

[文章编号] 1007-385X(2003)02-0079-05

TNP-470 联合重组人内皮抑素抑制小鼠肺腺癌生长的研究

夏虎¹, 骆利敏², 文金序³, 佟万成³(1. 第一军医大学附属珠江医院呼吸科, 广州 510280, 2. 第一军医大学热带病研究室, 广州 510515, 3. 第一军医大学附属南方医院呼吸科, 广州 510515)

[摘要] 目的: 观察 TNP-470 和重组人内皮抑素(recombinant human endostatin, rhES) 联合治疗对小鼠肺腺癌 LA795 肿瘤生长的抑制作用。方法: 用甲醇诱导能高效分泌表达重组人内皮抑素(rhES)的毕赤酵母菌株分泌表达 rhES, 将皮下接种 LA795 肺腺癌细胞的 T739 雄性近交系小鼠随机分成 3 组, 每组各 10 只, 分别给予 PBS, rhES 及 TNP-470 + rhES 皮下注射, 每日 1 次, 连续 14 d; 观察各组小鼠肿瘤生长情况, 游标卡尺测量肿瘤体积大小。断颈处死小鼠, 原位肿瘤免疫组化观察肿瘤内部微血管密度(microvessel density, MVD)。结果: 经甲醇诱导, 毕赤酵母重组菌分泌表达 rhES, 并应用肝素亲和层析将其纯化; 动物试验显示与 PBS 对照组比较, rhES 治疗组及 rhES + TNP-470 治疗组均明显抑制小鼠肿瘤的生长($P < 0.01$), TNP-470 + rhES 组与 rhES 组比较亦有显著性差异($P < 0.01$)。原位肿瘤免疫组化显示联合治疗组抑制血管生成更显著($P < 0.01$)。结论: TNP-470 联合 rhES 治疗对小鼠肺腺癌 LA795 生长的抑制效果比单独使用 rhES 的治疗效果更佳, 具有良好的协同治疗作用。

[关键词] 重组人内皮抑素; TNP-470; 肺腺癌 LA795; T739 小鼠; 联合治疗

[中图分类号] R730.54 [文献标识码] A

Synergistic Inhibition of TNP-470 and Recombinant Human Endostatin on the Growth of Mice Lung Adenocarcinoma LA795

XIA Hu¹, LUO Li-min², WEN Jin-xu³, TONG Wan-cheng³(1. Department of Respiratory Diseases, Zhujiang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou, 510280; 2. Institute of Tropical Diseases, First Military Medical University, Guangzhou, 510515; 3. Department of Respiratory diseases, Nanfang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou, 510515, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the combined inhibitive effect of TNP-470 and rhES on the growth of lung adenocarcinoma LA795 in T739 mice. **Methods:** The purified rhES was acquired by using methanol to induce the recombinant pichia pastoris. GS115 and heparin affinity chromatography. The T739 mice inoculated with LA795 cells were randomized into three groups, 10 mice per group, one group was injected with PBS for 14 days, the other two groups were respectively treated with rhES and TNP-470 + rhES. To observe the tumor growth in different groups, and the tumor volume was measured with caliper. The microvessel density(MVD) of tumors were measured by using immunohistochemistry. **Results:** The purified rhES was acquired. In compared with PBS group, the tumor growth of other two groups was inhibited significantly. And the tumor volume of TNP-470 + rhES group are smaller than the rhES group ($P < 0.01$). immunohistochemistry showed the combined therapy has more inhibitory effect on angiogenesis. **Conclusion:** The combined treatment with TNP-470 and rhES showed more than additive effect in tumor growth inhibition when compared with treatment with individual antiangiostatic protein rhES.

[Key words] recombinant human endostatin; TNP-470; lung adenocarcinoma LA795; T739 mice; combined treatment

* 血管生成抑制剂 TNP-470 是烟曲霉素的衍生物, 是目前发现的较为有效的血管抑制剂, 通过抑制血管内皮细胞的分裂、增殖和迁移而抑制肿瘤新生血管生

[基金项目] 广东省科委九五重点科技攻关项目资助(99G172001)

[作者简介] 夏虎(1974-), 男, 江苏南京人, 硕士, 主要从事肿瘤的生物治疗研究。

成。研究表明 TNP-470 对多种实体瘤的生长具有抑制作用^[1,2]。TNP-470 的治疗效应是剂量依赖性的,在治疗剂量(30~60 mg/kg)时,可产生明显抑瘤效应,而隔日皮下注射剂量达 100 mg/kg 时,试验动物出现体重下降,局部给药部位感染坏死,胃肠道功能紊乱等。在临床 II 期实验中也发现患者出现短暂精神症状^[3]。

内皮抑素是 O'Reilly 等^[4]1997 年从小鼠血管内皮瘤 EOMA 细胞的培养上清中分离的一种新的血管内皮细胞生长抑制因子。并被证实是胶原 XVIII NC1 结构域 C 末端分子量为 20 kD 的氨基酸片断,由 184 个氨基酸组成,具有肝素亲和性^[5]。重组表达的人内皮抑素分子量约为 18.5 kD,等电点为 9.3,与鼠源性的内皮抑素氨基酸序列有 85% 的完全一致。体外实验显示内皮抑素能抑制由碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)及血管内皮生长因子(vascular endothelia growth factor, VEGF)刺激的血管内皮细胞的增殖。动物实验表明其能显著抑制肿瘤的生长和转移,并且反复用药未发现耐药性及毒副作用的产生^[6,9]。

本试验用转化毕赤酵母菌分泌表达 rhES,应用皮下接种小鼠肺腺癌 LA795 细胞的 T739 雄性近交系小鼠作为研究对象,观察将 rhES 与 TNP-470 联合用于治疗肿瘤的效果,并与单独使用 rhES 的治疗组小鼠进行比较。

1 材料与方法

1.1 主要材料

能分泌表达 rhES 的毕赤酵母菌株由南方医院呼吸科转化并保存,TNP-470 由日本大阪 Takeda 化学公司 Hiroshi Fukui 博士惠赠。Agarose, SDS, acrylamide, bis-acrylamide 等购于美国 Sigma 公司。生物素,酵母提取物,YNB(W/O),pepton,等购自 Difco 公司,兔抗人内皮抑素多克隆抗血清及冻干粉为美国 Alpha diagnostic international 公司产品,山羊抗兔 IgG-HRP 购自晶美生物工程公司,Heparin sepharose CL-6B 为 Pharmacia 公司产品,其余试剂均为国产分析纯产品。Akta 色谱层析系统由 Pharmacia 公司制造,蛋白核酸垂直电泳系统(mini-protein II)及半干式印迹转移仪(Tras-Blot,SD,semi-Dry Transfer cell)为美国 Bio-Rad 公司制造产品。超净台购自苏州医疗仪器厂。

小鼠肺腺癌 LA795 动物模型购自中国医学科学院肿瘤研究所实验动物中心(将小鼠肺腺癌 LA795 细胞接种 T739 雄性近交系小鼠制备而成),动物合格证号为:SCXK11-00-0005。将接种 LA795 的 T739 小鼠随机分成 PBS 组、rhES 治疗组、TNP-470 + rhES 联合治疗

组,每组各 10 只。

1.2 rhES 的表达及纯化

取筛选出的 GS115-hEndostatin 高表达株接种于 75 ml BMGY 培养基中,于 30℃,250 rpm/min,振荡培养 18 h 至 OD₆₀₀ ≈ 6.0,将菌液于室温 3000 rpm/min 离心 10 min,弃上清,用 500 ml BMMY 培养基重悬沉菌于 30℃,250 rpm/min 振荡进行 rhES 的诱导表达。每隔 24 h 加甲醇至终浓度为 1%,84 h 后离心沉菌留取上清。将表达上清过滤除菌,用终浓度 70% 的硫酸铵沉淀,于 10 000 rpm/min,4℃,20 min 离心收集沉淀蛋白,用 1 倍体积的 PBS 液重悬,并用 20 mmol/L Tris · HCl, 0.1 mol/L NaCl, pH7.4 缓冲液平衡 24 h。用 Heparin sepharose CL-6B 填充层析柱,5 倍柱床体积的 20 mmol/L Tris · HCl, 0.1 mol/L NaCl, pH7.4 结合缓冲液平衡层析柱。平衡后将透析过的样品按 20 ml/h 的流速上样,上样完后用结合缓冲液洗柱至 A280 < 0.01,用分别含不同浓度 NaCl 的洗脱液洗脱蛋白(0.2, 0.3, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 2.0 mol/L NaCl, 20 mmol/L Tris · HCl, Ph7.4 梯度洗脱液)。收集各蛋白洗脱峰,SDS-PAGE 分析。将目的蛋白洗脱峰液用 PBS 透析 16 h 后于 -20℃ 保存。蛋白浓度测定用 BCA 法。

