

一种新的可用于干细胞移植的新西兰白兔青光眼视神经损伤模型

郭立云¹, 魏景宽^{2,3}, 杨上川^{2,*}, 王正波^{2,*}

(1. 昆明医学院第四附属医院 眼科, 云南 昆明 650021; 2. 中国科学院昆明动物研究所, 云南 昆明 650223;
3. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要: 青光眼是一种致盲且不可逆神经退行性疾病, 目前还没有能够彻底解决其视野缺失的治疗方法。神经干细胞研究的兴起为该病的治疗带来了可能, 且迫切需要一种适用于干细胞移植研究的青光眼造模方法。该实验对新西兰白兔球结膜下注射地塞米松给药, 2.5 mg/次, 一周3次, 持续8周。眼底照相显示造模眼眼球屈光间质保持清晰, 视乳头凹陷明显扩大、血管呈屈膝状; 病理切片显示造模眼视神经明显损伤; 海德堡视网膜断层扫描仪(Heidelberg retina tomography, HRT)定量分析显示造模眼眼盘沿面积减小(1.10 ± 0.88) mm²、杯/盘比增大 0.17 ± 0.13 , 视网膜神经纤维层平均厚度降低(0.44 ± 0.31) mm 等青光眼性质病理改变, 且均达到极显著水平($P<0.001$)。建模成功后, 于角膜缘后4 mm 向造模眼玻璃体注入猕猴神经干细胞, 植入5个月后摘取眼球切片, 通过荧光显微镜观察到存活的移植细胞。该实验建立了一种简单可靠、重复性强且适用于神经干细胞移植研究的慢性青光眼造模方法。

关键词: 青光眼; 动物模型; 地塞米松; 干细胞移植

中图分类号: Q95.33; Q436; Q57 **文献标志码:** A **文章编号:** 0254-5853-(2012)02-0225-06

Glaucoma model for stem cell transplantation research in New Zealand white rabbits

GUO Li-Yun¹, WEI Jing-Kuan^{2,3}, YANG Shang-Chuan^{2,*}, WANG Zheng-Bo^{2,*}

(1. Department of Ophthalmology, the Fourth Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Yunnan 650021, China; 2. Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China; 3. Graduate University of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Glaucoma is a typical irreversible blind neurodegenerative disease for which there is no effective treatment for halting visual deterioration. The recent development of neural stem cells studies sheds light on a potential resolution for this disease. As a result, an appropriate glaucoma modeling method for stem cell transplantation study is needed. In the present study, Dexamethasone was injected unilaterally into the conjunctiva of New Zealand rabbit at the dose of 2.5 mg (5 mg/mL), three times a week. After eight weeks, the eye ground photography showed that the optic nerve head of the treated eye was expanded, and the blood vessel was geniculate compared to the control eye, while the ocular media remained transparent. The hematoxylin-eosin (HE) stain of the retinal nerve fiber layer (RNFL) sections showed optic neuron death in the treated eye. The Heidelberg Retina Tomography (HRT) results showed optic disk morphological changes consistent with the pathophysiology of glaucoma in the treated eye, including a decrease in the rim area (1.10 ± 0.88) mm² and mean RNFL thickness (0.44 ± 0.31) mm, and an increase in the cup/disk ratio 0.17 ± 0.13 . Then neural stem cells were injected into the vitreous body of the treated eye. After five months, surviving transplanted cells were observed. These results suggest a simple and reproducible chronic glaucoma model, which is appropriate for neural stem cell transplant research, has been successfully developed.

