

内质网分子伴侣糖调节蛋白94在非酒精性脂肪肝中的表达及意义

俞泽元, 高鹏, 申力, 黄海云, 但杰

■背景资料

近年来,随着人民生活水平提高和饮食结构的改变,NAFLD的发病率呈逐年升高趋势。内质网应激是机体的一种保护机制,但是长期的应激会对机体造成一定的损害,他对应激细胞的结局如抵抗、适应、损伤或凋亡有重要作用,近年来有关其信号通路及效应研究非常活跃,其效应之一即对脂质代谢的影响。目前有关内质网应激与疾病的研究较多,但就内质网应激在非酒精性脂肪肝中作用的有关临床研究国内外较少见。

■同行评议者

张占卿,主任医师,上海市(复旦大学)公共卫生中心

俞泽元,但杰,兰州大学临床医学院 甘肃省兰州市 730000
高鹏,申力,黄海云,甘肃省人民医院普外科 甘肃省兰州市 730000

作者贡献分布: 此课题在高鹏的指导下由俞泽元设计; 肝组织的取材由高鹏与黄海云完成; 申力进行技术指导并提供了分析工具; 研究过程由俞泽元与但杰操作完成; 数据分析由俞泽元,申力及但杰完成; 本文写作由俞泽元完成; 高鹏对文章进行批评性审阅。

通讯作者: 高鹏, 730000, 甘肃省兰州市, 甘肃省人民医院普外科, gaopengl2@yahoo.com.cn

电话: 0931-8281965

收稿日期: 2008-07-20 修回日期: 2008-08-26

接受日期: 2008-09-01 在线出版日期: 2008-11-08

Expression of endoplasmic reticulum molecular chaperone GRP94 in human nonalcoholic fatty liver and its clinical significance

Ze-Yuan Yu, Peng Gao, Li Shen, Hai-Yun Huang, Jie Dan

Ze-Yuan Yu, Jie Dan, Clinical Medical College of Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu Province, China
Peng Gao, Li Shen, Hai-Yun Huang, Department of General Surgery, Gansu Provincial People's Hospital, Lanzhou 730000, Gansu Province, China

Correspondence to: Peng Gao, Department of General Surgery, Gansu Provincial People's Hospital, Lanzhou 730000, Gansu Province, China. gaopengl2@yahoo.com.cn
Received: 2008-07-20 Revised: 2008-08-26

Accepted: 2008-09-01 Published online: 2008-11-08

Abstract

AIM: To detect the expression of GRP94 in human nonalcoholic fatty liver injury, and to explore the mechanism of human nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD).

METHODS: Using immunohistochemistry and RT-PCR, GRP94 protein and mRNA expression were detected in fatty liver specimens and normal liver specimens. Hepatic steatosis, inflammation and necrosis were graded by routine H&E staining of liver sections, and their correlations were analyzed.

RESULTS: Steatosis, inflammation and necrosis were markedly increased in nonalcoholic fatty

liver group than in the control group (3.89 ± 0.32 vs 0.20 ± 0.4 ; 3.67 ± 0.49 vs 0 ; 0.44 ± 0.51 vs 0 , $P < 0.01$ or 0.05). The expression of GRP94 mRNA and its protein expression were enhanced significantly in nonalcoholic fatty liver group than in the normal control group (0.86 ± 0.02 vs 0.37 ± 0.03 ; 0.34 ± 0.01 vs 0.31 ± 0.01 , both $P < 0.01$). The expression of GRP94 mRNA and its protein expression were positively associated with steatosis, inflammation and necrosis scores ($P < 0.01$).

CONCLUSION: The excessive expression of GRP94 could participate in the development of nonalcoholic fatty liver disease.

Key Words: Nonalcoholic fatty liver disease; GRP94; Immunohistochemistry; Reverse transcription-polymerase chain reaction

Yu ZY, Gao P, Shen L, Huang HY, Dan J. Expression of endoplasmic reticulum molecular chaperone GRP94 in human nonalcoholic fatty liver and its clinical significance. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(31): 3566-3570

摘要

目的: 检测非酒精性脂肪肝患者肝组织中糖调节蛋白94的表达情况, 探讨非酒精性脂肪肝(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)的发病机制。

方法: 应用半定量逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)法和免疫组化法检测脂肪肝组和正常对照组肝组织中糖调节蛋白94基因和蛋白表达, HE染色观察肝脏脂肪变性、炎症活动和坏死, 并进行相关分析。

