

手机光照刺激对视网膜色素上皮细胞的影响

周劲, 谢娇, 雷杰, 吉祥, 杨青

基金项目: 武汉市卫生计生委科研基金资助项目 (No. WX16E10)

作者单位: (430050) 中国湖北省武汉市第五医院眼科
作者简介: 周劲, 毕业于武汉大学医学院, 硕士, 副主任医师, 研究方向: 青光眼、眼底病。

通讯作者: 谢娇, 毕业于华中科技大学同济医学院, 硕士, 主治医师, 研究方向: 青光眼、白内障. 22035870@qq.com

收稿日期: 2017-12-19 修回日期: 2018-06-06

Effect of mobile phone light for human retinal pigment epithelium cells

Jin Zhou, Jiao Xie, Jie Lei, Xiang Ji, Qing Yang

Foundation item: Health and Family Planning Commission Scientific Research Fund of Wuhan (No. WX16E10)

Department of Ophthalmology, the Fifth Hospital of Wuhan, Wuhan 430050, Hubei Province, China

Correspondence to: Jiao Xie. Department of Ophthalmology, the Fifth Hospital of Wuhan, Wuhan 430050, Hubei Province, China. 22035870@qq.com

Received: 2017-12-19 Accepted: 2018-06-06

Abstract

• **AIM:** To research the morphological and functional change of human retinal pigment epithelium (RPE) induced by mobile phone screen light *in vitro* and the mRNA express of apoptotic inhibitor B-cell lymphoma (Bcl-2), Bcl2-Associated X (Bax) and apoptotic actuators Caspase-3 in different groups.

• **METHODS:** Cultured human RPE cells were divided into different group in random. According to the time of exposing, the four groups were 3h group, 6h group, 12h group and no light-exposed group. Cells of different groups were exposed to the opening mobile phone that was kept high-light brightness and playing on the colorful picture on silent mode. The morphological and functional change of RPE was quantified after exposed by HE staining, TUNEL staining, MTT, and use the technology of polymerase chain reaction (PCR) to detect the mRNA express of apoptotic inhibitor Bcl-2, Bax and apoptotic actuators Caspase-3 in different groups.

• **RESULTS:** The different was not statistically significant ($P>0.05$) in the way of HE staining, TUNEL staining and MTT. The expression of Bcl-2, Bax and Caspase-3 intracellular was no difference statistically significant in 3h, 6h group to no exposure group on the way of PCR ($P>0.05$). But as the time of exposed increased to 12h, the expression of apoptotic inhibitor Bcl-2 decreased, at the same time the expression of apoptotic actuators Bax

and Caspase-3 increased, and the different was statistically significant ($P<0.05$).

• **CONCLUSION:** The human RPE would be injured under the constantly high-light brightness of mobile phone screen as the man-made light source.

• **KEYWORDS:** retinal pigment epithelium; mobile phone; apoptosis; light-injured

Citation: Zhou J, Xie J, Lei J, et al. Effect of mobile phone light for human retinal pigment epithelium cells. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2018;18(7):1188-1191

摘要

目的: 观察手机光照刺激体外培养人视网膜色素上皮细胞 (retinal pigment epithelium; RPE) 后形态及 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 (Bcl-2)、Bcl2-Associated X (Bax)、半胱天冬酶-3 (Caspase-3) 的 mRNA 表达变化。

方法: 将体外培养的人 RPE 细胞随机分成 4 组, 根据 RPE 细胞光照时间长短分为照射 3h 光照组、6h 光照组、12h 光照组和 0h 光照组。在特制的培养箱内, 将智能手机屏幕开到最大亮度 ($200 \pm 20\text{Lx}$) 做为光源, 持续静音情况下循环播放彩色图片。然后应用苏木精-伊红 (HE) 染色法, 末端脱氧核糖核酸转移酶介导的原位缺口末端标记 (TUNEL) 染色, 四甲基偶氮唑盐微量酶反应比色 (MTT) 法观察各实验组 RPE 细胞形态学改变, 并运用聚合酶链反应 (PCR) 技术检测各组细胞中 Bcl-2、Bax、Caspase-3 的 mRNA 表达变化。

结果: 用 HE 染色、TUNEL 染色、MTT 法观察发现各光照组 RPE 细胞形态学无明显改变, 差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。应用 PCR 技术检测发现 RPE 细胞在光照刺激 3h 光照组和 6h 光照组, 细胞内的 Bcl-2、Bax、Caspase-3 的 mRNA 表达与 0h 光照组的差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。但随着光照时间持续延长 (12h), 细胞内的 Bcl-2 表达下调, Bax、Caspase-3 表达水平均上升, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。

结论: 手机屏幕等作为人造光源在长期持续高亮度照射下会引起体外培养人视网膜色素上皮细胞的损伤。

关键词: 视网膜色素上皮; 手机屏幕; 细胞凋亡; 光损伤

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2018.7.05

引用: 周劲, 谢娇, 雷杰, 等. 手机光照刺激对视网膜色素上皮细胞的影响. 国际眼科杂志 2018;18(7):1188-1191

0 引言

临床研究表明, 强光可导致视网膜损伤。年龄相关性黄斑变性 (ARMD)、视网膜色素变性 (RP) 等眼底疾病已被证实与视网膜光损伤有关^[1]。近年随着电脑、手机、IPAD 等电子产品的蓬勃发展, 特别是智能手机的普及, 人

表 1 PCR 引物序列

| 引物名称 | 上游引物序列 | 下游引物序列 | 片段长度 (bp) |
|-----------|-------------------------------|-------------------------------|-----------|
| GAPDH | 5'-GCAAGTTCACCGCACAG-3' | 5'-GCCAGTAGACTCCACGACA-3' | 140 |
| Bcl-2 | 5'-GACTTCTCCCGCCGCTAC-3' | 5'-CACCAGGGCCAACTGAGCAG-3' | 211 |
| Bax | 5'-TGGGCTCCACTGGACTTC-3' | 5'-TCTTCAGATGGTGAGTGAGGC-3' | 242 |
| Caspase-3 | 5'-TGGAACAAATGGACCTGTTGACC-3' | 5'-AGGACTCAAATTCTGTTGCCACC-3' | 276 |

们的生活、学习、工作越来越离不开这些电子产品。而这些电子产品的视频终端(显示器、手机屏幕等)作为人造光源对视网膜是否有损害?损害的程度有多大?屏幕的亮度、时间、距离等是否与视网膜的损害有关?均是未知数。视网膜色素上皮是眼底吸收光线的主要部位,它的损伤可以影响到光感受器细胞的代谢与功能。本研究通过智能手机动态播放图片,持续对视网膜色素上皮细胞进行光刺激后,观察视网膜色素上皮细胞的变化,了解手机屏幕这种人造光源是否对视网膜色素上皮细胞有光损害及造成损害的机制。

1 材料和方法

1.1 材料 人视网膜色素上皮细胞株 ARPE-19(美国 ATCC 公司),胎牛血清(FBS,美国 Thermo 公司),胰蛋白酶(美国 Thermo 公司),MTT 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒(武汉博士德公司),磷酸盐缓冲(PBS)溶液,Trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司),细胞凋亡检测试剂盒(武汉博士德公司),逆转录聚合酶链反应试剂盒(大连 TaKaRa 公司),数字式照度计 MS6610(深圳华谊仪表有限公司),酶联免疫检测仪(芬兰 Thermo 公司),智能手机(华为 7D-501u)。

1.2 方法

1.2.1 RPE 细胞的培养 采用含 20% 胎牛血清,100U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素的 DMEM/F12 细胞培养液,在 5% CO₂,37 $^{\circ}$ C 细胞培养箱中培养 ARPE-19。待细胞生长融合铺满后,用 0.25% 胰蛋白酶消化,按 1:2~1:4 进行传代,取第 8~12 代生长良好的传代细胞用于实验。将同代细胞随机分为无光照组(0h 光照组)和光照组(3h 光照组、6h 光照组、12h 光照组)。

1.2.2 实验分组 选择常见智能手机一部(华为 7D-501u,TFT 材质 7 英寸电容屏),作为光源置于培养箱顶部,手机亮度开关调到最大,并根据数字式照度计的测量数值,挑选手机播放的彩色图片,使手机屏幕光照度均衡地控制在一个最大范围(200 \pm 20Lx)之内,静音情况下循环播放此特定彩色图片,直落式照射,光源与细胞之间距离为 20cm,各光照组分别接受 3、6、12h 持续不间断光照射。光照在培养箱内密闭进行,无自然光干扰,温度 36.5 $^{\circ}$ C~37.2 $^{\circ}$ C。同时无光照组(0h 组)以锡纸包裹避光在同一培养箱培养 12h。所有光照组在停止光照后,继续避光在同一培养箱内培养。各组培养时间均为 12h。各组之间除了光照时间不同外,其余各项培养指标均一致。

1.2.3 RPE 细胞 HE 染色和 TUNEL 染色 HE 染色:取出细胞爬片,PBS 洗 3 次;浸入 95% 乙醇固定 20min;PBS 洗 2 次,每次 1min;苏木素染液染色 3min;冲洗后,伊红染液染色 1min;浸洗;晾干,封片;光学显微镜下拍照。

TUNEL 染色:将经过实验处理的细胞爬片,自然晾干,4% 多聚甲醛室温固定 15~30min,加封闭液,室温孵育 10min。PBS 漂洗后加透膜液,室温孵育 30min。玻片干后,将按照说明书制备好的 TUNEL 反应混合液滴加于标本上,50 μ L/片,在 37 $^{\circ}$ C 暗湿盒中避光孵育 60min。玻片干后加 50 μ L converter-POD 于标本上,同样在 37 $^{\circ}$ C 暗湿盒中避光孵育 30min。以上步骤间 PBS 洗涤 3 次,每次 3min。再在细胞组织处加 50~100 μ L DAB 底物,15 $^{\circ}$ C~25 $^{\circ}$ C 避光孵育 10min。冲洗,染核,脱水,封片。用荧光显微镜进行计数并拍照。荧光显微镜下调亡的细胞呈红色荧光,细胞核呈蓝色荧光。

1.2.4 MTT 法检测视网膜色素上皮细胞活力 将培养的 RPE 细胞接种于 96 孔板,按照分组分别进行实验处理后,在 5% CO₂,37 $^{\circ}$ C 孵育 24h;每孔加入 20 μ L MTT 溶液(5mg/mL,即 0.5% MTT),继续培养 4h;终止培养,小心吸去孔内培养液;每孔加入 150 μ L 二甲基亚砷,低速振荡 10min;酶联免疫检测仪测定各孔在 570nm 的吸光度 A(即光密度 OD)值。测定出各组视网膜色素上皮细胞活力。

1.2.5 PCR 技术检测 Bcl-2、Bax、Caspase-3 的表达 利用 Trizol 试剂提取 ARPE-19 细胞总 RNA,经逆转录合成 cDNA 后,以 GAPDH 作为内参,采用 PCR 检测细胞中 Bcl-2、Bax、Caspase-3 的 mRNA 表达(表 1)。使用 Primer Premier 5.0 软件设计引物。Invitrogen Biotechnology Co. LTD 中国公司合成;反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 1min,95 $^{\circ}$ C 变性 15s,58 $^{\circ}$ C 退火 20s,72 $^{\circ}$ C 延伸 20s,重复 40 个循环,72 $^{\circ}$ C 末段延伸 5min。采用 2^{- $\Delta\Delta$ CT}法进行相对定量分析。各标本重复检测 3 次后取其平均值。

统计学分析:采用 SPSS24.0 统计软件行统计学分析,上述各组实验均重复 3 次,数据以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。多组间比较采用单因素方差分析。多组总体均数有差异时,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。方差不齐时采用近似 *F* 检验。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HE 染色 倒置相差显微镜观察发现,光照(3、6、12h)组与对照组(0h)相比,其细胞均呈扁平梭形,细胞质内有少量颗粒,细胞无色透明,形态结构未见明显变化,细胞质内色素颗粒无明显减少,未见明显细胞核固缩、核碎裂、核溶解以及细胞凝固、坏死等热损伤改变(图 1)。

2.2 TUNEL 染色 荧光显微镜下观察到对照组(0h)与光照组(3、6、12h)之间视网膜色素上皮(凋亡)细胞无明显变化(图 2)。

2.3 MTT 法测细胞活力 MTT 法检测结果显示,光照射(3h、6h、12h)组 OD_{570nm} 值与无光照(0h)组 OD_{570nm} 值组间比较,差异均无统计学意义(*F*=1.576,*P*=0.234,图 3)。

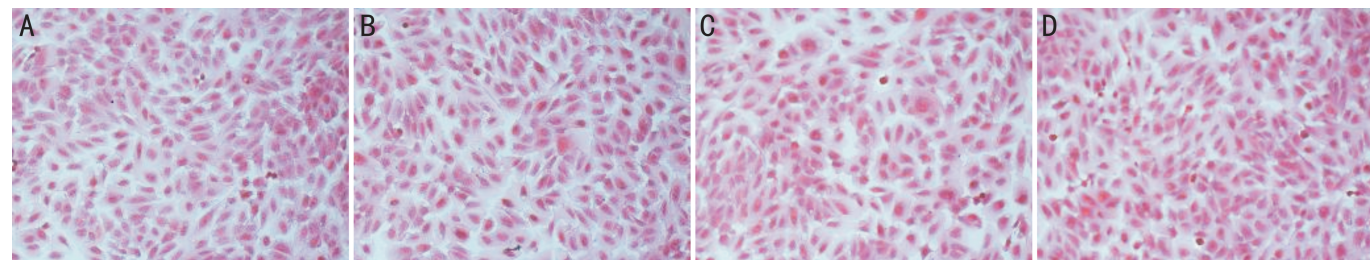


图1 ARPE-19细胞倒置相差显微镜像($\times 200$) A:0h光照组;B:3h光照组;C:6h光照组;D:12h光照组。

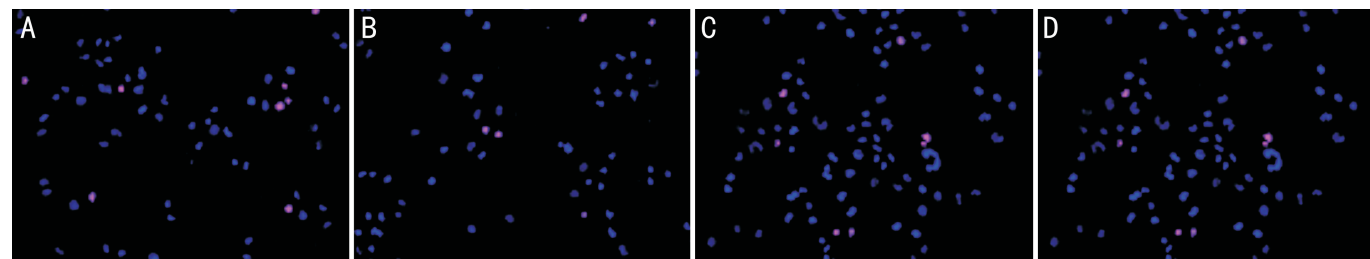


图2 荧光显微镜下凋亡的细胞呈红色荧光,细胞核呈蓝色荧光($\times 200$) A:0h光照组;B:3h光照组;C:6h光照组;D:12h光照组。

表2 同一手机不同光照时间下 Bcl-2、Bax、Caspase-3 的 mRNA 相对表达量及 Bcl-2/Bax 比较

| 组别 | Bcl-2 | Bax | Bcl-2/Bax | Caspase-3 | $\bar{x} \pm s$ |
|---------|--------------------------------|--------------------------------|-------------------|--------------------------------|-----------------|
| 0h 光照组 | 1.014 \pm 0.013 | 0.977 \pm 0.021 | 1.037 \pm 0.023 | 1.024 \pm 0.027 | |
| 3h 光照组 | 1.040 \pm 0.042 | 0.943 \pm 0.056 | 1.102 \pm 0.048 | 1.059 \pm 0.026 | |
| 6h 光照组 | 0.921 \pm 0.062 | 1.048 \pm 0.070 | 0.878 \pm 0.066 | 1.073 \pm 0.069 | |
| 12h 光照组 | 0.922 \pm 0.036 ^a | 1.139 \pm 0.083 ^a | 0.809 \pm 0.062 | 1.162 \pm 0.065 ^a | |

