

高表达 Krüppel 样因子 6 对紫外线 B 诱导的人晶状体上皮细胞凋亡的影响

田芳 赵今稚 黄亮瑜 徐嫚鸿 张哲 滕贺 张晓敏 李筱荣 东莉洁 张红
天津医科大学眼科医院 天津医科大学眼科研究所 天津医科大学眼视光学院 300384
通信作者:东莉洁,Email:aitaomubang@126.com

【摘要】 目的 探讨 Krüppel 样因子 6 (KLF6) 高表达对于紫外线 B (UVB) 诱导晶状体上皮细胞 (HLECs) 凋亡的影响。方法 利用脂质体转染的方法将已成功构建的真核表达质粒 pEGFP-C2-KLF6 转染到 HLECs 中,采用 Western blot 法测定细胞中 KLF6 蛋白的表达水平;采用四甲基偶氮唑盐 (MTT) 法检测转染后细胞活力;经苏木精-伊红染色法观察细胞形态;采用 Live/Dead 染色法观察细胞受损情况;采用 Western blot 法检测细胞中凋亡标志物 bax 和 bcl-2 的相对表达量,并计算 bax/bcl-2 比值;采用细胞凋亡检测试剂盒定量测定细胞凋亡水平,并检测细胞中活性氧簇 (ROS) 的表达水平。结果 0.5 μg 转染组和 1.0 μg 转染组细胞生存力较空载体对照组下降,差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。KLF6 高表达组细胞稀疏,细胞形态狭长,细胞质浓缩。正常对照组细胞形态稳定,数量均匀,为绿色活细胞;KLF6 高表达组红色死亡细胞数量显著增多。UVB 照射后,KLF6 高表达组 HLECs 细胞凋亡值、bax 相对表达量、bax/bcl-2 比值、ROS 表达量均高于空载体对照组,差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。结论 高表达的 KLF6 通过调控凋亡相关蛋白的表达及促进内质网内 ROS 堆积来加剧 UVB 照射导致的 HLECs 凋亡,提示 KLF6 参与 HLECs 的凋亡调控。通过生物学手段特异性下调 KLF6 的表达有可能在一定程度上发挥对 HLECs 的保护作用。

【关键词】 Krüppel 样因子 6; 晶状体上皮细胞; 凋亡; 紫外线 B; 氧化应激

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81570872); 天津市应用基础与前沿技术研究计划项目 (15JCYBJC24900); 天津医科大学自然科学基金面上项目 (2015KYZM10、2016KYZM14); 天津医科大学眼科研究所基金项目 (15YKYJS002); 天津医科大学基本科研业务费资助项目 (2016YD08)

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.04.004

Effects of Krüppel-like factor 6 overexpression towards apoptosis of human lens epithelial cells with ultraviolet radiation B treatment

Tian Fang, Zhao Jinzhi, Huang Liangyu, Xu Manhong, Zhang Zhe, Teng He, Zhang Xiaomin, Li Xiaorong, Dong Lijie, Zhang Hong

Tianjin Medical University Eye Hospital, Tianjin Medical University Eye Institute, College of Optometry and Ophthalmology, Tianjin 300384, China

Corresponding author: Dong Lijie, Email: aitaomubang@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of the overexpression of Krüppel-like factor 6 (KLF6) towards the apoptosis of human lens epithelial cells (HLECs) induced by ultraviolet B (UVB) radiation. **Methods** The eukaryotic expression plasmid pEGFP-C2-KLF6 which was successfully constructed were transfected into HLECs, followed by the detection of KLF6 level by using Western blot, and then accompanied by UVB stimulation. Cell viability was measured by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay. The morphology of the cells was observed by using hematoxylin-eosin staining method. The cell damage was examined by Live/Dead staining. The apoptotic markers bax and bcl-2 were detected by Western blot. Quantitative apoptotic levels were measured with the apoptosis detection kit; the expression level of reactive oxygen species (ROS) was analyzed by DCFH-DA probe. **Results** The cell viability of the 0.5 μg transfection group and the 1.0 μg transfection group was significantly lower than that of the blank vector control group (both at $P < 0.05$). In high KLF6 expression group, the cells were sparse, long and narrow in size and shape, and the cytoplasm was concentrated. The cells in the normal control group were green living cells with stable morphology and even quantity. The number of red dead cells was increased significantly in the KLF6 high-

expression group. After UVB irradiation, the apoptosis value, relative bax expression, bax/bcl-2 ratio and ROS expression of HLECs cells in the KLF6 high-expression group were all higher than those in the blank vector control group, with statistically significant differences between them (all at $P < 0.05$). **Conclusions** Overexpression of KLF6 can exacerbate apoptosis of HLECs caused by UVB, by regulating the expression of apoptosis-related proteins and promoting the accumulation of ROS in the endoplasmic reticulum. Down-regulation of KLF6 expression by biological tools may play a protective role on LECs to a certain extent.

