

# 幽门螺杆菌感染者的生存竞争优势

张卫民, 赖卓胜, 周殿元

张卫民, 赖卓胜, 周殿元, 中国人民解放军第一军医大学南方医院全军消化病研究所 广东省广州市 510515  
张卫民, 男, 湖北省荆州市人, 满族. 1986 年第四军医大学学士, 1994 年第一军医大学硕士, 副主任医师. 主要从事消化系统疾病的微生态及肿瘤应用基础研究.

项目负责人: 张卫民, 510515, 广东省广州市同和, 中国人民解放军第一军医大学南方医院全军消化病研究所. weigert@163.com

电话: 020-61641536 传真: 020-61647788

收稿日期: 2003-06-06 接受日期: 2003-08-25

## Survival advantage in hosts with *H pylori* infection

Wei-Min Zhang, Zou-Shen Lai, Dian-Yuan Zhou

Wei-Min Zhang, Zou-Shen Lai, Dian-Yuan Zhou. Institute for Digestive Disease, the First Military Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China

Correspondence to: Wei-Min Zhang, Chinese PLA Institute for Digestive Disease, the First Military Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China.

Received: 2003-06-06 Accepted: 2003-08-25

## Abstract

**AIM:** To study the *in vitro* killing effects of cecropin-like antibacterial peptide from *H pylori* Hp (2-20) on the gastrointestinal bacterial pathogens and to explore the survival advantage to the host of infection with *H pylori*.

**METHODS:** The inhibition zone assay was used to determine anti-bacterial activity and lethal concentrations of *H pylori* antibacterial peptide Hp (2-20) on the gastrointestinal bacterial pathogens. The rate of killing of *E.coli*K<sub>12</sub>D<sub>31</sub> (standard strain) by Hp (2-20) was estimated by counting viable bacteria based on counting of colonies grown in Luria-Bertani plate. The cytotoxicity of the Hp (2-20) peptides on human gastric epithelial cell line was measured by trypan blue exclusion test.

**RESULTS:** *In vitro* studies, the Hp (2-20) destroyed the gastrointestinal bacterial pathogens such as *Shigella flexneri*, *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi* and enteropathogenic *E.coli*. The lethal concentrations (LC) were 65-197  $\mu\text{mol/L}$ . The viable bacterial count dropped to zero after 12 min incubation with Hp (2-20) concentration closed to the LC value. The Hp (2-20) was inactive against the strains of *Yersinia enterocolitica* and *Staphylococcus aureus* and had much higher LC (over 1 014  $\mu\text{mol/L}$ ). The killing effects of Cecropin B were more pronounced than *Helicobacter* peptide Hp (2-20). The synthetic peptide Hp(2-20) showed no lytic or toxic activity against the human gastric epithelial cell line GES-1.

**CONCLUSION:** The cecropin-like antibacterial peptide from *H pylori* Hp (2-20) is active against faster-growing gastrointestinal bacterial pathogens. There is no effect on the human gastric epithelial cells. *H pylori* may actually have beneficial effects on infected carriers who are heavily ex-

posed to other gastrointestinal pathogens.

Zhang WM, Lai ZS, Zhou DY. Survival advantage in hosts with *H pylori* infection. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(6):1321-1324

## 摘要

**目的:** 幽门螺杆菌(*H pylori*)可产生*H pylori*源杀菌肽样抗菌肽,这种多肽与昆虫杀菌肽cecropins的结构和功能类似. 我们研究*H pylori*源杀菌肽样抗菌肽Hp (2-20)对消化道常见致病菌的杀伤作用,探讨*H pylori*感染者的生存竞争优势.

