

聚乙二醇作为乙型肝炎病毒 DNA 疫苗佐剂的体外试验

王军朋^{1,2#}, 芦丽滢^{1,2#}, 宋红利³, 杨永杰^{1,2}, 马远方^{1,2*}

(河南大学,¹ 医学院细胞与分子免疫学重点实验室,² 免疫研究所,³ 体育学院, 开封 475001)

摘要:【目的】研究聚乙二醇作为佐剂是否能够增强 HBV DNA 疫苗体液和细胞免疫效果。【方法】我们将乙型肝炎病毒 (HBV) DNA 疫苗 (pVAX-S2) 单独或 PEG/pVAX-S2 免疫 C57BL/6J 小鼠, 在最后一次免疫 14 d 检测抗-HBs IgG、T 淋巴细胞增殖、细胞因子表达及体内细胞毒 T 淋巴细胞杀伤作用 (CTL) 等免疫学指标。【结果】结果表明, 与仅免疫 pVAX-S2 比, PEG/pVAX-S2 能够增加免疫小鼠抗-HBs IgG 水平; 混合免疫组的 T 淋巴细胞体外经乙肝表面抗原 (HBsAg) 刺激后, T 淋巴细胞增殖数量显著高于对照组; 另外, 混合免疫组 CD4 + T 淋巴细胞中 IL-4 和 IFN- γ 以及 CD8 + T 淋巴细胞中 IFN- γ 的表达显著高于对照组。更重要的是, 混合免疫组 HBsAg 特异性 CTL 显著高于对照组。【结论】总之, 我们首次证明 PEG 作为佐剂不仅能够增强体液免疫反应和细胞免疫反应, 而且能够显著增强体内 CTL 的杀伤活性, 为 HBV DNA 的进一步研究奠定了基础。

关键词: 聚乙二醇; 乙型肝炎病毒 (HBV) DNA 疫苗; 体液免疫反应; 细胞免疫反应

中图分类号: R392 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 07-0949-06

乙型病毒性肝炎是由乙型肝炎病毒 (HBV) 引起的严重危害人类健康的传染性疾病之一, 在各国均有流行, 我国属高流行区。据统计, 我国现有 HBsAg 携带者超过 1.3 亿, 占全国人口的 10%, 其中每年死于慢性 HBV 感染者约 100-200 万^[1-2]。乙肝除暴发性肝炎外主要危害在于感染后变为慢性病毒携带者, 发展成为慢性肝炎。HBV 的持续感染将最终导致部分患者发展为肝硬化甚至肝癌^[1-2]。慢性 HBV 患者的持续性感染的重要原因是细胞免疫反应减弱特别是 IFN- γ 表达降低和 CTL 杀伤作用减弱。HBV DNA 疫苗能够诱发机体产生强的细胞免疫反应, 尤其是能够激发产生 CTL 反应有利于 HBV 的清除, 因此 DNA 疫苗是最具有前景的一种治疗慢性 HBV 携带者的治疗性疫苗^[3]。目前, 如何增强 HBV DNA 疫苗的免疫效果已成为 HBV 治疗

和疫苗的研究热点。

聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 是一种无活性、安全无毒的水溶性高分子。研究已经证实肽或蛋白质的聚乙二醇化, 能够延缓其半衰期, 增加其水溶性和稳定性, 这些结果提示聚乙二醇或许可以作为递送系统减少肽或蛋白质的降解^[4-5], 但其是否能够作为佐剂增强 DNA 疫苗的免疫效果, 至今还没有研究。本研究将 HBV DNA 疫苗溶于 PEG 形成 PEG/DNA 疫苗复合物后免疫小鼠, 观察 PEG 对 HBV DNA 疫苗的体液和细胞免疫的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂: 构建核酸疫苗的真核表达质粒载体 pVAX1 购自于美国 Invitrogen 公司, 感受态细胞

基金项目: 河南大学科研启动基金

* 通信作者。Tel/Fax: +86-378-3880398; E-mail: mayf@henu.edu.cn

作者简介: # 对本文有同等贡献。王军朋 (1979-), 男, 博士, 河南许昌人, 副教授, 主要从事分子免疫与免疫调节, E-mail: jpwangchina@henu.edu.cn; 芦丽滢 (1979-), 女, 河南平顶山人, 硕士研究生, 主要从事分子免疫学, E-mail: happyllg@yahoo.cn

收稿日期: 2009-12-03; 修回日期: 2010-02-03

DH5 α 和真核表达细胞 293T 均由本实验室保存。羊抗鼠 IgG2a 和 IgG1 为 Southern Biotechnology Associate 公司产品;兔 IgG、牛血清白蛋白(BSA)、羧基荧光素二醋酸琥珀酰亚胺脂(CFSE)、PEG400、莫能菌素、多聚甲醛和皂素均为 Sigma 公司产品;Lipofectamine 2000 转染试剂盒购自于美国 Invitrogen 公司;质粒大量提取试剂盒购于 BBI 公司;荧光标记的单克隆抗体 CD4, CD8, IL-4, IFN- γ , 及 Fc γ 抗体购自 Biolegend 公司;胎牛血清和 RPMI1640 购自于 GIBCO 公司;HBsAg 由华北制药集团提供;HBsAg 特异性 CTL 多肽 S208 - 215 (ILSPFLPL) 和无关的肽 OVA (S323 ~ 339) 由上海吉尔生化有限公司合成;抗-HBs ELISA 试剂盒购自北京金豪生物技术有限公司。

1.1.2 实验动物:6 - 8 周龄 C57BL/6 雌性小鼠购于中国医学科学院实验动物研究所。饲养在恒温(23 \pm 1 $^{\circ}$ C), 14h: 10h 光照条件下(05:00 - 19:00h), 自由采食和饮水。

1.2 质粒 DNA 疫苗的构建与表达

将 HBV 前 S2 和 S 区构建与真核表达载体 pVAX1 中, 具体构建方法如文献所述^[6], 命名为 pVAX-S2。应用质粒大量提取试剂盒提取质粒 pVAX-S2 并用 PEG8000 纯化, 最后定量为 1 μ g/ μ L, 保存于 -20 $^{\circ}$ C 备用。为了证明其是否在真核细胞中能够正确表达, 按 Lipofectamine 2000 转染试剂盒说明书的操作步骤, 将 pVAX-S2 瞬时转染到 293T 细胞。在转染后 72 h 收获细胞。用 Trizol (一步法) 提取细胞总 RNA, 反转录得到 cDNA, 然后用 S2 特异性引物进行 PCR 检测 293T 细胞中是否有 S2 基因的表达。

1.3 PEG/pVAX-S2 混合物的制备

将大量提取的 pVAX-S2 质粒用 1/10 体积 3 mol/L NaAc 和 2 倍体积的无水乙醇沉淀, 沉淀后的质粒用 75% 乙醇洗涤并与空中风干后, 将 pVAX-S2 溶解于 PEG400 中, 最后定量为 1 μ g/ μ L。

1.4 动物分组及处理方法

随机将 6 - 8 周龄雌性 C57BL/6 小鼠分为 3 组, 每组 8 只。设空载体为对照组, 实验组分别为肌肉注射 100 μ gPEG/pVAX-S2 混合物组和仅注射 pVAX-S2。分别在第 0、2、4 周进行免疫, 在最一次免疫 14d 处死小鼠检测各项免疫学指标。

1.5 ELISA 检测 IgG

抗-HBs IgG 浓度的检测: 抗-HBs 特异性的 IgG 浓度按北京金豪生物技术有限公司抗-HBs ELISA

试剂盒说明书完成。

1.6 CFSE 法检测 T 淋巴细胞增殖

小鼠最后一次免疫后 14 d, 麻醉状态下处死小鼠, 无菌条件下分离小鼠脾淋巴细胞, 通过尼龙柱纯化 T 淋巴细胞, 调整 T 淋巴细胞浓度为 1×10^7 个/mL, 活细胞数 > 90%。然后添加 1 μ mol/L 的 CFSE 染色, 染色 15 min 后用含有 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基终止反应并洗 5 次, 以除去多余 CFSE, 最后将细胞浓度调整为 1×10^6 个/mL, 取 100 μ L 的细胞悬液加入到 96 孔细胞培养板上, 然后加入终浓度 5 mg/L HBsAg 为实验组, 每组设 3 个重复孔, 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 培养 72 h 后, 通过流式细胞仪 (FACS) (BD 公司) 检测和 Flow Jo 分析 T 淋巴细胞增殖情况。

1.7 FACS 检测细胞因子表达情况

小鼠最后一次免疫后 14 d, 麻醉状态下处死小鼠, 无菌条件下分离脾细胞并通过尼龙柱纯化 T 淋巴细胞, 制成单细胞悬液, 调整细胞浓度为 1×10^6 个/mL, 每孔加入 100 μ L 的细胞悬液到 96 孔细胞培养板上, 加入终浓度 5 mg/L HBsAg 为实验组, 每组设 3 个重复孔, 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 培养, 培养 48 h 后, 离心收集细胞, 加入抗 Fc γ 抗体封闭, 4% 多聚甲醛固定 10 min, 0.1% 皂素破膜 8 min, PBS 洗 2 次, 直接加入荧光单克隆抗体 CD4-FITC, CD8-FITC, IL-4-PE, IFN- γ -PE, 4 $^{\circ}$ C 染色 45 min 并设相应的同型对照, 最后取样品进行 FACS 检测和 Flow Jo 分析细胞因子表达情况。

1.8 FACS 检测体内 CTL 杀伤活性^[7]

在小鼠最后一次免疫后 14 d, 取正常未免疫小鼠脾淋巴细胞, 如文献所述^[8], 制成单细胞悬液, 分成二等份: 一份为特异性刺激靶细胞, 加入 10^{-6} mol/L 乙肝 S 抗原特异性短肽 (S208 - 215); 另一份为非特异性刺激靶细胞, 加入相等量的无关的肽 OVA (S323 - 339), 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 培养, 培养 4 h 后, 离心收集细胞, 特异性刺激靶细胞中加入 5 μ mol/L CFSE 和非特异性刺激靶细胞加入 0.5 μ mol/L CFSE, 染色和处理方法同上。最后将两种靶细胞等体积混合, 将 2×10^7 个靶细胞尾静脉注射到最后一次免疫 14 d 的小鼠体内, 进行体内 CTL 杀伤实验, 注射 4h 后处死小鼠, 分离脾淋巴细胞进行 FACS 检测和 Flow Jo 分析 CTL 杀伤情况。体内 CTL 杀伤率 (%) = [1 - (特异性杀伤的百分数/非特异性杀伤的百分数)] \times 100。

1.9 统计学分析

采用 *t* 检验以及单因素方差分析进行统计学分析。* : $p < 0.05$ 差异显著, ** : $p < 0.01$ 差异极显著。

2 结果

2.1 重组质粒 pVAX-S2 在真核细胞中的表达

为证明重组质粒 pVAX-S2 是否在真核细胞中表达,脂质体法转染 293T 细胞后,采用 RT-PCR 的方法检测到 S2 在 293T 细胞中能够表达。

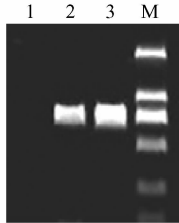


图 1 pVAX-S2 表达于真核细胞 293T

Fig. 1 Eukaryotic expression of pVAX-S2 in 293T cells. 1. RNA extracted from transfected 293T cells but not reverse transcribed as negative control; 2. RNA from transfected 293T cells and reverse transcribed into cDNA; 3. plasmids used as the positive controls; M, DL 2000.

2.2 PEG 作为佐剂对 pVAX-S2 的影响

为了证明 PEG 是否通过延缓质粒 DNA 的释放而发挥其佐剂效应,在 pVAX-S2 溶解于 PEG400 后,通过电泳检测其 PEG 是否包裹 pVAX-S2,结果显示,与 pVAX-S2 相比,其电泳速率明显降低,这说明 PEG 可以延缓质粒 pVAX-S2 的释放。

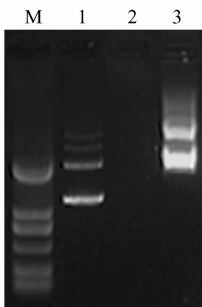


图 2 电泳检测 PEG/ pVAX-S2 复合物

Fig. 2 The detection for the complex of PEG/pVAX-S2 by electrophoresis. M. DL 2000; 1. naked pVAX-S2; 2. PEG; 3. PEG/ pVAX-S2.

2.3 抗-HBs IgG 的检测结果

在小鼠第 3 次免疫后 14d,定量 ELISA 法检测小鼠血清中抗-HBs IgG。结果显示(图 3),PEG/pVAX-S2 组抗-HBs IgG 为 323.93 ± 5.189 IU/L,显著高于仅免疫 pVAX-S2 组 (233.644 ± 15.607 IU/L) ($P < 0.05$),这说明 PEG 和 HBV DNA 疫苗

混合,能够增强体液免疫反应。

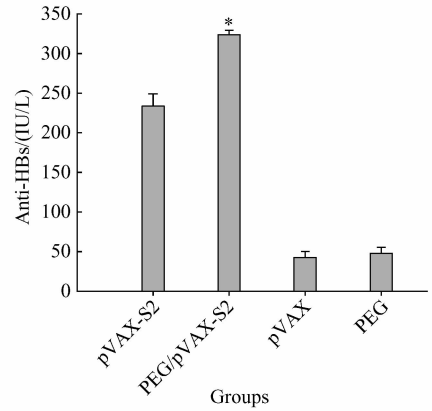


图 3 定量 ELISA 检测抗-HBs IgG 的浓度

Fig. 3 The level of anti-HBs IgG detected by quantity ELISA. * mean $P < 0.05$ PEG/pVAX-S2 groups compared to pVAX-S2 groups.

2.4 T 淋巴细胞增殖实验结果

为证明 PEG 作为佐剂对重组质粒免疫后能够诱导小鼠产生抗原特异性的细胞免疫反应,小鼠最后一次免疫后 14 d,如材料方法所示,取实验组和对

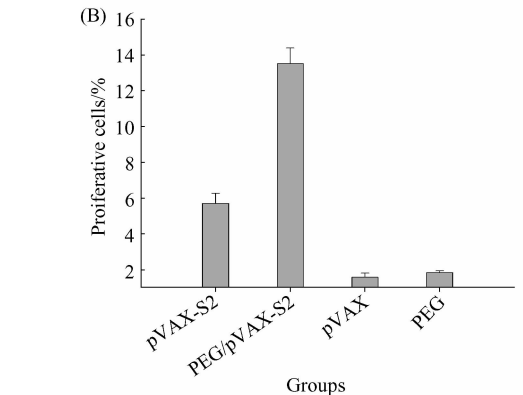
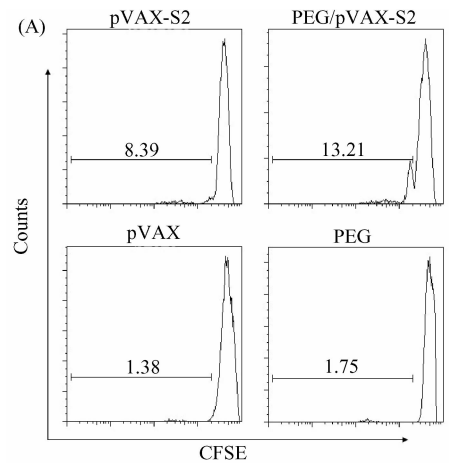


图 4 CFSE 法检测 T 淋巴细胞增殖反应

Fig. 4 The T cell proliferation reaction was detected by CFSE methods. A. One representative FACS result of three experiments is shown; B. The percentage of T cell proliferation was summarized in the means of the three independent experiments.

照组小鼠的脾细胞进行 T 淋巴细胞增殖实验。结果如图 4 所示,与仅免疫 pVAX-S2 组比,PEG/pVAX-S2 组能够显著的诱发机体产生抗原特异性 T 淋巴细胞增殖($p < 0.05$)。

综合上述结果显示,PEG 的确适合作为佐剂,进而增强 HBV DNA 疫苗的体液和细胞免疫反应。

2.5 细胞因子变化的情况检测

细胞因子在免疫反应中起着重要的免疫调节作用,因此我们想进一步研究 PEG 作为发送系统是否影响 Th 细胞的免疫反应。小鼠最后一次免疫后

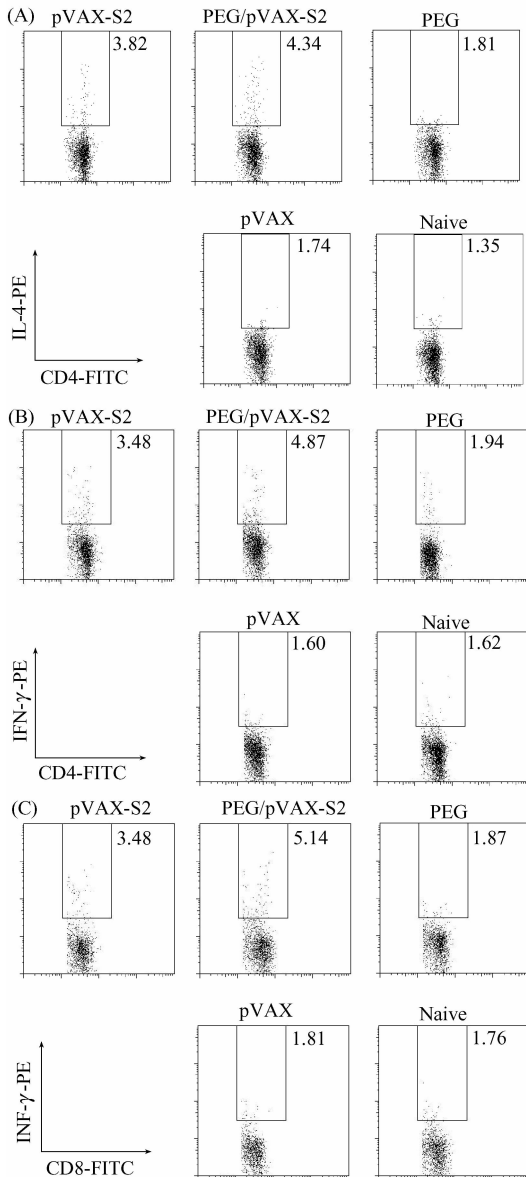


图 5 FACS 检测细胞因子在 CD4 + T 细胞和 CD8 + T 细胞的表达情况

Fig. 5 The expression of cytokines in CD4 + and CD8 + T cells were detected by FACS. The percentage of IL-4 in CD4 + (A), IFN-γ in CD4 + (B), and IFN-γ in CD8 + (C) T cells of the three independent experiments are shown.

14 d,如材料方法所示,小鼠 T 淋巴细胞经抗原处理后,与对照组比,PEG/pVAX-S2 混合组能够显著的增加 CD4 + T 细胞中 IL-4 (图 5-A) 和 IFN-γ (图 5-B) 的表达;重要的是,我们发现 PEG/pVAX-S2 混合组也能够上调 CD8 + T 细胞中 IFN-γ (图 5-C) 的表达,这有利于病毒的清除。

2.6 体内 CTL 杀伤作用的检测

对于慢性乙肝病毒携带者来说,抗原特异性 CTL 反应是清除病毒的关键因素^[9-11]。在小鼠第 3 次免疫后 14 d,通过 FACS 检测体内 CTL 杀伤作用,如图 6 所示,PEG/pVAX-S2 混合组的杀伤率为 42.76%,高于仅免疫 pVAX-S2 组(30.84%)。这说明 PEG 作为佐剂增加 HBV DNA 疫苗的体内 CTL 杀伤活性,这与 CD8 + T 细胞中产生较多的 IFN-γ 一致,这可能有利于慢性感染者体内病毒的清除。

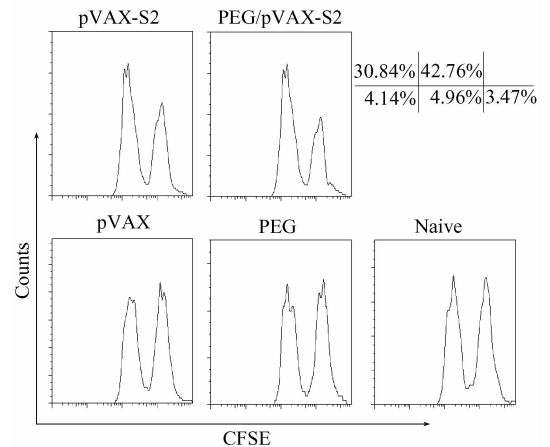


图 6 流式细胞仪检测体内 CTL 裂解活性

Fig. 6 Specific lysis of in vivo cytotoxic T lymphocyte reaction was detected by flow cytometry. The percentage of specific lysis of each group was calculated and indicated on the upper panel.

3 讨论

为了克服 HBV DNA 疫苗免疫原性低、免疫剂量大等缺点和不足,从而增强其免疫效果,国内外大量科研工作者通过不同的方式增强其免疫效果,如添加不同的细胞因子佐剂 4-1BBL,OX40L 等、prime-boost 方式、通过化学佐剂增强抗原递呈细胞(APC)递呈抗原能力、增加 DNA 进入机体的效率等^[6, 8, 12, 13]。本研究将 HBV DNA 疫苗溶于 PEG,通过琼脂糖电泳发现,PEG/DNA 复合物的迁移的速率与未包裹的质粒 DNA 相比明显降低,证明了 PEG 可以通过包裹质粒 DNA 进而保护质粒 DNA 不被降解而发挥其佐剂效应。

为了进一步证明 PEG 作为佐剂到底是否通过

递送系统影响 HBV DNA 疫苗的免疫效果,我们将 PEG/pVAX-S2 复合物与未包裹质粒 pVAX-S2 免疫小鼠,通过 ELISA 检测发现 PEG 能够增加抗-HBs IgG 的产生,同时 T 细胞增殖实验也显示 PEG/pVAX-S2 复合物的 T 细胞增殖效率也显著高于仅注射质粒 pVAX-S2。通过这些结果说明 PEG 可能是通过缓释 DNA 的方式而发挥其增强 HBV DNA 疫苗的免疫效果的佐剂效应,这将可能在基因表达与功能研究及基因治疗等领域发挥重要的作用。那么,PEG/DNA 复合物是否能够作为新的递送系统以及质粒 DNA 是否聚乙二醇化还待一步的研究。

在自然感染状态下,增强抗原特异性的 CTL 并分泌与抗病毒相关的细胞因子如 IL-2、TNF- α 及 IFN- γ , 有助于抑制或者终止病毒的持续感染^[9-11, 14]。研究结果表明,PEG 作为递送系统的方式作为佐剂增强了 HBsAg 特异性 CTL 反应,并在 CD8 + T 细胞产生了大量 IFN- γ ,暗示 PEG 作为递送系统的方式作为佐剂增强了潜在的细胞免疫反应从而达到治疗乙肝病毒的效果。是否该疫苗最终能够限制或终止慢性乙肝患者体内的病毒还需要进一步的研究。

参考文献

- [1] Lok ASF. Chronic Hepatitis B. *The New England Journal of Medicine*, 2002, 346(22) : 1682-1683.
- [2] Lee WM. Hepatitis B Virus Infection. *The New England Journal of Medicine*, 337(24) : 1733-1745.
- [3] Hui CK, Lau GK. Advances in immunomodulating therapy of HBV infection. *International Journal of Biological Sciences*, 2005, 2(1) : 24-29.
- [4] 何学令, 杨光, 张雪梅, 何杨尹. 聚乙二醇化重组人白细胞介素-6 大鼠皮下注射的药代动力学研究. 四川大学学报(医学版) [*Journal of Sichuan University (Medical Science Edition)*], 2009, 40(1) : 149-152.
- [5] 孙瑞元, 石何杨, 王江, 王华庆, 江泽飞, 朱允中, 克晓燕, 张阳, 刘云鹏, 张伟京, 王昭, 石庆芝, 谢晓冬, 张贺龙, 王杰军, 罗德云, 郑青山, 孙瑞元. 聚乙二醇化重组人粒细胞集落刺激因子预防化疗后中性粒细胞减少症的多中心随机对照 II 期临床研究. 中华医学杂志(*National Medical Journal of China*), 2006, 86(48) : 3414-3419.
- [6] Du X, Zheng G, Jin H, Kang Y, Wang J, Xiao C, Zhang S, Zhao L, Chen A, Wang B. The adjuvant effects of co-stimulatory molecules on cellular and memory responses to HBsAg DNA vaccination. *Journal of Gene Medicine*, 2007; 9(2) : 136-146.
- [7] Piriou L, Chilmonczyk C, Genetet N, Albina E. Design of a flow cytometric assay for the determination of natural killer and cytotoxic T-lymphocyte activity in human and in different animal species. *Cytometry*, 2000, 41: 289-297.
- [8] Wang J, Su B, Ding Z, Du X, Wang B. Cimetidine enhances immune response of HBV DNA vaccination via impairment of the regulatory function of regulatory T cells. *Biochemical Biophysical Research Communication*, 2008, 372(3) : 491-496.
- [9] Kakimi K, Guidotti LG, Koezuka Y, Chisari F. Natural Killer T Cell Activation Inhibits Hepatitis B Virus Replication In Vivo. *The Journal of Experimental Medicine*, 2000, 192(7) : 921-930.
- [10] Dunn C, Brunetto M, Reynolds G, Christophides T, Kennedy PT, Lampertico P, Das A, Lopes AR, Borrow P, Williams K, Humphreys E, Afford S, Adams DH, Bertolotti A, Maini MK. Cytokines induced during chronic hepatitis B virus infection promote a pathway for NK cell-mediated liver damage. *The Journal of Experimental Medicine*, 2007, 204(3) : 667-680.
- [11] Bertolotti A, Gehring AJ. The immune response during hepatitis B virus infection. *Journal of General Virology*, 2006, 87(6) : 1439-1449.
- [12] Toussaint JF, Letellier C, Paquet D, Dispas D, Kerkhofs, P. Prime-boost strategies combining DNA and inactivated vaccines confer high immunity and protection in cattle against bovine herpesvirus-1. *Vaccine*, 2005, 23(43) : 5073-5081.
- [13] 杜小刚, 康有敏, 王肖, 王军朋, 赵干, 王宾. 免疫共刺激分子 OX40L 对乙型肝炎核酸疫苗的免疫佐剂作用. 微生物学报(*Acta Microbiologica Sinica*), 2009, 49(3) : 357-362.
- [14] Davis HL, McCluskie MJ, Gerin JL, Purcell RH. DNA vaccine for hepatitis B: Evidence for immunogenicity in chimpanzees and comparison with other vaccines. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1996, 93(14) : 7213-7218.

Effect of polyethylene glycol as adjuvant on hepatitis B virus DNA vaccine *in vitro*

Junpeng Wang^{1,2 #}, Ligan Lu^{1,2 #}, Hongli Song³, Yongjie Yang^{1,2}, Yuanfang Ma^{1,2 *}

(¹Key Laboratory of Cellular and Molecular Immunology of College of Medicine; ²Institute of Immunology; ³College of Physical Education; Henan University, Kaifeng 475001, China)

Abstract: [**Objective**] To explore whether polyethylene glycol (PEG) as adjuvant could enhance the humoral and cellular immune responses on hepatitis B virus DNA vaccine. [**Methods**] C57BL/6J mice were immunized with PEG and pVAX-S2 or alone pVAX-S2. After these mice were finally immunized for 14 days, the anti-HBs IgG, T cell proliferation, the expression of cytokines and CTL *in vivo* were detected. [**Results**] Compared to mice immunized with alone pVAX-S2, PEG as adjuvant could increase the production of anti-HBs IgG and HBsAg specific T cell proliferation. In addition, the expression of IL-4, IFN- γ in CD4 + T cells and IFN- γ in CD8 + T cells was higher than control groups. The PEG/pVAX-S2 groups could elicit significantly *in vivo* HBsAg specific CTL responses. [**Conclusions**] PEG as adjuvant could enhance humoral and cellular immune responses, as well as *in vivo* CTL activity.

Keywords: polyethylene glycol (PEG); hepatitis B virus DNA vaccine; humoral immune response; cellular immune response

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Scientific Research Foundation of Henan University

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-378-3880398; E-mail: mayf@henu.edu.cn

#These authors contributed equally to this work.

Received: 3 December 2009/ Revised: 3 February 2010

《微生物学报》对摘要的写作要求

1. 研究报告摘要:基本要素包括研究目的、方法、结果和结论,并要求在文中给出“【目的】、【方法】、【结果】和【结论】”等字样。具体地讲就是研究工作的主要对象和范围,采用的手段和方法,得出的结果和重要结论。在结果和讨论中应写明本文的创新之处。
2. 综述摘要:包括论述内容的发展水平、自己的评论及展望。
3. 英文摘要的撰写要点:英文摘要的内容应与中文摘要一致,但比中文摘要更详尽。要求在文中按照[Objective]、[Methods]、[Results]、[Conclusion]顺序分项撰写。英文摘要完成后,务必请英文较好且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。凡不符合要求的,即使学术上可以达到刊出的水平,本刊也将推迟发表。
 - (1)在英语摘要中,不要使用任何汉字字符,包括标点、括号、温度、希腊字母等。
 - (2)建议使用第一人称,以此可区分研究结果是引用文献的还是作者的。
 - (3)建议用主动语态,被动语态表达拖拉模糊,尽量不用,这样可以免好多长句,以求简单清晰。
 - (4)摘要应当使用过去时态,语法正确,句子通顺。
 - (5)摘要中不用缩写语,除非是人人皆知的,如:DNA、ATP 等。
 - (6)句子的开头处最好不要使用数字。