[Key words] Krüppel factor 6; Lens epithelial cells; Apoptosis; Ultra violet radiation B; Oxidative stress

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81570872); Tianjin Basic and Frontier Technology Research Program (15JCYBJC24900); Tianjin Medical University Natural Science Foundation (2015KYZM10, 2016KYZM14); Tianjin Medical University Ophthalmological Research Institute Foundation (15YKYJS002); Tianjin Medical University Basic Scientific Research Foundation (2016YD08)

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.04.004

白内障是由多种因素导致的晶状体混浊,病因多为先天因素或后天全身营养代谢异常、中毒变性等。白内障的发病机制尚不明确,其中人晶状体上皮细胞(human lens epithelial cells, HLECs)凋亡是除先天性白内障以外所有类型白内障形成的细胞学基础,UVB照射造成的氧化损伤则是 LECs 凋亡的重要诱发因素。Krüppel 样因子 6 (Krüppel like factor 6, KLF6) 是肿瘤抑制因子,在 Schwann 细胞中其可通过上调 Fas 表达而调控凋亡反应^[1]。高表达的 KLF6 可以调节 p21 和 p27(kip1) 的表达,从而抑制细胞增生并降低 LECs 的细胞活力^[2]。本课题组的前期研究结果显示,上调 KLF6 蛋白表达水平可抑制胰岛素样生长因子 1 (insulin-like growth factor-1, IGF-1) 诱导的 HLECs 增生,提示 KLF6 是 LECs 功能的潜在调控因子^[3]。鉴于 KLF6 在细胞增生以及凋亡中的调控作用并结合氧化损伤对白内障发生和发展中的影响,本研究中拟观察 KLF6 对于紫外线 B (ultraviolet B, UVB) 诱导的 HLECs 氧化损伤的影响,为通过干预 KLF6 来控制白内障提供依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

HLECs 细胞株 (HLE-B3 细胞) 由天津医科大学眼科学院眼科研究所杨春波博士惠赠; pEGFP-C2-KLF6 真核表达质粒由本实验室自行构建,制备方法及其有效性验证见文献^[3]; 四甲基偶氮唑盐 (methyl thiazolyl tetrazolium, MTT) 溶液 (北京 Solarbio 公司); 兔抗 bcl-2 抗体 (Human Specific #2872)、兔抗 bax (D2E11 #5023)、兔抗 GAPDH (14C10#2118)、转染试剂脂质体 2000、LIVE/DEAD 细胞活性/细胞毒性试剂盒 (L3224) (美国 Sigma 公司); ER-Tracker 染色试剂、细胞凋亡检测试剂盒 (1177442500196) (瑞士罗氏公

司)。

1.2 方法

1.2.1 MTT 法比较 UVB 照射条件下 KLF6 高表达对 HLECs 活力的影响 按照 1×10^4 /孔将 HLECs 接种于 200 μ l 培养体系的 96 孔细胞板中。待细胞汇合度约为 70%, 分为空载体对照组、0.5 μ g 转染组和 1.0 μ g 转染组,将相应的质粒利用脂质体 2000 分别对 HLECs 进行相应的转染处理。转染后 24 h, 以能量密度为 20 mJ/cm² UVB 照射各组细胞 200 s, 继续培养 48 h, 吸除上清液, 加入 0.5 mg/L MTT 溶液孵育 4 h, 吸除上清液, 每孔加入 150 μ l DMSO 溶液, 室温下静置 10 min, 利用酶联免疫检测仪测量波长 456 nm 处各孔吸光度 (A) 值。分析 UVB 照射下各组 HLECs 活力。每组设 3 个复孔, 实验重复 3 次。

1.2.2 苏木精-伊红染色观察 UVB 照射条件下 KLF6 高表达对 HLECs 形态的影响 按照 3×10^4 /孔的密度将 HLECs 接种于 500 μ l 培养体系的 24 孔板中。待细胞于载玻片上生长至 70% 时, 将细胞分为正常对照组、空载体对照组和 KLF6 高表达组。正常对照组为加入不含任何外源性基因的 HLECs; 空载体对照组利用转染试剂脂质体 2000 将 pEGFP-C2-KLF6 空载体导入 HLECs; KLF6 高表达组利用转染试剂脂质体 2000 将 pEGFP-C2-KLF6 真核表达质粒导入 HLECs 中。转染后 24 h 以 20 mJ/cm² UVB 照射各组细胞 200 s, 培养后 48 h 用质量分数 4% 多聚甲醛固定 10 min, PBS 清洗 10 min, 清水冲洗, 苏木素溶液浸泡 1 min, 清水冲洗, 加体积分数 1% 醋酸溶液, 蘸取 2 次, 清水冲洗, 体积分数 0.5% 氨水中蘸取 2 次, 伊红溶液浸泡 1 min, 梯度乙醇脱水, 二甲苯溶液浸泡 1 min, 荧光显微镜下观察 UVB 照射条件下各组 HLECs 形态。

1.2.3 细胞毒性试验检测 UVB 照射条件下 KLF6 高表达对 HLECs 生存状态的影响 按照 1×10^4 /孔密度

将 HLECs 接种于 200 μl 培养体系 96 孔细胞板中,待细胞汇合度约为 70%,按照 1.2.2 部分进行实验分组处理。转染后 24 h,以 20 mJ/cm^2 UVB 照射各组细胞 200 s,继续培养 48 h,每孔加入 50 μl 配制的 Live/Dead 染色剂溶液。绿色荧光染色剂钙黄绿素-AM 用于标志活细胞;红色荧光染色剂乙锭二聚体-1 用于示踪死细胞。室温下孵育 30 min,终止染色,每孔加入 50 μl PBS,荧光显微镜下观察 UVB 照射条件下各组 HLECs 活性。

1.2.4 Western blot 法检测 KLF6 高表达对 UVB 诱导的 HLECs 中凋亡相关蛋白表达的影响 按照 6×10^5 /孔的密度将 HLECs 接种于 1 ml 培养体系的 6 孔细胞培养板中,待细胞汇合度达到 70%,将细胞分为空载体对照组和 KLF6 高表达组。空载体对照组利用转染试剂脂质体 2000 将 pEGFP-C2-KLF6 空载体导入 HLECs;KLF6 高表达组利用转染试剂脂质体 2000 将 1.0 μg pEGFP-C2-KLF6 真核表达质粒导入 HLECs。转染后 24 h,以 20 mJ/cm^2 UVB 照射各组细胞 200 s,继续培养 48 h。收集各组全细胞提取物,以 SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白复合物,转膜后用质量分数 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h,加入一抗(1:1 000)杂交,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜后,以 1 倍 TBST 缓冲液洗膜 3 次,每次 10 min,用辣根过氧化物酶标记的二抗(1:5 000)继续孵育 1 h,以 1 倍 TBST 缓冲液洗膜 3 次,每次 10 min;最后加入 ECL,曝光并拍照,以 GAPDH 为内参,经 Image J 图像分析软件计算灰度值,计算目的蛋白相对于 GAPDH 的灰度比值。

1.2.5 细胞凋亡检测 KLF6 高表达对 UVB 诱导 HLECs 凋亡的作用 按照 2×10^4 /孔的密度将 HLECs 接种于 200 μl 培养体系的 96 孔细胞板中,待细胞汇合度达到 70%,按照 1.2.4 部分进行细胞分组处理。转染后 24 h,以 20 mJ/cm^2 UVB 照射各组细胞 200 s。培养后 48 h 参照 ELISA PLUS 细胞凋亡检测试剂盒说明书将细胞裂解物置于链霉抗生物素蛋白包被的微量培养板,与抗组蛋白/生物素和抗 DNA/过氧化物酶混合物共同温育;通过酶联免疫检测仪测定各孔波长 405 nm 处细胞 A 值。各组凋亡值 = 各组 A 值 - 空白对照组 A 值。每组设 3 个复孔,实验重复 3 次。

1.2.6 细胞凋亡检测 UVB 照射条件下高表达 KLF6 对细胞 ROS 含量的影响 按照 1.5×10^4 /孔密度将 HLECs 接种于 200 μl 培养体系的 96 孔细胞板中,待细胞汇合度达约 70%,按照 1.2.4 部分对细胞进行分组处理。转染后 24 h,以 20 mJ/cm^2 UVB 照射各组细胞 200 s,继续培养 48 h。DCFH-DA 探针孵育 30 min

后,PBS 清洗 2 遍,酶联免疫检测仪测定波长 488 nm 处各孔细胞 A 值。A 值反映各组细胞的 ROS 产量,每组设 3 个复孔,实验重复 3 次。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 18.0 统计学软件进行统计分析。本研究计量资料经 Kolmogorov-Smirnov 检验,符合正态分布,以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示。HLECs 细胞活力、细胞 bcl-2 和 bax 表达、细胞内 ROS 表达、HLECs 凋亡水平的比较采用独立样本 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 HLECs 细胞活力比较

MTT 法检测发现,0.5 μg 转染组和 1.0 μg 转染组细胞活力分别为 1.24 ± 0.058 和 0.67 ± 0.11 ,均较空载体对照组的 1.39 ± 0.18 减小,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。KLF6 高表达可显著抑制 HLECs 的细胞活力,并呈剂量依赖性(图 1)。

