# 文章

蓝光诱导的氧化应激和自噬在斑马鱼视网膜色素上皮的损伤中的作用

# Kai-Chun Cheng 1,2,3, Yun-Tzu Hsu 4, Wangta Liu 4,5,6, Huey-Lan Huang 7, Liang-Yu Chen 8, Chen-Xi He 4, Shwu-Jiuan Sheu 2,3, Kuo-Jen Chen 1, Po-Yen Lee 2, Yi-Hsiung Lin 4,9,10,11,\* 和 Chien-Chih Chiu 4,5,6,12,13,\*

引用: Cheng, K.-C.; Hsu, Y.-T.;

Liu, W.; Huang, H.-L.; Chen, L.-Y.; He,

C.-X.; Sheu, S.-J.; Chen, K.-J.; Lee,

P.-Y.; Lin, Y.-H.; 等. 角色的

氧化应激与自噬在

蓝光引起的损伤到

视网膜色素上皮中的

斑马鱼体外和体内研究. Int. J. Mol. Sci. 2021, 22, 1338. https:// doi.org/10.3390/ijms22031338

学术编辑：Patrizia Ballerini, Antonia Patruno 和 Mirko Pesce收到：2020年12月23日接受：2021年1月7日

发布于：2021年1月29日

出版商说明：MDPI在已发布地图和机构附属关系方面保持中立。

版权: © 2021 由作者版权所有. 许可方 MDPI, 巴塞尔, 瑞士. 本文为开放获取文章，按创作共用署名 (CC BY) 许可条款和条件发布 (https:// creativecommons.org/licenses/by/

4.0/).

1. 高雄市小港医院眼科, 台湾高雄812; pington64@gmail.com (K.-C.C.); 0870649@kmhk.org.tw (K.-J.C.)
2. 眼科部门，高雄医学大学医院，高雄 807，台湾；sjiuansheu@gmail.com (S.-J.S.); maco69@gmail.com (P.-Y.L.)
3. 高雄医科大学医学院眼科，台湾高雄807
4. 生物技术系，高雄医学大学，台湾高雄807；tzu0611@gmail.com (Y.-T.H.); liuwangta@kmu.edu.tw (W.L.); u106500025@kmu.edu.tw (C.-X.H.)
5. 高雄医学大学癌症研究中心，高雄807，台湾
6. 高雄医科大学医院医学研究部，台湾高雄807
7. 长荣大学健康科学学院生物科学技术系, 台南 711, 台湾; hhuang@mail.cjcu.edu.tw
8. 医学系，高雄医学大学，高雄807，台湾；verity0418@gmail.com
9. 高雄医学大学医院心脏科, 高雄807, 台湾
10. 高雄医科大学医院脂质生物学中心, 高雄 807, 台湾
11. 高雄医学大学脂质科学与衰老研究中心, 高雄 807, 台湾
12. 生命科学系, 国立中山大学, 高雄 804, 台湾
13. 高雄医学大学研究所, 高雄 807, 台湾

\* 通讯作者：caminolin@gmail.com (Y.-H.L.); cchiu@kmu.edu.tw (C.-C.C.)

摘要：年龄相关性黄斑变性（AMD）是老年人中视网膜色素上皮（RPE）、视网膜和脉络膜毛细血管的渐进性退化，是全球失明的主要原因。因此，更好地理解蓝光暴露激活视网膜组织的潜在机制对于开发新治疗和干预策略至关重要。在这项研究中，使用440 nm波长的蓝光发射二极管以3.7 ± 0.75 mW/cm2的剂量施加于RPE细胞，持续24小时。使用ARPE-19细胞探讨蓝光暴露诱导的潜在机制。采用台盼蓝排除实验法进行细胞活力测定。流式细胞术用于检测凋亡率和自噬分析。免疫荧光显微镜分析用于研究细胞的氧化应激和DNA损伤，使用DCFDA荧光染色和抗-γH2AX抗体。建立了蓝光暴露斑马鱼幼虫模型，以探讨其对体内视网膜组织发育的影响。为了进一步展示蓝光对ARPE-19细胞的综合影响，进行了下一代测序（NGS）以进行创造性通路分析（IPA），揭示其他相关机制。结果显示，蓝光暴露导致ARPE-19细胞的细胞增殖减少和凋亡增加，呈时间依赖性。在曝光的早期阶段（2小时）氧化应激增加，并在暴露8小时后激活了ARPE-19细胞中的DNA损伤。此外，自噬在蓝光暴露24-48小时后被激活。斑马鱼幼虫模型显示蓝光对视网膜组织发育的不利影响。RNA-Seq结果确认蓝光诱导细胞死亡并参与组织生长抑制和成熟。本研究揭示了蓝光以时间依赖性的方式诱导细胞死亡的机制。此外，无论是体内实验还是NGS数据都揭示了蓝光对视网膜组织发育的影响，表明儿童接触蓝光可能相对危险。这些结果可能有助于利用基于草药的治疗眼部疾病或退化的预防策略的开发。

国际分子科学杂志 2021, 22, 1338. https://doi.org/10.3390/ijms22031338 https://www.mdpi.com/journal/ijms

关键词: 视网膜色素上皮; 蓝光; DNA损伤; 凋亡; 反应性氧种; 自噬; 鳗鱼模型; 退化

## 1. 引言

视觉缺陷对生活质量产生显著负面影响，这在全球造成了经济负担. 年龄相关性黄斑变性（AMD）是由老年人视力严重丧失引起的. AMD由负责在黄斑（视网膜中央部分）中光检测的视网膜色素上皮（RPE）细胞和锥体感光细胞的退化引起. 临床上，AMD可以分为两种主要表型：“干性（萎缩性）AMD”和“湿性（新生血管性）AMD”，后者涉及血液泄漏或异常血管生成. AMD是患者前往低视力诊所的最常见病因.

脂褐素，是一种氧化蛋白的聚集物，被报道通过抑制蛋白酶体和促凋亡蛋白失调诱导凋亡 [1]。此外，RPE细胞在过度暴露于可见光的情况下被损坏或破坏的倾向可能与视网膜疾病的特征有关，这些疾病通过增强自荧光色素的积累而加剧，后者构成脂褐素，是诱导凋亡的氧化蛋白聚集物，通过抑制蛋白酶体和促凋亡蛋白失调诱导凋亡 [1]。脂褐素是RPE细胞吞噬构成光感受器细胞外段的脂质并在溶酶体中积累的副产品。脂褐素是对RPE细胞具有光毒性的色素的复杂混合物 [2]。自荧光脂褐素的过度积累可能表明细胞衰老并增加AMD发展的风险 [3].

