

利用miRNA芯片分析酒精刺激肝癌细胞株miRNA表达谱的差异

桂照华, 汪心怡, 陈吉, 陈卓, 赵华, 汪思应

桂照华, 汪心怡, 陈吉, 陈卓, 赵华, 汪思应, 安徽医科大学基础医学院 安徽省合肥市 230032

桂照华, 在读硕士, 主要从事肿瘤分子机制的研究。

安徽省留学回国人员科研基金资助项目, No. 2009-2011

安徽省学术带头人基金资助项目

作者贡献分布: 桂照华与汪思应对此文所作贡献均等; 此课题由汪思应与桂照华设计; 研究过程主要由汪思应与桂照华操作完成; 汪心怡、陈吉、陈卓及赵华参与辅助工作; 数据分析由桂照华完成; 本论文写作由桂照华与汪思应完成。

通讯作者: 汪思应, 教授, 博士生导师, 230032, 安徽省合肥市蜀山区梅山路81号, 安徽医科大学基础医学院。

sywang@ahmu.edu.cn

收稿日期: 2013-04-26 修回日期: 2013-05-27

接受日期: 2013-06-04 在线出版日期: 2013-07-08

MiRNA expression profiling of alcohol-stimulated liver cancer cell lines using miRNA chips

Zhao-Hua Gui, Xin-Yi Wang, Ji Chen, Zhuo Chen, Hua Zhao, Si-Ying Wang

Zhao-Hua Gui, Xin-Yi Wang, Ji Chen, Zhuo Chen, Hua Zhao, Si-Ying Wang, School of Basic Medical Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032, Anhui Province, China

Supported by: the Scientific Research Foundation for the Returned Overseas Chinese Scholars of Anhui Province, No. 2009-2011; and the Discipline Leader Foundation of Anhui Province

Correspondence to: Si-Ying Wang, Professor, School of Basic Medical Sciences, Anhui Medical University, 81 Meishan Road, Shushan District, Hefei 230032, Anhui Province, China. sywang@ahmu.edu.cn

Received: 2013-04-26 Revised: 2013-05-27

Accepted: 2013-06-04 Published online: 2013-07-08

Abstract

AIM: To detect the miRNA expression profile in liver cancer cells induced with ethanol, and explore the molecular mechanisms behind abnormal expression of miRNAs and the growth and metastasis of ethanol-induced liver cancer cells.

METHODS: After cells were stimulated with 0.2% ethanol, total RNA was extracted from cancer cells, and the miRNA expression profiles were obtained using miRNA microarray chip hybridization. MiRNAs whose expression had significant difference was determined by RT-

PCR. TET protein expression was detected by Western blot.

RESULTS: There were multiple differentially expressed miRNAs in liver cancer cells induced with ethanol for 24 h. The expression of miRNA-29 family was up-regulated evidently. The results of RT-PCR were consistent with chip results. Western blot analysis showed that TET protein expression was decreased.

CONCLUSION: Stimulation with ethanol can lead to multiple changes of miRNA expression profiles in liver cancer cells, and these changes may influence the development and progression of liver cancer by causing changes in associated protein expression.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

Key Words: Liver cancer; Alcohol; MiRNA

Gui ZH, Wang XY, Chen J, Chen Z, Zhao H, Wang SY. MiRNA expression profiling of alcohol-stimulated liver cancer cell lines using miRNA chips. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(19): 1847-1852 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/1847.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i19.1847>

摘要

目的: 检测酒精刺激对肝癌细胞miRNA表达谱差异, 探讨异常表达的miRNA与酒精刺激诱导肝癌细胞生长转移的分子机制。

方法: 0.2%酒精刺激细胞培养, 提取总RNA, 在miRNA微阵列芯片中杂交检测, 通过芯片扫描和数据分析, 获得miRNAs表达谱, 筛选出表达差异明显者进行RT-PCR验证; Western blot检测TET蛋白的表达。

结果: 0.2%酒精处理肝癌细胞24 h后出现多个miRNAs的差异表达, 其中miRNA-29家族上升较为明显, RT-PCR验证得到与芯片相一致的结果, Western blot检测结果显示TET3蛋白表达下降。

