

结肠癌组织中CASP9的表达及其多态性

何向民, 王莉莉, 方长清, 刘树立, 娄毅, 李建华

何向民, 中国医科大学附属第一医院消化内科 辽宁省沈阳市 110001

王莉莉, 娄毅, 中国医科大学医学遗传学教研室 辽宁省沈阳市 110001

方长清, 刘树立, 李建华, 中国医科大学病理教研室 辽宁省沈阳市 110001

何向民, 副教授, 主要从事消化系统肿瘤的研究工作。

辽宁省科技基金资助项目, No. 2005225003-6

作者贡献分布: 此课题由何向民, 王莉莉, 娄毅及李建华设计; 研究过程由何向民, 王莉莉, 方长清, 刘树立, 娄毅操作完成; 数据分析由王莉莉, 娄毅及李建华完成; 本论文写作由何向民, 王莉莉, 娄毅及李建华完成。

通讯作者: 李建华, 110001, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学病理教研室. louyi_1963_1019@163.com

电话: 024-23256666

收稿日期: 2008-05-10 修回日期: 2008-06-05

接受日期: 2008-06-17 在线出版日期: 2008-07-28

Expression of CASP9 gene and its polymorphism distribution in colon cancer

Xiang-Min He, Li-Li Wang, Chang-Qing Fang,
Shu-Li Liu, Yi Lou, Jian-Hua Li

Xiang-Min He, Department of Digestive Medicine, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Li-Li Wang, Yi Lou, Department of Medical Genetics, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Chang-Qing Fang, Shu-Li Liu, Jian-Hua Li, Department of Pathology, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Supported by: the Science and Technology Foundation of Liaoning Province, No. 2005225003-6

Correspondence to: Jian-Hua Li, Department of Pathology, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. louyi_1963_1019@163.com

Received: 2008-05-10 Revised: 2008-06-05

Accepted: 2008-06-17 Published online: 2008-07-28

Abstract

AIM: To explore the expression of CASP9 in colon cancer, and single nucleotide polymorphism (SNP) distribution of CASP9 gene in colon cancer patients and normal individuals.

METHODS: Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect the expression of CASP9 gene in 170 colon cancer patients and their corresponding normal colon tissues. We analyzed the genotype of rs1052576 in CASP9 gene in 170 colon cancer patients and

100 normal people by PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). The SNP genotype frequency and allele frequency in patients and normal controls were analyzed by legally constituted authority statistical method.

RESULTS: In comparison with that in normal colon tissues, CASP9 gene expression was obviously down-regulated in 47% (80/170) colon cancer tissues ($P < 0.05$). The genotype and allele frequencies of rs1052576 located at exon 5 of CASP9 gene had significant difference between the two groups, and the G allele frequency in colon cancer patients was higher than that in the healthy controls ($\chi^2 = 9.99$, $P = 0.001$). The genotype frequency of rs1052576 in cancer patients was associated with the histological differentiation ($\chi^2 = 15.8$, $P = 0.003$).

CONCLUSION: CASP9 gene expression is down-regulated in colon cancer, and the G allele of rs1052576 in CASP9 gene is associated with the carcinogenesis of colon cancer.

Key Words: Colon Cancer; CASP9 gene; Single nucleotide polymorphism; Polymerase chain reaction

He XM, Wang LL, Fang CQ, Liu SL, Lou Y, Li JH. Expression of CASP9 gene and its polymorphism distribution in colon cancer. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(21): 2371-2375

摘要

目的: 探讨CASP9基因在结肠癌中的表达及其SNP多态位点在结肠癌患者和正常人中的分布情况。

方法: 应用RT-PCR方法检测170例结肠癌患者及对应癌旁正常组织中CASP9的表达情况; 应用限制性片段长度多态性技术结合测序, 分析结肠癌患者及100例正常人CASP9基因2个SNP位点基因型; 应用列联表法统计分析患者组和对照组各SNP位点基因型及等位基因频率。

结果: 47%(80/170)的结肠癌组织CASP9基因表达明显下调, 与癌旁正常组织相比差异有

■背景资料

凋亡和肿瘤的发生发展有着密切的关系, 也是肿瘤耐药和产生化疗副作用的重要原因。CASP9基因定位于1p36.3-p36.1, CASP9参与线粒体介导的凋亡途径。

■同行评议者

李瑜元, 教授, 广州市第一人民医院内科

■相关报道

有研究表明,在胃癌、皮肤黑色素瘤和白血病中都发现了caspase-9基因转录和翻译水平的下调,非小细胞肺癌中*CASP9*基因的单核苷酸多态位点rs1052576的等位基因频率和基因型频率的分布与正常人群存在差异。

统计学意义($P < 0.05$)。位于*CASP9*基因第5外显子的SNP位点rs1052576的基因型频率和等位基因频率在两组人群中的分布差异有统计学意义;患者组G等位基因频率明显高于对照组($\chi^2 = 9.99, P = 0.001$);基因型频率的分布与结肠癌的组织分化程度有关($\chi^2 = 15.8, P = 0.003$)。

结论: *CASP9*基因在结肠癌中低表达, rs1052576多态位点G等位基因和结肠癌的发生相关。

关键词: 结肠癌; *CASP9*基因; 单核苷酸多态; 聚合酶链反应

何向民, 王莉莉, 方长清, 刘树立, 姜毅, 李建华. 结肠癌组织中*CASP9*的表达及其多态性. 世界华人消化杂志 2008; 16(21): 2371-2375

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2371.asp>

0 引言

结肠癌是西方国家较常见的恶性肿瘤之一, 5年总体生存率约为40%^[1]。近年来, 随着国内生活水平的提高和生活习惯的改变, 我国结肠癌发病率亦呈逐渐升高的趋势。大量研究表明结肠癌的发生、发展是多基因畸变的结果。目前已经发现很多和结肠癌发生相关的基因, 如*RAS*基因家族、*ERBB*基因家族、*Myc*基因家族、*p53*等^[2-3]。凋亡和肿瘤的发生发展有着密切的关系, 也是肿瘤耐药和产生化疗、放疗副作用的重要原因。*CASP9*基因定位于1p36.3-p36.1, *CASP9*参与线粒体介导的凋亡途径^[4-5]。rs1052576位点位于*CASP9*基因第5外显子, 有研究表明该位点的G等位基因与胃癌和非小细胞肺癌有关^[6-7]。为探讨*CASP9*基因与结肠癌的分子遗传学联系, 我们研究*CASP9*基因在结肠癌中的表达, 进一步分析了*CASP9*基因内已知单核苷酸多态rs1052576位点在170个结肠癌患者及100个正常人中的分布情况, 分析其与结肠癌遗传易感性的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 中国医科大学附属第一医院2001-2007年新鲜手术切除结肠癌组织标本170例, 患者术前均未接受过放、化疗。其中男96例, 女74例, 年龄38-73岁。根据组织学分化程度: 高分化22例, 中分化100例, 低分化48例(黏液腺癌和印戒细胞癌归入低分化癌); 有淋巴结转移64例, 无转移106例; 有远处转移28例, 无转移142例; 临床Dukes分期: A期30例, B期66例, C期46例, D期28

例。癌旁结肠黏膜组织取自距肿瘤 ≥ 5 cm、外观正常的结肠黏膜。所有组织均经病理检查证实。

1.2 方法

1.2.1 半定量RT-PCR分析*CASP9*表达: 用TRIzol试剂提取结肠癌组织和癌旁正常结肠黏膜组织的总RNA。用逆转录酶和Oligo(dT)20引物合成cDNA。应用Primer3设计*CASP9*引物序列, 上游引物为: 5'-TGT GTC GGT CGA GAA GAT TG-3', 下游引物为: 5'-CTG CTC AAA GAT GTC GTC CA-3', 扩增长度349 bp。跨越cDNA865-1214位碱基序列。 β -actin作为内对照, 上游引物为: 5'-GTG GGG CGC CCC AGG CAC CA-3', 下游引物为: 5'-CTC CTT AAT GTC ACG CAC GAT TTC-3', 扩增长度498 bp^[4]。两对引物加入25 μ L PCR反应体系中, PCR反应条件为94℃变性45 s, 59℃复性45 s, 72℃延伸60 s, 共35个循环。RT-PCR产物经15 g/L琼脂糖胶分离, 用AlphaImage 2000自动成像仪(Alpha Innotech Corp., San Jose, CA)摄影, 用Fluorchem v2.0 Stand Alone软件分析RT-PCR产量。

