

蓝光照射致人视网膜色素上皮细胞线粒体凋亡的途径及机制

李红 吕建平 蔡善君 宿罡 武志鹏 宫鑫

【摘要】 **背景** 研究已证实蓝光照射可导致视网膜色素上皮细胞(RPE)凋亡,但其机制目前尚不完全清楚。**目的** 探讨线粒体凋亡通路是否参与蓝光照射诱导体外培养的人 RPE 细胞凋亡过程。**方法** 分离新鲜的供体视网膜,对人 RPE 细胞进行原代培养和传代,用角蛋白单克隆抗体行细胞鉴定。将体外培养的人 RPE 细胞分为无光照组、单纯光照组、光照+硝苯地平组、光照+钙磷酸结合蛋白 C(calphostin C)组、光照+佛波酯(PMA)组。光照组细胞用(2 000±500)lx 的蓝光照射人 RPE 细胞 6 h,然后继续培养 24 h 后终止。采用 Western blot 法比较两个组间 RPE 细胞中凋亡相关调控因子 bax、bcl-2、bcl-xl 的相对表达,以评价蓝光照射对 RPE 细胞凋亡的影响。光照+硝苯地平组、光照+calphostin C 组、光照+PMA 组细胞在蓝光照射前 1 h 分别在培养基中加入相应药物,然后以(2 000±500)lx 的蓝光照射人 RPE 细胞 6 h,并继续培养 24 h,采用 Western blot 法检测 5 个组细胞中 caspase-9 蛋白表达量的变化,观察钙通道和蛋白激酶 C(PKC)通路对 RPE 细胞线粒体的影响。**结果** 培养的细胞生长良好,细胞质内充满色素颗粒,呈铺路石样排列,对角蛋白呈阳性反应。无光照组和单纯光照组均可见 bax、bcl-2 及 bcl-xl 蛋白条带,相对分子质量分别为 23 000、26 000 和 30 000。与无光照组比较,单纯光照组 bax、bcl-2 和 bcl-xl 蛋白表达相对值(A)下降,差异均有统计学意义($t=-4.409$, $P=0.012$; $t=7.575$, $P=0.002$; $t=6.068$, $P=0.004$)。与无光照组比较,单纯光照组、光照+calphostin C 组、光照+PMA 组细胞中 caspase-9 蛋白表达均升高,差异均有统计学意义($P=0.005$, 0.002 , 0.000),而光照+硝苯地平组与无光照组比较差异无统计学意义($P=0.191$)。与单纯光照组比较,光照+PMA 组 caspase-9 蛋白表达升高,差异有统计学意义($P=0.005$);而光照+硝苯地平组及光照+calphostin C 组 caspase-9 蛋白表达差异均无统计学意义($P=0.057$, 0.643)。**结论** 蓝光致体外培养的人 RPE 细胞凋亡,同时细胞中 caspase-9 表达增强,凋亡抑制基因 bcl-2 及 bcl-xl 表达下降,凋亡促进基因 bax 蛋白表达增强。线粒体凋亡通路参与蓝光照射致 RPE 细胞凋亡的过程;PKC 通路可能参与了蓝光导致的人 RPE 细胞凋亡。

【关键词】 蓝光;光损伤;视网膜色素上皮;凋亡;线粒体;半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶;蛋白激酶 C;细胞培养

Mitochondrial pathway of retinal pigment epithelial cell apoptosis induced by blue light *in vitro* Li Hong, Lyu Jianping, Cai Shanjun, Su Gang, Wu Zhipeng, Gong Xin. Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi 563003, China

Corresponding author: Cai Shanjun, Email: caishanjun@163.com

[Abstract] **Background** Studies determined that blue light exposure causes apoptosis of human retinal pigment epithelial (RPE) cells, but its mechanism is still below understood. **Objective** The aim of this study was to investigate whether or how mitochondrial apoptotic pathway is involved in blue-light induced apoptosis of human RPE cells *in vitro*. **Methods** Human RPE cells were isolated from fresh donor eyes and primarily cultured and passaged. The cells were identified with keratin antibody by immunochemistry. Then the cells were the non-light exposed group, simple light-exposed group, light-exposed+nifedipine group, light-exposed+calphostin C group and the light-exposed+phorbol myristate acetate (PMA) group. Human RPE cells in light-exposed group were consequently

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.01.004

基金项目:国家自然科学基金项目(81060079);贵州省教育厅重点项目(黔教科 2008034 号)

