

小窝蛋白1和血管内皮生长因子在结直肠癌组织中的表达及临床意义

李远航

李远航, 辽宁省肿瘤医院肿瘤内科 辽宁省沈阳市 110001
李远航, 副主任医师, 博士研究生, 主要研究各种恶性肿瘤的内科治疗.

通讯作者: 李远航, 副主任医师, 110001, 辽宁省沈阳市, 辽宁省肿瘤医院肿瘤内科. li_yuanhang@sohu.com
收稿日期: 2011-04-27 修回日期: 2011-06-21
接受日期: 2011-06-28 在线出版日期: 2011-07-28

Clinical significance of expression of caveolin-1 and vascular endothelial growth factor in colorectal carcinoma

Yuan-Hang Li

Yuan-Hang Li, Department of Medical Oncology, Liaoning Provincial Cancer Hospital, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Correspondence to: Yuan-Hang Li, Department of Medical Oncology, Liaoning Provincial Cancer Hospital, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. li_yuanhang@sohu.com

Received: 2011-04-27 Revised: 2011-06-21

Accepted: 2011-06-28 Published online: 2011-07-28

Abstract

AIM: To detect the expressions of caveolin-1 (Cav-1) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in colorectal cancer and to analyze their correlation with the clinicopathological features of colorectal cancer.

METHODS: Immunohistochemistry was used to detect the expression of Cav-1 and VEGF in 83 colorectal carcinoma specimens and matched normal colorectal mucosal specimens.

RESULTS: The positive rate of Cav-1 expression was significantly lower in colorectal carcinoma than in normal colorectal mucosa (38.6% vs 81.9%, $P < 0.01$). VEGF was over-expressed in colorectal cancer compared to matched normal colorectal tissue (74.7% vs 13.3%, $P < 0.01$). The expression of Cav-1 and VEGF was significantly correlated with tumor differentiation, invasion depth and lymph node metastasis (all $P < 0.05$), but not with patient's age, sex or tumor size. There is a negative correlation between Cav-1

and VEGF expression in colorectal cancer ($r = -0.393$, $P < 0.01$).

CONCLUSION: The absent expression of Cav-1 and over-expression of VEGF may play an important role in the development and progression of colorectal carcinoma.

Key Words: Colorectal carcinoma; Caveolin-1; Vascular endothelial growth factor

Li YH. Clinical significance of expression of caveolin-1 and vascular endothelial growth factor in colorectal carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(21): 2241-2245

摘要

目的: 探讨小窝蛋白1(Cav-1)和血管内皮生长因子(VEGF)在结直肠癌组织中的表达, 分析其与结直肠癌临床病理因素的关系及意义.

方法: 收集辽宁省肿瘤医院2007-01/2009-06肿瘤外科手术切除的83例结直肠癌标本及其配对正常结直肠组织(距癌灶边缘 >5 cm). 应用免疫组织化学SP法检测Cav-1和VEGF蛋白在83例结直肠癌及其配对正常结直肠组织中的表达.

结果: Cav-1蛋白在正常结直肠组织中的阳性表达率为81.9%, 显著高于其在结直肠癌组织中的阳性表达率(38.6%, $P < 0.01$). VEGF蛋白在结直肠癌组织中的阳性表达率为74.7%, 显著高于正常结直肠黏膜(13.3%, $P < 0.01$). Cav-1与VEGF在结直肠癌组织中的表达均与结直肠癌的分化程度、浸润深度及淋巴结转移相关(均 $P < 0.05$), 而与结直肠癌患者的性别、年龄及肿瘤大小无显著关联(均 $P > 0.05$). 在83例结直肠癌组织中Cav-1与VEGF蛋白表达呈显著负相关($r = -0.393$, $P < 0.01$).

结论: Caveolin-1的缺失和VEGF的过表达可能在结直肠癌的发生、发展以及浸润转移中发挥重要作用, 二者可能协同参与了这些过程.

■背景资料

小窝蛋白-1(Cav-1)是细胞膜上的一种支架蛋白, 其通过磷酸化和/或去磷酸化等途径与多种转录因子相互作用, 参与调控肿瘤细胞的增殖、黏附、侵袭转移及凋亡.

■同行评议者

顾国利, 副主任医师, 中国人民解放军空军总医院普通外科

■相关报道

邢鑫等应用免疫组织化学SP法检测了Cav-1蛋白在92例结肠癌、27例腺瘤及22例癌旁正常黏膜组织中的表达,结果显示Cav-1蛋白在癌旁正常黏膜、腺瘤及癌组织中呈渐进性低表达,且Cav-1蛋白表达与结肠癌的分化程度、浸润深度及有无区域淋巴结转移有关。

关键词: 结直肠癌; 小窝蛋白-1; 血管内皮生长因子

李远航. 小窝蛋白1和血管内皮生长因子在结直肠癌组织中的表达及临床意义. 世界华人消化杂志 2011; 19(21): 2241-2245
http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2241.asp

0 引言

小窝蛋白-1(caveolin-1, Cav-1)是细胞膜上的一种支架蛋白,其通过磷酸化和/或去磷酸化等途径与多种转录因子相互作用,参与调控肿瘤细胞的增殖、黏附、侵袭转移及凋亡^[1,2]. Cav-1在胃癌、乳腺癌、卵巢癌、肺癌及结肠癌等多种恶性肿瘤中缺失表达,因此, Cav-1基因被认为是一个抑癌基因^[1-6]. 肿瘤血管是肿瘤生长、侵袭和转移的基础. 而肿瘤血管的发生是一个多因素调节的复杂过程,其中血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)被认为是最重要的血管生成诱导因子^[7]. 本研究应用免疫组织化学方法分别对结直肠癌及其配对正常结直肠组织中Cav-1和VEGF的表达进行检测,分析两者在结直肠癌组织中的表达情况及其临床意义.

1 材料和方法

1.1 材料 收集辽宁省肿瘤医院2007-01/2009-06肿瘤外科手术切除的83例结直肠癌标本及其配对正常结直肠组织(距癌灶边缘>5 cm). 患者年龄31-76(中位年龄58)岁. 所有患者术前均未接受放、化疗. 兔抗人Caveolin-1多克隆抗为美国Santa Cruz公司产品,工作浓度1:300. 鼠抗人VEGF单克隆抗体(即用型),免疫组织化学检测试剂盒和DAB显色试剂盒均购自福建迈新试剂公司.

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学SP法检测Cav-1及VEGF在正常结直肠组织及结直肠癌组织中的表达: 标本经40 g/L甲醛溶液固定,常规石蜡包埋,作4 μm厚连续切片,常规脱蜡及水化,3%过氧化氢阻断内源性过氧化物酶,枸橼酸缓冲液高压锅修复抗原,山羊血清室温下孵育15 min,滴加一抗4℃过夜;加入二抗37℃温箱孵育30 min,加入辣根酶标记链霉卵白素工作液,37℃温箱孵育30 min; DAB显色,苏木素复染,梯度酒精脱水,二甲苯透明,封片. 每组实验均以0.01 mol/L PBS代替第一抗体作为阴性对照.

1.2.2 结果判断标准: Cav-1与VEGF均定位于细胞质内,二者均以出现清晰棕黄色颗粒为阳

表1 Cav-1与VEGF蛋白表达与结直肠癌临床病理特征的关系

	<i>n</i>	Cav-1阳性 $n(\%)$	VEGF阳性 $n(\%)$
性别			
男	46	21(47.5)	32(69.6)
女	37	11(29.7)	30(81.1)
年龄(岁)			
>58	41	14(34.1)	32(76.2)
≤58	42	18(42.9)	30(73.2)
肿瘤大小(cm)			
>5	31	10(32.3)	25(80.6)
≤5	52	22(42.3)	37(71.2)
分化程度			
高-中分化	47	23(48.9) ^a	30(63.8) ^b
低分化	36	9(25.0)	32(88.9)
浸润深度			
未及浆膜	44	24(54.5) ^b	28(63.6) ^a
侵及浆膜	39	8(20.5)	34(87.2)
淋巴结转移			
无	43	22(51.2) ^a	27(62.8) ^a
有	40	10(25.0)	35(87.5)

^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$.

性细胞. 根据染色强度分别计0-3分, 无染色为0分, 浅黄色为1分, 棕黄色为2分, 棕褐色为3分, 再以阳性细胞所占百分比评分, <10%为0分, 10%-90%为1分, >90%为2分. 两项得分相乘, 0分为阴性表达, 1-6分为阳性表达.

统计学处理 采用 χ^2 检验和Spearman等级相关分析, 采用SPSS13.0统计软件包进行统计学处理. $P<0.05$ 视为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 Cav-1与VEGF蛋白在正常结直肠组织及结直肠癌中的表达 Cav-1蛋白在结直肠组织中的阳性表达率为(81.9%, 68/83)显著高于结直肠癌组织(38.6%, 32/83)($P<0.01$). VEGF蛋白在结直肠癌组织中的阳性表达率(74.7%, 62/83)显著高于其在正常结直肠组织中的阳性表达率(13.3%, 11/83)($P<0.01$, 图1).

2.2 Cav-1与VEGF蛋白表达与结直肠癌临床病理因素的关系 Cav-1与VEGF在结直肠癌组织中的表达均与结直肠癌的分化程度、浸润深度及淋巴结转移密切相关. Cav-1蛋白在高-中分化(48.9%)、未及浆膜(54.5%)、无淋巴结转移(51.2%)结直肠癌组中的阳性表达率分别显著高于其在低分化(25.0%)、侵及浆膜(20.5%)及伴淋巴结转移(25.0%)结直肠癌组中的阳性表

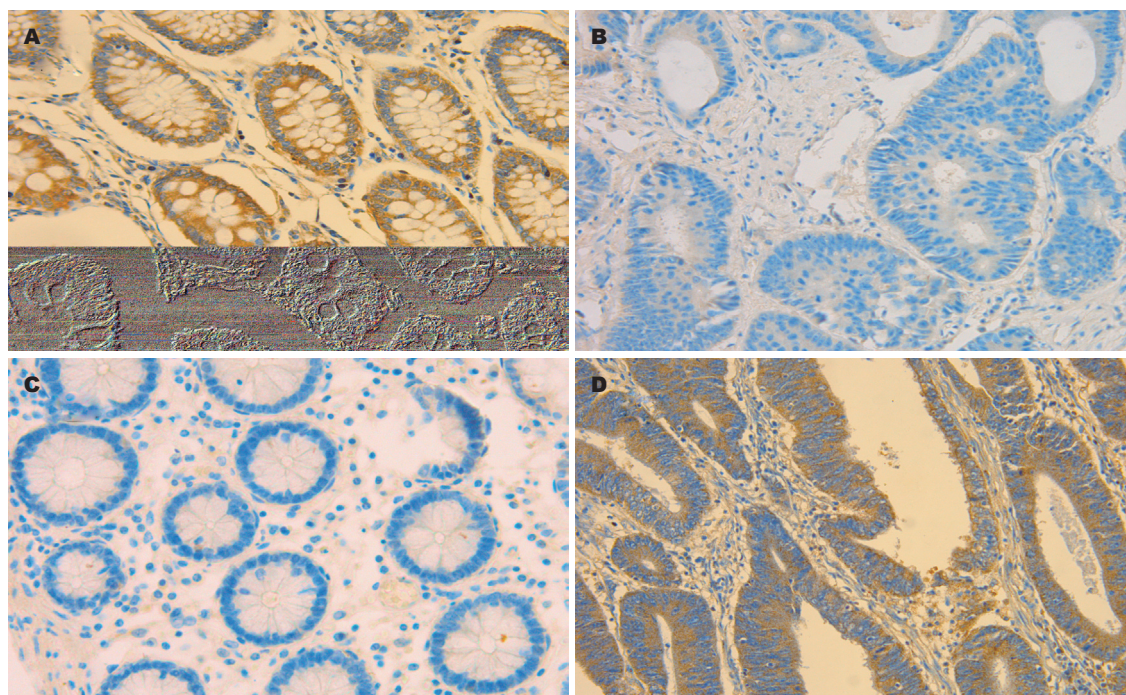


图1 Cav-1和VEGF在正常结直肠组织和结直肠癌组织中的表达(SP×200). A, B: Cav-1; C, D: VEGF; A, C: 正常结直肠组织; B, D: 结直肠癌组织.

■应用要点

Caveolin-1的缺失和VEGF的过表达可能在结直肠癌的发生、发展以及浸润转移中发挥重要作用,二者可能协同参与了这些过程.

达率($P<0.05$). VEGF蛋白在低分化(88.9%)、侵犯浆膜(87.2%)及伴淋巴结转移(87.5%)结直肠癌组中的阳性表达率分别显著高于其在中分化(63.8%)、未及浆膜(63.6%)、无淋巴结转移(62.8%)结直肠癌组中的阳性表达率($P<0.05$). Cav-1与VEGF蛋白表达均与结直肠癌患者的性别、年龄及肿瘤大小无显著关联($P>0.05$, 表1).

2.3 结直肠组织中Cav-1与VEGF蛋白表达的相关性分析 在83例结直肠癌组织中Cav-1与VEGF蛋白表达呈负相关($r = -0.393$, $P<0.01$, 表2).

3 讨论

小窝是一种特化的细胞质膜结构,被认为是信号传导的主要位点,其能把激素、生长因子以及细胞外调节分子所带的信号传入细胞^[8]. Cav-1是小窝的表面标记蛋白,自身能够促进小窝的形成^[9],其不仅在维持胞膜窖的形态、结构和功能方面起重要作用,而且还具有其他多种生物学功能,如参与胞吞、胞内运输、胆固醇运输、脂类稳定.另外,Cav-1在肿瘤细胞增殖、侵袭转移和凋亡中也发挥关键调控作用^[1,8-10].

Cav-1基因位于的人7号染色体长臂(7q31.1)是很多恶性肿瘤常常缺失的一个区域,且Cav-1蛋白在较多恶性肿瘤中表达下调^[3-6],所以较多研究认为Cav-1基因是抑癌基因,但在食管癌、口腔鳞癌及前列腺癌中Cav-1则表达上调^[11-17],

表2 结直肠癌组织中Cav-1与VEGF表达的关系

Cav-1表达	VEGF表达		r 值	P 值
	阳性	阴性		
阳性	17	15	-0.393	<0.01
阴性	45	6		

因此Cav-1在不同肿瘤中发挥着不一样的作用,其作用可能取决于癌的来源和各种生长因子以及激素的表达状态^[8,9,18,19]. Bender等^[20]研究发现在几种结肠癌细胞系中Cav-1 mRNA和蛋白水平的表达水平明显低于正常结肠黏膜. Cavallo-Medved等^[21]在结直肠癌细胞系HCT116的研究中发现Cav-1的下调抑制了细胞外基质蛋白IV型胶原的降解和细胞的浸润,提示在结直肠癌中Cav-1是一种抑癌基因,其具有抑制结直肠癌发生和浸润作用. 邢鑫等^[22]应用免疫组织化学SP法检测了Cav-1蛋白在92例结直肠癌、27例腺瘤及22例癌旁正常黏膜组织中的表达,结果显示Cav-1蛋白在癌旁正常黏膜、腺瘤及癌组织中呈渐进性低表达,且Cav-1蛋白表达与结直肠癌的分化程度、浸润深度及有无区域淋巴结转移有关. 本研究与以上研究结果相符,也发现Cav-1蛋白的阳性表达率在正常结直肠组织中显著高于结直肠癌组织,而且Cav-1蛋白在高-中分化、未及浆膜、无淋巴结转移结直肠癌组中的阳性表

同行评价

本文科学性、创新性、可读性尚可,为结直肠癌临床和基础研究奠定基础。

达率分别显著高于其在低分化、侵及浆膜及伴淋巴结转移结直肠癌组中的阳性表达率,提示Cav-1的表达下调可能参与了结直肠黏膜的癌变及浸润转移过程,对Cav-1进行深入研究有望为结直肠癌发生发展及演进机制的研究提供新思路。

肿瘤细胞的生长与转移依赖于肿瘤血管形成^[23], VEGF是迄今鉴定出来最重要的血管生成因子,是调控血管生成的主要因素,在肿瘤的浸润和转移中发挥着极其重要的作用^[24-28]。我们的研究结果显示, VEGF在结直肠癌组织中的阳性表达率显著高于正常结直肠组织,且其在低分化、侵及浆膜及伴淋巴结转移结直肠癌组中的阳性表达分别显著高于高-中分化、未及浆膜、无淋巴结转移结直肠癌组,这也与相关的研究结果一致^[29-33],提示VEGF与结直肠癌的发生、发展密切相关,可以作为预测结直肠癌侵袭、转移潜能及预后的重要标志物。

VEGF可通过诱导下调细胞周期激酶抑制剂p27^{kip1}和Rb磷酸化而促进细胞增殖,有研究发现过表达的Cav-1能阻遏VEGF的这种效应,而使内皮细胞停滞与G₀/G₁期^[34]。一些研究则发现过表达的Cav-1能抑制血管内皮生长因子受体2介导的信号传导,而在内皮细胞系中VEGF、PDGF、HGF等血管生成因子也能抑制Cav-1的表达,并推测Cav-1下调表达是内皮细胞增殖和血管形成中的一个重要步骤^[35,36],这些研究提示Cav-1与VEGF信号间存在互反调控作用。本研究发现在83例结直肠癌组织中Cav-1与VEGF蛋白表达呈负相关,提示Cav-1的缺失与VEGF过表达可协同参与了结直肠癌的发展演进过程。

