

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.12.002

## $\beta$ -catenin 在兔颈总动脉套管导致的动脉粥样硬化血管壁中高表达\*

刘月华<sup>1</sup>, 生 燕<sup>2</sup>, 涂应杰<sup>1</sup>, 杨 兴<sup>1</sup>, 欧刚卫<sup>1</sup>, 生 欣<sup>1△</sup>

(1. 遵义医学院基础医学院生物化学教研室, 贵州遵义 563000;

2. 遵义医学院基础医学院形态学实验室, 贵州遵义 563000)

**[摘要]** **目的** 探讨兔颈总动脉套管对动脉粥样硬化形成及  $\beta$ -catenin 表达的影响。**方法** 将 15 只体质量为  $(2.0 \pm 0.2)$  kg 的 2 个月龄健康新西兰兔分为 3 组, 分别为高脂饲养组、左侧颈总动脉套管组和左侧颈总动脉套管+高脂饲养组, 每组 5 只, 取左侧颈总动脉套管组右侧血管为对照组。饲养 9 周后处死动物, 取各组兔颈总动脉血管; 实时荧光定量 PCR (RT-PCR) 及免疫组织化学检测兔颈总动脉血管组织中  $\beta$ -catenin mRNA 和蛋白表达定位。**结果** RT-PCR 结果显示左侧颈总动脉套管组  $\beta$ -catenin mRNA 表达较对照组、高脂饲养组、左侧颈总动脉套管+高脂饲养组上调。免疫组化结果显示, 除对照组外, 各组胞质中均有  $\beta$ -catenin 蛋白定位, 且左侧颈总动脉套管组、左侧颈总动脉套管+高脂饲养组中主要定位于内膜增生处。**结论**  $\beta$ -catenin 在兔颈总动脉套管导致的动脉粥样硬化血管壁中高表达。

**[关键词]** 颈总动脉套管; 动脉粥样硬化;  $\beta$ -catenin; 动物实验; 兔

**[中图分类号]** R34 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2017)12-1588-04

### $\beta$ -catenin high expression in atherosclerotic vessel wall caused by rabbit carotid artery cannula\*

Liu Yuehua<sup>1</sup>, Sheng Yan<sup>2</sup>, Tu Yingjie<sup>1</sup>, Yang Xing<sup>1</sup>, Ou Gangwei<sup>1</sup>, Sheng Xin<sup>1△</sup>

(1. Teaching and Researching Section of Biochemistry; 2. Morphological Laboratory, Basic Medical College, Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou 563000, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effects of rabbit carotid artery cannula on atherosclerosis formation and  $\beta$ -catenin expression. **Methods** Fifteen 2-month-old New Zealand rabbits weighing  $(2.0 \pm 0.2)$  kg were randomly divided into three groups, high-fat diet group, left common carotid artery cannula group and left common carotid artery cannula plus high-fat diet group, 5 cases in each group, and taking the right blood vessels in the left common carotid artery cannula group served as the control group. The animals were sacrificed after 9-week feeding, and the total rabbit carotid artery in each group was taken; the real-time PCR and immunohistochemistry were used to detect  $\beta$ -catenin mRNA and protein expression targeting in rabbit common carotid artery tissue. **Results** The real-time PCR results showed that the  $\beta$ -catenin mRNA expression in the left common carotid artery cannula group was higher than that in the control group, high fat diet group and the left common carotid artery cannula + high-fat diet group. The immunohistochemistry results showed that, except for the control group, various groups had the  $\beta$ -catenin protein location in the cytoplasm, moreover which in the left carotid artery cannula group and left common carotid artery cannula + high-fat diet group mainly located in the area of intimal hyperplasia. **Conclusion**  $\beta$ -catenin is highly expressed in the atherosclerotic vessel wall caused by rabbit carotid artery cannula.

**[Key words]** carotid artery cannula; atherosclerosis;  $\beta$ -catenin; animal experimentation; rabbits

动脉狭窄所导致的局部血流变化成为动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 的重要诱因。Wnt 信号通路是一条极其保守的信号传导通路。近年来 Wnt 信号通路在心血管疾病发生发展中的作用备受关注。研究发现 Wnt 信号通路参与了 AS 发展的许多方面<sup>[1]</sup>, 且 Wnt 信号和 AS 的发展之间有着直接的联系<sup>[2-3]</sup>。研究表明  $\beta$ -catenin 在球囊损伤和高胆固醇血症所致的兔腹主动脉粥样斑块中呈高表达<sup>[4]</sup>。然而, 该蛋白在由血流变化所导致的 AS 发生过程中的作用还未见报道。因此, 本文研究应用了左侧颈总动脉套管, 造成左侧颈总动脉狭窄, 通过检测狭窄处血管组织中  $\beta$ -catenin mRNA 和蛋白表达定位, 探讨颈总动脉套管对 AS 形成及  $\beta$ -catenin 表达的影响, 旨在为进一步阐明动脉狭窄在导致 AS 过程中提供理论依据。

### 1 材料与方法

**1.1 材料** 2 个月龄的新西兰兔 15 只, 体质量  $(2.0 \pm 0.2)$

kg, 购自重庆医科大学实验动物中心 [许可证号 SCXK (渝) 2012-0001]。

**1.2 主要试剂** 总 RNA 提取试剂盒 (RNASimple Total RNA Kit) 购于北京天根生化科技有限公司; 反转录试剂盒 (TaKaRa PrimeScript™ RT Reagent Kit) 购于大连宝生物公司; 绿色荧光实时聚合酶链反应混合液 (SYBR Permixon Ex Taq™ II) 购于大连宝生物公司; PCR 引物由上海生工生物工程股份有限公司合成;  $\beta$ -catenin 抗体购于 Sigma; 免疫组织化学试剂盒 (Invitrogen tissue staining kit) 购于 Invitrogen; 苏木素购于北京索莱宝生物科技有限公司; 其余试剂均为国产分析纯试剂。

### 1.3 方法

**1.3.1 实验分组** 将兔分为 3 组, 分别为高脂饲养组 (H 组), 左侧颈总动脉套管组 (S 组), 左侧颈总动脉套管+高脂饲养组

\* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31360278); 贵州省科技厅联合基金项目 [黔科合 J 字 LKZ (2013) 28 号]; 遵义医学院博士启动基金 (F566)。 作者简介: 刘月华 (1990—), 在读硕士, 主要从事心血管疾病分子生物学研究。 △ 通信作者, E-mail: xshengbio@163.com。

(SH 组), 每组 5 只, 均喂养 9 周。取左侧颈总动脉套管组右侧血管为对照组(C 组), 5 只。S 组给予普通颗粒基础饲料, H 组和 SH 组给予高脂饲料(由 5% 猪油、1% 白糖、2% 胆固醇、0.12% 丙基硫氧嘧啶、1% 维生素 D、0.125% 硫酸亚铁组成)。

1.3.2 组织取材 采用普通饲料适应性饲养 1 周, 后各组按实验分组继续喂养 9 周后处死动物, 取出左、右侧颈总动脉血管, 置于-80℃ 备用。

1.3.3 β-catenin mRNA 表达水平检测

1.3.3.1 总 RNA 的提取 将颈总动脉血管在液氮中磨碎, 加入 1 ml 裂解液(Trizol), 处理成组织匀浆, 按照试剂盒说明书进行总 RNA 提取。

1.3.3.2 实时荧光定量 PCR(RT-PCR)测定 按照反转录试剂盒说明书进行反转录, 扩增的 cDNA 加入至 20 μL 的反应体系中, 完成 mRNA 检测; β-actin 作为内参照。β-catenin 及 β-actin 的上、下游引物序列见表 1。反转录反应条件为: 37℃ 15 min、85℃ 5 s、4℃; RT-PCR 反应条件为: 95℃ 3 min、95℃ 10 s、60℃ 30 s、40 cycle、65℃ 5 s、95℃ 5 min。目的基因 β-catenin 的表达根据经 RT-PCR 仪器检测的 Ct 值, 通过公式  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  进行相对定量分析计算可得到 β-catenin 相对表达量。

表 1 兔颈总动脉血管 β-catenin mRNA 表达的 RT-PCR 实验相关引物序列

引物	序列(5'~3')
β-catenin	正向: 5'-TCG TCC TTT AGG AGT AAC AAT ACA-3'
	反向: 5'-ACA AGC AAG GCT AGG GTT TGA-3'
β-actin	正向: 5'-CGG GAC ATC AAG GAG AAG C-3'
	反向: 5'-AGG AAG GAG GGC TGG AAG A-3'

1.3.4 兔颈总动脉血管 HE 染色及 β-catenin 蛋白定位及半定量测定

1.3.4.1 兔颈总动脉血管 HE 染色 石蜡切片 60℃ 烤片 1 h, 脱蜡至水, 苏木素染 1 min, 盐酸乙醇分化 5 s, 流水冲洗 1 h, 蒸馏水片刻, 70% 和 90% 乙醇中脱水 10 min, 乙醇伊红染色 2 min, 脱水、透明, 中性树胶封片。

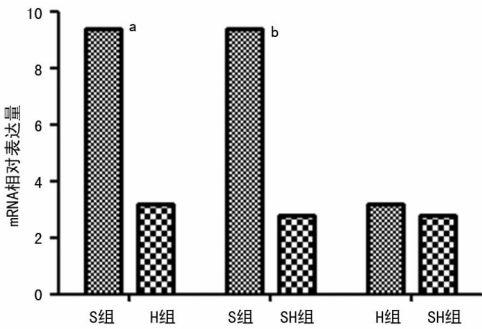
1.3.4.2 β-catenin 蛋白定位及半定量测定 免疫组化: 染色采用霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连结法(SP)。石蜡切片 60℃ 烤片 1 h, 脱蜡至水, 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS) 洗 2 次各 5 min, 枸橼酸盐缓冲液微波热修复抗原 4 次各 6 min, 迅速冷却, 0.01 mol/L PBS 洗 2 次各 5 min, 细胞通透液(0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 0.3% Triton X-100 混合) 室温避光孵育 30 min, 0.01 mol/L PBS 洗 2 次各 5 min, 封闭 37℃ 孵育 10 min, 倾去不洗, 滴加一抗(1:1000), 37℃ 孵育 1 h, 4℃ 过夜, 37℃ 复温 60 min, 0.01 mol/L PBS 洗 2 次各 5 min, 滴加生物素化二抗, 37℃ 孵育 20 min, 0.01 mol/L PBS 洗 2 次各 5 min, 滴加 SP, 37℃ 孵育 10 min, 0.01 mol/L PBS 洗 2 次各 5 min, DAB 显色, 0.01 mol/L PBS 缓冲液代替一抗做空白对照, 苏木素复染, 脱水、透明, 中性树胶封片。β-catenin 免疫组织化学结果以细胞质内出现棕黄色或棕褐色颗粒为阳性。Image-ProPlus 图像分析系统对染色结果进行半定量分析, 计算平均面积(200 倍视野中阳性信号的平均面积)、平均光密度、平均面积与平均光密度的综合指数(IOD)。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行统计学分析, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多样本均数比较采用单因素方差分析, 其

两两比较采用 LSD-*t* 法, 检验水准  $\alpha=0.05$ , 以  $P<0.05$  表示差异有统计学意义。

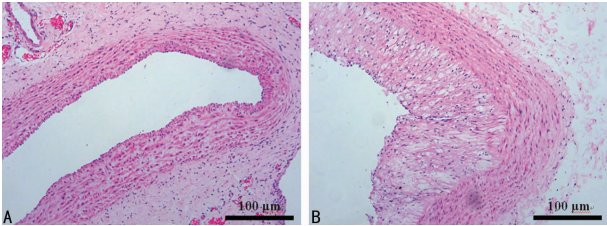
2 结 果

2.1 RT-PCR 检测 β-catenin mRNA 表达 实验结果采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法进行分析, C、H、S、SH 组 β-catenin mRNA 相对表达量分别是  $1.000 \pm 0.000$ 、 $3.161 \pm 2.892$ 、 $9.372 \pm 7.454$ 、 $2.789 \pm 1.880$ 。结果显示: 与 C 组比较, H、SH 组 β-catenin mRNA 表达差异无统计学意义( $P>0.05$ ), S 组 β-catenin mRNA 表达明显上调( $P<0.01$ ); H、S、SH 组之间两两比较(图 1), S 组 β-catenin mRNA 的表达较 H、SH 组上调( $P<0.05$ ), H、SH 组 β-catenin mRNA 表达差异无统计学意义( $P>0.05$ ), 见图 1。



<sup>a</sup>:  $P<0.05$ , 与 H 组比较; <sup>b</sup>:  $P<0.05$ , 与 SH 组比较。

图 1 β-catenin mRNA 的相对表达量



A: S 组; B: SH 组。

图 2 兔颈总动脉血管 HE 染色结果

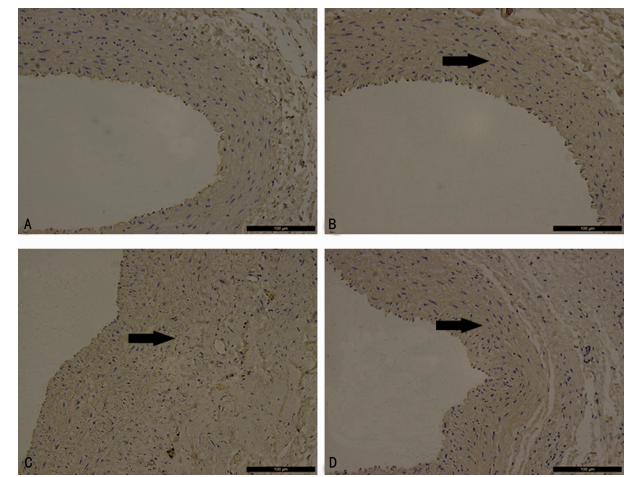
表 2 免疫组织化学 β-catenin 表达的半定量分析( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	面积(μm <sup>2</sup> )	平均光密度	IOD
C 组	14.009±0.752	14.063±3.384	194.463±36.829
H 组	16.219±0.455	33.947±3.150 <sup>a</sup>	549.138±35.653
S 组	20.409±1.478 <sup>a</sup>	412.174±6.251 <sup>b</sup>	8402.724±481.489 <sup>b</sup>
SH 组	14.571±0.074	16.645±5.126	242.151±73.457
F	7.272	1762.612	279.022
P	0.043	0.000	0.000

<sup>a</sup>:  $P<0.05$ , <sup>b</sup>:  $P<0.01$ , 与 C 组比较。

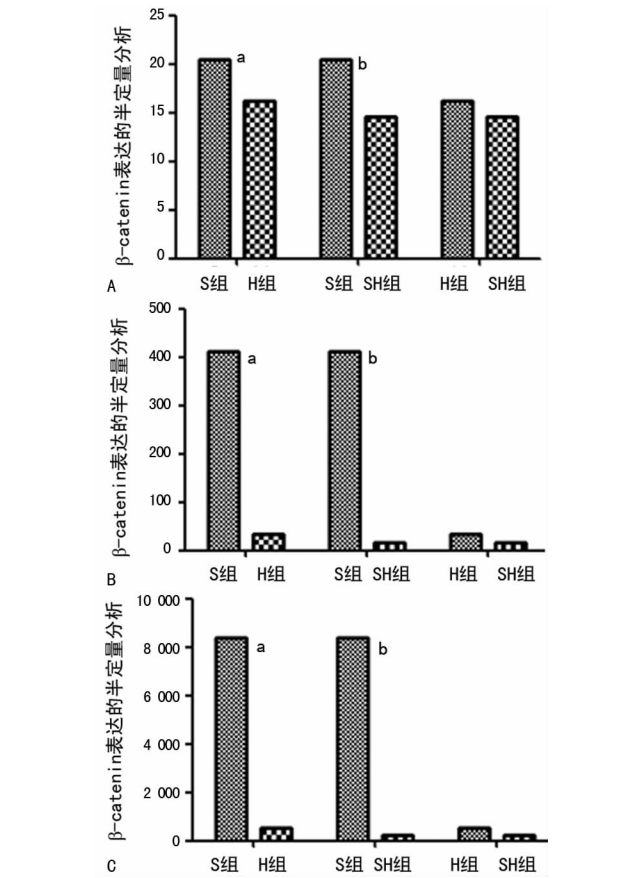
2.2 兔颈总动脉血管 HE 染色及 β-catenin 蛋白的免疫组化检测 兔颈总动脉血管标本经 HE 染色, 结果显示(图 2): S 组、SH 组可见内膜增生及大量的泡沫细胞, 管腔明显变窄, 说明兔颈总动脉套管导致明显的 AS 形成。采用免疫组织化学的方法检测 β-catenin 蛋白表达定位, SP 染色呈粗细不一的棕黄色颗粒, β-catenin 蛋白阳性产物主要定位于细胞质。结果显示: C 组细胞质无棕黄阳性颗粒(图 3A), H 组、S 组、SH 组细胞质均有棕黄阳性颗粒(图 3B~D), 且 S、SH 组主要定位于内膜增生处(图 3C、D)。根据免疫组织化学表达的半定量分析结果显

示(表 2、图 4);C 组、H 组、SH 组阳性染色面积、IOD 无明显差异( $P>0.05$ ),S 组阳性染色面积高于 C 组( $P<0.05$ ),S 组平均光密度、IOD 明显高于 C 组( $P<0.01$ ),H 组平均光密度高于 C 组( $P<0.05$ ),C 组、SH 组平均光密度无明显差异( $P>0.05$ ),S 组阳性染色面积高于 H 组、SH 组( $P<0.05$ ),S 组平均光密度、IOD 明显高于 H 组、SH 组( $P<0.01$ ),H 组、SH 组阳性染色面积、平均光密度、IOD 无明显差异( $P>0.05$ )。



A: C 组; B: H 组; C: S 组; D: SH 组。黑色箭头: 棕黄阳性颗粒所在。

图 3 兔颈总动脉血管  $\beta$ -catenin 免疫组织化学定位染色



A:  $\beta$ -catenin 所占面积; B: 平均光密度; C: IOD。<sup>a</sup>:  $P<0.05$ , 与 H 组比较; <sup>b</sup>:  $P<0.05$ , 与 SH 组比较。

图 4  $\beta$ -catenin 表达的半定量分析

3 讨 论

AS 是常见的心血管疾病,是由多因素参与、多基因异常调

控的长期的综合性病理过程,它好发生于动脉的弯曲、分叉及狭窄这样一些血管几何形状发生急剧变化的部位,这些部位易产生低速、摆动或回旋的异常血流,导致 AS 的发生<sup>[5-6]</sup>。血流异常导致血管重建,血管重建是 AS 病理基础<sup>[7]</sup>。研究表明, Wnt 信号通路对血管发展发挥关键作用<sup>[8]</sup>。最近的工作也表明 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号传导途径参与心血管系统内的病理生理重塑<sup>[9-11]</sup>。本文研究应用了兔左侧颈总动脉套管,造成左侧颈总动脉狭窄,并导致明显的 AS 的发生。结果显示,动脉狭窄所导致的 AS 斑块在左侧颈总动脉套管+高脂饲养组中更为明显,AS 发展程度较左侧颈总动脉套管组严重,然而  $\beta$ -catenin mRNA 和蛋白的表达在左侧颈总动脉套管组较左侧颈总动脉套管+高脂饲养组上调。因此推测,  $\beta$ -catenin 可能在 AS 发生的早期表达。

$\beta$ -catenin 是一种多功能的蛋白质,是经典 Wnt 信号通路的核心组成部分<sup>[12]</sup>。在静息状态下,  $\beta$ -catenin 主要位于细胞膜,而在细胞质中被降解游离量较少,当有特殊刺激诱导时,  $\beta$ -catenin 降解受到抑制。已有许多数据显示,  $\beta$ -catenin 激活是 AS 形成的一个关键组成部分<sup>[13-15]</sup>。此外,  $\beta$ -catenin 在多种实体肿瘤中高表达<sup>[16-18]</sup>且主要在细胞质中堆积,如肾细胞癌<sup>[19]</sup>、宫颈癌<sup>[20]</sup>、乳腺癌<sup>[21]</sup>,  $\beta$ -catenin 表达主要集中在细胞质内。本研究结果首次发现  $\beta$ -catenin 蛋白在 AS 发生时主要在细胞质中堆积,且蛋白表达水平在 AS 病理严重的 S 组中比 SH 组中高,这可能在 AS 发生时,  $\beta$ -catenin 的 GSK-3 磷酸化被阻断,  $\beta$ -catenin 的水平在细胞质内短暂提高有关。

