

# 微RNA-181a在核型正常急性髓系白血病患者中的表达及临床意义

庄贤栩 马秋玲 王焕萍 余梦霞 李霞 孟海涛 俞文娟 金春姬 尤良顺 金洁

**【摘要】** 目的 探讨核型正常急性髓系白血病(CN-AML)患者微RNA(miRNA)-181a的表达水平及其与预后的关系。方法 采用实时荧光定量PCR法检测120例初诊原发CN-AML患者骨髓单个核细胞miRNA-181a的表达水平,PCR后采用直接测序方法检测IDH1、IDH2、NPM1、FLT3-ITD、DNMT3A和CEBP $\alpha$ 突变。分析miRNA-181a表达与基因突变、其他临床指标和预后的关系。结果 miRNA-181a高表达组和低表达组患者中位总生存(OS)时间分别为25.0和15.0个月( $P < 0.05$ );中位无复发生存(RFS)时间分别为21.4和11.2个月( $P < 0.001$ )。miRNA-181a高表达组患者HGB水平、完全缓解率、NPM1野生型比例均较低表达组高,差异有统计学意义( $P$ 值均 $< 0.05$ );用Cox回归模型多因素分析显示,miRNA-181a高表达是影响CN-AML患者预后的独立因素( $HR = 2.219, 95\%CI 1.601 \sim 2.432, P = 0.018$ )。结论 miRNA-181a高表达是独立于临床指标和高频基因突变的预后良好的标志物,miRNA-181a表达水平可作为CN-AML预后的重要指标。

**【关键词】** 白血病,髓样,急性; 核型; 微RNA-181a; 预后

**基金项目:**浙江省重点创新团队(2011R50015);国家自然科学基金(U1404806)

**Expression characteristics and prognosis significance of miRNA-181a in acute myeloid leukemia with normal karyotype** Zhuang Xianxu, Ma Qiuling, Wang Huanping, Yu Mengxia, Li Xia, Meng Haitao, Yu Wenjuan, Jin Chunji, You Liangshun, Jin Jie\*. *Department of Hematology, the First Affiliated Hospital, Zhejiang University College of Medicine, Hangzhou 310003, China*  
Corresponding author: Jin Jie, Email: jie0503@163.com

**【Abstract】 Objective** To study the expression of miRNA-181a in acute myeloid leukemia (AML) patients with normal karyotype to probe its prognosis significance. **Methods** The expression level of miRNA-181a in bone marrow mononuclear cells of 120 de novo AML patients with normal karyotype was detected by real time fluorescence quantitative PCR. The direct sequencing method was used to detect IDH1, IDH2, NPM1, FLT3-ITD, DNMT3A and CEBP $\alpha$  mutations in CN-AML patients after PCR. The relationship between miRNA-181a expression and gene mutation, the clinical parameters and prognosis were analyzed. **Results** The rates of overall survival (OS) in high expression and low expression groups were 25.0 months and 15.0 months, respectively ( $P < 0.05$ ). Relapse free survival (RFS) in high expression and low expression groups were 21.4 months and 11.2 months, respectively ( $P < 0.05$ ). Significantly higher level hemoglobin, complete remission rate and proportion of wild type NPM1 expression in the high expression of miRNA-181a group were observed when compared with the lower expression of miRNA-181a group ( $P < 0.05$ ). Multivariate Cox regression analysis showed miRNA-181a overexpression was an independent prognostic factor for CN-AML ( $HR = 2.219, 95\%CI 1.601 \sim 2.432, P = 0.018$ ). **Conclusion** Higher expression of miRNA-181a was a good prognostic factor independent of clinical parameters and high frequency gene mutations, which implicated that the miRNA-181a expression level could be used as an important prognostic indicator of AML patients with normal karyotype.

**【Key words】** Leukemia, acute, myeloid; Karyotype; miRNA-181a; Prognosis

**Fund program:** The Foundation of Innovation Team for Basic and Clinical Research of Zhejiang Province (2011R50015); National Natural Science Foundation of China (U1404806)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2017.10.007

作者单位:310003 杭州,浙江大学医学院附属第一医院血液科[庄贤栩(现在浙江省宁波市鄞州人民医院血液科,315040)、王焕萍、余梦霞、李霞、孟海涛、俞文娟、金春姬、尤良顺、金洁];河南中医药大学第二附属医院血液科(马秋玲)

通信作者:金洁,Email:jie0503@163.com

急性髓系白血病(AML)是血液系统常见的恶性肿瘤,根据初诊时染色体核型差异,AML患者分为预后良好、中等、不良三种类型。但是,大约50%的患者为正常核型AML(CN-AML)<sup>[1]</sup>。微RNA(microRNA, miRNA)是一类长度18~25个核苷酸的非编码单链的RNA,通过靶向调节mRNA的转录或翻译调控人类约60%的基因表达<sup>[2]</sup>。2002年,Calin等<sup>[3]</sup>报道miRNA-16-1和miRNA-15a的缺失在B细胞慢性淋巴细胞白血病中起重要作用。随之大量研究显示microRNAs在AML发生和发展过程中起重要的作用,与AML的染色体核型、基因突变、耐药和预后相关<sup>[4]</sup>。我们旨在探讨miR-181a在CN-AML中的表达特点,分析其与临床其他指标、基因突变和预后的关系。

### 对象与方法

1. 研究对象:收集我院2011年1月至2015年7月初诊原发CN-AML患者(M<sub>3</sub>除外)骨髓标本120例,所有AML患者均经过血常规、骨髓形态学、染色体、细胞免疫分型、基因检查,诊断均符合张之南主编第3版血液病诊断及疗效标准<sup>[5]</sup>。120例患者中男78例,女42例,中位年龄49(18~66)岁。FAB分型:M<sub>1</sub>17例,M<sub>2</sub>45例,M<sub>4</sub>13例,M<sub>5</sub>33例,M<sub>6</sub>12例。这些患者初诊时染色体核型均正常。

2. 主要试剂:Ficoll淋巴细胞分离液购于上海华精生物高科技有限公司,TRIzol购于大连宝生物公司,2×Taq PCR MasterMix购自天根生化科技(北京)有限公司,miRNeasy Mini Kit,miScript II RT Kit和miScript SYBR GreenPCR Kit购于美国Qiagen公司,定量PCR仪(IQ5.0)为美国BIO-RAD公司产品。

3. 化疗方案:120例患者均住院接受治疗,高白细胞者在诱导缓解化疗前单用羟基脲或联合白细胞去除术进行预处理,所有患者均接受2个疗程标准剂量DA(柔红霉素+阿糖胞苷)或HAA(高三尖杉酯碱+阿克拉霉素+阿糖胞苷)或IA(去甲氧柔红霉素+阿糖胞苷)方案诱导化疗<sup>[6]</sup>。获得完全缓解(CR)的80例患者中72例接受7个不同的联合化疗方案进行巩固治疗,包括3个中大剂量Ara-C以及HHA、IA、MA(米托蒽醌+阿糖胞苷)、DA各1个疗程。其中15例患者在CR<sub>1</sub>或CR<sub>2</sub>后接受了异基因造血干细胞移植。未获得CR的患者或采用FLAG±IDA(氟达拉滨+阿糖胞苷+G-CSF±去甲氧柔红霉素)方案化疗,或更换其他化疗方案,如IA或DA方案不缓解的患者更换HAA方案,反之则用IA或DA

方案。

4. 实时荧光定量PCR方法检测miRNA-181a的表达:无菌条件下采集患者骨髓标本2~5 ml,肝素抗凝,按人淋巴细胞分离液(Ficoll)说明书分离单个核细胞,生理盐水洗涤3次,计数(2~8)×10<sup>6</sup>个细胞,加入TRIzol 1 ml,混匀后-80℃冻存。

按miRNeasy Mini Kit说明书提取RNA,取1 μl溶液,在核酸蛋白定量仪上检测提取的RNA的纯度和浓度,将RNA浓度调整为500 ng/μl。按miScript II RT Kit说明书进行反转录。具体反应体系如下:5×miScript HiSpec Buffer 4.0 μl,10×miScript Nucleics Mix 2.0 μl,miScript Reverse Transcriptase Mix 2.0 μl,RNA 2.0 μl,DEPC水 10.0 μl,共20 μl,将上述反应混合物混匀,离心后在PCR仪上37.0℃反应60 min,95.0℃反应5 min,结束反应。取出cDNA分装后储存于-80℃或直接定量PCR。

按miScript SYBR GreenPCR Kit说明书操作,具体引物序列如下:miRNA-181a:5'-CGACCGTTGATTGTACCAA-3',U6:5'-TTCGTGAAGCGTTCATATTTT-3',引物均由美国Invitrogen公司合成,具体反应体系如下:2×QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix 12.5 μl,10×miScript Universal Primer 2.5 μl,10×miScript Primer Assay 2.5 μl,cDNA 2.0 μl,DEPC水 5.5 μl,共25.0 μl,将上述反应混合物混匀,离心后在ABI 7900 HT Sequence Detection System上进行反应。反应程序:95.0℃15 min,40个循环:94℃15 s,55℃30 s,70℃30 s,结束反应,每个标本设3个复孔,目的基因相对表达水平以2<sup>-ΔΔCT</sup>表示。以miRNA-181a表达中位数为分界线,高于中位数定义为高表达,低于中位数定义为低表达。

5. 基因突变检测:因IDH1、IDH2、NPM1、FLT3-ITD、DNMT3A和CEBPα突变对AML患者预后的影响已明确,为了在临床资料的多因素分析中排除这些突变对结果的影响,我们对这些基因突变进行了检测,各突变引物和方法参考文献<sup>[7]</sup>。

6. 染色体核型分析:抽取受试者骨髓3 ml,肝素抗凝,采用细胞直接法和(或)短期培养法常规制备染色体标本,R显带分析中期分裂象,参照《人类细胞遗传学国际命名体制(ISCN2009)》<sup>[8]</sup>进行核型分析。核型分组参考西南肿瘤协作组(SWOG)和东部肿瘤协作组(ECOG)核型分组标准<sup>[9]</sup>:所有正常核型染色体均至少分析20个分裂象。

7. 随访:住院患者查阅病例,出院患者电话随访。总体生存(OS)时间为确诊到死亡或者末次随访的时间,无复发生存(RFS)时间为CR到复发或者末次随访的时间。

8. 统计学处理:应用SPSS17.0软件对数据进行统计学处理,计量数据采用中位数表示,采取*t*检验,计数资料采用 $\chi^2$ 检验,采取Kaplan-Meier法绘制生存曲线,生存曲线应用Log-rank方法检验,预后因素分析采用Cox风险模型,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

### 结 果

1. miRNA-181a在CN-AML患者中的表达:120例CN-AML患者miRNA-181a中位表达水平为10.8(7.9~13.5)。

2. miRNA-181a表达与CN-AML患者临床特征及基因突变关系:以miRNA-181a表达中位数将120例CN-AML患者分为miRNA-181a高表达组(60例)与miRNA-181a低表达组(60例)。其中15例移植患者miRNA-181a高表达9例,miRNA-181a低表达6例。miRNA-181a高表达组HGB、CR率、NPM1野生型比例均高于miRNA-181a低表达组,差异有统计学意义( $P$ 值均 $< 0.05$ )。两组在性别、年龄、WBC、PLT、骨髓原始细胞比例、CEBP $\alpha$ 、FLT3、IDH1/2、DNMT3A、FAB分型分布等方面差异均无统计学意义( $P$ 值均 $> 0.05$ )(表1)。

3. miRNA-181a表达水平对CN-AML患者预后的影响:120例CN-AML患者中位随访时间为12.5(1~58)个月。miRNA-181a高表达组患者的中位OS时间为25个月(95%CI 12.7~33.5个月),miRNA-181a低表达组患者的中位OS时间为15个月(95%CI 12.9~18.7个月),前者明显长于后者,差异有统计学意义( $P = 0.017$ ,图1)。miRNA-181a高表达组患者的中位RFS时间为21.4个月(95%CI 18.7~24.1个月),miRNA-181a低表达组患者的中位RFS时间为11.2个月(95%CI 5.7~16.7个月),前者亦明显长于后者,差异有统计学意义( $P < 0.001$ ,图2)。

4. CN-AML患者预后影响因素的分析:将CN-AML患者的miRNA-181a表达水平、性别、年龄、外周血WBC、骨髓原始细胞数、NPM1、FLT3-ITD、CEBP $\alpha$ 纳入Cox风险回归模型进行分析,结果显示,miRNA-181a高表达是独立于临床指标和高频基因突变的预后良好的标志物(表2)。

表1 微RNA(miRNA)-181a表达与核型正常的急性髓系白血病患者临床特征关系[例(%)]

临床特征	miRNA-181a高表达组(60例)	miRNA-181a低表达组(60例)	$\chi^2$ 值	$P$ 值
性别			0.015	0.821
男	40(66.7)	38(63.3)		
女	20(33.3)	22(36.7)		
年龄(岁)			0.028	0.801
$\geq 60$	19(31.7)	19(31.7)		
$< 60$	41(68.3)	41(68.3)		
WBC( $\times 10^9/L$ )			0.008	0.846
$\geq 10$	37(61.7)	35(58.3)		
$< 10$	23(38.3)	25(41.7)		
PLT( $\times 10^9/L$ )			0.002	0.901
$\geq 50$	30(50.0)	28(46.7)		
$< 50$	30(50.0)	32(53.3)		
HGB(g/L)			7.904	0.005
$\geq 90$	46(76.7)	32(53.3)		
$< 90$	14(23.3)	28(46.7)		
骨髓原始细胞			0.395	0.571
$\geq 0.600$	48(80.0)	51(85.0)		
$< 0.600$	12(20.0)	9(15.0)		
CEBP $\alpha$			0.009	0.841
阳性	22(36.7)	24(40.0)		
阴性	38(63.3)	36(60.0)		
NPM1			4.201	0.039
突变型	18(30.3)	28(46.7)		
野生型	42(70.0)	32(53.3)		
FLT3-ITD			0.002	0.892
阳性	19(31.7)	18(30.0)		
阴性	41(68.3)	42(70.0)		
IDH1/2			0.081	0.802
阳性	13(21.7)	11(18.3)		
阴性	47(78.3)	49(81.7)		
DNMT3A			0.183	0.753
阳性	18(30.0)	15(25.0)		
阴性	42(70.0)	45(75.0)		
FAB分型			0.061	0.983
M <sub>1</sub>	9(15.0)	8(13.3)		
M <sub>2</sub>	22(36.7)	23(38.3)		
M <sub>4</sub>	7(11.7)	6(10.0)		
M <sub>5</sub>	16(26.6)	17(28.4)		
M <sub>6</sub>	6(10.0)	6(10.0)		
完全缓解			10.543	0.001
是	48(80.0)	32(53.3)		
否	12(20.0)	28(46.7)		

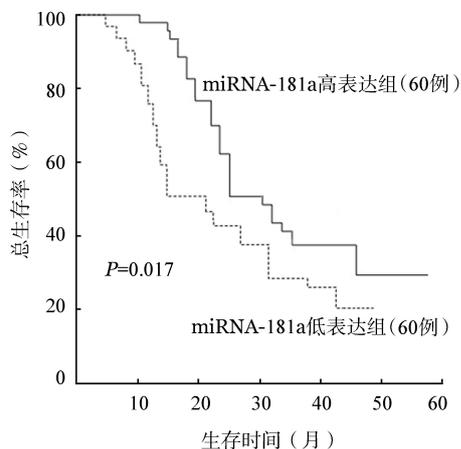


图1 核型正常的急性髓系白血病患者总生存曲线

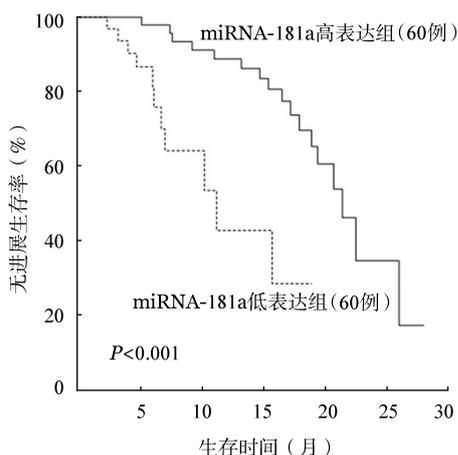


图2 核型正常的急性髓系白血病患者无进展生存曲线

表2 核型正常的急性髓系白血病患者预后影响因素分析

因素	Wald	HR(95% CI)	P值
miRNA-181a高表达	4.215	2.219(1.601~2.432)	0.018
性别	1.305	1.104(0.869~1.298)	0.593
年龄	2.547	1.924(0.792~1.857)	0.216
外周血WBC	4.530	1.215(0.716~1.634)	0.157
骨髓原始细胞数	1.405	1.127(0.872~1.348)	0.072
NPM1	2.201	1.631(0.915~1.872)	0.084
FLT3-ITD	2.279	1.648(1.124~2.268)	0.069
CEBPα	1.908	1.219(0.782~1.398)	0.105

### 讨 论

microRNA 已被证实在胚胎发育、细胞分裂、细胞分化、骨髓造血、细胞凋亡、肿瘤发生和药物的敏感性等方面都具有重要作用。miRNA-181 家族包含 miRNA-181a、miRNA-181b、miRNA-181c 和 miRNA-181d,是第一个被报道在 B-细胞发育和 T-细胞相关的免疫反应中起重要调节作用的 microRNA<sup>[10-11]</sup>。Schwind 等<sup>[12]</sup>报道在 FLT3-ITD 和

(或)NPM1 野生型 CN-AML 患者中,miRNA-181a 的高表达患者有 CR 率高、OS 和 RFS 时间长的特征,是 CN-AML 的独立预后因素。Li 等<sup>[13]</sup>报道在核型异常 AML 患者中 miRNA-181a 的高表达患者 OS 时间长,是核型异常 AML 患者独立预后因素。但是 miRNA-181a 表达对于中国 CN-AML 患者的意义尚未见报道。

本研究采用实时荧光定量 PCR 法检测 CN-AML 患者 miRNA-181a 表达,根据 miRNA-181a 表达水平的中位数将 CN-AML 患者分为 miRNA-181a 高表达和低表达两组,并分析 miRNA-181a 表达水平与各种临床指标及基因突变的关系。结果发现,miRNA-181a 高表达组患者 CR 率、NPM1 野生型比例高于低表达组。生存分析显示:miRNA-181a 高表达组中位 OS 和 RFS 时间分别为 25.0 和 21.4 个月,miRNA-181a 低表达组分别为 15.0 和 11.2 个月,两者差异有统计学意义(P 值分别为 0.017 和 < 0.001)。多因素分析表明,miRNA-181a 高表达 CN-AML 患者预后良好,研究结果与国外学者报道的一致,提示 miRNA-181a 高表达可能是独立于各种临床指标和高频基因突变的预后良好标志物。

有研究发现,miRNA-181 家族与耐药相关。Bai 等<sup>[14]</sup>和 Li 等<sup>[15]</sup>的研究显示 HL-60/Ara-C 和 K562/A02 耐药细胞株中 miRNA-181a 低表达,而抗凋亡基因 BCL-2 高表达,过表达 miRNA-181a 后引起 BCL-2 表达下调,增加耐药细胞株对药物的敏感性,逆转耐药,提示 miRNA-181a 通过负调控 BCL-2 而参与细胞耐药。在慢性淋巴细胞白血病中,miRNA-181a/b 通过抑制 BCL-2、MCL-1 和 XIAP 表达增加对药物的敏感性<sup>[16]</sup>。本研究 miRNA-181a 低表达 CN-AML 患者 CR 率低,OS 和 RFS 时间短,可能与患者对化疗药物耐药有关,提高 miRNA-181a 表达水平是否可以逆转耐药,值得进一步研究。

### 参 考 文 献

- [1] Sabattini E, Bacci F, Sagranso C, et al. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues in 2008: an overview[J]. Pathologica, 2010, 102(3):83-87.
- [2] Lee Y, Kim M, Han J, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II [J]. EMBO J, 2004, 23 (20):4051- 4060. DOI: 10.1038/sj.emboj.7600385.
- [3] Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99 (24):15524- 15529. DOI: 10.1073/pnas.242606799.

- [4] 马秋玲, 金洁. 微小RNA在急性髓细胞白血病中的研究进展[J]. 中华医学杂志, 2014, 94(2):153-156. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2014.02.018.
- [5] 张之南, 沈悌. 血液病诊断及疗效标准[M]. 3版. 北京: 科学出版社, 2007:131-134.
- [6] 秦铁军, 徐泽锋, 方力维, 等. 高三尖杉酯碱、阿糖胞苷、去甲氧柔红霉素联合诱导治疗初治急性髓系白血病临床研究[J]. 中国实验血液学杂志, 2011, 19(5):1277-1282.
- [7] Shen Y, Zhu YM, Fan X, et al. Gene mutation patterns and their prognostic impact in a cohort of 1185 patients with acute myeloid leukemia[J]. Blood, 2011, 118(20):5593-5603. DOI: 10.1182/blood-2011-03-343988.
- [8] Chia NL. A comprehensive set of idiograms representing all interpretive levels of resolution: ISCN (2009) [J]. Cytogenet Genome Res, 2009, 125(2):162-164. DOI: 10.1159/000227842.
- [9] Burnett A, Wetzler M, Löwenberg B. Therapeutic advances in acute myeloid leukemia[J]. J Clin Oncol, 2011, 29(5):487-494. DOI: 10.1200/JCO.2010.30.1820.
- [10] Li QJ, Chau J, Ebert PJ, et al. miR-181a is an intrinsic modulator of T cell sensitivity and selection[J]. Cell, 2007, 129(1):147-161. DOI: 10.1016/j.cell.2007.03.008.
- [11] Pekarsky Y, Santanam U, Cimmino A, et al. Tc11 expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by miR-29 and miR-181[J]. Cancer Res, 2006, 66(24):11590-11593. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-3613.
- [12] Schwind S, Maharry K, Radmacher MD, et al. Prognostic significance of expression of a single microRNA, miR-181a, in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study[J]. J Clin Oncol, 2010, 28(36):5257-5264. DOI: 10.1200/JCO.2010.29.2953.
- [13] Li Z, Huang H, Li Y, et al. Up-regulation of a HOXA-PBX3 homeobox-gene signature following down-regulation of miR-181 is associated with adverse prognosis in patients with cytogenetically abnormal AML[J]. Blood, 2012, 119(10):2314-2324. DOI: 10.1182/blood-2011-10-386235.
- [14] Bai H, Cao Z, Deng C, et al. miR-181a sensitizes resistant leukaemia HL-60/Ara-C cells to Ara-C by inducing apoptosis[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2012, 138(4):595-602. DOI: 10.1007/s00432-011-1137-3.
- [15] 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. DOI: 10.1093/abbs/gmr128.
- [16] Zhu DX, Zhu W, Fang C, et al. miR-181a/b significantly enhances drug sensitivity in chronic lymphocytic leukemia cells via targeting multiple anti-apoptosis genes[J]. Carcinogenesis, 2012, 33(7):1294-1301. DOI: 10.1093/carcin/bgs179.

(收稿日期:2017-02-27)

(本文编辑:王叶青)

·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)[ $M(Q_r)$ ]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。

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。

6. 样本数(病例数)小于20例的临床研究,原则上不进行统计学分析。

本刊编辑部