

论著 · 实验研究

胱硫醚-γ-裂解酶/硫化氢通路在小鼠 病毒性心肌炎中的表达

花旺¹ 姜剑斌² 荣星² 吴蓉洲² 仇慧仙² 张国海² 陈其²

(1. 浙江大学医学院附属儿童医院内科, 浙江 杭州 310003;
2. 温州医学院附属育英儿童医院心血管科, 浙江 温州 325027)

【摘要】 目的 近年研究发现硫化氢(H₂S)在血管活性调节、炎症反应、细胞增殖凋亡、缺血再灌注、氧化应激等方面起重要作用,而在心肌炎发病机制中也存在这些基本的病理生理过程,因此本研究检测胱硫醚-γ-裂解酶(CSE)/H₂S通路在小鼠病毒性心肌炎中的表达。**方法** 6周龄近交系雄性 Balb/c 小鼠随机分为对照组(*n* = 25)和病毒性心肌炎组(*n* = 30),分别给予 PBS 和 10^{-5.69}TCID₅₀/mL CVB3 0.1 mL 注射,第4和10天各随机取10只小鼠处死并取血和心脏标本,检测血清 H₂S 和心肌 H₂S 生成活性,心肌常规苏木素-伊红染色,免疫组化检测 CSE 蛋白表达。**结果** 在急性病毒性心肌炎小鼠模型中,血清 H₂S 及心肌 H₂S 生成活性较对照组升高(*P* < 0.05),心肌 CSE 蛋白表达亦增加(*P* < 0.05)。**结论** 在急性小鼠 CVB3 心肌炎中 CSE 及其下游产物 H₂S 水平上调,CSE/H₂S 通路表达上调可能通过多个环节参与疾病的发病。
[中国当代儿科杂志,2010,12(9):744-748]

【关键词】 胱硫醚-γ-裂解酶;硫化氢;柯萨奇病毒 B3;心肌炎;小鼠
【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1008-8830(2010)09-0744-05

Expression of cystathionine-γ-lyase/hydrogen sulfide pathway in CVB3-induced myocarditis in mice

HUA Wang, JIANG Jian-Bin, RONG Xing, WU Rong-Zhou, QIU Hui-Xian, ZHANG Yuan-Hai, CHEN Qi. Department of Cardiology, Children's Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310003, China (Chen Q, Email: ccq57@126.com)

Abstract: Objective Previous studies have shown that hydrogen sulfide (H₂S) plays key roles in a number of biological processes, including vasorelaxation, inflammation, apoptosis, ischemia/reperfusion and oxidative stress, which are involved in the pathogenesis of myocarditis. This study aimed to examine the expression of cystathionine-γ-lyase (CSE)/H₂S pathway in mice with viral myocarditis. **Methods** Six-week-old inbred male mice were randomly assigned to control (*n* = 25) and myocarditis group (*n* = 30). The myocarditis and the control groups were inoculated intraperitoneally with 0.1 mL 10^{-5.69}TCID₅₀/mL CVB3 or vehicle (PBS) alone respectively. Ten mice were sacrificed 4 and 10 days after injection. Blood and heart specimens were harvested for measuring the content of serum H₂S and the H₂S production rates in cardiac tissues. Heart sections were stained with hematoxylin and eosin. Immunohistochemistry was used to detect the CSE protein expression in the heart. **Results** In the myocarditis group, the serum H₂S content and H₂S production rates in cardiac tissues were significantly higher than those in the control group 4 and 10 days after injection (*P* < 0.05). The expression of CSE protein in the heart in the myocarditis group was also significantly higher than that in the control group (*P* < 0.05). **Conclusions** CSE and its downstream production H₂S increase in mice with acute viral myocarditis. The increased expression of CSE/H₂S pathway might be involved in the pathogenesis of viral myocarditis.

[Chin J Contemp Pediatr, 2010, 12 (9):744-748]

Key words: Cystathionine-γ-lyase; Hydrogen sulfide; Coxsackievirus B3; Myocarditis; Mice

气体信号分子(包括 NO, CO, H₂S)成为近年来的研究热点,NO 在病毒性心肌炎中研究颇多,柯萨奇病毒 B3(CVB3)感染后第4~28天心肌均有较高 iNOS mRNA 表达,第7~28天血清 NO 水平升高^[1];且 NOS 抑制剂可使 CVB3 心肌炎小鼠病毒滴度升高、死亡率增加^[2];体外研究还发现 NO 供体能抑制 CVB3 蛋白酶 2A、3C 活性^[3]。近年研究发现 H₂S 在血管活性调节、炎症反应、细胞增殖凋亡、缺血再灌注、氧化应激等方面起重要作用。如对心肌缺血模型的研究中发现 H₂S 有心肌保护作用^[4],抑制内源性 H₂S 生成可致白细胞粘附浸润和组织肿胀^[5],表明 H₂S 亦有抗炎保护心肌作用。Geng 等^[6]

[收稿日期]2009-12-13;[修回日期]2010-02-10
[基金项目]温州市科技计划项目(Y20090033)。
[作者简介]花旺,男,硕士,医师。
[通信作者]陈其,主任医师。

报导心肌中 H_2S 主要由胱硫醚- γ -裂解酶(cystathionine- γ -lyase CSE)催化底物 L-半胱氨酸生成,证实心肌内存在 CSE/ H_2S 通路;并在基因敲除小鼠实验中得到进一步证实^[7]。可以推测 H_2S 和病毒性心肌炎的发病机制有着多种层次上的广泛联系。但迄今未有 H_2S 在病毒性心肌炎中的相关报道。为了系统探讨 H_2S 在此疾病中的作用,本课题研究 CSE/ H_2S 通路在小鼠 CVB3 心肌炎中的表达。

1 材料和方法

1.1 动物和试剂

健康6周龄近交系雄性 Balb/c 小鼠 55 只,购于上海斯莱克实验动物有限责任公司,许可证号:SCXK(沪)2003-0003。Hela 细胞由浙江省医学遗传学重点实验室提供。CVB3 病毒 Nancy 标准株购于山东省医学科学院病毒室,冻存在我院科研中心 $-75^{\circ}C$ 超低温冰箱。优质胎牛血清购于杭州四季青生物工程材料有限公司,PRMI1640 培养基购于美国 Gibco 公司,25 mL 培养瓶购于美国 Corning 公司,BCA 蛋白浓度测定试剂盒和 HE 染色试剂盒购于江苏碧云天公司。N,N-二甲基-对苯二胺硫酸盐购自美国 Sigma 公司,磷酸吡哆醛、L-半胱氨酸购自北京 Solarbio 公司,兔多抗 CSE 抗体购于美国 PTGLAB 公司,即用型 SABC 试剂盒和 DAB 显色试剂盒购自武汉博士德公司。其余试剂为市售分析纯试剂。

1.2 病毒增殖和滴度测定

Hela 细胞冻存管快速复温后加入含 10% 胎牛血清 RPMI 1640 培养液至 25 mL 一次性塑料培养瓶中,于 $37^{\circ}C$ 、5% CO_2 培养箱内培养至细胞形成单层后,取病毒原液 0.2 mL 加入培养瓶中,吸附作用 1 h 后,反复冻融 3 次, $4^{\circ}C$ 下 7 500 rpm 离心 10 min,收集上清病毒液,以备动物病毒接种和滴度测定。在 96 孔板中培养 Hela 细胞到单层,加用 PBS 液 10 倍方式系列稀释的病毒液 0.05 mL 加至各孔(每一浓度 8 个孔)中吸附 1 h,最后在每个孔中再加入含 4% 胎牛血清 RPMI 1640 培养液 0.1 mL,培养箱内培养,每天观察并记录出现的细胞病变(Cytopathic effect, CPE)的孔数。CPE 在 50% 或以上作为病变的阳性孔,无细胞病变或病变在 50% 以下为阴性孔,用 Reed-Muench 法计算病毒的最终滴度,并以半数细胞感染率(50% Tissue Culture Infective Dose, TCID₅₀)来表示^[2]。

1.3 动物分组和模型建立

Balb/c 小鼠随机分为两组:对照组(25 只)和病

毒性心肌炎组(30 只),分别给予 PBS 和 $10^{-5.69}$ TCID₅₀/mL CVB3 0.1 mL 腹腔注射,注射当日为第 0 天,而后每天注射 0.1 mL PBS。第 4 和 10 天各随机取 10 只小鼠处死并取血和心脏标本。

1.4 血清 H_2S 含量测定

取血清样品 0.1 mL,依次加入以下试剂:1% 乙酸锌 0.5 mL,蒸馏水 2.5 mL,20 mmol/L N,N-二甲基-对苯二胺硫酸盐 0.5 mL(溶于 7.2 mol/L 盐酸),30 mmol/L $FeCl_3$ 0.4 mL(溶于 1.2 mol/L 盐酸)混匀,室温静置 15 min 充分反应。加入 10% 三氯乙酸 1 mL 去除蛋白影响,3 000 rpm 离心 5 min 后,测定上清液在 670 nm 波长的吸光度,以硫化钠制定标准曲线计算血清 H_2S 含量以 $\mu mol/L$ 表示^[4]。

1.5 心肌 H_2S 生成活性测定

在 $4^{\circ}C$ 的磷酸钾缓冲液(50 mmol/L, pH 6.8)中将心肌研磨成 10% (w/v) 匀浆,并用 BCA 法蛋白定量。加入反应液:100 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 7.4),10 mmol/L L-半胱氨酸,2 mmol/L 磷酸吡多醛,移至反应瓶,反应瓶中央的吸收孔中加入 0.5 mL 1% 乙酸锌+滤纸,N₂ 吹 20 s 除去 O₂,封口, $37^{\circ}C$ 水浴振荡孵育 90 min,加入 0.5 mL 50% 三氯乙酸 $37^{\circ}C$ 孵育 60 min,终止反应,反应瓶中央孔的液体加入:3.5 mL 水,0.5 mL 20 mmol/L N,N-二甲基-对苯二胺硫酸盐(溶于 7.8 mol/L 盐酸),0.4 mL 30 mmol/L 三氯化铁(溶于 1.2 mol/L 盐酸),室温反应 15 min,测 670 nm 波长的吸光度,以硫化钠制定标准曲线计算心肌 H_2S 生成率为每克心肌蛋白 nmol/min^[6]。

1.6 免疫组化测定心肌 CSE 蛋白表达

心肌组织石蜡切片经烤片,脱水,抗原修复,滴加 1:50 稀释的 CSE 一抗, $4^{\circ}C$ 过夜,依次加入生物素化羊抗兔 IgG(二抗),试剂 SABC, DAB 显微镜下显色,苏木素复染,脱水,中性树胶封片,镜检。CSE 蛋白阳性表达在镜下为棕黄色,用 Image Pro-plus 6.0 图像分析软件测定棕黄色颗粒平均光密度值来代表 CSE 蛋白表达量。同时心肌切片常规苏木精-伊红染色。

1.7 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件。所有数据均进行正态性检验和方差齐性检验。用两独立样本 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 心肌炎模型的评价

小鼠在接种病毒后出现体重下降、活动减少、蜷

缩,接种第5天出现死亡,至第10天,共死亡9只;而正常对照组小鼠则体重增加、活动良好,无死亡。接种病毒第10天小鼠心肌间质水肿,血管扩张充血,炎症细胞浸润,心肌肿胀坏死,而对照组未见这些改变。因此,本实验成功建立小鼠 CVB3 病毒性心肌炎模型(图1)。

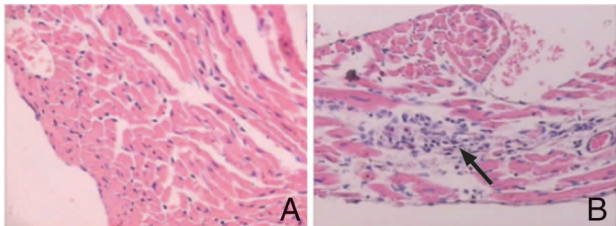


图1 两组心肌组织苏木素-伊红染色(×200) A:为第10天正常组心肌组织,形态正常;B:为第10天心肌炎组的心肌组织,可见间质水肿,血管扩张充血,炎症细胞浸润,心肌肿胀坏死。箭头所指为心肌间质浸润的炎症细胞。

