

文章编号:1004-7220(2013)04-0454-06

# 低渗联合冻干技术制备脱细胞神经支架 及其力学性能分析

赵斌<sup>1</sup>, 马信龙<sup>1,2</sup>, 孙晓雷<sup>2</sup>, 李秀兰<sup>2</sup>, 马剑雄<sup>1</sup>, 杨召<sup>2</sup>, 李爽<sup>2</sup>, 徐桂军<sup>1</sup>, 杨强<sup>2</sup>

(1. 天津医科大学总医院 骨科生物力学实验室, 天津 300052; 2. 天津市天津医院 骨研所细胞工程室, 天津 300211)

**摘要:** **目的** 研究低渗联合冻干技术改良制备的脱细胞神经支架材料的组织学和生物力学特性。**方法** 采用低渗联合冻干技术对传统脱细胞神经支架材料进行改良,脱细胞完成后通过 HE 染色和扫描电镜观察各组神经组织的组织学结构;利用 Mimics 软件测定脱细胞神经支架的孔隙率及空隙直径;并采用 Endura TEC ELF3200 力学仪器测试各组神经的生物力学特性。**结果** 改良组所获得的脱细胞神经的脱细胞效果与传统脱细胞方法组相似,但组织结构更为疏松;传统和改良脱细胞组平均孔隙率分别为 34.5%、49.3%,空隙直径分别为 11.96、17.61  $\mu\text{m}$ ;生物力学测试结果表明各组神经的生物力学特性(极限载荷、极限应力、极限应变、断裂功耗等)经检验无统计学差异( $P > 0.05$ )。**结论** 低渗联合冻干技术制备的脱细胞神经可作为一种更有利于细胞复合的神经支架材料。

**关键词:** 脱细胞神经; 组织工程; 力学特性

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

## Preparation and biomechanical properties of acellularized nerve scaffold using the technique of hypotonic buffer combined with freeze-drying

ZHAO Bin<sup>1</sup>, MA Xin-long<sup>1,2</sup>, SUN Xiao-lei<sup>2</sup>, LI Xiu-lan<sup>2</sup>, MA Jian-xiong<sup>1</sup>, YANG Zhao<sup>2</sup>, LI Shuang<sup>2</sup>, XU Gui-jun<sup>1</sup>, YANG Qiang<sup>2</sup> (1. Department of Orthopedics, General Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China; 2. Cell Engineering Laboratory of Orthopaedic Institute, Tianjin Hospital, Tianjin 300211, China)

**Abstract: Objective** To study the morphology and biomechanical properties of the improved acellularized nerve scaffold using the technique of hypotonic buffer combined with freeze-drying. **Methods** The traditional acellularized nerve scaffold (traditional group) was made to be improved with the technique of hypotonic buffer combined with freeze-drying (improved group). After the acellularization process was completed, the histological structure of nerves in each group was observed by HE staining and scanning electron microscope. The interval porosity and void diameter in each group were measured by Mimics software. The biomechanical properties of nerves in each group were tested by mechanical apparatus (Endura TEC ELF3200). **Results** The acellularization effect of the improved chemical method with the technique of hypotonic buffer combined with freeze-drying was similar to that of the traditional Hudson method, but the histological structure was more porous in improved group than that in traditional group. The interval porosity of traditional group and improved group were 34.5% and 49.3%, respectively; the void diameter of traditional group and improved group were 11.96 and 17.61  $\mu\text{m}$ , respectively. Biomechanical testing results showed that there was no statistical difference in ultimate load, ultimate stress, ultimate strain and mechanical work to fracture in each group ( $P > 0.05$ ). **Conclusions** The acellularized

收稿日期:2012-10-05; 修回日期:2012-10-09

基金项目:天津市卫生局科技基金项目(2011KZ57), 吴阶平医学基金项目(320.6750.11017), 国家自然科学基金资助项目(31000432)。

通信作者:马信龙, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, E-mail: maxinlong8686@sina.com。

nerve prepared by hypotonic buffer combined with freeze-drying can be used as a new kind of nerve scaffold material to make better contribution to cell combination.

