

# 血竭素高氯酸盐促进离体兔角膜基质细胞凋亡的作用

韩晓丽 朱梅红 胡建章 徐国兴

## Effect of dracorhodin perchlorate on apoptosis of rabbit keratocyte in vitro

Han Xiaoli, Zhu Meihong, Hu Jianzhang, Xu Guoxing. Department of Ophthalmology, Affiliated First Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350005, China

**Abstract Objective** Present study was to investigate the proliferation inhibition of rabbit keratocyte in vitro after intervention of dracorhodin perchlorate and the effect of dracorhodin perchlorate on the cell apoptosis, thus to supply a new method for the clinical prevention and management of corneal scar. **Methods** The eyeballs were obtained from 18 New Zealand white rabbits. Rabbit keratocytes were cultured by tissue explant culture technique in DMEM/F12 medium containing 10% fetal bovine serum and passaged in trypsinase containing EDTA. 10, 20, 40, 80  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of dracorhodin perchlorate was added in medium for the inhibiting rate of cells proliferation using MTT colorimetry. The apoptosis of the keratocytes were examined under the electron microscope 24 hours after exposure to dracorhodin perchlorate. Flow cytometry was used to analyze the apoptosis rate of keratocytes. **Results** The third generation of corneal stromal cells showed the positive response for vimentin antibody, showing the red fluorescence. The corneal epithelial cells presented the positive response for cytokeratin 12 antibody, showing the green fluorescence. The  $\text{IC}_{50}$  of dracorhodin perchlorate was 47.72, 41.40 and 32.01 in 24, 48 and 72 hours after intervention of dracorhodin perchlorate respectively. MTT colorimetry showed that the inhibitory rate of dracorhodin perchlorate was obviously increased in a concentration-dependent manner. Apoptotic keratocytes were seen under the electron microscope. Flow cytometry showed the apoptosis rate of cells was gradually raised with concentration increase of dracorhodin perchlorate in 24, 48 and 72 hours after intervention of dracorhodin perchlorate ( $P < 0.01$ ). The significant correlations were seen between concentration of dracorhodin perchlorate and inhibitory rate in 24, 48 and 72 hours ( $r = 0.984, P < 0.01; r = 0.947, P = 0.007; r = 0.920, P = 0.03$ ). **Conclusion** Dracorhodin perchlorate inhibits the proliferation of rabbit keratocyte in vitro at a concentration-dependent manner.

**Key words** keratocyte; dracorhodin perchlorate; apoptosis

**摘要 目的** 观察天然药物血竭素高氯酸盐(Dp)对离体兔角膜基质细胞增生的抑制作用,探讨其对细胞凋亡的影响,为临床上角膜瘢痕的防治提供新思路。**方法** 新西兰白兔 18 只,采用组织块培养法,在含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液中培养兔角膜基质细胞,通过含有 EDTA 的胰蛋白酶消化进行传代。采用四甲基偶氮唑盐(MTT)比色法检测不同质量浓度 Dp (10 ~ 80  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 对细胞生长的抑制率,电镜观察 Dp 作用后角膜细胞的凋亡情况,流式细胞术(FCM)检测 Dp 作用后细胞凋亡率。**结果** 第 3 代角膜基质细胞呈现对波形蛋白单克隆抗体阳性反应和对角蛋白 12 多克隆抗体的阴性反应。角膜上皮细胞对角蛋白 12 抗体呈现绿色的荧光反应。Dp 作用 24、48、72 h 后,其  $\text{IC}_{50}$  分别为 47.72、41.40、32.01  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。MTT 比色法显示 Dp 对角膜基质细胞的抑制率呈现明显的质量浓度依赖性;电镜可观察到角膜细胞的凋亡;FCM 检测 Dp 作用 24 h 的细胞凋亡率呈剂量依赖性升高( $P < 0.01$ )。在 Dp 作用后 24、48、72 h, Dp 质量浓度与抑制率呈正相关( $r = 0.984, P < 0.01; r = 0.947, P = 0.007; r = 0.920, P = 0.03$ )。**结论** Dp 对兔角膜基质细胞的增生具有显著的抑制作用,且呈量效关系促进角膜基质细胞发生凋亡。

