

· 实验研究 ·

组织因子靶向肽对蓝光诱导的人视网膜色素上皮细胞损伤的保护作用

李丹丹 邹秀兰 陈京霞 徐哲 俞永珍 周文杰 王观峰 饶本强 邹玉平

510405 广州中医药大学(李丹丹、周文杰);510010 广州军区广州总医院眼科(邹秀兰、陈京霞、徐哲、俞永珍、邹玉平);510150 广州医科大学第三附属医院眼科(王观峰);100012 北京,中国医科大学 航空总医院普外科(饶本强)

通信作者:邹秀兰,Email:xlzou2003@aliyun.com;饶本强,Email:raobenqiang@sina.cn

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.07.006

【摘要】 背景 视网膜光损伤可造成视网膜色素上皮(RPE)细胞损伤,是影响年龄相关性黄斑变性(AMD)发生和发展的重要因素之一。研究表明,组织因子(TF)在氧化损伤的RPE细胞中和AMD患者的脉络膜新生血管(CNV)中呈高表达,推测抑制TF可预防RPE细胞的损伤以及抑制CNV。**目的** 观察TF靶向肽(TF-TP)对蓝光诱导的人RPE细胞损伤的保护作用。**方法** 体外分离和培养人RPE细胞并分为空白对照组、蓝光照射组和TF-TP组。空白对照组细胞在常规条件下进行处理;蓝光照射组细胞用辐照强度为 $(4.0 \pm 0.5) \text{ mW/cm}^2$ 的蓝光照射12 h建立蓝光损伤细胞模型;TF-TP组先分别用不同浓度(10、100、150、200、300 $\mu\text{mol/L}$)TF-TP培养细胞24 h,再用蓝光照射12 h。采用CCK-8法检测各组细胞的存活率;分别在普通倒置显微镜和透射电子显微镜下观察RPE细胞的形态和超微结构变化;采用Hoechst染色法检测各组细胞的凋亡情况;采用Western blot法检测各组细胞中TF蛋白和相关凋亡蛋白bax和bcl-2的表达。**结果** 不同浓度TF-TP组间RPE细胞存活率比较,差异无统计学意义($F=2.15, P=0.11$)。空白对照组、蓝光照射组和150 $\mu\text{mol/L}$ TF-TP组细胞存活率分别为 $(100.0 \pm 0.00)\%$ 、 $(43.79 \pm 6.55)\%$ 和 $(63.45 \pm 3.57)\%$,150 $\mu\text{mol/L}$ TF-TP组细胞存活率较蓝光照射组明显增加,差异有统计学意义($P=0.00$),以150 $\mu\text{mol/L}$ TF-TP为后续实验的最适浓度。光学显微镜下和透射电子显微镜下显示,蓝光照射组有较多皱缩、变形、悬浮细胞,可见细胞微绒毛数量减少,部分线粒体嵴断裂和缺失以及细胞空泡样变性,而150 $\mu\text{mol/L}$ TF-TP组异常形态的细胞较少,细胞绒毛结构较完整,细胞质中空泡样结构改变和线粒体损伤改变明显减轻。空白对照组、蓝光照射组和150 $\mu\text{mol/L}$ TF-TP组细胞凋亡率分别为 $(0.98 \pm 0.19)\%$ 、 $(9.98 \pm 0.82)\%$ 和 $(5.73 \pm 0.88)\%$,组间总体比较差异有统计学差异($F=206.18, P=0.00$),其中150 $\mu\text{mol/L}$ TF-TP组细胞凋亡率明显低于蓝光照射组,差异有统计学意义($P<0.05$)。与空白对照组相比,蓝光照射组细胞中bax蛋白和TF蛋白的相对表达量明显增加,bcl-2蛋白的相对表达量显著下降,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$);与蓝光照射组相比,150 $\mu\text{mol/L}$ TF-TP组细胞中bax蛋白和TF蛋白的相对表达量均明显下降,而bcl-2蛋白的相对表达量明显增加,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。**结论** TF-TP预处理后可减少蓝光损伤的人RPE细胞的凋亡及增加细胞的存活率,从而对蓝光诱导的人RPE细胞损伤发挥保护作用,其作用机制可能与TF-TP抑制TF介导的bax/bcl-2凋亡通路有关。

【关键词】 组织因子;人;视网膜色素上皮/代谢;上皮细胞/辐射效应;光;细胞凋亡**基金项目:** 广东省药学会研究基金项目(2015RL04);广州市科技计划项目(2014J4100035);广州医科大学附属第三医院院内课题项目(2013Y06)

Protective effects of tissue factor targeting peptide on human retinal pigment epithelial cell damage induced by blue light Li Dandan, Zou Xiulan, Chen Jingxia, Xu Zhe, Yu Yongzhen, Zhou Wenjie, Wang Guanfeng, Rao Benqiang, Zou Yuping

Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China (Li DD, Zhou WJ); Department of Ophthalmology, General Hospital of Guangzhou Military of PLA, Guangzhou 510010, China (Zou XL, Chen JX, Xu Z, Yu YZ, Zou YP); Department of Ophthalmology, the Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510150, China (Wang GF); Department of General Surgery, Aviation General Hospital of China Medical University, Beijing 100012, China (Rao BQ)

Corresponding authors: Zou Xiulan, Email: xlzou2003@aliyun.com; Rao Benqiang, Email: raobenqiang@sina.cn

