

鬼臼毒素衍生物 CIP-36 抗肿瘤多药耐药的机制

梅 昕^{1,2}, 蒋云根^{2*}, 吕晶晶³, 吴可柱², 曹 波¹, 陈 虹¹

(1. 武警医学院生药学教研室, 天津 300162; 2. 武警江西总队医院药剂科, 江西 南昌 330001;
3. 石药集团中奇制药技术(石家庄)有限公司, 河北 石家庄 050051)

摘要: 研究鬼臼毒素衍生物 CIP-36 对耐药口腔鳞状上皮癌细胞 KBV200 的抗肿瘤活性及其作用机制。采用 MTT 法观察 CIP-36 对多种肿瘤细胞和正常细胞的体外抑制作用以及对 KB 和 KBV200 细胞生长曲线的作用, Hoechst 荧光染色进行细胞凋亡检测, RT-PCR 检测 CIP-36 对 KB 及 KBV200 细胞 *p53*、*p21*、*caspase-3*、*bax*、*mdr-1* 和 *bcl-2* 的 mRNA 表达的影响, 免疫组织化学检测观察 CIP-36 对 KBV200 细胞 P-gp 表达的影响。结果表明, CIP-36 对多种肿瘤细胞均有较好的抑制作用, 且对耐药株细胞均有明显抑制作用。荧光染色结果显示, CIP-36 可诱导 KBV200 细胞凋亡。同时 CIP-36 可剂量依赖性地增加 KBV200 及 KB 细胞的 *p53*、*p21*、*caspase-3* 及 *bax* 的 mRNA 表达, 同时降低 *mdr-1* 和 *bcl-2* 的 mRNA 表达, 与对照组比较差异均有统计学意义。免疫组织化学检测结果显示, CIP-36 显著降低 KBV200 的 P-gp 表达。提示 CIP-36 可能通过影响多个与肿瘤耐药相关基因和蛋白的表达来克服肿瘤细胞株的多药耐药性。

关键词: CIP-36; 鬼臼毒素衍生物; 多药耐药性; P-糖蛋白

中图分类号: R963

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2011) 10-1193-06

Anti-MDR tumor mechanism of CIP-36, a podophyllotoxin derivative

MEI Xin^{1,2}, JIANG Yun-gen^{2*}, LÜ Jing-jing³, WU Ke-zhu², CAO Bo¹, CHEN Hong¹

(1. Department of Pharmacognosy, Medical College of Chinese People's Armed Police Forces, Tianjin 300162, China;
2. Pharmacy Department, Jiangxi Provincial Corps Hospital of Chinese People's Armed Police Force, Nanchang 330001, China;
3. CSPC Zhongqi Pharmaceutical Technology (Shijiazhuang) Co., Ltd., Shijiazhuang 050051, China)

Abstract: This study is to investigate the antitumor activity of CIP-36 on multidrug resistant human oral squamous carcinoma cell line (KBV200 cells) *in vitro* and the possible anticancer mechanisms. MTT assay, Hoechst fluorescein stain, RT-PCR and immunohistochemistry were carried out on KBV200 and KB cells. The growth of many tumor cells was obviously inhibited by CIP-36, especially the multidrug resistant cells KBV200. Obvious apoptosis could be observed in the Hoechst 33342 staining experiments. The results of RT-PCR showed that the levels of *p53*, *p21*, *caspase-3* and *bax* mRNA increased, and meanwhile the expression of *mdr-1* and *bcl-2* mRNA decreased in a dose-dependent manner. The data were significantly different from that of vehicle. The expression of P-gp significantly decreased with the increasing dosage of CIP-36 examined by immunohistochemistry. It can be concluded that CIP-36 could change resistance-related genes and proteins to overcome multidrug resistance in the KBV200 cell line.

Key words: CIP-36; podophyllotoxin derivative; multidrug resistance; P-glycoprotein

收稿日期: 2011-05-09.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30873363); 天津市自然科学基金重点资助项目 (08JCYBJC070000); 天津市自然科学基金重点支持项目 (09ZCKFNC01200).

