

· 实验研究 ·

改良保存液处理自体血对糖尿病小鼠伤口成纤维细胞的影响

段立双 王欢 刘小倩 朱娜娜 卫含伟 金孝炬 郭建荣

【摘要】 目的 评价经改良保存液处理的自体血对糖尿病小鼠伤口成纤维细胞的影响,并初步探讨其机制。方法 诱导建立糖尿病模型小鼠 40 只,随机分为献血组和实验组,每组 20 只。实验组小鼠于伤口模型建立后,剔除死亡小鼠 3 只,将剩余小鼠随机分为标准组($n=6$)、改良组($n=6$)和供皮组($n=5$),标准组和改良组于术后第 1、2 和 3 天分别回输在不同保存液中贮存 7 d 的自体血,用透明膜示踪法记录并计算伤口愈合面积百分比、RT-qPCR 检测伤口组织缺氧诱导因子 1 α (HIF-1 α) mRNA 表达量。供皮组于术后 3 d 收集创面和边缘的全层皮肤,将皮肤成纤维细胞分离培养后,随机分为四组:细胞标准组(S 组)和标准+siRNA-HIF-1 α 组(S+siRNA 组)、细胞改良组(M 组)、改良+siRNA-HIF-1 α 组(M+siRNA 组),在细胞灌注培养系统中使用不同方法保存的自体血灌注培养。细胞计数 KIT-8 (CCK-8)、EdU、Transwell、流式细胞仪评价成纤维细胞细胞存活、增殖和迁移能力及其细胞周期分布;Western blot 测定各组成纤维细胞中 HIF-1 α 、血管内皮生长因子(VEGF)和基质金属蛋白酶(MMP)-2 蛋白相对含量。**结果** 与标准组比较,改良组小鼠术后伤口愈合面积和 HIF-1 α mRNA 相对表达量明显升高($P<0.05$)。与 S 组比较,M 组的细胞存活力增强,增殖细胞及迁移细胞数量明显升高,而 S+siRNA 组的细胞存活力减弱,增殖细胞及迁移细胞数量明显下降($P<0.05$);与 M 组比较,M+siRNA 组细胞存活力、增殖细胞及迁移细胞数量明显降低($P<0.05$)。与 S 组比较,S+siRNA 组 HIF-1 α 、VEGF 和 MMP-2 蛋白相对含量明显降低,而 M 组蛋白相对含量明显增高($P<0.05$);与 M 组比较,M+siRNA 组 HIF-1 α 、VEGF 和 MMP-2 蛋白相对含量明显降低($P<0.05$)。**结论** 改良处理自体血可增强糖尿病小鼠成纤维细胞的存活、增殖和迁移能力,可能参与伤口的愈合。

【关键词】 自体输血;改良保存液;伤口愈合;糖尿病

Effect of modified autologous blood on wound fibroblasts in diabetic mice DUAN Lishuang, WANG Huan, LIU Xiaojian, ZHU Nana, WEI Huanwei, JIN Xiaoju, GUO Jianrong. Department of Anesthesiology, the First Affiliated Hospital of Wannan Medical College, Wuhu 241000, China
Corresponding author: GUO Jianrong, Email: jianrguo@126.com

【Abstract】 Objective To evaluate the effect of autologous blood treated with modified preservation solution on wound fibroblasts in diabetic mice and its related mechanisms. **Methods** Forty diabetic mice were randomly divided into 2 groups using a random number table: blood donation group ($n = 20$) and experimental group ($n = 20$). After the wound model was established, mice in experimental group were randomly divided into standard group ($n = 6$), modified group ($n = 6$) and donor group ($n = 5$). Autologous blood stored in different preservation solutions for 7 days was returned to group standard group and modified group respectively on the 1st day, 2nd day and 3rd day after operation, the percentage of wound healing area was recorded and calculated by transparent film tracer method, and the expression level of HIF-1 α in wound tissue was detected by RT-qPCR. Mice in donor group were fed to the 3rd day after injury to collect the whole skin of the wound and the edge. After the fibroblasts of skin were isolated and cultured, some of them were transfected with HIF-1 α siRNA, the cells were then various groups namely cell modified group (group M), modified-siRNA-HIF-1 α group (group M+siRNA), cell standard group (group S) and standard-siRNA-HIF-1 α group (group S+siRNA). Cell-based perfusion assay was applied in order to culture the fibroblasts with different preservation solutions. Fibroblast cell viability, mobility, migration and cell cycle were evaluated by cell count KIT-8 (CCK-8) assay, EdU assay, Transwell assay and Flow cytometry.

DOI: 10.12089/jca.2020.05.014

基金项目:上海市浦东新区卫生系统重点学科群建设项目(PWZxq2017-10);国家自然科学基金(81671919, 81870147)

作者单位:241000 芜湖市,皖南医学院附属弋矶山医院麻醉科(段立双、金孝炬);海军军医大学附属公利医院麻醉科(王欢、刘小倩、朱娜娜、卫含伟、郭建荣)

通信作者:郭建荣,Email: jianrguo@126.com

etry, respectively. And the expression of HIF-1 α , VEGF and MMP-2 in fibroblasts were determined by Western blot. **Results** Compared with standard group, the wound healing rate and expression levels of HIF-1 α in skin tissue of group modified were significantly increased ($P < 0.05$). Compared with group S, group M exhibited improved cell viability, proliferative cells and migrated cells while the results in group S+siRNA were reversed ($P < 0.05$). Compared with group M, group M+siRNA exhibited decreased cell viability, proliferative cells and migrated cells ($P < 0.05$). Compared with group S, the protein levels of HIF-1 α , VEGF and MMP-2 in group M were significantly increased while they were significantly decreased in group S+siRNA ($P < 0.05$). Compared with group M, the protein levels of HIF-1 α , VEGF and MMP-2 in group M+siRNA were significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** Autologous blood treated with modified preservation solution may be involved in wound healing in diabetic mice by improve the survival rate, cell proliferation and migration ability of fibroblast cells.

【Key words】 Autologous blood transfusion; Modified blood preservation solution; Diabetes; Wound healing

伤口愈合受损是糖尿病最常见的并发症之一^[1], 往往会导致慢性伤口甚至截肢, 严重影响糖尿病患者的生活质量。成纤维细胞是皮肤组织的主要修复细胞, 在创口愈合的复杂生物过程中起着至关重要的作用^[2]。而糖尿病患者成纤维细胞的结构和功能发生显著变化, 是导致糖尿病伤口愈合受损的原因之一^[3], 提高成纤维细胞的功能对糖尿病患者创面愈合具有重要意义。研究表明糖尿病患者红细胞存在的功能异常与糖尿病伤口愈合障碍的发生存在密切的相关^[4]。科学处理自体血以避免糖尿病患者脆弱的红细胞功能进一步损伤可能会改善其成纤维细胞功能。本实验拟研究不同保存液处理的自体血对糖尿病小鼠伤口愈合及成纤维细胞的影响, 并初步探讨其机制。

材料与方 法

实验动物与分组 健康成年雄性昆明小鼠 45 只, 8~10 周龄, 体重 26~30 g, 购于中国科学院上海实验动物中心(批号: SKD111001)。清洁级动物房饲养: 温度(20 \pm 1) $^{\circ}$ C, 相对湿度 40%~60%, 昼夜周期为 12 h。所有动物实验和实验方法均获得海军军医大学附属公利医院实验动物伦理委员会批准。小鼠适应性饲养 1 周后, 连续 5 d 腹腔注射链脲佐菌素 50 mg/kg, 给药 2 周后, 2 次随机血糖 > 16.7 mmol/L 为造模成功。

