

The Mechanism of TMEM176B in Apoptosis of Breast Cancer

Chong Yang¹, Baochang Su^{2*}

¹Guangzhou Health Science College, Guangzhou Guangdong

²Department of Blood Transfusion, The First Affiliated Hospital of Jinan University, Guangzhou Guangdong
Email: *hong33san@126.com

Received: Jun. 26th, 2019; accepted: Jul. 18th, 2019; published: Jul. 25th, 2019

Abstract

Objective: To study the role and mechanism of transmembrane protein 176B (TMEM176B) in breast cancer. **Methods:** The expression of TMEM176B in breast cancer tissue was detected by qRT-PCR and Western blot, and using small interfering RNA for silencing TMEM176B level. MTT assay and CCK8 assay were used to detect the viability of breast cancer cells, and flow cytometry was used to detect the apoptosis of breast cancer cells. **Results:** Small interfering RNA significantly knocked down the level of TMEM176B, inhibited the growth of breast cancer. In terms of mechanism, siRNA inhibited the cell proliferation protein Ki67 expression, and down-regulated the expression of apoptotic protein Bcl-2 and up-regulated the expression of apoptotic protein Bax. Furthermore, the result showed that the expression of p53 and the level of p-AKT were down-regulated after TMEM176B interference. **Conclusion:** knockdown of TMEM176B promotes the apoptosis of breast cancer by regulating the expression of p53 and the level of p-AKT.

Keywords

Breast Cancer, TMEM176B, Bcl-2, Bax, Ki67, P53 and P-AKT Signaling Pathways

TMEM176B调控乳腺癌凋亡作用及机制研究

杨 翀¹, 苏宝倡^{2*}

¹广州卫生职业技术学院, 广东 广州

²暨南大学附属华侨医院, 广东 广州
Email: *hong33san@126.com

收稿日期: 2019年6月26日; 录用日期: 2019年7月18日; 发布日期: 2019年7月25日

*通讯作者。

摘要

目的: 研究跨膜蛋白176B (Transmembrane protein 176B, TMEM176B)在乳腺癌中凋亡作用及机制。**方法:** qRT-PCR、western blot法检测乳腺癌组织中TMEM176B表达; 小分子干扰RNA和干扰TMEM176B后研究其作用和分子机制。MTT法和CCK8实验检测乳腺癌细胞生长情况; 流式细胞实验检测乳腺癌凋亡作用。**结果:** 干扰TMEM176B后明显抑制乳腺癌活力和诱导乳腺癌凋亡, 抑制细胞增殖蛋白Ki67表达, 且下调抑凋亡蛋白Bcl-2和上调促凋亡蛋白Bax表达水平。在机制方面, 我们发现干扰TMEM176B后下调p53表达和p-AKT水平。**结论:** TMEM176B通过调控p53表达和p-AKT水平进而调控乳腺癌凋亡作用。

关键词

乳腺癌, TMEM176B, Bcl-2, Bax, Ki67, p53和p-AKT信号通路

Copyright © 2019 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

乳腺癌是最常见的恶性肿瘤之一, 近年来已成为全球女性第二大死因[1]。2015年, 约430万中国妇女诊断患有乳腺癌, 其中75%人死于乳腺癌[2]。乳腺癌治疗包括外科手术切除、化疗、放疗、内分泌治疗、靶向治疗和其他补充治疗[3]。但是, 这些传统治疗方法大多数会产生副作用或疗效不佳。因此, 寻找新的靶点抑制乳腺癌生长和诱导其凋亡, 可延长乳腺癌患者生存期和改善生活质量。跨膜蛋白176B (Transmembrane protein 176B, TMEM176B), 也称为耐受相关诱导蛋白, 是一种免疫调节的阳离子通道[4][5]。TMEM176B蛋白包含四个跨膜结构域及C端的ITIM基序。TMEM176B及其同源TMEM176A是MS4A蛋白家族的成员[6], 主要表达于单核细胞、巨噬细胞和CD11B⁺树突状细胞[7]。随后研究发现TMEM176B广泛存在于肺脏、肝脏、肾等[8]。最近研究发现TMEM176B调控肿瘤微环境中免疫细胞功能, 且阻断TMEM176B后增强抗肿瘤免疫作用[9]。但是, TMEM176B在乳腺癌中表达及其对乳腺癌作用和分子机制尚未清楚。

