

玻璃体腔注射 roscovitine 对大鼠视网膜中 Cdk5/p25 活性和 tau 蛋白磷酸化的抑制作用

张金金 盛迅伦 任英华 容维宁 李慧平 刘雅妮

【摘要】 **背景** 视网膜色素变性(RP)与阿尔茨海默病有着共同的发病机制,细胞周期依赖性蛋白激酶(Cdk5)活性及其激活剂参与中枢神经系统的退行性病变。Cdk5 抑制剂 roscovitine 可以抑制 Cdk5/p25 通路的活性,从而抑制细胞凋亡,但其对 RP 的影响尚不清楚。**目的** 探讨玻璃体腔注射 roscovitine 对 RCS 大鼠视网膜组织中 p35、p25 和 tau 蛋白表达的影响。**方法** 12 只 RCS 大鼠于出生后 17 d 右眼玻璃体腔注射 4 μ l roscovitine 作为实验眼,左眼未进行任何干预作为对照眼。分别于注射后 8 d(出生后 25 d)和 18 d(出生后 35 d)用过量麻醉法各处死 6 只大鼠并分离视网膜,Western blot 法检测 RCS 大鼠视网膜组织中 Cdk5、p35、p25 蛋白的相对表达水平和 tau 蛋白磷酸化水平,采用分光光度计(光谱法)测定大鼠视网膜组织 340 nm 处的吸光度(A)值,定量分析大鼠视网膜中 Cdk5/p25 激酶活性,采用配对 t 检验比较实验眼和对照眼的检测结果。**结果** 玻璃体腔注射后 8 d 和 18 d,大鼠实验眼视网膜组织中 p35 蛋白的相对表达水平分别为 1.186 \pm 0.019 和 1.069 \pm 0.019,明显低于对照眼的 1.364 \pm 0.016 和 1.214 \pm 0.008,差异均有统计学意义($t=-6.294$ 、 -6.477 ,均 $P<0.05$);大鼠实验眼视网膜组织中 p25 蛋白的相对表达水平分别为 0.312 \pm 0.009 和 0.269 \pm 0.018,明显低于对照眼的 0.595 \pm 0.013 和 0.473 \pm 0.011,差异均有统计学意义($t=-36.508$ 、 -11.879 ,均 $P<0.05$);实验眼与对照眼间大鼠视网膜中 Cdk5 蛋白的相对表达水平差异均无统计学意义($t=0.213$ 、 -0.540 ,均 $P>0.05$);实验眼大鼠视网膜组织中 tau 蛋白磷酸化水平均低于对照眼,差异均有统计学意义($t=-9.854$ 、 -6.744 ,均 $P<0.05$)。玻璃体腔注射后 8 d 和 18 d,比色定量测定法测得大鼠实验眼视网膜中 Cdk5/p25 活性分别为(0.003 83 \pm 0.000 14) mol/(s·mg)和(0.002 01 \pm 0.000 11) mol/(s·mg),明显低于对照眼的(0.005 47 \pm 0.000 27) mol/(s·mg)和(0.003 35 \pm 0.000 15) mol/(s·mg),差异均有统计学意义($t=-9.152$, $P=0.000$; $t=-9.248$, $P=0.000$)。**结论** 玻璃体腔注射 roscovitine 可以在一定程度上抑制 RCS 大鼠视网膜组织中 Cdk5/p25 激酶活性及 tau 蛋白磷酸化水平。

【关键词】 Cdk5/p25; 抑制剂; Roscovitine; 凋亡; RCS 大鼠; 视网膜变性/遗传性

Inhibition of roscovitine on the activity of Cdk5/p25 and phosphorylation of tau in retina of RCS rats after intravitreal injection Zhang Jinjin, Sheng Xunlun, Ren Yinghua, Rong Weining, Li Huiping, Liu Yani. Ningxia Eye Hospital, Ningxia People's Hospital, Yinchuan 750001, China

Corresponding author: Sheng Xunlun, Email: shengxunlun@163.com

【Abstract】 **Background** Study determined that retinitis pigmentosa has a similar pathogenesis mechanism to Alzheimer disease, and activity of cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) and its activators participates in the degeneration of central nervous system. Roscovitine, an inhibitor of Cdk5, can suppress activity of Cdk5/p25 pathway and therefore inhibit cell apoptosis. However, the influence of roscovitine on retinitis pigmentosa (RP) is unclear. **Objective** This study was to investigate the expressions of p35, p25 and tau in the retinas of RCS rats. **Methods** Roscovitine of 4 μ l was intravitreally injected in the right eyes of 12 SPF 17-day-old RCS rats, and the fellow eyes were not intervened as the control eyes. The rats were sacrificed on eighth day (postnatal 25 days) and eighteenth day (postnatal 35 days), and whole retinas were isolated to evaluate the relative expressions of Cdk5, p35, p25 and tau

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.01.002

基金项目:国家自然科学基金项目(81060078)

作者单位:750001 银川,宁夏回族自治区人民医院 宁夏眼科医院

通信作者:盛迅伦,Email:shengxunlun@163.com

phosphorylation by Western blot, and the activity of Cdk5/p25 was analyzed by quantitative colorimetric assay. The results were compared between the right eyes and fellow eyes by paired *t* test. The use and care of the rats complied with Ethic Statement of Experimental Animal of Ningxia Medical University. **Results** In the eighth and eighteenth day after injection, the relative expression values (*A* values) of p35 in rat retinas were 1.186 ± 0.019 and 1.069 ± 0.019 in the injected eyes, showing significant decreases in comparison with 1.364 ± 0.016 and 1.214 ± 0.008 of the fellow eyes ($t = -6.294, -6.477$, both at $P < 0.05$); the relative expression values (*A* values) of p25 in rat retinas were 0.312 ± 0.009 and 0.269 ± 0.018 in the injected eyes, which was significantly lower than 0.595 ± 0.013 and 0.473 ± 0.011 of the fellow eyes ($t = -36.508, -11.879$, both at $P < 0.05$). No significant difference was found in the relative expression of Cdk5 protein between the injected eyes and the fellow eyes in various time points after injection (both at $P > 0.05$). The activities of Cdk5/p25 were $(0.00383 \pm 0.00014) \text{ mol}/(\text{s} \cdot \text{mg})$ and $(0.00201 \pm 0.00011) \text{ mol}/(\text{s} \cdot \text{mg})$ in the injected eyes, with significant decreases in comparison with the $(0.00547 \pm 0.00027) \text{ mol}/(\text{s} \cdot \text{mg})$ and $(0.00335 \pm 0.00015) \text{ mol}/(\text{s} \cdot \text{mg})$ of the fellow eyes ($t = -9.152, P = 0.000; t = -9.248, P = 0.000$), and the tau phosphorylation levels followed the same pattern in the eighth and eighteenth day after injection ($t = -9.854, -6.744$, both at $P < 0.05$). **Conclusions** Intravitreal injection of roscovitine can inhibit the activity of Cdk5/p25 and tau phosphorylation level in retinas of RCS rats to certain extend.

[Key words] Cdk5/p25; Inhibitor; Roscovitine; Apoptosis; Rat, RCS; Retinal degeneration/genetics

视网膜色素变性 (retinitis pigmentosa, RP) 是遗传性致盲眼病。研究证实, RP 原发于视网膜光感受器细胞和色素上皮细胞, 并以光感受器细胞变性死亡为主要病理特征。细胞死亡有两种形式, 即坏死和凋亡, 而 RP 细胞变性死亡的形式主要是凋亡^[1]。细胞周期依赖性蛋白激酶 5 (cyclin-dependent kinase 5, Cdk5) 在中枢神经系统的发育和神经元正常功能的维持中发挥重要作用, 但它对细胞分裂周期的调节功能尚不清楚^[2]。近年研究表明, Cdk5 的酶活性和其激活剂的失调以及分布的改变可促进神经元的凋亡, 从而参与阿尔茨海默病等神经退行性疾病的发生^[3]。Cdk5 和 p35 也存在于视网膜中, 与光感受器细胞及视网膜神经节细胞 (retinal ganglion cells, RGCs) 正常功能的维持密切相关^[4], 推测 RP 可能与阿尔茨海默病等慢性神经退行性疾病有着共同的病理生理机制^[5]。我们前期的研究也发现, 过度激活的 Cdk5 可能参与 RCS 大鼠 RP 的形成^[6]。Cdk5 抑制剂 roscovitine 可以抑制 Cdk5/p25 激活性所致的 tau 蛋白的异常磷酸化, 减少细胞凋亡^[7], 但其是否能够逆转 RP 过程尚不清楚。本研究中探讨玻璃体腔注射 roscovitine 对 RCS 大鼠视网膜组织中 Cdk5、p35、p25 和 tau 蛋白表达的影响。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实验动物 选用 12 只雄性 SPF 级 RCS 大鼠, 许可证号: SCXK-(军)2007-017 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供), 符合国家医用动物实验标准。动物实验在宁夏医科大学科技楼实

