

文章编号:1004-7220(2011)06-0534-06

一种新型机械应变细胞加载装置的研制

胥春¹, 范震², 郝轶¹, 马佳音¹, 李隽¹, 李静¹, 张富强¹

(1. 上海交通大学医学院附属第九人民医院, 口腔修复科, 上海市口腔医学重点实验室, 上海 200011;

2. 同济大学附属口腔医院 口腔种植科, 上海 200072)

摘要: **目的** 研究开发一套具有自主知识产权的数控机械应变细胞加载装置, 为细胞力学研究提供必要的研究手段。**方法** 加载装置基于圆形基底形变技术, 采用数字式测控系统和基于 PC 机平台的专用软件, 实现对体外培养细胞加载牵张应变。采用 MTT 比色实验检测人牙周膜细胞在弹性硅橡胶细胞培养膜上的附着生长能力。采用该装置对体外培养人牙周膜细胞加载 1%、10%、20% 拉伸应变 0.5、1 和 24 h, 倒置相差显微镜观察细胞形态、排列的变化。**结果** 数控机械应变细胞加载装置可对体外培养细胞加载不同强度、频率和时间的拉伸应变, 具有输出应变范围大、精度高、操作方便、显示直观等优点。硅橡胶膜和对照细胞培养板接种细胞 1、2、4、7、8 d 后, MTT 比色实验光吸收值之间无统计学差异 ($P > 0.05$), 显示弹性硅橡胶膜具有良好的细胞附着生长能力。人牙周膜细胞加载 10%、20% 拉伸应变 24 h 后, 细胞形态、排列发生改变, 胞体呈长梭形, 并成栅栏状平行排列, 细胞长轴垂直于拉伸应变方向。**结论** 数控机械应变细胞加载装置可有效地对体外培养细胞加载动态机械拉伸应变, 为体外细胞力学研究提供了必要的研究手段。

关键词: 应变; 加载; 拉伸; 细胞培养; 基底; 形变; 生物力学

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

Development of a novel stretch strain cell loading unit

XU Chun¹, FAN Zhen², HAO Yi¹, MA Jia-yin¹, LI Jun¹, LI Jing¹, ZHANG Fu-qiang¹

(1. Department of Prosthodontics, Shanghai Key Laboratory of Stomatology, Ninth People's Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200011, China; 2. Department of Implantology, the Affiliated Stomatology Hospital of Tongji University, Shanghai 200072, China)

Abstract: **Objective** To develop a set of stretch strain cell loading unit with proprietary intellectual property rights so as to provide a necessary tool for the research of cellular mechanics. **Methods** Based on the deformation theory of round substrates, the stretch strain cell loading unit could apply the stretch strain to cultured cells *in vitro* by utilizing digital measuring-controlling system and computer software. MTT colorimetric test was adopted to evaluate the ability of human periodontal ligament cells (HPDLCs) to attach and grow on the silastic membrane. The cultured HPDLCs were loaded with 1%, 10% and 20% stretch strain for 0.5, 1 and 24 h, respectively, by the loading unit, and an inverted phase contrast microscope was used to observe the morphology and realignment of HPDLCs. **Results** The stretch strain cell loading unit could apply the stretch strain of different magnitude, frequency and duration to cultured cells *in vitro*, with the advantage of a large range strain output, high precision, convenient operation and clear visual monitoring. When cells were seeded for 1, 2, 4, 7, 8 d, respectively, there was no statistical difference between the MTT absorbance value of silastic membrane group and that of control group ($P > 0.05$), showing the good ability of cultured cells to attach and grow on the silastic membrane. After HPDLCs were loaded with 10% and 20% strain for 24 h, the morphology and realignment of HPDLCs changed,

收稿日期:2011-06-15; 修回日期:2011-07-25

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30900282),上海市重点学科建设项目(T0202, S30206-sms02),上海市科学技术委员会资助项目(08411961500,10QA1404200)。

通讯作者:张富强, Tel: (021) 23271699-5207; E-mail: fqzhang@vip.163.com。

and cells became spindle shaped, being parallel to each other with long axis perpendicular to the stretch vector.

