

## 氯沙坦调节两肾一夹型高血压大鼠 血管重塑及其与细胞外信号调节激酶 1/2 的关系

徐立朋, 秦旭平, 廖端芳

(南华大学药物药理研究所, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 病理生理学; 氯沙坦对高血压大鼠血管重塑的影响; 计算机图像分析技术; 血管重塑; 细胞外信号调节激酶; 氯沙坦; 大鼠

[摘要] 为探讨特异性血管紧张素 $\text{①}$ 受体 1 阻断剂氯沙坦调节高血压血管重塑与细胞外信号调节激酶的关系, 本文采用两肾一夹型高血压大鼠为动物模型, 术后第 2、4、6 周测血压, 6 周后处死大鼠称心脏重量, 取胸主动脉和肠系膜动脉作形态学观察和计算机图像分析, 免疫印迹方法检测主动脉中磷酸化细胞外信号调节激酶及总细胞外信号调节激酶的表达。结果发现, 与假手术对照组相比, 模型组大鼠血压和心脏与体重之比分别增加 50% 和 48% ( $P$  均 $< 0.01$ ), 主动脉和肠系膜动脉的内径与中膜厚度之比明显减少(分别为  $7.10 \pm 0.59$  比  $9.24 \pm 1.17$ ,  $6.00 \pm 0.89$  比  $8.96 \pm 1.23$ ), 中膜厚度明显增加(分别为  $119.47 \pm 10.77 \mu\text{m}$  比  $91.55 \pm 14.45 \mu\text{m}$ ,  $49.60 \pm 1.04 \mu\text{m}$  比  $37.01 \pm 4.85 \mu\text{m}$ ,  $P$  均 $< 0.05$ ), 主动脉中磷酸化细胞外信号调节激酶的表达显著增强; 氯沙坦治疗后, 血压、心脏与体重之比分别下降到  $132 \pm 9 \text{ mmHg}$ ,  $0.32 \pm 0.03$  ( $P$  均 $< 0.05$ ), 主动脉和肠系膜动脉的内径与中膜厚度之比明显增加, 中膜厚度明显减小, 并下调主动脉中磷酸化细胞外信号调节激酶的表达。提示氯沙坦可明显改善两肾一夹型高血压大鼠的血管重塑, 这种调节可能是通过细胞外信号调节激酶信号途径发挥作用的。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

### Correlation between Vascular Remodeling Regulated by Losartan and Extracellular Signal-regulated Kinase 1/2 Activity in Two-kidney, One-clipped Hypertensive Rats

XU Li-Peng, QIN Xu-Ping, and LIAO Duan-Fang

(The Institute of Pharmacy and Pharmacology, Nanhua University, Hengyang, Hunan 421001, China)

[KEY WORDS] Vascular Remodeling; Extracellular Signal-regulated Kinase; Losartan; Rats; Hypertension; Western Blot

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects and mechanisms of losartan, a specific blocker of angiotensin  $\text{①}$  (Ang  $\text{①}$ ) receptor 1 ( $\text{AT}_1\text{R}$ ) on vascular remodeling of two-kidney, one-clipped hypertensive rat. **Methods** The blood pressure (BP), heart weight (HW), and body weight (BW) were determined. The morphologic change of aortas and mesenteric resistance arteries was observed after staining with HE. Western blot was performed to evaluate the ERK1/2 activity of aortas. **Results** The blood pressure, and HW/BW in hypertension group were significantly larger than that of control group ( $178 \pm 17 \text{ mmHg}$  vs  $119 \pm 11 \text{ mmHg}$ ,  $0.40 \pm 0.07$  vs  $0.27 \pm 0.01$  respectively, both  $P < 0.01$ ). Treatment with  $20 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  of losartan normalized BP ( $132 \pm 9 \text{ mmHg}$  vs  $178 \pm 17 \text{ mmHg}$ ,  $P < 0.05$ ) and HW/BW ( $0.32 \pm 0.03$  vs  $0.40 \pm 0.07$ ,  $P < 0.05$ ). The lumen to media of mesenteric resistance arteries was decreased compared with control group ( $6.00 \pm 0.89$  vs  $8.96 \pm 1.23$ ,  $P < 0.01$ ). Losartan normalized the lumen to media of hypertension group ( $8.87 \pm 1.25$  vs  $6.00 \pm 0.89$ ,  $P < 0.05$ ). The p-ERK1/2 of aortas in hypertension group was overexpression compared with control group, and the overexpression of p-ERK1/2 was downregulated by treatment with losartan. **Conclusion** Losartan could regulate vascular remodeling in 2-kidney, 1-clipped hypertensive rat by inhibiting the signaling pathway of ERK1/2.

