

CD147慢病毒表达载体的构建及稳定转染 A549细胞系的建立

杨绍兴 汤传昊 王思涵 宋三泰 刘晓晴

【摘要】背景与目的 CD147是一类位于肿瘤细胞膜表面的跨膜糖蛋白，可促进肿瘤的浸润和转移。本研究拟构建CD147慢病毒表达载体，建立稳定过表达CD147的人肺腺癌A549细胞系，观察过表达CD147后对MMP-9及细胞增殖、侵袭能力的影响。方法 RT-PCR扩增CD147基因全长序列，将序列插入pEGFP载体，构建pEGFP-CD147慢病毒表达载体，随后转入293FT细胞中进行慢病毒包装，用获得的慢病毒液感染人肺腺癌细胞系A549，建立稳定过表达CD147的A549细胞系。Real-time PCR检测MMP-9的变化情况，CCK-8及Transwell法检测人肺腺癌细胞增殖、侵袭能力的变化。结果 经限制性内切酶鉴定及测序分析，成功构建了pEGFP-CD147慢病毒表达载体质粒。Real-time PCR和Western blot检测显示，与对照组相比，转染pEGFP-CD147慢病毒表达载体组的细胞，CD147的表达在mRNA和蛋白两个水平均增高，成功建立了A549-CD147细胞系。上调CD147的表达后，MMP-9的mRNA表达水平明显升高。同时，A549-CD147细胞增殖和侵袭能力明显增加（ $P<0.05$ ）。结论 成功构建CD147慢病毒表达载体和A549-CD147细胞系，过表达CD147可上调MMP-9的表达，增强人肺腺癌细胞的增殖和侵袭能力。

【关键词】 CD147；慢病毒载体；转染；增殖

【中图分类号】 R734.2

Construction of a CD147 Lentiviral Expression Vector and Establishment of Its Stably Transfected A549 Cell Line

Shaoxing YANG¹, Chuanhao TANG¹, Sihan WANG¹, Santai SONG², Xiaoqing LIU¹

¹Department of Pulmonary Oncology; ²Department of Breast Oncology, Affiliated Hospital of Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China

Corresponding author: Xiaoqing LIU, E-mail: liuxq@medmail.com.cn

【Abstract】 **Background and objective** CD147, a type of transmembrane glycoprotein embedded on the surface of tumor cells, can promote tumor invasion and metastasis. This aim of this study is to construct a CD147 lentiviral expression vector, establish its stably transfected A549 cell line, and observe the effect of CD147 on MMP-9 proliferation as well as on the invasive ability of human lung adenocarcinoma cells. **Methods** Full-length CD147 gene was amplified by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR), inserted into a pEGFP vector to construct pEGFP-CD147 and pEGFP vectors, and then transfected into 293FT cells to precede the lentivirus equipment package. Subsequently, we collected the lentivirus venom to infect the A549 cells and establish a stable, overexpressed cell line named A549-CD147. The mRNA expression of MMP-9 was examined by RT-PCR. The proliferation and invasive ability of the human lung cancer cells before and after transfection were examined by the CCK-8 and Transwell methods. **Results** A CD147 lentiviral expression vector (pEGFP-CD147) was successfully constructed by restrictive enzyme digestion and plasmid sequencing. RT-PCR and Western blot analyses revealed increased mRNA and protein expression of CD147 gene in cells transfected with pEGFP-CD147 compared with the control groups. Therefore, the A549-CD147 cell line was successfully established through the experiment. The mRNA expression of MMP-9 also significantly increased after the upregulation of CD147 expression. Meanwhile, CCK-8 and Transwell assays indicated that the proliferation and invasive ability significantly increased in the A549-CD147 cells. **Conclusion** A lentiviral CD147 expression vector and its A549 cell line (A549-CD147) were successfully constructed. CD147 overexpression upregulated the protein expression of MMP-9, and strengthened the proliferation and invasive ability of human lung adenocarcinoma cells.

【Key words】 CD147; Lentiviral expression vector; Transfection; Proliferation

本研究受首都医学发展基金项目（No.2007-3042）资助

作者单位：100071 北京，军事医学科学院附属医院肺部肿瘤科（杨绍兴，汤传昊，王思涵，刘晓晴）；乳腺肿瘤科（宋三泰）（通讯作者：刘晓晴，E-mail: liuxq@medmail.com.cn）

This study was supported by the grant from Medicine Developing Foundation of Capital (to Xiaoqing LIU)(No.2007-3042).

