

体外RNA干扰抑制RegIV基因表达对胃癌细胞增殖及凋亡的影响

刘兵, 项明, 于颖彦, 杨秋蒙, 蔡劬, 陈雪华, 李建芳, 刘炳亚, 朱正纲

刘兵, 项明, 于颖彦, 杨秋蒙, 蔡劬, 陈雪华, 李建芳, 刘炳亚, 朱正纲, 上海交通大学医学院附属瑞金医院普外科 上海消化外科研究所 上海市 200025
刘兵, 在读硕士研究生, 主要从事胃癌综合治疗方面的研究。
国家科技部“十一五”“863”重大专项基金资助项目, No. 2006AA02A402; No. 2006AA02A301
国家自然科学基金资助项目, No. 30572127, No. 30770961, No. 30670939
上海市浦江人才计划基金资助项目, No. PJ200700367
上海市科委重点基础研究基金资助项目, No. 05JC14013
作者贡献分布: 本课题在项明, 于颖彦及杨秋蒙的指导下由刘兵设计; 蔡劬, 陈雪华, 李建芳及刘炳亚提供技术指导; 朱正纲为课题总负责人; 研究过程、数据分析以及论文写作由刘兵操作完成; 于颖彦对文章进行批评性审阅。
通讯作者: 项明, 200025, 上海市, 上海交通大学医学院附属瑞金医院普外科, xm@medmail.com
电话: 021-64370045 传真: 021-64373909
收稿日期: 2008-12-21 修回日期: 2009-01-16
接受日期: 2009-01-19 在线出版日期: 2009-02-28

Influence of down-regulation of RegIV expression by small interfering RNA on proliferation and apoptosis of gastric cancer cells

Bing Liu, Ming Xiang, Ying-Yan Yu, Qiu-Meng Yang, Qu Cai, Xue-Hua Chen, Jian-Fang Li, Bing-Ya Liu, Zheng-Gang Zhu

Bing Liu, Ming Xiang, Ying-Yan Yu, Qiu-Meng Yang, Qu Cai, Xue-Hua Chen, Jian-Fang Li, Bing-Ya Liu, Zheng-Gang Zhu, Department of General Surgery, Shanghai Ruijin Hospital, Shanghai Institute of Digestive Surgery, Medical School of Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200025, China
Supported by: the Chinese National High-Tech Program, No. 863-2006AA02A402, No. 863-2006AA02A301; National Natural Science Foundation of China, No. 30572127, No. 30770961, No. 30670939; the Pujiang Talent Project of Shanghai Municipality, No. PJ200700367; and the Key Basic Research Foundation from Shanghai Commission of Science and Technology, No. 05JC14013
Correspondence to: Ming Xiang, Department of General Surgery, Shanghai Ruijin Hospital, Medical School of Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200025, China. xm@medmail.com
Received: 2008-12-21 Revised: 2009-01-16
Accepted: 2009-01-19 Published online: 2009-02-28

Abstract

AIM: To investigate RegIV expression level in human gastric cancer cell lines and the effect of

RNA interfering of RegIV on proliferation and apoptosis of gastric cancer cells.

METHODS: The expression levels of RegIV in nine gastric cancer cell lines were examined by real time PCR, and 3 small interfering RNA (siRNA1, siRNA2, siRNA3) targeting RegIV were designed and transfected into gastric cancer cell lines. The changes of RegIV mRNA expression level after siRNA interfering were detected by real time PCR. The proliferation was assayed by CCK-8 method. Flow cytometry was used to detect apoptosis of gastric cancer cells.

RESULTS: Compared with gastric mucosa cell line GES-1, the expression level of RegIV in gastric cancer cells was 5-fold or higher except MKN-45 and SNU-1. The expression level of RegIV in SNU-16 was the highest and was several thousand-fold higher than that in GES-1. SNU-16 was used for siRNA experiment. Three siRNAs showed notably down-regulated expression of RegIV mRNA levels with inhibitory rate of 79.3%, 77.4% and 60.4%, respectively in comparison with that in control group. So siRNA1 was used to do cell proliferation assay. After 96 hours' and 120 hours' transfection of siRNA1, the proliferation of SNU-16 cell significantly decreased compared with the control group ($P = 0.0057, 0.0173$, respectively). The results of flow cytometry revealed that 72 h after transfection with siRNA1, the apoptosis rate of SNU-16 significantly increased.