*通讯作者 Tel: 86-791-85231749, E-mail: jiangyungen@126.com

恶性肿瘤目前仍是威胁人类健康和生命的严重疾病之一。据世界卫生组织统计: 全球每年有近 800 万人死于癌症, 新增癌症病例每年达到 1 100 多万, 预计这一数字将在未来 20 年内增加 50%^[1]。鬼臼毒素虽然具有明显的抗肿瘤活性, 但水溶性差, 且对人体有严重的毒副作用。因此寻找低毒、水溶性更好的鬼臼毒素衍生物已成为现在抗肿瘤药物研究的热点^[2]。目前临床上应用较为广泛的依托泊苷 (etoposide, VP-16) 和替尼泊苷 (teniposide, VM-26) 均为半合成鬼臼毒素衍生物^[3], 但该类物质长时间应用容易引起耐药性, 因此限制了其在临床上的使用^[4]。本课题组通过针对鬼臼毒素的结构改造, 获得了一系列新的具有自主知识产权的化合物。其中, CIP-36 (图 1) 因其良好的体外抑制肿瘤细胞增殖活性而极具开发前景。本文旨在研究不同浓度 CIP-36 对 KBV200 细胞的增殖抑制及促凋亡作用, 从而探讨其抗多药耐药的机制。

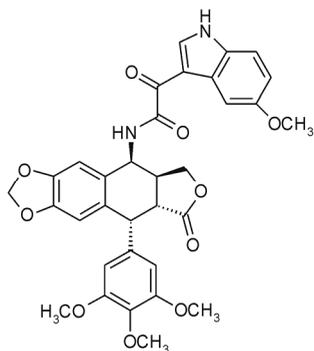


Figure 1 Chemical structure of CIP-36

材料与方法

实验材料 CIP-36 的相对分子质量为 614.6, 由武警医学院生药学教研室提供, 体外实验用 DMSO 配置成 $0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 原液, 置 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用, DMSO 的终浓度控制在 0.01% 以下, 使其不对细胞产生附加毒性^[5]。依托泊苷为江苏恒瑞医药股份有限公司产品 (批号: 07073131), 注射用硫酸长春新碱为深圳万乐药业有限公司产品, 均用生理盐水稀释配制成 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 原液, 置 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

溴化四氮唑蓝 (thiazolyl blue tetrazolum bromide, MTT) 和溴化乙锭 (EB) 为 Sigma 公司产品; 琼脂糖为 Promega 公司产品; DMSO 为 Gibco 公司产品。DAB Kit (20 \times) 试剂盒购于北京中山生物技术有限公司。兔抗人 P-gp 多克隆抗体和辣根过氧化物酶标记的小鼠抗兔二抗均购自北京博奥森生物技术有限

公司 (BIOS)。RT-PCR 试剂盒为大连宝生物资源有限公司产品。

细胞培养 KBV200 和 KB 细胞株培养于 RPMI 1640 培养基中, 内含 10% 胎牛血清、 $100 \text{ ku}\cdot\text{L}^{-1}$ 青霉素、 $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 链霉素, 置 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 孵箱中培养。KBV200 培养基中加入终浓度为 $200 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的长春新碱以维持细胞的耐药性, 实验前 2 周停药, 经检测其对于长春新碱、VP-16 及 CIP-36 的耐药系数分别为 68.49、7.08 和 1.46^[6]。

MTT 法检测 取对数生长期的细胞等量接种于 96 孔培养板。接种 24 h 后, 实验组加入不同浓度的 CIP-36, 阴性对照组加入等量溶剂, 置 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 孵箱中培养 48 h 后, 每孔加入 $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ MTT 溶液 (无血清培养基配制) $50 \mu\text{L}$; $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 4 h, 弃去上清液, 每孔加入 DMSO $150 \mu\text{L}$, 酶标仪测定吸收度并计算 IC_{50} 值。

Hoechst 荧光染色 不同浓度 CIP-36 作用于 KBV200 细胞 24 h 后, 离心去上清液。加入 Hoechst 33342 (终质量浓度为 $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), 染色 5~10 min。离心去染液, 用 PBS 吹悬, 离心洗涤, 涂片。晾干后用荧光显微镜以紫外光 (340 nm) 激发 Hoechst 33342, 照相保留结果。

