

三七总皂甙对心肌缺血一再灌注损伤的影响

唐旭东* 姜建青* 贺常文* 刘宝玉* 姜大春* 顾大勇* 王小平*

摘要 目的:研究心肌缺血一再灌注时中性粒细胞(PMN)核因子-kB(NF-kB)活性、细胞间粘附分子(ICAM-1)表达、中性粒细胞粘附浸润的变化及三七总皂甙的心肌保护作用。方法:新西兰兔124只分为:(1)缺血一再灌注组;(2)三七总皂甙预处理组(PNS预处理组);(3)假手术对照组;每组又分缺血前(0)、再灌注后30、60、90、120、240、360分钟时相点。用流式细胞仪检测中性粒细胞ICAM-1的表达,凝胶电泳迁移率分析检测NF-kB的活性,测定中性粒细胞与脐静脉内皮细胞(EC-340)的粘附率,用髓过氧化物酶法(MPO)定量测定心肌组织中浸润的中性粒细胞。结果:在缺血一再灌注组中心肌再灌注30分钟后NF-kB活性开始增高,120分钟达到高峰,之后活性下降;中性粒细胞ICAM-1的表达在心肌再灌注120分钟开始增高,并与中性粒细胞的粘附率升高及心肌浸润增加有相关性;在PNS预处理组,PNS能抑制NF-kB的活化、中性粒细胞ICAM-1的表达和中性粒细胞的粘附及心肌浸润。结论:心肌缺血一再灌注时刺激NF-kB的活化,启动中性粒细胞ICAM-1的表达而参与缺血一再灌注损伤的发生过程;三七总皂甙能抑制中性粒细胞NF-kB的活化,减少细胞间粘附分子表达及中性粒细胞粘附浸润而起到心肌保护作用。

关键词 心肌再灌注损伤/中医药疗法 心肌再灌注损伤/代谢 三七皂甙/治疗应用

中性粒细胞(PMN)是参与心肌缺血一再灌注损伤过程(IR)的重要的细胞成分之一,它在缺血心肌的浸润可引起并加剧心肌细胞的再灌注损伤^[1,2]。细胞间粘附分子-1(ICAM-1)是介导中性粒细胞与内皮细胞粘附的主要粘附分子,其在心肌缺血一再灌注损伤中起重要作用^[3]。核因子-kB(NF-kB)是一个遍在的核转录因子,它活化后能调控包括ICAM-1在内的一系列基因的表达并影响多种病理生理过程^[4];三七总皂甙(PNS)是传统中药三七的主要成分,具有抗心肌缺血再灌注损伤的作用^[5,6]。我们的实验采用兔心肌缺血一再灌注模型,观察三七总皂甙对心肌缺血一再灌注时中性粒细胞NF-kB活性变化、细胞间粘附分子表达及中性粒细胞粘附的影响,进一步探讨心肌缺血一再灌注损伤的发生机制及三七总皂甙心肌保护作用的机理。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器:ICAM-1单克隆抗体,美国Sigma公司;吡咯基二硫氨基甲酸酯(PDTC);NF-kB抑制剂,美国Sigma公司;T₄激酶(Cat18004-010)购自Gibco;NF-kB寡聚核苷酸探针5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3'由上海生工合成;(γ-³²P)ATP北京亚辉生产;电泳仪(Bio-Rad),图像扫描仪(Tiger90),低温离心机(Sigma),液体闪烁计数器(芬兰LKB-1217)。三七总皂甙产自云南植物药厂。人脐静脉内皮细胞株EC-340购自Clonetics公司。

1.2 实验分组及动物模型的制备:参照文献[7]方法制作动物模型:麻醉兔胸正中切口显露并结扎左冠状动脉前降支(LAD),造成心肌缺血,45分钟后开放LAD进行再灌注。新西兰大白兔24只,体重2.0~2.5kg,随机分为:(1)缺血一再灌注组;(2)三七总皂甙预处理组(PNS预处理组);(3)假手术对照组。每组又设缺血前(0)、再灌注30、60、90、120、240、360分钟时点。每时点6只动物,其中0时点为各组共用。缺血一再灌注组在缺血前10分钟静脉注射生理盐水10ml,PNS预处理组在缺血前10分钟静脉注射PNS 100mg/kg。假手术对照组不作动脉结扎。分别于各时相点采血并迅速取出兔心备用。

