文章

视网膜色素上皮中的抗氧化和线粒体保护：新光源的作用

明金 †, 肖宇张 †, 钱英, 海建胡, 辛婷冯, 珍彭, 玉莲庞, 冯燕

# 和张旭 \*

引用：金, M.; 张, X.-Y.; 应,

Q.; Hu, H.-J.; Feng, X.-T.; Peng, Z.; Pang, Y.-L.; Yan, F.; Zhang, X.

抗氧化和线粒体保护在视网膜色素

上皮：新光源的应用. Int. J. Mol. Sci. 2023, 24, 4794. https://doi.org/10.3390/ijms24054794

学术编辑: Silvia C. Finnemann

收到日期：2022年11月30日

修订日期: 2023年2月15日

接受日期: 2023年2月21日

发布: 2023年3月1日

版权：© 2023 由作者提供的。许可方MDPI，瑞士巴塞尔。本文为开放获取文章，根据创意共享署名（CC BY）许可的条款和条件分发（https:// creativecommons.org/licenses/by/

4.0/).

江西省眼科学重点实验室，江西省眼科疾病临床研究中心，南昌大学附属眼科医院，南昌八一大道463号，邮政编码330006，中国

\* 通信：ndfsyk092090@ncu.edu.cn；电话：+86-791-86318907 † 这些作者对本研究贡献相同。

摘要：低色温发光二极管（LED）(简称1900 K LED) 由于其无蓝光特性，有潜力成为健康的光源。我们之前的研究表明，这些LED对视网膜细胞没有伤害，甚至保护了眼表。针对视网膜色素上皮（RPE）的治疗是年龄相关性黄斑变性（AMD）的一个有前景的方向。然而，目前尚未有研究评估这些LED对RPE的保护作用。因此，我们使用ARPE-19细胞系和斑马鱼探讨1900 K LED的保护效果。我们的结果表明，1900 K LED能够在不同辐照度下增强ARPE-19细胞的活力，最明显的效果发生在10 W/m2。此外，保护效应随时间增加。经过1900 K LED预处理，可以通过减少由H2O2引起的活性氧（ROS）生成和线粒体损伤来保护RPE免于氢氧化氢（H2O2）损伤后的死亡。此外，我们初步证明在斑马鱼中照射1900 K LED不会导致视网膜损伤。总之，我们提供了1900 K LED对RPE保护作用的证据，为未来使用这些LED的光疗奠定基础。

关键词：低色温；无磷光体发光二极管（LED）；白光发光二极管（LED）；光疗法；与年龄相关的黄斑变性（AMD）；视网膜色素上皮

(RPE); 线粒体; 活性氧种（ROS）

## 1. 引言

如今，发光二极管（LED）因其低功耗、易用、长寿命和良好的显色指数（CRI）评分而被广泛使用。然而，磷光白光LED中有害的蓝光部分可能对人类健康产生两个方面的影响：（1）潜在的视网膜光毒性 [1,2]; （2）内部昼夜节律的干扰，包括与昼夜节律紊乱相关的健康问题 [3–9].

为了避免蓝光危害，LED开发者放弃了使用蓝色LED激发磷光体产生白光的原则；他们转而使用硅基底

InGaN黄光和AlGaInP红光LED合成无蓝色的低色温磷光体自由LED（简称1900 K LED）。1900 K LED的显色指数可超过80，色温为1600–2200 K，满足照明需求。

在1900 K LED出现后不久，我们使用这些LED进行了相关的视网膜光毒性体外实验。我们发现1900 K LED造成的细胞死亡率低于其他高色温荧光白LED [10]。我们还发现1900 K LED有助于伤口愈合、毛发生长以及褪黑激素和谷氨酸的分泌。此外，1900 K LED还能保护眼表 [11]。上述实验证明1900 K LED可能具有一定的保护作用和高安全性。

分子科学国际期刊. 2023, 24, 4794. https://doi.org/10.3390/ijms24054794 https://www.mdpi.com/journal/ijms

到2040年，年龄相关性黄斑变性（AMD）患者人数将接近3亿[12]，这将成为一个主要的公共健康问题，对社会经济产生显著影响。众所周知，视网膜色素上皮（RPE）的进行性退化和死亡是AMD的关键病理过程。因此，RPE的治疗具有重要意义[13,14]。考虑到1900 K LED对眼表的保护作用，我们假设1900 K LED可能会保护RPE。实际上，AMD的RPE中存在过量的活性氧（ROS）和线粒体缺陷[15]。红-黄光相关的光生物调控（PBM）治疗精准针对线粒体和氧化应激[16–19]。因此，我们认为1900 K LED通过保护RPE在预防和治疗AMD方面可以发挥关键作用。ARPE-19细胞作为AMD研究的可靠标准模型，主要作为本研究中的实验对象，初步调查1900 K LED对RPE的保护作用。此外，我们初步在体内证明，该新光源的照射对斑马鱼视网膜没有伤害。具体实验包括细胞活性检测、细胞死亡检测、ROS水平检测、线粒体成像、线粒体DNA（mtDNA）损伤检测、西方印迹和苏木精-伊红（H&E）染色。

## 结果与讨论

### 2.1. 1900 K LED根据照射强度和光照时间调节细胞活性

在10 W/m2照射48小时后，除了1900 K LED外，所有LED的细胞活性均降低（图1a）。在三种照射强度（5、10和15 W/m2）下，1900 K LED均不同程度地提高了细胞活性，其中10 W/m2的照射强度最显著地增加了细胞活性（图1b）。因此，照射强度保持在10 W/m2。在使用1900 K LED照射1天、2天和3天后，细胞活性分别提高了约30%、70%和75%（图1c）。这些实验使我们确定了后续实验中LED照明的参数，即10 W/m2照明48小时。关于不同色温的LED对细胞影响的此类实验并不罕见。Chen等人[20]发现，与2954 K和5624 K LED相比，7378 K LED在培养的人晶状体上皮细胞（hLECs）中引起过量的细胞内ROS产生和严重的DNA损伤，导致G2/M期阻滞和细胞凋亡。另一项研究发现，7378 K LED，但不是2954 K LED，诱导了上调

VEGF-A、IL-6和IL-8，以及通过ROS的积累和MAPK及NF-κB信号通路的激活下调MCP-1 [21]。这些研究部分支持我们的结果。然而，这些实验的对象并没有涉及色温为1900 K的LED。为了解决这一差距，我们设计了后续实验。

### 2.2. 预处理10 W/m2 1900 K LED减少了ARPE-19细胞的死亡

为了探索1900 K LED对受损细胞的保护作用，我们选择了经典用于AMD研究的过氧化氢(H2O2)损伤模型. 如图2a所示，我们用一系列浓度的H2O2(200 µM, 400 µM, 600 µM, 800 µM和1000 µM)处理细胞6小时，然后选择400 µM作为最终浓度. 接下来，我们研究了两种范式对ARPE-19细胞的影响，发现光照后处理的保护效果有限（图2b）. 通过明场图像和细胞凋亡的流式细胞术结果也证实了这一点（见补充图S1）. 因此，我们改为采用1900 K的LED预照射范式48小时，然后用400 µM的H2O2损伤6小时. 为了验证这些LED的保护效果不是暂时的，我们在去除H2O2后添加了几个检测点（3小时，9小时和24小时）. 1900 K + H2O2组的细胞活性在四个时间点上均高于H2O2组（图2c–f）. 有趣的是，我们观察到在去除H2O2后0小时，四组之间的细胞形态和凋亡没有显著差异（见补充图S2）. 我们推测400 µM的H2O2损伤6小时并未导致细胞凋亡，但导致细胞活性降低. 1900 K的LED防止了H2O2导致的细胞活性降低. 细胞在受到冲击后的负面表现通常会稍后显现. 为了研究在10 W/m2照射下LED的保护范围，我们在光预处理范式中检测了1000 µM H2O2浓度下的细胞状态和凋亡. 1900 K + H2O2组的细胞数量多于H2O2组. 此外，H2O2组中的细胞连接几乎消失. 然而，在1900 K + H2O2组的细胞中仍有一些细胞连接，并且细胞周围折射率增加的细胞百分比也低于H2O2组. 流式细胞术结果也证实了这一点; 1900 K + H2O2组的凋亡率显著低于H2O2组（图2g–i）. 实际上，我们将H2O2损伤的时间延长至

24小时，10 W/m2 LED照明48小时也对细胞产生了保护作用

(见补充图S3)。最终实验结果表明，1900 K LED可能具有细胞保护作用。

图1. 低色温发光二极管（LED）根据照射度和光照时间调节细胞活性。（a）不同色温下以10 W/m2照射48小时后的细胞活性；n = 6。\* 与黑暗组显著不同（单因素方差分析，p < 0.0001）；# 与1900 K组显著不同（单因素方差分析，p < 0.0001）；+ 与4000 K组显著不同（单因素方差分析，p < 0.0001）。（b）不同放射性下以1900 K LED照射48小时后的细胞活性；n = 5。\* 与黑暗组显著不同（双侧独立t检验：5 W/m2, p = 0.0032；10 W/m2, p = 0.0009；15 W/m2, p < 0.0001）。

(c) ARPE-19细胞在10 W/m2下1900 K LED照明不同时间后的细胞活性;

\* 与黑暗组显著不同（双侧，独立t检验：1天，n = 6，p < 0.0001; 2天，n = 5，p < 0.0001; 3天，n = 4，p < 0.0001）。数据以平均值 ± 标准差表示。

在我们之前，也曾有许多实验使用红色激光器、LED或甚至复合LED来保护动物或志愿者的视网膜 [17,22–27]。一些研究建议，光治疗的顺序会影响治疗结果。Albarracin等人 [25] 发现，670 nm的LED光在暴露于损害性白光之前和期间进行处理，可以显著改善由眩光引起的光感受器功能的减少。然而，在经历强烈光诱导损伤后接受光处理的动物的光感受器功能最初下降，但在暴露1个月后恢复。这些结果表明，光疗预处理和阶段性治疗可能具有更早或更大的保护效果，这与我们的结果部分一致。至于1900 K + H2O2和H2O2 + 1900 K范式中的不同现象，我们的解释如下：与其他色温的LED相比，1900 K的LED能够提高ARPE-19细胞的活性。细胞活性结果的解释通常需要两个方面；一个是细胞增殖，另一个是细胞内线粒体脱氢酶活性的变化。我们不能否认1900 K的LED在一定程度上可以促进ARPE-19细胞的增殖（见补充图S4）。我们还证明了1900 K的LED可以增加细胞内活性。4000 K和蓝光LED提高了细胞内ROS水平，而1900 K的LED则降低了它们。此外，线粒体成像和DNA损伤实验显示，1900 K的LED可以减少H2O2引起的线粒体损伤。结合上述结果以及细胞内核因子E2相关因子2（NRF2）、血红素氧化酶-1（HO-1）、微管相关蛋白1轻链3 beta（LC-3B）、动力蛋白相关蛋白1（DRP1）和视神经萎缩蛋白1（OPA1）的蛋白表达，我们假设在1900 K LED的预照射下不仅促进了ARPE19细胞的增殖，还减少了H2O2造成的损害，从而导致1900 K组的细胞活性明显增加。然而，如果细胞先是被H2O2损伤，那么在严重创伤状态下许多保护作用可能失效 [28]。

图2. 用1900 K的LED在10 W/m2的预处理降低了ARPE-19细胞的死亡率.

(a) 选择氢 peroxide (H2O2)浓度；n = 4. \* 与0 µM显著不同（单因素方差分析：200 µM, p = 0.0003; 400, 600, 800和1000 µM, p < 0.0001); # 与200 µM显著不同（单因素方差分析, p < 0.0001); + 与400 µM显著不同（单因素方差分析, p < 0.0001). (b) ARPE-19细胞在光照后处理范式中的细胞活性；n = 5.

\* 与黑暗组显著不同（单因素方差分析：H2O2和H2O2 + 1900 K，p < 0.0001）；# 与H2O2组显著不同（单因素方差分析，p < 0.0001）；+ 与1900 K组显著不同（单因素方差分析，p < 0.0001）。在预处理光照下，移除H2O2后ARPE-19细胞的细胞活性在0小时（c）、3小时（d）、9小时（e）和24小时（f）的表现；n = 5。\* 与黑暗组显著不同（单因素方差分析：0小时，H2O2，p = 0.0001和1900 K，p < 0.0001；3小时，

H2O2, p < 0.0001, 1900 K, p = 0.0079, 和1900 K + H2O2, p = 0.005; 9小时, H2O2, p = 0.0012 和

1900 K, p = 0.0001; 24小时，H2O2和1900 K + H2O2, p < 0.0001 和 1900 K, p = 0.0003）；# 与H2O2显著不同（单因素方差分析：0小时, 1900 K, p < 0.0001 和 1900 K + H2O2, p = 0.0032; 3小时, 1900 K和1900 K + H2O2, p < 0.0001; 9小时, 1900 K, p < 0.0001 和 1900 K + H2O2, p = 0.0009; 24小时, 1900 K和1900 K + H2O2, p < 0.0001）；+ 与1900 K显著不同（单因素方差分析：0小时, 1900 K + H2O2, p < 0.0001; 3小时, 1900 K + H2O2, p < 0.0001; 9小时, 1900 K + H2O2, p = 0.0002; 24小时, 1900 K + H2O2, p < 0.0001）。光预处理方案中的细胞形态（g）和细胞凋亡检测（h）；H2O2浓度 = 1000 µM。（i）凋亡率的定量分析；n = 3。\* 与黑暗组显著不同（单因素方差分析, p < 0.0001）；# 与H2O2组显著不同（单因素方差分析, p < 0.0001）；+ 与1900 K组显著不同（单因素方差分析, p < 0.0001）。数据以均值 ± 标准差表示。明场图像中的比例尺，50 µm。

1900 K的LED灯也可以用作照明，而其他研究中用于治疗的多数光源则不能用作照明。我们假设1900 K LED在预防AMD的同时提供照明，这可以大大提高患者的依从性，最重要的是，降低治疗成本。

### 2.3. 1900 K LED 在ARPE-19细胞的抗氧化应激中发挥积极作用

考虑到初步证据表明 1900 K LED 预处理可以保护 ARPE19 细胞，我们想探讨可能的机制。首先，我们关注抗氧化应激。我们发现，随着 LED 的色温升高，代表细胞内 ROS 水平的红色细胞核内荧光增加（图 3a）。然而，1900 K 组的 ROS 水平远低于对照组（图 3b,c）。然后我们在光预处理范式中重复了这个实验。正如预期的那样，1900 K 组的 ROS 水平仍低于对照组，而 H2O2 组的情况则相反。1900 K + H2O2 组的 ROS 水平介于 H2O2 组和 1900 K 组之间（图 3d,e）。这一结果并不令人惊讶。Shen et al. [17] 也发现 670 nm 的 LED 可以降低线粒体中的 ROS 水平，并增强大鼠原代 Müller 细胞的线粒体功能。在光预处理范式中，我们发现 H2O2 组中的 NRF2 上调，HO-1 也显示上调趋势。1900 K 组中的 NRF2 也略有增加。

