

糖基转移酶Colgalt2基因敲除对肝细胞再生过程中增殖和凋亡的作用研究

王智强¹, 杨琪¹, 王建文², 刘燃², 郝晓花², 黄玉波², 魏红山^{1,2} (1.北京大学地坛医院教学医院, 北京大学医学部, 北京 100015; 2.首都医科大学附属北京地坛医院, 北京 100015)

摘要: 目的 初步探讨Colgalt2基因敲除对小鼠肝细胞再生过程中细胞增殖和凋亡的作用。方法 根据Higgins和Anderson于1931年提出的肝大部分切除模型, 实施Colgalt2^{+/+}野生型对照组小鼠和Colgalt2^{-/-}小鼠(均为C57BL/6J品系)70%肝大部分切除术(PH), 分别取正常小鼠和PH后1、3、7天的再生肝脏的右外叶, 于10%中性福尔马林固定, 石蜡包埋, 切片。采用免疫组织化学方法比较细胞增殖核抗原(PCNA)在小鼠肝部分切除术后各时间点组间的表达阳性率差异; 胶原酶两步灌注法分别分离正常和PH后1、3、5天的Colgalt2^{+/+}小鼠和Colgalt2^{-/-}小鼠的肝细胞。流式细胞仪检测各组肝细胞凋亡率。结果 PH后1、3、7天, Colgalt2^{-/-}小鼠肝细胞PCNA阳性表达率显著高于Colgalt2^{+/+}小鼠肝细胞PCNA阳性表达率, 且差异有显著统计学意义($P < 0.01$)。分离的肝细胞活细胞比率达94%, 正常Colgalt2^{+/+}小鼠和Colgalt2^{-/-}小鼠分离的肝细胞凋亡率分别为(23.36 ± 0.83)%、(21.04 ± 1.16)%; PH后1天, Colgalt2^{+/+}对照组小鼠肝细胞凋亡率和Colgalt2^{-/-}小鼠肝细胞凋亡率分别为(8.27 ± 0.33)%、(8.44 ± 0.30)%, PH后1天肝细胞凋亡率均降至最低, 随即肝细胞凋亡率逐渐升高; PH后3天, Colgalt2^{+/+}小鼠和Colgalt2^{-/-}小鼠肝细胞凋亡率分别为(15.92 ± 0.56)%、(12.14 ± 0.37)%, Colgalt2^{-/-}小鼠的肝细胞凋亡率明显低于野生型对照组小鼠的肝细胞凋亡率($P < 0.01$); PH后5天, Colgalt2^{+/+}小鼠和Colgalt2^{-/-}小鼠肝细胞凋亡率分别为(21.36 ± 0.51)%、(18.92 ± 0.92)%, Colgalt2^{-/-}小鼠的肝细胞凋亡率仍低于野生型对照组小鼠的肝细胞凋亡率($P < 0.05$), 肝细胞凋亡率均接近于恢复正常水平。结论 糖基转移酶Colgalt2基因敲除在肝再生过程中在一定程度上具有促进肝细胞增殖和抗肝细胞凋亡的作用, 提示该基因介导的胶原Glcα1, 2Galβ1-糖基化修饰对肝再生可能起着重要的调控作用。

关键词: 肝再生; 糖基转移酶; 增殖; 凋亡

Effect of glycosyltransferase Colgalt2 gene knockout on hepatocyte proliferation and apoptosis on course of hepatocyte regeneration

WANG Zhi-qiang¹, YANG Qi¹, WANG Jian-wen², LIU Ran², HAO Xiao-hua², HUANG Yu-bo², WEI Hong-shan^{1,2} (1. Peking University Ditan Teaching Hospital, Peking University Health Science Center, Beijing, 100015, China; 2. Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing, 100015, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of Colgalt2 gene knockout on hepatocyte proliferation and apoptosis on course of hepatocyte regeneration. **Methods** Colgalt2^{+/+} wild type control mice and Colgalt2^{-/-} mice models of 70% partial hepatectomy (PH) were established according to the protocols by Higgins and Anderson in 1931. Then the part of right lateral lobes of liver from normal mice and those 1, 3, 7 days after PH were harvested, fixed in 10% neutral buffered formalin, embedded in paraffin and cut into tissue sections. Immunohistochemistry was used to compare the expressive difference of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in the mouse liver slices at different time points after partial hepatectomy. Primary hepatocytes of normal Colgalt2^{+/+} wild type control mice, normal Colgalt2^{-/-} mice and those treated by partial hepatectomy

after 1, 3, 5 days were isolated and purified by two steps of collagenase perfusion. Flow cytometry was used to detect apoptotic rate in each group. **Results** The number of PCNA positive cells of Colgalt2^{-/-} mice was much larger than that of Colgalt2^{+/+} mice on 1, 3, 7 days after PH, and the difference was statistically significant ($P < 0.01$). The viability of primary hepatocytes was 94%. The apoptotic rate of normal Colgalt2^{+/+} mice was $(23.36 \pm 0.83)\%$, and that of normal Colgalt2^{-/-} mice was $(21.04 \pm 1.16)\%$. The apoptotic rates of Colgalt2^{+/+} control mice and Colgalt2^{-/-} mice in the first day after PH were $(8.27 \pm 0.33)\%$, $(8.44 \pm 0.30)\%$. The apoptotic rates declined to the lowest on the first day after PH and then they began to increase gradually. While, the apoptotic rates of Colgalt2^{+/+} mice and Colgalt2^{-/-} mice in the third day after PH were $(15.92 \pm 0.56)\%$, $(12.14 \pm 0.37)\%$. The apoptotic rate of Colgalt2^{-/-} mice was much lower than that of wild type control mice ($P < 0.01$). The apoptotic rates of Colgalt2^{+/+} mice and Colgalt2^{-/-} mice in the fifth day after PH were $(21.36 \pm 0.51)\%$, $(18.92 \pm 0.92)\%$ which showed that the apoptotic rate of Colgalt2^{-/-} mice was still lower than that of wild type control mice ($P < 0.05$). The apoptotic rates of both groups had approached to normal level approximately. **Conclusions** Glycosyltransferase Colgalt2 gene knockout has the effects of promoting hepatocyte proliferation in certain degree and inhibiting hepatocyte apoptosis during liver regeneration, which suggests that Colgalt2 which mediates collagen Glc α 1, 2Gal β 1-glycosylation may play an important regulating role in liver regeneration. **Key words:** Liver regeneration; Glycosyltransferase; Proliferation; Apoptosis

肝脏是哺乳动物体内唯一具有再生能力的实质性脏器, 当肝脏实质细胞死亡或者手术部分切除后, 肝脏会表现出很强的再生能力^[1]。研究肝再生最常用的模型是Higgins和Anderson于1931年提出的啮齿动物70%肝大部分切除术(partial hepatectomy, PH)模型, 在术后5~7天残余的肝细胞能够通过细胞分裂增殖而使肝脏恢复接近原来的重量而终止^[2], 说明肝再生是在机体正反两方面因素共同调控的过程, 而作为一种负调控机制, 凋亡对肝再生终止起着重要的作用^[3]。肝再生组织结构重塑过程中还伴有胶原的合成与修饰, I型、III型和V型胶原表现为高水平的Gal β -或Glc α 1, 2Gal β 1-糖基化修饰^[4]。Schegg等^[5]发现Colgalt2为介导的胶原Glc α 1, 2Gal β 1-糖基化修饰的糖基转移酶。但其介导的胶原Glc α 1, 2Gal β 1-糖基化修饰在肝再生过程中的作用尚不清楚。本实验初步观察了Colgalt2基因敲除对小鼠肝再生过程中肝细胞增殖和凋亡的影响。

1 资料与方法

1.1 主要试剂及仪器 戊巴比妥钠购自美国Promega公司, PCNA抗体购于Cell Signaling Technology公司, 小鼠二步法检测试剂盒(PV-6002)、DAB显色试剂盒购自北京中杉金桥公司; IV型胶原酶、DNase I酶均购自美国Sigma公司, HBSS缓冲液购自美国Gibco公司; AnnexinV抗体、7-AAD抗体、Cell Staining Buffer、AnnexinV Binding Buffer均购

