

## 乙、丙型肝炎病毒基因联合诊断芯片的研制及应用

陈伟, 李刚, 马会慧, 汤正好, 黄呈辉, 韩晓燕

陈伟, 韩晓燕, 中山大学附属第三医院中心实验室 广东省广州市 510630  
李刚, 马会慧, 中山大学附属第三医院传染病学科 广东省广州市 510630  
汤正好, 上海市第六人民医院传染病学科 上海市 200233  
黄呈辉, 深圳市宝安区血站 广东省深圳市 518101  
陈伟, 男, 1974-10-18 生, 湖北省襄樊市人, 汉族. 2003 年中山大学硕士, 医师. 主要从事病毒性肝炎的研究.  
广东省科技重点项目资助, No. 2km05302S  
项目负责人: 李刚, 510630, 广东省广州市石牌岗顶, 中山大学附属第三医院传染病学科. ligangzh@public.guang.gd.cn  
电话: 020-87544614 传真: 020-87536401  
收稿日期: 2003-10-09 接受日期: 2004-02-01

### Development and application of a mixed microarray in detection of genes of HBV and HCV

Wei Chen, Gang Li, Hui-Hui Ma, Zheng-Hao Tang, Cheng-Hui Huang, Xiao-Yan Han

Wei Chen, Xiao-Yan Han, Medical Research Center, Third Affiliated Hospital of Zhongshan University, Guangzhou 510630, Guangdong Province, China

Gang Li, Hui-Hui Ma, Department of Infectious Diseases, Third Affiliated Hospital of Zhongshan University, Guangzhou 510630, Guangdong Province, China

Zheng-Hao Tang, Department of Infectious Diseases, Shanghai Sixth People's Hospital, Shanghai 200233, China

Cheng-Hui Huang, Shenzhen Bao'an Blood Center, Shenzhen 518101, Guangdong Province, China

Supported by the Key Project of the Department of Science and Technology of Guangdong Province, No.2km05302s

Correspondence to: Gang Li, Medical Research Center, Third Affiliated Hospital of Zhongshan University, Guangzhou 510630, Guangdong Province, China. ligangzh@public.guang.gd.cn

Received: 2003-10-09 Accepted: 2004-02-01

### Abstract

AIM: To develop a DNA microarray to detect hepatitis virus B (HBV) DNA, hepatitis virus C (HCV) RNA, HBV YMDD mutant and HCV genotype simultaneously. At the same time, the chip was compared with other techniques to evaluate its prospect in clinical application.

METHODS: A set of probes was designed to detect HBV DNA, HCV RNA, HBV YMDD mutant and HCV genotype. The probes were synthesized by DNA synthesizer. The microarray was prepared by spotting the probes onto the specially treated glass slides. Serum samples were collected from inpatients and outpatients at the Department of Infectious Diseases, the Third Affiliated Hospital of Zhongshan University. Among the samples, 20 were confirmed HBV DNA positive by fluorescent quantitation PCR, 20 were HCV RNA positive, 20 were confirmed YMDD mutant by mismatched PCR, 10 were HBV DNA and HCV RNA negative. HBV DNA and HCV RNA were extracted from the serum, then amplified by asymmetric PCR or RT-PCR in the presence of sense fluorescein labeled primers. The products of HBV YMDD and HCV NS-5 were purified and sequenced. Following

the hybridization of amplified products on the microarrays, detection was carried out by the fluorescence scanner. The detection results were obtained by analyzing the intensity and ratio of the fluorescence signals using image analysis software.

RESULTS: For the HBV DNA positive samples and HCV RNA positive samples, an intensive signal was observed at the point of corresponding probes on the microarrays. In detection of YMDD mutant, the coincident rate of the microarray and the mismatched PCR was 75%, the coincident rate of microarray and sequencing was 95%. In detection of HCV genotype, the coincident rate of microarray and sequencing was 75%.

CONCLUSION: The technology of microarray appears to be versatile, with a great sensitivity and specificity in detection of HBV and HCV. Furthermore, it can find co-infection of different virus strains. But it has some false negative rate and false positive rate in HCV genotyping.