■背景资料

酒精与肝癌的关系已得到确认, 但机制仍不明确。miRNA作为一类非编码单链RNA, 与多种疾病的发生、发展都密切相关, 尤其是根据其靶基因的不同在肿瘤的演变过程中扮演着类似于“癌基因”或者“抑癌基因”的作用。

■同行评议者

范学工, 教授, 中南大学湘雅医院感染病科

■ 研究前沿

酒精对肝脏的损伤是多方面的,目前多集中在酒精代谢产物对肝细胞的直接或者间接损伤上,但对于酒精导致的肝脏损伤在肝癌发生发展中起着作用的分子机制仍不明确。

结论: 酒精刺激可以导致肝癌细胞miRNAs表达谱出现多种差异性改变,这些改变可能会导致相关蛋白表达的改变从而影响肝癌的发生发展。

© 2013年版权归Baishideng所有。

关键词: 肝癌; 酒精; miRNA

核心提示: 酒精刺激可上调miR-29b/c表达,而下调的TET3蛋白的表达。

桂照华, 汪心怡, 陈吉, 陈卓, 赵华, 汪思应. 利用miRNA芯片分析酒精刺激肝癌细胞株miRNA表达谱的差异. 世界华人消化杂志 2013; 21(19): 1847-1852 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/1847.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v21.i19.1847>

0 引言

肝细胞癌是常见的恶性肿瘤,其发病率位居人类肿瘤发病率的第2位,仅次于肺癌^[1]. 研究发现,其发病原因与肝炎病毒感染、机体内在因素、环境因素、生活习惯等密切相关^[2]. 其中长期饮酒与肝癌的发生发展的相关性已得到证实^[3]. 在研究酒精与肝癌关系进程中,虽然已取得很多成果但还有很多问题需要解决。

由19-25个核苷酸组成的,非编码的单链RNA被称为微小核糖核酸(microRNA). 这类小RNA在表达上具有组织和时间的特异性,是调节其他功能基因表达的重要调控分子,在生物的生长发育过程中发挥着重要作用^[4]. 研究表明,多种microRNA参与肿瘤的恶性转变过程,如恶性增殖、复发转移、凋亡抑制等^[5,6]. 在本实验室前期的研究中发现,酒精刺激HepG2细胞后影响细胞的生长和转移,因此本实验利用miRNA微阵列分子技术重点探讨了酒精刺激HepG2细胞后是否是通过影响miRNA的表达影响了细胞的生长和转移。

1 材料和方法

1.1 材料 人肝癌细胞HepG2由本实验室保存. 胎牛血清(FBS)由灏洋公司生产, DMEM培养基由Gibco公司生产. 无水乙醇购自Sigma公司. 总RNA提取试剂、TRIzol购自Invitrogen公司. RT-PCR试剂盒购自上海吉玛公司, 引物由上海吉玛公司合成。

1.2 方法

1.2.1 酒精刺激细胞培养: 人类肝癌细胞HepG2

用含10%胎牛血清、0.5 ng/mL白介素-3(interleukin-3, IL-3) DMEM培养液, 100 U/mL链霉素/100 U/mL青霉素, 37 °C、5%CO₂条件下一定湿度孵箱中培养. 待细胞贴壁后, 加入无水乙醇, 占培养液体积比0.2%. 然后将培养皿置入体积为2200 mL容器中, 容器内加入200 mL灭菌后超纯水和400 μL无水乙醇(0.2%), 注入100 mL CO₂, 密封容器, 置入孵箱, 使细胞保持在0.2%乙醇及一定湿度的稳定环境中培养。

1.2.2 细胞总RNA提取: 采用Invection公司的RNAVzol试剂. 细胞经胰酶消化, PBS洗涤一次, 调整细胞数量为1×10⁶/mL转移至EP管中, 加入1 mL TRIzol试剂, 具体步骤按照说明书操作, 所得总RNA用紫外分光光度计测纯度及浓度, 分装后-80 °C冰箱保存。

1.2.3 miRNA基因芯片分析: 将提取的酒精刺激组总RNA及对照组总RNA送至上海吉玛公司检测miRNA表达谱差异。

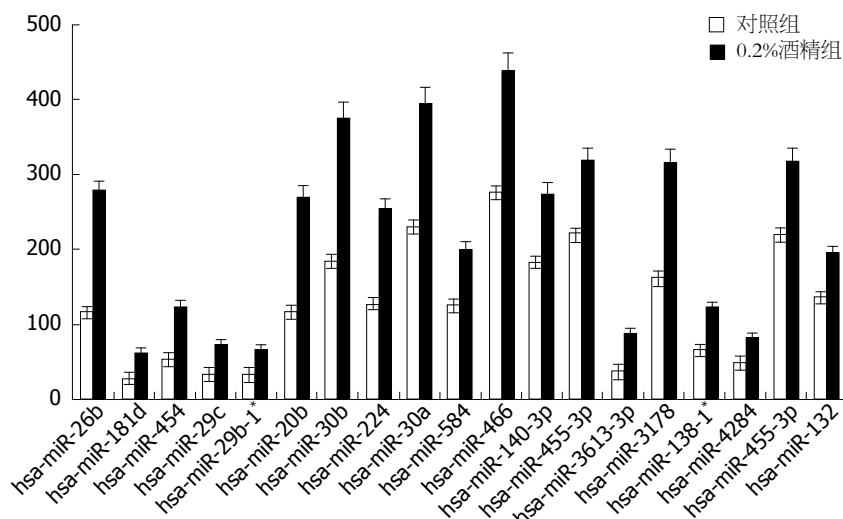
1.2.4 反转录: PC(RT-PCR)验证芯片结果: 按照上海吉玛公司的试剂盒说明书进行操作. MiR-RT primers引物、2 μL总RNA、4 μL RT Buffer、0.75 μL dNTP、0.2 μL AMV、DEPC水配成20 μL反应体系, 反应条件: 16 °C 30 min, 42 °C 30 min, 85 °C 10 min. 将反转录产物稀释3-4倍作为模板作PCR反应, 以U6为内参对照, 反应条件为: 99 °C 预变性1 min, 95 °C 3 min, 95 °C 12 s, 62 °C 50 s, 40个循环. 5%TAE琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物。

1.2.5 蛋白质免疫印迹法检测TET蛋白的表达: 酒精处理细胞24 h后收集细胞, PBS洗3遍, 加入RIPA(含蛋白酶抑制剂)裂解, 冰上裂解30 min, 4 °C 12000 g离心20 min, 吸取上清液, 加入5×loading buffer, 99 °C加热10 min, 分光光度计定量后10%SDS-PAGE分离样本, 200 mA转到PVDF膜上, 5%脱脂奶粉(TBST配制)室温封闭2 h, TET3蛋白一抗按照1:1000稀释, 4 °C过夜, HRP标记的二抗按照1:5000稀释, ECL显色系统检测目的蛋白。

统计学处理 实验结果采用SPSS20.0软件分析, 上述实验均重复3次, 实验数据以mean±SD表示, 组间差异比较采用t检验, P<0.05表示有统计学意义。

2 结果

2.1 酒精刺激影响肝癌细胞miRNA微阵列表达谱 miRNA微阵列芯片杂交结果显示: 与正常对



■ 相关报道

Friedberg等发现酒精代谢产物可以导致DNA的突变或缺失,从而导致肝癌发生: Gramantieri等发现miR-122a通过调节cyclin G1的表达影响肝癌的发生. 这两篇文章分别揭示了酒精影响肝癌发生及miRNA影响肝癌发生的相关机制.

图 1 21个表达量升高1.5倍以上的microRNA.

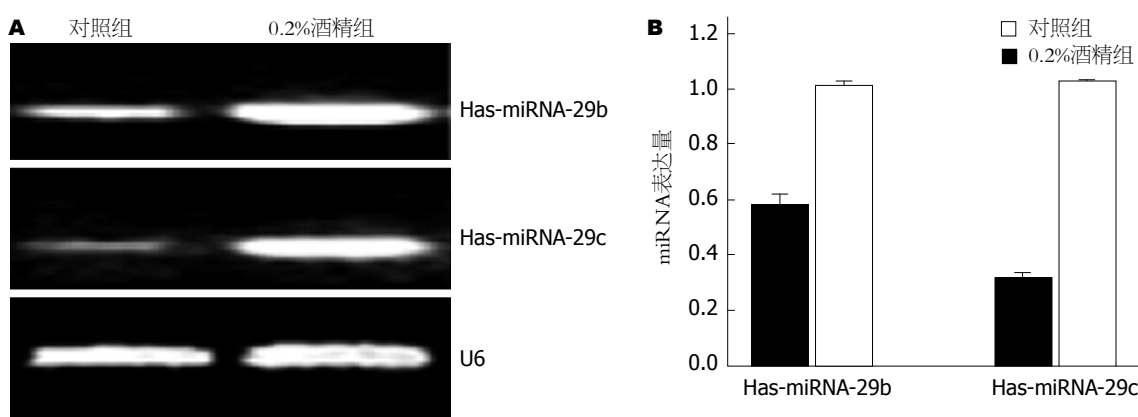


图 2 miRNA-29b/c在0.2%酒精组高表达. A: RT-PCR检测miRNA-29b/c的表达差异; B: RT-PCR实验结果的统计分析.

照组相比, 0.2%酒精刺激组miRNAs表达谱发生明显变化, 其中microRNA表达量显著升高的有21个, 其中miRNA-29家族上升较为明显(图1).

2.2 反转录PCR(RT-PCR)验证芯片结果 在对miRNAs表达谱进行分析的过程中发现miRNA-29家族成员中的miRNA-29c及miRNA-29b同时上升达1.5倍以上, 随后我们利用RT-PCR技术验证得到与芯片结果相一致(图2).

2.3 Western blot检测TET蛋白表达 利用生物学信息预测结果发现, TET3 3' UTR区存在多个与miR-29b/c互补结合的核苷酸位点(表1), 提示TET3有可能是miR-29b/c的潜在靶基因. 为了进一步明确TET3与miR-29b/c的关系, 我们利用Western blot检测TET3蛋白的表达情况, 发现酒精处理组TET3蛋白的表达显著下降(图3).

3 讨论

长期饮酒是多种疾病的致病因素, 如糖尿病、

精神疾病、心血管疾病、肝肠胰腺疾病等, 其中对肝脏的损伤尤为明显, 因而逐渐成为人们研究的热点^[7]. 酒精对肝脏的损害是多方面的, 一方面肝脏作为酒精的代谢场所可造成对肝细胞的直接损伤, 另一方面酒精的多种代谢产物可造成对肝脏的间接损伤, 其中乙醛及其代谢产物4-羟壬烯醛(4-hydroxy-2-nonenal)、丙二醛(malonaldehyde)可以导致DNA的突变或缺失^[8]. 长期饮酒不仅增加肝癌发生的危险性, 而且可以促进肝癌的转移和侵袭^[9]. 因此, 研究酒精导致肝癌的分子机制具有重要的现实意义.

MicroRNA是一类保守的, 长度约为19-25 nt的非编码单链小RNA, 通过与靶基因3'非编码区特异性的结合, 导致miRNA的降解或翻译抑制, 从而在转录后水平调控基因的表达^[10]. 目前已发现上千种miRNA, 这些miRNA调控着大约30%蛋白质的合成, 他们与人类的生长发育、干细胞分化与自我更新以及肿瘤、心血管疾病

■创新盘点

本文发现酒精刺激可导致多种miRNA的表达升高,尤其miRNA-29c及miRNA-29b的上升尤为明显,同时发现酒精刺激可导致TET3蛋白的表达下降。

表 1 miRNA-29b/c靶向TET3 3' UTR区域

预测的相应配对区域: 靶基因(上)和 miRNA (下)		种子序列
TET3 3' UTR 53-59	5' ... C C C G A G C U G U C U C U G U G G U G C U U ... 3'	
Has-miR-29b	3' ... U U G U G A C U A A A G U U U A C C A C G A U ... 5'	
TET3 3' UTR 53-59	5' ... C C C G A G C U G U C U C U G U G G U G C U U ... 3'	
Has-miR-29c	3' ... A U U G G C U A A A G U U U A C C A C G A U ... 5'	
TET3 3' UTR 4472-4479	5' ... A G G C U G C U U U U U A G U U G U G C U A ... 3'	
Has-miR-29b	3' ... U U G U G A C U A A A G U U U A C C A C G A U ... 5'	
TET3 3' UTR 4472-4479	5' ... A G G C U G C U U U U U A G U U G U G C U A ... 3'	
Has-miR-29c	3' ... A U U G G C U A A A G U U U A C C A C G A U ... 5'	
TET3 3' UTR 1471-1477	5' ... U U U G A A A U G A G A A U G U G G U G C U U ... 3'	
Has-miR-29b	3' ... U U G U G A C U A A A G U U U A C C A C G A U ... 5'	
TET3 3' UTR 1471-1477	5' ... U U U G A A A U G A G A A U G U G G U G C U U ... 3'	
Has-miR-29c	3' ... A U U G G C U A A A G U U U A C C A C G A U ... 5'	
TET3 3' UTR 3808-3815	5' ... A U A G U C U A A A U A A A A U G U G U G C U A ... 3'	
Has-miR-29b	3' ... U U G U G A C U A A A G U U U A C C A C G A U ... 5'	
TET3 3' UTR 3808-3815	5' ... A U A G U C U A A A U A A A A U G U G U G C U A ... 3'	
Has-miR-29c	3' ... U U G U G A C U A A A G U U U A C C A C G A U ... 5'	

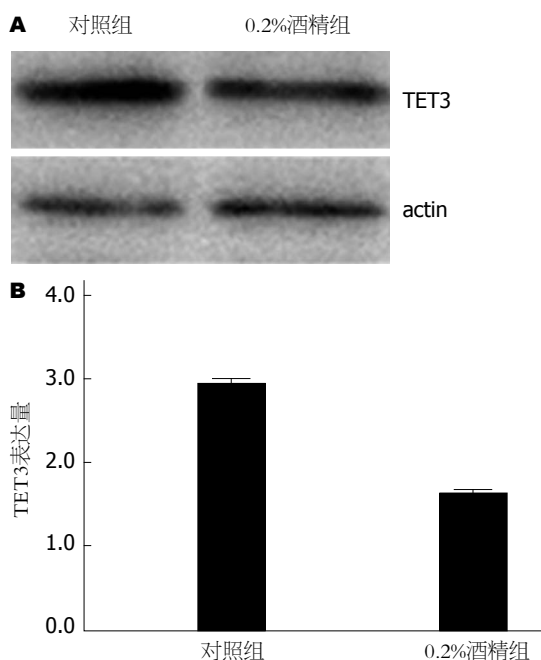


图 3 TET3蛋白在0.2%酒精组低表达. A: Western blot检测TET3蛋白的表达差异; B: Western blot实验结果统计分析.

等多种疾病密切相关,而在肿瘤演变过程中,这些miRNA扮演着尤其重要的角色^[11].近些年来随着对microRNA研究的深入,越来越多的研究

显示microRNA在肝癌组织中的异常表达,可能参与了肝细胞恶性生长和肝癌转移的病理过程. Meng等^[12]通过研究发现肝癌细胞中miR-21呈现高表达,通过下调PTEN的表达进而影响PI3K信号通路促进肝癌细胞的增殖和转移. Gramantieri等^[13]发现miR-122a通过调节靶基因*cyclinG1*的表达影响肝癌的发生.由此,我们想知道酒精导致肝脏损伤的过程是否也有microRNA的参与.

*TET*癌基因家族包括3个成员,分别为*TET1*、*TET2*和*TET3*,均属于 α -酮戊二酸和 Fe^{2+} 依赖的双加氧酶.3种TET蛋白表现出显著的显著的组织特异性,其中TET2在血液系统中含量较高,因此对其功能的研究多集中在血液系统.研究发现,TET蛋白基因突变或结构异常与造血系统恶性肿瘤密切相关^[14]. Lorschach等^[15]发现,在急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)患者中存在TET1与组蛋白甲基转移酶MLL基因融合的现象. Abdel-Wahab等^[16]通过对多种血液肿瘤的3种TET蛋白测序发现,TET2在MPN中突变率为7.6%,慢性粒单核细胞白血病为42%,AML为12%,而TET1和TET3基本未见突变.在骨髓增生性疾病(myeloproliferative

disease)或骨髓增生性肿瘤(myeloproliferative, MPN)中存在包含TET2位点的染色体缺失或TET2缺失性纯合子突变^[17,18], 在MPN中TET2突变率可达到15%^[19]. 然而对于TET蛋白, 尤其是TET3在实体肿瘤中发挥的作用还不清楚.

本实验中, 我们首先利用0.2%乙醇刺激培养肝癌HepG2细胞, 利用microRNA芯片技术分析发现两组之间microRNA表达谱的差异显著, 酒精组microRNA表达量上调1.5倍以上的有21个, 其中miRNA-29家族中的miRNA-29c及miRNA-29b同时上升达1.5倍以上. 进一步利用RT-PCR验证发现miR-29b/c的表达与芯片结果相一致. 通过生物学信息的预测我们发现TET3蛋白有可能是miR-29b的靶基因, 我们利用Western blot方法检测TET蛋白的表达情况, 结果显示酒精刺激组TET3蛋白的表达明显下降. 以上实验结果提示我们, 酒精刺激可上调miR-29b/c表达, 而下调的TET3蛋白的表达, 二者之间呈现负相关的关系. 但是, miR-29b/c是否调控TET3蛋白的表达仍需要荧光素酶报告基因实验的来进一步证实.