Key words: Glaucoma; Animal model; Dexamethasone; Stem cells transplantation

青光眼是一种以视野缺损为特征的不可逆致盲性眼病, 为导致成年人失明的首要因素, 目

收稿日期: 2011-12-14; 接受日期: 2012-01-04

基金项目: “973”项目(947703); 国家自然基金项目(31070963, 30670669)

*通信作者(Corresponding authors), E-mail: yangsc@mail.kiz.ac.cn; wangzb@mail.kiz.ac.cn

第一作者简介: 郭立云, 昆明医学院博士研究生, E-mail: kitteyyun@yahoo.com.cn

前在世界范围内约有 7×10^7 青光眼患者(Leske, 2007)。原发性开角型青光眼(primary open angle glaucoma, POAG)是成年人青光眼中最常检出的一类, 其发病进程通常伴随持续性眼压异常升高。目前, 普遍认为 POAG 病人眼压升高是由于房水流通道中胞外基质(如纤维连接蛋白、粘多糖等)的异常积聚引起房水循环受阻而导致(Babizhayev & Brodskaya, 1989; Francois, 1975; Rohen, 1983)。持续性眼压升高是导致视网膜视神经节细胞(retinal ganglion cells, RGCs)死亡的主要因素, 神经节细胞(RGCs)渐进性死亡的病征表现即为患者视野逐渐变小并最终导致失明。目前, 该疾病尚无有效治疗方法。

以前的高眼压动物模型研究主要着力于探索建模后降低眼压的方法, 但高眼压造成的视神经损伤具有不可恢复性, 降低眼压只能延缓青光眼发病进程, 对于损伤的神经节细胞没有恢复作用(Chihara, 1982), 因此不能对视野缺失进行根本性治疗。随着干细胞研究的发展, 利用胚胎干细胞或者神经干细胞载体移植, 通过其分化整合进而取代缺失神经元的功能来修复中枢及周围神经系统的损伤已经成为目前神经损伤性疾病的研究热点, 而利用干细胞移植修复视网膜损伤也已成为了青光眼研究的新方向(Bull et al, 2008; Johnson et al, 2010)。该方法需要一种能够模拟青光眼发病进程中眼压处于长时期慢性升高, 进而导致视网膜神经节细胞凋亡的动物模型; 且该模型眼球屈光间质清晰, 可对视网膜神经细胞缺失过程及干细胞整合替代缺失神经细胞过程进行持续监测; 同时能够进行动物视觉功能检测, 比如视网膜电图(electroretinogram, ERG)或者视觉诱发电位(visual evoked potential, VEP)检测(Ogata, 1971; Watts et al, 1989)来对比建模前后及修复前后视觉功能的变化等要求。

新西兰白兔眼球特点明显、大小和结构类似人眼、屈光间质清晰且病理变化易于检出, 是一种理想的眼科疾病研究模式动物(Bar-Ilan, 1984; Pierre V et al, 1977); 在青光眼研究中, 常被用于建立高眼压模型以青光眼模拟病理进程, 研究发病机理及降低眼压的方法(Beitch & Eakins, 1969; Katz et al, 1975)。早期的人及动物在体实验表明眼球经糖皮质激素处理后的症状同 POAG 类似(Bill, 1977; Vareilles et al, 1977; Weinreb et al, 1985), 离体实验表明糖皮质激素的主要作用部位是房水流通道

中的小梁网状结构(trabecular meshwork, TM)。体外培养经地塞米松处理的小梁网细胞表明, 其作用机制主要表现在以下四个方面: 1) 改变小梁网处细胞外基质的糖蛋白表达水平(Steely et al, 1992; Yun et al, 1989); 2) 通过影响肌动蛋白各亚基表达量来影响细胞骨架结构的组织方式(Clark et al, 1994); 3. 改变细胞连接蛋白中层粘连蛋白五种亚基中的三种亚基的表达量来影响小梁网组织细胞连接(Dickerson et al, 1998); 4) 改变 $\text{Na}^+ \text{-K}^+ \text{-Cl}^-$ 的对向运输水平(Putney et al, 1997)。本实验根据糖皮质激素药理特性及兔眼球优势提出一种新的高眼压建模方法, 即兔眼球结膜下注射地塞米松(dexamethasone)诱导产生青光眼性视神经损伤。应用海德堡视网膜断层扫描仪(Heidelberg retina tomography, HRT)和眼底照相仪观察眼球屈光间质及视盘形态变化, 组织切片观察视神经形态学变化以检测神经损伤程度。建模后行玻璃体腔内干细胞移植, 观察干细胞在模型眼玻璃体的生长情况来评价此建模方法的可行性。

