

不同剂量血必净对内毒素诱导调节性 T 细胞凋亡的影响

艾宇航¹, 姚咏明², 戴新贵¹

(1. 中南大学湘雅医院 ICU, 湖南 长沙 410008; 2. 解放军总医院第一附属医院全军烧伤研究所, 北京 100048)

【摘要】 目的 探讨血必净注射液对内毒素诱导 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞(Treg)凋亡影响的剂量-效应关系。方法 体外培养免疫磁珠法分选大鼠脾脏 CD4⁺CD25⁺Treg, 分为对照组、抗 CD3/CD28 组、抗 CD3/CD28+脂多糖(LPS)组、抗 CD3/CD28+血必净组(1、5、25 mg/ml)和抗 CD3/CD28+LPS+血必净组(1、5、25 mg/ml)。以刺激第 3 日为观察时间点, 采用流式细胞术分析 Treg 凋亡率、叉头翼状螺旋转录因子(Foxp3)和 T 淋巴细胞毒性相关抗原 4(CTLA-4)表达水平, 酶联免疫吸附法(ELISA)检测白细胞介素-10(IL-10)分泌情况。结果 抗 CD3/CD28+血必净各组 CD4⁺CD25⁺Treg 凋亡率高于对照组和抗 CD3/CD28 组, 抗 CD3/CD28+LPS+血必净各组凋亡率较对照组和抗 CD3/CD28+LPS 组明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 且凋亡率随血必净刺激剂量增加而升高, 其中 5 mg/ml 血必净组凋亡率接近 50%。Foxp3 和 CTLA-4 的表达及 IL-10 分泌随凋亡率增加而逐渐降低, 不同剂量血必净组间比较差异有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论 血必净注射液能显著促进内毒素介导 Treg 的凋亡, 并呈一定程度的剂量-效应关系。

【关键词】 调节性 T 细胞; 脂多糖; 脓毒症; 凋亡; 血必净注射液

中图分类号: R285.5; R365 文献标识码: A DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2010.03.004

Effect of various doses of Xuebijing injection (血必净注射液) on lipopolysaccharide-mediated apoptosis of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in vitro Ai Yu-hang*, YAO Yong-ming, DAI Xin-gui. * Department of Intensive Care Unit, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410008, Hunan, China
Corresponding author: YAO Yong-ming, Email: c_ff@sina.com

【Abstract】 **Objective** To evaluate the effect of various doses of Xuebijing injection (血必净注射液) on lipopolysaccharide (LPS)-mediated apoptosis of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells (Treg) in rats in vitro. **Methods** CD4⁺CD25⁺ Treg, separated by the immunomagnetic beads isolate system from spleens in rats, were divided into the control group, anti-CD3/CD28 group, anti-CD3/CD28+LPS group, anti-CD3/CD28+Xuebijing treated group (1, 5 and 25 mg/ml Xuebijing, respectively), and anti-CD3/CD28+LPS+Xuebijing treated group (1, 5 and 25 mg/ml, respectively). The apoptotic rates, the expression of transcription factor orkhead/winged helix transcription factor (Foxp3) and membrane molecule cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) of Treg were analyzed by flow cytometry (FCM), and secretion levels of interleukin-10 (IL-10) were measured by enzyme-labeled immunosorbent assay (ELISA) on day 3. **Results** The apoptotic rate of CD4⁺CD25⁺ Treg in anti-CD3/CD28+Xuebijing treated groups was markedly higher than that in control group and anti-CD3/CD28 group ($P<0.05$ or $P<0.01$). Meanwhile, the apoptotic rates of CD4⁺CD25⁺Treg in anti-CD3/CD28+LPS+Xuebijing group were significantly elevated in comparison to the control and anti-CD3/CD28+LPS groups ($P<0.05$ or $P<0.01$). Along with the increased doses of Xuebijing injection, the apoptotic rates of CD4⁺CD25⁺ Tregs were also enhanced, and among them, the rates of 5 mg/ml Xuebijing injection treated group approached to 50%. In addition, the mean fluorescence intensity of Foxp3 as well as CTLA-4, and the secretion levels of IL-10 were negatively correlated with the apoptotic rates of CD4⁺CD25⁺ Tregs. There were statistical significances of above three indexes in the various doses of Xuebijing groups ($P<0.05$ or $P<0.01$). **Conclusion** Treatment with Xuebijing injection could markedly enhance the apoptosis of CD4⁺CD25⁺ Tregs, showing a dose-dependent response pattern.

【Key words】 Regulatory T cell; Lipopolysaccharide; Sepsis; Apoptosis; Xuebijing injection

脓毒症的发病机制仍是现代危重病医学研究的难点与热点问题, 新近的研究提示, 免疫功能紊乱在脓毒症发生发展过程中具有重要作用。CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞(Treg)作为具有独立功能的 T 细胞亚群, 可表现出免疫无能性和免疫抑制性两大特征^[1-4]。通过调控 CD4⁺CD25⁺Treg 水平来实现自身

免疫疾病和肿瘤等疾病的干预已成为一种新的策略^[5]。脓毒症时 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞数量明显增加^[6], 且本课题组前期观察发现脓毒症动物 Treg 凋亡率明显下降, 因此, 寻找诱导 CD4⁺CD25⁺Treg 凋亡、减轻其对应应 T 细胞具有抑制功能的治疗方案将为防治脓毒症开辟新途径。本研究中采用体外实验, 用脂多糖(LPS)刺激 CD4⁺CD25⁺Treg 模拟脓毒症状态, 在抗 CD3/CD28 诱导 Treg 凋亡的基础上, 加入不同剂量血必净注射液(简称血必净)刺激 CD4⁺CD25⁺Treg, 探讨血必净影响 Treg 凋亡的剂量-效应关系, 为其临床应用提供实验依据。

基金项目: 国家重点基础研究发展规划项目(2005CB522602); 国家自然科学基金资助项目(30872683, 30971192)

通信作者: 姚咏明, Email: c_ff@sina.com

作者简介: 艾宇航(1961-), 女(汉族), 湖南省人, 医学博士, 教授, 主任医师, 主要从事危重病急救医学方面研究。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组:雄性清洁级 Wistar 大鼠,体重 180~220 g,购自中国医学科学院实验动物研究所。分离 CD4⁺CD25⁺Treg 后分为对照组、抗 CD3/CD28 组、抗 CD3/CD28+LPS 组、抗 CD3/CD28+血必净组(1、5、25 mg/ml)、抗 CD3/CD28+LPS+血必净组(1、5、25 mg/ml),各组均设 8 个平行孔。

1.2 细胞分离及培养:断颈处死大鼠后无菌取脾脏,制备细胞悬液,离心后加入淋巴细胞分离液分出中层白色细胞。加入藻红蛋白(PE)标记抗大鼠 CD25 单克隆抗体(单抗)和抗 PE 磁珠,阳性选择获得 CD25⁺T 细胞。解离试剂解离阴性选择细胞后以异硫氰酸荧光素(FITC)标记抗大鼠 CD4 和 CD4 磁珠阳性选择即得 CD4⁺CD25⁺Treg。流式细胞仪检测双阳性细胞的纯度。用锥虫蓝对 CD4⁺CD25⁺Treg 进行染色,观察细胞存活率。以含小牛血清的 RPMI1640 培养液调整细胞至 1×10^6 /ml,置 CO₂ 培养箱 37 °C 培养至 3 d。抗 CD3/CD28 组加入抗大鼠 CD3($0.5 \mu\text{g}/10^6$)和抗大鼠 CD28($1 \mu\text{g}/10^6$)刺激;抗 CD3/CD28+LPS 组在抗 CD3/CD28 基础上加入 LPS $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 刺激;抗 CD3/CD28+血必净组在抗 CD3/CD28 基础上加入 1、5、25 mg/ml 血必净刺激;抗 CD3/CD28+LPS+血必净组在抗 CD3/CD28+LPS 组基础上加入 1、5、25 mg/ml 血必净刺激,培养上清液于 -70 °C 保存待测。

1.3 检测指标及方法

1.3.1 流式细胞术检测 Treg 凋亡率:悬浮 CD4⁺CD25⁺Treg(1×10^6 /ml)用磷酸盐缓冲液(PBS)洗 2 次,加入 100 μl 结合缓冲液和别藻蓝蛋白(APC)标记膜联蛋白 V (Annexin V, $20 \mu\text{g}/\text{ml}$)10 μl ;室温避光 30 min,再加入放线菌素 D(7-AAD)10 μl ,避光反应 5 min 后,加入 400 μl 结合缓冲液,流式细胞术选择 7-AAD 阴性、Annexin V 阳性细胞为凋亡细胞,检测细胞凋亡率。

