

# 帕瑞昔布对人胰腺癌细胞株BxPC-3、AsPC-1增殖凋亡的影响及其机制

李鹏, 刘江伟, 许永华, 朱淑萍, 郭飞, 董翔

李鹏, 新疆石河子大学医学院 新疆维吾尔自治区石河子市 832000

刘江伟, 郭飞, 中国人民解放军兰州军区乌鲁木齐总医院肝胆外科 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830000

许永华, 朱淑萍, 董翔, 中国人民解放军兰州军区乌鲁木齐总医院 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830000

李鹏, 在读硕士, 主要从事消化系统肿瘤的研究。

中国博士后基金资助项目, No. 20100481517

作者贡献分布: 李鹏与刘江伟对此文所作贡献均等; 此课题由李鹏与刘江伟设计; 研究过程由李鹏与刘江伟操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由许永华与朱淑萍提供; 数据分析由李鹏、郭飞及董翔完成; 本论文写作由李鹏与刘江伟完成。

通讯作者: 刘江伟, 教授, 主任医师, 830000, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市友好北路359号, 中国人民解放军兰州军区乌鲁木齐总医院肝胆外科, ljw273@sohu.com

收稿日期: 2011-11-26 修回日期: 2012-01-10

接受日期: 2012-03-10 在线出版日期: 2012-03-18

## Parecoxib inhibits cell proliferation and induces apoptosis in human pancreatic cancer cell lines BxPC-3 and AsPC-1

Peng Li, Jiang-Wei Liu, Yong-Hua Xu, Shu-Ping Zhu, Fei Guo, Xiang Dong

Peng Li, Medical School of Shihezi University, Shihezi 832000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Jiang-Wei Liu, Fei Guo, Department of Hepatobiliary Surgery, Urumqi General Hospital of Lanzhou Military Region, Urumqi 830000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Yong-Hua Xu, Shu-Ping Zhu, Xiang Dong, Urumqi General Hospital of Lanzhou Military Region, Urumqi 830000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Supported by: the Chinese Postdoctoral Science Foundation, No. 20100481517

Correspondence to: Jiang-Wei Liu, Professor, Department of Hepatobiliary Surgery, Urumqi General Hospital of Lanzhou Military Region, Urumqi 830000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China. ljw273@sohu.com.

Received: 2011-11-26 Revised: 2012-01-10

Accepted: 2012-03-10 Published online: 2012-03-18

## Abstract

**AIM:** To investigate the effect of parecoxib on cell proliferation and apoptosis in human pancreatic cancer cell lines BxPC-3 and AsPC-1 and to explore possible mechanisms involved.

**METHODS:** After BxPC-3 and AsPC-1 cells

were incubated with different concentrations of parecoxib, cell viability was measured by MTT assay to calculate the half maximal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>); cell apoptosis was evaluated by TUNEL assay; and the expression of COX-2 was detected RT-PCR.

**RESULTS:** Cell viability was apparently inhibited by parecoxib in both cell types, and the inhibitory effect was time- and dose-dependent. The IC<sub>50</sub> values in the two cell lines were 400.98  $\mu\text{mol/L} \pm 10.78 \mu\text{mol/L}$  and 256.3  $\mu\text{mol/L} \pm 2.98 \mu\text{mol/L}$ , respectively. Treatment with parecoxib increased apoptosis rate and down-regulated COX-2 expression in both cell lines.

**CONCLUSION:** Parecoxib potently inhibits cell proliferation and induces apoptosis in human pancreatic cancer cell lines BxPC-3 and AsPC-1 possibly by suppressing the expression of COX-2.

**Key Words:** Pancreatic cancer; Parecoxib; Proliferation; Apoptosis; COX-2

Li P, Liu JW, Xu YH, Zhu SP, Guo F, Dong X. Parecoxib inhibits cell proliferation and induces apoptosis in human pancreatic cancer cell lines BxPC-3 and AsPC-1. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(8): 675-679

## 摘要

**目的:** 研究帕瑞昔布(parecoxib, PCB)对人胰腺癌细胞株BxPC-3和AsPC-1的增殖、凋亡及其可能的分子机制。

**方法:** BxPC-3、AsPC-1细胞用不同浓度PCB的培养液孵育后, 利用MTT法测定细胞活性, 计算IC<sub>50</sub>值, TUNEL法检测处理后细胞的凋亡情况, RT-PCR验证相关蛋白的变化表达。

**结果:** PCB对两种细胞生长呈时间和剂量依赖性抑制; PCB处理后BxPC-3、AsPC-1两种细胞IC<sub>50</sub>值为: 400.98  $\mu\text{mol/L} \pm 10.78 \mu\text{mol/L}$ 、256.3  $\mu\text{mol/L} \pm 2.98 \mu\text{mol/L}$ ; TUNEL法检测证明凋亡率增加; RT-PCR显示COX-2表达明显降低。

## ■背景资料

胰腺癌已成为全球第4大死因, 5年生存率仅1%-4%。胰腺癌由于诊断困难、预后差、发生率高, 已成为一个世界性的健康问题。

## ■同行评议者

谭晓冬, 教授, 中国医科大学附属盛京医院

## ■研发前沿

药物治疗仍然是胰腺癌治疗的基础,而COX-2抑制剂的研究已经进入白热化的阶段,随着新型COX-2抑制剂的上市,COX-2抑制剂应用于肿瘤领域成为研究的重要课题。

**结论:** PCB可以抑制胰腺癌细胞增殖,并诱导其凋亡生长,其可能机制是通过抑制COX-2表达来实现的。

**关键词:** 胰腺癌; 帕瑞昔布; 增殖; 凋亡; COX-2

李鹏, 刘江伟, 许永华, 朱淑萍, 郭飞, 董翔. 帕瑞昔布对人胰腺癌细胞株BxPC-3、AsPC-1增殖凋亡的影响及其机制. 世界华人消化杂志 2012; 20(8): 675-679

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/675.asp>

## 0 引言

胰腺癌(pancreatic cancer, PC)是一种起源于胰腺导管上皮的恶性肿瘤,恶性程度高,侵袭和转移率高,早期诊断困难,进展期症状缺乏特异性,是消化系统治疗效果差的恶性肿瘤之一。胰腺癌已成为全球第4大死因<sup>[1]</sup>, 5年生存率仅1%-4%<sup>[2]</sup>。胰腺癌由于诊断困难、预后差、发生率高成为了一个世界性的健康问题<sup>[3,4]</sup>。胰腺癌明确诊断时已经为晚期,还可能发生远处转移。因此手术切除已经不能延长大多数患者的生存时间。药物治疗是胰腺癌治疗的基础,尽管开展很多大规模的药物临床试验,但结果却令人沮丧。因此,寻找有效的口服药物成为治疗胰腺癌的必经之路。帕瑞昔布(parecoxib, PCB)是非甾体抗炎药的其中一个亚型,选择性COX-2抑制剂<sup>[5]</sup>。非甾体抗炎药物抑制COX-1、COX-2,仅有COX-2抑制剂发挥止痛、抗炎、解热的功效。PCB是一种COX-2抑制剂的新药,广泛应用于术后镇痛。流行病学研究显示非甾体抗炎药能够降低结直肠癌的风险<sup>[3,4]</sup>。非甾体抗炎药是花生四烯酸转化成前列腺素过程中的关键酶,COX有2种亚型: COX-1和COX-2,之前的报道显示胰腺癌中COX-2 mRNA和蛋白的表达增加,且COX-2高表达与肿瘤细胞凋亡相关<sup>[5-9]</sup>。自美国FDA将塞来昔布(celecoxib, CCB)的适用范围扩大,用于治疗家族性腺瘤病,COX-2抑制剂的应用范围较之前更为广阔,也成为了众多学者研究的焦点所在。COX-2抑制剂显示了强大的解热镇痛作用。而在大多数的研究中,COX-2抑制剂也不负重望地发挥了抗肿瘤作用。PCB的上市为患者术后镇痛带来了福音,但其在肿瘤中的作用仍未见相关文献报道。为此,PCB能否像CCB那样发挥抗肿瘤的作用,其抗肿瘤的可能机制是我们研究的着眼点。

