

# 应用酵母双杂交技术筛选肝细胞 cDNA 文库中乙型肝炎病毒前 - X 蛋白结合蛋白基因

刘敏, 王琳, 成军, 张树林, 邵清, 张健, 杨倩, 董菁

刘敏, 王琳, 成军, 邵清, 张健, 杨倩, 董菁, 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

张树林, 西安交通大学第一医院传染科 陕西省西安市 710061

刘敏, 女, 1969-02-19 生, 陕西省西安市人, 主治医师, 西安交通大学 2000 年内科学在读博士研究生。

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研究重点实验室。cj@genetherapy.com.cn

电话: 010-66933392 传真: 010-63801283

收稿日期: 2003-11-13 接受日期: 2003-12-16

## Screening and identification of interacting proteins with pre-X protein of hepatitis B virus in hepatocytes by yeast-two hybrid technique

Min Liu, Lin Wang, Jun Cheng, Shu-Lin Zhang, Qing Shao, Jian Zhang, Qian Yang, Jing Dong

Min Liu, Lin Wang, Jun Cheng, Shu-Lin Zhang, Qing Shao, Jian Zhang, Qian Yang, Jing Dong, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China Supported by Grants from the National Natural Scientific Foundation, No. C03011402, No. C30070689; and the 9.5 Research and Technique Foundation of PLA, No. 98D063; and the Launching Foundation for Student Studying Abroad of PLA, No. 98H038; and the 10.5 Youth Research and Technique Foundation of PLA, No. 01Q138; and the 10.5 Research and Technique Foundation of PLA, No.01MB135.

Correspondence to: Dr. Jun Cheng, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, 100 Xisihuanzhong Road, Beijing 100039, China. cj@genetherapy.com.cn Received: 2003-11-13 Accepted: 2003-12-16

## Abstract

**AIM:** To investigate the biological function of pre-X protein encoded by hepatitis B virus (HBV) genome, and to screen proteins in hepatocytes interacting with pre-X protein by yeast-two hybrid technique.

**METHODS:** The pre-X gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR) and pre-X 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 hepatocytes 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 x- $\alpha$ -gal for selecting two times and screening. After extracting and sequencing of plasmid from blue colonies, the results were

analyzed by bioinformatics.

**RESULTS:** Nineteen colonies were sequenced, in which five colonies were homo sapiens ferritin, one colonies was homo sapiens insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP3), one homo sapiens aldolase B, one homo sapiens gene for glycosylphosphatidylinositol anchor attachment 1 (GAA1), one homo sapiens hemopexin, one homo sapiens C1 esterase inhibitor (C1-INH), one homo sapiens vitronectin, one homo sapiens voltage-dependent anion channel 1 (VDAC1), one hepsin (transmembrane protease, serine 1), one homo sapiens spindling, one homo sapiens plasminogen (PLG), three hypothetical proteins, and one homo sapiens chromosome 16 clone RP11-542M13.

**CONCLUSION:** Genes of pre-X interacting proteins in hepatocytes are successfully cloned and the results bring some new clues for studying the biological functions of pre-X and associated proteins.

Liu M, Wang L, Cheng J, Zhang SL, Shao Q, Zhang J, Yang Q, Dong J. Screening and identification of interacting proteins with pre-X protein of hepatitis B virus in hepatocytes by yeast-two hybrid technique. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(4):790-793

## 摘要

**目的:** 用酵母双杂交技术筛选肝细胞中与乙型肝炎病毒(HBV)前-X蛋白结合蛋白的编码基因。

**方法:** 用多聚酶链反应(PCR)法扩增HBV基因组中的前-X基因, 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, 然后与转化了人肝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  $\alpha$ ), 提出质粒并测序, 进行生物信息学分析。