1 材料与方法

1.1 实验动物

雄性新西兰白兔 20 只, 由昆明医学院提供。分两批次进行实验, 每次 10 只, 体重范围 $1.5 \sim 3.5 \text{ kg}$, 平均(2.4 ± 0.43) kg, 兔龄 $120 \sim 240 \text{ d}$ (平均 180 d)。所有动物在标准条件下饲养, 12 h 黑暗交替(7:00~19:00 为光周期)。所有动物行为及给药实验在 13:30~16:00 之间完成。

1.2 建模方法

球结膜下注射地塞米松慢性升高眼压。动物固定后, 眼球滴用盐酸奥布卡因眼液(oxybuprocaine hydrochloride eye drops)局部麻醉, 单侧眼地塞米松(5 mg/mL)注射给药, 2.5 mg /次, 周一、三、五给药, 连续 8 周。该给药方式相对直接滴用药效作用时间长且药物吸收更充分。未做给药处理的对侧眼为对照眼。

眼压测量采用更适合白兔的帕金斯手持压平眼压计(Perkins hand held applanation tonometer)抽查(Abrams et al, 1996; Lim et al, 2005), 每次给药前 0.5 h 及给药后 1 h 测量眼内压。每次测量时间 $<10 \text{ min}$ 。

1.3 青光眼模型诊断方法

1.3.1 活体影像学检查 利用眼底照相仪(TOPCON.

MARK II, Japan)观察萎缩视神经的颜色、杯盘及血管变化; 利用海德堡断层扫描及多普勒血流扫描仪(HRT/F, Germany)检测视盘及视杯面积大小, 平均视网膜神经纤维层厚度等。

1.3.2 组织学切片观察 空气栓塞法处死实验动物后立即取出眼球, 4%多聚甲醛后固定 24 h; 20%、30%蔗糖溶液梯度脱水; 全眼球冰冻切片(20 μm); 苏木素-伊红(HE)染色; 显微观察视网膜神经纤维层。

1.4 神经干细胞培养及移植

绿色荧光蛋白(green fluorescence protein, GFP)猕猴神经干细胞由 GFP 猕猴胚胎干细胞分化得来。选取致密集落做分化实验。细胞集落悬浮培养形成拟胚体后贴壁培养, 分化得到神经干细胞。手工选取处于玫瑰花环结构中的具强分化能力的神经干细胞, 并计数。

微量进样针进行细胞移植, 进针点位于角膜缘后 4 mm, 9:00 方位, 深度 5 mm。垂直于巩膜向造模眼玻璃体移植入神经干细胞 5 μL (1×10^5 个/ μL), 速度 0.25 $\mu\text{L}/\text{min}$, 注射后留置 5 min。动物正常饲

养 5 个月后处死, 冰冻切片后通过荧光显微镜观察移植细胞在玻璃体内的生长存活情况。

1.5 统计学方法

应用 SPSS18.0 软件包对 HRT 检测的视盘形态各参数进行统计分析, 包括: 视盘面积、视杯面积、盘沿面积、杯/盘面积比和视网膜平均神经纤维层厚度。所得实验数据均以 $\text{mean} \pm \text{SE}$ 表示, 采用配对 *t*-检验(Vaajanen et al, 2008)。

