

转基因 JAK3 体外长期扩增 T 淋巴祖细胞的实验研究

赵声明 顾惜春 常乃柏 许晓东 彭明婷

【摘要】目的 探讨激活 JAK3 信号传导通路是否能够体外长期扩增调控 T 淋巴祖细胞并评价其定向分化潜能的可行性。方法 构建含有 JAK3 基因的逆转录病毒载体 MGF₂JAK3, 内含绿色荧光蛋白 (GFP) 和两个可以结合小分子二聚化合物 AP20187 的结合位点 F36_v。将该载体转入小鼠的骨髓造血干细胞中, 在无血清培养基 X-Vivo15 培养体系中扩增, 分为 4 组: 空白对照组; AP20187 组; 干细胞因子 (SCF) 组; AP20187 + SCF 组。对扩增的细胞进行流式细胞仪检测免疫分型, 定向分化、胸腺内注射等研究。结果 AP20187 + SCF 组可以使转导的造血细胞获得长期大量对数级的扩增, 扩增 50 d 后细胞可以达到 1.2×10^{12} 倍 $\pm 0.2 \times 10^{12}$ 倍, 所扩增的细胞为最早期的 T 淋巴祖细胞, 表型为 C-kit^{hi}CD44⁺CD25⁻TN。该祖细胞群在 SCF + L-7 + L-3 培养条件下, 可定向分化为 Thy1.2 阳性的 T 淋巴细胞, 并在小鼠的胸腺内可定向分化为 GFP⁺CD3⁺ 和 GFP⁺CD4⁺ 双阳性的成熟 T 淋巴细胞。结论 AP20187 联合 SCF 激活 JAK3 信号, 可以大量扩增最早期的 T 淋巴祖细胞。该祖细胞具有定向分化为成熟 T 淋巴细胞的功能。该系统有助于研究 T 淋巴细胞的发生发育。

【关键词】 酪氨酸激酶 JAK3; 转基因; T 淋巴祖细胞; 扩增

Long-term expansion of T cell progenitors by JAK3 gene transduced primitive hematopoietic cells in vitro ZHAO Shengming, GU Xi-chun, CHANG Nai-bai, XU Xiao-dong, PENG Ming-ting. Graduate school of Peking Union Medical College; Department of Hematology, Beijing Hospital, Beijing 100730, China

【Abstract】 Objective To explore whether activation of the JAK3-signaling pathway can stimulate long-term expansion of the earliest T cell progenitors from transduced primitive hematopoietic cells and evaluate their potential ability of committed differentiation. **Methods** A retrovirus vector (RV) containing JAK3 gene, two binding sites for chemical inducers of dimerization (AP20187), and green fluorescence protein (GFP), MGF₂JAK3, was constructed. The RV vector MGF₂JAK3 was then transduced into murine bone marrow hematopoietic cells. The transduced murine bone marrow cells were divided equally into four groups: blank control group (No drug group), AP20187 group (added with AP20187 only), SCF group (added with stem cell factor only), and AP20187 + SCF group. Cytometry was used to detect the GFP marker and observe the survival of cells. The murine bone marrow cells expanded for 50 days were divided into 2 groups: one group was washed to remove the cytokines to observe their survival, and AP20187 + SCF was added into the culture fluid of other group. Cytometry and CELLQuest v3.1 software analysis were used to analyze the phenotype of the cells of AP20187 + SCF after 50 days expansion. The C-kit^{hi}CD44⁺CD25⁻TN cells after 50 days expansion were further cultured under the condition of SCF + L7_L3 for 5 days. The differentiation rate of Thy1.2 positive cells was observed by cytometry. Five Ly5.2 mice underwent radiation of the dose of 600 cGy, and then injected with the expanded cells into the thymus. Three weeks later the mice were killed and their thymus glands were taken out to prepare suspension of single cells to undergo cytometry to observe the proportions of GFP positive CD3 and CD4 mature T lymphocytes. **Results** One week later the cells of the No Drug group all died, the cells of the AP20187 group and SCF group died 2 ~ 4 weeks later, however, the cells of the AP20187 + SCF continued to grow and expanded up to 10¹²-fold after 50 days culture. The cells of the AP20187 + SCF group with the cytokines washed died 2 more weeks later, and those with the cytokines washed and added with AP20187 + SCF continued to grow. The phenotype of the expanded proportion was identified as the earliest T cell progenitors expressing C-kit^{hi}CD44⁺CD25⁻TN (triple negative). These progenitors could differentiate into Thy1.2 + T cells in the presence of SCF + L-7 + L-3 culture condition. 32% ~ 96% of the mice thymus cell were GFP positive, 5% \pm 0.8% of the thymus cells were GFP + CD³ double positive, and

基金项目:北京市自然科学基金资助项目(7042055);首都医学发展基金重点资助项目(2003-2017)

作者单位:100730中国协和医科大学研究生院 卫生部北京医院血液科(赵声明、顾惜春、常乃柏、许晓东);卫生部临床检验中心(彭明婷)

11.0% \pm 1% of the T lymphocytes were GFP + CD4⁺ double positive. **Conclusion** AP20187 combined with SCF mediating the activation of JAK3 signaling can dramatically expand the earliest T cell progenitors subpopulation, and acquires the capacity to induce the differentiation into T mature cells. This system may help understand the T cell biology and provide a fundamental basement for gene therapy to immunodeficiency disease in the future.

【Key words】 Tyrosine kinase JAK3; Gene transfer; T cell progenitor; Expansion

研究证实,酪氨酸激酶 JAK3 存在于造血细胞中,尤其在 T 淋巴细胞的发生发育中扮演着重要的作用。JAK3 基因敲除的小鼠,可表现为胸腺缩小和 T 淋巴细胞的缺乏^[1]。我们应用基因调控表达技术^[2],构建克隆了 MSCV-F₂JAK3 逆转录病毒载体,将 JAK3 基因导入小鼠的造血干细胞中,应用小分子二聚化合物 AP20187^[3]使 JAK3 二聚化而激活,同时联合干细胞因子(SCF),实现了最早期 T 淋巴祖细胞的大量扩增,所扩增的淋巴祖细胞能够定向分化为功能性的 CD3、CD4 成熟 T 淋巴细胞,为今后进一步研究探讨淋巴细胞的发生发育及基因治疗奠定了基础。现报道如下。

材料和方法

一、材料

1. 主要试剂:限制性内切酶 BamH1、Sac II、T4DNA 连接酶购自 New England Biolabs; PfuDNA 聚合酶、DMEM 培养基、MDM 培养基及胎牛血清(FCS)购自 GBCO 公司;磷酸钙转染试剂盒购自 Invitrogen 公司;质粒提取试剂盒购自 Qiagen 公司;PCR 引物由 CloneTech 公司合成;C-kit、Thy1.2、CD3、CD4、CD8、CD25、CD44 抗体购自 BD Pharmingen; SCF、L-3、L-7 购自 PeproTech 公司;AP20187 购自美国 Araid 公司。

2. 质粒和菌株: HT1080、GPE + 86 细胞株及 DH5 大肠杆菌由本室保存;MSCV-GFP-RES-neo (简称 MGN) 载体由美国 Hawley 教授提供,内含有绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP),可用于细胞生长的检测标记;质粒 pBSIINGFR-2xF36v-JAK3 cDNA 由美国 BLAU 教授惠赠。

3. 实验动物:健康 C57BL/6 和 Ly5.1 雌性小鼠,4~6 周龄,体重 20 g,购自 Jackson 实验室。无特定病原体(SPF)级环境饲养。

二、方法

1. 重组 JAK3 逆转录病毒载体的构建及鉴定:以 pBSIINGFR-2xF36v-JAK3 cDNA 为模板,针对 2xF36v-JAK3 碱基序列设计 PCR 引物来扩增这一段,将其亚克隆到 MGN 载体中。在每条引物的 5

端引入相应的限制性酶切位点及保护性碱基。上游引物 5' CCCC GCGGA TGGGCGTCCAA GTCGAA 3', 引入 Sac II 酶切位点;下游引物 5' CGGGA TCCACCT-AGGACTTTTCTGT, 引入 BamH1 酶切位点。PCR 扩增参数:94 预变性 5 min, 94 变性 60 s, 55 退火 40 s, 72 延伸 60 s, 共 30 个循环,循环结束后再 72 延伸 5 min, 扩增产物长度为 1584 bp。将纯化后的 PCR 扩增产物和载体 MGN 分别用 BamH1 和 Sac II 双酶切,1% 琼脂糖凝胶电泳分离、纯化, T4DNA 连接酶作用下将目的基因插入质粒载体。将重组后的质粒转化大肠杆菌 DH5, 筛选阳性克隆,经酶切分析及测序鉴定正确的克隆,命名为 MSCV-GFP-RES-2xF36v-JAK3, 简称 MGIF₂JAK3。用 Qiagen 质粒提取制备大量 DNA 备用。

2. 转基因 JAK3 细胞株的建立:取 20 μ g 逆转录病毒质粒 MGIF₂JAK3, 应用磷酸钙转染法,转染细胞株 GPE + 86, 具体方法按照试剂盒说明书进行。通过流式细胞仪分选单个 GFP 阳性的克隆接种于 96 孔板培养,收集病毒上清,转染小鼠 HT1080 细胞株,测定病毒感染滴度,最后选取毒力最强的 GPE + 86 细胞株克隆为本次实验用。

3. 造血细胞基因转导及扩增试验:取 4~6 周龄 C57BL/6 雌性小鼠,处死前 48 h,腹腔内注射 5-氟尿嘧啶(5-Fu) 150 mg/kg。在超净台内无菌剪取小鼠双侧股骨,用 2 ml 注射器冲洗骨髓腔,制备单细胞悬液,将其培养在含 16% 的 FCS 中、重组 SCF 和重组白介素-6(rIL-6)的 DMEM 培养基中,48 h 后细胞离心沉淀,换用新鲜的培养基(含 16% FCS、rSCF 50 ng/ml、5% L-3、rhL-6 100 ng/ml 及 polybrene 8 μ g/ml)。然后将上述细胞与 1500 cGy 照射过的表达 MGIF₂JAK3 的 GPE + 86 细胞株在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中共培养 48 h,将 JAK3 基因导入骨髓细胞中,并测基因转导率。收集转基因后的细胞,离心沉淀并用无血清培养基洗脱两次,锥虫蓝拒染法计数活细胞,将细胞平均分为 4 组:(1)空白对照组,不加入任何药物;(2)AP20187 组;(3)SCF 组;(4)AP20187 + SCF 组。其中 SCF 浓度为 50 ng/ml, AP20187 浓度为

100 ng/ml,上述各组细胞置入 10 cm 培养皿,采用无血清培养基 Ex-vivo15 (Bio-whittaker 公司),于 37 °C 5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养,细胞每 3~4 d 计数并传代 1 次。

4. 流式细胞仪分析:取扩增 50 d 后的造血细胞,冷磷酸盐缓冲液 /1% 牛血清白蛋白 (PBS/1% BSA) 冲洗,加入 Fcγ R II B lock, 40°C 孵育 10 min,阻断非特异性抗体结合。然后应用直接法标记的与藻红蛋白荧光素 (PE) 结合的 Ckit CD44、CD25、CD3、CD4、CD8,并设阴性同型对照,于 4 °C 孵育 30 min,用 PBS/1% BSA 洗去未标记的抗体后,用 FACScalibur 流式细胞仪 (BD 公司) 上机检测。

5. 扩增细胞定向分化试验:将 AP20187 + SCF 组培养扩增的细胞,离心并洗去 AP20187 及 SCF 后,在 SCF + L-7 + L-3 条件下,于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养,5 d 后用流式细胞仪分析培养前后细胞表面标记的变化。

6. 胸腺内注射淋巴细胞分化:选 4~6 周龄 Ly5.1 小鼠 5 只,给予 600 cGy 亚致死量照射,胸骨柄上端正中局麻,切开皮肤肌层分离暴露胸腺上端区域。每只小鼠胸腺内注射上述扩增的细胞 1×10^6 个,缝合局部皮肤,3 周后将小鼠安乐死,取其胸腺,制备单细胞悬液,用流式细胞仪上机分别检测胸腺细胞内 GFP 阳性的 CD3 和 CD4 成熟 T 淋巴细胞,以上实验均重复 5 次。

7. 统计学分析:实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,结果采用 SPSS 11.0 软件包进行 t 检验分析。

结 果

1. JAK3 转基因细胞的扩增培养及扩增细胞的可逆性研究:JAK3 转基因后的造血细胞,经流式细胞仪测定 GFP 标记,判定其基因转导率为 52%~60%。转导后的细胞平均分为 4 组,其中,空白对照组约在 1 周左右死亡;SCF 组和 AP20187 组可在 2~4 周左右死亡;但 AP20187 + SCF 组,细胞能持续生长,在扩增至 50 d 时,细胞数已达到扩增前的 1.2×10^{12} 倍 $\pm 0.2 \times 10^{12}$ 倍,细胞平均倍增时间约 30 h。取 50 d 时间段,绘制细胞增殖反应曲线 (图 1)。为了评价扩增后细胞的安全性和可逆性,我们取扩增 50 d 后的细胞 1×10^6 个,用无血清培养液彻底洗涤 3 次,除去各种细胞因子,第 7 天时细胞计数为 0.12×10^6 个,约 2 周后细胞死亡;而培养液中加入 AP20187 + SCF,细胞继续保持增殖。表明所扩增的细胞是 AP20187 及 SCF 因子依赖性的,在没有

AP20187 和 SCF 条件下细胞不会永生化生长,这保证了所扩增细胞的安全性。

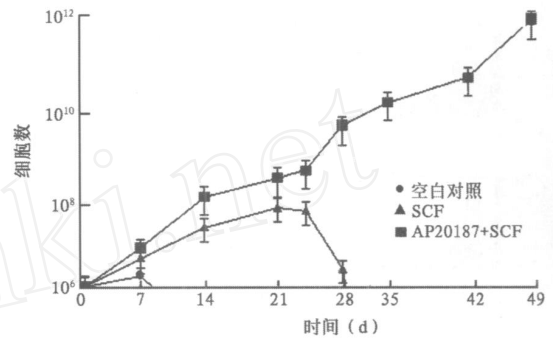


图 1 转基因细胞扩增培养增殖反应曲线 与空白对照组、SCF 组相比 $P < 0.001$

2. 扩增后细胞免疫表型分析:AP20187 + SCF 组所扩增的细胞为 C-kit 表达强阳性 55%~65% (C-kit^{hi}), CD44 100% 表达阳性, CD25 表达阴性, CD3、CD4、CD8 三项也阴性表达 (triple negative, TN), 另外 Gr1、CD11b、TER119 等髓系抗原表达阴性命名,命名为 C-kit^{hi} CD44⁺ CD25⁻ TN 群。这提示 AP20187 + SCF 所扩增的细胞表达最早期的 T 淋巴细胞表面标记,因此,该细胞群为最早期的 T 淋巴祖细胞 (图 2)。

3. JAK3 扩增的细胞定向分化研究:将扩增 50 d 后的 C-kit^{hi} CD44⁺ CD25⁻ TN 群,在 SCF + L-7 + L-3 条件下培养分化 5 d,分化前约 18% $\pm 2.2\%$ 的细胞为 Thy1.2 阳性,而分化后 90% $\pm 3.6\%$ 的细胞变为 Thy1.2 阳性,即大约 72% 的细胞由 Thy1.2 阴性定向分化为 Thy1.2 阳性 T 淋巴细胞,分化后的流式直方图中心明显右移;而 B220 分化前后未见变化 (图 3)。

4. 小鼠胸腺内 T 淋巴祖细胞分化:对小鼠施行安乐死,分别取胸腺内注射过 C-kit^{hi} CD44⁺ CD25⁻ TN 群及未接受注射的 Ly5.1 小鼠的胸腺,制成单个细胞悬液后,经流式细胞仪分析,可以检测到大约 32%~96% 的胸腺细胞为 GFP 阳性 (UL + UR); GFP + CD3⁺ 共阳性的胸腺细胞约 5% $\pm 0.8\%$ (UR); GFP + CD4⁺ 共阳性的 T 淋巴细胞约占 11.0% $\pm 2.1\%$ (UR)。这表明 AP20187 + SCF 扩增的最早期淋巴祖细胞 C-kit^{hi} CD44⁺ CD25⁻ TN 群在 Ly5.1 小鼠的胸腺里能够定向分化为 CD3⁺、CD4⁺ 的功能性 T 淋巴细胞,所有 GFP 阳性的细胞均起源于 JAK3 转基因的淋巴祖细胞 (图 4)。

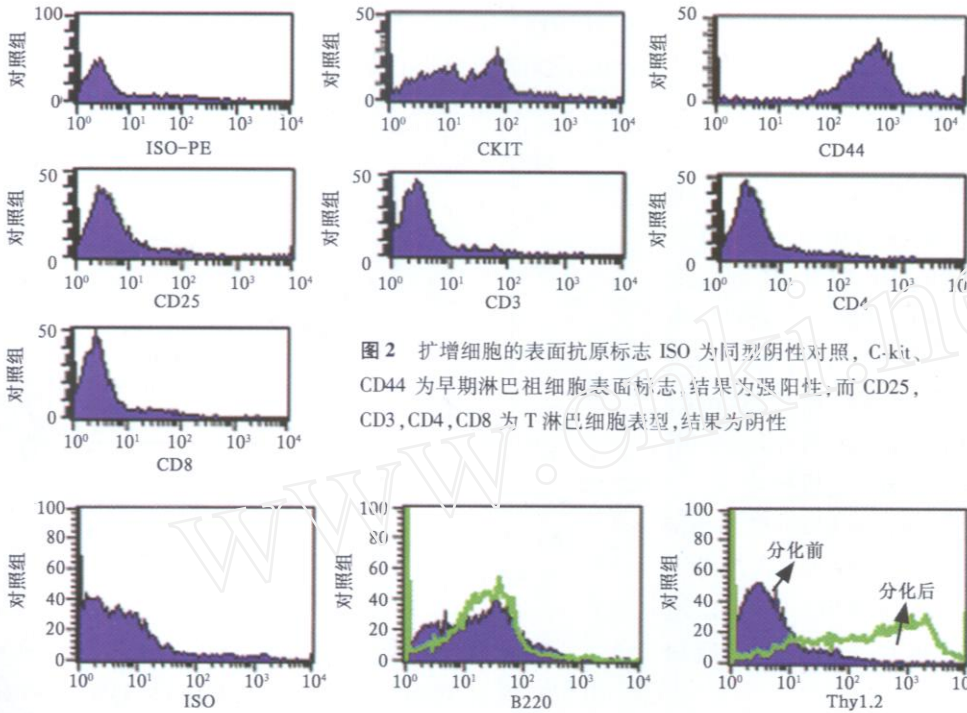


图2 扩增细胞的表面抗原标志 ISO 为同型阴性对照, C-kit、CD44 为早期淋巴祖细胞表面标志, 结果为强阳性, 而 CD25, CD3, CD4, CD8 为 T 淋巴细胞表型, 结果为阴性

图3 T 淋巴祖细胞定向分化抗原标志的流式细胞仪检查结果。扩增的细胞在 SCF + IL-7 + IL-3 培养条件下, 可定向分化为 Thy1.2 阳性的 T 淋巴细胞。ISO 为阴性对照, 虚线为分化前, 实线为分化后。分化后中心明显右移

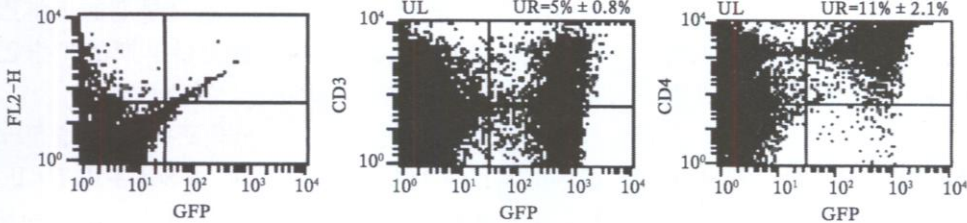


图4 T 淋巴祖细胞在小鼠胸腺内定向分化结果。设正常 Ly5.1 小鼠的胸腺细胞为阴性对照, 在注射过 T 淋巴祖细胞的小鼠胸腺细胞内可以检测到 GFP 阳性细胞为 32% ~ 96%, 而 GFP + CD3⁺ 共阳性细胞约为 5% ± 0.8%; GFP + CD4⁺ 共阳性细胞为 11% ± 2.1%。UR = 右上象限, UL = 左上象限

讨 论

JAKs-STAT (janus kinase-signal transducer and activator of transcription) 信号传导途径存在于机体各种组织细胞中, 对细胞的生长发育尤其是对淋巴细胞的分化、增殖、抗感染起着重要的作用^[4]。其中酪氨酸激酶 JAK3 是 JAK 家族中的重要成员, 它主要分布在造血细胞内, 在 T 淋巴细胞的发育中扮演着关键的作用^[5]。研究证实, JAK3 基因敲除后的小鼠, 胸腺细胞明显缩小, 体积只有正常的 0.5% ~ 10%, T 淋巴细胞和 NK 细胞的数量严重减低并伴有发育成熟功能受阻^[1,6]。同时, JAK3 基因缺失或本身突变可造成重症联合免疫缺陷性疾病 (SCD)^[7]。SCD 病的突出特征就是 T 淋巴细胞的

发育缺陷。因此, 深入研究 T 淋巴细胞对治疗免疫缺陷性疾病具有重要意义。近年已有研究报道, 在没有胸腺微环境条件下, 通过在基质细胞内表达 Notch 配体 Delta-like1 逆转录病毒载体, 已经成功地进行了体外 T 淋巴细胞的扩增研究^[8]。而且 Kohn^[9] 利用转基因技术成功地治疗了 JAK3 基因突变所导致的 X 连锁 SCD 患儿。

随着近几年对蛋白质分子结构的深入研究, 蛋白质工程学和基因技术的进步, 依据蛋白质分子结构为基础而设计的小分子靶向基因药物, 可通过所建立的基因表达调控技术在动物体内或培养的细胞内来实现靶向调控特定的细胞信号传导事件、

基因转录等重要生命活动, 使所控制细胞的增殖、分化及获得我们所需要的细胞类型成为可能。我们通过构建含有酪氨酸激酶 JAK3 的逆转录病毒载体, 内含有 JAK3 激酶的功能区和两个可以结合小分子二聚化合物 (AP20187) 的结合位点 F36v^[2,3]。将该载体转入小鼠的骨髓造血干祖细胞中, 通过应用美国 Ariad 公司开发的小分子靶向基因合成药物 AP20187, 使 JAK3 二聚化激活信号传导通路。AP20187 具有跨膜通透性、无毒, 是 JAK3 二聚化的诱导物, 二聚化后的 JAK3 二聚体提供了细胞信号通路激活的首要条件。AP20187 同时联合 SCF, 获得了 T 淋巴祖细胞的长期大量对数级的扩增, 扩增至 50 d 后, 细胞数已经达到扩增前的 1.2 × 10¹² 倍

$\pm 0.2 \times 10^{12}$ 倍;所扩增的细胞群表型为 C-kit^{hi} CD44⁺ CD25⁻ CD3⁻ CD4⁻ CD8⁻ (triple negative, TN)即 C-kit^{hi} CD44⁺ CD25⁻ TN。Opferman等^[10]和 Godfrey等^[11]已经证实了表型为 C-kit^{hi} CD44⁺ CD25⁻ TN的细胞群是最早期的 T淋巴祖细胞,保留进一步向 T淋巴细胞分化的特征。由于 SCF和 L-7在 T淋巴细胞定向分化中起着重要作用^[12],为证实我们所扩增的 T淋巴祖细胞具有定向分化的潜能,我们将此淋巴祖细胞群在 SCF + L-7 + L-3体外液体培养条件下,经流式细胞仪测定,可定向分化为 Thy1.2阳性的 T淋巴细胞;同时将扩增的 T淋巴祖细胞注射入异体小鼠胸腺内,又可以分别检测到 GFP表达阳性的 CD3、CD4的 T淋巴细胞。这提示我们所扩增的 C-kit^{hi} CD44⁺ CD25⁻ TN细胞群是最早期 T淋巴祖细胞,可以在小鼠的胸腺内定向分化为成熟的 T淋巴细胞。

我们的研究成功地进行了最早期 T淋巴祖细胞的体外扩增。由于 T淋巴细胞在人体细胞免疫中发挥着重要作用,该项研究有助于阐明 T淋巴细胞的发育调控机制,并为今后基因治疗 SC D、A D S、脏器移植等严重免疫缺陷性疾病奠定了基础。

参 考 文 献

1 Fischer A, Hacein-Bey S, Cavazzana-Calvo M. Gene therapy of

severe combined immunodeficiencies. *Nat Rev Immunol*, 2002, 8: 615-621.

- 赵声明,顾惜春,常乃柏,等. JAK2转基因骨髓造血干祖细胞体外长期扩增调控及定向分化的研究. *中华血液学杂志*, 2004, 25: 65-69.
- Jin L, Zeng H, Chien S, et al. In vivo selection using a cell-growth switch. *Nat Genet*, 2000, 26: 64-66.
- Kisseleva T, Bhattacharya S, Braunstein J, et al. Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene*, 2002: 285: 1-24.
- Thomis D, Berg LJ. The role of JAK3 in lymphoid development, activation and signaling. *Curr Opin Immunol*, 1997, 9: 541-547.
- Yeh TC, Pellegrini S. The Janus kinase family of protein tyrosine kinases and their role in signaling. *Cell Mol Life Sci*, 1999, 55: 1523-1534.
- Nosaka T, Van Deursen JM, Tripp RA, et al. Defective lymphoid development in mice lacking JAK3. *Science*, 1995, 270: 800-802.
- Schmitt TM, Zuniga-Pflucker JC. Induction of T cell development from hematopoietic progenitor cells by Delta-like-1 in vitro. *Immunity*, 2002, 17: 749-756.
- Kohn DB. Gene therapy for genetic haematological disorders and immunodeficiencies. *J Intern Med*, 2001, 249: 379-390.
- Opferman JT, Letai A, Beard C, et al. Development and maintenance of B and T lymphocytes requires antiapoptotic MCL-1. *Nature*, 2003, 426: 671-676.
- Godfrey DI, Kenedy J, Suda T, et al. A developmental pathway involving four phenotypically and functionally distinct subsets of CD3⁻ CD4⁻ CD8⁻ triple-negative adult mouse thymocytes defined by CD44 and CD25 expression. *J Immunol*, 1993, 150: 4244-4252.
- EI Kassir N, Lucas PJ, Klug DB, et al. A dose of L-7 on thymocyte development. *Blood*, 2004, 104: 1419-1427.

(收稿日期: 2006-03-07)

(本文编辑: 苗蔚)

第十七届长城国际心脏病学会议征文通知

由美国心脏病学院 (American college of cardiology, ACC)、心律学会 (Heart rhythm society, HRS)、日本循环器学会 (Japanese circulation society, JCS)、中国医师协会和中华医学会北京医学会心血管病分会等多家中外权威机构联合主办的第十七届长城国际心脏病会议 (17th GW-ICC) 将于 2006 年 11 月 2~5 日在北京国际会议中心举行。现将会议征文等有关事项通知如下。

1. 征文内容: 心血管疾病流行病学和基础研究, 心血管疾病临床研究, 介入心脏病学, 心电生理与起搏等, 心血管相关疾病, 心血管外科, 小儿心脏病学, 心血管影像学, 心血管病检验学, 心血管临床用药和临床试验, 心血管预防与康复等方面。

2. 征文要求: 所投稿件内容应真实, 稿件一律采用英文或中文摘要形式。反映出文章的主题, 力求简明、醒目, 一般不超过 28 个汉字, 字号为五号黑体字。要求稿件一律采取英文或中文摘要形式, 字数限制 500~700 字 (不得少于 500

字)。摘要应包括目的、方法、结果、结论四个部分, 各部分冠以相应的标题。采用第三人称叙述, 作者单位及邮编列于作者姓名的下一行。中文为五号 (字体应为宋体字), 英文为 11 号 (字体应为 Times New Roman)。由于采用激光直接照排编印论文集, 请一律使用会议专用文摘表格不得更改表格尺寸大小, 此表可在 www.gw-icc.org 网站下载。请将征文以电子邮件方式发送到 abstractgwicc@126.com 信箱。征文截止日期为 2006 年 7 月 31 日。欢迎从事心血管领域的各位同仁积极投稿。

3. 其他: 中英文摘要将刊登在中华医学杂志增刊和美国 *Clinical Cardiology* 杂志增刊上。优秀中文论文将推荐在中华医学杂志正刊, 优秀英文论文将推荐在中华医学杂志英文版。会议秘书处地址: 北京市西城区西直门南大街 11 号 (100044), 北京大学人民医院 GW-ICC 组委会收。电话: 010-88381733; 欲了解详细情况请登陆长城国际心脏病学会议网 <http://www.gw-icc.org>