

HBV preS2反义锁核酸在HepG2.2.15细胞内的抗病毒效果

张 梁, 邓益斌, 邓巧莹

■背景资料

近年来, 锁核酸(LNA)是新发现的一种在2'-O与4'-C发生缩水作用而形成带环状结构的核苷酸衍生物, 具有稳定性好、分子杂交能力强、抗核酸酶降解能力强、脂溶性好和低细胞毒性等特点, 因而具有广阔的研究与应用前景。

张梁, 邓益斌, 邓巧莹, 广西右江民族医学院附属医院医学检验中心 广西壮族自治区百色市 533000

作者贡献分布: 该实验由张梁与邓益斌设计; 实验过程由张梁、邓益斌及邓巧莹共同完成; 实验研究所需试剂及分析工具由邓益斌提供; 数据分析由张梁完成; 论文写作由张梁完成, 邓益斌审核。

通讯作者: 邓益斌, 533000, 广西壮族自治区百色市右江区中山二路18号, 广西右江民族医学院附属医院医学检验中心。

enbin0776@sina.com

电话: 0776-2840703

收稿日期: 2009-10-30 修回日期: 2009-12-03

接受日期: 2009-12-07 在线出版日期: 2009-12-28

Hepatitis B virus preS2 gene-specific locked nucleic acid antisense oligonucleotides significantly inhibit hepatitis B virus replication and expression in HepG2 2.2.15 cells

Liang Zhang, Yi-Bin Deng, Qiao-Ying Deng

Liang Zhang, Yi-Bin Deng, Qiao-Ying Deng, Center for Medical Laboratory Science, the Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Correspondence to: Yi-Bin Deng, Center for Medical Laboratory Science, the Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, 18 Zhongshan Second Road, Youjiang District, Baise 533000, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. enbin0776@sina.com

Received: 2009-10-30 Revised: 2009-12-03

Accepted: 2009-12-07 Published online: 2009-12-28

Abstract

AIM: To investigate the inhibitory effects of hepatitis B virus (HBV) preS2 gene-specific locked nucleic acid (LNA) antisense oligonucleotides on HBV replication and expression in HepG2 2.2.15 cells.

METHODS: Three LNA antisense oligonucleotides of different lengths that are complementary to the translation initiation region of the HBV preS2 gene were designed, synthesized and introduced into HepG2 2.2.15 cells by cationic liposome-mediated transfection. Hepatitis B surface antigen (HbsAg) and HBV DNA levels in cell supernatant were tested by time-resolved immunofluorescence assay (TRFIA) and fluo-

rescent quantitative-polymerase chain reaction (FQ-PCR). The inhibitory effects of different antisense oligonucleotides on HBV DNA replication and expression were compared. The cell toxicity of LNA antisense oligonucleotides was evaluated by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay.

RESULTS: On day 1 after transfection with LNA antisense oligonucleotides, the expression of HBsAg and the replication of HBV DNA were inhibited. On day 7, the reduced rates of HBsAg and HBV DNA levels were 45.79%, 52.92% and 67.21% as well as 35.15%, 40.69% and 52.16% in the non-modified antisense oligonucleotide group, all-phosphorothioate-modified antisense oligonucleotide group and LNA antisense oligonucleotide group, respectively. LNA antisense oligonucleotides showed the strongest inhibitory effects on viral activity and had no impact on cell metabolism. Compared with the control group, the reduced rates of HBsAg and HBV DNA levels achieved in each of the above groups were significantly higher (all $P < 0.01$). Moreover, the reduced rates of HBsAg and HBV DNA levels in the LNA antisense oligonucleotide group were significantly higher than those in other antisense oligonucleotide groups (all $P < 0.05$).

CONCLUSION: LNA antisense oligonucleotides targeting the preS2 gene can effectively inhibit the replication and expression of HBV *in vitro*. The preS2 gene can be used as an effective target for gene therapy of HBV infection.

Key Words: Hepatitis B virus; Locked nucleic acid; Hepatitis B virus preS2 gene; HepG2 2.2.15 cells; Gene therapy

Zhang L, Deng YB, Deng QY. Hepatitis B virus preS2 gene-specific locked nucleic acid antisense oligonucleotides significantly inhibit hepatitis B virus replication and expression in HepG2 2.2.15 cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(36): 3720-3724

摘要

目的: 探讨针对HBV preS2基因mRNA翻译起始区的反义锁核酸(LNA)片段在2.2.15细胞内

■同行评议者

潘秀珍, 教授, 福建省立医院消化内科

抗HBV复制和表达的作用。

方法: 分别合成三段互补于HBV preS2基因mRNA翻译起始区同一靶位的反义锁核酸、全硫代反义寡核苷酸、未修饰寡核苷酸及无关对照序列, 以阳离子脂质体作为载药体系, 作用于HepG22.2.15细胞, 采用时间分辨免疫荧光技术(TRFIA)和荧光定量聚合酶链技术(FQ-PCR)动态检测细胞上清液中HBsAg和HBV DNA的含量, 并比较其抑制HBV DNA复制与表达的作用; 以四甲基偶氮唑蓝(MTT)法检测LNA对细胞的毒性。

结果: 加入LNA后第1天, 即出现对HBsAg表达和HBV DNA复制的抑制作用, 第7天, 未修饰反义寡核苷酸组、全硫代修饰反义寡核苷酸组、反义锁核酸组对HBsAg表达的抑制率分别达45.79%、52.92%和67.21%; 对HBV DNA复制的抑制率分别达35.15%、40.69%和52.16%。其中LNA抑制病毒活性最强且对细胞代谢无影响。各组与对照组比较均有显著性差异(均 $P<0.01$), 且反义LNA组与其他ASODN组比较也有显著性差异(均 $P<0.05$)。

结论: 针对preS2基因的反义锁核酸体外能有效抑制HBV的复制与表达, 故preS2基因可作为乙型肝炎基因治疗的有效靶位。

关键词: 乙型肝炎病毒; 锁核酸; 前S2基因; 2.2.15细胞; 基因治疗

张梁, 邓益斌, 邓巧莹. HBV preS2反义锁核酸在HepG22.2.15细胞内的抗病毒效果. 世界华人消化杂志 2009; 17(36): 3720-3724
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3720.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)是一种严重危害人类健康的重要病原体, 其感染人体后可引起急、慢性乙型肝炎, 并与肝硬化、肝细胞癌密切相关, 已成为全球性健康问题^[1-5]。目前尚无特效药^[6-12]。因此, 探索专一性强、不良反应小的新型抗HBV药物具有重要意义。已经证实由preS1、preS2和S 3个基因所共同编码的蛋白质, 在HBV附着、侵入肝细胞的过程中发挥着重要作用, 他不仅参与HBV的复制、转录、装配和分泌过程, 还参与调节HBV引起的细胞及体液免疫应答反应, 故针对preS2基因设计合成反义寡聚脱氧核苷酸(antisense oligodeoxynucleotide, ASODN), 可能会抑制

preS2蛋白的合成, 从而影响HBV的复制与表达。但由于传统反义寡核苷酸的稳定性差, 分子杂交能力不强, 抗核酸酶降解能力弱等原因, 故一直未取得满意效果。锁核酸(locked nucleic acid, LNA)是新近发现的一种带环状结构形似锁状或桥状的核苷酸衍生物, 具有稳定性好、分子杂交能力高、抗核酸酶降解能力强和低毒性等优势^[13-21], 而成为基因诊断和治疗研究领域的热点。我们前期研究结果表明, 针对S基因的反义锁核酸能有效抑制HBV的复制与表达^[22-24]。为了进一步探索针对HBV的有效治疗基因靶位, 我们在前期研究的基础上, 设计针对preS2基因的反义LNA, 以HepG22.2.15细胞为实验对象, 阳离子脂质体为载药体系, 通过检测细胞培养上清液中HBsAg及HBV DNA含量变化, 探讨其抑制效果。

1 材料和方法

1.1 材料 HepG22.2.15细胞由中国人民解放军广州军区空军医院刘光泽博士惠赠, 该细胞株为HBV DNA全基因转染肝癌细胞系HepG2, 能稳定分泌HBsAg, 本室常规培养于含G418(380 IU/ml)、100 mL/L胎牛血清的DMEM培养基中, 37℃、50 mL/L CO₂条件下5-6 d传代1次; DMEM培养基、G418为Gibco产品; 胎牛血清购自杭州四季清公司; Lipofectamine™2000购自Invitrogen公司; HBsAg定量检测试剂盒为苏州新波生物技术有限公司产品; HBV DNA定量检测试剂盒为深圳匹基生物有限公司产品; 时间分辨免疫荧光技术仪为苏州新波生物技术有限公司产品; 荧光定量PCR仪为美国ABI公司产品。

1.2 方法

1.2.1 反义LNA片段合成与修饰: 针对HBV (ayw亚型)preS2 mRNA翻译起始区同一位点(3201-3214 nt)分别设计合成以下几段14聚脱氧核苷酸: (1)未修饰反义寡核苷酸, 其序列为: 5'-tccactgcatggcc-3'; (2)全硫代反义寡核苷酸, 碱基序列同前, 全硫代修饰; (3)反义锁核酸, 碱基序列为: 5'-TccAcTgcATggCc-3', 其中, 6个大写字母代表LNA, 8个小写字母代表DNA; (4)无关对照序列, 即5'-ataagcattacat-3'。以上序列经BLAST排除与人同源后由美国Genelink公司合成修饰并纯化。

1.2.2 脂质体包裹反义LNA的制备: 脂质体与反义LNA按1:10比例充分混匀(1 μg反义LNA+10 μL脂质体), 室温下静置1 h后, 即形成稳定的脂

■研究前沿

反义核酸技术作为分子生物学的新型抗基因技术, 目前不仅广泛应用于生理学、病理学、药理学等学科的基础研究, 而且已成为药物发展的新兴策略。在反义核酸技术基础上发展起来的反基因技术, 即三螺旋构象寡核苷酸技术(TFO)是目前研究的热点, 目前亟待解决的问题一是找到一种满意的肝靶向性核酸药物载体, 另外就是开发特异性抗HBV药物。

■创新盘点

本实验在前期研究基础上, 针对preS2基因设计合成反义LNA, 并将其应用于抗HBV感染的治疗研究.

表 1 各组ASODN对HepG22.2.15细胞HBsAg表达的影响 ($n = 6$, mean \pm SD, $\mu\text{g/L}$)

分组	用药前	用药后			
		第1天	第3天	第5天	第7天
空白对照	106.97 \pm 8.02	107.23 \pm 7.31	107.45 \pm 7.83	106.15 \pm 7.58	108.72 \pm 7.94
无关序列对照	106.32 \pm 7.22	108.15 \pm 7.52	107.38 \pm 6.91	107.47 \pm 7.16	108.10 \pm 7.03
未修饰ASODN	107.30 \pm 7.11 ^b	96.81 \pm 6.76 ^b	75.92 \pm 5.83 ^b	69.12 \pm 6.10 ^b	58.17 \pm 6.98 ^b
全硫代修饰ASODN	106.91 \pm 7.53 ^b	86.42 \pm 6.94 ^b	73.42 \pm 6.22 ^b	61.83 \pm 6.85 ^b	50.33 \pm 6.58 ^b
反义LNA	107.40 \pm 7.07 ^{bc}	78.19 \pm 6.48 ^{bc}	61.53 \pm 6.18 ^{bc}	42.95 \pm 6.05 ^{bc}	35.22 \pm 5.97 ^{bc}

^b $P < 0.01$ vs 同时点对照组; ^c $P < 0.05$ vs ASODN组.

质体-LNA混合物.

1.2.3 HepG22.2.15细胞培养与转染: 将HepG22.2.15细胞按 $1 \times 10^8/\text{L}$ 接种于96孔培养板, 每孔100 μL , 设定5个组(即未修饰ASODN组、全硫代ASODN组、反义LNA组、无关对照序列和不加药的空白对照组), 每组各设6个复孔, 待细胞贴壁后吸取培养上清液(-20°C 保存), 分别在各组每孔中一次性加入含LNA量为10 $\mu\text{mol/L}$ 的LNA-Lipo-DMEM混合液1 mL, 分别于1、3、5、7 d收集各孔培养上清液保存于 -20°C 待测.

1.2.4 培养上清液HBsAg含量测定: 采用时间分辨免疫荧光技术(TRFIA), 每个样品重复3次, 取均值, 严格按说明书操作.

1.2.5 培养上清液HBV DNA含量测定: 采用实时荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR)法检测. 取培养上清液50 μL , 加等量体积DNA提取液, 充分混匀, 100°C 恒温处理10 min, 1200 r/min离心5 min, 取2 μL 上清于PCR反应管中并加入反应液, 总体积共25 μL , 各反应管放入荧光定量PCR仪, 扩增条件: 37°C 保温2 min, 94°C 预变性3 min, 94°C 5 s, 60°C 40 s, 共35个循环. 由计算机软件自动分析所收集的荧光信号并计算出定量结果, 采用计算对数平均值的方法计算HBV DNA平均拷贝数.

1.2.6 LNA对细胞的毒性检测: 采用MTT比色法检测LNA对细胞代谢活性的影响.

统计学处理 所有数用mean \pm SD表示, 应用SPSS13.0统计软件处理, 组间比较采用Two-way ANOVA方差分析的LSD检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义. 抑制率(%) = (用药前N-用药后N)/用药前N \times 100%.

2 结果

2.1 LNA对HepG22.2.15细胞HBsAg表达的影响 加入LNA后第1天, 即出现对HBsAg表达的抑制

作用, 第3、5和7天时, 各组对HBsAg的抑制率分别为: 未修饰ASODN组29.25%、35.58%和45.79%; 全硫代修饰ASODN组31.32%、42.17%和52.92%; 反义LNA组42.71%、60.01%和67.21%. 各组与对照组比较均有显著性差异(均 $P < 0.01$), 且反义LNA组与其他ASODN组比较也有显著性差异(均 $P < 0.05$, 表1).

2.2 LNA对HepG22.2.15细胞HBV DNA复制的影响 加入LNA后第3天, 即出现对HBV DNA复制的抑制作用, 第5、7天时, 各组对HBV DNA的抑制率分别为: 未修饰ASODN组28.26%、35.15%; 全硫代修饰ASODN组32.67%、40.69%; 反义LNA组47.47%、52.16%. 各组与对照组比较均有显著性差异(均 $P < 0.01$), 且反义LNA组与其他ASODN组比较也有显著性差异(均 $P < 0.05$, 表2).

2.3 LNA-Lipo混合物对HepG22.2.15细胞活性的影响 用药7 d后, 采用MTT比色法测定各组A值, 无关序列、未修饰ASODN、全硫代修饰ASODN和反义LNA组的A值分别为 1.18 ± 0.05 、 1.16 ± 0.04 、 1.15 ± 0.04 和 1.14 ± 0.04 , 与空白对照组(A值为 1.23 ± 0.04)比较均无差异性, 表明LNA对细胞基本无毒性.

3 讨论

HBV DNA至少有4个开放读码框^[25-26]: S、C、P、X, 其中, S区是HBV DNA的一个重要开放读码框, 包括preS1、preS2和S 3个基因, 共同编码由389个氨基酸残基组成的一种蛋白质, 是S区编码产物中分子量最大的一种, 称为大蛋白. 大蛋白是HBsAg的主要组成部分, 不仅参与HBV颗粒的装配与成熟, 还与HBV在肝细胞间的弥漫性感染密切相关.

本研究针对preS2基因设计合成反义LNA, 由阳离子脂质体介导, 以HepG22.2.15细胞为研究对象, 通过检测细胞培养上清液中的HBsAg

表 2 各组ASODN对HepG2.2.15细胞HBV DNA复制的影响 ($n = 6$, mean \pm SD, 拷贝数log10数值)

分组	用药前	用药后			
		第1天	第3天	第5天	第7天
空白对照	5.49 \pm 0.17	5.39 \pm 0.16	5.40 \pm 0.17	5.48 \pm 0.19	5.55 \pm 0.16
无关序列对照	5.47 \pm 0.17	5.38 \pm 0.14	5.42 \pm 0.13	5.61 \pm 0.17	5.58 \pm 0.18
未修饰ASODN	5.52 \pm 0.15 ^b	4.90 \pm 0.17 ^b	4.39 \pm 0.15 ^b	3.96 \pm 0.17 ^b	3.58 \pm 0.14 ^b
全硫代修饰ASODN	5.48 \pm 0.19 ^b	4.81 \pm 0.16 ^b	4.10 \pm 0.15 ^b	3.69 \pm 0.18 ^b	3.25 \pm 0.15 ^b
反义LNA	5.54 \pm 0.15 ^{bc}	4.50 \pm 0.18 ^{bc}	3.42 \pm 0.13 ^{bc}	2.91 \pm 0.19 ^{bc}	2.65 \pm 0.14 ^{bc}

^b $P < 0.01$ vs 同时时间点对照组; ^c $P < 0.05$ vs ASODN组.

和HBV DNA水平来判断他的疗效. 结果显示, 针对preS2基因的反义LNA, 体外能有效抑制HBsAg的表达, 其抑制率最高可达67.21%, 且随作用时间延长呈增高趋势, 这将为反义LNA用于抗HBV的基因治疗研究提供了参考价值. 但其抑制率是否持续性增高, 还有待于进一步的研究. 研究结果还表明, 反义LNA对HBV DNA的复制也有抑制作用, 抑制率最高为52.16%, 原因可能是LNA的高亲和力、强抗核酸酶降解能力和良好的脂溶性, 促使部分LNA通过核孔进入细胞核内, 结合到与基因组cccDNA的编码链上, 形成三链杂交分子, 从复制和转录水平发挥抗病毒效果, 其作用机制还有待于进一步的研究. 由于HBV DNA聚合酶缺乏校对作用, 在复制过程中易产生变异株而导致对药物治疗敏感降低或耐药现象, 因此, 尚需要研究多基因位点的抗HBV药物或疗法^[27].

此外, 通过MTT比色、细胞计数、活细胞比率、细胞形态观察, 证实LNA对细胞的代谢活性无明显毒性作用.

总之, 针对preS2基因的反义LNA体外能有效抑制HBV的复制与表达, 故preS2基因可作为乙型肝炎基因治疗的有效靶位.

4 参考文献

- 1 Alter MJ. Epidemiology of hepatitis B in Europe and worldwide. *J Hepatol* 2003; 39 Suppl 1: S64-S69
- 2 Fleming J. Current treatments for hepatitis. *J Infus Nurs* 2002; 25: 379-382
- 3 elSaadany S, Tepper M, Mao Y, Semenciw R, Giulivi A. An epidemiologic study of hepatocellular carcinoma in Canada. *Can J Public Health* 2002; 93: 443-446
- 4 Hassan MM, Hwang LY, Hatten CJ, Swaim M, Li D, Abbruzzese JL, Beasley P, Patt YZ. Risk factors for hepatocellular carcinoma: synergism of alcohol with viral hepatitis and diabetes mellitus. *Hepatology* 2002; 36: 1206-1213
- 5 Kannangai R, Molmenti E, Arrazola L, Klein A, Choti M, Thomas DL, Torbenson M. Occult

- hepatitis B viral DNA in liver carcinomas from a region with a low prevalence of chronic hepatitis B infection. *J Viral Hepat* 2004; 11: 297-301
- 6 Hino O, Kajino K, Umeda T, Arakawa Y. Understanding the hypercarcinogenic state in chronic hepatitis: a clue to the prevention of human hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol* 2002; 37: 883-887
- 7 Buti M, Esteban R. Drugs in development for hepatitis B. *Drugs* 2005; 65: 1451-1460
- 8 Wai CT, Chu CJ, Hussain M, Lok AS. HBV genotype B is associated with better response to interferon therapy in HBeAg(+) chronic hepatitis than genotype C. *Hepatology* 2002; 36: 1425-1430
- 9 Manns MP. Current state of interferon therapy in the treatment of chronic hepatitis B. *Semin Liver Dis* 2002; 22 Suppl 1: 7-13
- 10 Liaw YF. Therapy of chronic hepatitis B: current challenges and opportunities. *J Viral Hepat* 2002; 9: 393-399
- 11 Wolters LM, Hansen BE, Niesters HG, de Man RA. Viral dynamics in chronic hepatitis B patients treated with lamivudine, lamivudine-famciclovir or lamivudine-ganciclovir. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002; 14: 1007-1011
- 12 Song JW, Zhang G, Lin JG, Tang WX, Lin JS. [Clinical study of lamivudine and interferon combinate administration to inhibit hepatitis B virus replication] *Zhonghua Ganzhangbing Zazhi* 2004; 12: 593-596
- 13 Inohara H, Obika S, Imanishi T. 2',4'-BNA derivatives bearing an unnatural nucleobase: synthesis and application to triplex-forming oligonucleotides. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)* 2004; 63-64
- 14 Rapozzi V, Cogoi S, Xodo LE. Antisense locked nucleic acids efficiently suppress BCR/ABL and induce cell growth decline and apoptosis in leukemic cells. *Mol Cancer Ther* 2006; 5: 1683-1692
- 15 Swayze EE, Siwkowski AM, Wanczewicz EV, Migawa MT, Wyrzykiewicz TK, Hung G, Monia BP, Bennett CF. Antisense oligonucleotides containing locked nucleic acid improve potency but cause significant hepatotoxicity in animals. *Nucleic Acids Res* 2007; 35: 687-700
- 16 Elmén J, Thonberg H, Ljungberg K, Frieden M, Westergaard M, Xu Y, Wahren B, Liang Z, Ørum H, Koch T, Wahlestedt C. Locked nucleic acid (LNA) mediated improvements in siRNA stability and functionality. *Nucleic Acids Res* 2005; 33: 439-447
- 17 Castoldi M, Schmidt S, Benes V, Noerholm M,

■应用要点

本研究表明, 针对preS2基因的反义锁核酸体外能有效抑制HBV的复制与表达, preS2基因可作为乙型肝炎基因治疗的有效靶位, 为今后反义核酸药物研发提供了理论与实验参考.

■同行评价

本文对HBV preS2反义锁核酸在HepG2.2.15细胞内的抗病毒效果进行了研究,方法先进,结果对乙型肝炎的基因治疗提供理论依据,有一定临床参考价值。

- Kulozik AE, Hentze MW, Muckenthaler MU. A sensitive array for microRNA expression profiling (miChip) based on locked nucleic acids (LNA). *RNA* 2006; 12: 913-920
- 18 Vester B, Hansen LH, Lundberg LB, Babu BR, Sørensen MD, Wengel J, Douthwaite S. Locked nucleoside analogues expand the potential of DNAzymes to cleave structured RNA targets. *BMC Mol Biol* 2006; 7: 19
- 19 Wengel J, Petersen M, Frieden M, Koch T. Chemistry of locked nucleic acids (LNA): Design, synthesis, and bio-physical properties. *Lett Pept Sci* 2003; 10: 237-253
- 20 Braasch DA, Liu Y, Corey DR. Antisense inhibition of gene expression in cells by oligonucleotides incorporating locked nucleic acids: effect of mRNA target sequence and chimera design. *Nucleic Acids Res* 2002; 30: 5160-5167
- 21 Braasch DA, Corey DR. Locked nucleic acid (LNA): fine-tuning the recognition of DNA and RNA. *Chem Biol* 2001; 8: 1-7
- 22 唐盈, 王燕菲. 针对HBVS基因的反义锁核酸抗乙肝病毒表达的初探. *江西医药* 2006; 41: 205-208
- 23 邓益斌, 王燕菲. 阳离子脂质体介导双靶区反义锁核酸抗病毒疗效研究. *国际流行病学传染病学杂志* 2008; 35: 149-153
- 24 邓益斌, 农乐根, 王燕菲. HBV S基因的反义锁核酸对乙型肝炎转基因小鼠HBV复制和表达的影响. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 2338-2345
- 25 Funk A, Mhamdi M, Will H, Sirma H. Avian hepatitis B viruses: molecular and cellular biology, phylogenesis, and host tropism. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 91-103
- 26 Madden CR, Finegold MJ, Slagle BL. Hepatitis B virus X protein acts as a tumor promoter in development of diethylnitrosamine-induced preneoplastic lesions. *J Virol* 2001; 75: 3851-3858
- 27 张政, 席宏丽, 公维波, 李文刚, 于敏, 曾争, 徐小元. 逆转录病毒介导双靶区反义RNA在转基因小鼠肝细胞中的表达及对HBV DNA复制的影响. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 2551-2555

编辑 李军亮 电编 何基才

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》参考文献要求

本刊讯 本刊采用“顺序编码制”的著录方法,即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序.提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映,并在文内引用处右上角加方括号注明角码.文中如列作者姓名,则需在“Pang *et al*”的右上角注角码;若正文中仅引用某文献中的论述,则在该论述的句末右上角注角码.如马连生^[1]报告……,潘伯荣 *et al*^[2-5]认为……;PCR方法敏感性高^[6-7].文献序号作正文叙述时,用与正文同角的数字并排,如本实验方法见文献[8].所引参考文献必须以近2-3年SCIE, PubMed,《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊为准,通常应只引用与其观点或数据密切相关的国内外期刊中的最新文献,包括世界华人消化杂志(<http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.jsp>)和 *World Journal of Gastroenterology*(<http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.jsp>).期刊:序号,作者(列出全体作者).文题,刊名,年,卷,起页-止页, PMID编号;书籍:序号,作者(列出全部),书名,卷次,版次,出版地,出版社,年,起页-止页. (科学编辑:李军亮 2009-12-28)