

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.22.001

## KLF4 调控 MMP9 对原发性肝癌的侵袭迁移能力的影响\*

冯 潜, 石世代, 周 勇, 李恩亮, 吴荣寿, 李科浩, 邬林泉<sup>△</sup>

(南昌大学第二附属医院肝胆胰外科, 南昌 330006)

**[摘要]** 目的 研究 Krüppel 样因子 4(KLF4)和基质金属蛋白酶 9(MMP9)在原发性肝癌中的表达情况,探讨 KLF4 调节 MMP9 对原发性肝癌细胞侵袭和迁移能力的影响。方法 收集原发性肝癌手术患者癌和癌旁组织标本,通过免疫组织化学、实时荧光定量 PCR 和免疫印迹试验(Western blot)检测 50 例肝癌组织及对应癌旁组织中 KLF4 和 MMP9 的表达情况;构建重组质粒,上调肝癌细胞(HepG2 细胞系)的 KLF4 表达,检测 MMP9 mRNA 及蛋白水平的表达情况;转染后的 HepG2 细胞运用 Transwell 侵袭试验和划痕试验观察侵袭和迁移能力的变化。结果 相比癌旁组织,KLF4 在肝癌组织中的表达明显降低( $P<0.05$ ),而 MMP9 的表达明显增高( $P<0.05$ )。通过构建重组质粒,上调 KLF4 的表达,发现 MMP9 的 mRNA 和蛋白表达均降低,并影响 HepG2 细胞的侵袭和迁移能力。结论 在原发性肝癌中,KLF4 低表达,而 MMP9 高表达。在肝癌细胞中上调 KLF4 表达可引起 MMP9 表达下降,进而抑制肝癌细胞的侵袭和迁移。

**[关键词]** KLF4;基质金属蛋白酶 9;肝肿瘤;侵袭;迁移

**[中图分类号]** R735.7

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-8348(2015)22-3025-05

## The effect of KLF4 on invasion and migration by regulating MMP9 in hepatocellular carcinoma\*

Feng Qian, Shi Shidai, Zhou Yong, Li Enliang, Wu Rongshou, Li Kehao, Wu Linqun<sup>△</sup>

(Department of Hepatobiliary Surgery, Second Affiliated Hospital, Nanchang

University, Nanchang, Jiangxi 330006, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effects of Krüppel like factor 4 (KLF4) on matrix metalloproteinase 9 (MMP9) expression in hepatocellular carcinoma(HCC). **Methods** A total of 50 primary hepatocellular carcinoma samples and their corresponding adjacent tissues specimens were collected. The expression of KLF4 and MMP9 were detected by IHC, Western blot and qRT-PCR. After KLF4 gene was transfected into hepatocellular carcinoma cell line(HepG2 cell line), the expressions of KLF4 and MMP9 were conformed by qRT-PCR and Western blot. Migration and invasion of HepG2 cell line transfected by KLF4 were detected by wound-healing assay and invasion assay. **Results** Compared to corresponding adjacent tissues, The expression of KLF4 was significantly lower in HCCs( $P<0.05$ ), and MMP9 expression was remarkably higher in HCCs( $P<0.05$ ). KLF4 over-expression inhibited the expression of MMP9 on the protein and mRNA levels. Wound-healing assay and invasion assay confirmed that KLF4 regulated cell invasion and migration through regulating MMP9 expression. **Conclusion** KLF4 showed low expression in HCCs, and MMP9 was overexpressed. Up-regulation of KLF4 could decrease the expression of MMP9 in HepG2 cell line, which inhibited invasion and migration.

**[Key words]** KLF4; matrix metalloproteinase 9; liver neoplasms; invasion; migration

原发性肝细胞癌简称肝癌,是严重威胁人类生命的恶性肿瘤之一。尽管早期诊断和治疗方案已有改善,但仍不能改变肝癌预后不良的结果。扩散和肿瘤侵袭、肝内转移是治疗失败的主要原因。研究表明多种基因的转录过程中都有 Krüppel 样因子 4(KLF4)参与,起激活或抑制的作用,多种细胞生物学过程,包括细胞增殖,KLF4 可以调节发育分化、炎症反应和细胞凋亡。基质金属蛋白酶 9(MMP9)与肝癌的侵袭转移密切相关。基质金属蛋白酶(MMPs)可以减少解除所有其他细胞外基质(ECM)成分的降解多糖,平衡可损伤矩阵,然后加速学习障碍癌细胞突破组织、癌旁组织及其他组织侵袭和转移到远处。然而,KLF4 与 MMP9 两者在肝癌侵袭转移中的关系尚不清楚,因此本试验主要探讨肝癌细胞中 KLF4 通过调控 MMP9 对肝癌细胞侵袭和迁移的影响。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 收集南昌大学第二附属医院行原发性肝癌切除手术患者的肝癌及癌旁组织标本各 50 例。所有患者术前均未接受放化疗。其中男 32 例,女 18 例,年龄 45~66 岁,平均(54.2±2.9)岁,样品采集后立即在液氮中保存,并经病理证实。患者均知情同意,南昌大学附属第二医院伦理委员会审核通过。

## 1.2 方法

**1.2.1 试验试剂及器具** RNA 提取试剂(Invitrogen 公司);蛋白抽提试剂盒(普利莱);限制性内切酶 BamH I、Xho I、T4 DNA 连接酶;无内毒素质粒小、大提取试剂盒;DH5 $\alpha$  感受态细胞(天根生物公司); $\beta$ -actin(Proteintech 公司);RNA 逆转录试剂盒、荧光定量 PCR 分析仪 7500(ABI 公司);BCA 法蛋

白测定试剂盒(碧云天公司);MMP9、KLF4 一抗(Proteintech 公司);山羊抗兔二抗(康为世纪公司);DMEM 培养液、胎牛血清(Gibco);设计的 KLF4 序列及相关引物由上海生工公司合成;pcDNA3.1(+ )质粒、过表达 KLF4 质粒和 HepG2 细胞由江西省分子医学重点实验室代传保存。

**1.2.2 免疫组织化学** 将收集的肝癌患者的癌组织和癌旁组织在福尔马林中固定,石蜡包埋。制成石蜡切片后烤片,3% 双氧水室温孵育消除过氧化物酶活性,磷酸盐缓冲(PBS)溶液冲洗 3 次,5% 胎牛血清孵育 20 min,加入一抗,37 °C 孵育 2 h, PBS 溶液冲洗 3 次。再加入二抗,在 37 °C 条件下孵育 30 min, PBS 溶液冲洗 3 次。滴加辣根过氧化物酶标记生物素,37 °C 孵育 30 min, PBS 溶液冲洗 3 次。每一张切片滴加 1 滴新鲜配制的二氨基联苯胺(DAB)液,显色。用自来水充分冲洗,染色,脱水,透明,封片。

**1.2.3 细胞培养及转染** 在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下,HepG2 细胞在用含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中培养,使用脂质体 Lipofectamine 2000 转染,转染时使用不含胎牛血清的 DMEM 培养液进行,在转染 6 h 后改换含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液继续培养 24~48 h,提取细胞中的总 RNA 和总蛋白。通过反转录试剂盒总 RNA 反转录成 cDNA,实时荧光定量 PCR 检测;获得的蛋白质行蛋白免疫印迹(Western blot)检测。

**1.2.4 RNA 的提取及其反转录成 cDNA** 研磨收集新鲜的肝癌组织和癌旁组织,移到焦碳酸二乙酯(DEPC)处理过的 EP 管中,向 EP 管中加有 1 mL Trizol 反复吹打,静置 5 min 后加入氯仿 0.2 mL,充分混匀后室温静置 5 min 后 12 000×g 离心 15 min,小心吸取上层透明液体,千万不能触及红色液体以免污染获得 RNA。向获得的上层透明液体中加入 0.5 mL 异丙醇,静置 15 min,12 000×g 离心 15 min,弃上清液,加无水乙醇 1 mL 混匀,12 000×g 离心 10 min,弃上清液,放置在通风处使得 EP 管中的无水乙醇挥发,DEPC 水溶解。提取的 RNA 的完整性用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测,-80 °C 条件下保存。

**1.2.5 实时荧光定量 PCR 检测 KLF4 和 MMP9 的 mRNA 的表达** 首先提取肝癌组织及对应的癌旁组织中总 RNA,将提取的组织中的 RNA 进行反转录成 cDNA,反应体系为 20 μL,反应条件为:16 °C 30 min,45 °C 30 min,85 °C 5 min。运用 SYBR Green 法检测 KLF4 和 MMP9 的表达情况,运用的反应条件为:94 °C 15 min;94 °C 30 s,60 °C 30 s,72 °C 30 s,共循环 40 次;最后 72 °C 延伸 7 min。每组样品重复 3 次,试验重复 3 次,统计分析肝癌患者的癌组织和癌旁组织中 KLF4 和 MMP9 mRNA 的表达。其次,将 HepG2 细胞分成:空白对照组、过表达 KLF4 组和无效处理组 3 组,提取总 RNA,反转录 cDNA,用 SYBR Green I 法,在 ABI PRISM 7500 自动荧光 PCR 仪进行荧光定量 PCR 检查 MMP9 的 mRNA 表达水平,每个样品均做 3 个复孔,设定阈值,测定平均的 Ct 值。

**1.2.6 构建过表达 KLF4 质粒** 通过 Pubmed 查找 KLF4 基因的序列,引物根据 Genebank 中 KLF4 mRNA 序列设计引物。其上游引物:5'-CGC GGA TCC ATG AGC AGC CAC CTG GCG AGT C-3';下游引物:5'-CCG CTC GAG TCA TTA AAA ATG CCT CTT CAT GTG T-3'。通过 PrimeStar 方法进行 PCR 扩增 KLF4 基因片段,获得的 KLF4 基因的片

段用 1% 琼脂糖凝胶电泳,紫外线观察目的条带,进行胶回收,靶基因恢复 KLF4 和质粒 DNA 的 T4 DNA 连接酶相同的酶切连接,连接产物转化大肠杆菌 DH5α,涂层板,重组质粒的筛选,质粒提取后测序验证。

**1.2.7 Western blot 检测 KLF4 和 MMP9 蛋白的表达情况** 通过蛋白裂解液法收集肝癌组织和癌旁组织蛋白,通过 BCA 法检测获得蛋白的浓度,通过 Western blot 检测收集的 50 例肝癌组织和癌旁组织中的 KLF4 和 MMP9 的表达情况。统计分析肝癌患者的癌组织和癌旁组织中 KLF4 和 MMP9 的表达情况。肝癌细胞上调 KLF4 后通过 Western blot 检测 MMP9 的表达情况。在 HepG2 细胞对数期时进行转染过表达 KLF4 的质粒,培养 48 h 后提取 HepG2 的蛋白,通过 BCA 法测定蛋白浓度,取等量 50 μg 蛋白质样品煮沸 10 min 后,配置 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),转膜,然后分别结合对应 KLF4、MMP9 的一抗及辣根过氧化物酶标记的二抗,最后利用化学发光法观察 KLF4 和 MMP9 表达情况。

**1.2.8 Transwell 侵袭试验和划痕试验检测细胞侵袭和迁移能力** (1)Transwell 试验:培养细胞至对数期后进行转染 KLF4 至 HepG2 细胞中,24 h 后用胰酶进行消化,将消化下来的细胞按 2×10<sup>4</sup> 细胞数加入每个 Transwell 小室,用无血清的培养液在小室上面进行培养后,24 孔板放置在含 10% 胎牛血清的培养液,37 °C、5% CO<sub>2</sub> 孵育 24 h,10 min 甲醛固定,0.1% 结晶紫染色 20 min,上非迁移的细胞用棉签轻轻擦拭,仔细地用 PBS 溶液洗 3 次。显微镜下观察细胞,计数。(2)划痕试验:培养细胞至均匀成单层铺满于每孔后进行转染 KLF4 至 HepG2 细胞中,24 h 后用相同大小枪头进行划痕,每孔划痕粗细均匀,PBS 清洗细胞,培养液为 37 °C、血清游离 5% 的 CO<sub>2</sub>,细胞培养基中观察划痕愈合情况,拍下 0、12、24 h 后在倒置显微镜下比较。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS19.0 统计软件,正态分布、方差不齐的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较用 *t* 检验,用单因素方差分析做多组均数间比较,用 LSD-*t* 检验两两比较,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 KLF4 与 MMP9 mRNA 及蛋白在肝癌组织和癌旁组织中的表达** 实时荧光定量 PCR 检测 50 例肝癌患者癌和癌旁组织中 KLF4 和 MMP9 的表达情况,结果发现肝癌组织 KLF4 mRNA 明显低于相对应的癌旁组织,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )(图 1A);MMP9 mRNA 的表达明显高于相对应的癌旁组织,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见图 1B。Western blot 结果进一步验证肝癌组织中 KLF4 蛋白表达低于相对应的癌旁组织,MMP9 蛋白表达高于相对应的癌旁组织(图 1C)。

**2.2 免疫组织化学检测 KLF4 和 MMP9 在肝癌组织中的表达情况** 通过免疫组织化学检测结果发现 KLF4 蛋白在 76% (38/50) 的病例肝癌组织呈低表达,而仅有 10% (5/50) 的癌旁组织中呈低表达,两者差异有统计学意义( $P < 0.05$ );MMP9 蛋白在 84% (42/50) 的病例肝癌组织呈高表达,而仅有 12% (6/50) 的癌旁组织中呈高表达,两者差别有统计学意义( $P < 0.05$ ),见图 2、3。

**2.3 过表达 KLF4 对 MMP9 表达的影响** 实时荧光定量 PCR 和 Western blot 检测结果发现过表达 KLF4 组中 KLF4 mRNA 和蛋白的表达较空白对照组和无效处理组明显升高

( $P < 0.05$ ), 而空白对照组、无效处理组之间 KLF4 mRNA 表达量差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。另外, MMP9 mRNA 表

达量随着 KLF4 表达的升高而降低。说明降低 KLF4 可以抑制 MMP9 的表达(图 4)。

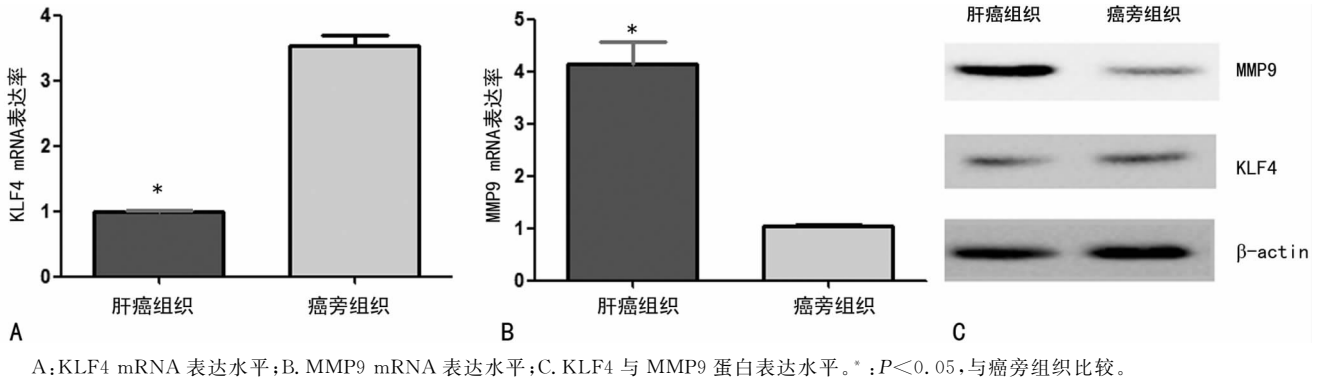


图 1 KLF4 与 MMP9 蛋白及 mRNA 在肝癌组织和癌旁组织中的表达

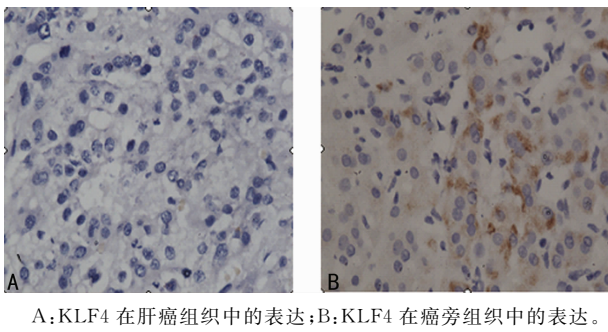


图 2 KLF4 在肝癌及癌旁组织中的表达( $\times 400$ )

2.4 KLF4 调节 MMP9 对肝癌细胞侵袭能力的影响 Transwell 侵袭试验结果显示:过表达 KLF4 组细胞侵袭能力较空白对照组和无效处理组明显降低( $P < 0.05$ )(图 5)。划痕试验

结果显示:过表达 KLF4 组 HepG2 细胞的划痕愈合率比空白对照组和无效处理组细胞划痕愈合率明显下降,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),见图 6。

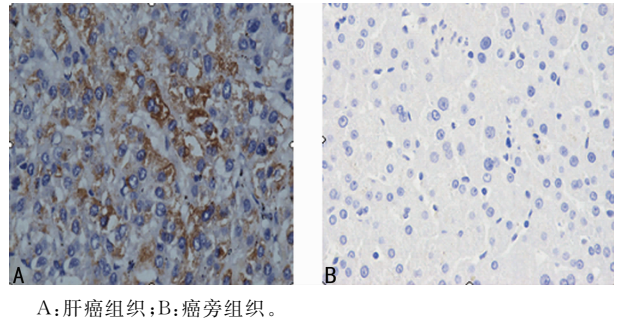


图 3 MMP9 在肝癌及癌旁组织中的表达( $\times 400$ )

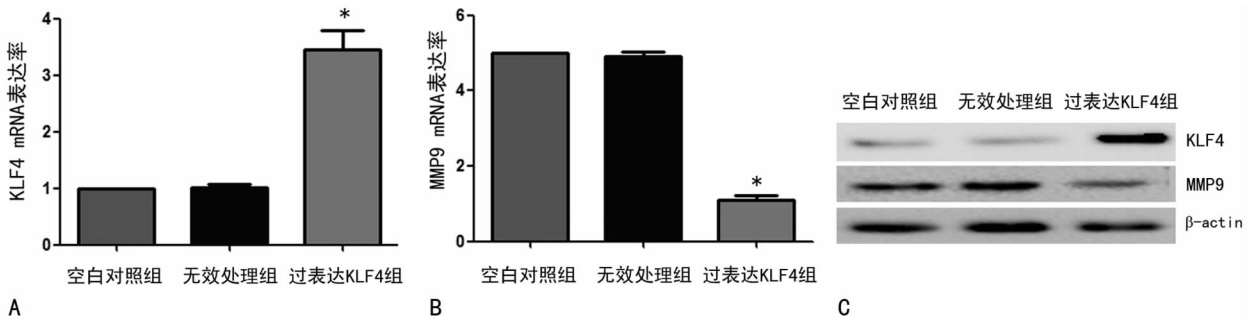


图 4 3 组 KLF4 和 MMP9 的 mRNA 和蛋白水平的变化

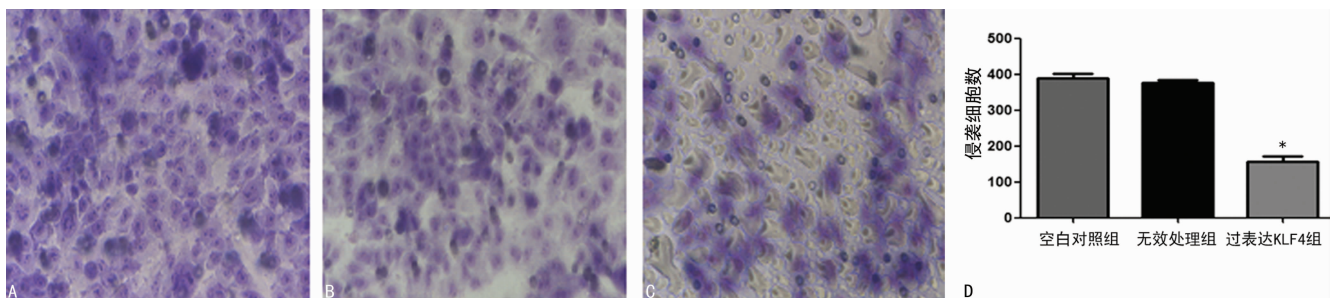


图 5 KLF4 调节 MMP9 对肝癌细胞侵袭能力的影响( $\times 400$ )

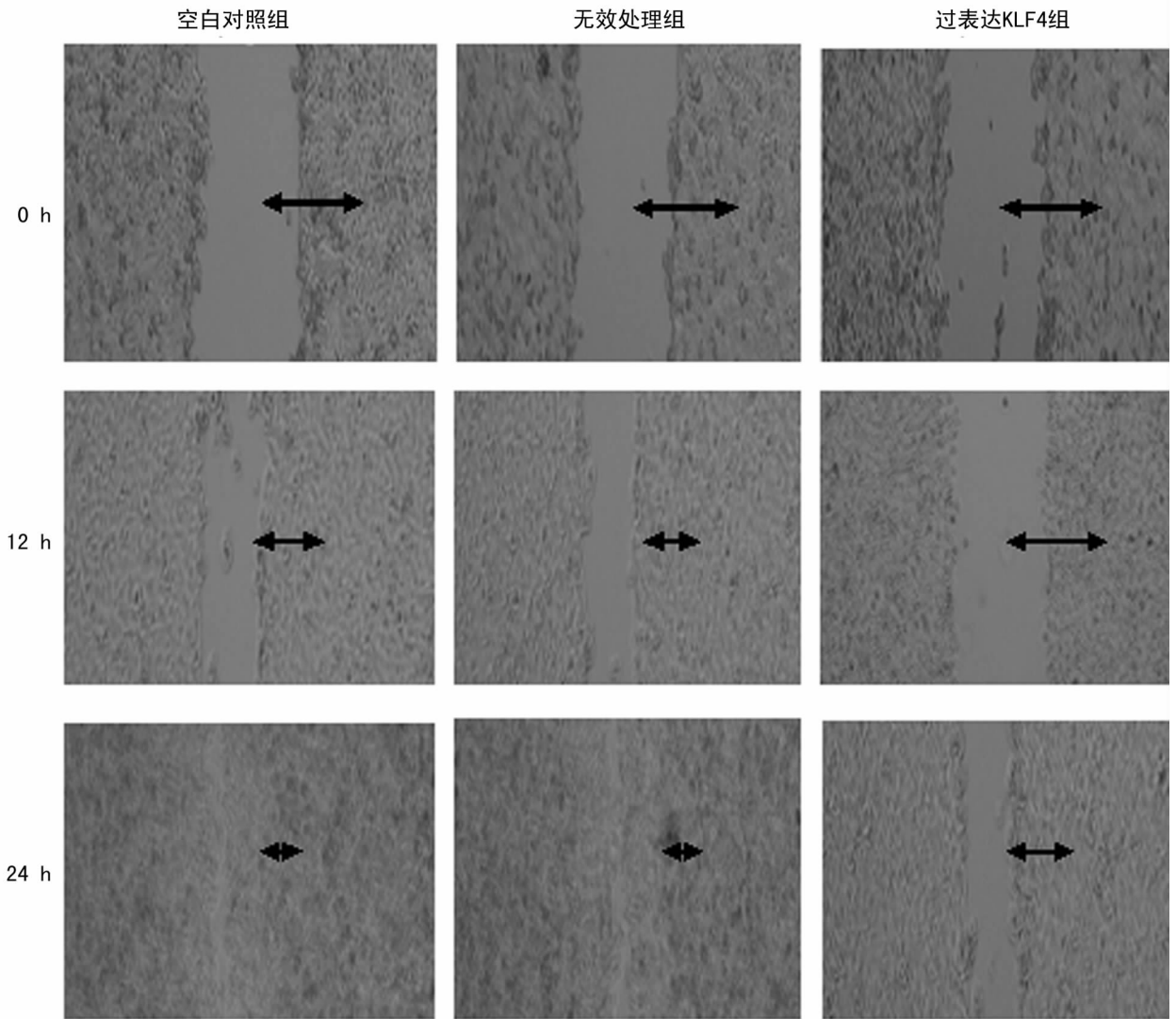


图6 过表达 KLF4 的 HepG2 细胞与空白对照组和无效处理组 HepG2 细胞迁移能力的比较( $\times 400$ )

### 3 讨论

原发性肝癌是世界范围内一种严重威胁人类生命安全的恶性肿瘤,也是一种发病率最高的恶性肿瘤,在癌症死亡率中排第3,每年新增加患者约600万<sup>[1]</sup>,虽然近年对肝癌的认识加深,早期诊断和治疗方法有了进一步提高,但总体效果仍然是很有限的,最关键就在于对肿瘤的侵袭、肝内扩散及肝外转移很难控制。

肿瘤的转移是一个复杂的过程,步骤多、阶段多、参与基因多。以分子水平角度可以分为以下过程:(1)原发肿瘤细胞的生长与增殖;(2)黏附分子介导癌细胞与细胞外黏附;(3)癌细胞释放多种蛋白水解酶水解细胞外基质、基膜;(4)通过间隙组织损伤局部浸润或水解血管和淋巴癌细胞发展到其他组织;(5)新生的微血管在肿瘤组织中形成;(6)肿瘤细胞逃避免疫系统攻击在新的微环境中得到成长后,增殖。其每一个过程中均受到多个基因或蛋白的精确调控。

KLF4是在1996年被发现的一种含有锌指结构的转录因子,以前被命名为GKLF,因其在胃肠道组织中高表达而被发现命名。KLF4和Spl/Krüppel样锌指转录因子家族是密切相关的,是家庭的一员,其作为一种重要的蛋白质存在与各种组织和细胞在体内,并与肿瘤等多种疾病有关<sup>[2-3]</sup>。KLF4作为一种转录因子,在不同的细胞背景下呈现出不同的功能,结

肠癌、食道癌、胃癌、膀胱癌、胰腺癌、肺癌中是起到抑癌作用<sup>[4-11]</sup>。Yori和Zhang等<sup>[12-13]</sup>认为胃癌细胞中,高表达KLF4能够导致迁移、侵袭能力下降。因此,在影响细胞生物学行为时,KLF4基因的表达调节和功能改变起着重要作用。

在肿瘤生长、侵袭、转移及新生血管形成中 $Ca^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$ 依赖的内源性蛋白酶家族MMPs起着重要的作用。MMPs可以降解ECM和血管基底膜,在肿瘤细胞突破细胞外基质和血管基底膜中发挥水解蛋白的作用<sup>[14]</sup>。明胶酶MMP9和MMP2作为MMPs成员,尤其被关注。Chen等<sup>[15]</sup>对143例肝癌组织标本中的MMP9和MMP2表达水平的临床意义进行了分析,结果发现在高侵袭力肝癌细胞株中MMP9的表达显著上调。在一项动物实验中,阻断MMP9的功能可以有效抑制肿瘤细胞的侵袭转移。在肝细胞癌侵袭和转移中MMP9的作用已得到认可。多种生长因子,包括转化生长因子P(TGF-P)、上皮生长因子(EGF)和类胰岛素1号生长因子(IGF-I)能够通过激活MMP9提高癌细胞的侵袭力<sup>[16-17]</sup>。上述研究表明MMP9在肿瘤的侵袭转移中起关键作用。本研究发现MMP9在肝癌组织中过表达,但是KLF4与MMP9共表达在肝癌发生侵袭和转移中的作用仍不清楚。

Lin等<sup>[18]</sup>研究发现KLF4在肝癌中是起到抑癌的作用,且对肝癌的侵袭转移起到抑制的作用,MMP9在肝癌侵袭转移

中的作用也得到广泛认同。本研究首次分析 KLF4 与 MMP9 蛋白在肝癌组织中表达的关联情况,结果发现 KLF4 与 MMP9 蛋白在肝癌组织中表达存在负相关性。另外,在肝癌细胞 HepG2 中过表达 KLF4 后 MMP9 mRNA 和蛋白表达均明显降低。上述结果表明 KLF4 可特异性调控 MMP9 的表达。同时本研究还发现在肝癌细胞 HepG2 中过表达 KLF4 后,肝癌细胞的侵袭及迁移能力明显减弱。上述结果表明 KLF4 通过调控 MMP9 的表达可以影响肝癌细胞的迁移和侵袭。

综上所述,本研究证实原发性肝癌细胞中过表达 KLF4 可以降低 MMP9 的表达,从而抑制肝癌细胞侵袭和迁移。目前,本课题组正在深入寻找肝癌细胞中 KLF4 调控 MMP9 的具体分子生物学机制,可能为原发性肝癌的治疗提供新思路。

#### 参考文献

- [1] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69-90.
- [2] McConnell BB, Ghaleb AM, Nandan MO, et al. The diverse functions of Krüppel-like factors 4 and 5 in epithelial biology and pathobiology[J]. Bioessays, 2007, 29(6): 549-557.
- [3] Zhang W, Geiman DE, Shields JM, et al. The gut-enriched Kruppel-like factor (Kruppel-like factor 4) mediates the transactivating effect of p53 on the p21WAF1/Cip1 promoter[J]. J Biol Chem, 2000, 275(24): 18391-18398.
- [4] Yu F, Li J, Chen H, et al. Kruppel-like factor 4 (KLF4) is required for maintenance of breast cancer stem cells and for cell migration and invasion[J]. Oncogene, 2011, 30(18): 2161-2172.
- [5] Dang DT, Chen X, Feng J, et al. Overexpression of krüppel-like factor 4 in the human colon cancer cell line RKO leads to reduced tumorigenicity [J]. Oncogene, 2003, 22(22): 3424-3430.
- [6] Wei D, Kanai M, Huang S, et al. Emerging role of KLF4 in human gastrointestinal cancer [J]. Carcinogenesis, 2006, 27(1): 23-31.
- [7] Ghaleb AM, McConnell BB, Nandan MO, et al. Haploinsufficiency of krüppel-like factor 4 promotes adenomatous polyposis coli dependent intestinal tumorigenesis [J]. Cancer Res, 2007, 67(15): 7147-7154.
- [8] Zhang W, Chen X, Kato Y, et al. Novel cross talk of Kruppel-like factor 4 and beta-catenin regulates normal

intestinal homeostasis and tumor repression[J]. Mol Cell Biol, 2006, 26(6): 2055-2064.

- [9] Zammarchi F, Morelli M, Menicagli M, et al. KLF4 is a novel candidate tumor suppressor gene in pancreatic ductal carcinoma[J]. Am J Pathol, 2011, 178(1): 361-372.
- [10] Hu W, Hofstetter WL, Li H, et al. Putative tumor-suppressive function of Kruppel-like factor 4 in primary lung carcinoma[J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(18): 5688-5695.
- [11] Nakahara Y, Northcott PA, Li M, et al. Genetic and epigenetic inactivation of Kruppel-like factor 4 in medulloblastoma[J]. Neoplasia, 2010, 12(1): 20-27.
- [12] Yori JL, Johnson E, Zhou G, et al. Kruppel-like factor 4 inhibits epithelial-to-mesenchymal transition through regulation of E-cadherin gene expression[J]. J Biol Chem, 2010, 285(22): 16854-16863.
- [13] Zhang N, Zhang J, Shuai L, et al. Krüppel-like factor 4 negatively regulates  $\beta$ -catenin expression and inhibits the proliferation, invasion and metastasis of gastric cancer [J]. Int J Oncol, 2012, 40(6): 2038-2048.
- [14] 刘敏, 曾霞, 侯恩存, 等. Glypican3、MMP-9 和 MMP-14 在原发性肝癌中的表达与临床意义[J]. 重庆医学, 2014, 43(2): 173-176.
- [15] Chen R, Cui J, Xu C, et al. The significance of MMP-9 over MMP-2 in HCC invasiveness and recurrence of hepatocellular carcinoma after curative resection[J]. Ann Surg Oncol, 2012, 19(Suppl 3): S375-384.
- [16] Sun L, Diamond ME, Ottaviano AJ, et al. Transforming growth factor-beta 1 promotes matrix metalloproteinase-9-mediated oral cancer invasion through snail expression [J]. Mol Cancer Res, 2008, 6(1): 10-20.
- [17] Dilly M, Hambruch N, Haeger JD, et al. Epidermal growth factor (EGF) induces motility and upregulates MMP-9 and TIMP-1 in bovine trophoblast cells[J]. Mol Reprod Dev, 2010, 77(7): 622-629.
- [18] Lin ZS, Chu HC, Yen YC, et al. Krüppel-like factor 4, a tumor suppressor in hepatocellular carcinoma cells reverts epithelial mesenchymal transition by suppressing slug expression[J]. PLoS One, 2012, 7(8): e43593.

(收稿日期: 2015-02-08 修回日期: 2015-07-08)

## 《重庆医学》开通微信公众平台

《重庆医学》已开通微信公众平台(微信号: ChongqingMedicine),《重庆医学》将以微信平台渠道向广大读作者发送终审会动态报道、各期杂志目录、主编推荐文章、学术会议、《重庆医学》最新资讯等消息。欢迎广大读作者免费订阅。读作者可以点击手机微信右上角的“+”,在“添加朋友”中输入微信号“Chongqing Medicine”,或在“添加朋友”中的“查找公众号”一栏输入“重庆医学”,添加关注。