

SELDI-TOF-MS联合蛋白质组学实验数据库对结直肠癌血清标志物的鉴定

蔡建, 高春芳, 范乃军, 盛新华, 赵光, 王秀丽

背景资料
SELDI-TOF-MS是近几年发展起来的一种蛋白质组学技术, 目前制约该技术应用发展的瓶颈是其最终结果仅为质荷比(m/z), 发现差异蛋白后仍需通过复杂的技术手段完成蛋白质的鉴定。匹兹堡大学生物医学信息学系建立了将质荷比(m/z)与先前所鉴定的蛋白质相关联的检索工具, 即蛋白质组学实验数据库(EPO-KB), 使学者们可直接根据 m/z 完成对差异蛋白质的检索。

蔡建, 范乃军, 盛新华, 中国人民解放军第二军医大学 上海市 200433

蔡建, 高春芳, 赵光, 王秀丽, 中国人民解放军第150中心医院全军肛肠外科研究所 河南省洛阳市 471031

作者贡献分布: 蔡建与高春芳对此文所作贡献均等; 此课题由蔡建与高春芳设计; 研究过程由蔡建、高春芳、范乃军、盛新华、赵光及王秀丽操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由高春芳提供; 数据分析由蔡建、赵光及王秀丽完成; 本论文写作由蔡建与范乃军完成。

通讯作者: 高春芳, 教授, 博士生导师, 471031, 河南省洛阳市, 中国人民解放军第150中心医院全军肛肠外科研究所。

gaochunfang150@163.com

电话: 0379-64169323

收稿日期: 2009-04-23 修回日期: 2009-08-27

接受日期: 2009-09-07 在线出版日期: 2009-09-28

Combined use of surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and empirical proteomic ontology knowledge base for identification of serum biomarkers for colorectal cancer

Jian Cai, Chun-Fang Gao, Nai-Jun Fan, Xin-Hua Sheng, Guang Zhao, Xiu-Li Wang

Jian Cai, Nai-Jun Fan, Xin-Hua Sheng, the Second Military Medical University of Chinese PLA, Shanghai 200433, China

Jian Cai, Chun-Fang Gao, Guang Zhao, Xiu-Li Wang, Institute of Anal-colorectal Surgery, the 150th Central Hospital of Chinese PLA, Luoyang, Henan Province, China, 471031

Correspondence to: Professor Chun-Fang Gao, Institute of Anal-colorectal Surgery, the 150th Central Hospital of Chinese PLA, Luoyang 471031, Henan Province, China. gaochunfang150@163.com

Received: 2009-04-23 Revised: 2009-08-27

Accepted: 2009-09-07 Published online: 2009-09-28

Abstract

AIM: To determine the feasibility of combined use of surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (SELDI-TOF-MS) and empirical proteomic ontology knowledge base (EPO-KB) for identification of serum biomarkers for colorectal cancer.

METHODS: Serum samples from 169 colorectal cancer patients and 83 age- and gender-matched

healthy individuals were analyzed by SELDI-TOF-MS using immobilized metal affinity capture 30 (IMAC30) proteinchip arrays. The resulting SELDI-TOF-MS spectral data were analyzed using the Biomarker WizardTM and Biomarker PatternsTM software to find differential proteins and develop a classification tree for colorectal cancer. The differential proteins were identified by searching the EPO-KB and verified by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

RESULTS: A total of 34 mass peaks were identified. Four peaks at mass:charge ratios (m/z) of 2873, 3163, 6121 and 7778 were used to construct the classification tree. The classification tree could effectively distinguish colorectal cancer samples from control samples, achieving a sensitivity and specificity of 91.57% and 90.53% in training mode, and 82.25% and 80.72% in test mode, respectively. Database search revealed that the peak at a m/z of 7778 corresponded to platelet factor 4 (PF4). ELISA detection of PF4 showed that serum PF4 level was significantly higher in colorectal cancer patients than in healthy controls ($P < 0.01$), with a sensitivity and specificity of 61.1% and 76.9%, respectively.

CONCLUSION: Combined use of SELDI-TOF-MS and EPO-KB is feasible for identification of serum biomarkers for colorectal cancer. PF4 (m/z at 7778) is significantly upregulated in colorectal cancer patients, providing a new biomarker for colorectal cancer.

Key Words: Colorectal cancer; Platelet factor 4; Biological markers; SELDI-TOF-MS; EPO-KB

Cai J, Gao CF, Fan NJ, Sheng XH, Zhao G, Wang XL. Combined use of surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and empirical proteomic ontology knowledge base for identification of serum biomarkers for colorectal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(27): 2854-2858

摘要

目的: 探讨表面增强激光解析离子化飞行时

同行评议者
陈立波, 副教授, 华中科技大学同济医学院附属协和医院肝胆外科中心

间质谱仪(SELDI-TOF-MS)联合蛋白质组学实验数据库方法研究结直肠癌患者血清标志物的可行性。

方法:应用SELDI-TOF-MS对169例结直肠癌患者与83例正常人血清进行了蛋白质谱检测,通过Biomarker Wizard™与Biomarker Patterns™软件分析发现差异蛋白,建立结直肠癌诊断模型;用蛋白质组学实验数据库检索鉴定出有意义的差异蛋白,并用ELISA法对结直肠癌患者及正常人血清样本中差异蛋白表达进行验证。

结果:发现34种差异蛋白,以质荷比(m/z)为2873, 3163, 6121, 7778的4种差异蛋白组成的分类树诊断模型,在学习模式下其诊断结直肠癌的灵敏度为91.57%,特异度为90.53%;在测试模式下分别为82.25%, 80.72%。其中 m/z 为7778的蛋白峰强度在结直肠癌患者血清中明显高于正常人($P<0.01$),数据库检索结果提示该蛋白为血小板因子4(PF4)。ELISA法测定结直肠癌患者血清PF4水平显著高于正常人($P<0.01$),其灵敏度及特异度分别为61.1%, 76.9%。

结论:SELDI-TOF-MS联合蛋白质组学实验数据库的方法简便可行,可为蛋白芯片研究提供新思路;PF4($m/z = 7778$)在结直肠癌患者血清中明显升高,是结直肠癌患者新的血清学标志物。

关键词:结直肠癌;血小板因子4;生物标志物;表面增强激光解析离子化飞行时间质谱;蛋白质组学实验数据库

蔡建, 高春芳, 范乃军, 盛新华, 赵光, 王秀丽. SELDI-TOF-MS联合蛋白质组学实验数据库对结直肠癌血清标志物的鉴定. 世界华人消化杂志 2009; 17(27): 2854-2858
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2854.asp>

0 引言

结直肠癌居我国肿瘤发病率的第3位,约1/3的患者治疗时已属晚期。现有临床指标因敏感性和特异性低,难以达到早发现、早诊断的要求。表面增强激光解析离子化飞行时间质谱仪(SELDI-TOF-MS)是近几年发展起来的一种蛋白质组学技术,具有快速、灵敏、高通量、可对复杂的生物学样本直接检测等特点,已广泛用于肿瘤血清标志物的筛查^[1-4]。目前制约该技术应用发展的瓶颈是其最终结果仅为质荷比(m/z),发现差异蛋白后仍需通过色谱分离纯化、二维电泳、光谱、

质谱定量定性等技术进一步完成对蛋白质的鉴定,然后才能推广应用于临床检验或进一步的研究。但这些手段技术条件要求高、仪器昂贵、步骤繁琐、耗时长,不适于大规模对生物标志物的筛查。匹兹堡大学生物医学信息学系根据目前已经发表的120篇文献,建立了将质荷比(m/z)与先前所鉴定的蛋白质相关联的检索工具,即蛋白质组学实验数据库(EPO-KB),使我们可直接根据 m/z 完成对差异蛋白质的检索^[8]。目前该数据库建立不到2年,其意义及作用有待进一步为广大研究者所接受。本研究的目的在于通过SELDI-TOF-MS联合EPO-KB对结直肠癌血清标志物进行研究,发现潜在的血清标志物,并初步探索这一研究方法的可行性及存在的问题。

1 材料和方法

1.1 材料 结直肠癌患者169例,男90例,女79例,年龄22-82(中位年龄56岁)血清标本来自解放军第150中心医院2006-10/2008-03住院患者;健康志愿者83例,男50例,女33例,年龄25-65(中位年龄45岁)。血清标本来自2007年在解放军第150中心医院健康体检者。取样人群有相似的暴露史,汉族。结直肠癌患者均经术后病理检查,根据AJCC的TNM分期2004诊断为结直肠癌,无家族史。正常人除外肿瘤及炎症性、代谢性等影响血清蛋白表达的相关疾病。告知所有受试者本人或其家属该研究的目的、方法及意义,经同意后签署知情同意书。尿素、乙腈、三氟乙酸、SPA(sinapinic)、CHAPS、Tris-HCL等均购自Sigma公司,ProteinChip Biology System(PBS II+)及其配套的固相金属螯合(immobilized metal affinity capture, IMAC30-Cu²⁺)蛋白芯片,SELDI-TOF-MS购自美国Ciphergen Biosystem公司。血小板因子4(platelet factor 4, PF4)酶联免疫检测试剂盒购自(美国RnD公司)。

1.2 方法

1.2.1 标本采集:各采集全血4-5 mL,立即放入4℃冰箱静置2 h,4℃ 700 *g*离心30 min,吸取血清,按每管分装100 μ L,置-70℃冰箱保存。

1.2.2 标本准备:用Cibacron Blue除去血清白蛋白后,取20 μ L分别加40 μ L U9缓冲液(含9 mol/L尿素,2% CHAPS,50 mmol/L Tris-HCl pH9.0),4℃振荡30 min使蛋白质变性。将120 μ L结合/洗脱缓冲液(含100 mmol/L磷酸钠,500 mmol/L氯化钠,pH7.0,即IMAC缓冲液)加入1.5 mL离心管,每管加入10 μ L变性后的血清样品,4℃振荡30 min。

研发前沿
应用SELDI-TOFMS技术进行比较蛋白质组学研究已成为疾病蛋白质组学研究的热点。基于对患者的体液或组织中差异蛋白的分析,目前已经建立了大量的疾病的诊断模型。但受到该技术本身限制,在发现差异蛋白峰及建立诊断模型后,如何进一步完成对蛋白质的鉴定是目前研究的重点和难点,也是限制该技术广泛应用的关键。

创新盘点

本文在SELDI蛋白质组学研究中应用了蛋白质组学实验数据库(EPO-KB),并初步论证了这一不同于经典的蛋白质鉴定的研究路线的方法的可行性.发现并验证了PF4在结直肠癌患者与正常人血清中具差异表达,有潜在的临床应用价值.

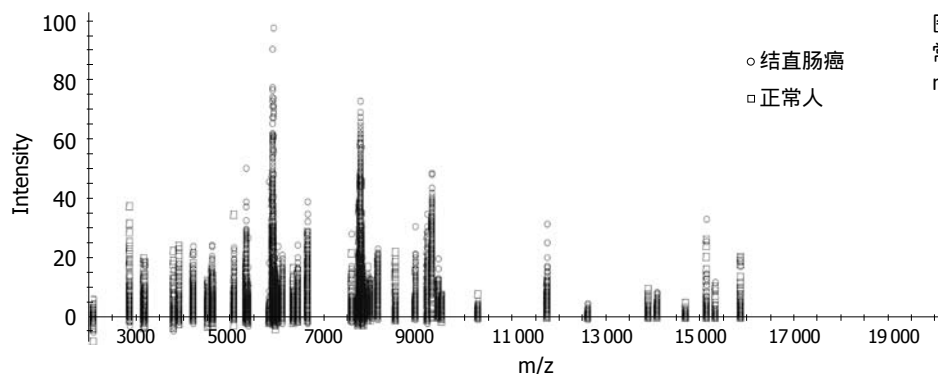


图1 结直肠癌和正常人34种差异蛋白在m/z横坐标上的分布.