2 结 果

2.1 眼底视乳头变化

经眼底照相检测, 新西兰白兔造模眼表现为: 前房透明、角膜无明显变化、屈光间质透明, 与正常对照眼无明显差别(图 1A); 造模眼较对照眼眼底视乳头凹陷明显扩大、加深, 血管呈明显的屈膝状(图 1B)。眼底视乳头变化提示在高眼压条件下视乳头被压迫。在 20 只兔中, 有 17 只可以观察到前述差异性变化, 而受压迫程度需通过 HRT 检测指标统计结果共同说明; 另外 3 只在给药过程中因为晶状体脱位无法清晰成像, 但不影响 HRT 成像。

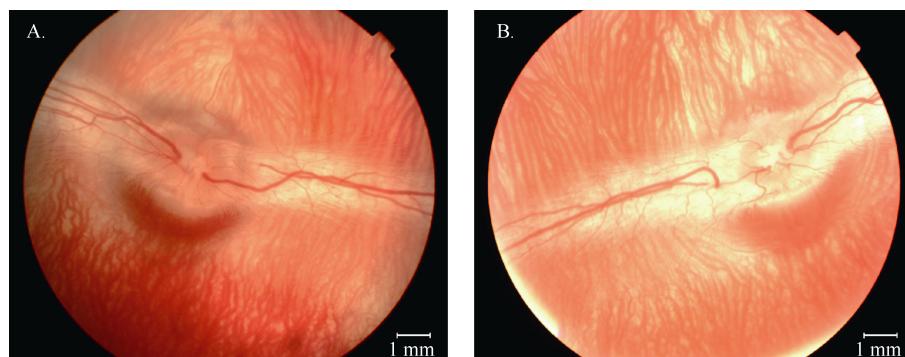


图 1 对照眼与造模眼眼底照相

Fig. 1 Eye-ground photography of control eye and model eye

A) 对照眼眼底照相; B) 青光眼造模眼眼底照相。

A) Eye-ground photography of control eye; B) Eye-ground photography of model eye.

2.2 海德堡视网膜断层扫描仪(HRT)检测

青光眼性视网膜损伤的临床判断指标有 3 个: 盘沿面积(rim area) 减小(盘沿面积=视盘面积-视杯面积); 杯/盘面积比(cup/disk ratio)增大(杯/盘面积比=视杯面积/视盘面积); 以及视网膜平均神经纤维厚度减小。其中任何一项变化超过正常范围即可诊断为青光眼。表 1 是在给药 8 周后的 20 只青光眼模型兔眼 HRT 检测指标统计分析结果, 造模眼相对于对照眼盘沿面积减少(1.10 ± 0.88) mm^2 ($P < 0.001$); 杯/盘面积比增大(0.17 ± 0.13)($P < 0.001$); 视

网膜神经纤维层平均厚度减小(0.44 ± 0.31) mm ($P < 0.001$), 三项指标变化同青光眼病理特征一致。

以对照眼样本 $\text{mean} \pm \text{SE}$ 为正常值参考范围($n=20$, 表 1), 对造模成功率进行初步评估, 造模眼指标超过该范围的被认为有病理变化趋势。经统计, 17 只兔的造模眼盘沿面积减小; 18 只兔的造模眼杯/盘面积比增大; 16 只兔的造模眼视网膜神经纤维层平均厚度减小。即 3 项指标均有变化趋势的为 13 只, 满足两项的为 5 只, 满足一项的为 1 只, 没有变化的为 1 只。

表 1 青光眼造模眼与对照眼 HRT 视盘形态参数对比($mean \pm SE, n=20$)Tab. 1 Rabbits optic disks HRT topographic parameters of model eyes and control eyes ($mean \pm SE, n=20$)