**方法:** 采用琼脂扩散法检测Hp (2-20)对消化道常见致病菌的抗菌活性及致死浓度,平板菌落计数法检测Hp (2-20)的抑菌率. 采用染料排斥试验测定Hp (2-20)对胃黏膜上皮细胞生长的影响.

**结果:** Hp (2-20)对消化道常见致病菌福氏志贺菌、伤寒、副伤寒沙门菌和致病性大肠杆菌具有杀伤作用,致死浓度为 65-197  $\mu\text{mol/L}$ ,并可在 12 min 内完全抑制细菌生长. 但小肠结肠炎耶氏杆菌及金黄色葡萄球菌对Hp (2-20)不敏感,致死浓度>1 014  $\mu\text{mol/L}$ . Hp (2-20)的杀菌作用明显低于Cecropin B,对胃黏膜上皮细胞无裂解.

**结论:** *H pylori* 源杀菌肽样抗菌肽 Hp (2-20)可抑制胃肠道内快速繁殖的致病菌的生长,对胃黏膜上皮细胞无影响. 感染Hp 的宿主可能拥有生存竞争优势.

张卫民, 赖卓胜, 周殿元. 幽门螺杆菌感染者的生存竞争优势. 世界华人消化杂志 2004;12(6):1321-1324

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1321.asp>

## 0 引言

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H pylori*)感染在世界范围普遍存在,估计约有半数以上的人口胃内有*H pylori*定居.*H pylori*感染是慢性胃炎和消化性溃疡的重要病因,与胃癌和胃黏膜相关淋巴组织淋巴瘤的发生也密切相关<sup>[1-4]</sup>. 但仍有感染的正常人存在,*H pylori*的致病机制也不清楚. 1999年,Putsep et al 发现<sup>[1]</sup>:*H pylori*可产生杀菌肽样抗菌多肽(cecropin-like antibacterial peptide). 这种来源于*H pylori*核糖体蛋白L1 (ribosomal protein L1, rpL1)的N-端肽,在结构与功能的许多方面与杀菌肽(cecropins)相似. 如*H pylori*源抗菌肽具有较强的抗菌作用,但抗菌活性明显低于cecropin A及猪小肠抗菌肽cecropin P1. *H pylori*源抗菌肽Hp (2-20)对包括白色念珠菌(*Candida albicans*)在内的多种真菌具有强烈

的杀伤作用. *H. pylori* 源抗菌肽的作用机制与杀菌肽相似, 可能是通过破坏细胞的膜性结构发挥作用. *H. pylori* 源杀菌肽样抗菌肽与杀菌肽类似, 不裂解真核细胞. 此外, *H. pylori* 自身可耐受 *H. pylori* 源抗菌肽及天然抗菌肽 cecropins 而不被杀灭. 我们研究 *H. pylori* 源杀菌肽样抗菌肽 Hp (2-20) 对消化道常见致病菌的杀伤作用, 探讨 *H. pylori* 产生抗菌肽的临床及流行病学意义及 *H. pylori* 感染者的生存竞争优势.

## 1 材料和方法

1.1 材料 *H. pylori* 源杀菌肽样抗菌肽 Hp (2-20) 为来源于 *H. pylori* RpL1N- 端第 2-20 位多肽, 由美联(西安)生物科技有限公司合成并提供质谱图, 纯度为 95%. RpL1 及 Hp (2-20) 的一级结构参考(FEBS Lett 1999; 451:249-52)及 GenBank, Swiss-Prot. 胃黏膜上皮细胞株 GES-1 由北京市肿瘤防治研究所细胞遗传室提供. 实验所用致病菌标准株来自第一军医大学热卫系. 抗菌肽活性测定标准菌 *E. coli* K12D31 由华南农业大学蚕桑系黄自然教授惠赠. 杀菌肽 B (cecropin B)、胰化蛋白胨、酵母提取物购自 Sigma 公司. 其他试剂为国产分析纯试剂. 胎牛血清购自杭州四季清生物工程材料有限公司(批号: 20011212). Petri 平皿为康宁(Coning)公司产品.

1.2 方法 实验菌株均培养于 LB (Luria-Bertani) 液体或琼脂培养基. 细菌计数采用平板菌落计数法. 小肠结肠炎耶氏杆菌于 28 °C, 其余菌株于 37 °C 振荡 3-5 h 至对数生长期, 使活菌数达  $10^{11}$ /L. 抗菌肽活性及致死浓度测定采用琼脂扩散法(EMBO J 1983; 2:571-576. Eur J Biochem 1982; 127:207-217). 抗菌肽活性测定标准菌 *E. coli* K12D31 培养于 LB (Luria-Bertani) 液体培养基, 于 37 °C 振荡 3-5 h 至对数生长期, 使活菌数达  $10^{11}$ /L 备用. 在直径 8.65 cm (内径) Petri 平皿中, 将标准菌株 *E. coli* K12D31 均匀混入 10 mL 45-50 °C LB 琼脂培养基, 使活菌数最终达  $10^9$ /L, 凝固后打出 2.7 mm 直径孔穴. 将待测抗菌肽倍比稀释成不同剂量后( $n$ ), 按 6  $\mu$ L/孔加入孔穴, 培养 12 h 后测定抑菌圈直径. 阳性对照采用杀菌肽 B (cecropin B). 根据文献(EMBO J 1983; 2:571-576)抑菌圈直径的平方( $d^2$ , 单位为 cm)与孔穴中的样品量的对数( $\log n$ ,  $n$  的单位为 nmol/L)呈线性关系. 采用 SPSS 10.0 统计软件, 根据  $d^2$  与  $\log n$  的线性关系, 取得线性回归方程及斜率( $K$ )和截率( $L$ ). 根据文献(Eur J Biochem 1982; 127:207-17)将  $\alpha$  (琼脂培养基的厚度, 单位为 cm)、截率  $L$  和斜率  $K$  代入下列方程:  $C_L = 2.93/(\alpha K 10^{L/K})$ ,  $C_L$  为致死浓度(lethal concentration, 单位为  $\mu$ mol/L).

抗菌肽活性测定标准菌 *E. coli* K12D31 于 LB 液体培养基中培养至对数生长期. 调整细菌数至约  $10^8$ /L, 加入 Hp (2-20) 使终浓度为 60  $\mu$ mol/L, 间隔 2 min 吸取菌液 20  $\mu$ L, 混入约 10 mL 45-50 °C LB 琼脂培养基. 阳性对照中加入 cecropin B 终浓度为 0.35  $\mu$ mol/L, 阴性对照中未加入任何多肽. 存活细菌数采用平板菌落计

数法计数. 胃黏膜上皮细胞株 GES-1 细胞 37 °C 50 mL/L  $CO_2$  饱和湿度培养于 RPMI 1640 培养基(内含灭活胎牛血清及抗菌素), 取对数生长期细胞备用. 按每孔 0.9 mL 含细胞数  $1.5 \times 10^5$ , 将 GES-1 细胞接种于 96 孔细胞培养板, 每孔加 0.1 mL 含 Hp (2-20) 及杀菌肽 cecropin B 的培养液, 使终浓度分别为 200  $\mu$ L 和 20  $\mu$ mol/L. 对照组(Control), 加 0.1 mL RPMI 1640 培养基. 培养 2 及 24 h 后, 4 g/L 麝酚蓝染色、计数活细胞(染料排斥试验).

## 2 结果

2.1 *H. pylori* -CABP 对消化道常见菌的抗菌活性 以 cecropin B 对大肠杆菌 *E. coli* K12D31 的作用为例, 介绍致死浓度(LC)的计算过程. cecropin B 的  $M_r$  为 3 835.7. 经回归分析(regression)得直线方程如下:  $Y = 1.447 + 0.88X$ . 其中  $Y: d^2$ ,  $X: \log n$ , 斜率  $k = 0.88$ , 截率  $l = 1.447$ ,  $a = 0.17$  cm, 代入方程  $C_L = 2.93/(a k 10^{L/K})$  得: cecropin B 对大肠杆菌 *E. coli* K12D31 的 LC 为 0.437  $\mu$ mol/L. 同理推算对其他致病菌的 LC (表 1). *H. pylori* 源杀菌肽样抗菌肽 Hp (2-20) 的杀菌作用明显低于杀菌肽 B. 但 Hp (2-20) 对消化道常见致病菌如福氏志贺菌(即痢疾杆菌)、伤寒、副伤寒沙门菌和致病性大肠杆菌均有杀伤作用, LC 为 65-197  $\mu$ mol/L. 而小肠结肠炎耶氏杆菌及金黄色葡萄球菌对 Hp (2-20) 不敏感,  $LC > 1\ 014$   $\mu$ mol/L, Hp (2-20) 浓度增加仍未见杀伤作用. 在大肠杆菌 *E. coli* K12D31 (标准菌) 培养物中, 加入 Hp (2-20) 及杀菌肽 B 使终浓度接近致死浓度(分别为 60 和 0.35  $\mu$ mol/L), 分别在 10 min 和 8 min 内大肠杆菌 *E. coli* K12D31 的活菌数降至 0 (图 1).

