

# 凋亡调节因子Smac、Cyt C在食管癌中的表达及与预后的关系

高凤兰, 宋文刚, 李维山, 王宪远, 刘国良, 郭宝强

## ■背景资料

肿瘤细胞凋亡是近年来研究的热点, 很多肿瘤的发生和发展都和肿瘤细胞的凋亡紊乱有密切关系。Smac是新近发现的重要凋亡调节因子, 细胞色素C从线粒体释放是细胞凋亡的关键步骤, 研究食管癌中凋亡调节因子Smac和细胞色素C的凋亡紊乱情况对进一步了解食管癌中凋亡紊乱机制有重要作用, 从而为食管癌的治疗及预后判断提供重要的理论依据。

高凤兰, 宋文刚, 李维山, 刘国良, 漯河医学高等专科学校 河南省漯河市 462002

王宪远, 郑州大学第二附属医院病理科 河南省郑州市 450014

郭宝强, 临颖县人民医院病理科 河南省漯河市 462600

高凤兰, 教授, 主要从事肿瘤病理的研究。

教育厅自然科学基金资助项目, No. 2008C31004

作者贡献分布: 高凤兰、宋文刚及李维山对此文献均等; 此课题由高凤兰、宋文刚及李维山设计; 研究过程、实验操作、数据统计、论文撰写由高凤兰、宋文刚及李维山共同完成; 数据分析由刘国良完成; 王宪远指导本课题实验设计、实验操作, 提供病理标本等、指导论文撰写; 郭宝强参与本课题部分指标的实验观察、论文撰写, 提供病理标本等。

通讯作者: 高凤兰, 教授, 462002, 河南省漯河市大学路148号, 漯河医学高等专科学校病理检验研究中心。lhyzgao@126.com  
电话: 0395-2964847

收稿日期: 2012-06-06 修回日期: 2012-08-02

接受日期: 2012-09-20 在线出版日期: 2012-10-18

## Correlation between expression of apoptosis modulators Smac and Cyt C and prognosis in esophageal squamous cell carcinoma

Feng-Lan Gao, Wen-Gang Song, Wei-Shan Li, Xian-Yuan Wang, Guo-Liang Liu, Bao-Qiang Guo

Feng-Lan Gao, Wen-Gang Song, Wei-Shan Li, Guo-Liang Liu, Pathological Examination and Research Center, Luohe Medical College, Luohe 462002, Henan Province, China

Xian-Yuan Wang, Department of Pathology, the Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450014, Henan Province, China

Bao-Qiang Guo, Department of Pathology, People's Hospital of Linying County, Luohe 462600, Henan Province, China

Supported by: the Nature Science Foundation of Education Department of Henan Province, No. 2008C31004

Correspondence to: Feng-Lan Gao, Professor, Pathological Examination and Research Center, Luohe Medical College, Luohe 462002, Henan Province, China. lhyzgao@126.com

Received: 2012-06-06 Revised: 2012-08-02

Accepted: 2012-09-20 Published online: 2012-10-18

## Abstract

**AIM:** To investigate the expression of second mitochondria-derived activator of caspase (Smac) and cytochrome C (Cyt C) in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) and to analyze their prognostic significance.

**METHODS:** Semiquantitative immunohistochemistry was performed to detect the expression of Smac and Cyt proteins in 85 cases of ESCC, matched tumor-adjacent esophageal tissue, and normal esophageal tissue.

**RESULTS:** The positive rates of Smac expression in ESCC, tumor-adjacent esophageal tissue and normal esophageal tissue were 63.75%, 92.50% and 77.50%, respectively, with a significant difference among the three groups ( $H_c = 28.703, P < 0.05$ ). The positive rates of Cyt C expression also differed significantly among ESCC, tumor-adjacent esophageal tissue and normal esophageal tissue (61.25% vs 90.00% vs 72.50%;  $H_c = 24.720, P < 0.05$ ). The expression of Smac/Diablo and Cyt C was not correlated with tumor histological differentiation and infiltration depth in ESCC (both  $P > 0.05$ ), but was correlated with lymph node metastasis ( $P < 0.05$ ). Expression of Cyt C protein was positively correlated with that of Smac protein in ESCC ( $r = 0.806, P < 0.01$ ).

**CONCLUSION:** The expression of Smac/Diablo and Cyt C protein closely correlates with lymph node metastasis in ESCC. Smac/Diablo is lowly expressed in ESCC, and expression of Smac/Diablo positively correlates with that of Cyt C.

**Key Words:** Esophageal carcinoma; Immunohistochemistry; Smac/Diablo; Cytochrome C

Gao FL, Song WG, Li WS, Wang XY, Liu GL, Guo BQ. Correlation between expression of apoptosis modulators Smac and Cyt C and prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(29): 2822-2826

## 摘要

**目的:** 探讨第二个线粒体激活因子(the second mitochondria-derived activator of caspase, Smac)和细胞色素C(Cycytochrome C, Cyt C)在食管鳞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)中的表达及其临床意义。

**方法:** 选择临床资料完整的存档蜡块, 应用免

## ■同行评议者

姜春萌, 教授, 大连医科大学附属第二医院消化科

疫组织化学SP法对85例经病理确诊为食管鳞癌病例的癌组织、正常组织及癌旁组织进行Smac和Cyt C蛋白半定量免疫组织化学分析。

**结果:** (1)Smac在食管鳞癌组织、正常组织、癌旁组织的阳性表达率分别为63.75%、92.50%、77.50%, 有显著性差异( $H_c = 28.703$ ,  $P < 0.05$ )。Cyt C在食管鳞癌组织、正常组织、癌旁组织的阳性表达率分别为61.25%、90.0%、72.50%, 有显著性差异( $H_c = 24.720$ ,  $P < 0.05$ ); (2)Smac/Diablo和Cyt C表达与患者的组织分化程度、浸润深度均无明显关系( $P > 0.05$ ); 但与淋巴结转移相关( $P < 0.05$ ); (3)Smac表达阳性的51例中, Cyt C蛋白阳性表达45例, 占88.24%(45/51), 两者表达的相关性, 经统计学分析, 两者有极强的关联性, 呈明显的正相关( $r = 0.806$ ,  $P < 0.01$ )。

**结论:** Smac/Diablo在食管鳞癌组织中呈低表达, 与Cyt C表达呈明显的正关, Smac/Diablo和Cyt C蛋白表达与食管癌淋巴结转移有关。

**关键词:** 食管肿瘤; 免疫组织化学; Smac/Diablo; 细胞色素C

高凤兰, 宋文刚, 李维山, 王宪远, 刘国良, 郭宝强. 凋亡调节因子Smac、Cyt C在食管癌中的表达及与预后的关系. 世界华人消化杂志 2012; 20(29): 2822-2826  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/2822.asp>

## 0 引言

肿瘤细胞凋亡是近年来研究的热点, 研究发现很多肿瘤的发生发展都与肿瘤细胞的凋亡紊乱有密切关系。细胞凋亡调节蛋白第二个线粒体激活因子(the second mitochondria-derived activator of caspase, Smac)是新近发现的又一种重要凋亡调节因子, 是一种由线粒体释放到细胞浆的重要凋亡调节因子。Smac蛋白能与已发现所有的凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis protein, IAP)结合, 使其丧失抑制Caspase活性。因此, Smac蛋白在细胞凋亡途径中有着极其重要的作用<sup>[1,2]</sup>, 可通过消除IAPs对Caspase蛋白抑制作用促进细胞凋亡。细胞色素C(Cytochrome C, Cyt C)是第一种被发现由线粒体释放的促凋亡蛋白。有研究表明, Cyt C的释放在内源性途径的细胞凋亡过程中占有核心地位<sup>[3-5]</sup>。食管癌在我国的发病率居世界首位, 全世界每年死于食管癌约30万人, 我国占半数以上<sup>[6]</sup>。本课题旨在研究食管癌中凋亡调节因子Smac和Cyt C的凋亡紊乱

情况及其相关性, 探讨其对食管癌发生、发展的影响。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 选择2008-2010年漯河医学高等专科学校病理检验研究中心、郑州大学第二附属医院、漯河市临颖县人民医院手术切除标本80例, 其中男47例, 女33例, 年龄37-78岁。根据2009年第7版国际抗癌联盟(UICC)食管癌分期对T、N、M的划分标准<sup>[7]</sup>: T1 18例, T2 24例, T3 38例, N0 11例, N1 41例、N2 33例, 80例均无远处转移。80例标本组织学类型经两名以上病理医师确诊, 均为鳞状细胞癌, 其中高分化33例, 中分化38例, 低分化19例。选择其中同期食管癌切除标本断端(距肿瘤 $< 2$  cm)40例, 作为癌旁组织组; 另取同期食管癌患者残端阴性组织(距癌灶边缘 $> 5$  cm)40例作为正常组织组。80例患者临床资料完整, 术前均未接受任何治疗。鼠抗人Smac/Diablo单克隆抗体(Cell Signaling Technology, 美国), 鼠抗人Cyt C单克隆抗体(北京中山公司), 即用型SP试剂盒(北京博奥森生物公司), DAB染色试剂盒(北京博奥森生物公司)等。

**1.2 方法** 采用SP免疫组织化学方法检测Smac和Cyt C的表达。用已知阳性切片做阳性对照, 以PBS代替一抗作阴性对照。方法及操作步骤: (1)脱蜡、水化: 所有被检标本石蜡4  $\mu$ m连续切片, 常规脱蜡水化; (2)修复抗原: 入30 mL/L过氧化氢室温孵育5 min, PBS(pH 7.0)洗5 min, 重复3次。微波中火煮沸10 min, 自然冷却, PBS洗5 min重复3次, 1:50正常羊血清封闭20 min; (3)加入1:100 PBS稀释的一抗Smac和Cyt C, 37  $^{\circ}$ C温育2 h, PBS洗5 min, 重复3次。加入1:100稀释的生物素化二抗37  $^{\circ}$ C温育30 min, PBS洗5 min, 重复3次, 加DAB室温显色3 min, 自来水冲洗后放入苏木素复染30 s, 用自来水冲洗返蓝, 常规脱水、透明、中性树胶封片镜检。对照实验除用PBS代替一抗作阴性对照外, 其他实验步骤不变。

Smac和Cyt C阳性染色均为淡黄色、棕黄色或棕褐色, Smac和Cyt C均定位于细胞浆。参照文献<sup>[7]</sup>评分方法, 将染色强度分为4级: 0分为无色; 1分为黄色; 2分为棕黄色; 3分为棕褐色。再计算阳性细胞所占的百分比: 1分为阳性细胞 $\leq 25\%$ ; 2分为阳性细胞26%-50%; 3分为51%-75%; 4分为 $> 76\%$ 。计算染色强度得分与阳性细胞所占百分比得分之和: 0-2定为阴性(-), 3-4分为弱阳性(+), 5-7分为强阳性(++), 弱阳性和强阳性均确

## ■ 相关报道

Yoo等用免疫组织化学分析Smac在肿瘤中表达率为62%, 表明Smac在不同癌组织中表达不同。在Smac表达阳性的51例中, Cyt C蛋白阳性表达45例, 占88.24%(45/51), 两者表达具有高度相关性, 呈明显正相关, 说明Smac和Cyt C蛋白表达在食管癌细胞的凋亡中具有协同作用, 且均与肿瘤的转移密切相关。

## ■创新盘点

本文研究了食管癌组织Smac和Cyt C蛋白表达的相关性及其与肿瘤分期与转移的关系,为食管癌的基因治疗及预后判断提供理论依据。

表 1 Smac和Cyt C蛋白在食管正常组织、癌组织及癌旁组织中的表达

分组	n	Smac				Cyt C			
		-	+	++	阳性率(%)	-	+	++	阳性率(%)
正常组织	40	3	8	29	92.50	4	8	28	90.00
癌旁组织	40	9	11	20	77.50	11	7	22	72.50
癌组织	80	29	34	17	63.75 <sup>a</sup>	31	31	18	61.25 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 其他组。

表 2 Smac和Cyt C蛋白表达与食管癌分期及组织分化程度的关系

分组	n	Smac阳性			Cyt C阳性		
		n	$\chi^2$ 值	P值	n	$\chi^2$ 值	P值
T分期	80	51	0.088	0.957	49	1.145	0.564
T1	18	12			10		
T2	24	15				17	
T3	38	24			23		
N分期	80	51	34.991	0.000	49	27.596	0.000
N0	48	43			41		
N1	21	6			7		
N2	11	2			2		
分化程度	80	51	0.007	0.997	49	0.603	0.740
G1	28	18			17		
G2	33	21			19		
G3	19	12			13		

定为表达阳性。

**统计学处理** 结果采用SPSS11.0软件进行分析。Smac和Cyt C蛋白在多组间的比较采用Kruskal-Wallis Test检验,两两组间比较采用Willcoxon秩和检验,Smac和Cyt C蛋白表达与食管癌分期的关系采用 $\chi^2$ 检验,Smac和Cyt C蛋白表达的相关性采用Spearman等级相关分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 Smac和Cyt C蛋白在食管正常组织、癌组织及癌旁组织中的表达情况** Smac和Cyt C均表达于癌组织细胞的胞浆中。Smac在食管鳞癌组织、正常组织、癌旁组织的阳性表达率分别为63.75%、92.50%、77.50%,经Kruskal-Wallis Test有显著性差异( $H_c = 28.703, P < 0.05$ )。Cyt C在食管鳞癌组织、正常组织、癌旁组织的阳性表达率分别为61.25%、90.0%、72.50%,有显著性差异( $H_c = 24.720, P < 0.05$ ),进一步对Smac和Cyt C蛋白在不同组织中的表达情况进行两两比较(Willcoxon秩和检验),发现癌组织与正常组织、癌旁组织在Smac和Cyt C蛋白的阳性率比较上

均有显著性统计学差异( $P$ 值均 $< 0.017$ ),正常组织与癌旁组织在两种蛋白的阳性率比较上未见有显著性统计学差异(表1)。

**2.2 Smac和Cyt C蛋白表达与食管癌分期的关系** Smac/Diablo和Cyt C表达与患者的组织分化程度、浸深润度均无明显关系( $P > 0.05$ )。但与淋巴结转移相关( $P < 0.05$ ,表2)。

**2.3 Smac和Cyt C蛋白表达的相关性及意义** 在Smac表达阴性的29例中,Cyt C蛋白阴性表达25例,占86.21%(25/29),弱阳性表达3例,占10.34%(3/29),强阳性表达1例,占3.45%(1/29);在Smac表达弱阳性的34例中,Cyt C蛋白阴性表达6例,占17.65%(6/34),弱阳性表达26例,占76.47%(26/34),强阳性表达2例,占5.88%(2/34);在Smac表达强阳性的17例中,Cyt C蛋白阴性表达0例,弱阳性表达2例,占11.76%(2/17),强阳性表达15例,占88.24%(15/17);在Smac表达阳性的51例中,Cyt C蛋白阳性表达45例,占88.24%(45/51),两者表达的相关性,采用Spearman等级相关分析,经统计学分析, $r = 0.806, P < 0.01$ ,两者有极强的关联性,呈明显的正相关(表3)。

表 3 食管癌组织Smac和Cyt C蛋白表达的相关性  $n(\%)$ 

Smac		Cyt C		
蛋白表达	<i>n</i>	-	+	++
-	29	25(86.21)	3(10.34)	1(3.45)
+	34	6(17.65)	26(76.47)	2(5.88)
++	17	0(0)	2(11.76)	15(88.24)
合计	80	31	31	18

### 3 讨论

机体内环境的相对稳定受多种因素的调节, 他不仅依赖于细胞增殖和分化的平衡, 还受细胞凋亡的调节, 而细胞凋亡又受诸多凋亡相关基因的调控. 近年来, 大量的研究表明, 凋亡相关基因调控失调, 与肿瘤的发生发展密切相关. 食管癌是我国发病率较高的恶性肿瘤之一, 目前研究表明食管癌的发生、发展也与许多凋亡调节因子紊乱有关<sup>[8-10]</sup>. Smac是2000年美国Du等<sup>[11]</sup>发现的一种新型线粒体膜间隙蛋白, Smac基因位于12号染色体长臂上, 有7个外显子组成, 是目前发现的唯一广泛存在于哺乳动物细胞中直接抑制IAP的蛋白, 可解除IAP家族对Caspase的抑制作用, 进而通过常规抗癌药物或靶向死亡的受体介导, 发出细胞凋亡信号, 从而激活肿瘤细胞的凋亡机制. 但其在肿瘤细胞中表达降低或缺失. Yoo等<sup>[12]</sup>用免疫组织化学分析Smac的表达, 结果显示: 癌瘤中表达率为62%, 包括7/10结肠癌, 42/60胃癌, 4/10肺癌, 2/10前列腺癌, 7/10卵巢癌. 在肉瘤中表达率为22%, 包括5/11横纹肌肉瘤, 2/8恶性神经鞘瘤, 1/6平滑肌肉瘤, 2/7恶性皮肤纤维瘤, 1/2尤因肉瘤, 8例血管肉瘤和8例脂肪肉瘤中无表达. 表明Smac在不同癌组织中表达不同, 提示Smac低表达可能抑制细胞凋亡. 本研究结果显示: Smac在食管正常组织癌旁组织、鳞癌组织的阳性表达率分别为92.50%、77.50%、63.75%, 在正常组织、癌旁组织、癌组织中表达依次降低, 以癌组织中表达最低, 经统计学分析, 有显著性差异( $P<0.05$ ). 在研究Smac蛋白表达与食管癌的分期及淋巴结转移中显示, Smac蛋白表达与淋巴结转移呈负相关, 由此说明, Smac表达降低确与食管癌的发生、发展密切相关.

Cyt C是第一种被发现由线粒体释放的促凋亡蛋白. 到目前为止, 其释放机制尚未完全阐明, 但有研究结果显示<sup>[12]</sup>, 线粒体中细胞色素C的释放分为两步: 首先, 当细胞受到凋亡因素刺激时, 细胞色素C与线粒体内膜的松散或紧密结合

状态受到破坏, 使细胞色素C成为游离状态, 释放入胞质; 其次, 通过Bcl-2家族促凋亡成员Bax/Bak造成线粒体外膜中断, 使线粒体外膜的通透性增加, 促使游离的细胞色素C释放. 有关实验结果证明<sup>[13]</sup>, CytC是一个线粒体起源普遍存在的细胞凋亡信号分子, 线粒体释放细胞色素C的同时, 还释放另一种促细胞凋亡因子Smac. 实验证明细胞色素C从线粒体释放是细胞凋亡的关键步骤, 细胞色素C在dATP存在的条件下能与凋亡相关因子1(Apaf-1)结合, 使其形成多聚体, 并促使Caspase-9与其结合形成凋亡小体, Caspase-9被激活, 被激活的Caspase-9能激活其他的Caspase如Caspase-3等, 从而诱导细胞凋亡. 本研究结果提示: 在Smac表达阴性组(29例), Cyt C蛋白阴性表达25例, 占86.21%(25/29), 在Smac表达弱阳性组(34例), Cyt C蛋白弱阳性表达26例, 占76.47%(26/34), 在Smac表达强阳性的17例中, Cyt C蛋白强阳性表达15例, 占88.24%(15/17); 在Smac表达阳性的51例中, Cyt C蛋白阳性表达45例, 占88.24%(45/51), 两者表达具有高度相关性, 呈明显正相关, 经统计学分析,  $r = 0.806$ ,  $P<0.01$ . 说明Smac和Cyt C蛋白表达在食管癌细胞的凋亡中具有协同作用, 且均与肿瘤的转移密切相关.

总之, 本实验结果显示: 在食管癌组织中Smac和Cyt C蛋白质的表达与正常食管组织中的表达具有明显的差异性( $P<0.05$ ), 同时与食管癌的病理分期, 淋巴结转移均有密切的关系, 说明这两种蛋白在一定程度上参与了食管癌的发生与发展. 通过基因技术外源性导入融合表达Smac的质粒可以诱发细胞凋亡<sup>[2]</sup>, 或者Smac的表达增高可以增强肿瘤患者化疗和放疗的效果<sup>[4]</sup>, 从而为治疗肿瘤提供了一个广阔的前景.

### 4 参考文献

- Wang X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 2001; 15: 2922-2933
- Jia L, Patwari Y, Kelsey SM, Srinivasula SM, Agrawal SG, Alnemri ES, Newland AC. Role of Smac in human leukaemic cell apoptosis and proliferation. *Oncogene* 2003; 22: 1589-1599
- Graham SH, Chen J. Programmed cell death in cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001; 21: 99-109
- Li P, He QP, Ouyang YB, Liu CL, Hu BR, Siesjö BK. Early release of cytochrome C and activation of caspase-3 in hyperglycemic rats subjected to transient forebrain ischemia. *Brain Res* 2001; 896: 69-76
- Volbracht C, Leist M, Kolb SA, Nicotera P. Apoptosis in caspase-inhibited neurons. *Mol Med* 2001; 7: 36-48
- 张汝刚. 当今食管癌的若干问题. *继续医学教育* 2006; 20: 79-83
- 方文涛. 第7版国际抗癌联盟食管鳞癌TNM分期解读. *上海交通大学学报(医学版)* 2011; 31: 265

### ■应用要点

本文研究结果表明, 食管癌的发生发展与凋亡调节因子Smac和Cyt C的凋亡紊乱情况密切相关, 对食管癌的生物治疗具有重要的指导作用.

## ■同行评价

本文研究结果有一定科学意义,对食管癌的治疗具有一定指导意义。

- 8 Salvesen GS, Duckett CS. IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3: 401-410
- 9 刘丽萍, 涂响安, 赵志毅, 张明, 左连富. 食管癌Fas、bc1-2蛋白和DNA含量的流式细胞定量研究. *中国医师杂志* 2002; 4: 621-623
- 10 Güner D, Sturm I, Hemmati P, Hermann S, Hauptmann S, Wurm R, Budach V, Dörken B, Lorenz M, Daniel PT. Multigene analysis of Rb pathway and apoptosis control in esophageal squamous cell carcinoma identifies patients with good prognosis. *Int J Cancer* 2003; 103: 445-454
- 11 Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 2000; 102: 33-42
- 12 Yoo NJ, Kim HS, Kim SY, Park WS, Park CH, Jeon HM, Jung ES, Lee JY, Lee SH. Immunohistochemical analysis of Smac/DIABLO expression in human carcinomas and sarcomas. *APMIS* 2003; 111: 382-388
- 13 Ott M, Robertson JD, Gogvadze V, Zhivotovsky B, Orrenius S. Cytochrome c release from mitochondria proceeds by a two-step process. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 1259-1263

编辑 李军亮 电编 鲁亚静

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: <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>c</sup> $P < 0.05$ , <sup>d</sup> $P < 0.01$ ; 第3套为<sup>e</sup> $P < 0.05$ , <sup>f</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 $t/\text{min}$ ,  $c/(\text{mol/L})$ ,  $p/\text{kPa}$ ,  $V/\text{mL}$ ,  $t/^\circ\text{C}$ 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)志谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐。