

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.30.003

文章编号: 1005-8982(2017)30-0015-06

棕榈酸对转化生长因子 β_1 刺激的肝星状细胞增殖、 凋亡及 Caspase-12 蛋白表达的影响*

李雅楠¹, 闫宇², 王铭¹, 刘芳¹, 肖永红¹

(华北理工大学 1. 公共卫生学院, 2. 临床医学院, 河北 唐山 063000)

摘要:目的 研究棕榈酸对转化生长因子 β_1 (TGF- β_1)刺激的肝星状细胞(HSC)增殖、凋亡及半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 12(caspase-12)蛋白表达的影响。**方法** 将液氮保存下的肝星状细胞株,于 37℃、5% CO₂ 孵箱中进行复苏传代培养,同步化后将细胞分为 5 组:空白组、TGF- β_1 (5 ng/ml)组、TGF- β_1 +低、中、高剂量棕榈酸组,即 5 ng/ml TGF- β_1 刺激 24 h,再分别加入 50、100 及 200 μ mol/L 不同剂量棕榈酸作用 24 h 后,用 MTT 比色法检测细胞增殖、流式细胞仪检测细胞凋亡率、免疫细胞化学法测定 Caspase-12 蛋白表达。**结果** 不同浓度棕榈酸均能抑制细胞增殖($P < 0.05$),且随着剂量的增加,细胞相对增殖率(RGR)降低,低、中、高剂量组分别为 76.56%、60.93%和 34.37%,组间比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。透射电镜发现,不同剂量棕榈酸组出现细胞核变小,细胞出现大量线粒体空泡,染色质边集等典型凋亡表现。空白组、TGF- β_1 组、TGF- β_1 +低、中、高剂量棕榈酸组凋亡率分别为(3.32 \pm 0.29)%、(1.70 \pm 0.14)%、(7.26 \pm 0.46)%、(11.24 \pm 0.52)%及(15.55 \pm 0.31)%,组间两两比较差异有统计学意义($P < 0.05$);随着棕榈酸剂量的增加,细胞 Caspase-12 蛋白表达增加($P < 0.05$)。**结论** 棕榈酸能抑制细胞增殖,增加 Caspase-12 蛋白表达,促进 HSC 凋亡。

关键词: 肝星状细胞;棕榈酸;细胞增殖;细胞凋亡;半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 12(caspase-12)

中图分类号: R575.5

文献标识码: A

Effect of palmitic acid on caspase-12 and proliferation and apoptosis of hepatic stellate cells*

Ya-nan Li¹, Yu Yan², Ming Wang¹, Fang Liu¹, Yong-hong Xiao¹

(1. College of Public Health, 2. College of Clinical Medicine, North China University of Science and Technology; Tangshan, Hebei 063000, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of palmitic acid (PA) on caspase-12 and proliferation and apoptosis in rat hepatic stellate cells (HSCs) when stimulated by transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1). **Methods** HSCs were randomly divided into five groups: Sham group, TGF- β_1 group, TGF- β_1 + low PA group, TGF- β_1 + middle PA group and TGF- β_1 + high PA group. HSCs were stimulated by TGF- β_1 (5 ng/ml) for 24 hours followed by co-incubation with PA under different doses (50, 100, and 200 μ mol/L). No intervention was performed in Sham group. Cell proliferation was detected by MTT; morphological manifestations of cells were obtained by transmission electronmicroscope; apoptosis rate was determined by flow cytometry; expression levels of caspase-12 was measured by Immunohistochemistry. **Results** Cellular proliferation was significantly inhibited with PA treatment in a dose dependent manner ($P < 0.05$). Transmission electronmicroscope showed typical apoptotic features such as small nuclei, large numbers of mitochondria vacuoles and obvious edge sets of DNA. Treatment of PA dramatically increased apoptosis rate when compared with TGF- β_1 group [(7.26 \pm 0.46)% vs (1.70 \pm 0.14)%, $P < 0.05$; (11.24 \pm 0.52)% vs (1.70 \pm 0.14)%, $P < 0.05$; (15.55 \pm 0.31)% vs (1.70 \pm 0.14)%, $P < 0.05$].

