

CCK-8 法检测蓝光和白光对 ARPE-19 细胞增殖的影响

陈 胜^{1,2*}, 刘 珂^{1,2*}, 秦 珊^{1,2}, 刘身文²

基金项目:广东省医学科研基金项目(No. A2015615);深圳市卫计委科研项目(No. 201506072);深圳市科创委基础研究项目(No. JCYJ20150402152130689)

作者单位:¹(510632)中国广东省广州市,暨南大学第二临床学院;²(518040)中国广东省深圳市眼科医院暨南大学附属深圳眼科医院 深圳大学眼视光学院 深圳眼科学重点实验室 深圳市眼外伤治疗与干细胞定向分化公共服务平台

*:陈胜和刘珂对本文贡献一致。

作者简介:陈胜,硕士,副主任医师,研究方向:眼底病、眼外伤;刘珂,在读硕士研究生,研究方向:眼底病、眼外伤。

通讯作者:刘身文,硕士,主任医师,研究方向:眼底病、眼外伤。

liushenwents@126.com

收稿日期:2018-01-29 修回日期:2018-07-03

Effect of blue light and white light on proliferation of ARPE-19 cells detected by CCK-8

Sheng Chen^{1,2*}, Ke Liu^{1,2*}, Shan Qin^{1,2}, Shen - Wen Liu²

Foundation items: Guangdong Medical Research Fund Project (No. A2015615); Scientific Research Project of Shenzhen Health and Family Planning Commission (No. 201506072); Basic Research Project of Shenzhen Municipal Bureau of Science and Technology Innovation Program Committee (No. JCYJ20150402152130689)

¹Second Clinical College, Jinan University, Guangzhou 510632, Guangdong Province, China; ²Shenzhen Eye Hospital; Affiliated Shenzhen Eye Hospital of Jinan University; College of Optometry, Shenzhen University; Shenzhen Key Laboratory of Ophthalmology; Ocular Trauma Treatment and Stem Cell Differentiation Public Service Platform of Shenzhen, Shenzhen 518040, Guangdong Province, China

* Co-first authors: Sheng Chen and Ke Liu.

Correspondence to: Shen - Wen Liu. Shenzhen Eye Hospital; Affiliated Shenzhen Eye Hospital of Jinan University; College of Optometry, Shenzhen University; Shenzhen Key Laboratory of Ophthalmology; Ocular Trauma Treatment and Stem Cell Differentiation Public Service Platform of Shenzhen, Shenzhen 518040, Guangdong Province, China. liushenwents@126.com

Received:2018-01-29 Accepted:2018-07-03

Abstract

• **AIM:** To investigate the effects of blue light and white light on the proliferation of human retinal pigment epithelial cell line (ARPE-19) at different times, and lay a foundation for further detecting the changes of related factors during photodamage and further studying the

signal transduction mechanism during light damage.

• **METHODS:** Well-grown ARPE-19 cells were collected for experimentation. The standard curve of CCK-8 was made to determine the proper cell density of ARPE-19 cells and the reaction time of CCK-8 reagent. The cells were divided into dark group, blue light group and white light group, which were irradiated for 3, 6 and 9h respectively. After 12h of light-repellent treatment, CCK-8 method was used to examine the effects of different light sources on the proliferation rate of ARPE-19 cells at different times.

• **RESULTS:** The number of cells per well was selected by CCK-8 standard curve to be 20 000, and the corresponding absorbance value was measured after 4h of the action of CCK-8 solution. The CCK-8 test results showed that the cell proliferation rates of the three groups were significantly different ($P < 0.01$). The cell proliferation rate of the blue light group was significantly different ($P < 0.001$) at 3, 6 and 9h, and the cell proliferation rate decreased gradually with the extension of the illumination time. The cell proliferation rate of the white light group was significantly different ($P < 0.05$) at 3, 6 and 9h; there was a statistically significant difference in the rate of cell proliferation at 3h and 6h in white light ($P < 0.05$), however, there was no significant difference in the rate of cell proliferation at 9h illumination compared with 3h and 6h illumination respectively ($P = 0.253, 0.120$). The proliferation rate of cells under white light for 3-6h showed a downward trend, while that of cells under light for 6-9h showed an upward trend. At the same illumination time, the proliferation rate of the cells in the blue and white groups was lower than that in the dark group, and the cell proliferation rate in the blue group was lower than that in the white group. The difference was statistically significant ($P < 0.05$).

