

应用表达谱芯片技术对截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白反式调节基因的研究

洪源, 刘妍, 成军, 杨倩, 王建军

洪源, 刘妍, 成军, 杨倩, 王建军, 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重点实验室 北京市 100039
洪源, 男, 1974-12, 福建省莆田市人, 汉族. 1998年毕业于第四军医大学军医系, 获医学学士学位, 目前在解放军军医进修学院攻读内科学硕士学位, 主要课题方向是肝炎病毒与肝细胞相互作用的分子生物学机制.
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”科技攻关面上项目, 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重点实验室. cj@genetherapy.com.cn
电话: 010-66933391 传真: 010-63801283
收稿日期: 2003-01-11 接受日期: 2003-03-21

Genes trans-regulated by C-terminally truncated middle surface protein of hepatitis B virus with microarray assay

Yuan Hong, Yan Liu, Jun Cheng, Qian Yang, Jian-Jun Wang

Yuan Hong, Yan Liu, Jun Cheng, Qian Yang, Jian-Jun Wang, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China
Supported by the National Natural Science Foundation of China, No. C03011402, No. C30070689, and Returned Scholarship of General Logistics Department of PLA, No. 98H038
Correspondence to: Dr. Jun Cheng, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, 302 Hospital of PLA, 100 Xisihuanzhonglu, Beijing 100039, China. cj@genetherapy.com.cn
Received: 2003-01-11 Accepted: 2003-03-21

Abstract

AIM: To study of genes trans-regulated by C-terminally truncated middle surface protein of hepatitis B virus by microarray.

METHODS: The recombinant expression plasmid pcDNA3.1(-)-MHBst was constructed, and HepG2 cells were transfected. Total mRNA was isolated from the HepG2 cells transfected with pcDNA3.1(-) and pcDNA3-MHBst, respectively. Microarray was employed for detecting and analyzing of both mRNA from the HepG2 cells.

RESULTS: After transfecting HepG2 cells, it was found 14 genes had been up-regulated, and 23 genes down-regulated. Their encoding proteins were involved in cell signal transduction, cell proliferation and differentiation.

CONCLUSION: Microarray technology is successfully used to screen the genes trans-regulated by C-terminally truncated middle surface protein of hepatitis B virus, which brings some new clues for studying the trans-regulated and immune regulation mechanism of MHBst.

Hong Y, Liu Y, Cheng J, Yang Q, Wang JJ. Genes trans-regulated by C-terminally truncated middle surface protein of hepatitis B virus with microarray assay. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(7):943-946

摘要

目的: 应用基因表达谱芯片研究乙型肝炎病毒(HBV)表面抗原截短型中蛋白(MHBst)的反式调节基因。

方法: 构建MHBst基因的真核表达载体pcDNA3.1(-)-MHBst, 应用基因表达谱芯片技术对 pcDNA3.1(-)-MHBst 转染的 HepG2(人肝母细胞瘤细胞系)细胞和转染空载体的相同细胞的差异表达mRNA进行检测和分析。

结果: HepG2 细胞经转染 MHBst 后, 有 37 条差异基因表达, 其中 14 条基因表达增强, 23 条基因表达降低。这些差异表达的基因与细胞的增生、分化及细胞的信号转导密切相关。

结论: 应用基因表达谱芯片成功筛选了乙型肝炎病毒表面抗原截短型中蛋白的反式调节基因, 为进一步阐明乙型肝炎病毒表面抗原截短型中蛋白的反式激活作用及免疫调节机制提供了新的依据。

洪源, 刘妍, 成军, 杨倩, 王建军. 应用表达谱芯片技术对截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白反式调节基因的研究. *世界华人消化杂志* 2003;11(7):943-946
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/943.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)是慢性肝病的重要病原体, 且是引发肝细胞癌(HCC)的重要因素^[1-10], 而病毒基因组编码的蛋白与宿主肝细胞之间的相互作用, 可能是病毒致癌的重要分子机制^[11-20]. 近年研究发现, 在肝癌细胞系或肝癌组织, 甚至是慢性乙型肝炎患者外周血中存在一种变异的病毒表面中蛋白, 与野生型病毒比较, 蛋白的羧基末端存在不同程度的缺失, 即截短型表面抗原中蛋白(MHBst). 研究证明, MHBst 能影响多种细胞信号转导途径, 激活多种病毒及细胞基因启动子, 具有广泛的反式激活作用^[23-25]. 我实验室成功地证明了MHBst¹⁶⁷具有反式激活SV40病毒早期启动子/增强子的作用^[26,27], 并应用抑制性消减杂交技术(suppression subtractive hybridization, SSH)对MHBst的反式调节基因进行了初步的研究^[28].

基因表达谱芯片技术(cDNA microarray)是由大量目的基因片段有序、密集地固定于玻片或尼龙膜上而制成芯片, 将两组组织或细胞的 mRNA 逆转录成 cDNA, 掺入荧光标记, 同时与芯片杂交, 通过扫描分析每一

位置的荧光信息可以快速有效地检测到二者间差异表达的基因^[29]. 为从不同角度对MHBst的反式调节基因进行验证及了解MHBst对于肝细胞基因表达谱的影响, 探索肝细胞癌发生的分子生物学机制, 我们决定应用基因表达谱芯片技术检测肝癌细胞系在MHBst基因转染后差异表达的基因谱的变化.

1 材料和方法

1.1 材料 人肝母细胞瘤细胞系HepG2细胞由本室保存, 细胞培养相关试剂及总RNA提取试剂Trizol购自Gibco公司, FuGENE购自Roche公司, 乙型肝炎病毒表面抗原截短型中蛋白真核表达质粒由本室构建^[26]. 表达谱芯片由上海联合基因有限公司提供.

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和取材 在35 mm培养皿中常规培养HepG2细胞, 细胞生长至对数期时, 以脂质体转染试剂FuGENE分别将2 μ g pcDNA3.1(-)-MHBst和空载体pcDNA3.1(-)转染HepG2细胞, 48 h后收获细胞, 每 5×10^6 个细胞加入1 mL Trizol试剂, 立即于液氮中保存.

1.2.2 总RNA提取 使用Trizol试剂一步法提取乙型肝炎病毒表面抗原截短型中蛋白表达质粒pcDNA3.1(-)-MHBst和空载体pcDNA3.1(-)转染的HepG2细胞总RNA(分别标记为实验组和对照组), 样品经分光光度计检测吸光度A值, 并行热稳定实验, 于-20 $^{\circ}$ C和70 $^{\circ}$ C保温1 h后, 经琼脂糖凝胶电泳检测28S、18S条带变化.

1.2.3 探针标记 参照Schna et al^[29]方法逆转录标记cDNA探针并纯化. Cy3-dUTP标记对照组细胞mRNA(5 μ g), Cy5-dUTP标记实验组细胞mRNA(5 μ g). 乙醇沉淀后溶解在20 μ L 5 \times SC+2 g/L SDS杂交液中.

1.2.4 芯片制备 芯片包含的1 152个cDNA, 包括原癌基因、抑癌基因、免疫调节相关基因、细胞凋亡和应激反应蛋白相关基因、信号转导相关基因等. 以通用引物进行PCR扩增, PCR产物长度为1 000-3 000 bp. 靶基因以0.5 μ g/ μ L溶解于3 \times SSC溶液中, 用Cartesian公司的Cartesian 7 500点样仪及TeleChem公司的硅烷化玻片进行点样. 玻片经水合(2 h)、室温干燥(30 min), 紫外线交联, 再分别用2 g/L SDS、双蒸水及2 g/L 硼氢化钠溶液处理10 min, 晾干备用.

1.2.5 预杂交 将预杂交液放入95 $^{\circ}$ C水浴锅内变性2 min, 将待预杂交的芯片放入95 $^{\circ}$ C水浴锅内变性30 s, 芯片取出后即放入无水乙醇中30 s, 晾干. 将已变性的预杂交液加到芯片的点样区域内, 盖上盖玻片, 放入杂交箱内42 $^{\circ}$ C预杂交5-6 h.

1.2.6 杂交及洗涤 将探针置于95 $^{\circ}$ C水浴中变性2 min; 芯片置于95 $^{\circ}$ C水浴中变性30 s, 芯片取出浸于无水乙醇30 s, 探针取出后迅速置于冰上. 将探针置于芯片上, 用盖玻片覆盖, 置于杂交舱中, 用Parafilm密封, 放入42 $^{\circ}$ C杂交箱内杂交过夜(16-18 h). 依次以2 \times SC+2 g/L

SDS、1:1 000 SSC +2 g/L SDS、1:1 000 SSC洗涤10 min, 室温晾干.

1.2.7 扫描与分析 用General Scanning公司的ScanArray 3 000扫描芯片. 用预先选定的内参照基因(24条管家基因, 每个基因点2个点, 共48个点)对Cy3和Cy5的原始提取信号进行均衡和修正. 用ImaGene3.0软件分析Cy3、Cy5两种荧光信号的强度, 计算Cy5/Cy3比值. 阳性结果判断: Cy5/Cy3>2.0, 红色荧光, 显示表达增强; Cy5/Cy3<0.5, 为绿色荧光, 显示表达减弱.

2 结果

2.1 总RNA的定性、定量分析 总RNA的吸光度A260/A280>1.92, 热稳定实验70 $^{\circ}$ C保温1 h与-20 $^{\circ}$ C 1 h的电泳条带比较, 显示28 S条带无明显降解, 电泳结果证实已抽提高纯度的总RNA.

2.2 芯片杂交体系验证及结果分析 在芯片上共有1 152个cDNA. 为了监控芯片杂交体系, 在芯片上设置了阴性对照(8条水稻基因, 共8个点), 这些点的杂交信号均很低, 证实了数据的可靠性. 由于实验组探针标记Cy5荧光素(呈红色), 对照组探针标记Cy3荧光素(呈绿色), 红绿颜色的差异就显示该基因在实验组和对照组中基因表达水平上的差异, 黄色代表表达水平无差异. 按阳性标准, 从1 152个基因中筛选出差异表达基因共37条, 占3.7%, 其中14条基因表达增强, 23条基因表达降低.

2.3 差异表达基因分析 表达增强的基因有14条(表1), 表达降低的基因有23条(表2).

表1 部分表达显著增加的基因

编号	编码蛋白	Cy5/Cy3
1	肽基脯氨酸异构酶 D(peptidylprolyl isomerase D)	2.023
2	泛素特异性蛋白酶 5(ubiquitin specific protease 5)	2.035
3	半胱氨酸内肽酶(cysteine endopeptidase)	2.051
4	核仁 GTP 水解酶(nucleolar GTPase)	2.066
5	可溶性鸟氨酸环化酶 1- β 3(guanylate cyclase 1, soluble, beta 3)	2.070
6	CD33 抗原 L1(CD33 antigen L1)	2.083
7	FK506 结合蛋白相关蛋白(FKBP-associated protein)	2.139
8	人 T 细胞淋巴瘤病毒(I 型)结合蛋白 1(human T-cell leukemia virus type I binding protein 1)	2.144
9	未知蛋白 KIAA0583	2.174
10	成纤维细胞生长因子受体 2(fibroblast growth factor receptor 2)	2.248
11	P53 结合蛋白(p53-binding protein)	2.362
12	RET 指蛋白(RET finger protein)	2.386
13	TNF 受体相关因子 3(TNF-receptor associated factor-3)	2.437

表2 部分表达显著降低的基因

编号	编码蛋白	Cy5/Cy3
1	蛋白酶体激活亚单位 1(proteasome activator subunit 1)	0.228
2	巨噬细胞幼红细胞黏附蛋白(macrophage erythroblast attacher)	0.310
3	谷氧还蛋白(glutaredoxin)	0.326
4	高速泳动族蛋白 17(high-mobility group protein 17)	0.356
5	死亡相关蛋白 6(death-associated protein 6)	0.394
6	70 kD 热休克蛋白 1A(heat shock 70 kD protein 1A)	0.405
7	CD14 抗原(CD14 antigen)	0.419
8	质膜钙迁移 ATP 酶(ATPase, Ca ²⁺ transporting, plasma membrane 1)	0.430
9	G 蛋白结合蛋白(G protein-binding protein)	0.431
10	核糖体蛋白 L34(ribosomal protein L34)	0.433
11	雌激素调控的 LIV-1 蛋白(LIV-1 protein, estrogen regulated)	0.434
12	钙激活蛋白酶小亚单位 1(calpain, small subunit 1)	0.448
13	153 kD 核孔蛋白(nucleoporin 153 kD)	0.470
14	可溶性鸟苷酸环化酶 1- α 3(guanylate cyclase 1, soluble, alpha 3)	0.473
15	v-raf 鼠肉瘤 3611 病毒致癌基因同系物 1(v-raf murine sarcoma 3611 viral oncogene homolog 1)	0.474
16	105 kD 热休克蛋白(heat shock 105 kD protein)	0.478
17	与增生相关的 mago-nashi 同系物(mago-nashi homolog, proliferation-associated)	0.488
18	磷酸甘油酸脱氢酶(phosphoglycerate dehydrogenase)	0.488
19	热休克蛋白 75(heat shock protein 75)	0.496
20	核糖体蛋白 S5(ribosomal protein S5)	0.499

3 讨论

乙型肝炎病毒感染后致癌的分子生物学机制还不十分清楚, 其中病毒编码的蛋白能够影响肝细胞基因表达谱从而影响细胞生长调节可能是主要因素. 近年来的研究^[23,24]发现截短型前 S2/S 基因的表达产物羧基末端截短型分子 -MHBst 具有反式调节作用. MHBst 于全长病毒中蛋白(MHBs)的羧基末端缺失一定数量的氨基酸残基, 由于结构的改变, MHBst 具备内质网定位功能, 能在内质网中滞留, 而不象 MHBs 那样进入高尔基复合体而分泌. 可能正是这一原因, 使 MHBst 能够发挥广泛的反式调节效应. Natoli et al^[24] 研究证实 MHBst 可发生蛋白激酶 C(PKC)依赖的磷酸化反应, 其前 -S2 区与 PKC 结合, 触发 PKC 依赖的 c-Raf-1/MAP2- 激酶信号传导链式反应, 激活了 AP-1、NF- κ B、AP-2、SRE、Sp1 等转录因子和 c-myc、c-fos 启动子, 从而诱发炎症反应及肝细胞癌. 因此研究 MHBst 的反式激活功能及其反式调节基因, 有利于阐明 HBV 感染的慢性化和肝细胞癌形成的机制, 同时也可探索更为有效的治疗方法. 本实验选择的的目的基因是编码缺失羧基末端 167 个氨

基酸残基的 MHBst(MHBst¹⁶⁷)序列, 该序列已由我室证明具有反式激活 SV40 早期启动子/增强子的作用^[26,27], 并已应用抑制性消减杂交技术对 MHBst 的反式调节基因进行了初步的研究^[28].

基因表达谱芯片技术^[30,31]是将大量的基因或 cDNA 片段固定在一块玻片上, 利用核酸杂交这一特性, 对不同组织或细胞的 mRNA 或 cDNA 进行荧光检测, 从而对这些基因表达个体的特异性进行综合分析和判断. 本实验我们用分子生物学技术构建了 MHBst 的真核表达载体 pcDNA3.1(-)-MHBst, 并用空载体作为阴性对照, 利用脂质体转染 HepG2 细胞, 之后从中提取总 RNA, 逆转录为 cDNA, 进行基因芯片技术分析. 结果表明, 14 种基因的表达水平上调, 23 种基因的表达水平下调. 这些基因包括细胞生长、细胞凋亡、信号转导、免疫调节、肿瘤发生等基因, 其中在上调基因中, 有多条基因与免疫调节相关, 如肿瘤坏死因子(TNF)受体相关因子 3、FK506 结合蛋白; 而 p53 结合蛋白基因和人 T 细胞淋巴瘤病毒结合蛋白 1 基因的表达增强则提示 MHBst 在细胞凋亡及肿瘤发生中可能起着一定的作用. 在下调基因中, G 蛋白结合蛋白、核糖体蛋白、鸟苷酸环化酶、钙激活蛋白酶、高速泳动族蛋白、磷酸甘油酸脱氢酶等的差异表达表明 MHBst 与细胞信号传导, 细胞生长调节有关. 将这一结果与早期应用 SSH 对 MHBst 反式调节基因的研究结果相比较, 发现都有核糖体蛋白及高泳动类蛋白的差异表达. 对这些研究结果的分析表明, MHBst 对于肝细胞的基因表达谱有显著的影响, 基因芯片技术是研究基因表达谱改变的有效分析技术. 他为我们进一步深入研究 MHBst 的反式调节基因及其致癌机制打下了重要基础.

4 参考文献

- 1 Yuen MF, Sablon E, Yuan HJ, Wong DK, Hui CK, Wong BC, Chan AO, Lai CL. Significance of hepatitis B genotype in acute exacerbation, HBeAg seroconversion, cirrhosis-related complications, and hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2003; 37:562-567
- 2 Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Basal core promoter mutations of hepatitis B virus increase the risk of hepatocellular carcinoma in hepatitis B carriers. *Gastroenterology* 2003;124: 327-334
- 3 Hino O, Kajino K, Umeda T, Arakawa Y. Understanding the hypercarcinogenic state in chronic hepatitis: a clue to the prevention of human hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol* 2002; 37:883-887
- 4 Ni YH, Chang MH, Hsu HY, Tsuei DJ. Different hepatitis B virus core gene mutations in children with chronic infection and hepatocellular carcinoma. *Gut* 2003;52:122-125
- 5 ElSaadany S, Tepper M, Mao Y, Semenciw R, Giulivi A. An epidemiologic study of hepatocellular carcinoma in Canada. *Can J Public Health* 2002;93:443-446
- 6 Kobayashi S, Saigoh K, Urashima T, Endoh M, Matsusita K, Katoh M, Asano T, Isono K. Frequent PCR detection of HBV x gene in excised hepatocellular carcinoma tissues as compared with HCV-RNA identification. *Nippon Rinsho* 1995;53 (Suppl 2):730-734
- 7 Matsushima S, Hayashi N. Mutation of the hepatitis B virus pre C region in hepatocellular carcinoma and nontumoral liver tissues. *Nippon Rinsho* 1995;53(Suppl 2):723-729

- 8 Takeuchi M, Okamoto E, Fujimoto J. Detection of HBV-DNA from hepatocellular carcinoma by polymerase chain reaction. *Nippon Rinsho* 1995;53(Suppl 2):718-722
- 9 Zanella I, Rossini A, Domenighini D, Albertini A, Cariani E. Real-time quantitation of hepatitis B virus (HBV) DNA in tumorous and surrounding tissue from patients with hepatocellular carcinoma. *J Med Virol* 2002;68:494-499
- 10 Cheng J. Molecular mechanisms of hepatitis virus-hepatocyte interactions. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17(Suppl 3):S342-S343
- 11 Jayshree RS, Sridhar H, Devi GM. Surface, core, and X genes of hepatitis B virus in hepatocellular carcinoma: an in situ hybridization study. *Cancer* 2003;25:63-67
- 12 董菁,成军,王勤环,王刚,施双双,夏小兵,斯崇文. 外周血中乙型肝炎病毒截短型囊膜中蛋白基因的克隆化与分析. *中华肝病杂志* 2001;9:163-165
- 13 Weis NM, Kroghsgaard K. Hepatitis B-a viral oncogene? *Ugeskr Laeger* 2002;164:5940-5944
- 14 Wang XW, Hussain SP, Huo TI, Wu CG, Forgues M, Hofseth LJ, Brechot C, Harris CC. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Toxicology* 2002;182:43-47
- 15 Otsuka M, Aizaki H, Kato N, Suzuki T, Miyamura T, Omata M, Seki N. Differential cellular gene expression induced by hepatitis B and C viruses. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;300:443-447
- 16 Trere D, Borzio M, Morabito A, Borzio F, Roncalli M, Derenzini M. Nucleolar hypertrophy correlates with hepatocellular carcinoma development in cirrhosis due to HBV infection. *Hepatology* 2003;37:72-78
- 17 Lara-Pezzi E, Gomez-Gavira MV, Galvez BG, Mira E, Iniguez MA, Fresno M, Martinez-AC, Arroyo AG, Lopez-Cabrera M. The hepatitis B virus X protein promotes tumor cell invasion by inducing membrane-type matrix metalloproteinase-1 and cyclooxygenase-2 expression. *J Clin Invest* 2002;110:1831-1838
- 18 Chung TW, Moon SK, Lee YC, Kim JG, Ko JH, Kim CH. Enhanced expression of matrix metalloproteinase-9 by hepatitis B virus infection in liver cells. *Arch Biochem Biophys* 2002;408:147-154
- 19 Urashima T, Saigo K, Kobayashi S, Matsubara H, Koide Y, Asano T, Isono K, Kondo F, Kondo Y. Integration of hepatitis B virus and its significance in hepatocarcinogenesis. *Nippon Rinsho* 1995;53(Suppl 2):735-739
- 20 Shen LJ, Zhang ZJ, Zhang HX, Yang WB, Huang R. Expression of GST-pi and HBV infection in hepatocellular carcinoma. *Ai Zheng* 2002;21:29-32
- 21 Baba M, Nagai H. Molecular biological characteristics of model cells of hepatitis B virus (HBV)-induced direct hepatocellular carcinogenesis. *Nippon Rinsho* 1995;53(Suppl 2):97-103
- 22 Zhang Y, Peng Z, Qiu G, Wang Z, Gu W. Overexpression of cyclin A in hepatocellular carcinoma and its relationship with HBx gene integration. *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 2002;24:353-355
- 23 Caselmann WH, Renner M, Schluter V, Hofschneider PH, Koshy R, Meyer M. The hepatitis B virus MHBst167 protein is a pleiotropic transactivator mediating its effect via ubiquitous cellular transcription factors. *J Gen Virol* 1997;78(Pt 6):1487-1495
- 24 Natoli G, Avantaggiati ML, Balsano C, De Marzio E, Collepardo D, Elfassi E, Levrero M. Characterization of the hepatitis B virus preS/S region encoded transcriptional transactivator. *Virology* 1992;187:663-670
- 25 Natoli G, Balsano C, Avantaggiati ML, De Marzio E, Artini M, Collepardo D, Elfassi E, Levrero M. Truncated pre-S/S proteins transactivate multiple target sequences. *Arch Virol Suppl* 1992;4:65-69
- 26 刘妍,成军,董菁,李克,夏小兵,王刚,杨继珍,王琳. 截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白反式激活作用的初步研究. *肝脏* 2001;6:8-10
- 27 韩萍,刘妍,成军,王刚,陆荫英,李克,李莉. 截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白上调 c-myc 基因表达的研究. *世界华人消化杂志* 2002;10:141-144
- 28 刘妍,成军,张跃新,段惠娟,牟劲松,李克,韩萍,李莉,张玲霞,陈菊梅. 截短型 HBsAg 中蛋白反式激活基因的克隆. *中华传染病杂志* 2002;20:218-221
- 29 Schena M, Shalon D, Dais RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 1995;270:467-470
- 30 Zhang MQ. Large-scale gene expression data analysis: a new challenge to computational biologists. *Genome Res* 1999;9:681-688
- 31 Bigger CB, Brasky KM, Lanford RE. DNA microarray analysis of chimpanzee liver during acute resolving hepatitis C virus infection. *J Virol* 2001;75:7059-7066

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

• 消息 •

世界华人消化杂志和 WJG 获得商标注册

本刊讯 世界华人消化杂志和 World Journal of Gastroenterology 经中华人民共和国国家工商行政管理总局商标局核定使用商品(第16类),获得商标注册。

世界华人消化杂志®注册有效期限自公元2002-11-14至2012-11-13止.商标注册证第2001071号。

World Journal of Gastroenterology®注册有效期限自2002-11-14至2012-11-13止.商标注册证第2001158号。

(世界胃肠病学杂志社2002-12-18)