1.3 检测指标及方法

1.3.1 中性粒细胞ICAM-1的表达:抗凝血0.5ml采用流式细胞术方法测定。

1.3.2 中性粒细胞NF-kB活性测定:抗凝血2.5ml按照以下步骤进行:(1)中性粒细胞的分离:参照文献[8]采用Percoll一步法分离中性粒细胞。用无血清DMEM悬浮PMN,配制中性粒细胞工作悬液 $1.0 \times 10^6/\text{ml}$ 。吸取此悬液0.05ml与等量1%台盼蓝混合做染色检查,活性中性粒细胞(无色)大于95%,姬姆萨染色PMN纯度在97%以上方可用于实验。分离的PMN立即放入4℃冰箱保存,在2小时内使用。(2)细胞核蛋白的提取^[9]:上述分离的中性粒细胞,冷PBS冲洗并离心,沉淀悬浮于200μl冷的缓冲液A(10mmol HEPES-KOH, 1.5mmol MgCl₂, 10mmol KCl, 0.5mmol DTT, 1mmol PMSF, 2μg/ml aprotinin, 10μg/ml leupeptin pH7.9),冰置15分钟,加入10%NP-40 25μl涡旋10s,离心。沉淀重新悬浮于50μl冷的缓冲液

* 中国人民解放军成都军区总医院心胸外科、心血管内科、临床实验科,成都市外北天回镇(610083)

收稿日期:2001-11-20;修回日期:2002-07-20

表 1 各组中性粒细胞 ICAM-1 的变化比较(平均荧光强度, $\bar{x} \pm s$)

组别	兔数	实 验 时 间(min)					
		0	60	90	120	240	360
缺血一再灌注组	8	2.79±1.01	3.01±0.92	3.54±0.89	6.31±1.25*◆	12.47±2.13*◆	18.29±2.68*◆
PNS 预处理组	8	2.68±0.87	2.95±0.76	3.42±0.93	5.47±1.05*◆▲	9.48±1.69*◆▲	13.56±0.32*◆▲
假手术对照组	8	2.57±0.72	2.86±0.63	3.13±1.14	3.35±0.95	3.21±0.79	3.57±1.23

与假手术对照组比较, * $P < 0.05$; 与缺血前比较, ◆ $P < 0.05$; 与缺血一再灌注组比较, ▲ $P < 0.05$

表 2 各组中性粒细胞 NF- κ B 活性的变化(积分灰度值 $\times 10^3$, $\bar{x} \pm s$)

组别	兔数	实 验 时 间(min)						
		0	30	60	90	120	240	360
缺血一再灌注组	8	41±9	110±14*◆	180±22*◆	273±39*◆	381±35*◆	256±27*◆	152±14*◆
PNS 预处理组	8	45±13	73±18*◆▲	154±29*◆▲	203±27*◆▲	279±38*◆▲	193±30*◆▲	114±12*◆▲
假手术对照组	8	41±8	47±15	42±12	48±10	43±9	48±17	51±14

与假手术对照组比较, * $P < 0.05$; 与缺血前比较, ◆ $P < 0.05$; 与缺血一再灌注组比较, ▲ $P < 0.05$

表 3 中性粒细胞-EC-340 粘附率的变化(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	兔数	实 验 时 间(min)					
		0	60	90	120	240	360
缺血一再灌注组	8	8.4±1.3	10.2±1.5*◆	14.8±2.4*◆	22.7±3.8*◆	31.5±4.1*◆	39.5±4.7*◆
PNS 预处理组	8	8.6±1.1	9.4±1.1*◆▲	11.9±2.2*◆▲	16.1±2.6*◆▲	22.3±2.8*◆▲	29.8±3.3*◆▲
假手术对照组	8	7.1±1.2	7.0±1.3	9.2±2.3	8.0±1.9	7.6±1.9	9.1±2.8

与假手术对照组比较, * $P < 0.05$; 与缺血前比较, ◆ $P < 0.05$; 与缺血一再灌注组比较, ▲ $P < 0.05$

表 4 MPO 的变化比较($\bar{x} \pm s$)

组别	兔数	实 验 时 间(min)			
		0	120	240	360
缺血一再灌注组	8	8.56±1.2	18.72±2.65*◆	31.09±5.12*◆	40.28±4.07*◆
PNS 预处理组	8	8.56±1.2	15.31±2.82*◆▲	24.28±5.38*◆▲	31.11±5.14*◆▲
假手术对照组	8	5.56±1.2	5.35±0.62	5.59±0.99	5.65±0.77

与假手术对照组比较, * $P < 0.05$; 与缺血前比较, ◆ $P < 0.05$; 与缺血一再灌注组比较, ▲ $P < 0.05$

C (20mmol HEPES — KOH pH7.9, 25% glycerol, 420mmol NaCl, 1.5mmol MgCl₂, 0.2mmol EDTA, 0.5mmol DTT, 1mmol PMSF, 2μg/ml aprotinin, 10μg/ml leupeptin), 冰置 30 分钟, 振荡 1 分钟, 离心取上清。核蛋白用考马斯亮兰法定量, 储存于-70℃待用。(3) 双链寡核苷酸探针的标记^[10]: 依次加入寡核苷酸探针 (5pmol/μl) 1.0μl, 5X T4 多核苷酸激酶缓冲液 5μl, T4 多核苷酸激酶 (10U/μl) 1.0μl, [γ -³²P]ATP (10μCi/μl) 2.5μl 无核酸酶水 15.0μl, 共 25μl 反应混合液于 37℃孵育 10 分钟, 加入 1μl 0.5mmol EDTA 终止反应, 然后加入 89μl TE 缓冲液 (10 mmol Tris—HCl, 1mmol EDTA, pH 8.0)。用乙醇沉淀法去除未标记寡核苷酸探针。闪烁计数器测定标记效率, 每微升的 cpm 值在 50000~100000 之间方可使用。(4) 凝胶电泳迁移率变化分析 (EMSA)^[11]: 5μg 核蛋白同 5X 结合缓冲液 (含 1μg/μl poly dI—dC, 10mmol Tris—HCl, 50mmol NaCl, 0.5 mmol EDTA, 5%甘油, 1mmol DTT, 1μg/μl BSA pH7.5), 1.6μl 标记寡核苷酸探针于 37℃反应 1 小时。DNA—蛋白复合物经 7%非变性聚丙烯酰胺凝胶于 100V 电泳 3 小时, 真空负压加热干燥凝胶后, —

70℃放射自显影。在凝胶电泳实验中设特异性竞争性对照, 即在反应体系中加入 200 倍未标记的特异性 NF- κ B 探针, 室温下置 10min 后加入标记探针。以后步骤同凝胶电泳迁移率实验。将显影结果经扫描仪扫入计算机中, 图像分析系统进行分析, 以积分灰度值表示 NF- κ B 的活性变化。

1.3.3 中性粒细胞—EC—340 粘附率测定: 抗凝血 0.5ml 上述方法分离中性粒细胞, 用无血清 DMEM 悬浮中性粒细胞, 配制中性粒细胞工作悬液 1.0×10^4 /ml。人脐静脉内皮细胞株加入 DMEM 培养基 (GibcoBRL), 在 37℃ 5% CO₂ 培养箱中培养, 2~3 天 0.25%胰酶消化传代 1 次。培养成功的 EC—340 吸去培养基, 每孔加各时点中性粒细胞 (1.0×10^4 /ml) 100μl (其中含有 1×10^3 个中性粒细胞), 作用 30 分钟, 然后吸出上清液, 再用 200μl 无血清、无抗生素 DMEM 培养基轻洗 2 次, 共 500μl, 一并收集于 EP 管中。目视计数法计数 EP 管中的 PMN 数, 每管计数 2 次。采用以下公式计算粘附率:

$$\text{粘附率} = \frac{1 \times 10^4 - \text{收集 PMN 数}}{1 \times 10^4}$$

1.3.4 中性粒细胞心肌浸润程度 (MPO) 的测定: 参

照罗武生^[12]的方法进行。

1.4 统计学处理:以上数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,统计学方法采用第三军医大学数理统计软件作方差及相关性分析。

2 结果

2.1 缺血一再灌注时中性粒细胞 ICAM-1 的表达规律:表 1 示,对照组中性粒细胞 ICAM-1 表达在整个实验过程中无明显改变($P > 0.05$),而缺血一再灌注组和 PNS 预处理组 ICAM-1 表达从再灌注 120 分钟开始明显升高,360 分钟最高,与对照组比较差异具有显著意义($P < 0.05$)。PNS 预处理组较缺血一再灌注组增高幅度低($P < 0.05$)。

2.2 缺血一再灌注时中性粒细胞 NF- κ B 活性变化:表 2 示,中性粒细胞中 NF- κ B 有一定的基础活性。对照组中性粒细胞 NF- κ B 活性在整个实验过程中无明显改变($P > 0.05$),而缺血一再灌注组, NF- κ B 在心肌再灌注 30 分钟后即被激活,120 分钟活性达到高峰,后逐渐下降,但仍高于再灌注前($P < 0.05$)。PNS 预处理组, NF- κ B 活化规律与缺血一再灌注组相似,但其活化程度明显低于缺血一再灌注组($P < 0.05$)。

2.3 缺血一再灌注时中性粒细胞-EC-340 粘附率的变化:表 3 示,对照组中性粒细胞-EC-340 粘附率在整个实验间没有明显变化($P > 0.05$),在缺血一再灌注组和 PNS 预处理组中,心肌缺血一再灌注组 120 分钟时中性粒细胞-EC-340 粘附率明显升高,360 分钟最高,与对照组比较差别具有显著意义($P < 0.05$)。PNS 预处理组较缺血一再灌注组增高幅度低($P < 0.05$)。

2.4 缺血一再灌注时中性粒细胞心肌浸润程度(MPO)的变化:表 4 示,对照组 MPO 在整个实验期间没有明显变化($P > 0.05$),在缺血一再灌注组和 PNS 预处理组中,心肌缺血一再灌注 120 分钟时 MPO 明显升高,360 分钟最高,与对照组比较差别具有显著意义($P < 0.05$)。PNS 预处理组较缺血一再灌注组增高幅度低($P < 0.05$)。

心肌缺血一再灌注时,中性粒细胞的 ICAM-1 的表达与中性粒细胞-EC-340 粘附率及中性粒细胞心肌浸润程度(MPO)的变化有显著相关性($r = 0.8437, P < 0.05; r = 0.8149, P < 0.05$)。

3 讨论

核因子- κ B 是一个核转录因子,为 Rel 蛋白家族成员,由多肽 P50 和 P65 亚基形成同源性或异源性二聚体。非活化状态的 NF- κ B 以与 I κ B 聚合的三聚体形式或与前体蛋白聚合的二聚体形式存在于胞浆中。

多种因素如细胞因子(TNF- α 、IL-1 β 、IL-2)、病毒、氧化剂、异种抗原及紫外线照射等均是 NF- κ B 活化的刺激信号,能通过多种不同的信号转导途径,激活 NF- κ B 诱导激酶(NIK)或活化途径中的其它激酶,使 I κ B 磷酸化,在蛋白水解酶作用下发生降解,从而使 NF- κ B 得以活化而转核发挥其调控作用。NF- κ B 活化后能调控一系列基因的表达,如粘附分子家族的 ICAM-1、VCAM-1、E-selectin、P-Selectin,前炎症性细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-2、IL-6,化学趋化因子 MCP-1、IL-8 以及一些受体分子 IL-2 受体、T 细胞受体 α 、 β 链等^[4]。而这些物质都能直接或间接地参与心肌缺血一再灌注损伤。研究表明^[13],在培养的心肌细胞缺氧再给氧时, NF- κ B 被激活,其活性变化与 ICAM-1 的表达及心肌损伤有明显关联。也有资料提示^[7,14], NF- κ B 参与了心肌的缺血预适应。从而表明 NF- κ B 与心肌缺血一再灌注损伤关系密切。中性粒细胞在心肌缺血一再灌注后炎症反应中扮演重要角色,随着再灌注的进行,大量活化的中性粒细胞聚集在心肌微血管内并浸润到心肌组织中,通过释放细胞炎性物质、氧自由基、蛋白酶等物质引起心肌损伤^[2,15]。在介导中性粒细胞与内皮细胞粘附的过程中, ICAM-1 起重要作用。有研究表明,缺血一再灌注后心肌 ICAM-1 表达明显增高^[16,17]。ICAM-1 表达增高导致中性粒细胞浸润增加,心肌组织细胞损伤加剧。使用 ICAM-1 单抗或 ICAM-1 表达抑制剂即能达到心肌保护作用。但以往的研究更多地注意 ICAM-1 的心肌表达。我们的实验显示,中性粒细胞在缺血一再灌注后同样表达 ICAM-1,从再灌注后 120 分钟开始至 360 分钟逐渐增高,并与中性粒细胞与内皮细胞粘附率以及中性粒细胞的心肌浸润程度有相关性。提示中性粒细胞的 ICAM-1 表达也是心肌缺血一再灌注损伤发生的重要因素。

