

# 长链非编码 RNA-P21 在过氧化氢诱导的人晶状体上皮细胞损伤中的表达

董晓鸣<sup>1</sup> 刘雨轩<sup>1</sup> 纪力旻<sup>1</sup> 王静<sup>1,2</sup> 张劲松<sup>1</sup>

<sup>1</sup>沈阳爱尔卓越眼科医院 爱尔集团眼科医院集团白内障与人工晶状体研究所 沈阳爱尔眼科精准医疗研究所 中国医科大学附属第四医院眼科 中国医科大学眼科医院 辽宁省晶状体研究重点实验室, 沈阳 110000; <sup>2</sup>中南大学爱尔眼科学院, 长沙 410000

通信作者: 张劲松, Email: cmu\_zhangjinsong1@163.com

**【摘要】** 目的 检测过氧化氢诱导的人晶状体上皮细胞 HLE-B3 生物活性及长链非编码 RNA-p21 (lncRNA-p21) 的表达变化。方法 将 HLE-B3 细胞分为正常对照组和过氧化氢组, 分别用正常培养液和含 200  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢的培养液培养 24 h。采用 MTS 比色法检测细胞活力; 采用活性氧试剂盒检测细胞活性氧簇 (ROS) 的水平; 采用流式细胞术检测细胞凋亡情况; 采用 Caspase-3 活性试剂盒检测细胞 Caspase-3 活性; 采用 Western Blot 方法检测细胞凋亡相关 Bax, Bcl-2 蛋白表达; 采用流式细胞术检测细胞周期分布; 采用 EDU 增殖试剂盒检测细胞增殖能力; 采用实时荧光定量 PCR 法检测细胞中 lncRNA-p21 的表达; 采用荧光原位杂交实验法检测细胞中 lncRNA-p21 的定位。结果 过氧化氢组细胞 ROS 水平为  $4.65 \pm 0.38$ , 明显高于正常对照组的  $1.00 \pm 0.01$ , 差异具有统计学意义 ( $t = 16.66, P < 0.05$ )。与正常对照组相比, 过氧化氢组细胞凋亡率显著上升, Caspase-3 活性增强, 凋亡蛋白 Bax 相对表达量明显升高, 差异均有统计学意义 ( $t = 20.69, 39.80, 12.73$ , 均  $P < 0.05$ )。与正常对照组相比, 过氧化氢组 G2 期细胞比例明显增多, 差异有统计学意义 ( $t = 23.10, P < 0.05$ )。过氧化氢组 EDU 阳性细胞比例为  $(25.41 \pm 6.99)\%$ , 明显低于正常对照组的  $(50.58 \pm 9.15)\%$ , 差异具有统计学意义 ( $t = 6.559, P < 0.05$ )。过氧化氢组 lncRNA-p21 相对表达量为  $2.36 \pm 0.29$ , 明显高于正常对照组的  $1.02 \pm 0.02$ , 差异具有统计学意义 ( $t = 7.893, P < 0.05$ )。荧光原位杂交实验结果显示, lncRNA-p21 定位于细胞质中。结论 过氧化氢诱导的氧化应激模型中晶状体上皮细胞增殖能力显著降低、凋亡水平显著上升, ROS 和 lncRNA-p21 表达水平升高。lncRNA-p21 可能参与晶状体上皮细胞的氧化应激损伤过程。

**【关键词】** 晶状体上皮细胞; 长链非编码 RNA-p21; 增殖; 凋亡; 氧化应激

**基金项目:** 国家自然科学基金 (8187040881); 湖南省自然科学基金 (2021JJ40003); 沈阳市科学技术计划公共卫生研发专项 (21-173-9-12); 沈阳市中青年科技创新人才支持计划项目 (RC210388)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20221109-00522

## Expression of long-chain non-coding RNA-P21 in hydrogen peroxide induced human lens epithelial cells damage

Dong Xiaoming<sup>1</sup>, Liu Yuxuan<sup>1</sup>, Ji Liyang<sup>1</sup>, Wang Jing<sup>1,2</sup>, Zhang Jinsong<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Shenyang Aier Excellent Ophthalmology Hospital, Aier Group Ophthalmology Hospital Group Cataract and Artificial Lens Research Institute, Shenyang Aier Ophthalmology Precision Medical Research Institute, Ophthalmology Department of the Fourth Affiliated Hospital of China Medical University, China Medical University Ophthalmology Hospital, Liaoning Provincial Key Laboratory of Lens Research, Shenyang 110000, China; <sup>2</sup>Aier College of Ophthalmology, Central South University, Changsha 410000, China

Corresponding author: Zhang Jinsong, Email: cmu\_zhangjinsong1@163.com

**【Abstract】 Objective** To detect the changes in the biological activity and expression of long-chain non-coding RNA-p21 (lncRNA-p21) in human lens epithelial cells HLE-B3 damage induced by hydrogen peroxide.

**Methods** HLE-B3 cells were divided into normal control group and hydrogen peroxide group, which were cultured in normal culture medium and culture medium containing 200  $\mu\text{mol/L}$  hydrogen peroxide for 24 hours, respectively. Cell viability was determined by MTS colorimetric method. Cellular reactive oxygen species (ROS) level was detected using ROS assay kits. Cell apoptosis was tested by flow cytometry. Cell Caspase-3 activity was detected using Caspase-3 assay kit. Expressions of Bax and Bcl-2 proteins related to cell apoptosis were determined by Western Blot. Cell cycle distribution was determined by flow cytometry. Cell proliferation ability was detected by EDU proliferation assay

kit. The expression of lncRNA-p21 in cells was detected by real time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (PCR). The localization of lncRNA-p21 in cells was detected by fluorescence in situ hybridization.

**Results** The ROS content of cells in hydrogen peroxide group was  $(4.65 \pm 0.38)$ , significantly higher than  $(1.00 \pm 0.01)$  of normal control group, and the difference was statistically significant ( $t = 16.66, P < 0.05$ ). Compared with the normal control group, the cell apoptosis rate was significantly increased, the activity of Caspase-3 was enhanced, and the relative expression of Bax was significantly increased in the hydrogen peroxide group, with statistically significant differences ( $t = 20.69, 39.80, 12.73$ , all at  $P < 0.05$ ). Compared with the normal control group, the proportion of G2 phase cells in the hydrogen peroxide group significantly increased, showing a statistically significant difference ( $t = 23.10, P < 0.05$ ). The EDU-positive cell rate of hydrogen peroxide group was  $(25.41 \pm 6.99)\%$ , significantly lower than  $(50.58 \pm 9.15)\%$  of normal control group ( $t = 6.559, P < 0.05$ ). The relative expression level of lncRNA-p21 in the hydrogen peroxide group was  $2.36 \pm 0.29$ , significantly higher than  $1.02 \pm 0.02$  in the normal control group ( $t = 7.893, P < 0.05$ ). The fluorescence in situ hybridization experiments indicate that lncRNA-p21 was localized in the cytoplasm. **Conclusions** In the oxidative stress model induced by hydrogen peroxide, the proliferation ability of lens epithelial cells significantly decreases, the apoptosis level significantly increases, and the expression levels of ROS and lncRNA-p21 enhances. lncRNA-p21 may be involved in the oxidative stress injury process of lens epithelial cells.