收稿日期: 2017-07-08

* 基金项目: 河北省自然科学基金资助项目(No: H2015209043)

[通信作者] 肖永红, E-mail: kycxyh@tom.com; Tel: 0315-8805226

$P < 0.05$]. Expression of caspase-12 protein increased significantly with PA in dose dependent manner ($P < 0.05$). **Conclusion** PA inhibits cellular proliferation through promoting caspase-12 mediated apoptosis in HSCs.

Keywords: hepatic stellate cell; palmitic acid; proliferation; apoptosis; caspase-12

肝纤维化(hepatic fibrosis, HF)是对慢性肝损伤的愈合反应,为一个可逆的过程^[1]。肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)是肝脏分泌细胞外基质(extra cellular matrix, ECM)的主要细胞, HSC 激活并转化为肌成纤维细胞样细胞是 HF 发生、发展的核心环节^[2]。而转化生长因子 β_1 (transforming growth factor beta-1, TGF- β_1)可以激活 HSC 并增加多种促纤维化因子的表达,在肝纤维化中起重要作用^[3]。如何逆转 HF 的进程是抗 HF 研究的重点之一。近年来,针对诱导活化的 HSC 凋亡成为研发抗 HF 药物的热点。棕榈酸是一种动植物体内常见的高级饱和脂肪酸,有研究报告^[4],棕榈酸刺激巨噬细胞的脂肪细胞脂肪酸结合蛋白(A-FABP)表达增加,可引起巨噬细胞内质网应激和凋亡,从而发挥促动脉粥样硬化作用。亦有研究报告^[5-6],棕榈酸通过内质网应激途径诱导成骨细胞凋亡,且呈浓度和时间依赖性降低成骨细胞增殖活性,增加细胞凋亡,增高细胞内质网应激相关蛋白和基因的表达,但其具体机制目前尚不明确。本研究用棕榈酸作用于经 TGF- β_1 刺激的 HSC,观察细胞增殖、凋亡及 ERS 标志性蛋白 Caspase-12 的变化,旨在从 ERS 途径探讨棕榈酸对 HSC 凋亡的影响,以为 HF 的治疗提供新的靶点。

1 材料与方法

1.1 细胞株

表型为活化的 HSC 株,从四氯化碳刺激的大鼠肝细胞中分离并获得永生性。

1.1.1 药品与试剂 棕榈酸(购自北京百威灵公司),二甲基亚砷(DMSO)、青霉素及链霉素混合液(双抗)(美国 Sigma 公司生产),胎牛血、DMEM 高糖培养基、磷酸盐缓冲液及含体积分数 0.25% 乙二胺四乙酸(EDTA)胰蛋白酶(购自美国 BI 公司),TGF- β_1 (批号:PHG9204,购自美国 Gibco 公司),辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔二抗(美国 Arigo 公司),兔抗鼠 Caspase-12 一抗(武汉博士德有限公司),FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I(购自美国 BD 公司)。

1.1.2 仪器 3111 细胞孵育箱(美国 Thermo 公司),FACScalibur 流式细胞仪(美国贝帝公司),

AC24S1 生物安全柜(新加坡 ESCO 公司),TS100F 倒置相差显微镜(日本 Nikon 公司),Universal Hood II 凝胶成像分析仪,7500 透射电子显微镜(日本 Hitachi 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将存放于液氮中的细胞复苏传代培养于含有 6% 胎牛血清、1% 双抗(100 u/ml 青霉素、100 μ g/ml 链霉素)DMEM 高糖培养基中,在 37 $^{\circ}$ C、5% 二氧化碳 CO₂ 孵箱中进行孵育。当细胞长满密度达到 80% 时,胰蛋白酶进行传代并接种在细胞培养瓶中。

1.2.2 细胞分组及处理 空白组, TGF- β_1 组, TGF- β_1 低、中、高剂量棕榈酸组。空白组加入无血清培养基培养 48 h, TGF- β_1 组加入 5 ng/ml TGF- β_1 作用细胞 48 h, TGF- β_1 低、中、高剂量棕榈酸组先用 5 ng/ml TGF- β_1 作用细胞 24 h,再分别加入 50、100 及 200 μ mol/L 棕榈酸,培养 24 h 后检测各项指标的改变。