RPE细胞是高度分化的独特上皮细胞，它们在顶侧与邻近的光感受器相互作用并维持光感受器功能。RPE细胞位于光感受器细胞层之间，为其提供养分。如果RPE细胞发生氧化损伤，光感受器细胞的破坏将在此后迅速发生，视觉清晰度可能会受到损害[4]。RPE细胞在基侧与Bruch膜和脉络毛细血管相互作用，这在维持视觉中起着重要作用[5]。RPE细胞的损伤、代谢失调和功能障碍是AMD发展的关键因素。基于过去的研究，RPE细胞的损伤可能是由辐射、氧化应激、脂褐素积累以及免疫系统造成的[6]。RPE细胞是形成血液屏障的一层细胞，由于其高氧消耗，容易发生氧化应激。慢性氧化应激可能诱导RPE细胞损伤和损伤[7]。在氧化应激中，脂褐素介导的光氧化显著促进AMD的发展。

在可见光中，蓝光（波长400–500 nm）相对能量较高，且比红光和绿光（波长500–700 nm）更具危害性[8]。RPE细胞对蓝光特别敏感[2]，这可能会加剧年龄相关性黄斑变性（AMD）的发展[9]。越来越多的证据表明，包括蓝光和紫外光在内的光诱导损伤可以导致RPE损伤，从而导致或促进各种与黄斑相关的疾病。在可见光波长（360–830 nm）范围内，蓝光（400–500 nm）已被报道可以促进黄斑中氧化应激的诱导[10]，过度暴露于蓝光与视网膜组织的病理生理学相关，这主要是由于视网膜和感光细胞的退化[11]。短波长度的光线，如紫外光和蓝光，能量相对较高，可能对视网膜组织造成严重损伤，特别是RPE细胞[12,13]。脂褐素在细胞暴露于蓝光时可能作为光氧化剂促进氧化损伤。除了脂褐素，还有其他可能因蓝光而受到影响的内源性物质，可能对视网膜造成光毒性，如全反式视黄醛和原卟啉[14,15]。

氧化自由基也称为反应性氧种（ROS）。自由基是具有未配对电子的原子、分子或离子，具有高度的反应性和不稳定性. ROS可以氧化体内细胞并导致DNA损伤或突变. 细胞中常见的自由基包括超氧阴离子（O2−）、过氧化氢（H2O2）、一氧化氮（NO）和羟基自由基（OH−•） [16]. 这些自由基攻击DNA、蛋白质和脂质等分子，造成细胞组织的损伤 [17]. 当细胞内的ROS大量产生，而抗氧化系统无法竞争时，将导致氧化应激. 在RPE细胞中产生的氧化应激被普遍认为促进与视觉相关的疾病（例如AMD），而氧化应激源于过度的光照暴露，导致视觉循环的过度激活 [18]. 根据研究，蓝光可以通过光诱导从线粒体中的细胞色素生成ROS [19]，抑制细胞色素氧化酶并导致RPE细胞钙累积和凋亡 [20].

随着蓝光屏幕越来越普遍，而对发光二极管 (LED) 依赖的增加，由蓝光造成的人类视网膜组织退化已成为越来越关注的问题。因此，当前研究旨在揭示蓝光诱导调节的视网膜组织退化的潜在机制，以开发针对蓝光引起的视网膜组织退化的新治疗策略或药物。

## 2. 结果

### 2.1. 蓝光暴露诱导ARPE-19细胞死亡通过激活凋亡

几十年来，蓝光对视网膜色素上皮细胞 (RPE) 有害已被广泛认识；然而，其潜在机制仍不清楚。在本研究中，我们旨在确定蓝光对 RPE 细胞造成的损伤，并揭示相关的潜在通路。首先使用 MTS 测定法调查了细胞活力的变化，以测量在曝光指定时间后的细胞存活率。如图1A所示，通过显微镜观察细胞形态，我们发现 450 nm 的蓝光通过以时间依赖的方式降低 ARPE-19 细胞活力而表现出细胞毒性。使用 MTS 测定法，数据显示蓝光在曝光 10 小时后诱导了显著的细胞毒性，并且在 48 小时的蓝光曝光后，细胞活力降于 40%（图 1B）。结果表明蓝光对 ARPE-19 细胞具有很大的潜在细胞毒性。

为了研究蓝光在ARPE19细胞中诱导损伤的潜在机制，首先确定了凋亡途径。通过使用7AAD和Annexin V双染色，我们调查了早期凋亡激活状态。我们发现，早期凋亡通过P.S.膜染色百分比表现出来，随着长期蓝光照射的增加，次要凋亡被检测到并增加（图1C）。定量数据显示，对照组ARPE-19细胞中的早期凋亡率低于5%，并在48小时蓝光照射后显著增加到超过26%。总凋亡率在36小时的蓝光照射后也显著从6%增加到33%（图1D）。此外，为了研究蓝光诱导的凋亡激活，我们进行了RNA测序以检测与凋亡相关的信号调节。通过创造性通路分析® (IPA)，揭示了蓝光照射调节的通路。我们发现蓝光通过增加p21Cip1、Bax、CYP1A1、ALDH、NQO和GST的基因表达，降低SMRT、RIP140、MCM7以及Cyclin A和D的基因表达，从而调节基因激活（图1E）。结果表明，蓝光在长期照射期间诱导了显著的ARPE-19细胞死亡，而凋亡可能是细胞死亡的原因之一；此外，细胞毒性可能是由于促凋亡调节因子的激活和细胞周期检查点基因表达的抑制。

图1. 蓝光诱导的ARPE-19细胞凋亡死亡。(A) 评估ARPE-19细胞在0小时到48小时的时间依赖性蓝光照射下的细胞活力和死亡情况（放大倍数：40×; 放大：200×）。(B) 通过MTS分析确定蓝光诱导的ARPE-19细胞活力下降（\*\* p < 0.01）。(C) 蓝光照射0到36小时诱导的ARPE-19细胞凋亡。使用7AAD和Annexin V双重染色在流式细胞术分析中检测早期和晚期凋亡细胞。(D) 早期凋亡群体的流式细胞术分析的定量结果

（右下角）和总凋亡细胞比例（右下角）用于统计分析（\* p < 0.05, \*\* p < 0.01）。(E) 使用NGS（下一代测序）和IPA（智慧通路分析）来确定参与蓝光诱导的凋亡细胞死亡的潜在分子。蓝色：基因表达降低；橙色：基因表达增加。

### 2.2. 蓝光暴露引发ARPE-19细胞的氧化应激生成

为了确定蓝光照射可能引发的其他效应，研究了活性氧（ROS）的生成。为了测量蓝光照射引起的ROS水平，使用了DCFDA染色。蓝光照射的ARPE-19细胞的DCFDA染色形态在指示的时间点使用免疫荧光显微镜进行分析，数据表明ROS信号在2到4小时内显著增加，并在10小时后骤降至非常低的水平（图2A）。定量数据表明，蓝光照射后2小时和4小时的ROS信号显著高于对照细胞的6倍以上。结果表明，蓝光在早期照射中诱导了细胞ROS（图2B）。为了进一步确认ROS生成在蓝光诱导细胞死亡中的作用，使用了ROS特异性抑制剂NAC进行MTS测定。我们发现1 mM NAC处理将ARPE-19细胞的存活率大幅提高了40%，相比于单独的蓝光照射（图2C）。同样，我们通过RNA-Seq分析了潜在机制。结果表明，大多数参与氧化应激激活的调节因子，如小MAF、ATF4、NRPB、SQSTM1、HO-1、PRDX1、FTL、FTH1、SOD、TXN、GSR、TRXR1、GST、NQO、EPHX1、GCLM、HSP22/40/90、STIP1、CCT7和ERP29基因表达被蓝光上调（图2D）。结果表明，ROS生成可能在ARPE-19细胞蓝光诱导的细胞毒性的早期阶段中发挥重要作用。

图2. 蓝光诱导ARPE-19细胞中的ROS生成。 (A) 通过DCFDA染色和免疫荧光显微镜检测蓝光诱导的ARPE-19细胞ROS（活性氧物种）生成。蓝光诱导从0至48小时（放大倍数：40×; 放大：200×）。 (B) 蓝光诱导的ROS生成的定量结果

在48小时内 (\*\* p < 0.01)。 (C) 使用MTS测定法来确定蓝光诱导的ARPE-19细胞死亡的细胞活力；使用ROS特异性抑制剂NAC (1 mM)来抑制ROS生成 (\*\* p < 0.01)。 (D) RNA测序和IPA分析在蓝光照射下影响ARPE-19细胞的ROS调控通路及相关分子。蓝色：基因表达降低；橙色：基因表达增加。

### 2.3. 蓝光刺激引发的DNA损伤

接下来我们研究了蓝光照射后DNA损伤的激活情况。著名的DNA损伤标志物γH2AX的强度可以代表蓝光诱导的DNA损伤水平。通过对γH2AX的免疫荧光染色和显微镜分析，我们发现γH2AX的表达水平在蓝光照射的4到24小时内显著增加。在细胞核中检测到的强烈γH2AX免疫信号与蓝光照射时间呈正相关（图3A）。为了研究ROS在蓝光诱导的DNA损伤中的作用，使用了抑制剂NAC。顺铂（CPT）

作为阳性对照，引发细胞DNA损伤，通过阻止DNA复制。结果表明，在正常条件下，ARPE-19细胞中γH2AX表达较低，而在CPT处理和蓝光照射的ARPE-19细胞核中发现强烈的γH2AX表达。然而，在1 mM NAC处理后，与单纯蓝光照射的ARPE-19细胞相比，γH2AX的表达减少了（图3B）。下一代测序（NGS）数据显示，蓝光照射增加了细胞周期相关DNA损伤反应通路中的基因表达，包括HIPK2、MDM2、p21Cip1和GADD45，同时DNA-PK、TOP2和PLK基因表达则减少（图3C）。结果表明，DNA损伤被激活，随后氧化应激和活性氧（ROS）产生增加。

图3. 蓝光诱导的ARPE-19细胞DNA损伤。（A）通过检测所呈现标记物γH2AX的免疫荧光强度评估DNA损伤。蓝光照射时间为0至24小时（放大倍率：40×；放大：200×）。 （B）为了确认ROS生成在DNA损伤调控中的作用，使用ROS抑制剂NAC（1 mM）来确定DNA损伤的变化。CPT（顺铂；5µM）用于阳性DNA损伤对照组（放大倍率：40×；放大：200×）。 （C）RNA测序的IPA显示与蓝光照射调控的ARPE-19细胞相关的分子。蓝色：基因表达降低；橙色：基因表达增加。

### 2.4. 蓝光照射导致ARPE-19细胞的细胞自噬激活

随后，确定了自噬性细胞死亡。使用AO（醌橙）染色，我们检测到了蓝光激活的自噬水平。绿色荧光被检测为细胞内部的原始信号，而在酸性囊泡中发生自噬时观察到红色荧光。氯喹（CQ）用作阳性对照以触发显著的自噬以便比较。如图4A所示，我们发现蓝光通过增加ARPE-19细胞中红色荧光的百分比以时间依赖的方式诱导自噬。定量结果分析表明，自噬在24和48小时蓝光照射的ARPE-19细胞中显著发生（图4B）。3-甲基腺苷（3-MA）用于通过阻断PI3K/mTOR激活自噬体形成来抑制自噬。在当前研究中，我们发现单独处理3-MA并不干扰细胞活力；然而，当与蓝光刺激结合时，我们发现细胞毒性加重，ARPE-19细胞死亡增加了15%（图4C）。RNA-Seq数据表明，细胞周期DNA损伤相关通路调节因子在暴露于蓝光后发生了变化。包括40S和60S核糖体在内的核糖体亚单位的基因表达，如eIF1, eLF4A, ATF4和GADD34，上调了，而参与细胞周期进程的G-肌动蛋白、周期蛋白D和VEGFA则下调了（图4D）。确定了负责自噬不同阶段的相关标记物。暴露于蓝光后的24小时内，溶酶体形成标记物LAMP2和自噬体成熟标记物LC3 I/II及P62的蛋白表达水平均上调。此外，重要的自噬抑制因子mTORC1在蓝光照射下被发现减少（图4E）。结果表明，由蓝光激活的自噬可能是细胞死亡的原因之一。

图4. 蓝光激活的ARPE-19自噬。(A) 使用流式细胞术通过荧光素橙染色确定蓝光照射对ARPE-19细胞诱导的自噬效果。氯喹(CQ)作为阳性对照激活自噬。(B) 蓝光激活的ARPE-19细胞自噬的定量结果，从0到48小时 (\* p < 0.05)。 (C) 为了确定自噬效应在蓝光诱导的ARPE-19细胞死亡中的作用，使用自噬上游调节因子PI3K抑制剂3-MA来演示细胞活力。使用MTS (2 mM)测定法来确认细胞活力 (\* p < 0.05, \*\* p < 0.01)。 (D) RNA测序和IPA揭示了蓝光在ARPE-19细胞中调控的潜在机制。蓝色：基因表达降低；橙色：基因表达增加。(E) 自噬相关调节因子标记物的西方印迹分析，包括启动抑制因子mTOR、溶酶体调节因子LAMP2以及自噬体P62和LC3 I/II。ARPE-19细胞暴露在蓝光下长达24小时。

### 2.5. 蓝光照射对斑马鱼幼虫视网膜的长期影响

为了确定蓝光对视网膜相关组织的长期伤害，建立了一种斑马鱼蓝光照射模型进行视网膜组织学分析。如图5A所示，视网膜组织的HE染色显示，正常的视网膜组织层分布包括内纤维层（IPL）、内核层（INL）、外核层（ONL）和RPE层。然而，在蓝光照射24小时和30小时后，整个视网膜的厚度不仅减少，IPL、INL、ONL和RPE层等组织的厚度也相应减薄。定量结果显示蓝光显著减少了所有视网膜组织的厚度（图5B–F）。蓝光对视网膜组织的有害影响导致视网膜细胞死亡并使相关组织层变薄。为了进一步检测蓝光在体内诱导细胞毒性的潜在机制，使用斑马鱼视网膜组织进行TUNEL检测和细胞凋亡关键调节因子caspase-3的IFC评估。通过TUNEL免疫荧光检测和显微镜分析，我们发现蓝光在视网膜各层中诱导了明显的TUNEL反应（图5G）。同样，IFC caspase-3蛋白表达结果显示蓝光增加了凋亡调节因子标记物的表达，从而促使视网膜细胞（包括RPE细胞）的程序性细胞死亡（图5H）。结果表明，蓝光确实通过激活斑马鱼模型中的凋亡信号诱导了视网膜细胞的死亡。

图5. 蓝光在斑马鱼幼虫模型中调节视网膜组织发育的影响。(A) 通过HE染色的视网膜组织切片确定视网膜相关层的分布，包括IPL（内膨胀层）、INL。

(内核层), ONL (外核层), 和 RPE (视网膜色素上皮) 层。比较了 24 和 30 小时的蓝光照射时间与 0 小时的对照组。比较了各个层的定量厚度结果，包括 (B) 整个视网膜, (C) IPL, (D) INL, (E) ONL, 和 (F) RPE 层，以确定蓝光对视网膜组织发展的影响 (\* p < 0.05, \*\* p < 0.01)。 (G) 蓝光照射的斑马鱼视网膜组织的 TUNEL 检测。相位: 明场，绿色: TUNEL 反应，蓝色: DAPI 用于细胞核染色。斑马鱼在 0、24 和 30 小时内暴露于蓝光中。 (H) 用于凋亡免疫荧光鉴定标记物Caspase-3的蓝光照射斑马鱼视网膜组织。绿色: Caspase-3 表达。

