

科学研究的设计和方法中的科学性

成 军

成军, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039
成军, 男, 1963-08-17生, 山东省淄博市人, 汉族. 博士, 教授, 主任医师, 博士生导师. 1986年毕业于第一军医大学军医系, 获医学学士学位. 1989年毕业于军医进修学院, 获传染病学硕士学位. 1994年毕业于北京医科大学, 获传染病学博士学位. 1994-11-17/1997-12-01在美国得克萨斯大学健康科学中心临床免疫与传染病学完成博士后研究. 回国后从事传染病特别是病毒性肝炎的临床工作和基础研究, 主要学术研究方向是肝炎病毒与肝细胞相互作用的分子生物学机制. 出版专著5部, 发表论文及综述300篇. 现任中华医学会传染病与寄生虫病学分会副主任委员、中华医学会热带病与寄生虫病学分会常委、解放军医学会传染病专业委员会委员, 《中华传染病杂志》副主编、《胃肠病学和肝病杂志》副主编、《传染病信息》杂志副主编、《热带病与寄生虫病杂志》副主编、《中华肝脏病杂志》、《世界华人消化杂志》编委等.
国家自然科学基金攻关项目, No.C03011402, No.C30070689
军队“九、五”科技攻关项目, No.98D063
军队回国留学人员启动基金项目, No.98H038
军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No.01Q138
军队“十、五”科技攻关面上项目, No.01MB135
项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路100号, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室. cj@genetherapy.com.cn
电话: 010-66933391 传真: 010-63801283
收稿日期: 2003-12-10 接受日期: 2004-04-16

摘要

生物学和医学的研究发展很快, 不断有新的理论和技术出现, 推动着生物学和医学领域的不断发展. 现代分子生物学技术和理论为肝脏病学研究提供了前所未有的机遇. 由于发展不平衡, 对于新理论和新技术的接受程度和推广还有一段艰难的过程. 在这一过程中, 不可避免地存在一些认识上的误差和偏差. 因此本文选取3个有代表性的例子, 阐明科学研究的设计和方法中的科学性.

成军. 科学研究的设计和方法中的科学性. 世界华人消化杂志 2004;12(7): 1513-1516

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1513.asp>

0 引言

我作为几家杂志的编委, 经常会审阅来自不同单位的稿件, 在审阅过程中发现了一些问题. 本文的目的是提出一些问题, 供编者、读者作为参考, 共同提高我们科研设计的水平和学术论文的质量. 关于正确理解现代分子生物学理论和技术在生物医学研究领域中的应用, 有许多鲜明的例子, 本文主要选取3个有代表性的例子, 说明在科研设计和学术论文鉴赏过程中常见的误区.

1 研究基因转录水平主要考虑的是启动子的转录活性在审稿过程中, 我接到一篇研究核苷类似物拉米夫定(lamivudine)抑制乙型肝炎病毒(HBV)X基因的研究报道. 基本的研究方法和过程如下: 首先利用分子生物学技

术, 构建HBV X基因的真核表达载体, 如具有巨细胞病毒(CMV)早期即刻基因启动子的pcDNA3, 然后用这一载体转染肝母细胞瘤细胞系HepG2, 建立稳定转染细胞系, 在细胞系的培养上清中加入拉米夫定, 利用半定量的逆转录多聚酶链反应(RT-PCR)技术, 检测HBV X基因的转录物水平, 并进行半定量分析, 结果证明HBV X基因的转录物水平有显著降低, 结论是拉米夫定对于HBV X基因的转录具有显著的抑制作用. 这一篇文章的设计存在严重的问题, 对于分子生物学的基本原理的理解有偏差, 是不能发表的.

首先我们必须明白, 基因的转录调节是在基因启动子指导下进行的, 基因转录水平的高低受到许多因素的影响, 但是主要决定于启动子在这一系统中的转录活性, 而与启动子指导的目的基因的性质没有太多的关系^[1-12]. 这样的设计更多的是研究了拉米夫定对于CMV早期即刻基因启动子转录活性的抑制作用, 而与HBV X基因的转录没有关系. 如果本实验的目的基因换成别的什么基因, 所得到的结果也同样不能说明目的基因的变化. 例如这一实验中我们将HBV X基因换成报告基因氯霉素乙酰转移酶(CAT), 那么岂不是可以得出结论拉米夫定可以抑制氯霉素乙酰转移酶的表达了吗? 显然这是不合适的.

关于转录水平的研究, 正确的研究方法设计应该是特定基因的启动子序列与报告基因构件成报告基因表达载体, 转染合适细胞系, 共同转染其他的表达质粒, 或者在细胞培养上清中加入某些药物(如拉米夫定), 以研究基因表达或药物对于该基因转录表达的影响^[13-15]. 要研究什么基因的转录表达, 即选择该基因的启动子基因序列, 而不是选择其编码基因序列. 目前报告基因表达载体的构建与细胞转染模型的建立是研究基因表达调控非常常用和成熟的研究技术和策略, 常用的报告基因包括CAT、 β -半乳糖苷酶(β -gal, β -galactosidase)、萤虫素酶(Luc, luciferase)、和绿色荧光蛋白(GFP, green fluorescence protein)等. 报告基因CAT的检测有酶联免疫黏附法(ELISA)、同位素分析法, β -gal的检测有ELISA法和免疫组织化学染色法, Luc的表达可用化学发光法, 而GFP是惟一可以在活细胞中进行观察的报告基因类型. 以上报告基因类型可以根据具体的研究条件和研究的目的进行选择. 但是, 无论采用的是何种类型的报告基因, 其表达水平并不代表报告基因的调控, 而是代表了报告基因上游的启动子的转录活性水平. 利用报告基因表达载体的研究技

术, 具有很多的优点, 其一可以避开内源和外源基因表达水平的影响. 例如, 研究一种基因的转录水平表达而进行报告基因表达载体的构建和细胞转染, 如果表达产物是基因编码产物本身, 就难以区别内源性基因的编码水平或者是外源转染基因的表达水平. 采用报告基因就可以解决这一问题, 因为采用的报告基因类型是细胞本身不表达的产物, 因此, 对于报告基因编码产物的检测水平可以精确地反映基因启动子的转录活性, 不会受到内源性基因表达产物水平的影响. 第二, 如果研究不同基因启动子的转录活性, 采取本身基因表达产物的检测方法, 必须建立各种基因表达产物的检测方法, 有些基因的表达产物的检测技术还不具备, 或者很难建立, 但是如果采用报告基因的研究策略就很容易解决这一问题, 只要建立稳定的报告基因表达的检测技术就可以应用不同基因启动子转录活性的检测和研究. 这也正是基因转录表达研究策略中非常成熟和公认的做法^[16-18].

2 肝炎病毒准种特点是一个不能忽视的问题

乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒(HCV)存在状态时准种(quasispecies)状态, 这是一个不能忽略的问题^[19-31]. 在研究抗病毒治疗前后的病毒的基因序列改变的研究中尤其要注意病毒基因准种的特点. 例如, 一篇论文研究慢性乙型肝炎的抗病毒治疗前后的病毒基因序列的改变, 治疗前留取患者的血清, 抗病毒治疗后再一次留取血清, 由两份血清提取HBV DNA, 应用聚合酶链反应(PCR)技术进行扩增, 扩增的HBV DNA片段进行克隆化, 各挑取1个克隆进行序列分析, 结果发现2个序列存在差别, 因此就判定抗病毒治疗前后病毒的基因序列发生了改变, 而且认为这种改变与抗病毒治疗的效应有关. 如果慢性乙型肝炎患者抗病毒治疗前后的HBV基因序列始终各自都是均一的病毒基因序列, 或许这种研究方法是可行的, 但是, 事实上HBV基因序列有准种特点, 就是说慢性乙型肝炎患者血清中的病毒, 其基因序列, 不同的病毒株之间十分相似, 但又不同, 这种相似性达到95%以上, 差别占总核苷酸数的5%以下, 这种差别较小, 还不足以分成不同的血清型, 也不足以分成不同的基因型, 但这种差别又是客观存在的. 病毒株之间的差别是一个较为普遍的现象, 甚至在患者的血清中很难找到2株序列完全一致的病毒. 因此, 我们对于HBV在患者血清中的存在状态, 应该是把HBV看成是由不同的基因序列的HBV组成的一个病毒群, 而且随着病毒自身复制过程的变化, 以及机体的免疫力和抗病毒药物应用的情况, 各种病毒在病毒中所占的比例在时时刻刻的变动之中^[32-35]. 因此, 准种概念之所以十分重要, 就是改变了以往人们对于HBV存在状态的看法, 换了一种角度来看HBV的存在状态, 更为客观和准确. 利用准种的观点来看上述研究结果, 就不难看出这种科研设计的局限性. 如果慢