1.3.2 Treg 表面标志物叉头翼状螺旋转录因子(Foxp3)和 T 淋巴细胞毒性相关抗原 4(CTLA-4)表达的检测:100 μl CD4⁺CD25⁺Treg(1×10^6 /ml)加入 1 ml 新配制的破膜液,4 °C 避光孵育 2 h 后用 2 ml 破膜缓冲液洗涤;加入 PE 抗 Foxp3,暗处 4 °C 孵育 30 min 后用 2 ml 破膜缓冲液洗涤,离心弃上清液,加入 0.5 ml PBS,流式细胞术检测 Foxp3 的平均荧光强度。重悬细胞(1×10^6 /ml)直接加入 PE 抗 CTLA-4,4 °C 避光孵育 30 min,检测 CTLA-4 平均荧光强度。

1.3.3 Treg 分泌白细胞介素-10(IL-10)功能的检测:严格按照大鼠 IL-10 酶联免疫吸附法(ELISA)检测试剂盒说明书操作,分别计算出标准曲线和回归方程,将样品吸光度(A)值代入标准曲线乘以相应的稀释倍数,计算出样品中细胞因子的蛋白浓度。

1.4 统计学分析:数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用 SPSS 13.0 统计软件对数据进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血必净影响正常 Treg 凋亡的剂量-效应关系

2.1.1 Treg 凋亡率(表 1):抗 CD3/CD28+血必净各组 CD4⁺CD25⁺Treg 凋亡率均明显高于对照组和抗 CD3/CD28 组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),凋亡率随血必净作用剂量增加而升高,不同剂量血必净组间两两比较差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$),其中 5 mg/ml 血必净组凋亡率已接近 50%。

2.1.2 Foxp3 表达水平(表 1):抗 CD3/CD28+血必净各组 Foxp3 表达水平均较对照组明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),而 1 mg/ml 血必净组表达水平明显高于抗 CD3/CD28 组($P < 0.01$)。Foxp3 表达随血必净作用剂量增加而降低,不同剂量血必净组间两两比较差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

2.1.3 CTLA-4 表达水平(表 1):抗 CD3/CD28+血必净 5 mg/ml、25 mg/ml 组 CTLA-4 表达强度较对照组明显降低(均 $P < 0.05$);1 mg/ml 组明显高于抗 CD3/CD28 组($P < 0.05$)。CTLA-4 表达随血必净剂量增加而逐渐降低,5 mg/ml、25 mg/ml 血必净组均较 1 mg/ml 组明显降低($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$)。

2.1.4 IL-10 分泌量(表 1):Treg 在诱导凋亡后分泌 IL-10 明显下降,各组与对照组比较均有明显差异($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);血必净组与抗 CD3/CD28 组比较 IL-10 进一步显著下降,且随血必净作用剂量增加而降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),其中 25 mg/ml 血必净组与 1 mg/ml 组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 血必净影响内毒素诱导 Treg 凋亡的剂量-效应关系

2.2.1 Treg 凋亡率的变化(表 2):抗 CD3/CD28+LPS+血必净各组 CD4⁺CD25⁺Treg 凋亡率较对照组明显升高(均 $P < 0.01$);5 mg/ml、25 mg/ml 血必净组凋亡率较抗 CD3/CD28+LPS 组显著升高(均 $P < 0.05$)。凋亡率随血必净剂量增加而升高,

表 1 血必净影响 CD4⁺CD25⁺Treg 凋亡的剂量-效应关系($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	凋亡率(%)	Foxp3	CTLA-4	IL-10(ng/L)
对照组	12.8±0.8	126.2±12.5	123.4±9.2	122.1±19.5
抗 CD3/CD28 组	33.7±3.1 ^a	63.1±12.4 ^b	75.7±9.6 ^a	86.7±13.3 ^a
血必净 1 mg/ml 组	42.6±2.0 ^b	99.7±4.2 ^{ad}	129.9±5.3 ^c	39.1±7.0 ^{bd}
血必净 5 mg/ml 组	49.5±1.9 ^{bce}	77.3±4.2 ^{bc}	87.5±8.3 ^{ac}	18.7±4.9 ^{bc}
血必净 25 mg/ml 组	67.2±3.8 ^{bdeg}	54.2±24.1 ^{bfg}	69.1±2.9 ^{af}	4.6±5.0 ^{bde}

注:与对照组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$;与抗 CD3/CD28 组比较,^c $P<0.05$,^d $P<0.01$;
与血必净 1 mg/ml 组比较,^e $P<0.05$,^f $P<0.01$;与血必净 5 mg/ml 组比较,^g $P<0.05$

表 2 血必净影响内毒素诱导 Treg 凋亡的剂量-效应关系($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	凋亡率(%)	Foxp3	CTLA-4	IL-10(ng/L)
对照组	12.8±0.8	126.2±12.5	123.4±9.2	122.1±19.5
抗 CD3/CD28+LPS 组	29.4±1.6 ^b	139.9±18.4	111.2±10.6	412.6±23.6 ^b
血必净 1 mg/ml 组	36.0±9.4 ^b	135.3±16.3	149.4±2.9 ^c	52.1±26.9 ^{bd}
血必净 5 mg/ml 组	45.1±2.7 ^{bc}	94.8±8.9 ^{ac}	119.4±6.7 ^e	20.1±2.6 ^{bde}
血必净 25 mg/ml 组	57.9±3.9 ^{bdeg}	82.3±10.3 ^{ace}	90.6±4.4 ^{adfg}	13.1±2.8 ^{bde}

注:与对照组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$;与抗 CD3/CD28+LPS 组比较,^c $P<0.05$,^d $P<0.01$;
与血必净 1 mg/ml 组比较,^e $P<0.05$,^f $P<0.01$;与血必净 5 mg/ml 组比较,^g $P<0.05$

25 mg/ml 血必净组与 1 mg/ml、5 mg/ml 组比较有明显差异(均 $P<0.05$)。

2.2.2 Foxp3 表达水平(表 2):抗 CD3/CD28+LPS+血必净 5 mg/ml 组 Foxp3 表达水平均较对照组及抗 CD3/CD28+LPS 组明显降低(均 $P<0.05$)。Foxp3 表达强度随血必净作用剂量增加而降低,25 mg/ml 血必净组与 1 mg/ml 组比较差异显著($P<0.05$)。

2.2.3 CTLA-4 表达水平(表 2):抗 CD3/CD28+LPS+血必净 25 mg/ml 组 CTLA-4 表达强度较对照组和抗 CD3/CD28+LPS 组明显降低($P<0.05$ 和 $P<0.01$);1 mg/ml 血必净组 CTLA-4 表达强度较抗 CD3/CD28+LPS 组明显升高($P<0.05$)。CTLA-4 表达随血必净作用剂量增加而降低,不同剂量血必净组间两两比较差异均有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

2.2.4 IL-10 分泌水平(表 2):内毒素诱导后 IL-10 分泌量明显高于对照组($P<0.01$);不同剂量血必净作用后其水平较 CD3/CD28+LPS 组有明显下降(均 $P<0.01$);且随血必净作用剂量增加而明显降低,其中 5 mg/ml、25 mg/ml 血必净组与 1 mg/ml 组比较差异有统计学意义(均 $P<0.05$)。

3 讨论

业已明确,脓毒症发生并非单纯与病原体及其毒素所致炎症损害有关,机体免疫功能状态也起着至关重要的作用。脓毒症免疫功能紊乱的机制一方面是 T 淋巴细胞功能失调,即促炎介质向抗炎反应漂移;另一方面则表现为细胞凋亡与免疫无反应

性^[7]。Treg 作为免疫系统的重要调节细胞之一,在脓毒症复杂的免疫调节网络中主要发挥着对细胞免疫的抑制效应。脓毒症时机体 Treg 数量明显增加,从而加剧免疫无反应状态,表现为对抗原刺激不发生反应性增殖并且也不分泌细胞因子 IL-2^[8]。因此,清除机体内过多的 Treg 含量,调整 Treg 的免疫反应活性对临床治疗具有重要意义,如增强 Treg 的选择性存活对自身免疫系统疾病是有益的,通过加速 Treg 凋亡可能对脓毒症有利^[9-10]。调节 CD4⁺CD25⁺Treg 水平可通过影响其发育和凋亡来实现,目前的研究重点以 CD4⁺CD25⁺Treg 发育为调控环节,而极少见于调控其凋亡来实现对疾病的干预。许多资料证实,CD4⁺CD25⁺Treg 通过细胞接触机制和释放细胞因子作用于效应 T 细胞发生免疫抑制作用^[9]。在影响 CD4⁺CD25⁺Treg 存活及功能发挥的诸多效应分子中,Foxp3 和 CTLA-4 是 Treg 表面介导接触抑制的重要膜分子,其中 Foxp3 系 Treg 活性的必备条件^[11]。IL-10 为 CD4⁺CD25⁺Treg 免疫抑制作用的关键细胞因子,抑制效应 T 细胞免疫功能^[12]。本课题组前期实验发现,抗 CD3/CD28 体外诱导 CD4⁺CD25⁺Treg 凋亡具有一定的时间规律,第 3 日可作为合适观察时间点。因此,本实验中选择抗 CD3/CD28 作为 Treg 凋亡初始诱导剂,再用血必净干预,观察血必净影响 Treg 凋亡的量效关系。同时选择 Foxp3、CTLA-4 表达及分泌 IL-10 等功能活化指标对 Treg 凋亡后其抑制活性变化进行研究。

血必净具有有效拮抗细菌内毒素,抑制炎症介质的损伤作用,促进免疫异常反应的恢复等作用^[13],在菌血症动物模型中,抗生素合用血必净治疗能显著提高动物的生存率,对严重烧伤、脓毒症免疫功能紊乱具有一定的调理作用^[14-15]。本课题组前期研究中还观察到,血必净对 CD4⁺CD25⁺Treg 具有促凋亡作用,本实验中通过采用内毒素刺激模拟脓毒症环境进一步探讨其影响凋亡的剂量-效应关系,旨在为寻求最佳应用剂量提供实验依据。在预实验中,分别采用 1、10、100 mg/ml 血必净进行干预,发现 100 mg/ml 刺激剂量偏大,流式细胞术检测 99%以

上为凋亡细胞。因此,本实验改用了 1、5、25 mg/ml 血必净作为干预剂量,结果显示无论是正常 Treg 还是 LPS 诱导后 Treg,不同剂量血必净组 CD4⁺CD25⁺Treg 凋亡率明显高于其他实验组,并呈现一定的量效关系,即 Treg 凋亡率随血必净作用剂量增加而升高。同时,抗 CD3/CD28+LPS+血必净组 Treg 凋亡率较抗 CD3/CD28+血必净组有所降低,而 Foxp3 和 CTLA-4 表达水平明显增强;抗 CD3/CD28 处理与对照组比较,Foxp3 和 CTLA-4 表达平均荧光强度随凋亡率增加而降低,但抗 CD3/CD28+LPS 组与对照组比较,Foxp3 和 CTLA-4 表现为荧光强度不随凋亡率增加而降低,反而接近或略高于对照组,IL-10 分泌明显高于对照组,这可能与 LPS 上调了 Treg 抑制活性有关,通过细胞接触机制和分泌抑制性细胞因子发挥对效应 T 细胞的抑制功能^[16]。值得一提的是,低剂量血必净组正常 Treg 和 LPS 诱导 Treg 凋亡率分别较抗 CD3/CD28 组、抗 CD3/CD28+LPS 组明显升高,但是 Foxp3 和 CTLA-4 表达水平并未随 Treg 凋亡增加而下降,反而均有所上调,其确切原因尚不清楚,推测可能与不同剂量血必净在体外对 Treg 活性具有双向调节作用有关,当血必净剂量超过 5 mg/ml 时,Treg 免疫抑制活性开始明显下调。因此,实际应用血必净的干预剂量应高于 5 mg/ml,这样才能通过促进 Treg 凋亡、降低 Foxp3 和 CTLA-4 表达水平进而改善脓毒症的免疫抑制状态。

参考文献

[1] Zheng SG, Meng L, Wang JH, et al. Transfer of regulatory T cells generated ex vivo modifies graft rejection through induction of tolerogenic CD4⁺CD25⁺ cells in the recipient. *Int Immunol*, 2006, 18(2): 279-289.

[2] Levings MK, Sangregorio R, Galbiati F, et al. IFN- α and IL-10 induce the differentiation of human type 1 T regulatory cells. *J Immunol*, 2001, 166(9): 5530-5539.

[3] Weaver CT, Hatton RD, Mangan PR, et al. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu Rev Immunol*, 2007, 25: 821-852.

[4] Mucida D, Park Y, Kim G, et al. Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science*, 2007, 317(5835): 256-260.

[5] Taylor SR, Alexander DR, Cooper JC, et al. Regulatory T cells are resistant to apoptosis via TCR but not P2X7. *J Immunol*, 2007, 178(6): 3474-3482.

[6] Le NT, Chao N. Regulating regulatory T cells. *Bone Marrow Transplant*, 2007, 39(1): 1-9.

[7] 姚咏明. 免疫功能紊乱在脓毒症发病中的作用及意义. *中国危重病急救医学*, 2007, 19(3): 138-141.

[8] Venet F, Pachot A, Debard AL, et al. Increased percentage of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells during septic shock is due to the decrease of CD4⁺CD25⁻ lymphocytes. *Crit Care Med*, 2004, 32(11): 2329-2331.

[9] Curiel TJ, Coukos G, Zou L, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med*, 2004, 10(9): 942-949.

[10] 姚咏明. 关注调节性 T 细胞在脓毒症中的免疫学意义. *中华急诊医学杂志*, 2009, 18(2): 117-119.

[11] Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol*, 2003, 4(4): 330-336.

[12] Sakaguchi S, Wing K, Miyara M. Regulatory T cells-a brief history and perspective. *Eur J Immunol*, 2007, 37(Suppl 1): S116-123.

[13] 姚咏明, 盛志勇. 脓毒症防治学. 北京: 科学技术文献出版社, 2008: 544-570.

[14] 李银平, 乔佑杰, 武子霞, 等. 血必净注射液对脓毒症大鼠高迁移率蛋白 B1 的影响. *中国危重病急救医学*, 2007, 19(4): 239-241.

[15] 王文江, 姚咏明, 威力明, 等. 血必净注射液对烧伤延迟复苏大鼠器官功能及死亡率的影响. *中国危重病急救医学*, 2006, 18(2): 16-18.

[16] 戴新贵, 姚咏明, 艾子航. 脓毒症大鼠调节性 T 细胞凋亡对辅助性 T 细胞漂移的影响及血必净注射液的干预作用. *中国危重病急救医学*, 2009, 21(3): 135-138.

(收稿日期: 2009-12-13)

(本文编辑: 李银平)

• 消息 •

中国科技信息研究所万方数据 2009 年版《中国期刊引证报告》(扩刊版)
——基础医学类期刊影响因子和总被引频次及中国医学类期刊影响因子前 15 位排序表

期刊名称	影响因子	排位	期刊名称	总被引频次	排位	期刊名称	影响因子	排位
中国疫苗和免疫	2.143	1	中华医院管理杂志	4 256	1	中西医结合学报	1.286	1
中国危重病急救医学	1.780	2	中国危重病急救医学	3 942	2	中国中西医结合杂志	1.266	2
中华医院管理杂志	1.720	3	中华麻醉学杂志	3 723	3	中国中药杂志	1.072	3
中国医院管理	1.438	4	中国医院管理	3 261	4	针刺研究	0.958	4
中华高血压杂志	1.351	5	中国病理生理杂志	2 942	5	世界科学技术-中医药现代化	0.950	5
免疫学杂志	1.197	6	中国健康心理学杂志	2 207	6	中国中西医结合急救杂志	0.907	6
中国健康心理学杂志	0.878	7	中华血液学杂志	2 163	7	中医杂志	0.835	7
中国病理生理杂志	0.792	8	解放军医学杂志	2 114	8	中国中医药科技	0.824	8
中国寄生虫学与寄生虫病杂志	0.777	9	中华高血压杂志	2 032	9	中国针灸	0.823	9
中华病理学杂志	0.760	10	医疗卫生装备	1 941	10	中华中医药杂志	0.781	10
中华男科学杂志	0.759	11	中国疫苗和免疫	1 922	11	中草药	0.772	11
中华麻醉学杂志	0.758	12	解放军医院管理杂志	1 908	12	上海针灸杂志	0.770	12
中国实验血液学杂志	0.736	13	中华病理学杂志	1 873	13	中药药理与临床	0.746	13
解放军医院管理杂志	0.726	14	中国人兽共患病学报	1 721	14	中药材	0.721	14
细胞与分子免疫学杂志	0.715	并列 15	免疫学杂志	1 672	15	吉林中医药	0.719	15
医疗卫生装备	0.715	并列 15						