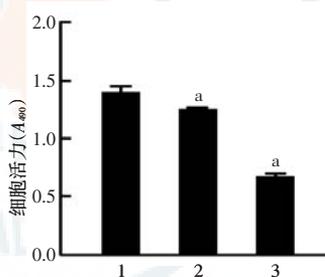


图 1 各组 HLECs 细胞活力比较 1:空载体对照组 2:0.5 μg 转染组 3:1.0 μg 转染组 与空载体对照组比较,^a $P < 0.05$ (独立样本 *t* 检验, $n = 3$)

2.2 光学显微镜下各组细胞的形态学表现

正常对照组细胞形态饱满,细胞质染色均一,细胞核呈圆形;空载体对照组细胞体积变小,细胞质浓缩,染色质高度凝聚、边缘化;KLF6 高表达组细胞稀疏,细胞形态狭长,细胞质浓缩(图 2)。

2.3 荧光显微镜下各组 HLECs 表现

正常对照组细胞形态稳定、大小一致、数量均匀,全部为绿色活细胞;经 UVB 照射后,空载体对照组可见点缀少量不均匀分布的红色死亡细胞;而 KLF6 高表达组红色死亡细胞数量显著多于空载体对照组(图 3)。

2.4 KLF6 高表达组和空载体对照组细胞凋亡相关蛋白 bcl-2 和 bax 表达情况

KLF6 高表达组与空载体对照组比较,bax 表达上调,bcl-2 的表达下调(图 4A)。KLF6 高表达组 bax 相对表达量为 0.70 ± 0.05 ,较空载体对照组的 0.30 ± 0.03 上调,差异有统计学意义($t = 11.610, P = 0.000$) (图 4B)。KLF6 高表达组 bcl-2 相对表达量为 0.62 ± 0.07 ,较空载体对照组的 0.27 ± 0.05 下调,差异有统

统计学意义 ($t = 6.717, P = 0.003$) (图 4C)。KLF6 高表达组中 $bax/bcl-2$ 为 2.68 ± 0.38 , 较空载体对照组的

0.49 ± 0.01 升高, 差异有统计学意义 ($t = 10.060, P = 0.001$) (图 4D)。

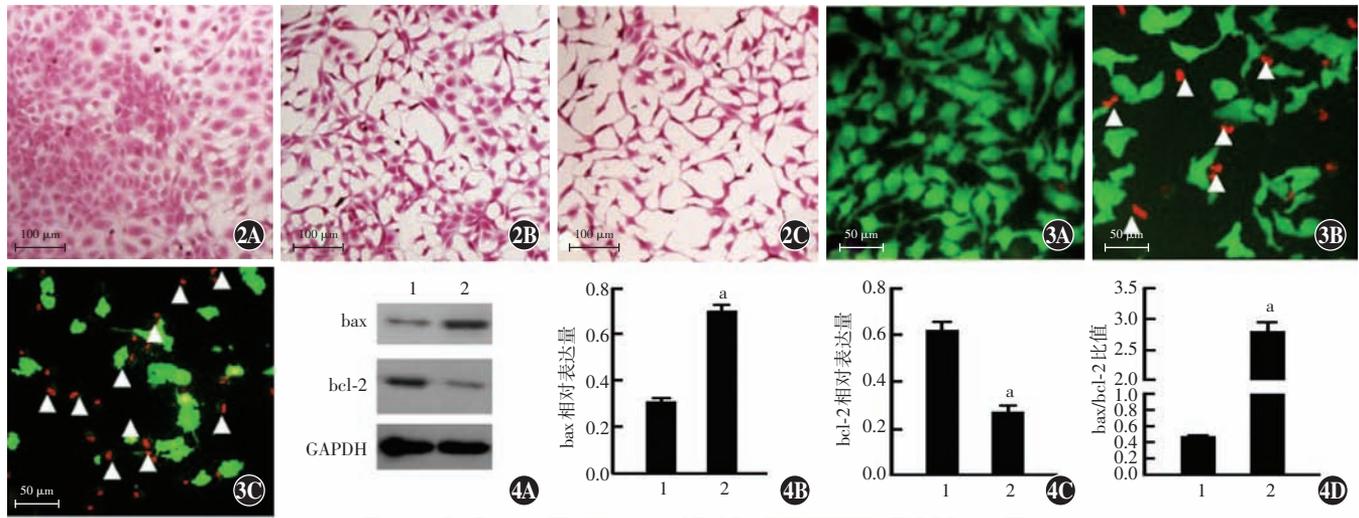


图 2 光学显微镜下各组 HLECs 凋亡的形态学改变 (HE $\times 100$, 标尺 = $100 \mu\text{m}$) A: 正常对照组 B: 空载体对照组 C: KLF6 高表达组 图 3 LIVE/DEAD 染色法标记各组细胞生存状态 ($\times 20$, 标尺 = $50 \mu\text{m}$) A: 正常对照组 B: 空载体对照组 C: KLF6 高表达组 绿色荧光染色剂钙黄绿素-AM 用于标记活细胞; 红色荧光剂乙锭二聚体-1 用于示踪死亡细胞, 箭头所示红色荧光标记死亡细胞 图 4 各组细胞内凋亡标志物 bax 和 $bcl-2$ 相对表达量比较 A: 各组 bax 和 $bcl-2$ 蛋白表达电泳图 B: 2 个组细胞 bax 相对表达量的比较 与空载体对照组比较, $^*P < 0.05$ (独立样本 t 检验, $n = 3$) C: 2 个组细胞 $bcl-2$ 相对表达量的比较 与空载体对照组比较, $^*P < 0.05$ (独立样本 t 检验, $n = 3$) D: 2 个组细胞 $bax/bcl-2$ 相对表达量的比较 与空载体对照组比较, $^*P < 0.05$ (独立样本 t 检验, $n = 3$) 1: 空载体对照组 2: KLF6 高表达组

2.5 各组 HLECs 凋亡水平的比较

KLF6 组细胞凋亡水平为 1.38 ± 0.14 , 较空载体对照组的 0.46 ± 0.02 明显升高, 差异有统计学意义 ($t = 19.660, P = 0.000$) (图 5)。

2.6 各组 HLECs 细胞中 ROS 表达水平的比较

KLF6 高表达组细胞 ROS 表达量为 4424.67 ± 877.59 , 较空载体对照组的 3047.00 ± 400.40 明显升高, 差异有统计学意义 ($t = 4.285, P = 0.001$) (图 6)。

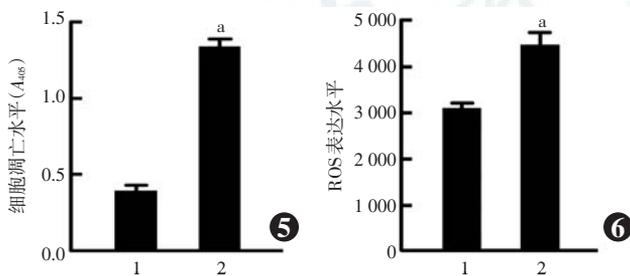


图 5 各组 HLECs 凋亡水平的比较 与空载体对照组比较, $^*P < 0.05$ (独立样本 t 检验, $n = 3$) 1: 空载体对照组 2: KLF6 高表达组 图 6 各组 HLECs 细胞中 ROS 表达水平的比较 与空载体对照组比较, $^*P < 0.05$ (独立样本 t 检验, $n = 3$) 1: 空载体对照组 2: KLF6 高表达组 注: ROS: 活性氧簇

3 讨论

晶状体是眼球的重要屈光间质, 老化、遗传、局部

营养障碍、免疫与代谢异常等原因均能引起晶状体代谢紊乱, 导致晶状体蛋白质变性而发生混浊, 进而诱发白内障^[4]。白内障的发病机制尚不明确, 其中 LECs 凋亡是除先天性白内障以外所有类型白内障形成的细胞学基础之一, 氧化损伤则是 HLECs 凋亡的重要诱发因素^[4]。此外, 晶状体蛋白的损伤和结构改变、LECs 自噬溶酶体系统和泛素蛋白酶体系统的紊乱和异常也是白内障重要的发病机制^[5]。

KLF6 作为肿瘤抑制因子, 可参与多种细胞的凋亡调控^[6-8]。Schwann 细胞中 KLF6 通过上调 Fas 表达来介导其凋亡^[1], 而在呼吸道合胞病毒感染过程中 KLF6 通过诱导型一氧化氮合酶途径调控细胞的凋亡^[9]。近年发现, miR-630 可通过针对 KLF6 这一靶基因调控卵巢癌上皮细胞的增生及侵袭^[10]。同时, He 等^[11] 研究也发现, KLF6 是调控宫颈癌细胞增生的潜在靶点。

研究证实, UVB 辐射与白内障的发生密切相关, 而 UVB 诱导的 LECs 凋亡是人和其他动物白内障形成共同的细胞学基础^[12-14]。因此本研究中将 KLF6 引入人 LECs 模型中, 并利用 UVB 照射诱导细胞凋亡, 探讨 KLF6 高表达对 HLECs 凋亡的影响。研究发现 UVB 照射条件下 KLF6 高表达可下调 HLECs 增生活力, KLF6 高表达细胞出现凋亡相关的形态学改变。同时 UVB 刺激可以诱导 HLECs 的损伤和凋亡, 且 KLF6 高