Conclusions The stretch strain cell loading unit is capable of loading the stretch strain to cultured cells effectively and provides a necessary method for cytomechanical research.

Key words: Strain; Loading; Stretch; Cell culture; Substrates; Deformation; Biomechanics

细胞力学研究的基础和关键是细胞力学加载技术和加载装置的研究。寻找合适的细胞力学加载方法是细胞力学面临的首要问题。目前体外细胞力学实验方法主要有单细胞力学实验方法^[1]、离心力加载技术^[2-3]、流变学加载技术^[4]、压力加载技术^[5-6]、基底形变加载技术^[7-13]等。其中,基底形变加载技术以弹性膜作为基底材料,通过机械牵拉弹性膜,或利用气压、液压和机械接触引起弹性膜的形变,使附着于膜上的细胞受到牵张力;因为加力方式合理,符合体内多数细胞受力特点,且不限实验周期,是一种较为理想的实验装置。目前基底形变加载技术主要有3种,即矩形基底拉伸法^[7-8]、圆形基底形变法^[9-11]和4点弯曲梁加载法^[12-13]。本课题组在国家自然科学基金和上海市科委基金资助下,研究开发出具有自主知识产权的数控机械应变细胞加载装置(专利号:200610028095.3)。该装置基于圆形基底形变技术,通过数字式测控系统和基于PC机平台的专用软件,可对体外培养细胞加载不同强度、频率和时间的动态机械拉伸应变,具有输出应变范围大、精度高、操作方便、显示直观等优点。该加载装置的研制开发为细胞力学研究提供必要的研究手段。

1 设计原理及结构组成

数控机械应变细胞加载装置基于圆形基底形变技术,由计算机、控制器和应变仪组成(见图1)。控制器采用单片机控制带有光电编码器位移反馈的步进电机,驱动精密凸轮传动系统带动球冠形顶板往返运动,球冠形顶板顶压弹性底细胞培养皿,使培养皿弹性硅橡胶膜发生拉伸变形,从而使附着生长于弹性硅橡胶膜上的细胞受到机械拉伸应变作用,实现对细胞加载机械应变。通过改变球冠形顶板的凸度即可对细胞加载不同大小的拉伸应变。球冠示意图见文献[14]。弹性硅橡胶膜上细胞所受拉伸应变 ε 大小根据文献[15]由下列公式计算得出:

$$\varepsilon = \frac{(\text{球冠表面积} - \text{球冠底面积})}{\text{球冠底面积}} = \frac{(2\pi RH - \pi r^2)}{\pi r^2} = \frac{(2RH - r^2)}{r^2} \quad (1)$$

式中: ε 为拉伸应变, R 为球半径, H 为球冠高度, r 为球冠底面半径。球冠底面半径 r 为28 mm。根据公式,取不同的球冠高度 H 值即可得到不同的应变 ε 大小,并计算得到球半径 R 。根据上述原理,计算得出了一系列球冠形顶板的尺寸^[14],采用硬质聚四氟乙烯材料用数控加工中心加工而成,可对细胞加载1%~25%的拉伸应变。

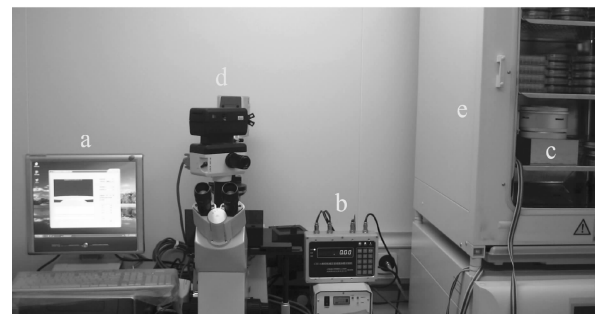


图1 数控机械应变细胞加载装置示意图 (a-计算机, b-控制器, c-应变仪, d-倒置相差显微镜, e-细胞培养箱)
Fig.1 Schematic diagram of the stretch strain cell loading unit (a-Computer, b-Controller, c-Strainer, d-Inverted phase contrast microscope, e-Cell incubator)

