

· 基础研究 ·

人肺癌EGFR基因突变与Gefitinib耐药相关性研究

魏巍 范羽 刘红雨 吴志浩 万海粟 阎志琴 徐克 周清华

【摘要】背景与目的 以人肺癌细胞株PC9及其耐药子系细胞PC9/AB2、PC9/AB11、PC9/BB4为模型,观察4株细胞对Gefitinib的耐药差异及耐药机制。方法 体外培养细胞测定耐药指数,对4株细胞EGFR基因exon18-21进行测序并在mRNA水平上的测定表达量差异。结果 PC9及其3株耐药子系细胞均存在耐药性差异。PC9及其3株耐药子系细胞均存在19外显子15 bp缺失突变并且耐药细胞株PC9/AB11外显子20存在A→G的点突变。敏感细胞株PC9的EGFR基因在mRNA水平上的表达量明显高于其他3株耐药株。结论 PC9、PC9/AB2、PC9/AB11和PC9/BB4肺癌细胞株对Gefitinib的耐药性存在非常显著的差异,4株肺癌细胞株EGFR基因突变和mRNA表达水平的差异与其与Gefitinib获得性耐药有关。

【关键词】 EGFR 基因; 耐药; Gefitinib; 肺肿瘤

【中图分类号】 R734.2 DOI:10.3779/j.issn.1009-3419.2009.01.004

Relationship between Mutations of the Epidermal Growth Factor Receptor Gene and Drug-Resistance to Gefitinib in Human Lung Cancer *in vitro*

Wei WEI[#], Yu FAN^{**}, Hongyu LIU[#], Zhihao WU[#], Haisu WAN[#], Zhiqin YAN[#], Ke XU[#], Qinghua ZHOU[#]

[#]Tianjin Lung Cancer Institute, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin 300052, China; ^{**}The Key Laboratory of Lung Cancer Molecular Biology in Sichuan Province, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

Corresponding author: Qinghua ZHOU, E-mail: zhouqh1016@yahoo.com.cn

【Abstract】 Background and objective To explore cell lines' difference of drug-resistance to gefitinib and the underlying mechanism. **Methods** Human lung cancer cell lines of PC9, PC9/AB2, PC9/AB11, PC9/BB4 were treated *in vitro*, exons 18-21 of EGFR gene were sequenced and EGFR gene mRNA levels were measured. **Results** Four cell lines' drug resistance difference of gefitinib were validated. All the four cell lines had the 15 bp deletion at exon 19, and AB11 had A to G point-mutation at exon 20. PC9 EGFR gene in the sensitive cell line was expressed much higher than that in 3 resistance cell lines by real-time PCR. **Conclusion** There is significant difference of drug-resistance to gefitinib existed among the lung cancer cell lines PC9, PC9/AB2, PC9/AB11 and PC9/BB4. The mutations changes of expressive level of EGFR gene might be correlated with the acquired drug-resistance to gefitinib in lung cancer cell lines.

【Key words】 EGFR genes; Resistance; Gefitinib; Lung neoplasms

This study was supported by the grants from National High Technology Research and Development Program of China (to Qinghua ZHOU)(No.2006AA02A401), the National High Technology Joint Research Program of China (to Qinghua ZHOU)(No.2006DFB32330) and the National Key Technology Research and Development Program of China (to Qinghua ZHOU)(No.2006BAI02A01).

肺癌是目前发病率和死亡率最高的恶性肿瘤, EGFR 基因在肿瘤的发生发展过程中起着十分重要的作用。针对 EGFR 基因的研究、针对 EGFR 基因靶向药物的研究是

目前肺癌治疗的热点之一。

EGFR 在上皮、间质、神经源性组织中都有表达, 在调节正常细胞的增生、生长和分化中起着重要作用。研究表明在许多实体肿瘤中存在 EGFR 的高表达或异常表达。在肺癌中 EGFR 的过表达在鳞癌多见 (84%), 腺癌及大细胞癌次之 (65%-68%), SCLC 罕见^[1-3]。EGFR 与肿瘤细胞的增殖、血管生成、肿瘤侵袭、转移及细胞凋亡的抑制有关。其可能机制有: EGFR 的高表达引起下游信号传导的增强; 突变型 EGFR 受体或配体表达的增加导致 EGFR 的持续活化; 自分泌环的作用增强; 受体下调机

本研究受国家863重大项目 (No.2006AA02A401)、科技部国家合作重大项目攻关 (No.2006DFB32330) 和国家“十一五”科技攻关项目 (No.2006BAI02A01) 资助

作者单位: 300052 天津, 天津医科大学总医院天津肺癌研究所 (魏巍, 范羽, 刘红雨, 吴志浩, 万海粟, 阎志琴, 徐克, 周清华); 610041 成都, 四川大学华西医院肺癌分子生物学重点实验室 (范羽) (通讯作者: 周清华, E-mail: zhouqh1016@yahoo.com.cn)

制的破坏;异常信号传导通路的激活等。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 人肺腺癌细胞株PC9及其子系细胞PC9/AB2、PC9/AB11、PC9/BB4,由同济大学附属上海市肺科医院肿瘤研究所周新存教授惠赠。

1.1.2 药物及处理 吉非替尼(Gefitinib;商品名为易瑞沙,Iressa)系英国阿斯利康(astrazeneca)公司产品250 mg,10片装。取1片Iressa(有效成分250 mg)于有盖无菌瓶中,加入22.37 mL DMSO,于摇床震荡至完全融解,此时配制成25 mmol/L的母液。摇匀后取0.1 mL母液,加入100 mL DMEM培养基,配成25 μM适用液,备用。(DMSO终浓度<0.1%,不引起细胞生物学性状的变化)耐药细胞株PC9/AB2、PC9/AB11、PC9/BB4以0.05 μM的Iressa培养维持其耐药性。敏感细胞株PC9加入相应DMSO培养致细胞稳定生长。

1.2 方法

1.2.1 细胞毒性实验 将不同梯度浓度Iressa分别作用于PC9、PC9/AB2、PC9/AB11、PC9/BB4细胞,每株细胞均取12个浓度梯度药物来处理细胞,并将0 μM Iressa浓度设为对照组细胞,72 h后细胞计数各株细胞在不同浓度Iressa下活细胞数,并计算细胞抑制率。细胞抑制率=(对照组细胞计数-实验组细胞计数)/对照组细胞计数

×100%。

1.2.2 EGFR基因突变检测 取处于对数生长期的PC9及其子系细胞PC9/AB2、PC9/AB11、PC9/BB4,提取4种细胞总DNA应用Primer5引物设计软件设计EGFR基因外显子18-21,引物序列见表1。扩增产物由上海生工生物公司进行,应用ABI PRISM 3730测序仪,应用Big Dye terminator V3.1试剂进行测序。

1.2.3 EGFR基因表达量差异的研究 取处于对数生长期的PC9及其子系细胞PC9/AB2、PC9/AB11、PC9/BB4,提取新鲜细胞的总RNA以GAPDH为内参应用real-time PCR方法测定在mRNA水平上EGFR基因表达量的差异。引物序列见表2。

1.2.4 统计分析 所得人肺癌细胞株PC9及其耐药子系细胞在不同浓度Iressa作用后所得细胞抑制率数据应用SPSS 13.0及Excel统计软件进行分析,采用卡方检验,多样本Logistic回归及Dunnetts's C法进行分析。

2 结果

2.1 绘制PC9、PC9/AB2、PC9/AB11、PC9/BB4,4种细胞在细胞计数法测得得生长抑制情况见图1。

2.2 四株细胞IC₅₀(半数抑制率)计算 应用Excel及SPSS软件,Logit回归分析,计算4种细胞的IC₅₀(见表3)四株细胞株之间IC₅₀有非常明显的统计学差异。应用Dunnetts's C法进行两两比较,细胞间两两比较均具有明

表1 PCR引物序列,退火温度及PCR产物片断

Tab 1 Sequences, Tm of PCR primers and product length

Exon	Primers	Tm (°C)	Products (bp)
18 R	5'- AAT GAG CTG GCA AGT GCC GTG TCC TG-3'	68	425
F	5'- CCT CTC AAT AAC TTG GGA AAA ACA CTG-3'	62	
19 R	5'- AGC CCC CAG CAA TAT CAG CCT TAG GTG-3'	68	446
F	5'- ATG GGA GAG GCC AGT GCT GTC TCT AAG-3'	68	
20 R	5'- GCA TTC ATG CGT CTT CAC CTG GAA GG-3'	66.4	385
F	5'- GCA CAC ACA TAT CCC CAT GGC AAA CTC-3'	66.5	
21 R	5'- CGC CAG CCA TAA GTC CTC GAC GTG GAG-3'	71	386
F	5'- TCT GGA GAG CAT CCT CCC CTG CAT GTG-3'	70	

表2 real-time PCR引物序列,退火温度及PCR产物片断

Tab 2 Sequences, Tm of PCR primers and product length

Gene sequences	Primers	Tm (°C)	Products (bp)
EGFR R	5'-GGC CGA CAG CTA TGA GAT CCA-3'	61.8	186
F	5'-ACC GGC AGG ATG TGG AGA TC-3'	61.4	
GAPDH R	5'-CTT AGC ACC CCT GGC CAA G-3'	62.0	151
F	5'-GAT GTT CTG GAG AGC CCC G-3'	62.0	

表3 PC9及其子系细胞在细胞计数法下的IC₅₀

Tab 3 50% inhibiting concentrations of PC9, PC9/AB2, PC9/AB11 and PC9/BB4 by cell-count method

Cell-lines	IC ₅₀ (μmol/L)
PC-9	0.011 ± 0.0047
PC-9/AB11	2.01 ± 0.19
PC-9/AB2	0.81 ± 0.12
PC-9/BB4	1.48 ± 0.17
P	<0.001

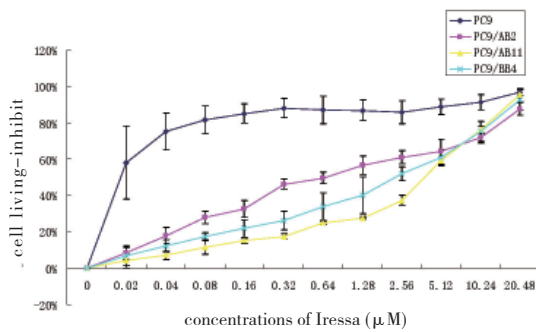


图1 细胞计数法测定PC9及其子系细胞PC9/AB2、PC9/AB11、PC9/BB4细胞生长抑制率曲线

Fig 1 The living-inhibit curve of the cell lines of PC9, PC9/AB2, PC9/AB11 and PC9/BB4 by cell-count method

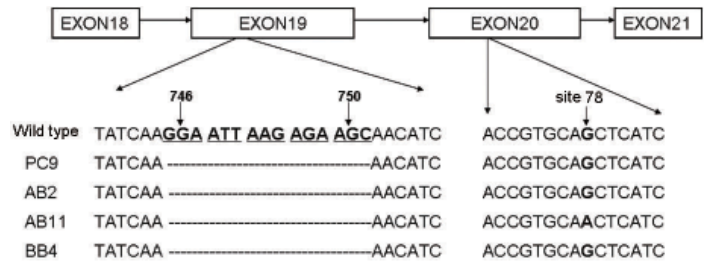


图2 PC9及其子系EGFR基因突变

Fig 2 The mutations of PC9/AB2, PC9/AB11 and PC9/BB4 from PC9 cell-line

表4 PC9及其子系real-time PCR之Raw RQ值

Tab 4 Raw RQ of PC9, PC9/AB2, PC9/AB11 and PC9/BB4 of real-time PCR

Cells	-Log ₁₀ RQ ₁	-Log ₁₀ RQ ₂	-Log ₁₀ RQ ₃	-Log ₁₀ RQ ₄	Mean of -Log ₁₀ RQ	P value
PC9	0 ± 0.04	0 ± 0.03	0 ± 0.03	0 ± 0.03	0 ± 0.03	
AB2	0.43 ± 0.01	0.42 ± 0.02	0.58 ± 0.03	0.47 ± 0.03	0.48 ± 0.02	<0.001
AB11	0.21 ± 0.02	0.23 ± 0.01	0.21 ± 0.00	0.50 ± 0.04	0.29 ± 0.02	0.007
BB4	0.41 ± 0.04	0.17 ± 0.02	0.24 ± 0.00	0.50 ± 0.04	0.33 ± 0.03	0.008

显著的统计学差异 ($P < 0.001$)，即四株细胞间耐药性有明显差异。耐药性以PC9/AB11最强，PC9/BB4次之，PC9/AB2较弱，PC9最弱。

2.3 PC9、PC9/AB2、PC9/AB11、PC9/BB4四株细胞EGFR基因19-21外显子突变EGFR基因原始序列(野生型)由Gene Bank NC_000007中查得，将PCR产物测序结果与野生型EGFR原始基因进行比较，基因突变如图2，可见与野生型相比，PC9及其子系细胞均有外显子19的15 bp缺失，导致EGFR第746-750位氨基酸序列(ELREA)缺失。除此之外，耐药株细胞PC9/AB11在外显子20的第78位碱基上存在A→G的点突变，但这个点突变并不引起氨基酸序列的变化，所对应的氨基酸均为谷氨酰胺。

2.4 四株细胞EGFR基因表达量的差异 以Gefitinib敏感细胞株PC9为参照组，其real-time PCR Raw RQ值设为1得出其余三株耐药子系-Log₁₀ RQ值，分别进行4次独立实验所得-Log₁₀ RQ值如表4。应用F检验行统计分析发现：四株细胞之间EGFR基因在mRNA水平上的表达有统计学差异。应用Dunnetts's C法进行两两比较得出：PC9细胞与三株耐药子细胞株EGFR基因的real-time结果比较均有明显的统计学差异 ($P < 0.01$)，而三株耐药子系细胞之

间没有明显的统计学差异 ($P > 0.05$)。

3 讨论

肺癌是目前发病率和死亡率最高的恶性肿瘤，其治疗也成为人们关注的焦点，传统的化疗和放疗由于缺乏特异性，取得疗效的同时也往往给患者带来较大的毒副作用。因此，针对不同分子遗传学背景的群体或/个体，根据其对药物敏感性相关基因或基因群表达谱的差异，进行有选择性的“个体化”治疗，以使疗效达到最优化，毒性最低化。这也是突破目前NSCLC化疗疗效进入“瓶颈”的希望所在^[4]。

PC-9细胞为Gefitinib高度敏感的肺腺癌细胞，来自于日本的一名未接受治疗的女性患者。PC9细胞EGFR基因天然性的外显子19的缺失 (delE746-A750)使EGFR-ATP结合囊(ATP-binding pocket, ABP)的角度改变，故其对Gefitinib敏感。

已有研究表明，发生在EGFR-TK结构域的突变共有486个^[6-17]。突变集中在18-21外显子，其突变比例分别为4.7%，44%，9.3%和42%。19外显子上的突变均位于K745附近，而K745是ATP结合的关键部位^[18]。缺失突变几乎均可引起酪氨酸激酶结构域中LREA 4个氨基酸残

基的缺失,从而导致EGFR-ATP受体结合囊角度改变,使Gefitinib更易于与ATP竞争而结合到该位点, Gefitinib通过结合于EGFR激酶域ATP口袋阻止ATP进入而阻断EGFR激酶活性^[19],从而阻断EGFR下游信号通路,包括MAPK通路以及PI3K通路等,进而抑制细胞增殖分化,并诱导凋亡^[20,21]。外显子20会发生点突变或碱基插入突变,点突变主要是第790位密码子出现C→T转换,引起EGFR蛋白中该位点的氨基酸由苏氨酸转变为甲硫氨酸(T790M),这一突变仅见于药物治疗后复发者,突变使得肿瘤细胞对Gefitinib产生抗性^[22]。本实验所测得的PC9及其子系细胞均不存在该点突变。碱基插入突变出现在第770-775位密码子,在GACAACCCACGTGTGC序列之间(主要在CCCC序列两侧)存在8种不同的插入方式,插入的片段为3-9个碱基。外显子21的点突变主要是第858位密码子出现T→G转换,引起EGFR蛋白中该位点的氨基酸由亮氨酸转变为精氨酸(L858R),此突变作用是使活化环A-loop的稳定性提高,肿瘤细胞对吉非替尼的敏感性明显增强。另外本研究还发现PC9/AB11外显子20中存在第78位A→G突变,使得密码子CAA→CAG,但所对应的氨基酸均为谷氨酰胺,属于密码子的简并性,并不造成氨基酸序列的改变。除此之外敏感株细胞PC9与耐药株细胞PC9/AB2、PC9/BB4外显子18-21并无碱基差异。

荧光定量PCR技术是近年来发展起来的新技术,是在PCR反应体系中加入荧光基团,利用荧光信号检测整个PCR进程,由于利用了光谱技术同普通PCR相比具有更高灵敏性,可定量及避免扩增后的污染等优点。本实验采用实时定量荧光PCR方法研究PC9及耐药其子系细胞EGFR基因在mRNA水平上表达量的差异,结果表明:①敏感细胞株PC9与三株耐药子系细胞之所以出现如此之大的耐药性差异与EGFR基因高表达有关。因为PC9细胞及其子系细胞EGFR基因exon19存在15 bp缺失突变,使Gefitinib更易于结合于酪氨酸激酶结构域的ATP结合区域,故这种突变增强了细胞对Gefitinib的敏感性。三株耐药子系细胞EGFR基因表达量明显低于敏感细胞株PC9,所产生的突变型EGFR量也较敏感细胞株少,药物Gefitinib对细胞所产生的抑制作用也较敏感株弱,耐药性增强,IC₅₀数值显著提高。②三株耐药子系之间EGFR基因在mRNA水平上没有明显的表达量差异(P>0.05)。说明PC9/AB2、PC9/AB11、PC9/BB4之间之所以出现耐药性差异与EGFR表达水平无明显相关性,可能存在其他耐药性机制如:丰富的EGFR旁路^[23-25]、EGFR下游效应分子的结构性活化^[26,27]、EGFR同

源二聚体与异源二聚体比例的改变^[28]等。

参考文献

- 1 Fukuoka M, Yano S, Giaccone G, *et al*. Multi-institutional randomized phase II trial of Gefitinib for previously treated patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*, 2003, 21(12): 2237-2246.
- 2 Baselga J. Why the epidermal growth factor receptor? The rationale for cancer therapy. *Oncologist*, 2002, 7 Suppl 4: 2-8.
- 3 Parra HS, Cavina R, Latteri F, *et al*. Analysis of epidermal growth factor receptor expression as a predictive factor for response to gefitinib ('Iressa', ZD1839) in non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer*, 2004, 91(2): 208-212.
- 4 Zhou QH, Wu ZH. Toward a "tailored" era for basic research and clinical therapy of lung cancer. *Chin J Lung Cancer*, 2008, 11(1): 1-3. [周清华, 吴志浩. 肺癌基础研究和临床治疗的"个体化"时代. *中国肺癌杂志*, 2008, 11(1): 1-3.]
- 5 Kosaka T, Yatabe Y, Endo H, *et al*. Mutations of the epidermal growth factor receptor gene in lung cancer: biological and clinical implications. *Cancer Res*, 2004, 64(24): 8919-8923.
- 6 Shigematsu H, Lin L, Takahashi T, *et al*. Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers. *J Natl Cancer Inst*, 2005, 97(5): 339-346.
- 7 Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, *et al*. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med*, 2004, 350(21): 2129-2139.
- 8 Paez JG, Jänne PA, Lee JC, *et al*. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science*, 2004, 304(5676): 1497-1500.
- 9 Pao W, Miller V, Zakowski M, *et al*. EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(36): 13306-13311.
- 10 Huang SF, Liu HP, Li LH, *et al*. High frequency of epidermal growth factor receptor mutations with complex patterns in non-small cell lung cancers related to gefitinib responsiveness in Taiwan. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(24): 8195-8203.
- 11 Kosaka T, Yatabe Y, Endo H, *et al*. Mutations of the epidermal growth factor receptor gene in lung cancer, biological and clinical implications. *Cancer Res*, 2004, 64(24): 8919-8923.
- 12 Qin BM, Chen X, Zhu JD, *et al*. Identification of EGFR kinase domain mutations among lung cancer patient in China: implication for targeted cancer therapy. *Cell Res*, 2005, 15(3): 212-217.
- 13 Chou TY, Chiu CH, Li L H, *et al*. Mutation in the tyrosine kinase domain of epidermal growth factor receptor is a predictive and prognostic factor for gefitinib treatment in patients with non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(10): 3750-3757.
- 14 Yang SH, Mechanic LE, Yang P, *et al*. Mutations in the tyrosine kinase domain of the epidermal growth factor receptor in non-small cell lung

- cancer. Clin Cancer Res, 2005, 11(6): 2106-2110.
- 15 Mu XL, Li LY, Zhang XT, *et al.* Gefitinib-sensitive mutations of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase domain in Chinese patients with non-small cell lung cancer. Clin Cancer Res, 2005, 11(12): 4289-4294.
 - 16 Kobayashi S, Boggon TJ, Dayaram T, *et al.* EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. N Engl J Med, 2005, 352(8): 786-792.
 - 17 Pao W, Miller VA, Politi KA, *et al.* Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. PLoS Med, 2005, 2(3): e75.
 - 18 Honegger AM, Dull TJ, Felder S, *et al.* Point mutation at the ATP binding site of EGF receptor abolishes protein-tyrosine kinase activity and alters cellular routing. Cell, 1987, 51(2): 199-209.
 - 19 Liu VW, Grandis JR. EGFR-mediated cell cycle regulation. Anticancer Res, 2002, 22(1A): 1-11.
 - 20 Zhang P, Wang YZ, Kagan E, *et al.* Peroxynitrite targets the epidermal growth factor receptor, Raf-1, and MEK independently to activate MAPK. J Biol Chem, 2000, 275(29): 22479-22486.
 - 21 Fukuoka M, Yano S, Giaccone G, *et al.* Multi-institutional randomized phase II trial of Gefitinib for previously treated patients with advanced non-small-cell lung cancer. J Clin Oncol, 2003, 21(12): 2237-2246.
 - 22 Pao W, Wang TY, Riely GJ, *et al.* KRAS mutations and primary resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib and erlotinib. PLoS Med, 2005, 2(1): e17.
 - 23 Jones HE, Goddard L, Gee JM, *et al.* Insulin-like growth factor- I receptor signaling and acquired resistance to gefitinib (ZD1839; Iressa) in human breast and prostate cancer cells. Endocr Relat Cancer, 2004, 11(4): 793-814.
 - 24 Morgillo F, Kim WY, Kim ES, *et al.* Implication of the insulin-like growth factor-IR pathway in the resistance of non-small cell lung cancer cells to treatment with gefitinib. Clin Cancer Res, 2007, 13(9): 2795-2803.
 - 25 Jones HE, Gee JM, Hutcheson IR, *et al.* Growth factor receptor interplay and resistance in cancer. Endocr Relat Cancer, 2006, 13 Suppl 1: S45-51.
 - 26 Uchida A, Hirano S, Kitao H, *et al.* Activation of downstream epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling provides gefitinib-resistance in cells carrying EGFR mutation. Cancer Sci, 2007, 98(3): 357-363.
 - 27 Massarelli E, Varella-Garcia M, Tang X, *et al.* KRAS mutation is an important predictor of resistance to therapy with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancer. Clin Cancer Res, 2007, 13(10): 2890-2896.
 - 28 Sordella R, Bell DW, Haber DA, *et al.* Gefitinib-sensitizing EGFR mutations in lung cancer activate anti-apoptotic pathways. Science, 2004, 305(5687): 1163-1167.

(收稿: 2008-10-06 修回: 2008-10-22)

(本文编辑 李博)

· 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