有趣的是，HO-1蛋白在1900 K组中减少。HO-1在

1900 K + H2O2组的结果低于H2O2组。然而，NRF2的表达与对照组相似（图3f,g）。NRF2是HO-1的上游蛋白。作为一种诱导酶，HO-1是氧化应激的可测指示物，随着NRF2蛋白的上调而上调 [29]。Núñez-Álvarez等 [30] 也证明625–635 nm的红光在6.5 W/m2下可以减少蓝光引起的HO-1。最近的研究显示，直接敲除或药理抑制HO-1显著阻止了氧化应激诱导的RPE细胞铁死亡 [31]。电亲和试剂和ROS在应激暴露后干扰CncC与Keap1之间的相互作用。CncC不会被降解，而是累积在细胞核中，形成与Maf-S的异二聚体，结合到AREs上，激活靶基因转录 [32,33]。因此，在H2O2损伤后，NRF2进入细胞核并结合AREs以激活靶基因的转录，从而导致HO-1的上调。相反，1900 K LED可以上调NRF2的表达。然而，相对较低的细胞内ROS水平不允许NRF2与Keap1脱离进入细胞核激活下游基因。只有在应激期间，上调的NRF2才会进入细胞核，增加细胞抵抗氧化应激的能力。我们的ROS结果也证实了这一点。我们的实验初步表明，1900 K LED通过增加非酶抗氧化系统发挥保护作用，而非酶抗氧化系统。考虑到1900 K LED对线粒体的影响，我们怀疑最可能的候选物是辅酶或谷胱甘肽。

此外，氧化应激可能导致细胞中压力诱导的自噬增加。

因此，我们检测了自噬相关蛋白LC3B的表达，并发现

400 µM H2O2可以增加LC3B-II/LC3B-I的比率，从而增加ARPE-19细胞中的自噬。1900 K组的LC3B-II/LC3B-I比率与暗组没有区别。1900 K+ H2O2组的自噬水平远低于H2O2组（图3h）。一项先前的研究使用了相同浓度为400 µM的H2O2，发现与0小时相比，RPE细胞在H2O2暴露6小时后LC3B-II/LC3B-I的比率上调 [34]。Hu等人的研究也支持我们的结果 [35]。总的来说，这表明1900 K LED能够降低ROS水平，以保护RPE免于死亡。

图3. 1900 K LED在ARPE-19细胞的抗氧化应激中发挥积极作用。（a）1900 K、4000 K和蓝光LED照射48小时后的二氢乙啶（DHE）荧光。荧光的数量和强度代表细胞内活性氧物种（ROS）的水平。上面的面板显示了DHE的红色荧光，下方面板由亮场合并图像组成；n = 3。（b,c）黑暗、1900 K、4000 K和蓝光LED组的定量荧光分析；n = 3。\* 与黑暗组显著不同（单因素方差分析：1900 K，p = 0.0013；4000 K，p = 0.0237；蓝光，p < 0.0001）；# 与1900 K显著不同（单因素方差分析，p < 0.0001）；+ 与4000 K显著不同（单因素方差分析，p = 0.0016)。（d,e）黑暗、H2O2、1900 K和1900 K + H2O2组的定量荧光分析，涉及1900 K LED预照射48小时，然后用400 µM H2O2损伤6小时；n = 3。\* 与黑暗组显著不同（单因素方差分析，p < 0.0001）；# 与H2O2组显著不同（单因素方差分析，p < 0.0001）；+ 与1900 K组显著不同（单因素方差分析，p < 0.0001）。(f–h) 通过Western blot分析检测四组光预处理中的核因子E2相关因子2（NRF2）（n = 7）、血红素加氧酶-1（HO-1）（n = 4）和微管相关蛋白1轻链3β（LC3B）（n = 4）的水平。β-微管蛋白作为内源性对照。\* 与黑暗组显著不同（单因素方差分析：NRF2，H2O2，p = 0.0062和1900 K，p = 0.0271；HO-1，1900 K，p = 0.0167；LC3B，H2O2，p = 0.0007）；

# 与H2O2组显著不同（单因素方差分析：NRF2, 1900 K + H2O2, p = 0.0028; HO-1, 1900 K, p = 0.0017 和 1900 K + H2O2, p = 0.0280; LC3B, 1900 K, p = 0.0004 和 1900 K + H2O2, p = 0.0038）；+ 与1900 K显著不同（单因素方差分析, NRF2, 1900 K + H2O2, p = 0.0127）。数据以均值 ± 标准差表示。合并图像中的比例尺，20 µm。

### 2.4. 1900 K LED可以减少H2O2在ARPE-19细胞中造成的线粒体损伤

线粒体功能障碍与多种与年龄相关的疾病的病理生理学有关，包括AMD。线粒体分裂、融合和线粒体自噬是线粒体质量控制的重要组成部分 [36]。因此，调节线粒体动力学可能是治疗视网膜变性疾病如AMD的有效策略。我们之前证明过，1900 K的LED可以降低ARPE-19细胞中的ROS水平，而线粒体是ROS的主要靶点。因此，我们将重点转向1900 K LED对线粒体功能的影响。首先，我们进行了线粒体成像，采用了Jang等人的研究中的实验参数 [37]。他们使用0.5 mM H2O2作用于ARPE-19细胞1小时，观察到线粒体分裂增加，而PARP-1抑制剂可以减少ARPE-19细胞中的分裂程度。荧光图像显示，黑暗组和1900 K组的线粒体呈线状和网状。在400 µM H2O2损伤后，可以观察到短杆状、点状或球状的线粒体，而这些损伤可以通过1900 K LED得到恢复（图4a）。接下来，我们量化了线粒体的形态。我们发现，在当前实验浓度下，H2O2使得长、分支的线粒体被打断成不同部分，导致线粒体网络的数量增加，但网络大小（分支数量）减少。这导致单个线粒体数量增加，同时分支长度减少。在[38–40]中观察到类似现象。1900 K LED可以减轻这种现象。然而，有趣的是，1900 K LED也增加了线粒体的碎片化。

(图4b–e)。结合之前关于自噬的结果，我们不认为1900 K LED导致线粒体碎片化的负增长，因为1900 K LED并没有导致细胞自噬的增加，而是由于线粒体交换的增加加速了融合切割周期。

体外研究表明，H2O2诱导的氧化应激通过导致对其线粒体DNA的优先损伤导致RPE细胞死亡 [41,42]。此外，人类细胞在氧化应激后线粒体DNA损伤比核DNA损伤更为广泛且持续时间更长 [43]。因此，我们可以通过检测线粒体DNA损伤来确定氧化应激的程度。我们的结果显示，ARPE-19细胞在400 µM H2O2损伤6小时后线粒体DNA受到损伤。照射1900 K LED并未在细胞中导致线粒体DNA损伤，而是减少了H2O2造成的线粒体DNA损伤（图4f,g）。结合ROS水平的结果，不难得出结论，1900 K LED通过减少细胞内ROS保护线粒体DNA免受损伤。实际上，线粒体基因组易受氧化应激损伤，而线粒体DNA修复途径的缺陷是视网膜退化发病机制的重要因素。使用特定靶向线粒体的治疗方式以保护它们免受氧化应激或促进mtDNA修复，可能为治疗例如年龄相关性黄斑变性这样的视网膜退行性疾病提供潜在替代方案 [44]。研究表明，PBM可以增强线粒体活性并恢复受损线粒体的功能，从而通过刺激细胞色素c氧化酶的活性促进体外细胞存活 [45]。Gopalakrishnan等 [46] 表明，远红外PBM改善了视网膜损伤和退行性疾病动物模型中的功能和结构结果。短时间近红外PBM过程将保持线粒体代谢状态并减少感光细胞损失。最近，670 nm LED已在临床试验中用于治疗人类黄斑水肿。670 nm LED不仅能够增强啮齿动物感光细胞的线粒体膜电位，还能在体内保护穆勒细胞和感光细胞免受损伤。此外，体外实验表明，670 nm LED能够增强线粒体功能并保护培养的穆勒细胞免受氧化应激 [17]。