弹性底细胞培养皿由上压圈、下压圈、弹性硅橡胶膜、聚四氟乙烯预紧压圈、锁紧螺圈和有机玻璃透明培养皿盖组成(见图2)。弹性硅橡胶膜采用进口医用硅橡胶 Q7-4750 (Dow Corning Co., 美国)模压成直径100 mm、厚150 μm 的圆形薄膜,由上、下压圈夹持,旋紧锁紧螺圈使聚四氟乙烯预紧压圈将弹性硅橡胶膜绷紧。培养皿组装好后除培养皿盖外,可采用高温高压整体消毒灭菌,培养皿盖可采用紫外线照射消毒灭菌。细胞接种于弹性底培养皿中,待细胞贴壁生长后即可将弹性底培养皿安装于应变仪上,置于细胞培养箱中,对细胞加载机械应变。控制器和应变仪之间采用扁平电缆连接,电缆厚度1 mm,不影响细胞培养箱箱门的关闭。



图2 弹性底细胞培养皿 (a - 下压圈, b - 聚四氟乙烯预紧压圈, c - 锁紧螺圈, d - 上压圈, e - 弹性硅橡胶膜, f - 有机玻璃透明培养皿盖, g - 组装完成的培养皿)

Fig.2 Flexible-bottomed culture dish (a - Lower clamping ring, b - Teflon pressing ring, c - Screw ring, d - Upper clamping ring, e - Silastic membrane, f - Transparent plexiglass culture dish cover, g - Assembled culture dish)

加载装置操作程序采用 VC + + 6.0 编写, 由一个主程序和两个 Active X 组件对象模块组成, 计算机软件界面由模拟图形显示、参数设置和操作控制等几部分组成(见图3), 计算机与控制器之间通过 RS 232 接口进行通信。通过计算机输入设置加载时间 T1、T2、T3、T4 4 个时间段(T1、T2、T3、T4 分别为球冠形顶板位于低位、上升、高位、下降时间段)以及球冠形顶板运行高度 H 几项参数, 经 RS 232 接口将参数传给控制器, 同时将光电编码器采集回来的角位移数据反馈回计算机, 精确控制步进电机运行, 计算机实时显示球冠形顶板运行高度和弹性硅橡胶膜拉伸变形量, 并由 OpenGL 组件模块将硅橡胶膜实时拉伸变形量模拟成三维图形显示输出。

