

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2009.02.011

## STAT3 反义寡核苷酸纳米复合微粒对肝癌细胞的抑制作用

董勤<sup>1</sup>, 高峰<sup>1</sup>, 吕鸣<sup>1</sup>, 章菲菲<sup>1</sup>, 李海军<sup>1</sup>, 蔡洪培<sup>2\*</sup> (1. 武警上海总队医院 消化内科, 上海 201103; 2. 上海长征医院 消化内科, 上海 200003)

**[摘要]** 目的: 研究利用聚酰胺胺型树枝状分子( polyamidoamine-dendrimer, PAMAM-D) 递送 STAT3 反义寡核苷酸( anti-sense oligodeoxynucleotide, asODN) 抑制人肝癌细胞( SMMC-7721) 增殖的效应。方法: 第7代的聚酰胺胺型树枝状分子室温下与 STAT3 反义寡核苷酸混合制备树形分子与反义寡核苷酸的复合物( PAMAM-asODN), 应用透射电镜观察复合物的形态结构, 激光粒径仪测定复合纳米微粒的粒径。MTT 法检测复合纳米微粒对肝癌细胞 SMMC-7721 增殖的抑制作用, 采用流式细胞术与 TUNEL 技术检测 PAMAM-asODN 诱导 SMMC-7721 细胞凋亡和细胞周期的变化, 实时定量 PCR 分析 PAMAM-asODN 作用后肝癌细胞 STAT3 mRNA 的表达水平。结果: 成功制备的新型纳米复合微粒分散均匀、流动性好, 其粒径约为 85.45 nm。MTT 检测结果表明, 纳米复合微粒以时间和浓度依赖的方式抑制人肝癌细胞增殖, 其最高抑制率达(  $68.9 \pm 3.0$  )%。流式细胞与 TUNEL 技术检测表明, PAMAM-asODN 可加强诱导肝癌细胞凋亡(  $P < 0.01$  ), 使细胞周期阻滞于 G<sub>2</sub>/M 期。实时定量 PCR 的结果表明, PAMAM-asODN 作用后肝癌细胞中 STAT3 mRNA 表达较 asODN 作用组降低了(  $54 \pm 2.1$  )%。结论: 聚酰胺胺型树枝状分子能高效递送 STAT3 asODN, 可显著抑制肝癌细胞增殖和诱导细胞凋亡。

**[关键词]** 肝肿瘤; 聚酰胺胺型树枝状分子; STAT3; 反义寡核苷酸; 增殖; 凋亡

**[中图分类号]** R735.7; R730.54

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2009)02-0156-05

## Inhibitory effect of STAT3 antisense oligodeoxynucleotide-nanoparticle complex against hepatocarcinoma cell line SMMC-7721

DONG Qin<sup>1</sup>, GAO Feng<sup>1</sup>, LÜ Ming<sup>1</sup>, ZHANG Fei-fei<sup>1</sup>, LI Hai-jun<sup>1</sup>, CAI Hong-pei<sup>2\*</sup> (1. Department of Gastroenterology, General Hospital of Shanghai Armed Police Forces, Shanghai 201103, China; 2. Department of Gastroenterology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the inhibitory effect of polyamidoamine dendrimer ( PAMAM-D ) STAT3 antisense oligodeoxynucleotide complex ( PAMAM-asODN ) against the proliferation of hepatocarcinoma cell line SMMC-7721. **Methods:** The seventh generation of PAMAM was mixed with STAT3 asODN in room temperature to prepare a PAMAM-asODN complex. The morphology of the complex was examined by transmission electron microscope ( TEM ); the mean diameter of the complex was evaluated using laser particle size analyzer; and its inhibitory effect on the proliferation of SMMC-7721 cells was measured by MTT. Cell cycle, apoptosis, and STAT3 mRNA expression in SMMC-7721 cells treated with PAMAM-asODN were examined by FACS/TUNEL and real-time PCR, respectively. **Results:** The PAMAM-asODN complex was successfully prepared, with even distribution, good fluidity, and a mean diameter of 85.45 nm. MTT assay showed that PAMAM-asODN inhibited the proliferation of SMMC-7721 cells in a time and concentration-dependent manner, with the highest inhibitory rate being (  $68.9 \pm 3.0$  )%. FCM and TUNEL assay showed that PAMAM-asODN induced apoptosis of SMMC-7721 cells and blocked cell cycle at G<sub>2</sub>/M phase. Real-time PCR showed that the expression of STAT3 mRNA in SMMC-7721 cells was significantly decreased after treatment with PAMAM-asODN. **Conclusion:** PAMAM dendrimer can efficiently deliver STAT3 asODN into SMMC-7721 cells, significantly inhibit SMMC-7721 cells proliferation, and induce apoptosis of hepatocarcinoma SMMC-7721 cells.