## 1 材料和方法

1.1 材料 PCB购自辉瑞制药; 高糖DMEM培养

基和胎牛血清购自Gibco公司; 四甲基偶氮唑盐(MTT)及二甲基亚砜(DMSO)购自Amersco; Trizol及琼脂糖购自Invitrogen; RT-PCR试剂盒、Marker购自TaKaRa; TUNEL试剂盒购自Promega;  $\beta$ -actin、COX-2引物由上海生工合成; 所用仪器包括C1000核酸扩增仪、酶标仪、电泳槽(Bio-Rad, 美国)。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞系和细胞培养: 在含有50 mL/L CO<sub>2</sub> 37 °C 95%湿度培养箱中培养。培养液为含100 mL/L胎牛血清和双抗(100 U/mL青霉素和100 U/mL链霉素)的高糖DMEM培养基。当细胞融合90%时,用0.25%胰酶消化传代,对数生长期的细胞为实验对象。

1.2.2 PCB药液配置: PCB用高糖DMEM稀释为不同浓度,针式过滤后,4 °C保存。

1.2.3 MTT法检测药物对细胞抑制率: 细胞接种于96孔板中( $5 \times 10^3$ /孔)。贴壁24 h后,分别加入含有不同浓度(0、10、40、160、320、640、1 000  $\mu$ mol/L)PCB孵育,分别加入MTT,再孵育4 h,弃去孔内液体,加入二甲基亚砜,在酶标仪490 nm波长处检测各孔吸光度(A)值,抑制率 = (1-实验组A/对照组)  $\times$  100%。

1.2.4 TUNEL法检测细胞凋亡: 细胞接种于24孔板,贴壁后分别用不同浓度(0、10、40、160、320、640、1000  $\mu$ mol/L)PCB孵育。48 h后弃去孔内培养液,按照TUNEL试剂盒方法操作,DAPI显色后镜下观察并照相。

1.2.5 RT-PCR法检测COX-2表达: 细胞接种于6孔板中,贴壁后分别用1/2 PCBIC50孵育48 h。收获细胞 $1 \times 10^6$ , TRIzol法提取RNA后反转录为cDNA,反转录体系为: 5 $\times$  PrimeScript Buffer 5  $\mu$ L, PrimeScript Enzyme Mix I 1.25  $\mu$ L, Oligo dT primer 1.25  $\mu$ L, Random 6 mers 5  $\mu$ L, RNA 500 ng, dd H<sub>2</sub>O(免酶)补齐至25  $\mu$ L。PCR反应体系: TaKaRa Ex Taq 0.125  $\mu$ L, 10 $\times$  Ex Taq Buffer 2.5  $\mu$ L, MgCl<sub>2</sub> 0.5  $\mu$ L, dNTP Mix 2  $\mu$ L, cDNA 1  $\mu$ L, Primer forward 1  $\mu$ L, Primer reverse 1  $\mu$ L, dd H<sub>2</sub>O补齐至25  $\mu$ L。COX-2引物(上游: 5'-TCCA-GATCACATTTGATTGACAG-3', 下游: 5'-TGT-GGGAGGATACATCTCTCC-3');  $\beta$ -actin为内参(上游: 5'-GGACTTCGAGCAGGAGATGG-3', 下游: 5'-GCACCGTGTGGCGTAGAGG-3')。PCR产物扩增条件为: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 60.5 °C 30 s, 72 °C 1 min, 35个循环; 72 °C 5 min。COX-2扩增产物440 bp,  $\beta$ -actin产物322 bp。电泳后凝胶成像仪紫外成像, Quantity One软件行灰度扫描。

