

泡沫细胞靶向适配子的体外筛选

严鹏科¹, 汪江波², 张 慧³, 段才闻³, 李世煌³

(1 广州医学院附属第三医院药剂科, 广东省广州市 510150 2 南溪山医院药剂科, 广西桂林市 541002

3 南华大学药物药理研究所, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 指数富集配基的系统进化技术; 巨噬细胞源性泡沫细胞; 寡核苷酸适配子

[摘要] 目的 筛选巨噬细胞源性泡沫细胞的寡核苷酸适配子, 为动脉粥样硬化的靶向治疗提供实验依据。方法 以 80 mg/L 氧化型低密度脂蛋白孵育 THP-1 巨噬细胞 72 h 建立泡沫细胞模型; 利用指数富集配基的系统进化技术, 从体外合成的随机单链 DNA 文库中筛选特异性寡核苷酸适配子; 荧光显微镜观察寡核苷酸文库与泡沫细胞结合的特异性; 克隆、测序确定适配子的序列并进行一级结构和二级结构分析。结果 通过油红 O 染色和高效液相色谱分析, 确定成功建立泡沫细胞模型; 经过 18 轮的循环筛选, 寡核苷酸文库仅与泡沫细胞结合, 不再结合巨噬细胞、血管平滑肌细胞。测序鉴定出的所有适配子序列可以分为 12 个家族, 没有共同的同源序列。二级结构分析表明, 适配子主要形成茎环结构, 这可能是适配子与巨噬细胞源性泡沫细胞结合的结构基础。结论 利用复合靶指数富集配基的系统进化技术成功筛选出巨噬细胞源性泡沫细胞的寡核苷酸适配子。

[中图分类号] Q7

[文献标识码] A

Screening Aptamers of Foam Cells Derived From Macrophages by Complex SELEX

YAN Peng-Ke¹, WANG Jiang-Bo², ZHANG Hui³, DUAN Cai-Wen³, and LI Shi-Huang³

(1 Pharmacy of the Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical College, Guangzhou, Guangdong 510150 2 Pharmacy of Nan Xi Shan Hospital, Guilin, Guangxi 541002 3 Institute of Pharmacology and Pharmacy, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

[KEY WORDS] SELEX; Foam Cell; Oligonucleotide Aptamers

[ABSTRACT] **Aim** To acquire oligonucleotide aptamers of foam cells derived from macrophages and laying theoretical basis for targeted therapy of atherosclerosis. **Methods** THP-1 cell was treated with 80 mg/L oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) for 72 hours to establish macrophage derived foam cell model. Aptamers acquired from a ssDNA library by complex system evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX). Fluorescence microscopy was used to detect the binding specificity of ssDNA library and foam cells. After cloning and sequencing, the primary sequences and second structure of the aptamers were analyzed. **Results** THP-1 macrophage derived foam cell model was identified successfully by red oil O staining and HPLC. After 18 rounds selection, the ssDNA library did not bind to THP-1 macrophages and vascular smooth cells but bind to foam cells. All aptamers had no conserved motifs and could be divided into 12 families. The main secondary structures of these aptamers were stem-loops which could be vital in the interaction between aptamers and foam cells. **Conclusions** We obtained the aptamers of THP-1 macrophage derived foam cells successfully by complex SELEX.

泡沫细胞是动脉粥样硬化病变的特征性病理细胞, 其中巨噬细胞源性的泡沫细胞是动脉粥样硬化病变中最早出现、最主要的泡沫细胞。Li 等^[1]指出, 巨噬细胞源性的泡沫细胞有可能成为动脉粥样硬化诊断和治疗的靶点。指数富集配基的系统进化

技术 (systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX), 是一种筛选有特异结合能力配基的生物文库技术^[2,3], 其基本原理是人工构建一个随机寡核苷酸序列库, 文库两端的序列固定, 用于设计 PCR 扩增引物, 中间为 25~35 个寡核苷酸

[收稿日期] 2011-04-08

[作者简介] 严鹏科, 博士后, 副教授, 硕士研究生导师, 多年从事动脉粥样硬化发病机制和药物防治研究, Email 为 YanPK@TOM.COM。汪江波, 硕士, 主管药师, 研究方向为动脉粥样硬化发病机制和药物防治, Email 为 Jiangbowang@TOM.COM。张慧, 硕士, 研究方向为动脉粥样硬化发病机制和药物防治, Email 为 zhanghu@TOM.COM。

随机排列,文库的总量可达 1014 以上,文库中的每条寡核苷酸序列由于碱基的差异,其形成的三级构象不同,理论上可涵盖所有可能的立体构象,可特异性结合自然界存在的几乎所有种类的分子。通过随机寡核苷酸文库与靶物质结合、洗脱,结合 PCR 扩增富集,经过数轮反复筛选,最终测序获得与靶物质高特异性亲和的寡核苷酸序列,称为适配子。这一技术 90 年代初发明以来,已在基础研究、药物筛选及临床诊断和治疗等方面广泛应用,显示出广阔的应用前景。本文以巨噬细胞源性泡沫细胞为靶,利用 SELEX 技术,筛选巨噬细胞源性泡沫细胞的寡核苷酸适配子。

1 材料与方法

1.1 材料

THP-1 巨噬细胞株为南华大学药物药理研究所保存;新生牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司;佛波酯(PMA)为 CALBIOCHEM 公司产品;低密度脂蛋白(LDL)由北京老年病研究所提供;6 孔培养板为 Amresco 公司产品;酵母 tRNA 为 Ambion 公司产品;PCR 优化试剂盒、DNA 高效纯化回收试剂盒购自北京博大泰克生物基因技术有限责任公司;链亲和素磁珠、pGEM-T 载体购自 Promega 公司;GeneRule™ 100 bp DNA Ladder 为 Fermentas 公司产品;高效感受态细胞制作试剂盒购自上海生工生物工程技术服务有限公司;大肠杆菌 JM109 购自日本 TaKaRa 公司。

1.2 泡沫细胞模型的建立

在 6 孔培养板中,THP-1 巨噬细胞用含 10% 新生牛血清的 RPMI1640 培养液于 37℃ 含 5% CO₂ 的培养箱中培养。实验前用 100 nmol/L PMA 孵育 72 h 使其诱导分化成巨噬细胞,再用 80 mg/L 氧化型 LDL(ox-LDL)孵育 72 h 诱导成泡沫细胞。

1.3 泡沫细胞模型的鉴定

(1)油红 O 染色。将 THP-1 细胞培养于放有无菌盖玻片的 6 孔培养板内,细胞处理后,将盖玻片取出, PBS 液洗 3 次, 50% 的异丙醇固定 1 min, 油红 O 染色液染色 15 min, 苏木素染色液染色 3 min, 1% 盐酸酒精分色 4 s, 水性封片剂封片。光学显微镜下观察并摄像, 图象分析系统收集图象。(2)高效液相色谱法(HPLC)。将收集的泡沫细胞用 200 μL 细胞裂解液作用 10 min, 使细胞充分裂解。取上清, BCA 法定量蛋白, 加入内标液和无水乙醇混匀后, 分为两管, 游离胆固醇检测管加水和无水乙醇, 总胆固醇检测管

加 8.9 mol/L KOH 和无水乙醇 50℃ 孵育 2 h, 随后, 两管均加入正己烷涡旋混匀 15 min, 取有机相在真空干燥机中 50℃ 干燥。再加入丙酮、2 mol/L H₂SO₄: CrO₃ (体积比 1:1), 作用 5 min 后, 正己烷终止反应。然后加水涡旋混匀 15 min, 取有机相 50℃ 真空干燥, 用异丙醇:乙腈 (20:80) 溶解, 取 20 μL 进行 HPLC 分析。采用 C18 柱, 以异丙醇:乙腈为流动相进行非梯度洗脱, 流速 1 mL/min, 柱温保持 4℃, 在波长 250 nm 处检测 10 min。以峰面积定量胆固醇, 单位为 mg/g (胆固醇量/细胞蛋白质量), 总胆固醇量减去游离胆固醇量为胆固醇酯的量。

1.4 随机单链 DNA 文库的构建和引物的合成

参照文献 [4] 设计随机 81nt 的单链 DNA (ssDNA) 文库和引物, 由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。随机库序列为 5'-CCC CTG CAG GTG ATT TTG CTC AAG T-(N35)-AGT ATC GCT AAT CAG GCG GAT-3'。引物序列为上游 5'-FITC-CCC CTG CAG GTG ATT TTG CTC AAG T-3', 下游 5'-Biotin-ATC CGC CTG ATT AGC GAT ACT-3'。上游测序引物为 5'-CCC CTG CAG GTG ATT TTG CTC AAG T-3', 下游测序引物为 5'-ATC CGC CTG ATT AGC GAT ACT-3'。

1.5 FITC 标记的随机单链 DNA 文库的构建方法

采用生物素-链亲和素磁珠分离方法制备 ssDNA。PCR 产物经琼脂糖电泳、切胶回收后, 溶于 PBS 液中, 通过一条带生物素标记的链与链亲和素磁珠结合; 通过用 0.15 mol/L 的 NaOH 37℃ 变性 15 min, 另一条带 FITC 标记的链从链亲和素磁珠上被洗脱下来, 用无水乙醇于 -80℃ 沉淀 3 h 或过夜。经离心、空气中干燥后溶于少量 PBS 液中, 紫外分光光度计测定 ssDNA 浓度, 用于下一轮筛选。

1.6 SELEX 筛选的方法

随机 FITC 标记的 ssDNA 文库和 1× 结合缓冲液 (DPBS 液) 先后加入到培养有平滑肌细胞和巨噬细胞的 6 孔板内, 37℃ 分别孵育 30 min, 再将上清转入培养有泡沫细胞的 6 孔板内孵育 30 min, 弃上清, 用 37℃ 冲洗缓冲液 (PBS 液) 洗去未与泡沫细胞结合的 ssDNA, 再加入洗脱液 (含 5 mmol/L EDTA、1 mmol/L DTT 的 PBS 液) 于 80℃ 热变性 10 min, 取上清短暂离心后, 弃下层少量的沉积物, 用无水乙醇 -80℃ 沉淀 3 h 或过夜。离心回收产物, 空气中干燥后, 溶于少量 TE 或灭菌水中, 紫外分光光度计测定 A 值。用 FITC 标记的上游引物和生物素标记的下游引物 PCR 扩增为双标记的 dsDNA, 构建次级 FITC 标记的 ssDNA 文库用于下一轮筛选。整个筛

选过程均在暗室或避光条件下进行。为增强筛选的特异性,反应中加入酵母 tRNA 作为竞争性结合物;每筛选一轮后,进行一次反筛,用来去除与 6 孔板、平滑肌细胞、巨噬细胞结合的 ssDNA 成分。筛选过程如图 1。

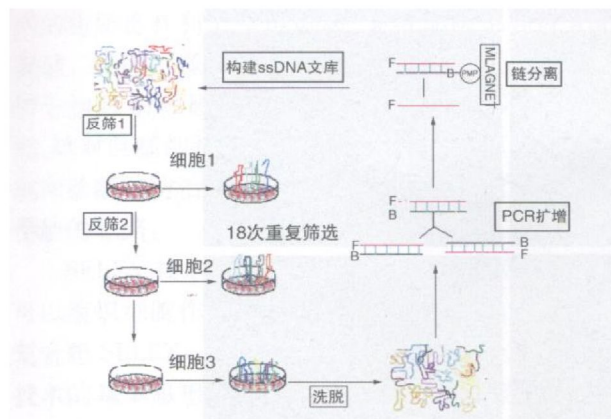


图 1. SELEX 技术筛选泡沫细胞适配子的过程

Figure 1. The process of screening aptamers of foam cells by SELEX technology

1.7 克隆与测序

将第 18 轮筛选后得到的 ssDNA 用无标记的上下游测序引物 PCR 扩增为 dsDNA, 纯化回收后与 pGEM-T 载体连接, 采用蓝白斑筛选方法, 随机挑选出 45 个克隆子。PCR 鉴定后将含有目的片段的 40 个克隆子送上海生工生物工程技术有限公司测序。

1.8 寡核苷酸适配子的一级结构和二级结构分析

分别采用 DNA MAN 软件和 RNA structure4.2 软件对寡核苷酸适配子的一级结构和二级结构进行分析。

2 结果

2.1 巨噬细胞源性泡沫细胞模型的建立

80 mg/L ox-LDL 孵育 THP-1 巨噬细胞 72 h 后, 经油红 O 染色, 显微镜下观察, 发现细胞浆体积扩大, 内含大量大颗粒脂滴, 符合泡沫细胞的形态特点 (图 2)。HPLC 检测 ox-LDL 处理组细胞内的总胆固醇 (TC)、游离胆固醇 (FC) 及胆固醇酯 (CE) 都明显增加, $CE/TC > 50\%$, 与正常对照组相比, 差异有显著性 ($P < 0.05$, 表 1)。

2.2 寡核苷酸适配子的克隆、测序

用随机 ssDNA 文库进行第一轮筛选时, 随机 ssDNA 可非特异性地与泡沫细胞、巨噬细胞及血管平

滑肌细胞结合, 经过 18 轮筛选后, 文库中的 ssDNA 只特异性结合泡沫细胞, 几乎不再与巨噬细胞、血管平滑肌细胞结合 (图 3)。将该轮筛选出的 ssDNA 适配子群用无标记的引物进行 PCR 扩增、T-A 克隆。随机挑选的 45 个白色的单个克隆子的菌液进行 PCR 鉴定, 发现 40 个有 PCR 产物, 其中有的产物比目的片段稍大。为了不遗漏克隆序列, 将所有有产物的克隆子进行测序, 结果 36 个测序成功。36 条序列中有 28 条序列长度与预期的一致, 只有两条序列比预期短 (18、24 少 1 个碱基); 有 5 条序列比预期要长 (4、7、14、16、43)。

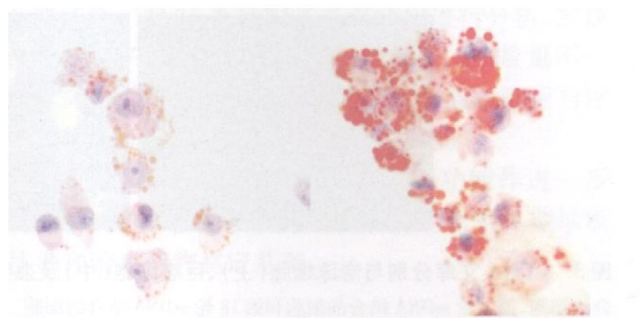


图 2. THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞的油红 O 染色 ($\times 200$)
左为正常对照组, 右为 ox-LDL 处理组。

Figure 2. Oil red O staining of THP-1 macrophage-derived foam cells

表 1. 各组细胞内胆固醇含量 (mg/g)

Table 1. Cholesterol content in each group of cells

分 组	FC	TC	CE
正常对照组	35.6 \pm 5.4	42.1 \pm 4.9	6.5 \pm 3.8
ox-LDL 处理组	64.6 \pm 9.1 ^a	168.3 \pm 8.6 ^a	103.7 \pm 3.6 ^a

a 为 $P < 0.05$ 与正常对照组比较。

2.3 寡核苷酸适配子的一级结构分析

采用 DNA MAN 软件对一级结构进行同源性分析, 结果所有随机序列无共同保守序列, 但可以分为 12 个家族: 家族 1 含有保守序列 CCCCTGCAGGT-GATTTTGCTCAAGT (4、7、14、16), 家族 2 含有保守序列 TGGTG (10、32、40、45), 家族 3 含有保守序列 GGCTC (23、36), 家族 4 含有保守序列 CGTGG (11、13、34), 家族 5 含有保守序列 TTGTG (25、28、30), 家族 6 含有保守序列 GGCCC (8、12、17、18、20), 家族 7 含有保守序列 CGGTG (9、35), 家族 8 含有保守序列 TGTGTGG (19、29), 家族 9 含有保守序列 TTG-GC (31、33), 家族 10 含有保守序列 TCTGCT (6、38), 家族 11 含有保守序列 CCACGG (2、3), 家族 12 共 5 个, 无保守序列 (24、26、42、43、44)。

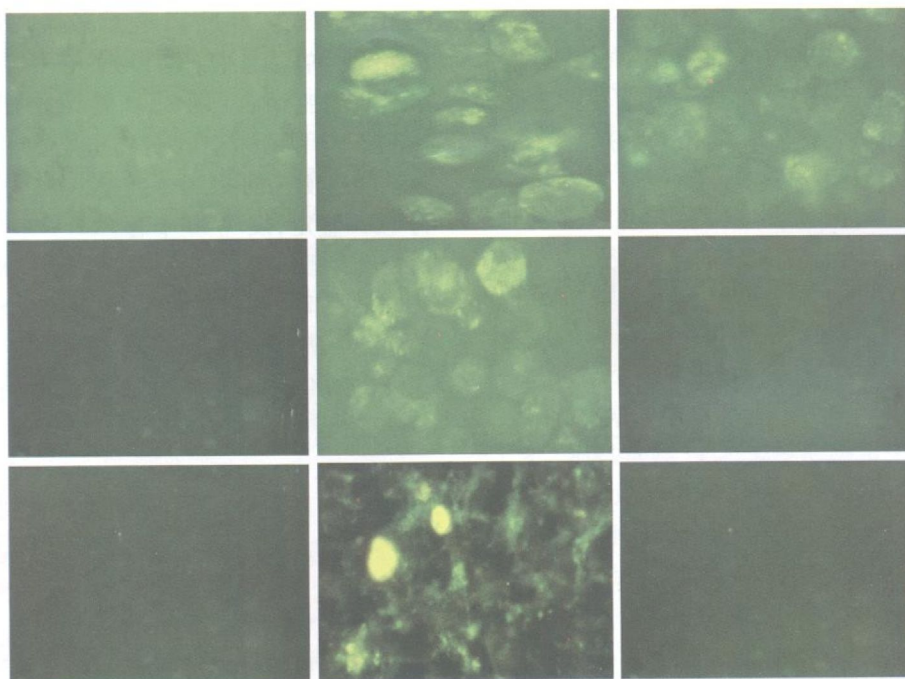


图 3. ssDNA 文库分别与泡沫细胞(上)、巨噬细胞(中)及血管平滑肌细胞(下)结合的荧光图($\times 200$) 从左到右依次为未结合的细胞、第 1 轮 ssDNA 结合的细胞和第 18 轮 ssDNA 结合的细胞。

Figure 3. Fluorescence microscope graph of binding of ssDNA library and foam cells, macrophages and vascular smooth muscle cells

2.4 寡核苷酸适配子的二级结构分析

对所有序列用软件 RNA structure 4.2 进行最低能量二级结构分析, 结果发现寡核苷酸适配子的二级结构主要特点是形成茎环结构。这些二级结构主要可以归纳为以下几类: A 类, 随机序列形成 1~3 个茎环、5'端和 3'端分别形成一个茎环, 以 8 号适配子为代表; B 类, 随机序列形成一个茎环、5'端与 3'端形成一个茎环, 以 24 号适配子为代表; C 类, 随机

序列本身形成 1~2 个茎环、5'端与随机序列形成一个茎环、3'端形成一个茎环, 以 2 号适配子为代表; D 类, 随机序列构成一个小茎环, 5'端和随机序列构成一个小茎环, 5'端和 3'端构成 2 个茎环, 以 12 号适配子为代表; E 类, 含有多个连续和单个茎环, 以 7 号适配子为代表(图 4)。这些也许正是寡核苷酸适配子与巨噬细胞源性泡沫细胞结合的结构基础。

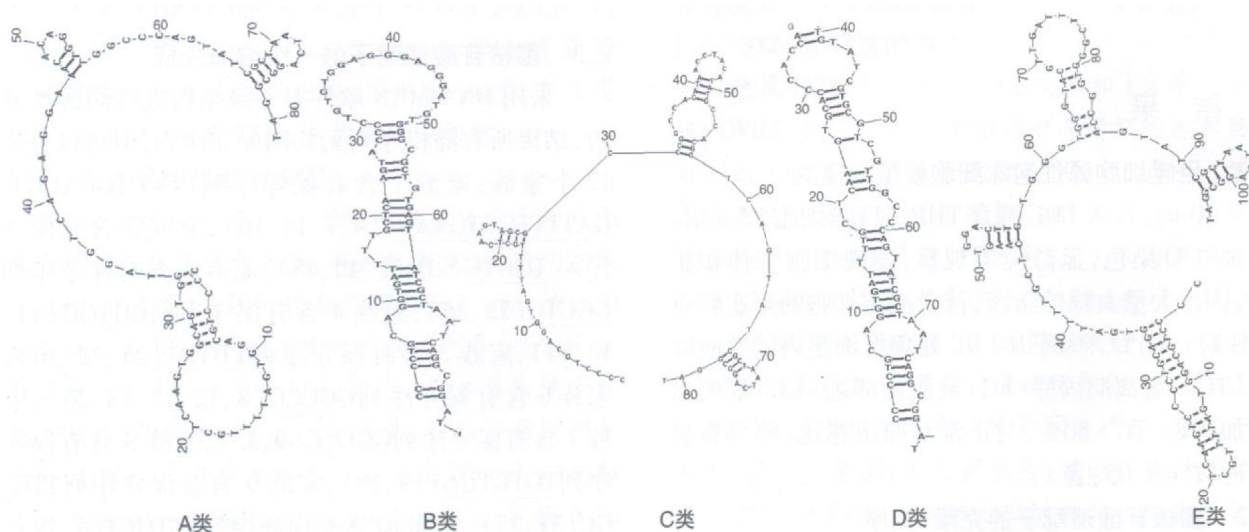


图 4. 寡核苷酸适配子的二级结构

Figure 4 The secondary structure of oligonucleotide aptamer

3 讨 论

研究表明^[5]大多数急性冠状动脉综合征患者的动脉斑块中有大量的巨噬细胞源性泡沫细胞凋亡,而抑制巨噬细胞源性泡沫细胞的凋亡、减少细胞内的脂质将有利于稳定斑块,促进动脉粥样硬化的消退。促进巨噬细胞源性泡沫细胞内的胆固醇流出对于动脉粥样硬化的转归有着重要意义^[6,7]。因此,针对巨噬细胞源性泡沫细胞的诊断和治疗将为临床诊断和防治动脉粥样硬化性心脑血管病开创一个新的思路。

SELEX 技术除了以单个分子为筛选对象外,还可以组织细胞作为靶进行筛选,这种筛选方法称为复合靶 SELEX (complex SELEX)。它和经典 SELEX 技术的基本思想是一样的,但可同时筛选出多种靶分子的适配子而不互相干扰,只是各个靶分子的适配子的分离效率不同^[8,9]。如通过 SELEX 筛选获得流感病毒凝血酶的适配子^[10]可以显著抑制流感病毒复制,降低传染性。此外,寡核苷酸适配子还有一个重要的功能就是作靶向剂。寡核苷酸适配子体积很小,有很强的穿透作用且易被血液清除,与放射性同位素、显影剂、染料连接等后,携带它们进入病变组织,可用于疾病的体内诊断。如 ^{99m}Tc 标记的中性粒细胞弹性蛋白酶的适配子^[11]能特异性地在炎症区成像。

参照文献 [12-13] 的方法,我们建立 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞模型。为了保证靶细胞的纯度以获得目的适配子,我们在建立泡沫细胞模型时,将 PMA 诱导 THP-1 细胞分化的时间延长到 3 天,ox-LDL 孵育的时间也延长到 3 天。经油红 O 染色和 HPLC 鉴定细胞达到泡沫化。参照有关文献^[4],构建了一个总长为 81nt 容量为 435 的随机单链 DNA 文库。采用生物素-链亲和素磁珠方法构建 FITC 标记的 ssDNA 文库后进行 SELEX 筛选。筛选以 6 孔板为筛选介质。由于高特异性亲和的适配子的含量在起始文库中很低,在首轮筛选中使用较高浓度的文库和较大数量的巨噬细胞源性泡沫细胞,有利于使尽可能多的文库序列被巨噬细胞源性泡沫细胞所捕获,减少漏掉目的适配子的可能性。在随后的十几轮筛选中,逐渐每隔几轮降低文库的量,以增强文库各序列之间与巨噬细胞源性泡沫细胞结合的竞争性,使筛选更加严谨。我们根据文献^[14],采用热变性加 EDTA 的洗脱方法,那就是将 EDTA 配制洗脱液,加入到靶细胞中,在 80℃ 条件下洗脱泡沫细

胞上的适配子,结果较好。尽管 EDTA 具有使贴壁细胞脱落的功能,但在实验中我们意外地发现,即使在 80℃ 条件下,EDTA 对于经过 PMA 长时间诱导后的贴壁的巨噬细胞源性泡沫细胞仍无明显的致脱落作用。

将第 18 轮筛选后的产物克隆和测序,所得的适配子序列长短不一。但大多与预期长度一致。有的适配子比预期要长,主要是由于 PCR 扩增时,退火导致目的片段 5' 端与上游引物连接或者与另 1~2 个目的片段的部分连接引起。也有的适配子要比预期稍短,可能是由于 PCR 扩增,链延伸时出现跳跃差错所致。对 36 个适配子二级结构进行分析,发现这些适配子二级结构的特点是形成大小、数量不一的茎环结构。这些结构可能是寡核苷酸适配子与巨噬细胞源性泡沫细胞结合的结构基础。

对这些适配子的特异性、结构和功能作进一步研究将对进一步开发动脉粥样硬化的新型早期诊断技术和治疗药物奠定基础。

[参考文献]

- [1] Li AC, Glass CK. The macrophage foam cell as a target for therapeutic intervention [J]. *Nat Med* 2002; 8(11): 235-242
- [2] Zimmermann B, Gesell T, Chen D, et al. Monitoring genomic sequences during SELEX using high-throughput sequencing: neutral SELEX [J]. *PLoS One* 2010; 5(2): e9169
- [3] Sefah K, Meng L, Lopez-Colon D, et al. DNA aptamers as molecular probes for colorectal cancer study [J]. *PLoS One* 2010; 5(12): e14269
- [4] 詹林盛,邵宁生,彭剑淳,等. 随机单链 DNA 文库 SELEX 筛选寡核苷酸适配子方法的建立 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 2003; 30(1): 151-155
- [5] 严鹏科,廖端芳,杨永宗. Caveolin-1 表达对血管平滑肌细胞胆固醇逆转运的调节作用 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2002; 10(5): 379-383
- [6] Larigauderie G, Fuman C. Adipophilin enhance lipid accumulation and prevents lipid efflux from THP-1 Macrophage: potential role in atherogenesis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24(3): 504-510
- [7] Lee-Rueckert M, Lappalainen J, Leinonen H, et al. Acidic extracellular environments strongly impair ABCA1 mediated cholesterol efflux from human macrophage foam cells [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; 30(9): 1766-772
- [8] Hicke BJ, Stephens AW. Escort aptamers: a delivery service for diagnosis and therapy [J]. *J Clin Invest* 2000;

- 106 (8): 923-928
- [9] Clark SL, Remcho VT. Aptamers as analytical reagents [J]. *Electrophoresis* 2002; 23(9): 1335-340
- [10] Sung Ho Jeon, Basak Kayhan, Tamar Ben-Yedidia, et al. A DNA aptamer prevents influenza infection by blocking the receptor binding region of the viral hemagglutinin [J]. *J Biol Chem*, 2004; 276(49): 48410-419
- [11] Charlton J, Sennello J, Smith D. In vivo imaging of inflammation using an aptamer inhibitor of human neutrophil elastase II. *J Chem Biol* 1997; 4: 809-816
- [12] Chen F, Hu Y, Li D, et al. CS-SELEX generates high-affinity ssDNA aptamers as molecular probes for hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 [J]. *PLoS One* 2009; 4(12): e8142
- [13] Barter PJ, Rye KA. Cholesteryl-ester transfer protein, high-density lipoprotein and arterial disease [J]. *Curr Opin Lipidol* 2001; 12(4): 377-382
- [14] Morris KN, Jensen KB, Julin CM, et al. High affinity ligands from in vitro selection: complex targets [J]. *Proc Natl Acad Sci* 1998; 95: 2902-907
- (此文编辑 许雪梅)

• 简讯 •

第 19 届国际帕金森病及相关疾病大会通知

第 19 届国际帕金森病及相关疾病大会 (The 19th World Congress on Parkinson's Disease and Related Disorders), 将于 2011 年 12 月 11 日 -14 日在上海召开。会议由国际帕金森病及相关疾病研究委员会 (Association on Parkinsonism and Related Disorders, APRD)、KENES 国际医疗会议公司 (Kenes International) 主办, 上海交通大学医学院附属瑞金医院神经科承办。

每两年一届的国际帕金森病及相关疾病大会是全球最大规模、最高级别的帕金森病学术盛会。本次会议将邀请来自世界各地 2500 名神经病学界的专家学者参会, 是中国神经病学界承办的世界规模的神经病学科帕金森病专业最高级别的学术会议, 必将有助于推动国内外同行在帕金森病及其他运动障碍病领域的交流与合作。热忱地欢迎大家积极投稿和参加会议。

一、会议名称: 第十九届国际帕金森病及相关疾病大会

二、会议时间: 2011 年 12 月 11 日 -14 日

三、会议地点: 上海国际会议中心 地址: 上海浦东滨江大道 2727 号

四、参会对象: 从事神经病学、老年病学及神经科学专业的医师、研究工作者和研究生

五、注册费用: > 35 岁: \$ 150/人; < 35 岁: \$ 100/人 (不包括食宿交通), 请在会议网站上进行注册。

六、报名方式: 请欲参加会议和已经完成注册的同志将回执单 (姓名、单位、职称、联系地址、邮编、身份证号、手机、E-mail) 发送到: WCOPD1901@gmail.com。电子回执单可以到上海交通大学医学院附属瑞金医院神经科网站上下载。

上海交通大学医学院附属瑞金医院神经科
2011 年 4 月 5 日