血管重塑(vascular remodeling)是生物学适应反应中最基本的表现,在许多心血管疾病特别是高血压的发病中起着重要作用<sup>[1]</sup>,它既是高血压的重要

病理变化,又是高血压维持、恶化的结构基础。近年来研究表明,高血压血管重塑是高血压靶器官损害中的新机制之一。细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)是目前发现的最重要的一个增殖信号调节蛋白,研究显示 ERK1/2 在多种致肥大因子介导的心肌肥大反应中起着关键作用<sup>[2]</sup>。氯沙坦(losartan)是血管紧张素 $\text{①}$ 受体 1(angiotensin  $\text{①}$  receptor-1,  $\text{AT}_1\text{R}$ )阻断剂,可以完全阻断由  $\text{AT}_1$  受体介导的与血管紧张素 $\text{①}$ 有关的蛋白质合

[收稿日期] 2002-07-18

[修回日期] 2002-11-07

[基金项目] 国家 973 项目(G2000056905)及国家自然科学基金(30171084)资助。

[作者简介] 徐立朋,男,1976 年出生,山东临清市人,在读硕士研究生。秦旭平,男,1964 年出生,在读博士研究生。廖端芳,男,1959 年出生,湖南沅江市人,教授,博士生导师,为本文通讯作者, E-mail: dfliao@hotmail.com。

成、血管收缩、细胞钙离子动员等作用,可改善心肌缺血后的左室重构<sup>[3]</sup>,但其对高血压血管重塑的影响机制及信号通路尚不清楚。我们推测氯沙坦可能通过 ERK1/2 信号途径调节高血压血管重塑。本研究采用两肾一夹(2-kidney, 1-clipped, 2K1C)型高血压大鼠为动物模型,观察了胸主动脉和肠系膜动脉结构的改变和 AT<sub>1</sub> 受体阻断剂氯沙坦对血管重塑的作用及其信号通路。

## 1 材料和方法

### 1.1 试剂和材料

雄性 Sprague-Dawley 大鼠,体重 180~200 g,由中南大学湘雅医学院动物部提供;氯沙坦由美国 Merck 公司惠赠;小鼠来源磷酸化 ERK1/2 单克隆抗体及小鼠来源的非磷酸化 ERK2 购于 Santa Cruz 公司;辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的羊抗鼠 IgG 购于北京中山技术有限公司;BCA 蛋白分析试剂盒(BCA Protein Assay Reagent)购于 PIERCE 公司;鼠尾测压仪(HX-1 型)购于中南大学湘雅医学院;其他试剂均为国产分析纯。

### 1.2 二肾一夹高血压大鼠模型的建立与分组

健康雄性 Sprague-Dawley 大鼠,体重 180~200 g。3%戊巴比妥钠腹腔麻醉(40 mg/kg),固定其四肢,碘伏消毒皮肤。于腹正中偏左 1 cm 处切开皮肤及腹膜,暴露左肾并钝性分离左肾动脉,用直径为 0.2 mm 的银夹缩窄左肾动脉,使左肾动脉部分狭窄,对侧肾及肾动脉不触及,缝合肌肉与皮肤,此即为二肾一夹高血压模型。术后肌肉注射青霉素 30 ku/kg,连续 1 周,预防感染,自由进食及饮水。术后 2 周高血压已初步形成,第 4~6 周趋于平稳。

选取收缩压在 20 kPa(1 kPa=7.5 mmHg)以上者为二肾一夹高血压模型大鼠。随机分为 3 组( $n=8$ ):假手术对照组(control);二肾一夹高血压模型组(hypertension);模型+氯沙坦组:氯沙坦 20 mg/(kg·d),将药物混于少量饮水中灌胃治疗 6 周。

### 1.3 血压、心脏及体重的测量

分别在第 2、4、6 周采用鼠尾血压测量仪测量大鼠清醒状态下的收缩压,6 周后称重,放血处死后取出心脏称量。

### 1.4 血管组织形态学观察

采用 4%多聚甲醛于恒压下进行在体原位灌注固定后,取出胸主动脉及肠系膜动脉行中性福尔马林固定,石蜡切片,常规苏木素-伊红染色。采用计算机图像分析系统分别测量血管内径、中膜厚度、管

腔面积和中膜面积。

### 1.5 免疫印迹检测主动脉磷酸化细胞外信号调节激酶及总细胞外信号调节激酶的表达

取大鼠胸腹主动脉,剥离血管外结缔组织,将血管剪碎,加入 1 mL 组织裂解液(Tris-HCl 50 mmol/L, NaCl 150 mmol/L, NP-40 1%, 去氧胆酸钠 0.1%, 乙二醇四乙酸 1 mmol/L, 苯甲磺酰氟 1 mmol/L, 抑肽酶 2 μg/mL, pH 7.5),冰浴条件下进行组织匀浆。4℃,离心力为 10 000 g,离心 10 min,弃除沉淀,用 BCA 法进行蛋白定量。取 20 μg 蛋白加入上样缓冲液,煮沸 3 min 后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,转 PVDF 膜,分别与一抗(小鼠来源磷酸化 ERK1/2 及非磷酸化 ERK2 单克隆抗体按照 1:600 稀释)和二抗(辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 按照 1:4 000 稀释)室温孵育 2 h 和 1 h,利用化学发光法进行显色反应。结果用 Labwork 凝胶图像分析软件对胶片扫描,测定感光区带的感光密度,并进行积分处理。

### 1.6 统计学处理

所得数据用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,用 SPSS 10.0 软件进行统计学处理,采用单因素方差分析进行差异显著性检验, $P < 0.05$  为差异有显著性意义。

## 2 结果

### 2.1 各组大鼠不同时期的血压变化

模型组大鼠的血压在第 0、2、4、6 周显著高于假手术对照组,在第 6 周模型组的平均血压较假手术对照组升高 50% (178±17 mmHg 比 119±11 mmHg,  $P < 0.01$ );而氯沙坦治疗组的血压在第 2、4、6 周降至正常水平,与假手术对照组无显著差异,在第 6 周的平均血压较模型组降低 26% (132±9 mmHg 比 178±17 mmHg,  $P < 0.05$ )。见图 1(Figure 1)。

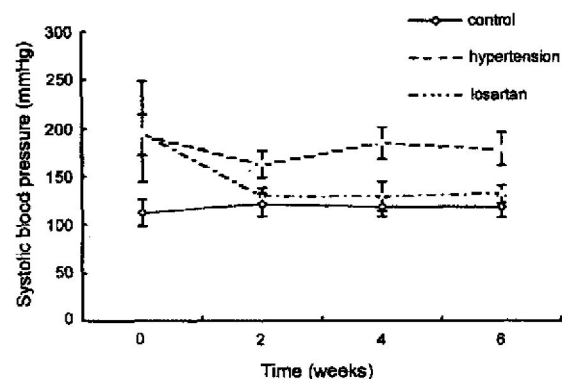


图 1. 各组大鼠不同时期的血压变化

Figure 1. The blood pressure curves after losartan treatment on various period ( $\bar{x}$ ,  $n=8$ ).

## 2.2 各组大鼠心脏、体重及两者比值

模型组大鼠的心脏与体重之比较对照组增加 48% ( $P < 0.01$ )。与模型组相比, 氯沙坦治疗组的心脏与体重之比降低 20% ( $P < 0.05$ )。见表 1 (Table 1)。

## 2.3 血管组织形态学观察

模型组的肠系膜动脉中膜较对照组明显增厚, 管腔内径明显缩小; 主动脉中膜较对照组明显增厚。而氯沙坦可抑制两者的血管重塑。见图 2、图 3 (Figure 2, Figure 3)。