2.2 *H. pylori* -CLAP 对胃黏膜上皮细胞 GES-1 的影响 Hp (2-20) 终浓度为 200  $\mu$ mol/L、cecropin B 的终浓度 20  $\mu$ mol/L. 细胞培养 24 h, Hp (2-20) 和 cecropin B 组细胞的生长与未加任何多肽的对照组生长基本一致, 无细胞生长抑制(图 2).

表 1 *H. pylori* -CABP 和 cecropin B 对消化道常见致病菌的致死浓度 ( $\mu$ mol/L)

实验菌株	Hp (2-20)	Cecropin B
<i>E. coli</i> K12D31	65	0.4
肠致病性 <i>E. coli</i>	137	0.2
福氏志贺菌	122	0.2
伤寒沙门菌 "O"	128	0.3
伤寒沙门菌 "H"	99	0.8
甲型副伤寒沙门菌	197	0.4
乙型副伤寒沙门菌	184	2.1
小肠结肠炎耶氏杆菌	>1 014	> 9.6
金黄色葡萄球菌	>1 014	> 9.6
金黄色葡萄球菌	>1 014	> 9.6

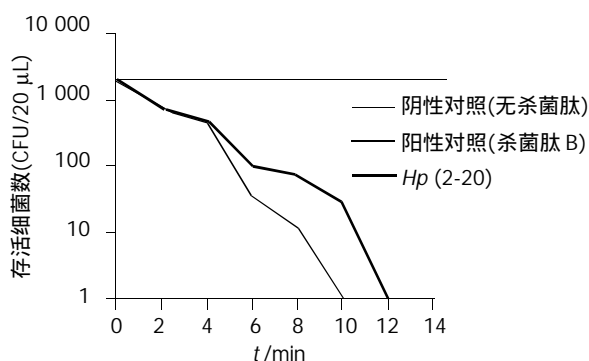


图1 H pylori-CLAP, cecropin B对大肠杆菌 E.coli K12D31 的杀菌率.

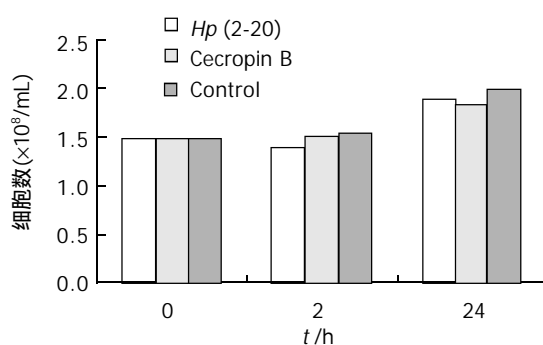


图2 Hp (2-20)对胃黏膜上皮细胞 GES-1 生长的影响.

### 3 讨论

幽门螺杆菌(H pylori)感染在世界范围普遍存在, 估计约有半数以上的人口胃内有H pylori定居<sup>[5-6]</sup>. H pylori感染是慢性胃炎和消化性溃疡的重要病因, 与胃癌和胃黏膜相关性淋巴瘤的发生也密切相关<sup>[7]</sup>. 但H pylori感染的临床和流行病学意义复杂, 其结局取决于H pylori菌株的变异、环境共同致病因素和感染者的个体差异<sup>[8-11]</sup>. 作为一种共生菌, H pylori与其人类宿主可能是互惠的, 或者至少人类可耐受H pylori的定殖<sup>[12]</sup>. 研究表明, 无H pylori感染的个体患食管反流疾病、Barrett食管和食管腺癌的危险性较大; H pylori感染对婴儿腹泻也有保护作用; 但对大多数个体, H pylori感染对发病率和死亡率无影响<sup>[13-14]</sup>. H pylori产生抗菌肽(antibacterial peptides)是对H pylori感染者有益的证据之一. 抗菌肽是天然免疫的主要效应分子<sup>[15-16]</sup>, 是有生物活性的小分子活性多肽, 具有强碱性、热稳定性以及广谱抗微生物作用等特点. 分子质量2-7 ku, 具有抗细菌、病毒、真菌等几乎所有种类微生物的作用, 还具有抗寄生虫、杀伤肿瘤细胞等功能, 又称为“antimicrobial peptides”、“peptide antibiotics”. 但抗菌肽已在国内被广泛采用, 并且习惯上不包括那些在代谢过程中通过酶促反应合成的多肽性质的抗生素, 如杆菌肽、多粘菌素E、短杆菌肽S等, 而特指由基因编码在核糖体上合成的具有生物活性的多肽.

基因编码的抗菌肽不仅在动物、植物中存在, 同样在细菌中也被发现. H pylori可产生杀菌肽样抗菌多肽(cecropin-like antibacterial peptide). 这种基因编码的来

源于H pylori核糖体蛋白L1(ribosomal protein L1, rpL1)的N-端肽, 在结构与功能的许多方面与杀菌肽(Cecropins)相似. 天然杀菌肽可杀灭大多数致病菌, 同时对正常细胞无裂解. H pylori抗菌肽与其相似. cecropin B对肿瘤细胞的IC<sub>50</sub>(半效抑制浓度)多在8-18 µmol/L间<sup>[9]</sup>, 本研究显示Hp(2-20)浓度为200 µmol/L仍未见胃黏膜上皮细胞GES-1细胞裂解, 肠道内G<sup>-</sup>杆菌致病菌如痢疾杆菌、伤寒杆菌较G<sup>+</sup>菌如葡萄球菌、小肠结肠炎耶氏杆菌对H pylori抗菌肽敏感. 而文献报道H pylori抗菌肽对H pylori本身也无裂解<sup>[1]</sup>. 可能的原因是, cecropins是通过与细菌细胞壁LPS(脂多糖)的二磷酸基脂质A结合发挥杀伤作用, 而H pylori及G<sup>+</sup>菌的细胞壁脂质A磷酸盐含量低, 因此可抵抗杀菌肽的作用<sup>[1]</sup>. H pylori抗菌肽对痢疾杆菌、伤寒杆菌等胃肠道常见致病菌较葡萄球菌这类非常见的胃肠道致病菌敏感, 对H pylori同时对H pylori宿主本身均有意义. 大多数细菌约20 min即可繁殖一代, 而H pylori源抗菌肽可在细菌的倍增时间内杀灭该菌. 表明H pylori释放的杀菌肽样抗菌肽可抑制胃肠道内快速繁殖的有害微生物. 已有研究证实, H pylori在体内存在“自我裂解(autolysis)”现象<sup>[17]</sup>. H pylori采取“利他性裂解”, 即一些胃腔内的H pylori的裂解释放抗菌肽, 有利于胃腔内其他H pylori的生存. 同时对胃肠道内其他病原菌的严重感染发挥有益作用. 因此, 感染H pylori的宿主可能拥有生存竞争优势. 目前, 已有在进行H pylori根除治疗时发生难辨梭菌感染导致伪膜肠炎的报道. H pylori的抗生素根除法导致的一些病变可能直接或间接与胃肠道内的正常微生物区系(包括H pylori)被改变有关<sup>[18]</sup>. 但H pylori感染可降低胃的泌酸能力, 这将削弱抵御其他病原菌感染的天然屏障而增加感染的机会. 深入研究H pylori与宿主及其与其他致病菌的相互关系<sup>[19]</sup>, 有助于解释这些相互矛盾的结果.

### 4 参考文献

- 张万岱, 徐智民. 幽门螺杆菌研究现状及共识. 世界华人消化杂志 2000;8:1084-1088
- 张万岱, 萧树东, 胡伏莲, 胡品津, 徐智民. 幽门螺杆菌若干问题的共识意见. 世界华人消化杂志 2000;8:219-220
- 全俊, 范学工. 幽门螺杆菌感染与胃癌发生的实验研究进展. 世界华人消化杂志 1999;7:1068-1069
- Xue FB, Xu YY, Wan Y, Pan BR, Ren J, Fan DM. Association of H pylori infection with gastric carcinoma: a Meta analysis. World J Gastroenterol 2001;7:801-804
- 徐智民, 张万岱, 周殿元. 幽门螺杆菌的研究进展. 世界华人消化杂志 2003;11:635-639
- 刘海峰, 刘为纹, 房殿春, 王国安, 滕小春. 幽门螺杆菌感染与胃癌前病变变化的关系. 世界华人消化杂志 2002;10:912-915
- Wang RT, Wang T, Chen K, Wang JY, Zhang JP, Lin SR, Zhu YM, Zhang WM, Cao YX, Zhu CW, Yu H, Cong YJ, Zheng S, Wu BQ. Helicobacter pylori infection and gastric cancer: evidence from a retrospective cohort study and nested case-control study in China. World J Gastroenterol 2002;8:1103-1107
- Pena A. Genetic factors determining the host response to Helicobacter pylori. World J Gastroenterol 2000;6:624-625
- Wang KX, Li CP, Cui YB, Tian Y, Yang QG. L-forms of H pylori. World J Gastroenterol 2003;9:525-528
- Serin E, Yilmaz U, Künefecci G, Özer B, Gümrüdülu Y, Guçlu M, Kayaselcuk F, Boyacıoğlu S. Serum positive cagA in patients

- with non-ulcer dyspepsia and peptic ulcer disease from two centers in different regions of Turkey. *World J Gastroenterol* 2003;9:833-835
- 11 Guo XL, Wang LE, Du SY, Fan CL, Li L, Wang P, Yuan Y. Association of cyclooxygenase-2 expression with *Hp-cagA* infection in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2003;9:246-249
- 12 Hou P, Tu ZX, Xu GM, Gong YF, Ji XH, Li ZS. *Helicobacter pylori* vacA genotypes and cagA status and their relationship to associated diseases. *World J Gastroenterol* 2000;6:605-607
- 13 Blaser MJ, Berg DE. *Helicobacter pylori* genetic diversity and risk of human disease. *J Clin Invest* 2001; 107:767-773
- 14 Rothenbacher D, Blaser MJ, Bode G, Brenner H. An inverse relationship between gastric colonization by *Helicobacter pylori* and diarrheal illnesses in children: results of a population-based cross-sectional study. *J Infect Dis* 2000;182:1446-1449
- 15 Boman HG. Innate immunity and the normal microflora. *Immunol Rev* 2000;173:5-16
- 16 Hancock RE. Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *Lancet Infect Dis* 2001;1:156-164
- 17 Couper RT, Huynh H, Butler RN. Gene encoded antibacterial activity in *Helicobacter pylori*. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000; 31:327-328
- 18 Vandenplas Y. *Helicobacter pylori* infection. *World J Gastroenterol* 2000;6:20-31
- 19 王承党, 李劲松, 陈玉丽. CagA 和 VacA 不能作为幽门螺杆菌相关性疾病的预测因子. 世界华人消化杂志 2002;10:533-535

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

## World Journal of Gastroenterology 编辑

经《World Journal of Gastroenterology, WJG》编委审稿后, 非常优秀的论文可直接录用, 通知作者按照编委审稿意见及本刊的书写格式进行修改, 符合本刊要求的论文经第一和第二编辑语言处理后方可进行排版. 排版后校样由责任编辑审读全文, 无语法及拼写错误方可付印. WJG 为了确保其出版的每篇论文的编辑质量, 特制定了编辑要点.

