

# 丙型肝炎病毒E2结合蛋白基因在人胰腺细胞cDNA文库中的筛选

张婷, 任娜, 田梅梅, 李贵, 张锦前, 成军

## ■背景资料

随着人们生活水平的提高, 代谢性疾病对人类危害日益加大, 其中代谢综合征(MS)为主要表现之一。MS与肥胖、2型糖尿病、高脂血症、心血管系统疾病以及结肠癌、肾癌、胰腺癌和肝细胞癌等有关, 以中心性肥胖和胰岛素抵抗为重要致病因素, 主要病理生理基础是胰岛素抵抗。

张婷, 任娜, 田梅梅, 李贵, 张锦前, 成军, 北京地坛医院 首都医科大学传染病研究所 北京市 100015

国家自然科学基金资助项目, No. 30600524

作者贡献分布: 此课题由张锦前设计; 研究过程由张婷、任娜、田梅梅、李贵及张锦前操作完成; 数据分析由张婷、任娜、田梅梅、李贵及张锦前完成; 本论文写作由张婷、张锦前及成军完成。

通讯作者: 成军, 主任医师, 100015, 北京市朝阳区京顺东街8号, 北京地坛医院, 首都医科大学传染病研究所。

cj@genetherapy.com.cn

电话: 010-84322291

收稿日期: 2010-01-07 修回日期: 2010-11-02

接受日期: 2010-11-23 在线出版日期: 2010-12-28

## Screening of proteins binding to hepatitis C virus E2 protein from a human pancreas cDNA library

Ting Zhang, Na Ren, Mei-Mei Tian, Ben Li, Jin-Qian Zhang, Jun Cheng

Ting Zhang, Na Ren, Mei-Mei Tian, Ben Li, Jin-Qian Zhang, Jun Cheng, Beijing Ditan Hospital; Institute of Infectious Diseases of Capital Medical University, Beijing 100015, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30600524

Correspondence to: Jun Cheng, Beijing Ditan Hospital, Institute of Infectious Diseases of Capital Medical University, 8 Shundong Avenue, Chaoyang District, Beijing 100015, China. cj@genetherapy.com.cn

Received: 2010-01-07 Revised: 2010-11-02

Accepted: 2010-11-23 Published online: 2010-12-28

## Abstract

**AIM:** To screen proteins that interact with hepatitis C virus (HCV) E2 protein from a human pancreas cDNA library.

**METHODS:** A human pancreas cDNA library was amplified, purified and identified, and the purified library plasmid was transformed into yeast strain Y187. Bait plasmid pGBKT7-E2 was transformed into yeast strain AH109 and selected on SD/-Trp medium. Transformed AH109 clones were then mated with Y187 strain containing the library plasmid. The resulting diploid yeast cells were plated on SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade medium with or without X- $\alpha$ -

gal for selection. The plasmids in diploid yeast cells were prepared and electrotransformed into *E. coli* DH5 $\alpha$ . The plasmids in DH5 $\alpha$  were prepared, sequenced, and blasted against GenBank.

**RESULTS:** A human pancreas cDNA library was constructed successfully. The bait plasmid (pGBKT7-HCV E2) was transformed into AH109 yeast cells successfully. Eight proteins interacting with HCV E2 were identified, including chymotrypsinogen B1, trypsinogen, carboxyl ester lipase, CDK5, carboxypeptidase, human v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homologue, elastase 3A, and colipase.

**CONCLUSION:** Eight pancreatic proteins that interact with HCV E2 have been screened from a human pancreas cDNA library.

**Key Words:** Pancreas; Hepatitis C virus; Pancreas cDNA library; Hybridization; Genetics

Zhang T, Ren N, Tian MM, Li B, Zhang JQ, Cheng J. Screening of proteins binding to hepatitis C virus E2 protein from a human pancreas cDNA library. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(36): 3900-3904

## 摘要

**目的:** 筛选人胰腺细胞cDNA文库中与HCV包膜糖蛋白E2相互作用的结合蛋白的编码基因。

**方法:** 扩增人胰腺细胞cDNA文库进行纯化鉴定, 并将文库质粒转化酵母菌株Y187。诱饵质粒pGBKT7-E2转化酵母菌株AH109, 在色氨酸缺陷型培养基(SD/-Trp)上筛选阳性菌落。应用酵母双杂交系统3将阳性重组AH109菌株与重组酵母菌株Y187进行配合, 在4缺培养基(SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade)和铺有X- $\alpha$ -gal的4缺培养基上进行筛选, 提取蓝色酵母菌落质粒, 电转化大肠埃希菌DH5 $\alpha$ 后再提取质粒测序。测序结果进行序列比对。

**结果:** 成功构建人胰腺cDNA文库以及pGBKT7-HCV E2重组质粒, 筛选出8种与HCV E2蛋白相结合的蛋白基因, 分别为: 胰凝乳蛋

## ■同行评议者

吴君, 主任医师, 贵阳医学院附属医院感染科; 党双锁, 教授, 西安交通大学第二医院感染科

白酶原B1前体、胰蛋白酶原、胆盐刺激酯酶、CDK5、羧肽酶B1、人类v-Ki-ras2、鼠Kirsten肉瘤、弹性蛋白酶3A及辅脂肪酶。

**结论:** 筛选出的与HCV E2蛋白结合的人胰腺细胞蛋白基因中,部分与2型糖尿病、肝脏脂肪变性密切相关。

**关键词:** 胰腺; 丙型肝炎病毒; 人胰腺cDNA文库; 酵母菌杂交; 遗传

张婷, 任娜, 田梅梅, 李贵, 张锦前, 成军. 丙型肝炎病毒E2结合蛋白基因在人胰腺细胞cDNA文库中的筛选. 世界华人消化杂志 2010; 18(36): 3900-3904

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3900.asp>

## 0 引言

随着人们生活水平的提高,代谢性疾病对人类危害日益加大,其中代谢综合征(metabolic syndrome, MS)为主要表现之一。MS与肥胖、2型糖尿病、高脂血症、心血管系统疾病以及结肠癌、肾癌、胰腺癌和肝细胞癌等有关,以中心性肥胖和胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)为重要致病因素,主要病理生理基础是IR。有相关研究报道,丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)感染与糖尿病、移植后糖尿病、地中海贫血患者伴发的糖尿病或糖代谢异常均有相关性<sup>[1]</sup>。而且,肝脂肪变的存在与慢性丙型肝炎(chronic hepatitis C, CHC)的疾病进展有关<sup>[2]</sup>。另外, Mason等<sup>[3]</sup>指出HCV感染与糖尿病(diabetes mellitus, DM)密切相关。HCV包膜糖蛋白E2是一种多功能蛋白质,与HCV感染的慢性化和抗病毒免疫关系密切。因此我们应用酵母双杂交技术筛选人胰腺细胞cDNA文库中的HCV E2结合蛋白基因,为研究HCV慢性感染与MS、IR之间的相关性及其作用机制,以及进而影响糖、脂类代谢的分子生物学机制提供了重要信息。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** YPDA SD/-Trp、SD/-Leu、SD/-Trp/-Leu、SD/-Trp/-Leu/-His以及SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade培养基均购自美国Clontech公司。酵母双杂交系统3试剂盒: 其中包括人胰腺细胞cDNA文库、pGADT7-AD克隆载体、pGBKT7-BD克隆载体、pGADT7-T对照质粒、pGBKT7-53对照质粒、酵母菌株AH109、酵母菌株Y187, 购自美国Clontech公司。引物合成由北京奥科生物技术公司完成。

## 1.2 方法

**1.2.1 酵母胰腺细胞cDNA文库的构建:** 按试剂盒说明书对文库进行扩增,纯化文库质粒后转化大肠埃希菌DH5 $\alpha$ 感受态细胞,随机挑取6个单克隆提取质粒, *Eco*R I、*Xho* I 双酶切鉴定cDNA文库的多样性。然后将该文库转化酵母菌株Y187,制备酵母胰腺细胞cDNA文库。提取新鲜生长的Y187酵母菌落(直径>2 mm)接种于150 mL YPDA液体培养基中,30℃振荡培养至 $A_{600}$ >1.5时,把该培养物转摇至850 mL YPDA液体培养基中,30℃振荡培养至 $A_{600}$ =0.4-0.6。以醋酸锂法将胰腺细胞cDNA文库质粒(0.25 mg)转化入酵母菌株Y187进行文库转化,然后将转化物铺SD/-Leu板50块,30℃倒置温育7 d。同时将转化产物按1:10、1:1 $\times 10^2$ 、1:1 $\times 10^4$ 、1:1 $\times 10^6$ 和1:1 $\times 10^8$ 分别铺于SD/-Leu培养基上检验转化效率。同时将pGADT7-AD和pGADT7-T对照质粒转化酵母菌株Y187。

**1.2.2 诱饵质粒转化酵母菌株及鉴定:** HCV E2蛋白的酵母表达载体pGBKT7-HCV E2由北京地坛医院传染病研究所构建,醋酸锂法转入酵母菌株AH109。转化后铺板于SD/-Trp固体培养基进行筛选,对直径>2 mm的菌落随机挑取进行菌落PCR鉴定。同时将pGBKT7-BD和pGBKT7-53对照质粒转化酵母菌株AH109。

**1.2.3 pGBKT7-HCV E2质粒转化的酵母菌株AH109与胰腺细胞cDNA文库质粒转化的酵母菌株Y187的配合:** 挑取新鲜生长的经菌落PCR鉴定正确的AH109酵母菌落(直径>2 mm),接种于SD/-Trp液体培养基中,30℃振荡至 $A_{600}$ =0.8-1.0。重悬于50 mL 2 $\times$ YPDA培养基中,与4 mL含胰腺细胞cDNA文库的酵母细胞于摇床中30℃ 45 r/min(离心半径为5 mm)振荡培养配合24 h。观察到三叶草状的二倍体细胞后,将其重悬于10 mL 0.25 $\times$ YPDA培养基中,然后铺SD/-Trp/-Leu/-His平板和SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade平板各25块,置30℃温箱培养。同时将配合产物按1:10、1:1 $\times 10^2$ 和1:1 $\times 10^3$ 分别铺于SD/-Trp/-Leu、SD/-Trp、SD/-Leu培养基上检验配合效率。生长16 d后把直径>2 mm的菌落划线于铺有X- $\alpha$ -gal的SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade培养基上,在此培养基上生长且变成蓝色的为阳性菌落。同时设立阳性对照和阴性对照,阳性对照为pGADT7-T质粒转化的酵母菌株Y187与pGBKT7-53质粒转化的酵母菌株AH109配合;阴性对照为pGBKT7-BD质粒转化的酵母菌

## ■相关报道

王琳等运用酵母双杂交技术证实HCV核心蛋白可与肝细胞中的载脂蛋白Apo-A1结合,他们的结合可能会影响Apo-A1的结构及其脂质转运的功能,进而影响脂类的代谢过程。

## ■创新盘点

本文应用经典的验证蛋白质-蛋白质相互作用的酵母双杂交方法,在胰腺细胞cDNA文库中筛选出HCV E2结合蛋白,为研究慢性丙型肝炎患者出现糖、脂代谢异常及伴发代谢性疾病的机制提供了研究依据和方向。

## ■应用要点

HCV E2可能与胰腺细胞中的蛋白结合后进一步导致IR和糖、脂代谢异常,最终发展为2型糖尿病、脂肪肝和MS等代谢性疾病。

表 1 阳性克隆测序后Blast比对结果

序号	已知的同源序列编码蛋白基因	相同克隆数(n)	同源性(%)
1	胰凝乳蛋白酶原B1前体	2	100
2	胰蛋白酶原	3	100
3	胆盐刺激酯酶	2	99
4	CDK5	2	99
5	羧肽酶B1	1	99
6	人类v-Ki-ras2鼠Kirsten肉瘤	1	98
7	弹性蛋白酶3A	1	98
8	辅脂肪酶	1	100

株AH109与胰腺细胞文库质粒转化的酵母菌株Y187配合、pGBKT7-HCV E2质粒转化的酵母菌株AH109、胰腺细胞cDNA文库质粒转化的酵母菌株Y187。

1.2.4 阳性质粒的分析: 于SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade固体培养基上挑取阳性菌落, 于摇床中30℃, 250 r/min(离心半径为5 mm)振荡5 d后用酸化玻璃珠法提取酵母质粒。电穿孔法将提取的质粒转化大肠埃希菌, 并于含氨苄西林的LB平板上培养, 所获得菌落质粒用Bgl II酶切鉴定后测序, 测序结果与基因库中的序列进行比对分析。

## 2 结果

2.1 酵母胰腺细胞cDNA文库的成功构建及鉴定待转化的胰腺cDNA文库滴度在 $5 \times 10^7$  CFU/mL左右, 纯化后的质粒DNA浓度约为0.32 g/L。随机挑取文库菌落, 提取质粒, 用Bgl II酶切鉴定胰腺细胞cDNA文库的多样性, 结果显示插入片段大小不一, 说明文库具有良好的多样性, 见图1。胰腺细胞cDNA文库转化酵母菌株Y187后, 检验转化效率, 确定其滴度 $>1 \times 10^6$  CFU/mL, 确定胰腺细胞cDNA文库转化成功。

2.2 pGBKT7-HCV E2质粒转化AH109酵母菌株用醋酸锂法转化酵母细胞后在缺陷型SD-Trp培养基上筛选生长。培养4 d后, 挑取菌落进行PCR扩增HCV E2基因, 结果显示转化成功(图2)。

2.3 酵母双杂交系统3筛选与HCV E2结合的胰腺蛋白 配合时观察到的三叶草状二倍体酵母细胞, 见图3。

2.4 筛选出的胰腺细胞cDNA文库质粒测序与同源性分析 初步结果共筛选出13个阳性克隆, 其测序结果与基因库进行同源序列比对分析, 发

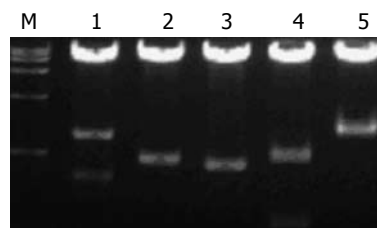


图 1 部分文库质粒鉴定结果. M: DNA Marker; 1-5: 部分文库质粒Bgl II酶切鉴定。

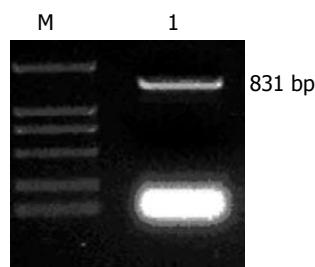
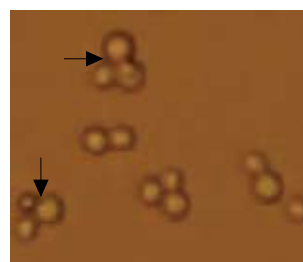


图 2 pGBKT7-HCV E2质粒转化AH109酵母菌株后菌落PCR的鉴定结果. M: DNA Marker; 1: pGBKT7-HCV E2质粒转化AH109酵母菌株后单克隆菌株PCR扩增结果。

图 3 三叶草状二倍体酵母细胞图. 胰腺细胞cDNA文库转化的酵母菌株Y187与pGBKT7-HCV E2质粒转化的AH109酵母菌株共同培养16 h后, 用显微镜( $\times 40$ )观察培养液可见配合生成的三叶草状二倍体酵母细胞(箭头指示)。

现HCV E2蛋白与8种人类基因表达蛋白可能存在相互作用, 见表1。阴性对照无酵母菌落生长, 阳性对照可见酵母菌落生长。

## 3 讨论

自1989年HCV发现以来, 人们研究发现HCV感染不仅导致肝损害, 并与肝外组织损害表现密切相关, 其中一个最主要的表现就是代谢性疾病。1992年, Thomssen等<sup>[4]</sup>就发现含有HCV RNA的病毒颗粒密度显著异常, 且与血清中 $\beta$ 脂蛋白有关, 1995年人们<sup>[5]</sup>注意到慢性丙型肝炎患者肝活检标本脂肪变性是其一大特征, 从而意识到HCV可能干扰了肝脏的脂肪代谢。近年来国内外研究证实慢性丙型肝炎发病机制之一是肝脏脂肪变性, 提示其是一种代谢性疾病, 丙型肝炎病毒与MS密切相关, 肝脏脂肪变性及IR可能是

HCV致MS的中心环节<sup>[6]</sup>. 2型糖尿病和脂肪肝是MS的部分表现,且大都存在IR,IR使胰岛B细胞代偿性增加,胰岛素分泌并促使胰岛B细胞功能逐步衰退,导致糖耐量异常和2型糖尿病,而糖、脂代谢异常也会加重IR,三者之间关系密切、互为因果、也可能相互促进,其中IR可能是中心环节,提示慢性丙型肝炎也是一种代谢性疾病<sup>[7]</sup>.因此IR被广泛认为是MS发病的核心,与糖代谢、脂代谢、高血压、肥胖等密切相关.由此,我们认为HCV慢性感染可能与MS密切相关.

目前,HCV感染引起的肝脏脂肪变的分子生物学机制尚无定论,但是推测HCV的结构蛋白和非结构蛋白对于肝脏细胞脂类代谢的干扰,甚至是HCV RNA与肝细胞脂类代谢物质的结合,可能是肝脏脂肪变形成的主要原因<sup>[8,9]</sup>.王琳等<sup>[10]</sup>运用酵母双杂交技术证实HCV核心蛋白可与肝细胞中的载脂蛋白Apo-A1结合,他们的结合可能会影响Apo-A1的结构及其脂质转运的功能,进而影响脂类的代谢过程.通过对重组的E1/E2包膜蛋白与低密度脂蛋白、极低密度脂蛋白和高密度脂蛋白结合的分子特性进行的研究,认为HCV进入血液后与脂滴结合形成复合物,通过低密度脂蛋白受体进入肝脏,进行复制,其产物与肝细胞中合成的载脂蛋白相互作用影响脂肪代谢,形成脂肪肝等表现<sup>[11,12]</sup>.

酵母双杂交系统是近年来新发展的分析蛋白-蛋白、蛋白-DNA、蛋白-RNA相互作用的一种有效的基因分析方法,为研究蛋白在体内生理情况下的相互作用提供了一种新的遗传学方法.酵母双杂交系统有3个表达基因进行筛选及作为严格的对照,且在增加报告基因的基础上,利用 $\alpha$ 型和 $\alpha$ 型酵母配合形成的二倍体细胞内,诱饵质粒与文库质粒所表达的蛋白质可相互作用的原理,解决了共转染两种质粒所带来的低效率问题,并将真阳性率提高至95%以上,而假阳性率在5%以下,增大了结果的可靠性.我们选择以HCV E2作为酵母双杂交的诱饵蛋白,从人胰腺细胞cDNA文库中筛选与其相互作用的蛋白基因,寻找其中与糖、脂代谢相关的蛋白基因,为相关的机制研究奠定基础.

本实验将胰腺细胞cDNA文库质粒扩增后成功转化酵母菌株Y187,构建成功酵母胰腺细胞cDNA文库,以备进一步更广泛的酵母双杂交筛选工作使用.成功构建pGBKT7-HCV E2诱饵质粒,在酵母菌株AH109中表达HCV E2蛋白,并进一步与前述构建好的酵母胰腺细胞cDNA文

库进行配合,筛选出可能与HCV E2蛋白存在相互作用的已知胰腺细胞蛋白基因8种.这些蛋白以参与三大物质消化、吸收的酶类为主,其中参与糖、脂代谢的酶主要有胰蛋白酶(原)、胆盐刺激酯酶、弹性蛋白酶和辅脂肪酶.有研究发现,弹性酶可抑制大白鼠和小白鼠自发性糖尿病,抑制试验性肝纤维化、增强脂肪肝时的肝脏脂肪分解.其作为药物主要可用于防治动脉硬化症、高脂血症、高血压、糖尿病和脂肪肝等<sup>[13-17]</sup>.另外实验发现,胰凝乳蛋白酶原B1前体是胰凝乳蛋白酶的前体,在小肠受到胰蛋白酶的分解,转变成具有活性的胰凝乳蛋白酶,主要分解多肽链中的芳香族氨基酸;羧肽酶B主要分解碱性氨基酸,其活性与锌有关.同时还发现,人类v-Ki-ras2鼠Kirsten肉瘤病毒致癌基因同源物蛋白也可以与HCV NS3蛋白相互作用,他在人类正常组织的增殖、分化和衰亡中有着非常重要的作用.有研究表明,HCV可在胰腺细胞中复制,HCV E2在胰腺细胞中与前述这些蛋白结合后可能会影响他们的结构和功能,从而影响糖、脂代谢过程.

我们此次应用经典的验证蛋白质-蛋白质相互作用的酵母双杂交方法,在胰腺细胞cDNA文库中筛选出HCV E2结合蛋白,为研究慢性丙型肝炎患者出现糖、脂代谢异常及伴发代谢性疾病的机制提供了研究依据和方向.根据本研究结果,我们推测HCV E2可能与胰腺细胞中的蛋白结合后进一步导致IR和糖、脂代谢异常,最终发展为2型糖尿病、脂肪肝和MS等代谢性疾病.

#### 4 参考文献

- 1 Saliba F, Lakehal M, Pageaux GP, Roche B, Vanlemmens C, Duvoux C, Dumortier J, Salamé E, Calmus Y, Maugendre D. Risk factors for new-onset diabetes mellitus following liver transplantation and impact of hepatitis C infection: an observational multicenter study. *Liver Transpl* 2007; 13: 136-144
- 2 Soresi M, Tripi S, Franco V, Giannitrapani L, Alesandri A, Rappa F, Vuturo O, Montalto G. Impact of liver steatosis on the antiviral response in the hepatitis C virus-associated chronic hepatitis. *Liver Int* 2006; 26: 1119-1125
- 3 Mason AL, Lau JY, Hoang N, Qian K, Alexander GJ, Xu L, Guo L, Jacob S, Regenstein FG, Zimmerman R, Everhart JE, Wasserfall C, Maclaren NK, Perrillo RP. Association of diabetes mellitus and chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 1999; 29: 328-333
- 4 Thomssen R, Bonk S, Propfe C, Heermann KH, Köchel HG, Uy A. Association of hepatitis C virus in human sera with beta-lipoprotein. *Med Microbiol Immunol* 1992; 181: 293-300
- 5 Goodman ZD, Ishak KG. Histopathology of hepati-

#### ■名词解释

1 代谢综合征: 葡萄糖调节受损或糖尿病,和(或)胰岛素抵抗,并伴有另外两项以上的成分,例如: 高血压、高三酰甘油血症和(或)低高密度脂蛋白血症、中心肥胖、微量白蛋白尿。  
2 胰岛素抵抗: 机体对一定量胰岛素的生物学反应低于预计正常水平的一种现象。

## ■同行评价

本文方法可信, 结果可靠, 为研究慢性丙型肝炎患者出现糖、脂代谢异常及伴发代谢性疾病的机制奠定了研究基础。

- 6 tis C virus infection. *Semin Liver Dis* 1995; 15: 70-81
- 7 张锦前, 范小玲. 慢性丙型肝炎与代谢综合征. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 3482-3486
- 8 Koike K. Hepatitis C as a metabolic disease: Implication for the pathogenesis of NASH. *Hepatol Res* 2005; 33: 145-150
- 9 Cortez-Pinto H. Concluding remarks: metabolic syndrome, liver and HCV. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 22 Suppl 2: 83-85
- 10 Jan CF, Chen CJ, Chiu YH, Chen LS, Wu HM, Huang CC, Yen MF, Chen TH. A population-based study investigating the association between metabolic syndrome and hepatitis B/C infection (Keelung Community-based Integrated Screening study No. 10). *Int J Obes (Lond)* 2006; 30: 794-799
- 11 王琳, 李克, 成军, 陆荫英, 张健, 洪源, 刘妍, 王刚, 钟彦伟, 段惠娟, 芮莉莉. 丙型肝炎病毒核心蛋白与载脂蛋白A1结合的研究. *世界华人消化杂志* 2002; 10: 1018-1021
- 12 Sanyal AJ. Review article: non-alcoholic fatty liver disease and hepatitis C--risk factors and clinical implications. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 22 Suppl 2: 48-51
- 13 Yoon EJ, Hu KQ. Hepatitis C virus (HCV) infection and hepatic steatosis. *Int J Med Sci* 2006; 3: 53-56
- 14 Garcia-Touchard A, Henry TD, Sangiorgi G, Spagnoli LG, Mauriello A, Conover C, Schwartz RS. Extracellular proteases in atherosclerosis and restenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 1119-1127
- 15 张玲, 高军, 李兆申, 龚燕芳, 金晶, 吴洪玉, 满晓华. 胰腺癌和慢性胰腺炎中弹性蛋白酶3B(ELA3B)基因甲基化状态检测. *胃肠病学* 2007; 12: 461-4640
- 16 蒋建, 谭善忠, 谭春雨, 刘成海, 徐列明. 扶正化疗方对肝纤维化大鼠弹力蛋白酶表达的影响. *中华肝脏病杂志* 2005; 13: 307-308
- 17 舒强, 凌光烈, 蒋建. 血管紧张素转换酶抑制剂对损伤后的动脉弹性蛋白酶的影响. *中国病理生理学杂志* 2001; 17: 1172-1174
- 18 朱广博, 孙静, 刘静. 血清胰弹性蛋白酶- I 连续监测法实验探讨. *临床检验杂志* 2003; 21: 209-210

编辑 李军亮 电编 李薇

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

## 《世界华人消化杂志》正文要求

**本刊讯** 本刊正文标题层次为 0 引言; 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参考文献。序号一律左顶格写, 后空 1 格写标题; 2 级标题后空 1 格接正文。以下逐条陈述: (1) 引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系。(2) 材料和方法 应尽量简短, 但应让其他有经验的研究者能够重复该实验。对新的方法应该详细描述, 以前发表过的方法引用参考文献即可, 有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可。(3) 结果 实验结果应合理采用图表和文字表示, 在结果中应避免讨论。(4) 讨论 要简明, 应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述, 也不应是大量文献的回顾。图表的数量要精选。表应有表序和表题, 并有足够具有自明性的信息, 使读者不查阅正文即可理解该表的内容。表内每一栏均应有表头, 表内非公知通用缩写应在表注中说明, 表格一律使用三线表(不用竖线), 在正文中该出现的地方应注出。图应有图序、图题和图注, 以使其容易被读者理解, 所有的图应在正文中该出现的地方注出。同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图, 统一用一个注解分别叙述。如: 图 1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化。A: ...; B: ...; C: ...; D: ...; E: ...; F: ...; G: ...。曲线图可按●、○、■、□、▲、△顺序使用标准的符号。统计学显著性用: <sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  ( $P > 0.05$  不注)。如同一表中另有一套  $P$  值, 则 <sup>c</sup> $P < 0.05$ , <sup>d</sup> $P < 0.01$ ; 第 3 套为 <sup>e</sup> $P < 0.05$ , <sup>f</sup> $P < 0.01$ 。  $P$  值后注明何种检验及其具体数字, 如  $P < 0.01$ ,  $t = 4.56$  vs 对照组等, 注在表的左下方。表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、- 应上下对齐。“空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上等等。表图勿与正文内容重复。表图的标目尽量用  $t/\text{min}$ ,  $c/(\text{mol/L})$ ,  $p/\text{kPa}$ ,  $V/\text{mL}$ ,  $t/^\circ\text{C}$  表达。黑白图请附黑白照片, 并拷入光盘内; 彩色图请提供冲洗的彩色照片, 请不要提供计算机打印的照片。彩色图片大小  $7.5\text{ cm} \times 4.5\text{ cm}$ , 必须使用双面胶条粘贴在正文内, 不能使用浆糊粘贴。(5) 志谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐。