

· 实验研究 ·

长链非编码 RNA Neat1 对紫外线 B 诱导人晶状体上皮细胞焦亡的抑制作用及其机制

王敏 王妍茜 陈颖 赵越越 杨涛 康刚劲

西南医科大学附属医院眼科, 泸州 646000

通信作者: 康刚劲, Email: 929460414@qq.com

【摘要】 目的 研究长链非编码 RNA 核旁斑长点组装转录本 1 (Neat1) 在紫外线 B 诱导人晶状体上皮细胞 (LECs) 焦亡中的作用及其机制。 **方法** 体外培养人晶状体上皮细胞系 HLE-B3, 将处于对数生长期的 HLE-B3 细胞分别采用紫外线 B 照射 0、2、4 和 8 h; 采用 Western blot 法检测照射不同时长后焦亡相关蛋白胱天蛋白酶 1 (caspase-1) 的表达, 采用实时荧光定量 PCR 法检测照射不同时长后细胞中 Neat1 mRNA 相对表达量, 采用细胞计数试剂盒 8 (CCK-8) 法检测细胞活力并以此筛选紫外线诱导 LECs 焦亡的最佳照射时长, 最终确定为 4 h。另将 HLE-B3 细胞分为阴性 siRNA 转染组、siRNA Neat1 转染组、阴性 siRNA 转染+照射组和 siRNA Neat1 转染+照射组, 采用相应试剂转染 24 h, 其中阴性 siRNA 转染+照射组和 siRNA Neat1 转染+照射组转染相应试剂后采用紫外线 B 照射 4 h。采用 CCK-8 法检测各组细胞活力, 流式细胞术检测细胞焦亡, Western blot 法检测 caspase-1、gasdermin D 蛋白 (GSDMD)、NOD 样受体蛋白 3 (NLRP3) 表达, ELISA 法检测白细胞介素 (IL)-1 β 质量浓度, 透射电子显微镜下观察各组 HLE-B3 细胞超微结构变化。 **结果** 随照射时间的延长, caspase-1 蛋白表达条带灰度呈递增趋势。照射 0、2、4、8 h caspase-1 蛋白相对表达量分别为 0.05 ± 0.01 、 0.25 ± 0.07 、 0.51 ± 0.04 和 0.74 ± 0.02 , 总体比较差异有统计学意义 ($F = 168.223, P < 0.001$), 其中照射不同时长两两比较, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。Neat1 mRNA 相对表达量随照射时间延长呈递增趋势, 细胞活力值呈递减趋势, 照射不同时长两两比较, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。与阴性 siRNA 转染组比较, siRNA Neat1 转染组细胞活力值升高, 阴性 siRNA 转染+照射组细胞活力值降低, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$); 与阴性 siRNA 转染+照射组比较, siRNA Neat1 转染+照射组细胞活力值升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。阴性 siRNA 转染组和 siRNA Neat1 转染+照射组细胞焦亡率明显低于阴性 siRNA 转染+照射组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$)。阴性 siRNA 转染+照射组 caspase-1、NLRP3、GSDMD 蛋白相对表达量均较阴性 siRNA 转染组和 siRNA Neat1 转染+照射组高, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$)。阴性 siRNA 转染+照射组 IL-1 β 质量浓度明显高于阴性 siRNA 转染组和 siRNA Neat1 转染+照射组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。透射电子显微镜下观察可见, 阴性 siRNA 转染+照射组和 siRNA Neat1 转染+照射组细胞肿胀, 细胞膜孔隙形成, 线粒体肿胀, 呈空泡状, 线粒体嵴模糊, 其中与阴性 siRNA 转染+照射组相比, siRNA Neat1 转染+照射组细胞肿胀程度减轻, 细胞膜孔隙减少, 线粒体肿胀程度亦减轻。 **结论** Neat1 通过 caspase-1 介导的焦亡经典途径参与紫外线 B 诱导的人 LECs 焦亡过程, 沉默 Neat1 可以抑制人 LECs 焦亡。

【关键词】 白内障; 晶状体; 上皮细胞; 细胞焦亡; 紫外线 B; LncRNA Neat1

基金项目: 西南医科大学-泸州市中医医院基地项目 (2019-LH007)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20211214-00687

Inhibitory effect of long non-coding RNA Neat1 on ultraviolet B-induced pyroptosis of human lens epithelial cells and its mechanism

Wang Min, Wang Yanxi, Chen Ying, Zhao Yueyue, Yang Tao, Kang Gangjin

Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China

Corresponding author: Kang Gangjin, Email: 929460414@qq.com

【Abstract】 Objective To investigate the role of long non-coding RNA nuclear paraspeckle assembly transcript 1 (Neat1) in pyroptosis of ultraviolet B (UVB)-induced human lens epithelial cells (LECs) and to explore the possible mechanism. **Methods** The human lens epithelial cell line HLE-B3 was cultured *in vitro*, and cells at log phase were exposed to ultraviolet B for 0, 2, 4 and 8 hours, respectively. The expression of cysteine aspartic acid-

specific protease-1 (caspase-1), a protein related to pyroptosis, was detected by Western blot. The relative expression level of Neat1 in cells after different irradiation durations was determined by real-time quantitative PCR. Cell viability was determined by the cell counting kit-8 (CCK-8) method to screen the optimal irradiation duration for UVB-induced LECs pyroptosis, which was finally determined to be 4 hours. HLE-B3 cells were divided into negative siRNA transfection group, siRNA Neat1 transfection group, negative siRNA transfection+irradiation group and siRNA Neat1 transfection+irradiation group, and were transfected with corresponding reagents for 24 hours. The negative siRNA transfection+irradiation group and siRNA Neat1 transfection+irradiation group were irradiated with UVB for 4 hours after transfection. The cell viability was detected by the CCK-8 method. The pyroptosis rate was detected by flow cytometry. The expression levels of caspase-1, gasdermin D (GSDMD) and nod-like receptor protein 3 (NLRP3) proteins were detected by Western blot. The concentration of interleukin (IL)-1 β was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Ultrastructural changes in HLE-B3 cells were observed under a transmission electron microscope. **Results** The grayscale of caspase-1 protein bands increased with the extension of irradiation duration. The relative expression levels of caspase-1 protein at 0, 2, 4 and 8 hours of irradiation were 0.05 ± 0.01 , 0.25 ± 0.07 , 0.51 ± 0.04 and 0.74 ± 0.02 , respectively, with a statistically significant overall difference ($F = 168.223, P < 0.001$), and significant differences were found in paired comparisons (all at $P < 0.05$). With prolonged irradiation, the relative expression level of Neat1 mRNA increased and the cell viability decreased, with statistically significant differences in paired comparisons (all at $P < 0.05$). Compared with negative siRNA transfection group, the cell viability was increased in siRNA Neat1 transfection group and decreased in negative siRNA transfection+irradiation group, with statistically significant differences (both at $P < 0.01$). Compared with negative siRNA transfection+irradiation group, the cell viability was increased in siRNA Neat1 transfection+irradiation group, showing a statistically significant difference ($P < 0.05$). The pyroptosis rate was significantly lower in negative siRNA transfection group and siRNA Neat1 transfection+irradiation group than in negative siRNA transfection+irradiation group, and the differences were statistically significant (both at $P < 0.01$). The relative expression levels of caspase-1, NLRP3 and GSDMD proteins in negative siRNA transfection+irradiation group were higher than those in negative siRNA transfection group and siRNA Neat1 transfection+irradiation group and the differences were statistically significant (all at $P < 0.01$). The concentration of IL-1 β was significantly higher in negative siRNA transfection+irradiation group than in negative siRNA transfection group and siRNA Neat1 transfection+irradiation group, and the differences were statistically significant (all at $P < 0.05$). Cell swelling, formed cell membrane pores, vacuolated cells and fuzzy mitochondrial cristae were seen in negative siRNA transfection+irradiation group and siRNA Neat1 transfection+irradiation group by transmission electron microscopy. Compared with negative siRNA transfection+irradiation group, slighter cell swelling, fewer cell membrane pores and lighter mitochondrial swelling were seen in siRNA Neat1 transfection+irradiation group. **Conclusions** Neat1 is involved in human LECs pyroptosis induced by UVB through the classic pyroptosis pathway mediated by caspase-1. Knockdown of Neat1 can inhibit the pyroptosis of human LECs.

[Key words] Cataract; Lens, crystalline; Epithelial cells; Pyroptosis; Ultraviolet B; LncRNA Neat1

Fund program: Southwest Medical University-Luzhou Traditional Chinese Medicine Hospital Base Project (2019-LH007)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20211214-00687

年龄相关性白内障是造成视力损害和盲的主要原因之一,既往已有研究证实,晶状体上皮细胞(lens epithelial cells, LECs)凋亡参与了白内障的形成^[1]。日光紫外线辐射作为不可避免的环境和物理因素,是导致白内障发生的重要原因之一^[2-4],其中紫外线 B 对白内障的影响最为重要^[5]。近年来研究发现,紫外线 B 照射还可使 LECs 发生焦亡,从而导致白内障形成^[6]。焦亡在 1922 年首次被发现并正式命名^[7]。目前在心肌梗死、肾炎、创伤性脑损伤、急性肝损伤、糖尿病肾

病、阿尔茨海默病等疾病中均发现有焦亡参与^[8]。近年来亦有研究表明,年龄相关性黄斑变性、白内障、干眼、蚕食性角膜溃疡和青光眼的形成中也有焦亡的参与^[9-11]。细胞焦亡有经典和非经典 2 种途径:(1)经典途径 核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 (nod-like receptor protein 3, NLRP3) 参与且依赖胱天蛋白酶 1 (cysteine aspartic acid specific protease-1, caspase-1) 的焦亡经典途径目前研究较多也较成熟;(2)长链非编码 RNA (long noncoding RNA, LncRNA) 核旁斑长点组

装转录本 1 (nuclear enrichment abundant transcript 1, Neat1) 途径 LncRNA 是一类长度大于 200 个核苷酸且不具有编码蛋白质能力的 RNA, 调控许多生物学过程^[12-13]。近来有研究显示, Neat1 参与 H₂O₂ 诱导的 LECs 凋亡和 LECs 的上皮-间质转化^[7,14], 还可调控 caspase-1 介导的细胞焦亡, 但其是否参与了 LECs 细胞焦亡目前尚不清楚, 我们推测 LECs 发生焦亡可能与 Neat1 的表达相关。本研究拟探讨 Neat1 对紫外线照射诱导 LECs 焦亡的作用及机制, 以期为延缓年龄相关性白内障的发生和发展提供新的研究方向。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 细胞来源 人晶状体上皮细胞系 HLE-B3 购自美国菌种保藏中心。

1.1.2 主要试剂及仪器 DMEM 培养基、胎牛血清 (杭州四季青生物工程材料有限公司); 细胞计数试剂盒 8 (cell counting kit-8, CCK-8) 检测试剂盒、BCA 蛋白定量试剂盒 (上海碧云天公司); 兔抗 GAPDH 抗体 (ab181602)、兔抗 GSDMD 抗体 (ab215203) (英国 Abcam 公司); 兔抗 caspase-1 抗体 (AF4005, 英国 Affinita Biotech 公司); 兔抗 NLRP3 抗体 (#15101, 英国 CST 公司); 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗 (AS1107, 美国 Aspen 公司); 白细胞介素 (interleukin, IL)-1 β 检测试剂盒 (武汉云克隆科技股份有限公司); 小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 转染试剂盒 (广州锐博生物科技有限公司)。UV-B 型紫外辐照计 (北京师范大学光电仪器厂); 紫外线灯 (南京华强电子有限公司); 恒温培养箱、超净工作台 (美国 Thermo 公司); 电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司); 流式细胞仪 (美国 BD 公司); 透射电子显微镜 (美国 FEI 公司)。

1.2 方 法

1.2.1 细胞培养及紫外线 B 照射 HLE-B3 细胞培养于含体积分数 10% 胎牛血清的低糖 DMEM 培养基中, 置于 37 °C、含体积分数 5% CO₂ 的培养箱内培养, 隔天换液, 待细胞生长至对数生长期时进行传代。将细胞暴露于辐照峰为 297 nm 且光谱波长为 280 ~320 nm 的紫外线灯下, 调整高度, 使照射强度为 2 W/m², 分别照射细胞 0、2、4、8 h。

1.2.2 Western blot 法检测照射不同时长细胞中 caspase-1 浓度 按照紫外线 B 照射不同时长处理 HLE-B3 细胞, 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 洗涤细胞 3 次, 吸尽 PBS, 加入全蛋白裂解

液使细胞完全裂解, 收集上清液, BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度, 电泳、转膜, 脱脂奶粉封闭 1 h, 加入 caspase-1 一抗稀释液 (1:1 000) 和 GAPDH 稀释液 (1:10 000), 4 °C 过夜, 采用 TBST 洗涤 3 次, 加入二抗稀释液 (1:10 000) 室温孵育 30 min, 滴加 ECL 试剂, 凝胶成像系统进行显影、拍照。以 GAPDH 为内参, 采用 Fusion 软件分析各组灰度值。目的蛋白相对表达量 = 目的条带灰度值/GAPDH 条带灰度值。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 法检测照射不同时长细胞中 Neat1 mRNA 相对表达量 收集紫外线 B 照射后的 HLE-B3 细胞, 采用 Trizol 试剂盒提取细胞总 RNA, 逆转录试剂盒转录为 cDNA, 扩增程序设置如下: 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 变性 10 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 40 个循环。Neat1 正向引物序列为 5'-AGTGA TGTGGAGTTAAGGCCG-3', 反向引物序列为 5'-CGGGC TTACCAGATGACCAG-3'; GAPDH 正向引物序列为 5'-CATCATCCCTGCCTCTACTGG-3', 反向引物序列为 5'-GTGGGTGTCGCTGTTGAAGTC-3'。以 GAPDH 为内参, 采用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法计算 Neat1 mRNA 相对表达量。

1.2.4 CCK-8 法检测照射不同时长细胞活力 将处于对数生长期的细胞用胰蛋白酶消化混匀后, 细胞板计数, 调整细胞密度为 1 \times 10⁵ 个/ml, 每孔 100 μ l 细胞悬液接种于 96 孔板中, 每组 5 个复孔, 培养箱中过夜, 次日吸去培养基, 每孔加入 40 μ l 完全培养基, 按相应时长进行照射处理, 照射结束后, 每孔加入 10 μ l CCK-8 溶液, 37 °C 培养箱中孵育 2 h, 采用酶标仪测量波长 450 nm 处吸光度 (absorbance, A) 值, 计算照射不同时长后的细胞活力值, 根据细胞活力值确定 UVB 的照射时长。细胞活力值 (%) = 照射不同时间点 A 值/照射 0 h A 值 \times 100%。

1.2.5 细胞转染及分组 将处于对数生长期的细胞接种于 6 孔板, 细胞密度为 1 \times 10⁶ 个/ml, 随机分为阴性 siRNA 转染组、siRNA Neat1 转染组、阴性 siRNA 转染+照射组和 siRNA Neat1 转染+照射组, 各组均根据 siRNA 转染试剂盒说明书转染相应试剂 24 h, 阴性 siRNA 碱基序列为 5'-GGTTGTGAAGGGAGGGAAGG TCCAG-3', siRNA Neat1 碱基序列为 5'-GAGTCAGG AGGAATAGCCGCAGCA-3'。其中阴性 siRNA 转染+照射组和 siRNA Neat1 转染+照射组转染相应试剂后采用紫外线 B 照射 4 h。收集细胞, 用于后续实验。

1.2.6 CCK-8 法检测各组细胞活力 按照 1.2.4 方法检测各组细胞 A 值, 计算各组细胞活力值。细胞活力值 (%) = 各实验组 A 值/阴性 siRNA 转染组 A 值 \times 100%。

1.2.7 流式细胞术检测细胞焦亡 收集处理后的各组 HLE-B3 细胞, PBS 清洗 2 次, 用不含 EDTA 的胰蛋白酶消化, 离心半径 5 cm, 1 000 r/min 离心 5 min, 收集细胞, 采用预冷的 PBS 洗涤细胞 2 次, 每组加入 300 μ l 的 1 倍结合缓冲液重悬细胞, 室温避光加入 5 μ l 膜联蛋白 V-异硫氰酸荧光素 (annexin V-fluorescein isothiocyanate isomer I, Annexin V-FITC) 染液, 混匀后避光孵育 10 min, 加入 5 μ l 碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 染液再次混匀后, 避光反应 5 min, 1 h 内上机检测。计算 Annexin V-FITC/PI 双阳细胞的晚期凋亡率, 即为细胞焦亡率。

1.2.8 Western blot 法检测各组细胞中 caspase-1、GSDMD、NLRP3 蛋白表达 按照 1.2.2 方法检测各组紫外线 B 照射不同时长处理 HLE-B3 细胞中 caspase-1、GSDMD、NLRP3 蛋白表达量, caspase-1、GSDMD、NLRP3 一抗稀释比例分别为 1:1 000、1:1 000 和 1:500。

1.2.9 ELISA 法检测 IL-1 β 质量浓度 将处理后的细胞冰冻溶解, 2 000 r/min 离心 20 min, 收集上清液, 按照 ELISA 检测试剂盒说明书进行操作, 酶标板中加入稀释后的细胞上清液, 加入抗体后封闭, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h 后洗涤, 加入酶标抗体后, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min, 加底物显色后加入终止液, 分光光度计 450 nm 处读数, 检测各孔 A 值。IL-1 β 浓度与 A₄₅₀ 值呈正比, 通过参考品绘制标准曲线, 对照未知样本中 A 值, 计算样本中 IL-1 β 质量浓度。

1.2.10 透射电子显微镜下观察各组 HLE-B3 细胞超微结构变化 将细胞收集后离心, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃去培养液, 加入体积分数 3% 戊二醛, 4 $^{\circ}$ C 固定过夜, PBS 清洗 4 次, 每次静置 15 min, 质量分数 1% 锇酸固定液 (pH=7.4) 室温固定 2 h, 再次用 PBS 清洗 4 次, 乙醇脱水后用丙酮置换 2 次, 丙酮与包埋剂混合液浸渍后使用包埋剂包埋, 60 nm 厚切片, 醋酸双氧铀、醋酸铅染色, 透射电子显微镜下观察各组 HLE-B3 细胞超微结构变化。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计学软件进行统计分析。计量资料数据经 Shapiro-Wilk 检验证实呈正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示。紫外线 B 照射不同时长后各检测指标总体比较均采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD-*t* 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 紫外线 B 照射不同时长后 caspase-1 蛋白表达比较

随照射时间的延长, caspase-1 蛋白表达条带灰度呈递增趋势。照射 0、2、4 和 8 h 后 caspase-1 蛋白相对表达量分别为 0.05 ± 0.01 、 0.25 ± 0.07 、 0.51 ± 0.04 和 0.74 ± 0.02 , 总体比较差异有统计学意义 ($F=168.223, P<0.001$), 照射不同时长两两比较, 差异均有统计学意义 (均 $P<0.05$) (图 1)。

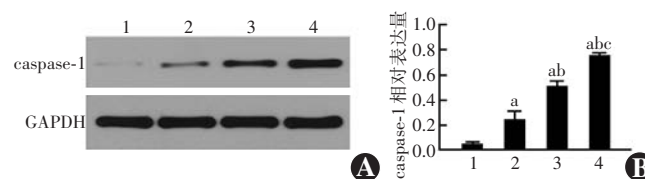


图 1 紫外线 B 照射不同时长后 caspase-1 蛋白表达量比较 A: 照射不同时长后细胞 caspase-1 蛋白表达电泳图 随照射时间的延长, caspase-1 蛋白表达条带灰度呈递增趋势 B: 照射不同时长后细胞 caspase-1 蛋白表达量比较 $F=168.223, P<0.001$ 。与照射 0 h 比较, ^a $P<0.01$; 与照射 2 h 比较, ^b $P<0.01$; 与照射 4 h 比较, ^c $P<0.01$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验; $n=3$) 1: 照射 0 h; 2: 照射 2 h; 3: 照射 4 h; 4: 照射 8 h caspase: 胱天蛋白酶; GAPDH: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶

Figure 1 Comparison of caspase-1 protein expression after different durations of ultraviolet B irradiation A: Electrophoretogram of caspase-1 protein expression With the extension of irradiation duration, the grayscale of caspase-1 protein expression bands increased B: Comparison of caspase-1 protein expression among different groups $F=168.223, P<0.001$. Compared with irradiation for 0 hour, ^a $P<0.01$; compared with irradiation for 2 hours, ^b $P<0.01$; compared with irradiation for 4 hours, ^c $P<0.01$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test, $n=3$) 1: irradiation for 0 hour; 2: irradiation for 2 hours; 3: irradiation for 4 hours; 4: irradiation for 8 hours caspase: cysteine aspartic acid specific protease; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

2.2 紫外线 B 照射不同时长后 HLE-B3 细胞中 Neat1 mRNA 相对表达量比较

Neat1 mRNA 相对表达量随照射时间延长呈递增趋势。照射 0、2、4 和 8 h 后 Neat1 mRNA 相对表达量分别为 1.11 ± 0.55 、 7.52 ± 0.48 、 11.89 ± 0.50 和 21.16 ± 2.48 , 总体比较差异有统计学意义 ($F=123.105, P<0.001$), 其中照射不同时长两两比较差异均有统计学意义 (均 $P<0.05$)。

2.3 紫外线 B 照射不同时长后 HLE-B3 细胞活力比较

倒置显微镜下可见, 照射 0 h 时 HLE-B3 细胞贴壁良好, 呈梭形及多边形, 轮廓清晰, 细胞饱满, 聚集生长; 照射 2 h 后, 贴壁细胞数量减少, 形态改变, 为不规则多边形, 细胞密度低于照射 0 h; 照射 4 h 后, 贴壁细胞数量及密度进一步降低, 明显低于照射 2 h 后, 细胞肿胀; 照射 8 h 后, 贴壁细胞零星分布, 细胞形态不规则, 肿胀明显, 细胞质不清晰 (图 2)。照射 0、2、4 和 8 h 后细胞活力值分别为 $(100.00 \pm 0.00)\%$ 、

(89.22±3.26)%、(65.94±9.03)%和(21.50±8.17)%，总体比较差异有统计学意义($F=152.615$, $P<0.001$)，其中照射不同时长两两比较差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。考虑到后续实验转染试剂对细胞的毒性作用，故确定紫外线 B 的照射时长为 4 h。

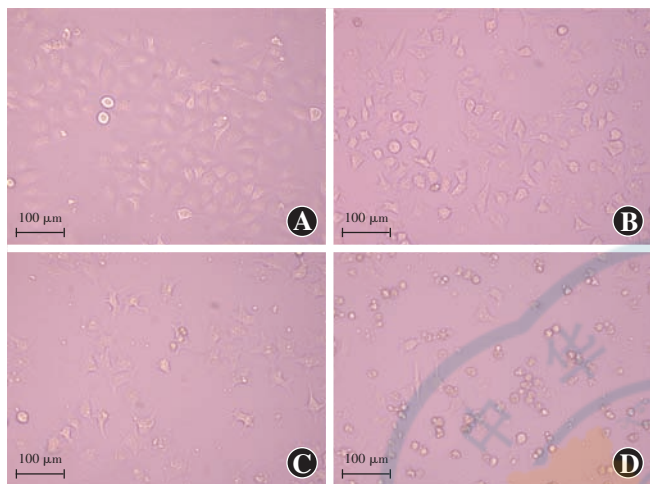


图 2 紫外线 B 照射不同时长后 HLE-B3 细胞形态($\times 100$, 标尺 = 100 μm) A: 照射 0 h 后 细胞贴壁良好, 呈梭形及多边形, 细胞饱满, 聚集生长 B: 照射 2 h 后 贴壁细胞数量减少, 形态改变, 为不规则多边形, 细胞密度低于照射 0 h C: 照射 4 h 后 贴壁细胞数量及密度进一步降低, 明显低于照射 2 h 后, 细胞肿胀 D: 照射 8 h 后 贴壁细胞零星分布, 细胞形态不规则, 肿胀明显, 细胞质不清晰

Figure 2 Morphology of HLE-B3 cells after ultraviolet B irradiation for different durations ($\times 100$, bar = 100 μm) A: Irradiation for 0 hour The cells were well adherent, spindle-shaped and polygonal, plump and aggregated B: Irradiation for 2 hours The number of adherent cells decreased and the cell morphology changed to irregular polygon, and the cell density was lower than that of irradiation for 0 hour C: Irradiation for 4 hours The number and density of adherent cells further decreased in comparison with irradiation for 2 hours, and cell swelling was seen D: Irradiation for 8 hours Adherent cells were distributed sporadically with irregular morphology. Obvious cell swelling with unclear cytoplasm was observed

2.4 不同 siRNA 转染组 HLE-B3 细胞中细胞活力比较

阴性 siRNA 转染组、siRNA Neat1 转染组、阴性 siRNA 转染+照射组、siRNA Neat1 转染+照射组细胞活力值分别为(100.00±0.00)%、(130.33±8.18)%、(58.66±8.24)%和(77.12±10.69)%，总体比较差异有统计学意义($F=46.417$, $P<0.001$)，其中与阴性 siRNA 转染组比较, siRNA Neat1 转染组细胞活力值升高, 阴性 siRNA 转染+照射组降低, 差异均有统计学意义(均 $P<0.01$)；与阴性 siRNA 转染+照射组比较, siRNA Neat1 转染+照射组细胞活力值升高, 差异有统计学意义($P<0.05$)(图 3)。

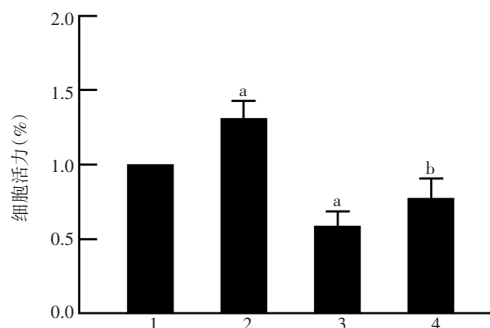


图 3 各组 HLE-B3 细胞活力值比较 $F=46.417$, $P<0.001$ 。与阴性 siRNA 转染组比较, $^aP<0.01$ ；与阴性 siRNA 转染+照射组比较, $^bP<0.05$ (单因素方差分析, LSD- t 检验; $n=3$) 1: 阴性 siRNA 转染组; 2: siRNA Neat1 转染组; 3: 阴性 siRNA 转染+照射组; 4: siRNA Neat1 转染+照射组

Figure 3 Comparison of cell viability of HLE-B3 cells among different groups $F=46.417$, $P<0.001$. Compared with negative siRNA transfection group, $^aP<0.01$; compared with negative siRNA transfection+irradiation group, $^bP<0.05$ (One-way ANOVA, LSD- t test, $n=3$) 1: negative siRNA transfection group; 2: siRNA Neat1 transfection group; 3: negative siRNA transfection+irradiation group; 4: siRNA Neat1 transfection+irradiation group

2.5 不同 siRNA 转染组 HLE-B3 细胞焦亡率比较

阴性 siRNA 转染组、siRNA Neat1 转染组、阴性 siRNA 转染+照射组和 siRNA Neat1 转染+照射组 HLE-B3 细胞焦亡率分别为(4.60±0.09)%、(2.74±0.03)%、(25.80±1.67)%和(10.73±1.01)%，总体比较差异有统计学意义($F=333.868$, $P<0.001$)，其中阴性 siRNA 转染组和 siRNA Neat1 转染+照射组细胞焦亡率明显低于阴性 siRNA 转染+照射组, 差异均有统计学意义(均 $P<0.01$)。siRNA Neat1 转染组细胞焦亡率略低于阴性 siRNA 转染组, 差异无统计学意义($P>0.05$)(图 4)。

2.6 不同 siRNA 转染组 HLE-B3 细胞中 caspase-1、NLRP3、GSDMD 蛋白相对表达量比较

阴性 siRNA 转染组、siRNA Neat1 转染组、阴性 siRNA 转染+照射组和 siRNA Neat1 转染+照射组细胞中 caspase-1、NLRP3 和 GSDMD 蛋白相对表达量总体比较, 差异均有统计学意义($F=64.562$ 、 37.885 、 40.949 , 均 $P<0.001$)，其中阴性 siRNA 转染+照射组 caspase-1、NLRP3、GSDMD 蛋白相对表达量均高于阴性 siRNA 转染组, 差异均有统计学意义(均 $P<0.01$)；siRNA Neat1 转染+照射组 HLE-B3 细胞 caspase-1、NLRP3、GSDMD 蛋白相对表达量均低于阴性 siRNA 转染+照射组, 差异均有统计学意义(均 $P<0.01$)；siRNA Neat1 转染组与阴性 siRNA 转染组 caspase-1、NLRP3、GSDMD 蛋白相对表达量比较, 差异均无统计学意义(均 $P>0.05$)(图 5, 表 1)。

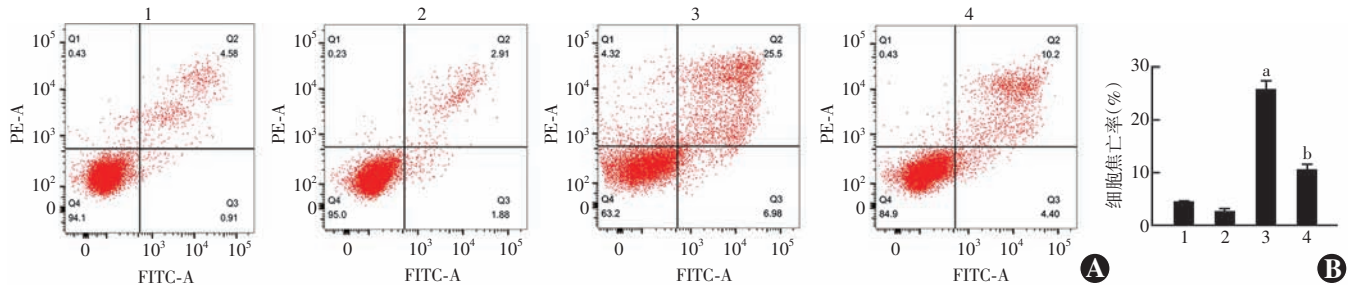


图4 各组细胞焦亡情况 A:各组细胞焦亡流式细胞图 B:各组细胞焦亡率比较 $F=333.868, P<0.001$. 与阴性 siRNA 转染组比较, $^a P<0.01$; 与阴性 siRNA 转染+照射组比较, $^b P<0.01$ (单因素方差分析, LSD- t 检验; $n=3$) 1: 阴性 siRNA 转染组; 2: siRNA Neat1 转染组; 3: 阴性 siRNA 转染+照射组; 4: siRNA Neat1 转染+照射组
Figure 4 Pyroptosis of HLE-B3 cells in various groups A: Pyroptosis of various groups by flow cytometry B: Comparison of pyroptosis rate among various groups $F=333.868, P<0.001$. Compared with negative siRNA transfection group, $^a P<0.01$; compared with negative siRNA transfection+irradiation group, $^b P<0.01$ (One-way ANOVA, LSD- t test; $n=3$) 1: negative siRNA transfection group; 2: siRNA Neat1 transfection group; 3: negative siRNA transfection+irradiation group; 4: siRNA Neat1 transfection+irradiation group

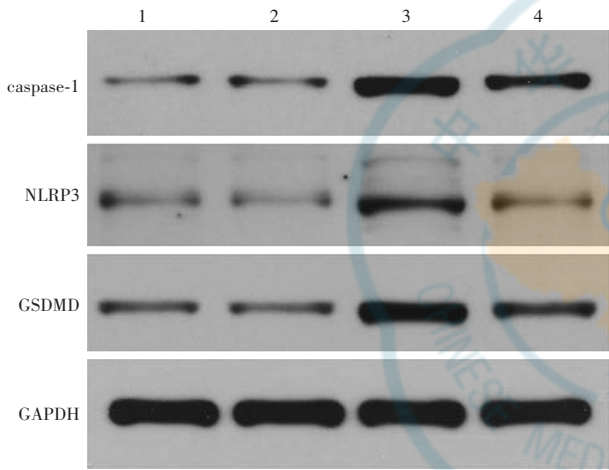


图5 各组细胞 caspase-1, NLRP3 和 GSDMD 蛋白表达电泳图 siRNA Neat1 转染+照射组 caspase-1、NLRP3、GSDMD 蛋白条带灰度弱于阴性 siRNA 转染+照射组, 强于 siRNA Neat1 转染组; 阴性 siRNA 转染+照射组 3 种焦亡相关蛋白条带灰度均强于阴性 siRNA 转染组; siRNA Neat1 转染组与阴性 siRNA 转染组 caspase-1、NLRP3、GSDMD 蛋白条带灰度均无明显差异 1: 阴性 siRNA 转染组; 2: siRNA Neat1 转染组; 3: 阴性 siRNA 转染+照射组; 4: siRNA Neat1 转染+照射组 caspase: 胱天蛋白酶; NLRP: 核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白; GSDMD: gasdermin D 蛋白; GAPDH: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶

Figure 5 Electrophoretogram of caspase-1, NLRP3 and GSDMD protein expressions by Western blot The grayscale of caspase-1, NLRP3 and GSDMD protein bands was weaker in siRNA Neat1 transfection + irradiation group than in negative siRNA transfection + irradiation group, but stronger than in siRNA Neat1 transfection group. The grayscale of the three protein bands was stronger in negative siRNA transfection+irradiation group than in negative siRNA transfection group. There was no significant difference in the grayscale of the three protein bands between siRNA Neat1 transfection group and negative siRNA transfection group 1: negative siRNA transfection group; 2: siRNA Neat1 transfection group; 3: negative siRNA transfection + irradiation group; 4: siRNA Neat1 transfection+irradiation group caspase: cysteine aspartic acid-specific protease; NLRP: NOD-like receptor protein; GSDMD: gasdermin D; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

表1 各组细胞中 caspase-1、NLRP3 和 GSDMD 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x}\pm s$)
Table 1 Comparison of the relative expression levels of caspase-1, NLRP3 and GSDMD proteins among various groups ($\bar{x}\pm s$)

| 组别 | 样本量 | caspase-1 | NLRP3 | GSDMD |
|--------------------|-----|------------------------|------------------------|------------------------|
| 阴性 siRNA 转染组 | 3 | 0.24±0.05 | 0.11±0.02 | 0.19±0.04 |
| siRNA Neat1 转染组 | 3 | 0.24±0.05 | 0.11±0.02 | 0.18±0.05 |
| 阴性 siRNA 转染+照射组 | 3 | 0.71±0.07 ^a | 0.39±0.06 ^a | 0.66±0.09 ^a |
| siRNA Neat1 转染+照射组 | 3 | 0.50±0.02 ^b | 0.20±0.02 ^b | 0.37±0.03 ^b |
| F 值 | | 64.562 | 37.885 | 40.949 |
| P 值 | | <0.001 | <0.001 | <0.001 |

注: 与阴性 siRNA 转染组比较, $^a P<0.01$; 与阴性 siRNA 转染+照射组比较, $^b P<0.01$ (单因素方差分析, LSD- t 检验) caspase: 胱天蛋白酶; NLRP: 核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白; GSDMD: gasdermin D 蛋白; siRNA: 小干扰 RNA; Neat: 核旁斑长点组转录本
 Note: Compared with negative siRNA transfection group, $^a P<0.01$; compared with negative siRNA transfection + irradiation group, $^b P<0.01$ (One-way ANOVA, LSD- t test) caspase: cysteine aspartic acid specific protease; NLRP: NOD-like receptor protein; GSDMD: gasdermin D; siRNA: small interfering RNA; Neat: nuclear enrichment abundant transcript

2.7 不同 siRNA 转染组 HLE-B3 细胞中 IL-1 β 质量浓度比较

阴性 siRNA 转染组、siRNA Neat1 转染组、阴性 siRNA 转染+照射组和 siRNA Neat1 转染+照射组 HLE-B3 细胞中 IL-1 β 质量浓度分别为 (19.29±1.41)、(16.80±1.29)、(66.59±8.11) 和 (31.10±4.74) pg/ml, 总体比较差异有统计学意义 ($F=68.851, P<0.001$), 其中与阴性 siRNA 转染+照射组相比, 阴性 siRNA 转染组和 siRNA Neat1 转染+照射组 IL-1 β 质量浓度明显降低, 差异均有统计学意义 (均 $P<0.05$); siRNA Neat1 转染组 IL-1 β 质量浓度略低于阴性 siRNA 转染组, 差异无统计学意义 ($P>0.05$) (图 6)。

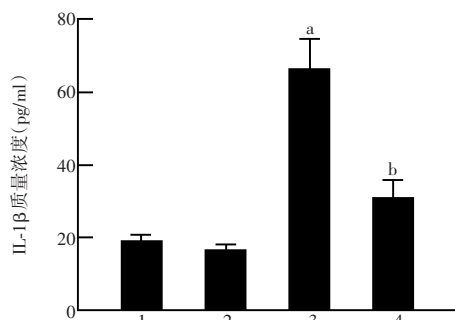


图 6 各组细胞中 IL-1β 质量浓度比较 $F = 68.851, P < 0.001$ 。与阴性 siRNA 转染组比较, $^a P < 0.05$; 与阴性 siRNA 转染+照射组比较, $^b P < 0.01$ (单因素方差分析, LSD- t 检验; $n = 3$) 1: 阴性 siRNA 转染组; 2: siRNA Neat1 转染组; 3: 阴性 siRNA 转染+照射组; 4: siRNA Neat1 转染+照射组 IL: 白细胞介素

Figure 6 Comparison of IL-1β concentration among different groups $F = 68.851, P < 0.001$. Compared with negative siRNA transfection group, $^a P < 0.05$; compared with negative siRNA transfection+irradiation group, $^b P < 0.01$ (One-way ANOVA, LSD- t test, $n = 3$) 1: negative siRNA transfection group; 2: siRNA Neat1 transfection group; 3: negative siRNA transfection+irradiation group; 4: siRNA Neat1 transfection+irradiation group IL: interleukin

2.8 不同 siRNA 转染组 HLE-B3 细胞超微结构比较

透射电子显微镜下观察可见, 阴性 siRNA 转染组和 siRNA Neat1 转染组细胞肿胀不明显, 细胞膜完整, 线粒体大小正常, 线粒体嵴清晰; 阴性 siRNA 转染+照射组和 siRNA Neat1 转染+照射组细胞肿胀, 细胞膜孔隙形成, 线粒体肿胀, 呈空泡状, 线粒体嵴模糊, 其中与阴性 siRNA 转染+照射组相比, siRNA Neat1 转染+照射组细胞肿胀程度减轻, 细胞膜孔隙减少, 线粒体肿胀程度亦减轻 (图 7)。

3 讨论

焦亡是一种由 caspase 介导, 异于凋亡和坏死的细胞程序性死亡。Duprez 等^[15] 认为 caspase-1 是一种炎性 caspase, 调控细胞焦亡途径, 不参与凋亡过程。Wang 等^[16] 在紫外线照射诱导白内障形成的动物模型中发现细胞焦亡参与了白内障的发生。本研究团队既往研究发现, 雌激素对 LECs 的保护机制与抑制 LECs 焦亡过

程相关, 并且有经典途径的参与^[17]。LncRNA 是一种非蛋白编码的转录单元, 可调节基因转录、mRNA 加工、运输等多种生物过程。研究发现, Neat1 可促进 caspase-1 依赖的细胞焦亡^[13], 且在年龄相关性白内障组织中的表达增加^[7]。本研究结果显示, 紫外线 B 照射 HLE-B3 细胞后 caspase-1 表达增加, 证明 HLE-B3 细胞焦亡模型诱导成功, 并且随紫外线照射时间延长, Neat1 的表达也增加, 由此推测 Neat1 可能参与了紫外线 B 诱导的 HLE-B3 细胞焦亡。

在细胞焦亡发生的 2 种途径中, 经典途径是细胞在外界刺激下, NLRP3 等模式识别受体与有 caspase 激活募集域 (caspase activation and recruitment domain, CARD) 的凋亡相关微粒蛋白 (apoptosis-associated speck-like protein containing CARD, ASC)、caspase-1 前体结合形成 NLRP3 炎性小体, NLRP3 炎性小体剪切激活 caspase-1 前体, 生成活性 caspase-1, caspase-1 激活后切割 GSDMD, 生成 N 端结构域和 C 端结构域,

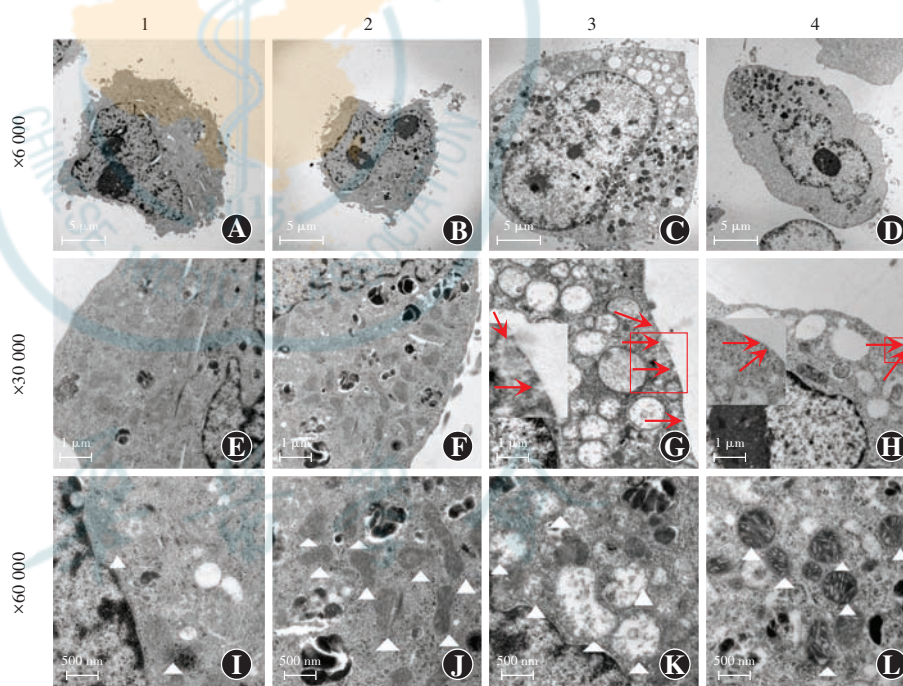


图 7 透射电子显微镜下各组细胞形态变化 (醋酸双氧铀+醋酸铅) A~D: siRNA Neat1 转染+照射组细胞肿胀, 程度较阴性 siRNA 转染+照射组轻 ($\times 60000$, 标尺 = $5 \mu\text{m}$) E~H: siRNA Neat1 转染+照射组细胞膜孔隙 (红色箭头) 形成, 但较阴性 siRNA 转染+照射组减少 ($\times 30000$, 标尺 = $1 \mu\text{m}$) I~L: 阴性 siRNA 转染+照射组线粒体肿胀明显, 呈空泡状, 线粒体嵴模糊, siRNA Neat1 转染+照射组线粒体肿胀程度较阴性 siRNA 转染+照射组明显减轻 ($\times 60000$, 标尺 = 500nm) 1: 阴性 siRNA 转染组; 2: siRNA Neat1 转染组; 3: 阴性 siRNA 转染+照射组; 4: siRNA Neat1 转染+照射组

