

文章编号:1005-6947(2008)02-0153-06

· 基础研究 ·

# 人 arresten 基因转染对自体移植静脉内膜增生的影响

尚丹<sup>1</sup>, 宋自芳<sup>2</sup>, 夏印<sup>1</sup>, 李毅清<sup>1</sup>, 胡青钢<sup>2</sup>, 郑启昌<sup>2</sup>

(华中科技大学同济医学院附属协和医院 1. 血管外科 2. 肝胆外科, 湖北 武汉 430022)

**摘要:**目的 探讨体内转染 arresten 基因对自体移植静脉内膜增生的影响。方法 建立大鼠自体静脉移植模型。血管吻合术前,用脂质体介导重组质粒 pSecTag2-AT( I 组),空载体 pSecTag2 转染( II 组)移植血管,等体积脂质体溶液处理移植血管(空白对照组, III 组)。各组动物均于 4 周后切取移植血管,RT-PCR 检测移植血管中 arresten mRNA 的表达;常规 HE, Verhoeff 弹力纤维染色;计算机图象分析检测移植静脉血管内膜及中膜面积、厚度;免疫组化检测移植血管内膜  $\alpha$ -SMA 及 PCNA 的表达;Western blot 检测 TGF- $\beta$ 1 蛋白的表达。结果 I 组转染的移植静脉中有目的基因 mRNA 的表达,而 II、III 组无 I 组内膜、中膜面积小均于 II 组和 III 组,差异有显著性( $P < 0.05$ )。而内膜面积/中膜面积 3 组间无统计学差异( $P > 0.05$ ); I 组内膜厚度小于 II 组和 III 组,组间比较有统计学差异( $P < 0.01$ ); $\alpha$ -SMA 染色表明增生内膜中的细胞是血管平滑肌细胞;PCNA 阳性细胞数及表达指数 I 组均低于 II 组和 III 组( $P < 0.05$ ); I 组 TGF- $\beta$ 1 蛋白的表达明显低于 II 组和 III 组。结论 移植血管转染 arresten 基因,可有效抑制自体移植静脉内膜的增生,在防治血管移植术后再狭窄方面显示出良好的临床应用前景。

[中国普通外科杂志, 2008, 17(2): 153-158]

**关键词:** 静脉; 移植, 自体; arresten; 内膜增生; 基因转染; PCNA; TGF- $\beta$ 1

中图分类号: R 654.3

文献标识码: A

## The effect of human arresten gene transfection on intimal hyperplasia of autogenous vein graft in rats

SHANG Dan<sup>1</sup>, SONG Zifang<sup>2</sup>, XIA Yin<sup>1</sup>, LI Yiqing<sup>1</sup>, HU Qinggang<sup>2</sup>, ZHENG Qichang<sup>2</sup>

(1. Department of Vascular Surgery 2. Department of Hepatobiliary Surgery. Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China)

**Abstract: Objective** To investigate the effects of human arresten gene transfection on the intimal hyperplasia of venous autografts in vivo. **Methods** Autogenous vein graft model was established in male Sprague-Dawley rats. The transplanted veins were immersed in the liposome mediated recombinant eukaryotic expression plasmid pSecTag2-AT solution (group I) or the liposome mediated control plasmid pSecTag2 solution (group II) for 30 minutes just before vascular anastomosis. Normal control group (group III) was only treated with isovolume of liposome. Vein graft samples were harvested at 4 weeks after operation. RT-PCR was used to detect the expression of arresten mRNA in blood vessel; the surface area and thickness of the intima and media were measured by computerized planimetry under a light microscope to compare the degree of neointimal hyperplasia by the calculated ratio between intima (I) and media (M) after staining with hematoxylin-eosin and Verhoeff (elastic fibers). Immunohistochemical labeling and morphologic analysis of vein graft sections were used to identify PCNA positive cells and  $\alpha$ -SMA positive cells; Western blot was used to detect the