表达可以促进 HLECs 的凋亡。

bcl-2 是细胞凋亡信号转导途径中关键的调节因子^[15],可在多个水平上发挥凋亡抑制作用,而 bax 则与 bcl-2 对抗阻止其抑制凋亡作用的发挥^[16]。当 bax 在细胞内高表达时,细胞对死亡信号的反应性增强,启动凋亡,细胞内这 2 种对立蛋白间的比率关系是细胞存亡的关键^[17-19]。本研究结果显示,KLF6 过表达后 bax/bcl-2 比值增加,提示细胞凋亡,从而提示 KLF6 是 HLECs 凋亡的潜在诱导因子。

氧化应激是指机体遭受紫外线刺激等有害因素时,体内 ROS 等高分子产生过多,超出氧化物的清除能力,氧化与抗氧化系统失衡,导致细胞组织损伤^[20]。因此本研究中应用 ROS 测定试剂检测细胞内 ROS 水平,结果显示与空载体对照组比较,UVB 照射条件下 KLF6 高表达可显著上调 HLECs 内 ROS 的表达水平。内质网是蛋白质合成场所,是细胞重要的抗氧化防御系统所在^[21],氧化应激则是内质网应激的主要诱因,表现为内质网腔内错误折叠与未折叠蛋白聚集以及钙离子平衡紊乱,可激活未折叠蛋白反应、内质网超负荷反应和 caspase-12 介导的凋亡通路等信号途径。研究显示,内质网应激直接影响细胞的转归,如适应、损伤或凋亡^[22-25]。内质网是 ROS 产生的主要场所^[26-27]。为明确 KLF6 对于 UVB 诱导的内质网应激的潜在调控作用,本研究中引入内质网、ROS 双染法特异性示踪细胞中内质网及 ROS,结果显示在 UVB 刺激下,与空载体对照组比较,KLF6 高表达组细胞荧光增强,提示 ROS 积聚增多,且绿色荧光(ROS)与红色荧光(内质网)之间存在共定位。同时也说明,KLF6 蛋白可以通过促进 UVB 诱导的氧化应激反应造成的内质网中 ROS 堆积,打破内质网平衡状态,诱导内质网应激,进而启动凋亡信号途径,破坏 HLECs 的稳态平衡,加速 HLECs 凋亡,诱导白内障的发生。

综上所述,本研究中结果显示,KLF6 蛋白对紫外线诱导 HLECs 凋亡的诱导作用,并发现高表达的 KLF6 通过调控凋亡相关蛋白的表达及促进内质网中 ROS 的积聚来加剧 UVB 照射导致的 HLECs 凋亡,因此 KLF6 有望成为临床中预防和治疗白内障的潜在生物学靶点,如利用 KLF6 促凋亡的特性可针对性地设计 KLF6 的小干扰 RNA,特异性下调 HLECs 中 KLF6 表达,内源性提高 HLECs 的抗氧化能力,进而抑制或延缓白内障的发生及发展。

参考文献

[1] Gui T, Wang Y, Zhang L, et al. Krüppel-like factor 6 rendered rat

Schwann cell more sensitive to apoptosis via upregulating FAS expression [J/OL]. PLoS One, 2013, 8 (12): e82449. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0082449>. DOI:10.1371/journal.pone.0082449.

