

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2013.05.009

· 基础研究 ·

表达 FLT1-CAR 的 Jurkat 细胞的筛选及其对 VEGF 的趋向性

朱洋洋^{1,2}, 刘辉², 王颖², 汪毕², 钱其军^{1,2} (1. 浙江理工大学生命科学院 新元医学与生物技术研究所, 浙江 杭州 310018; 2. 第二军医大学 东方肝胆外科医院 病毒基因治疗实验室, 上海 200438)

[摘要] **目的:**通过慢病毒介导获得表达针对血管内皮细胞生长因子受体 1 (vascular endothelial growth factor receptor 1, VEGFR1/FLT1) 的嵌合抗原受体 (chimeric antigen receptor, CAR) 的 Jurkat 细胞, 探讨其对 VEGF 的趋向性。**方法:**合成针对 VEGFR1 的 CAR (FLT1-CAR), 构建重组慢病毒载体 LV-gn-FLT1-CAR, 并感染 Jurkat 细胞; 经 G418 筛选得到稳定转染细胞株; PCR 及流式细胞术检测细胞株中 FLT1-CAR mRNA 及蛋白的表达, Transwell 法检测细胞株对 VEGF 的趋化效果。**结果:**重组慢病毒 LV-gn-FLT1-CAR 成功构建; FLT1-CAR 成功整合到 Jurkat 细胞中并稳定表达 FLT1-CAR 蛋白。筛选的细胞株 Jurkat-gn-FLT1-CAR-1、Jurkat-gn-FLT1-CAR-2 对 VEGF 有显著趋化效果, 100 ng/ml VEGF 处理后, Jurkat-gn-FLT1-CAR-1 细胞趋化数为 (62 ± 8) 个, 显著高于对照组 Jurkat 趋化细胞数的 (18 ± 5) 个 ($P < 0.01$)。**结论:**成功筛选到稳定表达 FLT1-CAR 的 Jurkat 细胞克隆, 其对 VEGF 有明显的趋向作用。

[关键词] 血管内皮细胞生长因子; CXC 趋化因子受体 3; 嵌合抗原受体; Jurkat 细胞; 趋化作用

[中图分类号] R730.51; R392.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2013)05-0559-05

Screening of Jurkat cells expressing FLT1-CAR and their chemotaxis to VEGF

Zhu Yangyang^{1,2}, Liu Hui², Wang Ying², Wang Bi², Qian Qijun^{1,2} (1. Xinyuan Institute of Medicine and Biotechnology, School of Life Science, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, Zhejiang, China; 2. Laboratory of Virus and Gene Therapy, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China)

[Abstract] **Objective:** To construct Jurkat cells expressing chimeric antigen receptor (CAR) of vascular endothelial growth factor receptor 1 (VEGFR1/FLT1) using lentivirus and to investigate their chemotaxis to VEGF. **Methods:** The CAR targeting VEGFR1 was synthesized, and the recombinant lentiviral vector named LV-gn-FLT1-CAR was constructed and infected into Jurkat cells. Stable infected cell strains were obtained through G418 screening. The expressions of FLT1-CAR mRNA and protein in the stable infected cell strains were detected by PCR and flow cytometry. The chemotaxis of selected cell strains toward VEGF was detected by Transwell assay. **Results:** Recombinant lentivirus LV-gn-FLT1-CAR was successfully constructed. FLT1-CAR was successfully integrated into Jurkat cells and FLT1-CAR protein was stably expressed. The selected cell strains, Jurkat-gn-FLT1-CAR-1 and Jurkat-gn-FLT1-CAR-2, showed obvious chemotaxis to VEGF. In a VEGF concentration of 100 ng/ml, Jurkat-gn-FLT1-CAR-1 cell chemotactic number was (62 ± 8), which was significantly higher than that of the control group Jurkat cells (18 ± 5) ($P < 0.01$). **Conclusion:** Jurkat cell strains stably express FLT1-CAR are successfully obtained, which have a distinct chemotaxis to VEGF.

[Key words] vascular endothelial growth factor; chemokine (C-X-C motif) receptor 3 (CXCR3); chimeric antigen receptor; Jurkat cell; chemotaxis

[Chin J Cancer Biother, 2013, 20(5): 559-564]

[基金项目] 国家科技部重大专项基金资助项目 (No. 2012ZX0002014-005); 国家自然科学基金面上项目 (No. 81071850)。Project supported by the Major Special Foundation from Ministry of Science and Technology of China (No. 2012ZX0002014-005), and the General Program of the National Natural Science Foundation of China (No. 810850)

[作者简介] 朱洋洋 (1987 -), 男, 安徽省阜阳市人, 硕士生, 主要从事免疫细胞治疗方面的研究。E-mail: yykaoyan2010@126.com

[通信作者] 钱其军 (Qian Qijun, corresponding author), E-mail: qianqj@163.com

恶性肿瘤的治疗一直是一个世界性问题, 细胞治疗一直以来备受科学家们的关注^[1-2]。将体外激活的自体或异体免疫效应细胞输注给患者, 以杀伤患者体内肿瘤细胞的过继免疫细胞治疗成为研究的热点, 但疗效尚不能令人满意^[3]。近年来, 一种新的免疫治疗方法——嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor, CAR) 基因修饰 T 细胞显示出良好的靶向性、杀伤性和持久性为过继性细胞免疫治疗注入了新的活力, CAR 的设计通常由胞外区、跨膜区和胞内信号区组成^[4-6]。第 3 代 CAR 的设计可以具有更强的细胞信号转导作用, 可使修饰的 T 细胞增殖和持续分泌细胞因子, 显示出良好的治疗前景; 但由于会产生过强的信号级联反应, 仅在黑素瘤和白血病中疗效显著^[7-8]。

血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF) 在多种人类实体瘤中过表达。本研究在前人 CAR 设计的基础上, 构建含 VEGF 受体 1(vascular endothelial growth factor receptor 1, VEGFR1/FLT1) 第 2 结构域和人 CXC 趋化因子受体 3 [chemokine (C-X-C motif) receptor 3, CXCR3] C4 胞内区的 CAR(图 1), 以期找到可以高效修饰 T 细胞, 使更多的 T 细胞集中到肿瘤部位, 以取得更好治疗效果的方法。



图 1 FLT1-CAR 基因结构图

Fig. 1 FLT1-CAR gene structure

1: Signal peptide; 2: VEGF binding domain; 3: CD28 transmembrane- intracellular domain; 4: CXCR3 intracellular domain

1 材料与与方法

1.1 细胞株及主要试剂

E. coli 菌株 DH5 α 为本实验室保存。表达 SV40 大 T 抗原的 293T 细胞购自康成公司, Jurkat 细胞购自美国 ATCC 细胞库(TIB-152)。含 *IREs*、*EGFP* 及抗性基因 *neo* 的慢病毒载体 pLV120gn 为本实验室改造保存(pLV120 载体酶切连接上 EGFP 及抗性基因 *neo*, 即为 pLV120gn)。pCMVdelta8.91、pMD.G 载体购自美国 Invitrogen 公司。质粒大量制备试剂盒购自 Qiagen 公司, RPMI 1640、DMEM 均购自 Gibco 公司, FBS 购自 PAA 公司, G418(氨基糖苷类抗生素)、polybrene 均购自 Sigma 公司, 抗重组人 VEGF 165、Anti-VEGF R1/Flt-1-Phycoerythrin 单抗

均购自 R&D 公司。所有引物均在 Invitrogen 公司合成。激光共聚焦显微镜(DMI3000 B)、Beckman 流式细胞仪(Cytomics FC 500)均购自 Leica 公司。

1.2 Jurkat 细胞的培养

Jurkat 细胞加入含 10% 胎牛血清、硫酸庆大霉素(终质量浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)的 RPMI-1640 培养液中, 置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中培养。293T 细胞使用 DMEM 培养基, 0.25% 的胰蛋白酶消化传代。

1.3 重组质粒 pLV120gn-FLT1-CAR 的构建

将 pLV120gn 和含 *EcoR* I / *Xho* I 酶切位点的 *FLT1-CAR* 基因(768 bp, 由 Invitrogen 公司全基因合成)分别用 *EcoR* I / *Xho* I 酶切回收后, 经 DNA 连接酶 Solution I 连接过夜并转化 DH5 α 大肠杆菌, 挑选单个克隆到 LB 培养液管中摇菌, 小抽、酶切后进行 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 鉴定正确后命名为 pLV120gn-FLT1-CAR, 质粒图谱如图 2。

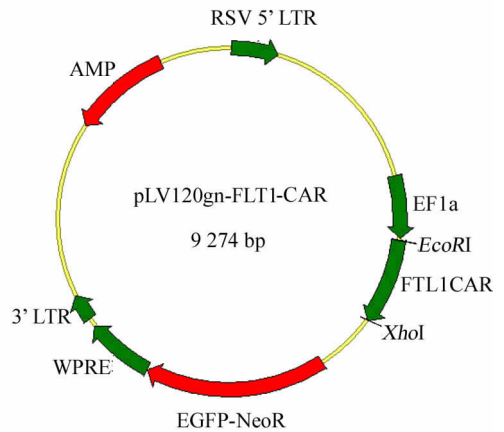


图 2 重组质粒 pLV120gn-FLT1-CAR 示意图

Fig. 2 Schematic diagram of recombinant plasmid pLV120gn-FLT1-CAR

1.4 重组慢病毒 LV-gn-FLT1-CAR 的包装和生产

转染前 1 d, 用 0.1% 明胶室温包被 10 cm 培养皿 30 min, 于 10 cm 培养皿上培养 2×10^6 个 293T 细胞。当细胞汇合度至 70% ~ 80% 时换液, 在 1.5 ml 离心管中滴加 ddH $_2$ O 440 μl 吸取表达质粒: 包装质粒(pCMVdelta8.91): 包膜质粒(pMD.G) = 3: 2: 1, 总 30 μg , 混合到灭菌水中, 总体积 450 μl , 吹打数次混匀, 并设空载质粒 pLV120gn 作为对照组。向上述体系中逐滴加入 50 μl 2.5 mol/L CaCl_2 , 吹打混匀, 加入 $2 \times$ Hanks 500 μl , 充分混匀, 室温静置 10 min; 将混合液立即加入 293T 细胞培养皿中, 平行晃动混匀, 转染后 8 h 换液。48、72 h 分别收集病毒上清, 将收

集的病毒上清用 0.25 μm 的滤膜过滤, 2 500 \times g, 离心 40 min, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻存备用。

1.5 慢病毒 LV-gn-FLT1-CAR 滴度的测定及 G418 筛选浓度的确定

收集富含慢病毒 LV-gn-FLT1-CAR 颗粒的培养上清液, 浓缩后得到高滴度的病毒浓缩液。采用磷酸钙转染法瞬时感染 293T 细胞, 培养 48 h 后, 通过慢病毒表达载体编码的 EGFP 荧光来计算病毒滴度, 病毒滴度 = 荧光细胞数/该孔病毒原液体积。按细胞密度为 3×10^3 个/孔接种 Jurkat 细胞于 24 孔板, 通过观察不同质量浓度 G418 (100、200、300、400、500、600、700、800、900 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 对 Jurkat 细胞生长的影响, 最终确定 G418 筛选浓度。

1.6 重组慢病毒 LV-gn-FLT1-CAR 感染 Jurkat 细胞

将 Jurkat 细胞按 5×10^4 个/孔加入 24 孔板, 并加入 100 μl 培养液、200 μl 浓缩病毒液 (MOI = 30) 和 0.5 μl 聚凝胺, 30 min 后补加 300 μl 培养液, 8 h 后离心换液。加入 G418 筛选 14 d 后, 取其细胞稀释至 96 孔板中培养, 每孔约 10 个细胞, 4 d 后有荧光细胞的孔换液, 第 6 天挑取带荧光的细胞团放入 96 孔板中, 共挑取 6 个孔。每隔 2 d 给细胞换液, 后转至 24 孔板培养, 进一步扩大培养。

1.7 PCR 鉴定 FLT1-CAR 基因的表达

合成 PCR 鉴定 FLT1-CAR 基因的引物: 上游引物为 5'-ACCATGGAGTTTTGGCTGAG-3', 下游引物为 5'-ATCACAAGCCCGAGTAGGAG-3'; 预测产物大小为 751 bp。按照 Biomed 细胞基因组 DNA 快速提取试剂盒说明书提取细胞基因组 DNA 进行 PCR 鉴定。PCR 反应条件为: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、3 min, $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、30 s, $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、30 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、1 min, 30 个循环后, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、10 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定产物并拍照, 采用 Image J 软件对电泳条带进行灰度值分析。

1.8 流式细胞术检测 FLT1-CAR 蛋白的表达

取 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 个细胞, PBS 洗 1 次, 离心去上清, 加入 100 μl PBS 重悬, 加入 10 μg 鼠 IgG 孵育 15 min; 加 10 μl PE-VEGFR1 试剂, 冰上孵育 30 min, 洗 2 次; 加入 1 ml PBS 重悬细胞, 准备上机检测。

1.9 趋化实验检测 Jurkat 细胞对 VEGF 的趋向性

操作按 Millipore 公司 Transwell 说明书进行。在 Transwell 板下室加入 1.25 ml 含相应浓度 VEGF 的血清培养基, 按 1×10^5 个/孔加 200 μl 细胞悬液于上室, 将上室置于下室之中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 12 h。取出上室, 除去残留在上室内表面的细胞, 上室用 PBS

洗涤, 迁移上室膜外的细胞用 4% 甲醛固定, 锥虫蓝染色, PBS 清洗, 显微镜下 ($\times 200$) 计算迁移细胞数, 取 5 个视野细胞计数平均值。

1.10 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 19.0 统计学软件, 组间比较采用 t 检验, 单因素方差分析 (One-way ANOVA), 以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 重组质粒 pLV120gn-FLT1-CAR 的成功构建

pLV120gn-FLT1-CAR 质粒经 *EcoR* I / *Xho* I 双酶切后, 得到两段长度分别为 8 518 和 756 bp, 与预测条带大小一致。经多组其他酶切 (*EcoR* I + *Xho* I, *Kpn* I + *Age* I, *Pst* I, *Hind* III) 鉴定, 结果均正确 (图 3)。

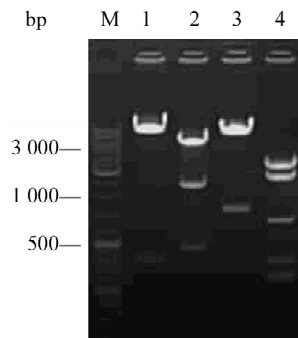


图 3 重组质粒 pLV120gn-FLT1-CAR 的酶切鉴定

Fig.3 Identification of recombinant plasmid pLV120gn-FLT1-CAR by enzyme digestion

1: *EcoR* I + *Xho* I (756 bp + 8 518 bp),
2: *Kpn* I + *Age* I (863 bp + 2 268 bp + 6 143 bp),
3: *Pst* I (1 495 bp + 7 779 bp), 4: *Hind* III
(583 bp + 730 bp + 1 298 bp + 2 686 bp + 3 977 bp), M: Marker

2.2 重组慢病毒 LV-gn-FLT1-CAR 的滴度测定及 G418 最佳筛选浓度确定

用 pLV120gn-FLT1-CAR 与慢病毒包装质粒共转染 293T 细胞, 收集重组慢病毒命名为 LV-gn-FLT1-CAR。病毒浓缩液转染 293T 细胞, 逐孔稀释法计数 EGFP 阳性细胞数。病毒滴度 7.5×10^6 TU/ml, 即病毒成功包装, 可用于后续研究。培养 14 d 后 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度以上 G418 孔中 Jurkat 细胞全部死亡, 其他组浓度中的细胞均有不同程度的死亡, 最后确定 G418 筛选最佳质量浓度为 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

2.3 重组慢病毒 LV-gn-FLT1-CAR 成功感染 Jurkat 细胞

LV-gn-FLT1-CAR 病毒感染 Jurkat 细胞 3 d 后会有少许荧光。3 d 后转移绿荧光细胞到 96 孔板中培养, 得到克隆细胞, 进一步扩大培养到中瓶, 如图 4 所示, Jurkat 1 细胞中荧光率接近 100%。共筛选到两个克隆, 分别命名为 Jurkat-gn-FLT1-CAR-1(简称 Jurkat 1)、Jurkat-gn-FLT1-CAR-2(简称 Jurkat 2)。

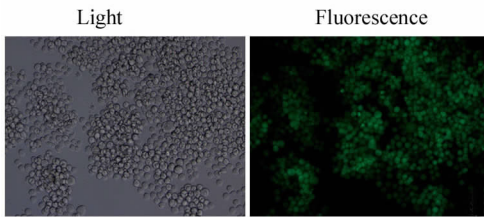


图 4 重组慢病毒 LV-gn-FLT1-CAR 感染 Jurkat 细胞(×200)

Fig. 4 Jurkat cells infected by recombinant lentivirus LV-gn-FLT1-CAR (×200)

2.4 LV-gn-FLT1-CAR 感染后 Jurkat 细胞中 FLT1-CAR 基因的表达

PCR 法扩增 FLT1-CAR 基因, 电泳结果(图 5)显示, 所筛选的 Jurkat 1、Jurkat 2 细胞中的扩增产物长度(751 bp)与预测大小一致。提示 LV-gn-FLT1-

CAR 成功感染所筛选的两个克隆, 进而选此两个克隆用于后续实验。

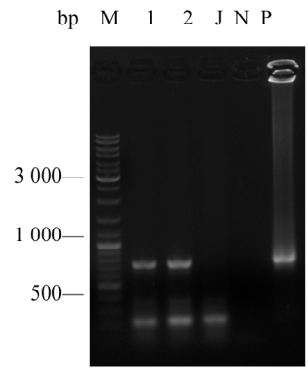


图 5 Jurkat 1、Jurkat 2 阳性克隆的 PCR 鉴定
Fig. 5 Identification of positive clones of Jurkat 1 and Jurkat 2 by PCR

P: Positive control; N: Negative control; J: Jurkat cell; 1: Jurkat 1 cells; 2: Jurkat 2 cells; M: Marker

2.5 LV-gn-FLT1-CAR 感染后 Jurkat 细胞中 FLT1-CAR 蛋白的表达

流式细胞术检测结果(图 6)显示, Jurkat 1、Jurkat 2 细胞均有 FLT1-CAR 蛋白的表达, 其中 Jurkat 1 细胞 FLT1-CAR 阳性表达率为 95.3%, 对照细胞 Jurkat 的 FLT1 表达率为 2.7%, 说明 FLT1-CAR 蛋白在所筛选的细胞株 Jurkat 1、Jurkat 2 中已稳定表达, 可用于后续实验。

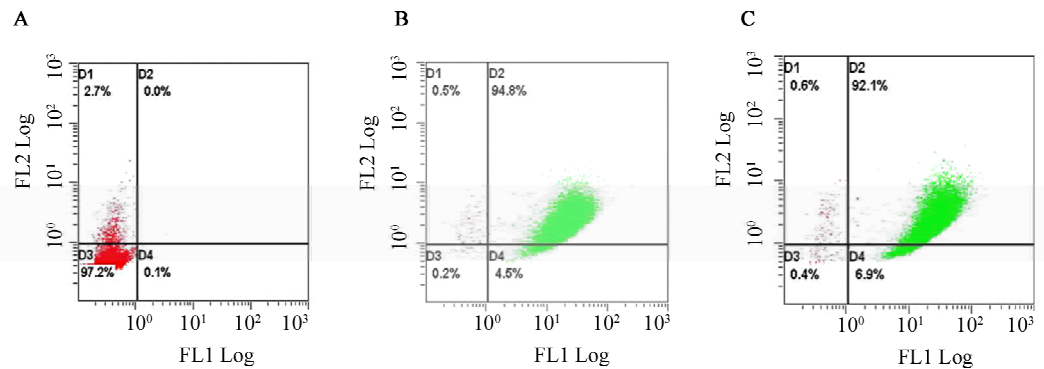


图 6 Jurkat 1、Jurkat 2 细胞中 FLT1-CAR 蛋白的表达
Fig. 6 Expression of FLT1-CAR protein in Jurkat 1 and Jurkat 2 cells

A: Ctrl; B: Jurkat 1 cell; C: Jurkat 2 cells

2.6 LV-gn-FLT1-CAR 感染后 Jurkat 细胞对 VEGF 的趋化作用

研究 LV-gn-FLT1-CAR 感染后 Jurkat 细胞对

VEGF 的趋化作用, 结果(图 7)显示, 所筛选的细胞株 Jurkat 1、Jurkat 2 对 VEGF 均具有很好趋化效果。其中, 细胞株 Jurkat 1 对 VEGF 的趋化效果显著, 当

VEGF 质量浓度为 100 ng/ml 时, Jurkat 1 趋化效果是 Jurkat 细胞的接近 4 倍[(62 ± 8) vs (18 ± 5) 个, $P < 0.01$]。100 ng/ml VEGF 对 Jurkat 2 也有明显的趋化效果。

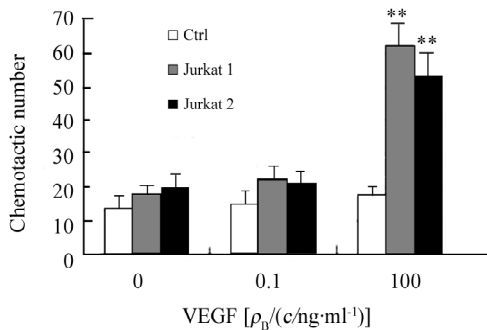


图7 LV-gn-FLT1-CAR 感染后 Jurkat 细胞对 VEGF 的趋化效果

Fig. 7 Chemotactic effect of LV-gn-FLT1-CAR-infected Jurkat cells in response to VEGF

** $P < 0.01$ vs 0 ng/ml group

3 讨论

大多数肿瘤组织分泌趋化因子并表达趋化因子受体,趋化因子与其受体相互作用在肿瘤的发生、发展过程中发挥着重要的作用。有些趋化因子能促进肿瘤的增殖,促进血管形成,诱导肿瘤细胞移动和黏附内皮细胞,加速肿瘤的扩散和转移^[9]。文献^[10-13]报道, CXCR3 的表达在促进 T 细胞迁移方面扮演重要角色,经 CXCR3 基因修饰的 Jurkat 细胞在相应趋化因子刺激下的迁移能力是正常 Jurkat 细胞的 10 倍左右^[14]。

血管生成是肿瘤生长和转移的一个特征和基本步骤, VEGF 途径在肿瘤血管生成中发挥了核心作用^[15]。 VEGF165 主要以可溶性形式存在,在多种实体肿瘤中过表达^[16]。 VEGF 可与 3 种 VEGFR 结合,其中 VEGF 和 VEGFR1 之间的亲和力为最高^[17-18]。 VEGFR1 的胞外区有 7 个 Ig 样结构域组成,第 2、3 结构域在与 VEGF 的结合过程中起主要作用^[19]。研究^[10,20]表明, CXCR3 胞内信号转导对嗜酸粒细胞、单核细胞和淋巴细胞具有趋化作用,对 T 细胞具有活化作用。通过 GenBank 检索,本研究选用能与 VEGF 有效结合的 VEGFR1 第 2 结构域和可以实现胞内信号转导的 CXCR3 胞内区(C4 区),构建 FLT1-CAR 结构作为信号肽——VEGF 结合区-CD28(跨膜 + 胞内区)-CXCR3 胞内区。筛选表达

FLT1-CAR 的 Jurkat 细胞株作为研究模型。 PCR 鉴定证明,通过慢病毒载体 LV-gn-FLT1-CAR 使 FLT1-CAR 目的基因整合到 Jurkat 细胞基因组内。流式细胞术证明, FLT1-CAR 可以在经 G418 筛选的 Jurkat 细胞(Jurkat 1、Jurkat 2)内表达。趋化实验结果表明,相对于 Jurkat 细胞,所筛选的细胞株 Jurkat 1、Jurkat 2 细胞对 VEGF 均有明显趋化效果。可能由于本研究构建的慢病毒载体过大,而病毒载体每增加 1 000 bp 得到相应病毒滴度就降低约 10 倍^[21],导致获得的病毒滴度不高,从而病毒液感染原代 T 细胞效率不高,因此没能进行体内实验,这有待进一步优化。

本研究成功将 FLT1-CAR 基因转染 Jurkat 细胞,而 Jurkat 细胞是人类 T 细胞淋巴瘤细胞株,与正常 T 淋巴细胞具有相似的生长特性,因此,本研究为下一步转染原代 T 淋巴细胞奠定了实验基础。同时,所筛选表达 FLT1-CAR 的 Jurkat 细胞株 Jurkat 1、Jurkat 2 对 VEGF 有很明显的趋化效果,慢病毒感染原代 T 细胞后,使原代细胞可以更好地趋向 VEGF 浓度高的地方,即 T 细胞可以向过表达 UEGF 的肿瘤部位集中,进而高效地杀伤肿瘤细胞。本研究为寻找对 T 细胞趋化起高效促进作用的细胞内信号区提供了方向,并为临床细胞治疗提供了很好的细胞模型。

[参考文献]

- [1] Romeo C, Seed B. Cellular immunity to HIV activated by CD4 fused to T cell or Fc receptor polypeptides [J]. Cell, 1991, 64 (5): 1037-1046.
- [2] Roberts MR, Qin L, Zhang D et al. Targeting of human immunodeficiency virus-infected cells by CD8⁺ T lymphocytes armed with universal T-cell receptors [J]. Blood, 1994, 84(9): 2878-2889.
- [3] Borghaei H, Smith MR, Campbell KS. Immunotherapy of cancer [J]. Eur J Pharmacol, 2009, 625(1/3): 41-54.
- [4] Sadelain M, Brentjens R, Rivière I. The promise and potential pitfalls of chimeric antigen receptors [J]. Curr Opin Immunol, 2009, 21(2): 215-223.
- [5] Chicaybam L, Sodrè AL, Bonamino M. Chimeric antigen receptors in cancer immuno-gene therapy: Current status and future directions [J]. Int Rev Immunol, 2011, 30(5/6): 294-311.
- [6] 王艺,赵颖颖,韩双印. 基于嵌合抗原受体修饰 T 细胞的肿瘤免疫治疗新策略 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2013, 20(4): 383-390.
- [7] Rosenberg SA, Dudley ME. Adoptive cell therapy for the treatment of patients with metastatic melanoma [J]. Curr Opin Immunol, 2009, 21(2): 233-240.
- [8] Porter DL, Levine BL, Kalos M, et al. Chimeric antigen receptor-

modified T cells in chronic lymphoid leukemia [J]. N Engl J Med, 2011, 365(8): 723-733.

[9] Richmond A, Yang J, Su Y. The good and the bad of chemokines/chemokine receptors in melanoma [J]. Pigment Cell Melanoma Res, 2009, 22(2): 175-186.

[10] Lacotte S, Brun S, Muller S, et al. CXCR3, inflammation, and autoimmune diseases [J]. Ann N Y Acad Sci, 2009, 1173: 310-317.

[11] Groom JR, Luster AD. CXCR3 in T cell function [J]. Exp Cell Res, 2011, 317(5): 620-631.

[12] Bach TL, Chen QM, Kerr WT, et al. Phospholipase cbeta is critical for T cell chemotaxis [J]. J Immunol, 2007, 179(4): 2223-2227.

[13] Oo YH, Banz V, Kavanagh D, et al. CXCR3- dependent recruitment and CCR6-mediated positioning of Th-17 cells in the inflamed liver [J]. J Hepatol, 2012, 57(5): 1044-1051.

[14] Dar WA, Knechtle SJ. CXCR3-mediated T-cell chemotaxis involves ZAP-70 and is regulated by signalling through the T-cell receptor [J]. Immunology, 2007, 120(4): 467-485.

[15] Sitohy B, Nagy JA, Dvorak HF. Anti-VEGF/VEGFR therapy for cancer: Reassessing the target [J]. Cancer Res, 2012, 72(8): 1909-1914.

[16] Tie J, Desai J. Antiangiogenic therapies targeting the vascular endothelia growth factor signaling system [J]. Crit Rev Oncog, 2012, 17(1): 51-56.

[17] Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: Basic science and clinical progress [J]. Endocr Rev, 2004, 25(4): 581-611.

[18] Wu FT, Stefanini MO, Mac Gabhann F, et al. A systems biology perspective on sVEGFR1: Its biological function, pathogenic role and therapeutic use [J]. J Cell Mol Med, 2010, 14(3): 528-552.

[19] Rahimi N. VEGFR-1 and VEGFR-2: Two non-identical twins with a unique physiognomy [J]. Front Biosci, 2006, 11: 818-829.

[20] Sauty A, Colvin RA, Wagner L, et al. CXCR3 internalization following T cell-endothelial cell contact: Preferential role of IFN-inducible T cell alpha chemoattractant (CXCL11) [J]. J Immunol, 2001, 167(12): 7084-7093.

[21] al Yacoub N, Romanowska M, Haritonova N, et al. Optimized production and concentration of lentiviral vectors containing large inserts [J]. J Gene Med, 2007, 9(7): 579-584.

[收稿日期] 2013 - 05 - 01 [修回日期] 2013 - 07 - 20

[本文编辑] 韩丹, 周玲琳

· 读者 · 作者 · 编者 ·

正确使用数的修约规则

在生物医学领域的各种研究中,对实验测定和计算所得的数据往往都要进行修约。过去习惯使用“四舍五入法”进行数的修约,该方法是不正确的,我们应将其废除。根据国家标准《出版物上数字用法的规定》,数的修约应遵照“四舍六入”的法则进行,具体介绍如下:

- (1) 数的修约规则的简明口诀: 4 舍 6 入 5 看后, 5 后有数便进 1, 5 后为 0 看左数, 左数奇进偶舍弃。
- (2) 数的修约操作示例见表 1。

表 1 数的修约操作示例

口 诀	示 例	
	已知数	修约数(设保留 1 位小数)
4 舍 6 入 5 看后	5. 741 8	5. 7
	5. 761 8	5. 8
5 后有数便进 1	5. 751 8	5. 8
5 后为 0 看左数		
左为奇数要进 1	5. 750 0	5. 8
左为偶数则舍弃	5. 650 0	5. 6
	5. 050 0	5. 0(0 为偶数)
无论舍弃多少位	5. 745 46	5. 7(不是由 5. 7455→
均须一次修完毕		5. 746→5. 75→5. 8)