

引文格式: 杨宝娣, 宋艳萍, 陈中山, 丁琴. 微脉冲半导体激光对兔视网膜色素上皮细胞阈值下光凝的光生物调制效应[J]. 眼科新进展, 2014, 34 (1): 5-9. doi: 10.13389/j.cnki.rao.2014.0002

【实验研究】

# 微脉冲半导体激光对兔视网膜色素上皮细胞阈值下光凝的光生物调制效应<sup>△</sup>

杨宝娣 宋艳萍 陈中山 丁琴

作者简介: 杨宝娣, 女, 1988年11月出生, 河南开封人, 在读硕士研究生。联系电话: 13986005204; E-mail: yang-baodi\_8651@163.com

About YANG Bao-Di: Female, born in November, 1988. Postgraduate student. Tel: 13986005204; E-mail: yangbaodi\_8651@163.com

收稿日期: 2013-08-10

修回日期: 2013-09-19

本文编辑: 方红玲

△基金项目: 国家自然科学基金资助(编号: 61378084); 湖北省卫生厅科学研究基金资助(编号: JX6C-22)

作者单位: 430070 湖北省武汉市, 南方医科大学附属武汉临床学院, 广州军区武汉总医院, 全军眼科中心

通讯作者: 宋艳萍, E-mail: songyanping@medmail.com.cn

Received date: Aug 10, 2013

Accepted date: Sep 19, 2013

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No: 61378084); Scientific Research Foundation of Health Department of Hubei Province (No: JX6C-22)

From the Ophthalmology Center of Entire Army of Clinical College of Wuhan of Southern Medical University, Wuhan General Hospital of Guangzhou Military Region, Wuhan 430070, Hubei Province, China

Responsible author: SONG Yan-Ping, E-mail: songyanping@medmail.com.cn

14 days after photocoagulation, the increased amplitude of three cytokines was near to each other ( $1.283 \pm 0.310$ ,  $1.662 \pm 0.409$ ,  $1.310 \pm 0.184$ ). **Conclusion** Micropulsed subthreshold 810 nm diode laser can stimulate normal RPE cells *in vivo* to secrete VEGF, PEDF, b-FGF in perfect union with no damage on retinal structure.

[Rec Adv Ophthalmol, 2014, 34 (1): 5-9]

【关键词】 微脉冲激光; 视网膜色素上皮细胞; 血管内皮生长因子; 色素上皮源性因子; 碱性成纤维细胞生长因子

【摘要】 目的 探讨微脉冲激光阈值下光凝对色素兔视网膜形态结构以及视网膜色素上皮细胞 (retinal pigment epithelial cells, RPE) 分泌细胞因子的影响。方法 微脉冲 810 nm 激光阈值下光凝色素兔视网膜, 光凝后 1 d、3 d、7 d、14 d 分别行眼底荧光血管造影 (fluorescein angiography, FFA) 和组织切片技术观察视网膜结构变化; 免疫荧光技术观察视网膜血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)、色素上皮源性因子 (pigment epithelium-derived factor, PEDF)、碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, b-FGF) 的表达变化; RT-PCR 检测视网膜组织匀浆中 VEGF mRNA、PEDF mRNA、b-FGF mRNA 的表达变化。结果 光凝后 FFA 检查未见荧光素渗漏; 组织切片各层结构基本完整。免疫荧光表明, 光凝后 VEGF、PEDF 在视网膜细胞层及 RPE 层表达明显增强; b-FGF 在神经纤维层、节细胞层也有表达。RT-PCR 表明, 激光后 3 种细胞因子 mRNA 含量均增多, 光凝后 1 d PEDF mRNA ( $3.748 \pm 0.890$ ) 表达最高, 3 d 次之, 与其他时间点比较差异均有统计学意义 (均为  $P < 0.05$ ); b-

## Photobiological effects of micropulsed subthreshold 810 nm diode laser photocoagulation on retinal pigment epithelial cells of rabbits

YANG Bao-Di, SONG Yan-Ping, CHEN Zhong-Shan, DING-Qin

【Key words】 micropulsed diode laser; retinal pigment epithelial cell; vascular endothelial growth factor; pigment epithelium-derived factor; basic fibroblast growth factor

