

• 论著-临床研究 •

食管鳞状细胞癌患者组织中 RAB1A 基因表达的相关研究及其临床意义

梁晓虎, 田海卫

(宝鸡市人民医院 胸心外科, 陕西 宝鸡 721000)

摘要: [目的]探讨 RAB1A 在食管鳞状细胞癌患者中的表达及其临床意义。[方法]采用实时荧光定量 PCR 检测课题组 2013~2015 年收集的 126 例确诊食管鳞状细胞癌患者的癌组织及对应癌旁正常组织中 RAB1A 的表达量,并根据其表达量高低分为高表达组和低表达组;分析 RAB1A 表达量与食管鳞状细胞癌患者临床特征、生存期之间的关系;通过过表达 RAB1A 的表达后检测其对食管鳞状细胞癌细胞系增殖、迁移和侵袭能力的影响。[结果] RAB1A 在食管鳞状细胞癌组织中表达量高于对应癌旁正常组织 (0.0113 ± 0.0194 vs. 0.0071 ± 0.0098 , $P = 0.0123$); RAB1A 高表达与食管鳞状细胞癌患者家族肿瘤史 ($P = 0.002$)、饮酒 ($P = 0.005$)、体质指数 ($P = 0.001$)、分期 ($P = 0.024$)、淋巴结转移 ($P < 0.001$)、远端转移 ($P < 0.001$) 及分化程度 ($P < 0.001$) 相关; RAB1A 高表达与食管鳞状细胞癌患者生存期明显缩短 ($P < 0.001$)。RAB1A 过表达后促进食管鳞状细胞癌细胞增殖 ($F = 151.9$, $P < 0.001$)、transwell 迁移 (100.4 ± 14.2 vs. 51.2 ± 10.6 , $P = 0.009$)、划痕实验迁移距离 [$(655.0 \pm 43.9) \mu\text{m}$ vs. $(320.7 \pm 115.2) \mu\text{m}$, $P = 0.0003$] 和 transwell 侵袭 (79.2 ± 13.4 vs. 46.2 ± 17.6 , $P = 0.0014$)。[结论] RAB1A 在食管鳞状细胞癌中高表达,且高表达将缩短食管鳞状细胞癌患者生存期,过表达 RAB1A 能够促进食管鳞状细胞癌细胞增殖、迁移和侵袭能力。

关键词: 食管鳞状细胞癌; RAB1A; 预后**doi:** 10.3969/j.issn.1671-038X.2019.08.02**中图分类号:** R735.1 **文献标志码:** A**The expression pattern and clinic value of RAB1A in esophageal squamous cell carcinoma**

LIANG Xiao-hu, TIAN Hai-wei

(Department of Cardiothoracic Surgery, Baoji People's Hospital, Baoji 721000, China)

Corresponding author: TIAN Hai-wei, E-mail: 496854906@qq.com

Abstract: [Objective] To detect the expression and clinical value of RAB1A in patients with esophageal squamous cell carcinoma (ESCC). [Methods] Real-time quantitative PCR (RT-PCR) was used to detect the expression level of RAB1A in cancer tissues and adjacent normal tissues of 126 patients diagnosed with ESCC which were collected from 2013 to 2015 by the research group, the expression level was divided into high expression group and low expression group according to the expression level. The relationship between RAB1A expression and clinical characteristics and survival of patients with ESCC were analyzed, the effect of RAB1A overexpression on the proliferation, migration and invasion ability of esophageal squamous cell carcinoma lines was detected. [Results] RAB1A was upregulated in ESCC cancer tissues than that in adjacent normal tissues (0.0113 ± 0.0194 vs. 0.0071 ± 0.0098 , $P = 0.0123$), and its high expression was correlated with the family history of cancer ($P = 0.002$), alcohol drinking ($P = 0.005$), BMI ($P = 0.001$), clinical stage ($P = 0.024$), lymph node metastasis ($P < 0.001$), distal metastasis ($P < 0.001$), and pathologic