AS 是心血管疾病的主要病理基础,而心血管疾病是人类常见的循环系统疾病,是我国和全世界危害人类生命健康最严重的疾病之一,其患病率和病死率均居各类疾病之首<sup>[22]</sup>。各种心血管疾病严重威胁着人类的生命和健康,因此防治动脉硬化具有重要的意义。本研究证实颈总动脉套管所导致的血流变化能促进 AS 的发生,并首次发现经典 Wnt 信号通路在该过程发生的早期起到关键作用。因此,进一步探索该信号通路的作用机制将为心血管疾病的治疗提供新的思路。

志谢:感谢上海勤浩生物科技有限公司王奎博士对实验研究提供的帮助。

参考文献

[1] Blankesteyn WM, Hermans KCM. Wnt signaling in atherosclerosis[J]. Eur J Pharmacol, 2015, 763 (Pt A): 122-130.

[2] van Gijn ME, Daemen MJ, Smits JF, et al. The wnt-frizzled cascade in cardiovascular disease[J]. Cardiovasc Res, 2002, 55(1): 16-24.

[3] Aikaterini T, Carina M, George SJ. The Wnt pathways in vascular disease: lessons from vascular development[J]. Curr Opin Lipidol, 2011, 22(5): 350-357.

[4] 李雪霞, 于晓玲. 阿托伐他汀对动脉粥样硬化模型兔 Wnt/ $\beta$ -连环蛋白信号通路的影响研究[J]. 中国药房, 2012, 23(5): 405-407.

[5] 危当恒, 王贵学, 王佐, 等. 剪切应力对家兔血管内膜增生及动脉粥样硬化斑块形成的影响[J]. 中国动脉粥样硬化杂志, 2007, 15(6): 410-414.

[6] 王贵学. 切应力变化与动脉粥样硬化斑块的形成和破裂[J]. 中国动脉粥样硬化杂志, 2009, 17(8): 625-628.



- [7] 李洪海,姜宗来,刘波,等. 实验性低血压大鼠腹主动脉的形态结构重建[J]. 医用生物力学,2000,15(1):1-7.
- [8] Dejana E. The role of wnt signaling in physiological and pathological angiogenesis[J]. Circ Res,2010,107(8):943-952.
- [9] Hall JL,Chatham JC,Eldar-Finkelman H,et al. Up regulated GLUT 1 expression and glucose metabolism during intimal lesion formation is coupled to the inhibition of vascular smooth muscle cell apoptosis;role of GSK3 $\beta$ [J]. Diabetes,2001,50(5):1171-1179.
- [10] Mao C, Malek TB, Pueyo ME, et al. Differential expression of rat frizzled-related frzb-1 and frizzled receptor fz1 and fz2 genes in the rat aorta after balloon injury[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol,2000,20(1):43-51.
- [11] Blankesteijn WM, van Gijn ME, Essers-Janssen YP, et al.  $\beta$ -Catenin, an inducer of uncontrolled cell proliferation and migration in malignancies, is localized in the cytoplasm of vascular endothelium during neovascularization after myocardial infarction[J]. Am J Pathol, 2000, 157(3): 877-883.
- [12] Jian H, Shen X, Liu I, et al. Smad3-dependent nuclear translocation of  $\beta$ -catenin is required for TGF- $\beta$ 1-induced proliferation of bone marrow-derived adult human mesenchymal stem cells[J]. Genes Dev, 2006, 20(6): 666-674.
- [13] Jian-Su S, Su-Li C, Pingsterhaus JM, et al. Mx2 promotes cardiovascular calcification by activating paracrine Wnt signals[J]. J Clin Invest, 2005, 115(5): 1210-1220.
- [14] Dwivedi A, Slater SC, George SJ. MMP-9 and -12 cause N-cadherin shedding and thereby  $\beta$ -catenin signalling and vascular smooth muscle cell proliferation[J]. Cardiovasc Res, 2009, 81(1): 178-186.
- [15] John Paul K, Crofts NJ, George SJ, et al. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling stimulates chondrogenic and inhibits adipogenic differentiation of pericytes: potential relevance to vascular disease? [J]. Circ Res, 2007, 101(6): 581-589.
- [16] Verras M, Sun Z. Roles and regulation of Wnt signaling and beta-catenin in prostate cancer[J]. Cancer Lett, 2006, 237(1): 22-32.
- [17] 李娟,张殿宝,罗绍凯,等.  $\beta$ -catenin 在多发骨髓瘤中的表达及其临床意义[J]. 癌症, 2007, 26(9): 1010-1014.
- [18] 戴文斌,任占平,陈蔚麟,等. APC、 $\beta$ -catenin、C-myc 和 Cyclin D1 在大肠癌组织中的表达和意义[J]. 癌症, 2007, 26(9): 963-966.
- [19] Zang T, Zhuang L, Zhang Z, et al. Expression and mutation of  $\beta$ -catenin in renal cell carcinoma[J]. Chin J Surg, 2002, 38: 1.
- [20] 刘兰华.  $\beta$ -Catenin 在宫颈上皮内瘤样变及宫颈鳞癌中的表达及意义[J]. 长江大学学报, 2011, 8(2): 137-140.
- [21] 孙明立,赵海山,肖庆环,等.  $\beta$ -catenin 在乳腺癌中的不同表达定位与预后的关系[J]. 热带医学杂志, 2015, 15(6): 717-720.
- [22] Fung YC. Celebrating the inauguration of the journal: biomechanics and modeling in mechanobiology[J]. Biomech Model Mechanobiol, 2002, 1(1): 3-4.

