

电子烟对小鼠视网膜组织及超微结构影响的研究

年 申¹, 乔妮妮², 罗阿丽³, 李 娟⁴, 王善伟¹, 米亚静⁵, 张光伟⁶

引用: 年申, 乔妮妮, 罗阿丽, 等. 电子烟对小鼠视网膜组织及超微结构影响的研究. 国际眼科杂志 2021; 21(2): 222-227

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No. 81873740); 陕西省教育厅重点科研项目(No. 19JS059); 西安医学院博士科研启动基金(No. 2016DOC24); 西安医学院国家基金培育项目(No. 2016GJFY03, 2017GJFY29)

作者单位: (710021) 中国陕西省西安市, 西安医学院¹基础医学部病理教研室; ²公共卫生学院; ³基础医学研究所; ⁴基础医学部; ⁵(710100) 中国陕西省西安市胸科医院病理科; ⁶(710004) 中国陕西省西安市第四医院眼科

作者简介: 年申, 讲师, 博士, 研究方向: 眼科病理基础研究。

通讯作者: 张光伟, 病理生理学博士, 副教授, 研究方向: 心血管动脉粥样硬化. zgw1979@163.com

收稿日期: 2020-05-11 修回日期: 2021-01-05

摘要

目的: 研究电子烟对小鼠视网膜组织及超微结构的影响以及可能的相关机制。

方法: 将 18 只 8 周龄雄性 c57BL 小鼠随机分为对照组(6 只), 0mg 尼古丁组(6 只)和 12mg 尼古丁组(6 只), 分别用 HE 染色观察视网膜各层结构的改变, 在透射电子显微镜下观察视网膜色素上皮(RPE)细胞超微结构的改变, 通过免疫荧光染色观察视网膜中 Tuj1、8-OHdG 的表达情况。

结果: 与对照组相比, 实验组(0mg 和 12mg 尼古丁组)视网膜全层、视神经纤维层和内丛状层厚度均显著减少($P < 0.01$), 但实验组间均无明显差异($P > 0.05$)。RPE 细胞顶部仅见零星微绒毛, 残存微绒毛长度变短。实验组中节细胞层、视神经纤维层和内丛状层可观察到 Tuj1 表达减少, 但是神经节细胞数目无显著变化($P > 0.05$)。0mg 和 12mg 尼古丁组中节细胞层、内核层内观察到 8-OHdG 表达增加。

结论: 电子烟可对小鼠视网膜造成损伤, 其损伤可能是由氧化应激反应造成的。

关键词: 电子烟; 视网膜; 视网膜神经节细胞; 视网膜色素上皮细胞; 氧化应激

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2021.2.06

Effects of e-cigarette on retinal histology and ultrastructure in mice

Shen Nian¹, Ni-Ni Qiao², A-Li Luo³, Juan Li⁴, Shan-Wei Wang¹, Ya-Jing Mi⁵, Guang-Wei Zhang⁶

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (No. 81873740); Shaanxi Provincial Education Department Key

Scientific Research Project (No. 19JS059); Research Funding for PhD Graduate in Xi'an Medical University (No. 2016DOC24); National Fund Cultivation Project of Xi'an Medical University (No. 2016GJFY03, 2017GJFY29)

¹Department of Pathology, Faculty of Basic Medicine; ²School of Public Health; ³Institute of Basic Medicine Science; ⁴Faculty of Basic Medicine, Xi'an Medical University, Xi'an 710021, Shaanxi Province, China; ⁵Department of Pathology, Xi'an Chest Hospital, Xi'an 710100, Shaanxi Province, China; ⁶Department of Ophthalmology, Xi'an No. 4 Hospital, Xi'an 710004, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Guang-Wei Zhang. Faculty of Basic Medicine, Xi'an Medical University, Xi'an 710021, Shaanxi Province, China. zgw1979@163.com

Received: 2020-05-11 Accepted: 2021-01-05

Abstract

• AIM: To study the histological and ultrastructural changes of mouse retina after exposure to e-cigarette and the potential mechanism.

• METHODS: Totally 18 male c57BL mice aged 8-week-old were divided into control group ($n = 6$), 0mg nicotine group ($n = 6$) and 12mg nicotine group ($n = 6$). The histological and ultrastructural changes of retina were evaluated by hematoxylin and eosin (HE) staining and transmission electron microscope (TEM), respectively. Additionally, the expression of Tuj1 and 8-OHdG was examined using immunofluorescent staining.