**Key words:** Acellularized nerve; Tissue engineering; Mechanical properties

临床上,由于创伤等原因造成的周围神经缺损非常常见,周围神经损伤成为全球所面临的严峻的健康问题之一<sup>[1]</sup>,神经修复一直是临床上的难题。组织工程学的创立和发展为神经缺损的修复和重建提供了新的思路和方法,寻找合适的支架材料是目前研究的热点之一。

研究表明,天然脱细胞组织工程支架因其高度的仿生性越来越多地受到学者的关注。但传统的天然脱细胞神经支架较致密,孔隙率低且空隙直径相对较小,在复合种子细胞时操作困难,且细胞黏附率及黏附均匀度都较差;另外,脱细胞神经支架还应具有一定的生物力学特性,以满足其为细胞提供结构支撑并抗击外力的作用。本文采用低渗联合冻干技术对传统脱细胞神经支架材料进行改良,以增大其孔隙率和空隙直径,并对其生物力学特性进行检测。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物及主要试剂、仪器

21只新西兰大白兔,体重2.0~2.5 kg,由天津医院动物实验室提供。Triton X-100、SB-10、SB-16 (Sigma公司,美国)。软组织生物力学测试专用冰冻卡具、Endure TEC ELF 3200力学试验仪器及其配套的Wintest生物力学测试软件(Bose公司,美国);平板振荡器(江苏省荣华仪器制造有限公司);光学显微镜(Nikon公司,日本);场发射扫描电镜(LEO公司,德国);冷冻干燥机;体式显微镜。

### 1.2 实验取材及分组

实验动物采用臀部肌肉注射麻醉(氯胺酮,0.1 mg/kg;1 min后速眠新0.1 mg/kg),麻醉成功后于无菌条件下切取双侧坐骨神经,体式显微镜下剥离神经周围结缔组织,取双侧各20 mm长坐骨神经,共42条。随机分为3组,每组14条。A组为正常对照组,B组为Hudson法化学处理组,C组为低渗联合冻干技术改良化学处理组。

### 1.3 实验方法

A组:坐骨神经不经任何处理,取出后立即置于PBS中备用。B组:按照Hudson方法<sup>[2]</sup>进行脱细胞

处理。于25℃条件下将神经组织置于灭菌蒸馏水中低渗处理7 h,振荡器持续震荡,速度80次/min;125 mmol/L SB-10溶液浸泡15 h;灭菌PBS中震荡15 min;0.6 mmol/L SB-16、0.14% Triton X-200溶液浸泡24 h;灭菌PBS中震荡3次(5 min/次);125 mmol/L SB-10溶液浸泡7 h;灭菌PBS中震荡15 min;0.6 mmol/L SB-16、0.14% Triton X-200溶液中浸泡15 h;灭菌PBS中震荡3次(15 min/次)。C组:将B组脱细胞过程中的等渗PBS液换为低渗液,并于脱细胞完成后进行低渗灌注处理8 h,之后进行冷冻干燥处理(将制备好的脱细胞神经支架材料于普通冷冻室内-4℃预冷24 h,然后在-80℃低温冰箱中速冻24 h,再置入-70℃、667 Pa的干燥冷冻机内6 h做冷冻干燥处理);冻干后的支架进行封装后,置常温下保存待用。使用前将支架采用低渗液浸泡水化24 h。

### 1.4 观察指标

**1.4.1 HE染色** 各组中分别随机抽取多条神经,修剪成5 mm的小段,10%甲醛固定,常规石蜡包埋,5 μm厚横、纵切片行HE染色,光镜下观察脱细胞程度和围绕神经轴突的基底膜管结构的完整性。

**1.4.2 扫描电镜观察** 各组中分别随机抽取多条神经,4%戊二醛前固定,1%锇酸后固定,丙酮梯度脱水,临界点干燥,真空喷金镀膜,场发射扫描电镜下观察神经横、纵切面,观察神经细胞、髓鞘及神经基底膜等结构。

**1.4.3 孔隙率及空隙直径测定** 随机选取多张B组、C组电镜图片,采用Mimics软件系统处理图像,计算其孔隙率及空隙直径。

**1.4.3 生物力学测试** 将各组其余样本( $n=8$ )固定于冰冻卡具中部,并保证神经垂直于水平面。卡具与生物力学材料动态力学性能测试仪器相连。此测试仪最大量程为200 N,精确度为0.01 N。5 min后旋紧卡具,此时卡具固定的神经已被冻硬,可确保不会有各向滑动,而外露的神经仍为常温,不会影响其拉伸时的生物力学特性。施加预负荷1 N,使神经紧张后调零。计算机中通过Wintest力学测试软

件将两卡具间距设为 10 mm(即初长度为 10 mm),最大相对位移设定为 6.5 mm,以 10 mm/min 的速度拉伸神经至断裂,拉力和位移每秒取样 5 次。测试过程中用生理盐水保持样本湿润。读取极限载荷(载荷-位移曲线中的最高点力值),读出每个测试点载荷与其对应的位移(见图 1)。按以下公式计算出各组神经生物力学特性。韧度 = 载荷/位移(N/mm);极限应力 = 极限载荷/横截面积(MPa);极限应变 = 极限载荷对应的位移/初长度;弹性模量 = 应力/应变(MPa);断裂功耗 = 载荷-位移曲线中极限载荷点左侧曲线下的面积。

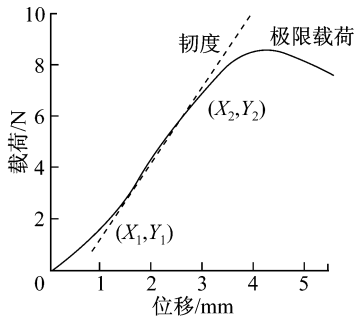


图 1 载荷-位移曲线示意图

Fig. 1 Load-displacement curve

## 1.5 统计学分析

应用 SPSS 18.0 统计学软件对上述结果进行统计学分析。结果用均数 ± 标准差表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 SNK 法。 $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 HE 染色

各组神经 HE 染色结果见图 2。A 组神经纵切面上可见大量许旺细胞及轴突,分布规则,组织结构致密,轴突及髓鞘结构完好;横切面呈大小不一的圆形,细胞核清晰,髓鞘外周淡染呈网格状结构。B 组神经横、纵切面上可见少许细胞残留,纵切面可见红染的神经内膜呈波浪状纵行排列,结构紧密。C 组神经横切面上轴突及细胞均消失,代之以神经内膜形成的不规则空腔;纵切面上也见不到任何细胞,红染的神经内膜呈波浪状纵行排列,结构疏松,神经纤维结构消失而形成管柱状空隙。

### 2.2 场发射扫描电镜

各组神经扫描电镜结果见图 3。A 组神经纵切面上可见许旺细胞及纵行排列的神经纤维,组织结构致密,横切面可见神经纤维粗细不等,中央为轴

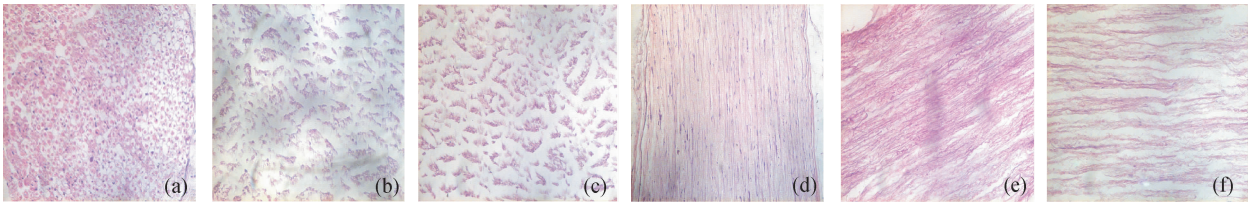


图 2 各组神经 HE 染色(×200) (a) A 组横截面, (b) B 组横截面, (c) C 组横截面, (d) A 组纵截面, (e) B 组纵截面, (f) C 组纵截面

Fig. 2 HE staining of the nerves(×200) (a) The cross-section in group A, (b) The cross-section in group B, (c) The cross-section in group C, (d) The longitudinal section in group A, (e) The longitudinal section in group B, (f) The longitudinal section in group C

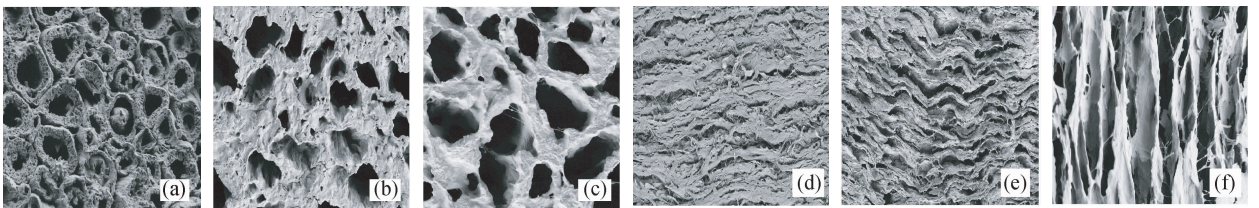


图 3 各组神经电镜观察 (a) A 组横截面(×800), (b) A 组纵截面(×400), (c) B 组横截面(×800), (d) B 组纵截面(×400), (e) C 组横截面(×800), (f) C 组纵截面(×600)

Fig. 3 Scanning electron micrographs of the nerves (a) The cross section in group A(×800), (b) The cross section in group B(×800), (c) The cross section in group C(×800), (d) The longitudinal section in group A(×400), (e) The longitudinal section in group B(×400), (f) The longitudinal section in group C(×600)

突,四周髓鞘包围,神经纤维表面有结缔组织形成的神经内膜包裹,髓鞘、轴突等内容物形态清晰;B组与C组神经结构相似,髓鞘、轴突等结构均消失,纵切面上可见平行排列的许旺细胞基底膜管,但C组与B组相比,组织结构更为疏松。

### 2.3 孔隙率及空隙直径

B组及C组 Mimics 计算结果见表1。两组神经间孔隙率及空隙直径的差异均具有统计学意义( $P < 0.05$ )。

表1 两组神经的孔隙率及空隙直径( $\bar{x} \pm s$ )

Tab.1 The interval porosity and void diameter of Group B and C

分组	空隙直径/ $\mu\text{m}$	孔隙率/%
B组	11.956 $\pm$ 3.095 98	34.5 $\pm$ 7.26
C组	17.612 $\pm$ 3.686 87	49.3 $\pm$ 9.76

### 2.4 生物力学测试

**2.4.1 极限载荷、极限应力、极限应变** 极限载荷直接反映神经的强度,3组中C组最大,A组次之,B组最小,但各组间差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。极限应力即拉伸强度,为作用在神经单位面积上的

表2 3组神经的生物力学特性

Tab.2 The biomechanical properties of peripheral nerve in group A,B,C

分组	极限载荷/N	韧度/( $\text{N} \cdot \text{mm}^{-1}$ )	极限应力/MPa	极限应变	弹性模量/MPa	断裂功耗/mJ
A组	6.69 $\pm$ 1.90	1.66 $\pm$ 0.36	1.11 $\pm$ 0.35	0.43 $\pm$ 0.09	3.73 $\pm$ 1.05	13.18 $\pm$ 4.34
B组	6.57 $\pm$ 2.32	1.72 $\pm$ 0.49	1.29 $\pm$ 0.68	0.42 $\pm$ 0.08	3.33 $\pm$ 1.27	13.11 $\pm$ 7.47
C组	6.92 $\pm$ 1.76	1.94 $\pm$ 0.29	1.53 $\pm$ 0.50	0.39 $\pm$ 0.09	2.45 $\pm$ 0.65	12.93 $\pm$ 4.58

## 3 讨论

### 3.1 支架的组织结构

当前,组织工程技术作为能永久修复组织缺损的理想方法,在种子细胞、支架材料、信号因子及组织构建方面都已取得显著的成就<sup>[3-4]</sup>。以构建组织工程化神经来修复周围神经缺损正日益成为研究的热点,为神经缺损的临床修复带来了新希望。其中,支架材料的选择及其重要,支架材料为细胞的黏附、生长、分化提供空间并且作为细胞进行新陈代谢的场所。研究发现,神经组织工程支架的仿生对神经修复效果有着至关重要的影响<sup>[5]</sup>。首先,周围神经的束样内部结构对于体内神经轴突的长入和髓鞘化

最大应力,消除了横截面积带来的差异,3组中C组最大,B组次之,A组最小,但各组间差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。极限应变等于拉伸断裂时的拉伸量除以样本初长度,3组中A组最大,B组次之,C组最小,但各组间差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

**2.4.2 韧度、弹性模量** 韧度,类似于胡克定律中的常数 $K$ ,代表神经抗形变、抗断裂的特性,决定于神经本身,能直接反应神经的“松散”或“坚韧”,3组中C组最大,B组次之,A组最小,但各组间差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。弹性模量,表示神经抗形变、抗断裂的特性,也是神经内在本质的参数。对脱细胞神经弹性模量的比较能看出不同脱细胞方法对神经本身性质的改变程度,是移植物的刚度指标,3组中A组最大,B组次之,C组最小,但各组间差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

**2.4.3 断裂功耗** 断裂功耗即样本从开始拉伸到断裂期间拉伸所做的所有功,从另一个角度反映了神经的强度,3组中A组最大,B组次之,C组最小,但各组间差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

极限载荷、韧度、弹性模量、断裂功耗等结果见表2。

是必要条件。其次,就是材料的力学特性,神经组织具有较好的柔韧性同时又具有适度的韧度,这对神经组织工程支架材料提出更高的要求。

目前用于神经构建的天然材料(如静脉、肠粘膜管、犬膜基质等)及可降解的化学合成高分子材料尚不能真正模拟神经的结构和力学性能<sup>[6-7]</sup>,越来越多的学者近来较为关注脱细胞神经移植材料来修复周围神经缺损<sup>[8]</sup>。Dumont等<sup>[9]</sup>和Sondell等<sup>[10]</sup>分别利用溶血性磷脂胆碱和脱氧胆酸钠对异体神经进行处理,获得脱细胞异体神经,但上述两种方法对基底膜损害明显。Hudson等<sup>[2]</sup>将Triton X-200与中性去细胞化学剂SB-10、SB-16结合使用,提高了脱细胞及脱髓鞘效率,并且有效地保留了基底膜管结

构的完整性。但上述方法制得的脱细胞神经支架结构致密,孔隙率及空隙直径小而难以满足细胞植入的要求,细胞无法较好地黏附及均匀分布。本实验采用低渗联合冻干技术对传统脱细胞神经支架材料进行改良。低渗能够使组织溶胀,组织结构变得疏松,可使支架的孔隙率及空隙直径增大,且细胞在低渗液中容易洗脱下来;冷冻干燥技术是将湿物料在较低温度下冻结成固态,然后使其中的水分不经液态直接升华成气态,最终使物料脱水的干燥技术。干燥后支架能保持原来的化学组成和物理性质(如多孔结构),且具有优异的复水性,可在短时间内恢复为干燥前的状态。Mackinnon 等<sup>[11]</sup>研究表明,冷冻法、冻干法、神经预变性法处理同种异体神经可以灭活神经内的细胞成分。本实验将神经化学萃取后给予冻干处理,处理后的神经储存方便,不需要特殊设备,且常温下可较长期地保存备用。由于组织工程化神经是在湿润条件下移植,故本实验将低渗联合冻干后的神经进行复水 24 h,之后进行 HE、扫描电镜观察,结果显示冻干复水后的神经完全去除了细胞及髓鞘等结构;且其完整保留了细胞外基质的三维结构、神经原有结构的有序性和趋向性。

另外,本实验采用了 Mimics 软件测量了两组脱细胞神经支架的孔隙率及空隙直径,结果显示低渗联合冻干技术改良制备的脱细胞神经支架孔隙率及空隙直径增大,为后一步的种子细胞复合接种及提高细胞的黏附能力和生物活性,提供了良好的空间构架条件。

### 3.2 支架的生物力学特性

杨力<sup>[12]</sup>认为软组织损伤后具有自我修复功能,但其达不到损伤前的力学强度,生物材料因其在生物力学强度上的优势而倍受关注。另外,冯西桥等<sup>[13]</sup>综述了多种生物材料的生物力学特性,认为天然生物材料具有良好的生物力学特性及高度仿生结构。脱细胞神经支架不仅为细胞提供附着场所、结构支撑的作用,还必须具备与其修复的组织及周围力学环境相适应的生物力学特性(强度、弹性模量等),以更好地适应新生的修复细胞和组织替代的过程<sup>[14]</sup>。

周围神经的良好的生物力学特性主要是由其周围结缔组织维持的,胶原纤维是构成周围神经结缔组织的主要成分,胶原纤维韧性大,抗拉力强,能抵

御一定程度的机械刺激,其类型的分布及量的多少决定着周围神经的生物力学特性<sup>[15]</sup>。研究表明<sup>[16]</sup>,神经脱细胞过程可能在一定程度上去除了一种或多种胶原成分,从而造成神经力学性能的改变。本课题组比较了 Sondell 法和 Hudson 法的脱细胞效果及生物力学特性,结果显示 Hudson 法在去除许旺细胞、轴突、髓鞘和保留神经结构方面优于 Sondell 法,且两法的生物力学特性经统计学检验无统计学差异<sup>[17]</sup>。本实验测定了低渗联合冻干技术改良制备脱细胞神经支架的力学特性,结果显示该法制备的支架与传统 Hudson 法及正常神经相比,生物力学差异无统计学意义。

综上所述,通过低渗联合冻干技术对传统的脱细胞神经支架材料进行改良,极大改善了天然的脱细胞神经支架的孔隙率及空隙直径不能满足组织工程操作要求的问题,并且对改良后的脱细胞神经支架进行了力学测定,证明其力学特性与正常神经相比无统计学差异,这也使得构建后的组织工程神经更有利于进行神经缺损动物模型的体内移植吻合,为体内观察神经修复过程及探索其可能机制打下了稳定的基础。

### 参考文献:

- [1] Scholz T, Krichevsky A, Sumarto A, *et al.* Peripheral nerve injuries: An international survey of current treatments and future perspectives [J]. *J Reconstr Microsurg*, 2009, 25(6): 339-344.
- [2] Hudson TW, Liu SY, Schmidt CE. Engineering an improved acellular nerve graft via optimized chemical processing [J]. *Tissue Eng*, 2004, 10(9-10): 1346-1358.
- [3] Xue C, Hu N, Gu Y, *et al.* Joint use of chitosan/PLGA scaffold and MSCs to bridge an extra large gap in dog sciatic nerve [J]. *Neurorehabil Neural Repair*, 2012, 26(1): 96-106.
- [4] Marconi S, Castiglione G, Turano E, *et al.* Human adipose-derived mesenchymal stem cells systemically injected promote peripheral nerve regeneration in the mouse model of sciatic crush [J]. *Tissue Eng Part A*, 2012, 18(11-12): 1264-1272.
- [5] Xiang N, Wang G. Research progress of neural tissue engineering based on electrically conductive carbon nanotube scaffold [J]. *Zhongguo Xue Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*, 2011, 25(11): 1389-1392.
- [6] Campbell GR, Campbell JH. Development of tissue engineered vascular grafts [J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2007, 8(1): 43-

- 50.
- [7] Tam erler C, Sarikaya M. Molecular biomimetics: Utilizing nature's molecular ways in practical engineering [J]. Acta Biomater, 2007, 3(3): 289-299.
- [8] Chalfoun CT, Wirth GA, Evans GRD. Tissue engineered nerve contrast; here do we stand [J]. J Cell Mol Med, 2006, 10(2): 309-317.
- [9] Dumont CE, Hentz VR. Enhancement of axon growth by detergent-extracted nerve grafts [J]. Transplantation, 1997, 63(9): 1210-1215.
- [10] Sondell M, Lundborg G, Kanje M. Regeneration of the rat sciatic nerve into allografts made acellular through chemical extraction [J]. Brain Res, 1998, 795(1-2): 44-54.
- [11] Mackinnon SE. Pathophysiology of nerve compression [J]. Hand Clin, 2002, 18(2): 231-241.
- [12] 杨力. 软组织修复的生物力学[J]. 医用生物力学, 2009, 24(S1): 6.
- [13] 冯西桥, 曹艳平, 赵红平, 等. 生物材料力学研究新进展 [J]. 医用生物力学, 2011, 26(5): 395-401.
- Feng XQ, Cao YP, Zhao HP, et al. Recent developments in mechanics of biological materials: A brief review [J]. J Med Biomech, 2011, 26(5): 395-401.
- [14] 杨召, 马信龙, 李秀兰, 等. 不同脱细胞方法对周围神经生物力学特性的影响 [J]. 中国生物医学工程学报, 2011, 30(1): 155-159.
- [15] Eather TF, Pollack M, Myers DB. Proximal and distal changes in collagen content of peripheral nerve that follow transection and crush [J]. Exp Neurol, 1986, 92(2): 299-310.
- [16] Borschel GH, Kia KF, Kuzon WM Jr, et al. Mechanical properties of acellular peripheral nerve [J]. J Surg Res, 2003, 114(2): 133-139.
- [17] Ma XL, Yang Z, Sun XL, et al. Biomechanical properties of acellular sciatic nerve treated with a modified chemical method [J]. Neural Regen Res, 2011, 6(4): 252-256.

## · 致读者 ·

# 关于论文写作中的作者署名和致谢

我国著作权法公布以来,已得到社会各界的广泛重视,作为医学科技期刊必须不折不扣地执行著作权法。为此将本刊对作者署名和致谢的有关要求重申如下。

## 1 作者署名的意义和应具备的条件

1.1 署名的意义: (1) 标明论文的责任人, 文责自负。(2) 医学论文是医学科技成果的总结和记录, 是作者辛勤劳动的成果和创造智慧的结晶, 也是作者对医学事业作出的贡献, 并以此获得社会的尊重和承认的客观指标, 是应得的荣誉, 也是论文版权归作者的一个声明。(3) 作者署名便于编辑、读者与作者联系, 沟通信息, 互相探讨, 共同提高。作者姓名在文题下按序排列, 排序应在投稿时确定, 在编排过程中不应再作更改; 作者单位名称及邮政编码脚注于同页左下方。

1.2 作者应具备下列条件: (1) 参与选题和设计, 或参与资料的分析和解释者。(2) 起草或修改论文中关键性理论或其他主要内容者。(3) 能对编辑部的修改意见进行核修, 在学术界进行答辩, 并最终同意该文发表者。以上3条均需具备。仅参与获得资金或收集资料者不能列为作者, 仅对科研小组进行一般管理者也不宜列为作者。其他对该研究有贡献者应列入致谢部分。对文章中的各主要结论, 均必须至少有1位作者负责。在每篇文章的作者中需要确定1位能对该论文全面负责的通讯作者。通讯作者应在投稿时确定, 如在来稿中未特殊标明, 则视第一作者为通讯作者。第一作者与通讯作者不是同一人时, 在论文首页脚注通讯作者姓名、单位及邮政编码。作者中如有外籍作者, 应附本人亲笔签名同意在本刊发表的函件。集体署名的论文于文题下列署名单位, 于文末列整理者姓名, 并于论文首页脚注通讯作者姓名、单位和邮政编码。集体署名的文章必须将对该文负责的关键人物列为通讯作者。

## 2 致谢

在文后致谢是表示感谢并记录在案的意思。对给予实质性帮助而又不能列为作者的单位或个人应在文后给予致谢。但必须征得被致谢人的书面同意。致谢应避免以下倾向: (1) 确实得到某些单位或个人的帮助, 甚至用了他人的方法、思路、资料, 但为了抢先发表, 而不公开致谢和说明。(2) 出于某种考虑, 将应被致谢人放在作者的位置上, 混淆了作者和被致谢者的权利和义务。(3) 以名人、知名专家包装自己的论文, 抬高论文的身份, 将未曾参与工作的, 也未阅读过该论文的知名专家写在致谢中。

被致谢者包括: (1) 对研究提供资助的单位和个人、合作单位。(2) 协助完成研究工作和提供便利条件的组织和个人。(3) 协助诊断和提出重要建议的人。(4) 给予转载和引用权的资料、图片、文献、研究思想和设想的所有者。(5) 作出贡献又不能成为作者的人, 如提供技术帮助和给予财力、物力支持的人, 此时应阐明其支援的性质。(6) 其他需致谢者。