

晶状体组织培养方法研究进展

沈心悦 综述 管怀进 审校

226000 南通大学附属医院眼科 南通大学眼科研究所

通信作者:管怀进,Email:guanhjeye@126.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.12.019

【摘要】 研究晶状体疾病的实验方法有多种,在离体实验中,除了晶状体上皮细胞培养外,晶状体组织培养作为一种评价疾病发病风险和探讨病因的方法,在科研领域已有应用。尤其是在药物评价方面,此类培养方法可以前瞻性和回顾性地评价药物导致晶状体疾病发生的风险,筛选合适的药物。此外,通过晶状体体外培养构建的各类模型能够更加直观地反映晶状体的病理生理状态,对于晶状体周围环境的控制也更加方便。然而,晶状体组织培养的取材、培养、鉴定等方法不尽相同,本文从晶状体的生物学特性、取材、组织培养、状态鉴定及晶状体组织培养的应用几方面就近年来国内外有关晶状体体外培养的研究情况进行综述。

【关键词】 晶状体; 白内障; 取材; 组织培养; 鉴定

基金项目: 国家自然科学基金项目(81470616、81270987); 研究生科技创新计划项目(YKC15092、SJZZ15_0172)

Research progress of lens culture procedure Shen Xinyue, Guan Huaijin
Eye Institute, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226000, China
Corresponding author: Guan Huaijin, Email: guanhjeye@126.com

【Abstract】 There are various methods to study lens disorders, mainly *in vivo* and *in vitro*. *In vitro*, besides lens epithelial cells culture, lens tissue culture has been widely used, which helps to evaluate onset risk and explore pathogenesis in scientific research field. Especially in pharmacology, lens tissue culture has manifested its superiority as a screening test that helps to estimate both ocular toxic and protective effects of a certain drug and screen out appropriate drug prospectively and retrospectively. In addition, models constructed by tissue culture reveal pathophysiology of lens more intuitively and their culture conditions are much easier to control. However, methods for sampling, culture and identification were diverse. Therefore, this review aimed to retrospect the front research of lens tissue culture both at home and abroad in biological property, sampling, tissue culture, identification of condition and application.

【Key words】 Lens; Cataract; Sampling; Tissue culture; Identification

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81470616, 81270987); Graduate Science and Technology Innovation Program (YKC15092, SJZZ15_0172)

研究晶状体疾病的动物实验方法主要分为在体实验和体外实验,体外实验的条件更易控制,现在应用较多的是晶状体上皮细胞的培养。除此之外,晶状体的组织培养有其特有的优势,其周围环境更易控制,对晶状体的观察也更加直观。从晶状体组织的取材、培养到后期鉴定的方法多种多样,如何合理选择至关重要,本文从晶状体的生物学特性、取材、组织培养、状态鉴定及晶状体组织培养的应用几个方面就近年来国内外有关晶状体体外培养的研究情况进行综述。

1 晶状体的生物学特性

晶状体是眼屈光介质的主要部分之一,其主要作用是透光

和屈光,使光线聚焦于视网膜上。晶状体由晶状体囊膜、晶状体上皮细胞、皮质和晶状体核构成。离子泵、膜通透性、糖代谢、晶状体蛋白的结构和含量等因素对于维持晶状体的透明性至关重要。正常状态下,晶状体内的抗氧化保护系统发挥作用,对抗氧化损伤。

2 晶状体的取材

2.1 实验动物的选择

晶状体体外培养动物大多选择 SD 大鼠或 Wistar 大鼠,以 6~10 周龄为宜^[1-4],极少使用胎鼠晶状体,这可能因为胎鼠的晶状体小且发育不完整,增加了操作难度。与啮齿类动物相

