·博士之窗·

三氧化二砷对人肝癌细胞黏附和侵袭影响的实验研究

华海清¹ 秦叔逵² 王锦鸿³ 陈惠英²

摘要 目的 探讨三氧化二砷(亚砷酸,As₂O₃)注射液是否具有抗肝癌细胞黏附和侵袭的作用及其相关机制。**方法** 选用人类肝癌细胞株 SMMC-7721 细胞及裸鼠人类肝癌转移模型为研究对象,通过细胞运动迁移实验、细胞黏附实验和免疫组化方法观察 As₂O₃ 对 SMMC-7721 细胞的运动迁移、与纤维粘连蛋白(FN)、内皮细胞黏附以及裸鼠人肝癌转移模型肝移植瘤表达 CD44 和 MMP-2 基因蛋白的影响。**结果** As₂O₃ 注射液可显著抑制 SMMC-7721 细胞在 FN 上的迁移运动和 SMMC-7721 细胞与 FN、内皮细胞的黏附,并能降低裸鼠肝移植瘤 CD44、MMP-2 的表达。**结论** As₂O₃ 具有抗肝癌细胞黏附和侵袭的作用,其机制可能与 As₂O₃ 能降低肝癌细胞表达 CD44 和 MMP-2 有关。

关键词 三氧化二砷;肝癌细胞;黏附;侵袭;CD44;MMP-2

Study on Effect of Arsenic Trioxide on Adhesion and Invasion of Human Hepatocarcinoma Cells in Vitro HUA Hai-qing, QIN Shu-kui, WANG Jin-hong, et al *The General Hospital of Nanjing PLA Area, Nanjing (210002)*

Objective To explore that the arsenic trioxide injection (ATI) has the effect in antagonizing adhesion and invasion of human hepatocarcinoma cells (HCC), and its relevant mechanism. **Methods** Human hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721 and the high metastatic nude mice human HCC in situ transplantation model was taken as the objects of study, the effects of ATI on the SMMC-7721 cell movement and migration, its adhesion with fibronectin (FN) and endothelial cell (EC), as well as the CD44 and MMP-2 gene protein expression in transplanted tumor of the model mice were observed by means of cell movement and migration test, cell adhesion test and immunohistochemical method. **Results** ATI could significantly inhibit SMMC-7721 cell movement and migration on FN, adhesion with FN and EC, also could lower CD44 and MMP-2 in cancer cells. **Conclusion** ATI has the effects of antagonizing hepatocarcinoma cell adhesion and invasion, the mechanism may be related with the action of ATI in lowering CD44 and MMP-2 expression in cancer cells.

Key words arsenic trioxide; hepatocarcinoma cell; adhesion; invasion; CD44; MMP-2

肿瘤细胞的黏附和侵袭是肿瘤发生转移的重要步骤,抑制肿瘤的黏附和侵袭可以控制或降低肿瘤转移的发生。作为传统中药砒霜的主要成分,三氧化二砷(亚砷酸,As₂O₃)具有诱导肿瘤细胞分化、凋亡及细胞毒作用,用于治疗急性早幼粒细胞白血病(APL)取得了突出的疗效^[1,2]。通过一系列实验与临床研究,我们发现该药对原发性肝癌亦有比较满意的疗效,并且有一定的抗肝癌转移作用^[3-5]。为了阐明 As₂O₃ 抗肿瘤转移的作用机制,我们选用人类肝癌细胞株 SMMC-

7721 细胞及裸鼠人类肝癌转移模型为研究对象,观察了 As₂O₃ 对 SMMC-7721 细胞的运动迁移、与纤维粘连蛋白(FN)和内皮细胞黏附以及裸鼠人肝癌转移模型肝移植瘤表达 CD44、MMP-2 基因蛋白的影响,现将研究结果报告如下。

材料与方 法

1 材料 人类肝癌细胞株 SMMC-7721 细胞和建株人脐静脉内皮细胞株(ECV304),均引自中国科学院上海细胞生物研究所。As₂O₃ 注射液(亚砷酸注射液,10mg/10ml/支)为哈尔滨伊达药业有限公司产品(国药准字 X19990191)。胰蛋白酶为美国 Difco 公司产品。小牛血清系杭州四季青生物工程公司产品。

基金项目:全军“十五”攻关课题(No. 01MB028)

作者单位:1. 南京军区南京总医院博士后科研工作站八一分站(南京 210002);2. 南京八一医院全军肿瘤中心;3. 南京中医药大学

通讯作者:华海清, Tel:025-80864049, E-mail: xhxh1223@163.net

MTT 试剂为美国 Fluka 公司产品。鼠抗人 CD44 单克隆抗体、鼠抗人 MMP-2 单克隆抗体、超敏 SP(鼠)试剂盒为美国 Maxim Biotech Inc. 产品。液体 DAB 酶底物显色试剂盒为福建迈新生物技术开发公司产品。

2 方法

2.1 细胞培养 SMMC-7721 细胞和 ECV304 细胞接种于无菌培养瓶中,加入适量 RPMI-1640 培养液(含 10% 的小牛血清、青霉素 100U/ml、链霉素 100μg/ml),于 37℃、5% CO₂ 及饱和湿度的培养箱中培养。细胞呈单细胞贴壁生长,每 3~5 天传代 1 次。传代时用 0.25% 胰蛋白酶消化 2~3min,用培养液吹打成细胞悬液,按所需浓度接种。

2.2 SMMC-7721 细胞迁移实验 参照文献方法^[6],取 120μg/ml 的 FN 包被 6 孔板,每孔加入 0.5ml,在超净台风干后放入 4℃ 冰箱中备用。实验时用 6×10^5 /ml 的 SMMC-7721 细胞接种于 6 孔培养板中,待细胞基本长满后,在底部划出一条 1mm 的无细胞带,用 PBS 漂洗 3 次,除去悬浮的细胞,加入浓度为 2μg/ml 的 As₂O₃ 1ml,对照组加入同等量的培养液继续培养,分别于 12h、24h、48h 在光镜下观察细胞迁移至无细胞带处的情况。每组做 3 复孔平行样。

2.3 SMMC-7721 细胞与 FN 的黏附实验 取 70μg/ml 的 FN 包装 96 孔板,每孔 30μl,在超净台风干后放入 4℃ 冰箱中备用。实验时取 1×10^6 /ml 的 SMMC-7721 细胞接种于已包被 FN 的 96 孔培养板中,每孔 100μl,设 4 复孔,待细胞贴壁后(4~5h),加入浓度分别为 2μg/ml、4μg/ml、8μg/ml 的 As₂O₃ 注射液 100μl,对照加入 100μl 培养液,置于 37℃、5% CO₂ 的培养箱内分别孵育 20、40、60、120min,吸出培养液,每孔加入 5mg/ml 的 MTT 20μl,继续培养 4h,弃去全部上清,每孔加入 100μl 0.04mol/L 盐酸异丙醇,微型振荡器振荡 5~10min,使结晶完全溶解,在酶联仪波长 570nm 处测出各孔吸光度值(OD),以 OD 值代表黏附细胞数,按下列公式计算细胞黏附抑制率:抑制率(%) = $[1 - (\text{加药孔平均 OD 值} - \text{空白孔平均 OD 值}) / (\text{对照孔平均 OD 值} - \text{空白孔平均 OD 值})] \times 100\%$ 。

2.4 SMMC-7721 细胞与 ECV304 细胞黏附 参照孙婧婧等^[7]的方法,SMMC-7721 细胞传代后,37℃、5% CO₂ 培养箱内孵育 24h,更换为含 ³H-TdR 5μCi/ml 的培养液,标记 36h。Hank's 液洗涤 3 次,0.25% 胰酶消化,制成细胞悬液供使用。将 1×10^6 /ml 内皮细胞每孔 100μl 接种至 96 孔板中,设 3 复孔,待细胞生长至融合,吸出培养液,每孔加入标记好的浓度为 2.5×10^5 /ml 的 SMMC-7721 细胞 100μl,As₂O₃

组加入浓度分别为 2μg/ml、4μg/ml、8μg/ml 的 As₂O₃ 注射液每孔 100μl,对照孔加入 100μl 培养液,37℃、5% CO₂ 孵育箱中分别孵育 20、40、60 和 90min 后,倾去培养液,PBS 漂洗 3 次,除去未黏附的细胞,胰酶消化,将细胞吸到 49# 醋酸纤维滤纸上,晾干。Wallac 液体闪烁计数器测定闪烁值(cpm)。细胞黏附抑制率(100%) = $[1 - (\text{加药孔平均 cpm 值} - \text{空白孔 cpm 值}) / (\text{对照孔平均 cpm 值} - \text{空白孔 cpm 值})] \times 100\%$ 。

2.5 免疫组化检测 将已构建的裸鼠人类肝癌转移模型 21 只裸鼠,随机分为 As₂O₃ 高剂量治疗组 [As₂O₃ 注射液 3.5mg/(kg·d) 组]、低剂量治疗组 [As₂O₃ 注射液 2.0mg/(kg·d) 组] 和生理盐水对照组各 7 只,于裸鼠肝移植瘤块后第 11 天开始用药,均腹腔注射,每天 1 次,连续 3 周,于停药后次日解剖裸鼠,完整剥取肝移植瘤,10% 甲醛固定,石蜡包埋,切片,二甲苯中脱蜡,高温高压组织抗原修复,按说明滴加一抗和二抗,DAB 显色,苏木素复染,中性树胶封固,镜检。采用已知阳性切片作阳性对照,用 PBS 代替一抗作阴性对照,观察裸鼠人类肝癌转移模型肝移植瘤表达 CD44、MMP-2 基因蛋白的情况。阳性判断标准^[8]:以胞浆和(或)胞膜呈棕黄色为阳性细胞。表达情况根据细胞染色强度(A)和染色细胞所占面积(B)两者积分之积来判断。染色强度积分为:不染色 = 0,轻度染色(浅黄色) = 1,中度染色(棕黄色) = 2,强染色(棕褐色) = 3;染色面积分为:<25% 细胞染色 = 1,≥25% 细胞染色 = 2。若两种积分之积(A×B) > 2,则为表达阳性,≤2 则为表达阴性。

3 统计学方法 应用 SPSS 10.0 统计软件进行相关资料处理,采用方差分析和 *t* 检验。

结 果

1 As₂O₃ 对 SMMC-7721 细胞迁移能力的影响 见表 1。As₂O₃ 对 SMMC-7721 细胞在 FN 基质上迁移能力的测定结果表明,对照组无细胞带随着时间的推移,细胞带逐渐变窄,至 48h 时已基本消失,迁入无细胞带的细胞由 12h 的 (52.0 ± 3.6) 个增加至 48h 的 (85.4 ± 85.4) 个,细胞轮廓清晰,活力旺盛;而 As₂O₃ 组细胞变圆,稀疏,细胞带仍较宽,12h、24h、48h 3 个时段迁移至无细胞带的数量较对照组明显减少,两组间差异有显著性(*P* 均 < 0.01)。

2 As₂O₃ 对 SMMC-7721 细胞与 FN 黏附的影响 见表 2。结果表明,As₂O₃ 有一定的抗 SMMC-7721 细胞与 FN 黏附的作用,其作用强度随着药物作用时间的延长而上升,相同浓度、不同时间各组差异均有显著

表 1 As₂O₃ 对 SMMC-7721 细胞迁移能力的影响 (个, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	12h	24h	48h
As ₂ O ₃ (2μg/ml)	3	26.3 ± 8.7*	174.3 ± 16.6*	212.0 ± 21.0*
对照	3	52.0 ± 3.6	295.7 ± 26.6	854.3 ± 85.4

注:与对照组比较,*P<0.01

性(P<0.01),以 120min 4μg/ml 剂量组的黏附抑制率最高,为 37.53%;相同时间、不同浓度 20min、120min 时段差异有显著性(P<0.05),40min、60min 时段则差异不明显(P>0.05)。

表 2 As₂O₃ 作用不同时间对 SMMC-7721 细胞与 FN 黏附的抑制率 (% , $\bar{x} \pm s$)

As ₂ O ₃ 浓度 (μg/ml)	n	20min	40min	60min	120min
2	4	17.97 ± 1.85	21.43 ± 1.67	25.00 ± 3.30	29.47 ± 2.04
4	4	22.23 ± 1.85	27.63 ± 3.72	28.33 ± 1.65	32.63 ± 0.81
8	4	27.57 ± 1.85	30.87 ± 7.04	30.57 ± 0.98	37.53 ± 0.75

注:相同浓度,不同时间各组间两两比较,P<0.01;20min、120min 各浓度组间两两比较,P<0.05

3 As₂O₃ 对 SMMC-7721 细胞与 ECV304 细胞黏附的影响 实验结果显示,As₂O₃ 对 SMMC-7721 细胞与 ECV304 细胞的黏附有一定的抑制作用,并随着时间的延长,抗黏附作用有增强的趋势,各浓度组 20min 与 40min、60min、90min 时段相比,差异均较明显(P<0.05),即随着作用时间的延长,抑制作用亦相应增强,但相同时段、不同浓度之间无明显差异(P>0.05)。具体结果见表 3。

表 3 As₂O₃ 作用不同时间对 SMMC-7721 细胞与 ECV304 细胞的黏附抑制率 (% , $\bar{x} \pm s$)

As ₂ O ₃ 浓度 (μg/ml)	n	20min	40min	60min	90min
2	3	0.00 ± 0.00	15.15 ± 9.41*	20.93 ± 5.33*	27.71 ± 18.06*
4	3	10.33 ± 9.76	14.06 ± 1.45*	21.56 ± 6.34*	20.24 ± 6.57*
8	3	23.71 ± 14.99	10.54 ± 8.38*	22.82 ± 10.84*	29.18 ± 8.30*

注:与同浓度 20min 比较,*P<0.05

4 As₂O₃ 对裸鼠人肝癌转移模型肝移植瘤表达 CD44、MMP-2 的影响 免疫组化实验结果表明,As₂O₃ 能抑制裸鼠肝移植瘤 MMP-2、CD44 的表达,经统计学处理,高剂量组与对照组比较各项表达率差异均有显著性(P<0.05),低剂量组 MMP-2 与对照组比较差异有显著性(P<0.05),但 CD44 与对照组比较差异无显著性(P>0.05)。具体结果见表 4。

表 4 As₂O₃ 对裸鼠肝移植瘤表达 CD44、MMP-2 基因蛋白的影响 (只)

组别	CD44				MMP-2			
	n	-	+	表达率(%)	n	-	+	表达率(%)
对照	6	0	6	100.00	6	1	5	83.33
As ₂ O ₃ 高剂量	7	3	4	57.14*	7	5	2	28.57*
As ₂ O ₃ 低剂量	7	2	5	71.42	7	4	3	42.86*

注:与生理盐水组比较,*P<0.05

讨 论

侵袭是贯穿肿瘤转移全过程的重要步骤。肿瘤转移始于恶性侵袭,此后瘤细胞穿入、穿出血管或淋巴管,侵入靶器官内都是侵袭行为的具体表现。Liotta^[9]最早提出了侵袭过程的“三步”假说:黏附、降解与移动;即肿瘤细胞侵袭时,胞体与基质成分黏附,瘤细胞伸出伪足,并释放蛋白酶降解伪足前端的基质,伪足进一步突入基质的缺损空间,肿瘤细胞与原基质脱黏附并与前方新的基质结合,细胞的黏附与运动耦连,瘤细胞便“履带式”的向前运动,由此而导致肿瘤发生侵袭与转移。因此要控制肿瘤的转移,首先必须控制肿瘤的侵袭,即必须抑制肿瘤细胞与基质或基底膜或宿主细胞的黏附及对基质或基底膜的降解以及自身的运动。

FN 为基底膜及细胞外基质的重要成分,肿瘤细胞从母体脱离后,侵袭基底膜及细胞外基质,通过膜表面受体可黏附于 FN 上而产生运动与迁移,使肿瘤扩散与转移。我们的实验结果表明,As₂O₃ 有抗 SMMC-7721 细胞与 FN 及内皮细胞黏附的作用,并能抑制 SMMC-7721 细胞在 FN 上的迁移能力,推测其作用可能与 As₂O₃ 抑制了 SMMC-7721 细胞的侵袭活力及改变了细胞膜表面 FN 受体的生化特性有关。

MMP-2、CD44 均是与肿瘤侵袭与转移密切相关的基因蛋白。MMP-2 是能够降解 IV 胶原的一种特异性蛋白水解酶。IV 胶原是组成细胞外基质及基底膜的主要结构蛋白,肿瘤细胞通过分泌 MMP-2 或激活某些诱导因子诱导或刺激宿主组织分泌 MMP-2 来水解 IV 胶原而突破基底膜,侵入血道或淋巴道向远端转移。CD44 是存在于细胞表面的跨膜糖蛋白,是介导转移的主要黏附分子,主要参与细胞与细胞、细胞与基质之间的特异性黏附^[10]。为了进一步揭示 As₂O₃ 对这些基因蛋白表达的影响,以阐明 As₂O₃ 抗侵袭与转移的作用机理,我们选择了汤钊猷等^[11]所构建的裸鼠人肝癌高转移模型 LCI-D20 为研究对象,该模型转移率高(100%),表现为肝内播散、淋巴结和肺转移,类似于临床肝癌患者,是目前研究人肝癌转移机理以及抗转移治疗较为理想的转移模型。我们的实验结果表明,加入 As₂O₃ 后 MMP-2、CD44 的表达率低剂量、高剂量组均下降,提示 As₂O₃ 还可能通过调节肿瘤组织某些基因蛋白的表达而发挥抗黏附和侵袭作用。

As₂O₃ 是剧毒中药砒霜的主要成分,自发现本品对 APL 有突出疗效后,围绕其抗癌机制进行了大量的研究,特别是抗实体肿瘤的作用,目前仍是研究热点。

本研究的结果提示, As₂O₃ 除了有抑制肝癌细胞的运动与迁移作用外, 还有抗肝癌细胞黏附和侵袭的作用, 这为临床 As₂O₃ 抗肿瘤转移的治疗提供了理论依据, 值得今后进一步加强研究与探索。

参 考 文 献

- 1 马 军. 急性早幼粒细胞白血病的“靶向”治疗. 中国肿瘤 1999;8(2):80.
Ma J. "Target Orientation" therapy of acute promyelocytic leukemia. Bull Chin Cancer 1999;8(2):80.
- 2 张 鹏, 王树叶, 胡龙彪, 等. 三氧化二砷治疗早幼粒细胞白血病七年总结——附 242 例分析. 中华血液学杂志 2000; 21(2):67—72.
Zhang P, Wang SY, Hu LB, et al. Seven years' summary on the treatment of acute promyelocytic leukemia with arsenic trioxide——An analysis of 242 cases. Chin J Hematol 2000;21(2):67—72.
- 3 陈 红, 秦叔逵, 陈惠英, 等. 三氧化二砷诱导人肝癌细胞株 SMMC-7721 凋亡的实验研究. 肿瘤防治研究 1998;25(5): 336—338.
Chen H, Qin SK, Chen HY, et al. A preliminary study on arsenic trioxide as an inducer of apoptosis in human hepatocellular carcinoma cell line. Cancer Res Prev Treat 1998; 25(5):336—338.
- 4 钱 军, 秦叔逵, 何泽民, 等. 三氧化二砷治疗中晚期原发性肝癌的临床研究. 中华肝脏病杂志 2002;10(1):63.
Qian J, Qin SK, He ZM, et al. Arsenic trioxide for the treatment of medium and advanced primary liver cancer. Chin J Hepatol 2002;10(1):63.
- 5 华海清, 秦叔逵, 陈惠英, 等. 三氧化二砷抗肿瘤血管形成研究. 世界华人消化杂志 2004;12(1):27—32.

Hua HQ, Qin SK, Chen HY, et al. Effect of arsenic trioxide on the vascularization of tumor. World Chin J Digestol 2004; 12(1):27—32.

- 6 路艳艳, 周柔丽. 整合素 α_vβ₁ 增强人肝癌细胞侵袭性机制的探讨. 中华肿瘤杂志 2000;22(4):287—289.
Lu YY, Zhou RL. Mechanism of enhanced invasiveness of human hepatocellular carcinoma by integrin α_vβ₁. Chin J Oncol 2000;22(4):287—289.
- 7 孙婧婧, 周信达, 刘银坤. 丹参对肝癌转移复发防治作用的研究. 中国中西医结合杂志 1999;19(5):292—295.
Sun JJ, Zhou XD, Liu YK. Salviae miltiorrhizae on recurrence and metastasis of liver cancer. Chin J Integr Tradit West Med 1999;19(5):292—295.
- 8 黄 颖, 黄建富, 殷凤峙. CD44 在原发性肝细胞癌中的表达. 福建医科大学学报 1999;33(2):127—129.
Huang Y, Huang JF, Ying FZ. CD44 expression in primary hepatocellular carcinoma. J Fujian Med Univ 1999;33(2): 127—129.
- 9 Liotta LA. Tumor invasion and metastasis role of the extracellular matrix: Rhoads memorial award lecture. Cancer Res 1986;46:1—7.
- 10 Gunthert U, Lotz N, Summer E, et al. Are CD44 variant isoforms involved in human tumor progression? Cancer Surv 1995;24:19.
- 11 孙昉宪, 汤钊猷, 刘康达, 等. 裸鼠人肝癌原位移植转移模型的生长特性及转移潜能. 中华医学杂志 1995;75(11): 673—675.
Sun FX, Tang ZY, Liu KD, et al. Growth pattern and metastatic behaviour of orthotopically metastatic model of human hepatocellular carcinoma in nude mice. Natl Med J China 1995;75(11):673—675.

(收稿:2003-04-26 修回:2004-07-05)

<p>《冉雪峰医著全集》(3卷) 定价 360.00 优惠价 280.00 冉雪峰先生, 六世医传, 早在 20 世纪 30 年代, 医坛已有“南冉北张”(南冉:冉雪峰, 北张:张锡纯)之誉。冉先生七十年如一日, 潜心中医学, 於近世中医学界, 影响深远。本书由其子冉先德率同门下高足, 合数十人之力, 费时 3 年, 将冉先生的全部遗著加以整理, 精心订正, 仔细核对, 完成此书。全书约 300 万余言, 纳《医经》、《方药》、《临证》3 册。</p>	<p>《秦伯未医学名著全书》 定价 158.00 优惠价 136.00 理论高深 说理透彻 临床实用 思路开阔 上篇 增补《谦斋医学讲稿》(新增 37 篇) 中篇 谦斋专著汇编 (治疗格言) 《中医入门》、《中医临证备要》、《内经类证》 《清代名医医案精华》、《金匱要略杂病浅说》 《清代名医医话精华》、《内经知要浅解》 下篇 谦斋医案荟萃 内科、妇科、儿科、膏方</p>	<p>《谢海洲医学文集》 定价 96.00 元 优惠价:80.00 元 全书共分八篇, 其中“医药丛谈篇”包括医学从论、方药漫谈等; “专病论治篇”包括脑髓病论治和神志病、辨证及杂证论治; “医案医话”篇收录 56 种病证医案和 32 则医话; “方药纵横篇”包括中药选注, 良方选注, 常用中成药及自选良方四大部分。涉及医药领域的各个方面, 全面反映谢老深邃的医药理论、丰富的临床经验、独特的学术见解和曲折的从医轨迹。</p>
<p>四十余年研究成果大总结 数十位学科带头人大手笔 《中国中西医结合临床全书》 定价 480.00 元 优惠价:288.00 元 上下两卷 16 开豪华精装 700 万字 3000 余页 顾问 崔月犁 董建华 陈可冀 尚天裕 高辉远 名誉主编 陈敏章 主编 李思 我国中西医结合全科临床经典权威巨著, 全书包括临床十一个学科(内、外、妇、儿、骨伤、皮肤、五官等)近千种病症, 每病按概述、病因病理、临床表现、实验室及其他检查、并发症、诊断与鉴别诊断、中医辨证、西医治疗、中医治疗、中西医结合治疗、预防护理等项详述, 有的还列中西医结合研究一项, 内容宏富、资料翔实、兼收并蓄、实事求是, 是迄今为止较为系统、全面、权威的中西医结合临床专著。该书问世后, 好评如潮, 连年畅销。</p>		<p>感经典震撼·悟千年医理 中医四大经典示范教学 VCD 每门课程 1500 元 优惠价 1050 元 全套 4000 元 伤寒论(70 盘) 金匱要略(80 盘) 内 经(77 盘) 温病条辨(72 盘) 北京中医药大学等七所院校相关学科带头人主讲, 配有中文字幕, 课堂学术氛围浓厚, 闪光点频频迸发, 看光盘如身临其境, 亲聆聆听知名教授、名师妙趣横生的讲授。</p>

邮购办法: 免费邮寄, 汇款地址: 北京 39 支局三想医药书店(北京五棵松·解放军医学图书馆内)。邮编: 100039; 联系人: 张 岩; 咨询电话: (010)68234503、68234504(传真); 66931860, 备有书店详细书目(万余种医学图书可供选购), 函索即寄。