- [2] Ying S, Feng W, Dan Z, et al. Inhibition of proliferation of rat lens epithelial cell by overexpression of KLF6 [J]. Mol Vis, 2011, 17(122): 1080-1084.
- [3] 周玉,东莉洁,张红,等. Krüppel 样因子 6 抑制人晶状体上皮细胞增生的研究 [J]. 中华实验眼科杂志, 2014, 32(4): 325-330. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2014.04.009.
- Zhou Y, Dong LJ, Zhang H, et al. Pilot study on suppression of Krüppel-like factor 6 for proliferation of human lens epithelial cells [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2014, 32(4): 325-330. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2014.04.009.
- [4] 吴欣欣,毕宏生,郭大东. 紫外线辐射致晶状体上皮细胞凋亡机制的研究进展 [J]. 眼科新进展, 2011, 31(12): 1186-1189.
- Wu QX, Bi HS, Guo DD. Advanced research on mechanisms of apoptosis in lens epithelial cells induced by ultraviolet irradiation [J]. Rec Adv Ophthalmol, 2011, 31(12): 1186-1189.
- [5] Wirth MG, Russell-Eggitt IM, Craig JE, et al. Aetiology of congenital and paediatric cataract in an Australian population [J]. Br J Ophthalmol, 2002, 86(7): 782-786.
- [6] Lang UE, Kocabayoglu P, Cheng GZ, et al. GSK3 β phosphorylation of the KLF6 tumor suppressor promotes its transactivation of p21 [J]. Oncogene, 2013, 32(38): 4557-4564.
- [7] Hsu LS, Huang RH, Lai HW, et al. KLF6 inhibited oral cancer migration and invasion via downregulation of mesenchymal markers and inhibition of MMP-9 activities [J]. Int J Med Sci, 2017, 14(6): 530-535. DOI:10.7150/ijms.19024.
- [8] 潘修成,陈智,陈峰,等. 原发性肝癌组织中 Krüppel 样因子 6 (KLF6) 的表达及其对肝癌细胞增殖的抑制作用 [J]. 实用肿瘤杂志, 2007, 22(2): 125-129.
- Pan XC, Chen Z, Chen F, et al. Expression of tumor suppressor Krüppel-like factor 6 (KLF6) gene in hepatocellular carcinoma and its effect on growth of SMMC-7721 cells [J]. J Practical On colo, 2007, 22(2): 125-129.
- [9] Mgbemena V, Segovia J, Chang TH, et al. KLF6 and iNOS regulates apoptosis during respiratory syncytial virus infection [J]. Cell Immunol, 2013, 283(1-2): 1-7. DOI:10.1016/j.cellimm.2013.06.002.
- [10] Zhang S, Zhang JY, Lu LJ, et al. MiR-630 promotes epithelial ovarian cancer proliferation and invasion via targeting KLF6 [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2017, 21(20): 4542-4547.
- [11] He AD, Wang SP, Xie W, et al. Platelet derived TGF- β promotes cervical carcinoma cell growth by suppressing KLF6 expression [J]. Oncotarget, 2017, 8(50): 87174-87181. DOI: 10.18632/oncotarget.19912.
- [12] Kim ST, Koh JW. Mechanisms of apoptosis on human lens epithelium after ultraviolet light exposure [J]. Korean J Ophthalmol, 2011, 25(3): 196-201. DOI:10.3341/kjo.2011.25.3.196.
- [13] Varma SD, Kovtun S, Hegde KR. Role of ultraviolet irradiation and oxidative stress in cataract formation-medical prevention by nutritional antioxidants and metabolic agonists [J]. Eye Contact Lens, 2011, 37(4): 233-245. DOI:10.1097/ICL.0b013e31821ec4f2.
- [14] Khan SA, Choudhary R, Singh A, et al. Hypertension potentiates cataractogenesis in rat eye through modulation of oxidative stress and electrolyte homeostasis [J]. J Curr Ophthalmol, 2016, 28(3): 123-130. DOI:10.1016/j.joc.2016.05.001.
- [15] Salminen A, Kaarniranta K, Kauppinen A. Beclin 1 interactome controls the crosstalk between apoptosis, autophagy and inflammasome activation: impact on the aging process [J]. Ageing Res Rev, 2013, 12(2): 520-534. DOI:10.1016/j.arr.2012.11.004.
- [16] 李伟华,亢泽峰,李凌,等. 晶状体上皮细胞凋亡调控基因与白内障的研究 [J]. 国际眼科杂志, 2010, 10(1): 88-89. DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2010.01.028.
- Li WH, Kang ZF, Li L, et al. Research of controlling genes of lens

- epithelial cell apoptosis and cataract [J]. *Int J Ophthalmol*, 2010, 10(1): 88-89. DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2010.01.028.
- [17] Veresov VG, Davidovskii AI. Activation of Bax by joint action of tBid and mitochondrial outer membrane; Monte Carlo simulations [J]. *Eur Biophys J*, 2009, 38(7): 941-960. DOI:10.1007/s00249-009-0475-4.
- [18] Shroff EH, Snyder C, Chandel NS. Role of bcl-2 family members in anoxia induced cell death [J]. *Cell Cycle*, 2007, 6(7): 807-809. DOI: 10.4161/cc.6.7.4044.
- [19] 檀露, 郑俊波, 梁聚友, 等. 沙眼衣原体呼吸道感染诱导 PI3K/AKT/bcl-2/Bax 通路活化促进 CD4⁺T 细胞凋亡 [J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2017, 37(3): 178-182. DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-5101.2017.03.003.
- Tan L, Zheng NB, Liang JY, et al. PI3K/AKT/bcl-2/bax pathway activation and CD4⁺T cell apoptosis induced by *Chlamydia muridarum* respiratory tract infection [J]. *Chin J Microbiol Immunol*, 2017, 37(3): 178-182. DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-5101.2017.03.003.
- [20] Zhong JL, Yang L, Lü F, et al. UVA, UVB and UVC induce differential response signaling pathways converged on the eIF2 α phosphorylation [J]. *Photochem Photobiol*, 2011, 87(5): 1092-1104. DOI:10.1111/j.1751-1097.2011.00963.x.
- [21] Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8(7): 519-529. DOI:10.1038/nrm2199.
- [22] 陈少青, 崔晓雪, 龙杰, 等. 氧化应激对乳鼠心肌细胞网腔钙结合蛋白、内质网应激及信号传导通路作用的研究 [J]. *临床心血管病杂志*, 2016, 33(6): 611-613.
- [23] 丁良才, 白波. 神经退行性疾病与内质网应激 [J]. *中华行为医学与脑科学杂志*, 2017, 26(2): 183-187. DOI:10.3760/cma.j.issn.1674-6554.2017.02.018.
- Ding LC, Bai B. Neurodegenerative diseases and endoplasmic reticulum stress [J]. *Chin J Behav Med Brain Sci*, 2017, 26(2): 183-187. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1674-6554.2017.02.018.
- [24] Siyan CS, Kaufmanrandal J. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress in cell fate decision and human disease [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2014, 21(3): 396-413.
- [25] Bhandary B, Marahatta A, Kim HR, et al. An involvement of oxidative stress in endoplasmic reticulum stress and its associated diseases [J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 14(1): 434-456. DOI:10.3390/ijms14010434.
- [26] 周映彤, 肖洪彬, 毕明刚. 活性氧与内质网应激 [J]. *中国药理学通报*, 2011, 27(5): 597-600. DOI:10.3969/j.issn.1001-1978.2011.05.002.
- Zhou YT, Xiao HB, Bi MG. ROS and endoplasmic reticulum stress [J]. *Chin Pharmacol Bulletin*, 2011, 27(5): 597-600. DOI:10.3969/j.issn.1001-1978.2011.05.002.
- [27] Chan C, Huang D, Huang Y, et al. Methylglyoxal induces cell death through endoplasmic reticulum stress-associated ROS production and mitochondrial dysfunction [J]. *J Cell Mol Med*, 2016, 20(9): 1749-1760.

(收稿日期:2018-01-05 修回日期:2019-03-02)

(本文编辑:杜娟)

读者·作者·编者

本刊对医学研究中知情同意和医学伦理学描述的要求

根据国际医学期刊编辑委员会提供的“生物医学期刊投稿统一要求”的表述,本刊对作者撰写稿件时关于“知情同意”和“医学伦理学”的描述提出如下要求:

(1) 知情同意 在未事先获得知情同意的情况下,患者有隐私不被侵犯的权力。患者的身份信息,包括姓名、来源、住院号等均不应该以文字、图片或家系信息的方式在出版物上公开,除非这些信息对于本研究是必需的,如需在出版物上显示,应征得患者(或者父母、监护人)签署的书面同意书。

发表的文章中应该省略不必要的患者个人信息,但难以做到完全匿名时(如在照片中掩盖患者的眼部,不足以保护患者的隐私权),应提供知情同意的信息。如果用改变患者的身份特征(如遗传家系等)以保护患者隐私权的方法,作者应该确保这些改变不影响研究的科学性,并且编辑应在文中对此予以说明。

(2) 医学伦理学 以人体为实验对象的研究,作者应该提及试验步骤是否符合相应的负责机构、国家委员会或 1975 年赫尔辛基宣言(2005 年修订)的医学伦理学标准。如果研究过程对是否符合赫尔辛基宣言有疑问或存在一定的问题,作者应当做出客观说明并解释研究的合理性,提交已通过审查机构的批准情况。以动物为实验对象的研究,作者应当说明是否遵循当地的相关机构、学会(国内或国外)及国家实验动物保护和利用指南。

本刊对来稿中作者署名的著录要求

作者向本刊投稿时署名应符合以下条件:(1)参与课题的选题和实验设计,参与实验资料的收集、分析和论证。(2)参与论文的起草或能够对论文中的方法学或关键部分进行修改。(3)能对审稿专家和编辑提出的修改意见进行核修,能够答辩并承担责任。仅参与筹得资金或收集资料者以及仅对科研小组进行一般管理者均不宜署名为作者。文中如有外籍作者,应附外籍作者亲笔签名在本刊发表的同意函。集体署名的文章应于题名下列出署名单位,于文末列出论文整理者的姓名,并须明确该文的主要责任者。

作者署名的名次应按对论文贡献大小顺序排列于文题下方,每篇论文须列出通信作者 1 名。如无特殊约定,则视第一作者为通信作者。作者(包括通信作者)的署名及其排序应在投稿前由所有研究者共同讨论确定,在编排过程中不宜变更或增减,尤其是通信作者和前三名作者,若确需变动者须提供所有署名作者的签名同意函并出示单位证明。有英文文题的论著和综述应有全部作者姓名的汉语拼音,列于英文文题之下。

(本刊编辑部)