**[Key words]** liver neoplasms; polyamidoamine dendrimer; STAT3; antisense oligodeoxynucleotide; proliferation; apoptosis

[ Chin J Cancer Biother, 2009, 16( 2 ): 156-160 ]

**[基金项目]** 上海科委专项基金资助项目( No.0452nm009). Supported by the Science Research Program Foundation of Shanghai( No.0452nm009)

**[作者简介]** 董勤(1978-), 浙江省绍兴市人, 主治医师, 博士, 主要从事消化系统肿瘤治疗研究

\* 通讯作者( Corresponding author ). E-mail: hongpeic@163.com

信号转导及转录活化因子( signal transducers and activators of transcription, STAT)是细胞因子和生长因子受体信号的下游效应物。STAT3 蛋白是近年来研究异常活跃的转录因子,目前已确认 STAT3 信号途径是多种人类肿瘤干预治疗有效的分子标靶之一<sup>[1-3]</sup>。以往研究<sup>[4]</sup>表明,特异性抑制 STAT3 的表达可以很好地抑制肿瘤的生长,延长生存周期。纳米技术在生物医药领域应用的突出表现在于其作为药物和基因的载体具有广阔的应用前景,其中聚酰胺胺型树枝状分子( polyamidoamine dendrimer, PAMAM-D)是一种新型纳米载体,呈树枝状结构,具有携带量大、透膜能力强、缓释性好、对人体无害等多方面的优点<sup>[5-7]</sup>。本研究以 STAT3 基因为靶点,将纳米技术与反义寡核苷酸技术相结合,在细胞水平研究新型纳米微粒复合物对 SMMC-7721 肝癌细胞增殖的抑制效应。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

G7 代 PAMAM-D 购于美国 Sigma 公司,直径 8 nm;STAT3 特异性反义寡核苷酸( antisense oligodeoxynucleotide, asODN)片段通过 GenBank 数据库比对,由上海生物工程技术服务有限公司合成( 5'-GCT CCA GCA TCT GCT GCT TC -3');原位凋亡细胞检测试剂盒、Trizol、反转录试剂盒、内参照 GAPDH 的 RT-PCR 特异引物序列购自上海生物工程有限公司;其他试剂均为分析纯,购于上海国药集团化学试剂有限公司。

### 1.2 细胞株的培养

人肝癌细胞株 SMMC-7721 由第二军医大学国际肿瘤研究所赠送,用完全 RPMI 1640 培养液( 内含 10% 小牛血清),在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,3~4 d 传代 1 次,待细胞达指数生长期、状态最佳时进行实验。

### 1.3 新型 STAT3 反义寡核苷酸纳米微粒的制备及其形态的观察

将 STAT3 特异性反义寡核苷酸与 PAMAM-D ( G7 代)按 1:0.65 的质量比投入无血清培养液体系中,室温下孵育 10 min,即可得所需要的 STAT3 反义寡核苷酸纳米微粒复合物( PAMAM-asODN)。滴 1~2 滴纳米复合物微粒混悬液于铜网上,2% 磷钨酸溶液染色,室温晾干,于透射电镜( Hitachi-6000,日本日立公司)下观察纳米微粒的形态并拍照。同时室温条件下取 PAMAM-asODN 纳米微粒混悬液适量,加注射用水使分散,通过激光粒径仪

( LS230,美国贝克曼库尔特仪器公司)测定纳米微粒的平均粒径。

### 1.4 MTT 实验检测 PAMAM-asODN 对肝癌 SMMC-7721 细胞增殖的抑制作用

取处于对数增长期的 SMMC-7721 细胞悬液接种在 96 孔细胞培养板( 5 × 10<sup>4</sup>/孔)中,每孔加入 200 μl 含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 液,待细胞贴壁后分 3 组:第 1 组依次加入浓度为 1.0、5.0、10 μmol/L 的 asODN 溶液;第 2 组对应加入与第 1 组实际 asODN 浓度相同的 PAMAM-asODN 溶液;第 3 组为 PAMAM-D 溶液,其质量与 PAMAM-asODN 对应相同,每组设 5 复孔;空白对照组不加药物。加药后分别于 24、48、72 h 加 MTT 溶液 20 μl/孔,继续培养 4 h,小心吸去上清液后加入二甲基亚砷 150 μl/孔,震荡溶解颗粒,立即于酶标仪下 570 nm 波长处测定光密度值( D<sub>570</sub>)。按下式计算抑制率:抑制率( % )=( 1 - 实验组 D<sub>570</sub>/对照组 D<sub>570</sub>) × 100%。实验重复 3 次。

### 1.5 流式细胞术检测 PAMAM-asODN 对肝癌 SMMC-7721 细胞周期的影响

将 SMMC-7721 细胞悬液按 1 × 10<sup>6</sup>/ml 细胞接种于培养瓶,24 h 后分别换加入含 STAT3 特异性反义寡核苷酸最终浓度为 5 μmol/L 的 PAMAM-asODN 与同浓度的 STAT3 asODN 及同质量的 PAMAM-D 完全培养液,24 h 后收集培养瓶内悬浮及贴壁细胞( 0.25% 胰酶消化),PI 染色,流式细胞术测定 DNA 含量,进行细胞周期分析。

### 1.6 TUNEL 技术检测 PAMAM-asODN 对 SMMC-7721 细胞凋亡的影响

先将玻片清洗干净并消毒处理,将其放入培养皿内,分别加入培养液和 SMMC-7721 细胞,待细胞生长到 80% 融合时,吸弃培养液,每个培养皿内加 3 ml 培养液及含 STAT3 反义寡核苷酸最终浓度为 5 μmol/L 的 PAMAM-asODN 药液与同浓度的纯 STAT3 asODN 及同质量的 PAMAM-D 药液,每组 3 张爬片。继续培养 48 h 后取出爬片,固定脱水。然后按照原位凋亡细胞检测试剂盒说明书的流程进行操作。

### 1.7 实时定量 PCR 检测 PAMAM-asODN 作用后 SMMC-7721 细胞 STAT3 mRNA 的表达

将 SMMC-7721 细胞以每皿 5 × 10<sup>6</sup> 接种到培养皿内,待细胞生长到 80% 融合时,吸弃培养液,每皿加 3 ml 培养液及含 STAT3 反义寡核苷酸最终浓度为 5 μmol/L 的 PAMAM-asODN 药液与同浓度的纯 asODN 及同质量的 PAMAM-D 药液,继续培养 48 h,

收集细胞, -80℃ 保存。然后按照试剂盒说明书提供的方法提取细胞总 RNA, 紫外分光光度仪检测其纯度, 电泳测其完整性。按照试剂盒的要求取逆转录 cDNA, 数据采用仪器自带软件(ABI Prism 7300)进行分析。其中 STAT3 两端引物序列分别为: 5'-GGAGCAGAGATGTGG GAATG-3', 5'-CTTGGTGGT-GGAGGAGAACT-3'; 内参照 GAPDH 的两端引物序列为: 5'-AAGGTCATCCCTGAGCTGAA-3', 5'-AC-CCAGAAGACTGTGGATGG-3'。转染后细胞采用仪器自带软件分析, 每个样品的靶基因 mRNA 的相对表达水平按以下公式计算: 相对 mRNA 表达(%) =  $2^{-\Delta Ct} \times 100\%$ ,  $\Delta Ct$  值 = 靶基因 Ct 值 - GAPDH Ct 值。

1.8 统计学处理

数据均以  $\bar{x} \pm s$  表达, 采用 SPSS 程序进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 PAMAM-asODN 的形态特征及粒径大小

PAMAM-asODN 的电镜照片(图 1)可见, PAMAM-asODN 纳米微粒复合物呈不规则椭圆形, 微粒之间无粘连, 流动性好。激光粒度分析仪测定纳米微粒粒径分布范围窄, 平均粒径为(85.45 ± 5.13) nm, 达到纳米粒径标准。

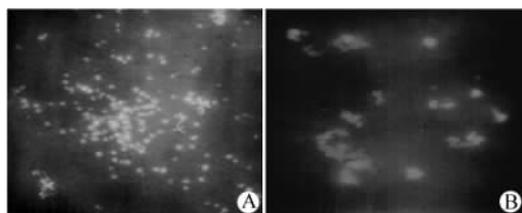


图 1 透射电镜观察 PAMAM-asODN 的形态特征  
Fig. 1 Morphologic characteristic of PAMAM-asODN detected by transmission electron microscope  
A: ×30 000; B ×50 000

2.2 PAMAM-asODN 对 SMMC-7721 细胞增殖的抑制作用

由实验结果(表 1)可知, PAMAM-asODN 对 SMMC-7721 细胞具有明显抑制作用, 且随着时间的延长和浓度的增加抑制作用更明显。在相同浓度及相同作用时间下, PAMAM-asODN 组的抑制效果要优于纯 asODN 组( $P < 0.05$ ); 随着时间的延长, 两者的抑制效果仍有一定的区别, PAMAM-asODN 组的抑制细胞增殖作用仍较为明显。此外, PAMAM-D 微粒对于肝癌细胞增殖无抑制作用, 其效果与空白

对照组无差异( $P > 0.05$ )。

表 1 不同浓度的 asODN 及 PAMAM-asODN 对 SMMC-7721 细胞增殖的影响

Tab. 1 Effects of different concentrations of asODN and PAMAM-asODN on proliferation of SMMC-7721 cells

Drug ( $c_B/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	Inhibitory rate(%)		
	1 d	2 d	3 d
asODN			
1.0	3.2 ± 0.5	14.6 ± 1.1	20.4 ± 1.4
5.0	10.2 ± 1.1	23.9 ± 2.1	37.6 ± 0.7
10.0	19.6 ± 2.2	32.4 ± 1.3	55.3 ± 2.9
PAMAM-asODN			
1.0	5.9 ± 0.4	17.7 ± 2.2	29.1 ± 2.6
5.0	27.6 ± 1.9*	32.4 ± 3.5*	52.2 ± 2.7*
10.0	31.3 ± 2.9*	47.8 ± 3.8*	68.9 ± 3.0*

\*  $P < 0.05$  vs asODN

2.3 PAMAM-asODN 对 SMMC-7721 细胞周期和凋亡的影响

流式术检测显示, 5.0  $\mu\text{mol/L}$  的 PAMAM-asODN 与同浓度的纯 asODN 及同质量的 PAMAM-D 分别作用 24 h, 3 组细胞的凋亡率分别为(28.66 ± 3.6)%、(8.78 ± 2.4)%、(5.91 ± 1.7)%。G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞含量减少, S + G<sub>2</sub>/M 期细胞含量增多(图 2)。

2.4 PAMAM-asODN 促进 SMMC-7721 细胞的凋亡

将两组细胞进行 TUNEL 染色后, 细胞核中有棕色颗粒者为阳性细胞(图 4), 并根据公式计算出凋亡指数[细胞凋亡指数(%) = 凋亡细胞数/总细胞数 × 100%]。计算结果表明, PAMAM-asODN 组细胞凋亡指数为(40.8 ± 3.3)%, 而纯 asODN 组细胞凋亡指数为(13.8 ± 2.1)%, PAMAM-D 组细胞凋亡指数为(6 ± 0.4)%, PAMAM-asODN 组的凋亡指数显著高于纯 asODN 组( $P < 0.01$ )。

2.5 PAMAM-asODN 对 SMMC-7721 细胞 STAT3 mRNA 表达的抑制

Real-time PCR 检测结果表明, PAMAM-asODN 组与 as-ODN 组相比, 其 STAT3 mRNA 的表达较后者降低了(54 ± 2.1)%(表 2)。

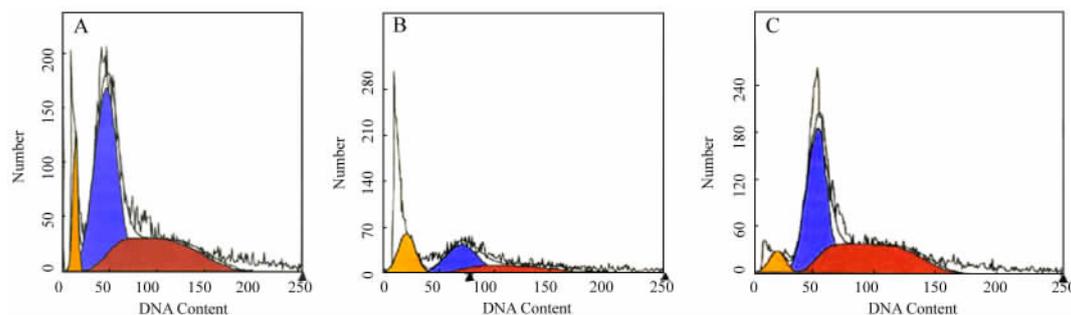


图2 PAMAM-asODN 处理后 SMMC-7721 细胞周期和凋亡峰的变化

Fig. 2 Changes of cell cycle and apoptotic peak of SMMC-7721 cells after treatment with PAMAM-asODN

A: asODN; B: PAMAM-asODN; C: PAMAM-D

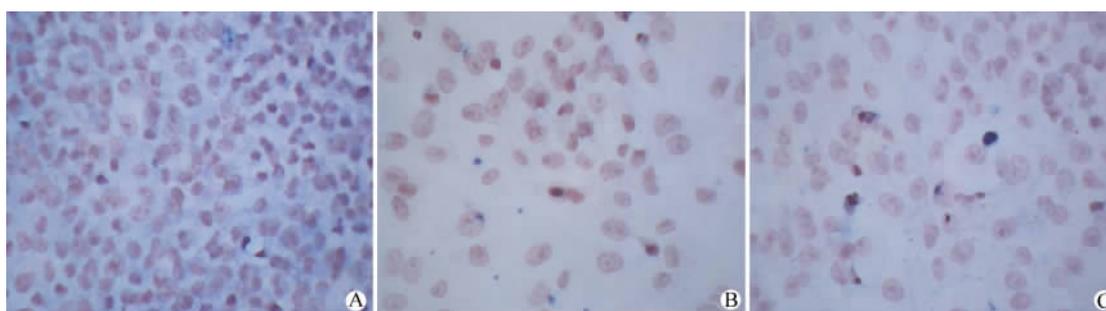


图3 PAMAM-asODN 对 SMMC-7721 细胞凋亡的影响(×250)

Fig. 3 Influence of PAMAM-asODN on apoptosis of SMMC-7721 cells(×250)

A: PAMAM- asODN group; B: asODN group; C: PAMAM-D group

表2 PAMAM-asOND 对 SMMC-7721

细胞 STAT3 mRNA 表达的抑制

Tab.2 Inhibitory effect of PAMAM-asOND on STAT3 mRNA expression in SMMC-7721 cells

Group	$\Delta Ct_{STAT3}$	$\Delta Ct_{GAPDH}$	STAT3 mRNA( % )
PAMAM-D	26.11	21.55	4.24
asODN	26.15	21.23	3.30
PAMAM-asODN	27.28	21.16	1.44

### 3 讨论

肿瘤基因治疗是目前肿瘤治疗的研究热点之一,而寻找一种无毒的高转染率的基因载体是基因治疗领域遇到的难点<sup>[8-10]</sup>。近年来,单分散性、稳定性好的 PAMAM 树状纳米分子作为基因载体的研究蓬勃发展,该载体具有携带反义寡核苷酸量大、保护其不被 RNA 酶降解、缓慢释放反义寡核苷酸,以及对人体无毒、无免疫原性等优点<sup>[11-13]</sup>。反义寡核苷酸抗肿瘤的缺点已经被广大学者所认同<sup>[14-16]</sup>。本

研究表明,通过静电作用,PAMAM-D 与 STAT3 反义寡核苷酸可以较好地组成稳定的复合物,该复合物流动性好,无粘连,且其粒径只有 85 nm 左右,符合纳米微粒的条件,已达到静脉给药的粒径标准。作为纳米级别的树形分子可以诱导细胞表面出现纳米孔,在人体内能够穿越各种屏障,到达目标部位,因此是一种高效的基因递送载体。

MTT 法检测发现 PAMAM-asODN 纳米微粒可以较好地抑制肝癌细胞的增殖,且随着作用时间、作用浓度的增加其抑制效果更明显。理论上由于纳米复合物具有缓释的效果,因此其早期的有效药物浓度应该低于纯 asODN 组,导致抑制率不是很高。但是本实验结果却表明,作用 24 h 时 PAMAM-asODN 组的抑制效果仍优于纯 asODN 组。其原因可能是因为 PAMAM-asODN 纳米复合物与其他缓释剂不同,其作为一个整体可以直接进入细胞内,而不需要等反义寡核苷酸释放后再发挥作用;而整个复合物穿透细胞膜的效果要优于纯 asODN 组,因此导致同一时间段内进入细胞内的药物较多,更好地增强了药物抑制肿瘤的

效果。流式细胞术与 TUNEL 技术检测均表明,在相同条件下 PAMAM-asODN 组与纯 asODN 组相比,诱导细胞的凋亡率明显高于后者,说明在相同的条件下和同一时间段内,PAMAM-asODN 可递送更多的反义寡核苷酸进入细胞内。TUNEL 技术是一种直观、迅速、原位显示凋亡细胞的方法,可观察各个时期的凋亡细胞,且可进行定量研究,是目前使用较先进的检测细胞凋亡的手段<sup>[17]</sup>。研究结果显示 PAMAM-asODN 组凋亡指数明显多于纯 asODN 组[(40.8 ± 3.3)% vs (13.8 ± 2.1)%]。此外本研究通过 RT-PCR 检测发现 SMMC-7721 细胞内的 STAT3 mRNA 的表达明显减少,充分说明 PAMAM-asODN 可以较好的被转入细胞内,抑制 STAT3 基因的表达。

PAMAM 树状大分子属于纳米微粒,粒径较小,可以到达人体的任何部位,但如何加强靶向性,是目前研究的重点之一。现在最常用的方法就是调节纳米微粒的大小或在微粒外表粘附特异性的受体等,从而提高靶向性的治疗效果。本研究结果提示,PAMAM-D 在体外可以较好地增强反义寡核苷酸抗肿瘤的效果,充分发挥了纳米微粒靶向性的优点,为抗肿瘤基因靶向治疗提供一种较好的载体,具有广泛的应用前景。

[ 参 考 文 献 ]

[ 1 ] Zhao S, Venkatasubbarao K, Lazor JW, *et al.* Inhibition of STAT3 Tyr705 phosphorylation by Smad4 suppresses transforming growth factor beta-mediated invasion and metastasis in pancreatic cancer cells [ J ]. *Cancer Res*, 2008, 68( 11 ): 4221-4228.

[ 2 ] Qu P, Roberts J, Li Y, *et al.* Stat3 downstream genes serve as biomarkers in human lung carcinomas and chronic obstructive pulmonary disease [ J ]. *Lung Cancer*, 2009, 63( 3 ): 341-347.