比,羊晶状体在形状、大小、蛋白质组成和所处环境方面都与人类晶状体类似^[5]。Lee 等^[5]利用含有钙离子载体的培养基培养晶状体,构建皮质性白内障模型,发现波形蛋白和血影蛋白这 2 种细胞骨架蛋白退化,这一现象在既往的大鼠、牛和人晶状体培养实验中均可见,但是羊晶状体仍然保持完整,干质量无显著变化,并未观察到广泛的蛋白水解,这一点与啮齿类动物模型不同^[6-8]。兔因其眼球体积大,便于手术操作和观察,是眼科研究中常用的实验动物。研究表明,猴房水的成分与人房水类似,而房水为晶状体的生存代谢环境,所以猴晶状体与人晶状体的相似度可能更高^[9]。

2.2 实验动物的麻醉

2.2.1 腹腔内注射麻醉 多项报道显示,腹腔内注射麻醉可能引起晶状体混浊。曹妍群等^[10]在麻醉诱导的小鼠晶状体混浊的研究中,发现乌拉坦、水合氯醛麻醉后晶状体出现混浊较早,且混浊程度重,戊巴比妥钠麻醉后仅出现轻度混浊,但麻醉后 24 h,裂隙灯显微镜下检查可见上述晶状体混浊均恢复透明,可见麻醉可以引起晶状体的短暂混浊。此外,温度的降低也会对晶状体有一定影响。Schindler 等^[11]研究发现,当周围温度低于 26 ℃ 时会诱导大鼠“寒冷性白内障”的发生,Bermudez 等^[12]的研究也证实了这一点。有文献报道,麻醉诱导的实验动物出现晶状体混浊与麻醉后的体温下降和麻醉剂引起的不良反应有关^[12-13]。所以,在晶状体体外培养前的动物麻醉实施中,应注意麻醉方式的选择和环境温度的维持。

2.2.2 吸入麻醉 由于腹腔内注射麻醉具有一定的局限性,晶状体体外培养的动物麻醉更倾向于选择吸入麻醉^[1]。目前,吸入麻醉导致晶状体混浊的现象尚无报道,但在实施动物麻醉的过程中,操作者的不当操作易导致误吸少量麻醉药物,所以要求尽量使用对人和动物伤害都尽可能小的麻醉药品。吸入麻醉药物中,乙醚对黏膜有刺激作用,另外尚有一定的毒性。Tokgöz 等^[14]报道了 1 例治疗婴幼儿视网膜发育不全的病例,术中采用的吸入麻醉剂为七氟醚,结果显示麻醉效果非常好,且对婴幼儿无潜在危害。该病例提示可采用七氟醚进行动物麻醉,对麻醉动物和操作者的有效性和安全性可能均较好。

2.3 晶状体的分离

动物麻醉后,用体积分数 75% 乙醇擦拭双眼睑周围,摘出眼球,放入 PBS 中清洗血液,漂洗 2 次后置于超净工作台上,在无菌条件下用显微剪刀在角巩膜缘后约 0.2 mm 处剪开,小心于裂口处向两边延伸,再用 2 把显微镊轻轻牵拉裂口两边,小心娩出晶状体。取出完整的晶状体放入 PBS 中,将周围残存的玻璃体小心剥离,再吸干晶状体表面水分及黏连的多余杂质,放入培养基进行实验。

3 晶状体组织的培养

3.1 培养条件

培养气相中含有体积分数 5% CO₂ 和体积分数 21% O₂,湿度维持在 75%,温度维持在 37 ℃^[1-2],与普通的细胞培养条件并无太大差异。但因晶状体对体外环境的改变较敏感,培养过程中应监测培养基的 pH 值和渗透压,通过调整换液时间使 pH

值维持在 7.1~7.8,渗透压维持在 295~300 mOsmol/kg^[4,15]。

3.2 培养基

3.2.1 市售培养基 现有的培养基基本可以满足晶状体培养的需要。Sampath 等^[1]利用体外培养晶状体来探讨环列酮导致白内障的机制的实验中,利用 Medium199 (M199) 作为培养基,48 h 后对照组的晶状体保持透明,石蜡切片显示囊膜完整,未出现上皮退化和皮质纤维空泡。基因芯片显示,氧化应激、氧化损伤、凋亡和细胞骨架黏附相关基因无明显改变。同样使用 M199 体外培养晶状体的其他研究均得到了令人满意的结果^[2,15]。Xie 等^[16]使用 MEM 培养晶状体,7 d 后苏木精-伊红染色示晶状体纤维排列仍然整齐。此外,少数研究使用 DMEM 培养晶状体^[17]。

