

靶向 4-1BBL 基因 siRNA 抑制 HL-60B 细胞生长的体外研究

王 慧¹, 吴俊英^{1,2}

[摘要] 目的: 观察 4-1BBL 基因小分子干扰 RNA (siRNA) 对 HL-60 细胞生长及诱导其凋亡作用的影响。方法: 化学合成法合成靶向人 4-1BBL 基因 siRNA, 脂质体转染法转染 HL-60B 细胞; 半定量 PCR 和流式细胞术检测转染前后 HL-60B 细胞 4-1BBL 的表达水平, MTT 法检测 HL-60B 细胞增殖, 流式细胞术检测细胞凋亡。结果: 靶向 4-1BBL 基因 siRNA 转染 HL-60B 细胞后, 4-1BBL mRNA 和蛋白的表达明显降低; 细胞增殖被抑制, 其抑制作用在转染后 48 h 最明显, 增生抑制率达到 $(22.1 \pm 2.3)\%$; 细胞凋亡率增加, 由 $(9.8 \pm 2.5)\%$ 上升到 $(32.5 \pm 5.1)\%$ 。结论: 化学合成的 siRNA 在体外能成功抑制靶基因 4-1BBL 的表达和 HL-60B 细胞的增殖, 并有助于细胞趋向凋亡。

[关键词] 4-1BBL; siRNA; HL-60 细胞; 细胞增殖; 细胞凋亡

[中国图书资料分类法分类号] R 392.114 [文献标识码] A

4-1BBL small interfering RNA inhibits the proliferation of HL-60B cell *in vitro*WANG Hui¹, WU Jun-ying^{1,2}

(1. Research Center of Clinical Laboratory Science, 2. Department of Immunology, Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233030, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the influence of 4-1BBL small interfering RNA (siRNA) on the growth and apoptosis of HL-60B cells. **Methods:** The siRNA for 4-1BBL gene was designed and synthesized *in vitro*, and then transfected into HL-60B cells by Lipofectamine; the expression of 4-1BBL mRNA and protein was detected by RT-PCR and flow cytometry, respectively; the proliferative rate of HL-60B cells was determined by methyl thiazoy tetrazolium (MTT), and the cell apoptosis was analyzed by flow cytometry. **Results:** After the siRNA for 4-1BBL gene was transfected into HL-60B cells, the expression of 4-1BBL gene and protein decreased, the growth of cells was repressed and the proliferation rate of HL-60B cells decreased. The inhibition rate was $(22.1 \pm 2.3)\%$ 48 h after transfection; the apoptosis rate increased from $(9.8 \pm 2.5)\%$ to $(32.5 \pm 5.1)\%$. **Conclusions:** Chemically synthetic siRNA can decrease 4-1BBL gene expression, inhibit cellular proliferation and promote apoptosis *in vitro*.

[Key words] 4-1BBL; siRNA; HL-60 cell; cell proliferation; apoptosis

4-1BBL 分子作为共刺激分子肿瘤坏死因子 (TNF) 家族的重要成员, 主要表达于活化的 B 细胞、单核细胞、树突细胞等抗原提呈细胞表面^[1]。有研究^[2]表明, 4-1BBL 分子也可表达于多种肿瘤细胞表面, 但表达水平差异很大。我们在前期实验中, 通过将人 4-1BBL 基因转染 4-1BBL 表达不良的 HT-29 细胞株, 发现可有效诱导人细胞毒性 T 细胞活化及杀伤活性的发挥^[3]。4-1BBL/4-1BB 在机体免疫调节中的作用是十分复杂的, 肿瘤细胞表面异常高表达的 4-1BBL 是否与肿瘤细胞的过度增殖及诱导 T 细胞的凋亡异常有关尚未阐明。

RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 是近年来发展起来的新兴的基因阻断技术。它通过内源性或

外源性双链 RNA (double-stranded RNA, dsRNA) 触发同源性 mRNA 的降解, 从而使该基因表达沉寂^[4]。由于 RNAi 具有高度的序列专一性, 可以特异地使特定基因沉默, 导致功能丧失或基因表达降低, 而且少量的 dsRNA 可促进大量同源 mRNA 的降解^[5], 因此 RNAi 可以作为一种强有力的研究工具, 用于功能基因组和靶基因治疗肿瘤的研究。本试验利用该技术特异性阻断 4-1BBL 基因表达, 观察其对白血病细胞生长的影响, 初步探讨 4-1BBL 分子过表达与肿瘤发生的关系及机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 HL-60B 肿瘤细胞购于中科院细胞研究所。

1.1.2 主要试剂 RPMI 1640 培养基和 OPTI-MEM 培养基均购自美国 GIBCO 公司, 新生牛血清购自杭州四季青生物制品公司, DERIE-C 转染试剂和 Trizol 购于美国 Invitrogen 公司, RT 及 PCR 试剂盒购自 Fermentas 公司, MTT 购于 Sigma 公司, 焦碳

[收稿日期] 2009-12-23

[基金项目] 安徽省教育厅自然科学研究重点资助项目 (KJ2007A097)

[作者单位] 蚌埠医学院 1. 临床检验诊断学实验中心, 2. 免疫学教研室, 安徽 蚌埠 233030

[作者简介] 王 慧 (1980 -), 女, 硕士研究生, 住院医师。

[通讯作者] 吴俊英, 研究生导师, 教授, Email: jywu8191@126.com

酸二乙酯购于 Invitrogen 公司, Annexin V/FITC 购自晶美公司。

1.1.3 PCR 引物 4-1BBL PCR 引物设计参照文献 [2], β -actin 引物依据 NCBI 提供的人基因 mRNA 序列,按照引物设计原则使用软件 Primer Primer 5 和 Oligo 6.0 设计,经 NCBI 网站 BLAST 验证其特异性,由上海生工生物工程技术有限公司合成。人 4-1BBL 上游引物序列:5'-GTT TCA CTT GCG CTG CAC CTG CAG CCA CTG-3',下游引物序列:5'-GGC TCT AGA TAT CAA GGT CCA ACT TGG GGA AGG-3'(产物 465 bp); β -actin 上游引物序列:5'-AAC AGA GGC ATC CTC ACC CT-3',下游引物序列:5'-TAC ATG GCT GGG GTG TTG AA-3'(产物 214 bp)。

1.1.4 siRNA 序列 由上海吉玛制药公司设计合成 4-1BBL 基因 3 个序列的 siRNA,分别位于 693、372、UTR,同时合成阴性对照 NC-siRNA 序列,把特异性 siRNA 序列输入 NCBI 数据库进行比较 (Blast),与其他基因和 EST 序列没有同源性。4-1BBL-UTR Sense:5'-GUA AUA CGU GAG GAA UUU ATT-3',Anti-sense:5'-UAA AUU CCU CAC GUA UUA CTT-3';4-1BBL-372 Sense:5'-GCU ACA AAG AGG ACA CGA ATT-3',Anti-sense:5'-UUC GUG UCC UCU UUG UAG CTC-3';4-1BBL-693 Sense:5'-CCA CAG UCU UGG GAC UCU UTT-3',Anti-sense:5'-AAG AGU CCC AAG ACU GUG GCG-3';Negative control FAM S-ense:5'-UUC UCC GAA CGU GUC ACG UTT-3',Anti-sense:5'-ACG UGA CAC GUU CGG AGA ATT-3'。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及转染 HL-60B 细胞用 RPMI 1640 培养液(含 10% 小牛血清)于 37 °C,5% CO₂ 培养箱内培养。将合成的 4-1BBL siRNA 和 Negative Control(NC) siRNA 粉末用无 RNase 水溶解,配成 20 μ mol/L 的储存液。转染当天收集培养的细胞,用 OPTI-MEM 培养基清洗 1 次,再用 OPTI-MEM 培养基调整细胞浓度至 3 \times 10⁵/ml,然后将细胞悬液加入到 6 孔板内,每孔 2 ml,取 250 μ l OPTI-MEM 培养基中加入 22 μ l siRNA,振荡混匀,再取 250 μ l OPTI-MEM 培养基,加入 7.5 μ l 转染试剂 DMERIC-Reagent,振荡混匀,室温孵育 5 min 后混匀,室温孵育 20 min 后将此混合物加入到细胞悬液里,摇晃板混匀,siRNA 终浓度为 176 nmol/L,转染 6 h 后用含 10% 小牛血清的无抗生素的 1640 更换培养液继续培养。

1.2.2 RT-PCR HL-60B 细胞转染 48 h 后,离心

后弃培养基加入 Trizol,提取总 RNA,紫外分光光度计测定 RNA 的浓度。RT-PCR 分两步进行:(1)反转录为 20 μ l 体系,1 μ g 总 RNA 和 2 μ l random hexamer primer(0.2 μ g/ μ l)混合加水补齐至 12 μ l,70 °C 5 min,冰浴 1 min;加入 5 \times reaction buffer、Ribolock™ Ribonuclease inhibitor (20 u/ μ l)、10 mmol/L dNTP mix,37 °C 5 min,再加入 Reverse Transcriptase(200 u/ μ l)25 °C 10 min,42 °C 60 min,70 °C 10 min。(2)PCR 为 25 μ l 体系:2 μ l 总 cDNA 模版、上下游引物各 1 μ l、2 \times Taq PCR MasterMix 12.5 μ l、无 RNase 水 8.5 μ l;94 °C 预变性 5 min,94 °C 变性 1 min、62 °C 退火 45 s、72 °C 延伸 45 s,反应 35 个循环,72 °C 充分延伸 10 min。各基因扩增产物在 1% 的琼脂糖上电泳,凝胶成像仪分析结果。

1.2.3 流式细胞术(FCM)检测蛋白表达 离心收集转染 48 h 的 HL-60 细胞,分为空白对照管、同型对照管、阴性对照管、转染管及未转染管,每管加入预冷的 PBS 缓冲液 1 ml,4 °C,1 500 r/min 离心 5 min,洗涤 2 次,每管加入 PBS 液 50 μ l,同型对照管加入 PE 标记的鼠抗人 IgG 2 μ l,阴性对照管、转染管、未转染管分别加入鼠抗人 4-1BBL 染液 2 μ l,混匀、避光、4 °C 作用 30 min 后每管加入预冷的 PBS 1 ml,4 °C,1 500 r/min 离心 5 min 后每管加入 300 μ l 预冷的 PBS 液,FCM 检测 HL-60B 细胞表面 4-1BBL 表达水平。

1.2.4 FCM 检测细胞凋亡 收集转染 48 h 的 HL-60B 细胞,每管加入预冷的 PBS 缓冲液 1 ml,4 °C,1 500 r/min 离心 5 min 洗涤 1 次后每管加入稀释后的结合缓冲液重悬细胞,再加入 Annexin V/FITC 3 μ l,室温避光 20 min 后加入 PI 5 μ l,同时做第一荧光补偿管(只加 Annexin V/FITC)和第二荧光补偿管(只加 PI),在各管中加入预冷的稀释后的结合缓冲液 200 μ l,FCM 检测淋巴细胞凋亡水平。

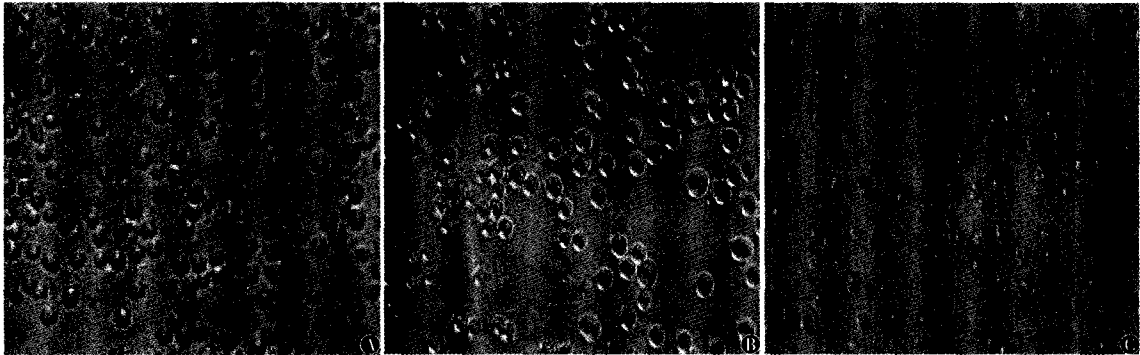
1.2.5 MTT 法检测细胞增殖 实验分空白对照组、阴性对照组、转染组,细胞按 2 \times 10⁵/ml 接种于 24 孔板,分别于转染后 24、48、72、96 h,MTT 法检测细胞增生状态:每组每孔取 100 μ l 加入 96 孔板中,每孔加入 20 μ l 5 mg/ml MTT 液,37 °C,5% CO₂ 培养箱中继续培养 4 h 后每孔加入 100 μ l 三联溶解液 37 °C,5% CO₂ 培养箱中过夜后,在全自动酶标仪上测 570 nm 波长各孔的吸光度(A)值。

$$\text{增殖抑制率} = \frac{1 - \text{实验组 A 值}}{\text{空白对照组 A 值}} \times 100\%$$

1.2.6 统计学方法 采用方差分析和 *q* 检验。

2 结果

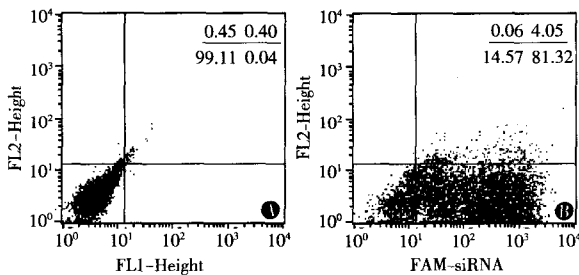
2.1 转染后 HL-60B 细胞的形态学改变 转染 48 h 后,倒置显微镜下观察发现,阴性对照



A: Blank control; B: NC-siRNA; C: 4-1BBL-siRNA

图 1 转染 48 h 后 HL-60 细胞的形态

2.2 细胞转染效率 用试剂盒所带的 FAM 荧光标记的 NC-siRNA 分一次转染及连续两次转染法转染 HL-60 细胞,7 h 后其转染阳性率分别为 $(65.6 \pm 12.2)\%$ 和 $(56.0 \pm 9.1)\%$ ($n=5$),所以后续试验选取一次转染法(见图 2)。



A: 空白对照组; B: 实验组

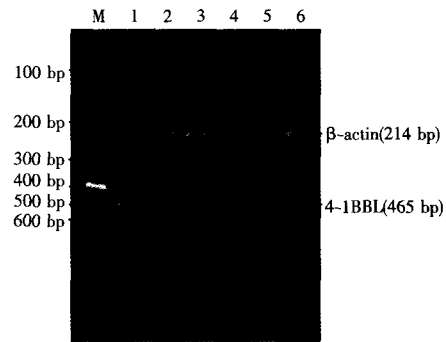
图 2 脂质体法转染 FAM-siRNA 后阳性率

2.3 4-1BBL mRNA 表达的变化 用 3 对特异性 4-1BBL-siRNA 序列 (-693, -372, -UTR) 分别转染 HL-60B 细胞后,用 RT-PCR 半定量法(PCR 产物电泳条带净光密度值)检测 4-1BBL 基因的表达,并以 4-1BBL/ β -actin 比值计算基因抑制率,结果显示 4-1BBL-siRNA-693, -372, -UTR 序列对 4-1BBL 基因表达抑制率分别为 $(72.8 \pm 8.7)\%$, $(58.1 \pm 7.4)\%$ 和 $(25.0 \pm 4.8)\%$ 。经重复试验结果表明,4-1BBL-siRNA-693 序列转染对基因沉默效果较稳定,选择用于后续试验(见图 3、4)。

2.4 4-1BBL 表达的变化 阴性对照组与空白对照组相比,蛋白表达水平相似 ($P > 0.05$),4-1BBL-siRNA 组与空白对照组相比,4-1BBL 表达水平下降 ($P < 0.01$) (见图 5、表 1)。

2.5 siRNA 对 HL-60B 细胞抑制作用 转染组与阴性对照组及空白对照组比较,加入 siRNA 后 24、48、

组、空白对照组细胞呈半贴壁生长,细胞轮廓清楚,生长旺盛;而 4-1BBL siRNA 组细胞集落较少,细胞碎片增多,出现碎裂死亡现象(见图 1)。



M: DNA Marker; 1: Blank control; 2: DMRIE-C Reagent; 3: NC-control; 4: siRNA-372; 5: siRNA-693; 6: siRNA-UTR

图 3 RT-PCR 检测转染 siRNA 后 HL-60 细胞 4-1BBL mRNA 表达水平

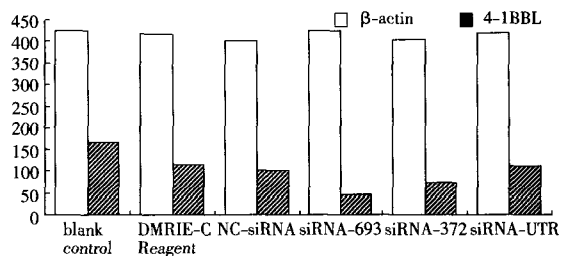


图 4 转染特异性 4-1BBL-siRNA 后基因表达 RT-PCR 净光密度半定量分析

72、96 h 细胞增殖均受到抑制 ($P < 0.05$),其抑制作用在转染后 48、72 h 最明显,增生抑制率分别为 $(22.1 \pm 2.3)\%$ 和 $(14.0 \pm 1.9)\%$,以后逐渐下降。阴性对照组对 HL-60B 细胞抑制作用不明显,与空白对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (见表 2)。

2.6 4-1BBL-siRNA 对 HL-60 细胞凋亡率的影响 4-1BBL-siRNA 作用于细胞 48 h 后,细胞凋亡率由 $(9.8 \pm 2.5)\%$ 上升到 $(32.5 \pm 5.1)\%$,与阴性对照组及空白对照组相比差异有统计学意义 ($P <$

0.01), 阴性对照组与空白对照组相比, 凋亡率水平相似 ($P > 0.05$) (见图 6、表 3)。

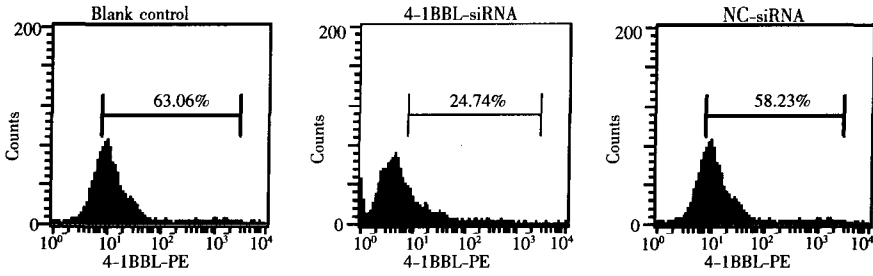


图 5 流式细胞术检测 4-1BBL 蛋白的表达

表 1 4-1BBL-siRNA 干扰后各组细胞蛋白表达率的变化 ($n_i = 4; \bar{x} \pm s$)

分组	表达率 (%)
空白对照组	60.57 ± 2.33
4-1BBL-siRNA	26.58 ± 1.86
NC-siRNA	60.00 ± 1.60
F	397.00
P	<0.01
MS _{组内}	3.817

3 讨论

肿瘤逃逸机体的免疫监视是肿瘤发生的基础, 其机制涉及肿瘤细胞自身的调变和免疫系统的功能障碍。肿瘤细胞和机体免疫细胞相互识别时的信号分子如抗原、共刺激分子和 MHC-I 类分子等表达异常是导致效应 T 细胞功能障碍的主要因素^[6]。

4-1BBL/4-1BB 是继 B7/CD28 之后又一对重要的共刺激分子。有研究^[7]表明, 4-1BB/4-1BBL 可介

表 2 4-1BBL-siRNA 干扰后各组细胞光密度值的变化 ($n_i = 3; \bar{x} \pm s$)

分组	OD _{570 nm}			
	24 h	48 h	72 h	96 h
空白对照组	0.588 4 ± 0.013 2	0.626 9 ± 0.019 6	0.771 5 ± 0.018 1	0.959 0 ± 0.010 6
NC-siRNA	0.576 9 ± 0.004 8	0.601 9 ± 0.001 7 *	0.740 4 ± 0.017 6	0.937 6 ± 0.013 0
4-1BBL-siRNA	0.553 2 ± 0.016 8 *	0.488 1 ± 0.005 7 *	0.663 2 ± 0.010 5 *	0.863 2 ± 0.023 7 *
F	6.046 6	117.417 5	37.430 7	26.993 0
P	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
MS _{组内}	0.000 2	0.000 1	0.000 2	0.000 3

q 检验: 与对照组比较 * $P < 0.05$

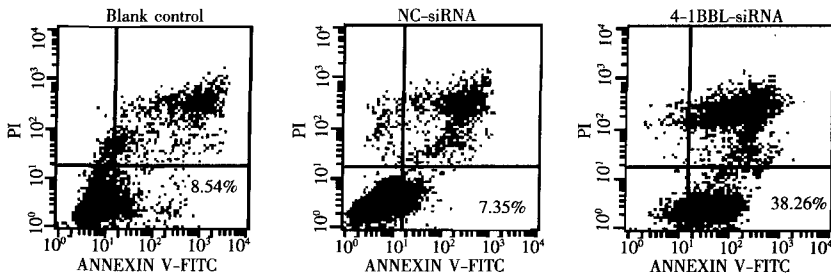


图 6 转染 4-1BBL-siRNA 后 HL-60 细胞凋亡

表 3 转染 4-1BBL-siRNA 后对 HL-60 凋亡的影响 ($n_i = 4; \bar{x} \pm s$)

分组	凋亡率 (%)
空白对照组	9.8 ± 2.5
NC-siRNA	11.0 ± 2.9
4-1BBL-siRNA	32.5 ± 5.1
F	47.96
P	<0.01
MS _{组内}	13.580

导双向信号传递: 当 4-1BBL 作为配体时, 介导活化信号, 促进 T 细胞活化、增殖, 并可阻止已活化的 T 细胞发生活化诱导的细胞死亡; 而当 4-1BBL 作为受体时, 介导的反向信号可诱导细胞发生凋亡, 这可能与机体的自身免疫调节有关。有实验^[8]证实, 在严重流感病毒感染时, 4-1BBL 基因敲除小鼠与野生型小鼠相比其 CD8⁺ T 细胞数量减少, 清除病毒作用减弱, 肺功能受损, 死亡率增加, 说明 4-1BBL/4-1BB 介导的信号可参与 CD8⁺ T 细胞的抗病毒效应。

4-BBL 除能介导活化信号促进 T 细胞活化、增殖外,还能介导逆向信号^[9]。仇红霞等^[10]用激发型抗 4-1BBL 单抗(1F1)刺激高表达 4-1BBL 的肿瘤细胞,发现 1F1 具有明显促进细胞增殖和分泌 IL-6 作用,推测 4-1BBL 可能充当了生长因子受体,并通过 4-1BBL 逆向信号促进白血病细胞生长。本室前期研究也发现,用阻断型抗 4-1BBL 单抗可抑制高表达 4-1BBL 的肿瘤细胞的增殖和分泌 TGF- β ,提示 4-1BBL 信号对肿瘤细胞的过度增殖起一定的促进作用。为了进一步探讨 4-1BB/4-1BBL 逆向信号与肿瘤发生的关系,我们采用 siRNA 技术特异性沉默 HL-60B 细胞高表达的 4-1BBL 基因,观察基因阻断前后对肿瘤细胞生长的影响。

RNAi 是一门新兴的高效、特异、安全、可操作性强的基因阻断技术,在抗病毒、抗肿瘤、抗超敏反应性疾病的治疗中有着深远的应用前景^[11]。用化学合成方法制备 siRNA^[12],所得到的 RNA 序列最为准确,siRNA 的量和纯度都有较高的保证,简化了实验操作。本实验采用化学合成法制备针对 4-1BBL 的 3 对 siRNA 序列,选用专门用于转染悬浮细胞的脂质体转染试剂 DMRIE-C Reagent 转染 HL-60B,7 h 后用 FCM 检测转染效率可达 (65.6 \pm 12.2)%。用 RT-PCR 筛选出一对干扰效率较稳定的 siRNA 序列,RT-PCR 和 FCM 检测显示,转染 48 h 后 4-1BBL mRNA 和蛋白表达水平分别下调了 (72.8 \pm 8.9)% 和 (58.8 \pm 6.2)%,证实了 RNA 干扰技术能有效地抑制 4-1BBL 基因表达。细胞形态学观察发现转染 4-1BBL-siRNA 48 h,HL-60 细胞集落减少,细胞皱缩,细胞碎片增多,出现碎裂死亡现象。MTT 结果显示,4-1BBL 干扰后能有效的抑制 HL-60B 细胞的增殖作用,其抑制作用在转染后 48、72 h 最明显,增生抑制率分别为 (22.1 \pm 2.3)% 和 (14.0 \pm 1.9)%,以后逐渐下降。FCM 检测凋亡结果显示,4-1BBL 基因干扰后细胞凋亡率由干扰前的 (9.8 \pm 2.5)% 上升为 (32.5 \pm 5.1)%,提示 4-1BBL 介导的逆向信号有抑制肿瘤细胞凋亡的作用,通过干扰其信号可促进肿瘤细胞凋亡,为白血病的治疗

提供了新的靶点。至于 4-1BBL 介导的逆向促增殖和诱导细胞凋亡的信号途径还不清楚,有待进一步研究探讨。

[参 考 文 献]

- [1] Kim JA, Averbook BJ, Chambers K, *et al.* Divergent effects of 4-1BB antibodies on antitumor immunity and on tumor-reactive T-cell generation[J]. *Cancer Res*, 2001, 61(5):2031-2037.
- [2] Salih HR, Kosowski SG, Haluska VF, *et al.* Constitutive expression of functional 4-1BB (CD137) ligand on carcinoma cells[J]. *J Immunol*, 2005, 165(5):2903-2910.
- [3] 吕坤, 吴俊英, 李柏青. 人 4-1BB 配体基因真核表达载体的构建、表达及其体外抗肿瘤效应[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2007, 23(6):511-514.
- [4] Fire A, Xu S, Montgomery MK, *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Nature*, 1998, 391(6669):806-811.
- [5] Lipardi C, Wei Q, Paterson BM. RNAi as random degradative PCR: siRNA primers convert mRNA into dsRNAs that are degraded to generate new siRNAs [J]. *Cell*, 2001, 107(3):297-307.
- [6] Inigo T, Eduardo H, Cristiana G, *et al.* Low surface expression of B7-1 (CD80) is an immuno-escape mechanism of colon carcinoma [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(4):2442-2450.
- [7] Ebata T, Mogi S, Hata Y, *et al.* Rapid induction of CD95 ligand and CD4⁺ T cell-mediated apoptosis by CD137 (4-1BB) costimulation [J]. *Eur Immunol*, 2001, 31(5):1410-1416.
- [8] Lin GH, Sedgmen BJ, Moraes TJ, *et al.* Endogenous 4-1BB ligand plays a critical role in protection from influenza-induced disease [J]. *Immunol*, 2009, 182(2):934-947.
- [9] Ebata T, Mogi S, Hata Y, *et al.* Rapid induction of CD95 ligand and CD4⁺ T cell-mediated apoptosis by CD137 (4-1BB) costimulation [J]. *Eur Immunol*, 2001, 31(5):1410-1416.
- [10] 仇红霞, 张学光, 居颂光. 4-1BBL 分子在人急性单核细胞白血病细胞系 U937 和 SH21 的表达及促生长作用 [J]. *江苏医药*, 2006, 32(10):916-918.
- [11] Fougereolles A, Vomlocher HP, Maraganore J, *et al.* Interfering with disease: a progress report on siRNA-based therapeutics [J]. *Drug discovery*, 2007, 443(6):443-453.
- [12] Caplen NJ, Parrish S, Imani F, *et al.* Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98(17):9742-9747.

关于本刊启用稿件在线处理系统的通知

为了加快稿件处理速度,缩短稿件出版周期,方便广大作者投稿及查询稿件处理情况,本刊已开通稿件在线处理系统(<http://xuebao.bbmc.edu.cn>),请作者尽可能应用稿件在线处理系统进行投稿、查稿。本刊稿件在线处理系统的在线办公中心设有作者在线投稿、作者在线查稿、专家在线审稿、编委在线审稿、编辑远程办公和主编在线办公六部分。作者第一次通过该系统向本刊投稿请先注册,并记住注册的用户名和密码。注册登录后就可以向本刊投稿。也可以通过您已注册的用户名和密码登录作者在线查稿,了解稿件处理状态。请不要重复注册,否则可能导致您信息查询不完整。

《蚌埠医学院学报》编辑部