

引文格式:俞永珍,徐哲,邹秀兰,张楚,王观峰,邹玉平.蓝光诱导氧化应激反应参与视网膜色素上皮细胞凋亡机制研究[J].眼科新进展,2015,35(6):520-524. doi:10.13389/j.cnki.rao.2015.0141

【实验研究】

蓝光诱导氧化应激反应参与视网膜色素上皮细胞凋亡机制研究[△]

俞永珍 徐哲 邹秀兰 张楚 王观峰 邹玉平

作者简介:俞永珍,女,1989年1月出生,江西人,硕士。联系电话:15914311531; E-mail: yzblue118@163.com

About YU Yong-Zhen: Female, born in January, 1989. Master degree. Tel: 15914311531; E-mail: yzblue118@163.com

收稿日期:2014-09-02

修回日期:2014-12-23

本文编辑:周志新

△基金项目:广东省科技计划项目(编号:2011B031800202);广东省科学自然基金项目(编号:S2013010012045)

作者单位:510010 广东省广州市,广州军区广州总医院眼科(俞永珍,徐哲,邹秀兰,张楚,邹玉平);510405 广东省广州市,广州中医药大学(俞永珍);510150 广东省广州市,广州医科大学附属第三医院(王观峰)

通讯作者:邹秀兰, E-mail: xlzou2003@aliyun.com;邹玉平, E-mail: gzzouyuping@sina.com

Received date: Sep 2, 2014

Accepted date: Dec 23, 2014

Foundation item: Guangdong Province Science and Technology Project (No: 2011B031800202); Guangdong Province Natural Science Foundation (No: S2013010012045)

From the Department of Ophthalmology, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Military Command (YU Yong-Zhen, XU Zhe, ZOU Xiu-Lan, ZHANG Chu, ZOU Yu-Ping), Guangzhou 510010, Guangdong Province, China; Department of Ophthalmology, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine (YU Yong-Zhen); Guangzhou 510405, Guangdong Province, China; the Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University (WANG Guan-Feng), Guangzhou 510150, Guangdong Province, China

Responsible author: ZOU Xiu-Lan, E-mail: xlzou2003@aliyun.com; ZOU Yu-Ping, E-mail: gzzouyuping@sina.com

Role of oxidative stress induced by blue light in human retinal pigment epithelium cells apoptosis

YU Yong-Zhen, XU Zhe, ZOU Xiu-Lan, ZHANG Chu, WANG Guan-Feng, ZOU Yu-Ping

【Key words】 apoptosis; reactive oxygen species; oxidative stress; human retinal pigment epithelium cell

【Abstract】 **Objective** To research the mechanism of oxidative stress mediating the cultured human retinal pigment epithelium cell (hRPE) apoptosis induced by blue light and the relationship with time. **Methods** The blue light damage model of cultured hRPE cells in vitro with LED blue light density of $(4.0 \pm 0.5) \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$ adjusted by FL-1D blue light illumination meter was established, and the illumination time was sat as 0 hour, 0.5 hour, 1 hour, 2 hours, 3 hours, 4 hours, 5 hours, 6 hours, 12 hours, then the cells are grouped according to illumination time. Cell ultrastructures were observed by transmission electron microscope, the rates of total cell apoptosis and the levels of reactive oxygen species (ROS) were measured with flow cytometry, and the expressions of Bax, Bcl-2 and Caspase-3 were detected by Western Blot. **Results** The cells and mitochondria became vacuolar or swollen, cytoplasm and microvilli were diminished in each illumination group. The total apoptosis rates at 0 hour, 1 hour, 2 hours, 3 hours, 4 hours, 5 hours, 6 hours, 12 hours were $(5.30 \pm 0.64)\%$, $(5.90 \pm 0.89)\%$, $(6.80 \pm 0.98)\%$, $(7.70 \pm 0.76)\%$, $(9.60 \pm 1.10)\%$, $(11.45 \pm 2.60)\%$, $(14.90 \pm 1.60)\%$ and $(23.90 \pm 1.20)\%$, respectively. The apoptosis rate increased after illumination for 4 hours compared with control group, there were significant differences (all $P < 0.05$). The levels of ROS at 0 hour, 0.5 hour, 1 hour, 2 hours, 3 hours, 4 hours, 5 hours, 6 hours were $(12.90 \pm 1.18)\%$, $(20.09 \pm 0.63)\%$, $(23.91 \pm 1.47)\%$, $(29.14 \pm 1.94)\%$, $(34.3 \pm 1.84)\%$, $(38.97 \pm 1.68)\%$, $(44.08 \pm 0.83)\%$, $(57.76 \pm 2.80)\%$, respectively, the levels of ROS increased significantly after illumination for 0.5 hour compared with control group (all $P < 0.05$). The expressions of Caspase-3 and Bax were up-regulated slightly after illumination for 3 hours and up-regulated significantly after illumination for 5 hours to 6 hours, while the expression of Bcl-2 after cell was down-regulated after illuminated for 3 hours, there were significant differences compared with control group (all $P < 0.05$). **Conclusion** Blue light can cause cell apoptosis in hRPE probably motivated by oxidative stress, the apoptosis phenomenon is not obvious after exposing for 3 hours, but obvious after exposing for 5 hours to 6 hours.

【关键词】 凋亡;活性氧;氧化应激;人视网膜色素上皮细胞

【摘要】 **目的** 研究氧化应激反应参与蓝光诱导体外培养的人视网膜色素上皮细胞(human retinal pigment epithelium, hRPE)凋亡的作用机制及其与时间的关系。**方法** 用LED蓝光光源建立蓝光损伤体外培养的hRPE细胞模型,蓝光辐射强度为 $(4.0 \pm 0.5) \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$,并将细胞分为光照时间0 h(正常对照组)、0.5 h、1 h、2 h、3 h、4 h、5 h、6 h、12 h组。透射电镜观察细胞的超微结构,流式细胞术检测细胞凋亡率及细胞内活性氧水平,Western Blot技术检测Bax、Bcl-2、Caspase-3蛋白的表达情况。**结果** 各光照组细胞均有不同程度的胞浆减少、空泡状改变、线粒体肿胀、微绒毛减少或脱落。正常对照组、光照1 h、2 h、3 h、4 h、5 h、6 h、12 h的细胞凋亡率分别为 $(5.30 \pm 0.64)\%$ 、 $(5.90 \pm 0.89)\%$ 、 $(6.80 \pm 0.98)\%$ 、 $(7.70 \pm 0.76)\%$ 、 $(9.60 \pm 1.10)\%$ 、 $(11.45 \pm 2.60)\%$ 、 $(14.90 \pm 1.60)\%$ 及 $(23.90 \pm 1.20)\%$,与正常对照组比较,光照4 h后细胞凋亡率明显升高,差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$)。正常对照组、0.5 h、1 h、2 h、3 h、4 h、5 h、6 h组hRPE细胞生成的

ROS 相对量分别为 $(12.90 \pm 1.18)\%$ 、 $(20.09 \pm 0.63)\%$ 、 $(23.91 \pm 1.47)\%$ 、 $(29.14 \pm 1.94)\%$ 、 $(34.30 \pm 1.84)\%$ 、 $(38.97 \pm 1.68)\%$ 、 $(44.08 \pm 0.83)\%$ 、 $(57.76 \pm 2.80)\%$ ，光照 0.5 h 后细胞产生的 ROS 明显升高，与正常对照组比较，差异均有统计学意义（均为 $P < 0.05$ ）。Caspase-3 及 Bax 在 3 h 后轻微上调，而 5~6 h 后表达上调较明显，Bcl-2 的表达则在 3 h 后下调明显，与正常对照组比较，差异均有统计学意义（均为 $P < 0.05$ ）。**结论** 蓝光可通过产生的氧化应激反应激活细胞凋亡系统导致细胞损伤，光照持续 3 h 时细胞可能出现了损伤但不明显，光照 5~6 h 后出现了较为明显的细胞凋亡。

人视网膜色素上皮 (human retinal pigment epithelium, hRPE) 细胞具有转营养成分、吞噬降解感光细胞外节段、视色素转运储存、清除自由基等功能，这对视网膜自平衡及视觉有重要的意义^[1]。流行病学资料显示，长期暴露于高强度紫外线或蓝光可引起年龄相关性黄斑变性及 Stargardt 病、色素性视网膜炎、视网膜色素变性等眼病。蓝光因其特定的物理性质，极易导致视网膜尤其是黄斑部的光化学损伤，并生成大量活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 引起氧化应激反应^[2-3]，进而诱导 RPE 细胞或感光细胞的凋亡^[4-5]。本实验通过建立蓝光损伤 hRPE 细胞模型，旨在探讨蓝光诱导 hRPE 细胞凋亡的作用机制及其与时间的关系，为今后预防视网膜光化学损伤提供一定的实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器 新鲜眼球由广州军区总医院眼库提供。胎牛血清、低糖培养基 (Gibco, 美国)； $100 \times 10^3 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ 青霉素、 $100 \times 10^3 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 链霉素的双抗溶液，含 $2.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA 的胰蛋白酶 (Gibco, 美国)；DCFH-DA 荧光探针 (Sigma, 美国)；Annexin V PE-7-AAD 凋亡试剂盒 (Merck Millipore, 德国)；一抗：Caspase-3、Bax、Bcl-2 兔抗人单克隆抗体 (Rabbit mAb, CST 美国)；内参 β -actin 鼠抗人单克隆抗体 (碧云天, 中国)；二抗：辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔及抗鼠 IgG 单抗 (Cell Signal Technology, 美国)；FL-1D 蓝光辐照计 (北京师范大学光电仪器厂)；LED 蓝光光源 (具体参数：主波峰 451 nm，色纯度 0.982，中山共炫光电科技有限公司)；Guava Easy-Cyte 流式细胞仪 (德国 Merck Millipore 公司)。其他化学试剂为最高纯度分析级别。

1.2 实验分组 将 37°C 、含体积分数 5% CO_2 细胞培养箱改造成蓝光照射细胞培养箱。铁丝固定 5 盏 LED 蓝光灯源于细胞培养箱正上方，使孵育箱内光强度分布均匀。调整 LED 灯源到细胞培养水平面的垂直距离，用蓝光辐照计测量，使细胞培养箱内蓝光辐射强度达到 $(4.0 \pm 0.5) \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$ 。将离体的新鲜眼球进行原代 RPE 细胞的分离及培养，其中 P4~P6 原代细胞用于实验，分为正常对照组和蓝光辐射组。正常对照组，即 0 h 光照组，未经任何光照处理并置于黑暗环境中培养；蓝光辐射组蓝光照射时间为 0.5 h、1 h、2 h、3 h、4 h、5 h、6 h、12 h。以上细胞培养均用含体积分数 10% 胎牛血清的低糖 DMEM 培养基。

1.3 透射电镜观察 hRPE 细胞超微结构 体外培

养的 hRPE 细胞经不同光照时间处理后， $3500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min 后弃上清液，并用滤纸吸干残余液，迅速加入 0.8 mL 体积分数 2.5% 戊二醛， 4°C 固定 3 h 或过夜，常规逐级脱水、浸透、包埋、超薄切片和铅-铀双重染色，透射电镜下观察正常对照组、光照 3 h、6 h、12 h 组细胞超微结构。

1.4 流式细胞术检测 hRPE 细胞凋亡率 胰蛋白酶消化光照 1 h、2 h、3 h、4 h、5 h、6 h、12 h 组细胞，并收集于 15 mL 离心管中，离心后轻轻重悬，调整细胞密度，吸取 100 μL 细胞悬液于 96 孔板中，并按说明书加入 Annexin V PE-7-AAD 凋亡试剂盒中的试剂，避光，于室温静置反应 20 min 后行流式细胞仪检测。

1.5 流式细胞术检测细胞内 ROS 水平 光照 0 h、0.5 h、1 h、2 h、3 h、4 h、5 h、6 h 组 hRPE 细胞，待细胞长满培养皿底部 70%~80% 时，用 DCFH-DA 荧光探针检测 hRPE 细胞内的 ROS，将 1~2 mL 的 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DCFH-DA 加入培养皿，置于细胞培养皿中孵育 30 min，无血清培养基、PBS 液各润洗 3 次后，消化细胞重悬后移至 96 孔板中行流式细胞仪检测。设置流式细胞仪激发波长为 488 nm 及发射波长 525 nm。

1.6 Western blot 检测凋亡相关蛋白的表达 常规方法提取光照 1 h、2 h、3 h、4 h、5 h、6 h、12 h 组细胞总蛋白，并测得提取蛋白的浓度，将 $5 \times$ 上样缓冲液加入所提蛋白中，取等量的上样蛋白加入已配好的 SDS 凝胶中，电泳跑胶，并用 0.22 μm PVDF 膜进行转膜，待脱脂奶粉液封闭漂洗后，一抗用 Bax、Bcl-2、Caspase-3 (1:200) 兔抗人单克隆抗体，内参用 β -actin 鼠抗人单克隆抗体 (1:1000)， 4°C 孵育过夜，次日漂洗后用山羊抗兔及抗鼠辣根过氧化物抗体 (1:3000) 37°C 孵育 1 h，再次清洗后暗房中用 ECL 发光液曝光并行灰度分析。

1.7 统计学分析 使用 SPSS 20.0 统计学软件进行数据分析。各检测指标用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示；各实验数据资料呈正态分布，检测指标均数经 Levene 检验行方差齐性检验，方差不齐 ($P < 0.05$) 时用 Dunnett-T3 进行均数两两比较，方差齐 ($P > 0.05$) 时用 LSD 检验进行均数两两比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 hRPE 细胞超微结构观察 正常对照组细胞结构完整、清晰，周边游离端见较多微绒毛，胞浆丰富，胞内见线粒体、高尔基体、溶酶体等亚细胞器，胞核内异染色质聚集于胞核周边，常染色质色淡、分布均匀；光照 3 h 组细胞结构较完整，游离端微绒毛仍可

见,胞浆及亚细胞器丰富,细胞核内未见明显结构改变;光照 6 h 组细胞胞浆减少,呈空泡状改变,微绒毛减少或脱落,线粒体减少、肿胀,胞核内异染色质散在分布;光照 12 h 组细胞胞浆减少,呈空泡状改变,微绒毛大部分脱落,线粒体减少、肿胀,胞核内异染色质及常染色质散在分布(图 1)。

Figure 1 Cell ultrastructures changes at different blue light illumination time by transmission electron microscope (Figure A – D: ×8000;Figure E – H: ×25 000). A,E:Normal control group;B,F:Illumination for 3 hours;C,G:Illumination for 6 hours;D,H:Illumination for 12 hours 透射电镜观察不同光照时间 hRPE 细胞超微结构变化(图 A – D 为 ×8000,图 E – H 为 ×25 000)。A、E:正常对照组;B、F:光照 3 h 组;C、G:光照 6 h 组;D、H:光照 12 h 组

2.2 hRPE 细胞凋亡率 实验中发现,不同光照时间作用于 hRPE 细胞后可诱导细胞发生凋亡。当 hRPE 细胞的光照时间为 0 h、1 h、2 h、3 h、4 h、5 h、6 h、12 h 时,流式细胞仪检测的细胞凋亡率分别为(5.30 ± 0.64)%、(5.90 ± 0.89)%、(6.80 ± 0.98)%、(7.70 ± 0.76)%、(9.60 ± 1.10)%、(11.45 ± 2.60)%、(14.90 ± 1.60)%及(23.90 ± 1.20)%。与正常对照组细胞凋亡率相比,光照 4 h、5 h、6 h、12 h 后细胞凋亡率明显增加,差异均有统计学意义($P=0.012,0.001,0.000,0.000$,见图 2)。由此推测,当 hRPE 细胞光照 3 h 时,细胞凋亡不明显;当光照时间超过 4 h 后,细胞凋亡率较正常对照组明显增加。

Figure 2 hRPE cells apoptosis rates detected by flow cytometry. Low-left:Normal alive cell;Up-left:Dead cell or fragments;Low-right:Early apoptosis;Up-right:Late apoptosis 流式细胞术检测 hRPE 凋亡率。左下:正常活细胞;左上:死亡细胞或碎片;右下:早凋亡细胞;右上:晚凋亡细胞

2.3 hRPE 细胞内 ROS 水平 流式细胞仪检测光照 0 h、0.5 h、1 h、2 h、3 h、4 h、5 h 及 6 h 组的 RPE 细胞内产生的 ROS 相对量分别为 (12.90 ± 1.18)%、(20.09 ± 0.63)%、(23.91 ± 1.47)%、(29.14 ± 1.94)%、(34.30 ± 1.84)%、(38.97 ±

1.68)%、(44.08 ± 0.83)%、(57.76 ± 2.80)%；与正常对照组比较,其他不同光照时间产生的 ROS 相对量差异均有统计学意义(均为 $P=0.000$,见图 3)。因此,可能随着光照时间的延长,hRPE 细胞内 ROS 生成量也不断增加。

Figure 3 Rates of DCFH-DA fluorescencin in hRPE cells measured by flow cytometry. The area of R_2 was relative value of DCFH-DA fluorescencin in hRPE cells,which was the relative levels of ROS 流式细胞术检测 hRPE 细胞 DCFH-DA 荧光相对值。图中 R_2 所在区域为 DCFH-DA 荧光量的相对值,即细胞生成 ROS 的相对值

2.4 hRPE 凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2、Caspase-3 表达 正常对照组细胞 Bcl-2 与内参的比值为 1.771 ± 0.149 ,光照 1 h、2 h、3 h、4 h、5 h、6 h、12 h 组细胞 Bcl-2 与内参比值分别为 1.320 ± 0.149 、 1.331 ± 0.093 、 0.979 ± 0.155 、 0.743 ± 0.087 、 0.431 ± 0.064 、 0.423 ± 0.044 、 0.263 ± 0.071 ,各光照组 Bcl-2 表达量与正常对照组比较,差异均有统计学意义(均为 $P=0.000$)。正常对照组中 Bax 及 Caspase-3 与内参的比值分别为 0.016 ± 0.004 、 0.009 ± 0.002 ,光照 1 h、2 h、3 h、4 h、5 h、6 h、12 h 组中 Bax 与内参的比值分别为 0.011 ± 0.001 、 0.008 ± 0.001 、 0.069 ± 0.005 、 0.115 ± 0.015 、 0.170 ± 0.024 、 0.245 ± 0.032 、 0.484 ± 0.064 ,光照 3 h、4 h、5 h、6 h、12 h 组与正常对照组比较,差异均有统计学意义($P=0.001$ 、 0.030 、 0.037 、 0.033 、 0.033)；光照 1 h、2 h、3 h、4 h、5 h、6 h、12 h 组中 Caspase-3 与内参的比值分别为 0.065 ± 0.011 、 0.256 ± 0.053 、 0.310 ± 0.045 、 0.665 ± 0.088 、 0.689 ± 0.096 、 0.943 ± 0.054 、 1.167 ± 0.131 ,光照 3 h、4 h、5 h、6 h、12 h 组与正常对照组比较,差异均有统计学意义($P=0.038$ 、 0.032 、 0.036 、 0.006 、 0.023)。由此可知,与正常对照组 Bcl-2、Bax、Caspase-3 表达量相比,光照组光照后 Bcl-2 表达有下调趋势,当光照时间达 3 h 后,Bcl-2 表达减少较为明显；而 Bax 及 Capase-3 在光照 3 h 后有表达上调趋势,其中光照 5 h 后 Bax、Caspase-3 表达上调较显著。故推测 hRPE 细胞 Bax、Bcl-2、Caspase-3 蛋白表达受光照时间长短的影响(图 4)。

Figure 4 Relationship of Bcl-2、Bax and Caspase-3 expressions with illumination time Caspase-3、Bax 及 Bcl-2 蛋白表达与光照时间的关系

3 讨论

有研究显示,体外培养 hRPE 细胞,当蓝光辐射强度达 $3 \sim 7 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$,持续作用 3 ~ 6 h 甚至 24 h 后可引起细胞不同程度的损伤^[2,5-6]。Cai 等^[7]研究发现,蓝光对 hRPE 细胞的损伤呈光照强度及光照时间依赖性。本实验中观察到蓝光光照 6 h 后 hRPE 细胞出现了空泡样改变,线粒体肿胀、数量减少,微绒毛减少或丢失；流式细胞术检测提示当持续光照 4 h 后细胞凋亡率增加,与正常对照组比较有显著性差异(均为 $P<0.05$)。

