

# 蓝光诱导体外培养的人视网膜色素上皮细胞凋亡

蔡善君 严密 张建军

**【摘要】** 目的 观察蓝光照射对体外培养的人视网膜色素上皮(RPE)细胞凋亡的影响。方法 用蓝光照射体外培养的人 RPE 细胞,分为 3 组,A 组:不同光照强度;B 组:同一光照强度,不同光照时间;C 组:同一光照强度和光照时间,不同细胞培养终止时间。利用末端脱氧核酸转移酶介导的原位缺口末端标记(TUNEL)、荧光素标记的连接素 V/碘化吡啶(Annexin V-FITC/PI)双染流式细胞检测、透射电子显微镜等手段观察细胞凋亡。结果 TUNEL 染色阳性细胞的体积缩小变圆,细胞核浓缩,边聚成新月形或帽状,细胞核碎裂成数个,细胞膜出胞。透射电子显微镜观察发现细胞内线粒体肿胀,线粒体内膜嵴消失;粗面内质网扩张;溶酶体增加,内含代谢产物。A 组低于一定阈值 $(500 \pm 100)lx$ 的蓝光照射对 RPE 细胞损伤较轻,细胞凋亡及坏死随光照强度的增强而增加;B 组随着光照时间延长,RPE 细胞凋亡数量没有增加,而细胞坏死逐渐增加;C 组光照后 6、12 h,损伤以细胞凋亡为主,但随着光照时间延长,凋亡继发坏死细胞和坏死细胞明显增加。结论 蓝光照射可引起体外培养的人 RPE 细胞损伤,损伤形式有凋亡、凋亡继发坏死及坏死;损伤程度呈光照强度和光照时间依赖性。

**【关键词】** 眼损伤; 色素上皮,眼; 细胞死亡; 光刺激; 临床实验室技术

中图分类号:R446-39 R77

**Blue-light-induced apoptosis of cultured human retinal pigment epithelial cells in vitro** CAI Shan-jun, YAN Mi, ZHANG Jun-jun. Department of Ophthalmology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

Corresponding author: ZHANG Jun-jun, Email: zhangjunjun@medmail.com.cn

**【Abstract】 Objective** To observe the effect of blue light on apoptosis of cultured human retinal pigment epithelial (RPE) cells in vitro. **Methods** Human RPE cells were exposed to blue light, and the cells were divided into 3 groups: group A, with various intensity of illumination; group B; with same intensity but different time of illumination; group C; with same intensity and time of illumination but different finish time of the culture. The apoptosis of RPE cells was observed by TdT-dUTP terminal nick-end labeling (TUNEL) and annexin V-fluoresein isothiocyanate (FITC)/propidium iodide (PI) flow cytometry, and transmission electron microscopy. **Results** The positive cells stained by TUNEL shrunk and turned round, whose nuclei concentrated and congregated like the crescent or hat. Cracked nuclei and membrane bleb were found. Swollen mitochondrial, disappeared inner limiting membrane of mitochondria, and dilation of the rough endoplasmic reticulum with metabolite were observed by transmission electronmicroscopy. In group A, mild damage of RPE cells was found when the threshold value of the intensity of illumination was less than  $(500 \pm 100)lx$ , and the apoptosis and necrosis of RPE cells aggravated as the intensity of illumination increased; in group B, as the time of illumination extended, the number of apoptotic RPE cells didn't increase while the necrosis increased; in group C, 6 and 12 hours after illumination, apoptosis of cells was the main injury, while apoptosis with necrosis was found and necrotic cells increased as the time of illumination was prolonged. **Conclusions** Illumination with blue light may cause damages of human RPE cells in vitro, with the modalities of apoptosis, apoptotic necrosis and necrosis. The extent of injury is dependent on intensity and duration of the illumination.

**【Key words】** Eye injuries; Pigment epithelium of eye; Cell death; Photoc stimulation; Clinical laboratory techniques

众所周知,老年性黄斑变性(AMD)是老年人致

盲的重要眼疾,而视网膜光损伤的病理过程与 AMD 及视网膜色素变性(RP)有许多相似之处,视网膜光损伤是研究视网膜变性类疾病的良好动物模型<sup>[1]</sup>,对其深入的研究可以为这些疾病的临床治疗提供良好的参

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39770788);贵州省科委基金资助项目(3039)

作者单位:610041 成都,四川大学华西医院眼科(蔡善君,现在遵义医学院附属医院眼科)

通讯作者:张建军,Email:zhangjunjun@medmail.com.cn

考。研究发现,可见光照射可导致视网膜神经上皮和色素上皮(RPE)细胞凋亡<sup>[2]</sup>。我们以蓝光作为光源,用不同光照强度、光照时间,及不同光照后终止时间对体外培养的人 RPE 细胞进行处理,观察有无细胞凋亡的发生,为进一步揭示其分子机制奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

培养的人 RPE 细胞来源于 10 个不同的 RPE 细胞系。主要仪器和试剂包括美的照明公司的 35W 冷反射定向照明卤素灯,光照度仅为上海光电研究所生产的 ST-III 型,流式细胞仪为美国 Coulter 公司的 EPICS ELTTE ESP 型。美国 Gibco 公司的 Dulbecco 改良 Eagle 培养基(DMEM)(高糖),丹麦 DAKO 公司的鼠抗人角蛋白抗体,成都华西生化制品厂的小牛血清(FCS),法国 Immunotech 公司的荧光素标记的连接素 V(Annexin V-FITC)试剂盒,德国 Boehringer Mannheim 公司的原位细胞凋亡检测试剂盒。

### 1.2 方法

人 RPE 细胞的原代培养及传代方法参照文献<sup>[3]</sup>,3~6 代细胞用于实验。将培养的人 RPE 细胞行光照处理:将 RPE 细胞培养于直径 3.5 cm 培养皿内,细胞铺满或近铺满时,以 35W 冷反射定向照明卤素灯作光源,光线通过蓝色滤光片,使照射 RPE 细胞的光线为蓝色光,波长为 470~490 nm,分别作如下光照模型:①A 组为不同光照强度组;分别用(500±100)、(2 000±500)、(3 000±500)lx 光照强度照射 RPE 细胞 6 h,光照结束后 24 h 终止培养;②B 组为同一光照强度、不同光照时间组;(2 000±500)lx 光照强度,光

照时间分别为 6、12、24 h,均于光照结束后 24 h 终止培养;③C 组为同一光照强度和光照时间、不同细胞培养终止时间组;(2 000±500)lx 光照 6 h,细胞终止培养时间分别为 6、12、24、36 h。以上每一实验平行组为同一细胞系的同一代,阴性对照均为无光照组,用黑色不透光布遮盖培养皿,在同一孵箱内培养。光照时培养皿水平台的温度变化为 36.5~37.5℃。

TUNEL 染色及流式细胞仪检测方法参考文献<sup>[4]</sup>。打印结果。

### 1.3 统计学方法

实验数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较用完全随机设计的方差分析,组内各处理组与对照组比较采用最小显著差异检验(LSD)法。双侧检验,检验水准  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

传代后细胞由多角形向椭圆形、不规则形或梭形或纤维细胞转变,细胞浆内色素颗粒减少甚至消失。角蛋白免疫细胞化学染色;培养的 RPE 细胞细胞浆呈棕褐色阳性反应,证实为 RPE 细胞。

光学显微镜下,TUNEL 染色阳性细胞的体积缩小变圆,细胞核被染成紫色,核红复染后略呈紫红色,阴性细胞核复染后呈粉红色(图 1)。可见细胞膜完整,细胞核浓缩,边缘成新月形或帽状(图 1),细胞核碎裂成数个(图 2),细胞膜出胞(图 3)。

透射电子显微镜检查结果显示,培养的人 RPE 细胞内富含线粒体、粗面内质网,细胞浆内色素颗粒,细胞表面微绒毛。B 组细胞内线粒体肿胀,线粒体内膜消失(图 4);粗面内质网扩张,凋亡细胞出现染色质浓集并靠近核膜(图 5);溶酶体增加,内含代谢产物。

