

Bifidobacterium combined with cationic lipid nanoparticles with liquid perfluorocarbon for improving HIFU ablation effect: Experimental study

GAO Xuan¹, ZOU Jianzhong^{1*}, JIANG Binglei¹, XU Die¹, LUO Yong¹,
XIONG Jie¹, WANG Yaotai¹, TANG Yu¹, HAO Lan²

(1. College of Biomedical Engineering, Chongqing Medical University, State Key Laboratory of
Ultrasound Engineering in Medicine Co-founded by Chongqing and the Ministry of
Science and Technology, Chongqing Key Laboratory of Biomedical Engineering,
Chongqing Collaborative Innovation Center for Minimally-invasive and
Noninvasive Medicine, Chongqing 400016, China; 2. Institute of
Ultrasound Imaging, Chongqing Medical University,
Chongqing 400010)

[Abstract] **Objective** To investigate the influence of bifidobacterium combined with cationic lipid nanoparticles with liquid fluorocarbon on HIFU ablation for tumor-bearing mice. **Methods** Bifidobacterium was cultured, cationic lipid nanoparticles with liquid fluorocarbon were prepared, and the connection ratio was examined in vitro. Mice models of human breast cancer MDA-MB231 cells were established. A total of 48 tumor-bearing mice were randomly divided into 4 groups (each $n=12$). Different substances were injected through the tail vein twice (two days apart). Tumor-bearing mice in group A (PBS group) were injected with phosphate buffer (PBS) twice, in group B (bifidobacterium group) were injected with bifidobacterium before PBS injection, in group C (cationic lipid nanoparticles) with PBS before cationic lipid nanoparticles injection and in group D (bifidobacterium + cationic lipid nanoparticle group) with bifidobacterium before cationic lipid nanoparticles injection. Twenty-four hours after the completion of the second injection, HIFU irradiation was performed on the tumor tissue of tumor-bearing mice, and the changes between pre- and post-ablation gray scale of the tumor tissue were analyzed. Histological examination was performed 1 h before HIFU irradiation and 1 day after irradiation, respectively. The tumor targeting of bifidobacterium was observed, and the coagulative necrotic volume of tumor tissues and energy efficiency factor (EEF) of HIFU ablation were measured. Statistical analysis was performed to compare the differences among 4 groups. **Results** Gram-stained bifidobacterium longum was manifested as blue-violet long rod with a surface potential of -29 mV. The cationic lipid nanoparticles were spherical and evenly distributed with average particle diameter of (280.21 ± 60.20) nm and a surface potential of 25 mV. The differences of gray scale change ($F=143.40$), coagulative necrotic volume ($F=243.20$) and EEF ($F=56.33$) were statistically significant among 4 groups (all $P<0.001$). Gray value change and coagulative necrotic volume gradually increased in group A, B, C and D (pairwise comparison; All $P<0.05$), while EEF trended from high to low in group A, B, C and D (pairwise comparison; All $P<0.05$). There was no bifidobacterium in heart, liver, spleen, lung and kidney of tumor-bearing mice among 4 groups nor in tumors of group A and C. A quantity of bifidobacterium was found in tumor tissue of group B and D. **Conclusion** Bifidobacterium combined with cationic lipid nanoparticles with liquid fluorocarbon can enhance the ablation effect of HIFU ablation on tumor tissue in tumor-bearing mice.

[基金项目] 重庆市科技计划项目(cstc2017jcyjAX0432)。

[第一作者] 高悬(1991—),女,河南商丘人,在读硕士。研究方向:超声医学。E-mail: 897064515@qq.com

[通信作者] 邹建中,重庆医科大学生物医学工程学院 省部共建国家重点实验室培育基地—重庆市超声医学工程重点实验室 重庆市生物医学工程
学重点实验室 重庆微创医学协同创新中心,400016。E-mail: zoujzh@cqmu.edu.cn

[收稿日期] 2019-01-28 **[修回日期]** 2019-04-08

[Keywords] bifidobacterium; cationic lipid nanoparticles; high-intensity focused ultrasound ablation; animal experimentation
DOI:10.13929/j.1672-8475.201901060