[Abstract] Background Light-induced retinal damage results in the damage of retinal pigment epithelial (RPE) cells and therefore affects the pathogenesis and development of age-related macular degeneration (AMD). Studies showed that tissue factor (TF) is overexpressed in oxidative damaged RPE cells and the choroidal neovascularization (CNV) of AMD, speculating that the suppression of TF can prevent the damage of RPE cells and inhibit CNV. **Objective** This study was conducted to observe the protective effects of TF targeting peptide (TF-TP), a new drug of autologous synthesis, on human RPE-cells induced by blue light. **Methods** Human RPE cells were isolated from donor eye and cultured. Cultured cells were divided into blank control group, model group and TF-TP treated group. Light-induced RPE cell damage model was established by exposing the cells in the blue light of $(4.0 \pm 0.5) \text{ mW/cm}^2$ for 12 hours in the model group, and different concentrations (10, 100, 150, 200, 300 $\mu\text{mol/L}$) of TF-TP were added into the medium to pretreat the cells for 24 hours and then exposed the cells to the blue light for 12 hours in the TF-TP groups. The cell viability was determined by CCK-8 assay. The morphology and ultrastructure in the cells were observed under the inverted microscope and transmission electron microscope. The apoptosis of the cells was assayed by Hoechst staining. The expressions of TF and apoptosis-related protein bax, bcl-2 in the cells were determined by Western blot. **Results** CCK-8 assay showed that there was no significant difference in the cell viability among blank control group and different concentrations TF-TP groups ($F=2.15, P=0.11$). The cell survival rate of blank control group, model group and 150 $\mu\text{mol/L}$ TF-TP group was $(100.0 \pm 0.00)\%$, $(43.79 \pm 6.55)\%$ and $(63.45 \pm 3.57)\%$, and the survival rate was increased in the 150 $\mu\text{mol/L}$ TF-TP group compared with the model group ($P=0.00$), and 150 $\mu\text{mol/L}$ was determined as a optimal concentration of TF-TP. A lot of shrinkage, deformation, suspension cells were exhibited under the optical microscope, and decrease of microvilli structure, rupture of mitochondrial cristae and vacuolar degeneration of the cells were found in the model group, and the damage of the cells were evidently lightened in the 150 $\mu\text{mol/L}$ TF-TP group. The apoptosis rate of the cells were $(0.98 \pm 0.19)\%$, $(9.98 \pm 0.82)\%$ and $(5.73 \pm 0.88)\%$ in the blank group, model group and 150 $\mu\text{mol/L}$ TF-TP group, respectively, with a significant difference among the groups ($F=206.18, P=0.00$), and the apoptosis rate of the cells in the 150 $\mu\text{mol/L}$ TF-TP group was significantly lower than that in the model group ($P<0.05$). Compared with the blank control group, the relative expression of bax and TF was obviously increased and that of bcl-2 was decreased in the model group; while the expression of bax and TF was lower, and that of bcl-2 was higher in the 150 $\mu\text{mol/L}$ TF-TP group compared with the model group (all at $P<0.05$). **Conclusions** Pretreatment of TF-TP can lessen cell apoptosis and increase cell survival rate and therefore plays a protective role to blue light-induced human RPE cells possibly by inhibiting bax/bcl-2 apoptotic pathways mediated by TF.

[Key words] Tissue factor; Human; Retinal pigment epithelium/metabolism; Epithelial cells/ radiation effects; Light; Apoptosis

Fund program: Research Fund of Pharmaceutical Society of Guangdong Province (2015RL04); Science and Technology Project of Guangzhou City (2014J4100035); Project of the Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University (2013Y06)

年龄相关性黄斑变性 (age-related macular degeneration, AMD) 是导致老年人视力丧失, 甚至致盲的一种退行性眼病^[1]。目前多数学者认为视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) 细胞结构及功能的破坏参与 AMD 疾病的形成, RPE 与 Bruch 膜构成的血-视网膜屏障的破坏也是导致 AMD 进展的重要因素^[2]。流行病学资料显示, 长期暴露于高强度紫外线或蓝光可引起 AMD、Stargardt 病、视网膜色素上皮炎及视网膜色素变性等眼病^[3]。我们在前期研究中也发现, 蓝光通过氧化应激损伤途径激活 bax/bcl-2 凋亡通路, 导致 RPE 细胞损伤, 甚至凋亡^[4]。虽然目前对于 AMD 的发病机制和病因仍未明确, 但越来越多的研究证实组织因子 (tissue factor, TF), 即凝血因子 III, 在 AMD 患者的脉络膜新生血管 (choroidal

neovascularization, CNV) 中呈高表达, 阻止 TF 的表达也可抑制和破坏 CNV 的形成, 促进 AMD 好转^[5]。此外, AMD 患者氧化应激诱导的 RPE 细胞和光感受器凋亡时 TF 的表达增强^[6]。但是目前尚无抑制 TF 的药物用于 AMD 的防治。本研究在前期研究的基础上, 用自主筛选的 TF 靶向肽 (TF targeting peptide, TF-TP) 干预蓝光损伤的 RPE 细胞, 探讨 TF-TP 对氧化损伤 RPE 细胞的保护作用及相关机制, 从而为其用于 AMD 的防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

新鲜人供体眼球 (广州军区广州总医院提供); TF-TP (航空总医院普外科饶本强教授提供); 澳洲胎

牛血清、DMEM/F12 培养基、青链霉素双抗、胰蛋白酶(美国 Gibco 公司);细胞计数试剂盒-8 (cell counting kit-8, CCK-8)(日本同仁公司);Hoechst 试剂盒(上海碧云天公司);鼠抗兔 TF 单克隆抗体(ab151748, 1:1 000)(美国 Abcam 公司);兔抗人 bax 单克隆抗体(#2772, 1:1 000)、bcl-2 单克隆抗体(#2876, 1:1 000)、鼠抗兔 β -actin 单克隆抗体(#4970, 1:1 000)、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗(#7074, 1:2 000)(美国 CST 公司);山羊抗鼠 IgG(CW0102, 1:2 000)(北京 CWBIO 公司)。多功能酶标仪、细胞培养箱(美国 Thermo 公司);LED 蓝光光源(参数:主波峰 451 nm, 色纯度 0.982, 中山共炫光电科技有限公司);IX 70-121 普通倒置显微镜(日本 Olympus 公司);JEM1400 透射电子显微镜(日本电子株式会社);Minichemi320 化学发光仪(北京赛智创业科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 人 RPE 细胞的分离和培养 根据前期实验,将普通细胞培养箱改造成蓝光照射细胞培养箱,使蓝光辐照强度达到 $(4.0 \pm 0.5) \text{ mW/cm}^2$ 。无菌条件下将离体新鲜眼球在含体积分数 1% 青链霉素双抗的 PBS 中浸泡 1 h,取出用 PBS 冲洗后沿角巩膜缘后 3 mm 处环形剪开巩膜,去除玻璃体及视网膜组织,PBS 洗 3 遍,视杯中加入质量分数 1% 胰蛋白酶室温消化 1 h,用含体积分数 10% 胎牛血清、1% 青链霉素双抗溶液的 DMEM/F12 培养液终止消化,离心半径 5 cm, 1 000 r/min 离心 10 min,接种于 25 cm^2 的培养瓶并置于 37°C 、体积分数 5% CO_2 培养箱中孵育 3 d 后进行正常换液传代培养。

1.2.2 CCK-8 法检测 TF-TP 对人 RPE 细胞的毒性作用 把生长至对数生长期的细胞消化重悬后,按照 $5 \times 10^4/\text{ml}$ 的密度接种于 96 孔板,待细胞生长融合成单层时弃培养液,加入含不同浓度(10、100、150、200、300 $\mu\text{mol/L}$) TF-TP 的培养液孵育,每孔 100 μl ,同时设置空白对照孔和空白孔,其中空白对照孔的细胞按常规培养法进行培养,不添加任何药物,空白孔不含药物和细胞。放入普通培养箱中孵育 24 h,弃去原培养液。将培养液和 CCK-8 溶液按 10:1 的比例混匀,每孔加入 110 μl 混合液,将培养板在孵育箱中避光孵育 2 h,用酶标仪测定波长 450 nm 处的吸光度(A)值。细胞存活率 = $(\text{实验孔 } A_{450} \text{ 值} - \text{空白孔 } A_{450} \text{ 值}) / (\text{空白对照孔 } A_{450} \text{ 值} - \text{空白孔 } A_{450} \text{ 值}) \times 100\%$ 。

1.2.3 CCK-8 法检测 TF-TP 最适作用浓度 在 96 孔板中接种细胞悬液(细胞密度为 $5 \times 10^4/\text{ml}$, 每孔 100 μl),待细胞长成单层时弃去培养液,实验孔用含

不同浓度(10、100、150、200、300 $\mu\text{mol/L}$) TF-TP 的培养液孵育,同时设置空白对照孔和空白孔,放入普通培养箱中孵育 24 h 后,移入蓝光培养箱照射 12 h,弃去原培养液。检测方法同 1.2.2。

1.2.4 倒置显微镜下观察人 RPE 细胞的形态学改变

将人 RPE 细胞接种到 12 孔板,细胞覆盖 70% ~ 80% 时弃培养液,分别用普通培养液和含 150 $\mu\text{mol/L}$ TF-TP 的培养液培养 24 h,然后放入蓝光培养箱中照射 12 h,倒置显微镜下观察蓝光照射组和 150 $\mu\text{mol/L}$ TF-TP 组细胞的形态改变。

1.2.5 透射电子显微镜下观察人 RPE 细胞超微结构的变化 各组人 RPE 细胞用胰蛋白酶进行消化,离心半径 5 cm, 1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,收集细胞于 1.5 ml EP 管,先后用质量分数 2.5% 戊二醛溶液及质量分数 1% 锇酸溶液 4°C 固定,梯度丙酮(体积分数 50%、70%、90%、100%)脱水,环氧树脂包埋,半薄切片定位,以醋酸铀和枸橼酸铅双重染色,透射电子显微镜下观察人 RPE 细胞超微结构的变化。

1.2.6 Hoechst 染色法检测人 RPE 细胞凋亡率 将人 RPE 细胞接种于 6 孔板培养并蓝光照射后弃去培养液,加入质量分数 4% 多聚甲醛固定液 0.5 ml,静置固定 10 min,弃去固定液,PBS 洗 2 次,加入 0.5 ml Hoechst 染色液避光染色 15 min,去染色液,PBS 洗 2 次,弃 PBS,室温下晾干,荧光显微镜下观察结果并拍照。细胞核固缩呈亮蓝色为凋亡细胞。每组随机选取 6 个视野,统计 Hoechst 染色阳性细胞个数,计算细胞凋亡率。细胞凋亡率(%) = $(\text{凋亡细胞数} / \text{视野内总细胞数}) \times 100\%$ 。重复实验 5 次。

1.2.7 Western blot 法检测人 RPE 细胞中 TF、bax 和 bcl-2 蛋白的表达 取各组人 RPE 细胞,弃培养液,PBS 洗涤后加入细胞裂解液刮取细胞,冰上裂解,蛋白定量,质量分数 10% SDS-PAGE 蛋白电泳、转膜,滴加脱脂奶粉封闭液,置于摇床上 2 h;加入相应一抗 4°C 孵育过夜;加入相应二抗 37°C 孵育 1 h,ECL 发光、曝片。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 21.0 统计学软件进行统计分析。本研究各检测指标的数据资料经 W 检验证实呈正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组均数经 Levene 检验方差齐。采用随机分组单因素干预多水平研究设计,空白对照组、蓝光照射组 and 不同浓度 TF-TP 组间细胞增生值的总体差异比较以及空白对照组、蓝光照射组和 TF-TP 组(150 $\mu\text{mol/L}$)细胞凋亡率,细胞中 bax、bcl-2 和 TF 蛋白相对表达量的总体差异比较均采用单因素方差分析,组间多重比较均采用 LSD-t 检验。 $P < 0.05$ 为差异

有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 RPE 细胞的存活率比较

2.1.1 CCK-8 法检测 TF-TP 对 RPE 细胞的毒性作用

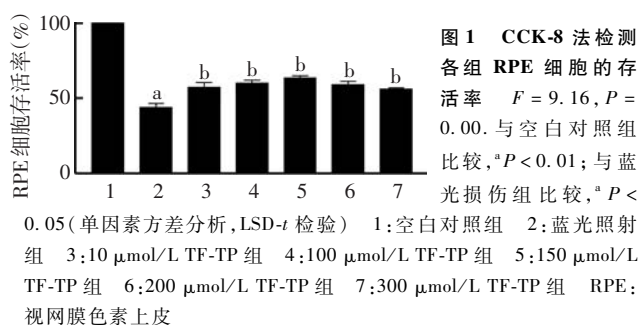
不同浓度 TF-TP 作用 RPE 细胞后 A_{450} 值和细胞存活率见表 1。测定结果以空白对照组细胞存活率为 100.0%。不同浓度 TF-TP 作用于 RPE 细胞后, 各组间细胞存活率比较差异无统计学意义 ($F = 2.15, P = 0.11$) (表 1)。