收稿日期: 2019-04-24

作者简介: 梁晓虎, 男, 本科, 主治医师, 研究方向: 肿瘤

通讯作者: 田海卫, E-mail: 496854906@qq.com

type($P < 0.001$). The patients with a higher RAB1A expression level had a shorter overall survival rate ($P < 0.001$). Over expression of RAB1A promotes proliferation of ESCC cell lines($F = 151.9, P < 0.001$), and promotes ESCC cell lines migration(100.4 ± 14.2 vs. $51.2 \pm 10.6, P = 0.009$) in trans-well assay, (655.0 ± 43.9) μm vs. (320.7 ± 115.2) $\mu\text{m}, P = 0.0003$) in wound healing assay, and invasion(79.2 ± 13.4 vs. $46.2 \pm 17.6, P = 0.0014$). [Conclusion] RAB1A was highly expressed in ESCC, higher expression of RAB1A shortens the overall survival rate of ESCC patients. Upregulate the expression level of RAB1A promotes ESCC cell lines proliferation, migration and invasion.

Key words: esophageal squamous cell carcinoma; RAB1A; survival

食管癌(esophageal carcinoma, EC)是一种常见的消化道肿瘤,也是全球高发的癌症类型之一,其中,南美洲、西欧国家以及中国是发病率最高的几个地区^[1-3]。食管癌分为鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)、腺癌和小细胞癌^[4],其中 ESCC 是我国食管癌最主要的病理类型,其比例占食管癌比例总数的 85%,近年来得到越来越多的关注^[5-6]。虽然目前医学科研及取得了较大进步,ESCC 的诊断和治疗方面也取得了一些进展,但是 ESCC 患者的 5 年生存率却没有得到显著提高^[7-8]。因此,寻找 ESCC 新的治疗措施、诊断和治疗的生物标志物,探讨 ESCC 细胞转移和侵袭的机制对延长 ESCC 患者生存时间和改善预后具有重要意义^[9]。目前,有较多文献报道 RAB1A 在肿瘤,如子宫颈癌^[10]、结肠癌^[11-13]、前列腺癌^[14-15]中发挥致癌基因的作用,能够促进肿瘤转移、侵袭。但是,尚未见到 RAB1A 在食管癌中有何作用的报道。本研究探讨 RAB1A 在食管癌中的表达模式及其对预后的影响,并通过实验验证 RAB1A 能否通过促进 ESCC 细胞转移和侵袭能力来促进 ESCC 的发生和发展,为 ESCC 的诊断和治疗提供新的思路。

1 资料与方法

1.1 一般资料

本研究所用到的 126 例 ESCC 组织及对应的癌旁正常组织标本均为 2013 年 1 月~2015 年 3 月收集于我院,追踪随访时间 5~57 个月,中位随访时间 17 个月,且均有追踪随访资料。男 92 例,女 34 例,平均年龄(56.76 ± 11.72)岁。患者相互之间不存在血缘关系,详细信息见表 1。本研究经我院伦理委员会审核通过。

1.2 qPCR

采用 TRIzol 法提取肿瘤组织及对应癌旁正常组织 totalRNA,并使用 TAKARA 反转录试剂盒(PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser)反转录制备 cDNA 文库;使用 ABI 7900 HT PCR 仪进行实验,qPCR mix 选用 SYBR Green PCR

Master Mix,反应体系根据其说明书配置,结果采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行分析;使用 ACTB 作为内参基因,基因相对表达量以癌组织表达量高于对应癌旁正常组织为高表达,反之为低表达。

1.3 细胞培养及转染

Eca-109 细胞使用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基,37℃、5% CO₂、饱和湿度条件下培养。通过在 ESCC 细胞系中过表达 RAB1A 后检测 ESCC 细胞 Eca-109 增殖、迁移和集落形成能力的变化,以期揭示 RAB1A 在 ESCC 中所起作用。本研究通过购买 Lipofectamine 3000 转染试剂进行转染,根据其说明书进行操作。瞬时转染使用订购于易锦生物技术有限公司的 RAB1A 过表达质粒。

1.4 MTT 实验

本实验通过检测 RAB1A 过表达后 ESCC 细胞增殖速度的差异来推断 RAB1A 对 ESCC 细胞增殖的影响。如 RAB1A 过表达后增殖速度较空白对照升高,则可推断 RAB1A 能够促进 ESCC 细胞系增殖。取转染后细胞处于对数生长期时消化接种于 96 孔细胞培养板中,每孔按 300 个细胞/孔的密度接种,每组设置 5 个平行孔。按厂家说明书配置 MTT 试剂(北京智杰方远公司)连续观测 0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h 细胞在 450 nm 下的吸光度值(OD),吸光度值越高则细胞越多。