组别 Groups	视盘面积 Disk area(mm^2)	视杯面积 Cup area(mm^2)	盘沿面积 Rim area(mm^2)	杯/盘面积比 Cup/Disk ratio	视网膜神经纤维层平均厚度 Mean RNFL thickness(mm)
造模眼 Model eyes	6.80 ± 1.20	6.52 ± 1.14	0.27 ± 0.24	0.96 ± 0.03	-0.62 ± 0.22
对照眼 Control eyes	6.41 ± 1.23	4.99 ± 1.08	1.37 ± 0.90	0.79 ± 0.13	-0.18 ± 0.24
差值 Difference	0.38 ± 0.80	1.53 ± 1.02	-1.10 ± 0.88	0.17 ± 0.13	-0.44 ± 0.31
差别显著性 Significance	$P=0.044$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$

2.3 组织形态学改变

高眼压模型中视网膜神经压迫性损伤，导致大量神经元死亡、细胞膜破裂、胞质扩散、细胞核堆积，以致 HE 染色切片着色不均。造模组视神经纤维排列失去规律，视神经肿胀，纤维间质水肿及空泡(图 2B)。对照组视神经纤维排列紧密、整齐有序、纤维间质少有水肿及空泡、基质均匀且无明显炎性细胞(图 2A)。

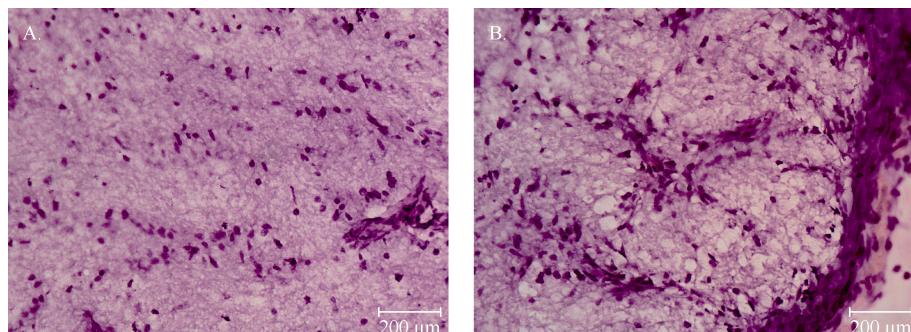


图 2 视网膜神经纤维组织切片 HE 染色

Fig. 2 Frozen section of RNFL with HE stain

A) 对照眼视网膜冰冻切片 HE 染色; B) 造模眼视网膜冰冻切片 HE 染色。

A) HE stain of control eye RNFL frozen section B) HE stain of model eye RNFL frozen section.

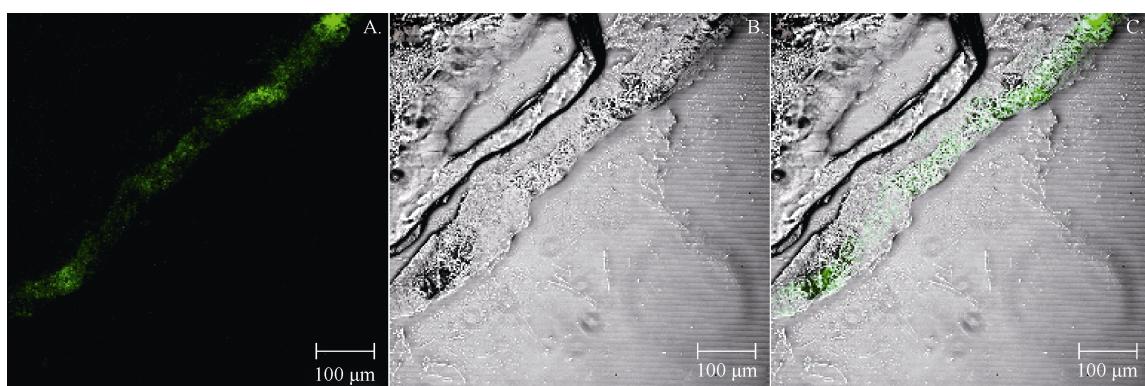


图 3 猕猴神经干细胞移植入玻璃体后存活情况

Fig. 3 Growth situation of rhesus monkey neural stem cells after transplant into conjunctiva

A) 存活的猕猴神经细胞(GFP 标记的细胞); B) 普通光镜像, 五角星所示为晶状体; C) A, B 叠加图。

A) Survived rhesus monkey neural stem cells (GFP label cells); B) Microscopy imaging in normal light, star refers to the eye lens; C: overlap of A and B.

