

疏风宣肺解毒方药对流感病毒性肺炎小鼠 Janus 激酶信号转导与转录激活因子通路的影响

刘琪¹ 王建国² 马彦平¹ 元海军¹ 杨琬芳¹ 顾立刚³ 凌莎莎¹ 智鹏¹ 祥露¹

(1. 山西中医学院, 山西 晋中 030619; 2. 山西省中西医结合医院, 山西 太原 030013;

3. 北京中医药大学, 北京 100029)

【摘要】 目的 观察疏风宣肺解毒方对流感病毒性肺炎小鼠肺组织 Janus 激酶信号转导与转录激活因子 (JAK-STAT) 通路的调控作用。方法 将 60 只小鼠按随机数字表法分为正常组、模型组、达菲对照组和疏风宣肺方高、中、低剂量组, 每组 10 只。应用 0.05 mL 的 4LD50 流感病毒肺适应株 FM1 滴鼻感染小鼠, 建立小鼠流感病毒性肺炎模型; 正常组以 0.05 mL 生理盐水滴鼻。制模成功 2 h 后, 正常组、模型组灌服蒸馏水; 达菲对照组灌服达菲 (磷酸奥司他韦) $2.5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$; 疏风宣肺方高、中、低剂量组分别灌服疏风宣肺解毒方药 (由菊花、桑叶、杏仁、桔梗、连翘、柴胡等组成, 颗粒剂), 按照人与小鼠体表面积换算给药剂量, 以加倍量为高剂量, 折半量为低剂量, 每日 1 次, 每次 0.2 mL。连续给药 4 d 后取小鼠肺组织, 采用基因芯片技术检测小鼠 JAK-STAT 通路相关差异基因的表达, 筛选差异表达基因的标准为: 上调基因 $P < 0.05$, 且 $\log_2$ 比值 > 1 , 下调基因 $P < 0.05$, 且 $\log_2$ 比值 < -1 。应用实时荧光定量反转录-聚合酶链反应 (RT-qPCR) 测定肺组织 Janus 激酶 (JAK)、 γ 干扰素 (IFN- γ) 的 mRNA 表达水平。结果 与正常组比较, 模型组差异表达基因 STAT5 [$\log_2$ (正常组 / 模型组) = 2.32]、白细胞介素-4 受体亚单位 [IL4RA, $\log_2$ (正常组 / 模型组) = 4.77]、白细胞介素-12 受体 [IL12R, $\log_2$ (正常组 / 模型组) = 1.58]、JAK [$\log_2$ (正常组 / 模型组) = 2.41] 均明显上调, 干扰素 (IFN) 明显下调 [$\log_2$ (正常组 / 模型组) = -1.45]; 与模型组比较, 达菲对照组 [$\log_2$ (达菲对照组 / 模型组) = 1.51]、方药各组 [$\log_2$ (方药低剂量组 / 模型组) = 1.46, $\log_2$ (方药中剂量组 / 模型组) = 1.72, $\log_2$ (方药高剂量组 / 模型组) = 1.40] 差异表达基因 IFN 明显上调, STAT5 [$\log_2$ (达菲对照组 / 模型组) = -2.06, $\log_2$ (方药低剂量组 / 模型组) = -1.41, $\log_2$ (方药中剂量组 / 模型组) = -2.10, $\log_2$ (方药高剂量组 / 模型组) = -1.89]、IL4RA [$\log_2$ (达菲对照组 / 模型组) = -2.52, $\log_2$ (方药低剂量组 / 模型组) = -1.85, $\log_2$ (方药中剂量组 / 模型组) = -2.74, $\log_2$ (方药高剂量组 / 模型组) = -1.39]、IL12R [$\log_2$ (达菲对照组 / 模型组) = -1.48, $\log_2$ (方药低剂量组 / 模型组) = -0.10, $\log_2$ (方药中剂量组 / 模型组) = -1.58, $\log_2$ (方药高剂量组 / 模型组) = -0.53]、JAK [$\log_2$ (达菲对照组 / 模型组) = -1.44, $\log_2$ (方药低剂量组 / 模型组) = -0.88, $\log_2$ (方药中剂量组 / 模型组) = -1.74, $\log_2$ (方药高剂量组 / 模型组) = -0.53] 明显下调, 模型组 JAK mRNA 表达较对照组明显升高 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$: 3.17 ± 0.94 比 1.01 ± 0.13 , $P < 0.05$), IFN- γ mRNA 表达较对照组明显降低 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$: 0.15 ± 0.48 比 1.01 ± 0.12 , $P < 0.05$); 与模型组比较, 达菲对照组和疏风宣肺方高、中剂量组 JAK mRNA 表达均明显降低 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$: 2.02 ± 0.63 、 1.19 ± 0.30 、 1.59 ± 0.67 比 3.17 ± 0.94 , 均 $P < 0.05$), 达菲对照组和疏风宣肺方高、中、低剂量组 IFN- γ mRNA 表达升高 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$: 0.61 ± 0.12 、 0.41 ± 0.13 、 0.85 ± 0.14 、 0.78 ± 0.20 比 0.15 ± 0.48 , 均 $P < 0.05$)。结论 疏风宣肺解毒方可通过调节 JAK-STAT 通路和升高 IFN- γ 水平, 调节辅助性 T 细胞 1/2 (Th1/2) 的平衡, 减轻肺组织免疫病理损伤。