• RESULTS: In comparison with control group, the thickness of whole retina, nerve fiber layer (NFL) and inner plexiform layer (IPL) was significantly decreased in experimental groups (0mg and 12mg nicotine group) ($P < 0.01$), but no significant difference was observed between 0mg and 12mg nicotine group ($P > 0.05$). The dramatically reduced microvilli of RPE cells were also observed in experimental groups using TEM. Furthermore, residual microvilli were shortened. The expression of Tuj1 was decreased in ganglion cell layer (GCL), NFL and IPL, but no significant changes in the number of retinal ganglion cells were shown among three groups ($P > 0.05$). In addition, the increased expression of 8-OHdG was observed in GCL and inner nuclear layer (INL) in experimental groups.

• CONCLUSION: E-cigarette can lead to the retinal damages in mice, which might be due to oxidative stress.

• KEYWORDS: e-cigarette; retina; retinal ganglion cells; retinal pigment epithelial cells; oxidative stress

Citation: Nian S, Qiao NN, Luo AL, et al. Effects of e-cigarette on retinal histology and ultrastructure in mice. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2021; 21(2): 222-227

0 引言

吸烟对身体的多个器官造成不同程度的影响,是世界上老年人死亡的重要原因之一。近年来电子烟以戒烟、清肺等为宣传口号,在全球快速流行,获得了越来越多的消费者青睐^[1]。电子烟(又称电子尼古丁传送系统, Electronic nicotine delivery systems, ENDS)由电池(供电系统)、雾化器(雾化系统)和液体(电子烟雾化液)构成^[2-3]。电子烟雾化液在加热后气化并向开口端喷出,喷出的蒸汽在大气中冷凝,形成类似于传统香烟烟雾的微小雾滴被吸食者吸入^[4]。有文献报道^[5-6]电子烟烟液可能含有有毒成分,如重金属、甲醛、丙烯醛等,对人体健康产生影响。文献报道吸烟与许多眼部疾病密切相关,其主要是通过氧化应激或缺氧机制造成视网膜的损伤,但电子烟与眼部疾病的关系鲜有报道,本文旨在探讨小鼠在被电子烟烟雾染毒后小鼠视网膜各层组织病理学变化、视网膜色素上皮(RPE)细胞超微结构改变及其与氧化应激之间的关系,为临床上防治相关视网膜疾病提供一定的理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 选取18只c57BL雄性小鼠(8周龄,体重18~22g,由西安交通大学医学院实验动物中心提供),均为无特定病原体级实验动物(SPF级动物)。使用裂隙灯显微镜及眼底镜检查小鼠眼前节、眼底未发现异常。整个实验中,18只小鼠均置于标准环境饲养:室温 $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$,湿度 $60\%\pm 10\%$ 和交替的12h明暗周期(早上8点到晚上8点),并给予相同的水量和食物^[7-8]。动物实验符合视觉与眼科协会规定的对于动物眼科和视觉研究的使用要求(动物处死采用水合氯醛过量麻醉后处死,仅使用动物的一只眼球用于实验),同时获得了西安交通大学医学院动物伦理委员会的批准。

1.1.2 电子烟 特唯普(Truvape,英国)。

1.1.3 仪器与试剂 模拟人体呼吸系统吸烟的仿生装置(专利201721438419.0),静式染毒柜(中国天津合普),光学显微镜(Olympus BX41),透射电子显微镜(Hitachi HT7800),激光共聚焦显微镜(Thermo CellInsight CX5),石蜡切片机(德国Leica RM2235),图像分析系统(Leica Q550CW), Anti-beta III Tubulin antibody(英国Abcam, 1:1000), 8-OHdG(美国Santa Cruz, 1:1000), Goat Anti-Mouse IgG H&L(英国Abcam, 1:500), 苏木素(Sigma)。

1.2 方法

1.2.1 动物模型建立 本研究应用仿生模拟人体呼吸系统吸烟发生装置模拟人体吸烟行为习惯,按人20支/天吸烟量(每根烟含12mg尼古丁)计算,依小鼠体表面积换算需要电子烟烟液的量。通过发明专利装置,将电子烟烟雾传送至静式染毒柜,每天2次,每次染毒30min,持续12wk。

1.2.2 动物分组 18只c57BL小鼠随机分为A组、B组和C组。A组为对照组(6只),不做特殊处理,B组为0mg尼古丁电子烟组(6只),C组为12mg尼古丁电子烟组(6只)。B组和C组进行电子烟烟雾干预,每天2次,一次30min。干预12wk后,处死小鼠,摘取眼球。

1.2.3 小鼠视网膜结构观察 各组小鼠水合氯醛

(100g/L)腹腔麻醉,处死小鼠后取眼球,将小鼠眼球分别固定于40g/L多聚甲醛溶液内^[9]。依次经体积分数为80%(1min,2次)、95%(3min,2次)、100%(5min,2次)乙醇逐级脱水,浸蜡,石蜡包埋并切片(片厚 $4\mu\text{m}$)。部分经过视神经切片行HE染色,于光学显微镜下观察视网膜各层结构的改变并测量每张切片中央部视网膜全层、视神经纤维层、内丛状层的厚度;随机选取5张切片并求得平均值作为该眼球的中央部平均视网膜、视神经纤维层、内丛状层厚度。其余经过视神经切片行免疫荧光染色。