自美国Biolegend公司; 流式细胞分析仪(BD FACS Calibur)为美国BD公司产品。

1.2 实验动物与分组 SPF级野生型C57BL/6J小鼠购自北京华阜康生物科技股份有限公司, 许可证号: SCXK(京)2014-0004, 本课题组委托南京大学模式动物研究所, 利用基因打靶技术制备Colgalt2^{+/+}杂合子小鼠。F0代Colgalt2^{+/+}小鼠在北京大学医学部实验动物科学部SPF级环境下饲养繁育, 然后采用PCR方法鉴定基因型。筛选出纯合子后进行实验, 本实验选择雄性小鼠, 鼠龄6~8周, 体重18~23 g。

实验动物分组: 免疫组化方法检测细胞增殖实验: 野生型C57BL/6J小鼠(Colgalt2^{+/+}) 12只和纯合子C57BL/6J小鼠(Colgalt2^{-/-}) 12只, 分别分为4组, 即0、1、3、7天组; 原代肝细胞分离与凋亡率检测实验: 野生型C57BL/6J小鼠(Colgalt2^{+/+}) 24只和纯合子C57BL/6J小鼠(Colgalt2^{-/-}) 24只, 分别分为4组, 即0、1、3、5天组。

1.3 小鼠70%肝大部分切除手术模型的建立 术前小鼠禁食8小时, 不禁水; 称量小鼠体重, 用8%的戊巴比妥钠以150 μ L/g的剂量腹腔注射麻醉小鼠, 注意从小剂量开始, 必要时补量; 根据Higgins和Anderson于1931年提出的肝大部分切除模型改良(保留胆囊)^[2], 实施70%肝大部分切除术, 分别切除肝左外叶、左中叶和右中叶, 术后缝合手术切口, 并用碘伏消毒, 使小鼠右侧卧位于笼中, 术

后自由进食和饮水。

1.4 免疫组化法检测细胞增殖核抗原表达 小鼠再生肝脏的右外叶固定、切片,实验前烤片脱蜡至水;3%过氧化氢中室温孵育10分钟;柠檬酸盐抗原修复液高压修复2分钟;1 × PBS稀释一抗[稀释比例细胞增殖核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)为1:2000],37 °C室温孵育2小时;用1 × PBS洗后滴加抗小鼠免疫组化专用二抗,室温孵育30分钟;用1 × PBS洗干净后滴加DAB显色液显色30秒后再用蒸馏水冲洗干净;苏木素染细胞核5分钟;1%盐水酒精分化5秒;氨水返蓝5秒;脱水、中性树胶封片。

1.5 免疫组化结果判定方法 光镜下观察,每张切片取5个视野(200 ×),细胞核染成棕黄色的为阳性细胞,计数阳性增殖细胞,求出PCNA阳性细胞率(即肝细胞增殖率)=平均阳性染色细胞核数/所有细胞核数×100%。

1.6 小鼠原代肝细胞的分离 8%的戊巴比妥钠以150 μL/g的剂量腹腔注射麻醉小鼠;打开腹腔,钝性分离门静脉,静脉输液针刺入门静脉,同时剪断下腔静脉,每只小鼠灌注37 °C预热的30 ml的HBSS,速度先快后慢,直到肝脏变黄白且流出道不再有血液流出;每只小鼠灌注37 °C预热的含0.3 mg/ml的IV型胶原酶的HBSS约12.5 ml,直至肝脏表面呈现筛网状;先摘除胆囊,生理盐水冲洗肝脏,用剪刀将肝组织刮碎;再加入37 °C预热的HBSS消化液(含0.3 mg/ml的IV型胶原酶,20 μg/ml的DNA I 12.5 ml)于37 °C摇床以220 r/min震荡消化23分钟;200目的钢网过滤后以1500 g离心7分钟后弃去上清;1 × PBS分别定容到流式管中各2 ml,以500 g每次离心2分钟,共洗涤3次,即获得肝细胞悬液。

1.7 小鼠原代肝细胞凋亡的检测 向装有肝细胞悬液的流式管中加入2 ml Cell Staining Buffer,离心1000 g/5分钟;在各流式管中将细胞弹起,然后各加入100 μL的Annexin V Binding Buffer,每管各加入2 μL Annexin V抗体,室温避光15分钟;上机前各加入2 μL的7-AAD抗体,室温避光10分钟;使用BD FACS Calibur检测,每管收集20000个细胞。

1.8 统计学处理 应用GraphPad Prism 5.01软件进行统计学分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用非配对样本的 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Colgalt2基因敲除对肝再生过程中肝细胞增殖核抗原(PCNA)表达的影响 细胞增殖核抗原PCNA表达于肝细胞核,其阳性率的多少能反映肝再生过程中肝细胞的增殖率,为研究Colgalt2在肝再生过程中对肝细胞增殖的影响,本实验分别检测了正常Colgalt2^{-/-}小鼠与正常Colgalt2^{+/+}小鼠肝细胞以及PH后1、3、7天两组小鼠肝细胞PCNA阳性率。肝细胞核PCNA阳性呈棕褐色,正常基因敲除小鼠与正常野生型小鼠肝脏仅见少数PCNA阳性肝细胞。Colgalt2^{-/-}小鼠与Colgalt2^{+/+}小鼠在PH后1天时PCNA阳性率均达到高峰,其表达阳性率分别为(97.47 ± 0.22)%、(84.01 ± 0.59)%。之后,PCNA阳性率均逐渐下降,在PH后3天,Colgalt2^{-/-}小鼠与Colgalt2^{+/+}野生型小鼠肝细胞PCNA阳性率分别为(89.75 ± 0.65)%、(81.35 ± 1.04)%;至PH后7天,PCNA阳性表达率均趋于正常。PH后1、3、7天,Colgalt2^{-/-}基因敲除小鼠肝细胞PCNA阳性表达率均高于对照组,差异有显著统计学意义($P < 0.01$),见图1、2。

2.2 Colgalt2对肝再生过程中肝细胞凋亡率的影响 分离的肝细胞活力测定,经台盼蓝染色法测定肝细胞活力为94%。流式细胞仪检测显示正常Colgalt2^{-/-}小鼠与正常Colgalt2^{+/+}野生型小鼠肝细胞凋亡率分别为(21.04 ± 1.16)%、(23.36 ± 0.83)%,组间差异无统计学意义($t = 1.60$, $P = 0.12$);而在PH后1天,实验组与对照组肝细胞凋亡率均降至最低,分别为(8.44 ± 0.30)%、(8.27 ± 0.33)%,组间差异无统计学意义($t = 0.35$, $P = 0.73$)。在PH后3天,实验组和对照组肝细胞凋亡率分别(12.14 ± 0.37)%、(15.92 ± 0.56)%;PH后5天,实验组和对照组肝细胞凋亡率逐渐趋向于正常,分别为(18.92 ± 0.92)%和(21.36 ± 0.51)%;在PH后3天和PH后5天,Colgalt2^{-/-}小鼠肝细胞凋亡率均明显低于Colgalt2^{+/+}小鼠肝细胞凋亡率,组间差异有统计学意义($P < 0.01$, $P < 0.05$),见图3。

