

# 清热活血健脾中药对大鼠肝癌基因转录差异的调整

方肇勤,管冬元,梁尚华

方肇勤,管冬元,梁尚华,上海中医药大学基础医学院 上海市 200032  
国家中医药管理局科研基金, NO.97Z014  
项目负责人:方肇勤,200032,上海市零陵路 530 号,上海中医药大学基础医学院.  
zqfang@sh163d.sta.net.cn.  
电话:021-54231178  
收稿日期:2002-07-20 接受日期:2002-08-07

## Regulation of gene transcription in rat with liver cancer by traditional Chinese medicine

Zhao-Qin Fang, Dong-Yuan Guan, Shang-Hua Liang

Zhao-Qin Fang, Dong-Yuan Guan, Shang-Hua Liang, Institute of Basic Medicine, Shanghai University of TCM, Shanghai 200032, China  
Supported by National Traditional Chinese Medicine Administration Bureau. NO:97Z014

Correspondence to: Professor Zhao-Qin Fang, Institute of Basic Medicine, Shanghai University of TCM, 530 Lingling Road, Shanghai 200032, China. zqfang@sh163d.sta.net.cn.  
Received: 2002-07-20 Accepted: 2002-08-07

### Abstract

AIM: To observe the regulatory effects of YAF Compositus and its modified Compositus: Qingrefang, Huoxuefang and Jianpifang on liver cancer and their transcription the genes in rats.

METHODS: DEN was used to induce the liver cancer in rats. All rats were divided into seven groups: normal group, model group, four therapy groups and FT-207 group. The survival rate, liver weight, body weight, liver weight/body weight, and pathological change of liver tissues were observed. Immunocytochemical change of AFP and DD-PCR was used to display the different transcriptional expression of cDNA fragments between normal liver tissues and DEN-induced liver cancer tissues. Northern blotting was used to verify the different transcription of these cDNA fragments.

RESULTS: Both YAF Composita and its modified Composita could improve the general condition of rats with liver cancer, especially Qingrefang and Huoxuefang. Different Composita inhibited the growth of cancer and synthesis of AFP, especially YAF Composita and Qingrefang. 9 genes important for the transformation of cancer were selected with DD-PCR and Northern blotting. YAF Composita and its modified Composita had capabilities to regulate differently the genetic transcription: DD-29 decreased 51-78 %, DD11 and DD-25 decreased 60 % and 78 % respectively, near to that of normal liver tissue.

CONCLUSION: Both YAF Composita and its modified Composita can be directly used to treat the liver cancer, and to regulate the transcription of the different genes in the tissues.

Fang ZQ, Guan DY, Liang SH. Regulation of gene transcription in rat with liver cancer by traditional Chinese medicine. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(3): 276-280

### 摘要

目的: 观察中药抑癌扶正行气活血方(全方)及其不同治法的拆方: 清热方、活血方、健脾方对肝癌大鼠的作用和对肝组织基因转录的整体调节作用。

方法: 采用二乙基亚硝胺(DEN)诱发大鼠肝癌, 设正常组、模型组、不同中药组及 FT-207 组对照, 分别观察各组大鼠生存率、肝、体、肝/体及肝组织的病理、甲胎蛋白(AFP)免疫组化变化; 以及采用 DDPCR 技术显示正常肝组织与模型组肝癌组织中呈差异转录的 cDNA 片段, Northern blot 验证这些 cDNA 片段在各组中转录的差异, 并将呈差异转录的 cDNA 片段进行克隆与测序。

结果: 全方及其拆方均能不同程度地改善肝癌大鼠的一般情况, 提高大鼠的生存率。各拆方中以清热组与活血组为优, 全方及其拆方均能不同程度地抑制肿瘤的生长及肝脏 AFP 的合成, 其中以全方组与清热组为优; 采用 DDPCR 结合 Northern blot 筛选出在各组中呈显著差异转录的 9 个阳性 cDNA 片段, 经与 Genbank 比较 4 个为新的基因, 且这 9 个基因在肝癌发生与转归中的作用至今未见报道; 全方及其拆方对这些基因的转录水平有不同程度的调节作用, 其中 DD<sub>29</sub> 下调 57-78 %, DD<sub>11</sub>、DD<sub>25</sub> 也有下调至 60 % 和 78 %, 使基因转录水平接近正常肝组织。

结论: 全方及其不同治法的拆方中药对大鼠肝癌具有直接治疗作用, 能不同程度地广泛地调控肝组织(含肝癌组织)有关基因的转录水平。

方肇勤,管冬元,梁尚华. 清热活血健脾中药对大鼠肝癌基因转录差异的调整. *世界华人消化杂志* 2003;11(3):276-280

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/276.htm>

### 0 引言

原发性肝癌是我国最常见的恶性肿瘤之一<sup>[1-4]</sup>。近年来, 我国在肝癌的病因、病理、诊断与治疗等方面的研究均取得了突出的成绩<sup>[5-9]</sup>。肝癌早期采用手术切除可以达到较高的治愈率, 但由于原发性肝癌起病隐匿, 待确诊时多数已属中晚期, 往往丧失手术指征, 而其他针对癌肿的治疗手段均有显著的副作用。我们通过对大量的中医临床文献整理, 表明中医将肝癌的病因病机归纳为“瘀”、“毒”、“虚”等 3 个方面; 治法集中在清热解毒、健脾理气、活血化瘀, 以及这三种治法的合用; 中药出现频率以半枝莲、白花蛇舌草, 黄芪、白术, 八月札、丹参、赤芍等为高。

据此我们归纳出清热方、活血方、健脾方, 以及由这三方组合的抑癌扶正行气活血方(全方), 代表了目前国内治疗原发性肝癌的中医治法的主流<sup>[10]</sup>.

我们以往的研究发现, 全方、清热方、活血方、健脾方等治法对肝癌大鼠具有一定的治疗作用, 并发现这些治法对 N-ras、P53 等已知癌基因或抑癌基因具有一定的调整作用, 其中清热方对 N-ras 癌基因下调作用最强<sup>[11]</sup>. 鉴于中医药作用多途径、多靶点的特点, 进一步重复以上的实验, 并扩大以上不同治法对大鼠肝和肝癌组织可能调整基因的筛选对于深入揭示肝癌的发生机制和不同中医治法的作用异同十分重要.

## 1 材料和方法

1.1 材料 采用 wistar 大鼠, 体重 100-120 g, 自由饮用 60-80 ppm DEN 水溶液, 直到 24 wk 末实验结束. 清热中药由半枝莲、白花蛇舌草、蒲公英等组成, 活血中药由桃仁、丹参、赤芍、八月札、茵陈、郁金、柴胡等组成, 健脾中药由黄芪、白芍、白术、薏苡仁、神曲、法夏、云苓等组成. 600 ml/L 乙醇沉淀中药水煎剂, 4 静置 48 h, 过滤, 浓缩至 1 ml 含 2 g 生药, 4 存放. FT-207 用双蒸水溶解, 4 存放. 正常组常规饲养, 各用药组从第 18 周起给予相应治疗药物. 各组药物均于下午 19 时加入饮水中给药. 剂量约为成人单位公斤体重的 10 倍量.

喃氟啶(FT-207, 上海华联制药有限公司), [<sup>32</sup>P]dATP、[<sup>32</sup>P]dCTP(250 uCi, Amersham), DEN 购自中国科学院南京土壤研究所, ABC(兔)试剂盒及兔抗人甲胎蛋白(AFP)抗体(华美生物工程公司), 异硫氰酸胍(Sangon), M-MuLV 逆转录酶(Promega), Taq DNA 聚合酶(Perkin Elmer), 硝酸纤维素膜(Sangon), 大肠杆菌聚合酶K片段(Sangon), T4 DNA连接酶(Sangon), 9600 型 PCR 仪(Perkin Elmer), 测序电泳系统(pharmacia), 377 自动测序仪(Perkin Elmer), 3 个 cDNA 第一链合成引物(简称锚引物)及 8 个寡核苷酸随机引物(Sangon 合成).

1.2 方法 病理形态学用常规 HE 染色观察. 每组取 5 个大鼠 5 mm 大小的肝组织, 用中性甲醛固定、石蜡包埋切片, 用 ABC 试剂盒进行免疫组化染色(兔抗人 AFP 抗体浓度为同 1:100); 光镜下观察, 用显微镜网格测微尺测定切片中央左右各 5 个视野(400 倍)中含 AFP 的阳性细胞数, 计算每个视野中含 AFP 阳性细胞的平均数, 作为半定量分析的参数. 常规异硫氰酸胍-苯酚-氯仿一步法抽提肝(含肝癌)组织中的总 RNA<sup>[12]</sup>. 取正常肝组织与模型组肝组织总 RNA 进行逆转录, 在 20 μL 反应体系中, 含 5 × M-MuLV reverse buffer 4 μL, 250 μmol/L dNTP 1.6 μL, 总 RNA 1 μg, 5 μmol/L 的锚引物 2 μL. 65 5 min, 37 10 min, 冰上加入 200 U/μL M-MuLV 1 μL, 37 50 min, 最后 95 5 min 灭活逆转录酶. 在 20 μL 反应体系中, 加入 10 × Taq DNA polymerase buffer 2 μL, 25 μmol/L

dNTP 1.6 μL, 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 1.6 μL, 5 μmol/L 锚引物(与逆转录对应) 2 μL, 5 μmol/L 随机引物 2 μL, [<sup>32</sup>P]dATP 0.25 μL, 逆转录产物 2 μL, Taq DNA 聚合酶 1 U. 反应条件: 94 变性 3 min, 然后依次 94 变性 30 s, 40 退火 2 min, 72 延伸 30 s, 共 40 个循环, 最后 72 延伸 5 min, 4 保存<sup>[13]</sup>. 用 6 g/L 的聚丙烯酰胺尿素变性凝胶进行电泳, 电泳条件: 温度 55, 电压 2 000 V, 电流 70 mA, 时间 4 h. 然后将凝胶黏附于滤纸上, 并在 80 的真空干燥仪上脱水干燥 2 h, 最后进行放射自显影 72 h. 放射自显影显示: 正常肝组织与肝癌组织许多条带一致, 部分出现差异, 表现为条带有无或密度不同. 取 32 个表达差异条带对应的凝胶切下, 自凝胶中回收 cDNA, 取回收产物进行 PCR 扩增: 在 40 μL 反应体系中, 加入 10 × Taq DNA polymerase buffer 4 μL, 250 μmol/L dNTP 3.2 ul, 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 4 μL, 5 μmol/L 的对应锚引物与随机引物各 4 μL, Taq DNA 聚合酶 2 U; 反应条件同前 DD-PCR 反应. 取 30 ul PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 并从凝胶中回收与纯化扩增的 DNA 片段. 肝组织总 RNA, 经 752 紫外光栅分光光度计测定 RNA 样品浓度和纯度后, 在 7 组样品中组内各取等量 RNA 混匀, 再以每组 RNA 混匀后取 10 μg, 依次上样于含溴化乙锭的 1.4 g/L 琼脂糖甲醛变性凝胶, 电泳(电压 80 V), 紫外光观察电泳结果, 并拍照. 将 RNA 转移到硝酸纤维素膜上, 80 真空干燥 2 h. Northern blot 杂交的操作按常规方法进行, 探针模板来自 DD-PCR 显示的差异片段再扩增产物, 随机引物法把 [<sup>32</sup>P]dCTP 标记到探针上, 放射自显影结果采用激光光密度计作灰度扫描. PCR 产物克隆与测序: 先对 PCR 产物添加单个碱基 A: 30 μL PCR 产物回收后用 18 μL TE (pH 8.0) 溶解, 加入 10 × Taq DNA polymerrase buffer 2 μL, 10 mmol/L dATP 0.4 ul, Taq 聚合酶 1U, 混匀, 72 保温 7 min, 回收后用 20 μL TE 溶解; 接着进行连接反应: 取 7 μL 回收产物, 加入 10 × T4 DNA ligase buffer 1 μL, pUCm-T (50 ng/ul) 1 μL, T4 DNA ligase 5U, 混匀, 16 过夜. 最后用常规方法把连接反应产物转化到感受态细胞 DH5 内, 经用含 X-gal 和 IPTG 的 LB-Amp 平板筛选白色的重组克隆, 并经 Pst I 酶切鉴定. 最后抽提重组克隆后的质粒, 按有关操作要求处理样品后, 用 377 型自动荧光测序仪测序.

统计学处理 生存率采用两时点生存率 U 检验, 其他计数资料均采用 F 检验.

## 2 结果

除全方组、模型组、活血组分别于第 4、8、8 周时各由于意外原因死亡 1 只大鼠外, 其余均为有效动物例数. 各组生存率与模型组比较, 正常组、全方组、活血组均存在显著差异(P < 0.05; P < 0.01); 而各组与正常组(100%)比较, 模型组(54.6%)、西药组(70%)、清热

组(80%)、健脾组(70%)呈显著差异(P <0.05; P <0.01). 提示不同组别中药具有延长肝癌大鼠生存率的作用.

各饮用 DEN 水溶液大鼠肝、肝/体明显大于正常组(P <0.01), 其中全方组的肝、肝/体较模型组、西药组显著降低(P <0.05), 活血组的肝/体较模型组、西药组显著降低(P <0.05). 提示不同组别中药具有抑制肝癌发展和改善肝癌大鼠生存质量的作用(表 1).

表 1 各组大鼠体、肝及肝/体之比情况 (x̄ ± s)

Table with 5 columns: 组别, n, 体/g, 肝/g, 肝/体 \*100. Rows include 正常组, 模型组, 西药组, 全方组, 清热组, 活血组, 健脾组.

\*P <0.05vs 模型组;°P <0.01vs 模型组;°P <0.01vs 正常组;°P <0.05 vs 西药组;

2.1 肝脏病理改变 正常组大鼠肝脏外观正常, 表面无结节. 模型组肝脏肿大, 表面布满大小不一的灰白结节, 伴出血斑点(图 1);光镜下呈典型的柱状及腺管样

癌巢结构, 且周围组织肝细胞异型性明显, 伴癌细胞浸润 (图 2).在各组 5 个肝组织中, 全方组有 1 例、清热组有 2 例明显优于模型组:肝脏体重明显小于模型组, 表面灰白结节少而小, 无出血斑点;光镜下, 细胞排列有序, 细胞核大小、规则一致, 核浆比例基本正常, 病理性的有丝分裂少见, 癌巢周围组织肝细胞异型性不明显, 无癌细胞浸润.同时西药组 5 个切片中有一例表现大量肝细胞坏死、纤维组织增生为特征的肝萎缩病理形态.

正常组大鼠肝组织 AFP 免疫组化染色呈阴性反应, 模型组大鼠肝细胞大多数呈强阳性反应(112 ± 22). 大鼠各治疗组阳性细胞数均有一定程度的减少, 尤其是癌巢周围组织, 其中与模型组比较, 全方组(80 ± 12)与清热组(76 ± 13)呈显著降低(P <0.05), 以清热组为最低;各治疗组之间无明显差异, 但相比之下, 全方组、清热组有下降趋势.

2.2 Northern blot、克隆、测序 32 个 Northern blot 印迹杂交结果提示:部分探针经反复杂交各组中差异不显著,其中9个显著差异(表2). 部分放射自显影结果见图5. 9 个差异显著基因片段经回收、克隆、测序, 并与 GenBank 比较[14-17](表 3)

表 2 不同差异 cDNA 片段的 Northern blot 印迹杂交结果灰度扫描

Table with 8 columns: 基因片段, 正常组, 模型组, 西药组, 全方组, 清热组, 活血组, 健脾组. Rows list various gene fragments like DD4, DD9, DD11, etc.

表 3 所测基因序列与 GenBank 比较结果

Table with 2 columns: 基因片段, 基因名称. Rows list gene fragments and their corresponding names like Rat mRNA for fibronectin, Human DNA sequence from clone RP3-47704, etc.

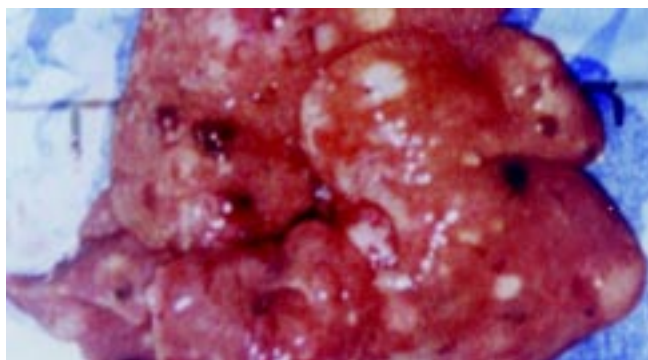


图1 肝脏外观图,伴出血斑点. 织肝细胞异型性明显,伴癌细胞浸润.

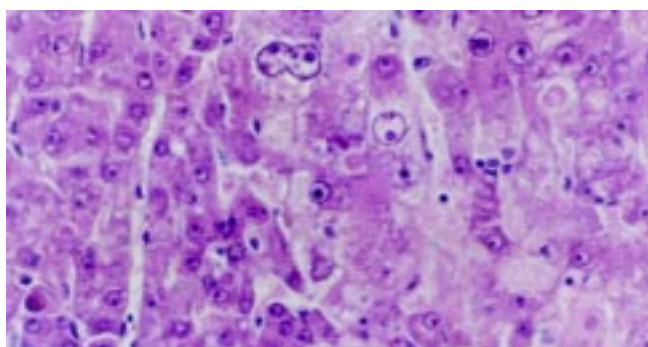


图2 大鼠肝癌病理(HE × 200)肝癌的肝脏肿大,表面布满大小不一的灰白结节,典型的柱状及腺管样癌巢结构,周围组.

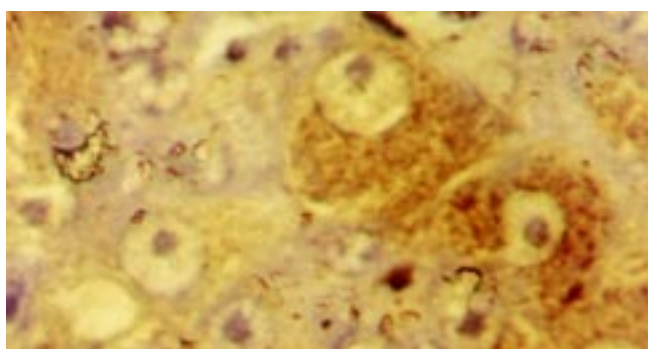


图3 模型组肝癌组织细胞AFP免疫组化呈强阳性反应,见棕黄色颗粒.(× 400)

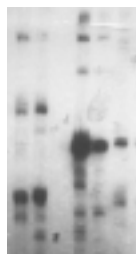


图4 DD-PCR 放射自显影结果.

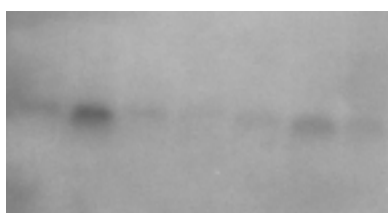


图5 DD<sub>11</sub> Northern blot 放射自显影结果.自左向右依次为正常组、模型组、西药组、全方组、清热组、活血组、健脾组.

### 3 讨论

本研究表明,无论是清热解毒法、活血化瘀法,还是健脾理气法、西药化疗,在肝癌的治疗上均取得了一定的疗效,各中药治法均优于西药化疗.其中清热解毒法在肝癌局部治疗方面是最有效的,尤其体现在对肝脏病理中癌细胞的恶性程度的改变及降低肝组织中AFP的含量等方面.但可能是该治法方药过度集中于“癌毒”的病机而忽视了苦寒致虚、致滞的病机,以致在大鼠肝脏局部情况的好转与大鼠生存质量及生存率不一致.这提示辨证论治的重要性.实验结果表明,活血化瘀法疗效较好,说明活血化瘀在治疗原发性肝癌方面具有一定的现实意义,也印证了中医对肿瘤以瘀血为主要病机的认识.但在临床上,医师普遍担心活血化瘀法会加重出血倾向.但是,我们的结果表明,与模型组相比,活血组大鼠腹腔出血死亡数明显降低,大鼠肝脏表面出血斑点也明显好转.同时活血化瘀可减少邪毒的进一步积聚,恢复机体对癌肿的抗病能力,这可能是采用活血化瘀法取得较好效果的原因.

健脾理气法可提高机体的免疫功能,有使肿瘤生长减慢,瘤体缩小,症状改善,生存期延长的作用.我们的实验表明,如果不顾及肝癌形成过程中“瘀”、“毒”病机,单纯健脾理气法效果并不理想.因而针对肝癌复杂的病因病机配伍清热解毒、活血化瘀等祛邪之法可望提高疗效.抑癌扶正行气活血方,数法并用,以清热解毒、活血化瘀为主、佐以健脾理气,取得了较好的疗效,进一步验证中医药组方配伍的重要性.与我们所推测的一致,DD-PCR显示不同治疗组别肝脏(含肝癌)组织基因表达存在广泛的差异,其中,清热解毒治法下调DD<sub>4</sub>、DD<sub>25</sub>、DD<sub>31</sub>基因表达的作用最为突出;健脾理气治法下调DD<sub>9</sub>基因表达的作用最为突出;活血化瘀治法下调DD<sub>22</sub>、DD<sub>23</sub>基因表达的作用最为突出;全方下调DD<sub>11</sub>、DD<sub>29</sub>基因表达的作用最为突出;FT207下调DD<sub>23</sub>、DD<sub>26</sub>基因表达的作用最为突出.提示不同治法可能直接或间接对这些基因进行选择性地调控,从而实现原发性肝癌的防治作用.由于这些基因在肝癌发生与转归中的作用至今未见报道,其作用将有待于进一步深入研究.

由于DD-PCR随机扩增与其一对引物对应的基因片段,我们所挑选的9个差异表达基因中尚未见到一些与原发性肝癌密切有关的基因,如N-ras基因.推测所选用引物对尚不能在较小的PCR产物(200-500 bp)中反映这些基因.但不代表这些基因表达没有差异.如果增加DD-PCR的引物对,或采用基因芯片,这些基因表达的差异将会明显、全面地展现出来.

原发性肝癌的发生发展是一个多因素、多阶段的复杂过程,基因表达异常是其最基本的分子生物学特征.深入研究其基因表达的差异,及其差异基因的作用,将有助于深入研究不同中医治法的分子作用机制,寻找不同治法的作用靶点,及有关中医证的分子基础,因

而对中医基础理论证及其证治机制的深入研究,以及进一步指导临床用药,具有重要的理论与实践意义。

4 参考文献

- 1 吴彬,罗仁夏. 消化道恶性肿瘤的关联性和地区聚集性的对应分析. *中国卫生统计* 2001;18:326-327
- 2 汤钊猷. 中国肝癌研究现状. *中西医结合肝病杂志* 1998;8:60-63
- 3 杨广顺,吴志全,吴孟超. 原发性肝癌的规范化综合治疗. *中华外科杂志* 2001;039:742-744
- 4 孙华林. 肝癌的综合治疗. *中国医刊* 2002;37:25-28
- 5 朱争艳,宋继昌. 肝癌基因治疗研究进展. *临床肝脏病学杂志* 2002;18:134-136
- 6 王锦波. 多中心肝癌与肝癌肝内转移. *国外医学:外科学分册* 2002;29:170-171
- 7 南克俊,隋晨光,魏永长,李春丽,李毅,杨谨,陈玲,刘亚民. 中晚期肝癌介入化疗术的预后影响因素. *第四军医大学学报* 2002;23:1134-1136
- 8 叶胜龙. 原发性肝癌介入治疗的现状及评价. *中华肝脏病学杂志* 2002;10:165-166
- 9 吴孟超. 重视中西医结合治疗肝癌的研究. *第二军医大学学报* 2001;22:601-602
- 10 Guan DY,Fang ZQ.Advances in TCM Treatment of Primary

- Hepatocarcinoma. *J Tradit Chin Med* 2000;20:223-226
- 11 方肇勤,管冬元,梁尚华,鲁恒心. 不同中医治法对 DEN 诱发大鼠肝癌作用的比较研究. *中医杂志* 2002;43: 542-544
- 12 Chomczyuski P,Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156-159
- 13 Liang P, Pardee AB.Differential display of eukaryotic mRNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 1992;257:967-972
- 14 Schwarzbauer JE, Patel RS, Fonda D, Hynes RO. Multiple sites of alternative splicing of the rat fibronectin gene transcript. *EMBO J* 1987;6:2573-2580
- 15 Falquerho L, Patey G, Paquereau L, Rossi V, L ahuna O, Szpirer J, Szpirer C, Levan G, Le Cam A. Primary structure of the rat gene encoding an inhibitor of the insulin receptor tyrosine kinase. *Gene* 1991;98:209-216
- 16 Malek SN, Yang CH, Earnshaw WC, Kozak CA, Desiderio S. p150TSP, a conserved nuclear phosphoprotein that contains multiple tetratricopeptide repeats and binds specifically to SH2 domains. *J Biol Chem* 1996;271:6952-6962
- 17 Gadaleta G, Pepe G, De Candia G, Quagliariello C, Sbisa E, Saccone C. The complete nucleotide sequence of the Rattus norvegicus mitochondrial genome: cryptic signals revealed by comparative analysis between vertebrates. *J Mol Evol* 1989;28:497-516

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

# 提供您使用世界华人消化杂志和 World J Gastroenterol 电子版

本刊讯 世界华人消化杂志(原新消化病学杂志)从 1993-2002 年的电子版全部出版. 世界华人消化杂志过刊索引: 新消化病学杂志,1993(1-4 期);新消化病学杂志,1994(1-4 期);新消化病学杂志,1995(1-4 期);新消化病学杂志,1996(1-12 期);新消化病学杂志,1997(1-12 期);华人消化杂志,1998(1-12 期);世界华人消化杂志,1999(1-12 期);世界华人消化杂志,2000(1-12 期);世界华人消化杂志,2001(1-12 期). 世界华人消化杂志现刊索引:2002(1-12 期).

World Journal of Gastroenterology(原中国新消化病学杂志)从 1993-2002 年的电子版全部出版. 过刊索引: China Natl J New Gastroenterol, 1995(1 期); China Natl J New Gastroenterol,1996(1-4 期); China Natl J New Gastroenterol, 1997(1-4 期); World J Gastroenterol ,1998(1-6 期); World J Gastroenterol ,1999(1-6 期); World J Gastroenterol , 2000(1-6 期); World J Gastroenterol , 2001(1-6 期).现刊索引:World J Gastroenterol , 2002(1-6 期).

世界华人消化杂志和 World J Gastroenterol 的电子版网址如下: 2002 世界华人消化杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/2002.htm> 2001 世界华人消化杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/2001.htm> 2000 世界华人消化杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/2000.htm> 1999 世界华人消化杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/1999.htm> 1998 华人消化杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/1998.htm> 1997 新消化病学杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/1997.htm> 1996 新消化病学杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/1996.htm> 1995 新消化病学杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/1995.htm> 1994 新消化病学杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/1994.htm> 1993 新消化病学杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/1993.htm> 2002 World J Gastroenterol 电子版 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/2002.htm> 2001 World J Gastroenterol 电子版 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/2001.htm> 2000 World J Gastroenterol 电子版 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/2000.htm> 1999 World J Gastroenterol 电子版 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/1999.htm> 1998 World J Gastroenterol 电子版 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/1998.htm> 1997 China Natl J New Gastroenterol 电子版 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/1997.htm> 1996 China Natl J New Gastroenterol 电子版 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/1996.htm> 1995 China Natl J New Gastroenterol 电子版 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/1995.htm>