

文章编号:1004-7220(2012)02-0133-06

· 专栏论著 ·

低载荷机械振动对去势大鼠骨组织成骨 相关蛋白表达情况的影响

李明^{1,2}, 高甲子³, 谭磊¹, 朱东¹, 闫玉仙⁴, 宫赫³, 张西正⁵

(1. 吉林大学第一医院, 长春 130021; 2. 西安市红十字会医院, 西安 710054; 3. 吉林大学机械学院, 长春 130025;
4. 武警后勤学院 实验管理中心, 天津 300162; 5. 军事医学科学院 卫生装备研究所, 天津 300161)

摘要: 目的 通过对去势大鼠加载不同时段低载荷机械振动, 探讨不同的振动持续时间对骨质疏松大鼠骨组织成骨相关蛋白表达的影响。方法 6个月龄雌性 Wistar 大鼠 24 只, 随机分为 8 周去势对照组 (C8)、12 周去势对照组 (C12)、8 周振动组 (V8) 和 12 周振动组 (V12)。所有大鼠接受去势手术 1 周后开始实施振动试验, 对 V8 组与 V12 组大鼠分别加载 35 Hz、0.25 g 的低载荷机械振动, 每天 15 min; 去势对照组不做处理。8 周与 12 周后分两批断颈处死大鼠, 采用 Western blot 技术检测各组大鼠成骨相关蛋白 BMP-2、p-ERK、Runx2、OCN 的表达。结果 低载荷机械振动能够显著上调去势大鼠骨组织 BMP-2、p-ERK、Runx2 和 OCN 的蛋白表达水平 ($P < 0.01$), 随着振动时间的延长, V12 组较 V8 组蛋白含量分别增加了 22.61% ($P < 0.05$)、27.96% ($P < 0.01$)、25.85% ($P < 0.01$)、27.05% ($P < 0.01$); 去势对照组间各蛋白表达水平无明显差异 ($P > 0.05$)。结论 低载荷机械振动能够上调骨组织成骨相关蛋白的表达水平, 并随着振动时间的增加显现出更为优越的成骨作用。

关键词: 低载荷; 机械振动; 去势大鼠; 蛋白表达

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

Effects of low-intensity mechanical vibration on expression level of osteogenesis-related proteins in ovariectomized rats

LI Ming^{1,2}, GAO Jia-zi³, TAN Lei¹, ZHU Dong¹, YAN Yu-xian⁴, GONG He³, ZHANG Xi-zheng⁵ (1. *The First Hospital of Jilin University, Changchun 130021, China*; 2. *Xi'an HongHui Hospital, Xi'an 710054, China*; 3. *College of Machinery and Engineering, Jilin University, Changchun 130025, China*; 4. *Academy of Military Medical Science, Tianjin 300162, China*; 5. *Institute of Medical Equipment, the Academy of Military Medical Sciences, Tianjin 300161, China*)

Abstract: Objective To investigate the effects of different vibration durations on expression level of osteogenesis-related proteins by loading low intensity mechanical vibration in the ovariectomized (OVX) rats. **Methods** Twenty-four 6-month old female Wistar rats were ovariectomized and then randomly divided into 8-week-control group (C8), 12-week-control group (C12), 8-week-vibration group (V8), and 12-week-vibration group (V12). Vibration treatment was started one week after all the rats were ovariectomized. Rats in both V8 and V12 groups were loaded with 35 Hz, 0.25 g low intensity mechanical vibration for 15 minutes per day. C8 and C12 groups served as control without any treatment. Rats were executed in batch at 8th and 12th week, respectively, to analyze expression level of osteogenesis-related proteins, including BMP-2, p-ERK, Runx2 and OCN. **Results** Low-intensity mechanical vibration enhanced the osteogenesis-related protein expression in OVX rats ($P < 0.01$).

收稿日期:2012-03-01; 修回日期:2012-03-28

基金项目:国家自然科学基金资助项目(10972090, 10832012, 10872078), 吉林大学科学前沿与交叉学科创新项目(20090372)。

通讯作者:朱东, E-mail:swyxgc@126.com; 闫玉仙, E-mail:yyx19683@126.com。

With the extension of vibration duration, the osteogenesis related proteins BMP-2, p-ERK, Runx2 and OCN in V12 group were increased by 22.61% ($P < 0.05$), 27.96% ($P < 0.01$), 25.85% ($P < 0.01$), 27.05% ($P < 0.01$), respectively, as compared with V8 group. But for the control groups, no significant differences were found in expression level of osteogenesis-related proteins. **Conclusions** The low intensity mechanical vibration could elevate expression level of osteogenesis-related proteins, and the osteogenesis was enhanced with the extension of vibration duration.

Key words: Low intensity; Mechanical vibration; Ovariectomized rats; Protein expression

骨质疏松症是一种以低骨量和骨组织的细微结构破坏为特征,导致骨的脆性和骨折危险性增加的一种疾病^[1]。随着全球范围内社会人口老龄化问题的日趋严重,骨质疏松症已成为一个严重的公共健康威胁,对社会及个人造成了沉重的医疗及经济负担^[2-4]。

由于机械刺激能够促进骨形成,故低载荷机械振动作为一种机械信号被广泛研究用于对抗骨质疏松。Rubin等^[5-7]研究发现,频率32~35 Hz、加速度0.2~0.3 g的低载荷机械振动能够增强骨骼的代谢合成,改善大鼠、羊、火鸡等动物的骨质疏松情况;Shi等^[8]与Chow等^[9]研究发现,35 Hz、0.3 g的高频低载振动能够促进去势骨质疏松大鼠的骨折愈合状况。此外,人体的振动实验也获得了类似的结果。Von Stengel等^[10]对108名绝经后妇女施以12个月的全身振动治疗,其结果显示:全身振动能够有效增加腰椎骨密度及下肢肌肉的力量,降低罹患骨质疏松症的风险;Gilsanz等^[11]对低骨量年轻妇女实施30 Hz、0.3 g的振动治疗后发现,患者股骨中段皮质骨及腰椎松质骨的骨量分别增加了3.4%和2.1%,增幅明显高于对照组;Kotel'nikov等^[12]的临床研究表明:24周的全身机械振动能够提升老年绝经妇女髌部骨密度及血清骨钙素的水平。细胞水平的振动实验也证实,低载荷机械振动能够诱导骨髓间充质干细胞(MSCs)向成骨谱系定向分化^[13-14],促进成骨细胞增殖及合成代谢作用^[15],上调成骨相关蛋白的转录和表达^[16],抑制破骨细胞的形成和数量^[17]。

本课题组前期的研究发现:低载荷机械振动能够提升去势大鼠四肢长骨的力学性能^[18],改善松质骨微观结构^[19],促进骨组织合成代谢及骨生长^[20]。然而,有关机械振动促进骨组织合成代谢的作用机制,以及随着振动时间的延长,骨组织成骨相关蛋白表达量变化的趋势及对骨组织的影响,目前尚无定论。因此,本研究拟通过去势手术建立大鼠骨质疏

松模型,在加载不同时段的低载荷机械振动后,通过对骨组织成骨相关蛋白的提取及检测,探讨不同的振动持续时间对骨质疏松大鼠骨组织骨合成代谢的影响。

1 材料与方法

1.1 分组与振动试验

实验选取吉林大学动物实验中心提供的6个月龄雌性Wistar大鼠24只,随机分为4组:8周去势对照组(C8)、12周去势对照组(C12)、8周振动组(V8)和12周振动组(V12),每组6只。采用去势方法建立骨质疏松模型,大鼠分笼饲养,自由取食及活动。所有动物接受去势手术1周后,对V8组和V12组大鼠施以35 Hz、加速度0.25 g的低载荷机械振动,每天振动15 min,V8组持续振动8周,V12组持续振动12周。去势对照C8组与C12组不做处理。振动试验完成后根据各个组别将大鼠断颈处死,于冰上迅速取双侧肱骨头及股骨头,剔除骨膜及软骨,用蒸馏水将残留血液反复冲洗干净后,放入1.5 mL的Eppendorf管,标记后置冻盒中,于-20℃冰箱中预冻30 min后再转入-80℃冰箱中保存备用。

1.2 骨组织蛋白的提取与纯化

取冰冻大鼠骨组织标本,放入盛有液氮的研钵里研磨粉碎,加入裂解液进行裂解并过夜,取上清采用丙酮沉淀法提取蛋白质;使用2-D Clean-Up Kit (Amersham Biosciences,美国)对提取的蛋白质进行纯化。

1.3 Western blot 检测

用BCA法对纯化的蛋白进行定量,一抗分别为:BMP-2单克隆抗体(Santa Cruz,美国1:1 000)、ERK1/2单克隆抗体(Cell Signaling Technology,美国1:2 000)、p-ERK1/2单克隆抗体(Cell Signaling Technology,美国,1:2 000)、Runx2单克隆抗体

(Aviva Systems Biology, 美国)、OCN 多克隆抗体(博奥森, 中国, 1 : 1 000)、 β -actin 单克隆抗体(Santa Cruz, 美国);采用 ECL detection kits(Pierce, 美国)化学发光法检测结果,使用 Quantity One 分析软件(BIO-RAD 公司)进行蛋白质条带定量分析,AU (Darea Ddensity)代表条带的面积 \times 荧光强度,以各种蛋白/ β -actin 的 AU 比值代表各自蛋白的相对含量。

1.4 统计学分析

实验数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)和百分率(%)表示,采用 SPSS 17.0 数据统计软件包处理。Two-Way-ANOVA 比较振动因素、时间因素及其交互效应是否影响成骨相关蛋白的表达水平,然后对有意义的因素进行 LSD 两两比较,以 $P < 0.05$ 为显著性差异。

2 结果

2.1 低载荷机械振动对去势大鼠骨组织 BMP-2 蛋白表达量的影响

各组大鼠骨组织 BMP-2 蛋白的表达量如图 1 所示。振动加载能够改变去势大鼠骨组织 BMP-2 蛋白的表达水平($P < 0.01$),而时间因素对其的影响无统计学意义($P > 0.05$),振动因素与时间因素具有交互效应($P < 0.05$)。与相应的去势对照组相比,8 周振动组和 12 周振动组骨组织 BMP-2 的含量

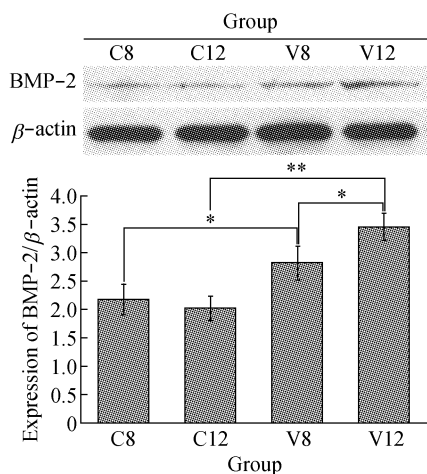


图1 低载荷机械振动对去势大鼠骨组织 BMP-2 蛋白表达的影响 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

Fig.1 Effects of low intensity mechanical vibration on expression level of BMP-2 in ovariectomized rats

分别增加了 29.72% ($P < 0.05$) 和 71.02% ($P < 0.01$),且均具有统计学差异;随着振动时间的增长,12 周振动组较 8 周振动组 BMP-2 蛋白含量增加了 22.61% ($P < 0.05$);而 8 周去势对照组与 12 周去势对照组间 BMP-2 含量差异不大($P > 0.05$)。

2.2 低载荷机械振动对骨组织 ERK 及 p-ERK 蛋白表达水平的影响

低载荷机械振动可以激活 ERK 信号分子,磷酸化活化的 p-ERK 能够转导 BMP-2 介导的成骨信号,通过激活相关成骨基因的转录和表达,调控成骨细胞的分化和增殖。实验结果如图 2 所示。各组 ERK 总蛋白的表达基本一致;振动因素能够影响去势大鼠骨组织 p-ERK 蛋白的表达($P < 0.01$),而时间因素对其的影响无统计学意义($P > 0.05$),振动因素与时间因素具有交互效应($P < 0.01$)。8 周与 12 周的振动能够增加骨组织 p-ERK 蛋白的含量($P < 0.01$),较各自对照组分别增加了 36.67% 和 90.07%;12 周振动组 p-ERK 含量提升更为显著,较 8 周振动组增加了 27.96% ($P < 0.01$);单纯随去势时间的增长对骨组织 p-ERK 蛋白的表达没有显著影响($P > 0.05$)。

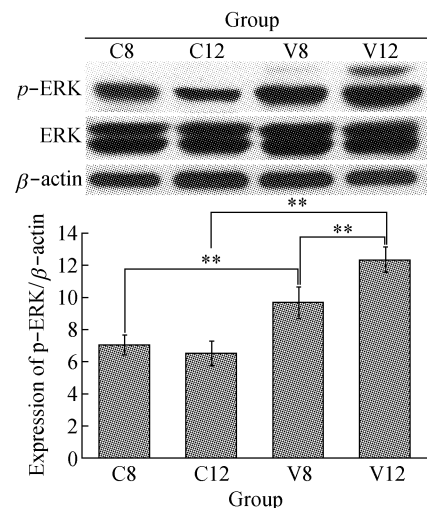


图2 低载荷机械振动对去势大鼠骨组织 ERK 和 p-ERK 蛋白表达的影响 (** $P < 0.01$)

Fig.2 Effects of low intensity mechanical vibration on expression level of ERK and p-ERK in ovariectomized rats

2.3 低载荷机械振动对骨组织成骨特异性转录因子 Runx2 表达量的影响

Runx2 能够对多种成骨信号做出反应,活化的

Runx2 能够激活下游骨钙素、骨桥素、骨涎蛋白和 I 型胶原基因的转录和表达,促进骨合成代谢。实验结果如图 3 所示。振动加载或者随着振动时间的增长,对去势大鼠骨组织 Runx2 蛋白的表达均有显著影响($P < 0.01$),且具有交互效应($P < 0.01$)。通过对比各振动组与其对照组间骨组织 Runx2 蛋白表达的差异,发现机械振动显著提高骨组织 Runx2 的表达水平($P < 0.01$);比较 8 周与 12 周的振动试验对 Runx2 蛋白的影响发现,12 周振动组较 8 周振动组 Runx2 蛋白表达升高了 35.08% ($P < 0.01$);而相应的去势对照组则显现出较低的 Runx2 蛋白水平,并随着去势时间的增长下降了 25.85% ($P > 0.05$)。

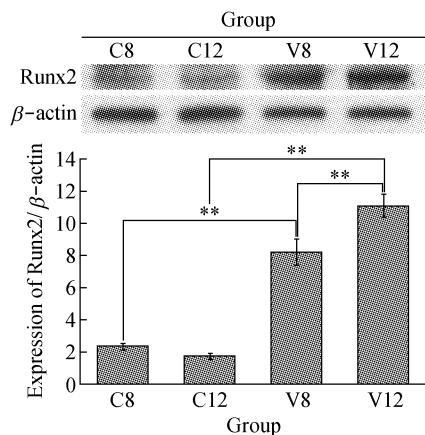


图3 低载荷机械振动对去势大鼠骨组织 Runx2 蛋白表达的影响 (** $P < 0.01$)

Fig.3 Effects of low intensity mechanical vibration on expression level of Runx 2 in ovarioectomized rats