1.5 transwell 实验

本研究采用 transwell 迁移实验检测 RAB1A 过表达后对 ESCC 细胞迁移能力的影响,如过表达 RAB1A 后迁移细胞数量较空白对照组低,则表示 RAB1A 能够促进 ESCC 细胞系的迁移能力。取转染后细胞处于对数生长期时消化接种于 8 μm 小室(CORNING)中,每孔 20 000 个细胞,每组设置 3 个平行孔。待接种后 48 h 后使用甲醛固定、使用结晶紫染液染色后使用倒置显微镜随机选取 5 个视野拍照,计数。

侵袭实验操作步骤同迁移实验,但使用的小室为预先铺设基质胶的小室。

表 1 RAB1A 表达水平与 ESCC 患者
临床特征之间的关系 例(%)

临床特征	低表达 (n=48)	高表达 (n=78)	χ^2	P
年龄/岁			2.790	0.095
<60	37(77.1)	49(62.8)		
≥60	11(22.9)	29(37.2)		
性别			0.187	0.665
女	14(29.2)	20(25.6)		
男	34(70.8)	58(74.4)		
家族肿瘤史			9.429	0.002
无	47(97.9)	61(78.2)		
有	1(2.1)	17(21.8)		
吸烟史			0.538	0.463
无	26(54.2)	37(47.4)		
有	22(45.8)	41(52.6)		
饮酒史			8.008	0.005
无	27(56.2)	24(30.8)		
有	21(43.8)	54(69.2)		
体质指数			14.441	0.001
<20	7(14.6)	33(42.3)		
20~28	24(50.0)	35(44.9)		
>28	17(35.4)	10(12.8)		
临床分期			7.488	0.024
I	21(43.8)	17(21.8)		
II	8(16.7)	24(30.8)		
III	19(39.6)	37(47.4)		
T			4.271	0.234
T1	5(10.4)	3(3.8)		
T2	12(25.0)	16(20.5)		
T3	20(41.7)	30(38.5)		
T4	11(22.9)	29(37.2)		
N			21.504	<0.001
0	20(41.7)	13(16.7)		
1	21(43.8)	22(28.2)		
2	7(7)	43(55.1)		
M			12.736	<0.001
0	31(64.6)	25(32.1)		
1	17(35.4)	53(67.9)		
分化程度			16.783	<0.001
低度分化	22(45.8)	13(16.7)		
中度分化	19(39.6)	31(39.7)		
高度分化	7(14.6)	34(43.6)		

1.6 划痕实验

实验前 1 天用记号笔于 12 孔细胞培养板背面划 5 条平行直线,紫外消毒灭菌后置于无菌环境备用。第 2 天将处于对数生长期的细胞消化传代培养于提前准备好的 12 孔细胞培养板中,细胞密度为 1×10^5 个/mL,共转染后 4 h 后,用 10 mL 移液枪头垂直于 12 孔细胞培养板背面横线划痕。用磷酸盐缓冲液洗涤 3 次,加入不含胎牛血清的培养液继续培养 24 h,分别于 0 时、24 时于倒置荧光显微镜下每孔随机选取 3 个视野拍照、记录并统计。

1.7 统计学处理

采用配对 *t* 检验分析 RAB1A 表达水平的差异,采用 χ^2 检验分析 RAB1A 表达水平和 ESCC 患者临床特征之间的关系,采用 K-M 法绘制 ESCC 患者生存曲线,用 *Log-rank* 检验不同 RAB1A 表达水平患者生存时间的差异。使用独立 *t* 检验分析不同 RAB1A 表达水平细胞迁移能力差异;采用重复测量的方差分析方法分析不同 RAB1A 表达水平细胞增殖能力的差异(MTT 实验)。使用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,所有检验均为双侧检验, $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RAB1A 在 ESCC 组织中高表达