结果: 非酒精性脂肪肝组脂肪变性、炎症评分及坏死评分较正常对照组明显增加, 差异具有统计学意义(3.89 ± 0.32 vs 0.20 ± 0.4 ; 3.67 ± 0.49 vs 0 ; 0.44 ± 0.51 vs 0 , $P < 0.01$ 或 0.05)。与正常组比较, 脂肪肝患者肝组织糖调节蛋白94 mRNA和蛋白表达明显增强(0.86 ± 0.02 vs 0.37 ± 0.03 ; 0.34 ± 0.01 vs 0.31 ± 0.01 , 均 $P < 0.01$)。糖调节蛋白94 mRNA和蛋白表达与脂肪变性、炎症评分及坏死评分明

呈正相关($P<0.01$).

结论: 非酒精脂肪肝引起的肝脏损害可能与糖调节蛋白94表达有关.

关键词: 非酒精性脂肪肝; 糖调节蛋白94; 免疫组织化学; 半定量逆转录聚合酶链反应

俞泽元, 高鹏, 申力, 黄海云, 但杰. 内质网分子伴侣糖调节蛋白94在非酒精性脂肪肝中的表达及意义. 世界华人消化杂志 2008; 16(31): 3566-3570

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3566.asp>

0 引言

非酒精性脂肪肝发病率正逐年升高, 已经成为全球范围内普遍存在的一种慢性肝病和其他疾病的辅助因素^[1-3]. 研究显示约20%的非酒精性脂肪肝炎(NASH)患者可进展为肝硬化, 甚至发生肝癌^[4]. 糖调节蛋白94(glucose-regulated protien, GRP94)是细胞内质网中的一种糖蛋白, 是一种压力诱导蛋白, 为相对分子质量 90×10^3 的热休克蛋白(HSP90)家族, 能调节蛋白质的折叠、传递和降解, 该家族蛋白具有分子伴侣功能, 与多种疾病相关, 因此又称为内质网分子伴侣^[5]. 本研究通过检测GRP94在非酒精性脂肪肝组织中的表达, 探讨其在该病中的致病作用.

1 材料和方法

1.1 材料 所有研究对象均来自2007-09/2008-04在甘肃省人民医院行腹部手术时, 经患者本人同意并签字, 并经医学伦理委员会同意取得. 非酒精性脂肪性肝病组18例, 男/女: 10/8, 平均年龄 50 ± 6.25 岁, 诊断标准符合2006-02中华医学会肝病学分会通过的“非酒精性脂肪性肝病诊疗指南”^[6], 术前检查提示有脂肪肝并经活检证实, 并排除病毒性、药物性、自身免疫性肝病. 非脂肪肝对照组10例, 暴露因素相似, 无肝脏疾病, 男/女: 5/3, 平均年龄在 50 ± 4.32 岁, 经转移性直肠癌手术时取得, 并经病理学证实为未发现癌转移的正常肝组织. 所有取得的脂肪肝组织和正常对照肝组织各0.2 g左右, 再分成两半, 一半于15 s内迅速置液氮冷冻, -80°C 低温冰箱保存; 另一半置40 g/L甲醛溶液内固定.

1.2 方法

1.2.1 组织病理学检测: 常规HE染色, 评价肝组织脂肪变性、炎症坏死等病理变化. 脂肪变性评分为: 0(无), 1(肝细胞含脂滴 $\leq 25\%$), 2(肝细胞含脂滴26%-50%), 3(肝细胞含脂滴51%-75%)

及4(肝细胞含脂滴 $>75\%$). 根据汇管区、肝叶内炎症细胞浸润程度将炎症评分为: 0(无), 1(轻度), 2(轻度), 3(中度)和4(重度). 坏死评分为: 0(无), 1(轻度), 2(轻度), 3(中度)和4(重度).

1.2.2 免疫组化检测GRP94蛋白表达: 标本用甲醛固定, 石蜡包埋, 连续切片4 μm 厚, 行免疫组化染色(SP法). 即用型GRP94兔抗人多克隆抗体和SP法免疫组化试剂盒购于北京中杉金桥生物技术公司. GRP94主要表达在细胞质内, 呈棕黄色颗粒. 光镜下每张切片随机选取6个不重叠视野, 采用全自动医学彩色图像分析系统, 测定平均吸光度(A), 计算每组平均值, 反映阳性强度.

1.2.3 RT-PCR检测GRP94 mRNA: 肝组织标本于匀浆器内研磨后, TRIzol试剂(上海生工)提取总RNA, 并逆转录合成cDNA. 以cDNA为模板进行PCR扩增. GRP94和GAPDH均由上海生工合成, GRP94正义链: 5'-CAG TTT TGG ATC TTG CTG TGG-3', 反义链: 5'-CAG CTG TAG ATT CCT TTG C-3', 扩增片段全长为274 bp; 磷酸甘油脱氢酶基(GAPDH)作为内对照, 正义链: 5'-GAA GGT GAA GGT CGG AGT C-3', 反义链5'-GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC-3', 扩增片段全长为226 bp. 反应条件为: 95°C 5 min后, 94°C 1 min, 58°C 30 s, 72°C 30 s, 循环30次, 最后 72°C 10 min. 以GAPDH作为内参照, 反应条件为 95°C 5 min后, 95°C 30 s, 56°C 45 s, 72°C 1 min, 循环35次, 最后 72°C 10 min. PCR反应产物经过12 g/L琼脂糖凝胶电泳检测, 凝胶成像仪观察拍照.

统计学处理 采用SPSS10.0统计学软件进行用 t 检验和Pearson相关分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 病理学观察 HE染色光镜下观察正常组肝脏形态无明显异常. 脂肪肝组肝组织均见重度脂肪肝(即肝脂肪变性和脂肪贮积的肝细胞占肝小叶2/3以上或者肝细胞弥漫脂肪变性呈鱼网状), 小叶内见局灶性肝细胞坏死, 有明显炎性细胞浸润, 肝细胞广泛的气球样变.

2.2 肝脏脂肪变性、炎症及坏死变化 非酒精性脂肪肝组较正常对照组明显增加, 有显著的差异, 有统计学意义(表1).

2.3 GRP94蛋白表达变化 免疫组化化学染色结果显示, GRP94蛋白染色定位于肝细胞胞质, 正常组检测到肝细胞胞质中, 呈散在分布的浅黄色颗粒. 非酒精脂肪肝组肝组织可见大量棕褐色

■ 相关报道

国内外研究报道内质网应激在酒精性脂肪肝中起着重要作用, 但酒精肝和非酒精性脂肪肝在病理学表现上基本一致. 还有研究报道在非酒精性脂肪肝时存在高半胱氨酸血症, 他是内质网应激的重要诱导因素. 同时有报道显示细胞色素P450的激活也是内质网应激的重要原因.

■创新盘点

本文从基因和蛋白水平检测了内质网分子伴侣在非酒精性脂肪肝中表达明显增强,并且与病理变化做了相关分析,从而证明了非酒精性脂肪肝存在内质网的应激。

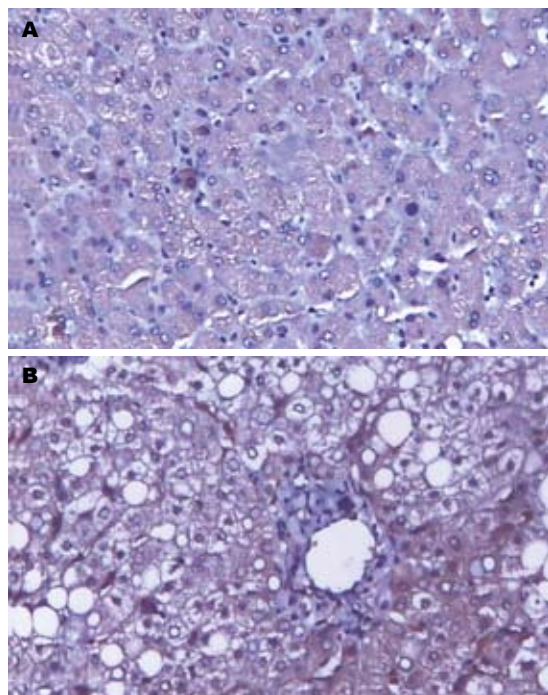


图1 GRP94蛋白表达变化(免疫组化染色 $\times 100$)。A: 正常对照组; B: 脂肪肝组。

颗粒沉积,其表达较正常组明显增强,差异有非常显著性意义(图1)。采用全自动医学彩色图像分析系统,测定正常对照组、脂肪肝组平均吸光度 A 值分别为 0.31 ± 0.01 、 0.34 ± 0.01 ,二者进行比较,差异有显著的统计学意义($t = 9.733$, $P = 0.000$)。

2.4 GRP94 RNA表达 正常对照组和脂肪肝组的GRP94 mRNA表达灰度值 A 值分别为 0.37 ± 0.03 、 0.86 ± 0.02 ,二者进行比较,差异具有显著的统计学意义($t = 49.186$, $P = 0.000$,图2)。

2.5 肝组织GRP94蛋白和GRP94 RNA表达与肝组织病理学改变的相关性 Pearson相关分析表明GRP94蛋白和GRP94 RNA表达增强与脂肪变性、炎症、坏死具有明显的正相关,其结果显示GRP94蛋白和基因的表达增强在非酒精性脂肪肝的发生中起着重要作用,其表达在脂肪变性、炎症、坏死越严重时越为显著(表2)。

3 讨论

NAFLD是一种无过量饮酒史致肝实质细胞脂肪变性和脂肪贮积,炎症和纤维化为特征的疾病。目前有关研究大多数集中在以胰岛素抵抗为发端的肝内脂质沉积,继发以线粒体、细胞色素P450-2E1(CYP2E1)为中心的氧自由基形成、脂质过氧化并最终导致肝实质损伤、蛋白质变性、基因突变等一系列病理结果的“二次

表1 肝脏脂肪变性、炎症及坏死比较(mean \pm SD)

	<i>n</i>	脂肪变性程度	炎症积分	坏死积分
脂肪肝组	18	3.89 ± 0.32^b	3.67 ± 0.49^b	0.44 ± 0.51^a
正常组	10	0.20 ± 0.42	0	0

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 正常组。

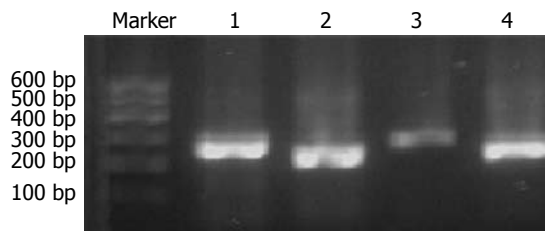


图2 GRP94RNA表达。1: 脂肪肝组GRP94; 2: 脂肪肝组GAPDH; 3: 正常对照组GRP94; 4: 正常对照组GAPDH。

打击”学说^[7],但其确切发病机制至今尚未完全明了。内质网是调节细胞内蛋白质合成后折叠与聚集、细胞应激反应及细胞内钙离子水平的细胞器。内质网应激是指由于某种原因使细胞内质网生理功能发生紊乱的一种亚细胞器病理过程,可促进内质网对蓄积在网腔内的错误折叠或未折叠蛋白质的处理,从而有利于维持细胞的正常功能并使之存活,但长时间的内质网应激可引起细胞凋亡^[8]。他作为作为脂质代谢失调、凋亡等相关性病理状态的一个原因,近来日益受到人们的重视。越来越多的研究表明^[9-12]内质网应激在肝疾病(脂肪肝、病毒性肝炎)糖尿病、神经元变性等疾病中起重要作用。研究表明^[13]在酒精性脂肪肝中GRP94表达明显增强,内质网应激参与了酒精性肝损伤的病理生理过程。而酒精性脂肪肝和非酒精性脂肪肝的病理表现基本一致,因而推测GRP94也参与了非酒精性脂肪肝的形成。还有国内外研究^[14-16]表明非酒精性脂肪肝患者同型半胱氨酸明显升高,他是内质网应激的重要诱导因素,从而激活肝细胞内质网应激。另国内研究^[10,17]报道内质网应激在非酒精性脂肪肝的形成中起着重要的作用。因此考虑内质网分子伴侣GRP94参与了非酒精性脂肪肝的形成。目前,有关GRP94与非酒精性脂肪肝形成关系国内外鲜有报道,尤其在临床试验方面,有少数报道均在动物实验方面。本实验中正常对照组肝组织结构正常,脂肪肝组均有明显的脂肪变性、炎症、坏死,采用RT-PCR和免疫组化方法对脂肪肝组GRP94基因转录及蛋

表 2 GRP94蛋白和RP94RNA表达与肝组织病理学改变的相关性 (1)

指标	脂肪变性程度	炎症积分	坏死积分
GRP94蛋白表达	0.981($P = 0.000$)	0.989($P = 0.000$)	0.396($P = 0.037$)
GRP94RNA表达	0.900($P = 0.000$)	0.871($P = 0.000$)	0.474($P = 0.011$)

白翻译水平检测显示, 脂肪肝组GRP94 mRNA和蛋白表达水平均较正常组显著增加, 提示内质网应激参与了非酒精性脂肪肝的病理生理过程。相关分析表明GRP94基因及蛋白表达与脂肪变性、炎症、坏死积分成正相关, 提示他在肝脏病理学改变越严重的部位表达越强, 他有可能是促进脂肪肝进展的重要因素。

在非酒精性脂肪肝中, 尤其是NASH时, 产生大量的活性氧即反应性氧(ROS)包括超氧阴离子、过氧化氢、羟自由基以及有高活性的三线态氧和单线态氧, 他对组织有强大的破坏作用, 他可以氧化大分子物质引起多聚不饱和脂肪酸、蛋白质、DNA损害, 同时还可以诱导细胞色素P450在肝细胞内的表达, 从而在非酒精性脂肪肝的发生和发展起重要的作用, 并被医学界广泛接受^[7,18-20]。研究发现^[20]非酒精性脂肪肝时细胞色素P450处于高表达状态, 从而促进未折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR)和内质网超负荷反应(endoplasmic overloaded response, EOR)通路, 促进内质网应激的发生, 从而进一步推测非酒精性脂肪肝存在内质网的应激。另外由于NASH时具有明显的同型半胱氨酸血症, 他是内质网应激的重要因素^[21-22], 也能够说明非酒精性脂肪肝存在内质网的应激。而内质网应激时胆固醇被消耗, 进而激活固醇调节元件结合蛋白(sterol regulatory element binding protein, SREBP), 并与SREBP裂解激活蛋白(SREBP cleavage-activating protein, SCAP)形成复合物。酶解的SREBP成为转录因子进入胞核, 调控靶基因的转录, 使HMG-CoA还原酶、乙酰辅酶A羧化酶等合成增多, 促进脂质的沉积与合成, 促进脂肪肝的形成^[22-23], 从而说明内质网应激在非酒精性脂肪肝的发生发展中有着重要作用。目前公认, 发生内质网应激的标志是组织中GRP94、GRP78等内质网分子伴侣表达上调^[5], 因此本研究选用GRP94作为反映内质网应激敏感指标, 在临床实验上来证明非酒精性脂肪肝患者存在内质网的应激。我们的实验证实非酒精性脂肪肝患者的肝组织中GRP94的蛋白和基因表达处于高表达, 并且与肝脏的病理学改变

呈正相关, 从而证实了内质网应激参与了非酒精性脂肪肝的病理生理过程, 是其发病机制之一。因此应用相应药物干预以阻断或抑制肝细胞内质网应激可能减弱脂质合成, 为非酒精性脂肪肝病的防治提供新的靶点。

4 参考文献

- Clark JM. The epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease in adults. *J Clin Gastroenterol* 2006; 40 Suppl 1: S5-S10
- Powell EE, Jonsson JR, Clouston AD. Steatosis: cofactor in other liver diseases. *Hepatology* 2005; 42: 5-13
- Targher G, Bertolini L, Padovani R, Rodella S, Zoppini G, Zenari L, Cigolini M, Falezza G, Arcaro G. Relations between carotid artery wall thickness and liver histology in subjects with nonalcoholic fatty liver disease. *Diabetes Care* 2006; 29: 1325-1330
- Bugianesi E, Leone N, Vanni E, Marchesini G, Brunello F, Carucci P, Musso A, De Paolis P, Capussotti L, Salizzoni M, Rizzetto M. Expanding the natural history of nonalcoholic steatohepatitis: from cryptogenic cirrhosis to hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2002; 123: 134-140
- Ma Y, Hendershot LM. ER chaperone functions during normal and stress conditions. *J Chem Neuroanat* 2004; 28: 51-65
- 中华医学会肝病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组. 非酒精性脂肪性肝病诊疗指南. 实用肝脏病杂志 2007; 10: 1-3
- Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology* 1998; 114: 842-845
- Szczesna-Skorupa E, Chen CD, Liu H, Kemper B. Gene expression changes associated with the endoplasmic reticulum stress response induced by microsomal cytochrome p450 overproduction. *J Biol Chem* 2004; 279: 13953-13961
- Xu C, Bailly-Maitre B, Reed JC. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J Clin Invest* 2005; 115: 2656-2664
- 艾正琳, 陈东风. SREBP-1c在大鼠非酒精性脂肪性肝病中的表达及意义. 第三军医大学学报 2006; 28: 1063-1065
- Kaplowitz N, Than TA, Shinohara M, Ji C. Endoplasmic reticulum stress and liver injury. *Semin Liver Dis* 2007; 27: 367-377
- Zhao L, Ackerman SL. Endoplasmic reticulum stress in health and disease. *Curr Opin Cell Biol* 2006; 18: 444-452
- 龚作炯, 王鲁文, 陈瑞, 张频. 内质网分子伴侣糖调节蛋白94在大鼠酒精性肝损伤中的高表达和意义. 肝脏 2006; 11: 167-169
- 沈雄文, 孙国红, 孙关忠, 毛飞. 肝损伤时血清同型半胱氨酸的浓度变化. 中华肝脏病杂志 2003; 11: 242-242
- 杨慧君, 李倩, 崔玲, 钱玉中, 李文静, 唐燕. 非酒精

■应用要点

本文论证了内质网应激参与了非酒精性肝损伤的病理生理过程, 因此应用相应药物干预以降低肝细胞内质网应激, 为非酒精性脂肪肝的治疗策略提供了新的思路。

■同行评价

本研究资料比较宝贵,结果可信,结论可靠,但逻辑性有待提高。

- 性脂肪肝患者同型半胱氨酸浓度及叶酸与维生素B12浓度变化及相关性. 世界华人消化杂志 2007; 15: 1449-1452
- 16 Gulsen M, Yesilova Z, Bagci S, Uygun A, Ozcan A, Ercin CN, Erdil A, Sanisoglu SY, Cakir E, Ates Y, Erbil MK, Karaeren N, Dagalp K. Elevated plasma homocysteine concentrations as a predictor of steatohepatitis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2005; 20: 1448-1455
- 17 黄丹文, 晏春根, 朱东方, 倪培华. SREBP-1C、GRP-94在小鼠肝细胞脂质代谢中的作用. 基础医学与临床 2007; 27: 509-513
- 18 Seki S, Kitada T, Yamada T, Sakaguchi H, Nakatani K, Wakasa K. In situ detection of lipid peroxidation and oxidative DNA damage in non-alcoholic fatty liver diseases. *J Hepatol* 2002; 37: 56-62
- 19 Hayashi S, Yasui H, Sakurai H. Essential role of singlet oxygen species in cytochrome P450-dependent substrate oxygenation by rat liver microsomes. *Drug Metab Pharmacokinet* 2005; 20: 14-23
- 20 Niemelä O, Parkkila S, Juvonen RO, Viitala K, Gelboin HV, Pasanen M. Cytochromes P450 2A6, 2E1, and 3A and production of protein-aldehyde adducts in the liver of patients with alcoholic and non-alcoholic liver diseases. *J Hepatol* 2000; 33: 893-901
- 21 Roblin X, Pofelski J, Zarski JP. [Steatosis, chronic hepatitis virus C infection and homocysteine] *Gastroenterol Clin Biol* 2007; 31: 415-420
- 22 Ji C, Kaplowitz N. Betaine decreases hyperhomocysteinemia, endoplasmic reticulum stress, and liver injury in alcohol-fed mice. *Gastroenterology* 2003; 124: 1488-1499
- 23 Ji C. Dissection of endoplasmic reticulum stress signaling in alcoholic and non-alcoholic liver injury. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23 Suppl 1: S16-S24

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志作者署名要求

本刊讯 本刊论文署名作者不宜过多,一般不超过8人,主要应限于参加研究工作并能解答文章有关问题、能对文稿内容负责者,对研究工作有贡献的其他人可放入致谢中。作者署名的次序按贡献大小排列,多作者时姓名间用逗号,如是单名,则在姓与名之间空1格(正文和参考文献中不空格)。世界华人消化杂志要求所有署名人写清楚自己对文章的贡献。第一方面是直接参与,包括:(1)酝酿和设计实验;(2)采集数据;(3)分析/解释数据。第二方面是文章撰写,包括:(1)起草文章;(2)对文章的知识性内容作批评性审阅。第三方面是工作支持,包括:(1)统计分析;(2)获取研究经费;(3)行政、技术或材料支持;(4)指导;(5)支持性贡献。每个人必须在第一至第三方面至少具备一条,才能成为文章的署名作者。世界华人消化杂志不设置共同第一作者和共同通信作者。(常务副总编辑:张海宁 2008-11-08)