• **CONCLUSION:** The proliferation of ARPE-19 cells was inhibited by light irradiation. The proliferation rate of cells in blue light group was significantly lower than that of white light group. With the increase of light time, the cell proliferation rate decreased.

• **KEYWORDS:** ARPE-19 cells; blue light; CCK-8

Citation: Chen S, Liu K, Qin S, *et al.* Effect of blue light and white light on proliferation of ARPE-19 cells detected by CCK-8. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2018;18(8):1385-1388

摘要

目的:探讨蓝光和白光分别光照不同时间对人视网膜色素上皮 (ARPE-19) 细胞增殖的影响,为进一步检测光照损伤过程中相关因子的变化情况,研究光照损伤过程中

的信号转导机制奠定基础。

方法:收集生长状态良好的 ARPE-19 细胞进行实验,制作 CCK-8 标准曲线,确定实验合适的 ARPE-19 细胞密度及 CCK-8 试剂的反应时间。将细胞分为避光组、蓝光组、白光组,分别光照 3、6、9h,再避光培养 12h 后采用 CCK-8 法检测不同光源光照不同时间对 ARPE-19 细胞增殖率的影响。

结果:通过 CCK-8 标准曲线选择每孔细胞数量为 20000 个,CCK-8 溶液作用 4h 后测量相应吸光度值。CCK-8 检测结果示,避光组、蓝光组、白光组三组细胞光照不同时间细胞增殖率比较,差异有统计学意义($P<0.01$)。蓝光组细胞光照 3、6、9h,各时间点细胞增殖率比较,差异有统计学意义($P<0.001$),且随着光照时间的延长,细胞增殖率逐渐降低。白光组细胞光照 3、6、9h,各时间点细胞增殖率比较,差异有统计学意义($P<0.05$),其中光照 3h 和 6h 细胞增殖率比较,差异有统计学意义($P<0.05$),而光照 9h 分别与光照 3、6h 细胞增殖率比较,差异均无统计学意义($P=0.253,0.120$)。白光光照 3~6h 细胞增殖率呈下降趋势,而光照 6~9h 细胞增殖率呈现上升趋势。相同光照时间,蓝光组和白光组细胞增殖率均低于避光组,且蓝光组细胞增殖率均低于白光组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。

