

蓝光诱导大鼠视网膜色素上皮细胞复制衰老

柯屹峰 陈松 郝瑞

【摘要】 目的 探讨蓝光光照强度、时间与大鼠视网膜色素上皮(RPE)细胞复制衰老的关系。**方法** 将 36 只鼠龄 12~14 周的 Wistar 大鼠置于悬有波长为(450±10) nm 的医用蓝光灯管的自制光照架中。随机分为 4 组,每组 9 只大鼠,1 组:无光照对照组;2 组:自然光照组;3 组:500 lx 光照组;4 组:1000 lx 光照组。每组按照照射时间再分为 1、2、3 个月组 3 个亚组,分别在 1、2、3 个月时行 10%水合氯醛腹腔注射麻醉后取出眼球,将右眼球行石蜡切片,苏木精-伊红(HE)染色;左眼球行冰冻切片,采用衰老相关 β 半乳糖苷酶(SA- β -Gal)染色方法观察 RPE 细胞染色阳性情况。采用 SPSS 11.5 统计软件对结果数据进行统计学分析。**结果** 不同光照强度组、不同光照时间组大鼠 RPE 细胞 SA- β -Gal 染色阳性细胞个数差异有统计学意义($F=510.309, 55.016; P=0.000$);组间两两比较,除 1 组与 2 组之间差异无统计学意义外($P=0.154$),其它各组之间差异均有统计学意义($P=0.000$)。在单一光照强度条件下,除 1 组大鼠 RPE 细胞 SA- β -Gal 染色阳性细胞个数差异无统计学意义外($P=0.897$),其余各组差异均有统计学意义($P<0.01$);在单一时间条件下,各组差异均有统计学意义($P=0.000$)。**结论** 同一蓝光光照强度下,随着时间的增加大鼠视网膜 RPE 细胞逐渐出现复制衰老改变;同一时间条件下,随光照强度增加大鼠视网膜 RPE 细胞也逐渐出现复制衰老改变。

【关键词】 光刺激/副作用; 色素上皮,眼/细胞学; 细胞衰老/生理学; 动物实验

中国分类号:R-332 R774

Blue light-induced replicative senescence of rat retinal pigment epithelial cells KE Yi-feng, CHEN Song, HAO Rui. The Clinic Ophthalmology Institute of Tianjin Medical University, Tianjin Eye Hospital, Tianjin 300020, China

Corresponding author: CHEN Song, Email: chensong20@hotmail.com

【Abstract】 Objective To investigate the relationship between exposure intensity and illumination time of blue light and replicative senescence of rat retinal pigment epithelial (RPE) cells. **Methods** Thirty-six 12-14 weeks Wistar rats were kept in the cage with a blue-light bulb [(450±10) nm], and were randomly divided into four groups (no light, nature light, 500 lx light and 1000 lx light illumination), each has nine rats. The rats in each group were further divided into three subgroups according to illumination time (one month, two months or three months). Eyeballs were collected after intraperitoneal injection of 10% chloral hydrate. The right eye of each rat was embedded in paraffin and sectioned for hematoxylin-eosin (HE) staining, while frozen sections of the left eye were stained for the senescence-associated β -galactosidase (SA- β -Gal). The data were analyzed by SPSS11.5 statistical software. **Results** The amounts of SA- β -Gal positive RPE cells were significantly different between all groups under the same illumination time ($P=0.000$), and between all subgroups of different illumination time with same exposure intensity ($P<0.01$) except for the control group (no light). **Conclusion** Blue-light can induce replicative senescence in rat RPE cells in an intensity and time-dependent manner.