1.2.3 MTT 比色法检测 HSC 增殖^[7] 细胞经常规培养后,以 2.5×10^4 个/孔的密度接种于 96 孔板中,每孔 200 μ l 细胞悬液,每组设置 5 个复孔并在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 孵箱中进行孵育 48 h,在培养结束前,每孔加入 20 μ l MTT 避光孵育 4 h,4 h 之后弃去上清液,加入 200 μ l DMSO,避光震荡 10 min 后酶标仪 490 nm 波长处读取光密度值(OD),计算细胞相对增殖率(relative growth rate, RGR) RGR= 实验组 OD490/ 对照组 OD490 \times 100%。

1.2.4 透射电子显微镜观察 HSC 超微结构的改变^[8] 将细胞处理后进行消化、离心,预冷的 PBS 洗 3 遍,戊二醛 4 $^{\circ}$ C 固定过夜。然后用 PBS 缓冲液洗 2 h,锇酸固定 1.5 h, PBS 再次清洗 2 h,然后依次经过酒精(30%、50%、70%、90%、100%)脱水,树脂包埋, AOE 型钻石切片进行超薄切片,枸橼酸铅,醋酸铀双染,透射电子显微镜观察 HSC 细胞内超微结构的改变。

1.2.5 AV/PI 双染检测 HSC 凋亡^[9] 细胞经过处理后,预冷 PBS 清洗 3 遍,胰蛋白酶进行消化,离心,沉淀细胞,弃去培养基,预冷 PBS 再次清洗 3 遍;预留 1/3 空白组细胞,不加任何染料,作为阴性对照组,剩下细胞加入 $1 \times$ Binding buffer 195 μ l + 5 μ l An-

nexin V,轻轻吹打进行混匀,避光孵育 30 min,离心沉淀细胞,弃上清液,加入 $1 \times$ Binding buffer $195 \mu\text{l} + 5 \mu\text{l}$ PI,轻轻吹打混匀,之后流式细胞仪检测。

1.2.6 免疫细胞化学法检测 HSC 内 Caspase-12 蛋白表达^[9] 取对数生长期的细胞,胰蛋白酶消化,接种在带有玻片的 6 孔板内,按照各处理组操作完成后,将培养板孔中的盖玻片取出,PBS 冲洗 2 次,用 4%多聚甲醛固定,按 SP 法试剂盒操作方式进行 Caspase-12 蛋白免疫细胞化学染色,DAB 显色后,显微镜下观察后摄片。结果判定:以胞浆棕黄色为阳性表达。

图像分析:将染色后的细胞爬片经 Image-pro plus 专业图像分析系统进行半定量分析,200 倍视野下每组图片随机选取 6 个视野,取其积分光密度值作为 Caspase-12 蛋白表达。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 17.0 统计软件,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用方差分析,两两比较用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞增殖情况

经单因素方差分析结果显示,各组 OD 值比较差异有统计学意义($F=195.25, P=0.000$),TGF- β_1 组与空白组比较 OD 值增高($P < 0.05$);不同浓度棕榈酸均抑制细胞增殖($P < 0.05$),且随着剂量的增加,细胞 RGR 降低,低、中、高剂量棕榈酸组,组间两两比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 HSC 细胞内超微结构的改变

空白组细胞体积较大,轮廓不规则,伸展性好,周缘伸出密集不规则的树枝状伪足。胞内超微结构可见正常微绒毛、线粒体、粗面内质网、游离核糖体和细胞核(见图 1A);TGF- β_1 组和空白组无差异,有完整的细胞器,细胞核处于分裂相,染色质分布均匀(见图 1B);TGF- $\beta_1 +$ 低剂量棕榈酸组,细胞表面微绒毛消失,表面平滑,胞浆收缩(见图 1C);TGF- $\beta_1 +$ 中剂量棕榈酸组染色质凝集、浓缩(见图 1D);TGF- $\beta_1 +$ 高剂量棕榈酸组染色质密度增加,沿核膜边集,厚薄不均,细胞质内出现大量空泡,细胞核变小等典型细胞凋亡特征(见图 1E)。

2.3 各处理组细胞间凋亡率

流式细胞仪检测各处理肝星状细胞凋亡散点图,见图 2。经统计学分析显示,不同处理组间细胞

凋亡率差异均有统计学意义($F=707.27, P=0.000$),TGF- β_1 组凋亡率低于空白组($P < 0.05$);随着棕榈酸剂量加大,细胞凋亡率增加。见表 2。

2.4 HSC 内 Caspase-12 蛋白表达

不同处理组 HSC 免疫组织化学结果见图 3。与空白组比较,TGF- β_1 组 HSC 的细胞浆染色深浅不明显(见图 3B);低、中、高剂量棕榈酸细胞浆出现棕黄色,且随着剂量的增加,细胞浆棕黄色逐渐加深(见图 3C-E)。与空白组比较,TGF- β_1 组 Caspase-12 蛋白表达未见差异($P > 0.05$),不同剂量棕榈酸

表 1 不同处理组 HSC 吸光度的改变 ($n=5, \bar{x} \pm s$)

组别	OD($\bar{x} \pm s$)	RGR/%	F 值	P 值
空白组	1.28 \pm 0.13	100.00		
TGF- β_1 组	1.85 \pm 0.11 ¹⁾	144.00		
TGF- $\beta_1 +$ 棕榈酸组				
低	0.98 \pm 0.08 ¹⁾²⁾	76.56	195.25	0.000
中	0.78 \pm 0.04 ¹⁾²⁾³⁾	60.93		
高	0.44 \pm 0.03 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾	34.37		

注:1)与空白组比较, $P < 0.05$;2)与 TGF- β_1 组比较, $P < 0.05$;3)与 TGF- $\beta_1 +$ 低剂量棕榈酸组比较, $P < 0.05$;4)与 TGF- $\beta_1 +$ 中剂量棕榈酸组比较, $P < 0.05$