## 2.4 主动脉和肠系膜动脉血管重塑指标的计算机图像分析

模型组中主动脉和肠系膜动脉的内径与中膜厚

度之比、管腔面积与中膜面积分别明显减少, 氯沙坦可明显改善大小动脉的血管重塑。见表 2、表 3 (Table 2, Table 3)。

表 1. 各组大鼠心脏重、体重及两者比值

Table 1. The weight of heart, body and HW/BW ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 8$ )

| 分 组  | 心脏重(g)                   | 体重(g)        | 心脏重/体重                   |
|------|--------------------------|--------------|--------------------------|
| 对照组  | 0.94 ± 0.09              | 349.0 ± 27.1 | 0.27 ± 0.01              |
| 高血压组 | 1.32 ± 0.24 <sup>a</sup> | 330.8 ± 32.1 | 0.40 ± 0.07 <sup>a</sup> |
| 氯沙坦组 | 1.07 ± 0.07 <sup>b</sup> | 339.0 ± 20.2 | 0.32 ± 0.03 <sup>b</sup> |

a:  $P < 0.01$ , 与对照组比较; b:  $P < 0.05$ , 与高血压组比较。



图 2. 肠系膜动脉的组织形态学观察(HE 染色) A: 对照组; B: 高血压组; C: 氯沙坦组。

Figure 2. The morphologic change of mesenteric resistance arteries ( $\times 200$ )

A: Control group; B: Hypertension group; C: Losartan group.

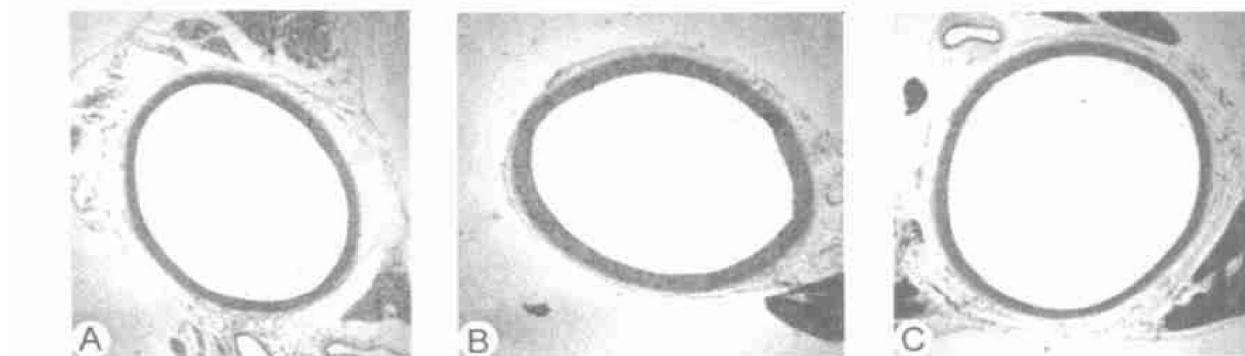


图 3. 主动脉的组织形态学观察(HE 染色) A: 对照组; B: 高血压组; C: 氯沙坦组。

Figure 3. The morphologic change of aortas ( $\times 40$ )

A: Control group; B: Hypertension group; C: Losartan group.

表 2. 主动脉的血管重塑指标

Table 2. The vascular remodeling index of aortas ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 8$ )

| 分 组  | 管腔内径<br>( $\mu\text{m}$ ) | 中膜厚度<br>( $\mu\text{m}$ )   | 管腔内径/<br>中膜厚度            | 中膜面积<br>( $\times 10^3 \mu\text{m}^2$ ) | 管腔面积<br>( $\times 10^3 \mu\text{m}^2$ ) | 管腔面积/<br>中膜面积            |
|------|---------------------------|-----------------------------|--------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------|--------------------------|
| 对照组  | 834.6 ± 62.5              | 91.55 ± 14.45               | 9.24 ± 1.17              | 510.8 ± 101.1                           | 2196 ± 320                              | 4.36 ± 0.57              |
| 高血压组 | 844.5 ± 16.7              | 119.47 ± 10.77 <sup>a</sup> | 7.10 ± 0.59 <sup>a</sup> | 674.9 ± 77.1 <sup>a</sup>               | 2240 ± 88                               | 3.34 ± 0.32 <sup>a</sup> |
| 氯沙坦组 | 843.7 ± 29.2              | 92.60 ± 8.32 <sup>b</sup>   | 9.18 ± 1.07 <sup>b</sup> | 515.2 ± 45.6 <sup>b</sup>               | 2237 ± 157                              | 4.37 ± 0.54 <sup>b</sup> |

