

引文格式:周琼,肖昂.雷珠单抗对糖尿病大鼠早期视网膜组织结构的影响[J].眼科新进展,2015,35(9):827-831.
doi:10.13389/j.cnki.rao.2015.0226

【实验研究】

雷珠单抗对糖尿病大鼠早期视网膜组织结构的影响

周琼 肖昂

作者简介:周琼,女,1962年8月出生,江西新余人,硕士。研究方向:眼底病。联系电话:13870063999; E-mail:qiongz-ms@126.com

About ZHOU Qiong:Female,born in August,1962. Tel:13870063999; E-mail:qiongz-ms@126.com

收稿日期:2014-11-10
修回日期:2014-12-26
本文编辑:盛丽娜
作者单位:330006 江西省南昌市,南昌大学第一附属医院眼科

Received date:Nov 10,2014
Accepted date:Dec 26,2014
From the Department of Ophthalmology,the First Affiliated Hospital of Nanchang University,Nanchang 330006,Jiangxi Province,China

Effects of ranibizumab on retinal structure at early stage of diabetic rats
ZHOU Qiong,XIAO Ang
【Key words】diabetic retinopathy;ranibizumab;vascular endothelial growth factor;type IV collagen;retinal ganglion cell
【Abstract】Objective To investigate the effects of ranibizumab on retinal structure at early stage of diabetic rats. Methods The diabetes models were established in 40 SD rats,and randomly divided into four groups,10 cases in each group. The rats in group A were given the right intravitreal injection with 1 μL ranibizumab in 2 weeks after modeling,group B received intravitreal injection with 1 μL ranibizumab in 4 weeks after modeling,group a received sham injections with 1 μL PBS in 2 weeks after modeling,group b received sham injections with 1 μL PBS in 4 weeks after modeling,while 10 normal rats were assigned as control group. The right rat retinas were obtained for flat preparation at 6 weeks and 8 weeks after modeling. Fluorescence imaging techniques for flat retinal preparations and retinal histopathological observation were used. Results At 6 weeks after modeling,compared with group a(10.53±0.88) or group b (11.53±0.96),there were significantly differences of retinal ganglion cells (RGC) in group A (20.73±0.93) and group B (19.53±0.96) (all P<0.01),and there were significant differences of IV+collagen strands in group B (6.87±0.96) compared with group a (14.73±1.00) or group b (14.80±0.91) (all P<0.01). At 8 weeks after modeling,RGC number in group A(19.80±1.01) and group B (19.47±0.99) was considerably different from group a(6.67±0.90) or group b (5.80±0.94) (all P<0.01),and it was considerably different of IV+collagen strands in group B(2.20±0.77) compared with group a (14.33±0.98) or group b (15.67±0.90) (all P<0.01). In addition,there was a significant difference in the RGC level between group A and B at 6 weeks after modeling(P<0.01),but not at 8 weeks,and IV+collagen strands had not been found in group A during 8 weeks of observation period. Conclusion The right intravitreal injection of 1 μL ranibizumab can delay the development of early retinopathy of diabetic rats,moreover the effects of drug given at 2 weeks after modeling are better than that at 4 weeks.

【关键词】 糖尿病视网膜病变;雷珠单抗;血管内皮生长因子;IV型胶原;视网膜神经节细胞

【摘要】 目的 探讨雷珠单抗对糖尿病大鼠早期视网膜组织结构的影响。方法 40只SD大鼠建立糖尿病模型后随机分为4组,每组各10只,其中A组造模后第2周右眼玻璃体内注射雷珠单抗1 μL,B组造模后第4周右眼玻璃体内注射雷珠单抗1 μL,a组造模后第2周右眼玻璃体内注射无菌PBS缓冲液1 μL,b组造模后第4周右眼玻璃体内注射无菌PBS缓冲液1 μL。另10只正常SD大鼠作为空白对照组。于第6周和第8周分别取各组大鼠右视网膜行苏木精-伊红染色和免疫荧光共聚焦检查。结果 造模后第6周,A组和B组的神经节细胞数量分别为(20.73±0.93)个和(19.53±0.96)个,与a组的(10.53±0.88)个和b组的(11.53±0.96)个相比,差异均有显著统计学意义(均为P<0.01),且B组IV型阳性(IV+型)胶原丝条数量为(6.87±0.96)条,与a组的(14.73±1.00)条和b组的(14.80±0.91)条相比,差异均有显著统计学意义(均为P<0.01)。造模后第8周,A组和B组神经节细胞数量分别为(19.80±1.01)个、(19.47±0.99)个,与a组的(6.67±0.90)个和b组的(5.80±0.94)个相比,差异均有显著统计学意义(均为P<0.01),且B组IV+型胶原丝条数量为(2.20±0.77)条,与a组的(14.33±0.98)条和b组的(15.67±0.90)条相比,差异均有显著统计学意义(均为P<0.01)。A组在第6周时的神经节细胞数量与同时时间点的B组有明显差异(P<0.01),而在第8周时差异无统计学意义(P>0.05),且A组在8周观察期内未观察到IV+型胶原丝条。结论 右眼单次玻璃体内注射雷珠单抗1 μL,可延缓糖尿病大鼠早期视网膜组织结构病变的发生发展,且造模后第2周用药的作用效果优于第4周。

12 姜明月,于敏,李文,黄国伟. 叶酸对 N2a-APP695 细胞 Tau 蛋白及其 Ser396 位点磷酸化的调控[J]. 天津医科大学学报,2013,19(5):365-367.

13 欧阳科,袁援生. 大鼠高血压模型中热休克蛋白 27 抗体及视网膜神经节细胞凋亡的研究[J]. 中华实验眼科杂志,2012,30(8):721-724.

14 陈莲,石晶明. 青光眼患者视网膜神经节细胞凋亡机制的研究进展[J]. 眼科新进展,2013,33(4):384-388.

15 仇福成,付英,韩瑞,刘惠苗,李冬,刘俊骞,等. 神经变性疾病相关睡眠障碍的机制及药物治疗进展[J]. 中华医学杂志,2014,1(40):3193-3195.

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是一种慢性进展性、以视力损害和微血管异常为主的疾病,是全球性致盲和导致发展中国家劳动人口法定盲的主要原因^[1]。DR当前影响着世界上1.5亿人口的生活质量,并且世界卫生组织预计到2025年,该病人口数将达到3亿^[2]。在生理和病理条件下,血管内皮生长因子A(vascular endothelial growth factor A, VEGF-A)在血管生成中表现出中枢性调节作用^[3]。VEGF-A主要在增加血管渗漏、促使新生血管形成和病理性内皮细胞增殖中发挥作用。Papadopoulos等^[4]研究表明,抑制VEGF-A的活性可阻止多种眼病中病理性新生血管的形成和血管渗漏的发生。雷珠单抗(Ranibizumab)对人VEGF-A的所有亚型都具有特异性和亲和力,在抑制新生血管形成中发挥重要作用^[5]。在治疗糖尿病性黄斑水肿和新生血管性年龄相关性黄斑变性中,雷珠单抗的耐受性、安全性和疗效等得到了肯定^[6-10]。但是,一旦发展到视网膜新生血管形成阶段,它所致眼部损害是不可逆转的^[11]。因此,在新生血管未形成的早期阶段进行预防和阻止视网膜新生血管形成显得更为重要,而不是在视网膜新生血管形成后的积极治疗。本课题通过右眼单次玻璃体内注射雷珠单抗1 μL ,探讨雷珠单抗对糖尿病大鼠早期视网膜组织结构的影响,进而明确雷珠单抗是否可以延缓糖尿病大鼠早期视网膜组织结构病变的发生发展。

1 材料与方法

1.1 实验动物 健康雄性8周龄SD大鼠50只,体重(220 \pm 20) g,购于南昌大学实验动物科学部。将其饲养在通风良好、室内温度(23 \pm 2) $^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度50%、光线充足(白昼12 h/夜晚12 h)、可自由饮食和饮水的环境中。实验通过南昌大学实验动物伦理委员会批准。

1.2 糖尿病大鼠模型的制备和实验分组 随机取40只SD大鼠按60 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 体重腹腔注射链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)(Sigma, Missouri, USA),建立糖尿病大鼠模型,造模失败者随即予以补充。选取右眼为实验眼。40只糖尿病大鼠随机分为4组,每组各10只,其中A组造模后第2周右眼玻璃体内注射雷珠单抗1 μL ^[12],B组造模后第4周右眼玻璃体内注射雷珠单抗1 μL ,a组造模后第2周右眼玻璃体内注射无菌PBS缓冲液1 μL ,b组造模后第4周右眼玻璃体内注射无菌PBS缓冲液1 μL 。另10只正常SD大鼠作为空白对照组,正常饲养,不作任何处理。

1.3 玻璃体内注射 腹腔注射戊巴比妥钠(40 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 体重)麻醉大鼠,术前大鼠右眼滴复方托吡卡胺(Mydrin-P[®]; Santen, Osaka, 日本)眼液散瞳,爱尔卡因眼液行局部麻醉。角膜反射消失后,于眼球距角巩膜缘部0.5 mm处用5 μL 微量进样器(Hamilton, 瑞士)行玻璃体内注射。A组和B组右

眼玻璃体内注射雷珠单抗(Schaffhauserstrasse, 瑞士)1 μL ,a组和b组右眼玻璃体内注射无菌PBS缓冲液1 μL 。若大鼠右眼出现晶状体损伤、视网膜损伤或眼内炎等将从实验中剔除,并予以相应补充。

1.4 取材 各组大鼠分别于造模后第6周($n=5$)和第8周($n=5$)取右眼视网膜行免疫荧光共聚焦检查和苏木精-伊红染色(HE染色)。为了标记血管系统,分别于造模后第6周和第8周大鼠尾静脉注射番茄凝集素(lycopersicon esculentum lectin)^[13],随即通过大鼠尾静脉注射500 μL 异硫氰酸荧光素(FITC)(1 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$; Sigma, Missouri, 美国)结合番茄凝集素(番茄凝集素可特异性结合于内皮细胞表面^[14],并且通过有效的血液循环标记所有血管)。注射后10 min,在80~120 mmHg(1 kPa = 7.5 mmHg)压力下依次通过左心室行心脏灌注无菌生理盐水10 min和40 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 多聚甲醛溶液5~10 min。于解剖显微镜下分离出大鼠右眼视网膜。

1.5 视网膜HE染色 每个视网膜样本取1/3的视网膜组织于40 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 多聚甲醛中固定2 h,以5 μm 厚度进行切片,行HE染色后置于光学显微镜(ZEISS, Willkommen, 德国)下进行观察和拍片,400倍目镜下每一标本随机取3个部位,计数视网膜神经节细胞数量,取其算术平均数代表该样本平均神经节细胞个数。

1.6 视网膜平片免疫荧光成像 将每个视网膜样本余下的2/3视网膜组织置于40 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 多聚甲醛中固定1 h,再将视网膜组织置于pH 7.2 PBS缓冲液中漂洗3次(第1次10 min,第2次和第3次均为5 min)。然后通过免疫荧光技术观察视网膜平片中血管基底膜的变化。在进行免疫固定前,常温下将视网膜平片置于含有体积分数0.5% Triton X-100的牛血清蛋白液中阻断30 min。接着于常温下将视网膜平片置于含有兔多克隆抗IV型胶原抗体(1:300; Abcam, 英国)的孵育液中进行孵育过夜。再将视网膜平片置于含有FITC标记-羊抗兔IgG抗体进行二抗处理。处理后,常温下将视网膜平片置于体积分数0.5% Triton X-100缓冲液中漂洗3次(第1次10 min,第2次和第3次均为5 min)。将20 μL 抗荧光衰减剂(BOSTER, 武汉)滴于视网膜上进行封片,在ZEISS LSM-710共聚焦显微镜(ZEISS, Willkommen, 德国)下观察和拍片,100倍目镜下每一标本随机取3个部位,计数IV型阳性(IV+型)胶原丝条数量,取其算术平均数代表该样本平均IV+型胶原丝条数量。

1.7 统计学分析 采用SPSS 19.0统计软件对所得数据进行统计学分析,多样本均数间行单因素方差分析,组间数据行独立样本 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HE染色结果 造模后第6周,a组、b组、A组