蓝光诱导的氧化应激反应在细胞凋亡中具有重要作用^[8-9]。视网膜组织是高耗氧量及高代谢的组织,而 hRPE 细胞又含有脂褐素、丰富的线粒体、内质网等,这与氧化应激反应诱导的细胞凋亡密切相关^[10-11]。主要表现在：一是高氧及新陈代谢需要线

粒体参与供能,而蓝光刺激 hRPE 细胞及感光细胞产生的 ROS 主要来自于线粒体氧化呼吸电子传递链。研究已证实,线粒体是蓝光刺激细胞生成自由基的最主要场所,其中线粒体呼吸链第一复合体及第三复合体可生成超氧阴离子 (O_2^-)^[9,12]。Sparrow 等^[12]研究发现,大量 ROS 未能及时清除时可使机体发生氧化应激反应,诱导线粒体膜电位降低,线粒体通透性转换孔开放,线粒体细胞色素 C 释放入胞浆,由此触发并激活细胞的凋亡系统引起细胞凋亡。二是 hRPE 细胞内不断积累的脂褐素可对细胞造成损害,主要是脂褐素含有的最为主要的载体即荧光基团视黄基 N 视黄乙醇胺 (N-retinylidene-N-retinylthanolamine, A2E) 在蓝光作用下,也可诱导自身或线粒体产生 ROS 或被氧化成环氧化物,发生氧化应激反应,进而引起细胞凋亡^[13-15]。本实验检测 hRPE 细胞内 ROS 水平发现,光照 0.5 h 后细胞内 ROS 水平已明显升高,且其生成量与光照时间呈正相关,而 hRPE 细胞的凋亡率也随着光照时间延长而增加。由此推测,细胞内 ROS 的生成量与细胞凋亡存在一定联系。当光照 hRPE 细胞后线粒体氧化呼吸电子传递链活动增加,细胞内 O_2^- 等 ROS 生成增多,且随着光照时间增加 ROS 也升高,原因可能是产生的 ROS 未能及时清除并不断积累,从而引起了 hRPE 细胞及线粒体结构的改变,并可能进一步引起细胞及线粒体功能的变化。此外,一旦线粒体氧化磷酸化功能障碍,发生电子侧漏, O_2^- 可与 H_2O_2 等含氧化合物反应生成羟自由基 (OH^\cdot) 及脂质过氧化物,形成更多的 ROS。因此引发了细胞损伤及凋亡,并形成“ROS-细胞损伤-ROS”的恶性循环。由此推测,细胞发生氧化应激反应后,可能由 ROS 作为信号受体激活了凋亡信号通路,引起了细胞损伤及凋亡。

视网膜光损伤所导致的光感受器细胞和 RPE 细胞的凋亡与 Caspase-3 的激活, Bax、Bcl-2 的表达有着密切的关系。Bcl-2 是抑制细胞凋亡的重要因子, Bax 是促细胞凋亡的关键调控因子, Bcl-2 抑制凋亡与 Bax 促凋亡对机体的凋亡起重要的调节作用^[16-17]。本实验中 Bax 表达在蓝光光照 3 h、4 h 时开始活跃,并于光照 5 h、6 h 表达显著增多,而 Bcl-2 表达则减少。若 Caspase-3、Bax 表达增多而 Bcl-2 表达减少,可知 RPE 细胞出现了凋亡。正常情况下线粒体膜表面的 Bcl-2 可阻止 Ca^{2+} 流动以稳定线粒体膜电位,抑制线粒体释放死亡因子如细胞色素 C、凋亡诱导因子、pro-caspase-3 等,抑制凋亡的发生。但当光照 hRPE 细胞 3 h 或 4 h 时,因 A2E 及线粒体产生的 ROS 及氧化物启动凋亡信号后,此时线粒体 MPTP 能将 Bax 蛋白聚集在线粒体膜孔道周边,形成更大的 MPTP,导致细胞质的高渗性,促进了细胞及线粒体肿胀及细胞凋亡因子释放,从而激活凋亡诱导因子、pro-caspase-3 等引起凋亡联级反应。