验中心完成, 动物处置按照《宁夏医科大学实验动物管理办法 (试行)》和《宁夏医科大学实验伦理审查指南 (试行)》原则进行。

1.1.2 主要试剂及仪器 Roscovitine (R7772-1MG) (美国 Sigma 公司); 左氧氟沙星眼用凝胶 (武汉中国远大天天明制药有限公司); Cdk-5 (c-8) 兔抗鼠抗体、p35/p25 (c-19) 兔抗鼠抗体、tau (Thr205) 磷酸化兔抗鼠抗体 (美国 Santa Cruz 公司); β -actin、BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (北京博奥森生物技术有限公司); 山羊抗兔辣根过氧化物酶标记二抗 (北京中杉金桥公司); 化学发光剂 (美国 Thermo 公司); 脱脂奶粉 (美国 BD 公司); Cdk5/p25 激酶活性光谱法定量检测试剂盒 (上海杰美基因医药科技有限公司)。5 μl 微量注射器 (瑞士 Hamilton 公司); 聚偏氟乙烯膜 (德国 Millipore 公司)。

1.2 方 法

1.2.1 Roscovitine 的玻璃体腔注射 12 只 RCS 变性大鼠于出生后 17 d 进行玻璃体腔注射。按照 50 mg/kg 剂量腹腔内注射质量分数 0.5% 戊巴比妥钠溶液, 盐酸丙美卡因滴眼液局部点眼行表面麻醉, 用 5 μl 微量注射器经右眼颞侧角巩膜缘后 2 mm 处进入玻璃体腔并注射 4 μl roscovitine, 注射后给予左氧氟沙星眼用凝胶点眼以预防感染。左侧眼不注射药物作为对照。

1.2.2 视网膜组织的提取 分别于玻璃体腔注射后 8 d (出生后 25 d)、18 d (出生后 35 d), 按照 50 mg/kg 剂量于大鼠腹腔内注射 0.5% 戊巴比妥钠过量麻醉法处死大鼠, 快速摘出眼球, 去除角膜、晶状体及玻璃体, 分离视网膜组织, 称量标记。随后将组织置于玻璃匀

浆器中球状部位(冰上),每 100 毫克组织加 1 ml 裂解液和 2 μ l 苯甲基磺酰氟(phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF)匀浆,充分裂解后 30 min,溶液移至 1.5 ml 离心管中,离心半径 5 cm,4 $^{\circ}$ C 条件下 12 000 r/min 离心 5 min,取上清,分装并置于-80 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.3 Western blot 法检测大鼠视网膜中 Cdk5、p35、p25 蛋白的相对表达水平和 tau 蛋白磷酸化水平 按 BCA 蛋白检测试剂盒说明书测定每只大鼠视网膜组织提取上清液中蛋白的质量浓度。取 40 μ l 视网膜组织蛋白上清液,加入 10 μ l 5 倍上样缓冲液后,100 $^{\circ}$ C 水浴 5 min,冷却。用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳将等量蛋白质(按等蛋白量 30 μ g 上样)分离,以 300 mA 作用 50 min 后转移到聚偏二氟乙烯膜上,用 PBS 配置的质量分数 5% 脱脂牛奶室温下封闭 1.5 h,滴加质量分数 5% 脱脂牛奶稀释的 Cdk5 一抗(1:500)、p35/p25 一抗(1:200)、tau 一抗(1:100)分别 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜;过夜后经 pH 7.5 PBST 洗膜 3 次,每次 5 min,再用 5% 脱脂牛奶稀释的二抗(1:2 000)室温孵育 1 h,PBST 洗膜 3 次,每次 5 min,最后用 ECL 发光试剂盒检测。采用凝胶成像分析及 Quantity One 软件分析结果。以目的蛋白 A 值/ β -actin A 值作为目的蛋白的相对表达量。

