

引文格式:康红花,刘康成,韩云,马明洋,叶蕾,闵幼兰,等.蓝光对小鼠角膜上皮和角膜全层厚度的影响——基于光学相干断层扫描血管造影观察[J].眼科新进展,2018,38(6):506-509. doi:10.13389/j.cnki.rao.2018.0118

【实验研究】

蓝光对小鼠角膜上皮和角膜全层厚度的影响——基于光学相干断层扫描血管造影观察[△]

康红花 刘康成 韩云 马明洋 叶蕾 闵幼兰 申眉 袁晴 朱佩文
姜楠 邵毅

作者简介:康红花,女,1995年4月出生,吉林延边人。研究方向:角膜病及眼表疾病;联系电话:13117913925;E-mail:925191383@qq.com;ORCID:0000-0001-5245-4109
作者简介:刘康成,男,1995年5月出生,江西赣州人。研究方向:角膜病与眼表疾病;联系电话:18684660956;E-mail:594801926@qq.com;ORCID:0000-0002-5008-085X
注:康红花和刘康成同为第一作者

About KANG Hong-Hua: Female, born in April, 1995. E-mail:925191383@qq.com;ORCID:0000-0001-5245-4109
About LIU Kang-Cheng: Male, born in May, 1995. Tel:18684660956;E-mail:594801926@qq.com;ORCID:0000-0002-5008-085X

收稿日期:2017-10-11
修回日期:2018-02-28
本文编辑:申蓝

[△]基金项目:国家自然科学基金资助(编号:81660158、81160118、81460092、81400372);江西省远航工程(编号:2014022);江西省自然科学基金重大项目(编号:2016ACB21017);江西省青年科学基金(编号:20151BAB215016);江西省科技支撑计划项目(编号:20151BBG70223);江西省卫计委科技计划面上项目(编号:20155204、20175116)

作者单位:330006 江西省南昌市,南昌大学第一附属医院眼科(康红花,刘康成,马明洋,叶蕾,闵幼兰,袁晴,朱佩文,邵毅);361102 福建省厦门市,厦门大学眼科研究所(韩云,申眉,姜楠)

通讯作者:邵毅, E-mail: freebee99@163.com; ORCID: 0000-0003-1571-2433

Received date: Oct 11, 2017
Accepted date: Feb 28, 2018

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (No: 81660158, 81160118, 81460092, 81400372); Jiangxi Province Voyage Project (No: 2014022); Natural Science Key Project of Jiangxi Province (No: 20161ACB21017); Youth Science Foundation of Jiangxi Province (No: 20151BAB215016); Technology and Science Foundation of Jiangxi Province (No: 20151BBG70223); Health Development Planning Commission Science Foundation of Jiangxi Province (No: 20155204, 20175116)

From the Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Nanchang University (KANG Hong-Hua, LIU Kang-Cheng, MA Ming-Yang, YE Lei, MIN You-Lan, YUAN Qing, ZHU Pei-Wen, SHAO Yi), Nanchang 330006, Jiangxi Province, China; the Eye Institute of Xiamen University (HAN Yun, SHEN Mei, JIANG Nan), Xiamen 361102, Fujian Province, China

Responsible author: SHAO Yi, E-mail: freebee99@163.com; ORCID: 0000-0003-1571-2433

Effects of blue light on the thickness of corneal epithelium and full-thickness of the cornea in mice by optical coherence tomography angiography

KANG Hong-Hua, LIU Kang-Cheng, HAN Yun, MA Ming-Yang, YE Lei, MIN You-Lan, SHEN Mei, YUAN Qing, ZHU Pei-Wen, JIANG Nan, SHAO Yi

【Abstract】 Objective To investigate the effects of blue light on the thickness of corneal epithelium and full-thickness of the cornea in mice by optical coherence tomography angiography (OCTA).

Methods Totally 40 mice were collected and randomly divided into experimental group and control group, with 20 mice in each group, and the experimental mice were raised in the blue light environment from 8 to 16 hours per day, while the controls were reared in normal environment. Then the thickness of corneal epithelium and full-thickness of the cornea in both groups were measured by OCTA before irradiation and one week, two weeks, one month, two months and three months after irradiation, respectively. **Results** Compared with pre-irradiation, the thickness of corneal epithelium of all regions did not change significantly in both groups at 1 week, 2 weeks, and 1 month after irradiation, and the differences were not statistically significant (all $P > 0.05$). Compared with before irradiation, the corneal epithelium thickness of the control group at 2 months and 3 months after irradiation did not change significantly, and there was no significant difference (both $P > 0.05$). Compared with the control group, the corneal epithelium at central, nasal 5 mm, inferior 5 mm, and temporal 5 mm regions in the experimental group were significantly thickened, and the differences were statistically significant (all $P < 0.05$). Three months after irradiation, compared with the control group, the thickness of corneal epithelium in the central and inner regions of the cornea and nasal 6 mm and temporal 6 mm regions of the experimental group were significantly thickened, and the differences were statistically significant (all $P < 0.05$). There was no significant change in the corneal full thickness between the experimental group and the control group before irradiation and 1 week, 2 weeks, 1 month, 2 months, and 3 months after irradiation, and the differences were not statistically significant (all $P > 0.05$). Furthermore, the difference in the extremum value of corneal epithelial thickness, namely the maximum and the minimum, was significantly different in both groups ($P < 0.05$), but the difference in the extremum value of the full-thickness of the cornea was not significant in the two groups ($P > 0.05$). **Conclusion** The blue light can change the thickness of corneal epithelium in mice, and the change of the central region is obvious, but the full-thickness of the cornea do not significantly change in a short term.

【Key words】 optical coherence tomography angiography; blue light; cornea

【摘要】 目的 应用光学相干断层扫描血管造影(optical coherence tomography angiography, OCTA)观察蓝光对小鼠角膜上皮和角膜全层厚度的影响。方法 选取40只小鼠随机分为实验组和对照组,每组各20只,其中实验组小鼠每天8~16 h于蓝光环境下饲养,而对照组小鼠于正常环境下饲养。分别于照射前及照射后1周、2周、1个月、2个月、3个月,利用OCTA分别测量实验组和对照组小鼠的角膜上皮和角膜全层厚度。结果 与蓝光照射前相比,实验组、对照组分别在照射后1周、2周、1个月,各区域角膜上皮厚度无明显改变,差异均无统计学意义(均为 $P > 0.05$)。与蓝光照射前相比,对照组在照射后2个月、3个月各区域角膜上皮厚度无明显改变,差异均无统计学意义(均为 $P > 0.05$)。与对照组相比,实验组角膜上皮中央、N5、I5、T5区域明显增厚,差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$)。蓝光照射后3个月,与对照组相比,实验组小鼠角膜中央、内环及N6、T6区域角膜上皮厚度均明显增厚,差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$)。蓝光照射前,照射后1周、2周、1个月、2个月、3个月,实验组与对照组相比,各区域角膜全层厚度比较无明显改变,差异均无统计学意义(均为 $P > 0.05$)。两组角膜上皮厚度的极值,即最大值和最小值差值比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),但两组角膜全层厚度最小值和最大值的差值比较无明显统计学意义($P > 0.05$)。结论 蓝光能引起小鼠角膜上皮厚度改变,且中央区域改变较为明显,但短期内角膜全层厚度无明显改变。