2.2 各组血清 H₂S 比较

第4天及第10天心肌炎组血清 H₂S 水平显著高于对照组($P < 0.05$)。两组组内第4天和第10天相比差异均无统计学意义(图2)。

2.3 各组心肌 H₂S 生成活性比较

第4天及第10天心肌炎组心肌 H₂S 生成活性水平显著高于对照组($P < 0.05$)。两组组内第4天和第10天相比差异均无统计学意义(图3)。

2.4 心肌 CSE 蛋白表达

免疫组化染色提示正常心肌组织在血管内皮处

有 CSE 弱表达,而在心肌炎时内皮表达升高,同时心肌细胞上亦开始表达,但表达在第4天和第10天两个时间点之间差异无统计学意义(图4,5)。

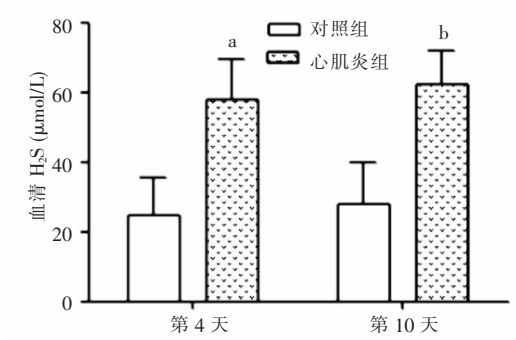


图2 各组血清 H₂S 含量比较($n = 10$) a: 与对照组第4天比较, $P < 0.05$; b: 与对照组第10天比较, $P < 0.05$ 。

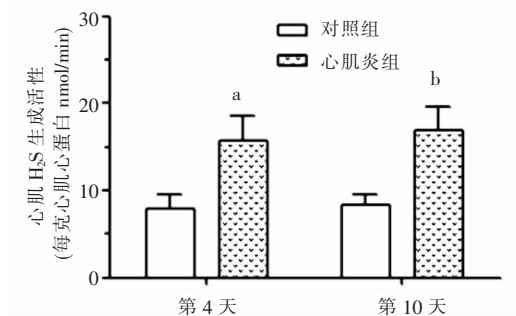


图3 各组心肌 H₂S 生成活性比较($n = 10$) a: 与对照组第4天比较, $P < 0.05$; b: 与对照组第10天比较, $P < 0.05$ 。

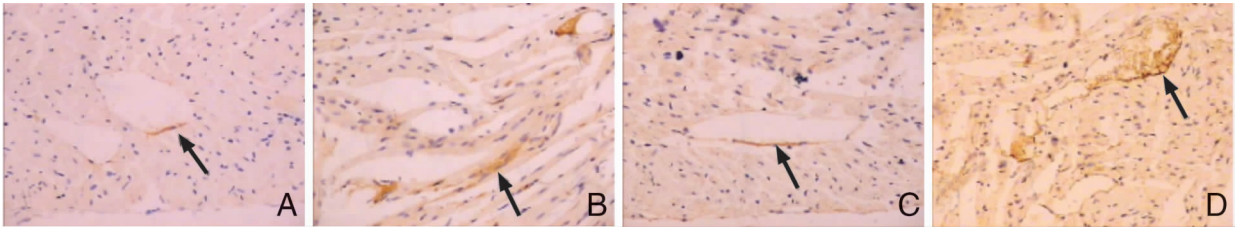


图4 各组心肌免疫组化染色(×200) A:第4天对照组心肌可见 CSE 蛋白在血管内皮弱表达; B:第4天心肌炎组心肌可见 CSE 蛋白在血管内皮表达增多,同时心肌细胞有表达; C:第10天对照组心肌可见 CSE 蛋白在血管内皮弱表达; D:第10天心肌炎组心肌可见 CSE 蛋白在血管内皮表达增多,同时心肌细胞有表达。箭头所指为 CSE 阳性表达部位。

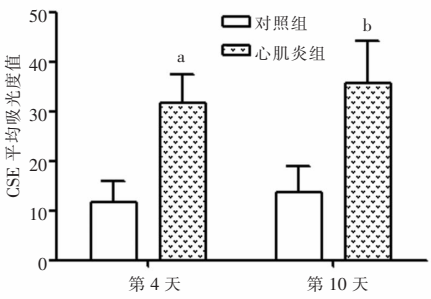


图5 各组心肌免疫组化染色的吸光度比较($n = 10$) a: 与对照组第4天比较, $P < 0.05$; b: 与对照组第10天比较, $P < 0.05$ 。

3 讨论

心肌炎是指在无明显急性缺血情况下由各种感染原、免疫非免疫因素导致共同的心肌炎症反应^[8],急性心肌炎常见病原体为 CVB3。时至今日它仍是严重危害人们健康的疾病之一。与此同时, H₂S 作为气体信号分子家族 NO、CO 之后新成员,被证实有着广泛的生理和病理生理作用。研究表明

H₂S能和效应蛋白反应形成多种不稳定的活性过硫化物^[9];能通过共价键直接作用于效应分子^[10];能和部分金属蛋白金属离子作用,如抑制含锌的血管紧张素酶的活性^[11];此外H₂S还能和NO生成亚硝基硫醇,减少cGMP的堆积,继而抑制NO效应的发挥^[12]。文献报道心肌组织能产生H₂S,并且主要由CSE酶催化而生成,心肌H₂S生成活性能够反应CSE酶的活性^[6,7]。

本研究发现在正常小鼠中,血H₂S水平和心肌H₂S生成活性分别是25 μmol/L和每克心肌蛋白8 nmol/min,和Yang等^[7]报道的40 μmol/L和每克心肌蛋白5 nmol/min;在急性CVB3心肌炎小鼠模型中,第4天和第10天的血清H₂S和心肌H₂S生成活性均升高2倍或2倍以上;心肌免疫组化染色提示CSE蛋白表达在心肌炎时亦明显增加;这表明CSE/H₂S通路在心肌炎中上调。进一步研究发现,正常心肌组织中CSE蛋白仅在内皮细胞中有微弱表达,而CVB3感染后可促进内皮细胞CSE蛋白表达,同时可诱导心肌细胞也表达此类蛋白,最后导致效应分子H₂S水平升高,但在第4天和第10天两个时间点的研究对比发现CSE/H₂S通路表达无明显变化。

上调的CSE/H₂S通路在CVB3心肌炎中究竟发挥了什么作用呢?推测H₂S可能通过以下机制作用于病毒性心肌炎发病机制的各个环节。

首先,有研究证实ERK1/2早期活化与CVB3和柯萨奇腺病毒受体相结合有关,后期活化则参与病毒复制^[13-14],CVB3感染可通过PI3K依赖的途径引起PKB/Akt 308位苏氨酸和473位丝氨酸磷酸化,这是病毒进入细胞后复制所需的,阻断此通路可抑制病毒RNA表达、诱导受感染细胞凋亡^[15]。H₂S能够活化K_{ATP}/PKC/ERK1/2和PI3K/Akt通路参与心脏缺血预适应保护作用^[16]。这些提示H₂S可通过多个信号通路促进病毒的表达。其次,病毒入侵心肌后早期浸润的是NK细胞,它能抑制病毒复制而有心脏保护作用,而NK细胞缺陷小鼠心肌炎症更加明显,后期是T淋巴细胞浸润,于7~14 d达到高峰,发挥病毒清除和免疫损伤作用,此阶段心肌损伤最为严重^[17]。Mirandola等^[18]证实H₂S促进CD8⁺T细胞和CD56⁺NK细胞死亡,减少CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞产生的IL-2,降低NK细胞的杀伤毒力。这些提示H₂S通过作用于免疫细胞减轻心肌细胞损伤。此外,气体信号分子的相互作用是近年研究的热点。心肌炎中心肌细胞和炎性浸润细胞均表达iNOS从而产生NO,它具有双重性:一方面

有抗病毒活性,另一方面过度表达可增加氧化应激,导致心肌凋亡和坏死^[16]。Oh等^[19]对3种气体信号系统相互作用进行了研究,发现H₂S可减少iNOS和NO的生成;H₂S激活ERK进而诱导HO-1表达;CO可活化NF-κB进而降低iNOS和NO表达。Jin等^[20]的研究表明抑制CSE/H₂S通路可促进CO的表达而抑制HO-1/CO通路也可促进H₂S的表达。这些提示H₂S和NO、CO相互作用也可影响病毒性心肌的发病过程。

本研究表明在CVB3感染后可诱导心肌CSE/H₂S通路上调,H₂S可能通过多个环节影响病毒性心肌炎的发生发展。当然,这个通路的上调是机体对病毒入侵损伤的自我防御还是CVB3利用宿主体内系统生存繁殖的表现我们还不得而知。阻断和激动此通路的表达有助于深入研究H₂S发挥具体效应和确切作用机制。

参 考 文 献

- [1] Gluck B, Merkle I, Dornberger G, Stelzner A. Expression of inducible nitric oxide synthase in experimental viral myocarditis[J]. Herz, 2000, 25(3):255-260.
- [2] Lowenstein CJ, Hill SL, Lafond-Walker A, Wu J, Allen G, Landavere M, et al. Nitric oxide inhibits viral replication in murine myocarditis[J]. J Clin Invest, 1996, 97(8):1837-1843.
- [3] Zell R, Markgraf R, Schmidtke M, Gorchach M, Stelzner A, Henke A, et al. Nitric oxide donors inhibit the coxsackievirus B3 proteinases 2A and 3C in vitro, virus production in cells, and signs of myocarditis in virus-infected mice[J]. Med Microbiol Immunol, 2004, 193(2-3):91-100.
- [4] Zhu YZ, Wang ZJ, Ho P, Loke YY, Zhu YC, Huang SH, et al. Hydrogen sulfide and its possible roles in myocardial ischemia in experimental rats[J]. J Appl Physiol, 2007, 102(1):261-268.
- [5] Zanardo RC, Brancalione V, Distrutti E, Fiorucci S, Cirino G, Wallace JL. Hydrogen sulfide is an endogenous modulator of leukocyte-mediated inflammation[J]. FASEB J, 2006, 20(12):2118-2120.
- [6] Geng B, Yang J, Qi Y, Zhao J, Pang Y, Du J, et al. H₂S generated by heart in rat and its effects on cardiac function[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 313(2):362-368.
- [7] Yang G, Wu L, Jiang B, Yang W, Qi J, Cao K, et al. H₂S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine gamma-lyase[J]. Science, 2008, 322(5901):587-590.
- [8] Ellis CR, Di Salvo T. Myocarditis: basic and clinical aspects[J]. Cardiol Rev, 2007, 15(4):170-177.
- [9] Wang R. Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter?[J]. FASEB J, 2002, 16(13):1792-1798.
- [10] Johansen D, Ytrehus K, Baxter GF. Exogenous hydrogen sulfide (H₂S) protects against regional myocardial ischemia-reperfusion injury—Evidence for a role of K ATP channels[J]. Basic Res Cardiol, 2006, 101(1):53-60.
- [11] Laggner H, Hermann M, Esterbauer H, Muellner MK, Exner M, Gmeiner BM, et al. The novel gaseous vasorelaxant hydrogen sul-

fide inhibits angiotensin-converting enzyme activity of endothelial cells[J]. J Hypertens, 2007, 25(10):2100-2104.

[12] Whiteman M, Li L, Kostetski I, Chu SH, Siau JL, Bhatia M, et al. Evidence for the formation of a novel nitrosothiol from the gaseous mediators nitric oxide and hydrogen sulphide[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 343(1):303-310.

[13] Lim BK, Nam JH, Gil CO, Yun SH, Choi JH, Kim DK, et al. Cocksackievirus B3 replication is related to activation of the late extracellular signal-regulated kinase (ERK) signal[J]. Virus Res, 2005, 113(2):153-157.

[14] Luo H, Yanagawa B, Zhang J, Luo Z, Zhang M, Esfandiarei M, et al. Cocksackievirus B3 replication is reduced by inhibition of the extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling pathway[J]. J Virol, 2002, 76(7):3365-3373.

[15] Esfandiarei M, Luo H, Yanagawa B, Suarez A, Dabiri D, Zhang J, et al. Protein kinase B/Akt regulates coxsackievirus B3 replication through a mechanism which is not caspase dependent[J]. J Virol, 2004, 78(8):4289-4298.

[16] Hu Y, Chen X, Pan TT, Neo KL, Lee SW, Khin ES, et al. Cardioprotection induced by hydrogen sulfide preconditioning involves activation of ERK and PI3K/Akt pathways[J]. Pflugers Arch, 2008, 455(4):607-616.

[17] Kearney MT, Cotton JM, Richardson PJ, Shah AM. Viral myocarditis and dilated cardiomyopathy: mechanisms, manifestations, and management[J]. Postgrad Med J, 2001, 77(903):4-10.

[18] Mirandola P, Gobbi G, Sponzilli I, Pambianco M, Malinverno C, Cacchioli A, et al. Exogenous hydrogen sulfide induces functional inhibition and cell death of cytotoxic lymphocytes subsets[J]. J Cell Physiol, 2007, 213(3):826-833.

[19] Oh GS, Pae HO, Lee BS, Kim BN, Kim JM, Kim HR, et al. Hydrogen sulfide inhibits nitric oxide production and nuclear factor-kappaB via heme oxygenase-1 expression in RAW264.7 macrophages stimulated with lipopolysaccharide[J]. Free Radic Biol Med, 2006, 41(1):106-119.

[20] Jin HF, Du JB, Li XH, Wang YF, Liang YF, Tang CS. Interaction between hydrogen sulfide/cystathionine gamma-lyase and carbon monoxide/heme oxygenase pathways in aortic smooth muscle cells[J]. Acta Pharmacol Sin, 2006, 27(12):1561-1566.

(本文编辑:黄 榕)

· 消息 ·

欢迎订阅 2011 年《实用儿科临床杂志》

《实用儿科临床杂志》是由新乡医学院主管、主办的儿科学类高级学术刊物,为儿科学类核心期刊、中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊),RCCSE 中国核心学术期刊,河南省一级期刊,美国《化学文摘》、俄罗斯《文摘杂志》、波兰《哥白尼索引》、美国《乌利希期刊指南》来源期刊,首批加入 WHO 西太平洋地区医学索引。本刊始终坚持突出实用为主,理论联系实践,注重基础与临床相结合。以贯彻党和国家的卫生工作方针、政策,贯彻理论与实践、普及与提高相结合的方针为办刊宗旨,反映国内外儿科医疗、科研等方面的新技术、新成果、新进展,促进学术交流。本刊辟有专家论坛、学术争鸣、热点、论著、小儿神经基础与临床、中西医结合、实验研究、儿童保健、误诊分析、药物与临床、综述、小儿外科、病例(理)讨论、病例报告、临床应用研究、英文原著、诊断标准 o 治疗方案、继续教育等栏目。本刊为半月刊,大 16 开本,80 页,铜版纸印刷,每月 5、20 日出版。ISSN 1003-515X, CN 41-1106/R, CODEN SELZBJ, Dewey #: 618.92。国内外公开发行,国内邮发代号:36-102,国外邮发代号:SM 1763。欢迎广大儿科医务工作者和医学科教研究人员,各级图书馆(室)、科技情报研究院(所)通过全国各地邮局订阅,也可与本刊编辑部直接联系订阅邮购。国内定价:7.20 元/期,172.80 元/年;国外定价:10.00 美元/期,240 美元/年。

联系地址:河南省新乡市新乡医学院《实用儿科临床杂志》编辑部 邮政编码:453003。

联系电话:0373-3029144, 0373-3831456 传真:0373-3029144

E-mail:syqk@chinajournal.net.cn; syqk@xxmu.edu.cn。