表 1 各组 RPE 细胞存活率的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	A_{450} 值	存活率 (%)
空白组	9	0.14 ± 0.01	—
空白对照组	9	0.68 ± 0.01	100.00 ± 0.00
10 $\mu\text{mol/L}$ TF-TP 组	9	0.68 ± 0.03	101.16 ± 5.67
100 $\mu\text{mol/L}$ TF-TP 组	9	0.69 ± 0.02	102.34 ± 4.72
150 $\mu\text{mol/L}$ TF-TP 组	9	0.70 ± 0.03	104.40 ± 4.86
200 $\mu\text{mol/L}$ TF-TP 组	9	0.66 ± 0.03	97.25 ± 4.85
300 $\mu\text{mol/L}$ TF-TP 组	9	0.65 ± 0.03	96.34 ± 5.84
F 值			2.15
P 值			0.11

注: RPE: 视网膜色素上皮; TF-TP: 组织因子靶向肽 (单因素方差分析, LSD- t 检验) —: 未计算

2.1.2 TF-TP 作用于 RPE 细胞的最适浓度 空白对照组细胞存活率为 $(100.0 \pm 0.00)\%$, 蓝光照射组细胞存活率为 $(43.79 \pm 6.55)\%$, 10、100、150、200、300 $\mu\text{mol/L}$ TF-TP 组细胞存活率分别为 $(57.24 \pm 7.89)\%$ 、 $(59.97 \pm 4.73)\%$ 、 $(63.45 \pm 3.57)\%$ 、 $(58.88 \pm 5.59)\%$ 和 $(55.95 \pm 2.80)\%$, 各组细胞存活率的总体比较差异有统计学意义 ($F = 9.16, P = 0.00$), 其中蓝光照射组细胞存活率明显低于空白对照组, 差异有统计学意义 ($P = 0.00$)。与蓝光照射组相比, 各浓度 TF-TP 组细胞存活率均明显升高, 差异均有统计学意义 ($P = 0.01, 0.00, 0.00, 0.00, 0.00$)。150 $\mu\text{mol/L}$ TF-TP 组细胞的存活率最高, 可作为构建 TF-TP 保护模型, 进行后续实验 (图 1)。



2.2 各组人 RPE 细胞的形态学变化

2.2.1 各组细胞的组织形态学变化

光学显微镜下空白对照组细胞呈梭形或多边形, 单层贴壁生长, 形态清晰 (图 2A)。蓝光照射组较多细胞皱缩、变圆, 悬浮细胞明显增多 (图 2B)。150 $\mu\text{mol/L}$ TF-TP 组少许细胞皱缩、变圆, 悬浮细胞较蓝光照射组明显减少 (图 2C)。

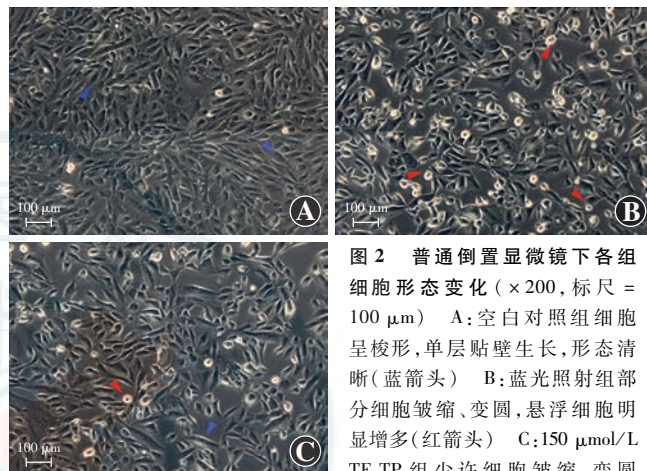


图 2 普通倒置显微镜下各组细胞形态变化 ($\times 200$, 标尺 = 100 μm) A: 空白对照组细胞呈梭形, 单层贴壁生长, 形态清晰 (蓝箭头) B: 蓝光照射组部分细胞皱缩、变圆, 悬浮细胞明显增多 (红箭头) C: 150 $\mu\text{mol/L}$ TF-TP 组少许细胞皱缩、变圆 (蓝箭头), 悬浮细胞较蓝光照射组明显减少 (红箭头)

2.2.2 人 RPE 细胞超微结构变化

透射电子显微镜下可见空白对照组细胞形态正常, 细胞间连接紧密, 周边游离端见较多微绒毛, 细胞膜及核膜完整, 核仁明显, 核染色质较均匀, 细胞质中线粒体、内质网等细胞器未见明显异常。蓝光照射组细胞形态出现明显改变, 微绒毛减少、脱落, 核染色质固缩、浓染, 细胞质中大量空泡样结构形成, 线粒体减少, 部分线粒体嵴断裂、缺失。150 $\mu\text{mol/L}$ TF-TP 组细胞超微结构损害减轻, 微绒毛较少, 空泡样结构改变明显减少, 线粒体等改变明显减轻 (图 3)。

2.3 各组蓝光诱导的人 RPE 细胞凋亡

荧光显微镜下可见空白对照组细胞核形态规则, 均匀淡染呈淡蓝色; 凋亡的细胞可见细胞核皱缩, 边界不光滑, 呈强荧光点。空白对照组仅见极少数凋亡形态的细胞核 (图 4A), 蓝光照射组可见较多亮染的凋亡细胞 (图 4B), 150 $\mu\text{mol/L}$ TF-TP 组的凋亡细胞较蓝光照射组明显减少 (图 4C)。空白对照组、蓝光照射组和 150 $\mu\text{mol/L}$ TF-TP 组细胞凋亡率分别为 $(0.98 \pm 0.19)\%$ 、 $(9.98 \pm 0.82)\%$ 和 $(5.73 \pm 0.88)\%$, 总体比较差异有统计学意义 ($F = 206.18, P = 0.00$), 其中蓝光照射组和 150 $\mu\text{mol/L}$ TF-TP 组细胞凋亡率均明显高于空白对照组, 150 $\mu\text{mol/L}$ TF-TP 组细胞凋亡率明显低于蓝光照射组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (图 4D)。