Figure 7 Observation of cell morphological changes under a transmission electron microscope (Uranyl acetate+lead acetate) A~D: Cell swelling was lighter in siRNA Neat1 transfection+irradiation group than in negative siRNA transfection+irradiation group ($\times 60000$, bar = $5 \mu\text{m}$) E~H: Cell membrane pores (red arrows) were seen in siRNA Neat1 transfection+irradiation group, which were decreased in comparison with negative siRNA transfection+irradiation group ($\times 30000$, bar = $1 \mu\text{m}$) I~L: Mitochondria was swelling (white triangles) and vacuolated with fuzzy mitochondrial cristae in negative siRNA transfection+irradiation group, which were more serious than that in siRNA Neat1 transfection+irradiation group ($\times 60000$, bar = 500nm) 1: negative siRNA transfection group; 2: siRNA Neat1 transfection group; 3: negative siRNA transfection+irradiation group; 4: siRNA Neat1 transfection+irradiation group

GSDMD 的活性 N 端异位到细胞膜,形成跨膜孔^[18], IL-1 β 、IL-18 等因子从胞内释放,引发炎症反应,最终导致细胞肿胀、破裂^[19]。非经典途径由脂多糖直接激活 caspase-4/5/11,活化后的 caspase-4/5/11 作用于 GSDMD 导致其活化裂解,膜孔形成,引起焦亡^[20]。焦亡与凋亡形态学特征不同,焦亡发生时离子内流、细胞肿胀、膜孔形成,线粒体去极化,染色质凝集,而凋亡时细胞膜完整^[21]。Neat1 可与 caspase-1 前体 P20 结构域结合,促进 NLRP3 炎症小体的组装,增加 caspase-1 蛋白酶活性,促进细胞焦亡^[13]。细胞焦亡时,细胞膜孔隙形成,Annexin V-FITC 与 PI 进入细胞,细胞膜内磷脂酰丝氨酸与 Annexin V-FITC 结合从而染色,DNA 与 PI 结合从而染色,因此 Annexin V-FITC/PI 双阳的晚期凋亡可认为是细胞焦亡。

本研究发现,转染阴性 siRNA 的 HLE-B3 细胞经紫外线 B 照射后细胞肿胀程度高、线粒体去极化及膜孔形成均较多。但转染特异性 siRNA Neat1 沉默 Neat1 后,紫外线 B 照射的 HLE-B3 细胞肿胀程度、线粒体去极化程度及膜孔形成均减轻,并且细胞活力和细胞焦亡率均明显降低,表明 Neat1 确实参与了紫外线 B 诱导的 HLE-B3 细胞焦亡,沉默 Neat1 可以抑制焦亡发生,维持 HLE-B3 细胞形态。Caspase-1、NLRP3 和 GSDMD 是细胞焦亡经典途径的相关蛋白,本研究结果显示,沉默 Neat1 后再经紫外线 B 照射的 HLE-B3 细胞中 caspase-1、NLRP3 和 GSDMD 表达下调,且细胞因子 IL-1 β 分泌量减少,表明 siRNA Neat1 沉默 Neat1 抑制 HLE-B3 细胞焦亡可能有 caspase-1 依赖的焦亡经典途径的参与。

Neat1 主要分布在细胞核,在胃癌、食管癌、肺癌、结肠癌、肝癌等许多恶性肿瘤中高表达^[22],同时也可以促进视网膜细胞及 LECs 的上皮-间质转化^[14,23]。本研究结果显示,Neat1 通过 caspase-1 介导的焦亡经典途径参与紫外线 B 诱导的人 LECs 焦亡,沉默 Neat1 可以抑制 LECs 焦亡,维持 LECs 形态,推测沉默 Neat1 可能延缓白内障的发生。但本研究仅探讨了 Neat1 参与的经典焦亡途径,尚未研究具体经何种信号通路介导,因此,未来的研究将进一步探索 Neat1/caspase-1 通路的上下游调控网络,进而为预防白内障的形成提供新的治疗靶点。

利益冲突 所有作者均声明不存在任何利益冲突

作者贡献声明 王敏: 酝酿和设计实验、实施研究、采集数据、统计分析、分析/解释数据、起草及修改文章;王妍茜: 酝酿和设计实验、分析/解释数据、对文章的知识性内容作批评性审阅及指导;陈颖: 酝酿和设计实验、实施研究、分析/解释数据、对文章的知识性内容作批评性审阅;赵越越: 实施研究、分析/解释数据;杨涛: 分析/解释数据;康刚劲:

酝酿和设计实验、分析/解释数据、对文章的知识性内容作批评性审阅及定稿

参考文献

- [1] Zhou C, Huang X, Li X, et al. Circular RNA erythrocyte membrane protein band 4.1 assuages ultraviolet irradiation-induced apoptosis of lens epithelial cells by stimulating 5'-bisphosphate nucleotidase 1 in a miR-24-3p-dependent manner [J]. *Bioengineered*, 2021, 12 (1): 8953-8964. DOI: 10.1080/21655979.2021.1990196.
- [2] Delavar A, Freedman DM, Velazquez-Kronen R, et al. Ultraviolet radiation and incidence of cataracts in a nationwide US cohort [J]. *Ophthalmic Epidemiol*, 2018, 25 (5-6): 403-411. DOI: 10.1080/09286586.2018.1501077.
- [3] Chen X, Li P, Zhang G, et al. Comprehensive profiling of proteome and ubiquitome changes in human lens epithelial cell line after ultraviolet-B irradiation [J/OL]. *ACS Omega*, 2020, 5 (50): 32171-32182 [2022-10-23]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33376855/>. DOI: 10.1021/acsomega.0c03088.
- [4] Yoshitomi Y, Osada H, Satake H, et al. Ultraviolet B-induced Otx2 expression in lens epithelial cells promotes epithelial-mesenchymal transition [J/OL]. *Biol Open*, 2019, 8 (2): bio035691 [2022-10-23]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30718229/>. DOI: 10.1242/bio.035691.
- [5] Ivanov IV, Mappes T, Schaupp P, et al. Ultraviolet radiation oxidative stress affects eye health [J/OL]. *J Biophotonics*, 2018, 11 (7): e201700377 [2022-10-23]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29603665/>. DOI: 10.1002/jbio.201700377.
- [6] Sun Y, Rong X, Li D, et al. Down-regulation of CRTAC1 attenuates UVB-induced pyroptosis in HLECs through inhibiting ROS production [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 532 (1): 159-165. DOI: 10.1016/j.bbrc.2020.07.028.
- [7] Zhou T, Yang M, Zhang G, et al. Long non-coding RNA nuclear paraspeckle assembly transcript 1 protects human lens epithelial cells against H₂O₂ stimuli through the nuclear factor kappa b/p65 and p38/mitogen-activated protein kinase axis [J/OL]. *Ann Transl Med*, 2020, 8 (24): 1653 [2022-10-24]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33490165/>. DOI: 10.21037/atm-20-7365.
- [8] Zhang HS, Ouyang B, Ji XY, et al. Gastrodin alleviates cerebral ischaemia/reperfusion injury by inhibiting pyroptosis by regulating the lncRNA NEAT1/miR-22-3p axis [J]. *Neurochem Res*, 2021, 46 (7): 1747-1758. DOI: 10.1007/s11064-021-03285-2.
- [9] Chen H, Gan X, Li Y, et al. NLRP12- and NLRC4-mediated corneal epithelial pyroptosis is driven by GSDMD cleavage accompanied by IL-33 processing in dry eye [J]. *Ocul Surf*, 2020, 18 (4): 783-794. DOI: 10.1016/j.jtos.2020.07.001.
- [10] Li L, Xing C, Zhou J, et al. Airborne particulate matter (PM_{2.5}) triggers ocular hypertension and glaucoma through pyroptosis [J/OL]. *Part Fibre Toxicol*, 2021, 18 (1): 10 [2022-10-24]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33663554/>. DOI: 10.1186/s12989-021-00403-4.
- [11] 金鑫, 张红. 细胞焦亡与眼病 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2017, 35 (12): 1130-1133. DOI: 10.3760/ema.j.issn.2095-0160.2017.12.015.
- [12] Jin X, Zhang H. Pyroptosis and eye disease [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2017, 35 (12): 1130-1133. DOI: 10.3760/ema.j.issn.2095-0160.2017.12.015.
- [13] Knutsen E, Harris AL, Perander M. Expression and functions of long non-coding RNA NEAT1 and isoforms in breast cancer [J]. *Br J Cancer*, 2022, 126 (4): 551-561. DOI: 10.1038/s41416-021-01588-3.
- [14] Zhang P, Cao L, Zhou R, et al. The lncRNA Neat1 promotes activation of inflammasomes in macrophages [J/OL]. *Nat Commun*, 2019, 10 (1): 1495 [2022-10-24]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30940803/>. DOI: 10.1038/s41467-019-09482-6.
- [15] Dong N. Long noncoding RNA NEAT1 regulates TGF- β 2-induced epithelial-mesenchymal transition of lens epithelial cells through the

- miR-34a/Snail1 and miR-204/Zeb1 pathways [J/OL]. Biomed Res Int, 2020, 2020 : 8352579 [2022-10-24]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32596382/>. DOI: 10.1155/2020/8352579.
- [15] Duprez L, Wirawan E, Vanden Berghe T, et al. Major cell death pathways at a glance [J]. Microbes Infect, 2009, 11(13) : 1050-1062. DOI: 10.1016/j.micinf.2009.08.013.
- [16] Wang Y, Zhang M, Sun Y, et al. Role of short-wavelength blue light in the formation of cataracts and the expression of caspase-1, caspase-11, Gasdermin D in rat lens epithelial cells: insights into a novel pathogenic mechanism of cataracts [J/OL]. BMC Ophthalmol, 2020, 20(1) : 289 [2022-10-25]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32669096/>. DOI: 10.1186/s12886-020-01565-z.
- [17] 陈颖, 康刚劲, 王妍茜, 等. 17 β -雌二醇对晶状体上皮细胞的保护作用与细胞焦亡的相关性研究 [J]. 国际眼科杂志, 2021, 21(10) : 1680-1685. DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2021.10.03. Chen Y, Kang GJ, Wang YX, et al. Study on the relationship between the protective effect of 17 β -estradiol on human lens epithelial cells and cell pyroptosis [J]. Int Eye Sci, 2021, 21(10) : 1680-1685. DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2021.10.03.
- [18] Wang C, Ruan J. Mechanistic insights into gasdermin pore formation and regulation in pyroptosis [J/OL]. J Mol Biol, 2022, 434(4) : 167297 [2022-10-25]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34627790/>. DOI: 10.1016/j.jmb.2021.167297.
- [19] Burdette BE, Esparza AN, Zhu H, et al. Gasdermin D in pyroptosis [J]. Acta Pharm Sin B, 2021, 11(9) : 2768-2782. DOI: 10.1016/j.apsb.2021.02.006.
- [20] Zhang KJ, Wu Q, Jiang SM, et al. Pyroptosis: a new frontier in kidney diseases [J/OL]. Oxid Med Cell Longev, 2021, 2021 : 6686617 [2022-10-25]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34007404/>. DOI: 10.1155/2021/6686617.
- [21] Wang Y, Kanneganti TD. From pyroptosis, apoptosis and necroptosis to PANoptosis: a mechanistic compendium of programmed cell death pathways [J]. Comput Struct Biotechnol J, 2021, 19 : 4641-4657. DOI: 10.1016/j.csbj.2021.07.038.
- [22] Zhang S, Mang Y, Li L, et al. Long noncoding RNA NEAT1 changes exosome secretion and microRNA expression carried by exosomes in hepatocellular carcinoma cells [J]. J Gastrointest Oncol, 2021, 12(6) : 3033-3049. DOI: 10.21037/jgo-21-729.
- [23] Yang Y, Zhou J, Li WH, et al. LncRNA NEAT1 regulated diabetic retinal epithelial-mesenchymal transition through regulating miR-204/SOX4 axis [J/OL]. PeerJ, 2021, 9 : e11817 [2022-10-25]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34386303/>. DOI: 10.7717/peerj.11817.

(收稿日期: 2020-10-29 修回日期: 2023-04-21)

(本文编辑: 刘艳 施晓萌)

读者 · 作者 · 编者

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。 (4) 对论文的诚信负责。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的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。

本刊对论文中关键词的著录要求

本刊投稿的论文请分别在中英文摘要下方标引 3~8 个关键词以便于编制文献索引。关键词应选取能反映文章主题概念的词或词组, 中英文关键词应一致。投稿作者可登陆 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh> 或 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=mesh> 网站从美国国立医学图书馆的 MeSH 数据库中选取关键词, 其中文译名可参照中国医学科学院信息研究所编译的《医学主题词注释字顺表》。未被词表收录的新的专业术语 (自由词) 可直接作为关键词使用, 但应排序在最后。中医药关键词应从中国中医科学院中医药信息研究所编写的《中医药主题词表》中选取。关键词中的缩写词应按《医学主题词注释字顺表》还原为全称, 每个关键词之间用“;”分隔。

本刊征稿启事

《中华实验眼科杂志》是由中国科学技术协会主管、中华医学会主办、河南省眼科研究所 河南省立眼科医院承办的眼科专业学术期刊, 月刊, 每月 10 日出版。本刊的报道范围主要为眼科基础和临床研究领域领先的科研成果, 主要栏目设有专家述评、实验研究、临床研究、调查研究、综述、病例报告等, 学术内容涉及眼科疾病的基因学研究、基因诊断和基因靶向治疗、眼科遗传学研究、分子生物学研究、眼科微生物学研究、眼科药理学研究、眼科生物材料研究、眼科表观遗传研究、眼科疾病的动物模型、眼科疾病的流行病学研究、眼科疾病的多中心或单中心随机对照临床试验、循证医学临床实践及眼科疾病的临床研究等。本刊拟刊出海外学者的中文或英文原创性论文或评述类文章, 欢迎国内外眼科研究人员踊跃投稿。

(本刊编辑部)