

拉曼光谱技术检测川芎嗪对视网膜色素上皮细胞氧化应激损伤的保护作用

谢婷¹, 陈阳², 陈文奕¹, 赖巧玲¹, 曹改改², 许云超³, 黄焱¹

1. 福建医科大学医学技术与工程学院眼视光学系, 福建 福州 350004; 2. 福建医科大学医学技术与工程学院医学检验学系, 福建 福州 350004; 3. 福建师范大学医学光电科学与技术教育部重点实验室, 福建 福州 350004

【摘要】目的:年龄相关性黄斑变性(AMD)是致盲的主要原因之一。氧化应激所引起的视网膜色素上皮(RPE)细胞变性在AMD的发病机制中发挥了关键作用。本文利用无创、无需标签、高灵敏度的拉曼光谱探究川芎嗪对氧化损伤的人RPE细胞的保护机制。**方法:**进行拉曼光谱采集之前,将除对照组外的其余两组RPE细胞(ARPE-19)用200 $\mu\text{mol/mL}$ H_2O_2 预孵育,24 h后在保护组细胞中加入200 $\mu\text{mol/mL}$ 川芎嗪。所有干预结束后,用MultiskanGO (Thermo, USA)微板法测定细胞内活性氧自由基的含量,用InVia微拉曼系统对3组细胞进行拉曼光谱分析。**结果:**活性氧检测显示川芎嗪对 H_2O_2 诱导的RPE细胞氧化应激损伤有较好的抑制作用。拉曼光谱结果显示细胞氧化应激损伤主要体现在氨基酸类分子上,而川芎嗪的加入不仅逆转了归属于脂质的谱带810 cm^{-1} 和840 cm^{-1} 峰强度比值的变化趋势,还使 H_2O_2 干预后显著提高的归属于各氨基酸谱带的峰强度值有所下降。与之前激光光镊拉曼光谱结果不同,活性氧自由基没有触发酰胺的脱酰胺反应,反而是川芎嗪的干预使得归属于酰胺的拉曼光谱强度发生改变。**结论:**通过对人RPE细胞拉曼光谱变化的分析,揭示过氧化氢和抗氧化剂川芎嗪潜在的作用靶点,为更好地探究RPE细胞氧化应激的损伤机制奠定了基础。

【关键词】视网膜色素上皮细胞;拉曼光谱;活性氧;川芎嗪;氧化应激损伤

【中图分类号】R318;R34

【文献标志码】A

【文章编号】1005-202X(2021)07-0864-07

Detection of the protective effect of ligustrazine against oxidative stress damages to retinal pigment epithelium cell *via* Raman spectroscopy

XIE Ting¹, CHEN Yang², CHEN Wenyi¹, LAI Qiaoling¹, CAO Gaigai², XU Yunchao³, HUANG Yan¹

1. Department of Ophthalmic Optics, School of Medical Technology and Engineering, Fujian Medical University, Fuzhou 350004, China; 2. Department of Medical Laboratory Science, School of Medical Technology and Engineering, Fujian Medical University, Fuzhou 350004, China; 3. Key Laboratory of Medical Optoelectronic Science and Technology, Ministry of Education, Fujian Normal University, Fuzhou 350004, China

Abstract: Objective Age-related macular degeneration (AMD) is one of the main causes of blindness. Retinal pigment epithelium (RPE) cell degeneration induced by oxidative stress plays a key role in the pathogenesis of AMD. The protective mechanism of ligustrazine against oxidative stress damages to human RPE cells is investigated using non-invasive, label-free and highly-sensitive Raman spectroscopy. **Methods** Before the collection of Raman spectra, RPE cells (ARPE-19) in 2 groups, except control group, were preincubated with 200 $\mu\text{mol/mL}$ H_2O_2 , and 200 $\mu\text{mol/mL}$ ligustrazine was added to the cells in protection group after 24 h. At the end of all interventions, MultiskanGO (Thermo, USA) microplate method was used for determining intracellular reactive oxygen species (ROS) content, and InVia microRaman system for Raman spectrum analysis. **Results** The ROS levels showed that ligustrazine had a good inhibitory effect on oxidative stress damages induced by H_2O_2 . Raman spectral results demonstrated that the oxidative stress damages to cells were mainly reflected in amino acids. The addition of ligustrazine not only reversed the changing trend of the peak strength ratio of 810 cm^{-1} and 840 cm^{-1} assigned to the lipid, but also reduced the peak strength value of each band assigned to amino acids that was significantly increased after H_2O_2 intervention. Different from the previous laser tweezers Raman spectral results, ROS did not trigger the deamide reaction of amides, but ligustrazine changed the Raman spectral

【收稿日期】2021-03-10

【基金项目】国家自然科学基金(61210016);福建省高校优秀青年学者培养计划项目(2018B036);福建省卫生系统中青年人才培养计划项目(2016-ZQN-62)

【作者简介】谢婷,硕士研究生,研究方向:光学与眼科医学,E-mail: 1341618259@qq.com

【通信作者】黄焱,博士,教授,研究方向:眼科学与视光学,E-mail: fjhyan-1988@fjmu.edu.cn

strength assigned to amides. **Conclusion** Through Raman spectrum analysis on human RPE cells, the potential biomarkers of hydrogen peroxide and ligustrazine are revealed, which laid a foundation for investigating the mechanism of oxidative stress damages to human RPE cells.

