

脑靶向基因转运免疫脂质体的制备

赵浩¹, 王任直^{1*}, 王菲², 张燕惠², 陈星伟², 李馨儒^{2*}, 刘艳²,
李桂林¹, 魏俊吉¹, 冯铭¹, 孔燕国¹, 栗世芳³

(1. 中国医学科学院北京协和医学院/北京协和医院神经外科, 北京 100730; 2. 北京大学药学院药剂学系, 北京 100191;
3. 青岛大学医学院附属医院神经外科, 山东 青岛 266003)

摘要: 构建一种高效的可以携带外源基因通过静脉注射的方式、透过血脑屏障进入脑内特异性表达目的蛋白的非病毒载体。通过不同比例的配比, 对免疫脂质体合成过程中油相种类和油水比例、磷脂和胆固醇比例、旋转蒸发温度、超声温度和时间进行筛选优化, 测定免疫脂质体的包封率和抗体偶联率。将包裹 LacZ 基因的免疫脂质体经尾静脉注射至大鼠体内, 通过组织化学染色检测 LacZ 基因在大鼠体内的表达情况, 验证合成的免疫脂质体是否可以转运外源基因跨过血脑屏障进入脑内表达。免疫脂质体合成的最佳比例为磷脂-胆固醇为 1 : 1; 脂药比为 100 : 1; 油相种类为二氯甲烷, 油水比例为 4 : 1; 旋转蒸发温度为 30 °C; 超声温度为 10 °C; 超声时间为 5 min, 10%海藻糖可以增加免疫脂质体的稳定性。脂质体的包封率为 87.24%, 抗体偶联率为 69%。将免疫脂质体通过尾静脉注射到大鼠体内后观察到 LacZ 基因在脑内及周围器官的表达。因此, 通过工艺优化可以得到携带外源基因的免疫脂质体, 其可以通过静脉系统跨过血脑屏障进入脑内并且表达, 为实现颅内疾病的基因治疗奠定了基础。

关键词: 免疫脂质体; 非病毒载体; 血脑屏障

中图分类号: R943

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2009) 11-1285-06

Preparation of brain targeted immunoliposomes

ZHAO Hao¹, WANG Ren-zhi^{1*}, WANG Fei², ZHANG Yan-hui², CHEN Xing-wei², LI Xin-ru^{2*},
LIU Yan², LI Gui-lin¹, WEI Jun-ji¹, FENG Ming¹, KONG Yan-guo¹, LI Shi-fang³

(1. Department of Neurosurgery, Peking Union Medical College Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100730, China;

2. Department of Pharmaceutics, School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100191, China;

3. Department of Neurosurgery, the Affiliated Hospital of Medical College, Qingdao University, Qingdao 266003, China)

Abstract: To prepare a kind of effective non-viral transduction vector, which can deliver exogenous gene into the brain, this vector can be injected through vein system and has the ability to penetrate blood brain barrier. Several groups of materials proportion, type of oil phase, water-oil ratio, phosphatides-cholesterol ratio, temperature of steaming, ultrasonic temperature and time were compared for optimization. Well-constructed immunoliposomes encapsulating LacZ gene were infused into rats through tail vein. 48 h after injection, expression product beta-galactosidase of LacZ gene was detected by histochemistry staining to convince the validity of immunoliposomes as non-viral vectors. The best proportion of synthesis immunoliposomes is as following: phosphatides-cholesterol ratio is 1 : 1, lipids/drug is 100 : 1, the type of oil phrase is dichloromethane, oil-water ratio is 4 : 1, temperature of steaming is 30 °C, ultrasonic temperature and time is 10 °C and 5 min. At last, 10% trehalose was

收稿日期: 2009-06-09.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30571901).

*通讯作者 Tel: 86-10-6529601, Fax: 86-10-82801508, E-mail: wangrz@126.com, ll@bjmu.edu.cn

added as a stabilizer. The entrapment rate is 87.24% and antibody coupling rate is 69%. When immunoliposomes were infused into rats, the expression of LacZ gene could be observed in the brain and periphery organs. Through the best proportion of materials, gene delivering immunoliposomes had been synthesized successfully. This non-viral vector can deliver exogenous gene penetrating blood brain barrier and express in the brain, and will be well-used in the field of gene therapy of cerebral diseases.

Key words: immunoliposome; non-viral vector; blood brain barrier

免疫脂质体是一种携带外源基因进行转导的非病毒载体,但文献中报道的免疫脂质体包封率不高,限制了其在体内转染效率^[1-4]。此外免疫脂质体的包封率及载药量一般通过同位素标记的方式得到,这样就要求实验操作在有同位素保护的设施中进行,从而限制了免疫脂质体的制备及使用。本实验对脂质体的合成工艺进行优化,并且偶联转铁蛋白受体抗体(OX26)构建具有脑靶向特性的免疫脂质体。包封率采用非同位素的方法进行测定,并通过尾静脉将免疫脂质体注射到大鼠体内,利用组织化学染色验证 LacZ 基因在脑内及周围器官的表达情况。

材料与方 法

主要试剂 pCMV-LacZ 质粒由本实验室保存;胆固醇氯甲酸酯(上海晶纯试剂有限公司);*N,N*-二甲基乙二胺(日照力德士化工有限公司)、转铁蛋白受体抗体(OX26, Abcam 公司)、2-亚氨基氯化硫醇 Traut's 试剂盒(PIERCE 公司); DSPE-PEG-MAL、DOPC、DSPE-PEG2000、DSPE(Creative PEGWorks); Nano orange 蛋白定量试剂盒、PicoGreen 核酸定量试剂盒和 LacZ Detection Kit for Tissues(Invitrogen 公司);琼脂糖 Sepharose CL-4B、葡聚糖 Sephadex G-25(北京东凯生物公司); EndoFree Plasmid Mega Kits 质粒大提试剂盒(Qiagen 公司)。

主要仪器 Cary Eclipse 荧光分光光度计(上海申生科技有限公司)、LGJO.5 冷冻干燥机(北京四环科学仪器厂)等。

动物 200~250 g 雄性大鼠(清洁级),购自北京协和医院实验动物中心。

PEG 化脂质体的制备 pCMV-LacZ 质粒(7.3 kb)由 CMV 启动子启动表达 β -半乳糖苷酶。质粒转化大肠杆菌后,用 EndoFree Plasmid Mega Kits 质粒试剂盒进行提取。胆固醇氯甲酸酯用无水氯仿溶解后,在冰浴中,滴入过量 *N,N*-二甲基乙二胺的无水氯仿溶液制备 DC-Chol。将蒸馏水与乙醚、氯仿、二氯甲烷和乙酸乙酯分别按照 1:1、1:2、1:3、1:4 和 1:5 的水油比例混合,超声 30 min 后,观察两相

的相容情况。将 33 mmol·L⁻¹ DC-chol、33 mmol·L⁻¹ POPC (25.971 mg·mL⁻¹)、1.65 mmol·L⁻¹ DSPE-PEG (5.61 mg·mL⁻¹) 和 0.33 mmol·L⁻¹ DSPE-PEG-MAL (1.122 mg·mL⁻¹) 按照等体积加至茄形瓶中,分别选择 20、30 和 40 °C 旋转蒸发吹干。加入水油相容较好的一组有机溶剂和质粒,涡旋振荡并分别选择 4、10 和 20 °C 作为超声温度,分别超声水浴 2、5 和 10 min,观察不同温度和时间对脂质包裹质粒形成 PEG 化脂质体的影响。用同样的方法将水溶液代替质粒水溶液,得到空白脂质体溶液并在动物实验中作为阴性对照。将得到的质粒脂质体和空白脂质体依次通过 400、200、100 和 80 nm 的微孔滤膜。回收得到的质粒脂质体用 DNase 和 Exonuclease III 于 37 °C 下作用 1 h, EDTA 终止反应。琼脂糖 CL-4B 柱分离包裹质粒的脂质体和未被包裹的、核酸酶降解的质粒 DNA,琼脂糖凝胶电泳检测。依照 PicoGreen 核酸定量试剂盒的使用说明测定 PEG 化脂质体的包封率。测定粒径后将质粒脂质体和空白脂质体加入 10% 海藻糖作为冻干保护剂,冻干成脂质体粉末 4 °C 保存。