1.2.2 SNP的选取及引物设计: rs1052576位于*CASP9*基因第5外显子。在<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>数据库获取rs1052576的序列信息。明确两侧基因组序列及SNP是否引起酶切位点改变。应用Primer3软件设计引物(Sangon公司合成)。rs1052576引物序列: CCT CCT GAG TAG CTG GGA TT/AAG GGT GTT TTG GAC ACA AG, 长度464 bp, 酶切后片段长度307 bp/157 bp(*Bst*u I)。应用常规饱和酚-氯仿法提取结肠癌患者及正常人外周静脉血基因组DNA。

1.2.3 目的片段扩增和酶切鉴定: 反应液总体积25 μ L, 其中基因组DNA约40 ng, 10 \times 反应缓冲液(MgCl₂ 15 mmol/L)2.5 μ L, dNTP(2.0 mmol/L)2.0 μ L, 上下游引物(20 μ mol/L)各0.5 μ L, Taq酶16.67 nkat。循环参数: rs1052576: 94℃变性8 min, 94℃50 s, 58℃50 s, 72℃50 s 35个循环, 72℃延伸5 min。所有PCR产物均经20 g/L琼脂糖凝胶电泳检测确认。*Bst*u I酶切鉴定rs1052576基因型。等位基因为G时能被*Bst*u I酶识别。酶切反应体系20 μ L: 其中PCR产物8 μ L, *Bst*u I 83.35 nkat, 10 \times 缓冲液2 μ L。37℃水浴过夜, 15 g/L琼脂糖凝胶电泳鉴定基因型。

统计学处理 应用Arlequin软件(<http://anthropologie.unige.ch/arlequin/methods.html>)检测病例组与对照组中的Hardy-weinberg平衡; 应用SPSS10.0软件统计分析患者组和对照组中基

表 1 *CASP9*基因表达与结肠癌临床病理参数的关系 (*n*)

病理参数	<i>CASP9</i> 基因表达		χ^2	<i>P</i>
	下调	无明显改变		
性别				
男	44	52	0.13	0.7184
女	36	38		
组织学分级				
低分化	16	32	17.71	0.0001
中分化	60	40		
高分化	4	18		
淋巴结转移				
有	27	37	0.97	0.3246
无	53	53		
远处转移				
有	10	18	1.73	0.1884
无	70	72		
Dukes分期				
A	16	14	1.98	0.5765
B	32	34		
C	22	24		
D	10	18		

因型频率、等位基因频率, 以及*CASP9*基因表达率是否存在差异。

2 结果

2.1 结肠癌组织*CASP9*基因表达 正常结肠黏膜组织中均有*CASP9*的表达, 而47%(80/170)结肠癌组织*CASP9*表达明显下调(图1), 与癌旁正常组织相比差异有统计学意义。分析*CASP9*基因表达与结肠癌临床病理参数的关系(表1), 结果表明其表达与患者年龄、性别、淋巴结转移、远处转移以及Dukes分期无关, 而仅与结肠癌组织学分化程度有关。

2.2 rs1052576酶切鉴定和统计分析 经Arlequin软件分析, 对照组和患者组中2个SNP位点基因型频率及等位基因频率均符合Hardy-weinberg平衡(图2)。患者组及正常对照组SNP位点基因型频率及等位基因频率有区别($P < 0.01$, 表2)。rs1052576位点患者组G等位基因频率高于对照组($\chi^2 = 9.99$, $P < 0.01$); 患者组与对照组相比, 3种基因型分布频率存在差异($\chi^2 = 12.76$, $P < 0.01$), AA基因型频率降低, AG基因型频率增高。进一步分析rs1052576基因型频率与患者组织分化程度有关($\chi^2 = 15.8$, $P = 0.003$, 表3)。

3 讨论

结直肠癌的发生、发展过程中涉及多种基因畸

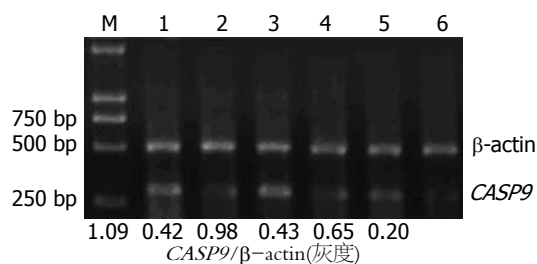


图 1 *CASP9*基因RT-PCR结果。M: DL2000 DNA Ladder; 1, 3, 5: 癌旁正常结肠黏膜组织; 2, 4, 6: 结肠癌组织。

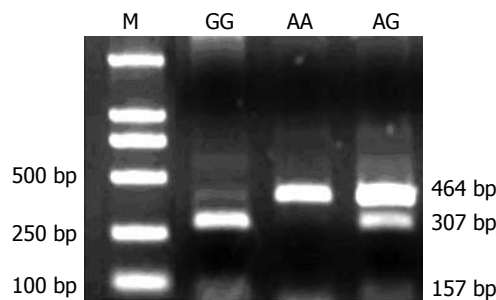


图 2 rs1052576 *BstU I* 酶切不同基因型。

变, 其确切机制至今仍不十分明确。有研究认为结直肠组织的恶性转化过程涉及多个途径, 如细胞周期和凋亡相关途径、Wnt通路和PI3K/Akt生存途径等^[8-10]。本实验研究了细胞周期和凋亡途径中的相关基因*CASP9*在结肠癌和癌旁结肠黏膜组织中的表达, 进一步分析了*CASP9*基因内已知单核苷酸多态rs1052576位点在170个结肠癌患者及100个正常人中的分布情况, 以探讨其在结肠癌形成过程中的生物学意义。

近年来发现恶性肿瘤的共同特征之一就是细胞失控性生长。细胞周期调控机制是一个复杂的蛋白互控系统, 某些基因的畸变往往导致细胞周期监控和驱动机制失控, 从而引起细胞周期启动、运行和终止异常, 使细胞增殖增加, 凋亡减少, 导致肿瘤形成。对细胞凋亡的耐受意味着肿瘤细胞逃避化疗药物治疗和免疫介导破坏的一个潜在机制。对于大多数抗肿瘤药物, 细胞凋亡始于细胞色素C/Apaf-1/caspase-9途径^[11-12]。失去激活细胞凋亡途径可以导致细胞对多种化疗药物的耐受。在dATP和ATP的作用下, Apaf-1/细胞色素C复合物通过CARD-CARD结构域相互作用与caspase-9前体结合, 从而激活caspase-9, 即成熟caspase-9从凋亡小体中释放出来^[13-15]。一旦与Apaf-1结合, caspase-9就会被细胞色素C和dATP激活, 进一步激活caspase-3, 从而引起细胞凋亡。caspase-3的激活依赖于caspase-9。

*CASP9*基因定位于1p36.3-p36.1, 编码的蛋

■创新盘点

本研究应用半定量RT-PCR方法发现在170例结肠癌中有80例出现了*CASP9*基因表达的明显下调, 进一步分析rs1052576基因型频率在结肠癌患者中的分布, 发现3种基因型的分布与结肠癌患者的性别、淋巴结转移、远处转移及临床分期无关, 与肿瘤的分化程度相关。

■应用要点

在结肠癌易感人群中筛查rs1052576位点的G等位基因有利于结肠癌的早期诊断与预防。

表 2 结肠癌患者rs1052576SNP位点基因型频率和等位基因频率 $n(\%)$

rs1052576分组	n	基因型频率			等位基因频率	
		GG	AG	AA	G	A
患者组	170	34(22.0) ^b	95(55.9) ^b	41(24.1) ^b	163(52.1) ^b	177(47.9) ^b
对照组	100	13(13.0)	42(42.0)	45(45.0)	68(34.0)	132(66.0)

^b $P < 0.01$ vs 对照组。

表 3 rs1052576基因型频率和结肠癌临床特征的关系 (n)

病理参数	基因型			χ^2	P
	GG	AG	AA		
性别					
男	21	52	23	0.50	0.779
女	13	43	18		
组织学分级					
低分化	13	19	16	15.8	0.003
中分化	13	68	19		
高分化	8	8	6		
淋巴结转移					
有	18	37	9	7.75	0.021
无	16	58	32		
远处转移					
有	8	11	9	3.78	0.151
无	26	84	32		
Dukes分期					
A	6	15	9	5.10	0.531
B	11	43	12		
C	9	26	11		
D	8	11	9		

白产物分子质量约为46 kDa, 广泛表达于人类的正常组织, 如神经组织、肌肉组织、肝脏、脾脏、胃和肺等^[16]。有研究表明, 在胃癌、皮肤黑色素瘤和白血病中都发现了caspase-9基因转录和翻译水平的下调^[17-18], 目前国内尚未有该基因在结肠癌中的表达研究。我们应用半定量RT-PCR技术发现在170例结肠癌中有80例出现了CASP9基因表达的明显下调, 而癌旁正常对照结肠黏膜组织却未发现明显改变。二者对比差异有统计学意义, 提示凋亡基因CASP9基因与结肠癌的发生相关。分析CASP9表达与结肠癌临床病理参数的关系, 发现其表达与患者年龄、性别、淋巴结转移、远处转移以及Dukes分期无关, 而仅与结肠癌组织学分化程度有关, 提示CASP9异常表达可能是结肠癌发生中的一个较晚期事件, 参与了结肠癌细胞的进一步恶性分化。

有研究表明, 在胃癌和非小细胞肺癌中CASP9基因的单核苷酸多态位点rs1052576的等位基因频率和基因型频率的分布与正常人群存在差异, rs1052576位点的G等位基因肿瘤的淋巴结转移有关^[6-7]。因此, 我们进一步研究该单核苷酸多态在结肠癌中的分布情况, 利用PCR-RFLP方法对170例结肠癌和100例正常人进行了rs1052576位点的基因型分析, 结果发现, rs1052576位点患者组G等位基因频率高于对照组($\chi^2 = 9.99$, $P < 0.01$); 患者组与对照组相比, 3种基因型分布频率存在差异($\chi^2 = 12.76$, $P < 0.01$), AA基因型频率降低, AG基因型频率增高, 这和其他学者的研究结果一致。进一步分析rs1052576基因型频率在结肠癌患者中的分布, 发现3种基因型的分布与结肠癌患者的性别、淋巴结转移、远处转移及临床分期无关, 与肿瘤的分化程度相关($\chi^2 = 15.8$, $P < 0.01$)。结果提示: rs1052576(Gln221Arg)位点位于CASP9基因第5外显子, 编码的氨基酸位于CASP9结构域。rs1052576位点的G等位基因与结肠癌的发生相关, 可能是由于蛋白质的空间结构的不同, 影响其在线粒体介导的凋亡caspase-3的激活, 进而阻碍了正常的细胞凋亡过程, 引起结肠癌的发生。因此, 在结肠癌易感人群中筛查rs1052576位点的G等位基因有利于结肠癌的早期诊断与预防。

4 参考文献

- 1 Pohl C, Hombach A, Kruis W. Chronic inflammatory bowel disease and cancer. *Hepato-gastroenterology* 2000; 47: 57-70
- 2 Yu KH, Wang WX, Ding YM, Li H, Wang ZS. Polymorphism of thymidylate synthase gene associated with its protein expression in human colon cancer. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 617-621
- 3 Janssen A, Schiffmann S, Birod K, Maier TJ, Wobst I, Geisslinger G, Grösch S. p53 is important for the anti-proliferative effect of ibuprofen in colon carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 365: 698-703
- 4 Soengas MS, Capodiceci P, Polsky D, Mora J, Esteller M, Opitz-Araya X, McCombie R, Herman JG, Gerald WL, Lazebnik YA, Cordon-Cardó C, Lowe SW. Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in

- malignant melanoma. *Nature* 2001; 409: 207-211
- 5 Fu WN, Bertoni F, Kelsey SM, McElwaine SM, Cotter FE, Newland AC, Jia L. Role of DNA methylation in the suppression of Apaf-1 protein in human leukaemia. *Oncogene* 2003; 22: 451-455
- 6 Lou Y, Fang CQ, Li JH. [A study on the expression of CASP9 gene and its polymorphism distribution in non-small cell lung cancer] *Zhonghua Yixue Yichuanxue Zazhi* 2007; 24: 59-62
- 7 方长清, 刘树立, 姜毅, 李建华. 胃癌组织中caspase 9的表达及其多态性变化. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 3190-3193
- 8 Lynch HT, Smyrk TC. Identifying hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *N Engl J Med* 1998; 338: 1537-1538
- 9 Worthley DL, Whitehall VL, Spring KJ, Leggett BA. Colorectal carcinogenesis: road maps to cancer. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 3784-3791
- 10 Rustgi AK. The genetics of hereditary colon cancer. *Genes Dev* 2007; 21: 2525-2538
- 11 Cecconi F, Alvarez-Bolado G, Meyer BI, Roth KA, Gruss P. Apaf1 (CED-4 homolog) regulates programmed cell death in mammalian development. *Cell* 1998; 94: 727-737
- 12 Fortin A, Cregan SP, MacLaurin JG, Kushwaha N, Hickman ES, Thompson CS, Hakim A, Albert PR, Cecconi F, Helin K, Park DS, Slack RS. APAF1 is a key transcriptional target for p53 in the regulation of neuronal cell death. *J Cell Biol* 2001; 155: 207-216
- 13 Robles AI, Bemmels NA, Foraker AB, Harris CC. APAF-1 is a transcriptional target of p53 in DNA damage-induced apoptosis. *Cancer Res* 2001; 61: 6660-6664
- 14 Ho AT, Li QH, Hakem R, Mak TW, Zacksenhaus E. Coupling of caspase-9 to Apaf1 in response to loss of pRb or cytotoxic drugs is cell-type-specific. *EMBO J* 2004; 23: 460-472
- 15 Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X. Apaf-1, a human protein homologous to C. elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 1997; 90: 405-413
- 16 Lemaire C, Godefroy N, Costina-Parvu I, Rincheval V, Renaud F, Trotot P, Bouleau S, Mignotte B, Vayssière JL. Caspase-9 can antagonize p53-induced apoptosis by generating a p76(Rb) truncated form of Rb. *Oncogene* 2005; 24: 3297-3308
- 17 Frank O, Brors B, Fabarius A, Li L, Haak M, Merk S, Schwindel U, Zheng C, Müller MC, Gretz N, Hehlmann R, Hochhaus A, Seifarth W. Gene expression signature of primary imatinib-resistant chronic myeloid leukemia patients. *Leukemia* 2006; 20: 1400-1407
- 18 Kuwahara D, Tsutsumi K, Oyake D, Ohta T, Nishikawa H, Koizuka I. Inhibition of caspase-9 activity and Apaf-1 expression in cisplatin-resistant head and neck squamous cell carcinoma cells. *Auris Nasus Larynx* 2003; 30 Suppl: S85-S88

■同行评价

本文探讨CASP9基因的表达式及其SNP多肽位点在结肠癌患者和正常人中的分布情况, 有一定新意, 研究对照设计合理, 具有较好的临床指导意义。

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 •

世界华人消化杂志正文要求

本刊讯 本刊正文标题层次为 0引言; 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参考文献. 序号一律左顶格写, 后空1格写标题; 2级标题后空1格接正文. 以下逐条陈述: (1)引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系. (2)材料和方法 应尽量简短, 但应让其他有经验的研究者能够重复该实验. 对新的方法应该详细描述, 以前发表过的方法引用参考文献即可, 有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可. (3)结果 实验结果应合理采用图表和文字表示, 在结果中应避免讨论. (4)讨论 要简明, 应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述, 也不应是大量文献的回顾. 图表的数量要精选. 表应有表序和表题, 并有足够具有自明性的信息, 使读者不查阅正文即可理解该表的内容. 表内每一栏均应有表头, 表内非公知通用缩写应在表注中说明, 表格一律使用三线表(不用竖线), 在正文中该出现的地方应注出. 图应有图序、图题和图注, 以使其容易被读者理解, 所有的图应在正文中该出现的地方注出. 同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图, 统一用一个注解分别叙述. 如: 图1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化. A: …; B: …; C: …; D: …; E: …; F: …; G: … 曲线图可按●、○、■、□、▲、△顺序使用标准的符号. 统计学显著性用: ^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ ($P>0.05$ 不注). 如同一表中另有一套 P 值, 则^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$; 第3套为^c $P<0.05$, ^d $P<0.01$. P 值后注明何种检验及其具体数字, 如 $P<0.01$, $t=4.56$ vs 对照组等, 注在表的左下方. 表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、-应上下对齐. “空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上等. 表图勿与正文内容重复. 表图的标目尽量用 t/min , $c/(\text{mol/L})$, p/kPa , V/mL , $t/^\circ\text{C}$ 表达. 黑白图请附黑白照片, 并拷入光盘内; 彩色图请提供冲洗的彩色照片, 请不要提供计算机打印的照片. 彩色图片大小 $7.5\text{ cm}\times 4.5\text{ cm}$, 必须使用双面胶条黏贴在正文内, 不能使用浆糊黏贴. (5)致谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐. (常务副总编辑: 张海宁 2008-07-28)