4 参考文献

- 1 Jemal A, Center MM, DeSantis C, Ward EM. Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010; 19: 1893-1907 [PMID: 20647400 DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-10-0437]
- 2 Perz JF, Armstrong GL, Farrington LA, Hutin YJ, Bell BP. The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. *J Hepatol* 2006; 45: 529-538 [PMID: 16879891 DOI: 10.1016/j.jhep.2006.05.013]
- 3 Lu Y, Cederbaum AI. CYP2E1 and oxidative liver injury by alcohol. *Free Radic Biol Med* 2008; 44: 723-738 [PMID: 18078827 DOI: 10.1016/j.freeradbio med.2007.11.004]
- 4 Swinkels-Meewisse IE, Roelofs J, Schouten EG, Verbeek AL, Oostendorp RA, Vlaeyen JW. Fear of movement/(re)injury predicting chronic disabling low back pain: a prospective inception cohort study. *Spine (Phila Pa 1976)* 2006; 31: 658-664 [PMID: 16540870]
- 5 Subramanian S, Steer CJ. MicroRNAs as gatekeepers of apoptosis. *J Cell Physiol* 2010; 223: 289-298 [PMID: 20112282 DOI: 10.1002/jcp.22066]
- 6 Asaga S, Kuo C, Nguyen T, Terpenning M, Giuliano AE, Hoon DS. Direct serum assay for microRNA-21 concentrations in early and advanced breast cancer. *Clin Chem* 2011; 57: 84-91 [PMID: 21036945 DOI: 10.1373/clinchem.2010.151845]
- 7 Altekruse SF, McGlynn KA, Reichman ME. Hepatocellular carcinoma incidence, mortality, and survival trends in the United States from 1975 to 2005. *J Clin Oncol* 2009; 27: 1485-1491 [PMID: 19224838 DOI: 10.1200/JCO.2008.20.7753]
- 8 Friedberg EC, Wagner R, Radman M. Specialized DNA polymerases, cellular survival, and the genesis of mutations. *Science* 2002; 296: 1627-1630 [PMID: 12040171]
- 9 Mueller S, Millonig G, Seitz HK. Alcoholic liver disease and hepatitis C: a frequently underestimated combination. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 3462-3471 [PMID: 19630099]
- 10 Nicoloso MS, Sun H, Spizzo R, Kim H, Wickramasinghe P, Shimizu M, Wojcik SE, Ferdin J, Kunej T, Xiao L, Manoukian S, Secreto G, Ravagnani F, Wang X, Radice P, Croce CM, Davuluri RV, Calin GA. Single-nucleotide polymorphisms inside microRNA target sites influence tumor susceptibility. *Cancer Res* 2010; 70: 2789-2798 [PMID: 20332227 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-3541]
- 11 Lu LF, Boldin MP, Chaudhry A, Lin LL, Taganov KD, Hanada T, Yoshimura A, Baltimore D, Rudensky AY. Function of miR-146a in controlling Treg cell-mediated regulation of Th1 responses. *Cell* 2010; 142: 914-929 [PMID: 20850013 DOI: 10.1016/j.cell.2010.08.012]
- 12 Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, Ghoshal K, Jacob ST, Patel T. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology* 2007; 133: 647-658 [PMID: 17681183]
- 13 Gramantieri L, Ferracin M, Fornari F, Veronese A, Sabbioni S, Liu CG, Calin GA, Giovannini C, Ferrazzi E, Grazi GL, Croce CM, Bolondi L, Negrini M. Cyclin G1 is a target of miR-122a, a microRNA frequently down-regulated in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2007; 67: 6092-6099 [PMID: 17616664]
- 14 Langemeijer SM, Aslanyan MG, Jansen JH. TET proteins in malignant hematopoiesis. *Cell Cycle* 2009; 8: 4044-4048 [PMID: 19923888]
- 15 Lorschbach RB, Moore J, Mathew S, Raimondi SC, Mukatira ST, Downing JR. TET1, a member of a novel protein family, is fused to MLL in acute myeloid leukemia containing the t(10; 11)(q22; q23). *Leukemia* 2003; 17: 637-641 [PMID: 12646957]
- 16 Abdel-Wahab O, Mullally A, Hedvat C, Garcia-Manero G, Patel J, Wadleigh M, Malinge S, Yao J, Kilpivaara O, Bhat R, Huberman K, Thomas S, Dolgalev I, Heguy A, Paietta E, Le Beau MM, Beran M, Tallman MS, Ebert BL, Kantarjian HM, Stone RM, Gilliland DG, Crispino JD, Levine RL. Genetic characterization of TET1, TET2, and TET3 alterations in myeloid malignancies. *Blood* 2009; 114: 144-147 [PMID: 19420352 DOI: 10.1182/blood-2009-03-210039]
- 17 Vigié F, Aboura A, Bouscary D, Ramond S, Delmer A, Tachdjian G, Marie JP, Casadevall N. Common 4q24 deletion in four cases of hematopoietic malignancy: early stem cell involvement? *Leukemia* 2005; 19: 1411-1415 [PMID: 15920487]
- 18 Jankowska AM, Szpurka H, Tiu RV, Makishima H, Aftab M, Huh J, O'Keefe CL, Ganetzky R, McDevitt MA, Maciejewski JP. Loss of heterozygosity 4q24 and TET2 mutations associated with myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2009; 113: 6403-6410 [PMID: 19372255 DOI: 10.1182/blood-2009-02-205690]

■应用要点

本文为研究酒精导致肝癌分子机制的研究提供了一个新的方向.

■同行评价

本文利用miRNA芯片研究酒精刺激HepG2后miRNA表达谱的差异,对进一步了解酒精对肝脏的损害机制有一定的作用.

19 Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V, James C, Trannoy S, Massé A, Kosmider O, Le Couedic JP, Robert F, Alberdi A, Lécluse Y, Plo I, Dreyfus FJ, Marzac C, Casadevall N, Lacombe C, Romana

SP, Dessen P, Soulier J, Viguié F, Fontenay M, Vainchenker W, Bernard OA. Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N Engl J Med* 2009; 360: 2289-2301 [PMID: 19474426 DOI: 10.1056/NEJMoa0810069]

编辑 田滢 电编 鲁亚静



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2013年版权归Baishideng所有

• 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.