

不同浓度维拉帕米及不同光照形式对豚鼠 RPE 细胞 Ca^{2+} 的影响

覃江圆¹, 王超英²

作者单位:¹(530003)中国广西壮族自治区南宁市,武警广西总队医院五官科;²(050082)中国河北省石家庄市,解放军白求恩国际和平医院眼科

作者简介:覃江圆,硕士,住院医师,研究方向:近视。

通讯作者:王超英,硕士,主任医师,教授,硕士研究生导师,研究方向:近视、视觉电生理. wanghc191@sina.com

收稿日期:2012-09-21 修回日期:2013-02-25

Effect of different forms of light on intracellular concentration of Ca^{2+} of guinea pig retinal pigment epithelial cells *in vitro*

Jiang-Yuan Qin¹, Chao-Ying Wang²

¹Department of Ophthalmology and Otorhinolaryngology, General Hospital of Guangxi Armed Police Corps, Nanning 530003, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China;² Department of Ophthalmology, Bethune International Peace Hospital, Shijiazhuang 050082, Hebei Province, China

Correspondence to: Chao - Ying Wang. Department of Ophthalmology, Bethune International Peace Hospital, Shijiazhuang 050082, Hebei Province, China. wanghc191@sina.com

Received:2012-09-21 Accepted:2013-02-25

Abstract

• **AIM:** To study the effect of different concentration of Verapamil (Ver) on Ca^{2+} of guinea pig retinal pigment epithelial (RPE) cells *in vitro* and compare the changes of Ca^{2+} with or without Ver under different forms of light.

• **METHODS:** Ten two-week-old healthy guinea pigs were chosen and RPE cells were cultured *in vitro*. Cells were divided into Ver treated and untreated groups, then each group further divided into 4 groups: focused light group, defocused light group, parallel light group and control group. The first three groups were exposed to the focused light, defocused light (2 forms of light were transformed from parallel light by passing through different lens) and the parallel light respectively, and control group was removed from exposure of light. After exposed to different forms of light, the fluorescence intensity of intracellular Ca^{2+} were detected by laser scanning confocal microscope (LSCM) immediately. Cool white light was used as light source. Cells were exposed to light with same spot diameter and degree of irradiation level (at 300 LUX) for 30 minutes respectively. Horizontal temperature of cells changed between 36.5°C-

37.2°C. There was no natural light interference. In order to avoid the impaction of refraction of liquid, most of the medium were siphoned off before irradiation. The data were analysed by SPSS 13.0 statistical software, completely randomized design ANOVA and Pearson linear correlation analysis were used as statistical methods. The forms-effect relations were explored.

• **RESULTS:** Treated with Ver for 12 hours, the apoptosis rates of RPE cells in 20, 40, 80mg/L concentration group had no significant difference compared with control group ($P>0.05$). Ver could reduce the Ca^{2+} fluorescence intensity of RPE cell, and there was significantly statistical difference in 80mg/L group ($P<0.05$). The Ca^{2+} fluorescence intensity of focused group of no Ver treated part was significantly higher than other groups, had significant differences compared with the other groups ($P<0.05$). After added 80mg/L Ver on the RPE cells for 12 hours, exposure to light did not significantly increase the Ca^{2+} fluorescence intensity, there was no significant difference among the 4 groups ($P>0.05$).

• **CONCLUSION:** Focused light can significantly stimulate the concentration of intracellular Ca^{2+} of RPE cells. Ver above a certain concentration can induce apoptosis of RPE cells; 80mg/L Ver can effectively reduce intracellular Ca^{2+} fluorescence intensity under the premise of not leading to apoptosis of RPE cells. Different forms of light have no effect on the Ca^{2+} fluorescence intensity of RPE cells after treated with Ver (80mg/L) for 12 hours.

• **KEYWORDS:** light exposure; focused light; defocused light; retinal pigment epithelium; Ca^{2+} ; laser scanning confocal microscope

Citation: Qin JY, Wang CY. Effect of different forms of light on intracellular concentration of Ca^{2+} of guinea pig retinal pigment epithelial cells *in vitro*. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2013;13(3):441-445

摘要

目的:探讨不同浓度维拉帕米(verapamil, Ver)对体外培养豚鼠视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)细胞内 Ca^{2+} 浓度的影响,并比较有无 Ver 作用下经不同形式光照后 RPE 细胞内 Ca^{2+} 浓度的变化。

方法:2 周龄幼年健康豚鼠 10 只,体外培养 RPE 细胞,传代、鉴定后,将细胞分为 Ver 处理组和未处理组,Ver 处理组加入 80mg/L Ver 作用 12h。两组均进一步分为聚焦光组、离焦光组、平行光组和空白对照组,前三组分别接受聚焦光、离焦光(均为将平行光经透镜转化)和平行光照

射,空白对照组不接受照射。于照射后立即采用激光扫描共焦显微镜(laser scanning confocal microscopy, LSCM)测定细胞内 Ca^{2+} 荧光强度,分析不同光照形式与效应的关系。统计学方法采用单因素方差分析。

结果: Ver 作用于 RPE 细胞 12h 后,20,40,80mg/L 组的细胞凋亡情况与空白对照组相比均无统计学意义 ($P > 0.05$),Ver 可降低 RPE 细胞内 Ca^{2+} 荧光强度,浓度为 20,40,80mg/L 时分别降低了 10.36%,24.54%,58.05%,仅 80mg/L 组与无光照组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。未加 Ver 对 RPE 细胞进行光照,聚焦光组的 Ca^{2+} 荧光强度较其他各组明显升高,离焦光组的荧光强度也较高,组间比较有统计学差异 ($P < 0.05$)。加入 80mg/L Ver 对 RPE 细胞作用 12h 后再进行光照,光照各组 Ca^{2+} 荧光强度没有明显提高,组间比较没有统计学差异 ($P > 0.05$)。

结论: 超过一定浓度的 Ver 可诱导 RPE 细胞凋亡,80mg/L 可在不引起 RPE 细胞凋亡的前提下有效降低细胞内 Ca^{2+} 荧光强度;不同光照形式对豚鼠 RPE 细胞内 Ca^{2+} 有明显刺激作用,聚焦光影响最大;不同光照形式对 Ver 处理的 RPE 细胞内的 Ca^{2+} 荧光强度无明显作用。

关键词: 光照;聚焦光;离焦光;视网膜色素上皮细胞;钙离子;激光扫描共聚焦显微镜

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2013.03.06

引用: 覃江圆,王超英.不同浓度维拉帕米及不同光照形式对豚鼠 RPE 细胞 Ca^{2+} 的影响.国际眼科杂志 2013;13(3):441-445

0 引言

目前常用的近视模型是给动物戴负镜片造成透镜诱导性近视,而不同的有色光如绿光、红光也可诱导出近视^[1]。不正确的光刺激或视觉信号输入会调控相关细胞因子及神经递质的分泌,干扰正视化过程,影响眼球和视觉系统发育,导致近视^[2]。对于正视眼来说,负镜片造成的离焦光线或者绿光、红光落在视网膜上的实际是一个弥散光斑,不是清晰的物像。那么视网膜感受到的到底是这种不同的光线形式还是有色光本身的颜色?又是对视网膜的哪一部分起作用?RPE 层由胚胎视泡的神经外胚层细胞高度分化而来的单层 RPE 细胞排列组成,在维持神经视网膜功能及保持视力方面有着至关重要的功能^[3]。RPE 细胞内 Ca^{2+} 浓度可调节其生长因子分泌、吞噬作用、离子交换和水分子转运等功能。全春梅等^[4]发现豚鼠透镜诱导性近视眼中,视网膜前、后极部 RPE 细胞内 Ca^{2+} 浓度升高,提示 Ca^{2+} 参与了豚鼠透镜诱导性近视的发生。本实验采用聚焦光和离焦光对 RPE 细胞进行照射,探讨不同光照形式对豚鼠 RPE 细胞内 Ca^{2+} 浓度的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及分组 2 周龄已脱离母乳喂养的健康幼年豚鼠 10 只,雌雄不限,由河北医科大学实验动物养殖场提供。取出眼球分离 RPE 细胞,培养、传代、鉴定。取生长良好的第 3~5 代细胞,分为 Ver 处理部分和未处理部分,两部分均进一步分为聚焦光组、离焦光组、平行光组和空白对照组,前三组分别接受不同形式的光线照射。

1.1.2 主要仪器和试剂 超净工作台,北京六一仪器厂;倒置相差显微镜(XDS-1B),重庆光学仪器厂;光学显微镜,日本 Olympus 公司;SD200 型冷光深部手术灯,中国上海医疗器械股份有限公司;DE-3351 数位式照度计,中国台北得益工业仪器有限公司;3.5cm 一次性玻底培养皿,美国 Corning 公司;DMEM 培养基,美国 Gibco 公司;小牛血清、胎牛血清,杭州四季青生物工程材料有限公司;II 型胶原酶、胰蛋白酶,美国 Sigma 公司;兔抗鼠 keratin(角蛋白)、Vimentin(波形蛋白)、Desmin(肌动蛋白)、S-100 蛋白检测试剂盒(免疫组化),北京博奥森生物技术有限公司;盐酸维拉帕米注射液,北京双鹤药业股份有限公司;Fluo-3/AM 荧光探针,美国 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 豚鼠 RPE 细胞培养、传代、鉴定 分离豚鼠 RPE 细胞,以 2×10^5 个/mL 密度接种于六孔板,在 37°C ,50mL/L CO_2 及饱和湿度培养箱中培养,2~3d 换液 1 次,细胞接近融合时按 1:2 或 1:3 传代。细胞鉴定角蛋白阳性。

1.2.2 RPE 细胞光照模型 自制一个大小为 $10\text{cm} \times 15\text{cm} \times 16.7\text{cm}$ 的长方形木盒作为光照器,顶部开 3 个圆孔,其中两个直径为 6cm,大小与球镜片一致,另外一个圆孔直径为 3cm。用 SD200 型冷光深部手术灯进行悬照。将屈光度分别为 +3.00D、+9.00D 的球镜片放置于直径 6cm 圆孔上,平行光通过镜片后焦点分别形成于细胞下方和细胞上方,落到细胞上的光线即为聚焦光和离焦光,其正下方分别放置聚焦光组、离焦光组细胞。直径 3cm 圆孔上无球镜片,下方放置平行光组细胞。空白对照组不接受光照。光线经过镜片后在细胞水平上形成的光斑直径均为 3cm,同一水平面的光照强度相同,为 300Lx,照射时间均为 30min。光照在暗室中进行,无自然光干扰,光照器内壁涂黑避免光线反射,光照前各组细胞吸掉大部分培养基以避免液体折光的影响。光源发出的光线色温为 $4000 \pm 500\text{K}$,低于自然光的 4800K,不会由于产热而干扰实验结果。光照器置于敞开的水浴箱中,使光照期间同一水平温度变化在 $36.5^\circ\text{C} \sim 37.2^\circ\text{C}$ 之间。

1.2.3 MTT 比色法测定 Ver 作用后的 RPE 细胞凋亡率

Ver 可诱导 RPE 细胞凋亡,因此需筛选出可有效降低 RPE 细胞内 Ca^{2+} 浓度而又不会导致细胞凋亡的浓度。将融合的第 3~5 代细胞,制成 5×10^4 个/mL 单细胞悬液,以每孔 200 μL 接种于 96 孔板中。待细胞贴壁,吸掉旧培养基,加入含 20mL/L 胎牛血清的 DMEM 稀释的 Ver 200 μL ,终浓度分别为 20,40,80,120,160mg/L,无光照组只加入 20mL/L 胎牛血清 DMEM,振荡 5min,使其充分混匀。每组均设 3 个平行孔。呈色:继续培养至加药后 12h,每孔加入 MTT 溶液(5g/L)10 μL ,振荡混匀, 37°C ,50mL/L CO_2 培养箱孵育 4h,小心吸弃孔内培养上清液,每孔加入 150 μL 二甲基亚砜(DMSO),震荡 5min,使结晶充分溶解。比色:选择 570nm 波长,在酶联免疫检测仪上测定各孔吸光度(A)值,记录结果。每一实验重复 3 次,取平均值。数据分析:细胞凋亡率(%)=(空白对照组 A-处理组 A)/无光照组 A $\times 100\%$ 。

1.2.4 LSCM 测定 RPE 细胞内 Ca^{2+} 荧光强度 在 1.2.3 的基础上,进一步检测未使 RPE 细胞出现明显凋亡的浓度组细胞内 Ca^{2+} 荧光强度,具体方法:用 D-Hanks 液漂洗细胞 3 次,将 Fluo-3/AM 用 D-Hanks 液稀释为终浓度 25 $\mu\text{mol/L}$,加入 F-127 使其终浓度为 2%,在 37°C ,50mL/L

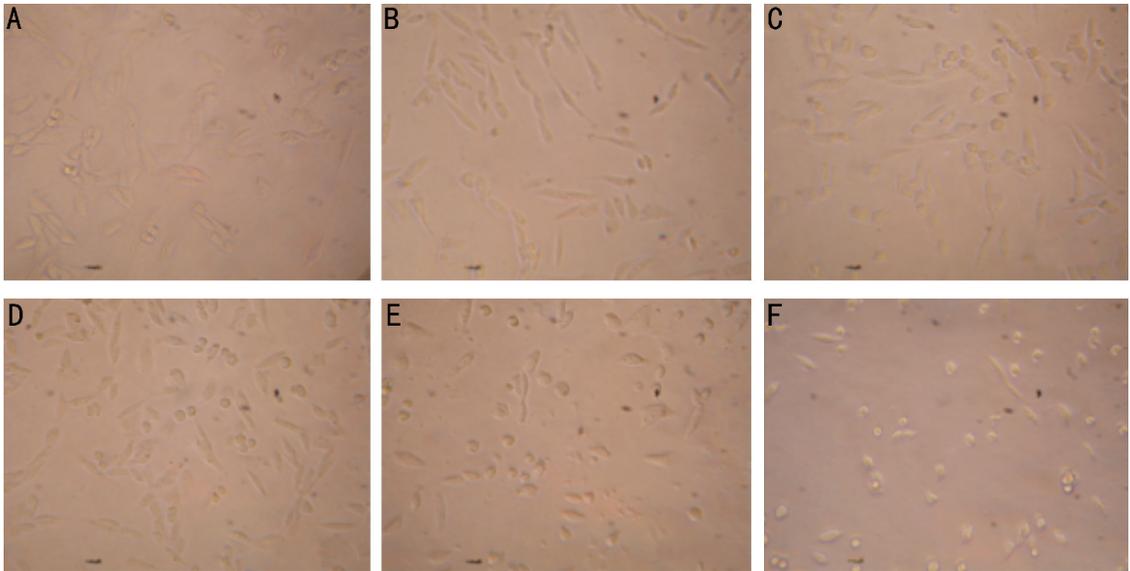


图1 Ver作用12h后RPE细胞的凋亡($\times 200$) A: 空白对照组; B: 20mg/L; C: 40mg/L; D: 80mg/L; E: 120mg/L; F: 160mg/L。

CO₂培养箱中孵育45min, 荧光染色后再用D-Hanks液漂洗3次, 充分洗去未负载的 fluo-3/AM, 加入1mL D-Hanks液防止干片, 上机检测荧光。LSCM激发波长为488nm, 发射波长为525nm, 光学物镜倍数为20倍, 油镜倍数为63倍。随机选择5个视野扫描细胞内的荧光强度, 每组重复3次。利用LSCM所配备的数据与图像处理软件, 计算出整个细胞荧光强度的相对值。选择既未使RPE细胞出现明显凋亡而细胞内Ca²⁺荧光强度又已出现显著降低的浓度用于光照前RPE细胞的处理。将第3~5代培养的RPE细胞, 按 1×10^5 个/mL接种于玻底直径为20mm的玻底培养皿, 待细胞贴壁后用换用10mL/L胎牛血清的培养基。将细胞分为两部分, 一部分加入Ver(浓度为上述步骤筛选出的结果)作用12h。12h后两部分细胞均分为聚焦光组、离焦光组、平行光组和无光照组。照射后立即测定RPE细胞内Ca²⁺荧光强度。

统计学分析: 采用SPSS 13.0统计软件对数据进行统计分析。各组数据均为计量资料, 结果记录为均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)。组间差异行完全随机单因素方差分析, 多重比较采用SNK-q法。取检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 Ver作用后的RPE细胞凋亡率 不同浓度的Ver对RPE细胞的抑制具有剂量依赖效应, 作用于RPE细胞12h后, 20, 40, 80mg/L组在镜下观察有极少量细胞凋亡(图1), 细胞凋亡率呈很平缓的上升趋势, 但与空白对照组相比差异均没有统计学意义($P>0.05$, 图2), 当浓度达120mg/L以上时, 细胞凋亡率急剧上升, 120mg/L和160mg/L组分别达到59.36%和93.05%, 与空白对照组相比差异有统计学意义, 160mg/L组在镜下只能观察到个别活细胞($P<0.05$)。

2.2 不同浓度Ver对RPE细胞内Ca²⁺强度的影响 在2.1的结果上, 只需检测20, 40, 80mg/L Ver对RPE细胞内Ca²⁺荧光强度的影响。RPE细胞负载荧光后基本保持细胞原有形态, 细胞内可见绿色均匀荧光, 胞核轮廓清晰, 荧

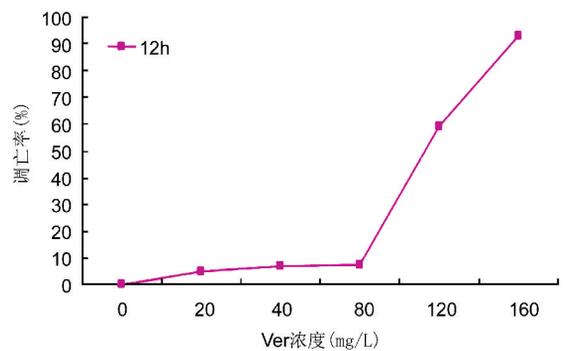


图2 Ver作用12h后RPE细胞的凋亡率。

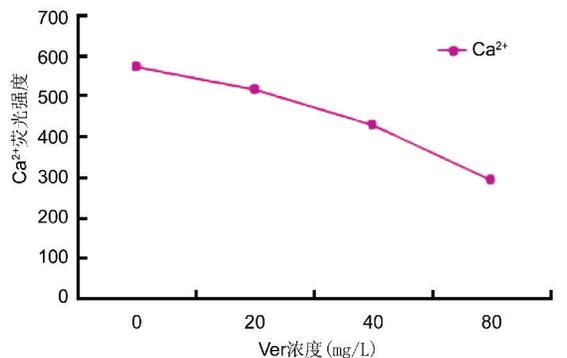


图3 Ver作用12h后RPE细胞内Ca²⁺荧光强度。

光比胞质强。Ca²⁺浓度越高, 荧光强度越大。加入Ver可降低RPE细胞内Ca²⁺荧光强度, 浓度为20, 40, 80mg/L时分别降低10.36%, 24.54%, 48.05%, 差异有统计学意义($P<0.05$; 图3, 4)。故80mg/L Ver可有效降低RPE细胞内Ca²⁺浓度而又不会导致细胞的明显凋亡, 用于下一步光照前对Ver组RPE细胞进行处理。

2.3 不同光照形式对RPE细胞内Ca²⁺强度的影响 未加Ver对RPE细胞进行光照, 聚焦光组的Ca²⁺荧光强度较其他各组明显升高, 离焦光组的荧光强度也较高, 组间差异有统计学差异($P<0.05$, 图5, 表1)。加入80mg/L Ver对RPE细胞作用12h后再进行光照, 光照各组荧光强度没有明显提高, 组间差异没有统计学意义($P>0.05$, 图5, 表1)。

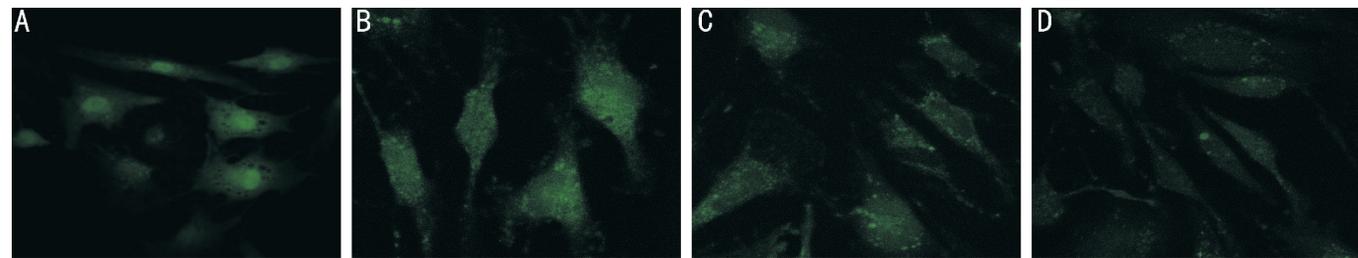


图4 Ver作用1h后RPE细胞内Ca²⁺的荧光强度(×1000) A:空白对照组;B:20mg/L;C:40mg/L;D:80mg/L。

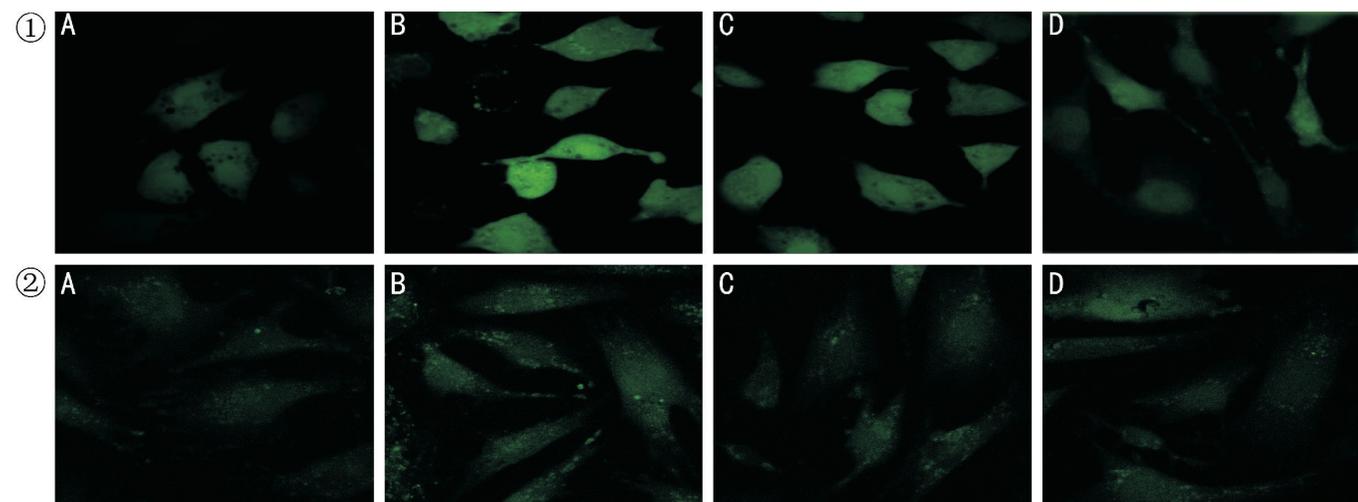


图5 不同光照形式对RPE细胞内Ca²⁺强度的影响(×1000) ①:未加Ver;②:Ver组;A:空白对照组;B:聚焦光组;C:离焦光组;D:平行光组。

表1 比较有无Ver作用下不同光照形式对豚鼠视网膜色素上皮细胞内Ca²⁺的影响 $\bar{x} \pm s$

分组	Ca ²⁺ 荧光强度	
	未加Ver组	Ver组
空白对照组	559.23±78.19	305.76±19.66
聚焦光组	1057.21±129.52 ^a	353.71±25.45 ^c
离焦光组	705.10±72.86 ^c	363.04±66.57 ^c
平行光组	620.72±80.36 ^c	348.04±39.76 ^c
F	28.413	1.851
P	0.000	0.179

^aP<0.05, ^cP>0.05 vs 空白对照组。

3 讨论

3.1 RPE细胞的感光能力 传统上认为,只有视锥细胞、视杆细胞能够感光、参与成像,而近年来,随着名为黑视素(melanopsin)的新型视蛋白的分离,人们发现视网膜内还有其它的光感受器存在。黑视素于1998年由Provencio等^[5]在两栖动物非洲蟾具有光敏特性的皮肤黑色素细胞中首次被克隆,也存在于多种脊椎动物的视网膜中。随后的几年中发现黑视素在哺乳动物的部分视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGCs)中表达,这部分RGC又称为内在光敏性视网膜神经节细胞(intrinsically photosensitive retinal ganglion cells, ipRGCs)^[6,7]。但近几年,黑视素也在视网膜的其他部分如RPE细胞和视锥细胞中检测到^[8,9]。

利用重组黑视素测得的吸光度峰值约为480nm,相当于蓝光范围(470~475nm)^[10],而纯化黑视素的吸光度峰值为420nm^[11]。通过对黑视素肽链的分析,发现与G蛋白偶联受体有极大的同源性,属于G蛋白偶联受体超家族,与已知的直接感光视蛋白也有结构上的高度相似,认

为其可能也是一种功能性感光视蛋白。黑视素通过吸收光子参与多种视觉和非视觉光感受功能,包括调整生物钟、瞳孔收缩、影响昼夜光周期和生理以及调节视觉成像系统等^[12]。Melyan等^[13]把人黑视素转入无感光性能的小鼠Neuro-2a细胞株中,结果使该细胞获得了光敏感性,从另一角度证明了黑视素是感光视素。黑视素是双稳态色素,可以为11-顺视黄醛和全反视黄醛提供生色团,这一过程主要在RPE细胞中发生,不需要G蛋白介导,因此Peirson等推论,RPE细胞能够表达黑视素,说明它可能既具有光感受功能,又可有色素再生功能,而细胞内是否有合适的信号转导蛋白决定其将发挥哪一种作用^[8]。

黑视素可与Gq蛋白作用,从而激活磷脂酶C-β,引起三磷酸肌醇和甘油二酯生成增多,最终导致细胞膜上cGMP门控的阳离子通道开放,Na⁺及部分Ca²⁺内流,引发细胞去极化,同时调节细胞内储存Ca²⁺的释放^[14]。

3.2 RPE细胞内Ca²⁺浓度变化的意义 Ca²⁺作为重要的第二信使对RPE细胞的功能是必不可少的。当RPE细胞受到刺激时,胞浆内游离Ca²⁺浓度升高,把外源信号(激素、光、重力、温度等)转变成胞内信号。RPE细胞上有多种选择性钙通道,其中典型的L型和T型电压门控性Ca²⁺通道均有表达。

钙通道阻滞剂主要是指对L-型电压门控性Ca²⁺通道具有阻断作用的药物。Ver是一种可靠的慢钙通道阻滞剂,可选择性阻断Ca²⁺向细胞内移动,使细胞内Ca²⁺浓度降低,已经证实RPE细胞上这种典型的L型电压门控性Ca²⁺通道对Ver敏感^[15]。

Smith-Thomas等^[16]和李劲等^[17]均报道Ver作用超过一定浓度或者一定时间可诱导体外培养RPE细胞的凋亡,这是由于降低RPE细胞内Ca²⁺浓度而抑制了RPE细

胞的增殖。参考以往的结果^[18],本实验设计 20,40,80,120,160mg/L 五个浓度组,对 RPE 细胞作用 12h 后测定其细胞凋亡率及细胞内 Ca^{2+} 浓度变化,发现 80mg/L 组可在不引起 RPE 细胞凋亡的情况下有效降低细胞内 Ca^{2+} 荧光强度,因此最终选择用 80mg/L 在光照前对 RPE 细胞进行预处理。

3.3 不同光照形式对 RPE 细胞内 Ca^{2+} 浓度的影响 本实验观察到未加 Ver 对 RPE 细胞进行光照时,聚焦光组的 Ca^{2+} 荧光强度较其他各组明显升高,当利用 Ver 对 RPE 细胞进行阻滞,尽管给予细胞不同形式的光照刺激,由于 Ca^{2+} 通道活性尚未恢复, Ca^{2+} 无法进入细胞内,各组荧光强度未表现出显著变化。

本实验中,聚焦光和离焦光在同等面积的情况下,光子数是相同的,唯一存在区别的是光线经过聚焦或离焦后在 RPE 细胞上的清晰程度,即存在边缘效应(红色边缘/绿色边缘),而这是视锥细胞的感受功能之一,目前尚无证据说明 RPE 细胞可以感受边缘效应。然而随着黑视素在 RPE 细胞和视锥细胞中的发现,我们认为这可能与黑视素的功能有关。

Giesbers 等^[19]曾报道,通过将黑视素的 C-末端与增强的黄色荧光蛋白融合(enhanced yellow fluorescent protein, eYFP),观察到人 RPE 细胞株 D407 和人胚肾细胞株 HEK293 在暗淡的 650nm 红光照射下,细胞内 Ca^{2+} 浓度出现快速而短暂的升高,而预先补充 11-顺视黄醛和全反视黄醛可以增强这一反应,该实验的结果至少说明,黑视素能吸收光并开启细胞中的一个化学反应链,引起电势反应。

我们推测,聚焦光照射后引起 RPE 细胞内 Ca^{2+} 浓度升高的可能机制是:RPE 细胞中的黑视素感受到聚焦光带来的边缘效应后,通过与相应的受体蛋白作用,将信号逐级传递,最终导致细胞膜上的阳离子通道开放,部分 Ca^{2+} 内流,细胞发生去极化,同时细胞内 Ca^{2+} 的释放又进一步刺激细胞膜上的 Ca^{2+} 通道打开,使更多的 Ca^{2+} 进入细胞内,直至发生进一步的生理、生化效应。

本实验在光照后立刻测定 RPE 细胞内 Ca^{2+} 荧光强度,只能反应早期 Ca^{2+} 的变化,这种变化究竟是一过性的、很快就恢复原始水平,还是持续性的,需要进一步动态的观察,而 RPE 细胞内 Ca^{2+} 浓度升高引发的下游效应是什么,也需要我们深入研究。

参考文献

- 1 钱一峰,戴锦晖,刘睿,等. 530nm 单色光诱导豚鼠近视眼模型的建立. 中国实验动物学报 2009;17(6):401-405
- 2 Wallman J, Winawer J. Homeostasis of eye growth and the question of myopia. *Neuron* 2004;43(4):447-468

3 Bharti K, Nguyen MT, Skuntz S, et al. The other pigment cell: specification and development of the pigmented epithelium of the vertebrate eye. *Pigment Cell Res* 2006;19:380-394

4 全春梅,王超英,王彩荣,等. 豚鼠透镜诱导型近视视网膜色素上皮细胞钙离子的研究. 眼科研究 2010;28(10):927-931

5 Provencio I, Jiang G, Willem J, et al. Melanopsin: An opsin in melanophores, brain, and eye. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95(1):340-345

6 Berson DM, Dunn FA, Takao M. Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science* 2002;295(5557):1070-1073

7 Hattar S, Liao HW, Takao M, et al. Melanopsin-containing retinal ganglion cells: Architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science* 2002;295(5557):1065-1070

8 Peirson SN, Bovee-Geurts PH, Lupi D, et al. Expression of the candidate circadian photopigment melanopsin (Opn4) in the mouse retinal pigment epithelium. *Brain Res Mol Brain Res* 2004;123(1-2):132-135

9 Dkhissi-Benyahya O, Rieux C, Hut RA, et al. Immunohistochemical evidence of a melanopsin cone in human retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47(4):1636-1641

10 Torii M, Kojima D, Okano T, et al. Two isoforms of chicken melanopsins show blue light sensitivity. *FEBS Lett* 2007;581(27):5327-5331

11 Newman LA, Walker MT, Brown RL, et al. Melanopsin forms a functional short-wavelength photopigment. *Biochemistry* 2003;42(44):12734-12738

12 王飞. 单色光诱导的豚鼠近视眼中黑视素和褪黑激素受体-1A 表达变化的研究. 复旦大学博士学位论文 2008

13 Melyan Z, Tarrtelin EE, Bellingham J, et al. Addition of human melanopsin renders mammalian cells photoreceptive. *Nature* 2005;433(7027):741-745

14 Panda S, Nayak SK, Campo B, et al. Illumination of the melanopsin signaling pathway. *Science* 2005;307(5709):600-604

15 Johnson AS, Garcia DM. Carbachol-mediated pigment granule dispersion in retinal pigment epithelium requires Ca^{2+} and calcineurin. *BMC Cell Biol* 2007;8:53

16 Smith-Thomas LC, Richardson PS, Rennie IG, et al. Influence of pigment content, intracellular calcium and cyclic AMP on the ability of human retinal pigment epithelial cells to contract collagen gels. *Curr Eye Res* 2000;21(1):518-529

17 李劲,宋琳,龚荃,等. 维拉帕米对人视网膜色素上皮细胞增殖的抑制作用. 华中科技大学学报(医学版) 2008;37(1):117-120

18 庞东渤,洪晶. 维拉帕米诱导人视网膜色素上皮细胞凋亡及细胞内钙变化. 国际眼科杂志 2006;6(2):324-327

19 Giesbers ME, Shirzad-Wasei N, Bosman GJ, et al. Functional Expression, Targeting and Ca^{2+} Signaling of a Mouse Melanopsin-eYFP Fusion Protein in a Retinal Pigment Epithelium Cell Line. *Photochem Photobiol* 2008;84(4):990-995