结论:光照能抑制 ARPE-19 细胞的增殖,其中蓝光光照细胞增殖率明显低于白光,且随光照时间的增长,细胞增殖率进一步降低。

关键词:ARPE-19 细胞;蓝光;CCK-8

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2018.8.06

引用:陈胜,刘珂,秦珊,等. CCK-8 法检测蓝光和白光对 ARPE-19 细胞增殖的影响. 国际眼科杂志 2018;18(8):1385-1388

0 引言

可见光是电磁波谱中人眼可以感知的部分,不同个体接收可见光的波长范围可能略有差异,一般而言其波长范围约 400~760nm。波长为 400~500nm 的光线被称为蓝光。角膜能吸收 295nm 以下的紫外线,晶状体可吸收大部分波长小于 400nm 的紫外线^[1],最终仅有少量紫外线到达视网膜,可见光中蓝光的波长最短,穿透力最强,视网膜对其敏感性较高,故蓝光对视网膜产生的光化学损伤作用最强,因此许多学者认为蓝光对视网膜最具有危害性。目前,干性年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration, ARMD)的治疗是国内外面临的难题,尚无有效的治疗方法,在积极寻求有效治疗方案的同时,预防和延缓其发生发展显得尤为重要。虽然光暴露与 ARMD 之间的联系尚不清楚,流行病学的相关统计也存在争议,但近年一系列的体内外研究都明确显示,蓝光暴露可通过多种机制损伤视网膜上皮细胞和视网膜光感受器细胞。为了探究光照对视网膜色素上皮(RPE)细胞的影响,本研究通过体外构建光照损伤 ARPE-19 细胞模型,利用 CCK-8 法测定 ARPE-19 细胞在蓝光、白光光照下不同时间点的细胞增殖情况,探究光源、光照时间对 ARPE-19 细胞增殖的影响,为进一步研究相关机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料 ARPE-19 细胞(ATCC 公司)。DMEM/F12

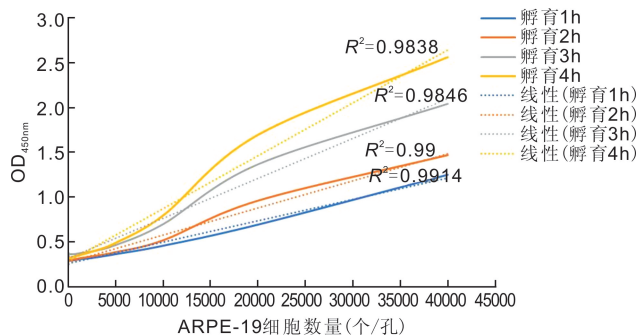


图1 CCK-8 检测标准曲线。

(含 HEPES) 培养基、胰蛋白酶、PBS 缓冲液(Gibco 公司);青链霉素(索莱宝公司);CCK-8 试剂盒(DOJINDO)。蓝光 460nm LED 光源、白光 LED 光源(东莞市隆辉电子公司);照度计 TA8120(苏州特安斯电子有限公司);细胞培养箱(德国 Labotect 公司);全波长多功能酶标仪(瑞士 TECAN 集团公司);超净生物工作台(新加坡 ESCO 公司);低温超速离心机(美国 Thermo 公司)。

1.2 方法

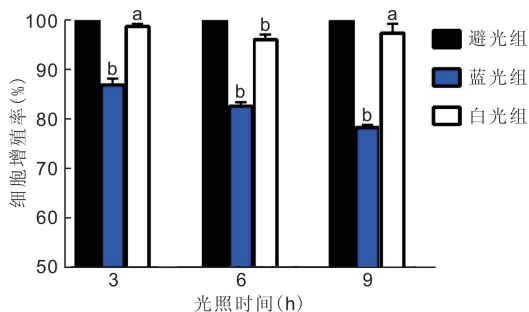
1.2.1 细胞培养及分组 ARPE-19 细胞复苏后,置于含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 (含 HEPES) 培养基中,于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。待细胞融合至 80%~90% 进行传代培养。取对数生长期细胞进行实验,分为 3 组:(1)避光组:用遮光锡纸遮盖细胞;(2)白光组:白色 LED 光源条带置于顶端,并与白光光照组细胞位置相对应,电源采用改装的移动充电电源,保证输出电流恒定,根据光照时间不同又分为光照 3、6、9h 组;(3)蓝光组:蓝光 LED 光源条带置于顶端,并与蓝光光照组细胞位置相对应,电源采用改装的移动充电电源,保证输出电流恒定,根据光照时间不同又分为光照 3、6、9h 组。光源均经消毒灭菌后置于细胞培养箱内,悬挂于细胞顶部,调整光源与细胞平面之间的距离,照度计检测被照平面光照度为 2000±500Lx^[2-3]。