2.4 低载荷振动对成骨细胞矿化标志物 OCN 蛋白表达的影响

OCN 是成骨细胞分化晚期的主要标志物,由成骨细胞合成和分泌,并对骨基质的矿化起主要作用。各组大鼠骨组织 OCN 蛋白表达水平如图 4 所示。振动因素($P < 0.01$)和时间因素($P < 0.05$)均能影响去势大鼠 OCN 蛋白的表达,且具有交互效应($P < 0.01$)。8 周振动组与 12 周振动组大鼠骨组织 OCN 蛋白量均处于较高水平,与相应的去势对照组相比具有显著差异($P < 0.01$);随着振动时间的增长,骨组织 OCN 蛋白的表达明显增加,12 周振动组较 8 周振动组 OCN 提升了 27.05% ($P < 0.01$);去势对照组骨组织 OCN 蛋白水平随时间的增长略有

下降,但无统计学意义($P > 0.05$)。

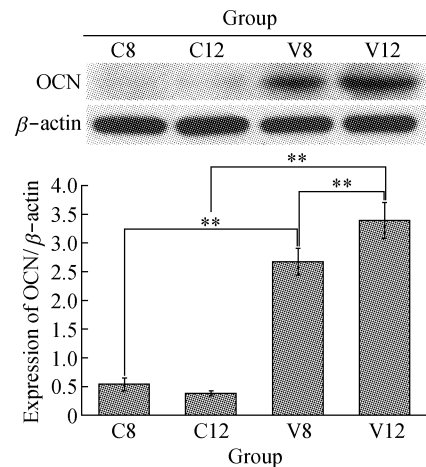


图4 低载荷机械振动对去势大鼠骨组织 OCN 蛋白表达的影响 (** $P < 0.01$)

Fig.4 Effects of low intensity mechanical vibration on expression level of OCN proteins in ovarioectomized rats

3 讨论

在体内骨发生的过程中, BMP-2 能够通过 Smads 信号通路^[21]及 ERK/MAPK 信号通路^[22-23]激活 Runx2 的表达及活化^[24-25],活化的 Runx2 能够与成骨特异性顺式作用元件(OSE2)相结合^[26-27],激活下游骨钙素(OCN)、骨桥蛋白(OPN)、骨涎蛋白(BSP)和 I 型胶原(Col-I)等成骨基因的转录和表达^[28-29],定向诱导成骨细胞的分化和成熟^[30-31],促进骨组织骨合成代谢及骨发生^[32-33]。

本实验采用去势大鼠模型模拟绝经及雌激素减少引起的女性骨质疏松症,通过对大鼠加载不同阶段的低载荷机械振动,发现振动能够明显上调骨组织 BMP-2、p-ERK、Runx2 和 OCN 蛋白的表达水平($P < 0.01$);且随着振动时间的延长,显著上调诱导成骨细胞增殖和分化的 BMP-2 蛋白表达($P < 0.05$),并大幅度上调促进成骨细胞成熟和矿化的 p-ERK、Runx2、OCN 蛋白在骨组织中的表达水平($P < 0.01$),显现出优良的成骨作用。而单纯随着去势时间的增长,骨组织以上蛋白的表达含量虽无统计学差异($P > 0.05$),但均有所减低。

本研究发现,振动加载能够上调去势大鼠骨组织成骨相关蛋白的表达水平,但是振动促进骨组织

合成代谢作用的机制至今尚未完全明了;此外,随着振动时间的延长,骨组织成骨相关蛋白表达量有所增加,但究竟怎样的振动治疗周期才是对抗骨质疏松最优的治疗方案,以及随着振动治疗时段的延长是否会对机体产生不利的影响,还有待进一步探讨。

低载荷机械振动能够上调骨组织成骨相关蛋白的表达量,促进骨组织合成代谢,并随着振动时间的增长,显著增加骨组织中成骨相关蛋白的表达,进而促进骨形成。这为低载荷机械振动作用于机体所产生的成骨作用提供了新的论据,并为今后低载荷机械振动应用于临床治疗骨质疏松症的可能性提供了部分依据。

参考文献:

- [1] NIH consensus development panel on osteoporosis prevention, diagnosis and therapy [J]. *South Med J*, 2001, 94(6): 569-573.
- [2] Braithwaite RS, Col NF, Wong JB. Estimating hip fracture morbidity, mortality, and costs [J]. *J Am Geriatr Soc*, 2003, 51(3): 364-370.
- [3] World Health Organization. Prevention and management of osteoporosis: Report of a WHO scientific group (WHO technical report Series, No 921) [R]. 2003.
- [4] Burge R, Dawson-Hughes B, Solomon DH, *et al.* Incidence and economic burden of osteoporosis-related fractures in the United States 2005-2025 [J]. *J Bone Miner Res*, 2007, 22(3): 465-475.
- [5] Rubin C, Turner AS, Bain S, *et al.* Anabolism. Low mechanical signals strengthen long bones [J]. *Nature*, 2001, 412(6847): 603-604.
- [6] Ozcivici E, Luu YK, Rubin CT, *et al.* Low-level vibrations retain bone marrows osteogenic potential and augment recovery of trabecular bone during reambulation [J]. *PLoS ONE*, 2010, 5(6): e11178.
- [7] Rubin C, Li C, Sun JC, *et al.* Non-invasive stimulation of trabecular bone formation via low magnitude, high frequency strain [C]// Proc 41st Ann Mtg Orthop Res Soc. Orlando, USA: [s. n.], 1995: 548.
- [8] Shi HF, Cheung WH, Qin L, *et al.* Low-magnitude high-frequency vibration treatment augments fracture healing in ovariectomy-induced osteoporotic bone [J]. *Bone*, 2010, 46(5): 1299-1305.
- [9] Chow DH, Leung KS, Qin L, *et al.* Low-magnitude high-frequency vibration (LMHFV) enhances bone remodeling in osteoporotic rat femoral fracture healing [J]. *J Orthop Res*, 2011, 29(5): 746-752.
- [10] Von Stengel S, Kemmler W, Bebenek M, *et al.* Effects of whole-body vibration training on different devices on bone mineral density [J]. *Med Sci Sports Exerc*, 2011, 43(6): 1071-1079.
- [11] Gilsanz V, Wren TA, Sanchez M, *et al.* Low-level, high-frequency mechanical signals enhance musculoskeletal development of young women with low BMD [J]. *J Bone Miner Res*, 2006, 21(9): 1464-1474.
- [12] Kotelnikov GP, Piatin VF, Bulgakova SV, *et al.* Whole body vibration (acceleration) training increases bone mineral density and serum levels of osteocalcin in elderly women [J]. *Adv Gerontol*, 2010, 23(2): 257-262.
- [13] Luu YK, Capilla E, Rosen CJ, *et al.* Mechanical stimulation of mesenchymal stem cell proliferation and differentiation promotes osteogenesis while preventing dietary-induced obesity [J]. *J Bone Miner Res*, 2009, 24(1): 50-61.
- [14] Rubin CT, Capilla E, Luu YK, *et al.* Adipogenesis is inhibited by brief, daily exposure to high-frequency, extremely low-magnitude mechanical signals [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(45): 17879-17884.
- [15] Rosenberg N, Levy M, Francis M, *et al.* Experimental model for stimulation of cultured human osteoblast-like cells by high frequency vibration [J]. *Cytotechnology*, 2002, 39(3): 125-130.
- [16] Zhou Y, Guan X, Zhu Z, *et al.* Osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells on bone-derived scaffolds: Effect of microvibration and role of ERK1/2 activation [J]. *Eur Cell Mater*, 2011, 22: 12-25.
- [17] Esther Lau, Saja Al-Dujaili, Axel Guenther, *et al.* Effect of low-magnitude, high-frequency vibration on osteocytes in the regulation of osteoclasts [J]. *Bone*, 2010, 46(6): 1508-1515.
- [18] Sun DH, Zhao Y, Tan L, *et al.* Mechanical properties in the ovariectomized rat model of osteoporosis after continuous and intermittent vibration [C]//The 3rd International Conference on BioMedical Engineering and Informatics. Yantai, China: [s. n.], 2010: 1214-1216.
- [19] Zhu D, Gao JZ, Ma RS, *et al.* Mechanical stimuli may prevent osteoporosis in ovariectomized rats [J]. *Bone*, 2010, 47(S3): S412.
- [20] Zhu D, Huang X, Ma RS, *et al.* Morphometry in the ovariectomized rat model of osteoporosis after continuous and intermittent vibration [C]//The 3rd International Conference on BioMedical Engineering and Informatics. Yantai, China: [s. n.], 2010: 1229-1231.
- [21] Javed A, Bae JS, Afzal F, *et al.* Structural coupling of Smad and Runx2 for execution of the BMP2 osteogenic signal [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(13): 8412-22.
- [22] Gallea S, Lallemand F, Atfi A, *et al.* Activation of mitogen-activated protein kinase cascades is involved in regulation

