

血浆中miR-144*直接扩增在大肠癌非侵入性诊断中的应用

桂银莉, 张金平, 李建生, 王 静

■背景资料

大肠癌是消化系统常见恶性肿瘤之一,其发病是多因素、多步骤的复杂过程,传统的检查方法都有其明显弊端,血浆中miRNA水平的检测作为一种新的无创性检查应运而生。

桂银莉, 张金平, 李建生, 王静, 郑州大学第一附属医院消化内科 河南省郑州市 450000

桂银莉, 硕士, 主要研究方向是消化系统肿瘤。

作者贡献分布: 此课题由桂银莉、张金平及李建生设计; 研究过程由桂银莉与张金平操作完成; 桂银莉与王静共同收集标本及购买试验试剂; 本论文写作由桂银莉完成。

通讯作者: 李建生, 教授, 450000, 河南省郑州市, 郑州大学第一附属医院消化内科。lijiansheng@medmail.com.cn

电话: 0371-66295922

收稿日期: 2012-02-01 修回日期: 2012-02-29

接受日期: 2012-03-20 在线出版日期: 2012-04-28

Expression of microRNA-144* in plasma of patients with colorectal cancer: A potential non-invasive diagnostic marker for colorectal cancer screening

Yin-Li Gui, Jin-Ping Zhang, Jian-Sheng Li, Jing Wang

Yin-Li Gui, Jin-Ping Zhang, Jian-Sheng Li, Jing Wang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, Henan Province, China

Correspondence to: Jian-Sheng Li, Professor, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, Henan Province, China. lijiansheng@medmail.com.cn

Received: 2012-02-01 Revised: 2012-02-29

Accepted: 2012-03-20 Published online: 2012-04-28

Abstract

AIM: To compare the levels of miR-144* in plasma of patients with colorectal carcinoma (CRC), those with colorectal adenoma, and those with inflammatory bowel disease (IBD), and to explore the role of miR-144* in the occurrence and development of colorectal cancer.

METHODS: Plasma samples were collected from 55 patients with CRC, 30 patients with colorectal adenoma, 30 patients with IBD, and 30 normal volunteers. All these samples were taken from patients without pre-treatment. In addition, postoperative plasma samples were collected from 43 patients with CRC and 30 patients with colorectal adenoma. Quantitative reverse transcription and real-time fluorescent quantitative PCR were performed to detect the expression of miR-144* in these plasma samples.

RESULTS: The expression of miR-144* in the plasma of CRC patients was significantly higher than that in non-carcinoma patients. High MiR-144* expression was associated with increased tumor size and advanced pT stage. Of 43 postoperative CRC patients, 30 underwent radical surgery and 27 of them had significantly reduced expression of miR-144* compared to pre-operative levels; 13 underwent palliative surgery and showed no significant change in miR-144* expression. There were no significant changes in miR-144* expression between preoperative and postoperative patients with either non-advanced or advanced adenoma.

CONCLUSION: Detection of miR-144* expression in plasma represents a non-invasive way to screen colorectal cancer and predict disease recurrence.

Key Words: Colorectal cancer; miR-144*; Plasma; Adenoma

Gui YL, Zhang JP, Li JS, Wang J. Expression of microRNA -144* in plasma of patients with colorectal cancer: A potential non-invasive diagnostic marker for colorectal cancer screening. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(12): 1066-1070

摘要

目的: 研究miR-144*在大肠癌(CRC)、大肠腺瘤、炎症性肠病(IBD)及健康对照组的血浆标本中直接扩增后的表达量,初步探索其在大肠癌的发生、发展中的作用。

方法: 分别收集CRC、大肠腺瘤、IBD及全结肠镜检查阴性的健康人的血浆标本55例、30例、30例、30例,上述标本均取自患者未治疗前;分别收集CRC、大肠腺瘤患者行肿瘤切除术后7 d的血浆标本43例、30例。利用TRIzol试剂进行上述标本中RNA的提取,得到纯化后的RNA样本,逆转录及实时荧光定量PCR反应检测miR-144*的表达,进行统计学分析。

结果: 在人大肠癌组血浆标本中,miR-144*较

■同行评议者

陈光, 教授, 吉林大学第一医院消化器官外科

非大肠癌组中表达增高, miR-144*的表达量与肿瘤的大小及浸润深度相关, 肿瘤越大, 浸润深度越深, miR-144*表达量越高. 在43例大肠癌患者术后7 d的血浆标本中, 30例行大肠癌根治术患者中27例miR-144*的表达量较术前降低, 13例行大肠癌姑息性手术患者的血浆miR-144*的表达量较术前无明显差异. 大肠腺瘤组中, 进展期腺瘤和非进展期腺瘤在行腺瘤切除术前miR-144*的表达量无明显变化.

结论: 血浆中miRNA-144*表达水平的检测, 可作为大肠癌非侵入性诊断方法并可以预测大肠癌的复发.

关键词: 结直肠肿瘤; miR-144*; 血浆; 大肠腺瘤

桂银莉, 张金平, 李建生, 王静. 血浆中miR-144*直接扩增在大肠癌非侵入性诊断中的应用. 世界华人消化杂志 2012; 20(12): 1066-1070
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1066.asp>

0 引言

小分子RNA(microRNAs, miRNA)是近年来新发现的一类具有短小、内源性、非编码特性的单链RNA分子, 其编码基因是目前最大的一类调节基因, 可以通过抑制或降解转录后的mRNA来调节某些基因的表达. miRNA通过对其靶基因的调控在组织发育、细胞增殖和细胞凋亡等基本生理学过程中发挥着重要作用^[1,2], 而细胞的过度增殖以及异常死亡都是癌症的显著特征, 由此提示肿瘤的发生、发展与miRNA之间可能存在着关联.

大肠癌(colorectal cancer, CRC)是消化系常见恶性肿瘤之一, 其发病是多因素、多步骤的复杂过程, 近年来我国大肠癌发病率呈逐年上升趋势. 由于多数大肠癌均以大肠内腺瘤样息肉为前期病变, 因此, 结肠肿瘤的筛查十分必要, 在欧美, 50岁及以上的人群, 都建议接受大肠癌的常规筛查^[3]. 传统检查方法有其明显的弊端, 而血浆中miRNA水平的检测作为一种新的无创性检查应运而生. 肿瘤源性miRNA能稳定存在于人体组织、血浆及粪便环境中, 并且不受内源性核糖核酸酶活动的影响^[4]. 特异miRNA的过度表达和沉默与大肠癌的进展有关, 组织、血液和粪便中特异miRNA的表达量不同, 提示了其在大肠癌早期发现和筛检中的应用前景^[5,6]. 本研究选用miR-144*作为研究对象, 初步探讨其在大肠癌非侵入性诊断中的作用.

1 材料和方法

1.1 材料 55例CRC、30例大肠腺瘤、30例炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)患者均由郑州大学第一附属医院2010-03/2011-12行结肠镜检查, 经组织病理检查明确诊断. 55例CRC组中, 男34例, 女21例, 年龄33-82岁; 大肠腺瘤组, 男22例, 女8例, 年龄29-72岁; 30例IBD患者中男性21例, 女性9例, 年龄范围21-69岁. 另选30例年龄匹配的全结肠镜检查阴性的健康人为健康对照组. 4组年龄和性别差异均无统计学意义. 收集上述患者未治疗前血浆标本, 收集43例CRC患者手术后7 d的血浆标本, 其中, 行大肠癌根治术患者30例, 行大肠癌姑息性手术患者13例. 收集大肠腺瘤患者行腺瘤切除后7 d的血浆标本.

1.2 方法

1.2.1 血浆中miR-144*的扩增: 将保存于-70℃备用的经抗凝、500 g离心10 min、去除血细胞的血浆, 样本500 μL与500 μL的10% SDS(Merck)进行1:1混合, 4℃条件下孵育1 h后, 利用TRIzol试剂进行样本中RNA的提取, 使用Beckman DU800型紫外分光光度计测定RNA提取液吸光度 A_{260} 值, 计算浓度, 得到纯化后的血浆RNA样本. 以30 μL DEPC H₂O溶解预处理后得到RNA样本, 取10 μL进行逆转录; 取2 μL逆转录获得的cDNA用于实时定量荧光PCR反应. 反应体系如下: 2.5 μL 10×PCR扩增缓冲液, 0.5 μL dNTP(2.5 mmol/L), 1 μL SYBR Green 1, 0.2 μL Taq(5 U/μL), 以及1 μL扩增引物, 加入去离子水使反应体系至25 μL. 具体反应条件是95℃预变性10 min; 95℃变性15 s, 60℃延伸1 min, 40个循环.

1.2.2 数据分析: 每个样本均做3个重复. 以U6管家基因做内参, 校正器采用Stamatopoulos方法. 计算方法为 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 相对定量法, 将不同标本的RQ值($RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$)进行比较. (Ct值是指在PCR反应体系中每个反应管内的荧光信号到达设定的阈值时所经历的循环数, $\Delta Ct =$ 目的基因Ct值-内参照基因Ct值, $\Delta\Delta Ct =$ 待测标本的 ΔCt -校正器 ΔCt).

统计学处理 采用SPSS17.0统计软件进行处理, miR-144*表达水平与临床病理资料的联系采用Chi-Square检验. $P < 0.05$ 认为有统计学差异. 检验水准 $\alpha = 0.05$.

2 结果

2.1 血浆中miR-144*表达 在大肠癌组血浆中

■ 研发前沿

生物体内众多的miRNA调节着肿瘤细胞的多种重要生物学行为. 目前发现很多肿瘤的发生发展都和miRNA异常表达息息相关.

■ 相关报道

基于血浆及粪便标本中的miRNA水平的监测可以为肠道肿瘤的诊断及治疗提供更好的方法。相关研究还证明基于miRNA水平的治疗可为肿瘤治疗提供一种新思路。

表 1 行不同手术的CRC组与大肠腺瘤组手术前后血浆中miR-144*表达水平比较

| | 手术前 Δ CT(mean \pm SD) | 手术后 Δ CT(mean \pm SD) | P值 |
|-----------|-----------------------------------|-----------------------------------|-------|
| CRC根治手术组 | 4.08 \pm 0.92 | 6.79 \pm 1.03 | 0.021 |
| CRC姑息手术组 | 2.57 \pm 1.15 | 2.07 \pm 1.10 | 0.230 |
| 大肠进展期腺瘤组 | 5.79 \pm 1.32 | 5.29 \pm 1.60 | 0.410 |
| 大肠非进展期腺瘤组 | 6.01 \pm 1.77 | 5.98 \pm 1.34 | 0.279 |

miR-144*较大肠腺瘤组、IBD组、对照组中表达增高,表达量依次为 3.28 ± 1.66 , 5.79 ± 2.32 , 6.17 ± 1.29 , 5.18 ± 1.40 ($P < 0.05$ vs 腺瘤组、IBD组, $P < 0.001$ vs 对照组)。

2.2 大肠癌术后血浆中miR-144*表达 在收集的43例行大肠癌手术的患者术后7 d的血浆标本中发现,30例行大肠癌根治术的患者,术后血浆标本中有27例miR-144*的表达量较手术前降低;13例行姑息性手术的患者,手术后血浆标本中miR-144*表达量较未手术前表达量无明显降低;姑息性手术组较行根治性手术组血浆miR-144*表达量高;30例大肠腺瘤组中,11例进展期腺瘤,19例非进展期腺瘤,手术前后其表达量均无明显变化(表1)。

2.3 miR-144*高表达与肿瘤大小及浸润深度的相关性 miR-144*的高表达与肿瘤的大小 ($P < 0.001$)与浸润深度 ($P = 0.026$)相关,肿瘤越大,浸润深度越深,miR-144*表达量越高。但miR-144*的高表达与性别、年龄、肿瘤位置、病理分级、病理N分期、病理TNM分期及淋巴管浸润因素无明显关系(表2)。

3 讨论

在转录水平上调基因表达的非蛋白编码小分子RNA-miRNA的发现,给肿瘤的研究开启了新的方向,成为近年来分子生物学研究的热点之一。自2002年,Calin等^[7]在人的慢性淋巴细胞白血病中发现miR-15a及miR-16-1低表达后,越来越多的研究发现miRNAs在多种人类肿瘤中存在异常表达。研究显示,超过50%的miRNA基因是位于癌症相关的基因组区域或脆性位点上^[8],进一步的研究证实,miRNA与肿瘤的增殖、分化及凋亡等多种因素相关,并且在肿瘤的发生与发展中发挥着重要的作用^[9]。近年已证实let-7、miR-143和miR-145等在大肠癌中存在异常表达^[10]并且与大肠癌的发生、发展密切相关^[11]。目前,对miRNA在肿瘤发生发展中的具

体作用机制仍不清楚,认为其在动物中主要作用机制为:miRNA通过RNA诱导的沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC)与靶基因mRNA的3'端UTR区不完全互补结合^[12],抑制靶基因mRNA的翻译,进而影响靶基因蛋白的表达。即在正常情况下,成熟的miRNA通过调控靶基因mRNA的翻译或其稳定性来参与正常细胞稳态的维持,故而miRNA的异常表达可能导致其相应靶基因转录后水平的表达异常。

大部分的结肠癌均以大肠内腺瘤样息肉为前期病变,由腺瘤(息肉)进展至癌是一个包含在基因表达中不同序列DNA的异常和变化的过程^[13]。因此,结肠肿瘤的筛查十分必要,其一方面可以保证及时发现、摘除还未恶变的息肉,另一方面可以早期发现无症状的结肠恶性肿瘤。传统的筛查方法如结肠镜检查,属侵入性检查,费用高,患者比较痛苦,有潜在穿孔和出血可能,检查阳性率与患者肠道清洁程度明显相关。最近的研究表明,肿瘤源性miRNA可以非常稳定的形式存在于人体血清及组织中,并且不受内源性核糖核酸酶活动的影响^[14]。这些肿瘤源性miRNA以一个可用作检测肿瘤生物标志物的指标存在于血液循环及组织中,由于血浆和血清miRNA的水平联系紧密,血浆或血清miRNA都可以用作生物标志物^[6,13]。相对于传统的检查方法及有创性方法,基于血清样本采取获取肿瘤组织miRNA相对更便捷,因此很适于普查和预防及早期诊断。

miR-144*是新近发现的与肿瘤密切相关的miRNA,可在多种肿瘤组织中异常表达^[15],已有研究表明其参与细胞发育分化过程中关键蛋白的合成环节,但尚没有报道与CRC的发病率相关。本实验中我们发现CRC患者血浆样本中的miR-144*表达较腺瘤组和IBD组显著升高,差异具有统计学意义。研究发现miR-144*可能通过作用其靶基因编码蛋白凋亡蛋白酶活化因子1(apoptotic protease activating factor-1, APAF-1),启动或抑制细胞凋亡,涉及程序性细胞凋亡机

