] Ameri H, Ratanapakorn T, Rao NA, et al. Natural course of experimental retinal vein occlusion in rabbit; arterial occlusion following venous photothrombosis [J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2008, 246(10): 1429~1439.
- [5] McMullen WW, Garcia CA. Comparison of retinal photocoagulation using pulsed frequency-doubled neodymium-YAG and argon green laser [J]. Retina, 1992, 12(3): 265~269.
- [6] Riss JM. Retinal vascular closure using laser photocoagulation [J]. Chirurgie, 1996, 121(4): 309~316.
- [7] Mosier MA, Champion J, Liaw LH, et al. Retinal effects of the frequency-doubled (532 nm) YAG laser: histopathological comparison with argon laser [J]. Lasers Surg Med, 1985, 5(4): 377~404.
- [8] 李立婕,金中秋.应用光化学法建立兔眼视网膜静脉分支阻塞模型[J].眼科新进展,2008,28(2): 90~93.
- [9] 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[J].眼科研究,2005,23(5): 488~490.
- [10] Wu J, Zhou X, Hu Y, et al. Video microscope recording of the dynamic course of thrombosis and thrombolysis of the retinal vein in rabbits [J]. Retina, 2010, 30(6): 966~970.

(下转第 1095 页)

- macular edema after cataract surgery using optical coherence tomography [J]. *Retina*, 2008, 28(6): 870–876.
- [4] Gabrő N, Dekaris I, Karaman Z. Refractive lens exchange for correction of high myopia [J]. *Eur J Ophthalmol*, 2002, 12(5): 384–387.
- [5] Cuitell JL, Rodriguez-Arenas AF, Gris O, et al. Phacoemulsification of the crystalline lens and implantation of an intraocular lens for the correction of moderate and high myopia: four-year follow-up [J]. *J Cataract Refract Surg*, 2003, 29(1): 34–38.
- [6] 季樱红, 卢奕, 陆国生. 负度数人工晶体植入术治疗白内障合并超高度近视眼 [J]. 中华眼科杂志, 2005, 41(3): 196–197.
- [7] Tsai CY, Chang TJ, Kuo LL, et al. Visual outcomes and associated risk factors of cataract surgeries in highly myopic Taiwanese [J]. *Ophthalmologica*, 2008, 222(2): 130–135.
- [8] Cagini G, Fiore T, Iaccheri B, et al. Macular thickness measured by optical coherence tomography in a healthy population before and after uncomplicated cataract phacoemulsification surgery [J]. *Curr Eye Res*, 2009, 34(12): 1036–1041.
- [9] Mentes J, Erakgun T, Afrashi F, et al. Incidence of cystoid macular edema after uncomplicated phacoemulsification [J]. *Ophthalmologica*, 2003, 217(6): 408–412.
- [10] Ursell PG, Spalton DJ, Whitecup SM, et al. Cystoid macular edema after phacoemulsification: relationship to blood-aqueous barrier damage and visual acuity [J]. *J Cataract Refract Surg*, 1999, 25(11): 1492–1497.
- [11] Sourdille P, Santiago PY. Optical coherence tomography of macular thickness after cataract surgery [J]. *J Cataract Refract Surg*, 1999, 25(11): 1492–1497.
- [12] Kecik D, Makowiec-Tabemaka M, Golebiewska J, et al. Macular thickness and volume after uncomplicated phacoemulsification surgery evaluated by optical coherence tomography. A one-year follow-up [J]. *Neuro Endocrinol Lett*, 2009, 30(5): 610–614.
- [13] Jurecka T, Bótková Z, Ventruba J. Macular edema after an uncomplicated cataract surgery [J]. *Cesk Slov Oftalmol*, 2007, 63(4): 262–273.
- [14] Ching HY, Wong AC, Wong CC, et al. Cystoid macular oedema and changes in retinal thickness after phacoemulsification with optical coherence tomography [J]. *Eye*, 2006, 20(3): 297–303.
- [15] 程冰, 刘奕志, 刘杏, 等. 光学相干断层成像术观察超声乳化白内障吸除术后黄斑变化 [J]. 中华眼科杂志, 2002, 38(5): 265–267.
- [16] Ferrari TM, Cavallo M, Durante G, et al. Macular edema induced by phacoemulsification [J]. *Doc Ophthalmol*, 1999, 97(3–4): 325–327.
- [17] 王祥群, 周丽钧, 黄又莉. 超声乳化白内障吸除术中建立累积极量复合参数指标的临床意义 [J]. 中华眼科杂志, 2002, 38(10): 610–613.
- [18] Tuft SJ, Minassian D, Sullivan P. Risk factors for retinal detachment after cataract surgery: a case-control study [J]. *Ophthalmology*, 2006, 113(4): 650–656.
- [19] Erie JC, Raecker MA, Baratz KH, et al. Risk of retinal detachment after cataract extraction, 1980–2004: a population-based study [J]. *Ophthalmology*, 2006, 113(11): 2026–2032.

[收稿日期] 2011-04-02

[本文编辑] 张智康

(上接第 1085 页)

- [11] Yamashita A, Nishihira K, Kitazawa T, et al. Factor XI contributes to thrombus propagation on injured neointima of the rabbit iliac artery [J]. *Thromb Haemost*, 2006, 95(7): 1496–1501.
- [12] Cam Y, Cetin E, Ica A, et al. Evaluation of some coagulation parameters in hepatic coccidiosis experimentally induced with *Eimeria stiedai* in rabbits [J]. *Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, 2006, 53(4): 201–202.
- [13] Wong PC, Crain EJ, Watson CA, et al. Razaxaban, a direct factor

Xa inhibitor, in combination with aspirin and/or clopidogrel improves low-dose antithrombotic activity without enhancing bleeding liability in rabbits [J]. *Thromb Thrombolysis*, 2007, 24(1): 43–51.

- [14] Furukawa H. Autonomic innervation of preretinal blood vessels of the rabbit [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1987, 28(11): 1752–1760.

[收稿日期] 2011-04-01

[本文编辑] 周珠凤