采用随机数字表法将糖尿病小鼠分为献血组($n=20$)和实验组($n=20$)。献血组: 小鼠麻醉后心脏采血 0.6 ml, 采血完成后处死。将血液置入含有抗凝剂预消毒的离心管中, 然后分别放入相应的保存液中贮存。改良保存液: pH = 6.5, 腺嘌呤 2 mmol/L, 糖 55.5 mmol/L, 甘露醇 55 mmol/L, NaCl 26 mmol/L 和 NaHCO₃ 12 mmol/L; 标准保存液: pH = 5.8, 腺嘌呤 2.2 mmol/L, 糖 110 mmol/L, NaCl 70.1

mmol/L, NaHCO₃ 20 mmol/L, 枸橼酸钠 12 mmol/L。轻轻摇晃混合后, 置于 4~6 $^{\circ}$ C 的冰箱内进行保存。实验组: 腹腔注射 1% 戊巴比妥钠 35~40 mg/kg 麻醉后, 背部皮肤消毒剃去, 用打孔机在脊柱两侧制作直径 2 cm 的开放性皮肤伤口。剔除死亡小鼠 3 只后, 将实验组小鼠随机分为: 标准组($n=6$)、改良组($n=6$)和供皮组($n=5$)。标准组和改良组小鼠于伤口模型建立后第 1、2、3 天分别回输贮存于改良保存液和标准保存液 7 d 的自体血, 0.5 ml/只, 并于伤后 0、1、4、7 和 14 d 用透明膜示踪法记录受伤并计算其伤口愈合面积[(初始面积-残余面积)/初始值面积 \times 100%]。

RT-qPCR 检测 术后第 14 天收集标准组和改良组小鼠创面及边缘的全层皮肤组织, 剪碎后加入细胞裂解液, 用 Trizol 法提取组织总 RNA, 测定 RNA 浓度后, 将达标的 RNA 反转录合成 cDNA, 引物由 KaTaRa 设计合成(表 1), 按说明书设定的反应体系进行 qPCR, 各样品均设 3 复孔, 使用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct}法计算 HIF-1 α mRNA 相对表达量。

表 1 PCR 引物序列

基因	引物方向	引物序列
HIF-1 α	F	5'-CGTTCCTTCGATCAGTTGTC-3'
	R	5'-TCAGTGGTGGCAGTGGTAGT-3'
β -actin	F	5'-TCACCCACACTGTGCCCATCTACGA-3'
	R	5'-CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGG-3'

成纤维细胞分离及体外培养 供皮组小鼠在打孔 3 d 后, 取背部伤口及周围组织, 将皮下组织和多余血管去除干净, 用 PBS 冲洗 3 次, 将其尽量剪碎, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃漂浮组织及上清液,

将离心后的组织块,均匀接种在已包被 0.2% 明胶的细胞培养皿中,用 7 ml 胰蛋白酶在 37 °C 水浴中处理 1 h,加入 2 ml DMEM 终止消化,然后加入含 10% Gibco 血清与 10% CLARK 血清的完全培养液,37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养,第 2 天补加培养液至正常量,培养基每 2~3 天更新一次。将第三代培养细胞接种于 24 孔板,密度为每孔 3×10⁴ 个细胞。

RNA 干扰 从 GenBank 获得 HIF-1α 基因序列,小鼠 HIF-1α 登录号 NM_181054。根据 siRNA 设计原理和引物特异性检测,将 HIF-1α siRNA 序列设计为 5'-GGCACAGAUGGACUGUUUUTT-3'。将成纤维细胞接种于 96 孔板中,当细胞汇合观察到已经达到 70%~90% 时,根据 LiPoFECTAMEN3000 操作说明转染细胞,5% CO₂、37 °C 孵育 6~8 h,完全培养基培养 24~48 h。将细胞均分为四组:细胞标准组(S 组)和 S+siRNA 组(用标准保存液处理的自体血灌注培养),细胞改良组(M 组)和 M+siRNA 组(用改良保存液处理的自体血灌注培养)。应用细胞灌流培养系统(Ibidi,德国)于体外恒速灌注培养 8 d。

EdU 染色计数 取对数期成纤维细胞以 4×10³ 的密度接种于 96 孔板中,按转染试剂说明书进行转染,转染 48 h 后每孔添加 100 μl 浓度为 50 μmol/L 的 EdU 溶液,5% CO₂ 的恒温箱中孵育 2 h 后,PBS 冲洗 2 次(5 min/次),经固定(4% 多聚甲醛 50 μl,30 min)和破膜(100 μl 0.05% Triton X-100,10 min)处理后,室温避光环境下,加入 100 μl Apollo[®] 染色剂染色 30 min,荧光倒置显微镜下多视野拍照计数。每组设 3 个复孔,试验独立重复 3 次。

细胞迁移检测 取对数期成纤维细胞,常规消化,PBS 冲洗 2 次后,细胞密度调整为 1×10⁵ 个/ml,在上室添加 200 μl 细胞悬液,下室加入 600 μl 含 20% FBS 的 RPMI 1640 培养基培养 24 h,然后从 Transwell 腔中取出成纤维细胞,4% 聚甲醛中固定 15 min。然后用 0.5% 的结晶紫溶液(甲醇制备)染色 15 min,冲洗 3 次后镜检(随机取中间和四周 5 个视野,取平均值),用 Image pro plus 6.0 对细胞图像进行分析。每组设 3 个复孔,试验独立重复 3 次。

细胞周期检测 取对数期成纤维细胞,用含 2.5 g/L 胰蛋白酶和 0.4 g/L 乙二胺四乙酸的 PBS 溶液处理后,收集并放置于 5 ml 离心管中,2.5 ml PBS 漂洗 2 次,800~1000 r/min 离心 5 min。洗掉上清液,用 1 ml PBS 悬浮细胞颗粒。2 ml 无水乙醇进行快速涡流混合固定,用隔膜密封,4 °C 保存。将细胞调节至 1.0×10⁶ 个/孔,并分到两个 FACS 管。使

用流式细胞术检测细胞在各相中的比例。

缺氧诱导因子(HIF-1α)、血管内皮生长因子(VEGF)、基质金属蛋白酶(MMP-2)蛋白含量测定 PBS 洗涤细胞 2 次,应用 RIPA 裂解液于匀浆器中进行匀浆。裂解 30 min 后,4 °C 下 12000 r/min 离心 30 min 后取上清,BCA 法测定蛋白浓度以调整上样量。将 50 μg 总蛋白在 100 °C 下煮沸 5 min。十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺电泳(SDS-PAGE)后湿转法转至 10% 聚偏氟乙烯(PVDF)膜上,5% 脱脂奶粉室温下封闭 1h。一抗 β-actin(1:1000)、HIF-1α(1:100)、VEGF(1:200)、MMP-2(1:100)在 4 °C 下孵育过夜,TBST 缓冲液(Tris 缓冲液和吐温 20)洗膜 3 次,加入酶标二抗孵育 1 h,ECL 法显色,使用 Bio-Rad 图像分析系统获取蛋白条带,然后使用 Image J 软件测量条带灰度值。目的蛋白条带灰度值与 β-actin 条带灰度值的比值反应目的蛋白含量,实验重复 3 次取平均值。

统计分析 采用 SPSS 22.0 软件进行数据处理。正态分布计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

伤口面积愈合情况 与标准组比较,改良组伤后 1、4、7 和 14 d 小鼠背部皮肤伤口愈合面积明显增高($P < 0.05$)(表 2)。

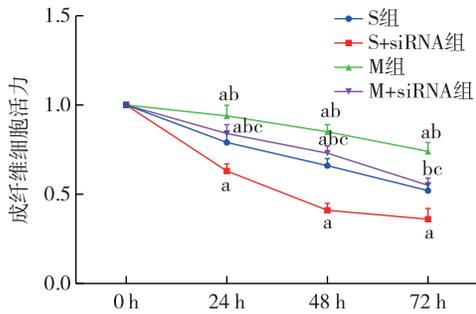
表 2 两组小鼠伤口模型建立后不同时点伤口愈合面积的比较(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	只数	0 d	1 d	4 d	7 d	14 d
标准组	6	0±0	5.3±0.9	30.5±7.7	52.3±5.9	64.4±4.1
改良组	6	0±0	16.9±0.8 ^a	44.7±5.1 ^a	85.1±7.9 ^a	94.6±4.1 ^a