1.2.4 比色法定量测定 Cdk5 活性 按试剂盒说明书操作,将已提取的视网膜组织蛋白上清液用分光光度仪在 340 nm 波长下检测吸光度(A)值。Cdk5 活性 [(样品 A 值-背景 A 值) \times 0.1(ml,体系容量) \times 样品稀释倍数] \div [0.005(ml,样品容量) \times 6.22(mmol,吸光系数) \times 5(min,反应时间)]=mmol/(min \cdot L) \div (样品蛋白)=mol/(s \cdot mg)。按照计算公式可计算出各组 Cdk5 活性具体数值。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计学软件进行统计分析。本研究测量指标的数据资料经 Shapiro-Wilk 检验呈正态分布,以 $\bar{x}\pm s$ 表示。采用实验动物双眼间对照的实验设计,实验眼与对侧对照眼间视网膜中 p35、p25、Cdk5 蛋白的相对表达值(A 值)、Cdk5/p25 活性和 tau 磷酸化水平的差异比较均采用配对 t 检验。采用双尾检测法, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠实验眼与对照眼视网膜中激活剂 p35 蛋白的相对表达

玻璃体腔注射后 8 d 和 18 d,实验眼视网膜组织 p35 蛋白的相对表达水平分别为 1.186 \pm 0.019 和 1.069 \pm

0.019,对照眼分别为 1.364 \pm 0.016 和 1.214 \pm 0.008,实验眼 p35 蛋白的相对表达量均低于对照眼,差异均有统计学意义($t=-6.294$ 、 -6.477 ,均 $P<0.05$) (图 1)。

2.2 大鼠实验眼与对照眼视网膜中激活剂 p25 蛋白的相对表达

玻璃体腔注射后 8 d 和 18 d,实验眼视网膜组织 p25 蛋白的相对表达水平为 0.312 \pm 0.009 和 0.269 \pm 0.018,对照眼分别为 0.595 \pm 0.013 和 0.473 \pm 0.011,实验眼 p25 蛋白的相对表达量均低于对照眼,差异均有统计学意义($t=-36.508$ 、 -11.879 ,均 $P<0.05$) (图 1)。

2.3 大鼠实验眼与对照眼视网膜组织中 Cdk5 蛋白的相对表达

玻璃体腔注射后 8 d 和 18 d,实验眼视网膜中 Cdk5 蛋白的相对表达水平分别为 1.343 \pm 0.028 和 1.239 \pm 0.020,对照眼分别为 1.332 \pm 0.022 和 1.257 \pm 0.019,实验眼和对照眼之间视网膜中 Cdk5 蛋白的相对表达量差异均无统计学意义($t=0.213$ 、 -0.540 , $P>0.05$) (图 1)。

2.4 大鼠实验眼与对照眼视网膜中 tau 蛋白磷酸化水平

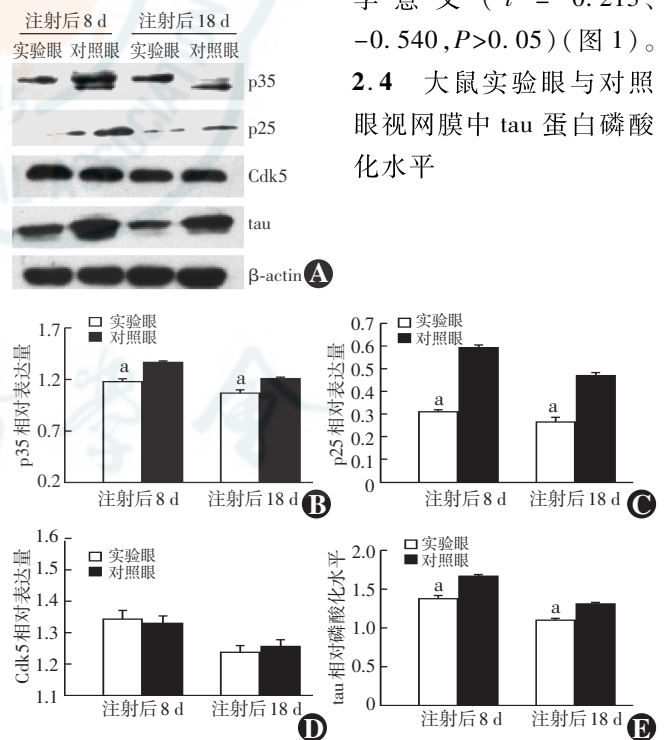


图 1 大鼠实验眼与对照眼视网膜中 Cdk5、p35、p25 和 tau 蛋白的相对表达 A:玻璃体腔注射后大鼠视网膜中 Cdk5、p35、p25、tau 蛋白相对表达 B:大鼠视网膜中 p35 蛋白相对表达量 与各自的对照眼比较, $^aP<0.05$ (配对 t 检验, $n=6$) C:大鼠视网膜中 p25 蛋白相对表达量 与各自的对照眼比较, $^aP<0.05$ (配对 t 检验, $n=6$) D:大鼠视网膜中 Cdk5 蛋白相对表达量(配对 t 检验, $n=6$) E:大鼠视网膜中 tau 蛋白磷酸化水平 与各自的对照眼比较, $^aP<0.05$ (配对 t 检验, $n=6$) Cdk5:细胞周期依赖性蛋白激酶 5

RCS 大鼠玻璃体腔注射后 8 d 和 18 d, 实验眼视网膜组织中 tau 蛋白磷酸化水平分别为 1.381 ± 0.029 和 1.104 ± 0.022 , 均低于对照眼的 1.662 ± 0.020 和 1.307 ± 0.014 , 差异均有统计学意义 ($t = -9.854$ 、 -6.744 , 均 $P < 0.05$) (图 1)。

2.5 大鼠视网膜中 Cdk5/p25 活性

大鼠玻璃体腔注射 roscovitine 后, 利用比色定量测定法测得 Cdk5/p25 活性结果示, 玻璃体腔注射后 8 d 和 18 d, 大鼠实验眼的 Cdk5/p25 活性分别为 $(0.00383 \pm 0.00014) \text{ mol}/(\text{s} \cdot \text{mg})$ 和 $(0.00201 \pm 0.00011) \text{ mol}/(\text{s} \cdot \text{mg})$, 均明显低于对照眼的 $(0.00547 \pm 0.00027) \text{ mol}/(\text{s} \cdot \text{mg})$ 和 $(0.00335 \pm 0.00015) \text{ mol}/(\text{s} \cdot \text{mg})$, 差异均有统计学意义 ($t = -9.152, P = 0.000; t = -9.248, P = 0.000$) (图 2)。

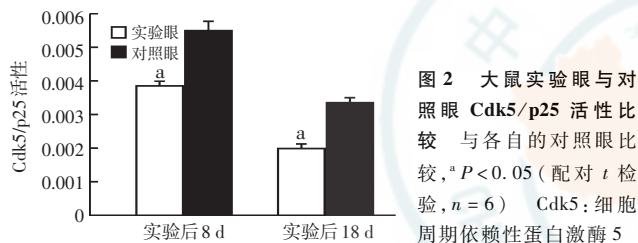


图 2 大鼠实验眼与对照眼 Cdk5/p25 活性比较 与各自的对照眼比较, $^a P < 0.05$ (配对 t 检验, $n = 6$) Cdk5: 细胞周期依赖性蛋白激酶 5

3 讨论

Roscovitine 为人工合成的 Cdk5 抑制剂, 可抑制 Cdk5/p25 活性所致的 tau 蛋白的异常磷酸化过程, 抑制细胞凋亡^[7], 因此有可能成为针对 Cdk5 过度激活所导致的神经退行性疾病的治疗药物。我们前期的研究发现, 过度激活 Cdk5/p25 与 RCS 大鼠视网膜的神经细胞凋亡有一定的关系^[6], 所以我们推测应用 roscovitine 可能会阻断 Cdk5 过度激活对光感受器细胞的损害, 从而保护光感受器细胞的功能。

RCS 大鼠是自发性 RP 鼠, 17 日龄时视网膜光感受器细胞发育成熟, 21 日龄即出现 RP 表现, 25 日龄光感受器细胞明显变性, 35 日龄光感受器细胞凋亡, 其视网膜外核层的厚度减少到一半^[8]。17 日龄是 RCS 大鼠视网膜感受器细胞发育的重要拐点, 此时视网膜光感受器细胞已发育成熟但未发生明显变性, 所以本研究选择在 17 日龄后给予 RCS 大鼠玻璃体腔注射 roscovitine 以观察其是否能够早期干预 RP, 并选择注射后 8 d (25 日龄) 和 18 d (35 日龄) 检测大鼠视网膜中 p35 蛋白、p25 蛋白的相对表达和 tau 蛋白磷酸化水平及 Cdk5/p25 活性, 因为这两个时间点是 RCS 大鼠自然病程中细胞凋亡的重要拐点。有文献证实, 将 Cdk 相互作用蛋白 1 (cyclin-dependent kinase interacting

protein 1, CIP1) 和 Cdk5/p25 共转染至人胚肾细胞系 HEK293 细胞中, tau 的磷酸化水平可明显降低, CIP1 不仅可特异性地抑制 Cdk5/p25 复合物的活性, 还可抑制 Cdk5/p25 诱导的 tau 的高度磷酸化^[9]。本研究也显示, roscovitine 玻璃体腔注射后 8 d, Cdk5 蛋白在 25 日龄大鼠实验眼与对照眼之间的相对表达水平差异无统计学意义, 而 p35 和 p25 蛋白在实验眼的相对表达水平明显低于对照眼, 实验眼视网膜中 Cdk5/p25 激酶活性低于对照眼, 同时实验眼视网膜中 tau 蛋白磷酸化水平也低于对照眼, 说明 RCS 大鼠行玻璃体腔注射 roscovitine 后对视网膜组织的 Cdk5 活性发挥了一定的抑制作用, 并进一步抑制了 Cdk5 主要磷酸化底物 tau 蛋白的过度磷酸化, roscovitine 的主要作用是抑制 Cdk5/p25 活性, 而不影响 Cdk5 蛋白的表达, 与 Michaelis^[7] 的研究结果相吻合, 也与我们前期的研究结果相符^[6]。p25 蛋白是在某些病理因素下由锚定于膜上的内源性 p35 蛋白病理性剪切形成, 所以 p25 蛋白与异常表达的 p35 蛋白水平表达一致^[7]。Cdk5/p25 活性主要被 p25 蛋白激活, Cdk5/p25 活性受到 roscovitine 抑制后, 可能会逆向调节 p35 蛋白和 p25 蛋白的表达水平, 导致 p35 蛋白和 p25 蛋白在实验眼表达水平低于对照眼的现象。

在 35 日龄 RCS 变性大鼠实验眼视网膜组织中, p35 蛋白、p25 蛋白的相对表达水平和 tau 蛋白磷酸化水平及 Cdk5/p25 活性均低于对照眼, 而实验眼与对照眼的 Cdk5 蛋白表达水平差异无统计学意义, 这提示在 RCS 变性大鼠出生后 17 d 给予玻璃体腔注射 roscovitine 的早期干预对 35 日龄大鼠视网膜组织蛋白表达及激酶活性有一定的影响, 与我们前期的研究结果一致^[6]。结合 25 日龄及 35 日龄 RCS 变性大鼠各蛋白的表达及激酶活性程度的检测结果, 本研究发现 17 日龄 RCS 变性大鼠玻璃体腔注射 roscovitine 对 RCS 大鼠视网膜组织中 p35 蛋白和 p25 蛋白表达、tau 蛋白磷酸化水平及 Cdk5/p25 活性有一定的影响。

本研究发现了 roscovitine 对 RCS 大鼠视网膜细胞凋亡的干预作用, 但其结果也存在一定的局限性, 主要在于: (1) 本研究中 Cdk5/p25 活性的抑制剂 roscovitine 既往主要用于对体外细胞的干预过程^[10], 尚未有动物或人的活体研究报道, 所以 roscovitine 玻璃体注射的浓度和剂量尚处于摸索阶段, 结合大量文献, 本研究选取中等剂量的 roscovitine, 即每眼 $4 \mu\text{g}$, 但其最佳有效剂量仍有待进一步研究。(2) 本实验最初的目的是检测 roscovitine 玻璃体腔注射后是否对 RP 大鼠视网膜组织中 p35 蛋白和 p25 蛋白表达、tau 蛋白

