

GLP-1通过抑制肝L02细胞脂性凋亡的可能机制

王 珣, 王明林, 鲁新耀, 张 鹏, 于红刚, 胡义奎

背景资料
目前临床上非酒精性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)的防治主要是针对发病机制进行的, 但尚无公认有效的治疗药物。胰高血糖素样肽-1(glucagon-like peptide-1, GLP-1)为胰岛素促泌剂, 增加胰岛素敏感性及减轻体重等作用, 目前主要用于糖尿病等代谢性疾病; 而NASH和糖尿病同属代谢综合征, GLP-1是否对NASH有治疗作用值得研究, 而且该机制的阐明为该药运用于临床提供实验基础。

王珣, 王明林, 鲁新耀, 张鹏, 武汉市武昌医院消化内科 湖北省武汉市 430063

于红刚, 武汉大学人民医院消化内科 湖北省武汉市 430060
胡义奎, 华中科技大学同济医学院附属普爱医院神经内科 湖北省武汉市 430034

王珣, 主治医师, 在职博士, 主要从事消化系统疾病的发病机制研究。

武汉市卫生局科研基金资助项目, No. WX1321

作者贡献分布: 此课题由王珣、鲁新耀及张鹏设计; 动物模型制作和基因、蛋白检测分析由王明林与于红刚操作完成; 统计学分析由胡义奎完成; 论文写作由王珣完成。

通讯作者: 胡义奎, 主治医师, 430034, 湖北省武汉市硚口区解放大道50号古田三路, 华中科技大学同济医学院附属普爱医院神经内科。1274965507@qq.com

电话: 027-68831695

收稿日期: 2014-07-31 修回日期: 2014-10-11

接受日期: 2014-11-12 在线出版日期: 2015-01-08

Glucagon-like peptide-1 suppresses palmitic acid induced L02 cell apoptosis through JNK pathway

Xun Wang, Ming-Lin Wang, Xin-Yao Lu, Peng Zhang, Hong-Gang Yu, Yi-Kui Hu

Xun Wang, Ming-Lin Wang, Xin-Yao Lu, Peng Zhang, Department of Gastroenterology, Wuchang Hospital of Wuhan City, Wuhan 430063, Hubei Province, China
Hong-Gang Yu, Department of Gastroenterology, People's Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China

Yi-Kui Hu, Department of Neurology, Puai Hospital, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430034, Hubei Province, China

Supported by: Wuhan Health Bureau Scientific Research Fund, No. WX1321

Correspondence to: Yi-Kui Hu, Department of Neurology, Puai Hospital, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Gutiansan Road, 50 Jiefang Avenue, Qiaokou District, Wuhan 430034, Hubei Province, China. 1274965507@qq.com

Received: 2014-07-31 Revised: 2014-10-11

Accepted: 2014-11-12 Published online: 2015-01-08

Abstract

AIM: To investigate the potential effects of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) on palmitic acid (PA) induced apoptosis of hepatic L02 cells and the underlying mechanism.

METHODS: L02 cells were stimulated with different levels (0.125, 0.250 and 0.500 mmol/L)

of PA for different durations (12, 24 and 48 h) in the presence or absence of GLP-1. Cell Counting Kit-8 (CCK-8) assay was used to analyze the inhibitory effects on growth of L02 cells, and terminal-deoxynucleotidyl transferase mediated nick end labeling (TUNEL) assay was used to observe the apoptotic rate of the cells. The expression of c-Jun N-terminal kinase (JNK), c-Jun, p-JNK and p-c-Jun proteins was detected by Western blot assay.

RESULTS: The growth of the L02 cells was significantly inhibited by PA *in vitro*, and PA induced the expression of p-JNK and p-c-Jun. GLP-1 suppressed the activation of JNK and c-Jun induced by PA.

CONCLUSION: PA can inhibit the proliferation of L02 cells and induce cell apoptosis. The JNK signaling pathway is probably involved in the mechanism of PA induced apoptosis.

© 2015 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Non-alcoholic steatohepatitis; Palmitic acid; L02 cells; c-Jun N-terminal kinase; Apoptosis

Wang X, Wang ML, Lu XY, Zhang P, Yu HG, Hu YK. Glucagon-like peptide-1 suppresses palmitic acid induced L02 cell apoptosis through JNK pathway. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2015; 23(1): 16-21 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/23/16.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v23.i1.16>

摘要

目的: 探讨胰高血糖素样肽-1(glucagon-like peptide-1, GLP-1)对棕榈酸(palmitic acid, PA)诱导的肝L02细胞脂性凋亡的影响及可能机制。

方法: 不同浓度PA(0.125、0.250、0.500 mmol/L)分别干预肝L02细胞; 使用Cell Counting Kit-8(CCK-8)试剂盒检测其在12、24和48 h时的细胞增殖活性; 将肝L02细胞随机分为对照组(NC组)、PA干预组(PA组)、PA+SP 600125组(PASP组)及PA+GLP-1组(PAGLP组), 运用末端脱氧核苷酸转移酶介导的

同行评议者
许戈良, 教授, 安徽省立医院

dUTP缺口末端标记测定法(TUNEL法)检测细胞凋亡; 免疫印迹(Western blot)法检测c-Jun氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)、c-Jun、p-JNK及p-c-Jun蛋白表达。

结果: 和对照组相比较, 经PA处理的肝L02细胞增殖活性降低($P<0.05$), 而且呈剂量依赖性; 0.5 mmol/L PA干预24 h后, 肝L02细胞凋亡率增加 $28.4\% \pm 2.6\%$, Western blot结果显示: JNK、c-Jun磷酸化增多; 加用SP 600125或GLP-1后, 细胞凋亡率分别减少 $21.7\% \pm 2.9\%$ 和 $19.4\% \pm 2.7\%$, 差异具有统计学意义($P<0.05$), PAGLP组p-JNK与p-c-Jun蛋白表达有所下降, 差异具有统计学意义($P<0.05$)。

结论: PA可诱导肝L02细胞脂性凋亡; 此过程可能和JNK通路相关; GLP-1可能是通过抑制JNK信号通路来抑制肝L02细胞的脂性凋亡。

© 2015年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 非酒精性脂肪性肝炎; 游离脂肪酸; L02细胞; c-Jun氨基末端激酶; 凋亡

核心提示: 我们发现, 棕榈酸(palmitic acid, PA)诱导L02细胞发生凋亡的过程中出现c-Jun氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)活化, 当应用JNK抑制剂SP 600125抑制JNK通路后, L02凋亡率下降, 用胰高血糖素样肽-1(glucagon-like peptide-1, GLP-1)可明显降低经PA诱导的肝L02细胞凋亡率, 抑制了p-JNK和下游底物p-c-Jun表达水平, 提示GLP-1可拮抗PA诱导的肝L02细胞的脂性凋亡, 其过程可能是通过JNK信号通路实现。为非酒精性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis)防治药物的研制提供一定的实验基础。

王珣, 王明林, 鲁新耀, 张鹏, 于红刚, 胡义奎. GLP-1通过抑制肝L02细胞脂性凋亡的可能机制. 世界华人消化杂志 2015; 23(1): 16-21 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/23/16.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v23.i1.16>

0 引言

游离脂肪酸(free fatty acid, FFA)是体内的脂质代谢物质, 研究显示: FFA是诱导非酒精性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)的发生最主要外在因子^[1,2], 机制可能是FFA诱导了肝细胞的脂性凋亡。我们先前的研究显示c-Jun氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)通路参与此过程^[3]。目前临床上NASH的防治主要是针对发病机制进行的, 但尚无公认有效的治疗