- of bone morphogenetic protein-2-induced osteoblast differentiation in pluripotent C2C12 cells [J]. *Bone*, 2001, 28(5): 491-498.
- [23] Jun JH, Yoon WJ, Seo SB, *et al.* BMP2-activated Erk/MAP kinase stabilizes Runx2 by increasing p300 levels and histone acetyltransferase activity [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(47): 36410-36419.
- [24] Kanno T, Takahashi T, Tsujisawa T, *et al.* Mechanical stress-mediated Runx2 activation is dependent on Ras/ERK1/2 MAPK signaling in osteoblasts [J]. *J Cell Biochem*, 2007, 101(5): 1266-1277.
- [25] Ge C, Xiao G, Jiang D, *et al.* Identification and functional characterization of ERK/MAPK phosphorylation sites in the Runx2 transcription factor [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(47): 32533-32543.
- [26] Ziros PG, Gil AP, Georgakopoulos T, *et al.* The bone-specific transcriptional regulator Cbfa1 is a target of mechanical signals in osteoblastic cells [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(26): 23934-23941.
- [27] Costessi A, Pines A, D'Andrea P, *et al.* Extracellular nucleotides activate Runx2 in the osteoblast-like HOBIT cell line: A possible molecular link between mechanical stress and osteoblasts' response [J]. *Bone*, 2005, 36(3): 418-432.
- [28] Franceschi RT, Xiao Guoz. Regulation of the osteoblast-specific transcription factor, Runx2: Responsiveness to multiple signal transduction pathways [J]. *J Cell Biochem*, 2003, 88(3): 446-454.
- [29] Jang WG, Kim EJ, Kim DK, *et al.* BMP2 protein regulates osteocalcin expression via Runx2-mediated Atf6 gene transcription [J]. 2012, 287(2): 905-915.
- [30] Lian JB, Javed A, Zaidi SK, *et al.* Regulatory controls for osteoblast growth and differentiation: Role of Runx/Cbfa/AML factors [J]. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 2004, 14(1-2): 1-41.
- [31] Phimphilai M, Zhao ZR, Boules H, *et al.* BMP signaling is required for RUNX2-dependent induction of the osteoblast phenotype [J]. *J Bone Miner Res*, 2006, 21(4): 637-646.
- [32] Komori T. Requisite roles of Runx2 and Cbfb in skeletal development [J]. *J Bone Miner Metab*, 2003, 21(4): 193-197.
- [33] Lian JB, Stein GS, Javed A, *et al.* Networks and hubs for the transcriptional control of osteoblastogenesis [J]. *Rev Endocr Metab Disord*, 2006, 7(1-2): 1-16.

• 致读者 •

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。有些研究还应说明该研究开始的具体时间。前方必须开门见、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。

方法主要介绍研究对象(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(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。改进的方法应详述改进之外,并以引用文献的方式给出原方法的出处。原封不动地使用他人方法,应以引用文献的方式给出方法的出处,无须展开描述。

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,内容冗长烦琐不易读懂,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,出可以进行必要的讨论,提出建议、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。避免作不成熟的主观推断。讨论中一般不应设置图或表。

本刊编辑部

2012-04-25