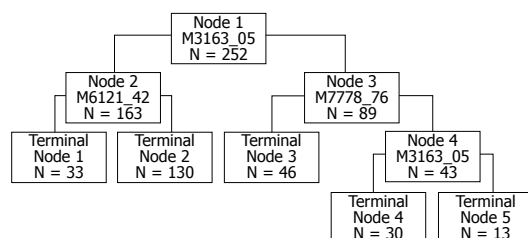


图2 分类树模型示意图.

1.2.3 芯片的预处理: 芯片每孔加100 mmol/L硫酸铜50 μ L, 室温下振荡5 min, 弃硫酸铜, 用去离子水冲洗5次后甩干, 每孔中加入100 mmol/L醋酸钠50 μ L(pH4.10)室温下振荡5 min, 弃除未结合的铜离子. 芯片每孔加入150 μ L IMAC缓冲液后, 置振荡器上室温孵育5 min后弃缓冲液, 重复1次. 每孔加入50 μ L稀释标本, 置振荡器上4 $^{\circ}$ C孵育60 min后弃缓冲液. 用150 μ L IMAC缓冲液冲洗3次, 每次振荡5 min, 最后1次用1 mmol/L HEPES pH7.0快速冲洗, 取出芯片, 在每孔周围用疏水笔圈样品孔并风干. 在2 mg EAM(SPA)中加75 μ L乙氰和1% TFA 75 μ L, 充分振荡5 min, 确保SPA全部溶解, 离心1 min; 每孔分2次加SPA(0.5 μ L/次), 2次之间允许各孔风干.

1.2.4 芯片检测: 用加有All-in-one标准蛋白质的NP20芯片校正质谱仪, 设定仪器参数, 在CiphergenProteinChip 软件中设定读片程序, 以读取芯片数据. 计算机以每秒1 G Hz的速度从所获得的原始数据快速精确的绘制出蛋白质质谱图. (1)蛋白质m/z: 结合EAM后的蛋白质在激光的轰击下电离, 带有电荷的蛋白质在加速电场的作用下, 不同质荷比的蛋白质在长度一定的真空管中飞行所需的时间不同, 蛋白质的m/z与离子飞行时间的平方成正比. 公式为: $E = UZ = 1/2 mv^2$; $t = L/V$ 推出 $m/z = Kt^2 = (2U/L^2)t^2$. 其中Z为离子所带电荷数, U为电压, V为飞行速度, L为加速飞行电场电压, K为常数. (2)蛋白质相对含量: 带有正电荷的蛋白质离子束在到达检测

器的一瞬间, 电子倍增器将产生瞬时电流($I_t = Q/t$), 其中Q为t时, 检测到的电荷数可转换成蛋白质的相对含量.

1.2.5 差异蛋白的数据库检索: 应用匹兹堡大学的EPO-KB对差异蛋白峰的m/z进行检索, 检索界面网址<http://www.dbmi.pitt.edu/EPO-KB/Query.jsp>. 检索条件为: SELDI平台, IMAC30芯片, 血清标本, m/z误差范围<0.5%.

1.2.6 差异蛋白的验证: 随机从试验样本中选取80例血清样本(其中结直肠癌54例, 正常人26例), 按试剂盒说明书操作并记录结果, 统计分析绘制ROC曲线, 评价其诊断效力.

统计学处理 将获得的SELDI-TOF-MS蛋白质质谱图进行标准化处理后, 采用Biomarker Wizard和Biomarker Pattern软件进行差异蛋白的筛选和分类树的建立. 以SPSS软件(13.0版本, SPSS INC, Chicago, IL, USA)进行病例资料及ELISA实验结果的分析, 其中对ELISA实验结果的分析使用非参数检验(Mann-Whitney U test), $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著. 用ROC曲线来选择能够将结直肠癌和正常对照组分开的合适值(包括蛋白峰强度和A值).

