

· 论 著 ·

## 泛素-结核抗原融合基因 DNA 疫苗诱导小鼠较强的细胞免疫应答

王庆敏<sup>2</sup>, 殷明<sup>2</sup>, 章建程<sup>2</sup>, 胡家庆<sup>2</sup>, 何颖<sup>1</sup>, 孙树汉<sup>1\*</sup>

(1. 第二军医大学基础部医学遗传学教研室, 上海 200433; 2. 上海海军医学研究所舰艇卫生研究室, 上海 200433)

**[摘要]** **目的:** 构建结核杆菌 ESAT6 抗原 DNA 疫苗(pE)和泛素基因与 ESAT6 抗原基因融合的 DNA 疫苗(pUE)。**方法:** 分别将构建的 DNA 疫苗肌内注射免疫 BALB/c 雌性小鼠, 检测小鼠的血清抗体(IgG、IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2a</sub>)、细胞因子(IFN- $\gamma$ 、IL-4)和细胞毒性 T 淋巴细胞反应(CTL), 比较融合基因 DNA 疫苗和单基因 DNA 疫苗诱导免疫应答的强度。**结果:** pE 组小鼠血清 IgG 水平高于 pUE 组( $P < 0.01$ ), 但 IgG<sub>2a</sub>/IgG<sub>1</sub> 比值低于 pUE 组( $[2.28 \pm 0.40]$  vs  $[3.87 \pm 0.60]$ ,  $P < 0.05$ )。与 pE 组相比, pUE 组小鼠 IFN- $\gamma$  分泌水平增高( $P < 0.01$ ), IL-4 分泌水平下降( $P < 0.01$ ); pUE 增强了 CTL 活性。提示融合基因 DNA 疫苗诱导的抗原特异的体液免疫应答不及单基因 DNA 疫苗, 但其能诱导更强的细胞免疫应答。**结论:** 泛素-ESAT6 融合基因 DNA 疫苗对于防治结核病可能比单基因 DNA 疫苗更为有效。

**[关键词]** 分枝杆菌, 结核; 疫苗, DNA; 泛素; 免疫应答

**[中图分类号]** R 378.911 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)03-0261-05

### Ubiquitin and ESAT6 antigen fusion gene DNA vaccine induced stronger cellular immune response in mice

WANG Qing-min<sup>2</sup>, YIN Ming<sup>2</sup>, ZHANG Jian-cheng<sup>2</sup>, HU Jia-qing<sup>2</sup>, HE Ying<sup>1</sup>, SUN Shu-han<sup>1\*</sup> (1. Department of Medical Genetics, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Warship Health Division, Institute of Navy Medicine Research, Shanghai 200433)

**[ABSTRACT]** **Objective:** To construct Mycobacterium tuberculosis ESAT6 (pE) antigen DNA vaccine and ubiquitin-ESAT6 fusion gene (pUE) DNA vaccine. **Methods:** The constructed DNA vaccines were intramuscularly inoculated into female BALB/c mice separately. The serum antibodies (including IgG, IgG<sub>1</sub>, and IgG<sub>2a</sub>), Cytokines (IFN- $\gamma$  and IL-4), and cytotoxic T lymphocytes response were detected in the immunized mice. **Results:** Mice in pE group had a higher serum level of IgG ( $P < 0.01$ ) and a lower value of IgG<sub>2a</sub>/IgG<sub>1</sub> ( $[2.28 \pm 0.40]$  vs  $[3.87 \pm 0.60]$ ,  $P < 0.05$ ) than mice in pUE group. Besides, mice in pUE group secreted more IFN- $\gamma$  than those in pE group ( $P < 0.01$ ), but secreted less IL-4 ( $P < 0.01$ ). Furthermore, pUE enhanced the activity of CTL. The results showed that pUE DNA vaccine induced weaker humoral immune response, but stronger cellular immune responses compared to pE DNA vaccine. **Conclusion:** The pUE DNA vaccine constructed in this study sheds new lights on the prophylactic and therapy of tuberculosis.

**[KEY WORDS]** *Mycobacterium tuberculosis*; vaccines, DNA; ubiquitin; immune response

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(3): 261-265]

结核病是结核分支杆菌引起的一种传染病。近年来随着人口流动增加、人类免疫缺陷病毒(HIV)与结核杆菌伴发感染以及结核杆菌多重耐药性菌株的出现,全球结核病的发病率有抬头趋势。目前,全球每年约 900 万人患结核病,约 200 万人死于该病;据估计,约 1/3 全球人口感染结核杆菌,但只有 10% 的人 would 发病。如此庞大的感染群给结核病的诊断、防治提出了新的挑战。传统的卡介苗(BCG)免疫效果极其不稳定,不同地区的人群接种 BCG 后免疫保护效果差异很大(从 0%~80% 不等)<sup>[1-2]</sup>,因此发展新型疫苗势在必行。

核酸疫苗是 20 世纪 90 年代兴起的新一代疫苗,由于它具备多种优点而在多种感染性疾病和肿瘤的防治中显示出巨大的优势。但就目前的研究报

道表明,单一结核抗原 DNA 疫苗虽然使实验动物获得了一定的保护率,但保护效果并不是非常理想<sup>[3-4]</sup>。因此有必要选用一些策略来调节结核 DNA 疫苗诱导的免疫应答,其中根据保护性免疫的特点来选用一些小分子与抗原融合是常用的策略之一。本研究就是针对结核保护性免疫主要依赖于细胞免疫的特点,将泛素分子与 ESAT6 抗原基因融合,从而来调节单一抗原基因 DNA 疫苗诱导的免疫应答。泛素系统是细胞内重要的蛋白质降解途径之

**[基金项目]** 国家自然科学基金重点项目(30530660)。Supported by Key Program of National Natural Science Foundation of China (30530660)。

**[作者简介]** 王庆敏,博士,助理研究员。

\* Corresponding author. E-mail: shsun888@yahoo.com

一,将泛素与蛋白连接可增强蛋白在蛋白酶体中的降解、呈递<sup>[5-6]</sup>,最终可以改变抗原诱导的免疫应答。

## 1 材料和方法

1.1 菌/细胞株、质粒和实验动物来源 结核分支杆菌由河北省胸科医院确诊患者标本中分离获取<sup>[7]</sup>;P815细胞株购于中国科学院上海细胞学研究所;DH5 $\alpha$ 菌、pcDNA3质粒为Invitrogen公司产品。6~8周龄BALB/c小鼠购于第二军医大学实验动物中心。

1.2 血清和试剂 结核病患者血清由河北省胸科医院提供。限制性内切酶、连接酶均为TaKaRa公司产品;IFN- $\gamma$ 、IL-4细胞因子检测试剂盒为晶美公司产品,脂质体(DOSPER Liposomal Transfection Reagent,货号18811169)、CTL检测试剂盒为Roche公司产品;HRP-山羊抗小鼠IgG、IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2a</sub>均购自SBA公司,小鼠重组IL-2为Biosource公司产品;HRP-山羊抗人IgG及其他免疫试剂均购于上海华美生物工程有限公司。

### 1.3 ESAT6抗原重组表达质粒的构建

1.3.1 ESAT6 DNA疫苗的构建 根据H37Rv基因组的核苷酸序列设计引物,上游引物:5'-gcg caa gct tgc cac cat gac aga gca gca gtg gaa ttt cg-3';下游引物:5'-gct cta gac tat gcg aac atc cca gtg acg ttg-3'。两条引物中分别引入HindIII和XbaI酶切位点,上游引物中加入Kozak序列。以结核杆菌基因组<sup>[6]</sup>为模板,扩增ESAT6基因,然后将PCR产物插入到pcDNA3载体的HindIII和XbaI酶切位点之间得到重组质粒pE。

1.3.2 泛素-ESAT6融合基因DNA疫苗的构建 合成泛素(UbR)基因的引物,上游引物5'-gcg caa gct tgc cac cat gca gat ctt cgt gaa gac cct gac cg-3',下游引物5'-gcg gat ccg ccg cca cca cgg cca cct ctc agg cga agg acc ag-3';上下游引物中分别引入HindIII和BamHI酶切位点;合成ESAT6基因引物,上游引物5'-cgg gat ccg gtg gcg gtt ctg gtt gcg gtt cta cag agc agc agt gga att tcg ccg-3',下游引物5'-gct cta gac tat gcg aac atc cca gtg acg ttg-3';上下游引物中分别引入BamHI和XbaI酶切位点,融合基因之间加入了柔性接头序列(GGGGS)<sub>3</sub>,上游引物去除了起始密码子。将泛素

