

VEGFR₂siRNA 腺病毒载体的构建及其对人结肠癌细胞系的影响

黄大伟, 吴开春, 潘阳林, 林涛, 刘长江, 郭长存, 樊代明

黄大伟, 吴开春, 潘阳林, 林涛, 刘长江, 郭长存, 樊代明, 中国人民解放军第四军医大学西京医院消化病研究所 陕西省西安市 710032
黄大伟, 男, 1969-1-15 生, 男, 汉族, 山东潍坊人, 主治医师, 第四军医大学西京医院消化病研究所硕士。
全军医药卫生科研基金课题, No. 01Z087
项目负责人: 吴开春, 710032, 陕西省西安市长乐西路 15 号, 中国人民解放军第四军医大学西京医院消化病研究所。daweih@fmmu.edu.cn
电话: 029-83375230
收稿日期: 2004-11-01 接受日期: 2004-11-12

Construction of adenoviral vector encoding VEGFR₂ siRNA and its effect on human colorectal cancer LOVO cell line

Da-Wei Huang, Kai-Chun Wu, Yang-Lin Pan, Tao Lin, Chang-Jiang Liu, Chang-Cun Guo, Dai-Ming Fan

Da-Wei Huang, Kai-Chun Wu, Yang-Lin Pan, Tao Lin, Chang-Jiang Liu, Chang-Cun Guo, Dai-Ming Fan, Institute of digestive disease, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China
Supported by the Medical Research Project of Chinese PLA, No. 01Z087
Correspondence to: Kai-Chun Wu, Institute of digestive disease, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, 15 West Changle Road, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China. daweih@fmmu.edu.cn
Received: 2004-11-01 Accepted: 2004-11-12

Abstract

AIM: To construct an adenovirus vector for efficient delivery of vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR₂) siRNA, and to investigate its effect on human colorectal cancer LOVO cells.

METHODS: After digestion with *Hind* III and *Xba* I, the U6 promoter and VEGFR₂ siRNA were cloned into the promoterless shuttle vector to construct pShuttle-mU6pro-VEGFR₂siRNA. Then the product vector was cotransformed with adenovirus backbone containing plasmid pAdeasy-1 to produce pAdeasy-mU6pro-VEGFR₂siRNA by homologous recombination. Finally the human colorectal cancer LOVO cells were infected with the recombinant adenovirus and the VEGFR₂ expression was examined using Western-blot.

RESULTS: The pAdeasy-mU6pro-VEGFR₂siRNA was successfully constructed. VEGFR₂siRNA mediated by the adenovirus significantly inhibited the expression of VEGFR₂ in LOVO cell lines ($P < 0.01$).

CONCLUSION: The pAdeasy-mU6pro-VEGFR₂siRNA can effectively down-regulate VEGFR₂ expression in LOVO cell line, which lays the foundation for gene therapy of colorectal cancer.

Key Words: Adenovirus vector; Vascular endothelial growth factor receptor 2; LOVO cell line; Colorectal cancer

Huang DW, Wu KC, Pan YL, Lin T, Liu CJ, Guo CC, Fan DM. Construction of adenoviral vector encoding VEGFR₂ siRNA and its effect on human colorectal cancer LOVO cell line. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;13(2):184-188

摘要

目的: 构建血管内皮细胞生长因子受体 2(VEGFR₂) siRNA 腺病毒载体, 并研究其对结肠癌细胞系 LOVO VEGFR₂ 表达的影响。

方法: 首先构建含有 VEGFR₂siRNA 的鼠 U6 载体 (mU6-VEGFR₂siRNA); 利用 *Hind* III 与 *Xba* I 双酶切将鼠 U6 载体启动子和 VEGFR₂siRNA 克隆入无启动子穿梭载体 promoterless pShuttle vector, 得到 pShuttle-mU6pro-VEGFR₂siRNA; 将 pShuttle-mU6pro-VEGFR₂siRNA 与腺病毒骨架质粒 (pAdeasy-1) 在 BJ5183 细菌中进行同源重组, 得到 pAdeasy-mU6pro-VEGFR₂siRNA; 利用得到的重组腺病毒感染人结肠癌 LOVO 细胞系, 观察 VEGFR₂ siRNA 对结肠癌细胞 VEGFR₂ 表达的影响。采用 West-blot 检测感染前后 VEGFR₂ 蛋白表达水平的变化。

结果: 成功构建血管内皮细胞生长因子受体 2(VEGFR₂) siRNA 腺病毒载体, 该载体显著抑制 LOVO 细胞中 VEGFR₂ 的蛋白表达水平 ($P < 0.01$)。

结论: 构建的 Adeasy-mU6pro-VEGFR₂siRNA 腺病毒能有效地抑制 LOVO 细胞中 VEGFR₂ 表达, 从而为肿瘤的基因治疗打下基础, 也为肿瘤血管抑制治疗提供了新思路。

关键词: 腺病毒载体; 血管内皮细胞生长因子受体 2; LOVO 细胞系; 结肠癌

黄大伟, 吴开春, 潘阳林, 林涛, 刘长江, 郭长存, 樊代明. VEGFR₂siRNA 腺病毒载体的构建及其对人结肠癌细胞系的影响. *世界华人消化杂志* 2005;13(2):184-188
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/184.asp>

0 引言

基因治疗作为一种治疗肿瘤的新手段日益受到人们的重视. 腺病毒由于其安全、高效而在基因治疗中广泛被用做载体. 肿瘤的生长需要丰富的血供, 血管内皮生长因子(VEGF)是肿瘤血管生长的重要调节因子, 与血管内皮细胞上的VEGF受体结合后能促进肿瘤血管的生长, 加快肿瘤的生长和转移. 但外源性VEGF也可直接与肿瘤细胞表面的VEGF受体结合, 促进肿瘤细胞的生长^[1]. 我们利用小干扰RNA技术, 阻断或降低肿瘤细胞表达VEGF受体, 进而抑制其与VEGF的结合, 达到阻滞肿瘤生长的目的.

1 材料和方法

1.1 材料 LOVO细胞株由第四军医大学动物中心提供, 293细胞、BJ5183细菌和腺病毒(Ad5)骨架质粒(pAdeasy-1)由本所保存, promoterless shuttle vector(pshuttle)由第四军医大学生化教研室杨安钢教授惠赠. 胎牛血清、新生牛血清购自杭州四季青生物材料工程有限公司, DMEM系Gibco产品, *Hind* III、*Xba* I为Takara公司产品. Oligo1、Oligo2由上海生工合成, 质粒小量提取试剂盒和小量胶回收试剂盒, 购自上海华舜公司. 胰蛋白酶及酵母提取物, 购自宝泰克公司. 抗KDR一抗(mAb)及二抗均购自北京中山公司, 其余试剂均为国产分析纯.

1.2 方法 VEGFR₂ siRNA的设计及pShuttle-mU6pro-VEGFR₂siRNA、pShuttle-mU6pro构建设计针对VEGF受体2(基因号AF063658)3641-3660bp的小干扰RNA, 具体设计如下: Forward. primer: 5'-tttgattcctgctgtgttgcaacatgacaacacagcaggaatcttttt-3' reverse. primer: 5'-ctagaaaaagattcctgctgtgttgatcatgttgacaacacagcaggaat-3', 将Oligo1、Oligo2根据退火条件在95℃退火5 min, 自然冷却, 得到退火产物VEGFR₂siRNA, 以小提质粒试剂盒提取U6质粒, BbsI、*Xba*I双酶切U6质粒, 胶回收大片段, 用T4 DNA连接酶连接胶回收片段和退火产物VEGFR₂siRNA, 16℃连接12 h, 将获得的连接产物10 μL与低温CaCl₂制备的*E. coli* DH5α感受态细菌轻轻旋转混匀, 加入LB 0.8 mL, 37℃摇床160 r/min摇动1 h, 将得到的产物4 000 r/min离心5 min, 去掉大部分上清, 留取液体200 μL, 混匀沉淀, 将其涂于氨苄抗性的平皿上, 过夜培养, 挑取克隆, 测序证明无误, 得到mU6-VEGFR₂siRNA, 再以*Xba*I、*Hind*III双酶切mU6-VEGFR₂siRNA和pshuttle质粒, 分别胶回收小、大片段, T4 DNA连接酶连接胶回收片段, 16℃连接12 h, 转化*E. coli* DH5α感受态细菌, 铺于卡那霉素抗性平皿上, 过夜培养, 挑取克隆, 测序证明无误, 最后得到pShuttle-mU6pro-VEGFR₂siRNA.

pShuttle-mU6pro的构建 设计引物: forward primer: 5'-gggggtaccccatccgacgcgcgcctctcta-3' (带有KpnI酶切位点) reverse primer: 5'-gctctagagcggatccgaagaccacaaac-3' (带有*Xba*I酶切位点), 以U6质粒为模板进行PCR, 94℃ 5 min 1个循环, 94℃ 1 min、60℃ 45 s、72℃ 45 s共5个循环, 之后94℃ 1 min、65℃ 45 s、72℃ 45 s共30个循环, 72℃ 10 min 1个循环. 将PCR扩增产物及穿梭载体(Pshuttle)分别用KpnI、*Xba*I双酶切, 胶回收相应片段, T4 DNA连接酶连接, 得到Pshuttle-U6pro, 测序并酶切鉴定.

1.2.1 同源重组 将质粒pShuttle-mU6pro、pShuttle-mU6pro-VEGFR₂siRNA用PmeI酶切, 回收线性化载体, 去磷酸化后分别与腺病毒骨架质粒pAdeasy-1(摩尔数之比均为10:1)共转染BJ5183电转化感受态细胞. pShuttle-mU6pro组: 电压2412V, 电阻200 Ω, 电容25 μF, 电穿时间4.3 ms; pShuttle-mU6pro-VEGFR₂siRNA组: 电压2417V, 电阻200 Ω, 容25 μF, 电穿时间3.8 ms. 之后在电穿孔杯内各加入LB 0.5 mL, 分别混匀后铺于卡那霉素抗性平皿上, 过夜培养, 挑取克隆, 用*Pac*I酶切鉴定, 得到pAd-mU6pro-VEGFR₂siRNA、pAd-mU6pro. 将正确克隆的质粒转入DH5α感受态细胞中扩增.

1.2.2 重组腺病毒的包装、扩增及滴度测定 包装细胞293细胞于250 mL培养瓶中培养, 加入DMEM、100 mL/L胎牛血清、以及100 kU/L青霉素、100 mg/L链霉素. 转染前1 d, 将1.5×10⁶ 293细胞种植于6孔板中, 将腺病毒Ad-mU6pro-VEGFR₂siRNA、Ad-mU6pro DNA各5 μg用*Pac*I酶切并胶回收. 用10 μL Lipofectamine™ 2 000按照使用说明转染(Invitrogen). 第2 d, 加入适量培养液继续培养7-10 d, 至细胞出现肿胀、变圆、脱落以及聚集成团的病变现象时收获细胞, 反复冻融法收集病毒. 反复感染、冻融293细胞, 最后测定Ad-mU6pro-VEGFR₂siRNA、Ad-mU6pro的滴度分别为1.3×10¹⁶ PFU/L, 1.0×10¹⁶ PFU/L.

1.2.3 LOVO细胞的转染 LOVO细胞用100 mL/L小牛血清完全培养基, pH值7.1-7.3, 置于37℃含50 mL/L CO₂培养箱中培养. 感染前1 d, 1.5×10⁶ LOVO细胞种植于6孔板上, 第2 d, 每孔LOVO细胞用0.1 mL病毒液(Ad-mU6pro或Ad-mU6pro-VEGFR₂siRNA, MOI为10-20)转染, 置于37℃, 50 mL/L CO₂孵箱培养1-2 h, 每孔再加入2 mL新鲜培养液继续培养2-3 d. 转染后72 h, 收集细胞, 用冰冷的PBS溶液冲洗细胞, 三去污裂解液裂解细胞(50 mmol/L Triscl pH 8.0, 150 mmol/L NaCl, 0.2 g/L叠氮钠, 1 g/LSDS, 100 mg/L Aprotin, 10 g/L NP-40, 5 g/L去氧胆酸钠, 100 mg/L PMSF).

按照 80 μg 蛋白 / 泳道上样, 80 g/L 聚丙烯酰胺电泳, 用硝酸纤维素膜转膜. 100 g/L 的脱脂奶粉溶液 (溶于 PBS) 封闭过夜. 然后将一抗按照体积比 1 : 50 溶于 50 g/L 的脱脂奶粉溶液 (溶于 PBS), 室温条件下与膜共孵育 8 h, 用 250 mL PBST (吐温按照体积比 1 : 1 000 加入) 漂洗膜 3 次, 每次 10 min, 二抗按照体积比 1 : 2 000 溶于 50 g/L 的脱脂奶粉溶液, 室温条件下与膜共孵育 3 h, 250 mL PBST 漂洗膜 3 次, 每次 10 min, PBST 充分洗涤后 ECL 化学发光系统显色、压片、曝光、显影、定影后晾干保存.

统计学处理 所有数据用 mean $\pm$ SD 表示, 组间差异应用 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 具有统计学差异.

2 结果

带有 VEGFR₂ siRNA 的腺病毒载体以及空载体构建成功, 测序及酶切鉴定示结果正确 (图 1-5). 用 Ad-mU6pro-VEGFR₂ siRNA 转染人 LOVO 细胞后, Western

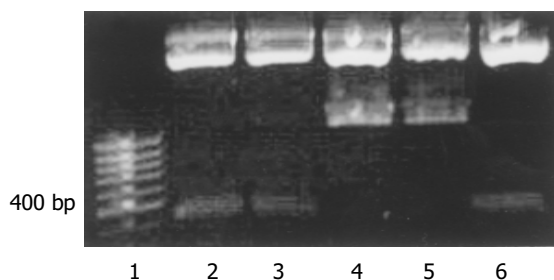


图1 U6-VEGFR₂ siRNA *Hind*III、*Xba*I 酶切鉴定. 1: marker; 2-6: 随机挑选的克隆. 2, 3, 6 为阳性克隆.

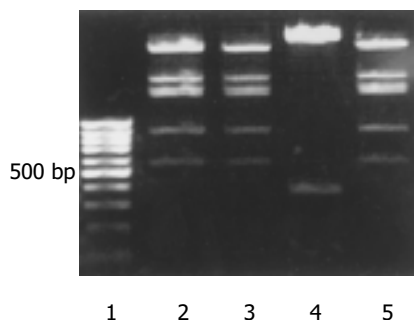


图2 Pshuttle-pro-VEGFR₂ siRNA *Hind*III、*Xba*I 酶切鉴定. 1: marker; 2-5: 随机挑选的克隆. 4 为阳性克隆.

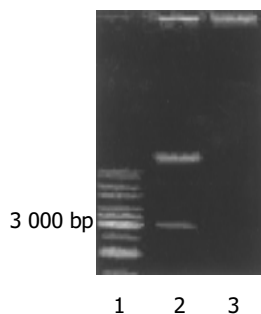


图3 重组腺病毒 *Pac*I 酶切鉴定. 1: Marker; 2: pAd-mU6pro-VEGFR₂ siRNA; 3: pAd.

blot 结果 (图 6) 经相对蛋白含量分析显示: 亲本细胞组 3.61 ± 0.12 ; 空载体组 3.42 ± 0.14 ; 转染组 2.35 ± 0.09 , 每组均重复测量 10 次, 取平均值. 可发现 VEGFR₂ (KDR) 表达水平在转染组明显降低 ($P < 0.01$); 而空载体组和亲本细胞组 KDR 表达水平变化不明显.

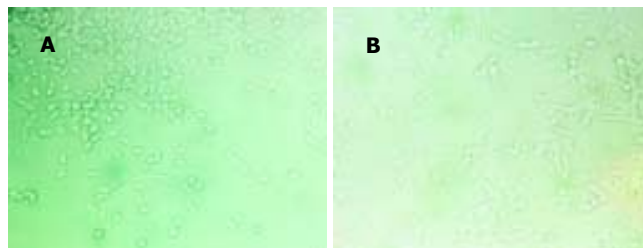


图4 293 细胞转染 48 h ($\times 100$). A: 空载体; B: 腺病毒.

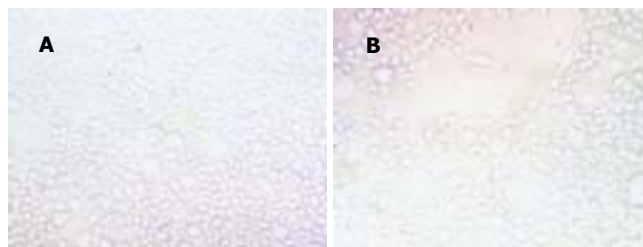


图5 LOVO 细胞转染 48 h ($\times 100$). A: 空载体; B: 腺病毒.

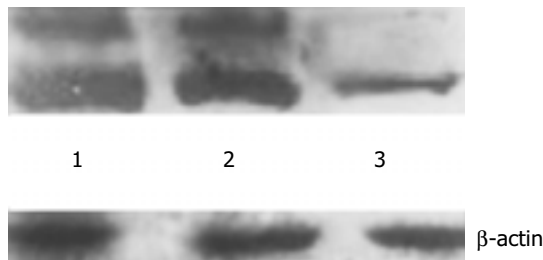


图6 LOVO 细胞转染重组腺病毒、空载体及亲本细胞 Western blot 结果. 1: 亲本细胞; 2: 空载体; 3: 转染细胞.

3 讨论

肿瘤细胞过度分泌 VEGF 与肿瘤血管内皮细胞过度表达 VEGF 受体均能够促进肿瘤的生长和转移^[2], VEGF 及其受体可作为肿瘤抑制治疗的靶分子, 利用抗体中和血管生长因子的活性或采用生长因子类似物封闭内皮细胞上生长因子的功能性受体是抑制肿瘤血管生成的有效手段^[3-4], 如抗 VEGF 的抗体^[5-6]、可溶性 VEGF 受体^[7]、反义 VEGF 基因表达^[8]和 VEGF 受体抑制剂^[9]等. VEGF 在肿瘤血管生成中发挥关键的作用^[10], 其受体包括 VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (KDR/Flk-1) 和 VEGFR-3 (Flt-4) 等. 其中 VEGFR-2 (KDR/Flk-1) 被认为是血管内皮最重要的靶标^[11]. KDR 不仅表达在肿瘤血管内皮细胞中, 而且表达在肿瘤细胞上^[12]. Zhang 证明, 外源性 VEGF 可刺激 KDR 阳性胃癌细胞系 NCI-N87 和 AGS-1 的细胞生长^[1]. 因此抑制肿瘤细胞和/或肿瘤

血管内皮细胞上^[13] VEGF 受体的表达, 不仅可阻止肿瘤细胞的生长, 也可抑制肿瘤血管的生成, 从而阻断肿瘤的生长和转移^[14].

肿瘤的基因治疗中, 腺病毒载体是重要的运载工具. 动物实验发现腺病毒 DNA 在体内的清除主要依赖先天的免疫清除机制, 该途径能清除约 90% 的腺病毒^[15]. 目前应用的腺病毒载体 (Ad5 和 Ad2) 经瘤内注射、胸腔内注射、气管内滴注等局部途径的体内转染实验表明, 在有效剂量范围内, 尽管可引起局部轻度的、可逆的、自限性炎性反应, 但无明显的急性毒性和可检测的慢性毒性产生^[16-21]. 实验证明, 腺病毒基因组性质稳定, 转染后不整合入靶细胞基因组^[22], 且感染广泛、感染效率高、能达到较高的滴度, 同时既可以感染分裂细胞又可以感染静止细胞, 他是一种安全、高效、稳定的重要载体.

RNAi 是一种高效、特异的阻断体内某些特定基因表达、诱导细胞特定基因缺失的一种重要手段, 比反义 RNA 技术、基因突变体技术有更大的优势^[23]. Dicer 酶 (RNA 酶 III 家族成员) 能够以 ATP 依赖的方式将 dsRNA 切割降解为 21-23 碱基的 siRNA, 然后 siRNA 双链结合一个核酶复合物, 形成 RNA 诱导沉默的复合物 (RNA-induced silencing complex, RISC). 激活的 RISC 通过碱基互补配对定位到同源 mRNA 转录本上, 在距离 siRNA 3' 端 12 个碱基的位置切割 mRNA^[24-27]. SiRNA 也可直接源于细胞内 RNA- 依赖的聚合酶 (RNA-dependent RNA polymerase, RdRP) 在被 RNAi 作用的靶 mRNA 上的活动²⁸. 在 RdRP 作用下, 进入细胞内的 dsRNA 以指数级数量扩增^[24-26].

以腺病毒为工具, 应用 RNA 干扰技术可以特异、有效地抑制肿瘤细胞内靶基因的表达. Shen 利用装载有 H1-RNA 启动子的穿梭载体 pshuttle 与腺病毒骨架质粒进行同源重组, 在细胞内成功表达 P53 基因的 siRNA, 使 P53 基因静默^[29]. 在本实验中, 我们将鼠 U6 基因启动子克隆入无启动子穿梭载体 pshuttle, 并与腺病毒骨架质粒进行同源重组, 成功地构建了带有 VEGF 受体-2 (KDR) 小干扰 RNA 的重组腺病毒 Ad-mU6pro-VEGF₂siRNA, 转染 LOVO 细胞后明显抑制了 KDR 的蛋白表达水平, 从而能够抑制 VEGF 与 VEGFR-2 (KDR) 的结合, 阻止肿瘤细胞的生长. 在另一实验中, 我们应用该重组腺病毒转染人脐静脉内皮细胞系 (human umbilical vein endothelial cells HUVEC), 结果发现其 KDR 的表达水平明显降低, 且细胞生长受到显著抑制. 上述策略为肿瘤的基因治疗奠定了基础, 也为肿瘤的血管抑制治疗提供了思路. 但该载体是否可通过抑制 VEGFR-2 的表达而发挥抗肿瘤生长、抑制肿瘤血管生成的作用, 我们将在体内实验中进一步验证.

4 参考文献

- Zhang H, Wu J, Meng L, Shou CC. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors KDR and Flt-1 in gastric cancer cells. *World J Gastroenterol* 2002;8:994-998
- Brown LF, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Manseau EJ, Senger DR, Dvorak HF. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in adenocarcinoma of gastrointestinal tract. *Cancer Res* 1993; 53:4727-4735
- Ke LD, Shi YX, Im SA, Chen X, Yung WK. The relevance of cell proliferation, vascular endothelial growth factor, and basic fibroblast growth factor production to angiogenesis and tumorigenicity in human glioma cell lines. *Clin Cancer Res* 2000;6: 2562-2572
- Zhong H, Chiles K, Feldser D, Laughner E, Hanrahan C, Georgescu MM, Simons JW, Semenza GL. Modulation of hypoxia inducible factor 1 alpha expression by the epidermal growth factor /phosphatidylinositol 3-kinase /PTEN /AKT /FRAP pathway in human prostate cancer cells; implications for tumor angiogenesis and therapeutics. *Cancer Res* 2000;60: 1541-1545
- 阎锡蕴, 汤健, 吴小平, 王凤采, 李建生, 杨东玲. 血管内皮细胞生长因子人单链抗体的基因克隆、高效表达、亲和力和成熟及生物活性鉴定. *中国科学 C 辑* 2000;30:394-400
- Borgstrom P, Bourdon MA, Hillan KJ, Sriramaraio P, Ferrara N. Neutralizing anti-vascular endothelial growth factor antibody completely inhibits angiogenesis and growth of human prostate carcinoma mico tumors in vivo. *Prostate* 1998;35:1-10
- 宋述梅, 吴健, 寿成超. VEGF 受体 KDR 胞外配基结合区单抗对内皮细胞增生及血管形成的抑制. *中华微生物学与免疫学杂志* 2000;20:327-330
- 吴晓, 郑杰, 付坚, 由江峰, 崔湘琳, 王洁良, 方伟岗, 周爱儒, 吴秉铨. 反义 VEGF 基因转染在调节人肺巨细胞肺癌血管生成和转移的作用. *中华医学杂志* 2000;80:943-946
- Millauer B, Longhi MP, Plate KH, Shawver LK, Risau W, Ullrich A, Strawn LM. Dominant-negative of Flk-1 suppresses the growth of many tumor type in vivo. *Cancer Res* 1996;56:1615-1620
- Ferrara N, Davis ST. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endoc Rev* 1997;18:4-25
- Brekken RA, Overholser JP, Stastny VA, Waltenberger J, Minna JD, Thorpe PE. Selective inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor 2 (KDR /Flk-1) activity by a monoclonal anti-VEGF antibody blocks tumor growth in mice. *Cancer Res* 2000;60:5117-5124
- 程宏伟, 毛伯镛, 张尚福, 成娘. 血管内皮生长因子受体 KDR 在髓母细胞瘤中的表达及临床意义. *华西医科大学学报* 2001;32: 369-371
- McDonnell CO, Hill AD, McNamara DA, Walsh TN, Bouchier-Hayes DJ. Tumor micrometastases: the influence of angiogenesis. *Eur J Surg Oncol* 2000;26:105-115
- Melnyk O, Zimmerman M, Kim KJ, Shuman M. Neutralizing antivascular endothelial growth factor antibody inhibits further growth of established prostate cancer and metastases in a pre-clinical model. *J Urol* 1999;161:960-963
- Worgall S, Wolff G, Falck-Pedersen E, Crystal RG. Innate immune mechanisms dominate elimination of adenoviral vectors following in vivo administration. *Hum Gene Ther* 1997;8:37-44
- Kucharczuk JC, Raper S, Elshami AA, Amin KM, Sterman DH, Wheeldon EB, Wilson JM, Litzky LA, Kaiser LR, Albelda SM. Safety of intrapleurally administered recombinant adenovirus carrying herpes simplex thymidine kinase DNA followed by ganciclovir therapy in nonhuman primates. *Hum Gene Ther* 1996;7:2225-2233
- Clayman GL, el-Naggar AK, Roth JA, Zhang WW, Goepfert H, Taylor DL, Liu TJ. In vivo molecular therapy with p53 adenovirus for microscopic residual head and neck squamous carcinoma. *Cancer Res* 1995;55:1-6
- Goldman MJ, Litzky LA, Engelhardt JF, Wilson JM. Transfer of the CFTR gene to the lung of nonhuman primates with E1-deleted, E2a-defective recombinant adenoviruses: a prelini-

- cal toxicology study. *Hum Gene Ther* 1995;6:839-851
- 19 Prince GA, Porter DD, Jenson AB, Horswood RL, Chanock RM, Ginsberg HS. Pathogenesis of adenovirus type 5 pneumonia in cotton rats (*Sigmodon hispidus*). *J Virol* 1993;67:101-111
- 20 Simon RH, Engelhardt JF, Yang Y, Zepeda M, Weber-Pendleton S, Grossman M, Wilson JM. Adenovirus-mediated transfer of the CFTR gene to lung of nonhuman primates: toxicity study. *Hum Gene Ther* 1993;4:771-780
- 21 Wilmott RW, Amin RS, Perez CR, Wert SE, Keller G, Boivin GP, Hirsch R, De Inocencio J, Lu P, Reising SF, Yei S, Whitsett JA, Trapnell BC. Safety of adenovirus-mediated transfer of the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator cDNA to the lungs of nonhuman primates. *Hum Gene Ther* 1996;7:301-318
- 22 Brody SL, Crystal RG. Adenovirus-mediated in vivo gene transfer. *Ann N Y Acad Sci* 1994;716:90-101
- 23 杨吉成. 2002年世界十大科学成就之首—siRNA和RNAi. *苏州大学学报·医学版* 2003;23:253-256
- 24 Hammond SM, Caudy AA, Hannon GJ. Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. *Nature Rev Gen* 2001;2:110-119
- 25 Sharp PA. RNA interference. *Genes Dev* 2001;15:485-490
- 26 Hutvagner G, Zamore PD. RNAi: nature abhors a double-strand. *Curr Opin Genetics Devel* 2002;12:225-232
- 27 Nykanen A, Haley B, Zamore PD. ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell* 2001;107:309-321
- 28 Sijen T, Fleenor J, Simmer F, Thijssen KL, Parrish S, Timmons L, Plasterk RH, Fire A. On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell* 2001;107:465-476
- 29 Shen C, Buck AK, Liu X, Winkler M, Reske SN. Gene silencing by adenovirus-delivered siRNA. *FEBS Lett* 2003;539:111-114

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

World Journal of Gastroenterology 的编辑

经《*World Journal of Gastroenterology*, WJG》编委审稿后, 非常优秀的论文可直接录用, 通知作者按照编委审稿意见及本刊的书写格式进行修改, 符合本刊要求的论文经第一和第二编辑语言处理后方可进行排版. 排版后校样由责任编辑审读全文, 无语法及拼写错误方可付印. WJG 为了确保其出版的每篇论文的编辑质量, 特制定了编辑要点.