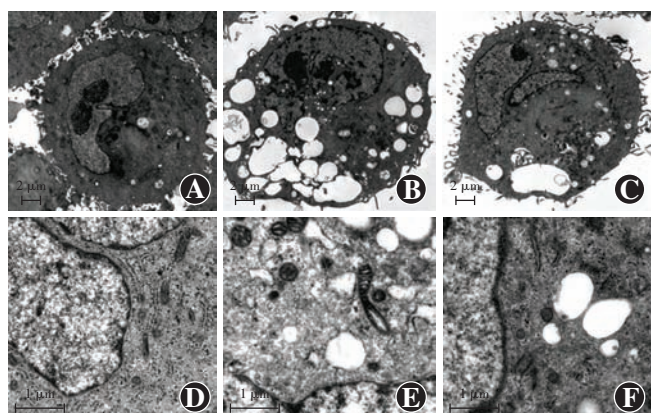


图3 透射电子显微镜下各组 RPE 细胞的超微结构变化 A:空白对照组细胞之间紧密连接,周边游离端见较多微绒毛,细胞膜及核膜完整,核仁明显,核染色质较均匀($\times 5\,000$,标尺=2 μm) B:蓝光照射组微绒毛减少、脱落,核染色质固缩、浓染,细胞质中大量空泡样结构形成,线粒体减少($\times 5\,000$,标尺=2 μm) C:150 $\mu\text{mol/L}$ TF-TP 组超微结构损害减轻,微绒毛较少,空泡样结构改变明显减少($\times 5\,000$,标尺=2 μm) D:空白对照组细胞超微结构显示细胞质中线粒体、内质网等细胞器未见明显异常($\times 20\,000$,标尺=1 μm) E:蓝光损伤组细胞超微结构显示部分线粒体嵴断裂、缺失($\times 20\,000$,标尺=1 μm) F:150 $\mu\text{mol/L}$ TF-TP 组细胞超微结构显示线粒体断裂、缺失等改变明显减轻($\times 20\,000$,标尺=1 μm)

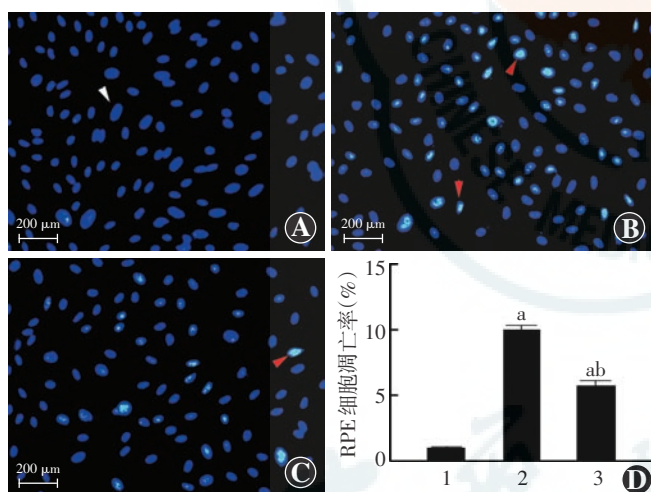


图4 各组 RPE 细胞凋亡过程中细胞核的形态和凋亡变化 (Hoechst $\times 200$,标尺=200 μm) A:空白对照组细胞核形态规则,均匀淡染,呈淡蓝色(白箭头) B:蓝光照射组可见大量凋亡细胞,细胞核皱缩,边界不光滑,呈强荧光点(红箭头) C:150 $\mu\text{mol/L}$ TF-TP 组凋亡细胞较蓝光照射组明显减少(红箭头) D:各组 RPE 细胞凋亡率的量化比较 $F = 206.18$, $P = 0.00$ 。与空白对照组比较, $^a P < 0.05$;与蓝光照射组比较, $^b P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD- t 检验, $n = 5$) 1:空白对照组 2:蓝光照射组 3:150 $\mu\text{mol/L}$ TF-TP 组 RPE:视网膜色素上皮

2.4 各组人 RPE 细胞中 TF 蛋白、凋亡相关蛋白 bax 和 bcl-2 的表达变化

与空白对照组相比,蓝光照射组细胞中 bax 蛋白和 TF 蛋白的表达明显增强, bcl-2 蛋白的表达明显减弱(图 5)。空白对照组、蓝光照射组和 150 $\mu\text{mol/L}$ TF-TP 组 RPE 细胞中 TF 蛋白、bax 和 bcl-2 相对表达

量的总体比较,差异均有统计学意义($F = 67.67$ 、106.36、142.46,均 $P = 0.00$),与蓝光照射组相比,150 $\mu\text{mol/L}$ TF-TP 组细胞中 bax 蛋白和 TF 蛋白的表达量均不同程度下降,而 bcl-2 蛋白的表达量明显增加,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)(表 2)。

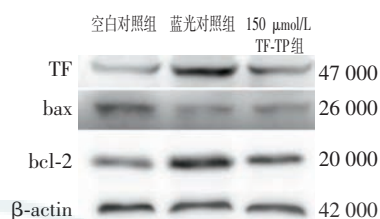


图5 Western blot 法检测各组 RPE 细胞中 TF 蛋白及凋亡相关蛋白 bax 和 bcl-2 的表达 TF-TP:组织因子靶向肽

表2 各组 RPE 细胞中目的蛋白相对表达量的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	bax	bcl-2	TF
空白对照组	3	0.74 $\pm$ 0.06	1.07 $\pm$ 0.06	0.39 $\pm$ 0.07
蓝光照射组	3	1.35 $\pm$ 0.06 ^a	0.47 $\pm$ 0.03 ^a	0.95 $\pm$ 0.07 ^a
150 $\mu\text{mol/L}$ TF-TP 组	3	0.87 $\pm$ 0.04 ^b	0.58 $\pm$ 0.04 ^b	0.54 $\pm$ 0.04 ^b
F 值		106.36	142.46	67.67
P 值		0.00	0.00	0.00

注:与各自的空白对照组比较, $^a P < 0.05$;与各自的蓝光照射组比较, $^b P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD- t 检验) RPE:视网膜色素上皮; TF-TP:组织因子靶向肽

3 讨论

RPE 细胞不仅具有转运营养成分、吞噬和降解感光细胞外段、视色素转运和储存、清除自由基等功能,而且可与 Bruch 膜共同构成血-视网膜屏障,在维持视网膜神经纤维层内环境稳定方面发挥重要作用,这对视网膜自平衡及视觉维持具有重要意义^[7]。研究证实,RPE 细胞形态及功能的改变是 AMD 发生和发展过程中的重要影响因素之一,从早期 RPE 细胞的形态学改变、色素变化、细胞内脂褐素的堆积到晚期 RPE 细胞间的紧密连接受损等都在 AMD 疾病的进程中发挥重要作用^[8-10]。流行病学资料显示,紫外线或蓝光的暴露程度与 AMD 的发生呈正相关^[11]。研究表明,蓝光因其特有的高能量、可穿透性等特点,极易引起视网膜,尤其是黄斑部的氧化损伤,从而导致光化学损伤^[12]。因此本实验在前期研究的基础上,利用蓝光诱导 RPE 细胞氧化损伤模型,发现当 RPE 细胞在特定辐照强度的蓝光培养箱内照射后 12 h,细胞形态结构以及亚细胞结构出现明显改变,如微绒毛减少和脱落、核染色质固缩和浓染、细胞质中大量空泡样结构形成、线粒体减少、部分线粒体嵴断裂和缺失。

TF 是由 263 个氨基酸组成的单链跨膜糖蛋白,相对分子质量为 47 000,其既能激活外源性凝血级联反应而发挥促凝血作用,又能经蛋白酶活化受体介导信

号转导而发挥非凝血作用,参与炎症、细胞凋亡、细胞迁移及病理性新生血管的形成^[13]。有研究发现,氧化应激和炎症反应可以诱导 TF 高表达于凋亡的 RPE 细胞和光感受器中,而且高表达的 TF 本身也可以加剧炎症反应并促进活性氧的产生^[14]。TF-TP 是梁绮雯等^[15]运用受体-细胞序贯筛选法获得的新型药物,对 TF 具有高度亲和力,并成功靶向抑制 TF 的高表达。本实验中发现该药物对 RPE 细胞的生长无毒性作用,且对蓝光诱导的 RPE 细胞损伤具有保护作用,而且当 TF-TP 浓度达到 150 $\mu\text{mol/L}$ 时,RPE 细胞的存活率最高。

细胞凋亡是为维持内环境稳定、由基因控制的细胞自主的有序死亡。细胞凋亡是一个主动过程,它涉及一系列蛋白的激活、表达以及调控等^[16]。Bcl-2 家族在细胞凋亡中扮演重要角色,其中 *bax* 基因是 bcl-2 家族的一员^[17]。研究表明,*bax* 允许一些离子和小分子穿过线粒体膜进入细胞质,从而引起细胞凋亡,而 bcl-2 的作用正好相反,它能封闭 *bax* 形成的孔道的活性,使一些小分子不能自由通透,从而抑制细胞凋亡^[18-19]。我们在前期的研究中发现,将 RPE 细胞置入辐照强度为 $(4.0 \pm 0.5) \text{ mW/cm}^2$ 蓝光培养箱后 12 h 可引起大量活性氧的产生,激活 *bax/bcl-2* 凋亡信号通路,进而发生瀑布式的氧化应激反应,最终导致 RPE 细胞凋亡^[20]。本实验中发现,蓝光照射 RPE 细胞后 *bax* 蛋白、TF 蛋白表达水平均显著升高,bcl-2 蛋白的表达水平下降,而经 150 $\mu\text{mol/L}$ TF-TP 预处理的细胞中 *bax* 蛋白、TF 蛋白表达水平下降,bcl-2 蛋白表达水平升高,表明 TF-TP 在一定程度上可抑制蓝光诱导的 RPE 细胞凋亡。此外,光学显微镜下细胞形态结构和透射电子显微镜下亚细胞结构均提示,TF-TP 预处理可明显改善蓝光诱导的 RPE 细胞损伤,表明 TF-TP 对氧化损伤的 RPE 细胞有一定的保护作用。

综上所述,本研究认为 TF-TP 对蓝光诱导的人 RPE 细胞有保护作用,其机制可能与 TF-TP 抑制 TF 介导的 *bax/bcl-2* 凋亡通路有关,本研究有助于了解 AMD 形成的原因,对我们防治蓝光造成的职业性损伤也具有重大意义。我们进一步的研究将从细胞水平和动物实验水平深入探讨 TF-TP 对 RPE 细胞损伤的保护作用及机制。

参考文献

- [1] Lim LS, Mitchell P, Seddon JM, et al. Age-related macular degeneration [J]. *Lancet*, 2012, 379 (9827) : 1728–1738. DOI: 10. 1016/S0140-6736(12)60282-7.
- [2] Bhutto I, Luttu G. Understanding age-related macular degeneration (AMD): relationships between the photoreceptor/retinal pigment epithelium/Bruch's membrane/choriocapillaris complex [J]. *Mol Aspects Med*, 2012, 33 (4) : 295–317. DOI: 10. 1016/j. mam. 2012. 04. 005.
- [3] Wielgus AR, Collier RJ, Martin E, et al. Blue light induced A2E oxidation in rat eyes-experimental animal model of dry AMD [J]. *Photochem Photobiol Sci*, 2010, 9 (11) : 1505–1512. DOI: 10. 1039/c0pp00133c.
- [4] 邹秀兰,俞永珍,徐哲,等. 蓝光诱导的人视网膜色素上皮细胞的氧化损伤及其线粒体机制[J]. *中华实验眼科杂志*, 2015, 33 (2) : 129–134. DOI: 10. 3760/ema. j. issn. 2095-0160. 2015. 02. 007.
- [5] Zou XL, Yu YZ, Xu Z, et al. Oxidative damage of human retinal pigment epithelium cells induced by blue light irradiation and mitochondria-participated mechanism [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2015, 33 (2) : 129–134. DOI: 10. 3760/ema. j. issn. 2095-0160. 2015. 02. 007.
- [6] Wang L, Yang Z, Yu Y, et al. Blockage of tissue factor ameliorates the lesion of laser-induced choroidal neovascularization in mice [J]. *Exp Eye Res*, 2014, 127 : 117–123. DOI: 10. 1016/j. exer. 2014. 07. 006.
- [7] Wang GF, Zou XL. Tissue factor with age-related macular degeneration [J]. *Int J Ophthalmol*, 2012, 5 (5) : 609–613. DOI: 10. 3980/j. issn. 2222-3959. 2012. 05. 13.
- [8] Sparrow JR, Ueda K, Zhou J. Complement dysregulation in AMD: RPE-Bruch's membrane-choroid [J]. *Mol Aspects Med*, 2012, 33 (4) : 436–445. DOI: 10. 1016/j. mam. 2012. 03. 007.
- [9] Han L, Ma Z, Wang C, et al. Morphologic features and viability analysis of human detached retinal pigment epithelium in age-related macular degeneration [J]. *Am J Ophthalmol*, 2013, 155 (3) : 474–483. DOI: 10. 1016/j. ajo. 2012. 09. 010.
- [10] Imamura Y, Noda S, Hashizume K, et al. Drusen, choroidal neovascularization, and retinal pigment epithelium dysfunction in SOD1-deficient mice: a model of age-related macular degeneration [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103 (30) : 11282–11287. DOI: 10. 1073/pnas. 0602131103.
- [11] Parmeggiani F, Sorrentino FS, Romano MR, et al. Mechanism of inflammation in age-related macular degeneration: an up-to-date on genetic landmarks [J/OL]. *Mediators Inflamm*, 2013, 2013 : 435607 [2016-09-20]. [https://dx. doi. org/10. 1155/2013/435607](https://dx.doi.org/10.1155/2013/435607). DOI: 10. 1155/2013/435607.
- [12] Algreve PV, Marshall J, Seregard S. Age-related maculopathy and the impact of blue light hazard [J]. *Acta Ophthalmol Scand*, 2006, 84 (1) : 4–15. DOI: 10. 1111/j. 1600-0420. 2005. 00627. x.
- [13] Nakanishi-Ueda T, Majima HJ, Watanabe K, et al. Blue LED light exposure develops intracellular reactive oxygen species, lipid peroxidation, and subsequent cellular injuries in cultured bovine retinal pigment epithelial cells [J]. *Free Radic Res*, 2013, 47 (10) : 774–780. DOI: 10. 3109/10715762. 2013. 829570.
- [14] Åberg M, Siegbahn A. Tissue factor non-coagulant signaling-molecular mechanisms and biological consequences with a focus on cell migration and apoptosis [J]. *J Thromb Haemost*, 2013, 11 (5) : 817–825. DOI: 10. 1111/jth. 12156.
- [15] Cho Y, Cao X, Shen D, et al. Evidence for enhanced tissue factor expression in age-related macular degeneration [J]. *Lab Invest*, 2011, 91 (4) : 519–526. DOI: 10. 1038/labinvest. 2010. 184.
- [16] 梁绮雯,饶本强,许希,等. 利用噬菌体肽库序贯筛选组织因子靶向肽[J]. *中国病理生理杂志*, 2011, 27 (12) : 2429–2432. DOI: 10. 3969/j. issn. 1000-4718. 2011. 12. 038.
- [17] Liang QW, Rao BQ, Xu X, et al. Screening of tissue factor targeting peptides alternately from phage display peptide library [J]. *Chin J Pathophysiol*, 2011, 27 (12) : 2429–2432. DOI: 10. 3969/j. issn. 1000-4718. 2011. 12. 038.
- [18] Mukhopadhyay S, Panda PK, Sinha N, et al. Autophagy and apoptosis: where do they meet? [J]. *Apoptosis*, 2014, 19 (4) : 555–566. DOI: 10. 1007/s10495-014-0967-2.
- [19] Garcia-Barros M, Paris F, Cordon-Cardo C, et al. Tumor response to radiotherapy regulated by endothelial cell apoptosis [J]. *Science*, 2003, 300 (5622) : 1155–1159. DOI: 10. 1126/science. 1082504.
- [20] Gross A. BCL-2 family proteins as regulators of mitochondria metabolism [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1857 (8) : 1243–1246. DOI: 10. 1016/j. bbabio. 2016. 01. 017.
- [21] Hatok J, Racay P. Bcl-2 family proteins: master regulators of cell

survival[J]. Biomol Concepts, 2016, 7(4): 259-270. DOI: 10.1515/bmc-2016-0015.

[20] 俞永珍, 徐哲, 邹秀兰, 等. 蓝光诱导氧化应激反应参与视网膜色素上皮细胞凋亡机制研究[J]. 眼科新进展, 2015, 35(6): 520-524. DOI: 10.13389/j.cnki.rao.2015.0141.

Yu YZ, Xu Z, Zou XL, et al. Role of oxidative stress induced by blue light in human retinal pigment epithelium cells apoptosis[J]. Rec Adv

Ophthalmol, 2015, 35(6): 520-524. DOI: 10.13389/j.cnki.rao.2015.0141.

(收稿日期: 2016-12-06)

(本文编辑: 尹卫靖 刘艳)

· 病例报告 ·

小梁切除术后角膜后弹力层大范围脱离自发复位一例

杨骁 陈元芝 党光福

250200 济南市明水眼科医院 泰山医学院眼视光学临床学院

通信作者: 杨骁, Email: shuibingyue0723@163.com

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.07.007

患者, 女, 66 岁, 2015 年 4 月因右眼突然胀痛伴同侧头痛、恶心、呕吐半月余至济南市明水眼科医院就诊。眼部检查: 视力右眼光感, 左眼 0.5; 眼压右眼 40 mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa), 左眼 15 mmHg; 右眼结膜混合充血, 角膜雾状水肿, 基质混浊、水肿, 后弹力层皱褶, 前房浅, 虹膜萎缩, 瞳孔欠圆, 直径约 5 mm, 对光反射消失, 晶状体混浊, 眼底窥不清; 左眼前房浅, 晶状体混浊, 其余眼前节大致正常, 视盘边界清、颜色正常, 其余窥不清。B 型超声示双眼玻璃体轻度混浊; 角膜内皮细胞参数右眼测不出, 左眼角膜内皮细胞密度 (cell density, CD) 为 2 344 个/mm², 细胞面积变异系数 (co-efficient of variation, CV) 为 22。A 型超声示右眼眼轴长度为 22.11 mm, 前房深度为 2.30 mm, 晶状体厚度为 5.00 mm; 左眼眼轴长度为 21.88 mm, 前房深度为 2.23 mm, 晶状体厚度为 4.97 mm。既往患精神分裂症 20 年, 口服利培酮口腔崩解片治疗; 帕金森病 1 年, 口服多巴丝肼胶囊、盐酸苯海索片治疗, 目前病情尚稳定。临床诊断: 双眼急性闭角型青光眼 (右眼急性发作期、左眼临床前期); 双眼年龄相关性白内障; 精神分裂症; 帕金森病。入院后药物降眼压不能缓解, 遂行右眼前房穿刺, 眼压降低后角膜中央区上皮水肿, 基质混浊, 内皮皱褶, 提示长期高眼压内皮损伤严重。给予多次右眼前房放液后眼压仍控制不佳, 2 d 后行右眼小梁切除术, 手术顺利, 术中未发现异常。术后第 1 天结膜滤泡弥散, 全角膜混浊、水肿, 前房略浅, 眼压指测正常。行眼前节 OCT 检查发现右眼角膜后弹力层重度脱离, 部分脱离接近于虹膜晶状体面 (图 1), 考虑小梁切除术后角膜后弹力层脱离, 给予后弹力层手术复位, 术中前房注入黏弹剂及无菌空气。2 d 后行眼前节 OCT 检查见右眼全角膜后弹力层基本复位 (图 2)。为避免左眼青光眼急性发作, 建议患者行左眼 YAG 激光周边虹膜切除术治疗, 患者拒绝, 要求出院。出院后 7 d 首次复诊时发现右眼角膜混浊、水肿, 行眼前节 OCT 检查发现右眼角膜后弹力层再次脱离, 程度较手术复位前轻 (图 3), 建议患者再次行手术复位。患者及家属拒绝, 后失去联系。2015 年 12 月患者因左眼急性闭角型青光眼再次入院。检查发现右眼角膜透明 (图 4), 行眼前节 OCT 检查见右眼角膜后弹力层正常 (图 5), 考虑右眼角膜后弹力层自发性复位。复查角膜内皮镜: 右眼 CD 为 1 032

个/mm², CV 为 20。

讨论: 后弹力层是角膜内皮细胞的基底膜, 位于基质层和内皮细胞之间, 是一层有弹性、无结构、对化学物质和病理损害抵抗力强的透明薄膜, 损伤后可以再生。由于后弹力层与基质层之间的黏附较为疏松, 遇外力容易分离; 中重度脱离可导致角膜水肿、混浊, 影响角膜屈光功能, 严重者可引起角膜内皮失代偿。引起角膜后弹力层脱离的原因有许多, 如手术、浅前房、角膜内皮功能不良等^[1], 其中手术源性角膜后弹力层脱离常见于白内障术后, 也见于其他眼科手术, 如周边虹膜切除术、小梁切除术、全板层角膜移植术、穿透角膜移植术、玻璃体切割手术等术后^[2-7]。随着小梁切除术的普及和改良术式的应用, 手术并发症较前减少, 但角膜后弹力层脱离仍是术后严重并发症之一, 一旦发现需尽快治疗, 以恢复患者的视功能。Samuels^[8]首次系统性报告了角膜后弹力层脱离, 随后他又报道了 3 例周边虹膜切除术后出现角膜后弹力层脱离。

结合文献分析本例患者发生角膜后弹力层脱离原因如下^[3,5,9]: (1) 患者高龄, 术前眼压长期处在较高的状态, 角膜水肿时间长, 后弹力层与基质层间组织相对疏松, 层间黏附力下降; (2) 眼压未降至正常, 导致术中刀口切开后压力骤降, 角膜组织结构松弛, 发生脱离; (3) 小梁切除术内切口靠前, 导致后弹力层脱离; (4) 全身状况差, 不能行全身麻醉手术, 帕金森病致术中患者频繁抖动不能自控, 浅前房致角膜辅助穿刺口内口小于外口, 弯针头注水加深前房时误入角膜层间导致脱离。

角膜后弹力层脱离的预后取决于脱离的范围、程度以及合适的处理。临床上一旦出现角膜后弹力层脱离, 可运用眼前节 OCT 评估后弹力层脱离的范围和程度, 小范围的脱离可在术后一段时间内自行复位而无需手术治疗^[10]。研究发现若脱离的角膜后弹力层无皮瓣或卷边, 也可以自发复位^[11-14]。考虑由于角膜内皮层接受来自房水的糖分、氧气及其他营养物质, 脱离的角膜后弹力层/内皮层复合体在前房可保持功能的稳定性。因此经过一段时间的自发复位后, 仍可检测出角膜内皮细胞数量。若脱离范围较大, 同时伴有皮瓣或卷边, 则极有可能无法自发复位, 需手术治疗。复位的手术方式包括前房注入无菌空气、惰性气体、黏弹剂等, 或者行角膜后弹力层缝合术、角