本次研究中,我们采用 qPCR 检测了所有 126 对 ESCC 癌-癌旁正常组织,发现 RAB1A 在 78 (61.9%)对癌组织中高表达,48(38.1%)对癌组织中低表达(见表 1);癌组织中的表达量显著高于对应癌旁正常组织达 1.58 倍 (0.0113 ± 0.0194 vs. 0.0071 ± 0.0098 , $P=0.0123$,见图 1)。

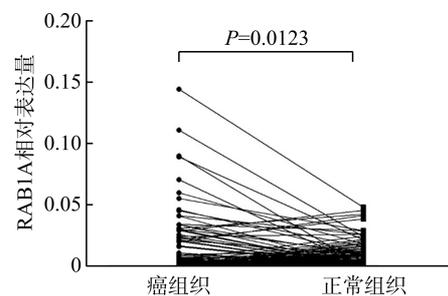


图 1 RAB1A 在 ESCC 组织中高表达

2.2 RAB1A 表达水平与 ESCC 患者临床特征之间的关系

分析 RAB1A 表达水平与 ESCC 患者临床特征之间的关系可见,RAB1A 高表达与 ESCC 患者家族肿瘤史、饮酒史、体质指数、肿瘤临床分期、是否淋巴结转移、是否远端转移及肿瘤分化程度有关。见表 1。

2.3 RAB1A 高表达与 ESCC 患者生存期缩短相关

通过进一步分析 RAB1A 表达量与 ESCC 患者生存随访资料之间的关系,将本研究患者分为 RAB1A 高表达组和低表达组,使用 *Kaplan-Meier* 法进行生存分析,使用 *Log-rank* 检验 2 组间生存率的差异,结果显示,RAB1A 低表达组中位生存时间为 39.0 个月,高表达组中位生存时间为 31.0 个月,组间总生存率(overall survival, OS)差异有统计学意义,RAB1A 高表达组 OS 明显低于 RAB1A 低表达组($\chi^2=5.92, P=0.015$),见图 2。

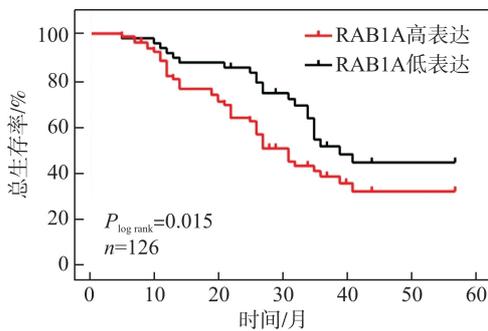


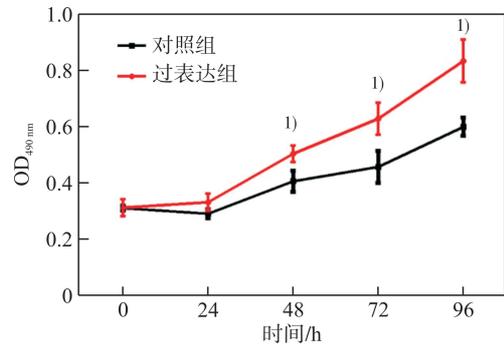
图 2 RAB1A 高表达患者生存期缩短

2.4 过表达 RAB1A 促进 ESCC 细胞增殖

通过 MTT 实验验证过表达 RAB1A 后对 ESCC 细胞增殖能力的影响。通过重复测量的方差分析($F=151.9, P<0.001$),结果显示:当细胞增殖 48 h 以后,过表达组细胞系增殖能力明显较对照组细胞系强,增殖速度升高。

转染后 0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h 分别在 450 nm 下的吸光度值(OD 值),分别为: 0.314 ± 0.026 vs. 0.312 ± 0.008 (0 h, $P>0.05$); 0.334 ± 0.027 vs. 0.293 ± 0.014 (24 h, $P>0.05$); 0.506 ± 0.026 vs. 0.407 ± 0.033 (48 h, $P=0.002$); 0.629 ± 0.051 vs. 0.458 ± 0.051 (72 h, $P=0.001$); 0.834 ± 0.067 vs. 0.601 ± 0.029 (96 h, $P<0.001$),见图 3。

通过以上数据可见在细胞生长达到平台期以前,RAB1A 能够明显促进 ESCC 细胞的增殖。



与对照组比较,¹⁾ $P<0.05$ 。

图 3 RAB1A 过表达促进 ESCC 细胞系增殖

2.5 过表达 RAB1A 促进细胞迁移

我们通过 Transwell 迁移实验验证过表达 RAB1A 后对 ESCC 细胞迁移能力的影响。通过染色后显微镜下拍照(200 倍)计数后分析发现:过表达组 ESCC 细胞迁移细胞数量明显较对照组细胞增加; [100.4 ± 14.2 个 vs. (51.2 ± 10.6) 个, $P=0.009$],见图 4A、B。

另外,我们通过划痕实验验证过表达 RAB1A 后对 ESCC 细胞迁移能力的影响。划痕 48 h 后,通过比较 0 h 划痕宽度,分析发现:过表达组 ESCC 细胞迁移距离明显较对照组细胞远; [过表达组 vs. 对照组(655.0 ± 43.9) μm vs. (320.7 ± 115.2) μm , $P=0.0003$],见图 4C、D。

2.6 过表达 RAB1A 促进细胞侵袭

我们通过 Transwell 侵袭实验验证过表达 RAB1A 后对 ESCC 细胞侵袭能力的影响。通过染色后显微镜下拍照(200 倍)计数后分析发现:过表达组 ESCC 细胞侵袭细胞数量(个)明显较对照细胞增加 [(79.2 ± 13.4) 个 vs. (46.2 ± 17.6) 个, $P=0.0014$],见图 5。

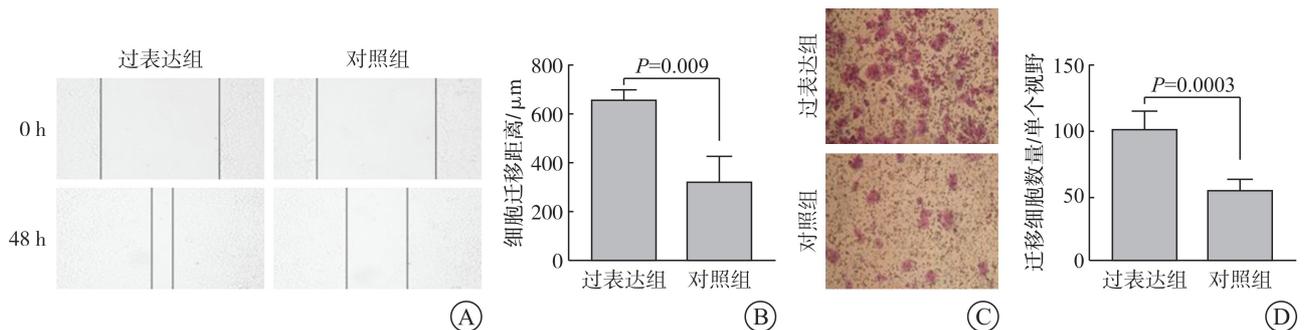


图 4 过表达 RAB1A 促进细胞迁移($\times 200$)

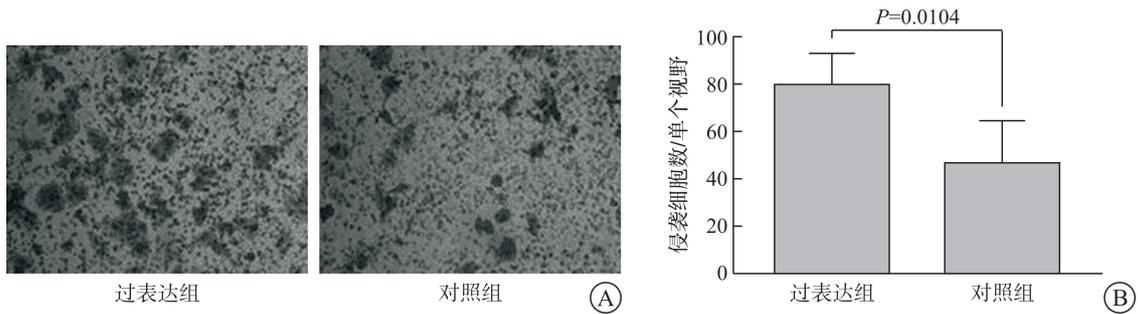


图 5 过表达 RAB1A 促进细胞侵袭(×200)

