

## · 实验研究 ·

# N-乙酰半胱氨酸对 TGF- $\beta_1$ 诱导的 ARPE-19 细胞向肌成纤维细胞转分化的影响

刘帅 金海鹰

200093 上海交通大学医学院附属新华医院眼科

通信作者:金海鹰, Email: eagle\_jin@163.com

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.10.008

**【摘要】** 背景 视网膜色素上皮(RPE)细胞转分化为肌成纤维细胞是增生性玻璃体视网膜病变发生和发展中的一个核心事件。N-乙酰半胱氨酸(NAC)能够通过抑制转化生长因子- $\beta_1$ (TGF- $\beta_1$ )诱导的细胞内活性氧(ROS)的产生和 MAPK 蛋白的磷酸化来抑制多种细胞向肌成纤维细胞的转分化,但是 NAC 对 TGF- $\beta_1$  诱导的人 RPE 细胞系 ARPE-19 细胞向肌成纤维细胞转分化的影响及其潜在的分子机制尚不清楚。目的 研究 NAC 对 TGF- $\beta_1$  诱导的 ARPE-19 细胞向肌成纤维细胞转分化的影响及其潜在的分子机制。方法 体外培养人 ARPE-19 细胞并分为对照组、TGF- $\beta_1$  处理组、NAC 干预组和 NAC 单独处理组,对照组不做处理,其他 3 个组分别使用 10 ng/ml TGF- $\beta_1$ 、10 ng/ml TGF- $\beta_1$ +5 mmol/L NAC 和 5 mmol/L NAC 处理细胞 48 h,相差显微镜下观察细胞的形态学改变。采用实时荧光定量 PCR、Western blot、免疫荧光及 ELISA 法检测转分化标志基因  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)、纤维结合蛋白及 I 型胶原的表达情况。使用非荧光探针 DCFH-DA 通过流式细胞仪检测在 TGF- $\beta_1$  处理后 1 h,细胞内 ROS 的产生情况及 NAC 对细胞内 ROS 产生的影响。采用 Western blot 法检测各组细胞内 p38MAPK、ERK1/2 及 SAPK/JNK 蛋白磷酸化的影响。采用细胞计数试剂盒-8(CCK-8)法检测不同浓度 NAC 对 ARPE-19 细胞生存的影响。结果 实时荧光定量 PCR、Western blot 及 ELISA 实验结果表明,与对照组相比,TGF- $\beta_1$  处理组  $\alpha$ -SMA、纤维结合蛋白和 I 型胶原 mRNA 表达水平均上调,分别是对照组的(2.15±0.29)、(9.54±1.08)和(25.78±0.66)倍,蛋白表达水平分别是对照组的(8.49±0.32)、(2.53±0.69)和(4.45±1.05)倍,差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ )。NAC 干预组  $\alpha$ -SMA、纤维结合蛋白和 I 型胶原 mRNA 的表达水平分别是 TGF- $\beta_1$  处理组的(66.70±12.57)%、(66.11±8.35)%和(33.19±6.90)%,蛋白表达水平分别是 TGF- $\beta_1$  处理组的(52.30±4.83)%、(55.03±2.58)%和(56.08±3.65)%,差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ )。流式细胞仪分析结果显示,TGF- $\beta_1$  处理组细胞内 ROS 的产生水平较对照组增加,是对照组的(2.12±0.20)倍,NAC 干预组细胞内 ROS 水平是 TGF- $\beta_1$  处理组的(57.41±9.45)%,差异均有统计学意义(均  $P < 0.01$ )。Western blot 结果显示,与对照组相比,TGF- $\beta_1$  处理组 p38MAPK、SAPK/JNK 及 ERK1/2 蛋白磷酸化水平均上调,分别是对照组的(9.18±1.00)、(4.87±0.81)和(4.20±0.69)倍,差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ )。使用 NAC 干预处理后,p38MAPK、SAPK/JNK 及 ERK1/2 蛋白磷酸化水平分别是 TGF- $\beta_1$  处理组的(48.16±14.82)%、(67.90±2.90)%和(74.52±4.00)%,差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ )。结论 NAC 可能通过抑制 TGF- $\beta_1$  诱导的 ROS 的产生及 p38MAPK、SAPK/JNK 及 ERK1/2 蛋白的磷酸化进而抑制 ARPE-19 细胞向肌成纤维细胞转分化。

**【关键词】** N-乙酰半胱氨酸; 视网膜色素上皮细胞; 转化生长因子- $\beta_1$ ; 肌成纤维细胞; 转分化;  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白

**Effect of N-acetylcysteine on the transforming growth factor  $\beta_1$ -induced transdifferentiation of retinal pigment epithelial cell to myofibroblast** Liu Shuai, Jin Haiying

Department of Ophthalmology, Xinhua Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200093, China

Corresponding author: Jin Haiying, Email: eagle\_jin@163.com

**【Abstract】** **Background** The transdifferentiation of retinal pigment epithelial (RPE) cell to myofibroblast is a central event in the development and progression of proliferative vitreoretinopathy (PVR). N-acetylcysteine (NAC)

can inhibit the transdifferentiation of multiple cells to myofibroblasts via suppressing the production of reactive oxygen species (ROS) and the phosphorylation of MAPK induced by transforming growth factor- $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ), but the effect of NAC on the TGF- $\beta_1$ -induced transdifferentiation of human RPE cell line ARPE-19 cell to myofibroblast and its underlying molecular mechanism is still unclear. **Objective** This study was to investigate the effect of NAC on the TGF- $\beta_1$ -induced transdifferentiation of ARPE-19 cell to myofibroblast and its underlying mechanisms. **Methods** Human ARPE-19 cells were divided into control group, TGF- $\beta_1$  treatment group, NAC intervention group and simple NAC group. Cells in the control group were not disposed, 10 ng/ml TGF- $\beta_1$ , 10 ng/ml TGF- $\beta_1$  + 5 mmol/L NAC and 5 mmol/L NAC were used to interfere the ARPE-19 cells for 48 hours in the other 3 groups. The morphological changes of the cells were observed by phase contrast microscopy. Real-time quantitative PCR, Western blot, immunofluorescence and ELISA were used to detect the expression of transdifferentiation marker genes— $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA), fibronectin and type I collagen. The expression level of intracellular ROS induced by TGF- $\beta_1$  in the presence or absence of NAC was detected using the non-fluorescent probe DCFH-DA performed by flow cytometry. The phosphorylation level of p38MAPK, ERK1/2 and SAPK/JNK were detected by Western blot. The cell counting kit-8 (CCK-8) assay was used to investigate the effect of NAC on the viability of ARPE-19 cells. **Results** The expressions of  $\alpha$ -SMA, fibronectin and type I collagen mRNA in the TGF- $\beta_1$  treatment group were significantly increased, and were (2.15 $\pm$ 0.29), (9.54 $\pm$ 1.08), (25.78 $\pm$ 0.66) times higher than those of the control group, with significant differences between the two groups (all at  $P < 0.05$ ). The expressions of  $\alpha$ -SMA, fibronectin and type I collagen protein were significantly increased, and were (8.49 $\pm$ 0.32), (2.53 $\pm$ 0.69), (4.45 $\pm$ 1.05) times higher than those of the control group, respectively, with significant differences between the two groups (all at  $P < 0.05$ ). The expressions of  $\alpha$ -SMA, fibronectin and type I collagen mRNA in the NAC intervention group were (66.70 $\pm$ 12.57)%, (66.11 $\pm$ 8.35)% and (33.19 $\pm$ 6.90)% lower than those of the TGF- $\beta_1$  treatment group, and the expressions of protein were (52.30 $\pm$ 4.83)%, (55.03 $\pm$ 2.58)% and (56.08 $\pm$ 3.65)% lower than those of the TGF- $\beta_1$  treatment group, respectively, with significant differences between the two groups (all at  $P < 0.05$ ). Flow cytometry results showed that the expression level of intracellular ROS in the TGF- $\beta_1$  treatment group was (2.12 $\pm$ 0.20) times higher than that of the control group, and the intracellular ROS in the NAC intervention group was (57.41 $\pm$ 9.45)% lower than that of the TGF- $\beta_1$  treatment group, with significant differences between the groups (both at  $P < 0.01$ ). Western blot results showed that the phosphorylation levels of p38MAPK, SAPK/JNK and ERK1/2 in the TGF- $\beta_1$  treatment group were (9.18 $\pm$ 1.00), (4.87 $\pm$ 0.81) and (4.20 $\pm$ 0.69) times higher than those of the control group, respectively, showing significant differences between the two groups (all at  $P < 0.05$ ). The phosphorylation level of p38MAPK, SAPK/JNK and ERK1/2 in the NAC intervention group were (48.16 $\pm$ 14.82)%, (67.90 $\pm$ 2.90)% and (74.52 $\pm$ 4.00)% lower than those of the TGF- $\beta_1$  treatment group, respectively, showing significant differences between the two groups (all at  $P < 0.05$ ). **Conclusions** NAC inhibits the TGF- $\beta_1$ -induced transdifferentiation of ARPE-19 cells possibly via suppressing the production of intracellular ROS and the phosphorylation of p38MAPK, SAPK/JNK and ERK1/2.

**[Key words]** N-acetylcysteine; Retinal pigment epithelial cell; Transforming growth factor- $\beta_1$ ; Myofibroblast; Transdifferentiation;  $\alpha$ -Smooth muscle actin

增生性玻璃体视网膜病变 (proliferative vitreoretinopathy, PVR) 是引起孔源性视网膜脱离患者复位手术失败的主要原因之一<sup>[1]</sup>, 其主要特征是在脱离的视网膜或玻璃体表面形成纤维增生膜<sup>[2]</sup>。研究表明, 多种细胞参与 PVR 纤维增生膜的发生和发展, 其中, 肌成纤维细胞是引起 PVR 增生膜收缩, 导致视网膜复位手术失败的主要细胞类型<sup>[3-5]</sup>。视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelial, RPE) 细胞可以经上皮-间充质转化转分化为肌成纤维细胞, 是 PVR 增生膜中肌成纤维细胞的主要来源<sup>[5-6]</sup>。转化生长因子- $\beta$

(transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ ) 是诱导 RPE 细胞向肌成纤维细胞转分化最重要的纤维生长因子<sup>[6-7]</sup>。N-乙酰半胱氨酸 (N-acetylcysteine, NAC) 是 L-半胱氨酸乙酰化的衍生物, 为谷胱甘肽的前体, 是一种含有巯基的抗氧化剂, 具有清除自由基、抗细胞凋亡、抗血管生成及抑制恶性肿瘤转移等作用<sup>[8-10]</sup>。新近研究表明, NAC 还具有抑制 TGF- $\beta_1$  诱导的肺泡上皮细胞、支气管上皮细胞、肾小管上皮细胞及成纤维细胞向肌成纤维细胞转分化的作用<sup>[11-14]</sup>。但是 NAC 对 RPE 细胞向肌成纤维细胞转分化的影响尚不清楚。本研究中旨

在研究 NAC 对 TGF- $\beta_1$  诱导的 ARPE-19 细胞向肌成纤维细胞转分化的影响及其潜在的分子机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

ARPE-19 细胞购自 ATCC 细胞库。DMEM/F12 培养基(美国 HyClone 公司);青链霉素双抗、质量分数 0.25% 胰蛋白酶、胎牛血清(美国 Gibco 公司);Trizol(美国 Invitrogen 公司);细胞计数试剂盒-8 (cell counting kit-8, CCK-8)、Hieff<sup>TM</sup> 第 1 条链 cDNA 合成 Super Mix 试剂盒、Hieff<sup>TM</sup> qPCR SYBR Green Master Mix 试剂盒(上海翊圣公司);人重组 TGF- $\beta_1$ (英国 PeproTech 公司);NAC、DCFH-DA(美国 Sigma 公司);纤维结合蛋白 ELISA 试剂盒(武汉博士德公司);I 型胶原 ELISA 试剂盒(上海森雄科技公司);小鼠抗人  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA)抗体(英国 Dako 公司);小鼠抗人 p38MAPK 抗体、p-p38MAPK 抗体(上海碧云天公司);兔抗人 ERK1/2 抗体、兔抗人 p-ERK1/2 抗体、兔抗人 SAPK/JNK 抗体、兔抗人 p-SAPK/JNK 抗体(美国 CST 公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞处理及分组** 使用含体积分数 10% 胎牛血清和质量分数 1% 青链霉素双抗的 DMEM/F12 培养基在 37 °C、体积分数 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱培养 ARPE-19 细胞。为了诱导 ARPE-19 细胞向肌成纤维细胞转分化,ARPE-19 细胞在使用无血清的培养基饥饿 6 h 后,再使用 10 ng/ml TGF- $\beta_1$  处理 48 h。实验分为对照组、TGF- $\beta_1$  处理组、NAC 干预组和 NAC 单独处理组,对照组不做处理,其他 3 个组分别使用 10 ng/ml TGF- $\beta_1$ 、10 ng/ml TGF- $\beta_1$ +5 mmol/L NAC 和 5 mmol/L NAC 处理细胞 48 h。

**1.2.2 CCK-8 法检测不同浓度 NAC 对 ARPE-19 细胞生存的影响** 将 ARPE-19 细胞接种于 96 孔板,调整细胞密度为  $1 \times 10^4$ /孔,待细胞生长融合后,将培养基更换为无血清的 DMEM/F12 培养基饥饿细胞 6 h。之后每孔分别加入 NAC 终浓度为 0.005、0.05、0.5、5 及 50 mmol/L 的培养基 100  $\mu$ l 处理细胞 48 h,然后将培养基更换为含体积分数 10% WST-8 的完全培养基再孵育细胞 3 h。使用酶标仪在 450 nm 及 600 nm 波长处测定吸光度(A)值。不加 NAC 的细胞培养组作为对照组。细胞生存率 =  $(A_{450 \text{ nm NAC}} - A_{600 \text{ nm NAC}}) / (A_{450 \text{ nm 对照}} - A_{600 \text{ nm 对照}}) \times 100\%$

**1.2.3 实时荧光定量 PCR 法检测  $\alpha$ -SMA、纤维结合蛋白及 I 型胶原 mRNA 的表达水平** 将 ARPE-19 细

胞接种于 6 孔板,调整细胞密度为  $5 \times 10^5$ /孔。待细胞生长融合至 70% ~ 80% 时,将培养基更换为无血清的 DMEM/F12 培养基并饥饿细胞 6 h,再按照不同组的处理条件处理细胞 48 h。使用 Trizol 试剂从细胞中提取总 RNA,逆转录合成 cDNA。设计并合成引物, $\alpha$ -SMA 上游引物为 5'-TGGTCGGTATGGGTCAGAAAG-3',下游引物为 5'-TCAGGGTCAGGATACCTCTCTTG-3';纤维结合蛋白上游引物为 5'-CGGTGGCTGTCA GTCAAAG-3',下游引物为 5'-AAACCTCGGCTTCCTC CATAA-3';I 型胶原上游引物为 5'-ATCAACCGGA GGAATTTCCGT-3',下游引物为 5'-CACCAGGACGA CCAGGTTTTC-3';GAPDH 上游引物为 5'-CTGGGCTA CACTGAGCACC-3',下游引物为 5'-AAGTGGTCGTT GAGGGCAATG-3'。配制反应液,设置反应程序,反应条件为 95 °C 预变性 30 s,95 °C 变性 5 s,50 °C 退火及延伸 34 s,共 40 个循环。应用 ABI 7500 型实时荧光定量 PCR 仪获得目的基因扩增曲线和 Ct 值,以 GAPDH 为内参照,采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法对各组目的蛋白相对表达量进行计算。

**1.2.4 免疫荧光实验检测  $\alpha$ -SMA 蛋白的表达分布** 24 孔板内置无菌细胞爬片,调整细胞密度为  $1 \times 10^5$ /孔,待细胞贴壁生长 12 h 后,使用无血清培养基培养 6 h,再按照不同组的处理条件处理细胞 48 h。预冷的甲醇-20 °C 固定细胞 10 min,添加小鼠抗人  $\alpha$ -SMA 抗体(1:100 稀释),置于湿盒内 4 °C 孵育过夜,添加 TRITC 标记的山羊抗小鼠二抗(1:100)室温下孵育 1 h,DAPI 染核 5 min,封片并置于荧光显微镜下观察。荧光显微镜下见细胞质中存在呈丝状排列的红色荧光为  $\alpha$ -SMA 蛋白表达阳性。

**1.2.5 ELISA 法检测纤维结合蛋白和 I 型胶原的含量** 将 ARPE-19 细胞接种于 6 孔板,调整细胞密度为  $5 \times 10^5$ /孔,待细胞生长融合至 70% ~ 80% 时,使用无血清培养基饥饿培养 6 h,再按照不同组的处理条件处理细胞 48 h。收集细胞培养基上清,冻存于 -20 °C 待分析。依据 ELISA 试剂盒说明书操作,测定细胞培养基上清中纤维结合蛋白和 I 型胶原的含量。使用酶标仪在 450 nm 波长处测定 A 值,制作标准曲线,依据标准曲线计算各组纤维结合蛋白和 I 型胶原的含量。

**1.2.6 流式细胞技术测定细胞内 ROS 水平** 使用非荧光探针 DCFH-DA 通过流式细胞仪检测细胞内 ROS 的产生情况。将 ARPE-19 细胞接种于 6 孔板,调整细胞密度为  $5 \times 10^5$ /孔;待细胞生长融合至 70% ~ 80% 时,使用无血清的 DMEM/F12 培养基培养细胞 6 h;使用新鲜的 DMEM/F12 培养基稀释 DCFH-DA 至终浓度

为  $10 \mu\text{mol/L}$ , 使用  $10 \mu\text{mol/L}$  DCFH-DA 在  $37^\circ\text{C}$  条件下孵育细胞 1 h; 然后移除含 DCFH-DA 的培养基, 并使用无血清的 DMEM/F12 培养基洗 3 次; 依据各组预设的实验条件处理细胞 1 h; 将细胞收集至流式管中, FACS Canto II 流式细胞仪(美国 BD 公司)进行检测, 设定激发波长为  $488 \text{ nm}$ , 发射波长为  $525 \text{ nm}$ , 检测各组细胞内荧光的强度。计算每组单个细胞内平均荧光强度。

**1.2.7 Western blot 法检测各组  $\alpha$ -SMA 蛋白、磷酸化 p38MAPK、磷酸化 SAPK/JNK 及磷酸化 ERK1/2 的表达** 使用直径  $6 \text{ cm}$  的培养皿培养细胞, 待细胞生长融合至  $70\% \sim 80\%$  时, 无血清培养基培养细胞 6 h, 再按照不同组的处理条件处理细胞 48 h; 无血清培养基培养细胞 6 h 后, NAC 干预组首先使用  $5 \text{ mmol/L}$  NAC 预处理细胞 1 h, 然后再使用  $\text{TGF-}\beta_1$  处理细胞 1 h。使用 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白, BAC 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度, 质量分数  $10\%$  SDS-PAGE 胶分离蛋白, 电转膜, 脱脂蛋白封闭, 添加相应一抗  $4^\circ\text{C}$  孵育 15 h, 之后添加相应二抗室温下孵育 1 h, 显影、曝光。使用 Image Lab 5.0 图像分析软件测定条带的 A 值, 计算各组与对照组 A 值之比作为蛋白的相对表达量。

### 1.3 统计学方法

采用 SAS 9.3 统计学软件进行统计分析。计量资料经 W 检验呈正态分布, 以  $\bar{x} \pm s$  表示, 各组均数经 Levene 检验证实方差齐, 各组间各检测指标的总差异比较采用单因素方差分析, 组间多重比较采用 LSD-t 检验。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 不同浓度 NAC 对细胞生存率的影响

CCK-8 法检测结果表明,  $0.005$ 、 $0.05$ 、 $0.5$ 、 $5$ 、 $50 \text{ mmol/L}$  及对照组 ARPE-19 细胞生存率分别为  $1.02 \pm 0.13$ 、 $1.05 \pm 0.08$ 、 $1.03 \pm 0.06$ 、 $1.02 \pm 0.03$ 、 $0.50 \pm 0.07$  和  $1.00 \pm 0.00$ , 细胞生存率的总体比较差异有统计学意义 ( $F = 39.85, P < 0.01$ )。其中  $50 \text{ mmol/L}$  NAC 组细胞生存率较对照组显著降低, 差异有统计学意义 ( $t = 16.63, P < 0.01$ );  $0.005$ 、 $0.05$ 、 $0.5$  及  $5 \text{ mmol/L}$  NAC 组的细胞生存率与对照组相比, 差异均无统计学意义 (均  $P > 0.05$ ) (图 1)。因  $50 \text{ mmol/L}$  NAC 具有明显的细胞毒性, 显著抑制细胞的增生, 因此, 选取  $5 \text{ mmol/L}$  NAC 用于后续实验。

### 2.2 NAC 抑制 $\text{TGF-}\beta_1$ 诱导的 ARPE-19 细胞形态学的改变

相差显微镜下观察结果显示, 对照组 ARPE-19 细

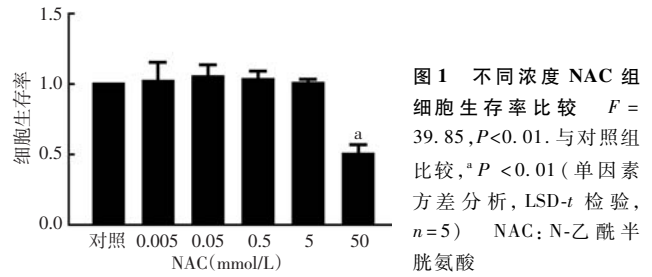


图 1 不同浓度 NAC 组细胞生存率比较  $F = 39.85, P < 0.01$ 。与对照组比较,  $^a P < 0.01$  (单因素方差分析, LSD-t 检验,  $n = 5$ ) NAC: N-乙酰半胱氨酸

胞生长规则, 呈典型圆鹅卵石样外形特征。  $\text{TGF-}\beta_1$  处理组细胞形态发生明显改变。细胞以一种更具侵袭性的生长模式生长, 细胞体拉长, 与临近的细胞之间失去接触, 部分细胞呈现典型的肌成纤维细胞长梭形的形态特征。 NAC 干预组细胞逆转了  $\text{TGF-}\beta_1$  处理组细胞形态学的改变。 NAC 单独处理组对细胞的形态无影响 (图 2)。

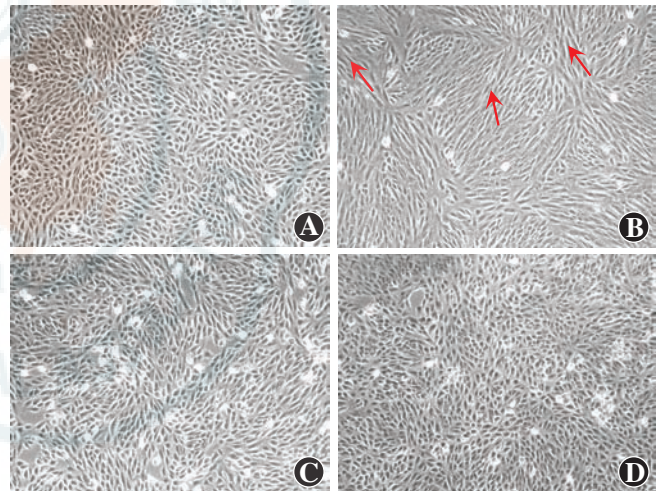


图 2 相差显微镜下观察细胞形态学改变 ( $\times 100$ ) A: 对照组细胞生长规则, 呈鹅卵石状 B:  $\text{TGF-}\beta_1$  处理组细胞呈长梭形, 与临近的细胞之间失去接触 (箭头) C: NAC 干预组逆转了  $\text{TGF-}\beta_1$  处理组细胞形态学的改变 D: NAC 单独处理组细胞的形态无变化

### 2.3 NAC 抑制 $\text{TGF-}\beta_1$ 诱导的 $\alpha$ -SMA 表达上调

对照组、 $\text{TGF-}\beta_1$  处理组、NAC 干预组和 NAC 单独处理组  $\alpha$ -SMA mRNA 及蛋白表达水平的总体比较差异均有统计学意义 (mRNA:  $F = 33.68, P < 0.01$ ; 蛋白:  $F = 542.50, P < 0.01$ ), 其中与对照组相比,  $\text{TGF-}\beta_1$  处理组  $\alpha$ -SMA mRNA 及蛋白水平均上调, 分别是对照组的 ( $2.15 \pm 0.29$ ) 倍和 ( $8.49 \pm 0.32$ ) 倍, 差异均有统计学意义 ( $t = 7.98, P < 0.01$ ;  $t = 40.10, P < 0.01$ ); NAC 干预组  $\alpha$ -SMA mRNA 和蛋白的表达水平均下调, 分别为  $\text{TGF-}\beta_1$  处理组的 ( $66.70 \pm 12.57$ )% 和 ( $52.30 \pm 4.83$ )%, 差异均有统计学意义 ( $t = 4.05, P = 0.03$ ;  $t = 15.40, P < 0.01$ ); NAC 单独处理组与对照组  $\alpha$ -SMA mRNA 及蛋白表达水平比较, 差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ ) (图

3)。免疫荧光分析结果显示, TGF-β<sub>1</sub> 处理组可见大量红色荧光标记的 α-SMA 表达阳性细胞, 而 NAC 干预组未见 α-SMA 表达阳性的细胞(图 4)。

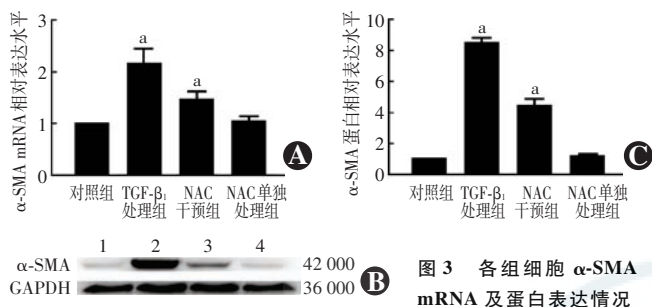


图 3 各组细胞 α-SMA mRNA 及蛋白表达情况

A: 各组 α-SMA mRNA 表达水平比较  $F = 33.68, P < 0.01$ . 与对照组比较,  $^a P < 0.01$  (单因素方差分析, LSD- $t$  检验,  $n = 4$ ) B: 各组 α-SMA 蛋白表达的电泳图 1: 对照组 2: TGF-β<sub>1</sub> 处理组 3: NAC 干预组 4: NAC 单独处理组 C: 各组 α-SMA 蛋白表达水平比较  $F = 542.50, P < 0.01$ . 与对照组比较,  $^a P < 0.01$  (单因素方差分析, LSD- $t$  检验,  $n = 3$ ) SMA: 平滑肌肌动蛋白; TGF: 转化生长因子; NAC: N-乙酰半胱氨酸

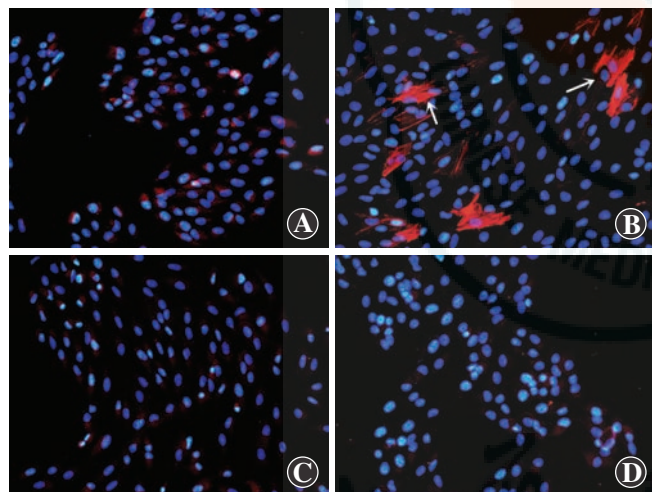


图 4 免疫荧光法观察各组细胞 α-SMA 的表达 (TRITC × 200) A: 对照组 可见少量荧光标记的细胞 B: TGF-β<sub>1</sub> 处理组 可见大量红色荧光标记的细胞(白箭头) C: NAC 干预组 未见 α-SMA 表达阳性的细胞 D: NAC 单独处理组 未见 α-SMA 表达阳性的细胞

## 2.4 NAC 抑制 TGF-β<sub>1</sub> 诱导的纤维结合蛋白和 I 型胶原表达的上调

实时荧光定量 PCR 检测结果显示, 对照组、TGF-β<sub>1</sub> 处理组、NAC 干预组和 NAC 单独处理组纤维结合蛋白和 I 型胶原 mRNA 表达水平的总体比较差异均有统计学意义 ( $F = 261.90, P < 0.01$ ;  $F = 345.20, P < 0.01$ ), 其中 TGF-β<sub>1</sub> 处理组纤维结合蛋白和 I 型胶原 mRNA 表达水平分别是对照组的 ( $9.54 \pm 1.08$ ) 倍和 ( $25.78 \pm 0.66$ ) 倍, 差异均有统计学意义 ( $t = 15.77, P < 0.01$ ;  $t = 75.55, P < 0.01$ ); NAC 干预组纤维结合蛋白

和 I 型胶原 mRNA 表达水平分别是 TGF-β<sub>1</sub> 处理组的 ( $66.11 \pm 8.35$ )% 和 ( $33.19 \pm 6.90$ )%, 差异均有统计学意义 ( $t = 11.15, P < 0.01$ ;  $t = 18.73, P < 0.01$ ); NAC 单独处理组与对照组纤维结合蛋白和 I 型胶原 mRNA 表达水平比较, 差异均无统计学意义 (均  $P > 0.05$ ) (图 5A, B)。

ELISA 检测结果显示, 对照组、TGF-β<sub>1</sub> 处理组、NAC 干预组和 NAC 单独处理组细胞培养上清液中纤维结合蛋白质量浓度分别为 ( $29.00 \pm 4.88$ )、( $71.76 \pm 11.59$ )、( $39.51 \pm 6.68$ ) 和 ( $30.34 \pm 5.03$ ) ng/ml, I 型胶原的蛋白质量浓度分别为 ( $17.21 \pm 2.48$ )、( $74.93 \pm 5.66$ )、( $42.01 \pm 4.06$ ) 和 ( $16.63 \pm 1.88$ ) ng/ml, 差异均有统计学意义 ( $F = 29.54, P < 0.05$ ;  $F = 171.30, P < 0.01$ ); 其中 TGF-β<sub>1</sub> 处理组培养上清液中纤维结合蛋白和 I 型胶原的蛋白表达水平分别为对照组的 ( $2.53 \pm 0.69$ ) 倍和 ( $4.45 \pm 1.05$ ) 倍, 差异均有统计学意义 ( $t = 5.36, P < 0.05$ ;  $t = 12.33, P < 0.01$ ); NAC 干预组细胞培养上清液中纤维结合蛋白和 I 型胶原的蛋白质量浓度分别为 TGF-β<sub>1</sub> 处理组的 ( $55.03 \pm 2.58$ )% 和 ( $56.08 \pm 3.65$ )%, 差异均有统计学意义 ( $t = 10.24, P < 0.01$ ;  $t = 15.39, P < 0.01$ ); NAC 单独处理组与对照组纤维结合蛋白和 I 型胶原质量浓度比较, 差异均无统计学意义 (均  $P > 0.05$ ) (图 5C, D)。

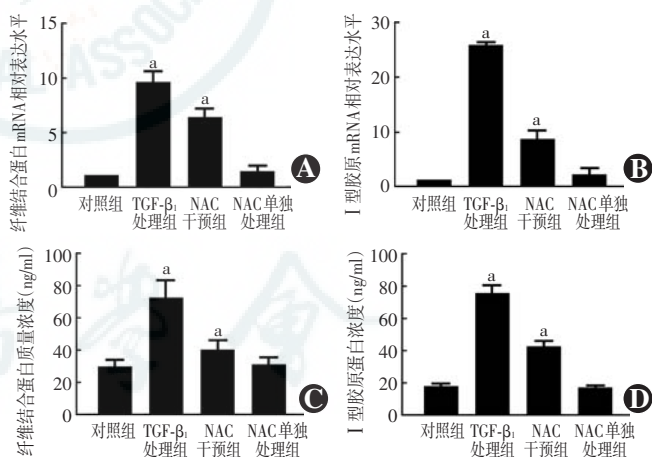


图 5 各组细胞纤维结合蛋白和 I 型胶原 mRNA 及蛋白表达比较

A: 各组纤维结合蛋白 mRNA 相对表达水平的比较  $F = 261.90, P < 0.01$ . 与对照组比较,  $^a P < 0.05$  (单因素方差分析, LSD- $t$  检验,  $n = 4$ ) B: 各组 I 型胶原 mRNA 相对表达水平的比较  $F = 345.20, P < 0.01$ . 与对照组比较,  $^a P < 0.05$  (单因素方差分析, LSD- $t$  检验,  $n = 4$ ) C: 各组纤维结合蛋白质量浓度的比较  $F = 29.54, P < 0.05$ . 与对照组比较,  $^a P < 0.05$  (单因素方差分析, LSD- $t$  检验,  $n = 4$ ) D: 各组 I 型胶原蛋白质量浓度的比较  $F = 171.30, P < 0.01$ . 与对照组比较,  $^a P < 0.05$  (单因素方差分析, LSD- $t$  检验,  $n = 4$ ) TGF: 转化生长因子; NAC: N-乙酰半胱氨酸

## 2.5 NAC 抑制 TGF-β<sub>1</sub> 诱导的细胞内 ROS 的产生

流式细胞仪分析结果显示, 对照组、TGF-β<sub>1</sub> 处理

组、NAC 干预组和 NAC 单独处理组细胞内 ROS 水平的总体比较差异有统计学意义 ( $F = 68.34, P < 0.01$ ), TGF- $\beta_1$  刺激 ARPE-19 细胞 1 h 能显著上调细胞内 ROS 的水平, 其中与对照组相比, TGF- $\beta_1$  处理组细胞内 ROS 的水平增加, 是对照组的  $(2.12 \pm 0.20)$  倍, 差异有统计学意义 ( $t = 9.90, P < 0.01$ ); NAC 干预组细胞内 ROS 的水平显著降低, 是 TGF- $\beta_1$  处理组的  $(57.41 \pm 9.45)\%$ , 差异有统计学意义 ( $t = 7.25, P < 0.01$ ); NAC 单独处理组与对照组细胞内 ROS 水平比较, 差异无统计学意义 ( $t = 1.04, P > 0.05$ ) (图 6)。

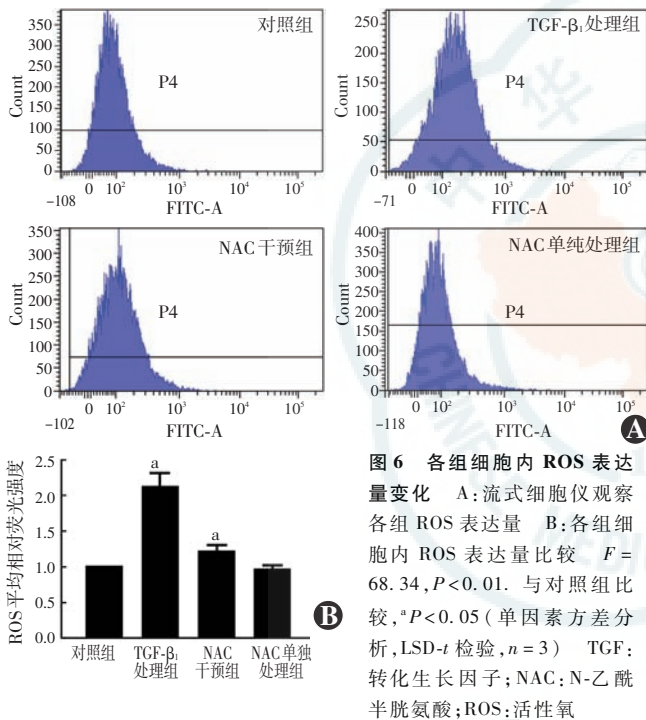


图 6 各组细胞内 ROS 表达量变化 A: 流式细胞仪观察各组 ROS 表达量 B: 各组细胞内 ROS 表达量比较  $F = 68.34, P < 0.01$ . 与对照组比较,  $^a P < 0.05$  (单因素方差分析, LSD- $t$  检验,  $n = 3$ ) TGF: 转化生长因子; NAC: N-乙酰半胱氨酸; ROS: 活性氧

### 2.6 NAC 抑制 TGF- $\beta_1$ 诱导的 p38MAPK、SAPK/JNK 及 ERK1/2 蛋白的磷酸化

Western blot 检测结果显示, 对照组、TGF- $\beta_1$  处理组、NAC 干预组和 NAC 单独处理组 p38MAPK、SAPK/JNK 及 ERK1/2 蛋白磷酸化水平的总体比较差异均有统计学意义 ( $F = 70.35, P < 0.01$ ;  $F = 76.31, P < 0.01$ ;  $F = 74.54, P < 0.05$ ), 其中 TGF- $\beta_1$  处理组 p38MAPK、SAPK/JNK 及 ERK1/2 蛋白磷酸化水平分别为对照组的  $(9.18 \pm 1.00)$ 、 $(4.87 \pm 0.81)$  和  $(4.20 \pm 0.69)$  倍, 差异均有统计学意义 ( $t = 14.130, P < 0.01$ ;  $t = 8.249, P < 0.05$ ;  $t = 7.980, P < 0.05$ ); NAC 干预组 p38MAPK、SAPK/JNK 及 ERK1/2 蛋白磷酸化水平分别是 TGF- $\beta_1$  处理组的  $(48.16 \pm 14.82)\%$ 、 $(67.90 \pm 2.90)\%$  和  $(74.52 \pm 4.00)\%$ , 差异均有统计学意义 ( $t = 5.499, P = 0.032$ ;  $t = 11.090, P = 0.008$ ;  $t = 5.544, P = 0.031$ ); NAC 单独

处理组与对照组 MAPK 蛋白磷酸化水平比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ) (图 7)。

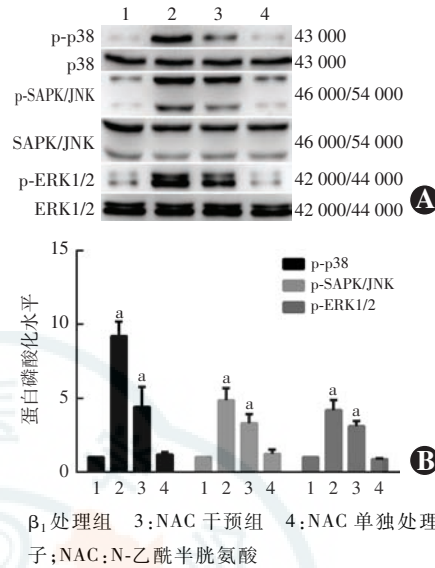


图 7 各组细胞 p38MAPK、ERK1/2 及 SAPK/JNK 磷酸化水平变化 A: 各组 p38MAPK、ERK1/2 和 SAPK/JNK 蛋白磷酸化水平表达的电泳图 B: 各组 p38MAPK、ERK1/2 和 SAPK/JNK 蛋白磷酸化水平表达的定量比较与对照组比较,  $^a P < 0.05$  (单因素方差分析, LSD- $t$  检验,  $n = 3$ ) 1: 对照组 2: TGF- $\beta_1$  处理组 3: NAC 干预组 4: NAC 单独处理组 TGF: 转化生长因子; NAC: N-乙酰半胱氨酸

### 3 讨论

本研究探讨了 NAC 对 TGF- $\beta_1$  诱导的 ARPE-19 细胞向肌成纤维细胞转分化的影响, 结果表明 NAC 能够显著抑制 TGF- $\beta_1$  诱导的 ARPE-19 细胞向肌成纤维细胞的转分化。同时本研究还表明, NAC 能够显著抑制 TGF- $\beta_1$  诱导的细胞内 ROS 的产生及 MAPK 蛋白的磷酸化。

Feist 等<sup>[5]</sup> 研究表明, 在 PVR 的纤维增生膜中至少一半的肌成纤维细胞来源于转分化的 RPE 细胞。RPE 细胞转分化为肌成纤维细胞进而参与 PVR 的发生和发展。本研究结果显示, 10 ng/ml TGF- $\beta_1$  刺激 RPE 细胞能够显著诱导细胞向肌成纤维细胞转分化, 与 Gamulescu 等<sup>[15]</sup> 的研究结果一致。转分化而来的肌成纤维细胞会重构其细胞骨架产生应力纤维, 同时表达特征性的细胞标志物  $\alpha$ -SMA 并与应力纤维结合, 以增加其收缩力。转分化的 RPE 细胞还能产生大量的细胞外基质 (extracellular matrix, ECM)。I 型胶原和纤维结合蛋白是 PVR 纤维增生膜中的主要 ECM 成分<sup>[5,16]</sup>。本实验结果显示, TGF- $\beta_1$  刺激 RPE 细胞 48 h 能显著诱导纤维结合蛋白和 I 型胶原的产生, 与转分化的 RPE 细胞的特性相符。当肌成纤维细胞收缩时, 产生的收缩力会通过细胞外基质传递到视网膜, 进而引起视网膜脱离<sup>[3,17-18]</sup>。

虽然诱导 RPE 细胞向肌成纤维细胞转分化的具体分子机制还未阐明, 但是多种细胞因子参与 RPE 细胞转分化的调控。其中, TGF- $\beta$  在 RPE 细胞向肌成纤维细胞转分化的过程中发挥关键作用<sup>[6-7]</sup>。此外, 肝

细胞生长因子、表皮生长因子、血小板源性生长因子及结缔组织生长因子等均参与 RPE 细胞向肌成纤维细胞转分化过程<sup>[19-21]</sup>。研究表明, PVR 动物模型中干预 RPE 细胞向肌成纤维细胞转分化能够有效抑制 PVR 的发生和发展<sup>[22-24]</sup>。

本研究结果显示, TGF- $\beta_1$  在诱导 ARPE-19 细胞转分化为肌成纤维细胞的过程中, 伴有 ROS 的显著上调, 使用 NAC 干预后能够显著抑制细胞内 ROS 的产生, 与 Felton 等<sup>[11]</sup>的研究结果相符。TGF- $\beta$  诱导的多种细胞向肌成纤维细胞转分化过程中伴有 ROS 的显著上调, 其主要机制是通过上调 NADPH 氧化酶及下调过氧化氢酶和超氧化物歧化酶来增加细胞内 ROS 的产生<sup>[11-14, 25]</sup>。新近研究表明, NAC 能够通过抑制 TGF- $\beta_1$  诱导的 p38MAPK、ERK1/2 及 SAPK/JNK 蛋白的磷酸化, 进而抑制支气管上皮细胞向肌成纤维细胞的转分化<sup>[12]</sup>, 与本研究结果一致。ROS 信号是 MAPK 信号通路的上游分子, ROS 可以使细胞内的 p38MAPK、ERK1/2 及 SAPK/JNK 磷酸化, 进而参与 TGF- $\beta_1$  诱导的上皮细胞向肌成纤维细胞的转分化过程<sup>[12-13]</sup>。

综上所述, 本研究结果表明 NAC 可能通过抑制 ROS 的产生及 MAPK 蛋白的磷酸化进而抑制 RPE 细胞向肌成纤维细胞的转分化。但是本研究是基于单一的细胞系, 未来可使用原代细胞和动物实验进行进一步研究。

## 参考文献

- Pastor JC. Proliferative vitreoretinopathy: an overview [J]. *Surv Ophthalmol*, 1998, 43(1): 3-18.
- The Retina Society Terminology Committee. The classification of retinal detachment with proliferative vitreoretinopathy [J]. *Ophthalmology*, 1983, 90(2): 121-125.
- Walshe R, Esser P, Wiedemann P, et al. Proliferative retinal diseases: myofibroblasts cause chronic vitreoretinal traction [J]. *Br J Ophthalmol*, 1992, 76(9): 550-552.
- Abu El-Asrar AM, Struyf S, van Damme J, et al. Circulating fibrocytes contribute to the myofibroblast population in proliferative vitreoretinopathy epiretinal membranes [J]. *Br J Ophthalmol*, 2008, 92(5): 699-704. DOI: 10.1136/bjo.2007.134346.
- Feist RM, King JL, Morris R, et al. Myofibroblast and extracellular matrix origins in proliferative vitreoretinopathy [J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2014, 252(2): 347-357. DOI: 10.1007/s00417-013-2531-0.
- Tamiya S, Liu L, Kaplan HJ. Epithelial-mesenchymal transition and proliferation of retinal pigment epithelial cells initiated upon loss of cell-cell contact [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2010, 51(5): 2755-2763. DOI: 10.1167/iovs.09-4725.
- Saika S, Yamanaka O, Sumioka T, et al. Fibrotic disorders in the eye: targets of gene therapy [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2008, 27(2): 177-196. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2007.12.002.
- Aruoma OI, Halliwell B, Hoey BM, et al. The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid [J]. *Free Radic Biol Med*, 1989, 6(6): 593-597.
- Atkuri KR, Mantovani JJ, Herzenberg LA, et al. N-Acetylcysteine-a safe antidote for cysteine/glutathione deficiency [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2007, 7(4): 355-359. DOI: 10.1016/j.coph.2007.04.005.
- Shimojo Y, Akimoto M, Hisanaga T, et al. Attenuation of reactive oxygen species by antioxidants suppresses hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition and metastasis of pancreatic cancer cells [J]. *Clin Exp Metastasis*, 2013, 30(2): 143-154. DOI: 10.1007/s10585-012-9519-8.
- Felton VM, Borok Z, Willis BC. N-acetylcysteine inhibits alveolar epithelial-mesenchymal transition [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2009, 297(5): L805-812. DOI: 10.1152/ajplung.00009.2009.
- Ge A, Ma Y, Liu YN, et al. Diosmetin prevents TGF- $\beta_1$ -induced epithelial-mesenchymal transition via ROS/MAPK signaling pathways [J]. *Life Sci*, 2016, 153: 1-8. DOI: 10.1016/j.lfs.2016.04.023.
- Rhyu DY, Yang Y, Ha H, et al. Role of reactive oxygen species in TGF-beta1-induced mitogen-activated protein kinase activation and epithelial-mesenchymal transition in renal tubular epithelial cells [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2005, 16(3): 667-675. DOI: 10.1681/ASN.2004050425.
- Park IH, Park SJ, Cho JS, et al. Role of reactive oxygen species in transforming growth factor beta1-induced alpha smooth-muscle actin and collagen production in nasal polyp-derived fibroblasts [J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2012, 159(3): 278-286. DOI: 10.1159/000337460.
- Gamulescu MA, Chen Y, He S, et al. Transforming growth factor beta2-induced myofibroblastic differentiation of human retinal pigment epithelial cells: regulation by extracellular matrix proteins and hepatocyte growth factor [J]. *Exp Eye Res*, 2006, 83(1): 212-222. DOI: 10.1016/j.exer.2005.12.007.
- Scheiffarth OF, Kampik A, Günther H, et al. Proteins of the extracellular matrix in vitreoretinal membranes [J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 1988, 226(4): 357-361.
- Gabbiani C. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases [J]. *J Pathol*, 2003, 200(4): 500-503. DOI: 10.1002/path.1427.
- Hinz B, Celetta G, Tomasek JJ, et al. Alpha-smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity [J]. *Mol Biol Cell*, 2001, 12(9): 2730-2741.
- Chen YJ, Tsai RK, Wu WC, et al. Enhanced PKC $\delta$  and ERK signaling mediate cell migration of retinal pigment epithelial cells synergistically induced by HGF and EGF [J/OL]. *PLoS One*, 2012, 7(9): e44937 [2016-12-20]. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0044937>. DOI: 10.1371/journal.pone.0044937.
- Ando A, Ueda M, Uyama M, et al. Enhancement of dedifferentiation and myoid differentiation of retinal pigment epithelial cells by platelet derived growth factor [J]. *Br J Ophthalmol*, 2000, 84(11): 1306-1311.
- Chen CL, Liang CM, Chen YH, et al. Bevacizumab modulates epithelial-to-mesenchymal transition in the retinal pigment epithelial cells via connective tissue growth factor up-regulation [J/OL]. *Acta Ophthalmol*, 2012, 90(5): e389-398 [2016-12-23]. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1755-3768.2012.02426.x/epdf>. DOI: 10.1111/j.1755-3768.2012.02426.x.
- Umazume K, Tsukahara R, Liu L, et al. Role of retinal pigment epithelial cell  $\beta$ -catenin signaling in experimental proliferative vitreoretinopathy [J]. *Am J Pathol*, 2014, 184(5): 1419-1428. DOI: 10.1016/j.ajpath.2014.01.022.
- Saika S, Kono-Saika S, Tanaka T, et al. Smad3 is required for dedifferentiation of retinal pigment epithelium following retinal detachment in mice [J]. *Lab Invest*, 2004, 84(10): 1245-1258. DOI: 10.1038/labinvest.3700156.
- Liang CM, Tai MC, Chang YH, et al. Glucosamine inhibits epithelial-to-mesenchymal transition and migration of retinal pigment epithelium cells in culture and morphologic changes in a mouse model of proliferative vitreoretinopathy [J/OL]. *Acta Ophthalmol*, 2011, 89(6): e505-514 [2016-12-23]. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1755-3768.2011.02426.x/epdf>.

1111/j. 1755-3768. 2011. 02147. x/epdf. DOI:10. 1111/j. 1755-3768. 2011. 02147. x.

DOI:10. 1007/s12272-014-0380-y.

[25] Ryoo JG, Shin DH, Kang KS, et al. Involvement of Nrf2-GSH signaling in TGFβ1-stimulated epithelial-to-mesenchymal transition changes in rat renal tubular cells[J]. Arch Pharm Res, 2015, 38 (2) : 272-281.

(收稿日期:2017-03-29)

(本文编辑:刘艳)

## · 临床经验 ·

## 黄斑光损伤急性期影像学特征分析

王志立 陈晓 罗欢

450003 郑州,河南省立眼科医院 河南省眼科研究所 河南省人民医院 郑州大学人民医院

通信作者:陈晓,Email:cxdoctor@sina.com

DOI:10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2017. 10. 009

随着科技的发展,光学产品已被广泛应用到医疗、美容、教学、娱乐、装饰等诸多领域,给人们的工作和生活带来了便利,其不当使用也给眼部带来了意想不到的伤害,黄斑光损伤就是其中之一。光相干断层扫描(optical coherence tomography, OCT)和荧光素眼底血管造影(fluorescein fundus angiography, FFA)是目前临床诊断黄斑病变的主要影像学检查。黄斑光损伤急性期是治疗的关键时期,因此及早明确黄斑光损伤的诊断尤为重要。本研究收集了在河南省立眼科医院确诊为急性期黄斑光损伤患者9例,对其影像学特征进行分析。

## 1 资料与方法

## 1.1 一般资料 采用回顾性研究方法,收

集2012年1月至2016年12月于河南省立眼科医院就诊的急性期黄斑光损伤患者9例13眼的临床资料,其中男8例,女1例;12岁以下儿童5例,成人4例;激光笔损伤者5例8眼,美容激光损伤者1例1眼,电弧光损伤者1例1眼,手机光损伤者1例2眼,浴霸灯光损伤者1例1眼;就诊时间多在光损伤后6h~3d,1例为光损伤后5d。纳入标准:(1)有明确的眼部光损伤史;(2)有突然或明显的视力下降等视觉障碍史;(3)光损伤后短期内就诊。排除标准:(1)既往有眼科疾病史、手术史和外伤史;(2)高度近视患者;(3)长期接触强光源。

1.2 方法 所有患者均进行病史采集和眼部检查,包括裸眼视力、最佳矫正视力(best corrected visual acuity, BCVA)、裂隙灯显微镜检查、眼底检查、彩色眼底照相、视野和多焦视网膜电图(multifocal macular electroretinogram, mERG)检查,并进行FFA和OCT检查,影像学检查均由经验丰富的医师进行分析。

## 2 结果

所有患者均表现为突然视力下降或中心暗点。7例11眼BCVA为0.1~0.3,2例2眼BCVA为0.5~0.6。8眼黄斑均表现为灰白色及黄白色病变,局部水肿(图1A),1眼出现黄斑裂孔(图1B),1眼黄斑出血,3眼黄斑区未见明显改变。所有

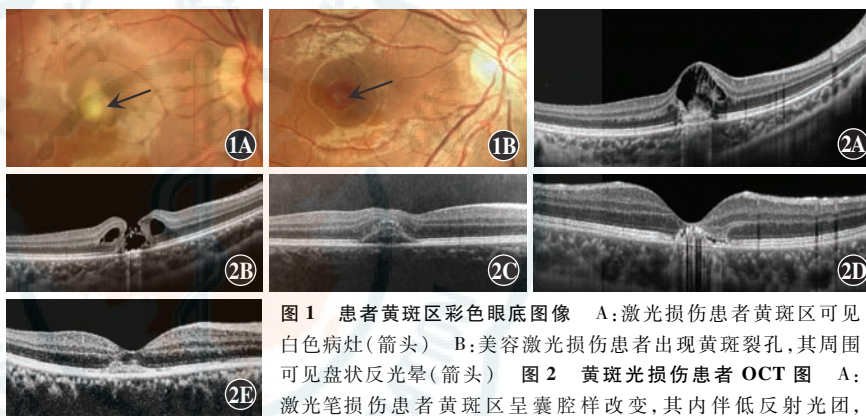


图1 患者黄斑区彩色眼底图像 A:激光损伤患者黄斑区可见白色病灶(箭头) B:美容激光损伤患者出现黄斑裂孔,其周围可见盘状反光晕(箭头) 图2 黄斑光损伤患者OCT图 A:激光笔损伤患者黄斑区呈囊腔样改变,其内伴低反射光团,IS/OS及嵌合体带肿胀,结构模糊不清,RPE层粗糙 B:美容激光损伤患者黄斑裂孔合并纤细条状反射光带,RPE层粗糙 C:浴霸灯光损伤患者黄斑区神经上皮出现中低反射光团伴光衰减 D:电弧光损伤患者黄斑神经上皮出现中高反射光团伴光衰减 E:手机损伤患者黄斑中心凹神经上皮呈裂隙状脱离,IS/OS及嵌合体带肿胀,结构不清

患者患眼视野均表现为中心暗点或中心敏感度下降,mERG表现为中心幅值下降。OCT检查显示,8眼黄斑区呈囊腔样改变,其内可见低反射光团,光感受器内节/外节(inner segment/outer segment, IS/OS)及嵌合体带肿胀,结构模糊不清,视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)层粗糙;1眼黄斑表现为裂孔合并纤细条状反射光带,RPE层粗糙;其他患眼黄斑区表现为神经上皮中低、中高反射光团,神经上皮浅脱离,IS/OS及嵌合体带肿胀,结构模糊不清(图2,表1)。FFA结果显示,1例黄斑区出血遮挡荧光,1例黄斑裂孔表现为圆形透见荧光,其余患者黄斑区多表现为不均匀的弱荧光斑点,均未见明显的荧光素渗漏。

## 3 讨论

黄斑是视觉最灵敏处,黄斑中心凹富含叶黄素和黑色素,容易吸收光波能量,又富含不饱和脂肪酸、丰富的线粒体和大量的视紫红质,因此易受光损伤,其损伤程度受光照强度、曝光时间、波长等多种因素影响<sup>[1]</sup>。光损伤的机制包括机械性、热效应和光化学效应<sup>[2]</sup>。机械性损伤是在极短时间内接受强光引起的机械性爆破性损伤;热效应是局部高温引起的蛋白凝固变性;光化学效应是低能量光作用较长时间所引起的病理改变,急性期光损伤对组织结构的变化并不明显<sup>[3]</sup>。