a:  $P < 0.05$ , 与对照组比较; b:  $P < 0.05$ , 与高血压组比较。

表 3. 肠系膜动脉的血管重塑指标

Table 3. The vascular remodeling index of mesenteric resistance arteries ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 8$ )

| 分 组  | 管腔内径<br>( $\mu\text{m}$ )     | 中膜厚度<br>( $\mu\text{m}$ )   | 管腔内径/<br>中膜厚度                | 中膜面积<br>( $\times 10^3 \mu\text{m}^2$ ) | 管腔面积<br>( $\times 10^3 \mu\text{m}^2$ ) | 管腔面积/<br>中膜面积                |
|------|-------------------------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------|------------------------------|
| 对照组  | 327.7 $\pm$ 10.6              | 37.0 $\pm$ 4.9              | 8.96 $\pm$ 1.23              | 47.5 $\pm$ 1.7                          | 84.4 $\pm$ 5.5                          | 1.78 $\pm$ 0.09              |
| 高血压组 | 297.8 $\pm$ 2.2 <sup>a</sup>  | 49.6 $\pm$ 1.0 <sup>a</sup> | 6.00 $\pm$ 0.89 <sup>a</sup> | 57.0 $\pm$ 0.9 <sup>a</sup>             | 69.6 $\pm$ 1.0 <sup>a</sup>             | 1.22 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup> |
| 氯沙坦组 | 325.6 $\pm$ 11.4 <sup>b</sup> | 37.2 $\pm$ 5.5 <sup>b</sup> | 8.87 $\pm$ 1.25 <sup>b</sup> | 48.4 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>             | 83.3 $\pm$ 5.9 <sup>b</sup>             | 1.72 $\pm$ 0.13 <sup>b</sup> |

a:  $P < 0.05$ , 与对照组比较; b:  $P < 0.05$ , 与高血压组比较。

## 2.5 磷酸化细胞外信号调节激酶及总细胞外信号调节激酶的半定量分析

免疫印迹分析发现模型组主动脉中 p-ERK1/2 表达明显增高, 氯沙坦可明显抑制 p-ERK1/2 过度表达, 而各组的总 ERK2 表达无明显差异。见图 4 (Figure 4)。

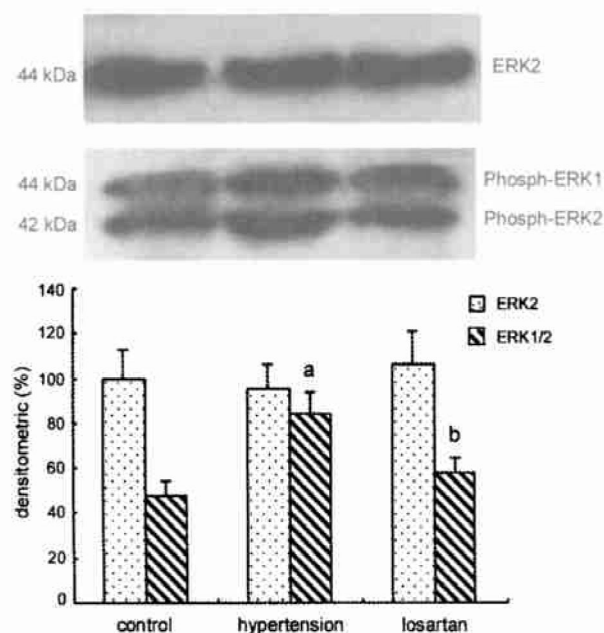


图 4. 氯沙坦对两肾一夹型高血压大鼠主动脉细胞外信号调节激酶活性的影响 a:  $P < 0.01$ , 与对照组比较; b:  $P < 0.05$ , 与高血压组比较。

Figure 4. Effect of Losartan on ERK1/2 activity of aortas in 2K1C hypertensive rats ( $\bar{x}$ ,  $n = 3$ ) a:  $P < 0.01$ , compared with control group; b:  $P < 0.05$ , compared with hypertension group.