1.2.4 视网膜 Tuj1 和 8-OHdG 免疫荧光染色 各组石蜡切片脱蜡后, Proteinase K (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PBS) 15min 修复抗原,用免疫荧光封闭液封闭60min, Tuj1、8-OHdG 一抗 4°C 孵育过夜,羊抗小鼠二抗室温避光孵育1h,含 DAPI 的封闭液封片,激光共聚焦显微镜下观察、拍照。用细胞图像分析系统计数节细胞层 Tuj1 阳性细胞数,随机选取5张切片并求得平均值作为该眼球的平均节细胞层 Tuj1 阳性细胞数。

1.2.5 视网膜色素上皮细胞超微结构观察 将3组小鼠眼球标本分别置于体积分数2.5%戊二醛前固定2~4h,洗涤,10g/L 锇酸固定1~2h,洗涤;乙醇梯度脱水、环氧树脂渗透、包埋与聚合、切片,枸橼酸铅和醋酸双氧铀双重染色,于透射电子显微镜下观察 RPE 细胞的超微结构并拍照^[10]。

统计学分析:使用统计学软件 SPSS17.0 处理数据,各组间结果数据的比较采用单因素方差(one-way ANOVA)分析,以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠视网膜结构观察 对照组小鼠视网膜形态正常,各层结构完整,层次分明。内界膜(internal limiting membrane, ILM)清晰完整;视神经纤维层(nerve fiber layer, NFL)神经纤维排列较好;神经节细胞层(ganglion cell layer, GCL)内细胞核多呈卵圆形,在中央部排列成假复层,周边部呈单层排列,较密集,可见多个毛细血管;内丛状层(inner plexiform layer, IPL)结构较完整;内核层(inner nuclear layer, INL)细胞核排列整齐,染色均匀,约5~6层;外丛状层(outer plexiform layer, OPL)和外核层(outer nuclear layer, ONL)细胞核排列整齐、紧密,有一定极向性;外界膜(external limiting membrane, ELM)、视锥视杆细胞(rods and cones)和 RPE 层均形态正常,RPE 层细胞呈矮立方状单层排列,细胞浆内含色素(图1A)。0mg尼古丁组测得小鼠视网膜厚度 $178.8\pm 6.92\mu\text{m}$,内界膜较完整,局部不清晰;视神经纤维层神经纤维部分改变、消失,排列不规则;视神经节细胞层内细胞核为卵圆形,部分形态异常,排列紊乱,染色不均一,疏密不一,局部可见细胞核的缺失,毛细血管较对照组减少;内丛状层结构较好,内核层细胞核排列较规则,外丛状层、外核层、外界膜、视锥视杆细胞和视网膜色素上皮层均未见明显改变(图1B)。12mg尼古丁组各层结构改变与0mg尼古丁组基本一致(图1C)。3组小鼠视网膜厚度、视神经纤维层厚度和内丛状层厚度见表1。三组间视网膜厚度、视神经纤维层厚度和内丛状层厚度比较,差异有统计学意义($F=44.65, P<0.0001; F=56.64, P<0.0001; F=24.42, P<$

