

肝细胞癌 DNA 修复酶 hMTH1 基因 mRNA 及其蛋白的表达

周鹤俊, 林菊生, 周秀敏, 黎培员, 陶璐薇

周鹤俊, 林菊生, 周秀敏, 黎培员, 陶璐薇, 华中科技大学同济医学院附属同济医院肝病研究所 湖北省武汉市 430030

周鹤俊, 女, 1975-05-03 生, 湖南省邵阳市人, 汉族, 2003 年华南理工大学同济医学院博士生, 主要从事肝脏疾病的研究及消化系统疾病的临床工作。

项目负责人: 林菊生, 430030, 湖北省武汉市解放大道 1095 号, 华中科技大学同济医学院附属同济医院肝病研究所。linjusheng2001@163.net

电话: 027-83663595

收稿日期: 2004-06-24 接受日期: 2004-07-15

Expression of DNA repair enzyme hMTH1 mRNA and its protein in hepatocellular carcinoma

He-Jun Zhou, Ju-Sheng Lin, Xiu-Min Zhou, Pei-Yuan Li, Lu-Wei Tao

He-Jun Zhou, Ju-Sheng Lin, Xiu-Min Zhou, Pei-Yuan Li, Lu-Wei Tao, Institute of Liver Diseases, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Correspondence to: Dr. Ju-Sheng Lin, Institute of Liver Diseases, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China. linjusheng2001@163.net

Received: 2004-06-24 Accepted: 2004-07-15

Abstract

AIM: To study the expression of DNA repair enzyme hMTH1 mRNA and protein in hepatocellular carcinoma (HCC) tissues, normal liver cell and hepatoma cell lines, and to investigate their function in the progress of HCC.

METHODS: Expression of hMTH1 mRNA in matched HCC tissues(33 cases)/surrounding tissues of HCC (33 cases), normal liver cell L-02 and hepatoma cell lines SMMC7721 HepG2 were detected by semi-quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). hMTH1 protein was detected in corresponding HT tissues (17 cases HT) as well as their surrounding liver tissues (17 cases HST) by immunohistochemistry.

RESULTS: The expression level of hMTH1 mRNA in HT was higher than that in HST ($t=2.424$, $P=0.021<0.05$). The expression level of hMTH1 mRNA in two hepatoma cell lines was higher than that in normal liver cell line ($F=6.810$, $P=0.009<0.01$). The expression of hMTH1 mRNA in SMMC7721 was similar to that in HepG2. hMTH1 protein was 88.2% (15 of 17) positive in HT and 82.4% (14 of 17) in HST and was mainly distributed in hepatocytes cytoplasm. The protein level of hMTH1 in HCC tissues was correspondingly higher than in their surrounding tissues ($t=2.618$, $P=0.019<0.05$).

CONCLUSION: Overexpression of hMTH1 mRNA and its

protein in the liver tissues of HCC and hepatoma cell lines is found.

Zhou HJ, Lin JS, Zhou XM, Li PY, Tao LW. Expression of DNA repair enzyme hMTH1 mRNA and its protein in hepatocellular carcinoma. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(9):2057-2060

摘要

目的: 通过检测 DNA 修复酶 hMTH1 mRNA 及其蛋白在肝细胞癌组织及细胞株中的表达, 探讨 hMTH1 在肝细胞癌发生、发展及防御机制中的作用。

方法: 采用半定量逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)研究肝癌(HT, $n=33$)、癌旁组织(HST, $n=33$)和正常肝细胞株(L-02)、肝癌细胞株(SMMC7721, HepG2)中 hMTH1 mRNA 的表达, 同时采用免疫组织化学方法原位检测了上述的肝癌组织($n=17$)及癌旁组织($n=17$)中 hMTH1 蛋白的表达。

结果: 绝大部分检测对象中均有不同程度 hMTH1 mRNA 及其蛋白的表达。肝癌组织中 hMTH1 mRNA 的表达较癌旁组织显著升高($t=2.424$, $P=0.021<0.05$); SMMC7721, HepG2 细胞中 hMTH1 mRNA 的表达显著高于 L-02 细胞($F=6.810$, $P=0.009<0.01$)。SMMC7721 与 HepG2 细胞中 hMTH1 mRNA 的表达没有显著差异($P=0.395>0.05$)。hMTH1 蛋白主要在肝细胞胞质中表达, 肝癌组织中 hMTH1 蛋白水平明显高于癌旁组织($t=2.618$, $P=0.019<0.05$)。

结论: hMTH1 mRNA 及其蛋白在肝癌组织及肝癌细胞株中表达升高。

周鹤俊, 林菊生, 周秀敏, 黎培员, 陶璐薇. 肝细胞癌 DNA 修复酶 hMTH1 基因 mRNA 及其蛋白的表达. 世界华人消化杂志 2004;12(9):2057-2060
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2057.asp>

0 引言

我国肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)患病率较高。活性氧族(reactive oxygen species, ROS)在癌症的发生发展中起了一定的作用^[1]。抗氧化保护机制不能抵挡高水平 ROS 的作用时, 便产生氧化应激^[2], 引起 DNA 损伤, 包括碱基修饰, DNA 链断裂, DNA-蛋白交联^[3], 其中 8-羟基-鸟嘌呤脱氧核苷酸(8-OH-dG)是一种重要的碱基修饰产物^[4], 他可由 ROS 直接作用于 DNA 链

产生,亦可由 ROS 氧化游离于核苷酸池中的 dGTP 为 8-oxo-dGTP 再脱焦磷酸产生,被氧化的核苷酸池是 8-OH-dG 的一个重要来源^[5]。而在 DNA 的复制中,8-OH-dG 可以同等效率结合在 DNA 链中 A 或 C 的对位导致 A:T→C:G 及 G:C→T:A 颠换^[6-7],参与癌变过程^[8-11]。人 MutT 同源物(human MutT homologue, hMTH1)基因与 *Escherichia coli* 的 Mut T 同源,其基因编码产物为 8-oxo-dGTPase(或 8-OH-dGTP 酶),他是一种三磷酸酶,具有糖苷酶活性,可水解游离核苷酸池中 8-oxo-dGTP 为 8-oxo-dGMP,从而阻止 8-oxo-dGTP 错误结合至 DNA 链中,避免了 DNA 链的损伤^[12]。因此, hMTH1 可能在人类基因组 DNA 氧化损伤的修复中起重要作用。迄今, hMTH1 在 HCC 中的研究报道颇少,而 hMTH1 蛋白在肝癌中的表达至今未见报道。我们检测了肝细胞癌组织、癌旁组织及 L-02, SMMC7721, HepG2 细胞株中 hMTH1 基因表达水平,旨在探讨 DNA 修复酶 hMTH1 基因表达在 HCC 发生、发展及防御机制中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 同济医院 2002/2003 年肝细胞癌患者 33 例,男 28 例,女 5 例,平均年龄 48 岁。取其手术切除的肝癌及相应的癌旁组织,液氮冷冻后储存于 -80℃ 冰箱待检。所有的病例均经病理证实。3 株传代真核贴壁生长细胞,为 SMMC7721, HepG2 及经 SV40 病毒大 T 抗原永生化的人胎肝细胞株 L-02,购自武汉大学中国典型培养物保藏中心。Trizol 试剂购自 Omega 公司, Moloney 鼠白血病病毒 M-MLV 逆转录酶等 RT-PCR 试剂及 DMEM 购自 Promega 公司,胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司。目的基因 hMTH1 扩增引物序列参照文献(Int J Cancer.1996;65:437-441)为: U 5' -GCAAGAAGGAGAGACCATCG-3', D 5' -AACCAGTAGCTGTCGTCGG-3'; 内参 β -actin 基因序列参照 NCBI 的 nucleotide 库,自行设计内参扩增引物序列如下: U 5' - TGGCACCACACCTTCTACAA-3'; D 5' -AGCCTGGATAGCAACGTACA-3'。均由北京赛百盛生物公司合成。MTH1 兔抗人抗体购自美国 Novus Biologicals 公司,由国内深圳晶美公司代理, SP 免疫组化试剂盒购自北京中山生物技术公司。其他均为分析纯试剂。

1.2 方法 L02, SMMC7721 及 HepG2 细胞用含 100 mL/L 胎牛血清、100 U/L 青霉素、100 U/L 链霉素的 DMEM (Dulbeccos modified engle medium)培养基, 37℃, 50 mL/L CO₂, 湿度饱和的条件下进行培养,每株细胞均重复培养 5 瓶。根据产品说明书用 Trizol 试剂抽提癌、癌旁组织及 3 株细胞中的总 RNA,测 A 值,计算浓度,依纯度鉴定质量。用半定量 RT-PCR 法检测 hMTH1 在肝细胞癌的癌、癌旁组织及 3 株细胞中的表达,以 β -actin 为内参照。先吸取总 RNA 3 μ g,用 oligo

(dT)作引物在 M-MLV 逆转录酶作用下逆转录生成第一链 cDNA,其体系为: 5 × RT Buffer 4 μ L, 10 mmol/L dNTPs 1 μ L, 50 mU/L 的 RNasin 0.5 μ L, oligo(dT) 1 μ L, 200 mU/L 的 M-MLV RT 1 μ L, 再加无 RNase 灭菌水,总体积为 20 μ L, 42℃ 反应 60 min, 90℃ 灭活 5 min, 阴性对照体系除不加模板外均同上;再取逆转录产物 2 μ L 行 PCR 反应,其体系为: 25 mmol/L MgCl₂ 1.5 μ L, 10 mmol/L dNTPs 及 4 条 10 pmol/L 引物各 0.5 μ L, 加入 10 × buffer 2.5 μ L 及 MillQ 水, 94℃ 热启动 5 min, 冰上冷却并加 Taq 酶 1IU, 终体积为 25 μ L, 循环条件为: 94℃ 45 s, 57℃ 30 s, 72℃ 45 s, 30 个循环后 72℃ 再延伸 7 min。分别扩增出 255 bp 的 hMTH1 及 159 bp 的 β -actin 的片段, 阴性对照体系除不加模板外均同上。取 PCR 产物 5 μ L, PCR 上样缓冲液 1 μ L 加至含 0.5 mg/L 的溴化乙锭 15 g/L 琼脂糖凝胶加样孔中行电泳, 75 V, 30 min, 随后将凝胶置紫外灯下观察桔黄色条带,并用 UVP 凝胶分析系统摄像分析结果,以曲线下面积作为 PCR 产物含量,相对单位 = hMTH1 积分值/ β -actin 积分值。对 17 例所收集肝细胞癌的癌及癌旁组织 4 μ m 厚的石蜡切片进行免疫组织化学 hMTH1 蛋白表达研究,采用 SP 法。常规脱腊至水, 30 mL/L H₂O₂ 封闭内源性过氧化物酶,微波行抗原修复,抗原修复液为 pH 6.0, 0.01 mol/L 的柠檬酸钠缓冲液,磷酸盐缓冲液(PBS)清洗后加正常兔血清,甩去血清,再滴加一抗(抗 hMTH1 抗体), 4℃ 孵育过夜。并设立对照:以 PBS 代替一抗为阴性对照;以高表达 hMTH1 蛋白的支气管肺泡癌为阳性对照。PBS 振洗再依次加二抗及经标记的链霉卵白素工作液, DAB 染色, 苏木素复染,脱水后中性树胶封片。用 HMIAS-2000 高清晰度彩色医学图文分析系统进行 hMTH1 蛋白阳性表达定量分析,每张切片随机挑选 5 个视野,再计算其均值。

统计学处理 数据以均数 ± 标准差(mean ± SD)表示,率的显著性差异应用 SPSS 11.5 软件进行 *t* 检验, 方差分析及两两比较。

2 结果

2.1 hMTH1 mRNA 的表达 所有肝癌及癌旁组织均有不同水平的 hMTH1 mRNA 表达,肝癌组织呈高表达,与癌旁组织比(87.8%),肝癌组织有 hMTH1 mRNA 水平上调。密度分析显示,肝癌组织中 hMTH1 mRNA 水平(1.138 ± 0.092)较癌旁组织(0.820 ± 0.093)高(*t* = 2.424, *P* < 0.05 图 1A)。3 株细胞亦均有 hMTH1 mRNA 的表达,平均表达水平为: L02(0.820 ± 0.082), SMMC7721(1.956 ± 0.286), HepG2(1.683 ± 0.233), 数据经方差分析及两两比较,结果显示其他 2 株细胞中 hMTH1 mRNA 水平较 L-02 细胞明显升高(*F* = 6.810, *P* < 0.01 图 1.B), SMMC7721 与 HepG2 细胞中其表达水平没有显著差异。

2.2 hMTH1 蛋白的表达 hMTH1 蛋白阳性染色主要位于肝细胞胞质内(图 2), 只有 1 例呈核染色。癌组织阳

性率为 88.2%、癌旁组织为 82.4%; 癌组织 hMTH1 蛋白表达水平灰度值(147.301 ± 6.228)明显高于癌旁组织(135.335 ± 4.507) ($t=2.618$, $P<0.05$).

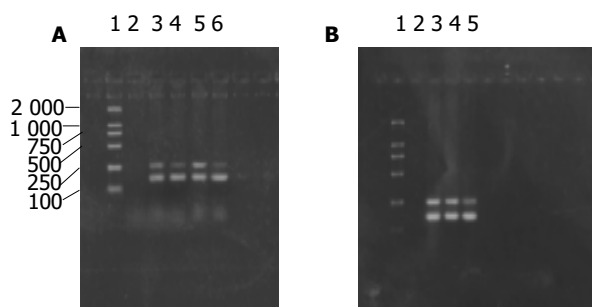


图1 hMTH1 mRNA表达. A:肝癌及癌旁组织, 1: Marker; 2:不加cDNA; 3:肝癌组织; 4:癌旁组织; 5: 肝癌组织; 6:癌旁组织 2. B:三株细胞, 1: Marker; 2:不加 cDNA; 3: SMMC7721 细胞; 4: HepG2 细胞; 5: L-02 细胞.

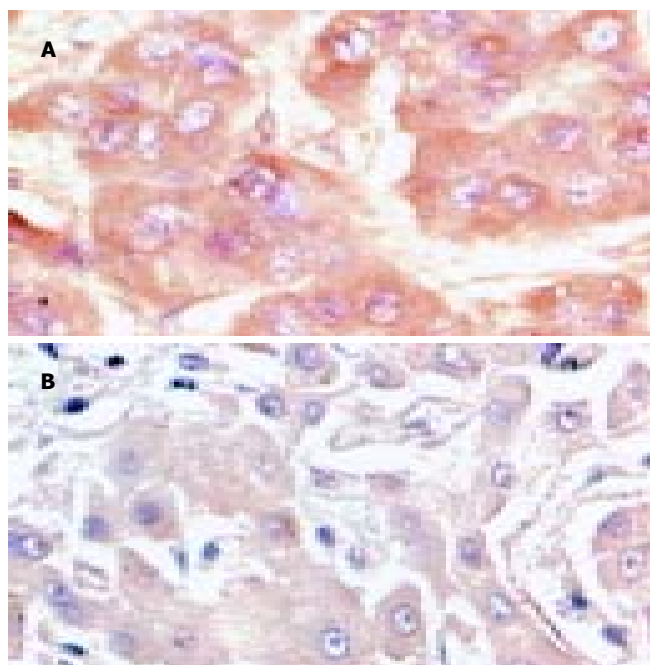


图2 hMTH1 蛋白表达免疫组化 $\times 400$. A: 肝癌组织; B:肝癌癌旁组织.

3 讨论

持续氧化应激在癌症发生发展中起重要作用, 即癌症发病机制的持续性氧化应激学说^[13-17], 研究指出, 相比癌旁组织, 癌组织中的DNA持续暴露在更高水平的ROS下, 其氧化应激程度更强. 电离辐射、环境诱变剂及细胞的自身代谢均可使细胞产生活性氧簇 ROS, 如 OH^- , O^- , OH^\cdot , O_2 , H_2O_2 , O_2^- 等, DNA 在活性氧簇的作用下形成多种氧化产物, 在众多的氧化产物中, 8-OXO-dG 是一种有强致突变作用的DNA氧化损伤产物. 然而真核生物都有一套修复DNA氧化损伤的防御性酶系统^[18-21], 其中包括 hMTH1, hOGG1^[22-23], hMYH^[24]. 他们可以对各种氧化损伤进行修复而与氧化损伤因子保持平衡, 从而保护机体免受氧化损伤. 当机体内的活性氧簇负荷超过自身防御系统的抗氧化能力

时, DNA 就会受到攻击而损伤, 其中可造成DNA的碱基颠换进而导致癌症. 一般认为, 氧化应激致癌的机制如下: (1)活性氧簇引起永久性的DNA结构变化, 如碱基颠换后致重要的结构基因突变, 进而引起癌基因的激活及抑癌基因的失活; (2)活性氧簇激活了细胞质或细胞核的信号转导途径^[25-26]; (3)活性氧簇调节关键蛋白及基因的活性, 而它们又具有调控有关细胞生长、分化、死亡的效应基因的功能. 现已在人乳腺癌^[27-28]、胃癌、肺鳞癌、肺腺癌、肾细胞癌等肿瘤中检测到高水平的8-OXO-dG; 亦有研究表明, 在人肾细胞癌、前列腺癌^[29]、乳腺癌、肺癌细胞系中 hMTH1 mRNA 呈过表达; 而且已在脑部肿瘤中检测到hMTH1蛋白过表达^[30]. hMTH1 基因在肝癌中表达情况的研究颇少, 而 hMTH1 蛋白在肝癌中的表达至今未见报道. 在本研究中, 癌组织 hMTH1 mRNA 水平显著高于癌旁组织, 与同类研究报道结果一致^[31-32], 其机制可能是癌组织的氧化损伤远远重于癌旁组织, 而机体为了适应这种持续高水平的氧化应激, 削弱氧化损伤, 反应性地上调了 hMTH1 mRNA 的表达. hMTH1 基因的过表达有助于减少核苷酸池中游离的8-oxo-dGTP, 防止8-oxo-dG在DNA复制中错误配入细胞DNA链中, 从而有助于保持细胞DNA的完整性. 但此时氧化损伤已经存在, 并已造成了细胞不可逆的结构和功能的变化, 甚至发生了恶性转变及癌症形成, 反应性地上调 hMTH1 的表达也不能阻止疾病的发展, 更不能逆转癌变. 在本研究中, 2株肿瘤细胞 hMTH1 mRNA 表达显著高于L-02, 同样说明肿瘤细胞氧化损伤重于非肿瘤细胞; 但2株肿瘤细胞之间的 hMTH1 mRNA 表达没有明显差异. 免疫组化结果显示: 癌组织染色明显高于癌旁组织, 即 hMTH1 蛋白显著升高, 与 hMTH1 mRNA 检测结果是一致的.

总之, 肝癌组织中 hMTH1 mRNA 及 hMTH1 蛋白水平均高于癌旁组织, SMMC7721 和 HepG2 hMTH1 mRNA 水平明显高于L-02; 肝癌处于高水平的氧化应激状态下, hMTH1 参与肝细胞DNA氧化损伤修复, 这种损伤修复是肝癌发生、发展及防御过程中发生的重要分子事件之一, 起着重要作用, hMTH1 可作为诊断肝细胞癌的候选指标. 而阻断DNA的氧化损伤又可为肝癌治疗提供新的思路.