PEG 化免疫脂质体的制备 将转铁蛋白受体抗体 OX26 按照 Traut's 试剂盒的实验步骤巯基化,制作得到标准曲线。将载有质粒的 DSPE-PEG-MAL 脂质体冻干产品以 1 mL 蒸馏水重分散,加入巯基化的 OX26,室温下氮气保护进行偶联反应 16 h。用琼脂糖 CL-4B 柱分离未连接的抗体和已经连接抗体的免疫脂质体,洗脱液进行荧光测定,绘制洗脱曲线。PicoGreen 核酸定量试剂盒测定总 DNA 和游离 DNA 量,通过公式:包封率 = [(总 DNA 量 - 未包裹的脂质体中 DNA 量) / 总 DNA 量] × 100%, 计算脂质体的包封率。采用 Nano orange 蛋白定量试剂盒,依照说明书测定 OX26 的浓度,根据加入 OX26 的量间接测定抗体偶联率。

PEG 化免疫脂质体的特性 PEG 化免疫脂质体的平均粒径、粒径分布以及 zeta 电位通过动态光散射方法测定。为了验证脂质体已经将质粒 DNA 包裹至其内部及其在合成过程中质粒的完整性,取质粒脂质体 10 μ L,加入 0.5% SDS 20 μ L 进行裂解,将

DNA marker、质粒、质粒脂质体、裂解后的质粒脂质体依次加入到 0.8%琼脂糖凝胶中进行电泳,在紫外透射仪下观察电泳结果。脂质体的稳定性是通过将脂质体在 4 °C 放置 1、6 和 24 h 后观察其在 PBS 中的凝聚情况,并且用琼脂糖凝胶电泳的方法检测。

脂质体电镜观察 将脂质体悬浮液 50 μL 加至聚乙烯醇缩甲醛铜载网上,固定约 3 min,吸去多余的液体。1%乙酸双氧钨 (pH 4.5) 加至载铜网上,静置 2 min,自然晾干 1 h。样品置于 1010 JEM 电子显微镜下,分别放大 15 000、30 000 和 100 000 倍,观察脂质体的形态及大小分布,并用 CCD 照相机拍照。

免疫脂质体尾静脉注射 将 OX26 免疫脂质体(包裹 pCMV-LacZ 质粒)、普通脂质体(包裹 pCMV-LacZ 质粒)和空白脂质体(不包裹任何质粒),分别通过尾静脉注射至大鼠体内,注射剂量 1 mL (80 μg 质粒/mL),每组 6 只。

脑组织冰冻切片及组织化学染色 每组动物分别于给药后 48 h 后处死,用 0.01 mol·L⁻¹ PBS 和 4% 多聚甲醛以先快后慢的速度行心脏灌注。取脑、肝、脾、心、肺和肾并置于 4% 多聚甲醛中固定过夜,再分次浸泡于 10%、20% 和 30% 蔗糖溶液梯度脱水,直到脑组织沉入溶液底部后, OCT 胶包埋并置于恒冷冰冻切片仪,切片厚度为 12 μm ,每 2 张切片间隔 70 μm ,铺片于 DEPC 处理过的载玻片。将 X-gal 染色液滴加到切片上,37 °C 孵箱孵育 2~4 h 后封片镜检。

结果

1 油相种类以及油水比例的选择

将乙醚、乙酸乙酯、氯仿和二氯甲烷与蒸馏水混合后放入超声水浴中超声 30 min 后,氯仿和二氯甲烷可以与水形成均相,而且不分层,因此氯仿或二氯甲烷可以作为较好的有机相溶剂。

2 超声温度和时间对脂质体包封率及粒径的影响

脂质体包封质粒过程中,当旋转蒸发设置的温度为 20 °C 时,测得的脂质体包封率为 53.62%,包封率较低;旋转蒸发温度为 30 °C 时,包封率为 82.90%;温度为 40 °C 时,旋转蒸发过程中溶液中出现大量泡沫。当超声水浴的温度设置为 4 °C 时,油水两相不能充分混合均匀;10 °C 时,粒径为 252.9 nm;20 °C 时,粒径为 485.7 nm。超声水浴的时间选择 2 min 时,油水两相不能均匀混合;5 min 时粒径为 234.9 nm;10 min 时粒径为 532.7 nm。由此可见选择旋转蒸发的温

度为 30 °C、超声水浴的温度为 20 °C、时间为 5 min 时,可以获得包封率较高和粒径较小且均一的脂质体。此外观察了加入不同浓度海藻糖后,脂质体粒径分布的情况,发现只有在加入 10% 海藻糖的情况下,脂质体的粒径分布呈正态分布。

3 OX26 与 PEG 化脂质体的偶联

OX26 通过 Traut's 试剂盒巯基化后得到的标准曲线为 $y = 8.1752x + 0.0078$,由此得到的抗体巯基连接率为 69%。免疫脂质体洗脱曲线见图 1。由图可见,第 1 个峰可能为连接了 OX26 的脂质体,第 2 个峰可能为游离 OX26。通过粒径进行检测,第 1 峰的粒径分别为 78 和 300 nm,通过 450 nm 和 220 nm 滤膜后,检测粒径为 84 nm, PDI 为 0.251。第 2 峰收集得到免疫脂质体经测定的粒径分布不统一,且 PDI > 0.8,因此可以判断第 1 峰值为偶联了 OX26 的免疫脂质体。

4 免疫脂质体的粒径分布及电镜图像

从图 2 中可以看到,经过多次滤膜后免疫脂质体粒径分布在 100 nm 左右,平均粒径为 84.21 nm, PDI 为 0.176。从电镜图片中可以看到(图 3),脂质体的形态呈均匀圆形,粒径分布一致。除圆形的脂质体外,还可见长条状物质分布其中,为海藻糖成分。

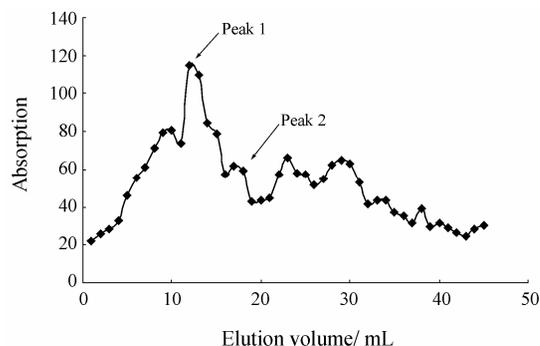


Figure 1 Elution curve of coupling of OX26 antibody and pegylated liposomes

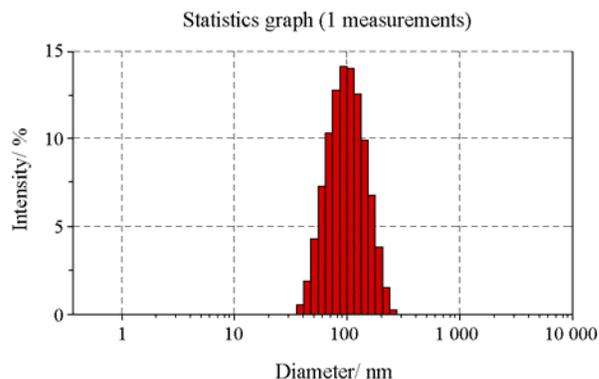


Figure 2 Distribution of particular diameter of immunoliposomes

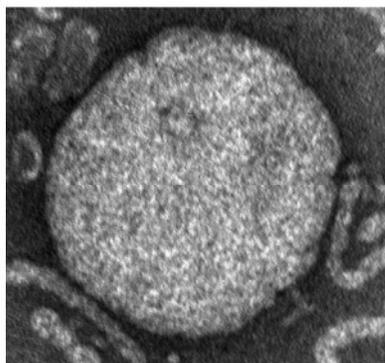


Figure 3 Electron microscope of immunoliposome, 80 kV, 100 000 \times

5 免疫脂质体的稳定性

将免疫脂质体与 PBS 混合后 1、6、24 h 观察, 发现并没有产生凝聚现象, 合成的免疫脂质体稳定性可以满足实验的需要。在琼脂糖凝胶电泳实验中, 从图 4 中看到, 脂质体使绝大多数包裹的 DNA 停留在点样原点, 这与脂质体无法在琼脂糖凝胶中进行迁移有关, 用 SDS 去垢剂处理后, 在与对照质粒 DNA 组同样的位置出现条带, 说明脂质体破裂后, 重新将质粒 DNA 释放到了溶液中, 而且质粒 DNA 在脂质体包裹的过程中, 并没有发生损害。最终测得的脂质体的 zeta 电位为 30.2 mV。

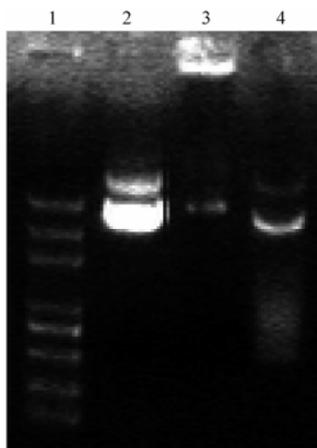


Figure 4 Agarose gel electrophoresis of immunoliposomes. Lane 1: DNA Ladder, Lane 2: Plasmid/DNA, Lane 3: Encapsulated DNA, Lane 4: Released DNA after SDS lysis

6 脑组织化学染色结果

包裹 pCMV-LacZ 质粒的 OX26 免疫脂质体可以实现脑内和周围组织的表达。脑组织染色中, 在海马、脑皮质、小脑及锥体束区域均可见 LacZ 基因的蛋白产物与底物 X-gal 产生反应的蓝色阳性表达 (图 5); 组织切片在脑内可见广泛表达, 尤其以大脑

皮质, 海马齿状回、CA1 区、CA2 区、CA3 区, 侧脑室室管膜下区 (SVZ) 阳性表达明显, 此外在脾、肺、肝、肾、心组织均可见到阳性表达 (图 6)。包裹 pCMV-LacZ 的普通脂质体在周围器官可见阳性表达, 但是在脑中并没有表达, 空白脂质体注射组在脑、心、肝、肺中没有阳性表达, 在肾、脾可见阳性表达, 与文献中报道的与内源性的 β -半乳糖苷酶表达有关一致^[2]。



Figure 5 Histochemistry staining of brain section after 48 h of immunoliposomes injection from tail vein of rat

讨论

当前颅内疾病的基因治疗大多采用病毒作为载体, 通过开颅钻孔的方式进行侧脑室注射或者是病灶周围注射。病毒进入脑内可以不断的复制, 从而提高了目的基因的转染效率。但是, 采用这种方式进行基因治疗也有极大的弊端。首先, 生物体对于外源性的病毒, 如慢病毒 (HSV)、腺病毒 (AV)、腺相关病毒 (AAV) 等都有一定的免疫原性, 因此将这些病毒载体进行颅内注射, 会引起感染或者神经脱髓鞘损害^[5], 将 HSV 和 AV 载体注射入人及猴脑内引发威胁生命的感染已有报道^[6]。其次, HSV、AV 及 AAV 可以整合入宿主的基因组, 从而导致外源基因在宿主体内的持续性表达^[5], 这种随机的非可控的外源基因的整合将会导致基因突变的发生几率。总之, 由于病毒载体在发挥作用的过程中具有诸如上述的毒性作用, 迫切需要寻找一种可以替代的非病毒的基因治疗载体。

免疫脂质体是由天然的可以生物降解的脂质构成双分子层^[7, 8], 与动物细胞膜的结构相似, 因此其免疫原性和毒性较小, 避免了宿主免疫反应的产生。通过脂质体转运的表达质粒不整合入宿主的基因组, 在细胞核内只是作为染色体外遗传因子进行复制, 在细胞内只进行瞬时表达^[1, 9]。脂质体制备过程中,

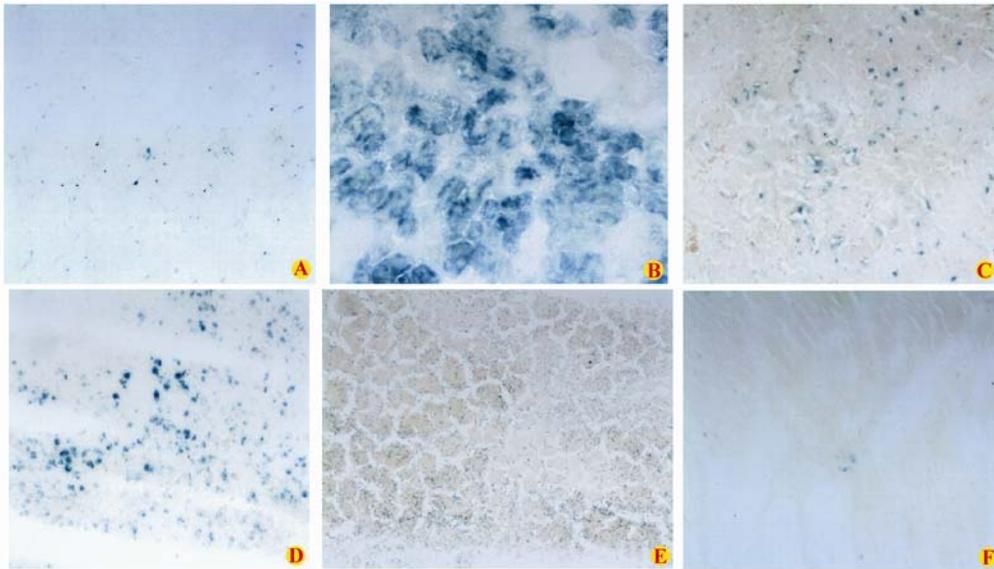


Figure 6 Brain, kidney, lung, spleen, liver and heart expression of LacZ gene after 48 h of injection of OX26-pCMV-LacZ. A: Positive expression of LacZ gene in brain cortex; B, C, D, E, F: Positive expression of LacZ gene separately in kidney, lung, spleen, liver and heart (100×)

采用具有聚乙二醇 (PEG) 的原材料, 使脂质体表面接有 PEG 长链, 起到了空间保护的作用, 从而可以减少血浆清除率。文献报道, 通过这种方法可以使 PEG 化的脂质体在血液中的半衰期延长到 90 h^[10-13]。脂质体纳米颗粒内部可以提供空间容纳目的基因, 进行体内注射后, 与裸露的 DNA 相比, 在体内可以达到较好的药物动力学^[2, 7, 8]。此外, 脂质体表面需要能够偶联大量具有靶向作用的蛋白配体, 形成具有靶向性的免疫脂质体, 从而实现免疫脂质体的靶向性运输并且行使受体介导的细胞转运的功能。血脑屏障的脑毛细血管内皮细胞上表达大量的转铁蛋白受体^[14], 因此在 OX26 的作用下, 免疫脂质体可以靶向性的运输至血脑屏障, 并且触发受体介导的转运作用, 使免疫脂质体跨过血脑屏障进入脑内, 然后在 OX26 介导的胞吞作用下将免疫脂质体内吞至脑细胞内。在脑细胞中, 免疫脂质体将其内部的表达质粒释放出来, 进行外源基因的表达。本实验合成的免疫脂质体的粒径在 100 nm 左右, 从而可以保证转染细胞对免疫脂质体的可获得性^[2, 8, 12]。文献报道目前合成的免疫脂质体对目的基因的包封率较低, 从而限制了其在体内对细胞的转染效率^[1-4, 15]。本实验中免疫脂质体的包封率达到 87.24%, 从而可以保证有较高的载药比。而且在测定免疫脂质体的包封率时避免了应用同位素标记的方法, 从而使其可以在普通实验室内进行制备。

本实验通过一系列的工艺优化, 得到了最佳的

材料配比, 合成了转铁蛋白受体抗体 OX26 靶向的带有 PEG 长链的免疫脂质体, 其包封率和抗体偶联率通过非同位素的方法进行检测, 获得了较高的包封率。将其包裹报告基因 LacZ, 进行大鼠尾静脉注射, 对脑及周围器官的组织化学染色, 发现合成的免疫脂质体可以携带外源基因透过血脑屏障进入脑内进行表达, 是一种比较好的基因转运的非病毒载体。但是由于部分周围器官也表达转铁蛋白受体, 使 LacZ 基因在这些器官也出现表达。为了避免目的基因在非特异性部位的表达, 在后续的实验中将采用脑内特异性启动的启动子, 如 GFAP 启动子, 控制目的基因的表达特异性。期待为颅内肿瘤及脑卒中的基因治疗带来曙光。

References

- [1] Zhang Y, Calon F, Zhu C, et al. Intravenous nonviral gene therapy causes normalization of striatal tyrosine hydroxylase and reversal of motor impairment in experimental parkinsonism [J]. *Hum Gene Ther*, 2003, 14: 1-12.
- [2] Schnyder A, Huwyler J. Drug transport to brain with targeted liposomes [J]. *NeuroRx*, 2005, 2: 99-107.
- [3] Monnard PA, Oberholzer T, Luisi P, et al. Entrapment of nucleic acids in liposomes [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1997, 1329: 39-50.
- [4] Kim NH, Park HM, Chung SY, et al. Immunoliposomes carrying plasmid DNA: preparation and characterization [J]. *Arch Pharm Res*, 2004, 27: 1263-1269.

- [5] Thomas CE, Ehrhardt A, Kay MA, et al. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy [J]. Nat Rev Genet, 2003, 4: 346-358.
- [6] Schnell MA, Zhang Y, Tazelaar J, et al. Activation of innate immunity in nonhuman primates following intraportal administration of adenoviral vectors [J]. Mol Ther, 2001, 3 (5 Pt 1): 708-722.
- [7] Smyth Templeton N. Liposomal delivery of nucleic acids *in vivo* [J]. DNA Cell Biol, 2002, 21: 857-867.
- [8] Allen TM, Cullis PR. Drug delivery systems: entering the mainstream [J]. Science, 2004, 303:1818-1822.
- [9] Zhang Y, Jeong Lee H, Boado RJ, et al. Receptor-mediated delivery of an antisense gene to human brain cancer cells [J]. J Gene Med, 2002, 4: 183-194.
- [10] Gabizon A, Shmeeda H, Barenholz Y. Pharmacokinetics of pegylated liposomal doxorubicin: review of animal and human studies [J]. Clin Pharmacokinet, 2003, 42: 419-436.
- [11] Cullis PR, Chonn A, Semple SC. Interactions of liposomes and lipid-based carrier systems with blood proteins: relation to clearance behaviour *in vivo* [J]. Adv Drug Deliv Rev, 1998, 32: 3-17.
- [12] Maruyama K, Ishida O, Takizawa T, et al. Possibility of active targeting to tumor tissues with liposomes [J]. Adv Drug Deliv Rev, 1999, 40: 89-102.
- [13] Klibanov AL, Maruyama K, Torchilin VP, et al. Amphiphatic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes [J]. FEBS Lett, 1990, 268: 235-237.
- [14] Gosk T, Vermehren C, Storm G, et al. Targeting anti-transferrin receptor antibody (OX26) and OX26-conjugated liposomes to brain capillary endothelial cells using *in situ* perfusion [J]. J Cerebral Blood Flow Metab, 2004, 24: 1193-1204.
- [15] Lasic DD, Ceh B, Stuart MC, et al. Transmembrane gradient driven phase transitions within vesicles: lessons for drug delivery [J]. Biochim Biophys Acta, 1995, 1239: 145-156.

《中国海洋药物》杂志 2010 年征订启事

《中国海洋药物》杂志是由中国科协主管、中国药学会主办、国内外公开发行的全国性科技核心期刊。

《中国海洋药物》杂志自 1982 年创刊以来,一直被国家科技部列入“中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)”,并被国外主要检索期刊“美国化学文摘(CA)、联合国水科学和渔业文摘(ASFA)”等收录。2001 年《中国海洋药物》杂志影响因子为 0.685,在全国 1372 种科技期刊中居药学类第 1 名,并由国内学术成果权威评价检索机构“中国科学文献计量评价中心”向杂志颁发了 3 种国家级火炬计划项目收录认定证书。同时还因认真、严格、准确执行《中国学术期刊(光盘版)检索与评价数据规范》而获 2001 年执行优秀奖。近几年来,杂志影响因子在全国药学类期刊中一直名列前茅。杂志以其专业性、权威性、信息性、资料性、导向性、准确性等特点深受国内外读者好评。

本刊设有研究报告、研究简报、综述、海药临床、海药鉴定、资源开发、海药养殖、水产品综合利用、海洋功能食品、新技术介绍、海药人物、科技园地等栏目,可为从事医药卫生、海洋、水产、营养、化学等方面的专业人员提供帮助和参考。

本刊为双月刊, A4 开本, 60 页, 每期定价 10 元, 全年 60.00 元, 国内邮发代号: 24-57; 国外代号: BM1277; 欢迎广大作者踊跃投稿, 欢迎广大读者通过当地邮局订阅。欢迎与中外制药企业合作, 宣传推广产品、刊登广告(包括处方药品广告)等。

编辑部地址: 青岛市延安三路 101 号

电 话: (0532) 88083130

电子信箱: zghyyw@growful.com

邮 编: 266071

传 真: (0532) 88083130

网 址: <http://www.chinainfo.gov.cn>

<http://www.growful.com>