Keywords: retinal pigment epithelium cell; Raman spectroscopy; reactive oxygen; ligustrazine; oxidative stress damage

前言

视网膜色素上皮(Retinal Pigment Epithelium, RPE)细胞是血-视网膜屏障的重要组成部分,具有参与视循环代谢,不断吞噬视网膜光感受器外节段,维持视功能和视网膜结构发育等重要作用。RPE细胞耗氧量高,多不饱和脂肪酸比例高。作为视网膜大量代谢产物跨膜运输的重要通道,为了使光感受器能顺利地将光刺激传递给双极细胞,RPE需持续不断地将光感受器无法转化的全反式视黄醇处理、加工为11-顺式视黄醛后再转运给光感受器,这一过程进一步增加了RPE细胞内活性氧自由基(Reactive Oxygen Species, ROS)的清除负担^[1]。当RPE细胞内ROS生成和清除机制不平衡时,ROS所诱导的氧化应激损伤将导致RPE细胞变性,致发光受体死亡,最终造成视力丧失^[2]。近年来研究表明,中药川芎的有效成分川芎嗪具有扩张血管、改善微循环、减少氧自由基损伤、抗氧化等作用^[3],但其对RPE细胞的保护作用尚不清楚。到目前为止,虽然许多技术已被证实可用于检测和分析细胞与其环境之间的体外相互作用,例如流式细胞仪技术、四甲基偶氮唑盐微量酶反应比色法、电子显微镜技术,但这些传统技术无法准确描述细胞在自然状态下与药物的相互作用与结合位点。基于非弹性散射的拉曼光谱是检测活细胞的理想光学平台^[4]。它能根据来自蛋白质、核酸、脂类、碳水化合物和无机晶体的特定信号来评估生物样品的整体分子组成。此外,拉曼光谱作为一种先进的指纹分析工具,可在单细胞水平监测RPE细胞的氧化损伤,并从分子水平评估抗氧化损伤药物的保护效果。本课题组先前采用实验室自建的显微拉曼系统结合激光光镊对RPE细胞进行过光谱采集^[5]。虽然光镊所形成的三维光学势阱能够无损伤地囚禁和操纵悬浮在液体中的单个活细胞并实现生化动力学过程的实时跟踪,但该自建系统的光谱分辨率为4~5个波数,分辨率较低,活体临床检测可行性低。故在先前研究的基础上,本文利用更高分辨率显微拉曼系统对先前的实验进行补充,重新采集并分析3组细胞的拉曼光谱,评估川芎嗪对过氧化氢所诱导的RPE细胞氧化损伤的保护作用,进一步探索川芎嗪抗氧化的作用机制,为相关临床研究提供重要的理论依据。

1 材料和方法

1.1 细胞培养和处理

人RPE细胞(ARPE-19)(Jennio Biotech, 中国)采用含有10%胎牛血清(Hyclone, GE Lifescience, 美国)、1%青霉素及1%链霉素的改良伊格尔培养基(Dulbecco Modified Eagle Medium, DMEM),于37℃、5% CO₂保温箱中培养。取处于对数生长期的细胞接种于9个直径9 mm的培养皿中,并将其分为3组(每组3皿),分别为对照(NC)组、氧化应激(OS)组和保护(LP)组。为了建立合理的氧化应激模型,当细胞约50%汇合后,更换培养液,除NC组外,OS组、LP组均添加终浓度为200 μmol/mL的H₂O₂,孵育24 h后LP组细胞加入200 μmol/mL的川芎嗪(Sigma-Aldrich, 美国),再培养24 h后用磷酸缓冲盐(PBS)缓冲液洗涤2次,以消除培养基影响,最后用胰酶将细胞消化下来以进行后续的实验。

1.2 细胞活力测定

采用MultiskanGO(Thermo, USA)微板法测定细胞内ROS的含量,选择5个浓度梯度的细胞悬液作为筛选的最佳浓度,取1 mL每皿消化下来的细胞悬液,利用细胞计数法将细胞密度稀释至3~5×10⁴/mL后,吸取100 μL/孔已经稀释的细胞悬液于96孔板中培养,每皿3个复孔。孵育24 h后,去培养基,用PBS缓冲液洗涤2次,最后按体积比10:1加入新鲜培养基和CCK-8试剂(Beyotime Biotech, 中国)。CCK-8培养2 h后,将处理好的细胞样品置于96孔板上,在450 nm波长下测量可间接反映活细胞数量的吸光度和光密度值。

1.3 细胞活性氧测定

2',7'-二氯荧光素二乙酸(DCFH-DA)是一种非极性燃料,在细胞内活性氧和其他氧化物的作用下可转化为高荧光的2',7'-二氯荧光素(DCF)。将每组的RPE细胞与5 μmol/L DCFH-DA在37℃避光条件下孵育30 min后,加入PBS缓冲液2 mL洗涤2次后,更换新的DMEM培养基。最后使用荧光显微镜(IX71, Olympus, 日本)测量荧光强度。

1.4 拉曼光谱测定及数据处理

本研究采用InVia微拉曼系统(Renishaw Corporation, England)对目的细胞进行拉曼光谱采集。以20 mW功率下产生782 nm波长的多元件高

功率二极管作为激励源,记录范围为 $400\sim 1\,800\text{ cm}^{-1}$,每个细胞标本扫描累积时间为 20 s ,分辨率为 1 cm^{-1} 。为了保证单细胞的最佳定位,先用20倍的物镜对细胞进行聚焦,随后再小心地切换到50倍的物镜。整个扫描过程聚焦到细胞样品的激发光束直径约 $5\text{ }\mu\text{m}$,小于细胞直径。为了确保聚焦区域完全覆盖细胞,在每个细胞的3个不同点处均采集光谱。实验中对每个细胞样品所测得的3条光谱先进行荧光背景去除,再将其分别取平均,归一化处理之后用于代表不同组别样品。

采集结束后采用SPSS statistics 20(IBM Inc.,芝加哥)软件对3组RPE细胞的拉曼光谱进行数据处理。整个过程主要分为以下两个步骤:首先考虑到重复实验时微拉曼系统的状态可能不同,先将所得的光谱根据曲线下面积进行归一化,以消除系统本身的影响;再将每组细胞的全光谱作为数据源,应用决策树(Decision Tree, DT)和主成分分析法(Principle Component Analysis, PCA)进行数据分析。本研究所使用的DT模型是基于SPSS软件的分類与回归树(Classification and Regression Tree, CART)算法。CART分析主要包括3个重要部分:(1)特征选

择。本文采用基尼指数来测定纯度指数,基尼系数越低,纯度越高。(2)利用二进制拆分过程构建最大树,尽可能多地描述训练数据集。(3)树的修剪。决策树的过度生长可能会导致过拟合,因此需要对拟合模型进行修剪,并通过交叉验证来选出最优树。最终利用PCA进行特征峰的识别^[6]。

2 结果与讨论

2.1 川芎嗪可逆转氧化应激所导致的细胞损伤

利用荧光显微镜通过测量DCFH-DA荧光探针的氧化产物DCF的荧光强度来测定细胞内ROS的累积量(图1)。如图1b所示,OS组的DCF产物明显多于NC组和LP组。通过比较LP组与NC组光密度值,还发现川芎嗪可抑制氧化应激环境下RPE细胞ROS的产生。不仅如此,细胞活性检测发现OS组的细胞存活率约为NC组的 $(70.7\pm 0.84)\%$ 。川芎嗪的干预使得LP组细胞的存活率上升至NC组的 $(83.5\pm 0.31)\%$ 。但ROS抑制RPE细胞增殖活性的作用机制以及川芎嗪抗氧化作用位点尚不清楚,需要借助拉曼光谱技术来进一步探索。

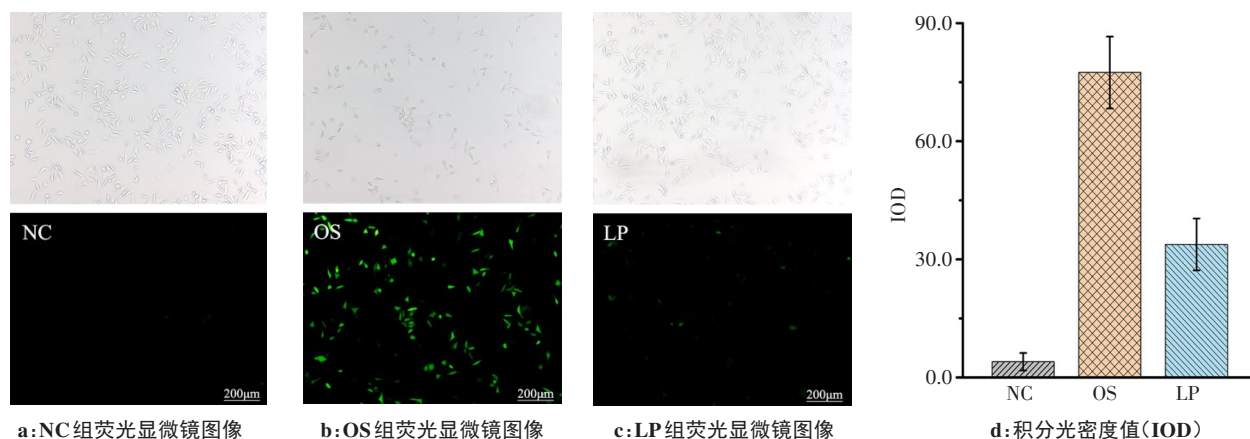


图1 RPE细胞中活性氧自由基水平的示意图

Fig.1 Representative diagrams of reactive oxygen species (ROS) levels in retinal pigment epithelium (RPE) cells

