

短期暴露于不同剂量细颗粒物对哮喘小鼠气道炎症的影响

刘 燕^{1,2}, 冯旰珠^{1*}, 杜 强¹, 杜兴冉¹, 晋小祥²

(¹南京医科大学第二附属医院呼吸科, 江苏 南京 210011; ²马鞍山市中心医院呼吸科, 安徽 马鞍山 243000)

[摘要] 目的: 观察短期暴露于不同剂量细颗粒物(fine particulate matter, PM2.5)对哮喘小鼠气道炎症的影响, 并初步探索 PM2.5 影响哮喘小鼠气道炎症机制。方法: 将 40 只 Balb/c 小鼠采用随机数字表法分为 5 组: 对照组、卵清蛋白(ovalbumin, OVA)组、OVA+低剂量 PM2.5(10 μg)组、OVA+中剂量 PM2.5(31.6 μg)组和 OVA+高剂量 PM2.5(100 μg)组。通过腹腔注射 OVA 致敏、雾化吸入 OVA 构建小鼠哮喘模型, 第 26、28、30 天予以 PM2.5 滴鼻激发。第 31 天处死小鼠后观察 HE 染色观察各组小鼠肺组织病理变化、炎性细胞浸润情况, 比较各组小鼠肺泡灌洗液(BALF)中细胞总数及分类计数; 并通过 ELISA 方法检测各组小鼠肺泡灌洗液中 IL-3、IL-14 及血清 IgE 水平。结果: OVA+低剂量 PM2.5 组小鼠 BALF 中细胞总数、分类计数百分比及 IL-4、IL-13 水平与 OVA 组相比均无统计学差异($P > 0.05$); 而 OVA+中剂量 PM2.5 组及 OVA+高剂量 PM2.5 组较 OVA 组升高($P < 0.05$)。OVA+低剂量 PM2.5 组和 OVA+中剂量 PM2.5 组血清 IgE 与 OVA 组相比轻度升高, 但无统计学差异($P > 0.05$); OVA+高剂量 PM2.5 组较 OVA 组升高($P < 0.05$)。结论: 中剂量 PM2.5(31.6 μg)和高剂量 PM2.5(100 μg)可进一步加重哮喘小鼠气道炎症; 而低剂量 PM2.5(10 μg)对哮喘小鼠气道炎症无显著影响。

[关键词] 哮喘; PM2.5; 白细胞介素 4; 白细胞介素 13

[中图分类号] R562.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2015)10-1364-05

doi:10.7655/NYDXBNS20151006

Effects of fine particulate matter by different dosages at short-term exposure on airway inflammation in asthmatic mice

Liu Yan^{1,2}, Feng Ganzhu^{1*}, Du Qiang¹, Du Xingran¹, Jin Xiaoxiang²

(¹Department of Respiratory Medicine, the Second Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210011; ²Department of Respiratory, the Central Hospital of Maanshan City, Maanshan 243000, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effects of fine particulate matter (PM2.5) by different dosages at short-term exposure on airway inflammation in asthmatic mice, and study the mechanisms of PM2.5 on airway inflammation in asthmatic mice. **Methods:** A total of 40 BALB/c mice were randomly assigned into 5 groups, including the PBS control group, the OVA group (asthma group), the OVA PM2.5 (10 μg) group, the OVA PM2.5 (31.6 μg) group, and the OVA PM2.5 (100 μg) group. Asthma model was reproduced by sensitization with intraperitoneal injection and inhalation of OVA. On day 26, 28 and 30, the mice were performed with PM2.5 intranasal stimulation, and then sacrificed on day 31. We observed the pathological changes and inflammatory cell infiltration by hematoxylin-eosin (HE) staining of lung tissues of mice alveolar fluid (BALF) cells in each group. IL-4/IL-13 and serum IgE levels were examined by the method of ELISA. **Results:** Compared with the asthma group, the differences in cell count and levels of IL-4/IL-13 were not statistically significant in the PM2.5 (10 μg)/OVA group ($P > 0.05$), while those in the PM2.5(31.6 μg)/OVA group and the PM2.5(100 μg)/OVA group were increased ($P < 0.05$). The level of serum IgE in the PM2.5 (10 μg)/OVA group and the PM2.5 (31.6 μg)/OVA group was increased slightly compared with the OVA group, but there was no significant difference ($P > 0.05$). However, the level of serum IgE in the PM2.5 (100 μg)/OVA group was significantly increased than that of the OVA group ($P < 0.05$). **Conclusion:** The asthma airway inflammation may further aggravate in the PM2.5 (31.6 μg)/OVA and PM2.5 (100 μg)/OVA, and no significant effect was from the PM2.5 (10 μg)/OVA.

[Key words] asthma; fine particulate matter; interleukin-4; interleukin-13

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(10): 1364-1368]

[基金项目] 国家自然科学基金(81470209); 江苏省自然科学基金(BK20131436); 南京医科大学科技发展基金(2014NJMU141)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: zhu1635253@163.com

支气管哮喘(简称哮喘)是由多种细胞包括气道的炎性细胞和结构细胞参与的气道慢性炎症性疾病^[1-2]。哮喘的发病机制迄今仍未完全明了,可能是由多种机制引起的共同反应,气道炎症是目前已知的哮喘最重要的发病机制,Th2 活化亢进,Th1/Th2 失衡在哮喘气道炎症中占有非常重要的地位^[3]。在 Th2 合成释放的细胞因子中,IL-13 与 IL-4 是最强的 IgE 调节因子。王文璐等^[4]也提出 IL-4 和 IL-13 是最重要的 Th2 型细胞因子。细颗粒物(fine particulate matter,PM2.5)是指能较长时间悬浮于空气中、空气动力学当量直径 $\leq 2.5 \mu\text{m}$ 可入肺的细颗粒物。近年来研究表明 PM2.5 不仅可以诱导小鼠产生氧化应激、炎症反应以及肺组织的损伤,而且还可以加重哮喘小鼠气道炎症的发展^[5]。为探索不同剂量 PM2.5 对哮喘小鼠气道炎症的影响,本研究以 Balb/c 小鼠作为研究对象,建立哮喘模型,并经鼻滴入低(10 μg)、中(31.6 μg)、高(100 μg)3 个不同剂量 PM2.5,观察不同剂量 PM2.5 在哮喘小鼠气道氧化应激加重、炎症发展及肺组织损伤的作用。根据 Gavett^[6]文中小鼠与人类 PM2.5 等效剂量换算表,PM2.5 低、中、高 3 种剂量换算成人类等效剂量分别为 40、128、404 μg ,换算成人类 PM2.5 浓度为 42、134、425 $\mu\text{g}/\text{m}^3$,并参照 2014 年 EPA(美国环境保护署)制定的 PM 标准值、空气质量指数(air quality index,AQI)、空气质量与健康警示之间的关系表相对应人类空气质量类别依次为良、中度污染、严重污染。

1 材料与方 法

1.1 材 料

8 周龄雌性 Balb/c 小鼠,体重(20 \pm 3)g,由南京医科大学实验动物中心提供。OVA (Grade V,(Sigma 公司,美国)。小鼠免疫球蛋白 E(IgE)ELISA 试剂盒(Cusabio 公司,美国)。IL-13 ELISA 试剂盒(eBioscience 公司,美国),IL-4 ELISA 试剂盒(上海巧伊生物科技有限公司)。

1.2 方 法

1.2.1 PM2.5 的采集与处理

采用武汉天虹 TH-150 中流量总悬浮微粒采样器采样。其采样点位于南京市鼓楼区,经超声洗脱处理后收集 PM2.5,灭菌后真空冷冻干燥后-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2.2 动物分组及模型制备

将 40 只 Balb/c 小鼠采用随机数字表法分为 5 组:PBS 对照组、OVA 组、OVA+低剂量 PM2.5(10.0 μg)组、OVA+中剂量 PM2.5(31.6 μg)组和 OVA+高

剂量 PM2.5(100.0 μg)组,每组 8 只。OVA 组以 OVA 致敏、激发;OVA+PM2.5(10.0、31.6、100.0 μg)3 组在 OVA 致敏、激发的基础上经鼻滴入 3 种不同剂量的 PM2.5,这种经鼻滴入是一种比较适合吸入性毒性研究的方法^[7-8]。以磷酸盐缓冲液(phosphate-buffered saline,PBS)代替 OVA 致敏、激发作为对照组。在第 1 和第 14 天,分别向 Balb/c 小鼠腹腔注射致敏液 0.1 mL(含 2.25 mg 氢氧化铝、20 μg OVA 的 PBS 液),第 27 天开始用 1%OVA PBS 溶液超声雾化激发,每天 1 次,每次 30 min,连续 5 d;10.0、31.6、100.0 μg PM2.5 均分别溶于 50 μL 生理盐水中,使用前 37 $^{\circ}\text{C}$ 超声降解 5 min^[6,9],并于第 26、28、30 天鼻腔分别滴入。第 31 天处死动物,取材后测定相应指标。

1.2.3 肺泡灌洗液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF)中细胞计数与分类百分比

予 0.5 mL 预冷的 PBS 液反复冲洗 2 遍进行肺泡灌洗后 1 000 r/min 离心 10 min,回收上清置于-70 $^{\circ}\text{C}$ 等待进行细胞因子检测。细胞沉淀用 0.1 mL PBS 重悬后,取 10 μL 用血细胞计数板进行细胞总数的计数;取一滴滴于载玻片上涂片,行瑞氏-吉姆萨染色,根据形态特征对 200 个白细胞做细胞分类检测。

1.2.4 肺病理组织学 HE 染色

取小鼠右下肺组织,放在 4%多聚甲醛中固定后送病理科进行 HE 染色。

1.2.5 BALF 中 IL-4、IL-13 和血清中 IgE 的测定

摘取眼球取血,4 $^{\circ}\text{C}$ 3 000 r/min 离心 10 min,收集血清,按试剂盒使用说明书检测血清 IgE 和 BALF 中 IL-4、IL-13。

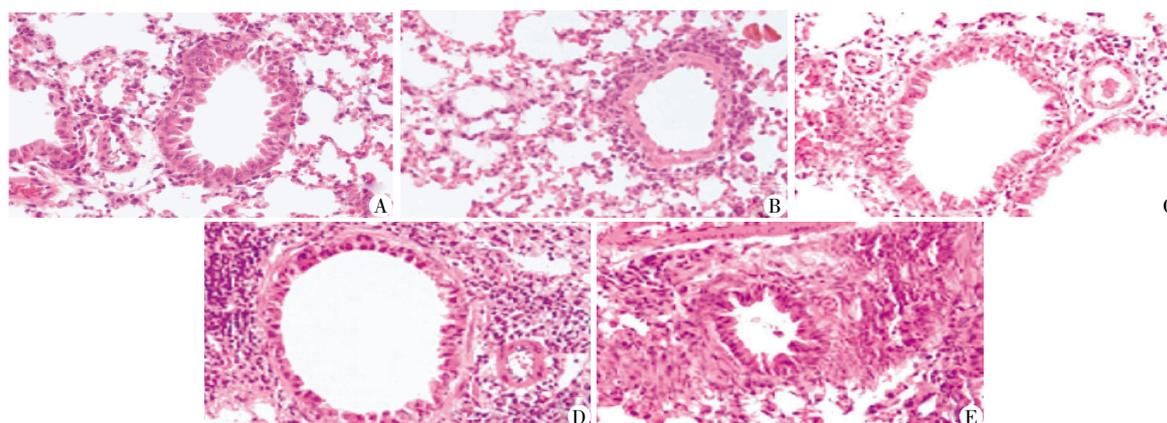
1.3 统计学方法

应用 SPSS20.0 统计软件包分析数据,定量数据采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。各组之间均数比较采用 ANOVA 分析,组间两两比较采用 LSD 检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 肺组织病理变化