## 3 讨论

本研究首次应用 2K1C 高血压大鼠模型, 观察并阐明了 AT<sub>1</sub>R 阻断剂氯沙坦通过丝裂素活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号途径可以明显改善高血压血管重塑。2K1C 高血压大鼠模型的血压自术后逐渐升高, 4 周后上升到高峰水平并趋向平稳。我们实验显示高血压所引起的大

动脉和小动脉结构的改变是不同的, 主动脉的管腔内径和血管平滑肌层横切面积增加, 称为肥厚外向性重塑; 肠系膜动脉的重塑特点为管腔内径明显缩小, 中膜厚度增加, 称为肥厚向心性重塑。发生上述变化的原因目前认为主要与血压和局部肾素-血管紧张素系统 (renin-angiotensin system, RAS) 激活有关<sup>[4]</sup>。

高血压血管重塑机制十分复杂, 血管活性物质、血液动力学、遗传和神经体液等因素共同参与重塑过程。血管壁能感受环境理化因素的变化并通过旁分泌-自分泌机制释放多种血管活性物质。这些活性物质主要分为两类: 一类发挥舒张血管、抑制血小板聚集和抑制血管平滑肌细胞增生作用, 如内皮依赖性舒张因子或一氧化氮; 另一类则发挥收缩血管、促进血小板聚集和促进血管平滑肌细胞增生作用, 如血管紧张素  $\text{Ang II}$ 、内皮素 1。血管紧张素  $\text{Ang II}$  (angiotensin  $\text{Ang II}$ ) 是肾素-血管紧张素系统的主要介质, 它通过收缩血管和调节水盐代谢而影响心血管系统的功能, 在病理状态下,  $\text{Ang II}$  可作用于靶细胞膜上的血管紧张素  $\text{Ang II}$  受体 1, 导致细胞增殖并引起心血管组织的重塑<sup>[5]</sup>, 同时也可以通过其他机制损伤血管内皮细胞, 导致内皮功能不良, 表现为乙酰胆碱引起的血管内皮依赖性舒张功能的降低<sup>[6]</sup>。

血管紧张素  $\text{Ang II}$  受体 1 阻断剂可有效的降低血压, 逆转左室重构, 防治心肌肥大<sup>[3]</sup>, 但对血管重塑的作用及其机制尚不明确。我们的实验显示氯沙坦可明显的降低血压, 改善心肌肥大, 减少主动脉和肠系膜动脉中膜面积和中膜厚度。这些结果都与氯沙坦直接拮抗  $\text{Ang II}$  作用的最后一步即 AT<sub>1</sub>R 受体有关, 使  $\text{Ang II}$  不能发挥它的生物学效应。

丝裂素活化蛋白激酶是细胞增殖与分化信号转导的共同通路, 是血管平滑肌细胞和心肌细胞中多种信号向核内传递的共同途径。MAPK 家族包括细胞外信号调节激酶、应激活化蛋白激酶、p38MAPK 等, 其中细胞外信号调节激酶途径与细胞肥大、增殖反应最密切。AT<sub>1</sub>R 受体属于 G 蛋白偶联受体,  $\text{Ang II}$

①与  $AT_1R$  受体结合, 活化磷脂酶 C, 水解二磷酸磷脂酰肌醇, 形成三磷酸肌醇和二酰甘油, 三磷酸肌醇刺激  $Ca^{2+}$  从钙库释放, 二酰甘油激活蛋白激酶 C, 蛋白激酶 C 可促进细胞外信号调节激酶的磷酸化, 引起细胞增殖。我们以前的工作阐明了 Ang ①激活 ERK1/2 的信号途径<sup>[7,8]</sup>, 结合本实验发现氯沙坦可明显抑制 ERK1/2 的磷酸化, 说明氯沙坦可能在改善血管重塑方面起重要作用。

研究表明, 氯沙坦可明显改善 2K1C 高血压大鼠血管重塑, 抑制信号蛋白 ERK1/2 的激活。我们打算在今后的工作中进一步阐明其阻断 MAPK 的信号转导途径, 为防治高血压的发生发展提供理论依据。