**关键词** 角膜基质细胞; 血竭素高氯酸盐; 凋亡

**分类号** R 772.2 R 988.1 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)09-0755-05

作者单位:350005 福州,福建医科大学附属第一医院眼科(韩晓丽、胡建章、徐国兴);362000 泉州,福建医科大学附属泉州市第一医院眼科(朱梅红)

通讯作者:韩晓丽 (Email: hxlflk@163.com)

角膜瘢痕是影响视力的重要原因之一。各种原因如炎症、外伤、手术等损伤至角膜基质层时,最终均形成角膜瘢痕。研究表明,角膜基质细胞在角膜的创伤

愈合中发挥极其重要的作用<sup>[1-2]</sup>。当损伤至角膜基质层时,上皮基底膜断裂,从上皮细胞分泌的相关细胞因子进入基质层,促进基质层中角膜基质细胞的活化、增生、移行及向成纤维细胞的转化,同时分泌大量细胞外基质及不规则排列的粗大胶原纤维,造成瘢痕形成,角膜透明度下降,致使患者视力减退。有报道从天然药物血竭中提取的一种活性成分血竭素高氯酸盐(dracorhodin perchlorate, Dp)对体外培养的瘢痕成纤维细胞(fibroblast, FB)的增生和胶原合成具有明显的抑制作用<sup>[3-4]</sup>。本研究将Dp作用于体外培养的兔角膜基质细胞,观察其对角膜基质细胞增生的影响,为角膜瘢痕防治的可行性提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** 健康新西兰白兔18只(许可证号:SCXK(沪)2003-0003,上海斯莱克实验动物有限责任公司),体重2.0~2.5 kg,雌雄兼用,无明显眼部疾患。

**1.1.2 主要试剂及仪器** Dp(中国药品生物制品检定所);胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司);DMEM/F12培养基(北京海克隆生物化学制品有限公司);二甲基亚砜(dimethylsulfoxide, DMSO)(美国Sigma公司);四甲基偶氮唑盐(MTT)(上海华舜生物公司);胰蛋白酶(深圳市赛泰克生物科技有限公司);鼠抗兔波形蛋白单克隆抗体(V-2258,美国Sigma公司);抗小鼠IgG-CY3(上海碧云天生物技术研究所);羊抗兔细胞角蛋白12(N-16)多克隆抗体(sc-17098)、驴抗羊IgG-FITC(sc-2024)(美国Santa Cruz公司);细胞周期流式细胞分析试剂盒(美国Beckman-Coulter公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 兔角膜基质细胞的培养、传代及鉴定** 采用“组织块法”进行原代培养<sup>[5]</sup>。即通过耳缘静脉注射空气将兔致死,无菌条件下摘除眼球,乙醇浸泡5 s,平衡盐液(PBS)冲洗3次,沿角膜缘内1 mm处剪下角膜(不含角巩膜缘),在解剖显微镜下取基质层,并将其剪成约2 mm<sup>2</sup>大小的组织片,放入6孔板中,每孔约5块,加入DMEM/F12培养液(内含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素、50 U/mL庆大霉素)。8~10 d后,见角膜基质细胞从组织块长出。原代培养的细胞在生长至融合度约为80%时,0.25%含有EDTA的胰蛋白酶消化传代。将传至第3代的细胞采用鼠抗兔波形蛋白单克隆抗体(一抗)、小鼠IgG-CY3(二抗)以及羊抗兔角蛋白12(N-16)多克隆抗体(一抗)、驴抗羊IgG-

FITC(二抗)的免疫细胞化学鉴定。

**1.2.2 MTT比色法检测Dp对角膜基质细胞增生的影响** 将传至第3代的兔角膜基质细胞接种于96孔培养板中,每孔的细胞数约为10<sup>4</sup>个,每孔体积200 μL。于接种后的第2天,弃去培养液,分别加入终质量浓度为10、20、40、80 μg/mL的Dp培养液,同时设空白对照组和阴性对照组,各组设6个复孔。分别培养24、48、72 h后,进行常规MTT法测定光吸收值(A),计算抑制率。抑制率(%)=[(阴性对照组A值-实验组A值)/阴性对照组A值]×100%。同时利用回归方程求出Dp的中效抑制质量浓度(IC<sub>50</sub>)。实验重复3次。

**1.2.3 角膜基质细胞凋亡形态学检查** 将细胞接种于100 mL的培养瓶中,共4瓶。至细胞融合度为60%时,弃去培养液,实验组加入终质量浓度为10、20、40 μg/mL的Dp培养液,对照组仅加培养液,培养24 h后收集细胞。经3%戊二醛-1.5%多聚甲醛前固定数日(或数小时)(4℃),1%锇酸-1.5%亚铁氰化钾后固定1.5 h, PBS漂洗;70%乙醇饱和醋酸铀染液块染,乙醇-丙酮梯度脱水,环氧树脂618包埋剂包埋。超薄切片80 nm,醋酸铀、柠檬酸铅各染色5 min;在日立Hu-12A型或飞利浦EM208型透射电镜下观察、摄影。

**1.2.4 流式细胞仪检测细胞凋亡** 将角膜基质细胞接种于100 mL的培养瓶中,共5瓶。至细胞的融合度为60%时,弃去培养液,实验组分别加入终质量浓度为10、20、40、60 μg/mL Dp的培养液,对照组仅加培养液,培养24 h后收集细胞,按照Annexin v-FITC凋亡试剂盒的说明书进行操作,流式细胞仪检测。

### 1.3 统计学方法

采用SPSS 11.5统计学软件进行统计学分析,各测试指标的数据资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组数据资料的方差齐性检验采用Levene分析。若方差齐,采用单因素方差分析,组间的两两比较用LSD-*t*检验;方差不齐的数据资料采用Kruskal-Wallis秩和检验,组间的两两比较采用Tamhane检验;两变量间的相关关系采用直线相关回归分析。*P* < 0.05为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 角膜基质细胞的形态学观察及鉴定

组织块接种后8~10 d,见细胞从组织块边缘游离出来,单层、长短不等的数个突起,核椭圆、居中(图1A)。细胞长出后5 d基本融合,呈漩涡状、束状排列(图1B)。抗波形蛋白单克隆抗体(图1C)、抗角蛋白12多克隆抗体鉴定阳性(图1D)。

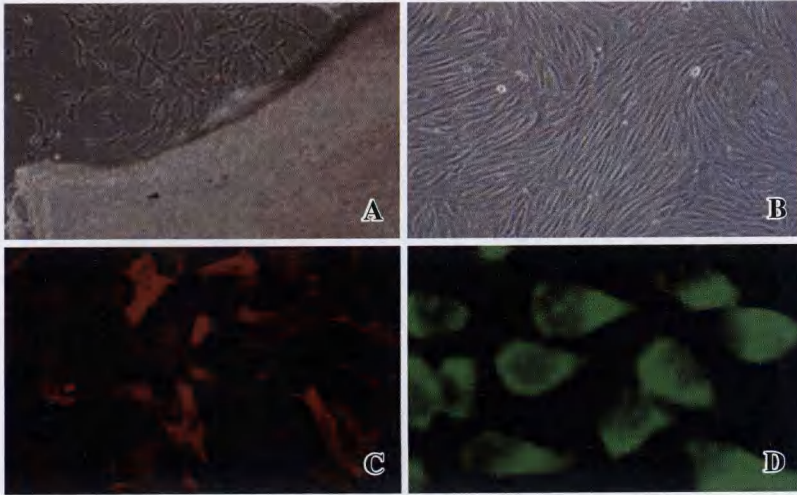


图 1 角膜基质细胞的原代培养及鉴定 A:角膜基质细胞从组织块游离出 B:角膜基质细胞原代培养 C:角膜基质细胞波形蛋白免疫荧光化学染色鉴定 D:角膜上皮细胞角蛋白 12 免疫荧光化学染色鉴定  
Fig. 1 Primary culture and identification of keratocyte A:Keratocytes migrate from cultured tissue B:primary culture of keratocyte C:Keratocytes show red fluorescence for vimentin D:Corneal epithelial cells present green fluorescence for CK12

