

650nm 半导体红色激光照射视网膜安全性 实验研究报告

张春霞 李光宇

吉林大学白求恩第二医院眼科医院

2023年1月

摘 要

近视是目前全球范围内引发视觉损害的重要原因之一。北大国家发展研究院数据统计显示：2012 年我国 5 岁以上罹患近视总人数在 4.5 亿左右，到 2020 年近视患病人数约为 7 亿。寻求有效的近视防控措施一直是眼科领域研究热点，也是“健康中国战略”中重要内容。近来，苏州宣嘉光电科技有限公司创新性研发并应用“艾尔兴哺光仪”防控青少年近视进展取得了可喜的临床效果。临床研究数据显示，应用重复低能量半导体红色激光（波长，650nm；功率，2mW）照射可以有效控制青少年近视的发展，压低近视度数增长的曲线。然而，长期应用半导体红色激光进行眼部照射，其对视网膜安全性也一直是萦绕眼科医生与使用者心中的重要问题。

吉林大学白求恩第二医院眼科医院李光宇教授课题组围绕“艾尔兴哺光仪”所使用的“650nm 红色半导体激光”对视网膜、视细胞的影响展开了系列实验研究。课题研究主要以体外培养视细胞(661W)，以及 4-6 周龄 C57/BL 小鼠为研究对象，并利用 450nm 蓝色半导体激光作为对比性研究，深入探究了长、短波长激光照射，以及不同照射方式、照射功率对视网膜的影响。课题研究发现：①辐照度为 $2.55\text{mW}/\text{cm}^2$ （发射功率约为 2mW）450nm 蓝色激光照射可以显著诱导视细胞光氧化性损伤，导致视细胞死亡率显著上升；而相同功率 650nm 红色激光照射却未诱导出显著视细胞损伤。②间断性重复性低功率（2mW）650nm 红色激光与 450nm 蓝色激光照射均未诱导出小鼠视网膜显著损伤。③连续性低功率（2mW）650nm 红色激光照射未诱导出小鼠视网膜显著损伤，而连续性低功率 450nm 蓝光照射却可以造成小鼠视网膜显著损伤。④间断性重复性高功率（10mW）650nm 红色激光照射未诱导出小鼠视网膜显著损伤，而间断性重复性高功率 450nm 蓝色激光照射却可以显著造成小鼠视网膜损伤。⑤连续性高功率（10mW）照射，650nm 红色激光与 450nm 蓝色激光均可诱导出小鼠视网膜损伤，但 450nm 蓝色激光连续照射造成视网膜损伤更显著。据此，通过对课题实验结果分析，现可以得出如下研究结论：1. 不同波长光照对视网膜影响具有差异性，相同照射方式与照射剂量下短波长蓝光较长波长红光对视网膜损伤严重。2. 单次光照对视网膜损伤具有能量依赖性，随着光照功率的增加对视网膜所造成的损伤逐渐加重。3. 单次光

照对视网膜损伤具有时间依赖性，随着单次光照时长的增加对视网膜所造成的损伤逐渐显著；在总照射时长相同情况下，间断重复性照射较连续性照射安全。

基于以上研究结果，结合“艾尔兴哺光仪”现有临床应用方式，我们提出进一步优化策略：1.在技术条件允许情况下，可以进行个体化照射功率设置；在确保治疗有效性的前题下可以个体化设定较低的照射功率和剂量；2. 在确保治疗有效性的前题下，可以进一步缩短照射时长或尝试增加照射频次而缩短照射时长。

正文

近视是目前在全球范围内引发视觉损害的重要原因之一。2013 年澳大利亚华柏恩视觉研究中心的一项全球眼健康和视觉保健报告指出：至 2020 年，世界上将有三分之一的人（25 亿）罹患近视。2016 年发表在眼科权威国际期刊《Ophthalmology》的一项研究报告预测：至 2050 年，将有 49.8% 世界人口（47 亿）罹患近视，而其中 9.8% 近视患者（9 亿）将转变为高度近视。世界卫生组织（WHO）2018 年公布的研究报告显示，中国近视患者达 6 亿人，青少年近视率持续居世界第 1 位。北大国家发展研究院的《国民视觉健康报告》显示，2012 年我国 5 岁以上人群中，罹患近视的总人数在 4.5 亿左右，若没有有效的政策干预，至 2020 年，我国近视患病人数约为 7 亿。随着时代的发展，近视人数不断的增多，近视问题已经越来越影响人们的生活，特别是发展成为病理性高度近视后会诱发出系列的眼部并发症，严重威胁视觉健康。

多年来，研究人员一直在不断探索近视的发生与发展进程。诸多研究结果证明，眼正视化阶段的视觉体验对屈光系统发育发挥重要作用。视觉信息构成视觉体验。光，则是各种视觉信息的共同载体。此外，多种重要的神经递质在近视的发生发展过程中亦起着重要作用。视网膜中多巴胺的合成和代谢具有光依赖性，受到周围环境亮度、时间和空间的影响。视网膜多巴胺的含量变化呈现昼夜节律性，即日间含量较高，夜间含量较低。研究表明多巴胺作为视网膜上光调节释放的神经递质可提高日间视网膜功能，通过光和视觉信号抑制眼球的生长。故青少年增加户外活动，增加日光照射时长对青少年近视的防控发挥积极作用。近年来，苏州宣嘉光电科技有限公司研发的“艾尔兴哺光仪”在很大程度上填补了国内外近视防控中光生物调节作用的空白。临床研究数据显示，重复应用“艾尔兴哺光仪”（波长为 650 nm 的红色半导体激光，功率为 2mW）照射每次 3 分钟，每天两次可以有效控制青少年近视的发展，压低近视度数增长的曲线。

但应用红色半导体激光长期对眼部照射，其安全性也一直是眼科医生与使用者所关心的重要问题。吉林大学白求恩第二医院眼科医院李光宇教授课题组围绕

“艾尔兴哺光仪”所使用的“650nm 红色半导体激光”对视网膜、视细胞的影响展开了系列的体内、外实验研究实验。

具体研究方案如下：体外细胞实验，采用视网膜感光细胞（661W 细胞株）为研究对象，体内实验选取 4-6 周龄 C57/BL 小鼠为实验对象，对其眼部进行光照。光照装置为“艾尔兴哺光仪”光源，即波长为 650nm 半导体红色激光，发射功率模拟临床使用功率为 2mW（光照直径为 10mm，辐照度为功率/光照面积=2.55mW/cm²）。另外，应用相同功率而波长为 450nm 的蓝色半导体激光进行对照性研究。体内、外实验分为三组：非光照对照组，红光照射处理组，蓝光照射处理组。此外，研究中也通过改变不同照射功率及照射方式，深入探讨比较了长、短波长光照对视网膜的影响。

一. 细胞实验研究方法

1. 光感受器细胞（661W）培养

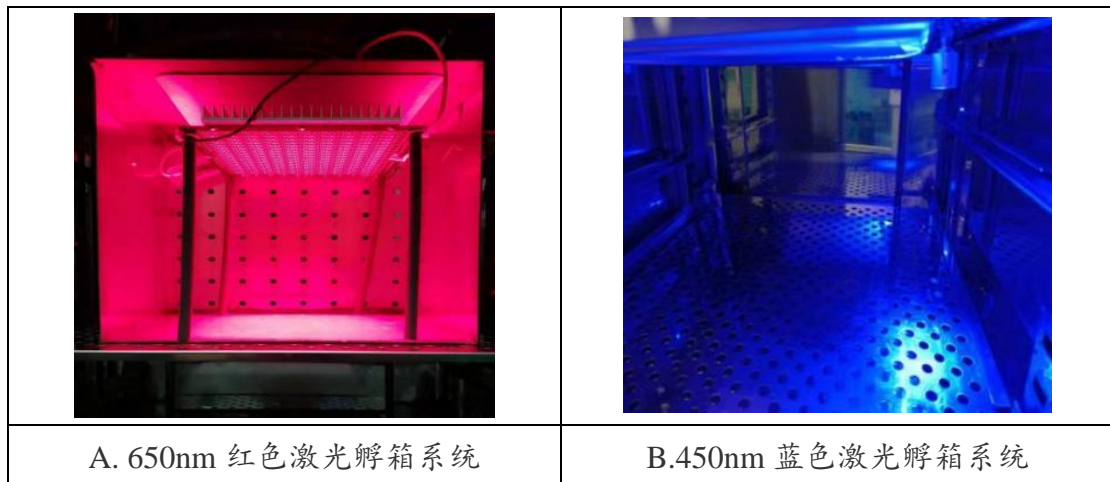
661W 细胞系永生化小鼠视网膜神经细胞，其 SV40-T 抗原表达受编码人视网膜受体结合蛋白基因启动子控制。661W 细胞具有类锥状感光细胞的结构和生化特性，被广泛应用于体外感光细胞相关的实验研究中。

661W 细胞培养基为添加 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 mg/ml 链霉素的 DMEM 培养基，置于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养。每 2 天换液 1 次，细胞融合达到 80-90% 时传代。

细胞传代方法：清除培养基后，PBS 冲洗 2 遍，用 0.25% 胰酶于细胞培养箱中消化 5 分钟，加入新鲜完全培养基终止消化。将细胞悬液置入离心管中 1000rpm 离心 5 分钟，弃上清后重悬细胞，细胞按照 1: 3 比例进行传代。

2. 细胞实验分组

非光照正常对照组：待细胞生长至 75% 的密度后用新鲜完全培养基换液，置于正常细胞培养箱中避光培养。红光照射处理组：待细胞生长至 75% 的密度后用新鲜完全培养基换液，置于 650nm 红色激光光照（辐照度为 2.55mW/cm²）细胞孵箱中培养于指定时间。蓝光照射处理组：待细胞生长至 75% 的密度后用新鲜完全培养基换液，置于 450nm 蓝色激光（辐照度为 2.55mW/cm²）光照细胞孵箱中培养于指定时间。



3. 细胞活性测定（CCK8 检测法）

将 661W 细胞接种于 96 孔板中，培养 24h 后根据上述 2 的方法进行分组培养，红色激光照射处理组与蓝色激光照射处理组给予相同的辐照度 $2.55\text{mW}/\text{cm}^2$ 光照照射，照射时长分别为 15min、30min、60min、120min，然后休息 12 小时后，更换培养基并于 $100\mu\text{l}$ 培养基中加入 $10\mu\text{l}$ CCK8 试剂，在细胞培养箱内继续孵育 1-4 小时后行细胞活性测定。CCK8 溶液含有水溶性四唑盐，在电子载体存在的情况下，四唑盐被细胞脱氢酶还原为可溶于组织培养基的橙色甲醛产物。产生的甲醛的产量与活细胞的代谢活性成正比，并通过 460 nm 的吸光度来测量。根据测得的吸光度值（OD 值）来判断细胞活性，即 OD 值越大表示细胞活性越强。将结果导入 GraphPad Prism 6 软件计算出 IC50 值并绘制量-效反应曲线。

4. 细胞存活/死亡检测（PI/Hoechst 染色法）

将 661W 细胞接种于 96 孔板中，24h 后根据上述 2 的方法进行分组培养，48h 后弃去各组的培养基，应用 PI/Hoechst 双染检测细胞的存活率，首先将 $10\mu\text{l}$ Hoechst 33258 染料 ($2\mu\text{g}/\text{ml}$) 稀释液加入不同细胞组的 96 孔板中， 37°C 避光孵育 30min，然后每孔加入 $10\mu\text{l}$ PI ($5\mu\text{g}/\text{ml}$) 在相同条件下染色 10min。使用倒置显微镜观察并拍摄照片，并使用 ImageJ 软件 (v1.51, NIH, 美国) 对照片进行分析统计。

5. 细胞内活性氧簇（ROS）检测

活性氧荧光探针(DCFH-DA)用新鲜无血清培养基配制，其终浓度为 $10\mu\text{M}$ 。将 661W 细胞接种于 96 孔板，按照 2 的方法进行分组培养，48h 后弃去各组的培养基，将 $100\mu\text{l}$ 配制好的含有探针的培养基加入待测孔。置于细胞培养箱避光孵育 20 分钟。弃去含 DCFH-DA 的培养基，用新鲜的无血清培养基清洗 2 次。置于倒置荧光显微镜下观察，拍照保存，使用 Image J 软件分析荧光强度。