2.4 干细胞植入后在玻璃体内的生长情况

建模兔眼玻璃体内移植神经干细胞 5 个月后的组织学检查发现，在玻璃体中，有大量的移植细胞存活，并且附着在晶状体上(图 3A, C)。本研究的建模方法在停药一段时间后眼压可自行恢复正常，不影响移植细胞生长(图 3)，这为将来开展移植干细胞对青光眼的治疗研究提供了可能。

3 讨 论

青光眼作为一种视通路疾病在生理病理学进程方面同其他神经退行性疾病有诸多类似之处，包括神经元轴突末梢消亡(Martin et al, 2006)、氧化应激(Kumar & Agarwal, 2007)和胶质细胞减少(Naskar et al, 2002)等。青光眼患者在通过物理或化学方法降低眼内压至正常水平后，仍然表现进行性视野缺失直至失明。视神经作为中枢神经系统的一部分，损伤后无法自然修复(Bull et al, 2008)，以外源移植多分化潜能的神经干细胞作为修复的细胞动力源已成为青光眼治疗的研究方向。

已有研究提出了几种建立高眼压模型的方法：麻醉大鼠前房角注射生理盐水使动物眼内压迅速升高至 76 mmHg (10.13 kPa) 并持续 24 h 后回落到正常眼压 (19±4) mmHg [(2.5±0.5) kPa] (Ben Simon et al, 2006)；灼烧巩膜外静脉使房水不能正常引流继而升高眼内压，使眼内压达到对照眼的 1.6 倍(Mittag et al, 2000; Naskar et al, 2002)；巩膜外层三根静脉注射高渗盐水迅速提高眼内压 (Morrison et al, 1997; Neufeld et al, 1999)；利用高能激光灼烧小梁网(trabecular meshwork TM)致变性，阻断房水流引起眼压升高(Aihara et al., 2003; Jonas & Hayreh, 1999; Levkovitch-Verbin et al, 2002) 等。这些高眼压建模多采用短时间内急性升高眼压的方法来获得视网膜神经损伤模型，主要适用于研究高眼压导致的相关基因表达异常、视网膜神经细胞凋亡机理及降低眼压的方法探索等。且这些方法多以机械损伤视神经为主，对眼球破坏大，导致

屈光间质混浊，不利于观察视觉功能的变化。但就观察干细胞植入后的视神经损伤修复而言，需要最小化眼压升高过程中的视通路损伤。

地塞米松处理兔眼球不会引起眼压剧烈波动，这与现有在体研究结果相符合。Weinreb 对 POAG 病人滴用地塞米松后发现给药 0.5 h 后眼压较未给药对照眼升高 2 mmHg (266.64 Pa), 4~8 h 后药效达到峰值时差值也仅为 5.5 mmHg (733.26 Pa) (Weinreb et al, 1985); Knepper 对兔眼使用地塞米松处理后，青年兔眼内压在给药后有轻微升高，而老年兔眼压无显著变化(Knepper et al, 1978)。本实验给药后第一周的眼内压抽查发现，相对于对照眼基准值(6.7±5.7) mmHg [(893.24±759.92) Pa] (6 次眼压数据平均)，建模眼眼压仅升高至(14.7±2.5) mmHg [(1.96±0.33) kPa]，这种眼压轻微升高的模式很好地模拟了青光眼病人的病程。

总之，本实验采用地塞米松诱导青光眼的建模方法，诱发了青光眼病理特征性的眼底乳头扩大、加深，以及血管屈膝状改变；HRT 检测结果符合青光眼病理变化特征；视网膜切片 HE 染色证实了相关视神经组织的退行性变化。这些检测结果说明了该建模方法的有效性和可靠性；以及非侵入性、不会诱发炎症反应、对眼球无破坏、保持屈光间质清晰等优点；同时作为一种慢性青光眼建模手段，更接近原发性开角型青光眼的自然病程；另一方面，神经干细胞移植入建模眼后能够长时间存活并生长的结果也为干细胞移植治疗青光眼的研究提供了理论基础。

参考文献：

- Abrams LS, Vitale S, Jampel HD. 1996. Comparison of three tonometers for measuring intraocular pressure in rabbits[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 37(5): 940-944.
- Aihara M, Lindsey JD, Weinreb RN. 2003. Experimental mouse ocular hypertension: establishment of the model[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 44(10): 4314-4320.
- Babizhayev MA, Brodskaya MW. 1989. Fibronectin detection in drainage outflow system of human eyes in ageing and progression of open-angle glaucoma[J]. *Mech Ageing Dev*, 47(2): 145-157.
- Bar-Ilan A. 1984. Diurnal and seasonal variations in intraocular pressure in the rabbit[J]. *Exp Eye Res*, 39(2): 175-181.
- Beitch BR, Eakins KE. 1969. The effects of prostaglandins on the intraocular pressure of the rabbit[J]. *Br J Pharmacol*, 37(1): 158-167.
- Ben Simon GJ, Bakalash S, Aloni E, Rosner M. 2006. A rat model for acute rise in intraocular pressure: immune modulation as a therapeutic strategy[J]. *Am J Ophthalmol*, 141(6): 1105-1111.
- Bill A. 1977. Basic physiology of the drainage of aqueous humor[J]. *Exp Eye Res*, 25(Suppl): 291-304.
- Bull ND, Limb GA, Martin KR. 2008. Human Muller stem cell (MIO-M1) transplantation in a rat model of glaucoma: survival, differentiation, and integration[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 49(8): 3449-3456.
- Chihara E. 1982. Optic nerve damage in glaucoma[J]. *Surv Ophthalmol*, 27(2): 140-141.
- Clark AF, Wilson K, McCartney MD, Miggans ST, Kunkle M, Howe W. 1994. Glucocorticoid-induced formation of cross-linked actin networks in cultured human trabecular meshwork cells[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 35(1): 281-294.
- Dickerson JE Jr, Steely HT Jr, English-Wright SL, Clark AF. 1998. The effect of dexamethasone on integrin and laminin expression in cultured human trabecular meshwork cells[J]. *Exp Eye Res*, 66(6): 731-738.
- Francois J. 1975. The importance of the mucopolysaccharides in intraocular pressure regulation[J]. *Invest Ophthalmol*, 14(3): 173-176.