**[Key words]** Lens epithelial cells; Long-chain non-coding RNA-p21; Proliferation; Apoptosis; Oxidative stress

**Fund program:** National Natural Science Foundation of China (8187040881); Hunan Natural Science Foundation Project (2021JJ40003); Shenyang Science and Technology Plan Public Health R&D Special Project (21-173-9-12); Shenyang Youth Science and Technology Innovation Talent Support Program Project (RC210388)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20221109-00522

白内障是世界上首要的致盲眼病,全球范围内有 2 000 万人因白内障而致盲,年龄相关性白内障 (age-related cataract, ARC) 是其中常见的一类,占比达 50% 以上<sup>[1]</sup>。房水的成分、晶状体囊的通透性、代谢紊乱等多种原因都可引起晶状体蛋白变性,导致晶状体混浊<sup>[2]</sup>。目前普遍认为氧化应激损伤所致的晶状体上皮细胞 (lens epithelial cells, LECs) 凋亡是除先天性白内障以外其他所有类型白内障形成的细胞学基础。本研究团队在前期研究中发现正常 LECs 中 p53 的 mRNA 及蛋白表达水平低,而在 ARC 的 LECs 中呈高表达,miRNA-125b 靶向 p53 促进 LECs 凋亡,导致晶状体发生混浊,表明 p53 在 ARC 的发生发展中具有重要调控作用<sup>[3]</sup>。p53 作为一种重要的转录因子,是氧化应激反应中调节细胞周期、凋亡的重要分子<sup>[4-5]</sup>。近年来,随着分子生物学技术的发展,已经发现长链非编码 RNA (long-chain non-coding RNA, lncRNA) 在眼部疾病中起着重要的调节作用,与 LECs 的增殖、迁移、分化、凋亡和晶体蛋白修饰密切相关<sup>[6-9]</sup>。2010 年, Huarte 等<sup>[10]</sup>在 p53 缺失型和野生型小鼠胚胎成纤维细胞 DNA 损伤模型中通过 lncRNAs 高通量筛选首次克隆出一种与 p53 表达密切相关的 lncRNA, lncRNA-p21。p53 可直接结合于 lncRNA-p21 的上游调控区,并正向调控 lncRNA-p21 转录水平。然而,关于 lncRNA-p21 在白内障发生和发展中的生物学功能

及调控机制研究报道较少见。本研究拟以人 LECs 系 HLE-B3 细胞为研究对象,通过过氧化氢诱导体外构建氧化损伤模型,验证 lncRNA-p21 在 ARC 细胞模型中的表达,明确其在增生凋亡、氧化应激中的生物学功能。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 细胞来源** 人 LECs 系 HLE-B3 由中国医科大学附属第四医院眼科晶状体实验室提供。

**1.1.2 主要试剂及仪器** 总蛋白提取试剂盒 (P0013B, 上海碧云天生物技术股份有限公司); PVDF 膜 (IPVH00010)、ECL 发光液 (WBKLS0100) (美国 Millipore 公司); 兔抗 Bax 抗体 (5023S)、兔抗 Bcl-2 抗体 (3498T) (美国 CST 公司); 鼠抗 GAPDH 抗体 (TA-08, 北京中杉金桥生物技术有限公司); 辣根过氧化物酶标记山羊抗鼠二抗 (31430)、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔二抗 (31460) (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 细胞周期检测试剂盒 (BHCK004) (辽宁佰昊生物科技有限公司); DMEM 培养基 (01-100-1ACS)、磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) (C3580-0500) (上海 VivaCell 公司); 胰蛋白酶 (03-050-1A)、胎牛血清 (04-002-1A) (上海道鹏生物科技有限公司); 3% 过氧化氢溶液 (88497, 瑞士 Sigma 公司); Caspase-3 活性试剂盒 (G015-1, 南京建成科技有限公

司);异丙醇(101636,成都艾科达化学试剂有限公司);氯仿(10006818)、多聚甲醛(80096618)(上海国药集团化学试剂有限公司);无水乙醇(868,沈阳瑞丰科技有限公司);RNAiso Plus 裂解液(9108,日本 TAKARA 公司);GoScript™ 逆转录试剂盒(A5001)、GoTaq® qPCR Master Mix 试剂盒(A6001)(美国 Promega 公司);活性氧检测试剂盒(S0033S)、EdU-555 细胞增殖试剂盒(C0075S)、TritonX-100(ST795)(上海碧云天生物技术股份有限公司);Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒(BMS500FI,美国 eBioscience 公司);DAPI 染色液(C0060)、抗荧光衰减封片剂(S2100)(北京索莱宝科技有限公司);荧光原位杂交试剂盒(Lnc1031589,广州市锐博生物科技有限公司)。流式细胞仪(EC201827C1,美国 Luminex 公司);PCR 仪(QuantStudio™ 3,美国 ABI 公司);化学发光成像仪(Tanon 5200,上海天能生命科学有限公司)。

## 1.2 方法

**1.2.1 MTS 比色法检测不同浓度过氧化氢处理细胞活力** 收集对数生长期 HEL-B3 细胞于 15 ml 离心管中,1 000 r/min(离心半径为 7 cm)离心 5 min,弃上清;PBS 清洗,低速离心后用培养基重悬,制备单细胞悬液,按照  $1 \times 10^4$ /孔接种至 96 孔板中,每组设 4 个复孔;置于 37 °C 培养箱中培养 6 h 至细胞贴壁。分别更换 0、25、50、100、200、400  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢浓度的培养基。培养 24 h 后,每孔加入 20  $\mu\text{l}$  MTS 检测试剂,于 5%  $\text{CO}_2$ 、37 °C 条件下孵育 0.5~1.0 h;于 492 nm 下读取吸光度(absorbance, A)值。细胞活力 =  $(A_{\text{实验组}} - A_{\text{空白孔}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白孔}}) \times 100\%$ 。