【关键词】 疏风宣肺解毒方; 流感病毒; Janus 激酶信号转导与转录激活因子; 基因芯片

Effects of Shufengxuanfeijiedu formula on Janus kinase signal transducer and transcription activator pathway in mice with influenza viral pneumonia Liu Qi*, Wang Jianguo, Ma Yanping, Yuan Haijun, Yang Wanfang, Gu Ligang, Ling Shasha, Zhi Peng, Xiang Lu. *Shanxi University of Traditional Chinese Medicine, Jinzhong 030619, ShanXi, China

Corresponding author: Ma Yanping, Email: mayp820@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the regulatory effects of traditional Chinese medicine (TCM) Shufengxuanfeijiedu formula on Janus kinase signal transducer and activators of transcription (JAK-STAT) of lung tissues in mice with influenza viral pneumonia. **Methods** According to random number table, 60 mice were randomly divided into six groups with 10 mice in each group: normal group (N), model group (M), Tamiflu control group (C) and low (SL), medium (SM), high dose (SH) Shufengxuanfeijiedu formula groups. The mouse model of influenza virus pneumonia was reproduced by dropping of 0.05 mL 4LD50 influenza virus FM1 strain which can be adapted to lung tissue into the nose; while the N received nose instillation of 0.05 mL normal saline. After successful modeling for 2 hours, distilled

doi: 10.3969/j.issn.1008-9691.2016.05.001

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81173371); 山西省基础研究项目青年科技研究基金 (2015021192); 山西省卫生和计划生育委员会科研项目 (2014098)