## ■相关报道

刘江伟等学者研究发现,COX-2在胰腺癌中的表达率为74.5%,认为COX-2可能在胰腺癌的发生、发展及肿瘤的浸润和转移中其重要作用,COX-2的过表达可能是反映胰腺癌预后的有用指标。

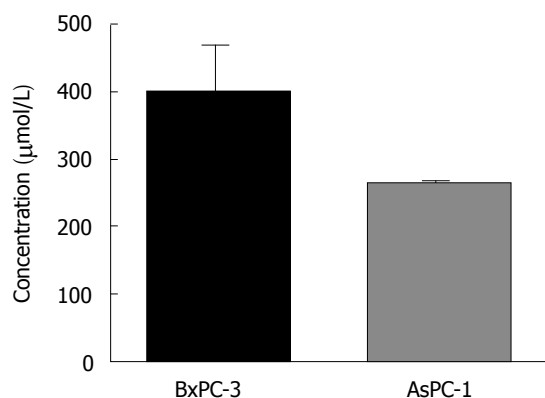


图1 帕瑞昔布对人胰腺癌细胞株IC50值.

表1 BxPC-3、AsPC-1 2种细胞RT-PCR灰度值比较

	实验组	对照组
BxPC-3细胞	0.161 ± 0.171 <sup>a</sup>	1.011 ± 0.774
AsPC-1细胞	0.171 ± 0.017 <sup>a</sup>	0.863 ± 0.036

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 对照组.

**统计学处理** 所得数据采用SPSS17.0软件分析. 计量资料以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, 多个样本比较采用单因素方差分析, 两样本均数采用 $t$ 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

## 2 结果

**2.1 PCB对细胞增殖的影响** 随着药物浓度升高和时间延长, 2种细胞活性均明显下降, 2种细胞对PCB的反应稍有不同, BxPC-3、AsPC-1的IC50分别为400.98  $\mu\text{mol/L}$ 、256.3  $\mu\text{mol/L}$ . 2种细胞IC50值如图1.

**2.2 TUNEL法检测PCB对细胞凋亡的影响** BxPC-3、AsPC-1细胞正常对照组、PCB干预BxPC-3、AsPC-1细胞组凋亡率分别为: 5.35%  $\pm$  0.92%、17.52%  $\pm$  0.75%、2.44%  $\pm$  0.57%、20.35%  $\pm$  0.78%, 干预组与对照组比较, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ , 图2).

**2.3 RT-PCR检测COX-2表达变化** COX-2的表达明显下调, 结果见图3, 表1.

## 3 讨论

PCB是选择性COX-2抑制剂, PCB在癌症领域的研究尚属空白, 其大部分的研究都立足于其极强的术后镇痛作用<sup>[10,11]</sup>, 而COX-2抑制剂CCB早已成为肿瘤界研究的热点. 很多学者<sup>[12-21]</sup>的研究证明COX-2抑制剂在肿瘤进展过程中发挥重要

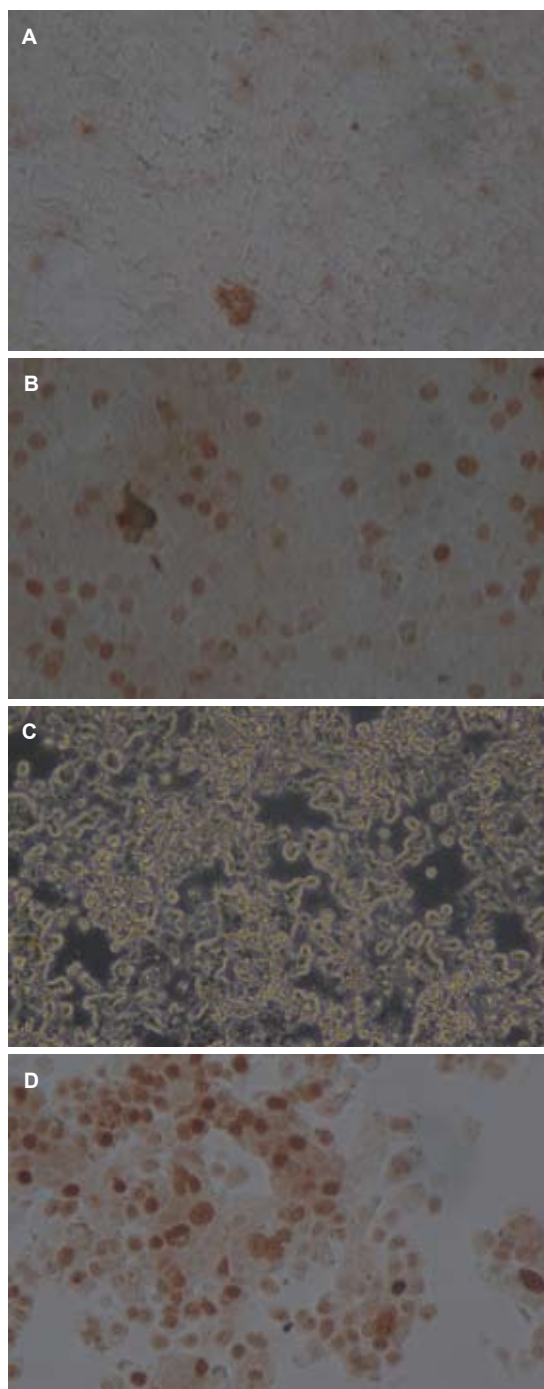


图2 TUNEL法检测帕瑞昔布对细胞凋亡的影响( $\times 200$ ). A: BxPC-3细胞对照组; B: BxPC-3细胞帕瑞昔布组; C: AsPC-1细胞正常组; D: AsPC-1细胞帕瑞昔布组.

作用, 其具体机制尚未阐明.

胰腺癌发病后病情隐匿, 早期诊断极为困难, 很多患者晚期时才有明显症状, 且很多药物耐药成为胰腺癌治疗的难点<sup>[22]</sup>. COX-2抑制剂有望被应用于抗肿瘤药物的范围内. 国内学者<sup>[23-28]</sup>研究发现, COX-2在胰腺癌中的表达率为74.5%, 认为COX-2可能在胰腺癌的发生、发展及肿瘤的浸润和转移中起重要作用, COX-2的高表达可

**■创新盘点**  
新型COX-2抑制剂帕瑞昔布在胰腺癌中的研究并探讨其可能机制是本文的一大亮点.

## ■应用要点

本文研究显示新型COX-2抑制剂可诱导胰腺癌凋亡, 抑制其增殖, 这为胰腺癌的药物治疗提供新思路及实验基础。

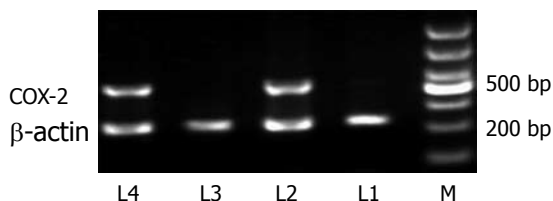


图3 帕瑞昔布对BxPC-3、AsPC-1细胞mRNA表达的影响。M: Marker; L1: BxPC-3 PCB; L2: BxPC-3正常对照组; L3: AsPC-1 PCB; L4: AsPC-1正常对照组。

能是反映胰腺癌预后的有用指标。COX-2在胰腺癌组织中高表达, 而在相邻正常组织中不表达, 其高表达均与胰腺癌细胞增殖、血管生成、抗凋亡有关。我们曾将CCB与顺铂联合作用于胰腺癌BxPC-3, 可明显抑制细胞的增殖, 诱导细胞凋亡并增加胰腺癌细胞对化疗药物的敏感性。本研究应用PCB处理胰腺癌细胞, 发现其增殖抑制, 凋亡增加。