4 参考文献

- Behrend L, Henderson G, Zwacka RM. Reactive oxygen species in oncogenic transformation. *Biochem Soc Trans* 2003;31 (Pt 6):1441-1444
- Barnham KJ, Masters CL, Bush AI. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nat Rev Drug Discov* 2004;3:205-214
- Singh P, Jain A, Kaur G. Impact of hypoglycemia and diabetes on CNS: correlation of mitochondrial oxidative stress with DNA damage. *Mol Cell Biochem* 2004;260:153-159
- Wu LL, Chiou CC, Chang PY, Wu JT. Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetes. *Clin Chim Acta* 2004;339:1-9
- Colussi C, Parlanti E, Degan P, Aquilina G, Barnes D, Macpherson P, Karran P, Crescenzi M, Dogliotti E, Bignami M. The mammalian mismatch repair pathway removes DNA

- 8-oxodGMP incorporated from the oxidized dNTP pool. *Curr Biol* 2002;12:912-918
- 6 Wooden SH, Bassett HM, Wood TG, McCullough AK. Identification of critical residues required for the mutation avoidance function of human MutY (hMYH) and implications in colorectal cancer. *Cancer Lett* 2004;205:89-95
- 7 Touati E, Michel V, Thiberge JM, Wuscher N, Huerre M, Labigne A. Chronic *Helicobacter pylori* infections induce gastric mutations in mice. *Gastroenterology* 2003;124:1408-1419
- 8 Sato H, Sone H, Sagai M, Suzuki KT, Aoki Y. Increase in mutation frequency in lung of Big Blue rat by exposure to diesel exhaust. *Carcinogenesis* 2000;21:653-661
- 9 Miyake H, Hara I, Kamidono S, Eto H. Oxidative DNA damage in patients with prostate cancer and its response to treatment. *J Urol* 2004;171:1533-1536
- 10 Ichiba M, Maeta Y, Mukoyama T, Saeki T, Yasui S, Kanbe T, Okano J, Tanabe Y, Hirooka Y, Yamada S, Kurimasa A, Murawaki Y, Shiota G. Expression of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *Liver Int* 2003;23:338-345
- 11 Akcay T, Saygili I, Andican G, Yalcin V. Increased formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in peripheral blood leukocytes in bladder cancer. *Urol Int* 2003;71:271-274
- 12 Sekiguchi M, Tsuzuki T. Oxidative nucleotide damage: consequences and prevention. *Oncogene* 2002;21:8895-8904
- 13 Park S, Kim WS, Choi UJ, Han SU, Kim YS, Kim YB, Chung MH, Nam KT, Kim DY, Cho SW, Hahm KB. Amelioration of oxidative stress with ensuing inflammation. Contributes to chemoprevention of *H pylori*-associated gastric carcinogenesis. *Antioxid Redox Signal* 2004;6:549-560
- 14 Sander CS, Chang H, Hamm F, Elsner P, Thiele JJ. Role of oxidative stress and the antioxidant network in cutaneous carcinogenesis. *Int J Dermatol* 2004;43:326-335
- 15 Miyake H, Hara I, Kamidono S, Eto H. Oxidative DNA damage in patients with prostate cancer and its response to treatment. *J Urol* 2004;171:1533-1536
- 16 Gackowski D, Banaszkiwicz Z, Rozalski R, Jawien A, Olinski R. Persistent oxidative stress in colorectal carcinoma patients. *Int J Cancer* 2002;101:395-397
- 17 Oliveira CP, Kassab P, Lopasso FP, Souza HP, Janiszewski M, Laurindo FR, Iriya K, Laudanna AA. Protective effect of ascorbic acid in experimental gastric cancer: reduction of oxidative stress. *World J Gastroenterol* 2003;9:446-448
- 18 Cadet J, Bourdat AG, D'Ham C, Duarte V, Gasparutto D, Romieu A, Ravanat JL. Oxidative base damage to DNA: specificity of base excision repair enzymes. *Mutat Res* 2000;462:121-128