6. 细胞免疫荧光染色

(1) 将 661W 细胞接种于 96 孔板中，培养 24h 后根据上述 2 的方法进行分组处理后，弃尽培养基，用 PBS 轻轻洗涤 1 遍。

(2) 加入 4% 多聚甲醛，室温固定 20 分钟。

(3) 摇床上 PBS 洗 3 次，每次 5 分钟。

(4) 加入 0.2% Triton X-100，室温打孔 10 分钟。

(5) 摇床上 PBS 洗 3 次，每次 5 分钟。

(6) 加入使用 PBS 现配的 3% BSA，室温封闭 20 分钟，吸出后用 PBS 轻柔清洗。

(7) 加入使用 PBS 配制的一抗工作液，在 4°C 冰箱中过夜孵育（一抗稀释浓度为：8-OHdG 1:50）。

(8) 摇床上 PBS 洗 3 次，每次 5 分钟。

(9) 加入使用 PBS 配制的荧光二抗工作液，室温孵育 30 分钟（二抗稀释浓度为：Dylight488 1:200）。

(10) 摇床上 PBS 洗 3 次，每次 5 分钟。

(11) 加入 DAPI 溶液 (1:2)，室温孵育 15 分钟。

(12) 摇床上 PBS 洗 3 次，每次 5 分钟。

(13) 置于荧光显微镜下观察拍照。

二. 细胞实验研究结果

1. 650nm 红色\450nm 蓝色激光照射对感光细胞 (661W) 活性影响

如图 1 所示, 661W 细胞接受相同辐照度 ($2.55\text{mW}/\text{cm}^2$) 蓝色和红色激光照射不同时长后, 利用 CCK8 测定细胞活性。结果显示: 红色激光连续照射 15min、30min、1 小时可以使细胞活性显著升高, 且连续照射 2 小时细胞活性较非光照对照组未见明显下降; 而相同辐照度的蓝色激光照射除在 30min 时细胞活性略有升高外, 连续照射 2 小时可以导致细胞活性较非光照对照组显著降低。(平均值 \pm 标准差, * $p<0.05$)

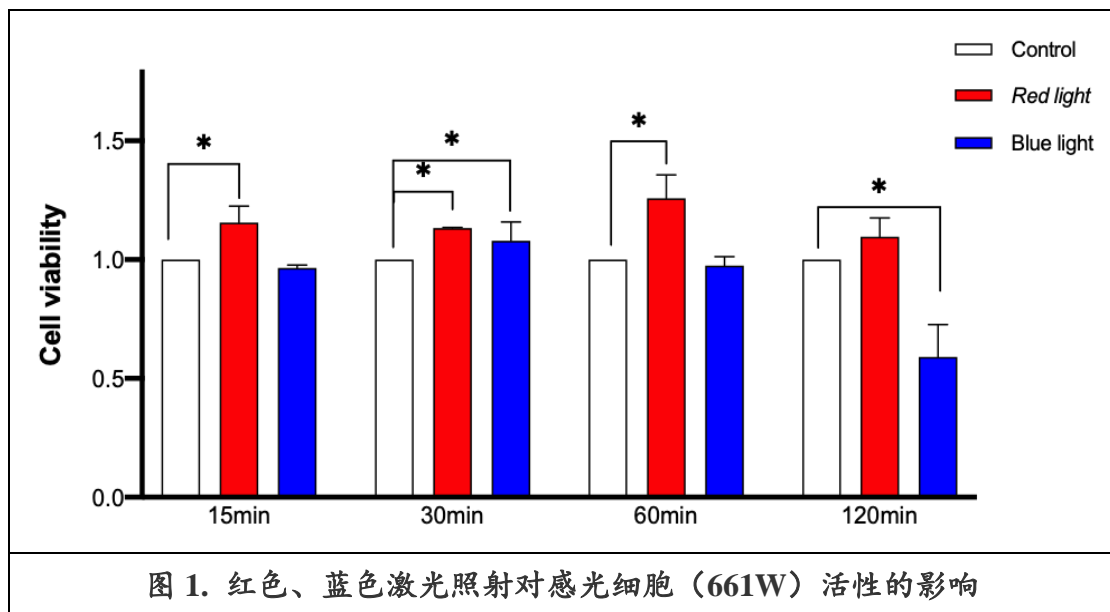


图 1. 红色、蓝色激光照射对感光细胞 (661W) 活性的影响

2. 650nm 红色\450nm 蓝色激光照射导致感光细胞死亡检测

利用 Hoechst-PI 染色可以检测细胞死亡情况。如图 2 所示, 红色激光连续照射 48 小时后, 与非光照正常对照组相比, 细胞死亡未见明显增加; 而蓝色激光照射组细胞死亡明显增加 (平均值 \pm 标准差, ns 无统计学差异, * $P<0.05$)。

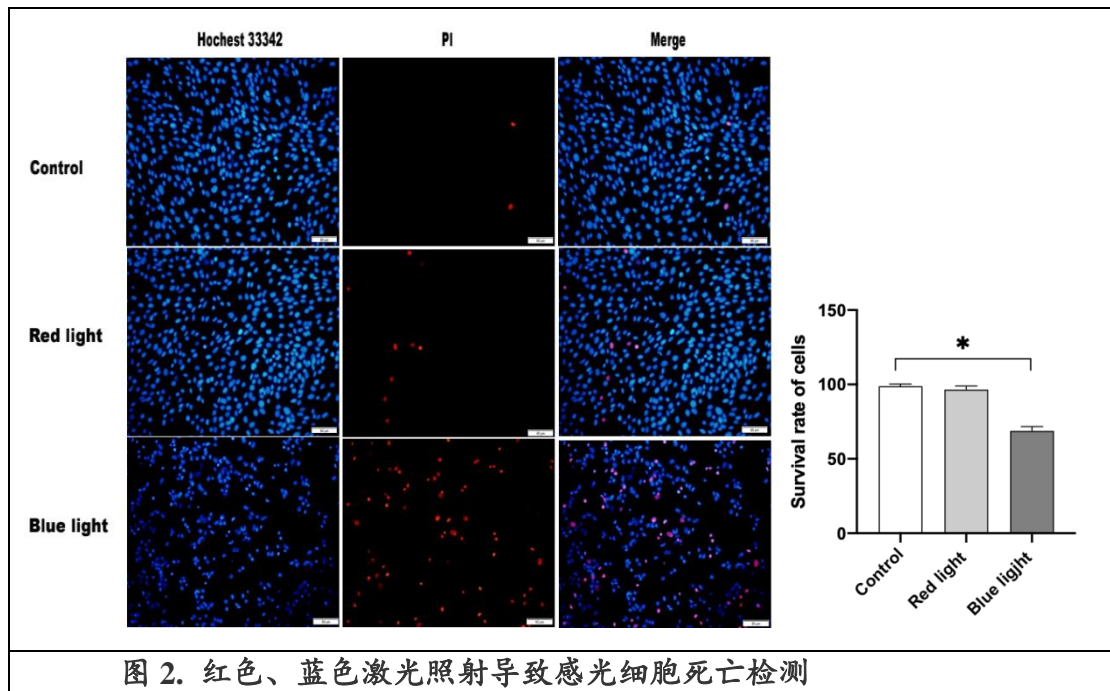


图 2. 红色、蓝色激光照射导致感光细胞死亡检测

3. 650nm 红色\450nm 蓝色激光照射对感光细胞内氧化应激水平影响

光氧化性损伤是光诱导视网膜、视细胞损伤的早期反应。发生氧化应激反应时，细胞内会产生大量的 ROS，因此通过应用 DCFH-DA 对活性氧簇染色可以评估细胞的氧化应激水平，细胞内 ROS 产量越多，DCFH-DA 绿色荧光越强。如图 3 所示，红色激光照射 48h 后，与非光照正常对照组细胞相比未见显著绿色荧光增加。而蓝色激光照射 48h 后，661W 细胞内绿色荧光强度明显增强。（平均值 ± 标准差，ns 无统计学差异，*P<0.05）

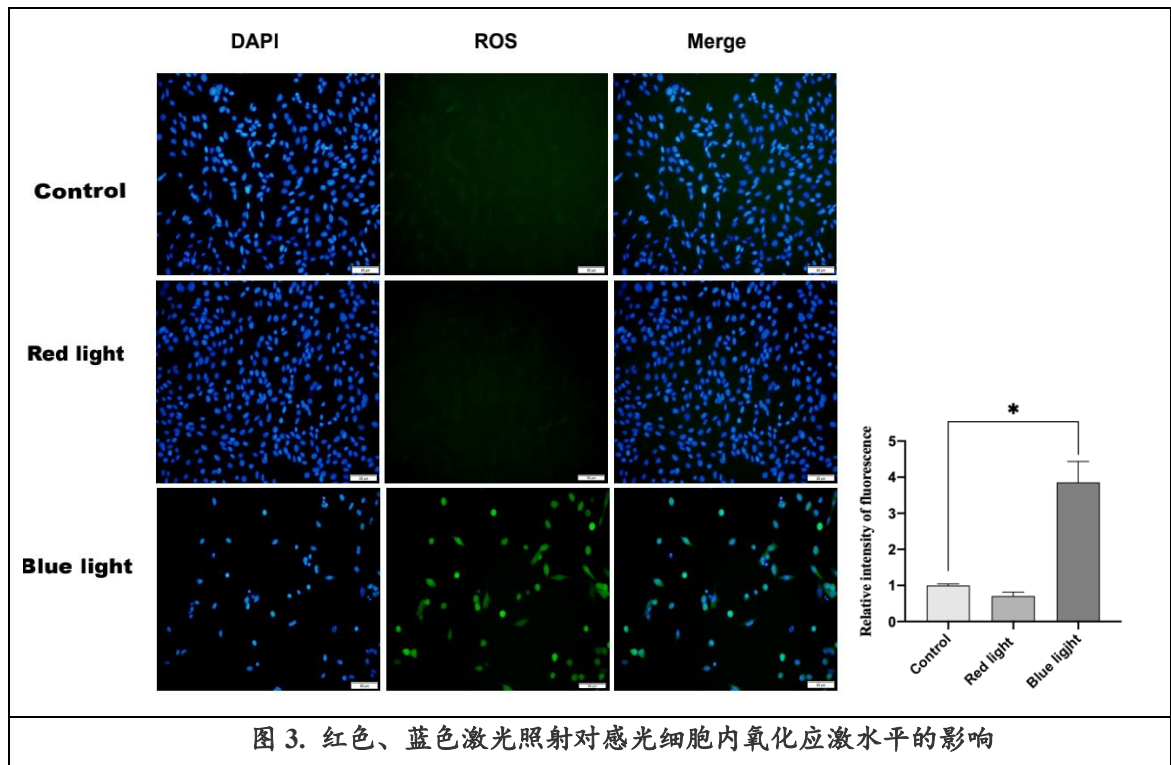


图 3. 红色、蓝色激光照射对感光细胞内氧化应激水平的影响

4. 650nm 红色\450nm 蓝色激光照射诱导感光细胞 DNA 损伤情况

8-OHdG 是细胞内 DNA 发生氧化性损伤的标志物。当细胞内出现氧化应激损伤时，会诱导鸟苷酸转化为 8-OHdG，通过检测细胞内 8-OHdG 含量可以反应出细胞内 DNA 发生氧化性损伤的情况。如图 4 所示，红色激光照射 48h 后与非光照正常对照组细胞相比，未见显著 8-OHdG 绿色荧光增加；而蓝色激光照射 48h 后，661W 细胞内 8-OHdG 绿色荧光强度明显增强。（平均值±标准差，ns 无统计学差异，* $P<0.05$ ）

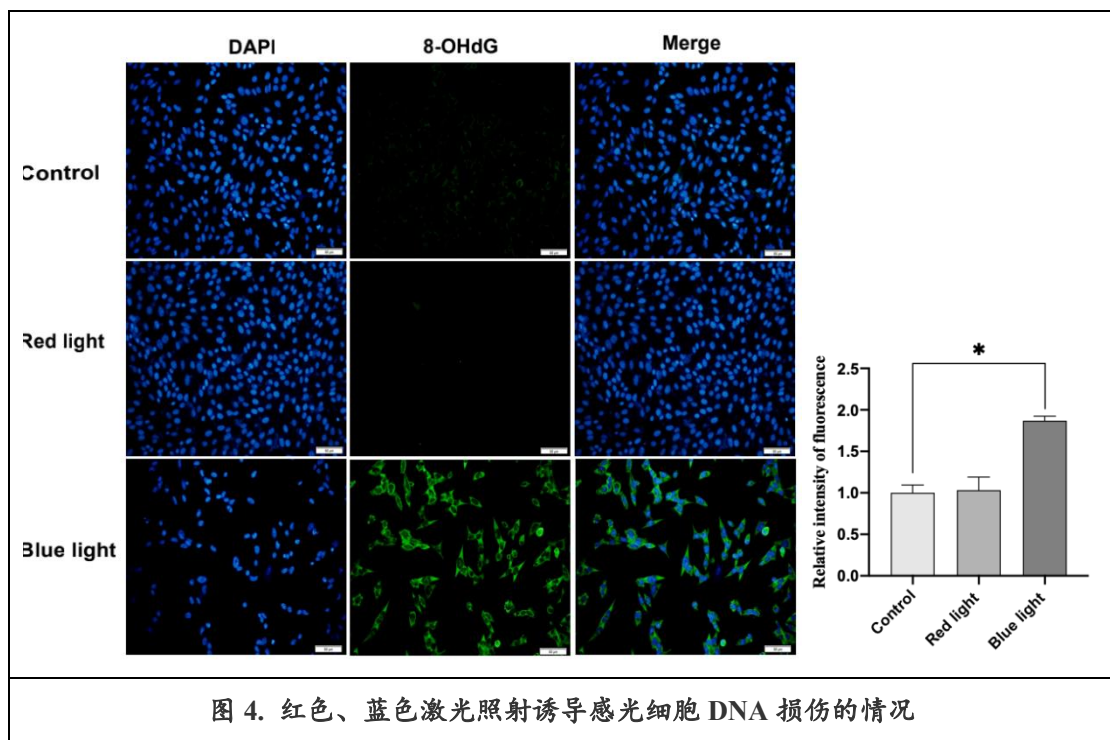


图 4. 红色、蓝色激光照射诱导感光细胞 DNA 损伤的情况

三、动物实验研究方法

1. 实验动物

C57BL/6J 小鼠存活率高且眼部结构富含色素，较白化性动物更接近于人眼视网膜结构。本研究选取 4-6 周龄生长期 C57BL/6J 小鼠为实验动物研究对象，小鼠购于吉林大学（长春）动物中心。饲养室内温度维持在 21-23℃并保持 12h 光/暗照明循环，小鼠均可自由饮水和进食。所有的动物实验都是根据“视觉和眼科研究协会”关于“在眼和视觉研究中动物实验声明”框架下执行，且得到吉林大学第二医院伦理委员会的批准。

2. 低功率间断光照处理方案与动物实验分组(2mW)

将小鼠分为 3 组：非光照正常对照组（n=15）；650nm 红色激光（发射功率 2mW,辐照度为 2.55 mW/cm²）光照组（n=15）；450nm 蓝色激光（发射功率 2mW,辐照度为 2.55 mW/cm²）光照组（n=15）。

用 1%阿托品滴眼液散瞳，吸入性异氟烷气体麻醉。非光照正常对照组（常规散瞳+麻醉）；红色激光光照组：红色激光照射 3 分钟，休息半小时，照射 3 分钟为一循环，一天照射 6 个循环共十二次，共照射 10 天（相当于“艾尔兴哺光仪”每次 3 分钟每天照射两次，2 个月的总照射剂量）。蓝色激光光照组：蓝色激光照射 3 分钟，休息半小时，照射 3 分钟为一循环，一天照射 6 个循环共十二次，共照射 10 天（与红色激光光照强度剂量相同）。

光照后，继续在动物室内正常光/暗循环环境下喂养。待实验结束后，通过腹腔注射过量戊巴比妥钠（Sigma-Aldrich, USA）对小鼠施行安乐死，摘除眼球行相应分析。

3. 低功率连续光照处理方案与动物实验分组(2mW)

将小鼠分为 3 组：非光照正常对照组（n=15）；650nm 红色激光（发射功率 2mW,辐照度为 2.55 mW/cm²）光照组（n=15）；450nm 蓝色激光（发射功率 2mW,辐照度为 2.55 mW/cm²）光照组（n=15）。

用 1%阿托品滴眼液散瞳，吸入性异氟烷气体麻醉。非光照正常对照组（常规散瞳+麻醉）；红色激光光照组：红色激光连续照射 6 小时，共照射 1 天，照射总剂量与间断照射（照射 3 分钟，休息半小时，照射 3 分钟为一循环，一天照

射 6 个循环共十二次，共照射 10 天）总剂量相同。相当于“艾尔兴哺光仪”现实应用中 2 个月的照射总剂量。蓝色激光光照组：蓝色激光连续照射 6 小时，共照射 1 天，照射总能量与间断照射（照射 3 分钟，休息半小时，照射 3 分钟为一循环，一天照射 6 个循环共十二次，共照射 10 天）总剂量相同。

光照后，继续在动物室内正常光/暗循环环境下喂养。待实验结束后，通过腹腔注射过量戊巴比妥钠（Sigma-Aldrich, USA）对小鼠施行安乐死，摘除眼球行相应分析。

4. 高功率间断光照处理方案与动物实验分组(10mW)

将小鼠分为 3 组：非光照正常对照组（n=15）； 650nm 红色激光（发射功率 10mw，辐照度为 12.7mW/cm²）光照组（ n=15）； 450nm 蓝色激光（发射功率 10mw，辐照度为 12.7mW/cm²）光照组（ n=15）。

用 1%阿托品滴眼液扩张瞳孔，吸入性异氟烷气体麻醉。非光照正常对照组（常规散瞳+麻醉）；红色激光光照组：红色激光照射 3 分钟，休息半小时，照射 3 分钟为一循环，一天照射 6 个循环共十二次，共照射 10 天（单次照射剂量显著高于“艾尔兴哺光仪”）。蓝色激光光照组：蓝色激光照射 3 分钟，休息半小时，照射 3 分钟为一循环，一天照射 6 个循环共十二次，共照射 10 天（与红色激光光照强度剂量相同）。

光照后，继续在动物室内正常光/暗循环环境下喂养。待实验结束后，通过腹腔注射过量戊巴比妥钠（Sigma-Aldrich, USA）对小鼠施行安乐死，摘除眼球行相应分析。

5. 高功率连续光照处理方案与动物实验分组（10mW）

将小鼠分为 3 组：非光照正常对照组（n=15）； 650nm 红色激光（发射功率 10mw，辐照度为 12.7mW/cm²）光照组（ n=15）； 450nm 蓝色激光（发射功率 10mw，辐照度为 12.7mW/cm²）光照组（ n=15）。

用 1%阿托品滴眼液扩张瞳孔，吸入性异氟烷气体麻醉。非光照正常对照组（常规散瞳+麻醉）；红色激光光照组：红色激光连续照射 6 小时，共照射 1 天，照射总剂量与间断照射（照射 3 分钟，休息半小时，照射 3 分钟为一循环，一天照射 6 个循环共十二次，共照射 10 天）总剂量相同，光照功率显著高于“艾尔兴哺光仪”的照射功率。蓝色激光光照组：蓝色激光连续照射 6 小时，共照射 1 天，

照射总剂量与间断照射（照射3分钟，休息半小时，照射3分钟为一循环，一天照射6个循环共十二次，共照射10天）总剂量相同。

6. 视网膜组织蛋白样本提取、蛋白浓度测定及 Western Blot 检测

6.1 视网膜组织蛋白样本提取

取出小鼠眼球后浸入生理盐水中，沿角巩膜缘分离角膜，去除虹膜、晶状体、玻璃体，完整分离出视网膜。将视网膜组织转移至含有80 μ l RIPA蛋白裂解液的1.5ml EP管中，超声粉碎3-4次，每次1-2秒，于冰上裂解30分钟。13300rpm离心5分钟后吸取并保留上清液，即为蛋白样品。取5 μ l蛋白样品用于浓度测定，余样品加入四分之一体积的5 \times 蛋白上样缓冲液，100 $^{\circ}$ C恒温金属浴中振荡10分钟，-20 $^{\circ}$ C保存备用。

6.2 蛋白浓度测定

使用BCA蛋白浓度试剂盒测定蛋白浓度。按照使用说明书，根据样本数量按比例混匀一定体积的工作液（A液：B液=50：1）。96孔板每孔中加入200 μ l的工作液和5 μ l的样品或者标准品。将标准品进行梯度稀释用于绘制标准曲线。每个样品重复两次，将孔板放置于酶标仪中振荡10秒混匀，37 $^{\circ}$ C孵育30分钟，测定594nm处的吸光度。最后根据绘制好的标准曲线，计算样品蛋白浓度。

6.3 Western Blot 检测

根据目的蛋白分子量，按照SDS-PAGE凝胶配制试剂盒的使用说明配置相应浓度的SDS凝胶，每个样品上样量为总蛋白10 μ g，蛋白Marker的上样体积为5 μ l。上样完成后，80V恒压电泳用以分离蛋白质。待样品全部跑至分离胶时，将电压调至120V，继续120V恒压电泳至目的蛋白得到充分的分离。取出凝胶，泡至预冷的转膜液中备用。裁剪出适当大小的PVDF膜并用甲醇活化。将凝胶、PVDF膜、滤纸与海绵排列整齐置于转膜夹中，接下来80V恒压电转1小时。取出PVDF膜，封闭液室温封闭1小时以上。TBST洗膜2次，每次2分钟；4 $^{\circ}$ C过夜孵育一抗工作液（采用TBST稀释，一抗稀释浓度分别为： β -actin 1:10000，Rhodopsin 1:1000）；TBST洗膜3次，每次5分钟。加入HRP标记的相应二抗工作液（采用封闭液稀释，稀释浓度均为1:8000），于摇床上室温孵育1h。TBST

洗膜 3 次，每次 5 分钟。最后加入适量 ECL 发光液于显影仪中捕获图像。应用 ImageJ 软件计算蛋白条带灰度值分析比较蛋白表达情况。

7. 小鼠视网膜取材与冰冻切片制备

(1) 采用腹腔注射戊巴比妥钠的方式麻醉小鼠，用带线外科缝针（宁波医用针有限公司，中国宁波）在每只眼睛 12 点位进行标记后。采用腹腔注射过量戊巴比妥钠的方式对不同分组小鼠施行安乐死，摘除眼球。

(2) 摘取的眼球，经 PBS 冲洗后，在显微镜下剪除眼球周围结缔组织。

(3) 先在包埋盒中放入部分 OCT 胶，将修剪后的眼球放入 OCT 胶中，缝线位置放到右侧，再放入 OCT 胶将包埋盒填满，将包埋块放入温度降至 -20°C 的冰冻切片机中。

(4) 将立方块安置在底座于样品头上，缝线位置放到右侧，在 -20°C 下进行冰冻切片。

(5) 用粘附载玻片的粘附面迅速、平整地粘贴切片，维持组织结构完整性。制备好的切片在 -20°C 冰箱中保存备用。

8. 视网膜冰冻切片免疫荧光染色

(1) 冰冻切片取出后置于加过水的免疫组化湿盒中，室温复温，在载玻片上滴加 4% 多聚甲醛，室温固定 15 分钟。

(2) 摇床上 PBS 洗 3 次，每次 5 分钟。洗去组织周围多余的 OCT 胶。

(3) 待切片接近自然风干时，用免疫组化笔在组织周围画圈以圈出整个组织。在圈中滴加封闭液，室温封闭 1 小时。注意所加液体不可太多以致溢出圆圈范围。

(4) 用 PBS 轻轻冲洗切片，待切片接近自然风干时，在圈中滴加使用 PBS 配制的一抗工作液，在 4°C 冰箱中过夜孵育（一抗稀释浓度为：Rhodopsin 1:200）。

(5) 摇床上 PBS 洗 3 次，每次 5 分钟。

(6) 加入使用 PBS 配制的荧光二抗工作液，室温孵育 1 小时（二抗稀释浓度为：Dylight 488 1:400）。

(7) 待切片接近自然风干时，在组织上滴加抗荧光衰减封片剂，加盖盖玻片，在盖玻片边缘涂抹指甲油用于固定盖玻片。切片可放在 -20°C 冰箱中保存。

(8) 置于荧光显微镜下观察拍照。

9. 视网膜组织切片 HE 染色分析

采用腹腔注射过量戊巴比妥钠的方式对不同分组小鼠施行安乐死，用带线外科缝针（宁波医用针有限公司，中国宁波）在每只眼睛 12 点位进行标记后，摘除眼球。将眼球置于 FAS 眼球固定液常温固定 24 小时。弃掉 FAS 眼球固定液后，用 PBS 漂洗 2 遍。将眼球进行程序性脱水：65%乙醇 15 分钟，70%乙醇 15 分钟，80%乙醇 15 分钟，90%乙醇 15 分钟，95%乙醇 15 分钟，100%乙醇 15 分钟，100%乙醇 1 个小时，二甲苯 I 30 分钟，二甲苯 II 30 分钟，石蜡 I 45 分钟，石蜡 II 45 分钟，石蜡 III 45 分钟。脱水结束后，将眼球置于包埋模具中，缝线位置为 12 点钟，根据左右眼，包埋冷却。包埋完成后置于切片机切片，于视神经处切片保留，每张 3 μ m，连续切 6 张，HE 染色观察。显微镜下观察拍照，使用 Image J 软件测量外核层厚度。

10. 小鼠视网膜透射电镜观察

将小鼠眼球去除前部角膜、晶状体及玻璃体，制成“眼杯”，于 2.5%戊二醛固定液中 4℃过夜；PBS 缓冲液 4℃漂洗 4 小时以上，换 5 次漂洗液，1%锇酸固定 2 小时，漂洗 5 分钟；50%、70%、80%、90%乙醇系列脱水，各 10 分钟，90%丙酮 10 分钟，用干燥剂处理过的纯丙酮处理 3 次，每次 10 分钟；按浓度梯度包埋浸透，丙酮：环氧树脂包埋剂=1:1 浸透 1 小时，丙酮：环氧树脂包埋剂=1:3 浸透 3 小时，纯包埋剂浸透 1 小时，最后用新配制的纯包埋剂于胶囊内包埋标本；于烤箱中 35℃过夜，65℃24 小时；用超薄切片机切片，醋酸铀饱和水溶液染后再用枸橼酸铅染色，透射电镜观察拍照。

11. 统计学分析

本节研究中涉及的实验至少重复 3 次，实验结果为均数 \pm 标准差，应用单因素方差分析法进行统计学分析，* P <0.05 认为具有统计学意义。

四、低功率间断重复性照射动物实验研究结果(2mW)

1. 650nm 红色\450nm 蓝色激光间断照射对小鼠视网膜组织结构的影响

经功率 2mW 红、蓝色激光间断重复光照射处理后，取出小鼠眼球并行石蜡切片 HE 染色，通过软件测量视网膜厚度。如图 5 所示，与非光照对照组视网膜组织结构相比较，650nm 红色激光及 450nm 蓝色激光间断照射均未导致视网膜各层厚度显著变薄，以及外核层结构紊乱（结果显示为平均值±标准差）。

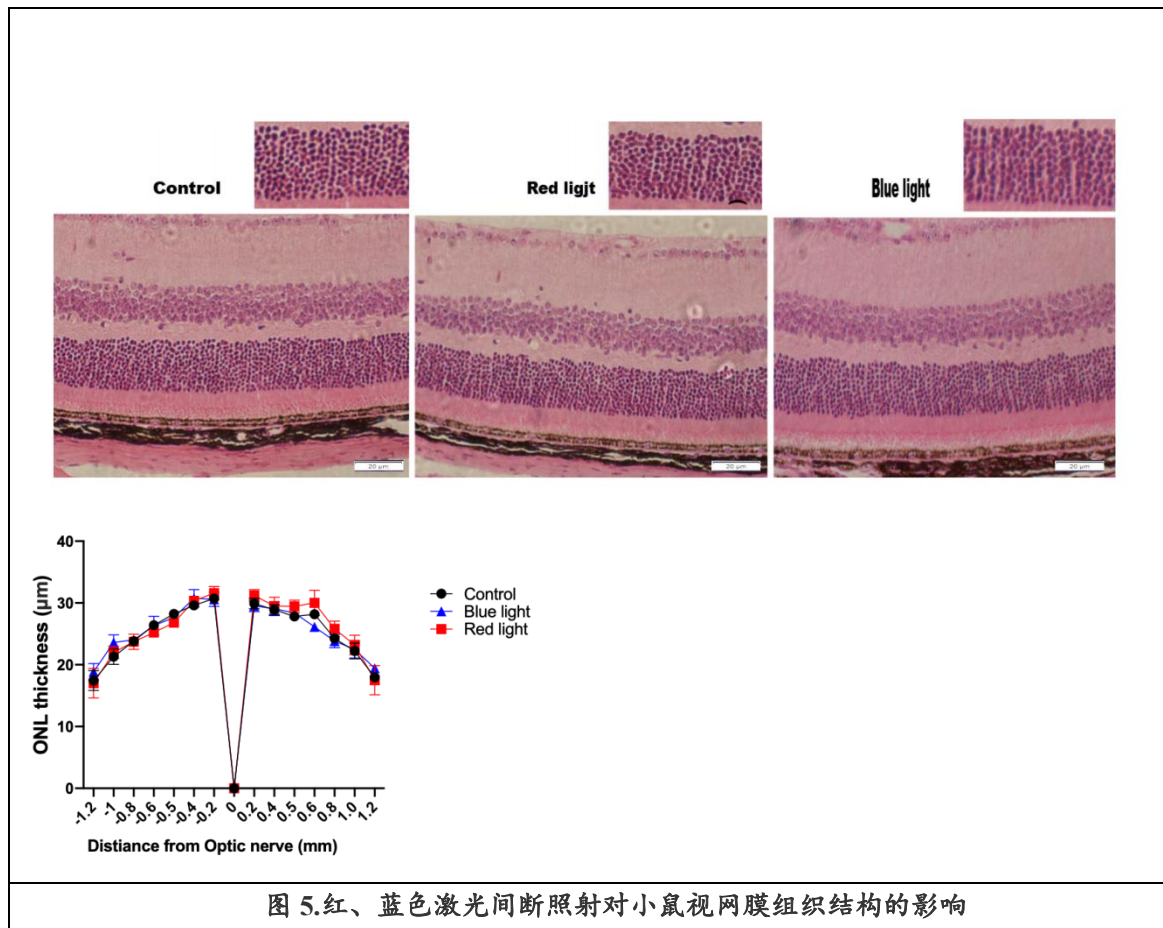


图 5.红、蓝色激光间断照射对小鼠视网膜组织结构的影响

2. 650nm 红色\450nm 蓝色激光间断照射对小鼠视网膜组织超微结构影响

经功率 2mW 红、蓝色激光间断重复光照射处理后，将小鼠视网膜组织取出行电镜分析，如图 6 所示，与非光照正常对照组相比，红色激光照射及蓝色激光

照射均未导致视网膜光感受器超微结构出现显著变化；

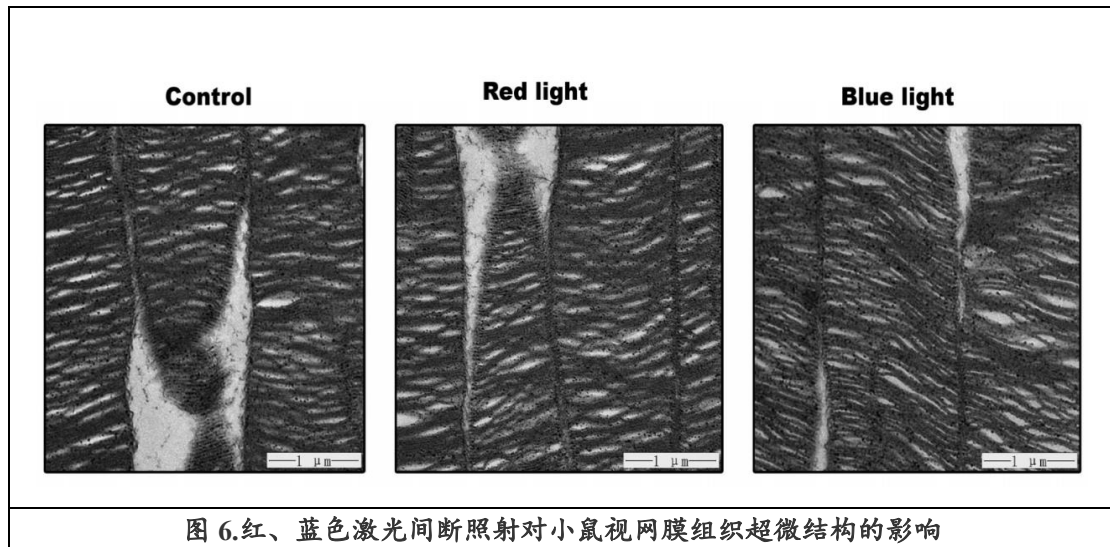


图 6.红、蓝色激光间断照射对小鼠视网膜组织超微结构的影响

3. 650nm 红色\450n 蓝色激光间断照射对小鼠视细胞 Rhodopsin 表达影响

Rhodopsin 是视杆细胞中表达的视蛋白，其常作为蛋白标志物反应视网膜视细胞损伤程度，rhodopsin 含量的下降标志视杆细胞的损伤或数量的减少。如图 7 所示，与非光照正常对照组相比，视网膜冰冻切片 rhodopsin 染色与 Western Blot 分析显示功率 2mW 红、蓝色激光间断光照均未导致视网膜光感受器中 rhodopsin 含量的减少。

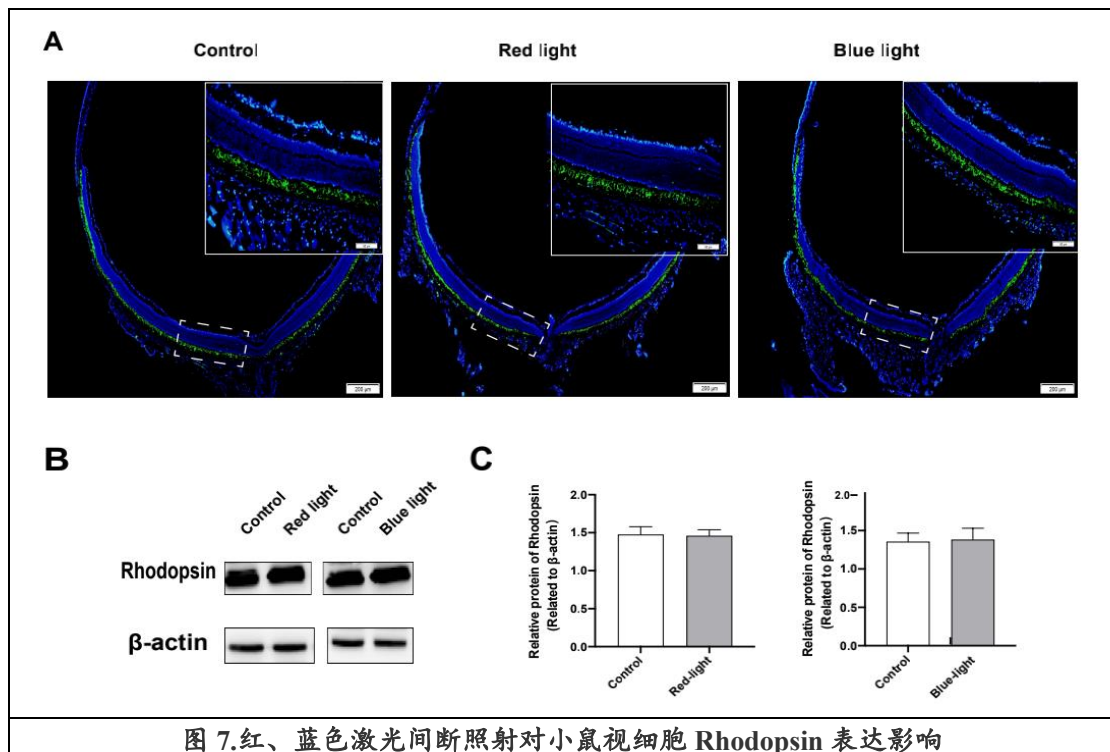
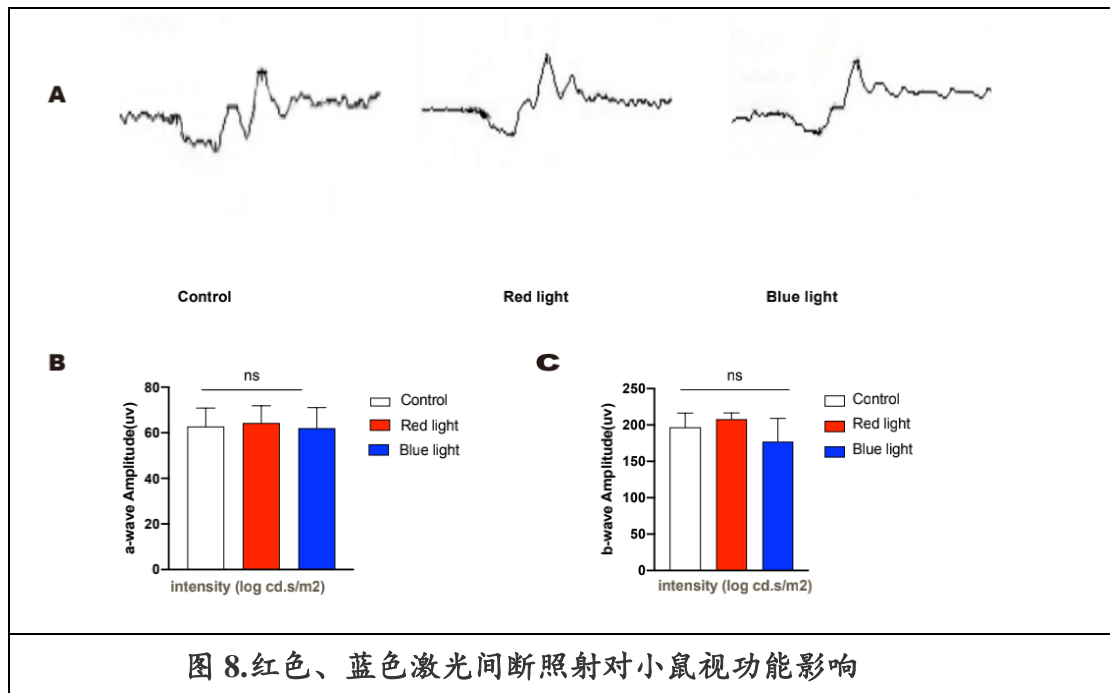


图 7.红、蓝色激光间断照射对小鼠视细胞 Rhodopsin 表达影响

4. 650nm 红色\450n 蓝色激光间断照射对小鼠视网膜功能影响

经红、蓝激光间断重复照射后将小鼠行视觉电生理 ERG 分析。如图 8 所示，与非光照正常对照组相比，红色激光间断重复照射未导致 ERG 各波幅降低，蓝色激光间断重复照射后 ERG 中 b 波幅值略显降低，但未具有显著统计意义。



五、低功率连续照射动物实验研究结果(2mW)

1. 650nm 红色\450nm 蓝色激光连续照射对小鼠视网膜组织结构影响

经功率 2mW 红、蓝激光连续照射处理后，取出小鼠眼球并行石蜡切片 HE 染色，通过软件测量视网膜厚度。如图 9 所示，650nm 红色激光连续照射未导致视网膜厚度变薄，外核层紊乱；而 450nm 蓝色激光连续照射后视网膜厚度显著变薄，外核层细胞排列结构紊乱（结果显示为平均值±标准差）。

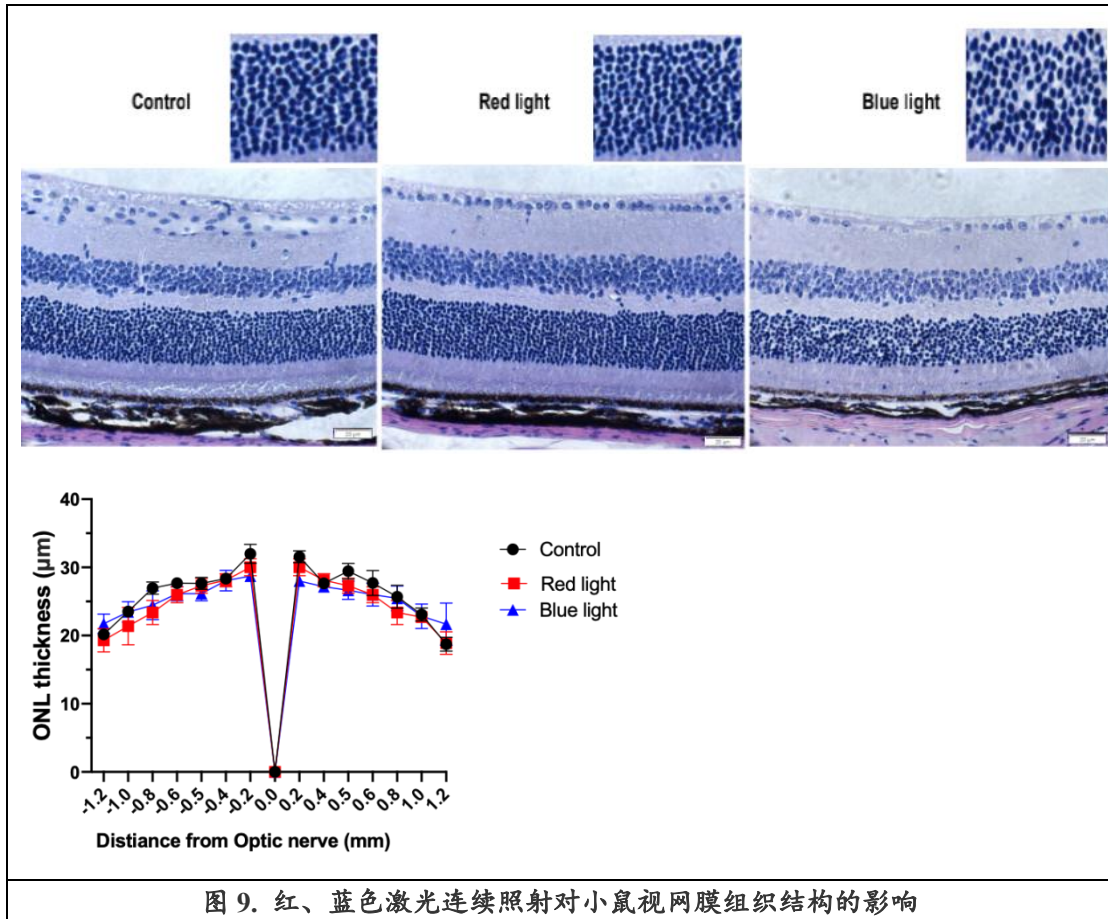
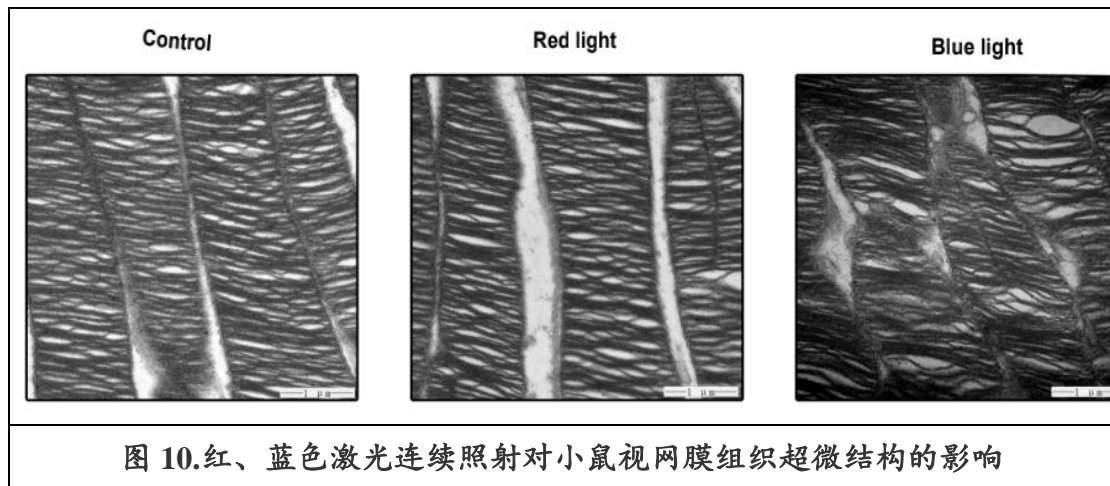


图 9. 红、蓝色激光连续照射对小鼠视网膜组织结构的影响

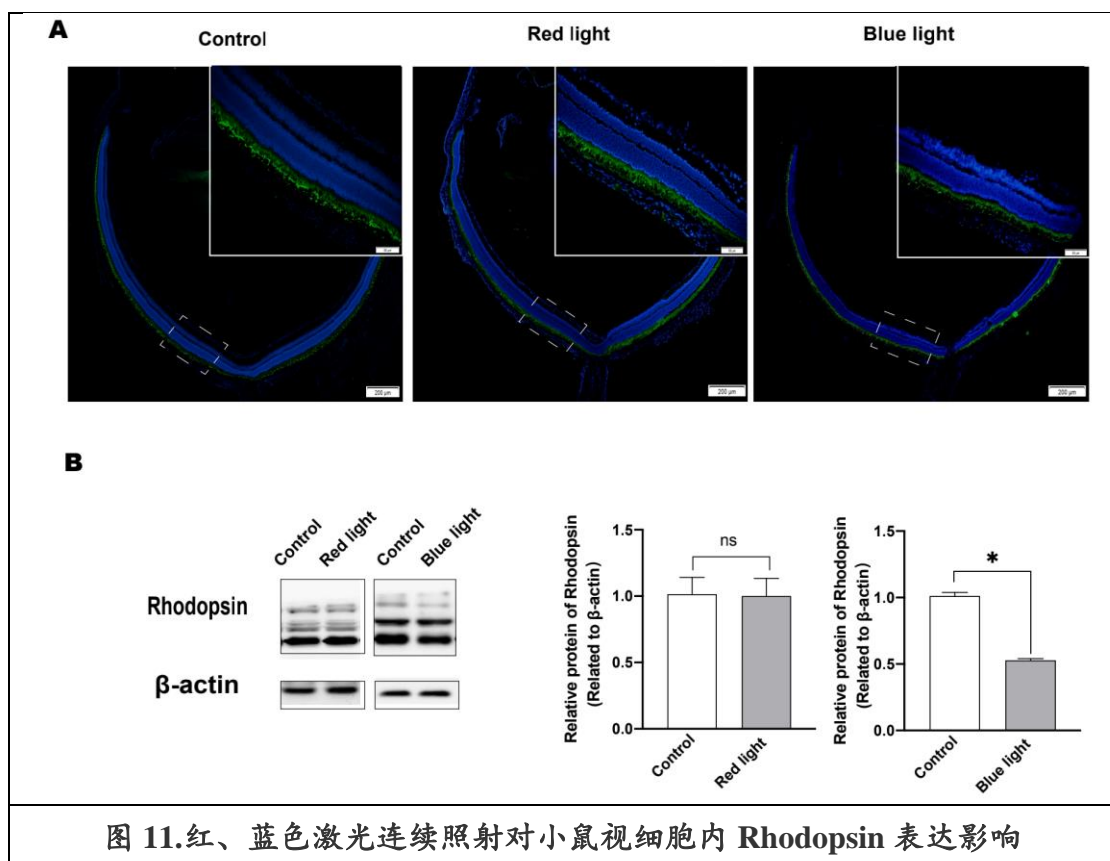
2. 650nm 红色\450n 蓝色激光连续照射对小鼠视网膜组织超微结构影响

将红光蓝光（功率 2mW）连续照射后小鼠视网膜组织取出行电镜分析。如图 10 所示，与非光照正常对照组相比，红色激光连续光照射未导致视网膜光感受器超微结构出现显著变化，视细胞外节盘膜排列规则工整；而蓝色激光连续光照射造成视网膜光感受器超微结构出现显著变化，视细胞外节盘膜排列紊乱，断裂。



3. 650nm 红色\450nm 蓝色激光连续照射对小鼠视细胞 Rhodopsin 影响

如图 11.A 所示，与非光照正常对照组相比，视网膜冰冻切片 rhodopsin 染色显示红色激光连续照射未导致视网膜光感受器中 rhodopsin 含量的显著减少；此外，Western blot 检测亦未发现视网膜光感受器中 rhodopsin 含量的减少。而蓝色激光连续光照射可以导致视网膜光感受器中 rhodopsin 含量的显著减少；此外，Western blot 检测亦发现视网膜光感受器中 rhodopsin 含量的显著减少(图 11.B)。



4. 650nm 红色\450nm 蓝色激光连续照射对小鼠视网膜功能影响

经 2mW 红、蓝激光连续照射后将小鼠行视觉电生理 ERG 检测分析。如图 12 所示,与非光照正常对照组相比,红色激光连续照射未导致视网膜功能改变;而蓝色激光连续照射导致 ERG 中 b 波幅值显著下降,提示蓝色激光连续照射可以造成视网膜功能降低。

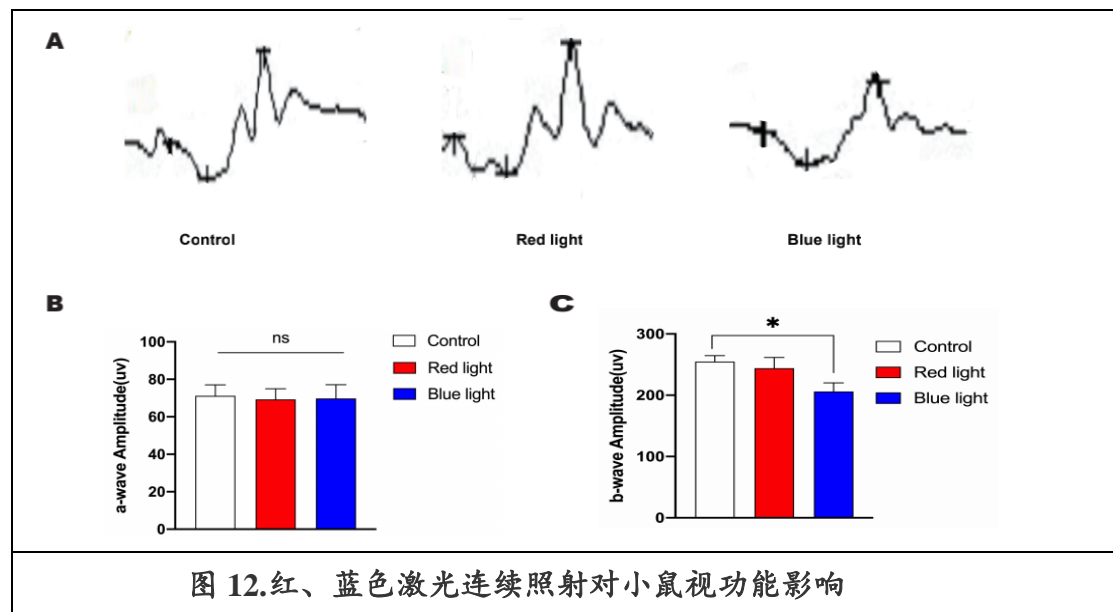


图 12.红、蓝色激光连续照射对小鼠视功能影响

六、高功率间断照射动物实验结果 (10mw)

1. 650nm 红色\450nm 蓝色激光间断照射对小鼠视网膜组织结构影响

经 10mW 红光、蓝光间断照射处理后,取出小鼠眼球并行石蜡切片 HE 染色,通过软件测量视网膜厚度。如图 13 所示,光镜下 10mW 650nm 红色激光及 450nm 蓝色激光间断照射均未导致视网膜结构显著变化,视网膜厚度均未发现显著变薄(结果显示为平均值±标准差)。

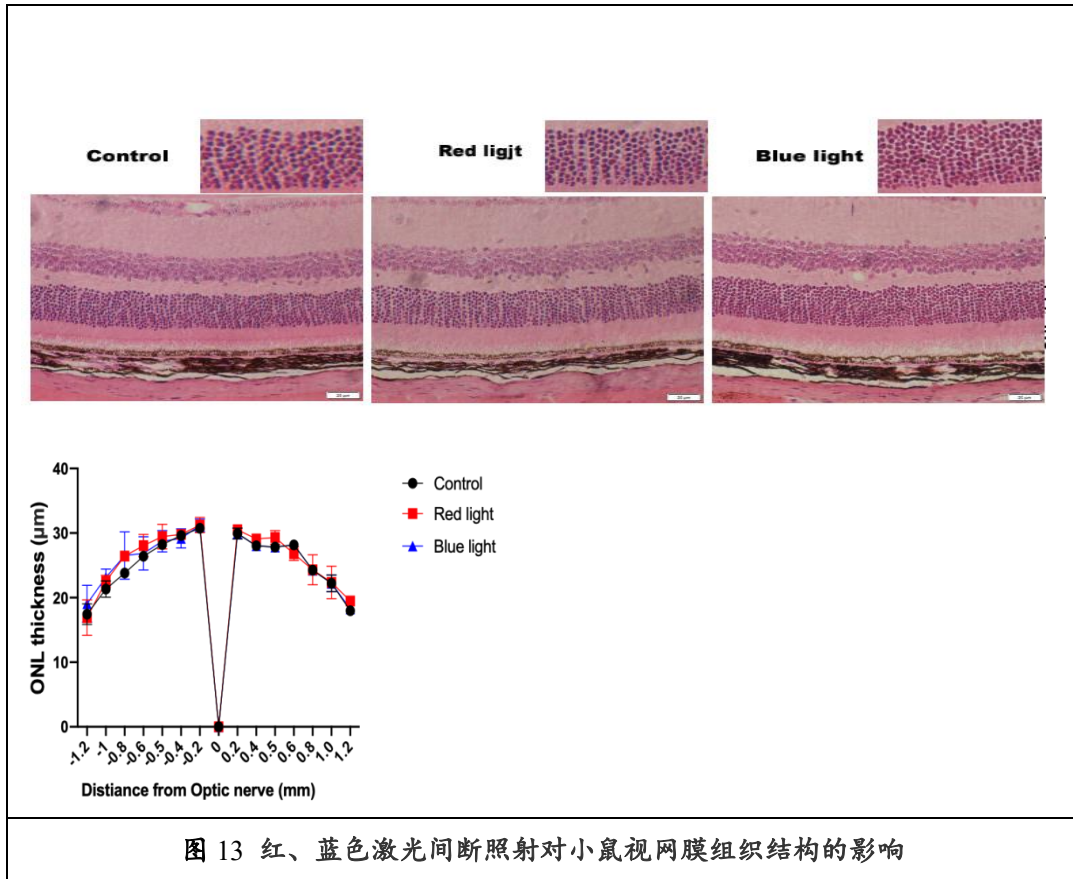


图 13 红、蓝色激光间断照射对小鼠视网膜组织结构的影响

2. 650nm 红色\450nm 蓝色激光间断照射对小鼠视网膜组织超微结构的影响

经 10mW 红、蓝激光间断照射处理后，将小鼠视网膜组织取出行电镜分析。如图 14 所示，与非光照正常对照组相比，10mW 650nm 红色激光间断照射未导致视网膜光感受器超微结构出现显著变化，视细胞外节盘膜排列规则工整；而 10mW 450nm 蓝色激光间断照射却造成了视网膜光感受器超微结构出现显著变化，视细胞外节盘膜出现排列紊乱与断裂。

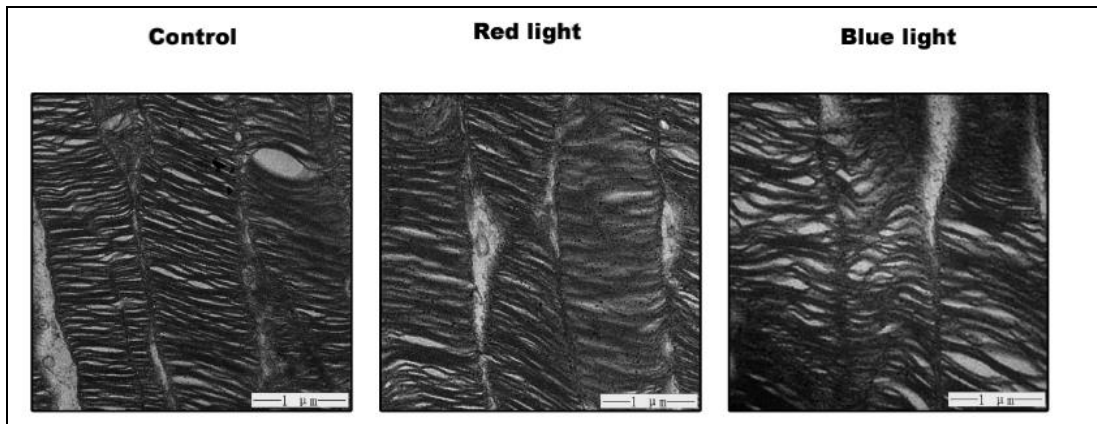


图 14.红、蓝色激光间断照射对小鼠视网膜组织超微结构的影响

3. 650nm 红色\450nm 蓝色激光间断照射对小鼠视细胞 Rhodopsin 影响

经 10mW 红、蓝激光间断照射处理后，应用免疫荧光与 Western blot 检测小鼠视网膜中 rhodopsin 表达情况。如图 15A 所示，与非光照正常对照组相比，视网膜冰冻切片 rhodopsin 免疫荧光染色显示 10mW 红、蓝激光间断照射均未导致视网膜光感受器中 rhodopsin 含量的减少。此外，Western blot 检测亦未发现视网膜光感受器中 rhodopsin 含量的减少。

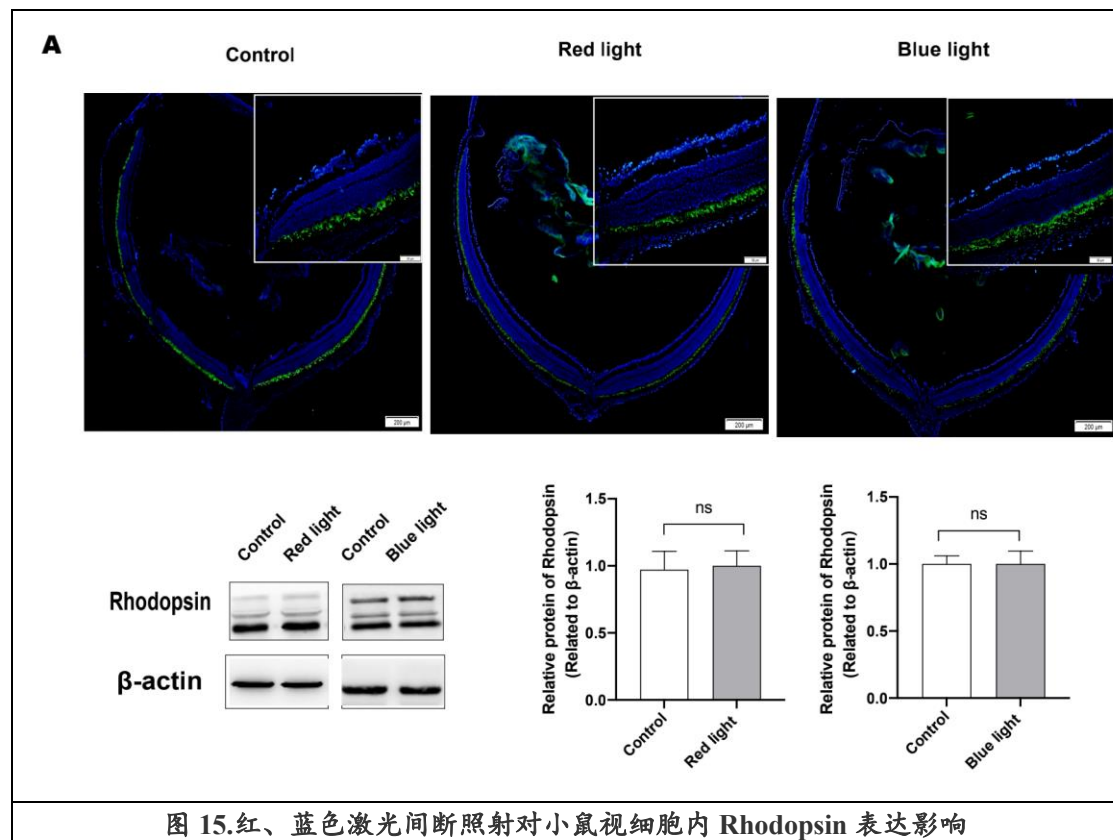
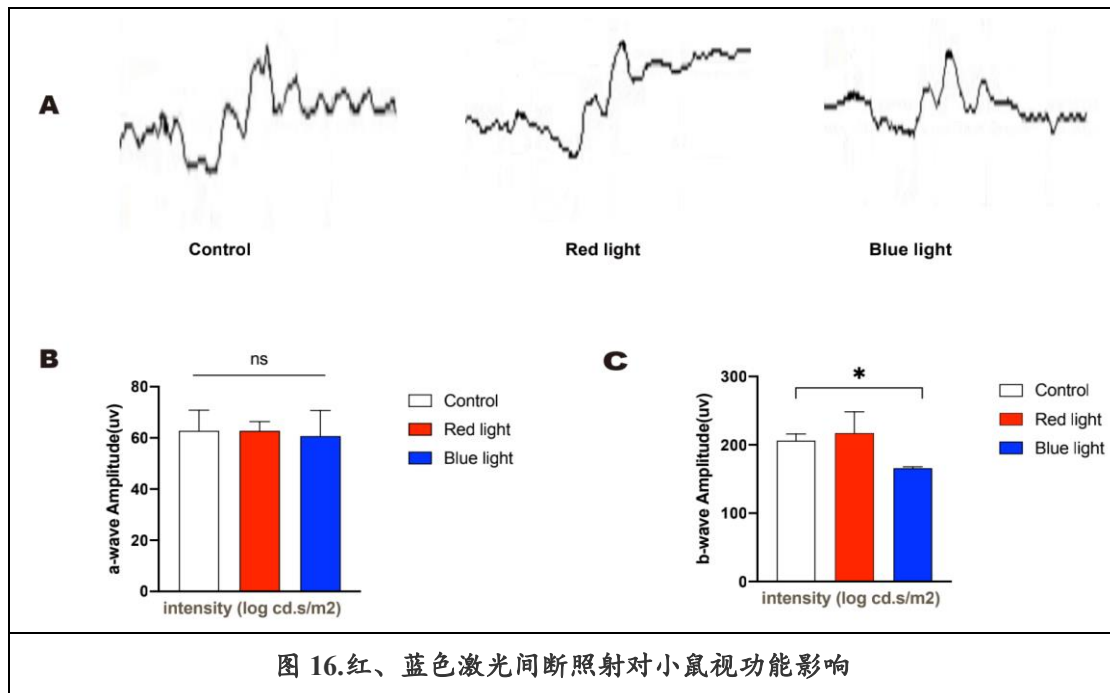


图 15.红、蓝色激光间断照射对小鼠视细胞内 Rhodopsin 表达影响

4. 650nm 红色\450nm 蓝色激光间断照射对小鼠视网膜功能影响

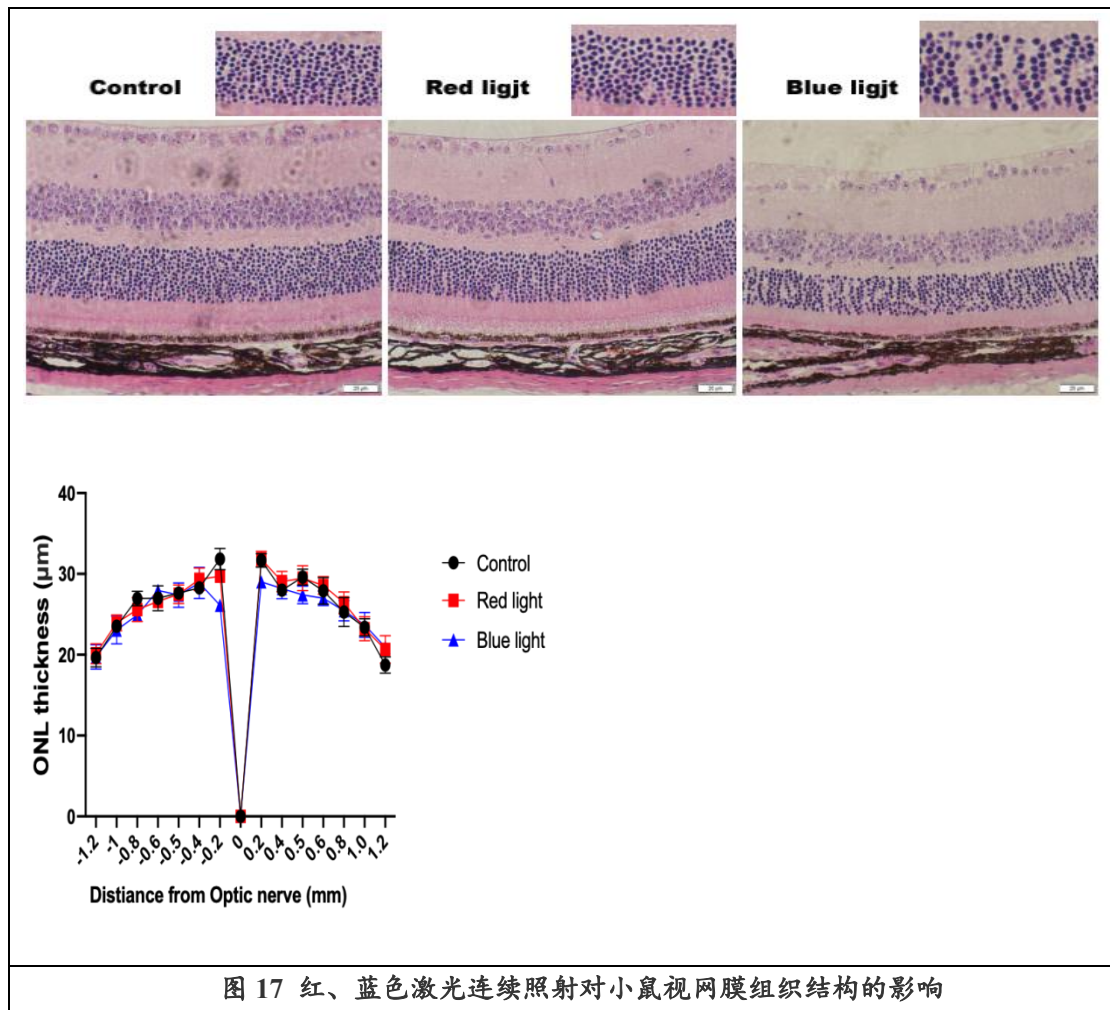
经 10mW 红、蓝激光间断照射处理后将小鼠行视觉电生理 ERG 检测分析。如图 16 所示，与正常对照组相比，10mW 红色激光间断照射未导致小鼠视网膜电图的显著改变，而 10mW 红色激光间断照射却造成小鼠视网膜电图 b 波幅值显著降低，提示视网膜功能下降。



七、高功率连续照射动物实验结果 (10mw)

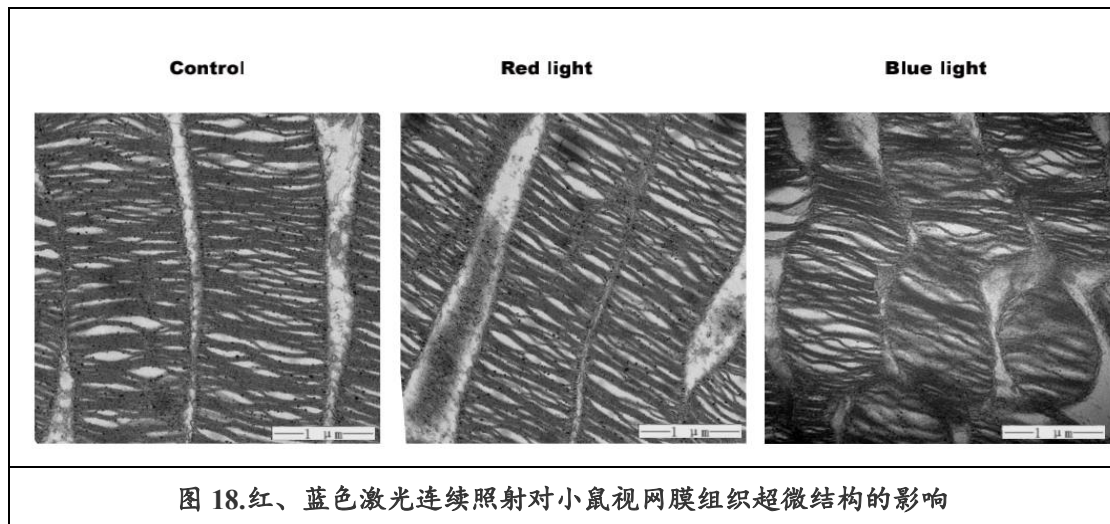
1. 650nm 红色\450nm 蓝色激光连续照射对小鼠视网膜组织结构的影响

经 10mW 红、蓝激光连续照射处理后，取出小鼠眼球并行石蜡切片 HE 染色，通过软件测量视网膜厚度。如图 17 所示，10mW 650nm 红色激光照射未导致视网膜厚度变薄，外核层紊乱；而 10mW 450nm 蓝色激光连续照射后视网膜厚度出现显著变薄，外核层细胞排列结构紊乱（结果显示为平均值±标准差）。



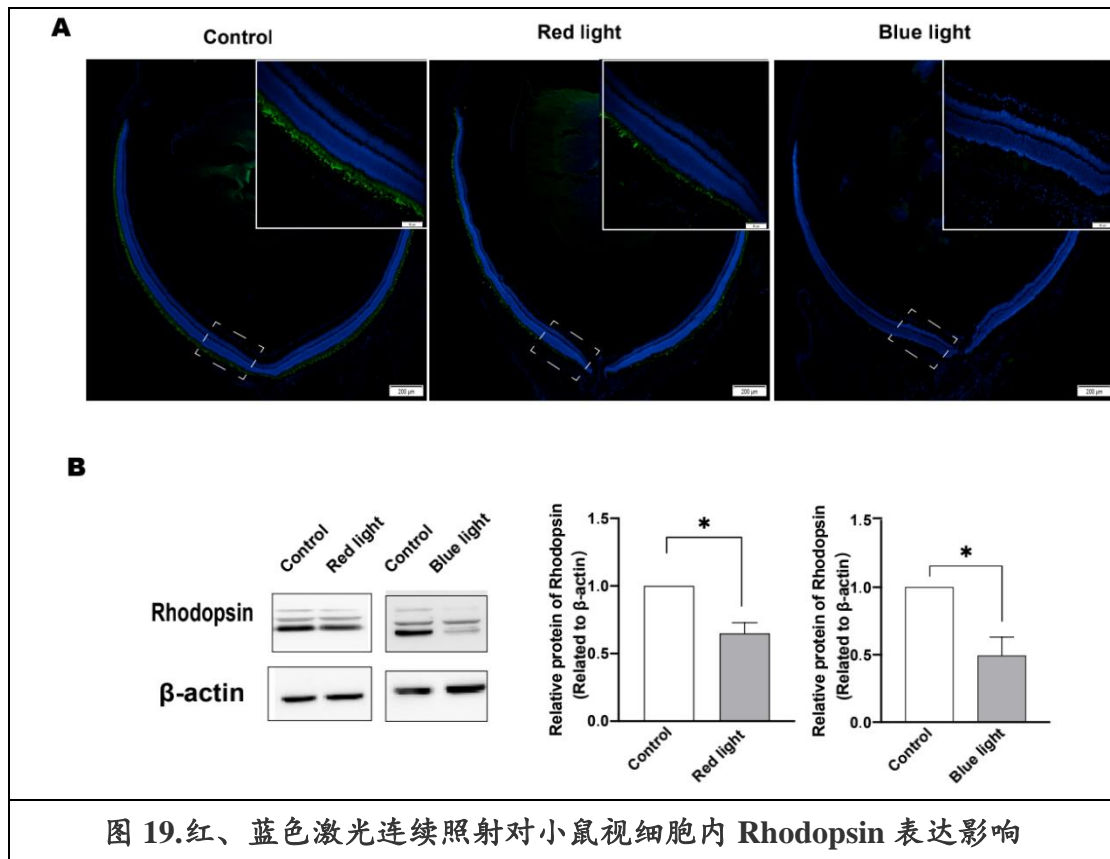
2. 650nm 红色\450nm 蓝色激光连续照射对小鼠视网膜组织超微结构的影响

经 10mW 红、蓝激光连续照射处理后，将小鼠视网膜组织取出行电镜分析。如图 18 所示，与非光照正常对照组相比，10mW 红色激光连续照射未导致视网膜光感受器超微结构出现显著变化，视细胞外节盘膜排列规则工整；而 10mW 蓝色激光连续光照射可以显著导致视网膜光感受器超微结构变化，表现为视细胞外节盘膜排列紊乱，断裂。



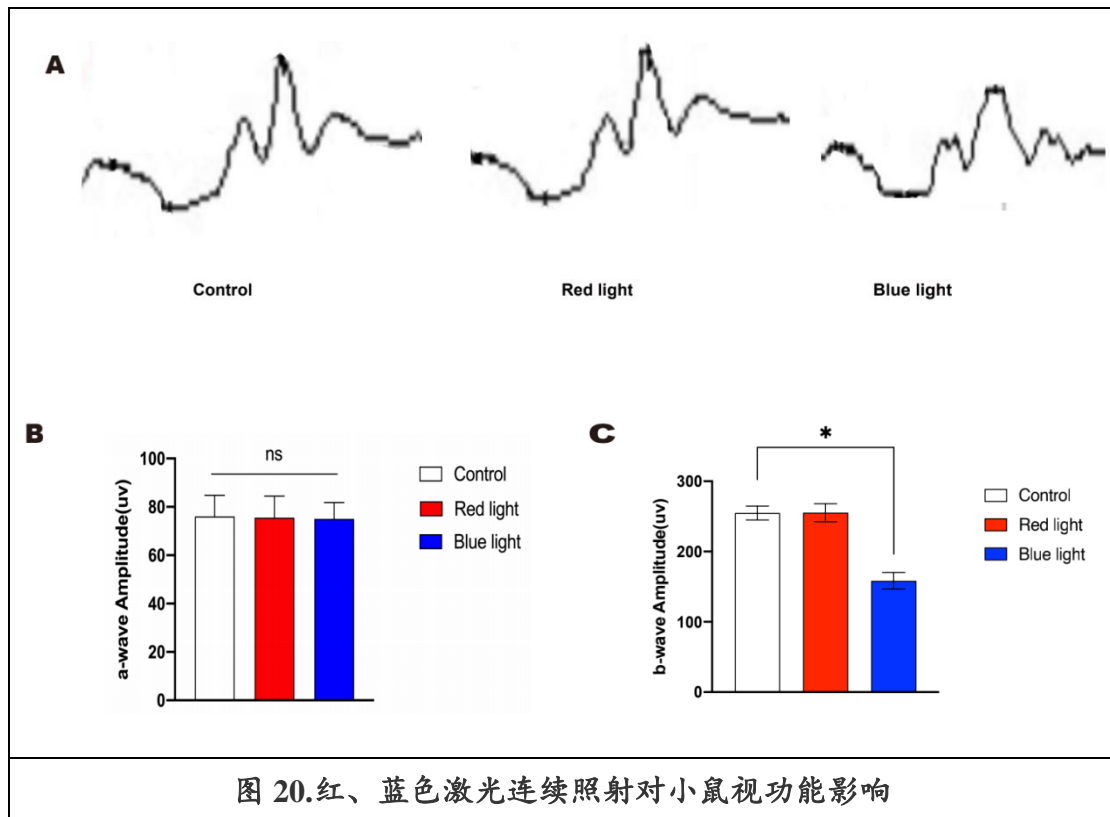
3. 650nm 红色\450nm 蓝色激光连续照射对小鼠视细胞 Rhodopsin 影响

经 10mW 红、蓝激光连续照射处理后，应用免疫荧光与 Western blot 检测小鼠视网膜中 rhodopsin 表达情况。如图 19A 所示，与非光照正常对照组相比，视网膜冰冻切片 rhodopsin 免疫荧光染色显示 10mW 红、蓝色激光连续照射均可导致视网膜光感受器中 rhodopsin 含量的显著减少；此外，Western blot 检测亦发现 10mW 红、蓝色激光连续照射后视网膜中 rhodopsin 含量显著下降（图 19.B）。



4. 650nm 红色\450nm 蓝色激光连续照射对小鼠视网膜功能影响

经 10mW 红、蓝激光连续照射处理后,将小鼠行视觉电生理 ERG 检测分析。如图 20 所示,与正常对照组相比,10mW 红色激光连续照射未导致小鼠视网膜电图的显著改变,而 10mW 蓝色激光连续照射却造成小鼠视网膜电图 b 波幅值显著降低。



八、实验结果总结与课题研究结论

本课题通过应用 650nm 红色激光与 450nm 蓝色激光对照研究，深入探讨了低功率光照与高功率光照对视网膜损伤的情况，同时也分析了短时间间断重复照射与长时间连续照射的不同照射方式对视网膜影响的差异。现将课题实验结果总结如下：

- 1、发射功率约为 2mW（辐照度为 2.55mW/cm²）450nm 蓝色激光照射可以显著诱导视细胞光氧化性损伤，导致细胞死亡率显著上升，而相同功率 650nm 红色激光照射却未见显著的视细胞损伤。
- 2、间断性重复性低功率（2mW）650nm 红色激光与 450nm 蓝色激光照射均未诱导出小鼠视网膜显著损伤。

3、连续性低功率（2mW）650nm 红色激光照射未诱导出小鼠视网膜显著损伤，而低功率 450nm 蓝光连续性照射可以造成小鼠视网膜显著损伤。

4、间断性重复性高功率（10mW）650nm 红色激光照射未诱导出小鼠视网膜显著损伤，而间断性重复性高功率 450nm 蓝色激光照射可以显著造成小鼠视网膜损伤。

5、连续性高功率（10mW）照射，650nm 红色激光与 450nm 蓝色激光均可诱导出小鼠视网膜损伤，但 450nm 蓝色激光连续照射造成视网膜损伤更显著。

据此，通过对课题实验结果分析，现可以得出如下研究结论：

1. 不同波长光照对视网膜影响具有差异性，在相同照射方式与照射剂量下短波长蓝光较长波长红光对视网膜损伤严重。

2. 单次光照对视网膜损伤具有能量依赖性，随着光照功率的增加对视网膜所造成的损伤逐渐加重。

3. 单次光照对视网膜损伤具有时间依赖性，随着单次光照时长的增加对视网膜所造成的损伤逐渐显著；在总照射时长相同情况下，间断重复性照射较连续性照射安全。

九、研究讨论

目前在国外多个科研团队应用红光针对眼科不同疾病进行治疗研究工作，并提出了“光生物调节治疗”的方案及概念。如澳大利亚国立大学 Riccardo Natoli 教授研究发现 670nm 红光可以显著治疗早产儿视网膜病变，降低视网膜新生血管形成与牵拉性视网膜脱离[1]；美国克利夫兰医学院 Johnny Tang 教授发现近红外光可以有效改善糖尿病性视网膜病变视网膜渗出形成，并推荐为可以成为性价比很高的治疗方案[2]；英国牛津大学 Neville Osborne 团队得出与我们研究相似的

结果，他们发现在体外实验中红光具有保护性，可以帮助视网膜神经细胞抵御对多种刺激损伤[3]。近来，有关应用红光防控近视进展的研究报导越来越多，如美国休斯顿大学视光研究院 Earl Smith 教授研究发现窄带红光刺激可以导致幼年猴子眼轴生长缩短，出现远视变化趋势[4]。何明光教授团队应用 650nm 半导体红色激光（一天照射 2 次，一次三分钟，每周照射 5 次）治疗儿童近视，临床研究结果表明持续重复低强度红色激光在延缓近视发展方面具有良好的治疗效果且无治疗相关的不良反应发生[5,6]。眼睛是人身体唯一可以感受光线刺激的器官，光线刺激也可以对人眼发育造成影响，合理利用光生物调节治疗作用对我国目前严重青少年近视状况可以发挥四两拨千斤的防控效果。然而。长时间过量光辐射会导致视网膜光损伤，因此在应用光生物调节作用治疗眼部疾病时，光辐射对视网膜所造成的损伤需要高度重视。在可见光谱中红光是波长最长的可见光，光子所携带的能量较小。根据我们本课题的研究结果，发现相同照射剂量下，蓝色激光较红色激光照射对视网膜损伤严重，不同照射方式所诱导的视网膜损伤也具有显著差异。基于本课题研究结果，结合现有的“艾尔兴哺光仪”临床治疗方案，我们提出进一步优化策略：1.在技术条件允许情况下，可以进行个体化照射功率设置；在确保治疗有效性的前提下可以个体化设定较低的照射功率和剂量；2. 在确保治疗有效性的前提下，可以进一步缩短照射时长或尝试增加照射频次而缩短照射时长。

参考文献:

1. Natoli, R.; Valter, K.; Barbosa, M.; Dahlstrom, J.; Rutar, M.; Kent, A.; Provis, J., 670nm photobiomodulation as a novel protection against retinopathy of prematurity: evidence from oxygen induced retinopathy models. *PLoS One* **2013**, *8*, (8), e72135.
2. Tang, J.; Herda, A. A.; Kern, T. S., Photobiomodulation in the treatment of patients with non-center-involving diabetic macular oedema. *Br J Ophthalmol* **2014**, *98*, (8), 1013-5.
3. Del Olmo-Aguado, S.; Núñez-Álvarez, C.; Osborne, N. N., Red light of the visual spectrum attenuates cell death in culture and retinal ganglion cell death in situ. *Acta Ophthalmol* **2016**, *94*, (6), e481-91.
4. Smith, E. L., 3rd; Hung, L. F.; Arumugam, B.; Holden, B. A.; Neitz, M.; Neitz, J., Effects of Long-Wavelength Lighting on Refractive Development in Infant Rhesus Monkeys. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **2015**, *56*, (11), 6490-500.
5. Jiang, Y.; Zhu, Z.; Tan, X.; Kong, X.; Zhong, H.; Zhang, J.; Xiong, R.; Yuan, Y.; Zeng, J.; Morgan, I. G.; He, M., Effect of Repeated Low-Level Red-Light Therapy for Myopia Control in Children: A Multicenter Randomized Controlled Trial. *Ophthalmology* **2022**, *129*, (5), 509-519.
6. Xiong, R.; Zhu, Z.; Jiang, Y.; Kong, X.; Zhang, J.; Wang, W.; Kiburg, K.; Yuan, Y.; Chen, Y.; Zhang, S.; Xuan, M.; Zeng, J.; Morgan, I. G.; He, M., Sustained and rebound effect of repeated low-level red-light therapy on myopia control: A 2-year post-trial follow-up study. *Clin Exp Ophthalmol* **2022**, *50*, (9), 1013-1024.