

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2017.06.015

左归丸和右归丸对去卵巢大鼠股骨骨髓 PPAR γ 、C/EBP β 、C/EBP α 蛋白表达的影响

张添昊, 任艳玲*, 艾思羽, 秦臻

(辽宁中医药大学, 辽宁省沈阳市崇山东路 79 号, 110032)

摘要 目的 探讨左归丸和右归丸治疗绝经后骨质疏松症的可能作用机制。方法 60 只大鼠随机分为空白组、假手术组、模型组、补佳乐组、左归丸组、右归丸组, 每组 10 只。除空白组、假手术组外, 其余各组经双侧卵巢切除手术建立绝经后骨质疏松症大鼠模型。3 天后, 左归丸组、右归丸组、补佳乐组给予相应药物灌胃, 剂量分别为 9.45 g/(kg·d)、10.26 g/(kg·d)、0.09 g/(kg·d), 空白组、假手术组、模型组灌胃 2ml 蒸馏水, 各组均灌胃 12 周。灌胃结束后, HE 染色观察股骨近端骨组织形态学变化, western blot 法检测股骨骨髓过氧化物酶增殖物激活受体 γ (PPAR γ)、CCAAT-增强子结合蛋白 β (C/EBP β)、CCAAT-增强子结合蛋白 α (C/EBP α) 蛋白表达量。结果 与空白组比较, 模型组大鼠股骨脂肪细胞数目以及骨髓 PPAR γ 、C/EBP β 、C/EBP α 蛋白表达明显升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 补佳乐组、左归丸组、右归丸组大鼠股骨脂肪细胞数目以及骨髓 PPAR γ 、C/EBP β 、C/EBP α 蛋白表达量均有不同程度降低, 并且补佳乐组、左归丸组优于右归丸组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 左归丸与右归丸均能改善去卵巢大鼠骨髓微环境, 其机制可能与抑制股骨脂肪分化和骨髓 PPAR γ 、C/EBP β 、C/EBP α 蛋白表达有关。

关键词 绝经后骨质疏松症; 左归丸; 右归丸; 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ ; CCAAT-增强子结合蛋白 β ; CCAAT-增强子结合蛋白 α ; 脂肪细胞

随着人口老龄化的加剧, 绝经后骨质疏松症 (postmenopausal osteoporosis, PMOP) 已成为威胁老年人健康的疾病之一, 其发病机制为妇女绝经后卵巢功能衰退, 体内的雌激素水平明显下降, 骨形成与骨吸收代谢平衡失调, 从而导致骨量丢失^[1]。成骨细胞和成脂细胞有一个共同的前体细胞源, 即骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs), 骨髓腔内骨与脂肪组织的量的维系是由 BMSCs 向成骨细胞与成脂细胞分化来决定的^[2-3]。研究发现, 绝经后妇女 BMSCs 产生分化成熟脂肪细胞能力增加^[4-5]。本实验采用切除大鼠双侧卵巢法建立绝经后骨质疏松症模型, 观察左归丸、右归丸对去卵巢大鼠股骨近端骨组织形态学和过氧化物酶增殖物激活受体 γ (PPAR γ)、CCAAT-增强子结合蛋白 β (C/EBP β)、CCAAT-增强子结合蛋白 α (C/EBP α) 表达的影响, 旨在为探讨左归丸和右归丸防治绝经后骨质疏松症的可能

分子机制。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级雌性未生育 SD 大鼠 60 只, 2 月龄, 体重 200 ~ 220 g, 购自辽宁长生生物技术有限公司, 实验动物许可证号: SCXK (辽) 2015-0001。