COX-2的过度表达具有以下作用: (1)刺激肿瘤细胞的增殖; (2)抗凋亡; (3)促进肿瘤血管形成; (4)促浸润和转移。因此, COX-2抑制剂是抗胰腺癌很有潜力的药物之一。

本研究中PCB的应用验证了在体外细胞水平上抑制细胞增殖, 并诱导细胞凋亡, 这种作用的可能机制是抑制了COX-2的表达, 从而发挥重要作用。还有很多分子机制是在整个肿瘤发生发展过程中COX-2表达产生了重要影响。故此, 对于COX-2抑制剂在肿瘤中的重要作用还有待进一步从体内试验证明。

PCB不仅有强大的镇痛作用, 尤其是外科手术后的镇痛, 而且为胰腺癌的治疗提供了新希望, 本研究为PCB治疗胰腺癌提供理论依据。

#### 4 参考文献

- Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* 2010; 60: 277-300
- Hidalgo M. Pancreatic cancer. *N Engl J Med* 2010; 362: 1605-1617
- Jemal A, Murray T, Ward E, Samuels A, Tiwari RC, Ghafoor A, Feuer EJ, Thun MJ. Cancer statistics, 2005. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 10-30
- McKenna S, Eatock M. The medical management of pancreatic cancer: a review. *Oncologist* 2003; 8: 149-160
- Molina MA, Sitja-Arnau M, Lemoine MG, Frazier ML, Sinicrope FA. Increased cyclooxygenase-2 expression in human pancreatic carcinomas and cell lines: growth inhibition by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cancer Res* 1999; 59: 4356-4362
- Yip-Schneider MT, Barnard DS, Billings SD, Cheng L, Heilman DK, Lin A, Marshall SJ, Crowell PL, Marshall MS, Sweeney CJ. Cyclooxygenase-2 expression in human pancreatic adenocarcinomas.

*Carcinogenesis* 2000; 21: 139-146

- Franco L, Doria D, Bertazzoni E, Benini A, Bassi C. Increased expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in pancreatic cancer. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2004; 73: 51-58
- Crowell PL, Schmidt CM, Yip-Schneider MT, Savage JJ, Hertzler DA, Cummings WO. Cyclooxygenase-2 expression in hamster and human pancreatic neoplasia. *Neoplasia* 2006; 8: 437-445
- Nasir A, Lopez A, Boulware D, Malafa M, Coppola D. Correlation between COX-2 and APC expression in left versus right-sided human colon cancer. *Anticancer Res* 2011; 31: 2191-2195
- Gehling M, Arndt C, Eberhart LH, Koch T, Krüger T, Wulf H. Postoperative analgesia with parecoxib, acetaminophen, and the combination of both: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial in patients undergoing thyroid surgery. *Br J Anaesth* 2010; 104: 761-767
- Kyriakidis AV, Perysinakis I, Alexandris I, Athanasios K, Papadopoulos Ch, Mpesikos I. Parecoxib sodium in the treatment of postoperative pain after Lichtenstein tension-free mesh inguinal hernia repair. *Hernia* 2011; 15: 59-64
- Gamradt SC, Feeley BT, Liu NQ, Roostaeian J, Lin YQ, Zhu LX, Sharma S, Dubinett SM, Lieberman JR. The effect of cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibition on human prostate cancer induced osteoblastic and osteolytic lesions in bone. *Anticancer Res* 2005; 25: 107-115
- Ferrandina G, Lauriola L, Zannoni GF, Fagotti A, Fanfani F, Legge F, Maggiano N, Gessi M, Mancuso S, Ranalletti FO, Scambia G. Increased cyclooxygenase-2 (COX-2) expression is associated with chemotherapy resistance and outcome in ovarian cancer patients. *Ann Oncol* 2002; 13: 1205-1211
- Kim YM, Park SY, Pyo H. Cyclooxygenase-2 (COX-2) negatively regulates expression of epidermal growth factor receptor and causes resistance to gefitinib in COX-2-overexpressing cancer cells. *Mol Cancer Res* 2009; 7: 1367-1377
- Liu Z, Wang X, Lu Y, Han S, Zhang F, Zhai H, Lei T, Liang J, Wang J, Wu K, Fan D. Expression of 15-PGDH is downregulated by COX-2 in gastric cancer. *Carcinogenesis* 2008; 29: 1219-1227
- Talar-Wojnarowska R, Gasiorowska A, Olakowski M, Lampe P, Smolarz B, Romanowicz-Makowska H, Malecka-Panas E. Role of cyclooxygenase-2 gene polymorphisms in pancreatic carcinogenesis. *World J Gastroenterol* 2011; 17: 4113-4117
- Zhao D, Xu D, Zhang X, Wang L, Tan W, Guo Y, Yu D, Li H, Zhao P, Lin D. Interaction of cyclooxygenase-2 variants and smoking in pancreatic cancer: a possible role of nucleophosmin. *Gastroenterology* 2009; 136: 1659-1668
- Zhang XM, Zhong R, Liu L, Wang Y, Yuan JX, Wang P, Sun C, Zhang Z, Song WG, Miao XP. Smoking and COX-2 functional polymorphisms interact to increase the risk of gastric cardia adenocarcinoma in Chinese population. *PLoS One* 2011; 6: e21894
- Bu X, Zhao C, Dai X. Involvement of COX-2/PGE(2) Pathway in the Upregulation of MMP-9 Expression in Pancreatic Cancer. *Gastroenterol Res Pract* 2011; 2011: 214269
- Özhan G, Lochan R, Leathart JB, Charnley R, Daly AK. Cyclooxygenase-2 polymorphisms and pancreatic cancer susceptibility. *Pancreas* 2011; 40: 1289-1294