性乙型肝炎患者血清中HBV的拷贝数在 10^{11} 拷贝/mL, 而且各株病毒间的序列都是不同的, 那么在治疗前随机扩增、克隆、测序一个克隆, 仅仅代表的是该病毒株而已, 与其他病毒无关, 没有多少普遍的意义. 如果治疗后, 也是随机挑取一个病毒基因序列进行测定, 也是同样的道理. 但是, 治疗前后研究同一个病毒的可能性只有 $1/10^8$, 换句话说这是不可能的. 因此, 在治疗前后, 根本就是对于2株肯定不一样的病毒基因序列进行比较, 这样的结果与治疗的效应又有何干? 因此, 不能对于治疗前后各1个或少数的病毒基因序列进行测定来研究抗病毒治疗前后病毒基因序列的改变, 这种差别根本就不可能与治疗的效应有关.

类似的例子还有很多. 有些有心人对于血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)正常的HBV无症状携带者(ASC)进行研究, 观察病情变化过程中病毒基因序列的改变. 也是在ALT治疗前获取一个HBV基因克隆进行序列测定, 在治疗后又获取一个克隆进行测序, 并且将ALT正常和ALT升高2个时间点的HBV基因序列进行比较, 并且将这种差别, 解释为HBV感染者从ALT正常状态到ALT升高状态转变过程中的HBV基因序列的变化及其规律, 殊不知2次获得HBV病毒株根本就是不同的病毒, 序列本来就不同, 这样的比较不但没有意义, 还会误导HBV基因序列变化与病情变化之间相关性的研究. 如果将HBV基因准种特点考虑进去, 就不难理解这样的科研设计的局限性, 就可以避免类似的错误或不足之处. 因此, 关于HBV准种研究的结果, 尽管这一概念十分浅显, 容易理解, 但是对于我们认识HBV的存在状态, 进行合理的科研设计, 提高学术论文的鉴赏水平, 都具有十分重要的意义. 同样的道理, 关于HCV和人免疫缺陷病毒-1(HIV-1)的类似研究, 也必须将病毒基因的准种特点考虑进去, 事实上, 关于HBV准种特点的研究就是采用了在HCV、HIV-1的研究中所采用的准种概念.

研究病情变化前后, 或者是研究治疗前后病毒基因序列的改变, 应该将准种特点考虑进去, 因此不能通过单个或少数的几个克隆的序列分析进行判断^[36-38]. 正确的做法是对于病毒的准种群进行研究, 从优势种群的漂变(shift)规律来解释病毒基因序列的改变与病情变化和治疗疗效之间的关系. 由于病毒的准种特点, 由于病毒的基因序列的异质性(heterogeneity)广泛存在, 应用目前少数克隆的序列分析技术是不可能解决的. 近年来基因芯片(DNA chips)这类高通量分析技术的出现为研究这一课题提供了前所未有的机遇. 可以通过基因芯片的高通量研究, 对于HBV基因准种的特点进行研究, 阐明HBV基因的变化与临床病情之间的相互关系、与抗病毒治疗疗效之间的相互关系.

3 结合蛋白和受体的区别

利用配体蛋白分子进行筛选, 一方面可能会得到受体

蛋白分子, 另一方面也会得到蛋白结合蛋白. 如果只是发现一种配体蛋白结合的蛋白, 还不足以肯定这种蛋白就是配体蛋白的受体蛋白分子, 还需要有另外的足够的研究证据, 否则就会不完整, 就会导致错误的结论.

研究蛋白蛋白之间相互结合的技术相当多^[39-51]. 研究细胞内蛋白与蛋白质间的结合与相互作用的技术, 主要有哺乳动物细胞双杂交、活细胞的激光共聚焦显微技术、酵母双杂交技术等; 研究体外蛋白与蛋白之间相互作用的技术包括体外免疫共沉淀技术、放射性配体分析技术、拖拉(pull down)技术等^[52-59]. 作为受体蛋白, 必须具备与配体分子之间的结合, 还必须具备跨膜的分布特征, 与配体分子结合以后介导信号转导过程. 配体分子与受体分子之间存在结合的现象, 但是同时也会存在与其他蛋白结合的现象. 因此, 仅仅只有与配体分子结合的能力还不够, 还必须阐明配体结合蛋白的分子结构与性质, 才能决定配体蛋白结合的蛋白分子究竟是否是受体分子. 如果明白这一点, 就不会在仅仅证明有配体分子结合活性的情况下, 就匆匆断定这就是配体分子的受体分子. 这样的研究结果, 必须具备重组的实验证据, 否则仅仅靠蛋白之间的这种结合就判定是配体的受体分子就显得证据不足, 可能会导致错误的结论.

我们利用酵母双杂交技术对于各种肝炎病毒的结构和非结构蛋白的结合蛋白进行了系统的筛选, 从理论上讲, 如果“诱饵”质粒表达的是肝炎病毒的包膜蛋白, 那么就有可能筛选得到肝炎病毒的特异性受体分子, 因为筛选的惟一要求是在酵母细胞中存在蛋白与蛋白之间的相互结合^[60-66]. 但是, 我们所筛选得到都是结合蛋白, 都不是受体蛋白, 可见结合蛋白与受体蛋白之间的差别.

研究一种配体分子蛋白的受体的研究策略, 可以参考发现 HIV-1 第二受体分子的研究策略. 首先对于配体分子的细胞系通过流式细胞学技术进行分选、富集, 从这样的细胞系中分离纯化总 mRNA, 可以很好地保证受体蛋白编码基因的 mRNA 的丰度. 然后应用这样的 mRNA 逆转录后建立真核细胞表达载体, 转染不表达配体蛋白分子的细胞系, 然后利用配体分子与转染细胞系结合的磁珠细胞分离方法, 富集配体分子结合的转染细胞系, 从中提取质粒 DNA, 以大肠杆菌扩增质粒, 重复细胞转染, 配体分子结合细胞的筛选等步骤, 最终获得配体分子结合的受体分子结合蛋白编码基因. 无论采用什么样的筛选技术和流程, 最终的判断筛选分子是否是受体分子, 在没有确定其分子结构及功能之前, 任何草率的结论都是一种误导, 应该特别小心^[67-69].

现代分子生物学的理论和技术, 极大地推动了现代肝脏病学研究和进展. 同时也在不断地修正着我们对于肝脏病学的概念和理论. 在这一探索过程中, 不可避免地存在着一些偏差, 甚至是错误^[70-72]. 我们要勇于提出这些不足或者是错误之处, 只要我们认识到了错误

或不足之处之所在, 我们的认识就会提高一步, 我们的学科建设才会更快进步.

4 参考文献

- 1 成军. 丙型肝炎病毒致病的分子生物学机制. 解放军医学杂志 2003;28:23-27
- 2 成军. 新基因结构与功能研究的策略. 世界华人消化杂志 2003;11:373-377
- 3 成军. 病毒性肝炎发病机制中的反式调节机制. 世界华人消化杂志 2003;11:888-896
- 4 成军, 董菁, 洪源, 钟彦伟, 刘妍, 王刚, 王琳. 乙型肝炎病毒中国流行株全基因的克隆与序列分析. 世界华人消化杂志 2003;11:1083-1090
- 5 成军, 董菁. 乙型肝炎病毒基因组结构与功能复杂性的新认识. 世界华人消化杂志 2003;11:1073-1080
- 6 成军. 病毒性肝炎发病机制相关基因克隆化的研究策略. 解放军医学杂志 2003;28:757-761
- 7 成军. 坚持相对稳定的科研方向是关键. 世界华人消化杂志 2003;11:1857-1861
- 8 成军. 肝炎病毒与肝细胞相互作用的分子生物学机制研究策略. 中西医结合肝病杂志 2003;14:321-323
- 9 韩萍, 刘妍, 成军, 王刚, 陆荫英, 李克, 李莉. 截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白上调 c-myc 基因表达的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:141-144
- 10 王建军, 刘妍, 成军, 杨倩, 杨艳杰. 丙型肝炎病毒核心蛋白上调 NIP3 基因表达研究. 世界华人消化杂志 2003;11:951-954
- 11 王建军, 刘妍, 成军, 杨倩, 杨艳杰. 丙型肝炎病毒核心蛋白上调细胞周期调节蛋白 WEE1 基因表达研究. 世界华人消化杂志 2003;11:947-950
- 12 杨倩, 刘妍, 成军, 王建军, 杨艳杰, 张树林. 丙型肝炎病毒核心蛋白上调粘蛋白 B1 链基因启动子表达活性的研究. 世界华人消化杂志 2003;11:955-958
- 13 杨倩, 刘妍, 成军, 李克, 王建军, 洪源, 张树林. 丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白 6 上调新生多肽相关复合物 α 多肽基因的表达. 世界华人消化杂志 2003;11:959-962
- 14 张忠东, 成军, 钟彦伟, 杨倩, 王业东, 董菁, 杨艳杰, 张树林. 羧肽酶 N 调节乙型肝炎病毒核心启动子表达活性的研究. 世界华人消化杂志 2003;11:1131-1134
- 15 王建军, 刘妍, 成军, 杨倩, 纪冬, 党晓燕, 王春花. 表达谱基因芯片技术研究胰氨酸钠上调细胞凋亡蛋白酶激活因子-1 基因的表达. 中西医结合肝病杂志 2003;14:351-354
- 16 洪源, 杨倩, 成军, 刘妍, 王建军. 丙型肝炎病毒 NS5A 蛋白上调 NS3TP6 基因启动子表达活性的研究. 世界华人消化杂志 2004;12:813-816
- 17 王建军, 李宝伟, 成军, 刘妍, 徐志强, 杨倩, 纪冬, 党晓燕, 王春花. 表达谱基因芯片技术研究甘草甜素上调白介素-18 基因的表达. 世界华人消化杂志 2004;12:855-858
- 18 成军. 乙型肝炎病毒准种研究的意义. 中华传染病杂志 2001;19:197-198
- 19 董菁, 成军, 王勤环, 刘友昭, 王刚, 施双双, 夏小兵, 邵清, 斯崇文. 慢性乙型肝炎患者体内乙型肝炎病毒准种特点的初步研究. 中华内科杂志 2000;39:838-839
- 20 董菁, 成军, 王勤环, 施双双, 洪源, 皇甫竞坤, 王刚, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒逆转录酶基因序列准种与变异特点的研究. 病毒学报 2001;17:270-272
- 21 董菁, 成军, 王勤环, 施双双, 洪源, 皇甫竞坤, 王刚, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒逆转录酶区基因序列准种与变异研究. 解放军医学杂志 2001;26:823-825
- 22 皇甫竞坤, 董菁, 邓红, 成军, 施双双, 洪源, 任喜民, 李莉. 乙型肝炎病毒核心基因启动子序列突变及准种. 世界华人消化杂志 2001;9:1323-1325
- 23 董菁, 成军, 王勤环, 皇甫竞坤, 施双双, 张国庆, 洪源, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒 DNA 序列异质性及准种特点的研究. 中华医学杂志 2002;82:81-85
- 24 董菁, 成军, 王勤环, 施双双, 皇甫竞坤, 王刚, 洪源, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒前 C/C 基因准种与变异特点的研究. 解放军医学杂志 2002;27:122-123
- 25 董菁, 成军, 王勤环, 王刚, 施双双, 刘妍, 夏小兵, 李莉, 张国庆, 斯崇文. 乙型肝炎病毒 C 基因启动子区准种与变异特点的研究. 中华实验和临床病毒学杂志 2002;16:264-266
- 26 董菁, 施双双, 皇甫竞坤, 成军, 王勤环, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎

- 病毒 X 基因准种特点的研究. 中国病毒学 2002;17:22-26
- 27 成军. 乙型肝炎病毒基因异质性及其准种特点研究的临床意义. 解放军医学杂志 2002;27:112-115
- 28 董菁, 李进, 施双双, 皇甫竞坤, 成军, 王勤环, 洪源, 王业东, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒基因组准种与变异特点的研究. 解放军医学杂志 2002;27:116-118
- 29 董菁, 成军, 皇甫竞坤, 洪源, 王刚, 陈国凤, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 乙型肝炎病毒序列个体化变异的初步观察. 解放军医学杂志 2002;27:119-121
- 30 刘妍, 董菁, 皇甫竞坤, 成军, 王刚, 王琳, 李莉. 乙型肝炎病毒 X 基因异质性及对其反式激活功能的影响. 解放军医学杂志 2002;27:125-127
- 31 刘妍, 董菁, 皇甫竞坤, 成军, 韩萍, 牟劲松, 李克, 钟彦伟. 乙型肝炎病毒核心启动子区基因异质性及对其转录活性的影响. 解放军医学杂志 2002;27:128-130
- 32 成军, 董菁, 刘妍, 李莉, 斯崇文, 王勤环, 张玲霞, 陈菊梅. 乙型肝炎病毒准种研究的临床意义. 世界华人消化杂志 2002;10:209-211
- 33 董菁, 施双双, 皇甫竞坤, 成军, 王勤环, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒前 C/C 基因准种与变异特点的研究. 中华微生物学与免疫学杂志 2002;22:27
- 34 董菁, 成军, 王勤环, 刘友昭, 王刚, 施双双, 夏小兵, 邵清, 斯崇文. 慢性乙型肝炎患者体内乙型肝炎病毒准种特点的初步研究. 临床肝胆病杂志 2002;18:17-19
- 35 成军, 董菁, 刘妍, 王琳, 钟彦伟, 王刚. 准种是乙型肝炎病毒存在的基本方式. 世界华人消化杂志 2003;11:1238-1240
- 36 成军. 从乙型肝炎病毒准种特点看抗病毒治疗的艰巨性. 新医学 2004;35:(待发表)
- 37 Dong J, Cheng J, Wang QH, Liu Y, Wang G, Shi SS, Xia XB, Shao Q, Si CW. The preliminary study on hepatitis B virus (HBV) quasispecies in patients with chronic HBV infection. *Chin J Infect Dis* 2001;19:199-203
- 38 Deng H, Dong J, Cheng J, Huangfu JK, Shi SS, Hong Y, Ren XM, Li L. Quasispecies groups in the core promoter region of hepatitis B virus. *Hepatobiliary Pancreatic Dis Int* 2002;1:392-396
- 39 李克, 王琳, 成军, 张玲霞, 段惠娟, 陆荫英, 杨继珍, 刘妍, 洪源, 夏小兵, 王刚, 董菁, 李莉, 钟彦伟, 陈菊梅. 酵母双杂交技术筛选克隆 HCV 核心蛋白结合蛋白基因 1. 世界华人消化杂志 2001;9:1379-1383
- 40 李克, 王琳, 成军, 陆荫英, 张玲霞, 李莉, 刘妍, 段惠娟. 丙型肝炎病毒 NS2 基因酵母双杂交“饵”载体构建及表达. 世界华人消化杂志 2002;10:129-132