1.2 药品制备

左归丸: 熟地黄 24 g, 麸炒山药 12 g, 枸杞子 12 g, 山萸肉 12 g, 鹿角胶 12 g, 菟丝子 12 g, 牛膝 9 g, 龟甲胶 12 g。右归丸: 熟地黄 24 g, 麸炒山药 12 g, 枸杞子 12 g, 山萸肉 12 g, 鹿角胶 12 g, 菟丝子 12 g, 当归 9 g, 肉桂 6 g, 杜仲 9 g, 炮附片 6 g。中药饮片购于辽宁中医药大学附属第一医院, 自制成生药量 1 g/ml 水煎液。戊酸雌二醇片 (补佳乐, DELPHARM Lille S. A. S 公司, 批号 J20130009), 用蒸馏水溶化补佳乐为 0.1 mg/L。青霉素注射液 (河南新乡华星药厂, 批号: H41020818)。

1.3 主要试剂与仪器

PPAR γ 抗体 (批号: ab191407), Abcam 公

基金项目: 国家自然科学基金 (81373527)

* 通讯作者: 1053557608@qq.com, 13998293608

司; C/EBP β 抗体 (批号: bs1396R)、C/EBP α 抗体 (批号: bs1630R), 均购于北京博奥森生物技术有限公司; β -Actin (批号: cst #3700), 美国 CST 公司; RIPA 裂解液 (批号: 40N00150), ED-TA-Glycerol (批号: 45230202251), 均购于北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司; $2 \times$ 蛋白上样缓冲液 (批号: 10L16B31), 武汉博士德生物工程有限公司; ECL 发光液 (批号: P0018), 沈阳科硕商贸有限公司。Neofuge13R 台式高速冷冻离心机, 香港 Heal Force 公司; Alpha View SA 3.4.0 凝胶图像分析软件, 美国 NatureCrop 公司; X-Cite Adaptor 显微镜, 加拿大 LDGI 公司。

1.4 动物分组与模型建立

60 只大鼠适应性喂养 1 周后, 按体重分层采用随机数字表法分为空白组、假手术组、模型组、补佳乐组、左归丸组、右归丸组, 每组 10 只。采用 10% 水合氯醛 (0.3 ml/100 g) 进行麻醉。除空白组、假手术组外, 其余各组分别从背部切除双侧卵巢。假手术组只切除卵巢周围适量的脂肪组织, 不切除双侧卵巢。切口处术后立即给予青霉素 0.08 ml/100 g 肌肉注射, 预防感染。

1.5 给药方法

大鼠等效剂量按成人每日用药量的 6.3 倍计算。造模 3 天后, 左归丸组、右归丸组、补佳乐组分别灌胃相应药物, 剂量分别为 9.45 g/(kg·d)、10.26 g/(kg·d)、0.09 g/(kg·d), 空白组、假手术组、模型组灌胃给予 2 ml 蒸馏水, 均每日上午灌胃 1 次, 共 12 周。

1.6 观察指标及方法

末次给药 2 h 后, 麻醉, 取出大鼠股骨, 剔除肌肉和筋膜, 将左侧股骨投入到 4% 多聚甲醛溶液中固定。剪断右侧股骨两端, 显露髓腔, 用 1.5 ml PBS 缓冲液反复冲洗髓腔, 冲出骨髓, 直至骨干发白透亮。将冲出的骨髓 4℃ 2500 r/min 离心 10 min, 弃去 PBS, 将装有骨髓的离心管放入 -80℃ 冰箱保存, 用于提取总蛋白。

1.6.1 骨组织脂肪细胞数目 经 4% 多聚甲醛固定后股骨组织块置于 EDTA-Glycerol 脱钙液中脱钙, 4℃ 脱钙 21 天, 每 3~5 天更换 1 次脱钙液。经针刺法检测脱钙情况 (组织很容易被刺透而无阻力), 石蜡包埋。每组采用抽签法选取 3 只大鼠, 对每只大鼠股骨近端相同部位进行连续切片, 切片经常规 HE 染色后, 在光学显微镜下对每只大鼠相同部位进行观察拍片。每张图片选取 (200 ×)

视野, 统计视野内脂肪细胞数目。

1.6.2 western blot 法检测股骨骨髓组织 PPAR γ 、C/EBP β 、C/EBP α 蛋白表达 称取骨髓组织 0.1 g, 加入 500 μ l 蛋白裂解液研磨提取匀浆液, 4℃ 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清, 加入上样缓冲液, 100℃ 变性 5 min, 蛋白变性后, 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 每孔上样等量总蛋白, 电泳后转膜 2 h, 封闭 2 h, 一抗孵育 1 h 后, 4℃ 过夜, 次日二抗孵育 1 h 后, TBST 充分洗膜后, 加入 ECL 发光液, 曝光, 扫描图像后分析结果, 计算目的蛋白与内参 (β -Actin) 条带灰度值的比值后, 再进行各组比较。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 13.0 软件。数据用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 用单因素方差分析, 方差齐采用 LSD 检验, 方差不齐采用 Tamhane's 方法。

2 结果

2.1 各组大鼠股骨近端骨组织形态学表现

图 1、表 1 示, 与空白组比较, 假手术组股骨近端骨小梁排列致密整齐, 形态完整, 骨髓中有少量的脂肪细胞, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与空白组比较, 模型组骨小梁结构紊乱稀疏变细, 股骨近端骨髓脂肪细胞数目增多 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 补佳乐组、左归丸组、右归丸组股骨近端骨髓脂肪细胞数目明显减少 ($P < 0.01$); 右归丸组股骨近端骨髓脂肪细胞数目多于左归丸组和补佳乐组 ($P < 0.01$)。

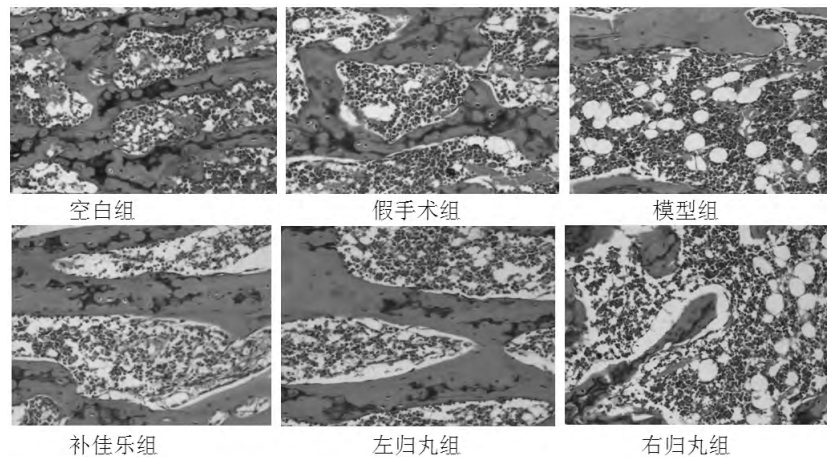
表 1 各组大鼠股骨近端脂肪细胞数目比较 (个, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	脂肪细胞数目 (个)
空白组	10	39.67 $\pm$ 7.234
假手术组	10	52.33 $\pm$ 14.640 $^{\Delta}$
模型组	10	162.33 $\pm$ 7.767 *
补佳乐组	10	38.67 $\pm$ 5.508 $^{\Delta\Delta}$
左归丸组	10	46.33 $\pm$ 11.846 $^{\Delta\Delta}$
右归丸组	10	88.67 $\pm$ 3.055 $^{*}\Delta$

注: 与空白组比较, $^{*} P < 0.01$; 与模型组比较, $^{\Delta} P < 0.01$; 与右归丸组比较, $^{\Delta\Delta} P < 0.05$, $^{\Delta\Delta\Delta} P < 0.01$