1.2.2 制作 CCK-8 标准曲线 收集对数生长期细胞,制备细胞悬液,接种于 96 孔板,每孔加入细胞悬液 100μL,细胞密度分别为 0、625、1250、2500、5000、10000、20000、40000 个/孔,各设 3 个复孔,于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 24h,待细胞贴壁后,每孔加入 CCK-8 溶液 20μL 和培养基 80μL,继续避光孵育,并分别于加入 CCK-8 溶液后 1、2、3、4h 采用酶标仪检测 450nm 处的吸光度(OD)值。以细胞数量为横坐标,OD 值为纵坐标制作标准曲线,见图 1。根据标准曲线,在各组线性相关性良好的前提下,在酶标仪最佳检测区间,最终选取细胞接种数量为 20000 个/孔,加入 CCK-8 溶液作用 4h 后,OD 值与 ARPE-19 细胞数量呈线性相关($t=19.095, P<0.01$),决定系数为 0.9838。

1.2.3 CCK-8 法检测细胞增殖率 取生长状态良好的 ARPE-19 细胞,用 DMEM/F12 (含 HEPES) 培养液制成 2×10⁵ 个/mL 的细胞悬液,根据分组接种到 96 孔板中,每孔 100μL,采用等体积的相同培养基作空白对照。光照组对应上方光源条带,避光组采用锡纸包裹。每组设置 6 个复孔。分别光照 3、6、9h,再避光培养 12h。相应时间后取出 96 孔板,每孔中加入 20μL CCK-8 溶液及 80μL DMEM/F12 (含 HEPES) 培养液,培养箱中继续孵育 4h

表1 不同光源光照不同时间对 ARPE-19 细胞增殖率的影响

组别	光照 3h	光照 6h	光照 9h	F	P
避光组	1.0005±0.0035	1.0005±0.0078	0.9984±0.0077	0.130	>0.05
蓝光组	0.8686±0.0129	0.8257±0.0083	0.7850±0.0055	79.319	<0.001
白光组	0.9871±0.0054	0.9604±0.0103	0.9760±0.0189	4.362	0.047
F	305.053	426.592	368.056		
P	<0.001	<0.001	<0.001		

图2 不同光源光照不同时间对 ARPE-19 细胞增殖率的影响
* $P < 0.05$, $^b P < 0.01$ vs 相同光照时间避光组。

后,采用酶标仪检测 450nm 处的 OD 值,计算细胞增殖率。细胞增殖率=(光照组 OD 值-空白组 OD 值)/(避光组 OD 值-空白组 OD 值)×100%。

统计学分析:采用 SPSS 20.0 统计学软件进行统计分析。计量资料均以均数±标准差表示,重复测量数据采用重复测量数据的方差分析,单独效应分析采用单因素方差分析,组间两两比较采用 SNK- q 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

CCK-8 检测结果显示,避光组、蓝光组、白光组三组细胞光照不同时间细胞增殖率比较,差异有统计学意义($F_{\text{组间}} = 1331.481$, $P_{\text{组间}} < 0.01$; $F_{\text{时间}} = 30.456$, $P_{\text{时间}} < 0.01$; $F_{\text{交互}} = 20.164$, $P_{\text{交互}} < 0.01$)。蓝光组细胞光照 3、6、9h,各时间点细胞增殖率比较,差异有统计学意义($P < 0.001$),且随着光照时间的延长,细胞增殖率逐渐降低。白光组细胞光照 3、6、9h,各时间点细胞增殖率比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),其中光照 3h 和 6h 细胞增殖率比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),而光照 9h 分别与光照 3、6h 细胞增殖率比较,差异均无统计学意义($P = 0.253, 0.120$)。相同光照时间,蓝光组和白光组细胞增殖率均低于避光组,且蓝光组细胞增殖率均低于白光组,差异均有统计学意义($P < 0.05$),见表 1、图 2。白光光照 3~6h 细胞增殖率呈下降趋势,而光照 6~9h 细胞增殖率呈现上升趋势,我们推测在此时间区间内细胞内某种保护机制被激活,抑制了细胞增殖率的降低趋势。

