

[ 文章编号 ] 1007-385X( 2004 )04-0257-06

## 血管能抑素重组基因表达载体抗肺癌效应研究

李玉英, 钱桂生, 黄桂君, 余时沧, 王兴友, 陈维中, 李淑平 ( 第三军医大学新桥医院呼吸内科研究所, 重庆 400037 )

[ 摘要 ] **目的:** 通过构建人血管能抑素( Canstatin )真核表达载体, 转染裸鼠肿瘤局部, 探索其对肺癌治疗作用。**方法:** RT-PCR 法获取 Canstatin cDNA 全长, 定向克隆法构建 Canstatin 基因表达载体 pCMV-Script-Cans。荧光定量 PCR 法检测转染细胞 Canstatin mRNA 的表达。台盼蓝拒染法、<sup>3</sup>H-TdR 掺入法检测细胞生长增殖, TUNEL 法检测细胞凋亡。基因枪转染重组载体到荷瘤裸鼠肿瘤局部, CD31 单克隆抗体微血管记数检测抗血管生成效应。**结果:** 成功构建 pCMV-Script-Cans 重组载体, 并在转染的细胞株中检测到 Canstatin mRNA 的表达。人脐静脉内皮 HUV-EC-C 细胞株 pCMV-Script-Cans 质粒转染组比空载体组<sup>3</sup>H-TdR 掺入量明显减低(  $P < 0.01$  ), 细胞凋亡率明显增加(  $P < 0.01$  ), 重组载体转染肿瘤生长缓慢, 微血管数显著低于对照组(  $P < 0.01$  )。**结论:** pCMV-Script-Cans 重组载体能在转染的哺乳动物细胞中表达 Canstatin, 并抑制内皮细胞增殖, 而且有很好的抗肺癌血管生成作用。

[ 关键词 ] 人血管能抑素; 血管生成; 肿瘤治疗; 肺癌; 荧光定量 PCR

[ 中图分类号 ] R979.1; R734.2 [ 文献标识码 ] A

## The Anti-Lung Cancer Effects of Canstatin Recombinant Vector

LI Yu-ying, QIAN Gui-sheng, HUANG Gui-jun, YU Shi-cang, WANG Xing-you, CHEN Wei-zhong, LI Shu-ping ( Institute of Respiratory Disease, Xinqiao Hospital, The Third Military Medical University, Chongqing 400037, China )

[ **Abstract** ] **Objective:** To construct a mammal expression system of human canstatin and study its anti-tumor effects on lung cancer. **Methods:** Canstatin cDNA was acquired by RT-PCR, and cloned into a mammal expression vector named pCMV-Script. Canstatin expression was detected by Real-time PCR. The proliferation, apoptosis of the cells transfected with recombinant canstatin vector were measured by trypan blue exclusive assay, <sup>3</sup>H-thymidine incorporation and TUNEL method respectively. Then the recombinant vector encoding canstatin cDNAs was transferred into tumors of cancer-bearing nude mice with electroporator *in vivo*, and micro-vessel count was proceeded of each tumor by anti-CD31 antibody immunohistochemical staining. **Results:** The recombinant vector pCMV-Script-Cans was successfully constructed, and the canstatin mRNA was detected in both of the transformed HUVE and A549 cells. The <sup>3</sup>H-TdR intake rate in pCMV-Script-Cans transformed HUVE cells is significant lower than that of the naked plasmid transformed cells (  $P < 0.001$  ), while the apoptosis rate of them is significant higher than that of the control cells (  $P < 0.001$  ). The micro-vessels in the recombinant vector transformed tumors were significant lower than that of the control group. **Conclusions:** Canstatin only inhibit cell proliferation and induce apoptosis in endothelial cell, and it also has a good anti-tumor effect *in vivo*.

[ **Key words** ] canstatin; angiogenesis; tumor therapy; lung cancer; real-time PCR

\* 自肿瘤抗血管生成疗法问世以来陆续出现了大量血管生成抑制剂。Canstatin 是又一新近发现的内源性血管生成抑制剂, 具有很强的抑制血管生成的作用。构建 Canstatin 的哺乳动物表达载体, 研究其对肿瘤细胞和内皮细胞的生物学效应及其对肺癌移植瘤模型的血管生成作用。将对该蛋白抑制血管生成作用机理的

阐明及抗肿瘤治疗的研究提供理论和实验依据。

[ 作者简介 ] 李玉英( 1972- ), 女, 甘肃兰州市人, 博士, 主治医师, 主要从事肺癌的分子生物学治疗研究

[ 通讯作者 ] 钱桂生, 黄桂君

## 1 材料与方法

### 1.1 材料来源

人胎肝组织来自新桥医院妇产科引产胎儿。A549 细胞株为本所保存,人脐静脉内皮细胞系 HUV-EC-C 细胞(HUVEC)系购自美国 ATCC。pCMV-Script 载体及 XLI-Blue MRF' 宿主菌均购自美国 Stratagene 公司,裸鼠 12 只购自中科院上海实验动物中心。RT-PCR 试剂盒,荧光定量试剂盒为 Promaga 产品,脂质体为美国 Roche 公司产品。利用 Primer5.0 设计如下引物及 Tagman 探针,下划线部分为内切酶 Hind III, EcoR I 识别序列,并送上海 Sangon 合成。预计扩增产物长度 703 bp。

P1: TCGAATTCATGGTCAGCATCGGCTACCTCTCT

P2: GCAAGCTTTCACAGGTTCTTCATGCACAC

Tagman 探针: 5'-FAM-CGGAACGACAAGTCCTA CTGGCTCT-3'-TAMRA

### 1.2 胎肝组织总 RNA 的提取、cDNA 的第一链的合成及 Canstatin 的扩增。

总 RNA 的提取参照 Gibico 公司 Tripure 说明书进行。cDNA 的合成参照 Promaga 公司 RT-PCR 试剂盒说明书进行。PCR 反应为: 95℃ 5 min, 94℃ 30 s, 60℃ 40 s, 72℃ 90 s 32 个循环后 72℃ 10 min。

### 1.3 pCMV-Script-Cans 重组载体的构建

PCR 产物经 V 型槽纯化后用 Hind III, EcoR I 双酶切并纯化。pCMV-Script 载体 1 μg 用 EcoR I, Hind III 双酶切并纯化。取纯化的 PCR 产物及载体按 3:1 摩尔比混合建立连接体系 16 h 后,电穿孔转化大肠杆菌 XL1-Blue MRF,挑取阳性克隆进行酶切鉴定,并送上海 Sangon 测序。

### 1.4 pCMV-Script-Cans 转染 A549 及 HUVEC 细胞及筛选

A549 细胞培养在含 10% 小牛血清的 1640 培养基中, HUVEC 细胞培养在含 10% 小牛血清的 Ham's F12K 培养基中,含 30 μg/ml Endothelial cell growth supplement( ECGS)。将纯化的重组质粒 pCMV-Script-Cans 取 5 μg 加入 HBS 缓冲液中,使终体积至 50 μl。取 30 μl DOTAP 脂质体加入 HBS 70 μl,室温放置 15 min。将质粒 HBS 混合液加入 100 μl 脂质体 HBS 混合液中混匀,加入 2 ml 无血清的 1640 培养基中,并加入细胞生长 70% 融合的 25 ml 培养瓶中 37℃ 5% CO<sub>2</sub> 培养 8 h,更换含 10% 小牛血清的继续培养 48 h 后换用含 400 μg/ml G418( A549 为 500 μg/ml)的选择性培养基,约 7 d 后筛选出抗性克隆后扩大培养,并用 200 μg/ml G418 维持抗性。同时用空载体 pCMV-Script 转染上述两种细胞为对照(转染方法同上),并设未干预

细胞对照。

### 1.5 转染细胞 Canstatin mRNA 的表达检测

上述筛选所得阳性细胞分别扩大培养,并分离各组细胞总 RNA(具体操作步骤参照 Gibico 公司 Tripure 说明书进行)。将各组细胞 RNA 分别逆转录为 cDNA(参照 Promaga 公司 RT-PCR 试剂盒说明书进行)。用各组细胞 cDNA 为模板, P1、P2 为引物,并加入 Tagman 探针,荧光定量 PCR 法检测各组细胞 Canstatin mRNA 的表达(方法和扩增条件参照 Promaga 公司荧光定量 PCR 说明书进行)。

### 1.6 台盼蓝拒染法细胞计数

上述各组细胞经 0.25% 的胰酶消化,制成以  $1 \times 10^5$ /ml 以 100 μl 接种 24 孔板,台盼蓝拒染法<sup>[1]</sup>每天记数 3 孔细胞,共 8 d。观测转染后细胞生长状况和细胞活力。

### 1.7 细胞增殖检测

各组细胞以  $1 \times 10^4$  接种 96 孔板培养 48 h 后更换培养基并加入 1 μCi <sup>3</sup>H-TdR 继续培养 6 h,收集细胞做液体闪烁计数(Backman Modle Ls8100 闪烁计数仪);各组细胞均以约 500 个接种 φ60 细胞培养皿, 37℃ 5% CO<sub>2</sub> 培养到有肉眼可见克隆后染色记数,参照《细胞培养》<sup>[1]</sup>进行。

### 1.8 原位凋亡检测(TUNEL 法)

将各组 A594 及 HUVE 组细胞制成  $1 \times 10^5$ /ml,以 1 ml 接种有无菌小盖玻片的 24 孔板中培养 48 h 后 PBS 漂洗 4% 多聚甲醛固定 30 min,其余步骤按华美公司原位凋亡试剂盒说明书进行,照相并记数凋亡细胞。在光镜下(×400)观察至少 5 个视野,记数 200 个以上细胞,计算阳性细胞百分率。

### 1.9 裸鼠移植瘤实验

常规培养亲代 A549 细胞制成细胞悬液,以  $1 \times 10^7$ /只,接种于 2 只裸鼠背部皮下,待肿瘤生长至约 1.5 cm<sup>3</sup> 时处死小鼠,并剥离肿瘤组织。无菌操作将肿瘤组织切成 0.3 cm<sup>3</sup> 左右,埋植到 10 只裸鼠背部皮下。待肿瘤生长到约 1.5 cm<sup>3</sup> 时,将裸鼠随机分为 2 组,空载体组和重组载体组。

将纯化的空质粒及重组载体分别用基因枪(EC830 型)转染到 2 组肿瘤局部,条件为质粒 30 μg/只、400 V 电压、200 ms。转染基因 10 d 后处死裸鼠,剥离肿瘤组织,冰冻切片,抗 CD31 单克隆抗体作为一抗,进行免疫组化染色(参照北京中山公司 SP9000 型试剂盒说明进行),进行肿瘤组织微血管记数(MVC),记数方法标准均按参考文献[2]进行。转染前及处死前测量肿瘤体积、小鼠体重,剥离肿瘤后称重。比较两组的微血管数目和肿瘤体积、瘤重、小鼠体

重变化。

### 1.10 统计学分析

结果以均数  $\pm$  标准差表示 ( $\bar{x} \pm s$ ), 采用方差分析, 百分率采用  $\chi^2$  检验, 均使用 SPSS10.0 软件包进行统计。

## 2 结果

### 2.1 pCMV-Script-Cans 重组载体的鉴定及 Canstatin 序列分析

人肝组织中克隆到的 Canstatin PCR 产物琼脂糖凝胶电泳(如图1), 约 700 bp 与预期一致。该序列经测序验证后提交 GenBank, 收录号为 AY450357。重组质粒经双酶切得到约 700 bp 片段, 与预期一致(图2)。测序结果显示连接方向正确, 证实重组载体构建成功。

细胞生长缓慢, 与空载体组及 ECC 细胞未干预组相比倍增时间明显延长、最大增殖倍数、饱和密度显著降低 ( $P < 0.01$ ) 表明重组载体转染后内皮细胞 HUVEC 的生长受到明显抑制, 而 A549 细胞生长不受影响。说明 canstatin 基因对内皮细胞生长有延缓的作用。

图1 人 Canstatin 基因 RT-PCR 扩增产物鉴定

Fig.1 Identification of human canstatin amplification products with RT-PCR

1: RT-PCR products from human liver tissues; 2: DNA marker SD003

### 2.2 A549, HUVEC 细胞 Canstatin mRNA 表达

转染 pCMV-Script-Cans 及 pCMV-Script 的 2 种细胞基因组 RNA 中均扩增到 Neo 基因(492 bp)未转染细胞未扩增到 Neo 基因, 证明转染成功。(图3) pCMV-Script-Cans 转染的 A549、HUVEC 细胞均有 Canstatin 表达, 其 mRNA 表达的拷贝数分别为 22821 及 21457, 而 2 种细胞的空载体转染组和亲代细胞对照组拷贝数均为 0。

### 2.3 台盼蓝细胞生长曲线

转染 pCMV-Script-Cans 的 HUVEC 细胞生长缓慢, 而 A549 细胞与空载体对照组无差别(图4, 图5)。

细胞生长曲线 A549 细胞未干预组、空载体组、重组载体组在细胞倍增时间、饱和密度、最大增殖倍数上比较均无显著差异 ( $P > 0.05$ ), 而 HUVEC 重组载体组

图2 重组质粒 pCMV-Script-Cans 的双酶切鉴定

Fig.2 Restriction enzyme digestion analysis of recombinant vector pCMV-Script-Cans

1: pCMVScript-Canstatin digested with EcoRI and HindIII;  
2: pCMVScript-Canstatin without digestion; 3: Marker DO16-2

图3 G418 抗性细胞克隆的 Neo 基因鉴定

Fig.3 Identification of Neo gene in G418-resistant cells clones

1: DNA marker SD003; 2~3: Neo gene was detected in pCMV-Script (2) and pCMV-Script-Cans (3) transfected A549 cells; 4~5: Neo gene was detected in pCMV-Script (4) and pCMV-Script-Canstatin (5) transfection HUVEC cells; 6~7: No Neo gene was detected in parental A549 cells; (6) and parental HUVE cells (7)

### 2.4 细胞增殖检测结果

#### 2.4.1 $^3\text{H-TdR}$ 掺入实验结果

A549 细胞未干预组、空载体转染组、重组载体转染组的<sup>3</sup>H-TdR 掺入量依次为 23 074.05 ± 3 224.36, 23 370.08 ± 3 320.56 和 21 034.61 ± 1 455.93,3 组相

5 810.50 ± 30.41,5 478.00 ± 71.16,2 786.50 ± 28.43。重组载体转染组显著低于空载体转染组及未干预 HUVE 细胞组( *P* < 0.01 )。

图 4 台盼兰拒染法描记的 A549 细胞生长曲线  
Fig.4 Growth curve of A549 cells by trypan blue exclusion method

图 5 台盼兰拒染法描记的 HUVE 细胞生长曲线  
Fig.5 Growth curve of HUVEC cells by trypan blue exclusion method

比无显著差异( *P* > 0.05 );ECC 细胞未干预组、空载体转染组、重组载体转染组的<sup>3</sup>H-TdR 掺入量分别为

\* \* *P* < 0.01, recombinant vector group vs Naked plasmid group  
##*P* < 0.01, recombinant vector group vs Naked plasmid group

表 1 各组 A549,HUVE 细胞生长曲线特征  
Tab.1 Specification of cells growth curves of A549 and HUVE cells

Groups	Doubling time ( day )	Maximum density time ( day )	Maximum density ( × 10 <sup>4</sup> /ml )	Maximum power of proliferation
A549	3.9	6	4.98 ± 0.35	3.47
A549 naked plasmid	3.99	6	4.85 ± 0.33	3.36
A549 recombinant vector	3.96	6	4.89 ± 0.42	3.4
HUVEC	4.37	6	4.25 ± 0.36	3.03
HUVEC naked plasmid	4.37	6	4.28 ± 0.28	3.0
HUVEC recombinant vector	6.352	6	2.95 ± 0.23	2.15

2.4.2 克隆形成实验结果

A549 细胞未干预组、空载体转染组、重组载体转染组的克隆形成率分别依次为 97.00%,95.35%,96.6%,3 组相比无显著差异;HUVE 细胞重组载体转染组的克隆形成率为 57.00%,显著低于空载体转染组( 88.40% )及未干预 HUVE 细胞组( 87.00% )( *P* < 0.01 )。

2.5 原位凋亡检测结果

光镜下观察到的 HUVE 细胞重组载体转染组如( 图 6 )所示,可见部分细胞凋亡,凋亡细胞的显色部位细胞核呈棕黄色,有核固缩征象,核中可见深棕色颗粒,正常细胞核形态正常呈淡蓝色。重组载体转染的 HUVEC 细胞凋亡率为( 7.56 ± 0.52 )%,显著高于空载

体组( 1.98 ± 0.32 )% 及未干预组( 1.32 ± 0.35 )% ( *P* < 0.01 )。而 A549 未干预组、空载体组、重组载体组的凋亡率分别为:( 0.70 ± 0.28 )% ,( 0.50 ± 0.25 )% ,( 0.44 ± 0.31 )%,无显著差异( *P* > 0.05 )。说明 Canstatin 基因转染可诱导内皮细胞凋亡而对肿瘤细胞无诱导凋亡的作用。

2.6 抗肿瘤实验及微血管计数结果

重组载体组转染前肿瘤体积为 1.1 ± 0.3 cm<sup>3</sup>,小鼠体重为 16.6 ± 0.4 g,空载体组分别为 1.2 ± 0.2 cm<sup>3</sup>和 17.5 ± 0.1 g,2 组相比无显著差异( *P* > 0.05 );转染基因 10 d 后,重组载体组肿瘤体积为 1.5 ± 0.2 cm<sup>3</sup>,瘤重为 1.88 ± 0.24 g,小鼠体重为 20.2 ± 0.4 g,空载体分别依次为 2.2 ± 0.3 cm<sup>3</sup>,2.25 ± 0.16 g,18.2 ± 0.3

g, 与空载体组相比肿瘤体积、瘤重均明显减小 ( $P < 0.01$ ), 小鼠体重显著增高 ( $P < 0.01$ )。转染后 10 d 与转染前相比空载体组小鼠体重无显著变化 ( $P > 0.05$ ), 重组载体组小鼠体重明显增加 ( $P > 0.05$ )。

图 6 pCMV-Script-Cans 载体转染 HUVE 细胞原位凋亡 ( $\times 200$ )

Fig. 6 Apoptosis was observed in HUVE cells transfected with pCMV-Script-Cans vector

微血管记数结果显示: 重组载体组为  $150.6 \pm 18.4$ , 空载体组为  $206.2 \pm 22.5$ 。重组载体组 MVC 显著低于空载体组 ( $P < 0.01$ )。光镜下微血管内皮细胞被染成棕黄色, 呈环状或条索状, 其它细胞呈淡蓝色 (图 7)。

图 7 CD31 单克隆抗体的移植瘤微血管免疫组化照片 ( $\times 200$ )

Fig. 7 Immunohistochemical analysis of vascularization of transplanted tumors by staining with monoclonal antibody against CD31

### 3 讨论

肿瘤的流行病学资料显示, 肺癌的死亡率居于首位<sup>[3]</sup>。虽然近来治疗方法有了很大改进, 但肺癌的 5 年存活率仍仅有 10%。由于实体肿瘤组织产生的促进血管生成的因子和抑制血管生成的因子间的对比决定着肿瘤的转归。因此 Folkman 的“肿瘤饥饿疗法”为寻找实体肿瘤的治疗方案提供了崭新的思维。大量血

管生成抑制剂的陆续发现和应用充实了这一疗法的理论基础。Canstatin 是又一新发现的内源性血管生成抑制剂, 具有更高活性和内皮生长抑制特异性<sup>[4]</sup>。这使 Canstatin 有可能在不远的将来成为极有临床价值的新药。由于基因疗法可持续稳定的表达基因产物, 并使局部保持高浓度, 因此利用 Canstatin 基因表达载体研究其对肺癌的治疗作用, 将对寻找肺癌治疗方案有重要意义。

实验从人肝组织中克隆到 Canstatin cDNA, 并成功地构建了含有 Canstatin cDNA 的基因表达载体 pCMV-Script-Cans, 测序证实阅读框架正确。实验采用了能精确定量的荧光定量 PCR 来检测 Canstatin 基因在转染细胞中的表达。设计针对 Canstatin 基因的 Tagman 探针, 其原理是在探针 5' 端标记一个荧光分子, 3' 端标记一个淬灭分子, 由于荧光能量传递规律, 探针不发荧光。只有当特异性 PCR 反应发生时, 探针与模板退火, 产生了适合 Tag 酶活性的底物, 荧光分子被从探针上切下并发出荧光, 因此荧光分子脱落数目与 PCR 产物数目一致, 根据 PCR 反应液的荧光强度即可算出初始模板的量<sup>[5-6]</sup>。结果表明, 重组载体转染的内皮细胞和肿瘤细胞均有不同拷贝的目的基因表达, 肿瘤细胞的表达量高于内皮细胞, 可能是由于内皮细胞表达的 Cansattin 具有抑制内皮细胞生长的缘故。细胞生长曲线显示转染了 pCMV-Script-Cans 重组载体的人脐静脉 HUVEC 细胞生长显著抑制, 其倍增时间、最大密度时间均显著延长, 饱和密度、最大增殖倍数均显著低于空载体转染组和 HUVEC 亲代组。但转染重组载体的 A549 细胞却生长良好, 上述生长状况指标与 2 个对照组相比无差别。克隆形成实验是反映细胞自我更新能力的实验, 重组载体转染的内皮 HUVEC 细胞组克隆形成率明显低于 2 个对照组, 而 A549 细胞转染后与对照组相比克隆形成率无显著差别; <sup>3</sup>H-TdR 掺入法是检测细胞增殖极为灵敏的方法, 实验中重组载体组 HUVEC 细胞 <sup>3</sup>H-TdR 掺入量明显低于空载体组和未干预组, A549 细胞则与两对照组无差别。这 3 个实验从不同角度说明 Canstatin 基因可抑制内皮细胞生长、增殖, 但对肿瘤细胞没有直接的抑制作用。原位凋亡结果进一步表明 Canstatin 诱导细胞凋亡的作用具有内皮特异性。这一点国外文献也有类似报道<sup>[4]</sup>。最近研究发现 Canstatin 诱导细胞凋亡的可能机理是通过下调抗凋亡蛋白 FLIP (FADD like ICE inhibitory protein) 水平和增强内皮细胞对凋亡信号的敏感性而实现的。而且 Canstatin 与生长因子竞争细胞表面受体, 抑制细胞因子对内皮的刺激增生作用。体外实验中缺乏内皮生长因子时, Canstatin 对抗凋亡蛋白 FLIP 水平无影响。而当

Canstatin 缺失时,不论刺激因素存在与否,FLIP 水平上升,因而认为 Canstatin 抑制血管生成是通过降低 FLIP 水平致使内皮细胞对凋亡信号敏感性增高所致<sup>[4,7]</sup>。这也许是 Canstatin 诱导细胞凋亡只对内皮细胞有效的一种解释。

裸鼠移植瘤实验进一步说明 Canstatin 基因表达载体具有体内抑制肿瘤生长和血管生成的作用。因此,基因转染后重组载体组肿瘤生长缓慢,体积瘤重均显著低于对照组,由于肿瘤所致的恶液质使对照组小鼠体重增加不明显,重组载体组能有效抑制肿瘤生长,所以小鼠体重明显高于对照组。肿瘤 MVC 结果证实重组载体转染可明显抑制肿瘤血管生成。为保证实验结果的准确可靠,实验采用了组织块移植法。同时为保证微血管记数结果的准确可靠,实验选用了 CD31 单克隆抗体,因为 CD31 是一种分布于内皮细胞膜上的跨膜糖蛋白,可用于新血管生成的检测<sup>[8]</sup>,方法简单可靠。

综上所述,实验中构建的 pCMV-Script-Cans 重组载体使 Canstatin 在肿瘤细胞和内皮细胞内得到有效表达,并能有效抑制体内血管生成从而抑制肿瘤生长。围绕 Canstatin 的基因治疗研究将为进一步研究该基因抑制内皮生长的机理及肿瘤的生物治疗方案提供实验和理论依据。

[ 参 考 文 献 ]

[ 1 ] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养[ M ]. 第 2 版, 西安: 世界图书出版社, 2001. 136-137.

[ 2 ] Jaeger TM, Weidner N, Chew K, *et al.* Tumor angiogenesis correlates with lymph node metastases in invasive bladder cancer[ J ]. *J Urol*, 1995, 154( 1 ): 69-71.

[ 3 ] Parkin DM, Bray F, Ferlay J, *et al.* Estimating the world cancer burden: Globocan 2000[ J ]. *Int J Cancer*, 2001, 94( 6 ): 153-156.

[ 4 ] Kamphaus GD, Colorado PC, Panka DJ, *et al.* Canstatin, a novel matrix-derived inhibitor of angiogenesis and tumor growth [ J ]. *J Biol Chem*, 2002, 277 ( 2 ): 1209-1215.

[ 5 ] Meijerink J, Mandigers CV, Loch L, *et al.* A novel method to compensate for different amplification efficiencies between patient DNA samples in quantitative real time PCR[ J ]. *J Mol Diagn*, 2001, 3( 2 ): 55-61.

[ 6 ] Weinberger KM, Wiedenmann E, Bohm S, *et al.* Sensitive and accurate quantitation of hepatitis B virus DNA using a kinetic fluorescence detection system ( Tagman PCR ) [ J ]. *J Virol Methods*, 2000, 85 ( 12 ): 75-82.

[ 7 ] David J, Panka, James WM. Canstatin inhibits Akt activation and induces Fas-dependent apoptosis in endothelial Cells[ J ]. *J Biol Chem*, 2003, 278( 39 ): 37632-37636.

[ 8 ] De Lisser KH, Christofidou-Solomidou M, Strieter RM, *et al.* Involvement of endothelial PECAM/CD31 in angiogenesis [ J ]. *Am J Pathol*, 1997, 151( 3 ): 671-674.

[ 收稿日期 ] 2004 - 02 - 02 [ 修回日期 ] 2004 - 05 - 19

第四届全国医药卫生期刊编辑出版学术会议征文通知

由中国科技期刊编辑学会医学分会和中华医学会杂志社联合举办的第四届全国医药卫生期刊编辑出版学术会议,定于 2005 年 6 月在黄山市召开( 具体时间、地点另行通知);会议除进行学术交流外,还将请有关专家就期刊伦理学、期刊评价指标、数字化稿件处理流程等内容做专题讲座。会议期间将进行中国科技期刊编辑学会医学分会换届改选。现将征文注意事项通知如下:

一、征文内容:( 1 )医学期刊国际化研究;( 2 )医学期刊体制改革的实践与经营管理;( 3 )医学期刊编辑现代化和网上编辑处理的实践和探讨;( 4 )医学期刊审稿研究和审稿质量控制;( 5 )医学期刊编辑工程及编辑质量控制研究;( 6 )医学期刊的标准化与规范化;( 7 )医学期刊的出版与发行;( 8 )医学期刊的广告经营;( 9 )中外医学期刊的比较研究;( 10 )医学期刊编辑的素质与人才培养;( 11 )医学期刊的评价与评价标准的研究;( 12 )数字化期刊的建造方式、模式、组织管理与技术;( 13 )伦理学在医学期刊编辑中的意义和实践;( 14 )科技期刊编辑学的理论研究;( 15 )医学期刊编辑与知识产权保护。

二、征文要求:( 1 )论文全文和摘要( 1000 字以内)各一份,请提供文章软盘( 欢迎 E - mail 投稿 ),同时寄审稿费 50 元/篇;( 2 )截稿日期: 2005 年 4 月 20 日;( 3 )联系地址: 来稿请寄北京东四西大街 42 号 中华医学会杂志社办公室姜玮收, 邮编: 100710, 电话: 010 - 65221454, 电子信箱: jiangwei@cma.org.cn

中国科技期刊编辑学会医学分会  
中华医学会杂志社