# miRNA-145 抑制肺癌细胞系 A549 迁移侵袭的研究

徐　驰[1,2],汪　栋[1,3],苏长青[4],杨胜生[2],张剑锋[1,3],叶玉坤[1,3]
(1. 第二军医大学八一医院临床学院，江苏 南京 210002;2. 第二军医大学福州总医院临床医学院，福建 福州 350025;3. 中国人民解放军第八一医院，江苏 南京 210002;4.第二军医大学东方肝胆外科医院,上海 200438)

**摘　要**:[目的] 观察 miRNA-145 对肺癌细胞系 A549 迁移、侵袭和克隆形成的影响,探讨其潜在的应用价值。[方法] 采用 miRNA-145 过表达的慢病毒载体上调 A549 细胞中 miRNA-145 的表达量,Transwell 迁移及侵袭实验分析 miRNA-145 表达上调前后 A549 细胞的体外迁移、侵袭能力，平板克隆形成实验分析 miRNA-145 表达上调前后 A549 细胞的体外增殖能力。[结果] RT-PCR 结果表明，侵染了 miRNA-145 过表达载体的 A549 细胞中 miRNA-145 水平明显高于阴性对照组及空白对照组,差异有统计学意义($P$<0.01);Transwell 迁移和侵袭实验结果表明,过表达 miRNA-145 的 A549 细胞过膜数少于阴性对照及空白对照组,差异有统计学意义($P$<0.01);平板克隆形成实验结果表明,过表达 miRNA-145 的 A549 细胞平板克隆形成能力明显降低,差异有统计学意义($P$<0.01)。[结论] miRNA-145 的过表达能够抑制肺癌细胞系 A549 的迁移、侵袭和克隆形成,由此提示 miRNA-145 有可能成为肺癌治疗的潜在靶点。

**主题词**:肺肿瘤;miRNA-145;细胞迁移;肿瘤浸润;细胞增殖
**中图分类号**:R734.2　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:1671-170X(2015)-09-0742-06
doi:10.11735/j.issn.1671-170X.2015.09.B009

## Inhibitory Effect of MicroRNA-145 on Migration and Invasion of Human Lung Cancer Cell Line A549

XU Chi[1,2],WANG Dong[1,3],SU Chang-qing[4],et al.
(1.*The 81st Hospital Clinical Institute of the Second Military Medical University*,*Nanjing* 210002,*China*;2. *Fuzhou General Hospital Clinical Institute of the Second Military Mediacl University*,*Fuzhou* 350025,*China*;3.*The 81st Hospital of PLA*,*Nanjing* 210002,*China*;4.*Eastern Hepatobiliary Surgical Hospital*,*the Second Military Medical University of Chinese PLA*,*Shanghai* 200438,*China*)

**Abstract**:[Purpose] To observe the effect of miRNA-145 on the migration and invasion and proliferation abilities of human lung cancer cell line A549,and to discuss its potential application. [Methods] Hsa-miR-145-5p was used to increase miRNA-145 expression in A549 cell lines,then the migration ability of A549 cell was observed by Transwell migration assay before and after treatment with hsa-miR-145-5p,the invasive abilitiy of A549 cell was observed by Transwell invasion assay before and after treatment with hsa-miR-145-5p,the proliferation ability of A549 cell was observed by plate clone formation assay before and after treatment with hsa-miR-145-5p. [Results] The result of real-time RT-PCR showed that miRNA-145 expression in A549 cell infected by hsa-miR-145-5p was higher than others($P$<0.01). Up-expression of miRNA-145 in A549 cell inhibited the migration and invasion and proliferation abilities of A549 cells ($P$<0.01). [Conclusion] Up-expression of miRNA-145 plays an inhibitory role in the migration and invasion and proliferation of human lung cancer cell line A549,which indicate that it might be a new target for biotherapy of lung cancer.