双歧杆菌联合包裹液态氟碳阳离子脂质纳米粒 增加 HIFU 消融效果: 实验研究

高 悬¹, 邹建中^{1*}, 蒋冰蕾¹, 徐 蝶¹, 罗 勇¹,
熊 洁¹, 汪瑶台¹, 唐 瑜¹, 郝 兰²

(1. 重庆医科大学生物医学工程学院 省部共建国家重点实验室培育基地—重庆市超声医学工程
重点实验室 重庆市生物医学工程学重点实验室 重庆微无创医学协同创新中心,
重庆 400016; 2. 重庆医科大学超声影像学研究所, 重庆 400010)

[摘 要] 目的 探讨双歧杆菌联合包裹液态氟碳的阳离子脂质纳米粒对 HIFU 消融荷瘤鼠肿瘤组织的影响。方法 培养双歧杆菌, 并制备包裹液态氟碳的阳离子脂质纳米粒, 检测体外连接率。建立人乳腺癌 MDA-MB231 细胞荷瘤鼠模型, 将 48 只荷瘤鼠随机分为 4 组(每组 12 只), 前后 2 次经尾静脉注射不同物质(间隔 2 天), 其中 A 组(PBS 组)2 次均注射磷酸盐缓冲液(PBS), B 组(双歧杆菌组)分别注射双歧杆菌、PBS, C 组(阳离子脂质纳米粒组)分别注射 PBS、阳离子脂质纳米粒, D 组(双歧杆菌+阳离子脂质纳米粒组)分别注射双歧杆菌、阳离子脂质纳米粒。第 2 次注射完成后 24 h, 对荷瘤鼠肿瘤组织行 HIFU 辐照, 分析肿瘤组织灰度变化。分别于 HIFU 辐照前 1 h 和辐照后 1 天行组织学检查, 观察双歧杆菌的肿瘤靶向性, 并测算肿瘤组织凝固性坏死体积和能效因子(EEF), 行统计学分析, 比较各组间的差异。结果 双歧杆菌革兰染色呈蓝紫色的长棒状, 表面电位 -29 mV; 阳离子脂质纳米粒呈球形, 分布均匀, 平均粒径 (280.21 ± 60.20) nm, 表面电位 25 mV。各组间灰度变化值 $(F=143.40)$ 、凝固性坏死体积 $(F=243.20)$ 、EEF $(F=56.33)$ 差异均有统计学意义 $(P$ 均 $< 0.001)$ 。灰度变化值及凝固性坏死体积 A 组 $<$ B 组 $<$ C 组 $<$ D 组, EEF: A 组 $>$ B 组 $>$ C 组 $>$ D 组, 两两比较差异均有统计学意义 $(P$ 均 $< 0.05)$ 。4 组荷瘤鼠心、肝、脾、肺、肾组织及 A、C 组肿瘤组织中均无双歧杆菌生长; B、D 组肿瘤组织中可见大量双歧杆菌。结论 双歧杆菌联合包裹液态氟碳的阳离子脂质纳米粒可增强 HIFU 对荷瘤鼠肿瘤组织的消融效果。

[关键词] 二裂菌属; 阳离子脂质纳米粒; 高强度聚焦超声消融术; 动物实验

[中图分类号] R-332; R445.1 [文献标识码] A [文章编号] 1672-8475(2019)05-0309-06

HIFU 已广泛用于治疗实体肿瘤。由于超声波在传播过程中能量衰减较大, 当肿瘤体积较大或其位置深在时, HIFU 疗效会受到较大影响^[1]。在靶区引入碘油、微泡等物质, 可通过改变组织的声环境来增强 HIFU 消融效果; 但这些物质的靶向性不强, 在肿瘤及其周围组织器官内均存在, 辐照时易导致声通道组织损伤^[2-5]。近年来, 研发体内滞留时间长且靶向性强的 HIFU 增效剂逐渐受到关注。本研究探讨 HIFU 生物靶向增效的可行性, 以双歧杆菌^[5-7]作为载体, 联合包裹液态氟碳的阳离子脂质纳米粒, 观察其增强 HIFU 消融的效果。

1 材料与方法

1.1 双歧杆菌培养及镜下观察 将长双歧杆菌 ATCC15707(重庆医科大学基础医学院生物化学与分子生物学系提供)于 37℃、厌氧条件下, 在 MRS 培养基中培养 24 h, 4℃ 条件下以 1 000 r/min 离心 10 min。将细菌浓度调整至 6×10^7 /ml 备用。革兰氏染色后于

光学显微镜下观察双歧杆菌形态, 并采用 Malvern ZEN3600 型分析仪测量其表面电位。

1.2 包裹液态氟碳的阳离子脂质纳米粒制备及镜下观察 将二棕榈酰基卵磷脂(1, 2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DPPC; Avanti 公司)、二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇-氨基{1, 2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[amino (polyethylene glycol)-2000]}, DSPE-PEG2000-Amine; Avanti 公司)、胆固醇盐酸盐(DC-cholesterol hydrochloride, DC-CHOL; Avanti 公司)按 5:2:2 的比例溶于氯仿中, 旋转蒸发去除有机溶剂成膜, 加入双蒸水洗脱后, 滴加 100 μ l 液态氟碳全氟己烷(perfluorohexanes, PFH; 沸点 56℃), 均质乳化后获得包裹液态氟碳的阳离子脂质纳米粒, 4℃ 保存备用。于光学显微镜下观察阳离子脂质纳米粒形态, 并采用 Malvern ZEN3600 型分析仪测量其粒径及表面电位。

1.3 双歧杆菌与阳离子脂质纳米粒体外连接 将

100 μ l 绿色荧光染料异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 标记的双歧杆菌 (浓度 1×10^6 /ml) 加入 300 μ l 红色荧光染料细胞膜红色荧光探针 (1, 1'-dioctadecyl-3, 3, 3', 3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate, DiI) 标记的阳离子脂质纳米粒 (浓度 1 mg/ml) 中, 孵育 10 min 后, 稀释 200 倍备用。采用 Nikon A1R 型激光共聚焦显微镜观察双歧杆菌与阳离子脂质纳米粒的连接情况, 以 CytoFLEX PN B49007AD 型流式细胞仪检测连接率。

1.4 建立荷瘤鼠模型 选取 4 周龄雌性 BALB/c 裸鼠 48 只 (重庆医科大学动物实验中心提供, 动物实验审查批准号: CQLA-2016-406), 体质量 18~24 g, 平均 (21.14 ± 2.04) g。将 0.2 ml 培养至对数生长期的浓度调为 4×10^6 /ml 的人乳腺癌 MDA-MB231 细胞 (重庆医科大学超声影像学研究所提供) 接种于每只裸鼠左侧臀部皮下, 之后常规饲养, 待瘤体最大径达 0.8 cm 时用于后续实验。

1.5 HIFU 辐照

1.5.1 分组处理 选取 48 只荷瘤鼠随机均分为 A 组 [磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 组]、B 组 (双歧杆菌组)、C 组 (阳离子脂质纳米粒组) 和 D 组 (双歧杆菌 + 阳离子脂质纳米粒组), 每组 12 只。首先对 A、C 组荷瘤鼠经尾静脉注射 0.2 ml PBS, B、D 组荷瘤鼠经尾静脉注射 0.2 ml 双歧杆菌 (浓度 1×10^6 /ml); 而后于首次注射后 72 h, 对 A、B 组再注射 0.2 ml PBS, C、D 组再注射 0.2 ml 阳离子脂质纳米粒 (浓度 0.1 mg/ml)。

1.5.2 HIFU 辐照及评价 采用海扶 JC200 型聚焦超声肿瘤治疗系统, 于第 2 次注射完成后 24 h 在超声监控下行 HIFU 辐照。消融参数: 治疗头频率 0.94 MHz, 焦距 145 mm, 换能器直径 220 mm; 辐照方式为点辐照, 功率 150 W, 辐照时间 2 s。辐照后即刻, 通过声像图观察荷瘤鼠肿瘤组织灰度变化, 与辐照前对照, 系统自动测得灰度变化值。

1.6 组织学观察 HIFU 辐照前 1 h, 从各组中各随机选取 2 只处死, 完整剥离肿瘤并摘取荷瘤鼠心、肝、脾、肺、肾组织, 以 4% 多聚甲醛固定, 革兰氏染色后于光学显微镜下观察肿瘤组织及重要脏器中双歧杆菌的生长情况, 验证双歧杆菌的肿瘤靶向性。HIFU 辐照后 1 天, 将荷瘤鼠全部处死, 完整剥离肿瘤后, 沿最大面切开, 用 2% 氯化三苯基四氮唑 (triphenyltetrazolium chloride, TTC) 染色, 肉眼观察其大体组织学情况, 并测算各组荷瘤鼠肿瘤组织凝固性坏死体积和 HIFU 消融能效因子 (energy efficiency factor, EEF)。凝固性坏死体积 (mm^3) = $(\pi/6) \times \text{长度}(\text{mm}) \times \text{宽度}(\text{mm}) \times \text{深度}(\text{mm})$, $\text{EEF}(\text{J}/\text{mm}^3) = \text{声功率}(\text{W}) \times \text{辐照时间}(\text{s}) / \text{凝固性坏死体积}(\text{mm}^3)$ 。

1.7 统计学分析 采用 SPSS 21.0 统计分析软件。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD 法。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 双歧杆菌和阳离子脂质纳米粒的表征 双歧杆菌革兰氏染色呈蓝紫色的长棒状 (图 1A), 表面电位为

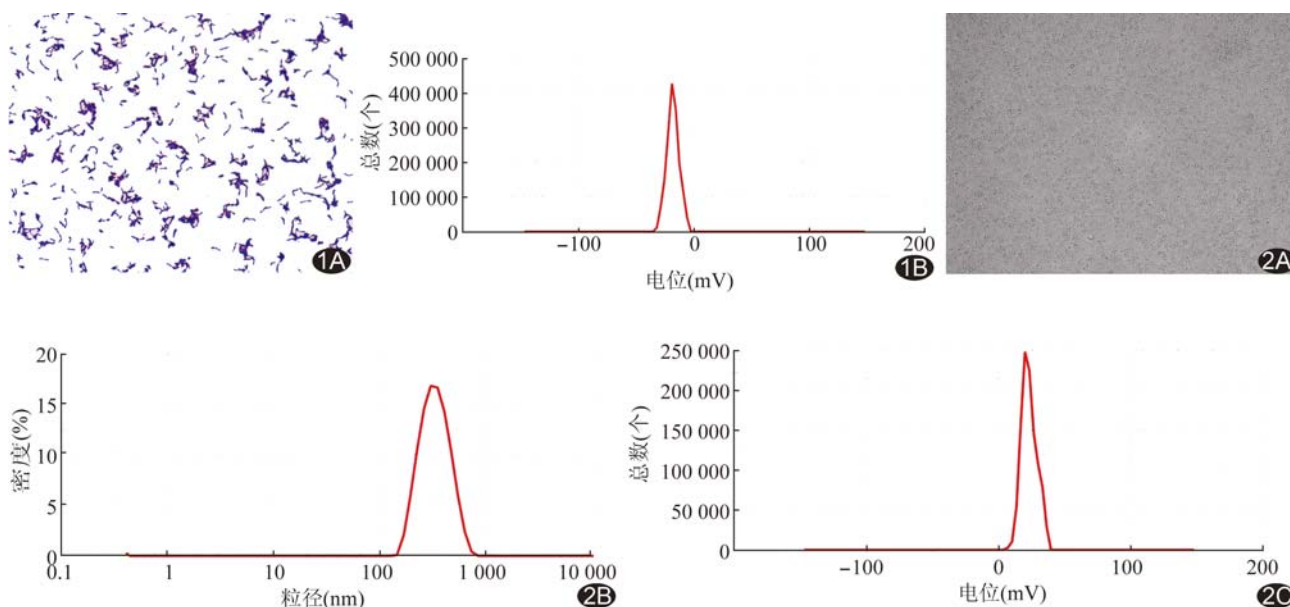


图 1 双歧杆菌表征 A. 光学显微镜下观察 (革兰染色, $\times 400$); B. 表面电位检测 A. 光学显微镜下观察 ($\times 400$); B. 粒径检测; C. 表面电位检测

图 2 包裹液态氟碳的阳离子脂质纳米粒表征

-29 mV(图 1B)。阳离子脂质纳米粒呈球形,分布均匀(图 2A),粒径 220~340 nm,平均 (280.21 ± 60.20) nm(图 2B),表面电位为 25 mV(图 2C)。

2.2 体外连接情况 双歧杆菌与阳离子脂质纳米粒体外连接后,激光共聚焦显微镜下可见 FITC 标记的双歧杆菌表面附着大量被 DiI 标记的阳离子脂质纳米粒(图 3)。流式细胞仪检测其连接率为 99.9%(图 4)。

2.3 HIFU 消融效果

2.3.1 灰度变化值 HIFU 辐照后,4 组荷瘤鼠肿瘤组织声像图均可见不同程度灰度变化(图 5)。各组间灰度变化值差异有统计学意义($F=143.40$, $P<0.001$,表 1),A 组<B 组<C 组<D 组,且两两比较差异均有统计学意义(P 均 <0.001 ,表 2)。

2.3.2 凝固性坏死体积

HIFU 辐照后,4 组荷瘤鼠肿瘤组织内均可见凝固性坏死,坏死区呈灰白色,而未坏死区切面呈红色(图 6)。各组间凝固性坏死体积差异有统计学意义($F=243.20$, $P<0.001$,表 1),A 组<B 组<C 组<D 组,且两两比较差异均有统计学意义(P 均 <0.05 ,表 2)。

表 1 各组荷瘤鼠肿瘤组织灰度变化值、EEF 及凝固性坏死体积($\bar{x} \pm s$)

组别	灰度变化值	凝固性坏死体积 (mm ³)	EEF (J/mm ³)
A 组	10.44±2.74	37.48±7.138	16.62±3.65
B 组	18.78±3.53	48.91±7.45	12.57±2.19
C 组	26.44±3.71	73.62±8.58	8.26±1.04
D 组	43.33±3.94	131.60±10.46	4.59±0.40
F 值	143.40	243.20	56.33
P 值	<0.001	<0.001	<0.001

注:A 组:PBS 组;B 组:双歧杆菌组;C 组:阳离子脂质纳米粒组;D 组:双歧杆菌+阳离子脂质纳米粒组

2.3.3 EEF 各组间 EEF 差异有统计学意义($F=56.33$, $P<0.001$,表 1),A 组>B 组>C 组>D 组,且两两比较差异均有统计学意义(P 均 <0.05 ,表 2)。

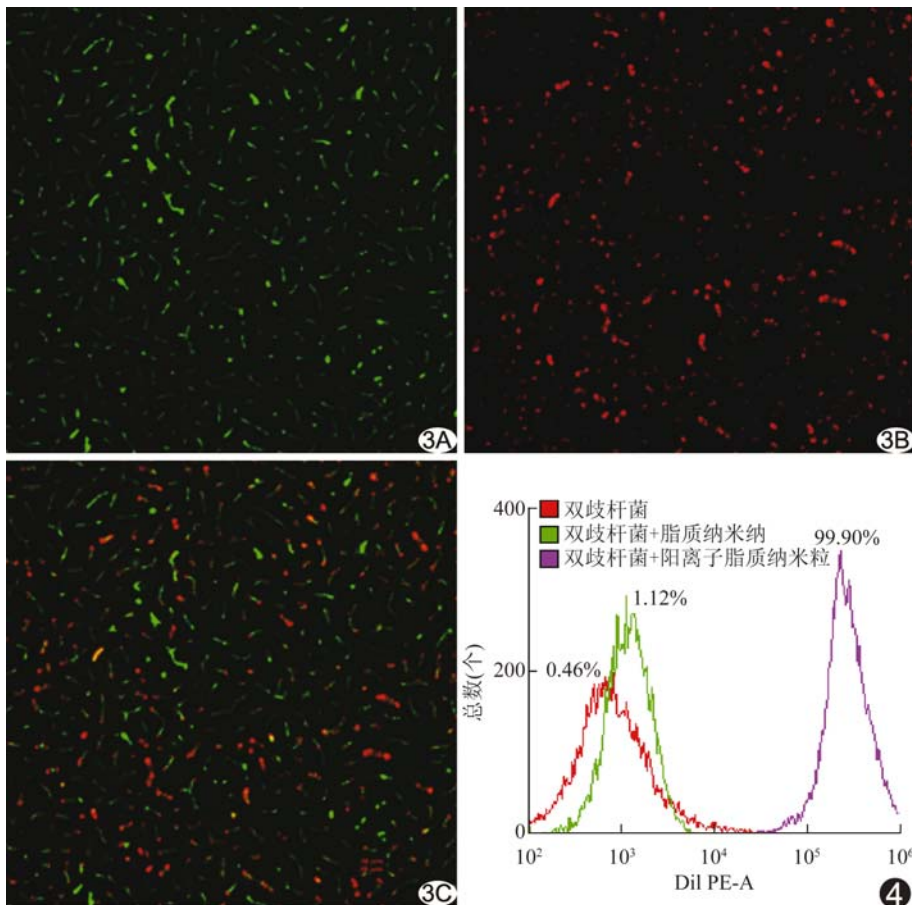


图 3 激光共聚焦显微镜下观察双歧杆菌与阳离子脂质纳米粒体外连接($\times 800$) A. 以 FITC 标记的双歧杆菌; B. 以 DiI 标记的阳离子脂质纳米粒; C. 双歧杆菌与阳离子脂质纳米粒连接后的合成图 图 4 流式细胞仪检测双歧杆菌与阳离子脂质纳米粒体外连接率

2.3.4 靶向性 4 组荷瘤鼠心、肝、脾、肺、肾组织中均无双歧杆菌生长;A、C 组肿瘤组织中无双歧杆菌,B、D 组肿瘤组织中可见大量双歧杆菌(图 7)。

3 讨论

微泡、羟基磷灰石纳米复合物等现有 HIFU 增效剂存在靶向性不强的问题,对 HIFU 消融增效有限;目前仍在不断探索,以提升 HIFU 消融效率。本研究利用双歧杆菌能够靶向肿瘤乏氧区的特性,将其与具有 HIFU 增效作用的包裹液态氟碳的阳离子脂质纳米粒相结合,克服了传统 HIFU 增效剂靶向性不强的问题。本研究结果显示,表面带有负电荷的双歧杆菌与阳离子脂质纳米粒在体外可通过静电吸附的方式有效连接,连接率达 99.9%。本研究中 C 组荷瘤鼠 HIFU 辐照后肿瘤组织灰度变化值及凝固性坏死体积均明显高于 A 组(P 均 <0.001),表明包裹液态氟碳的阳离子脂质纳米粒具有增效 HIFU 的作用,与周洋等^[8]研究结果相符;此外,D 组灰度变化值及凝固性坏

表 2 荷瘤鼠肿瘤组织灰度变化值、EEF 及凝固性坏死体积组间两两比较的 P 值

指标	A 组 vs B 组	A 组 vs C 组	A 组 vs D 组	B 组 vs C 组	B 组 vs D 组	C 组 vs D 组
灰度变化值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
凝固性坏死体积	0.024	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
EEF	0.001	<0.001	<0.001	0.001	<0.001	0.004

注: A 组: PBS 组; B 组: 双歧杆菌组; C 组: 阳离子脂质纳米粒组; D 组: 双歧杆菌+阳离子脂质纳米粒组

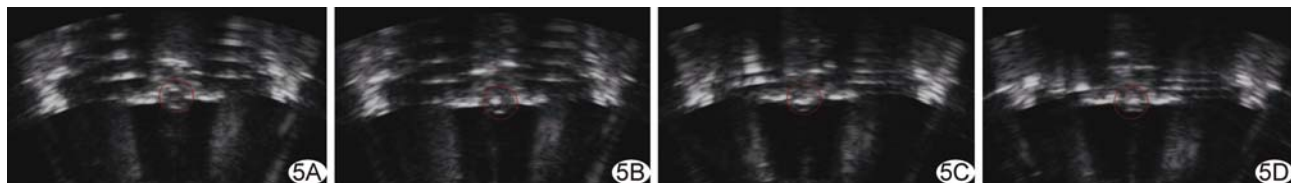


图 5 HIFU 辐照后各组荷瘤鼠肿瘤组织声像图 A. A 组(PBS 组); B. B 组(双歧杆菌组); C. C 组(阳离子脂质纳米粒组); D. D 组(双歧杆菌+阳离子脂质纳米粒组)

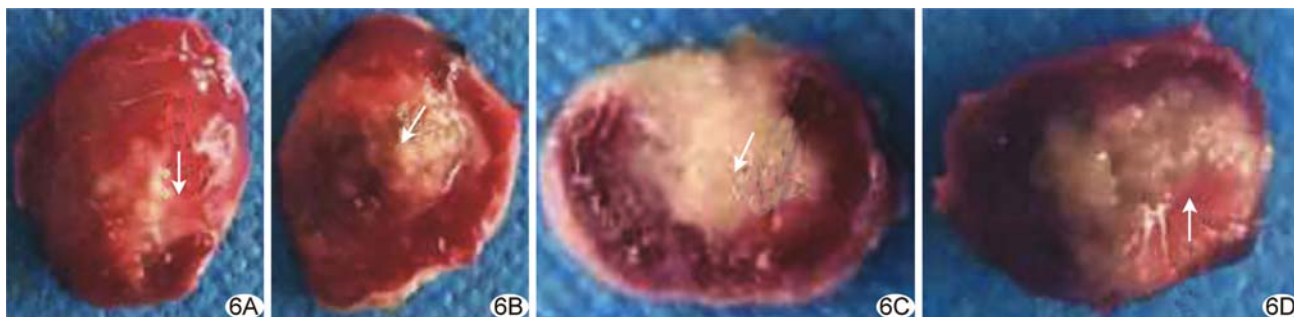


图 6 HIFU 辐照后各组荷瘤鼠肿瘤组织大体病理图, 箭头凝固性坏死 A. A 组(PBS 组); B. B 组(双歧杆菌组); C. C 组(阳离子脂质纳米粒组); D. D 组(双歧杆菌+阳离子脂质纳米粒组)

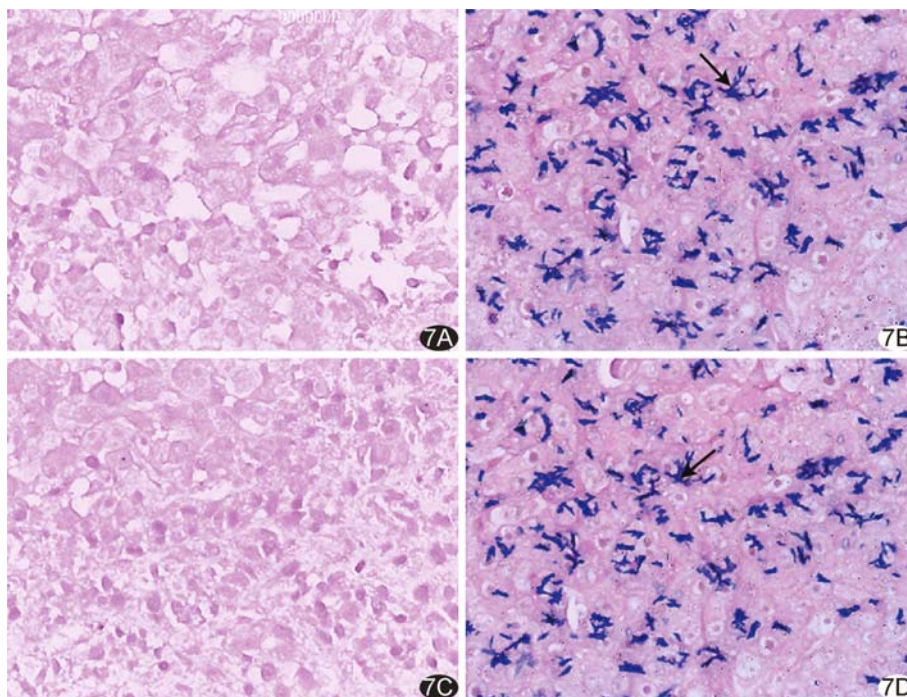


图 7 双歧杆菌的肿瘤靶向性(革兰染色, $\times 400$), 箭头双歧杆菌 A. A 组(PBS 组); B. B 组(双歧杆菌组); C. C 组(阳离子脂质纳米粒组); D. D 组(双歧杆菌+阳离子脂质纳米粒组)

死体积均明显高于 C 组(P 均 <0.001), 分析其原因: ①双歧杆菌增殖可能改变了肿瘤组织局部声环境, 使超声能量沉积增加, 进而增强 HIFU 消融肿瘤效果; ②包裹液态氟碳的阳离子脂质纳米粒在肿瘤中的滞留量增加, 增强了 HIFU 消融肿瘤的效果。肿瘤组织中阳离子脂质纳米粒滞留量增加的原因可能包括: ①双歧杆菌在肿瘤组织中生长 72 h 后, 通过静电吸附作用可连接数量较多阳离子脂质纳米粒; ②双歧杆菌在肿瘤组织中增殖, 不仅可提高巨噬细胞的吞噬功能, 还能通过提高局部一氧化氮水平而增强滞留效应(enhanced permeability and retention effect, EPR)效应和肿瘤血管通透性^[9-11], 使阳离子脂

质纳米粒“漏入”肿瘤组织中的数量增多。

此外,EEF 也可反映 HIFU 消融肿瘤的效果,EEF 越小,表明消融效果越强,本研究中 D 组 EEF 明显低于其他各组(P 均 <0.05)。

本研究通过动物实验证实,双歧杆菌联合包裹液态氟碳的阳离子脂质纳米粒具有增效 HIFU 消融肿瘤的作用;但本研究为初步探索,具体机制有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Tinghe Y, Jun L. Adverse events of extracorporeal ultrasound-guided high intensity focused ultrasound therapy. *PLoS One*, 2011,6(12):e26110.
- [2] 钟志强,陈首名,李非,等. MRI 监控高强度聚焦超声联合 SonoVue 损伤山羊肝脏组织的增效研究. *中国介入影像与治疗学*, 2015,12(9):559-562.
- [3] Cheng C, Xiao Z, Huang G, et al. Enhancing ablation effects of a microbubble contrast agent on high-intensity focused ultrasound: An experimental and clinical study. *BJOG*, 2017,124(S3):78-86.
- [4] 陈飞,马大钊,邹建中. 高强度聚焦超声增效的方法学研究进展. *中国医学影像技术*, 2016,32(10):1597-1600.
- [5] 周韬,张天遨,邓朝晖,等. 双歧杆菌对小鼠肝缺血再灌注损伤保护作用实验研究. *肝胆外科杂志*, 2017,25(3):78-81.
- [6] Liu Y, Zhou M, Luo D, et al. Bacteria-mediated in vivo delivery of quantum dots into solid tumor. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012,425(4):769-774.
- [7] Luo CH, Huang CT, Su CH, et al. Bacteria-mediated hypoxia-specific delivery of nanoparticles for tumors imaging and therapy. *Nano Lett*, 2016,16(6):3493-3499.
- [8] 周洋,郑元义,沈红霞,等. 经静脉注射脂质包裹液态氟碳纳米粒增效高强度聚焦超声治疗肿瘤的初步研究. *中国超声医学杂志*, 2012,28(3):193-196.
- [9] Mokrozub VV, Lazarenko LM, Babenko LP, et al. Effect of probiotic strains of lacto- and bifidobacteria on the activity of macrophages and other parameters of immunity in cases of staphylococcosis. *Mikrobiol Z*, 2012,74(6):90-98.
- [10] Ebbesen MF, Konrad B, Deleuran BW, et al. Extended blood circulation and joint accumulation of a p(HPMA-co-AzMA)-based nanoconjugate in a murine model of rheumatoid arthritis. *Mol Cell Ther*, 2014,2:29.
- [11] Fang J, Nakamura H, Maeda H. The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect. *Adv Drug Deliv Rev*, 2011,63(3):136-151.

《肿瘤 PET/CT 成像图谱:病例解析》已出版

由土耳其伊斯坦布尔 Okmeydani 培训和研究医院的塔梅尔·奥祖克教授、菲利兹·奥祖克医师主编,天津医科大学附属肿瘤医院核医学科陈薇医师主译,天津科技翻译出版有限公司出版的《肿瘤 PET/CT 成像图谱:病例解析》一书已于 2018 年 4 月出版,并在全国发行。PET/CT 扫描仪的出现,意味着功能代谢信息和解剖数据的融合,开创了医学领域的新纪元,特别是肿瘤学领域。自从 PET/CT 出现于研究中心,就成为肿瘤影像学中不可或缺的工具。《肿瘤 PET/CT 成像图谱:病例解析》涵盖了很多关于恶性肿瘤¹⁸F-FDG PET/CT 诊断和治疗的临床病例。全书共两部分内容,第 1 部分为 FDG PET/CT 基础知识,第 2 部分涵盖了大量临床肿瘤病例,包括常见和罕见表现。本书中的所有病例均经组织病理学证实,适合核医学、放射学、肿瘤学、肿瘤放射学和核医学技术专业的住院医师和执业医师阅读。

《肿瘤 PET/CT 成像图谱:病例解析》,国际 16 开,精装,铜版纸全四色印刷,384 页,定价 198 元。

邮购地址:天津市南开区白堤路 244 号科贸大厦 B 座 6 楼

联系人:姜晓婷

电话:022-87892596

也可关注公众号“科翻图书出版”购买!