

· 临床研究 ·

Twist在肺癌中高表达并与肺癌的分化有关

惠林萍 刘冰冰 赵蕾 张四洋 周宝森 邱雪杉 崔泽实

【摘要】背景与目的 转录因子Twist是上皮-间质转变(EMT)过程中的重要调控因子,在肿瘤进展中发挥重要作用。本研究的目的是检测Twist在肺癌组织和细胞系中的表达情况,并探讨其与肺癌的临床病理因素和生物学行为的关系。方法 应用免疫组织化学方法检测68例肺癌及8例癌旁肺组织中Twist的表达;采用RT-PCR方法检测人支气管上皮细胞系(HBE)和8个肺癌细胞系Twist1和Twist2 mRNA的表达水平;应用免疫荧光方法检测HBE和8个肺癌细胞系中Twist蛋白的表达和亚细胞定位。结果 8例癌旁肺组织中Twist弱表达,在68例肺癌组织标本中,9例为Twist弱表达(13.24%),51例为Twist中高表达(75.00%),癌旁肺组织Twist弱表达。Twist高表达与肺癌分化程度($P=0.002$)和患者年龄($P=0.012$)有关。Twist1和Twist2的mRNA在不同组织学类型的肺癌细胞系中的表达水平均有差异($P<0.05$)。免疫荧光显示Twist蛋白在HBE细胞系中弱表达,而在肺鳞癌和腺癌细胞系中高表达,主要定位于细胞浆。结论 Twist在正常肺组织中低表达,在肺癌中高表达,其表达水平与肺癌的分化有关,可作为肺癌进展的生物学标志。

【关键词】肺肿瘤; Twist; 肿瘤标志物

【中图分类号】 R734.2 DOI:10.3779/j.issn.1009-3419.2009.04.07

High Expression of Twist Is Positively Correlated with the Differentiation of Lung Cancer

Linping HUI*, Bingbing LIU*, Lei ZHAO*, Siyang ZHANG*, Baosen ZHOU#, Xueshan QIU[△], Zeshi CUI*

*CTR Laboratory Technology, China Medical University, Shenyang 110001, China; #Department of Epidemiology, China Medical University, Shenyang 110001, China; [△]Department of Pathology, China Medical University, and Department of Clinical Pathology, The First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, China

Corresponding author: Zeshi CUI, E-mail: labczs@cmu.edu.cn; Xueshan QIU, E-mail: qiuxues@hotmail.com

【Abstract】 **Background and objective** Twist has been identified as a promoting factor for epithelial-mesenchymal transition (EMT), which enhances the metastatic potential of cancer. The aim of this study is to detect the expression of Twist in lung cancer tissues and cell lines, and analyze its relationship with clinicopathologic characteristics and biological behavior of lung cancer. **Methods** Twist expression was examined in 68 lung cancer specimens and 8 normal lung specimens using immunohistochemistry (S-P method). Expression levels of Twist1 and Twist2 mRNA were detected using transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) in HBE and 8 lung cancer cell lines. Immunofluorescence was used to detect the Twist protein expression levels and subcellular localization in lung cancer cells and HBE (human normal bronchi epithelium) cells. **Results** Among 68 lung cancer specimens, 9 samples showed weak expression of Twist 13.24% (9 of 68), 75.00% (51 of 68) lung cancer specimens showed moderate to strong Twist staining whereas 8 corresponding normal lung specimens showed weak staining extent. Twist expression level was positively correlated with differentiation ($P=0.002$) and age ($P=0.012$). Twist1 and Twist2 mRNA expression levels were incompatible in different histology types. The fluorescence signal of Twist protein was conspicuous in lung squamous cell carcinoma cells and adenocarcinoma cells, primarily in cytoplasm, but low in HBE. **Conclusion** High expression of Twist in lung cancer was associated with differentiation. Twist could be used as a valuable biomarker to evaluate the progression of lung cancer.

【Key words】 Lung neoplasms; *Twist* gene; Biological tumor markers

This study was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (to Baosen ZHOU) (No.30471493) and the Foundation of Shenyang Science & Technology (To Zeshi CUI)(No.2007Gx-20).

本研究受国家自然科学基金(No.30471493)和沈阳市科技局项目(No.2007Gx-20)资助

作者单位: 110001 沈阳, 中国医科大学实验技术中心三部(惠林萍, 刘冰冰, 赵蕾, 张四洋, 崔泽实); 中国医科大学流行病学教研室(周宝森); 中国医科大学基础医学院病理学教研室, 中国医科大学第一临床学院病理科(邱雪杉)(通讯作者: 崔泽实, E-mail: labczs@cmu.edu.cn; 邱雪杉, E-mail: qiuxues@hotmail.com)

肺癌是人类最常见的恶性肿瘤之一,也是全球恶性肿瘤致死的重要因素。上皮-间质转变(epithelial-mesenchymal transition, EMT)是肿瘤进展中的一个重要过程,具有碱性螺旋-环-螺旋结构的Twist是上皮-间质转变过程中的重要调控因子^[1],对肿瘤的侵袭和转移有重要影响。脊椎动物中转录因子Twist家族包括Twist1和Twist2,这两个蛋白在碱性螺旋-环-螺旋结构和C端有>90%的相似性, Twist2的N端比Twist1的N端少一个富有甘氨酸的区域。Twist参与了前列腺癌^[2,3]、乳腺癌^[4]、前列腺癌^[5]、人神经胶质瘤^[6]和卵巢上皮瘤^[7]等肿瘤细胞发生EMT并促进其侵袭转移。本研究采用肺癌组织标本,检测Twist在肺癌组织中的表达水平,及其与临床病理因素的关系,同时检测Twist蛋白和mRNA在多种肺癌细胞系中的表达,深入研究Twist与肺癌发生发展的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 68例肺腺癌和肺鳞癌标本及8例癌旁肺组织标本来自2000年11月-2006年4月于中国医科大学附属第一医院行肺癌切除手术的患者。患者术前均未接受过放化疗。患者平均年龄59岁(20岁-81岁),其中男性40例,女性28例。肺癌标本根据世界卫生组织2004年的分类标准分为鳞癌24例,腺癌44例;其中高分化11例、中分化40例、低分化17例。40例有淋巴结转移,依据国际抗癌联盟(UICC)1997年修订的肺癌P-TNM分期标准:I期23例,II期20例,III期22例,IV期3例。8种肺癌细胞系分别为:肺腺癌细胞系A549和LTE;肺鳞癌细胞系SK-MES-1(以下简称为SK);肺大细胞癌细胞系NCI-H460(以下简称为460)和NCI-H661(以下简称为661);肺巨细胞癌细胞系LH7、BE1;肺小细胞癌细胞系NCI-H446(以下简称为446)。以人支气管上皮细胞系HBE为正常对照。HBE细胞用含15%胎牛血清的RPMI-1640培养基,其它细胞都用含10%的胎牛血清的RPMI-1640培养基,pH值保持在7.2-7.4之间,于含5%CO₂的37℃孵箱内培养。

Twist兔抗人多克隆抗体Twist(H-81)购自美国Santa Cruz生物技术公司,SP超敏免疫组织化学试剂盒(KIT-9710)和DAB显色试剂盒(DAB-0031)购自福州迈新生物技术公司,Trizol试剂购自美国Invitrogen公司,RT-PCR试剂盒TaKaRa RNA PCR Kit(AMV) Ver. 3.0购自大连宝生物(TaKaRa)公司,RPMI-1640购自GIBCO公司。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学 所有切除标本均用10%甲醛固定,石蜡包埋,制成4 μm切片(LEICA RM2155),经脱蜡、

脱苯、水化后,采用链菌素抗生物素蛋白-过氧化物酶法(S-P法)检测Twist蛋白表达情况。首先3%的过氧化氢阻断内源性过氧化物酶的活性,高温高压修复抗原,然后使用Twist一抗(1:100)4℃湿盒内孵育过夜,次日依次滴加生物素标记的二抗和链菌素抗生物素蛋白-过氧化物酶,DAB显色,苏木素复染细胞核。以PBS代替一抗作为阴性对照。判定标准:每张切片在显微镜(×400)下随机选取10个视野,每个视野计数100个肿瘤细胞,计数其中的阳性细胞数,然后取平均值。染色强度分级:阴性为0,淡黄色为1,黄棕色为2,深棕色为3。以阳性肿瘤细胞数分级:<5%为0,5%-25%为1,25%-50%为2,>50%为3。利用染色强度与阳性肿瘤细胞数乘积来评定结果,0为阴性,1为弱阳性,2-4为阳性,6-9为强阳性。

1.2.2 RT-PCR 传代细胞在培养瓶中生长2 d后使用0.25%胰酶消化细胞并离心收集,分别加入400 μL Trizol试剂,提取每种细胞系的总RNA,具体操作按生产商提供的说明书进行。总RNA纯度和浓度使用紫外分光光度计(NanoPhotometer, Germany)测定,经测定所用样品的A₂₆₀/A₂₈₀比值都在1.8-2.0之间。反转录过程按说明书操作。PCR引物序列分别为:Twist1上游引物为5'-CGG GAG TCC GCA GTC TTA-3',下游引物为5'-CCC ATG TGA TTC GAT GCG T-3';Twist2上游引物为5'-GAG AAG GGA CAG CAG TGA CAT C-3',下游引物为5'-AAT AGC GGC GTG AAA GTA AGA A-3';内参GAPDH上游引物为5'-GAA GGT CGG AGT CAA CGG AT-3',下游引物为5'-CCT GGA AGA TGG TGA TGG G-3'。Twist1、Twist2和GAPDH的PCR反应在PCR仪(T Professional Gradient 96, BIOMETRA, Germany)进行扩增。循环条件为:94℃预变性5 min,94℃变性40 s,58℃、56℃、58.5℃退火40 s,72℃延伸40 s,30个循环后于72℃延伸5 min。PCR反应产物的大小分别是498 bp(Twist1)、411 bp(Twist2)和224 bp(GAPDH),PCR产物经GeneFinder染色,2%琼脂糖凝胶电泳,实验重复3次。使用成像系统(MF-ChemiBIS 3.2, DNR Bio-Imaging Systems, Israel)采图,分析光密度值。将Twist1、Twist2的光密度值与GAPDH光密度值的比值作为Twist1、Twist2的相对表达量进行比较分析。

1.2.3 细胞免疫荧光 将盖玻片放入无菌十二孔板中,将不同的细胞系分别传代至每个孔中并做好标记。36 h后取出,4%多聚甲醛室温下固定20 min。PBS冲洗3次,每次5 min(以下PBS冲洗方法相同),Triton X-100 37℃打孔20 min, PBS冲洗,非免疫动物血清37℃封闭1 h,吸净血清后加入Twist一抗(1:100)4℃孵育过夜,次日PBS冲洗

后避光加入FITC标记的山羊抗兔荧光二抗, 37 °C孵育60 min, PBS冲洗, PI复染细胞核37 °C孵育5 min。PBS冲洗后用50%甘油封片。使用激光共聚焦扫描显微镜(FV1000, OLYMPUS)观察采图。

1.3 统计学分析 采用SPSS 13.0统计分析软件进行分析, 对Twist的表达与临床病理特征的关系采用两组资料非参数检验和多组资料非参数秩和检验, Twist在细胞系中的表达采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫组化 在68例肺鳞癌和腺癌组织中, 有8例为Twist阴性(11.76%), 9例为Twist弱表达(13.24%), 28例Twist表达(41.18%), 有23例Twist高表达(33.82%) (图1)。Twist在8例癌旁肺组织中弱表达。Twist的表达情况与肺癌的分化程度($P=0.002$)和肺癌患者的年龄($P=0.012$)相关。Twist的表达水平与患者的性别($P=0.820$)、组织学类型($P=0.426$)、TNM分期($P=0.200$)和有无淋巴结转移($P=0.392$)关系并不明显(表1)。

2.2 RT-PCR Twist1和Twist2的mRNA在HBE和8种肺癌细胞系中的表达并不一致($P < 0.01$, $P < 0.01$) (图2)。Twist1在肺腺癌A549表达最高, 其次为在肺小细胞癌446细胞系

和肺腺癌LTE, 再次为HBE和肺鳞癌SK细胞系, 然后为肺巨细胞癌LH7和BE1细胞系, 最后为肺大细胞癌460和661细胞系。Twist1在HBE表达, 在同种组织学类型的不同细胞系中比较, Twist1 mRNA在A549的表达高于LTE; Twist1 mRNA在巨细胞癌细胞系中表达水平较为一致, 低侵袭性细胞系LH7中表达略低于BE1细胞系($P=0.478$), 在肺大细胞癌460、661两种细胞系中表达水平也较为一致, 在低侵袭性细胞系460中表达略低于661细胞($P=0.371$); 但差异都不具有统计学意义。Twist2在肺小细胞癌446细胞系和肺鳞癌细胞系SK和肺腺癌LTE中表达水平最高, 其次为肺腺癌A549, 然后为肺大细胞癌661和460和HBE, 肺巨细胞癌LH7和BE1表达水平最低。其次在同种组织学类型的不同细胞系中比较, Twist2 mRNA在LTE的表达高于A549; 在460、661两种细胞系中表达水平也较为一致($P=0.856$); 在LH7和BE1细胞系表达水平也无明显差别($P=0.792$)。

2.3 免疫荧光 在人支气管上皮HBE细胞系中, Twist弱表达, Twist蛋白在不同肺癌细胞系中表达水平不同(图3), 在肺腺癌LTE和A549细胞系和肺鳞癌SK中表达较强, 大细胞癌460和661荧光强度比腺癌和鳞癌弱, Twist蛋白表达定位以细胞浆为主。

表1 肺鳞和肺腺癌中Twist的表达与临床病理学特征的关系

Tab 1 Expression of Twist and clinicopathologic characteristics in lung squamous cell carcinoma and adenocarcinoma

Characteristic	n	Expression of Twist				Z	χ^2	P
		Negative	Weak	Moderate	Strong			
Sex								
Male	40	4	4	15	17	-1.739		0.820
Female	28	4	5	13	6			
Age						-2.498		0.012
<59 years	26	6	4	11	5			
≥59 years	42	2	5	17	18			
TNM stage							3.217	0.200
I	23	2	4	13	4			
II	20	0	0	13	7			
III-IV	25	6	5	2	12			
Differentiation							12.717	0.002
Highly differentiated	11	2	2	7	0			
Moderately differentiated	40	6	5	18	11			
Poorly differentiated	17	0	2	3	12			
Histology type						-0.797		0.426
Squamous cell carcinoma	24	5	3	8	8			
Adenocarcinoma	44	3	6	20	15			
Lymphnode metastasis						-0.855		0.392
No	29	4	4	13	8			
Yes	39	4	5	15	15			

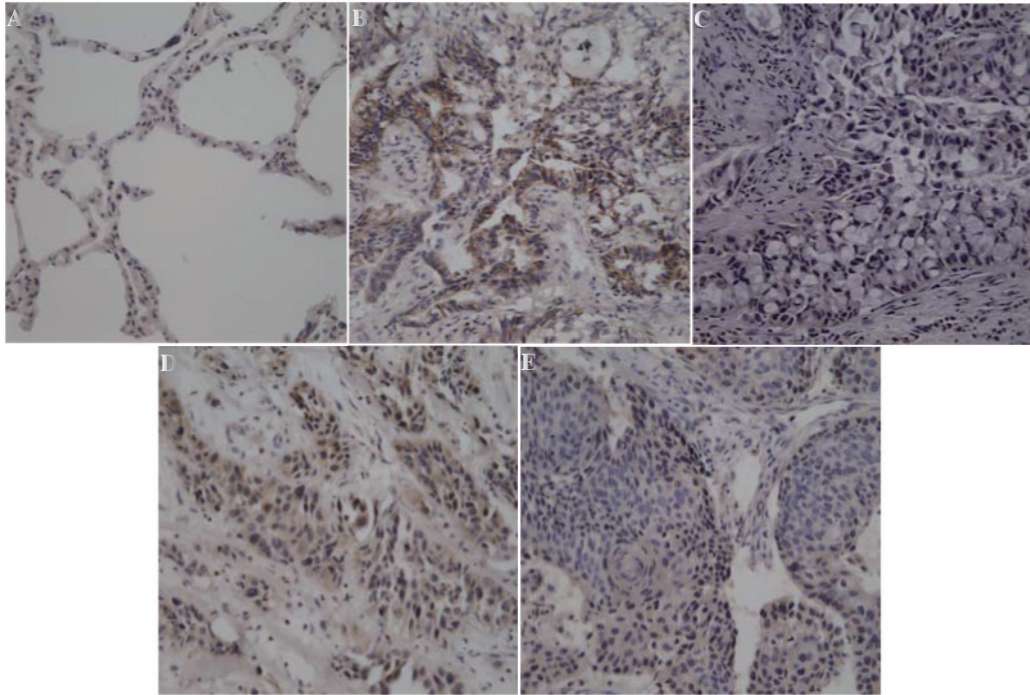


图1 Twist在肺腺癌和鳞癌中的表达 (×400)

A: Twist在癌旁肺组织的表达较弱, 细胞浆表达; B: Twist在低分化肺腺癌中的高表达, 细胞浆阳性表达; C: Twist在中分化肺腺癌中的低表达; D: Twist在低分化肺鳞癌中的高表达, 细胞浆阳性表达; E: Twist在高分化肺鳞癌中的低表达。

Fig 1 Twist expression in lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma (×400)

A: The weak positive cytoplasmic expression of Twist in corresponding normal lung; B: The positive cytoplasmic expression of Twist in lung adenocarcinoma; C: The low expression of Twist in lung adenocarcinoma; D: The positive cytoplasmic expression of Twist in lung squamous cell carcinoma (SCC); E: The low expression of Twist in lung SCC.

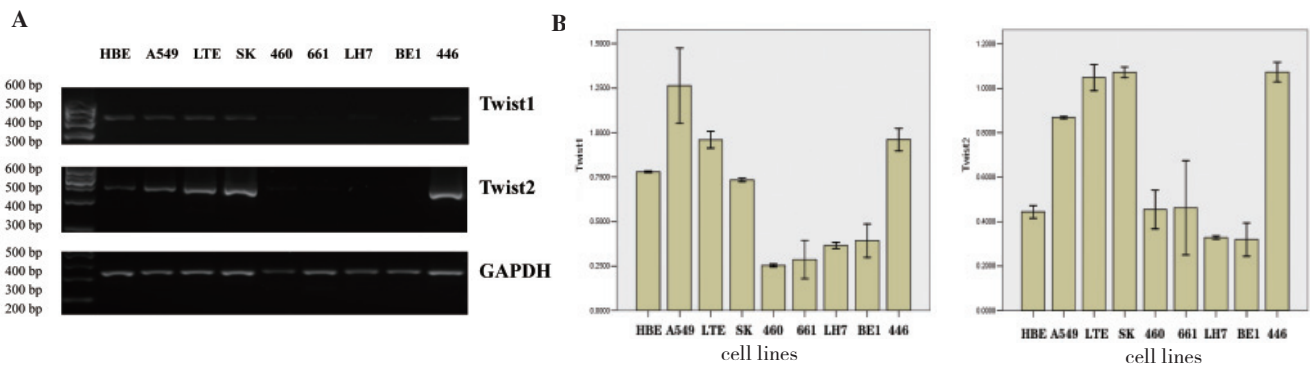


图2 Twist1和Twist2 mRNA在HBE和8种肺癌细胞系中的表达水平

A: HBE和8种肺癌细胞系中Twist1、Twist2和GAPDH的 mRNA经RT-PCR后的电泳结果, 以GAPDH为内参; B: Twist1和Twist2 mRNA与GAPDH相比后的相对表达量。可见在同种组织学类型的细胞系之间Twist1和Twist2表达水平相近, 而不同组织学类型的细胞系中有所不同, 肺大细胞癌细胞系中Twist1和Twist2的表达水平低于其它细胞系。

Fig 2 Expression levels of Twist1 and Twist2 mRNA in HBE and 8 lung cancer cell lines

A: RT-PCR results of Twist1 and Twist2 mRNA expression levels in HBE and eight lung cancer cell lines. GAPDH served as an internal control; B: The histogram of relative expression rate of Twist1 and Twist2 compared to GAPDH. The Twist1 and Twist2 expression levels were incompatible in different histological types, but were similar in the same histological types. The Twist1 and Twist2 expression levels were lower in lung giant cell carcinoma cell line than other cell lines.

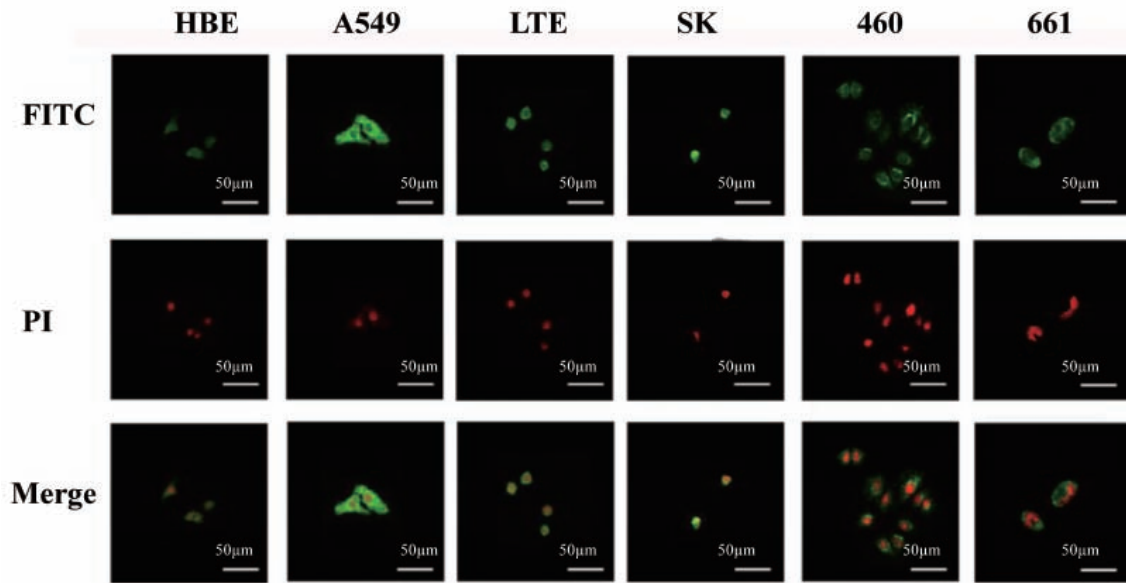


图3 Twist蛋白在肺癌细胞系和支气管上皮细胞系中的表达情况

用PI标记的细胞核显示红色荧光, FITC标记的Twist蛋白显示绿色荧光。在肺癌细胞系中Twist的呈阳性表达, 主要表达于细胞浆。Twist在肺癌细胞系的表达明显高于其在HBE中的表达。

Fig 3 Twist expression in lung cancer cell line and HBE cell line

Cell nuclei stained with PI showed red fluorescence. Twist protein marked with FITC showed green fluorescence. The fluorescence was mainly in cytoplasm. The fluorescence intensity of Twist protein was much higher in lung cancer cells than in HBE cells.

3 讨论

Twist蛋白是高度保守的转录因子, 在不同种属中具有很高的同源性, 具有碱性的螺旋-环-螺旋结构, 在胚胎的发生发展中发挥重要调控作用。Twist作为上皮-间质转变过程中的关键调控因子, 在肿瘤的进展和转移起重要作用。

乳腺癌中的研究^[8,9]表明, Twist在乳腺癌中表达上调, 并在分化较低的侵袭性小叶癌中表达最高。Wang等^[5]发现前列腺癌中Twist的表达与肿瘤分期相关。Twist在大多数胶质瘤来源的细胞系中表达, 并且随着Twist mRNA水平与人胶质瘤分级相关; 在人胶质瘤细胞中过量表达Twist后, 肿瘤细胞的侵袭能力明显增强^[6]。Horikawa等^[10]研究发现在转移性鼻咽癌中, Twist介导上皮间质化进而促进肿瘤的转移。Zhang等^[11]发现Twist高表达在膀胱癌的进展起重要作用, Twist的表达与膀胱癌的分期有关。黑色素瘤中Twist表达与肿瘤分级相关^[12]。Yuen等^[13]发现食管鳞状细胞癌中Twist上调与肿瘤分化和远隔转移有关。最近, Ansieau等^[14]研究发现Twist通过失活细胞的过早老化而促进肿瘤发生。在7例肺癌组织中Twist1有1例阳性表达, 8个肺癌细胞系中Twist1有4个细胞系表达, Twist2有3个细胞系表达。但Twist在肺癌细胞中的具体定位, 以及其与肺癌组织类型和肿瘤分期等临床病理因素的关系未见相关报道。

本研究免疫组化结果显示, 在癌旁肺组织中Twist弱表达, 肺鳞癌和肺腺癌组织中Twist较高表达。Twist的表达情况与肺癌的分化程度相关, 低分化的肺癌Twist高表达, 中高分化的肺癌其阳性表达, 这表明Twist可能在肺癌发生中起重要作用。在人乳腺癌、胶质瘤、前列腺癌等肿瘤中, Twist的高表达与肿瘤的转移相关, 本研究可能因肺癌病例样本量相对较少, Twist的表达与淋巴结转移与否的差异不具有统计学意义, 还有待于扩大样本进一步研究。

我们分别采用RT-PCR和免疫荧光方法进一步检测了HBE和肺癌细胞系中Twist mRNA和蛋白的表达情况。结果显示: 在mRNA水平, Twist1在肺腺癌细胞系和非小细胞癌中的表达高于HBE, Twist2在肺小细胞癌、肺鳞癌和肺腺癌细胞系中的表达均高于HBE。在蛋白水平, Twist的表达在肺鳞癌和腺癌细胞系中均高于HBE, 这与组织免疫组化的结果一致。Twist在肺大细胞癌中的表达较低, 具体机制有待进一步研究。Twist在肺癌细胞中表达于细胞浆。此外, 肺癌细胞中Twist mRNA水平与蛋白水平一致, 但如何在转录水平上调Twist的表达, 还有待进一步研究验证。综上所述, 我们的研究提示Twist表达上调可能引起肺泡上皮向肿瘤转化, Twist表达水平与肺癌的分化程度密切相关, 可作为肺癌进展的生物学标志。

参考文献

- 1 Kang Y, Massague J. Epithelial-mesenchymal transitions: Twist in development and metastasis. *Cell*, 2004, 118(3): 277-279.
- 2 Howe LR, Watanabe O, Leonard J, *et al*. Twist is up-regulated in response to Wnt1 and inhibits mouse mammary cell differentiation. *Cancer Res*, 2003, 63(8): 1906-1913.
- 3 Stasiopoulos IA, Mironchik Y, Raman A, *et al*. HOXA5-Twist interaction alters p53 homeostasis in breast cancer cells. *J Biol Chem*, 2005, 280(3): 2294-2299.
- 4 Hamamori Y, Sartorelli V, Ogrysko V, *et al*. Regulation of histone acetyltransferases p300 and PCAF by the bHLH protein Twist and adenoviral oncoprotein E1A. *Cell*, 1999, 96(3): 405-413.
- 5 Kwok WK, Ling MT, Lee TW, *et al*. Up-regulation of Twist in prostate cancer and its implication as a therapeutic target. *Cancer Res*, 2005, 65(12): 5153-5162.
- 6 Hosono S, Kajiyama H, Terauchi M, *et al*. Expression of Twist increases the risk for recurrence and for poor survival in epithelial ovarian carcinoma patients. *Br J Cancer*, 2007, 96(2): 314-20.
- 7 Elias MC, Tozer KR, Silber JR, *et al*. Twist expressed in human gliomas and promotes invasion. *Neoplasia*, 2005, 7(9): 824-837.
- 8 Yang J, Mani SA, Donaher JL, *et al*. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell*, 2004, 117(7): 927-939.
- 9 Mironchik Y, Winnard PT, Vesuna F, *et al*. Twist overexpression induces *in vivo* angiogenesis and correlates with chromosomal instability in breast cancer. *Cancer Res*, 2005, 65(23): 10801-10809.
- 10 Horikawa T, Yang J, Kondo S, *et al*. Twist and epithelial-mesenchymal transition are induced by the EBV oncoprotein latent membrane protein 1 and are associated with metastatic nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res*, 2007, 67(5): 1970-1978.
- 11 Zhang Z, Xie D, Li X, *et al*. Significance of Twist expression and its association with E-cadherin in bladder cancer. *Hum Pathol*, 2007, 38(4): 598-606.
- 12 Hoek K, Rimm DL, Williams KR, *et al*. Expression profiling reveals novel pathways in the transformation of melanocytes to melanomas. *Cancer Res*, 2004, 64(15): 5270-5282.
- 13 Yuen HF, Chan YP, Wong ML, *et al*. Upregulation of Twist in oesophageal squamous cell carcinoma is associated with neoplastic transformation and distant metastasis. *J Clin Pathol*, 2007, 60(5): 510-514.
- 14 Ansieau S, Bastid J, Doreau A, *et al*. Induction of EMT by Twist proteins as a collateral effect of tumor-promoting inactivation of premature senescence. *Cancer Cell*, 2008, 14(1): 79-89.

(收稿: 2008-12-31 修回: 2009-01-15)
(本文编辑 南娟)

· 启事 ·

关于公布第十九批允许发布处方药广告的医学药学专业刊物的通知

国食药监市[2008]713号

<http://www.sda.gov.cn/directory/web/WS01/CL0055/34688.html>

2008年12月03日 发布

各省、自治区、直辖市食品药品监督管理局(药品监督管理局)、卫生厅(局),新疆生产建设兵团食品药品监督管理局:根据《中华人民共和国药品管理法》第十六条规定,经卫生部和国家食品药品监督管理局共同审核,认定《中国肺癌杂志》等3个医学、药学专业刊物(见附件)可发布处方药广告。

根据新闻出版总署《关于〈中药研究与信息〉等2期刊物变更登记项目的函》(新出报刊〔2005〕1137号),同意更名后的《中国现代中药》杂志可以发布处方药广告。

特此通知。

附件:允许发布处方药广告的医学、药学专业刊物名单

国家食品药品监督管理局
二〇〇八年十二月三日

附件:允许发布处方药广告的医学、药学专业刊物名单

序号	刊物中文名称	CN刊号	登记地	广告经营许可证号
1	中国肺癌杂志	CN12-1395/R	天津市	1201024000660号
2	中国民族民间医药	CN53-1102/R	昆明市	5300004000105号
3	中国卒中杂志	CN11-5434/R	北京市	京海工商广字第0302号