文章编号:1000-5404(2011)07-0723-05

论著

pEGFP-N1-DCN 重组质粒抑制胃癌细胞 SGC-7901 的增殖和侵袭

袁 媛,王 川,姜 政,王丕龙 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院消化内科)

【摘要】 **目的** 构建 pEGFP-N1-DCN 真核表达载体并转染胃癌细胞 SGC-7901,观察其对细胞增殖、周期、迁移、侵袭的影响。**方法** 将细胞分为3组,分别为空白对照组、pEGFP-N1 组及 pEGFP-N1-DCN 组,质粒通过脂质体转染SGC-7901,RT-PCR 及 Western blot 方法检测表皮生长因子受体(EGFR)及 TGF-β_1的表达,MTT 法检测细胞增殖,流式细胞仪检测细胞周期,Transwell 检测核心蛋白聚糖(DCN)对细胞迁移及侵袭能力的影响。**结果** RT-PCR 及 Western blot 检测结果显示,DCN 使 EGFR 及 TGF-β_1的表达均降低($P<0.05$);MTT 法检测发现 72 h 时空白对照组、pEGFP-N1 组及 pEGFP-N1-DCN 组细胞 $D(490)$值分别为(1.190±0.037)、(1.169±0.052)、(0.572±0.021),DCN 使细胞增殖受到明显抑制($P<0.05$);流式细胞仪分析细胞周期空白对照组、pEGFP-N1 组及 pEGFP-N1-DCN 组细胞 $G_0\sim G_1$的细胞数分别为(46.12±0.63)、(46.07±0.82)、(56.36±0.92),DCN 使细胞阻滞在 $G_0\sim G_1$($P<0.05$);Transwell 迁移、侵袭实验显示 DCN 使细胞迁移和侵袭能力均降低($P<0.05$)。**结论** DCN 通过抑制肿瘤细胞的增殖、迁移、侵袭等起到抗肿瘤作用。

【关键词】 核心蛋白聚糖;SGC-7901;增殖;侵袭
【中图法分类号】 R730.23;R735.2;R394.3 【文献标志码】 A

pEGFP-N1-DCN suppresses proliferation and invasion of human gastric cancer SGC-7901 cells

Yuan Yuan, Wang Chuan, Jiang Zheng, Wang Pilong (Department of Gastroenterology, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

【**Abstract**】 **Objective** To construct an eukaryotic expression vector encoding decorin (DCN) (pEGFP-N1-DCN) and determine its effect on proliferation, cell cycle, migration and invasion of human gastric cancer cell line SGC-7901 after transfection. **Methods** SGC-7901 cells were divided into 3 groups, control, pEGFP-N1 group and pEGFP-N1-DCN group. SGC-7901 cells were transfected by corresponding plasmids with liposome. The expressions of epidermal growth factor receptor (EGFR) and transforming growth factor-β1 (TGF-β1) were detected by Western blotting and RT-PCR, cell proliferation by MTT assay, cell cycle by flow cytometry and cell migration and invasion by Transwell chamber test. **Results** RT-PCR and Western blotting results showed that the expressions of EGFR and TGF-β_1 were decreased in pEGFP-N1-DCN group. MTT assay demonstrated that the value of $D(490)$ of the control group, pEGFP-N1 group and pEGFP-N1-DCN group were 1.190±0.037, 1.169±0.052, and 0.572±0.021 respectively, indicating that DCN made cell proliferation inhibited ($P<0.05$). Flow cytometric analysis showed that cell population at G_0 to G_1 stage of these 3 groups were (46.12±0.63)%, (46.07±0.82)%, and (56.36±0.92)%, and the cells in pEGFP-N1-DCN group were arrested at G_0 to G_1 stage ($P<0.05$). Transwell assay showed that DCN inhibits cell migration and invasion ($P<0.05$). **Conclusion** DCN plays a role of anti-tumor by inhibiting tumor cell proliferation, migration and invasion.

【**Key words**】 decorin; SGC-7901 cells; proliferation; invasion

Corresponding author: Jiang Zheng, E-mail: jiangz1753@163.com

核心蛋白聚糖(decorin, DCN)是一种富含亮氨酸的小分子蛋白聚糖,由糖胺聚糖(glycosaminoglycan, GAG)链共价连接于核心蛋白(core protein)所组成的大分子糖复合物,主要分布在结缔组织中,属细胞外基质(extracellular matrix,ECM)成分,总相对分子质量为925×10^3,其中核心蛋白约为40×10^3,其代谢异常或结构的改变与许多疾病的病理过程有密切关系[1-2]。作为细胞生长的负调节剂,DCN 在细胞增殖分化、基

【通信作者】 姜 政, E-mail:jiangz1753@163.com

质形成、维持内环境稳定以及在器官发育过程中结构与功能的完整性等方面起重要作用。近年来，DCN被证实是一强的肿瘤细胞生长负性调节因子，因而成为肿瘤研究领域的热点[3-5]。本实验通过构建DCN的真核表达载体，使其转染胃癌细胞SGC-7901，检测转化生长因子β_1（transforming growth factor-β_1，TGF-β_1）和表皮生长因子受体（epidermal growth factor receptor，EGFR）的表达，并观察其对肿瘤细胞增殖、侵袭等方面的影响。

1 材料与方法

1.1 主要材料及试剂

pEGFP-N1真核表达载体和胃癌细胞株SGC-7901由重庆医科大学附属第一医院向廷秀博士惠赠，RNAiso Plus、无内毒素质粒抽提试剂盒购于Omega公司，Lipofectamine 2000购于Invitrogen公司，MTT及DMSO购于Sigma公司，Matrigel购于BD公司，Transwell购于Milipore公司。

1.2 重组质粒的构建及转染

1.2.1 重组质粒的构建 从人胎盘组织中提取总RNA，通过RT-PCR扩增目的基因，引物设计为上游引物P1：5′-CGGAATTCACATGAAGGCCACTATCATCCT-3′，下游引物5′-CGGGATCCTTATAGTTTCCGAGTTGAATG-3′，在上游引物中加入*Eco*RⅠ酶切位点及保护碱基，下游引物加入*Bam*HⅠ酶切位点及保护碱基，扩增产物大小为1 080 bp。用限制性内切酶*Bam*HⅠ和*Eco*RⅠ分别酶切胶回收后的PCR产物和质粒pEGFP-N1，酶切产物胶回收后通过T_4连接酶连接后转化DH5α感受态细胞，通过卡那霉素抗性筛选挑选阳性菌落抽提质粒，重组质粒命名为pEGFP-N1-DCN。将重组质粒送上海生工测序。

1.2.2 重组质粒在SGC-7901中的表达 用含10%胎牛血清的RPMI1640培养基培养人胃癌细胞SGC-7901，转染前1 d，将细胞以2.5×10^5接种于24孔板中培养至细胞70%～80%融合，采用Lipofectamine 2000转染法进行转染。培养24 h后置于荧光显微镜下观察荧光蛋白的表达。

1.2.3 RT-PCR检测DCN mRNA的表达 按上述方法转染细胞，设置pEGFP-N1转染组与空白对照组，转染48 h后，提取总RNA，以500 ng总RNA进行RT-PCR，以β-actin作为内参照（上游引物：5′-ACTGTGCCCATCTACGAGG-3′，下游引物：5′-GAAAGGGTGTAACGCAACTA-3′，扩增产物大小678 bp，引物由上海生工合成），然后进行2%琼脂糖凝胶电泳。

1.2.4 Western blot检测融合蛋白的表达 按1.2.3将细胞分为3组并按上述方法转染细胞，转染48 h后提取蛋白，以50 μg蛋白上样，SDS-PAGE电泳后将蛋白电转至PVDF膜上，封闭后一抗4 ℃孵育过夜，次日二抗孵育1 h，洗膜后进行化学发光试剂显色。

1.3 RT-PCR及Western blot检测TGF-β_1和EGFR的表达

TGF-β_1上游引物：5′-CCCACAACGAAATCTATGACA-3′，下游引物：5′-AACCACTGCCGCACAACT-3′，扩增产物大小为277 bp；EGFR上游引物5′-GAGGGTGAGCCAAGGGAGT-3′，下游引物5′-CCAGTGCATCCGTAGGTG-3′，扩增产物大小为263 bp，引物由上海生工合成。将上述提取的细胞总RNA 500 ng进行半定量RT-PCR反应，以β-actin作为内参照，然后进行2%琼脂糖凝胶电泳。将上述提取的细胞蛋白50 μg上样，按上述方法进行Western blot实验，以β-tubulin为内参照。

1.4 MTT检测细胞生产情况

将细胞以1×10^4的密度接种于96孔板中，分为pEGFP-N1-DCN组、pEGFP-N1组与空白对照组，每组5个复孔，当细胞生长至70%～80%融合时按上述方法转染，24、48、72 h后每孔加入20 μl MTT，置于培养箱中培养4 h，去上清后加入200 μl DMSO，振荡10 min后，酶标仪读取490 nm波长处光密度值[D(490)]。各组实验重复3次。

1.5 流式细胞仪分析细胞周期变化

以5×10^5密度将细胞接种于6孔板中，实验分组同1.4，每组设置3个复孔，转染48 h后收集2×10^5细胞，PBS洗涤1遍后，加入70%乙醇固定细胞过夜，PI染色后流式细胞仪进行检测。

1.6 Transwell迁移实验

按上述方法将细胞分为3组，每组3个复孔，转染24 h后收集6×10^4细胞，将Transwell放入24孔板中，上室加入200 μl含1%胎牛血清的1640，下室加入700 μl含10%胎牛血清的1640，将细胞置于培养箱中培养30 h后取出小室，棉签擦去上室细胞，PBS洗涤2遍后5%戊二醛固定15 min，然后加入0.1%结晶紫，30 min后PBS洗涤2遍，风干后显微镜下观察。于200倍镜下随机取5个视野计数穿膜细胞。

1.7 Transwell侵袭实验

细胞分组情况同1.4，Matrigel按1∶10使用无血清1640稀释后加入Transwell小室内，置于37 ℃ 2 h后，按上述方法接种6×10^4细胞于上室，上室加入200 μl含1%胎牛血清的1640，下室加入700 μl含10%胎牛血清的1640，培养36 h后按上述方法染色后观察穿膜细胞。

1.8 统计学处理

采用SPSS 10.0统计软件行单因素方差分析。

2 结果

2.1 测序鉴定

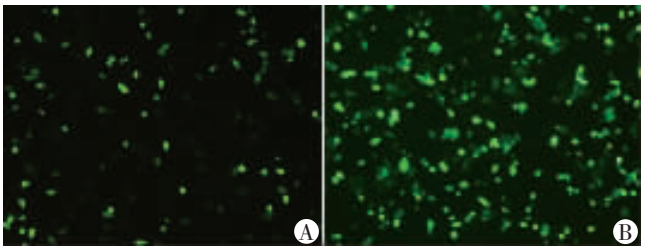
重组质粒pEGFP-N1-DCN采用通用引物正反向测序，测序结果经过DNAssist 2.2比对，所测结果与目的基因序列比较，同源性100%。

2.2 重组质粒pEGFP-N1-DCN在SGC-7901中的表达

脂质体转染细胞24 h后倒置荧光显微镜观察绿色荧光的表达，pEGFP-N1-DCN组和pEGFP-N1组都可见绿色荧光的表达，空白对照组未见绿色荧光表达，说明重组质粒能转染SGC-7901，并能表达融合蛋白。见图1。

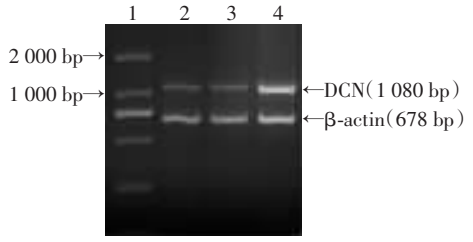
2.3 RT-PCR检测DCN基因的表达

转染48 h后将3组细胞提取总RNA进行RT-PCR反应，电泳结果显示，pEGFP-N1-DCN、pEGFP-N1和空白对照组中目的基因表达分别为（0.09±0.18）、（0.58±0.12）和（0.59±0.07），转染组与空质粒组以及空白对照组相比，差异有统计学意义（$P<0.05$）。见图2。



A：重组质粒 pEGFP-N1-DCN 组；B：空质粒 pEGFP-N1 组

图 1　荧光显微镜观察转染质粒在 SGC-7901 中的表达　（×100）

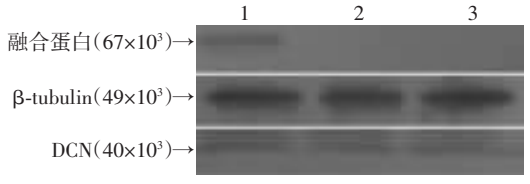


1：DNA 标准（DL 2000）；2：空白对照组；3：pEGFP-N1 组；4：pEGFP-N1-DCN 组

图 2　RT-PCR 鉴定重组质粒在 SGC-7901 中的表达

2.4　Western blot 检测 DCN 融合蛋白的表达

转染 48 h 后的细胞提取蛋白后进行 Western blot，DCN 蛋白相对分子质量为 40×10^3，GFP 绿色荧光蛋白相对分子质量为 27×10^3，融合蛋白相对分子质量为 67×10^3。pEGFP-N1-DCN 组在 67×10^3 左右可见条带，而 pEGFP-N1 组和空白对照组无此条带。见图 3。

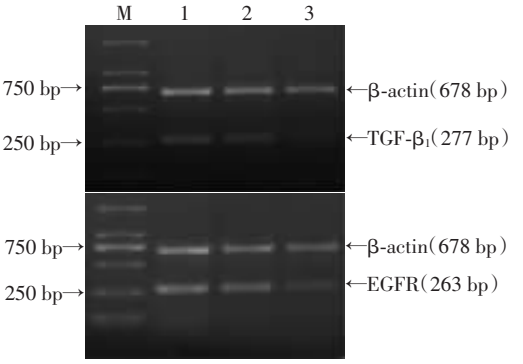


1：pEGFP-N1-DCN 组；2：pEGFP-N1 组；3：空白对照组

图 3　Western blot 鉴定重组质粒在 SGC-7901 中的表达

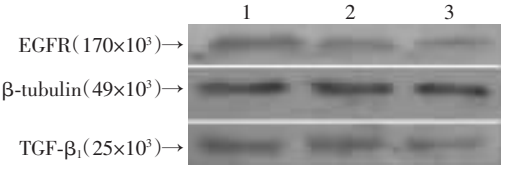
2.5　RT-PCR 及 Western blot 检测 TGF-β_1 和 EGFR 的表达

RT-PCR 检测结果显示：pEGFP-N1-DCN、pEGFP-N1 组和空白对照组中，TGF-β_1 mRNA 灰度值比值分别为（0.54 ± 0.11）、（0.71 ± 0.12）和（0.70 ± 0.08），转染组与空质粒组以及空白对照组相比，具有统计学差异（$P<0.05$）；EGFR mRNA 灰度值比值分别为（0.39 ± 0.05）、（0.69 ± 0.14）、（0.71 ± 0.07），转染组与空质粒组以及空白对照组相比，具有统计学差异（$P<0.05$）。Western blot 检测结果显示：在 pEGFP-N1-DCN、pEGFP-N1 和空白对照组中 TGF-β_1 灰度值比值分别为（0.50 ± 0.05）、（0.69 ± 0.04）和（0.68 ± 0.02），转染组与空质粒组以及空白对照组相比，具有统计学差异（$P<0.05$），而 EGFR 灰度值比值在 3 组中的分布为（0.53 ± 0.02）、（0.73 ± 0.03）和（0.71 ± 0.02），转染组与空质粒组以及空白对照组相比，具有统计学差异（$P<0.05$）。见图 4、5。



M：DNA 标准（DL 2000）；1：空白对照组；2：pEGFP-N1 组；3：pEGFP-N1-DCN 组

图 4　RT-PCR 检测 DCN 对 TGF-β_1、EGFR mRNA 转录的影响



1：空白对照组；2：pEGFP-N1 组；3：pEGFP-N1-DCN 组

图 5　Western blot 检测 DCN 对 TGF-β_1 及 EGFR 表达的影响

2.6　MTT 法检测细胞增殖情况

转染 48 h 后，pEGFP-N1-DCN 组细胞增殖能力与 pEGFP-N1 组和空白对照组相比较受到明显抑制（$P<0.05$），而 pEGFP-N1 组与空白对照组比较增殖能力没有明显改变。见表 1。

表 1　pEGFP-N1-DCN 转染对 SGC-7901 细胞生长的影响 [D(490), $\bar{x}\pm s$]

组别	24 h	48 h	72 h
pEGFP-N1-DCN 组	0.340 ± 0.037	0.437 ± 0.014	0.572 ± 0.021
pEGFP-N1 组	0.418 ± 0.030[a]	0.740 ± 0.042[a]	1.169 ± 0.052[a]
空白对照组	0.395 ± 0.012[a]	0.738 ± 0.041[a]	1.190 ± 0.037[a]

a：$P<0.05$，与 pEGFP-N1-DCN 组比较

2.7　细胞周期分析

细胞转染 48 h 后，流式细胞仪检测结果分析显示，pEGFP-N1-DCN 组处于 $G_0\sim G_1$ 细胞较 pEGFP-N1 组与空白对照组多（$P<0.05$），而 pEGFP-N1 组与空白对照组比较没有明显差异。见表 2。

表 2　pEGFP-N1-DCN 转染对 SGC-7901 细胞周期的影响（%, $\bar{x}\pm s$）

组别	$G_0\sim G_1$	$G_2\sim M$	S
pEGFP-N1-DCN 组	56.36 ± 0.92	11.14 ± 0.96	32.49 ± 1.41
pEGFP-N1 组	46.07 ± 0.82[a]	7.68 ± 0.61[a]	46.23 ± 0.78[a]
空白对照组	46.12 ± 0.63[a]	7.43 ± 0.55[a]	46.45 ± 0.89[a]

a：$P<0.05$，与 pEGFP-N1-DCN 组比较

2.8　Transwell 迁移实验

转染后细胞接种于上室培养 30 h，均有细胞穿过滤膜，pEGFP-N1-DCN 组穿膜细胞数（37.25 ± 2.54）与 pEGFP-N1 组（88.00 ± 6.26）和空白对照组（90.25 ± 3.27）比较明显减少（$P<0.05$）。见图 6。

2.9 Transwell 侵袭实验

细胞接种于上室培养 36 h 后，3 组均有细胞通过铺有 Matrigel 的滤膜，pEGFP-N1-DCN 组穿膜细胞数（31.25 ± 1.71）与 pEGFP-N1 组（91.00 ± 2.58）和空白对照组（92.25 ± 3.59）比较明显减少（$P < 0.05$）。见图 7。

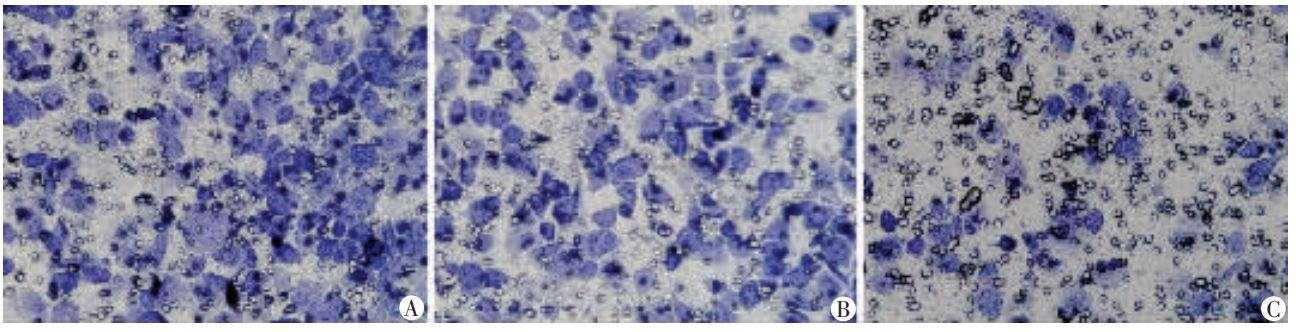
3 讨论

DCN 亦称 PGⅡPGS2 及 PG40，主要分布在结缔组织中，属 ECM 成分，广泛表达于肝细胞及肝贮脂细胞、皮肤成纤维细胞、Ⅱ型肺泡细胞和肾小球系膜细胞等。DCN 基因在人类基因组中为双拷贝，定位于 12 号染色体 12q21－q22，其编码基因由 1 080 bp 组成，在体内分布广泛。近年来，DCN 因被证实是一强的肿瘤细胞生长负性调节因子而成为肿瘤研究领域的热点[6-8]。

因此本实验通过亚克隆技术，构建了真核表达载体 pEGFP-N1-DCN，并转染入胃癌细胞株 SGC-7901 中表达，其结果显示：pEGFP-N1-DCN 转染 SGC-7901 后，EGFR 及 TGF-β_1 的表达均降低；细胞阻滞在 $G_0 \sim G_1$ 期，细胞增殖受到明显抑制；Transwell 迁移、侵袭实验显示 DCN 能抑制细胞的迁移及侵袭，说明 DCN 通过下调 EGFR 及 TGF-β_1 的表达，抑制肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭，从而起到抗肿瘤作用，这将对肿瘤的基因治疗产生重要的临床意义。

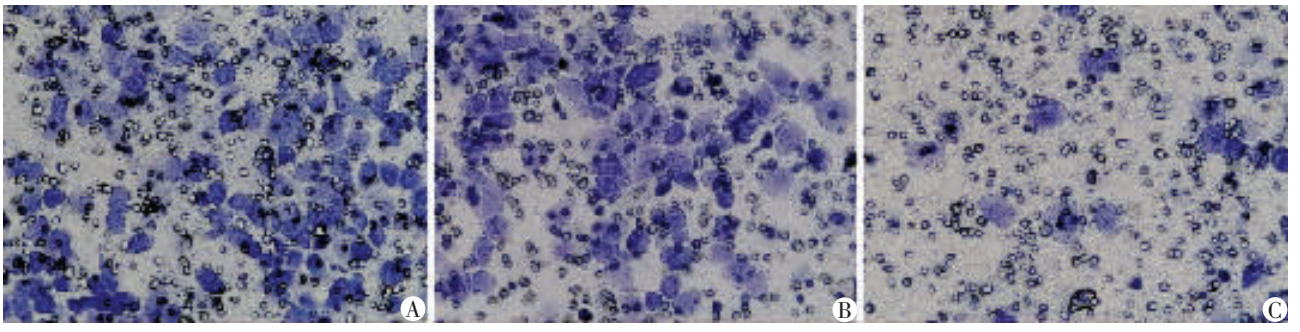
据研究 DCN 通过与 EGFR 相互作用，阻断 EGF-EGFR 所介导的信号通路。DCN 与 EGFR 结合[9]，促使其磷酸化，从而引起 MAPK 的活化、胞内 Ca^{2+} 动员和细胞周期素依赖性抑制物 p21 表达，使细胞周期停滞[5,10-11]，而近年来研究发现 EGFR 在胃癌组织中呈高表达[12-14]；DCN 具有中和和调节 TGF-β 活性以及阻断 TGF-β 所介导的信号通路，达到肿瘤治疗的作用[11]。因此这就是本实验选择 DCN 为目的基因，胃癌细胞株 SGC-7901 为研究载体，探讨 DCN 在肿瘤治疗中的作用的原因所在。本实验将 DCN 基因转染入胃癌细胞 SGC-7901 中，观察到 DCN 能使 EGFR 及 TGF-β_1 的表达下调，细胞停止在 $G_0 \sim G_1$ 期，细胞增殖受到明显抑制，与文献[10]报道一致。

除上述作用外，DCN 也通过抑制胞外基质的形成和聚集来发挥抗肿瘤作用。DCN 表达的降低可使基质结构紊乱，降低基质作为肿瘤迁移的物理屏障效应的有效性[15-16]。DCN 在 ECM 能够特异性、高亲和性地与纤维粘连蛋白（FN），血栓结合素，Ⅱ、Ⅵ、Ⅹ、Ⅳ型胶原相互结合，从而阻断或抑制细胞转移[17]。研究发现，TGF-β_1 作为肿瘤细胞促进因子，能促进肿瘤细胞生长、迁移和侵袭的能力[18-19]，所以下调 TGF-β_1 亦能减少肿瘤细胞迁移、侵袭作用。本实验通过将 DCN 基因转染入胃癌细胞 SGC-7901 中观察到 DCN 可以抑制细胞的迁移及侵袭，但 DCN 作为基因治疗的手段运用于临床还有待进一步研究。



A：空白对照组；B：pEGFP-N1 组；C：pEGFP-N1-DCN 组

图 6 pEGFP-N1-DCN 转染对 SGC-7901 细胞迁移的影响 （结晶紫染色 ×200）



A：空白对照组；B：pEGFP-N1 组；C：pEGFP-N1-DCN 组

图 7 pEGFP-N1-DCN 转染对 SGC-7901 细胞侵袭的影响 （结晶紫染色 ×200）

参考文献：

[1] Fiedler L R, Eble J A. Decorin regulates endothelial cell-matrix interactions during angiogenesis[J]. Cell Adh Migr, 2009, 3(1): 3-6.

[2] Scott P G, McEwan P A, Dodd C M, *et al*. Crystal structure of the dimeric protein core of decorin, the archetypal small leucine-rich repeat proteoglycan[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(44): 15633-15638.

[3] Bi X, Tong C, Dockendorff A, *et al*. Genetic deficiency of decorin causes intestinal tumor formation through disruption of intestinal cell maturation[J]. Carcinogenesis, 2008, 29(7): 1435-1440.

[4] Ma W, Cai S, Du J, *et al*. SDF-1/54-DCN: a novel recombinant chimera with dual inhibitory effects on proliferation and chemotaxis of tumor cells[J]. Biol Pharm Bull, 2008, 31(6): 1086-1091.

[5] Zafiropoulos A, Nikitovic D, Katonis P, *et al*. Decorin-induced growth inhibition is overcome through protracted expression and activation of epidermal growth factor receptors in osteosarcoma cells[J]. Mol Cancer Res, 2008, 6(5): 785-794.

[6] Li X, Pennisi A, Yaccoby S. Role of decorin in the antimyeloma effects of osteoblasts[J]. Blood, 2008, 112(1): 159-168.

[7] Salomaki H H, Sainio A O, Soderstrom M, *et al*. Differential expression of decorin by human malignant and benign vascular tumors[J]. J Histochem Cytochem, 2008, 56(7): 639-646.

[8] Pucci-Minafra I, Cancemi P, Di-Cara G, *et al*. Decorin transfection induces proteomic and phenotypic modulation in breast cancer cells 8701-BC[J]. Connect Tissue Res, 2008, 49(1): 30-41.