分子基因和ESAT6基因分别从小鼠睾丸组织总RNA和pE质粒中扩增出后,将这两种PCR产物插入到pcDNA3载体的HindIII和XbaI酶切位点之间得到重组质粒pUE。

上述所有PCR扩增的基因均于上海基康公司进行DNA测序。

### 1.4 稳定表达ESAT6抗原的P815细胞株的建立

将pE和pcDNA3质粒用脂质体进行转染,转染中所用重组质粒为5 $\mu$ g,脂质体为15 $\mu$ l,具体转染方法参见罗氏公司说明书。分别用ELISA和免疫组化的方法筛选<sup>[8]</sup>,所用一抗为结核病患者血清,二抗为HRP-山羊抗人IgG。

1.5 DNA免疫接种 碱裂解法大量制备质粒pcDNA3、pE、pUE、TritonX-100去除内毒素,溶于PBS中并调浓度为1 $\mu$ g/ $\mu$ l。将雌性的6~8周龄的BALB/c小鼠,共36只,随机分为3组,分别为空载体组、pE组、pUE组。质粒免疫时首先分别向双侧股四头肌注射25%的蔗糖50 $\mu$ l,15min后再注射质粒DNA100 $\mu$ g,每条腿50 $\mu$ g,共免疫3次,注射间隔为2周。其中一半小鼠用于检测体液免疫,另一半用于检测细胞免疫。

### 1.6 免疫应答的检测

1.6.1 ELISA检测血清中的抗体水平 在首次注射后0、2、4、6、8、10周经眶后静脉取血,分离血清保存于-20 $^{\circ}$ C,进行间接ELISA检测血清中IgG、IgG<sub>2a</sub>和IgG<sub>1</sub>水平,并计算IgG<sub>2a</sub>/IgG<sub>1</sub>比值。小鼠血清从1:50开始倍比稀释,所用二抗的效价分别为1:8000,以TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>显色,以P/N值 $\geq$ 2.1确定为阳性。

1.6.2 细胞因子水平检测 末次免疫4周后,将小鼠拉颈处死,无菌取脾脏,用淋巴细胞分离液分离(淋巴细胞分离液:脾细胞悬液=3:1),2000r/mim离心10min,吸取淋巴细胞层,加入RPMI1640洗2遍(1000r/min离心5min),在37 $^{\circ}$ C,5%CO<sub>2</sub>的条件下培养2h,去除贴壁细胞(巨噬细胞),吸取非贴壁细胞,计数淋巴细胞数并调整至5 $\times$ 10<sup>6</sup>/ml。将5 $\times$ 10<sup>6</sup>/ml的脾淋巴细胞悬液1ml加入到24孔细胞培养板中,加入终浓度为5 $\mu$ g/ml的抗原蛋白,在37 $^{\circ}$ C,5%CO<sub>2</sub>的饱和水气的CO<sub>2</sub>的培养箱培养72h,1000r/min离心10min后收集上清,以0.22 $\mu$ m的微孔滤膜过滤,-80 $^{\circ}$ C中保存待用。

用细胞因子试剂盒检测收获上清中的IFN- $\gamma$ 及IL-4的水平。具体步骤参照厂家试剂盒说明书。

1.6.3 免疫小鼠脾细胞分泌 IFN- $\gamma$  的细胞数的检测 采用 ELISPOT 试剂盒,具体步骤参见说明书。

1.6.4 小鼠细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)活性的检测 吸取分离的脾淋巴细胞悬液  $1 \times 10^7$ /ml 1 ml 于 6 孔板中,加入以转染目的基因的 P815 细胞 1 ml ( $10^5$ /ml)以 20  $\mu$ l 的比例混合,预刺激 5 d,其中还加入 20 U/ml 的小鼠重组 IL-2,10  $\mu$ g/ml 的 ConA,总体积为 5 ml。转染 ESAT6 基因的 P815 细胞要经过浓度为 50  $\mu$ g/ml 的丝裂霉素 C 预处理 1 h,洗涤 3 次后才与脾细胞共孵育。共孵育 2.5 d 后,换液,用 20 U/ml 的小鼠重组 IL-2 再刺激 2.5 d。

将刺激后的脾细胞和靶细胞分别用检测培养基 (assay medium, AM, 含 1% 小牛血清的培养基) 洗涤 3 次,均以 AM 重悬,然后将效应细胞和靶细胞按不同的比例将效靶细胞加入到 96 孔培养板中,效、靶细胞各 100  $\mu$ l,均设 3 复孔,同时设靶细胞最大释放量 (100  $\mu$ l 靶细胞 + 100  $\mu$ l AM, 2% TritonX-

100)、自发释放量 (100  $\mu$ l 靶细胞 + 100  $\mu$ l AM)、自然背底 (200  $\mu$ l AM)、效应细胞释放量。250 $\times$ g 离心 5 min,于 37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub> 的饱和水汽的 CO<sub>2</sub> 的培养箱培养 4 h,250 $\times$ g 离心 5 min,,吸取 100  $\mu$ l 上清至另一 96 孔板中,加入检测 LDH 含量的反应液,18~25 $^{\circ}$ C 避光 30 min,测 492 nm 波长的 D 值,按公式计算 CTL 对靶细胞的杀伤活性:(效应细胞对靶细胞的杀伤活性 - 自发释放量)/(最大释放量 - 自发释放量) $\times$ 100%。

1.7 统计学处理 数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SAS 统计软件,各组间均数采用方差分析,采用 *t* 检验,  $P < 0.05$  为有统计学差异。

## 2 结果

2.1 pE 和 pUE 重组质粒的构建 筛选出来的 pE 和 pUE 重组子经相应的酶切鉴定表明是正确的(图 1A、1B),DNA 测序证明所有扩增的片段与 GenBank 中登录的完全一致。

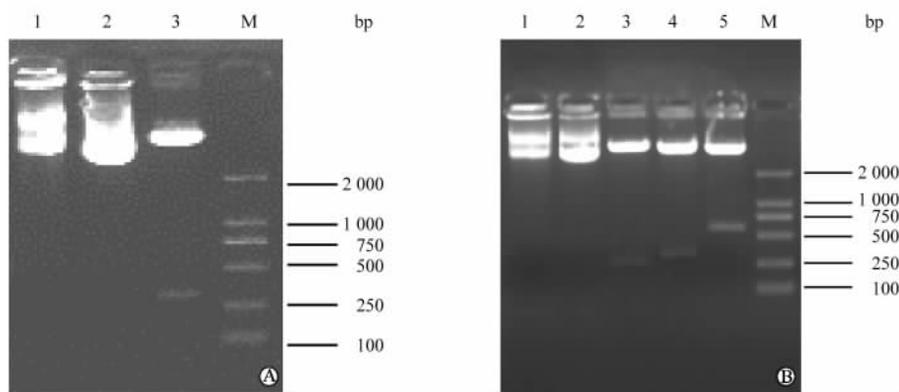


图 1 重组质粒 pE(A)和 pUE(B)的酶切鉴定

Fig 1 Recombinant plasmids pE and pUE digested by endonuclease enzymes

A: 1: pcDNA3 plasmid; 2: pE recombinant plasmid; 3: pE digested by *Hind*III/*Xba*I; M: DL2000 marker; B: 1: pcDNA3 plasmid; 2: pUE recombinant plasmid; 3-5: pUE digested by *Hind*III/*Bam*H I, *Bam*H I / *Xba*I and *Hind*III/*Xba*I; M: DL2000 marker

2.2 免疫小鼠血清中抗体水平的检测 结果显示 pE DNA 疫苗诱发了特异的 IgG,空载体组均没有检测到特异的抗体。泛素与抗原融合组的抗体水平均比不加泛素组的 IgG 抗体水平明显降低 ( $P < 0.01$ ,图 2A)。IgG<sub>2a</sub>/IgG<sub>1</sub> 的比值检测表明,泛素融合组的 IgG<sub>2a</sub>/IgG<sub>1</sub> 的比值 ( $3.87 \pm 0.60$ ) 比非泛素融合组 ( $2.28 \pm 0.40$ ) 高 ( $P < 0.05$ ,图 2B)。这表明泛素融合的 DNA 疫苗可诱导更强的 Th<sub>1</sub> 型免疫应答。

2.3 免疫小鼠脾细胞分泌的细胞因子的检测 结

果如图 3 所示泛素融合组与非泛素组相比,明显增高了 IFN- $\gamma$  的分泌水平 ( $P < 0.01$ ),降低了 IL-4 的分泌水平 ( $P < 0.01$ )。本研究还进一步用 ELISPOT 的方法对  $2 \times 10^5$  个脾细胞中分泌 IFN- $\gamma$  的细胞进行了计数,结果表明,与 pE 组 ( $47 \pm 7$ ) 相比, pUE 组 ( $79 \pm 11$ ) 分泌 IFN- $\gamma$  的细胞数增多了 ( $P < 0.05$ )。

2.4 泛素分子对抗原特异的 CTL 活性的调节 鉴定及获得稳定转染 ESAT6 基因的 P815 细胞,用稳定转染 ESAT6 基因的 P815 细胞作为靶细胞进行

CTL 活性检测。来源于 ESAT6 DNA 疫苗组的脾细胞可以对相应的靶细胞产生杀伤活性,与 pcDNA3 空载体相比有显著差异 ( $P < 0.01$ ); 与非融合组相比,泛素融合疫苗增强了脾细胞对抗原特异的靶细胞的杀伤活性 ( $P < 0.05$ ) (图 4), 自然释放率小于 10%。

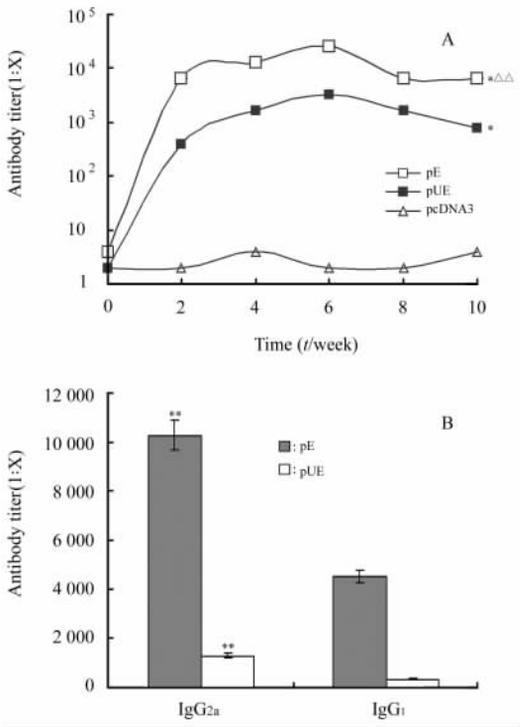


图 2 免疫小鼠血清中的 IgG (A)、IgG<sub>2a</sub> 与 IgG<sub>1</sub> (B) 抗体效价

Fig 2 Specific IgG (A), IgG<sub>2a</sub> and IgG<sub>1</sub> (B) titers in mouse sera after DNA vaccine immunization

△△  $P < 0.01$  vs pcDNA3 group; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs pUE group;  $n = 6, \bar{x} \pm s$

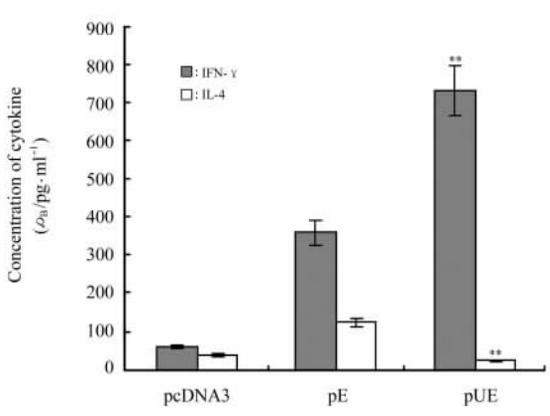


图 3 免疫小鼠脾细胞分泌的细胞因子水平  
Fig 3 Cytokines released from splenocytes of immunized mice

\* \*  $P < 0.01$  vs pE group;  $n = 6, \bar{x} \pm s$

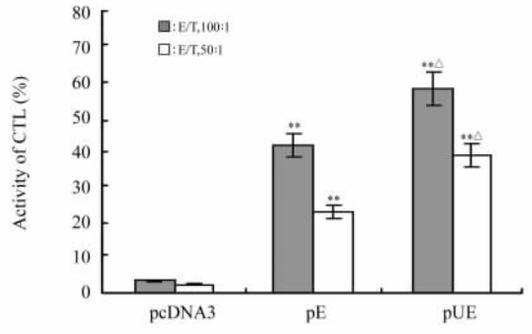


图 4 免疫小鼠脾细胞的 CTL 活性检测

Fig 4 Cytotoxicity of splenocytes in mice immunized with DNA vaccines

\* \*  $P < 0.01$  vs pcDNA3 group; △  $P < 0.05$  vs pE group;  $n = 6, \bar{x} \pm s$

### 3 讨论

目前有两种策略通过泛素来调整抗原的降解率来调节免疫应答。一种策略是产生稳定的泛素-抗原蛋白(即 UbAAg, 把泛素分子的最后一个氨基酸用 A 来替代原来的 G), 这样蛋白水解酶就不能把泛素分子从融合蛋白中水解下来, 这种稳定的体系很容易被多聚泛素化, 从而增强蛋白的降解率; 另一策略是将泛素分子的 C 末端增加一个精氨酸(R), 然后与抗原连接, 即 UbGRAg, 这种形式的连接适合 N 末端原则, 可以被泛素系统的某些分子识别从而增强抗原的周转率。本研究中所选用的是第二种策略, 将 UbGR 与结核杆菌的抗原融合。

本研究中没有在体外检测加入泛素分子后的抗原的周转率的变化。但是在 BALB/c 小鼠体内诱导的免疫应答的变化间接的反映了蛋白的周转情况。与 ESAT6 单独免疫组相比, 泛素-抗原融合的 DNA 疫苗组降低了抗原特异的抗体水平, 增强了 Th<sub>1</sub> 型免疫应答及 CTL 的活性, 这种免疫应答的改变对于结核病的防治是非常有利的。本实验中泛素融合组的抗体水平没有完全消失, 这与 Rodriguez 等<sup>[9]</sup>的报道有些出入。他们的研究是将 UbA 与淋巴细胞脉络丛病毒的 NP 蛋白融合, 发现增强抗原特异的 CTL 免疫应答和抗病毒感染的能力, 但抗体水平却完全消失, 这可能与选用的策略及泛素的蛋白依赖性相关有关。Wu 等<sup>[5]</sup>的研究发现 β 半乳糖苷酶与 UbGR 融合后, β 半乳糖苷酶很快就降解了; 而 Fu 等<sup>[10]</sup>的研究显示流感病毒的 NP 蛋白的降解率却不受 UbGR 的影响。本研究结果表明泛素融合 ES-AT6 DNA 疫苗后, 增强了 IgG<sub>2a</sub> 与 IgG<sub>1</sub> 的比值及脾

细胞分泌的 IFN- $\gamma$  的水平,也同时增强了 CTL 细胞毒性。所有这些结果提示 UbR-抗原嵌合体进入小鼠体细胞表达后,蛋白水解酶将泛素分子(UbG)的部分降解,留下了 R-抗原部分,该部分因为 N 端带有 1 个很不稳定的氨基酸,符合 N 末端原则<sup>[6]</sup>,最终导致了目的抗原在蛋白酶体中的降解率的提高,从而使与 B 细胞发生反应的完整蛋白的数量减少,最终导致内源性抗原呈递的增强及细胞免疫应答的提高,使抗原特异的体液免疫应答减弱。

诸多研究表明,结核病的保护性免疫主要依赖于多种因素,虽然巨噬细胞及其分泌的细胞因子在结核杆菌的感染早期起着非常重要的作用,但单靠巨噬细胞的作用是远远不够的。要想有效地防治结核杆菌的感染,还有赖于 T 细胞,包括 CD4<sup>+</sup>T 和 CD8<sup>+</sup>T 细胞及其分泌的相关细胞因子。Th<sub>1</sub>型细胞因子有利于控制结核病,而 Th<sub>2</sub>型细胞因子则促进结核病的发病,其中诱发 Th<sub>1</sub>型免疫应答随后产生的 IFN- $\gamma$  是控制结核杆菌在体内生长繁殖的重要因素<sup>[11-12]</sup>。本实验将泛素分子与结核抗原融合,通过改变目的抗原在体内的加工过程来调节抗原特异的免疫应答,结果表明是可行的,为结核病疫苗的研究提供了新思路。

#### [参考文献]

- [1] Roche P W, Triccas J A, Winter N. BCG vaccination against tuberculosis: past disappointments and future hopes [J]. Trends Microbiol, 1995,3:397-401.
- [2] Kaufmann S H. Is the development of a new tuberculosis vaccine possible [J]? Nat Med,2000,6:955-960.
- [3] Tanghe A, Denis O, Lambrecht B, et al. Tuberculosis DNA

vaccine encoding Ag85A is immunogenic and protective when administered by intramuscular needle injection but not by epidermal gene gun bombardment [J]. Infect Immun, 2000,68:3854-3860.

- [4] Baldwin S L, D'Souza C, Roberts A D, et al. Evaluation of new vaccines in the mouse and guinea pig model of tuberculosis [J]. Infect Immun,1998,66:2951-2959.
- [5] Wu Y, Kipps T J. Deoxyribonucleic acid vaccine encoding antigens with rapid proteasome-dependent degradation are highly efficient inducers of cytotoxic T lymphocytes [J]. J Immunol, 1997,159:6037-6043.
- [6] Varshavsky A. The N-end rule: function, mysteries, uses [J]. Proc Natl Acad Sci USA,1996,93:12142-12149.
- [7] 王庆敏,胡振林,孙树汉,等. 结核抗原 ESAT-6 基因的克隆及在大肠埃希菌中的表达 [J]. 中华传染病杂志,2003,21:30-32.
- [8] 康林,王庆敏,胡振林,等. 稳定表达结核杆菌 38 抗原的 EL-4 细胞株的建立及鉴定 [J]. 第二军医大学学报,2003,24:1253-1255.
- [9] Rodriguez F, Zhang J, Whitton JL. DNA immunization; ubiquitination of a viral protein enhances cytotoxic T-lymphocyte induction and antiviral protection but abrogates antibody induction [J]. J Virol,1997,71:8497-8503.
- [10] Fu T M, Guan L, Friedman A, et al. Induction of MHC I class I-restricted CTL response by DNA immunization with ubiquitin-influenza virus nucleoprotein fusion antigens [J]. Vaccine,1998,16:1711-1717.
- [11] Cardona P J, Cooper A, Luquin M, et al. The intravenous model of murine tuberculosis is less pathogenic than the aerogenic model owing to a more rapid induction of systemic immunity [J]. Scand J Immunol,1999,49:362-366.
- [12] Orme I M. New vaccines against tuberculosis; The status of current research [J]. Infect Dis Clin North Am, 1999,13:169-185.
- [收稿日期] 2006-07-15 [修回日期] 2007-01-17  
[本文编辑] 尹茶

#### · 书 讯 ·

### 《中国药学年鉴》2006 年版已出版

《中国药学年鉴》是我国惟一的一部药学历年学科年鉴。由全国多位著名药学专家、教授组成的编委会负责编纂,主编是中国工程院院士彭司勋教授。

该书系统、全面、概括地记载了我国药学领域各方面的发展和成就,自 1980 年起逐年连续出版。全书共分十一个大栏目,内容包括专论、药学研究、药学教育、药物生产与流通、医院药学、药品监督管理、药学人物、学会与学术活动、药学书刊、药学纪事、附录等。2006 年版是至今已出版的第 22 卷,随书附检索光盘。

《中国药学年鉴》对从事医药教学、科研、生产、使用、经营、管理的药学工作者具有良好的参考价值。本书因其密集的信息、翔实的统计资料而深得广大读者的好评,是医药工作者案头备查备考的资料书,也是医药企事业单位必备的馆藏书目。

《中国药学年鉴》2006 年版定价:232.00 元。由第二军医大学出版社出版、发行。

订购电话:021-65493093,地址:上海市翔殷路 800 号 第二军医大学出版社发行科,邮编:200433