1 题名

应简明扼要有特色, 突出主题, 不宜过长; 应直入主题, 避免使用“探讨、研究、分析、观察、调查、探索”等词语; 不用定冠词 The, 一般不使用缩写字(常用缩写字例外). 具体写作的要求见《科技论文英文题名的撰写》<http://www.wjgnet.com/1009-3079/new/26.asp>.

2 摘要

采用结构式摘要. 目的部分应直入主题, 如 To investigate the, 可简要交代背景或该课题目前开展情况; 方法(包括材料)和结果(包括重要数据)部分使用过去时, 结论部分使用一般现在时. 人称和语态使用应自然, 避免使用“悬垂分词”. 摘要的第一句不要重复文章题名, 应增加变化, 补充一些细节. 具体写作要求见《科技论文英文摘要的撰写》<http://www.wjgnet.com/1009-3079/new/25.asp>.

3 正文

(1) 短句子: 提倡使用短句子, 尽量避免一个句子使用多个从句. 拼写正确, 时态一致、准确. 方法及结果部分一般使用过去时. 讨论部分, 引用文献叙述一般使用过去时, 结论性语言使用一般现在时. 要注意主句和从句的时态呼应及文中上下文含意的呼应; 应尽量对照其中文稿以求如实表达其原意; 使用分词短语作状语和定语时, 一定要注意其语态的正确使用, 以求其前后呼应; 应注意用词的对照一致及词语的固定搭配等; 在编辑过程中, 一定要核对各基本数据及其百分比. 此外, 还应注意标点符号的正确使用与拉丁语名词的单复数. (2) 数字: 出现在句首的数字应写为: Sixteen cases... 或 A total number of 16 cases 而不能写为: 16 cases, 100 patients, 等. (3) 缩略词: 首次使用词语时, 应先写出全称然后在括号内写出其缩写词. (4) 斜体: 细菌、病毒、动植物的拉丁学名、统计学符号、基因符号、内切酶(前3个字符)、量符号、拉丁词如 *in vivo*, *in situ*, *et al* 等及参考文献中的刊名应使用斜体. (5) 图表: 不要重复使用, 已用图表示的内容不再使用表格. 表和图题的说明应与正文的文题一样, 文内图表的标注使用句子表示时应使用一般现在时而不使用过去时, 如 The data are shown in Table 1. 图表置正文内, 图表内注解首字母大写, 其余小写.

4 参考文献

应按先后顺序在正文内标出. 参考文献全体作者是否与首页一致, 题名与首页是否一致, 刊名与首页是否一致, 年与首页是否一致, 卷号与首页是否一致, 起页-止页与首页是否一致, PMID号是否与首页一致.

5 其他

(1) 注意字符间空格, 文稿要隔行打印. (2) 使用正式文体, 不用口语体和非规范缩写词. 如 isn't, aren't, hasn't, hadn't, haven't, don't, can't, wouldn't, a lot of, a bit, too (also), thru (through), exam (examination), lab (laboratory) 等. (3) 要客观地叙述方法和结果, 用词要质朴无华, 避免使用带感情色彩或广告式宣传的词语. (4) 可用动词时应尽量避免使用动词的名词形式. (5) 正确使用冠词, 对可数词应尽量使用复数形式. (6) 应多用预置短语分开或用连字符断开名词词组, 避免使用长系列形容词或名词修饰名词. (7) 尽量应用重要的事实开头, 避免短语或从句开头. (8) 涉及他人的工作或研究成果时, 尽量列出其姓名, 两名以上的作者一定要用 “et al”. 具体写作要求见《科技论文的写作要点》<http://www.wjgnet.com/1009-3079/new/31.asp>.