RT-PCR 检测 收集 CIP-36 处理 24 h 后的 KBV200 细胞, 用 Biozol 提取总 RNA, 以总 RNA $1 \mu\text{g}$ 进行逆转录 (RT), 反应体积 $25 \mu\text{L}$, 反应条件: $70 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 min, 冰上冷却, $42 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 45 min, $95 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min。以反应产物 cDNA $1 \mu\text{L}$ 进行聚合酶链反应 (PCR), 反应过程: $94 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min, $94 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, 退火 $72 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min, 30~35 个循环后, $72 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min, 反应体积 $20 \mu\text{L}$, 引物条件及退火温度见表 1。取 PCR 产物 $5 \mu\text{L}$, 用 1.5% 琼脂糖凝胶进行电泳, 结果用凝胶自动成像系统扫描。得到待测的 RNA 扩增产物与内参照 β -actin RNA 扩增产物的光密度值 (volume), 计算两者的比值, 并以此作为目的 RNA 的相对表达量。

免疫组织化学染色 收集细胞, 离心并用预冷 PBS 洗涤 2 遍, 涂片。3% H_2O_2 室温浸泡 30 min, PBS 清洗后滴加封闭液于室温放置 20 min, 滴加兔抗人 P-gp 多克隆抗体 (1:200 稀释), $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜。PBS 清洗后滴加鼠抗兔 IgG 二抗, $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。之后 PBS 洗 3 次, 每次 3 min。滴加辣根过氧化物酶, 室温放置 30 min。PBS 洗 3 次, 每次 5 min。DAB 法染色 5 min, 苏木精复染 5 min, 自来水洗 1 次, 1% 盐酸酒精分化数秒, 自来水洗 1 次。1% 氨水返蓝 1 min, 乙醇脱水,

Table 1 Primer sequences and annealing conditions used in this study

Gene name	Primer sequence (5'-3')	Number of base pair/bp	Annealing condition
<i>β-Actin</i>	Forward: GTGGGGCGCCCCAGGCACCA	540	57 °C 30 s
	Reverse: CTTCCTTAATGTCACGCACGATTTTC		
<i>Mdr-1</i>	Forward: CCCATCATGCAATAGCAGG	157	58 °C 40 s
	Reverse: GTTCAAACCTTCTGCTCCTCA		
<i>P53</i>	Forward: TCTGGGACAGCCAAGTCTGT	435	58 °C 30 s
	Reverse: GGAGTCTTCCAGTGTGATGA		
<i>P21</i>	Forward: TGTCCGTCAGAACCCATGCG	346	57 °C 30 s
	Reverse: GCGAGGCACAAGGTACAAG		
<i>Bcl-2</i>	Forward: GGTGCCACCTGTGGTCCACCT	458	57 °C 1 min
	Reverse: CTTCACCTGTGGCCAGATAGG		
<i>Bax</i>	Forward: CGTCCACCAAGAAGCTGAGCG	382	57 °C 45 s
	Reverse: AGCACTCCCGCCACAAAGATG		
<i>Caspase-3</i>	Forward: GTGGAATTGATGCGTGATG	499	58 °C 45 s
	Reverse: GGAATCTGTTTCTTTGCATG		

用中性树胶封片, 光镜观察并照相。

统计学分析 实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。使用 t 检验进行组间比较。

结果

1 CIP-36 对肿瘤细胞及正常细胞的抑制作用

采用 MTT 法观察 CIP-36 对体外培养的 HeLa、MCF-7、Lovo、Hos、Hepg-2、SMMC-7721、SKOV3 和 BGC-823 等 8 种肿瘤细胞生长的影响。从表 2 可以看出, CIP-36 对各种肿瘤细胞均有较强的杀伤作用 (IC_{50} : $0.14 \sim 7.47 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 均优于阳性对照 VP-16。此外, CIP-36 对正常细胞与癌细胞具有良好的选择性, 对人瘢痕成纤维细胞 (FB) 和人的血管内皮细胞 (VEC) 的 IC_{50} 均 $>50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

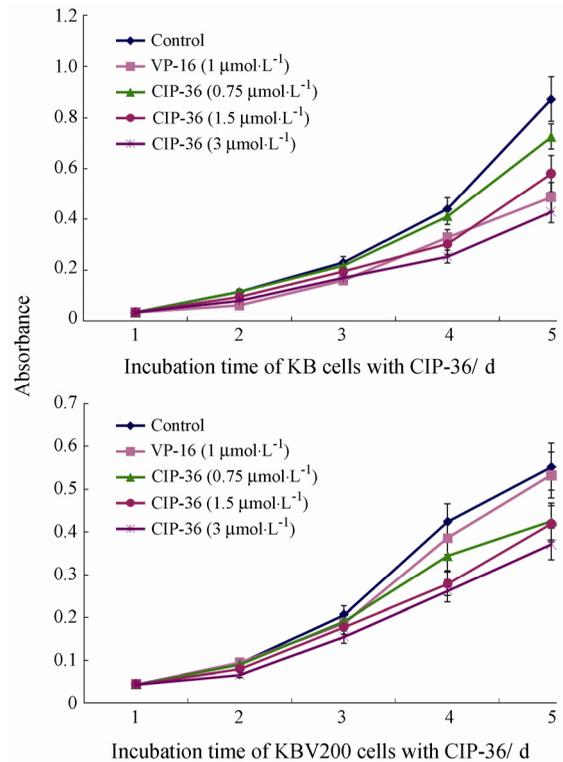
Table 2 Cytotoxic activity of CIP-36 on different human cancer cells (IC_{50} , $n \geq 3$, $\bar{x} \pm s$)

Cell line	VP-16/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	CIP-36/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
HeLa	1.01 ± 0.53	0.56 ± 0.34
MCF-7	2.31 ± 0.51	1.09 ± 0.14
Lovo	2.38 ± 0.76	2.01 ± 0.36
Hos	0.45 ± 0.06	0.14 ± 0.03
Hepg-2	9.70 ± 0.12	4.46 ± 0.16
SMMC-7721	30.60 ± 2.1	2.02 ± 0.93
SKOV3	2.77 ± 0.24	0.52 ± 0.02
BGC-823	10.02 ± 1.25	7.47 ± 0.62
FB	16.78 ± 2.31	56.98 ± 1.28
VEC	26.41 ± 1.49	58.36 ± 2.03

2 CIP-36 对肿瘤细胞生长曲线的影响

采用 MTT 法观察了 CIP-36 对敏感细胞株 KB 及

耐药细胞株 KBV200 生长曲线的影响。由图 2 可以看出两种细胞的生长曲线均呈“S”型, 一般到第 6 天细胞数明显下降; 与阴性对照相比, CIP-36 对敏感株和耐药株细胞均有抑制作用, 且呈现一定的剂量依赖关系。

**Figure 2** Time-dependent effects of CIP-36 on cell growth and viability

3 CIP-36 对 KBV200 细胞凋亡的影响

Hoechst 33342 荧光染色结果 (图 3) 显示, 未加药组的细胞核染色均一、结构完整, 呈微弱荧光;

0.75 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CIP-36 组中, 开始有呈亮蓝色荧光的凋亡细胞出现, 且随着 CIP-36 浓度的增大凋亡细胞比例逐渐增加, 至最高浓度 3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 可见到凋亡小体的出现。

4 CIP-36 对凋亡相关基因 mRNA 表达的影响

经 CIP-36 处理 24 h 后的结果: 与对照组相比, KBV200 细胞中的 *mdr-1* 和 *bcl-2* 表达量下降, *p53*、*p21*、*bax* 和 *caspase-3* 表达量升高, 并呈现剂量依赖性; KB 细胞中的相关基因亦表现相同趋势 (图 4)。

5 CIP-36 对 KBV200 细胞 P-gp 蛋白表达的影响

结果 (图 5) 显示, 对照组细胞膜染色最深, 而随着 CIP-36 浓度的增加, 细胞膜染色越来越浅, 至最高浓度 3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, CIP-36 有降低 P-gp 蛋白表达的明显趋势。说明 CIP-36 可能通过降低 P-gp 蛋白表达, 达到抑制多药耐药细胞生长的作用。

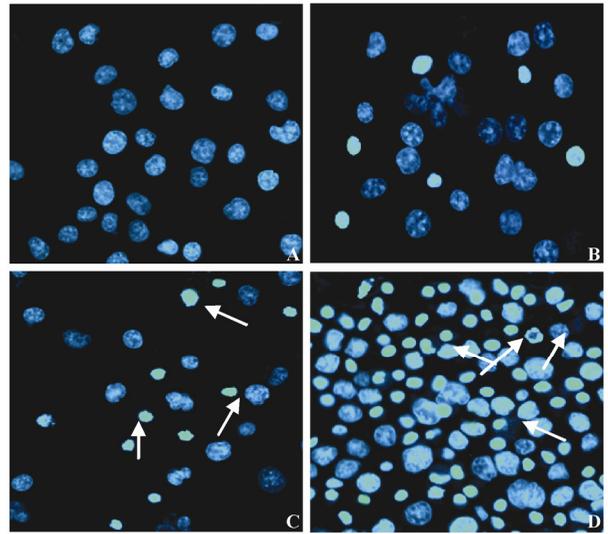


Figure 3 Nuclear morphological appearance changes of KBV200 cells treated with CIP-36 for different doses by fluorescence microscope detection ($\times 200$). A: 0.1% DMSO; B: 0.75 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CIP-36; C: 1.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CIP-36; D: 3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CIP-36

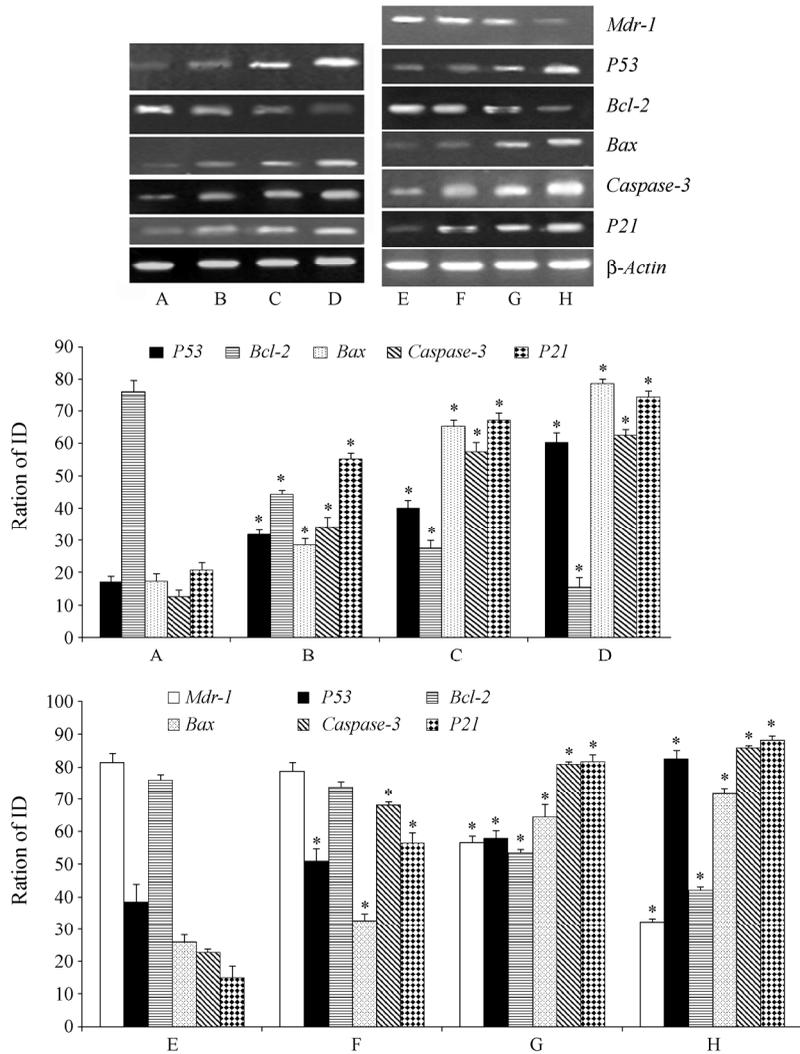


Figure 4 Effect of CIP-36 on mRNA expression in KBV200 and KB cells. A-D: mRNA expression in KB; A: 0.1% DMSO; B: 0.75 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CIP-36; C: 1.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CIP-36; D: 3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CIP-36. E-H: mRNA expression in KBV200; E: 0.1% DMSO; F: 0.75 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CIP-36; G: 1.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CIP-36; H: 3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CIP-36. * $P < 0.05$ vs 0.1% DMSO

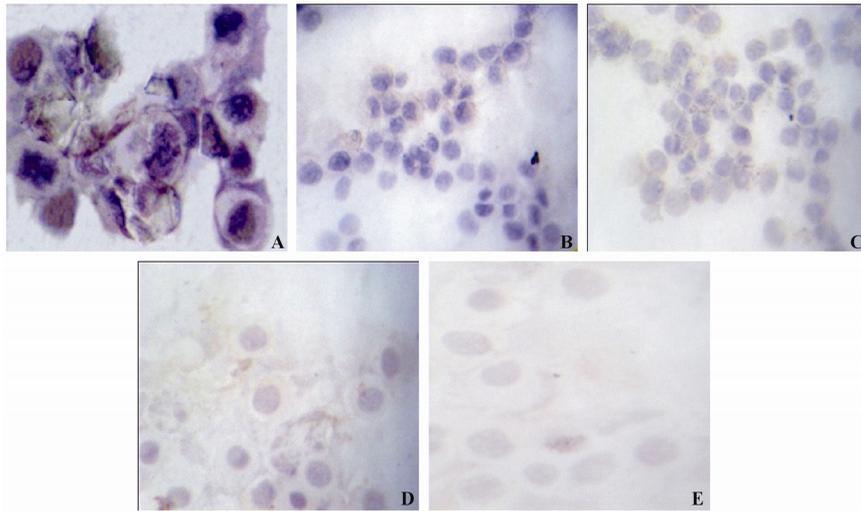


Figure 5 Effect of CIP-36 on P-gp expression in KBV200 cells by immunohistochemistry. A: 0.1% DMSO; B: $0.75 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CIP-36; C: $1.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CIP-36; D: $3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CIP-36; E: KB cells

讨论

化疗是肿瘤治疗的有效方法之一,随着分子肿瘤学及其基因工程技术的不断发展,抗肿瘤药的研究及开发已步入一个崭新的阶段,相伴而来的肿瘤耐药性的产生成为临床治愈癌症的重大障碍^[7]。多药耐药 (multidrug resistance, MDR)^[8]是指肿瘤细胞对一种抗肿瘤药物产生耐药性的同时,对结构和作用机制完全不同的其他多种抗肿瘤药物产生交叉耐药性。

本课题组前期实验证实 CIP-36 能够抑制 KBV200 细胞的耐药性,并作用于细胞的微丝微管系统,破坏微管蛋白/微管循环的机制,从而引起细胞的凋亡^[6]。本实验结果表明, CIP-36 对多种敏感肿瘤细胞均有较强的增殖抑制作用,且其活性明显高于阳性对照药依托泊苷; KB、KBV200 细胞生长曲线的结果表明,不同浓度的 CIP-36 对敏感细胞和耐药细胞的生长有明显的抑制作用,且呈现一定的剂量依赖性,形态学亦可见 CIP-36 在体外有明显的抗肿瘤活性。

p53 基因是人类恶性肿瘤中突变频率最高的抑癌基因,分为野生型和突变型两种,其中野生型 *p53* (^{wt}*p53*) 对凋亡起促进作用^[9]。野生型 *p53* 蛋白作用于 *p21* 基因,使其迅速表达,从而发挥 *p21* 诱导细胞凋亡的生物学功能。*Mdr-1* 是肿瘤多药耐药性基因,其编码产物 P-糖蛋白 (P-glycoprotein, P-gp) 具有将抗癌药物泵出细胞,造成细胞内药物浓度下降、细胞毒作用降低或完全丧失的功能,从而使细胞产生耐药性,而 ^{wt}*p53* 能够抑制 *mdr-1* 基因的表达^[10]。

Caspase 家族是细胞凋亡过程中的关键元件,其

激活与超常表达均引起细胞凋亡,可通过与众多蛋白因子的相互作用调控细胞凋亡^[11]。Caspase-3 是最重要的效应型 Caspase,它的活化是凋亡进入不可逆阶段的标志^[12]。Bcl-2 家族通过促凋亡基因和抑制凋亡基因两类基因相互作用来调节细胞的凋亡。抗凋亡基因 *bcl-2* 过度表达利于细胞的生存,因此可使肿瘤细胞产生对药物的耐受;而促凋亡基因 *bax* 的活性增加则可提高恶性细胞对凋亡的敏感性,从而克服药物耐受^[13]。

药物抗肿瘤的作用机制不是单一的,而是多种因素相互作用的结果。CIP-36 能够作用于肿瘤细胞凋亡相关基因,并减少多药耐药细胞 P-gp 表达量,增加耐药细胞对化疗药物的敏感性,具有很好的开发前景。

References

- [1] World Health Organization. A safer future [R]. Geneva: WHO, 2009.
- [2] He Y, Ma WY, Chen XH, et al. Synthesis and activities of 4-deoxy-4 β -arylmethylene sulfonylamido-4'-demethylpodophyllotoxins [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2001, 36: 105-107.
- [3] Issell BF. The podophyllotoxin derivatives VP16-213 and VM26 [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 1982, 7: 73-80.
- [4] Lum BL, Kaubisch S, Yahanda AM, et al. Alteration of etoposide pharmacokinetics and pharmacodynamics by cyclosporine in a phase I trial to modulate multidrug resistance [J]. J Clin Oncol, 1992, 10: 1635-1642.
- [5] Ji SY, Weng ZY, Zhou YP, et al. The cytotoxicity of

- some organic solvents in common use on human tumor cell lines 8 [J]. *J Yunnan Univ (云南大学学报)*, 2001, 23: 457-460.
- [6] Lü JJ, Zhang YY, Chen H, et al. CIP-36, a novel podophyllotoxin derivative, induces the apoptosis of KBV200 cells [J]. *Chin Pharmacol Bull (中国药理学通报)*, 2010, 26: 607-610.
- [7] Meresse P, Dechaux E, Bertounesque E, et al. Etoposide: discovery and medicinal chemistry [J]. *Curr Med Chem*, 2004, 11: 2443-2466.
- [8] Yu T, Zhao GS, Zang HL, et al. Advances in tumor multidrug resistance reversal agents [J]. *Chin J Med Chem (中国药物化学杂志)*, 2003, 13: 172-178.
- [9] El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, et al. WAF1, a potential mediator of p53 tumour suppression [J]. *Cell*, 1993, 75: 817-823.
- [10] Chin KV, Ueda K, Pastan I, et al. Modulation of the promoter of the human *mdr1* gene by *ras* and *p53* [J]. *Science*, 1992, 255: 459-464.
- [11] Zhang Y, Goodyer C, LeBlanc A. Selective and protracted apoptosis in human primary neurons microinjected with active caspase-3, -6, -7 and -8 [J]. *J Neurosci*, 2000, 20: 8384-8389.
- [12] Cryns V, Yuan J. Protease to die for [J]. *Genes Dev*, 1998, 12: 1551-1570.
- [13] Wu J, Lu H, Xue QJ, et al. Advance of *Bcl-2* genes [J]. *World Chin J Digestol*, 2004, 12: 2171-2173.

第三届定量药理学与新药评价国际会议通知 (第三轮)

自从美国FDA(2004年)提出了“基于模型的药物研发(Model Based Drug Development, MBDD)”模式,定量药理学在全球范围内成为一个热门学科,MBDD已经列入中国“十二五”国家科技重大专项研究。中国药理学学会数学药理专业委员会分别于2007年和2010年在南京和厦门成功举办了两届“定量药理学与新药评价国际学术会议”(International Symposium of Quantitative Pharmacology in Drug Development and Regulation, ISQP),吸引了国内外众多学者参加。为促进我国定量药理学的发展,增进国内外交流,第三届“定量药理学与新药评价国际学术会议”将于2011年11月3~6日在上海举办。会议将邀请来自美国、欧洲、中国的药政当局、学术界和企业界等诸多知名专家学者参加,本次会议将为国内外从事定量药理学与新药研究人员提供一个交流平台。

参会人员:从事药物研发和管理的行政部门、科研院所、制药企业、药物临床研究机构、CRO等相关人员;新药研发、临床药理学、临床药学、生物统计、数据管理、临床医学等研究人员;大专院校研究生。

会议形式:会议将邀请国内外一流定量药理学专家、美国FDA、中国SFDA和国内外同行知名专家作学术专题报告,各专题由专家报告、实例介绍、问题研讨和软件演示组成,内容强调实用性。会议内容丰富,将设多个分会场。会议期间将组织一场专题讨论(Panel Discussion),就“定量药理学是中国新药研发的急迫之需?”与会专家将与代表们进行学术交锋。会议还将结合专家报告内容进行专题培训(workshop),免费提供论文展示(posters)空间,展架自备。

会议内容:① 定量药理学在新药研发中的应用;② 药代动力学;③ 生物等效性与耐受性分析;④ 量效关系与时效关系;⑤ 药物临床评价的热点及难点讨论;⑥ 临床试验设计与定量评价。

请直接在线注册(<http://www.drugChina.net>),也可下载报名表填写后以邮寄、传真或电子邮件发回。

欢迎各厂商在会议期间进行医药分析软件、药物检测仪器、实验材料展示,也欢迎进行会议冠名等宣传活动。