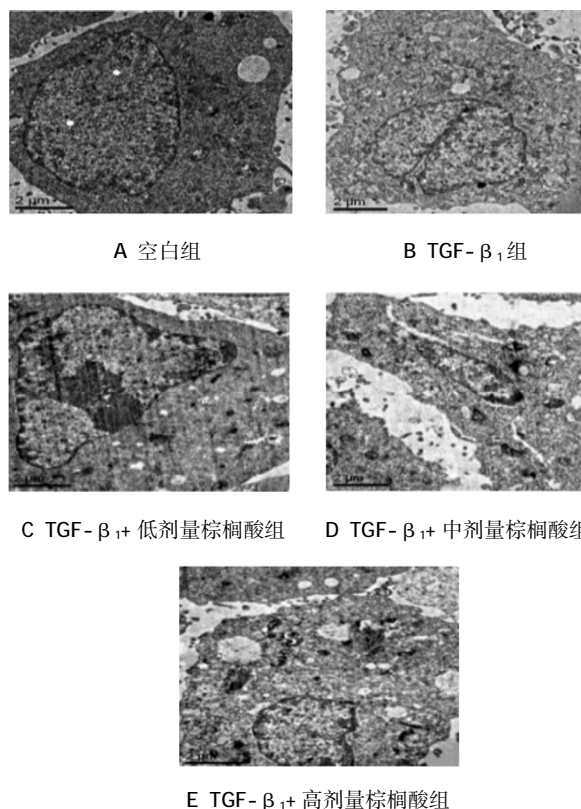


图 1 透射电子显微镜下各处理组细胞的形态变化

使 HSC 中 Caspase-12 蛋白表达增强 ($P < 0.05$)。见 表 3。

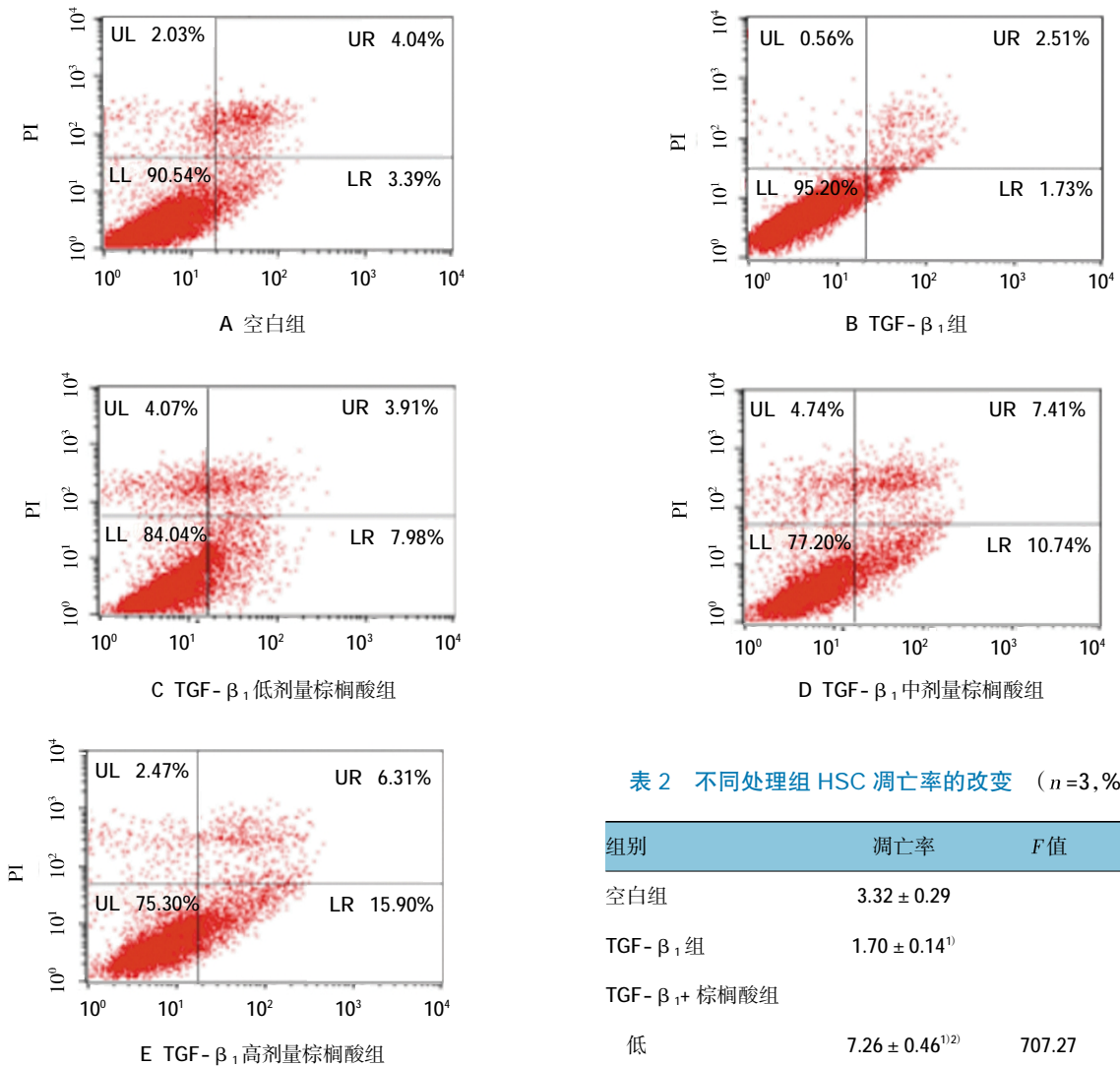


图 2 不同处理组 HSC 凋亡散点图

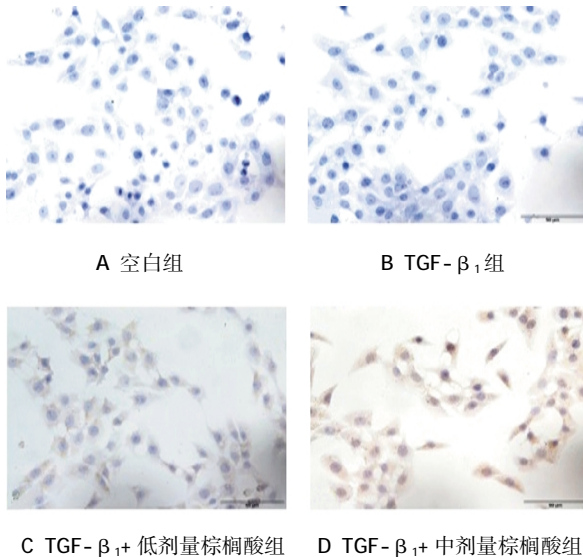


表 2 不同处理组 HSC 凋亡率的改变 ($n=3, \%, \bar{x} \pm s$)

