

HBX基因对人肝癌细胞系Huh7细胞增殖和迁移的影响

卫波, 成扬

背景资料
乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 基因具有反式激活作用, 在调控细胞周期、细胞增殖、细胞凋亡以及信号转导等方面, 有一定的作用。乙型肝炎病毒X (hepatitis B virus X, HBX) 是具有多种生物活性的蛋白质。HBX和乙型肝炎病毒感染宿主细胞的过程有关。HBX和肝细胞癌的发生有一定的相关性。研究HBX基因对肝癌细胞增殖和迁移有着一定的影响。

卫波, 上海浦东新区人民医院感染科 上海市 201200
成扬, 上海中医药大学附属曙光医院肝病研究所 上海市 200021
卫波, 副主任医师, 主要从事乙型肝炎与脂肪肝的免疫研究。
作者贡献分布: 本文主要由卫波与成扬共同写作完成。
通讯作者: 卫波, 副主任医师, 201200, 上海浦东新区川环南路 490号, 上海浦东新区人民医院感染科。 fxy55@sina.com
收稿日期: 2014-09-15 修回日期: 2014-10-21
接受日期: 2014-11-04 在线出版日期: 2014-12-18

Influence of overexpression of hepatitis B virus X gene on proliferation and migration of hepatoma cells

Bo Wei, Yang Cheng

Bo Wei, Department of Infectious Diseases, the People's Hospital of Pudong New District, Shanghai 201200, China
Yang Cheng, Institute of Liver Disease, Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200021, China
Correspondence to: Bo Wei, Associate Chief Physician, Department of Infectious Diseases, the People's Hospital of Pudong New District, 490 Chuanhuan South Road, Pudong New District, Shanghai 201200, China. fxy55@sina.com
Received: 2014-09-15 Revised: 2014-10-21
Accepted: 2014-11-04 Published online: 2014-12-18

Abstract

AIM: To explore the influence of overexpression of hepatitis B virus X (HBX) on the proliferation and migration of hepatoma cells.

METHODS: Human hepatic carcinoma cell line Huh7 was cultured and infected with a recombinant adenovirus vector expressing HBX to establish an Huh7-HBX cell line. Colony forming assay, MTS assay and crystal violet staining were performed to assess cell proliferation. Cell migration assay was also performed.

RESULTS: The Huh7-HBX cell line was established successfully. HBX overexpression could promote cell proliferation. The number of cell colonies formed for Huh7-HBX cells was significantly higher than that for Huh7 cells ($P < 0.05$). Restoration of secreted frizzled-related protein

1 (SFRP1) and SFRP5 expression or knockdown of DNA methyltransferase 1 (Dnmt1) could significantly inhibit liver cancer cell proliferation and migration ($P < 0.05$).

CONCLUSION: Overexpression of HBX significantly inhibits the proliferation and migration of hepatoma cells.

© 2014 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Hepatitis B virus X; Hepatoma cell; Proliferation; Migration; Influence

Wei B, Cheng Y. Influence of overexpression of hepatitis B virus X gene on proliferation and migration of hepatoma cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(35): 5408-5413
URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/5408.asp>
DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i35.5408>

摘要

目的: 探讨乙型肝炎病毒X (hepatitis B virus X, HBX) 基因对肝癌细胞增殖和迁移的影响。

方法: 选取人肝癌细胞系Huh7细胞, 进行培养, 感染重组腺病毒, 建立可稳定表达HBX的Huh7-HBX细胞系(分布构建实验组和对照组), 进行平板克隆形成实验、MTS和结晶紫染色检测细胞增殖情况, 完成细胞迁移实验。分析HBX基因对肝癌细胞增殖和迁移的影响。

结果: Huh7-HBX的稳定细胞系构建成功。HBX能够促进细胞增殖。实验组细胞克隆明显高于对照组, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。回复分泌型卷曲相关蛋白1 (secreted frizzled-related protein 1, SFRP1)、SFRP5和干扰掉DNA甲基化转移酶1 (DNA methyltransferase 1, Dnmt1) 后, 能够明显抑制肝癌细胞的增殖。回复SFRP1、SFRP5和干扰掉Dnmt1后, 能够明显抑制肝癌细胞迁移。Huh7-HBX组、AdSFRP1感染组、AdSFRP5感染组与对照组比较, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

结论: HBX基因能够抑制肝癌细胞的增殖和

同行评议者
高国全, 教授, 中山大学中山医学院生物化学教研室

迁移, 对于临床治疗有一定的指导意义.

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有.

关键词: 乙型肝炎病毒X; 肝癌细胞; 增殖; 迁移; 影响

核心提示: 本研究探讨乙型肝炎病毒X(hepatitis B virus X, *HBX*)基因对肝癌细胞增殖和迁移的影响. 结果显示, *HBX*基因能够抑制肝癌细胞的增殖和迁移, 对于临床治疗有一定的指导意义.

卫波, 成扬. *HBX*基因对人肝癌细胞系Huh7细胞增殖和迁移的影响. 世界华人消化杂志 2014; 22(35): 5408-5413 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/5408.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v22.i35.5408>

0 引言

肝癌是临床的常见恶性肿瘤之一, 肝癌可分为原发性肝癌和继发性肝癌两大类^[1]. 肝脏是人体最大的实质性器官, 承担人体的各类重要代谢功能, 肝脏一旦出现恶性肿瘤将对患者生命造成威胁. 乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, *HBV*)基因具有反式激活作用, 在调控细胞周期、细胞增殖、细胞凋亡以及信号转导等方面, 有一定的作用. 乙型肝炎病毒X(hepatitis B virus X, *HBX*)是具有多种生物活性的蛋白质. *HBX*和乙型肝炎病毒感染宿主细胞的过程有关. *HBX*和肝细胞癌的发生有一定的相关性. 研究*HBX*基因对肝癌细胞增殖和迁移有着一定的影响. 已有研究^[2]表明, *HBX*蛋白能够下调*SFRP1*、*SFRP5*的表达, 病情经染色质免疫共沉淀研究*HBX*可以诱导DNA甲基化转移酶1(DNA methyltransferase1, *Dnmt1*)富集于分泌型卷曲相关蛋白1(secreted frizzled-related protein 1, *SFRP1*)、*SFRP5*启动子区. 因此, 设计实验, 观察回复*SFRP1*、*SFRP5*或者干扰掉*Dnmt1*后, 是否会抑制肝癌细胞的增殖、迁移能力, 以其更进一步了解*HBV X*蛋白对*SFRP1*、*SFRP5*启动子区调节的机制. 现将上海浦东新区人民医院在该方面的研究报道如下.

1 材料和方法

1.1 材料 人肝癌细胞系Huh7细胞为浦东新区人民医院实验室存放. 培养条件: 37 °C温度下, 50 mL/L CO₂, 10%胎牛血清, 1%青霉素的MEM培养基. 重组腺病毒: Ad*SFRP1*, Ad*SFRP5*, Ad*Dnmt1*, AdRFP的重组腺病毒(美国芝加哥大学分

子肿瘤实验室提供). EK293为浦东新区人民医院保存. 胎牛血清(购自Gibco公司); 脂质体(购自Sigma公司); 抗生素(购自Sigma公司); 磷酸盐缓冲液、胰酶均由本实验室配制而成; 结晶紫染色试剂盒(购自美国GENMED公司); MTS比色检测试剂(购自Promoger公司); Brdu试剂(购自Roche公司). 其他所需仪器包括CO₂细胞培养箱、核酸电泳仪、金属恒温仪、凝胶成像仪、倒置荧光显微镜、台式高速离心机、超净台等.

1.2 方法

1.2.1 可稳定表达*HBX*的Huh7-*HBX*细胞系的建立: 把HEK293细胞铺于T25培养瓶中, 填铺密度为 1.5×10^5 /mL. 细胞贴壁完成后, 转染已经构建好的pSEB-3Flag-*HBX*重组质粒作为试验组, 转染阴性对照pSEB-3Flag空白质粒作为对照组^[3]. 把Huh7细胞铺于T25培养瓶中, 填铺密度为 1.5×10^5 /mL. 收集转染36、60、84、108 h的HEK293细胞培养上清液, 感染Huh7细胞^[4]. 感染60 h后, 加入终浓度为0.1 μg/mL的Blasticidine筛选阳性细胞株.

1.2.2 平板克隆形成实验: 取处于对数期生长的Huh7-*HBX*细胞、对照组Huh7细胞, 经胰蛋白酶消化, 制备细胞悬浮液, 将其培养于10%胎牛血清的培养基中. 稀释细胞悬液, 接种在37 °C的预温培养液的6孔板中, 轻轻转动以使细胞分散均匀. 37 °C、50 mL/L CO₂孵育3 wk. 当出现肉眼可见的克隆细胞时, 终止培养^[5]. 结晶紫染色、照相.

1.2.3 细胞增殖的检测(MTS检测): Huh7-*HBX*细胞按照 3×10^5 /mL的浓度铺于100 mm培养皿中, 感染Ad*Dnmt1*, Ad*SFRP1*, Ad*SFRP5*腺病毒. 12 h后, 换液, 加入AdRFP腺病毒. 24 h后, 重新铺板, 接种24、48、72、96 h后, 进行MTS检测, 检测波长为490 nm^[6], 测定吸光度(*A*)值.

1.2.4 细胞增殖的检测(结晶紫染色): Huh7-*HBX*细胞按照 3×10^5 /mL的浓度铺于100 mm培养皿中, 感染Ad*Dnmt1*、Ad*SFRP1*、Ad*SFRP5*腺病毒. 12 h后, 换液, 加入AdRFP腺病毒. 24 h后, 重新铺板, 接种48-72 h, 观察细胞增殖情况. 显微镜观察, 当细胞增殖区别明显时, 弃上清, 加磷酸盐缓冲液2 mL, 清洗细胞, 结晶紫染色20 min, 漂洗, 观察细胞增殖情况^[7]. 裂解液裂解30 min, 570 nm检测吸光度(*A*)值.

1.2.5 Brdu掺入实验: Huh7-*HBX*细胞、Huh7-Flag细胞按照 3×10^5 /mL的浓度分别铺于100 mm

研发前沿
肝癌发病隐匿, 侵袭性生长快速, 治疗难度较高, 早发现、早诊断、早治疗对于提高预后具有重要意义.

相关报道

已有研究表明, HBX蛋白能够下调分泌型卷曲相关蛋白1(secreted frizzled-related protein 1, SFRP1)、SFRP5的表达, 病情经染色质免疫共沉淀研究HBX可以诱导Dnmt1富集于SFRP1、SFRP5启动子区。

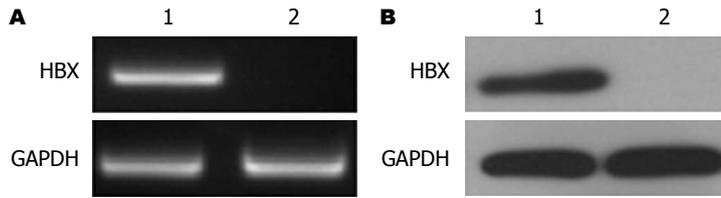


图1 Huh7-HBX稳定细胞学的构建. A: RT-PCR分析; B: 蛋白质印记分析. 1: Huh7-HBX; 2: Huh7-Control.

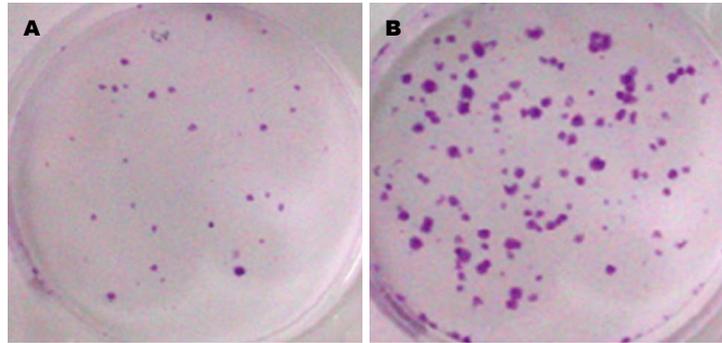


图2 平板克隆形成实验. A: Huh7细胞集落; B: Huh7-HBX克隆细胞集落.

培养皿中, 分别感染AdsiDnmt1、AdSFRP1、AdSFRP5腺病毒. 12 h后, 换液, 加入AdRFP腺病毒. 细胞贴壁后, 铺板, 48 h后, 加入10 μ L的BrdU, 于37 $^{\circ}$ C、50 mL/L CO₂条件下培养^[8]. 2 h后, 检测370 nm波长吸光度(A)值.

1.2.6 细胞迁移实验: Huh7-HBX细胞按照 3×10^5 /mL的浓度铺于100 mm培养皿中, 感染AdsiDnmt1、AdSFRP1、AdSFRP5腺病毒^[9]. 12 h后, 换液, 加入AdRFP腺病毒. 37 $^{\circ}$ C温热细胞培养基, Transwell小室放于室温条件下. 消化细胞后, 进行悬浮、计数. CO₂孵箱孵育24 h. 染色. 完成染色后1 h, 观察无气泡出现, 继续培养24 h, 去除上下小室培养液. 37 $^{\circ}$ C预温PNS, 淋洗小室2次. 加入多聚甲醛, 固定25 min, 弃固定液, PBS淋洗. 倒置小室, 自然风干. 结晶紫浸泡25 min, 去除染液、计数、照相.

统计学处理 采用SPSS19.0统计软件进行统计分析, 计量资料结果用mean \pm SD表示, 治疗前后及组间比较用t检验, 计数资料以构成比表示, 用 χ^2 检验. $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 Huh7-HBX的稳定细胞系构建情况 Huh7-HBX的稳定细胞系构建成功. 把HEK293细胞铺于T25培养瓶中, 填铺密度为 1.5×10^5 /mL. 细胞贴壁完成后, 转染已经构建好的pSEB-3Flag-HBX重组质粒作为试验组, 转染阴性对

照pSEB-3Flag空白质粒作为对照组. 把Huh7细胞铺于T25培养瓶中, 填铺密度为 1.5×10^5 /mL. 收集转染36、60、84、108 h的HEK293细胞培养上清液, 感染Huh7细胞. 感染60 h后, 加入终浓度为0.1 μ g/mL的Blasticidine筛选阳性细胞株. 结果显示Huh7-HBX的稳定细胞系构建成功(图1).

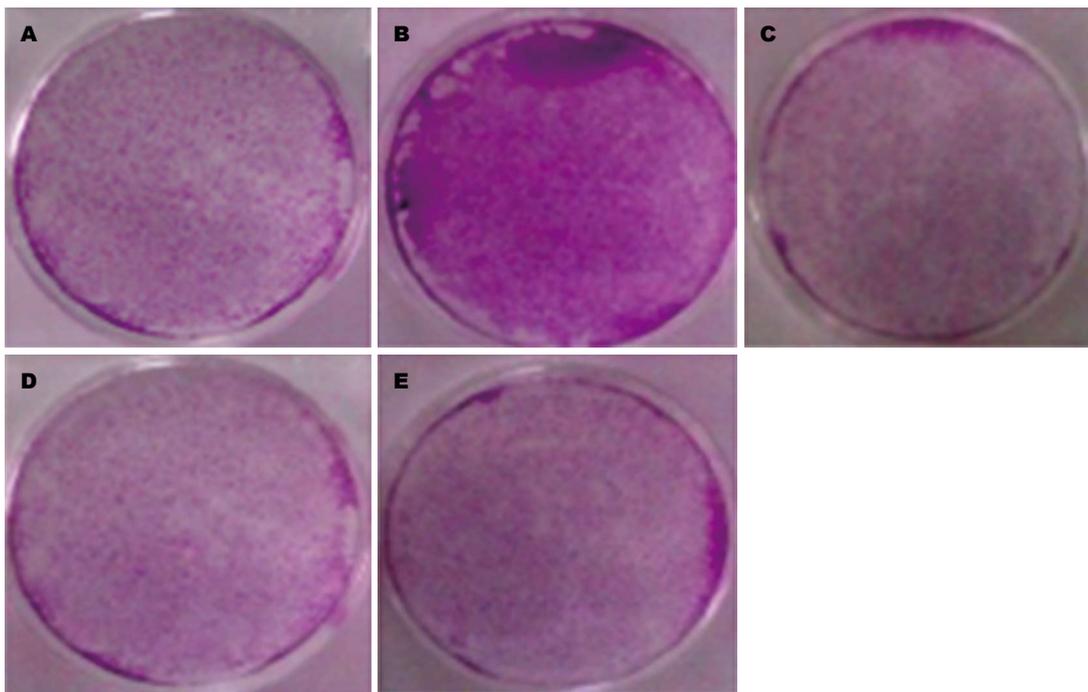
2.2 HBX能够促进细胞增殖 实验组细胞克隆明显高于对照组, 差异具有统计学意义($P < 0.05$) (图2).

2.3 对肝癌细胞增殖的抑制 结果表明, 回复SFRP1、SFRP5和干扰掉Dnmt1后, 能够明显抑制肝癌细胞的增殖(图3).

2.4 对肝癌细胞迁移的抑制 结果表明, 回复SFRP1、SFRP5和干扰掉Dnmt1后, 能够明显抑制肝癌细胞迁移. 结果如图4所示. 在Huh7细胞里, 对照组平均31.46个/视野 \pm 1.88个/视野; Huh7-HBX组平均68.28个/视野 \pm 3.78个/视野, AdSiDnmt1感染组平均31.98个/视野 \pm 1.57个/视野; AdSFRP1感染组平均28.69个/视野 \pm 2.13个/视野; AdSFRP5感染组平均32.48个/视野 \pm 2.25个/视野. Huh7-HBX组、AdSFRP1感染组、AdSFRP5感染组与对照组比较, 差异具有统计学意义($P < 0.05$).

3 讨论

肝脏具有丰富的血流供应, 与人体重要结构



同行评价
本研究设计合理,
结果合理, 研究有
一定的参考价值.

图 3 回复SFRP1、SFRP5和干扰掉Dnmt1后, 能够明显抑制肝癌细胞的增殖能力, 结晶紫染色分析细胞增殖的可行性. A: Huh7; B: Vector; C: siDnmt1; D: SFRP1; E: SFRP5.

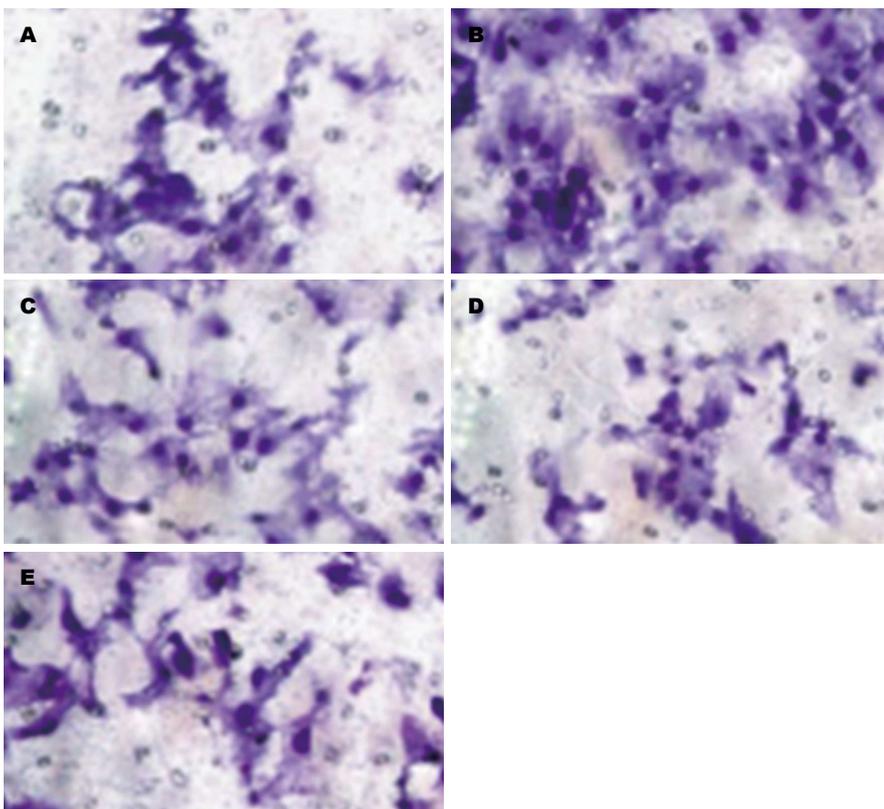


图 4 回复SFRP1、SFRP5和干扰掉Dnmt1后, 能够明显抑制肝癌细胞的迁移能力. A: Huh7; B: Vector; C: siDnmt1; D: SFRP1; E: SFRP5.

如下腔静脉、门静脉等有密切的联系; 肝癌发病隐匿, 侵袭性生长快速, 治疗难度较高. 早发现、早诊断、早治疗对于提高预后具有重要意义. 原发性肝癌(hepatocellular carcinoma,

HCC)是常见肿瘤之一,其中,HBV感染是引起原发性肝癌的主要危险因素^[10-15].HBX蛋白有反式激活作用,可以激活病毒和细胞启动子、增强子^[16-20].HBX在进行细胞调节和病毒基因中,有一定的作用,如HBV增强子、class II、原癌基因*c-jun*等^[21-25].当肿瘤发展到进展期之后,HBX会促进恶性细胞的增殖,加快肿瘤细胞增长.

HBV可以异常调控原癌基因,对细胞周期造成影响,引起肿瘤细胞的周期改变,产生相关激酶.HBX可以调控细胞凋亡.在生物体中,细胞凋亡是一项必须的过程,在完成细胞凋亡环节中,需要凋亡起始因子、诱导凋亡蛋白、调节蛋白三种类型的酶^[25-28].其通过感染肝细胞诱导凋亡后,可以促进HBV的复制和传播,进而使得宿主细胞免疫失效.HBX介导凋亡细胞死亡,其反应机制是他能够和线粒体相互作用,进而破坏线粒体结构^[28-30].

HBX还会影响DNA的修复,参与DNA修复的多个环节.HBX通过对p53途径的影响,使得NER受到影响,进而影响到XPB、XPD的表达^[15].HBX还会促进正常肝细胞LO2的迁移和增殖^[16].HBX是一个多功能蛋白,在HBV感染等环节中发挥着重要的作用.HBX可以促进肝癌细胞的凋亡,也能够抑制肝癌细胞的凋亡,这一系列的环节均和细胞培养环境有关系.进一步研究其作用机制,对于更好的预防和治疗肝癌有着重要价值.

本文研究结果显示,HBX基因能够抑制肝癌细胞的增殖和迁移,对于临床治疗有一定的指导意义.

4 参考文献

- Xie Q, Chen L, Shan X, Shan X, Tang J, Zhou F, Chen Q, Quan H, Nie D, Zhang W, Huang AL, Tang N. Epigenetic silencing of SFRP1 and SFRP5 by hepatitis B virus X protein enhances hepatoma cell tumorigenicity through Wnt signaling pathway. *Int J Cancer* 2014; 135: 635-646 [PMID: 24374650 DOI: 10.1002/ijc.28697]
- 王文欢, 曹建彪. 乙型肝炎病毒相关性肝癌抗病毒治疗的现状. *世界华人消化杂志* 2013; 21: 415-420
- Wei L, Shen Z, Zhao X, Wu Y, Liu W, Zhang J, Xie Y, Liu J. A broadly reactive monoclonal antibody detects multiple genotypes of hepatitis B virus X protein. *Arch Virol* 2014; 159: 2731-2735 [PMID: 24838854]
- Sun Q, Wang R, Luo J, Wang P, Xiong S, Liu M, Cheng B. Notch1 promotes hepatitis B virus X protein-induced hepatocarcinogenesis via Wnt/ β -catenin pathway. *Int J Oncol* 2014; 45: 1638-1648

- [PMID: 25017705 DOI: 10.3892/ijo.2014.2537]
- Mosca N, Castiello F, Coppola N, Trotta MC, Sagnelli C, Pisaturo M, Sagnelli E, Russo A, Potenza N. Functional interplay between hepatitis B virus X protein and human miR-125a in HBV infection. *Biochem Biophys Res Commun* 2014; 449: 141-145 [PMID: 24824183 DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.05.009]
 - Lou X, Hou Y, Liang D. Effects of hepatitis B virus X protein on human T cell cytokines. *Can J Microbiol* 2013; 59: 620-626 [PMID: 24011345 DOI: 10.1139/cjm-2013-0259]
 - 李卫华, 缪晓辉, 戚中田, 朱诗应, 赵克开. 乙型肝炎病毒X蛋白对肝癌细胞生长的影响. *生物医学工程与临床* 2008; 12: 235-240
 - Liu F, You X, Chi X, Wang T, Ye L, Niu J, Zhang X. Hepatitis B virus X protein mutant HBx Δ 127 promotes proliferation of hepatoma cells through up-regulating miR-215 targeting PTPRT. *Biochem Biophys Res Commun* 2014; 444: 128-134 [PMID: 24434140 DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.01.004]
 - Kusunoki H, Tanaka T, Kohno T, Wakamatsu K, Hamaguchi I. Structural characterization of the BH3-like motif of hepatitis B virus X protein. *Biochem Biophys Res Commun* 2014; 450: 741-745 [PMID: 24950407 DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.06.042]
 - 侯全玲, 唐红, 黄飞骏. 乙型肝炎病毒X蛋白与原发肝癌. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 50-55
 - 潘爱萍, 黄古叶, 陈晶, 何燕玲. 乙型肝炎病毒cccDNA与HBX蛋白在肝细胞性肝癌中表达的关系及意义. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 712-715
 - 翟露露, 刘晶, 谢幼华. 乙型肝炎病毒X蛋白对细胞凋亡的影响存在剂量依赖性. *微生物与感染* 2011; 6: 72-77
 - 徐付卿, 山长亮, 叶丽虹, 张晓东. COX-2在乙肝病毒X蛋白(HBX)促进肝癌细胞和肝细胞增殖中的作用. *中国生物化学与分子生物学报* 2008; 24: 968-973
 - Zhang W, Lu Z, Kong G, Gao Y, Wang T, Wang Q, Cai N, Wang H, Liu F, Ye L, Zhang X. Hepatitis B virus X protein accelerates hepatocarcinogenesis with partner survivin through modulating miR-520b and HBXIP. *Mol Cancer* 2014; 13: 128 [PMID: 24886421 DOI: 10.1186/1476-4598-13-128]
 - Li CH, Xu F, Chow S, Feng L, Yin D, Ng TB, Chen Y. Hepatitis B virus X protein promotes hepatocellular carcinoma transformation through interleukin-6 activation of microRNA-21 expression. *Eur J Cancer* 2014; 50: 2560-2569 [PMID: 25087183 DOI: 10.1016/j.ejca.2014.07.008]
 - Slagle BL, Andrisani OM, Bouchard MJ, Lee CG, Ou JH, Siddiqui A. Technical standards for hepatitis B virus X protein (HBx) research. *Hepatology* 2014 Aug 7. [Epub ahead of print] [PMID: 25099228 DOI: 10.1002/hep.27360]
 - 张峰, 邵永孚, 许杨, 高纪东, 刘国亭, 徐立斌, 孙宗棠. 乙型肝炎病毒活跃复制与肝细胞癌发生的相关性研究. *中华普通外科杂志* 2006; 21: 1-3
 - 张涛, 韩涛, 高英堂, 陈浩, 杜智, 王毅军. 乙型肝炎病毒感染的肝癌患者肝组织中乙型肝炎病毒cccDNA的检测. *中华肝脏病杂志* 2007; 15: 232-233
 - 郭晓榕, 程斌, 郑要初, 林松挺, 黎培员. HBx基因下调P21及其对HepG2细胞增殖与凋亡的影响. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 2080-2085
 - 程斌, 田德安. DNA修复酶表达与8-羟脱氧鸟核苷酸在肝癌发生中的作用. *中华消化杂志* 2005; 25: 437-439

- 21 戴悦, 宁涛, 李坤, 蔡素霞, 蒋明伟, 柴庆波, 盖郁慧, 汪欣. LMP2/LMP7基因多态性与人群中乙型肝炎病毒感染相关性研究. 北京大学学报医学版 2005; 37: 508-512
- 22 李坤, 戴悦, 阴秀丽, 蔡素霞, 宁涛, 曹邦伟, 徐昌青. 中国华北地区人群TAP1基因多态性与乙肝关联性的研究. 胃肠病学和肝病学杂志 2005; 14: 66-70
- 23 曹邦伟, 戴悦, 盖郁慧, 柴庆波, 汪欣. LMP2/LMP7基因编码区多态性及单倍体型与胃癌易感无相关性. 世界华人消化杂志 2006; 14: 3471-3476
- 24 庄林, 游晶, 陈红英, 俞岚, 孔蕾, 唐宝璋, 黄俊华, 袁绍明, Hutcha Sriplung, Virasakdi Chongsuvivatwong, Alan Geater, 袁丽芳, 王辉. 云南地区乙型肝炎病毒基因型分布与临床的相关性. 世界华人消化杂志 2007; 15: 2120-2127
- 25 肖扬, 周岳进, 王开鉴, 张文静, 胡操寒, 谢庆荣, 朱冰星, 郑金莉. 浙江温州地区1020例乙型肝炎患者HBV基因分型研究. 中西医结合肝病杂志 2005; 15: 41-42
- 26 李雅娟, 庄辉, 李杰, 董庆鸣, 陈雅洁, 牛俊奇, 马为民, 赵伟, 赵保安, 钟金群. 乙型肝炎病毒感染者病毒基因型和亚型分布及其临床意义. 中华肝脏病杂志 2005; 13: 724-729
- 27 谢秀琴, 许家璋, 李平, 杨志国, 孟运运, 李旭. 江苏地区乙型肝炎病毒基因分型及其临床意义. 疾病控制杂志 2005; 9: 171-173
- 28 李桂珍, 刘兴祥, 王兴亮. 江苏地区不同类型乙型肝炎患者HBV基因分型研究. 第四军医大学学报 2007; 27: 157-159
- 29 张岩, 白雪帆, 李新红, 李羽, 谢玉梅, 康文臻, 赵玉玲. 陕西地区乙型肝炎患者血清中病毒的基因分型. 第四军医大学学报 2002; 23: 746-747
- 30 杨艳杰, 成军, 陈东风, 吴煜, 黄燕萍, 钟彦伟, 王春花, 刘敏. 乙型肝炎病毒基因分型的临床意义. 世界华人消化杂志 2004; 12: 1670-1673

编辑 郭鹏 电编 都珍珍



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有

• 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等”的右上角注角码号;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号.如马连生^[1]报告……,潘伯荣等^[2-5]认为……;PCR方法敏感性高^[6-7].文献序号作正文叙述时,用与正文同号的数字并排,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.