2.6. RNA测序以确定参与蓝光的潜在信号转导

## 诱导损伤

为了进一步确定蓝光诱导的 ARPE-19 细胞死亡的潜在机制，筛查了大规模的基因表达改变。通过使用 NGS，全面确定了对照 ARPE-19 和蓝光照射的 ARPE-19 细胞中的基因表达。为了分析基因表达的差异及其在蓝光引发的机制中的作用，使用了 IPA。通路富集数据显示在 ARPE-19 暴露于蓝光后有 671 个差异表达基因 (图 6A)。我们发现，蓝光照射影响了 ARPE-19 细胞的 16 种以上的细胞过程，通过调查相关基因的改变和涉及的信号通路。至少有 340 个基因 (超过 241 个与癌症细胞死亡相关的基因, 超过 67 个与细胞发育相关的基因, 和 32 个与细胞死亡生存相关的基因) 在 ARPE-19 细胞的命运决定中被蓝光修饰 (图 6B)。基因表达热图显示蓝光照射通过分析蓝光对毒性功能的影响，抑制了与正常细胞功能、行为、细胞-细胞相互作用和发育相关的基因的表达。此外，我们发现蓝光参与了额外的机制，包括生物体损伤和异常、癌症发展和细胞死亡 (图 6C)。进一步分析显示，蓝光细胞全面减少了与 ARPE-19 细胞的细胞运动、细胞周期、组织发育和细胞-细胞相互作用相关的信号转导 (图 6D–G)；活性分子见表 1。RNA-Seq 结果表明，蓝光对正常 ARPE-19 细胞功能的普遍抑制以及对细胞死亡相关通路的激活可能对视网膜组织的各个方面产生严重的不利影响。

表1. 参与蓝光诱导ARPE-19细胞功能的分子。

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 类别 | 预测激活状态 | p-值 | 激活z-分数 | 相关分子 |
| 细胞  运动 | 减少 | 9.36 × 10−47 | −4.498 | ACTB, ACTN1, ACTN4, ACTR2, ADAM19, ADAM9, ADAMTS5,  AHNAK, AKAP12, AKT1S1, ALCAM, ALDH1A3, ALDOA,  ANGPTL2, ANXA2, ANXA3, ARHGAP11A, ARL4C, ARPC2,  ASPH, ASPM, AXL, BAX, BTG2, CA9, CALD1, CALR, CAP1, CAST,  CCBE1, CCN1, CCN2, CCNA2, CCND1, CD274, CD44, CD63,  CDH11, CDH4, CDK1, CDKN1A, CENPF, CFL1, CLIC4, CNN2,  COL11A1, COL4A1, COL4A2, CRMP1, CRY1, CSF1, CTSL, CYP1A1,  CYP1B1, DAG1, DCBLD2, DDRGK1, DEK, DIAPH1, DIO2, DKK1, DNAJA1, DNAJB4, DSP, DUSP1, ECT2, EDN1, EFNB2, EGFR,  EGLN1, EMP1, ENAH, ENO1, ENPP2, EPPK1, ERRFI1, ETS1, EZR, F2R, FASN, FAT1, FAT3, FBN1, FERMT2, FGF1, FGF5, FKBP4,  FLNA, FLNB, FLNC, FLRT2, FN1, FOSL2, FOXF2, FOXQ1, FSTL1,  GADD45A, GAPDH, GAS5, GDF5, GIPC1, GNAI2, GNG12, GPC1,  GPI, GTSE1, HIF1A, HMGA2, HMGB1, HMGB2, HMOX1,  HSP90AA1, HSPA8, HSPB1, HSPD1, HSPG2, ID1, ID3, IGF2R,  IGFBP3, IGFBP5, IGFBP7, IL7R, INHBA, INPPL1, IRS2, ITGA3,  ITGA4, ITGA5, ITGAV, ITGB1, ITGB3, JUN, JUNB, KDM3A, KIF14,  KIF20B, KIFC1, KLF2, KLF6, KPNA2, KRT18, KRT8, LCP1, LDHA,  LIMA1, LMNB1, LMNB2, LMO4, LMO7, LOX, LOXL2, LRP1, LTBP2,  LTBP3, LTBR, MAP1B, MAP2, MAP4, MBOAT7, MDM2,  MIR100HG, MSN, MYADM, MYH10, MYH9, MYL12A, NAV1,  NDST1, NEDD9, NEU1, NGF, NINJ1, NKX3-1, NOG, NPPB, NQO1,  NR3C2, NREP, NRP1, OSGIN1, P4HB, PALLD, PCOLCE2, PDGFB,  PDK1, PHLPP1, PLXNB2, PODXL, PPIF, PPP1R15A, PRDX1, PTEN,  PTPRB, PTPRF, PTPRJ, RACGAP1, RELN, RPL13A, RPS19, RUNX2,  SEMA3B, SEMA7A, SERPINB2, SERPINE1, SERPINE2, SGK1,  SLC16A3, SLC3A2, SLC48A1, SLC7A11, SLC7A5, SLIT3, SOD1,  SORT1, SOX9, SPARC, SPHK1, SQSTM1, TAGLN2, TFPI, TGFB2, TGFBR1, THBS1, TIMP3, TKT, TLN1, TMEM30A, TMPO,  TMSB10/TMSB4X, TNFRSF10B, TNIK, TNS1, TPI1, TPM1, TPM2,  TPM3, TPT1, TSPAN14, TUBA1C, TUBB, TXN, TXNRD1, UCHL1, VASP, VCL, VEGFA, VIM, VSIR, WBP2, WWC1, YBX1, ZYX |
| 细胞周期 | 减少 | 1.49 × 10−23 | −2.301 | AKAP12, ANLN, BIRC5, BUB1B, CAP1, CCNB1, CDC20, CDK1,  CDKN1A, CENPE, CEP55, CFL1, CIT, CKAP2, CSF1, DIAPH3,  ECT2, FLNA, GADD45A, GIPC1, GNAI2, GPC1, HIPK2, HSPB1,  INCENP, ITGB1, KIF14, KIF20A, KIF20B, KIF23, KIFC1, MCM7,  MDM2, MYH10, NDC80, NEK6, NEK7, NUSAP1, PLK1, PRC1,  RACGAP1, SPART, SPDL1, TACC3, TM4SF1, TOP2A, UBE2S, YBX1 |

表 1. 续

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 类别 | 预测激活状态 | p-值 | 激活z-分数 | 相关分子 |
| 组织发育 | 减少 | 7.58 × 10−16 | −1.174 | ANXA2, AXL, BMPER, CA9, CALR, CCN1, CCND1, CD44,  CDKN1A, CLIC4, COL4A2, CSF1, DAG1, DKK1, ECT2, EDN1,  EFNB2, EGFR, F2R, FAT1, FGF1, FLNB, FN1, FOSL2, FRAS1, GPC1,  HEG1, HIF1A, HIPK2, HMGB1, HMGB2, HMOX1, HSPG2, ID1, ID3,  IGFBP3, ITGA4, ITGB1, ITGB3, JUN, KRT18, KRT8, LOXL2, LTBR,  MYDGF, NGF, NKX3-1, NRP1, ODC1, PALLD, PDGFB, PLOD3,  PTEN, PTPRJ, RUNX2, SERPINE1, SOX9, SPARC, TGFBR1, THBS1, TIMP3, VCL, VEGFA |
| 细胞-细胞  信号传导与相互作用 | 减少 | 7.45 × 10-15 | −1.439 | ADAM9, AHNAK, ANXA2, AXL, BAMBI, BAX, BHLHE40, BMPER,  BNIP3, CALR, CCN1, CCN2, CCND1, CD274, CD44, CDKN1A,  CFL1, CRY1, CSF1, CTSL, DKK1, DUSP1, EDN1, EFNB2, EGFR,  ETS1, F2R, FBN1, FERMT2, FGF1, FLNA, FN1, GADD45A, GAS5,  GNAI2, HMGB1, HSPB8, HSPD1, HSPG2, HSPH1, ID1, ID3, ITGA3,  ITGA4, ITGA5, ITGAV, ITGB1, ITGB3, KLF2, KRT18, KRT8, LOX,  LRP1, LTBR, MGST1, MT-CO1, MT-ND2, MT-ND3, MT-ND4,  MT-ND5, NBR1, NCOR2, NGF, NPPB, ODC1, PDGFB, PFKFB3,  PHLPP1, PLXNB2, PRDX1, PRKDC, PTEN, PTPRJ, RAB3B,  SERPINE2, SOD1, TAB3, TACC3, TGFB2, TGFBR1, THBS1, TLN1, TNFRSF10B, TOP2A, TPT1, VASP, VEGFA, VIM, VSIR |

图6. 蓝光调控下ARPE-19细胞的差异基因表达分析及潜在机制. (A) 对照组与蓝光照射组之间差异表达基因（DEGs）的总数. (B) 涉及的671个差异表达基因的前15种细胞疾病和功能. (C) 由IPA生成的毒性和生物功能分析的一般热图和各个目录热图，包括(D) 细胞运动,(E) 细胞周期,(F) 组织发育, 和(G) 细胞间信号传递与相互作用，特别分析以确定被蓝光影响的调控通路. 蓝色: 基因表达下降; 橙色: 基因表达上升.

### 3. 讨论

#### 3.1. 一般讨论

在当今社会，我们离不开计算机、通信和消费（3C）产品。因此，我们经常接触各种类型的可见光。波长范围在400–450 nm的蓝光被报道为对眼睛最危险的光。然而，蓝光如何诱导视网膜组织损伤的完整机制尚未明确。在本研究中，我们旨在发现蓝光诱导的ARPE-19细胞死亡的机制。此外，应用NGS进行了广泛的基因调控筛选，以揭示蓝光影响和调控的所有潜在机制。我们的数据显示，蓝光通过至少四种现象减少了视网膜ARPE-19细胞的生存：（1）诱导细胞凋亡，（2）ROS生成和增加细胞氧化应激，（3）DNA损伤，以及（4）自噬激活。这四种现象可能是导致蓝光诱导的ARPE-19细胞死亡的主要原因。

#### 3.2. 蓝光诱导的凋亡

蓝光诱导的视网膜细胞凋亡已有数十年的报道。早在1999年和2001年，Wu等人和Seko等人展示了关于蓝光诱导的rat视网膜组织和培养的人视网膜色素上皮细胞凋亡的证据，二者均使用相同的TUNEL检测来评估凋亡并以时间依赖的方式计算凋亡率。DNA梯带证明了DNA断裂的凋亡结果[21,22]。在我们的实验中，通过使用7AAD和Annexin V双重染色，我们通过流式细胞术定义了早期凋亡率和总凋亡率。然而，当我们比较细胞存活率和细胞凋亡率（早期/总计）时，我们发现蓝光照射10小时后，细胞活性显著降低，仅有轻微的凋亡发生。这个现象很有趣，因为它表明蓝光诱导的凋亡可能导致ARPE-19细胞死亡，并参与其他信号通路。

#### 3.3. 蓝光诱导的氧化应激

为了评估蓝光诱导损伤的潜在机制，研究了氧化应激。Seko等人在2001年首次报告了一个概念，即蓝光诱导大鼠分离RPE细胞的死亡和损伤可以通过使用30 mM NAC来抑制[22]，并得出结论称RPE细胞通过依赖氧化的机制而被破坏，最终导致了细胞凋亡。然而，当时没有提供真实数据。免疫荧光图像和定量数据表明，暴露于蓝光后仅2小时和4小时就会生成ROS。这些结果可能解释了在蓝光照射早期阶段，凋亡未完全激活时细胞存活率下降的原因之一。ROS的产生可能导致DNA损伤及相关的蛋白质活性抑制，从而影响整体细胞过程。Lee等人报告称蓝光照射诱导人类角膜上皮细胞的氧化应激，并导致细胞活力下降[23]。测试了一系列蓝光波长，以证明蓝光对角膜上皮细胞的危害，他们添加的提取物有效地通过激活自由基清除活性抑制了细胞死亡，并增加了血红素氧合酶-1（HO-1）、过氧化物酶体酶-1（Prx-1）、过氧化氢酶（CAT）和超氧化物歧化酶-2（SOD-2）的抗氧化酶表达。因此，蓝光可能在短期暴露后对RPE细胞产生同样的ROS生成和氧化应激增加的效果。

#### 3.4. 蓝光诱导的 DNA 损伤

DNA损伤反应（DDR）途径，包括ATM-Chk2和ATR-Chk1检查点，在氧化应激诱导的DNA损伤中被激活，以协调DNA修复过程、细胞周期、细胞凋亡和细胞衰老[24]。共济失调毛细血管扩张突变蛋白（ATM）和ATM及Rad3相关蛋白（ATR）是DDR的主要调控蛋白。我们的数据清楚表明蓝光通过增加γH2AX的表达引起DNA损伤。此外，NAC处理强烈表明DDR主要是通过氧化应激的激活；一旦特定抑制剂消除了应激，DNA损伤得以改善。陈等人在2019年提供了证据，表明蓝光可以通过上调Ku80的表达在蓝光暴露的视网膜神经细胞中诱导DNA双链断裂。

#### 3.5. 蓝光诱导的自噬

自噬是一个复杂的生理降解和再循环过程。功能失常或损坏的细胞内物质（蛋白质/脂质/细胞器）被自噬泡吞噬并在溶酶体中降解。最终，它们将在细胞代谢过程中被重新利用 [25,26]。一些研究报道了蓝光在相关组织中激活自噬以应对诱导的细胞损伤。早在2013年，陈等人发现有关自噬参与光诱导Abca4-/-Rdh8-/-小鼠自噬的证据，缺失必要的自噬基因，包括Beclin1和Atg7，进一步增加了细胞对光诱导视网膜组织损伤的易感性。结果表明自噬在光诱导损伤中发挥着关键和保护作用 [27]。同样，夏等人特别强调了蓝光在老年小鼠中诱导自噬。他们的数据表明，经过五天的蓝光照射后，10个月大的小鼠视网膜功能发生变化，包括a波和b波潜伏期的延迟和幅度的减少。此外，自噬相关调节因子如PERK、LC3和Beclin-1在蓝光照射的早期阶段上调，而在晚期阶段下调 [28]。我们的研究发现，蓝光通过降低自噬抑制因子mTOR的表达并增加ARPE-19细胞中的自噬调节因子来改善自噬。曝光24–30小时后，溶酶体形成标记物LAMP2和自噬泡成熟标记物LC3 I/II的表达被激活以促进自噬进程。蓝光是可见光的主要成分；因此，我们当前研究的发现与文献一致，认为自噬的存在可能是应对压力引起的细胞损伤或死亡的早期细胞保护机制之一。P62被认为是自噬的底物，其增加表明在蓝光照射下自噬的异常进程。同时发现的脂褐素增加，我们认为自噬在启动后被阻断。然而，我们证明这种情况可能会加剧细胞压力，最终导致细胞死亡 [29]。这些发现或许可以解释为什么自噬抑制剂3-MA与蓝光照射结合会进一步降低ARPE-19细胞的活力。3-MA主要用于通过抑制自噬泡和溶酶体的形成来阻止自噬进程；阻断自噬泡可能会抑制自噬过程并增加细胞压力。我们报告了一种自噬启动化合物C2鞘氨醇与自噬抑制剂CQ结合的类似效果。细胞压力异常增加最终可能会使保护性的自噬效应转变为有害的细胞死亡效应 [29]。因此，现象表明自噬抑制剂与蓝光照射相结合可能导致意想不到的严重损害。