注:与标准组比较,^a $P < 0.05$

HIF-1α mRNA 相对表达量 皮肤组织的 HIF-1α mRNA 相对表达量标准组为 0.732±0.08,改良组为 1.759±0.19;与标准组比较,改良组皮肤组织的 HIF-1α mRNA 相对表达量明显升高($P < 0.05$)。

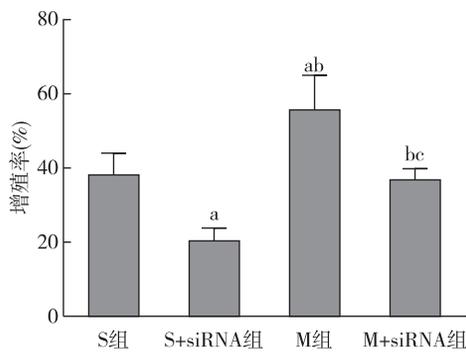
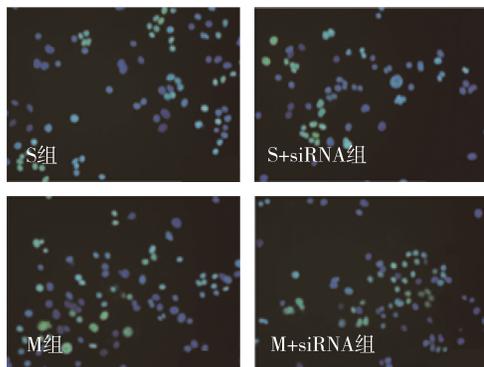
成纤维细胞存活率 与 S 组比较,M 组和 M+siRNA 组成纤维细胞存活率明显增高,而 S+siRNA 组细胞存活率明显降低($P < 0.05$);与 S+siRNA 组比较,M 组和 M+siRNA 组成纤维细胞成活率明显增高($P < 0.05$);与 M 组比较,M+siRNA 组细胞存活率明显降低($P < 0.05$)(图 1)。



注:与 S 组比较,^a $P < 0.05$;与 S+siRNA 组比较,^b $P < 0.05$;与 M 组比较,^c $P < 0.05$

图 1 四组成纤维细胞存活能力的比较

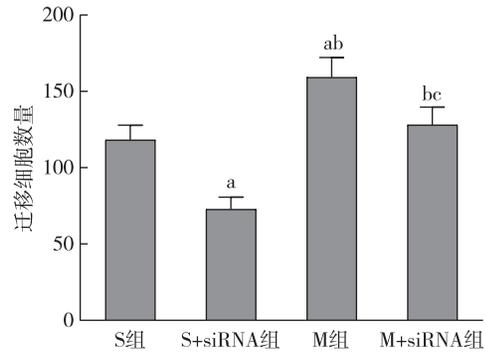
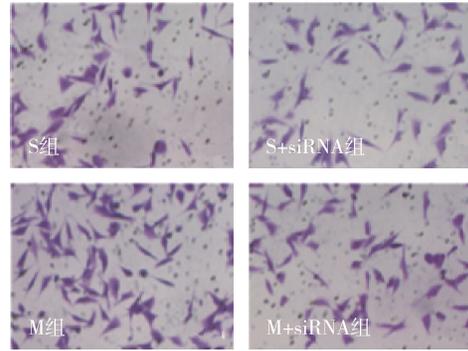
成纤维细胞增殖和迁移能力 与 S 组比较,S+siRNA 组成纤维细胞增殖能力和迁移能力明显降低,M 组成纤维细胞增殖及迁移能力明显增强($P < 0.05$);与 S+siRNA 组比较,M 组和 M+siRNA 组成纤维细胞增殖能力及迁移能力明显增强($P < 0.05$);与 M 组比较,M+siRNA 组成纤维细胞增殖能力及迁移能力明显下降($P < 0.05$)(图 2—3)。



注:与 S 组比较,^a $P < 0.05$;与 S+siRNA 组比较,^b $P < 0.05$;与 M 组比较,^c $P < 0.05$

图 2 四组成纤维细胞增殖能力的比较

细胞周期分布 与 S 组比较,M 组中处于 G0/G1 期的细胞比例降低,处于 G2/M 期细胞比例明显升高,而 S+siRNA 组中结果相反($P < 0.05$);与



注:与 S 组比较,^a $P < 0.05$;与 S+siRNA 组比较,^b $P < 0.05$;与 M 组比较,^c $P < 0.05$

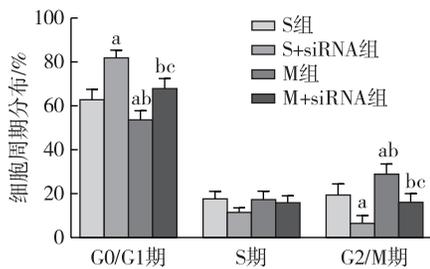
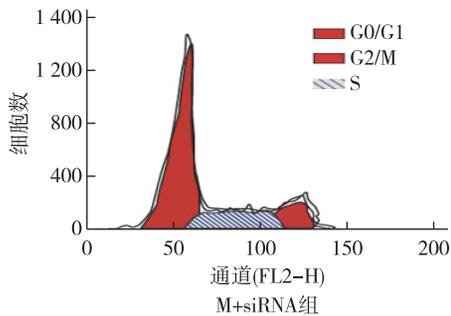
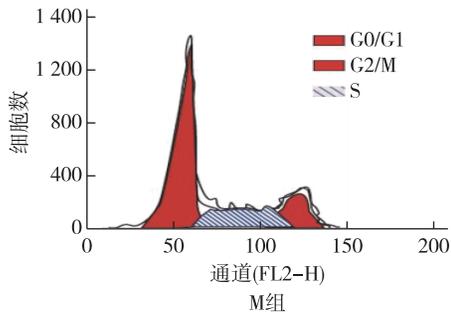
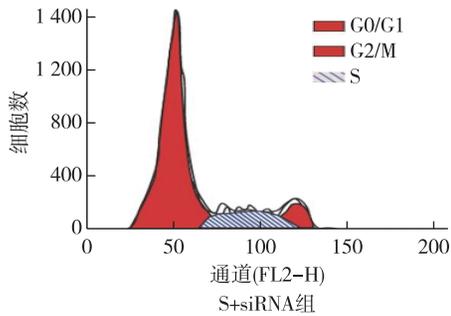
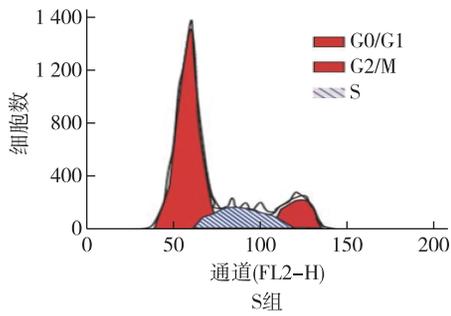
图 3 四组成纤维细胞迁移能力的比较

S+siRNA 组比较,M 组和 M+siRNA 组中处于 G0/G1 期的细胞比较降低,处于 G2/M 期的细胞比例明显升高($P < 0.05$);与 M 组比较,M+siRNA 组中处于 G0/G1 期的细胞比例明显升高,处于 G2/M 期细胞比例明显降低($P < 0.05$)(图 4)。

伤口愈合相关蛋白 HIF-1 α 、VEGF、MMP-2 蛋白相对含量 与 S 组比较,S+siRNA 组 HIF-1 α 、VEGF 和 MMP-2 蛋白相对含量明显降低,而 M 组 HIF-1 α 、VEGF 和 MMP-2 蛋白相对含量明显增高($P < 0.05$);与 S+siRNA 组比较,M 和 M+siRNA 组 HIF-1 α 、VEGF 和 MMP-2 蛋白相对含量明显升高($P < 0.05$);与 M 组比较,M+siRNA 组 HIF-1 α 、VEGF 和 MMP-2 蛋白相对含量明显降低($P < 0.05$)(图 5)。

讨论

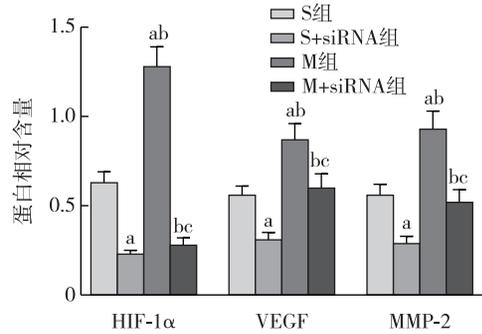
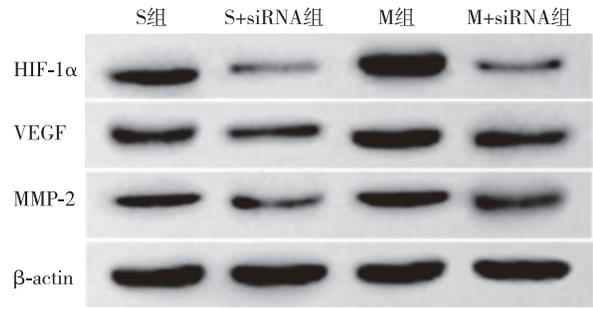
根据文献^[5]和预实验结果,本实验构建糖尿病小鼠伤口模型后,分别输注在标准保存液和改良保存液中保存 7 d 的自体血,研究结果显示,经改良保存液处理的自体血回输可促进糖尿病小鼠伤口愈合。糖尿病患者伤口难愈的机制尚不明确,但多项研究证实,成纤维细胞形态和功能的异常可能是导致糖尿病伤口愈合受损重要因素之一^[7]。增殖和



注:与 S 组比较,^a $P < 0.05$;与 S+siRNA 组比较,^b $P < 0.05$;与 M 组比较,^c $P < 0.05$

图 4 四组成纤维细胞细胞周期的比较

迁移是成纤维细胞的主要生物学特性,因此,本实验分离培养皮肤伤口组织的成纤维细胞,通过细胞



注:与 S 组比较,^a $P < 0.05$;与 S+siRNA 组比较,^b $P < 0.05$;与 M 组比较,^c $P < 0.05$

图 5 四组细胞 HIF-1α、VEGF、MMP-2 蛋白相对含量的比较

灌注培养系统分别使用经标准保存液和改良保存液处理的自体血对其进行体外培养,继而应用 CCK-8、EdU、Transwell 和流式细胞仪等方法观察成纤维细胞细胞存活、增殖和迁移以及细胞周期的情况。实验结果显示,经改良保存液处理的自体血可通过改善成纤维细胞活力并促进成纤维细胞进入细胞周期以提高细胞增殖能力。其机制可能与改良保存液相较于标准保存液,适度的减少了糖、氯化钠和磷酸盐含量,避免了细胞膜糖基化终末产物的堆积,并在此基础上,添加甘露醇以稳定细胞的渗透功能,去除枸橼酸以改善细胞代谢,从而使贮存的自体血得到更好的保存,上调糖尿病小鼠伤口组织 HIF-1α 的表达^[5-6]。

HIF-1α 被认为是调控伤口愈合的重要靶点^[8],正常情况下,伤口愈合过程中,局部组织处于缺氧状态,伤口处成纤维细胞的 HIF-1α 会被激活,并通过 Erk/MAPK 或 PI3K/Akt 信号通路上调与伤口愈合密切相关的蛋白表达以促进伤口愈合;而在高血糖状态下,HIF-1α 水平异常降低,抑制 VEGF 和内皮一氧化氮合酶(eNOS)产生,引起局部伤口组织血管新生障碍、细胞外基质含量减少,最终导致伤口愈合缓慢^[9]。结合 RT-qPCR 的结果,本研究显示,输注经改良保存液处理的自体血可能通过上调糖尿病小鼠伤口组织 HIF-1α 的表达,从而改善成纤维

细胞活力,促进伤口愈合。

为了验证改良保存液处理的自体血是否能激活 HIF-1 α 进而增强成纤维细胞活性,课题组对糖尿病小鼠加设了 HIF-1 α 基因沉默对照,结果显示,改良保存自体血可以激活 HIF-1 α 提高成纤维细胞活力,同时促进伤口愈合相关蛋白 VEGF、MMP-2 的合成。而 HIF-1 α 沉默后,会逆转输注改良保存液处理自体血通过激活 HIF-1 α 通路所带来的促进伤口愈合的作用,这提示 HIF-1 α 在自体血促进伤口愈合中发挥作用。在进一步探讨糖尿病小鼠伤口愈合过程中,将研究改良处理自体血是如何通过 HIF-1 α 信号通路加速糖尿病小鼠伤口愈合及 HIF-1 α 与成纤维细胞功能的相互关系。

综上所述,经改良保存液处理后的自体血回输可提高糖尿病小鼠成纤维细胞存活率及其增殖和迁移能力,可能参与伤口的愈合,且其机制可能与激活 HIF-1 α 途径有关。

参 考 文 献

- [1] Pengzong Z, Yuanmin L, Xiaoming X, et al. Wound healing potential of the standardized extract of boswellia serrata on experimental diabetic foot ulcer via inhibition of inflammatory, angiogenic and apoptotic markers. *Planta Med*, 2019, 85 (8): 657-669.
- [2] 主父中印, 林樾, 刘惠铂, 等. 高葡萄糖高游离脂肪酸对皮肤成纤维细胞 β -连环蛋白表达的影响. *中华实验外科杂志*, 2014, 31(1): 57-60.
- [3] Lima AL, Illing T, Schliemann S, et al. Cutaneous manifestations of diabetes mellitus: a review. *Am J Clin Dermatol*, 2017, 18 (4): 541-553.
- [4] Cahn A, Livshits L, Srulevich A, et al. Diabetic foot disease is associated with reduced erythrocyte deformability. *Int Wound J*, 2016, 13(4): 500-504.
- [5] Yoshida T, AuBuchon JP, Dumont LJ, et al. The effects of additive solution pH and metabolic rejuvenation on anaerobic storage of red cells. *Transfusion*, 2008, 48(10): 2096-2105.
- [6] Dumont LJ, Yoshida T, Aubuchon JP. Anaerobic storage of red blood cells in a novel additive solution improves in vivo recovery. *Transfusion*, 2009, 49(3): 458-464.
- [7] Lafosse A, Dufeys C, Beauloye C, et al. Impact of hyperglycemia and low oxygen tension on adipose-derived stem cells compared with dermal fibroblasts and keratinocytes: importance for wound healing in type 2 diabetes. *PLoS One*, 2016, 11 (12): e0168058.
- [8] Ruthenborg RJ, Ban JJ, Wazir A, et al. Regulation of wound healing and fibrosis by hypoxia and hypoxia-inducible factor-1. *Mol Cells*, 2014, 37(9): 637-643.
- [9] Qiu S, Jia Y, Sun Y, et al. Von Hippel-Lindau (VHL) protein antagonist VH298 improves wound healing in streptozotocin-induced hyperglycaemic rats by activating hypoxia-inducible factor-(HIF-) 1 signalling. *J Diabetes Res*, 2019, 2019: 1897174.

(收稿日期:2019-07-22)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

《临床麻醉学杂志》对来稿署名的要求

作者姓名在文题下方按序排列,一般不宜超过 6 位。排序应在投稿时确定,在编排过程中不应再作更换,如欲更换第一作者,需出具单位证明和由全体作者签名的申请。作者单位的邮编、所在城市、单位名称的全称和科室在首页脚注中说明。若其他作者不属同一单位,需写出各自单位,并在单位后用括号列出作者的姓名。作者应具备的条件:(1)参与选题和设计,或参与资料的分析 and 解释;(2)起草或修改论文中关键性理论或其他主要内容;(3)能对编辑部的修改意见进行核修,在学术上进行答辩,并最终同意该文发表者。以上 3 条均需具备。“通信作者”系指研究生课题论文的导师或直接指导者、相关科研项目课题负责人及该文的主要责任者和联系者。“通信作者”对论文应具有与第一作者同等的权利和义务。