作者单位:563003 遵义医学院附属医院眼科 贵州省眼科医院(吕建平,现在山东省济宁市第二人民医院眼科)

通信作者:蔡善君, Email: caishanjun@163.com

cultured for 24 hours following the exposure of $(2\ 000\pm 500)$ lx blue-light for 6 hours, and then the expression levels of bax, bcl-2, bcl-xl in the cells were detected by Western blot to evaluate the effect of blue light on the apoptosis. The cells in the light-exposed+nifedipine group, light-exposed+calphostin C group and the light-exposed+PMA group were treated with the corresponding drugs 1 hour prior to light irradiation and sequently received 6-hour light irradiation and 48-hour culture. The expression of caspase-9 protein in the cells were assayed with Western blot to assess the influence of Ca^{2+} channel and protein kinase C (PKC) pathway on mitochondria of RPE cells. **Results** Cultured cells grew well with visible pigment in cytoplasm. The cells showed the positive response for keratin and presented a cobblestone-like appearance. The expression bands of bax, bcl-2 and bcl-xl proteins were clearly visible at the molecular weight of 23 000, 26 000 and 30 000 in both non-light exposed group and the simple light-exposed group, and the absorbance values of the cells to bax were elevated, while the absorbance values to bcl-2 and bcl-xl were declined in the simple light-exposed group compared with the non-light exposed group ($t = -4.409, P = 0.012; t = 7.575, P = 0.002; t = 6.068, P = 0.004$). Compared with the non-light exposed group, the absorbance values of caspase-9 were significantly raised in the simple light-exposed group, light-exposed+calphostin C group and the light-exposed+PMA group ($P = 0.005, 0.002, 0.000$), but no significant difference between the non-light exposed group and light-exposed+nifedipine group ($P = 0.191$). Compared with the simple light-exposed group, the expression level was considerably higher in the light-exposed+PMA group ($P = 0.005$); while that in the light-exposed+nifedipine group or light-exposed+calphostin C group was not significantly different ($P = 0.057, 0.643$). **Conclusions** Blue light exposure induces apoptosis of RPE cells by up-regulating the expressions of bax and caspase-9 proteins and down-regulating the expressions of bcl-2 and bcl-xl. The mitochondrial apoptosis pathway and PKC pathway participate in blue-light induced apoptosis of human RPE cells *in vitro*.

[Key words] Blue light; Light-induced injury; Retinal pigment epithelium; Apoptosis; Mitochondria; Cysteine-aspartic acid proteases; Protein kinase C; Cell culture

视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) 细胞凋亡是多种视网膜疾病的共同病理机制, 可见光及紫外线可以对 RPE 细胞产生光化学损伤, 尤其是光谱中的蓝光^[1]。按照启动酶活性信号的起源, 细胞凋亡分为线粒体途径、死亡受体途径及内质网途径^[2], 以往的研究已证实适度的蓝光照射导致体外培养的人 RPE 细胞凋亡, 并发现线粒体呼吸酶, 如细胞色素 C 氧化酶异常^[3], 但其通过何种机制导致 RPE 细胞损伤, 由哪条信号转导通路介导目前尚不清楚。本研究中探讨线粒体凋亡通路是否参与蓝光照射诱导的人 RPE 细胞凋亡过程及其机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞来源 人 RPE 细胞来源于意外死亡的 3 名健康成年男性, 年龄 25 ~ 35 岁, 死亡后 12 h 内取材。对 RPE 细胞进行原代培养和传代, 第 3 ~ 6 代细胞用于实验, 每组平行对照实验均在同一细胞系同一代中进行。细胞取材和实验程序符合贵州省人体试验委员会制定的伦理道德标准。

1.1.2 主要试剂及仪器 BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (上海捷瑞有限公司); 鼠抗人 caspase-9 抗体 (9508)、兔抗人 bcl-xl 抗体 (2764)、兔抗人 bax 抗体 (2772)、兔

