

乙肝病毒核心抗原单链抗体细胞内免疫抗乙肝病毒基因治疗研究

陆荫英, 王琳, 刘妍, 于敏, 李克, 王业东, 张玲霞, 成军

陆荫英, 王琳, 刘妍, 李克, 王业东, 张玲霞, 成军, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039

于敏, 北京大学第一医院感染病科 北京市 100034

国家自然科学基金攻关项目, No.C03011402, 军队“十、五”科技攻关面上项目, No.01MB135

项目负责人 成军, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 北京市 100039. cj@genetherapy.com.cn

电话: 010-66933392 传真: 010-63801283

收稿日期 2002-03-29 接收日期 2002-05-21

Inhibitory effect of HBcAg ScFv on hepatitis B virus

Yin-Ying Lu, Lin Wang, Yan Liu, Min Yu, Ke Li, Ye-Dong Wang, Ling-Xia Zhang, Jun Cheng

Yin-Ying Lu, Lin Wang, Yan Liu, Ke Li, Ye-Dong Wang, Ling-Xia Zhang, Jun Cheng, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China
Min Yu, Department of Infectious Diseases, The First Hospital of Beijing University, Beijing, 100034.

Supported by the Natural Science Foundation of China, No. C03011402.

Correspondence to: Jun Cheng, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China. cj@genetherapy.com.cn

Received 2002-03-29 Accepted 2002-05-21

Abstract

AIM: Single chain fragment variable (ScFv) antibody was the smallest fragment of antibody containing antigen binding domain, which could come into cell easily and had less immunogenicity. In order to study the inhibitory effect on hepatitis B virus of HBcAg ScFv, HBcAg ScFv gene was transferred and expressed in 2.2.15 cell. Meanwhile, the inhibition of HBsAg and HBeAg was investigated.

METHODS: HBcAg ScFv gene was screened and identified from a semi-synthetic phage library by phage display technique and amplified and cloned into the retroviral vector pLXSN. The reconstructed plasmid pLXSN-HBcAg ScFv was transfected into PA317 cells and infected 2.2.15 cells by using the supernatant containing the pseudovirus. Then, HBsAg and HBeAg were detected by ELISA and the density of HBV DNA was tested by quantitative determination.

RESULTS: The specific HBcAg ScFv was screened by phage display technique. Then it was amplified and cloned into

retroviral vector pLXSN, and transfected into PA317 cell. HBcAg ScFv pseudovirus contained in the supernatant of transfected PA317 cells were identified by RT-PCR. When the HBcAg ScFv pseudovirus were infected into 2.2.15 cells and incubated for 3, 5, 7, 14 days, the P/N value of HBsAg and HBeAg were decreased gradually and turned to negative at day 14. The density of HBV DNA had not changed apparently.

CONCLUSIONS: The results indicated that HBcAg ScFv gene expressed in 2.2.15 cells can inhibit the expression of HBV significantly and it may be a potential candidate for gene therapy against HBV infection.

Lu YY, Wang L, Liu Y, Yu M, Li K, Wang YD, Zhang LX, Cheng J. Inhibitory effect of HBcAg ScFv on hepatitis B virus. Shijie Huanren Xiaohua Zazhi 2002;10(7):765-769

摘要

目的: 研究乙型肝炎病毒核心抗原(HBcAg)人源单链抗体(ScFv)细胞内免疫抗乙型肝炎病毒(HBV)基因治疗的作用。

方法: 用噬菌体表面展示技术筛选特异性的HBcAg人源可变区单链抗体, 聚合酶链反应(PCR)法和基因重组技术体外扩增HBcAg单链抗体基因, 并构建表达HBcAg ScFv基因的重组逆转录病毒载体pLXSN-HBcAg, 转染PA317细胞, 逆转录PCR(RT-PCR)方法验证细胞培养液上清分泌的假病毒颗粒中HBcAg ScFv的表达; 将假病毒颗粒感染2.2.15细胞, 酶联免疫吸附法(ELISA)检测其上清HBsAg和HBeAg, 定量检测HBV DNA。

结果: 成功筛选出HBcAg ScFv, PCR扩增出750bp的全基因, 构建HBcAg ScFv基因的逆转录病毒载体, 转染PA317细胞, 在上清中检测出含HBcAg ScFv假病毒颗粒的存在, 上清感染2.2.15细胞后第3、5、7、14天, HBsAg、HBeAg逐渐下降, 到14d时HBsAg已变为阴性, DNA定量检测无明显变化。

结论: HBcAg ScFv能成功地在逆转录病毒载体中表达, 并有抑制HBsAg、HBeAg表达的作用。

陆荫英, 王琳, 刘妍, 于敏, 李克, 王业东, 张玲霞, 成军. 乙肝病毒核心抗原单链抗体细胞内免疫抗乙肝病毒基因治疗研究. 世界华人消化杂志 2002; 10(7): 765-769

0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)感染, 不仅可引起急、慢性肝炎, 还与肝硬化和原发性肝癌的发生、发展有着密切的关系^[1-5]。目前对HBV感染缺乏理想的治疗手段, 即使是干扰素这类公认有确切疗效的药物, 也只

有20-40%的持久有效率,探索新的更有效的抗HBV的治疗方法,已成为当前医学研究的热点^[6-10].近年来新发展起来的噬菌体抗体库筛选技术,能不经人体免疫直接获得人源化抗体,在新型抗病毒药物筛选方面具有强大的发展潜力^[11-13].本实验通过噬菌体抗体库筛选技术筛选得到特异性的HBcAg ScFv,并进一步用转基因方法研究筛选出的HBcAg ScFv在细胞内的表达情况,证实具有抑制HBsAg和HBeAg的作用,有望成为新的抗HBV药物.

1 材料和方法

1.1 材料 乙型肝炎病毒(HBV)核心抗原蛋白购于Virostat公司;大肠杆菌*DH5 α* 、人噬菌体抗体文库, M13K07辅助噬菌体购于Pharmacia公司; *Taq* DNA聚合酶、*T4* DNA连接酶、*Sfi*I, *Not*I, *Eco*RI和*Xho*I购于Takara生物公司;DNA玻璃奶回收试剂盒、Wizard质粒DNA提取纯化试剂盒、RNA提取试剂盒、RT-PCR试剂盒、IPTG、X- β -Gal及pGEM-T载体购于Promega公司;PA317细胞、2.2.15细胞购于中国科学院上海细胞生物所;精制胎牛血清、Lipofectin²⁰⁰⁰转染试剂盒、DMEM培养基、二甲亚砜(DMSO)、G418购于Gibco公司;HBsAg、HBeAg酶联免疫试剂盒购于厦门新创生物技术有限公司;引物合成及DNA测序由上海博亚生物技术有限公司完成;其他生化试剂购自Sigma公司.

1.2 方法 HBcAg ScFv的筛选及表达采用噬菌体表面展示技术,以重组的HBV核心蛋白为包被抗原,从噬菌体单链可变区抗体库中经过5轮“黏附-洗脱-扩增”筛选过程,获得抗原结合活性较强的乙型肝炎病毒核心蛋白人源单链可变区抗体ScFv片段克隆,并对其进行DNA序列及免疫活性测定.从噬菌体抗体阳性克隆中提取插入了ScFv片段的pHEN1载体质粒转化大肠杆菌HB2151, IPTG诱导表达乙型肝炎核心蛋白可溶性人源单链可变区抗体,ELISA和Western blot检测其抗原结合特异性^[14].HBcAg ScFv基因的扩增及逆转录病毒载体的构建是以上述pHEN1载体中的HBcAg ScFv为模板进行PCR扩增,在编码区的上游和下游分别设计合成一对寡聚核苷酸引物(p1 5' -GAA TTC ATG GCC CAG GTG CAG CTC GT-3', p2 5' -CTC GAG CTA TGC GGC ACG CGG TTC CA-3'),引物的3'、5'端分别加入*Eco*RI和*Xho*I酶切位点.在0.5mL的Eppendorf管中依次加入17.3 μ L双蒸水,2.5 μ L的10 \times 缓冲液(含20mmol \cdot L⁻¹MgCl₂),2 μ L 2mmol \cdot L⁻¹dNTP、1 μ L 12.5mmol \cdot L⁻¹P1、1 μ L 12.5mmol \cdot L⁻¹P2、1 μ L pCP10质粒、0.2 μ L *Taq* DNA聚合酶(5 \times 10⁶U \cdot L⁻¹).放入

PE9600 PCR仪中扩增.扩增条件:94 $^{\circ}$ C变性90s,58 $^{\circ}$ C退火60s,72 $^{\circ}$ C延伸90s,循环30次后,72 $^{\circ}$ C保温10min.10g \cdot L⁻¹琼脂糖凝胶电泳鉴定扩增结果后切胶玻璃奶回收.上述回收的PCR反应产物与pGEM-T载体按8:1混合,在16 $^{\circ}$ C用*T4* DNA连接酶连接过夜,随后转化入用氯化钙法制备的大肠杆菌DH5 α 感受态细胞,在铺有异丙基硫代- β -D-半乳糖苷(IPTG)及5-溴-4-氯-3-吡啶- β -D-半乳糖苷(X- β -Gal)的氨苄西林琼脂糖平板上进行蓝白斑落筛选,挑取白色菌落用碱裂解法提取质粒DNA进行酶切鉴定及测序,证明HBcAg ScFv基因已被克隆进T载体,送DNA测序鉴定.提取该质粒,与载体pLXSN一同用*Eco*RI及*Xho*I酶切,用上述相同的方法连接到pLXSN载体中,转化后接种于氨苄西林琼脂糖平板上筛选阳性菌落,提取质粒DNA,双酶切及PCR鉴定后转染PA317细胞,分别用于5 μ g的pLXSN-HBcAg ScFv质粒加10 μ L的Lipofectin²⁰⁰⁰脂质体,pLXSN质粒5 μ g和Lipofectin²⁰⁰⁰脂质体10 μ L混合后(阴性对照)混合室温孵育20min后加入培养皿中,次日按1:10传代,待细胞贴壁后加G418 380 μ g/ml并维持浓度培养筛选抗性克隆.14d时获得两个的阳性细胞克隆,分离并传代培养.分别收集培养液上清,提取总RNA,反转录成cDNA,先用HBcAg ScFv的外引物(p1,p2)94 $^{\circ}$ C 1min 30s,58 $^{\circ}$ C 50s,72 $^{\circ}$ C 1min 30s,PCR扩增30个循环,然后以扩增产物1 μ L为模板,用内引物(p3 5' -GGG ATG GAT CAA CGC TGG CA-3' p4 5' -GCC CCA GTG ATG GTC AAG GA-3', nt 150-671)PCR扩增30个循环,1%的琼脂糖凝胶电泳鉴定上清中分泌的假病毒颗粒中含有HBcAg ScFv基因表达产物^[14,15].2.2.15细胞以1 \times 10⁶接种于细胞培养瓶中,将7ml的PA317抗性细胞培养上清加入培养液中培养2.2.15细胞,第2天换成完全DMEM培养液培养,以后第3、5、7天换液并收集,第7天传代,至14d再收集一次上清,共4次,-20 $^{\circ}$ C保存待测^[16].2.2.15细胞上清HBsAg、HBeAg和HBV DNA的检测采用HBsAg和HBeAg酶联免疫(ELISA)测定试剂盒,P/N值为样品值A \times 20.HBV DNA用中山医科大学生产的定量PCR检测试剂盒测定,操作均按说明书进行.

2 结果

2.1 HBcAg ScFv的筛选 用噬菌体抗体展示技术成功筛选出HBcAg ScFv,经SDS-PAGE电泳表明,HB2151中表达的HBcAg可溶性ScFv分子量约28000,免疫活性检测结果表明,该抗体具有较强的抗原结合活性和特异性^[17].

2.2 人源 HBcAg ScFv 逆转录病毒载体的构建及其转移和表达 用 PCR 方法, 在 HBcAg ScFv 两端设计引物从 pHEN1-HBcAg ScFv 载体上扩增出其全基因片段 750bp, 然后分别用 *EcoRI* 和 *XhoI* 双酶切扩增产物及逆转录病毒载体 pLXSN, T4 DNA 连接酶连接, 即构建表达 HBcAg ScFv 基因的逆转录病毒载体 (pLXSN-HBcAg ScFv) (图 1). 用 *EcoRI* 和 *XhoI* 双酶切鉴定, 证实连接正确 (图 2). 用 Lipofectin²⁰⁰⁰ 转染 PA317 细胞, G418 筛选, 选出两株抗性细胞克隆, 用巢式 RT-PCR 两次扩增出内引物所包含的 457bp 片段, 证明抗性细胞分泌上清的假病毒颗粒中有 HBcAg ScFv 的表达 (图 3).

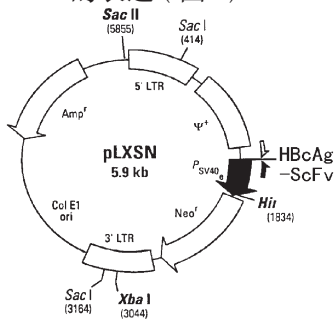
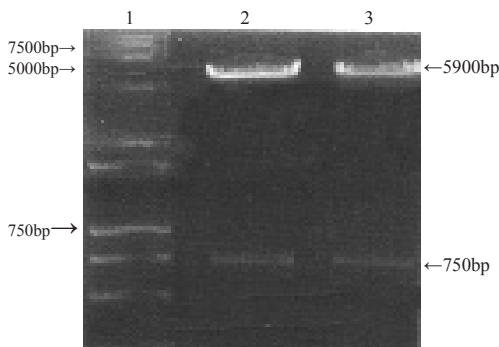
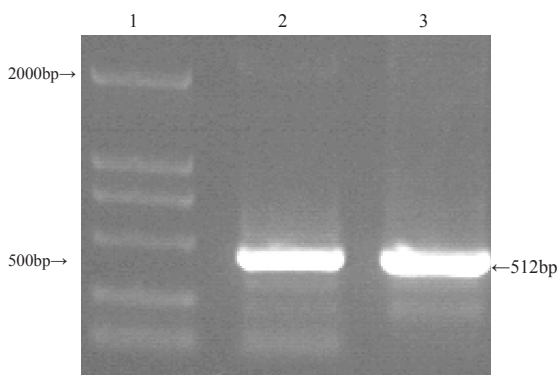


图 1 HBcAg ScFv 基因的逆转录病毒载体 (pLXSN-HBcAg ScFv)



1. DNAMarker 2. 3. 实验组
图 2 HBcAg ScFv *EcoRI* 和 *XhoI* 双酶切图



1. DNAMarker 2. 3. 实验组
图 3 转染 PA317 细胞上清巢式 RT-PCR 扩增图

2.3 人源 HBcAg ScFv 基因对 HBV 抗原表达及 HBV DNA 的影响 转染 pLXSN 空载体的抗性细胞上清感

染的 2.2.15 细胞培养上清为阴性组. 两株抗性细胞克隆上清感染 2.2.15 细胞的第 3、5、7、14 天的上清中 HBcAg 的 P/N 值分别为组 1:1.72、1.80、1.26、2.1; 组 2:1.96、2.52、2.96、1.9; 在第 14 天时两组均为阴性 (<2.1); 阴性组为 1.04、2.56、1.98、3.78. 第 3、5、7、14 天的上清中 HBeAg 的 P/N 值分别为组 1:7.32、30.50、37.12、14.92; 组 2:7.72、24.68、21.52、12.84; 阴性组为 10.24、26.76、39.04、34.38. 实验组中 HBcAg 和 HBeAg 的表达较对照组明显下降. HBV DNA 第 7、14 天时, 实验组 1 分别为 7.96×10^6 , 1.13×10^6 ; 实验组 2 分别为 6.75×10^6 , 6.26×10^6 ; 阴性组为 9.8×10^6 , 6.83×10^6 (图 4、5).

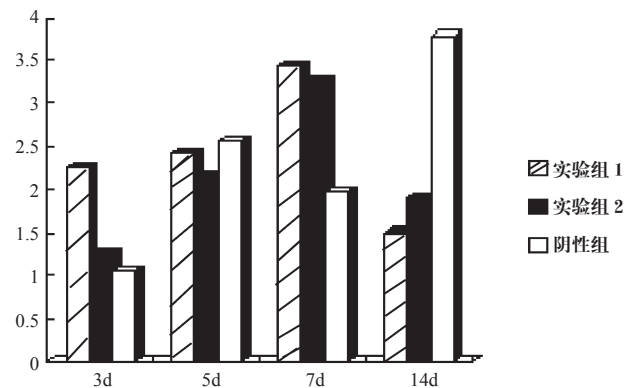


图 4 HBcAg ScFv 对 2.2.1 细胞分泌 HBcAg 的抑制

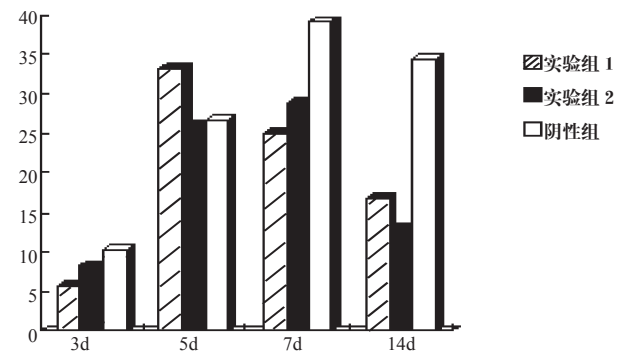


图 5 HBcAg ScFv 对 2.2.1 细胞分泌 HBeAg 的抑制

3 讨论

在众多有潜在应用价值的新型抗病毒治疗策略中, 抗病毒基因治疗技术逐渐引起人们的关注^[18-24]. 将特异性抗体以基因转移手段导入体内, 通过调节机体免疫应答达到抗病毒感染的目的^[25,26]是抗病毒基因治疗领域中一项新兴的技术. 在抗体研制发展的三个阶段中, 第一代多克隆抗体因成分复杂, 针对性差, 不宜用于治疗; 第二代单克隆抗体虽在抗 HBV、HCV 感染中的应用研究取得了很大的进展, 但存在异源蛋

白反应的缺点,很难在临床上推广应用;第三代单链可变区抗体是具有抗原结合位点的最小抗体片段,由连接肽将抗体的重链可变区和轻链可变区连接起来而组成,其分子小,没有Fc段,免疫原性小,易于穿过组织细胞,能通过基因工程技术大量制备,已开始

在抗体研究领域崭露头角^[27-30]。
在乙型肝炎病毒的生活周期中,HBcAg、病毒mRNA和DNA聚合酶共同构成核心颗粒,在核心颗粒中完成病毒DNA的合成。HBcAg具有保护病毒mRNA,防止其被RNA酶降解的作用,HBcAg对于乙肝病毒前基因组RNA的装配、基因组DNA的合成具有重要的作用^[31-33]。如能将编码HBcAg单链抗体的基因转移到细胞内部,在细胞内与HBcAg结合,则有望阻断病毒的复制过程,从而为抗乙肝病毒治疗开辟新的途径^[34]。目前靶向HBc的抗体研究已得到广泛重视,但通过杂交瘤技术生产的单克隆抗体的鼠源性问题限制了临床上的应用,因此制备人源化的乙型肝炎病毒核心蛋白抗体是其解决的途径之一。我们应用噬菌体抗体库技术,以HBcAg为固相抗原,从噬菌体单链可变区半合成抗体库中获得了特异性较强的HBcAg人源单链可变区抗体克隆,并对其细胞内免疫的抗病毒作用做了深入的研究。细胞内免疫指将抑制病毒复制和表达的基因导入细胞内进行表达,从而对其中已感染的病毒起抑制或阻断作用,或使细胞对病毒感染具有抵抗力。以单链抗体为主要技术路线的细胞内免疫的主要目的是在哺乳动物细胞内生成特定的单链抗体,并通过其特异性的功能作用干扰细胞功能或阻止病毒的复制。

逆转录病毒表达载体-包装细胞系这一基因转移系统,是目前较为常见的基因转移系统,具有可插入片段长,基因转移效率高,宿主范围广,能稳定表达目的基因的优点。我们用该系统研究人源HBcAg ScFv转基因表达,在转染的PA317细胞上清中,巢式逆转录-多聚酶链反应(RT-PCR)扩增出HBcAg ScFv基因,说明HBcAg ScFv在PA317细胞中稳定表达,并被包装分泌入上清中。我们进一步将PA317细胞上清中分泌的假病毒颗粒感染2.2.15细胞,通过检测被感染细胞培养上清中HBSAg、HBeAg的含量,观察HBcAg ScFv的细胞内抗病毒作用。以转染pLXSN-HBcAg ScFv的抗性细胞上清感染的2.2.15细胞培养上清为实验组,以转染pLXSN空载体的相同细胞上清为对照组,研究发现,HBcAg ScFv能明显抑制2.2.15细胞分泌HBsAg、HBeAg的水平,抑制作用随着孵育时间的延长而增强,说明HBcAg ScFv能在胞内抑制HBV的表达,阻断病毒对细胞的损害作用。以上结果证明HBcAg ScFv可

以通过细胞内免疫机制抗HBV感染,效果确切,可以进一步做动物实验研究,如果效果满意将为其用于临床病毒性肝炎的治疗奠定良好基础,在抗HBV感染治疗方面开辟新的道路。

4 REFERENCES

- Huang YX, Wu GH. Relationship between hepatitis B and hepatocarcinoma. *Shijie Huanren Xiaohua Zazhi* 2000;8(supp):101
- Tang ZY. Hepatocellular Carcinoma Cause, Treatment and Metastasis. *World J Gastroenterol* 2001;7:445-454
- Wang WL, Gu GY, Hu M. Expression and significance of HBV genes and their antigens in human primary intrahepatic cholangiocarcinoma. *World J Gastroenterol* 1998;4:392-396
- Wang WL, Gu GY, Hu M, Wang CJ. Expression and significance of genes and HBV in human primary intrahepatic cholangiocarcinoma. *Huaren Xiaohua Zazhi* 1998;6:1039-1042
- Huang YX, Wu GH. Relationship between HBV and hepatocarcinoma. *Shijie Huanren Xiaohua Zazhi* 2001;9:682-668
- Huang ZM, Yang XB, Cao WB, Zhou YJ, Lu LY. Effect of Qinling granule in treatment of 102 patients with chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol* 1998; 4:47
- Shi JJ, Miao F, Liu FL. Therapeutic effect of medicinal herbs and western drugs on hepatitis B virus. *World J Gastroenterol* 1998; 4(supp):61-63
- Qiu AG, Qiu RB, Miao Y, Fu ZL, Zhang YR, Zheng YQ, Hong YS, Wu BS, Jiang YP, Qian CF. Clinical study on therapeutic effect of three cycle natural therapy on chronic hepatitis B and C. *World J Gastroenterol* 1998; 4(supp):82
- You J, Zhuang L, Tang BZ, Yang WB, Ding SY, Li W, Wu RX, Zhang HL, Zhang YM, Yan SM, Zhang L. A randomized controlled clinical trial on the treatment of Thymosin-a1 versus interferon in patients with hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2001; 7:411-414
- Xu KC, Wei BH, Yao XX, Zhang WD. Recent therapy for chronic hepatitis B by combined traditional Chinese and Western medicine. *Shijie Huanren Xiaohua Zazhi* 1999; 7:970-974
- Zhong YW, Cheng J, Liu Y, Dong J, Yang JZ, Zhang LX. Expression of human single-chain variable fragment antibody against non-structural protein 3 of hepatitis C virus antigen in *E.coli*. *Chin J Hepatol* 2000; 8:171-173
- Zhong YW, Cheng J, Shi SS, Xia XB, Wang G, Yang JZ, Chen JM. Screening and characterization of human phage antibody to hepatitis virus C NS4A antigen. *Immunol J* 2000; 16:422-428
- Zhong YW, Wang SS, Zhao JM, Cheng J, Zhang LX, Li LI. The preparation of human single-chain Fv antibody specifically against hepatitis C virus E2 antigen and its application in histochemistry. *Chin J Exp Clin Virol* 2001; 15:186-189
- Dong J, Yang J, Zhang L. Screening and identification of a humanized single chain variable region antibody for hepatitis C virus non-structural 3 protein. *Chin J Immunol* 2000;16:246-249
- Zhong YW, Cheng J, Wang G, Tian XJ, Chen XH, Li L, Chen JM. Screening and characterization of human phage antibody to hepatitis virus B core antigen. *Chine Pub Med* 2002;18:1-2
- Locarnini SA, Bartholomeusz A, Delaney WE. Evolving therapies for the treatment of chronic hepatitis B virus infection. *Expert Opin Inves Drug* 2002;11:169-187
- Wu C, Zeng Z, Wang Q. Experimental study of inhibition of hepatitis B by dual-target antisense RNA. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2001;81:605-608
- Chiou HC, Lucas MA, Coffin CC, Banaszczyk MG, Ill CR, Lollo CP. Gene therapy strategies for the treatment of chronic viral hepatitis. *Expert Opin Biol Ther* 2001;1:629-639
- Robaczewska M, Guerret S, Remy JS, Chemin I, Offensperger WB, Chevallier M, Behr JP, Podhajska AJ, Blum HE, Trepo C, Cova L. Inhibition of hepadnaviral replication by polyethylenimine-based

- intravenous delivery of antisense phosphodiester oligodeoxynucleotides to the liver. *Gene Ther* 2001;8:874-881
- 22 Zhou Z, Zhang D, Ren H. Humoral immunization and cell-mediated immunization evoked by HBsAg and B7-2 Ag coexpression recombinant adenovirus vector. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2001;9:111-113
- 23 Kriangkum J, Xu B, Nagata LP, Fulton RE, Suresh MR. Bispecific and bifunctional single chain recombinant antibodies. *Biomol Eng* 2001;18:31-40
- 24 zu Putlitz J, Skerra A, Wands JR. Intracellular expression of a cloned antibody fragment interferes with hepatitis B virus surface antigen secretion. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;255:785-791
- 25 Pumpens P, Grens E. Hepatitis B core particles as a universal display model: a structure-function basis for development. *FEBS Lett* 1999;442:1-6
- 26 Preikschat P, Gunther S, Reinhold S, Will H, Budde K, Neumayer HH, Kruger DH, Meisel H. Complex HBV populations with mutations in core promoter, C gene, and pre-S region are associated with development of cirrhosis in long-term renal transplant recipients. *Hepatology* 2002;35:466-477
- 27 Yamamoto M, Hayashi N, Takehara T, Ueda K, Mita E, Tatsumi T, Sasaki Y, Kasahara A, Hori M. Intracellular single-chain antibody against hepatitis B virus core protein inhibits the replication of hepatitis B virus in cultured cells. *Hepatology* 1999;30:300-307
- 28 Zhong YW, Cheng J, Liu Y, Dong J, Yang JZ, Zhang LX. Expression of soluble human single chain Fv antibody to hepatitis C NS 3 antigen in *E.coli*. *Chine Hepatol* 1999;4: 71-73
- 29 Zhong YW, Cheng J, Liu Y, Dong J, Yang JZ, Zhang LX. screening and characterization of human phage antibody with single-chain variable fragment specific to hepatitis C nonstructural 3 protein. *Chine J Infect Dis* 2000;18: 84-87
- 30 Zhong YW, Cheng J, Shi SS, Yang JZ, Dong J, Xia XB, Li K. Screening and expression of human phage antibody to hepatitis virus C NS5A antigen. *Chinese J Traditional Western Med* 2001; 2: 97-99
- 31 Zhong YW, Cheng J, Shi SS, Xia XB, Wang G, Yang JZ, Chen JM. Screening and characterization of human phage antibody to hepatitis virus C core antigen. *Chine J Hepatol* 2001; 9: 217-219
- 32 Cheng J, Zhong YW, Shi SS, Wang G, Dong J, Xia XB, Chen JM. Screening and characterization of human phage antibody to hepatitis virus C NS5A antigen. *J Exp Clin Virol* 2001; 15: 216-218
- 33 Feng Y, Kong YY, Wang Y, Qi GR. Intracellular inhibition of the replication of hepatitis B virus by hammerhead ribozymes. *J Gastroenterol Hepatol* 2001;16:1125-30
- 34 Partha SC, Ira P. Analysis of cloned Fvs from a phage display library indicates that DNA immunization can mimic antibody response generated by cell immunization. *J Immunol Met* 1999;231:83-91

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2002 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 征 订 •

欢迎订阅 2002 度 World Journal of Gastroenterology

美国科学情报研究所 (ISI) 2000 年度《期刊引用报告》(Journal Citation Reports, JCR[®]) 报道中国 47 种期刊引文状况影响因子排序: World Journal of Gastroenterology[®] (WJG[®]) 影响因子 0.993 排名第 2 位. Science Citation Index-Expanded (SCI-E[®]) 收录世界领先的胃肠病学和肝病杂志 44 种, 其中包括 WJG[®]. Current Contents/Clinical Medicine[®] (即时目次/临床医学) 收录世界领先的 1130 种期刊和书所登载的文章, 社论, 会议摘要, 评论及其他重要信息的完整的书刊目次信息. 其中收录世界领先的胃肠病学和肝病杂志 36 种, 其中包括 WJG[®]. Clinical Medicine Citation Index[®] 收录世界领先的胃肠病学和肝病杂志 43 种, 其中包括 WJG[®]. 由 122 位胃肠病学者组成的编委会, 分布在 65 个国家和地区, 其中包括 53 个国家的胃肠病学会主席. 53 个国家和地区胃肠病学会为 WJG[®] 的合作伙伴. WJG[®] 被美国《科学引文索引》(Science Citation Index[®]-Expanded, Research Alert[®] Current Contents/Clinical[®] Medicine, Journal Citation Reports[®], Clinical Medicine Citation Index[®]), 美国《医学索引》(Index Medicus/MEDLINE), 美国《化学文摘》(Chemical Abstracts, CA)、荷兰《医学文摘库/医学文摘 (EMBASE/Excerpta Medica, EM)》和俄罗斯《文摘杂志》(Abstract Journal, AJ) 收录. 国内被中国科学引文索引, 中国科技论文统计与分析, 国家级火炬计划项目中国学术期刊综合评价数据库来源期刊. 世界胃肠病学杂志英文版, 1999 年度, 2000 年度被评为山西省一级期刊. 中华人民共和国科学技术部, 国科发财字 [2001] 340 号文件 2001-09-10 关于公布科技期刊方阵名单的通知. 按照期刊方阵入选要求和比例, 经部门推荐、专家评审, 最终从推荐名单中选出科技期刊 716 种进入中国期刊方阵, 其中“双高”期刊 40 种, “双奖”期刊 58 种, “双百”期刊 122 种, “双效”期刊 496 种. 《World Journal of Gastroenterology[®] (WJG)》在众多消化类期刊中唯一进入双百期刊行列. 中国科技信息研究所信息分析研究中心期刊检索报告: 2000 年度 WJG[®] 总被引频次 1394, 影响因子 2.616, 即年指标 1.205, 他引总引比 0.654, 地区分布数 25, 基金和资助论文比例 0.50, 海外作者论文数 35, 指标综合加权评分 74.34. 2000 年度中国科技期刊引证报告: 1411 种科技期刊影响因子排名: 世界华人消化杂志和 World Journal of Gastroenterology 影响因子分别为 2.700 和 2.616, 夺得冠亚军; 世界华人消化杂志总引频 2954 次排名第 2 位, WJG[®] 1394 次排名第 12 位. WJG[®], 大 16 刊, 168 页, 双月刊, 定价 50.00 元/期, 邮发代号 82-261. Email: wjgd@public. bta.net.cn http://www.wjgnet.com

(世界胃肠病学杂志社 2002-03-14)