

# 牛蒡子苷元对肝癌侵袭转移的影响

王兵, 郑国灿

王兵, 郑国灿, 东南大学医学院附属中大医院普外科 江苏省南京市 210009

东南大学国家自然科学基金资助项目, No. XJ0650261  
作者贡献分布: 此课题由王兵与郑国灿共同设计; 动物模型制作和分子生物学实验由王兵操作完成; 病理分析和论文写作由王兵与郑国灿完成。

通讯作者: 郑国灿, 副教授, 副主任医师, 硕士生导师, 210009, 江苏省南京市, 东南大学医学院附属中大医院普外科。

zgc9252003@yahoo.com.cn

电话: 025-83272195

收稿日期: 2010-12-23 修回日期: 2011-01-22

接受日期: 2011-02-15 在线出版日期: 2011-03-08

## Treatment with arctigenin inhibits the metastasis and invasion of human hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cells

Bing Wang, Guo-Can Zheng

Bing Wang, Guo-Can Zheng, Department of General Surgery, Zhongda Hospital, Southeast University, Nanjing 210009, Jiangsu Province, China

Supported by: the Southeast University Preliminary Research Fund for National Natural Science Foundation, No. XJ0650261

Correspondence to: Associate Professor Guo-Can Zheng, Department of General Surgery, Zhongda Hospital, Southeast University, Nanjing 210009, Jiangsu Province, China. zgc9252003@yahoo.com.cn

Received: 2010-12-23 Revised: 2011-01-22

Accepted: 2011-02-15 Published online: 2011-03-08

## Abstract

**AIM:** To evaluate the effects of treatment with arctigenin (ARG) on the adhesion, invasion, and metastasis of human hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cells.

**METHODS:** After SMMC-7721 cells were treated with ARG, cell adherence, migration, and invasion were assessed by MTT assay and Transwell migration assay. A model of pulmonary metastasis of SMMC-7721 cells was then generated in nude mice to evaluate the effect of arctigenin on tumor cell metastasis.

**RESULTS:** The adhesion, migration, and invasion of SMMC-7721 cells were significantly inhibited after ARG treatment. Compared with control cells, the average reduced rates of adhe-

sion, metastasis, and invasion in cells treated with ARG were 43.08%, 55.19% and 58.21%, respectively. ARG inhibited the adhesion of SMMC-7721 cells in a concentration- and time-dependent manner (72 h:  $0.260 \pm 0.014$  vs  $0.999 \pm 0.066$ ,  $P < 0.05$ ; 4 h:  $0.558 \pm 0.026$  vs  $1.241 \pm 0.102$ ,  $P < 0.05$ ). The number of metastatic pulmonary tumors in nude mice inoculated with arctigenin was lower than that in mice inoculated with control cells ( $62.5\%$  vs  $100\%$ ,  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** Treatment with arctigenin markedly inhibits the adherence, migration and invasion of SMMC-7721 cells.

**Key Words:** Arctigenin; Hepatic carcinoma; SMMC-7721 cell; Adhesion; Metastasis; Invasion

Wang B, Zheng GC. Treatment with arctigenin inhibits the metastasis and invasion of human hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(7): 723-727

## 摘要

**目的:** 研究牛蒡子苷元(arctigenin, ARG)对肿瘤黏附、侵袭、转移的影响。

**方法:** 体外实验分别采用MTT法、Transwell法检测ARG对SMMC-7721细胞黏附、侵袭和转移的影响; 体内实验采用裸鼠肺转移瘤模型, 检测ARG对SMMC-7721细胞肺转移的影响。

**结果:** 与空白对照组相比, ARG作用后SMMC-7721细胞黏附率、侵袭率和转移率显著下降, 其平均黏附抑制率、转移抑制率和侵袭抑制率分别为43.08%、55.19%和58.21%。随着ARG浓度的增加, 作用时间的延长, ARG对SMMC-7721细胞及细胞黏附的抑制作用显著增强(72 h:  $0.260 \pm 0.014$  vs  $0.999 \pm 0.066$ ,  $P < 0.05$ ; 4 h:  $0.558 \pm 0.026$  vs  $1.241 \pm 0.102$ ,  $P < 0.05$ )。裸鼠SMMC-7721细胞肺转移灶数目显著减少( $62.5\%$  vs  $100\%$ ,  $P < 0.05$ )。