注:^a $P < 0.05$ vs 0h 光照组。

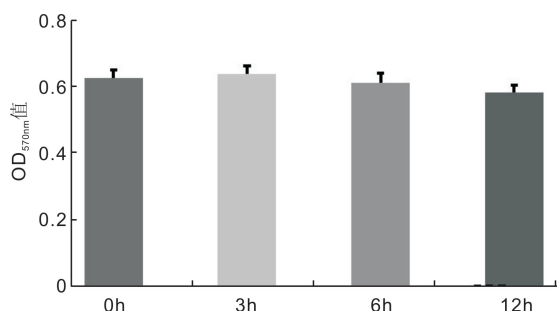


图3 同一手机不同光照时间下 RPE 细胞活力。

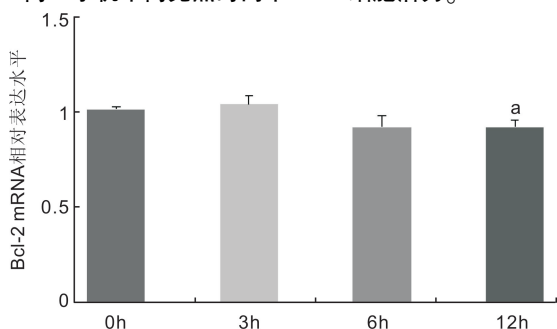


图4 同一手机不同光照时间下 Bcl-2 的 mRNA 表达 ^a $P < 0.05$ vs 0h 光照组。

2.4 RT-PCR 检测结果 所有标本均检测到内参基因 GAPDH 的稳定表达,证实逆转录所得产物 cDNA 的完整性和 PCR 反应成功。

2.4.1 各组 Bcl-2 的 mRNA 表达比较 光照组(3h、6h、12h)与无光照(0h)组 Bcl-2 的 mRNA 表达,经组间比较,组间差异有统计学意义($F = 6.391, P = 0.016$)。各组间再进行两两比较,无光照(0h)组与光照(3h、6h)组($P =$

0.478、0.052),光照(3h)组与光照(6h、12h)组($P = 0.09$ 、0.09),光照(6h)组与光照(12h)组($P = 0.963$)比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。而光照(12h)组与无光照(0h)组比较,差异有统计学意义($P = 0.029$)。提示光照 12h 后 Bcl-2 基因的表达降低,细胞凋亡水平增加,与对照(0h)组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$,图 4),见表 2。

2.4.2 各组 Bax 的 mRNA 表达比较 光照组(3h、6h、12h)与无光照(0h)组 Bax 的 mRNA 表达,经组间比较,组间差异有统计学意义($F = 5.924, P = 0.020$)。各组间再进行两两比较,无光照(0h)组与光照(3h、6h)组($P = 0.519$ 、0.195),光照(3h)组与光照(6h、12h)组($P = 0.07$ 、0.05),光照(6h)组与光照(12h)组($P = 0.109$)比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。光照(12h)组与无光照(0h)组比较,差异有统计学意义($P = 0.012$)。提示光照 12h 后 Bax 基因的表达升高,细胞凋亡水平增加,与对照(0h)组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$,图 5),同时观察到 Bcl-2/Bax 的比值随光照时间延长逐渐下降(表 2)。

2.4.3 各组 Caspase-3 的 mRNA 表达比较 光照组(3h、6h、12h)与无光照(0h)组 Caspase-3 的 mRNA 表达,经组间比较,组间差异有统计学意义($F = 3.963, P = 0.043$)。各组间再进行两两比较,无光照(0h)组与光照(3h、6h)组($P = 0.420$ 、0.273),光照(3h)组与光照(6h、12h)组($P = 0.751$ 、0.59),光照(6h)组与光照(12h)组($P = 0.273$)比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。光照(12h)组与无光照(0h)组比较,差异有统计学意义($P = 0.011$)。提示光照 12h 后 Caspase-3 基因的表达升高,细胞凋亡水平增加,与对照(0h)组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$,图 6),见表 2。

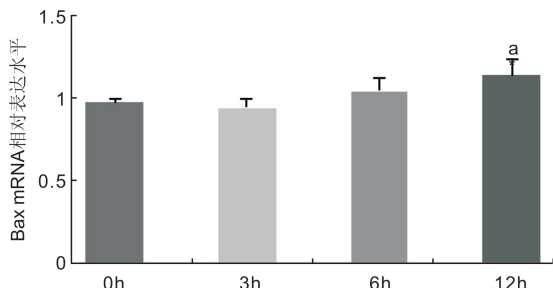


图5 同一手机不同光照时间下 Bax 的 mRNA 表达 ^a $P < 0.05$ vs 0h 光照组。

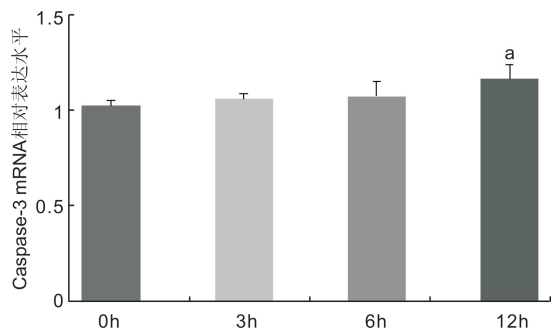


图6 同一手机不同光照时间下 Caspase-3 的 mRNA 表达 ^a $P < 0.05$ vs 0h 光照组。

3 讨论

光对视网膜的损害包括 3 种方式:热灼伤、机械伤、光化学伤^[2]。其中光化学伤占视网膜光损伤的主要部分。它可以导致生物膜组织的损伤(细胞凋亡),使视网膜形态学、生化方面发生变化,造成视网膜的结构和功能不可逆的损伤^[3]。

视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)位于视网膜的最外层,是一些视网膜疾病中最早受损伤的靶组织^[4]。相关研究的临床资料提示,视网膜的光化学损伤主要有两种细胞参与,即光感受器细胞及视网膜色素上皮(RPE)细胞,在大多数哺乳动物,最敏感部分是 RPE 细胞^[5]。也就是各种原因引起的视网膜光化学损伤,均可导致视网膜色素上皮(RPE)变性、损伤。它的损伤、变性可以影响光感受器细胞的代谢和功能,最终导致视网膜功能异常而致视力丧失^[6]。因此,我们选用 RPE 细胞作为研究对象。本研究结果显示:手机屏幕分别照射体外培养人 RPE 细胞 3、6、12h 后。用 HE 染色、TUNEL 法、MTT 法检测 RPE 细胞形态及功能,未见明显细胞核固缩、核碎裂、核溶解等细胞坏死性死亡的特征性改变,也未见光照前后细胞活力的明显改变。可能原因在于手机屏幕的光照强度(200±20Lx)不是很高,对 RPE 细胞的光损伤并不是很明显,不能立即显现出视网膜细胞的死亡。

临床研究表明,凋亡是 RPE 细胞损伤的主要机制。参与了多种视网膜疾病的发生、发展过程,其中包括年龄相关性黄斑变性、视网膜色素变性和视网膜光损伤等^[7]。Caspase-3 参与细胞凋亡并发挥着重要作用,它是细胞凋亡的执行蛋白。细胞的凋亡受到细胞内凋亡蛋白的调控, Bcl-2 与 Bax 是两种凋亡调节蛋白,互为配体。它们既可促进细胞凋亡的发生,也可抑制凋亡^[8]。即 Bcl-2 的升高,抑制了细胞色素 C 自线粒体释放到胞质,阻止细胞色素 C 对 Caspase-3 的蛋白酶激活,从而抑制细胞的凋亡, Bax 升高则会加速细胞的凋亡。因此二者的比值能够很好地体现出细胞凋亡的程度, Bcl-2 占优时细胞存活, Bax 占优时细胞凋亡。