2 结果

2.1 芯片检测及分类树诊断模型的建立 用Biomarker Wizard软件对169例结直肠癌与83例正常人血清蛋白质质谱图比较, 结果共捕获34种差异蛋白质. 其中6种蛋白在结直肠癌患者血清中的相对含量偏低, 28种相对含量偏高, 他们在质荷比横坐标上的分布如图1. 采用Biomarker Pattern软件对模板组差异蛋白进行分析, 以m/z分别为2873, 3163, 6121, 7778等4种差异蛋白组成了分类树诊断模型(图2). 在学习模式下其诊断灵敏度91.57%, 特异度90.53%, 在测试模式下其诊断灵敏度82.25%, 特异度80.72%.

2.2 数据库检索结果 对分类树模型中m/z分别

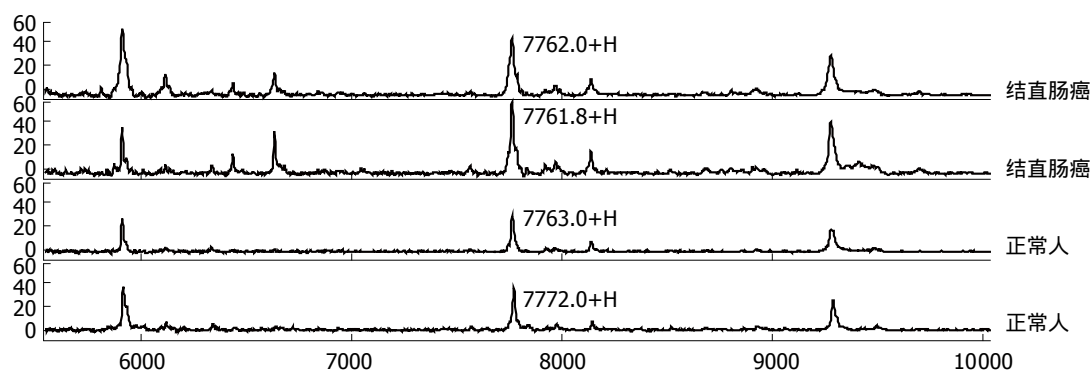


图 3 m/z为7778差异蛋白的质谱图.

名词解释

SELDI-TOF-MS: 即表面增强激光解析离子化飞行时间质谱, 由美国CiphaGen Biosystems公司发明, 是蛋白质芯片和质谱技术的结合, 主要由蛋白质芯片、芯片阅读器和生物信息学三大部分组成, 其表面可结合蛋白质的固体点, 具有高通量、高灵敏度等技术优势.

为2873, 3163, 6121, 7778的4种差异蛋白在EPO-KB中进行检索, 结果发现m/z为7778的蛋白质为PF4, 其余均未检索到. 结直肠癌患者m/z为7778的蛋白质平均峰强度为 33.67 ± 17.48 , 正常人为 17.49 ± 12.8 ($P < 0.01$, 图3). 其ROC曲线下面积为0.772. 以蛋白峰强度24.098 11040为诊断界值, $>24.098 11040$ 诊断为结直肠癌, $<24.098 11040$ 诊断为正常人, 则其诊断灵敏度为69.2%, 特异度为77.1%.

2.3 ELISA检验结果 应用非参数检验(Mann-Whitney U test), 两组差异极显著($P < 0.01$). 其ROC曲线下面积为0.709. 以A值0.78800为诊断界值, >0.78800 诊断为结直肠癌, <0.78800 诊断为正常人, 其诊断灵敏度为61.1%, 特异度为76.9%.

3 讨论

目前, 结直肠癌血清学诊断方法仍仅限于CEA、CA19-9等少数几个肿瘤标志物, 不能满足临床诊断的需要. SELDI-TOF-MS是一项非常具有潜力的适于差异蛋白质组学研究的新技术, 已成功筛选出卵巢癌、前列腺癌、膀胱癌等肿瘤蛋白标志物^[1-4]. 我们已应用SELDI-TOF-MS技术建立了结直肠癌的诊断、分期等多个分类树模型^[5-9]. SELDI-TOF-MS的结果是m/z, 而不是相对分子质量, 更不是具体的蛋白质. 然而, 从头开始的鉴定蛋白质的工作恰恰是最繁杂的, 最困难的, 而且对不同质荷比的蛋白质进行鉴定的实验方法及流程也不相同. 这严重限制了SELDI技术的应用. 有没有一种方法能让我们简单的突破蛋白质鉴定这一瓶颈呢? 这也正是Jonathan *et al*^[10]建立EPO-KB的初衷. 其实, 很多蛋白质组学的研究者已经完成了大量的基于质谱技术的蛋白质鉴定的工作^[11-13], 然而他们并不完全清楚其鉴定出的蛋白质在不同疾病中的意义. 这些前人的研究成果正是EPO-KB的

资料来源. 该数据库建立较晚, 第一篇介绍他的文章刊登在2008年生物信息学杂志上, 目前尚未有将其应用于研究的报道. 由于基于SELDI-TOF-MS平台, 应用相同芯片进行的实验本身有很好的可重复性, 本研究尝试将其应用于结直肠癌血清标志物的研究. 我们得到的m/z为7778的蛋白质峰值与应用PF4 ELISA试剂盒对结直肠癌进行诊断得到的预测值基本一致, 验证了我们通过数据库检索得到的结果, 也进一步证明了SELDI-TOF-MS联合EPO-KB的可行性. 在SELDI的基础上联合EPO-KB将使我们有可能绕过复杂的蛋白质鉴定过程, 在海量的蛋白质峰中快速得到我们所需要的蛋白质, 大大缩短研究进程.

PF4是一种血小板衍生因子, 具有抑制肿瘤血管形成的作用. Dymicka-Piekarska *et al*^[14]研究发现, PF4在结直肠癌患者血清中高表达. Cervi *et al*^[15]研究发现, PF4在多种肿瘤早期高表达. 我们曾报道过m/z为7768的蛋白质峰在结直肠癌中明显上调^[6], 与7778两者m/z差异 $<0.5\%$, 通过数据库检索两者得到的结果相同. 虽然通过ELISA法检测PF4诊断结直肠癌灵敏度和特异度尚不十分理想, 但其作为结直肠癌的候选标志物仍有进一步研究及临床应用的价值. 我们在建立4个不同质荷比的蛋白峰的诊断模型后, 只有m/z为7778的蛋白质经检索为PF4. 而7778并不是其中诊断效力最好的蛋白峰, 分析原因如下: 目前该数据库建立时间较短, 未涵盖所有的蛋白质, 本次实验着重探索这一方法的可行性, 我们在检索条件下限制为我们实验室使用的IMAC30芯片, 而该数据库中涵盖了目前研究使用的各种不同类型、型号的芯片, 如果能进一步证明在不同型号、类型芯片之间SELDI数据的可重复性, 将明显扩大检索范围. 诊断模型的

同行评价

本文通过SELDI-TOF-MS联合蛋白质组学数据库验证了PF4在结肠癌中具有较高的敏感性和特异性,认为该方法可以提高诊断效能。

建立明显优于依靠单一蛋白质的诊断,他进一步明确了模型中的蛋白质及其诊断的界值.通过免疫学的方法建立诊断模型将为今后临床应用提供一条新的思路.

4 参考文献

- 1 Petricoin EF, Ardekani AM, Hitt BA, Levine PJ, Fusaro VA, Steinberg SM, Mills GB, Simone C, Fishman DA, Kohn EC, Liotta LA. Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet* 2002; 359: 572-577
- 2 Grizzle WE, Semmes OJ, Basler J, Izbicka E, Feng Z, Kagan J, Adam BL, Troyer D, Srivastava S, Thornquist M, Zhang Z, Thompson IM. The early detection research network surface-enhanced laser desorption and ionization prostate cancer detection study: A study in biomarker validation in genitourinary oncology. *Urol Oncol* 2004; 22: 337-343
- 3 Mueller J, von Eggeling F, Driesch D, Schubert J, Melle C, Junker K. ProteinChip technology reveals distinctive protein expression profiles in the urine of bladder cancer patients. *Eur Urol* 2005; 47: 885-893; discussion 893-894
- 4 Pan YZ, Xiao XY, Zhao D, Zhang L, Ji GY, Li Y, Yang BX, He DC, Zhao XJ. Application of surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight-based serum proteomic array technique for the early diagnosis of prostate cancer. *Asian J Androl* 2006; 8: 45-51
- 5 赵光, 高春芳, 宋国英, 李冬晖, 王秀丽. 血清中蛋白质组构型对结肠癌的诊断意义. *癌症* 2004; 23: 614-618
- 6 高春芳, 赵光, 宋国英, 李冬晖, 王秀丽, 许洋, 马龙华. 用飞行质谱技术筛选结肠癌患者中特异性生物标志物的临床意义. *中华检验医学杂志* 2003; 26: 658-661
- 7 高春芳, 赵光, 郑国宝, 李冬晖, 王秀丽. 利用血清中蛋白质组构型鉴定Dukes A期结肠癌. *解放军医学杂志* 2005; 30: 460-462
- 8 张剑锋, 高春芳, 王秀丽, 郑国宝, 李冬晖, 沈东海. 结肠癌分类树模型建立的初步探讨. *中华消化杂志* 2007; 27: 487-488
- 9 张剑锋, 高春芳, 王秀丽, 郑国宝, 李冬晖. 结肠癌肿瘤标记物的筛选及其表达变化. *中华外科杂志* 2007; 45: 459-461
- 10 Lustgarten JL, Kimmel C, Ryberg H, Hogan W. EPO-KB: a searchable knowledge base of biomarker to protein links. *Bioinformatics* 2008; 24: 1418-1419
- 11 Timms JF, Arslan-Low E, Gentry-Maharaj A, Luo Z, T'Jampens D, Podust VN, Ford J, Fung ET, Gammerman A, Jacobs I, Menon U. Preanalytic influence of sample handling on SELDI-TOF serum protein profiles. *Clin Chem* 2007; 53: 645-656
- 12 Vermeulen R, Lan Q, Zhang L, Gunn L, McCarthy D, Woodbury RL, McGuire M, Podust VN, Li G, Chatterjee N, Mu R, Yin S, Rothman N, Smith MT. Decreased levels of CXC-chemokines in serum of benzene-exposed workers identified by array-based proteomics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 17041-17046
- 13 Meuwis MA, Fillet M, Geurts P, de Seny D, Lutteri L, Chapelle JP, Bours V, Wehenkel L, Belaiche J, Malaise M, Louis E, Merville MP. Biomarker discovery for inflammatory bowel disease, using proteomic serum profiling. *Biochem Pharmacol* 2007; 73: 1422-1433
- 14 Dymicka-Piekarska V, Butkiewicz A, Kemona H, Gryko M, Mantur M. [Does colorectal cancer clinical advancement and surgical treatment affect platelet factor 4 concentration] *Pol Merkur Lekarski* 2004; 17: 575-578
- 15 Cervi D, Yip TT, Bhattacharya N, Podust VN, Peterson J, Abou-Slaybi A, Naumov GN, Bender E, Almog N, Italiano JE Jr, Folkman J, Klement GL. Platelet-associated PF-4 as a biomarker of early tumor growth. *Blood* 2008; 111: 1201-1207

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

WJG 成功通过评审被 PMC 收录

本刊讯 PubMed Central(PMC)是由美国国家医学图书馆(NLM)下属国家生物技术信息中心(NCBI)创立的开放存取(Open Access)的生物医学和生命科学全文数据库.此数据库只收录采取国际同行评审制度评议的期刊,并对收录期刊有较高的科学、编辑及数据文件质量要求.

截至目前,我国只有两本期刊被PMC收录.《浙江大学学报B》(英文版)(*Journal of Zhejiang University Science B*)是我国第一本通过PMC评审并于2006-03-15被收录的期刊.《世界胃肠病学杂志》(英文版)(*World Journal of Gastroenterology, WJG*)第二本通过PMC评审并于2009-03-26被收录,全文免费向公众开放,见: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/tocrender.fcgi?journal=818&action=archive>(WJG编辑部主任:程剑侠 2009-09-28)