[9] Goldoni S, Humphries A, Nystrom A, *et al*. Decorin is a novel antagonistic ligand of the Met receptor[J]. J Cell Biol, 2009, 185(4): 743-754.

[10] Csordas G, Santra M, Reed C C, *et al*. Sustained down-regulation of the epidermal growth factor receptor by decorin. A mechanism for controlling tumor growth *in vivo*[J]. J Biol Chem, 2000, 275(42): 32879-32887.

[11] Wu H, Wang S, Xue A, *et al*. Overexpression of decorin induces apoptosis and cell growth arrest in cultured rat mesangial cells *in vitro*[J]. Nephrology (Carlton), 2008, 13(7): 607-615.

[12] Matsubara J, Yamada Y, Hirashima Y, *et al*. Impact of insulin-like growth factor type 1 receptor, epidermal growth factor receptor, and HER2 expressions on outcomes of patients with gastric cancer[J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(10): 3022-3029.

[13] Kim M A, Lee H S, Lee H E, *et al*. EGFR in gastric carcinomas: prognostic significance of protein overexpression and high gene copy number[J]. Histopathology, 2008, 52(6): 738-746.

[14] Galizia G, Lieto E, Orditura M, *et al*. Epidermal growth factor receptor (EGFR) expression is associated with a worse prognosis in gastric cancer patients undergoing curative surgery[J]. World J Surg, 2007, 31(7): 1458-1468.

[15] Magzoub M, Jin S, Verkman A S. Enhanced macromolecule diffusion deep in tumors after enzymatic digestion of extracellular matrix collagen and its associated proteoglycan decorin[J]. FASEB J, 2008, 22(1): 276-284.

[16] Rykova V I, Grigorieva E V, Chernenko A V, *et al*. Proteoglycans and human breast cancer[J]. Bull Exp Biol Med, 2007, 144(3): 335-337.

[17] Shintani K, Matsumine A, Kusuzaki K, *et al*. Decorin suppresses lung metastases of murine osteosarcoma[J]. Oncol Rep, 2008, 19(6): 1533-1539.

[18] 于宏，姜政，王丕龙. pEGFP-N1-TGF-β1 重组质粒对结肠癌细胞增殖、细胞周期及侵袭性的影响[J]. 第三军医大学学报，2010，32(9)：943-946.

[19] Zhang P, Di J Z, Zhu Z Z, *et al*. Association of transforming growth factor-beta 1 polymorphisms with genetic susceptibility to TNM stage Ⅰ or Ⅱ gastric cancer[J]. Jpn J Clin Oncol, 2008, 38(12): 861-866.

（收稿：2010-10-21 修回：2010-11-18）
（编辑 王小寒）

正文中参考文献的标注方法

正文中参考文献的著录制度有顺序编码制和著者-出版年制。

1. 本刊采用顺序编码制，即按照正文中引用的文献出现的先后顺序用阿拉伯数字（从1开始）连续编码，并将序号置于方括号中。

2. 文内标注　　根据具体情况一般可按照下述3种格式标注。

a. 正文指明原始文献作者姓名时，序号标注于作者姓名之后的右上角。

例1：薛社普等[1]指出棉酚从体内排泄缓慢。

b. 正文未指明作者姓名或非原始文献作者时，序号标注于相关论述句末的右上角。

例2：动态心电图特别适用于无症状心肌缺血的发现[1-3]。

c. 正文直接述及文献序号，即文献作正文叙述的直接补语时，文献序号不用角码标注，与正文并排。

例3：本研究与文献[4,6]报道的结果一致。

3. 标注应尽可能靠近有关引文，写在标点符号之前。在同一处同时引用几条文献时，文献序号应放在1个方括号内。文献序号不连续时，用逗号分隔，如例3；连续时文献序号不必一一列出，可标注起止序号，用连接线连接，如例2。

本刊编辑部