3 讨论

在发达国家,ARMD 是老年人不可逆性视力下降的主要原因之一^[4]。在美国,超过 7.2 万人患有 ARMD,预计 2050 年将会增长 97%^[5-6]。ARMD 的特点是进展性中心视力下降,分为干性 ARMD 和湿性 ARMD 两种类型,干性 ARMD 早中期的特征是 RPE 细胞和 Bruch 膜之间存在玻璃膜疣和富含脂质的细胞外沉积,RPE 细胞逐渐死亡及继发的光感受器细胞损伤导致视力缓慢下降,RPE 层及附于其上的光感受器的地图样萎缩(geographic atrophy,

GA)是晚期干性 ARMD 的主要特征^[7],约 90% 的 ARMD 患者属于干性 ARMD。部分干性 ARMD 会向湿性 ARMD 进展,表现为黄斑区下脉络膜新生血管生长,可导致严重的中心视力下降^[8]。目前,湿性 ARMD 可进行抗血管内皮生长因子(VEGF)药物治疗^[9],但干性 ARMD 尚无明确可行的治疗措施^[10],因此,寻找高效、安全的治疗药物成为紧迫而现实的问题。RPE 细胞对光线非常敏感,特别是蓝光,光线造成的 RPE 病态改变与视网膜退行性病变极其相似。研究发现,ARMD 是视网膜脉络膜中心区域光感受器-视网膜色素上皮-Bruch 膜-脉络膜毛细血管复合体的进展性病变,其中 RPE 细胞是其病理发展的中心环节,长期氧化应激及代谢废物的堆积所导致的 RPE 结构及功能的异常被认为是引发 ARMD 的重要原因^[11]。Beaver Dam 眼科研究组调查了当地老年人,评估了光照暴露与 ARMD 之间的横向及纵向联系,结果表明光照暴露时间与 ARMD 发病之间存在正相关关系^[12],但也有学者得出了相反的结论^[13]。正因为其无有效治疗方法,所以在积极寻求有效治疗方法的同时,预防与延缓其发展显得更为重要。虽然当前没有明确光暴露与 ARMD 之间的联系,但近年一系列的体内外研究都明确显示,蓝光暴露可通过对细胞溶酶体、线粒体的损伤、诱导凋亡发生、相关因子及通路的改变等机制损伤 RPE 细胞^[14-17]。

CCK-8 溶液中含有 WST-8,其可被细胞中脱氢酶还原生成溶于水的甲臞染料,呈橙黄色,用于检测细胞数量。CCK-8 法实验步骤简便,实验的敏感性较高,具有良好的可重复性。本研究采用白光和蓝光两种光源处理处于对数生长期的 ARPE-19 细胞,避光组为对照组,应用 CCK-8 比色法检测细胞增殖率。结果表明,白光和蓝光对体外培养的 ARPE-19 细胞的增殖具有抑制作用,蓝光的抑制作用更为明显,这与 Yu 等^[3]的研究结果一致。同时,我们通过观察不同光照时间点细胞增殖率的变化发现,ARPE-19 细胞的增殖率随蓝光光照时间的延长逐渐下降,表明蓝光对 ARPE-19 细胞的损伤具有时间累积性。白光是一种混合光,不同白光光谱组成也不一样,无法明确白光中各种单色光的比例。本研究所用 LED 白光色温约为 6000K,我们发现白光对 ARPE-19 细胞增殖也具有一定的抑制作用,可能与白色 LED 灯是以蓝色芯片为主要发光源有关。本研究结果显示,白光光照 3、6h,ARPE-19 细胞的增殖率是逐渐降低的,但光照 6h 后细胞的增殖率有增高趋势,我们推测轻微光损伤过程中可能存在一种保护机制,能一定程度抑制光损伤的进一步发展,此外,白光光照 9h 后 ARPE-19 细胞的增殖率是进一步回升还是超出保护机制的调控范围而使增殖率下降,仍需进一步探究。