在这篇文章中, 我们探讨TMEM176B在乳腺癌中表达及其在乳腺癌中作用, 同时阐明其分子机制。本文采用小分子干扰片段敲低乳腺癌细胞TMEM176B表达, 用MTT实验、CCK8实验和流式细胞实验检测乳腺癌生长和凋亡情况。同时检测相关凋亡蛋白Bax/Bcl-2、增殖蛋白Ki67, 以及抑癌基因p53和AKT信号通路, 初步阐明TMEM176B在乳腺癌中作用及分子机制。此外, 我们也初步评估TMEM176B在乳腺癌诊断中价值。

2. 材料与方法

2.1. 细胞培养

乳腺癌细胞株MDA-MB-231购自ATCC。用DMEM+10%的胎牛血清完全培养基无菌于37°、5% CO₂的细胞培养箱中培养。

2.2. 试剂和耗材

MTT 购自北京鼎国公司。CCK8 试剂盒购自乐研生物公司。Real time PCR 的 SYBER Green 和逆转录酶试剂盒购自 Takara 公司。RNA 提取试剂盒购自 TIANGEN 公司。干扰 TMEM176B 的 siRNA 小分子干扰片段购自上海吉玛公司。转染试剂 Lipo3000 购自 Invitrogen 公司。细胞培养液购 Hyclone 公司。TMEM176B 抗体购自 Proteintech 公司; Bax、Bcl-2、p53、Ki67、 β -actin 抗体购自 Abcam 公司。

2.3. 方法

MTT 法检测乳腺癌细胞活力: 采用噻唑兰颜色反应法, 即 MTT 法进行细胞增殖活力的测定。其原理为活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能使外源性 MTT 还原为水不溶性的蓝紫色晶体甲瓚, 并沉淀在细胞中, 而死细胞无此功能。MDA-MB-231 细胞种植于 96 孔板, 转染 siRNA-TMEM176B, 处理 24 h 后, 每孔加入 10 μ l 的 MTT 工作液(浓度为 5 mg/ml), 于 37 $^{\circ}$ 、5% CO₂ 的细胞培养箱中继续培养 4 小时; 去掉上清, 加入 150 μ l DMSO, 1000 转/min, 摇床震荡 10 min, 用酶标仪测定 OD₄₉₀ 的光密度值。实验中每份样品设 6 个复孔, 实验至少重复 3 次。

CCK8 法检测乳腺癌细胞活力: 该试剂中含有 WST-8, 它在电子载体 1-Methoxy PMS 的作用下被细胞中的脱氢酶还原为具有高度水溶性的黄色甲瓚产物。生成的甲瓚物的数量与活细胞的数量成正比。每孔接种 5000 个细胞, 设定 6 个重复孔, 细胞贴壁后, 转染 siRNA-TMEM176B, 24 h 后加入 PBS 润洗后吸出, 加入稀释好的 CCK8 溶液, 放入培养箱中 30 min 后测定 OD 值。

qRT-PCR 实验

qRT-PCR 检测乳腺癌组织 TMEM176B 的转录水平。步骤如下: 收集 20 例乳腺癌组织, 以癌旁组织为对照组, 提取 RNA, 逆转录为 cDNA, 用 Takara 公司的 SYBER green 试剂盒进行实时荧光 PCR 实验。PCR 条件为: 95 $^{\circ}$ C 30 s, 1 个循环; PCR 反应, 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 10 s, 40 个循环; 溶解, 95 $^{\circ}$ C 0 s, 65 $^{\circ}$ C 20 s, 95 $^{\circ}$ C 0 s, 1 个循环。PCR 结束后, 根据反应得到的 Cp 值, 使用相对定量的分析方法, 以标准曲线进行校正, 最后计算出样品中各 mRNA 的相对浓度。进行 qRT-PCR 引物序列如表 1。

Table 1. The primer of qRT-PCR

表 1. 实时荧光定量 PCR 引物

NCBI ID	基因	引物	引物序列	退火温度
NM_NM_001101311.1	TMEM176B	上游	5'-TACATGCAGATGCTGAGGAAG-3'	60 $^{\circ}$ C
		下游	5'-GAAGACCTACTCCCAAGGAAAC-3'	
NM_002046.5	GAPDH	上游	5'-ACCATCTCCAGGAGCGAGA-3'	60 $^{\circ}$ C
		下游	5'-GACTCCACGACGTACTCAGC-3'	

干扰 TMEM176B 实验

TMEM176B 干扰小分子片段 siRNA 购自上海吉玛公司。

具体步骤如下: MDA-MB-231 细胞种植于六孔板中, 待其融合度为 50%~60%时候, 用 Lipo3000 转染试剂转染干扰小分子片段 siRNA, 一定时间后进行 MTT 实验、CCK8 实验和流式细胞实验。

流式细胞实验

MDA-MB-231 细胞种植于六孔板中, 待其融合度为 50%~60%时候, 用 Lipo3000 转染试剂转染干扰小分子片段 siRNA, 24 小时后收集细胞, 重悬在 1 \times binding buffer 中, 调浓度为 1 \times 10⁶/ml, 加入 PI 和 Annexin V, 孵育 15 min, 流式细胞仪分析。

Western blot 实验

收集处理好的乳腺癌细胞蛋白或乳腺癌组织蛋白, 进行蛋白定量, 跑胶, 电转电泳。加入一抗, 4 度过夜, 收集一抗, 加入二抗, 然后加入 ECL 显色, 拍照。

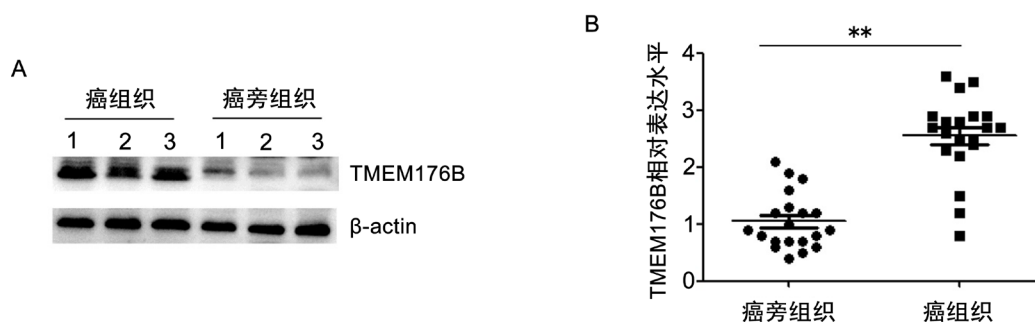
2.4. 统计学分析

采用 SPSS17.0 软件进行统计学处理。计量资料以均数±标准差表示。采用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 表示具有统计学意义。

3. 实验结果

3.1. 乳腺癌组织中 TMEM176B 表达情况

收集诊断为乳腺癌患者的乳腺癌组织, 取癌旁组织为对照组。采用实时荧光 PCR 和 Western blot 分别检测 TMEM176B 在乳腺组织中表达。结果显示, 相对于癌旁组织, TMEM176B 在乳腺癌组织中高表达(图 1(A)和图 1(B))。



(A) Western blot 检测 TMEM176B 在乳腺癌组织中表达。(B) qRT-PCR 检测 TMEM176B 在乳腺癌组织中表达。 $**p < 0.01$ 。

Figure 1. The expression of TMEM176B in breast cancer tissue

图 1. TMEM176B 在乳腺癌组织中表达

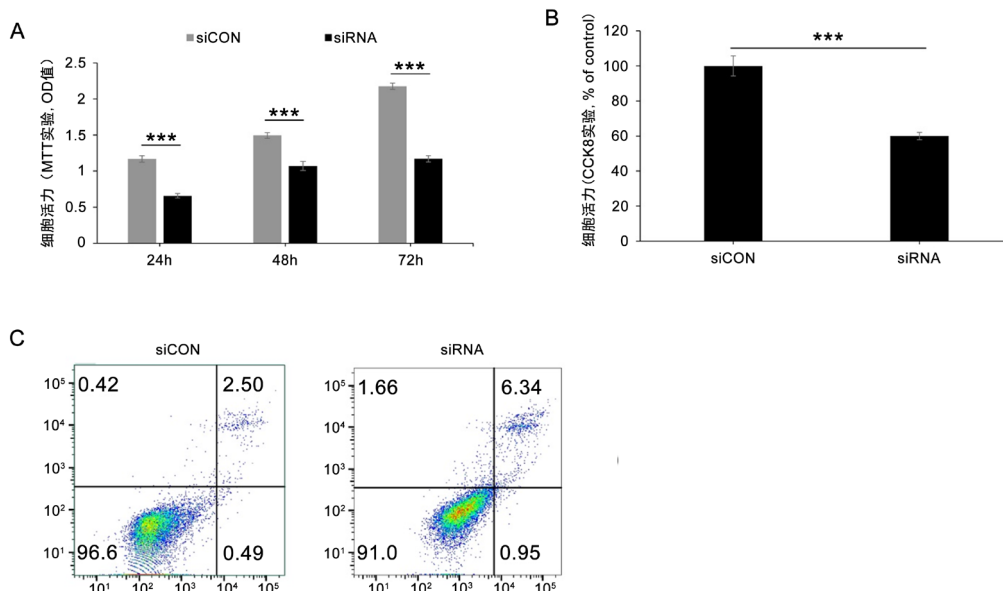
3.2. TMEM176B 在乳腺癌细胞中作用

用小分子干扰片段 siRNA 转染 MDA-MB-231 细胞, 进行 MTT 实验、CCK8 实验检测乳腺癌细胞活力, 以及流式细胞实验检测乳腺癌细胞凋亡作用。结果显示, 小分子干扰片段 siRNA 敲低乳腺癌细胞 TMEM176B 后, 乳腺癌细胞活力明显受抑制(图 2(A)和图 2(B))。流式细胞实验结果显示干扰 TMEM176B 后诱导乳腺癌细胞凋亡(图 2(C))。这些结果表明 TMEM176B 调控乳腺癌细胞的凋亡过程。

3.3. TMEM176B 调控乳腺癌细胞相关凋亡蛋白 Bax/Bcl-2 和增殖蛋白 Ki67 表达

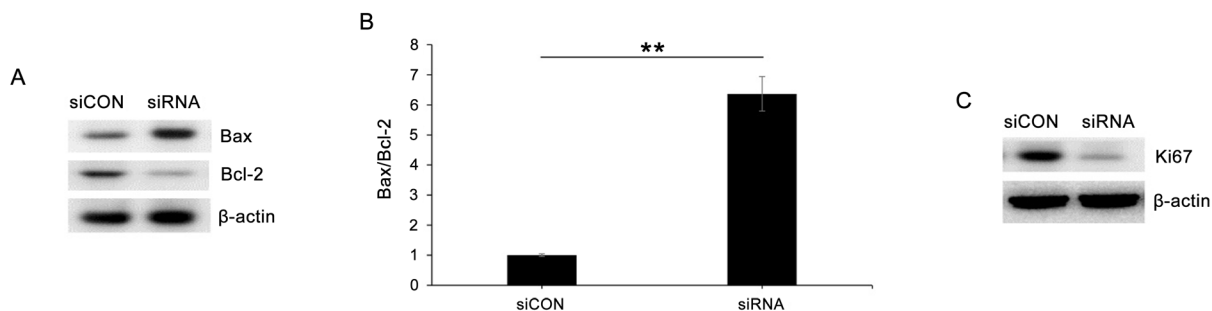
为了阐明 TMEM176B 调控乳腺癌细胞生长和凋亡作用的分子机制, 我们检测凋亡相关蛋白 Bax 和 Bcl-2 表达。结果显示, 干扰 TMEM176B 后明显上调促凋亡蛋白 Bax 表达, 抑制抑凋亡蛋白 Bcl-2 表达(图 3(A)), 明显上调 Bax/Bcl-2 比例(图 3(B))。此外, 我们也检测了增殖蛋白 Ki67 情况。图 3(C)显示, 沉默 TMEM176B 后明显下调 Ki67 蛋白表达。这些结果表明敲低 TMEM176B 后可能通过调控凋亡蛋白 Bax/Bcl-2 和增殖蛋白 Ki67 表达进而调控乳腺癌细胞凋亡作用。

(图 3(A)和图 3(B)) TMEM176B 调控乳腺癌细胞 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达。小分子 RNA 敲低 TMEM176B 后, 于 24 h 收集细胞蛋白检测 Bax 和 Bcl-2 表达。 $**p < 0.01$ 。图 3(C) TMEM176B 调控乳腺癌细胞 Ki67 蛋白表达。小分子 RNA 敲低 TMEM176B 后, 于 24 h 收集细胞蛋白检测 Ki67 表达。



(A 和 B) MTT 和 CCK8 法检测乳腺癌细胞的活力。干扰 TMEM176B 后, 于 24 h、48 h、72 h 检测细胞活力。(C) 流式细胞实验检测乳腺癌细胞凋亡情况。干扰 TMEM176B 后, 于 24 h 检测实验细胞凋亡情况。*** $p < 0.001$ 。

Figure 2. TMEM176B knockdown inhibits breast cancer viability and promotes apoptosis
图 2. 敲低 TMEM176B 后抑制乳腺癌细胞生长和诱导其凋亡



(A 和 B) TMEM176B 调控乳腺癌细胞 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达。小分子 RNA 敲低 TMEM176B 后, 于 24 h 收集细胞蛋白检测 Bax 和 Bcl-2 表达。** $p < 0.01$ 。(C) TMEM176B 调控乳腺癌细胞 Ki67 蛋白表达。小分子 RNA 敲低 TMEM176B 后, 于 24 h 收集细胞蛋白检测 Ki67 表达。

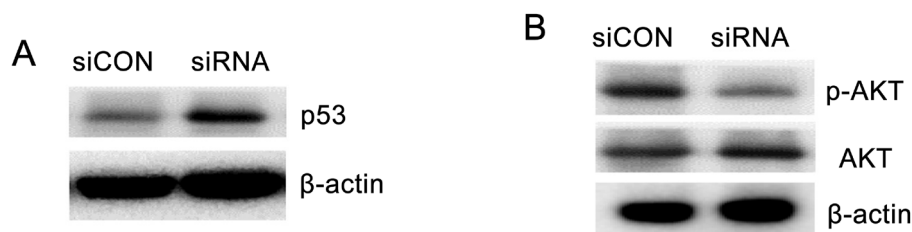
Figure 3. TMEM176B regulates the expression of Bax/Bcl-2 and Ki67
图 3. TMEM176B 调控乳腺癌细胞 Bax/Bcl-2 和 Ki67 蛋白表达

3.4. TMEM176B 调控乳腺癌细胞 p53 和 p-AKT 水平

为了进一步阐明 TMEM176B 调控乳腺癌细胞凋亡作用的分子机制, 我们检测抑癌 p53 蛋白和 p-AKT 水平。结果显示, 干扰 TMEM176B 后, 上调抑癌 p53 蛋白表达和下调 p-AKT 水平(图 4(A)和图 4(B))。以上结果表明, TMEM176B 可能通过 p53 和 p-AKT 通路调控凋亡相关蛋白 Bax/Bcl-2 和增殖蛋白 Ki67 表达, 进而调控乳腺癌凋亡作用。

3.5. TMEM176B 在乳腺癌诊断价值评估

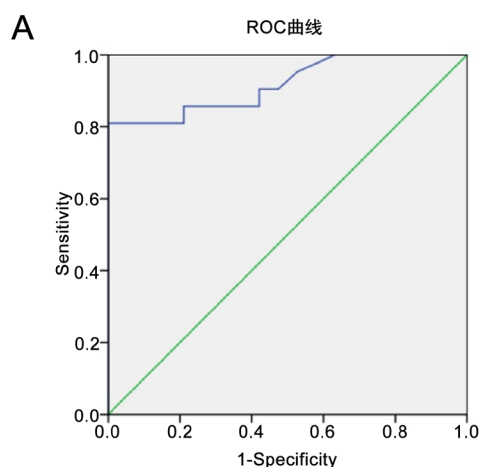
为了评估 TMEM176B 在乳腺癌诊断中价值, 我们进行了 ROC 曲线分析。结果显示, TMEM176B 在乳腺癌诊断中具有较好价值, AUC 面积为 0.919 (图 5(A))。同时 ROC 曲线分析表明 TMEM176B 对乳腺癌诊断敏感性和特异性分别为 81.5%和 89.5%; 95%置信区间为 0.832~1.005 (图 5(B))。



(A 和 B) 干扰 TMEM176B 后上调乳腺癌细胞 p53 蛋白表达和下调 p-AKT 水平。小分子 RNA 敲低 TMEM176B 后, 于 24 h 收集细胞蛋白检测 p53 蛋白表达和 p-AKT 水平。

Figure 4. Up-regulation of p53 and p-AKT in breast cancer treated with siRNA for TMEM176B

图 4. 干扰 TMEM176B 后上调乳腺癌细胞 p53 蛋白表达和下调 p-AKT 水平



B

项目	数值
AUC面积	0.919
95%区间	0.832-1.005
敏感性	81.5
特异性	89.5

(A 和 B) ROC 曲线分析 TMEM176B 在乳腺癌诊断中价值。

Figure 5. Evaluation of TMEM176B in the diagnosis of breast cancer

图 5. TMEM176B 在乳腺癌诊断中评估

4. 讨论

乳腺癌在女性恶性肿瘤中排第一位, 虽然近几年治疗水平提高, 患者病情得到很好的控制。但是, 发生远处转移的患者平均生存率极低(低于 24 个月) [10]。因此, 寻找新的靶点诱导乳腺癌凋亡有望提高乳腺癌患者的生存期。人 TMEM176B 最初发现于人肺成纤维细胞中[11], 最近研究发现其与小细胞肺癌有关[12]。越来越多证据表明 TMEM176B 与肿瘤发生发展密切相关。TMEM176B 蛋白异常积累与癌症的发病机制显著相关[13], 并且在胃肠道肿瘤中 TMEM176B 高表达[14]。但是, TMEM176B 在乳腺癌凋亡中作用及分子机制尚未清楚。我们研究发现 TMEM176B 在乳腺癌中高表达, 且敲低 TMEM176B 后抑制乳腺癌细胞生长和诱导其凋亡。分子机制方面, 我们发现 TMEM176B 调控凋亡相关蛋白 Bax/Bcl-2、增殖蛋白 Ki67、抑癌基因 p53 表达和 p-AKT 水平。此外, ROC 曲线分析表明 TMEM176B 对乳腺癌诊断有良好价值, 可辅助乳腺癌诊断。

细胞凋亡也是肿瘤的一个重要特征[15]。细胞凋亡主要由细胞凋亡蛋白 Bcl-2 家族调控。Bcl-2 家族包括促凋亡蛋白 Bak 和 Bax 以及抑凋亡蛋白 Bcl-2 和 Mcl-1 [16]。我们实验中发现敲低 TMEM176B 后明显上调促凋亡蛋白 Bax 水平, 下调抑凋亡蛋白 Bcl-2 水平, 明显升高 Bax/Bcl-2 比例; 且功能实验表明阻断 TMEM176B 后抑制乳腺癌生长和诱导凋亡, 表明 TMEM176B 可能通过调控凋亡蛋白 Bcl-2 家族调控进而调控乳腺癌凋亡过程。抑癌基因 p53 作为细胞应激传感器而发挥作用, 由 DNA 损伤和癌基因激活等应激条件激活, 在肿瘤凋亡中起着重要作用。正常情况下, p53 蛋白水平较低, 这是由于 p53 靶向 E3 泛

素蛋白连接酶 mdm2 的反馈调节, 后者靶向 p53 进行蛋白酶体介导的降解[16]。我们实验发现 TMEM176B 也可调控 p53 蛋白表达。PI3K-Akt 信号通路在乳腺癌的发展中起着重要作用。p-Akt 作为这一途径中最关键的信号分子, 作为一种治疗靶点引起了广泛的关注[17]。在我们实验中, 发现沉默 TMEM176B 后下调 p-Akt, 提示 TMEM176B 也可能作为 p-Akt 抑制剂成为治疗乳腺癌新的靶点。此外, ROC 曲线表明 TMEM176B 也是乳腺癌诊断的潜在指标。但是, TMEM176B 在体内是否调控乳腺癌凋亡过程以及 TMEM176B 如何调控 p53 蛋白表达和 p-Akt 水平尚需进一步研究, 这也是本文不足之处。

总之, 在这篇论文中我们研究 TMEM176B 在乳腺癌中作用和初步探讨分子机制, 同时分析其在乳腺癌中诊断价值。我们发现阻断 TMEM176B 后抑制乳腺癌细胞生长和诱导其凋亡, 其机制与 Bax/Bcl-2、Ki67、抑癌基因 p53 和 p-AKT 通路有关, 这些结果表明靶向 TMEM176B 可诱导乳腺癌凋亡, 为将来临床靶向 TMEM176B 治疗乳腺癌提供实验基础, 具有一定的临床意义。

参考文献

- [1] Yedjou, C., Izevbigie, E. and Tchounwou, P. (2008) Preclinical Assessment of Vernonia Amygdalina Leaf Extracts as DNA Damaging Anti-Cancer Agent in the Management of Breast Cancer. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, **5**, 337-341. <https://doi.org/10.3390/ijerph5050337>
- [2] Chen, W., et al. (2016) Cancer Statistics in China, 2015. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, **66**, 115-132. <https://doi.org/10.3322/caac.21338>
- [3] DeSantis, C.E., et al. (2014) Cancer Treatment and Survivorship Statistics, 2014. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, **64**, 252-271. <https://doi.org/10.3322/caac.21235>
- [4] Louvet, C., et al. (2005) Identification of a New Member of the CD20/FcepsilonRIbeta Family Overexpressed in Tolerated Allografts. *American Journal of Transplantation*, **5**, 2143-2153. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2005.01007.x>
- [5] Segovia, M., et al. (2014) Autologous Dendritic Cells Prolong Allograft Survival through Tmem176b-Dependent Antigen Cross-Presentation. *American Journal of Transplantation*, **14**, 1021-1031. <https://doi.org/10.1111/ajt.12708>
- [6] Eon Kuek, L., et al. (2016) The MS4A Family: Counting Past 1, 2 and 3. *Immunology & Cell Biology*, **94**, 11-23.
- [7] Condamine, T., et al. (2010) Tmem176B and Tmem176A Are Associated with the Immature State of Dendritic cells. *Journal of Leukocyte Biology*, **88**, 507-515. <https://doi.org/10.1189/jlb.1109738>
- [8] Cuajungco, M.P., et al. (2012) Abnormal Accumulation of Human Transmembrane (TMEM)-176A and 176B Proteins Is Associated with Cancer Pathology. *Acta Histochemica*, **114**, 705-712. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2011.12.006>
- [9] Segovia, M., et al. (2019) Targeting TMEM176B Enhances Antitumor Immunity and Augments the Efficacy of Immune Checkpoint Blockers by Unleashing Inflammation Activation. *Cancer Cell*, **35**, 767-781.e6.
- [10] DeSantis, C., et al. (2014) Breast Cancer Statistics, 2013. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, **64**, 52-62. <https://doi.org/10.3322/caac.21203>
- [11] Lurton, J., et al. (1999) Isolation of a Gene Product Expressed by a Subpopulation of Human Lung Fibroblasts by Differential Display. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, **20**, 327-331. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.20.2.3368>
- [12] Gottschling, S., et al. (2012) Establishment and Comparative Characterization of Novel Squamous Cell Non-Small Cell Lung Cancer Cell Lines and Their Corresponding Tumor Tissue. *Lung Cancer*, **75**, 45-57. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2011.05.020>
- [13] Cao, Q., et al. (2016) MicroRNA-7 Inhibits Cell Proliferation, Migration and Invasion in Human Non-Small Cell Lung Cancer Cells by Targeting FAK through ERK/MAPK Signaling Pathway. *Oncotarget*, **7**, 77468-77481. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12684>
- [14] Lee, C.H., Liang, C.W. and Espinosa, I. (2010) The Utility of Discovered on Gastrointestinal Stromal Tumor 1 (DOG1) Antibody in Surgical Pathology—The GIST of It. *Advances in Anatomic Pathology*, **17**, 222-232. <https://doi.org/10.1097/PAP.0b013e3181d973c2>
- [15] Su, Z., et al. (2015) Apoptosis, Autophagy, Necroptosis, and Cancer Metastasis. *Molecular Cancer*, **14**, 48.
- [16] Adams, J.M. and Cory, S. (2007) The Bcl-2 Apoptotic Switch in Cancer Development and Therapy. *Oncogene*, **26**,

1324-1337. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210220>

- [17] Hasson, S.P., *et al.* (2013) Endocrine Resistance in Breast Cancer: Focus on the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt/Mammalian Target of Rapamycin Signaling Pathway. *Breast Care (Basel)*, **8**, 248-255.
<https://doi.org/10.1159/000354757>

Hans 汉斯

知网检索的两种方式:

1. 打开知网首页: <http://cnki.net/>, 点击页面中“外文资源总库 CNKI SCHOLAR”, 跳转至: <http://scholar.cnki.net/new>, 搜索框内直接输入文章标题, 即可查询;
或点击“高级检索”, 下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2164-9049, 即可查询。
2. 通过知网首页 <http://cnki.net/>顶部“旧版入口”进入知网旧版: <http://www.cnki.net/old/>, 左侧选择“国际文献总库”进入, 搜索框直接输入文章标题, 即可查询。

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: wjcr@hanspub.org