三七是我国的传统中药,具有散瘀止血、消肿定痛的功效。其主要成分三七总皂甙(PNS)具有耐缺氧、降血糖血脂、改善微循环、增强机体免疫力、抗炎、抗衰老等多方面的生理活性^[18]。目前认为, PNS 对抗心肌缺血再灌注损伤的作用机理主要是,抗氧自由基损伤;抗脂质过氧化;抑制钙通道防止钙超载;抑制肾素活性,降低 TXA₂/PEI₂ 比值;提高心肌 SOD 活性;增加心肌营养血流量等^[5]。那么三七总皂甙又如何改善心肌微循环,减轻再灌注后的“无复流”现象? 本研究表明,在缺血一再灌注时,中性粒细胞内的 NF- κ B 在再灌注 30 分钟时被激活,120 分钟时活性达到最高,之后活性有所下降。再灌注同时促使中性粒细胞的 ICAM-1

表达增加,而且 NF- κ B 的活性升高远在前在 ICAM-1 的表达升高之前;用三七总皂甙预处理后,NF- κ B 的活性明显被抑制,同时伴有 ICAM-1 表达的下降及中性粒细胞与内皮细胞粘附率、中性粒细胞心肌浸润的减少。提示中性粒细胞的 NF- κ B 活性变化与心肌再灌注损伤有关。从而在转录水平上表明心肌缺血一再灌注时存在 NF- κ B 活化的信号传导途径。NF- κ B 被激活后,通过调控粘附分子等蛋白的表达而参与再灌注损伤的发生过程。三七总皂甙通过抑制 NF- κ B 的活化,减少中性粒细胞粘附分子表达及中性粒细胞与内皮细胞粘附、中性粒细胞的心肌浸润程度,从而改善心肌微循环而起到心肌保护的作用。这也进一步阐明了三七总皂甙心肌保护作用的分子机理并为对抗心肌缺血一再灌注损伤提供了新的治疗途径。

参考文献

- 1 Kurose I, Anderson DC, Miyasaka M, et al. Molecular determinants of reperfusion - induced leukocyte adhesion and vascular protein leakage. *Circ Res*, 1994, 74(2): 336-343.
- 2 Hansen PR. Role of neutrophils in myocardial ischemia and reperfusion. *Circulation*, 1995, 91(6): 1872-1885.
- 3 Shyu KG, Chang H, Lin CC. Serum levels of intercellular adhesion molecule-1 and E-selectin in patients with acute ischemia stroke. *J Neurol*, 1997, 244(2): 90-93.
- 4 Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor - κ B: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med*, 1997, 336(15): 1066-1071.
- 5 李秀才. 抗心肌缺血再灌注损伤的中草药研究进展. *中国现代应用药学*, 1998, 15(4): 1-4.
- 6 刘季春, 陈朋, 方功德, 等. 三七总皂甙对犬心肌的保护作用. *中国循环杂志*, 1998, 13(2): 109-110.
- 7 Morgan EN, Boyle EM Jr, Yun W, et al. An essential role of NF- κ B in the cardioadaptive response to ischemia. *Ann Thorac Surg*, 1999, 68(2): 377-382.
- 8 Lindena J, Burkhardt H. Separation and chemiluminescence properties of human, canine and rat polymorphonuclear cells. *J Immuno Methods*, 1988, 115(1): 141-147.
- 9 Kravchenko VV, Pan Z, Han J, et al. Platelet-activating factor induces NF- κ B activation through a G protein-coupled pathway. *J Biol Chem*, 1995, 270(25): 14928-14934.
- 10 Thieblemont N, Haeflner - Cavaillon N, Haeflner A, et al. Triggering of complement receptors CR₁(CD35) and CR₃(CD11b/CD18) induces nuclear translocation of NF- κ B(P50/P65) in human monocytes and enhances viral replication of HIV - infected monocytic cells. *J Immunol*, 1995, 155(10): 4861-4867.
- 11 Osborn L, Kunkel S, Nabel GJ. Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 stimulate the human immunodeficiency virus enhancer by activation of the nuclear factor κ B. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86(7): 2336-2340.
- 12 罗武生, 郭兆贵. 用髓过氧化物酶法定量测定心肌组织中的中性白细胞. *中国药理学通报*, 1990, 6(4): 264-266.
- 13 Kacimi R, Karliner JS, Koudssi F, et al. Expression and regulation of adhesion molecules in cardiac cells by cytokines: response to acute hypoxia. *Circ Res*, 1998, 82(5): 576-586.
- 14 Maulik N, Sato M, Price BD, et al. An essential role of NF- κ B in tyrosine kinase signaling of p38 MAP kinase regulation of myocardial adaptation to ischemia. *FEBS Lett*, 1998, 429(3): 365-369.
- 15 Lefer AM, Campbell B, Shin YK, et al. Simvastatin preserves the ischemic - reperfused myocardium in normocholesterolemic rat hearts. *Circulation*, 1999, 100(2): 178-184.
- 16 Yoshimoto T. The expression of ICAM - 1 and cytokines in the reperfusional state. *Hokkaido Igaku Zasshi*, 1997, 72(1): 97-112.
- 17 司良毅, 陈运贞, 何国祥, 等. 细胞间粘附分子-1 表达水平对心肌再灌注损伤的影响及 N-乙酰半胱氨酸的保护作用. *中华心血管病杂志*, 2000, 28(1): 65-68.
- 18 陈英. 三七总皂甙的药理研究及临床应用进展. *广西医学*, 1998, 20(6): 1109-1112.

