

三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 在泡沫 细胞胆固醇流出中的作用

唐朝克^{1,2}, 易光辉², 唐国华², 王佐², 王燕², 刘录山², 袁中华², 万载阳², 严鹏科², 阮长耿², 杨永宗²

(1. 中南大学湘雅医学院, 湖南省长沙市 410078; 2. 南华大学心血管病研究所, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 病理生理学; 三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 的作用; 流式细胞术; 胆固醇流出; 低密度脂蛋白; 泡沫细胞; 22(R)-羟基胆固醇

[摘要] 以 THP-1 细胞源泡沫细胞为研究对象, 观察三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 在单核-巨噬细胞源泡沫细胞胆固醇流出中的作用。实验采用流式细胞术检测的方法, 来判断三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 激动剂 22(R)-羟基胆固醇和抑制剂 4,4'-二巯基二丙二烯 2,2'-二磺酸(4,4'-diisothiocyanostilbene-2,2'-disulfonic acid, DIDS) 对 THP-1 细胞源泡沫细胞三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 表达的影响。实验结果发现, 22(R)-羟基胆固醇作用 THP-1 细胞源泡沫细胞不同时间后, 能明显增加细胞三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 的蛋白表达, 流式细胞术检测三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 表达的平均荧光强度从 0 h 的 31.1 增加到 24 h 的 45.2; 而 DIDS 作用 THP-1 细胞源泡沫细胞不同时间后, 能明显降低细胞三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 的蛋白表达, 平均荧光强度从 0 h 的 29.4 降低到 24 h 的 10.4。胆固醇流出实验发现, 22(R)-羟基胆固醇作用 THP-1 细胞源泡沫细胞不同时间后, 能明显增加细胞胆固醇流出; 而 DIDS 作用 THP-1 细胞源泡沫细胞不同时间后, 能明显降低细胞胆固醇流出。这些结果表明, 三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 在 THP-1 细胞源泡沫细胞胆固醇流出中起着重要的作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The Action of ATP Binding Cassette Transporter A1 on Cholesterol Efflux in THP-1 Macrophage-derived Foam Cell

TANG Chao-Ke^{1,2}, YI Guang-Hui², TANG Guo-Hua², WANG Zuo², WANG Yan², LIU Lu-Shan², YUAN Zhong-Hua², WAN Zai-Yang², YAN Peng-Ke², RUAN Zhang-Geng², and YANG Yong-Zong²

(1. Xiangya Medical School, Central Southern University, Changsha, Hunan 410078; 2. Institute of Cardiovascular Disease, Nanhua University, Hengyang, Hunan 421001, China)

[KEY WORDS] Cholesterol Efflux; Low Density Lipoprotein; Foam Cell; 22(R)-hydroxycholesterol; ATP Binding Cassette Transporter A1; Flow Cytometer

[ABSTRACT] **Aim** To study the action of ATP binding cassette transporter A1 (ABCA1) on cholesterol efflux in THP-1 macrophage-derived foam cell. **Methods** After exposure of the cultured THP-1 macrophage-derived foam cell to 22(R)-hydroxycholesterol and 4,4'-diisothiocyanostilbene-2,2'-disulfonic acid (DIDS) at different time, cholesterol efflux and ABCA1 protein level were determined by FJ-2107P type liquid scintillator and flow cytometer, respectively. **Results** 22(R)-hydroxycholesterol increased cholesterol efflux in THP-1 macrophage-derived foam cell with time-dependent pattern and DIDS inhibited cholesterol efflux in THP-1 macrophage-derived foam cell with time-dependent pattern; flow cytometer showed that exposure of the cultured THP-1 macrophage-derived foam cell to 22(R)-hydroxycholesterol and DIDS at different time, resulted in increase and decrease in the expression of ABCA1 protein in THP-1 macrophage-derived foam cell with time-dependent pattern, respectively. **Conclusion** ABCA1 play an important role in cholesterol efflux in THP-1 macrophage-derived foam cell.