Chen W, Li G, Ma HH, Tang ZH, Huang CH, Han XY. Development and application of a mixed microarray in detection of genes of HBV and HCV. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(4):866-870

### 摘要

目的: 制备一款肝炎病毒检测芯片, 能同时实现对乙型肝炎病毒(HBV)、丙型肝炎病毒(HCV)、HBV YMDD 变异株及HCV基因型的检测, 并与其他检测方法进行比较, 以探讨基因芯片技术临床应用的可行性。

方法: 根据 HBV、HCV 的序列设计出探针, 采用点样法制备芯片. 收集 HBV DNA 阳性和 HCV RNA 阳性血清各 20 份, YMDD 变异株阳性血清 20 份, HBV DNA 阴性和 HCV RNA 阴性血清各 10 份, 用基因诊断芯片检测, 并与荧光定量法、错配 PCR 及测序法比较。

结果: HBV DNA 阳性标本和 HCV RNA 阳性标本用芯片检测均为阳性; 芯片法检测 HBV YMDD 变异株和错配 PCR 法的符合率为 75%, 和测序法的符合率为 95%; 芯片法检测 HCV 基因型和测序法的符合率为 75%。

结论: 基因诊断芯片的敏感性和特异性较高, 且能检测出不同病毒株的共生状态, 但在检测 HCV 基因型方面存在一定的假阴性和假阳性。

陈伟, 李刚, 马会慧, 汤正好, 黄呈辉, 韩晓燕. 乙、丙型肝炎病毒基因联合诊断芯片的研制及应用. *世界华人消化杂志* 2004;12(4):866-870

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/866.asp>

## 0 引言

基因芯片是指将许多特定的寡核苷酸片段或基因片段作为探针, 有规律地排列固定于支持物上, 然后与待测的标记样品的基因按碱基配对原理进行杂交, 再通过激光共聚焦荧光检测系统对芯片进行扫描, 并配以计算机系统对每一探针上的荧光信号作出分析比较, 从而迅速得出所要的信息<sup>[1]</sup>. 通过设计不同的探针阵列、使用特定的分析方法可使该技术具有多种不同的应用价值, 如基因表达谱分析、突变检测、单碱基多态性分析、杂交测序(SBH)、药物筛选及病原体检测<sup>[2-14]</sup>等. 我们将基因芯片技术应用于常见传染病 - 病毒性肝炎的诊断, 并与其他检测方法比较, 探讨基因芯片在临床诊断方面的价值.

## 1 材料和方法

1.1 材料 血清标本来自中山大学附属第三医院传染病学科2002/2003年住院和门诊患者, 其中HBV DNA阳性血清20份, HCV RNA阳性血清20份, YMDD变异株阳性血清20份及HBV DNA, HCV RNA阴性血清各10份.