#### [参考文献]

[1] Intengan HD, Schiffrin EL. Vascular remodeling in hypertension: roles of apop-

toxis, inflammation, and fibrosis. *Hypertension*, 2001, **38** (3 Pt 2): 581-587

[2] Tanaka K, Honda M, Takabatake T. Redox regulation of MAPK pathways and cardiac hypertrophy in adult rat cardiac myocyte. *J Am Coll Cardiol*, 2001, **37** (2): 676-685

[3] Sunil Mankad, Thomas AD Amato, Nathaniel Reichek, et al. Combined angiotensin ①receptor antagonism and angiotensin converting enzyme inhibition further attenuates postinfarction left ventricular remodeling. *Circulation*, 2001, **103**: 2845-850

[4] Chrysant SG. Vascular remodeling: the role of angiotensin converting enzyme inhibitors. *Am Heart J*, 1998, **135** (2 Pt 2): S21-30

[5] Blaufarb IS, Sonnenblick EH. The renin-angiotensin system in left ventricular remodeling. *Am J Cardiol*, 1996, **77**: 8C-16C

[6] Kenichi Goto, Koji Fujii, Uran Onaka, et al. Renin-angiotensin system blockade improves endothelial dysfunction in hypertension. *Hypertension*, 2000, **36**: 575-580

[7] Liao DF, Duff JL, Daum G, et al. Angiotensin ①stimulate MAP kinase activity in vascular smooth muscle cell, role of raf. *Circ Res*, 1996, **79** (5): 1007-014

[8] Liao DF, Monia B, Dean N, et al. Protein kinase C- $\zeta$  mediates angiotensin ① activity of ERK1/2 in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*, 1997, **272**: 6146-150

(此文编辑 曾学清)

•读者•作者•编者•

## 关于改[主题词]为[关键词]并规范关键词选择的告示

本刊编辑部

遵照中国科协学会学术部的指示, 自 2003 年第 11 卷第 1 期起, 本刊将学术论文中的中文[主题词]改为[关键词], 编排位置不变。现就有关事项告知于众。

### 1 关于关键词的个数

本刊认为, 文章类别不同, 关键词个数应有所差别。本刊对各类文章规定标引的关键词是: ①实验研究论文不少于 7 个; 其它研究论文、研究简报和快报不少于 6 个; ②临床诊治经验、文献综述、评论和其它文章不少于 5 个。

### 2 关于关键词的选择

**第一个关键词**列出该文主要工作或内容所属二级学科名称。与本刊有关的二级学科是: 细胞生物学、生理学、生物化学、分子生物学、神经生物学和生物工程; 流行病学、营养学、毒理学、中医学、民族医学、中西医结合医学、中药学、人体解剖学、组织胚胎学、病理学、药理学、放射医学、医学实验动物学、生物医学工程学、临床诊断学、内科学、外科学、儿科学、妇产科学、眼科学、神经病学、药物化学、生物药理学、药效学、医药工程和特种医学。

二级学科的选择, 由作者根据论文内容和所在科室来决定, 一篇文章只能选择属于一个二级学科。作者选择好二级学科后, 编辑部一般不作修改。

**第二个关键词**列出该文研究得到的成果名称或文内若干个成果的总类别名称。

文章的研究成果名称或研究成果总类别名称应简单明确, 一般不超过 15 个汉字, 应由作者自己根据文章主要内容来决定, 编辑部可作适当修改。

**第三个关键词**视文章种类有别: 对于实验研究、临床研究和流行病学研究等论文, 列出该文在得到上述成果或结论时采用的科学研究方法的具体名称。一篇论文往往采用多种研究方法, 此处只列最主要的一种。对于综述和评述性论文, 此处只写“综述”或“评论”。对于方法学论文, 此处只写应用方法名称, 不写被研究的方法名称。后者出现于第二个关键词的位置。

**第四个以后的关键词**必须列出在前三个关键词中没有出现的, 但被该文作为主要研究的事件或物质名称。这些关键词应在题目和摘要中出现过, 作者认为读者用这些词就能很快找到这篇文章的词。

作者在选择关键词时应注意: ①集合名词、动词、动名词、形容词和副词等单独存在时不能用作关键词; 中文关键词只能用汉字或数字, 不能用英文缩写词或全英文。

以上规定, 请广大作者遵照执行。