- 19 Davies KJ. Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB Life* 2000;50:279-289
- 20 Lu AL, Li X, Gu Y, Wright PM, Chang DY. Repair of oxidative DNA damage: mechanisms and functions. *Cell Biochem Biophys* 2001;35:141-170
- 21 Mitra S, Boldogh I, Izumi T, Hazra TK. Complexities of the DNA base excision repair pathway for repair of oxidative DNA damage. *Environ Mol Mutagen* 2001;38:180-190
- 22 Hazra TK, Izumi T, Boldogh I, Imhoff B, Kow YW, Jaruga P, Dizdaroglu M, Mitra S. Identification and characterization of a human DNA glycosylase for repair of modified bases in oxidatively damaged DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:3523-3528
- 23 周秀敏, 林菊生, 章金艳, 张莉, 周鹤俊. 肝细胞癌 hOGG1 mRNA 及其蛋白的表达. 世界华人消化杂志 2004;12:280-282
- 24 Boldogh I, Milligan D, Lee MS, Bassett H, Lloyd RS, McCullough AK. hMYH cell cycle-dependent expression, subcellular localization and association with replication foci: evidence suggesting replication-coupled repair of adenine:8-oxoguanine mispairs. *Nucleic Acids Res* 2001;29:2802-2809
- 25 Klaunig JE, Kamendulis LM. The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2004;44:239-267
- 26 Li HL, Chen DD, Li XH, Zhang HW, Lu YQ, Ye CL, Ren XD. Changes of NF- κ B, p53, Bcl-2 and caspase in apoptosis induced by JTE-522 in human gastric adenocarcinoma cell line AGS cells: role of reactive oxygen species. *World J Gastroenterol* 2002;8:431-435
- 27 Matsui A, Ikeda T, Enomoto K, Hosoda K, Nakashima H, Omae K, Watanabe M, Hibi T, Kitajima M. Increased formation of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, in human breast cancer tissue and its relationship to GSTP1 and COMT genotypes. *Cancer Lett* 2000;151:87-95
- 28 Li D, Zhang W, Zhu J, Chang P, Sahin A, Singletary E, Bondy M, Hazra T, Mitra S, Lau SS, Shen J, DiGiovanni J. Oxidative DNA damage and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine DNA glycosylase/apurinic lyase in human breast cancer. *Mol Carcinog* 2001;31:214-223
- 29 Liu Z, Wang LE, Strom SS, Spitz MR, Babaian RJ, DiGiovanni J, Wei Q. Overexpression of hMTH1 in peripheral lymphocytes and risk of prostate cancer: a case-control analysis. *Mol Carcinog* 2003;36:123-129
- 30 Iida T, Furuta A, Kawashima M, Nishida J, Nakabeppu Y, Iwaki T. Accumulation of 8-oxo-2'-deoxyguanosine and increased expression of hMTH1 protein in brain tumors. *Neuro-oncol* 2001;3:73-81
- 31 程斌, 王思元. 原发性肝癌 DNA 修复酶 hOGG1, hMTH1 基因表达与 DNA 氧化损伤的修复. 世界华人消化杂志 2003;11:272-275
- 32 Jungst C, Cheng B, Gehrke R, Schmitz V, Nischalke HD, Ramakers J, Schramel P, Schirmacher P, Sauerbruch T, Caselmann WH. Oxidative damage is increased in human liver tissue adjacent to hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2004;39:1663-1672

World Journal of Gastroenterology 排版印刷

《World Journal of Gastroenterology, WJG》全文模板设计从书眉、栏目、题名、作者、作者单位、基金资助、通讯作者、E-mail、电话、传真、收稿日期、接受日期、摘要、文献著录格式、一级标题字体、二级标题字体、图、表、参考文献, 均制订了统一的字体及格式要求, 每篇文章结束后不再续接其他文章, 适用于摘要数据库、ASP、XML、PDF 格式的要求。WJG 使用的排版软件为国际流行的 PageMaker 软件, 可自动生成 ASP、XML、PDF, 为 WJG 进入电子版格式起到了重要的作用。WJG 出片为进口片, 黑白和彩色印刷用海德堡彩色印刷, 采用三面刀剪切。北京科信印刷厂承担 WJG 印刷业务, 一条龙服务, 包括出片、打样、装订前书样, 全部送杂志社审核, 达到标准后才能印刷和装订。WJG 出版后, 赠送给国内外专家, 他们认为 WJG 封面、内文印刷和装订可与国际著名期刊相媲美。