【Key words】 Photoc stimulation/adverse effects; Pigment epithelium of eye/cytology; Cell aging/physiology; Animal experimentation

细胞作为生物体基本的结构和功能单位,有其特定的遗传寿命期,随着遗传和环境信息的双重调控而不断发生衰老和死亡,这是生物体发育中的一种自然

现象^[1]。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)有着许多相似之处,视网膜光损伤的动物模型是研究视网膜变性类疾病的良好模型^[2],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考。研究发现,位于可见光边缘的蓝光视网膜敏感度明显高于可见光中的红光和绿光,可造成视网膜色素上皮(RPE)细胞的衰老损伤^[3]。为此,我们以蓝光

DOI:10.3760/cma.j.issn.1005-1015.2009.06.15

基金项目:天津市应用基础研究计划面上项目(06YFJMJC09200);天津市卫生局科技基金支持项目(05KY29)

作者单位:300020 天津医科大学眼科临床学院 天津市眼科医院(柯屹峰,现在天津医科大学第二医院眼科)

通信作者:陈松,Email:chensong20@hotmail.com

作为光源,用不同光照强度、光照时间诱导大鼠 RPE 细胞发生生物学改变,探讨蓝光光照强度和时间与复制衰老之间的关系,现将结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料

36 只鼠龄 14~16 周的健康成年 Wistar 大鼠,雌雄不限,体重 200~400 g,军事医学科学院动物中心提供。经直接检眼镜及裂隙灯显微镜检查无眼部疾病。自然昼夜光线照明,室内通风良好,相对湿度 40%~70%,温度 24~26℃。20 W 医用蓝光灯管(天津市英泽科技有限公司)、TES1330A 光照度计(台湾泰仕光学仪器股份有限公司)、1900 型恒温冷冻切片机(德国 Leica 公司)、RM2255 型全自动切片机(德国 Leica 公司)、HI1220 型烤片机(德国 Leica 公司)、BX50 型荧光显微镜(日本 Olympus 公司)、10%水合氯醛(天津市化学试剂三厂)、4%多聚甲醛(天津市化学试剂三厂)、蔗糖(天津市化学试剂三厂)、冰冻切片机(德国 Leica 公司)、组织冰冻切片(OCT)包埋液(美国 Sigma 公司)、衰老相关 β 半乳糖苷酶(SA- β -Gal)染色试剂盒(碧云天生物技术研究所)、核固红染色液(武汉博士德生物公司)。

自制两个体积为 70 cm×50 cm×50 cm 的铁丝笼作为光照笼。光照笼内悬挂 1 个小的铁丝饲养笼,在光照笼和饲养笼之间根据不同光照强度悬挂相应数量的波长为(450±10) nm 的医用蓝光灯管。500 lx 光照笼悬挂 3 只 20 W 医用蓝光灯管,用光照度计检测使饲养笼内光照强度为(500±100) lx;1000 lx 光照笼悬挂 5 只 20 W 医用蓝光灯管,使饲养笼内的光照强度为(1000±200) lx。光照笼外套一黑色遮光罩避免外界自然光线的影响。

1.2 方法

将 36 只 Wistar 大鼠随机分为 4 组,每组各 9 只大鼠。1 组:无光照对照组;2 组:自然光照组,光照度为(50±10) lx;3 组:500 lx 光照组,光照强度(500±100) lx;4 组:1000 lx 光照组,光照强度(1000±200) lx。3 组和 4 组每天连续光照 12 h,从 20 点至 8 点。每组再按照照射时间分为 1、2、3 个月组 3 个亚组,分别在 1、2、3 个月时腹腔注射 10%水合氯醛麻醉,按 3.5 ml/kg,在大鼠眼球的 12 点球结膜处用苦味酸、5-0 黑色缝线作标记,迅速摘除眼球,包括球后视神经 2 mm。取眼球后断颈处死,左眼球行石蜡切片及苏木精-伊红(HE)染色,右眼球行冰冻切片及 SA- β -Gal 免疫组织化学染色。

将固定好的大鼠眼球组织进行梯度脱水后浸蜡包埋。用石蜡切片机做连续切片后,行 HE 染色:(1)将烤干的切片依次放入二甲苯 I、II 中,脱醋各 10 min;(2)移入无水酒精、95%酒精、80%酒精、70%酒精、蒸馏水中,各 5 min;(3)浸入苏木素染液中 5~7 min,自来水漂洗 1~2 min;(4)1%盐酸酒精中分化 3~5 s,蒸馏水漂洗 3~5 s,1%氨水中蓝化 3~5 s,蒸馏水中浸片,水洗 2 次,每次 3~5 s;(5)浸入伊红溶液中染色 2~5 min;(6)放入 80%、95%、无水酒精中,每次 20~30 s,脱水时间按染色颜色深浅酌情增减;(7)放入 1:1 无水酒精二甲苯、二甲苯 I、II 中,各溶液中停留 1~5 min。待二甲苯稍干燥后,用中性树胶封片,光学显微镜观察切片染色情况。

参照文献[4]的实验方法,对右眼球行冰冻切片及 SA- β -Gal 组织化学染色。用显微剪沿角膜缘将角膜剪下后,浸入 4℃条件下含 4%多聚甲醛的磷酸盐缓冲液(PBS)中 16 h,延长的多聚甲醛固定是为了阻止孵育时酶扩散到组织外。对组织进行脱水固定,用 OCT 包埋液包埋切片,切片厚度为 10 μ m。用新鲜配置的 SA- β -Gal 染色液进行染色,核固红复染,用荧光显微镜观察 RPE 细胞染色情况。每只眼球选取 3 张完整视网膜结构 SA- β -Gal 染色切片,每张切片随机选取 10 个视野,计数每个视野中阳性细胞的个数。以细胞核红染、周围细胞质呈淡蓝染色为阳性细胞。计数时不论染色深浅,能辨认出细胞核和细胞质并符合前述表现都计数为阳性细胞。

所有数据采用 SPSS 11.5 统计软件处理,实验数据以均数±标准差($\bar{x}$ ±s)表示。单一光照组或单一时间点数据采用单因素方差分析,不同光照组不同时间点数据采用双因素方差分析,组间两两比较采用 SNK 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

光学显微镜观察发现,1、2 组大鼠视网膜光感受器细胞内外节形态规整,内外核层细胞核染色深紫,染色均匀,RPE 细胞核呈淡紫色,扁椭圆形,边界清晰,染色均匀(图 1)。3 组大鼠视网膜细胞结构层次紊乱,视网膜外层组织萎缩变薄,包括视杆视锥细胞消失,外核层变薄,数目减少,外丛状层变薄消失,使得外核层与内核层细胞呈并行排列。RPE 细胞肿胀变圆,染色变淡,数量未见减少(图 2)。4 组大鼠视网膜可见视杆视锥细胞大部分消失,RPE 细胞肿胀成球形,染色变淡,数量未见减少。

光学显微镜观察发现,1 组染色切片未见

SA-β-Gal 阳性染色细胞;2 组 3 个月亚组染色切片可见少量 SA-β-Gal 阳性染色细胞(图 3);3、4 组染色切片均可见 SA-β-Gal 阳性染色细胞(图 4~6)。随着蓝光照射时间的延长,视网膜 RPE 细胞层染色阳性细胞逐渐增多,而视网膜内外核层、内外丛状层、神经纤维层均未见阳性染色细胞。

双因素方差分析显示,不同光照强度组及不同光照时间组大鼠 RPE 细胞 SA-β-Gal 染色阳性细胞个数差异有统计学意义($F=510.309, 55.016; P=0.000$);SNK 法两两比较发现,1、2 组之间大鼠 RPE 细胞 SA-β-Gal 染色阳性细胞个数差异无统计学意义($P=0.154$),其它各组之间差异均有统计学意义($P=0.000$)。单一光照强度条件下,除 1 组大鼠 RPE 细胞 SA-β-Gal 染色阳性细胞个数差异无统计学意义外($P=0.897$),其余各组差异均有统计学意义($P<0.01$);两两比较发现,1 组 1 个月与 2 个月、2 个月与 3 个月组之间、2 组 1 个月与 2 个月组之间大鼠 RPE 细胞 SA-β-Gal 染色阳性细胞个数差异无统计学意义($P=0.687, 1.000, 0.406$),其余各组之间差异均有统计学意义($P<0.01$)。单一光照时间条件下,各组间差异均有统计学意义($P=0.000$);两两比较发现,各时间点 1 组与 2 组间大鼠 RPE 细胞 SA-β-Gal 染色阳性细胞个数差异无统计学意义($P=0.767, 0.494, 0.079$),其余各组之间差异均有统计学意义($P<0.01$)(表 1)。

表 1 大鼠 RPE 细胞 SA-β-Gal 染色阳性细胞个数($\bar{x}\pm s$,个)

组别	n	1 个月	2 个月	3 个月	F 值	P 值
1 组	9	0.100±0.305	0.130±0.346	0.100±0.305	0.109	0.897
2 组	9	0.200±0.407	0.330±0.547	0.730±0.828	6.032	0.004
3 组	9	4.270±1.780	5.330±1.398	7.330±1.900	24.984	0.000
4 组	9	5.170±1.802	6.770±1.675	9.100±1.807	43.222	0.000
F 值		116.312	254.815	327.203		
P 值		0.000	0.000	0.000		

3 讨论

复制衰老是指细胞株在有限次数的细胞分裂后丧失合成 DNA 及有丝分裂的能力,最后导致丧失增生能力,但仍能维持基本代谢过程的现象^[1]。除了最早发现的人类二倍体成纤维细胞,现已知许多其他类型的人类细胞也存在复制衰老现象,如表皮角质、平滑肌、晶状体上皮、神经胶质、内皮细胞等^[5]。

从 1995 年 Dimri 等^[6]首次提出体内鉴别衰老细胞的生物学标志 SA-β-Gal 的存在至今 20 余年,大部分研究集中在体外培养的细胞上,对体内环境中复制衰老细胞的研究较少,而体外培养条件与体内生理环境有很大的差别,体外细胞培养处于一个氧应激的环境。相反,作为多细胞生物整体,体内细胞表现出群体行为,细胞与细胞间发生着复杂的相互影响,如激素调控、免疫调控以及凋亡。因此,以体外细胞复制衰老来推论生物的整体衰老机制很容易引起以偏概全。Kurz 等^[7]发现纤维原细胞的增生能力与物种本身最大的寿命有关,寿命 100 岁的细胞能在衰老前传代 130 多次,

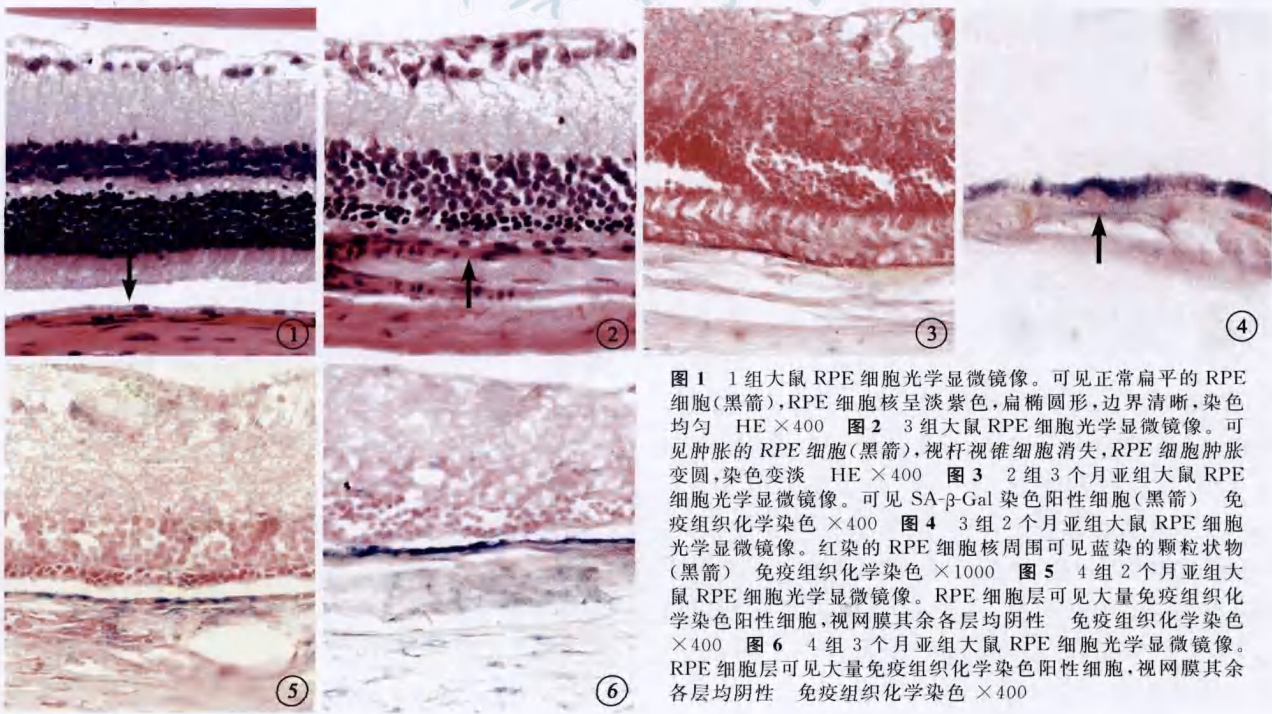


图 1 1 组大鼠 RPE 细胞光学显微镜像。可见正常扁平的 RPE 细胞(黑箭),RPE 细胞核呈淡紫色,扁椭圆形,边界清晰,染色均匀 HE×400 图 2 3 组大鼠 RPE 细胞光学显微镜像。可见肿胀的 RPE 细胞(黑箭),视杆视锥细胞消失,RPE 细胞肿胀变圆,染色变淡 HE×400 图 3 2 组 3 个月亚组大鼠 RPE 细胞光学显微镜像。可见 SA-β-Gal 染色阳性细胞(黑箭) 免疫组织化学染色×400 图 4 3 组 2 个月亚组大鼠 RPE 细胞光学显微镜像。红染的 RPE 细胞核周围可见蓝染的颗粒状物(黑箭) 免疫组织化学染色×1000 图 5 4 组 2 个月亚组大鼠 RPE 细胞光学显微镜像。RPE 细胞层可见大量免疫组织化学染色阳性细胞,视网膜其余各层均阴性 免疫组织化学染色×400 图 6 4 组 3 个月亚组大鼠 RPE 细胞光学显微镜像。RPE 细胞层可见大量免疫组织化学染色阳性细胞,视网膜其余各层均阴性 免疫组织化学染色×400

而寿命 3 年的老鼠细胞只能培养 10 代。Utz 等^[8]研究表明复制衰老细胞在老龄动物体内存在的比例大于 15%。Mishima 等^[9]用改进后的 SA- β -Gal 染色方法在不同年龄猕猴眼的冰冻切片中也发现衰老细胞随年龄累积的现象。这为我们进一步研究体内 RPE 细胞复制衰老现象提供了依据。

研究发现 400~500 nm 蓝光波长具有较高的能量及较强的组织穿透能力,对于生物光敏基团也有着较强的作用,且已证实 RPE 细胞是在这个波长段的视网膜损伤的基本位点^[10]。我们运用 SA- β -Gal 组织化学方法证实了采用波长 440~460 nm 蓝光照射诱导出了大鼠视网膜 RPE 细胞的复制衰老,证实了复制衰老在大鼠体内环境中存在。同时经过统计学分析证实复制衰老的 RPE 细胞呈时间和光照强度相关性改变,复制衰老细胞逐渐增多,且伴有形态的改变。这种形态学改变可能受蛋白糖基化终产物、氧化应激等因素的影响。直得注意的结果还有,在 2 组经过 3 个月的时间,正常 RPE 细胞也出现了复制衰老的表现,且差异有统计学意义,这可以说明,在自然光照条件下,随着时间的延续,复制衰老现象也能出现。我们还注意到在 4 组光照 3 个月后,视网膜视锥视杆细胞层已经消失殆尽,而 RPE 细胞数量没有明显改变,只表现为肿胀的细胞衰老表现。因而我们认为蓝光照照射视网膜能直接伤害视锥视杆细胞,使之死亡,而并不能直接伤害 RPE 细胞,但可使其产生衰老表现,RPE 细胞这种表现可能是视锥视杆细胞死亡后的继发改变,其机制尚需进一步研究。

本实验采用大鼠为实验对象,证实蓝光可诱导大鼠 RPE 细胞复制衰老,且呈光照强度和时间依赖性,这为进一步研究眼部复制衰老现象提供了一个可行的动物模型。本实验采用独特设计的光照架,使光照强度及时间易于控制,同时使动物适合长期生活,适宜进