3.2.2 人工房水 Vaghefi 等^[18]在利用磁共振观察晶状体内部水梯度的研究中,采用人工房水作为晶状体环境,结果显示 4 h 后晶状体内水梯度无明显改变,说明此培养基在短时间内不会对晶状体产生不良影响,但并未做更长时间的观察。现有报道的人工房水内仅含无机物、葡萄糖和 HEPES 等成分,缺乏晶状体代谢所必需的其他营养物质,所以用现有人工房水长期培养晶状体的可行性还有待进一步验证。

目前,细胞培养技术已趋向成熟,但组织和器官培养的条件更加严格。晶状体生存环境与上皮细胞不同。在活体中,细胞的代谢环境是细胞外液,而晶状体的代谢环境为房水,其对于维持晶状体的代谢和完整性具有重要作用^[19]。房水成分中除了与细胞外液相似的成分外,睫状突分泌的抗坏血酸等抗氧化物质较细胞外液增多。另一方面,晶状体受渗透压和 pH 值影响大,当渗透压和 pH 值超过一定的范围,晶状体吸水肿胀、混浊。再加上取材时易损伤脆弱的晶状体,诸多因素决定了体外培养晶状体很难长期使之保持透明。比 M199 等常用培养基和房水成分后,发现市售培养基的氨基酸含量多于房水,而抗坏血酸等抗氧化剂明显少于房水。为了更好地体外培养晶状体,有待设计出更加接近晶状体代谢环境的培养基。

3.3 污染预防

由于操作不当和环境条件等原因,晶状体培养过程中可能发生污染,进而影响晶状体自身的代谢。在晶状体取材时,应严格用体积分数 75% 乙醇消毒眼睑周围皮肤,使用灭菌的手术器械。在分离晶状体前,操作台面、手术器械、废液缸和实验用品均应在紫外线下照射 30~60 min 灭菌,以 75% 乙醇擦拭无菌操作台面,并开启风扇运转 10 min 后才可开始实验操作。在无菌操作台上工作前,必须戴一次性乳胶手套,每次换液都应严格按照无菌原则操作。

4 晶状体状态的鉴定

4.1 形态观察

4.1.1 大体形态 培养中施加干预措施后的晶状体状态可用多项指标来评价。实验过程中采集晶状体的图像可以最为直接地反映出晶状体混浊和肿胀的程度,具体方法为将晶状体置于黑色背景下,通过观察晶状体的灰度来判断晶状体的透明度^[1]。Lee 等^[5]将晶状体置于划有黑色格子的纸上,通过观察

透过晶状体的黑线灰度来设立评分标准,进而量化体现晶状体的透明程度,2种方法均能够较为直观地观察晶状体透明度的改变。

4.1.2 显微形态 苏木精-伊红染色可以直接观察晶状体囊膜的完整性、是否存在上皮细胞水肿和晶状体纤维断裂,并且可以作为免疫组织化学、免疫荧光等方法的形态学参考。扫描电子显微镜下检查显示,晶状体上皮细胞为规则多边形,紧邻晶状体纤维的上皮细胞表面较平滑,紧邻囊膜的细胞表面则凹凸不平。晶状体纤维在电子显微镜下呈同心圆式紧密排列,横截面为六边形,纤维会聚于前后极。极部缝合形态因种属而异,兔为线形缝合,大鼠、羊、牛等呈“Y”形缝合。人类晶状体纤维最初呈“Y”形缝合,成年后呈现复杂的星状缝合^[20]。透射电子显微镜下检查显示,人类晶状体囊膜为均质无结构的基质膜。上皮细胞间以交错对叉方式紧密连接,纤维之间可见缝隙连接,混浊晶状体中可能观察到纤维扭曲、不定性物质沉积等异常改变^[21-23]。

4.2 生物化学指标

晶状体与其他组织相比最突出的特点是其具有强大的抗氧化防御能力,利于其保持透明状态,其中谷胱甘肽和抗坏血酸是重要的内源性抗氧化活性物质,保护晶状体免受氧化损伤^[24-25]。晶状体内 ATP 含量代表线粒体功能^[1],从而反映晶状体的活性。除此以外,丙二醛、过氧化氢酶(catalase, CAT)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)等也是反映晶状体氧化程度的指标^[3,26]。

4.3 蛋白检测

晶状体为机体中蛋白质含量最高的组织,晶状体的透光性和屈光度与水溶性蛋白的含量有关,晶状体蛋白的不溶性增加导致蛋白质凝集而影响晶状体的透明度,晶状体蛋白的有序性破坏导致稳定性丧失,因此可以通过测定晶状体可溶性和不可溶性蛋白质的含量变化来反映晶状体状态的改变^[5]。Zhao等^[27]采用透射电子显微镜这一较为直观的方法来观察晶状体蛋白质的聚集情况。

4.4 基因检测

检测晶状体内相关基因的表达是近年来较多使用且准确的方法。检测氧化应激相关基因、抗氧化相关基因和细胞骨架蛋白相关基因等可更加本质地阐明晶状体的状态^[1]。Mori等^[28]利用微卫星标记将可能与白内障相关的基因进行定位。此类基因检测方法可为将来从分子水平研究疾病病因、筛选高危人群提供依据,同时为新药开发奠定靶分子的理论基础。

5 晶状体组织培养的应用

5.1 白内障模型的构建

已有较多研究采用晶状体组织培养来构建各类白内障模型。Qi等^[3]采用亚硒酸钠刺激体外培养的晶状体构建氧化损伤的白内障模型,研究发现氧化损伤所致的混浊晶状体中SOD、CAT等氧化指标表达下降。Kurmi等^[26]在培养基中加入55 mmol/L葡萄糖构建糖尿病性白内障模型。Lee等^[5]利用钙离子载体剂模拟钙超载所致白内障模型。

5.2 药物评价

在成功构建各类白内障模型的基础上,晶状体组织培养可以合理地进行药物研究,评价药物对晶状体的保护或损伤作用。研究发现,在M199培养基中加入10 μmol/L环格列酮可导致大鼠晶状体混浊程度增加^[1]。熊去氧胆酸被证明可以阻止亚硒酸钠所致的晶状体混浊,延缓白内障的发生^[3]。最近研究发现,羊毛甾醇可以逆转体外培养的兔晶状体混浊^[27]。此类研究都证明了晶状体组织培养是进行药物评价的较好方法。

6 展望

利用动物来进行人类相关疾病的研究是促进医学发展的重要途径之一,无论在探讨疾病的发生和发展机制还是预防和治疗方面均起着重要作用^[29]。组织培养较传统的细胞培养更加接近整体水平。晶状体体外培养用于构建晶状体疾病模型,无论是在病因探索还是在评价药物方面均有重要作用。但是,目前的培养技术不能完全模拟晶状体在体内的生存代谢环境,有待寻求更加接近房水生理状态的培养环境,以更好地利用体外培养的手段研究晶状体疾病。基于此理论,Berthoud等^[30]认为可以考虑建立一种使晶状体前方为类似房水成分而后方为类似玻璃体成分的培养基的培养方法以模拟体内环境,但目前尚未发现有研究使用类似培养方法。

参考文献

- [1] Sampath S, McLean LA, Buono C, et al. The use of rat lens explant cultures to study the mechanism of drug-induced cataractogenesis [J]. *Toxicol Sci*, 2012, 126(1): 128-139. DOI: 10.1093/toxsci/kfr344.
- [2] Aleo MD, Doshna CM, Navetta KA. Ciglitazone-induced lenticular opacities in rats; *in vivo* and whole lens explant culture evaluation [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2005, 312(3): 1027-1033. DOI: 10.1124/jpet.104.076950.
- [3] Qi HP, Wei SQ, Gao XC, et al. Ursodeoxycholic acid prevents selenite-induced oxidative stress and alleviates cataract formation; *in vitro* and *in vivo* studies [J]. *Mol Vis*, 2012, 18: 151-160.
- [4] Thiraphatthanavong P, Wattanathorn J, Muchimapura S, et al. Preventive effect of *Zea mays* L. (purple waxy corn) on experimental diabetic cataract [J/OL]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014: 507435 [2016-09-16]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3914321/>. DOI: 10.1155/2014/507435.
- [5] Lee HY, Morton JD, Sanderson J, et al. The involvement of calpains in opacification induced by Ca²⁺-overload in ovine lens culture [J]. *Vet Ophthalmol*, 2008, 11(6): 347-355. DOI: 10.1111/j.1463-5224.2008.00655.x.
- [6] David LL, Shearer TR. Beta-crystallins insolubilized by calpain II *in vitro* contain cleavage sites similar to beta-crystallins insolubilized during cataract [J]. *FEBS Lett*, 1993, 324(3): 265-270.
- [7] Augusteyn RC. Alpha-crystallin: a review of its structure and function [J]. *Clin Exp Optom*, 2004, 87(6): 356-366.
- [8] David LL, Azuma M, Shearer TR. Cataract and the acceleration of calpain-induced beta-crystallin insolubilization occurring during normal maturation of rat lens [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1994, 35(3): 785-793.
- [9] Lu Z, Zhang Y, Freddo TF, et al. Similar hydrodynamic and morphological changes in the aqueous humor outflow pathway after washout and Y27632 treatment in monkey eyes [J]. *Exp Eye Res*, 2011, 93(4): 397-404. DOI: 10.1016/j.exer.2011.05.012.
- [10] 曹妍群, 于慧敏, 尚蕾, 等. 麻醉诱导的小鼠晶状体突发性浑浊 [J]. *解剖学杂志*, 2013, 36(3): 279-281, 308, 封2. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1633.2013.03.003.

- Cao YQ, Yu HM, Shang L, et al. Acute lens opacification of mice induced by anesthesia[J]. Chin J Anatomy, 2013, 36(3): 279-281, 308, cover 2. DOI:10.3969/j.issn.1001-1633.2013.03.003.
- [11] Schindler MB, Hislop AA, Haworth SG. Postnatal changes in pulmonary vein responses to endothelin-1 in the normal and chronically hypoxic lung [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2007, 292(5): L1273-1279. DOI:10.1152/ajplung.00173.2006.
- [12] Bermudez MA, Vicente AF, Romero MC, et al. Time course of cold cataract development in anesthetized mice [J]. Curr Eye Res, 2011, 36(3): 278-284. DOI:10.3109/02713683.2010.542868.
- [13] Zhang F, Löfgren S, Söderberg PG. Interaction of anaesthetic drugs and UV-B irradiation in the anterior segment of the rat eye [J]. Acta Ophthalmol Scand, 2007, 85(7): 745-752. DOI:10.1111/j.1600-0420.2006.00856.x.
- [14] Tokgöz O, Sahin A, Tüfek A, et al. Inhalation anesthesia with sevoflurane during intravitreal bevacizumab injection in infants with retinopathy of prematurity [J]. Biomed Res Int, 2013, 2013: 435387. DOI:10.1155/2013/435387.
- [15] Walsh CCM, Aleo MD. Mechanistic analysis of S-(1,2-dichlorovinyl)-L-cysteine-induced cataractogenesis *in vitro* [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 1997, 146(1): 144-155.
- [16] Xie GL, Yan H, Lu ZF. Inhibition of glucocorticoid-induced alteration of vimentin by a glucocorticoid receptor antagonist RU486 in the organ-cultured rat lens [J]. Mol Vis, 2011, 17: 32-40.
- [17] Yan H, Wang J, Liu B, et al. Protective effect of aspirin against dexamethasone-induced cataract in cultured rat lens [J]. Ophthalmic Res, 2006, 38(5): 303-308. DOI:10.1159/000095774.
- [18] Vaghefi E, Pontre BP, Jacobs MD, et al. Visualizing ocular lens fluid dynamics using MRI; manipulation of steady state water content and water fluxes [J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2011, 301(2): R335-342. DOI:10.1152/ajpregu.00173.2011.
- [19] Aubin ML, Gionfriddo JR, Mama KR, et al. Analysis of aqueous humor obtained from normal eyes of llamas and alpacas [J]. Am J Vet Res, 2001, 62(7): 1060-1062.
- [20] Bassnett S, Shi Y, Vrensen GF. Biological glass: structural determinants of eye lens transparency [J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2011, 366(1568): 1250-1264. DOI:10.1098/rstb.2010.0302.
- [21] 梁皓, 谭少健, 梁莹, 等. 青年人晶状体囊膜及上皮细胞的电镜研究 [J]. 眼科研究, 2004, 22(3): 240-242.
- Liang H, Tan SJ, Liang Y, et al. A study of the lens anterior capsule and epithelium in youth cadaver eyes by transmission electron microscope [J]. Chin Ophthalmol Res, 2004, 22(3): 240-242.
- [22] Andjelic S, Drašlar K, Hvala A, et al. Anterior lens epithelial cells attachment to the basal lamina [J/OL]. Acta Ophthalmol, 2016, 94(3): e183-188 [2016-09-16]. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/aos.12902/epdf>. DOI:10.1111/aos.12902.
- [23] 赵自然, 徐杰, 刘鹤松, 等. 老年性白内障晶状体扫描电镜观察 [J]. 中国老年学杂志, 2000, 20(1): 11-12.
- Zhao ZR, Xu J, Liu HS, et al. Scanning electron microscopic study of the ultrastructure of senile cataract lenses [J]. Chin J Gerontol, 2000, 20(1): 11-12.
- [24] El-Gharabawy RM, Ahmed AS, Al-Najjar AH. Cataract induction by administration of nitroglycerin in cardiac patients through imbalance in redox status [J]. Ther Clin Risk Manag, 2016, 12: 1487-1496. DOI:10.2147/TCRM.S114469.
- [25] Anbaraki A, Khoshaman K, Ghasemi Y, et al. Preventive role of lens antioxidant defense mechanism against riboflavin-mediated sunlight damaging of lens crystallins [J]. Int J Biol Macromol, 2016, 91: 895-904. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2016.06.047.
- [26] Kurmi R, Ganeshpurkar A, Bansal D, et al. Ethanol extract of Moringa oleifera prevents *in vitro* glucose induced cataract on isolated goat eye lens [J]. Indian J Ophthalmol, 2014, 62(2): 154-157. DOI:10.4103/0301-4738.116482.
- [27] Zhao L, Chen XJ, Zhu J, et al. Lanosterol reverses protein aggregation in cataracts [J]. Nature, 2015, 523(7562): 607-611. DOI:10.1038/nature14650.
- [28] Mori M, Li G, Abe I, et al. Lanosterol synthase mutations cause cholesterol deficiency-associated cataracts in the Shumiya cataract rat [J]. J Clin Invest, 2006, 116(2): 395-404. DOI:10.1172/JCI20797.
- [29] 杨秀兰, 苏玉虹, 李文龙. 遗传性白内障动物模型的研究进展 [J]. 遗传, 2007, 29(2): 137-144.
- Yang XL, Su YH, Li WL. Progress in animal models for inherited cataract [J]. Hereditas (Beijing), 2007, 29(2): 137-144.
- [30] Berthoud VM, Beyer EC. Oxidative stress, lens gap junctions, and cataracts [J]. Antioxid Redox Signal, 2009, 11(2): 339-353. DOI:10.1089/ars.2008.2119.

(收稿日期:2017-04-12 修回日期:2017-10-29)

(本文编辑:刘艳)

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。

(本刊编辑部)