2.2 各组大鼠股骨骨髓组织 PPAR γ 、C/EBP β 、C/EBP α 蛋白表达比较

表 2 示, 与空白组比较, 假手术组大鼠股骨骨髓 PPAR γ 、C/EBP β 、C/EBP α 蛋白表达量相当 ($P > 0.05$), 而模型组大鼠股骨骨髓 PPAR γ 、C/EBP β 、C/EBP α 蛋白表达量升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 补佳乐组、左归丸组、右归丸组股骨骨髓 PPAR γ 、C/EBP β 、C/EBP α 蛋白表达明显



注：脂肪细胞表现为圆形不着色空洞

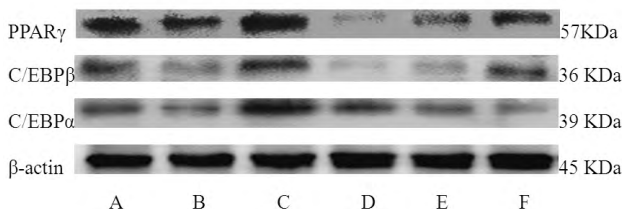
图 1 各组大鼠股骨近端骨组织形态学表现 (HE 染色 $\times 200$)

表 2 各组大鼠股骨髓组织 PPAR γ 、C/EBP β 、C/EBP α 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	PPAR γ	C/EBP β	C/EBP α
空白组	10	0.8564 $\pm$ 0.02210	0.7238 $\pm$ 0.01462	0.7440 $\pm$ 0.00844
假手术组	10	0.8413 $\pm$ 0.03218 Δ	0.6808 $\pm$ 0.02500 Δ	0.7002 $\pm$ 0.03402 Δ
模型组	10	1.2284 $\pm$ 0.01390 *	0.9871 $\pm$ 0.05643 *	1.1510 $\pm$ 0.03043 *
补佳乐组	10	0.7550 $\pm$ 0.04272 * Δ $\blacktriangle$	0.6683 $\pm$ 0.03329 Δ $\blacktriangle$	0.7683 $\pm$ 0.04193 Δ
左归丸组	10	0.7594 $\pm$ 0.03856 * Δ $\blacktriangle$	0.6738 $\pm$ 0.07877 Δ $\blacktriangle$	0.7594 $\pm$ 0.05659 Δ
右归丸组	10	0.9600 $\pm$ 0.03905 * Δ	0.7783 $\pm$ 0.02930 Δ	0.8100 $\pm$ 0.03122 * Δ

注：PPAR γ ，过氧化物酶体增殖物激活受体 γ ；C/EBP β ，CCAAT-增强子结合蛋白 β ；C/EBP α ，CCAAT-增强子结合蛋白 α ；与空白组比较，* $P < 0.01$ ；与模型组比较， $\Delta P < 0.01$ ；与右归丸组比较， $\blacktriangle P < 0.05$ ， $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$

降低 ($P < 0.01$)，右归丸组 PPAR γ 、C/EBP β 表达量高于左归丸组和补佳乐组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。



注：A，空白组；B，假手术组；C，模型组；D，补佳乐组；E，左归丸组；F，右归丸组；PPAR γ ，过氧化物酶增殖物激活受体 γ ；C/EBP β ，CCAAT-增强子结合蛋白 β ；C/EBP α ，CCAAT-增强子结合蛋白 α

图 2 各组大鼠骨髓组织 PPAR γ 、C/EBP β 、C/EBP α 蛋白电泳图

3 讨论

绝经后骨质疏松症是女性绝经后常见的骨代谢疾病，属于中医学“骨痿”范畴。中医学认为，PMOP 病因是肾阴损及肾阳，以致阴阳俱虚。阴精为充骨生髓的物质基础，阳精为阴精的原动力。依据“肾主骨，生髓”理论，肾精不足所致的骨髓空虚是 PMOP 发病的关键，治疗应以补肾为基本治

则。左归丸与右归丸均出自明代医家张景岳的《景岳全书》，左归丸功效为滋阴补肾、填精益髓，方中熟地黄滋阴补肾，龟甲胶、鹿角胶为血肉有情之品，峻补精髓，育阴涵阳，取阳中求阴之意；右归丸功效为温补肾阳、填精益髓，重用附子、肉桂、鹿角胶大补肾中元阳，补阳药与补阴药相配，则阳得阴助而生化无穷，体现了阴中求阳的治疗法则。