- 41 王琳, 李克, 成军, 陆荫英, 王刚, 刘妍, 钟彦伟, 段惠娟, 洪源. 筛选与克隆肝再生增强因子结合蛋白的基因. 世界华人消化杂志 2002;10:161-164
- 42 李克, 王琳, 成军, 张玲霞, 段惠娟, 陆荫英, 杨继珍, 刘妍, 洪源. 酵母双杂交技术筛选克隆丙型肝炎病毒 NS3 蛋白结合蛋白. 解放军医学杂志 2003;28:31-33
- 43 王琳, 李克, 成军, 陆荫英, 张健, 陈天艳, 洪源, 刘妍, 王刚, 钟彦伟. 酵母双杂交技术筛选 Hcsp6 结合的肝细胞蛋白编码基因. 世界华人消化杂志 2003;11:385-388
- 44 陈天艳, 成军, 张树林. 酵母双杂交系统的原理及应用. 世界华人消化杂志 2003;11:451-455
- 45 陆荫英, 王琳, 成军, 李克, 刘妍, 张玲霞. 酵母双杂交技术筛选 HBcAg 肝细胞结合蛋白基因. 世界华人消化杂志 2003;11:426-429
- 46 陆荫英, 邵清, 成军, 陈天艳, 王琳, 梁耀东, 刘妍, 张健, 李克, 张玲霞. 酵母双杂交技术筛选鉴定乙型肝炎病毒 e 抗原结合蛋白 E-19 的研究. 世界华人消化杂志 2003;11:1118-1121
- 47 陆荫英, 陈天艳, 成军, 邵清, 梁耀东, 王琳, 刘妍, 张健, 李克, 张玲霞. 酵母双杂交技术筛选鉴定乙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白新基因 C-12 的研究. 世界华人消化杂志 2003;11:1122-1125
- 48 张健, 成军, 王琳, 邵清, 陆荫英, 梁耀东, 陈天艳, 洪源. 丙型肝炎病毒 E2 蛋白结合蛋白的酵母双杂交筛选研究. 解放军医学杂志 2003;28:765-777
- 49 张健, 成军, 王琳, 邵清, 陆荫英, 梁耀东, 陈天艳, 洪源. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 5B 结合蛋白的酵母双杂交筛选研究. 解放军医学杂志 2003;28:768-770
- 50 王琳, 李克, 成军, 张健, 邵清, 梁耀东, 陈天艳, 刘妍, 钟彦伟, 洪源. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 5A 结合蛋白 37 基因的克隆化研究. 解放军医学杂志 2003;28:774-776
- 51 成军. 病毒性肝炎发病机制的分子生物学研究新探讨. 传染病信息 2003;16:6-8
- 52 成军, 李克, 王琳, 陆荫英, 刘妍, 王刚, 张玲霞. 猪丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白 6 同源基因的克隆化研究. 生物学杂志 2003;20:10-13, 33
- 53 梁耀东, 成军, 李强, 王琳, 陆荫英, 吴君, 程明亮. 酵母双杂交技术筛选乙型肝炎病毒 X 蛋白结合蛋白基因. 世界华人消化杂志 2003;11:1866-1869
- 54 梁耀东, 陆荫英, 成军, 李强, 王琳, 吴君, 程明亮. 酵母双杂交技术筛选肝细胞中与乙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白 C-12 相互作用蛋白的研究. 世界华人消化杂志 2003;11:1862-1865
- 55 邵清, 成军, 白雪帆, 王琳, 张健, 梁耀东, 刘敏, 李强. 酵母双杂交技术筛选白细胞 HCV NS3 蛋白结合蛋白基因. 世界华人消化杂志 2003;11:1897-1900
