

# miR-181a在急性淋巴细胞白血病患者中的表达及其功能研究

廖旺 刘晓丹 彭红霞 徐令

**【摘要】** 目的 检测microRNA-181a(miR-181a)在急性淋巴细胞白血病(ALL)患儿中的表达水平,并研究其在ALL细胞株CCRF-CEM细胞及耐药株CEM-C1细胞中的功能。方法 采用实时荧光定量PCR方法检测ALL患儿骨髓样本、ALL细胞株CCRF-CEM细胞及其耐药株CEM-C1细胞中miR-181a的表达水平。采用电穿孔转染的方法抑制耐药株CEM-C1细胞并上调非耐药株CCRF-CEM细胞中miR-181a的表达,予不同浓度梯度(终浓度分别为0.01、0.1、1、10、100、1 000 ng/ml)喜树碱处理后,采用CCK-8法观察各浓度梯度喜树碱处理后细胞的存活情况,绘制细胞增殖抑制曲线并计算半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)。结果 初诊-复发组患儿初诊及复发骨髓样本miR-181a相对表达水平(4.84±2.71及6.53±2.20)均高于对照组(1.41±0.53)( $P=0.017, 0.001$ ),初诊-完全缓解组患儿初诊骨髓样本miR-181a水平(7.58±2.50)较对照组明显升高( $P=0.000$ ),而完全缓解后miR-181a水平下降至1.35±0.35,与对照组比较差异无统计学意义( $P=0.863$ )。CEM-C1细胞miR-181a相对表达水平(-4.39±0.08)较CCRF-CEM细胞(-2.32±0.03)明显升高( $P=0.000$ )。转染miR-181a抑制剂CEM-C1细胞较转染阴性对照组增殖抑制率明显升高( $P<0.05$ ),IC<sub>50</sub>分别为30.61、2 255.00 ng/ml,耐药指数(RI)=73.67。miR-181a过表达 CCRF-CEM细胞较阴性对照组增殖抑制率明显降低( $P<0.05$ ),IC<sub>50</sub>分别为126.60、1.34 ng/ml,RI=94.26。结论 ALL患儿骨髓及CEM-C1细胞中miR-181a异常高表达,抑制CEM-C1细胞中miR-181a的表达可明显增加CEM-C1细胞的药物敏感性,在CCRF-CEM细胞中上调miR-181a的表达能明显增加CCRF-CEM细胞的耐药性。

**【关键词】** 白血病,淋巴样; 儿童; 微RNAs; 抗药性,肿瘤

**The expression and functional study of miR-181a in pediatric acute lymphoblastic leukemia** Liao Wang, Liu Xiaodan, Peng Hongxia, Xu Ling. Birth Cohort Study Lab, Guangzhou Women and Children Medical Center, Guangzhou Medical University, Guangzhou 510623, China  
Corresponding author: Liu Xiaodan, Email: kabin2004@126.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the expression of miR-181a in bone marrow (BM) samples of pediatric acute lymphoblastic leukemia (ALL) and explore the mechanism of miR-181a on ALL cell line CCRF-CEM and drug resistance cell line CEM-C1. **Methods** BM samples were obtained from 18 patients where matched samples at initial diagnosis and first BM relapse or complete remission were available. BM samples and cord blood samples (normal controls) were used to confirm the differential expression of miRNA-181a by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). The expressions of miR-181a in both CCRF-CEM and its multidrug-resistant counterpart CEM-C1 cells were also detected. Then, CCK-8 assay was performed to quantify the effects of miR-181a on CEM-C1 and CCRF-CEM cells growth and viability. **Results** Up-regulated miR-181a with higher fold changes in both initial diagnosis (4.84±2.71, 7.58±2.50) and relapsed samples (6.53±2.20) compared to normal controls (1.41±0.53) ( $P=0.017, 0.000, 0.001$ , respectively) were observed, whereas the miR-181a expression in the samples of CR (1.35±0.35) compared to normal control showed no significant difference ( $P=0.863$ ). The miR-181a expression level was higher in CEM-C1 cells (-4.39±0.08) than of in CCRF-CEM cells (-2.32±0.03) ( $P=0.000$ ). CCK-8 assay revealed that suppression of miR-181a in CEM-C1 cells by

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2015.01.013

基金项目:国家自然科学基金(81272310)

作者单位:510623 广州医科大学附属广州市妇女儿童医疗中心出生队列研究室(廖旺、刘晓丹、彭红霞),科教信息科(徐令)

通信作者:刘晓丹,Email:kabin2004@126.com

transfecting the specific inhibitor of miR-181a led to significantly higher cellular proliferation inhibition rate than negative control cells ( $P < 0.05$ ),  $IC_{50}$  were 30.61 ng/ml and 2 255.00 ng/ml with RI as 73.67. While increased miR-181a in CCRF-CEM cells led to significantly lower CPIR than negative control cells ( $P < 0.01$ ),  $IC_{50}$  were 126.60 ng/ml and 1.34 ng/ml with RI as 94.26. **Conclusion** Upregulation of miR-181a might play an important role in the development of drug resistance in CEM-C1 cells, and knockdown of miR-181a could sensitize CEM-C1 cells to camptothecin; Meanwhile increased expression of miR-181a could promote CCRF-CEM drug resistance. These results suggested that suppression of miR-181a expression might provide a promising therapeutic in drug resistance of leukaemia.

**【Key words】** Leukemia, lymphocytic; Child; MicroRNAs; Drug resistance, neoplasm

多药联合强化疗及骨髓移植很大程度上提高了儿童急性淋巴细胞白血病(ALL)的治愈率,但仍有一部分ALL患儿治疗失败<sup>[1]</sup>。白血病细胞耐药是导致白血病治疗失败最重要的原因,研究白血病细胞耐药的生物学特征有助于寻找难治性白血病的有效治疗方法<sup>[2]</sup>。microRNA(miRNA)参与细胞增殖、分化、凋亡、生长发育及肿瘤发生等众多生物过程<sup>[3]</sup>。越来越多的研究表明,miRNA通过调控耐药相关基因或者原癌、抑癌基因表达,在肿瘤细胞的化疗敏感性方面发挥重要作用<sup>[4-5]</sup>。

在前期研究中,我们发现一组与儿童ALL复发及预后相关的miRNA<sup>[6-7]</sup>,其中miR-181a在儿童ALL中异常高表达,但功能及作用机制尚不明确。为进一步阐明miR-181a在儿童ALL中的功能,我们检测了ALL患儿骨髓样本中miR-181a的表达,并研究了miR-181a在ALL细胞株CCRF-CEM细胞及耐药株CEM-C1细胞中的功能,以期阐明miR-181a在ALL细胞耐药中的作用,为儿童ALL的治疗提供新的思路。

## 对象和方法

1. 研究对象:收集2009年1月至2011年12月中山大学第一附属医院诊治的初诊ALL患儿配对骨髓标本(同一患儿初诊-复发或初诊-完全缓解的2份骨髓标本为1对配对标本)18对,其中初诊-复发标本8对,初诊-完全缓解标本10对。18例ALL患儿中男12例,女6例,初诊时中位年龄6岁(3个月~14岁6个月)。诊断分型及疗效判断参考文献<sup>[8]</sup>标准,其中FAB分型L<sub>1</sub> 5例、L<sub>2</sub> 9例、L<sub>3</sub> 4例,免疫分型B-ALL 11例、T-ALL 7例。所有患儿均使用ALL ICB-FM2002方案<sup>[8]</sup>治疗。以5份健康孕妇捐献的脐血标本为正常对照。本研究通过中山大学临床研究伦理委员会的批准,所有受试对象或其监护人均签署知情同意书。

2. 细胞株及细胞培养:人ALL细胞株CCRF-

CEM细胞及其相应的耐药株CEM-C1细胞均购自中国科学院细胞库。细胞接种于含有15%胎牛血清、100 U/ml青霉素、100 U/ml链霉素的RPMI 1640培养液中,置于37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养。

3. 电穿孔转染法转染ALL细胞株:取对数生长期CEM-C1及CCRF-CEM细胞,调整细胞密度为10<sup>6</sup>/孔,应用Gene Pulser Xcell™电穿孔系统(美国Bio-Rad公司产品),将100 pmol micrOFF™ miR-181a抑制剂、micrOFF™ miRNA抑制剂阴性对照以10 μl体系电击转入CEM-C1细胞,将100 pmol miR-181a模拟物、miRNA模拟物阴性对照以10 μl体系电击转入CCRF-CEM细胞。电转条件:1 350 V, 35 ms, 1次电击。将电击完毕的细胞接种于12孔板中,1 ml完全培养基置于37℃、5%CO<sub>2</sub>的培养箱中继续培养24 h用于后续实验。每组设3个复孔,实验重复3次。

4. 实验分组及细胞增殖水平检测:取对数生长期CCRF-CEM、CEM-C1、转染miR-181a抑制剂CEM-C1(anti-miR-181a)、转染miRNA抑制剂阴性对照CEM-C1(anti-miR-NC)、转染miR-181a模拟物CCRF-CEM(miR-181a过表达)及转染miRNA模拟物阴性对照CCRF-CEM(miR-NC)细胞,调整细胞密度为5×10<sup>4</sup>/孔,接种于96孔板,分别加入不同浓度(终浓度分别为0.01、0.1、1、10、100、1 000 ng/ml)喜树碱,并设置空白对照。每组设3个复孔,实验重复3次。培养22 h后每孔加入10 μl CCK-8(日本同仁公司产品),继续培养2 h,应用多功能酶标仪检测450 nm处吸光度(A)值,以630 nm处A值为参比波长。根据公式计算细胞增殖抑制率、半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)及耐药指数(RI)。

$$\text{细胞增殖抑制率}(\%) = \left(1 - \frac{A_{450\text{nm}}\text{实验组} - A_{630\text{nm}}\text{实验组}}{A_{450\text{nm}}\text{对照组} - A_{630\text{nm}}\text{对照组}}\right) \times 100\%$$

$$\text{RI} = \frac{\text{耐药细胞系的 } IC_{50}}{\text{亲本细胞系的 } IC_{50}}$$

经验证,CCRF-CEM细胞及CEM-C1细胞IC<sub>50</sub>分别为2.32及3 488.00 ng/ml,CEM-C1 RI为1 500,证实CEM-C1细胞对喜树碱有很强的耐药性。

5. RNA提取及cDNA合成:按照TRIzol(美国Invitrogen公司产品)说明书提取患儿骨髓样本及正常对照RNA,采用M-MLV逆转录试剂盒(日本TaKaRa公司产品),应用含有茎环结构的逆转录引物(引物序列:GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGACTGGATACGACTCAC,由深圳华大基因股份有限公司合成)合成cDNA。反应体系:总RNA 5  $\mu$ l、miR-181a RT引物 1.8  $\mu$ l、U6 RT引物 1.8  $\mu$ l、dNTP 5  $\mu$ l、5 $\times$ M-MLV逆转录缓冲液 6  $\mu$ l、逆转录酶 0.25  $\mu$ l、RNA酶抑制剂 0.6  $\mu$ l,补DEPC水至30  $\mu$ l。反应条件:16  $^{\circ}$ C 30 min,42  $^{\circ}$ C 45 min,85  $^{\circ}$ C 2 min。

6. 实时荧光定量PCR检测miR-181a的表达:采用SYBR PrimeScript<sup>TM</sup> RT-PCR试剂盒(日本TaKaRa公司产品)检测miR-181a的表达。引物序列:miR-181a上游引物:5'-GCGGTAACATTC-AACGCTGTCG-3',下游引物:5'-GTGCAGGG-TCCGAGGT-3';内参U6上游引物:5'-CGCTT-CGGCAGCACATATA-3',下游引物:5'-TTCACG-AATTTGCGTGTGCAT-3'。引物均由深圳华大基因股份有限公司合成。反应体系:cDNA 2  $\mu$ l、上下游引物各0.4  $\mu$ l、2 $\times$ SYBR mix 10  $\mu$ l。加DEPC水至20  $\mu$ l。PCR采用两步法进行,在LightCycler480荧光定量PCR系统(瑞士罗氏公司产品)上进行检测。反应条件:95  $^{\circ}$ C,3 min预变性;变性95  $^{\circ}$ C,15 s,退火延伸60  $^{\circ}$ C,30 s,共40个循环。独立实验重复3次,目的基因相对表达水平以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示。

7. 统计学处理:采用SPSS 16.0软件进行统计分析,结果以至少3次独立实验的 $\bar{x}\pm s$ 表达,方差齐性检验采用Levene检验,两样本组间的比较采用 $t$ 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 结 果

1. miR-181a在ALL患儿骨髓样本及ALL细胞株中的表达:初诊-复发组中,患儿初诊及复发骨髓样本miR-181a相对表达水平分别为 $4.84\pm 2.71$ 、 $6.53\pm 2.20$ ,均显著高于对照组( $1.41\pm 0.53$ )( $P$ 值分别为0.017、0.001)。初诊-完全缓解组中,患儿初诊骨髓样本miR-181a水平为 $7.58\pm 2.50$ ,较对照组明显升高( $P=0.000$ ),而完全缓解骨髓样本miR-181a水平( $1.35\pm 0.35$ )下降,与对照组比较差异无统计学意义( $P=0.863$ )。初诊-复发及初诊-完全缓解组患儿初诊骨髓样本miR-181a水平比较差异无统计学意义

( $P=0.069$ )。ALL耐药株CEM-C1细胞miR-181a表达水平为 $-4.39\pm 0.08$ ,较CCRF-CEM细胞( $-2.32\pm 0.03$ )表达明显增高,差异有统计学意义( $P=0.000$ )。

2. 抑制miR-181a表达对CEM-C1细胞的作用:anti-miR-181a组miR-181a相对表达水平( $-0.14\pm 0.12$ )较anti-miR-NC组细胞( $-1.95\pm 0.32$ )明显下降( $P=0.000$ )。采用CCK-8法,观察各浓度梯度下细胞增殖情况,绘制细胞增殖抑制率曲线(图1)。结果显示,anti-miR-181a组细胞 $IC_{50}=30.61$  ng/ml,对照组anti-miR-NC组细胞 $IC_{50}=2255.00$  ng/ml,RI=73.67。可见抑制miR-181a表达后能显著增加耐药株CEM-C1细胞对喜树碱的敏感性。

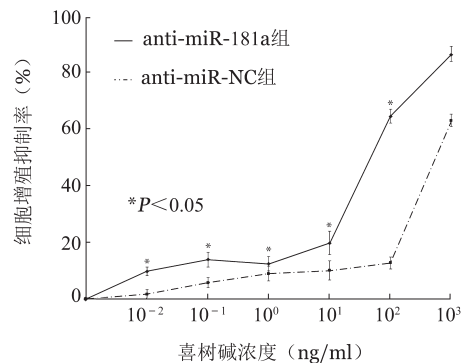


图1 不同浓度喜树碱处理24 h对转染miR-181a抑制剂(anti-miR-181a组)及转染miRNA抑制剂阴性对照(anti-miR-NC组)CEM-C1细胞增殖抑制的影响(每次实验设3个复孔,实验重复3次)

3. 上调miR-181a表达对CCRF-CEM细胞的作用:miR-181a过表达组miR-181a的相对表达水平( $-9.57\pm 0.24$ )较miR-NC组细胞( $-0.79\pm 0.26$ )明显上调( $P=0.000$ )。采用CCK-8法,观察各浓度梯度下细胞增殖情况,绘制细胞增殖抑制率曲线(图2)。结果显示,miR-181a过表达组细胞 $IC_{50}=126.60$  ng/ml,对照组miR-NC组细胞 $IC_{50}=1.34$  ng/ml,RI=94.26。可见上调miR-181a表达后能显著增加CCRF-CEM细胞对喜树碱的耐药性。

## 讨 论

多数ALL患者在化疗初期对药物敏感,但是初治缓解的患者经过一段长短不等的缓解期后大部分会复发,复发的白血病细胞对原方案药物很快产生耐药性,甚至对以前从未用过的、结构和作用机制完全不同的药物也产生交叉耐药性,即多耐药性(multidrug resistance, MDR)。白血病细胞耐药性的



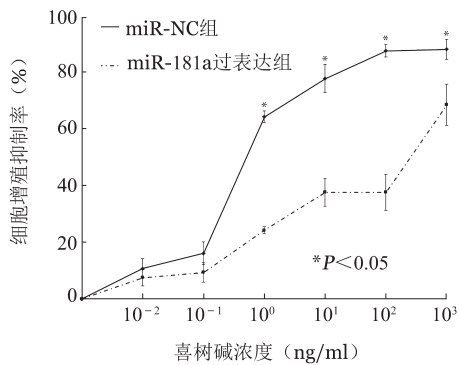


图 2 不同浓度喜树碱处理 24 h 对转染 miR-181a 模拟物(miR-181a 过表达组)及转染 miRNA 模拟物阴性对照(miR-NC 组) CCRF-CEM 细胞增殖抑制的影响(每次实验设 3 个复孔,实验重复 3 次)

产生是导致化疗失败的重要原因之一。目前,临床上对 ALL 细胞耐药性还缺乏有效的对策,仅限于通过联合使用作用机制不同的药物来防止或延缓耐药细胞的过度增殖。但是,由于 MDR 细胞的存在,这一措施往往难以奏效。因此,探索更加积极有效的克服耐药性的途径已成为当前白血病研究中的重大课题<sup>[1]</sup>。近来,miRNA 在肿瘤细胞耐药形成中发挥的作用已引起广泛关注。Si 等<sup>[4]</sup>报道乳腺癌细胞系 MCF7 细胞中抑制 miR-21 的表达可增强 MCF7 细胞对拓扑替康的敏感性,Xia 等<sup>[5]</sup>报道 miR-15b、miR-16 在多耐药胃癌细胞系 SGC7901/VCR 细胞中表达下调,上调其表达能增加 SGC7901/VCR 细胞对长春新碱的敏感性。

目前,不少研究团队报道了 miR-181a 在多种肿瘤的复发和耐药中发挥了重要作用。miRNA 芯片结果显示,在多种肝癌耐药细胞株中 miR-181a 均有上调,可见 miR-181a 在肝癌细胞耐药中发挥作用<sup>[9]</sup>。Lwin 等<sup>[10]</sup>报道,在非霍奇金淋巴瘤中,过表达 miR-181a 可抑制促凋亡蛋白 Bim,从而在滤泡树突细胞药物抵抗中发挥作用。Ke 等<sup>[11]</sup>报道在宫颈癌放疗不敏感的临床样本及细胞系中,miR-181a 异常高表达,其通过靶向促凋亡蛋白激酶 PRKCD 抑制放射诱导的凋亡,减少 G<sub>2</sub>/M 期细胞阻滞。Ota 等<sup>[12]</sup>检测 291 例乳腺癌患者 miR-181a 表达情况并随访分析,发现 miR-181a 在乳腺癌复发组中异常高表达,可作为独立预后因素,提示预后不良。我们的研究结果与以上研究报道一致。miR-181a 在儿童 ALL 初发及复发患者中明显高表达,完全缓解组与正常对照组差异无统计学意义,这一结果表明

miR-181a 可能在 ALL 的发生及发展进程中发挥重要作用,或与白血病的复发有关。我们进一步研究 miR-181a 在 ALL 耐药细胞株的表达和功能发现,miR-181a 在耐药株 CEM-C1 细胞中明显高表达,抑制 miR-181a 能明显增加 CEM-C1 细胞的药物敏感性;同时,上调 ALL 细胞株 CCRF-CEM 细胞中 miR-181a 能明显提高其对喜树碱的耐药性。

然而,也有少量研究表明 miR-181a 在提高肿瘤细胞药物敏感性上发挥作用。miR-181a 在柔红霉素抵抗的白血病细胞系 K562/A029 细胞及阿糖胞苷抵抗的白血病细胞系 HL-60/Ara-C 细胞中均表达下调,过表达 miR-181a 能靶向 BCL-2 促进细胞凋亡,从而提高白血病细胞对柔红霉素、阿糖胞苷的敏感性<sup>[13-14]</sup>。这与我们的研究结果相反,分析原因可能是肿瘤类型、肿瘤细胞微环境、靶基因的差异及 miRNA 本身作用的复杂性,导致同一 miRNA 在不同肿瘤甚至同种肿瘤中发挥的不同甚至完全相反的作用<sup>[14]</sup>。鉴于此,可通过更大样本研究对 miR-181a 在不同类型的肿瘤中的功能进行更全面更深入的探讨。

miRNA 通过与靶基因 mRNA 的 3'非编码区特异结合在转录后水平调控基因的表达,参与众多生物过程。目前 miR-181a 已经鉴定的靶基因有 Bim<sup>[10]</sup>、K-ras<sup>[15]</sup>、Bcl-2<sup>[13-14]</sup>、Prox1<sup>[16]</sup>、hox A11<sup>[17]</sup>等。在 ALL 细胞耐药中,miR-181a 通过与哪些靶基因结合,从何发挥作用尚待进一步研究。

本研究中,我们对 miR-181a 在 ALL 患儿中的表达及其在 ALL 细胞株 CCRF-CEM 细胞、耐药株 CEM-C1 细胞的作用进行了初步的探讨,发现 miR-181a 可能与儿童 ALL 复发及细胞耐药性有关,并证实过表达 miR-181a 能提高 CCRF-CEM 细胞的耐药性,抑制 miR-181a 表达能增加 CEM-C1 细胞对喜树碱的敏感性,为难治性白血病的治疗提供了新的思路。

参考文献

[1] Mody R, Li S, Dover DC, et al. Twenty-five-year follow-up among survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia: a report from the Childhood Cancer Survivor Study [J]. Blood, 2008, 111(12): 5515-5523.  
 [2] Nørgaard JM, Hokland P. Biology of multiple drug resistance in acute leukemia [J]. Int J Hematol, 2000, 72(3): 290-297.  
 [3] Pasquinelli AE, Hunter S, Bracht J. MicroRNAs: a developing story [J]. Curr Opin Genet Dev, 2005, 15(2): 200-205.  
 [4] Si ML, Zhu S, Wu H, et al. miR-21-mediated tumor growth [J].

- Oncogene, 2007, 26(19): 2799-2803.
- [5] Xia L, Zhang D, Du R, et al. miR-15b and miR-16 modulate multidrug resistance by targeting BCL2 in human gastric cancer cells[J]. Int J Cancer, 2008, 123(2): 372-379.
- [6] Zhang H, Luo XQ, Zhang P, et al. MicroRNA patterns associated with clinical prognostic parameters and CNS relapse prediction in pediatric acute leukemia[J]. PLoS One, 2009, 4(11): e7826.
- [7] 徐令, 梁燕妮, 罗学群, 等. miRNA 表达与儿童急性淋巴细胞白血病患者预后及复发的相关性研究[J]. 中华血液学杂志, 2011, 32(3): 178-181.
- [8] 中华医学会儿科学分会血液组, 中华儿科杂志编辑委员会. 小儿急性淋巴细胞白血病诊疗建议(第三次修订草案)[J]. 中华儿科杂志, 2006, 44(5): 392-395.
- [9] Zhuo L, Liu J, Wang B, et al. Differential miRNA expression profiles in hepatocellular carcinoma cells and drug-resistant sublines[J]. Oncol Rep, 2013, 29(2): 555-562.
- [10] Lwin T, Lin J, Choi YS, et al. Follicular dendritic cell-dependent drug resistance of non-Hodgkin lymphoma involves cell adhesion-mediated Bim down-regulation through induction of microRNA-181a[J]. Blood, 2010, 116(24): 5228-5236.
- [11] Ke G, Liang L, Yang JM, et al. MiR-181a confers resistance of cervical cancer to radiation therapy through targeting the proapoptotic PRKCD gene [J]. Oncogene, 2013, 32(25): 3019-3027.
- [12] Ota D, Mimori K, Yokobori T, et al. Identification of recurrence-related microRNAs in the bone marrow of breast cancer patients [J]. Int J Oncol, 2011, 38(4): 955-962.
- [13] Li H, Hui L, Xu W. miR-181a sensitizes a multidrug-resistant leukemia cell line K562/A02 to daunorubicin by targeting BCL-2[J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2012, 44(3): 269-277.
- [14] Bai H, Cao Z, Deng C, et al. miR-181a sensitizes resistant leukemia HL-60/Ara-C cells to Ara-C by inducing apoptosis[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2012, 138(4): 595-602.
- [15] Shin KH, Bae SD, Hong HS, et al. miR-181a shows tumor suppressive effect against oral squamous cell carcinoma cells by downregulating K-ras [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 404(4): 896-902.
- [16] Kazenwadel J, Michael MZ, Harvey NL. Prox1 expression is negatively regulated by miR-181 in endothelial cells[J]. Blood, 2010, 116(13): 2395-2401.
- [17] Li YG, Zhang PP, Jiao KL, et al. Knockdown of microRNA-181 by lentivirus mediated siRNA expression vector decreases the arrhythmogenic effect of skeletal myoblast transplantation in rat with myocardial infarction [J]. Microvasc Res, 2009, 78(3): 393-404.

(收稿日期:2014-07-15)

(本文编辑:刘爽)

·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。例如:调查设计分为前瞻性、回顾性还是横断面调查研究;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。主要做法应围绕重复、随机、对照、均衡4个基本原则概要说明,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:用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表达近似服从正态分布的定量资料,用中位数(四分位数间距)[M(Q<sub>R</sub>)]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。

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,以便对各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:当 $P < 0.05$ (或 $P < 0.01$ )时,应表述为对比组之间的差异有统计学意义,而不应表述为对比组之间具有显著性(或非常显著性)差异;应写明所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 $P < 0.01$ 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、总体率等)时,在给出显著性检验结果的同时,应再给出95%可信区间。