胆固醇在巨噬细胞源泡沫细胞聚积是形成动

脉粥样硬化的重要事件之一。虽然早已知道高密度脂蛋白能引起泡沫细胞胆固醇流出并在动物模型中有抗动脉粥样硬化作用, 但在这一方面的研究直到 Tangier 病基因缺陷的发现才得以深入。Tangier 病^[1]是由三磷酸腺苷结合盒转运体 A1(ATP binding cassette transporter A1, ABCA1) 基因的突变而引起载脂蛋白介导的胆固醇流出减少, 其特征病理是巨噬细胞源泡沫细胞在多种组织中堆积。本文以 THP-1 细

[收稿日期] 2003-02-12 [修回日期] 2003-06-06

[基金项目] 湖南省科技厅重点项目(01SSY1003)资助

[作者简介] 唐朝克, 男, 1960 出生, 副教授, 湖南省邵阳市人, 在读博士研究生, 主要从事动脉粥样硬化的病因学及发病机理研究; 电话: 0734-8281277, E-mail: tchaoke@hotmail.com。杨永宗, 男, 教授, 博士研究生导师, 中国病理生理学会动脉粥样硬化专业委员会主任委员, 多年从事动脉粥样硬化的病因学及发病机理研究; 为本文通信作者, E-mail 为 yzyang@mail.hy.hn.cn。

胞为研究对象,观察 ABCA1 在 THP-1 单核—巨噬细胞源泡沫细胞胆固醇流出中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

流式细胞仪 (COULTER EPICS ALTRA Hyper-Sort™ System, USA), 200 型高效液相色谱仪 (PE 公司), CP100MX 超速离心机 (Tokyo Japan), FJ-2107P 液体闪烁计数器 (国营二六二厂)。THP-1 人单核细胞 (中国科学院上海细胞生物学研究所细胞库), 牛血清白蛋白、载脂蛋白 A_{IV}、佛波酯、22(R)-羟基胆固醇和 4,4'-二巯硫氰酸二丙乙烯 2,2'-二磺酸 (4,4'-diisothiocyanostilbene-2,2'-disulfonic acid, DIDS) (Sigma 公司), 羊抗人 ABCA1 多克隆抗体、FITC 标记的兔抗羊二抗 (Santa Cruz 公司); 其他试剂均为进口或国产分析纯。

1.2 低密度脂蛋白的分离、修饰及鉴定

健康人血浆购自衡阳市血站。按我们以前的方法^[2]制备低密度脂蛋白,将 210 mL 血浆置超速离心机作序列超速离心。提纯的低密度脂蛋白在含 200 μmol/L 乙二胺四乙酸的 BPS 液中透析 48 h, BCA 法定量蛋白,用 PBS 液调节蛋白浓度至 1 g/L,并进行修饰及鉴定,过滤除菌,4℃保存。

1.3 细胞培养

THP-1 细胞用含有 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液,在 37℃、5% CO₂ 培养箱中静置培养。培养液中加青霉素和链霉素各 1.0×10^5 u/L。在每次实验前用 160 nmol/L 佛波酯孵育 THP-1 细胞 24 h,使其诱导分化成巨噬细胞。

1.4 胆固醇流出

胆固醇流出检测按文献^[3]描述的方法进行,THP-1 细胞用 0.2 mCi/L ³H-胆固醇和 50 mg/L 氧化型低密度脂蛋白及含有 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液共同孵育 48 h 之后,用 PBS 液洗涤细胞,加 22(R)-羟基胆固醇或 DIDS 和含 2 g/L 牛血清白蛋白的 RPMI 1640 培养液培养细胞不同时间。再用 PBS 液洗涤细胞,在无血清、含 10 mg/L 载脂蛋白 A_{IV} 的新培养液中培养细胞 12 h,用闪烁计数法检测培养液和细胞的 ³H-胆固醇。胆固醇流出用总 cpm 除以培养液中 cpm,再乘以 100% 来表示 [cpm: 每分钟记数 (counts per minute)]。

1.5 油红 O 染色和脂质染色的半定量分析

将细胞培养于放有消毒盖玻片的 6 孔培养板内,细胞被处理后,用 PBS 洗 3 次,50% 异丙醇固定 1

min,油红 O 染色液染色 10 min,苏木素染色 5 min,1% HCl 分色及返蓝后,水性封片剂封片。显微镜下观察,细胞内脂质呈红色,细胞核呈蓝色,图像分析系统收集图像并显微镜下摄像。按 Wada 方法^[4]进行脂质染色的半定量分析,即根据细胞脂滴的面积进行细胞分类。如果细胞脂滴的面积小于细胞核的面积记为“-”,细胞脂滴的面积等于或大于细胞核的面积记为“+”,此即为油红 O 染色细胞;每一块玻片计数 100 个细胞。

1.6 高效液相色谱分析

按我们以前描述的方法进行^[5]。将收获好的细胞用 1 mL 0.9% NaCl 溶液稀释细胞,冰浴中超声破碎细胞,工作条件为 100 W,工作时间为 4 min,脉冲时间为 10 s。用 BCA 法测定蛋白含量。在细胞溶解产物中加入等体积新鲜配制的 15% 醇溶性 KOH,涡旋至细胞溶解物清亮,加入 6% 三氯乙酸去蛋白,再加入等体积的正己烷:异丙醇为 4:1 (V/V) 的混合溶液,将混合物涡旋 5 min;然后在 1 500 r/min、15℃ 下离心 5 min,收集上层有机相,在真空干燥机中 45℃ 干燥;在室温中冷却后,加入 50 μL 异丙醇:正庚烷:乙晴为 35:13:52 (V/V) 的混合溶液,将样品溶解;取 10 μL 进行高效液相色谱分析。采用 C18 柱,以异丙醇:正庚烷:乙晴为流动相进行非梯度洗脱,流速 1 mL/min,柱温保持 4℃,在 216 nm 波长下检测 10 min。以峰面积定量胆固醇,单位为 mg/g 细胞蛋白;胆固醇酯经胆固醇酯酶水解,测总胆固醇量,总胆固醇量减去游离胆固醇量为胆固醇酯的量,以 mg/g 细胞蛋白为单位。

1.7 流式细胞仪检测 THP-1 细胞三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 的表达

按文献^[6]方法进行。各组细胞经 4% 多聚甲醛室温下固定 30 min,再用含 1% 小牛血清的 PBS 洗 3 遍,每次 5 min,加入含 1% 小牛血清、1.5% ABCA1 一抗的 PBS,置室温 60 min,用含 1% 小牛血清的 PBS 洗 3 遍,按 1:200 加入 FITC 标记的兔抗羊二抗,室温避光反应 30 min。胰酶消化细胞,含 1% 小牛血清的 PBS 洗 3 遍后,移入测试管,上机检测细胞平均荧光强度。阴性对照不加 FITC 标记的兔抗羊二抗,代之以小鼠 IgG。避光 30 min 后用流式细胞仪检测。每份标本收集 10 000 个细胞进行检测。

1.8 统计学处理

实验所得数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用方差分析及 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 氧化型低密度脂蛋白使 THP-1 细胞泡沫化

THP-1 细胞与 50 mg/L 氧化型低密度脂蛋白共同孵育 48 h 后, 经油红 O 染色, 显微镜下观察, 细胞浆内有大量的脂滴存在, 符合泡沫细胞形态特点。细胞内总胆固醇、游离胆固醇与胆固醇酯均明显增加, 其中细胞内胆固醇酯从 62 mg/g 蛋白剧增到 374 mg/g 蛋白, 胆固醇酯与总胆固醇之比值达到 60% 以上, 说明已成为泡沫化细胞。

2.2 22(R)-羟基胆固醇对 THP-1 细胞源泡沫细胞内脂质的影响

THP-1 细胞与 50 mg/L 氧化型低密度脂蛋白孵育 48 h 后, 经 10 μ mol/L 22(R)-羟基胆固醇孵育不同时间即 0、8、16 和 24 h, 油红 O 染色, 显微镜下观察, 细胞内脂滴由大而多逐渐变为小而少, 特别到 24 h 时非常明显地减少和变小(图 1, Figure 1)。油红 O 染色细胞计数分别为 63 ± 7 、 59 ± 6 、 33 ± 4 、 28 ± 3 , 16 h、24 h 时分别与 0 h 时比较, 油红 O 染色细胞数明显减少($P < 0.05$)。

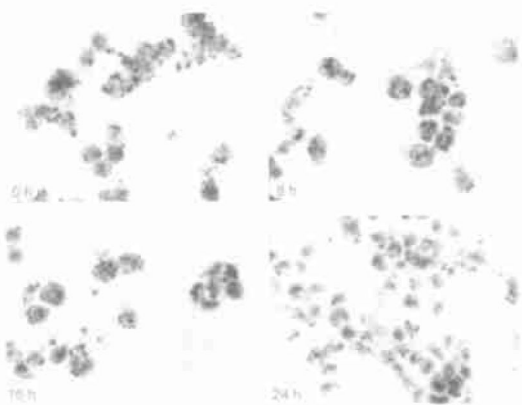


图 1. 22(R)-羟基胆固醇对 THP-1 细胞源泡沫细胞内脂质的影响 $P < 0.05$, 16 h 组、24 h 组与 0 h 组比较。

Figure 1. The effect of 22(R)-hydroxycholesterol on lipid in THP-1 macrophage-derived foam cell ($\times 400$, $n = 3$)

2.3 4,4'-二异硫氰酸二丙乙烯 2,2'-二磺酸对 THP-1 细胞源泡沫细胞内脂质的影响

THP-1 细胞与 50 mg/L 氧化型低密度脂蛋白孵育 48 h 后, 经 0.4 mmol/L DIDS 孵育细胞不同时间即 0、8、16、24 h, 油红 O 染色, 显微镜下观察, 细胞内脂滴逐渐增多增大, 到 16、24 h 时明显增多变大(图 2, Figure 2)。油红 O 染色细胞计数分别为 61 ± 7 、 64 ± 7 、 85 ± 9 和 88 ± 9 , 16 h、24 h 时分别与 0 h 时比较, 油红 O 染色细胞数明显增多($P < 0.05$)。

2.4 22(R)-羟基胆固醇对 THP-1 细胞源泡沫细胞胆固醇流出的影响

用 50 mg/L 氧化型低密度脂蛋白孵育 THP-1 细

胞 48 h 使其泡沫化, 再用 10 μ mol/L 22(R)-羟基胆固醇孵育泡沫细胞, 测量胆固醇流出。结果显示, 22(R)-羟基胆固醇对 THP-1 细胞源泡沫细胞胆固醇流出的影响依时间不同而有所不同。在 0、8、16、24 h 时胆固醇流出分别为 7.2%、7.9%、12.4%、14.8% (图 3, Figure 3)。16 h、24 h 时分别与 0 h 时比较, 胆固醇流出明显增多($P < 0.05$)。

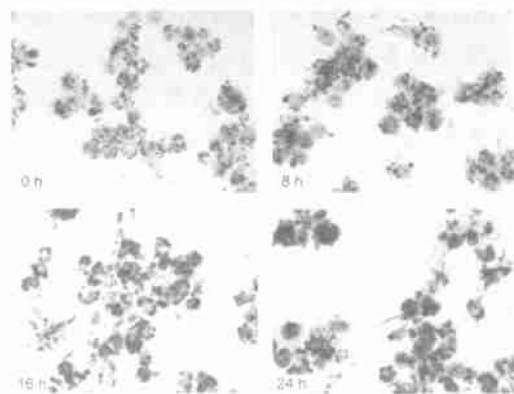


图 2. 4,4'-二异硫氰酸二丙乙烯 2,2'-二磺酸对 THP-1 细胞源泡沫细胞内脂质的影响 $P < 0.05$, 16 h 组、24 h 组与 0 h 组比较。

Figure 2. The effect of DIDS on lipid in THP-1 macrophage-derived foam cell ($\times 400$, $n = 3$)

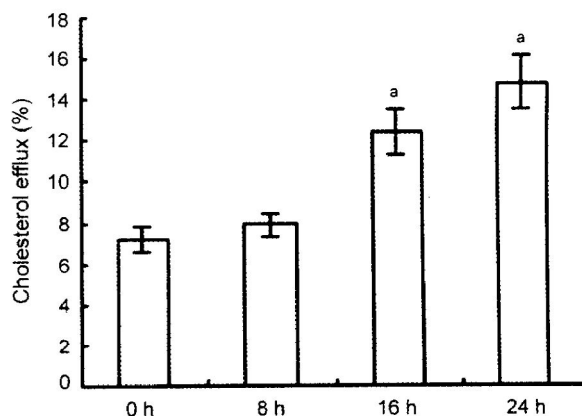


图 3. 22(R)-羟基胆固醇对 THP-1 细胞源泡沫细胞胆固醇流出的影响 $P < 0.05$, 与 0 h 组比较。

Figure 3. The effect of 22(R)-hydroxycholesterol on cholesterol efflux in THP-1 macrophage-derived foam cell ($n = 3$)

2.5 4,4'-二异硫氰酸二丙乙烯 2,2'-二磺酸对 THP-1 细胞源泡沫细胞胆固醇流出的影响

用 50 mg/L 氧化型低密度脂蛋白孵育 THP-1 细胞 48 h, 0.4 mmol/L DIDS 孵育细胞, 测量 THP-1 细胞源泡沫细胞胆固醇流出。实验结果显示, DIDS 对 THP-1 细胞源泡沫细胞胆固醇流出的影响依时间不同而有所不同。在 0、8、16、24 h 时胆固醇流出分别

为 8.5%、7.8%、6.2%、4.3% (图 4, Figure 4)。16 h、24 h 时分别与 0 h 时比较, 胆固醇流出明显减少 ($P < 0.05$)。

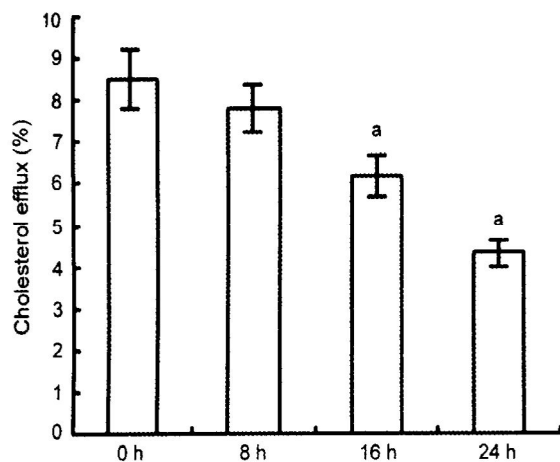


图 4. 4,4-二异硫氰酸二丙乙烯 2,2-二磺酸对 THP-1 细胞源泡沫细胞胆固醇流出的影响 a: $P < 0.05$, 与 0 h 组比较。

Figure 4. The effect of DIDS on cholesterol efflux in THP-1 macrophage-derived foam cell ($n = 3$)

2.6 22(R)-羟基胆固醇对 THP-1 细胞源泡沫细胞三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 表达的影响

THP-1 细胞源泡沫细胞暴露于 22(R)-羟基胆固醇 (10 $\mu\text{mol/L}$) 不同时间后, 流式细胞仪检测 ABCA1 表达的平均荧光强度。结果显示, 22(R)-羟基胆固醇对 THP-1 细胞源泡沫细胞 ABCA1 表达的影响依时间不同而有所不同。在 0、8、16、24 h 时平均荧光强度分别为 31.1、31.6、38.4、45.2 (图 5, Figure 5)。16 h、24 h 时分别与 0 h 时比较, 平均荧光强度明显增强 ($P < 0.05$)。

2.7 4,4-二异硫氰酸二丙乙烯 2,2-二磺酸对 THP-1 细胞源泡沫细胞三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 表达的影响

THP-1 细胞源泡沫细胞暴露于 DIDS (0.4 mmol/L) 不同时间后, 流式细胞仪检测 ABCA1 表达的平均荧光强度。结果显示, DIDS 对 THP-1 细胞源泡沫细胞 ABCA1 表达的影响依时间不同而有所不同。在 0、8、16、24 h 时平均荧光强度分别为 29.4、28.1、22.9、10.4 (图 6, Figure 6)。16 h、24 h 时分别与 0 h 时比较, 平均荧光强度明显减弱 ($P < 0.05$)。

3 讨论

在肝、肾、肾上腺、肠等都有 ABCA1 mRNA 表达, 在动脉粥样硬化病变处, 巨噬细胞源性泡沫细胞也有大量的 ABCA1 mRNA 表达^[7]。虽然巨噬细胞

中的 ABCA1 mRNA 和蛋白质的基础水平较低, 但两者都可由胆固醇负荷诱导产生^[8]。胆固醇诱导 ABCA1 产生的机制涉及到肝 X 受体/类视黄醛受体 (LXR/RXR) 转录因子, 肝 X 受体/类视黄醛受体作用

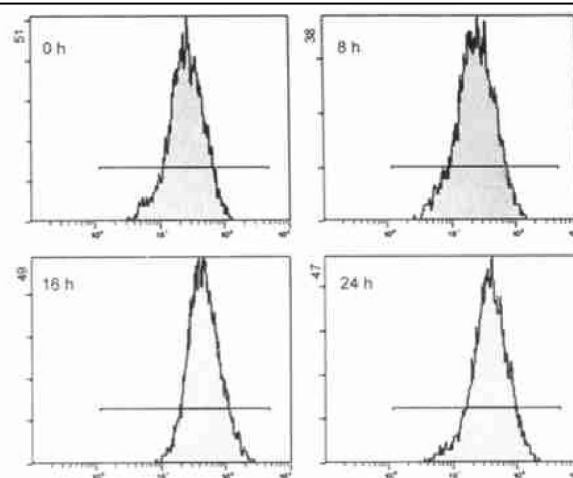


图 5. 22(R)-羟基胆固醇对 THP-1 细胞源泡沫细胞 ABCA1 表达的影响 $P < 0.05$, 16 h 组、24 h 组与 0 h 组比较。

Figure 5. ABCA1 expression in THP-1 macrophage-derived foam cell increased by 22(R)-hydroxycholesterol ($n = 3$)

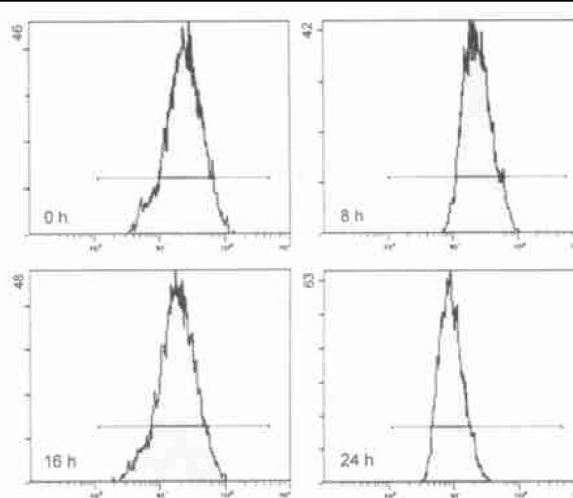


图 6. 4,4-二异硫氰酸二丙乙烯 2,2-二磺酸抑制 THP-1 细胞源泡沫细胞 ABCA1 的表达 $P < 0.05$, 16 h 组、24 h 组与 0 h 组比较。

Figure 6. ABCA1 expression in THP-1 macrophage-derived foam cell inhibited by DIDS ($n = 3$)

于 ABCA1 基因近端起动子的 DR4 位点而起动 ABCA1 的表达。ABCA1 是肝 X 受体/类视黄醛受体靶基因之一。肝 X 受体/类视黄醛受体可调节胆固醇转运、胆固醇分泌及脂肪酸的生物合成; 肝 X 受体/类视黄醛受体转录因子可调控巨噬细胞胆固醇流出、胆固醇转运、胆固醇转变成胆汁酸以及使胆固醇分泌等基因。因此, 肝 X 受体/类视黄醛受体的一些

小分子激动剂可影响体内胆固醇的平衡。也有证据显示 ABCA1 在转录水平后被调节,多聚不饱和脂肪酸除了作为刺激肝 X 受体基因表达抑制剂外,它也减少细胞表面 ABCA1 蛋白质的表达^[9,10]。糖尿病时游离脂肪酸水平升高,这表明细胞内胆固醇流出可能存在缺陷。

由于流式细胞技术能较敏感地从单个细胞水平定量或半定量检测细胞蛋白,因此,实验采用流式细胞检测的方法来判断 ABCA1 激动剂 22(R)-羟基胆固醇和抑制剂 DIDS 对 THP-1 细胞源泡沫细胞 ABCA1 表达的影响。实验结果显示,22(R)-羟基胆固醇作用 THP-1 细胞源泡沫细胞不同时间后,能明显增加细胞 ABCA1 的蛋白表达,流式细胞检测 ABCA1 表达的平均荧光强度从 0 h 时的 31.1 增加到 24 h 时的 45.2;而 DIDS 作用 THP-1 细胞源泡沫细胞不同时间后,能明显降低细胞 ABCA1 的蛋白表达,平均荧光强度从 0 h 时的 29.4 降低到 24 h 时的 10.4。另用胆固醇流出实验检测胆固醇流出量和油红 O 染色方法检测细胞内脂质情况,结果显示 22(R)-羟基胆固醇作用 THP-1 细胞源泡沫细胞不同时间后,能明显增加细胞胆固醇流出,细胞内脂质明显减少;而 DIDS 作用 THP-1 细胞源泡沫细胞不同时间后,能明显降低细胞胆固醇流出,细胞内脂质明显增加。以上结果说明,只要 ABCA1 表达上调,细胞内胆固醇流出就会增加,最后导致细胞内脂质减少,这意味

着 ABCA1 在 THP-1 细胞源泡沫细胞胆固醇流出中起着重要的作用,也为开发和寻找抗动脉粥样硬化药物提供了新的策略。

[参考文献]

- [1] 许竹梅,赵永平. ATP 结合盒转运子调节细胞内胆固醇流出及对动脉粥样硬化的影响. 中国动脉硬化杂志, 2002, 10 (5): 449-451
- [2] 袁中华,杨永宗,杨小毅,谭健苗,万载阳. 消斑肽加速氧化低密度脂蛋白诱导的血管平滑肌细胞凋亡. 中国病理生理杂志, 2001, 17 (10): 935-937
- [3] Guorong Lin, Bornfeldt KE. Cyclic AMP-specific phosphodiesterase 4 inhibitors promote ABCA1 expression and cholesterol efflux. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 2002, 290: 663-669
- [4] Wada Y, Sugiyama A, Yamamoto T, Naito M, Noguchi N, Yokoyama S, et al. Lipid accumulation in smooth muscle cells under LDL loading is independent of LDL receptor pathway and enhanced by hypoxic conditions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, 22 (10): 1712-1719
- [5] 王佐,李全忠,杨向东,肖尚志,杨永宗. 高效液相色谱分析氧化型低密度脂蛋白处理的 U937 细胞内胆固醇及胆固醇酯. 中国动脉硬化杂志, 1998, 6 (4): 317-320
- [6] 佐连富. 流式细胞仪样品制备技术. 北京: 华夏出版社, 1991; 145-146
- [7] 唐朝克,杨永宗. ABCA1 在动脉粥样硬化发生与发展中的作用. 生命的化学, 2003, 23 (2): 138-140
- [8] Langmann T, Klucken J, Reil M. Molecular cloning of the human ATP binding cassette transporter-1 (ABCT-1): evidence for sterol-dependent regulation in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 257 (1): 29-33
- [9] Ou J, Tu H, Shan B, Luk A, Debose-Boyd RA, Bashmakov Y, et al. Unsaturated fatty acids inhibit transcription of the sterol regulatory element-binding protein 1c (SREBP-1c) gene by antagonizing ligand-dependent activation of the LXR. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98 (11): 6027-6032
- [10] Wang Y, Oram JF. Unsaturated fatty acids inhibit cholesterol efflux from macrophages by increasing degradation of ATP binding cassette transporter A1. *J Biol Chem*, 2002, 277 (7): 5692-697

(此文编辑 曾学清)

•读者•作者•编者•

投稿须知: 关于参考文献的著录

本刊按照顺序编码制来著录参考文献。

1. 列入参考文献的必须是作者亲自阅读过的近 3 年内的原创研究论文文献(或称一次文献,主要为发表在具有标准刊号的期刊上的研究论文)。译文、转载、综述、教科书、内部刊物和非正式出版的会议资料等均不得引用,引用的文献应严格按照在文稿中出现的先后次序用方括号右上角标注排序,如^[1,2]、^[3,4]等;按顺序著录于文末。

2. 文末著录参考文献,应按照国家标准执行,格式如下所述。

期刊:

[序号] 作者. 文题. 刊名, 年, 卷(期): 起页—止页

专著:

[序号] 著者. 书名. 版次(第一版可省略), 出版地: 出版者, 出版年; 起页—止页

专著中析出的文献和公开出版的论文集:

[序号] 作者. 文题. 见(In): 编者. 书名. 版次(第一版可省略), 出版地: 出版者, 出版年, 起页—止页

专利文献:

[序号] 所有者. 题名. 专利国别. 专利号. 出版年月日

3. 文末著录参考文献应注意: 作者为 6 位内, 全部列出, 其间加“,”; 多于 6 位的, 只写前 6 位, 后加“等”或“et al”。④专著的第一版不列出, 若有多个出版地的, 只写主要的。⑤对所引用的文献, 若只阅读过摘要写页码时只写摘要所在页码; 若阅读过全文, 就应写出起页—止页。