通讯作者: 马彦平, Email: mayp820@126.com

water was given orally (by lavage) to N and M; Duffy (oseltamivir) $2.5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ was administrated to C; the TCM SL, SM, SH were intragastrically administered with different doses of shufengxuanfeijiedu decoction into the corresponding groups respectively (the ingredients of prescription: chrysanthemum, mulberry leaf, almond, platycodon root, forsythia, bupleurum etc. forming granules), according to the suitable dose of granules used for human body surface, the dose used for mouse surface area was calculated, the high dose means the dose used in the medium dose group doubled, the low dose means 1/2 dose used in medium group, once a day, once 0.2 mL for consecutive 4 days. Afterwards, the lung tissues were collected, the mouse differential gene expressions related to JAK-STAT pathway were detected by gene chip technology, the standards for screening of differential gene expression were as follows: up-regulated gene was $P < 0.05$, and the $\log_2$ ratio > 1 ; down-regulation gene was $P < 0.05$, and $\log_2$ ratio < -1 . The levels in lung tissue kinase (JAK) and γ interferon (IFN- γ) mRNA expressions were determined by real-time fluorescence quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR). **Results** Compared with those in N, the differential expression gene transcription activator, STAT5 [$\log_2$ (N/M) = 2.32], interleukin 4 receptor alpha subunit [IL4RA, $\log_2$ (N/M) = 4.77], interleukin 12 receptor [IL12R, $\log_2$ (N/M) = 1.58], JAK [$\log_2$ (N/M) = 2.41] were all obviously up-regulated, and IFN was significantly down-regulated [$\log_2$ (N/M) = -1.45] in M. Compared with those in M, C group IFN [$\log_2$ (C/M) = 1.51], various TCM dose groups [$\log_2$ (SL/M) = 1.46, $\log_2$ (SM/M) = 1.72, $\log_2$ (SH/M) = 1.40] differential expression gene IFN was significantly up-regulated, STAT5 [$\log_2$ (C/M) = -2.06, $\log_2$ (SL/M) = -1.41, $\log_2$ (SM/M) = -2.10, $\log_2$ (SH/M) = -1.89], IL4RA [$\log_2$ (C/M) = -2.52, $\log_2$ (SL/M) = -1.85, $\log_2$ (SM/M) = -2.74, $\log_2$ (SH/M) = -1.39], IL12R [$\log_2$ (C/M) = -1.48, $\log_2$ (SL/M) = -0.10, $\log_2$ (SM/M) = -1.58, $\log_2$ (SH/M) = -0.53], JAK [$\log_2$ (C/M) = -1.44, $\log_2$ (SL/M) = -0.88, $\log_2$ (SM/M) = -1.74, $\log_2$ (SH/M) = -0.53] were significantly down-regulated. In M, the JAK mRNA expression was obviously elevated ($2^{-\Delta\Delta Ct}$: 3.17 ± 0.94 vs. 1.01 ± 0.13 , $P < 0.05$), while the IFN- γ mRNA expression was decreased ($2^{-\Delta\Delta Ct}$: 0.15 ± 0.48 vs. 1.01 ± 0.12 , $P < 0.05$); compared with M, the JAK mRNA expressions in C, SM and SH groups were all obviously decreased ($2^{-\Delta\Delta Ct}$: 2.02 ± 0.63 , 1.19 ± 0.30 , 1.59 ± 0.67 vs. 3.17 ± 0.94 , all $P < 0.05$); while the IFN- γ mRNA expressions in C, SL, SM and SH groups were elevated ($2^{-\Delta\Delta Ct}$: 0.61 ± 0.12 , 0.41 ± 0.13 , 0.85 ± 0.14 , 0.78 ± 0.20 vs. 0.15 ± 0.48 , all $P < 0.05$). **Conclusions** Shufengxuanfeijiedu formula can ameliorate the mice immune pathological injury of lung tissues induced by influenza virus by regulating JAK-STAT signal pathway and balancing Th1/2 via up-regulating the expression of IFN- γ .

【Key words】 Shufengxuanfeijiedu formula; Influenza virus; Janus kinase signal transducer and transcription activator; Gene chips

甲型流感是一种急性呼吸道传染性疾 病,大多甲型流感患者伴有呼吸道感染的临床表现,中医将其分为风热毒邪侵袭肺卫和风热毒邪侵袭、卫气同病等证型^[1]。疏风宣肺解毒方是山西省名老中医、实验方剂学带头人王世民教授根据山西省气候、温度、湿度等自然条件开具的方药,由菊花、桑叶、杏仁、桔梗等组成,临床用于流感病毒引起的上呼吸道感染,伴发热、咽喉肿痛等症^[2]。本研究通过流感病毒性肺炎小鼠动物实验,探讨疏风宣肺解毒方药对流感病毒可能的作用机制,为探索具有山西省特色的中西医结合防治流感病毒方案提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物: SPF 雄性 ICR 小鼠,体质量 14~15 g,动物合格证号:0194691;小鼠及饲料均由北京斯贝福实验动物科技有限公司提供;实验动物在洁净柜中饲养,保持室温(26 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度(50 ± 10)%。

1.2 流感病毒: 流感病毒亚甲型鼠肺适应株 FM1 购自中国中医科学院中药研究所。复苏后接种于 9 日龄鸡胚尿囊腔,连续传代 3 次后测定血凝滴度为 2~8 时用于实验。

1.3 实验分组及给药: 将 60 只小鼠按随机数字表法分为正常组、模型组、达菲对照组和疏风宣肺方高、中、低剂量组,每组 10 只。用乙醚轻度麻醉小鼠,以 0.05 mL 的 4LD50 流感病毒 FM1 稀释液滴鼻感染小鼠制备流感病毒亚甲型鼠模型;正常组以 0.05 mL 生理盐水滴鼻。制模成功 2 h 后,正常组、模型组灌服蒸馏水;达菲对照组灌服达菲(磷酸奥司他韦胶囊, 75 mg) $2.5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$;中药治疗组分别灌服疏风宣肺解毒方药(由菊花、桑叶、杏仁、桔梗、连翘、柴胡等组成,颗粒剂,由山西省中西医结合医院药房制备)高、中、低剂量(按照人与小鼠体表面积换算给药剂量,以加倍量为高剂量,折半量为低剂量),每日 1 次,每次 0.2 mL,连续给药 4 d。

本实验中动物处置方法符合动物伦理学标准。

1.4 检测指标: 动物禁食不禁水 8 h,摘眼球放血处死,无菌条件下取全肺,存于液氮罐中备用^[3]。

1.4.1 基因芯片的检测: 提取肺组织总 RNA,样品用于芯片杂交及扫描,重复 3 次。计算各组探针信号与模型组强度的比值, I 为信号强度。筛选差异表达基因的标准为:上调基因 $P < 0.05$,且 $\log_2$ 比值 > 1 ;下调基因 $P < 0.05$,且 $\log_2$ 比值 < -1 。本研

究利用 NCBI 数据库、KEGG 基因通路信息数据库等,分析涉及 Janus 激酶信号转导与转录激活因子 (JAK-STAT) 通路相关的差异表达基因^[4-5]。

1.4.2 实时荧光定量反转录-聚合酶链反应 (RT-qPCR) 测定 JAK 和 γ 干扰素 (IFN- γ) 的 mRNA 表达:PCR 反应条件设定为 94 °C 预变性 1 min、94 °C 为 8 s、60 °C 为 34 s,共进行 40 个循环,72 °C 为 10 min。JAK 的引物序列:正向引物为 5'-ATGCAAATCTTTGCCAAGTG-3',反向引物为 5'-AGGCTTTAAGTCCCGATGAA-3',扩增产物片段 127 bp; IFN- γ 引物序列:正向引物为 5'-AGGCCATCAGCAACAACATA-3',反向引物为 5'-TGAGCTCATTGAATGCTTGG-3',扩增产物片段 178 bp。采用相对定量 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析结果,以目的基因 Ct 值-内参照基因三磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH) Ct 值,得出 ΔCt ; ΔCt -对照组的均值,得出 $-\Delta\Delta Ct$,确定 $2^{-\Delta\Delta Ct}$,计算样本目的基因的表达水平。

1.5 统计学方法:使用 SPSS 17.0 软件处理数据,计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用单因素方差分析,两组间比较应用 LSD 多重分析法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 基因芯片数据分析 (表 1):通过 KEGG 基因通路信息数据库分析涉及 JAK-STAT 生物学通路主要差异基因的表达。在 JAK-STAT 生物学通路中,模型组较正常组上调的主要差异表达基因包括信号转导和转录激活因子 (STAT5)、白细胞介素-4 受体亚单位 (IL4RA)、白细胞介素-12 受体 (IL12R)、JAK 等,下调的主要差异表达基因包括 IFN 等。方药各组差异表达基因 IFN 均明显上调,STAT5、IL4RA、IL12R、JAK 均明显下调。

2.2 疏风宣肺方对流感病毒感染小鼠肺组织 JAK mRNA 表达的影响 (表 2):模型组 JAK mRNA 表达明显高于正常组;与模型组比较,达菲对照组和疏风宣肺方高、中剂量组 JAK mRNA 表达均明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),疏风宣肺方高、低剂量组 JAK mRNA 表达均较中剂量组有降低趋势 (均 $P > 0.05$)。该结果与基因芯片结果相符。

2.3 疏风宣肺方对流感病毒感染小鼠肺组织 IFN- γ mRNA 表达的影响 (表 2):模型组小鼠 IFN- γ mRNA 表达明显低于正常组;达菲对照组和疏风宣肺方高、中、低剂量组 IFN- γ mRNA 表达均明显高于模型组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表 1 病毒性肺炎小鼠肺组织 JAK-STAT 生物学通路的主要差异基因分析

组别	各基因的 log ₂ 比值				
	STAT5	IL4RA	IL12R	IFN	JAK
正常组 / 模型组	2.32	4.77	1.58	-1.45	2.41
达菲对照组 / 模型组	-2.06	-2.52	-1.48	1.51	-1.44
方药低剂量组 / 模型组	-1.41	-1.85	-0.10	1.46	-0.88
方药中剂量组 / 模型组	-2.10	-2.74	-1.58	1.72	-1.74
方药高剂量组 / 模型组	-1.89	-1.39	-0.53	1.40	-0.53
Oligo 编号	mMC002994 PH_mM_0001283 mMC018135 PH_mM_0014587 mMC021611				
NCBI 序列	NM_011488	NM_001008700	NM_008353	NM_010508	NM_008413

注:上述各组探针信号的强度比值以 log₂ 比值表示;与模型组比较,log₂ 比值 > 1,表示显著上调的表达基因;log₂ 比值 < -1,表示显著下调的表达基因

表 2 疏风宣肺方对流感病毒感染小鼠肺组织 JAK、IFN- γ mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	JAK mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	IFN- γ mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)
正常组	10	1.01 $\pm$ 0.13	1.01 $\pm$ 0.12
模型组	10	3.17 $\pm$ 0.94 ^a	0.15 $\pm$ 0.48 ^a
达菲对照组	10	2.02 $\pm$ 0.63 ^b	0.61 $\pm$ 0.12 ^c
疏风宣肺方高剂量组	10	1.19 $\pm$ 0.30 ^c	0.41 $\pm$ 0.13 ^b
疏风宣肺方中剂量组	10	1.59 $\pm$ 0.67 ^c	0.85 $\pm$ 0.14 ^c
疏风宣肺方低剂量组	10	2.22 $\pm$ 0.14	0.78 $\pm$ 0.20 ^c

注:与正常组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$,^c $P < 0.01$

3 讨 论

病毒感染早期细胞即可激活 STAT,从而使人体建立抗病毒机制,这种机制对引起抗病毒的固有免疫应答过程起到一定作用。宿主细胞可能通过视黄酸诱导基因蛋白-1 (RIG-I) 识别流感病毒的 RNA 成分,从而诱导 III IFN- λ 的大量表达。IFN- λ 激活的 JAK-STAT 信号通路则受病毒刺激产生的细胞信号转导抑制因子-1 (SOCS-1) 的抑制,宿主可能通过代偿性过量表达 IFN- λ 以抵抗病毒感染来保护受损细胞。这从一个层面上说明了流感病毒引起细胞因子风暴的可能成因^[6]。流感病毒感染后各器官损伤病理改变的部分原因是由细胞因子风暴所造成的。流感病毒感染可引发机体大量释放细胞因子,特别是炎性介质的聚集,甚至可引起全身炎症“瀑布”反应,导致广泛的自身细胞和组织损伤。本研究结果表明,疏风宣肺解毒方各组 JAK-STAT

信号通路差异表达基因 STAT5、IL4RA、IL12R、JAK 均明显下调。荧光 RT-qPCR 结果显示,与模型组比较,达非对照组和疏风宣肺方高、中剂量组 JAK mRNA 表达均明显降低,这和基因芯片的结果基本吻合。说明疏风宣肺解毒方在一定程度上减少了由于 JAK-STAT 信号通路激活而导致大量炎性细胞因子的释放,这有助于深入了解宿主与病毒的相互作用对固有免疫应答的调节作用,为抗病毒的机制研究提供了方向。

CD4⁺ T 淋巴细胞按照免疫学功能的不同可为辅助性 T 细胞 1/2 (Th1/2)、Th17 细胞和滤泡 Th 细胞。正常情况下, Th1 和 Th2 处于相对平衡状态^[3],二者通过分泌不同的细胞因子谱,互相产生负调控效应^[7]。本研究 RT-qPCR 结果表明,与模型组比较,达非对照组和疏风宣肺方高、中、低剂量组 IFN- γ mRNA 表达均升高,说明经过药物治疗后, Th1/2 失衡状态有所改善, Th1 的免疫学功能提高,增强了人体通过细胞免疫途径对流感病毒的应答过程。

疏风宣肺解毒方是张世民教授的经验方^[8]。本研究提示,该方药可能通过调节 JAK-STAT 信号通路的靶点基因,从而达到缓解流感病毒病理损伤

的目的。疏风宣肺解毒方是否通过 Toll 样受体 (TLR) 信号转导、凋亡等其他免疫途径发挥作用,本课题组将继续研究报道。

参考文献

- [1] 刘芸芸. 基于证素辨证的甲型 H1N1 流感发病证候学研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2013.
- [2] 冯振宇, 赵建平. 疏风宣肺解毒汤抗甲 1 型流感病毒诱导细胞凋亡的研究[J]. 环球中医药, 2012, 5(2): 88-90.
- [3] 卢娜娜, 刘琪, 顾立刚, 等. 流感病毒性肺炎小鼠自然杀伤细胞毒性相关信号转导通路差异基因表达及两种不同治法中药方剂的调控作用研究[J]. 中华危重病急救医学, 2013, 25(6): 322-326.
- [4] Lai CY, Hung JT, Lin HH, et al. Immunomodulatory and adjuvant activities of a polysaccharide extract of *Ganoderma lucidum* in vivo and in vitro[J]. Vaccine, 2010, 28(31): 4945-4954.
- [5] Yang Y, Shu X, Liu D, et al. EPAC null mutation impairs learning and social interactions via aberrant regulation of miR-124 and Zif268 translation[J]. Neuron, 2012, 73(4): 774-788.
- [6] 魏海涛. 流感病毒与干扰素信号通路相互作用的机理研究[D]. 北京: 中国科学院大学, 2014.
- [7] 刘琪, 王建国, 马彦平, 等. 疏风宣肺和解表清里方药对流感病毒性肺炎小鼠 Toll 样受体通路影响的研究[J]. 中华危重病急救医学, 2014, 26(5): 321-324.
- [8] 张东坡, 刘必旺, 赵俊云, 等. 疏风宣肺解毒方对豚鼠止咳作用及其机理的研究[J]. 山西中医学院学报, 2012, 13(2): 12-14, 17.

(收稿日期: 2016-07-26)
(本文编辑: 邸美仙 李银平)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

本刊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 GB/T 7714-2005《文后参考文献著录规则》执行。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[文献类型标志]. 刊名, 年, 卷(期): 起页 - 止页.
- 2 图书著录格式: 主要责任者. 题名[文献类型标志]. 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[文献类型标志]. 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[文献类型标志]// 专著、会议文献主要责任者. 专著、会议题名. 版本(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[文献类型标志]. 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[文献类型标志]. 公告日期或公开日期. 获取和访问路径.
- 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[文献类型标志]. 出版地: 出版者, 出版年. 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[文献类型标志]. 报纸名, 出版日期(版次). 获取和访问路径.
- 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: Kurth T, Gaziano JM, Cook NR. Unreported financial disclosures in a study of migraine and cardiovascular disease [J/OL]. JAMA, 2006, 296: E1 [2006-09-08]. <http://jama.ama-assn.org/cgi/data/296/3/283/DC1/1> [published online ahead of print July 18, 2006].