总之, Cav-1和VEGF可能在结直肠癌的发生及侵袭转移过程中发挥重要作用,但二者与癌结直肠癌发生发展的确切关系,及其在此过程中二者的相互作用尚需进一步深入研究。

参考文献

- Razani B, Schlegel A, Liu J, Lisanti MP. Caveolin-1, a putative tumour suppressor gene. *Biochem Soc Trans* 2001; 29: 494-499
- Fiucci G, Ravid D, Reich R, Liscovitch M. Caveolin-1 inhibits anchorage-independent growth, anoikis and invasiveness in MCF-7 human breast cancer cells. *Oncogene* 2002; 21: 2365-2375
- 杨育生, 刘斌, 邢传平, 高自芳, 顾立萍, 钱震, 董亮, 苏勤军. 胃癌组织中Caveolin-1, nm23及MMP-2的表达及其意义. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 1561-1566
- Sloan EK, Stanley KL, Anderson RL. Caveolin-1 inhibits breast cancer growth and metastasis. *Oncogene* 2004; 23: 7893-7897

- Wiechen K, Diatchenko L, Agoulunik A, Scharff KM, Schober H, Arlt K, Zhumabayeva B, Siebert PD, Dietel M, Schäfer R, Sers C. Caveolin-1 is down-regulated in human ovarian carcinoma and acts as a candidate tumor suppressor gene. *Am J Pathol* 2001; 159: 1635-1643
- Racine C, Bélanger M, Hirabayashi H, Boucher M, Chakir J, Couet J. Reduction of caveolin 1 gene expression in lung carcinoma cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 255: 580-586
- Gonzalez FJ, Vicioso L, Alvarez M, Sevilla I, Marques E, Gallego E, Alonso L, Matilla A, Alba E. Association between VEGF expression in tumour-associated macrophages and elevated serum VEGF levels in primary colorectal cancer patients. *Cancer Biomark* 2007; 3: 325-333
- Liu P, Rudick M, Anderson RG. Multiple functions of caveolin-1. *J Biol Chem* 2002; 277: 41295-41298
- Quest AF, Gutierrez-Pajares JL, Torres VA. Caveolin-1: an ambiguous partner in cell signalling and cancer. *J Cell Mol Med* 2008; 12: 1130-1150
- Couet J, Belanger MM, Roussel E, Drolet MC. Cell biology of caveolae and caveolin. *Adv Drug Deliv Rev* 2001; 49: 223-235
- Han SE, Park KH, Lee G, Huh YJ, Min BM. Mutation and aberrant expression of Caveolin-1 in human oral squamous cell carcinomas and oral cancer cell lines. *Int J Oncol* 2004; 24: 435-440
- Kato K, Hida Y, Miyamoto M, Hashida H, Shinohara T, Itoh T, Okushiba S, Kondo S, Katoh H. Overexpression of caveolin-1 in esophageal squamous cell carcinoma correlates with lymph node metastasis and pathologic stage. *Cancer* 2002; 94: 929-933
- Fong A, Garcia E, Gwynn L, Lisanti MP, Fazzari MJ, Li M. Expression of caveolin-1 and caveolin-2 in urothelial carcinoma of the urinary bladder correlates with tumor grade and squamous differentiation. *Am J Clin Pathol* 2003; 120: 93-100
- Ando T, Ishiguro H, Kimura M, Mitsui A, Mori Y, Sugito N, Tomoda K, Mori R, Harada K, Katada T, Ogawa R, Fujii Y, Kuwabara Y. The overexpression of caveolin-1 and caveolin-2 correlates with a poor prognosis and tumor progression in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 2007; 18: 601-609
- Satoh T, Yang G, Egawa S, Addai J, Frolov A, Kuwano S, Timme TL, Baba S, Thompson TC. Caveolin-1 expression is a predictor of recurrence-free survival in pT2N0 prostate carcinoma diagnosed in Japanese patients. *Cancer* 2003; 97: 1225-1233
- Corn PG, Thompson TC. Identification of a novel prostate cancer biomarker, caveolin-1: Implications and potential clinical benefit. *Cancer Manag Res* 2010; 2: 111-122
- Thompson TC, Tahir SA, Li L, Watanabe M, Naruishi K, Yang G, Kadmon D, Logothetis CJ, Troncso P, Ren C, Goltsov A, Park S. The role of caveolin-1 in prostate cancer: clinical implications. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2010; 13: 6-11
- Burgermeister E, Liscovitch M, Röcken C, Schmid RM, Ebert MP. Caveats of caveolin-1 in cancer progression. *Cancer Lett* 2008; 268: 187-201
- Williams TM, Lisanti MP. Caveolin-1 in oncogenic transformation, cancer, and metastasis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005; 288: C494-C506
- Bender FC, Raymond MA, Bron C, Quest AF. Ca-

- veolin-1 levels are down-regulated in human colon tumors, and ectopic expression of caveolin-1 in colon carcinoma cell lines reduces cell tumorigenicity. *Cancer Res* 2000; 60: 5870-5878
- 21 Cavallo-Medved D, Mai J, Donescu J, Sameni M, Sloane BF. Caveolin-1 mediates the expression and localization of cathepsin B, pro-urokinase plasminogen activator and their cell-surface receptors in human colorectal carcinoma cells. *J Cell Sci* 2005; 118: 1493-1503
- 22 邢鑫, 王贵吉, 王留兴. Caveolin 1在大肠癌组织中的表达及其临床生物学意义. *肿瘤基础与临床* 2007; 20: 99-101
- 23 Pang RW, Poon RT. Clinical implications of angiogenesis in cancers. *Vasc Health Risk Manag* 2006; 2: 97-108
- 24 Martins SF, Reis RM, Rodrigues AM, Baltazar F, Filho AL. Role of endoglin and VEGF family expression in colorectal cancer prognosis and anti-angiogenic therapies. *World J Clin Oncol* 2011; 2: 272-280
- 25 Folkman J. Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Clinical applications of research on angiogenesis. *N Engl J Med* 1995; 333: 1757-1763
- 26 Veikkola T, Alitalo K. VEGFs, receptors and angiogenesis. *Semin Cancer Biol* 1999; 9: 211-220
- 27 Hanrahan V, Currie MJ, Gunningham SP, Morrin HR, Scott PA, Robinson BA, Fox SB. The angiogenic switch for vascular endothelial growth factor (VEGF)-A, VEGF-B, VEGF-C, and VEGF-D in the adenoma-carcinoma sequence during colorectal cancer progression. *J Pathol* 2003; 200: 183-194
- 28 Shibuya M, Claesson-Welsh L. Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Exp Cell Res* 2006; 312: 549-560
- 29 朱云松, 杨大明, 姚登福, 钱俊波, 李小明, 许利华. VEGF的表达与大肠癌组织生长、侵袭及转移的关系. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 2549-2552
- 30 李建文, 陶凯雄, 蔡开琳. ER β 和VEGF在大肠癌中的表达及临床意义. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 2652-2656
- 31 王志宇, 杨渤彦, 高健, 韩强, 毕雪冰. 直肠癌中MIC-1, VEGF和P53表达的临床意义. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 2170-2173
- 32 孔令建, 赵晶, 曲波, 樊微微, 高善玲. Survivin、COX-2及VEGF在大肠癌中的表达及与肿瘤微血管密度的关系. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 2048-2053
- 33 Zheng S, Han MY, Xiao ZX, Peng JP, Dong Q. Clinical significance of vascular endothelial growth factor expression and neovascularization in colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1227-1230
- 34 Fang K, Fu W, Beardsley AR, Sun X, Lisanti MP, Liu J. Overexpression of caveolin-1 inhibits endothelial cell proliferation by arresting the cell cycle at G0/G1 phase. *Cell Cycle* 2007; 6: 199-204
- 35 Labrecque L, Royal I, Surprenant DS, Patterson C, Gingras D, Béliveau R. Regulation of vascular endothelial growth factor receptor-2 activity by caveolin-1 and plasma membrane cholesterol. *Mol Biol Cell* 2003; 14: 334-347
- 36 Liu J, Razani B, Tang S, Terman BI, Ware JA, Lisanti MP. Angiogenesis activators and inhibitors differentially regulate caveolin-1 expression and caveolae formation in vascular endothelial cells. Angiogenesis inhibitors block vascular endothelial growth factor-induced down-regulation of caveolin-1. *J Biol Chem* 1999; 274: 15781-15785

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011年版权归世界华人消化杂志

• 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角码号.如马连生^[1]报告……,潘伯荣等^[2-5]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.