图4. 1900 K LED可以减少ARPE-19细胞中H2O2导致的线粒体损伤。

(a) 荧光图像显示在用1900 K LED照射48小时后，线粒体形态的变化，随后用400 µM H2O2损伤3小时；n = 5. 上面展示的面板显示了经过指示处理后的线粒体形态的荧光图像。下方面板是各组的部分放大视图。(b) 线粒体网络的数量；n = 5, 5, 4, 和 5. \* 与黑暗组显著不同（单因素方差分析：H2O2, p = 0.0002；1900 K + H2O2, p = 0.0042）；# 与H2O2组显著不同（单因素方差分析：1900 K, p = 0.0293）。(c) 线粒体网络大小（分支）的数量；n = 5, 5, 4, 和 5. \* 与黑暗组显著不同（单因素方差分析：H2O2, p = 0.0012；1900 K, p = 0.0395）。(d) 线粒体个体的数量；n = 5, 5, 4, 和 5. \* 与黑暗组显著不同（单因素方差分析：H2O2, p = 0.0151）。(e) 线粒体网络分支的平均长度；n = 5, 5, 4, 和 5. \* 与黑暗组显著不同（单因素方差分析：H2O2, p = 0.0097）；# 与H2O2组显著不同（单因素方差分析：1900 K + H2O2, p = 0.0060）。(f) 线粒体DNA损伤检测的代表性胶体。长线粒体段和短线粒体段的带密度分别约为16,568 bp和158 bp。(g) 线粒体DNA长链与短链比率的定量分析；n = 4. \* 与黑暗组显著不同（单因素方差分析：1900 K, p = 0.0066）；# 与H2O2组显著不同（单因素方差分析：1900 K, p = 0.0030；1900 K + H2O2, p = 0.0197）。(h) 连接蛋白相关蛋白的水平

1 (DRP1); n = 7。\* 与黑暗组显著不同（单因素方差分析：1900 K，p = 0.0361）；# 与H2O2组显著不同（单因素方差分析：1900 K，p = 0.0009）。(i) 总性视神经萎缩蛋白1（OPA1）的相对蛋白水平；n = 4。(j) L-OPA1/S-OPA1的比率；n = 4。# 与H2O2组显著不同（单因素方差分析：1900 K，p = 0.0348）。数据以均值±标准差表示。原始荧光图中的条形，20 µm。放大荧光图中的条形，5 µm。缩写： mito-L,线粒体DNA长链； mito-S,线粒体DNA短链。

根据线粒体形态实验，我们检测了线粒体的分裂和融合蛋白。我们发现 DRP1 蛋白在 H2O2 组中下调，而在 1900 K 组中上调。1900 K + H2O2 组的 DPR1 水平介于 H2O2 组和 1900 K 组之间（图 4h）。对于 OPA1，这种内膜融合蛋白，四组的总蛋白水平没有显著差异（图 4i）。然而，H2O2 组的 L-OPA1/S-OPA1 比例显示出下降趋势。1900 K 组则相反。与 DRP1 类似，1900 K + H2O2 组的 L-OPA1/S-OPA1 比例也介于 H2O2 组和 1900 K 组之间（图 4j）。我们之前的假设是，H2O2 会上调细胞内 DRP1 水平，导致线粒体碎片化。然而，H2O2 处理后 DRP1 水平并没有增加；因此，不能排除 DRP1 仍可能在线粒体碎片化引起的氧化过程中发挥作用 [40]。有趣的是，1900 K 组的 DRP1 增加。Sheng et al. 还在斑马鱼视网膜中观察到白藜芦醇处理后 OPA1 和 FIS1 的上调 [47]。FIS1 也是一种线粒体分裂蛋白。在生理条件下，线粒体的融合和分裂在动态平衡中进行，外部刺激会改变这种平衡。1900 K 组的线粒体形态呈线性和网状，与对照组相似，线粒体 DNA 没有受到损伤；因此，1900 K 组的 DRP1 水平可能上调以平衡线粒体的融合。融合分裂循环的增加可能促进线粒体之间的交流，并提高线粒体功能 [48]，这与之前的线粒体形态实验结果一致。

若干研究支持我们关于OPA1蛋白的结果。李等人用蓝光照射R28细胞不同时间，发现OPA1的总蛋白水平在不同时间点（0-24小时）没有变化[49]。加西亚等人也发现，H2O2处理并未改变OPA1的整体表达，但H9c2和143B细胞系中的L-OPA1同种型却被降解[40]。当线粒体内膜的跨膜电位完整时，L-OPA1同种型对线粒体内膜的融合过程是必要的。当跨膜电位丧失时，L-OPA1被压力敏感的与m-AAA蛋白酶1同源物（OMA1）金属蛋白酶切割，产生一种不能促进线粒体内膜融合的短的S-OPA1同种型，甚至可能参与线粒体内膜的裂变，导致线粒体网络崩溃为碎片状细胞器群体[50-52]。这是一种生物体保护机制。如果细胞遭遇超过临界阈值的压力，严重受损的线粒体可以通过重新加入线粒体网络在被自噬清除之前污染其他线粒体。生物体必须防止这种情况发生。这时，OMA1通过低膜电位和低水平的三磷酸腺苷（ATP）快速被激活，以切割L-OPA1。即使在没有L-OPA1或膜电位非常低的情况下，这些线粒体的外膜仍然可以融合。然而，内膜却无法融合，导致几个内膜基质区室被一个共同的外膜包围，就像豆荚中的豌豆一样，等待被自噬清除[53]。王等人也观察到了类似现象[39]。因此，我们认为1900 K LED可能通过降低H2O2引起的压力来保护线粒体，从而减少OMA1的激活和L-OPA1的切割。上述解释需要进一步研究以确认保护因子对OPA1和DRP1的调控作用。

### 2.5. 辐照1900 K LED对斑马鱼未造成视网膜损伤

斑马鱼在眼睛形状、解剖结构、基因表达和功能方面与人类有很大的相似性，并且它们具有快速发育、体外受精、透明胚胎和易于观察的优势。因此，它们在眼部发育和疾病研究中发挥着重要作用 [54,55]。此外，斑马鱼没有眼睑；因此，避免了因眼睑阻挡光线而导致的实验失败。我们分析了斑马鱼在暴露于1900 K和蓝光LED后视网膜的变化。与对照组相比，蓝光组在第7天外核层（ONL）、光感受器层（PRL）和视网膜色素上皮（RPE）的厚度显著减少，而在1900 K LED光组中，ONL、PRL和RPE的厚度没有显著变化（图5）。这项体内实验初步证明了1900 K LED在斑马鱼眼底的安全性。

近年来，光生物调变（PBM）被认为是一种新兴疗法，用于治疗与年龄相关的退行性疾病和线粒体相关疾病 [56–58]。其主要机制可能是促进细胞色素c氧化酶（COX）活性和ATP含量。PBM还可以促进一氧化氮（NO）从细胞内储存区域（如含血红素的蛋白质）释放，以增强其生物利用度，触发后续保护信号通路的活化 [57]。尽管之前用于PBM的光需要是相干和极化的，例如He–Ne激光产生的光，但这些特性现在不再被视为必要条件。LED阵列也可以作为光医学中的光源 [59]，单色和多波长LED可以影响不同的细胞目标，并可能提供额外的好处 [26,27]。以激光或LED作为辐射源的PBM的优缺点依然存在争议。激光是相干的，因眼睛结构引起的散射、吸收和过滤减少，治疗区域和剂量可以更精确地控制。LED更安全、成本更低且更易于获得，使其成为一种比激光更具潜力的新型治疗光源。然而，使用LED作为辐射源的PBM在建立治疗参数上更具挑战性。LED介导的PBM仍然存在许多问题。我们的结果进一步拓宽了能够产生细胞保护效应的LED范围，证明PBM的光源不再限于单色LED，还可以包括具有照明功能的复合LED。

此外，关于PBM的大多数研究涉及基础表型研究。最近的一项研究发现，632.8 nm红激光通过激活PKA/Sirtuin 1（SIRT1）信号通路减少了阿尔茨海默病模型中的淀粉样β蛋白（Aβ）沉积 [60]。这给了我们很大的启示；许多研究已证明PBM的有效性。然而，关于生理机制的研究有限；因此，未来有必要探讨PBM中的信号通路。因此，我们检查了1900 K LED对SIRT1表达的影响，发现H2O2可以上调SIRT1的表达，而1900 K LED增加了SIRT1的量超过H2O2组（见补充图S5）。我们还发现，在1900 K LED处理后，其他SIRT家族成员（如Sirtuin 3和Sirtuin 5）也表达增加（Xu Zhang，未发表数据）。我们假设LED可能通过上调SIRT家族为细胞带来一些积极的影响。这个机制值得未来深入研究。作为本研究的局限性，我们仅初步讨论了1900 K LED对RPE细胞和斑马鱼的保护作用；缺乏进一步的体内实验和相关特定机制。

