

[文章编号] 1007-385X(2006)03-0171-05

PTEN 基因转染联合奥沙利铂对胆管癌细胞生长的影响

崔平¹, 段体德¹, 董坚², 贾伟², 戴书鹏¹(昆明医学院第一附属医院 1. 肝胆外科; 2. 实验中心, 昆明 650032)

[摘要] **目的:** 观察脂质体介导 *PTEN* 基因转染人胆管癌细胞(QBC939), 联合化疗药物奥沙利铂(L-OHP)对胆管癌细胞生长的影响, 探索人类胆管癌的生物治疗方法。 **方法:** 将携带 *PTEN* 基因的真核表达载体 pBP-*PTEN* 和不含该基因的空载体转染胆管癌 QBC939 细胞, 嘌呤霉素抗性筛选克隆、扩增培养, S-P 免疫组化法检测转染前后 *PTEN* 阳性表达率。实验分组为 QBC939、QBC + L-OHP、*PTEN*-QBC 和 *PTEN* + L-OHP 4 组, 以 MTT 法检测癌细胞生长活性, 透射电镜扫描观察转染前后及联合奥沙利铂后细胞的超微结构变化, 流式细胞仪分析转染前后细胞周期变化和凋亡情况, 体外细胞侵袭力抑制试验观察转染及用药前后细胞侵袭力的变化。 **结果:** *PTEN* 基因转染后 QBC939 细胞稳定表达、*PTEN* 阳性表达率升高 ($P < 0.05$); 基因转染后肿瘤细胞活性下降 ($P < 0.05$); 细胞周期 $G_1 \sim S$ 期抑制、细胞凋亡率增加 ($P < 0.01$); 透射电镜下显示细胞较成熟、分化好、线粒体增多; 细胞侵袭力明显抑制 ($P < 0.05$), 其中以 *PTEN* + L-OHP 抑制作用最强, L-OHP 抑制作用次之。 **结论:** *PTEN* 基因转染生物治疗联合奥沙利铂化疗对人胆管癌细胞生长具有显著的抑制作用。

[关键词] *PTEN* 基因; 胆管癌细胞; 细胞生长; 奥沙利铂

[中图分类号] R 735.8 [文献标识码] A

Inhibitory effects of *PTEN* gene transfection combined with L-OHP on proliferation of human cholangiocarcinoma cells

CUI Ping¹, DUAN Ti-de¹, DONG Jian², JIA Wei², DAI Shu-peng¹(1. Department of Hepatobiliary Surgery, 2. Reserach center, the First Affiliated Hospital, Kunming Medical College, Kunming 650031, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the inhibitory effects of *PTEN* gene transfection combined with L-OHP on human cholangiocarcinoma cell line, QBC939, providing a new method for gene therapy of human biliary duct carcinoma. **Methods:** A eukaryotic expression vector containing *PTEN* gene was transfected into human QBC939 cells under mediation of lipofectamine and positive cell clones were selected and amplified. Expression of *PTEN* gene was detected by immunohistochemistry. MTT test was used to determine the *in vitro* activity of cells, electron microscope was applied to observe cell ultrastructure, and flow cytometry was used for determining the cell cycle and apoptosis. *In vitro* test was used to study the invasive ability of cells before and after treatment. **Results:** After transfected with *PTEN* gene, QBC939 cells had a higher expression of *PTEN* gene ($P < 0.05$), a decreased activity ($P < 0.05$), an arrest of G_1 -S phase, and an increased apoptotic rate ($P < 0.01$). Electron microscope showed that maturity of cells and increased well-differentiated mitochondria. The aggressiveness of the cells was obviously inhibited ($P < 0.05$). **Conclusion:** *PTEN* gene transfection combined with L-OHP has obvious inhibitory effect on cholangiocarcinoma cell line *in vitro*.

[Key words] *PTEN* gene; cholangiocarcinoma cell; cell growth; oxlipatine

[Chin J Cancer Biother, 2006, 13(3): 171-175]

胆管癌(cholangiocarcinoma)占肝胆系恶性肿瘤的第二位,发病率逐年增加,其生物学特性是沿黏膜下侵犯其周围的淋巴管、血管及神经周围间隙,手术切除率仅约 25%~30%,且单纯的放、化疗疗效不满意,预后极差,5 年生存率不超过 20%^[1]。现代肿瘤基因学的研究已表明,人类肿瘤的发生、发展与相应抑癌基因的

变异或缺失密切相关,外源性补充缺失基因或修复变异基因已成为当今肿瘤治疗研究的新方向。本实验经

[基金项目] 云南省卫生厅项目

[作者简介] 崔平(1962-),男,副教授,外科学博士,主要从事胆管癌治疗方面的研究, E-mail: cp-99@sohu.com

胆管癌细胞(QBC939)转染抑癌基因 *PTEN* 及联合奥沙利铂(L-OHP)后,观察细胞生长的变化,探讨胆管癌的基因转染联合化学药物治疗的依据和途径。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

大肠杆菌 DH5 α (昆明医学院神经研究所提供),QBC939 胆管癌细胞株(第三军医大学西南医院肝胆外科王曙光教授惠赠),质粒 pBP 及 pBP-*PTEN*(美国 LuDwing 肿瘤研究所 Frank B Furnari 博士惠赠)。内切酶 *EcoR* I(Clontech 公司),脂质体 lipofectamineTM2000(Clontech 公司),嘌呤霉素(Clontech 公司),DMEM 细胞培养液(美国 Gibco 公司),胎牛血清(杭州四季青生物制品公司),S-P 免疫组化试剂盒(福建迈新生物试剂公司),鼠-人 *PTEN* 单克隆抗体及生物素标记二抗(北京中山生物技术有限公司),Anti-*PTEN* 抗体(Santa cruz 公司),12 孔 Transwell 细胞侵袭实验试剂盒(Corning Costar 公司),IGF-1 细胞趋化因子(PeproTech 公司),奥沙利铂注射剂(50 mg/支 江苏恒瑞医药公司,批号 2004040031312)。Olympus 透射显微镜(Olympus 公司),透射电镜 JEM 100-CX(日本电子公司),LKB-V 超薄切片机(Manufactured 公司);流式细胞仪 Backman, Coulter EPACS-SL(Bacman 公司)。

1.2 基因转染

将携有人 *PTEN* 基因真核表达载体的 pBP-*PTEN* 和空质粒 pBP 转化大肠杆菌 DH5 α ,氨苄青霉素抗性筛选阳性,克隆、扩增,提取并纯化质粒 DNA,*EcoR* I 单酶切,0.8% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。采用脂质体介导 *PTEN* 基因转染法(参照 lipofectamine 2000 说明),将 pBP-*PTEN* 和 pBP 质粒分别转染入对数生长期的 QBC939 胆管癌细胞,DMEM 培养基中嘌呤霉素浓度筛选为 0.5 mg/L,挑选阳性细胞克隆,扩增培养。将分别成功转染 pBP-*PTEN* 和 pBP 质粒的 QBC939 细胞命名为 *PTEN*-QBC 和 pBP-QBC 细胞。未转染 QBC939 细胞作阴性对照。

1.3 S-P 免疫组化

在 *PTEN*-QBC 和 QBC939 细胞中加入一抗(为鼠抗人 *PTEN* 蛋白单抗),1:100 稀释,4 $^{\circ}$ C 过夜,加入生物素标记二抗,室温孵育 30 min,加入 SABC 复合物,DAB 显色,苏木精衬染,检测基因转染前后细胞的 *PTEN* 阳性表达。

1.4 MTT 法检测细胞活性

将转染空质粒 pBP 和转染 pBP-*PTEN* 两组细胞分别以每孔 1×10^4 接种于 96 孔板,每组 3 个复孔,每孔 100 μ l,在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下培养 48 h,再以含 10%

小牛血清培养 24 h,每孔加入 MTT(5 mg/ml)10 μ l,继续孵育,吸弃培养液,每孔加入 75 μ l DMSO,振荡 10 min,以 SLT400-ATC 酶联免疫检测仪 550 nm 波长下测其光密度值(*D*)检测细胞活性。

1.5 流式细胞仪检测细胞周期及凋亡

将 *PTEN*-QBC 和 QBC939 两组对数生长期细胞,各取约 1×10^6 个细胞,每组随机选择加入 0.5 μ g/ml 的 L-OHP 继续培养。分组命名为 QBC939、QBC + L-OHP、*PTEN*-QBC 和 *PTEN* + L-OHP。各经胰酶消化,PBS 洗涤 2 遍,无水乙醇固定后,流式细胞仪进行细胞周期及凋亡检测。

1.6 透射电镜观察细胞超微结构

另取上述 3 组细胞分别以戊二醛固定 2 h,常规包埋,切片,电子显微镜下观察其超微结构的变化。

1.7 细胞侵袭力实验

将 *PTEN*-QBC、QBC939 两组细胞孵育到对数生长期,按细胞数 10×10^7 /孔接种于 Transwell 的上层 6 个孔中,加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 孵育 24 h 后,每组选两孔加入 0.5 μ g/ml 的 L-OHP,分为 QBC939 对照组、QBC + L-OHP 组、*PTEN*-QBC 组和 *PTEN*-QBC + L-OHP 4 组,下层为加 IGF-1 细胞趋化因子的(不含血清)细胞培养液,孵育 72 h。高倍显微镜随机计数各孔下层视野中的细胞数目,以下列公式计算相对数表示细胞侵袭抑制率。

$$\text{细胞生长抑制率} = \frac{(\text{对照组 } D - \text{实验组 } D)}{\text{对照组 } D} \times 100\%$$

1.8 统计学处理

数据的统计和分析采用 SPSS11.0 软件包进行,采用方差分析和 *t* 检验。

2 结果

2.1 基因转染的酶切鉴定

*EcoR*I 单酶切将含 *PTEN* 基因的 pBP 质粒切为约 1.2 kb 和 5.1 kb 的两条带,而空 pBP 仅切为 5.2 kb 的 1 条带(图 1)。

2.2 基因转染后 *PTEN* 蛋白的表达

PTEN 定位于胞膜/胞质,以胞膜/胞质染淡棕黄色至深棕黄色颗粒者为阳性细胞,取高倍镜视野($\times 200$)中以阳性细胞数计算的百分比。*PTEN*-QBC 组细胞 *PTEN* 转染率为 46%;QBC939 组细胞转染率为 18%(图 2)。随机取各组染色切片在 10 个高倍视野($\times 200$)下计数阳性细胞占各细胞总数的百分比,如 < 20% 定为无表达(-)。QBC 和 *PTEN*-QBC 组细胞 *PTEN* 基因蛋白阳性表达率分别为(23.37 \pm 11.07)%,(52.02 \pm 14.38)%(*P* < 0.05)。

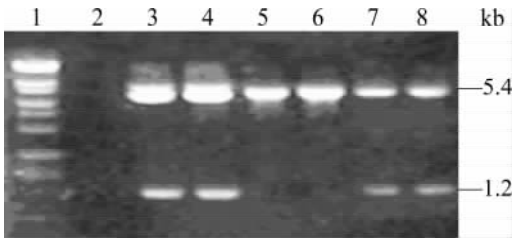


图1 *PTEN* 转染后酶切鉴定图

Fig. 1 Restriction endonuclease digestion after transfection

1: Marker; 2: Collater; 3,4: pBP-PTEN;
5, 6: pBP; 7,8: *PTEN*

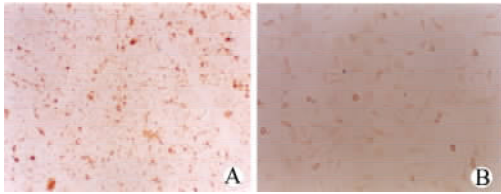


图2 *PTEN*-QBC 组(A)和 QBC939 组(B)
PTEN 基因的阳性表达

Fig. 2 Expression of *PTEN* gene in *PTEN*-QBC
group (A) and QBC939 group (B)

2.3 基因转染对癌细胞生长的抑制

各组 550 nm 波长光密度值: pBP-*PTEN*-QBC 转染组为 0.6765 ± 0.084 ; 空质粒 pBP-QBC 组为 1.156 ± 0.150 。t 检验表明, pBP-*PTEN*-QBC 转染组活细胞数较空质粒组明显减少 ($P < 0.05$), 表明转基因后细胞生长受到一定抑制。

2.4 基因转染用药后各组细胞周期和凋亡变化比较

PTEN + L-OHP 组细胞凋亡率高于其他组, 与 QBC939 组和 QBC + L-OHP 组比较差异非常显著 ($P < 0.01$), 与 *PTEN*-QBC 组比较差异显著 ($P < 0.05$); *PTEN*-QBC 组凋亡率也高于对照 QBC939 组及 QBC + L-OHP 组 ($P < 0.05$); 而 QBC 和 QBC + L-OHP 两组间凋亡率差异不明显。*PTEN* + L-OHP 组细胞周期从 $G_1 \sim S$ 期明显受到抑制, G_1 期细胞滞留率达 99.5%, 高于对照 QBC 组 ($P < 0.05$); 单纯 *PTEN*-QBC 组与单纯化疗组 $G_1 \sim S$ 期生长抑制接近, G_1 期细胞滞留率差异无显著性 ($P > 0.05$) (见表 1)。

2.5 基因转染及用药后细胞超微结构的变化

QBC939 生长良好, 细胞核大、核仁明显、较多核分裂、常染色质丰富、胞质较丰富, 细胞幼稚。转染 *PTEN*

表 1 4 组细胞凋亡率及细胞周期的变化

Tab. 1 Changes of cell cycle and apoptosis in 4 groups

Groups	Apoptosis (%)	Cell cycle		
		G_1	S	G_2
QBC939	1.99 ± 0.06	0.45 ± 0.03	0.029 ± 0.010	0.47 ± 0.02
QBC + L-OHP	2.06 ± 0.20	0.61 ± 0.07	0.064 ± 0.003	0.19 ± 0.18
<i>PTEN</i> -QBC	$16.80 \pm 0.13^*$	0.58 ± 0.04	0.048 ± 0.010	0.27 ± 0.05
<i>PTEN</i> + L-OHP	$21.80 \pm 0.12^{**\Delta}$	$0.97 \pm 0.251^\Delta$	0.000 ± 0.00	0.03 ± 0.02

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs QBC939 or QBC + L-OHP; $\Delta P < 0.05$ vs QBC939; $\Delta P < 0.05$ vs *PTEN*-QBC

基因细胞(*PTEN*-QBC)生长良好, 细胞表面见较多绒毛样突起, 多数细胞胞质见较多粗面内质网及大量线粒体, 部分线粒体肿胀、内质网扩张, 多数细胞较成熟, 分化好, 见早期凋亡细胞(图 3)。

2.6 转染及用药前后细胞侵袭力的变化

PTEN-QBC + L-OHP 组侵袭至 Transwel 小室滤膜下表面的细胞数为 (207 ± 14.849)、QBC + L-OHP 组为 (303.5 ± 14.849)、*PTEN*-QBC 组为 (251 ± 22.627) 和 QBC939 组为 (414.5 ± 9.192)。各组细胞侵袭抑制率为 QBC939 组为 18%、QBC + L-OHP 组为 40%、*PTEN*-QBC 组为 56%、*PTEN*-QBC + L-OHP 组为 76%, 方差分析显示, 各组抑制率间有显著性差异 ($P < 0.05$), 而以 *PTEN*-QBC + L-OHP 组的抑制率为最高, QBC + L-OHP

组次之。

3 讨论

PTEN(phosphatase and tensin homology deleted on chromosome ten) 基因是迄今发现的第一种具有双特异性磷酸酶活性的肿瘤抑制基因^[2,5]。它定位于染色体 10q23.3 位点, 包含 9 个外显子和 8 个内含子, 它通过对多条细胞内信号通路的去磷酸化调节, 对细胞的生长、增值、分化、凋亡、黏附、迁移和血管生成等许多生物学行为有重要作用。肿瘤细胞分子生物学研究表明, 人类多种肿瘤染色体存在 10q23 广泛缺失。*PTEN* 基因异常广泛存在于人类多种恶性肿瘤, 如恶性神经胶质瘤、前列腺癌、子宫内膜癌、黑素瘤等。研究结果

显示胆管癌组织的 *PTEN* 阳性表达率在 30% ~ 60%^[5], 癌旁组织表达为 100%。而且 *PTEN* 阳性表达率与肿瘤的恶性程度成正比^[6]。本实验用脂质体介导 *PTEN* 基因成功转染 QBC939, 并有稳定表达, 转染后 QBC939 细胞中 *PTEN* 基因表达升高, 与对照组差异显著 ($P < 0.05$)。转染后肿瘤细胞活性降低。并见转染 *PTEN* 基因后出现细胞超微结构的改变, 细胞凋亡。流式细胞仪显示转染基因组细胞 G_1 期滞留率为 63.5%, 联合化疗药 L-OHP 作用后, G_1 期细胞滞留率高达 99.5%, 明显高于对照组 ($P < 0.05$)。转染 *PTEN* 基因后, 细胞的侵袭力也受到抑制, 而且差异显著 ($P < 0.05$)。*PTEN* 基因通过抑制 PI3K/Akt 介导的信号传导途径, 达到细胞周期抑制和促进凋亡的目的, 由于 *PTEN* 具有与 PTP 催化区同源的序列, 因此具有 PTP 活性, 可以使酪氨酸磷酸盐、丝氨酸磷酸盐及局部黏附激酶 (FAK) 等酸性磷酸化蛋白去磷酸化^[7]。在细胞生长和分化过程中所必需的蛋白质酪氨酸磷酸化过程是由蛋白质酪氨酸激酶 PTKs 和 PTPs 协同作用的结果。PTKs 作为原癌基因参与蛋白质的磷酸化, 当细胞蛋白

质酪氨酸磷酸化后, 可使蛋白质功能发生改变, 并影响其参与细胞维持其外形和控制生长的调控, 而 PTPs 的作用与 PTKs 相拮抗, 通过参与细胞周期调控而抑制细胞增生, 两者之间的平衡失调会导致细胞发生变化乃至恶性转化^[8-11]。*PTEN* 另外通过其脂质磷酸酶活性影响细胞信号传递机制从而促进细胞凋亡, PIP3 是一种全新的磷酸酶作用信号传递分子, 这些生长因子与细胞膜上的受体结合后, 激活磷脂肌醇激酶 (PI3K), 使 PIP2 变为 PIP3, PIP3 又通过蛋白激酶 B (PKB) PAkt 促使细胞进入细胞分裂周期, 抑制细胞的凋亡。PIP3 还可通过其他效应分子来刺激细胞增殖。*PTEN* 可使 PIP3 去磷酸化为 PIP2, 逆转了 PI3K 的作用, 抑制了细胞的分裂增殖, 诱导细胞的凋亡。第三代铂类化疗药奥沙利铂 (L-OHP) 是以 DNA 作为靶作用部位, 与 DNA 连上的 G 共价结合, 并形成链间交联, 从而阻断 DNA 的复制和转录^[12], 使细胞生长周期中断。L-OHP 对多种肿瘤抑制作用主要是细胞凋亡导致 G_2 期停滞。因此联合 *PTEN* 基因对细胞周期改变达到抑制肿瘤生长的作用。

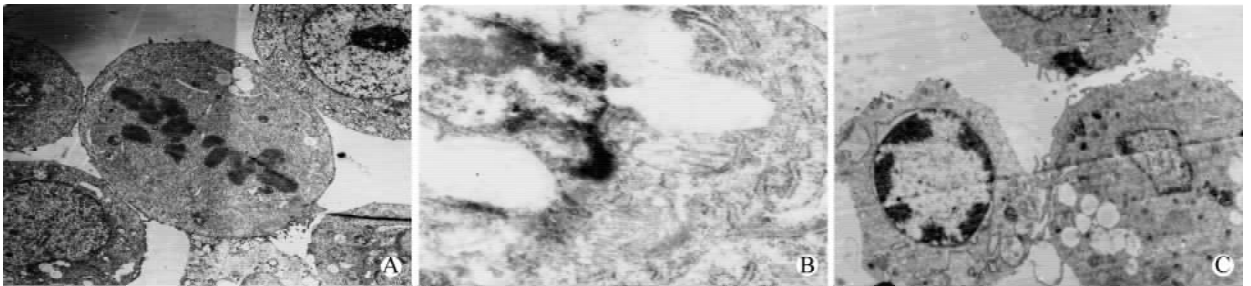


图 3 基因转染及用药后细胞超微结构的变化

Fig. 3 Changes of cell ultrastructure after transfection of *PTEN* and drug treatment

A: TEM QBC939 nucleolus spilt ($\times 3\ 300$); B: TEM *PTEN*-QBC cells showed rough endoplasmic reticulum and mitochondria ($\times 10\ 000$); C: *PTEN*-QBC cell apoptosis ($\times 10\ 000$)

总之, 脂质体介导能有效将 *PTEN* 基因转入 QBC939 细胞, 并有稳定表达; *PTEN* 基因通过对细胞 PI3K 信号通路的阻断, 抑制了细胞周期、诱导细胞凋亡、改变了细胞的超微结构。*PTEN* 基因联合 L-OHP 加强了对 QBC939 肿瘤细胞分裂增值和生长侵袭的抑制作用。

[参考文献]

[1] Reed DN Jr, Vitale GC, Martin R, *et al.* Bile duct carcinoma: trends in treatment in the ninties[J]. *Am Surg*, 2000, 66(8): 711-714.
[2] Raymond E, Faivre S, Chaney S, *et al.* Cellular and molecular pharmacology of Oxaliptin [J]. *Mol Cancer Ther*, 2002, 1(3): 227-235.

[3] 李志强, 袁先厚. *PTEN* 基因与脑胶质瘤[J]. 国外医学遗传学分册, 2000, 23(3): 150-152.
[4] 谷化平, 尚培中, 周翠玲. 胆管癌中 *PTEN* 和 *P16* 抑癌基因表达的鉴定及其临床意义[J]. 中国普通外科杂志, 2004, 13(2): 74-78.
[5] Gebbia V, Majello E, Testa A, *et al.* Treatment of adavenced adenocarcinoma of the exocerin pancreas and the gallbladder with 5-FU, hight dose levofolince acid and oral hydroxyurea on weekly schedule results of multicenter study of the sounthern Italy incology group[J]. *Cancer*, 1996, 78(6): 1300-1307.
[6] Tanaka M, Grossman HB. *In vivo* gene therapy of human bladder cancer with *PTEN* suppresses tumor growth, downregulates phosphorylated Akt, and increases sensitivity todoxorubin[J]. *Gene Ther*, 2003, 10(19): 1636-1642.
[7] Stewart AL, Mhashilkar AM, Yang XH, *et al.* PI3K blockade by

Ad-PTEN inhibits invasion and induces apoptosis in radial growth phase and metastatic melanoma cell [J]. *Mol Med*, 2002, 8(8): 451-461.

[8] Zhong H, Chiles K, Feldser D, *et al.* Modulation of hypoxia-inducible factor α expression by the epidermal growth factor/ phosphatidylinositol 3-kinase/ PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells; implications for tumor angiogenesis and therapeutics [J]. *Cancer Res*, 2000, 60(6): 1541-1545.

[9] Brunet A, Bouni A, Zigmund MJ, *et al.* Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor [J]. *Cell*, 1999, 96(6): 857-868.

[10] Freeman DJ, Li AG, Wei G, *et al.* PTEN tumor suppressor regulates P53 protein levels and activity through phosphatase-dependent

and independent mechanisms [J]. *Cancer Cell*, 2003, 3(2): 117-130.

[11] Stanibolic V, Akira S, Greg M, *et al.* Negative regulation of PKB/AKT-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN [J]. *Cell*, 1998, 95(4): 29-39.

[12] Ramaswamy S, Nakamura N, Vazquez F, *et al.* Regulation of G₁ progression by the PTEN tumor suppressor protein is linked to inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(5): 2110-2115.

[收稿日期] 2006 - 05 - 30 [修回日期] 2006 - 06 - 10
 [本文编辑] 王莹

· 简 讯 ·

中国科学技术信息研究所将 IM/Medline 收录论文统计为国际统计源论文

2005 年 12 月 6 日,中国科学技术信息研究所在第 13 届中国科技论文(2004 年度)统计结果发布会上宣布:该统计结果中的“国内论文”是指中国科技信息研究所的“中国科技论文与引文数据库(CSTPCD)”收录的论文;“国际论文”是指 SCI、EI、ISTP 和 IM/Medline 等 4 个国际检索系统收录的我国科技人员发表的论文,新增加了对 IM/Medline 收录论文的统计。截至 2005 年 9 月,国际著名检索系统收录我国大陆科技期刊:SCI 为 78 种,EI 为 152 种,IM/Medline 为 75 种。2004 年度 IM/Medline 共收录我国生物医学工作者的论文 18 962 篇。以下分别列出我国 2004 年度被 IM/Medline 收录论文数排名前 20 位的高等院校(表 1)和医疗机构(表 2)。

表 1 Medline 2004 年度收录中国高等院校论文数排名

排序	单 位	论文数(篇)
1	浙江大学	1 027
2	北京大学	967
3	上海第二医科大学	805
4	四川大学	594
5	复旦大学	591
6	中山大学	491
7	华中科技大学	399
8	第四军医大学	340
9	武汉大学	322
10	南方医科大学	312
11	南京大学	290
12	清华大学	277
13	第二军医大学	237
14	山东大学	223
15	中南大学	222
16	首都医科大学	208
17	第三军医大学	193
18	中国协和医科大学	189
19	上海交通大学	185
20	中国医科大学	162

表 2 Medline 2004 年度收录中国医疗机构论文数排名

排序	单 位	论文数(篇)
1	上海第二医科大学上海第九人民医院	348
2	四川大学华西医院	230
3	中国协和医科大学北京协和医院	181
4	北京大学第一医院	178
5	解放军总医院	168
6	浙江大学第一医院	160
7	南方医科大学南方医院	152
8	华中科技大学同济医学院同济医院	149
9	浙江大学第二医院	137
10	第四军医大学西京医院	116
11	北京大学人民医院	90
12	上海第二医科大学附属瑞金医院	86
13	北京大学第三医院	83
14	华中科技大学同济医学院协和医院	79
15	第二军医大学长海医院	77
16	复旦大学附属中山医院	74
17	中山大学第一医院	71
18	第三军医大学西南医院	70
19	中国医学科学院阜外心血管病医院	67
20	中国医科大学第一附属医院	65