**结论:** ARG在体外可以抑制SMMC-7721细胞的黏附、侵袭和转移, 在体内可以抑制肿瘤的

## ■背景资料

临床上牛蒡子复方制剂治疗感冒等感染性疾病, 以及多种肿瘤及白血病有显著效果, 其有效成分是牛蒡子苷元(ARG)。

## ■同行评议者

魏继福, 副研究员, 江苏省人民医院中心实验室

## ■ 研发前沿

目前分子靶向药物、中药单体成为肿瘤治疗热点。

转移。

**关键词:** 牛蒡子苷元; 肝癌; SMMC-7721细胞; 黏附; 侵袭; 转移

王兵, 郑国灿. 牛蒡子苷元对肝癌侵袭转移的影响. 世界华人消化杂志 2011; 19(7): 723-727

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/723.asp>

## 0 引言

临床上牛蒡子复方制剂治疗感冒等感染性疾病, 以及多种肿瘤及白血病有显著效果, 相关体外细胞学实验有所验证<sup>[1,2]</sup>. 其有效成分是牛蒡子苷元(arctigenin, ARG). 国外有其在抑制热休克反应中的应用的报道<sup>[3]</sup>, 国内外均有实验报道其有抗病毒<sup>[4]</sup>、诱导肿瘤细胞凋亡等抗肿瘤作用<sup>[5,6]</sup>. 但ARG对于肿瘤侵袭、转移方面的研究尚无报道. 本研究通过ARG对肝癌细胞株SMMC-7721的体内、外实验, 探讨其对肿瘤侵袭、转移的影响.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 肝癌细胞株SMMC-7721由东南大学医学院中心实验室保存; PRMI 1640细胞培养液(美国Gibco公司); ARG(上海展舒化学科技公司); 酶联免疫检测仪(BIO-RAD550型, 美国BD公司); Transwell Chamber(8  $\mu$ m孔径)细胞培养小室、Matrigel胶(美国BD公司);  $\delta$  BALB/nu/u裸鼠, SPF级, 周龄6-8 wk, 体质量18-20 g(上海科学院动物实验中心).

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养:** SMMC-7721细胞接种于RPMI1640培养液(含100 mL/L胎牛血清, 青霉素100 kU/L、链霉素100 kU/L), 于37  $^{\circ}$ C, 50 mL/L CO<sub>2</sub>及饱和湿度的培养箱中培养. 细胞贴壁生长, 2-3 d传代. 取生长对数期的细胞制成细胞悬液用于实验.

**1.2.2 MTT法检测检测ARG对SMMC-7721细胞抑制率:** 取SMMC-7721, 制成 $1 \times 10^7$ /L单细胞悬液, 接种于96孔板, 每组5孔, 细胞贴壁后, 弃上清, 据ARG的浓度(DMSO助溶, 终浓度控制在0.3%以下)分为: 0.5、1.0、5.0、10.0 mg/L组, 0.3% DMSO为阴性对照组, 孵育24、48、72 h后, 加入MTT 20  $\mu$ L, 孵育4 h, 弃上清, 加200  $\mu$ L DMSO, 振荡5 min, 酶联免疫检测仪测波长570 nm的吸光度值(A值), 每组实验重复3次取均值, 计算抑制率, 并通过POMS软件得出各组的半数

抑制浓度(50% inhibitory concentration, IC<sub>50</sub>). 抑制率 = (1-给药组A值/对照组A值)  $\times$  100%.

**1.2.3 MTT法检测ARG对SMMC-7721细胞黏附的影响:** 以70 mg/L的FN包被96孔板, 风干后放入4  $^{\circ}$ C冰箱中备用. 根据文献[4], 实验时取 $1 \times 10^7$ /L的SMMC-7721细胞接种于已包被FN的96孔培养板中, 每孔2 001  $\mu$ L, 设5复孔, 待细胞贴壁后(4-5 h), 加入以培养液配置终浓度为1.0 mg/L的ARG, 空白对照组加入200  $\mu$ L培养液, 以75 mg/L 5-Fu为阳性对照组, 置于培养箱内分别孵育1、2、4 h, 吸出培养液, 每孔加入5 g/L的MTT 20 mL, 继续培养4 h, 弃去全部上清, 每孔加入DMSO 150  $\mu$ L, 以下各步骤同上, 按下列公式计算细胞黏附抑制率. 黏附抑制率 = (1-处理组平均A值/对照组平均A值)  $\times$  100%.

**1.2.4 Transwell法检测ARG对SMMC-7721细胞侵袭、转移的影响:** Transwell小室杯底为8  $\mu$ m孔径的聚碳酸酯微孔滤膜, FN封闭、4  $^{\circ}$ C过夜. 侵袭实验时Transwell小室铺有Matrigel胶, 下室加入0.5 mL含10%血清培养液, 上室加入含BSA无血清培养液细胞悬液( $1 \times 10^8$ /L, 200  $\mu$ L/孔), 各设3个复孔. 实验组为1.5 mg/L ARG, 阴性对照组为不加药物的培养基, 阳性对照组为75  $\mu$ g/mL 5-Fu. 各组常规37  $^{\circ}$ C孵育24 h, 无菌下取出Transwell小室, 棉签擦净上室细胞, PBS漂洗5 min 2次, 4%多聚甲醛固定、0.1%结晶紫染色, 镜下随机计数5个视野的穿膜细胞平均数(400  $\times$ ). 转移能力的测定时不涂胶, 上室加入细胞悬液( $1 \times 10^9$ /L), 孵育8 h, 余步骤同上. 侵袭(转移)抑制率 = [1-ARG组侵袭(转移)细胞数/对照组侵袭(转移)细胞数]  $\times$  100%.

**1.2.5 ARG对SMMC-7721细胞裸鼠肺转移灶的影响:** 取 $2 \times 10^7$ /mL指数生长期的SMMC-7721细胞经裸鼠尾静脉注射, 接种后第8天随机分3组(每组8只): ARG组[50 mg/(kg $\cdot$ d), 腹腔注射]、5-Fu组(5-Fu 17 mg/kg, 每周2次, 腹腔内注射)、空白对照组(无菌生理盐水2 mL/d, 腹腔注射), 连续用药6 wk, 末次用药24 h后处死裸鼠解剖, 观察肺及其他各脏器癌转移灶.

**统计学处理** 采用SPSS17.0统计软件, 计量资料以mean  $\pm$  SD表示, 计量资料的组间比较采用单因素方差分析, 等级资料的多组比较用H检验, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义.

## 2 结果

**2.1 ARG对SMMC-7721细胞增殖的影响** 随ARG浓度的增加, 其抑制作用逐渐增大(表1). 各实

表 1 MTT法检测ARG对SMMC-7721细胞的抑制 ( $I_{50}$ , mean  $\pm$  SD)

分组	24 h	48 h	72 h
空白对照组	1.242 $\pm$ 0.350	1.131 $\pm$ 0.039	0.999 $\pm$ 0.066
阴性对照组	1.289 $\pm$ 0.256	1.192 $\pm$ 0.034	1.107 $\pm$ 0.061
ARG 0.5 mg/L	0.743 $\pm$ 0.052 <sup>a</sup>	0.608 $\pm$ 0.035 <sup>a</sup>	0.558 $\pm$ 0.026 <sup>a</sup>
ARG 1.0 mg/L	0.452 $\pm$ 0.024 <sup>a</sup>	0.420 $\pm$ 0.003 <sup>a</sup>	0.399 $\pm$ 0.017 <sup>a</sup>
ARG 5.0 mg/L	0.361 $\pm$ 0.026 <sup>ac</sup>	0.321 $\pm$ 0.007 <sup>ac</sup>	0.300 $\pm$ 0.011 <sup>ac</sup>
ARG 10.0 mg/L	0.314 $\pm$ 0.006 <sup>ac</sup>	0.292 $\pm$ 0.008 <sup>ac</sup>	0.260 $\pm$ 0.014 <sup>ac</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 空白对照组; <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs ARG 0.5, 1.0 mg/L; <sup>a</sup> $P < 0.05$  vs ARG 5.0 mg/L.

表 2 MTT法检测ARG对SMMC-7721细胞黏附的影响 ( $I_{50}$ , mean  $\pm$  SD)

分组	1 h	2 h	4 h
空白对照组	0.893 $\pm$ 0.050	1.02 $\pm$ 0.0549	1.241 $\pm$ 0.102
ARG组	0.702 $\pm$ 0.041 <sup>a</sup>	0.584 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.433 $\pm$ 0.040 <sup>a</sup>
5-Fu组	0.743 $\pm$ 0.052 <sup>a</sup>	0.608 $\pm$ 0.035 <sup>a</sup>	0.558 $\pm$ 0.026 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 空白对照组.