CONCLUSION: Interfering and down-regulating RegIV gene can inhibit proliferation and promote apoptosis of gastric cancer cells, indicating that RegIV gene is probably a target for gastric cancer gene therapy.

Key Words: Gastric cancer; RegIV; siRNA; Proliferation inhibiting; Apoptosis

Liu B, Xiang M, Yu YY, Yang QM, Cai Q, Chen XH, Li JF, Liu BY, Zhu ZG. Influence of down-regulation of RegIV expression by small interfering RNA on proliferation and

■背景资料

RegIV基因是2001年在人类的炎症性肠病基因文库中筛选得到的,他是Reg家族最新成员。正常情况下,RegIV主要在近端消化系统有微弱的表达。近年来有研究发现RegIV基因与胃癌的关系密切,血中RegIV蛋白的水平可以作为胃癌患者对5-FU化疗敏感性的指标,而且有实验发现大约有一半的胃癌中RegIV高表达。

■同行评议者

熊斌, 教授, 武汉大学中南医院肿瘤科

■ 研发前沿

目前关于RegIV生理病理方面的功能研究很少,其在胃癌中的具体作用尚不清楚,其可能是胃癌的一个新的治疗靶点,所以RegIV的功能研究是非常有意义的。

apoptosis of gastric cancer cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(6): 549-553

摘要

目的: 拟探讨RegIV基因在胃癌细胞中的表达及干扰该基因对胃癌细胞增殖和凋亡的影响。

方法: 应用实时定量PCR方法检测九株胃癌细胞株中RegIV基因的mRNA表达。针对RegIV基因设计三条小干扰RNA片段(siRNA1、siRNA2、siRNA3),瞬时转染高表达胃癌细胞株,实时定量PCR方法检测转染后RegIV基因的mRNA的表达水平,CCK-8法检测细胞增殖能力,流式细胞仪检测细胞凋亡。

结果: 以永生化正常胃黏膜细胞株GES-1作为参照,除MKN-45和SNU-1胃癌细胞株外,其余胃癌细胞株中RegIV表达水平平均升高5倍以上,尤以SNU-16细胞株明显,其RegIV的表达水平高出GES-1细胞数千倍,遂选用SNU-16细胞进行RNA干扰。合成的三对siRNA对RegIV基因表达均有明显抑制作用,抑制率分别为79.3%、77.4%和60.4%。选用siRNA1干扰SNU-16细胞株后96 h和120 h,其细胞增殖率受到明显抑制($P = 0.0057, 0.0173$)。流式细胞仪检测显示72 h细胞凋亡率明显增加($P = 0.0231$)。

结论: 干扰RegIV基因具有抑制胃癌细胞增殖,促进凋亡的作用,RegIV基因可能成为胃癌基因靶向治疗的分子靶点。

关键词: 胃癌; RegIV; RNA干扰; 生长抑制; 凋亡

刘兵, 项明, 于颖彦, 杨秋蒙, 蔡劬, 陈雪华, 李建芳, 刘炳亚, 朱正纲. 体外RNA干扰抑制RegIV基因表达对胃癌细胞增殖及凋亡的影响. *世界华人消化杂志* 2009; 17(6): 549-553
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/549.asp>

0 引言

胃癌是最常见的恶性肿瘤之一,在我国的发病率与死亡率多年居高不下,其总体平均5年生存率仍未超过40%。为寻找与胃癌治疗相关靶基因,众多研究者进行了一系列探索,筛选出若干候选基因,其中RegIV(regenerating islet-derived family, member 4)便是在胃癌研究领域受到关注的靶基因之一^[1]。RegIV基因是2001年在人类的一个炎症性肠病基因文库中筛选获得^[2],他是Reg家族的最新成员。有实验通过SAGE(serial analysis of gene expression)技术发现RegIV在胃癌表达明显上调^[3]。有关其在胃癌发生发展中的

详细作用机制目前尚不清楚。本实验通过RNA干扰技术体外下调胃癌细胞株中RegIV的表达,并检测干扰前后胃癌细胞的增殖能力以及凋亡的变化,探讨RegIV基因对胃癌细胞增殖和凋亡的影响,为寻找胃癌基因靶向治疗新靶点提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料 人胃癌细胞系(SGC-7901、AGS、MKN-45、MKN-28、BGC-823、NCI-N87、KATOIII、SNU-16、SNU-1)及永生化胃黏膜上皮细胞株GES-1由上海消化外科研究所传代保存。TRIzol试剂(Invitrogen, 美国)、分光光度计(Beckman, 美国)、逆转录试剂盒(Promega, 美国)、Lipofectamine2000TM(Invitrogen, 美国)。新生牛血清的RPMI 1640由杭州吉诺生物有限公司产品。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: 用含100 mL/L新生牛血清的RPMI 1640进行常规培养,待细胞融合度达80%,消化收集细胞。

1.2.2 细胞总RNA抽提及RegIV mRNA检测: 使用TRIzol试剂抽提细胞总RNA。RNA经电泳鉴定完整性,分光光度计测定RNA浓度。使用逆转录试剂盒以1 μg 总RNA逆转成cDNA。引物序列: RegIV: 上游引物5'-ACAAGCACTGTGCTGAGATGAG-3', 下游引物5'-TGTTGGCGCTTGTTCAT-3'; GAPDH内参引物: 上游引物5'-GGACCTGACCTGCCGTCTAG-3', 下游引物5'-GTAGCCAGGATGCCCTTGA-3'。使用试剂盒miScript SYBR Green PCR Kit(Qiagen, 美国)以1 μL cDNA在Opticon MonitorTM system荧光定量PCR仪中进行反应。反应条件如下: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性15 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 70 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 40个循环。计算检测结果: 实时定量PCR结果以Ct值表示, ΔCt 为同一样本中内参与目的基因Ct之差,某一样本中RegIV的表达水平用 $2^{-\Delta\text{Ct}}$ 来表示。若胃癌细胞中RegIV的表达水平是GES-1的1.5倍或以上则认为RegIV的表达升高。

1.2.3 小干扰RNA(siRNA)筛选: 委托上海吉马制药技术有限公司设计并合成3对针对RegIV基因的小干扰RNA(表1)。转染前1 d将SNU-16细胞以 4×10^5 /孔接种于6孔培养板,细胞丰度达到80%左右时用Lipofectamine2000TM将siRNA转染入细胞。siRNA的终浓度为100 nmol/L,参照Lipofectamine2000TM说明书进行转染操作。在转

表 1 针对RegIV基因设计的三对siRNA序列

siRNA编号	碱基序列
siRNA1	
正义	5'-GAGUGUCAGUCUUACGGAATT-3'
反义	5'-UUCGGUAAGACUGACACUCGA-3'
siRNA2	
正义	5'-GCACCAUAGCAGAGUACAUTT-3'
反义	5'-AUGUACUCUGCUAUGGUGCTG-3'
siRNA3	
正义	5'-AGAUGAGCUCCAAUACAATT-3'
反义	5'-UUGUUAUUGGAGCUCAUCUCA-3'
阴性对照	
正义	5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3'
反义	5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'

染后24 h提取细胞总RNA, 用实时定量PCR(real time PCR)筛选一对最为有效的siRNA.

1.2.4 CCK-8(cell counting kit-8)检测细胞增殖: 取状态良好的SNU-16细胞铺于96孔板, 接种密度为3000个/孔, 实验设3组: 干扰组、阴性对照组、正常对照组, 每组4复孔. 作用24、48、72、96、120 h后于实验各孔分别加CCK-8试剂(Dojindo, Japan)10 μ L, 37 $^{\circ}$ C继续孵育3 h, 酶联免疫检测仪测定各孔的吸光度值(测定波长450 nm, 参比波长650 nm). 以时间为横坐标, 细胞A值为纵坐标绘制细胞生长曲线.

1.2.5 流式细胞仪检测细胞凋亡: 取状态良好的SNU-16细胞铺于6孔板, 接种密度为 4×10^5 个/孔. 实验设3组: 干扰组、阴性对照组、正常对照组, 每组2复孔. 72 h后应用Annexin V凋亡检测试剂盒(ADL, 美国)在流式细胞仪上检测细胞凋亡, 参照Annexin V凋亡检测试剂盒说明书进行操作.

统计学处理 采用SAS 6.0软件包, 各组间均数比较采用方差分析, 以 $P < 0.05$ 作为差异有显著意义.

2 结果

2.1 RegIV在不同胃癌细胞株中的表达 用实时定量PCR方法检测目的基因的mRNA表达水平. 经与永生化胃黏膜细胞株GES-1比较发现, 除了MKN-45和SNU-1以外, 其余胃癌细胞株中RegIV的表达水平平均升高5倍左右或以上, 其中SNU-16细胞的RegIV表达水平比GES-1升高7120.333倍, 遂选用SNU-16细胞株做RNA干扰以及体外增殖及凋亡实验(图1).

2.2 siRNA的筛选 通过实时定量PCR发现,

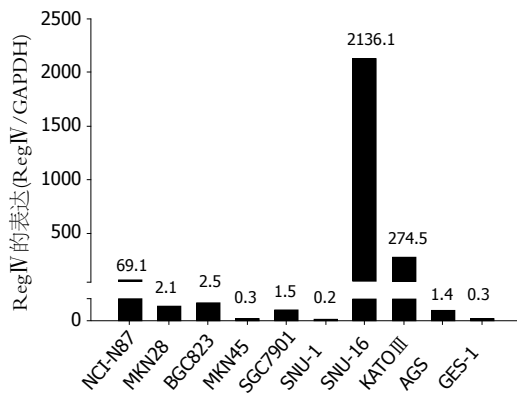


图 1 不同胃癌细胞株中RegIV的表达水平.

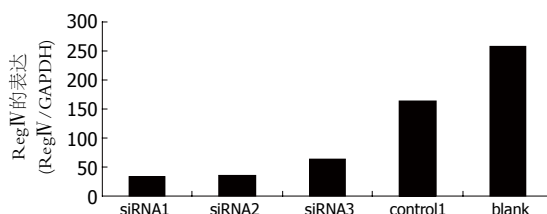


图 2 三对siRNA转染24 h后SNU-16细胞中RegIV的表达.

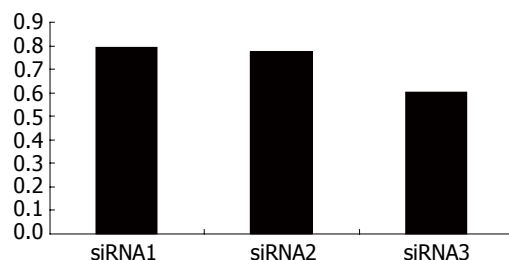


图 3 三对siRNA的干扰率比较.

SNU-16细胞转染24 h后, 三对siRNA对RegIV基因的表达均有明显的抑制作用(图2). siRNA1、siRNA2、siRNA3三对小干扰RNA对RegIV的抑制效率分别为79.3%、77.4%和60.4%(图3). 因此选用siRNA1做后续的功能实验.

2.3 CCK-8法检测siRNA干扰RegIV基因对SNU-16细胞增殖能力的影响 连续5 d测定siRNA转染组、阴性对照组、空白对照组细胞吸光度值, 绘制细胞生长曲线, 并对数值进行统计学分析. 在siRNA转染96 h和120 h后, siRNA干扰组较阴性对照组以及空白对照组相比, 细胞增殖明显受到抑制($P = 0.0057, 0.0173$, 图4).

2.4 Annexin V法检测siRNA干扰RegIV基因对SNU-16细胞凋亡的影响 胃癌细胞转染siRNA 72 h后, 应用流式细胞仪检测siRNA转染组、阴性对照组、空白对照组的凋亡水平发现, siRNA干扰组较阴性对照组以及空白对照组的

■ 相关报道

Mitani *et al*的研究发现RegIV蛋白可以作为胃癌的一种血清学标志物并且有助于预测5-FU化疗的敏感性. RegIV蛋白的检测有助于胃癌化疗药物的选择, 对提高胃癌患者的生存期有重要意义.

■ 创新盘点

本文检测了胃癌细胞株中RegIV的表达,再运用RNA干扰技术研究RegIV在胃癌细胞增殖和凋亡中的作用,为RegIV成为胃癌治疗的靶标提供了有力的证据。

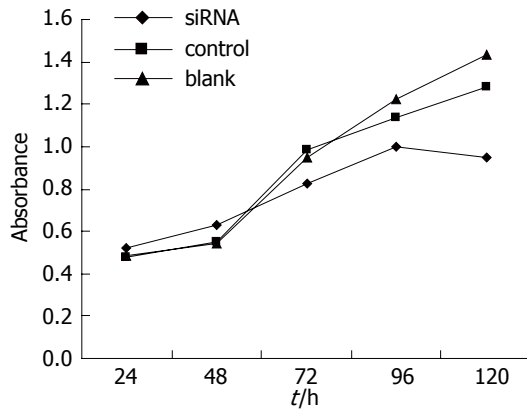


图4 siRNA干扰组SNU-16细胞增殖能力在96 h与120 h时间点明显受到抑制。

细胞凋亡明显增加($P = 0.0231$, 图5)。

3 讨论

RegIV基因是2001年在人类的一个炎症性肠病基因文库中筛选得到的Reg家族最新成员。该基因是位于1号染色体的单拷贝基因,全长17 557 bp,由6个外显子、5个内含子组成。RegIV cDNA由1518 bp组成,其中编码区474 bp,编码158个氨基酸,分子质量18.229 kDa,是Reg家族最小的成员^[2-4]。正常情况下RegIV主要在胃肠道表达,如胃、小肠、结肠、胰腺等,当组织损伤时其表达显著升高。Crohn's病以及溃疡性结肠炎所致的黏膜损伤时,RegIV的表达上调^[2]。Oue *et al*^[5]研究显示,大约一半的胃癌组织过表达RegIV基因。此外,Violette *et al*通过原位杂交等方法在结直肠癌和腺瘤中也发现RegIV过表达^[6-8]。本实验通过定量PCR检测9株胃癌细胞株中的RegIV的表达水平,结果显示:与永生性胃黏膜来源细胞株GES-1相比,除MKN-45, SNU-1外,其余7株胃癌细胞株中RegIV的表达均升高5倍以上,提示RegIV基因在大多数胃癌细胞中高表达,结果与Oue *et al*^[5]的临床研究结果一致。其中SNU-16细胞株中RegIV的表达异常高,较GES-1升高了7120.333倍。SNU-16细胞株是来源于胃癌腹膜转移的细胞株,本研究结果提示,RegIV基因过度表达可能参与胃癌的侵袭性生长和腹膜转移等生物学行为,这与Miyagawa *et al*^[9]报道的胃癌恶性腹水癌细胞中RegIV表达上调的结果一致。

目前对RegIV的病理生理功能研究甚少。Sentani *et al*^[10]发现RegIV的免疫组化染色有助于胃肠印戒细胞癌的诊断。Oue *et al*^[11]报道称RegIV的过表达与结直肠癌肝转移有关。另外RegIV的表达可能与胃癌的小肠分化以及神经内分泌

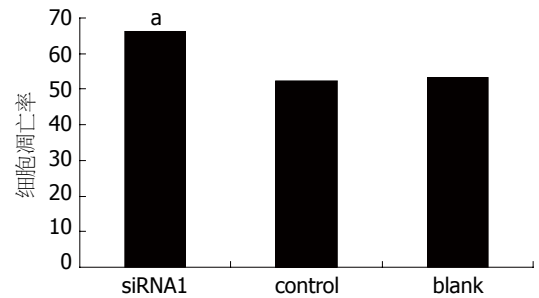


图5 72 h后干扰组SNU-16细胞凋亡率明显增加。 $^3P < 0.05$ vs 其他两组。

分化有关^[12]。RNA干扰是近年来发展起来的一项用于基因功能、调控机制研究的新技术,他通过合成的siRNA特异性的抑制某靶基因,研究下调目的基因对细胞生物学行为的影响^[13]。本研究选用RegIV异常高表达SNU-16胃癌细胞株,运用特异性siRNA进行干扰后通过细胞增殖实验发现,转染siRNA 96 h和120 h后,RegIV干扰组较阴性对照组以及空白组相比,细胞增殖活性明显受到抑制。应用流式细胞仪检测siRNA干扰对凋亡的影响发现,干扰RegIV基因72 h后,干扰组较无关序列对照组以及空白组细胞凋亡率明显增加。以上结果提示RegIV基因具有促进胃癌细胞增殖与抑制胃癌细胞凋亡的作用,该发现与Mitani *et al*^[14]研究结果类似,他们的研究还发现,RegIV蛋白可以作为胃癌的一种血清学标志物并且有助于预测5-FU化疗的敏感性。此外,Bishnupuri *et al*^[15]在肠癌细胞株的研究中亦发现同样现象,他们将重组人RegIV(rhR4)蛋白加入肠癌细胞株培养基中,发现癌细胞增殖明显且与加入的重组人RegIV(rhR4)蛋白呈剂量依赖型增长。另外有研究发现RegIV在溃疡性结肠炎的病理生理中起了促增殖和抗凋亡的作用^[16]。

总之,RegIV基因具有促胃癌细胞生长,抑制胃癌细胞凋亡的作用,并可能参与胃癌细胞的腹膜转移,干扰RegIV基因表达具有抑制胃癌细胞增殖,促进胃癌细胞凋亡作用,这为RegIV基因成为胃癌靶向治疗新靶点提供了实验依据。

4 参考文献

- Lee S, Baek M, Yang H, Bang YJ, Kim WH, Ha JH, Kim DK, Jeoung DI. Identification of genes differentially expressed between gastric cancers and normal gastric mucosa with cDNA microarrays. *Cancer Lett* 2002; 184: 197-206
- Hartupee JC, Zhang H, Bonaldo MF, Soares MB, Dieckgraefe BK. Isolation and characterization of a cDNA encoding a novel member of the human regenerating protein family: Reg IV. *Biochim Biophys*

- Acta* 2001; 1518: 287-293
- 3 Kämäräinen M, Heiskala K, Knuutila S, Heiskala M, Winqvist O, Andersson LC. RELP, a novel human REG-like protein with up-regulated expression in inflammatory and metaplastic gastrointestinal mucosa. *Am J Pathol* 2003; 163: 11-20
 - 4 Li A, Crimmins DL, Luo Q, Hartupee J, Landt Y, Ladenson JH, Wilson D, Anant S, Dieckgraefe BK. Expression of a novel regenerating gene product, Reg IV, by high density fermentation in *Pichia pastoris*: production, purification, and characterization. *Protein Expr Purif* 2003; 31: 197-206
 - 5 Oue N, Hamai Y, Mitani Y, Matsumura S, Oshimo Y, Aung PP, Kuraoka K, Nakayama H, Yasui W. Gene expression profile of gastric carcinoma: identification of genes and tags potentially involved in invasion, metastasis, and carcinogenesis by serial analysis of gene expression. *Cancer Res* 2004; 64: 2397-2405
 - 6 Zhang Y, Lai M, Gu X, Luo M, Shao L. Reg IV, a differentially expressed gene in colorectal adenoma. *Chin Med J (Engl)* 2003; 116: 918-922
 - 7 Violette S, Festor E, Pandrea-Vasile I, Mitchell V, Adida C, Dussaulx E, Lacorte JM, Chambaz J, Lacasa M, Lesuffleur T. Reg IV, a new member of the regenerating gene family, is overexpressed in colorectal carcinomas. *Int J Cancer* 2003; 103: 185-193
 - 8 Zhang Y, Lai M, Lv B, Gu X, Wang H, Zhu Y, Zhu Y, Shao L, Wang G. Overexpression of Reg IV in colorectal adenoma. *Cancer Lett* 2003; 200: 69-76
 - 9 Miyagawa K, Sakakura C, Nakashima S, Yoshikawa T, Fukuda K, Kin S, Nakase Y, Shimomura K, Oue N, Yasui W, Hayasizaki H, Okazaki Y, Yamagishi H, Hagiwara A, Otsuji E. Overexpression of RegIV in peritoneal dissemination of gastric cancer and its potential as a novel marker for the detection of peritoneal micrometastasis. *Anticancer Res* 2008; 28: 1169-1179
 - 10 Sentani K, Oue N, Tashiro T, Sakamoto N, Nishisaka T, Fukuhara T, Taniyama K, Matsuura H, Arihiro K, Ochiai A, Yasui W. Immunohistochemical staining of Reg IV and claudin-18 is useful in the diagnosis of gastrointestinal signet ring cell carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2008; 32: 1182-1189
 - 11 Oue N, Kuniyasu H, Noguchi T, Sentani K, Ito M, Tanaka S, Setoyama T, Sakakura C, Natsugoe S, Yasui W. Serum concentration of Reg IV in patients with colorectal cancer: overexpression and high serum levels of Reg IV are associated with liver metastasis. *Oncology* 2007; 72: 371-380
 - 12 Oue N, Mitani Y, Aung PP, Sakakura C, Takeshima Y, Kaneko M, Noguchi T, Nakayama H, Yasui W. Expression and localization of Reg IV in human neoplastic and non-neoplastic tissues: Reg IV expression is associated with intestinal and neuroendocrine differentiation in gastric adenocarcinoma. *J Pathol* 2005; 207: 185-198
 - 13 Hannon GJ. RNA interference. *Nature* 2002; 418: 244-251
 - 14 Mitani Y, Oue N, Matsumura S, Yoshida K, Noguchi T, Ito M, Tanaka S, Kuniyasu H, Kamata N, Yasui W. Reg IV is a serum biomarker for gastric cancer patients and predicts response to 5-fluorouracil-based chemotherapy. *Oncogene* 2007; 26: 4383-4393
 - 15 Bishnupuri KS, Luo Q, Murmu N, Houchen CW, Anant S, Dieckgraefe BK. Reg IV activates the epidermal growth factor receptor/Akt/AP-1 signaling pathway in colon adenocarcinomas. *Gastroenterology* 2006; 130: 137-149
 - 16 Nanakin A, Fukui H, Fujii S, Sekikawa A, Kanda N, Hisatsune H, Seno H, Konda Y, Fujimori T, Chiba T. Expression of the REG IV gene in ulcerative colitis. *Lab Invest* 2007; 87: 304-314

■同行评价

本研究方法先进, 实验设计合理可靠, 实验证据充足, 结论明确, 有一定的理论意义和科学价值。

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 •

世界华人消化杂志英文摘要要求

本刊讯 本刊英文摘要包括目的、方法、结果、结论, 书写要求与中文摘要一致. 具体格式要求如下: (1)题名文章的题名应言简意赅, 方便检索, 英文题名以不超过10个实词为宜, 应与中文题名一致; (2)作者 署名一般不超过8人. 作者姓名汉语拼音拼写法规定为: 先名, 后姓; 首字母大写, 双名之间用半字线“-”分开, 多作者时姓名间加逗号. 格式如: “潘伯荣”的汉语拼写法为“Bo-Rong Pan”; (3)单位 先写作者, 后写单位的全称及省市邮政编码. 例如: Xu-Chen Zhang, Li-Xin Mei, Department of Pathology, Chengde Medical College, Chengde 067000, Hebei Province, China; (4)基金资助项目 格式如: Supported by National Natural Science Foundation of China, No.30224801; (5)通讯作者 格式如: Correspondence to: Dr. Lian-Sheng Ma, Taiyuan Research and Treatment Center for Digestive Diseases, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China. wjcd@wjgnet.com; (6)收稿及修回日期 格式如: Received: Revised: . (常务副总编辑: 张海宁 2009-02-28)