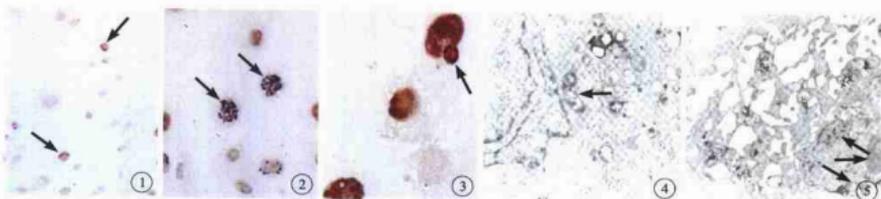


图 1 光照后 RPE 细胞 TUNEL 染色像。RPE 细胞的体积缩小变圆,染色成边缘(黑箭) TUNEL 染色  $\times 100$  图 2 光照后 RPE 细胞 TUNEL 染色像。细胞核裂解(黑箭) TUNEL 染色  $\times 200$  图 3 光照后 RPE 细胞 TUNEL 染色像。可见细胞膜出胞(黑箭) TUNEL 染色  $\times 100$  图 4 (2 000±500)lx 光照 6 h,光照后 24 h RPE 细胞电子显微镜像。线粒体肿胀,内膜消失(黑箭)  $\times 1 400$  图 5 (2 000±500)lx 光照 6 h,光照后 24 h RPE 细胞电子显微镜像。染色质浓集并靠近核膜(黑箭),粗面内质网扩张(白箭)  $\times 1 400$

Fig. 1 Photograph of TUNEL staining of RPE cells after illumination. Shrunken and round RPE cells with chromatin condensation (black arrows) TUNEL staining  $\times 100$  Fig. 2 Photograph of TUNEL staining of RPE cells after illumination. Cracked nucleolus (black arrows) TUNEL staining  $\times 200$  Fig. 3 Photograph of TUNEL staining of RPE cells after illumination. Membrane blebs of the cell (black arrow) TUNEL staining  $\times 100$  Fig. 4 Photograph of electron microscope of RPE cells 24 hours after illuminated with (2 000±500)lx for 6 hours. Mitochondrial swelling and disappeared inner mitochondrial membrane ridge (black arrow)  $\times 1 400$  Fig. 5 Photograph of electron microscope of RPE cells 24 hours after illuminated with (2 000±500)lx for 6 hours. Chromatin condensation near nuclear membrane (black arrows); dilation of the rough endoplasmic reticulum (white arrows)  $\times 1 400$

Annexin V-FITC/PI 染打印结果分为 4 个象限, 即 4 个细胞亚群, 象限 1(Q1) 代表凋亡细胞 (Annexin+/PI-); 象限 2(Q2) 代表凋亡继发坏死细胞 (Annexin+/PI+); 象限 3(Q3) 代表正常活细胞 (Annexin-/PI-); 象限 4(Q4) 代表坏死或机械损伤的细胞 (Annexin-/PI+) (图 6)。

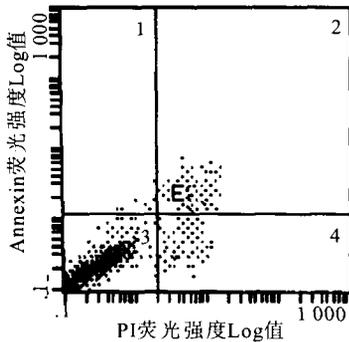


图 6 Annexin V-FITC/PI 双染流式细胞检测打印结果。依次将细胞分为 4 个象限, 即 4 个细胞亚群。象限 1(Q1) 代表凋亡细胞 (Annexin+/PI-); 象限 2(Q2) 代表凋亡继发坏死细胞 (Annexin+/PI+); 象限 3(Q3) 代表正常活细胞 (Annexin-/PI-); 象限 4(Q4) 代表坏死或机械损伤的细胞 (Annexin-/PI+)

Fig. 6 Results of the flow cytometry of analyzing cells with Annexin V-FITC and PI. Four phenotypes; quadrant 1 (Q1) indicates the apoptotic cells (Annexin+/PI-); quadrant 2 (Q2) indicates the apoptotic necrotic cells (Annexin+/PI+); quadrant 3 (Q3) indicates the viable cells (Annexin-/PI-); quadrant 4 (Q4) indicates the necrotic or mechanical damaged cells (Annexin-/PI+)

A 组中, 光照强度为 (500±100) lx 时的细胞凋亡及凋亡继发性坏死程度与无光照组之间差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ); 光照强度为 (2 000±500)、(3 000±500) lx 时均较无光照组有所增加, 差异有统计学意义

( $P<0.05$ ); 光照强度为 (2 000±500)、(3 000±500) lx 时较 (500±100) lx 时有所增加, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ) (表 1)。

B 组中, 在 (2 000±500) lx 的光照强度下, 光照 6、12 h 组与无光照组比较, 凋亡细胞数增加, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ); 而光照 24 h 组与无光照组比较, 差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。光照 6 h 组与无光照组坏死或机械性损伤细胞比较, 差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ), 而光照 12 及 24 h 组与无光照组比较有所增加, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ )。光照 12 及 24 h 组与光照 6 h 组比较, 无论是凋亡细胞数、坏死或机械性损伤细胞数均有所增加, 差异均有统计学意义 ( $P<0.05$ )。12 h 光照组与 24 h 光照组比较, 凋亡细胞数差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ); 而凋亡继发坏死细胞数、坏死或机械性损伤细胞数的差异均有统计学意义 ( $P<0.05$ ) (表 2)。

C 组中, 随着光照后培养时间的延长, RPE 细胞凋亡数逐渐增加 ( $P<0.05$ ), 但光照后 36 h 细胞凋亡数并无增加 ( $P>0.05$ ), 而坏死或机械性损伤细胞数量明显增加 ( $P<0.05$ )。光照后 6、12 h 组的损伤以细胞凋亡为主, 细胞坏死数量增加不明显, 但随着时间延长, 凋亡继发坏死细胞和坏死细胞明显增加 (表 3)。

### 3 讨论

RPE 细胞对维护视网膜的正常结构和功能有着重要的作用。有研究表明, 在视网膜光损伤过程中, RPE 细胞的改变最早发生, 光感受器的改变为继发

表 1 光照强度与 RPE 细胞损伤的关系 ( $\bar{x}\pm s$ )

| 光照强度 (lx) | 样本数 (n) | RPE 细胞损伤                |                          |                           |                           |
|-----------|---------|-------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|
|           |         | Q1                      | Q2                       | Q3                        | Q4                        |
| 无光照       | 3       | 1.70±0.14               | 4.40±0.28                | 93.10±0.71                | 0.80±0.28                 |
| 500±100   | 3       | 2.35±0.64               | 7.05±1.63                | 89.45±1.20                | 1.15±0.21                 |
| 2 000±500 | 3       | 5.95±0.35 <sup>*</sup>  | 11.80±3.81 <sup>*</sup>  | 81.05±3.32 <sup>**</sup>  | 1.20±0.14                 |
| 3 000±500 | 3       | 2.90±0.14 <sup>*Δ</sup> | 14.65±0.64 <sup>**</sup> | 69.95±2.05 <sup>**Δ</sup> | 12.50±1.27 <sup>**Δ</sup> |

注: \* 与无光照组比较, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ); \*\* (2 000±500)、(3 000±500) lx 光照组与 (500±100) lx 光照组比较, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ); Δ (3 000±500) lx 光照组与 (2 000±500) lx 光照组比较, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ )。Q1 组间比较  $F=49.696, P=0.001$ ; Q2 组间比较  $F=9.610, P=0.027$ ; Q3 组间比较  $F=49.180, P=0.001$ ; Q4 组间比较  $F=148.702, P=0.000$  (表中数据为各类细胞占总细胞的百分值)

表 2 光照时间与 RPE 细胞损伤的关系 ( $\bar{x}\pm s$ )

| 光照时间 (h) | 样本数 (n) | RPE 细胞损伤                |                          |                          |                          |
|----------|---------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
|          |         | Q1                      | Q2                       | Q3                       | Q4                       |
| 无光照      | 3       | 0.95±0.07               | 4.95±0.07                | 93.05±0.35               | 1.05±0.21                |
| 6        | 3       | 6.55±0.64 <sup>*</sup>  | 12.05±0.21 <sup>*</sup>  | 81.10±0.28 <sup>*</sup>  | 0.35±0.07                |
| 12       | 3       | 4.15±0.50 <sup>**</sup> | 10.60±0.57 <sup>**</sup> | 82.50±0.28 <sup>*</sup>  | 2.75±0.35 <sup>**</sup>  |
| 24       | 3       | 1.85±0.21 <sup>Δ</sup>  | 12.10±0.28 <sup>*Δ</sup> | 80.00±1.13 <sup>*Δ</sup> | 6.05±1.06 <sup>**Δ</sup> |

注: \* 与无光照组比较, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ); \*\* 光照后 12、24 h 组与光照后 6 h 组比较, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ); Δ 光照后 24 h 组与光照后 12 h 组比较, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ )。Q1 组间比较  $F=71.952, P=0.001$ ; Q2 组间比较  $F=204.163, P=0.000$ ; Q3 组间比较  $F=184.804, P=0.000$ ; Q4 组间比较  $F=39.754, P=0.002$  (表中数据为各类细胞占总细胞的百分值)

表 3 (2 000±500) lx 光照后不同时间 RPE 细胞的损伤( $\bar{x}\pm s$ )

| 光照后时间<br>(h) | 样本数<br>(n) | RPE 细胞损伤                 |             |                           |                          |
|--------------|------------|--------------------------|-------------|---------------------------|--------------------------|
|              |            | Q1                       | Q2          | Q3                        | Q4                       |
| 无光照          | 3          | 1.17±0.21                | 2.73±0.68   | 95.47±0.31                | 0.67±0.64                |
| 6            | 3          | 2.20±0.16*               | 6.88±3.91   | 88.95±3.04*               | 2.05±0.68                |
| 12           | 3          | 3.93±0.55**              | 9.267±2.27* | 84.70±2.10**              | 2.10±0.44                |
| 24           | 3          | 3.65±0.07**              | 10.15±1.34* | 83.55±0.64**              | 2.65±0.64*               |
| 36           | 3          | 1.45±0.21** <sup>△</sup> | 10.75±0.92* | 83.25±0.92** <sup>△</sup> | 4.55±1.63** <sup>△</sup> |

注: \* 与无光照组比较, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ); \*\* 光照结束后 12、24、36 h 组与光照结束后 6 h 组比较, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ); <sup>△</sup> 光照结束后 24、36 h 组与光照结束后 12 h 组比较, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ); <sup>▽</sup> 光照结束后 36 h 组与光照结束后 24 h 组比较, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ )。Q1 组间比较  $F=45.560, P=0.000$ ; Q2 组间比较  $F=4.299, P=0.032$ ; Q3 组间比较  $F=17.020, P=0.000$ ; Q4 组间比较  $F=7.473, P=0.006$ (表中数据为各类细胞占总细胞的百分值)

性<sup>[5]</sup>。RPE 细胞内含有黑色素和脂褐素, 脂褐素是由 RPE 细胞吞噬光感受器细胞外节盘膜的代谢产物形成, 可以产生自发荧光, 用蓝光可以激发脂褐素发出荧光, 容易建立人 RPE 细胞光损伤模型。另外蓝光的波长为 470~490 nm, 可以明确引起人 RPE 细胞损伤的波长。因此, 蓝光诱导视网膜细胞损伤已广泛用于体外和体内视网膜变性的研究<sup>[6,8]</sup>。我们也选用蓝光作为光源, 观察蓝光对人 RPE 细胞的损害。

我们用不同强度蓝光; 同一光照强度, 不同光照时间; 同一光照强度和光照时间, 不同细胞培养终止时间对人 RPE 细胞进行处理。结果表明, 低于一定阈值的光照对 RPE 细胞损伤较轻, 细胞凋亡及坏死随光照强度的增强而增加。光照 6、12 h 后, RPE 细胞损伤以细胞凋亡为主, 随着光照时间延长, RPE 细胞凋亡数量没有增加, 而细胞坏死逐渐增加, 因此, 在 (2 000±500) lx 光照强度光照 6 h, 光照后 12 h 为诱导体外培养的人 RPE 细胞凋亡的最佳条件。我们发现, 蓝光照射可引起体外培养的人 RPE 细胞损伤, 损伤形式有凋亡、凋亡继发性坏死及坏死, 三者之间既有区别, 也有联系, 随着光照强度增加; 相同光照强度和光照时间, 光照后时间延长, 人 RPE 细胞可由凋亡转化为凋亡继发性坏死, 最后转化为坏死。

推测 Annexin V-FITC 与 PI 双染, 流式细胞检测到的凋亡细胞为凋亡早期细胞 Annexin V (+) PI (-), 凋亡继发性坏死细胞为凋亡晚期细胞 Annexin V (+) PI (+), 它既具有凋亡细胞的特征 Annexin V (+), 又具有坏死细胞的特点 PI (+)。周咏东等<sup>[4]</sup>把凋亡细胞和凋亡继发性坏死细胞作为凋亡细胞的总数进行探讨, 即把凋亡继发性坏死细胞纳入凋亡细胞类。该研究把凋亡继发性坏死细胞作为单独一类细胞, 探讨在不同处理条件下它的变化规律, (2 000±500) lx 光照强度光照 12 h, 光照后 24 h 为诱导体外培养的人

RPE 细胞凋亡继发性坏死的最佳条件。

正常情况下磷脂酰丝氨酸(PS)位于细胞膜内侧, 在细胞凋亡时转至细胞膜外表面, 这一改变被认为是特导性的, 并且可作为凋亡细胞表面改变的标记。Annexin V 对 PS 具有高度亲和力, 荧光标记的 Annexin V-FITC 与细胞表面 PS 结合, 用流式细胞仪进行检测, 可以观察凋亡过程中细胞膜 PS 的表面化。结合 PI 染色进行双参数检测能区分正常细胞、凋亡细胞、凋亡继发性坏死细胞及坏死细胞。透射电子显微镜观察凋亡细胞的超微结构, 发现线粒体肿胀、内膜嵴消失, 为进一步证明蓝光照射诱导 RPE 细胞凋亡过程中是否发生了线粒体膜通透性转运奠定了形态学基础。

志谢: 感谢四川大学华西医院肿瘤生物治疗中心毛咏秋老师及移植免疫实验室李胜富老师给予的大力帮助。

#### 4 参考文献

- Organisciak DT, Darrow RM, Barsalou L, et al. Light history and age-related changes in retinal light damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1998, 39: 1107-1116.
- Wenzel A, Grimm C, Samardzija M, et al. Molecular mechanisms of light-induced photoreceptor apoptosis and neuroprotection for retinal degeneration. *Prog Retin Eye Res*, 2005, 24: 275-306.
- 王雨生, 严密. 可见光对原代培养人视网膜色素上皮细胞的光化学损伤. *中华眼底病杂志*, 1996, 12: 174-176.
- 周咏东, 严密, 张军军. 可见光照对培养的人视网膜色素上皮细胞凋亡的影响. *中华眼底病杂志*, 2002, 18: 227-230.
- Moreira H, Queiroz JM, Liggett PE, et al. Correal toxicity study of two perfluorocarbon liquids in rabbit eyes. *Cornea*, 1992, 11: 376-379.
- Sparrow JR, Bolin Cai. Blue light-induced apoptosis of A2E-containing RPE: involvement of caspase-3 and protection by bcl-2. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2001, 42: 1356-1362.
- Sparrow JR, Nakanishi K, Parish CA. The lipofuscin fluorophore A2E mediates blue light-induced damage to retinal pigmented epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2000, 41: 1981-1989.
- Seko Y, Pang J, Tokoro T, et al. Blue light-induced apoptosis in cultured retinal pigment epithelium cells of the rat. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2001, 239: 47-52.

(收稿日期: 2004-09-27)

(本文编辑: 朱敏)