- 56 王琳, 李克, 成军, 张健, 邵清, 梁耀东, 刘敏. 应用淋巴细胞表达型 cDNA 文库的酵母双杂交技术筛选丙型肝炎病毒非结构蛋白 5A 的结合蛋白. 中西医结合肝病杂志 2003;14:345-348
- 57 陆荫英, 李克, 王琳, 刘妍, 成军, 李莉, 张玲霞. 酵母双杂交技术筛选乙型肝炎病毒 X 蛋白结合蛋白基因. 中华传染病杂志 2004;22:47-49
- 58 陆荫英, 刘妍, 李克, 成军, 王琳. 乙型及丙型肝炎受体的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:211-213
- 58 陆荫英, 陈天艳, 成军, 梁耀东, 王琳, 刘妍, 张健, 邵清, 李克, 张玲霞. 乙型肝炎病毒 X 蛋白与去唾液酸糖蛋白受体 2 突变体相互作用的研究. 世界华人消化杂志 2003;11:1126-1130
- 60 李克, 王琳, 成军, 陆荫英, 洪源, 刘妍, 张玲霞. 丙型肝炎病毒蛋白结合蛋白. 世界华人消化杂志 2002;10:215-217
- 61 李克, 王琳, 成军, 陆荫英, 洪源, 刘妍, 张玲霞. 乙型肝炎病毒蛋白结合蛋白的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:213-215
- 62 董菁, 施双双, 王业东, 皇甫竞坤, 洪源, 李莉, 张玲霞, 成军. cDNA 文库噬菌体展示法的建立及乙型肝炎病毒前 S1 蛋白结合蛋白筛选. 解放军医学杂志 2002;27:321-322
- 63 李克, 王琳, 成军, 张玲霞, 段惠娟, 陆荫英, 杨继珍, 刘妍, 邵得志, 夏小兵, 王刚, 董菁, 李莉, 钟彦伟, 洪源, 陈菊梅. 筛选与克隆丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白 6 基因. 中华实验和临床病毒学杂志 2002;16:351-354
- 64 王琳, 李克, 成军, 陆荫英, 张健, 刘妍, 王刚, 洪源, 王贺, 芮莉莉. 筛选与克隆丙型肝炎病毒 NS5A 蛋白结合蛋白基因. 解放军医学杂志 2003;28:50-52
- 65 陆荫英, 李克, 王琳, 刘妍, 王业东, 成军, 张玲霞. 乙型肝炎病毒前-S2 蛋白结合蛋白的筛选. 中华肝脏病杂志 2003;11:8-10
- 66 成军, 李克, 陆荫英, 王琳, 刘妍. 丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白 6 基因和蛋白的生物信息学分析. 世界华人消化杂志 2003;11:378-384
- 67 梁耀东, 成军, 陆荫英, 吴君, 程明亮. 乙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白的研究. 世界华人消化杂志 2003;11:1242-1245
- 68 陆荫英, 陈天艳, 成军, 梁耀东, 王琳, 刘妍, 李克, 张健, 邵清, 张玲霞. 乙型肝炎病毒前-S2 蛋白结合蛋白基因 S2-29 的克隆化研究. 世界华人消化杂志 2003;11:1114-1117
- 69 王琳, 李克, 成军, 张健, 邵清. 乙型肝炎病毒 X 蛋白结合蛋白. 世界华人消化杂志 2003;11:1940-1942
- 70 成军, 李莉. 清除乙型肝炎病毒的非细胞裂解机制. 世界华人消化杂志 2002;10:73-76
- 71 成军. 慢性病毒性肝炎发病机制的分子生物学研究. 世界华人消化杂志 2002;10:125-128
- 72 成军. 慢性丙型肝炎肝脂肪变的机制及其意义. 世界华人消化杂志 2002;10:999-1003