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(30371396; 30271242)。

**收稿日期:**2007-11-06; **修订日期:**2008-01-08。

**作者简介:**尚丹,女,华中科技大学同济医学院附属协和医院主治医师,主要从事肝胆肿瘤及血管外科方面的研究。

**通讯作者:**郑启昌 E-mail: zqc654@21cn.com

protein of TGF- $\beta$ 1. **Results** The genome of arresten-transferred tissue contained a 449bp specific fragment of arresten gene was expressed in group I, but was not expressed in group II or group III; the surface area of the intima and media of group I was less than that of group II and group III, and the difference were statistically significant ( $P < 0.05$ ), while I/M had no statistical difference ( $P > 0.05$ ). A less intimal thickness of group I was seen compared with group II and group III ( $P < 0.01$ ).  $\alpha$ -SMA staining suggested that VSMC was present in the hyperplastic intimal. The number of PCNA-positive-stained cells and expression index of group I was lower as compared with that of group II and group III ( $P < 0.05$ ). Protein level of TGF- $\beta$ 1 of group I decreased obviously compared with group II and group III. **Conclusions**

Transfection of human arresten gene can effectively inhibit the intimal hyperplasia of venous autograft. Arresten has a potential perspective for clinic application in prevention and treatment of restenosis after vascular transplantation. [Chinese Journal of General Surgery, 2008, 17(2):153-158]

**Key words:** Vein; Transplantation, Autogenous; arresten; Intimal Hyperplasia; Gene Transfection; PCNA; TGF- $\beta$ 1

**CLC number:** R 654.3

**Document code:** A

血管移植术、血管腔内成形术等血管重建术,是治疗冠状动脉狭窄及周围血管疾病的重要手段,但术后血管狭窄或再狭窄率高达30%~50%,严重影响其远期疗效。内膜增生是静脉移植植物发生闭塞的主要因素<sup>[1]</sup>。血管平滑肌细胞(VSMC)过度增殖并向内膜迁移是新生内膜增生的重要病理基础,是各种因素导致血管重建术后再狭窄发病链条上的关键环节<sup>[2-3]</sup>。因此,抑制平滑肌细胞过度增殖及迁移是防治血管重建术后再狭窄的有效策略。

arresten 是 Colorado 等<sup>[4]</sup>研究发现的一种强效血管生成抑制因子,是IV型胶原 $\alpha$ 1链的羧基末端NC1结构域片段,其分子量约为26 kD。在本课题组前期研究中发现真核表达的arresten蛋白对体外培养的大鼠VSMC的增殖和迁移有明显的抑制作用<sup>[5]</sup>。基于此,本研究用脂质体介导人arresten基因,对大鼠自体移植静脉进行局部转染,观察其对血管狭窄的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要材料和试剂

重组质粒 pSecTag2-AT 由本课题组自行制备保存。小鼠抗大鼠  $\alpha$ -SMA 单克隆抗体、小鼠抗大鼠 PCNA 单克隆抗体、即用型 SABC 免疫组织化学染色试剂盒购自武汉博士德公司; TGF- $\beta$ 1 购自美国 Santa Cruz 公司; 辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗购自北京中山试剂公司; Lipofectamin<sup>TM</sup> 2000、TRIzol 总 RNA 提取试剂、Taq 酶、反转录酶 M-MuLV 均购自 Invitrogen 公司; 逆转录-多聚酶链反应(RT-PCR)试剂盒购自 Fermentas 公司; 免疫印迹化学发光试剂(ECL Reagent) 1 和 2 购自武汉凌飞公司; 计算机病理图象分析系统由同济医学院病理教研室提供。

### 1.2 动物

Sprague-Dawley (SD) 大鼠, 雄性, 3~4 个月, 体重 250 g~300 g, 由同济医学院动物实验中心提供。

### 1.3 实验方法

1.3.1 动物模型的建立及静脉标本的采集 将 34 只 SD 大鼠随机分为 3 组: I 组为重组质粒 pSecTag2-AT 转染组, II 组为空载体 pSecTag2 转染组, III 组为空白对照组, 仅转染脂质体。麻醉成功后, 在手术显微镜下切取左侧颈外静脉, 肝素盐水冲洗备用; 吻合前将 I 组移植血管浸泡于脂质体与重组质粒 pSecTag2-AT 的混合溶液中, II 组移植血管浸泡于脂质体与空载体 pSecTag2 的溶液中, III 组移植血管浸泡于脂质体溶液中, 各 30 min。10-0 无损伤缝线间断外翻缝法将颈外静脉端端吻合移植于髂外动脉中, 吻合口缝约 8~10 针。根据血管充盈情况及远端勒血试验确定血管是否通畅。本实验吻合血管均通畅, 移植静脉和髂外动脉的管径一致, 有明显血管搏动。术后单笼、常规饮食饲养。4 周后切取移植血管, 标本保存于液氮或 4% 中性多聚甲醛中固定备用。

1.3.2 RT-PCR 检测血管中 arresten 基因 mRNA 的表达 以 TRIzol 法抽提血管组织总 RNA, 两步法行 RT-PCR。目的基因引物根据已知 arresten 基因序列设计; 目的基因引物及内参照 GAPDH 引物由上海生工公司合成, 序列如下

arresten 引物序列	P1: 5'-GACTACTGCTACTGGCTG-3'	目的产物为 449 bp
	P2: 5'-CTCATA CAGACTTGGCAG-3'	
GAPDH 引物序列	P1: 5'-TATGATGACATCAAGAAGTGG-3'	目的产物为 213 bp
	P2: 5'-CACCACCCTGTGCTGTA-3'	

扩增条件:首先 94 °C 预变性 5 min;然后 94 °C 1 min 变性,55 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 1 min,循环 33 次;最后 72 °C 延伸 10 min。取扩增产物 5  $\mu$ L 加样于 2% 的琼脂糖凝胶进行电泳,紫外光下观察结果。

1.3.3 组织形态学染色 血管标本经多聚甲醛固定 48 h 后,脱水、石蜡包埋,连续切片,厚度 4  $\mu$ m。行 HE 和 Verhoeff 弹力纤维染色。Verhoeff 染色弹力纤维呈黑色,用 Van Gieson 染液使胶原纤维呈红色。内膜的范围界定:内缘为血管腔,外缘为内弹力板。以计算机图像分析系统 (Meta Morph BX41, OLYMPUS) 采集图像。每个标本最少随机取 5 处测量增生内膜厚度及内膜、中膜面积,并计算内膜面积/中膜面积 (I/M),以评价移植静脉内膜增生程度。

1.3.4 免疫组织化学染色 分别用鼠抗  $\alpha$ -SMA 单克隆抗体及鼠抗 PCNA 单克隆抗体作为一抗 (1:100)。用 3,3'-二氨基联苯胺 (DAB) 抗体作为二抗进行免疫组化染色,正常静脉作为对照,磷酸盐缓冲液 (PBS) 代替一抗作阴性对照。参照 SABC 免疫组化试剂盒说明书操作。用计算机病理图像分析系统计数移植静脉内膜的细胞数和 PCNA 阳性细胞数,随机计数每个视野增生内膜 500 个细胞作为细胞总数,以阳性细胞为分子计算 PCNA 表达指数百分比 (PCNA 阳性细胞数/总细胞数  $\times$  100)。

1.3.5 免疫印迹 (Western blot) 检测 TGF- $\beta$ 1 的表达 将剪碎的静脉匀浆后,4 °C 12 000 r/min 离心 15 min,取上清液,考马斯亮蓝测定蛋白浓度并调至同一水平。经十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 电泳后,转至聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜上,用漂洗液 (TBS-T) 配制的 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h。一抗兔抗大鼠 TGF- $\beta$ 1 (1:400) 4 °C 孵育过夜,TBS-T 洗膜;二抗辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG (1:2 000) 室温孵育 1 h,TBS-T 洗膜。ECL 发光法显影。

#### 1.4 统计学处理

样本数据用中位数和均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。对方差齐同的数据采用多个样本均数之间两两比较的方差分析;对方差不齐的数据采用多个样本两两比较的秩和检验。各项统计均采用 SPSS12.0 统计软件系统完成。

## 2 结果

### 2.1 动物模型的建立情况

本实验共建立动物模型 34 只,4 只因麻醉意外、吻合口出血、腹腔感染等原因死亡,健康存活 30 只。存活者术后 1~3 d 手术侧肢体血运欠佳,活动功能一定程度上受限,其后血运及肢体活动逐渐恢复,成功建模。

### 2.2 RT-PCR 检测结果

扩增产物经琼脂糖凝胶电泳后,I 组在约 450 bp 处均有一条特异的扩增条带,而 II 组及 III 组均无相应的核酸扩增条带 (图 1)。提示脂质体可将目的基因成功导入移植血管中并表达。

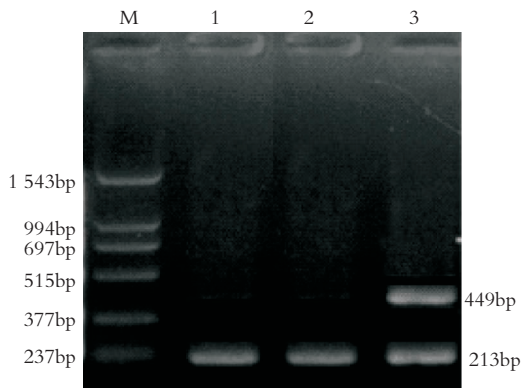


图 1 移植血管 PCR 扩增产物的凝胶电泳分析 M: PCR Marker; 1: 空白对照组 (III 组); 2: pSecTag2 转染组 (II 组); 3: pSecTag2-AT 转染组 (I 组)

### 2.3 组织形态学变化

HE 染色后 (图 2),可见移植静脉均呈现出典型的内膜增生、肥厚,新生内膜内可见增生的梭形细胞,细胞排列紊乱,并出现透明状细胞基质,基质沉淀。弹力纤维染色后 (图 3),可见移植静脉内膜弹力纤维显著增多。I 组内膜增厚,弹力纤维增长及管腔狭窄程度均显著低于 II 组和 III 组,其新生内膜中的细胞数也显著减少。提示转染人 *arresten* 基因可抑制移植静脉新生内膜增生。

### 2.4 移植静脉内膜增生的病理图像分析

静脉内膜与中膜增生为不均匀性,面积、厚度差异大。以非参数检验 Kruskal-Wallis 法统计,结果以中位数 (最小数、最大数) 表示。3 组间用 Mann-Whitney *U*-*t* 法检验分析。结果示 I 组内膜增生明显轻于 II 组和 III 组,内膜增殖受到抑制;而 I/M 值 3 组间无统计学差异 ( $P > 0.05$ ) (表 1-2)。

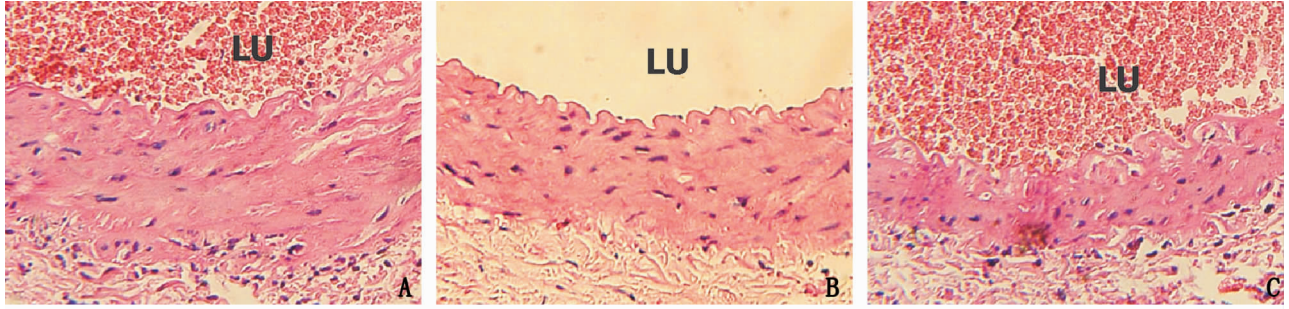


图2 移植静脉病理组织学观察(HE染色 ×200) A:空白对照组(Ⅲ); B:pSecTag2 转染组(Ⅱ); C:pSecTag2-AT 转染组(Ⅰ); LU:管腔

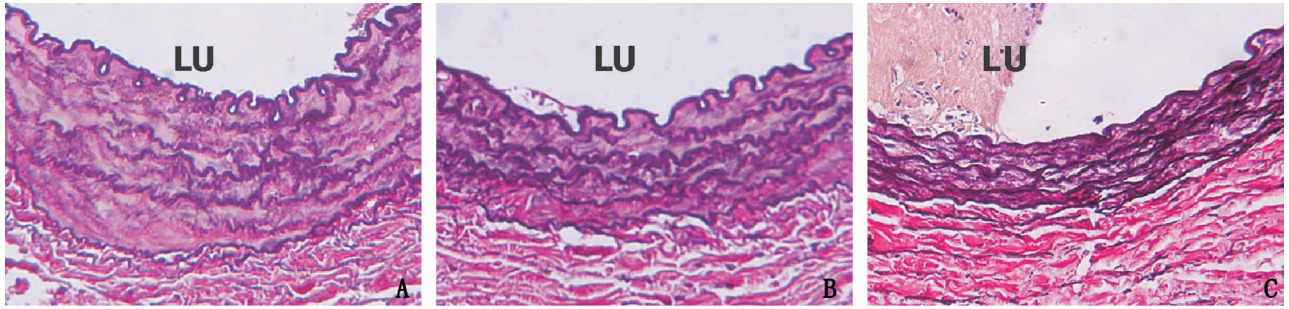


图3 移植静脉病理组织学观察(Verhoeff 弹力纤维染色 ×200) A:空白对照组(Ⅲ); B:pSecTag2 转染组(Ⅱ); C:pSecTag2-AT 转染组(Ⅰ); LU:管腔

表1 移植静脉新生内膜和中膜面积及L/M值分析

组别	动物数	内膜面积(μm <sup>2</sup> )	中膜面积(μm <sup>2</sup> )	L/M × 100(%)
I组	10	0.61 <sup>1),2)</sup>	0.96 <sup>1),2)</sup>	79.98 <sup>1),3)</sup>
		(0.30~3.0)	(0.64~1.76)	(17.61~195.63)
II组	10	1.49 <sup>1)</sup>	1.75 <sup>1)</sup>	108.04 <sup>1)</sup>
		(0.58~3.97)	(0.72~2.35)	(27.93~225.27)
III组	10	1.63 <sup>1)</sup>	1.86 <sup>1)</sup>	110.38 <sup>1)</sup>
		(0.54~4.01)	(0.47~2.65)	(29.34~230.12)

注:1)中位值(median);2)与II, III组比较, P<0.05; 3) II, III组比较, P>0.05

表2 自体移植静脉内膜厚度

组别	动物数	增生内膜厚度(μm)
I组	10	12.04 <sup>1),2)</sup> (6.30~15.33)
II组	10	19.41 <sup>1)</sup> (12.84~35.70)
III组	10	21.53 <sup>1)</sup> (11.98~37.03)

注:1)为中位数; 2)与II, III组比较, P<0.01

### 2.5 移植静脉免疫组织化学染色分析

α-SMA 为 VSMC 的特异性蛋白标志物, 主要定位于细胞浆中, 棕黄色为阳性染色。移植静脉新生内膜细胞呈阳性染色, 表明移植静脉增生新生内膜细胞成分主要是 VSMC (图4)。PCNA 染色亦呈棕黄色, 定位于细胞核上 (图5)。PCNA 阳性表达指数见表3。分析提示, arresten 基因可明显抑制移植静脉新生内膜平滑肌细胞的增殖。

### 2.6 TGF-β1 的蛋白表达

正常静脉中一般未见到 TGF-β1 阳性细胞。I, II, III 移植静脉均有 TGF-β1 蛋白的表达, 但 I 组的蛋白表达明显弱于 II 组及 III 组 (图6)。提示人 arresten 基因可有效抑制血管壁 TGF-β1 蛋白的表达。

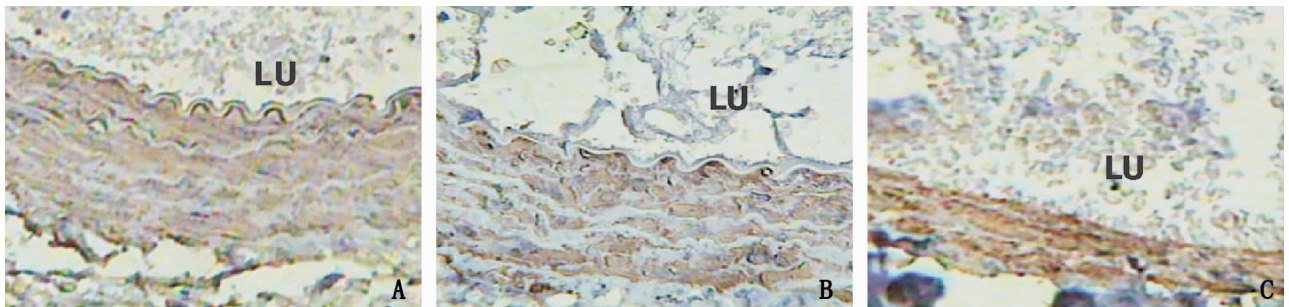


图4 移植静脉 α-SMA 表达的免疫组化分析(SABC法, ×200) A:空白对照组(Ⅲ); B:pSecTag2 转染组(Ⅱ); C:pSecTag2-AT 转染组(Ⅰ); LU:管腔

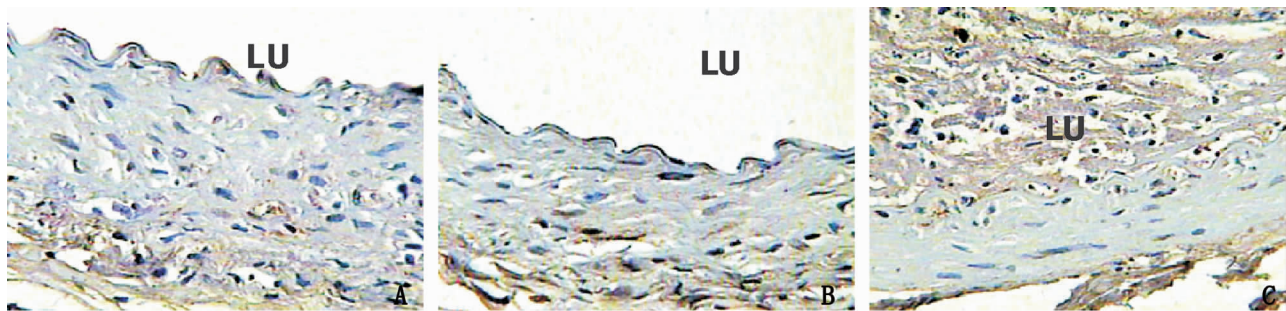


图5 移植静脉 PCNA 表达的免疫组化分析 (SABC, ×200) A:空白对照组(Ⅲ); B:pSecTag2 转染组(Ⅱ); C:pSecTag2-AT 转染组(Ⅰ); LU :管腔

表3 移植静脉新生内膜细胞增殖分析(% ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	PCNA 免疫组化	
	PCNA 阳性细胞数	PCNA 阳性表达指数
I 组	136.30 ± 39.96	27.26 ± 0.08 <sup>1),2)</sup>
II 组	191.80 ± 34.22	38.36 ± 0.07
III 组	203.78 ± 31.51	40.76 ± 0.00
<i>F</i>		22.551
<i>P</i>		<0.05

注:1)与 II 组比较,  $P < 0.05$ ; 2)与 III 组比较,  $P < 0.05$

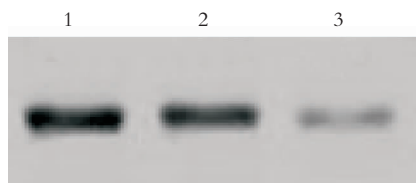


图6 移植静脉 TGF-β1 的蛋白表达分析 1:空白对照组(Ⅲ); 2;pSecTag2 转染组(Ⅱ); 3:pSecTag2-AT 转染组(Ⅰ)

### 3 讨论

血管重建术后再狭窄是一个多因素、多环节、多阶段修复过程的结果。有研究指出,后期静脉移植术失效的主要因素归咎于持续发展的内膜增生,中膜增厚以及后续的动脉粥样硬化<sup>[6-7]</sup>。正常情况下,血管中膜的平滑肌细胞处于静止状态,若受到病理性因素的持续刺激,平滑肌细胞可重新表现出增殖活性,从血管中膜迁移到内膜,并发生由收缩型向合成型的表型转换,导致血管内膜增生,最终使血管腔狭窄或闭塞<sup>[8]</sup>。由此可知,新生内膜增生的主要病理基础是 VSMC 过度增殖并向内膜迁移<sup>[2-3]</sup>, 这为血管移植术后再狭窄的基因治疗提供了有效的靶向。

内膜厚度、管腔面积一直是评价血管狭窄比

较客观的指标。本实验移植静脉新生内膜定量分析表明,静脉内膜与中膜增生为不均匀性,面积和厚度差异大。I 组内膜、中膜面积小于 II 组及 III 组 ( $P < 0.05$ )。而 I/M 3 组间无统计学差异 ( $P > 0.05$ ); I 组内膜厚度小于 II 组及 III 组 ( $P < 0.01$ )。提示 *arresten* 基因在体内能明显抑制移植静脉新生内膜增生。

PCNA 是 DNA 多聚酶  $\delta$  的一个辅助亚单位,当细胞分裂时协助 DNA 引导链和随从链的合成,在细胞核内含量受到细胞自分泌和旁分泌生长因子的调节,表达量和表达部位可客观地反映 SMC 增殖的数量和增殖部位。PCNA 表达与内膜增殖有显著关系;PCNA 蛋白表达越强,内膜增殖越明显。PCNA 免疫组化分析显示, I 组 PCNA 阳性细胞数及表达指数均少于 II 组及 III 组,差异均有统计学意义。提示 *arresten* 能通过有效抑制新生内膜平滑肌细胞的增殖而明显抑制自体移植静脉内膜增生的发生、发展。

静脉移植术在动脉高血压、吻合口血流状态改变的条件下,持续过量产生 TGF-β1,导致 VSMC 迁移、增殖,以及细胞外基质 (ECM) 过度沉积和组织纤维化<sup>[9]</sup>。TGF-β1 是一种具有广泛生物学效应的多效生长因子,与 ECM 关系最密切,是 ECM 产生和沉积的重要调控因子。TGF-β1 主要来源于 VSMC,通过自分泌方式作用于 VSMC,导致 ECM 积聚,从而参加血管壁的重建。孙达欣等<sup>[10]</sup>应用纳米粒子载体携带反义 TGF-β1 转染大鼠的移植静脉,发现血管壁的 TGF-β1 的 mRNA 和蛋白表达减弱,内膜显著受到抑制。本实验中 I 组的蛋白表达明显弱于转染 II 组及 III 组。提示人 *arresten* 基因可有效地抑制血管壁 TGF-β1 蛋白的表达,从而削弱了 TGF-β1 的作用,有效地抑制了移植静脉的内膜增生及负性血管重塑。

本研究表明,移植血管转染 *arresten* 基因的表

达,对移植静脉内膜的增生具有抑制作用,能提高移植血管的通畅程度。此结果对于临床进一步提高血管重建术的远期疗效具有重要意义。

#### 参考文献:

- [1] Cho W, Kim HT, Koo JH, *et al.* Effect of AP-1 decoy using hemagglutinating virus of Japan-liposome on the intimal hyperplasia of the autogenous vein graft in mongrel dogs [J]. *Transplant Proc*, 2006, 38(7): 2161-2163.
- [2] Wang Z, Castresana MR, Newman WH. Reactive oxygen and NF-kappaB in VEGF-induced migration of human vascular smooth muscle cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 285(3): 669-674.
- [3] Blindt R, Vogt F, Lamby D, *et al.* Characterization of differential gene expression in quiescent and invasive human arterial smooth muscle cells [J]. *J Vasc Res*, 2002, 39(4): 340-352.
- [4] Colorado PC, Torre A, Kamphaus G, *et al.* Anti-angiogenic cues from vascular basement membrane collagen [J]. *Cancer Res*, 2000, 60(9): 2520-2526.
- [5] 尚丹,郑启昌,宋自芳,等. 人 *arresten* 基因的真核表达

- 及其对血管平滑肌细胞增殖和迁移的影响 [J]. *中国病理生理杂志*, 2007, 23(10): 1887-1890.
- [6] Jackson MR, Belott TP, Dickason T, *et al.* The consequences of a failed femoropopliteal bypass grafting: comparison of saphenous vein and PTFE grafts [J]. *J Vasc Surg*, 2000, 32(3): 498-504.
- [7] Vijayan V, Shukla N, Johnson JL, *et al.* Long-term reduction of medial and intimal thickening in porcine saphenous vein grafts with a polyglactin biodegradable external sheath [J]. *J Vasc Surg*, 2004, 40(5): 1011-1019.
- [8] Boehm M, Nabel EG. Cell cycle and cell migration: new pieces to the puzzle [J]. *Circulation*, 2001, 103(24): 2879-2881.
- [9] Hu Y, Baker AH, Zou Y, *et al.* Local gene transfer of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 influences vein graft remodeling in a mouse model [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, 21(8): 1275-1280.
- [10] 孙达欣,张强,郎晓讴,等. 纳米粒子载体携带反义转化生长因子- $\beta 1$  基因的局部定位转染对大鼠自体移植静脉内膜增生的影响 [J]. *中华实验外科杂志*, 2005, 22(06): 654-656.

· 读者 · 作者 · 编者 ·

## 本刊对来稿中统计学处理的有关要求

1. 统计研究设计:应交代统计研究设计的名称和主要做法。如调查设计(分为前瞻性、回顾性或横断面调查研究);实验设计(应交代具体的设计类型,如自身配对设计、成组设计、交叉设计、正交设计等);临床试验设计(应交代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(随机、对照、重复、均衡)概要说明,尤其要交代如何控制重要非试验因素的干扰和影响。

2. 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  $M(Q_R)$  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,要注意区分百分率与百分比。

3. 统计分析方法的选择: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条件以分析目的,选用合适的统计分析方法,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布图,选用合适的回归类型,不应盲目套用简单直线回归分析,对具有重复实验数据的回归分析资料,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进行全面、合理的解释和评价。

4. 统计结果的解释和表达:当  $P < 0.05$  (或  $P < 0.01$ ) 时,应说明对比组之间的差异有统计学意义,而不应说对比组之间具有显著性(或非常显著性)的差别;应写明所用统计分析方法的具体名称(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)应可能给出具体的  $P$  值(如  $P = 0.0238$ );当涉及到总体参数(如总体均数、总体率等)时,在给出显著性检验结果的同时,再给出95%置信区间。