

· 实验研究 ·

治疗性 650 nm 低功率半导体激光照射鸡视网膜的安全剂量研究

王一鹏¹ 陈松² 杨文超¹ 孔佳慧¹

¹安阳市眼科医院 安阳市眼科重点实验室 455000; ²天津医科大学眼科临床学院 天津市眼科医院 300020

通信作者:陈松, Email: chensong9999@126.com

【摘要】 目的 观察 650 nm 半导体激光(功率 2 mW)照射以视锥细胞为主的鸡视网膜后是否存在慢性光损伤,探讨该波段激光对视网膜的安全性。**方法** 采用随机数字表法将 60 只自然光线下饲养 1 个月的小鸡分为正常对照组、照射 3-min 组、照射 6-min 组和照射 30-min 组,每组 15 只。采用 650 nm 激光并按照分组不同各组小鸡双眼每日接受不同时间的激光照射。分别于激光照射后 1 个月(2 月龄鸡)、3 个月(4 月龄鸡)和 6 个月(7 月龄鸡)各组任选 5 只进行活体光相断层扫描(OCT)检查,测定鸡的相对视网膜面积;采用过量麻醉法处死并制备视网膜切片,行苏木精-伊红染色和 TUNEL 染色,分别观察各组鸡视网膜面积变化和视细胞凋亡情况;实验眼制备视网膜匀浆,分别采用 TBA 法和 NBT 法检测鸡视网膜中丙二醛质量摩尔浓度和超氧化物歧化酶(SOD)比活性;采用 Western blot 法检测鸡视网膜中 L/M 视蛋白和视紫红质蛋白的表达。**结果** 2 月龄时鸡照射 30-min 组视网膜中丙二醛质量摩尔浓度高于正常对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),4 月龄时激光照射 6-min 组和照射 30-min 组丙二醛质量摩尔浓度均高于正常对照组,差异均有统计学意义($P = 0.026, 0.003$),7 月龄时所有激光照射组鸡视网膜中丙二醛质量摩尔浓度均高于正常对照组,差异均有统计学意义($P = 0.038, 0.032, < 0.01$)。7 月龄时激光照射 30-min 组鸡视网膜中 SOD 比活性和视紫红质蛋白相对表达量均低于正常对照组[SOD:(140.20 ± 5.99) (nmol/s · mg)与(160.57 ± 3.13) (nmol/s · mg);视紫红质蛋白: 0.392 ± 0.065 与 0.566 ± 0.072],差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。OCT 检查显示,照射 3-min 组、照射 6-min 组和照射 30-min 组 6 个月内鸡视网膜相对面积及形态与正常对照组相比无明显差别;组织病理学检查显示各照射组鸡视网膜厚度均接近正常对照组,TUNEL 染色显示各组鸡视网膜细胞排列整齐,未发现 TUNEL 阳性染色细胞。**结论** 实验鸡眼接受 650 nm 半导体激光照射时,用 2 mW 的功率每日照射 6 min 持续 6 个月不引起明显光损伤;每日照射 30 min 持续 6 个月引起视网膜中自由基含量增高和视紫红质减少,提示存在光损伤。

【关键词】 光/不良作用;视网膜;激光/治疗用途;红光;氧化应激;凋亡;鸡

基金项目:安阳市科技攻关项目(20180084)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20200519-00359

Safe dose of 650 nm low-power semiconductor laser irradiation in chicken retina

Wang Yipeng¹, Chen Song², Yang Wenchao¹, Kong Jiahui¹

¹Anyang Eye Hospital, Anyang Key Laboratory of Ophthalmology, Anyang 455000, China; ²Clinical College of Ophthalmology, Tianjin Medical University, Tianjin Eye Hospital, Tianjin 300020, China

Corresponding author: Chen Song, Email: chensong9999@126.com

【Abstract】 Objective To observe whether there was a chronic light damage after the irradiation of 650 nm semiconductor laser (power 2 mW) in chicken cone-rich-retina and discuss the safety of this laser for retina.

Methods Sixty 1-month-old chicken reared under natural light were divided into a normal control group, an irradiation 3-min group, an irradiation 6-min group and an irradiation 30-min group by using a random number table and 15 for each group. The chicken eyes were irradiated with 650 nm laser for different duration according to a grouping. Relative retina area was measured with optical coherence tomography (OCT) at 1 month (2-month-old chicken), 3 months (4-month-old chicken) and 6 months (7-month-old chicken) after laser irradiation. Chickens were sacrificed by

overdose anesthesia and the histopathology of chicken retina was examined by hematoxylin-eosin staining. The apoptosis of the retinal cells was evaluated by TUNEL staining. Chicken retinal homogenate was prepared, and the content of malondialdehyde and activity of superoxide dismutase (SOD) in the retina were detected by TBA method and NBT method, respectively. Western blot was employed to detect the expression of L/M opsin and rhodopsin in the retina. The use and care of the animals complied with Regulations for the Administration of Affairs Concerning Experimental Animals by State Science and Technology Commission. **Results** In 2-month-old chicken, the molar concentration of malondialdehyde in retina was significantly higher in the irradiation 30-min group compared with the normal control group ($P < 0.05$). In 4-month-old chicken, the molar concentration of malondialdehyde was statistically higher in the irradiation 6-min group and the irradiation 30-min group in comparison with the normal control group ($P = 0.026, 0.003$). In 7-month-old chicken, the concentrations of retinal malondialdehyde in the irradiation 3-min group, irradiation 6-min group and irradiation 30-min group were statistically higher than those of the normal control group ($P = 0.038, 0.032, < 0.01$). In 7-month-old chicken, the SOD activity and the relative expression of rhodopsin in the retina of the irradiation 30-min group were statistically reduced in comparison with the normal control group (SOD: $[140.20 \pm 5.99]$ $[\text{nmol/s} \cdot \text{mg}]$ vs. $[160.57 \pm 3.13]$ $[\text{nmol/s} \cdot \text{mg}]$; Rhodopsin: 0.392 ± 0.065 vs. 0.566 ± 0.072) (both at $P < 0.05$). OCT showed that there was no significant difference in relative retinal area within 6 months among the four groups. Histopathological examination showed that the thickness of the retina in each irradiation group was close to the normal control group. TUNEL staining showed that the retinal cells were regularly arranged, and no TUNEL positive staining cells were found in all of the groups. **Conclusions** Irradiation of a 650 nm semiconductor laser (2 mW) in chicken's eyes for 6 minutes is safe for retina within 6 months. The laser irradiation 30 minutes for 6 months results in an increase of free radical content in the retina and a decrease in rhodopsin, suggesting the presence of photo damage.

[Key words] Light/adverse effects; Retina; Laser/therapeutic use; Red light; Oxidative stress; Apoptosis; Chicken

Fund program: Technology and Science Foundation of Anyang (20180084)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20200519-00359

红光对生物组织具有抗炎、增加线粒体电子链传递等生物调节作用,在促进伤口修复、组织细胞再生、改善血液循环方面具有良好作用,近年来主要用于治疗周围神经损伤、慢性疼痛和减轻视网膜、视神经损伤等^[1-3]。临床上采用的红光治疗波段多为 630~700 nm,发光二极管或激光均有相似的治疗作用^[4-5]。激光作为一种特殊光线具有亮度高、单色性、方向性好的特点,对一些局部病灶,如黄斑区病变可发挥精确治疗作用,但目前关于低功率激光治疗时对视网膜光照的安全性尚未完全明确。低功率激光照射短期内人眼无明显光损伤表现,但长期光照的安全性研究仍缺乏。视网膜光损伤主要表现为光化学损伤、机械损伤和光热损伤^[6]。光化学损伤早期主要表现在视网膜光感受器外节和视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)细胞,其发生与自由基氧化损伤有密切关系。正常情况下,感光细胞外节盘膜中含有高水平的长链不饱和脂肪酸,对氧化反应很敏感,外界持续光照会增加感光细胞中自由基含量,这些自由基会与盘膜、线粒体和内质网中的多价不饱和脂肪酸结合使其发生过氧化反应,导致生物功能异常。脂质过氧化物中的醛类化

合物,如丙二醛,也具有细胞毒性,可与细胞内蛋白、核酸等含氮化合物发生交联使其丧失功能,长期自由基氧化损伤最终导致细胞功能异常,引起细胞凋亡^[7-8]。采用 3 mW 的 650 nm 半导体激光对豚鼠视网膜连续照射 1 个月可引起轻度光损伤,其主要机制为 Fas 蛋白表达轻度增加、线粒体功能异常和外层视网膜感光细胞凋亡^[9]。本研究观察长期低功率激光照射后鸡视网膜是否产生光化学损伤,评估该波段激光用于视网膜黄斑区病变治疗的安全性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 自然光线下饲养 1 个月的雄性来亨鸡 60 只(购自安阳顺弘孵化厂)由安阳市眼科重点实验室动物房用鸡颗粒饲料和自来水饲养,饲养温度为 20~25℃,湿度为 40%~70%,饲养环境为自然光。实验动物的使用和喂养遵循国家科学技术委员会颁布的《实验动物管理条例》。

1.1.2 主要试剂及仪器 兔抗 L/M 视蛋白多克隆抗体(一抗)(工作浓度 1:1 000)(K11380,北京百奥莱

博有限责任公司);鼠抗视紫红质多克隆抗体(一抗)(Ab32046,工作浓度 1:3 000)(英国 Abcam 公司);羊抗兔二抗(A0208,工作浓度 1:1 000)、羊抗鼠二抗(A0192,工作浓度 1:1 000)、丙二醛检测试剂盒、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)检测试剂盒、TUNEL 法细胞凋亡检测试剂盒、DAPI 细胞染色液、BCA 法蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术有限责任公司);内参蛋白 α -tubulin(AF7010,工作浓度 1:3 000)(美国 Affinity Biosciences 公司)。650 nm 半导体激光器(本课题组自制);光相干断层扫描仪(optical coherence tomography, OCT)(德国 Heidelberg 公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验动物分组 采用随机数字表余数分组法将 60 只来亨鸡随机分为正常对照组、照射 3-min 组、照射 6-min 组和照射 30-min 组,每组 15 只,按照分组双眼每天接受相应时间的激光照射,其余时间自然光线下饲养。

1.2.2 激光照射 小鸡为站立位,用纱布缠绕鸡的双腿和躯干以固定实验动物,用实验铁架台的试管钳轻夹鸡颈部以固定头部。由于小鸡存在薄膜样第三眼睑,可短暂闭合避免角膜干燥,因此双面胶纸粘合鸡下睑,以免实验中闭合眼睑。650 nm 半导体激光器照射功率为 2 mW,双眼照射,光源距离照射眼 10 cm,照射光斑直径为 1 cm。

1.2.3 OCT 检测鸡相对视网膜面积 采用 OCT 测量仪分别于激光照射后 1、3 和 6 个月活体状态下行实验眼视网膜厚度和视网膜形态检查。固定头部,双眼分别进行 OCT 扫描,分辨率为 5 μ m。选取机器自带神经纤维层厚度测量模式的环形扫描,OCT 可清晰显示全层视网膜和部分脉络膜形态。为避免图片像素不同引起的测量误差,各图片通过对左下角的固定长度标尺进行像素矫正,图像用 Image J 软件进行分析和处理,将图片调节为 8 bit,计算 OCT 影像显示的所有神经纤维层与 RPE 层之间区域的相对视网膜面积。相对视网膜面积=测量区域像素值/标尺长度像素值。

1.2.4 鸡视网膜组织病理学检查 每组任意选取 5 只鸡,采用质量分数 10%水合氯醛腹腔内过量麻醉法处死,摘出左眼立即在冰台上沿眼球赤道部切开,剥离后极部视网膜,去除玻璃体和色素膜。用质量分数 4%多聚甲醛固定 24 h,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,行 3 μ m 厚切片。每间隔 3 张片取 1 张行苏木精-伊红染色,每个样品取 3 张切片。光学显微镜下观察视网膜组织形态。

1.2.5 TUNEL 法测定鸡视网膜细胞凋亡 采用 TUNEL 细胞凋亡原位检测试剂盒,将制备的石蜡切片用二甲苯浸泡 10 min,反复脱蜡 3 次,用梯度乙醇置换二甲苯,蒸馏水浸泡 2 min,蛋白酶 K 37 $^{\circ}$ C 消化 15 min,TBS 冲洗,滴加 FITC 荧光标记的检测液,湿盒内 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 2 h,TBS 冲洗,DAPI 复染细胞核,封片,荧光显微镜下观察并拍照。

1.2.6 TBA 法和 NBT 法测定鸡视网膜组织中丙二醛质量摩尔浓度和 SOD 比活性 于冰台上取鸡右眼后极部视网膜,超声粉碎后制备成质量分数 10%视网膜匀浆,低温离心机离心半径 15 cm,3 500 r/min 离心 15 min,取上清液备用。(1)TBA 法测定视网膜中丙二醛质量摩尔浓度 取制备好的上清液 0.1 ml,加入丙二醛检测试剂混匀,95 $^{\circ}$ C 水浴 30 min,3 500 r/min 离心 10 min,取上清,计算波长 532 nm 处比色浓度。(2)NBT 法测定视网膜中 SOD 比活性 取部分制备好的 10%视网膜匀浆上清液,TBS 稀释至 1%后取 40 μ l,加入检测试剂混匀,37 $^{\circ}$ C 水浴 40 min,加入显色剂 10 min,计算波长 550 nm 处比色浓度。(3)BCA 法测定 1%视网膜匀浆上清液蛋白质量浓度 取 1%视网膜匀浆上清液 50 μ l 于孔板中,加入 BCA 工作液,37 $^{\circ}$ C 放置 30 min,于波长 562 nm 处比色计算上清液蛋白质量浓度。

1.2.7 Western blot 法测定视网膜中 L/M 视蛋白和视紫红质含量 取 10%视网膜匀浆,10 000 r/min 离心 30 min。根据蛋白质量浓度调整上样浓度,加入上样缓冲液,混匀后于 100 $^{\circ}$ C 水浴 5 min,取混合样品液 20 μ l 上样电泳,调节电压至 80 V;当溴酚蓝指示剂离开浓缩胶后,调节电压至 120 V,待溴酚蓝达凝胶末端时停止电泳。依次将滤纸、胶、PVDF 膜放入转膜仪中,调节电流 100 mA,转膜 40 min。用质量分数 5%脱脂奶粉封闭孵育 4 h,TBST 洗膜 3 次,将 PVDF 膜置入一抗中 4 $^{\circ}$ C 过夜,TBST 洗膜 3 次,加入相应二抗,37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h,光化学法显影摄片,采用 Image J 软件对图像进行灰度分析。以 α -tubulin 为内参,计算 L/M 视蛋白和视紫红质条带与内参条带的相对灰度值。目的蛋白相对表达量=目的蛋白灰度值/ α -tubulin 灰度值。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计学软件(美国 IBM 公司)进行统计分析。计量资料数据经 W 检验呈正态分布,以 mean \pm SD 表示,组间数据经 Levene 检验证实方差齐。采用随机分组单因素干预四水平研究设计,正常对照组、照射 3-min 组、照射 6-min 组和照射 30-min 组间各检测指标总体差异比较均采用单因素方差分析,组间两两比较采用 Dunnett-t 检验。检验标准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 各组鸡视网膜 OCT 表现及相对视网膜面积比较

随着小鸡自身发育和生长,鸡视网膜厚度逐渐增加。正常对照组鸡视网膜层间结构清晰,照射 3-min 组、照射 6-min 组和照射 30-min 组未见明显的视网膜

层间结构缺失和模糊(图 1),照射后 2、4、7 月龄鸡相对视网膜面积测量发现,同月龄内正常对照组、照射 3-min 组、照射 6-min 组和照射 30-min 组间视网膜相对面积总体比较差异均无统计学意义(2 月龄: $F=1.066, P=0.371$;4 月龄: $F=0.850, P=0.476$;7 月龄: $F=0.817, P=0.503$)(表 1)。

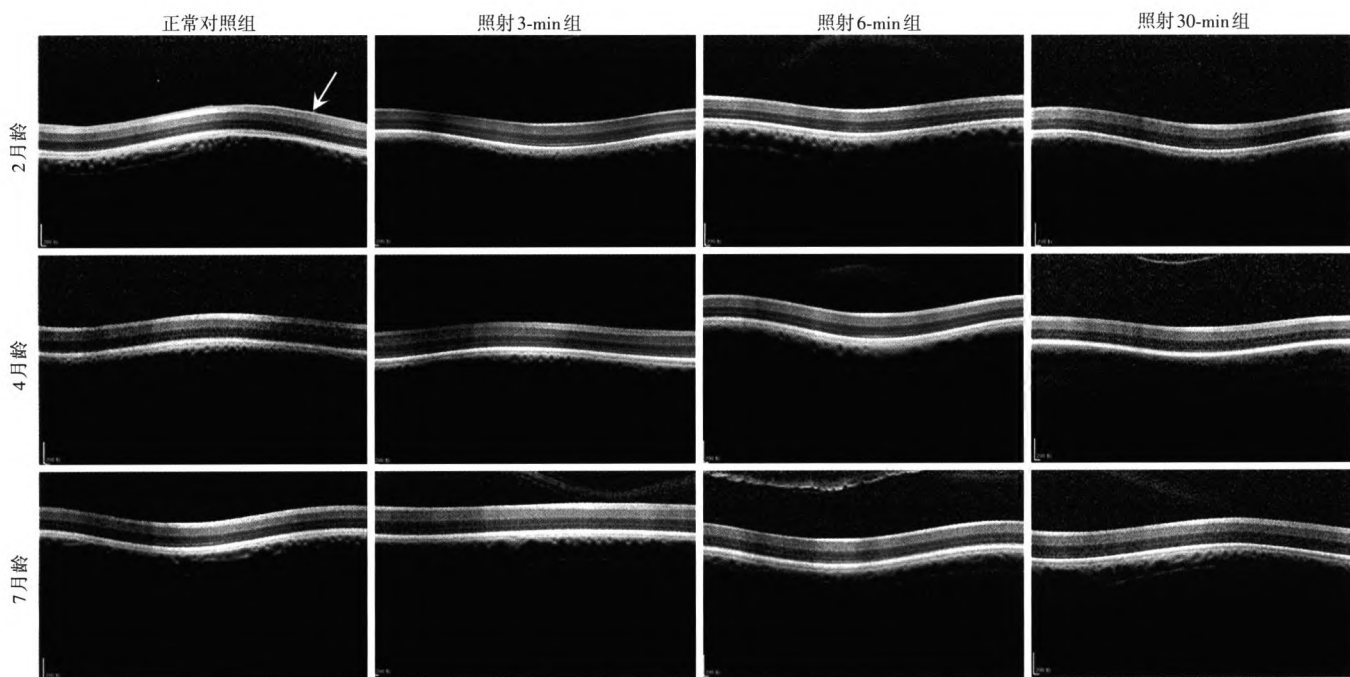


图 1 OCT 测定各组鸡相对视网膜面积变化 各月龄鸡视网膜(箭头)面积随着鸡生长发育而逐渐增加,但同月龄鸡照射不同时间组间视网膜面积大小无明显差别

Figure 1 Retinal area of different ages of chicken by OCT among various groups Retinal area (arrow) was increased with the growth of the chicken, and there was no significant abnormal in retinal area among different laser irradiation groups

表 1 各组鸡相对视网膜面积比较 (mean±SD)

Table 1 Comparison of relative retinal area in different ages of chicken among various groups (mean±SD)

组别	样本量	不同月龄时相对视网膜面积		
		2 月龄	4 月龄	7 月龄
正常对照组	5	17.67±1.49	22.40±1.34	22.58±1.17
照射 3-min 组	5	17.63±1.47	21.95±1.19	22.68±0.70
照射 6-min 组	5	18.08±1.23	21.65±1.45	22.38±0.73
照射 30-min 组	5	18.48±1.77	21.66±0.83	21.94±0.50
F 值		1.066	0.850	0.817
P 值		0.371	0.476	0.503

注:(单因素方差分析)

Note:(one-way ANOVA)

2.2 各组鸡视网膜组织病理学表现

各组鸡视网膜层次结构清楚,光感受器内外节排列整齐,未见明显视网膜细胞结构紊乱、碎裂、缺失和边界模糊(图 2)。

2.3 各组鸡视网膜细胞凋亡表现

正常对照组鸡视网膜各层未见 TUNEL 阳性染色细胞,照射 3-min 组、照射 6-min 组和照射 30-min 组鸡视网膜各层细胞核染色清晰,未见明显核固缩、核溶解现象,各层细胞核区域未见明显 TUNEL 阳性染色,下方视蛋白可见绿色自发荧光(图 3)。

2.4 各组鸡视网膜丙二醛质量摩尔浓度比较

2 月龄鸡各组视网膜中丙二醛质量摩尔浓度总体比较差异有统计学意义($F=3.652, P=0.035$),与正常对照组比较,照射 3-min 组和照射 6-min 组鸡视网膜中丙二醛质量摩尔浓度均升高,但差异均无统计学意义($P=0.105, 0.057$),照射 30-min 组鸡视网膜中丙二醛质量摩尔浓度较正常对照组明显升高,差异有统计学意义($P=0.019$)。4 月龄鸡各组视网膜中丙二醛质量摩尔浓度总体比较差异有统计学意义($F=5.784, P=0.007$),与正常对照组比较,照射 3-min 组鸡视网膜中丙二醛质量摩尔浓度升高,但差异无统计学意义

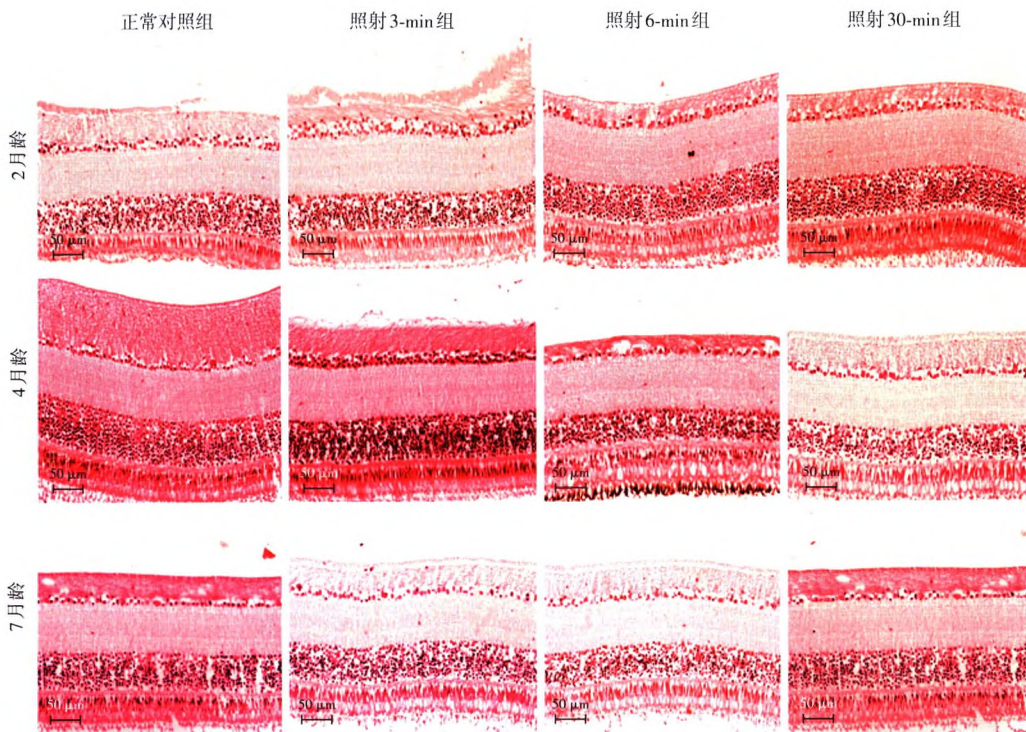


图 2 各组鸡视网膜组织病理学表现 (HE ×400, 标尺 = 50 μm) 不同月龄鸡各照射组视网膜组织结构排列整齐, 均未见异常

Figure 2 The retinal histopathology in different ages of chicken among various groups (HE ×400, bar = 50 μm) No obvious pathological changes was found in chicken retinas among various groups

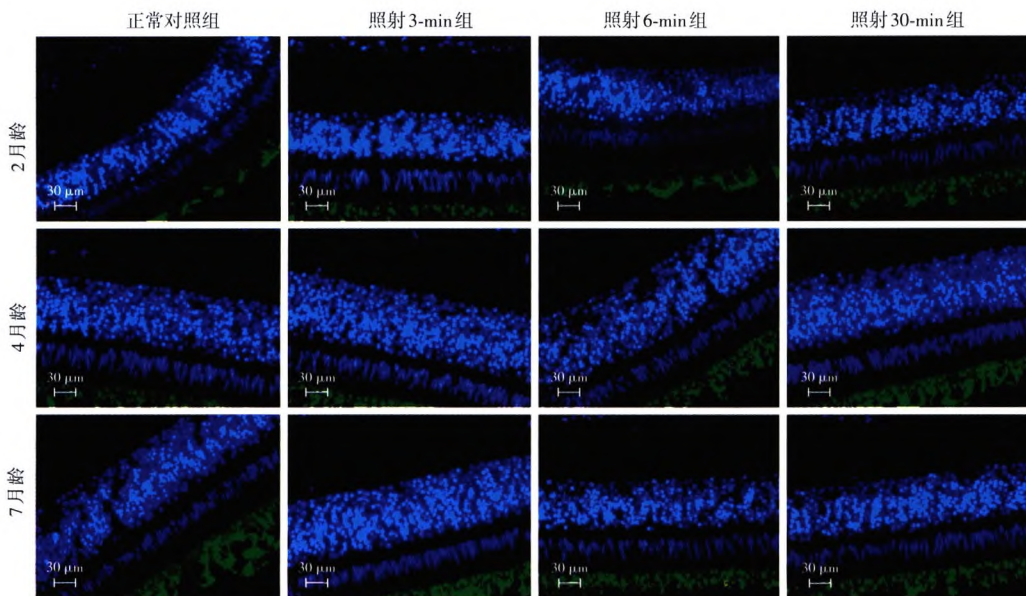


图 3 各组 TUNEL 免疫荧光染色表现 (OAPI ×400, 标尺 = 30 μm) 可见各层细胞核呈蓝色荧光 (DAPI) 和视蛋白的自发绿色荧光。上层稀疏的蓝色荧光为神经节细胞核, 中间密度较高的蓝色荧光为双极细胞核, 下层锥形的蓝色荧光为感光细胞核, 各层细胞均未见 TUNEL 阳性染色

Figure 3 TUNEL immunofluorescence staining among various groups (OAPI ×400, bar = 30 μm) The cell nucleus showed blue fluorescence (DAPI) and retinal autofluorescence showed a green fluorescence. No TUNEL positive cell was found among various groups. The ganglion cell nuclei were in the top layer, bipolar cell nuclei were in the middle layer with the higher density, and photoreceptor nuclei were in the lower layer

($P = 0.091$), 照射 6-min 组和照射 30-min 组鸡视网膜中丙二醛质量摩尔浓度明显高于正常对照组, 差异均有统计学意义 ($P = 0.026, 0.003$)。7 月龄鸡各组视网

膜中丙二醛质量摩尔浓度总体比较差异有统计学意义 ($F = 31.153, P < 0.01$), 照射 3-min 组、照射 6-min 组和照射 30-min 组鸡视网膜中丙二醛质量摩尔浓度均高于正常对照组, 差异均有统计学意义 ($P = 0.038, 0.032, < 0.01$) (表 2)。

2.5 各组鸡视网膜中 SOD 比活性比较

2 月龄、4 月龄鸡各组视网膜中 SOD 比活性总体比较差异均无统计学意义 ($F = 1.076, P = 0.387; F = 0.513, P = 0.679$), 7 月龄鸡各组视网膜中 SOD 比活性总体比较差异有统计学意义 ($F = 33.215, P < 0.01$), 其中照射 3-min 组和照射 6-min 组鸡视网膜中 SOD 比活性与正常对照组比较差异均无统计学意义 ($P = 0.574, 0.607$), 照射 30-min 组鸡视网膜中 SOD 比活性明显低于正常对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$) (表 3)。

2.6 各组鸡视网膜 L/M 视蛋白和视紫红质蛋白相对表达量比较

照射 3-min 组、照射 6-min 组和照射 30-min 组 2 月龄和 4 月龄鸡视网膜中 L/M 视蛋白和视紫红质蛋白表达条带强度与正常对照组均比较接近, 7 月龄鸡各光照组

视网膜中 L/M 视蛋白表达强度与正常对照组接近, 照射 3-min 组和照射 6-min 组鸡视网膜中视紫红质蛋白表达强度与正常对照组接近, 照射 30-min 组鸡视网膜

表 2 各组鸡视网膜组织中

丙二醛质量摩尔浓度比较 (mean±SD, nmol/mg)

Table 2 Comparison of malondialdehyde content in chicken retina among various groups (mean±SD, nmol/mg)

组别	样本量	不同月龄鸡视网膜丙二醛质量摩尔浓度		
		2 月龄	4 月龄	7 月龄
正常对照组	5	77.12±2.86	79.81±2.58	75.18±3.78
照射 3-min 组	5	82.26±3.78	83.77±2.72	85.23±2.00 ^a
照射 6-min 组	5	83.03±3.81	84.89±2.01 ^a	85.52±3.41 ^a
照射 30-min 组	5	84.32±4.19 ^a	86.83±3.49 ^a	109.32±10.24 ^a
F 值		3.652	5.784	31.153
P 值		0.035	0.007	<0.01

注:与正常对照组比较,^aP<0.05(单因素方差分析,Dunnett-t 检验)

Note: Compared with the normal control group, ^aP < 0.05 (one-way ANOVA, Dunnett-t test)

表 3 各组鸡视网膜组织中 SOD

比活性比较 [mean±SD, nmol/(s·mg)]

Table 3 Comparison of SOD activity in chicken retina among various groups [mean±SD, nmol/(s·mg)]

组别	样本量	不同月龄鸡视网膜中 SOD 比活性		
		2 月龄	4 月龄	7 月龄
正常对照组	5	155.93±5.37	157.89±4.86	160.57±3.13
照射 3-min 组	5	154.96±4.08	160.21±6.46	163.59±4.42
照射 6-min 组	5	153.01±7.09	159.54±3.27	163.45±3.32
照射 30-min 组	5	158.96±4.32	161.44±3.04	140.20±5.99 ^a
F 值		1.076	0.513	33.215
P 值		0.387	0.679	<0.01

注:与正常对照组比较,^aP<0.05(单因素方差分析,Dunnett-t 检验)

SOD:超氧化物歧化酶

Note: Compared with the normal control group, ^aP < 0.05 (one-way ANOVA, Dunnett-t test) SOD:superoxide dismutase

表 4 各组鸡视网膜中 L/M 视蛋白和视紫红质蛋白相对表达量比较 (mean±SD)

Table 4 Comparison of relative protein expression of L/M opsin and rhodopsin in chicken retina among various groups (mean±SD)

组别	样本量	不同月龄鸡视网膜中各种蛋白相对表达量					
		2 月龄		4 月龄		7 月龄	
		视蛋白	视紫红质	视蛋白	视紫红质	视蛋白	视紫红质
正常对照组	5	0.752±0.040	0.378±0.031	0.744±0.054	0.454±0.072	0.654±0.035	0.566±0.072
照射 3-min 组	5	0.764±0.048	0.360±0.041	0.660±0.038	0.428±0.033	0.634±0.066	0.532±0.045
照射 6-min 组	5	0.760±0.030	0.386±0.034	0.700±0.094	0.472±0.033	0.664±0.052	0.522±0.064
照射 30-min 组	5	0.750±0.022	0.384±0.029	0.676±0.066	0.416±0.044	0.656±0.039	0.392±0.065 ^a
F 值		0.165	0.611	1.523	1.365	0.333	7.840
P 值		0.919	0.617	0.247	0.289	0.802	0.002

注:与正常对照组比较,^aP<0.05(单因素方差分析,Dunnett-t 检验)

Note: Compared with the normal control group, ^aP < 0.05 (one-way ANOVA, Dunnett-t test)

3 讨论

常用的视网膜光损伤实验动物为小鼠,小鼠视网膜主要以视杆细胞为主,视锥细胞仅占 1%,无类似于人黄斑区的视锥细胞聚集区域,并且小鼠的视锥细胞

中视紫红质蛋白条带较正常对照组变窄(图 4)。2 月龄鸡各组视网膜中 L/M 视蛋白和视紫红质蛋白相对表达量总体比较差异均无统计学意义 ($F = 0.165, P = 0.919; F = 0.611, P = 0.617$); 4 月龄鸡各组视网膜中 L/M 视蛋白和视紫红质蛋白相对表达量总体比较差异均无统计学意义 ($F = 1.523, P = 0.247; F = 1.365, P = 0.289$); 7 月龄鸡各组视网膜中 L/M 视蛋白相对表达量总体比较差异无统计学意义 ($F = 0.333, P = 0.802$),视紫红质蛋白相对表达量总体比较差异有统计学意义 ($F = 7.840, P = 0.002$),其中照射 3-min 组、照射 6-min 组与正常对照组比较,差异均无统计学意义 ($P = 0.726, 0.559$),照射 30-min 组视网膜中视紫红质蛋白相对表达量低于正常对照组,差异有统计学意义 ($P = 0.001$) (表 4)。

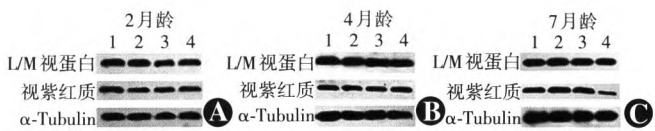


图 4 各组鸡视网膜 L/M 视蛋白和视紫红质蛋白表达 2 月龄和 4 月龄鸡各组视网膜中 L/M 视蛋白和视紫红质蛋白表达强度接近,7 月龄鸡照射 30-min 组视网膜中视紫红质表达条带强度减弱 1:正常对照组 2:照射 3-min 组 3:照射 6-min 组 4:照射 30-min 组 A:2 月龄 B:4 月龄 C:7 月龄

Figure 4 Comparison of L/M opsin and rhodopsin expression in chicken retina among various groups The expression bands of L/M opsin and rhodopsin were similar in 2-month and 4-month old chicken among different irradiation groups. The band intensity of rhodopsin was weakened in 7-month old chicken of irradiation 30 min group 1: normal control group 2: irradiation 3-min group 3: irradiation 6-min group 4: irradiation 30-min group

仅分为中波长敏感视锥细胞 (508 nm) 和短波长敏感视锥细胞 (360 nm), 与人的感光波段相差较大。鸡视网膜以视锥细胞为主, 约占视网膜感光细胞的 80%, 并且鸡视锥细胞根据视蛋白吸收波长不同分为多种视锥细胞, 即吸收峰值为 571 nm 的长波长视锥细胞、吸

收峰值为 508 nm 的中波长视锥细胞和吸收峰值为 455 nm 的短波长视锥细胞,视杆细胞视紫红质吸收峰值为 503 nm,与人视锥视杆细胞的吸收峰值相近。鸡视网膜层间无血管,与人眼黄斑区类似,是较理想的模拟人眼黄斑区的动物模型^[10-12],因此本研究选取鸡视网膜作为实验对象。国内外红光生物调节针对眼部组织的实验中采用的波长集中在 630~700 nm,单次照射能量为 0.1~8.0 J/cm²^[1-2,4,13]。Natoli 等^[14]采用 670 nm 的发光二极管(光源能量为 6 J/cm²),发现每天照射鼠眼 6 min 视网膜的视觉功能明显优于非照射组。前期研究中分别用 2、3、4 和 5 mW 功率的 650 nm 半导体激光每天照射豚鼠眼 6 min,功率≥3 mW 的光源照射 1 个月各组均出现不同程度的光损伤^[9]。本研究中 3 个实验组用 2 mW 的激光照射鸡眼 3、6 和 30 min,对应的照射能量分别为 0.459、0.917 和 4.586 J/cm²,均在有效治疗能量范围内。光损伤与选择的功率、照射时间和光线波长均有关。在瞬时功率为 270 mW/cm² 时,白光瞬时照射便可出现光损伤症状^[1],用于眼部生物调节的光源功率远低于该标准。相对于短波长光源来说,红光较难产生光损伤,但并不代表低功率红光是安全的,尤其在慢性光化学损伤方面。研究发现,光化学损伤的发生机制与自由基产生过多密切相关,其中丙二醛含量和 SOD 比活性是反映细胞内自由基平衡的常用指标^[15-17],丙二醛含量反映细胞内自由基的含量,SOD 比活性反映细胞内清除自由基的能力。生理状态下,细胞内自由基的生成和清除处于动态平衡状态,该平衡的破坏导致大量自由基生成,过多的自由基与细胞内的脂质膜、蛋白、碱基等结合,影响细胞的生物功能,诱导细胞凋亡。慢性光化学损伤引起自由基增多的原因包括细胞器的功能异常、脂褐素的过度光降解、视觉循环中间产物的堆积等。研究表明,在视网膜感光细胞中视杆细胞较视锥细胞更易出现光损伤,可能与视杆细胞中负责视觉循环的限速酶活性较视锥细胞中低很多有关,接受等量光照的视杆细胞中更易堆积视黄醛二聚体和中间产物^[16,18-19]。视网膜光损伤早期表现主要集中在锥杆细胞和其外节盘膜,其表现包括 DNA 损伤和染色体浓缩、视蛋白降解、钙代谢异常和多不饱和脂肪酸在光感受器外节段的过氧化。视蛋白作为视锥细胞和视杆细胞外节段的重要蛋白,其含量变化可以反映细胞的早期损伤^[10]。

本研究中发现,激光照射 30 min 后 1 个月时,2 月龄鸡视网膜中丙二醛含量较正常对照组升高,各组 SOD 比活性无明显差异,说明接受额外的激光照射造

成了自由基的生成增多,但并未出现 SOD 的过度消耗,自由基可能为一过性增多,组织中仍可保持自由基产生和清除间的平衡。激光照射 6-min 和 30-min 组 3 个月时,4 月龄鸡视网膜中丙二醛含量较正常对照组明显升高,各组 SOD 比活性无明显差异,光照 6 个月时,激光照射 3-min、6-min、30-min 组 7 月龄鸡视网膜中丙二醛含量均较正常对照组明显升高,其中以照射 30-min 组增加幅度更大,SOD 比活性在照射 30-min 组较正常对照组明显降低,提示每天激光光照 30 min 持续 6 个月时视网膜出现了自由基清除平衡的破坏。本研究中发现,650 nm 激光照射鸡视网膜产生的自由基随时间延长有一定的积累效应,且单次照射时间越长,累积效应越明显,这可能与短时视蛋白消耗过多而产生的中间产物过多无法及时代谢有关,一方面这些产物可以直接造成类似自由基损伤,如视黄醛二聚体与脂质膜结合,另一方面这些中间产物通过盘膜脱离被 RPE 细胞吞噬,最终在溶酶体中形成脂褐素,并在日后的光降解中释放自由基和醛类碎片,进一步损伤组织细胞,本研究中观察到的自由基累积效应也许也源自脂褐素的堆积。本研究中还发现,不同光照时间后不同月龄鸡视网膜中 L/M 视蛋白含量无明显变化,而 2 月龄和 4 月龄鸡视网膜中视紫红质蛋白表达也无明显变化,但激光照射 30-min 组 7 月龄鸡视网膜中视紫红质蛋白表达较正常对照组明显降低,提示视锥细胞在经过 6 个月的照射后仍无明显的外节盘膜损伤,而视杆细胞接受每天 30 min 的照射并持续 6 个月时出现了一定的外节盘膜损伤和视色素的降解。光感受器外节盘膜每天的新生和脱落可以使自由基损伤暂时得到修复,但当自由基损伤到视细胞内节时则影响线粒体和内质网的功能,引起外节盘膜和视蛋白的合成异常,反映出视网膜开始发生不可逆光损伤。本研究中通过 6 个月的观察,发现使用低功率激光对鸡视网膜进行照射,虽然短期内仅表现为视网膜自由基的增多,提示自由基损伤可能仅局限在视网膜感光细胞外节,但是随着自由基的积累效应和长期的光照刺激,这一损伤可能会逐渐累及周边组织,引起感光细胞内节细胞器的损伤。本研究中采用 OCT 来检测活体鸡视网膜相对面积,相较于视网膜的组织病理学检查,OCT 的测量更加精准,避免了切片角度引起的组织斜切或者组织拉伸等造成的误差。本研究中 OCT、视网膜组织病理学和 TUNEL 检测均未发现明显视网膜面积和形态的异常,一方面说明可能慢性光损伤并未造成细胞凋亡的程度,另一方面可能由于鸡视网膜主要以视锥细胞为主,而少量的视杆细胞出现初期的光损伤对

组织学和影像学表现影响不大。

本研究中用 2 mW 功率的 650 nm 激光照射鸡视网膜并进行 6 个月的观察,发现每天照射 30 min 持续 6 个月时发生视杆细胞光损伤,出现视网膜自由基代谢平衡的破坏和视紫红质含量下降,后者提示视杆细胞的光化学损伤可能已影响到内节盘膜,为不可逆损伤的开始。虽然持续每天 3 min 照射和 6 min 照射在 6 个月内暂时无明显的不可逆损伤表现,但由于可能存在自由基产生的慢性积累效应,延长观察时间有可能会发现持续的自由基损伤。本实验结果为 650 nm 激光用于临床治疗的安全阈值提供了参考依据。本研究尚未观察视网膜的超微结构改变,此外尚未对其他一些光损伤相关蛋白的表达变化进行检测,并且受实验样本量的限制,本研究的结果仍待进一步验证。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Beirne K, Rozanowska M, Votruba M. Photostimulation of mitochondria as a treatment for retinal neurodegeneration [J]. *Mitochondrion*, 2017, 36: 85-95. DOI: 10.1016/j.mito.2017.05.002.
- [2] Eells J T, Gopalakrishnan S, Valter K. Near-infrared photobiomodulation in retinal injury and disease [J]. *Adv Exp Med & Bio*, 2016, 854: 437-441. DOI: 10.1007/978-3-319-17121-0_58.
- [3] Merry GF, Munk MR, Dotson RS, et al. Photobiomodulation reduces drusen volume and improves visual acuity and contrast sensitivity in dry age-related macular degeneration [J]. *Acta Ophthalmol*, 2017, 95(4): 270-277. DOI: 10.1111/aos.13354.
- [4] Geneva II. Photobiomodulation for the treatment of retinal diseases: a review [J]. *Int J Ophthalmol*, 2016, 9(1): 145-152. DOI: 10.18240/ijo.2016.01.24.
- [5] Rojas JC, Gonzalez-Lima F. Low-level light therapy of the eye and brain [J]. *Eye Brain*, 2011, 3: 49-67. DOI: 10.2147/EB.S21391.
- [6] 王淑荣, 吴煜波, 何宇茜, 等. 视网膜光损伤的研究进展 [J]. *中华眼视光学与视觉科学杂志*, 2015, 17(10): 633-636. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1674-845X.2015.10.015.
Wang SR, Wu YB, He YX, et al. Progress in research on retinal light damage [J]. *Chin J Optom Ophthalmol Vis Sci*, 2015, 17(10): 633-636. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1674-845X.2015.10.015.
- [7] 姜文静, 张丽娜, 于晓, 等. 内质网应激对光照诱导的人视网膜色素上皮细胞损伤的促进作用 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2017, 35(9): 816-823. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.09.010.
Jiang WJ, Zhang LN, Yu X, et al. Mediated effects of endoplasmic reticulum stress on light-induced apoptosis and inflammation of human retinal pigment epithelial cell [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2017, 35(9): 816-823. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.09.010.
- [8] Organisciak DT, Vaughan DK. Retinal light damage: mechanisms and protection [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2010, 29(2): 113-134. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2009.11.004.
- [9] 吴小兰, 邱良秀, 王双勇, 等. 650 nm 半导体激光照射豚鼠视网膜诱导细胞凋亡及 Fas 蛋白的表达 [J]. *第三军医大学学报*, 2010, 32(14): 1563-1565.
- [10] Jha KA, Nag TC, Wadhwa S, et al. Expressions of visual pigments and synaptic proteins in neonatal chick retina exposed to light of variable photoperiods [J]. *J Biosci*, 2016, 41(4): 667-676. DOI: 10.1007/s12038-016-9637-6.
- [11] Kostic C, Arsenijevic Y. Animal modelling for inherited central vision loss [J]. *J Pathol*, 2016, 238(2): 300-310. DOI: 10.1002/path.4641.
- [12] Diaz NM, Morera LP, Tempesti T, et al. The visual cycle in the inner retina of chicken and the involvement of retinal G-protein-coupled receptor (RGR) [J]. *Mol Neurobiol*, 2017, 54(4): 2507-2517. DOI: 10.1007/s12035-016-9830-5.
- [13] Saliba A, Du Y, Liu H, et al. Photobiomodulation mitigates diabetes-induced retinopathy by direct and indirect mechanisms: evidence from intervention studies in pigmented mice [J/OL]. *PLoS One*, 2015, 10(10): e0139003 [2020-01-06]. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0139003>. DOI: 10.1371/journal.pone.0139003.
- [14] Natoli R, Valter K, Barbosa M, et al. 670 nm photobiomodulation as a novel protection against retinopathy of prematurity: evidence from oxygen induced retinopathy models [J/OL]. *PLoS One*, 2013, 8(8): e72135 [2020-01-19]. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0072135>. DOI: 10.1371/journal.pone.0072135.
- [15] Begaj T, Schaal S. Sunlight and ultraviolet radiation-pertinent retinal implications and current management [J]. *Surv Ophthalmol*, 2018, 63(2): 174-192. DOI: 10.1016/j.survophthal.2017.09.002.
- [16] Cia D, Cubizolle A, Crauste C, et al. Phloroglucinol protects retinal pigment epithelium and photoreceptor against all-trans-retinal-induced toxicity and inhibits A2E formation [J]. *J Cell Mol Med*, 2016, 20(9): 1651-1663. DOI: 10.1111/jemm.12857.
- [17] Wenzel A, Grimm C, Samardzija M, et al. Molecular mechanisms of light-induced photoreceptor apoptosis and neuroprotection for retinal degeneration [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2005, 24(2): 275-306. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2004.08.002.
- [18] Youssef PN, Sheibani N, Albert DM. Retinal light toxicity [J]. *Eye (Lond)*, 2011, 25(1): 1-14. DOI: 10.1038/eye.2010.149.
- [19] Wu J, Seregard S, Algere PV. Photochemical damage of the retina [J]. *Surv Ophthalmol*, 2006, 51(5): 461-81.

(收稿日期: 2019-03-19 修回日期: 2020-05-19)

(本文编辑: 尹卫靖 杜娟)

广告目次

止血祛瘀明目片 陕西摩美得气血和制药有限公司……封二

同息通(曲安奈德注射液) 广东省医药进出口公司珠海公司……前插页

博士伦治疗用绷带镜 山东博士伦福瑞达制药有限公司……前插页

海德堡超清 OCTA+X 北京高视远望科技有限责任公司……前插页

沃丽汀(卵磷脂络合碘片) 广东泰恩康医药股份有限公司……前插页

灵光复方樟柳碱注射液 华润紫竹药业有限公司……封三

迈达科技 天津迈达科技股份有限公司……封底