BMSCs 是一种具有多向分化潜能的细胞，能够向成骨细胞、成软骨细胞、成肌细胞、肌膜细胞、成脂细胞等分化。随着年龄的增长骨髓细胞中大部分细胞被脂肪细胞所取代，BMSCs 向成骨与成脂细胞分化的失衡会导致 PMOP 的发生^[1]。孙月娇^[2]研究发现，左归丸、右归丸及其拆方皆可促进成骨细胞、抑制脂肪细胞分化，有效预防 PMOP 的发生。李书娟^[3]研究发现，左归丸、右归丸对绝经后女性脂质代谢紊乱起到很好的调节作用。

过氧化物酶增殖物激活受体 (PPARs) 属核激素受体超家族，共分为 α 、 β (也称 δ)、 γ 三种亚型。PPAR γ 作为脂肪细胞成熟的关键因子，在骨髓细胞中表达，调节成脂和成骨分化方向，从而影

响骨髓成骨与成脂细胞数目^[10-11]。CCAAT 结合蛋白 (C/EBP) 是一类拥有 6 个成员的转录因子家族, 在脂肪细胞生产中 C/EBP 家族成员起到重要作用^[12-13]。C/EBP β 可诱导 PPAR γ 的表达, 作用发生于成脂化过程的初期, 表达的 PPAR γ 再诱导 C/EBP α 的产生, C/EBP α 则作用于成脂化末期^[14]。PPAR γ 激活 C/EBP α 因子, C/EBP α 和 PPAR γ 共同激活相关基因表达, 促进脂肪细胞最终分化, 这三种转录因子协同调控脂肪细胞的生成^[15-16]。

本研究结果显示, 与模型组比较, 各用药组大鼠股骨骨髓成脂分化转录因子 PPAR γ 、C/EBP β 、C/EBP α 蛋白表达有不同程度降低, 并且股骨组织脂肪细胞数目减少, 其中左归丸组和补佳乐组疗效最好, 且左归丸组疗效优于右归丸组。证实骨形成的减少与骨组织中脂肪组织的增加相伴发生, 且补肾益精中药可以调控 BMSCs 的分化, 其中滋阴补肾、填精益髓的左归丸治疗 PMOP 的效果最佳。