**Subject words**:lung neoplasms;miRNA-145;cell migration;neoplasm invasion;cell proliferation

近年来的研究发现细胞内存在的 microRNA(miRNA)在肿瘤的发生、发展等中发挥了重要的调节功能[1]。对 miRNA 及其调控网络的研究将有可能在癌症的治疗方面发挥出重要的作用。miRNA 有可能成为提高非小细胞肺癌(NSCLC)的诊断和治疗水平的重要生物分子标靶。研究证实,miRNA-145 在

**基金项目**:军队临床高新技术重大项目(2010gxjs027);福建省科技计划项目(2012D021);福建省自然科学基金(2015J01486)
**通讯作者**:叶玉坤,主任医师;中国人民解放军第八一医院胸心外科,江苏省南京市杨公井 34 标 34 号(210002);E-mail:yukunyegold888@126.com
**收稿日期**:2015-06-02;**修回日期**:2015-08-07

组织中广泛存在，且在多种肿瘤组织中表达是下调的，如结肠癌、乳腺癌、前列腺癌、肺癌、肝癌、膀胱癌、卵巢癌、垂体瘤、B细胞淋巴瘤等[2]，提示其可能是抑癌基因。因此，本研究以miRNA-145为研究对象，将miRNA-145过表达慢病毒载体侵染入肺腺癌A549细胞，观察过表达miRNA-145对A549细胞迁移、侵袭和克隆能力的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料及试剂

A549细胞购自中国科学院上海生命科学研究院；DMEM培养基+10%FBS，DMEM培养基+20%FBS，DMEM培养基+1% FBS，D-Hank's Solution，Trypsin-EDTA Solution (0.05% Trypsin - EDTA，Gibco)，Trypsin-EDTA Solution(0.25% Trypsin+0.53mmol/L EDTA，Gibco)，6孔板(Corning)，96孔板 (Corning)，hsa-miR-145-5p mimics病毒液(上海吉玛，$1\times10^8$TU/ml)，LV3-NC病毒液(上海吉玛，$1\times10^8$TU/ml)，Opti-MEM I Reduced serum medium(Gibco)，Matrigel(BD)，24孔板 和Transwell小室(Corning)

### 1.2 细胞培养

A549，DMEM培养基 (Gibco)(含1.5mmol/L L-Glutamine，100U/ml penicillin，100μg/ml Streptomycin)(含10%胎牛血清)，37℃ 、5%$CO_2$饱和湿度培养箱中培养。

### 1.3 miRNA-145过表达载体的合成与侵染

miRNA-145过表达载体(hsa-miR-145-5p mimics)及阴性对照 (LV3-NC) 由上海吉玛生物公司提供，序列分别为GUCCAGUUUUCCCAGGAAUCCCU，TTCTCCGAACGTGTCACGT。A549细胞在6cm dish中培养至80%~90%融合时，倾去培养液，用3ml D-Hank's solution洗涤细胞2次。加1ml Trypsin-EDTA solution，混匀后，小心吸去胰酶溶液，37℃放置3min。再加入2ml DMEM培养液，吹打使细胞形成单细胞悬液。血球计数板计数，按$10\times10^5$细胞/孔的浓度接种6孔板，混匀后37℃、5% $CO_2$培养24h。将慢病毒原液200μl，用10%FBS的DMEM培养液5倍稀释，并加入终浓度为0.5μg/ml的Polybrene。吸去6孔板中的培养液，每孔加入上述1ml稀释的病毒液，同时设立空白对照组，于37℃、5% $CO_2$培养24h。吸弃6孔板中的稀释病毒液，每孔加入2ml 10%FBS的DMEM培养液于37℃、5% $CO_2$继续培养至72、96h分别收样，所得细胞用于RT检测。

### 1.4 Real-time PCR检测各组细胞miRNA-145的表达

实验分为3组：空白对照组(BLANK)、阴性对照组(NC)、过表达组(MIR)。逆转录程序(42℃ 30min；85℃ 10min)、定量PCR反应程序(95℃，3min 变性。95℃，12s；62℃，40s，40个循环)。使用MX3000P软件进行分析，每组测量3次后取平均值。结果为目标基因与*U6*基因的表达比值表示。

### 1.5 细胞迁移实验

实验分为3组：过表达组(MIR)、阴性对照组(NC)、空白对照组(BLANK)。侵染24h后的A549细胞，撤去完全培养基，以1% FBS培养基继续培养24h。倾去培养液，用3ml D-Hank's solution洗涤细胞两次。加1ml Trypsin-EDTA solution，混匀后，小心吸去胰酶溶液，37℃放置3~5min。在加入2 ml含1% FBS的DMEM培养液，吹打使细胞形成单细胞悬液。血球计数板计数，将细胞稀释至$3\times10^5$细胞/ml。按$2\times10^3$细胞/孔的浓度接种于Transwell小室，下室加入血清浓度为15%的培养液700μl，37℃、5% $CO_2$培养24h(预实验中摸索好的条件)。取出小室，PBS洗1次。加入预冷的甲醇，–20℃固定10min。弃净甲醇，用PBS洗上表面3次。在PBS中用棉签轻轻擦拭小室上表面，拿出小室倒置，风干。将小室放入一新的24-well中，加入200μl 0.1%结晶紫，使膜浸没，37℃染色30min。用$ddH_2O$洗3次。小室风干后，放入孔中，倒置显微镜下取若干视野，拍照计数。

### 1.6 细胞侵袭实验

实验分为3组：过表达组(MIR)、阴性对照组(NC)、空白对照组(BLANK)。包被基底膜：用含0.5% FBS的DMEM培养液按1:6稀释50mg/L Matrigel，取60μl包被Transwell小室底部膜的上室面，放37℃、5%$CO_2$培养箱孵育4h，吸弃上清。侵染24h后的A549细胞，撤去完全培养基，以1% FBS培养基继续培养24h。倾去培养液，用3ml D-Hank's solution洗涤细胞2次。加1ml Trypsin-EDTA solution，混匀后，小心吸去胰酶溶液，37℃放置3~5min。在加入2ml 含20% FBS的DMEM培养液，吹打使细胞形成单细胞悬液。血球计数板计数，将细胞稀释至$3\times10^5$细胞/ml。按$5\times10^3$细胞/孔的浓度接种于

Transwell 小室，下室加入血清浓度为 20%的培液 700μl,37℃、5% $CO_2$ 培养 48h。小室用 PBS 洗 1 次后加入预冷的甲醇,–20℃固定 10min。弃净甲醇,PBS 洗。在 PBS 中用棉签轻轻去除小室上表面的 Matrigel 胶，再用 PBS 洗上表面 3 次。拿出小室倒置,风干。将小室放入一新的 24-well 中,加入 200μl 0.1%结晶紫,使膜浸没,37℃染色 30min。用 ddH2O 洗 3 次。小室风干后,放入孔中,倒置显微镜下取若干视野,拍照计数。

### 1.7 平板克隆形成实验

实验分为 3 组:过表达组(MIR)、阴性对照组(NC)、空白对照组(BLANK)。侵染 72h 后的 A549 细胞用 3ml D-Hank's solution 洗涤 2 次。加 1ml Trypsin-EDTA solution 混匀，吸去胰酶溶液,37℃放置 3min。加入 2ml 含 15% FBS 的 DMEM 培养液,吹打形成单细胞悬液。血球计数板计数,将细胞稀释至 $3\times10^5$ 细胞/ml。按 300 细胞/孔的浓度接种于 6 孔板,并使细胞分散均匀。37℃、5% $CO_2$ 培养。至第 6d 6 孔板中出现肉眼可见的克隆，终止培养。弃去上清，用 PBS 洗涤 2 次，加 4%多聚甲醛 2ml 固定 30min。弃去固定液,PBS 洗 1 次,加入 1ml 0.1%结晶紫,37℃染色 30min。PBS 洗去染液,风干后,肉眼计数克隆,显微镜拍照。

### 1.8 统计学处理

RT–PCR 数据采用 $2^{-\triangle\triangle Q}$ 法计算。其他数据应用 EXCEL2003 进行数据录入与整理,然后用 SAS8.1 进行统计学处理。采用两因素重复测量方差分析和单因素方差分析+SNK 法。检验水平 α 为 0.05。

## 2 结 果

### 2.1 miRNA-145过表达载体侵染后 A549 细胞 miRNA-145的相对表达量

RT–PCR 检测结果(Figure 1,Table 1)显示：侵染了 miRNA-145 过表达载体的 A549 细胞中 miRNA-145 水平(72h、96h)均明显高于同期 BLANK 组及 NC 组，差异有统计学意义（$P<0.01$）。

### 2.2 miRNA-145对 A549 细胞迁移能力的影响

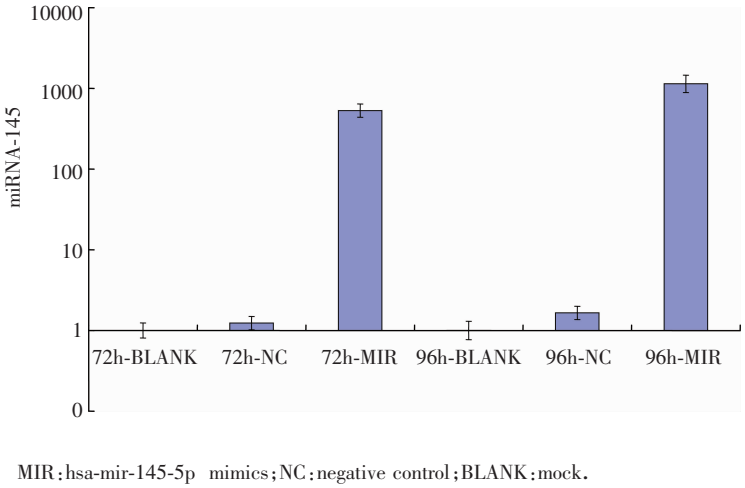
Transwell 迁移实验结果（Figure 2）显示：BLANK 组、NC 组、MIR 组细胞过膜数分别为 94.83±6.62、90.17±19.92、44.50±10.48；过表达 miRNA-145 的 A549 细胞过膜数少于另外两组细胞，差异有统计学意义（$F=25.28$,$P<0.01$）。结果说明过表达 miRNA-145 可以抑制 A549 肺腺癌细胞的迁移能力。

### 2.3 miRNA-145对 A549 细胞侵袭能力的影响

Transwell 侵袭实验结果（Figure 3）显示：BLANK 组、NC 组、MIR 组细胞过膜数分别为 80.50±9.95、72.83±5.49、41.17±4.40,过表达 miRNA-145 的 A549 细胞过膜数少于另外两组细胞,差异有统计学意义（$F=52.65$,$P<0.01$）。结果说明过表达 miRNA-145 可以抑制 A549 肺腺癌细胞的侵袭能力。

### 2.4 miRNA-145对 A549 细胞克隆形成能力的影响

平板克隆形成实验结果(Figure 4)显示:BLANK 组、NC 组、MIR 组克隆形成数分别为 374.67±15.50、366.33±20.26、26.33±10.02，过表达 miRNA-145 的

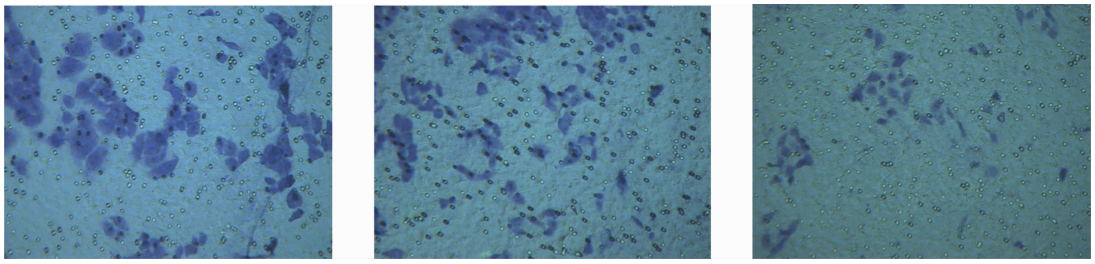



MIR:hsa-mir-145-5p mimics;NC:negative control;BLANK:mock.

**Figure 1 Expression of miRNA-145 by qRT–PCR**

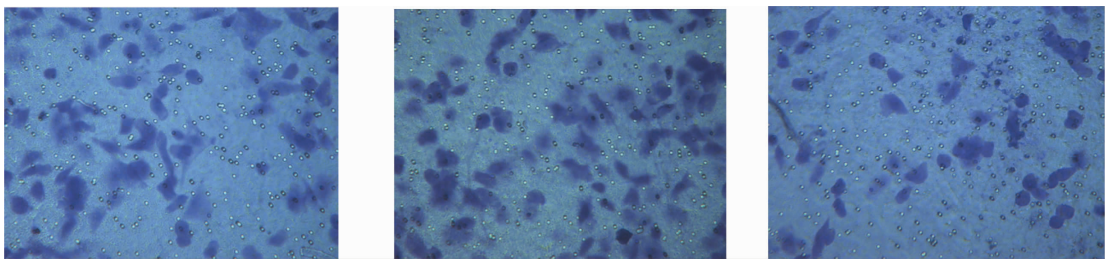
**Table 1 Expression of miRNA-145 by qRT–PCR**

| | 72h-BLANK | 72h-NC | 72h-MIR | 96h-BLANK | 96h-NC | 96h-MIR |
|---|---|---|---|---|---|---|
| △Ct | 15.19 ± 0.22 | 14.89 ± 0.17 | 6.14 ± 0.16 | 15.89 ± 0.27 | 15.17 ± 0.05 | 5.74 ± 0.24 |
| △△Ct | 0.00 ± 0.31 | –0.30 ± 0.28 | –9.05 ± 0.27 | 0.00 ± 0.38 | –0.72 ± 0.27 | –10.15 ± 0.36 |
| $2^{-\triangle\triangle Q}$ | 1.00(0.81~1.24) | 1.24(1.02~1.49) | 531.04(439.04~639.94) | 1.00(0.77~1.30) | 1.65(1.37~1.99) | 1140.74(886.48~1456.26) |



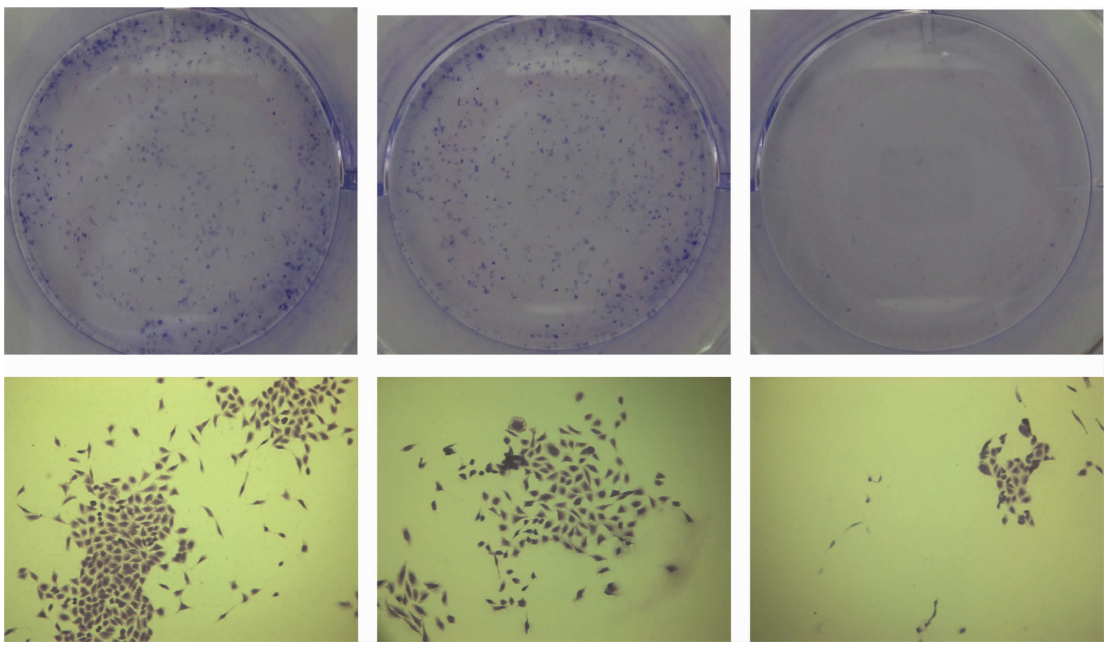

MIR:hsa-mir-145-5p mimics;NC:negative control;BLANK:mock.

**Figure 2 The effect of transfection with miRNA-145 on the migration ability of lung cancer cells(×200)**




MIR:hsa-mir-145-5p mimics;NC:negative control;BLANK:mock.

**Figure 3 The effect of transfection with miRNA-145 on the invasion ability of lung cancer cells(×200)**




MIR:hsa-mir-145-5p mimics;NC:negative control;BLANK:mock.

**Figure 4 The effect of transfection with miRNA-145 on the colony formation ability of lung cancer cells(×100)**

A549 细胞克隆形成数少于另外两组细胞，差异有统计学意义（$F$=473.38，$P$<0.01）。结果说明过表达 miRNA-145 可以抑制 A549 肺腺癌细胞的克隆形成能力。

## 3 讨 论

癌症的基因治疗是近年来一个很有吸引力的概念，例如：我们可以下调基因的表达进而改善药物使用的有效率，减少癌肿的耐药，减慢肿瘤的侵袭、增殖及转移的能力，促使恶性肿瘤出现凋亡等[3]。miRNA 是一类长 20~24nt 的调控 RNA，于 1993 年首次发现于线虫体内[4]。Chang 等[5]研究发现它参与了众多的生理代谢过程。与正常组织相比，多种肿瘤组织中不同的 miRNA 的表达水平发生了改变，数个研究也已证实 miRNA 在恶性肿瘤的发病机制中发挥了重要的作用[6-9]。随着对 miRNA 研究的深入，其在肺癌的产生以及进展中的作用也受到越来越多的关注。miRNA 的变化可以影响肺癌的产生、进展、增殖、侵袭、凋亡以及抗肿瘤药耐药等过程。诱导特定的 miRNA 产生过表达或低表达可以改变癌症的进程，这也进一步提示 miRNA 在治疗肺癌的领域有可能拥有无穷的潜力。近年来的数个研究结果提示，某些关键的 miRNA 分子在肺癌的转变过程中发挥着重要的调节作用，有成为肺癌基因治疗靶点的潜力[10-14]。

MiRNA-145 是近年来肿瘤靶基因研究的热点之一。既往的研究已经表明在多种肿瘤中 miRNA-145 的表达异常下调，例如乳腺癌，胃癌，前列腺癌等[15~18]。而 Wang 等[19]的研究发现 miRNA-145 可以抑制乳腺癌细胞的生长。另一个研究发现 miRNA-145 有着抑制肿瘤转移的作用[20]。这些研究均提示它是有肿瘤抑制功能的 MicroRNA。

目前针对 miRNA-145 对肺癌影响的研究较少。我们的研究成功地利用 miRNA-145 慢病毒载体对 A549 细胞进行了侵染，RT-PCR 检测的结果提示 MIR 组与 BLANK 组及 NC 组相比，其 miRNA-145 的表达明显上调。恶性肿瘤的一个很重要的特性是其具有很强的转移及侵袭能力。肺癌细胞的转移侵袭能力是导致肺癌患者死亡率很高的因素之一。我们使用了 Transwell 小室的迁移、侵袭实验来反映肺癌细胞株 A549 的侵袭转移能力，Transwell 法能比较客观地反映肺癌细胞的运动能力。虽然 Zhao 等[21]的研究认为 miRNA-145 的表达与 A549 和 SPC-A1 细胞在体外的侵袭、迁移能力无关。但我们的研究发现上调 miRNA-145 的表达后，A549 细胞的迁移、侵袭能力显著降低，而 NC 组以及 BLANK 组的 A549 细胞的迁移、侵袭能力差异无统计学意义。说明使 A549 肺癌细胞中的 miRNA-145 表达上调可以通过降低肺癌细胞的运动能力来影响 A549 细胞的转移，这也与 Yin 等[24]的研究结果相一致。恶性肿瘤的另一个特性是无限增殖的能力，而平板克隆形成实验反映的正是单个细胞增殖能力，它代表着细胞的独立生存的能力。我们的平板克隆形成实验结果显示，上调 miRNA-145 的表达之后，A549 细胞 MIR 组与 BLANK 组及 NC 组相比克隆形成率明显下降。这正说明了 miRNA-145 可以抑制 A549 细胞的增殖。

实验结果提示过表达 miRNA-145 能够降低肺癌细胞系 A549 的迁移、侵袭、增殖的能力，由此考虑 miRNA-145 有可能成为未来肺癌生物治疗的新靶点，主动上调 miRNA-145 的表达有可能成为肺癌治疗的一种有效新方法。

## 参考文献：


[1] Xu C，Ye YK，Wang D，et al.The differential expression and potential applications of miRNAs in non-small cell lung cancer [J].National Medical Journal of China，2012，92(48)：3451-3453.[徐驰，叶玉坤，汪栋，等. 微小RNA 在非小细胞肺癌中的差异性表达和潜在应用价值[J].中华医学杂志，2012，92(48)：3451-3453.].

[2] Sachdeva M，Mo YY. Mir-145-mediated suppression of cell growth，invasion and metastasis [J].Am J Transl Res，2010，2(2)：170-180.

[3] Gunji Y，Ochiai T，Shimada H，et al.Gene therapy for cancer[J]. Surg Today，2000，30( 11)：967-973.

[4] Lee RC，Feinbaum RL，Ambros V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14[J]. Cell，1993，75(5)：843-854.

[5] Chang S，Johnston RJ Jr，Frokjaer-Jensen C，et al. MicroRNAs act sequentially and asymmetrically to control chemosensory laterality in the nematode [J]. Nature，2004，430(7001)：785-789.

[6] He L，He X，Lowe SW，et al. MicroRNAs join the p53 network—another piece in the tumour-suppression puzzle [J]. Nat Rev Cancer，2007，7(11)：819-822.

[7] Esquela-Kerscher A,Slack FJ. Oncomirs—microRNAs with a role in cancer[J]. Nat Rev Cancer,2006,6(4):259–269.
[8] Calin GA,Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers[J]. Nat Rev Cancer,2006,6(11):857–866.
[9] Hammond SM. MicroRNAs as oncogenes [J]. Curr Opin Genet Dev,2006,16(1):4–9.
[10] Cho WC. MicroRNAs as therapeutic targets for lung cancer [J]. Expert Opin Ther Targets,2010,14(10):1005–1008.
[11] Heneghan HM,Miller N,Kerin MJ. MiRNAs as biomarkers and therapeutic targets in cancer [J]. Curr Opin Pharmacol,2010,10(5):543–550.
[12] Du L,Pertsemlidis A. MicroRNAs and lung cancer:tumors and 22-mers[J]. Cancer Metastasis Rev,2010,29(1):109–122.
[13] Wang YH,Gu H,Zhou Q,et al. MiR-21 promotes epithelial to mesenchymal transition in EGFR-TKI resistant lung cancer cells [J]. Journal of Oncology,2014,20 (8):654–658. [王银华,谷宏,周勤,等.MiR-21 促进肺癌 EGFR-TKI 耐药细胞株上皮—间质细胞转化的研究[J].肿瘤学杂志,2014,20(8):654–658.]
[14] Wang J,Chen QY,Zhang XM,et al. Impact of transfection of microRNA-330-5p on the invasion and metastasis of lung cancer cells [J]. Journal of Oncology,2014,20(8):648–653.[王剑, 陈清勇, 张晓敏, 等. 转染 microRNA-330-5p 对肺癌细胞侵袭和迁移能力的影响[J].肿瘤学杂志,2014,20(8):648–653].
[15] Sempere LF,Christensen M,Silahtaroglu A,et al. Altered MicroRNA expression confined to specific epithelial cell subpopulations in breast cancer [J]. Cancer Res,2007,67(24):11612–11620.
[16] Chang S,Gao L,Yang Y,et al.MiR-145 mediates the antiproliferative and gene regulatory effects of vitamin D3 by directly targeting E2F3 in gastric cancer cells[J]. Oncotarget,2015,6(10):7675–7685.
[17] Qiu T,Zhou X,Wang J,et al. MiR-145,miR-133a and miR-133b inhibit proliferation,migration,invasion and cell cycle progression via targeting transcription factor Sp1 in gastric cancer[J]. FEBS Lett,2014,588(7):1168–1177.
[18] Fuse M,Nohata N,Kojima S,et al. Restoration of miR-145 expression suppresses cell proliferation,migration and invasion in prostate cancer by targeting FSCN1[J]. Int J Oncol,2011,38(4):1093–1101.
[19] Wang S,Bian C,Yang Z,et al. MiR-145 inhibits breast cancer cell growth through RTKN [J]. Int J Oncol,2009,34(5):1461–1466.
[20] Sachdeva M,Mo YY. MicroRNA-145 suppresses cell invasion and metastasis by directly targeting mucin 1 [J]. Cancer Res,2010,70(1):378–387.
[21] Zhao C,Xu Y,Zhang Y,et al. Downregulation of miR-145 contributes to lung adenocarcinoma cell growth to form brain metastases [J]. Oncol Rep,2013,30(5):2027–2034.
[22] Yin R,Zhang S,Wu Y,et al. MicroRNA-145 suppresses lung adenocarcinoma-initiating cell proliferation by targeting OCT4 [J]. Oncol Rep,2011,25(6):1747–1754.

## 2015 首届肺癌精准治疗论坛
## 暨首届浙江省肿瘤精准治疗学习班预告

2015 首届肺癌精准治疗论坛暨首届浙江省肿瘤精准治疗学习班将于 2015 年 10 月 9 日~11 日在杭州举行,浙江省肿瘤医院主办,浙江省抗癌协会、肿瘤学杂志社协办。重点交流与探讨恶性肿瘤,尤其是肺癌的精准诊断及精准治疗,主要涉及肿瘤基础研究、转化性研究、分子病理学、分子靶向治疗、手术、放疗及化疗等方面的进展与热点问题,解决临床诊断与治疗中存在的问题,介绍恶性肿瘤、尤其是肺癌精准诊断及精准治疗领域的新进展、新技术。会议特别邀请了一批国内著名的肿瘤专家,尤其是肺癌领域的专家、肿瘤转化研究专家及病理专家作学术报告,传递最新的国际研究成果和创新技术。本论坛为 2015 年国家级继续教育项目,对全程参会者经考试合格后将授予国家级Ⅰ类继续教育学分。

联系人:徐艳君 13819188644　谢发军 13735423545　E-mail:jzzl2015@sina.com

地址:杭州市拱墅区半山桥广济路 38 号(310022)　浙江省肿瘤医院胸部肿瘤内科四十一病区