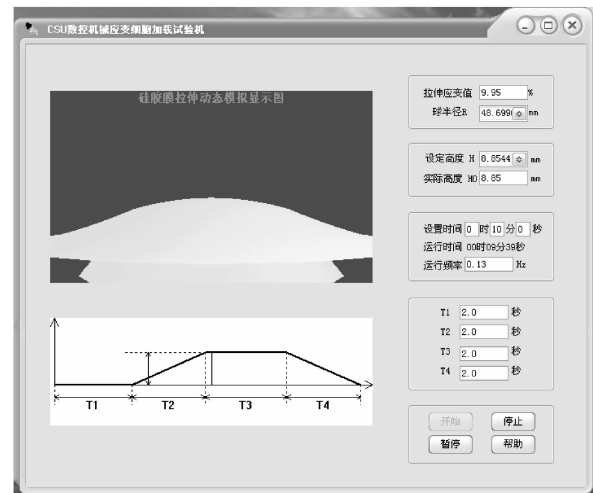


图3 数控机械应变细胞加载装置软件界面

Fig.3 Software interface of the stretch strain cell loading unit

2 弹性硅橡胶膜细胞附着生长能力检测

2.1 材料与方法

将弹性硅橡胶薄膜切成面积为 0.32 cm^2 的圆片, 用双蒸水浸泡 24 h, 75% 酒精反复擦洗, 双蒸水漂洗, $50 \text{ }^\circ\text{C}$ 烘干, 置于玻璃培养皿中, $121 \text{ }^\circ\text{C}$ 高温高压消毒 20 min, 烘干备用。取 96 孔细胞培养板 $\times 5$, 每板取 10 孔分为 2 组; 其中 5 孔各置入 1 片消毒后的硅橡胶圆片, 为硅橡胶膜组; 另 5 孔不放置硅橡胶圆片, 作为对照组。取第 5 代人牙周膜细胞 (human periodontal ligament cells, HPDLCs) 接种 96 孔细胞培养板, 每孔接种 $200 \text{ }\mu\text{L}$ 细胞悬液, 含细胞 1.0×10^4 个。将培养板置于 CO_2 恒温细胞培养箱中静置密闭培养。每 3 d 更换培养基 1 次。分别在接种细胞后的 1、2、4、7、8 d 加入 5 g/L 的噻唑蓝 (MTT, Sigma, 美国) 溶液 $20 \text{ }\mu\text{L}$, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 继续孵育 4 h, 吸弃各孔培养液后加入 $150 \text{ }\mu\text{L}$ 二甲基亚砜, 振荡 10 min 后在全自动微板读数仪上测定各孔液体 490 nm 波长光吸收值 (A 值)。采用 SPSS 10.0 软件的 t 检验对 2 组的光吸收值进行比较, 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2.2 结果

接种 HPDLCs 后 1 d, 镜下见硅橡胶膜组和对照组各孔中细胞均已贴壁生长, 接种 2~7 d, 两组细胞数量增加; 至 7 d 时, 两组细胞均已汇合; 至接种 8 d 时; 细胞数量无明显增加。MTT 比色试验结果如表 1 所示, 统计分析结果显示接种细胞后 1、2、4、7、8 d, 硅橡胶膜组和对照组各孔光吸收值之间无统计学差异 ($P > 0.05$)。

表1 MTT 比色试验结果

Tab.1 Results of the MTT colorimetric test

	光吸收值(均值 ± 标准差)				
	1 d	2 d	4 d	7 d	8 d
弹性硅橡胶膜组	0.2648 ±	0.3176 ±	0.3438 ±	0.4684 ±	0.4785 ±
对照组	0.2886 ±	0.3368 ±	0.3696 ±	0.5486 ±	0.4878 ±
<i>P</i> 值	0.113	0.518	0.214	0.146	0.914

表1 结果显示:动态机械应变细胞加载装置所采用的弹性硅橡胶膜具有良好的细胞附着生长能力,与作为对照的细胞培养板之间无明显差异,可用于培养细胞。

3 动态牵张应变对体外培养人牙周膜细胞形态排列的影响

3.1 应变加载

采用数控机械应变加载装置,对 HPDLCs 分别加载 1%、10%、20% 拉伸应变,对照组 HPDLCs 不加载应变。各加载组设加载 0.5、1 和 24 h 3 个时间段,对照组亦设相应的时间段。

取第 5 代 HPDLCs 接种弹性底培养皿,每皿接种 10 mL 细胞悬液,含细胞 1.0×10^6 个,置于细胞培养箱中静置密闭培养 3 d 后,弃去原培养基, D-Hanks 液洗 2 遍,加入含 20 mL/L 胎牛血清的 DMEM 培养基。将弹性底培养皿安装于数控机械应变加载装置上,分别加载 1%、10%、20% 的拉伸应变 0.5、1、24 h,加载频率为 6 次/min,5 s 拉伸,5 s 松弛。应变加载完成后,将弹性底培养皿置于倒置相差显微镜下观察各组细胞形态和排列,照相记录。

3.2 结果

对照组细胞在实验过程中形态、排列均无明显

变化,呈贴壁、单层生长,胞体形态呈典型的成纤维细胞样,为长梭形或星形,胞浆突起较长,细胞呈漩涡状或放射状排列(见图 4(a))。加载 1%、10%、20% 拉伸应变至 24 h,细胞贴壁良好。加载 1% 拉伸应变 0.5、1、24 h 后,细胞形态、排列无明显变化,与对照组细胞相似(见图 4(b))。加载 10%、20% 拉伸应变 0.5、1 h 后,细胞形态、排列亦无明显变化;而加载 24 h 后,细胞形态呈长梭形,细胞长轴明显垂直于拉伸应变方向(即径向)平行排列(见图 4(c)、(d))。

4 讨论

4.1 机械应变细胞加载装置的性能特点

本课题研制的机械应变细胞加载装置通过数字式测控系统和基于 PC 机平台的专用计算机软件,可对体外培养细胞加载不同强度、频率和时间的动态机械拉伸应变。该装置输出应变范围最大可达 25%,加载频率最快可达 0.625 Hz,最长可连续加载 99 h 59 min 59 s。顶板运行的 4 个时间段参数可独立设置,故可调节应变加载速度。采用光电编码器实时采集角位移数据,监控球冠形顶板的运行高度并实时反馈给控制器和计算机,确保了输出应变的精确性。机械应变器体积小,可整体放入细胞培养箱中,可确保实验过程中细胞培养环境的稳定。通过计算机输入设置仪器各项参数,操作方便,可在计算机屏幕上实时显示运行时间、球冠形顶板运行高度和弹性硅橡胶膜拉伸变形量,并将弹性硅橡胶膜实时拉伸应变情况模拟成三维图形显示输出,并显示运行时间段与球冠形顶板运行高度模拟曲线图,形象直观,便于观察。弹性底细胞培养皿消毒灭菌处理简单,可反复使用,培养皿盖为透明有机玻璃

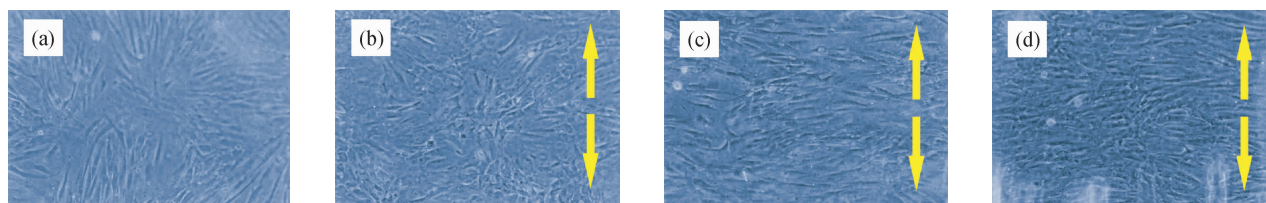


图4 HPDLCs 加载拉伸应变后形态、排列照片(倒置相差显微镜, ×200) (a) 对照组, (b) 加载 1% 拉伸应变 24 h, (c) 加载 10% 拉伸应变 24 h, (d) 加载 20% 拉伸应变 24 h(箭头示拉伸应变方向)

Fig.4 Picture of stretch-induced realignment of HPDLCs (inverted phase contrast microscope, magnification: ×200) (a) Control group, (b) Stretch with 1% strain after 24 h, (c) Stretch with 10% strain after 24 h, (d) Stretch with 20% strain after 24 h (the arrow represents the stretch vector)

制作,便于在显微镜下观察细胞。弹性底细胞培养皿采用可反复消毒使用的组件和一次性使用的弹性硅橡胶膜组合而成,降低了实验成本,便于推广使用。

4.2 弹性硅橡胶膜的表面处理

本文采用医用硅橡胶 Q7-4750 模压成圆形弹性硅橡胶薄膜做为细胞培养皿的弹性底。该材料在模压成形过程中会沾染油污、脱模剂等物质,如不进行处理,会影响细胞在膜上的附着生长能力。因此,在组装细胞培养皿前,必须仔细清洁硅橡胶膜表面。将硅橡胶膜用双蒸水浸泡 24 h 后用 75% 酒精反复擦洗,之后再用双蒸水漂洗,50 °C 烘干,组装成细胞培养皿后高温高压消毒、烘干,接种细胞后见细胞附着生长良好,与普通一次性细胞培养皿上细胞生长情况无区别。

4.3 加载应变值的选择

研究显示对人切牙施加 4.9 N 力最大可使牙周膜拉伸 24%^[16],而对前磨牙施加 1 N 的力可使牙周膜产生 1% 的拉伸应变^[15]。解剖学研究显示,PDLCs 广泛分布于牙周膜内,其长轴平行于牙周膜胶原纤维的排列方向^[17];PDLCs 分布于牙周膜中的胶原纤维之间,也将受到同样大小的拉伸变形。据此,Yamaguchi 等^[18]认为,采用 24% 以内的拉伸应变对 PDLCs 进行加载实验是合适的。因此,本研究中选择 1%、10% 和 20% 拉伸应变值对 HPDLCs 加载。

4.4 动态机械拉伸应变对 HPDLCs 形态和排列的影响

本研究采用数控机械应变细胞加载装置对 HPDLCs 加载 1%、10%、20% 的动态拉伸应变(6 次/min, 5 s 拉伸,5 s 松弛)0.5、1、24 h 后,观察细胞形态和排列,结果显示加载 10%、20% 拉伸应变 24 h 后,细胞呈长梭形,成栅栏状平行排列,细胞长轴明显垂直于拉伸应变方向。这与 Matsuda 等^[15]以及 Chiba 等^[19]的研究结果类似。Matsuda 等采用 Flexercell 对 HPDLCs 加载 9%、18% 的动态拉伸应变(6 次/min, 5 s 拉伸,5 s 松弛)5 d 后,发现细胞肌动蛋白细胞骨架垂直于拉伸方向平行排列。Chiba 等也采用 Flexercell 对 HPDLCs 加载 15% 的动态拉伸应变(30 次/min, 1 s 拉伸,1 s 松弛)3 d 后,发现细胞成梭形垂直于拉伸方向平行排列,细胞中微管、肌动蛋白微

丝细胞骨架垂直于拉伸方向平行排列,而且细胞核也稍拉长,其长轴垂直于拉伸方向。由于本研究中加载的拉伸应变大小与上述研究中所加载的应变值非常接近,这从一个侧面验证了本研究中研制的数控机械应变细胞加载装置的有效性。

综上所述,本文研制开发的数控机械应变细胞加载装置,采用数字式测控系统和基于 PC 机平台的专用计算机软件,具有输出应变范围大、精度高、操作方便、显示直观等优点,经实验证实可有效地对体外培养细胞加载不同强度、频率和时间的动态机械拉伸应变,为体外细胞力学研究提供了必要的研究手段。

参考文献:

- [1] Wang N, Butter JP, Ingber DE. Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton [J]. *Science*, 1993, 260(21): 1124-1127.
- [2] Fitzgerald J, Hughes-Fulford M. Mechanically induced c-fos expression is mediated by cAMP in MC3T3-E1 osteoblasts [J]. *FASEB J*, 1999, 13(3): 553-557.
- [3] 卞琴, 杨铸, 刘书芬, 等. 离心加压对前成骨细胞株 OCT-1 成骨功能的影响 [J]. *医用生物力学*, 2010, 25(6): 449-455. Bian Q, Yang Z, Liu SF, et al. Effects of centrifugating pressure on the function of preosteoblast OCT-1 [J]. *J Med Biomech*, 2010, 25(6): 449-455.
- [4] 姜晓华, 姚庆革, 姜隽, 等. 切应力与血管平滑肌细胞对上皮细胞增殖的影响及 TGFβ1 与 p-Akt 信号通路在其中的作用 [J]. *医用生物力学*, 2010, 25(5): 316-320. Jiang XH, Yao QH, Jiang J, et al. Shear stress and vascular smooth muscle cells modulate the proliferation of endothelial cells via TGFβ1 and p-Akt pathways [J]. *J Med Biomech*, 2010, 25(5): 316-320.
- [5] Tanaka SM. A new mechanical stimulator for cultured bone cells using piezoelectric actuator [J]. *J Biomech*, 1999, 32(4): 427-430.
- [6] 张惠, 施生根, 宋应亮. 模拟咬合压力对人牙周膜成纤维细胞 COX-2 表达的影响 [J]. *实用口腔医学杂志*, 2003, 19(6): 630-633.
- [7] Leung DY, Glagov S, Mathews MB. A new in vitro system for studying cell response to mechanical stimulation. Different effects of cyclic stretching and agitation on smooth muscle cell biosynthesis [J]. *Exp Cell Res*, 1977, 109(2): 285-298.
- [8] 张丁, 李小彤. 一种新型细胞加力实验装置的研制 [J]. *口腔正畸学*, 1999, 6(3): 112-113.

- [9] Banes AJ, Gilbert J, Taylor D, *et al.* A new vacuum-operated stress-providing instrument that applies static or variable duration cyclic tension or compression to cells in vitro [J]. *J Cell Sci*, 1985, 75: 35-42.
- [10] Gilbert JA, Weinhold PS, Banes AJ, *et al.* Strain profiles for circular cell culture plates containing flexible surfaces employed to mechanically deform cells in vitro [J]. *J Biomech*, 1994, 27(9): 1169-1177.
- [11] 李菲菲, 丁寅, 冯雪, 等. 机械牵张应力刺激成骨细胞的差异蛋白质组学研究[J]. *医用生物力学*, 2010, 25(6): 406-411.
Li FF, Ding Y, Feng X, *et al.* Differential proteomic analysis on osteoblasts stimulated by mechanical strain [J]. *J Med Biomech*, 2010, 25(6): 406-411.
- [12] Bottlang M, Simnacher M, Schmitt H, *et al.* A cell strain system for small homogeneous strain applications [J]. *Biomed Tech (Berl)*, 1997, 42(11): 305-309.
- [13] 张西正, 康少华, 蔡绍哲. 一种四点弯曲单向交应变细胞加载装置的研制[J]. *医疗卫生装置*, 1999, 83(4): 6-8.
- [14] 仲维广, 胥春, 米红林, 等. 细胞应变装置中硅橡胶膜的应力分析[J]. *医用生物力学*, 2007, 22(2): 121-126.
Zhong WG, Xu C, Mi HL, *et al.* Stress analysis of silastic membrane in dynamic strain cell unit [J]. *J Med Biomech*, 2007, 22(2): 121-126.
- [15] Matsuda N, Yokoyama K, Takeshita S, *et al.* Role of epidermal growth factor and its receptor in mechanical stress-induced differentiation of human periodontal ligament cells in vitro [J]. *Arch Oral Biol*, 1998, 43(12): 987-997.
- [16] Yamaguchi M, Shimizu N, Goseki T, *et al.* Effect of different magnitudes of tension force on prostaglandin E2 production by human periodontal ligament cells [J]. *Arch Oral Biol*, 1994, 39(10): 877-884.
- [17] McCulloch CA, Lekic P, McKee MD. Role of physical forces in regulating the form and function of the periodontal ligament [J]. *Periodontol 2000*, 2000, 24: 56-72.
- [18] Yamaguchi M, Shimizu N, Shibata Y, *et al.* Effect of different magnitudes of tension force on alkaline phosphatase activity in periodontal ligament cells [J]. *J Dent Res*, 1996, 75(3): 889-894.
- [19] Chiba M, Mitani H. Cytoskeletal changes and the system of regulation of alkaline phosphatase activity in human periodontal ligament cells induced by mechanical stress [J]. *Cell Biochem Funct*, 2004, 22(4): 249-256.

· 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,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。