#### 3.6. 动物模型

年龄相关性黄斑变性（AMD）是全球老年人失明的最常见原因，光诱导的AMD可能是导致视网膜细胞损伤积累和降低保护作用的主要原因之一. 陈等人使用小鼠模型指示 10 个月大小鼠的光诱导视网膜光感受器杆组织损伤，表明光在诱导AMD中的促进作用 [27]. 相比之下，我们的斑马鱼模型显示蓝光对视网膜组织发展的影响，这与陈在2013年报告的概念有所不同. 他们的数据表明，在光照后七天，超过6个月大或老年小鼠的视网膜组织外核层（ONL）厚度减少. 然而，通过与对照组比较，我们发现包括内位脉络层（IPL）、内核层（INL）、外核层（ONL）和视网膜 pigment epithelium（RPE）层在内的多个层次受到显著影响，且在4天大的斑马鱼幼虫中，蓝光照射后表现出厚度减小. 此外，针对TUNEL和caspase-3的免疫荧光检测显示蓝光在诱导视网膜组织凋亡中的调节作用，揭示了蓝光在体内的有害影响. 这一发现与我们体外结果一致，后者显示蓝光对ARPE-19细胞增殖的抑制作用与凋亡的诱导作用. 在新生阶段，细胞增殖和分化在组织/器官成熟中都发挥着重要作用. 因此，蓝光的抑制效应影响了细胞增殖和细胞分化，导致在视网膜发育过程中儿童时期的后遗症更加严重.

相关实验需要证明这个概念。

#### 3.7. NGS数据用于潜在机制预测

通过分析RNA测序数据，我们发现了在视网膜APRE-19细胞中涉及蓝光调控的分子，这些分子参与多个途径，包括细胞凋亡、氧化应激生成、DNA损伤和自噬，并且时间依赖性分析显示了蓝光诱导的细胞效应的时间顺序。此外，IPA结果揭示了超出我们预期的额外潜在机制：蓝光暴露不仅引起了细胞增殖抑制，还影响了组织成熟、发育、细胞间相互作用、运动、形态和炎症，这在过去很少被报道。结合我们在斑马鱼幼体中的数据，蓝光可能对视网膜组织发育产生抑制作用，导致多层（整个视网膜以及IPL、INL、ONL和RPE层）视网膜组织厚度的减少，这不同于Xia模型中针对10个月大小鼠报道的无序光感受器外段（OS）。蓝光暴露对视网膜组织生长和发育的潜在影响提供了宝贵的信息和科学基础，为未来的研究提供了依据，并值得进一步验证和讨论。

### 4. 材料与方法

#### 4.1. 培养

视网膜色素上皮细胞系-19（ARPE-19），是一层极化上皮细胞，位于感光视网膜与脉络毛细血管之间，在正常生理条件下分化并处于有丝分裂失活状态。ARPE-19细胞（BCRC寄编号：60383）来自生物资源收集与研究中心（BCRC，台湾新竹），在含有8%（v/v）胎牛血清、100单位/mL青霉素和100 µg/mL链霉素的Dulbecco改良鹰培养基（DMEM，Invitrogen Corporation，加利福尼亚州卡尔斯巴德，美国）中培养，在37 ◦C、5% CO2的培养箱中进行培养。细胞暴露于0至639 J/cm2的蓝光下，并培养0至48小时。不同蓝光照射剂量实验以三重复进行，并重复三次以确保可重复性。

#### 4.2. 细胞活性评估

细胞（1 × 105）在37 ◦C的5% CO2培养箱中于6 cm培养皿中培养. 在24小时附着后，细胞暴露于蓝光下0、2、4、10、24、36或48小时. 去除上清液，并用1× PBS洗涤；加入200 µL胰蛋白酶（Trypsin-EDTA, 2×）（Invitrogen, Carlsbad, CA, USA）；将细胞放置在37 ◦C培养箱中10分钟，直到完全悬浮. 总共有1 mL培养液添加到悬浮的细胞中，在15 mL离心管中. 管子混合均匀，20 µL细胞溶液转移到1.5 mL离心管中，然后加入20 µL台盼蓝并混合均匀以进行细胞染色. 染色后，使用显微镜计数细胞数量. 活细胞排出染料，呈现圆形光亮且未染色，而死亡细胞则呈蓝色染色.

#### 4.3. 细胞活力评估

细胞活力使用比色法三氟氮基盐酸盐3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-5-(3-羧基甲酰苯酚)-2-(4-磺酰基苯)-2H-四唑（MTS, Promega, Madison, WI, USA）测定。简单来说，将2.5 × 103个细胞接种到96孔板中，细胞接受不同的蓝光照射剂量（从0到639 J/cm2），持续时间按说明进行。每个孔中MTS和苯胺甲基硫酸盐（PMS, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA）的最终浓度分别为80 µg/mL和7.3 µg/mL，细胞进一步培养。随后，使用微孔板读数器（MTX Lab Systems, Inc., 维也纳, VA, USA）在490 nm处测量吸光度，相对细胞活力表示为处理组与对照组吸光度的百分比。

#### 4.4. 通过Annexin V/7AAD检测法确定凋亡

Annexin V (#AVK005, Strong Biotech Corporation, Taipei, Taiwan)/7AAD (#11397, Cayman, Ann Arbor, MI, USA) 被用来检测凋亡。在蓝光照射后，细胞用 10 µg/mL annexin V-荧光异硫氰酸酯和 1 µg/mL 7AAD 处理 30 分钟，然后用 Accuri™ C6 仪器 (BectonDickinson, Mansfield, MA, USA) 进行流式细胞术。

#### 4.5. 细胞内ROS的测定

细胞（1 × 105）被播种在6厘米的培养皿中。细胞接受蓝光照射0、2、4、10、24、36或48小时处理。处理后，细胞被孵育与

10 mL的2,7-二氯荧光素二醋酸酯探针(DCFH-DA, Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA)在37°C下孵育20分钟，然后用PBS洗涤三次。DCFH的荧光强度通过流式细胞仪进行定量分析(激发波长为485 nm，发射波长为525 nm)，使用Accuri™ C6仪器及其软件进行分析。结果以对照细胞的百分比表示。

#### 4.6. DNA损伤评估

细胞被暴露在蓝光下不同时间，并对细胞进行收集. 然后，使用4%多聚甲醛进行10分钟的固定，并用PBS清洗细胞三次. 使用0.5% Triton作用5分钟后，使用1%BSA浸泡15分钟提取细胞，并将500倍的初始抗体γH2AX（目录号：sc-101696，圣克鲁斯, 达拉斯, TX, USA）通过加入1% BSA稀释，并在4 ◦C的冰箱中摇晃一个小时. 用1% BSA清洗细胞3次，每次10分钟，加1% BSA稀释二抗500倍，并在冰箱中孵育1小时. 去除二抗后，细胞用1% BSA和浓度为1 mg/mL的40,6-二氨基-2-苯基吲哚（DAPI）孵育，核使用2000倍稀释的DAPI进行标定，然后用1% BSA清洗细胞五次. 然后，从24孔板上取下圆形载玻片，向载玻片中添加3 µL的油滴，并将圆形载玻片垂直放置在载玻片上以覆盖油滴. 最后，使用倒置荧光显微镜（奥林巴斯，型号：IX71，东京新宿，日本）进行成像.

#### 4.7. 溴化乙啶橙染色以评估自噬

总共 1 × 105 ARPE19 细胞被播种到一个 60 mm 培养皿中，在 5% CO2 的培养箱中于 37 ◦C 培养。细胞在 5 mL 培养基中培养 24 小时，并暴露于不同时间的蓝光下。加入胰蛋白酶 (1 mL) 收集细胞，并在 4 ◦C 下以 3000 rpm 离心 10 分钟。去除上清液，向细胞中加入 1 mL 的铅铬橙 (AO) 染料，在 37 ◦C 下孵育 15 分钟，然后离心以去除上清液。用 PBS 洗涤三次后，重复离心步骤。去除上清液，加入 200 µL PBS，小心且反复使用吸管将细胞悬浮。使用 BD Accuri C6 流式细胞仪和随附软件分析数据。

#### 4.8. RNA提取与分析

在暴露于蓝光24小时后，使用TRIzol®试剂（Invitrogen, USA）根据制造商的说明提取总RNA。采用纳米滴定2000c光谱仪（Thermo Scientific, Waltham, MA, USA）对纯化的RNA进行定量，以获得260 nm处的光密度（OD），并使用Qubit 2.0荧光计（Life Technologies, Carlsbad, CA, USA）与Agilent 2100生物分析仪系统（Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA）评估RNA的完整性。

#### 4.9. 文库准备和测序

RNA文库构建和测序由Tools Biotech进行

(生物工具, 台北, 台湾). 根据制造商的说明，总RNA用于使用TruSeqtm RNA LT样本制备试剂盒（Illumina Inc., 圣地亚哥, CA, USA）构建文库. 使用标记的磁珠寡聚（dt）从不同处理组的ARPE-19细胞中收集mRNA. 然后在片段缓冲液中随机断裂mRNA, 并使用随机六聚体和逆转录酶进行cDNA合成. 第一步链合成后，加入定制的第二链合成缓冲液（Illumina）、dNTPs、RNase H和大肠杆菌聚合酶I，通过缺口转移形成第二链. 经过纯化、末端修复、A尾加、序列适配子连接、大小选择和PCR富集，最终的cDNA文库完成. 随后，使用Qubit® dsDNA H.S. 检测试剂盒（Life Technologies, Carlsbad, CA, USA）首先定量文库浓度，然后使用Agilent 2100生物分析仪系统（Agilent Technologies, 圣克拉拉, CA, USA）稀释至1 ng/µL. 文库适配子的cDNA大小在两端进行测定并通过定量PCR（Q-PCR）获得相对高的准确度（文库活性 > 2 nm）. RNA文库在Illumina HiSeq 2500（Illumina, Inc., 加利福尼亚, CA, USA）仪器上进行300个周期的测序. 测序数据使用Illumina软件HiSeq X系统（HD.3.4.0/RTA 2.7.7）处理.

#### 4.10. 生物途径分析

首先，使用原始的fastq读取来验证确定的序列质量。预先删除了接头序列，修剪了低质量末端，并使用Trimmomatic软件过滤低质量读取（Q33）。然后，使用来自tophat2软件的低质量数据生成RNA。对于序列数据分析，高质量读取对齐与人类参考基因组（grch38.p7）进行比较。使用featureCounts软件计算基因计数，并通过RLE/TMM/FPKM进行标准化。根据q值 < 0.05作为筛选阈值筛选差异表达基因。差异基因结果被筛选，并使用京都基因和基因组百科全书（KEGG）途径数据库（http://www.genome.ad.jp/kegg/kegg1.Html）进行后续系统生物测定。

#### 4.11. 统计分析

所有实验均进行三次重复，数据表示为均值 ± 标准差。地图绘制和统计分析使用Sigma Plot 12.0（SPSS Inc., Chicago, IL, USA）进行。数据经过方差分析（ANOVA）和Duncan多重范围检验。p < 0.05被认为具有统计学意义。

### 5. 结论

总之，我们的结果表明蓝光的有害作用是通过抑制细胞增殖及诱导 DNA 损伤和氧化应激的序列机制引起的视网膜 ARPE-19 细胞死亡（图 7）。虽然自噬的保护机制与细胞增殖抑制和氧化应激同时发生，但似乎不足以阻止损伤的积累。更可能的是，自噬的追踪过程可能是导致 RPE 细胞因细胞应激压力而发生自噬性细胞死亡的原因之一。斑马鱼幼虫模型表明，蓝光的有害作用包括减少视网膜组织层厚度和 4 天大斑马鱼的视网膜退化，而此时视网膜组织仍在发育中。RNA-Seq 的结果提供了许多参与蓝光作用于 ARPE-19 细胞的潜在机制，表明对细胞存活和细胞周期调节的影响，同时还涉及细胞/组织发育、细胞间相互作用、蛋白质/基因表达和炎症的调节。本研究揭示了关于蓝光对视网膜细胞损伤的新证据，如图形摘要所示，并为在现代社会中开发针对蓝光诱导的黄斑变性的新的治疗策略提供了科学依据。

图 7. 蓝光诱导视网膜组织病理发生的示意图。我们的结果表明，蓝光诱导了RPE细胞的连续效应，包括（1）ROS生成，（2）DNA损伤，（3）自噬应激和（4）凋亡，最终导致黄斑变性或视网膜病。蓝色箭头表示对RPE无害的低能可见光，红色箭头表示高能蓝光的照射。

作者贡献: K.-C.C., Y.-H.L.和C.-C.C.设计了实验并撰写了论文. Y.-T.H., L.-Y.C.和C.-X.H.进行了实验并收集数据. C.-X.H.进行了斑马鱼实验. Y.-H.L.分析了体外和体内数据. W.L.进行了生物信息学分析并提供了有关体内斑马鱼实验的建议. H.-L.H.作为生物测定的顾问并提供试剂. K.-C.C., S.-J.S., K.-J.C.和P.-Y.L.提供了试剂和转化建议. K.-C.C.和Y.-H.L.撰写了草稿. Y.-H.L.和C.-C.C.检查和编辑了手稿. 所有作者均已阅读并同意发表手稿的版本.

资金：该研究得到了台湾科技部MOST 108-2314-B-037-088和108-2314-B-037-051的资助，以及来自台湾高雄市小港医院的KMHK-106-022, KMHK-107-008和KMHK-108-032的资助。我们还感谢高雄医科大学研究资源与开发中心对IPA、流式细胞术和共聚焦显微镜的仪器支持。

机构审查委员会声明: 不适用。

知情同意声明: 不适用。

数据可用性声明：不适用。

利益冲突: 作者声明没有利益冲突。

# 参考文献

1. Powell, S.R.; Wang, P.; Divald, A.; Teichberg, S.; Haridas, V.; McCloskey, T.W.; Davies, K.J.; Katzeff, H. 氧化蛋白聚集体（脂褐素）通过抑制蛋白酶体和调节促凋亡蛋白诱导凋亡. Free Radic. Biol. Med. 2005, 38, 1093–1101. [CrossRef] [PubMed]
2. Zhao, Z.; Sun, T.; Jiang, Y.; Wu, L.; Cai, X.; Sun, X.; Sun, X. 通过grp78在视网膜色素上皮细胞中导致的光氧化损伤及葡萄皮多酚的保护作用. Food Chem. Toxicol. 2014, 74, 216–224. [CrossRef] [PubMed]
3. Brandstetter, C.; Mohr, L.K.; Latz, E.; Holz, F.G.; Krohne, T.U. 光通过脂褐素介导的光氧化损伤诱导视网膜色素上皮细胞中的nlrp3炎症小体激活。J. Mol. Med. 2015, 93, 905–916. [CrossRef] [PubMed]
4. 尼尔森, S.E.; 桑德林, S.P.; 维尔马克, U.; 布伦克, U.T. 培养的视网膜色素上皮细胞的衰老：氧化反应、脂褐素形成和蓝光损伤. 眼科学文献. 2003, 106, 13–16. [CrossRef] [PubMed]
5. Datta, S.; Cano, M.; Ebrahimi, K.; Wang, L.; Handa, J.T. 氧化应激和炎症对非新生血管性黄斑变性中RPE退化的影响. 视网膜与眼睛研究进展. 2017, 60, 201–218. [CrossRef]
6. Xu, X.R.; Yu, H.T.; Yang, Y.; Hang, L.; Yang, X.W.; Ding, S.H. 槲皮素磷脂复合物显著保护 ARPE-19 细胞免受与 nrf2 通路激活相关的氧化损伤。 欧洲药理学杂志 2016, 770, 1–8. [CrossRef]
7. Woo, J.M.; Shin, D.Y.; Lee, S.J.; Joe, Y.; Zheng, M.; Yim, J.H.; Callaway, Z.; Chung, H.T. 姜黄素通过诱导血红素氧化酶-1的表达和减少活性氧，保护视网膜色素上皮细胞免受氧化应激的影响。分子视觉 2012, 18, 901–908。
8. Young, R.W. 太阳辐射与年龄相关的黄斑变性. Surv. Ophthalmol. 1988, 32, 252–269. [CrossRef]
9. Shen, C.J.; Cheng, Y.M.; Wang, C.L. Lncrna pvt1 表观遗传学沉默 mir-195 并调节颈癌细胞的 EMT 和耐药性. J. Drug Target. 2017, 25, 637–644. [CrossRef]
10. Vila, N.; Siblini, A.; Esposito, E.; Bravo-Filho, V.; Zoroquiain, P.; Aldrees, S.; Logan, P.; Arias, L.; Burnier, M.N. 蓝光过滤改变人类视网膜色素上皮细胞培养模型中的血管生成信号。BMC Ophthalmol. 2017, 17, 198. [CrossRef]
11. Nakamura, M.; Kuse, Y.; Tsuruma, K.; Shimazawa, M.; Hara, H. 研究了氧化应激在小鼠蓝光LED光诱导的视网膜损伤模型中的参与。Biol. Pharm. Bull. 2017, 40, 1219–1225. [CrossRef] [PubMed]
12. Kurihara, T.; Omoto, M.; Noda, K.; Ebinuma, M.; Kubota, S.; Koizumi, H.; Yoshida, S.; Ozawa, Y.; Shimmura, S.; Ishida, S.; 等。 在一种新的小鼠眼内镜片植入模型中观察视网膜光毒性。分子视觉 2009, 15, 2751–2761. [PubMed]
13. Tanito, M.; Kaidzu, S.; Anderson, R.E. 软丙烯酸黄色滤光片对蓝光诱导的视网膜损伤的保护作用. Exp. Eye Res. 2006, 83, 1493–1504. [CrossRef]
14. Boulton, M.; Rozanowska, M.; Rozanowski, B.; Wess, T. 眼部脂褐素的光反应性. 光化学. 光生物学. 科学. 2004, 3, 759–764. [CrossRef] [PubMed]
15. Wielgus, A.R.; Chignell, C.F.; Ceger, P.; Roberts, J.E. 人视网膜色素上皮细胞中a2e细胞毒性和光毒性与全反视黄醇的比较. 光化学. 光生物学. 2010, 86, 781–791. [CrossRef] [PubMed]
16. Phaniendra, A.; Jestadi, D.B.; Periyasamy, L. 自由基：性质、来源、靶标及其在各种疾病中的影响。印度临床生物化学杂志 2015, 30, 11–26. [CrossRef]
17. Nordberg, J.; Arner, E.S. 活性氧物种，抗氧化剂和哺乳动物的硫氧还蛋白系统。自由基生物医学 2001, 31, 1287–1312. [CrossRef]
18. Narimatsu, T.; Negishi, K.; Miyake, S.; Hirasawa, M.; Osada, H.; Kurihara, T.; Tsubota, K.; Ozawa, Y. 研究了蓝光诱导的小鼠视网膜色素上皮-脉络膜中的炎症标记物表达及黄色眼内透镜材料的保护作用。Exp. Eye Res. 2015, 132, 48–51. [CrossRef]
19. King, A.; Gottlieb, E.; Brooks, D.G.; Murphy, M.P.; Dunaief, J.L. 线粒体衍生的反应性氧种介导蓝光引起的视网膜色素上皮细胞死亡. Photochem. Photobiol. 2004, 79, 470–475. [CrossRef]
20. Wielgus, A.R.; Collier, R.J.; Martin, E.; Lih, F.B.; Tomer, K.B.; Chignell, C.F.; Roberts, J.E. 蓝光诱导大鼠眼中的a2e氧化——干性年龄相关性黄斑变性实验动物模型。光化学光生物科学 2010, 9, 1505–1512. [CrossRef]
21. Wu, J.; Seregard, S.; Spangberg, B.; Oskarsson, M.; Chen, E. 蓝光诱导大鼠视网膜的凋亡。眼睛 1999, 13 Pt 4, 577–583. [CrossRef]
22. Seko, Y.; Pang, J.; Tokoro, T.; Ichinose, S.; Mochizuki, M. 蓝光诱导的大鼠培养视网膜色素上皮细胞的凋亡。Graefes. Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. 2001, 239, 47–52. [CrossRef] [PubMed]
23. Brandtzaeg, P.; Kierulf, P.; Gaustad, P.; Skulberg, A.; Bruun, J.N.; Halvorsen, S.; Sorensen, E. 血浆内毒素作为系统性脑膜炎球菌病多脏器衰竭和死亡的预测因子。J. Infect. Dis. 1989, 159, 195–204. [CrossRef] [PubMed]
24. 颜, S.; 所雷尔, M.; 伯曼, Z. atm/atr介导的DNA损伤反应与氧化应激中的DNA修复通路之间的功能相互作用. 细胞分子生命科学. 2014, 71, 3951–3967. [CrossRef] [PubMed]
25. Kaarniranta, K.; Tokarz, P.; Koskela, A.; Paterno, J.; Blasiak, J. 自噬调节年龄相关黄斑变性中的视网膜色素上皮细胞死亡. Cell Biol. Toxicol. 2017, 33, 113–128. [PubMed]
26. Boya, P.; Esteban-Martinez, L.; Serrano-Puebla, A.; Gomez-Sintes, R.; Villarejo-Zori, B. 眼中的自噬：发育、退化与衰老。视网膜与眼研究进展 2016, 55, 206–245. [CrossRef]
27. Chen, Y.; Sawada, O.; Kohno, H.; Le, Y.Z.; Subauste, C.; Maeda, T.; Maeda, A. 自噬保护视网膜免受光诱导的退化。J. Biol. Chem. 2013, 288, 7506–7518. [CrossRef]
28. 夏, H.; 胡, Q.; 李, L.; 唐, X.; 邹, J.; 黄, L.; 李, X. 自噬对蓝光诱导的老年小鼠视网膜退化的保护作用. 中国科学: 生命科学 2019, 62, 244–256. [CrossRef]
29. Chou, H.L.; Lin, Y.H.; Liu, W.; Wu, C.Y.; Li, R.N.; Huang, H.W.; Chou, C.H.; Chiou, S.J.; Chiu, C.C. 氯喹与c(2)-神经酰胺的联合治疗增强了肺癌h460和h1299细胞的细胞毒性. Cancers 2019, 11, 370. [CrossRef]