表 3 不同浓度ARG对SMMC-7721细胞侵袭、转移的影响 ( $n$ , mean  $\pm$  SD)

分组	0 mg/L	1.0 mg/L	1.5 mg/L	2.0 mg/L
侵袭组	48 $\pm$ 5	32 $\pm$ 3 <sup>a</sup>	25 $\pm$ 2 <sup>ac</sup>	19 $\pm$ 2 <sup>ac</sup>
转移组	112 $\pm$ 10	76 $\pm$ 7 <sup>a</sup>	59 $\pm$ 4 <sup>ac</sup>	49 $\pm$ 4 <sup>ac</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 空白对照组; <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs ARG 2.0 mg/L.

验组与对照组比较差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$ ), 但是随着作用时间延长, 抑制率并未有明显差异. 通过POMS软件由各药物组结合剂量-抑制曲线得出SMMC-7721细胞24 h的 $IC_{50}$ 约为1.50 mg/L, 以下实验取低于此浓度观察药物对细胞侵袭转移的抑制.

**2.2 ARG对SMMC-7721细胞黏附的影响** 实验组各时段的细胞黏附率均明显低于对照组, 各时段及5-Fu组黏附抑制率分别为21.39%、42.75%和65.11%, 各时间段之间差异有统计学意义(表2), 表明ARG对SMMC-7721细胞黏附有抑制作用, 且此作用具有时间依赖性.

**2.3 ARG对SMMC-7721细胞侵袭、转移的影响** ARG组转移细胞数及侵袭细胞数均明显低于对照组, 转移抑制率和侵袭抑制率分别为55.19%和58.21%(表3). 对照组细胞轮廓清晰, 活力旺盛, ARG组细胞明显变圆、稀疏. 经ARG处理后, SMMC-7721细胞体外侵袭由Matrigel胶模拟的基底膜的能力受到明显抑制. 0、1.0、1.5、2.0

mg/L ARG组作用24 h后SMMC-7721细胞穿过基底膜的细胞数逐渐减少(图1), 差异除2组、3组之间外均有统计学意义(均 $P < 0.01$ ), 各药物组侵袭抑制率分别是41.25%、51.43%、68.18%. 上述各药物组作用SMMC-7721细胞8 h后穿过小孔的转移细胞数均明显减少(图1), 差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$ ), 转移抑制率分别是32.55%、42.38%和59.31%.

**2.4 ARG对SMMC-7721细胞裸鼠肺转移灶的影响** 药物组、阳性对照组、阴性对照组分别有5只、6只、8只裸鼠肺部出现转移灶, 阴性对照组肝脏发现转移灶, 其他脏器中均未发现可疑病灶. 将裸鼠肺脏取出, 在解剖显微镜下观察并记录肺转移灶数目和大小(图2), 并按以下标准分级: (+)级, 直径( $d$ ) $< 0.5$  mm; (++)级,  $d = 0.5-1.0$  mm; (+++)级,  $d = 1.1-2.0$  mm; (++++级,  $d > 2.0$  mm. 经秩和检验分析, 阴性组肺转移率(8/8 = 100%)高于阳性组(6/8 = 75%)和药物组(5/8 = 62.5%,  $P < 0.05$ ), 但后两者间无明显差异

#### ■应用要点

ARG在体外抑制肿瘤细胞的黏附、侵袭和转移, 在体内抑制肿瘤的转移.

### ■同行评价

本文研究系统,具有一定的科学价值.

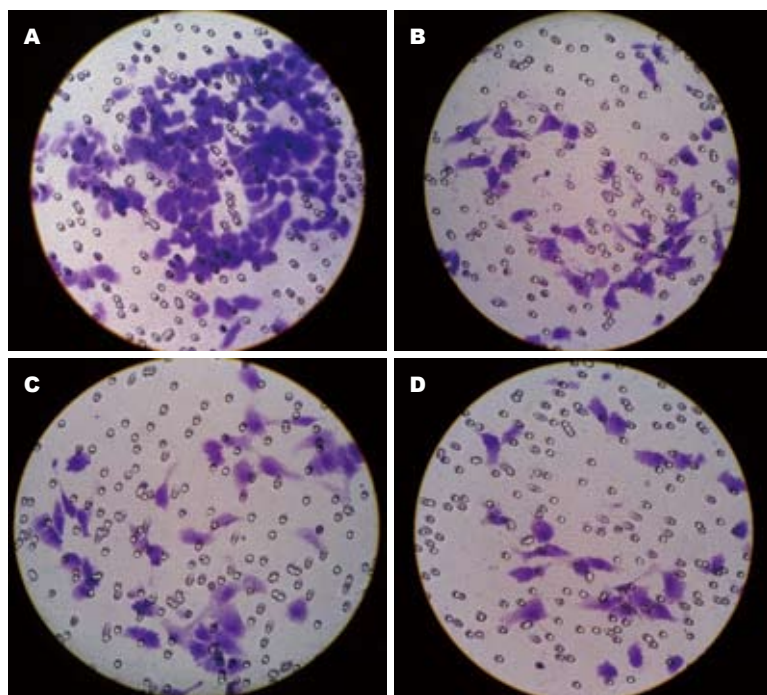


图 1 SMMC-7721细胞迁移和细胞侵袭(结晶紫染色 $\times 400$ ). A: SMMC-7721细胞空白对照组; B: 牛蒡子苷元处理(1 mg/L, 8 h)之后的细胞迁移表现; C: 空白对照组; D: 牛蒡子苷元处理(1 mg/L, 24 h)之后的细胞(药物组)侵袭表现, 较空白对照组明显减少.

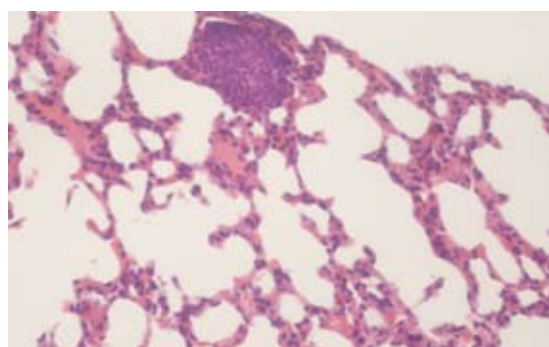


图 2 肝癌SMMC-7721细胞裸鼠肺转移(H&E染色 $\times 200$ ).

( $P>0.05$ ). 镜下可见: 裸鼠肺转移灶由大量密集排列的肝癌细胞构成, 在肺部小血管内可见癌栓存在.

### 3 讨论

侵袭和转移是恶性肿瘤最基本的特性<sup>[7]</sup>, 是疾病进展、患者最终死亡的主要原因之一. Liotta<sup>[8]</sup>曾最早提出了侵袭、转移过程的“三步”假说: 黏附、降解与转移, 肿瘤细胞首先脱离原发灶, 黏附在基底膜与细胞外基质中的大分子蛋白, 并激活与基质蛋白溶解有关的蛋白水解酶如基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)等<sup>[9]</sup>, 从而降解基底膜与细胞外基质<sup>[10]</sup>, 肿瘤细胞运动穿过从而完成侵袭周围组织、完成血行、淋巴等转移<sup>[11]</sup>, 肝癌细胞的黏附、侵袭和转移是肝癌发生转移, 甚或微转移<sup>[12]</sup>的重要步骤, 抑制肝癌细胞的黏附、侵袭和转移可能降低肝

癌转移的发生.

本研究在体外主要利用培养基中重组形成与天然基质膜极为相似的Matrigel胶和聚碳酸酯膜制成人工膜, 观察到ARG对肿瘤细胞的黏附、侵袭和转移有显著的抑制作用: 可使SMMC-7721黏附能力明显下降, 且具有时间依赖性; 同时ARG可使细胞形态发生明显的改变, 有较强的抑制侵袭、转移能力. 提示ARG可降低肝癌SMMC-7721细胞黏附能力, 阻止侵袭、转移的发生. 在体内实验, 通过裸鼠尾静脉注射SMMC-7721细胞建立肺转移模型模拟肿瘤血行转移的自然进程, 然后观察ARG干预后转移性肿瘤生长情况, 发现ARG能抑制肿瘤的转移, 其效果与5-Fu相近.

ARG是一种细胞毒药物, 具有多种生物学活性, 可以影响肿瘤细胞的发生、发展的各个阶段, 既往对其促进肿瘤细胞的凋亡及相关信号通路有了一定的研究, 我们的前期研究中观察到ARG抑制肿瘤细胞增殖并诱导其凋亡<sup>[13,14]</sup>. 本实验结果表明: ARG在体外抑制肿瘤细胞的黏附、侵袭和转移, 在体内抑制肿瘤的转移. 目前分子靶向药物、中药单体成为肿瘤治疗热点<sup>[15-17]</sup>, 与之类似的ARG相关分子机制有待于进一步实验研究, 从而为临床高效低毒抗肿瘤药物研制提出新的思路.

### 4 参考文献

- 1 Kim JY, Hwang JH, Cha MR, Yoon MY, Son ES,



- Tomida A, Ko B, Song SW, Shin-ya K, Hwang YI, Park HR. Arctigenin blocks the unfolded protein response and shows therapeutic antitumor activity. *J Cell Physiol* 2010; 224: 33-40
- 2 Matsumoto T, Hosono-Nishiyama K, Yamada H. Antiproliferative and apoptotic effects of butyrolactone lignans from *Arctium lappa* on leukemic cells. *Planta Med* 2006; 72: 276-278
- 3 Ishihara K, Yamagishi N, Saito Y, Takasaki M, Konoshima T, Hatayama T. Arctigenin from *Fructus Arctii* is a novel suppressor of heat shock response in mammalian cells. *Cell Stress Chaperones* 2006; 11: 154-161
- 4 Hayashi K, Narutaki K, Nagaoka Y, Hayashi T, Uesato S. Therapeutic effect of arctiin and arctigenin in immunocompetent and immunocompromised mice infected with influenza A virus. *Biol Pharm Bull* 2010; 33: 1199-1205
- 5 王璐, 赵峰, 刘珂. 牛蒡子苷元诱导人白血病细胞凋亡的作用及机制. *药学报* 2008; 43: 542-547
- 6 Awale S, Lu J, Kalauni SK, Kurashima Y, Tezuka Y, Kadota S, Esumi H. Identification of arctigenin as an antitumor agent having the ability to eliminate the tolerance of cancer cells to nutrient starvation. *Cancer Res* 2006; 66: 1751-1757
- 7 Yao Z, Che XC, Lu R, Zheng MN, Zhu ZF, Li JP, Jian X, Shi LX, Liu JY, Gao WY. Inhibition by tyrosinase (YSL) on the invasion and adhesion of the mouse melanoma cell. *Mol Med* 2007; 13: 14-21
- 8 Liotta LA. Tumor invasion and metastases--role of the extracellular matrix: Rhoads Memorial Award lecture. *Cancer Res* 1986; 46: 1-7
- 9 Gialeli C, Theocharis AD, Karamanos NK. Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. *FEBS J* 2011; 278: 16-27
- 10 Zal T, Chodaczek G. Intravital imaging of anti-tumor immune response and the tumor microenvironment. *Semin Immunopathol* 2010; 32: 305-317
- 11 Watanabe H. [Extracellular matrix--regulation of cancer invasion and metastasis]. *Gan To Kagaku Ryoho* 2010; 37: 2058-2061
- 12 Strauss DC, Thomas JM. Transmission of donor melanoma by organ transplantation. *Lancet Oncol* 2010; 11: 790-796
- 13 郑国灿. 牛蒡子提取液的抗癌性研究. *东南大学学报(医学版)* 2003; 22: 319-322
- 14 郑国灿. 牛蒡子苷诱导人肝癌HepG2细胞凋亡的实验研究. *中国病理生理杂志* 2008; 24: 586-587
- 15 Furukawa K, Hamamura K, Ohkawa Y, Furukawa K. [Drug discovery sciences in Japan with focus on molecular-targeted drugs]. *Nippon Rinsho* 2010; 68: 1797-1802
- 16 Pavese JM, Farmer RL, Bergan RC. Inhibition of cancer cell invasion and metastasis by genistein. *Cancer Metastasis Rev* 2010; 29: 465-482
- 17 Khan N, Mukhtar H. Cancer and metastasis: prevention and treatment by green tea. *Cancer Metastasis Rev* 2010; 29: 435-445

编辑 李薇 电编 李薇

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》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: <sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  ( $P > 0.05$  不注). 如同一表中另有一套  $P$  值, 则 <sup>1</sup> $P < 0.05$ , <sup>2</sup> $P < 0.01$ ; 第 3 套为 <sup>3</sup> $P < 0.05$ , <sup>4</sup> $P < 0.01$ .  $P$  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  $t/\text{min}$ ,  $c/(\text{mol/L})$ ,  $p/\text{kPa}$ ,  $V/\text{mL}$ ,  $t/^\circ\text{C}$  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  $7.5\text{ cm} \times 4.5\text{ cm}$ , 必须使用双面胶条粘贴在正文内, 不能使用浆糊粘贴. (5) 致谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐.