

靶向Slug基因的腺相关病毒载体的构建与鉴定

严明总, 张克君, 王齐全, 欧树安

严明总, 海南省人民医院检验科 海南省海口市 527102
张克君, 欧树安, 海南医学院附属医院普外科 海南省海口市 527000
王齐全, 海口市人民医院消化内科 海南省海口市 527102
作者贡献分布: 本课题由严明总、王齐全及欧树安共同设计、共同试验操作; 严明总进行论文写作和统计; 张克君进行技术指导。
通讯作者: 严明总, 527102, 海南省海口市, 海南省人民医院检验科, wlsdermyy@163.com
电话: 0898-88069558
收稿日期: 2009-11-26 修回日期: 2011-04-14
接受日期: 2011-04-18 在线出版日期: 2011-04-18

Construction and identification of a recombinant adeno-associated virus-2 vector carrying an siRNA targeting the slug gene

Ming-Zong Yan, Ke-Jun Zhang, Qi-Quan Wang, Shu-An Ou

Ming-Zong Yan, Department of Clinical Laboratory Sciences, Hainan Provincial Hospital, Haikou 527010, Hainan Province, China

Ke-Jun Zhang, Shu-An Ou, Department of General Surgery, the Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou Municipal Hospital, Haikou 527000, Hainan Province, China

Qi-Quan Wang, Department of Gastroenterology, Haikou Municipal Hospital, Haikou 527102, Hainan Province, China

Correspondence to: Ming-Zong Yan, Department of Clinical Laboratory Sciences, Hainan Provincial Hospital, Haikou 527010, Hainan Province, China. wlsdermyy@163.com
Received: 2009-11-26 Revised: 2011-04-14

Accepted: 2011-04-18 Published online: 2011-04-18

Abstract

AIM: To construct a recombinant adeno-associated virus-2 vector carrying a small interfering RNA (siRNA) targeting the slug gene (rAAV2-slug-siRNA).

METHODS: A double-stranded siRNA targeting the slug gene was designed, synthesized and cloned into the pDC316-EGFP vector. The resulting vector containing slug siRNA was confirmed by RT-PCR and direct sequencing. EGFP-slug-siRNA sequence was amplified, double digested with *EcoR* I and *Sal* I, and ligated to pSNAV2.0-lacZ- α plasmid digested with the same enzyme pair. After the resulting recombinant plasmid

was transformed into DH5 α , bacterial colonies containing the recombinant plasmid was screened on LB agar plates. pSNAV2.0-EGFP-Slug-siRNA plasmid DNA was prepared, purified, identified, and transfected into BHK cells by means of Lipofectamine. BHK cells expressing slug-siRNA (BHK-slug-siRNA) were obtained and subsequently infected with recombinant herpes simplex virus 1 (HSV1-rc/ Δ UL2) to package the rAAV2-slug-siRNA to obtain a functional and infectious virus (rAAV2-slug-siRNA).

RESULTS: A recombinant adeno-associated virus-2 vector carrying a slug siRNA was constructed successfully. The presence of the target sequence in the vector was confirmed by RT-PCR and enzyme digestion. By transfecting the pSNAV2.0-EGFP-Slug-siRNA plasmid into BHK cells, BHK-slug-siRNA was obtained and infected with HSV1-rc/ Δ UL2 to package the rAAV2-slug-siRNA to obtain a functional and infectious virus. The titer of the recombinant virus was 9.23×10^{10} PFU.

CONCLUSION: A high-titer recombinant adeno-associated virus-2 vector carrying a slug siRNA has been constructed successfully.

Key Words: Slug gene; Small interfering RNA; Recombinant adeno-associated virus

Yan MZ, Zhang KJ, Wang QQ, Ou SA. Construction and identification of a recombinant adeno-associated virus-2 vector carrying an siRNA targeting the slug gene. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(11): 1179-1183

摘要

目的: 构建并制备携带目的基因的rAAV-EGFP-Slug-siRNA病毒载体。

方法: 首先构建pDC316-EGFP-Slug-siRNA质粒, 以PCR鉴定正确的pDC316-EGFP-Slug-siRNA克隆为模板扩增EGFP-Slug-siRNA片段, *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切回收的PCR产物; 酶切pSNAV2.0-lacZ- α 载体质粒, 并与上述产物进行连接; 转化感受态大肠杆菌DH5 α , 得到

■背景资料

Slug是腺癌治疗的有效靶基因。rAAV对于肿瘤的基因治疗是一种理想的载体, 对人体无毒害作用, 免疫反应小, 能有效地转导非分裂细胞, 并且可定点整合至人的19号染色体上, 产生长期基因表达。

■同行评议者

朱传武, 主任医师, 江苏省苏州市第五人民医院传染科

■ 研发前沿

目前常用的病毒载体有逆转录病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒载体等。非病毒载体由于转导效率低,其应用受到限制。

重组质粒pSNAV2.0-EGFP-Slug-siRNA, 酶切和测序对其进行鉴定。建立载体细胞株BHK/Slug-siRNA, 大规模制备rAAV2-EGFP-Slug-siRNA并对其纯化、鉴定和滴度测定。

结果: 携带编码靶向Slug的小发夹状干扰RNA序列的腺相关病毒载体质粒pSNAV2.0-EGFP-Slug-siRNA, 经PCR、酶切和测序鉴定, 质粒构建正确。将构建成功的载体质粒与重组I型单纯疱疹病毒HSV1-rc/ Δ UL2共转染包装细胞BHK-2, 成功复制和包装出重组腺相关病毒rAAV2-EGFP-Slug-siRNA, 经检测目的片段插入成功, 滴度为 9.23×10^{10} puf。

结论: 成功制备出高滴度的携带目的基因的rAAV-EGFP-Slug-siRNA病毒载体。

关键词: Slug基因; 小干扰RNA; 重组腺相关腺病毒

严明总, 张克君, 王齐全, 欧树安. 靶向Slug基因的腺相关腺病毒载体的构建与鉴定. 世界华人消化杂志 2011; 19(11): 1179-1183

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1179.asp>

0 引言

以往研究发现^[1], 脂质体转染携带siRNA-Slug的载体特异抑制Slug基因表达后, 胰腺癌BxPC-3细胞株的生长明显被抑制, 并且BxPC-3细胞对放射治疗的敏感性也明显提高, 因此, Slug是胰腺癌治疗的有效靶基因。rAAV对于肿瘤的基因治疗是一种理想的载体, 对人体无毒害作用, 免疫反应小, 能有效地转导非分裂细胞, 并且可定点整合至人的19号染色体上, 产生长期基因表达^[2]。因此, rAAV是一种用于基因治疗的安全而有效的病毒载体。本实验中我们将构建并大量制备携带siRNA-Slug基因的腺相关腺病毒载体(rAAV-siRNA-Slug), 用于胰腺癌的基因治疗。

1 材料和方法

1.1 材料 pDC316-EGFP载体质粒、pSNAV2.0-LacZ- α 载体质粒、pSNAV2.0-EGFP-si-cdc2-U6质粒、HSV1-rc/ Δ UL2(北京元阳基因公司); 金黄地鼠胚胎肾细胞BHK-21(ATCC); *Bam*H I、*Hind* III、*Eco*R I、*Sal* I、Pyrobest酶(TaKaRa公司)。其他试剂为国产纯。

1.2 方法

1.2.1 质粒构建: (1)pDC316-EGFP-Slug-siRNA质粒构建及鉴定: 根据前期筛选的有效靶点, 设计合成以下序列: sense: 5'-gatccgcaaatgtaccaat-

gatattcaagagatatcattgggtacattgcttttta-3'; antisense: 5'-agcttaaaaaagcaaatgtaccaatgatattctctgaatatcattgggtacatttgcgg-3', 其中上游加入*Bam*H I位点, 下游加入*Hind*III位点, 双链退火。酶切pDC316-EGFP-U6质粒, 回收酶切片段; 连接、转化感受态大肠杆菌DH5 α ; PCR鉴定pDC316-EGFP-Slug-siRNA质粒; (2)pSNAV2.0-EGFP-Slug-siRNA构建: PCR扩增EGFP-Slug-siRNA片段, 扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 40 s, 共30个循环, 72 $^{\circ}$ C 5 min。产物经10 g/L琼脂糖凝胶10 V/cm电泳, 回收目的DNA片段。*Eco*R I和*Sal* I双酶切回收的PCR产物, 37 $^{\circ}$ C水浴酶切3 h。酶切pSNAV2.0-lacZ- α 载体质粒, 并与前面的产物进行连接, 转化细菌; (3)重组质粒pSNAV2.0-EGFP-Slug-siRNA鉴定: PCR鉴定, 反应体系: 1.0 μ L pSNAV2.0-EGFP-Slug-siRNA, 2.0 μ L 10 \times PCR Buffer, 0.4 μ L RNAi-ID-F(50 μ mol/L), 0.4 μ L RNAi-ID-R(50 μ mol/L), 1.6 μ L dNTP(2.5 mmol/L), 0.3 μ L Taq酶(5 U/ μ L), 14.3 μ L ddH₂O; 扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 40 s, 共30个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。PCR产物经1%琼脂糖凝胶10 V/cm电泳, 紫外成像。酶切鉴定, PCR鉴定正确的质粒进行*Sal* I + *Eco*R I双酶切和*Sma* I单酶切鉴定。测序鉴定, 对PCR鉴定和酶切鉴定正确的pSNAV2.0-EGFP-Slug-siRNA质粒送北京诺赛基因测序, 采用测序引物EGFP-U6-cexu-r作单向测序, 所测得的序列为质粒的反义序列。

1.2.2 病毒包装: (1)载体细胞株BHK/Slug-siRNA的建立: 将 2×10^5 金黄地鼠肾细胞BHK-2接种至6孔板中, 含100 mL/L FBS的RPMI 1640培养液。37 $^{\circ}$ C, 50 mL/L CO₂, 饱和湿度条件下培养24 h后待细胞长满至90%。用无血清RPMI 1640培养液洗细胞2次。同时用无血清Opti-MEM[®]1培养液分别稀释5 μ g pSNAV2.0-EGFP-Slug-siRNA质粒及10 μ L Lipofectamine[™]2000至250 μ L, 室温孵化5 min后将两者轻轻混合, 室温下静置20 min。将上述DNA-脂质体混合液滴加至细胞上, 轻轻混匀。37 $^{\circ}$ C, 50 mL/L CO₂, 饱和湿度培养5 h。弃转染液, 加入2 mL含150 mL/L FBS的RPMI 1640培养液继续培养24 h。细胞按1:4传代, 加800 mg/L G418选择培养。待抗性细胞克隆形成并生长至孔底面积的1/2左右时, 用胰酶消化, 继续用G418选择培养直至细胞长满。传代后换用不含G418的培养液。将此混合细胞株命名为BHK/slug-siRNA; (2)rAAV2-EGFP-Slug-siRNA

的大规模制备: 将BHK/Slug-siRNA移至转瓶培养, 培养液为每个转瓶200 mL含150 mL/L FBS的RPMI 1640培养液. 细胞长满后(约为 8×10^8 个细胞)将培养液倾出, 加HSV1-rc/ Δ UL2(MOI = 1.0), 低速转动吸附病毒2 h. 每个转瓶加200 mL无血清RPMI 1640培养液37 °C低速转动培养. 24 h后, 将每个转瓶中的液体弃去100 mL, 继续培养24 h待细胞完全病变、容易脱落. 盖紧瓶盖剧烈振摇, 将瓶壁上的细胞全部洗脱至培养液中, 2 000 r/min离心10 min去细胞碎片, 所得病毒命名为rAAV2-EGFP-Slug-siRNA. 上清分装至500 mL的三角烧瓶中, 每瓶250 mL, 进行下一步纯化; (3)rAAV2-EGFP-Slug-siRNA的纯化: 将收集的上清加入25 mL的氯仿, 置于37 °C摇床中剧烈振摇1 h. 加入终浓度为1 mol/L的固体氯化钠, 振摇溶解, 4 °C, 12 000 r/min离心15 min. 弃氯仿和沉淀, 取上层水相, 加终浓度为1 mol/L NaCl, 100 g/L PEG8000, 振摇溶解, 冰浴1 h, 11 000 r/min离心15 min. 弃上清, 用5 mL PBS2+将离心管管底和管壁上的沉淀吹打洗脱下来分装至1.5 mL塑料离心管中(每管0.6 mL). 加入终浓度为1 mg/L的DNase和RNase, 室温消化30 min. 加等体积的氯仿, 4 °C, 12 000 r/min离心5 min. 无菌操作下小心吸出上层水相, 即为浓缩和纯化的rAAV2-EGFP-Slug-siRNA病毒液; (4)采用SDS-PAGE电泳检测rAAV2-EGFP-Slug-siRNA纯度: 取纯化的病毒液与2×上样缓冲液等体积混合, 沸水浴5 min, 每个加样孔加样15 μ L, 浓缩胶电泳的工作电压80 V, 分离胶电压120 V, 电泳2 h. 电泳完毕后将凝胶用ddH₂O漂洗2次, 再用考马斯亮蓝染色固定液在常温下固定30 min. 置于5倍体积的1.25 μ g/L考马斯亮蓝R-250染液中, 室温下在脱色摇床缓慢摇动染色4 h. 用考马斯亮蓝染色脱色液脱色, 期间液换3-4次, 直到显出低背景、清晰的条带. 照相, 采用凝胶扫描图像分析系统进行纯度测定; (5)rAAV2-EGFP-Slug-siRNA的目的基因的PCR鉴定: 取10 μ L rAAV2-EGFP-Slug-siRNA病毒样品, 煮沸5 min, 冰浴. 扩增条件: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 40 s, 共30个循环; 72 °C 7 min. PCR产物经10 g/L琼脂糖凝胶10 V/cm电泳, 紫外成像; (6)rAAV2-EGFP-Slug-siRNA滴度测定按照文献[3]进行.

2 结果

2.1 pDC316-EGFP-Slug-siRNA PCR鉴定 以siRNA鉴定引物扩增应能获得503 bp的条带, 2

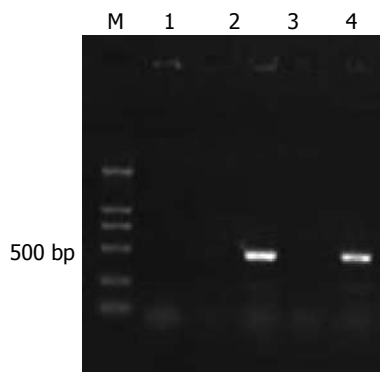


图1 pDC316-EGFP-Slug-siRNA PCR鉴定结果. M: DL2000 Marker; 1: 阴性对照; 2-4: 以pDC316-EGFP-Slug-siRNA为模板的PCR产物.

■ 相关报道

以往研究发现, 脂质体转染携带siRNA-Slug的载体特异抑制Slug基因表达后, 胰腺癌BxPC-3细胞株的生长明显被抑制, 并且BxPC-3细胞对放射治疗的敏感性也明显提高.

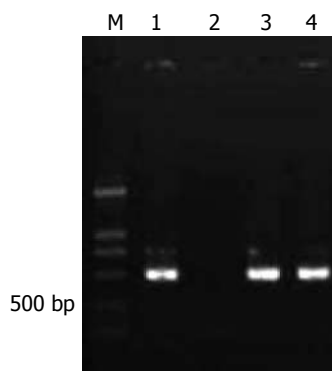


图2 pSNAV2.0-EGFP-Slug-siRNA PCR鉴定结果. M: DL2000 Marker; 2: 阴性对照; 1、3、4: 以pSNAV2.0-EGFP-Slug-siRNA为模板PCR产物.

和4泳道结果与预期相符(图1).

2.2 pSNAV2.0-EGFP-Slug-siRNA PCR鉴定 以RNAi鉴定引物扩增应能获得503 bp的条带, 1、3和4泳道结果与预期相符(图2).

2.3 pSNAV2.0-EGFP-Slug-siRNA酶切鉴定 pSNAV2.0-EGFP-Slug-siRNA质粒经Sma I酶切能获得4 810 bp+1 113 bp+1 009 bp+768 bp+692 bp的条带, 经Sal I+EcoR I酶切获得7.1 kb和1.38 kb, 酶切鉴定与预期相符(图3).

2.4 pSNAV2.0-EGFP-Slug-siRNA测序鉴定 将所测结果与设计的shRNA转录模板序列完全相同, 与以往报道完全相同, 证实编码shRNA的序列已完全正确的插入载体中.

2.5 rAAV2-EGFP-Slug-siRNA PCR鉴定 用RNAi-ID-F和RNAi-ID-R引物应能特异性扩增出503 bp左右的EGFP-Slug-siRNA-U6片段, 电泳证明该重组腺相关病毒携带目的基因EGFP-Slug-siRNA(图4).

2.6 rAAV2-EGFP-Slug-siRNA的滴度测定 经测定, rAAV2-EGFP-Slug-siRNA的滴度为 9.23×10^{10} puf, 能够满足体内外动物实验的需要.

3 讨论

干扰性核糖核酸普遍存在于人体细胞内, 当外源性或内源性双链RNA(dsRNA)进入细胞后, 识别含有其互补序列的mRNA并与之结合后, 在酶

同行评价

本文设计合理, 对将来开发胰腺癌的基因治疗具有积极意义。

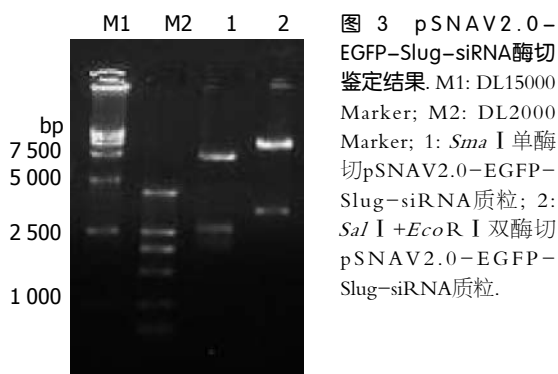


图3 pSNAV2.0-EGFP-Slug-siRNA酶切鉴定结果。M1: DL15000 Marker; M2: DL2000 Marker; 1: *Sma* I 单酶切pSNAV2.0-EGFP-Slug-siRNA质粒; 2: *Sal* I + *Eco* R I 双酶切pSNAV2.0-EGFP-Slug-siRNA质粒。

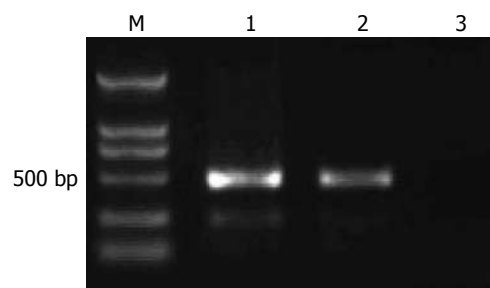


图4 rAAV2-EGFP-Slug-siRNA PCR鉴定结果。M: DNA Marker; 1: 阳性对照(pSNAV2.0-EGFP-si-cdc2质粒); 2: rAAV-EGFP-Slug-siRNA; 3: 阴性对照。

的作用下降解mRNA, 从而干扰相应基因表达。一些小干扰RNA(RNA interfere, RNAi)能够高效特异性地阻断相应基因的表达, 促进RNA降解, 可在细胞内发挥基因敲除的作用, 这一现象称为RNA干扰(short interfering RNA, siRNA), 他是在RNA水平调节基因表达的一种方式^[4]。随着近年来对RNA干扰的机制和功能研究, RNAi技术在肿瘤治疗方面显示出良好的前景。

我们曾将携带siRNA-Slug的载体特异干扰Slug基因表达后, 胰腺癌BxPC-3细胞株的生长明显被抑制, 并且BxPC-3细胞对放射治疗的敏感性也明显提高^[2], 因此, Slug干扰是胰腺癌基因治疗有效方法。

基因治疗需要载体的协助, 基因载体系统在基因治疗中具有不可或缺的作用, 根据载体的组成和制备过程可将基因载体分为病毒载体和非病毒载体两大类。病毒载体是将外源基因包装到天然病毒的外壳中, 利用病毒对宿主细胞的感染性将外源基因导入细胞中。病毒载体因具有转导效率及表达效率高的特点而得到广泛应用。目前常用的病毒载体有逆转录病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒载体等。非病毒载体由于转导效率低, 其应用受到限制。

目前临床实验多用的是腺病毒和腺相关病毒。腺病毒载体多用于肿瘤基因治疗。其优点是易于培养和纯化基因组大, 因而可插入大片段外源基因可高效地转导不同类型的人组织细胞, 可转导非分裂细胞在细胞培养物中有高滴度的重组病毒产量进入细胞内并不整合到宿主细胞基因组, 仅瞬间表达, 因而安全性较高可原位感染组织, 如肺等。缺点有: 表达外源基因时间短, 免疫原性强, 可引发机体产生强烈的炎症反应和免疫反应, 几乎可以感染所有细胞, 而缺乏特异性。

较为优胜的是腺相关病毒, 腺相关病毒病毒基因组很小, 可感染分裂期及静止期细胞, 当

辅助病毒不存在时, 能整合到宿主细胞基因组的特定区域, 无致病性, 免疫原性弱, 因此, 他无毒高效, 是目前理想的基因治疗载体。

本实验构建了携带编码靶向Slug的小发夹状干扰RNA序列的腺相关病毒载体质粒pSNAV2.0-EGFP-Slug-siRNA, 经PCR、酶切和测序鉴定, 质粒构建正确。pSNAV2.0-EGFP-Slug-siRNA质粒全长8 496 bp。将构建成功的载体质粒与重组I型单纯疱疹病毒HSV1-rc/ΔUL2共转染包装细胞BHK-2, 成功复制和包装出重组腺相关病毒rAAV2-EGFP-Slug-siRNA, 经检测目的片段插入成功, 滴度为 9.23×10^{10} puf。该病毒为我们下一步的实验提供了材料。

参考文献

- 1 王齐全, 魏小斌, 郑健超. siRNA干扰Slug基因表达对胰腺癌BxPC-3细胞放射敏感性的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17: 1079-1084
- 2 Batchu RB, Shammash MA, Wang JY, Munshi NC. Dual level inhibition of E2F-1 activity by adenovirus associated virus Rep78. *J Biol Chem* 2001; 276: 24315-24322
- 3 张克君, 李德春. p53正向凋亡调节因子(PUMA)重组腺病毒载体的构建及对体内外胰腺癌增殖的影响. 中华微生物学与免疫学杂志 2009; 29: 12-15
- 4 Agami R. RNAi and related mechanisms and their potential use for therapy. *Curr Opin Chem Biol* 2002; 6: 829-834
- 5 Wadhwa R, Kaul SC, Miyagishi M, Taira K. Vectors for RNA interference. *Curr Opin Mol Ther* 2004; 6: 367-372
- 6 Tauşer RG, Stoica O. [Basic principles of the antisense strategy]. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi* 2003; 107: 483-486
- 7 Sledz CA, Williams BR. RNA interference and double-stranded-RNA-activated pathways. *Biochem Soc Trans* 2004; 32: 952-956
- 8 Amarzguioui M, Rossi JJ, Kim D. Approaches for chemically synthesized siRNA and vector-mediated RNAi. *FEBS Lett* 2005; 579: 5974-5981
- 9 Vidal L, Blagden S, Attard G, de Bono J. Making sense of antisense. *Eur J Cancer* 2005; 41: 2812-2818
- 10 Morris KV, Rossi JJ. Antiviral applications of RNAi. *Handb Exp Pharmacol* 2006: 105-116
- 11 Shen Y. Advances in the development of siRNA-

- based therapeutics for cancer. *IDrugs* 2008; 11: 572-578
- 12 Rana TM. Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8: 23-36
- 13 Fuchs U, Borkhardt A. The application of siRNA technology to cancer biology discovery. *Adv Cancer Res* 2007; 96: 75-102

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

2009 年内科学类期刊总被引频次和影响因子排序

代码	期刊名称	总被引频次			影响因子		
		数值	学科排名	离均差率	数值	学科排名	离均差率
I170	JOURNAL OF GERIATRIC CARDIOLOGY	—	—	—	—	—	—
G275	WORLD JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY	6013	1	3.70	0.789	3	0.59
G803	肝脏	710	25	-0.45	0.545	21	0.10
G938	国际呼吸杂志	796	22	-0.38	0.218	46	-0.56
G415	国际内分泌代谢杂志	786	23	-0.39	0.243	44	-0.51
G940	国际心血管病杂志	331	41	-0.74	0.231	45	-0.53
Q908	临床肺科杂志	1600	12	0.25	0.437	26	-0.12
G501	临床肝胆病杂志	671	28	-0.48	0.385	33	-0.22
G658	临床荟萃	1913	9	0.49	0.363	36	-0.27
G257	临床内科杂志	968	19	-0.24	0.403	30	-0.19
G855	临床消化病杂志	393	37	-0.69	0.443	25	-0.11
G261	临床心血管病杂志	998	18	-0.22	0.444	24	-0.10
G293	临床血液学杂志	462	35	-0.64	0.633	8	0.28
G491	岭南心血管病杂志	214	44	-0.83	0.205	47	-0.59
G662	内科急危重症杂志	365	40	-0.71	0.389	31	-0.22
G523	内科理论与实践	85	46	-0.93	0.260	41	-0.48
G746	实用肝脏病杂志	431	36	-0.66	0.483	22	-0.03
G190	世界华人消化杂志	3009	6	1.35	0.625	9	0.26
G800	胃肠病学	703	27	-0.45	0.602	11	0.21
G326	胃肠病学和肝病学杂志	706	26	-0.45	0.412	29	-0.17
G451	现代消化及介入诊疗	233	43	-0.82	0.567	14	0.14
G083	心肺血管病杂志	392	38	-0.69	0.575	13	0.16
G419	心血管病学进展	713	24	-0.44	0.436	27	-0.12
G578	心血管康复医学杂志	590	33	-0.54	0.385	33	-0.22
G260	心脏杂志	654	29	-0.49	0.387	32	-0.22
G234	中国动脉硬化杂志	1042	17	-0.19	0.555	19	0.12
G973	中国呼吸与危重监护杂志	625	32	-0.51	0.677	7	0.36
G267	中国实用内科杂志	2693	7	1.10	0.578	12	0.17
G211	中国糖尿病杂志	1855	11	0.45	0.567	14	0.14
G380	中国心血管杂志	367	39	-0.71	0.384	35	-0.23
G203	中国心脏起搏与心电生理杂志	652	30	-0.49	0.614	10	0.24
G633	中国血液净化	815	20	-0.36	0.559	17	0.13
G119	中国循环杂志	650	31	-0.49	0.290	40	-0.42
G231	中华肝脏病杂志	3363	5	1.63	0.733	4	0.48
G235	中华高血压杂志	1259	16	-0.02	0.715	5	0.44
G147	中华结核和呼吸杂志	5293	2	3.14	1.492	1	2.01
G639	中华老年多器官疾病杂志	203	45	-0.84	0.248	43	-0.50
G876	中华老年心脑血管病杂志	812	21	-0.37	0.561	16	0.13
G155	中华内分泌代谢杂志	1891	10	0.48	0.713	6	0.44
G156	中华内科杂志	3674	4	1.87	0.550	20	0.11
G505	中华乳腺病杂志(电子版)	84	47	-0.93	0.302	39	-0.39
G161	中华肾脏病杂志	1562	13	0.22	0.558	18	0.13
G285	中华消化内镜杂志	1497	14	0.17	0.431	28	-0.13
G168	中华消化杂志	2460	8	0.92	0.451	23	-0.09
G892	中华心律失常学杂志	496	34	-0.61	0.306	38	-0.38
G170	中华心血管病杂志	4623	3	2.61	1.391	2	1.80
G172	中华血液学杂志	1482	15	0.16	0.356	37	-0.28
G610	中华胰腺病杂志	303	42	-0.76	0.256	42	-0.48
	48种期刊平均值	1280			0.496		

以上数据摘自2010年版《中国科技期刊引证报告》(核心版). 科学技术文献出版社, 184-185.