

DOI: 10.3779/j.issn.1009-3419.2006.02.16

· 临床研究 ·

# 荧光实时定量 PCR 检测 NSCLC 中 PEDF 基因表达状态的研究

张力建 陈晋峰 柯杨 Robert E Mansel Wen G Jiang

**【摘要】** 背景与目的 SYBR Green 是一种较为常用的非探针类定量 PCR 的方法,其主要优点在于操作过程简单,结果具有一定特异性。本研究的目的是建立检测色素上皮衍生因子(pigment epithelium derived factor, PEDF) mRNA 的 SYBR Green 实时定量 PCR 的方法,了解肺癌组织及其远癌肺组织中 PEDF 的表达水平,研究肺癌组织中 PEDF 的表达水平与各种临床病理特征之间的关系。方法 利用 RT-PCR 的方法扩增并纯化 PEDF 以及内对照 GAPDH mRNA 的目的片段,倍比稀释后作为定量模板。利用相对定量的方法,检测 21 例肺癌及相应远癌肺组织中 PEDF mRNA 相对于 GAPDH mRNA 的表达量,进行相对定量分析。结果 21 例肺癌组织及相应的远癌肺组织中均可检出 PEDF 的表达,肺癌组织中 PEDF 的相对表达量为  $0.5505 \pm 0.3590$  (0.11 ~ 1.11),远癌肺组织中为  $0.7219 \pm 0.2582$  (0.29 ~ 1.31) ( $P=0.024$ )。早期( ~ 期)肺癌患者和肿瘤较小时( $T_1$ ) PEDF 的表达量显著高于晚期( ~ 期,  $P=0.010$ )和肿瘤较大者( $T_{2-4}$ ,  $P=0.007$ )。结论 所建立的 SYBR Green 实时定量 PCR 方法可以成功地检测 PEDF 基因的表达量。初步检测结果显示 PEDF 可能是一种肺癌发生发展过程中的保护因素。

**【关键词】** PEDF 非小细胞肺癌 实时定量聚合酶链反应 SYBR Green

**【中图分类号】** R-331;R734.2

**Expression of PEDF mRNA in non-small cell lung cancer by real-time PCR method** ZHANG Lijian\*, CHEN Jinfeng\*, KE Yang, Robert E Mansel, Wen G Jiang. \* Surgery Department, Peking University School of Oncology, Beijing Cancer Hospital, Beijing 100036, P. R. China; Cancer Research Center, Peking University Health Science Center, Beijing 100083, P. R. China; Surgery Department, Metastasis & Angiogenesis Research Group, Wales College of Medicine, Cardiff University, Cardiff, United Kingdom

Corresponding author: ZHANG Lijian, E-mail: lijzhang@yeah.net

**【Abstract】** **Background and objective** SYBR Green is a non-probe real-time PCR method. It is quite convenient and its specificity is good. The aim of this study is to establish a quantitative SYBR Green real-time PCR method for detection of PEDF gene in non-small cell lung cancer (NSCLC), and to investigate the relationship between PEDF mRNA expression and the clinicopathological characteristics. **Methods** The target segments of PEDF and GAPDH proliferated by RT-PCR were diluted and used as the standard templates. PEDF mRNA was detected in 21 NSCLC tissues and matched paracancerous pulmonary tissues by relative quantitative method. **Results** All the lung cancer tissues and the matched paracancerous pulmonary tissues had expression of PEDF mRNA. The relative level of PEDF mRNA expression was  $0.5505 \pm 0.3590$  (0.11--1.11) in the lung cancer tissues and  $0.7219 \pm 0.2582$  (0.29--1.31) in the matched paracancerous pulmonary tissues respectively ( $P=0.024$ ). PEDF expression was significantly related to TNM stages ( -- vs --,  $P=0.010$ ) and the tumor size ( $T_1$  vs  $T_{2-4}$ ,  $P=0.007$ ). **Conclusion** The established SYBR Green quantitative real-time PCR method can successfully detect the expression of PEDF mRNA. The primary results show that PEDF may be a protective factor in oncogenesis and development of NSCLC.

**【Key words】** PEDF Non-small cell lung cancer, NSCLC Real-time PCR SYBR Green

This work was supported by a grant from Cancer Research UK (CR-UK) (to Wen G Jiang and ZHANG Lijian) (No. C7603/ A3065).

本研究受英国癌症研究基金(C7603/ A3065)资助

作者单位:100036 北京大学临床肿瘤学院、北京肿瘤医院外科(张力建、陈晋峰);北京大学医学部肿瘤中心实验室(柯杨);英国加的夫大学威尔士医学院外科,转移及血管生成研究室(Robert E Mansel、Wen G Jiang)(通讯作者:张力建, E-mail: lijzhang@yeah.net)

随着对肿瘤复发转移机制研究的深入,人们逐渐认识到新生血管生成在实体肿瘤的生长和发展以及肿瘤的转移过程中发挥着重要的作用<sup>[1]</sup>。我们前期已有关于血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)在肺癌中表达,并与肺癌患者预后相关的文献报道<sup>[2,3]</sup>。色素上皮衍生因子(pigment epithelium-derived factor, PEDF)是一种重要的内源性血管抑制因子,它可以有效地抑制血管内皮细胞的移行<sup>[4,5]</sup>,可以保护和营养多种神经元与雪旺氏细胞。PEDF 可以诱导子宫内膜癌细胞的凋亡,其抑制作用呈时间与剂量依赖性<sup>[6]</sup>。这些研究说明 PEDF 在肿瘤血管的生长以及肿瘤细胞的生长中均可发挥作用。然而到目前为止尚无文献报道其在肺癌中 RNA 水平的表达状况。本研究采用 SYBR Green 实时定量 PCR 技术,检测 21 例非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)患者肺癌和远癌正常肺组织中的 PEDF mRNA,为进一步研究 PEDF 基因及其编码蛋白在肺癌发生、发展中的作用奠定基础。

## 1 材料与方法

**1.1 组织标本** 选取 2003~2004 年我院胸外科接受手术的肺癌患者共 21 例(表 1),收集肺癌和远癌正常肺组织标本,标本均取自北京大学临床肿瘤学院标本库。在手术切除标本离体 30 min 内取肿瘤组织,并于远离肿瘤处切取正常肺组织作为正常对照,置冻存管中,速置于液氮中冻存,备 RNA 提取。

**1.2 试剂** 总 RNA 提取试剂 Trizol 为 Gibco 公司产品,反转录试剂盒 Superscript<sup>TM</sup> Rnase H<sup>-</sup> Reverse Transcriptase 为 Invitrogen 公司产品,DNA 纯化试剂盒购自申能博彩公司,含 SYBR Green 的 PCR MasterMix 为 Bio-Rad 公司产品。

**1.3 仪器** 凝胶成像系统为 AlphaImager<sup>TM</sup> 2200,为 Alpha Innotech 公司产品;电泳仪和 iCycler iQ<sup>TM</sup> 荧光实时多波长 PCR 检测系统为 Bio-Rad 公司产品。

**1.4 总 RNA 制备** 收集新鲜的肺癌组织和正常的肺组织 0.1~0.2 g,分别加入 1 mL Trizol,按试剂说明书中操作步骤进行 RNA 提取。经凝胶电泳后,使用紫外分光光度仪检测提取总 RNA 的质量和浓度。要求 A260/A280 2.0,并计算 RNA 含量。

**1.5 cDNA 的合成** 反应体系 20 μL。取 Oligo-dT 0.5 μg,每一标本取总 RNA 2 μg,Rnasin 40 U,dNTP 终浓度 0.5 mmol/L,5 × 反应缓冲液 4 μL,DTT 终浓度为 0.01 mol/L,Superscript<sup>TM</sup> 200 U,加 DEPC 水至 20 μL。42 50 min,70 15 min,进行逆转录。

表 1 21 例 NSCLC 患者的临床病理特征

Tab 1 Pathological characteristics of 21 patients with NSCLC

Characteristic	n
Age (year)	56.19 ±6.37
Sex	
Male	13
Female	8
Histology	
Squamous cell carcinoma	10
Adenocarcinoma	8
Undifferentiated carcinoma	3
TNM stage	
I	3
II	7
III	10
IV	1
Tumor size	
T1	6
T2	3
T3	10
T4	2
Lymph node status	
N0	8
N1	10
N2	2
N3	1

合成好的 cDNA 置于 -80 保存备用。

**1.6 引物设计和合成** PEDF 基因和三磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)基因的引物合成使用引物设计软件 primer3 ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)),分别参照 GenBank 序列号 M76979、CR600594 设计,上海 BioAsia 公司合成。PEDF 上游引物:5'-CGA TGA GA TCA GCA TTCTCC-3';下游引物:5'-ATTCTGGGTCACCTTTCA GGG-3',扩增片段长度为 256 bp。GAPDH 基因上游引物:5'-AGGTCGGAGTCAACGGATTTG-3';下游引物:5'-GTGATGGCATGGACTGTGGT-3',扩增片段长度为 532 bp。

**1.7 定量模板的制备** 利用内参照 GAPDH 的引物进行 RT-PCR 扩增,反应条件为:95 5 min,94 1 min,57 60 s,72 75 s;利用 PEDF 的引物进行 RT-PCR 扩增,反应条件为 95 5 min,94 1 min,55 45 s,72 30 s,循环 35 次。扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳确定,并切取含有目的片段的凝胶,根据 DNA 纯化试剂盒说明书对 PCR 纯化,终体积为 50 μL。将此定量模板倍比稀释至 1 1 × 10<sup>8</sup>,得到不同浓度的标准模板,分别定义为 10~1 × 10<sup>8</sup> 拷贝数/

μL, -20 保存备用。

**1.8 SYBR Green 实时定量 PCR** 25 μL 反应体系中包括:上下游引物各 0.5 μL (10 μmol), 2 × Mix 12.5 μL (包括反应缓冲液、dNTP、MgCl<sub>2</sub>、SYBR Green、Taq 酶), 双蒸水 11 μL, cDNA 标本 1 μL。将不同浓度的标准模板同时进行 PCR。反应扩增条件同上,循环 35 次。将检测的临界点设定在 PCR 扩增过程中,荧光信号由本底进入指数增长阶段的拐点所对应的循环数(threshold cycle, C<sub>T</sub>)作为模板初始浓度的间接指标,将不同浓度的标准模板拷贝的对数和相应的 C<sub>T</sub> 值作图,得到标准曲线。

**1.9 PCR 产物的确定和溶解曲线分析** 将所扩增的 PCR 产物同时进行琼脂糖凝胶电泳和溶解曲线分析。溶解曲线分析模式定为:95 5 min, 55 20 s, 以 0.1 /s 缓慢加热至 94, 最后设置为 40 20 s。

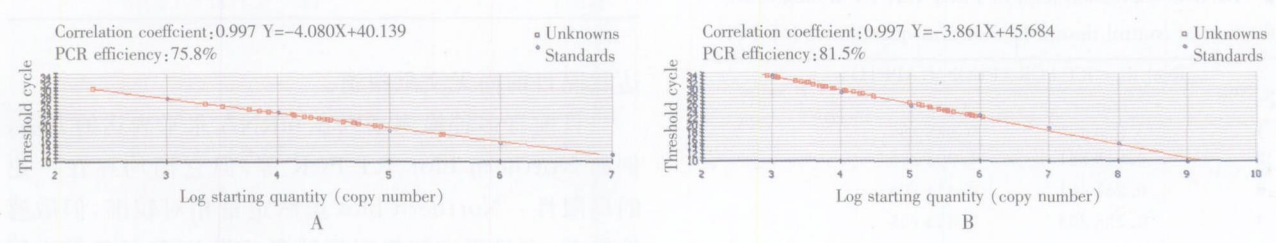
**1.10 统计方法** 利用配对 t 检验分析在肺癌组织和

正常肺组织中 PEDF mRNA 表达水平的差异,独立样本的 t 检验分析肺癌组织中 PEDF mRNA 表达水平与临床病理特征之间的关系。数据采用 SPSS10.0 统计软件包进行统计分析。

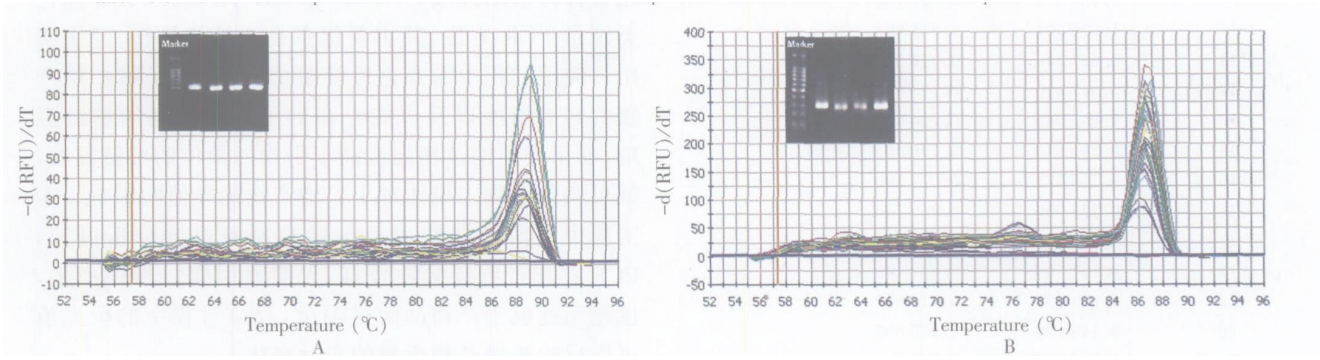
**2 结果**

**2.1 标准曲线和相关系数** GAPDH 和 PEDF 定量标准曲线见图 1A 和图 1B,斜率 (slope) 分别为 -4.080 和 -3.861,相关系数 (correlation coefficient) 均为 0.997。

**2.2 PCR 产物的确定分析** 溶解曲线分析显示 GAPDH 基因 PCR 产物的溶解曲线峰值在 88.5, 溶解温度均一,峰的形状较为锐利,琼脂糖凝胶电泳显示所得的产物为目的条带(图 2A);PEDF cDNA 的 PCR 产物的溶解曲线的峰值在 86.5,峰形锐利,琼脂糖凝胶电泳所示产物为目的条带(图 2B)。



**图 1** A: GAPDH 基因实时定量 PCR 标准曲线; B: PEDF mRNA 表达水平与 C<sub>T</sub> 值之间的标准曲线 (蓝点代表标准模板, 红点代表未知浓度的样本)  
**Fig 1** A: Standard curve of C<sub>T</sub> value vs log starting quantity of GAPDH mRNA; B: Standard curve of C<sub>T</sub> value vs log starting quantity of PEDF mRNA (The blue dots represented the data for the standard samples and the red dots for unknown samples)



**图 2** A: GAPDH PCR 扩增产物的溶解曲线和部分扩增产物的琼脂糖凝胶电泳分析; B: PEDF PCR 扩增产物的溶解曲线和部分扩增产物的琼脂糖凝胶电泳分析 (溶解曲线在 86.5 有一较明显的峰形)  
**Fig 2** A: The melting curve and the agarose gel electrophoresis analysis for GAPDH PCR product; B: The melting curve and the agarose gel electrophoresis analysis for PEDF PCR product (the peak shape was at 86.5 on melting curve)

**2.3 肺癌组织和正常肺组织中 PEDF mRNA 的检测** 作为内对照, GAPDH 基因在不同组织中的表达量处于恒定状态,故而可以将其基因产物的含量作为定量 PEDF 的参照物,并可以此来校正标本之间 RNA 的质量和逆转录效率的差异。本研究中将 PEDF

mRNA 的拷贝数与相对应的 GAPDH 基因的拷贝数相除来进行标准化,从而得出 PEDF 基因产物的相对定量<sup>[7]</sup>。21 例 NSCLC 组织中均可检测出不同程度的 PEDF mRNA 表达,其相对表达量为 0.5505 ± 0.3590 (0.11 ~ 1.11); 21 例相对应的远癌正常肺组织中亦可



检测出 PEDF mRNA 的表达,其相对表达量为 $0.7219 \pm 0.2582$  ( $0.29 \sim 1.31$ ) (表 2)。远癌正常肺组织中 PEDF 基因产物含量高于肺癌组织,有统计学意义 ( $P = 0.024$ )。表 3 列出了 PEDF mRNA 的相对表达水平与临床病理特征之间的关系,早期(Ⅰ~Ⅱ期)患者 PEDF 表达量高于晚期(Ⅲ~Ⅳ期)患者 ( $0.7510 \pm 0.3858$  vs  $0.3682 \pm 0.2168$ ,  $P = 0.010$ );肿瘤较小时( $T_1$ ) PEDF 表达量大于肿瘤较大时( $T_{2-4}$ ) ( $0.8650 \pm 0.2955$  vs  $0.4247 \pm 0.3059$ ,  $P = 0.007$ );其他病理特征与 PEDF 表达量之间无明显关系 ( $P > 0.05$ )。综合表 2 和表 3 可以发现,Ⅰ~Ⅱ期肺癌组织中 PEDF 的表达量与正常肺组织相近 ( $0.7510 \pm 0.3858$  vs  $0.7219 \pm 0.2582$ ,  $P = 0.805$ )。

**表 2** 实时定量 RT-PCR 检测 PEDF mRNA 在肺癌和正常肺组织中的相对表达水平

**Tab 2** Relative expression level of PEDF mRNA in lung cancer and the normal control tissues by real-time quantitative RT-PCR

Case No.	Real-time RT-PCR (PEDF/ GAPDH)		P value
	Tumor	Control	
1	0.870 450	0.888 485	
2	0.618 881	1.002 296	
3	0.231 481	0.414 706	
4	0.758 333	0.853 755	
5	0.892 246	0.452 830	
6	0.308 807	0.324 088	
7	0.985 612	1.311 224	
8	1.109 244	0.993 266	
9	0.138 571	0.452 752	
10	1.055 901	0.841 823	
11	0.627 249	0.946 360	
12	0.317 600	0.923 913	
13	1.056 962	0.786 667	
14	0.205 319	0.750 000	
15	0.113 793	0.812 500	
16	0.275 000	0.559 140	
17	0.344 444	0.758 427	
18	0.187 500	0.657 143	
19	0.914 894	0.513 077	
20	0.113 022	0.285 088	
21	0.421 687	0.645 503	
Total	$0.5505 \pm 0.3590$	$0.7219 \pm 0.2582$	0.024

### 3 讨论

PEDF 是一种 serpin 家族成员。人类 PEDF 基因全长约为 16 kb,位于染色体 17p13.1,由 8 个外显子和 7 个内含子组成,其编码的多肽链由 418 个氨基酸组成,分子量为 46.3 ku<sup>[8]</sup>。PEDF 是一种近来研究较多的与肿瘤相关的内源性血管抑制因子<sup>[9-11]</sup>。但是,作为一种重要的血管抑制因子,PEDF 在肺癌中的表

**表 3** PEDF mRNA 相对表达水平与 NSCLC 临床病理特征的关系

**Tab 3** Relationship between relative level of PEDF mRNA expression and clinicopathological characteristics in NSCLC

Characteristic	n	PEDF mRNA (PEDF/ GAPDH)	P value
Sex			0.198
Male	13	$0.4700 \pm 0.3536$	
Female	8	$0.6813 \pm 0.3497$	
Histology			0.601
Squamous cell carcinoma	10	$0.5950 \pm 0.3535$	
Non-squamous carcinoma	11	$0.5100 \pm 0.3762$	
TNM stage			0.010
Ⅰ-Ⅱ	10	$0.7510 \pm 0.3858$	
Ⅲ-Ⅳ	11	$0.3682 \pm 0.2168$	
Tumor size			0.007
T1	6	$0.8650 \pm 0.2955$	
T2-4	15	$0.4247 \pm 0.3059$	
Lymph node status			0.216
N0	8	$0.6763 \pm 0.3981$	
N1-3	13	$0.4731 \pm 0.3246$	

达状况目前尚无文献报道。

目前有多种检测基因在 mRNA 水平表达的方法,例如 Northern blot、RT-PCR 等,但它们均存在一定的局限性。Northern blot 虽然定量相对较准,但敏感性较差,而且要求的组织量较多;RT-PCR 虽然较为敏感和特异,但定量不准,只能进行半定量。新近发展起来的实时定量 PCR (real-time PCR) 有效地避免了前述各种方法的弊端。SYBR Green 作为一种非探针类定量 PCR 方法,其主要优点在于简便易行、经济实用。应用过程中需要进行溶解曲线分析,了解扩增产物的解链温度以及可能存在的引物二聚体的解链温度,如果设定的读靶温度高于引物二聚体的解链温度,就可避免引物二聚体对于扩增产物荧光值的影响。本实验中由溶解曲线以及琼脂糖凝胶电泳分析可知,PCR 扩增产物特异性较好,无明显引物二聚体产生,读靶温度低于产物的解链温度,反应过程中的荧光值可以反映扩增产物含量的实时变化。

本研究通过 SYBR Green 实时定量 PCR 方法检测肺癌及其对应的远癌正常肺组织中 PEDF mRNA 的表达水平。观察到在 21 例肺癌组织中均有 PEDF 表达,但与对应的正常组织相比,76.2% (16 例) 的肺癌组织中 PEDF 的表达量低于正常组织 ( $P = 0.024$ );当肿瘤进展后,Ⅰ~Ⅱ期肿瘤中的表达量明显高于 Ⅲ~Ⅳ期的表达量 ( $P = 0.010$ );而且当肿瘤组织体积增大时,PEDF 的表达量明显减少 ( $P = 0.007$ )。仔细分析各个统计数据后可以发现,对于早期肺癌(

~ 期)患者,癌组织中 PEDF mRNA 的表达量与癌旁正常组织中的含量相近(表 2、表 3),这说明在肿瘤早期,新生血管的形成尚不活跃,随着肿瘤的进展,癌细胞向外扩展的趋势增加, PEDF 的表达量也相应减少。所有这些初步检验结果均说明 PEDF 在肺癌进展过程中是一种保护因子,其表达量的减少意味着肿瘤将会突破原先的限制向外扩展,并有可能与肿瘤患者预后不佳相关。

### 参 考 文 献

- Ribatti D. The involvement of endothelial progenitor cells in tumor angiogenesis. *J Cell Mol Med*, 2004, 8(3) 294-300.
- Zhang LJ, Yang GL, Xie YQ, et al. Expression of vascular endothelial growth factor in primary non-small cell lung carcinoma. *Chin J Cancer Res*, 1999, 11(4) 288-291.
- Yang GL, Zhang LJ, Xie YQ. Vascular endothelial growth factor in non-small cell lung carcinoma expression and its significance. *Natl Med Chin*, 1999, 79(2) 104-105. [杨国利, 张力建, 谢玉泉. 血管内皮生长因子在非小细胞肺癌中的表达及其意义. *中华医学杂志*, 1999, 79(2) 104-105.]
- Dawson DW, Volpert OV, Gillis P, et al. Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis. *Science*, 1999, 285(5425) 245-248.
- Gao G, Li Y, Zhang D, et al. Unbalanced expression of VEGF and PEDF in ischemia-induced retinal neovascularization. *FEBS Lett*, 2001, 489(2-3) 270-276.
- Palmieri D, Watson JM, Rinehart CA. Age-related expression of PEDF/ EPC-1 in human endometrial stromal fibroblasts: implications for interactive senescence. *Exp Cell Res*, 1999, 247(1) 142-147.
- Castello R, Estelles A, Vazquez C, et al. Quantitative real-time reverse transcription-PCR assay for urokinase plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor type 1, and tissue metalloproteinase inhibitor type 1 gene expressions in primary breast cancer. *Clin Chem*, 2002, 48(8) 1288-1295.
- Simonovic M, Gettins PG, Volz K. Crystal structure of human PEDF, a potent anti-angiogenic and neurite growth-promoting factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98(20) 11131-11135.
- Abramson LP, Stellmach V, Doll JA, et al. Wilms' tumor growth is suppressed by antiangiogenic pigment epithelium-derived factor in a xenograft model. *J Pediatr Surg*, 2003, 38(3) 336-342.
- Wang L, Schmitz V, Perez-Mediavilla A, et al. Suppression of angiogenesis and tumor growth by adenoviral-mediated gene transfer of pigment epithelium-derived factor. *Mol Ther*, 2003, 8(1) 72-79.
- Doll JA, Stellmach VM, Bouck NP, et al. Pigment epithelium-derived factor regulates the vasculature and mass of the prostate and pancreas. *Nat Med*, 2003, 9(6) 774-780.

(收稿:2005-05-24 修回:2005-08-10)

(本文编辑 李蓓兰)

## · 启 事 ·

### 《循证医学》杂志征稿、征订通知

《循证医学》是经国家新闻出版署批准,广东省卫生厅主管,由广东省循证医学研究中心、广东省人民医院和中山大学附属第三医院主办的医学学术期刊。2003 年被评为“《CNKI 中国期刊全文数据库》(CJFD)”、“万方数据-数字化期刊群”全文收录期刊,“中国学术期刊综合评价数据库”统计源期刊(CAJCED)、《中国科学引文数据库》(CSCD)、《中国生物医学文献数据库》(CBMdisc)、《中国核心期刊(遴选)数据库》、《中文生物医学期刊文献数据库》(CMCC)、《中文科技期刊数据库》来源期刊;2004 年 3 月被中国科学技术信息研究所评定为“中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)”;2005 年 5 月荣获首届《CAJ-CD 规范》执行优秀期刊奖。

主编吴一龙(广东省人民医院副院长,广东省人民医院肿瘤中心主任,广东省肺癌研究所所长,广东省循证医学研究中心主任,中山大学肿瘤学教授、博士生导师)。本刊以广大医药卫生技术人员和医疗、教学、科研管理工作者为读者对象,立足临床医学,介绍循证医学(evidence-based medicine, EBM)的理念、方法及相关知识,探讨符合中国国情的循证医学实践,促进国内外医学学术交流和医学科学发展。

本刊以临床实践指导性为特色,设置的主要栏目有:快讯、述评、循证评价、论著(包括诊断性研究、疗效研究、病因学研究、疾病的预后研究等)、Cochrane 研究方案、证据的寻求与评价、循证医学中的医学统计学问题、循证医学理论方法研究、综述与讲座、教育与争鸣、循证医学在线、临床指引与共识等。诚挚欢迎投稿。

本刊国际连续出版物标准刊号 ISSN 1671-5144, 国内统一刊号 CN 44-1548/R。《循证医学》杂志为双月刊、大 16 开本、64 页,国内定价每期 10 元,全年定价 60 元。欲订阅者请从全国各地邮局订购,邮发代号 46-326,也可直接从本刊编辑部邮购。

地址:广州市中山二路 106 号广东省人民医院内《循证医学》编辑部 收(510080)。

电话:020-83844620, 020-83827812-51482 传真:020-83844620

网址:www.jebm.cn E-mail: xzyxzz@163.net

循证医学编辑部