- Johnson TV, Bull ND, Hunt DP, Marina N, Tomarev SI, Martin KR. 2010. Neuroprotective effects of intravitreal mesenchymal stem cell transplantation in experimental glaucoma[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 51(4): 2051-2059.
- Jonas JB, Hayreh SS. 1999. Localised retinal nerve fibre layer defects in chronic experimental high pressure glaucoma in rhesus monkeys[J]. *Br J Ophthalmol*, 83(11): 1291-1295.
- Katz RS, Henkind P, Weitzman ED. 1975. The circadian rhythm of the intraocular pressure in the New Zealand White rabbit[J]. *Invest Ophthalmol*, 14(10): 775-780.
- Knepper PA, Breen M, Weinstein HG, Blacik JL. 1978. Intraocular pressure and glycosaminoglycan distribution in the rabbit eye: effect of age and dexamethasone[J]. *Exp Eye Res*, 27(5): 567-575.
- Kumar DM, Agarwal N. 2007. Oxidative stress in glaucoma: a burden of evidence[J]. *J Glaucoma*, 16(3): 334-343.
- Leske MC. 2007. Open-angle glaucoma—an epidemiologic overview[J]. *Ophthalmic Epidemiol*, 14(4): 166-172.
- Levkovich-Verbin H, Quigley HA, Martin KRG, Valenta D, Baumrind LA, Pease ME. 2002. Translimbal laser photocoagulation to the trabecular meshwork as a model of glaucoma in rats[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 43(2): 402-410.
- Lim KS, Wickremasinghe SS, Cordeiro MF, Bunce C, Khaw PT. 2005. Accuracy of intraocular pressure measurements in new zealand white rabbits[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 46(7): 2419-2423.
- Martin KRG, Quigley HA, Valenta D, Kielczwski J, Pease ME. 2006. Optic nerve dynein motor protein distribution changes with intraocular pressure elevation in a rat model of glaucoma[J]. *Exp Eye Res*, 83(2): 255-262.
- Mittag TW, Danias J, Pohorenc G, Yuan HM, Burakgazi E, Chalmers-Redman R, Podos SM, Tatton WG. 2000. Retinal damage after 3 to 4 months of elevated intraocular pressure in a rat glaucoma model[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 41(11): 3451-3459.
- Morrison JC, Moore CG, Deppmeier LMH, Gold BG, Meshul CK, Johnson EC. 1997. A rat model of chronic pressure-induced optic nerve damage[J]. *Exp Eye Res*, 64(1): 85-96.
- Naskar R, Wissing M, Thanos S. 2002. Detection of early neuron degeneration and accompanying microglial responses in the retina of a rat model of glaucoma[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 43(9): 2962-2968.
- Neufeld AH, Sawada A, Becker B. 1999. Inhibition of nitric-oxide synthase 2 by aminoguanidine provides neuroprotection of retinal ganglion cells in a rat model of chronic glaucoma[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96(17): 9944-9948.
- Ogata H. 1971. Electrophysiological study of glaucoma 1. ERG in primary, especially simple glaucoma[J]. *Nihon Ganka Kiyo*, 22(6): 388.
- Putney LK, Brandt JD, O'Donnell ME. 1997. Effects of dexamethasone on sodium-potassium-chloride cotransport in trabecular meshwork cells[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 38(6): 1229-1240.
- Rohen JW. 1983. Why is intraocular pressure elevated in chronic simple glaucoma[J]? *Ophthalmology*, 90(7): 758-765.
- Steely HT, Browder SL, Julian MB, Miggans ST, Wilson KL, Clark AF. 1992. The effects of dexamethasone on fibronectin expression in cultured human trabecular meshwork cells[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 33(7): 2242-2250.
- Vaajanen A, Vapaatalo H, Kautiainen H, Oksala O. 2008. Angiotensin (1-7) reduces intraocular pressure in the normotensive rabbit eye[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 49(6): 2557-2562.
- Vareilles P, Conquet P, Le Douarec JC. 1977. A method for the routine intraocular pressure (IOP) measurement in the rabbit: Range of IOP variations in this species[J]. *Exp Eye Res*, 24(4): 369-375.
- Vareilles P, Silverstone D, Plazonnet B, Le Douarec JC, Sears ML, Stone CA. 1977. Comparison of the effects of timolol and other adrenergic agents on intraocular pressure in the rabbit[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 16(11): 987-996.
- Watts MT, Good PA, O'Neill EC. 1989. The flash stimulated VEP in the diagnosis of glaucoma[J]. *Eye (Lond)*, 3(Pt 6): 732-737.
- Weinreb RN, Polansky JR, Kramer SG, Baxter JD. 1985. Acute effects of dexamethasone on intraocular pressure in glaucoma[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 26(2): 170-175.
- Yun AJ, Murphy CG, Polansky JR, Newsome DA, Alvarado JA. 1989. Proteins secreted by human trabecular cells. Glucocorticoid and other effects[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 30(9): 2012-2022.