- 21 Lashinger LM, Malone LM, McArthur MJ, Goldberg JA, Daniels EA, Pavone A, Colby JK, Smith NC, Perkins SN, Fischer SM, Hursting SD. Genetic reduction of insulin-like growth factor-1 mimics the anticancer effects of calorie restriction on cyclooxygenase-2-driven pancreatic neoplasia. *Cancer Prev Res (Phila)* 2011; 4: 1030-1040
- 22 Wang Z, Ahmad A, Li Y, Azmi AS, Miele L, Sarkar FH. Targeting notch to eradicate pancreatic cancer stem cells for cancer therapy. *Anticancer Res* 2011; 31: 1105-1113
- 23 刘伟, 李开宗, 窦科峰. COX-2在胰腺癌组织中的表达及其与p53的相关性研究. *世界华人消化杂志* 2003; 11: 229-232
- 24 刘伟, 李开宗, 窦科峰. 环氧化酶-2和血管内皮生长因子在胰腺癌组织中的表达及其相关性研究. *中国普外基础与临床杂志* 2003; 10: 539-541
- 25 刘伟, 李开宗, 窦科峰, 马福成, 王映梅. 胰腺癌组织中survivin和COX-2表达的相关性. *第四军医大学学报* 2004; 25: 635-636
- 26 刘伟, 李开宗, 窦科峰, 宋振顺, 苏明权, 于文彬. COX-2抑制剂联合顺铂对胰腺癌细胞增生和凋亡的影响. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 1139-1143
- 27 刘伟, 张永久, 李开宗, 窦科峰, 许永华, 张东, 闫兵. COX-2抑制剂联合survivin反义寡核苷酸抗胰腺癌BxPC-3细胞的效应. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 3178-3183
- 28 贾福鑫, 刘伟, 张东, 李鹏, 李建英, 冯玉玲, 冯德元. MMP-9和COX-2蛋白的表达对胰腺癌预后的影响. *中华临床医师杂志(电子版)* 2011; 5: 1917-1922

#### ■同行评价

本研究立意有一定新意, 实验设计合理, 数据详实准确, 论文逻辑性较强, 研究结果有助于进一步明确胰腺癌细胞增殖及凋亡的调控机制, 具有较好的科学价值。

编辑 曹丽鸥 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>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。