参考文献

- [1] DALLE CARBONARE L, VALENTI MT, ZANATTA M, et al. Circulating mesenchymal stem cells with abnormal osteogenic differentiation in patients with osteoporosis [J]. Arthritis Rheum, 2009, 60(11): 3356-3365.
- [2] 李慧武, 戴冠戎. 骨髓内成骨与成脂平衡的调控 [J]. 国外医学骨科学分册, 2005, 26(5): 288-289.
- [3] KUSHWAHA P, KHEDGIKAR V, GAUTAM J, et al. A novel therapeutic approach with Caviunin-based isoflavonoid that en routes bone marrow cells to bone formation via BMP2/Wnt- β -catenin signaling [J]. Cell Death Dis, 2014, 5: e1422. doi: 10.1038/cddis.2014.350.
- [4] NUTTALL ME, GIMBLE JM. Controlling the balance between osteoblastogenesis and adipogenesis and the consequent therapeutic implications [J]. Curr Opin Pharmacol, 2004, 4(3): 290-294.
- [5] FAN JZ, WANG Y, MENG Y, et al. Panax notoginseng saponins mitigate ovariectomy-induced bone loss and inhibit marrow adiposity in rats [J]. Menopause, 2015, 22(12): 1343-1350.
- [6] YEUNG DK, GRIFFITH JF, ANTONIO GE, et al. Osteoporosis is associated with increased marrow fat content and decreased marrow fat unsaturation: a proton MR spectroscopy study [J]. J Magn Reson Imaging, 2005, 22(2): 279-285.
- [7] MYERS TJ, GRANERO-MOLTO F, LONGOBARDI L, et al. Mesenchymal stem cells at the intersection of cell and gene therapy [J]. Expert Opin Biol Ther, 2010, 10(12): 1663-1679.
- [8] 孙月娇. 左、右归丸及其拆方调节去卵巢骨质疏松大鼠成骨与成脂平衡的研究 [D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2015.
- [9] 李书娟. 左、右归丸及其拆方调节去卵巢大鼠脂质代谢的研究 [D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2016.
- [10] 刑丽, 解汝娟. 过氧化物酶增殖物激活受体与骨代谢 [J]. 中国老年学杂志, 2007, 27(17): 1742-1744.
- [11] KNOUFF C, AUWERX J. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ calls for activation in moderation: lessons from genetics and pharmacology [J]. Endocr Rev, 2004, 25(6): 899-918.
- [12] CONZE D, WEISS L, REGEN PS, et al. Autocrine production of interleukin 6 causes multidrug resistance in breast cancer cells [J]. Cancer Res, 2001, 61(24): 8851-8858.
- [13] 蒋旭鹏, 潘晓琳, 潘泽民. 转录因子 C/EBP β 的研究进展 [J]. 中国公共卫生, 2011, 27(12): 1628-1629.
- [14] HU E, TONTONOS P, SPIEGELMAN BM. Transdifferentiation of myoblasts by the adipogenic transcription factors PPAR γ and C/EBP α [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92(21): 9856-9860.
- [15] ROSEN ED, WALKER CJ, PUIGSERVER P, et al. Transcriptional regulation of adipogenesis [J]. Genes Dev, 2000, 14(11): 1293-1307.
- [16] TANG QQ, LANE MD. Activation and centromeric localization of CCAAT/enhancer-binding proteins during the mitotic clonal expansion of adipocyte differentiation [J]. Genes Dev, 1999, 13(17): 2231-2241.

Impact of Zuogui Pill (左归丸) and Yougui Pill (右归丸) on Expressions of PPAR γ , C/EBP β and C/EBP α Proteins in Femur Bone Marrow of Ovariectomized Rats

ZHANG Tianhao, REN Yanling, AI Siyu, QIN Zhen

(Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang, 110032)

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of Zuogui Pill (左归丸) and Yougui Pill (右归丸) in treating postmenopausal osteoporosis (PMOP). **Methods** Sixty rats were randomized into a blank group, a sham operation group, a model group, an estradiol valerate tablets group, a Zuogui Pill group and a Yougui Pill group, 10 rats in each group. Except the blank group and the sham operation group, rats in other groups were built PMOP

models by bilateral oophorectomy. After 3 days, the Zuogui Pill group, Yougui Pill group and estradiol valerate tablets group were given corresponding medicine by gavage, with the dose of 9.45 g/(kg · d), 10.26 g/(kg · d), and 0.09 g/(kg · d), respectively. The blank group, the sham operation group and the model group were given 2 ml of distilled water by gavage. All groups were treated for 12 weeks. After intragastric administration was over, morphological changes of bone in proximal femur was examined by hematoxylin and eosin stain (HE stain). The expressions of femur bone marrow peroxisome proliferator activated receptors γ (PPAR γ), CCAAT-enhancer binding protein β (C/EBP β) and CCAAT-enhancer binding protein α (C/EBP α) were detected with Western blot method. **Results** Compared with the blank group, fat cells in the femur, and the expressions of bone marrow PPAR γ , C/EBP β and C/EBP α proteins in the model group increased ($P < 0.01$). Compared with the model group, fat cells in the femur, and the expressions of bone marrow PPAR γ , C/EBP β and C/EBP α proteins in the estradiol valerate tablets group, the Zuogui Pill group and the Yougui Pill group decreased to varying degrees, especially in the estradiol valerate tablets group and the Zuogui Pill group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** Zuogui Pill and Yougui Pill might both improve the bone marrow microenvironment of ovariectomized rats. The mechanism might relate to inhibiting the femur adipose differentiation and the expressions of bone marrow PPAR γ , C/EBP β and C/EBP α proteins.

Keywords postmenopausal osteoporosis; Zuogui Pill; Yougui Pill; peroxisome proliferator activated receptors γ ; CCAAT-enhancer binding protein β ; CCAAT-enhancer binding protein α ; fat cell

(收稿日期: 2016-07-18; 修回日期: 2016-10-23)

编辑: 王利芬

第四届国际中医药临床研究新进展暨养生保健学术大会征文通知

由世界中医药学会联合会国际合作部、《世界中医药》杂志社联合主办的“第四届国际中医药临床研究新进展暨养生保健学术大会”将于 2017 年 5 月 19 日至 22 日在中国福建省泉州市滨海大酒店举行。

一、会议征文与研讨内容

(一) 中医临床及养生保健: (1) 发挥中医特色、继承老中医学术经验的总结; (2) 中医药现代研究的新思路、新方法; (3) 中医、中西医结合临床研究和治疗的新经验、新成果; (4) 中医基础理论探讨; (5) 临床应用处方及验方的治疗体会; (6) 中医食疗及药膳方法介绍及理论研究; (7) 中医养生方法及理论研究; (8) 临床应用推拿、按摩及其它理疗方法的经验; (9) 非药物康复治疗经验总结。

(二) 中药的临床应用及研发与创新: (1) 中药新药的临床研究; (2) 中成药的合理应用; (3) 中西药合并应用的合理性和安全性; (4) 中药临床用药不良反应的分析与防范; (5) 创新药物研发规律与中药制剂创新战略; (6) 中药新药防治疑难病症; (7) 中药复方研究的思路、经验与模式; (8) 中药制剂工艺设计和质量标准化研究; (9) 中药制剂药动力学与生物等效性的研究。

二、征文要求

(1) 论文要求论点明确、论据充分、结构严密、层次分明、文字精炼,具有科学性、创新性、实用性; (2) 征文请附医院或主管单位介绍信; (3) 文题下署作者姓名,作者单位名称、地址、邮政编码、电话请写在文稿末尾,请在投稿信封左下角注明“会议”字样; (4) 每位作者可投数篇论文(要求 2000 字以内); (5) 征文经专家评审后,录用文章将刊登在《世界中医药》杂志 2017 年增刊上(第 1、第 2 作者分别授予国家继续教育学分),并邀请参加会议,入选论文将安排在大会上交流,参加会议者颁发证书并授予国家 II 类继续教育 10 学分。征文截止日期为 2017 年 4 月 18 日。

三、会议地址及住宿: 滨海大酒店(四星级) 泉州市丰泽区美桐街中段 28 号(长途中心客运站旁), 电话: 0595-22135555。住宿: 双人标间 160 元/床/天; 单人间 270 元/天。

四、注册费用: 国内代表每位 1680 元(含餐费、场地租用费、专家讲课费、会议资料、礼品、会议合影照片、参观交通费); 提前 2 个月回执者优惠 10%。

五、投稿地址: 世界中医药学会联合会国际合作部、《世界中医药》杂志社,北京市朝阳区小营路 19 号财富嘉园 A 座 303 室, 邮编: 100101, 电话: (010) 58239055、(010) 62143672, 手机: 13901318403, <http://www.wfcm.org>, E-mail: 13901318403@139.com。联系人: 王炳岐、徐晖、邓爱英、赵和爱。

六、汇款方式

1. 邮局汇款: 收款人: 北京华盛国际医药信息交流中心; 2. 银行汇款: 户名: 北京华盛国际医药信息交流中心, 开户银行: 兴业银行知春路支行, 帐号: 321180100100043563。