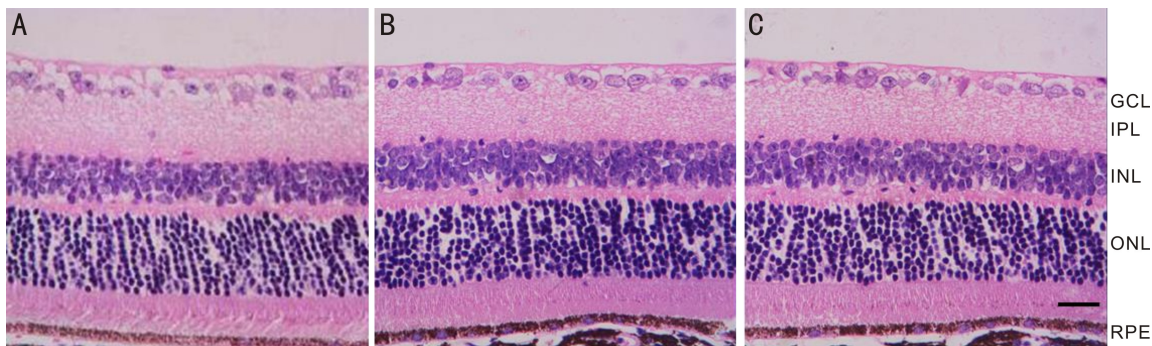


图1 三组小鼠视网膜 HE 染色情况 (×400) A: 正常对照组; B: 0mg 尼古丁电子烟干预; C: 12mg 尼古丁电子烟干预。

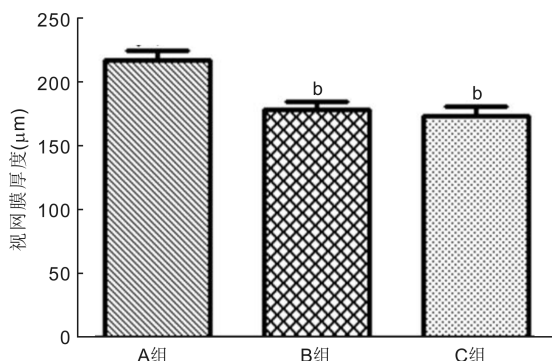


图2 三组小鼠视网膜厚度的比较 A组: 正常对照组; B组: 0mg 尼古丁电子烟干预; C组: 12mg 尼古丁电子烟干预。^b*P* < 0.001 vs A组。

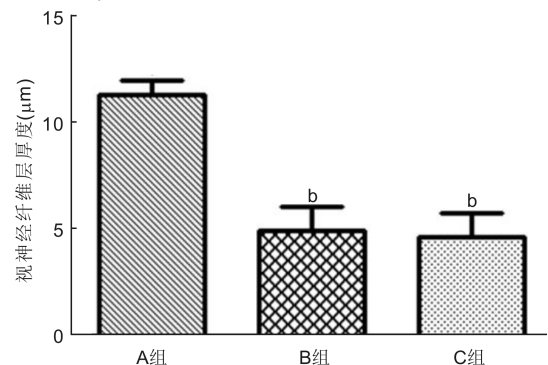


图3 三组小鼠视神经纤维层厚度的比较 A组: 正常对照组; B组: 0mg 尼古丁电子烟干预; C组: 12mg 尼古丁电子烟干预。^b*P* < 0.001 vs A组。

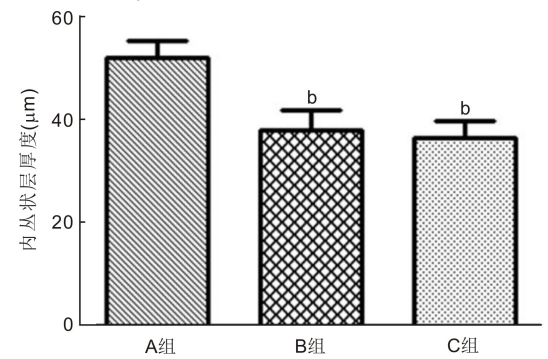


图4 三组小鼠内丛状层厚度的比较 A组: 正常对照组; B组: 0mg 尼古丁电子烟干预; C组: 12mg 尼古丁电子烟干预。^b*P* < 0.001 vs A组。

0.001)。0mg 和 12mg 尼古丁组视网膜、视神经纤维层和内丛状层厚度与对照组相比均显著变薄 (*P* < 0.01), 但是 0mg 和 12mg 尼古丁组之间差异无统计学意义 (*P* = 0.3716, 0.7201, 0.5369), 见图 2~4。

表1 三组小鼠视网膜、视神经纤维层和内丛状层的厚度

分组	视网膜	视神经纤维层	内丛状层
对照组	216.7 ± 7.43	11.4 ± 0.56	52.1 ± 3.17
0mg 尼古丁组	178.8 ± 6.92	4.9 ± 1.02	38.4 ± 3.86
12mg 尼古丁组	173.6 ± 6.07	4.6 ± 1.18	36.2 ± 3.14

2.2 小鼠视网膜 Tuj1 免疫荧光染色 Tuj1 可以与神经细胞中Ⅲ类 β-微管蛋白特异性结合, 因此常作为视网膜神经节细胞的标志。本实验将在 GCL 层的 Tuj1 和 DAPI 双染的细胞定义为视网膜神经节细胞。对照组小鼠视网膜神经节细胞排列紧密有序, 大小相似, 胞浆内可见强的红色免疫荧光信号, 视神经纤维层和内丛状层也可见红色免疫荧光信号 (图 5A, D); 0mg 尼古丁组神经节细胞排列紊乱, 疏密不一, 胞浆内可见较强的红色免疫荧光信号, 视神经纤维层红色免疫荧光信号较弱, 内丛状层内也可见红色免疫荧光信号 (图 5B, E); 12mg 尼古丁组红色免疫荧光信号强弱与 0mg 尼古丁组相似 (图 5C, F)。对照组、0mg 尼古丁组和 12mg 尼古丁组神经节细胞数目 (85.5 ± 2.38、81.75 ± 2.63、81 ± 3.16 个/毫米) 无明显差别, 差异无统计学意义 (*F* = 3.089, *P* = 0.0952, 图 6)。

