

• 论著 •

大肠癌气血亏虚证患者蛋白质差异性表达的研究

周小军^{1,2}, 周福生¹, 苟新敏², 周怀力², 郭惠学²

(1. 广州中医药大学脾胃研究所, 广东 广州 510405; 2. 中山大学附属第五医院, 广东 广州 519000)

【摘要】 目的 研究大肠癌气血亏虚证患者蛋白质差异性表达, 从蛋白质水平上探讨大肠癌气血亏虚证的本质。方法 采用双向凝胶电泳法分离大肠癌气血亏虚证患者肿瘤组织和正常人结肠黏膜蛋白质, 用银染、PDQuest 7.1.0 软件对部分差异蛋白质点进行基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)分析, 并测定其胶内酶解后的肽质量指纹图谱, 查询人类蛋白质公共数据库(NCBI、SWISS-PROT), 获得蛋白质的相关信息。结果 从组织中获得了分辨率和重复性均较好的双向电泳图谱, 共筛选出 23 个差异蛋白质点, 其中有 21 个差异蛋白质得到鉴定, 这些蛋白质包括热休克蛋白、细胞骨架蛋白、抗氧化蛋白、信号转导相关蛋白、能量产生相关蛋白、血液蛋白等, 大肠癌气血亏虚证与对照组比较, 其中 14 个升高, 7 个降低。结论 建立了大肠癌气血亏虚证的双向电泳图谱, 提示大肠癌气血亏虚证患者和正常人的蛋白质表达具有差异, 这些蛋白质的差异分析对在蛋白质水平上研究气血亏虚证本质提供了物质基础。

【关键词】 大肠癌; 气血亏虚证; 蛋白质; 双向凝胶电泳; 质谱

中图分类号: R241.3; R735.34 文献标识码: A DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2010.05.007

A study on different expressions of proteins in patients with colorectal cancer and Qi-Xue deficiency syndrome (气血亏虚证) ZHOU Xiao-jun*, ZHOU Fu-sheng, GOU Xin-min, ZHOU Huai-li, GUO Hui-xue. *The Spleen and Stomach Research Institute of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong, China

【Abstract】 Objective To investigate the different expressions of proteins in patients with colorectal cancer and Qi-Xue deficiency syndrome (气血亏虚证), and from the protein expression level to reveal the essence of Qi-Xue deficiency syndrome of colorectal cancer. Methods Two-dimensional electrophoresis (2-DE) was applied to isolate the proteins of tumor tissue in cases with colorectal cancer and Qi-Xue deficiency syndrome and those of colon mucosa in normal persons. Silver nitrate stain and PDQuest 7.1.0 analysis software were used at the protein spots with partial differential expressions to carry out matrix-assisted laser desorption/ionization time of flying mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) to measure their peptide mass finger prints in gel after zymolysis; then NCBI and SWISS-PROT database searching was made to obtain the information related to the proteins. Results A good 2-DE image including resolution and reproducibility was obtained. Twenty-three differential expression protein spots were screened, then 21 proteins were identified, which related to heat shock protein, cytoskeletal protein, anti-oxidation protein, signal transduction related protein, energy production related protein, blood protein, and so on. Compared to the control group, there were 14 proteins of up-regulation and 7 proteins of down-regulation in colorectal cancer patients with Qi-Xue deficiency syndrome. Conclusion A well-resolved reproducible 2-DE image of Qi-Xue deficiency syndrome of colorectal cancer patient was established; it revealed the protein expression differences between health adults and colorectal cancer patients with Qi-Xue deficiency syndrome. The analysis of differences in proteins is helpful to provide substantial evidence in investigation of the essence of Qi-Xue deficiency syndrome from the protein level.

【Key words】 Colorectal cancer; Qi-Xue deficiency syndrome; Protein; Two-dimensional electrophoresis; Mass spectrometry

大肠癌是我国常见的恶性肿瘤之一,除了手术、化疗,中医治疗大肠癌在改善患者生存质量、延长患者生存时间上发挥着重要的作用。目前,蛋白质组学已广泛应用于大肠癌的研究中,而中医证候与蛋白质组均有着整体性和动态变化的特点,故对于大肠癌中医证候蛋白质组的研究有着极其重要的意义。本研究中通过对大肠癌气血亏虚证在蛋白质组学上的差异表达,探讨气血亏虚证大肠癌的发病机制及特异蛋白的表达。

1 资料与方法

1.1 一般资料:选择 2008 年 8 月至 2009 年 11 月住中山大学附属第五医院的气血亏虚证大肠癌患者 30 例,其中男 15 例,女 15 例;年龄 25~64 岁,平均(49.17±9.96)岁;病程 2~25 个月,平均(8.10±9.02)个月;同期选择 20 例进行结肠镜检查的志愿者作为对照组,男 12 例,女 8 例;年龄 21~63 岁,平均(50.21±9.78)岁。气血亏虚证大肠癌患者与对照组年龄、性别比较差异均无统计学意义(均 $P>0.05$),有可比性。

1.2 诊断标准:气血亏虚证大肠癌诊断标准参照

基金项目:广东省中医药管理局项目(2007023)

作者简介:周小军(1972-),女(汉族),湖南省人,主治医师。

2000 年出版的《肿瘤科专病中医临床诊治》中有关大肠癌气血亏虚证的中医辨证分型标准^[1]。大肠癌西医诊断依据病理学检查结果。对照组无心脑血管、肝、肾疾病史,心、肝、肾功能检查正常;结肠镜检查结肠黏膜基本正常;中医辨证基本正常;年龄在 18~65 岁的自愿者。

1.3 组织标本的采集: 气血亏虚证大肠癌患者肿瘤组织标本在中山大学附属第五医院手术室收集;对照组结肠黏膜在中山大学附属第五医院内镜室收集。标本在 30 min 内保存于 -80 °C 冰箱。本研究经医院伦理委员会批准,符合医学伦理学标准,全部受试者签署知情同意书。

1.4 主要材料: 固相 pH 梯度干胶条(IPG)为美国通用(GE)公司产品,电泳试剂丙稀酰胺、甲叉双丙稀酰胺和质谱鉴定试剂二硫苏糖醇(DTI)、碘乙酰胺、铁氰化钾、胰蛋白酶、三氟乙酸等均为美国 Sigma 公司产品。等电聚焦仪、垂直电泳系统均购自美国 GE 公司,LKB-MultiTemp I 低温循环水浴箱购自美国 Pharmacia 公司,Milli-Q 超纯水仪购自美国 Millipore 公司,透射扫描仪为 UMAX Power-Look 1100,图像分析软件为 PDQuest 7.1.0。美国 ABI 公司 Voyager-DE STR 型基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)分析仪。

1.5 差异蛋白质检测: 取 50 mg 组织研磨,加入裂解液,经振荡、静置、离心后取上清液,使用二喹啉甲酸(BCA)法测定蛋白浓度。将蛋白质加入到含水化液的小离心(EP)管中振荡,300 μg 蛋白质上样,先用 IPG 进行等电聚焦电泳(IEF)、冲洗、平衡,再将胶条转移至 13% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)上。每个样品重复 3 次。取出胶条后依次进行固定、敏化、漂洗、银染、显影。用透射扫描仪获取图像,软件进行分析,包括蛋白质斑点的检测、量化、背景去除和点的匹配。选取表达量差异 2 倍以上的点作为后续质谱分析的候选蛋白质点。

1.6 质谱分析和数据库检索: 选取图像分析得到的差异蛋白质点,从凝胶上取点,进行水洗、脱色、酶解、样品萃取、点样、脱盐。将制备好的点样板放入质谱仪中进行分析,获得肽质量指纹图谱(PMF),最后应用 Mascot Distiller 软件在人类蛋白质公共数据库(NCBI, SWISS-PROT)中搜寻,获得蛋白质的相关信息。

2 结果

2.1 双向凝胶电泳图谱(图 1): 经分离、银染,获得分辨率和重复性均较好的双向电泳图谱。

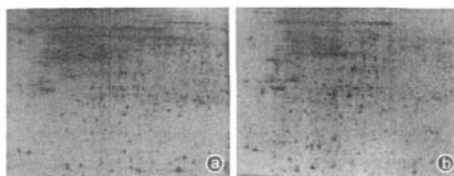


图 1 对照组(a)和结肠癌患者(b)的双向凝胶电泳图谱

2.2 差异蛋白质点的 MALDI-TOF-MS 肽质量指纹分析(表 1): 经软件及肉眼分辨,气血亏虚证大肠癌组、对照组间共分析筛选出 23 个表达量差异 2 倍以上的蛋白质点。经质谱鉴定及生物信息学分析后共有 21 个蛋白质点得到鉴定,其中有热休克蛋白(HSP)、细胞骨架蛋白、抗氧化蛋白、信号转导相关蛋白、能量产生相关蛋白、血液蛋白及其他蛋白。

3 讨论

大肠癌在世界范围内是第三大常见恶性肿瘤,在发达国家占第二位。除了手术、化疗外,中医治疗大肠癌在改善患者生存质量、延长患者生存时间上发挥着重要的作用。本研究结果表明,大肠癌气血亏虚证患者与正常人体蛋白质表达有差异,主要有 HSP、细胞骨架蛋白、抗氧化蛋白、信号转导相关蛋白、能量产生相关蛋白、血液蛋白等。

HSP 是在高温、感染、肿瘤等应激状态下生成的一组蛋白质,它可以保证细胞必要的生命活动以维持细胞生存。有研究结果认为,热休克预处理可能通过诱导 HSP 表达来减轻肠上皮细胞缺氧-再给氧损伤,增加细胞 Bcl-2 基因表达并抑制肠上皮细胞缺氧-再给氧后细胞凋亡而发挥细胞保护作用^[2]。本研究结果表明,大肠癌气血亏虚证患者 HSP90α、HSP90β3 明显上调,而 HSPβ6、HSPβ1 明显下调。

细胞骨架系统是由蛋白质纤维组成的复杂网络,大肠癌气血亏虚证患者细胞骨架蛋白表达有差异,包括 Transgelin、CK10、结蛋白。有文献报道 Transgelin 在许多实体肿瘤中呈现异常表达^[3-6],但 Transgelin 的表达模式并不一致。CK 是所有上皮细胞的主要骨架蛋白,其广泛表达于恶性肿瘤上皮细胞中^[7-10],而且随转移能力和恶性程度的增高而变化^[11]。结蛋白为细胞骨架中间丝蛋白之一,结蛋白在肿瘤的表达研究结果不一^[12-13]。本研究结果表明,在气血亏虚证大肠癌 Transgelin 和 CK10 表达明显上调,结蛋白表达明显下调。

抗氧化酶能保护机体免受活性氧(ROS)损伤,抗氧化酶 Prdx6 具有细胞保护作用^[14],GSH-Px 是体内清除 H₂O₂ 和许多有机氢过氧化物的重要过氧

表 1 气血亏虚证大肠癌组与对照组鉴定出的 21 个差异蛋白质

编号	蛋白序列号	蛋白分子量	等电点	得分	蛋白名称	气血亏虚证大肠癌组与对照组比较
01	P13645	58 827.09	5.13	67	角蛋白 10(CK10)	上调
02	P02768	69 366.68	5.92	60	血清白蛋白前体	上调
03	O75489	30 241.53	6.98	96	还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)脱氢酶	下调
04	P00738	45 205.31	6.13	60	结合珠蛋白(Hp)前体	上调
05	P07900	84 659.71	4.94	71	热休克蛋白 90α(HSP90α)	上调
06	P08758	35 936.77	4.94	111	膜联蛋白 A5(AnnexinsA5)	上调
07	P02766	15 887.03	5.52	118	转甲状腺素蛋白(TTR)前体	上调
08	P02675	55 928.15	8.54	103	纤维蛋白原(Fib)β链前体	上调
09	P07355	38 604.04	7.57	136	膜联蛋白 A2(AnnexinsA2)	上调
10	Q58FF7	68 324.84	4.71	73	热休克蛋白 90β3(HSP90β3)	上调
11	P10909	52 494.58	5.89	106	丛生蛋白(Clusterin)前体	上调
12	Q01995	22 610.90	8.87	36	编码肌动蛋白结合蛋白(Transgelin)	上调
13	Q8IX19	21 228.52	9.03	58	肥大细胞表达膜蛋白 1	下调
14	Q6ZNH5	54 721.17	9.27	57	锌指蛋白 497	上调
15	O14558	17 135.60	5.95	44	热休克蛋白 β6(HSPβ6)	下调
16	Q01995	22 610.90	8.87	76	编码肌动蛋白结合蛋白(Transgelin)	上调
17	Q01995	22 610.90	8.87	38	编码肌动蛋白结合蛋白(Transgelin)	上调
18	P22352	25 402.30	8.26	59	谷胱甘肽过氧化物酶 3(GSH-Px3)前体	下调
19	P30041	25 034.99	6.00	64	过氧化物酶 6(Prdx6)	下调
20	P04792	22 782.52	5.98	124	热休克蛋白 β1(HSPβ1)	下调
21	P17661	53 535.79	5.21	103	结蛋白	下调

化酶,它特异地催化还原型谷胱甘肽(GSH)对H₂O₂起还原反应,从而清除细胞内有害的过氧化物代谢产物,阻断脂质过氧化连锁反应,起到保护细胞膜结构和功能完整的作用,是抗氧化系统中重要的抗氧化剂。在一定范围内,脂质过氧化增强时,抗脂质过氧化酶活性也相应增强,以对抗脂质过氧化对机体的损伤,因此,GSH-Px活性可反映机体抗氧化能力^[15-17]。本研究结果表明,气血亏虚证大肠癌GSH-Px3前体、Prdx6表达均明显下调,提示气血亏虚证大肠癌抗氧化能力明显减退。

Annexins是一类与结构相关的钙依赖性磷脂结合蛋白,在细胞中参与膜转运及膜表面一系列依赖于钙调蛋白的活动。本研究结果表明,气血亏虚证大肠癌AnnexinsA2和A5均明显下调,提示气血亏虚证大肠癌发生了细胞信号转导障碍。

NADH脱氢酶是构成线粒体呼吸链的关键酶,参与细胞氧化还原反应和能量代谢过程,是体内最有效的抗氧化剂,可使机体免受自由基损伤。本研究结果表明,气血亏虚证大肠癌NADH脱氢酶明显下降,提示气血亏虚证大肠癌能量代谢发生了障碍。

血液蛋白在气血亏虚证大肠癌中也存在不同的表达。血清白蛋白的主要功能是维持胶体渗透压,保持血容量的稳定。本研究结果表明,气血亏虚证大肠癌血清白蛋白前体的表达明显上调,这用气血亏虚证的“虚证”证型特点似乎较难解释,其机制尚有待进一步研究。Hp是一种急性期蛋白,在感染、炎症、组织坏死、恶性肿瘤等疾病时明显增加^[18]。TTR是甲状腺素与视黄醇的转运蛋白,当机体热量不足、蛋

白丢失以及急性应激状态下,TTR迅速下降,及时补充足够的热量后其迅速上升,能及时反映内脏蛋白合成的状况以及危重病患者的营养情况^[19]。Fib是血浆中含量最高的凝血因子,Fib与肿瘤发生及其转移、预后密切相关,Fib水平在恶性肿瘤明显升高^[20-21]。本研究结果表明,气血亏虚证大肠癌Hp前体、TTR和Fibβ链前体表达均明显上调。

Clusterin具有抗凋亡作用,通过抑制细胞凋亡促进肿瘤的恶性进展,肿瘤分期越晚,分化程度越低、恶性程度越高且有淋巴结转移的病例,Clusterin阳性表达率越高^[22-25],Clusterin可能是肿瘤侵袭性行为的重要因素之一。本研究表明,气血亏虚证大肠癌Clusterin前体明显升高。

锌指蛋白也是一类转录因子,在基因表达调控、细胞分化、胚胎发育等生命过程中发挥重要作用。近来有研究表明,锌指蛋白参与了肿瘤的发生发展,在肿瘤患者癌组织及血清中表达均明显增高^[26-28],本研究结果表明,气血亏虚证大肠癌锌指蛋白497表达明显增高。

综上所述,通过对气血亏虚证大肠癌蛋白质差异性表达的研究,获得了与气血亏虚证大肠癌密切相关的21个差异表达蛋白质,这些蛋白质包括HSP、细胞骨架蛋白、抗氧化蛋白、信号转导相关蛋白、能量产生相关蛋白、血液蛋白等,通过对这些蛋白质的差异分析,在蛋白质水平上为研究气血亏虚证的本质提供物质基础。

参考文献

[1] 刘伟胜,徐凯. 肿瘤科专病中医临床诊治. 北京:人民卫生出版

- 社, 2000:166.
- [2] 袁志强, 李晓鲁, 彭毅志. 热休克预处理对肠上皮细胞缺氧-再给氧损伤的保护作用及其机制. 中国危重病急救医学, 2002, 14(5):265-268.
- [3] 孙凯, 蒋晨, 陈奇, 等. 非肌层浸润性和肌层浸润性膀胱癌的双向电泳图谱的差异分析. 中国癌症杂志, 2009, 19(9):684-688.
- [4] Prasad PD, Stanton JA, Assinder SJ. Expression of the actin-associated protein transgelin (SM22) is decreased in prostate cancer. *Cell Tissue Res*, 2010, 339(2):337-347.
- [5] 刘群, 岳阳, 王敏. 子宫肌瘤组织 Transgelin 基因表达及其临床意义的研究. 中华肿瘤防治杂志, 2008, 15(21):1655-1657.
- [6] Arias LF, Blanco J, Hernández S, et al. Immunohistochemical profile and clinical features of mucinous tubular and spindle renal cell carcinoma. *Actas Urol Esp*, 2006, 30(7):649-654.
- [7] Apaydin R, Gürbüz Y, Bayramgürler D, et al. Cytokeratin contents of basal cell carcinoma, epidermis overlying tumour, and associated stromal amyloidosis; an immunohistochemical study. *Amyloid*, 2005, 12(1):41-47.
- [8] Kim MA, Lee HS, Yang HK, et al. Cytokeratin expression profile in gastric carcinomas. *Hum Pathol*, 2004, 35(5):576-581.
- [9] Heatley MK. Keratin expression in human tissues and neoplasms. *Histopathology*, 2002, 41(4):365-366.
- [10] Hendrix MJ, Seftor EA, Chu YW, et al. Role of intermediate filaments in migration, invasion and metastasis. *Cancer Metastasis Rev*, 1996, 15(4):507-525.
- [11] Alvarez-Chaver P, Rodríguez-Piñero AM, Rodríguez-Berrocal FJ, et al. Identification of hydrophobic proteins as biomarker candidates for colorectal cancer. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007, 39(3):529-540.
- [12] Ma Y, Peng J, Liu W, et al. Proteomics identification of desmin as a potential oncofetal diagnostic and prognostic biomarker in colorectal cancer. *Mol Cell Proteomics*, 2009, 8(8):1878-1890.
- [13] Smeets A, Loumaye E, Clippe A, et al. The crystal structure of the C45S mutant of annelid *Arenicola marina* peroxiredoxin 6 supports its assignment to the mechanistically typical 2-Cys subfamily without any formation of toroid-shaped decamers. *Protein Sci*, 2008, 17(4):700-710.
- [14] Bensi G, Raugai G, Klefenz H, et al. Structure and expression of the human haptoglobin locus. *EMBO J*, 1985, 4(1):119-126.
- [15] 袁裕强, 施小燕, 陈毅军, 等. 茶多酚对急性呼吸窘迫综合征兔肺抗氧化作用的研究. 中国中西医结合急救杂志, 2008, 15(2):92-94.
- [16] 蒋军广, 谭伟丽, 王丽华, 等. 银杏叶提取物对老年肺心病患者抗脂质过氧化损伤的影响. 中国危重病急救医学, 2006, 18(4):246-247.
- [17] 王岱君, 田华, 王金平. 脉络宁注射液对缺血/再灌注骨骼肌丙二醛及谷胱甘肽过氧化物酶的影响. 中国中西医结合急救杂志, 2009, 16(3):175-176.
- [18] Langlois MR, Delanghe JR. Biological and clinical significance of haptoglobin polymorphism in humans. *Clin Chem*, 1996, 42(10):1589-1600.
- [19] 李佩章, 王英, 黄玲莎, 等. 恶性肿瘤患者血浆纤维蛋白原检测的意义. 中华实用诊断与治疗杂志, 2009, 23(6):566-567.
- [20] 汪晓东, 刘丹, 吕东昊, 等. 术前纤维蛋白原水平与结直肠癌病理分期的关系. 中华实用诊断与治疗杂志, 2009, 23(7):643-645.
- [21] Redondo M, Villar E, Torres-Muñoz J, et al. Overexpression of clusterin in human breast carcinoma. *Am J Pathol*, 2000, 157(2):393-399.
- [22] 牛林琳, 臧家兰, 蔡莉, 等. clusterin, Bax 及 p53 在非小细胞肺癌中的表达及相关性研究. 中国肺癌杂志, 2007, 10(4):284-287.
- [23] 刘伯龙, 李解方, 胡和平, 等. Clusterin 和 p21 在膀胱癌中的表达及临床意义. 现代生物医学进展, 2009, 9(7):1297-1299.
- [24] 陈金元, 李杰, 徐宏. Clusterin 在大肠癌组织中的表达及其与临床病理特征的关系. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2009, 16(1):75-79.
- [25] 钟良, 陈坚, 徐近, 等. 锌指蛋白 2 在胰腺癌中的表达. 胰腺病学, 2007, 7(4):248-250.
- [26] 胡娟, 王启军. 肝癌患者血清锌指蛋白和 p53 高表达的临床意义. 中华实用诊断与治疗杂志, 2009, 23(5):430-431.
- [27] 顾香芳, 余德才. 肝癌患者血清和癌组织中锌指蛋白 216 表达增加. 基础医学与临床, 2008, 28(6):610-613.
- [28] 王立平, 武铁峰, 王春田. CD44V6 在大肠癌中的表达及临床意义. 中国危重病急救医学, 2004, 16(9):562-563.

(收稿日期: 2010-07-15)

(本文编辑: 李银平)

• 读者 • 作者 • 编者 •

《中国中西医结合急救杂志》对文后参考文献著录格式的要求

《中国中西医结合急救杂志》参考文献的著录格式, 基本参照执行 GB/T 7714-2005《文后参考文献著录规则》。采用顺序编码制著录, 依照文献在文中出现的先后顺序用阿拉伯数字标出, 并将序号置于方括号中, 排列于文后。尽量避免引用摘要作为参考文献。引用文献(包括文字和表达的原意)务必请作者与原文核对无误。日文汉字请按日文规定书写, 勿与汉字及简化字混淆。同一文献作者不超过 3 人, 全部著录; 超过 3 人, 可以只著录前 3 人, 后依文种加表示“等”的文字(如西文加“et al”, 日文加“他”)。作者姓名一律姓氏在前, 名字在后, 外国人的名字采用首字母缩写形式, 缩写名后不加缩写点; 不同作者姓名之间用“,”隔开, 不用“和”、“and”等连词。引用日期、获取和访问途径为联机文献必须著录的项目。书籍出版项中的出版地(者)有多个时, 只著录第一出版地(者)。出版项中的期刊名称, 中文期刊用全称, 外文期刊名称用缩写, 以 *Index Medicus* 中的格式为准。每条参考文献均须著录起止页码。著录格式示例如下。

- 1 期刊著录格式: 主要责任者. 题名. 刊名. 年. 卷(期): 起页-止页.
- 2 图书著录格式: 主要责任者. 题名. 版本项(第 1 版不著录). 出版地: 出版者, 出版年; 引文起页-止页.
- 3 会议论文汇编(集)著录格式: 主要责任者. 题名. 出版地: 出版者, 出版年; 引文起页-止页.
- 4 析出文献著录格式: 析出文献主要责任者. 析出文献题名//专著、会议文献主要责任者. 专著、会议题名. 版本项(第 1 版不著录). 出版地: 出版者, 出版年; 析出文献起页-止页.
- 5 学位论文著录格式: 论文作者. 题名. 学位授予单位所在城市: 学位授予或论文出版单位, 年份.
- 6 专利文献著录格式: 专利申请者或所有者. 专利题名: 专利国别, 专利号. 公告日期或公开日期.
- 7 标准(包括国际标准、国家标准、行业标准等)著录格式: 主要责任者. 标准编号 标准名称. 出版地: 出版者, 出版年.
注: 标准编号与标准名称之间留 1 个汉字的空隙.
- 8 报纸文章著录格式: 主要责任者. 题名. 报纸名, 出版日期(版次).
- 9 电子文献著录格式: 主要责任者. 题名[文献类型标志/文献载体标志, 是必选著录项目]. 出版地: 出版者, 出版年(更新或修改日期)[引用日期]. 获取和访问途径.
- 10 待发表材料: 对于已明确被杂志接受的待发表文献, 可以标明期刊及年代, 其后标注: 待发表, 或 In press.
- 11 以电子版优先发表的文献著录格式示例: Kurth T, Gaziano JM, Cook NR. Unreported financial disclosures in a study of migraine and cardiovascular disease [published online ahead of print July 18, 2006]. *JAMA*, 2006, 296:E1. <http://jama.ama-assn.org/cgi/data/296/3/283/DC1/1>. Accessed August 1, 2006.