和 B 组的神经节细胞数量分别为(10.53 ± 0.88)个、(11.53 ± 0.96)个、(20.73 ± 0.93)个和(19.53 ± 0.96)个,各组与空白对照组的(28.87 ± 0.88)个相比,差异均有显著统计学意义(均为 $P < 0.01$)。造模后第 8 周,a 组和 b 组神经节细胞数量分别为(6.67 ± 0.90)个、(5.80 ± 0.94)个,与第 6 周相比明显降低,差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$);A 组和 B 组神经节细胞数量分别为(19.80 ± 1.01)个、(19.47 ± 0.99)个,与第 6 周相比差异均无统计学意义(均为 $P > 0.05$)。A 组和 B 组在第 6 周和第 8 周时的神经节细胞数量与同时时间点的 a 组、b 组相比差异均有显著统计学意义(均为 $P < 0.01$);A 组在第 6 周时的神经节细胞数量与同时时间点的 B 组有明显差异($P < 0.01$),而在第 8 周时差异无统计学意义($P > 0.05$)。a 组和 b 组大鼠分别于第 6 周和第 8 周在神经节细胞层与内丛状层和内核层与外丛状层之间出现新生血管;但是在 A 组和 B 组中,造模

后第 6 周和第 8 周均未观察到新生血管。

2.2 免疫荧光成像结果

空白对照组各时间点均未见 IV + 型胶原丝条。a 组和 b 组大鼠在造模后第 6 周,视网膜血管之间交联了大量 IV + 型胶原丝条,数量分别为(14.73 ± 1.00)条、(14.80 ± 0.91)条($P < 0.01$),且观察到视网膜血管渗漏现象;a 组和 b 组大鼠在第 8 周时,视网膜血管之间的 IV + 型胶原丝条数量分别为(14.33 ± 0.98)条、(15.67 ± 0.90)条,与第 6 周时相比差异均无统计学意义(均为 $P > 0.05$),但血管渗漏点增加,并且有新生血管芽形成。造模后第 6 周和第 8 周,A 组大鼠视网膜未观察到 IV + 型胶原丝条、新生血管芽和血管渗漏现象。B 组在第 6 周和第 8 周时,IV + 型胶原丝条数量分别为(6.87 ± 0.96)条、(2.20 ± 0.77)条,与 a 组、b 组相比差异均有显著统计学意义(均为 $P < 0.01$),且未观察到新生血管芽和血管渗漏;B 组大鼠从第 6 - 8 周,IV + 型胶原丝条数量显著减少($P < 0.05$,图 1)。

Figure 1 Immunofluorescence images of each group (×100). a6:Group a at 6 weeks;a8:Group a at 8 weeks;A6:Group A at 6 weeks;A8:Group A at 8 weeks;b6:Group b at 6 weeks;b8:Group b at 8 weeks;B6:Group B at 6 weeks;B8:Group B at 8 weeks. The arrowhead indicated the type IV collagen antibody,the thin arrow indicated the vascular permeability,and the thick arrow showed the vascular buds 各组免疫荧光图(×100)。a6:a 组造模后第 6 周;a8:a 组造模后第 8 周;A6:A 组造模后第 6 周;A8:A 组造模后第 8 周;b6:b 组造模后第 6 周;b8:b 组造模后第 8 周;B6:B 组造模后第 6 周;B8:B 组造模后第 8 周。箭头示 IV + 型胶原丝条,小箭头示血管渗漏,粗箭头示新生血管芽

3 讨论

本课题通过右眼单次玻璃体内注射雷珠单抗 1 μL,探讨雷珠单抗对糖尿病大鼠早期视网膜组织结构的影响。根据 DR 病程可分为两个阶段:非增殖期阶段,特征性改变为血管渗漏,其中在轻度非增殖性 DR 之前可看作 DR 早期;增殖期阶段,其特征为通过各种生长因子引起视网膜血管增生^[15-16]。有研究发现,DR 的形态学变化包括血管基底膜增厚、周细胞丧失、无细胞丝条的增加和血管闭塞,且以血-视网膜屏障破坏为特征引起微血管瘤的形成^[17]。随着 DR 的进展,血管异常,包括等离子体渗漏、微动脉瘤、玻璃体出血、异常微血管的增生(新生血管发生)等发生的频率越来越高。

在我们的研究中,随着糖尿病病程的进展,a 组和 b 组大鼠视网膜神经节细胞分别在造模后第 6 周

和第 8 周显著减少。在一些研究中^[18],神经节细胞在糖尿病病程的第 4 周出现凋亡增加,这种神经元的早期异常也许是源自于神经细胞的丧失。在糖尿病病程的第 4 周,神经节细胞结构的异常是唯一被发现导致神经元功能丧失的主要原因,这与一些研究中的晚期功能缺失是相符合的^[19-20]。有研究表明随着糖尿病的发展,视网膜神经节细胞在第 6 周开始减少^[21-22],且内核层和外核层在第 10 周出现厚度变薄^[22]。尽管细胞减少或者结构异常的分子机制尚不清楚,但普遍研究认为炎症、氧化应激或者晚期糖基化终末产物是导致视网膜病理变化的原因^[22]。

同时,我们发现在病理切片中,a 组和 b 组大鼠在造模后第 6 周和第 8 周时,视网膜神经节细胞层与内丛状层和内核层与外丛状层之间出现新生血管。在造模后第 6 周,a 组和 b 组大鼠视网膜之间交联大量 IV + 型胶原丝条和出现血管渗漏,且在第 8

周时,IV + 型胶原丝条减少、血管渗漏点增加和新生血管芽形成。这些标志着新生血管的发生,将导致视网膜新生血管化。VEGF 可导致血管内皮细胞之间的连接疏松,血管渗透性增加,是目前已知作用最强的促血管生成因子^[9],其具有多种功能,包括促使细胞迁移、增殖和脉管形成等^[23]。其中,VEGF-A 可促进新生血管形成和血管渗漏,已经被认定为是促进视网膜新生血管化的关键因子^[9]。有学者指出糖尿病患者视网膜循环血量的变化先于临床 DR,其中包括功能性充血反应减少,高氧刺激反应能力降低,基础血流量减少,导致视网膜缺血缺氧^[24-25]。在缺血缺氧状态下,通过多种机制,玻璃体内 VEGF 基因的表达水平增高^[26]。Ayalasomayajula 等^[27]研究发现在造模后的第 8 天,糖尿病大鼠玻璃体内 VEGF 含量明显高于正常对照组;在 4 周观察周期内,糖尿病大鼠第 4 周玻璃体内 VEGF 含量最高,明显高于对照组 ($P < 0.01$)^[28]。Schrufner 等^[29]研究结果发现,在 12 周观察期内,糖尿病大鼠第 4 周玻璃体内 VEGF 含量最高,随后出现降低。此外,VEGF 的过度表达将转变或者改变新生血管的发生和提高血管通透性,导致视网膜结构和功能异常^[30]。根据这些研究,新生血管的出现和新生血管芽的生成是合理的,且血管渗漏的增加是病程自然发展的一个过程。有研究表明^[28],视网膜血管早期形态学表现为:在糖尿病进程的第 1 周和第 4 周出现无内皮细胞的番茄凝集素阴性或 IV + 胶原丝条。Zhang 等^[31]指出在糖尿病早期阶段,IV 型胶原丝条与血管退化是有一定关系的。Inai 等^[32]研究表明血管的退化代表着结构异常或者无血流通过的空血管,导致血管发生“鬼影”现象。因此,血管退化中 IV 型胶原的存在是血管基底膜组成的残留物。这表明糖尿病引起的内皮细胞退化和血管基底膜的残留是因血管退化性改变所致。

在本研究中,A 组和 B 组大鼠周边视网膜血管上的 IV 型胶原丝条在 8 周的观察期内明显降低,这几乎和空白对照组相似。此外,A 组和 B 组在第 6 周和第 8 周均未观察到新生血管、血管渗漏和新生血管芽的形成,且神经节细胞的减少量低于 a 组和 b 组。A 组玻璃体内注射雷珠单抗所获得的效果优于 B 组。这表明玻璃体内注射雷珠单抗可以预防视网膜血管退化或损伤,降低神经节细胞的减少量和抑制新生血管的形成,且有效的注药方案为造模后第 2 周单次注射雷珠单抗。

一些促血管生成因子在多种病理性血管生成中过度表达,包括 VEGF 家族中两个成员:VEGF-A 和 PlGF^[33]。雷珠单抗能够特异性结合和中和 VEGF,尤其是 VEGF-A。在造模后的第 2 周和第 4 周,玻璃体内注射雷珠单抗可以下调 VEGF 水平。糖尿病可以上调视网膜上多种炎症介质前体,包括 ICAM-1、VEGF、NF- κ B、iNOS 和 TGF- β ,且局部炎症反应在

DR 的发展中起重要作用^[34-35]。有研究指出^[36],由于炎症过程中包括细胞因子的上调和白细胞浸润,从而使 DR 归类为炎症疾病。炎症反应和白细胞聚集被认为是导致视网膜神经元死亡的重要因素^[37]。此外,IV + 型胶原丝条与在 N-甲基-D-天冬氨酸 (NMDA) 治疗 1 周后 SD 大鼠的血管相似;他们认为血管退化所致 IV + 型胶原丝条增加的原因可能是由于 NMAD 信号通路的异常引起,且神经元细胞在维护血管正常结构和功能中起到重要作用^[38]。在本研究中,雷珠单抗可特异性结合和中和 VEGF,使玻璃体内 VEGF 含量维持在正常水平,抑制 VEGF (尤其是 VEGF-A) 对血管内皮细胞的损伤,从而阻止新生血管的发生和出现血管渗透性增加。因此,新生血管芽和新生血管不能形成,糖基化终末产物、炎症介质前体和白细胞从血管中迁移至视网膜组织结构中的量减少或无,降低糖基化终末产物、炎症因子等对神经元的损伤。本实验 A 组和 B 组的视网膜神经节细胞得到改善,而不是像 a 组或者 b 组随着时间出现持续下降。由于内层视网膜的神经元细胞(如视网膜神经节细胞)通过释放 VEGF^[39] 和营养因子来维护血管的正常结构和功能^[38],且玻璃体内含有正常水平的 VEGF,这可能是促使 A 组不形成 IV + 型胶原丝条和 B 组 IV + 型胶原丝条逐渐减少的原因。造模后第 2 周注药,可使大鼠玻璃体内 VEGF 含量处于正常水平,防止了 VEGF 的过度表达对视网膜血管的损伤,降低了神经节细胞的凋亡等,明显延缓了视网膜组织结构病变的进展;造模后第 4 周,视网膜微血管已产生了损伤和神经节细胞的凋亡,玻璃体内雷珠单抗的注射抑制了 VEGF 的过度表达所致的进一步损害,减慢了视网膜组织结构病变的进展。这使造模后第 2 周注药的作用效果优于第 4 周注药。尽管当前研究只是为现有假设提供了一些线索,但为后续研究的进行提供了重要信息。

总而言之,通过右眼单次玻璃体内注射雷珠单抗 1 μ L,可以预防视网膜血管损伤,降低神经节细胞的减少量和抑制新生血管的形成,延缓糖尿病大鼠早期视网膜组织结构病变发生发展,且造模后第 2 周注药的作用效果优于第 4 周注药。我们建议对雷珠单抗在 DR 发生发展中的早期预防作用进行深入研究。

参考文献

- 1 Baharivand N, Zarghami N, Panahi F, Dokht Ghafari MY, Fard AM, Mohajeri A. Relationship between vitreous and serum vascular endothelial growth factor levels, control of diabetes and microalbuminuria in proliferative diabetic retinopathy [J]. *Clin Ophthalmol*, 2012, 6(1): 185-191.
- 2 Pascolini D, Mariotti SP. Global estimates of visual impairment: 2010 [J]. *Br J Ophthalmol*, 2012, 96(5): 614-618.
- 3 Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor [J]. *Endocr Rev*, 1997, 18(1): 4-25.
- 4 Papadopoulos N, Martin J, Ruan Q, Rafique A, Rosconi MP, Shi E, et al. Binding and neutralization of vascular endothelial growth factor (VEGF) and related ligands by VEGF Trap, ranib-

- izumab and bevacizumab [J]. *Angiogenesis*, 2012, 15 (2) : 171-185.
- 5 Antoszyk AN, Tuomi L, Chung CY, Singh A. Ranibizumab combined with verteporfin photodynamic therapy in neovascular age-related macular degeneration (FOCUS): year 2 results [J]. *Am J Ophthalmol*, 2008, 145 (5) : 862-874.
- 6 Fong AH, Lai TY. Long-term effectiveness of ranibizumab for age-related macular degeneration and diabetic macular edema [J]. *Clin Interv Aging*, 2013, 8 (3) : 467-483.
- 7 Evoy KE, Abel SR. Ranibizumab; the first vascular endothelial growth factor inhibitor approved for the treatment of diabetic macular edema [J]. *Ann Pharmacother*, 2013, 47 (6) : 811-818.
- 8 Brown DM, Kaiser PK, Michels M, Soubrane G, Heier JS, Kim RY, et al. Ranibizumab versus Verteporfin for neovascular age-related macular degeneration [J]. *N Engl J Med*, 2006, 355 (14) : 1432-1444.
- 9 Rosenfeld PJ, Brown DM, Heier JS, Boyer DS, Kaiser PK, Chung CY, et al. Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. [J]. *N Engl J Med*, 2006, 355 (14) : 1419-1431.
- 10 Holz FG, Bandello F, Gillies M, Mitchell P, Osborne A, Sheidow T, et al. Safety of ranibizumab in routine clinical practice; 1-year retrospective pooled analysis of four European neovascular AMD registries within the LUMINOUS programme [J]. *Br J Ophthalmol*, 2013, 97 (9) : 1161-1167.
- 11 Du ZJ, Kamei M, Suzuki M, Tano Y, Wang BR, Hui YN. Coordinated expression of Ets-1, pERK1/2, and VEGF in retina of streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Ophthalmic Res*, 2007, 39 (4) : 224-231.
- 12 Cloutier F, Lawrence M, Goody R, Lamoureux S, Al-Mahmood S, Colin S, et al. Antiangiogenic activity of aganirsin in nonhuman primate and rodent models of retinal neovascular disease after topical administration [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2012, 53 (3) : 1195-1203.
- 13 Ezaki T, Baluk P, Thurston G, La Barbara A, Woo C, McDonald DM. Time course of endothelial cell proliferation and microvascular remodeling in chronic inflammation [J]. *Am J Pathol*, 2001, 158 (6) : 2043-2055.
- 14 Thurston G, Baluk P, Hirata A, McDonald DM. Permeability-related changes revealed at endothelial cell borders in inflamed venules by lectin binding [J]. *Am J Physiol*, 1996, 271 (11) : 2547-2562.
- 15 Shaya FT, Aljawadi M. Diabetic retinopathy [J]. *Clin Ophthalmol*, 2007, 1 (3) : 259-265.
- 16 Chen F, Zhang HQ, Zhu J, Liu KY, Cheng H, Li GL, et al. Puerarin enhances superoxide dismutase activity and inhibits RAGE and VEGF expression in retinas of STZ-induced early diabetic rats [J]. *Asian Pac J Trop Med*, 2012, 5 (11) : 891-896.
- 17 De La Cruz JP, González-Correa JA, Guerrero A, de la Cuesta FS. Pharmacological approach to diabetic retinopathy [J]. *Diabetes Metab Res Rev*, 2004, 20 (2) : 91-113.
- 18 El-Remessy AB, Al-Shabrawey M, Khalifa Y, Tsai NT, Caldwell RB, Liou GI. Neuroprotective and blood-retinal barrier-preserving effects of cannabidiol in experimental diabetes [J]. *Am J Pathol*, 2006, 168 (1) : 235-244.
- 19 Kern TS, Barber AJ. Retinal ganglion cells in diabetes [J]. *J Physiol*, 2008, 586 (18) : 4401-4408.
- 20 Bui BV, Loeliger M, Thomas M, Vingrys AJ, Rees SM, Nguyen CT, et al. Investigating structural and biochemical correlates of ganglion cell dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Exp Eye Res*, 2009, 88 (6) : 1076-1083.
- 21 Martin PM, Roon P, Van Ells TK, Ganapathy V, Smith SB. Death of retinal neurons in streptozotocin-induced diabetic mice [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2004, 45 (9) : 3330-3336.
- 22 Yang Y, Mao D, Chen X, Zhao L, Tian Q, Liu C, et al. Decrease in retinal neuronal cells in streptozotocin-induced diabetic mice [J]. *Mol Vis*, 2012, 18 : 1411-1420.
- 23 Aldebasi YH, Rahmani AH, Khan AA, Aly SM. The effect of vascular endothelial growth factor in the progression of bladder cancer and diabetic retinopathy [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2013, 6 (4) : 239-251.
- 24 Curtis TM, Gardiner TA, Stitt AW. Microvascular lesions of diabetic retinopathy: clues towards understanding pathogenesis [J]? *Eye (Lond)*, 2009, 23 (7) : 1496-1508.
- 25 Pemp B, Schmetterer L. Ocular blood flow in diabetes and age-related macular degeneration [J]. *Can J Ophthalmol*, 2008, 43 (3) : 295-301.
- 26 Dor Y, Porat R, Keshet E. Vascular endothelial growth factor and vascular adjustments to perturbations in oxygen homeostasis [J]. *Am J Physiol*, 2001, 280 (6) : C1367-1374.
- 27 Ayalasomayajula SP, Kompella UB. Celecoxib, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, inhibits retinal vascular endothelial growth factor expression and vascular leakage in a streptozotocin-induced diabetic rat model [J]. *Eur J Pharmacol*, 2003, 458 (3) : 283-289.
- 28 Mitsuhashi J, Morikawa S, Shimizu K, Ezaki T, Yasuda Y, Hori S. Intravitreal injection of erythropoietin protects against retinal vascular regression at the early stage of diabetic retinopathy in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Exp Eye Res*, 2013, 106 (1) : 64-73.
- 29 Schrufer TL, Antonetti DA, Sonenberg N, Kimball SR, Gardner TW, Jefferson LS. Ablation of 4E-BP1/2 prevents hyperglycemia-mediated induction of VEGF expression in the rodent retina and in Müller cells in culture [J]. *Diabetes*, 2010, 59 (9) : 2107-2116.
- 30 Xu L, Kanasaki K, Kitada M, Koya D. Diabetic angiopathy and angiogenic defects [J]. *Fibrogenesis Tissue Repair*, 2012, 5 (1) : 13.
- 31 Zhang J, Wu Y, Jin Y, Ji F, Sinclair SH, Luo Y, et al. Intravitreal injection of erythropoietin protects both retinal vascular and neuronal cells in early diabetes [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2008, 49 (2) : 732-742.
- 32 Inai T, Mancuso M, Hashizume H, Baffert F, Haskell A, Baluk P, et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in cancer causes loss of endothelial fenestrations, regression of tumor vessels, and appearance of basement membrane ghosts. [J]. *Am J Pathol*, 2004, 165 (1) : 35-52.
- 33 Crawford Y, Ferrara N. VEGF inhibition: insights from preclinical and clinical studies [J]. *Cell Tissue Res*, 2009, 335 (1) : 261-269.
- 34 Kern TS. Contributions of inflammatory processes to the development of the early stages of diabetic retinopathy [J]. *Exp Diabetes Res*, 2007, 2007 : 95103.
- 35 Chan PS, Kanwar M, Kowluru RA. Resistance of retinal inflammatory mediators to suppress after reinstitution of good glycemic control: novel mechanism for metabolic memory [J]. *J Diabetes Complications*, 2010, 24 (1) : 55-63.
- 36 Jousen AM, Poulaki V, Le ML, Koizumi K, Esser C, Janicki H, et al. A central role for inflammation in the pathogenesis of diabetic retinopathy [J]. *FASEB J*, 2004, 18 (12) : 1450-1452.
- 37 Matsubara A, Tomida K, Matsuda Y, Tamai K, Tashita A, Jomori T, et al. Protective effects of selectin ligands/inhibitor (SKK-60060) against retinal ischemia-reperfusion injury [J]. *Exp Eye Res*, 2000, 71 (3) : 283-293.
- 38 Ueda K, Nakahara T, Hoshino M, Mori A, Sakamoto K, Ishii K. Retinal blood vessels are damaged in a rat model of NMDA-induced retinal degeneration [J]. *Neuro Letters*, 2010, 485 (1) : 55-59.
- 39 Ogata N, Yamanaka R, Yamamoto C, Miyashiro M, Kimoto T, Takahashi K, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, following retinal ischemia-reperfusion injury in the rat [J]. *Curr Eye Res*, 1998, 17 (9) : 1087-1096.