

[文章编号] 1007-385X(2002)03-0158-05

TRAIL 真核表达治疗肝细胞癌作用的研究

薛胜利, 冯作化, 张桂梅, 张 慧, 黎培员, 李 东 (华中科技大学同济医学院医学分子生物学研究室, 武汉 430030)

[摘 要] **目的:** 构建鼠源 TRAIL (mTRAIL) 真核表达质粒。研究其体内、外表达对肝癌细胞的诱导凋亡作用, 抑制肝癌生长作用及与重组人 FN 多肽真核表达质粒 pCH510 协同抑制肝癌生长作用。**方法:** 采用 RT-PCR 及重组 DNA 技术构建 mTRAIL 真核表达质粒; 体内、外进行基因转染; 用流式细胞仪检测肝癌细胞凋亡率, 用 TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) 法及免疫组织化学技术检测肝癌细胞凋亡; 小鼠实体瘤块模型研究基因转染抑制肝癌生长作用。**结果:** 用 RT-PCR 方法自小鼠脾细胞 RNA 扩增出 TRAIL 基因的全长 cDNA, 并克隆至真核表达载体 pcDNA3.1 中获重组质粒 pX1; 以 pX1 转染 BHK 细胞株后攻击肝癌细胞株 H22 细胞, 可检测到肝癌细胞凋亡; 肌肉内注射转染质粒 DNA pX1, 通过诱导肿瘤细胞凋亡抑制肝癌生长; pX1 与 FN 多肽真核表达质粒 pCH510 有协同抑制肝癌生长作用。**结论:** 质粒 pX1 可在细胞及小鼠体内表达; 体内、外表达可诱导肝癌细胞凋亡并可通过该机制抑制肝癌生长; 与 FN 多肽真核表达质粒 pCH510 有协同抑制肝癌生长作用。

[关键词] TRAIL; 重组 FN 多肽; 肝癌; 基因治疗

[中图分类号] Q78; R735.7 [文献标识码] A

The Therapeutic Effects on Hepatocellular Carcinoma Caused by Eukaryotic Expression of TRAIL

XUE Sheng-li, FENG Zuo-hua, ZHANG Gui-mei, ZHANG Hui, LI Pei-yuan, Li Dong (Department of Medical Molecular Biology, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

[Abstract] **Objective:** To construct an eukaryotic expressing plasmid of mouse TRAIL (mTRAIL), and investigate its apoptosis-inducing ability to hepatocellular carcinoma cells *in vitro* and *in vivo*, inhibitory effect on the growth of hepatocellular carcinoma, and its synergism with pCH510, an eukaryotic expressing plasmid of recombinant human FN polypeptide.

Methods: The eukaryotic expressing plasmid of mTRAIL was constructed by RT-PCR and DNA recombination techniques. Gene transfection was performed *in vitro* and *in vivo*. The apoptosis rate of hepatocellular carcinoma cells was measured by Flow Cytometry. The apoptosis of hepatocellular carcinoma cells was also detected by TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) and histochemistry techniques. The inhibitory effect of gene transfection on solid tumor was observed in mice. **Results:** The cDNA of mTRAIL was amplified by RT-PCR from the RNA of the mouse spleen cells, and cloned into the eukaryotic expressing vector pcDNA3.1. The recombinant plasmid was designated as pX1. The BHK cells transfected with plasmid pX1 could attack H22 hepatocellular carcinoma cells and induce them into apoptosis. The transfection of plasmid pX1 through injection into mouse muscles could inhibit the growth of hepatocellular carcinoma by inducing tumor cells into apoptosis. Plasmid pX1 and pCH510 have a synergistic inhibitory effect on the hepatocellular carcinoma growth. **Conclusion:** Plasmid pX1 could be expressed in cells and *in vivo* in mouse. The expression of pX1 *in vivo* and *in vitro* could induce hepatocellular carcinoma cells into apoptosis and inhibit the growth of hepatocellular carcinoma by this mechanism. Plasmid pX1 and pCH510 have a synergistic inhibitory effect on the hepatocellular carcinoma growth.

[Key words] TRAIL; fibronectin; hepatocellular carcinoma; gene therapy

* TRAIL (TNF-related Apoptosis Inducing Ligand) 是 TNF 家族成员中的一员^[1-2]。TRAIL 因其诱导凋亡受体 TRAIL-R₁, TRAIL-R₂ 与不能诱导凋亡的受体 TRAIL-R₃, TRAIL-R₄ 在正常组织与肿瘤组织细胞中的

* [基金项目] 本课题受国家自然科学基金 (39870763)、教育部跨世纪人才培养计划基金资助

[作者简介] 薛胜利 (1977-), 男, 河南南阳人, 硕士, 主要从事肿瘤生物治疗和基因治疗研究。

[通讯作者] 冯作化, E-mail: fengzhg@public.wh.hb.cn

选择性表达而特异性地诱导肿瘤细胞凋亡^[3]。为了研究 TRAIL 是否对肝细胞癌有同样的诱导凋亡作用, 及其作为一种非免疫性的特异杀伤机制应用于肿瘤基因治疗的可行性。我们从小鼠脾细胞中克隆出 mTRAIL 基因, 构建了 mTRAIL 的真核表达质粒, 并初步研究了利用该质粒进行体内、外基因转染对肝细胞癌的诱导凋亡作用, 抑制肝癌生长作用及与重组人 FN 多肽真核表达质粒 pCH510 协同抑制肝癌生长的作用。

1 材料与方 法

1.1 菌株与质粒

实验中所用菌株和质粒均为本室保存。pCH510 是含有人 FN 多肽 Cell I -Hep II 双结构域的真核表达质粒^[4]。

1.2 细胞与动物

BHK 细胞株(幼仓鼠肾细胞株)为本室保存。H22 肝癌细胞株购自武汉大学细胞与菌种保藏中心。昆明种小鼠购自同济医学院实验动物学部。BALB/c 小鼠购自湖北省医学实验动物中心。

1.3 试剂

各种工具酶均购自华美生物工程公司。TRIzol 试剂购自 Gbico 公司。TUNEL 法凋亡检测试剂盒 *in situ* Cell Death Detection Kit, AP, Lipofectin 均购自 Boehringer Mannheim 公司。PI 染色剂购自 Sigma 公司。

1.4 多聚赖氨酸包被的载玻片

购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.5 PCR 引物

根据 Wiley^[1]等报导的 mTRAIL 基因序列设计了 2 个引物。引物 1: 5'-GGCACTTAAGCTTTGCTGGGCT-GCAAGTCTG-3'; 引物 2: 3'-GCGCGCCGAAT TCTAG-TAGGTGAGATATTCTG-3'。引物由上海博亚生物技术有限公司合成。

1.6 mTRAIL 真核表达质粒 pX1 的构建

利用 TRIzol 试剂从昆明种小鼠脾细胞中提取总 RNA, 以引物 2 作为逆转录引物进行逆转录反应。取逆转录产物作为模板, 以引物 1 和引物 2 为一对引物进行 PCR 扩增。扩增产物纯化后用于 mTRAIL 真核表达质粒的构建。按照文献^[5]方法进行 DNA 重组。获得的重组质粒 pX1 送往上海博亚生物技术有限公司测序。

1.7 细胞转染及基因表达检测

采用 Lipofectin 脂质体介导, 将构建的真核表达质粒 pX1 和对照空白载体质粒 pcDNA3.1 转染体外培养的 BHK 细胞。转染后 24h 做 RT-PCR 检测 mTRAIL 真

核表达质粒 pX1 在 BHK 细胞中的表达。

1.8 转染 pX1 的 BHK 细胞攻击 H22 肝癌细胞试验及凋亡检测

采用 Lipofectin 脂质体介导, 将构建的真核表达质粒 pX1 和对照空白载体质粒 pcDNA3.1 分别转染体外培养贴壁生长的 BHK 细胞。其中 pX1 转染组分设为第 1, 4 组, 对照质粒转染组设第 2, 3 组。转染后 24 h, 第 3, 4 组细胞分别加入 H22 肝癌细胞。继续培养 24 h 后, 收集第 3, 4 组悬浮生长的 H22 肝癌细胞, 胰酶消化收集第 1, 2 组的 BHK 细胞, PI 染色后用流式细胞仪进行凋亡分析。同时取 3, 4 组收集的部分 H22 肝癌细胞涂片于包被有多聚赖氨酸的载玻片上, 利用 TUNEL 法凋亡检测试剂盒, AP 进行细胞凋亡检测, 最后以 X-phosphate/BCIP 显色。

1.9 pX1 单独抑瘤试验

将 H22 肝癌细胞接种于 BALB/c 小鼠右后腿, 接种量为 1×10^5 瘤细胞/只。小鼠分为 3 组, 每组 8 只。采用肌肉直接注射质粒进行基因转染。每次每只小鼠注射 50 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ 。3 组小鼠分别注射生理盐水、pX1 质粒、pcDNA3.1 质粒。注射 10 次(第 2, 3, 5, 7, 9 天, 每天上、下午各 1 次), 于第 10 天解剖小鼠称瘤重。并取瘤组织进行福尔马林固定、石蜡包埋、组织切片, 最后用凋亡检测试剂盒, AP 处理, X-Phosphate/BCIP 显色。

1.10 pX1 和 pCH510 联合抑制肿瘤试验

将 H22 肝癌细胞接种于 BALB/c 小鼠右后腿, 接种量为 1×10^5 瘤细胞/只。小鼠分为 4 组, 每组 6 只。采用肌肉直接注射质粒进行基因转染。每次每种质粒 100 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ 。4 组小鼠分别注射生理盐水、pCH510 质粒、pX1 质粒、pCH510 联合 pX1。注射 6 次(第 2, 3, 5, 6, 8, 9 天), 于第 10 天解剖小鼠称瘤重。

1.11 数据统计

小鼠瘤重之间的差异显著性采用 SAS 软件进行方差分析。

2 结 果

2.1 重组质粒 pX1 的构建

以引物 1 和引物 2 扩增得一条 1 335 bp 的单一一条带(图 1)。将其用 Hind III 和 EcoR I 双酶切, 分离回收即为 mTRAIL 的 cDNA, 且其 5' 和 3' 分别带有 Hind III 和 EcoR I 的黏性末端。载体质粒 pcDNA3.1 用 Hind III 和 EcoR I 酶切, 然后将回收的 mTRAIL 的 cDNA 重组入载体质粒中, 即构建出 mTRAIL 的真核表达质粒 pX1。测序结果显示与文献报道序列一致。

2.2 mTRAIL 基因真核表达检测

脂质体法用 pX1 转染 BHK 细胞,以空载体 pcDNA3.1 转染为对照。24 h 后从被转染的 BHK 细胞中提取总 RNA,以引物 1,2 做 RT-PCR。在转染 pX1 的 BHK 细胞中出现 1.3 kb 的 mTRAIL 的 cDNA 条带(图 2)。

两组的 BHK 细胞凋亡率均为 6.2%。与转染对照质粒组相比,转染了 pX1 质粒的 BHK 细胞可以明显地诱导 H22 细胞凋亡,使 H22 细胞的凋亡率明显上升,从 6.2% 升至 31%。

用 TUNEL 法及组织化学技术对 H22 细胞进行染色分析亦得到同样结果。收集与转染了质粒的 BHK 细胞混合培养的肝癌 H22 细胞,涂片于包被有多聚赖氨酸的载玻片上,用 *in situ* Death Detectinon Kit, AP 试剂盒处理, X-Phosphate/BCIP 显色。与转染对照质粒组相比,和转染 pX1 质粒的 BHK 细胞混合培养的 H22 肝癌细胞可见有呈蓝黑染色的凋亡细胞(图 3)。

图 1 RT-PCR 扩增出的 mTRAIL 的 cDNA 片段

Fig.1 The amplification product of cDNA of mTRAIL by RT-PCR

图 2 RT-PCR 检测 mTRAIL 基因的表达

Fig.2 Transcription of mTRAIL gene tested by RT-PCR

M: Marker; 1: Cells transfected with pcDNA3.1;
2: Cells transfected with pX1

2.3 pX1 转染的 BHK 细胞诱导 H22 肝癌细胞凋亡的作用

按方法所述,用脂质体将 pX1 和对照质粒 pcDNA3.1 转染 BHK 细胞。24 h 后,分别转染 2 种质粒的 BHK 细胞各取 1 组,各加入 H22 细胞继续培养 24 h。收集单独培养的转染质粒的 BHK 细胞及与转染质粒的 BHK 细胞共培养的 H22 细胞,用 PI 染色后,流式细胞仪进行凋亡细胞计数。分析结果表明,与转染对照质粒组相比,转染 pX1 质粒并不诱导 BHK 细胞凋亡。

图 3 转染 pX1 质粒后 BHK 细胞对 H22 细胞的致凋亡作用 ×400

Fig.3 The Apoptosis-inducing effect on H22 cells by BHK cells transfected with plasmid pX1

A: H22 cells growing with BHK cells transfected with plasmid pcDNA3.1;
B: H22 cells growing with BHK cells transfected with plasmid pX1

2.4 pX1 质粒体内转染对小鼠肿瘤生长的抑制作用

采用小鼠 H22 肝癌细胞于小鼠右后腿注射接种,得到小鼠实体瘤模型。按方法中所述进行肌肉注射,第 11 天解剖小鼠称瘤重。对照组瘤重(1.76 ± 0.80) g,单纯注射质粒空白载体组瘤重(1.04 ± 0.62) g,对肿瘤较对照组亦有抑制作用(P < 0.05)。转染 pX1 则产生更强的抑瘤作用,瘤重(0.29 ± 0.48) g。与对照组相比,P < 0.01;与质粒对照组相比,P < 0.05。

2.5 体内转染 pX1 质粒诱导肝癌细胞凋亡的作用

在转染 pX1 质粒抑瘤试验中,从各组动物制备的瘤组织切片用 TUNEL 法凋亡检测试剂盒, AP 处理,经 X-Phosphate/BCIP 显色。镜下观察可见 pX1 转染组的瘤组织切片中有多数呈蓝黑染色的凋亡细胞。而 pcDNA3.1 对照组则未见呈蓝黑染色的凋亡细胞(图 4)。

图 4 肌肉转染 pX1 对肿瘤细胞的诱导凋亡作用 ×400
Fig. 4 Apoptosis-inducing effect on tumor cells caused by transfection of plasmid pX1 in muscle

A: Transfection with plasmid pcDNA3.1;
B: Transfection with plasmid pX1

2.6 pX1 质粒与 pCH510 质粒联合转染对小鼠肿瘤生长的抑制作用

采用小鼠 H22 肝癌细胞于小鼠右后腿注射接种,得到小鼠实体瘤模型。按方法中所述进行肌肉注射进行基因转染,第 11 天解剖小鼠称瘤重。对照组瘤重(2.02 ± 0.20) g,单独转染 pX1, pCH510 质粒及 pX1 质粒与 pCH510 质粒联合转染较对照组均有明显的抑制作用($P < 0.01$)。pX1 质粒与 pCH510 质粒联合转染组瘤重(0.15 ± 0.13) g,对小鼠肿瘤生长的抑制作用较单独转染 pX1 质粒[瘤重(0.52 ± 0.10) g]及 pCH510 质粒[瘤重(0.60 ± 0.18) g]有更显著的抑瘤效应($P < 0.01$)。表明 pX1 质粒与 pCH510 质粒联合转染对小鼠肿瘤生长有协同抑制效应。单独转染 pX1 质粒与单独转染 pCH510 质粒两者间并没有显著性差

异($P = 0.41$)。

3 讨论

TNF- α 及 Fas L 具有诱导肿瘤细胞凋亡的特性,但体内应用时易引起全身严重的炎症反应及多组织、大范围的出血性坏死^[6-7],因而难以用于临床肿瘤治疗。而 TRAIL 分子不仅能够特异性地诱导肿瘤细胞凋亡,对机体亦无严重毒副作用^[8],因而具有较好的临床应用前景。随着研究的深入,TRAIL 分子特异性地诱导肿瘤细胞凋亡的特性逐渐得以阐释:TRAIL 分子的受体有多种^[9-11],TRAIL-R₁, TRAIL-R₂ 具有转导凋亡信号能力;TRAIL-R₃, TRAIL-R₄ 不能转导 TRAIL 分子所诱发的凋亡信号,这 4 种受体广泛表达于正常组织中。细胞表面的 TRAIL 受体是上述 4 种受体随机组合的三聚体,只要三聚体中含有 TRAIL-R₃ 或 TRAIL-R₄,受体三聚体与 TRAIL 三聚体结合后就不能诱导细胞凋亡。所以尽管 TRAIL 分子在正常组织中广泛表达,但机体组织并不受该分子的攻击^[3]。TRAIL 分子的另一种受体 Osteoprotegerin(OPG)作为一种拮抗受体也潜在地发挥保护正常组织的功能^[12]。许多肿瘤细胞中只能表达 TRAIL-R₁, TRAIL-R₂;不表达 TRAIL-R₃, TRAIL-R₄,因而 TRAIL 能够特异性诱导肿瘤细胞凋亡。

目前发现的 TRAIL 敏感肿瘤细胞株已有多种,但由于 TRAIL 分子所启动的凋亡信号有着很复杂和精细的调控机制^[13],不同肿瘤细胞株存在对 TRAIL 敏感性的差异。因此,研究 TRAIL 对不同肿瘤的治疗作用,对于 TRAIL 在临床肿瘤治疗中的应用将起着很大的指导意义。本文研究中证明了所构建的 mTRAIL 真核表达质粒 pX1 能够在细胞及小鼠体内表达;表达 TRAIL 分子的细胞与肝癌细胞接触后,通过 TRAIL 分子的介导,特异性地诱导肝癌细胞凋亡,初步证明了 TRAIL 用于肝癌基因治疗的可行性。

目前临床肿瘤治疗主要采用三大常规疗法。但在实施过程中,或由于切除得不彻底、或由于严重的毒副作用不能够进一步加大剂量而使残存瘤细胞得以逃逸。从而使肿瘤的治疗被复发所困扰。因此,如何消除残存瘤细胞是肿瘤治疗中防止复发的关键。随着近年来免疫生物治疗及基因治疗研究的迅速发展,肿瘤常规疗法之后将会越来越多地继续用各种免疫生物疗法来消灭残存瘤细胞,其中调动机体的免疫功能来清除肿瘤细胞的免疫疗法是消除肿瘤残存细胞的一种重要方法^[14]。然而,常规治疗尤其是化疗、放疗后都伴有机体免疫系统的损伤。在免疫系统损伤及恢复期利用免疫疗法已被实验证实无法取得令人满意的效果^[15-16],同时也错过了消除肿瘤细胞的良机,给肿瘤

细胞得以增殖的机会。TRAIL 的非免疫性杀伤机制则提供了在该阶段杀伤肿瘤细胞的一种很好的治疗手段。

TRAIL 分子是 II 型膜分子,胞外段 C 末端有 TNF 家族保守的 β 片层结构。三聚化后识别并募集靶细胞上的死亡受体 TRAIL-R₁, TRAIL-R₂ 引发凋亡^[13]。尽管 TRAIL 在多数正常组织细胞中都有表达,但临床上肿瘤的发生和转移说明:生理状态下的 TRAIL 表达达不到抑制肿瘤的效应。本文研究结果表明,采用适当的方法用 pX1 质粒转染正常组织细胞(肌肉细胞、肾细胞),可使其获得诱导肿瘤细胞凋亡的能力,成为针对肿瘤细胞的杀伤细胞。从而也提出一种思路,即在临床上可采用适当方法在瘤周正常组织细胞中转染 TRAIL 基因。既可以直接杀伤肿瘤细胞,又可在瘤细胞周围形成防止瘤细胞转移的屏障,预防其转移。

肿瘤是一个多因素、多环节、多阶段的复杂疾病,单一因素的介入往往不能达到理想的抑瘤效应。因此,寻找新的治疗方案及将现有的治疗途径进行有效的联合是肿瘤基因治疗和生物治疗研究的热点^[17]。纤维黏连蛋白是一种具有多个功能结构域的高分子糖蛋白,含有 Cell I 结构域的 FN 片段对巨噬细胞具有趋化作用^[18]。Cell I -Hep II 双结构域真核表达载体 pCH510 能够趋化巨噬细胞和淋巴细胞,抑制肿瘤生长^[4]。质粒 pX1 通过表达 TRAIL 特异性地诱导肿瘤细胞凋亡,抑制肝癌生长,并与重组人 FN 多肽真核表达质粒 pCH510 具有协同抑瘤效应,这就为如何在免疫系统损伤期继续杀伤肿瘤细胞,及协同免疫疗法杀伤肿瘤细胞以提高抑瘤效果提供一种方法和实验依据。

[参 考 文 献]

[1] Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, *et al.* Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis[J]. *Immunity*, 1995, 3: 673-682.

[2] Pitti RM, Marsters SA, Ruppert S, *et al.* Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family[J]. *J Biol Chem*, 1996, 271(22): 12687-12690.

[3] Gura T. How TRAIL kills cancer cells, but not normal cells[J]. *Science*, 1997, 277: 768.

[4] 叶仕桥, 冯作化, 李东, 等. CH50 多肽真核表达载体 pCH510 的构建、表达及体内趋化和抑瘤作用[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2001, 8(1): 23-26.

[5] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

[6] Vassalli P. The pathophysiology of tumor necrosis factors[J]. *Annu Rev Immunol*, 1992, 10: 411-452.

[7] Ogasawara J, Watanabe-Fukunaga R, Adachi M, *et al.* Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice[J]. *Nature*, 1993, 364: 806-809.

[8] Walczak H, Miller RE, Ariail K, *et al.* Tumoricidal activity of TNF-related apoptosis inducing ligand *in vivo*[J]. *Nature Med*, 1999, 5: 157-163.

[9] Pan G, O'Rourke K, Chinnaiyan AM, *et al.* The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL[J]. *Science*, 1997, 276: 111-113.

[10] Pan G, Ni J, Wei Y, *et al.* An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL[J]. *Science*, 1997, 277: 815-817.

[11] Sheridan JP, Marsters SA, Pitti RM, *et al.* Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors[J]. *Science*, 1997, 277: 818-821.

[12] Emery JG, McDonnell P, Burke MB, *et al.* Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL[J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(23): 14363-14367.

[13] Schulze-Osthoff K, Ferrari D, Los M, *et al.* Apoptosis signaling by death receptors[J]. *Eur J Biochem*, 1998, 254(3): 439-459.

[14] Rosenberg SA. Progress in human tumor immunology and immunotherapy[J]. *Nature*, 2001, 411: 380-384.

[15] 孙红, 张惜阴, 丰有吉. 重组白细胞介素 2 联合化疗治疗卵巢癌复发和转移灶的探讨[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 1999, 6(4): 312-313.

[16] 黄波, 冯作化, 张桂梅, 等. 重组 FN 多肽真核表达载体 CH510 衔接化疗治疗小鼠肿瘤的研究[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2001, 8(3): 168-172.

[17] 柳湘. 联合基因治疗肿瘤研究新进展[J]. *国外医学肿瘤学分册*, 2000, 27(5): 257-259.

[18] Doherty DE, Henson PM, Clark RA. Fibronectin fragment containing the RGDS cell-binding domain mediate monocyte migration into the rabbit lung: A potential mechanism for C5 fragment-induced monocyte lung accumulation[J]. *J Clin Invest*, 1990, 86: 1065-1075.

[收稿日期] 2002 -04 -15 [修回日期] 2002 -05 -30

欢迎订阅《中国肿瘤临床年鉴》2002 年版(2001 年卷)

《中国肿瘤临床年鉴》由中国癌症研究基金会主办,东南大学承办、协办,由吴孟超教授等国内肿瘤界著名人士组成编委会。每年 1 册,2002 年版中国肿瘤临床年鉴将于今年 9 月出版,本年鉴内设专家论坛、评述、一流原著、标准与规范、大事记、医学新闻、新书出版、专题报道、论文摘登、其他(如图片报道……)等栏目,为一本全面反映我国 2001 年中肿瘤学的成就、具有信息检索功能的参考书,预计字数为 1 百万字,由中国铁道出版社出版。每册(精装本)65 元(含邮资)。

订购地址:南京市丁家桥 87 号东南大学内中国肿瘤临床年鉴编辑出版部。丁茂平收。

邮编: 210009, 电话: (025)3272459