

# 流体剪切应力对肝星状细胞的活化和相关基因表达的影响

崔晓栋, 尹青令, 张晓芸, 李宏, 官秀梅, 李鑫, 王建英, 成敏

崔晓栋, 张晓芸, 李宏, 官秀梅, 李鑫, 王建英, 潍坊医学院基础医学院 山东省潍坊市 261053

尹青令, 成敏, 潍坊医学院医学中心实验室 山东省潍坊市 261053  
崔晓栋, 讲师, 主要从事肝纤维化、肝硬化的发生机制与防治方面的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30900290

山东省自然科学基金资助项目, No. ZR2010HQ046

作者贡献分布: 此课题由崔晓栋设计; 研究过程由崔晓栋与尹青令操作完成; 研究所用流体剪切应力实验装置由成敏提供; 荧光定量PCR实验由成敏给予指导和帮助; 细胞培养耗材由李宏、官秀梅、李鑫及王建英提供; 数据分析由张晓芸完成; 本论文写作由崔晓栋完成; 成敏指导论文写作。

通讯作者: 成敏, 副教授, 医学博士, 261053, 山东省潍坊市宝通西街7166号, 潍坊医学院医学中心实验室。

chengmin1976@wfmcc.edu.cn

收稿日期: 2012-02-17 修回日期: 2012-04-25

接受日期: 2012-05-18 在线出版日期: 2012-11-18

## Effect of fluid shear stress on activation of hepatic stellate cells and expression of $\alpha$ -SMA, collagen-I, collagen-III, MMP-2, and MMP-9

Xiao-Dong Cui, Qing-Ling Yin, Xiao-Yun Zhang, Hong Li, Xiu-Mei Guan, Xin Li, Jian-Ying Wang, Min Cheng

Xiao-Dong Cui, Xiao-Yun Zhang, Hong Li, Xiu-Mei Guan, Xin Li, Jian-Ying Wang, Department of Physiopathology, School of Basic Medicine, Weifang Medical College, Weifang 261053, Shandong Province, China  
Qing-Ling Yin, Min Cheng, Medical Research Center, Weifang Medical College, Weifang 261053, Shandong Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30900290; and the Natural Science Foundation of Shandong Province, No. ZR2010HQ046

Correspondence to: Min Cheng, Associate Professor, Medical Research Center, Weifang Medical College, 7166 Baotong West Street, Weifang 261053, Shandong Province, China. chengmin1976@wfmcc.edu.cn

Received: 2012-02-17 Revised: 2012-04-25

Accepted: 2012-05-18 Published online: 2012-11-18

## Abstract

**AIM:** To investigate the effects of different types of fluid shear stress on the activation of hepatic stellate cells-T6 (HSC-T6) and expression of  $\alpha$ -SMA, collagen-I, collagen-III, MMP-2, and MMP-9.

**METHODS:** HSC-T6 cells were seeded on slides precoated with rat tail collagen and exposed

to different types of fluid shear stress (6, 12, 20 dyn/cm<sup>2</sup>) for 3 h, and static cells served as controls. The gene expression of  $\alpha$ -SMA, collagen-I, collagen-III, MMP-2 and MMP-9 was assayed by real-time RT-PCR. Intracellular  $\alpha$ -SMA protein was analyzed by FACS.

**RESULTS:** After treatment by fluid shear stress, the expression of  $\alpha$ -SMA and collagen-III was lower in the low shear stress (6 dyn/cm<sup>2</sup>) group than that in the control group. However, the expression of  $\alpha$ -SMA was higher in the moderate (12 dyn/cm<sup>2</sup>) and high (20 dyn/cm<sup>2</sup>) shear stress groups than that in the control group, and the expression of collagen-III was higher in the high shear stress group than that in the control group. There was no significant difference in the expression of collagen-I among different fluid shear stress groups. The expression of MMP-2 was higher than in three fluid shear stress groups than in the control group.

**CONCLUSION:** High fluid shear stress can lead to the activation of HSC-T6 cells and promote the mRNA expression of  $\alpha$ -SMA, collagen-III and MMP-2.

**Key Words:** Hepatic stellate cells; Fluid shear stress; Liver fibrosis

Cui XD, Yin QL, Zhang XY, Li H, Guan XM, Li X, Wang JY, Cheng M. Effect of fluid shear stress on activation of hepatic stellate cells and expression of  $\alpha$ -SMA, collagen-I, collagen-III, MMP-2, and MMP-9. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(32): 3135-3139

## 摘要

**目的:** 探讨不同大小的流体剪切应力对大鼠肝星状细胞株HSC-T6的活化和基因表达的影响。

**方法:** 对种植于鼠尾胶原上的HSC-T6细胞施以剪切应力处理, 剪切应力的大小分别为6、12、20 dyn/cm<sup>2</sup>, 干预时间为3 h。TRIzol法提取mRNA, 采用SYBR Green荧光定量RT-PCR方法分别检测各组 $\alpha$ -SMA、Collagen-I、Collagen-III、MMP-2及MMP-9基因的表达情况, 流式细胞术检测细胞内蛋白 $\alpha$ -SMA的表达。

## ■背景资料

在肝纤维化过程中, 肝星状细胞(HSC)所处环境中的血液动力学因素变化对肝纤维化进程产生着重要的影响, 因此考察机械力对HSCs的生物学特性的影响是非常有必要的。

## ■同行评议者

季菊玲, 副教授, 南通大学医学院病理教研室

## ■ 研发前沿

生物力学在研究血管重建, 门脉高压对门静脉的重建方面已经取得丰硕的成果。但是关于生物力学在肝纤维化发生发展过程中作用的研究尚在起步阶段。

**结果:** 剪切应力处理3 h后, 与对照组相比, 6 dyn/cm<sup>2</sup>剪切应力组 $\alpha$ -SMA、Collogen-III的表达降低, 但随着剪切应力的增加(12 dyn/cm<sup>2</sup>、20 dyn/cm<sup>2</sup>),  $\alpha$ -SMA mRNA较对照组表达升高; 20 dyn/cm<sup>2</sup>剪切应力组Collogen-III基因表达较对照组升高; 3种剪切应力组之间Collogen-I mRNA的表达无统计学差异; 3种剪切应力均上调MMP-2 mRNA的表达。

**结论:** 低剪切应力对HSC-T6的活化有一定的抑制作用, 相反高剪切应力可以促进HSC-T6的活化, 促进Collogen-III、MMP-2的表达。

**关键词:** 肝星状细胞; 剪切应力; 肝纤维化

崔晓栋, 尹青令, 张晓芸, 李宏, 官秀梅, 李鑫, 王建英, 成敏. 流体剪切应力对肝星状细胞的活化和相关基因表达的影响. 世界华人消化杂志 2012; 20(32): 3135-3139

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3135.asp>

## 0 引言

肝纤维化的发生是肝脏内纤维结缔组织异常增生的病理生理过程。目前研究表明肝间质细胞, 尤其是肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)的激活是肝纤维化发生、发展的关键因素<sup>[1,2]</sup>。HSCs存在于肝血窦Disse间隙内皮屏障下, 同时其细胞质突起与肝窦内皮细胞壁平行, 正常情况下HSCs处于静止状态。当各种致肝病因因子如生物、化学、物理因素等造成肝脏细胞损伤时, 大量HSCs被活化, 转化成肌成纤维细胞(myofibro-blast, MFB), 合成较多的细胞外基质(extracellular matrix, ECM), 使其在肝脏内不断沉积, 致使肝纤维化、肝硬化的形成。HSC所处的特殊位置决定了其不仅容易受到化学因素, 同时还可直接或间接受到肝脏血液流体动力学因素的影响<sup>[3]</sup>。本实验通过平行板流室系统模拟HSC在体内的流体剪切应力环境, 初步探讨不同大小流体剪切应力对大鼠肝星状细胞基因表达的影响。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** HST-T6购自中南大学湘雅中心实验室。荧光定量PCR(美国伯乐IQ5); 50 mL/L CO<sub>2</sub>培养箱(Thermo); 高糖型DMEM(Gibco公司), 胎牛血清(杭州四季青公司), TRIzol试剂(Invitrogen), SYBR<sup>®</sup> PrimeScript<sup>®</sup> RT-PCR Kit II及相关引物设计合成(大连宝生物公司), 0.25%胰蛋白酶、鼠尾胶原蛋白、琼脂糖、 $\alpha$ -SMA抗体均购自sigma公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养和接种:** 将HST-T6接种于含100 mL/L胎牛血清的DMEM(高糖)培养基中, 置于37 °C、50 mL/L CO<sub>2</sub>饱和湿度的培养箱培养。每3 d换液, 融合度达90%后胰酶消化, 接种于经鼠尾胶原打底处理的载玻片上, 待其铺满程度达80%后行剪切应力干预。

**1.2.2 流体剪切应力加载装置和条件设置:** 剪切应力加载所应用的实验装置<sup>[4,5]</sup>由蠕动泵、储液瓶、管道及平行板流室组成。平行板流室的流室测试区满足: (1)层流; (2)二维流动; (3)充分发展的流动。给予HSC-T6施加6、12、20 dyn/cm<sup>2</sup>的力学刺激, 干预时间为3 h, 力学负荷大小参考丁纪明等<sup>[6]</sup>文献。

**1.2.3 实验分组:** 设立实验组和对照组。实验组施加不同大小剪切应力处理, 对照组为未施加剪切应力静止状态, 即0 dyn/cm<sup>2</sup>的HSC-T6组。

**1.2.4 流式细胞术检测HSC-T6  $\alpha$ -SMA的表达:** 待处理组HSC-T6用PBS清洗3次, 采用2%Triton X-100破膜5 min。取 $2 \times 10^6$ - $4 \times 10^6$ 个细胞, 加入一抗 $\alpha$ -SMA抗体(1:100), 室温下避光反应2 h, PE标记相应二抗染色, 行FACS检测, 每组样本收集10 000个细胞, 数据用Flow Jo软件分析。

**1.2.5 荧光定量RT-PCR方法检测不同基因的表达:** 按TRIzol试剂说明书提取总RNA, 溶于DEPC处理的去离子水中, -80 °C保存备用。荧光定量RT-PCR根据宝生物说明书操作。反应引物均委托宝生物设计合成。反应体系为25  $\mu$ L, 引物浓度为终浓度为0.4  $\mu$ mol/L。PCR反应程序: 95 °C预变性30 s; 95 °C变性30 s, 60 °C退火30 s, 40个循环。实验中以超纯水(PCR级, 无RNase)作为阴性对照。根据Ct值, 利用公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算出相对表达量, 重复3次。扩增后采用1.5%琼脂糖凝胶电泳检测扩增片段大小及有无非特异性扩增。

**统计学处理** 采用SPSS10.0统计学软件处理, 正态分布资料组间差异性分析采用单因素方差分析, 非正态分布资料采用Mann-Whitney U检验。数据均以mean $\pm$ SD表示,  $P < 0.05$ 有统计学差别。

## 2 结果

**2.1 定量RT-PCR 荧光定量RT-PCR扩增曲线显示** 所有样品均进入平台期, 提示反应条件设定准确, 同时溶解曲线未见杂峰, 琼脂糖凝胶电泳条带EB染色, 目的条带均在理论位置(图1)。

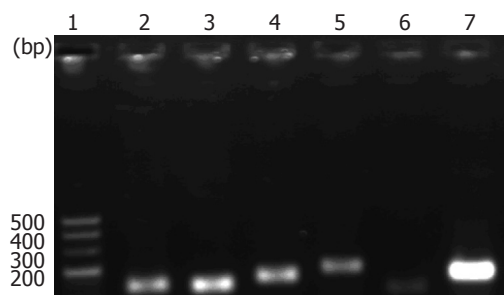


图 1 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物. 1: DL500 Marker; 2: Collogen-III; 3: Collogen-I; 4: MMP-2; 5: MMP-9; 6:  $\alpha$ -SMA; 7: GAPDH.

**2.2 流体剪切应力对HSC-T6  $\alpha$ -SMA蛋白表达的影响** 不同剪切应力作用HSC-T6 12 h, 和静止组HSC-T6相比, 12、20 dyn/cm<sup>2</sup>处理组 $\alpha$ -SMA蛋白表达量升高( $P<0.05$ ), 提示12、20 dyn/cm<sup>2</sup>剪切应力作用后可促进其表达(图2).

**2.3 流体剪切应力对HSC-T6  $\alpha$ -SMA、Collogen-I 和Collogen-III基因表达的影响** 不同的流体剪切应力处理3 h后, 与对照组相比, 低剪切应力(6 dyn/cm<sup>2</sup>)组 $\alpha$ -SMA mRNA表达降低( $0.743 \pm 0.011$ ), Collogen-III表达降低( $0.547 \pm 0.0012$ ), 差异均有统计学意义( $P<0.05$ ), 但随着剪切应力的增加(12、20 dyn/cm<sup>2</sup>) $\alpha$ -SMA mRNA表达均升高, 分别为 $1.330 \pm 0.013$ ,  $2.101 \pm 0.012$ , 差异有统计学意义( $P<0.05$ ); 当剪切应力增加到20 dyn/cm<sup>2</sup>时, Collogen-III基因表达与对照组相比较升高( $1.337 \pm 0.010$ ). 但3种剪切应力对HSCT6 Collogen-I mRNA的表达则无统计学差异.

**2.4 HSC-T6经不同流体剪切应力处理后的MMP-2和MMP-9基因表达** 流体剪切应力6、12、20 dyn/cm<sup>2</sup>干预3 h后, 与对照组相比, HSC-T6 MMP-2 mRNA表达均增高, 分别为 $2.001 \pm 0.018$ ,  $2.010 \pm 0.016$ ,  $2.415 \pm 0.013$ , 有统计学差异( $P<0.05$ ); 低剪切应力(6 dyn/cm<sup>2</sup>)干预后发现MMP-9表达较对照组降低( $0.672 \pm 0.010$ ), 有统计学差异( $P<0.05$ ).

### 3 讨论

肝纤维化是病毒性肝炎、酒精性、自身免疫性、胆管性肝病等多种原因损害后肝脏的一种修复过程, 但这一过程往往由于胞外基质的过度积累而造成肝功能障碍. 研究表明: 肝纤维化是一个ECM形成和降解失衡的过程. 其涉及到的机制包括物理、化学、生物等方面的变化致使静止状态的HSC激活、活化、转化为肌成纤维细胞(标志分子为 $\alpha$ -SMA)<sup>[7,8]</sup>, 使HSC收缩

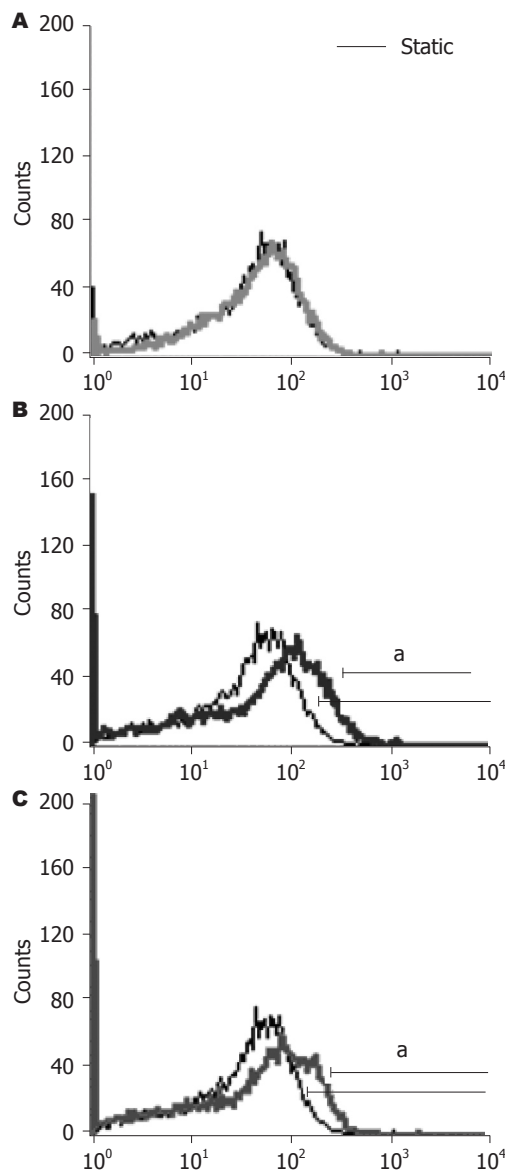


图 2 不同的流体剪切应力对HSC-T6  $\alpha$ -SMA蛋白表达的影响. A: 6 dyn/cm<sup>2</sup>; B: 12 dyn/cm<sup>2</sup>; C: 20 dyn/cm<sup>2</sup>. <sup>a</sup> $P<0.05$  vs static control.

能力增强, 参与对肝血窦血流量的调控. 除此之外, 活化后的HSC能合成大量的ECM, 如I、II、III和IV胶原和非胶原基质蛋白. 与此同时, 活化的HSC还分泌多种基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)<sup>[9]</sup>, 催化胞外基质的分解. HSC存在于肝血窦Disse间隙内皮下, 激活后的HSC在结构上有长的细胞质突起与肝窦内皮细胞壁平行且在内皮细胞间穿插, 因此活化后的HSC直接或间接受到血流动力学的影响发生相应的变化<sup>[3]</sup>.

肝脏血流丰富, 肝血窦也接受两种血供: 末端入口微静脉(the terminal portal venule, TPVn)和末端肝微动脉(the terminal hepatic arteriole, THAo). TPVn直接与肝血窦相联系, 提供约

#### ■ 创新盘点

本文从肝脏血液动力学角度研究剪切应力对肝星状细胞的活化及胞外基质表达的影响, 从生物力学角度探讨肝纤维化的病理机制, 具有较高的科学性和创新性.



### ■同行评价

本文创新性地阐述肝脏血流动力学的改变对肝星状细胞的影响,初步探讨力学环境对肝纤维化的影响,该文研究水平较高,创新性强。

80%血量,而THAo通过末端的毛细血管前括约肌的舒缩调节,主要为肝血窦提供平稳和恒定的动力。小静脉内剪切应力 $<10 \text{ dyn/cm}^{2[10]}$ ,但基于肝血窦血流特点,肝血窦内也属静脉系统,但其内剪切应力比一般小静脉偏高些。随着肝纤维化、肝硬化的发生,肝内血管阻力增加,门静脉血流量增加,此时肝血窦剪切应力可以异常增加。故本实验综合参考丁纪明等<sup>[6]</sup>实验数据和Debbaut等<sup>[11]</sup>计算相关因素,设置低剪切应力组( $6 \text{ dyn/cm}^2$ )、中剪切应力组( $12 \text{ dyn/cm}^2$ )和高剪切应力组( $20 \text{ dyn/cm}^2$ )。采用Cheng等<sup>[4,5]</sup>剪切应力力学加载装置,以DMEM高糖完全培养基作为流体,通过力学公式计算出所需具体流量,使用蠕动泵控制流速达到模拟肝血窦血流的目的。

实验发现,与对照组相比,低剪切应力( $6 \text{ dyn/cm}^2$ )处理后HSC-T6  $\alpha$ -SMA mRNA表达量稍低;相反随着剪切应力增高, $\alpha$ -SMA mRNA和蛋白表达增加,其活化程度增高,促进肝纤维化的发生。同时我们还发现剪切应力处理后,HSC外基质Collogen-I和III表达差别明显,3种大小剪切应力对Collogen-I的表达与对照组相比均无统计学差异。但 $6 \text{ dyn/cm}^2$ 剪切应力可抑制HSC Collogen-III表达,相反高剪切应力 $20 \text{ dyn/cm}^2$ 可使其表达上调。提示在高剪切应力状态下HSC可能更容易激活、活化,其表达ECM可能以Collogen-III为主,而非以Collogen-I为主。究其原因可能是在肝损伤早期主要以Collogen-III沉积为主,而晚期以Collogen-I增加最为明显<sup>[12]</sup>。随着剪切应力的变化,HSC激活、活化以及其生物学功能如何改变以及其发生的具体机制,国内外尚未见报道,有待于进一步深入研究。

如前所述,肝纤维是一个ECM形成和降解失衡的病理过程,MMPs是一类与细胞间基质蛋白代谢相关的结构蛋白,是主要的基质降解酶<sup>[13,14]</sup>,可参与许多正常生物学过程。有关文献显示肝纤维时HSC是MMP-2<sup>[15]</sup>和MMP-9<sup>[16]</sup>的主要细胞来源<sup>[17]</sup>,因此我们还对剪切应力状态下HSC表达MMP-2和MMP-9做了初步探讨。发现3种剪切应力均可以促进MMP-2的表达,而低剪切应力( $6 \text{ dyn/cm}^2$ )却抑制MMP-9的表达,但 $12$ 、 $20 \text{ dyn/cm}^2$ 对MMP-9表达的影响无统计学差异。提示一定的剪切应力可以促进HSC活化、ECM表达的同时,还可能促进MMP-2的表达,以此来发挥其降解相应ECM的作用。

总之,本实验构建的体外血流动力学模型能

较好地反应肝纤维化,肝硬化前后HSC在肝窦和DISS内所承受的剪切应力,本研究中对不同的剪切应力对HSC-T6的 $\alpha$ -SMA、Collogen-I和III、MMP-2和MMP-9的变化做了初步探讨,但其具体机制亟待进一步深入研究。

### 4 参考文献

- Marcos LA, Terashima A, Yi P, Andrade R, Cubero FJ, Albanis E, Gotuzzo E, Espinoza JR, Friedman SL. Mechanisms of liver fibrosis associated with experimental Fasciola hepatica infection: roles of Fas2 proteinase and hepatic stellate cell activation. *J Parasitol* 2011; 97: 82-87
- 邵祥强, 肖华胜. 肝纤维化发病机制与临床诊断的研究进展. 世界华人消化杂志 2011; 19: 268-274
- 陈骧, 徐世荣, 吴云鹏. 肝纤维化过程中血液动力学因素对肝星状细胞的影响. 世界华人消化杂志 2008; 16: 185-191
- Cheng M, Liu X, Li Y, Tang R, Zhang W, Wu J, Li L, Liu X, Gang Y, Chen H. IL-8 gene induction by low shear stress: pharmacological evaluation of the role of signaling molecules. *Biorheology* 2007; 44: 349-360
- Cheng M, Wu J, Li Y, Nie Y, Chen H. Activation of MAPK participates in low shear stress-induced IL-8 gene expression in endothelial cells. *Clin Biomech (Bristol, Avon)* 2008; 23 Suppl 1: S96-S103
- 丁纪明, 陈平, 张林, 朱瑾, 熊燕, 段世刚, 李颖. 切应力对大鼠肝窦内皮细胞分泌功能的影响. 中国普外基础与临床杂志 2005; 12: 455-458, 468
- 张贺吉, 吴江峰, 柳长柏. 肝星状细胞的可塑性及其对肝纤维化的意义. 世界华人消化杂志 2011; 19: 3415-3419
- Almeida-Porada G, Zanjani ED, Porada CD. Bone marrow stem cells and liver regeneration. *Exp Hematol* 2010; 38: 574-580
- 韦燕飞, 彭岳, 谢海源, 赵铁建. 基于肝星状细胞分子机制的抗肝纤维化研究进展. 世界华人消化杂志 2009; 17: 1745-1748
- Shah V, Haddad FG, Garcia-Cardena G, Frangos JA, Mennone A, Groszmann RJ, Sessa WC. Liver sinusoidal endothelial cells are responsible for nitric oxide modulation of resistance in the hepatic sinusoids. *J Clin Invest* 1997; 100: 2923-2930
- Debbaut C, Monbaliu D, Casteleyn C, Cornillie P, Van Loo D, Masschaele B, Pirenne J, Simoons P, Van Hoorebeke L, Segers P. From vascular corrosion cast to electrical analog model for the study of human liver hemodynamics and perfusion. *IEEE Trans Biomed Eng* 2011; 58: 25-35
- 刘诗权, 于皆平, 冉宗学. 基质金属蛋白酶及其组织抑制因子和肝纤维化. 胃肠病学 2002; 7: 183-185
- 冀润利, 邸瑶, 夏时海, 李飞. 氧化苦参碱对SW1990细胞MMP-2表达的抑制作用及对细胞侵袭力的影响. 世界华人消化杂志 2011; 19: 19-24
- 廖明, 李彦, 舒伟. Genistein对大鼠肝星状细胞的增殖及TGF- $\beta$ 1、MMP-2和TIMP-2表达的影响. 世界华人消化杂志 2010; 18: 229-233
- Li J, Fan R, Zhao S, Liu L, Guo S, Wu N, Zhang W, Chen P. Reactive Oxygen Species Released from Hypoxic Hepatocytes Regulates MMP-2 Expression in Hepatic Stellate Cells. *Int J Mol Sci* 2011; 12: 2434-2447
- Dechène A, Sowa JP, Gieseler RK, Jochum C,

Bechmann LP, El Fouly A, Schlattjan M, Saner F, Baba HA, Paul A, Dries V, Odenthal M, Gerken G, Friedman SL, Canbay A. Acute liver failure is associated with elevated liver stiffness and hepatic stel-

late cell activation. *Hepatology* 2010; 52: 1008-1016  
Han YP. Matrix metalloproteinases, the pros and cons, in liver fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21 Suppl 3: S88-S91

编辑 李军亮 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: <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.