

· 论 著 ·

系膜细胞来源的 IL-13 对系膜细胞促炎性 细胞因子基因表达的调控作用

陈荣华, 张爱华, 吴元俊, 丁桂霞, 潘晓勤, 蔡毅

(南京医科大学小儿肾脏病研究中心, 江苏 南京 210029)

【摘 要】 目的 探讨脂多糖(LPS)对体外培养的人肾小球系膜细胞(HMC)表达 IL-13 的调节作用及 IL-13 对 HMC 促炎性细胞因子、趋化因子和促纤维化因子基因表达的影响,以探讨 IL-13 对肾小球疾病状态下系膜细胞炎症反应的抑制作用。**方法** HMC 分为实验组和对照组,实验组予以不同浓度的 LPS(1 μ g/ml, 10 μ g/ml, 100 μ g/ml)刺激或用不同浓度的 IL-13(1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml)预处理。应用 RT-PCR 和 ELISA 检测系膜细胞 IL-13 mRNA 和蛋白表达;应用核酸酶保护法检测系膜细胞 TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , MCP-1, IL-8 和 TGF- β 1 mRNA 表达。**结果** ①未予任何刺激的对照组,系膜细胞不表达 IL-13 mRNA 和蛋白;LPS 可呈剂量依赖性的方式促进系膜细胞 IL-13 mRNA 的表达和蛋白分泌。②正常培养状态下,系膜细胞可组成型表达 TNF- α , IL-1 β , IL-8 和 TGF- β 1,而不表达 IL-1 α 和 MCP-1 mRNA;LPS 刺激后上述炎症因子表达显著上调;IL-13 可呈剂量依赖性地抑制 LPS 诱导的系膜细胞炎症性细胞因子的基因表达。**结论** IL-13 是系膜细胞的自分泌因子;IL-13 可抑制 LPS 诱导的系膜细胞促炎性细胞因子、趋化因子和促纤维化因子的表达,提示自分泌和旁分泌的 IL-13 对于肾小球疾病状态下肾脏系膜细胞的炎症反应具有抑制作用。

【关 键 词】 白细胞介素类;系膜细胞;炎症

【中图分类号】 Q813.1⁺1 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1008-8830(2001)06-0622-05

Mesangial Cell-Derived Interleukin-13 Inhibits Cytokines Synthesis by Human Mesangial Cells

CHEN Rong-Hua, ZHANG Ai-Hua, WU Yuan-Jun, et al.

Center of Pediatric Nephrology, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

Abstract: **Objective** To investigate the synthesis of IL-13 in cultured human mesangial cells (HMC) following LPS activation and the inhibitory effect of IL-13 on the pro-inflammatory cytokines, chemokines, and pro-fibrogenic cytokine expression by HMC. **Methods** The expression of IL-13 mRNA and production of IL-13 protein were determined using the semiquantitative reverse transcription-PCR technique and ELISA respectively. TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , MCP-1, IL-8, and TGF- β 1 mRNA expressions were determined by ribonuclease protection assay. **Results** ① Basal levels of IL-13 were undetectable and HMC stimulated with LPS produced IL-13 in a dose-dependent manner. ② HMC which was incubated in the medium alone did not express IL-1 α and MCP-1 mRNA, and constitutive mRNA expression in unstimulated cells was found for TNF- α , IL-1 β , IL-8, and TGF- β 1. LPS significantly upregulated TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , MCP-1, IL-8, and TGF- β 1 mRNA expressions. Recombinant human IL-13 inhibited TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , MCP-1, IL-8, and TGF- β 1 mRNA expressions in a dose-dependent manner. **Conclusions** LPS can synergistically induce the expression of IL-13 in HMC. IL-13 can inhibit pro-inflammatory cytokines, chemokines and profibrogenic cytokine synthesis, which suggests that IL-13 has important regulatory effects on the inflammatory response of HMC.

Key words: Interleukins; Mesangial cell; Inflammation

收稿日期: 2001-04-17; [修回日期] 2001-08-24

基金项目: 江苏省卫生厅科研基金(编号: H9209)和江苏省教委自然科学基金(编号: 99KJB320003)资助项目

作者简介: 陈荣华(1940-),男,大学,教授。

肾小球系膜细胞异常增殖与炎症介质的产生,是肾小球炎症与硬化的重要发病机制。在病理状态下,系膜细胞可释放白细胞介素(IL)-1, IL-6, IL-8, 肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1)和转化生长因子- β (TGF- β)等多种炎症介质参与炎症损伤与硬化过程。IL-13 是新近发现的一种抗炎性细胞因子,可抑制脂多糖及 TNF- α 诱导的单核巨噬细胞产生多种炎症介质,如 IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α 和细胞间粘附分子(ICAM)等^[1,2]。但 IL-13 在肾小球系膜细胞中的表达及其作用目前尚未见研究报道,本实验应用 RT-PCR 及核酸酶保护法观察了脂多糖(LPS)对系膜细胞 IL-13 表达以及 IL-13 对系膜细胞 IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , IL-8, MCP-1 与 TGF- β 1 表达的影响,以探讨在肾小球炎症反应过程中,IL-13 作为抗炎因子之可能及其作用。

1 材料和方法

1.1 实验材料

RPMI-1640 培养基购自 Gibco BRL 公司;脂多糖(LPS)购自 Sigma 公司;Taq DNA 聚合酶、AMV 逆转录酶, dNTP, Oligo (dT)₁₅ 和 RNA 酶抑制剂(RNasin)购自 Promega 公司, TRIzol 总 RNA 抽提试剂盒购自 Gibco BRL 公司;IL-13 ELISA 检测试剂盒购自 Endogen 公司;多探针模板购自美国 PharMingen 公司、体外转录试剂盒、核酸酶保护法试剂盒(RNase protection assay III, RPA III) 购自美国 Ambion 公司。

1.2 方法

1.2.1 人肾小球系膜细胞培养和鉴定 按本实验室建立的方法^[6]分离和培养肾小球系膜细胞。经倒置显微镜和间接免疫荧光(抗结蛋白、波形蛋白阳性;抗角蛋白和第 VIII 因子相关抗原阴性)证实为肾小球系膜细胞。本实验采用第 4~6 代肾小球系膜细胞。

1.2.2 实验分组 转种肾小球系膜细胞(1×10^6 /瓶)于 75 cm² 培养瓶中,待细胞生长至 80% 融合时更换培养液(含 0.5% FCS 的 RPMI 1640 完全培养液)继续培养 48 h,使细胞生长基本处于静止状态。细胞分为实验组与对照组。实验组加入含 20% FCS 的 RPMI 1640 培养液,同时加入不同浓度的 LPS(1 μ g/ml, 10 μ g/ml, 100 μ g/ml)刺激 24 h 或用不同浓度的 IL-13(1 ng/ml, 10 ng/ml 和 100 ng/ml)预处理 30 min 后加入 LPS 继续培养 12 h,于实验终点收集细胞,用于抽提总 RNA,进行 RT-PCR 和核

酸酶保护法,上清用于检测 IL-13 蛋白水平,以未刺激细胞为阴性对照。

1.2.3 系膜细胞总 RNA 抽提 采用 TRIzol 抽提试剂盒提取细胞总 RNA,应用 GeneQuant 核酸定量分析仪测定细胞总 RNA 的产量和纯度, A_{260/280} 比值 > 1.6,并经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定证实无降解后用于 RT-PCR 和核酸酶保护法。

1.2.4 RT-PCR 取细胞总 RNA 1 μ g 进行逆转录反应,反应体系为: 5 $\times$ RT Buffer 4 μ l, dNTP (10 mM) 1 μ l, Oligo (dT)₁₅ (0.05 μ g/ μ l) 2 μ l, Rnasin(40 U/ μ l) 0.5 μ l, AMV(10 U/ μ l) 0.5 μ l, 总反应体积为 20 μ l, 37 $^{\circ}$ C 水浴 60 min, 95 $^{\circ}$ C 灭活逆转录酶以终止反应。取逆转录反应后的原液 10 μ l 进行 PCR 扩增。将内参照 β -actin 引物与 IL-13 引物置于同一反应体系中共同扩增,PCR 反应体系为: 10 $\times$ Buffer 5 μ l, MgCl₂ (25 mM) 3 μ l, dNTP (10 mM) 1 μ l, IL-13 上游引物(10 pmol/ μ l) 3 μ l, IL-13 下游引物(10 pmol/ μ l) 3 μ l, β -actin 上游引物(10 pmol/ μ l) 3 μ l, β -actin 下游引物(10 pmol/ μ l) 3 μ l, Taq DNA 多聚酶(2 U/ μ l) 0.5 μ l, 总反应体积为 50 μ l。PCR 反应条件为 94 $^{\circ}$ C, 30 s; 56 $^{\circ}$ C, 50 s; 72 $^{\circ}$ C, 60 s; 循环 30 次。72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min, 终止扩增。IL-13 及 β -actin 引物分别为: IL-13 上游引物 5'-CCCAGAACCAGAAAGGCTCCG-3'; IL-13 下游引物: 5'-CAGTTGAACCGTCCCTGCCG-3'; β -actin 上游引物: 5'-CAGGTCCAGACGCAGGATGGC-3'; β -actin 下游引物: 5'-CTACAATGAGCTGCGTGTGGC-3', 引物委托上海博亚生物技术有限公司合成, β -actin 和 IL-13 预期扩增产物分别为 206 bp 和 279 bp。

1.2.5 cRNA 探针的合成 多探针模板含有编码人 TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , MCP-1, IL-8, TGF- β 1 及管家基因 GAPDH DNA。以此 DNA 为模板,在 T7 RNA 聚合酶作用下转录成 ³²P 标记的 cRNA 探针,参照试剂盒说明书操作。

1.2.6 核酸酶保护法 按试剂盒说明书操作。取 20 μ g 细胞总 RNA,加入 2 μ l cRNA 探针,混匀并短暂离心,95 $^{\circ}$ C 3 min 变性、56 $^{\circ}$ C 杂交过夜。以酵母 RNA 作为对照。取适量的 RNA 酶 A/T1 加至 RPA III 消化缓冲液中(1:1 000 稀释),加 100 μ l 稀释的 RNA 酶 A/T1 至样本中,30 $^{\circ}$ C 孵育 45 min,加入 150 μ l 灭活/沉淀 III 缓冲液, -20 $^{\circ}$ C 静置 30 min, 4 $^{\circ}$ C 12 000 g 离心 30 min,加入 10 μ l 凝胶上样缓冲液,进行 10% 丙烯酰胺/8M 尿素变性凝胶电泳, -80 $^{\circ}$ C 放射自显影 12~24 h。

1.2.7 培养上清中 IL-13 的检测 采用 ELISA 法检测培养上清中 IL-13 的含量。

1.2.8 半定量分析 应用 UVP 凝胶图像扫描系统对 PCR 扩增产物的电泳条带或 X 光片上的杂交结果进行光密度扫描,计算出各细胞因子(CK)与内参照(β -actin 或 GAPDH)的密度比值,结果以随机单位(arbitrary unit)来表示,随机单位 = $OD_{CK}/OD_{\beta\text{-actin}/GAPDH} \times 100\%$ 。

1.3 统计学处理

实验结果以均数 $\pm$ 标准差表示。应用 SPSS 10.0 统计分析软件对实验数据进行统计学处理,采用单因素方差分析(F 检验和 q 检验)进行各组间比较。

2 结果

2.1 LPS 对 HMC IL-13 mRNA 表达的影响

对照组系膜细胞不表达 IL-13 mRNA, $1 \mu\text{g/ml}$ LPS 即可诱导 IL-13 mRNA 表达,且随浓度增加其表达量也逐渐增强。见图 1。

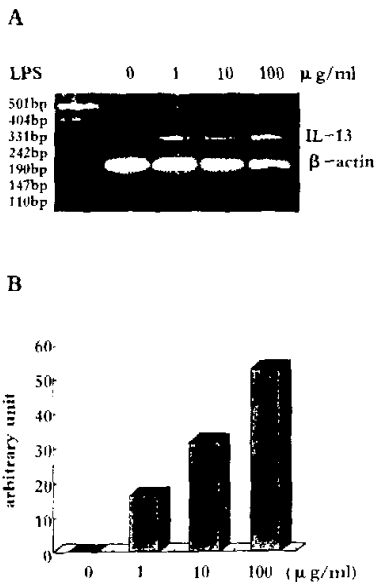


图1 系膜细胞 IL-13 mRNA 表达。A: IL-13 RT-PCR 产物电泳图谱;B: IL-13 mRNA 半定量分析结果

Figure 1 The expression of IL-13 mRNA of HMC.

A: Electrophoretogram of IL-13 gene RT-PCR products.

B: RT-PCR data were normalized for the expression of β -actin, and the ratio of IL-13 to β -actin was determined by semiquantitative analysis

2.2 LPS 对 HMC 培养上清中 IL-13 蛋白水平的影响

对照组系膜细胞培养上清中 IL-13 水平低于试剂盒检测下限($6 \mu\text{g/ml}$)。 $1 \mu\text{g/ml}$ LPS 即可诱导 IL-13 蛋白分泌($28.67 \pm 17.58 \mu\text{g/L}$),且随 LPS 浓度增加,IL-13 蛋白分泌也逐渐增多,LPS 在 $100 \mu\text{g/ml}$ 时,IL-13 为($73.77 \pm 23.47 \mu\text{g/ml}$)。

2.3 外源性 IL-13 下调 LPS 诱导的细胞因子的基因表达

加入不同浓度重组人 IL-13 (1 ng/ml , 10 ng/ml , 100 ng/ml)预刺激 30 min,再加入 LPS ($10 \mu\text{g/ml}$)继续孵育 12 h,对照组仅用 20% FCS 的 RPMI 1640 液培养。于实验终点抽提细胞总 RNA,进行核酸酶保护法实验。结果表明,系膜细胞在含 20% FCS 的培养液中可组成型表达 TNF- α , IL-1 β , IL-8 和 TGF- β 1,而不表达 IL-1 α 和 MCP-1 mRNA。LPS 刺激后上述细胞因子表达均显著上调, 100 ng/ml IL-13 对基础状态下表达的细胞因子无明显影响,但显著抑制 LPS 诱导的系膜细胞 TNF- α , IL-12, IL-1 β , IL-8, MCP-1 和 TGF- β 1 mRNA 表达,且随剂量增加其作用也愈明显。见图 2。

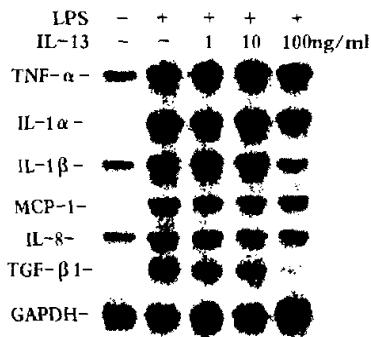


图2 TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , MCP-1, IL-8 和 TGF- β 1 mRNA 表达

Figure 1 mRNA expression of TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , MCP-1, IL-8 and TGF- β 1

3 讨论

在肾小球炎症与硬化的发生过程中,系膜细胞既是主要的靶细胞,也是病变过程的主要参与者。研究表明,肾小球系膜细胞可分泌多种炎症细胞因子与其它炎症介质,如 IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , MCP-1, ICAM-1 与活性氧等。其中细胞因子的自分泌与旁分泌作用使炎症效应不断放大,这也是慢

性肾小球肾炎持续发展和难以治愈的主要原因。然而,有关系膜细胞炎症介质产生的抑制因子研究较少,目前已发现的系膜细胞炎症介质合成的抑制因子主要有 IL-4 和 IL-10 等^[3]。

IL-13 是新近发现的一种主要由 Th2 细胞产生的抗炎性细胞因子,其抗炎作用主要表现在两方面:第一、有效地抑制单核巨噬细胞、中性粒细胞及淋巴细胞炎症性细胞因子(包括 IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , IL-12, MIP-1 α , M-CSF, GM-CSF 等)的基因转录和蛋白合成。第二、通过上调单核巨噬细胞和 B 淋巴细胞内 IL-1ra 和 IL-1 decoy 受体的表达、释放,从而阻断 IL-1 的多种致炎生物学活性^[1,2]。因此,IL-13 的抗炎作用不仅在于全面抑制炎症因子的合成,同时还阻断炎症因子的生物学功能。Lakkis 等应用 RT-PCR 检测肾毒血清性肾炎(NTN)大鼠肾小球 IL-13 表达时发现,在注射抗肾小球基底膜(anti-GBM)抗体后 16 h IL-13 mRNA 明显增强且一直持续到 48 h,而对照组肾组织内无 IL-13 表达^[4]。但 IL-13 表达的细胞来源并不清楚。我们应用 RT-PCR 和 ELISA 检测体外培养的肾小球系膜细胞在 LPS 刺激下 IL-13 mRNA 表达和蛋白分泌,结果发现,基础培养状态下,系膜细胞不表达 IL-13,而 LPS 可呈剂量依赖性的方式促进系膜细胞 IL-13 mRNA 的表达和蛋白分泌。

体外研究业已证实,IL-13 可抑制 LPS 和 TNF- α 诱导的单核巨噬细胞产生多种炎症介质,如 IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , MIP-1 α 和 ICAM 等^[1,2]。体内研究也发现,IL-13 可通过抑制炎症介质 TNF- α , IFN- γ 和 MIP-1 α 的释放而在 LPS 诱导的败血症和 IgG 免疫复合物诱导的肺损伤中发挥保护作用^[5,6]。新近国外有个别报道,IL-13 可抑制炎症因子 LPS, IL-1 β , TNF- α 和 IFN- γ 诱导的肾小球系膜细胞 NO 和前列腺素 E₂ (PGE₂) 产生及 iNOS mRNA 表达^[7,8]。国内郭汉城等也研究证实,IL-13 可抑制系膜细胞合成和分泌 IL-6^[9]。本实验进一步证明,IL-13 可呈剂量依赖性地抑制 LPS 刺激的系膜细胞 TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , MCP-1, IL-8 和 TGF- β 1 的表达,这种抑制作用主要发生在转录水平。100 ng/ml IL-13 几乎完全抑制了 IL-1 β , MCP-1, IL-8 和 TGF- β 1 的表达。

IL-13 对系膜细胞 IL-1 和 TNF- α 的抑制作用与在人单核巨噬细胞中的观察结果一致^[1,2]。但对人支气管上皮细胞和平滑肌细胞的研究却发现,IL-13 可上调 IL-8 和 MCP-1 的表达^[10,11],亦有报道 IL-13 对骨髓单核细胞 MCP-1 的分泌无抑制作

用^[12]。我们推测 IL-13 对上述细胞因子的调控作用可能具有细胞特异性。

IL-1 和 TNF- α 是与肾小球肾炎有关的重要炎症介质,IL-1 能刺激系膜细胞增殖,释放活性氧,分泌胶原及细胞外基质;TNF- α 能刺激肾小球系膜细胞分泌 IL-1 β , IL-6, ICAM-1, PAF 等;IL-8 是趋化因子 α (CXC)亚家族的成员,可趋化中性粒细胞、T 细胞向肾组织内积聚;MCP-1 是趋化因子 β (CC)亚家族的成员,对单核细胞和 T 细胞具有趋化和激活的特性^[3]。本研究结果证实,IL-13 可抑制系膜细胞促炎性细胞因子(IL-1 α , IL-1 β 和 TNF- α)和趋化因子(IL-8 和 MCP-1)的基因表达,提示 IL-13 可能在肾小球炎症反应中发挥抗炎作用。

TGF- β 是一种多功能的细胞因子,在调控细胞增殖、分化、血管形成和 ECM(纤维连接蛋白、I 型和 III 型胶原)积聚中发挥重要作用。此外,TGF- β 还通过趋化中性粒细胞和单核细胞向肾组织内积聚并激活这些炎症细胞而参与肾小球肾炎的炎症反应。在本研究中,我们证实 IL-13 可显著下调系膜细胞 TGF- β 1 的表达。Kitamura 等^[13]发现 IL-13 可明显抑制 IL-1, IL-6 和 TNF- α 诱导的纤维连接蛋白合成。此外,IL-1 α 刺激系膜细胞分泌 I 型和 IV 型胶原可被 IL-4 所抑制^[14]。由于 IL-13 与 IL-4 有许多相似的生物学特性,因此,我们推测 IL-13 可通过下调促纤维化因子如 TGF- β 分泌和胶原的合成而发挥抗纤维化作用。当然,这还需要更多的实验来验证。

总之,本研究结果证实,正常培养状态下,系膜细胞不表达 IL-13, LPS 可呈剂量依赖性的方式促进系膜细胞 IL-13 mRNA 的表达和蛋白分泌,而 IL-13 又可呈剂量依赖性地抑制 LPS 诱导的系膜细胞内 TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , MCP-1, IL-8, TGF- β 1 等促炎性细胞因子、趋化因子和促纤维化因子表达。提示系膜细胞自分泌的 IL-13 可通过抑制其他炎症介质的产生而在肾小球肾炎的炎症反应中发挥抗炎效应。

[参 考 文 献]

- [1] Minty A, Chalon P, Denoux JM, et al. Interleukin-13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune responses [J]. *Nature*, 1993, 362(6417): 248-250.
- [2] de Waal Malefyt R, Figdor CG, et al. Effects of IL-13 on phenotype, cytokine production, and cytotoxic function of human monocytes [J]. *J Immunol*, 1993, 151(11): 6370-6381.
- [3] Kluth DC, Rees AJ. New approaches to modify glomerular in

- inflammation [J]. J Nephrol, 1999, 12(2): 66-75.
- [4] Lakkis FG, Cruet EN. Cloning of rat interleukin-13 (IL-13) cDNA and analysis of IL-13 gene expression in experimental glomerulonephritis [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1993, 197(2): 612-618.
- [5] Baumhofer JM, Beinbauer BG, Wang JE, et al. Gene transfer with IL-4 and IL-13 improves survival in lethal endotoxemia in the mouse and ameliorates peritoneal macrophages immune competence [J]. Eur J Immunol, 1998, 28(2): 610-615.
- [6] Lentsch AB, Shanley TP, Sarma V, et al. In vivo suppression of NF- κ B and preservation of I κ B by interleukin-10 and interleukin-13 [J]. J Clin Invest, 1997, 100(10): 2443-2448.
- [7] Saura M, Martinez-Dalmau R, Minty A, et al. Interleukin-13 inhibits inducible nitric oxide synthase expression in human mesangial cells [J]. Biochem J, 1996, 313(2): 641-646.
- [8] Diaz-Cazorla M, Perez-Sala D, Ros J, et al. Regulation of cyclooxygenase-2 expression in human mesangial cells-transcriptional inhibition by IL-13 [J]. Eur J Biochem, 1999, 260(1): 268-274.
- [9] 郭汉城, 陈孝文, 江黎明, 等. 肾小球系膜细胞白细胞介素-6基因表达与白细胞介素-13的关系 [J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2000, 9(3): 218-221.
- [10] Striz I, Mio T, Adachi Y, et al. IL-4 and IL-13 stimulate human bronchial epithelial cells to release IL-8 [J]. Inflammation, 1999, 23(6): 545-555.
- [11] Jordan NJ, Watson ML, Williams RJ, et al. Chemokine production by human vascular smooth muscle cells: modulation by IL-13 [J]. Br J Pharmacol, 1997, 122(4): 749-757.
- [12] Steube KG, Meyer C, Drexler HG. Constitutive protein expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) by myelomonocytic cell lines and regulation of the secretion by anti- and proinflammatory stimuli [J]. Leuk Res, 1999, 23(9): 843-849.
- [13] Kitamura N, Nishimura S, Takizawa T, et al. Cultured human monocytes secrete fibronectin in response to activation by proinflammatory cytokines [J]. Clin Exp Immunol, 2000, 120(1): 66-70.
- [14] Nakazato Y, Okada H, Tajima S, et al. Interleukin-4 modulates collagen synthesis by human mesangial cells in a type-specific manner [J]. Am J Physiol, 1996, 270(3): 447-453.

(本文编辑:俞燕)

欢迎订阅 2002 年中国当代儿科杂志

中国当代儿科杂志是由中华人民共和国教育部主管,中南大学主办的国家级儿科专业学术期刊,为国家科学技术部中国科技论文统计源期刊,向国内外公开发行,双月刊,逢双月15日出版。国际刊号:ISSN 1008-8830,国内刊号:CN 43-1301/R,邮发代号:42-188。本刊内容以儿科临床与基础研究并重,反映我国当代儿科领域的最新进展与最新动态。读者对象主要为从事儿科及相关学科的临床、教学和科研工作者。欢迎全国各高等医学院校,各省、市、自治区、县医院和基层医疗单位,各级图书馆(室)、科技情报研究所及广大医务人员和医学科技人员订阅。2002年起由64页增至80页,定价不变。每期定价仍为7.8元,全年定价46.8元。可通过全国各地邮局订阅或直接来函与本刊编辑部联系订阅。

联系地址:湖南省长沙市湘雅路141号中国当代儿科杂志编辑部 邮编:410008

电话/传真:0731-4327402

E-mail: xyped@public.cs.hn.cn