

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2009.10.006

PTEN/PI3K/Akt 信号通路对 K562 细胞凋亡调控的研究

成志勇¹, 梁文同¹, 牛志云³, 李颖军¹, 尚雪飞², 杨宁¹, 焦婷³, 潘陵³

Regulatory of PTEN/PI3K/Akt Pathway on Apoptosis of K562 Cells

CHENG Zhi-yong¹, LIANG Wen-tong¹, NIU Zhi-yun³, LI Ying-jun¹, SHANG Xue-fei², YANG Ning¹, JIAO Ting³, PAN Ling³

1. Department of Hematology and Oncology, The First Hospital of Baoding, Baoding 071000, China, 2. Department of Pathology; 3. Department of Hematology, The Second Hospital of Hebei Medical University

Corresponding Author: Pan Ling, E-mail: lingpan20002000@yahoo.com.cn

Abstract: Objective To investigate the effect of PTEN/PI3K/Akt signal pathway on cell proliferation, apoptosis and its possible apoptosis-related molecular mechanism on human chronic myeloid leukemia (CML) cell line K562 cells. **Methods** The recombinant adenovirus containing green fluorescent protein (GFP) and PTEN (Ad-PTEN-GFP) or empty vector (Ad-GFP) was transfected into K562 cells. The growth of K562 cells was observed by MTT assay; the apoptosis rate and proliferation index (PI) were assessed by flow cytometry (FCM). We also detected apoptosis by morphology, DNA and transmission electron microscope technique; PTEN together with anti-apoptosis gene Bcl-2, Bcl-x_L mRNA and apoptosis gene Bax mRNA levels were detected by real-time fluorescent relative-quantification reverse transcriptional PCR (FQ-PCR). PTEN and p-Akt protein levels were detected by western blotting. **Results** Compared with Ad-GFP growth, the growth of K562 cells transfected by Ad-PTEN-GFP was suppressed markedly, proliferation index (PI) was down regulated, apoptosis rate risen and p-Akt expression levels decreased but not total Akt; Bcl-2, Bcl-x_L mRNA levels descend and Bax mRNA level increased after transfected with wild type PTEN. **Conclusion** Over expression PTEN gene might inhibit K562 cells proliferation and promote cell apoptosis via down regulation PI3K/Akt pathway.

Key words: PTEN gene; K562 cell line; Proliferation index; PI3K/Akt

摘要:目的 探讨 PTEN/PI3K/Akt 信号传导通路对人慢性粒细胞白血病细胞系 K562 的增殖、凋亡调控的研究及可能的分子作用机制。**方法** 将携带有野生型 PTEN 及绿色荧光蛋白的腺病毒(Ad-PTEN-GFP)及空载体(Ad-GFP)腺病毒,转染人慢性粒细胞白血病细胞系 K562。通过 MTT 检测细胞生长曲线,流式细胞术检测细胞凋亡率和细胞增殖指数,同时用细胞光镜、电镜形态等方法检测细胞凋亡,荧光定量 PCR(FQ-PCR)检测 PTEN 及凋亡相关基因 Bcl-2、Bcl-x_L、Bax mRNA 水平变化,Western blot 检测 PTEN 及 Akt、p-Akt 蛋白水平变化。**结果** 与 Ad-GFP 组相比,Ad-PTEN-GFP 转染 K562 细胞后,细胞增殖受抑,增殖指数降低,凋亡率增加,p-Akt 表达降低,抗凋亡相关基因 Bcl-2、Bcl-x_L mRNA 表达降低,促凋亡基因 Bax mRNA 表达增加。**结论** 过表达 PTEN 可能通过抑制 PI3K/Akt 通路抑制 K562 细胞系增殖,促进细胞凋亡。

关键词: PTEN 基因; K562 细胞系; 增殖指数; PI3K/Akt

中图分类号: R733.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2009)10-0828-05

0 引言

癌基因与抑癌基因调控失常均可引起细胞增殖失控导致肿瘤发生。在多数肿瘤类型中,尤其是白血病、淋巴瘤中,这些基因表达水平的异常变化为疾病的分类提供了基础,并有助于判断个体患者的预后。癌基因的激活和抑癌基因的失活参与了多种肿瘤的发生与进展,通常预示预后不良。

收稿日期:2008-03-03;修回日期:2008-10-13

基金项目:河北省自然科学基金资助项目(C200500745)

作者单位:1. 071000 河北省保定市第一医院血液肿瘤科,2. 病理科;3. 河北医科大学第二医院血液内科

通信作者:潘陵, E-mail: lingpan20002000@yahoo.com.cn

作者简介:成志勇(1976-),男,博士,主治医师,主要从事血液肿瘤专业研究

抑癌基因:10 号染色体上缺失的磷酸酶与张力蛋白同源物 (phosphatase and tensin homology deleted on chromosome ten gene, PTEN) 基因表达产物具有脂质磷酸酶和蛋白磷酸酶活性,发挥双重肿瘤抑制功能^[1-2],PTEN 蛋白表达降低及缺失可影响其肿瘤抑制功能。目前在大多实体瘤如乳腺癌、前列腺癌、子宫内膜癌、恶性胶质瘤中 PTEN 基因存在不同程度的突变缺失,而 PTEN 对造血系统疾病影响的研究也逐渐增多^[3-5]。多项研究表明,PTEN 基因在白血病中突变罕见,但存在不同程度的缺失和低表达。PTEN 能够抑制 PI3K/Akt 途径的活性,从而抑制了白血病的进展。在人慢性粒细胞白血病急变细胞系 K562 细胞中,有低水平的 PTEN 基因及蛋白表达^[3]。我们以重组腺病毒为载体,将野生型 PTEN 基因体外转染 K562 细胞系,使其过表达后,观察其对细胞增殖和凋亡的影响,以及可能的分子作用机制,为基因治疗白血病提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 逆转录反应体系、SYBR Green Real Master Mix(北京天根);PTEN、Akt、SER 473 p-Akt、GAPDH 单克隆抗体(Santa Cruz, USA)、HRP 标记的山羊抗鼠二抗(北京鼎国生物)。

1.1.2 重组腺病毒 Ad-PTEN-GFP 和 Ad-GFP 由上海吉凯生物公司合成并鉴定,在 293A 细胞中进行扩增及滴度测定。

1.1.3 细胞系 人胚肾细胞系 293A 细胞用于腺病毒扩增,用含 10%胎牛血清高糖 DMEM 培养液培养,人慢性粒细胞白血病急变细胞系 K562 细胞用含 10%胎牛血清 RPMI 1640 培养液培养;均在 37℃、5%CO₂、饱和湿度环境孵育。两种细胞为本实验室长期保存品种。

1.2 方法

1.2.1 病毒转染及效率的测定 按感染复数 (Multiplicity of infection, MOI) 为 200,在 100 μl 无血清培养液中加入病毒液后加入 K562 细胞中,37℃、5%CO₂ 培养 2 h,加入含 10%胎牛血清 RPMI 1640 培养液继续培养。直接用流式细胞仪检测表达绿色荧光蛋白的细胞比例计算转染效率。

1.2.2 细胞形态学观察 设置 MOI 为 200,将 Ad-PTEN-GFP 和 Ad-GFP 分别转染 K562 细胞。5 天后将细胞离心,PBS 清洗 2 次,涂片后 Wright 染色,光镜下观察细胞形态变化。

1.2.3 透射电镜观察细胞的超微结构变化 收集转染 Ad-PTEN-GFP 和 Ad-GFP 5 天的 K562 细

胞,4%戊二醛固定过夜,1%锇酸固定 1 h,PBS 充分清洗。梯度乙醇脱水,丙酮浸透,包埋,超薄切片,醋酸双氧铀-柠檬双染,HITACHI 1200ES 型透射电镜观察并拍照。

1.2.4 细胞生长曲线(MTT 法) 采用 96 孔板,取对数生长期细胞每孔接种 5 000 个,分为对照组、转染空载体腺病毒组、转染 PTEN 组,按 MOI200 转染细胞。于不同时间点每孔加入噻唑兰(MTT) 溶液,孵育 4 h 后离心弃之,另加入二甲基亚砜(DMSO)振荡数分钟,酶标仪检测每孔 A₅₄₀ 值。根据时间及 A 值绘制生长曲线。

1.2.5 细胞周期检测 收集转染不同时间的细胞,每组收集 1 × 10⁶ 个,70%乙醇 4℃ 固定过夜;加入 RNA 酶,37℃ 水浴消化 15~30 min 后加入碘化丙啶(PI),4℃ 存放 15 min 以上,流式细胞仪检测,分析凋亡率及计算增殖指数。增殖指数(PI) = (S + G₂/M)/(G₀/G₁ + S + G₂/M)。

1.2.6 实时荧光定量 PCR (1)收集不同组 K562 细胞,TRIzol 提取细胞总 RNA,电泳鉴定 RNA 并定量,逆转录合成 cDNA。(2)实时荧光定量 PCR 反应:SYBR 反应体系共 25 μl。反应条件为 94℃ 5 min,94℃ 45 s,60℃ 1 min,30 循环,设空白对照。PCR 反应前 3~15 个循环的荧光信号作为荧光本底信号,调节基线至适宜处,各荧光曲线与基线交叉点的循环数即为 Ct 值。根据 $\Delta C(t) = C(t)$ 目的基因 - C(t)β-actin, $\Delta\Delta C(t) = 2^{-\Delta C(t)}$ 计算目的基因与 β-actin 相对表达量。PCR 引物序列:PTEN:上游 5'-ATACCAGGACCAGAGGAAACC-3',下游 5'-TTGTTCATTATCCGCACGCTC-3'(产物 101 bp);Bcl-2:上游 5'-CATGTGTGTGGAGAGCGTCAA-3',下游 5'-GCCGGTTCAGGTACTCAGTCA-3'(产物大小 83 bp);Bcl-x_L:上游 5'-GTAAACTGGGGTCGCATTGT-3',下游 5'-TGCTGCATTGTTCCCATAGA-3'(产物大小 83 bp);Bax:上游 5'-ACCAAGAAGCTGAGCGAGTGTC-3',下游 5'-TGTCAGCCCATGATGGTTC-3'(产物大小 185 bp);β-actin:上游 5'-CTGGCACCACCTTCTACAAT-3',下游 5'-AATGTCACGCACGATTTCCCGC-3'(产物 382 bp)。

1.2.7 Western 印迹法 收集不同组 K562 细胞,每组 10⁷ 细胞,加入 200 μl 预冷的蛋白裂解液 4℃ 裂解 1 h,冰浴下超声裂解 15 min。18 000 g 4℃ 离心 20 min,取上清用考马斯亮蓝试剂盒测定蛋白浓度,分装后置 -20℃ 保存。取 80 μg 样品蛋白质加入等体积上样缓冲液,经 5%浓缩胶和 10%SDS-PAGE 凝胶电泳后,用水浴式电转仪转至硝酸纤维素膜上。

经 5%BSA 37℃ 封闭 1 h, 分别加入 1:500 稀释的小鼠抗人单克隆抗体, 4℃ 培育过夜。TBS 漂洗 5 min × 3 次, 加入 HRP 标记的山羊抗小鼠二抗, 37℃ 孵育 1 h, TBS 漂洗 5 min × 3 次。化学发光法检测后分析结果。

1.2.8 统计学方法 两样本均数比较采用 *t* 检验, 率的比较采用 χ^2 检验或确切概率法。所有数据用 SAS 8.0 统计软件分析处理, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

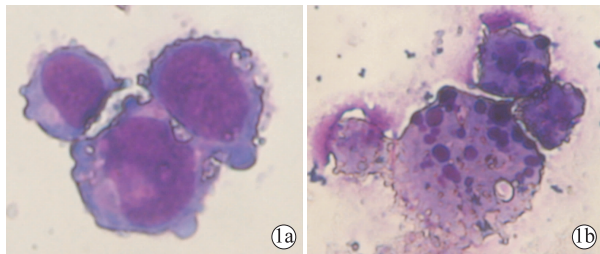
2 结果

2.1 重组腺病毒的转染效率

当 MOI 为 200 时, 流式细胞仪检测腺病毒感染 K562 细胞效率为 $(81.2 \pm 5.4)\%$, 符合基因治疗对载体的要求。

2.2 细胞形态学改变

转染 Ad-GFP 与 Ad-PTEN-GFP 5 天后, 观察两组细胞形态变化, 转染空载体组细胞呈圆形或椭圆形, 体积较大, 染色质疏松, 转染 PTEN 组部分细胞体积缩小, 染色质高度浓缩边集, 核碎裂溶解, 见图 1。



1a: The K562 cells in Ad-GFP group;
1b: The K562 cells in Ad-PTEN-GFP group

图 1 转染腺病毒 5 天后 K562 细胞形态的变化 (Wright × 400)

Figure 1 The morphologic change of K562 cells transfected with Ad-GFP or Ad-PTEN-GFP for 72 h (Wright × 400)

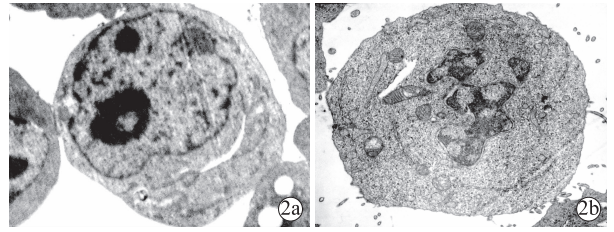
2.3 电镜观察细胞形态结果

如图 2a 所示, 转染 5 天后, 转染 Ad-GFP 组 K562 细胞未见明显凋亡形态。图 2b 所示, 转染 Ad-PTEN-GFP 部分细胞出现凋亡改变(包括细胞膜皱缩和起泡、染色质凝聚、核碎裂和凋亡小体的形成)。

2.4 细胞生长曲线

MTT 法对未转染组, Ad-GFP 组, Ad-PTEN-GFP 组转染 K562 细胞生长情况进行检测, 在 MOI = 200、转染 K562 细胞后第 4~7 天出现区别, 7 天以后细胞荧光逐渐衰减, 细胞生长抑制逐渐减弱, 在第 5 天细胞生长抑制率最大, 约为 35.2%, Ad-GFP

与 Ad-PTEN-GFP 组 A490 值比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 见图 3。



2a: The K562 cells of Ad-GFP group;
2b: The K562 cells of Ad-PTEN-GFP group

图 2 转染腺病毒 5 天后 K562 细胞的超微结构电镜图

Figure 2 The ultramicrostructure change of K562 cells transfected by Ad-GFP or Ad-PTEN-GFP for 5 days

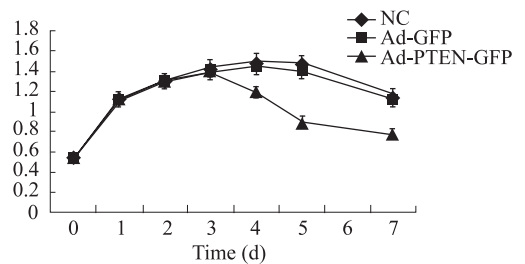


图 3 PTEN 转染 K562 细胞后不同时间生长曲线图

Figure 3 Anti-proliferative effect of PTEN on K562 cells in different days

2.5 细胞周期变化

以 MOI = 200 转染 K562 细胞后, 分别于 2、5、7 天收集各组细胞, 流式细胞仪检测细胞凋亡率及增殖指数。转染 Ad-PTEN-GFP 组与 Ad-GFP 组和正常对照组相比, 凋亡率逐渐增加, 增殖指数逐渐减少, 见表 1。

表 1 转染 K562 细胞后不同时间对照组和 PTEN 组凋亡率和增殖指数 (%)

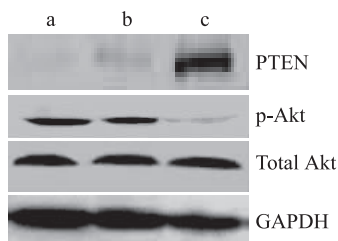
Table 1 The Apoptosis rate and proliferation index after infected K562 cells in different time (%)

Group	Normal Control		Ad-GFP		Ad-PTEN-GFP	
	Apoptosis	PI	Apoptosis	PI	Apoptosis	PI
2d			0.8	41.5	1.5	43.6
5d	0.2	45.1	2.8	38.3	22.4	30.3
7d			4.1	42.1	30	21.5

2.6 PTEN mRNA 及蛋白检测

我们以 MOI = 200 转染 K562 细胞后, 应用实时荧光定量 PCR 检测了不同时间 PTEN mRNA 及 Western blot 检测蛋白表达水平。结果显示在转染第 3 天 PTEN mRNA 及蛋白表达水平达到最高, 与细胞绿色荧光蛋白表达率一致。转染后 3 天, Ad-PTEN-GFP 组 PTEN 表达 mRNA 水平 $(23.58 \pm$

4.52) 及蛋白表达水平 (0.912 ± 0.102) 高于 Ad-GFP 组 mRNA (0.650 ± 0.516) 及蛋白 (0.117 ± 0.028) 表达水平和未转染对照组 mRNA (0.575 ± 0.226) 及蛋白 (0.086 ± 0.021) 表达水平 ($P < 0.01$), 见图 4, 5。



a: Untransfected group; b: Ad-GFP group; c: Ad-PTEN-GFP group

图 4 不同组转染转染 3 天后 PTEN、Akt、p-Akt 蛋白的表达差异

Figure 4 The expression levels of PTEN, Akt, p-Akt protein in K562 cells transfected with or without PTEN gene after 3 days

2.7 转染 PTEN 基因对 p-Akt 表达的影响

Western blot 检测 Akt 及 p-Akt 结果显示, 转染 PTEN 基因 3 天, 总 Akt 表达水平无明显变化, 而 Ser473 p-Akt 表达水平在未转染组、转染 Ad-GFP 组、转染 Ad-PTEN-GFP 组分别为 (0.587 ± 0.078 , 0.547 ± 0.061 , 0.021 ± 0.011), 转染 PTEN 3 天后 p-Akt 表达水平明显减低 ($P < 0.01$), 而总 Akt 无明显改变, 见图 4。同时我们检测了转染 PTEN 基因后不同时间 p-Akt 及总 Akt 表达变化, 结果显示随着 PTEN 蛋白表达水平的变化, p-Akt 表达水平与 PTEN 蛋白表达呈负相关改变, 见图 5。

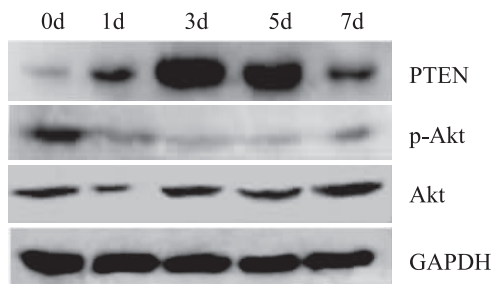


图 5 转染 Ad-PTEN-GFP 不同时间 PTEN、Akt、p-Akt 蛋白的表达水平变化

Figure 5 The expression levels of PTEN, p-Akt and Akt protein in K562 cells transfected with Ad-PTEN-GFP after different days

2.8 凋亡相关基因 Bcl-2、Bcl-x_L、Bax mRNA 检测

细胞转染 3 天后我们检测了上述基因 mRNA 水平的变化, 结果显示未转染组、转染空载体组与转染 PTEN 组分别为: Bcl-2 mRNA (0.732 ± 0.078 ;

0.723 ± 0.148 ; 0.195 ± 0.043), Bcl-x_L mRNA (0.0181 ± 0.0009 ; 0.0176 ± 0.0011 ; 0.0047 ± 0.0008); Bax mRNA (0.376 ± 0.031 ; 0.395 ± 0.036 ; 0.912 ± 0.117), 结果显示空载体组与转染 PTEN 组比较均 $P < 0.01$ 。转染野生型 PTEN 后 Bcl-2 与 Bcl-x_L 抗凋亡基因表达减低, 而促凋亡基因 Bax mRNA 表达升高, 而转染空载体组与未转染组无明显统计学差异。

3 讨论

PTEN 基因是磷酸酶家族中发现的首个肿瘤抑制基因, 通过其蛋白磷酸酶和脂质磷酸酶的活性, 阻断细胞因子介导的信号传导通路, 从而抑制肿瘤细胞生长、侵袭、转移, 促进肿瘤细胞凋亡^[1-2]。在造血系统恶性肿瘤如白血病、淋巴瘤、骨髓瘤及细胞系中, PTEN 基因及蛋白出现不同程度的低表达和表达缺失, 而基因突变、重排少见^[3-6], 其低表达与预后不良相关。PTEN 基因的失活主要是间接失活机制如转录沉默和转录后修饰和甲基化等。

PTEN 基因抑制增殖, 促进凋亡的作用在多种肿瘤细胞中已经得到证实, 而其在造血系统肿瘤及造血细胞中的作用尚不清楚。最近研究发现, PTEN 在区分白血病干细胞和正常造血干细胞中发挥关键作用^[4]。K562 细胞系低表达 PTEN mRNA 及蛋白。我们以腺病毒为载体将外源性野生型 PTEN 基因转染 K562 细胞后, 发现 PTEN 转染组与空载体组及对照组比较, 凋亡率呈时间依赖性增加, 以转染 5 天后最为明显, 在转染 3 天内与对照组比较无显著性差异。

同时通过普通光镜和透射电子显微镜观察到, K562 细胞在转染 PTEN 后 5 天出现凋亡的特征性改变, 可见部分凋亡细胞, 并出现凋亡小体。细胞周期分析显示, 转染 PTEN 后 K562 细胞凋亡率明显增加, 而反映细胞增殖程度的增殖指数逐渐降低。

PI3K/Akt 信号通路是细胞内重要的信号传导通路, 通过激活下游 mTOR、NF- κ B 等通路, 灭活 caspase、诱导细胞周期素等相关基因转录或其转录调控子的生成及调控 Bcl-2 家族成员 Bcl-2、Bcl-x_L 及 Bax 表达的平衡等, 在细胞增殖、凋亡、耐药等多方面发挥重要的生物学功能^[5-7], PTEN 正是通过其磷酸酶活性, 去除 PIP3 第三位磷酸基团, 使之转化为 PIP2, 从而抑制 PI3K/Akt 信号传导通路, 发挥抑制细胞增殖、促进细胞凋亡等生物学作用^[1-3]。另有研究发现 Bcl-x_L 与 Akt 联合表达可以促进小鼠成瘤性转化^[8]。我们检测转染 PTEN 基因后, K562 细胞 p-Akt 表达水平明显降低, 同时凋亡抑制基因

Bcl-2, Bcl-x_L 亦有不同程度的减低而促凋亡基因 Bax 表达升高, 与上述结论相一致。

我们以腺病毒为载体将野生型 PTEN 基因转染 K562 细胞系后明显抑制了细胞的增殖, 促进了细胞凋亡, 推测可能通过抑制 PI3K/Akt 通路间接调控 Bcl-2 家族基因的表达, 从而抑制 K562 细胞系增殖。并为进一步研究 PTEN 在白血病中的抑癌作用的分子机制奠定了初步基础, 同时为 PTEN 基因治疗白血病提供了一定理论依据。

参考文献:

[1] Myers MP, Stolarov JP, Eng C, et al. PTEN, the tumor suppressor from human chromosome 10q23, is a dual-specificity phosphatase[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94 (17): 9052-9057.

[2] Tamura M, Gu J, Matsumoto K, et al. Inhibition of cell migration, spreading, and focal adhesions by tumor suppressor PTEN[J]. Science, 1998, 280(5369): 1614-1617.

[3] Dahia PL, Aguiar RC, Alberta J, et al. PTEN is inversely

correlated with the cell survival factor Akt/PKB and is inactivated via multiple mechanisms in haematological malignancies [J]. Hum Mol Genet, 1999, 8(2): 185-193.

[4] Yilmaz OH, Valdez R, Theisen BK, et al. Pten dependence distinguishes haematopoietic stem cells from leukaemia-initiating cells[J]. Nature, 2006, 441(7092): 475-482.

[5] Blanco-Aparicio C, Peque o B, Moneo V, et al. Inhibition of phosphatidylinositol-3-kinase synergizes with gemcitabine in low-passage tumor cell lines correlating with Bax translocation to the mitochondria[J]. Anticancer Drugs, 2005, 16(9): 977-987.

[6] Xu Q, Simpson SE, Scialla TJ, et al. Survival of acute myeloid leukemia cells requires PI3 kinase activation[J]. Blood, 2003, 102(3): 972-980.

[7] Montiel-Duarte C, Cordeu L, Agirre X, et al. Resistance to Imatinib Mesylate-induced apoptosis in acute lymphoblastic leukemia is associated with PTEN down-regulation due to promoter hypermethylation[J]. Leuk Res, 2008, 32(5): 709-716.

[8] Karnauskas R, Niu Q, Talapatra S, et al. Bcl-x(L) and Akt cooperate to promote leukemogenesis *in vivo* [J]. Oncogene, 2003, 22(5): 688-698.

[编辑:刘红武;校对:贺文]

• 简讯 •

《肿瘤研究与临床》2010 年征订启事

《肿瘤研究与临床》(ISSN 1006-9801, CN11-5355/R)是由中华人民共和国卫生部主管,中华医学会、山西省肿瘤研究所、山西省肿瘤医院主办的肿瘤学专业学术期刊,是中华医学会系列杂志之一,为中国科技核心期刊、中国科技论文统计源期刊、中国生物医学核心期刊、中国肿瘤学类核心期刊。被美国《化学文摘》(CA)、俄罗斯《文摘杂志》(AJ)、荷兰《医学文摘》(EM)、波兰《哥白尼索引》(IC)、美国《剑桥科学文摘(自然版)》(CSA)、美国《乌利希期刊指南》(Ulrich PD)《WHO 西太平洋地区医学索引》(WPRIM)、中国核心期刊(遴选)数据库、中国科技论文与引文数据库(CSTPCD)、万方数据库、中国生物医学文献数据库等国际著名检索期刊及国内各大检索数据库收录。主要栏目:专论、论著、临床研究、技术改进、调查报告、讲座、综述、短篇及个案报告、消息等。报道内容:(1)关于肿瘤发病、诊断治疗的最新基础科学及其临床应用研究;(2)西医、中医、中西医结合治疗肿瘤的临床研究成果;(3)临床病理讨论及疑难病例讨论;(4)肿瘤防治热点问题的述评、评论;(5)癌情监测及调查报告;(6)国内外学术动态及会议报道。

《肿瘤研究与临床》为月刊,每月 28 日出版。页码、定价不变,每期定价 6.00 元,全年 72.00 元,全国各地邮局(所)均可订阅(邮发代号:22-137),同时也可向编辑部直接订阅(联系地址:山西省太原市职工新街 3 号,邮编:030013 联系电话:0351-4650389、4650386,传真 0351-4651415, E-mail: zlyjylc@163.com, 网址: www.zlyjylc.com.cn),免邮寄费。

《肿瘤研究与临床》编辑部