

[文章编号] 1007-385X(2003)01- 0042- 06

Ad-wtp53 对 p53 状态不同结直肠癌细胞生长的影响

阎 昭, 李 雯, 牛瑞芳, 史玉荣, 郝希山 (天津医科大学肿瘤医院, 天津 300060)

[摘 要] **目的:** 探索重组腺病毒介导的外源性野生型 p53cDNA(Ad-wtp53)对内源性 p53 基因状态不同结直肠癌细胞的抑制作用是否存在差异,研究 p53 基因抑制肿瘤细胞增殖的机制。**方法:** 采用 MTT 法选择 Ad-wtp53 的最佳转染滴度,分别感染内源性 p53 基因缺失、突变和正常的 3 种结直肠癌细胞株,观察比较它们的生长抑制作用。**结果:** Ad-wtp53 在 1 000MOI 时表现出最强的细胞抑制作用,p53 缺失细胞株(THC-8908)的抑制效应最明显,3 种细胞转染后均发生 G₀/G₁ 期阻滞,并对不同 p53 状态细胞 G₂-M 期具有不同的调控作用。**结论:** 外源性野生型 p53 cDNA 导入可显著抑制结直肠癌细胞生长,使细胞周期停滞于 G₀/G₁ 期;同时对内源性 p53 状态不同细胞的生长抑制强度和 G₂-M 期调控作用不同。

[关键词] 基因治疗; p53 基因; 腺病毒载体; 结直肠癌

[中图分类号] R735.3^{*4} [文献标识码] A

The Effects of Recombinant Adenovirus-Mediated Wild Type p53 cDNA on Human Colorectal Cancer Cell Lines with Different p53 Status

YAN Zhao, LI Wen, NIU Rui-fang, SHI Yu-rong, HAO Xi-shan (Cancer Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300060)

[**Abstract**] **Objective:** To explore the inhibition effects of ectogenic wild-type p53 cDNA(Ad-wtp53) on colorectal carcinoma cell lines with different p53 gene status and search for the role of wild type p53 tumor suppressor gene in occurrence and progress of malignant tumor. **Methods:** MTT process was taken to choose optimal transfection titre. Three kinds of cell lines(p53 gene deletion, mutation and normal) were transferred by Ad-wtp53 in optimal titre. The inhibition effects of these cell lines were observed and compared. **Results:** The best titre is 1 000 MOI and p53 gene deletion cell line (THC-8908) shew the highest sensitivity. G₁-S transition period blocking effects occurred in all cell lines and G₂-M phase regulation effects were not coincidence in three colorectal cell lines. **Conclusions:** Recombinant adenovirus-mediated wild type p53 gene observably inhibited colorectal carcinoma cell lines growth and proliferation, blocked cell cycle in G₀/G₁ phase and displayed obvious different actions on G₂-M phase among cell lines with different p53 status.

[**Key words**] gene therapy; p53 gene; adenovirus vector; colorectal carcinoma

* 人们对肿瘤发病机制的认知经历了一个漫长的过程,而正是通过对结肠癌的研究使人们认识到肿瘤的发生是一个多因素、多阶段、累积渐进的过程。作为肿瘤发生发展的一个环节,p53 基因发挥着重要的作用,它是迄今发现与人类肿瘤相关性最高的抑癌基因,人类约 50% 以上的肿瘤与 p53 基因变化有关。含野生型 p53 的细胞,在 DNA 受损时可使细胞停止于 G₁ 期,在 DNA 开始合成前对损伤进行修复;而缺乏野生型 p53 功能的细胞则不能停止在 G₁ 期以修复损伤的 DNA,突变型 p53 则具有癌基因的特性,可促进正常细胞恶性转化。另一方面,一些含有内源性野生性 p53 等位基因的肿瘤细胞(如乳腺癌细胞系 MCF-7),显然存在着

非 p53 途径的肿瘤发生机制,提醒我们 p53 基因缺失和突变并非所有肿瘤发生的必要条件。本研究试图选择不同 p53 状态(正常、缺失和突变)的结直肠癌细胞株,通过导入外源性野生型 p53 基因,比较以 p53 为靶点的基因治疗对它们的影响是否存在差异,进而探讨外源性 p53 导入对肿瘤细胞生长抑制作用与肿瘤细胞内源性 p53 状态之间的关系,为个体化基因靶向治疗提供实验依据。

1 材料与方 法

[作者简介] 阎昭(1973-),男,硕士,主管药师,主要从事肿瘤临床药理研究工作。

1.1 细胞系及腺病毒

THC-8908 细胞为天津市肿瘤医院肿瘤研究所建立的人高分化腺癌细胞系,存在 p53 等位基因缺失(17P13 末端缺失);HT-29 存在突变型 p53 基因和 Lovo 存在野生型 p53 等位基因细胞引自浙江医科大学肿瘤研究所^[1-3]。

重组腺病毒介导的野生型 p53cDNA(Ad-wtp53)由深圳赛百诺生物技术有限公司惠赠,含野生型 p53cDNA(1.8 KB)。复制缺陷的 5 型腺病毒空载体(Ad5-lacZ):由天津医科大学微生物教研室惠赠。

1.2 主要试剂

DNA 提取试剂盒购自美国 Omega Bio-tek 公司,PCR 试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司,腺病毒载体 DNA 引物(上游:5'-TCG TTT CTC AGC AGC TGT TG-3',下游:5'-CAT CTG AAC TCA AAG CGT GG-3')由宝生物工程(大连)有限公司合成鼠抗人 P53 蛋白单抗免疫组化染色试剂盒购自北京中山生物技术有限公司。

1.3 Ad-wtp53 转染 3 种结直肠癌细胞最佳滴度的确定

3 个细胞株均取对数生长期细胞,0.25% 胰酶消化,配成 1×10^5 细胞/ml,分别取 $100 \mu\text{l}$ /孔,加入 96 孔板中,置于 5% CO_2 培养箱中培养 24 h。待细胞贴壁后,分别以 1,10,100,1000 和 10000 MOI(multiplicities of infection)的 Ad-wtp53 和 Ad-LacZ 感染细胞,并以非感染细胞作对照。每 24 小时取 3 孔细胞,MTT 法检测,计算抑制率,确定半数抑制浓度和最大抑制浓度。

1.4 转染细胞中外源性腺病毒载体 DNA 的检测

收集以最佳滴度 Ad-wtp53 转染的 3 种细胞及非转染细胞($\leq 10^7$ 细胞),提取 DNA(参照 DNA 提取试剂盒说明)。PCR 扩增(参照 PCR 试剂盒说明),反应结束后,于 2% 琼脂糖凝胶电泳进行结果检测。

1.5 免疫细胞化学法检测外源性 P53 蛋白表达

收集以最佳滴度 Ad-wtp53 转染的 3 种细胞,爬片,固定。以非转染细胞作对照,按免疫组化染色试剂盒说明书染色,用 PBS 代替鼠抗人 p53 单抗工作液作为阴性对照。镜下计阳性细胞数,计算 P53 蛋白阳性表达率。

1.6 转染 Ad-wtp53 后 3 个结直肠癌细胞形态学变化

以最佳转染滴度 Ad-wtp53 转染 3 种细胞后 72 h 观察活细胞形态和固定染色细胞形态,并与非感染细胞形态做比较。

1.7 生长曲线

每种细胞设空白对照、Ad5-lacZ 转染和 Ad-wtp53 转染 3 组,分别取对数生长期细胞, 2×10^4 细胞/孔接种于无菌 24 孔板内,置于 5% CO_2 ,37℃ 培养箱中培养 24 h,以最佳感染强度加入 Ad5-lacZ 和 Ad-wtp53,24 h 计数 1 次,每次计数 3 孔,连续计数 5 d,绘制生长曲线。

1.8 集落形成实验

每种细胞设空腺病毒(Ad5-lacZ)转染和 Ad-wtp53 转染 2 组,分别取对数生长期细胞,1000 个细胞/孔接种于无菌 6 孔板内,置于 5% CO_2 ,37℃ 培养箱中培养 24 h,待细胞贴壁后,用空腺病毒转染和 Ad-wtp53,以最佳感染强度的效靶比感染细胞,培养 24 h 后换液,培养 10~14 d,Giemsa 染色,OLYMPUS IX70 型倒置显微镜观察、照相,计算集落形成率。

1.9 流式细胞仪检测细胞周期变化

以最佳感染强度的 Adwtp53 感染细胞,培养 72 h 后收集细胞($1 \sim 5$) $\times 10^6$ 个,用 1 ml PI 染液,4℃ 避光,染色 30 min;流式细胞仪检测分析。

2 结果

2.1 MTT 法检测 Ad-wtp53 最佳转染滴度

3 种细胞生长抑制程度随感染强度增大而增强(见图 1),同时未转染组细胞数在 72 h 达到最大值然

图 1 不同感染滴度 Ad-wtp53 对 3 种结直肠癌细胞生长的抑制作用

Fig. 1 Inhibition effects of different Ad-wtp53 titres on three colorectal cancer cell lines

A: THC-8908; B: Lovo; C: HT-29

后逐渐渐少。以转染 72 h 的时间点计算,3 种细胞的 Ad-wtp53 转染强度在 10 MOI 时,可达半数最大抑制;在 1 000 和 10 000 MOI 时,抑制程度不再明显随感染滴度增加,最佳感染强度应为 1 000 MOI。

2.2 PCR 法检测转染细胞中腺病毒载体 DNA

提取转染 Ad-wtp53(1 000MOI)后 3 种细胞的 DNA 并以未转染组细胞 DNA 作对照,经 PCR 扩增腺病毒载体 DNA 特定片段,2% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物,结果转染组 3 种细胞均在 860 bp 处存在 DNA 片段条带,而未转染组没有出现 DNA 条带(见图 2),证明腺病毒介导的野生型 p53 基因确实转入 3 种细胞的细胞核内。

2.3 免疫细胞化学法检测外源性 p53 基因表达

THC-8908 细胞转染 Ad-wtp53 后细胞核内 P53 蛋白表达由转染前阴性转为阳性(图 3A-B),阳性率 22.9%,细胞浆内无染色,表明野生型 p53 基因成功转入细胞核并有蛋白表达。Lovo 细胞和 HT-29 细胞转染后细胞核由转染前黄褐色变成棕褐色(图 3C-F),提示转染后细胞核 P53 蛋白表达强度较转染前提高,表达阳性率分别为 55.1% 和 28.0%。

2.4 Ad-wtp53 对 3 种细胞增殖生长的影响

2.4.1 细胞形态

观察固定细胞可见 3 种细胞转染 Ad-wtp53 后均发生变圆、细胞膜不完整,细胞生长受到显著抑制(图 3)。相差显微镜下观察活细胞形态可见,正常生长的

3 种细胞,排列紧密,胞浆丰富,核膜、核仁轮廓清晰,生长状态良好。Adwtp53 转染后 3 种细胞排列松散,细胞之间空隙加大,形态变得不规则,有的细胞变圆、相互融合而失去原有特点,但细胞膜完整。

图 2 Ad-wtp53 转染后 3 种细胞核内腺病毒载体 DNA 检测

Fig.2 Detection of adenovirus DNA in three transfected colorectal cancer cell lines

- M: Marker; 1: Untransfected THC-8908;
- 2: Untransfected Lovo; 3: Untransfected HT-29;
- 4: Transfected THC-8908; 5: Transfected Lovo;
- 6: Transfected HT-29

图 3 转染 Ad-wtp53 前后 3 种细胞 P53 蛋白表达

Fig.3 Detection of P53 protein expression in transfected and un transfected colorectal cancer cell lines

- A: THC-8908(untransfected); B: THC-8908(transfected); C: Lovo(untransfected); D: Lovo(transfected);
- E: HT-29(untransfected); F: HT-29(transfected)

2.4.2 生长曲线

3种细胞未转染组均在96孔板中培养72h左右达到最大细胞数,而后细胞数逐渐减少,其中THC-8908细胞生长最旺盛;Ad-LacZ转染组细胞与空白对照组细胞生长曲线的变化趋势基本一致,没有明显的细胞抑制作用;Ad-wtp53转染组的生长曲线均从起始点开始下落直至最低点,表现出强烈得抑制作用,其中又以THC-8908细胞表现得最为敏感(见图4)。转染

72h3种细胞生长抑制率分别为:THC-8908 89.09%,Lovo 65.22%,HT-29 65.91%。经 X^2 检验三者间存在显著性差异($P=0.001, \alpha=0.05$),按Bonferroni校正方法进行两两比较,表明THC-8908细胞生长抑制率高于Lovo和HT-29细胞($P_{T,L}=0.001, P_{T,H}=0.001, \alpha=0.0125$),而后两者之间抑制率无统计学差异($P_{L,H}=0.544, \alpha=0.0125$)。

图4 Ad-wtp53和Ad-LacZ在1000MOI感染强度时对3种细胞的生长抑制曲线

Fig.4 The growth suppression curves of three colorectal cancer cell lines transfected by Ad-wtp53 and Ad-LacZ in 1000 MOI

2.4.3 集落形成率

3种细胞经Ad-LacZ和Ad-wtp53转染后集落形成试验结果见表1,这些结果说明Ad-LacZ对3种细胞的

细胞活力和增殖能力没有明显影响,Ad-wtp53转染则抑制了这3种结直肠癌细胞的活力和增殖能力,并以THC-8908细胞最为敏感。

表1 Ad-wtp53和Ad-LacZ转染THC-8908,Lovo及HT-29细胞集落形成率分析

Tab.1 Colony forming efficiency analysis of three colorectal cancer cell lines transfected by Ad-wtp53 and Ad-LacZ

Cell lines	Groups	means	standard deviation	colony forming efficiency(%)	X^2	P		
THC-8908	Ad-LacZ	227.78	10.31	22.8	257.366	0.001		
	Ad-wtp53(A)	0.00	0.00	0.0				
Lovo	Ad-LacZ	138.00	18.50	13.8	57.731	0.001		
	Ad-wtp53(B)	41.22	4.50	4.1				
HT-29	Ad-LacZ	152.33	12.90	15.2	47.013	0.001		
	Ad-wtp53(C)	58.00	11.00	5.8				
	A, B, C						55.717	0.001
	A and B ^a						41.858	0.001
	A and C ^b						59.707	0.001
B and C ^c					3.071	0.080		

a,b,c: Benferroni corrected X^2 ($\alpha=0.0125$)

2.5 细胞周期分析

3种细胞未转染组和转染Ad-wtp53组的细胞周期变化情况见表2,结果显示3种结直肠癌细胞均具有典

型的恶性肿瘤的生物学特性,且THC-8908细胞在3种细胞中恶性度最高。转染Ad-wtp53后,3种结直肠癌细胞 G_0/G_1 期比例均高于非转染组($P<0.001$),其中

Lovo 和 THC-8908 细胞更为明显。另外,3 种细胞转染 Ad-wtp53 后,S 期和 G₂-M 期比例也发生变化,THC-8908 细胞 S 期比例明显升高、G₂-M 期比例则显著下

降;Lovo 细胞则相反,表现为 G₂-M 期比例的升高和 S 期比例的显著下降;HT-29 细胞则介于前两者之间,表现为 G₂-M 期比例略有下降,而 S 期比例变化不明显。

表 2 Ad-wtp53 转染和非转染的 THC-8908,Lovo 及 HT-29 细胞周期分析

Tab. 2 Cell cycle analysis of Ad-wtp53 transfected and untransfected colorectal cancer cell lines

Cell cycle	Groups	Distribution rate in cell cycle(%)			
		Normal blood cells	THC-8908	Lovo	HT-29
G ₀ /G ₁	untransfected	97.9	39.8	49.5	48.3
	Ad-wtp53	-	47.9	63.5	51.7
S	untransfected	0.2	28.1	39.7	41.8
	Ad-wtp53	-	48.0	17.8	41.4
G ₂ -M	untransfected	1.8	32.1	10.7	9.9
	Ad-wtp53	-	4.1	18.7	6.9

3 讨论

癌基因和抑癌基因的发现及其功能的逐步明确是恶性肿瘤研究进程中一个重要的里程碑,至今已有一百多种癌基因和二十多种抑癌基因被鉴定或克隆,但人们对这些基因与肿瘤发生发展关系的认识仍很局限,因此深入研究众多肿瘤相关基因在肿瘤发生发展中的相互关系和角色显得尤为重要。我们通过研究比较外源性野生型 p53 基因的导入对不同 p53 状态的结直肠癌细胞生长抑制、细胞周期调控等方面的作用,初步探讨对于 p53 途径或非 p53 途径恶性转化的结直肠癌细胞给予 p53 基因靶向性治疗的意义。

野生型 p53 基因的主要生物学功能包括:①抑制细胞分化与增殖^[4,5];②诱导细胞凋亡^[6]。在抑制肿瘤细胞分化、增殖方面 p53 基因可以通过两条途径发挥作用。一条途径是,在 DNA 遭到破坏时,wt-p53 可与细胞核内特异的 DNA 部位结合,通过氨基酸的酸性激活区激活临近基因的启动子而促进其表达,如可活化 p21^{WAF1/CIP1} 基因的转录,其产物可抑制 CDK(细胞周期依赖性蛋白激酶)活性,使 DNA 合成有关的基因不能表达,DNA 合成终止,细胞生长停止在 G₁期^[7]。另一条途径是,不通过 DNA 特异结合部位而直接对某些与细胞增殖有关基因的启动子起负调控作用,从而抑制肿瘤细胞增殖^[8]。

我们在研究中发现 Ad-wtp53 转染 3 种结直肠癌细胞并发挥细胞生长抑制作用的强度与转染滴度在一定范围内呈正相关,并存在天花板效应,一味增加 Ad-wtp53 的转染滴度并不能提高其对肿瘤细胞生长的抑制作用。同时,3 种结直肠癌细胞具有不同的恶性增殖能力,并在导入外源性 wt-p53cDNA 后表现出不同的

受抑制程度。我们考虑:THC-8908 细胞 p53 2 条等位基因缺,P53 蛋白不能合成,从而完全失去内源性野生型 p53 基因的功能,使其表现出很强的恶性增殖能力;当导入外源性野生型 p53 基因后,细胞内正常 P53 蛋白功能重新建立,表现出对细胞恶性生长的显著抑制作用。HT-29 细胞存在 p53 基因 5,6 外显子突变,表达的突变蛋白结合 DNA 特殊部位使激活邻近相关基因的功能丧失;我们的实验中,未转染组 HT-29 细胞恶性生长程度低于 THC-8908 细胞,转染 wt-p53cDNA 的 HT-29 细胞受抑制程度也不如 THC-8908 细胞明显,这可能为 HT-29 细胞内源性 wt-p53 尚存并受 mt-p53 所拮抗,以及外源性 wt-p53 导入被内源性 mt-p53 部分抵消的结果。Lovo 细胞含有内源性野生型 p53 等位基因,P53 蛋白表达阳性;我们推测 Lovo 细胞恶性转化的机制至少存在两个可能——P53 蛋白结合位点上的氨基酸发生突变或通过非 p53 基因途径使细胞发生转化。Casey 等^[9]将野生型 p53 基因转入 MCF7 细胞(含有内源性野生型 p53 等位基因),结果细胞的生长未能得到抑制,其肿瘤生物学特性与未转染的细胞间也无明显差异。我们的实验结果则表明导入外源性 wt-p53 基因的 Lovo 细胞表现虽不如 THC-8908 那样敏感,但对其仍具有相当的抑制作用,我们考虑在恶性肿瘤错综复杂的发生机理中 p53 基因的突变并非所有肿瘤发生的必要条件,但增加 wt-p53 蛋白在肿瘤细胞内的表达量仍有可能抑制其增殖。

另外,从细胞周期分析结果中我们发现,非转染组中 THC-8908 细胞的 S 期和 G₂-M 期细胞比例不同于另外 2 种细胞,前者 G₂-M 期比例高于 S 期,而后两者则相反,表现为较低的 G₂-M 和较高的 S 期比例。更为有趣的现象是,转染 Ad-wtp53 后,S 期和 G₂-M

期的比例在 THC-8908 细胞和 Lovo 细胞间发生了完全相反的变化:THC-8908 细胞 S 期比例提高而 G₂-M 期比例下降,Lovo 细胞则正好相反。HT-29 细胞此时与非转染组比较则变化不大。我们推测这些现象与 3 种细胞内源性 p53 状态有关。因此,更广泛深入地探讨分子间相互作用和基因表达调控机制的工作显得尤为艰巨和必要。

[参考文献]

- [1] Peters GJ, van Triest B, Backus HH, *et al.* Molecular downstream events and induction of thymidylate synthase in mutant and wild-type p53 colon cancer cell lines after treatment with 5-fluorouracil and the thymidylate synthase inhibitor raltitrexed[J]. *Eur J Cancer*, 2000, 36(7): 916-924.
- [2] Shao RG, Cao CX, Nieves-Neira, *et al.* Activation of the Fas pathway independently of Fas ligand during apoptosis induced by camptothecin in p53 mutant human colon carcinoma cells[J]. *Oncogene*, 2001, 20(15): 1852-1859.

- [3] Schumacher U, Adam E, Feldhaus S, *et al.* Cell differentiation and chemotherapy influence p53 and Mdm2 immunoreactivity in human HT29 colon cancer cells grown in scid mice[J]. *Cancer Lett*, 2001, 166(2): 215-21.
- [4] Hunter T. Braking the cycle[J]. *Cell*, 1993, 75: 839-841.
- [5] 张克强,杨靖清,侯春梅,等. p53 抗原肽及 B7 重组痘苗病毒抗肿瘤的研究[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2000, 7(4): 261-264.
- [6] Clarke AR, Rurdie CA, Harrison DJ, *et al.* Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways[J]. *Nature*, 1993, 362(6423): 849-852.
- [7] El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, *et al.* WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression[J]. *Cell*, 1993, 75(4): 817-825.
- [8] Mercer WE. Checking on the cell cycle[J]. *J Cell Biochem*, 1998, 30-31: 50-54(Suppl).
- [9] Casey G, Lo-Y Hsueh M, Lopez ME, *et al.* Growth suppression of human breast cancer cells by the introduction of wild-type p53 gene. *Oncogene*, 1991, 6(10): 1791-1797

[收稿日期] 2002 - 08 - 25

[修回日期] 2002 - 10 - 30

2003 年全国环境·基因与健康学术论坛第一轮征文通知

由中国环境诱变剂学会主办的第 11 届学术会议(环境·基因与健康学术论坛)将于 2003 年 10 月在四川省成都市(具体时间、地点第二轮再通知)召开。现将有关征文事宜通知如下:

1. 大会主题: 环境·基因与健康
2. 大会专题: ①21 世纪遗传病理学与疾病预防; ②基因组学与环境医学的发展; ③环境因素与肿瘤等疾病的交互作用; ④系统生物学与癌变、畸变、突变; ⑤生物工程产品的安全评价。

3. 征文要求

来稿请按《癌变·畸变·突变》2003 年第 1 期的“稿约”格式撰写,字数控制在 4000 字以内,需附 300~400 字的中、英摘要,全文及摘要各一份;或交 500~800 字的大摘要一份;首页加盖章位公章,来稿采用 word 格式打印并同时寄软盘。文责自负并请自留底稿。

4. 征文截止时间:2003 年 9 月 10 日(以当地邮戳为准)。

5. 征文投稿邮箱地址: 邮政编码:100083 北京市海淀区学院路 38 号

北京大学公共卫生学院营养与食品卫生学系 李 勇(收)

来稿请在信封上注明“征文”字样。

6. 优秀论文评选:

在被录用的论文中,评选优秀论文并发给主办单位签发的优秀论文证书,同时刊发在《癌变·畸变·突变》杂志上。

“全国乳腺疾病的病理学诊断及研究进展研讨会”征文通知

《临床与实验病理学杂志》编辑部和中华医学会病理学分会拟于 2003 年 10 月中旬在安徽省屯溪举办“全国乳腺疾病的病理学诊断及研究进展研讨会”。会议将邀请数位国内著名乳腺疾病研究专家做专题报告,重点介绍 WHO 乳腺病变最新组织学诊断标准以及国外乳腺病变的病理学研究进展。本次学术研讨会面向全国各级医疗机构、高等院校和科研院所的病理学和肿瘤学工作者,会期 6 天。

征文内容:(1)乳腺良性、恶性及交界性病变;(2)少见类型乳腺癌;(3)乳腺少见非肿瘤性病变;(4)其他乳腺病变。要求论文未公开发表,参考《临床与实验病理学杂志》论文格式撰写,请寄电脑打印稿并附软盘(Word 格式)。征文截稿日期:2003 年 9 月 1 日。

征文请寄: 230032 合肥市安徽医科大学内《临床与实验病理学杂志》编辑部,并在信封左下角注明“征文”字样。

联系电话: 0551 - 5161102 E - mail: JCEPW@sohu.com