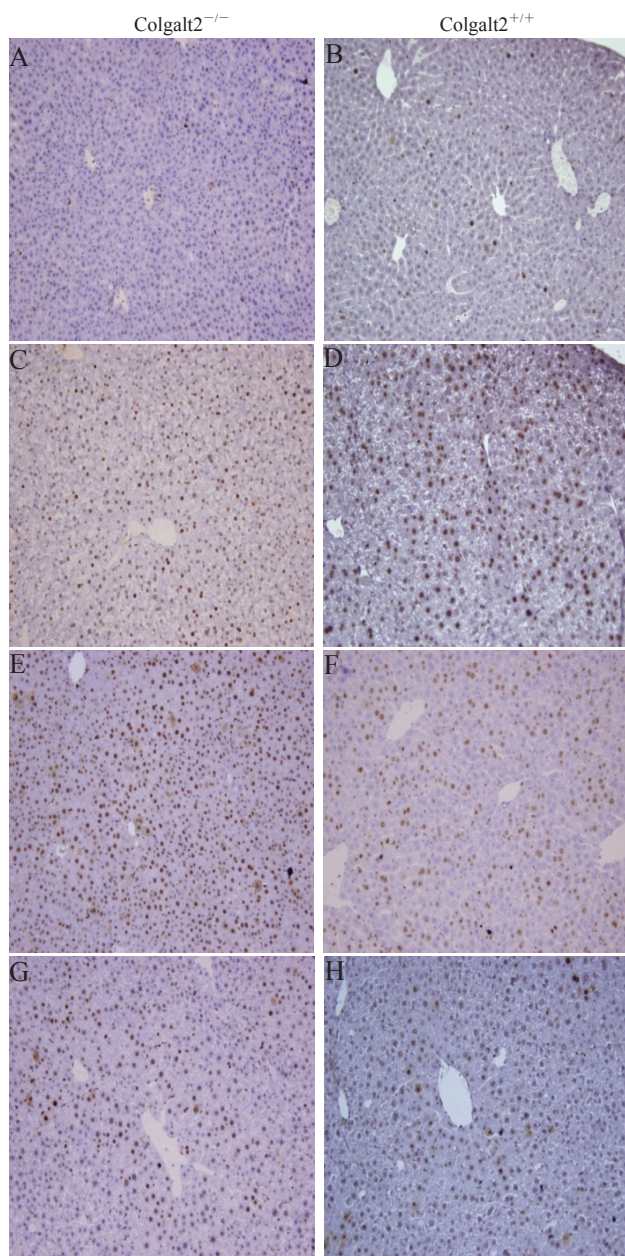


图1 正常小鼠及PH后细胞增殖核抗原(PCNA)免疫组织化学染色切片图($\times 200$)

注: A、B分别为正常Colgalt2^{-/-}小鼠与正常Colgalt2^{+/+}小鼠对照组; C、D分别为Colgalt2^{-/-}小鼠与Colgalt2^{+/+}小鼠PH后1天PCNA的表达情况; E、F为Colgalt2^{-/-}小鼠与Colgalt2^{+/+}小鼠PH后3天PCNA的表达情况; 图G、H为Colgalt2^{-/-}小鼠与Colgalt2^{+/+}小鼠PH后7天PCNA的表达情况

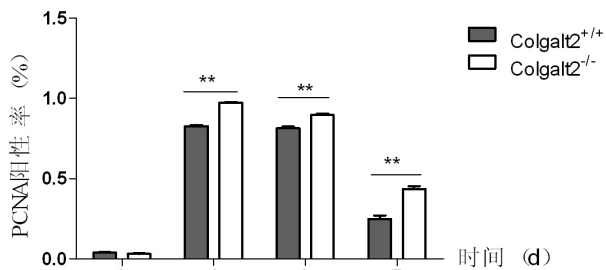


图2 正常小鼠及PH后肝细胞增殖核抗原(PCNA)表达阳性率

注: **与同时间点野生型对照组比较, $P < 0.01$, PCNA阳性表达率以Mean \pm SEM表示

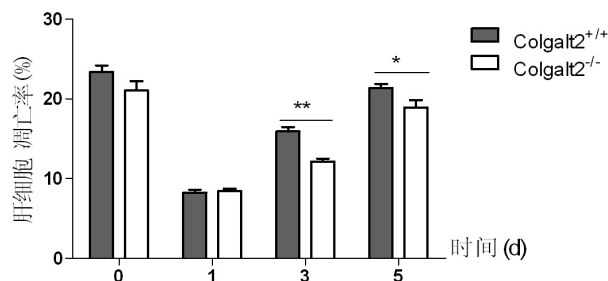


图3 Colgalt2^{-/-}基因敲除小鼠与Colgalt2^{+/+}野生型小鼠在0小时及PH后1、3、5天分离原代肝细胞凋亡率的比较

注: *与同时间点野生型组比较, $P < 0.05$; **与同时间点野生型组比较, $P < 0.01$, 肝细胞凋亡率均以Mean \pm SEM表示

3 讨论

Colgalt2基因编码由626个氨基酸组成的II型跨膜蛋白,其中包括4个N-糖基化位点和C-末端内质网滞留信号RDEL。Colgalt2基因定位于1q25,编码胶原β(1-O)半乳糖基转移酶,介导胶原蛋白分子上的羟基赖氨酸Glcα1, 2Galβ1-糖基化修饰^[5]。本研究发现Colgalt2介导的Glcα1, 2Galβ1-糖基化修饰对肝细胞再生过程中具有重要调控作用,表现为部分抑制肝细胞增殖,并具有一定的促进肝细胞凋亡作用。

正常成年哺乳动物的肝脏中的肝细胞几乎均处于细胞周期G0期而不发生有丝分裂增殖。肝部分切除后约95%原处于静止期的肝细胞迅速进入细胞增殖周期循环^[6]。肝再生过程包括肝实质细胞的增殖以及围绕肝细胞周围的细胞外基质的重塑^[7]。细胞外基质成分,如胶原、纤连蛋白和层黏连蛋白等为细胞生存,增殖和分化提供微环境^[8]。显然,胶原蛋白的糖基化修饰会对肝再生过程中肝细胞增殖产生重要影响。因此,肝再生过程是肝实质细胞的增殖与细胞外基质重塑的协调过程。在肝脏中,肝细胞外基质主要位于Disse腔和由胶原纤维(包括I、III、VI型胶原)、纤连蛋白、层黏连蛋白等组成的窦周间隙^[9]。Kim等^[10]研究发现在早期肝再生过程中门静脉周围的细胞外基质降解是门静脉周围肝细胞增殖的先决条件,此外还发现对正常肝脏注入肝细胞生长因子之前如果用胶原酶预处理将会导致处于DNA合成期的肝细胞大量增加。Donthamsetty等^[11]研究发现整合素相关激酶肝脏特异性基因敲除小鼠(ILK: liver^{-/-})在肝大部分切除后表现为肝细胞增殖能力增强而促进肝再生。由此看见细胞外基质

重塑对肝再生起着重要的调控作用。

为了阐述糖基转移酶Colgalt2介导的胶原Glc α 1, 2Gal β 1-糖基化修饰对肝再生的作用, 本课题组采用基因打靶技术制备了Colgalt2^{+/-}杂合子小鼠(南京大学模式动物研究所协助完成)^[12]。本实验分别检测了正常Colgalt2^{-/-}小鼠与正常Colgalt2^{+/+}小鼠肝细胞以及PH后1、3、7天两组小鼠肝细胞PCNA阳性表达率。PCNA高表达提示细胞内进行旺盛的DNA复制, 是S期细胞的明显标志物^[13]。1998年, 有学者^[14]报道了可以通过Western blot检测再生肝组织中PCNA蛋白表达情况或者再生肝组织切片PCNA免疫组化来量化评价肝再生的程度。本研究发现, Colgalt2^{+/+}小鼠组与Colgalt2^{-/-}小鼠组在PH后1天时PCNA阳性表达率均达到高峰, 本研究结果与Wolf等^[15]研究结果一致。PH后1、3、7天时, Colgalt2^{-/-}基因敲除组小鼠肝细胞PCNA阳性表达率均明显高于同时时间点Colgalt2^{+/+}野生型对照组小鼠的PCNA阳性表达率, 且差异有显著统计学意义。由此表明, 基因敲除小鼠缺失Colgalt2基因的功能后表现为肝再生过程中肝细胞增殖过度, 本研究发现Colgalt2在肝再生过程参与调控肝细胞的增殖, 其作用为在一定程度上抑制肝细胞过度增殖。

细胞凋亡是指细胞程序性主动死亡的形式, 是机体对不能修复的损伤作出的反应, 并且通过细胞凋亡可以调控自身细胞的增殖和死亡的平衡, 对机体起着重要的防御作用^[16]。肝细胞的凋亡常发生于急性或慢性肝损伤过程中^[17]。细胞表面的糖基化修饰异常会影响细胞的凋亡, Ku等^[18]研究发现, 组织特异性敲除小鼠细胞角蛋白K18的O-GlcNAc糖基化位点导致细胞对损伤诱导的凋亡敏感性增加。此外, 韩国学者^[19]研究发现, 要在肝内分泌的纤维蛋白原/血管生成素相关蛋白(HFARP)可以通过糖基化修饰而发挥抗血管内皮细胞凋亡的效应。以上证据表明, 细胞表面或细胞外基质蛋白的糖基化修饰状态对细胞凋亡具有重要的调节作用。本课题组为探索Colgalt2介导的胶原Glc α 1, 2Gal β 1-糖基化修饰对肝再生过程中肝细胞凋亡的影响, 检测了Colgalt2^{-/-}小鼠和Colgalt2^{+/+}小鼠PH后不同时间

点分离的原代肝细胞凋亡率, 发现两组肝细胞凋亡率均在PH后1天达到最低。继而肝细胞凋亡率逐渐上升, 在PH后5天, 肝细胞凋亡率明显增加并接近于正常肝脏中肝细胞凋亡率的水平。在PH后3天及5天, Colgalt2^{-/-}小鼠肝细胞凋亡率均明显低于Colgalt2^{+/+}野生型对照组小鼠的肝细胞凋亡率, 提示Colgalt2在肝细胞再生晚期具有诱导肝细胞凋亡的作用。

根据目前本课题组初步的观察结果, Colgalt2介导的Glc α 1, 2Gal β 1-糖基化修饰对肝细胞再生过程中具有重要的调控作用, 突出表现为Colgalt2基因敲除具有促进肝细胞增殖, 并具有一定的抗肝细胞凋亡作用, 但详细的分子机制有待进一步深入研究。

参考文献

- [1] Wei W, Dirsch O, Lawson Mclean A, et al. Rodent models and imaging techniques to study liver regeneration[J]. *European Surgical Research*, 2015, 54: 97-113.
- [2] Mao SA, Glorioso JM, Nyberg SL, et al. Liver regeneration[J]. *Translational Research*, 2014, 163: 352-362.
- [3] Sakamoto T, Liu Z, Murase N, et al. Mitosis and apoptosis in the liver of interleukin-6-deficient mice after partial hepatectomy[J]. *Hepatology*, 1999, 29: 403-411.
- [4] Fan X, Chuan S, Hongshan W, et al. Protein O glycosylation regulates activation of hepatic stellate cells[J]. *Inflammation*, 2013, 36: 1248-1252.
- [5] Schegg B, Hülsmeier AJ, Rutschmann C, et al. Core glycosylation of collagen is initiated by two beta (1-O) galactosyltransferases[J]. *Mol Cell Biol*, 2009, 29: 943-952.
- [6] Taub R. Liver regeneration: from myth to mechanism[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2004, 5: 836-847.
- [7] Rudolph KL, Trautwein C, Kubicka S, et al. Differential regulation of extracellular matrix synthesis during liver regeneration after partial hepatectomy in rats[J]. *Hepatology*, 1999, 30: 1159-1166.
- [8] Badylak SF. The extracellular matrix as a biologic scaffold material[J]. *Biomaterials*, 2007, 28: 3587-3593.
- [9] Martinez-Hernandez A, Amenta PS. The extracellular matrix in hepatic regeneration[J]. *The FASEB journal*, 1995, 9: 1401-1410.
- [10] Kim T, Mars WM, Stolz DB, et al. Extracellular matrix remodeling at the early stages of liver regeneration in the rat[J]. *Hepatology*, 1997, 26: 896-904.
- [11] Donthamsetty S, Bowen W, Mars W, et al. Liver specific ablation of integrin linked kinase (ILK) in mice results in enhanced and prolonged cell proliferation and hepatomegaly after phenobarbital administration[J]. *Toxicological sciences*, 2009, 113: 358-366.
- [12] 魏红山, 李红敏, 任慧, 等. 糖基因GLT2SD2敲除小鼠的制备与基因型鉴定[J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2013, 27: 492-494.

- [13] Strzalka W, Ziemienowicz A. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a key factor in DNA replication and cell cycle regulation[J]. Ann Bot, 2011, 107: 1127-1140.
- [14] Assy N, Gong Y, Zhang M, et al. Use of proliferating cell nuclear antigen as a marker of liver regeneration after partial hepatectomy in rats[J]. J Lab Clin Med, 1998, 131: 251-256.
- [15] Wolf HK, Michalopoulos GK. Hepatocyte regeneration in acute fulminant and nonfulminant hepatitis: a study of proliferating cell nuclear antigen expression[J]. Hepatology, 1992, 15: 707-713.
- [16] Lee JJ, Lee KS, Paik YH, et al. Apoptosis of hepatic stellate cells in carbon tetrachloride induced acute liver injury of the rat: analysis of isolated hepatic stellate cells[J]. J Hepatol, 2003, 39: 960-966.
- [17] Tao Y, Yan X, Zhou T, et al. Fuzheng Huayu recipe alleviates hepatic fibrosis via inhibiting TNF-alpha induced hepatocyte apoptosis[J]. BMC Complement Altern Med, 2014, 14: 449-461.
- [18] Ku NO, Toivola DM, Strnad P, et al. Cytoskeletal keratin glycosylation protects epithelial tissue from injury[J]. Nat Cell Biol, 2010, 12: 876-885.
- [19] Kim I, Kim HG, Kim H, et al. Hepatic expression, synthesis and secretion of a novel fibrinogen/angiopoietin-related protein that prevents endothelial-cell apoptosis[J]. Biochem J, 2000, 346: 603-610.

收稿日期: 2015-02-10

· 消息 ·

医学论文写作中的注意事项

论文的写作前言主要概述研究的背景、目的、研究思路、理论依据等。有些研究还说明该研究开始的具体时间。前言必须开门见山、简要、清楚、切忌套话、空话、牵涉面过宽、详述历史过程或复习文献过多等。不要涉及本研究中的数据或结论。不要与摘要雷同。未经检索,前言中不可写“国内外未曾报道”等字样,也不可自我评价达到“XX水平”或“填补XX空白”等。前言通常不需要标题。论著文稿的前言一般不超过250字;比较短的论文可以只用小段文字起前言作用。

方法主要介绍对象(人或实验动物,包括对照组)的选择及其基本情况,以及研究所采用的方法及观察指标。常用标题有“材料与方法”、“对象与方法”、“资料与方法”等。

临床研究需交代病例和对照者的来源、选择标准及研究对象的年龄、性别和其他重要特征等,并应注明参与研究者是否知情同意。临床随机对照组研究应交代干预方法的设计(随机方法)和所采用的盲法。实验研究需注明动物的名称、种系、等级、数量、来源、性别、年龄、体重、饲养条件和健康状况等。

个人创造的方法应详细说明“方法”的细节,以备他人重复。改进的方法详述改进之处,并以引用文献的方式给出原方法出处。原封不动使用他人方法,应以引用文献的方式给出方法的出处,无需展开描述。

药品、试剂应使用化学名,并注明剂量、单位、纯度、批号、生产单位和生产时间。仪器、设备应注明名称、型号、规格、生产单位、精密度或误差范围。无须描述其工作原理。

统计学处理项应说明统计分析方法及其选择依据。

结果的叙述应客观真实、简洁明了、重点突出、层次分明、合乎逻辑,不应与讨论内容混淆。若文稿设有图表,则正文不需重述其全数据,只需摘述其主要发现或数据。若使用文字描述,内容冗长繁琐不易读懂,则应改用图或表来表达数据,以收到一目了然的效果。应认真核对正文和图表的数据,达到准确、统一。统计学分析应交代统计方法、统计值,仅有P值不能体现重要的定量信息。

讨论应着重讨论研究中的新发现及从中得出的结论,包括发现的意义及其限度,以及对进一步研究的启示。若不能导出结论,也可以进行必要的讨论,提示建议、设想、改进的意见或待解决的问题。应将研究结果与其他有关的研究相联系,并将本研究的结论与目的相关联。不必重述已在前言和结果部分详述过的数据或资料。不要过多罗列文献。避免做不成熟的主观推断。讨论中一般不应设置图或表。

本刊编辑部