

· 基础研究 ·

醛固酮及醛固酮拮抗剂依普利酮对自发性高血压大鼠足细胞CD2AP表达的影响

王 鹏, 孙跃民*, 万 征, 王 清

(天津医科大学总医院心内科, 天津 300052)

【摘 要】 目的 观察自发性高血压大鼠肾损害早期血浆与组织醛固酮水平和醛固酮受体拮抗剂对肾足细胞损伤和CD2AP表达的影响。方法 20只8周龄雄性自发性高血压大鼠(SHRs), 随机分成干预组和未干预组, 每组10只, 10只同龄Wistar-Kyoto大鼠为对照组。每天给予干预组依普利酮悬浊液灌胃(50 mg/kg, 溶于2ml过滤水), 未干预组和对照组用同体积过滤水灌胃。测量大鼠尾动脉收缩压、尿微量白蛋白、血浆醛固酮和肾组织醛固酮。RT-PCR和Western印迹法检测肾小球CD2AP基因和蛋白表达。透射电镜检测大鼠肾足细胞形态学变化。结果 SHRs收缩压明显高于对照组($P < 0.01$); 未干预组的尿微量白蛋白水平高于对照组和干预组($P < 0.01$); 未干预组血浆和肾组织醛固酮水平高于对照组($P < 0.05$)。透射电镜显示未干预组上皮足突节段融合, 肾小管上皮细胞溶酶体中度增多, 肾间质毛细血管扩张。未干预组CD2AP基因和蛋白表达水平低于对照组和干预组($P < 0.01$)。尿微量白蛋白水平与肾小球CD2AP蛋白表达水平呈中度负相关($r = -0.587, P < 0.01$)。肾小球CD2AP蛋白表达水平与血浆和肾组织醛固酮水平呈中度负相关($r = -0.552$ 和 $r = -0.577, P < 0.01$)。结论 自发性高血压大鼠肾损害早期的足细胞损伤与血浆和肾组织高醛固酮水平有关。依普利酮可以减轻足细胞损伤, 改善CD2AP的表达。

【关键词】 高血压; 醛固酮; 足细胞; CD2AP; 依普利酮

【中图分类号】 R544.1

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-5403(2011)02-0161-06

Effects of aldosterone and eplerenone on CD2AP expression in podocytes from spontaneously hypertensive rats

WANG Peng, SUN Yue-min*, WAN Zheng, WANG Qing

(Department of Cardiology, General Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China)

【Abstract】 **Objective** To observe the tissue and plasma levels of aldosterone at the early stage of renal damage in spontaneously hypertensive rats (SHRs), and to analyze the effects of eplerenone, aldosterone receptor antagonist, on podocytes injury and CD2AP expression in podocytes. **Methods** Twenty male SHRs, 8-week-old, were randomly separated into two groups: intervention group and non-intervention group, with 10 in each group. Another ten age-matched Wistar-Kyoto rats were used as control group. The rats in intervention group were administrated intragastrically with eplerenone (50 mg/kg per day) dissolved in 2ml filtered water, and the rats in unintervention and control groups with the same volume of filtered water. Systolic blood pressure of caudal artery was measured by tail-cuff plethysmography. Microalbuminuria, plasma aldosterone and renal tissue aldosterone were detected respectively. RT-PCR and Western blot were performed to evaluate the gene expression and protein synthesis of CD2AP respectively. Morphology of podocytes was detected by transmission electron microscope. **Results** Systolic blood pressure was obviously higher in SHRs than in control group ($P < 0.01$). The rats in unintervention group presented higher microalbuminuria level than control and intervention groups ($P < 0.01$). Aldosterone levels of plasma and renal tissue were higher in unintervention group than in control group ($P < 0.05$). Transmission electron microscopy showed fusion of podocytes, moderate increase in cytolysosome of tubular epithelial cells, and hyperplasia of renal interstitial microvessels in unintervention group. Gene and protein expressions of CD2AP were lower in unintervention group than in control and intervention groups ($P < 0.01$). CD2AP protein expression had negative correlation with microalbuminuria ($r = -0.587, P < 0.01$), and with plasma and renal tissue aldosterone levels ($r = -0.552, r = -0.577, P < 0.01$) respectively. **Conclusion** Podocytes injury is associated with high aldosterone levels in plasma and renal tissue at early stage of renal damage in SHRs. Eplerenone alleviates podocytes injury and attenuates CD2AP expression in SHRs.

【Key words】 hypertension; aldosterone; podocytes; CD2AP; eplerenone

This work was supported by the Foundation for Science and Technology Development Program of Tianjin (06YFSZSF01400)

收稿日期: 2009-09-21; 修回日期: 2010-11-29

基金项目: 天津市科技发展计划项目(06YFSZSF01400)

通讯作者: 孙跃民, Tel: 022-60362845, E-mail: sunyueminzr@yahoo.com.cn

蛋白尿是高血压性肾损害的重要标志和决定预后的重要预测因子。近几年研究显示,足细胞裂孔隔膜病变在蛋白尿发生发展过程中有重要作用^[1],同时醛固酮与肾脏疾病的进展相关^[2,3];而醛固酮受体拮抗剂可以减轻高血压患者和高血压动物模型的蛋白尿和肾损害程度^[4,5]。足细胞损伤可以通过分析裂孔隔膜(slit diaphragm, SD)正常组分 nephrin 或 podocin 的表达来评估,CD2 相关蛋白(CD2 associated protein, CD2AP)与 nephrin 和 podocin 同为 SD 正常组分。然而,有关高血压病早期肾损害中 CD2AP 表达和醛固酮的关系以及醛固酮受体拮抗剂对 CD2AP 表达的影响尚不明确。本实验旨在观察在高血压早期肾损害中醛固酮和依普利酮对足细胞损伤和 CD2AP 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

醛固酮放免试剂盒(美国 DSL 公司);兔抗 CD2AP 多克隆抗体 IgG、小鼠抗 β -肌动蛋白单克隆抗体 IgG、Western 印迹 Luminol 试剂(美国 Santa Cruz 公司);Trizol 总 RNA 提取试剂、随机引物 Oligo d(T)18、M-MLV 逆转录酶、dNTP、2 $\times$ Taq PCR MasterMix(天根生化科技有限公司);15%SDS-PAGE 溶液(上海杰美基因医药科技有限公司);Tris base(美国 Sigma 公司)。依普利酮(eplerenone)由江西奥勃纳制药有限公司提供(批号:070120-A4)。

1.2 实验动物及分组

采用 8 周龄、平均体质量 180g 的雄性 SHRs 20 只和 8 周龄、平均体质量约 200g 的雄性同源、血压正常的 Wistar-Kyoto(WKY)大鼠 10 只,由中国医学科学院放射医学研究所实验动物中心提供(许可证号:SCXK 津 2005-0001)。根据血压情况,采用随机区组设计方法,SHRs 分为干预组和未干预组各 10 只,WKY 大鼠作为正常对照组。干预组予依普利酮悬浊液灌胃[按 50 mg/(kg $\cdot$ d),溶于 2 ml 过滤水中],未干预组和对照组每天予同体积过滤水灌胃。3 组大鼠均予普通饮食饲养。

1.3 收缩压测量

采用尾袖(tail-cuff)法测量尾动脉收缩压,于饲养第 0、5 和 10 周时各测量 1 次,每次测量 3 遍,取均值计算收缩压。

1.4 24h 尿微量白蛋白定量

分别于饲养第 0、10 周末时采用代谢笼法收集大鼠 24 h 尿,留尿当天禁食,可自由饮水。免疫比

浊法检测尿微量白蛋白。

1.5 标本获取

饲养 10 周末时,大鼠均采用股动脉放血法处死。取出双侧肾脏,分离肾皮质。左肾皮质经过筛法分离肾小球,液氮冷冻后转入-80 $^{\circ}$ C 冰箱保存留作 RT-PCR 和 Western 印迹法用。右肾皮质一部分留作组织醛固酮测定用,另一部分于上极处取 1 mm $\times$ 1 mm $\times$ 1 mm 肾组织 2 块,经 2.5%戊二醛固定后送电镜室行透射电镜检查。其余肾组织用 10%中性甲醛(福尔马林)固定 24 h 后,石蜡包埋,以备组织病理学检查。

1.6 醛固酮的测定

饲养第 0 周时和饲养 10 周末时取血液标本 1 ml,放免法测定血浆醛固酮水平;冻存的肾脏标本制成组织匀浆后取上清液,放免法测定组织醛固酮水平。

1.7 肾小球 CD2AP mRNA 表达检测

RT-PCR 方法半定量检测 CD2AP 基因表达。提取肾小球总 RNA,逆转录为 cDNA 用于 PCR 扩增。合成大鼠 CD2AP 引物序列如下:5'-GGGAGACGA GGGATGTTC-3'(正义, sense), 5'-ATGGCATAGGTG AGGTAGGG-3'(反义, antisense), 该序列预期扩增产物的长度为 448 bp,以 β -actin 作为内参照。应用 VDS450 型影像分析系统进行图像的采集、分析,对 CD2AP 和 β -actin mRNA 的 RT-PCR 产物的光密度和面积进行定量分析,计算 CD2AP/ β -actin 的光密度积分比值,确定各组织中 CD2AP 的相对表达量。

1.8 肾小球 CD2AP 蛋白表达检测

将冻存的肾小球冰浴研磨匀浆,4 $^{\circ}$ C 孵育,11 405 g 离心(4 $^{\circ}$ C),煮沸后恢复室温,-80 $^{\circ}$ C 保存,Lowry 法进行蛋白定量,确定上样量。制备不连续 SDS 聚丙烯酰胺凝胶。待测标本蛋白变性后,上样、电泳,4 $^{\circ}$ C、80V 恒压转膜 1 h。取出 NC 膜,加入 15 ml 膜封闭液,4 $^{\circ}$ C 轻摇孵育 4 h,弃封闭液,加入抗体稀释液,分别按 1:200 的浓度加入 CD2AP 抗原液和 1:1000 浓度加入 β -actin 抗原液,4 $^{\circ}$ C 轻摇孵育过夜,按 1:5000 的浓度加入相应的抗,室温轻摇孵育 1 h,加 1 ml 化学发光底物溶液,随后于暗房中拍照、显影、定影,应用 VDS450 型影像分析系统进行图像的采集、分析,计算 CD2AP/ β -actin 的光密度积分比值,确定 CD2AP 蛋白的相对表达量。

1.9 统计学处理

采用 SPSS13.0 统计学软件包进行统计分析。连续型变量以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间均数比较采用单因素方差分析;Pearson 法行两变量关联性分析。 $P < 0.05$

为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 临床指标的变化

饲养第 0、5 和 10 周末时, 两组 SHR 收缩压均高于对照组 WKY 大鼠($P < 0.01$), 未干预组和干预组 SHR 收缩压无差异(表 1)。第 0 周时, 3 组大鼠之间尿微量白蛋白无差异($P > 0.05$)。第 10 周时, 未干预组的尿微量白蛋白排泄水平高于干预组和对照组($P < 0.01$; 表 2)。

表 1 实验不同时期大鼠动脉收缩压水平 ($n=10$, mmHg, $\bar{x} \pm s$)

组别	第 0 周	第 5 周	第 10 周
未干预组	162 ± 18**	181 ± 20**	198 ± 10**
干预组	159 ± 11**	181 ± 14**	202 ± 13**
对照组	112 ± 6	122 ± 7	131 ± 12

注: 1mmHg=0.133kPa。与对照组比较, ** $P < 0.01$

表 2 尿微量白蛋白 ($n=10$, mg/24h, $\bar{x} \pm s$)

组别	第 0 周	第 10 周
未干预组	3.2 ± 0.6	10.6 ± 1.6
干预组	3.0 ± 0.6	6.0 ± 1.5**
对照组	2.7 ± 0.4	6.3 ± 3.0**

注: 与未干预组比较, ** $P < 0.01$

2.2 醛固酮水平

饲养第 0 周时(给药前), 3 组大鼠之间血浆醛固酮水平无差异。饲养 10 周末时, 未干预组血浆醛固酮水平高于对照组($P < 0.05$)。未干预组和干预组比较、干预组和对照组比较均无差异。对比前后两次血浆醛固酮的差值, 干预组和对照组血浆醛固酮升高的幅度均低于未干预组($P < 0.05$)。未干预组的组织醛固酮水平高于对照组($P < 0.05$; 表 3)。

表 3 血浆醛固酮(ng/L)和肾组织醛固酮(ng/g)水平比较

($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

组别	血浆醛固酮		血浆醛固酮差值	肾组织醛固酮
	第 0 周	第 10 周		
未干预组	130 ± 69	650 ± 196	520 ± 152	1.5 ± 0.4
干预组	154 ± 81	469 ± 184	315 ± 181*	1.2 ± 0.4
对照组	196 ± 82	378 ± 214*	182 ± 223*	1.0 ± 0.5*

注: 与未干预组比较, * $P < 0.05$

2.3 病理组织形态学变化

普通光镜下, 各组大鼠肾组织无明显病理形态学改变(图 1)。透射电镜下, 未干预组肾小球系膜细胞和基质轻度增生, 上皮足突节段融合(图 2A 白箭头), 肾小管上皮细胞溶酶体中度增多(图 2B 白箭头), 肾间质毛细血管扩张, 少量单核细胞浸润伴胶原纤维增生; 干预组肾小球系膜细胞和基质轻度增生, 肾小管上皮细胞溶酶体轻度增多。对照组无明显病变。

2.4 RT-PCR 和 Western 印迹法结果

未干预组 CD2AP mRNA 和蛋白表达均低于干预组和对照组($P < 0.01$), 干预组与对照组相比, 其 CD2AP mRNA 和蛋白表达无差异(表 4, 图 3, 图 4)。

2.6 醛固酮与 CD2AP 蛋白表达相关分析

大鼠的血浆醛固酮和组织醛固酮均与肾小球 CD2AP 蛋白表达水平呈负相关, 相关系数分别为 $r = -0.552$ ($P < 0.01$)和 $r = -0.577$ ($P < 0.01$)(图 5, 图 6)。

图 1 大鼠肾脏普通光镜检测结果 (天狼星红染色 ×400)

A, B: 未干预组; C 干预组; D 对照组

2.7 尿微量白蛋白与 CD2AP 蛋白表达关系

大鼠的尿微量白蛋白与 CD2AP 蛋白表达呈负

相关, 相关系数 $r = -0.587 (P < 0.01)$; 图 7)。

3 讨 论

本研究中, SHRs 的血浆醛固酮水平和肾组织醛固酮水平均高于血压正常的 WKY 大鼠, 与国内外学者的研究结果相似^[6,7]。通过透射电镜检测, 观察到未干预组 SHRs 已经有足细胞足突的节段融合, 伴有肾间质的病理改变, 而干预组与对照组无此类病理改变。饲养第 0 周时(给药前), 3 组大鼠之间的血浆醛固酮水平和尿微量白蛋白排泄率无差异, 我们考虑这与 8 周龄的 SHRs 处于高血压状态的时间较短, RAAS 激活不充分及早期肾损伤较轻有关。饲养 10 周末时, 未干预组 SHRs 的尿微量白蛋白排泄率高于干预组和对照组, 表明醛固酮增高和足细胞损伤有关。正常生理情况下, 肾小球滤过屏障需要肾小球基底膜和 SD 共同维持。Kretzler 等^[8]和 Shibata 等^[9]在残余肾模型大鼠的研究中发现, 醛固酮可以导致的足细胞损伤, 抑制 SD 上 nephrin 和 podocin 的基因表达, 促进蛋白尿和肾损伤的发生。CD2AP 同样是 SD 的重要组成部分, 免疫组化研究结果显示 CD2AP 在肾脏主要表达于肾小球足突细胞 SD^[10]。Zhang 等^[11]研究发现, CD2AP 表达下调将明显抑制足细胞增殖, 降低 nephrin 的表达和磷酸化

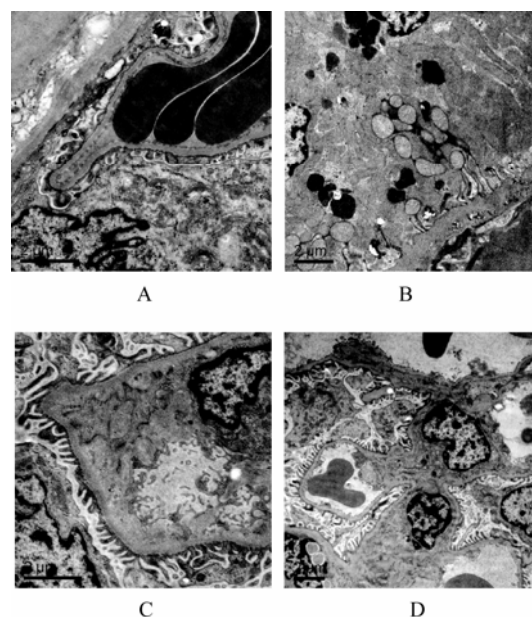


图 2 大鼠肾脏的透射电镜检测结果 (TEM)
A: 未干预组($\times 15\ 000$); B: 未干预组($\times 10\ 000$); C: 干预组($\times 15\ 000$); D: 对照组($\times 8\ 000$)

表 4 肾小球 CD2AP mRNA 和蛋白表达情况 ($n = 10, \bar{x} \pm s$)

组别	CD2AP mRNA	CD2AP 蛋白
未干预组	0.86 ± 0.11	0.84 ± 0.08
干预组	$1.05 \pm 0.07^{**}$	$1.10 \pm 0.14^{**}$
对照组	$1.05 \pm 0.08^{**}$	$1.19 \pm 0.15^{**}$

注: 与未干预组比较, $^{**}P < 0.01$

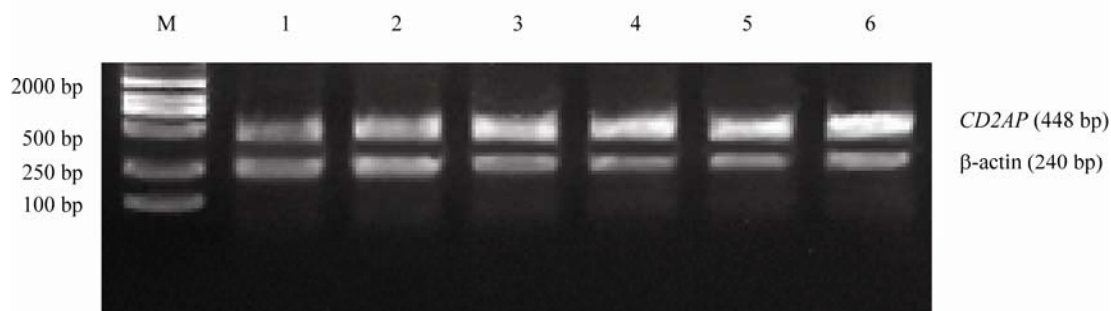


图 3 RT-PCR 分析肾小球 CD2AP mRNA 表达情况
M: 标志物; 1, 2: 未干预组; 3, 4: 干预组; 5, 6: 对照组

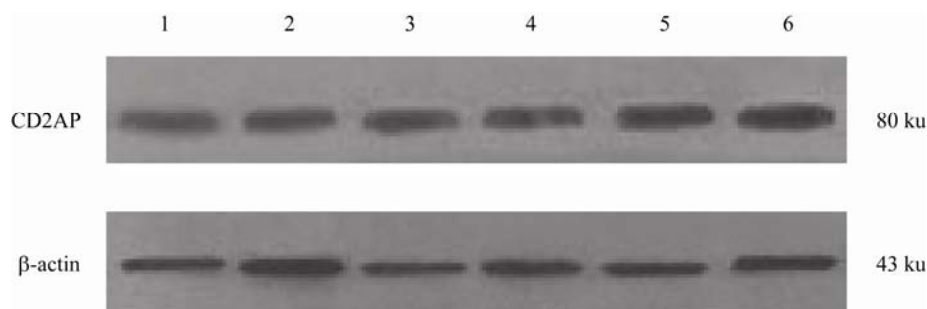


图 4 Western 印迹法分析肾小球 CD2AP 蛋白表达情况
1, 2: 未干预组; 3, 4: 干预组; 5, 6: 对照组

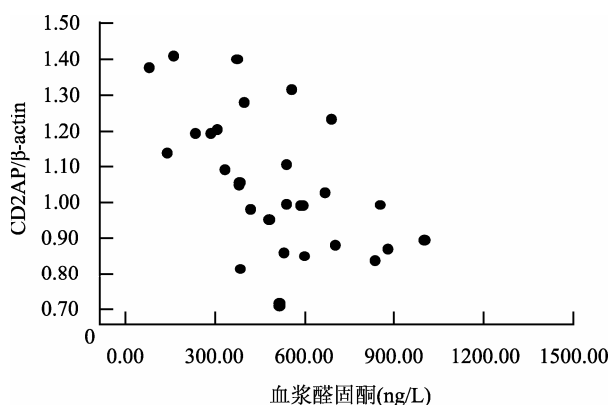


图 5 血浆醛固酮与 CD2AP 蛋白表达相关关系

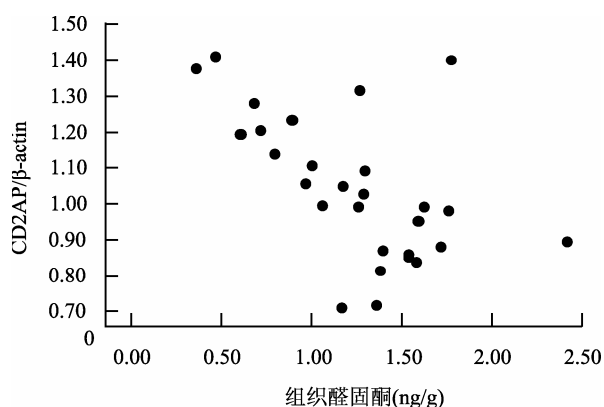


图 6 组织醛固酮与 CD2AP 蛋白表达相关关系

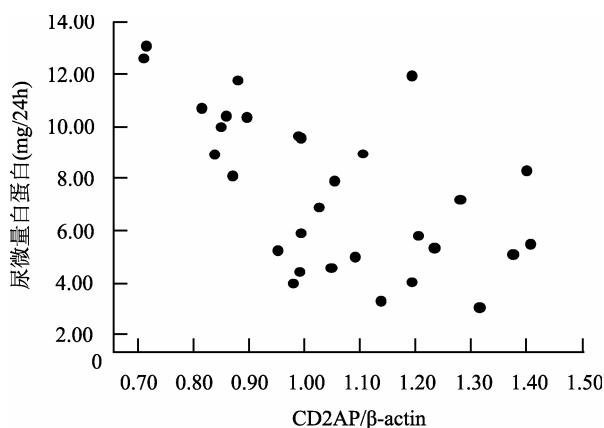


图 7 尿微量白蛋白与 CD2AP 蛋白表达相关关系

水平,使细胞骨架断裂并干扰nephrin-CD2AP信号通路,导致足细胞损伤,出现蛋白尿。因此 CD2AP 表达改变时,也可导致蛋白尿发生。本研究观察到,在 SHR 高血压肾损害早期,血浆与组织醛固酮增加,CD2AP mRNA 和蛋白表达水平均明显低于对照组大鼠,并且血浆与组织醛固酮分别和 CD2AP 蛋白表达水平呈负相关,尿微量白蛋白排泄率与 CD2AP 蛋白表达呈负相关。这表明,虽然普通光镜下大鼠肾组织尚未出现明显的病理改变,但 CD2AP 表达已经出现异常;在 SHR 肾损害早期同样存在着蛋白尿和肾小

球足细胞的损伤,CD2AP 可能是反映足细胞损伤的更早期的指标,血浆和肾组织醛固酮水平的增高可能是 CD2AP 表达水平降低的原因之一。

依普利酮的作用机制是与盐皮质激素受体结合,阻止醛固酮与盐皮质激素受体结合,从而抑制醛固酮受体复合物形成,进而影响由醛固酮受体复合物诱导的一系列生理生化反应。目前的研究显示依普利酮具有显著的靶器官保护作用:延缓、减轻蛋白尿,抑制肾间质纤维化,改善肾功能^[12]。但是,依普利酮对 CD2AP 表达的影响,目前尚未阐明。在本研究中,SHRs 血浆和肾组织醛固酮水平未干预组高于对照组($P < 0.05$),在干预组和对照组比较也无差异;而干预组和未干预组比较无差异,但是对前后两次血浆醛固酮的差值进行方差分析后,干预组血浆醛固酮升高幅度低于未干预组($P < 0.01$)。这表明,依普利酮可以抑制 SHR 血浆醛固酮的升高。目前依普利酮对血浆和肾组织醛固酮水平影响结果在不同研究中尚不一致,原因可能与动物种属^[13]、干预时间和盐负荷状态^[7,14-16]以及盐皮质激素受体阻断、组织内 11 β -羟类固醇脱氢酶含量变化、CYP11B2 基因表达降低^[17]有关。干预组尿微量白蛋白水平和血浆醛固酮升高的幅度均低于未干预组,而 CD2AP 的 mRNA 和蛋白表达水平明显高于未干预组,这表明依普利酮可以降低 SHR 的尿微量白蛋白水平,使肾小球 CD2AP 表达增加,具有肾脏保护作用。临床试验显示依普利酮在人体有降压作用,且与剂量相关,但在血管紧张素灌注的 Wistar 大鼠模型中,依普利酮并不能防止严重高血压的发生,因此我们考虑两组 SHR 的收缩压水平没有差异可能与用药剂量小和 SHR 体内血管紧张素水平高有关。

【参考文献】

- [1] Asanuma K, Mundel P. The role of podocytes in glomerular pathobiology[J]. Clin Exp Nephrol, 2003, 7(4): 255-259.
- [2] Chun TY, Chander PN, Kim JW, *et al.* Aldosterone, but not angiotensin, increases profibrotic factors in kidney of adrenalectomized stroke-prone spontaneously hypertensive rats[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2008, 295(2): E305-E312.
- [3] Huang W, Xu C, Kahng KW, *et al.* Aldosterone and TGF- β 1 synergistically increase PAI-1 and decrease matrix degradation in rat renal mesangial and fibroblast cells[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2008, 294(6): F1287-F1295.
- [4] Kuriyama S, Sugano N, Ueda H, *et al.* Successful effect of triple blockade of renin-angiotensin-aldosterone system on massive proteinuria in a patient with chronic kidney disease[J]. Clin Exp Nephrol, 2009, 13(6): 663-666.

- [5] Kobayashi N, Hara K, Tojo A, *et al.* Eplerenone shows renoprotective effect by reducing LOX-1-mediated adhesion molecule, PKCepsilon-MAPK-p90RSK, and Rho-kinase pathway[J]. *Hypertension*, 2005, 45(4): 538-544.
- [6] 成彩联, 姜探奇, 汤颖, 等. 自发性高血压大鼠肾组织醛固酮及其受体与肾脏纤维化[J]. *中国现代医学杂志*, 2006, 16(21): 3245-3248.
- [7] Endemann DH, Touyz RM, Iglarz M, *et al.* Eplerenone prevents salt-induced vascular remodeling and cardiac fibrosis in stroke-prone spontaneously hypertensive rats[J]. *Hypertension*, 2004, 43(6): 1252-1257.
- [8] Kretzler M, Koeppen-Hagemann I, Kriz W. Podocyte damage is a critical step in the development of glomerulosclerosis in the uninephrectomized-desoxycorticosterone hypertensive rat[J]. *Virchows Arch*, 1994, 425(2): 181-193.
- [9] Shibata S, Nagase M, Yoshida S, *et al.* Podocyte as the target for aldosterone roles of oxidative stress and Sgk1[J]. *Hypertension*, 2007, 49(2): 355-364.
- [10] 周伟. CD2AP 在肾脏病学的研究进展[J]. *国外医学生理、病理科学与临床分册*, 2005, 25(2): 183-185.
- [11] Zhang C, Jiang HJ, Chang Y, *et al.* Down-regulation of CD2-associated protein impaired the physiological functions of podocytes[J]. *Cell Biol Int*, 2009, 33(6): 632-639.
- [12] de las Heras N, Ruiz-Ortega M, Rupérea M, *et al.* Interaction between aldosterone and connective tissues growth factor in vascular and renal damage in spontaneously hypertensive rats[J]. *J Hypertens*, 2007, 25(3): 629-638.
- [13] de Paula RB, da Silva AA, Hall JE. Aldosterone antagonism attenuates obesity-induced hypertension and glomerular hyperfiltration[J]. *Hypertension*, 2004, 43(1): 41-47.
- [14] Bayorh MA, Mann G, Walton M, *et al.* Effects of enalapril, tempol and eplerenone on salt-induced hypertension in dahl salt-sensitive rats[J]. *Clin Exp Hypertens*, 2006, 28(2): 121-132.
- [15] Kobayashi N, Yoshida K, Nakano S, *et al.* Cardioprotective mechanisms of eplerenone on cardiac performance and remodeling in failing rat hearts[J]. *Hypertension*, 2006, 47(4): 671-679.
- [16] Burla AK, Neves MF, Oigman W, *et al.* Eplerenone offsets cardiac and aortic adverse remodeling in spontaneously hypertensive rats[J]. *Int J Cardiol*, 2007, 114(1): 64-70.
- [17] Nagata K, Obata K, Xu J, *et al.* Mineralocorticoid receptor antagonism attenuates cardiac hypertrophy and failure in low-aldosterone hypertensive rats[J]. *Hypertension*, 2006, 47(4): 656-664.

· 消 息 ·

中国科技核心期刊 《中华临床医师杂志(电子版)》2011 年度征稿、征订

《中华临床医师杂志(电子版)》是中国科技核心期刊, 半月刊, 全年出刊 24 期, 定价 672 元, 国内刊号 CN 11-9147/R, 邮发代号 80-728, 被万方数据库、中国期刊网、维普数据库、美国化学文摘、乌利希期刊指南、波兰哥白尼索引等国内外知名数据库收录。

2011 年度重点栏目征稿及 2011 年优惠征订详情请见中华临床医师杂志官方网站 www.clinicmed.net 的期刊动态。欢迎广大临床医师积极投稿并订阅杂志! 欢迎各位专家组织、推荐、撰写重点栏目论文!

投稿邮箱: 100035 北京市 100035-50 信箱 编辑部 收

投稿邮箱电子邮箱: Lcdoctor@163.com

电话: 010-62219211

传真: 010-62222508

网址: <http://www.clinicmed.net>