2.2 3组细胞平均拉曼光谱的外形比较

本研究共获得3组细胞拉曼光谱共50例,其中NC组细胞特征光谱15例、OS组特征光谱15例、LP组特征光谱20例。3组细胞拉曼光谱峰位归属及分子结构见表1。在 $400\sim 1\,800\text{ cm}^{-1}$ 范围内可见不同组细胞拉曼光谱呈现多个谱峰,且形态相近。为了更直观地测定氧化损伤RPE细胞与正常RPE细胞之间的光谱差异,将3组细胞平均光谱进行两两对比,最终所获得差异性光谱显示,不同组细胞间的拉曼光谱存在一定差异(图2)。在量化每个光谱波段的强度值变化后,不同的光谱区域呈

现出不同的变化趋势。例如, H_2O_2 干预后, $750\sim 1\,000\text{ cm}^{-1}$ 和 $1\,325\sim 1\,410\text{ cm}^{-1}$ 区域的峰值强度呈负向变化趋势,而 $1\,000\sim 1\,140\text{ cm}^{-1}$ 和 $1\,430\sim 1\,490\text{ cm}^{-1}$ 区域的峰值强度则呈正向变化趋势(图2b)。

2.3 RPE细胞拉曼光谱的多元统计学分析

应用PCA对所获得的拉曼光谱数据进行PCA变换,发现前9个主成分可表达98%的原始信息,且由于主成分1(PC1)和主成分2(PC2)的特征方差贡献率最大,最终选择用前两个主成分的载荷图及得分散点图来代表原始数据的光谱信息(图3)。图3a和

表 1 3组 RPE 细胞拉曼光谱归属
Tab.1 Raman spectra assignment in 3 groups of RPE cells

峰位置/cm ⁻¹	核酸	蛋白质	脂质	糖类	类胡萝卜素
574	脱氧鸟苷酸	色氨酸	-	-	-
757	-	色氨酸	-	-	-
770	-	酰胺 III, 色氨酸	-	-	-
810	-	-	磷酸二酯	-	-
841	-	-	甘油三亚油酸酯	葡萄糖	-
937	-	ν(C-C)R-helix	-	-	-
973	-	ρ(CH3), δ(CCH)olefinic	-	-	-
1 165	-	酪氨酸	-	-	-
1 043	-	谷氨酸, 脯氨酸	-	-	-
1 140	-	组氨酸	-	-	-
1 240	-	酰胺 III	HCC, HCO, COH def.	-	-
1 256	脱氧胸苷酸, 脱氧腺苷酸	酰胺 III	C-H bend	-	-
1 365	-	酰胺 III	-	-	-
1 454	脱氧鸟苷酸, 脱氧腺苷酸	C-H def.	C-H def.	C-H def.	-
1 527~1 538	-	-	-	-	C=C
1 583	脱氧鸟苷酸, 脱氧腺苷酸	-	-	-	-
1 609	-	酪氨酸, 苯丙氨酸	-	-	-
1 618	-	酪氨酸, 色氨酸	-	-	-
1 653	-	酰胺 I	-	-	-
1 657	-	酰胺 I	C=C str.	-	-
1 694	-	酰胺 I	-	-	-
1 736	-	-	C=O ester	-	-