行长期光照,且安全有效。为了减少因样本数量带来的偏差,我们对每只鼠眼取 30 个显微镜下视野计数阳性细胞,以减少误差。但本研究使用的 SA- β -Gal 生物标记染色法可受到衰老组织中永生化细胞的诱导,甚至在某些条件下可以逆转,故在体内组织染色时可能会对我们的结果带来一定的干扰^[8]。Wei, Sedivy^[11]认为 SA- β -Gal 阳性培养细胞应该进一步检测 BrdU 标记指数,才能更准确鉴定复制衰老表现。本研究自制的光照架列举了 2 个典型的光照强度点而非一个连续的光照强度,尚无法确定蓝光诱导复制衰老的阈值如何,因而体内细胞复制衰老的生物学特性仍需进一步研究。

4 参考文献

- [1] 赵亮,张宗玉,童坦君. 生物体衰老与复制衰老一体内与体外研究. 生理科学进展,2000,31:205-210.
- [2] 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.
- [3] Hammer M, Richter S, Guehrs KH, et al. Retinal pigment epithelium cell damage by A2E and its photo-derivatives. Mol Vis, 2006, 12:1348-1354.
- [4] Mishima K, Handa JT, Aotaki KA, et al. Senescence-associated beta-galactosidase histochemistry for the primate eye. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1999, 40: 1590-1593.
- [5] Henslar PJ, Pereira SM. Human replicative senescence: a molecular study. Am J Pathol, 1995, 147:1-8.
- [6] Dimri GP, Lee X, Basile G, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92: 9363-9367.
- [7] Kurz DJ, Decary S, Hong Y, et al. Senescence-associated beta-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. J Cell Sci, 2000, 113:3613-3622.
- [8] Utz H, Mark F, Laura C, et al. Cellular senescence in aging primates. Science, 2006, 311:1257.
- [9] Mishima K, Handa JT, Aotaki KA, et al. Senescence-associated beta-galactosidase histochemistry for the primate eye. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1999, 40:1590-1593.
- [10] Alverez PV, Marshall J, Seregard S, et al. Age-related maculopathy and the impact of blue light hazard. Acta Ophthalmol Scand, 2006, 84:4-15.
- [11] Wei W, Sedivy JM. Differentiation between senescence (M1) and crisis (M2) in human fibroblast cultures. Exp Cell Res, 1999, 253:519-522.

(收稿日期:2008-11-14)

(本文编辑:唐健)

· 消息 ·

第十六届全国眼外伤、眼整形、眼眶病学术会议暨继续教育学习班征文通知

第十六届全国眼外伤、眼整形、眼眶病学术会议暨继续教育学习班将于 2010 年 4 月 22 至 25 日在郑州召开。会议内容包括:(1)大会主题论文交流;(2)分组专业论文交流;(3)国内知名专家主持专题讨论;(4)眼外伤专题高峰论坛;(5)眼外伤、眼整形、眼眶病继续教育培训课程。本次会议适逢眼外伤学组创始人张效房教授 90 华诞及从医从教 65 周年,会议期间将举办庆祝活动。盛开的洛阳牡丹也将欢迎您的到来。真诚欢迎全国的眼科同道参加本次会议。参加者可获国家 I 类学分 10 分。

征文要求:500 字左右含“目的、方法、结果、结论”四要素的“结构式”摘要。并注明作者姓名、性别、年龄、职称、工作单位、邮政编码、详细的通讯地址、联系电话、电子邮件地址。

投稿方式:(1)电子投稿信箱:zzuyfyyk@yahoo.com.cn(郑州大学一附院眼科 zzuyfyyk);(2)书面投稿:请用书面打印。投稿地址:郑州市建设东路 1 号郑州大学第一附属医院眼科,邮编 450052。信封标明“郑州眼外伤会议投稿”。(3)详情和后续通知请登陆郑州大学第一附属医院网页浏览 <http://fcc.zzu.edu.cn>。已在正式刊物上发表的论文请勿投寄。截稿日期:2010 年 3 月 10 日。联系人:李秀娟、郝尚臣、闫磐石。联系电话:0371-66862213,66862224。Email:zzuyfyyk@yahoo.com.cn。主办单位:中华医学会眼科学分会眼外伤、眼整形暨眼眶病学组。承办单位:郑州大学第一附属医院。协办单位:北京大学眼科中心、北京武警总院、上海第九人民医院。