3 讨论

食管癌是消化系统常见的恶性肿瘤,根据世界卫生组织(WHO)下属国际癌症研究组织估计^[16-17],2018年将有57.20万新发病例,以及50.90万死亡病例,且约70%病例为男性患者。根据国家肿瘤研究中心预测^[18-19],我国2015年食管癌新发病例约47.79万例,死亡病例37.50万例。我国85%食管癌患者病理类型为ESCC^[5],ESCC给我国造成的疾病负担仍然较重^[19-20]。近年来研究发现,RAB1A基因在多种肿瘤中发挥癌基因效应:RAB1A通过在应激条件下拮抗热休克同源蛋白(Heat shock cognate protein)Hsc70的作用使癌细胞能够在应激条件下存活^[11];RAB1A在肠癌中高表达,且与mTORC1激活和mTOR抑制因子敏感性有关^[12-13]。这些证据都表明RAB1A可以作为一个潜在的肿瘤相关诊断和治疗的生物标志物^[21]。

RAB1A定位于人类染色体2q14,目前已有较多文献报道显示RAB1A与肿瘤的发生和发展相关^[22-24],但是尚未见到其在ESCC中的报道所起作用的报道。本研究是首次对RAB1A在ESCC中所起作用 and 临床意义进行探讨,通过大样本临床标本检测RAB1A的表达量,我们发现RAB1A在ESCC患者肿瘤组织中的表达量显著高于对照组,其高表达与ESCC患者生存期缩短,侵袭和转移等呈正相关,提示RAB1A可以作为ESCC患者预后的生物标志物。在功能方面,我们通过过表达技术在ESCC细胞系中过表达RAB1A后检测ESCC细胞系生物学功能的改变,发现过表达RAB1A后能够促进肿瘤细胞迁移和侵袭,且能够明显促进肿瘤细胞增殖,据此我们推断RAB1A在ESCC中发挥致癌基因作用。

尽管以上证据表明RAB1A在ESCC中起到促进肿瘤发生和发展的作用,但是本研究仅发现人群关联和简单的功能验证,缺乏RAB1A致癌的机制研究,其导致ESCC发生和发展的机制尚不明确,有待进步研究。

参考文献

- [1] Siegel R L, Miller K D, Jemal A. Cancer statistics, 2018 [J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(1): 7-30.
- [2] Allemani C, Matsuda T, Carlo V D, et al. Global surveillance of trends in cancer survival 2000-14 (CONCORD-3): analysis of individual records for 37513025 patients diagnosed with one of 18 cancers from 322 population-based registries in 71 countries [J]. The Lancet, 2018, 391(10125): 1023-1075.
- [3] Nj K, Ab V, Ms C, et al. Global, regional, and national levels and causes of maternal mortality during 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013 [J]. Lancet, 2014, 384(9947): 980-1004.
- [4] Zeng H, Zheng R, Zhang S, et al. Esophageal cancer statistics in China, 2011; Estimates based on 177 cancer registries [J]. Thorac Cancer, 2016, 7(2): 232-237.
- [5] 杜灵彬, 魏文强. 中国人群食管鳞癌生存分析研究新进展 [J]. 实用肿瘤学杂志, 2018, 32(4): 344-348.
- [6] 郑荣寿, 张思维, 吴良有, 等. 中国肿瘤登记地区 2008 年恶性肿瘤发病和死亡分析 [J]. 中国肿瘤, 2012, 21(1): 1-8.
- [7] Zheng R, Zeng H, Zhang S, et al. Estimates of cancer incidence and mortality in China, 2013 [J]. Chin J Cancer, 2017, 36(1): 66.
- [8] 曾红梅, 郑荣寿, 张思维, 等. 1989-2008 年中国恶性肿瘤死亡趋势分析 [J]. 中华肿瘤杂志, 2012, 34(7): 525-531.
- [9] Islami F, Chen W, Yu X Q, et al. Cancer deaths and cases attributable to lifestyle factors and infections in China, 2013 [J]. Ann Oncol, 2017, 28(10): 2567-2574.
- [10] Nikoshkov A, Broliden K, Attarha S, et al. Expression pattern of the PRDX2, RAB1A, RAB1B, RAB5 A and RAB25 genes in normal and cancer cervical tissues [J]. Int J Oncol, 2015, 46(1): 107-112.
- [11] Tanaka M, Mun S, Harada A, et al. Hsc70 contributes to cancer cell survival by preventing Rab1 A degradation under stress conditions [J]. PLoS one, 2014, 9(5): e96785.

- [12] Sanchez-gurmaches J, Guertin D A. mTORC1 gRABs the Golgi[J]. *Cancer Cell*, 2014, 26(5): 601–603.
- [13] Thomas J D, Zhang Y J, Wei Y H, et al. Rab1 A is an mTORC1 activator and a colorectal oncogene [J]. *Cancer Cell*, 2014, 26(5): 754–769.
- [14] Sun T, Wang X, He H H, et al. MiR-221 promotes the development of androgen independence in prostate cancer cells via downregulation of HECTD2 and RAB1A[J]. *Oncogene*, 2014, 33(21): 2790–800.
- [15] Abd Elmageed Z Y, Yang Y, Thomas R, et al. Neoplastic reprogramming of patient-derived adipose stem cells by prostate cancer cell-associated exosomes[J]. *Stem Cells*, 2014, 32(4): 983–997.
- [16] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394–424.
- [17] Torre L A, Bray F, Siegel R L, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. *CA Cancer J Clin*, 2015, 65(2): 87–108.
- [18] Chen W, Zheng R, Baade P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115–132.
- [19] Chen W. Cancer statistics: updated cancer burden in China[J]. *Chin J Cancer Res*, 2015, 27(1): 1.
- [20] Li W, Zheng J, Deng J, et al. Increased levels of the long intergenic non-protein coding RNA POU3 F3 promote DNA methylation in esophageal squamous cell carcinoma cells[J]. *Gastroenterology*, 2014, 146(7): 1714–1726, e5.
- [21] Park J S, Heo J S, Chang H S, et al. Association analysis of member RAS oncogene family gene polymorphisms with aspirin intolerance in asthmatic patients [J]. *DNA Cell Biol*, 2014, 33(3): 155–161.
- [22] Shimada K, Uzawa K, Kato M, et al. Aberrant expression of RAB1A in human tongue cancer[J]. *Br J Cancer*, 2005, 92(10): 1915–1921.
- [23] Ishida M, Ohbayashi N, Fukuda M. Rab1 A regulates anterograde melanosome transport by recruiting kinesin-1 to melanosomes through interaction with SKIP [J]. *Sci Rep*, 2015, 5(8): 238.
- [24] Ruffell B, Chang-shtrachan D, Chan V, et al. RAB1A Promotes Oncogenesis in Colorectal Cancer via mTORC1 Activation [J]. *Cancer Dis*, 2014, 4(12): 1366.

文内参考文献的标注规范

文内所列参考文献应限于作者直接阅读过的、最主要的、且为发表在正式出版物上的文章。私人通信和未发表(含待发表)的著作及论文,一般不宜作为参考文献。参考文献还应注重权威性和时效性。文内标注参考文献时应按文献出现的先后顺序用阿拉伯数字连续编码,并将序号置于方括号中。可根据具体情况分别按下述 3 种格式之一标注。

① 文中已标明原始文献作者姓名时,序号标注于作者姓名右上角。

例如: Vairaktaris 等^[7]研究表明, MMP-9-1562C/T 基因多态性与口腔癌关系密切。

② 正文未标明作者或非原始文献作者时,序号标注于引用内容的句末。

例如: ……在中枢神经系统中具有保护神经的作用,减少缺氧、缺血对动物脑神经元的损害^[1]。

③ 正文直接述及文献序号时则将之作为语句的组成部分时不用角码标注。

例如: 肱动脉超声检查的方法见文献[2]。

文中多次引用同一参考文献,只在第一次出现时编排序号(在参考文献表中也只出现一次),其他处使用同一序号;如果多次引用的是同一参考文献的不同页的内容,则应参考文献表中按引用顺序一一列出页码。

若某一问题使用了多篇文献说明,这时将各文献的序号在一个方括号内全部列出,中间加逗号,若遇连续序号,则在起止序号中间加“—”表示。如: ……组织型 RAS 激活也成为心肌肥厚、心肌纤维化、心腔扩大、心力衰竭的主要因素^[1,3,9-10]。