表 2 大肠癌组织中miR-144*的表达水平与临床病理资料的关系

| | <i>n</i> | miR-144* ¹ |
|-------------------|----------|-----------------------|
| 性别 | | |
| 男 | 34 | 0.11(0.05–0.31) |
| 女 | 21 | 0.14(0.03–0.39) |
| <i>P</i> 值 | | 0.792 |
| 年龄(岁) | | |
| ≤65 | 23 | 0.16(0.03–0.84) |
| >65 | 32 | 0.15(0.04–0.57) |
| <i>P</i> 值 | | 0.586 |
| 肿瘤大小(cm) | | |
| <6 | 43 | 0.11(0.04–0.32) |
| ≥6 | 12 | 0.27(0.01–0.18) |
| <i>P</i> 值 | | <0.001 |
| 肿瘤位置 ² | | |
| 近端结肠 | 17 | 0.21(0.04–0.56) |
| 远端结肠及直肠 | 38 | 0.18(0.05–0.31) |
| <i>P</i> 值 | | 0.617 |
| 病理分级 | | |
| 分化良好 | 37 | 0.17(0.03–0.46) |
| 分化不良 | 18 | 0.22(0.04–0.66) |
| <i>P</i> 值 | | 0.238 |
| 病理T分期 | | |
| T2+T3 | 39 | 0.18(0.04–0.59) |
| T4 | 16 | 0.04(0.01–0.08) |
| <i>P</i> 值 | | 0.026 |
| 病理N分期 | | |
| N0 | 26 | 0.13(0.17–0.24) |
| N1 | 18 | 0.20(0.05–0.33) |
| N2 | 11 | 0.23(0.21–1.40) |
| <i>P</i> 值 | | 0.250 |
| 病理TNM分期 | | |
| I | 11 | 0.06(0.12–0.43) |
| II | 25 | 0.13(0.20–0.34) |
| III | 13 | 0.17(0.03–0.57) |
| IV | 6 | 0.10(0.07–1.27) |
| <i>P</i> 值 | | 0.501 |
| 淋巴管浸润 | | |
| 阴性 | 31 | 0.15(0.02–0.48) |
| 阳性 | 24 | 0.12(0.02–0.75) |
| <i>P</i> 值 | | 0.625 |

¹miRNA相对表达的中位数, 括号中表示25%及75%百分位数.

²以结肠脾曲为界分为近端结肠及远端结肠.

制(<http://www.microrna.org/>). APAF-1, 是与人类同源的线虫CED-4基因^[16], 该基因编码的蛋白是细胞凋亡调控网络的中心枢纽之一^[17]. 另有研究表明miR-144*可能存在有其他潜在的目标基因和作用途径, 尚有待确定, 这也可以解释本试验过程中miR-144*在3例CRC血浆标本中低表

达的原因.

本研究还发现, 大肠癌行根治性肿瘤切除术后患者血浆中miR-144*表达水平在统计学意义上显著低于术前, 行姑息性手术患者的血浆中miR-144*的表达量较术前无明显变化, 大肠腺瘤组在行腺瘤切除前后, 血浆中miR-144*的表达量无明显变化. 进一步的统计还发现miR-144*在大肠癌血浆中的表达量与肿瘤的大小及浸润深度相关, 这与文献报道的多数肿瘤相关miRNA的表达量与肿瘤的TNM分期及淋巴管浸润无关相符合, 说明miR-144*可能在大肠癌的发生、发展阶段发挥着重要的作用, 可能与肿瘤的愈后及复发相关. 但由于个别样本的变化及样本数量的限制, 我们的数据可能会有失偏颇, 因此需要大规模的样本研究验证这些结果. 然而最新研究显示, 在CRC患者的粪便样本中miR-144*呈过度表达, 也进一步证实检测miR-144*表达水平是一种可行的大肠癌非侵入性的诊断方法之一^[18-19].

4 参考文献

- 1 Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature* 2004; 431: 350-355
- 2 Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; 116: 281-297
- 3 Whitlock EP, Lin JS, Liles E, Beil TL, Fu R. Screening for colorectal cancer: a targeted, updated systematic review for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med* 2008; 149: 638-658
- 4 Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Brian KC, Allen A, Lin DW, Urban N, Drescher CW, Knudsen BS, Stirewalt DL, Gentleman R, Vessella RL, Nelson PS, Martin DB, Tewari M. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 10513-10518
- 5 Gilad S, Meiri E, Yogeve Y, Benjamin S, Lebanony D, Yerushalmi N, Benjamin H, Kushnir M, Cholak H, Melamed N, Bentwich Z, Hod M, Goren Y, Chajut A. Serum microRNAs are promising novel biomarkers. *PLoS One* 2008; 3: e3148
- 6 Ventura A, Jacks T. MicroRNAs and cancer: short RNAs go a long way. *Cell* 2009; 136: 586-591
- 7 Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, Di Leva G, Shimizu M, Wojcik SE, Iorio MV, Visone R, Sever NI, Fabbri M, Iuliano R, Palumbo T, Pichiorri F, Roldo C, Garzon R, Sevignani C, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2005; 353: 1793-1801
- 8 Michael MZ, O'Connor SM, van Holst Pellekaan NG, Young GP, James RJ. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol Cancer Res* 2003; 1: 882-891
- 9 Tang F, Hajkova P, O'Carroll D, Lee C, Tarakhovsky A, Lao K, Surani MA. MicroRNAs are tightly associ-

■创新盘点

本文选用了较新的miRNA分子, 提出了采用检测血浆中miRNA-144*分子的扩增水平作为大肠癌非侵入性诊断的方法.

■同行评价

本研究初步证明血液中miR-NA-144*的检测可作为非侵入性手段筛查大肠癌并可以预测疾病复发,该结论非常有创意,并具有较好的临床实用价值。

- ated with RNA-induced gene silencing complexes in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 372: 24-29
- 10 Fang WJ, Lin CZ, Zhang HH, Qian J, Zhong L, Xu N. Detection of let-7a microRNA by real-time PCR in colorectal cancer: a single-centre experience from China. *J Int Med Res* 2007; 35: 716-723
- 11 Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, Labourier E, Reinert KL, Brown D, Slack FJ. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell* 2005; 120: 635-647
- 12 Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, Guo J, Zhang Y, Chen J, Guo X, Li Q, Li X, Wang W, Zhang Y, Wang J, Jiang X, Xiang Y, Xu C, Zheng P, Zhang J, Li R, Zhang H, Shang X, Gong T, Ning G, Wang J, Zen K, Zhang J, Zhang CY. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res* 2008; 18: 997-1006
- 13 Park NJ, Zhou H, Elashoff D, Henson BS, Kastratovic DA, Abemayor E, Wong DT. Salivary microRNA: discovery, characterization, and clinical utility for oral cancer detection. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 5473-5477
- 14 Mestdagh P, Van Vlierberghe P, De Weer A, Muth D, Westermann F, Speleman F, Vandesompele J. A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data normalization. *Genome Biol* 2009; 10: R64
- 15 Kalimutho M, Blanco Gdel V, Gravina P, Cretella M, Mannucci L, Mannisi E, Formosa A, Pallone F, Federici G, Bernardini S. Quantitative denaturing high performance liquid chromatography (Q-dHPLC) detection of APC long DNA in faeces from patients with colorectal cancer. *Clin Chem Lab Med* 2010; 48: 1303-1311
- 16 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
- 17 Mihara M, Erster S, Zaika A, Petrenko O, Chittenden T, Pancoska P, Moll UM. p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol Cell* 2003; 11: 577-590
- 18 Kalimutho M, Del Vecchio Blanco G, Di Cecilia S, Sileri P, Cretella M, Pallone F, Federici G, Bernardini S. Differential expression of miR-144* as a novel fecal-based diagnostic marker for colorectal cancer. *J Gastroenterol* 2011; 46: 1391-1402
- 19 Link A, Balaguer F, Shen Y, Nagasaka T, Lozano JJ, Boland CR, Goel A. Fecal MicroRNAs as novel biomarkers for colon cancer screening. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010; 19: 1766-1774

编辑 张姗姗 电编 闫晋利

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2012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^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$; 第 3 套为^e $P < 0.05$, ^f $P < 0.01$ 。 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 $7.5\text{ cm} \times 4.5\text{ cm}$, 必须使用双面胶条粘贴在正文内, 不能使用浆糊粘贴。(5) 志谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐。