

酵母双杂交技术筛选白细胞中HCV NS3蛋白结合蛋白基因

邵清, 成军, 白雪帆, 王琳, 张健, 梁耀东, 刘敏, 李强

邵清, 成军, 王琳, 张健, 梁耀东, 刘敏, 李强, 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

白雪帆, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院传染科 陕西省西安市 710039

邵清, 男, 1966-10-22 出生, 北京市人, 汉族. 1991 年第四军医大学本科学历, 第四军医大学唐都医院感染科 2001 年级传染病学专业硕士研究生, 主要从事病毒性肝炎的基因治疗研究.

国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689; 军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063; 军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038; 军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138; 军队“十、五”科技攻关项目, No. 01MB135

项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路 100 号, 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. cj@genetherapy.com.cn

电话: 010-6693-3391 传真: 010-6380-1283

收稿日期: 2003-06-07 接受日期: 2003-06-18

Screening of hepatitis C virus NS3 protein-interacting proteins in leukocytes by yeast-two hybrid technique

Qing Shao, Jun Cheng, Xue-Fan Bai, Lin Wang, Jian Zhang, Yao-Dong Liang, Min Liu, Qiang Li

Qing Shao, Jun Cheng, Xue-Fan Bai, Lin Wang, Jian Zhang, Yao-Dong Liang, Min Liu, Qiang Li, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China

Supported by grants from National Natural Science Foundation of China, No. C39970674, No. C03011402, No. C30070689

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

Received: 2003-06-07 Accepted: 2003-06-18

Abstract

AIM: To investigate the biological function of hepatitis C virus NS3 protein (HCV NS3), we performed yeast-two hybrid to screen proteins in leukocytes interacting with HCV NS3.

METHODS: HCV NS3 gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR) and HCV NS3 bait plasmid was constructed by using yeast-two hybrid system 3, then the constructed vector was transformed into yeast AH109. The transformed yeast mated with yeast Y187 containing leukocytes cDNA library plasmid in 2xYPDA medium. Diploid yeast was plated on synthetic dropout nutrient medium (SD/-Trp-Leu-His-Ade) and synthetic dropout nutrient medium (SD/-Trp-Leu-His-Ade) containing α -gal for selecting two times and screening. After extracting and sequencing of plasmid from blue colonies, we underwent analysis by bioinformatics.

RESULTS: Eighteen colonies were sequenced. Among them, four colonies were eukaryotic translation elongation factor 2 (EEF2), two colonies were immunoglobulin lambda light chain and myosin IF (MYO1F), and one colony was actin,

beta (ACTB), ferritin, light polypeptide (FTL), mitogen-activated protein kinase kinase 3 (MAPKK3), interleukin 2 receptor, beta (IL2RB), splicing factor, arginine/serine-rich 6 (SFRS6), cathepsin S (CTSS), 2'-5'-oligoadenylate synthetase-like (OASL), DAZ (deleted in azoospermia) associated protein 2 (DAZAP2), calponin 2 (CNN2), and one new gene without known function.

CONCLUSION: Genes of HCV NS3 interacting proteins in leukocytes are successfully cloned and the results bring some new clues for studying the biological functions of HCV NS3 and associated proteins.

Shao Q, Cheng J, Bai XF, Wang L, Zhang J, Liang YD, Liu M, Li Q. Screening of hepatitis C virus NS3 protein-interacting proteins in leukocytes by yeast-two hybrid technique. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003; 11(12):1897-1900

摘要

目的: 用酵母双杂交技术筛选白细胞中与丙型肝炎病毒(HCV)NS3蛋白结合蛋白的编码基因.

方法: 用多聚酶链反应(PCR)法扩增NS3基因, 连接入酵母表达载体 pGBKT-7 中构建诱饵质粒, 转化酵母细胞 AH109 并在其内表达, 然后与转化了人白细胞文库质粒的酵母细胞 Y187 进行配合, 在营养缺陷型培养基上进行双重筛选阳性菌落, 增菌后提出质粒, 转化入大肠杆菌 (DH5 α), 提取质粒并测序, 进行生物信息学分析.

结果: 成功克隆出 NS3 基因并在酵母细胞中表达, 配合后选出在四缺 (SD/-Trp-Leu-Ade-His) 培养基和在铺有 X- α -半乳糖 (X- α -gal) 的四缺培养基上均能生长并变成蓝色的真阳性菌落 18 个, 其中 4 个真核细胞翻译延伸因子 2; 2 个免疫球蛋白 λ 轻链; 1 个肌动蛋白 β ; 1 个铁蛋白轻多肽; 1 个 (丝裂原) 活化蛋白激酶 3; 2 个肌球蛋白因子 1; 1 个白介素 2 受体 β ; 1 个富含精氨酸/丝氨酸剪切因子 6; 1 个组织蛋白酶 S; 1 个 2'-5' 寡腺苷酸合成酶类似物; 1 个缺失精子缺乏相关蛋白 2; 1 个 CNN2; 1 个新基因.

结论: 成功克隆出 HCV NS3 的结合蛋白, 为进一步研究 HCV 的作用提供了新线索.

邵清, 成军, 白雪帆, 王琳, 张健, 梁耀东, 刘敏, 李强. 酵母双杂交技术筛选白细胞中 HCV NS3 蛋白结合蛋白基因. *世界华人消化杂志* 2003;11(12):1897-1900
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1897.asp>

0 引言

丙型肝炎病毒 (hepatitis C virus, HCV) 于 1989 年被发

现, 是输血后病毒性肝炎的重要病原体, 可引起急性、慢性病毒性肝炎, 慢性肝炎迁延不愈, 导致肝纤维化(LC), 甚至肝细胞癌(HCC)^[1]. 丙型肝炎病毒是单股正链RNA病毒, 全长约9 500个核苷酸(nt), 含有一个大的开放读码框架(ORF), 编码3 010-3 033个氨基酸残基(aa)的多肽前体, 多肽前体至少被加工为10种结构蛋白和非结构蛋白, 其中非结构蛋白NS3基因编码的70 kD NS3蛋白(631 aa)是一种多功能蛋白质, 具有丝氨酸蛋白酶、三磷酸核苷酸酶(NTPase)和RNA解旋酶(helicase)的功能, 在HCV复制及表达产物多蛋白裂解加工上起重要作用^[1-3]. 研究表明, HCV NS3蛋白还可能通过反式激活作用, 调控细胞内多种病毒及细胞基因的转录, 在HCV致病(癌)过程中起着重要的作用^[4]. HCV的蛋白与肝细胞和白细胞中的蛋白之间的相互作用在HCV感染、慢性肝炎和致肝细胞癌过程中起着重要的作用, 我们曾用酵母双杂交技术筛选了肝细胞中与HCV NS3蛋白结合蛋白的基因^[5], 为探讨HCV致病的分子生物学机制提供重要线索, 为进一步研究HCV NS3蛋白与免疫系统的关系, 我们用酵母双杂交技术筛选白细胞中HCV NS3蛋白结合蛋白基因.

1 材料和方法

1.1 材料 *Saccharomyces cerevisiae* AH109酵母株、Y187酵母株(K1612-1)、cDNA白细胞文库均购自Clontech公司. 酵母YPDA培养基、SD/-Trp、SD/-Leu、SD/-Trp/-Leu、SD/-Trp/-Leu/-His、SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade培养基, X- α -半乳糖苷酶(Gal)等购自Clontech公司, 半硫酸腺苷、醋酸锂购自Sigma公司. 复杂高效感受态(FSB), 本室自制. 大肠杆菌(DH5 α), 本室保存.

1.2 方法

1.2.1 诱饵质粒的构建及表达 HCV NS3的酵母表达载体pGBKT7-HCV NS3用醋酸锂法转入酵母细胞AH109, 由本室构建.

1.2.2 酵母白细胞文库的构建 cDNA白细胞文库进行增殖后, 提出质粒, 转化入酵母细胞(Y187), 经文库滴定, 确定文库细胞计数大于 1×10^9 细胞/mL.

1.2.3 诱饵与白细胞文库的酵母配合 挑取在SD/-Trp选择培养基上生长转化子(计数大于 1×10^9 细胞/mL)与白细胞文库混合, 30 °C轻摇配合过夜, 24 h后铺板SD/-Trp/-Leu/-His 25块、SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 25块. 同时进行阳性对照实验及文库滴定. 生长16 d后将长出的大于3 mm的酵母集落, 在铺有X- α -Gal的QDO上检查 α -半乳糖苷酶活性, 认为在QDO培养基上生长且出现蓝色菌落的配合为阳性菌落.

1.2.4 阳性质粒的克隆和分析 挑取真正的阳性菌落按照试剂盒提供的操作指南Lyticase法提取酵母质粒. 提取的质粒以复杂冰冻高效感受态方法转化大肠杆菌, 于含有氨苄青霉素的SOB平板培养, 所获得的菌落酶切鉴定后测序. 阳性克隆DNA测序后, 提交GenBank比对,

进行生物信息学分析, 并把所获新基因存入GenBank数据库.

2 结果

2.1 cDNA测序与同源性分析初步结果 配合后筛选出在4缺(SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade)培养基和在铺有X- α -Gal的4缺培养基上均能生长并变成蓝色的真阳性菌落18个克隆测序后与GenBank数据库进行初步比较. 其中有1个克隆为新基因, 其余17个均与已知基因的部分序列高度同源(95-100%)(表1).

表1 白细胞中HCV NS3蛋白结合蛋白的类型

序号	筛选出的目的基因	同源性	相同克隆数
1	真核细胞翻译延伸因子2(EEF2)	98-99%	4
2	免疫球蛋白 λ 轻链	95-96%	2
3	肌球蛋白因子1	99%	2
4	肌动蛋白 β	100%	1
5	铁蛋白轻多肽	99%	1
6	(丝裂原)活化蛋白激酶3	99%	1
7	白介素2受体 β	99%	1
8	富含精氨酸、丝氨酸剪切因子6	100%	1
9	组织蛋白酶S	99%	1
10	2' - 5' 寡腺苷酸合成酶类似物	100%	1
11	缺失精子缺乏相关蛋白2	99%	1
12	Homo sapiens calponin 2 (CNN2)	99%	1
13	新基因	99%	1

3 讨论

酵母双杂交系统是近年来新发展起来的分析真核细胞中蛋白-蛋白、蛋白-DNA、蛋白-RNA相互作用的一种有效的基因分析方法, 他的产生为研究蛋白在体内生理情况下的相互作用提供了一种新的遗传学方法. 酵母双杂交系统通过将两个推定有相互作用的蛋白X和Y分别融合到一酵母转录激活因子的BD和AD上, X与Y的相互作用重构了激活因子, 从而导致下游“报告基因”的转录, 产生容易探测到的表型^[5-9]. 我们使用的是酵母双杂交系统3(Clontech公司商品化的双杂交系统), 由于有3个表达基因用来筛选及严格的对照, 其阳性率达95%以上, 假阳性率5%以下. 实验中我们在真核表达载体pGBK-T7中构建pGBKT7-HCV NS3诱饵质粒并在酵母菌株AH109中表达了HCV NS3基因^[5], 与人白细胞cDNA文库的酵母菌株Y187进行配合, 筛选出与之相互作用的蛋白基因18种, 其中免疫球蛋白 λ 轻链、白介素2受体 β 和(丝裂原)活化蛋白激酶3与体液免疫和信号转导相关. 延伸因子-2(EEF2)是真核细胞合成蛋白所必需的因子^[10], 富含精氨酸/丝氨酸剪切因子6、组织蛋白酶S与蛋白合成相关. 2' - 5' 寡腺苷酸合成酶类似物与细胞的基因表达相关. 缺失精子缺乏相关蛋白2(DAZAP2)是一种位于Y染色体的

能广泛结合的蛋白. 铁蛋白轻多肽(FTL)位于人X染色体19q13.3(Xp19q13.3)^[11]或X染色体(Xp21)甘油激酶区域^[12], 可以转运铁离子, 体内高铁离子影响丙型肝炎干扰素治疗, 具体机制还不清楚. 发现新基因1个.

HCV基因组编码的非结构蛋白3(NS3)是一种具有多种生物学功能的蛋白质. 除了具有丝氨酸蛋白酶、RNA解旋酶等之外, 对于HCV基因组表达的结构和非结构蛋白的结构与功能具有重要的调节作用^[22-31]. HCV的表达调节主要是转录水平为主的多水平的调节机制, 即病毒借助感染的宿主细胞的一些复制和表达的辅助元件完成其生活周期及致病过程. 转录水平的调节根据调节的机制和参与的因素不同, 可以分成顺式(cis)调节和反式(trans)调节两种. 所谓的顺式调节就是分子结构内部的调节. 反式调节的结果, 从调节靶点的效果来看可以分成2类: 上调(up-regulation)和下调(down-regulation). 从参与的反式调节的因素来看, 可以分成病毒对病毒的反式调节、病毒对于肝细胞蛋白编码基因的反式调节、肝细胞蛋白对于病毒基因表达的反式调节等几种不同的情况. 肝炎病毒蛋白作为一类反式激活因子, 常常改变肝细胞中细胞周期(cell cycle)、细胞凋亡(apoptosis)、细胞分化(differentiation)、信号转导(signal transduction)等相关基因的表达, 在肝炎病毒的致病性和肝细胞癌的发生发展中具有十分重要的作用和意义. HCV感染肝细胞之后, 也存在复杂的反式调节作用^[17-26], 临床和实验研究显示HCV感染与肝细胞癌(HCC)发生发展过程密切相关, 其中病毒NS3蛋白起到重要的作用^[32]. HCV NS3蛋白对细胞信号转导途径, 尤其是血清应答元件(SRE)、激活蛋白1(AP-1)、血清应答因子(SRF)等信号转导途径具有增强作用. Sakamuro D et al^[34]研究显示, NS3 cDNA能够使转染的小鼠成纤维细胞NIH 3T3具有转化特性, 且转化细胞移植入裸鼠体内可形成纤维肉瘤灶, 直接证明了HCV NS3蛋白的恶性转化潜能. NS3还可能通过解旋酶活性诱导肝细胞基因组的不稳定性, 甚至发生突变. 另外, NS3能与蛋白激酶A(PKA)催化亚单位特异性结合, 可能干扰RNA与细胞内信号转导过程, 严重干扰细胞正常功能. 刘妍 et al^[4]研究表明NS3基因重组表达载体在HepG2细胞中表达相应的蛋白, 对SV40早期启动子具有反式激活作用, 从而使SV40启动子下游的CAT基因表达增强. 这些都是HCV NS3通过反式激活作用对靶细胞中细胞周期调节机制干扰的结果, 说明HCV NS3蛋白的反式激活功能在HCV致病中发挥重要的作用, 研究其作用的分子生物学机制有助于理解HCV感染的慢性化和致癌作用机制.

HCV病毒编码的一系列蛋白所引起的机体免疫反应可能是其致病的主要原因之一, 在HCV的致病机制中, NS3蛋白可能占有相当重要的地位. 通过本次实验我们得知NS3蛋白能与多种蛋白相结合, 其中包括几种免疫因子, 使我们进一步了解了HCV病毒与免疫系统的相互关系. 通过以上结果提供的这些线索, 我们可以

进行更深入的研究, 进一步弄清各种蛋白与HCV NS3的相互作用及HCVNS3的确切作用, 为阻断HCV感染及HCC发生探索新道路.

4 参考文献

- 1 成军, 杨守纯. 现代肝炎病毒分子生物学. 第2版. 北京: 人民军医出版社, 1997:55-70
- 2 刘妍, 成军, 牟劲松, 陆荫英, 王建军, 杨倩, 王琳, 张玲霞. 丙型肝炎病毒非结构蛋白NS3与乙型肝炎病毒X蛋白协同反式激活作用的研究. 解放军医学杂志 2003;28:47-49
- 3 成军. 丙型肝炎病毒基因组的翻译及其产物的加工. 国外医学微生物学分册 1995;18:14-16
- 4 刘妍, 成军, 牟劲松, 陆荫英, 王建军, 李克, 王琳, 张玲霞. 丙型肝炎病毒非结构蛋白NS3反式激活SV40病毒早期启动子的研究. 解放军学杂志 2003;28:44-46
- 5 李克, 王琳, 成军, 陆荫英, 洪源, 张玲霞, 刘妍. 酵母双杂交技术筛选克隆丙型肝炎病毒NS3结合蛋白基因. 解放军学杂志 2003;28:31-33
- 6 Wang XZ, Jiang XR, Chen XC, Chen ZX, Li D, Lin JY, Tao QM. Seek protein which can interact with hepatitis B virus X protein from human liver cDNA library by yeast two-hybrid system. *World J Gastroenterol* 2002;8:95-98
- 7 Nagpal S, Ghosn CR, Chandraratna RA. Identification of nuclear receptor interacting proteins using yeast two-hybrid technology. *Methods Mol Biol* 2001;176:359-376
- 8 Serebriiskii IG, Toby GG, Finley RL Jr, Golemis EA. Genomic analysis utilizing the yeast two-hybrid system. *Methods Mol Biol* 2001;175:415-454
- 9 Gietz RD, Woods RA. Screening for protein-protein interactions in the yeast two-hybrid system. *Methods Mol Biol* 2002;185:471-486
- 10 Zhen Z. Progress in proteomics. *Shengwu Gongcheng Xuebao* 2001;17:491-493
- 11 Kaneda Y, Yoshida MC, Kohno K, Uchida T, Okada Y. Chromosomal assignment of the gene for human elongation factor 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:3158-3162
- 12 Gasparini P, Calvano S, Memeo E, Bisceglia L, Zelante L. Assignment of ferritin L gene (FTL) to human chromosome band 19q13.3 by *in situ* hybridization. *Ann Genet* 1997;40:227-228
- 13 Guo W, Adams V, Mason J, McCabe ER. Identification of a ferritin light chain pseudogene near the glycerol kinase locus in Xp21 by cDNA amplification for identification of genomic expressed sequences. *Biochem Mol Med* 1997;60:169-173
- 14 成军. 丙型肝炎与肝脏脂肪变的相关性. 中西医结合肝病杂志 2002;12:257-259
- 15 钟彦伟, 成军, 陈新华, 王刚, 洪源, 王琳, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 应用噬菌体随机肽库技术筛选丙型肝炎病毒NS3抗原模拟表位. 中国病毒学 2002;17:202-205
- 16 李莉, 成军, 李梵, 王建军, 张健, 吴勤, 韩萍, 陈国凤, 纪冬, 李克. 慢性丙型肝炎病毒性肝炎脂肪变的临床与病理学特点. 世界华人消化杂志 2002;10:1009-1013
- 17 张健, 成军, 李莉, 刘爱兵, 吴勤, 李克, 董菁, 王琳, 陆荫英. 丙型肝炎病毒感染者血清载脂蛋白AI和AII水平的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:1014-1017
- 18 王琳, 李克, 成军, 陆荫英, 张健, 洪源, 刘妍, 王刚, 钟彦伟, 段惠娟, 芮莉莉. 丙型肝炎病毒核心蛋白与载脂蛋白AI结合的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:1018-1021
- 19 成军, 任进余, 李莉, 陆志檬, 李克, 洪源, 陆荫英, 王刚, 刘妍, 张玲霞, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒结构基因转基因小鼠引起肝脏脂肪变. 世界华人消化杂志 2002;10:1022-1026
- 20 陆荫英, 成军, 李克, 刘妍, 王琳, 张玲霞. 丙型肝炎病毒进入肝细胞机制的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:1028-1029
- 21 Yoshida CF, Rouzere CD, Nogueira RM, Lampe E, Travassos-da-Rosa MA, Vanderborcht BO, Schatzmayr HG. Human antibodies to dengue and yellow fever do not react in diagnostic assays for hepatitis C virus. *Braz J Med Biol Res* 1992;25:1131-1135
- 22 洪源, 成军, 李莉. 丙型肝炎病毒转基因小鼠模型的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:1032-1034

- 23 钟彦伟, 成军, 刘妍, 董菁, 杨继珍, 张玲霞. 可溶性 HCV 非结构蛋白 NS3 人源单链可变区抗体在大肠杆菌中的表达. 肝脏 1999; 4:73-76
- 24 钟彦伟, 成军, 刘妍, 董菁, 杨继珍, 张玲霞. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 3 人源单链抗体的筛选与鉴定. 中华传染病杂志 2000;18: 84-87
- 25 成军, 钟彦伟, 刘妍, 董菁, 杨继珍, 杨守纯. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS3 基因在大肠埃希菌中的可诱导性表达. 中华实验与临床病毒学杂志 2002;16:85-87
- 26 钟彦伟, 成军, 陈新华, 王刚, 洪源, 王琳, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS4A 抗原模拟表位的筛选和鉴定. 免疫学杂志 2002;18:347-349
- 27 钟彦伟, 成军, 陈新华, 王刚, 洪源, 王琳, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 应用噬菌体表面展示技术筛选丙型肝炎病毒 NS5A 抗原模拟表位. 世界华人消化杂志 2002;10:133-136
- 28 钟彦伟, 成军, 王刚, 田小军, 陈新华, 刘妍, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS₅ 抗原模拟表位的筛选与鉴定. 中华肝病杂志 2002;10:266-268
- 29 陆荫英, 李克, 成军, 王琳, 刘妍, 张玲霞. 乙型肝炎病毒前 S1 基因酵母表达载体的构建及表达. 解放军医学杂志 2002;27:341-342
- 30 Zhong YW, Cheng J, Wang G, Shi SS, Li L, Zhang LX, Chen JM. Preparation of human single chain Fv antibody against hepatitis C virus E2 protein and its identification in immunohistochemistry. *World J Gastroenterol* 2002;8:863-867
- 31 董菁, 施双双, 王业东, 皇甫竞坤, 李莉, 张玲霞, 成军. cDNA 文库噬菌体展示法的建立及乙型肝炎病毒前 S1 蛋白结合蛋白筛选. 解放军医学杂志 2002;27:321-322
- 32 成军, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒感染与脂类代谢的相关性. 肝脏 2002;7:56-58
- 33 刘妍, 成军, 牟劲松, 陆荫英, 王建军, 杨倩, 王琳, 张玲霞. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS3 与乙型肝炎病毒 X 蛋白协同反式激活作用的研究. 解放军医学杂志 2003;28:47-49
- 34 Sakamuro D, Furukawa T, Takegami T. Hepatitis C virus nonstructural protein NS3 transforms NIH 3T3 cells. *J Virol* 1995;69:3898-3894

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

• 消息 •

World Journal of Gastroenterology 2004年由月刊改为半月刊

本刊讯 《World Journal of Gastroenterology, WJG》是我国消化病学领域中惟一以全英文发表原创性论文的国际性学术期刊。WJG 创刊于 1995 年, 原名《China National Journal of New Gastroenterology》, 1998 年更名为 WJG, 由世界胃肠病学杂志社出版。WJG 国际标准刊号 ISSN 1007-9327, 国内统一刊号 CN 14-1219/R, 半月刊, 大 16 开, 160 页, 每月 1 日、15 日出版, 50.00 元/期, 邮发代号 82-261, 北京报刊发行局发行。

1 电子版

WJG 网(<http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.asp>)于 2003-04-15 开通, 截止 2003-10-26 点击率已达 452 392 人次。WJG 电子版由以下 7 个栏目组成。(1) 期刊介绍: 编委成员, 编委成员简介, 编辑, 检索系统收录, 影响因子。(2) 出版: 出版, 版权, 征订。(3) 投稿: 投稿细则、文献综述、研究论文、研究快报、病例报告等的书写格式。(4) 新闻: IM 收录期刊、JCR 报道的影响因子。(5) 投稿查询: 提交用户名和密码, 可查询到稿件的全部流程, 共计 28 项。(6) 电子期刊: 现刊和过刊(1995-2003), 全刊索引。WJG 电子期刊功能包括 HTML、PDF、摘要、相关性文献、被引频次、点击次数、下载次数、评论等。(7) 参考文献链接: WJG 对刊出论文的全部参考文献与原文的首页进行校对, 保证了每条参考文献的作者、题名、年、卷号、页码、PMID 等内容的正确性, 并与 PubMed 和 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.asp> 中的摘要及全文进行链接, 提高了参考文献的引用准确性, 也方便了读者查阅参考文献的全文及摘要。

2 发行

WJG 2003 年印刷版共发行 973 份, 其中国内邮局征订 168 份, 分布在 27 个省市自治区; 国外发行 105 份, 分布在 56 个国家和地区; 向承担国家 973 和 863 及国家自然科学基金项目负责人赠送 700 份。让更多的国际胃肠病学和肝病专家阅读和使用 WJG 发表的具有我国特色及国际先进水平的学术论文, WJG 向美国胃肠病学会会员, 美国肝病学会会员, 美国癌症研究会会员免费提供每期的全文电子版, 目前每期电子版的发行量已达 21 200 份。

3 点击和下载次数

WJG 从 2003 年第 4-9 期电子版, 实现了动态网页制做, 记录每篇论文的点击和下载次数。4-9 期共发表论文 322 篇, 其中 265 篇有点击和下载次数记录, 占 82.29%, 无点击和下载次数记录的为 57 篇(17.70%)。2003-04-15/2003-10-13, 265 篇论文的点击次数为 35745, 平均每篇论文点击次数为 134.89, 最高点击次数为 1 918, 最低点击次数为 11。其中每篇论文点击次数 100 次以上为 131 篇(49.43%); 30-99 次为 123 篇(46.41%); 11-29 次为 11 篇(4.15%)。最高下载次数 1 087, 最低下载次数 10。例如, 2003 年第 8 期刊出的第四军医大学唐都医院感染科王全楚等撰写的“RNA interference: Antiviral weapon and beyond. *World J Gastroenterol* 2003;9(8):1657-1661”一文的点击次数为 1 918, 下载次数为 1 087。(世界胃肠病学杂志社 2003-12-02)