1.2 方法 从GeneBank下载HBV, HCV的相关序列资料, 设计出一套分别用于检测HBV DNA, HCV RNA, HBV YMDD变异株及HCV基因型的探针. 采用点样法将合成好的寡核苷酸探针用点样仪按一定的矩阵点在表面经过醛基化处理的玻片上, 同时点上用于系统监控的阴性参照、阳性参照和空白对照(表1). 设计引物根据HBV、HCV的基因组序列, 设计6对引物. 有关的HCV靶基因设计了内、外引物各一对以进行巢式PCR. 其中引物PBS, P4, S2和YS的5'端用荧光素Cy3标记. 取血清100  $\mu$ L, 加入0.5 mL无菌离心管中, 98  $^{\circ}$ C 15 min, 12 000 r/min, 离心5 min, 取上清为模板; 将引物PBA稀释10倍, 使PBS与PBA浓度之比为10:1, 进行不对称PCR. 循环参数为94  $^{\circ}$ C 5 min, 94  $^{\circ}$ C 30 s, 50  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 30 s, 45个循环, 72  $^{\circ}$ C 10 min; 将引物YA稀释10倍, 使YS与YA浓度之比为10:1, 进行不对称PCR. 循环参数为94  $^{\circ}$ C 5 min, 94  $^{\circ}$ C 30 s, 55  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 30 s, 45个循环, 72  $^{\circ}$ C 10 min; HCV RNA阳性血清100  $\mu$ L加入1 mL TRIZOL溶液, 充分混合, 室温放置15 min, 加入0.2 mL氯仿, 振荡摇匀, 室温放置10 min, 4  $^{\circ}$ C 12 000 rpm离心10 min, 吸取上层水相置于另一无菌离心管中, 加入等体积异丙醇, 室温沉淀10 min, 4  $^{\circ}$ C 12 000 r/m离心10 min, 弃上清, 75%乙醇洗两遍, 沉淀的RNA于室温下自然干燥, 用10  $\mu$ L DEPC水重悬沉淀RNA, 置于冰浴立即用于合成cDNA; 采用逆转录试剂盒(MBI), 按说明书操作; 第1次扩增用外引物P1, P3(表2)进行对称PCR, 循环参数为94  $^{\circ}$ C 5 min, 94  $^{\circ}$ C 30 s, 40  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 30 s, 35个循环, 72  $^{\circ}$ C 10 min. 取第1次扩增产物5  $\mu$ L, 稀释10倍后取5  $\mu$ L作为模板, 加入内引物, 并将引物P2稀释10倍, 进行不对称PCR, 反应体系和循环参

数同第1次扩增; 第1次扩增用外引物S1, A2(表2)进行对称PCR, 循环参数为94  $^{\circ}$ C 5 min, 94  $^{\circ}$ C 30 s, 50  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 30 s, 35个循环, 72  $^{\circ}$ C 10 min. 取第1次扩增产物5  $\mu$ L, 稀释10倍后取5  $\mu$ L作为模板, 加入内引物, 并将引物A1稀释10倍, 进行不对称PCR, 反应体系和循环参数同第1次扩增. 取四种PCR产物各2  $\mu$ L, 与24  $\mu$ L杂交液混匀, 取10  $\mu$ L杂交混合物加于芯片反应区中, 于45  $^{\circ}$ C水浴中杂交1 h. 杂交反应结束后将芯片依次用洗液A, B, C各清洗1 min, 室温晾干. 扫描仪为GenePix4000B; 激光强度和PMT设置为650和33; 激发波长为532 nm; 根据配套软件分析结果. HBV P区包含有YMDD区域的片段及HCV NS-5区片段的序列测定和分析. 取PCR产物50  $\mu$ L电泳, 切取目的条带, 凝胶回收纯化DNA按QIA quick Gel Extraction kit试剂盒说明书进行. PCR产物纯化后, 采用双脱氧链终止法, 在ABI377全自动测序仪上进行双向测序, 测序工作由上海博亚公司和上海生工生物工程服务公司完成.

表1 用于不同检测目的的探针序列

No	Sequence(5' -3')	Length	Tm	GC%	Target
1	ATA AAG CCT CTC GGT GA	17	47.4	47	1 a
2	CAC CGG CGA TAA CC	14	46.2	64	1 b
3	GCA CCG GCG GTA GC	14	46.8	79	1 b
4	GAT GTA GCA GGT GAG AGT G	19	47	53	1 c
5	GAG AGT GTT ACC GCA GC	17	47.9	59	1 c
6	CAG CGA GTG TAT GGC A	16	47.8	56	2 a
7	TGT AAC CGC AGG ATT G	16	46.8	50	2 b
8	TGC CCT TTG CTG TTT	15	46.2	47	2 c
9	CGC AGT AAA GCC GC	14	47.6	64	3 a
10	GTC TTT GAG ACC CGC G	16	48.1	63.5	3 b
11	GGG CAG TAA TAA CCT T	16	47.7	43.75	4 a
12	GCG TTG GGT GAG TGA C	16	48.1	64	5 a
13	CAG TCC TTG ATG TTG GC	17	48.1	53	6 a
14	CGA TAG CCG CAG TTT TG	17	47.6	53	1 b
15	CGA TAG CCG CAG TTC TG	17	48.3	62.5	1 b
16	AGG TGA AGC GAA GTG C	16	47.9	56	HBV
17	GTT CCG CAG ACC ACT AT	17	47.1	53	HCV
18	AT CAT CCA CAT AAC TGA	17	43.2	35	YVDD
19	ACA TCA TCA ATA TAA CT	17	38.3	24	YIDD
20	CAT CAT CCA TAT AAC TGA	18	45.5	33	YMDD

## 2 结果

2.1 基因芯片检测HBV DNA和HCV RNA 用HBV DNA荧光定量检测证实为HBV DNA(+ )的血清标本20份和HCV RNA荧光定量检测证实为HCV RNA(+ )的血清标本20份, 与芯片杂交后, 在相应探针位置均出现很强的杂交信号, 阴性血清无杂交信号(表3, 4).

表2 HBV, HCV 基因相关引物

Name	Polarity	Position	Sequence(5' - 3')
PBS	+	1526	CGCACCTCTCTTTACGC
PBA	-	1795	ATTTATGCCTACAGCCTCC
P1	-	320	ATACTCGAGGTGCACGGTCTACGAGACC
P2	-	310	CACTCTCGAGCACCCCTATCAGGCAGT
P3	+	33	CTGTGAGGA ACTACTGTCTT
P4	+	60	TTCACGCAGAAAGCGTCTAG
S1	+	8199	G TSAAYRCCTGG AAA TCAAAGAA
S2	+	8229	ATGGGSTTYKCRATGACACC
A1	-	8557	CAGATAACGACAAGGTCGTCTC
A2	-	8624	GTACCT AGTCATAGCCTCCGTG
YS	+	673	AGT GCM ATTTGTTCAGTG
YA	-	1105	CCTTGTAAGTTGGCGA

Y =C, T; K =T, G; R =A, G; S =C, G; M =A, C.

表3 基因芯片和荧光定量检测 HBV DNA 的比较

芯片法	定量法		合计
	阳性	阴性	
阳性	20	0	20
阴性	0	10	10
合计	20	10	30

表4 基因芯片和荧光定量检测 HCV RNA 的比较

芯片法	定量法		合计
	阳性	阴性	
阳性	20	0	20
阴性	0	10	10
合计	20	10	30

表5 芯片法和测序法检测 HBV YMDD 变异株的结果比较

芯片法	测序法						合计
	YMDD	YVDD	YIDD	V+I	M+V+I	其他	
YMDD	3	0	0	0	0	0	3
YVDD	0	10	0	0	0	0	10
YIDD	0	0	2	0	0	0	2
V+I	0	2	1	0	0	0	3
M+V+I	1	0	0	0	0	0	1
未检出	0	0	0	0	0	1	1
合计	4	12	3	0	0	1	20

2.2 基因芯片检测 HBV YMDD 变异株 用错配 PCR 法检测为 YMDD 变异的血清标本 20 份, 扩增产物回收纯化后进行 DNA 序列测定, 结果为 YMDD 野生株 4 例, YVDD 变异株 12 例, YIDD 变异株 3 例, 还有 1 例的

蛋氨酸(M)三联体密码的第 3 个碱基由 G 变为 A. 芯片检测结果为 YMDD 野生株 3 例, YVDD 变异株 10 例, YIDD 变异株 2 例, YVDD+YIDD 3 例, YMDD+YVDD+YVDD 1 例, 有 1 例未能检出(表 5).

2.3 基因芯片检测 HCV 基因型 HCV NS-5 区扩增产物 20 份回收纯化后进行 DNA 序列测定, 4 份测序不成功. 16 份测序结果用 GeneBank 的 Blast 软件进行在线比对, 并用 DNASTar 和 GeneBank 中的 HCV 标准株序列进行同源性分析, 结果表明 16 份测序样品均为 HCV 1b 型; 芯片检测结果为 HCV 1b 型 11 例, 1c 型 2 例, 1b 型 + 3b 型 1 例, 有 2 例用芯片未能分型(表 6).

表6 芯片法和测序法检测 HCV 基因型的结果比较

芯片法	测序法				
	1b	1b + 3b	1c	未检出	合计
1b	11	0	0	0	11
1b + 3b	1	0	0	0	1
1c	2	0	0	0	2
未检出	2	0	0	0	2
合计	16	0	0	0	16

### 3 讨论

在我国, 病毒性肝炎的发病率很高<sup>[15-17]</sup>, 其中以引起慢性肝炎的乙型、丙型肝炎病毒对患者危害最大<sup>[18-24]</sup>, 是发展为肝硬化, 肝功能衰竭和原发性肝癌的主要危险因素之一<sup>[25-27]</sup>, 临床上很多情况下对 HBV、HCV 的基因都要进行检测. 此外, 随着 HBV 治疗药物拉米夫定的广泛使用, HBV 耐药现象的出现已成为临床应用的一个棘手问题<sup>[28-32]</sup>, 有效检测 HBV 耐药相关 DNA 突变成成为指导临床用药, 提高治疗效率, 降低患者负担的重要手段. 目前, 最常用的 HBV 耐药基因诊断方法是 DNA 测序法. 该方法准确但成本较高, 临床应用有一定局限性; 另一缺点是对感染病毒中优势株的检测效果较好, 但较难发现非优势株, 不能检测多种病毒株并存的情况. 由于 HCV RNA 变异大, 除存在不同型外, 还有很多亚型, 而 HCV 的基因型在分子流行病学、干扰素疗效评估及疫苗研制等方面具有重要意义<sup>[33-38]</sup>. 目前国内尚无普遍推广使用的 HCV 分型标准试剂盒, 应用较多的是 LiPA 方法<sup>[39]</sup>, 此法成本较高, 操作较复杂. 基因芯片技术由于同时将大量探针固定于支持物上, 所以可以一次性对样品中大量序列进行检测和分析, 基因芯片在病毒性肝炎诊断上的价值在于, 有可能对多种病毒以及病毒的耐药性、变异型等情况, 通过一张芯片同时诊断出来.

实验结果表明, 芯片对 HBV DNA 和 HCV RNA 的检出率达到 100%, 这和本实验所用的标本有一定关系. 为了成功地获得目的片段, 我们选择了荧光定量检测报告病毒拷贝数较高的血清标本. 对于 HCV RNA 阳性的血清标本, 我们采用巢式 PCR 扩增. HBV DNA 阳性

标本 20 例和 HCV RNA 阳性标本 20 例芯片检测皆为阳性, 扩增产物稀释 16 倍后, 仍可检测到很强的荧光信号, 阴性血清芯片检测全部阴性. 说明 HBV DNA、HCV RNA 检测探针设计合理, 芯片质量控制较好, 无假阳性出现, 芯片具有较好的敏感性和特异性. 基因芯片检测 HBV YMDD 变异株与测序法比较, 二者完全一致的 15 例(15/20), 部分一致的有 4 例(4/20), 两种方法的符合率为 95%, 此外, 有些测序报告为单一病毒株的样品, 和芯片杂交后, 在不同的探针位置都有阳性荧光信号, 且信号强度有差别, 考虑为不同病毒株共存, 信号强的探针所对应的病毒株即为优势株, 实验中还发现, 芯片检测 HBV YMDD 变异株时有 1 例未检出, 假阴性率为 5%, 假阴性的出现是因为在探针对应的序列附近有碱基发生突变, 由此可见, 基因芯片检测 HBV YMDD 变异株的敏感性和特异性均较高, 还能检测出野生株和变异株共存情况, 这有利于判断病情变化和指导临床用药. 用芯片检测 HCV 基因型时假阴性率和假阳性率各为 12.5%, 通过比较测序结果和探针序列, 发现假阴性的出现是由于 2 例标本的核酸序列与探针在相应区域有 1-2 个碱基不同, 而且这些有差异的碱基接近探针的中心位置, 致使杂交时不能结合; 假阳性的出现则是因为有 2 例标本的核酸序列与探针序列很接近, 碱基差异位于探针 5' 端, 二者发生非特异性结合.

基因芯片技术是在 PCR 的基础上用核酸杂交加以确认, 有较高的灵敏度和特异性, 可以直接检测病原体, 尤其针对用常规检测方法灵敏度低、费时、难以判断预后、或不能对具有治疗意义的亚群进行检测的病原体, 则更有价值. 但在实际操作中, 直接采用核酸杂交进行检测, 杂交信号难以检测, 导致敏感性低, 所以在目前, 样品扩增, 如通过 PCR 来提高敏感性仍是必不可少的措施, 但亦导致实验步骤的复杂化和扩增环节带来的假阳性和假阴性. 因此, 从多个方面进行优化, 包括标记方式的改进, 提高杂交信号检测仪器的灵敏度, 杂交温度的控制等都是基因芯片能否用于临床检测的关键<sup>[40-42]</sup>.

#### 4 参考文献

- Gabig M, Wegrzyn G. An introduction to DNA chips: principles, technology, applications and analysis. *Acta Biochim Pol* 2001;48:615-622
- Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, Mesirov JP, Coller H, Loh ML, Downing JR, Caligiuri MA, Bloomfield CD, Lander ES. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 1999;286:531-537
- 刘妍, 成军, 李克, 杨倩, 陆萌英, 王琳, 王建军. 丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白 6 基因转染肝癌细胞的基因表达谱芯片分析. *世界华人消化杂志* 2003;11:394-398
- Hacia JG, Brody LC, Chee MS, Fodor SP, Collins FS. Detection of heterozygous mutations in BRCA1 using high density oligonucleotide arrays and two-colour fluorescence analysis. *Nat Genet* 1996;14:441-447
- Cronin MT, Fucini RV, Kim SM, Masino RS, Wespi RM, Miyada CG. Cystic fibrosis mutation detection by hybridization to light-generated DNA probe arrays. *Hum Mutat* 1996;7:244-255
- Lindroos K, Sigurdsson S, Johansson K, Ronnblom L, Syvanen AC. Multiplex SNP genotyping in pooled DNA samples by a four-colour microarray system. *Nucleic Acids Res* 2002;30:e70
- Iwasaki H, Ezura Y, Ishida R, Kajita M, Kodaira M, Knight J, Daniel S, Shi M, Emi M. Accuracy of genotyping for single nucleotide polymorphisms by a microarray-based single nucleotide polymorphism typing method involving hybridization of short allele-specific oligonucleotides. *DNA Res* 2002;9:59-62
- Dubiley S, Kirillov E, Lysov Y, Mirzabekov A. Fractionation, phosphorylation and ligation on oligonucleotide microchips to enhance sequencing by hybridization. *Nucleic Acids Res* 1997;25:2259-2265
- Drmanac R, Drmanac S, Baier J. DNA sequencing by hybridization with arrays of samples or probes. *Methods Mol Biol* 2001;170:173-179
- Fuhrman S, Cunningham MJ, Wen X, Zweiger G, Seilhamer JJ, Somogyi R. The application of shannon entropy in the identification of putative drug targets. *Biosystems* 2000;55:5-14
- Marton MJ, DeRisi JL, Bennett HA, Iyer VR, Meyer MR, Roberts CJ, Stoughton R, Burchard J, Slade D, Dai H, Bassett DE Jr, Hartwell LH, Brown PO, Friend SH. Drug target validation and identification of secondary drug target effects using DNA microarrays. *Nat Med* 1998;4:1293-1301
- Chen YH, Wang WC, Young KC, Chang TT, Chen SH. Plastic microchip electrophoresis for analysis of PCR products of hepatitis C virus. *Clin Chem* 1999;45:1938-1943
- Anthony RM, Brown TJ, French GL. Rapid diagnosis of bacteremia by universal amplification of 23S ribosomal DNA followed by hybridization to an oligonucleotide array. *J Clin Microbiol* 2000;38:781-788
- 阎小君, 苏成芝. 生物芯片技术在 Hp 诊断和研究中的应用. *世界华人消化杂志* 1999;7:737-739
- Li G, Ma HH, Lau GK, Leung YK, Yao CL, Chong YT, Tang WH, Yao JL. Prevalence of hepatitis G virus infection and homology of different viral strains in Southern China. *World J Gastroenterol* 2002;8:1081-1087
- Yan J, Chen LL, Lou YL, Zhong XZ. Investigation of HGV and TTV infection in sera and saliva from non-hepatitis patients with oral diseases. *World J Gastroenterol* 2002;8:857-862
- Chen YD, Liu MY, Yu WL, Li JQ, Dai Q, Zhou ZQ, Tisminetzky SG. Mix-infections with different genotypes of HCV and with HCV plus other hepatitis viruses in patients with hepatitis C in China. *World J Gastroenterol* 2003;9:984-992
- Wang T, Wang Y, Wu MC, Guan XY, Yin ZF. Activating mechanism of transcription factor NF-kappaB regulated by hepatitis B virus X protein in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2004;10:356-360
- Huang JM, Huang TH, Qiu HY, Fang XW, Zhuang TG, Liu HX, Wang YH, Deng LZ, Qiu JW. Effects of hepatitis B virus infection on human sperm chromosomes. *World J Gastroenterol* 2003;9:736-740
- Tang ZY. Hepatocellular carcinoma-Cause, treatment and metastasis. *World J Gastroenterol* 2001;7:445-454
- He QQ, Cheng RX, Sun Y, Feng DY, Chen ZC, Zheng H. Hepatocyte transformation and tumor development induced by hepatitis C virus NS3 c-terminal deleted protein. *World J Gastroenterol* 2003;9:474-478
- Li K, Wang L, Cheng J, Lu YY, Zhang LX, Mu JS, Hong Y, Liu Y, Duan HJ, Wang G, Li L, Chen JM. Interaction between hepatitis C virus core protein and translin protein- a possible molecular mechanism for hepatocellular carcinoma and lymphoma caused by hepatitis C virus. *World J Gastroenterol* 2003;9:300-303
- Yang JM, Wang RQ, Bu BG, Zhou ZC, Fang DC, Luo YH. Effect of HCV infection on expression of several cancer-associated gene products in HCC. *World J Gastroenterol* 1999;5:25-27
- Yan FM, Chen AS, Hao F, Zhao XP, Gu CH, Zhao LB, Yang DL, Hao LJ. Hepatitis C virus may infect extrahepatic tissues in patients with hepatitis C. *World J Gastroenterol* 2000;6:805-811

- 25 Poovorawan Y, Chatchatee P, Chongsrisawat V. Epidemiology and prophylaxis of viral hepatitis: a global perspective. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17 Suppl:S155-166
- 26 杜竞辉, 查文章. 丙型肝炎与原发性肝癌关系研究现状. *世界华人消化杂志* 1999;7:176-179
- 27 Lee WM. Hepatitis B virus infection. *N Engl J Med* 1997;337:1733-1745
- 28 Lai CL, Chien RN, Leung NW, Chang TT, Guan R, Tai DI, Ng KY, Wu PC, Dent JC, Barber J, Stephenson SL, Gray DF. A one-year trial of lamivudine for chronic hepatitis B. Asia Hepatitis Lamivudine Study Group. *N Engl J Med* 1998;339:61-68
- 29 姚光弼, 王宝恩, 崔振宇, 姚集鲁, 曾明德. 拉米夫定治疗慢性乙型肝炎患者的长期疗效. *中华肝脏病杂志* 1999;7:80-83
- 30 Dusheiko G. Lamivudine therapy for hepatitis B infection. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1999;230:76-81
- 31 Ling R, Mutimer D, Ahmed M, Boxall EH, Elias E, Dusheiko GM, Harrison TJ. Selection of mutations in the hepatitis B virus polymerase during therapy of transplant recipients with lamivudine. *Hepatology* 1996;24:711-713
- 32 郑可飞, 杨守平, 陈孟峰, 黄志贤, 胡晚霞, 倪炼. 拉米夫定治疗慢性乙型肝炎 HBV YMDD 变异与肝组织病理状况. *世界华人消化杂志* 2002;10:1089-1091
- 33 Kanai K, Kako M, Okamoto H. HCV genotypes in chronic hepatitis C and response to interferon. *Lancet* 1992;339:1543
- 34 Pozzato G, Kaneko S, Moretti M, Croce LS, Franzin F, Unoura M, Bercich L, Tiribelli C, Crovatto M, Santini G. Different genotypes of hepatitis C virus are associated with different severity of chronic liver disease. *J Med Virol* 1994;43:291-296
- 35 Takada N, Takase S, Enomoto N, Takada A, Date T. Clinical backgrounds of the patients having different types of hepatitis C virus genomes. *J Hepatol* 1992;14:35-40
- 36 Pozzato G, Moretti M, Franzin F, Croce LS, Tiribelli C, Masayu T, Kaneko S, Unoura M, Kobayashi K. Severity of liver disease with different hepatitis C viral clones. *Lancet* 1991;338:509
- 37 Silini E, Bottelli R, Asti M, Bruno S, Candusso ME, Brambilla S, Bono F, Iamoni G, Tinelli C, Mondelli MU, Ideo G. Hepatitis C virus genotypes and risk of hepatocellular carcinoma in cirrhosis: a case-control study. *Gastroenterology* 1996;111:199-205
- 38 Tsubota A, Chayama K, Ikeda K, Yasuji A, Koida I, Saitoh S, Hashimoto M, Iwasaki S, Kobayashi M, Hiromitsu K. Factors predictive of response to interferon-alpha therapy in hepatitis C virus infection. *Hepatology* 1994;19:1088-1094
- 39 Stuyver L, Wyseur A, van Arnhem W, Lunel F, Laurent-Puig P, Pawlotsky JM, Kleter B, Bassit L, Nkengasong J, van Doorn LJ. Hepatitis C virus genotyping by means of 5' -UR/core line probe assays and molecular analysis of untypeable samples. *Virus Res* 1995;38:137-157
- 40 Tran PH, Peiffer DA, Shin Y, Meek LM, Brody JP, Cho KW. Microarray optimizations: increasing spot accuracy and automated identification of true microarray signals. *Nucleic Acids Res* 2002;30:e54
- 41 Efron B, Tibshirani R. Empirical bayes methods and false discovery rates for microarrays. *Genet Epidemiol* 2002;23:70-86
- 42 Yuen T, Wurmbach E, Pfeffer RL. Accuracy and calibration of commercial oligonucleotide and custom cDNA microarrays. *Nucleic Acids Res* 2002;30:e48

## World Journal of Gastroenterology 排版印刷

《World Journal of Gastroenterology, WJG》全文模板设计从书眉、栏目、题名、作者、作者单位、基金资助、通讯作者、E-mail、电话、传真、收稿日期、接受日期、摘要、文献著录格式、一级标题字体、二级标题字体、图、表、参考文献, 均制订了统一的字体及格式要求, 每篇文章结束后不再续接其他文章, 适用于摘要数据库、ASP、XML、PDF 格式的要求. WJG 使用的排版软件为国际流行的 PageMaker 软件, 可自动生成 ASP、XML、PDF, 为 WJG 进入电子版格式起到了重要的作用. WJG 出片为进口片, 黑白和彩色印刷用海德堡彩色印刷, 采用三面刀剪切. 北京科信印刷厂承担 WJG 印刷业务, 一条龙服务, 包括出片、打样、装订前书样, 全部送杂志社审核, 达到标准后才能印刷和装订. WJG 出版后, 赠送给国内外专家, 他们认为 WJG 封面、内文印刷和装订可与国际著名期刊相媲美.