**1.2.2 MTS 比色法检测 200  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢处理不同时间点细胞活力** 取单细胞悬液,按照  $1 \times 10^4$ /孔接种至 96 孔板中,每组设 4 个复孔;置于 37 °C 培养箱中培养 6 h 至细胞贴壁。更换 200  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢的培养基。分别培养 0、6、12、24、48 h 后测量吸光度 A 值并计算细胞活力。

**1.2.3 细胞培养和分组** 取冻存的 LECsHLE-B3,加入含体积分数 10% 胎牛血清的培养基中,置于 37 °C、含体积分数 5%  $\text{CO}_2$  的培养箱中培养 48 h。将细胞分为正常对照组和过氧化氢组,过氧化氢组细胞用含 200  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢的培养基作用 24 h,正常对照组细胞自然生长不做处理。

**1.2.4 DCFH-DA 活性氧荧光探针法检测各组细胞内活性氧水平** 参照活性氧检测试剂盒说明,细胞进行分组培养,每组设 3 个复孔,用预温的 PBS 洗涤细胞 2 次,加入现配的无血清培养液稀释的 DCFH-DA(终浓

度 10  $\mu\text{mol/L}$ )200  $\mu\text{l}$ ,37 °C 孵育 20 min。设置荧光酶标仪激发波长为 488 nm,检测 525 nm 处 A 值,并计算各组相对正常对照组的活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)水平。

**1.2.5 流式细胞法检测各组细胞的凋亡** 取对数生长期细胞按照  $2 \times 10^5$ /孔接种至 6 孔板中,1 ml 每孔,分组处理细胞,每组设 3 个复孔。另设置不加染色剂的细胞样本作为阴性对照,再设置分别加 Annexin V-FITC 染液和 PI 染液的细胞样本作为单染对照。培养 48 h,收集细胞,用 PBS 洗 2 次,1 000 r/min 离心 5 min,收集细胞;加入 200  $\mu\text{l}$  Binding buffer 制备单细胞悬液,每管加入 5  $\mu\text{l}$  Annexin V-FITC 混匀后,室温避光孵育 10 min;用 200  $\mu\text{l}$  Binding buffer 清洗细胞,1 000 r/min 离心 5 min,收集细胞,加入 190  $\mu\text{l}$  Binding buffer 重悬细胞,加入 10  $\mu\text{l}$  PI 染色液混匀,室温下避光孵育 15 min,流式细胞仪上机检测。计算各组细胞凋亡率 = 早期凋亡细胞百分比 + 晚期凋亡细胞百分比。

**1.2.6 Caspase-3 活性试剂盒法检测各组细胞中 Caspase-3 的活性** 细胞分组培养,每组设 3 个复孔。PBS 洗涤 1 次,低速离心,弃去上清;按照每  $2 \times 10^6$  个细胞加入 50  $\mu\text{l}$  裂解液的比例添加裂解液,重悬并冰浴裂解 30 min,期间涡旋振荡 3~4 次,每次 10 s;12 000 r/min 4 °C 离心 10~15 min;小心吸取上清并转移至新 1.5 ml 离心管中,并放置冰上待用。采用 Bradford 法测定蛋白浓度,吸取含 100  $\mu\text{g}$  蛋白的细胞上清,用裂解液补足至 50  $\mu\text{l}$ ,加入 5  $\mu\text{l}$  Ac-DEVD-pNA 后混匀;37 °C 孵育 6 h 后,测定 405 nm 下 A 值,即各组 Caspase-3 活性。

**1.2.7 Western blot 法检测各组细胞中 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达** 收集各组细胞,利用蛋白快速提取试剂盒提取总蛋白,使用 BCA 法测定总蛋白浓度。利用 SDS-PAGE 电泳分离蛋白,并通过湿转膜方式将蛋白质转印到 PVDF 膜上。取 PVDF 膜,用 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h,加入 Bax、Bcl-2 或 GAPDH 一抗(均 1:1 000 稀释)4 °C 孵育过夜,用 TBST 洗膜 3 次,每次 10 min;加入相应二抗(1:10 000 稀释)室温摇床上孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次,每次 10 min;ECL 超敏显色液显色,采用化学发光成像仪进行拍照。采用 ImageJ 软件分析蛋白条带灰度值,以 GAPDH 为内参照,计算各组 Bax 和 Bcl-2 蛋白相对表达水平。

**1.2.8 流式细胞法检测各组细胞的周期分布** 取对数生长期细胞,按照  $3 \times 10^5$ /孔的密度接种至 6 孔板中进行分组处理,每组设 3 个复孔。处理 48 h 后,收集细胞悬液,1 000 r/min 离心 5 min,弃掉上清;加入 1 ml



PBS 重悬细胞,转移至 1.5 ml EP 管中,1 000 r/min 离心 5 min,弃掉上清;加入 1 ml 预冷的 70%乙醇,离心沉淀细胞,用 100  $\mu$ l PBS 重悬细胞。将细胞悬液逐滴加入 70%乙醇中,轻轻吹打混匀,-20  $^{\circ}$ C 固定过夜;1 000 r/min 低速离心 5 min,弃上清,加入 1 ml PBS 室温涡旋混匀 1 min;1 000 r/min 低速离心 5 min,弃上清;每管分别加入 475  $\mu$ l PBS,25  $\mu$ l 的 20 $\times$ PI 染色液,再加入 1  $\mu$ l RNaseA,混合均匀,室温避光孵育 30 min,流式细胞仪上机检测。

**1.2.9 EDU 实验法检测 HEL-B3 细胞的增殖能力** 取对数生长期细胞,按照  $1\times 10^5$ /孔接种在含有专用细胞爬片的 24 孔板中,分组培养,每组设 9 个复孔。按照 1:500 稀释比例,配置 2 $\times$ EdU 工作液;然后加入等体积 37  $^{\circ}$ C 预热的 2 $\times$ EdU 工作液,孵育细胞 2 h;4% 多聚甲醛溶液室温固定 15 min,PBS 漂洗 3 次,每次 5 min;配制 Click 反应液(24 孔板每孔量:Click Reaction Buffer 107.5  $\mu$ l;CuSO<sub>4</sub> 5  $\mu$ l;Azide 555 0.25  $\mu$ l;Click Additive Solution 12.5  $\mu$ l),室温避光孵育 30 min,PBS 漂洗 3 次,每次 5 min;DAPI 复染核,PBS 漂洗 3 次,每次 5 min;应用抗荧光淬灭剂封片,使用荧光显微镜进行拍照。

**1.2.10 实时荧光定量 PCR 法检测 HEL-B3 细胞 lncRNA-p21 表达水平** 细胞分组培养,每组设 3 个复孔。收集各组细胞,按照 RNA 提取试剂盒说明书步骤提取总 RNA 并测定浓度。使用逆转录试剂盒逆转录成 cDNA。PCR 反应条件:95  $^{\circ}$ C 预变性 10 min;95  $^{\circ}$ C 变性 15 s,60  $^{\circ}$ C 退火及延伸 60 s,共 40 个循环。lncRNA-p21 正向引物为 5'-GAGGGAGAGTTTTCTACTG AATAGCC-3',反向引物为 5'-GTAGTTTACTCAAAA GTGCAGAGCG-3';GAPDH 正向引物为 5'-TCAAGGC TGAGAACGGGAAG-3',反向引物为 5'-TGGACTCCACG ACGTACTCA-3'。以 GAPDH 为内参,采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算各组 lncRNA-p21 相对表达量。

**1.2.11 荧光原位杂交实验法检测细胞中 LncRNA-p21 的定位** 细胞分组培养,每组设 3 个复孔。取各组细胞,多聚甲醛固定 1 h,PBS 漂洗 3 次,每次 5 min;滴加 0.5% TritonX-100 室温孵育 10 min,PBS 漂洗 3 次,每次 5 min;滴加 20  $\mu$ l 预杂交液于样本上,盖膜后 37  $^{\circ}$ C 孵育封闭 30 min;将探针与杂交液按 1:39 比例配制杂交反应液,充分混匀,迅速置于冰上,滴加 20~40  $\mu$ l 杂交反应液于待测样本上,盖膜后 73  $^{\circ}$ C 共变性 5~8 min,快速转移至 37  $^{\circ}$ C 杂交过夜(16~20 h);甩净残液,放入蒸馏水中,浸泡 5 min,53  $^{\circ}$ C 预热的 25% 甲酰胺/2 $\times$ SSC 洗涤 2 次,每次

5 min,42  $^{\circ}$ C 预热的含 0.1% TritonX-100/2 $\times$ SSC 洗涤 2 次,每次 5 min,42  $^{\circ}$ C 预热的 0.5 $\times$ SSC 洗涤 5 min,42  $^{\circ}$ C 预热的 0.2 $\times$ SSC 洗涤 5 min;滴加 10~20  $\mu$ l DAPI 避光染色 10 min,PBS 洗涤 2 次,每次 5 min,避光晾干,滴加 10~20  $\mu$ l 抗荧光衰减封片剂封片,于正置荧光显微镜下观察并拍照。

### 1.3 统计学方法

采用 GraphPad Prism 8.0.2 统计学软件进行统计分析,计量数据经 Shapiro-Wilk 检验证实呈正态分布,以  $\bar{x}\pm s$  表示。过氧化氢组与正常对照组间各数据差异比较采用独立样本 *t* 检验;各不同浓度组及处理时间组间数据比较采用单因素方差分析,多重比较采用 Dunnett 检验。采用双尾检验, $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 过氧化氢诱导人 LECs 氧化损伤模型的构建

MTS 实验结果显示,空白对照组,25、50、100、200 和 400  $\mu$ mol/L 过氧化氢组细胞的存活率总体比较差异有统计学意义( $F=204.10,P<0.001$ ),呈浓度依赖的下降趋势,400  $\mu$ mol/L 过氧化氢组细胞活力显著降低,将 200  $\mu$ mol/L 作为本研究的后续实验浓度(表 1)。200  $\mu$ mol/L 的过氧化氢处理细胞不同时间点细胞存活率总体比较,差异有统计学意义( $F=47.49,P<0.001$ ),细胞的存活率呈时间依赖的下降趋势,其中处理 6、12、24 和 48 h 组细胞的存活率均明显低于未处理组,差异有统计学意义(均  $P<0.05$ ),以 24 h 作为本研究后续的处理时间(表 2)。

表 1 不同浓度的过氧化氢处理 24 h HLE-B3 细胞活力比较 ( $\bar{x}\pm s, \%$ )

Table 1 Comparison of HLE-B3 cell viability after 24-hour treatment with different concentrations of hydrogen peroxide ( $\bar{x}\pm s, \%$ )

组别	样本量	细胞活力
空白对照组	4	100.0 $\pm$ 0.0
25 $\mu$ mol/L 过氧化氢组	4	90.0 $\pm$ 6.4 <sup>a</sup>
50 $\mu$ mol/L 过氧化氢组	4	83.0 $\pm$ 4.3 <sup>a</sup>
100 $\mu$ mol/L 过氧化氢组	4	74.5 $\pm$ 8.6 <sup>a</sup>
200 $\mu$ mol/L 过氧化氢组	4	50.5 $\pm$ 3.1 <sup>a</sup>
400 $\mu$ mol/L 过氧化氢组	4	4.5 $\pm$ 1.0 <sup>a</sup>
<i>F</i> 值		204.10
<i>P</i> 值		<0.001

注:与空白对照组比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ (单因素方差分析,Dunnett 检验)

Note:Compared with blank control group,<sup>a</sup> $P<0.05$ (One-way ANOVA, Dunnett test)

**表 2 200 μmol/L 过氧化氢处理不同时间点 HLE-B3 细胞活力比较 ( $\bar{x}\pm s, \%$ )**  
**Table 2 Comparison of HLE-B3 cell viability at different time points after 200 μmol/L hydrogen peroxide induction ( $\bar{x}\pm s, \%$ )**

组别	样本量	细胞活力
未处理组	4	92.55±1.40
处理 6 h 组	4	79.28±8.39 <sup>a</sup>
处理 12 h 组	4	68.35±4.38 <sup>a</sup>
处理 24 h 组	4	55.40±3.93 <sup>a</sup>
处理 48 h 组	4	46.50±5.94 <sup>a</sup>
F 值		47.49
P 值		<0.001

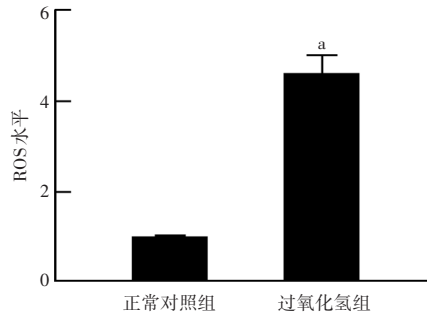
注:与未处理组相比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ (单因素方差分析,Dunnett 检验)

Note:Compared with control group,<sup>a</sup> $P<0.05$ (One-way ANOVA,Dunnett test)

**2.2 过氧化氢组和正常对照组细胞中 ROS 水平变化**  
 正常对照组和过氧化氢组细胞中 ROS 含量分别为  $1.00\pm 0.01$  和  $4.65\pm 0.38$ ,过氧化氢组细胞中 ROS 含量明显高于正常对照组,差异具有统计学意义( $t = 16.66, P < 0.05$ ) (图 1)。

**2.3 过氧化氢组和正常对照组细胞中凋亡水平变化**  
 流式细胞术结果显示,过氧化氢组细胞凋亡染色较正常对照组明显增多,正常对照组和过氧化氢组细胞凋亡率分别为 ( $0.37 \pm 0.07$ )% 和 ( $64.86 \pm 5.39$ )%,组间比较差异具有统计学意义( $t = 20.69, P < 0.05$ ) (图 2A、B)。

Caspase-3 活性试剂盒检测结果显示,正常对照组和过氧化氢组 Caspase-3 的活性分别为  $0.026 \pm 0.001$  和  $0.070 \pm 0.002$ ,与正常对照组相比,过氧化氢组 Caspase-3 的活性显著升高,差异具有统计学意义( $t = 39.80, P < 0.05$ ) (图 2C)。Western blot 结果显示,过氧化氢组 Bax 蛋白表达条带强度较正常对照组明显升高,正常对照组和过氧化氢组 Bax 蛋白相对表达量分别为  $0.59 \pm 0.07$  和  $1.19 \pm 0.04$ ,差异有统计学



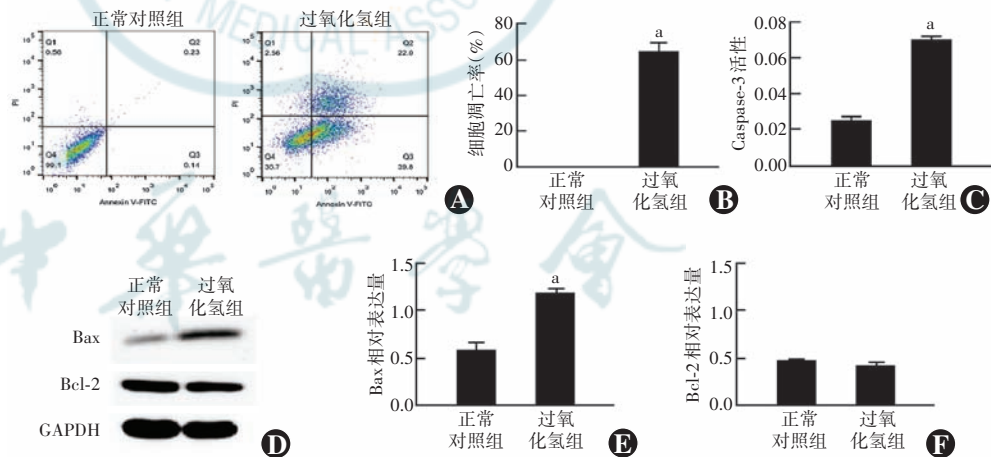
**图 1 过氧化氢组和正常对照组 HLE-B3 细胞中 ROS 水平比较**  
 与正常对照组比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ (独立样本  $t$  检验, $n = 3$ ) ROS:活性氧簇

**Figure 1 Comparison of ROS content in HLE-B3 cells between hydrogen peroxide group and normal control group** Compared with normal control group,<sup>a</sup> $P<0.05$ (Independent samples  $t$ -test, $n = 3$ ) ROS: relative oxygen species

意义( $t = 12.73, P < 0.05$ ) (图 2D、E);过氧化氢组 Bcl-2 蛋白相对表达量较正常对照组降低,但差异无统计学意义( $P > 0.05$ ) (图 2F)。

**2.4 过氧化氢组和正常对照组细胞增殖的变化**

与正常对照组相比,过氧化氢组 G2 期的 LECs 增多,正常对照组和过氧化氢组 G2 期细胞比例分别为 ( $9.34 \pm 1.01$ )% 和 ( $33.73 \pm 1.53$ )%,差异有统计学意义( $t = 23.10, P < 0.05$ ) (图 3A)。EdU 实验结果显示,



**图 2 过氧化氢组与正常对照组 LECs 凋亡水平比较** A:各组细胞凋亡流式细胞图 B:各组细胞凋亡率比较 与正常对照组相比,<sup>a</sup> $P<0.05$ (独立样本  $t$  检验; $n = 3$ ) C:各组细胞 Caspase-3 的活性比较 与正常对照组比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ (独立样本  $t$  检验; $n = 3$ ) D:各组 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达电泳图 E、F:各组 Bax 和 Bcl-2 蛋白相对表达量比较 与正常对照组相比,<sup>a</sup> $P<0.05$ (独立样本  $t$  检验; $n = 3$ )

**Figure 2 Comparison of LECs apoptosis between hydrogen peroxide group and normal control group** A:Flow cytometry analysis of cell apoptosis in two groups B:Comparison of cell apoptosis rates between two groups Compared with normal control group,<sup>a</sup> $P<0.05$ (Independent samples  $t$ -test; $n = 3$ ) C:Comparison of Caspase-3 activity between two groups Compared with normal control group,<sup>a</sup> $P<0.05$ (Independent samples  $t$ -test; $n = 3$ ) D:Electrophoretogram of Bax and Bcl-2 protein expression in two groups E-F:Comparison of relative expression levels of Bax and Bcl-2 proteins between two groups Compared with normal control group,<sup>a</sup> $P<0.05$ (Independent samples  $t$ -test; $n = 3$ )

过氧化氢组 EDU 阳性比例为  $(25.41 \pm 6.99)\%$ , 明显低于正常对照组的  $(50.58 \pm 9.15)\%$ , 差异有统计学意义 ( $t = 6.559, P < 0.05$ ) (图 3B)。

### 2.5 过氧化氢组和正常对照组 lncRNA-p21 的表达及细胞定位

过氧化氢组 lncRNA-p21 相对表达量为  $2.36 \pm 0.29$ , 明显高于正常对照组的  $1.02 \pm 0.02$ , 差异有统计学意义 ( $t = 7.893, P < 0.05$ ) (图 4A)。荧光原位杂交实验结果显示, lncRNA-p21 定位于细胞质中 (图 4B)。

### 3 讨论

随着人口老龄化, 白内障发病率逐年升高, 并严重影响国民眼健康水平与社会生产力能力。手术是目前治疗白内障唯一有效的方法, 虽然白内障手术设备及屈光性人工晶状体在不断更新换代, 但白内障的药物治疗领域尚未取得突破性进展<sup>[11-12]</sup>。因此, 进一步寻找切实可行的治疗靶点以延缓和阻止 ARC 的发生和

发展, 具有重要及深远的意义。lncRNAs 是近年来发现的一种具有生物学功能的非编码 RNA, 其转录本长度超过 200 nt, 在进化中高度保守, 参与了转录调节、染色质重塑及组蛋白修饰、可变剪接、分子海绵吸附 miRNAs、蛋白质的活性、定位及功能等功能<sup>[13-14]</sup>。然而, 关于 lncRNAs 在白内障发生和发展中生物学功能及调控机制的研究报道尚少<sup>[15]</sup>。Shen 等<sup>[16]</sup>发现 lncRNA MIAT 是白内障的特异性生物标志物, 并通过 miRNA-150-5p/Akt 参与调节 LECs 的功能, 对细胞存活、细胞增殖和凋亡有影响。此外, Cheng 等<sup>[17]</sup>发现, lncRNA H19 在 ARC 患者的晶状体中高表达, 敲除 lncRNA H19 可加重 UVB 辐射诱导的人 LECs 氧化损伤, 降低细胞存活率和增殖, 促进细胞的凋亡。

2010 年, Huarte 等<sup>[9]</sup>在 p53 缺失型和野生型小鼠胚胎成纤维细胞 DNA 损伤模型中通过 lncRNAs 高通量筛选首次克隆出一种与 p53 表达密切相关的长链非编码 RNA, lncRNA-p21, 位于 Ckdn1a(p21) 基因座上, 其编码区位于两条蛋白质编码基因之间, 是 5 种 lncRNAs 亚型中的一种。p53 可直接结合于 lncRNA-p21 的上游调控区, 并正向调控 lncRNA-p21 转录水平<sup>[18]</sup>。自 lncRNA-p21 的发现, 越来越多的研究表明, 其与肿瘤明显相关, 调控肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭<sup>[19-20]</sup>。Han 等<sup>[21]</sup>研究证实, lncRNA-p21 通过 miR130b/

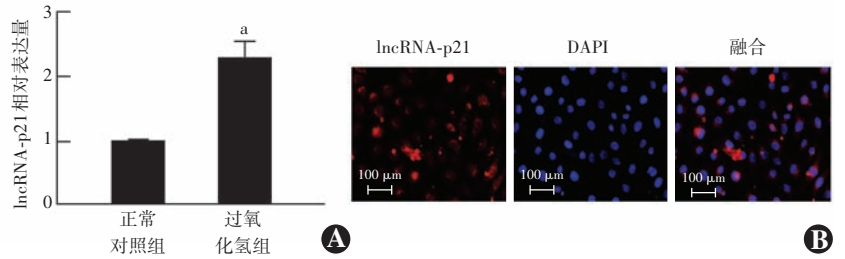


图 4 过氧化氢组和正常对照组 lncRNA-p21 表达及细胞定位 A: 与正常对照组相比,  $P < 0.05$  (独立样本  $t$  检验;  $n = 3$ ) B: 人晶状体上皮细胞 lncRNA-p21 定位的荧光原位杂交图 ( $\times 200$ , 标尺 =  $100 \mu\text{m}$ ) lncRNA-p21 呈红色荧光 (Cy3), 细胞核呈蓝色荧光 (DAPI), lncRNA-p21 定位于细胞质

Figure 4 lncRNA-p21 expression and cell localization in hydrogen peroxide group and normal control group A: Compared with normal control group,  $P < 0.05$  (Independent samples  $t$ -test;  $n = 3$ ) B: Fluorescence in situ hybridization map of lncRNA-p21 localization in human lens epithelial cells ( $\times 200$ , scale bar =  $100 \mu\text{m}$ ) lncRNA-p21 showed red fluorescence (Cy3) and nuclei were blue fluorescence (DAPI). lncRNA-p21 was located in the cytoplasm

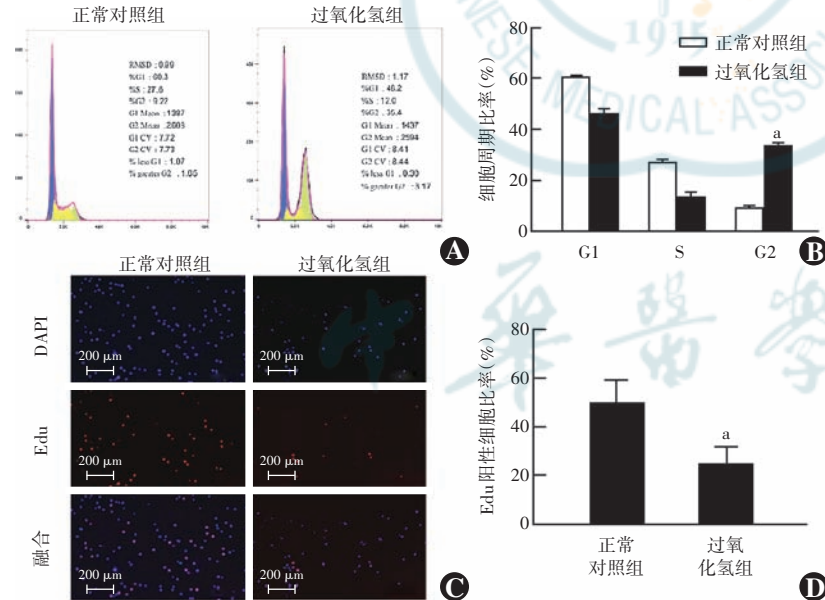


图 3 过氧化氢组和正常对照组 LECs 增殖能力比较 A: 各组细胞周期流式细胞图 B: 各组细胞周期分布比较 与正常对照组相比,  $P < 0.05$  (独立样本  $t$  检验;  $n = 3$ ) C: 各组细胞 EDU 染色免疫荧光图 (EDU  $\times 100$ , 标尺 =  $200 \mu\text{m}$ ) D: 各组细胞 EDU 阳性细胞百分比比较 与正常对照组相比,  $P < 0.05$  (独立样本  $t$  检验;  $n = 9$ )

Figure 3 Comparison of proliferation ability of LECs between hydrogen peroxide group and normal control group A: Flow cytometry of cell cycle in two groups B: Comparison of cell cycle distribution between two groups Compared with normal control group,  $P < 0.05$  (Independent samples  $t$ -test;  $n = 3$ ) C: Immunofluorescence of cells in two groups after EDU treatment (EDU  $\times 100$ , scale bar =  $200 \mu\text{m}$ ) D: Comparison of the percentage of EDU-positive cells between two groups Compared with normal control group,  $P < 0.05$  (Independent samples  $t$ -test;  $n = 9$ )