抗人 bcl-2 抗体 (2870)、羊抗鼠抗体 (700)、羊抗兔抗体 (800) (美国 CST 公司); β -actin (美国 Santa Cruz 公司); RIPA 裂解液 (上海碧云天公司); 彩色预染蛋白相对分子质量标准 (加拿大 Fermentas 公司); DMEM/F12 培养基 (美国 Gibco 公司); 硝苯地平、佛波酯 (phorbol myristate acetate, PMA)、钙磷酸结合蛋白 C (calphostin C) (德国 Sigma 公司)。电泳仪 (美国 Biorad 公司); 酶标仪 (美国 Thermo 公司); X 射线片 (上海锐珂医疗器材公司); CO_2 培养箱 (美国 CST 公司); 超净工作台 (江苏苏净集团); CX40RF400 倒置相差显微镜 (日本奥林巴斯公司); 自动显微照相装置 (日本奥林巴斯公司); 20 W 医用蓝光灯管 (江西英华科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 人 RPE 细胞的体外培养 无菌条件下分离 RPE 细胞, 从睫状体平坦部 (角膜缘后 5 ~ 6 mm) 环形剪开眼球, 弃去眼前节, 显微镜下去除玻璃体及视网膜神经上皮, 制成眼杯。用质量分数 0.25% 胰蛋白酶和质量分数 0.02% EDTA 进行消化, 以 5×10^4 个/ml 细胞密度接种入培养瓶, 加完全培养液 [含质量分数 20% 小牛血清、青链霉素 100 U/ml (商品单位)、0.3 mg/ml 谷氨酰胺], 置于 37 °C、体积分数 5% CO_2 孵箱内培养。待细胞生长至融合状态后常规传代, 取 3 ~ 6 代细胞用于实

验。锥虫蓝染色法测定 RPE 细胞的活力均在 90% 以上。

1.2.2 培养细胞的免疫组织化学法鉴定 用预冷丙酮固定细胞爬片 10 min。用角蛋白单克隆抗体行细胞鉴定,一抗用 1:3 000 稀释的鼠抗人角蛋白抗体,二抗用生物素标记羊抗小鼠 IgG,滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液,DAB 显色,充分冲洗脱水,封片,拍照。

1.2.3 实验分组及人 RPE 细胞光照处理 将培养的细胞分为 5 个组:无光照组、单纯光照组、光照+硝苯地平组、光照+calphostin C 组和光照+PMA 组,其中硝苯地平为钙通道抑制剂,calphostin C 为蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 抑制剂,PMA 为 PKC 激动剂。采用波长为 (450±20) nm、光照强度为 (2 000±500)lx 的蓝光照射 RPE 细胞 6 h,然后继续培养 24 h。硝苯地平浓度为 10 μmol/L,calphostin C 和 PMA 浓度均为 100 μmol/L,均在光照前 1 h 加入培养基。

1.2.4 Western blot 法检测 RPE 细胞内 bax、bcl-2、bcl-xl、caspase-9 的蛋白表达 RIPA 裂解提取 RPE 细胞总蛋白,行蛋白定量检测,变性,上样,电泳,转至聚偏氟乙烯膜,质量分数 5% 脱脂奶粉封闭,加入相应抗体(一抗、二抗用 1% 脱脂奶粉稀释,一抗效价比为 1:300,二抗效价比为 1:1 000),曝光洗片,胶片扫描后用 ipwin32 图像分析软件分析结果,测定波长为 450 nm 细胞的吸光度(A)读数,内参基因为 β-actin,各凋亡调控因子的相对表达量为目的基因 A 值/β-actin A 值,每

个检测指标样本量为 3。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 18.0 (5086892, SPSS 中国析数软件上海有限公司)统计软件进行统计分析。本研究的测量数据指标经 W 检验呈正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 进行描述,组间均数经 Levene 检验方差齐。蓝光照射后对 RPE 细胞凋亡的影响采用均衡分组单因素干预两水平实验设计,无光照组与单纯光照组间细胞中 bax、bcl-2、bcl-xl 蛋白表达量(A 值)的差异比较采用独立样本 t 检验,检验水准 α=0.05。关于钙离子和 PKC 通路对光照照射后细胞凋亡的影响评价采用均衡分组单因素多水平实验设计,5 个组间细胞中 caspase-9 蛋白量(A 值)表达的差异比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 SNK-q 检验,检验水准 α=0.05。

2 结果

2.1 体外培养人 RPE 细胞的形态特点

培养的细胞生长良好,细胞生长接近融合状态后进行传代。原代 RPE 细胞生长旺盛,细胞质内充满色素颗粒。细胞接近融合状态时细胞呈六角形或多边形,呈铺路石样排列。传代后细胞由多角形变为梭形、椭圆形或不规则形,细胞质内色素颗粒逐渐减少(图 1),培养的人 RPE 细胞对角蛋白呈阳性反应,细胞质呈棕褐色染色(图 2)。