### 2.2 Dp 对角膜基质细胞增生的影响

MTT 比色法检测 Dp 对兔角膜基质细胞的抑制作用,表明在作用后 24、48、72 h 不同质量浓度的 Dp 对角膜基质细胞抑制率的总体差异均有统计学意义 ( $F = 1\ 047.285, P < 0.01$ ;  $F = 2\ 441.144, P < 0.01$ ;  $F = 3\ 287.572, P < 0.01$ )。各质量浓度间的两两比较差异均有统计学意义 ( $P < 0.01$ ) (表 1)。根据公式计算出抑制率,显示出明显的剂量-效应及时间-效应依赖关系。3 个时间点的 Dp 质量浓度与抑制率的相关系数及回归方程分别为:24 h 时  $\hat{Y} = -15.328 + 1.369X$  ( $r = 0.984, P < 0.01$ );48 h 时  $\hat{Y} = -10.479 + 1.461X$  ( $r = 0.947, P = 0.007$ );72 h 时  $\hat{Y} = 9.096 + 1.278 X$

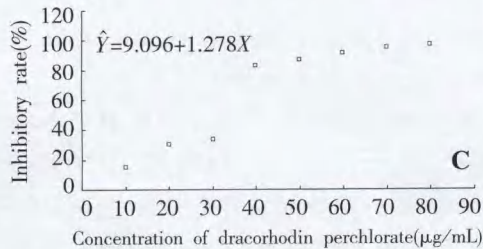
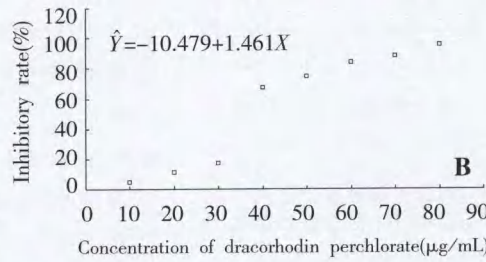
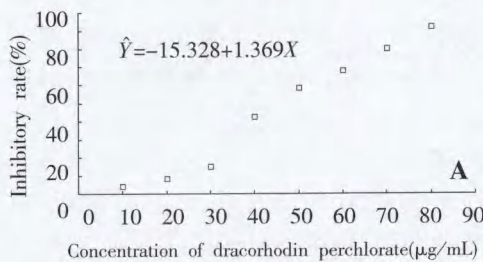


图 2 Dp 质量浓度与 Dp 对细胞生长抑制率的直线回归关系散点图 A: Dp 作用 24 h B: Dp 作用 48 h C: Dp 作用 72 h  
Fig. 2 Scatter plot of regression analysis of concentration of dracorhodin perchlorate and inhibitory rate A: dracorhodin perchlorate for 24 hours ( $r = 0.984, P < 0.01$ ) B: dracorhodin perchlorate for 48 hours ( $r = 0.947, P = 0.007$ ) C: dracorhodin perchlorate for 72 hours ( $r = 0.920, P = 0.03$ )

( $r = 0.920, P = 0.03$ ) (图 2)。同时利用回归方程求出 3 个时间点 Dp 的  $IC_{50}$ , 分别为 47.721、41.40、32.01  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

表 1 不同质量浓度 Dp 作用于角膜基质细胞 24、48、72 h 的抑制率比较 ( $\bar{x} \pm s, \%$ )  
Table 1 Inhibitory rate of dracorhodin perchlorate on cell growth in different time ( $\bar{x} \pm s, \%$ )