1.3 rhES 的 Western-blot 检测

取蛋白纯化液于 12% SDS-PAGE 电泳分离各蛋白,用半干转印仪将蛋白转移至 PVDF 膜上(14V, 15 min),丽春红染色 5 min 观察蛋白条带并标记蛋白分子量标准。蒸馏水洗膜至退色,用 PBS + 5% 脱脂牛奶 + 0.1% Tween-20 封闭液封闭 PVDF 膜 2 h,加入兔抗人内皮抑素多克隆抗血清室温孵育 1.5 h,清洗后加入山羊抗兔 IgG-HRP 二抗孵育 1 h,漂洗后加入 DAB 显色液显示,显色条带出现后立即终止反应。

1.4 小鼠肺腺癌 LA795 的疗效观察

随机将皮下接种 LA795 的 T739 雄性近交系小鼠 30 只分成 3 组。接种后第 6 天起一组给予纯化 rhES 20 mg · kg⁻¹ · d⁻¹ 于肿瘤边缘外 3 cm 处皮下注射;一组给予 TNP-470 30 mg · kg⁻¹ · d⁻¹ + 纯化 rhES 20 mg · kg⁻¹ · d⁻¹ 注射,另一组给予等量的 PBS 液注射,连续治疗 14 d。治疗期间隔日测量肿瘤大小,按 a² × b × 0.52 (a 为短径, b 为长径)计算肿瘤体积^[1],治疗结束后将小鼠断颈处死,取下肿瘤比较各组小鼠肿瘤大小。并用 10% 中性福尔马林固定,切片,HE 染色行病理学观察。原位肿瘤进一步行免疫组化(SABC 法)观察(应用作用于小鼠血管内皮的 Rabbit Anti-CD34 为一抗),根据 DAB 显色间接显示肿瘤微血管密度(MVD),肿瘤微血管密度测量应用 weidner 报道的方法^[8]:在 40 倍光镜下找到高血管密度区域,再在 200 倍光镜下记录被抗

CD34 抗体染成棕黑色的血管管形数,以 3 个 200 倍光镜下测量的微血管平均数表示。

1.5 统计学分析

所有数据采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各治疗组肿瘤体积大小对比采用重复测量方差分析,肿瘤内微血管密度比较采用方差分析,数据处理均由 SPSS10.0 软件完成。

2 结果

2.1 rhES 的表达和纯化

将经筛选的高表达株扩大体积进行诱导表达,取表达上清用 70% 浓度的硫酸铵沉淀蛋白,透析后用肝素亲和层析的方法进行目的蛋白纯化,经 SDS-PAGE 分析发现当洗脱液中 NaCl 浓度为 0.3 mol/L 时 rhES (分子量约为 18.5 kD)从层析柱上被洗脱下来。(如图 1)薄层扫描分析纯度达到 91.8%。

图 1 rhES 纯化的 SDS-PAGE

Fig.1 SDS-PAGE analysis of purified rhES

1: Molecular weight marker; 2: The induced supernatant; 3: The supernatant through column; 4: The elution of 0.2 mol/L NaCl; 5: The elution of 0.3 mol/L NaCl

2.2 纯化产物的 Western-blot 鉴定

用半干式转印仪将纯化目的蛋白转移至 PVDF 膜上,兔抗人内皮抑素多克隆抗血清作为一抗与目的蛋白结合,用结合有 HRP 的山羊抗兔 IgG 二抗与一抗反应,最后用 DAB 显色法检测。结果显示(如图 2)在分子量约为 18.5 kD 处有一明显显色条带出现,证明本实验室纯化的重组人内皮抑素具有良好的抗原活性。

2.3 小鼠肺腺癌 LA795 原位肿瘤的治疗效果

皮下接种 LA795 的 T739 小鼠于第 6 天背部可见皮下肿瘤,肿瘤生长加快。接受 PBS 治疗的小鼠肿瘤继续生长明显增大,而接受 rhES 及 TNP-470 + rhES 治疗的小鼠肿瘤生长缓慢,明显受到抑制。治疗结束时各组小鼠肿瘤大小分别为 PBS 组($6.261 \pm 0.207 \text{ cm}^3$),rhES 组($2.073 \pm 0.202 \text{ cm}^3$),TNP-470 + rhES 组($1.095 \pm 0.149 \text{ cm}^3$),各组小鼠肿瘤大小对比可见两

组治疗组肿瘤与 PBS 组比较具有显著性差异($P < 0.01$),TNP-470 + rhES 组与其它两组比较亦有统计学意义($P < 0.01$)(如图 3)。肿瘤病理学观察发现 PBS 组肿瘤细胞生长良好(如图 4A),肿瘤内部有少许中心性坏死存在,而其它两组肿瘤组织出现广泛大面积坏死,尤以 TNP-470 + rhES 组严重(如图 4B,C)。

图 2 rhES 的 Western-blot 检测

Fig.2 Western-blot of rhES

图 3 肿瘤小鼠接受治疗后肿瘤的体积变化

Fig.3 Changes in tumor volumes in the 3 groups before and after treatment with PBS, rhES or TNP-470 + rhES

2.4 各组小鼠原位肿瘤的微血管密度观察

肿瘤组织免疫组化观察发现:rhES 治疗组及 TNP470 + rhES 治疗组肿瘤组织内阳性血管内皮细胞少,而对照组肿瘤组织阳性血管内皮细胞多,并可见较多血管管形染色,肿瘤微血管密度测量结果显示 PBS 组肿瘤微血管密度为(10.6 ± 1.9),而 rhES 治疗组肿瘤微血管密度为(2.2 ± 1.1),TNP-470 + rhES 组肿瘤微血管密度为(0.8 ± 0.3)。各组比较具有显著性差异($P < 0.01$),间接证实了血管抑制剂能抑制血管生成的作用,同时亦说明两种血管抑制剂联合使用具有协同作用。

3 讨论

自 70 年代初 Folkman 等^[10]首先提出肿瘤生长依

赖于新生血管生成以来,血管生成抑制剂在肿瘤治疗方面的研究日趋活跃。TNP-470 和内皮抑素作为两种血管生成抑制剂亦受到很大的重视。国外研究显示它们均有较强的抑制新生血管生成的作用,从而达到抑制肿瘤生长和转移,且反复用药不产生耐药性及明显的毒副作用。

用基因工程中的发酵技术进行大量发酵诱导表达重组人内皮抑素,再经肝素亲和层析方法获得了足量的重组人内皮抑素(rhES)。经 Western-blot 检测发现所获得的纯化蛋白具有良好的抗原活性^[11]。TNP-470 作为一种血管抑制剂抑制内皮细胞增生的机制已被大量的研究所证实,对于其抑制肿瘤细胞增殖的研究结果不尽相同,体外研究证实 TNP-470 能抑制多种肿瘤细胞的增殖,但肿瘤细胞对 TNP-470 的敏感性远不如内皮细胞^[12]。Ogwa 等^[12]发现 TNP-470 能抑制结肠癌 CT26 细胞的生长,使癌细胞停留于 G1/S 期。Yak-mamoto 等^[13]在培养的 5 种乳腺癌细胞株中加入 TNP-470,发现能诱导癌细胞凋亡。所以 TNP-470 作为一种治疗肿瘤的药物同时具有抑制肿瘤细胞的作用。

LA795 是一株低免疫原性小鼠肺腺癌细胞株,具有高度恶性,致瘤率达 100%^[14]。用目的蛋白对皮下接种 LA795 小鼠肺腺癌的 T739 小鼠进行注射治疗,实验结果发现 rhES 能有效地抑制小鼠肿瘤的生长,联合 TNP-470 使用与单独使用比较发现具有协同作用,比单独使用抑制肿瘤生长效果更好($P < 0.01$),治疗第 10 天后联合治疗组小鼠肿瘤平均体积减小,4 只小鼠肿瘤表面出现塌陷,并有脱毛现象出现。反应了血管抑制剂在抑制肿瘤生长的同时,因为肿瘤氧气及营养的供应受抑制而导致的肿瘤细胞广泛坏死。14 d 治疗期中未见重组人内皮抑素及 TNP-470 治疗组小鼠有注射部位感染坏死和小鼠生长的抑制等毒副作用出现。而 PBS 组小鼠却出现了反应迟钝,摄食减少和 6 只小鼠右前肢瘫痪的现象,进一步解剖发现小鼠右前肢被肿瘤浸润,肿瘤组织与小鼠皮下组织和肌肉组织粘连。小鼠瘫痪可能为肿瘤破坏运动神经所致。

TNP-470 和内皮抑素被认为通过不同的机制作用于血管内皮细胞。研究显示 TNP-470 是一种烟曲霉素的半合成物,能够特异性地与内皮细胞增殖的活性因子 - 甲硫氨酸-氨基肽酶-2(MetAP-2)共价结合,封闭其中的活性位点,抑制内皮细胞增殖,从而抑制新生血管形成^[15]。而内皮抑素可能是通过影响血管内皮细胞内的抗凋亡蛋白如 BCL-2 来起到抑制血管内皮细胞的^[16]。由于两种血管抑制剂并非通过相同的抑制途径而产生的叠加作用来抑制血管内皮细胞,所以可以利用联合 TNP-470 和内皮抑素产生的协同作用来抑制血管内皮细胞,从而达到进一步抑制肿瘤生长的目的,本实验结果证实了两者在治疗中的协同抑制作用。

目前国外亦有主张用血管抑制剂联合其他治疗肿瘤的手段,并取得了可喜的结果。Pittsburgh 大学的科学家们采用抗血管生成药物和免疫治疗协同的方法进行治疗,利用内皮抑素阻断了肿瘤的血供应,再通过

图 4 A,B,C 为各组小鼠肿瘤病理观察结果(HE staining, ×100)

Fig. 4 Pathological observation of the tumor sections in different groups (HE staining, ×100)

A: Pathological observation of the tumor section in PBS group; B: Pathological observation of the tumor section in rhES group; C: Pathological observation of the tumor section in TNP-470 + rhES group

内皮抑素是具有代表性的一种内源性血管抑制剂,具有较强的抑制新生血管生成的作用。本实验运

刺激机体的免疫系统杀死被抑制后的残余瘤体^[17]。Hanna 等^[18]应用内皮抑素和放射疗法结合,对由放射耐受的 SQ2-OB 瘤细胞在去胸腺裸鼠中诱生的肿瘤进行治疗,同两种方法单独使用相比效果显著,同样的结合治疗对小鼠 Lewis 肺癌也有相似的效果。

总而言之,我们的研究在国内首次证实了联合应用 TNP-470 和内皮抑素治疗对小鼠肺腺癌 LA795 生长的抑制具有协同作用,治疗效果远大于单独应用某一种药物,因此可以在避免因大剂量用药所造成的毒副作用的情况下,更为有效地抑制肿瘤的生长,并为进一步探索联合药物治疗肿瘤的研究提供一定的资料。

[参 考 文 献]

- [1] Takei H, Lee ES, Cisneros A, *et al.* Effects of angiogenesis inhibitor TNP-470 on tamoxifen-stimulated MCF-7 breast tumors in nude mice[J]. *Cancer Lett*, 2000, 155(2): 129- 135.
- [2] Kin M, Torimura T, Ueno T, *et al.* Angiogenesis inhibitor TNP-470 suppresses the progression of experimentally- induced hepatocellular carcinoma in rats[J]. *Int J Oncol*, 2000, 16(2): 375-382
- [3] Stadler WM, Kuzel T, Shapiro C, *et al.* Multi-institutional study of the angiogenesis inhibitor TNP-470 in metas-tatic renal carcinoma[J]. *J Clin Oncol*, 1999, 17(8): 2541-2545.
- [4] O'Reilly-MS, Boehm-T. Endostatin: An endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth[J]. *cell*, 1997, 88(2): 277-285.
- [5] Hohenester E, Sasaki T, Olsen BR. Crystal structure of the angiogenesis inhibitor endostatin at 1.5A resolution[J]. *EMBO J*, 1998, 17(6): 1656-1664.
- [6] Dhanabal M, Ramchandran R, Volk R. Endostatin: Yeast production, mutants, and antitumor effect in renal cell carcinoma[J]. *Cancer Res*, 1999, 59(1): 189-197.
- [7] Boehm T, Folkman J. Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance[J]. *Nature*, 1997, 390(6658): 404-407.
- [8] Yokoyama Y, Green JE. Effect of endostatin on spontaneous tu-

morigenesis of mammary adenocarcinoma in a transgenic mouse model[J]. *Cancer Res*, 2000, 60(16): 4362-4365.

- [9] Blezinger P, Wan J, Margatet G. Systemic inhibition of tumor growth and tumor metastases by intramuscular administration of the endostatin gene[J]. *Nature biotechnol*, 1999, 17(4): 343-348.
- [10] Folkman J, Tumor angiogenesis: Therapeutic implication[J]. *N Engl J Med*, 1971, 285: 1182-1186.
- [11] 夏 虎, 张 琳, 文金序, 等. 人内皮抑素在毕赤酵母中的表达、纯化及其对小鼠肺腺癌 LA795 生长的抑制[J]. *第一军医大学学报*, 2002, 22(5): 393 - 396.
- [12] Ogawa H, Sato Y, Kondo M, *et al.* Combined treatment with TNP-470 and 5-fluorouracil effectively inhibits growth of murine colon cancer cells *in vitro* and liver metastasis *in vivo*[J]. *Oncol Rep*, 2000, 7(3): 467-472.
- [13] Yamamoto D, Kiyozuka Y, Adachi Y, *et al.* Synergistic action of apoptosis induced by eicosapentaenoic acid and TNP-470 on human breast cancer cells[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 1999, 55(2): 149-160.
- [14] 张兆伟, 张金芝, 孙文义, 等. 小鼠肺腺癌(LA-795)细胞株的建立及一些生物学特性的研究[J]. *中华肿瘤杂志*, 1985, 7(2): 83-85.
- [15] Sin N, Meng L, Wang MQ, *et al.* The anti-angiogenic agent fumagillin covalently binds and inhibits the methionine aminopeptidase, MetAP-2[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 4(12): 6099-6103
- [16] Dhanabal M, Ramchandran R, Waterman MJ, *et al.* Endostatin induces endothelial cell apoptosis[J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(17): 11721-11726.
- [17] Bertolini F, Fusetti L, Mancuso P, *et al.* Endostatin, an antiangiogenic drug, induces tumor stabilization after chemotherapy or anti-CD20 therapy in a NOD/SCID mouse model of human high-grade non-Hodgkin lymphoma[J]. *Blood*, 2000, 96(1): 282-287.
- [18] Hanna NN, Seetharam S, Mauceri HJ, *et al.* Antitumor interaction of short-course endostatin and ionizing radiation[J]. *Cancer J*, 2000, 6(5): 287-293.

[收稿日期] 2002 - 12 - 24

[修回日期] 2003 - 03 - 20

全国肿瘤诊断治疗新技术研讨会征文通知

经卫生部科技教育司批准,由陕西省抗癌协会、陕西肿瘤医学杂志社主办的第二届全国肿瘤诊断治疗新技术研讨会拟定于2003年第三季度在西安召开。会议将邀请第四军医大学樊代明院士等知名专家作专题报告,与会者将被授予国家级继续医学教育学分8分(项目编号2003-04-08032)。现将征文有关事宜通知如下:

一、征文内容: 1. 肿瘤射频治疗; 2. 肿瘤电化学治疗; 3. 肿瘤立体定向放射治疗; 4. 自体干细胞移植治疗实体肿瘤; 5. 肿瘤介入治疗; 6. 肿瘤内镜治疗; 7. 肿瘤导向治疗; 8. 基因芯片诊断技术; 9. 肿瘤血管抑制治疗; 10. 乳腺癌前哨淋巴结活检; 11. 肿瘤化疗新技术; 12. 肿瘤外科治疗新技术; 13. 其他诊断治疗新技术。

二、征文要求: 来稿请寄4000字以内全文及300~400字内摘要各一份;或交500~800字的大摘要一份;首页加盖单位公章,来稿采用Word格式打印并同时寄送软盘。文责自负并请自留底稿。

三、征文截止时间: 2003年7月31日(以当地邮戳为准)。

四、投稿地址: 西安市雁塔西路309号陕西省肿瘤医院内陕西省抗癌协会 王文娟、李树业,邮编: 710061; 来稿请在信封上注明“征文”字样。

五、其它: 对来稿中符合条件的论文可优先发表在《陕西肿瘤医学》杂志上(刊号: ISSN1008-7001, CN61-1344/R)。

陕西省抗癌协会 陕西肿瘤医学杂志社