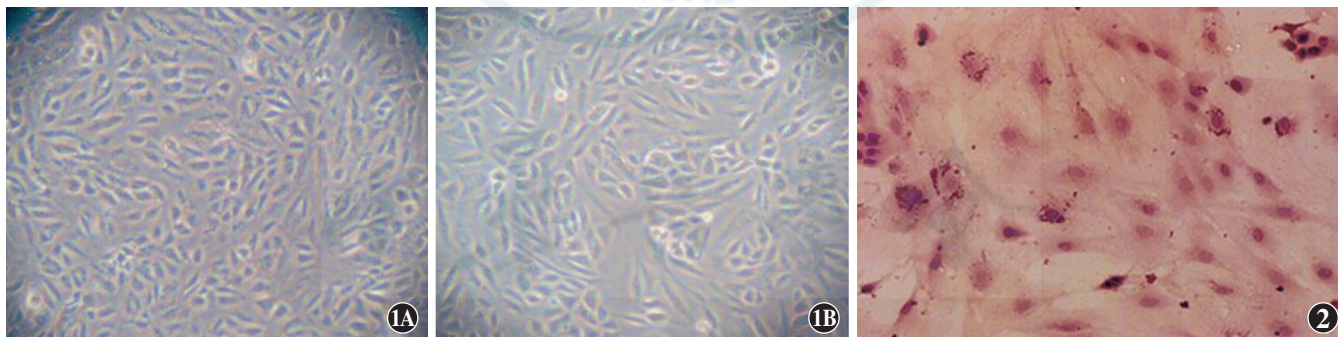


图 1 原代 RPE 细胞及第 4 代 RPE 细胞 (×200) A:原代培养的 RPE 细胞 B:第 4 代 RPE 细胞 图 2 体外培养的人 RPE 细胞免疫化学染色 (DAB ×200) RPE 细胞对角蛋白呈阳性反应,细胞质呈棕褐色染色

2.2 单纯光照组与无光照组 RPE 细胞中 bax、bcl-2 及 bcl-xl 蛋白的表达变化

无光照组和单纯光照组细胞分别在相对分子质量 23 000、26 000 及 30 000 处见 bax、bcl-2 及 bcl-xl 蛋白的反应条带(图 3)。与无光照组比较,单纯光照组细胞中 bax 蛋白的表达量增加,而 bcl-2 及 bcl-xl 蛋白表达量下降,差异均有统计学意义 ($t = -4.409, P = 0.012; t = 7.575, P = 0.002; t = 6.068, P = 0.004$)。单纯光照组细胞中 bax/bcl-2 及 bax/bcl-xl 值均明显大于

无光照组,差异均有统计学意义 ($t = 5.076, P = 0.002; t = 4.023, P = 0.001$) (表 1)。

表 1 各组 RPE 细胞中各凋亡调控因子的变化 ($\bar{x} \pm s, A$ 值)

组别	样本量	bax	bcl-2	bcl-xl	bax/bcl-2	bax/bcl-xl
无光照组	3	0.308±0.071	0.712±0.064	0.828±0.111	0.431±0.757	0.377±0.102
光照组	3	0.604±0.092	0.374±0.044	0.408±0.044	1.617±1.178	1.480±1.174
t		-4.409	7.575	6.068	5.076	4.023
P		0.012	0.002	0.004	0.002	0.001

注:RPE:视网膜色素上皮(独立样本 t 检验)

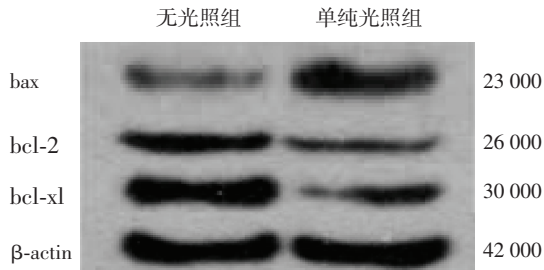


图 3 Western blot 检测无光照组与单纯光照组 bax、bcl-2 和 bcl-xl 的相对表达量

2.3 各组 RPE 细胞中 caspase-9 蛋白表达的变化

无光照组和单纯光照组在相对分子质量 37 000、35 000 处均可见 caspase-9 蛋白表达条带(图 4)。与无光照组比较,单纯光照组、光照+calphostin C 组、光照+PMA 组 caspase-9 蛋白表达均升高,差异均有统计学意义($P=0.005、0.002、0.000$),而光照+硝苯地平组与无光照组比较差异无统计学意义($P=0.191$)。与单纯光照组比较,光照+PMA 组 caspase-9 蛋白表达升高,差异有统计学意义($P=0.005$);而光照+硝苯地平组及光照+calphostin C 组 caspase-9 蛋白表达差异均无统计学意义($P=0.057、0.643$)(表 2)。