**结果:** 成功克隆出 HBV 的前 - X 基因, 构建表达载体并在酵母细胞中表达, 配合后选出在四重缺陷(SD/-Trp-Leu-Ade-His)培养基及铺有 X- $\alpha$ -半乳糖(X- $\alpha$ -gal)的四重缺陷培养基上均能生长并变成蓝色的真阳性菌落 19 个, 其中 5 个是人铁蛋白; 1 个是人的胰岛素样生长因子结合蛋白 3 (IGFBP3); 1 个是人醛缩酶 B; 1 个是人糖基化磷脂酰肌醇锚定结合因子 1 (GPAA1); 1 个是人血红素结合蛋白; 1 个是人 C1 酯酶抑制子 (C1-INH); 1 个是人玻连蛋白; 1 个是人电压依赖性阴离子通道 1 (VDAC1); 1 个是丝氨酸穿膜蛋白酶 (hepsin); 1 个是人梭素; 1 个是人纤溶酶原 (PLG); 3 个是人假想蛋白; 1 个是 RP11-542M13 克隆, 位于染色体 16。

结论: 成功克隆出前-X的结合蛋白, 为进一步研究HBV的前-X蛋白的作用提供了新线索.

刘敏, 王琳, 成军, 张树林, 邵清, 张健, 杨倩, 董菁. 应用酵母双杂交技术筛选肝细胞cDNA文库中乙型肝炎病毒前-X蛋白结合蛋白基因. 世界华人消化杂志 2004;12(4):790-793

http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/790.asp

## 0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)是一种嗜肝性部分双链DNA病毒, 不仅引起急、慢性病毒性肝炎, 而且与肝纤维化(LF)、肝细胞癌(HCC)的发生发展密切相关<sup>[1]</sup>. 1979年Gelibert et al<sup>[2]</sup>首次报告了HBV DNA的全基因序列并确定4个主要的开放读码框架(ORF), 分别命名为S、C、P、X区, 一直沿用至今. HBV基因组只有3.2 kb, 其结构特点是结构基因与调节基因序列之间重叠, 甚至结构基因序列之间重叠<sup>[3]</sup>. 关于这一紧密DNA结构中是否存在新的编码序列, 一直没有进行系统的研究. 最近董菁 et al 对于中国HBV流行株的全基因序列进行克隆和序列分析, 发现了前-S和前-X基因序列, 改写了HBV DNA编码基因序列研究的历史<sup>[4-7]</sup>. 病毒蛋白和肝细胞蛋白之间的作用是病毒致病的关键之一, 通过与肝细胞中的许多蛋白质的相互作用, 介导病毒进入肝细胞, 影响这些蛋白质的活性功能, 进一步调节改变细胞功能, 影响病毒复制, 造成机体免疫功能失调, 感染慢性化及肿瘤发生. 深入研究这些蛋白之间相互作用对于揭示病毒性肝炎发病机制, 寻找可能的新的治疗方法均有重要意义. 我们应用酵母双杂交技术筛选肝细胞cDNA文库中与HBV前-X蛋白结合蛋白基因, 以筛选与前-X蛋白有相互作用的蛋白, 为研究前-X的功能提供线索.

## 1 材料和方法

1.1 材料 *Saccharomyces cerevisiae* AH109 酵母株、Y187 酵母株(K1612-1)、cDNA 肝细胞文库等均购自 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- $\alpha$ -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 $\alpha$ ), 本室保存.

### 1.2 方法

1.2.1 前-X基因PCR扩增 根据董菁 et al 的研究<sup>[4]</sup>, 确定前-X基因序列, 长度168 bp. 以此设计引物, 同时在引物两端加酶切位点行PCR扩增. 将扩增产物连接于pGEM-T载体, 转化DH5 $\alpha$ 后提质粒行酶切鉴定、测序, 确定扩增的基因结果正确.

1.2.2 诱饵质粒的构建及表达 构建前-X基因的酵母表达载体pGBKT7-前-X, 用醋酸锂法转入单倍体酵母细胞AH109.

1.2.3 酵母肝文库的构建 cDNA肝文库进行增菌后, 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 $1 \times 10^9$  细胞/mL.

1.2.4 诱饵与肝文库的酵母配合 挑取在SD/-Trp选择培养基上生长转化子(计数大于 $1 \times 10^9$  细胞/ml)与肝细胞文库混合, 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后挑取生长大于3 mm的酵母集落, 在铺有X- $\alpha$ -半乳糖苷酶的QDO上检查 $\alpha$ -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集落.

1.2.5 阳性质粒的克隆和分析 挑取真正的阳性集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, 并把所获新的基因存入GenBank数据库.

## 2 结果

2.1 pGBKT7-前-X诱饵质粒的构建及表达 利用自行设计的引物成功克隆出前-X基因(图1), 酶切鉴定与预期片段符合后连接到用相同酶所切的pGBKT7载体中. 再次酶切鉴定结果正确. 由此表明前-X基因已按正确方向克隆入酵母表达载体pGBKT7中, pGBKT7-前-X诱饵质粒构建成功.

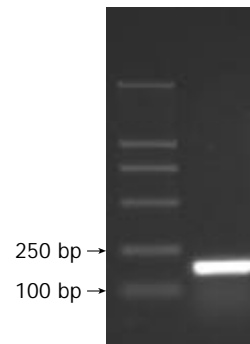


图1 前-X基因PCR扩增凝胶电泳图.

2.2 配合后cDNA筛选配合后筛选出既能在4缺(SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade)培养基又能在铺有X- $\alpha$ -gal的4缺培养基上生长并变成蓝色的真阳性菌落, 行PCR验证有插入序列, 结果见图2.

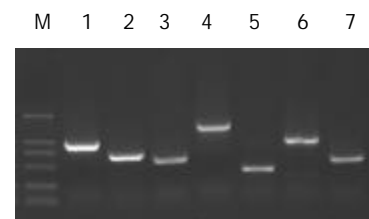


图2 文库扩增筛选部分菌落PCR扩增结果. M: 2 000 bp, 1-7是不同的集落PCR扩增结果.

2.3 cDNA 测序与同源性分析初步结果 阳性菌落测序后, 与 GenBank 数据库进行初步比较. 19 个均与已知基因的部分序列高度同源(98-100%), 详细结果见表 1.

表 1 前 -X 蛋白结合的肝细胞中蛋白的类型

序号	筛选出的目的基因	同源性	相同克隆数
1	人铁蛋白	99-100%	5
2	人胰岛素样生长因子结合蛋白 3(IGFBP3)	99%	1
3	人醛缩酶 B	99%	1
4	人糖基化磷脂酰肌醇锚定结合因子 1(GAA1)	99%	1
5	人血红素结合蛋白	99%	1
6	人 C1 酯酶抑制子(C1-INH)	100%	1
7	人玻连蛋白	99%	1
8	人电压依赖性阴离子通道 1 (VDAC1)	98%	1
9	丝氨酸穿膜蛋白酶(hepsin)	100%	1
10	人梭素	100%	1
11	人纤溶酶原(PLG)	98%	1
12	人假想蛋白	99%	3
13	RP11-542M13 克隆, 位于染色体 16	100%	1

### 3 讨论

最早在 1990 年 Loncarevic et al<sup>[8]</sup>在对 HCC 患者血液 HBV 基因组的研究中简单介绍了前 -X 区的存在. Takahashi et al<sup>[9]</sup>于 1995 年的研究结果认为前 -X 区与 HCC 有密切关系. 1998 年, Hiroi et al<sup>[10]</sup>自 HCC 患者体内克隆了 40 株 HBV 全序列, 其中 38 株为 adr 亚型, 之中的 18 株含有前 -X 基因, 作者综合以往的资料, 认为前 -X 基因与 HCC 有密切的关系. 但上述资料分析的患者病例数较少, 结论需要进一步推敲. 董菁 et al 对于中国 HBV 流行株的全基因序列进行克隆和序列分析, 界定了乙型肝炎病毒前 -X 基因区, 根据针对前 -X 多肽的氨基酸组成分析, 发现该区域含有多个 S, 可能是磷酸化的重要区域, 与细胞内信号转导有关<sup>[4]</sup>. 关于前 -X 编码蛋白的功能及相互作用蛋白还需应用多种分子生物学技术从多方面研究.

酵母双杂交技术是近年来新发展起来的一种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. 我们应用此技术成功的筛选出前 -X 蛋白相互作用蛋白. 其中特别有意义的是糖基化磷脂酰肌醇糖基化磷脂酰肌醇锚定结合因子 1 (glycosyl phosphatidylinositol anchor attachment GAA1)、电压依赖性阴离子通道 1 (VDAC1)和丝氨酸穿膜蛋白酶 (Hepsin).

糖基化磷脂酰肌醇(glycosyl phosphatidylinositol GPI)结合是蛋白锚定细胞膜表面的一般机制<sup>[10]</sup>. GPI 锚定蛋白的作用是细胞与细胞间的相互作用而不是细胞生长<sup>[11]</sup>. 大多数原核细胞表面蛋白通过共价黏附 GPI 被锚定于细胞膜. 转录后黏附 GPI 是在细胞表面表达这些蛋白的

基础<sup>[12]</sup>. 这种膜锚定也广泛存在于所有真核组织. 在哺乳动物细胞有 100 多个细胞表面蛋白存在各种大小和功能的 GPI 锚定位点<sup>[13]</sup>. 在内质网中 GPI 前体和一种蛋白前体形成 GPI 锚定蛋白. GPI 锚定蛋白有两个信号多肽. 一个是氨基末端信号多肽直接易位穿过内质网膜. 另一个是羧基末端信号多肽直接黏附 GPI 锚凹. 转录后, 羧基端 GPI 黏附信号立即被 GPI 氨基转移酶识别并分离信号以 GPI 取代. 从 F9 细胞裂解 GAA1, 发现 GAA1 是蛋白前体 GPI 锚凹的基础而对 GPI 合成无作用. 缺少 GAA1, 羧基末端介导的蛋白前体和 GPI 氨基转移无法形成. GAA1 和 Gpi8p 形成复合物, 所以这两个蛋白对于羧基末端介导的形成是必要的<sup>[10]</sup>. HBV 前 -X 蛋白与 GAA1 有相互作用, 推测前 -X 蛋白与细胞死亡对细胞转化和肿瘤发生起作用, 有研究表明 C-Raf 可通过调节线粒体 VDAC 影响细胞存活<sup>[21]</sup>. VDAC 结合 Ca(2+), 使 Ca(2+)透过, 在调节线粒体 Ca(2+)的自身稳定中有作用<sup>[14-21]</sup>. HBV 前 -X 与 VDAC 有相互作用, 推测前 -X 蛋白与线粒体膜蛋白可结合, 从而影响线粒体膜通透性, 与 HBV 感染癌变有关.

丝氨酸穿膜蛋白酶是一种 51 kDa 的膜相关性丝氨酸蛋白酶, 作为一种完整的膜蛋白参与细胞生长和维持合适的细胞形态. 在许多原发性肿瘤和生长分化快的细胞中有丝氨酸穿膜蛋白酶超表达, 如肝癌细胞、哺乳动物癌细胞、外周神经细胞和幼小仓鼠肾细胞中水平高, 而在人脐带和大鼠毛细血管上皮细胞测不到<sup>[22]</sup>. 肝癌细胞用抗 -丝氨酸穿膜蛋白酶抗体处理后生长抑制, 推测正常细胞生长在细胞表面要有丝氨酸穿膜蛋白酶分子, 但丝氨酸穿膜蛋白酶超表达与肿瘤发生有关<sup>[23]</sup>. Chen et al<sup>[24]</sup>认为丝氨酸穿膜蛋白酶在癌前状态超表达意味着丝氨酸穿膜蛋白酶在肿瘤侵入时有作用. Wu et al<sup>[25]</sup>认为丝氨酸穿膜蛋白酶是一种 II 型穿膜丝氨酸蛋白酶, 肝细胞表面大量表达, 对血液凝集、肝细胞生长和受精过程有一定作用. 前 -X 蛋白与丝氨酸穿膜蛋白酶有相互作用, 是否与 HBV 癌变发生有关有待进一步研究证实.

众所周知, HBV 感染与 HCC 发生、发展密切相关. 我们用酵母双杂交技术成功筛选出与 HBV 前 -X 蛋白相互作用蛋白, 提示前 -X 蛋白与信号传导、细胞凋亡、HCC 发生等关系密切, 这一部分的研究还有待进一步深入.

### 4 参考文献

- 1 成军, 杨守纯. 现代肝炎病毒分子生物学. 第 1 版. 北京: 人民军医出版社, 1997:83-88
- 2 Gelibert F, Mandart E, Fitoussi F, Tiollais P, Charnay P. Nucleotide sequence of the hepatitis B virus genome (subtype ayw) cloned in *E.coli*. *Nature* 1979;281:646-650
- 3 Seeger C, Mason WS. Hepatitis B virus biology. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000;64:51-68
- 4 董菁, 成军. 董菁, 成军. 乙型肝炎病毒基因组中前 - 前 -S 区编码基因的界定. 世界华人消化杂志 2003;11:1091-1096
- 5 董菁, 成军. 乙型肝炎病毒基因组中前 -X 编码基因的界定. 世界华人消化杂志 2003;11:1097-1101
- 6 杨倩, 董菁, 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 张树林. 乙型肝炎病毒基

- 因组中前 - 前 - S - 编码基因启动子序列的确定及转录活性的鉴定. 解放军医学杂志 2003;28:762-764
- 7 杨倩, 董菁, 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 王琳, 张树林. 乙型肝炎病毒基因组中前 - X - 编码基因启动子序列的确定及转录活性的鉴定. 解放军医学杂志 2003;28:765-767
  - 8 Loncarevic IF, Zentgraf H, Schroder CH. Sequence of a replication competent hepatitis B virus genome with a preX open reading frame. *Nucleic Acids Res* 1990;18:4940-4944
  - 9 Takahashi K, Brotman B, Usuda S, Mishiro S, Prince AM. Full-genome sequence analyses of hepatitis B virus (HBV) strains recovered from chimpanzees infected in the wild: implications for an origin of HBV. *Virology* 2000;267:58-64
  - 10 Hiroi Y, Chen R, Sawa H, Hosoda T, Kudoh S, Kobayashi Y, Aburatani H, Nagashima K, Nagai R, Yazaki Y, Medof ME, Komuro I. Cloning of murine glycosyl phosphatidylinositol anchor attachment protein, GPAA1. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000;279:C205-212
  - 11 Takeda J, Kinoshita T. GPI-anchor biosynthesis. *Trends Biochem Sci* 1995;20:367-371
  - 12 Ohishi K, Inoue N, Maeda Y, Takeda J, Riezman H, Kinoshita T. Gaa1p and gpi8p are components of a glycosylphosphatidylinositol (GPI) transamidase that mediates attachment of GPI to proteins. *Mol Biol Cell* 2000;11:1523-1533
  - 13 Kinoshita T, Inoue N, Takeda J. Defective glycosyl phosphatidylinositol anchor synthesis and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Adv Immunol* 1995;60:57-103
  - 14 Gincel D, Zaid H, Shoshan-Barmatz V. Calcium binding and translocation by the voltage-dependent anion channel: a possible regulatory mechanism in mitochondrial function. *Biochem J* 2001;358:147-155
  - 15 Kmita H, Budzinska M, Stobienia O. Modulation of the voltage-dependent anion-selective channel by cytoplasmic proteins from wild type and the channel depleted cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *Acta Biochim Pol* 2003;50:415-424
  - 16 Benz R. Permeation of hydrophilic solutes through mitochondrial outer membranes: review on mitochondrial porins. *Biochim Biophys Acta* 1994;1197:167-196
  - 17 Shi Y, Chen J, Weng C, Chen R, Zheng Y, Chen Q, Tang H. Identification of the protein-protein contact site and interaction mode of human VDAC1 with Bcl-2 family proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;305:989-996
  - 18 Muller A, Rassow J, Grimm J, Machuy N, Meyer TF, Rudel T. VDAC and the bacterial porin PorB of *Neisseria gonorrhoeae* share mitochondrial import pathways. *EMBO J* 2002;21:1916-1929
  - 19 Muller A, Rudel T. Modification of host cell apoptosis by viral and bacterial pathogens. *Int J Med Microbiol* 2001;291:197-207
  - 20 Kroemer G, Reed JC. Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* 2000;6:513-519
  - 21 Le Mellay V, Troppmair J, Benz R, Rapp UR. Negative regulation of mitochondrial VDAC channels by C-Raf kinase. *BMC Cell Biol* 2002;3:14-17
  - 22 Somoza JR, Ho JD, Luong C, Ghate M, Sprengeler PA, Mortara K, Shrader WD, Sperandio D, Chan H, McGrath ME, Katz BA. The structure of the extracellular region of human hepsin reveals a serineprotease domain and a novel scavenger receptor cysteine-rich (SRCR) domain. *Structure (Camb)* 2003;11:1123-1131
  - 23 Torres-Rosado A, O'Shea KS, Tsuji A, Chou SH, Kurachi K. Hepsin, a putative cell-surface serine protease, is required for mammalian cell growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:7181-7185
  - 24 Chen Z, Fan Z, McNeal JE, Nolley R, Caldwell MC, Mahadevappa M, Zhang Z, Warrington JA, Stamey TA. Hepsin and maspin are inversely expressed in laser capture microdissected prostate cancer. *J Urol* 2003;169:1316-1319
  - 25 Wu Q. Gene targeting in hemostasis. Hepsin. *Front Biosci* 2001;6:D192-200

## World Journal of Gastroenterology 审稿要点

《World Journal of Gastroenterology, WJG》根据编委的审稿意见, 来稿分为优先发表、可以发表、修改后发表、修改后再审等项处理. WJG 为了确保其出版的每篇论文的学术质量, 特制定了以下评审要点. (1)题名: 是否准确反映了研究工作的科学问题, 内容是否简明而有特色. 若不符, 请提出具体修改意见. (2)摘要: 是否明确指出了研究的背景与目的、材料和方法、结果(包括重要数据)和结论, 创新点和重点科学问题是否与目的、材料和方法、结果(包括重要数据)和结论相符. (3)引言: 是否包括该研究的目的和与其他相关研究的关系. (4)材料和方法: 有无特色, 如大样本、安全性和有效性的随机、双盲双模拟、多中心平行对照临床试验、特殊病例、细胞或组织样品; 研究方法和技术有无创新性、系统性或特色. 改进和创新方法的描述是否达到了他人可以重复或验证的要求, 实验对照的设计是否合理可靠, 统计学处理方法的使用是否恰当. (5)结果: 是否能得出较明确的科学结论, 实验证据是否充足. 临床研究重点应看其样本大小和统计学分析结果. (6)讨论: 是否条理分明, 有无系统的理论分析和有价值的科学结论. (7)参考文献: 文献引用是否恰当和充分, 特别是最新文献的引用情况. (8)综合评价: 论文的科学性、创新性和可读性是否能较好地反映我国或国际胃肠病学临床和基础研究的先进水平.