对照组 Balb/c 小鼠 HE 染色可见气道上皮平整,黏膜下未见炎性细胞浸润,气道平滑肌无增厚,无纤毛脱落,肺泡腔内未见炎性渗出物;OVA 组小鼠气道上皮增生,黏膜下可见炎性细胞浸润,以嗜酸性细胞和淋巴细胞浸润为主,气道平滑肌有所增厚;3 组不同 PM2.5 剂量组小鼠气道上皮黏膜下可见大量炎性细胞浸润,以嗜酸性细胞和淋巴细胞浸润为主,气道平滑肌明显增厚见图 1。



A: 对照组; B: OVA 组; C: OVA+低剂量 PM2.5 组; D: OVA+中剂量 PM2.5 组; E: OVA+高剂量 PM2.5 组。

图 1 各组小鼠肺组织病理染色(HE, ×400)

Figure 1 Pathological staining of lung tissue of mice in each group(HE, ×400)

2.2 BALF 中细胞计数与分类百分比

OVA+低剂量 PM2.5 组小鼠 BALF 中细胞总数、分类计数百分比值与 OVA 组相比均无统计学差异($P > 0.05$); 而 OVA+中、高剂量 PM2.5 组小鼠 BALF 中细胞总数及嗜酸性粒细胞、淋巴细胞

分类计数百分比值较 OVA 组升高($P < 0.05$), 同时 OVA+高剂量 PM2.5 组中性粒细胞较 OVA 组升高有统计学意义($P < 0.05$); 而且 OVA+高剂量 PM2.5 组在嗜酸性粒细胞百分比、淋巴细胞分类计数百分比明显升高($P < 0.01$, 表 1)。

表 1 5 组小鼠肺泡灌洗液中细胞计数与分类百分比

Table 1 Inflammatory cell accumulation in broncho-alveolar lavage fluid in a murine model of asthma in the 5 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	细胞总数绝对值($\times 10^4$ 个/L)	嗜酸性粒细胞百分比(%)	中性粒细胞百分比(%)	淋巴细胞百分比(%)	巨噬细胞百分比(%)
PBS 对照组	32.20 ± 5.40	1.73 ± 0.62	1.21 ± 0.71	0.89 ± 0.69	96.17 ± 1.39
OVA 组	107.84 ± 21.27*	10.40 ± 1.16**	4.37 ± 1.38	4.93 ± 0.71*	80.20 ± 2.27
OVA+低剂量 PM2.5 组	151.80 ± 43.06*	13.44 ± 1.70**	8.25 ± 3.68*	6.93 ± 0.65**	71.38 ± 4.86
OVA+中剂量 PM2.5 组	168.40 ± 36.72**	16.60 ± 4.97***	9.90 ± 4.86*	10.23 ± 2.48***	63.26 ± 6.02
OVA+高剂量 PM2.5 组	189.40 ± 50.18**	21.14 ± 4.50***	10.66 ± 4.00**	15.76 ± 2.34***	52.43 ± 7.88
F 值	15.65	26.81	7.20	60.42	53.73
P 值	< 0.001	< 0.001	0.001	< 0.001	< 0.001

与 PBS 对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 OVA 组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