药物。胰高血糖素样肽-1(glucagon-like peptide-1, GLP-1)为胰岛素促泌剂, 有增加胰岛素敏感性及减轻体质量等作用^[4]。本文意在探索GLP-1对FFA诱导的肝L02细胞脂性凋亡的影响及可能机制, 为新药研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料 L02细胞系购自武汉大学细胞收藏中心。培养细胞所用试剂、试剂盒购自北京中杉生物科技有限公司。棕榈酸(palmitic acid, PA)、JNK抑制剂SP 600125及实验用GLP-1、Cell Counting Kit-8(CCK-8)试剂盒、Western blot试剂盒及TUNEL试剂盒均购自瑞士Roche公司。JNK及β肌动蛋白(β-actin)多克隆一抗以及单克隆二抗均购自美国Santa Cruz公司。

1.2 方法

1.2.1 L02细胞培养: 用含20%的胎牛血清的DMEM(dulbecco's modified eagle medium)完全培养基稀释细胞悬液, 并留取少量的L02细胞进行纯度及活力鉴定。以 1×10^5 - 1×10^6 mL的密度接种到50 mL塑料培养瓶中, 在温度为37℃、体积分数为5%的CO₂, 95%潮湿空气的CO₂恒温培养箱中进行细胞培养。培养瓶内L02细胞24 h后第一次换新鲜的DMEM培养液, 以后每隔3 d换液1次, 将培养液换为含10%胎牛血清的DMEM完全培养基, 经3-4 d的消化传代。选择生长状态良好的L02细胞用于实验。

1.2.2 实验分组与处理: 分组: 将传代的L02细胞随机分为4组: 对照组(NC组)、PA干预组(PA组)、PA+SP 600125组(PASP组)及PA+GLP-1组(PAGLP组)。

处理: NC组为空白对照; PA组(0.5 mmol/L的PA干预24 h); PASP组(25 μmol/L的SP 600125预孵育1 h, 再予0.5 mmol/L的PA+25 μmol/L的SP 600125干预24 h); PAGLP组(50 nmol/L的GLP-1预孵育24 h, 再予0.5 mmol/L的PA及50 nmol/L的GLP-1共孵育24 h)。

1.2.3 CCK-8法检测L02细胞的增殖活性: 参照我们先前的研究方法^[5]对L02细胞进行培养。NC组加入20 μL的完全培养基, 而非对照组加入20 μL不同浓度PA(浓度分别为0.125、0.250、0.500 mmol/L)干预12、24和48 h。然后每组加入10 μL的CCK-8溶液, 继续孵育3 h。

1.2.4 TUNEL法检测L02细胞凋亡: 严格按照试剂盒操作说明对L02进行细胞凋亡的检测; 随机

研发前沿
NASH可进一步发展为终末期肝病甚至肝恶性肿瘤, 然而NASH的发病机制尚不明确。NASH发生发展过程中肝细胞凋亡越来越受到研究者的关注, 逐渐成为目前NASH发病机制研究的热点。本实验采用不同浓度的棕榈酸(palmitic acid, PA)诱导肝L02细胞的凋亡, 探寻可能机制。

相关报道
目前临床有使用口服降糖药来治疗NASH, 作用机制多为降低胰岛素抵抗及调节脂质代谢, 但均无法解决NASH发展过程中肝细胞脂性凋亡这一难题。本研究发现GLP-1可明显降低经PA诱导的肝L02细胞凋亡率, 其过程可能是通过JNK信号通路实现。

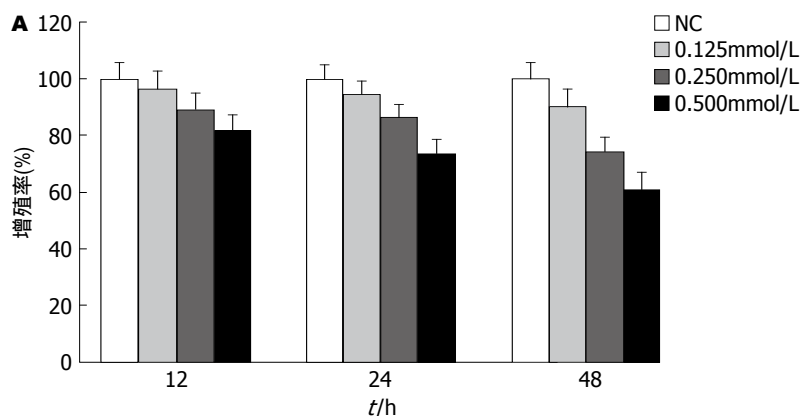


图1 PA对L02细胞增殖活性的影响. PA: 棕榈酸.

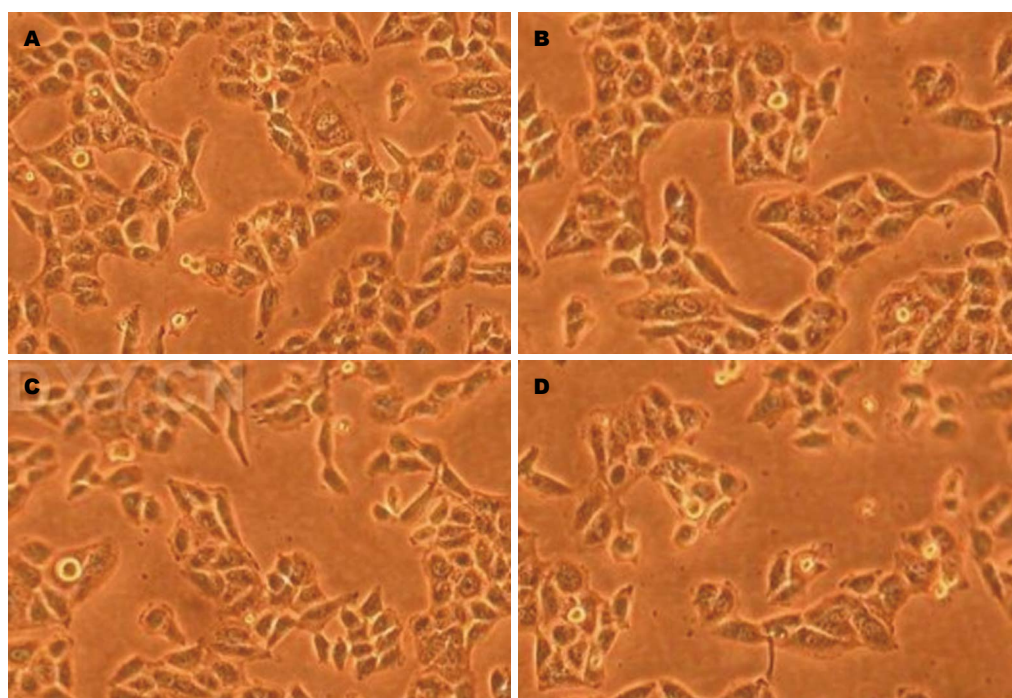


图2 PA干预24 h后L02细胞形态学及加入SP 600125或GLP-1后的变化($\times 100$). A: 对照组; B: PA干预组; C: PA+SP 600125组; D: PA+GLP-1组. PA: 棕榈酸; GLP-1: 胰高血糖素样肽-1; SP 600125: JNK抑制剂SP 600125.

选取5个视野, 计数100个细胞核. 凋亡率(%) = 凋亡细胞数/细胞总数 $\times 100\%$.

1.2.5 Western blot半定量测定p-JNK、p-c-Jun蛋白水平: 方法参照文献[5]. 使用GEI-pro 4.0软件进行灰度值定量.

统计学处理 正态计量资料以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示; 细胞增殖抑制率的比较采用重复测量数据的方差分析(ANOVA); 组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA); 两两比较采用SNK- q 法; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

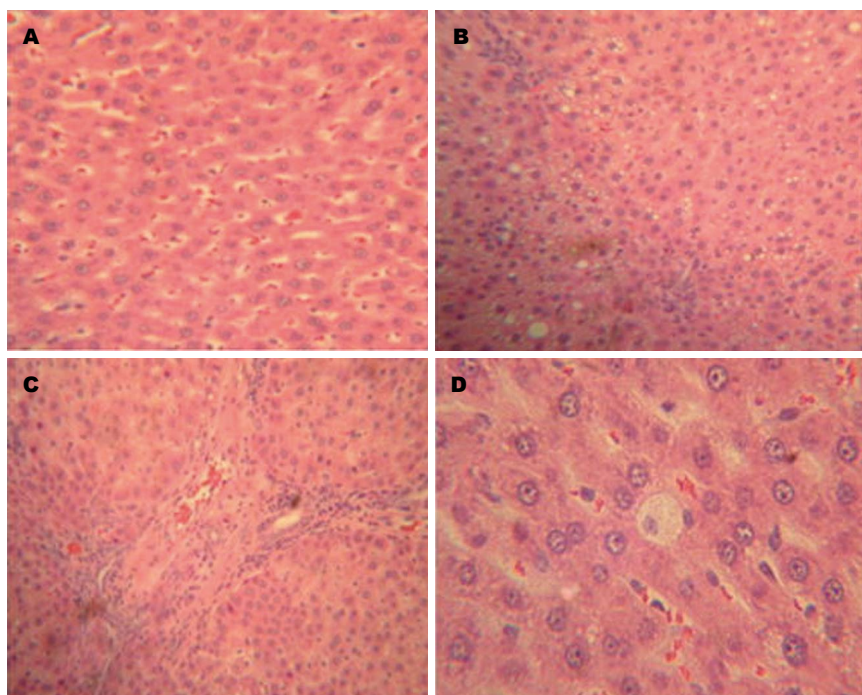
2 结果

2.1 PA抑制L02细胞增殖活性 假定NC组增殖活

性100%. 与NC组比较, 随着PA干预浓度的升高及干预时间延长, 细胞增殖活性降低, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)(图1).

2.2 PA干预L02细胞凋亡 正常的L02细胞之间相互连接并见融合, 出现抱团. 然而经过PA干预24 h后, 可见细胞间连接减少, 并可见崩解现象. 当加入SP 600125或GLP-1后, 上述情况有所改善(图2).

2.3 TUNEL法检测凋亡 棕色为凋亡细胞. PA组凋亡率为 $27.2\% \pm 2.1\%$, NC组为 $3.2\% \pm 0.4\%$, 差异有统计学意义($P < 0.05$). 加入SP 600125或GLP-1的干预组, L02细胞凋亡率分别为 $21.3\% \pm 2.6\%$ 及 $17.3\% \pm 2.8\%$, 较PA组减少, 差异有统计



同行评价
本文的科学性、
创新性及可读性
能较好地反映我
国胃肠病学临床
和基础研究的先
进水平。

图 3 各组细胞DAB染色结果. A: 对照组($\times 200$); B: PA干预组($\times 200$); C: PA+SP 600125组($\times 200$); D: PA+GLP-1组($\times 400$). PA: 棕榈酸; GLP-1: 胰高血糖素样肽-1; SP 600125: JNK抑制剂SP 600125.

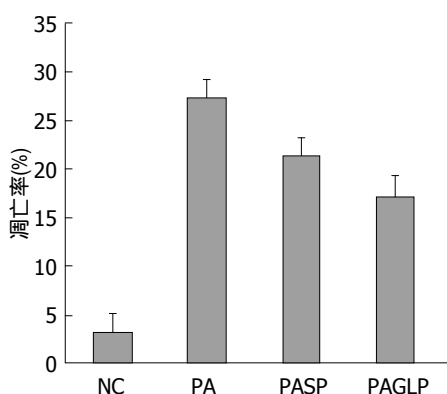


图 4 各组凋亡率比较. NC: 对照组; PA: PA干预组; PASP: PA+SP 600125组; PAGLP: PA+GLP-1组. PA: 棕榈酸; GLP-1: 胰高血糖素样肽-1; SP 600125: JNK抑制剂SP 600125.

学意义(图3, 4).

2.4 Western blot结果 各组JNK、c-Jun蛋白表达差异无统计学意义. 与对照组比较, PA干预后p-JNK与p-c-Jun表达均上升, 而应用SP 600125或GLP-1预处理后, 两蛋白表达下降, 差异有统计学意义(图5).

3 讨论

非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)是一组临床病理综合征, 包括NASH和单纯性脂肪肝(nonalcoholic fatty liver,

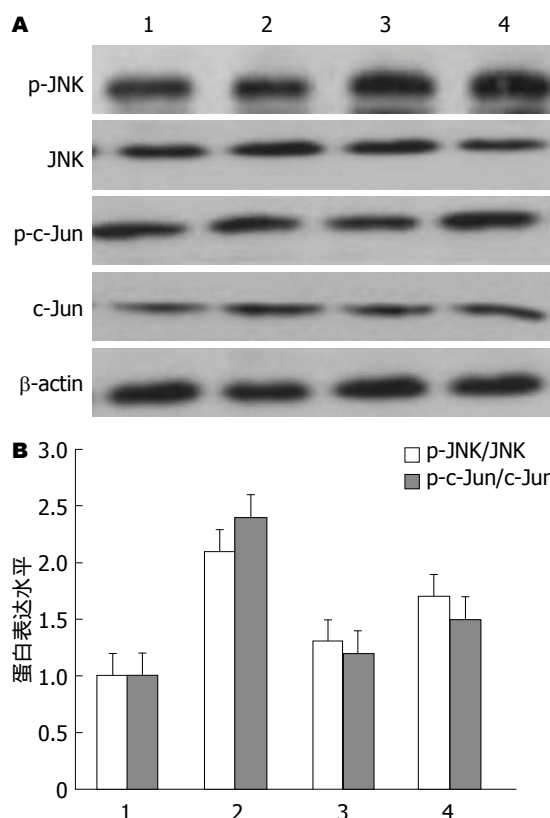


图 5 各组细胞JNK、c-Jun、p-JNK、p-c-Jun蛋白表达比较. A: 各组蛋白表达Western blot结果; B: 各组p-JNK/JNK和p-c-Jun/c-Jun的相对水平. 1: 对照组; 2: PA干预组; 3: PA+SP 600125组; 4: PA+GLP-1组. PA: 棕榈酸; GLP-1: 胰高血糖素样肽-1; SP 600125: JNK抑制剂SP 600125; JNK: c-Jun氨基末端激酶.

NAFL)^[6-10]. NASH可进一步发展为终末期肝病甚至肝恶性病变^[11-13]. 然而目前临床上有效的防治NASH的药物较少, 针对发病机制的药物研制显得尤其重要, 然而NASH的发病机制尚不明确. NASH发生发展过程中肝细胞凋亡越来越受到研究者的关注, 逐渐成为目前NASH发病机制研究的热点^[14]. 本实验采用不同浓度的PA成功诱导了肝L02细胞的凋亡, 表明高游离脂肪酸水平是促进肝L02细胞发生凋亡的重要机制之一.

JNK是位于细胞质内的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶. 研究发现, JNK参与某些神经退行性疾病(如帕金森病)、糖尿病、脂质代谢紊乱等疾病的发生^[15-17]. 作用机制可能是JNK在一些外源性因子刺激作用下(如游离脂肪酸等), 通过使其第63、73位丝氨酸残基发生磷酸化而活化. 活化的JNK与c-Jun等蛋白的氨基末端区域结合, 使转录因子活性区域发生磷酸化, 从而对细胞凋亡、分化起到调控作用^[18]. 我们发现, PA诱导L02细胞发生凋亡的过程中出现JNK活化, 当应用JNK抑制剂SP 600125抑制JNK通路后, L02凋亡率下降. 这一现象可能提示JNK通路参与了FFA诱导的肝细胞脂性凋亡, 和我们先前的研究^[5]结论一致.

GLP-1是一种肠道分泌的、促胰岛素分泌激素, 其包含30个氨基酸. GLP-1及其类似物药物的应用使得2型糖尿病的治疗获得突破性进展. 他和其他降糖药物治疗糖尿病的本质区别在于不导致胰岛B细胞凋亡. NASH和糖尿病同属代谢综合征范畴, 他是代谢综合征的肝脏的一种表现形式. 目前临床有使用口服降糖药来治疗NASH^[19], 作用机制多为降低胰岛素抵抗及调节脂质代谢, 但均无法解决NASH发展过程中肝细胞脂性凋亡这一难题.

本研究还发现加用GLP-1可明显降低经PA诱导的肝L02细胞凋亡率, 抑制了p-JNK和下游底物p-c-Jun表达水平, 提示GLP-1可拮抗PA诱导的肝L02细胞的脂性凋亡, 其过程可能是通过JNK信号通路实现. 为NASH防治药物的研制提供一定的实验基础.

4 参考文献

- 1 Nascimento AF, Ip BC, Luvizotto RA, Seitz HK, Wang XD. Aggravation of nonalcoholic steatohepatitis by moderate alcohol consumption is associated with decreased SIRT1 activity in

- rats. *Hepatobiliary Surg Nutr* 2013; 2: 252-259 [PMID: 24570955 DOI: 10.3978/j.issn.2304-3881.2013.07.05]
- 2 Attar BM, Van Thiel DH. Current concepts and management approaches in nonalcoholic fatty liver disease. *Scientific World Journal* 2013; 2013: 481893 [PMID: 23576902 DOI: 10.1155/2013/481893]
- 3 Wu D, Cederbaum AI. Inhibition of autophagy promotes CYP2E1-dependent toxicity in HepG2 cells via elevated oxidative stress, mitochondria dysfunction and activation of p38 and JNK MAPK. *Redox Biol* 2013; 1: 552-565 [PMID: 24273738 DOI: 10.1016/j.redox.2013.10.008]
- 4 Olaywi M, Bhatia T, Anand S, Singhal S. Novel anti-diabetic agents in non-alcoholic fatty liver disease: a mini-review. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2013; 12: 584-588 [PMID: 24322742 DOI: 10.1016/S1499-3872(13)60092-2]
- 5 王珣, 鲁新耀, 张鹏, 王明林, 于红刚, 胡义奎. c-Jun氨基末端激酶抑制剂对大鼠非酒精性脂肪性肝炎的防治及机制. *世界华人消化杂志* 2014; 22: 2881-2886
- 6 Chang E, Park CY, Park SW. Role of thiazolidinediones, insulin sensitizers, in non-alcoholic fatty liver disease. *J Diabetes Investig* 2013; 4: 517-524 [PMID: 24843703 DOI: 10.1111/jdi.12107]
- 7 Ozturk ZA, Kadayifci A. Insulin sensitizers for the treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *World J Hepatol* 2014; 6: 199-206 [PMID: 24799988 DOI: 10.4254/wjh.v6.i4.199]
- 8 Takaki A, Kawai D, Yamamoto K. Molecular mechanisms and new treatment strategies for non-alcoholic steatohepatitis (NASH). *Int J Mol Sci* 2014; 15: 7352-7379 [PMID: 24786095 DOI: 10.3390/ijms15057352]
- 9 Mishra S, Yadav D, Gupta M, Mishra H, Sharma P. A Study of Carotid Atherosclerosis in Patients with Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Indian J Clin Biochem* 2013; 28: 79-83 [PMID: 24381427 DOI: 10.1007/s12291-012-0286-8]
- 10 Zarrinpar A, Loomba R. Review article: the emerging interplay among the gastrointestinal tract, bile acids and incretins in the pathogenesis of diabetes and non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2012; 36: 909-921 [PMID: 23057494 DOI: 10.1111/apt.12084]
- 11 Xiang Z, Chen YP, Ma KF, Ye YF, Zheng L, Yang YD, Li YM, Jin X. The role of ursodeoxycholic acid in non-alcoholic steatohepatitis: a systematic review. *BMC Gastroenterol* 2013; 13: 140 [PMID: 24053454 DOI: 10.1186/1471-230X-13-140]
- 12 Walenbergh SM, Koek GH, Bieghs V, Shiri-Sverdlov R. Non-alcoholic steatohepatitis: the role of oxidized low-density lipoproteins. *J Hepatol* 2013; 58: 801-810 [PMID: 23183522 DOI: 10.1016/j.jhep.2012.11.014]
- 13 Takahashi Y, Soejima Y, Fukusato T. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol* 2012; 18: 2300-2308 [PMID: 22654421 DOI: 10.3748/wjg.v18.i19.2300]
- 14 Mells JE, Anania FA. The role of gastrointestinal hormones in hepatic lipid metabolism. *Semin Liver Dis* 2013; 33: 343-357 [PMID: 24222092 DOI: 10.1055/s-0033-1358527]
- 15 Inamdar AA, Chaudhuri A, O'Donnell J. The Protective Effect of Minocycline in a Paraquat-Induced Parkinson's Disease Model in *Drosophila*

- is Modified in Altered Genetic Backgrounds. *Parkinsons Dis* 2012; 2012: 938528 [PMID: 22900232 DOI: 10.1155/2012/938528]
- 16 Bogoyevitch MA, Ngoei KR, Zhao TT, Yeap YY, Ng DC. c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling: recent advances and challenges. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1804: 463-475 [PMID: 19900593 DOI: 10.1016/j.bbapap.2009.11.002]
- 17 Yang C, Aye CC, Li X, Diaz Ramos A, Zorzano A, Mora S. Mitochondrial dysfunction in insulin resistance: differential contributions of chronic insulin and saturated fatty acid exposure in muscle cells. *Biosci Rep* 2012; 32: 465-478 [PMID: 22742515 DOI: 10.1042/BSR20120034]
- 18 Huntwork-Rodriguez S, Wang B, Watkins T, Ghosh AS, Pozniak CD, Bustos D, Newton K, Kirkpatrick DS, Lewcock JW. JNK-mediated phosphorylation of DLK suppresses its ubiquitination to promote neuronal apoptosis. *J Cell Biol* 2013; 202: 747-763 [PMID: 23979718 DOI: 10.1083/jcb.201303066]
- 19 Poon MK, Chiu PY, Mak DH, Ko KM. Metformin protects against carbon tetrachloride hepatotoxicity in mice. *J Pharmacol Sci* 2003; 93: 501-504 [PMID: 14737024 DOI: 10.1254/jphs.93.501]

编辑: 韦元涛 电编: 都珍珍



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2015年版权归百世登出版集团有限公司所有

• 消息 •

《世界华人消化杂志》参考文献要求

本刊讯 本刊采用“顺序编码制”的著录方法,即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序。提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映,并在文内引用处右上角加方括号注明角码。文中如列作者姓名,则需在“Pang等”的右上角注角码号;若正文中仅引用某文献中的论述,则在该论述的句末右上角注码号。如马连生^[1]报告……,潘伯荣等^[2-3]认为……;PCR方法敏感性高^[6-7]。文献序号作正文叙述时,用与正文同号的数字并排,如本实验方法见文献[8]。所引参考文献必须以近2-3年SCIE, PubMed,《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊为准,通常应只引用与其观点或数据密切相关的国内外期刊中的最新文献,包括世界华人消化杂志(<http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.jsp>)和 *World Journal of Gastroenterology* (<http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.jsp>)。期刊: 序号, 作者(列出全体作者), 文题, 刊名, 年, 卷, 起页-止页, PMID编号; 书籍: 序号, 作者(列出全部), 书名, 卷次, 版次, 出版地, 出版社, 年, 起页-止页。