全国中医、中西医结合临床学术交流大会 全国针灸、推拿及外治法学术交流大会 征文通知

由中华中医药学会和中医杂志社联合主办的“全国中医、中西医结合临床学术交流大会”和“全国针灸、推拿及外治法学术交流大会”将于 2003 年 7 月在贵州省贵阳市举行。

全国中医、中西医结合临床学术交流大会(简称“中医会”)征文内容如下:(1)名老中医临床治疗经验总结;(2)临床辨证施治的经验;(3)中医和中西医结合临床治疗的新成果、新技术、新经验介绍;(4)基础研究及理论探讨;(5)临床应用成方、验方的治疗新体会,例如:半夏泻心汤、柴胡疏肝散等等,对其中一方在临床新用的经验与体会;(6)临床应用单味中药的治疗体会,例如夏枯草、牛蒡子等等,对其中一味中药在临床新用的经验体会;(7)对于某方剂或其单味中药的研究新成果;(8)药物外敷、外贴、外洗等临床新用的经验体会。

全国针灸、推拿及外治法学术交流大会(简称“针灸会”)征文内容如下:(1)针灸治疗常见病的经验;(2)推拿、按摩及其它理方法治疗常见病的经验;(3)气功和体育疗法治疗常见病的经验;(4)食疗治疗常见病的经验;(5)非药物康复治疗经验;(6)穴位埋线和割治法等治疗常见病的经验;(7)某一个新、旧穴位的临床应用经验体会;(8)常用配穴临床经验体会;(9)穴位研究新成果。

以上两会征文要求:(1)征文截止日期为 2003 年 3 月 30 日;(2)每位作者只限投一篇;(3)文稿要求字迹工整,字数在 2000~3000 字,尽量不用表格,请留底稿,字迹潦草者不予审阅;(4)文稿中的计量单位均须采用法定计量单位,如“克”应为“g”,“毫升”应为“ml”,“白细胞 5000/mm³”应为“白细胞 5×10⁹/L”等等;(5)文题下署作者姓名,作者单位名称、地址、邮政编码请写在稿纸首页末尾;(6)文稿务请加盖单位公章;(7)征文经专家审核后,录用文章将刊登在《中医杂志》2003 年增刊上,并由中华中医药学会和中医杂志社联合颁发论文证书,参会代表将授予继续教育学分;(8)请在投稿信封左下角注明“中医会”或“针灸会”字样。会议具体时间、地点另行通知。

欢迎计算机软盘及电子邮件投稿。

联系地址:北京东直门内南小街 16 号,中医杂志社东方岐黄科技服务中心,邮政编码:100700,联系人:牛易。

网址:www.jtcm.net.cn E-mail:jtcm@163.com