综上,本研究通过体外培养 ARPE-19 细胞,参考文献

构建光照损伤 ARPE-19 细胞模型,利用 CCK-8 法测定 ARPE-19 细胞在蓝光、白光光照下不同时间点的细胞增殖情况,发现白光和蓝光光照对 ARPE-19 细胞的体外增殖均具有抑制作用,蓝光的抑制作用更为明显,且随蓝光光照时间的增加细胞增殖率逐渐下降,为进一步研究 ARMD 的发病机制和防治提供了实验依据。

参考文献

- 1 Youssef PN, Sheibani N, Albert DM. Retinal light toxicity. *Eye(Lond)* 2011;25(1):1-14
- 2 蔡善君,严密,张军军. 蓝光诱导体外培养的人视网膜色素上皮细胞凋亡. *中华眼底病杂志* 2005(6):42-45
- 3 Yu T, Chen CZ, Xing YQ. Inhibition of cell proliferation, migration and apoptosis in blue-light illuminated human retinal pigment epithelium cells by down-regulation of HtrA1. *Int J Ophthalmol* 2017;10(4):524-529
- 4 Lim LS, Mitchell P, Seddon JM, et al. Age-related macular degeneration. *Lancet* 2012;379(9827):1728-1738
- 5 Klein BE, Klein R. Forecasting age-related macular degeneration through 2050. *JAMA* 2009;301(20):2152-2153
- 6 Klein R, Chou CF, Klein BE, et al. Prevalence of age-related macular degeneration in the US population. *Arch Ophthalmol* 2011;129(1):75-80
- 7 Holz FG, Strauss EC, Schmitz-Valckenberg S, et al. Geographic atrophy: clinical features and potential therapeutic approaches. *Ophthalmology* 2014;121(5):1079-1091
- 8 Bowes RC, Farsiu S, Toth CA, et al. Dry age-related macular degeneration: mechanisms, therapeutic targets, and imaging. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013;54(14):F68-F80
- 9 Rosenfeld PJ, Shapiro H, Tuomi L, et al. Characteristics of patients

- losing vision after 2 years of monthly dosing in the phase III ranibizumab clinical trials. *Ophthalmology* 2011;118(3):523-530
- 10 Meleth AD, Wong WT, Chew EY. Treatment for atrophic macular degeneration. *Curr Opin Ophthalmol* 2011;22(3):190-193
- 11 Bhutto I, Luttly G. Understanding age-related macular degeneration (AMD): Relationships between the photoreceptor/retinal pigment epithelium/Bruch's membrane/choriocapillaris complex. *Mol Aspects Med* 2012;33(4):295-317
- 12 Tomany SC, Cruickshanks KJ, Klein R, et al. Sunlight and the 10-year incidence of age-related maculopathy: the Beaver Dam Eye Study. *Arch Ophthalmol* 2004;122(5):750-757
- 13 Pham TQ, Rochtchina E, Mitchell P, et al. Sunlight-related factors and the 10-year incidence of age-related maculopathy. *Ophthalmic Epidemiol* 2009;16(2):136-141
- 14 Cai SJ, Yan M, Mao Y Q, et al. Relationship between blue light-induced apoptosis and mitochondrial membrane potential and cytochrome C in cultured human retinal pigment epithelium cells. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi* 2006;42(12):1095-1102
- 15 Bergmann M, Schutt F, Holz FG, et al. Inhibition of the ATP-driven proton pump in RPE lysosomes by the major lipofuscin fluorophore A2-E may contribute to the pathogenesis of age-related macular degeneration. *FASEB J* 2004;18(3):562-564
- 16 Wang L, Cai S, Wu Z, et al. The correlation between the concentrations of VEGF and PEDF and Ca²⁺-PKC signaling pathways in human retinal pigment epithelial cells cultured *in vitro* after exposing to blue light. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi* 2015;51(11):839-843
- 17 Chu R, Zheng X, Chen D, et al. Blue light irradiation inhibits the production of HGF by human retinal pigment epithelium cells *in vitro*. *Photochem Photobiol* 2006;82(5):1247-1250