

具有不同酶活性并可抵抗特异shRNA降解的 nm23-H1真核表达载体的构建和表达

鲁战胜 郭丽丽 李林 吴志浩 周清华

【摘要】背景与目的 已有的研究证明nm23-H1基因是一个重要的肿瘤转移抑制基因，但其抑制肿瘤转移的生化机理尚不完全清楚。Nm23-H1基因结构和功能异常与肿瘤的侵袭转移有密切关系。我们前期已构建了nm23-H1的短发夹RNA (short hairpin RNA, shRNA) 载体以及可抵抗此shRNA降解的nm23-H1的cDNA的表达载体，在此基础上我们欲应用基因定点突变技术构建具有不同酶活性并能抵抗此shRNA降解的nm23-H1cDNA真核表达载体，并通过恢复实验验证其表达，为进一步研究肿瘤抑制基因nm23-H1的分子机制提供理论基础和实验依据。方法 以pcDNA3.1(+)-shRNA-resistant-nm23-H1质粒为突变模板，应用重叠延伸PCR方法引入nm23-H1基因四个单点突变和一个联合位点突变，并将突变基因片段克隆到真核表达载体pcDNA3.1Hygro(+).将突变质粒转染人肺腺癌细胞株A549/nm23-H1-shRNA (稳定沉默nm23-H1基因)，利用Western blot技术验证不同突变体nm23-H1蛋白的表达。结果 成功构建了shRNA抵抗的nm23-H1^{S44A}、nm23-H1^{P96S}、nm23-H1^{H118F}、nm23-H1^{S120G}、nm23-H1^{P96S-S120G}五个突变型真核表达载体，经DNA序列分析突变的碱基序列与实验设计完全一致，经Western blot验证nm23-H1蛋白表达正常。结论 成功构建了五个具有不同突变位点的shRNA抵抗的nm23-H1基因真核表达载体，并且突变蛋白质nm23-H1表达正常，同时也表明重叠延伸PCR技术是一种高效、便捷、经济的DNA定点突变方法。

【关键词】 Nm23-H1; 重叠延伸PCR; 定点突变; Western blot

Construction and Expression of nm23-H1 Gene with Different Enzyme Activities and Resistant Specific shRNA in Eukaryotic Expression Vector

Zhansheng LU, Lili GUO, Lin LI, Zhihao WU, Qinghua ZHOU

Tianjin Key Laboratory of Lung Cancer Metastasis and Tumor Microenvironment, Tianjin Lung Cancer Institute, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin 300052, China

Corresponding author: Qinghua ZHOU, E-mail: zhouqh135@163.com;

Zhihao WU, E-mail: zwu2ster@gmail.com

【Abstract】 Background and objective It has been proven that nm23-H1 gene was a tumor metastatic suppressor gene. However, it's molecular mechanism of suppressing metastasis remains unexplored. There is a closely relationship between the abnormality of structures and functions of nm23-H1 gene, and cancer invasion and metastasis. We have constructed the vector with nm23-H1-shRNA and the vector with nm23-H1cDNA resistant to the specific shRNA. So, we plan to construct shRNA-resistant eukaryotic expression vector of nm23-H1 gene by site-directed mutagenesis, rescue experiment was performed to verify the nm23-H1 gene expression, and to provide basement for studying the biochemical mechanisms of nm23-H1 gene. Methods Site-directed mutagenesis of nm23-H1 gene was performed by overlap extension PCR method. Pure plasmid containing gene of nm23-H1 (shRNA-resistant) was prepared. The desired five mutations were constructed and cloned into the eukaryotic vector pcDNA3.1Hygro(+). The human lung adenocarcinoma cell A549/nm23-H1-shRNA (stable nm23-H1 gene silencing) was transfected with the five mutants, and the expression of the mutant proteins was determined by Western blot. Results Five eukaryotic expression vectors (shRNA-resistant) of nm23-H1, nm23-H1^{S44A}, nm23-H1^{P96S}, nm23-H1^{H118F}, nm23-H1^{S120G}, nm23-H1^{P96S-S120G}, were successfully constructed. The results of DNA sequencing confirmed that the base sequences

本研究受国家“973”重大项目(2010CB529405)、国家“863”重大项目(No.2012AA02A502和No.2012AA02A201)、国家自然科学基金面上项目(No.81272359)和中瑞国际合作项目(No.09ZCZDSF04100)资助

作者单位: 300052 天津, 天津市肺癌转移与肿瘤微环境重点实验室, 天津市肺癌研究所, 天津医科大学总医院(通讯作者: 周清华, E-mail: zhouqh135@163.com; 吴志浩, E-mail: zwu2ster@gmail.com)

of the genes were completely concordant with experiment design. The expression of nm23-H1 mutant proteins was verified by Western blot. **Conclusion** Five eukaryotic expression vectors (shRNA-resistant) of *nm23-H1* gene were successfully constructed, and the mutant proteins were verified. The site-directed mutagenesis technical of overlap extension PCR is a efficient, simple and economical method.

【 Keywords 】 Nm23-H1; Overlap extension PCR; Site-directed mutagenesis; Western blot

This work was partly supported by the grants from Major State Basic Research Development Program of China (to Qinghua ZHOU)(No.2010CB529405), National High Technology Research and Development Program of China (to Qinghua ZHOU)(No.2012AA02A502 and 2012AA02A201), National Natural Science Foundation of China (to Zhihao WU)(No.81272359) and China-Sweden International Cooperative Foundation (to Qinghua ZHOU)(No.09ZCZDSF04100).

*Nm23-H1*基因是第一个被发现的重要的肿瘤转移抑制基因,为*nm23*基因家族8个成员之一^[1,2],该基因与人类多种肿瘤的侵袭转移密切相关。已有的研究表明:*nm23-H1*具有多种酶的活性^[3-6],其44位丝氨酸的磷酸化水平与其肿瘤转移抑制功能有关;118位的组氨酸突变为苯丙氨酸,丧失核苷二磷酸激酶活性,但不影响其肿瘤抑制功能;96位的脯氨酸突变为丝氨酸和120位的丝氨酸突变为甘氨酸则保留了核苷二磷酸激酶活性,丧失了组氨酸依赖的蛋白磷酸转移酶活性,其不同特定碱基的突变改变了其蛋白酶活性并影响到肿瘤的生物行为。为此,本研究应用重叠延伸PCR方法构建shRNA(NM_000269.x-99s1c1:GCGTACCTTCATTGCGATCAA)抵抗的*nm23-H1*^{S44A}、*nm23-H1*^{P96S}、*nm23-H1*^{H118F}、*nm23-H1*^{S120G}、*nm23-H1*^{P96S-S120G}五个突变型真核表达载体并验证其表达,从而为进一步揭示*nm23-H1*基因在肿瘤信号传导通路的分子机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料 pcDNA3.1Hygro(+)由本实验室保存;菌种大肠杆菌DH5 α 购自北京全式金生物技术有限公司;pcDNA3.1(+)-shRNA-resistant-*nm23-H1*由本实验室构建;PCR反应试剂盒购自Roche公司;Goldview购自北京赛百盛公司;质粒提取试剂盒、PCR产物纯化试剂盒、凝胶回收试剂盒、DNA连接试剂盒均购自QIAGEN公司;限制性内切酶*Bam*H1、*Xba*1购自NEB公司;核酸Marker购自美国Fermentas公司;*nm23-H1*鼠单抗、 β -actin鼠单抗购自CST公司;其他试剂均为国产或进口分析纯;引物合成及DNA测序均由华大基因公司完成。

1.2 方法

1.2.1 质粒提取 摇菌扩增质粒,HiSpeed Plasmid Midi Kit提取质粒,紫外分光光度仪测定质粒浓度及纯度。

1.2.2 引物设计 包括侧翼引物和突变引物(表1和

表2),根据GenBank报道的*nm23-H1*cDNA序列号(X17620)、重叠延伸PCR定点突变原理、*nm23-H1*基因shRNA抵抗突变碱基序列及载体pcDNA3.1Hygro(+)图谱,利用Oligo7软件共设计1对侧翼引物及4对突变引物。侧翼引物上游酶切位点*Bam*H1:GGATCC,下游酶切位点*Xba*1:TCTAGA;4个突变点分别为44位的丝氨酸(TCC)突变为丙氨酸(GCC)S44A,96位的脯氨酸(CCT)突变为丝氨酸(TCT)P96S,118位的组氨酸(CAT)突变为苯丙氨酸(TTT)H118F,120位的丝氨酸(AGT)突变为甘氨酸(GGT)S120G。

1.2.3 突变反应 每个待突变位点需要3个PCR反应来完成。首先以质粒pcDNA3.1(+)-shRNA-resistant-*nm23-H1*为模板,正向侧翼引物F和突变引物Rm为上下游引物进行PCR扩增(PCR1),扩增突变位点及其上游序列的DNA片段,产物命名P1,同时也以质粒pcDNA3.1(+)-shRNA-resistant-*nm23-H1*为模板,以突变引物Fm和反向侧翼引物R为上下游引物进行PCR扩增(PCR2),扩增含突变位点及其下游序列的DNA片段,产物命名为P2。最后取P1和P2各1 μ L为模板,以正、反向侧翼引物F和R为上下游引物进行第3次PCR扩增(PCR3),用外侧引物将P1和P2拼接而成含突变位点的目的产物。PCR反应总体积均为25 μ L:10 \times Buffer 2.5 μ L, Taq DNA polymerase 0.5 μ L, dNTPs (10 mM) 1 μ L, 正、反向引物 (20 μ M) 各0.5 μ L, 模板质粒pcDNA3.1(+)-shRNA-resistant-*nm23-H1* (230 ng/ μ L) 0.5 μ L, 模板P1、P2各1 μ L, 余用双蒸水补足。PCR循环条件均为94 $^{\circ}$ C预变性2 min;94 $^{\circ}$ C变性30 s,60 $^{\circ}$ C退火30 s,72 $^{\circ}$ C延伸45 s,共30个循环;末次循环后,72 $^{\circ}$ C再延伸8 min,4 $^{\circ}$ C终止循环。用PCR产物纯化试剂盒将第3次PCR循环结束后产物纯化,经1%琼脂糖凝胶电泳鉴定(图1),与目的片段大小(459 bp)相符,在*nm23-H1*^{H118F}片段泳道可见一杂带,应用NDA凝胶回收试剂盒将杂带去除。

表 1 侧翼引物

Tab 1 Outside primers

Primer name	Primer sequence(5' →3')
F	(GC)GGATCCATGGCCA <u>ACTGTGAGCGAA</u>
R	(CG)TCTAGATCATT <u>CATAGATCCAGTTCGA</u>

Protective bases in brackets, the restriction sites were underlined.

表 2 突变引物

Tab 2 Mutation primers

Primer name	Primer sequence(5' →3')
Fm44	GAAATTCATGCAAGCTG(T)CCGAAGATCTTCTCAAGG
Rm44	CCTTGAGAAGATCTTCGGC(A)AGCTTGCATGAATTC
Fm96	CGGGGAGACCAACT(C)CTGCAGACTCCAAGC
Rm96	GCTTGGAGTCTGCAGA(G)GTTGGTCTCCCCG
Fm118	CAAGTTGGCAGGAACATTATAIT(CA)TGGCAGTGATTCTGTGGAGA
Rm118	TCTCCACAGAATCACTGCCAAA(TG)TATAATGTTCTGCCAACTTG
Fm120	GGAACATTATACATGGCG(A)GTGATTCTGTGGAGAGT
Rm120	ACTCTCCACAGAATCAC(C)GCCATGTATAATGTTCC

Normal bases in brackets, the bases for substitutions were underlined.

1.2.4 联合位点 (P96S-S120G) 突变方法 以片段大小相符的nm23-H1^{P96S}PCR纯化产物为模板进行重叠延伸PCR反应, 操作步骤同前。

1.2.5 目的基因片段与载体连接克隆 将载体pcDNA3.1Hygro(+)及PCR纯化产物进行BamH1、Xba1双酶切反应, 酶切产物再次纯化, 以DNA连接试剂盒连接过夜。连接产物转化感受态DH5α大肠杆菌。取200 μL菌液涂布于含100 μg/mL氨苄青霉素的LB平板中, 37℃摇床过夜, 挑取阳性菌落小摇。

1.2.6 转染及Western blot验证nm23-H1蛋白表达 脂质体法将shRNA抵抗nm23-H1基因重组突变质粒转染稳定沉默nm23-H1基因表达的肺癌细胞株A549/nm23-H1-shRNA, 48 h后细胞裂解后提取总蛋白, 测定浓度后进行12%SDS-PAGE电泳。100 V转膜1 h, 抗nm23-H1和β-actin一抗4℃孵育过夜, 洗膜后室温二抗孵育1 h, ECL显影。

2 结果

2.1 突变载体菌液PCR鉴定 取菌液1 μL为模板, 以侧翼正、反向引物为上下游引物进行PCR扩增反应, 产物行1%琼脂糖凝胶电泳检测, 所得片段与目的基因大小(459 bp)相符(图2)。

2.2 突变载体DNA测序结果 构建的4个单点突变型和1个联合位点突变型抗shRNA nm23-H1基因, 经DNA测序验证, 碱基突变结果与预期完全一致, 抗shRNA碱基序列未发生改变(图3)。

2.3 shRNA抵抗nm23-H1基因重组突变质粒转染恢复实验 将shRNA抵抗nm23-H1基因重组突变质粒转染稳定沉默nm23-H1基因表达的肺癌细胞株A549/nm23-H1-shRNA, 48 h后收获细胞蛋白作Western blot检测, 显示恢复了

nm23-H1蛋白的正常表达(图4)。

3 讨论

基于PCR方法的定点突变是指在基因的特定位置引入突变, 有目的改变DNA序列中的碱基, 是研究基因蛋白质结构与功能之间关系的有力工具^[7,8]。重叠延伸PCR技术采用互补引物, 使PCR产物之间形成重叠链, 从而在随后的扩增反应中通过重叠链的延伸将不同来源的扩增片段拼接起来, 其成功的关键在于突变引物的设计, 重叠部分应设计20个碱基左右, 并且使引物的Tm值彼此接近。此技术利用PCR可以在体外进行有效的基因重组, 并可在侧翼引物加入限制性酶切位点, 可以将突变成功的基因片段克隆到目的载体上, 比依靠试剂盒内切酶消化^[9]的基因突变方法灵活、经济, 后者需要事先克隆载体且后期筛选假阳性率高。重叠延伸PCR几乎没有任何特殊条件的限制, 而且成功率很高, 可利用这一技术很快获得其他依靠内切酶消化的方法难以得到的产物, 因此运用非常广泛。本实验即是利用该技术通过设计突变引物和侧翼引物, 并在侧翼引物加入酶切位点成功克隆到四个单点定点突变载体和一个联合位点突变载体, 经验证与预期相符。

Nm23基因是美国国立癌症研究所的Steeg^[1]等于1988年用消减杂交分离的方法筛选7个K-1735小鼠黑色素瘤细胞株时发现并分离出来的cDNA克隆, 显示在2个低转移细胞株中其mRNA表达较另外5个高转移细胞株高10倍, 随后在蛋白水平的检测中也有类似发现。Nm23基因是一个具有高度同源性的保守基因家族, 广泛存在于细菌、酵母、植物、果蝇、鼠及人类在内的众多生物物种之中。迄今人类nm23基因家族已经发现8个成员, 即

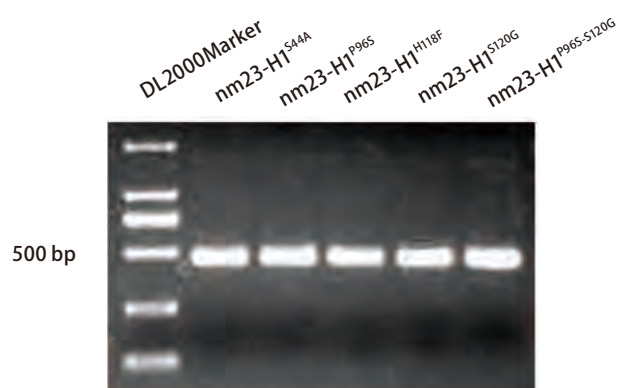
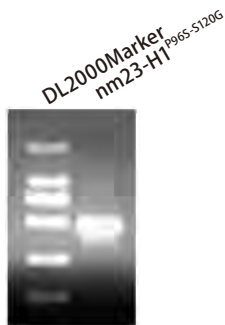
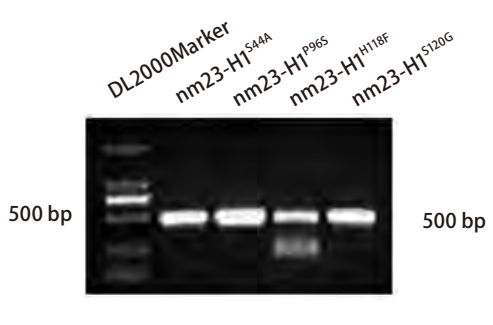


图1 PCR结果

Fig 1 PCR amplification products were obtained by an overlap extension PCR

图2 菌液PCR电泳结果

Fig 2 PCR amplification products from the bacteria

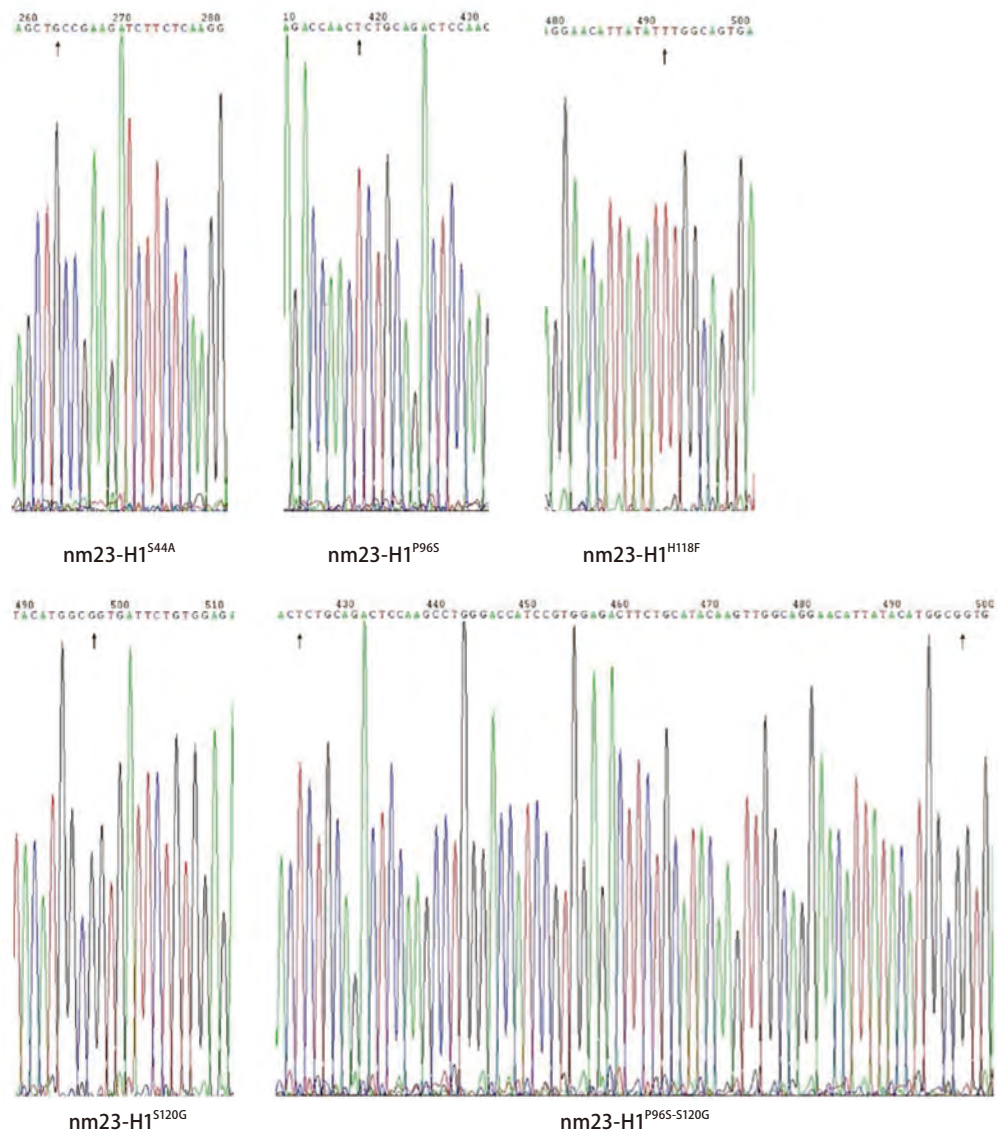


图3 测序结果

Fig 3 Results of sequencing

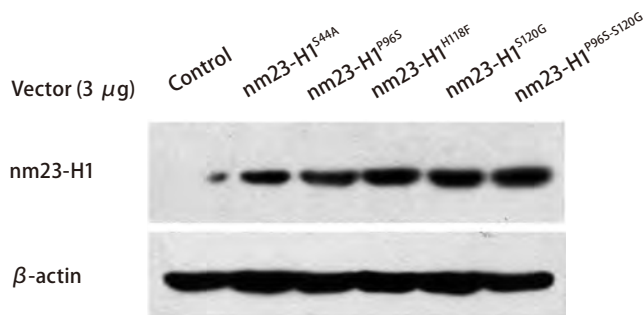


图4 A549/nm23-H1-shRNA细胞基因重组质粒恢复实验, 与对照组相比 nm23-H1基因重组质粒转染组重现nm23-H1蛋白的正常表达

Fig 4 shRNA rescue experiment in A549/nm23-H1-shRNA cells analyzed by Western blot

nm23-H1至nm23-H8。其中nm23-H1亚型与人类肿瘤的发生、发展的关系最为密切, 其mRNA由533个核苷酸组成, 产生的蛋白质含有152个氨基酸, 编码核苷二磷酸激酶-A (NDPK-A), 分子量约为17 kDa, 该基因具有抑制肿瘤转移潜能而不影响肿瘤大小的能力^[10]。

侵袭转移是恶性肿瘤的重要生物学特征, 也是导致肿瘤患者死亡的主要原因。Nm23-H1是第一个被发现的重要的肿瘤转移抑制基因, 其抑制肿瘤侵袭转移的能力在多种肿瘤细胞实验中得到了证实, 因此其抑制肿瘤侵袭转移作用的分子机理研究得到了持续的关注。同样在肺癌的基础研究中, nm23-H1基因被证明起着“转移抑制级联”^[11,12]的作用, 作为靶基因通过级联效应调节下游基因的表达从而抑制肺癌细胞的侵袭转移表型, 精细调控着细胞的多种生理功能, 但其在抑制肺癌侵袭转移能力方面的分子机制尚未阐明。

本实验室研究工作已经证明肿瘤转移抑制基因nm23-H1低表达、杂合性缺失和突变与肺癌的高转移性和预后不良密切相关, 其编码蛋白核苷二磷酸激酶-A的酶活性可能在抑制肺癌侵袭转移方面起着重要作用。而已有的研究^[11-19]表明nm23-H1基因编码蛋白具有3'→5'核酸外切酶、核苷二磷酸激酶和组氨酸蛋白激酶等多种酶的活性, 并且相关研究显示, 突变的nm23-H1基因蛋白在细胞的生长、分化及信号传导方面具有多种功能, 其44位丝氨酸的磷酸化水平与其肿瘤转移抑制功能有关; 118位的组氨酸突变为苯丙氨酸, 丧失核苷二磷酸激酶活性, 但不影响其肿瘤抑制功能; 96位的脯氨酸突变为丝氨酸和120位的丝氨酸突变为甘氨酸则保留了核苷二磷酸激酶活性, 丧失了组氨酸依赖的蛋白磷酸转移酶活性。本研究通过设计五个定点突变来改变其上述的相关

酶活性, 以shRNA抵抗的nm23-H1cDNA为模板利用重叠延伸PCR技术构建了shRNA抵抗的四个单点突变载体和一个联合位点突变载体, 经鉴定符合预期要求, 并验证了其蛋白表达, 为下一步转染shRNA抵抗的A549肺癌细胞株^[17]研究nm23-H1基因在肿瘤转移抑制及细胞信号传导中的生化机制奠定了基础。

参考文献

- 1 Steeg PS, Bevilacqua G, Kopper L, et al. Evidence for a novel gene associated with low tumor metastatic potential. J Natl Cancer Inst, 1988, 80(3): 200-204.
- 2 Polakis P. Wnt signaling and cancer. Gene Dev, 2000, 14(15): 1837-1851.
- 3 Ma D, McCorkle JR, Kaetzel DM. The metastasis suppressor nm23-H1 possesses 3'-5' exonuclease activity. J Biol Chem, 2004, 279(17): 18073-18084.
- 4 Wagner PD, Vu ND. Phosphorylation of ATP-citrate lyase by nucleoside diphosphate kinase. J Biol Chem, 1995, 270(37): 21758-21764.
- 5 Wagner PD, Steeg PS, Vu ND. Two-component kinase-like activity of nm23 correlates with its motility-suppressing activity. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94(17): 9000-9005.
- 6 Wagner PD, Vu ND. Histidine to aspartate phosphotransferase activity of nm23 proteins: phosphorylation of aldolase C on Asp-319. Biochem J, 2000, 346 Pt 3: 623-630.
- 7 Ho SN, Hunt HD, Horton RM, et al. Site-directed mutagenesis by overlap using the polymerase chain reaction. Gene, 1989, 77(1): 51-59.
- 8 Heckman KL, Pease LR. Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension. Nat Protoc, 2007, 2(4): 924-932.
- 9 Zhu DX, Zhou QH, Wang YP, et al. Construction of human nm23-H1 mutant and EGFR fusion genes using site-directed mutagenesis. Zhongguo Fei Ai Za Zhi, 2006, 9(2): 117-123. [朱大兴, 周清华, 王艳萍, 等. 利用定点突变技术构建nm23-H1和EGFR融合基因. 中国肺癌杂志, 2006, 9(2): 117-122.]
- 10 Leone A, Flatow U, King C, et al. Reduced tumour incidence metastatic potential and cytokine responsiveness of nm23 transfected melanoma cells. Cell, 1991, 65(1): 25-35.
- 11 Che GW, Zhou QH, Zhu W, et al. Molecular mechanism of reversing metastatic phenotype in human high-metastatic large cell lung cancer cell line L9981 by nm23-H1. Ai Zheng, 2005, 24(3): 278-284. [车国卫, 周清华, 朱文, 等. nm23-H1基因逆转人高转移大细胞肺癌细胞L9981转移表型的分子机制. 癌症, 2005, 24(3): 278-284.]
- 12 Nie Q, Zhu W, Liu LX, et al. The mechanism and influence on the biological behavior of human high-metastatic large cell lung cancer cell lines with transfection of nm23-H1 gene. Zhongguo Fei Ai Za Zhi, 2008, 11(3): 349-353. [聂强, 朱文, 刘伦旭, 等. nm23-H1基因转染对人高转移大细胞肺癌细胞株生物学行为的影响及作用机理. 中国肺癌杂志, 2008, 11(3): 349-353.]
- 13 MacDonald NJ, De La Rosa A, Benedict MA, et al. A serine phosphorylation of Nm23, and not its nucleoside diphosphate kinase

- activity, correlates with suppression of tumor metastatic potential. *J Biol Chem*, 1993, 268(34): 25780-25789.
- 14 Freije JM, Blay P, MacDonald NJ, *et al.* Site-directed mutation of Nm23-H1 mutations lacking motility suppressive capacity upon transfection are deficient in histidine-dependent protein phosphotransferase pathways *in vitro*. *J Biol Chem*, 1997, 272(9): 5525-5532.
- 15 Lee HY, Lee H. Inhibitory activity of nm23-H1 on invasion and colonization of human prostate carcinoma cells is not mediated by its NDP kinase activity. *Cancer letters*, 1999, 145(1): 93-99.
- 16 Hamby CV, Abbi R, Prasad N, *et al.* Expression of a catalytically inactive H118Y mutant of nm23-H2 suppresses the metastatic potential of line IV Cl 1 human melanoma cells. *Int J Cancer*, 2000, 88(4): 547-553.
- 17 Cho SJ, Lee NS, Jung YS, *et al.* Identification of structural domains affecting transactivation potential of Nm23. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 289(3): 738-743.
- 18 Kim Y I, Park S, Jeoung D I, *et al.* Point mutations affecting the oligomeric structure of Nm23-H1 abrogates its inhibitory activity on colonization and invasion of prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 307(2): 281-289.
- 19 Luo M, Zhu DX, Gong L, *et al.* Lentivirus-mediated stable silencing of *nm23-H1* gene in lung cancer cells and the influence on biological behavior. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi*, 2012, 15(3): 139-145. [罗猛, 朱大兴, 弓磊, 等. 慢病毒介导的稳定沉默*nm23-H1*基因的肺癌细胞株的建立及生物学行为改变. *中国肺癌杂志*, 2012, 15(3): 139-145.]

(收稿: 2013-12-12 修回: 2013-12-28)

(本文编辑 南娟)



Cite this article as: Lu ZS, Guo LL, Li L, *et al.* Construction and expression of *nm23-H1* gene with different enzyme activities and resistant specific shRNA in eukaryotic expression vector. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi*, 2014, 17(3): 183-188. [鲁战胜, 郭丽丽, 李林, 等. 具有不同酶活性并可抵抗特异shRNA降解的*nm23-H1*真核表达载体的构建和表达. *中国肺癌杂志*, 2014, 17(3): 183-188.] doi: 10.3779/j.issn.1009-3419.2014.03.01.

· 消息 ·

《中国肺癌杂志》入选《中文核心期刊要目总览》

日前,《中国肺癌杂志》入选《中文核心期刊要目总览》2011年版(即第六版)之临床医学/特种医学类核心期刊。这是《中国肺癌杂志》继2010年被Medline/PubMed收录以来获得的又一成绩。

《中文核心期刊要目总览》(以下简称《总览》)由北京大学图书馆和北京高校图书馆期刊工作研究会共同主持,已于1992年、1996年、2000年、2004年、2008年出版过五版,主要是为图书情报部门对中文学术期刊的评估与订购、为读者导读提供参考依据。为了及时反映中文期刊发展变化的新情况,课题组认真总结了前五版的研制经验,对核心期刊评价的基础理论、评价方法、评价软件、核心期刊的作用与影响等问题进行了深入研究,在此基础上,进一步改进评价方法,使之更加科学合理,力求使评价结果尽可能准确地揭示中文期刊的实际情况。第六版版核心期刊定量评价,采用了被索量、被摘量、被引量、他引量、被摘率、影响因子、被国内外重要检索工具收录、基金论文比、Web下载量等9个评价指标,选作评价指标统计源的数据库及文摘刊物达60余种,统计文献量达221,177余篇次(2006年-2008年),涉及期刊14,400余种。本版还加大了专家评审力度,8,200多位学科专家参加了核心期刊评审工作。经过定量评价和定性评审,从我国正在出版的中文期刊中评选出1,980余种核心期刊,分属七大编73个学科类目。《中国肺癌杂志》同时被《中国科技期刊引证报告》和《中文核心期刊要目总览》收录,成为“双核心”期刊,并被国际主要检索系统Medline/PubMed、EMBASE等收录,这标志着《中国肺癌杂志》迈上了一个新台阶。