### 1 题名

应简明扼要有特色, 突出主题, 不宜过长; 应直入主题, 避免使用“探讨、研究、分析、观察、调查、探索”等词语; 不用定冠词 The, 一般不使用缩写字(常用缩写字例外). 具体写作的要求见《科技论文英文题名的撰写》<http://www.wjgnet.com/1009-3079/new/26.asp>.

### 2 摘要

采用结构式摘要. 目的部分应直入主题, 如 To investigate the, 可简要交代背景或该课题目前开展情况; 方法(包括材料)和结果(包括重要数据)部分使用过去时, 结论部分使用一般现在时. 人称和语态使用应自然, 避免使用“悬垂分词”. 摘要的第一句不要重复文章题名, 应增加变化, 补充一些细节. 具体写作要求见《科技论文英文摘要的撰写》<http://www.wjgnet.com/1009-3079/new/25.asp>.

### 3 正文

(1) 短句子: 提倡使用短句子, 尽量避免一个句子使用多个从句. 拼写正确, 时态一致、准确. 方法及结果部分一般使用过去时. 讨论部分, 引用文献叙述一般使用过去时, 结论性语言使用一般现在时. 要注意主句和从句的时态呼应及文中上下文含意的呼应; 应尽量对照其中文稿以求如实表达其原意; 使用分词短语作状语和定语时, 一定要注意其语态的正确使用, 以求其前后呼应; 应注意用词的对照一致及词语的固定搭配等; 在编辑过程中, 一定要核对各基本数据及其百分比. 此外, 还应注意标点符号的正确使用与拉丁语名词的单复数. (2) 数字: 出现在句首的数字应写为: Sixteen cases...或 A total number of 16 cases 而不能写为: 16 cases, 100 patients, 等. (3) 缩略词: 首次使用词语时, 应先写出全称然后在括号内写出其缩写词. (4) 斜体: 细菌、病毒、动植物的拉丁学名、统计学符号、基因符号、内切酶(前3个字符)、量符号、拉丁词如 *in vivo*, *in situ*, *et al* 等及参考文献中的刊名应使用斜体. (5) 图表: 不要重复使用, 已用图表示的内容不再使用表格. 表和图题的说明应与正文的文题一样, 文内图表的标注使用句子表示时应使用一般现在时而不使用过去时, 如 The data are shown in Table 1. 图表置正文内, 图表内注解首字母大写, 其余小写.

### 4 参考文献

应按先后顺序在正文内标出. 参考文献全体作者是否与首页一致, 题名与首页是否一致, 刊名与首页是否一致, 年与首页是否一致, 卷号与首页是否一致, 起页 - 止页与首页是否一致, PMID 号是否与首页一致.

5 其他 (1) 注意字符间空格, 文稿要隔行打印. (2) 使用正式文体, 不用口语体和非规范缩写词. 如 isn't, aren't, hasn't, hadn't, haven't, don't, can't, wouldn't, a lot of, a bit, too (also), thru (through), exam (examination), lab (laboratory) 等. (3) 要客观地叙述方法和结果, 用词要质朴无华, 避免使用带感情色彩或广告式宣传的词语. (4) 可用动词时应尽量避免使用动词的名词形式. (5) 正确使用冠词, 对可数词应尽量使用复数形式. (6) 应多用预置短语分开或用连字符断开名词词组, 避免使用长系列形容词或名词修饰名词. (7) 尽量应用重要的事实开头, 避免短语或从句开头. (8) 涉及他人的工作或研究成果时, 尽量列出其姓名, 两名以上的作者一定要用“et al”. 具体写作要求见《科技论文的写作要点》<http://www.wjgnet.com/1009-3079/new/31.asp>.