

乳腺癌外周血标记物 NPY1R 的检测及临床意义*

刘 镭^① 潘理会^① 黄 亮^② 黄 旭^② 程露阳^① 肖丽君^① 徐大为^①

摘要 目的: 鉴定一种新的检测乳腺癌循环癌细胞的肿瘤标记物 NPY1R (neuropeptide Y receptor Y1)。探讨 NPY1R 在乳腺癌外周血中的表达水平及其与临床病理学特征的关系。**方法:** 通过肿瘤基因组解剖计划 (cancer genome anatomy project, CGAP) 数据库的数字基因表达演示工具 (digital gene expression display, DGED), 发现了一种新的乳腺癌外周血标记物 NPY1R。采用实时半定量巢式 PCR 技术, 检测了 142 例乳腺癌和 60 例正常人外周血中 NPY1R 的表达水平, 并进一步分析了 NPY1R 表达与乳腺癌临床病理特征的相关性。对 131 例患者随访 38 个月, 观察 NPY1R 的表达对乳腺癌患者生存时间的影响。**结果:** 证实 NPY1R 在 142 例乳腺癌外周血中的表达水平明显高于正常组 ($P < 0.01$)。并且, NPY1R 在外周血中的表达水平与临床分期、淋巴结转移和 ER、PR、HER2 具有相关性 ($P < 0.05$)。131 例随访患者中, NPY1R 表达阳性组的生存率显著低于阴性组 ($P < 0.01$)。**结论:** NPY1R 是外周血循环癌细胞一种新的肿瘤标记物, 可作为判断乳腺癌转移和预后的评估指标。

关键词 乳腺癌 NPY1R 肿瘤标记物 循环癌细胞

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2013.05.006

Detection and clinical significance of the peripheral blood tumor marker NPY1R for circulating breast cancer cells

Lei LIU¹, Lihui PAN¹, Liang HUANG², Xu HUANG², Luyang CHENG¹, Lijun XIAO¹, Dawei XU¹

Correspondence to: Lei LIU; Email: liuliu_64@163.com

¹Department of Basic Medicine, Chengde Medical College and ²The Affiliated Hospital of Chengde Medical College, Chengde 067000, China

This study was supported by grants from the Hebei Provincial Population and Family Planning Commission (No. 2009-B21) and the Hebei Provincial Bureau of Health (No. 20090579)

Abstract Objective: This study aimed to evaluate a new tumor marker, NPY1R, for the detection of circulating breast cancer cells and to investigate the relationship between NPY1R expression and the clinicopathological features of breast cancer patients. **Methods:** The marker NPY1R, which could detect circulating cancer cells, was identified by the Digital Gene Expression Display tool of the Cancer Genome Anatomy Project. The expression levels of NPY1R in 142 breast cancer patients and 60 healthy volunteers were determined using the real-time semi-quantitative nested polymerase chain reaction. The correlation between NPY1R expression and the clinicopathological features of the patients was then analyzed. A follow-up study was performed with 131 breast cancer patients for 38 months to observe the effect of NPY1R expression on the survival of breast cancer patients. **Results:** NPY1R was highly expressed in the cancer patients as compared with the normal controls ($P < 0.01$). The high-level expression of NPY1R was positively correlated with the clinical stages and lymph node metastasis as well as the status of the estrogen and progesterone receptors ($P < 0.05$). Breast cancer patients with circulating cancer cells that expressed NPY1R had shorter tumor-specific survival as compared with those without NPY1R expression ($P < 0.01$). **Conclusion:** NPY1R may serve as a useful marker to predict cancer metastasis and to evaluate the prognosis of breast cancer patients.

Keywords: breast cancer, NPY1R, tumor marker, circulating cancer cells

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一, 治疗失败的主要原因是具有转移潜能的肿瘤细胞在术前或术中脱离原发灶随血行转移。微转移是一个独立的预后指标, 其价值优于肿瘤的分级和分期。因此, 及时发现肿瘤的血行微转移, 对减少日后转移性肿瘤的发生, 改善预后, 提高生存率, 具有重要的意义。

神经肽 Y (NPY) 主要在大脑和外周神经发挥调节作用, 其受体包括 6 种亚型。使用体外受体放射自显影技术, 发现 Y1 和 Y2 受体在乳腺癌、肾上腺肿瘤、肾细胞癌、卵巢癌等多种肿瘤的细胞和血管中高表达。瘤神经纤维或肿瘤细胞本身释放的内源性 NPY 可激活 NPY 受体, 并介导肿瘤细胞增殖和血液供

作者单位: ①承德医学院基础医学部 (河北省承德市 067000); ②承德医学院附属医院

*本文课题受河北省人口与计划生育委员会科研计划 (编号: 2009-B21) 和河北省卫生厅医学科学研究重点计划 (编号: 20090579) 资助

通信作者: 刘镭 liuliu_64@163.com

应。本研究通过肿瘤基因组解剖计划(CGAP)SAGE (Serial Analysis of Gene Expression) 数据库发现 NPY1R 基因在乳腺癌外周血中高表达。以该基因作为分子标记物,测定了乳腺癌患者外周血的微转移情况,并进一步分析了其与乳腺癌发生、转移和预后的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

收集2008年11月至2011年12月承德医学院附属医院肿瘤科病历资料完整的乳腺癌外周血标本142例,均为女性,年龄21~82岁,中位年龄为52岁。抽血前均未接受化学治疗和放射治疗。所有患者均经手术治疗证实,手术后均经病理确诊。其中浸润性导管癌98例,单纯癌7例,湿疹样癌5例,髓样癌19例,浸润性小叶癌13例。淋巴结转移阳性84例,淋巴结转移阴性58例。I期和II期乳腺癌患者89例,III期和IV期53例。雌激素受体(ER)阳性82例,阴性60例。孕激素受体(PR)阳性63例,阴性79例。HER2阳性68例,阴性74例。另选取正常捐献者外周血60例,均为女性,年龄22~76岁,中位年龄为49岁,与乳腺癌组比较差异无统计学意义。经胸片和B超检查未发现乳腺相关和其他疾病。

1.2 差异基因的筛选

利用CGAP提供的SAGE Genie数据库(<http://cgap.nci.nih.gov/SAGE>),选取数字基因表达演示(DGED)工具。选择乳腺癌组织和正常白细胞两个池,设置F值为16,即表达差异大于16倍以上,P值设置为0.01。差异表达的基因按差异显著性高低排序,比对出在短序列标签文库和长序列标签文库中均出现的差异基因,作为候选基因。

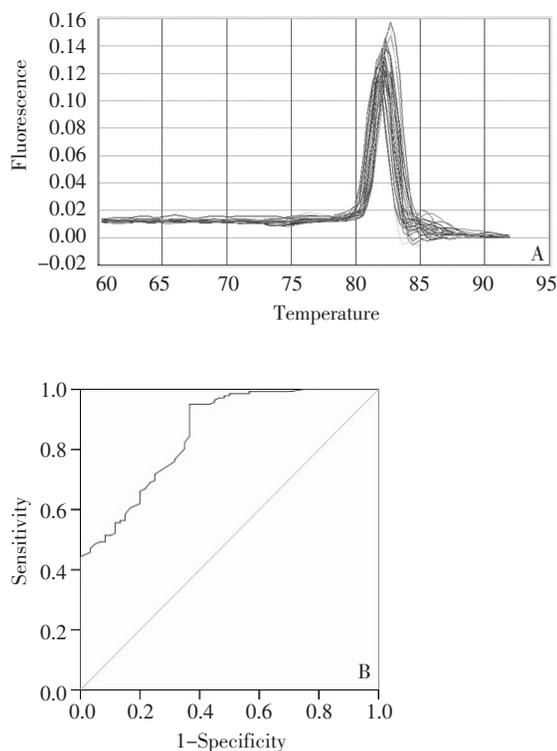
1.3 总RNA提取和cDNA合成

将3~5 mL外周血置于淋巴细胞分离液上,密度梯度离心法分离单个核淋巴细胞。细胞计数后,按 10^6 个/mL在1.5 mL eppendorf管中加入适量Trizol试剂,提取总RNA。分光光度法测定纯度后取5 μ g,按逆转录试剂盒(QIAGEN)操作步骤进行逆转录获得cDNA。

1.4 实时半定量巢式PCR方法检测外周血癌细胞

第一轮PCR反应体系包括:2.5 μ L外周血的cDNA模板,0.2 μ mol/L 外侧引物(上游序列为:5'-TATACC ACTCTTCTCTTGGTGCTG-3';下游序列为:5'-CTGG AAGTTTTTGTTCAGGAACCCA-3'),0.2 mM dNTP,50 mM Tris-HCl (pH 8.3),10 mM KCl,5 mM (NH₄)₂SO₄,2 mM MgCl₂,0.75 U of Taq polymerase,总体积为25 μ L。反应条件为:94 $^{\circ}$ C变性20 s,退火温度为62 $^{\circ}$ C,72 $^{\circ}$ C延伸40 s,35个循环后,再72 $^{\circ}$ C延伸10 min。

取2 μ L第一轮PCR的产物作为第二轮的模板,20 μ L PCR反应体系还包括:0.25 μ mol/L 内侧引物(上游序列为:5'-ATCTGCCCTTGGCCATGAT-3';下游序列为:5'-AGGCCAGGTTTCCAGAGACA-3'),SYBR Green PCR master mix(上海基康生物技术有限公司)。反应条件:94 $^{\circ}$ C变性4 min,94 $^{\circ}$ C 15 s,58 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 35 s,共40个循环扩增。溶解曲线见图1A。GAPDH为内参照,每个样本的每个待测项目均测3次,取平均值。记录各样品的Ct值,并计算各组目的基因的相对表达量。计算公式: $\Delta Ct^{NPY1R} = Ct^{NPY1R} - Ct^{GAPDH}$; $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct^{肿瘤} - \Delta Ct^{正常人}$ 平均值;目的基因的相对量Q为 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。根据肿瘤组和正常组 ΔCt 值绘制ROC曲线(图1B),本研究将特异性为100%时的 ΔCt 值(-2.75)作为界限值。



A: Dissociation curve; B: receiver operating characteristic (ROC) curve of NPY1R

图1 肿瘤标志物NPY1R检测的准确性

Figure 1 Detection accuracy of tumor marker NPY1R

1.5 随访

随访主要通过电话、查阅门诊复诊病历、上门随访等方式进行。随访从确诊之日开始,每3个月1次,直至2011年12月或患者死亡及失访,进行随访患者共131例,随访率为92.3%。患者生存时间为确诊乳腺癌之日起至患者死于乳腺癌或随访截止时间。

1.6 统计学方法

采用SPSS 13.0统计软件包进行统计分析。乳腺

癌病例对照的比较采用 t 检验, 病例按临床病理特征分组后不同组的比较采用方差分析。Kaplan-Meier 绘制生存曲线, Log-rank 计算评价 NPY1R 阴性、阳性组生存时间的差异。

2 结果

2.1 乳腺癌外周血高表达基因 NPY1R 的鉴定

在 SAGE 文库中, 比对出在 10bp 的短标签文库 (short tags) 和 17 bp 的长标签文库 (long tags) 中共同出现的基因, 最终筛选出 23 个在乳腺癌中高表达的基因。其中 NPY1R 高度差异表达, 并经 RT-PCR 验证其在 10 例乳腺癌外周血标本中有 5 例表达, 而 10 例正常人外周血中无一例表达, 可作为外周血检测乳腺癌的标记物。

2.2 乳腺癌外周血 NPY1R 的表达水平

实时半定量巢式 PCR 检测外周血 NPY1R mRNA 表达水平, 测得乳腺癌组患者 $^{-\Delta}Ct$ 值为 -3.93 ± 2.5 , 显著高于正常组 (-8.21 ± 2.9) ($P < 0.01$, 图 2)。乳腺癌患者 NPY1R mRNA 相对表达量为 55.54 ± 27.3 。根据界限值 ($^{-\Delta}Ct$ 值为 -2.75), 得到 NPY1R 在乳腺癌中的阳性表达率为 44.4% (63/142)。

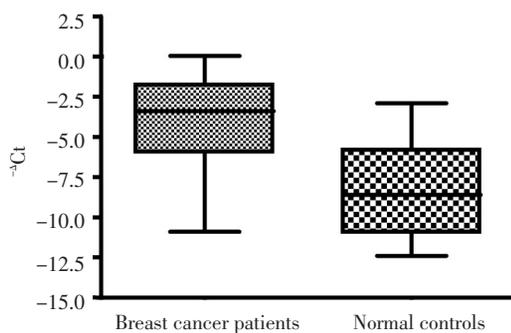


图2 NPY1R在乳腺癌和正常组外周血中的表达比较
Figure 2 Comparison of NPY1R expression in the peripheral blood between breast cancer patients and normal controls

2.3 NPY1R表达与临床病理特征的关系

外周血肿瘤标记物 NPY1R 表达与临床分期 ($P < 0.001$)、淋巴结转移 ($P = 0.001$) 和 ER ($P = 0.001$)、PR ($P = 0.037$)、HER2 ($P = 0.001$) 相关。而与年龄、病理类型和肿瘤大小无相关性 (P 均 > 0.05 , 表 1)。

2.4 NPY1R表达与乳腺癌患者术后生存率的关系

本组对 131 例乳腺癌患者共随访 38 个月, 死亡 51 例 (38.9%), 生存 80 例 (61.1%), 其中无复发生存 46 例 (35.1%)。肿瘤标记物 NPY1R 表达阳性组死亡 34 例 (56.7%), 阴性组死亡 17 例 (23.9%)。NPY1R 表达阳性组和阴性组的生存率分别为 43.3% (26/60) 和 76.1% (54/71), 差异有统计学意义 ($P < 0.01$, 图 3)。

表1 乳腺癌外周血 NPY1R 表达水平与临床病理特征的关系 $\bar{x} \pm s$

Table 1 Relationship between the expression of NPY1R in peripheral blood and the clinical pathologic features of breast patients $\bar{x} \pm s$

Clinicopathologic features	<i>n</i>	Relative amount of NPY1R expression ($^{-\Delta}Ct$)	<i>P</i>
Age (years)			
<50	56	-2.51 ± 0.23	0.350
≥ 50	86	-2.23 ± 1.07	
Pathology			
Invasive ductal carcinoma	98	-2.25 ± 0.85	0.952
Simple cancer	7	-2.42 ± 1.27	
Eczematous carcinoma	5	-2.48 ± 1.34	
Medullary carcinoma	19	-2.56 ± 1.22	
Invasive lobular carcinoma	13	-2.51 ± 1.08	
Tumor size (cm)			
≤ 2	75	-2.69 ± 1.41	0.055
> 2	67	-2.12 ± 0.48	
Clinical stages			
I, II	89	-3.11 ± 1.62	< 0.001
III, IV	53	-1.72 ± 0.91	
Lymph node metastasis			
Yes	84	-2.04 ± 1.39	0.001
No	58	-3.17 ± 1.49	
ER			
+	82	-1.96 ± 1.28	0.001
-	60	-2.88 ± 1.12	
PR			
+	63	-2.17 ± 1.27	0.037
-	79	-2.80 ± 1.34	
HER2			
+	68	-1.86 ± 0.87	0.001
-	74	-2.96 ± 1.07	

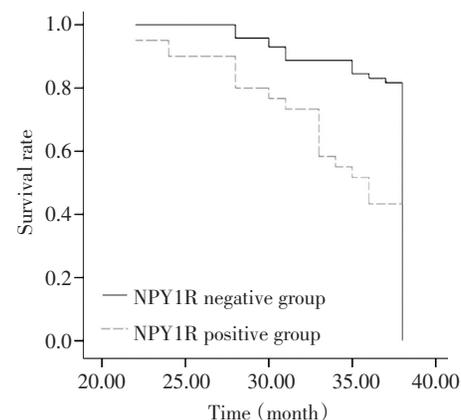


图3 NPY1R阴性组与阳性组生存曲线
Figure 3 Kaplan-Meier survival analyses of breast cancer patients with positive or negative NPY1R expression

2.5 NPY1R 基因表达与乳腺癌 HER2 表达状态的分层分析

NPY1R 阳性组和阴性组按照 HER2 的表达状态进行分层分析,分为 HER2 阳性组和 HER2 阴性组,两组的生存情况见表 2。经 χ^2 检验, NPY1R 阳性组 $\chi^2=4.85$, OR=3.27, OR(95% CI) 为 1.140~9.38; NPY1R 阴性组 $\chi^2=14.73$, OR=11.08, OR(95% CI) 为 3.25~37.77, 结果说明, NPY1R 阳性组和阴性组中, 死亡率均与 HER2 阳性表达有关联。经 Mantel-Haenszel χ^2 检验, $\chi^2_{M-H}=11.48$, $P<0.01$, 调整 ORM-H=4.29 (95% CI 为 1.85~9.95), 表明 HER2 表达与患者生存相关, 是影响死亡率的危险因素。

表 2 HER2 表达状态分层分析结果 例

Table 2 Stratified analysis based on the expression of HER2

Group	HER2 ⁺		Totals	HER2 ⁻		Totals
	NPY1R positive	NPY1R negative		NPY1R positive	NPY1R negative	
Deaths tolls	24	14	38	10	3	13
Survivals	11	16	27	15	38	53
Totals	35	30	65	25	41	66

3 讨论

及时发现肿瘤的血行播散并给予有效治疗,将有助于杀灭血中播散的肿瘤细胞,减少日后转移性肿瘤的发生,改善预后,提高生存率^[1]。但由于播散到外周血中的实体肿瘤细胞数目非常少,需要高度敏感、特异的技术对其进行检测。本研究采用了实时半定量巢式 PCR 技术^[2],第一轮为普通 PCR 反应,结束后取扩增产物 2 μ L 作为模板加入到第二轮体系中,而第二轮 PCR 则采用荧光定量技术,对扩增产物进行相对的定量检测。这样既保证了检测的敏感性,又兼具有 Real-time PCR 定量的优势。

有效的微转移检测,仅仅敏感的方法还不够,还需要特异性好的标志物基因。由于目前在实体瘤中尚无特异明确的肿瘤标记物,因此,主要采用组织特异 mRNA 转录物为标记物。本研究为了寻找检测乳腺癌外周血循环癌细胞的肿瘤标记物,我们应用生物信息学技术^[3],在 SAGE 文库中选择了乳腺癌组织和正常白细胞两个池。最终筛选出 23 个短序列标签和长序列标签所共同代表的差异基因,然后用 RT-PCR 方法,对其进行验证。选取 10 例乳腺癌和 10 例正常人外周血标本,规定比较理想的肿瘤标记物,最好在 10 例乳腺癌标本中至少有 2 例表达,而在 10 例正常人标本中不多于 2 例表达。研究结果显示在筛选过程中,主要出现以下情况:1)有的肿瘤基因虽然在组织中高表达,但在外周血中检测阳性率非

常低;2)有的肿瘤基因虽然在乳腺癌外周血单个核细胞上高表达,但其在正常人外周血单个核细胞上的表达也较高,因此不能作为诊断的标记物。最后,我们得到了一个在乳腺癌外周血中高表达的新的肿瘤标记物基因 NPY1R。本研究结果也进一步证实了生物信息学分析的可靠性。

神经肽 Y(NPY)在中枢神经系统中除具有调节下丘脑激素的合成和释放功能外,还有增加摄食、抑制呼吸、降低血压和调节体温等作用^[4]。在外周 NPY 主要存在于交感神经末梢,对心血管系统发挥重要的调节作用。此外,研究证实垂体前、后叶均含有 NPY 的表达。有研究^[5]认为垂体前叶中 NPY 主要由下丘脑合成,通过垂体门脉系统到达垂体,参与调控垂体激素的合成和分泌,包括促性腺激素(FSH/LH)、生长激素(GH)和泌乳素(PRL)等。最近的研究表明, NPY 及其受体参与很多肿瘤的发生发展过程。有研究报道 NPY1 受体在尤文肉瘤中高表达,阳性率高达 84%,平均密度为 5 314 DPM/mg 组织。同样,滑膜肉瘤也表现为高密度 Y1 表达(平均 7 497 DPM/mg; 发病率 40%)。此外, NPY1R 原位杂交显影结果证实许多肉瘤血管中高表达 Y1 受体^[6-7]。Ruscica 等^[8]的结果表明神经肽 Y 可直接通过 Y1 受体调节前列腺细胞生长。这种效应的方向似乎与 MAPK 激活的时间动力学以及其他细胞内的信号克隆的参与相关。NPY 相关的机制可能在前列腺癌的进展中发挥了相应的作用,包括雄激素依赖和独立的阶段。另外,在神经母细胞瘤和肾上腺肿瘤中也发现了 NPY 受体的异常表达,提示 NPY 及其受体在这些肿瘤的发生中也参与了调节作用^[9]。

有研究^[10]证实,85%的原发性乳腺癌表达 Y1 亚型受体,而正常乳腺组织则表达 Y2 亚型。Y1 受体在乳腺癌中高发生率的原因至今还不清楚。最近有研究提出^[11],神经肽 Y 能够刺激血管内皮生长因子的产生和分泌进而促进乳腺癌血管的生成。Y1R 是第一个被克隆鉴定的 NPY 受体。雌激素和 NPY 及其受体之间的关系能够解释雌、孕激素与 NPY 水平增加的协同作用和促黄体酮激素的增加。逆转录 PCR 实验证实,经雌激素处理的大鼠的下丘脑 Y1R mRNA 水平增加。Amlal 等^[12]提出 Y1R 的诱导产生受到雌激素信号转导通路的调节,其通过研究雌激素受体阳性的人类乳腺癌细胞系 MCF-7,检测雌激素作用下 Y1R 受体的表达和信号通路,发现 MCF-7 表达高亲和力的 NPY 受体, NPY 抑制 cAMP 的积累以及动员细胞内的钙离子。结果证实,雌激素在 Y1R 上调中起重要作用,反之其同样调节了雌激素诱导的乳腺癌细胞的增殖。本研究中也发现乳腺癌外周血 NPY1R

的表达水平与雌激素和孕激素相关,雌、孕激素阳性患者 NPY1R 基因的表达水平明显高于雌、孕激素阴性的患者。结果也提示, NPY1R 在乳腺癌中可能是通过雌激素、孕激素介导的信号传导通路而发挥作用的,其具体机制有待进一步探讨。

本研究还根据 HER2 表达状况对 NPY1R 阳性和阴性组患者的预后进行了分层分析。结果表明 HER2 表达与患者死亡有关联,是影响死亡率的危险因素。过去的研究也证实,原癌基因 HER2 多拷贝的性质而导致肿瘤易复发和临床预后较差。HER2 基因扩增是引起 HER2 蛋白增加的最常见机制,可导致肿瘤细胞的形成。在 20% ~ 30% 乳腺癌中可检测到 HER2 基因扩增,对进展期乳腺癌常规治疗方法疗效甚微。许多临床研究对 HER2 和乳腺癌预后之间的关系进行了探讨^[13],表明 HER-2 阳性可作为多变量分析中的一个独立的预后指标。HER-2/neu 扩增/过表达的乳腺癌的特点表现为病情进展迅速、局部复发的危险性高、化疗缓解期短,无瘤生存期(DFS)和总生存期(OS)缩短。但是有关 NPY1R 的表达是否与 HER2 具有相关性还有待进一步研究。

参考文献

- Rahbari NN, Bork U, Mutschall E, et al. Molecular detection of tumor cells in regional lymph nodes is associated with disease recurrence and poor survival in node-negative colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis[J]. J Clin Oncol, 2012, 30(1): 60-70.
- Liu L, Liao GQ, He P, et al. Detection of circulating cancer cells in lung cancer patients with a panel of marker genes[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 372(4):756-760.
- Kavak E, Unlü M, Nistér M, et al. Meta-analysis of cancer gene expression signatures reveals new cancer genes, SAGE tags and tumor associated regions of co-regulation[J]. Nucleic Acids Res, 2010, 38(20):7008-7021.
- Higuchi H. Molecular analysis of central feeding regulation by neuropeptide Y (NPY) neurons with NPY receptor small interfering RNAs (siRNAs)[J]. Neurochem Int, 2012, 61(6):936-941.
- Kiyokawa M, Matsuzaki T, Iwasa T, et al. Neuropeptide Y mediates orexin A-mediated suppression of pulsatile gonadotropin-releasing hormone secretion in ovariectomized rats[J]. J Med Invest, 2011, 58(1-2):11-18.
- Körner M, Waser B, Reubi JC. High expression of neuropeptide Y1 receptors in ewing sarcoma tumors[J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(16):5043-5049.
- Lu C, Tilan JU, Everhart L, et al. Dipeptidyl peptidases as survival factors in Ewing sarcoma family of tumors: implications for tumor biology and therapy[J]. J Biol Chem, 2011, 286(31):27494-27505.
- Ruscica M, Dozio E, Boghossian S, et al. Activation of the Y1 receptor by neuropeptide Y regulates the growth of prostate cancer cells[J]. Endocrinology, 2006, 147(3):1466-1473.
- Körner M, Waser B, Reubi JC. High expression of neuropeptide Y receptors in tumors of the human adrenal gland and extra-adrenal paraganglia[J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(24):8426-8433.
- Reubi JC, Gugger M, Waser B, et al. Y(1)-mediated effect of neuropeptide Y in cancer: breast carcinomas as targets[J]. Cancer Res, 2001, 61(11):4636-4641.
- Sheriff S, Ali M, Yahya A, et al. Neuropeptide Y Y5 receptor promotes cell growth through extracellular signal-regulated kinase signaling and cyclic AMP inhibition in a human breast cancer cell line[J]. Mol Cancer Res, 2010, 8(4):604-614.
- Amlal H, Faroqui S, Balasubramanian A, et al. Estrogen up-regulates neuropeptide Y Y1 receptor expression in a human breast cancer cell line[J]. Cancer Res, 2006, 66(7):3706-3714.
- Lennon S, Barton C, Banken L, et al. Utility of serum HER2 extracellular domain assessment in clinical decision making: pooled analysis of four trials of trastuzumab in metastatic breast cancer[J]. J Clin Oncol, 2009, 27(10):1685-1693.

(2012-05-26 收稿)

(2012-08-16 修回)

(本文编辑:邢颖)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

摘要撰写规范

摘要是对论文内容不加注释与评论的简短陈述,要求扼要地说明研究工作的目的、方法、结果和结论,是一篇具有独立性与完整性的短文,可以引用、推广。摘要一般在论文完稿后撰写。为了便于交流,还应有英文摘要。中文编排在前面,英文在后。中文摘要前面以“摘要”或“[摘要]”作为标识;英文摘要前面以“Abstract”作为标识。英文摘要的内容应与中文摘要相对应。

本刊要求中文摘要 250 ~ 300 字,英文摘要 250 ~ 300 单词。撰写摘要注意事项:1)不得简单重复题名中已有信息,勿把引言内容写入摘要,勿照搬论文正文中的小标题(目录)或论文结论。摘要内容必须完整。2)摘要一般不分段,陈述应客观,对研究过程、方法和结果等不宜作主观评价。3)英文摘要时态常用一般现在时或一般过去时,语言应凝练流畅。