

[文章编号] 1007-3949(2004)12-06-0627-05

• 实验研究 •

重组腺相关病毒载体介导人血管内皮生长因子 165 基因对缺血心肌血管新生的影响

黄志军¹, 袁洪¹, 曾钧发², 吴小兵³, 彭建强³, 易斌¹, 阳国平¹

(1. 中南大学湘雅三医院医学实验中心, 湖南省长沙市 410013; 2. 南华大学附属第二医院 ICU, 湖南省衡阳市 421001; 3. 八六三计划生物领域病毒基因载体研发基地, 北京市 100052)

[关键词] 病理学与病理生理学; 腺相关病毒; 血管内皮生长因子; 缺血心肌; 血管新生; 基因治疗

[摘要] 为了研究重组 2 型腺相关病毒载体介导人血管内皮生长因子 165(hVEGF165) 基因对兔缺血心肌血管新生的影响, 选取了 40 只新西兰兔, 建立心肌缺血模型后随机分为血管内皮生长因子高、中、低剂量组及对照组等 4 组, 分别向缺血区域心肌注射不同剂量的腺相关病毒载体/人血管内皮生长因子 165 或磷酸盐缓冲液。4 周后取心肌组织和血液标本, 采用逆转录聚合酶链反应和酶联免疫吸附法检测人血管内皮生长因子 165 基因的表达; 制作组织学切片以观察心肌组织的病理改变, 于高倍镜下计数缺血区域毛细血管数目。结果发现, 血管内皮生长因子低、中、高剂量组的人血管内皮生长因子 165/GAPDH mRNA 比值依次为 0.14 ± 0.03 、 0.40 ± 0.04 和 0.64 ± 0.04 , 血清人血管内皮生长因子 165 含量分别为 64.6 ± 8.0 ng/L、 327.1 ± 9.9 ng/L 和 471.6 ± 6.9 ng/L, 各组间的差异均具有显著性 ($P < 0.01$)。低、中、高剂量组单个高倍视野内的毛细血管数分别为 4.6 ± 1.3 、 11.6 ± 1.8 和 21.8 ± 3.1 条, 而对照组为 4.5 ± 1.5 条。高、中剂量组的毛细血管数显著高于对照组 ($P < 0.01$), 而低剂量组与对照组相比差异无显著性 ($P > 0.05$)。相关分析发现毛细血管数与腺相关病毒载体/人血管内皮生长因子 165 剂量呈正相关关系 ($r = 0.910$, $P < 0.01$)。此结果提示, 2 型腺相关病毒载体介导的人血管内皮生长因子 165 基因具有明显的诱导缺血心肌血管新生的作用, 且呈剂量依赖关系。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Recombinant Adeno-associated Viral Vector2-Mediated Human Vascular Endothelial Growth factor 165 Gene Transfer Induces Angiogenesis in Ischemic Heart

HUANG Zhi-Jun, YUAN Hong, ZENG Jun-Fa, WU Xiao-Bin, PENG Jian-Qiang, YANG Guo-Ping, YI Bin, and TANG Xiao-Hong

(The Center of Experimental Medical Research in the Third Xiangya Hospital, Centre South University, Changsha, 410013, China)

[KEY WORDS] Adeno-associated Virus; Vascular Endothelial Growth Factor; Ischemic Myocardium; Angiogenesis; Gene Therapy

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of human vascular endothelial growth factor 165 (hVEGF165) cDNA mediated by recombinant adeno-associated viral vector2 (rAAV-2) on the angiogenesis in ischemic myocardium. **Methods** Rabbit myocardial ischemic models were generated by ligation of the anterior descending coronary artery. All these models were randomly divided into 4 groups: VEGF high dose group (10^{12} v. g./kg), VEGF middle dose group (10^{11} v. g./kg), VEGF low dose group (10^{10} v. g./kg) and control group. rAAV-2/hVEGF165 or PBS was injected into the ischemic myocardium respectively. After 4 weeks, the expression of objective gene was evaluated by RT-PCR and ELISA. The histological changes of myocardium were observed through histological sections. Myocardial capillary counts were calculated to evaluate the proangiogenic effects.

Results With the increasing dosage of injected rAAV-2/hVEGF165, hVEGF165/GAPDH mRNA ratio were 0.14 ± 0.03 , 0.40 ± 0.04 and 0.64 ± 0.04 respectively, while VEGF protein content were 64.6 ± 8.0 ng/L, 327.1 ± 9.9 ng/L and 471.6 ± 6.9 ng/L respectively. The changes of expression were dose-dependent and there were significant difference among the groups ($P < 0.01$). In rAAV-2/hVEGF165 10^{10} , 10^{11} and 10^{12} v. g./kg treatment groups, the microvessel counts were $(4.6 \pm 1.3)/HPF$, $(11.6 \pm 1.8)/HPF$ and $(21.8 \pm 3.1)/HPF$ respectively, while $(4.5 \pm 1.5)/HPF$ in control group. There was significant difference between the 10^{11} , 10^{12} v. g./kg hVEGF165 gene-treated groups and control group (both $P < 0.01$), but no such difference between 10^{10} v. g./kg hVEGF165 gene-treated group and control group ($P > 0.05$). The result of correlation analysis showed the microvessel counts were related with the dosages of rAAV-2/hVEGF165 positively ($r = 0.910$, $P < 0.01$). **Conclusions** hVEGF165 gene mediated by rAAV-2 can be efficiently transferred into rabbit ischemic heart and induce angiogenesis of myocardium.

[收稿日期] 2004-09-20

[修回日期] 2004-11-09

[基金项目] “863” 高科技发展计划基因治疗重大关键技术资助项目 (863-BH03-05-02)

[作者简介] 黄志军, 硕士, 主要研究方向是冠心病的基因治疗, 联系电话 0731-8618311, 13908472564, E-mail 为 mhjz@163.com。袁洪, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为心血管疾病的基因治疗, 本文通讯作者, 联系电话 0731-8618311, E-mail 为 yuanhong01@vip.sina.com。

ium successfully. The proangiogenic effect of hVEGF165 gene mediated by rAAV-2 is in a dose-dependent manner.

随着现代医学对血管生长机理研究的深入, 心肌缺血相关治疗基因的克隆成功, 使冠心病的基因诱导血管再生治疗成为可能。以往的基因治疗多以携带血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)核酸的腺病毒或者裸质粒作为研究对象, 而以携带 VEGF 基因的腺相关病毒(adenovirus-associated virus, AAV)作为载体治疗心肌缺血模型的研究国内外尚处于起步阶段^[1,2], 有关量效关系的研究则未见文献报道。本研究拟通过注射重组 2 型 AAV (rAAV-2) 介导的人 VEGF165(hVEGF165) cDNA 到新西兰兔缺血心肌, 来探讨不同剂量 rAAV-2/hVEGF165 对兔缺血心肌血管新生的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

rAAV-2/hVEGF165 由 863 计划生物领域病毒基因载体研究开发基地构建, 采用“一种病毒感染一个载体细胞株”的方法生产^[3], 滴度为 1×10^{16} /L。CK-MB 检测试剂购自上海德赛试剂公司, RNA 提取试剂(Trizol Reagent)购自 GIBCO 公司, cDNA 合成试剂盒(k1622)购自 Revert AidTM MBI 公司, Taq DNA 聚合酶购自 Promega 公司, VEGF165-CytElisa 试剂盒购自 CytImmune Sciences 公司。其他试剂均为进口或国产分析纯。

1.2 实验动物及分组

雄性新西兰兔 40 只, 体重 2.0~2.5 kg, 由中南大学实验动物学部提供。先建立心肌缺血模型。然后随机分为 4 组, 前 3 组 rAAV-2/hVEGF165 滴度分别为 10^{12} /kg、 10^{11} /kg 和 10^{10} /kg 剂量组(VEGF 高、中、低剂量组)第 4 组为手术对照组(对照组)。另在建模之前随机抽取 10 只新西兰兔的血液标本用来检测心肌酶学正常范围(正常组)。

1.3 动物模型的建立

将新西兰兔仰位固定于手术台上, 剪毛, 接好心电图机, 络合碘消毒, 2% 盐酸利多卡因逐层局麻, 沿胸骨左缘切开第三、四肋软骨, 打开胸腔, 剪开心包, 以心大静脉及左心耳下缘为标志, 在左前降支距离左心耳下缘 5~10 mm 处结扎, 当观察到结扎点远端的心前壁变成暗红色, 室壁运动减弱, 心电图示 ST 段呈弓背向上抬高、T 波高耸, 即认为模型建立成功。将成功建模的家兔按照分组给予相应处理; 然后关闭胸腔, 逐层缝合。术后精心饲养, 给予青霉素 30 万单位肌注 3 天。

1.4 基因导入

将 rAAV-2/hVEGF165 用磷酸盐缓冲液(PBS)稀释成相应剂量, 每只家兔在前降支结扎部位约 10 mm × 10 mm 范围内分 6 点注射含 rAAV-2/hVEGF165 的 PBS 1 mL。对照组注射 1 mL PBS。

1.5 心肌酶学指标检查

采用免疫抑制酶动力学方法测定血清标本肌酸激酶同功酶(CK-MB)的含量来反应心肌损伤程度。按照试剂盒说明书操作, 取样本血清 50 μ L, 加入预先保温至 37 $^{\circ}$ C 的 CK-MB 试剂盒工作液中, 37 $^{\circ}$ C 温育 1 min, 在 Biophptometer 分光光度计 340 nm 波长处测定吸光度, 根据公式计算出 CK-MB 的释放量(U/L)。

1.6 半定量逆转录聚合酶链反应检测人血管内皮生长因子 165 基因的表达

取 100 mg 心肌组织放入研钵中, 加适量液氮研碎, 用 1 mL Trizol 提取组织总 RNA, 采用 MBI-k1622 试剂盒合成 cDNA。取 5 μ L cDNA 在 50 μ L 的 PCR 反应体系中进行扩增: 反应体系首先加热至 94 $^{\circ}$ C, 预变性 5 min, 然后进行 30 个 PCR 循环(94 $^{\circ}$ C 变性 30 s \rightarrow 54 $^{\circ}$ C 退火 30 s \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 延伸 40 s); 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。取 5 μ L PCR 产物作电泳。为减小误差, 采用 GAPDH 基因作为内对照, 扩增条件与目的基因一致。hVEGF165 mRNA PCR 扩增产物为 235 bp, 引物序列如下: 上游引物 5'-AGGGCAGAATCATCACGAAG-3'; 下游引物 5'-AGGTTTGATC CGCATAATCT-3'。GAPDH mRNA 的 PCR 扩增产物为 437 bp, 引物序列如下: 上游引物 5'-GACCCCTTCATTGACCTCAA-3'; 下游引物 5'-GCATGGACTGTGGTCATGA GT-3'。

1.7 酶联免疫吸附法定量分析血清中人血管内皮生长因子 165 含量

应用 hVEGF165-CytElisa 试剂盒检测新西兰兔血清中的 hVEGF165 浓度。主要步骤如下: 按说明书要求配好各种溶液, 添加空白液、标准品及标本血清各 100 μ L; 每孔添加 25 μ L 生物素标记的兔抗人 VEGF 多克隆抗体; 室温下(20~25 $^{\circ}$ C)孵育 3 h; 清洗 5 次后, 每孔添加 50 μ L 抗生物素碱性磷酸酶, 孵育 45 min; 再次清洗 5 次, 每孔添加 200 μ L 染色剂; 在 ELX800NB Kejunior 酶标仪上于 490 nm 处检测标准品的 OD 值, 记录所有孔的 OD 值; 计算标准曲线和各个样本的 hVEGF165 浓度。

1.8 缺血心肌形态观察

将包埋好的石蜡标本固定, 垂直于心肌长轴, 切

4 μm 的薄片, 每个标本 15 张片。切片经二甲苯脱蜡, 各级乙醇水化、水洗, 苏木素浸染数分钟, 水洗, 返蓝约 10 min, 于伊红中浸染约 15 s, 各级乙醇脱水, 二甲苯透明, 树胶封固。在低倍镜下选取典型区域, 高倍镜下 ($\times 400$ 倍) 观察各组梗死区域心肌形态, 并用数码相机拍摄照片。

1.9 新生毛细血管计数

将心肌切成 5 μm 厚的组织切片, 用抗 CD31 因子单克隆抗体染色后, 在高倍显微镜 ($\times 400$ 倍) 下观察, 鉴定肌肉组织中内皮细胞毛细血管并计数^[4]。

1.10 统计学分析

所有数据均采用 SPSS10.0 统计软件包统计; 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示; 多个样本均数的比较采用单因素方差分析, 多个样本均数间的两两比较采用最小有意义差异 t 检验 (LSD- t 检验); 变量间线性关系采用直线相关分析; $P < 0.05$ 为差别具有显著性意义。

2 结果

2.1 新西兰兔心肌缺血模型建立情况

40 只新西兰兔在模型制作过程中, 因气胸死亡 4 只, 因术中恶性心律失常死亡 4 只, 造模成功率为 80%。术后无死亡, 故完成实验的全部动物为 32 只, 分别为 VEGF 高、中、低剂量组和对照组各 8 只。

心肌酶学测定结果发现, 与正常组相比, 手术建模各组的 CK-MB 都有明显升高 ($P < 0.01$), 方差分析显示建模各组间差异无显著性 ($P > 0.05$), 说明建模各组模型的心肌缺血程度比较一致 (表 1, Table 1)。

表 1. 各组新西兰兔术后 48 h 的 CK-MB 比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1. Comparison of CK-MB of different groups

分 组	数量(只)	CK-MB(U/L)
正常组	10	284 \pm 27
对照组	8	4 030 \pm 88 ^a
VEGF 低剂量组	8	4 044 \pm 155 ^{ab}
VEGF 中剂量组	8	4 001 \pm 104 ^{ab}
VEGF 高剂量组	8	4 064 \pm 170 ^{ab}

a: 与正常组相比, $P < 0.01$; b: 与对照组相比, $P > 0.05$

2.2 不同剂量人血管内皮生长因子 165 病毒载体的促血管生成作用

2.2.1 不同剂量组人血管内皮生长因子 165 mRNA 的表达情况 半定量逆转录聚合酶链反应检测发现, VEGF 低、中、高剂量组均有 hVEGF165 mRNA 的

表达, hVEGF165 与 GAPDH 灰度比值分别为 0.14 ± 0.03 、 0.40 ± 0.04 和 0.64 ± 0.04 , 对照组未能检测到 hVEGF165 mRNA 的表达 (图 1 和图 2, Figure 1 and 2)。提示随着 rAAV-2/hVEGF165 治疗剂量的增加, hVEGF165 mRNA 表达量也增加, 且三组间两两比较差异都有显著性 ($P < 0.01$)。

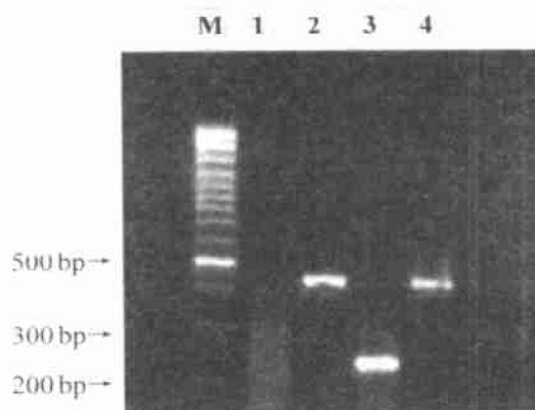


图 1. 人血管内皮生长因子 mRNA 在心肌组织中的表达

M 为 DNA 标记, 1 为对照组, 2 为内对照基因 GAPDH, 3 为 hVEGF 治疗组, 4 同 2。

Figure 1. Expression of hVEGF mRNA in myocardium

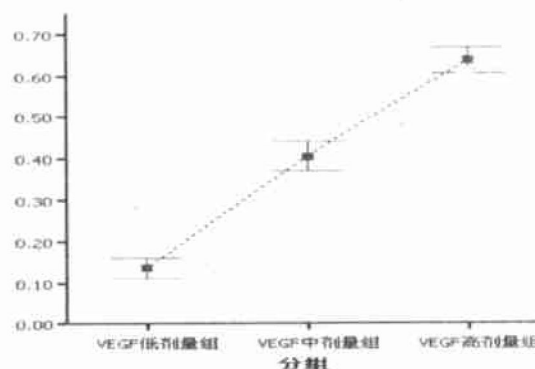


图 2. 不同剂量组人血管内皮生长因子 165 mRNA 的表达

Figure 2. Expression of hVEGF165 mRNA in different groups

2.2.2 不同剂量组血清人血管内皮生长因子 165 蛋白含量 酶联免疫吸附法测定发现, VEGF 低、中、高剂量组的血清 hVEGF165 含量分别为 64.6 ± 8.0 ng/L、 327.1 ± 9.9 ng/L 和 471.6 ± 6.9 ng/L, 呈剂量依赖性增高。中、高剂量组的蛋白含量均显著高于低剂量组 ($P < 0.01$), 且高剂量组与中剂量组比较亦存在显著性差异 ($P < 0.01$)。对照组未能检测到 hVEGF165 的含量。

2.2.3 各组微血管计数比较 心肌组织形态学检测结果见图 3 (Figure 3) 和表 2 (Table 2)。可见 VEGF 低剂量组和对照组的毛细血管密度无统计学

差异($P > 0.05$);而中、高剂量组毛细血管数均显著高于低剂量组及对照组($P < 0.01$);中和高剂量组之间也存在显著的统计学差异($P < 0.01$)。

2.3 人血管内皮生长因子 165 基因表达与病毒载体剂量的相关分析

相关分析发现,基因治疗各组的 mRNA 表达、蛋白含量、毛细血管数和 rAAV-2/hVEGF165 剂量均呈正相关关系,相关系数(r)分别为 0.882($P < 0.01$)、0.794($P < 0.01$)和 0.910($P < 0.01$),提示随着 rAAV-2/hVEGF165 治疗剂量的增加, hVEGF165 基因表达增强,新生血管数目增多。

表 2. 各组毛细血管密度比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2. Density of capillaries in different groups

分 组	<i>n</i>	毛细血管密度(条/高倍视野)
对照组	8	4.5 ± 1.5
VEGF 低剂量组	8	4.6 ± 1.3 ^a
VEGF 中剂量组	8	11.6 ± 1.8 ^b
VEGF 高剂量组	8	21.8 ± 3.1 ^{bc}

a: $P > 0.05$; b: $P < 0.01$, 与对照组相比; c: $P < 0.01$, 与 VEGF 中剂量组比较。

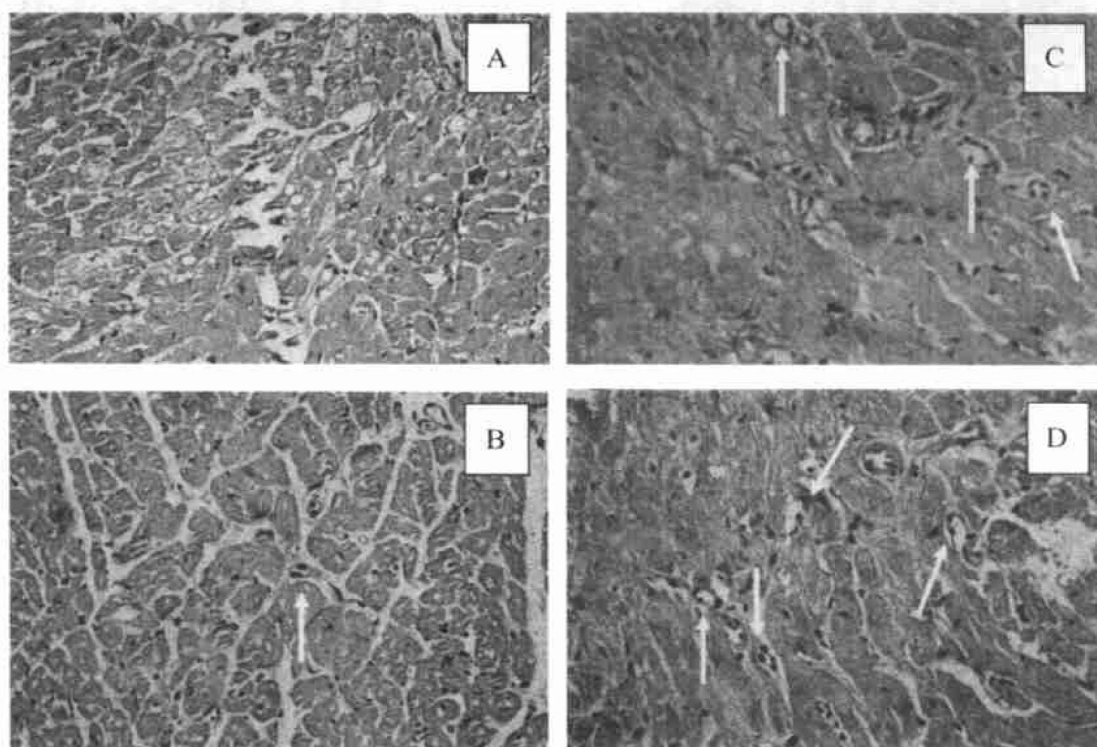


图 3. 各组注射部位心肌形态学改变(HE × 400) A 为对照组标本,可见梗死区肌原纤维破碎,心肌细胞空泡变性;B 为 VEGF 低剂量组,可见生成毛细微血管较少;C 为 VEGF 中剂量组,可见薄壁血管;D 为 VEGF 高剂量组,可见大量新生血管和少量炎性细胞的浸润;图中箭头所指即新生血管。

Figure 3. Myocardial morphological changes around the injection sites in different groups

3 讨论

血管内皮生长因子(VEGF)是一种特异作用于血管内皮细胞的多功能细胞因子。目前认为 VEGF 可以通过对血管生成过程中多个环节的调节来达到促血管新生的作用:如促进内皮细胞的分裂增殖、增加血管的通透性、调节相关细胞因子及其受体活性、改变细胞外基质的组成、抑制血管内皮细胞的凋亡等^[7-12]。应用 VEGF 诱导心肌血管再生有两种方法:一是应用重组蛋白因子,二是以编码因子的基因转

染心肌。二者都有成功的报道,哪种方法更安全、有效尚无定论。但直接应用细胞因子有几个问题是难以解决的:一是重组蛋白制备复杂、价格贵;二是半衰期短、需反复给药。而 rAAV 具有表达时间长、宿主范围广等特点,因此采用 rAAV 载体转染 VEGF cDNA 的基因治疗则可以较好的解决上述问题。

本文发现,导入 rAAV-2/hVEGF165 的局部心肌组织可以较持久地表达 hVEGF165 mRNA 和分泌 hVEGF165,治疗组的表达水平远高于对照组。在治疗组的缺血心肌中,可以见到修复的心肌细胞和明

显的微血管再生,而对照组仍可见较多的心肌坏死,微血管数目很少,这与国外的报道是一致的^[1]。以往的研究发现高血清水平的 VEGF(200 mg/L),可以导致人骨骼肌生成血管瘤;而低血清水平的 VEGF(30 mg/L)又不足以诱导缺血肌肉的血管生成。因此,控制 VEGF 的表达水平,量化基因导入数量是很重要的。本研究发现 rAAV 的滴度与目的基因 mRNA 及蛋白水平的表达、新生的毛细血管数目变化趋势保持一致,提示 rAAV 的滴度变化直接影响了外源基因的表达,可以通过控制 rAAV 的剂量来控制目的基因的表达。本研究采用了 10^{10} /kg、 10^{11} /kg 和 10^{12} /kg 三种递增的剂量,结果除 10^{10} /kg 治疗组最终诱导产生的微血管数目与对照组差异无显著性以外,其他两个剂量组都呈现了较强的促血管生成作用,而且三组之间呈现了明显的量效关系。

本研究结果表明 rAAV-2 介导的 hVEGF165 基因可以有效地转染入家兔缺血心肌,并具有明显的诱导缺血心肌血管生成的作用,且呈剂量依赖关系。

[参考文献]

- [1] Su H, Lu RH, Kan YW. Adenovirus associated viral vector mediated vascular endothelial growth factor gene transfer induces neovascular formation in ischemic heart. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97** (25): 13 801-806
- [2] 于雪,龚艳君,蒋捷,周爱儒,高炜. 重组腺病毒相关病毒携带人血管内皮生长因子 165 诱导家兔缺血心肌血管生成的研究. *中华老年心脑血管病杂志*, 2003, **5** (6): 403-405
- [3] 伍志坚,吴小兵,曹晖,董小岩,王宏,侯云德. 一种高效的重组腺病毒载体生产系统. *中国科学(C辑)*, 2001, **31** (5): 423-430
- [4] Murohara T, Asahara T, Silver M, Bauters C, Masuda H, Kalka C, et al. Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. *J Clin Invest*, 1998, **101** (11): 2 567-578
- [5] Miller DG, Adam MA, Miller AD. Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection. *Mol Cell Biol*, 1990, **10** (8): 4 239-242
- [6] Harvey BG, Hackett NR, El-Sawy T, Rosengart TK, Hirschowitz EA, Lieberman MD, et al. Variability of human systemic humoral immune responses to adenovirus gene transfer vectors administered to different organs. *J Virol*, 1999, **73** (8): 6 729-742
- [7] Brizzi MF, Formato L, Bonamini R. The molecular mechanisms of angiogenesis: a new approach to cardiovascular disease. *Ital Heart J*, 2001, **2** (2): 81-92
- [8] Breier G. Functions of the VEGF/VEGF receptor system in the vascular system. *Semin Thromb Hemost*, 2000, **26** (5): 553-559
- [9] 刘启功,陆再英,周洪莲,张卫东,颜进. 血管内皮生长因子预防血管成形后再狭窄的机理. *中国动脉硬化杂志*, 2001, **9** (3): 209-212
- [10] Behzadian MA, Windsor LJ, Ghaly N, Liou G, Tsai NT, Caldwell RB. VEGF induced paracellular permeability in cultured endothelial cells involves urokinase and its receptor. *FASEB J*, 2003, **17** (6): 752-754
- [11] Wang H, Keiser JA. Vascular endothelial growth factor upregulates the expression of matrix metalloproteinases in vascular smooth muscle cells: role of flt-1. *Circ Res*, 1998, **83** (8): 832-840
- [12] 王家宁,张群林,葛永贵,王玮,黄永章,王俊峰,等. 血管内皮细胞生长因子基因治疗严重肢体缺血. *中国动脉硬化杂志*, 2001, **9** (4): 328-331

(此文编辑 胡必利)

·征稿征订·

《实用全科医学》杂志 2005 年征稿征订启事

《实用全科医学》杂志是经中华人民共和国科技部批准,国家新闻出版总署注册备案,是中华预防医学会系列杂志,国内外公开出版发行的全科医学科技类学术性双月刊。国际标准刊号 ISSN1672-1764,国内统一刊号 CN34-1261/R。主要栏目:专家论坛、全科基础研究、全科临床研究、全科医学探讨、医学教育、医疗卫生管理、预防与保健、全科临床实践、临床护理、中医中药、医学检验、社区卫生与康复、健康教育、医疗与法律、心理卫生、技术交流、药物与临床、专题研究、国外医学进展、卫生信息、急诊急救、病例分析、医学影像、综述等 30 多个栏目。欢迎临床、社区医务人员、医疗卫生管理人员及教育人员、科研人员踊跃投稿,对于基金资助项目、科研课题等高质量研究性文章优先刊用。

本刊为双月刊,每单月 1 日出刊。国际标准版本大 16 开,每期 96 页,每期定价 6 元,全年 36 元。本刊立足全科、面向全国、注重实用、贴近实际。普及全科医学知识,传播全科医学理念,弘扬全科医学精神,发展全科医学事业。适宜各级医疗机构、科研单位、大专院校及各类卫生人员阅读。本刊被中国核心期刊(遴选)数据库,中国期刊全文数据库、中国学术期刊综合评价数据库、中国生物医学数据库、科技部西南信息中心《中国科技期刊数据库》、中国药学文摘数据库,万方数据—数字化期刊群等多家数据库收录。读者可上网查寻浏览本刊内容并征订本刊。

订购全国各地邮政局(所),邮发代号 26-200。也可直接汇款至《实用全科医学》杂志编辑部订阅免收邮寄费,欢迎投稿(请寄打印稿与软盘)。

地址:233004 安徽省蚌埠市长淮路 41 号 《实用全科医学》杂志编辑部;电话/传真:0552-3066635

电子信箱:Zhouhp@ah163.com Syqkx@periodicals.net.cn Syqy@chinajournal.net.cn