

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.09.004

文章编号: 1005-8982 (2018) 09-0022-06

## 超声微泡介导沉默 T 淋巴细胞 *Itch* 基因对胃癌 MFC 细胞免疫杀伤作用的实验研究

刘丹<sup>1</sup>, 张煜<sup>1</sup>, 彭莉晴<sup>1</sup>, 周静<sup>1</sup>, 邹庆伟<sup>2</sup>

(西南医科大学附属医院 1. 超声科, 2. 胃肠外科, 四川 泸州 646000)

**摘要: 目的** 利用超声介导微泡破裂技术 (UTMD) 沉默 T 淋巴细胞 *Itch* 基因表达, 观察转染 T 细胞对胃癌 MFC 细胞的免疫杀伤效率。**方法** 免疫磁珠分离 T 淋巴细胞, 构建靶向 *Itch* 基因的 shRNA 表达质粒, 超声微泡介导转染 48 h 后, 流式细胞仪分析 T 细胞转染成功率, Western blot 测定 T 细胞 *Itch* 蛋白表达。转染 24 h 后, 流式细胞仪检测 T 淋巴细胞活化早期标志 CD69 表达。转染 72 h 后, 观察对比单纯 T 淋巴细胞、阴性对照 T 淋巴细胞及转染 T 淋巴细胞与小鼠胃癌 MFC 细胞共培养时肿瘤杀伤率。**结果** 利用 UTMD 技术介导 shRNA 转染效率达到 51.9%, *Itch* 蛋白表达能被有效抑制。转染 24 h 后, 转染组 T 淋巴细胞早期活化标志 CD69 表达较其他组更高。转染 72 h 后, 与阴性对照组和空白组相比, 在不同的效靶比水平 (10 : 1、20 : 1、40 : 1), 转染 T 淋巴细胞杀瘤活性均增强。**结论** 利用 UTMD 技术介导 shRNA 转染能有效沉默 *Itch* 基因表达, 促进 T 淋巴细胞免疫活性, 增强 T 淋巴细胞对胃癌 MFC 细胞的免疫杀伤效率。

**关键词:** *Itch*; 超声介导微泡破裂技术; 基因沉默; 胃癌; 免疫治疗

**中图分类号:** R655

**文献标识码:** A

## Effect of ultrasound-targeted microbubble destruction mediated silencing of *Itch* gene in T lymphocyte on cytotoxicity against MFC gastric cancer cells

Dang Liu<sup>1</sup>, Yu Zhang<sup>1</sup>, Li-qing Peng<sup>1</sup>, Jing Zhou<sup>1</sup>, Qing-wei Zou<sup>2</sup>

(1. Department of Ultrasound, 2. Department of Gastrointestinal Surgery, Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China)

**Abstract: Objective** To investigate the effect of ultrasound-targeted microbubble destruction (UTMD) technology mediated silencing of *Itch* gene in T-lymphocytes on killing MFC gastric cancer cells. **Methods** T lymphocyte were isolated by magnetic beads. shRNA plasmid was constructed and transferred by UTMD technology to silence *Itch* gene in T lymphocytes. Twenty-four hours after transfection, the expression of CD69 was detected by flowcytometry; 48 hours after transfection, transfection efficiency and expression of *Itch* were identified by flowcytometry and Western blot, respectively; 72 hours after transfection, cytotoxicity activity against MFC gastric cancer cells were determined. **Results** Success rate of transfection by UTMD was 51.9%. Transfection of *Itch* increased expression of CD69 significantly when compared with remaining groups. Expression of *Itch* gene was sufficiently blocked by UTMD. Cytotoxicity of transfected T lymphocyte against MFC gastric cancer cells was dramatically upregulated when compared with negative control and blank group. **Conclusion** Silencing the expression of *Itch* gene by UTMD significantly promotes immune cytotoxicity of T lymphocyte against MFC gastric

cancer cells in vitro.

**Keywords:** *Itch*; ultrasound-targeted microbubble destruction; gene silencing; gastric cancer; immunotherapy

胃癌发生率和死亡率占目前全部癌症例数第二位<sup>[1]</sup>。胃癌进展与机体免疫水平密切关系,然而针对晚期胃癌的靶向免疫治疗至今仍未取得实质进展,如何增强胃癌组织内T淋巴细胞活性将成为胃癌免疫治疗关键<sup>[2-3]</sup>。*Itch*蛋白是一种E3泛素连接酶,在调节T淋巴细胞活化和免疫耐受方面起着关键作用,其通过调控T细胞受体表达和转化生长因子- $\beta$ 信号通路以诱导机体免疫耐受<sup>[4-5]</sup>。敲除*Itch*基因可增强T淋巴细胞免疫活性和促进Th2细胞因子(IL-4/IL-5)分泌,同时*Itch*基因敲除小鼠血清IgE和IgG1水平升高,出现严重的自体免疫性皮炎病变<sup>[6-8]</sup>。因此,*Itch*基因可作为抗肿瘤免疫治疗新型靶点用于临床。RNA干扰(RNA interfere, RNAi)技术是基因研究中一种常用有效工具,但如何将外源基因无创且高效地导入靶细胞内是目前亟待改善的关键技术。超声介导微泡破裂技术(ultrasound-targeted microbubble destruction, UTMD)是一种新型基因定位释放技术,可为基因靶向治疗提供一种简便、高效、无创的转染途径<sup>[9]</sup>。目前国内外关于*Itch*抗肿瘤免疫治疗应用的报道少见,且未见UTMD介导靶向沉默*Itch*基因用于胃癌免疫治疗的相关研究。本研究拟利用UTMD技术沉默T淋巴细胞*Itch*基因表达,检测T淋巴细胞因子IL-2和IFN- $\gamma$ 分泌水平变化,分析转染T细胞对胃癌MFC细胞的免疫杀伤情况,探索以*Itch*基因为靶点免疫治疗胃癌的可行性。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂及设备

615小鼠购于中国科学院(北京)动物实验中心(许可证号:SHZK(沪)2016-0002),无特定病原体级(SPF级),体重约20~25g。利用德国美天尼公司免疫磁珠纯化脾脏T淋巴细胞,T淋巴细胞纯度达96.9%,培养基构成:90%1640培养基,10%胎牛血清,5 $\mu$ g/ml ConA和1%双抗。小鼠胃癌MFC细胞起源于615小鼠,购自中国科学院(北京)细胞库,培养基配置:10%胎牛血清+90%1640培养基+链霉素(100 $\mu$ g/ml)+青霉素(100IU/ml)。细胞培养基及耗材购自美国Gibco公司,T淋巴细胞免疫磁珠购

自德国美天尼公司,CD3、CD69兔抗小鼠多克隆抗体购自美国BD公司,*Itch*兔抗小鼠多克隆抗体购自美国Abcom公司,超声低变频治疗仪器购自Chattanooga公司,SonoVue超声微泡造影剂购自美国Bracco公司,*Itch*-shRNA序列合成和质粒构建由上海吉凯基因公司完成,其中质粒携带绿色荧光蛋白(green fluorescence protein, GFP)标记基因。

### 1.2 ShRNA/微泡复合物制备

采用文献报道*Itch*-shRNA高效沉默序列<sup>[10]</sup>,正向:5'-AACCATGACCAATCCGAATAC-3',反向:5'-AATGTTAGCCCCAATCGTT-3',扩增片段长度为256bp。shRNA质粒合成与构建由上海吉凯基因公司合成,按照说明书操作,将正、反2条核苷酸链退火得到双链DNA,T4连接酶定向克隆退火后的shRNA双链模板,包装至线性化的质粒载体中。随后,将10 $\mu$ l *Itch*-shRNA表达质粒与100 $\mu$ l微泡混合,加入100 $\mu$ l DMEM培养基中室温孵化10min,0.22 $\mu$ m过滤器过滤除菌,备用。

### 1.3 T淋巴细胞转染

调节超声辐照最优参数为1W/cm<sup>2</sup>,3min,20%占空比<sup>[11]</sup>,超声探头置于水槽正下方,探头上放置12孔板操作平台,探头中心正对靶孔。CD3免疫磁珠纯化分离小鼠脾脏CD3<sup>+</sup>T淋巴细胞,离心收集P2代T淋巴细胞,无血清DMEM培养基重悬,以细胞密度1 $\times$ 10<sup>5</sup>/cm<sup>2</sup>接种至12孔板中。超声辐照前,3ml PBS溶液与SonoVue微气泡预混合,振荡或倒置使其分布均匀,微泡密度约为(5~0) $\times$ 10<sup>8</sup>个/ml,微泡直径约为2~5 $\mu$ m。30 $\mu$ l质粒溶液与100 $\mu$ l SonoVue微泡悬液充分混匀后,将质粒-微泡混合液置入T淋巴细胞悬液内,予超声辐照60s。辐照完成后,从水槽中移出6孔板,37 $^{\circ}$ C细胞培养箱中继续培养。处理后6h,更换为10%FBS的1640培养基,继续培养48h后离心收集细胞。本实验设置3个分组,其中实验组:*Itch*-shRNA质粒+SonoVue微泡+超声辐照,对照组:阴性对照shRNA质粒+SonoVue微泡+超声辐照,空白组:无微泡及超声辐照处理,另外将GFP质粒按照上述步骤予以超声辐照微泡处理,转染48h后,流式细胞仪检测UTMD介导细胞转染效率,荧光

显微镜下观察各分组 GFP 表达情况。

#### 1.4 Western blot 检测 Itch 蛋白表达

细胞转染后继续培养 48 h, 1 200 r/min 离心 5 min, 收集细胞后提取 T 淋巴细胞总蛋白, 检测其中靶蛋白 Itch 表达水平, 80 V 直流电压转 PVDF 膜 3 h, 2% BSA 封闭 1 h, 剪膜, 加入 1 : 800 稀释兔抗鼠 Itch 多克隆抗体 4℃ 过夜孵育 (16~18 h), 加入 1 : 500 稀释 HRP 标记 IgG 抗体室温孵育 1 h, 在 ECL 显色系统中显色定影, 分析杂交条带。

#### 1.5 流式细胞仪检测 CD69 表达

转染 T 淋巴细胞 24 h 后, PBS 清洗 2 次。每组各取  $1 \times 10^5$  个细胞, 分别加入 PBS 溶液 100  $\mu$ l, 吸管轻柔吹打均匀, 加入 1  $\mu$ l 兔抗小鼠多克隆 CD69 抗体, FITC 荧光标记, 混匀后置室温避光孵育 30 min, PBS 清洗 3 次, 800 r/min 细胞离心, 弃上清液, 250  $\mu$ l PBS 溶液重悬, 流式细胞仪上机检测。

#### 1.6 T 淋巴细胞免疫杀伤效率测定

转染 T 淋巴细胞 72 h 后, 将 100  $\mu$ l 实验组、对照组及空白组 T 淋巴细胞分别与 100  $\mu$ l 胃癌 MFC 细胞混合接种于 96 孔板, 效靶比梯度分别为 10 : 1、20 : 1、40 : 1, 其中胃癌 MFC 细胞密度为  $2 \times 10^4$  个/ml, 每组设 3 个复孔。设置单纯胃癌 MFC 细胞为靶细胞组, 单纯 T 淋巴细胞作为效应细胞组。细胞共培养 72 h, CCK-8 法测定细胞杀伤效率。

#### 1.7 肿瘤杀伤率计算方法如下<sup>[12]</sup> :

肿瘤细胞杀伤率 (%) = [(ODE+ODT) - ODE+T] / ODT  $\times$  100%

ODE+T= 效应细胞 + 靶细胞孔 OD 值

ODE= 单独 T 淋巴细胞 OD 值

ODT= 单独胃癌 MFC 细胞 OD 值

#### 1.8 统计学方法

数据分析采用 SPSS 17.0 统计软件, 计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 采用单因素方差分析, 两两比较方差齐性用 LSD-*t* 法检验, 方差不齐性用 Dunnett's T3 法检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 T 淋巴细胞原代培养

利用免疫磁珠分离 C57 小鼠脾脏 CD3<sup>+</sup>T 淋巴细胞, T 淋巴细胞呈椭圆形外观, 悬浮生长, 直径在 20  $\mu$ m 左右, 流式细胞仪检测 T 淋巴细胞表面标志

CD3 抗原分子表达, 证实分离 T 细胞纯度为 95.9%。见图 1。

### 2.2 细胞转染率测定结果

GFP 是一种绿色荧光蛋白, 激发后表达绿色荧光, 并散在分布于胞质内, 荧光显微镜下可观察转染成功的 T 淋巴细胞显示绿色荧光, 超声微泡转染 Itch-siRNA 质粒 48 h 后, 本研究利用流式细胞仪检测 T 淋巴细胞转染率达到 70.8%。见图 2。

### 2.3 超声微泡介导 Itch-shRNA 质粒转染对 Itch 蛋白表达的影响

Western blot 检测 UTMD 介导 Itch-shRNA 质粒转染 T 淋巴细胞后各组 Itch 蛋白表达, 空白组、对照组和实验组 Itch 蛋白相对表达量分别是 ( $0.41 \pm 0.09$ )、( $0.39 \pm 0.10$ ) 和 ( $0.15 \pm 0.078$ ), 各组 Itch 蛋白相对表达量比较, 差异有统计学意义 ( $F = 7.699, P = 0.022$ )。各组总体方差相等, 满足方差齐性, 两两对比采用

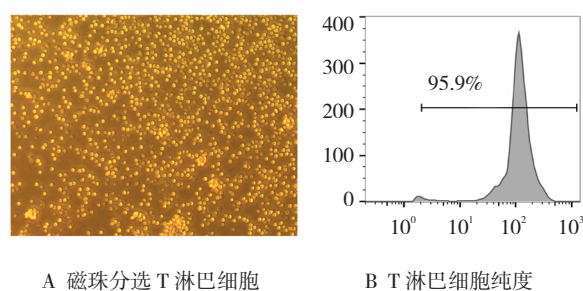


图 1 T 淋巴细胞培养与鉴定

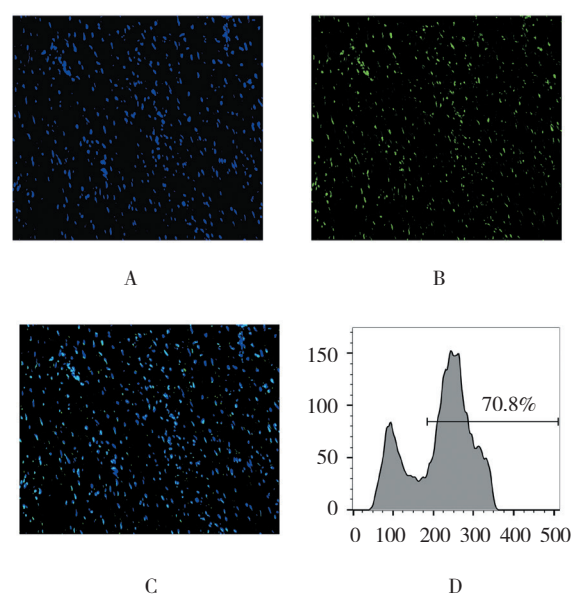
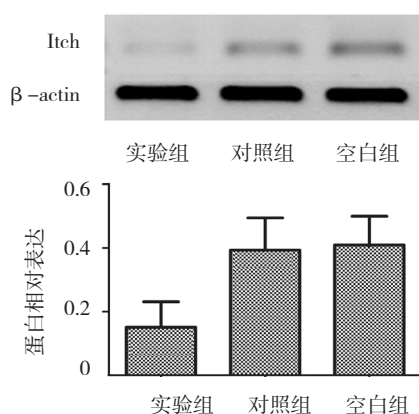


图 2 细胞转染率测定

图3 各组 *Itch* 蛋白表达

LSD法。与对照组比较,实验组 *Itch* 蛋白表达量降低 ( $t = -0.327, P = 0.021$ );空白组与对照组 *Itch* 蛋白表达量比较,差异无统计学意义 ( $t = 0.0273, P = 0.810$ ),表明超声微泡介导 *Itch*-siRNA 质粒能高效且特异性抑制 T 淋巴细胞 *Itch* 蛋白表达。见图 4。

#### 2.4 超声微泡介导 *Itch* 基因沉默后细胞表型 CD69 表达变化

转染 24 h 后流式细胞仪检测 T 细胞早期活化标志 CD69 表达,显示实验组 CD69 表达上调,达到 ( $27.61 \pm 3.65$ )%,对照组和空白组分别为 ( $7.82 \pm 1.79$ )%、( $9.33 \pm 1.54$ )%(见图 3),各分组早期活化标志 CD69 表达比较,差异有统计学意义 ( $F = 57.79, P = 0.000$ )。各组总体方差相等,满足方差齐性,两两比较采用 LSD 法。与对照组比较,实验组早期活化标志 CD69 表达增加,差异有统计学意义 ( $t = 9.701, P = 0.000$ );对照组与空白组早期活化标志 CD69 表达差异无统计学意义 ( $t = -0.737, P = 0.489$ )。由此得知,沉默 *Itch* 基因表达后 T 淋巴细胞表面活化标志 CD69 表达提高。

#### 2.5 *Itch* 基因沉默可增强 T 淋巴细胞肿瘤免疫杀伤效率

各组总体方差相等,满足方差齐性,两两对比采

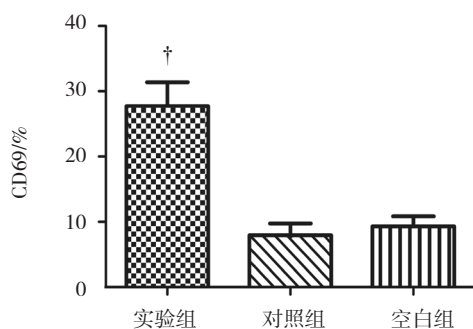


图4 转染 24 h 后 CD69 表达

用 LSD- $t$  法。不同效靶比水平 (10 : 1、20 : 1、40 : 1) 比较,各分组肿瘤杀伤效率比较,差异有统计学意义,其中效靶比水平为 10 : 1 时 ( $F = 12.988, P = 0.007$ ),与对照组比较,实验组肿瘤杀伤效率增加 ( $t = 4.496, P = 0.011$ );效靶比水平为 20 : 1 时 ( $F = 9.003, P = 0.016$ ),与对照组比较,实验组肿瘤杀伤效率增加 ( $t = 4.496, P = 0.011$ );效靶比水平为 40 : 1 时 ( $F = 26.881, P = 0.001$ ),与对照组比较,实验组肿瘤杀伤效率增加, ( $t = 4.496, P = 0.011$ )。此外,随着效靶比升高, T 淋巴细胞对于胃癌 MFC 细胞杀伤率逐渐增加,当效靶比为 40 : 1 时,实验组 T 淋巴细胞杀伤效率最高,达到 ( $45.91 \pm 5.65$ )%。

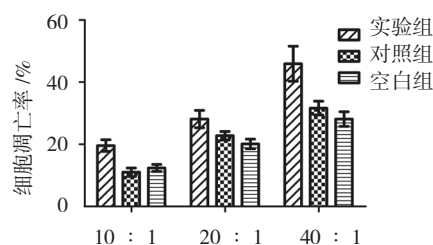


图5 共同培养肿瘤杀伤效率比较

### 3 讨论

免疫细胞通过关键蛋白调节其自身免疫水平而不致过度活化或抑制。*Itch* 蛋白负性调节 T 淋巴细胞活化因子,如核转录因子 BAP-1、NF- $\kappa$ b 及 T 细胞表面受体等,诱导机体免疫无反应性,防止机体免疫过度活化<sup>[13]</sup>。研究证实,特异性 T 淋巴细胞能浸润至肿瘤组织内部,然而浸润 T 淋巴细胞在肿瘤微环境中处于免疫耐受状态,无法对肿瘤细胞发动有效免疫攻击<sup>[14-15]</sup>。胃癌组织中抗肿瘤免疫应答被调节性 T 细胞抑制,细胞毒性 T 细胞活性受损,如能特异性抑制 *Itch* 基因表达,则可增强 T 淋巴细胞免疫反应性以免疫杀伤胃癌细胞。

RNA 干扰技术利用小双链 RNA 诱发同源 mRNA 高效特异性降解,沉默目的基因表达,是目前常用的分子生物学技术。小干扰 RNA (Small interfering RNA, siRNA) 和短发夹 RNA (short hairpin RNA, shRNA) 是 RNAi 技术常用的效应片段。具体来讲,siRNA 的沉默效应是暂时的,而基因载体与 shRNA 结合后,能实现稳定转染,诱导靶基因 mRNA 分解,达到持续抑制效果<sup>[16]</sup>。本研究选用文献报道的成熟 shRNA 序列持续抑制 *Itch* 基因表达以便于后续动物实验研究。将

RNAi 用于特异性沉默 *Itch* 基因之前, 首先应解决是基因转染载体问题, 目前通常采用非病毒或病毒载体。病毒载体转染效率较高, 但存在一定的生物安全隐患, 同时病毒自身免疫原性也是实际运用中需要考虑的难题<sup>[17]</sup>; 脂质体和质粒等非病毒载体虽无上述缺陷, 但其转染效率不高, 且具有一定的细胞毒性, 因此有必要寻找一种新的转染途径<sup>[18]</sup>。UTMD 技术利用超声介导微泡靶向释放所携带基因, 可为细胞转染提供新的途径, 该方法产生细胞空化作用, 增加细胞膜通透性, 一过性地形成细胞膜孔洞, 减小细胞表面不流动层厚度, 从而增加转染效率, 本实验中, UTMD 技术转染 48 h 后, 荧光显微镜下可观察到转染成功细胞内发出绿色荧光, 转染成功率达 51.9%。当然, 超声介导微泡空化转染基因作为一种物理辅助手段, 如果超声能量强度过大, 也可能造成细胞不可逆损伤, 甚至导致细胞凋亡和溶解, 因此本研究参考既往文献调整超声辐照最优参数为 1 W/cm<sup>2</sup>, 3 min, 20% 占空比<sup>[11]</sup>, 可有效避免潜在的细胞损伤发生, 有利于确保 UTMD 介导细胞转染的安全性。

*Itch* 基因对于 T 淋巴细胞免疫功能具有负调控作用, 本研究首先利用 UTMD 介导 shRNA 转染 T 细胞以有效沉默 *Itch* 基因表达, 继而观察 T 淋巴细胞活化程度。CD69 分子位于 T 淋巴细胞表面, 静止的 T 淋巴细胞不表达 CD69 分子, 而一旦活化, 其 CD69 分子表达数量则上升, 因此被认为是 T 淋巴细胞活化早期标志<sup>[19]</sup>。实验结果表明, UTMD 转染 48 h 后, 实验组 CD69 表达率升高, 这表明 UTMD 技术能有效抑制 *Itch* 基因表达, 进而增强 T 淋巴细胞活性。如何体外评价转染 T 淋巴细胞对胃癌 MFC 细胞免疫杀伤效率是本实验研究重点。混合细胞培养 72 h 后, 在不同效靶比 (10 : 1、20 : 1、40 : 1), 实验组 T 淋巴细胞较空白组或对照组均具有更高的肿瘤杀伤效率。当效靶比为 40 : 1 时, 杀伤效率达到 (45.91 ± 5.65%), 这表明超声微泡介导沉默 *Itch* 基因能增强 T 淋巴细胞对胃癌 MFC 细胞的免疫杀伤作用。

上述研究结果表明, UTMD 技术具有较强基因转染效率, 下调 *Itch* 基因表达能有效增强 T 淋巴细胞免疫活性, 增强 T 淋巴细胞对胃癌 MFC 细胞的体外免疫杀伤作用。

#### 参 考 文 献:

[1] FELTEN M K, KNOLL L, SCHIKOWSKY C, et al. Is it useful to combine sputum cytology and low-dose spiral computed

tomography for early detection of lung cancer in formerly asbestos-exposed power industry workers[J]. *J Occup Med Toxicol*, 2014, 9(1): 14.

- [2] BOCKORNY B, PECTASIDES E. The emerging role of immunotherapy in gastric and esophageal adenocarcinoma[J]. *Future Oncol*, 2016, 12(15): 1833-1846.
- [3] 王美清, 彭大为, 程小珍, 等. 自体免疫细胞治疗前后胃癌患者外周血免疫功能测定及临床意义 [J]. *中国现代医学杂志*, 2014, 24(35): 35-38.
- [4] AKI D, ZHANG W, LIU Y C. The E3 ligase *itch* in immune regulation and beyond[J]. *Immunol Rev*, 2015, 266(1): 6-26.
- [5] PARK S H, JUNG E H, KIM G Y, et al. *Itch* E3 ubiquitin ligase positively regulates TGF- $\beta$  signaling to EMT via Smad7 ubiquitination[J]. *Mol Cells*, 2015, 38(1): 20-25.
- [6] ASASHIMA H, TSUBOI H, TAKAHASHI H, et al. The Anergy induction of M3 muscarinic acetylcholine receptor-reactive CD4 + T cells suppresses experimental sialadenitis - like Sjögren's syndrome[J]. *Arthritis Rheumatol*, 2015, 67(8): 2213-2225.
- [7] THEIVANTHIRAN B, KATHANIA M, ZENG M, et al. The E3 ubiquitin ligase *itch* inhibits p38 $\alpha$  signaling and skin inflammation through the ubiquitylation of Tab1[J]. *Sci Signal*, 2015, 8(365): ra22.
- [8] SCHNEIDER L C. Ditching the *itch* with anti-type 2 cytokine therapies for atopic dermatitis[J]. *New Engl J Med*, 2017, 376(9): 878-879.
- [9] LIAO Y Y, CHEN Z Y, WANG Y X, et al. New progress in angiogenesis therapy of cardiovascular disease by ultrasound targeted microbubble destruction[J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014(1): 872984.
- [10] LIAO B, ZHONG X, XU H, et al. *Itch*, an E3 ligase of Oct4, is required for embryonic stem cell self-renewal and pluripotency induction[J]. *J Cell Physiol*, 2013, 228(7): 1443-1451.
- [11] CHEN Z, LIANG K, SHENG X, et al. Optimization and apoptosis induction by RNAi with UTMD technology in vitro[J]. *Oncol Lett*, 2012, 3(5): 1030-1036.
- [12] SHI Z D, LI X F, HAO L, et al. Cbl-b gene silencing in splenic T lymphocytes as a therapeutic strategy to target the prostate cancer RM-1 cell tumors in immune competent mice[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2014, 18(24): 3819-3830.
- [13] LE C C, LAZREK Y, DUBREUIL O, et al. The anti-HER3 (ErbB3) therapeutic antibody 9F7-F11 induces HER3 ubiquitination and degradation in tumors through JNK1/2 - dependent ITCH/AIP4 activation[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(24): 37013-37029.
- [14] WAUGH K A, LEACH S M, SLANSKY J E. Tolerance of tumor-specific T cells in melanoma metastases[J]. *J Clin Cell Immunol*, 2016, 7(2): 409.
- [15] 张洪超. 树突状细胞 - 细胞因子诱导的杀伤细胞对人体影响的实验研究 [J]. *中国现代医学杂志*, 2015, 25(27): 32-35.
- [16] DYAWANAPALLY S, GHODKE S B, VISHWANATHAN R, et al. RNA interference-based therapeutics: molecular platforms for infectious diseases[J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2014, 10(9): 1998-2037.

- [17] ZACCHIGNA S, ZENTILIN L, GIACCA M. Adeno-associated virus vectors as therapeutic and investigational tools in the cardiovascular system[J]. *Circ Res*, 2014, 114(11): 1827-1846.
- [18] ZHOU Y, ZHANG C, LIANG W. Development of RNAi technology for targeted therapy--a track of siRNA based agents to RNAi therapeutics[J]. *J Control Release*, 2014, 193: 270-281.
- [19] SANCHO D, GÓMEZ M, SÁNCHEZ-MADRID F. CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation[J]. *Trends Immunol*, 2005, 26(3): 136-140.

(王荣兵 编辑)

## 欢迎订阅《中国现代医学杂志》

《中国现代医学杂志》创刊于1991年,系中国科技论文统计源期刊、北大中文核心期刊、中国核心期刊(RCCSE)(A-)及湖南省十佳期刊,被中国知网、万方数据库、超星域出版、美国《化学文摘》(CA)、俄罗斯《文摘杂志》(AJ)等国内外多个检索系统收录。本刊是中华人民共和国教育部主管的综合性医学学术期刊,以服务于广大医药卫生科技人员,促进国内外医学学术交流和医学事业发展为宗旨。由中南大学、中南大学湘雅医院主办,湖南省湘雅医学期刊社有限公司出版。

《中国现代医学杂志》辟有基础研究·论著、临床研究·论著、综述、新进展研究·论著、临床报道、学术报告、病例报告等栏目。主要刊登国内外临床医学、基础医学、预防医学以及医学相关学科的新理论、新技术、新成果,以及医院医疗、教学、科研、管理最新信息、动态等内容。读者为广大医药卫生工作者。

《中国现代医学杂志》为旬刊,国际标准开本(A4),全刊为彩色印刷,无线胶装。内芯采用90g芬欧汇川雅光纸(880×1230mm),封面采用200g紫鑫特规双面铜版纸(635×965mm)印刷,每个月10、20、30日出版。定价25元/册,全年900元。公开发行,国内统一刊号:CN 43-1225/R;国际标准刊号:ISSN 1005-8982;国内邮发代号:42-143。欢迎新老用户向当地邮局(所)订阅,漏订或需增订者也可直接与本刊发行部联系订阅。

联系地址:湖南省长沙市湘雅路87号《中国现代医学杂志》发行部,邮编:410008

电话:0731-84327938;传真:0731-89753837;E-mail:journal@zgxdyx.com

唯一官网网址:www.zgxdyx.com