Dracorhodin perchlorate ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Inhibiting rate in different time (%)		
	24 h	48 h	72 h
10	4.43 $\pm$ 2.30	4.47 $\pm$ 2.56	15.19 $\pm$ 0.93
20	8.48 $\pm$ 3.62	11.22 $\pm$ 2.94	30.40 $\pm$ 1.48
30	15.02 $\pm$ 3.22	17.28 $\pm$ 1.67	33.49 $\pm$ 1.97
40	42.82 $\pm$ 2.77	67.40 $\pm$ 1.65	83.27 $\pm$ 1.53
50	58.46 $\pm$ 2.77	74.68 $\pm$ 1.63	86.94 $\pm$ 1.93
60	68.31 $\pm$ 2.55	83.66 $\pm$ 1.65	91.59 $\pm$ 1.07
70	80.17 $\pm$ 1.53	87.97 $\pm$ 1.16	94.92 $\pm$ 1.38
80	92.37 $\pm$ 1.40	95.50 $\pm$ 0.82	97.02 $\pm$ 0.88
F	1 047.285	2 441.144	3 287.572
P	< 0.01	< 0.01	< 0.01
$IC_{50}$	47.72	41.40	32.01

Intergroup comparison:  $P < 0.01$  (One-way ANOVA, LSD-*t* test)

### 2.3 电镜观察细胞凋亡

透射电镜下可见随 Dp 质量浓度的增高,细胞凋亡增多。镜下可见凋亡细胞体积变小,细胞质浓缩,细胞核的染色质高度凝聚、边缘化(图 3A),以及细胞凋亡小体形成(图 3B)。

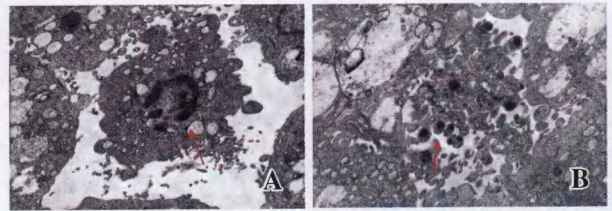


图 3 透射电镜下可见角膜基质细胞凋亡 ( $\times 6\ 300$ ) A:凋亡细胞(箭头) B:凋亡小体(箭头)  
Fig. 3 Keratocyte apoptosis is seen under the transmission electron microscope ( $\times 6\ 300$ ) A: apoptotic cell (arrow) B: apoptotic bodies (arrow)

### 2.4 流式细胞仪检测 Dp 作用后的细胞凋亡率

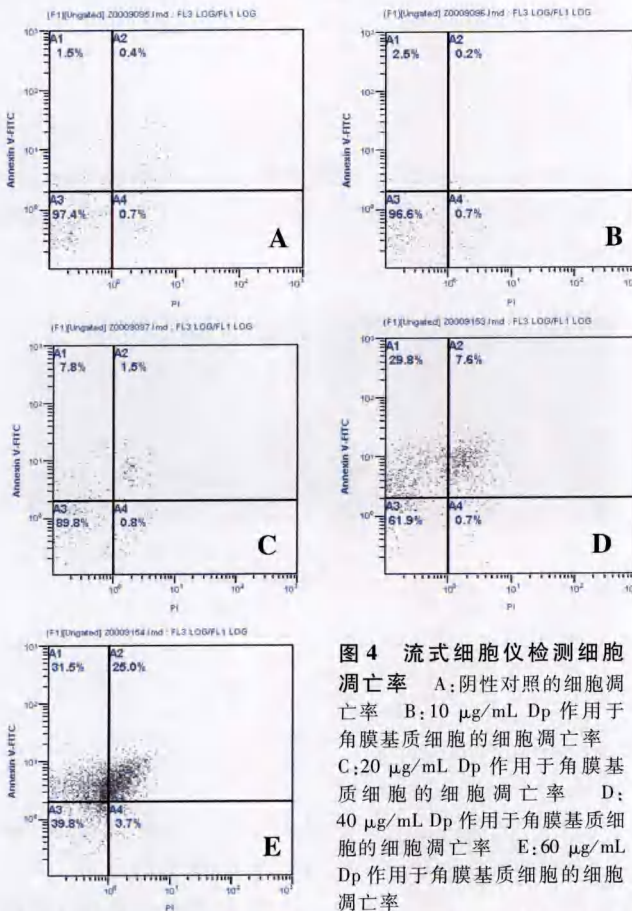
流式细胞仪检测 Dp 作用后的细胞凋亡情况,将 3 次流式结果的数据进行统计分析。实验组与各 Dp 质量浓度组总凋亡率的差异

有统计学意义。在 Dp 质量浓度为 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时,细胞总凋亡率与阴性对照组间差异无统计学意义 ( $P = 0.609$ ),而 20、40、60  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Dp 质量浓度组,细胞凋亡率较阴性对照组高,差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ),且随着 Dp 质量浓度的增高,细胞凋亡率增加(表 2,图 4)。

**表 2 Dp 作用 24 h 后角膜基质细胞凋亡率 ( $\bar{x} \pm s, \%$ )**  
Table 2 Apoptosis rate of corneal stromal cells after exposure to dracorhodin perchlorate for 24 hours ( $\bar{x} \pm s, \%$ )

Dracorhodin perchlorate ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Apoptosis rate of corneal stromal cells		
	Early stage	Later stage	Total
0	1.4 $\pm$ 0.5	0.3 $\pm$ 0.1	1.7 $\pm$ 0.4
10	2.2 $\pm$ 0.4	0.2 $\pm$ 0.1	2.5 $\pm$ 0.4
20	6.7 $\pm$ 1.0	1.9 $\pm$ 0.4	8.6 $\pm$ 0.8 <sup>c</sup>
40	28.6 $\pm$ 1.2	8.3 $\pm$ 0.7	37.0 $\pm$ 0.5 <sup>c</sup>
60	32.9 $\pm$ 1.8	25.2 $\pm$ 1.1	58.1 $\pm$ 2.7 <sup>c</sup>
H	13.382	13.075	13.406
P	0.010	0.011	0.009

<sup>c</sup>  $P < 0.01$  vs respective 0 concentration dracorhodin perchlorate group (Kruskal-Wallis rank sum test, Tamhane test)



**图 4 流式细胞仪检测细胞凋亡率** A: 阴性对照的细胞凋亡率 B: 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Dp 作用于角膜基质细胞的细胞凋亡率 C: 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Dp 作用于角膜基质细胞的细胞凋亡率 D: 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Dp 作用于角膜基质细胞的细胞凋亡率 E: 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Dp 作用于角膜基质细胞的细胞凋亡率

**Fig. 4 Cell apoptosis rate by flow cytometry** A: apoptosis rate of negative control B: apoptosis rate of keratocyte for 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  dracorhodin perchlorate C: apoptosis rate of keratocyte for 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  dracorhodin perchlorate D: apoptosis rate of keratocyte for 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  dracorhodin perchlorate E: apoptosis rate of keratocyte for 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$  dracorhodin perchlorate

### 3 讨论

正常情况下角膜基质细胞分泌组成基质层的成分,维持角膜的透明,但当角膜基质细胞受刺激后,细胞死亡或者从静止状态转化为修复表型,这些修复表型在促进再生的同时诱导纤维变性以致瘢痕形成,且修复表型的角膜基质细胞产生大量粗大且排列紊乱的胶原纤维,对前弹力层和基质缺损处进行瘢痕组织修复。

细胞各组成部分在不断发展的基础上不断增生,产生新细胞,以代替衰老、死亡和创伤所损失的细胞,这是机体新陈代谢的表现,也是机体不断生长发育、赖以生存和延续种族的基础。细胞以分裂的方式进行增生,每次分裂后所产生的新细胞必须经过生长增大,才能再分裂。当细胞在分裂过程中,某个途径受到抑制,细胞增生将受到抑制。如抑制有丝分裂原激活的蛋白激酶信号通路抑制细胞生长<sup>[6]</sup>。有研究显示 Dp 以剂量、时间依赖性的方式抑制 FB 生长<sup>[3]</sup>。RT-PCR 检测见 Dp 抑制 FB 的 I 型、III 型前胶原 mRNA 的表达<sup>[4]</sup>,同时促进瘢痕成纤维细胞的凋亡<sup>[7]</sup>。本实验 MTT 的结果显示,同一时间段各实验组的 A 值较正常对照组低,且随着药物质量浓度的增加, A 值下降,差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。通过 A 值计算各药物质量浓度的抑制率,显示出明显的剂量-效应依赖关系及时间-效应关系,进一步证实该药具有抑制角膜基质细胞增生的作用。

凋亡一般是机体细胞在发育过程中或在某些因素作用下,通过细胞内基因及其产物的调控而发生的一种程序性细胞死亡。细胞凋亡信号转导的最终途径是 DNA 降解,半胱氨酸蛋白酶为细胞凋亡效应酶,通过降解细胞外基质和骨架蛋白以及激活核酸酶裂解 DNA 修复的相关分子<sup>[8]</sup>。主要有 2 条途径:通过胞外信号激活细胞内的凋亡酶 caspase 及线粒体释放凋亡酶激活因子激活 caspase。这些活化的 caspase 可将细胞内的重要蛋白降解,引起细胞凋亡。研究发现体外培养的瘢痕成纤维细胞,加入含有 Dp 的培养液后,随着药物质量浓度的增加、作用时间延长,活细胞数量逐渐减少,细胞间隙增宽,细胞突起明显缩短或消失;细胞变圆,胞体缩小,细胞质减少,有的呈空泡状;染色质浓缩边聚,胞核模糊或断裂成块状<sup>[3]</sup>。在本实验中,于加药后 24 h 倒置相差显微镜下观察细胞的形态变化,发现角膜基质细胞生长速度较对照组慢,且随着药物质量浓度的升高,部分贴壁细胞出现皱缩、变圆甚至脱落。透射电子显微镜观察发现,随药物质量浓度的

增加,细胞出现凋亡,且凋亡的细胞数量增加,说明该药物具有促进细胞凋亡的作用。流式细胞仪检测 Dp 作用后的细胞凋亡,结果显示在 Dp 质量浓度为 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时,细胞总凋亡率与阴性对照组差异无统计学意义( $P=0.609$ ),而当 Dp $\geq 20 \mu\text{g}/\text{mL}$  时,其细胞凋亡率较阴性对照组高,差异均有统计学意义( $P<0.01$ ),且随着 Dp 质量浓度的增高,细胞凋亡率增加。有研究表明,Dp 通过改变 bcl-2 家族蛋白的表达,即 Bax 表达增加、Bcl-X<sub>L</sub> 表达下降,而促进细胞凋亡<sup>[9-12]</sup>。

本研究将 Dp 作用于体外培养的兔角膜基质细胞,发现其对细胞的增生有抑制作用,且随 Dp 质量浓度的增加,细胞凋亡率增加,为探讨角膜瘢痕防治的可行性提供理论依据。

## 参考文献

- 1 Funderburgh JL, Mann MM, Funderburgh ML. Keratocyte phenotype mediates proteoglycan structure: a role for fibroblasts in corneal fibrosis [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(46): 45629 - 45637
- 2 Fini ME, Stramer BM. How the cornea heals; cornea specific repair mechanisms affecting surgical outcomes [J]. *Cornea*, 2005, 24: S2 - 11
- 3 张培华,罗少军,汤少明,等. 血竭素对瘢痕成纤维细胞增殖的影响