2.3 小鼠 RPE 细胞超微结构改变 RPE 细胞位于 Bruch 膜上, 对照组 RPE 细胞内可见黑色素颗粒, 细胞顶部可见十分丰富的细长微绒毛 (图 7A); 0mg 尼古丁组 RPE 细胞内仍可见黑色素颗粒, 但是细胞顶部微绒毛数量明显减少, 仅可见零星的微绒毛, 残存的微绒毛长度变短 (图 7B); 12mg 尼古丁组 RPE 细胞超微结构的改变与 0mg 尼古丁组相似 (图 7C)。

2.4 小鼠视网膜 8-OHdG 免疫荧光染色 正常组小鼠视网膜内偶尔在神经节细胞层内见到核呈淡红色的 8-OHdG 免疫荧光信号, 其余各层未见明显阳性表达 (图 8A, D)。实验组 (0mg 尼古丁组和 12mg 尼古丁组) 小鼠视网膜 GCL 内可见多个核浆着色的较强红色 8-OHdG 免疫荧光信号, 内核层内可见较弱红色 8-OHdG 免疫荧光信号, 其余各层未见明显阳性表达 (图 8B, C, E, F)。

3 讨论

近年来电子烟因具有戒烟、清肺的宣传作用, 且具有与传统香烟相近的外观、烟雾、味道和吸食口感而被消费者青睐^[6]。Farsalinos 等^[11]对 20 种电子烟烟液与传统香烟烟气的体外毒性效应进行分析表明, 电子烟烟液的细胞毒性均小于传统香烟烟气, 但仍有毒性影响, 可能主要与

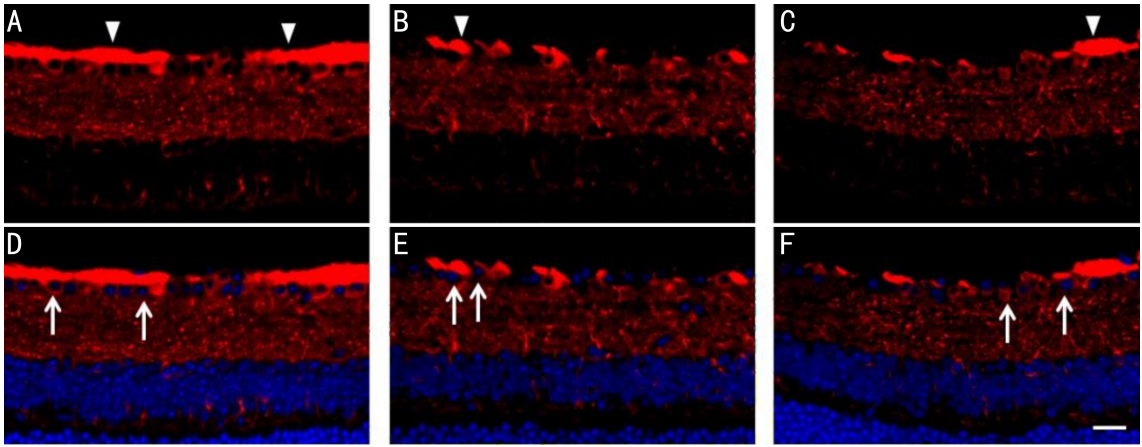


图5 三组小鼠视网膜 Tuj1 (红色) 和 DAPI (蓝色) 染色情况 (×200) A, D: 正常对照组; B, E: 0mg 尼古丁电子烟干预; C, F: 12mg 尼古丁电子烟干预。三角指示在神经纤维层 Tuj1 的染色, 箭头指示视网膜神经节细胞。

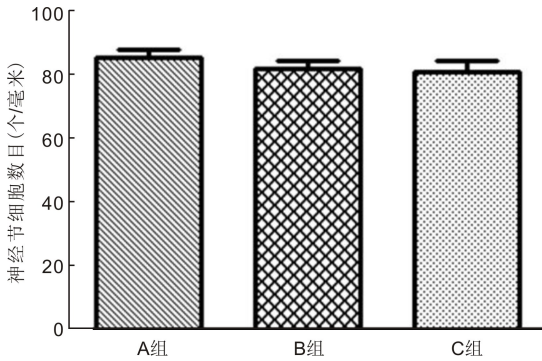


图6 三组小鼠视网膜神经节细胞数目的比较 A: 正常对照组; B: 0mg 尼古丁电子烟干预; C: 12mg 尼古丁电子烟干预。

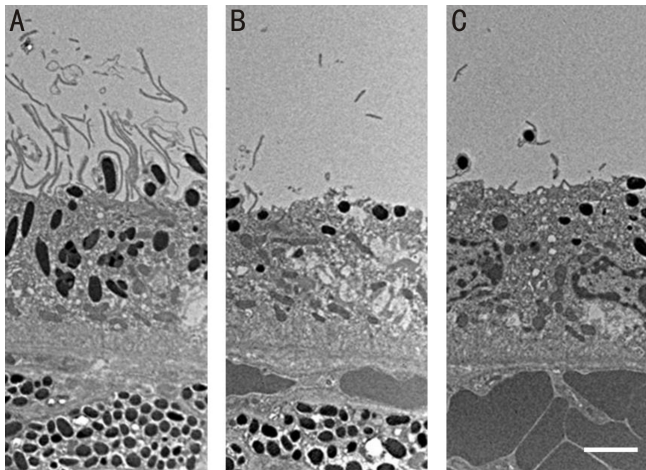


图7 三组小鼠视网膜色素上皮细胞顶部微绒毛的改变 (×4 000) A: 正常对照组; B: 0mg 尼古丁电子烟干预; C: 12mg 尼古丁电子烟干预。

烟液内添加的香味成分有关。Bahl 等^[12]报道不同电子烟烟液的细胞毒性差距很大, Behar 等^[13]则进一步证明电子烟烟液造成的细胞毒性与其内的肉桂添加剂有关。有研究证实^[14], 电子烟烟液可致小鼠肺、膀胱等器官 DNA 损伤。传统香烟与视网膜相关疾病如年龄相关性黄斑变性有密切关系, 但电子烟是否也会造成视网膜病理改变并继而引发相关疾病却鲜有报道。

视网膜是一层柔软而透明的膜, 紧贴在脉络膜内面, 可以感受光的刺激。视网膜从外向内分为 10 层, 分别为

色素上皮层 (由单层色素上皮细胞构成)、视杆视锥层 (由视杆细胞和视锥细胞的外突构成)、外界膜 (由 Müller 细胞的外突末端连接而成)、外核层 (由视杆细胞和视锥细胞的细胞体组成)、外丛状层 (由视杆细胞和视锥细胞的内突及双极细胞的树突构成)、内核层 (由双极细胞、水平细胞、无长突细胞和 Müller 细胞的胞体构成)、内丛状层 (由双极细胞的轴突和无长突细胞及节细胞的树突构成)、节细胞层 (由节细胞的胞体组成)、神经纤维层 (由节细胞的轴突组成)、内界膜 (由 Müller 细胞的内突末端连接而成)。有研究显示在慢性吸烟人群中神经纤维层的厚度明显减少^[15], 在本实验中我们也观察到类似的结果, 即两个实验组的神经纤维层厚度较对照组明显减少, 这说明电子烟也可能对视网膜造成与传统烟相似的损伤。但是三组小鼠视网膜神经节细胞层内细胞数量无明显统计学差异, 我们推测可能是由于个体间神经节细胞层内细胞数量的差异较大造成的^[15]。但值得关注的是我们观察到实验组内丛状层厚度较对照组明显减少, 有研究表明内丛状层厚度的变化可一定程度反映神经节细胞数量的变化^[16], 虽然如前所述三组间神经节细胞数量无明显统计学差异, 但是实验组的神经节细胞较对照组明显紊乱, 这一现象也许和内丛状层厚度减少有关, 这还需在后续的实验中进行进一步探讨。

视网膜色素上皮层与脉络膜相连, 是由单层色素上皮细胞构成, 排列十分规则。RPE 细胞位于视网膜感光细胞层和 Bruch 膜之间, 底部紧邻 Bruch 膜, 由一层六面柱状单层细胞组成, 是血-眼屏障和血-视网膜外屏障的主要组成部分, 有一定的抗氧化能力, 在维持视网膜微环境和保护视网膜中神经元等方面起到了一定的作用。Masashi 等的研究表明传统烟烟雾会造成小鼠视网膜 RPE 细胞超微结构的改变, 这与年龄相关性黄斑变性的发生密切相关^[17]。在我们实验中, RPE 层组织病理学观察未见明显变化, 电子显微镜下我们观察到两个实验组小鼠 RPE 细胞顶部微绒毛数量显著减少且排列不规则, 残存的微绒毛结构也被破坏, 长度变短, 说明电子烟对于 RPE 细胞的超微结构同样具有损伤作用, 提示电子烟也可能与年龄相关性黄斑变性的发生有关。