磷酸化水平及 Cdk5/p25 活性有一定的作用,尚未给予梯度剂量注射进行优选,本研究仅为后续相关研究提供了一定的实验基础。(3)本实验中仅实施了 roscovitine 单次玻璃体腔注射,药物作用时间有限。关于该药物玻璃体腔注射后的时间效应、是否需要多次玻璃体腔注射及安全性有待于进一步研究。(4)RP 的病理过程复杂,多个通路的相互作用可影响 RP 的过程,本研究仅涉及其中的一部分。

本研究首次对 RCS 大鼠早期给予单次玻璃体腔注射 roscovitine,观察 RP 进展过程中 Cdk5/p25 活性抑制剂 roscovitine 对视网膜 p35 蛋白、p25 蛋白表达和 tau 蛋白磷酸化水平及 Cdk5/p25 活性的影响,结果提示内源性过量表达的 Cdk5/p25 可能参与 RP 的过程,Cdk5/p25 抑制剂确实影响了 RCS 变性大鼠视网膜组织中 p35 蛋白、p25 蛋白表达和 tau 蛋白磷酸化水平及 Cdk5/p25 活性。此通路是否参与了 RP 仍有待于进一步结合功能学及形态学来证实。由于实验存在一定局限性,仍需要更深层次的研究证实我们的预想及猜测,对 RP 可能存在的机制及治疗方法提供更多的实验依据。

参考文献

- [1] Fishman GA. Retinitis pigmentosa. Genetic percentages [J]. Arch Ophthalmol, 1978, 96 (5) : 822-826. doi: 10. 1001/archophth. 1978. 03910050428005.
- [2] Lew J, Wang JH. Neuronal cdc2-like kinase [J]. Trends Biochem Sci, 1995, 20 (1) : 33-37. doi: 10. 1016/S0968-0004 (00) 88948-3.
- [3] Patrick GN, Zukerberg L, Nikolic M, et al. Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration [J]. Nature, 1999, 402 (6762) : 615-622. doi: 10. 1038/45159.
- [4] Hahn CM, Kleinholtz H, Koester MP, et al. Role of cyclin-dependent kinase 5 and its activator P35 in local axon and growth cone stabilization [J]. Neuroscience, 2005, 134 (2) : 449-465. doi: 10. 1016/j. neuroscience. 2005. 04. 020.
- [5] Oka T, Nakajima T, Tamada Y, et al. Contribution of calpains to photoreceptor cell death in N-methyl-N-nitrosourea-treated rats [J]. Exp Neurol, 2007, 204 (1) : 39-48. doi: 10. 1016/j. expneurol. 2006. 09. 011.
- [6] 张金金, 盛迅伦, 任英华. Cdk5/P25 激酶活性与 RCS 大鼠视网膜神经细胞凋亡的关系 [J]. 中华实验眼科杂志, 2013, 31 (6) : 546-550. doi: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2013. 06. 006.
- [7] Michaelis ML. Drugs targeting Alzheimer's disease: some things old and some things new [J]. J Pharmaco Exp Ther, 2003, 304 (3) : 897-904. doi: 10. 1124/jpet. 102. 035840.
- [8] Tso MO, Zhang C, Ablner AS, et al. Apoptosis leads to photoreceptor degeneration in inherited retinal dystrophy of RCS rats [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1994, 35 (6) : 2693-2699.
- [9] Zheng YL, Li BS, Amin ND, et al. A peptide derived from cyclin-dependent kinase activator (p35) specifically inhibits Cdk5 activity and phosphorylation of tau protein in transfected cells [J]. Eur J Biochem, 2002, 269 (18) : 4427-4434. doi: 10. 1046/j. 1432-1033. 2002. 03133. x.
- [10] Amin ND, Zheng YL, Kesavapany S, et al. Cyclin-dependent kinase 5 phosphorylation of human septin SEPT5 (hCDCrel-1) modulates exocytosis [J]. J Neurosci, 2008, 28 (14) : 3631-3643. doi: 10. 1523/JNEUROSCI. 0453-08. 2008.

(收稿日期: 2014-08-16)

(本文编辑: 尹卫靖 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)签署的知情同意书。

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 以人体为试验对象的研究,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)