【关键词】 光学相干断层扫描血管造影技术;蓝光;角膜

【中图分类号】 R770.43

近年来,各种电子产品的使用不可避免地对人类眼部组织造成了损伤,一定程度上造成了眼部疾病的发生^[1]。其中,许多电子产品可发出蓝光,其波长主要在400~500 nm,而角膜仅可吸收295 nm以下的可见光,所以蓝光对角膜的影响还犹未可知^[2]。光学相干断层扫描血管造影(optical coherence tomography angiography, OCTA)是一种新型的非侵入性成像技术,扫描速度快、分辨率高,可以对角膜相关指标进行较为精准的测量^[3-5]。因此,本研究通过蓝光照射小鼠角膜,利用OCTA检测角膜上皮和角膜全层厚度变化,为进一步研究蓝光对人类角膜影响提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组 于恒温且安静的环境下饲养小鼠至6~8周龄(温度27℃,相对湿度50%,高压灭菌水和普通饲料喂养),从中选取体质量18~21 g的小鼠40只[均为无特定病原体级实验动物,动物合格证号:医动字(赣)12-012;实验许可证号:SY(昌医)2015-293]。小鼠购于南昌大学医学院动物实验中心。对所选的小鼠进行裂隙灯显微镜、眼底镜等眼部相关检查,排除眼部疾病后,将所选小鼠随机均分为实验组和对照组(每组20只,右眼为实验眼)。为控制变量,所有操作均在相同环境下由一人完成。本研究经南昌大学第一附属医院医学伦理委员会批准,严格遵循《赫尔辛基宣言》,充分考虑实验动物的利益,尽可能减少实验动物的痛苦,符合医学伦理原则^[6]。

1.2 实验方法 使用蓝光二极管(苏州久腾光电科技有限公司)发出蓝光,光量子数为每秒 $30 \times 10^{-3} \mu\text{mol} \cdot \text{cm}^{-2}$,波峰值为430 nm,半波宽约为20 nm,蓝光强度为 $0.527 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$,由调压器调节获得并由辐射仪测量确定。将实验组小鼠每天8~16 h于蓝光环境下饲养,而对照组小鼠于正常环境下饲养,在照射前及照射后1周、2周、1个月、2个月、3个月分别测量两组小鼠的角膜上皮和角膜全层厚度。

1.3 OCTA检查 应用AngioVue OCTA系统(Optovue, Inc., Fremont, CA),选择视网膜成像(An-

gioRetina模式),采用分频幅去相关血管造影算法,由于系统的默认焦点是视网膜,关闭自动对焦功能,套上眼前节探头,手动调整焦距进行成像^[5]。确定扫描中心,关闭自动聚焦功能,设置5 μm的轴向分辨率、15 μm的横向分辨率,应用波长840 nm、宽度22 μm的光源获取3D扫描图像^[7]。利用系统软件,按以下分区标准,将角膜划分为17个区域:确定扫描中心为圆心,2 mm、5 mm、6 mm为直径作为圆形扫描区域,分别作为角膜中央、内环和外环。同时,按上侧(superior, S)、鼻上侧(superior nasal, SN)、鼻侧(nasal, N)、鼻下侧(inferior nasal, IN)、下侧(inferior, I)、颞下侧(inferior temporal, IT)、颞侧(temporal, T)、颞上侧(superior temporal, ST)对内环和外环的17个区域角膜上皮厚度和角膜全层厚度进行测量。

1.4 测量和分析 对实验组和对照组所有小鼠进行测量,并分析其角膜中央直径2 mm区域和内环、外环17个分区的角膜上皮和角膜全层各区域的局部厚度和变化量,叠加双眼数据,获得各区域角膜上皮和角膜全层厚度的平均值,将所得数据制成图形。

1.5 统计学分析 采用SPSS 17.0软件进行统计学分析,采用完全随机设计资料的方差分析比较角膜上皮厚度和角膜全层厚度,计数资料采用 χ^2 检验,检验水准均为 $\alpha = 0.05$;两组间的均数比较采用Mann-Whitney U检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 蓝光对小鼠角膜上皮厚度的影响 与蓝光照射前相比,实验组、对照组分别在照射后1周、2周、1个月,各区域角膜上皮厚度无明显改变,差异均无统计学意义(均为 $P > 0.05$)。与蓝光照射前相比,对照组在照射后2个月、3个月各区域角膜上皮厚度无明显改变,差异均无统计学意义(均为 $P > 0.05$)。与对照组相比,实验组角膜上皮中央、N5、I5、T5区域明显增厚,差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$)。蓝光照射后3个月,与对照组相比,实验组小鼠角膜中央、内环及N6、T6区域角膜上皮厚度均明显增厚,差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$)。见图1。

图1 实验组和对照组经蓝光照射后各时间点角膜各区域的上皮厚度改变。红色*代表实验组蓝光照射后与蓝光照射前对比,角膜上皮厚度有显著性差异的区域($P < 0.05$)。从蓝光照射后2个月起,角膜上皮中央、N5、I5、T5区域增厚,差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$);内环其他区域及N6、T6区域随后增厚,差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$)。单位: μm

2.2 蓝光对小鼠角膜全层厚度的影响 经蓝光照射后1周、2周、1个月、2个月、3个月,实验组、对照组不同时间点各区域角膜全层厚度与蓝光照射前相比均无明显改变,差异均无统计学意义(均为 $P > 0.05$)。蓝光照射前及照射后1周、2周、1个月、2个月、3个月,实验组与对照组相比,各区域角膜全层厚度比较也无明显改变,差异均无统计学意义(均为 $P > 0.05$)。

2.3 实验组与对照组角膜上皮和全层厚度极值差值结果的比较 实验组照射3个月后角膜上皮厚度最大值为(82.12 ± 5.12) μm ,最小值为(66.97 ± 4.14) μm ,最小值和最大值的差值为(-16.15 ± 1.17) μm ,角膜全层厚度最大值为(319.65 ± 21.67) μm ,最小值为(152.32 ± 18.51) μm ,最小值和最大值的差值为(-169.64 ± 20.19) μm ;对照组照射3个月后角膜上皮厚度最大值为(70.22 ± 4.17) μm ,最小值为(57.19 ± 3.16) μm ,最小值和最大值的差值为(-13.71 ± 0.92) μm ,角膜全层厚度最大值为(305.52 ± 20.91) μm ,最小值为(139.96 ± 44.64) μm ,最小值和最大值的差值为(-166.75 ± 13.87) μm 。两组角膜上皮厚度的最大值和最小值的差值比较差异有统计学意义($P < 0.05$),但两组角膜全层厚度最小值和最大值的差值比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

3 讨论

发光二极管相关产品的应用领域正在逐渐扩大,被广泛应用于普通照明、装饰、指示及背光源等领域,并且在电脑等电子数码产品中也逐步开展应用。随着它的广泛使用,人们开始关注其在光生物安全方面的问题,尤其是蓝光对人眼的影响。本实验选择小鼠作为对象,是由于其眼部结构和功能与人类较为相似,通过观察蓝光照射对眼部的影响,了

解蓝光对角膜的影响程度,为进一步研究蓝光对角膜的损伤提供科学的依据。

有研究显示,具有较短波长的光(如蓝光)比波长较长的光更容易被角膜吸收^[8]。短波长的蓝光,其波段存在一个很强的波峰,折射力大^[9],而较长时间的蓝光照射可以对眼部的相关结构造成损伤,可引起视网膜细胞凋亡^[10],甚至导致年龄相关性黄斑变性等疾病的发生^[11-12],但其对角膜的影响鲜有报道。OCTA作为较新的非侵入性成像系统,现已有报道将其应用于视网膜等眼部相关结构的血流动力学指标检测^[13],且OCTA技术已可应用于检查角膜疾病的异常新生血管,因此应用OCTA扫描系统对角膜上皮和角膜全层各区域厚度的测量有较好的效果。

本实验结果表明,蓝光照射后1周、2周、1个月时角膜上皮及角膜全层厚度增加不明显,可能由于蓝光对角膜的影响需要一个较长的过程,而1个月时间可能较短,对于角膜的影响还未显露出来。其次,OCTA的显像程度可能还有待提高,需要更加精细的检测手段才能发现较短时间内蓝光对角膜的影响。而再照射1个月后,我们可以清楚地发现,角膜上皮厚度明显增加,这意味着蓝光对角膜已经产生了一定的影响。但是,本研究结果显示蓝光对于角膜全层厚度无明显改变,这意味着我们可能需要更长时间的研究才能发现角膜全层厚度的改变。而结果中两组角膜上皮厚度的极值有差别,差异有统计学意义,但两组角膜全层厚度最小值和最大值的差值无明显差别,我们考虑这更多的是个体差异和操作过程中所引起改变的因素居多,而极值差值无明显改变可以一定程度上验证我们的猜想。

角膜属于眼表结构,极易受到外界各种因素的影响而引起损伤。有研究表明,外界电离辐射和防腐剂等因素可以通过诱导DNA损伤从而损害角膜

上皮^[14-15]。而蓝光的辐射能量到达眼睛可引起光化学反应,导致眼部的结构变化或代谢水平紊乱,甚至导致深层间质损伤或穿孔^[16-17]。与红光、绿光等可见光相比,蓝光的照射增加了角膜中 IL-1 β 、IL-6 的表达,而 IL-1 β 和 IL-6 出现于各种病理刺激中^[18-21]。IL-6 与其他促炎因子一起在甲状腺相关眼病、干眼症和移植抗宿主病等疾病中,通过 NF- κ B 和丝裂原活化蛋白激酶的方式发挥主要作用,从而改变了角膜厚度。此外, Marnett^[22] 和 Dedon 等^[23] 发现,蓝光照射可导致角膜凋亡细胞的氧化应激反应,其氧化应激标记物作为中间体,在形成氧化终产物和脱氧核苷反应过程中导致了 DNA 的损伤。并且,还有学者发现蓝光导致了氧自由基的产生,其生成水平和角膜上皮细胞活力有着明显的关系^[24-25],而角膜上皮活力的增加可能是导致角膜上皮厚度增加的原因。

综上所述,蓝光照射可以导致小鼠角膜上皮厚度增加,但由于本实验对蓝光的能量未设置梯度,无法判断其能量的大小是否对角膜有不同的影响,因此我们需要进一步研究并探究是否有其他因素可能导致角膜厚度发生变化,为今后可对暴露于蓝光的时间、强度等指标制定标准。同时,本研究也为蓝光导致的干眼影响角膜上皮厚度的现象提供了依据。

参考文献

[1] LONG Q, CHEN D, CHU R. Illumination with monochromatic long-wave length light promotes myopic shift and ocular elongation in newborn pigmented guinea pigs[J]. *Cutan Ocul Toxicol*, 2009, 28(4):176-180.

[2] YOUSSEF P N, SHEIBANI N, ALBERT D M. Retinal light toxicity[J]. *Eye (Lond)*, 2011, 25(1):1-14.

[3] MIWA Y, MURAKAMI T, SUZUMA K, UJI A, YOSHITAKE S, FUJIMOTO M, et al. Relationship between functional and structural changes in diabetic vessels in optical coherence tomography angiography[J]. *Sci Rep*, 2016, 6:29064.

[4] ANG M, CAI Y, SHAHIPASAND S, SIM D A, KEANE P A, SNG C C, et al. En face optical coherence tomography angiography for corneal neovascularisation[J]. *Br J Ophthalmol*, 2016, 100(5):616-621.

[5] ANG M, SIM D A, KEANE P A, SNG C C, EGAN C A, TUFALI A, et al. Optical coherence tomography angiography for anterior segment vasculature imaging[J]. *Ophthalmology*, 2015, 122(9):1740-1747.

[6] SHAO Y, YU Y, LIU Q P, LI J M, DONG F, HUANG X, et al. Effects of Honghua preserved amniotic membrane on scar healing in experimental glaucoma surgery[J]. *Int J Ophthalmol*, 2014, 7(2):226-231.

[7] SPAIDE R F, KLANCNIK J M Jr, COONEY M J. Retinal vascular layers imaged by fluorescein angiography and optical coherence tomography angiography[J]. *JAMA Ophthalmol*, 2015, 133(1):66-73.

[8] VAN DE KRAATS J, VAN NORREN D. Optical density of the aging human ocular media in the visible and the UV[J]. *J Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis*, 2007, 24(7):1842-1857.

[9] GALLEGO P, MARTÍNEZ-GARCÍA C, PÉREZ-MERINO P, IBARES-FRÍAS L, MAYO-ISCAR A, MERAYO-L LOVES J. Scleral changes induced by atropine in chicks as an experimental model of myopia[J]. *Ophthalm Physiol Opt*, 2012, 32(6):478-484.

[10] ORGANISCIAC D T, VAUGHAN D K. Retinal light damage: mechanisms and protection[J]. *Prog Retin Eye Res*, 2010, 29(2):113-134.

[11] MARC R E, JONES B W, WATT C B, VAZQUEZ-CHONA F, VAUGHAN D K, ORGANISCIAC D T. Extreme retinal remodeling triggered by light damage; implications for age related macular degeneration[J]. *Mol Vis*, 2008, 14(93-96):782-806.

[12] KERNT M, NEUBAUER A S, LIEGL R G, HIRNEISS C, ALGE C S, WOLF A, et al. Sorafenib prevents human retinal pigment epithelium cells from light-induced overexpression of VEGF, PDGF and PIGF[J]. *Br J Ophthalmol*, 2010, 94(11):1533-1539.

[13] JIA Y, WEI E, WANG X, ZHANG X, MORRISON J C, PARIKH M, et al. Optical coherence tomography angiography of optic disc perfusion in glaucoma[J]. *Ophthalmology*, 2014, 121(7):1322-1332.

[14] JIA Y, BAILEY S T, WILSON D J, TAN O, KLEIN M L, FLAXEL C J, et al. Quantitative optical coherence tomography angiography of choroidal neovascularization in age-related macular degeneration[J]. *Ophthalmology*, 2014, 121(7):1435-1444.

[15] CHA S H, LEE J S, OUM B S, KIM C D. Corneal epithelial cellular dysfunction from benzalkonium chloride (BAC) *in vitro*[J]. *Clin Exp Ophthalmol*, 2004, 32(2):180-184.

[16] CHOY C K, BENZIE I F, CHO P. UV-mediated DNA strand breaks in corneal epithelial cells assessed using the comet assay procedure[J]. *Photochem Photobiol*, 2005, 81(3):493-497.

[17] SLINEY D H. Risks of occupational exposure to optical radiation[J]. *Med Lav*, 2006, 97(2):215-220.

[18] STAMATACOS C, HARRISON J L. The possible ocular hazards of LED dental illumination applications[J]. *J Mich Dent Assoc*, 2014, 96(4):34-39.

[19] KHAN S, COLE N, HUME E B, GARTHWAITE L, CONIBEAR T C, MILES D H, et al. The role of CXC chemokine receptor 2 in Pseudomonas aeruginosa corneal infection[J]. *J Leukol Biol*, 2007, 81(1):315-318.

[20] HALL L R, DIACONU E, PATEL R, PEARLMAN E. CXC chemokine receptor 2 but not C-C chemokine receptor 1 expression is essential for neutrophil recruitment to the cornea in helminth-mediated keratitis (river blindness)[J]. *J Immunol*, 2001, 166(6):4035-4041.

[21] ZHANG Z, YANG W Z, ZHU Z Z, HU Q Q, CHEN Y F, HE H, et al. Therapeutic effects of topical doxycycline in a benzalkonium chloride-induced mouse dry eye model[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2014, 55(5):2963-2974.

[22] MARNETT L J. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde[J]. *Mutat Res*, 1999, 424(1-2):83-95.

[23] DEDON P C, PLASTARAS J P, ROUZER C A, MARNETT L J. Indirect mutagenesis by oxidative DNA damage: Formation of the pyrimidopurine adduct of deoxyguanosine by base propenal[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(19):11113-11116.

[24] NIWANO Y, KANNO T, IWASAWA A, AYAKI M, TSUBOTA K. Blue light injures corneal epithelial cells in the mitotic phase *in vitro*[J]. *Br J Ophthalmol*, 2014, 98(7):990-992.

[25] LEE J B, KIM S H, LEE S C, KIM H G, AHN H G, LI Z, et al. Blue light-induced oxidative stress in human corneal epithelial cells: protective effects of ethanol extracts of various medicinal plant mixtures[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2014, 55(7):4119-4127.