

生长激素慢性刺激对肝脏JAK2-STAT5信号通路的影响

赵巧飞, 徐扬志, 邹婧, 何济满

■背景资料

生长激素(growth hormone, GH)在临床上广泛应用于各种疾病, 而GH不敏感是其重要的不良反应。肝脏是GH在人体最重要的靶器官, Janus激酶2(Janus kinase 2, JAK2)-信号转导及转录激活因子5(signal transducer and activator of transcription 5, STAT5)是GH在肝脏最重要的信号通路, STAT5的磷酸化水平直接影响了GH的生物效应。

赵巧飞, 徐扬志, 邹婧, 何济满, 南方医科大学南方医院消化内科 广东省广州市 510515

国家自然科学基金资助项目, No. 81170743

作者贡献分布: 本课题由赵巧飞、徐扬志及邹婧参与实验操作与论文撰写; 何济满设计指导与撰写。

通讯作者: 何济满, 教授, 510515, 广东省广州市白云区广州大道北1838号, 南方医科大学南方医院消化内科。
jimanhe@smu.edu.cn
电话: 020-62786221

收稿日期: 2016-01-02
修回日期: 2016-03-30
接受日期: 2016-04-05
在线出版日期: 2016-05-08

Effect of chronic administration of growth hormone on JAK2-STAT5 signaling pathway in the liver

Qiao-Fei Zhao, Yang-Zhi Xu, Jing Zou, Ji-Man He

Qiao-Fei Zhao, Yang-Zhi Xu, Jing Zou, Ji-Man He, Department of Gastroenterology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangdong 510515, Guangzhou Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 81170743

Correspondence to: Ji-Man He, Professor, Department of Gastroenterology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, 1838 Guangzhou Street, Baiyun District, Guangdong 510515, Guangzhou Province, China. jimanhe@smu.edu.cn

Received: 2016-01-02
Revised: 2016-03-30
Accepted: 2016-04-05
Published online: 2016-05-08

Abstract

AIM: To investigate the effect of chronic administration of growth hormone (GH) on the JAK2-STAT5 signaling pathway in the liver.

METHODS: Healthy male BALB/c mice were treated with recombinant human growth hormone (r-hGH) daily for two weeks, or with equal amount of sterile phosphate buffered saline (PBS). Then the expression levels of tyrosine phosphorylated signal transducer and activator of transcription 5 (P-STAT5), and suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS-3) mRNA and growth hormone receptor (GHR) were examined. H4-II-E cells were treated with r-hGH daily for 4 d, or with equal amount of PBS. Then the expression level of P-STAT5 and the DNA binding activity of P-STAT5 were examined.

RESULTS: After chronic administration of GH, liver P-STAT5 level decreased, SOCS-3 mRNA increased ($P < 0.05$), and no change was observed for GHR expression. Similar results were observed in the cell culture experiments. Chronic administration of GH caused an inhibition of P-STAT5 expression and also its DNA binding activity ($P < 0.05$).

CONCLUSION: Chronic administration of GH inhibits the JAK2-STAT5 signaling pathway in the liver *via* mechanisms possibly associated with increasing the expression of SOCS-3 gene.

© 2016 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Liver; Growth hormone; Signal

■同行评议者

唐世刚, 教授, 湖南省人民医院; 陆伦根, 主任医师, 上海交通大学附属第一人民医院消化科

transducer and activator of transcription 5; Suppressor of cytokine signaling-3

Zhao QF, Xu YZ, Zou J, He JM. Effect of chronic administration of growth hormone on JAK2-STAT5 signaling pathway in the liver. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2016; 24(13): 2032-2037 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/24/2032.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v24.i13.2032>

摘要

目的: 研究生长激素(growth hormone, GH)慢性刺激对肝脏Janus激酶2(Janus kinase 2, JAK2)-信号转导及转录激活因子5(signal transducer and activator of transcription 5, STAT5)信号通路的影响。

方法: 动物实验使用健康BALB/c ♂小鼠, 分为GH慢性刺激组与对照组, 每日分别予GH或PBS刺激共2 wk; 检测肝脏P-STAT5、信号转导抑制因子(suppressor of cytokine signaling, SOCS)-3 mRNA及生长激素受体(growth hormone receptor, GHR)水平。细胞实验使用大鼠肝癌细胞H4-II-E, 分为GH慢性刺激组与对照组, 每日分别予GH或PBS刺激共4 d; 检测细胞P-STAT5水平及P-STAT5与DNA的结合水平。

结果: 动物试验中, 小鼠接受GH慢性刺激后, 肝脏P-STAT5水平降低, SOCS-3 mRNA水平升高($P<0.05$), 而GHR水平无变化。细胞实验中, GH慢性刺激同样导致P-STAT5水平下降($P<0.05$), 同时P-STAT5与DNA的结合水平亦降低($P<0.05$)。

结论: GH慢性刺激可抑制肝脏JAK2-STAT5信号通路, 其机制可能是SOCS-3基因的表达增加, 从而抑制了STAT5的磷酸化。

© 2016年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 肝脏; 生长激素; 信号转导及转录激活因子5; 信号转导抑制因子-3

核心提示: 生长激素慢性刺激可抑制肝脏Janus激酶2-信号转导及转录激活因子5(signal transducer and activator of transcription 5, STAT5)信号通路, 其机制可能与SOCS-3基因的表达增加抑制了STAT5的磷酸化有关。

赵巧飞, 徐扬志, 邹婧, 何济满. 生长激素慢性刺激对肝脏JAK2-STAT5信号通路的影响. *世界华人消化杂志* 2016; 24(13): 2032-2037 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/24/2032.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v24.i13.2032>

com/1009-3079/24/2032.asp DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v24.i13.2032>

0 引言

生长激素(growth hormone, GH)是人体重要的生长调节因子, 对机体代谢与生长发育有多种影响^[1,2]。GH缺乏可造成儿童生长发育障碍、成人代谢紊乱等疾病。临床上常使用重组人生长激素(recombinant human growth hormone, r-hGH)治疗GH缺乏症(growth hormone deficiency, GHD), 以及儿童慢性肾功能不全、先天性卵巢发育不全综合征(turner syndrome, TS)、HIV/AIDS的消耗与恶病质、炎症性肠病、烧伤、重症胰腺炎等^[3-9]。但长期使用易产生GH不敏感, 而其机制还很多都不清楚。

Janus激酶2(Janus kinase 2, JAK2)-信号转导及转录激活因子5(signal transducer and activator of transcription 5, STAT5)通路是GH重要的信号通路。GH与生长激素受体(growth hormone receptor, GHR)结合后激活JAK2与自身的磷酸化, 进一步激活STAT5磷酸化产生P-STAT5, P-STAT5结合于DNA上GH调控基因的启动区域, 激活一系列基因表达, 从而产生各种细胞效应^[1,2,10]。信号转导抑制因子(suppressor of cytokine signaling, SOCS)家族被认为对该通路有调控作用, 其中SOCS-2、SOCS-3及CIS被认为是该信号通路的抑制性调控因子^[10-12]。肝脏是人体GH重要的靶器官, 本研究从在体水平(健康BALB/c ♂小鼠)及细胞水平(大鼠肝癌细胞系H4-II-E), 研究GH慢性刺激对肝脏JAK2-STAT5信号转导通路的影响机制。

1 材料和方法

1.1 材料 8周龄BALB/c ♂小鼠16只, SPF级标准饲养于南方医院动物实验中心, 大鼠肝癌细胞系H4-II-E, 冻存于南方医院广东省消化病研究所。注射用重组人生长激素(安苏萌)(20141229)[安徽安科生物工程(集团)股份有限公司], P-Stat 5b抗体(Tyr694)(D47E7)(美国Cell Signaling公司), P-Stat 5b抗体(Tyr694)(C71E5)(美国Cell Signaling公司), 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG/Alexa Flor 488(ZF0511)(北京中杉金桥公司), GHR抗体(B-10)(SC-137185)(美国Santa Cruz公司), β -Actin抗体(MG3)(RM2001)(锐抗生物), 辣根

■ 研究前沿

JAK2-STAT5通路是GH重要的信号转导通路, 可介导细胞的生长、增殖、代谢与凋亡。该通路中STAT5磷酸化水平的抑制与GH不敏感效应直接相关, 其中SOCS基因家族的抑制性调节作用受到广泛的关注。而其发挥调节作用的机制仍有许多不清楚。

■ 相关报道

GH-JAK2-STAT5信号通路的抑制与生长激素受体(growth hormone receptor, GHR)水平下调及STAT5的磷酸化水平降低直接相关。SOCS基因家族对该通路可产生抑制性调节作用。

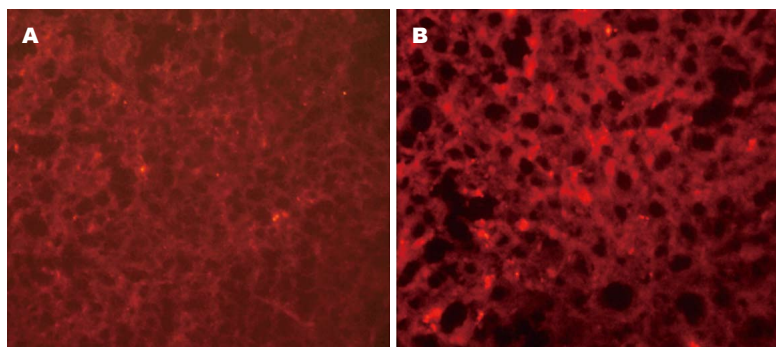


图1 生长激素慢性刺激对肝脏STAT5磷酸化的影响($\times 1000$)。A: 生长激素慢性刺激组; B: 对照组。STAT5: 信号转导及转录激活因子5。

过氧化物酶标记的山羊抗小鼠IgG(ZB2305)(北京中杉金桥公司), 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG(ZB2301)(北京中杉金桥公司), SHP-1抗体(Y476)(ab32559)(美国Santa Cruz公司), BCA蛋白检测试剂盒(#23228, #1859078)(美国Thermo公司), 化学发光增强剂(ECL)试剂盒(P0018-1, P0018-2)(上海碧云天公司), EMSA试剂盒(#20148)(美国Thermo公司), Miles 4622全自动组织脱水机(德国Miles公司), 正置荧光显微镜(BX50)(日本奥林巴斯公司), BeckmanCS-15R低温高速离心机(美国Beckman公司), Power Pac-HC164-5052电泳仪(美国BIO.RAD公司), 硝酸纤维素薄膜(美国Millipore公司), X-OMAT BT医用X射线胶片[锐珂(厦门)医疗器材有限公司], GDS7500光密度扫描仪(美国UVT公司), Surecycler8800PCR仪(美国Agilent Technologies公司), Light Cycler 480II PCR仪(瑞士Roche公司), ImageJ光密度分析软件, SPSS20.0软件。

1.2 方法

1.2.1 动物实验: 将16只6-8周龄的健康♂BALB/c小鼠随机分为GH慢性刺激组和对照组, 每组8只。GH慢性组按3 $\mu\text{g/g}$ 体质量剂量予2次/d腹腔注射r-hGH(1 mg/mL), 对照组予等量0.1 mol/L的PBS液, 共2 wk; 末次注射后16 h于次日上午8:00处死。处死前使用水合氯醛充分麻醉, 然后快速摘取肝脏冻存于液氮中, 再移至-80℃低温冰箱长期保存。制作冰冻组织切片, 免疫荧光法检测小鼠肝组织中P-STAT5的表达水平; 提取组织RNA, RT-PCR检测SOCS-3基因mRNA的表达水平; 提取组织蛋白, 蛋白印迹法(Western blot)检测GHR的表达水平。

1.2.2 细胞培养实验: H4-II-E细胞均匀铺12孔细胞培养板, 分为GH慢性刺激组与对照组, 每

组6孔, 予含4%胎牛血清的DMEM培养基培养。每日分别予等量r-hGH(500 ng/mL)与PBS(0.1 mmol/L)刺激, 共4 d, 末次刺激后24 h予血清及GH饥饿6 h, 之后每组3孔予1次单剂量r-hGH刺激, 3孔予等量PBS, 30 min后裂解。提取细胞蛋白, Western blot检测P-STAT5的表达水平; 提取细胞DNA, 凝胶迁移实验(EMSA)检测P-STAT5与DNA的结合水平。

统计学处理 实验数据使用Microsoft Excel2010软件记录, 采用SPSS20.0统计软件进行统计学分析, 两组间比较采用两独立样本 t 检验(Independent-Samples t Test)或Satterthwaite近似 t 检验(符合或不符合方差齐性), 实验结果以mean \pm SD表示, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GH慢性刺激致肝脏STAT5磷酸化水平降低 STAT5是JAK2-STAT5信号通路重要的信号因子, 磷酸化之后才可激活相应的基因表达。故本实验检测了GH慢性刺激下肝脏STAT5磷酸化水平的变化。图1为组织免疫荧光实验, 结果显示相较于对照组, GH慢性刺激组小鼠肝脏的P-STAT5水平降低, 提示该信号通路受到了抑制(图1)。

2.2 GH慢性刺激对肝脏SOCS-3基因及GHR的影响 RT-PCR实验结果显示, 与对照组相比, GH慢性刺激后, 小鼠肝脏的SOCS-3 mRNA水平显著升高($P<0.05$)(表1, 图2)。GHR的表达水平直接影响GH信号调节, Western blot实验结果显示, GH慢性刺激组和对照组小鼠肝脏GHR表达水平无显著性差异($P<0.05$)(表1, 图2)。

2.3 GH慢性刺激降低肝脏对GH的敏感性及P-STAT5与DNA的结合能力 Western blot实验

表 1 生长激素慢性刺激组与对照组SOCS-3 mRNA及GHR水平的比较 ($n = 4$)

项目	GH慢性刺激组	对照组	t 值	P 值
SOCS-3 mRNA相对值	0.88 ± 0.40^a	0.23 ± 0.07	2.803	0.049
GHR灰度相对值	0.95 ± 0.17	1.25 ± 0.22	1.874	0.134

^a $P < 0.05$ vs 对照组. SOCS: 信号转导抑制因子; GH: 生长激素; GHR: 生长激素受体.表 2 生长激素慢性刺激组与对照组P-STAT5及P-STAT5-DNA结合水平的比较 ($n = 6$)

项目	GH慢性刺激组	对照组	t 值	P 值
P-STAT5灰度相对值	0.83 ± 0.16^a	2.04 ± 0.27	6.682	0.003
P-STAT5-DNA结合灰度相对值	0.80 ± 0.12^a	1.59 ± 0.30	4.298	0.013

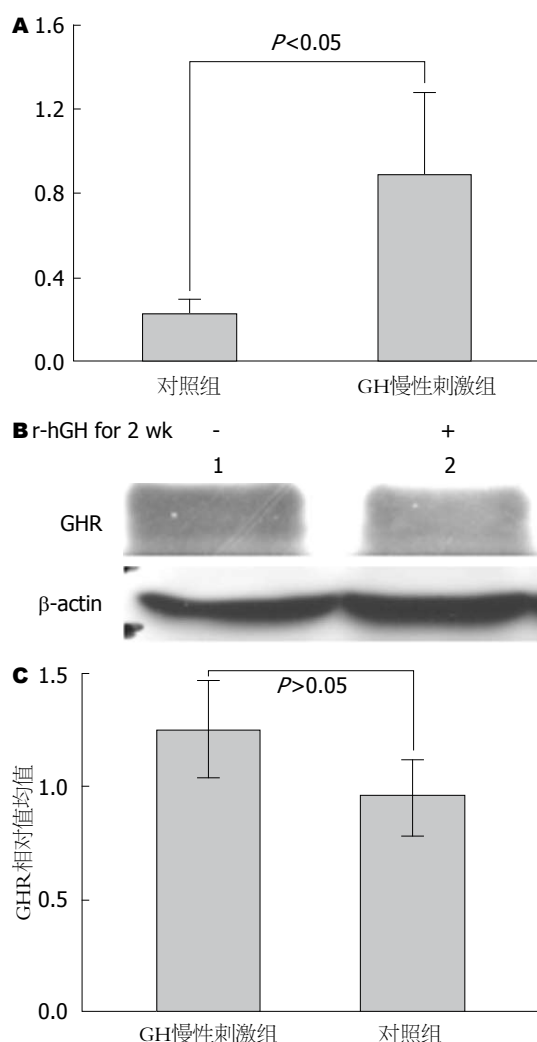
^a $P < 0.05$ vs 对照组. STAT5: 信号转导及转录激活因子5; GH: 生长激素.

图 2 生长激素慢性刺激对肝脏SOCS-3基因及GHR的影响. A: 对肝脏SOCS-3基因转录的影响; B: 肝脏GHR Western blot实验结果; C: 肝脏GHR灰度相对值. 1: 对照组; 2: GH慢性刺激组. SOCS: 信号转导抑制因子; GH: 生长激素; GHR: 生长激素受体.

■ 创新亮点

本文研究了GH长期刺激抑制肝脏JAK2-STAT5信号通路是否与SOCS-3基因表达水平及GHR表达水平有关. 研究结果显示, GH慢性刺激可致SOCS-3基因表达水平增加, 而不影响GHR的表达水平, 同时致STAT5磷酸化水平降低, 提示SOCS-3表达水平增加可能与STAT5的磷酸化水平降低有关.

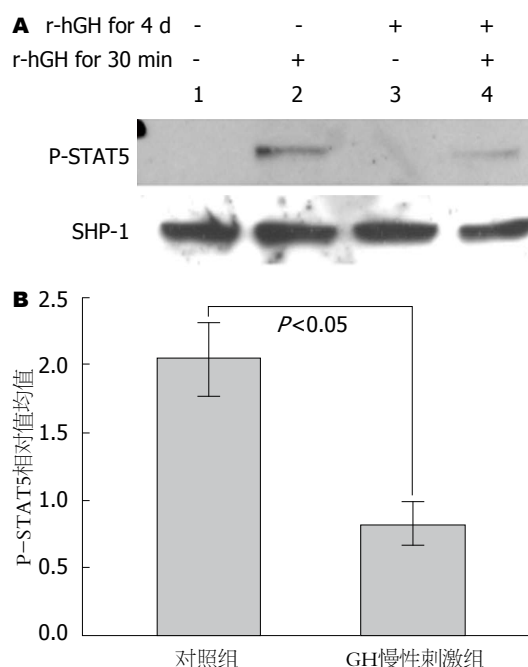


图 3 生长激素慢性刺激下肝脏对生长激素的敏感性. A: Western blot结果; B: 三次独立实验灰度相对值. 1, 2: 对照组; 3, 4: GH慢性刺激组. STAT5: 信号转导及转录激活因子5; GH: 生长激素.

结果显示GH慢性刺激组的P-STAT5水平显著降低($P < 0.05$). 该结果印证了小鼠肝脏的实验结果, 提示肝脏对GH的敏感性降低(表2, 图3). EMSA实验结果显示相较于对照组, GH慢性刺激组P-STAT5与DNA结合水平显著降低(表2, 图4)($P < 0.05$).

3 讨论

本研究通过体内(健康小鼠)和体外(H4-II-E细

应用要点

GH慢性刺激致SOCS-3基因表达水平增加, 可能抑制了STAT5的磷酸化水平, 进而抑制了肝脏JAK2-STAT5信号通路。提示GH慢性刺激确可致GH不敏感效应, 可能对GH的临床应用方式有一定的指导意义。

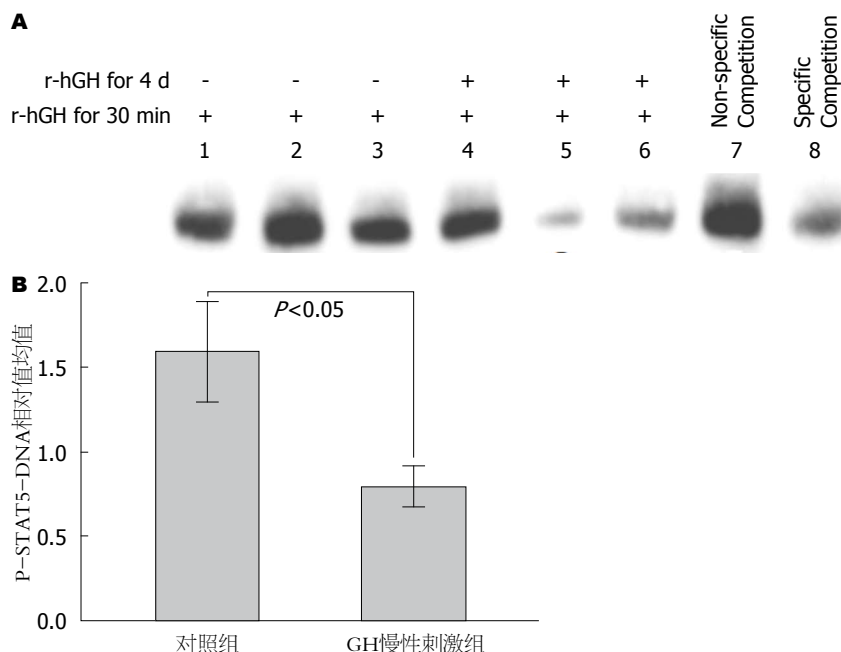


图4 生长激素慢性刺激对肝脏P-STAT5与DNA结合能力的影响。A: EMSA实验结果; B: 三次独立实验灰度相对值。1-3: 对照组; 4-6: GH慢性刺激组; 7: 非特异性结合; 8: 特异性结合。STAT5: 信号转导及转录激活因子5; GH: 生长激素。

胞系)实验检测了GH慢性刺激对肝脏的GH敏感性的影响机制。GH慢性刺激可导致肝脏STAT5的磷酸化水平降低, 降低肝脏对GH的敏感性。其机制可能是GH慢性刺激导致了肝脏SOCS-3基因的转录水平升高。

由于GHR水平直接影响GH的信号转导效率, 有研究报道外科重症患者GHR合成减少且降解增加, 是GH不敏感的机制之一, 并且认为应用外源性GH可以增加GHR的表达水平^[13]。本研究中, 外源性GH慢性刺激并未影响健康小鼠肝脏GHR的表达水平, 这提示不同生理状态下GH敏感性降低的机制可能不同。

SOCS-2、SOCS-3和CIS基因被认为是JAK2-STAT5信号通路的3个抑制性因子^[10,12,14,15]。其中SOCS-2基因对该通路的调控既可抑制也可增强^[16-18]。本研究前期实验曾检测了GH慢性刺激下SOCS-2和CIS信号的变化及其机制, 发现GH慢性刺激后, 肝脏SOCS-2表达没有变化, 但CIS表达确有增加^[19]。本实验又进一步检测了SOCS-3的作用。结果显示, GH慢性刺激导致的肝脏对GH的敏感性降低可能与SOCS-3也有关。

内源性GH的分泌是脉冲式的, 睡眠醒来之前分泌最为活跃。由于内源性GH和外源性注射激素可能相互影响而干扰研究结果, 为保证实验的重复性, 小鼠每天注射r-hGH的时间

是固定的, 处死时间也是一致的。

本研究使用了6-8周龄的健康小鼠。由于GH对人体最主要的作用为促进个体生长, 故儿童缺乏GH可导致生长障碍与发育迟缓, 目前临床上主要使用外源性GH替代疗法治疗儿童GHD。因此本研究选择6-8周龄健康小鼠。研究结果说明, 长期的GH替代疗法虽然有效, 但易产生不良反应即GH不敏感。因此, 如何处理GH的临床治疗和不良反应之间的平衡是急需探索的另一个课题。

4 参考文献

- 1 Sotelo AI, Miquet JG, González L, Bartke A, Turyn D. Vitamin D3 cannot revert desensitization of growth hormone (GH)-induced STAT5-signaling in GH-overexpressing mice non-calcemic tissues. *Growth Horm IGF Res* 2008; 18: 148-156 [PMID: 17881271 DOI: 10.1016/j.ghir.2007.08.001]
- 2 Martinez CS, Piazza VG, Ratner LD, Matos MN, González L, Rulli SB, Miquet JG, Sotelo AI. Growth hormone STAT5-mediated signaling and its modulation in mice liver during the growth period. *Growth Horm IGF Res* 2013; 23: 19-28 [PMID: 23245546 DOI: 10.1016/j.ghir.2012.11.002]
- 3 Hodson EM, Willis NS, Craig JC. Growth hormone for children with chronic kidney disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2012; 2: CD003264 [PMID: 22336787 DOI: 10.1002/14651858.CD003264.pub3]
- 4 Rogol AD. Clinical and humanistic aspects of growth hormone deficiency and growth-related disorders. *Am J Manag Care* 2011; 17 Suppl 18:

- eS4-e10 [PMID: 22590765]
- 5 Cook DM, Rose SR. A review of guidelines for use of growth hormone in pediatric and transition patients. *Pituitary* 2012; 15: 301-310 [PMID: 22271255 DOI: 10.1007/s11102-011-0372-6]
 - 6 Gelato M, McNurlan M, Freedland E. Role of recombinant human growth hormone in HIV-associated wasting and cachexia: pathophysiology and rationale for treatment. *Clin Ther* 2007; 29: 2269-2288 [PMID: 18158071 DOI: 10.1016/j.clinthera.2007.11.004]
 - 7 Mauras N, George D, Evans J, Milov D, Abrams S, Rini A, Welch S, Haymond MW. Growth hormone has anabolic effects in glucocorticosteroid-dependent children with inflammatory bowel disease: a pilot study. *Metabolism* 2002; 51: 127-135 [PMID: 11782884 DOI: 10.1053/meta.2002.28972]
 - 8 包建华. 重组人生长激素的临床应用进展. *药学服务与研究* 2008; 8: 272-275
 - 9 Mulligan K, Tai VW, Schambelan M. Effects of chronic growth hormone treatment on energy intake and resting energy metabolism in patients with human immunodeficiency virus-associated wasting--a clinical research center study. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 1542-1547 [PMID: 9589652 DOI: 10.1210/jcem.83.5.4772]
 - 10 Tollet-Egnell P, Flores-Morales A, Stavr us-Evers A, Sahlin L, Norstedt G. Growth hormone regulation of SOCS-2, SOCS-3, and CIS messenger ribonucleic acid expression in the rat. *Endocrinology* 1999; 140: 3693-3704 [PMID: 10433229]
 - 11 Davey HW, McLachlan MJ, Wilkins RJ, Hilton DJ, Adams TE. STAT5b mediates the GH-induced expression of SOCS-2 and SOCS-3 mRNA in the liver. *Mol Cell Endocrinol* 1999; 158: 111-116 [PMID: 10630411 DOI: 10.1016/S0303-7207(99)00175-6]
 - 12 Ram PA, Waxman DJ. SOCS/CIS protein inhibition of growth hormone-stimulated STAT5 signaling by multiple mechanisms. *J Biol Chem* 1999; 274: 35553-35561 [PMID: 10585430 DOI: 10.1074/jbc.274.50.35553]
 - 13 王治国, 秦环龙. 外科重症疾病获得性生长激素抵抗的研究进展. *肠外与肠内营养* 2006; 13: 250-253
 - 14 Greenhalgh CJ, Bertolino P, Asa SL, Metcalf D, Corbin JE, Adams TE, Davey HW, Nicola NA, Hilton DJ, Alexander WS. Growth enhancement in suppressor of cytokine signaling 2 (SOCS-2)-deficient mice is dependent on signal transducer and activator of transcription 5b (STAT5b). *Mol Endocrinol* 2002; 16: 1394-1406 [PMID: 12040024 DOI: 10.1210/mend.16.6.0845]
 - 15 Nicholson SE, Hilton DJ. The SOCS proteins: a new family of negative regulators of signal transduction. *J Leukoc Biol* 1998; 63: 665-668 [PMID: 9620657]
 - 16 Greenhalgh CJ, Metcalf D, Thaus AL, Corbin JE, Uren R, Morgan PO, Fabri LJ, Zhang JG, Martin HM, Willson TA, Billestrup N, Nicola NA, Baca M, Alexander WS, Hilton DJ. Biological evidence that SOCS-2 can act either as an enhancer or suppressor of growth hormone signaling. *J Biol Chem* 2002; 277: 40181-40184 [PMID: 12208853 DOI: 10.1074/jbc.C200450200]
 - 17 Favre H, Benhamou A, Finidori J, Kelly PA, Edery M. Dual effects of suppressor of cytokine signaling (SOCS-2) on growth hormone signal transduction. *FEBS Lett* 1999; 453: 63-66 [PMID: 10403376 DOI: 10.1016/S0014-5793(99)00681-X]
 - 18 Zellmer S, Sickinger S, Schmidt-Heck W, Guthke R, Gebhardt R. Heterogeneous expression of suppressor of cytokine signalling 2 (SOCS-2) in liver tissue. *J Anat* 2009; 215: 176-183 [PMID: 19470084 DOI: 10.1111/j.1469-7580.2009.01085.x]
 - 19 谭微, 陈小兰, 王楚琼, 姜泊, 何继满. 慢性重组人生长激素对小鼠肝脏STAT5的影响及其机制. *重庆医学* 2013; 26: 3142-3144

■同行评价

本文研究通过动物实验和体外细胞实验探讨了GH慢性刺激对肝脏P-STAT5、SOCS-3 mRNA及GHR水平以及P-STAT5与DNA的结合水平的影响, 比较详实地证实了长期的GH替代疗法虽然有效, 但易产生GH不敏感. 全文设计合理可行, 方法较为先进可靠, 结论可信, 对于临床的GH的应用有较为客观的实际指导意义.

编辑: 于明茜 电编: 都珍珍





Published by **Baishideng Publishing Group Inc**
8226 Regency Drive, Pleasanton,
CA 94588, USA
Fax: +1-925-223-8242
Telephone: +1-925-223-8243
E-mail: bpgoffice@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>



ISSN 1009-3079