(收稿日期:2016-11-16 修回日期:2017-01-20)

## 《重庆医学》杂志对运用统计学方法的有关要求

1. 统计学符号:按 GB 3358—1982《统计学名词及符号》的有关规定,统计学符号一律采用斜体。
2. 研究设计:应告知研究设计的名称和主要方法。如调查设计(分为前瞻性、回顾性或是横断面调查研究),实验设计(应告知具体的设计类型,如自身配对设计、成组设计、交叉设计、析因设计、正交设计等),临床试验设计(应告知属于第几期临床试验,采用了何种盲法措施等);主要做法应围绕 4 个基本原则(重复、随机、对照、均衡)概要说明,尤其要告知如何控制重要非试验因素的干扰和影响。
3. 资料的表达与描述:用  $\bar{x} \pm s$  表达近似服从正态分布的定量资料,用  $M(QR)$  表达呈偏态分布的定量资料;用统计表时,要合理安排纵横标目,并将数据的含义表达清楚;用统计图时,所用统计图的类型应与资料性质相匹配,并使数轴上刻度值的标法符合数学原则;用相对数时,分母不宜小于 20,要清楚区分百分率和百分比。
4. 统计学分析方法的选择:对于定量资料,应根据所采用的设计类型、资料所具备的条件和分析目的,选用合适的统计学分析方法,不应盲目套用  $t$  检验和单因素方差分析;对于定性资料,应根据所采用的设计类型、定性变量的性质和频数所具备的条件及分析目的,选用合适的统计学分析方法,不应盲目套用  $\chi^2$  检验。对于回归分析,应结合专业知识和散点图,选用合适的回归类型,不应盲目套用简单直线回归分析;对于具有重复实验数据检验回归分析资料,不应简单化处理;对于多因素、多指标资料,要在一元分析的基础上,尽可能运用多元统计分析方法,以便对因素之间的交互作用和多指标之间的内在联系做出全面、合理的解释和评价。
5. 统计结果的解释和表达:应写明采用统计学方法的具体名称(如:成组设计资料的  $t$  检验、两因素析因设计资料的方差分析、多个均数之间两两比较的  $q$  检验等),统计量的具体值(如: $t=3.45, \chi^2=4.68, F=6.79$  等);在用不等式表示  $P$  值的情况下,一般情况下选用  $P>0.05, P<0.05$  和  $P<0.01$  3 种表达方式,无须再细分为  $P<0.001$  或  $P<0.0001$ 。当涉及总体参数(如总体均数、总体率)时,再给出显著性检验结果的同时,应再给出 95% 可信区间(CI)。