组别	凋亡率	F 值	P 值
空白组	3.32 ± 0.29		
TGF-β ₁ 组	1.70 ± 0.14 ¹⁾		
TGF-β ₁ + 棕榈酸组			
低	7.26 ± 0.46 ¹⁾²⁾	707.27	0.000
中	11.24 ± 0.52 ¹⁾²⁾³⁾		
高	15.55 ± 0.31 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾		

注:1)与空白组比较, $P < 0.05$; 2)与 TGF-β₁组比较, $P < 0.05$; 3)与 TGF-β₁+ 低剂量棕榈酸组比较, $P < 0.05$; 4)与 TGF-β₁+ 中剂量棕榈酸组比较, $P < 0.05$

图 3 各处理组细胞中 Caspase-12 蛋白的表达 (免疫组织化学)

表 3 各组 HSC 中 Caspase-12 蛋白表达 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	Caspase-12 表达	F 值	P 值
空白组	4 827.12 \pm 116.10		
TGF- β_1 组	4 845.49 \pm 131.27		
TGF- β_1 + 棕榈酸组			
低	6 545.90 \pm 205.89 ¹⁾	517.52	0.000
中	8 352.85 \pm 212.46 ¹⁾²⁾		
高	9 619.55 \pm 114.64 ¹⁾²⁾³⁾		

注:1)与空白组比较, $P<0.05$;2)与 TGF- β_1 组比较, $P<0.05$;3)与 TGF- β_1 + 低剂量棕榈酸组比较, $P<0.05$

3 讨论

传统观点认为, HF 形成过程中的关键效应细胞是 HSC。TGF- β_1 刺激 HSC 可作为体外的 HF 模型,可以用于进行 HSC 基因表达调控、抗纤维化药物作用及纤维化发生机制等研究^[9]。促进活化的 HSC 凋亡,有助于逆转 HF。棕榈酸是一种在生物体内广泛存在的饱和脂肪酸,又称十六烷酸。有研究表明,棕榈酸对 β TC6 细胞增殖率及胰岛素的合成有抑制作用,并且呈时间-剂量依赖性作用,证实棕榈酸对 β TC6 细胞的毒性损伤作用^[10]。本研究用不同剂量棕榈酸作用于经 TGF- β_1 刺激的 HSC, MTT 结果显示,低、中、高剂量棕榈酸增殖率依次降低,说明棕榈酸明显抑制 HSC 增殖。

PARK 等^[11]发现, HSC 经棕榈酸处理后其线粒体和内质网较对照组疏松,当加入 Caspase、p53 或内质网应激抑制剂能使细胞增殖水平恢复。表明棕榈酸能抑制细胞增殖可能与细胞凋亡、自噬和内质网应激有关。有研究发现^[9], 棕榈酸可诱导包括成骨细胞在内的多种细胞凋亡,内质网应激可能参与棕榈酸诱导成骨细胞凋亡过程。

内质网应激反应在棕榈酸诱导的人脐带间充质干细胞、胰岛细胞凋亡中也发挥重要作用^[12-14]。内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)是继死亡受体活化和线粒体损伤之后第 3 条介导细胞凋亡的信号转导通路。其中 ERS 有 1 条特有 Caspase-12 途径, Caspase-12 与其他的 Caspases 一样以无活性的酶原形式存在。ERS 引起 Caspase-12 激活, 激活的 Caspase-12 切割并激活 Caspase-9, 活化的 Caspase-9 激活 Caspase-3 等效应 Caspases, 导致细胞凋亡。BITKO 等^[15] 研究发现, 由呼吸道合胞病毒引起的 A549 人肺上皮细胞凋亡与 Caspase-12 活化及 ERS

有关。本实验通过免疫组织化学检测法发现, 低、中、高剂量棕榈酸上调细胞内 Caspase-12 表达水平。

研究结果表明, 棕榈酸能抑制细胞增殖, 增加 Caspase-12 蛋白表达, 促进 HSC 凋亡。用棕榈酸干预可能为抗纤维化的治疗带来了新的提示。

参 考 文 献:

- [1] 黄艳, 黄成, 李俊. 肝纤维化病程中 Kupffer 细胞分泌的细胞因子对肝星状细胞活化增殖、凋亡的调控[J]. 中国药理学通报, 2010, 26(1): 9-13.
- [2] 唐桂连. 肝星状细胞与肝纤维化[J]. 国际消化病杂志, 2012, 32(5): 270-273.
- [3] ZHOU W C, ZHANG Q B, QIAO L. Pathogenesis of liver cirrhosis[J]. World Journal of Gastroenterology, 2014, 20(23): 7312-7324.
- [4] 李卉. 脂肪酸结合蛋白在棕榈酸诱导巨噬细胞凋亡中的作用和机制[D]. 长沙: 中南大学, 2012.
- [5] 辛莹. 内质网应激介导棕榈酸诱导的成骨细胞凋亡[D]. 郑州: 郑州大学, 2015.
- [6] NIELSON C M, MARSHALL L M, ADAMS A L, et al. BMI and fracture risk in older men: the osteoporotic fractures in men study (Mr OS)[J]. J Bone Miner Res, 2011, 26(3): 496-502.
- [7] 李喜艳, 王加启, 魏宏阳, 等. MTT 比色法检测赖氨酸、蛋氨酸对体外培养的奶牛乳腺上皮细胞增殖的影响[J]. 生物技术通报, 2010, 3(39): 143-148.
- [8] 王铭, 闫宇, 李雅楠, 等. 衣霉素对转化生长因子 β_1 的肝星状细胞增殖、凋亡及 Caspase-9 蛋白表达的影响[J]. 中国临床药理学杂志, 2016, 33(1): 40-43.
- [9] 梁晓飞, 王铭, 肖永红. 粉防己碱对小鼠肺成纤维细胞的凋亡及 Caspase-3 蛋白的影响[J]. 中国临床药理学杂志, 2016, 32(6): 531-533.
- [10] 陈丹玲. ERp46 在棕榈酸诱导的内质网应激中的保护作用及 Exendin-4 的干预研究[D]. 福州: 福建医科大学, 2012.
- [11] PARKE J, LEE A Y, PARK S, et al. Multiple pathways are involved in palmitic acid-induced toxicity[J]. Food and Chemical Toxicology, 2014, 67(5): 26-34.
- [12] LU J, WANG Q, HUANG L, et al. Palmitate causes endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human mesenchymal stem cells: prevention by AMPK activator [J]. Endocrinology, 2012, 153(11): 5275-5284.
- [13] ZHAO Y, TAN Y, XI S, et al. A novel mechanism by which SDF-1 β protects cardiac cells from palmitate-induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis via CXCR7 and AMPK/p38 MAPK-mediated interleukin-6 generation [J]. Diabetes, 2013, 62(7): 2545-2558.
- [14] SIMON-SZABÓL, KOKAS M, MANDLI, et al. Metformin attenuates palmitate-induced endoplasmic reticulum stress, serine phosphorylation of IRS-1 and apoptosis in rat insulinoma cells[J]. PLoS One, 2014, 9(6): e97868.

- [15] NAKAGAWA T, ZHU H, MORISHIMA N, et al. Caspase-12 mediates ER-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid- β [J]. Nature, 2000, 403(6765): 98-103.

(王荣兵 编辑)

《中国现代医学杂志》投稿须知

《中国现代医学杂志》创刊于 1991 年, 期刊号 ISSN1005-8982/CN43-1225/R, 旬刊, 系中国科技论文统计源期刊、北京大学图书馆中文核心期刊、中国核心学术期刊(RCCSE)(A-)及湖南省十佳期刊, 被中国知网、万方数据库、超星域出版、美国《化学文摘》(CA)、俄罗斯《文摘杂志》(AJ)等国内外多个检索系统收录, 公开发行。本刊是中华人民共和国教育部主管的国家级综合性医学学术期刊, 以服务于广大医药卫生科技人员, 促进国内外医学学术交流和医学事业发展为宗旨。由中南大学、中南大学肝胆肠外科研究中心主办, 中南大学湘雅医院承办。

本刊刊登的论文内容涉及基础医学、临床医学、预防医学及医学相关学科的新理论、新技术、新成果以及医学信息、动态等。文稿须具有科学性、创新性、实用性。文字要求准确、通顺、精练。本刊设基础研究·论著、临床研究·论著、综述、新进展研究·论著、临床报道、学术报告、病例报告等栏目。学术报告类论文字数控制在 3000 字以内; 病例报告类论文字数控制在 800 字以内。稿件格式为题名、作者姓名、作者单位、邮编、摘要(具体要求见投稿细则)、关键词、正文、参考文献。

本刊对国家级的科研成果或阶段性成果及部级以上课题项目的进展报道实行速审快发。一般稿件 2 个月内有评审结果, 录用后等待发表。请作者自行登录本刊网站(www.zgxdyx.com)查询稿件处理结果, 恕不另行通知。稿件发表后, 赠当期杂志 2 本。

投 稿 细 则

1. 文稿力求文字精练、准确、通顺; 文题简明、醒目, 能反映出文章的主题; 勿用不规范字。请作者仔细校对全文, 并认真复核数据。摘要应与正文内药物剂量、病例数、百分比等数据一致。如有错误, 将降低审稿人和编辑对该文真实性的信任度, 导致退稿。	6. 所有栏目需附关键词 3~5 个, 其中临床报道、学术报告和病例报告只需中文关键词, 其余栏目需中英文关键词齐全。
2. 文题中不使用英文缩略语。摘要中一般也不使用英文缩略语, 如因为该词出现多次而需要使用时, 应于首次出现处先写出中文全称, 然后括号内注明英文缩略语(此处不写出英文全称)。正文中首次使用英文缩略语时, 也应于首次出现处先写出中文全称, 然后括号内注明英文全称及英文缩略语。此规则对已公知、公用的缩略语除外。	7. 照片、图片(黑白原始照片必须清晰, 大小 5 cm × 7 cm), 须在文章内标明其位置, 并附标题, 显微镜下照片应标明放大倍数, 图背面标明作者姓名、文章编号、图序及照片方向(上、下)。
3. 单位介绍信原件, 注明稿件非一稿多投。采用网上投稿方式时, 请将该介绍信照片插入提交的论文 Word 文稿第一页。	8. 所有栏目参考文献须引用 10 条以上, 以近 5 年文献为主。引用期刊的格式为: 作者·文题·刊名, 年, 卷(期): 起止页码; 引用书籍的格式为: 著者·书名·版次·出版地: 出版社, 年份: 起止页码; 每条参考文献应列出作者姓名, 如超过 3 名者, 则在 3 名作者后写等。中文格式: 解勤之, 陈方平, 蹇在伏, 等. 红细胞收缩: 血小板无力症的可能代偿机制[J]. 中国医学工程, 1998, 8(11): 3-5。英文格式: SZEMAN B, NAGY G. Changes in cognitive function in patient with diabetes mellitus[J]. Orv Hetil, 2012, 153(9): 323-329。
4. 所有栏目投稿的中英文论文题目、作者姓名及作者单位需齐全(每位作者只标注一个主要单位, 其余的可以作者简介方式在首页左下角注明, 标注通信作者的必须留下通信作者本人的电话或电子邮箱, 以便核实)。	9. 综述第一作者须有副高以上职称证明(参考文献 35 条以上)。
5. 栏目对中英文摘要的要求: 基础研究·论著、临床研究·论著、新进展研究·论著需中英文摘要齐全, 并按目的、方法、结果、结论四要素书写, 200~500 个字。综述需中英文摘要齐全, 不需按四要素书写。临床报道和学术报告只需中文摘要, 病例报告无需中英文摘要。	10. 凡国家、省部级自然科学基金、博士基金、863 计划及国家重点实验室项目的论文, 请注明基金名称及编号并附相关项目批准文件或任务书复印件, 可优先发表。项目主要负责人为通信作者。采用网上投稿方式时, 请将相关证明材料的照片插入提交的论文 Word 文稿最后一页。