PTEN/AKT 信号通路抑制骨肉瘤细胞增殖。Shen 等<sup>[22]</sup>研究发现, lncRNA-p21 低表达通过 HIF-1/Akt/mTOR/P70S6K 信号通路减少自噬, 从而增加缺氧肿瘤细胞的放疗敏感性。Chen 等<sup>[23]</sup>发现 lncRNA-p21 通过靶向  $\beta$ -连环蛋白信号通路增强胃癌细胞的放疗敏感性。Wang 等<sup>[24]</sup>发现, lncRNA-p21 通过靶向  $\beta$ -catenin/Wnt 信号通路, 促进结直肠癌细胞的放疗敏感性。

目前普遍认为氧化应激损伤所致的 LECs 凋亡是除先天性白内障以外其他所有类型白内障形成的细胞学基础。细胞发生氧化损伤时内质网稳态受到干扰, 内质网未折叠蛋白/错误折叠蛋白发生堆积, 激活未折叠蛋白应答, 即内质网应激<sup>[25-26]</sup>。在本研究中, 过氧化氢组 HLE-B3 细胞 ROS 含量显著上升, 同时细胞凋亡率和 Bax 蛋白表达显著增加, Bcl-2 蛋白表达降低, 凋亡蛋白 Caspase-3 的活性也显著增强。本研究结果还显示, 过氧化氢组处于 G2 期的细胞百分比升高, 表明细胞在 G2 期发生阻滞, 最终抑制细胞增殖; 过氧化氢组 EDU 阳性细胞比例明显降低, 说明 HLE-B3 细胞存活率降低, 过氧化氢可诱导 LECs 损伤。

lncRNA 发挥作用主要取决于其细胞定位, 在细胞核中, lncRNA 能够调节转录, 通常通过充当支架来组装大型染色质重构复合物<sup>[27-28]</sup>; 在细胞质中, lncRNA 可以充当竞争性内源 RNA (ceRNA), 与其他 RNA 转录本竞争相同的 miRNA, 从而导致相互作用和后续调控<sup>[29-30]</sup>。本研究通过荧光原位杂交法发现 lncRNA-p21 定位于细胞质中, 推测其可能通过控制 miRNA 表达来影响其靶基因的表达量。然而本研究未验证 lncRNA-p21 敲减后对细胞氧化应激损伤的影响, 未来需进一步实验验证其因果关系。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

**作者贡献声明** 董晓鸣: 研究实施、数据采集及分析/解释、文章起草及修改; 刘雨轩: 研究实施、数据采集; 纪力响: 酝酿和设计实验; 王静: 统计分析、指导研究; 张劲松: 直接参与选题、酝酿和设计实验、对文章的知识性内容作批评性审阅及定稿

## 参考文献

- [1] Flaxman SR, Bourne R, Resnikoff S, et al. Global causes of blindness and distance vision impairment 1990—2020: a systematic review and meta-analysis [J/OL]. *Lancet Glob Health*, 2017, 5 (12): e1221-e1234 [2023-06-12]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29032195>. DOI: 10.1016/S2214-109X(17)30393-5.
- [2] Liu YC, Wilkins M, Kim T, et al. Cataracts [J]. *Lancet*, 2017, 390(10094): 600-612. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)30544-5.
- [3] Qin Y, Zhao J, Min X, et al. MicroRNA-125b inhibits lens epithelial cell apoptosis by targeting p53 in age-related cataract [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1842(12 Pt A): 2439-2447. DOI: 10.1016/j.bbdis.2014.10.002.
- [4] Li T, Kon N, Jiang L, et al. Tumor suppression in the absence of p53-mediated cell-cycle arrest, apoptosis, and senescence [J]. *Cell*, 2012, 149(6): 1269-1283. DOI: 10.1016/j.cell.2012.04.026.
- [5] Kasthuber ER, Lowe SW. Putting p53 in context [J]. *Cell*, 2017, 170(6): 1062-1078. DOI: 10.1016/j.cell.2017.08.028.
- [6] Cissé Y, Bai L, Meng T. LncRNAs in genetic basis of glaucoma [J/OL]. *BMJ Open Ophthalmol*, 2018, 3(1): e000131 [2023-06-12]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29963644>. DOI: 10.1136/bmjophth-2017-000131.
- [7] Raut SK, Khullar M. The big entity of new RNA world: long non-coding RNAs in microvascular complications of diabetes [J/OL]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2018, 9: 300 [2023-06-12]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29915562>. DOI: 10.3389/fendo.2018.00300.
- [8] Liu X, Liu C, Shan K, et al. Long non-coding RNA H19 regulates human lens epithelial cells function [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 50(1): 246-260. DOI: 10.1159/000494003.
- [9] Du S, Shao J, Qi Y, et al. Long non-coding RNA ANRIL alleviates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced injury by up-regulating microRNA-21 in human lens epithelial cells [J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(8): 6543-6557. DOI: 10.18632/aging.102800.
- [10] Huarte M, Guttman M, Feldser D, et al. A large intergenic noncoding RNA induced by p53 mediates global gene repression in the p53 response [J]. *Cell*, 2010, 142(3): 409-419. DOI: 10.1016/j.cell.2010.06.040.
- [11] Peng C, Zhao J, Ma L, et al. Optical performance after bilateral implantation of apodized aspheric diffractive multifocal intraocular lenses with +3.00-D addition power [J/OL]. *Acta Ophthalmol*, 2012, 90(8): e586-e593 [2023-06-12]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23194310>. DOI: 10.1111/j.1755-3768.2012.02497.x.
- [12] Peng C, Zhao JY, Zhang JS. Aspheric multifocal intraocular lens [J]. *Ophthalmology*, 2012, 119(2): 423-423. DOI: 10.1016/j.ophtha.2011.09.036.
- [13] Quinn JJ, Chang HY. Unique features of long non-coding RNA biogenesis and function [J]. *Nat Rev Genet*, 2016, 17(1): 47-62. DOI: 10.1038/nrg.2015.10.
- [14] Batista PJ, Chang HY. Long noncoding RNAs: cellular address codes in development and disease [J]. *Cell*, 2013, 152(6): 1298-1307. DOI: 10.1016/j.cell.2013.02.012.
- [15] Li G, Song H, Chen L, et al. TUG1 promotes lens epithelial cell apoptosis by regulating miR-421/caspase-3 axis in age-related cataract [J]. *Exp Cell Res*, 2017, 356(1): 20-27. DOI: 10.1016/j.yexcr.2017.04.002.
- [16] Shen Y, Dong LF, Zhou RM, et al. Role of long non-coding RNA MIAT in proliferation, apoptosis and migration of lens epithelial cells: a clinical and *in vitro* study [J]. *J Cell Mol Med*, 2016, 20(3): 537-548. DOI: 10.1111/jcmm.12755.
- [17] Cheng T, Xu M, Qin B, et al. lncRNA H19 contributes to oxidative damage repair in the early age-related cataract by regulating miR-29a/TDG axis [J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(9): 6131-6139. DOI: 10.1111/jcmm.14489.
- [18] Li T, Kon N, Jiang L, et al. Tumor suppression in the absence of p53-mediated cell-cycle arrest, apoptosis, and senescence [J]. *Cell*, 2012, 149(6): 1269-1283. DOI: 10.1016/j.cell.2012.04.026.
- [19] Yang W, Yu H, Shen Y, et al. MiR-146b-5p overexpression attenuates stemness and radioresistance of glioma stem cells by targeting HuR/lncRNA-p21/ $\beta$ -catenin pathway [J/OL]. *Oncotarget*, 2016, 7(27): 41505-41526 [2023-06-16]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27166258>. DOI: 10.18632/oncotarget.9214.
- [20] Yu F, Guo Y, Chen B, et al. LincRNA-p21 inhibits the Wnt/ $\beta$ -Catenin pathway in activated hepatic stellate cells via sponging microRNA-17-5p [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 41(5): 1970-1980. DOI: 10.1159/000472410.
- [21] Han W, Liu J. LncRNA-p21 inhibited the proliferation of osteosarcoma cells via the miR-130b/PTEN/AKT signaling pathway [J]. *Biomed*



- Pharmacother, 2018, 97: 911–918. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.11.014.
- [22] Shen Y, Liu Y, Sun T, et al. LincRNA-p21 knockdown enhances radiosensitivity of hypoxic tumor cells by reducing autophagy through HIF-1/Akt/mTOR/P70S6K pathway[J]. Exp Cell Res, 2017, 358(2): 188–198. DOI: 10.1016/j.yexcr.2017.06.016.
- [23] Chen L, Yuan D, Yang Y, et al. LincRNA-p21 enhances the sensitivity of radiotherapy for gastric cancer by targeting the  $\beta$ -catenin signaling pathway[J]. J Cell Biochem, 2019, 120(4): 6178–6187. DOI: 10.1002/jcb.27905.
- [24] Wang G, Li Z, Zhao Q, et al. LincRNA-p21 enhances the sensitivity of radiotherapy for human colorectal cancer by targeting the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway[J]. Oncol Rep, 2014, 31(4): 1839–1845. DOI: 10.3892/or.2014.3047.
- [25] Pluquet O, Pourtier A, Abbadie C. The unfolded protein response and cellular senescence. A review in the theme: cellular mechanisms of endoplasmic reticulum stress signaling in health and disease[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2015, 308(6): C415–425. DOI: 10.1152/ajpcell.00334.2014.
- [26] Dufey E, Sepúlveda D, Rojas-Rivera D, et al. Cellular mechanisms of endoplasmic reticulum stress signaling in health and disease. 1. An overview[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2014, 307(7): C582–594. DOI: 10.1152/ajpcell.00258.2014.
- [27] Kuo CC, Hänzelmann S, Sentürk Cetin N, et al. Detection of RNA-DNA binding sites in long noncoding RNAs[J/OL]. Nucleic Acids Res, 2019, 47(6): e32[2023-06-20]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30698727>. DOI: 10.1093/nar/gkz037.
- [28] Wang F, Chainani P, White T, et al. Deep learning identifies genome-wide DNA binding sites of long noncoding RNAs[J]. RNA Biol, 2018, 15(12): 1468–1476. DOI: 10.1080/15476286.2018.1551704.
- [29] Salmena L, Poliseno L, Tay Y, et al. A ceRNA hypothesis: the Rosetta Stone of a hidden RNA language? [J]. Cell, 2011, 146(3): 353–358. DOI: 10.1016/j.cell.2011.07.014.
- [30] Karreth FA, Tay Y, Perna D, et al. In vivo identification of tumor-suppressive PTEN ceRNAs in an oncogenic BRAF-induced mouse model of melanoma[J]. Cell, 2011, 147(2): 382–395. DOI: 10.1016/j.cell.2011.09.032.

(收稿日期: 2023-08-26 修回日期: 2024-02-23)

(本文编辑: 张宇 骆世平)

读者·作者·编者

## 本刊对论文中统计学方法描述的要求

研究论文如有量化测试指标时须有统计学分析的内容,并在方法部分提供统计学方法的描述,反应变量为单变量时请提供测量指标数据资料的性质(如计量数据资料及计数数据资料的表达方式)、多个样本计量数据资料正态分布检验方法的名称及方差齐性检验方法的名称、实(试)验设计方法及与之相匹配的统计学设计(如配对设计、成组设计、交叉设计、析因设计、正交设计等)、与统计设计相应的统计方法名称(如  $t$  检验、方差分析)以及检验水准。选择方差分析统计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。反应变量为双变量时,应根据实(试)验设计正确选择简单直线相关分析、回归分析或其他方法,不宜简单套用直线相关分析。统计学的检验水准请提供为双侧检验或单侧检验。论文结果部分的统计学分析内容可用相应的图表表达。

统计学符号的著录执行 GB/T 3358.1—2009/ISO 3534-1:2006《统计学词汇及符号》的有关规定,统计学符号一律采用斜体,如样本量用  $n$ ; 样本的算术平均数用英文小写 mean; 中位数用英文斜体大写  $M$ , 标准差用英文大写 SD, 样本均数的标准误用英文小写  $\sigma_{\bar{x}}$ ,  $t$  检验用英文小写  $t$ ,  $F$  检验用英文大写  $F$ , 卡方检验用希腊小写  $\chi^2$ , 相关系数用英文小写  $r$ , 秩相关分析相关系数用  $r_s$ , 确定系数用  $R^2$ , 自由度用希腊小写  $\nu$ ; 概率用英文大写  $P$ ; 检验水准用  $\alpha$ 。统计结果的解释和表达采用对比组或比较对象之间差异有统计学意义的描述方法,而不用对比组之间差异具有显著性(或非常显著性)的描述。论文的统计学分析结果提倡提供统计学检验量值和  $P$  值的具体数据,如不能提供  $P$  值的具体数据时,必须提供统计学检验量值如  $\chi^2$  值、 $t$  值、 $F$  值等。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(CI)。

## 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。

(本刊编辑部)