本实验观察到,体外培养人 RPE 细胞在手机屏幕光照刺激 3、6h 后,细胞内的 Bcl-2、Bax、Caspase-3 基因的表达与光照前比较差异无统计学意义。但在光照 12h 后,细胞内的 Bcl-2、Bax、Caspase-3 出现了相应的改变。Bcl-2 表达水平下调, Bax 表达水平上升, Bcl-2/Bax 比值降低, Caspase-3 被激活,表达水平上升。

视网膜细胞对光照射具有一定程度的耐受能力。但光损伤具有积累效应,损伤程度呈光照时间依赖性,光照时间越长,细胞损伤越严重^[9]。本实验也印证了这一点, RPE 细胞在手机屏幕光照刺激 3、6h 后,细胞内的 Bcl-2、Bax、Caspase-3 的 mRNA 表达与光照前无明显变化。但随着光照时间持续不间断延长(12h)后,虽然在细胞层面没有显现出视网膜细胞的死亡,但细胞内的凋亡抑制蛋白 Bcl-2 表达水平下调、凋亡促进蛋白 Bax、凋亡的执行蛋白 Caspase-3 表达上升, Bcl-2/Bax 比值进行性降低,提示出现了细胞凋亡的趋势,进入了细胞凋亡的早期。由于我们是根据人们使用手机的习惯,设定持续不间断光照时间分别为 3、6、12h。也许更长时间持续照射(持续不间断光照时间超过 12h,但这种情况在日常生活中应该很少),细胞凋亡现象会更明显。

手机屏幕的光照强度与手机的亮度虽然不是同一概念,但它们之间呈正相关。即手机亮度越亮,手机屏幕的光照强度越大。综上所述,视频终端(显示器、手机屏幕等)作为人造光源在长期持续高亮度(高光照强度)照射下是会对视网膜色素上皮细胞带来损害的。而 RPE 的损伤可以影响光感受器细胞的代谢和功能,最终导致视网膜功能异常。

本研究采用的体外培养 ARPE-19 细胞是人 RPE 细胞自然形成的细胞系,与正常生理状态下的细胞存在着差异^[10],同时部分损伤的视网膜细胞也存在停用手机屏幕照射后功能有所恢复的可能。所以下一步需建立动物模型来进行活体研究,以了解手机屏幕这种人造光源对活体视网膜功能的损害具体情况。

参考文献

- 傅敏,栾洁,张忠红. 可见光对视网膜色素上皮细胞氧化损伤的影响. 中华眼底病杂志 2011;27(5):466-470
- Wu J, Seregard S, Alverer PV. Photochemical damage of the retina. *Surv Ophthalmol* 2006;51(5):461-481
- 张楚,邹玉平. 蓝光对视网膜的损伤及其防护的研究进展. 中华眼外伤职业病学杂志 2012;34(6):476-480
- 公慧敏,周占宇,牛膺筠,等. EPO 对氧化损伤的人视网膜色素上皮细胞 bcl-2 表达的影响. 眼科研究 2007;25(7):481-484
- Noell WW, Al Bk. Retinal damage by light in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1966;5(6):447-450
- Portera Cailliau C, Sung CH, Nathans J, et al. Apoptotic photoreceptor cell death in mouse models of retinitis pigmentosa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91(7):974-978
- 牛膺筠,刘夫玲. 应重视视网膜光化学损伤光感受器细胞凋亡的研究. 中华眼科杂志 2009;45(3):196-198
- Vandenabeele P, Grootjans S, Callewaert N, et al. Necrostatin-L blocks both RIPK1 and IDO; consequences for the study of cell death in experimental disease models. *Cell Death Differ* 2013;20(2):185-187
- Kanupfiya D, Prasad D, Sai Ram M, et al. Mechanism of tert butylhydroperoxide induced cytotoxicity in U-937 macrophages by alteration of mitochondrial function and generation of Ros. *Toxicol In Vitro* 2007;21(5):846-854
- 李菲,陈长征,周俊,等. 光损伤后人视网膜色素上皮细胞血管内皮生长因子 A 及其受体的表达. 中华眼底病杂志 2012;28(2):159-162