2.3 BALF 中 IL-4、IL-13 和血清 IgE 测定

与 OVA 组相比, OVA+低剂量 PM2.5 组 BALF 中 IL-4、IL-13 虽轻度升高, 但无统计学意义($P > 0.05$), OVA+中、高剂量 PM2.5 组有统计学差异 ($P < 0.05$); OVA+低、中剂量 PM2.5 组血清 IgE 与 OVA 组相比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$); 而高剂量 PM2.5 组与 OVA 组比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$, 表 2)。

3 讨论

PM2.5 化学成分主要包括有多环芳香烃 (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs) 类如菲、苯并、萘、钠盐等和以铁、锌为主的金属元素等, 其中多环芳香烃和金属可能与氧化应激, 以及许多哮喘相关

表型改变有关^[10]。另外, PM2.5 可能也包含多种免疫原性物质 (如真菌孢子、花粉等), 这些都与哮喘症状加重独立相关。Wagner 等^[11] 研究证实暴露于 PM2.5, 会导致气道炎症、氧化应激和气道高反应性, 这些都与哮喘的加重存在必然联系, 甚至可导致新发哮喘的发生。但目前这些机制尚不能完全明了, 英国空气污染物医学效应委员会给出了空气污染促使哮喘发展和加重的 4 种机制框架: 氧化应激与损伤、气道重塑、炎性通道与免疫反应, 以及增强呼吸道对气源性致敏原的致敏作用。

从本次研究显示, PM2.5 对哮喘小鼠气道炎症的影响主要有以下几个方面: ①与哮喘组相比, 中、高剂量组小鼠 BALF 中细胞总数、细胞分类计数百

表 2 5 组小鼠肺泡灌洗液中 IL-4/IL-13 和血清 IgE 测定
Table 2 Cytokine levels in BALF and serum total IgE measured by ELISA

组别	肺泡灌洗液 IL-4(pg/mL)	肺泡灌洗液 IL-13(pg/mL)	血清 IgE(ng/mL)
PBS 对照组	26.95 ± 3.78	9.78 ± 0.96	1.33 ± 0.63
OVA 组	78.12 ± 9.87**	21.50 ± 1.17**	16.83 ± 3.91**
OVA+低剂量 PM2.5 组	86.23 ± 6.21**	24.61 ± 1.79**	16.86 ± 7.33**
OVA+中剂量 PM2.5 组	88.72 ± 14.05***	27.86 ± 2.24***	19.51 ± 6.75**
OVA+高剂量 PM2.5 组	98.76 ± 4.88***#	34.50 ± 5.90***#	26.90 ± 5.57***#
F 值	82.07	30.80	15.78
P 值	<0.001	<0.001	<0.001

与 PBS 对照组相比, **P < 0.01; 与 OVA 组相比, *P < 0.05, #P < 0.01。

分比有统计学差异,说明 PM2.5 可增加哮喘小鼠气道炎症细胞如嗜酸性粒细胞、淋巴细胞、中性粒细胞的浸润,加重哮喘小鼠的气道炎症。其中嗜酸性粒细胞是支气管哮喘气道炎症的关键效应细胞,激活后不仅释放许多介质和细胞因子参与炎症反应,而且释放的细胞毒性物质可引起气道上皮损伤^[12]。②与哮喘组相比,中、高剂量组小鼠 BALF 中 IL-4、IL-13 水平升高,说明小鼠暴露于 PM2.5 后,可导致机体各种炎症细胞的激活,从而促进 IL-4、IL-13 细胞因子的释放。IL-4 是 Th2 选择性发育和扩增的必需细胞因子,促进 B 细胞合成和分泌 IgE^[13]。IL-4 及其受体 α 链的表达,是抗原激发导致炎症细胞的聚集活化、气道高反应性及黏液过度分泌的哮喘气道特异性炎症基础。IL-13 能诱导主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC) II 类分子和低亲和力 IgE 受体表达、诱导血管细胞黏附分子-1(vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)在内皮细胞的表达,活化肥大细胞、嗜酸性粒细胞和中性粒细^[14]。IL-4 基因和 IL-13 基因位于同一条染色体上(分别是 5q31-q33、5q23-31)而紧密连锁,共同享用一条受体链和信号转导系统,二者是最强的 IgE 调节因子,在哮喘中占有重要地位^[15-16]。所以 PM2.5 加重哮喘小鼠气道炎症的机制可能与增加 IL-4、IL-13 的表达有关。③与哮喘组相比,高剂量 PM2.5(100.0 μg)/OVA 组血清 IgE 水平增高,说明 PM2.5 加重哮喘小鼠气道炎症的机制可能与 IgE 的表达有关。IgE 介导的 I 型变态反应是哮喘的主要发病机制,当变应原首次进入易感者体内,在树突状细胞和 Th2 细胞协助下,B 细胞合成特异性 IgE,并与肥大细胞、嗜碱粒细胞、血小板表面的高亲和力受体结合,使效应细胞致敏;一旦再次暴露于同种抗原,抗原与细胞表面特异性 IgE 交联从而导致炎性介质释放的哮喘链式反应^[12]。④与哮喘组相比,低剂量 PM2.5 组小鼠 BALF 中上述指标

均无统计学差异,而中、高剂量 PM2.5 组则有统计学差异,且高剂量 PM2.5 组差异明显。说明哮喘小鼠气道炎症的加重与 PM2.5 剂量是密切相关的。PM2.5 在支气管和肺泡沉积后被巨噬细胞吞噬,促使吞噬细胞释放促炎症因子和上皮细胞释放细胞因子;同时导致气道上皮氧化损伤^[17]。文中已提过 PM2.5 低、中、高剂量对应于人类空气质量类别分别为良、中度污染、严重污染。所以当 PM2.5 达到人类空气质量指数类别为中度、严重污染时,可进一步加重哮喘小鼠气道炎症的发展;当 PM2.5 达到人类空气质量指数类别为良时,对哮喘小鼠气道炎症无显著影响。

综上所述,PM2.5 加重哮喘小鼠气道炎症的机制可能与 IgE 介导 T 淋巴细胞依赖的炎症途径、激活的 T 淋巴细胞产生 IL-4、IL-13 等细胞因子、气道各种炎性细胞的募集及激活和 PM2.5 沉积造成的气道上皮细胞损伤和氧化应激有关。当 PM2.5 达到人类空气质量指数类别为中度、严重污染时,可进一步加重哮喘小鼠气道炎症的发展;当 PM2.5 达到人类空气质量指数类别为良时,对哮喘小鼠气道炎症无显著影响,具体机制有待于进一步研究。

[参考文献]

[1] 中华医学会呼吸病学分会哮喘学组. 支气管哮喘防治指南(支气管哮喘的定义、诊断、治疗和管理方案)[J]. 中华哮喘杂志;电子版,2008,2(1):3-13

[2] 蒋 莉,金 蕊,李 悦,等. 哮喘易感基因 ORMDL3 在哮喘小鼠中的表达及地塞米松的干预作用[J]. 南京医科大学学报:自然科学版,2013,33(6):744-748

[3] 邱 晨,张 婷,齐 晖,等. STAT5 基因沉默对支气管哮喘小鼠 T 细胞增殖的影响[J]. 中华结核和呼吸杂志,2012,35(1):50-54

[4] 王文璐,李红岩,苗伟伟,等. 布地奈德抑制支气管哮喘小鼠 TSLP 及 Th2 优势免疫作用的研究[J]. 南京医科大学学报:自然科学版,2012,32(9):1207-1210

[5] Martin S, Fernandez-Alanis E, Delfosse V, et al. Low dos-

- es of urban air particles from Buenos Aires promote oxidative stress and apoptosis in mice lungs[J]. *Inhal Toxicol*, 2010, 22(13): 1064-1071
- [6] Gavett SH, Haykal-Coates N, Highfill JW, et al. World Trade Center fine particulate matter causes respiratory tract hyperresponsiveness in mice[J]. *Environ Health Perspect*, 2003, 111(7): 981-991
- [7] Leong BK, Coombs JK, Sabaitis CP, et al. Quantitative morphometric analysis of pulmonary deposition of aerosol particles inhaled via intratracheal nebulization, intratracheal instillation or nose-only inhalation in rats[J]. *J Appl Toxicol*, 1998, 18(2): 149-160
- [8] Southam DS, Dolovich MO, Byrne PM, et al. Distribution of intranasal instillations in mice: effects of volume, time, body position, and anesthesia[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2002, 282(4): L833-L839
- [9] Ding LR, Wang K, Fahmy B, et al. Airborne fine particulate matter induced pulmonary inflammation as well as oxidative stress in neonate rats [J]. *Chin Med J*, 2010, 123(20): 2895-2900
- [10] Riva DR, Magalhães CB, Lopes AA, et al. Low dose of fine particulate matter(PM_{2.5}) can induce acute oxidative stress, inflammation and pulmonary impairment in healthy mice[J]. *Inhal Toxicol*, 2011, 23(5): 257-267
- [11] Wagner JG, Morishita M, Keeler GJ, et al. Divergent effects of urban particulate air pollution on allergic airway responses in experimental asthma: a comparison of field-exposure studies[J]. *Environ Health*, 2012, 11(7): 45-58
- [12] 苗伟伟, 汪凤凤, 刘洪洪, 等. 支气管哮喘气道重塑的新视角: 免疫球蛋白 E[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2013, 36(5): 367-370
- [13] Tarlo SM, Lemiere C. Occupational asthma[J]. *N Engl J Med*, 2014, 370(7): 640-649
- [14] 程 静, 梁红艳, 姜晓峰. 哮喘造模不同阶段的小鼠支气管肺泡灌洗液中 IL-4、IL-12、IL-13 的检测及意义[J]. *中国实验诊断学*, 2013, 17(4): 643-646
- [15] 王修海, 赵 炜, 刘世国, 等. 白细胞介素 4 和 13 基因多态性对支气管哮喘患者易感性及血清总 IgE 水平的影响[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2009, 32(3): 161-164
- [16] Wenzel SE. Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches[J]. *Nat Med*, 2012, 18(5): 716-725
- [17] 时彦玲, 邓林红. 细颗粒物(PM_{2.5})对气道的病理作用及其与哮喘病理机制的关系[J]. *医用生物力学*, 2013, 28(2): 127-134

[收稿日期] 2015-02-27

本刊来稿题名和作者署名的注意事项

1. 题名

- (1) 题名应以简明、确切的词语反映文章中最重要特点内容, 要符合编制题录、索引和检索的有关原则, 并有助于选定关键词。
- (2) 中文题名一般不超过 20 个字, 必要时可加副题名。
- (3) 英文题名应与中文题名含义一致。
- (4) 题名应避免使用非公用的缩写词、字符、代号, 尽量不出现数学式或化学式。

2. 作者署名和工作单位

- (1) 文章都应有作者署名, 这是文责自负和拥有著作权的标志;
- (2) 作者姓名署于题名下方;
- (3) 英文摘要中附与中文同样的作者姓名与排列顺序, 写法为: 姓前名后, 姓全部大写, 名的首字母大写, 其余字母小写, 如 Zhou Ping, Shi Honglei;
- (4) 作者单位需注明全称(标注到二级或三级单位, 如“南京医科大学第一附属医院心内科”, “南京医科大学公共卫生学院流行病与统计学系”)、所在城市及邮政编码;
- (5) 对于有基金课题资助的论文需在课题负责人的名字后加上标“*”, 并在论文首页下补充基金的名称、编号, 以及课题负责人的 E-mail。
- (6) 本刊对于没有课题资助的文章一律不标注通讯作者。

(本刊编辑: 接雅俐)