[ 3 ] Costantino L, Barlocco D. STAT 3 as a target for cancer drug discovery [ J ]. *Curr Med Chem*, 2008, 15( 9 ): 834-843.

[ 4 ] Buettner R, Mora LB, Jove R. Activated STAT signaling in human tumors provides novel molecular targets for therapeutic intervention [ J ]. *Clin Cancer Res*, 2002, 8( 4 ): 945-954.

[ 5 ] Yang H, Kao WJ. Dendrimers for pharmaceutical and biomedical

applications [ J ]. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2006, 17( 1-2 ): 3-19.

[ 6 ] 崔大祥. 肿瘤纳米诊断和治疗技术的研究现状与发展前景 [ J ]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2008, 15( 5 ): 401-405.

[ 7 ] 徐 萍, 崔大祥, 潘碧峰, 等. 树形分子递送 survivin 反义寡核苷酸对 HepG2 细胞的抑制效应 [ J ]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2007, 14( 5 ): 411-416.

[ 8 ] Kodama K, Katayama Y, Shoji Y, *et al.* The features and shortcomings for gene delivery of current non-viral carriers [ J ]. *Curr Med Chem*, 2006, 13( 18 ): 2155-2161.

[ 9 ] Akita H, Harashima H. Advances in non-viral gene delivery: using multifunctional envelope-type nano-device [ J ]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2008, 5( 8 ): 847-859.

[ 10 ] Huang RQ, Pei YY, Jiang C. Enhanced gene transfer into brain capillary endothelial cells using antp-modified DNA-loaded nanoparticles [ J ]. *J Biomed Sci*, 2007, 14( 5 ): 595-605.

[ 11 ] Majoros IJ, Myc A, Thomas T, *et al.* PAMAM dendrimer-based multifunctional conjugate for cancer therapy: synthesis, characterization, and functionality [ J ]. *Biomacromolecules*, 2006, 7( 2 ): 572-579.

[ 12 ] Liu YC, Chen HL, Su CJ, *et al.* Mesomorphic complexes of poly ( amidoamine ) dendrimer with DNA [ J ]. *Macromol*, 2005, 38 ( 23 ): 9434-9440.

[ 13 ] Pan B, Cui D, Sheng Y, *et al.* Dendrimer-modified magnetic nanoparticles enhance efficiency of gene delivery system [ J ]. *Cancer Res*, 2007, 67( 17 ): 8156-8163.

[ 14 ] Klisovic RB, Stock W, Cataland S, *et al.* A phase I biological study of MG98, an oligodeoxynucleotide antisense to DNA methyltransferase 1, in patients with high-risk myelodysplasia and acute myeloid leukemia [ J ]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14( 8 ): 2444-2449.

[ 15 ] Gjertsen BT, Bredholt T, Anensen N, *et al.* Bcl-2 antisense in the treatment of human malignancies: a delusion in targeted therapy [ J ]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2007, 8( 6 ): 373-381.

[ 16 ] Fuessel S, Herrmann J, Ning S, *et al.* Chemosensitization of bladder cancer cells by survivin-directed antisense oligodeoxynucleotides and siRNA [ J ]. *Cancer Lett*, 2006, 232( 2 ): 243-254.

[ 17 ] Kim JH, Kim YS, Park K, *et al.* Antitumor efficacy of cisplatin-loaded glycol chitosan nanoparticles in tumor-bearing mice [ J ]. *J Control Release*, 2008, 127( 1 ): 41-49.

[ 收稿日期 ] 2009 - 02 - 04 [ 修回日期 ] 2009 - 03 - 11  
[ 本文编辑 ] 王 莹

本期广告目次

沈阳三生制药有限责任公司 ..... 封二

东胜创新生物科技有限公司 ..... 封三

碧迪医疗器械有限公司 ..... 封四

德国美天旆生物技术有限公司 ..... 前插页一

浙江康莱特药业有限公司 ..... 前插页二

上海医元生物基因发展有限公司 ..... 后插页二