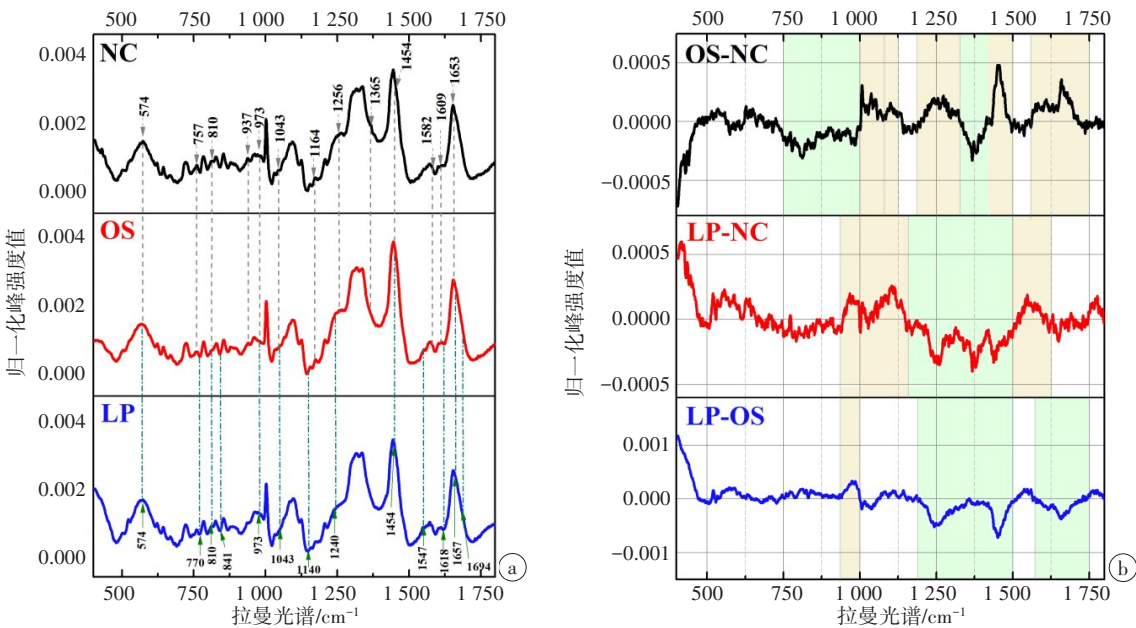


图 2 归一化的平均拉曼光谱和差异光谱
Fig.2 Normalized mean Raman spectra and difference spectra
a: NC 组、OS 组和 LP 组的平均拉曼光谱, 箭头表示 RPE 细胞拉曼谱峰的位置; b: 对 3 组拉曼光谱进行两两比较得到的差异光谱, 不同颜色的阴影用来区分差异光谱强度的变化趋势, 黄色阴影代表增强, 绿色阴影代表减弱

3b所示的PC1和PC2载荷图,包含了用于计算类别区分的频谱特征信息。图3e为3组细胞拉曼光谱主成分分析后得到的聚类散点图。虽然不同组与其他组均存在部分重叠,但仍可明确不同组之间确已存在分离趋势(如图中箭头所示)。不仅如此,图3c和图3d中PC1及PC2的得分箱式图也证实了OS组、NC组和LP组之间的差异性,OS组PC1与PC2得分值与NC组及LP组相比,差异均具有统计学意义($P<0.05$)。每张拉曼光谱1492个数据点中可提取出57个主成分,将不同组提取出的主成分通过两两比较来建立决策树模型,并采用交叉验证方法对鉴别模

型进行检验。基于CRT算法的决策树模型的原理是通过确定一系列if-then逻辑关系,形成一组层次规则,用树图表示所有可能结果的概率分布,从而达到对研究对象进行准确预测或正确分类的目的^[7]。在交叉验证过程中,所构建的决策树能量化每条光谱谱带的重要性,以确定每个模型中最重要预测因子。表2总结了各鉴别模型的准确率,结果显示每个模型的分类准确率都在90%以上,甚至有一半以上模型的分类准确率达到100%,表明此鉴别模型预测能力良好,即使是轻微的光谱差异都能被正确分类。

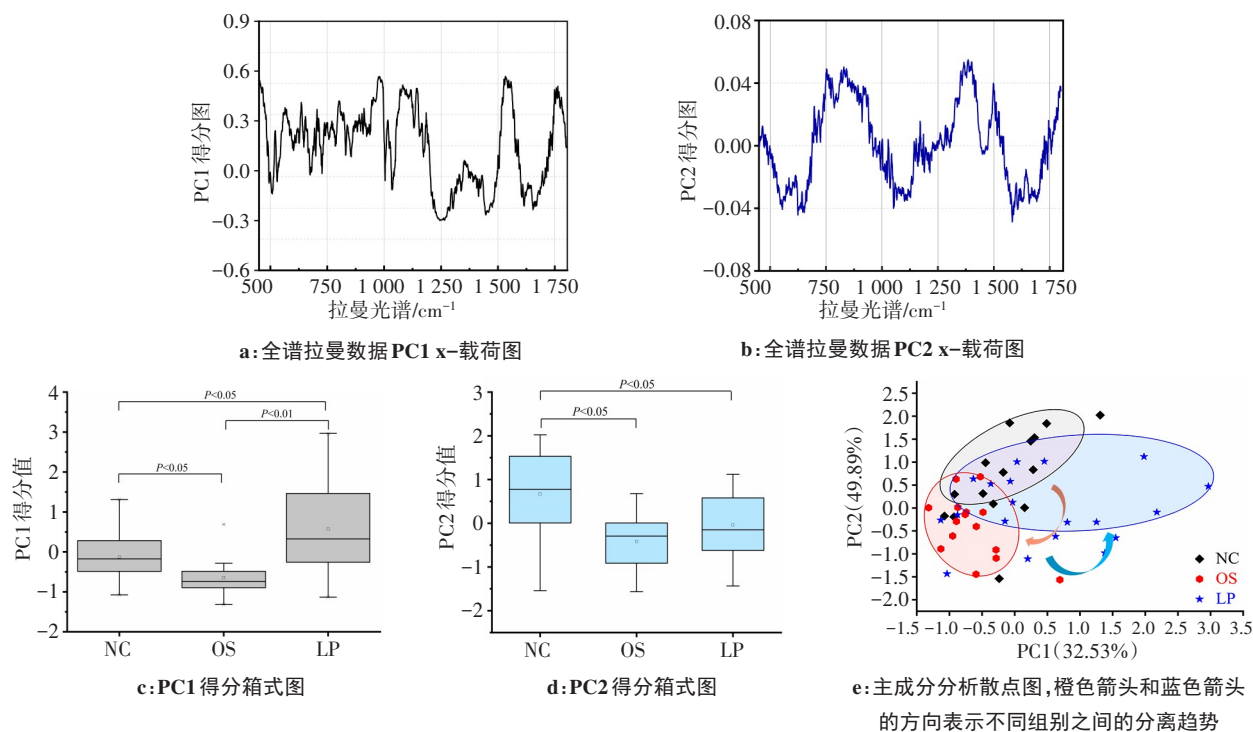


图3 前两个主成分的得分图

Fig.3 Score plots of the first two principal components

表2 3组细胞分类模型的混淆矩阵

Tab.2 Confusion matrix for the classification model of 3 groups of RPE cells

样本组别	预测组别			准确率%
	NC	OS	LP	
NC	15	0	0	100.0
OS	1	14	0	93.3
LP	0	0	20	100.0

基于峰位归属的相似性、化学键(振动模式的差异)或生物功能,对同一类别的谱带进行配对。最终根据不同组细胞间谱带强度的变化及其所属的基团和化学键,来进一步探索视网膜氧化应激潜在的生

物标志物。拉曼光谱的峰强度比作为一种有效的方法已应用于许多生物样品拉曼光谱数据的分析中^[8]。首先将OS组和LP组全拉曼光谱的峰强度值分别与NC组相比,再从所得到的比值中挑选出几条相对强度差异最突出的谱带(图4)。

对比OS组与NC组,发现虽然两组之间的拉曼光谱显著差异在DNA、蛋白质和脂质类型的分子中都有涉及,但主要集中在蛋白质分子上。视网膜氧化应激生物标志物及年龄相关性黄斑变性代谢组学特征的相关研究表明^[9-10],脂质和氨基酸含量和结构的变化确实与氧化应激所引起的眼底病变密切相关。结合图4证明氧化应激位点主要位于某些氨基酸和脂类中。有证据表明,ROS在细胞生长、分化、

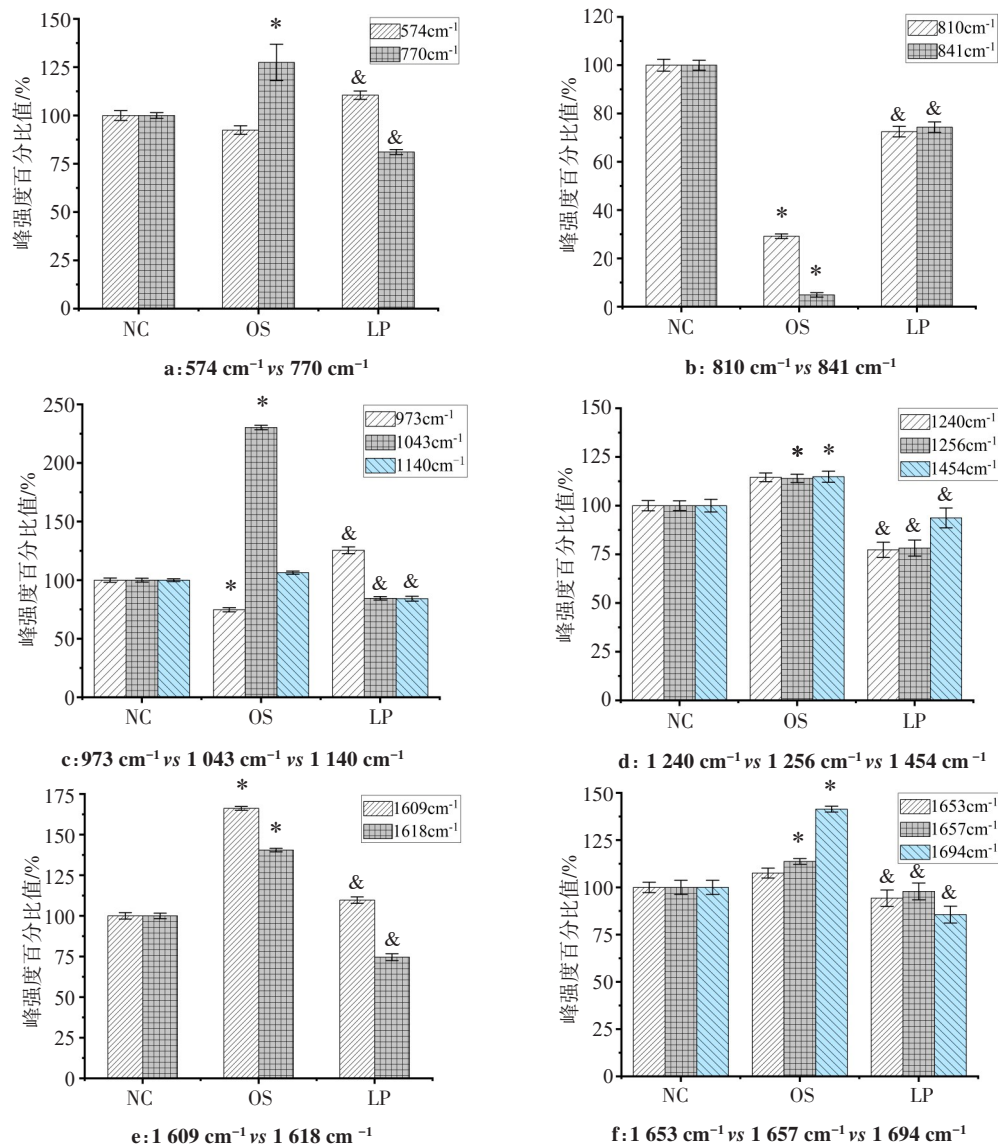


图4 拉曼光谱的峰强度比值

Fig.4 Peak intensity ratios of Raman spectra

*表示与NC组相比, $P < 0.05$; &表示与OS组相比 $P < 0.05$, 双尾 t 检验

凋亡、基因表达等重要信号通路中起重要作用^[11]。

过氧化氢所诱导产生的RPE细胞的抗氧化防御机制失代偿主要表现在氨基酸谱带峰强度比的变化上。例如,加入过氧化氢干预后,归属于各氨基酸的770、1 043、1 256、1 609、1 618、1 694 cm⁻¹谱带的峰强度明显增强。尤其是归属于脯氨酸及谷氨酸的1 043 cm⁻¹谱带,其峰强度增幅达到125%。该实验结果证实了氧化应激反应影响了酪氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸和色氨酸等氨基酸的“C=C”振动模式。黑色素是RPE细胞中重要的抗氧化成分,且黑色素的合成需要黑色素细胞利用苯丙氨酸、色氨酸、酪氨酸等物质进行合成。此外,脯氨酸在RPE代谢中的重要性也已得到了证实^[12-14]。一旦脯氨酸分解代谢遇到异常,RPE细胞的葡萄糖代谢和谷胱甘肽的产生就受到影

响,最终使RPE细胞的抗氧化能力受到损害。因此,我们推测H₂O₂所产生的大量ROS改变了氨基酸的含量和结构,影响氨基酸的代谢,最终阻断抗氧化物质的产生、能量代谢和蛋白质合成。不仅如此,H₂O₂诱导的氧化应激反应也对脂质产生影响,如归属于磷酸二酯的810 cm⁻¹谱带和归属于甘油三亚油酸酯的840 cm⁻¹谱带,两者的峰强度在ROS的作用下呈显著下降趋势,且降幅超过70%。此现象证实H₂O₂的干预使细胞内脂质氧化反应和氧自由基反应失衡。但抗氧化剂川芎嗪的加入不仅逆转了归属于脂质的810和840 cm⁻¹谱带峰强度比值的变化趋势,还使得H₂O₂干预后显著提高的归属于各氨基酸谱带的峰强度值有所下降,如770、1 043、1 609 cm⁻¹等。故推测川芎嗪对H₂O₂所造成的一系列氧化应激损伤具有较强

的保护作用,其抗氧化的作用靶点可能与脂类相关。另外值得注意的是,分别归属于酰胺I和酰胺III的谱带1 694、1 240和1 256 cm^{-1} ,其峰强度值在川芎嗪的作用下出现不同程度的下降。这与我们之前得到的结果不同。表明氧化应激没有引起RPE细胞内酰胺的脱酰胺化,反而是在添加川芎嗪后酰胺峰强度比发生了变化。最后,我们还发现ROS也可能影响RPE细胞的DNA核酸碱基,如谱带1 256、574、1 454 cm^{-1} 。

3 结 论

本文利用InVia微拉曼光谱系统对过氧化氢所诱导的人RPE细胞氧化应激损伤进行了指纹分析。结果表明, H_2O_2 干预后,RPE细胞ROS水平升高,存活率降低。添加抗氧化剂川芎嗪后,细胞ROS水平显著降低,细胞活力测试结果也显示川芎嗪能抑制细胞活力的下降。光谱结果显示,施加 H_2O_2 干预的细胞与对照组细胞拉曼光谱的差异主要体现在归属于氨基酸和脂质分子的谱带上。根据所影响的氨基酸类型,推断氧化应激可能会影响RPE细胞黑色素合成、葡萄糖代谢和抗氧化剂的产生等生理过程。此外,川芎嗪的加入逆转了属于脂质的谱带峰强度值的变化趋势,故推测脂类是川芎嗪发挥抗氧化作用的重要靶点。与此同时,我们还发现川芎嗪可能使RPE细胞内的酰胺发生脱酰胺化。综上,本研究使用无创无标签拉曼光谱技术,揭示了 H_2O_2 和抗氧化剂川芎嗪潜在的作用靶点,为更好地探究视网膜RPE细胞氧化应激的损伤机制奠定了基础。同时,为今后抗氧化药物的研究和开发提供了一个新的方向。进一步证明了基于分子水平的拉曼光谱技术是视网膜相关疾病生物标志物检测的有效手段。

【参考文献】

- [1] CAI J, NELSON K C, WU M, et al. Oxidative damage and protection of the RPE[J]. *Prog Retin Eye Res*, 2000, 19(2): 205-221.
- [2] MASUDA T, SHIMAZAWA M, HARA H. Retinal diseases associated with oxidative stress and the effects of a free radical scavenger (Edaravone)[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017. DOI: 10.1155/2017/9208489.
- [3] JIANG F R, QIAN J C, CHEN S Y, et al. Ligustrazine improves atherosclerosis in rat *via* attenuation of oxidative stress[J]. *Pharm Biol*, 2011, 49(8): 856-863.
- [4] BRAUCHLE E, SCHENKE-LAYLAND K. Raman spectroscopy in biomedicine-non-invasive *in vitro* analysis of cells and extracellular matrix components in tissues[J]. *Biotechnol J*, 2013, 8(3): 288-297.
- [5] CHEN Y, WANG Z Q, HUANG Y, et al. Label-free detection of hydrogen peroxide-induced oxidative stress in human retinal pigment epithelium cells *via* laser tweezers Raman spectroscopy[J]. *Biomed Opt Express*, 2019, 10(2): 500-513.
- [6] DECONINCK E, SACRÉ P Y, COOMANS D, et al. Classification trees based on infrared spectroscopic data to discriminate between genuine and counterfeit medicines[J]. *J Pharma Biomed Anal*, 2012, 57: 68-75.
- [7] FEI Y, GAO K, HU J, et al. Predicting the incidence of portosplenomesenteric vein thrombosis in patients with acute pancreatitis using classification and regression tree algorithm[J]. *J Crit Care*, 2017, 39: 124-130.
- [8] DE VASCONCELOS NASSER CAETANO L, DE OLIVEIRA MENDES T, BAGATIN E, et al. *In vivo* confocal Raman spectroscopy for intrinsic aging and photoaging assessment[J]. *J Dermatol Sci*, 2017, 88(2): 199-206.
- [9] NITA M, GRZYBOWSKI A. The role of the reactive oxygen species and oxidative stress in the pathomechanism of the age-related ocular diseases and other pathologies of the anterior and posterior eye segments in adults[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2016. DOI: 10.1155/2016/3164734.
- [10] OSBORN M P, PARK Y, PARKS M B. Metabolome-wide association study of neovascular age-related macular degeneration[J]. *PLoS One*, 2013, 8(8): e72737.
- [11] KERSTEN E, PAUN C C, SCHELLEVIS R L, et al. Systemic and ocular fluid compounds as potential biomarkers in age-related macular degeneration[J]. *Surv Ophthalmol*, 2018, 63(1): 9-39.
- [12] RZEPKA Z, BUSZMAN E, BEBEROK A, et al. From tyrosine to melanin: signaling pathways and factors regulating melanogenesis [J]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 2016, 70(0): 695-708.
- [13] DONTSOV A E, SAKINA N L, OSTROVSKY M A. Loss of melanin by eye retinal pigment epithelium cells is associated with its oxidative destruction in melanolipofuscin granules[J]. *Biochemistry (Mosc)*, 2017, 82(8): 916-924.
- [14] YAM M, ENGEL A L, WANG Y, et al. Proline mediates metabolic communication between retinal pigment epithelial cells and the retina [J]. *J Biol Chem*, 2019, 294(26): 10278-10289.

(编辑:薛泽玲)

[1] CAI J, NELSON K C, WU M, et al. Oxidative damage and protection