

溶瘤病毒M1诱导宫颈癌细胞C-33A凋亡的作用及机制^Δ

肖晓^{1*},周雅思²,彭楚茵¹,邓金清²,王来友¹,朱文博^{3#}[1.广东省人民医院(广东省医学科学院)药学部,广州510080;2.广东药科大学药学院,广州510006;3.中山大学中山医学院药理教研室,广州510080]

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2021)23-2827-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.23.03



摘要 目的:研究溶瘤病毒M1(简称“M1病毒”)诱导宫颈癌细胞C-33A凋亡的作用及机制。方法:采用MTT法检测不同滴度(0、0.001、0.01、0.1、1、10 PFU/cell)M1病毒处理后C-33A细胞的存活率;将C-33A细胞分为对照组(0 PFU/cell)和M1病毒低、中、高剂量组(0.001、0.01、0.1 PFU/cell),加入相应滴度病毒,培养48 h后,采用流式细胞仪检测细胞的凋亡率和感染率,采用Western blot法检测细胞中C/EBP同源蛋白(CHOP)、胱天蛋白酶12(caspase-12)、caspase-3、活化的caspase-3(cleaved-caspase-3)的表达水平。结果:经不同滴度M1病毒处理后,C-33A细胞存活率均显著降低($P<0.01$),且呈剂量依赖趋势。与对照组比较,M1病毒各剂量组细胞的凋亡率和感染率以及中、高剂量组细胞中CHOP、caspase-12、cleaved-caspase-3(中剂量组除外)蛋白的表达水平均显著升高($P<0.01$)。结论:M1病毒可诱导宫颈癌细胞C-33A的凋亡,其作用机制可能与激活内质网应激通路有关。

关键词 溶瘤病毒M1;宫颈癌;C-33A细胞;内质网应激;细胞凋亡

Effects and Mechanism of Oncolytic Virus M1 Inducing the Apoptosis of Cervical Cancer C-33A Cells

XIAO Xiao¹, ZHOU Yasi², PENG Chuyin¹, DENG Jinqing², WANG Laiyou¹, ZHU Wenbo³(1. Dept. of Pharmacy, Guangdong Provincial People's Hospital/Guangdong Academy of Medical Sciences, Guangzhou 510080, China; 2. School of Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China; 3. Dept. of Pharmacology, Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effects and mechanism of oncolytic virus M1 (called M1 virus for short) inducing the apoptosis of cervical cancer C-33A cells. METHODS: MTT assay was used to detect survival rate of C-33A cells that were treated with different titers (0, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 PFU/cell) of M1 virus. C-33A cells were divided into control group (0 PFU/cell), low-dose, medium-dose and high-dose groups of M1 virus (0.001, 0.01, 0.1 PFU/cell). After treated with corresponding titers of M1 virus for 48 h, flow cytometry was used to detect the apoptotic rate and infection rate of cells; Western blot was performed to detect the protein expression of C/EBP homologous proteins (CHOP), caspase-12, caspase-3 and cleaved-caspase-3. RESULTS: After treated with different titers of M1 virus, the survival rate of C-33A cells decreased significantly ($P<0.01$), and showed a dose-dependent trend. Compared with control group, the apoptotic rate and infection rate of cells in M1 virus groups as well as the protein expression of CHOP, caspase-12 and cleaved-caspase-3 (except for medium-dose group) in M1 virus medium-dose and high-dose groups were increased significantly ($P<0.01$). CONCLUSIONS: M1 virus can induce the apoptosis of cervical cancer C-33A cells, and its mechanism may be related to the activation of endoplasmic reticulum stress pathway.

KEYWORDS Oncolytic virus M1; Cervical cancer; C-33A cells; Endoplasmic reticulum stress; Cell apoptosis

[17] 国家食品药品监督管理局.关于深化药品审评审批改革进一步鼓励创新的意见:国食药监注[2013]37号[EB/OL]. (2013-02-22)[2021-03-05].<https://www.nmpa.gov.cn/directory/web/nmpa/xxgk/fgwj/gzwj/gzwjyp/20130222-120001551.html>.

^Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81903652);广东省人民医院第二批双青人才项目(No.KY012021187)

* 药师,博士。研究方向:药理学。电话:020-83827812-36066。E-mail: xiaoxiao@gdph.org.cn

通信作者:副教授,博士。研究方向:肿瘤药理学。电话:020-87333258。E-mail: zhuwenbo@mail.sysu.edu.cn

[18] 国家卫生计生委,国家发展改革委,工业和信息化部,等.关于保障儿童用药的若干意见:国卫药政发[2014]29号[EB/OL]. (2014-05-30)[2021-03-05].<http://www.nhc.gov.cn/cms-search/xxgk/getManuscriptXxgk.htm?id=e51-354d631944fa68aac0c4d9585f291>.

[19] 徐蔼琳,李文君,卢梦情,等.我国2009—2018年儿童药物经济学研究文献质量评价[J].中国药房,2020,31(6):718-723.

(收稿日期:2021-05-27 修回日期:2021-10-27)

(编辑:刘明伟)

宫颈癌是常见的女性恶性肿瘤,也是威胁人类生命安全的主要疾病。《2020年全球癌症报告》显示:宫颈癌发病率在女性癌症中排名第2位,发病年龄呈年轻化趋势;2020年全球宫颈癌新发病例超过60万例,死亡病例超过34万^[1]。目前,早期宫颈癌的治疗效果较好,但晚期宫颈癌患者生存质量低、病死率居高不下^[2-3]。因此,晚期宫颈癌的治疗已经成为临床工作的难点和重点,亟须新的安全有效的临床方案、策略或者药物来治疗。

溶瘤病毒是一类天然的或经过基因修饰的病毒,可特异性地在肿瘤细胞中复制,然后通过直接裂解细胞或者激活免疫来杀伤肿瘤细胞,而不损伤正常细胞^[4-5]。近年来溶瘤病毒疗法发展迅速,20余种病毒正在或者已经完成临床研究,且均表现出良好的安全性^[4,6];现已被中国以及多个欧美国家批准上市,主要用于治疗鼻咽癌、晚期黑色素瘤^[7]。相关研究报道证实,单纯疱疹病毒、新城疫病毒可杀伤宫颈癌细胞^[8-9]。由此可知,溶瘤病毒为抗宫颈癌药物研发提供了新的方向。

溶瘤病毒M1(以下简称“M1病毒”)属于披膜病毒科甲病毒属盖塔样病毒,是研究者于1964年从库蚊属蚊虫中分离得到的病毒^[10]。甲病毒作为载体已在病毒性疾病的肿瘤疫苗、核酸疫苗、基因治疗等方面得到了大量应用^[11],这提示M1病毒有成为新型抗肿瘤药物的潜力。

内质网是细胞内蛋白质合成、折叠的重要“车间”,当细胞受到过度刺激时,大量未折叠或错误折叠的蛋白质堆积于内质网,从而诱发内质网应激;当剧烈的、长时程的内质网应激不能得到缓解时,就会引起细胞凋亡^[12]。M1病毒是否可通过作用于内质网诱导宫颈癌细胞凋亡,尚不明确。基于此,本研究拟基于内质网应激通路,研究M1病毒对宫颈癌细胞凋亡的诱导作用及机制,以期治疗晚期宫颈癌的新型药物开发提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器有: CytoFLEX型流式细胞仪(美国 Beckman Coulter 公司), Synergy H1型多功能微孔板检测仪(美国 BioTek 公司), MicroCL 21型台式低温高速离心机、Forma 310型 CO₂细胞培养箱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司), TE-2000型倒置相差荧光显微镜(日本 Nikon 公司), ChemiDoc XRS⁺ System型凝胶成像仪、Mini-PROTEAN Tetra型电泳转膜仪(美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 主要药品与试剂

MTT试剂(批号 T100896)购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;细胞凋亡检测试剂盒(批号

FXP023-050)购自北京四正柏生物科技有限公司;ECL发光液(批号 WBKLS0100)购自美国 Millipore 公司;胎牛血清(批号 B21001)购自中山康天晟合生物技术有限公司;胰酶、青链霉素、DMEM培养基、VP-SFM培养基(批号分别为 25300062、15070063、11965118、11681020)均购自美国 Gibco 公司;牛血清白蛋白(BSA,批号 021998625)购自广州威佳科技有限公司;鼠源 C/EBP 同源蛋白(CHOP)单克隆抗体(批号 2895S)、兔源胱天蛋白酶 12(caspase-12)多克隆抗体(批号 35965)、兔源 β -微管蛋白(β -tubulin)单克隆抗体(批号 2128S)、兔源 caspase-3 多克隆抗体(批号 9662)、兔源活化的 caspase-3 (cleaved-caspase-3)单克隆抗体(批号 9664)、辣根过氧化物酶(HRP)标记的马抗鼠免疫球蛋白 G(IgG)二抗(批号 7076S)、HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗(批号 7074S)均购自美国 Cell Signaling Technology 公司;其余试剂为实验室常用规格,水为纯净水。

1.3 细胞

本研究所用人宫颈癌细胞 C-33A 购自中国科学院上海生科院细胞资源中心,非洲绿猴肾细胞 Vero、仓鼠肾成纤维细胞 BHK-21 购自美国 ATCC 细胞库。

1.4 病毒

本研究所用 M1 病毒来源于中国典型培养物保藏中心。

2 方法

2.1 细胞的复苏、培养及传代

将细胞冻存管从液氮罐中移出,置于 37℃ 水浴条件下快速融化,移出冻存液于离心管中;加入 DMEM 培养基(含 10% 胎牛血清和 1% 青链霉素),以 1 200 r/min 离心 5 min,弃上清液;以 DMEM 培养基重悬细胞,再移入培养瓶或培养皿中,置于 37℃、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养(以下培养条件相同)。当细胞融合度达 80%~90%时,以胰酶消化传代,然后取对数生长期的细胞用于后续实验。

2.2 M1 病毒的扩增培养

采用非洲绿猴肾细胞 Vero 来扩增 M1 病毒。将 Vero 细胞接种于 100 mm 的培养皿中,置于 37℃、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养至融合度达 90%;然后将培养基更换为 VP-SFM 培养基,加入 M1 病毒母液(1×10⁷ PFU/mL) 20 μ L,待 80% Vero 细胞裂解后(培养 48~60 h后),以 1 200 r/min 离心 5 min,取上清液混匀分装后,于 -80℃ 条件下保存备用。

2.3 C-33A 细胞存活率的检测

采用 MTT 法进行检测。取对数生长期的 C-33A 细胞适量,经胰酶消化后,将密度调整为 3×10⁴ mL⁻¹,按 100 μ L/孔接种于 96 孔板,培养过夜;然后加入不同滴

度[0(作为对照组)、0.001、0.01、0.1、1、10 PFU/cell,滴度参考文献[13]设置]的M1病毒进行干预,另设不加细胞、不加病毒的空白组,每组设4个复孔。各组细胞培养48 h后,加入MTT试剂(5 mg/mL)20 μ L,继续培养3 h;弃去上清液,加入二甲基亚砜(DMSO)100 μ L,然后采用多功能微孔板检测仪于570 nm波长处检测各孔吸光度(OD),并计算细胞存活率[细胞存活率=(OD_{给药组}-OD_{空白组})/OD_{对照组}×100%]。以GraphPad Prism 8软件计算M1病毒的半数抑制浓度(IC₅₀)。

2.4 C-33A细胞凋亡率以及病毒感染率的检测

采用流式细胞仪进行检测。取对数生长期的C-33A细胞适量,经胰酶消化后,将密度调整为 5×10^4 mL⁻¹,按2 mL/孔接种于12孔板;培养24 h后,将细胞分为对照组(0 PFU/cell)和M1病毒低、中、高剂量组(0.001、0.01、0.1 PFU/cell,滴度根据“2.3”项下结果设置),每组设4个复孔。对照组加入VP-SFM培养基,M1病毒各剂量组加入相应滴度病毒。各组细胞继续培养48 h后,按细胞凋亡检测试剂盒说明书方法操作,采用流式细胞仪检测细胞凋亡率;同时通过M1病毒自带的GFP标签,检测其对C-33A细胞的感染率。

2.5 C-33A细胞中内质网应激通路相关蛋白及凋亡相关蛋白表达水平的检测

采用Western blot法进行检测。取对数生长期的C-33A细胞适量,经胰酶消化后,将密度调整为 3×10^5 mL⁻¹,按3 mL/孔接种于6孔板;培养24 h后,按“2.4”项下方法分组与给药,每组设4个复孔。各组细胞继续培养48 h后,收集细胞并进行裂解,以获取蛋白。采用BCA法测定蛋白浓度后,煮沸5 min使其变性;取变性后蛋白进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜,以5%的BSA封闭;加入CHOP、caspase-12、cleaved-caspase-3、caspase-3、 β -tubulin一抗(稀释度均为1:1 000),于4 $^{\circ}$ C孵育过夜;以TBST缓冲液洗膜3次,每次5 min,然后加入相应二抗(稀释度均为1:1 000),于室温孵育1 h;经ECL化学发光试剂显色后,置于凝胶成像仪上成像。采用Image Lab 4.0软件进行分析,以目的蛋白与内参 β -tubulin蛋白的灰度值比值表示目的蛋白的表达水平。

2.6 统计学方法

采用SPSS 19.0统计软件进行统计。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD-*t*检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 M1病毒对C-33A细胞存活率的影响

与对照组比较,M1病毒处理组细胞存活率均显著降低($P<0.01$),且呈剂量依赖趋势;M1病毒对C-33A细胞的IC₅₀为(0.015 6 \pm 0.002 4) PFU/cell。结果见表

1。另外,当M1病毒滴度大于1 PFU/cell时,其对细胞存活率的影响趋于稳定,故选择0.001、0.01、0.1 PFU/cell的滴度进行后续实验。

表1 各组细胞存活率的测定结果($\bar{x} \pm s, n=4$)

Tab 1 Survival rate of cells in each group($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	细胞存活率,%	组别	细胞存活率,%
对照组(0 PFU/cell)	100 \pm 3.91	M1病毒0.1 PFU/cell组	20.64 \pm 2.47*
M1病毒0.001 PFU/cell组	80.35 \pm 6.34*	M1病毒1 PFU/cell组	14.92 \pm 2.13*
M1病毒0.01 PFU/cell组	58.02 \pm 2.93*	M1病毒10 PFU/cell组	15.30 \pm 3.11*

注:与对照组比较,* $P<0.01$

Note:vs. control group,* $P<0.01$

3.2 M1病毒对C-33A细胞凋亡率及病毒感染率的影响

与对照组比较,M1病毒低、中、高剂量组细胞凋亡率及感染率均显著升高($P<0.01$)。结果见表2、图1、图2。

表2 各组细胞凋亡率和感染率的检测结果($\bar{x} \pm s, n=4$)

Tab 2 Apoptotic rate and infection rate of cells in each group($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	凋亡率,%	感染率,%
对照组	2.48 \pm 1.66	0
M1病毒低剂量组	5.08 \pm 0.14*	8.96 \pm 0.08*
M1病毒中剂量组	16.39 \pm 0.19*	61.22 \pm 1.14*
M1病毒高剂量组	73.80 \pm 1.19*	59.68 \pm 0.72*

注:与对照组比较,* $P<0.01$

Note:vs. control group,* $P<0.01$

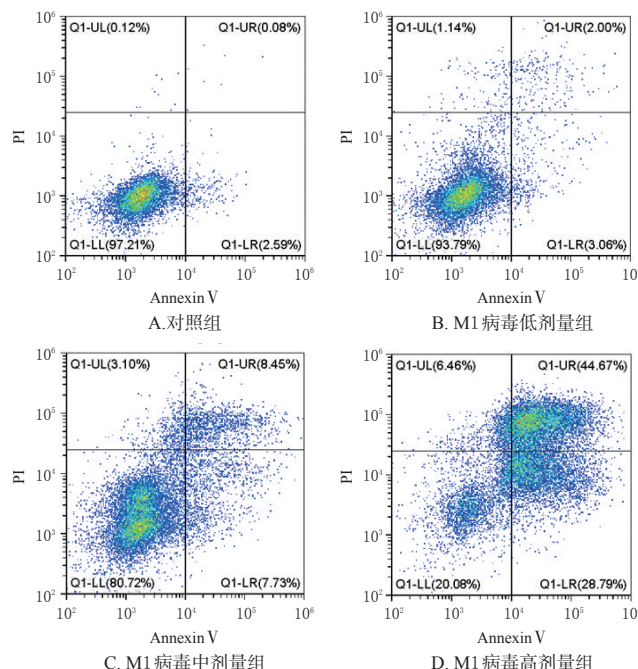


图1 各组细胞凋亡的流式散点图

Fig 1 Flow cytometry scatter plot of the apoptosis of cells in each group

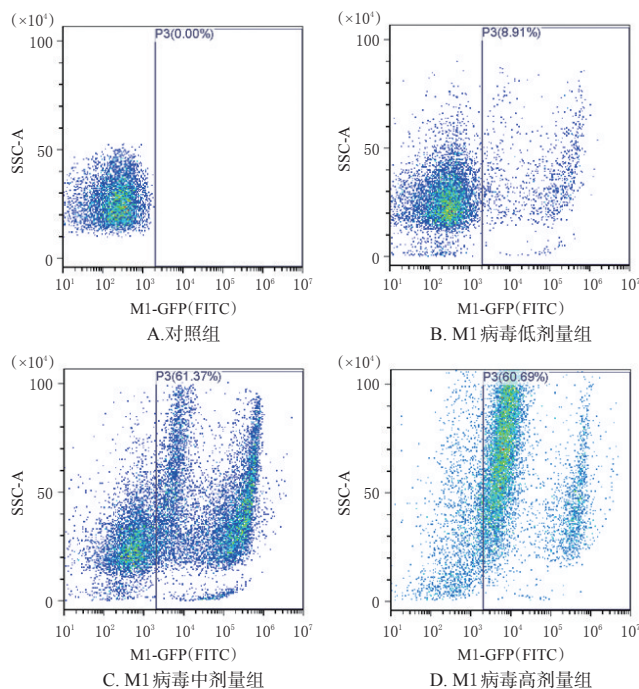


图2 各组细胞感染的流式散点图

Fig 2 Flow cytometry scatter plot of the infection of cells in each group

3.3 M1病毒对内质网应激通路相关蛋白及凋亡相关蛋白表达的影响

与对照组比较, M1病毒中、高剂量组细胞中CHOP、caspase-12、cleaved-caspase-3(中剂量组除外)蛋白的表达水平均显著升高($P < 0.01$)。结果见表3、图3。

表3 各组细胞中CHOP、caspase-12、cleaved-caspase-3、caspase-3蛋白表达水平的检测结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 3 Protein expression of CHOP, caspase-12, cleaved-caspase-3 and caspase-3 in cells of each group($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	CHOP/ β -tubulin	caspase-12/ β -tubulin	cleaved-caspase-3/ β -tubulin	caspase-3/ β -tubulin
对照组	0.22 ± 0.06	0.15 ± 0.03	0.27 ± 0.02	0.64 ± 0.15
M1病毒低剂量组	0.41 ± 0.12	0.40 ± 0.28	0.27 ± 0.04	0.70 ± 0.15
M1病毒中剂量组	0.71 ± 0.17*	0.53 ± 0.20*	0.35 ± 0.05	0.61 ± 0.12
M1病毒高剂量组	0.90 ± 0.07*	0.68 ± 0.08*	0.69 ± 0.02*	0.59 ± 0.19

注:与对照组比较, * $P < 0.01$

Note: vs. control group, * $P < 0.01$

4 讨论

目前宫颈癌的治疗方法主要包括放疗、化疗、靶向治疗、生物治疗等。其中,放化疗是治疗晚期宫颈癌的重要方式,但毒副作用大;靶向治疗是药物进入体内后与特定的致癌位点相结合后发挥抗肿瘤作用;生物治疗是通过机体的防御机制,应用生物大分子或小分子化合物调节机体生物反应,发挥抗肿瘤作用^[14]。其中,靶向治疗和生物治疗的安全性高,目前已成为治疗肿瘤的有效手段。

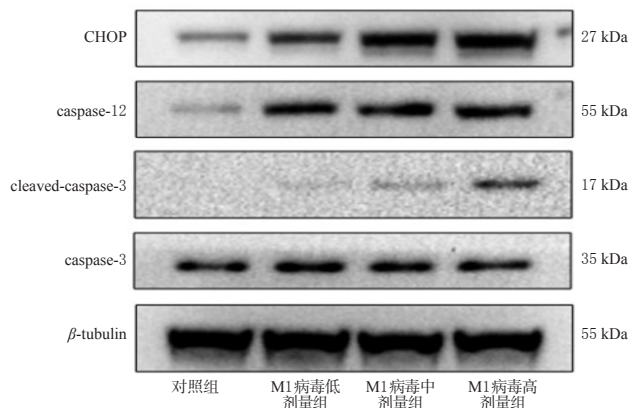


图3 各组细胞中内质网应激相关蛋白以及凋亡相关蛋白表达的电泳图

Fig 3 Electrophoretogram of the expression of endoplasmic reticulum stress-related proteins and apoptosis-related proteins in cells of each group

本课题组前期研究证实, M1病毒可杀伤胶质瘤、黑色素瘤等多种肿瘤细胞^[13,15]。将M1病毒注射在大鼠、小鼠、石蟹猴等多种模型动物体内后,该病毒可在正常组织中迅速消退,而在肿瘤组织中富集扩增;且受试动物精神状态良好,无明显的体质量减轻或者食欲减退的现象^[10,13,16]。此外,本课题组也开发了M1病毒的脂质体制剂,结果发现,该制剂可减少中和抗体的生成,从而发挥更好的治疗效果^[17]。由此可知, M1病毒具备良好的临床应用潜力。基于此,本研究拟进一步探讨M1病毒诱导宫颈癌细胞凋亡的作用及机制。

本研究通过MTT实验发现, M1病毒可显著降低C-33A细胞的存活率且呈剂量依赖趋势;进一步研究发现,经M1病毒作用后,细胞凋亡率及感染率均显著升高。这提示M1病毒感染可能具有促宫颈癌细胞凋亡的作用。

大量外源性病毒累积于内质网,从而诱发内质网应激反应,进一步激活下游的凋亡通路^[12]。内质网应激诱导的细胞凋亡途径主要有3条:第一条是通过内质网应激的转录因子CHOP介导的;第二条是通过c-Jun氨基末端激酶(JNK)通路介导的;第三条是通过凋亡相关的关键分子caspase-12介导的^[18]。本研究结果显示,经M1病毒作用后, C-33A细胞中CHOP、caspase-12、cleaved-caspase-3(中剂量组除外)蛋白的表达水平均显著升高。这提示M1病毒可通过激活内质网应激通路,促进C-33A细胞凋亡。

综上所述, M1病毒可诱导宫颈癌细胞C-33A凋亡,其作用机制可能与激活内质网应激通路有关。本课题组将进一步在体内模型上验证上述结论,以期为临床应用M1病毒治疗晚期宫颈癌提供理论依据。

参考文献

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3):209-249.
- [2] 周晖, 白守民, 林仲秋. 《2019 NCCN 宫颈癌临床实践指南(第1版)》解读[J]. *中国实用妇科与产科杂志*, 2018, 34(9):1002-1009.
- [3] SMALL W J R, BACON M A, BAJAJ A, et al. Cervical cancer: a global health crisis [J]. *Cancer*, 2017, 123(13):2404-2412.
- [4] LAWLER S E, SPERANZA M C, CHO C F, et al. Oncolytic viruses in cancer treatment: a review[J]. *JAMA Oncol*, 2017, 3(6):841-849.
- [5] RAJA J, LUDWIG J M, GETTINGER S N, et al. Oncolytic virus immunotherapy: future prospects for oncology [J]. *J Immunother Cancer*, 2018, 6(1):140.
- [6] CHESNEY J, PUZANOV I, COLLICHO F, et al. Randomized, open-label phase II study evaluating the efficacy and safety of talimogene laherparepvec in combination with ipilimumab versus ipilimumab alone in patients with advanced, unresectable melanoma[J]. *J Clin Oncol*, 2018, 36(17):1658-1667.
- [7] 许青, 陆舜, 朱蕙燕, 等. 溶瘤病毒治疗恶性肿瘤临床应用上海专家共识: 2021年版[J]. *中国癌症杂志*, 2021, 31(3):231-240.
- [8] KESHAVARZ M, NEJAD A S M, ESGHAEI M, et al. Oncolytic newcastle disease virus reduces growth of cervical cancer cell by inducing apoptosis[J]. *Saudi J Biol Sci*, 2020, 27(1):47-52.
- [9] KAGABU M, YOSHINO N, SAITO T, et al. The efficacy of a third-generation oncolytic herpes simplex viral therapy for an HPV-related uterine cervical cancer model[J]. *Int J Clin Oncol*, 2021, 26(3):591-597.
- [10] ZHANG H, LIN Y, LI K, et al. Naturally existing oncolytic virus M1 is nonpathogenic for the nonhuman primates after multiple rounds of repeated intravenous injections[J]. *Hum Gene Ther*, 2016, 27(9):700-711.
- [11] LUNDSTROM K. Alphavirus vectors as tools in neuroscience and gene therapy[J]. *Virus Res*, 2016, 216:16-25.
- [12] HU H, TIAN M, DING C, et al. The C/EBP homologous protein (CHOP) transcription factor functions in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and microbial infection[J]. *Front Immunol*, 2018, 9:3083.
- [13] LIN Y, ZHANG H, LIANG J, et al. Identification and characterization of alphavirus M1 as a selective oncolytic virus targeting ZAP-defective human cancers[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(42):E4504-E4512.
- [14] CHUNG H C, ROS W, DELORD J P, et al. Efficacy and safety of pembrolizumab in previously treated advanced cervical cancer: results from the phase II KEYNOTE-158 study[J]. *J Clin Oncol*, 2019, 37(17):1470-1478.
- [15] HU C, LIU Y, LIN Y, et al. Intravenous injections of the oncolytic virus M1 as a novel therapy for muscle-invasive bladder cancer[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(3):274.
- [16] ZHANG H, LI K, LIN Y, et al. Targeting VCP enhances anticancer activity of oncolytic virus M1 in hepatocellular carcinoma[J]. *Sci Transl Med*, 2017, 9(404):eaam7996.
- [17] WANG Y, HUANG H, ZOU H, et al. Liposome encapsulation of oncolytic virus M1 to reduce immunogenicity and immune clearance in vivo[J]. *Mol Pharm*, 2019, 16(2):779-785.
- [18] XIAO X, LIANG J, HUANG C, et al. DNA-PK inhibition synergizes with oncolytic virus M1 by inhibiting antiviral response and potentiating DNA damage[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1):4342.

(收稿日期:2021-06-24 修回日期:2021-10-02)
(编辑:唐晓莲)

《中国药房》杂志——中文核心期刊, 欢迎投稿、订阅