图5. 使用1900 K LED照射不会对斑马鱼造成视网膜损伤. (a) 正常斑马鱼和实验斑马鱼在3000 lux的1900 K LED和蓝光LED下暴露7天后的苏木素-伊红染色视网膜组织. (b) 正常斑马鱼和在3000 lux的1900 K LED和蓝光LED下暴露7天的实验斑马鱼外核层 (ONL)、视网膜感光层 (PRL) 与视网膜色素上皮 (RPE) 厚度的定量. \* ONL 厚度与对照组显著不同 (单因素方差分析: 蓝色, p = 0.0005). \* PRL 厚度与对照组显著不同 (单因素方差分析: 蓝色, p = 0.0001). \* RPE 厚度与对照组显著不同 (单因素方差分析: 蓝色, p = 0.0006). ONL、PRL 和 RPE 厚度的定量结果按垂直列呈现为均值 ± 标准差 (每组 n = 6 只眼). 刻度条 = 100 µm. 缩写: NFL, 神经纤维层; GCL, 神经节细胞层; IPL, 内层网状层; INL, 内核层; OPL, 外层网状层.

我们的研究表明，使用1900 K LED预处理可以通过减少ARPE-19细胞中的氧化应激和线粒体损伤来抵消H2O2对RPE细胞的损害（图6）。1900 K LED可能需要在某一辐照度范围内才能达到最佳保护，这可能是累积的。此外，使用1900 K LED照射7天不会对斑马鱼造成视网膜损伤。我们的研究有很大意义，因为在缺乏对症治疗的情况下，保护细胞免受死亡是一种明确而有效的措施。这是首次研究1900 K低色温无磷光LED对RPE和斑马鱼的保护作用。使用1900 K LED的光疗法具有非侵入性、良好的依从性、便利性和可获取性，将使其成为预防和治疗年龄相关性黄斑变性的最有前景的新兴工具。此外，光疗法还可以为管理其他类似疾病提供灵感，这对人类有很大益处。

图6. 1900 K LED在H2O2诱导的RPE损伤中的作用。H2O2增加了细胞内ROS水平、线粒体碎片化和线粒体DNA损伤，导致线粒体功能障碍，最终导致细胞死亡。预处理1900 K LED可以减少细胞内ROS水平、线粒体碎片化和线粒体DNA损伤，保护线粒体功能，并最终防止细胞死亡。

## 3. 材料与方法

### 3.1. 细胞培养

我们从美国典型培养物保藏中心（ATCC）购买了ARPE-19细胞，

马纳萨斯，弗吉尼亚州）。细胞在Dulbecco改良的鹰培养基中培养。

(DMEM/F-12, BI, 以色列) 加10% (v/v) 胎牛血清 (FBS, BI, 以色列), 100 U/mL青霉素, 和100 µg/mL链霉素 (Solarbio, 北京, 中国) 在37 ◦C、5% CO2 的细胞培养箱中培养. 细胞传代每4到5天进行一次. 我们的实验使用了第3到10代的ARPE-19细胞.

### 3.2. 动物

所有AB品系的野生型斑马鱼（Danio rerio）均来自中国斑马鱼资源中心（CZRC）（武汉，中国）。斑马鱼在28.5 ◦C的14小时光照/10小时黑暗周期中维持生长。斑马鱼的使用和处理经过伦理审查委员会的批准，研究遵循ARVO关于眼科与视觉研究中动物使用的声明。

### 3.3. 光处理和H2O2损伤

本研究主要使用了以下LED：1900 K, 4000 K, 6600 K和蓝光LED。光源和照明设备与我们之前的文章中描述的相同（图7a,b）[10]。整个光箱放置在细胞培养箱内，以确保细胞正常生长。图7c的顶部面板显示了光照后处理范式，涉及用400 µM H2O2损伤细胞6小时，然后用辐照度为10 W/m2的1900 K LED照射细胞48小时。图7c的下部面板显示了光照预处理范式。光照预处理范式涉及以10 W/m2的辐照度照射细胞48小时，然后用400 µM H2O2损伤它们6小时。

图7. 照明装置和方法时间表。(a) 1900 K LED在560和630 nm有两个峰值且没有蓝光成分。4000 K和6600 K LED在450 nm有一个峰值，随后是代表黄色光的第二个峰值。6600 K LED的幅度低于4000 K LED的幅度。蓝光LED仅在470 nm有单个波峰。(b) 照明装置由一个灯罩和一个分为六个独立区域的箱子组成。我们将灯放置在灯罩的内表面。设计了气孔在六个不同区域的非接触表面上，以避免光干扰。本研究主要使用两种建模方法(c)：光后处理范式和光预处理范式。每种建模方法有四组（暗组，H2O2组，1900 K LED组，和H2O2 + 1900 K组或1900 K + H2O2组）。光后处理范式涉及从400 µM H2O2处理6小时后，跟随用1900 K LED照射48小时。另一个范式则是用1900 K LED照射48小时后，再进行400 µM H2O2处理6小时。缩写：LED，发光二极管；H2O2，过氧化氢。

### 3.4. 动物实验中的光照

斑马鱼在一个透明水族箱中饲养（10 cm × 10 cm × 10 cm），每个水族箱放置在一个具有反射内壁的光箱中央（12 cm × 12 cm × 12 cm）。LED被放置在光箱的四个侧壁上，以改善辐射的方向均匀性。光照与斑马鱼的昼夜节律自动一致，光强为3000 lux。

### 3.5. 细胞活性测定

我们根据试剂说明使用细胞计数试剂盒-8（CCK-8）（40203ES60，Yeasen，上海，中国）测量细胞活性。将ARPE-19细胞以每孔3 × 10^3个细胞的密度接种到96孔板中，然后孵育24小时。随后，细胞接受相应的处理。接下来，将细胞培养在添加了10%（v/v）WST-8的培养基中，培养2小时。通过酶标仪（Multiskan Mk3，Thermo Scientific，上海，中国）测量吸光度。

### 3.6. 细胞死亡检测

治疗后，细胞立即在显微镜下观察，并记录了三个随机视野。然后，我们使用Annexin V–FITC/PI凋亡检测试剂盒（40302ES50，Yeasen，中国上海）检测凋亡。细胞用无EDTA的豌豆蛋白酶消化，收集后在4 ◦C下以300× g的速度离心5分钟。洗涤两次PBS后，细胞重悬于缓冲液中。然后，添加染色溶液到细胞中，在室温下在黑暗中孵育10-15分钟。孵育后，添加1×结合缓冲液，并使用流式细胞仪（DxFLEX，贝克曼，中国苏州）检测结果。

### 3.7. ROS水平检测

根据说明，我们在暗处以37 ◦C将细胞与稀释至100 µM的DHE培养基混合物孵育20分钟。然后，我们用DHE染色溶液洗涤细胞，并随机拍摄三个视野。此外，我们使用相同的试剂定量分析细胞内ROS水平。细胞用DHE染色后，收集并洗涤两次，重悬于PBS中，并通过流式细胞术（DxFLEX，贝克曼，苏州，中国）进行检测。

### 3.8. 线粒体成像

ARPE-19细胞以4 × 10^5细胞的密度接种到35 mm共聚焦培养皿中，并孵育24小时，直到其融合度达到50–70%。然后，我们使用DsRed2-Mito质粒（武汉苗灵生物科技有限公司，武汉，中国）对ARPE-19细胞进行转染，以根据Hanheng LipoFiter3脂质体转染试剂（HB-TRLF3-1000，Hanheng，上海，中国）的说明标记线粒体。DsRed2-Mito质粒编码Discosoma sp.红色荧光蛋白（DsRed2; 1, 2）和人类细胞色素c氧化酶（Mito; 3, 4）第八亚基的线粒体靶向序列的融合体。接下来，在转染后36小时，细胞用1900 K LED照射48小时，然后添加400 µM H2O2，持续3小时。在线粒体形态观察中，使用蔡司共聚焦显微镜（LSM800，蔡司，哥廷根，德国），随机选择多个视野进行摄影和记录。然后，我们使用线粒体网络分析（MiNA）工具集评估线粒体的数量和形态。

### 3.9. 西方印迹

根据制造商关于放射免疫沉淀缓冲液（RIPA）（Solarbio，北京，中国）和双吡啶基甲酸（BCA）蛋白质测定试剂盒（Solarbio，北京，中国）的说明，我们裂解了ARPE-19细胞并检测了蛋白质浓度。将等量蛋白质（25 µg）通过10%或12% SDS聚丙烯酰胺凝胶进行电泳，并转移到聚偏二氟乙烯膜（PVDF，Millipore，英国）。然后，膜用5%脱脂奶粉封闭1小时，并在4 ◦C下与适当的一级抗体（表1和表S1）过夜孵育。第二天，膜被洗涤并在室温下用二级抗体孵育1小时。洗膜后，使用EasySee Western Blot Kit（TRANS，北京，中国）检测目标蛋白质，并获取数字图像。通过使用ImageJ软件整合像素强度对条带进行定量。β-微管蛋白作为内参。

表1. 研究中使用的主要抗体.

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 抗体 | 来源 | 目录号 | 抗体类型 | 稀释 | 分子量 |
| HO-1 | Abcam | Ab13248 | 小鼠单克隆抗体 | 1:1000 | 34.6 |
| NRF2 | Abmart | T55136F | 兔单抗 | 1:1000 | 110 |
| LC3B | CST | 2775s | 兔单抗 | 1:1000 | 14/16 |
| DRP1 | CST | #8570 | 兔单抗 | 1:1000 | 78–82 |
| OPA1 | BD | 612606 | 小鼠单克隆抗体 | 1:1000 | 80–100 |
| β-微管 | TRANS | HC101-01 | 小鼠单克隆抗体 | 1:2500 | 55 |

### 3.10. 线粒体DNA损伤检测

我们参考了Sheng等人的方法来检测线粒体DNA损伤 [47]。细胞处理后，我们提取了总细胞DNA，并根据Ezup Column Animal Genomic DNA Extraction Kit（Sangon Biotech，上海，中国）和Long Amplification Taq聚合酶试剂盒（P101-d1，Vazyme，南京，中国）的步骤，从15 ng的总DNA中扩增长和短的线粒体片段。长线粒体片段（16568 bp）的引物为F: ATGATGTCTGTGTGGAAAGTGGCTGTGC和R: GGGAGAAGCCCCGGCAGGTTTGAAGC。短线粒体片段（158 bp）的引物为F: GATTTGGGTACCACCCAAGTATTG和R: AATATTCATGGTGGCTGGCAGTA。长线粒体片段的PCR扩增条件为: 95 ◦C 5分钟，随后17个循环（95 ◦C 30秒；65 ◦C 15分钟），最后在72 ◦C延伸10分钟。短线粒体片段的PCR扩增条件为: 95 ◦C 5分钟，随后17个循环（95 ◦C 30秒；60 ◦C 30秒；72 ◦C 30秒），最后在72 ◦C延伸10分钟。所有长链和短链PCR反应均在线性阶段停止。PCR产物随后通过0.8%和1%琼脂糖凝胶电泳分离。最后，凝胶在Image Lab 5.2.1（SYSTEM GelDoc XR+ IMAGELAB, Bio-Rad, Hercules, CA, USA）下进行紫外线照射可视化，带状通过ImageJ进行数量化。

### 3.11. 苏木精-伊红染色和组织学评估

具体步骤与我们之前的文章 [61] 中描述的一样。简而言之，斑马鱼的眼球在内部和外部固定后以逐步脱水的方式处理。随后，眼球使用特丁基苯和石蜡包埋。接下来，嵌入后的眼睛被切割成厚度为4 µm的切片，然后进行H&E染色。使用Image-pro Plus 6.0确定距视神经头中心250 µm处区域的ONL、PRL和RPE的厚度。

### 3.12. 统计分析

所有结果以平均值 ± 标准差 (x ± SD) 的形式呈现。使用 Graph Pad Prism 7.0 软件进行统计分析。使用学生 t 检验比较两组的均值。对于三个或更多组样本，采用单因素方差分析和事后 Tukey 测试。p 值 < 0.05 被认为具有统计学显著性。

补充材料：支持信息可在此下载：https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms24054794/s1。

作者贡献：概念构思，X.Z.和M.J.; 方法论，M.J., X.-Y.Z.和Q.Y.; 软件，M.J., X.-Y.Z.和Q.Y.; 验证，Q.Y.和H.-J.H.; 正式分析，M.J., X.-Y.Z.和H.-J.H.; 调查，M.J., X.-Y.Z., H.-J.H., X.-T.F., Z.P., Y.-L.P.和F.Y.; 资源，X.Z.; 数据整理，M.J., X.-Y.Z.和Q.Y.; 撰写—原始稿准备，M.J.和X.-Y.Z.; 撰写—审阅和编辑，M.J., X.-Y.Z., Q.Y.和X.Z.; 可视化，M.J.; 监督，X.Z.; 项目管理，X.Z.; 资金获得，X.Z. 所有作者均已阅读并同意出版的手稿版本。

资金：我们的工作得到了中国国家自然科学基金（编号：81860170）和江西省自然科学基金（20181ACG70010）的支持。

机构审查委员会声明：动物研究方案已获得南昌大学附属眼科医院（或伦理委员会）的批准，位于中国江西省南昌市。本研究的伦理批准代码为YLP20211206.

知情同意声明：不适用。

数据可用性声明：本研究中提出的原始贡献已包含在文章/补充材料中；进一步的查询可以直接联系对应作者.

致谢：作者感谢南昌大学生命科学学院和生命科学研究所的洪旭提供斑马鱼。我们也衷心感谢李雄峰和梅露瑶在光箱的设计和构建上的巨大帮助。

冲突声明：作者声明没有利益冲突。

# 参考文献

1. 尚, Y.-M.; 王, G.-S.; 斯莱尼, D.; 杨, C.-H.; 李, L.-L. 家庭照明水平下的白光发光二极管 (LED) 与大鼠模型中的视网膜损伤. 环境与健康展望. 2014, 122, 269–276. [CrossRef] [PubMed]
2. Behar-Cohen, F.; Martinsons, C.; Viénot, F.; Zissis, G.; Barlier-Salsi, A.; Cesarini, J.; Enouf, O.; Garcia, M.; Picaud, S.; Attia, D. 发光二极管（LED）用于家庭照明：对眼睛有任何风险吗？Prog. Retin. Eye Res. 2011, 30, 239–257. [CrossRef] [PubMed]
3. Touitou, Y.; Point, S. 发光二极管对人类视网膜和生物钟的影响及作用机制。Environ. Res. 2020, 190, 109942. [CrossRef] [PubMed]
4. Faulkner, S.M.; Bee, P.E.; Meyer, N.; Dijk, D.-J.; Drake, R.J. 光疗法改善内在昼夜节律睡眠障碍和神经精神疾病的睡眠：一项系统综述和荟萃分析。睡眠医学评论 2019, 46, 108–123. [CrossRef]
5. Touitou, Y.; Reinberg, A.; Touitou, D. 夜间光照、褪黑激素分泌、睡眠不足与内部生物钟之间的关联：健康影响及昼夜节律紊乱的机制。生命科学. 2017, 173, 94–106. [CrossRef]
6. 马基, M.M.; 布鲁斯, J.N. 人类松果体生理和褪黑激素的功能意义. 神经内分泌前沿. 2004, 25, 177–195. [CrossRef]
7. Wu, Y.-H.; Swaab, D.F. 人类松果体及其在衰老和阿尔茨海默病中的褪黑激素。松果体研究杂志 2005, 38, 145–152. [CrossRef]
8. Guan, Q.; Wang, Z.; Cao, J.; Dong, Y.; Chen, Y. 褪黑激素在肥胖中的机制：综述。Int. J. Mol. Sci. 2021, 23, 218. [CrossRef]
9. Costa, G.; Haus, E.; Stevens, R. 值班工作与癌症——关于理由、机制和流行病学的考虑。Scand. J. Work. Environ. Health 2010, 36, 163–179. [CrossRef]
10. 金明；李雪；闫峰；陈伟；姜琳；张晓。低色温双原色发光二极管对三种视网膜细胞的影响。光化学与光生物学B 生物学 2021, 214, 112099. [CrossRef]
11. Lin, J.; Ding, X.; Hong, C.; Pang, Y.; Chen, L.; Liu, Q.; Zhang, X.; Xin, H.; Wang, X. 基于低色温发光二极管的正常室内照明源的几种生物学益处. Sci. Rep. 2019, 9, 7560. [CrossRef] [PubMed]
12. Wong, W.L.; Su, X.; Li, X.; Cheung, C.M.G.; Klein, R.; Cheng, C.Y.; Wong, T.Y. 与年龄相关的黄斑变性的全球流行率及2020年和2040年的疾病负担预测：系统评估和荟萃分析。柳叶刀全球健康 2014, 2, e106–e116. [CrossRef] [PubMed]
13. Hanus, J.; Anderson, C.; Wang, S. 视网膜色素上皮的坏死性凋亡在氧化应激和年龄相关性黄斑变性中的反应。《老化研究与评论》2015, 24 Pt B, 286–298. [CrossRef]
14. Binder, S.; Stanzel, B.V.; Krebs, I.; Glittenberg, C. AMD中RPE的移植。Prog. Retin. Eye Res. 2007, 26, 516–554. [CrossRef] [PubMed]
15. Ebeling, M.C.; Polanco, J.R.; Qu, J.; Tu, C.; Montezuma, S.R.; Ferrington, D.A. 改善视网膜线粒体功能作为年龄相关性黄斑变性治疗的方法。Redox Biol. 2020, 34, 101552. [CrossRef] [PubMed]
16. 杨丽；董宇；吴晨；杨布拉德，H.; 李毅；宗骅；李莲；徐涛；张强. 产前光生物调节治疗对大鼠后代新生儿缺氧缺血的影响。《治疗诊断学》 2021, 11, 1269–1294. [CrossRef] [PubMed]
17. Shen, W.; Teo, K.Y.C.; Wood, J.P.M.; Vaze, A.; Chidlow, G.; Ao, J.; Lee, S.-R.; Yam, M.X.; Cornish, E.E.; Fraser-Bell, S.; 等. 光生物调控疗法在黄斑水肿的临床前和临床研究. 糖尿病学 2020, 63, 1900–1915. [CrossRef]
18. 杨, L.; 杨, H.; 吴, C.; 张, Q. 线粒体作为神经保护的靶点: 美蓝和光生物调制的作用. 转化神经退行性疾病. 2020, 9, 19. [CrossRef]
19. Leyane, T.S.; Jere, S.W.; Houreld, N.N. 细胞信号传导与光生物调制在慢性创伤修复中的作用. Int. J. Mol. Sci. 2021, 22, 11223. [CrossRef]
20. Xie, C.; Li, X.; Tong, J.; Gu, Y.; Shen, Y. 不同关联色温（CCTs）的白色发光二极管（LED）光照对培养的人类晶状体上皮细胞的影响。Photochem. Photobiol. 2014, 90, 853–859. [CrossRef]
21. 沈, Y.; 谢, C.; 顾, Y.; 李, X.; 童, J. 发光二极管 (LED) 的照明破坏了病理细胞因子的表达并激活了人类原代视网膜色素上皮细胞中的相关信号通路. 实验眼研究. 2016, 145, 456–467. [CrossRef]
22. Ivandic, B.T.; Ivandic, T. 低水平激光治疗改善与年龄相关的黄斑变性患者的视力。光学医学与激光外科 2008, 26, 241–245. [CrossRef]
23. Qu, C.; Cao, W.; Fan, Y.; Lin, Y. 近红外光保护光感受器免受光诱导损伤在大鼠中. Adv. Exp. Med. Biol. 2009, 664, 365–374. [CrossRef]
24. Rutar, M.; Natoli, R.; Albarracin, R.; Valter, K.; Provis, J. 670-nm光治疗减少了视网膜退化后补体传播。神经炎症杂志. 2012, 9, 257. [CrossRef] [PubMed]
25. Albarracin, R.; Eells, J.; Valter, K. 光生物调制保护视网膜免受光诱导的感光细胞退化。《眼科研究与视觉科学》2011, 52, 3582–3592. [CrossRef] [PubMed]
26. Merry, G.F.; Munk, M.R.; Dotson, R.S.; Walker, M.G.; Devenyi, R.G. 光生物调制减少了干性年龄相关黄斑变性中的沉积体体积，并改善了视力和对比敏感度。眼科学报. 2016, 95, e270–e277. [CrossRef] [PubMed]
27. Markowitz, S.N.; Devenyi, R.G.; Munk, M.R.; Croissant, C.L.; Tedford, S.E.; Rückert, R.; Walker, M.G.; Patino, B.E.; Chen, L.; Nido, M.; 等. 一项双盲、随机、安慰剂对照的单中心研究，使用光生物调节治疗干性年龄相关性黄斑变性. Retina 2020, 40, 1471–1482. [CrossRef] [PubMed]
28. 加里多，C.; 古尔布克萨尼亚，S.; 拉瓦尼安，L.; 克罗默，G. 热休克蛋白：内源性凋亡细胞死亡调节因子。《生物化学与生物物理研究通讯》 2001, 286, 433–442. [CrossRef]
29. 希普, H.M.; 宋, W.; 祖克, H.; 哈斯卡洛维奇, J.R.; 泽利格曼, D. 血红素氧化酶-1与神经退行性变: 拓展参与的前沿. 神经化学杂志. 2009, 110, 469–485. [CrossRef]
30. Núñez-Álvarez, C.; Barrio, C.S.; Aguado, S.D.O.; Osborne, N.N. 蓝光通过对线粒体的作用对ARPE19细胞的生存产生负面影响，并被红光减轻。Acta Ophthalmol. 2019, 97, e103–e115. [CrossRef]
31. 唐, Z.; 居, Y.; 戴, X.; 倪, N.; 刘, Y.; 张, D.; 高, H.; 孙, H.; 张, J.; 顾, P. HO-1介导的铁死亡作为保护视网膜色素上皮退化的靶点。氧化还原生物学. 2021, 43, 101971. [CrossRef] [PubMed]
32. 米斯拉，J.R.; 霍纳，M.A.; 蓝，G.; 汤梅尔，C.S. 转录调节果蝇中的外源性解毒。《基因发展》 2011, 25, 1796–1806. [CrossRef] [PubMed]
33. Misra, J.R.; Lam, G.; Thummel, C.S. 在抗农药的果蝇菌株中Nrf2/Keap1通路的持续激活。昆虫生物化学与分子生物学. 2013, 43, 1116–1124. [CrossRef] [PubMed]
34. 宋, C.; 米特, S.K.; 齐, X.; 贝利, E.; 饶, H.V.; 丁, J.; 尹, C.S.; 顾, H.; 阿金, D.; 邓, W.A., Jr.; 等. 氧化应激介导的NFκB磷酸化上调p62/SQSTM1，通过增加自噬促进视网膜色素上皮细胞存活. PLoS ONE 2017, 12, e0171940. [CrossRef] [PubMed]
35. 胡, L.; 郭, J.; 周, L.; 朱, S.; 王, C.; 刘, J.; 胡, S.; 杨, M.; 林, C. 硫化氢保护视网膜色素上皮细胞免受氧化应激引发的凋亡，并影响自噬。氧化医学与细胞寿命. 2020, 2020, 8868564. [CrossRef] [PubMed]
36. Mao, K.; Wang, K.; Liu, X.; Klionsky, D.J. 框架蛋白Atg11招募裂变机制以驱动选择性线粒体通过自噬降解。《发育细胞》2013, 26, 9–18. [CrossRef] [PubMed]
37. Jang, K.-H.; Do, Y.-J.; Son, D.; Son, E.; Choi, J.-S.; Kim, E. AIF-独立的parthanatos在干性年龄相关黄斑变性发生中的作用。细胞死亡疾病. 2017, 8, e2526. [CrossRef]
38. Legros, F.; Lombès, A.; Frachon, P.; Rojo, M. 人类细胞中的线粒体融合是高效的，需要内膜电位，并由线粒体融合蛋白介导。分子生物学细胞 2002, 13, 4343–4354. [CrossRef]
39. Wang, Z.; Wang, S.-P.; Shao, Q.; Li, P.-F.; Sun, Y.; Luo, L.-Z.; Yan, X.-Q.; Fan, Z.-Y.; Hu, J.; Zhao, J.; et al. 脑源性神经营养因子模拟物7,8-二羟基黄酮通过重新平衡视神经萎缩1处理来保护心肌缺血。Free Radic. Biol. Med. 2019, 145, 187–197. [CrossRef]
40. Garcia, I.; Innis-Whitehouse, W.; Lopez, A.; Keniry, M.; Gilkerson, R. 氧化损伤破坏了培养的哺乳动物细胞中的OPA1介导的线粒体动态。还原报. 2018, 23, 160–167. [CrossRef]
41. Liang, F.-Q.; Godley, B.F. 由氧化应激引起的人类视网膜色素上皮细胞线粒体DNA损伤：一种可能的RPE衰老和年龄相关性黄斑变性机制。Exp. Eye Res. 2003, 76, 397–403. [CrossRef] [PubMed]
42. Kaarniranta, K.; Pawlowska, E.; Szczepanska, J.; Jablkowska, A.; Blasiak, J. 线粒体DNA损伤在ROS介导的与年龄相关的黄斑变性（AMD）发病机制中的作用。国际分子科学杂志 2019, 20, 2374. [CrossRef] [PubMed]
43. Yakes, F.M.; Van Houten, B. 在人类细胞中，氧化应激后线粒体DNA损伤比核DNA损伤更广泛且持续时间更长。美国国家科学院院刊. 1997, 94, 514–519. [CrossRef] [PubMed]
44. Jarrett, S.; Lin, H.; Godley, B.F.; Boulton, M.E. 线粒体DNA损伤及其在视网膜退化中的潜在作用。Prog. Retin. Eye Res. 2008, 27, 596–607. [CrossRef]
45. Eells, J.T.; Henry, M.M.; Summerfelt, P.; Wong-Riley, M.T.T.; Buchmann, E.V.; Kane, M.; Whelan, N.T. 治疗性光生物调节用于甲醇诱导的视网膜毒性。美国国家科学院院刊. 2003, 100, 3439–3444. [CrossRef]
46. Gopalakrishnan, S.; Mehrvar, S.; Maleki, S.; Schmitt, H.; Summerfelt, P.; Dubis, A.M.; Abroe, B.; Connor, T.B., Jr.; Carroll, J.; Huddleston, W.; 等。光生物调节保持线粒体氧化还原状态，并在视网膜色素变性的小鼠模型中具有视网膜保护作用。Sci. Rep. 2020, 10, 20382. [CrossRef]
47. Sheng, W.; Lu, Y.; Mei, F.; Wang, N.; Liu, Z.-Z.; Han, Y.-Y.; Wang, H.-T.; Zou, S.; Xu, H.; Zhang, X. 白藜芦醇对成年斑马鱼视网膜中Sirtuins、OPA1和Fis1表达的影响。Investig. Opthalmol. Vis. Sci. 2018, 59, 4542–4551. [CrossRef]
48. Liu, X.; Weaver, D.; Shirihai, O.; Hajnóczky, G. 线粒体‘亲吻和奔跑’：线粒体运动性与融合-分裂动力学之间的相互作用. EMBO J. 2009, 28, 3074–3089. [CrossRef]
49. Li, J.-Y.; Zhang, K.; Xu, D.; Zhou, W.-C.; Fang, W.-Q.; Wan, Y.-Y.; Yan, D.-D.; Guo, M.-Y.; Tao, J.-X.; Yang, F.; 等. 线粒体分裂对蓝光诱导的视网膜神经元R28细胞凋亡和自噬是必要的。Front. Mol. Neurosci. 2018, 11, 432. [CrossRef]
50. 赖勇；林鹏；陈明；张扬；陈静；郑敏；刘晶；杜浩；陈瑞；潘雪；等. L-OPA1的恢复通过抑制神经元凋亡和保护线粒体功能减轻大鼠急性缺血性中风损伤。《还原生物学》 2020, 34, 101503. [CrossRef]
51. Gilkerson, R.; De La Torre, P.; Vallier, S.S. 线粒体OMA1和OPA1作为细胞器结构/功能和细胞压力反应的守卫者。前沿. 细胞发育生物学. 2021, 9, 626117. [CrossRef] [PubMed]
52. Anand, R.; Wai, T.; Baker, M.J.; Kladt, N.; Schauss, A.C.; Rugarli, E.; Langer, T. i-AAA蛋白酶YME1L和OMA1切割OPA1以平衡线粒体的融合和分裂。J. Cell Biol. 2014, 204, 919–929. [CrossRef] [PubMed]
53. Youle, R.J.; van der Bliek, A.M. 线粒体裂变、融合与应激。科学 2012, 337, 1062–1065. [CrossRef] [PubMed]
54. Stella, S.; Geathers, J.; Weber, S.; Grillo, M.; Barber, A.; Sundstrom, J.; Grillo, S. 在斑马鱼视网膜中的神经退行性变、神经保护和再生。细胞 2021, 10, 633. [CrossRef]
55. Goldsmith, P.; Harris, W. 斑马鱼作为理解视觉障碍生物学的工具。Semin. Cell Dev. Biol. 2003, 14, 11–18. [CrossRef]
56. 蔡世荣；哈姆布林，M.R. 红外辐射的生物效应和医学应用。《光化学和光生物学B》生物学 2017, 170, 197–207. [CrossRef]
57. Chung, H.; Dai, T.; Sharma, S.K.; Huang, Y.Y.; Carroll, J.D.; Hamblin, M.R. 低强度激光（光）治疗的基础。生物医学工程年鉴. 2012, 40, 516–533. [CrossRef]
58. 日内瓦, I.I. 光生物调变治疗视网膜疾病: 一项综述. 国际眼科杂志. 2016, 9, 145–152. [CrossRef] 59. Fitzgerald, M.; Hodgetts, S.; Heuvel, C.V.D.; Natoli, R.; Hart, N.S.; Valter, K.; Harvey, A.R.; Vink, R.; Provis, J.; Dunlop, S.A. 红色/近红外照射疗法用于治疗中枢神经系统损伤和疾病. 神经科学评论. 2013, 24, 205–226. [CrossRef]
59. 张，Z.; 沈，Q.; 吴，X.; 张，D.; 邢，D. 光生物调节疗法通过激活PKA/SIRT1信号通路降低阿尔茨海默病模型中的Aβ水平。衰老细胞 2019，19，e13054。[CrossRef]
60. Luo, Z.; Wang, H.-T.; Wang, N.; Sheng, W.-W.; Jin, M.; Lu, Y.; Bai, Y.-J.; Zou, S.-Q.; Pang, Y.-L.; Xu, H.; 等. 建立NMDA诱导的成年斑马鱼视网膜神经退行性变模型。Int. J. Ophthalmol. 2020, 12, 1250–1261. [CrossRef]

[PubMed]

免责声明/出版商声明：所有出版物中所含的陈述、观点和数据仅代表个别作者和贡献者的意见，而不代表MDPI和/或编辑的观点。MDPI和/或编辑对因内容中提及的任何观点、方法、指示或产品而导致的人身或财产伤害不承担责任。