吸烟会增加氧化应激的水平, 香烟烟雾中的化学氧化

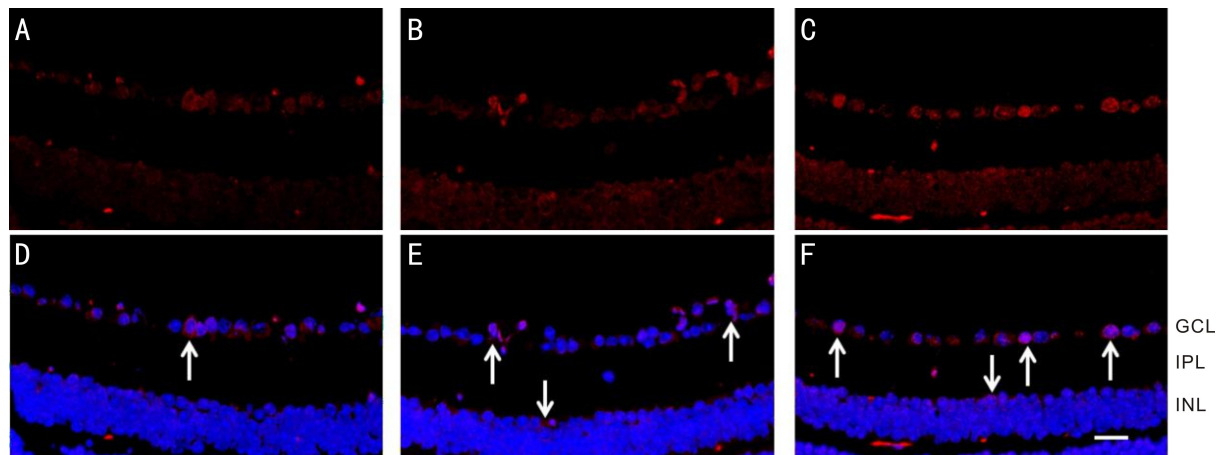


图8 三组小鼠视网膜8-OHdG(红色)和DAPI(蓝色)染色情况($\times 200$) A,D:正常对照组;B,E:0mg尼古丁电子烟干预;C,F:12mg尼古丁电子烟干预。箭头指示为在神经节细胞层和内核层中8-OHdG染色阳性的细胞。

剂会引起蛋白质、DNA和脂质的氧化损伤^[18-21]。有大量证据表明DNA氧化损伤与吸烟的影响关系密切,氧化损伤的核苷也随着时间增加而在细胞核和线粒体DNA中积累^[22]。8-OHdG是核苷2'-脱氧鸟苷的氧化形式,是DNA的氧化产物,它是一个很好的标记DNA氧化损伤的指标^[23]。Higuchi等报道经过香烟烟雾作用后,大鼠角膜内8-OHdG可以表达上调,但是电子烟烟雾对于人体甚至视网膜的影响作用鲜有报道,在本实验中我们观测到8-OHdG在视网膜(节细胞层和内核层)的阳性表达,也能反映电子烟烟雾对于视网膜有一定的氧化损伤作用^[24]。烟草中最主要的生物碱-尼古丁会导致视网膜血管收缩,造成缺氧,引起血管内皮生长因子上调,从而诱发新生血管的形成^[25]。另外,尼古丁还可以引起氧化应激反应,在RPE细胞内产生大量自由基,损伤线粒体,最终导致RPE细胞凋亡^[25-26]。在本实验中,我们观察到0mg尼古丁组和12mg尼古丁组之间在视网膜组织结构、RPE超微结构以及氧化损伤指标上没有明显差异,这提示电子烟引起的损伤不仅仅是尼古丁的单独作用,而应该是由烟油中各种有害物质的叠加作用所形成的。

综上所述,电子烟可以对小鼠视网膜组织结构和RPE细胞在超微结构上造成改变,同时节细胞层、内核层均观察到8-OHdG表达增加,我们推测可能是电子烟干预所引起的视网膜氧化应激反应。但由于我们的干预时间较短,还未造成显著的不可逆损伤,未引起明显的组织病理学改变。这些研究结果将为我们后期进一步探究电子烟对视网膜的长期影响以及相关机制提供一定的研究基础,进一步科学评价电子烟对机体的影响,积极寻求有效研究方法,为临床诊疗提供科学依据。

参考文献

- Oren R, Alessandra P, Giuseppe V, et al. Are E-cigarettes a safe and good alternative to cigarette smoking? *Ann N Y Acad Sci* 2015; 1340: 65-74
- Trtchounian A, Williams M, Talbot P. Conventional and electronic cigarettes (e-cigarettes) have different smoking characteristics. *Nicotine Tob Res* 2010; 12(9): 905-912
- Andrew C, Jennifer F, Adeeb B, et al. The electronic cigarette: the good, the bad, and the ugly. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2015; 3(4): 498-505

- Alison B, Eric S, Alexa L, et al. Electronic cigarettes_ what are they and what do they do? *Ann N Y Acad Sci* 2017; 1394(1): 5-30
- Cahn Z, Siegel M. Electronic cigarettes as a harm reduction strategy for tobacco control: a step forward or a repeat of past mistakes. *J Public Health Policy* 2011; 32(1): 16-31
- Huang SJ, Xu YM, Lau ATY. Electronic cigarette: a recent update of its toxic effects on humans. *J Cell Physiol* 2018; 233(6): 4446-4478
- 李娟, 丁小艳, 王亚虹, 等. PM2.5对小鼠泪膜功能和角膜上皮组织结构的影响. *眼科新进展* 2017; 37(3): 201-204
- Dong ZZ, Luo A, Gan YF, et al. Amyloid beta deposition could cause corneal epithelial cell degeneration associated with increasing apoptosis in APP^{swe}PS1 transgenic mice. *Curr Eye Res* 2018; 43(11): 1326-1333
- 罗阿丽, 张萌涛, 李娟, 等. 肺曲菌病23例临床病理分析. *临床肺科杂志* 2014; 19(3): 405-408
- 罗阿丽, 王唯析, 强辉, 等. 大鼠丘脑中央下核GABA纤维终末与腹外侧眶皮层投射神经元的突触联系. *郑州大学学报(医学版)* 2013; 48(4): 466-469
- Farsalinos KE, Romagna G, Alliffranchini E, et al. Comparison of the cytotoxic potential of cigarette smoke and electronic cigarette vapour extract on cultured myocardial cells. *Int J Environ Res Public Health* 2013; 10(10): 5146-5162
- Bahl V, Lin S, Xu N, et al. Comparison of electronic cigarette refill fluid cytotoxicity using embryonic and adult models. *Reprod Toxicol* 2012; 34(4): 529-537
- Behar RZ, Davis B, Wang Y, et al. Identification of toxicants in cinnamon-flavored electronic cigarette refill fluids. *Toxicol In Vitro* 2014; 28(2): 198-208
- Lee HW, Park SH, Weng MW, et al. E-cigarette smoke damages DNA and reduces repair activity in mouse lung, heart, and bladder as well as in human lung and bladder cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2018; 115(7): E1560-E1569
- Derivoşgulları MS, Totan Y, Tenlik A, et al. Effect of smoking on retina nerve fiber layer and ganglion cell-inner plexiform layer complex. *Cutan Ocul Toxicol* 2015; 34(4): 282-285
- Curcio CA, Allen KA. Topography of ganglion cells in human retina. *J Comp Neurol* 1990; 300(1): 5-25
- Fujihara M, Nagai N, Sussan ET, et al. Chronic cigarette smoke causes oxidative damage and apoptosis to retinal pigment epithelial cells in mice. *PLoS One* 2008; 3(9): e3119

- 18 Lykkesfeldt J, Christen S, Wallock LM, *et al.* Ascorbate is depleted by smoking and Repleted by moderate supplementation; A study in male smokers and nonsmokers with Matched dietary antioxidant intakes. *Am J Clin Nutr* 2000;71:530-536
- 19 Barnett BP, Handa JT. Retinal Microenvironment Imbalance in Dry Age-related Macular Degeneration; A Mini-Review. *Gerontology* 2013; 59(4):297-306
- 20 Wu LL, Chioud CC, Change PY, *et al.* Urinary 8-OHdG: a Marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. *Clin Chim Acta* 2003;339(1):1-9
- 21 Steffen L, Anne FN, Inge BJ, *et al.* 8-hydroxydeoxyguanosine as a urinary biomarker of oxidative DNA damage. *J Toxicol Environ Health* 1993;40(2-3):391-404
- 22 Cooke MS, Patel K, Ahmad J, *et al.* Monoclonal antibody to single-stranded DNA: a potential tool for DNA repair studies. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;284(1):232-238
- 23 Abu El-Asrar AM, Alam K, Garcia-Ramirez M, *et al.* Association of HMGB1 with oxidative stress markers and regulators in PDR. *Mol Vis* 2017;23:853-871
- 24 Akihiro H, Kaori I, Murat D, *et al.* Corneal damage and lacrimal gland dysfunction in a smoking rat model. *Free Radic Biol Med* 2011;51: 2210-2216
- 25 张营春, 赵博军. 烟草烟雾与老年性黄斑变性. *中华眼底病杂志* 2014;30(3):325-328
- 26 Bertram KM, Baglole CJ, Phipps RP, *et al.* Molecular regulation of cigarette smoke induced - oxidative stress in human retinal pigment epithelial cells; implications for age-related macular degeneration. *Am J Physiol Cell Physiol* 2009;297:1200-1210