【Abstract】 **Objective** To investigate the photobiological effects of micropulsed subthreshold 810 nm diode laser photocoagulation on retinal structure and cell factor secretion under retinal pigment epithelial cells of chinchilla rabbits. **Methods** Micropulsed subthreshold 810 nm diode laser photocoagulated retina of chinchilla rabbits. By fluorescein angiography (FFA), HE staining of retina, the changes of morphology and vascular of retina were observed at 1 day, 3 days, 7 days, 14 days after photocoagulation. The expression changes of vascular endothelial growth factor (VEGF), pigment epithelium-derived factor (PEDF), basic fibroblast growth factor (b-FGF) in retina were observed by immunofluorescence. The mRNA expression changes of VEGF, PEDF, b-FGF were analyzed in retinal tissue homogenates by RT-PCR. **Results** After photocoagulation, FFA examination showed no vascular fluorescence leakage; Retinal tissue sections stained with HE showed retina structure was in order generally; Immunofluorescence showed that after laser photocoagulation, the expression of VEGF and PEDF were enhanced significantly in rods or cones cell layer and retinal pigment epithelial layer; b-FGF was also expressed in nerve fiber layer and ganglion cell layer. RT-PCR results showed that after laser photocoagulation the mRNA content of three cytokines increased. PEDF mRNA expression increased to the maximum at 1 day after photocoagulation ( $3.748 \pm 0.890$ ), followed by that at 3 days, which both had significantly difference compared with the other time points (all  $P < 0.05$ ). b-FGF mRNA expression increased to the maximum at 1 day after photocoagulation ( $1.578 \pm 0.299$ ), but for each time point, the difference was not statistically significant (all  $P > 0.05$ ). VEGF mRNA expression increased to the maximum at 3 days after photocoagulation ( $2.301 \pm 0.378$ ), which had significantly difference compared with other time points (all  $P < 0.05$ ). At 14

FGF mRNA 光凝后 1 d ( $1.578 \pm 0.299$ ) 增高最明显,但与其他时间点比较差异均无统计学意义 (均为  $P > 0.05$ ); 光凝后 3 d VEGF mRNA ( $2.301 \pm 0.378$ ) 表达最高,与其他时间点比较差异均有统计学意义 (均为  $P < 0.05$ )。光凝后 14 d, 3 种细胞因子的升高幅度相近 ( $1.283 \pm 0.310$ 、 $1.662 \pm 0.409$ 、 $1.310 \pm 0.184$ )。结论 微脉冲 810 nm 激光阈值下光凝可刺激正常视网膜 RPE 细胞协调表达分泌 3 种细胞因子,且对视网膜组织结构无损伤。

[眼科新进展, 2014, 34 (1): 5-9]

自从眼底激光器问世,激光治疗已成为众多眼底病的主要治疗方法,包括视网膜血管性疾病、视网膜裂孔、眼内肿瘤以及青光眼等,尤其对于视网膜血管性疾病,眼底激光治疗是目前最主要的方法之一。传统激光主要通过激光的热损伤作用达到治疗的目的,包括破坏视网膜组织、改善残余视网膜的供养状态、改变视网膜内血管活性因子的产生等<sup>[1-2]</sup>。但是这种治疗为强激光治疗,会引起医源性视网膜损伤,限制了激光在黄斑区疾病的应用<sup>[3]</sup>。近年来,很多学者提出阈值下光凝,即光凝所采用的激光能量处于损伤阈值(细胞失活)水平以下,在达到治疗效果的同时将视网膜损伤降到最小。810 nm 激光穿透性较强,主要作用于视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)层,采用微脉冲模式,调整合适的参数可进行阈值下光凝。目前研究表明,阈值下微脉冲 810 nm 半导体激光可成功治疗糖尿病黄斑水肿<sup>[4-5]</sup>、中心性浆液性脉络膜视网膜病变<sup>[6-7]</sup>等,但治疗机制仍未完全明确。目前推测,阈值下微脉冲 810 nm 激光可选择性作用于视网膜 RPE 层,通过光生物调制效应刺激 RPE 再生,增强其吞噬功能,并促进分泌各种血管活性因子<sup>[8,9]</sup>,如血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, b-FGF)、色素上皮源性因子(pigment epithelium-derived factor, PEDF)等,使促血管生长因子与抗血管生长因子达到新的平衡,抑制新生血管的形成,改善视网膜屏障功能,达到治疗眼底血管性疾病的目<sup>[10]</sup>。本研究我们观察微脉冲 810 nm 激光阈值下光凝对色素兔视网膜形态结构的影响以及激光后 RPE 细胞表达分泌 VEGF、PEDF、b-FGF 的变化,进一步明确阈值下激光治疗的作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** 健康青紫蓝兔 12 只 24 眼,体重 2.5 ~ 3.0 kg,雌雄不限,由广州军区武汉总医院动物实验中心提供,实验前双眼前节及眼底检查均正常。

**1.1.2 主要仪器与试剂** 810 nm 半导体激光器(IRIDEX 公司)、眼底荧光造影仪(Heidelberg 公司);小鼠抗兔 VEGF 单克隆抗体(Abcam 公司)、小鼠抗人 PEDF 单克隆抗体(Abcam 公司)、小鼠抗人 b-FGF 单克隆抗体(Abcam 公司)、荧光(Cy3)标记羊抗小鼠 IgG(武汉博士德生物工程有限公司)、抗荧光淬灭封片剂(Southernbiotech 公司)、Trizol 液(In-

vitrogen 公司)、cDNA 反转录合成试剂盒(Fermentas 公司)、SYBR Green 荧光定量 PCR 试剂盒(Fermentas 公司)。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 动物分组、激光造模、眼底荧光血管造影检查** 12 只(24 眼)青紫蓝兔随机分为两组:实验组 8 只(16 眼),对照组 4 只(8 眼)。100 g · L<sup>-1</sup>水合氯醛 3.5 mL · kg<sup>-1</sup>腹腔注射麻醉,复方托吡卡胺眼液滴眼散瞳,盐酸奥布卡因眼液滴眼行表面麻醉。实验组 16 眼在眼前放置全视网膜镜,经裂隙灯用 810 nm 半导体激光,参照 Sanislo 等<sup>[11]</sup>微脉冲激光对兔眼视网膜形态学阈能量、组织学阈能量及阈下能量的比值关系和阈值下微脉冲半导体激光治疗糖尿病黄斑水肿的相关方法<sup>[12-13]</sup>确定激光参数:功率 400 mW,光斑 200 μm,时间(每次发射激光的总时间)200 ms,负载系数 10%,避开视盘及有髓神经纤维,距离视盘垂直距离 1 PD 处上下方行视网膜光凝,每眼 500 点。对照组 8 眼不做激光光凝。激光光凝后 1 d、3 d、7 d、14 d 麻醉后行眼底荧光血管造影(fluorescein angiography, FFA)检查。随后深麻醉处死,摘取眼球,进行下一步实验操作。对照组每个时间点分别选取一只兔子进行实验组同样的操作。

**1.2.2 视网膜组织切片 HE 染色** 每个时间点各摘取兔右眼球,40 g · L<sup>-1</sup>多聚甲醛固定,酒精梯度脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,切片厚 4 μm,脱蜡,脱水,苏木素-伊红(HE)染色,中性树胶封片,显微镜下观察视网膜组织结构改变,采集分析图像。

**1.2.3 视网膜组织切片免疫荧光检测 VEGF、PEDF 和 b-FGF 表达** 视网膜组织切片脱蜡,抗原修复,山羊血清封闭抗原,分别滴加一抗过夜,即小鼠抗兔 VEGF 单克隆抗体(1 : 50)、小鼠抗人 PEDF 单克隆抗体(1 : 100)、小鼠抗人 b-FGF 单克隆抗体(1 : 300),在暗处滴加荧光(Cy3)标记羊抗小鼠 IgG,核复染,封片,荧光显微镜观察采集图像。

**1.2.4 荧光定量 RT-PCR 检测视网膜 VEGF、PEDF 和 b-FGF 的 mRNA 表达** 采用 Trizol 一步法提取总 RNA,紫外分光光度计检测 RNA 的纯度与浓度。按照 M-MLV 逆转录酶试剂盒说明书进行逆转录反应合成第一链 cDNA。按照 SYBR Green 荧光染料试剂盒说明书建立 20 μL 反应体系,用 ABI7900 型荧光定量 PCR 仪进行扩增反应。PCR 热循环数:50 °C 2 min,95 °C 10 min 循环 1 次,接着变性 95 °C 30 s,退火和延伸 60 °C 30 s,循环 40 次。所用引物序列:VEGF 上游引物 5'-CTACCTCCACCATGC-CAAGT-3',下游引物 5'-GCACTCCAGGCTTTCAT-

CAT-3'; PEDF 上游引物 5'-ATCACAGGCAAGC-CCATCAA-3', 下游引物 5'-GCTGGTTCAGGTGG-TAGTCC-3'; b-FGF 上游引物 5'-GTGCAAACCGT-TACCTTGCT-3', 下游引物 5'-ACTGCCAGT-TCGTTTCAGT-3'; 内参  $\beta$ -actin 上游引物 5'-AGT-GCGACGTGGACATCCG-3', 下游引物 5'-TG-GCTCTAACAGTCCGCCTAG-3'。每个样本分别重复 3 次, 以提高实验的重复性和可信度。目标 mRNA 的相对含量用相对 Ct 值法 ( $\Delta\Delta Ct$ )。

**1.3 统计学处理** 所有数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 ANOVA 和 LSD-*t* 检验。应用 SPSS 18.0 统计软件处理。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 光凝前后 FFA 检查结果** 光凝前后, FFA 检查无明显的荧光素渗漏, 光凝后即刻可见不明显的激光斑样透见荧光, 光凝后 14 d 透见荧光减弱 (图 1)。

**2.2 光凝前后视网膜组织结构变化** 光镜下, 正常色素兔视网膜层次结构清晰完整, RPE 层连续规则。光凝后实验组兔视网膜各层结构完整, 但光凝后 1 d, 视网膜 RPE 层局灶性小隆起、欠规整; 光凝后 3 d RPE 层仍欠规整, 局灶性小隆起较前好转; 光凝后 14 d 视网膜各层结构恢复正常 (图 2)。

**Figure 1** FFA results of rabbit's retina before and after photocoagulation. A: FFA before photocoagulation; B: FFA after photocoagulation instantly; C: FFA at 14 days after photocoagulation 光凝前后兔眼视网膜 FFA 检查结果。A: 光凝前 FFA; B: 光凝后即刻 FFA; C: 光凝后 14 d FFA

**Figure 2** Changes of retinal tissue of rabbits (HE,  $\times 400$ ). A: One day after photocoagulation; B: Three days after photocoagulation; C: Seven days after photocoagulation; D: Fourteen days after photocoagulation 实验组兔视网膜组织学改变 (HE,  $\times 400$ )。A: 光凝后 1 d; B: 光凝后 3 d; C: 光凝后 7 d; D: 光凝后 14 d

**2.3 光凝前后视网膜内 VEGF、PEDF、b-FGF 的表达** 对照组 VEGF 在神经纤维层 (nerve fiber layer, NFL)、节细胞层 (ganglion cell layer, GC)、内丛状层 (inner plexiform layer, IPL)、内核层 (inner nuclear layer, INL)、外丛状层 (outer plexiform layer, OPL)、视锥视杆细胞层 (rods or cones cell layer, RC)、RPE 层表达; 实验组光凝后 VEGF 在 RC 及 RPE 层表达明显增强, 且光凝后 3 d 表达最强, 以后逐渐减弱, 光凝后 14 d 基本恢复正常 (图 3)。对照组 PEDF 在 NFL、GC、IPL、INL、RPE 层表达; 实验组光凝后 PEDF 在 RC 及 RPE 层表达明显增强, 光凝后 1 d 表达最强, 3 d 次之, 以后逐渐减弱, 但光凝后 14 d 仍较激光光凝前表达增强 (图 4)。对照组 b-FGF 在 RC、RPE 层表达; 实验组光凝后 b-FGF 在 NFL、GC 也有表达,

且光凝后 1 d 表达更强, 此后逐渐减弱, 光凝后 14 d 基本恢复正常 (图 5)。

**Figure 3** Expression of VEGF in each retinal layer before and after photocoagulation. A: Expression of VEGF in NFL, GC, IPL, INL, OPL, RC and RPE layers in control group; B: Expression of VEGF in RC and RPE layers enhanced obviously at 3 days after photocoagulation in experimental group 光凝前后 VEGF 在视网膜各层的表达。A: 对照组 VEGF 在 NFL、GC、IPL、INL、OPL、RC、RPE 层表达; B: 实验组光凝 3 d 后 VEGF 在 RC 及 RPE 层表达明显增强

**Figure 4** Expression of PEDF in retina before and after photocoagulation. A: Expression of PEDF in control group; B: Expression of PEDF at 1 day after photocoagulation in experimental group; C: Expression of PEDF at 3 days after photocoagulation in experimental group 光凝前后 PEDF 在视网膜的表达。A: 对照组 PEDF 表达; B: 实验组光凝后 1 d PEDF 表达; C: 实验组光凝后 3 d PEDF 表达 ( $\times 200$ )

**Figure 5** Expression of b-FGF in each retinal layer before and after photocoagulation. A: Expression of b-FGF in RC and RPE layers in control group; B: Expression of b-FGF in NFL and GC layers at 1 day after photocoagulation in experimental group; C: Expression of b-FGF at 7 days after photocoagulation in experimental group 光凝前后 b-FGF 在视网膜各层的表达。A: 对照组 b-FGF 在 RC、RPE 层表达; B: 实验组光凝后 1 d b-FGF 在 NFL、GC 也有表达; C: 实验组光凝后 7 d b-FGF 表达

**2.4 光凝后 VEGF、PEDF 和 b-FGF 的 mRNA 表达** 微脉冲激光光凝后视网膜组织中 VEGF、PEDF 和 b-FGF mRNA 表达均增多,其中 VEGF mRNA 激光后 3 d 表达最强,与其他时间点比较差异均有统计学意义(均为  $P < 0.05$ ),激光后 7 d 及 14 d 表达逐渐减弱; PEDF mRNA 光凝后 1 d 表达最强,3 d 次之,与其他时间点比较差异均有统计学意义(均为  $P < 0.05$ ),此后表达逐渐减弱; b-FGF mRNA 光凝后表达增强,但各个时间点统计学差异不显著(均为  $P > 0.05$ )。光凝后 14 d 3 种细胞因子的升高幅度相近(表 1)。

**表 1 光凝后 VEGF mRNA、PEDF mRNA 和 b-FGF mRNA 不同时间点的表达变化**

**Table 1 Expression of VEGF, PEDF, b-FGF mRNA at different time points after laser photocoagulation**

Time	VEGF mRNA	PEDF mRNA	b-FGF mRNA
1 day	1.520 $\pm$ 0.397	3.748 $\pm$ 0.890	1.578 $\pm$ 0.299
3 days	2.301 $\pm$ 0.378	2.978 $\pm$ 0.234	1.240 $\pm$ 0.128
7 days	1.567 $\pm$ 0.186	2.254 $\pm$ 0.280	1.263 $\pm$ 0.041
14 days	1.283 $\pm$ 0.310	1.662 $\pm$ 0.409	1.310 $\pm$ 0.184

### 3 讨论

新生血管的形成是很多眼底病共同的病理改变,如湿性年龄相关性黄斑变性、病理性近视、增殖期糖尿病视网膜病变等,它是机体对缺血、缺氧及炎症等刺激的一种适应性反应,但极易造成出血、渗出及过度增生等病理改变,损伤眼部结构,引起视功能的严重障碍甚至致盲。大量研究表明新生血管形成

的直接原因是促血管生长因子与抗血管生长因子之间的平衡失调<sup>[10,14-15]</sup>。其中 VEGF 和 b-FGF 在促血管生长因子中作用显著,而 PEDF 在抗血管生长因子中作用显著。在体内 RPE 有多种生理功能,包括遮光、构成视网膜-脉络膜屏障、物质转运、视黄醛的转运存储、吞噬降解脱落的感光细胞外节、清除氧自由基以及合成多种细胞因子等<sup>[16]</sup>。正常生理状态下,体内的 RPE 相对静止,无增殖现象,但是受到炎症、理化因素及光化学因素的刺激将发生增殖,并分泌多种细胞因子,如 VEGF、PEDF 和 b-FGF 等<sup>[10,17]</sup>。通过调整合适的激光参数,可使阈值下微脉冲 810 nm 激光主要作用于 RPE 层,对内层神经视网膜和外层脉络膜的影响很小。本研究主要通过观察阈值下微脉冲激光光凝前后 VEGF、PEDF、b-FGF 的变化,探讨阈值下激光对视网膜 RPE 细胞的光生物学效应,进一步为视网膜新生血管疾病的治疗提供新的思路。

VEGF 可诱导内皮细胞的增殖、促进细胞分裂,抑制细胞凋亡,增加血管通透性<sup>[18]</sup>,具有很强的促血管生长作用。b-FGF 属于肝素结合生长因子家族成员,具有比 VEGF 更强的促内皮细胞分裂的作用<sup>[19-20]</sup>,然而, Ozaki 等<sup>[21]</sup>研究表明 b-FGF 是发生视网膜新生血管的非必需非充分因素。Wong 等<sup>[22]</sup>实验结果表明,兔眼玻璃体内同时注射 VEGF 和 b-FGF 可使视网膜新生血管长得更快,渗漏更明显,而 VEGF 与 b-FGF 单独作用均不会出现这种效果。此外, b-FGF 可诱导 Müller 胶质细胞分泌 VEGF,并促

进细胞增殖<sup>[23]</sup>。以上研究说明,b-FGF对VEGF有协同刺激作用。本研究显示光凝后1 d b-FGF升高最明显,VEGF在光凝后3 d升高最明显,这与Hu等<sup>[14]</sup>的研究结果一致,推测在视网膜新生血管的形成过程中,b-FGF可能对VEGF功能的发挥起着启动和允许作用。PEDF具有诱导培养的Y79视网膜母细胞瘤细胞神经分化作用。后来的研究表明,PEDF具有神经保护<sup>[24]</sup>和很强的抑制新生血管生长的作用<sup>[25-26]</sup>。

本研究RT-PCR结果显示,光凝后1 d、3 d、7 d、14 d,三种细胞因子mRNA表达均升高,其中PEDF、b-FGF光凝后1 d升高最显著,VEGF光凝后3 d升高最显著,这与Hu等<sup>[14]</sup>及Ogata等<sup>[8]</sup>的实验结果一致。光凝后14 d三种因子的升高幅度相似,说明阈值下激光可刺激视网膜RPE细胞分泌细胞因子,并保持促血管生长因子与抗血管生长因子的内在平衡,可能起到预防或治疗视网膜新生血管的作用。本研究FFA检查未见血管荧光素渗漏,仅见不明显的激光斑样透见荧光,视网膜激光部位病理切片HE染色视网膜各层结构未见明显损伤,说明采用本实验激光参数进行阈值下光凝安全可行,并可以通过及时荧光造影观察定位激光作用部位。

本研究初步证实了阈值下微脉冲810 nm激光对视网膜RPE层的生物调制效应,促进其分泌细胞因子,并调节各种因子的内在平衡,发挥预防或治疗视网膜新生血管作用的同时避免造成医源性视网膜损伤,逆转了对传统激光破坏性治疗视网膜血管性疾病的观点,为黄斑部疾病尤其是血管性疾病的治

## 参考文献

- 1 Lange CA, Stavrakas P, Luhmann UF, Silva DJ, Ali RR, Gregor ZJ, et al. Intraocular oxygen distribution in advanced proliferative diabetic retinopathy [J]. *Am J Ophthalmol*, 2011, 152 (3): 406-412.
- 2 Blumenkranz MS. Optimal current and future treatments for diabetic macular oedema [J]. *Eye*, 2010, 24 (3): 428-434.
- 3 Shah AM, Bressler NM, Jampol LM. Does laser still have a role in the management of retinal vascular and neovascular disease [J]? *Am J Ophthalmol*, 2011, 152 (3): 332-339.
- 4 Laursen ML, Moeller F, Sander B, Sjoelie AK. Subthreshold micropulse diode laser treatment in diabetic macular oedema [J]. *Br J Ophthalmol*, 2004, 88 (9): 1173-1179.
- 5 Luttrull JK, Dorin G. Subthreshold diode micropulse laser photocoagulation (SDM) as invisible retinal phototherapy for diabetic macular edema: a review [J]. *Curr diabetes Rev*, 2012, 8 (4): 274-284.
- 6 Ricci F, Missiroli F, Regine F, Grossi M, Dorin G. Indocyanine green enhanced subthreshold diode-laser micropulse photocoagulation treatment of chronic central serous chorioretinopathy [J]. *Clin Exp Ophthalmol*, 2009, 247 (5): 597-607.
- 7 Gupta B, Elagouz M, McHugh D, Chong V, Sivaprasad S. Micropulse diode laser photocoagulation for central serous chorio-retinopathy [J]. *Clin Exp Ophthalmol*, 2009, 37 (8): 801-805.
- 8 Ogata N, Tombran-Tink J, Jo N, Mrazek D, Matsumura M. Upregulation of pigment epithelium-derived factor after laser photocoagulation [J]. *Am J Ophthalmol*, 2001, 132 (3): 427-429.
- 9 Yu AK, Merrill KD, Truong SN, Forward KM, Morse LS, Telander DG. The comparative histologic effects of subthreshold 532-and 810-nm diode micropulse laser on the retina [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2013, 54 (3): 2216-2224.
- 10 Schlingemann RO. Role of growth factors and the wound healing response in age-related macular degeneration [J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2004, 242 (1): 91-101.
- 11 Sanislo K, Kelsoe D, Blumenkranz Z. The selective effect of micropulse diode laser upon the retina [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1996, 37 (3): S779.
- 12 Takatsuna Y, Yamamoto S, Nakamura Y, Tatsumi T, Arai M, Mitamura Y. Long-term therapeutic efficacy of the subthreshold micropulse diode laser photocoagulation for diabetic macular edema [J]. *Jpn J Ophthalmol*, 2011, 55 (4): 365-369.
- 13 Nakamura Y, Mitamura Y, Ogata K, Arai M, Takatsuna Y, Yamamoto S. Functional and morphological changes of macula after subthreshold micropulse diode laser photocoagulation for diabetic macular oedema [J]. *Eye*, 2010, 24 (5): 784-788.
- 14 Hu W, Criswell MH, Fong SL, Temm CJ, Rajashekhar G, Cornell TL, et al. Differences in the temporal expression of regulatory growth factors during choroidal neovascular development [J]. *Exp Eye Res*, 2009, 88 (1): 79-91.
- 15 张忠红, 栾洁. 眼内新生血管与细胞因子 [J]. 国际眼科杂志, 2006, 6 (1): 158-163.
- 16 张承芬. 眼底病学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1998: 1-3.
- 17 Perraud AL, Takanishi CL, Shen B, Kang S, Smith MK, Schmitz C, et al. Accumulation of free ADP-ribose from mitochondria mediates oxidative stress-induced gating of TRPM2 cation channels [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280 (7): 6138-6148.
- 18 牛彤彤, 徐艳春. VEGF与眼内新生血管 [J]. 眼科新进展, 2008, 28 (5): 394-398.
- 19 Zubilewicz A, Hecquet C, Jeanny JC, Soubrane G, Courtois Y, Mascarelli F. Two distinct signalling pathways are involved in FGF2-stimulated proliferation of choriocapillary endothelial cells: a comparative study with VEGF [J]. *Oncogene*, 2001, 20 (12): 1403-1413.
- 20 Wang YS, Eichler W, Friedrichs U, Yafai Y, Hoffmann S, Yasukawa T, et al. Impact of endostatin on bFGF-induced proliferation, migration, and matrix metalloproteinase-2 expression/secretion of bovine choroidal endothelial cells [J]. *Curr Eye Res*, 2005, 30 (6): 479-489.
- 21 Ozaki H, Okamoto N, Ortega S, Chang M, Ozaki K, Sadda S, et al. Basic fibroblast growth factor is neither necessary nor sufficient for the development of retinal neovascularization [J]. *Am J Pathol*, 1998, 153 (3): 757-765.
- 22 Wong CG, Rich KA, Liaw LH, Hsu HT, Berns MW. Intravitreal VEGF and bFGF produce florid retinal neovascularization and hemorrhage in the rabbit [J]. *Curr Eye Res*, 2001, 22 (2): 140-147.
- 23 Rosenthal R, Malek G, Salomon N, Peill-Meininghaus M, Coeppicus L, Wohlleben H, et al. The fibroblast growth factor receptors, FGFR-1 and FGFR-2, mediate two independent signalling pathways in human retinal pigment epithelial cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 337 (1): 241-247.
- 24 Houenou LJ, D'Costa AP, Li L, Turgeon VL, Enyadike C, Alberdi E, et al. Pigment epithelium-derived factor promotes the survival and differentiation of developing spinal motor neurons [J]. *Science*, 1999, 284 (3): 506-514.
- 25 Stellmach V, Crawford SE, Zhou W, Bouck N. Prevention of ischemia-induced retinopathy by the natural ocular antiangiogenic agent pigment epithelium-derived factor [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98 (5): 2593-2597.
- 26 金姬, 关明. 色素上皮细胞衍生因子: 一种高效的新生血管抑制因子 [J]. 眼科新进展, 2002, 22 (1): 68-70.