肺癌是发病率和病死率均居第一位的肿瘤，其中非小细胞肺癌占80%，按其病理分型依次递减为腺癌、鳞癌、大细胞肺癌等。腺癌易发生血行转移，近年的研究^[1]又发现其所占比例有所增长，成为女性和年轻患者中最为常见的一种类型，对肺腺癌细胞的生物学特性进行深入的研究有着非常重要的意义。CD147，又称基质金属蛋白酶诱导因子(EMMPRIN)，是一类位于肿瘤细胞膜表面的跨膜糖蛋白，属于免疫球蛋白超家族，能够刺激成纤维细胞产生大量基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)^[2]，可介导基底膜组成成分和细胞外基质大分子的重塑，促进肿瘤的浸润和转移，诱导肿瘤血管的生成^[3]。尽管CD147的功能和作用在其它类型肿瘤研究中已有报道，但在肺腺癌细胞生物学特性中还未见研究报道。本实验拟通过构建CD147的慢病毒表达载体，建立稳定表达CD147的人肺腺癌A549细胞系，检测上调表达CD147后MMP-9及人肺腺癌细胞增殖、侵袭能力的变化情况，为研究CD147在人肺腺癌生物学特性中的功能和作用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料 过表达慢病毒载体pEGFP购自Addgene公司，慢病毒包装质粒pLP1、pLP2、pLP/VSVG购自Invitrogen公司。pMD-T载体购自TaKaRa公司。SYBR Green real-time PCR mixture购自Qiagen公司。限制性内切酶、dNTP、Taq酶以及快速连接试剂盒均购自TaKaRa公司，引物合成及测序由上海英骏公司完成。CCK-8试剂盒购自DojinDo公司。转染试剂Lipofectamine 2000购自Invitrogen公司。慢病毒包装细胞293FT细胞购自Invitrogen公司。人肺腺癌细胞系A549由清华大学生命科学院肿瘤分子研究室惠赠。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 根据PubMed上CD147基因全长序列(NM_001728.3)，以及pEGFP载体的酶切位点，进行引物设计：CD147 sense, 5' GCTAGCATCATGGCGGCTGCGCTGTT 3'，CD147 antisense, 5' TCTAGAGGAAGAGTTCCCTCTG CGGGACGTT 3'。其中，分别在上游和下游的5'端加入了XbaI和NheI酶切位点。

1.2.2 RT-PCR扩增人CD147全基因序列 用Trizol试剂按照说明书方法提取A549细胞总mRNA，然后取1 μg反转录成cDNA，用上述引物进行PCR扩增CD147全长序列，扩

增条件如下：先94 °C预变性5 min，94 °C变性30 s，57 °C退火30 s，72 °C延伸90 s，共计30个循环反应，最后72 °C延伸4 min，4 °C保存。反应产物进行琼脂糖凝胶电泳，对所需片段进行凝胶回收，获得带有XbaI和NheI双酶切位点的CD147全基因组。

1.2.3 人CD147基因的慢病毒过表达载体的构建及鉴定 将获得的CD147全基因PCR克隆到pMD-T载体中，转化大肠杆菌，进行蓝白斑筛选，挑取阳性克隆后在液体LB中扩大化培养，提取质粒后进行PCR及酶切鉴定，鉴定正确后送去测序。将测序验证后的重组质粒和pEGFP载体分别用XbaI和NheI进行双酶切，回收所需要的基因及载体片段，用快速连接试剂盒进行连接反应，16 °C过夜连接后转化大肠杆菌，挑取阳性克隆后在液体LB中扩大化培养，提取质粒后进行PCR及酶切鉴定，鉴定正确后送去测序。将鉴定正确的CD147过表达载体命名为pEGFP-CD147。

1.2.4 慢病毒的包装 慢病毒包装细胞293FT培养条件为添加10%FBS的H-DMEM，取5 μg pEGFP-CD147质粒及对照质粒pEGFP与包装质粒4.2 μg pLP1、2 μg pLP2和包膜质粒2.8 μg pLP/VSVG质粒在无血清培养基中与42 μL Lipofectamine 2000混合，室温孵育20 min，形成DNA-Lipofectamine 2000复合物后，转染293FT细胞，6 h后更换为含有1 mmol/L丙酮酸钠的培养基，48 h后收集培养基上清，用0.45 μM滤器过滤后，超速离心浓缩病毒，分装后-80 °C保存。

1.2.5 过表达CD147的A549细胞系的建立 人肺腺癌细胞系A549培养条件为添加10%FBS的H-DMEM，当A549细胞生长至60%密度时，吸去培养皿中的培养基，加入pEGFP-CD147和pEGFP慢病毒毒液，同时加入Polybrene，使其终浓度为8 mg/L，置37 °C、5%CO₂的孵箱中培养过夜。第2天，去除培养基，添加完全培养液，待细胞密度生长至80%-90%时，按1:3传代。流式细胞术分选表达绿色荧光蛋白的细胞。分别命名为A549-CD147、A549-pEGFP。

1.2.6 细胞总mRNA的提取、逆转录反应及实时定量PCR检验干涉效率 用Trizol试剂溶解细胞，然后按照说明书方法提取细胞总mRNA，然后取1 μg反转录成cDNA，用SYBR GREEN mixture做染料，用iQ™5多重实时荧光定量PCR仪进行实时定量PCR检测CD147的过表达效率，用GAPDH做内参，所用引物序列为：5'-CD147 sense, GCTAGCATC ATGGCGGCTGCGCTGTT-3'，5'-CD147 antisense, 5'-TC

TAGAGGAAGAGTTCCCTGGCGGACGTT-3'; GAPDH sense, 5'-GAGTCAACGGATTTGGTCGT-3', GAPDH antisense, 5'-TTGATTTGGAGGGATCTCG-3'; MMP-9正义链: 5'-TGACAGCGACAAGAAGT-3', MMP9反义链: 5'-CAGTGAAGCGGTACATAGG-3'。

1.2.7 Western blot 用RIPA溶解细胞后提取细胞蛋白, 各取200 μg进行SDS-PAGE, 电泳后用电转仪进行转膜, 5%脱脂奶粉室温封闭1 h后加入mouse anti-CD147抗体(1:300), 4 °C过夜, TBST洗涤3次, 每次10 min, 加入HRP偶联山羊抗小鼠二抗(1:1,000), 室温孵育1 h, TBST洗涤3次, 每次15 min, ECL显影。同时以β-actin为内参照。

1.2.8 CCK-8法检测细胞增殖能力 将A549细胞、A549-pEGFP、A549-CD147按照每孔 1×10^4 /200 μL的密度接种于96孔板中继续培养, 每组设置4个复孔, 分别选取24 h、48 h、72 h三个时间节点进行检测。检测前换液1次, 每孔加100 μL培养基和10 μL CCK-8, 细胞放入37 °C、5%CO₂培养箱中培养2 h, 使用酶联仪在450 nm波长检测光密度值。实验重复3次, 取其平均值。

1.2.9 细胞侵袭能力检测 使用Transwell(Corning Inc., USA)检测转染CD147组及对照组细胞的侵袭能力变化。首先, 将Matrigel置于4 °C过夜使其融化, 用预冷的无血清1640以1:3稀释Matrigel, 每个上室加入稀释后的Matrigel 100 μL, 室温2 h使其凝固。然后于转染后24 h, 收集A549-CD147、A549-pEGFP和A549细胞, 用无血清1640液重悬细胞, 细胞记数并调整细胞浓度为 5×10^5 个/mL。每个上室中加入100 μL细胞悬液, 下室加入含10%小牛血清的1640培养液, 每种细胞做3孔。继续培养48 h后, 取出滤膜, 甲醇固定,

常规HE染色。显微镜下计数迁移至滤膜外表面的细胞数, 每张滤膜随机计数10个视野($\times 200$), 取平均值, 实验重复3次。

1.3 统计学分析 使用SASS 9.1统计学软件进行数据处理, 单组间的比较, 采用t检验。多组间采用具有一个重复测量的两因素设计定量资料的方差分析, P<0.05为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 pEGFP-CD147慢病毒表达载体的构建及鉴定 利用特异性引物扩增出了大小约为1,150 bp的目的基因条带, 与预期的大小片段一致(图1A)。将测序验证正确的pMD-T-CD147进行双酶切, 回收目的片段, 并连接至pEGFP表达载体中, 构建重组质粒pEGFP-CD147。提取质粒后进行XbaI和NheI双酶切, 结果显示, 酶切后呈现两条条带, 与CD147目的基因片段和pEGFP载体片段的大小一致(图1B), 对质粒进行PCR, 琼脂糖凝胶电泳后出现了与CD147大小一致的片段(图1C), 将酶切及PCR鉴定正确的质粒送去测序。测序的结果与预期的CD147基因序列完全相同。将鉴定正确的CD147过表达载体命名为pEGFP-CD147。

2.2 pEGFP-CD147慢病毒表达载体的包装和转染人肺腺癌A549细胞系 分别将pEGFP-CD147慢病毒表达载体和pEGFP空载体, 与包装质粒pLP1、pLP2及包膜质粒pLP/VSVG、Lipofectamine 2000共转染293FT细胞, 48 h后荧光显微镜下发现大部分细胞呈绿色荧光表达(图2A)。收集病毒并去除漂浮细胞和细胞碎片, 浓缩后分别感染A549

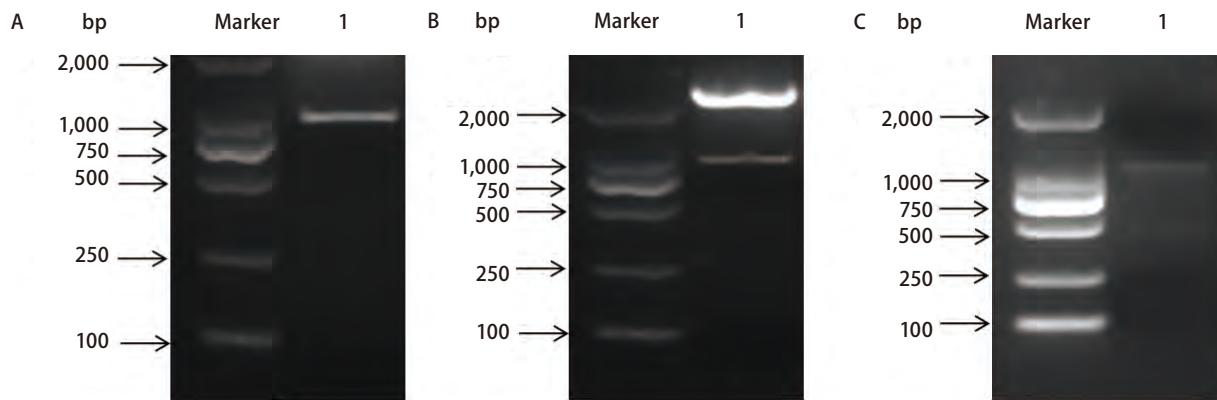


图1 CD147慢病毒表达载体的构建及鉴定

Fig 1 Construction and identification of CD147 lentiviral expression vector. A: Human CD147 whole genome obtained; 1: Human CD147 gene. B: Restriction map analysis of CD147 lentiviral expression vector; 1: pEGFP vector and CD147 gene; C: Identification of CD147 lentiviral expression vector by RT-PCR; 1: CD147 gene.

细胞, 48 h后荧光显微镜下均见到部分A549细胞发绿色荧光, 说明pEGFP-CD147及pEGFP成功转入A549细胞中(图2B)。连续将细胞培养1个月, 分别提取感染pEGFP-CD147慢病毒表达载体的细胞和pEGFP-CD147空载体的细胞的总RNA。半定量RT-PCR分析表明, 转染pEGFP-CD147慢病毒表达载体后的细胞, CD147的mRNA表达水平明显增高(图2C), 进一步的实时荧光定量PCR结果表明, 对比转染pEGFP空载体组, 转染pEGFP-CD147慢病毒表达载体后的细胞的CD147表达水平增加了2.5倍(图2D)。说明所构建的载体在A549细胞中表达。

2.3 A549-CD147细胞系的建立 选取转染pEGFP-CD147慢病毒表达载体的A549细胞和转染pEGFP空载体的A549细胞进行流式细胞术分选(图3A), 分选后经扩增培养1个月, 荧光显微镜下可见满视野的绿色荧光标记的细胞(图3B)。两组细胞的real-time PCR分析显示, 转染pEGFP-CD147组细胞的CD147的mRNA表达水平比转染pEGFP空载体组高17.32倍(图3C), Western blot结果表明, 与对照组相比, pEGFP-CD147组细胞的CD147蛋白表达水平明显升高(图3D), 表明我们已经成功建立了稳定过表达CD147的人肺腺癌A549细胞系, 命名为A549-CD147。

2.4 过表达CD147对MMP-9及人肺癌细胞增殖、侵袭能力的影响 Real-time PCR结果显示转染CD147基因后, A549-CD147细胞中MMP-9 mRNA的表达明显增加($P<0.001$)。CCK-8法检测结果表明, 转染后的第1天, 3种细胞的增殖率没有明显差别, 而第2、3天, 与对照组相比, A549-CD147细胞的增殖能力明显增强。A549-pEGFP细胞与A549细胞的增殖能力对比未见统计学差异($P<0.001$)(图4)。Transwell结果显示, 穿透Matrigel到达滤膜的A549-CD147细胞数明显多于A549-pEGFP和A549细胞($P<0.001$)。

3 讨论

在包括对卵巢、肺、前列腺、胰腺、乳腺等恶性肿瘤的研究中发现, MMPS的活性程度与肿瘤的侵袭转移潜能关系密切。而肿瘤细胞表面高表达的CD147使得MMPS表达数量及活性增加, 从而降解基底膜的主要成分, 破坏天然组织的机械屏障, 促进肿瘤的浸润和转移^[4]。CD147是一个在多种生理和病理过程中发挥重要作用的关键分子, 但大家关注的重点还是其在肿瘤生长和发展中的功能和作用。Zheng等^[5]发现上调CD147的表达可促进胃癌细胞

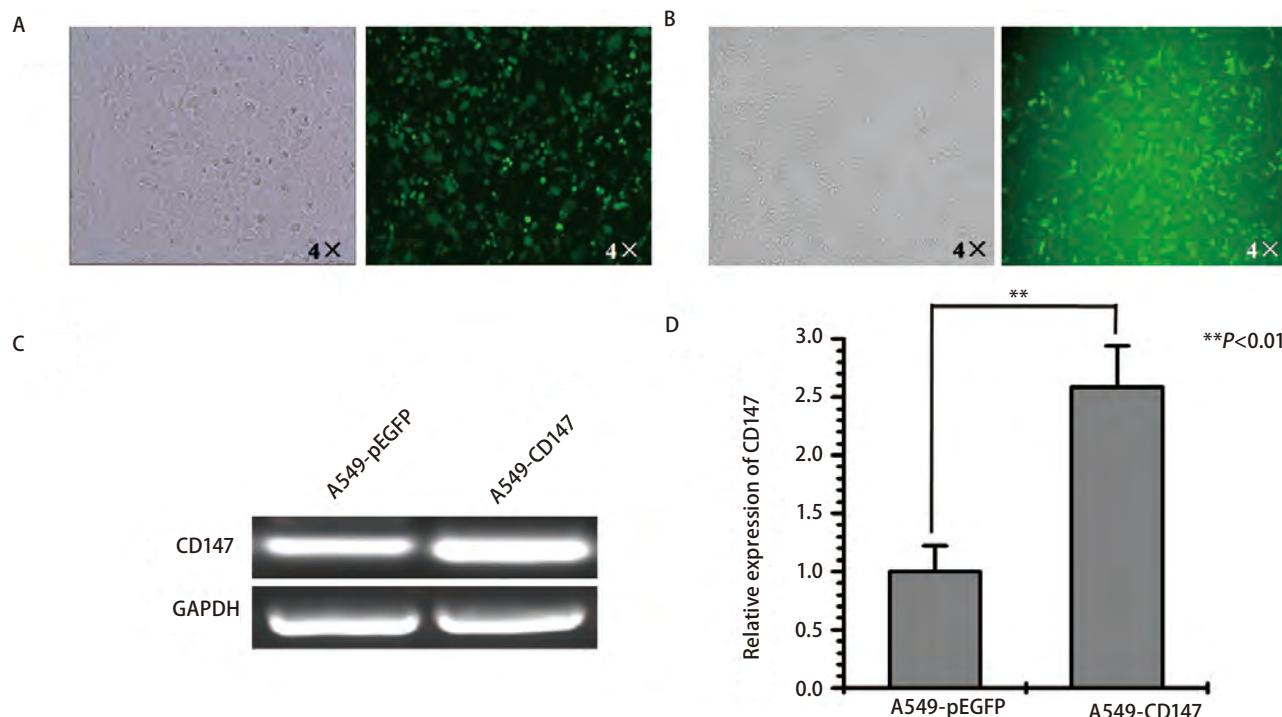


图2 pEGFP-CD147慢病毒的包装和感染人肺腺癌A549细胞系

Fig 2 pEGFP-CD147 lentiviral packaging and infection of human lung adenocarcinoma cell line A549. A: pEGFP-CD147 lentiviral expression vector was transfected in 293FT cells; B: pEGFP-CD147 lentiviral vector infected A549 cells; C: Detection of CD147 mRNA expression levels in the respective cells by RT-PCR; D: Detection of CD147 mRNA expression levels in the respective cells by real-time PCR.

的生长和血管的生成。Wang等^[6]在体外实验研究中发现,CD147的表达与胃癌SGC7901细胞的增殖速度密切相关。Bougatef等^[7]发现CD147的表达可促进恶性黑色素细胞瘤细胞的浸润、转移。Hao等^[8]已证实CD147的表达可能是前列腺癌细胞耐药的一个关键因素。为探讨CD147在肺腺癌细胞生物学特性中的功能和作用,我们首先构建了CD147慢病毒表达载体和稳定表达CD147的人肺腺癌A549细胞系。

对比其它研究应用的普通质粒载体的方法,我们所构建的慢病毒载体具有获得病毒周期短,滴度高,可以感染分裂、非分裂细胞,能将外源基因高效导入宿主细胞,从而在细胞中稳定长期表达siRNA、cDNA或报告基因,且不会产生化学转染或腺病毒转染引起的细胞损伤及免疫反应。慢病毒实验系统被广泛应用于各类基因治疗的实

验研究中^[9,10]。为实现CD147基因在人肺腺癌A549细胞中的高效、稳定表达,我们首先成功构建了pEGFP-CD147重组表达质粒,随后进行293FT细胞包装慢病毒。因我们采用的慢病毒载体上表达GFP,慢病毒毒液感染A549细胞后,经荧光显微镜观察可以见到部分细胞中有GFP表达,表明A549细胞已经有效地被慢病毒感染。感染后的细胞经过流式细胞术分选,培养扩增1个月后,细胞荧光显示镜下可见到满视野的绿色荧光标记的细胞。Real-time PCR结果显示,与对照组相比,pEGFP-CD147组CD147的表达水平上调17.29倍,Western blot检测结果也显示,pEGFP-CD147组的CD147的表达在蛋白水平也明显增加。说明我们已经成功建立了过表达CD147的人肺腺癌A549细胞系,命名为A549-CD147。我们随后对CD147靶产物MMPS家族的MMP-9的表达水平进行了real-time PCR检测,发现过表

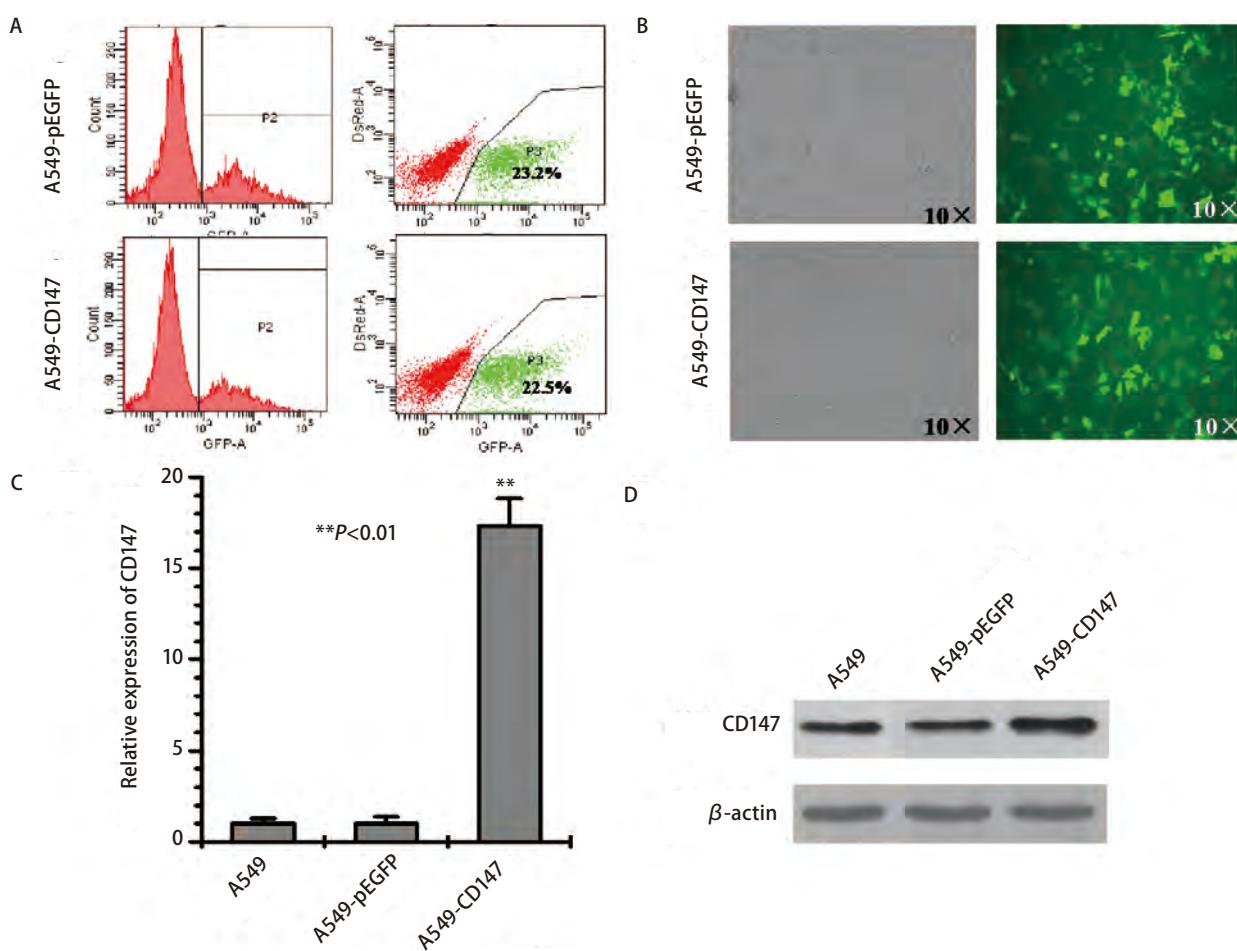


图3 A549-CD147细胞系的建立

Fig 3 Established the A549-CD147 cell line. A: The A549 cells transfected with p-EGFP lentiviral expression vector and p-EGFP empty vector were sorted by flow cytometry respectively; B: The A549-pEGFP cells and A549-CD147 cells after sorted by flow cytometry; C: Detection of CD147 mRNA expression levels in the respective cells by real-time PCR; D: Detection of CD147 in protein level by Western blot in cells.

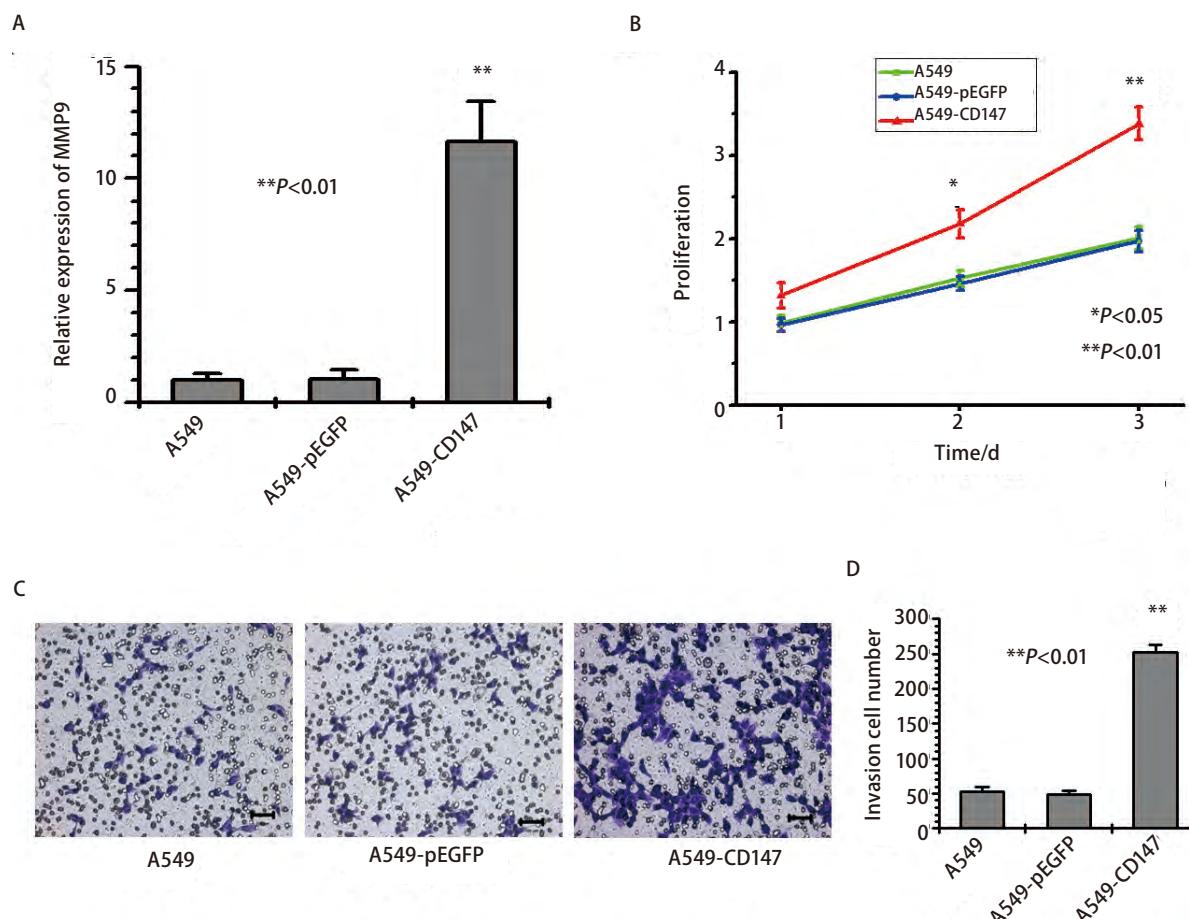


图4 过表达CD147对MMP-9及人肺癌细胞增殖、侵袭能力的影响

Fig 4 Effects on MMP-9, proliferation and invasive ability of the human lung adenocarcinoma cells after overexpression CD147. A: The relative expression rate of MMP-9 mRNA was significantly enhanced in A549-CD147 cells than that in A549 and A549-pEGFP cells; B: The growth curves indicated that the growth rates had not significant difference among A549-CD147, A549-pEGFP and A549 cells in the first day after transfection, but in the second day ($P<0.05$) and the third day ($P<0.01$), the growth rate was significantly higher in A549-CD147 cells than that in A549-pEGFP and A549 cells; C: Representative microscope field of filters under the Matrigel from A549-CD147, A549-pEGFP and A549 cells respectively ($\times 100$); D: The Histogram showed that the number of invasive cell was significantly more in A549-CD147 cells than that in A549-pEGFP and A549 cells ($P<0.01$).

达CD147可上调MMP-9的表达。CCK-8和Transwell法证实A549-CD147细胞的增殖和侵袭能力明显增强。根据上述研究所显示CD147具有的功能特性，推测其有可能是一个潜在的治疗靶点，这也是我们后续研究关注的重点。

综上所述，我们成功构建了CD147慢病毒表达载体，建立了稳定上调表达CD147的A549-CD147细胞系，并对其在促进细胞增殖和侵袭方面进行了初步的研究。我们将利用成功构建载体和细胞系进一步研究CD147在人肺腺癌生物学特性中的功能和作用。

参考文献

1 Kadara H, Kabbout M, Wistuba L. Pulmonary adenocarcinoma: a re-

newed entity in 2011. *Respirology*, 2012, 17(1): 50-55.

- 2 Biswas C, Zhang Y, Decastro R, et al. The human tumor cell-derived collagenase stimulatory factor (Renamed EMMPRIN) is a member of the immunoglobulin superfamily. *Cancer Res*, 1995, 55(2): 434-439.
- 3 Kanekura T, Chen X, Kanzaki T. Basig (CD147) is expressed on melanoma cells and induces tumor cell invasion by stimulating production of matrix metalloproteinases by fibroblasts. *Int J Cancer*, 2002, 99(4): 520-528.
- 4 Kanekura T, Chen X. CD147 promotes progression of malignant melanoma and other cancers. *J Dermatol Sci*, 2010, 57(3): 149-154.
- 5 Zheng HC, Takahashi H, Murai Y. Up-regulated EMMPRIN/CD147 might contribute to growth and angiogenesis of gastric carcinoma: a good marker for local invasion and prognosis. *Br J Cancer*, 2006, 95(10): 1371-1378.

- 6 Wang B, Xu YF, He BS, et al. RNAi-mediated silencing of CD147 inhibits tumor cell proliferation, invasion and increase chemosensitivity to cisplatin in SGC7901 cells *in vitro*. Clin Cancer Res, 2010, 29(1): 61-69.
- 7 Bougatéf F, Menashi S, Khayati F, et al. EMMPRIN promotes melanoma cells malignant properties through a HIF-2alpha mediated up-regulation of VEGF-receptor-2. PLoS One, 2010, 5(8): e12265.
- 8 Hao J, Chen H, Madigan MC, et al. Co-expression of CD147 (EMMPRIN), CD44v3-10, MDR1 and monocarboxylate transporters is associated with prostate cancer drug resistance and progression. Br J Cancer, 2010, 103(7): 1008-1018.
- 9 Naldini L, Blomer U, Gage FH, et al. Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brain injected with a lentiviral vector. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(21): 11382-11388.
- 10 McMahon JM, Conroy S, Lyons M, et al. Gene transfer into rat mesenchymal stem cells: a comparative study of viral and nonviral vectors. Stem Cell Dev, 2006, 15(1): 87-96.

(收稿: 2012-09-07 修回: 2012-10-29)

(本文编辑 丁燕)

• 消息 •

《中国肺癌杂志》荣获“中国高校优秀科技期刊奖”

2012年11月, 教育部科技司公布了“第四届中国高校精品·优秀·特色科技期刊”评比活动的结果, 《中国肺癌杂志》喜获“中国高校优秀科技期刊奖”。

该评比活动是在教育部科技司的领导下, 由中国高校科技期刊研究会主持, 根据期刊的功能和特点制订一系列指标, 对高校科技期刊在科研活动和文献交流中所起的作用及其质量做出客观、全面的评价, 以明确改进的方向。

这是《中国肺癌杂志》继2010年7月被Medline/PubMed收录、入选《中文核心期刊要目总览》(2011年版)以来获得的又一荣誉, 表明本刊在期刊声誉、学术质量等方面已跻身我国高影响期刊之列。

在今后的工作中, 《中国肺癌杂志》编辑部将秉承服务肺癌工作者的办刊宗旨, 坚持高水平、高质量、高品位的办刊理念, 为推动我国肺癌防治工作的发展做出新的贡献。

《中国肺癌杂志》编辑部
2012年11月



中国肺癌杂志
www.lungca.org