综上所述,可推断在光照 3 h、4 h 甚至更早时, hRPE 细胞就可能出现了细微的病理改变,引起细胞凋亡。本实验从光化学损伤诱导细胞凋亡的角度,探讨了光照时间对 hRPE 细胞凋亡的影响,一定程度上对预防蓝光损害视网膜眼病提供了指导意义,但该氧化应激反应具体在凋亡信号通路上是怎样进行的仍有待进一步研究与探索。

参考文献

- Kay P, Yang YC, Paraoan L. Directional protein secretion by the retinal pigment epithelium; roles in retinal health and the development of age-related macular degeneration [J]. *J Cell Mol Med*, 2013, 17(7): 833-843.
- Algere PV, Marshall J, Seregard S. Age-related maculopathy and the impact of blue light hazard [J]. *Acta Ophthalmol Scand*, 2006, 84(1): 4-15.
- Liang FQ, Godley BF. Oxidative stress-induced mitochondrial DNA damage in human retinal pigment epithelial cells: a possible mechanism for RPE aging and age-related macular degeneration [J]. *Exp Eye Res*, 2003, 76(4): 397-403.
- King A, Gottlieb E, Brooks DG, Murphy MP, Dunaief JL. Mitochondria-derived reactive oxygen species mediate blue light-induced death of retinal pigment epithelial cells [J]. *Photochem Photobiol*, 2004, 79(5): 470-475.
- Wu J, Seregard S, Spangberg B, Oskarsson M, Chen E. Blue light induced apoptosis in rat retina [J]. *Eye (Lond)*, 1999, 13(Pt 4): 577-583.
- Sheng H, Lu Y, Qing FL. Blue light-induced damage to human retinal pigmented epithelial cells mediated by A2E [J]. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi*, 2007, 43(11): 1017-1021.
- Cai SJ, Yan M, Mao YQ, Zhou Y, Liu GJ. Relationship between blue light-induced apoptosis and mitochondrial membrane potential and cytochrome C in cultured human retinal pigment epithelium cells [J]. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi*, 2006, 42(12): 1095-1102.
- Huang C, Zhang P, Wang W, Xu Y, Wang M, Chen X, et al. Long-term blue light exposure induces RGC-5 cell death *in vitro*: involvement of mitochondria-dependent apoptosis, oxidative stress, and MAPK signaling pathways [J]. *Apoptosis*, 2014, 19(6): 922-932.
- Roberts JE. Ultraviolet radiation as a risk factor for cataract and macular degeneration [J]. *Eye Contact Lens*, 2011, 37(4): 246-249.
- Kijlstra A, Tian Y, Kelly ER, Berendschot TT. Lutein; more than just a filter for blue light [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2012, 31(4): 303-315.
- Tokarz P, Kaarniranta K, Blasiak G. Role of antioxidant enzymes and small molecular weight antioxidants in the pathogenesis of age-related macular degeneration (AMD) [J]. *Biogerontology*, 2013, 14(5): 461-482.
- Sparrow JR, Cai B. Blue light-induced apoptosis of A2E-containing RPE: involvement of caspase-3 and protection by Bcl-2 [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2001, 42(6): 1356-1362.
- Chalam KV, Khetpal V, Rusovici R, Balaiya S. A review: role of ultraviolet radiation in age-related macular degeneration [J]. *Eye Contact Lens*, 2011, 37(4): 225-232.
- Wielgus AR, Roberts JE. Retinal photodamage by endogenous and xenobiotic agents [J]. *Photochem Photobiol*, 2012, 88(6): 1320-1345.
- Sparrow JR, Zhou J, Ben-Shabat S, Vollmer H, Itagaki Y, Nakanishi K. Involvement of oxidative mechanisms in blue-light-induced damage to A2E-laden RPE [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2002, 43(4): 1222-1227.
- Khalfaoui T, Basora N, Ouertani-Meddeb A. Apoptotic factors (Bcl-2 and Bax) and diabetic retinopathy in type 2 diabetes [J]. *J Mol Histol*, 2010, 41(2-3): 143-152.
- Abu El-Asrar AM, Dralands L, Missotten L, Geboes K. Expression of antiapoptotic and proapoptotic molecules in diabetic retinas [J]. *Eye (Lond)*, 2007, 21(2): 238-245.