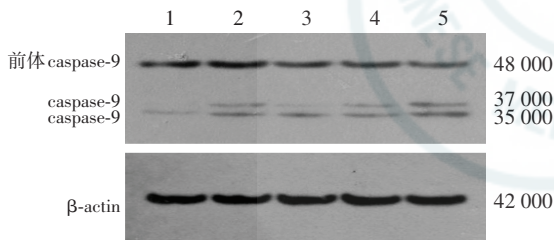


图 4 Western blot 检测各组 RPE 细胞 caspase-9 表达 1:无光照组 2:单纯光照组 3:光照+硝苯地平组 4:光照+calphostin C 组 5:光照+PMA 组

表 2 各组 RPE 细胞中 caspase-9 蛋白表达量的变化($\bar{x}\pm s, A$ 值)

组别	样本量	caspase-9/ β -actin
无光照组	3	0.000 49 \pm 0.000 08
单纯光照组	3	0.081 92 \pm 0.033 84 ^a
光照+硝苯地平组	3	0.032 67 \pm 0.007 37 ^a
光照+calphostin C 组	3	0.092 88 \pm 0.048 01 ^a
光照+PMA 组	3	0.164 04 \pm 0.020 98 ^{ab}
<i>F</i>		14.868
<i>P</i>		<0.001

注:与无光照组比较,^a $P<0.05$;与单纯光照组比较,^b $P<0.05$ (单因素方差分析,SNK-*q* 检验) RPE:视网膜色素上皮;calphostin C:钙磷酸结合蛋白 C;PMA:佛波酯

3 讨论

研究证实,适度的光照时间及光照强度可造成 RPE 细胞凋亡的形态学改变、线粒体膜电位及细胞色

素 C 异常^[3]。细胞色素 C 是线粒体起源的细胞凋亡信号,当凋亡信号传至线粒体时,引起细胞色素 C 释放,在 ATP/脱氧 ATP 作用下,细胞色素 C 与前体 caspase-9 及凋亡蛋白酶激活因子结合,形成凋亡体,进而激活 caspase-9, caspase-9 再以级联放大的方式激活下游的效应酶 caspase-3,导致细胞凋亡^[4]。Perche 等^[5]在光致人视网膜光感受器凋亡损伤模型中发现 caspase-3 表达增加。Zeidan 等^[6]用紫外光照射乳腺癌细胞,发现细胞线粒体形态及功能变化。我们的前期研究结果提示,蓝光照射可能通过线粒体途径致体外培养的人 RPE 细胞凋亡^[7-8],因此本研究用(2 000 \pm 500)lx 的蓝光照射体外培养 RPE 细胞的方法建立人 RPE 细胞蓝光损伤模型,研究线粒体凋亡途径是否参与蓝光诱导的人 RPE 细胞损伤,以及 Ca²⁺-PKC 信号转导通路是否介导这个过程。我们的前期研究也提示,蓝光照射可通过钙通道和 PKC 两个通路使 RPE 细胞的细胞质内 Ca²⁺质量浓度升高^[8],因此本研究分组时选择硝苯地平组、光照+calphostin C 组及光照+PMA 组,旨在明确钙通道和 PKC 通路对 RPE 细胞线粒体的影响。

Bcl-2 和 bax 是目前已知线粒体通路凋亡调控过程中功能对立的一对重要的调控基因,它们的表达量及相对比例对细胞凋亡有重要影响。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;而 bcl-2 高表达时,对抗其诱导凋亡的作用,使细胞存活期延长^[9]。Medearis 等^[10]认为 bcl-2 家族中 bcl-xl 的表达下降,将减弱其与 bax 的相互作用,导致 bax 表达增加,最终引起细胞死亡。Perche 等^[5]研究发现,在光损伤致线粒体凋亡途径中 caspases-9 扮演了重要的角色。陈雪芳等^[11]研究发现,在紫外线照射后晶状体上皮细胞 caspase-3 及 caspase-9 的活性明显增强, caspase 通路参与氧化损伤的病理生理过程,诱导并促进了晶状体上皮细胞的凋亡。本研究显示,蓝光照射 RPE 细胞后,前体 caspase-9 裂解为相对分子质量分别为 37 000 和 35 000 两个蛋白条带,分别对各组 37 000 条带灰度值及两个条带平均灰度值进行比较,其表达量非常接近。本研究结果还显示,单纯光照组 caspase-9 蛋白表达量明显高于无光照组,但光照+硝苯地平组与无光照组之间比较 caspase-9 蛋白表达量无明显差异,推测蓝光照射致体外培养人 RPE 细胞的细胞质内 Ca²⁺质量浓度升高,细胞外 Ca²⁺通过钙通道内流可能为主导因素,而激活蛋白激酶为次要因素,与其他研究结果吻合^[7]。为了进一步验证线粒体通路是否参与蓝光致 RPE 细胞凋亡,本研究中选择 bcl-2

家族最具有代表性的促凋亡 bax 和抑凋亡 bcl-2、bcl-xl 进行研究,发现与无光照组比较,单纯光照组 bax 蛋白表达、bax/bcl-2 及 bax/bcl-xl 值增加,与 Zhang 等^[12]的报道相似。

我们前期的研究显示,采用(2 000±500)lx 蓝光光照 RPE 细胞 6 h,继续培养后 24 h 细胞内 Ca²⁺较无光照组荧光强度增高^[6-7],因此进一步观察 RPE 细胞凋亡过程中 caspase-9 的变化。Sitailo 等^[13]研究显示,PKC 的表达可引起细胞色素 C 的释放和 bcl-xl 抗凋亡蛋白水平下调,从而发挥其促凋亡作用。本研究参照文献[14]及预实验结果,蓝光照射前 1 h 分别应用钙通道阻断剂硝苯地平、PKC 激动剂 PMA 及 PKC 抑制剂 calphostin C 预处理 RPE 细胞,然后检测 caspase-9 蛋白表达的变化,结果显示光照+PMA 组 caspase-9 蛋白表达高于光照+calphostin C 组及单纯光照组,提示蓝光光照及 PKC 的活性增强促进了 caspase-9 蛋白的表达,推测 Ca²⁺-PKC 信号通路在蓝光照射诱导体外培养的人 RPE 细胞凋亡过程中起到一定作用。

参考文献

[1] Sparrow JR, Nakanishi K, Parish CA, et al. The lipofuscin fluorophore A2E mediates blue light-induced damage to retinal pigmented epithelial cells[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2000, 41(7): 1981-1989.

[2] Krueger A, Baumann S, Krammer PH, et al. FLICE-inhibitory proteins: regulators of death receptor-mediated apoptosis [J]. Mol Cell Biol, 2001, 21(24): 8247-8254. doi: 10.1128/MCB. 21. 24. 8247-8254. 2001.

[3] 蔡善君, 严密, 毛咏秋, 等. 蓝光致人视网膜色素上皮细胞凋亡与线粒体膜电位和细胞色素 C 的关系 [J]. 中华眼科杂志, 2006, 42(12): 1095-1102. doi:10.3760/j.issn:0412-4081. 2006. 12. 009.

[4] McDonnell MA, Abedin MJ, Melendez M, et al. Phosphorylation of murine caspase-9 by the protein kinase casein kinase 2 regulates its cleavage by caspase-8[J]. J Bio Chem, 2008, 283(29): 20149-20158. doi: 10.1074/jbc. M802846200.

[5] Perche O, Doly M, Ranchon-Cole I. Caspase-dependent apoptosis in light-induced retinal degeneration [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2007, 48(6): 2753-2759. doi:10.1167/iovs.06-1258.

[6] Zeidan YH, Wu BX, Jenkins RW, et al. A novel role for protein kinase Cdelta-mediated phosphorylation of acid sphingomyelinase in UV light-induced mitochondrial injury[J]. FASEB J, 2008, 22(1): 183-193. doi:10.1096/fj.07-8967com.

[7] 宫鑫, 蔡善君, 李海辉, 等. 蓝光照射对人视网膜色素上皮细胞 L-型钙通道 mRNA 表达的影响 [J]. 中华眼底病杂志, 2013, 29(4): 411-415. doi:10.3760/cma.j.issn.1005-1015. 2013. 04. 015.

[8] 宿罡, 宫鑫, 蔡善君, 等. 蓝光致人视网膜色素上皮细胞损伤与细胞内钙离子含量变化的关系 [J]. 中华实验眼科杂志, 2013, 31(8): 734-738. doi:10.3760/cma.j.issn.2095-0160. 2013. 08. 007.

[9] Tsukaharas S, Yamamoto S, Tin-Tin-Win-Shew, et al. Inhalation of low-level formaldehyde increases the Bcl-2/Bax expression ratio in the hippocampus of immunologically sensitized mice[J]. Neuroimmunomodulation, 2006, 13(2): 63-68. doi:10.1159/000094829.

[10] Medearis S, Han IC, Huang JK, et al. The role of Bcl-xL in mouse RPE cell survival [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011, 52(9): 6545-6551. doi:10.1167/iovs.10-6772.

[11] 陈雪芳, 刘忠鑫, 陈炳荣, 等. 白藜芦醇对紫外线诱导人晶状体上皮细胞氧化损伤的保护作用 [J]. 国际眼科杂志, 2013, 13(6): 1073-1076. doi:10.3980/j.issn.1672-5123. 2013. 06. 03.

[12] Zhang N, Peairs JJ, Yang P, et al. The importance of Bcl-xL in the survival of human RPE cells [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2007, 48(8): 3846-3853. doi:10.1167/iovs.06-1145.

[13] Sitailo LA, Tibudan SS, Denning MF. The protein kinase C delta catalytic fragment targets Mcl-1 for degradation to trigger apoptosis [J]. J Biol Chem, 2006, 281(40): 29703-29710. doi: 10.1074/jbc. M607351200.

[14] Rosenthal R, Heimann H, Agostini H, et al. Ca²⁺ channels in retinal pigment epithelial cells regulate vascular endothelial growth factor secretion rates in health and disease [J]. Mol Vis, 2007, 13: 443-456.

(收稿日期:2014-08-17)

(本文编辑:尹卫靖 杜娟)

读者·作者·编者

本刊对论文中统计学方法描述的要求

本刊投稿论文中如有量化测试指标时须有统计学处理的内容,并应在方法部分提供统计学方法的描述。实验中反应变量为单变量时,请提供测量指标数据资料的性质(如定量数据资料及定性数据资料的表达方式)、样本均数正态分布检验的名称及方差齐性检验的名称、实验设计方法及与之相匹配的统计学设计方法(如自身配对设计、成组设计、交叉设计、析因设计、正交设计等)、与统计学设计相应的统计方法名称(如配对 t 检验、独立样本 t 检验,重复测试的方差分析等)以及检验标准。选择方差分析统计学设计时,应根据单因素或多因素设计选择正确的方法,不宜简单套用单因素方差分析。经正态分布检验或方差齐性检验不能满足条件的数据资料应采用非参数检验。定性数据资料应根据与实验设计相匹配的统计学方法,不宜简单套用χ²检验。实验中反应变量为双变量时,应根据实验设计正确选择简单直线相关分析、回归分析或其他,不宜简单套用直线相关分析。统计学的检验标准请提供为双侧性检验或单侧性检验。论文结果部分的统计学处理内容可用相应的图表表达。

统计学符号的著录执行 GB 3358-1982《统计学名词及符号》的有关规定,统计学量值符号一律采用斜体,如样本的算术平均数用英文小写 $\bar{x} \pm s$ (中位数仍用 M);标准差用英文小写 s;标准误用英文小写 s_e; t 检验用英文小写 t; F 检验用英文大写 F;卡方检验用希文小写 χ²;相关系数用英文小写 r;确定系数用 R²,自由度用希文小写 v;概率用英文大写 P。

统计结果的解释和表达采用对比组或比较对象之间的差异有统计学意义的描述方法,而不用对比组之间的差异具有显著性(或极显著性)的描述。论文结果部分需提供统计学量值和相应的概率值(如:t = -5.88, P = 0.00;χ² = 4.38, P < 0.05; F = 0.39, P = 0.37; q = 10.69, P < 0.01 等),如不能提供统计学量值时,概率值应用原值而不用不等式的形式。当涉及总体参数,如总体均数、总体率等时,在给出显著性检验结果的同时,请给出 95% 可信区间。

(本刊编辑部)