

适于膜片钳技术的大鼠肝 Kupffer 细胞急性分离和鉴定

刘亮, 张宗明, 张驰, 姜楠

刘亮, 张驰, 姜楠, 同济大学附属同济医院普外科 上海市 200065
张宗明, 清华大学第一附属医院普外科 北京市 100016
刘亮, 男, 1975-12-27 生, 云南昆明人, 汉族, 同济大学附属同济医院普外科 2002 级硕士研究生, 主要从事细胞离子通道与肝胆外科疾病的研究。
国家自然科学基金资助项目, No. 30270532
教育部“跨世纪优秀人才培养计划”基金资助项目, 教技函[2002]48 号
上海市教委“曙光计划”基金资助项目, No. 02SG20
项目负责人: 张宗明, 100016, 北京市朝阳区酒仙桥一街坊 6 号, 清华大学第一附属医院普外科. zhangzongming@yahoo.com
电话: 010-64372362 传真: 010-64361322
收稿日期: 2004-11-01 接受日期: 2004-11-12

Fresh isolation and identification of the rat liver Kupffer cells suitable to patch clamp technique

Liang Liu, Zong-Ming Zhang, Chi Zhang, Nan Jiang

Liang Liu, Chi Zhang, Nan Jiang, First Department of General Surgery, Affiliated Tongji Hospital of Tongji University, Shanghai 200065, China
Zong-Ming Zhang, Department of General Surgery, First Affiliated Hospital of Tsinghua University, Beijing 100016, China
Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30224801; the Fund from Ministry of Education for Trans-Century Excellent Talent Development Plan, Official Letter No. 2002-48; and Shuguang Project of Shanghai Educational Committee, No. 02SG20.
Correspondence to: Dr. Zong-Ming Zhang, Department of General Surgery, First Affiliated Hospital of Tsinghua University, Beijing 100016, China. zhangzongming@yahoo.com
Received: 2004-11-01 Accepted: 2004-11-12

Abstract

AIM: To establish a method for isolation of rat liver Kupffer cells suitable for patch clamp technique (PCT).

METHODS: Liver Kupffer cells were isolated from Sprague-Dawley rats by *in situ* perfusion via the portal vein with $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -free Krebs buffer followed by collagenase IV digestion. Then Percoll Isopyknic gradient centrifugation was performed. Kupffer cells were purified after selective adhesion. The cells were identified by endocytosis (ink and latex beads) experiments *in vivo* and *in vitro*. The electric current in Kupffer cells was recorded by whole-cell patch-clamp recording technique.

RESULTS: The isolated Kupffer cells showed polymorphism with typical polygon-like and star-like shapes. A total of $2.5\text{--}3.5 \times 10^6$ cells were collected per gram of rat liver. The purity and adhesion rate were 90% and 39.4%, respectively. The activity is over 90%. The isolated and purified rat Kupffer cells were easy to be used in whole-

cell PCT, and the store-operated Ca^{2+} current was successfully recorded in the cells.

CONCLUSION: The Kupffer cells suitable for PCT were successfully isolated from rats by enzyme digestion combined with gradient centrifugation and adhesion purification.

Key Words: Kupffer cells; Patch clamp technique

Liu L, Zhang ZM, Zhang C, Jiang N. Fresh isolation and identification of the rat liver Kupffer cells suitable to patch clamp technique. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;13(2):202-206

摘要

目的: 建立一种适于膜片钳技术(PCT)的大鼠肝 Kupffer 细胞的急性分离方法。

方法: 经门静脉插管, 用无 Ca^{2+} , Mg^{2+} K-H 原位灌注液冲洗后, IV 型胶原酶原位循环灌注消化, Percoll 不连续密度梯度离心, 分离制备大鼠肝 Kupffer 细胞, 选择性贴壁纯化。用体内、体外吞噬功能(炭素墨水或聚苯乙烯乳珠)实验鉴定制备的肝 Kupffer 细胞。用全细胞膜片钳记录技术测定 Kupffer 细胞电流。

结果: 分离获得的大鼠肝 Kupffer 细胞形态多样, 典型的为多角形或星形, 细胞分离产量为 $2.5\text{--}3.5 \times 10^6/\text{g}$, 细胞纯度 90%, 贴壁率为 39.4%。用台盼蓝染色鉴定, 细胞活性大于 90%, 多数细胞明显吞噬颗粒。易于 PCT, 且记录到钙池操纵的 Ca^{2+} 通道电流(store-operated Ca^{2+} channel currents, Isoc)。

结论: 用胶原酶原位循环灌注消化, 结合 Percoll 不连续密度梯度离心和选择性贴壁纯化, 成功分离制备出高产、纯度高的适于 PCT 的肝 Kupffer 细胞。

关键词: Kupffer 细胞; 膜片钳技术

刘亮, 张宗明, 张驰, 姜楠. 适于膜片钳技术的大鼠肝 Kupffer 细胞急性分离和鉴定. *世界华人消化杂志* 2005;13(2):202-206
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/202.asp>

0 引言

肝 Kupffer 细胞是组成机体单核-巨噬细胞系统最大的群体, 占总量的 80-90%, 执行多种生物学功能。用膜片钳技术直接记录肝 Kupffer 细胞的离子通道电

流, 对于深入了解 Kupffer 细胞的功能特性, 探讨其与某些肝脏疾病、胆道疾病、全身性炎症反应等相关疾病的发生机制及防治均具有十分重要的意义. 肝 Kupffer 细胞的分离较难, 国外应用细胞淘析器或分离剂 Nycodenz 等成功分离 Kupffer 细胞, 然而由于设备昂贵或试剂来源不易而难于在我国广泛应用, 特别是膜片钳技术对于急性分离细胞的完整性和活性要求很高^[1], 迄今为止, 国内外尚无理想的适于膜片钳技术的肝 Kupffer 细胞急性分离方法. 我们拟建立一种适用于膜片钳技术的大鼠肝 Kupffer 细胞急性分离方法, 为进一步从细胞水平研究 Kupffer 细胞的功能特性和调节机制奠定方法学基础.

1 材料和方法

1.1 材料 Sprague-Dawley 大白鼠, 鼠龄 4-8wk, 质量 200-300 g, ♂. 由中国科学院上海实验动物中心提供. 胶原酶 IV 型(collagenase IV), Percoll 分离液, N-2-羟乙基哌嗪-N-2-乙磺酸(HEPES), 乙二醇-双(2-氨基乙基)四乙酸(EGTA), trypan blue, 聚苯乙烯乳珠(latex beads, 直径 1.1 μm), 均为美国 Sigma 公司产品; DMEM(美国 Gibco 公司); 小牛血清(上海华美生物工程公司). 其余均为国产分析纯试剂. 无 Ca^{2+} , Mg^{2+} K-H 原位灌注液(mmol/L): KCl 5, KH_2PO_4 1, NaCl 115, HEPES 25, EGTA 0.5^[1]. 含 0.2 g/L IV 型胶原酶的 K-H 灌注消化液(mmol/L): KCl 5, KH_2PO_4 1, NaCl 115, HEPES 25, $\text{CaCl}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$ 1, 胶原酶 IV 0.2 g/L^[1]. 含 0.5 g/L 胶原酶 IV 的孵育液(mmol/L): KCl 5, KH_2PO_4 1, NaCl 115, HEPES 25, $\text{CaCl}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$ 1, 胶原酶 IV 0.5 g/L. 磷酸缓冲盐溶液(PBS, g/L): KCl 0.2, KH_2PO_4 0.2, NaCl 8.0, $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2.08^[2]. DMEM 培养液: 含 HEPES 25 mmol/L, Glutamine 2 mmol/L. -20°C 保存, 临用前加入 100 ml/L 新鲜灭活小牛血清(FCS)、青霉素 100 kU/L、链霉素 100 mg/L. Percoll 分离液: 用 10 mL 无菌的 85 g/L NaCl (1.5 mol/L) 稀释 90 mL Percoll 液(1:9), 得到 100% 的 Percoll 溶液(300 mOsmol/L, pH 7.4), 4°C 保存. 临用前用无菌生理盐水将 Percoll 配成 30% (V/V, 密度为 1044.8 g/L) 和 70% (V/V, 1096.8 g/L) 的浓度.

电子蠕动泵(保定兰格恒流泵有限公司), 倒置显微镜(Zeiss Axiovert 200, 美国), 高速冷冻离心机(eppendoff, 德国), 水浴振荡箱(上海跃进医疗仪器厂), CO_2 培养箱(Nuair, 美国), 抽滤除菌系统(真空泵、储液罐、滤膜 0.22 μm), 培养皿(Nuncon, 美国). 硬质玻璃电极(Would Precision, 美国), MP-285 三维微操纵器(Sutter Instrument Co. 美国), Axopatch 200B 膜片钳放大器及 pClamp9.0 软

件包(AXON Instrument, 美国), 防震台及静电屏蔽罩(IOI Technology Corporation Limited), MODEL P-97 微电极控制仪(Sutter Instrument Co. 美国).

1.2 方法^[3]

1.2.1 Kupffer 细胞的分离和培养 大鼠用 10 g/L 戊巴比妥 ip (5 mL/kg 体重) 麻醉, 同时予以 1 U/g 的肝素 ip. 15 min 后, 固定于操作台上, 腹部用 80 g/L 的硫化钠脱毛, 安尔碘消毒手术野皮肤, 打开腹腔后分别显露门静脉和下腔静脉, 于下腔静脉内注入 1 MU/L 的肝素 1 mL, 进一步肝素化抗凝, 游离门静脉, 结扎远端, 剪开血管, 置入直径 4 mm 的硅胶管, 深度不宜超过第一肝门. 立即用预热 37°C 的无 Ca^{2+} , Mg^{2+} K-H 原位灌注液灌注, 用电子蠕动泵控制流速为 40 mL/min. 剪开胸腔, 夹闭下腔静脉. 快速灌注 1-2 min, 待肝脏由于灌注液的充盈而膨胀, 出现均匀性颜色苍白后, 再剪开肝下下腔静脉, 放出积血积液, 同时置入直径 6-8 mm 的硅胶管, 供引流用. 总计快速灌注冲洗 5 min, 以流出液变清和肝表面呈黄白色为准. 冲洗完成后, 取含 0.2 g/L IV 型胶原酶的 K-H 灌注消化液 100 mL, 预热 37°C . 电子蠕动泵控制流速 20 mL/min, 继续从门静脉插管灌注, 经下腔静脉流出, 收集后循环灌注 2-3 次, 总的消化时间为 10 min. 待肝变软、塌陷、弹性消失, 棉签压迫凹陷不易恢复, 肝被膜下出现空泡时, 表明灌注消化完全. 将肝脏摘下, 置入预热 37°C 含 0.5 g/L 胶原酶 IV 的孵育液 50 mL 中, 剔除肝包膜和结缔组织, 使细胞散落. 孵育时间 20 min, 其间水浴振荡 200 r/min. 孵育液用 200 目的不锈钢筛网滤过, 得到肝组织细胞悬液. 将上述肝组织细胞悬液以 500 r/min 离心 10 min, 获得细胞团块. 加入 PBS 液 50 mL, 充分吹打悬浮后, 再以 50 r/min 离心 2 min, 保留上清液. 此时的沉淀为肝实质细胞团块, 而上清液即为非实质肝细胞悬液(NPC). 将得到的 NPC 以 500 r/min 离心 5 min, 获得沉淀, 再经 PBS 液洗涤 2 次, 最终悬浮于 DMEM 液 40 mL 中. 取 10 mL 的离心管若干支, 仔细将 Percoll 分离液铺层: 底层为 70% 的 Percoll 2 mL, 密度是 1096.8 g/L; 中层为 30% 的 Percoll 2 mL, 密度是 1044.8 g/L; 顶层为 NPC 细胞悬液 2 mL. 铺层时尽量减少振荡, 保持每层之间界面清晰. 放入高速冷冻离心机, 离心 (4°C , 800 r/min, 20 min). 取出离心管后, 可见 30% 和 70% 界面之间有一白膜状的细胞层面, 此层即为富含 Kupffer 细胞的 NPC 细胞, 用尖吸管轻轻将此层细胞吸入, 移入另一试管中^[4], 加入 PBS 液, 以 500 r/min 离心 5 min, 反复 2 次. 最终细胞悬浮于 4 mL DMEM 液中, 取部分用于计数和鉴定. 用苔盼蓝染色检测细胞活性, 并计数细胞量. 将获得的细胞以 $1\times 10^8/\text{L}$ 的密度

接种于 3.5 mm 的培养皿中, 每个培养皿预先放置含小牛血清的 DMEM 液 1.5 mL. 置入 37℃, 50 mL/L CO₂, 950 mL/L O₂, 950 mL/L 湿度的 CO₂ 的培养箱内, 培养 60 min 后取出, 洗去非贴壁细胞, 获得纯化的 Kupffer 细胞. 贴壁的 Kupffer 细胞即可进行全细胞膜片钳记录.

1.2.2 Kupffer 细胞的全细胞膜片钳记录 玻璃微电极控制后尖端直径为 1-2 μm, 充满电极内液后阻抗为 4-8 MΩ 标准电极外液成分 (mmol/L): NaCl 145, MgCl₂ 2, CaCl₂ 10, CsCl 1, KCl 2.8, glucose 10, HEPES 10, 用 NaOH 调 pH 至 7.4. 标准细胞内液成分 (mmol/L): CsCl 120, MgCl₂ 1, EGTA 10, HEPES 10, Thapsigargin 2 μmol/L, 用 CsOH 调 pH 至 7.3. 记录在 20-24℃ 的室温下进行. 实验用 Axopatch 200B 膜片钳放大器, 当电极尖端与细胞膜之间形成高阻封接 (大于 1 GΩ) 后, 负压或电击破膜, 使电极内液与细胞内液相通, 调节放大器的电容-慢控制 (C-slow) 和电导-串联控制 (G-series) 来抵消瞬时电流, 并记录调节值. 电流或电压信号经放大器放大后通过接口 Labmaster TL-1 与一台奔腾 4 计算机相连, 经 3 kHz 滤波, 采样频率为 50 kHz, 设定钳制电位 (holding potential, HP) 为 0 mV, 实验电位 (test potential, TP) 为 -120~+60 mV, 持续时间 50 ms. 信号采集与贮存, 结果分析等均借助计算机用 pCLAMP 9.0 软件完成.

统计学处理 计量数据以 mean±SD 表示, 多组间差异采用方差分析, 两组组间差异用 Dunnett T 检验, $P < 0.05$ 为差异显著.

2 结果

2.1 Kupffer 细胞的获得和功能 本法分离得到的 Kupffer 细胞产量 (2.5-3.5) × 10⁶/g, 细胞纯度 90%, 以 4 g/L 台盼蓝染色, 细胞活性大于 90%. 倒置显微镜下, 急性分离得到的 Kupffer 细胞为折光性很强的圆球, 直径为 10 μm, 远小于肝细胞 (肝细胞直径约为 21 μm). 胞核大, 呈圆形或肾性, 胞质少. 完整的细胞形态在标准细胞外液中可以维持 8-12 h. 在 328 nm 波长的紫外光照射下, 未观察到细胞的自发荧光. 在培养皿中加入含微量的碳素墨水 (高温消毒) 或含 10⁹ 个/L 聚苯乙烯乳珠 (latex beads, 直径 1.1 μm) 的 DMEM 培养液, 6 h 后分别在相差显微镜下观察到 Kupffer 细胞内吞噬的炭素颗粒或聚苯乙烯乳珠 (图 1); 或者取鼠肝前 12-24 h, 经鼠尾静脉注射含 100 g/L 碳素墨水的 DMEM 液 (已消毒) 1 mL, 分离 Kupffer 细胞过程中, 发现肝脏稍变黑; 梯度离心后, 见 30-70% 的 Percoll 界面有一层黑色物; 培养细胞贴壁清洗后, 相差显微镜下同样可见 Kupffer 细胞内的吞噬炭素颗粒 (图 1).

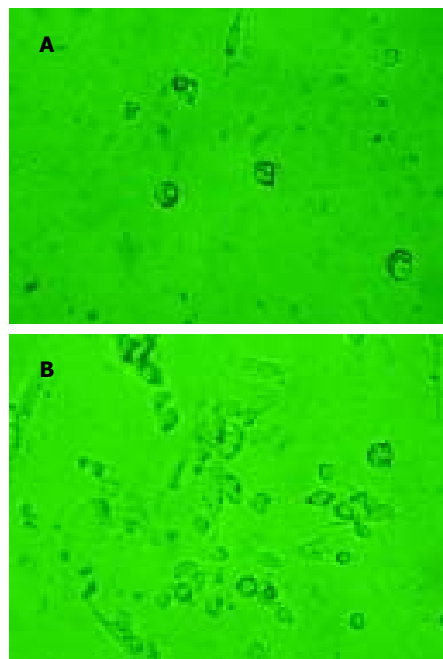


图 1 急性分离培养的大鼠 Kupffer 细胞, 培养 24 h 后, 绝大多数细胞伸展贴附于培养瓶底. (×40)

2.2 Kupffer 的全细胞膜片钳记录 分离完整的大鼠肝 Kupffer 细胞易于形成全细胞膜片钳记录, 封接成功率高达 80% 以上 ($N > 1000$), 在电压钳制条件下, 用标准电极内液和电极外液, 可测得一种延迟性的内向电流, 当加入 2 μmol/L thapsigargin + 10 mmol/L EGTA 耗竭细胞内钙池 5-10 s 后, 在 -100 mV 钳制电位下, 平均电流幅度为 -650 ± 50 mV ($N = 12$), 反转电位 (reverse potential) 为 0~+10 mV, 具有明显的内向整流性. (图 2) 经过特异性药理学检测, 证实该

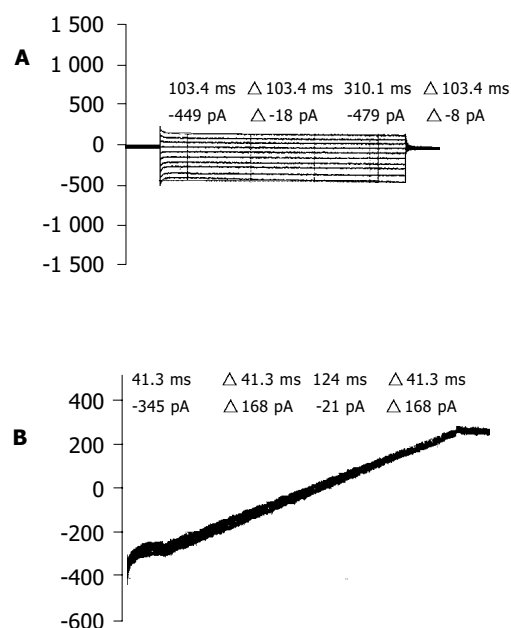


图 2 全细胞膜片钳记录大鼠肝 Kupffer 细胞上的钙池操纵的钙通道电流 (Isoc), HP: 0 mV, TP: -120~+60 mV, 持续时间 50 ms. A: 阶梯(step)程序记录. B: 斜坡(ramp)程序记录.

电流主要为钙离子(Ca^{2+})负载(当电极外液中的 Ca^{2+} 由 10 mmol/L 螯合至 100 nmol/L 时, 该内向电流几乎完全消失, $N = 7$), 对 Ca^{2+} 具有高度选择性, 并可被 2-APB 特异性地抑制(电极外液中加入 100 $\mu\text{mol/L}$ 2-APB 后, 在 -100 mV 钳制电位时电流幅度为 -162 ± 11 pA, $N = 5$) (图 3). 表明记录的电流为钙池操纵的 Ca^{2+} 通道电流(store-operated Ca^{2+} channel currents, I_{soc}).

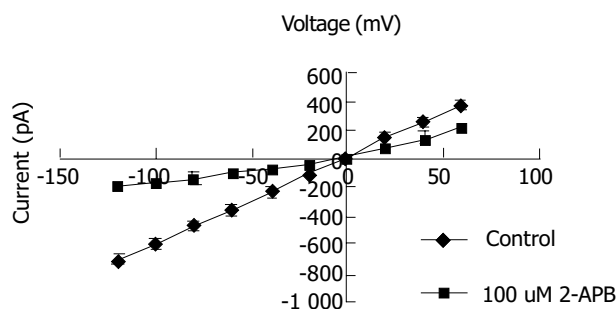


图3 100 $\mu\text{mol/L}$ 2-APB 对大鼠肝 Kupffer 细胞 I_{soc} 抑制作用的电流/电压(I/V)曲线.

3 讨论

分离完整、表面光洁、活性好、存活时间较长的大鼠肝 Kupffer 细胞是膜片钳记录成功的关键. 参考有关文献, 结合实验条件反复改进, 我们摸索出一种简单、快速、产量大且活性好的适于膜片钳记录的大鼠肝 Kupffer 细胞的急性分离方法, 其要点为: 鼠龄 4-8 wk. 灌注冲洗速率 40 mL/min; 原位消化灌注 0.2 g/L IV 型胶原酶速率 20-30 mL/min, 为节约酶量, 可采用循环灌注, 根据消化程度适当增加灌注次数以延长酶作用时间. 孵育是增加细胞产量、提高细胞活性的关键环节: (1) 孵育时间: 1 h 内, 孵育时间的长短对提高细胞产量有明显关系, 二者呈正相关; 孵育时间超过 1 h, 细胞产量增加不明显. 另外, 孵育时间的延长, 也使细胞离体时间和酶作用时间的延长, 导致细胞活性下降. 本实验的孵育时间选用 20 min. (2) 酶解: 大多数文献^[5-7]均采用“Pronase-collagenase”的消化方式, 但 Pronase E 对肝细胞破坏作用的浓度和时间都很难掌握, 并且有文献证明对 Kupffer 细胞膜造成损害^[8]. 而且肝细胞破坏后的产物 DNA, 使细胞粘连聚集形成絮状物, 需使用 Dnases I 溶解, 进一步增加了用酶的复杂性和对细胞膜的破坏. 实验证明孵育过程中仅用 0.5 g/L IV 型胶原酶, 并通过将解离液中 Ca^{2+}

浓度降低终止酶解, 可获得足够多的分散细胞. 对于如何在不破坏细胞完整性的基础上剔除肝细胞, 我们运用差速离心法. 根据肝细胞的漂浮密度 (>1096 g/L) 明显大于 Kupffer 细胞漂浮密度 (1 040-1 060 g/L) 的特点, 首先用 50 r/min 的离心力去除肝细胞团块, 继之以 500 r/min 的离心力即可得到非实质肝细胞,

而 Kupffer 即存在于这一层次当中. Percoll 是一种优良的梯度材料, 能够耐受高压和高温, 广泛用于各种肝组织细胞的分离, 不表现任何细胞毒性^[9]. 我们经反复实验, 在 Percoll 为 1044.8 g/L 和 1096.8 g/L 界面之间可获得纯度和数量较满意的 Kupffer 细胞^[4]. 每克鼠肝可提取的 Kupffer 细胞的数量在 2×10^6 以上. 经 Percoll 不连续密度梯度离心后获得 Kupffer 细胞纯度约为 70%, 将细胞接种于玻璃培养皿中, 发现 Kupffer 细胞 15 min 后即开始贴壁, 1 h 胞膜开始伸展, 牢固贴附于培养皿底部. 在细胞接种 30-60 min 后, 弃去上清液后可以去除绝大多数非贴壁的内皮细胞和小淋巴细胞, 获得高纯度的 Kupffer 细胞, 经鉴定纯度大于 90%^[10]. 在细胞分离过程中, 温度也是影响细胞产量和活性的重要因素: (1) 灌注液体要预热 37°C, 因为 0-4°C 灌注液所造成的冷缺血虽然有益于保护肝组织细胞, 但低温的灌注液也是低氧的, 而且降低了酶的活性; (2) 孵育液预热至 37°C, 是酶活性的最佳作用温度, 也有益于保持细胞生理活性; (3) 离心过程保持 4°C 的条件能快速去除细胞间的钾, 增加细胞间的钠, 并且减少膜蛋白的损伤^[11].

酶能够不可逆地破坏生物膜上的蛋白质, 而各种离子通道本身就是蛋白质. 选用酶消化加梯度离心分离法分离大鼠肝 Kupffer 细胞同样存在上述问题, 容易造成细胞结构的破坏和生物活性的丧失. 因此, 急性分离的肝 Kupffer 细胞, 既要保存其形态学特征, 又要保存其生理学特征, 才能供电理学研究使用. 我们分离的大鼠肝 Kupffer 细胞具有较大的细胞核, 且细胞质较少, 鉴定具有明显的吞噬颗粒, 用全细胞膜片钳技术记录到一种被细胞内钙池耗竭激活的、具有明显内向整流特性的阳离子电流, 对 Ca^{2+} 具有高度的选择性, 能被 2-APB 或 SKF_{96365} 特异性阻滞, 考虑为钙池操纵的 Ca^{2+} 通道电流 (I_{soc}). 因为 SOC 通道是非兴奋细胞 Ca^{2+} 内流的主要通道^[12-13], 表明该分离方法能较好地保存大鼠肝 Kupffer 细胞主要离子通道的功能.

4 参考文献

- Knook DL, Blansjaar N, Sleyster EC. Isolation and characterization of Kupffer and endothelial cells from the rat liver. *Exp Cell Res* 1977;109:317-329
- Goto M, Lemasters JJ, Thurman RG. Activation of voltage-dependent calcium channels in Kupffer cells by chronic treatment with alcohol in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 1993;267:1264-1268
- Nnalue NA, Shnyra A, Hultenby K, Lindberg AA. Salmonella choleraesuis and Salmonella typhimurium associated with liver cells after intravenous inoculation of rats are localized mainly in Kupffer cells and multiply intracellularly. *Infect Immun* 1992;60:2758-2768
- 张森, 万德森, 肖锡宾. BALB/c 鼠巨噬细胞的分离培养与鉴定. 大肠肛门病外科杂志 2003;9:88-92

- 5 Ramadori G, Neubauer K, Odenthal M, Nakamura T, Knittel T, Schwogler S, Meyer zum Buschenfelde KH. The gene of hepatocyte growth factor is expressed in fat-storing cells of rat liver and is downregulated during cell growth and by transforming growth factor-beta. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;183:739-742
- 6 Hendriks HF, Brouwer A, Knook DL. Isolation, purification, and characterization of liver cell types. *Methods Enzymol* 1990; 190:49-58
- 7 Valatas V, Xidakis C, Roumpaki H, Kolios G, Kouroumalis EA. Isolation of rat Kupffer cells: a combined methodology for highly purified primary cultures. *Cell Biol Int* 2003;27:67-73
- 8 Ikejima K, Enomoto N, Seabra V, Ikejima A, Brenner DA, Thurman RG. Pronase destroys the lipopolysaccharide receptor CD14 on Kupffer cells. *Am J Physiol* 1999;276(3 Pt 1):G591-598
- 9 Smedsrod B, Pertoft H. Preparation of pure hepatocytes and reticuloendothelial cells in high yield from a single rat liver by means of Percoll centrifugation and selective adherence. *J Leukoc Biol* 1985;38:213-230
- 10 施鑫, 李保全, 黎介寿. 大鼠肝 Kupffer 细胞分离培养及鉴定. *医学研究生学报* 2000;13:242-246
- 11 Kolb HA, Adam G. Regulation of ion permeabilities of isolated rat liver cells by external calcium concentration and temperature. *J Membr Biol* 1976;26:121-151
- 12 Berridge MJ. Capacitative calcium entry. *Biochem J* 1995;312 (Pt 1):1-11
- 13 Putney JW Jr, McKay RR. Capacitative calcium entry channels. *Bioessays* 1999;21:38-46

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

World Journal of Gastroenterology 办刊宗旨

《World Journal of Gastroenterology, WJG》的任务是及时报道和刊登国内外、特别是我国消化病学者具有创造性的、有较高学术水平的基础和临床研究论文、研究快报等。对具有中国特色的研究论文, 如食管癌、胃癌、肝癌、大肠癌、病毒性肝炎、幽门螺杆菌、中医中药、中西医结合和基于作者自己研究工作为主的综述性论文, 将优先发表, 使WJG成为我国消化疾病临床和基础科学研究对外学术交流的窗口和我国优秀医务工作者走向世界的桥梁。

World Journal of Gastroenterology 审稿要点

《World Journal of Gastroenterology, WJG》根据编委的审稿意见, 来稿分为优先发表、可以发表、修改后发表、修改后再审等项处理。WJG 为了确保其出版的每篇论文的学术质量, 特制定了以下评审要点。(1)题名: 是否准确反映了研究工作的科学问题, 内容是否简明而有特色。若不符, 请提出具体修改意见。(2)摘要: 是否明确指出了研究的背景与目的、材料和方法、结果(包括重要数据)和结论, 创新点和重点科学问题是否与目的、材料和方法、结果(包括重要数据)和结论相符。(3)引言: 是否包括该研究的目的是与其他相关研究的关系。(4)材料和方法: 有无特色, 如大样本、安全性和有效性的随机、双盲双模拟、多中心平行对照临床试验、特殊病例、细胞或组织样品; 研究方法和技术的有无创新性、系统性或特色。改进和创新方法的描述是否达到了他人可以重复或验证的要求, 实验对照的设计是否合理可靠, 统计学处理方法的使用是否恰当。(5)结果: 是否能得出较明确的科学结论, 实验证据是否充足。临床研究重点应看其样本大小和统计学分析结果。(6)讨论: 是否条理分明, 有无系统的理论分析和有价值的科学结论。(7)参考文献: 文献引用是否恰当和充分, 特别是最新文献的引用情况。(8)综合评价: 论文的科学性、创新性和可读性是否能较好地反映我国或国际胃肠病学临床和基础研究的先进水平。