- [J]. *广东医学院学报*, 2005, 23(4): 361 - 363
- 4 张培华,罗少军,汤少明,等. 血竭素对瘢痕成纤维细胞胶原合成的影响 [J]. *中国美容医学*, 2006, 15(6): 624 - 626
- 5 牟章兵,杜之渝,晏丕松. 汉防己甲素对离体兔角膜基质细胞抑制机制的实验研究 [J]. *眼科研究*, 2007, 25(1): 29 - 32
- 6 Wang CH, Tang CW, Liu CL, et al. Inhibitory effect of octreotide on gastric cancer growth via MAPK pathway [J]. *World J Gastroenterol*, 2003, 9: 1904 - 1908
- 7 张培华,罗少军,肖佐环,等. 血竭素高氯酸盐促进瘢痕成纤维细胞凋亡的作用 [J]. *中国皮肤性病学杂志*, 2006, 20(6): 338 - 340
- 8 Akasaka Y, Ishikawa Y, Ono I, et al. Enhanced expression of caspase-3 in hypertrophic scars and keloid; induction of caspase-3 and apoptosis in keloid fibroblasts in vitro [J]. *Lab Invest*, 2000, 80(3): 345 - 357
- 9 夏明钰,王敏伟,王浩然,等. 血竭素高氯酸盐诱导人宫颈癌 HeLa 细胞凋亡的机制 [J]. *药学报*, 2004, 39(12): 966 - 970
- 10 Xia M, Wang D, Wang M, et al. Dracorhodin perchlorate induces apoptosis via activation of caspases and generation of reactive oxygen species [J]. *J Pharmacol Sci*, 2004, 95(2): 273 - 283
- 11 Xia M, Wang M, Tashiro S, et al. Dracorhodin perchlorate induces A375-S2 cell apoptosis via accumulation of p53 and activation of caspases [J]. *Biol Pharm Bull*, 2005, 28(2): 226 - 232
- 12 Xia MY, Wang MW, Cui Z, et al. Dracorhodin perchlorate induces apoptosis in HL-60 cells [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2006, 8(4): 335 - 343

(收稿:2008-07-25 修回:2009-06-15)

(本文编辑:尹卫靖)

读者·作者·编者

## 关于投稿的相关事宜

- 1 来稿需经作者单位的学术机构审核同意,并开具单位介绍信,介绍信应注明稿件无一稿两投、不涉及保密、署名无争议等。作者投稿时应提供自己详细的联系方式,如作者的详细地址、邮政编码、联系电话及通讯作者的 Email 地址等。
- 2 为保障重要科研课题的时效性,我刊开设了“快审、快编、快登”的“绿色”通道,优先刊登国家级攻关项目、国家自然科学基金资助项目等重大科研课题。凡属此类稿件,作者投稿时请提供有关项目批准件的复印件,经编辑部审核将在稿件通过审核后提前安排发表,并请作者在文稿的脚注中予以注明,如:“本课题为  $\times \times$  基金资助(基金号:  $\times \times \times \times$ )”。
- 3 请自留底稿,勿一稿两投。我刊在收到文稿后即发送回执至作者邮箱中,并注明稿号,以便作者查询。稿件经审理决定采用者,2 个月以内发出采用通知。稿件未被采用者,2 个月以内发退稿通知,稿件不再退回。编辑部的各种通知将从 Email 发出,审稿期间请作者留意电子信箱。作者接到退稿通知或与编辑部联系确认后方可自行处理稿件;发送作者修改的稿件,如 2 个月内没有修回,视为作者自行撤稿。一旦稿件进入编排阶段,请尽量避免自撤稿件。对一稿两投或强行撤稿而给我刊造成不良影响和/或经济损失者,编辑部有权给以公开曝光并实施经济赔偿,作者自行承担一切责任和后果。
- 4 根据《著作版权法》的相关条文,本刊编辑有权对来稿按照编辑规范和专业知进行文字加工、修改和删减,修改后的稿件作者需认真校对核实,修改涉及文章的核心内容时双方进行沟通。
- 5 来稿需付稿件审理费,每篇 30 元。稿件决定采用后,请按通知按时缴纳版面费,有彩图者还需另付彩图印制工本费。版面费及彩图工本费由作者单位从课题基金、科研费等费用中支付。
- 6 来稿刊登后即付给作者稿酬,并赠当期杂志第一作者 2 册,其余作者各 1 册。
- 7 本刊联系方式请从《眼科研究》版权页查询。

(本刊编辑部)