

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2014.22.015

实验研究

益肾化浊方对 SAMP8 小鼠学习记忆能力及海马神经元突触关键蛋白 CREB 的影响

张玉莲^{*}, 崔远武¹, 周震¹, 张琳琳¹, 宋宛珊², 韩文文¹

(1. 天津中医药大学第二附属医院, 天津市河北区真理道 816 号, 300150; 2. 天津中医药大学)

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(“973”计划)资助项目(2010CB530405); 国家自然科学基金资助项目(81273940)

摘要 目的 观察益肾化浊方对 SAMP8 小鼠学习记忆能力及海马神经元突触关键蛋白环磷酸腺苷效应元件结合蛋白(CREB)的影响。方法 取 30 只 12 月龄快速老化小鼠(SAMP8), 随机分为 SAMP8 组、盐酸多奈哌齐组及益肾化浊方组, 另取 10 只正常老化小鼠(SAMR1)作为对照组。其中 SAMR1 组及 SAMP8 组不干预, 益肾化浊方组给予益肾化浊方生药 9.62 mg/kg, 盐酸多奈哌齐组给予盐酸多奈哌齐 0.01 mg/g, 通过 Morris 水迷宫实验检测各组小鼠学习记忆能力; 通过电镜观察各组小鼠海马神经元突触微观形态学变化; 采用 Western blot 法检测各组小鼠海马组织 CREB 蛋白的表达。结果 在定位航行实验中, SAMP8 组小鼠的潜伏时间与游泳总路程比 SAMR1 组明显延长($P < 0.05$), 与 SAMP8 组小鼠比较, 益肾化浊方组小鼠潜伏时间与游泳总路程明显缩短($P < 0.05$); 空间探索实验中, 与 SAMR1 组比较, SAMP8 组小鼠穿越目标象限次数与 $t/t_{\text{总}}$ 明显减少($P < 0.05$), 益肾化浊方组穿越目标象限次数和 $t/t_{\text{总}}$ 较 SAMP8 组显著增加($P < 0.05$), 而盐酸多奈哌齐组穿越目标象限次数较 SAMP8 组显著增加($P < 0.05$)。电镜下 SAMR1 组小鼠海马神经元突触间隙清晰, 突触前线粒体嵴和膜完整, 突触小泡数量正常, 大小均一。而 SAMP8 组突触间隙完全融合、模糊不清, 突触前重度水肿, 未见线粒体, 突触小泡数量大量减少, 大小不均一, 益肾化浊方组突触间隙少部分融合, 突触前水肿程度减轻, 对于突触损伤的缓解程度优于盐酸多奈哌齐组。与 SAMR1 组比较, SAMP8 组小鼠海马组织 CREB 表达明显减少($P < 0.05$), 益肾化浊方组与盐酸多奈哌齐组可上调 CREB 的表达($P < 0.05$)。结论 益肾化浊方可明显改善 SAMP8 小鼠学习记忆能力, 可能与上调海马组织内 CREB 蛋白的表达, 保护海马神经元突触微观形态, 进而改善神经元突触功能有关。

关键词 益肾化浊方; SAMP8 鼠; 神经元; 突触; 环磷酸腺苷效应元件结合蛋白

阿尔茨海默病(alzheimer's disease, AD)是一种以进行性认知障碍为主的中枢神经系统退行性疾病, 其中记忆减退为其首要症状^[1]。近年来研究表明, 突触(synapse)可塑性是导致 AD 患者学习记忆能力减退的重要发病基础^[2], 所谓突触可塑性是指突触在形态和功能上的改变, 包括突触结构以及神经递质释放等功能。环磷酸腺苷效应元件结合蛋白(CREB)作为突触关键蛋白, 在长期记忆形成过程中起着其至关重要的作用^[3]。本研究选用 12 月龄快速老化小鼠(SAMP8)为模型, 观察益肾化浊方对其学习记忆能力的改善, 以及对突

触微观形态及海马神经元 CREB 蛋白表达的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选择 12 月龄健康雄性 SAMP8 小鼠 30 只, SAMR1 小鼠 10 只, 体重(30 ± 2) g, 由天津中医药大学第一附属医院赠送, 实验动物许可证号: SCXK(津)2010-0001。

1.2 试剂与仪器

兔抗大鼠 CREB 单克隆抗体试剂盒(美国 Abcam 公司, 批号: ab32096)、辣根酶标记羊抗鼠 IgG(Millipore 公司, 批号: AP136P)、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒(碧云天生物技术有限公司, 批

* 通讯作者: zhyl220@126.com, (022) 60335355

号: P0012A)、TGL-16C 离心机(上海安亭科学仪器有限公司)、dmrxa2 型全自动多功能显微镜(德国莱卡公司)、H-7500 型透射电子显微镜(日立建机株式会社)。

1.3 药物

益肾化浊方组成:淫羊藿 10 g、补骨脂 10 g、制何首乌 12 g、女贞子 10 g、石菖蒲 12 g、炙黄芪 10 g、川芎 10 g。水煎 3 次,每次 0.5 h,煎煮液浓缩至含生药浓度为 0.8 g/ml。以上均由天津中医药大学第二附属医院制剂室制备,4℃ 保存备用。盐酸多奈哌齐[安理申,卫才(中国)药业有限公司,5 mg/片,批号:20100319]。

1.4 动物分组

按照随机数字表法将 30 只 SAMP8 小鼠随机分为 SAMP8 组、盐酸多奈哌齐组、益肾化浊方组,每组 10 只,另取 10 只正常老化小鼠(SAMR1)作为对照组。

益肾化浊方组给药剂量参照《药理实验方法学》^[4]中人和动物间按体表面积折算的等效剂量比值计算,小鼠每日给予益肾化浊方 9.62 g/kg 制成浓煎液,按 13 ml/kg 灌胃。盐酸多奈哌齐组小鼠每日给予浓度为 0.1 mg/ml 的盐酸多奈哌齐溶液,按 0.1 ml/g 灌胃,两组均连续灌胃 4 周。SAMR1 组及 SAMP8 组小鼠不干预。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 Morris 水迷宫实验^[5] 灌胃结束 1 周后开始水迷宫实验,实验分为定位航行实验和空间探索实验。水迷宫为直径 120 cm,高 50 cm,水池深 30 cm,水温控制在(23.0±0.5)℃。在水池边缘等距离标有四个入水点,将水池分为四个象限,平台位于第一象限水下 1 cm 处。

定位航行实验:将各组小鼠预训练 3 天,每天 2 次,设定时间为 90 s,若小鼠在 90 s 内找到站台,让其在站台上停留 20 s,若动物未找到站台,将其放在站台上使其停留 20 s。第 4 天开始正式实验,记录小鼠平均潜伏时间(从入水起点至寻找到站台出水的时间),若设定时间内未找到站台,计算机停止跟踪,记录时间为 90 s,同时记录小鼠游泳总路程,以此作为学习能力的检测指标。

空间探索实验:航行定位实验结束第 2 天,将平台撤除,开始 60 s 的探查训练。将小鼠由原先平台象限的对侧放入水中。记录动物在目标象限(原先放置平台的象限)所花时间与总时间比($t/t_{\text{总}}$)和进入该象限的次数,以此作为空间记忆的

检测指标。

1.5.2 电镜观察小鼠海马突触微观形态 每组选取 4 只小鼠进行腹腔麻醉,取脑,在冰上取皮层区的组织块,体积为 1 mm³,放入前固定液(4%戊二醛固定液)中,7 天内进行锇酸固定、乙醇脱水、树脂包埋聚合,最后制成 50 nm 的超薄切片。用醋酸铀 30~40 min 和柠檬酸铅 30 min 双重电子染色,置于透射电镜下观察各组海马突触超微结构。

1.5.3 免疫印迹法检测海马 CREB 蛋白表达 每组选取 6 只小鼠取双侧海马组织,首先进行蛋白浓度的测定,对蛋白样品进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,转膜,封闭,加入一抗进行孵育,在 4℃ 下静置过夜。洗涤后加入二抗孵育,进行充分洗涤,化学发光显影,定影,蒸馏水冲洗终止。凝胶图像处理系统分析结果。灰度比(GSR)=(测得目的蛋白强度×面积)/(内参蛋白 β-actin 强度×面积)。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计分析软件进行处理,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 各组小鼠学习记忆能力比较

各组小鼠采用的策略均有差异,SAMR1 组主要采用趋向式和直线式的策略,而 SAMP8 组主要采用边缘式和随机式的策略,益肾化浊方组和盐酸多奈哌齐组趋向式和直线式策略较 SAMP8 组多,且益肾化浊方组优于盐酸多奈哌齐组。

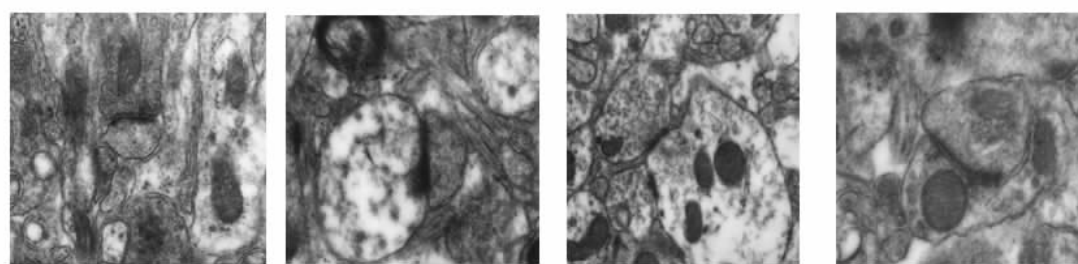
表 1 示,与 SAMR1 组相比,SAMP8 组小鼠潜伏时间与游泳路程明显延长($P < 0.05$);与 SAMP8 组比较,益肾化浊方组小鼠潜伏时间与游泳路程明显缩短($P < 0.05$)。

表 1 各组小鼠学习能力的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	潜伏时间(s)	游泳总路程(cm)
SAMR1 组	10	54.87±5.45	645.98±227.65
SAMP8 组	10	79.68±9.65*	1022.45±456.43*
盐酸多奈哌齐组	10	70.15±8.17	939.66±366.47
益肾化浊方组	10	62.39±8.38 [△]	769.88±179.75 [△]

注:与 SAMR1 组比较,* $P < 0.05$;与 SAMP8 组比较, $\Delta P < 0.05$

表 2 示,与 SAMR1 组比较,SAMP8 组小鼠出现了明显的空间记忆障碍,穿越次数及 $t/t_{\text{总}}$ 显著下降($P < 0.05$);益肾化浊方组穿越目标象限次数和 $t/t_{\text{总}}$ 较 SAMP8 组显著增加($P < 0.05$),而盐酸多奈哌齐组穿越目标象限次数较 SAMP8 组显著增加($P < 0.05$)。



SAMR1 组

SAMP8 组

盐酸多奈哌齐组

益肾化浊方组

图 1 各组小鼠海马神经元突触超微结构观察 (×15 000)

表 2 各组小鼠记忆能力的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	穿越次数 (次)	t/t _总 (%)
SAMR1 组	10	5.10 ± 1.03	56.8 ± 8.22
SAMP8 组	10	1.54 ± 0.97*	35.22 ± 4.53*
盐酸多奈哌齐组	10	3.97 ± 1.12 [△]	40.91 ± 5.62
益肾化浊方组	10	4.68 ± 1.23 [△]	51.23 ± 7.34 [△]

注: 与 SAMR1 组比较, * $P < 0.05$; 与 SAMP8 组比较, $\Delta P < 0.05$

2.2 各组小鼠海马神经元突触微观形态变化

电镜下观察, SAMR1 组突触间隙清晰, 突触前线粒体嵴和膜完整, 突触小泡数量正常, 大小均一。而 SAMP8 组突触间隙完全融合、模糊不清, 突触前重度水肿, 未见线粒体, 突触小泡数量大量减少, 大小不均一。益肾化浊方组突触间隙少部分融合, 突触前水肿程度减轻, 对于突触损伤的缓解程度优于盐酸多奈哌齐组, 见图 1。

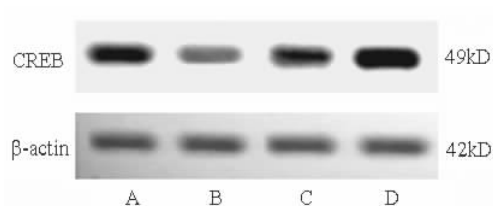
2.3 各组小鼠海马组织 CREB 蛋白表达比较

表 3 示, 与 SAMR1 组比较, SAMP8 组小鼠海马组织 CREB 表达明显减少 ($P < 0.05$), 益肾化浊方组与盐酸多奈哌齐可上调 CREB 的表达 ($P < 0.05$), 各组小鼠海马组织 CREB 蛋白电泳图见图 2。

表 3 各组小鼠海马组织 CREB 蛋白表达比较 (CREB/ β -actin, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	蛋白含量
SAMR1 组	6	1.92 ± 0.21
SAMP8 组	6	0.88 ± 0.19*
盐酸多奈哌齐组	6	1.18 ± 0.09 [△]
益肾化浊方组	6	1.74 ± 0.18 [△]

注: 与 SAMR1 组比较, * $P < 0.05$; 与 SAMP8 组比较, $\Delta P < 0.05$



注: A SAMR1 组; B SAMP8 组; C 盐酸多奈哌齐组; D 益肾化浊方组

图 2 各组小鼠海马组织 CREB 蛋白电泳图

3 讨论

AD 属中医学“痴呆”范畴, 肾虚精亏、髓海不足是 AD 形成的基本病机^[1], 并始终贯穿该病的全过程^[2]。同时, 随着肾精亏虚, 其他脏腑功能也相应虚衰, 气血运化不畅成瘀, 津液失于布化为痰, 痰瘀互结, 酿生浊毒而痹阻脑络, 因肾虚而致浊毒成为 AD 发病的主要因素。因此, 在中医“肾藏精”、“肾生髓通于脑”经典脏象理论的指导下, 从肾虚浊毒入手, 以益肾化浊方治疗 AD, 切中病机。方中淫羊藿、补骨脂壮肾阳, 温助肾精, 制何首乌、女贞子益肾精, 生髓益脑; 石菖蒲化痰开窍; 炙黄芪补气行血; 川芎辛散上行, 为血中气药, 三者合用可达化浊开窍之目的。诸药相辅相成, 共奏补肾益精、化浊开窍之功^[3]。

SAMP8 鼠为快速易老化小鼠, 寿命一般为 12~13 个月。研究显示, 在 SAMP8 小鼠中, 抗氧化应激反应酶——锰超氧化物歧化酶^[4]、过氧化氢酶^[5]及谷胱甘肽过氧化物酶^[6]的水平降低, 并且脑内出现了 Tau 蛋白的异常磷酸化^[7]、A β 蛋白的沉积以及胶质细胞的增生^[8], 这均符合 AD 的病理机制, 因此可作为动物模型广泛应用于 AD 相关的基础研究^[9]。除此之外行为学检测发现, 与同龄 SAMR1 小鼠相比, 12 月龄的 SAMP8 小鼠出现了明显的衰老特征^[10], 这为本研究选择 12 月龄 SAMP8 小鼠作为研究对象提供了理论依据。

大脑学习记忆能力的产生与突触密切相关, 突触可塑性则被认为是学习与记忆的细胞分子学基础^[11]。突触可塑性包括突触形态的改变、新的突触的形成及传递性能的建立。本研究 Morris 水迷宫结果显示, 益肾化浊方可明显改善 SAMP8 小鼠的学习记忆能力, 同时电镜下观察发现 SAMP8 组小鼠海马神经元突触间隙完全融合、模糊不清, 突触前重度水肿, 未见线粒体, 突触小泡数量大量减少, 大小不均一。而益肾化浊方可明显减轻突触的

水肿程度,改善其微观形态,并优于盐酸多奈哌齐,由此推测益肾化浊方改善 SAMP8 小鼠学习记忆能力可能与改善其海马神经元突触微观形态相关。

CREB 是一种具有选择性特异结合 cAMP 反应元件的核蛋白,研究发现该蛋白可调节突触可塑性相关的基因转录^[7]。在细胞内,多条信号通道都能磷酸化 CREB 并使其激活,进而调节下游基因转录和新蛋白合成,从而影响突触传递功能^[8]。同时对神经元的存活、分化、再生和修复起重要作用,如 CREB 磷酸化后不仅可调节即早基因如 c-fos、c-jun 等的表达,而且还调节抗凋亡和保护性蛋白分子及神经营养因子的表达,因此与学习记忆关系密切^[9]。本研究发现 SAMP8 小鼠海马 CREB 蛋白的含量与 SAMR1 组比较明显减少,而益肾化浊方干预后,CREB 表达升高,可见益肾化浊方可能通过提高 CREB 的表达改善 SAMP8 小鼠的学习记忆能力。

本实验借助 SAMP8 小鼠为动物模型,采用益肾化浊方与西药盐酸多奈哌齐进行干预,运用行为学、形态学、分子生物学等方法进行观察,发现益肾化浊方可明显改善 SAMP8 小鼠学习记忆能力,该作用可能与上调 CREB 蛋白,保护神经元突触微观形态,改善了突触可塑性相关,但该方是否进一步调控 CREB 相关的信号通路,还有待深入系统的研究。

参考文献

- [1] Cummings JL, Ringman J, Metz K, et al. Mary S • Easton Center of Alzheimer's Disease Research at UCLA: advancing the therapeutic imperative [J]. J Alzheimers Dis, 2010, 19(2): 375-388.
- [2] Li B, Wanka L, Blanchard J, et al. Neurotrophic peptides incorporating adamantane improve learning and memory, promote neurogenesis and synaptic plasticity in mice [J]. FEBS Lett, 2010, 584(15): 3359-3365.
- [3] Hansen RT 3rd, Zhang HT. Senescent-induced dysregulation of cAMP/CREB signaling and correlations with cognitive decline [J]. Brain Res, 2013, 1516: 93-109. doi: 10.1016/j.brain.res.2013.04.033. Epub 2013 Apr 25.
- [4] 徐叔云. 药理实验方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 20.
- [5] 刘金凤, 聂坤, 栗振杰, 等. Morris 水迷宫测评方法的改进及对快速老化痴呆小鼠 SAMP8 认知功能的再评价 [J]. 中国中医急症, 2013, 22(1): 5-7, 22.
- [6] 郭振球. 老年期痴呆的证治学研究 [J]. 中医药研究, 1991(1): 16-18.
- [7] 傅仁杰, 罗社文. 中医药治疗老年呆病的临床研究述评 [J]. 北京中医药大学学报, 1994, 17(3): 2-9.
- [8] 傅凯丽, 林翠茹, 张玉莲, 等. “益肾化浊方”治疗轻度阿尔茨海默病 15 例临床研究 [J]. 江苏中医药, 2012, 44(8): 28-29.
- [9] 许焕芳, 崔莹雪, 黄茶熙, 等. 艾燃烧生成物对快速老化模型小鼠 SAMP8 血清抗氧化酶的影响 [J]. 中国针灸, 2012, 32(1): 53-57.
- [10] Zhao X, Bian Y, Sun Y, et al. Effects of moderate exercise over different phases on age-related physiological dysfunction in testes of SAMP8 mice [J]. Exp Gerontol, 2013, 48(9): 869-880.
- [11] He XL, Zhou WQ, Bi MG, et al. Neuroprotective effects of icariin on memory impairment and neurochemical deficits in senescence-accelerated mouse prone 8 (SAMP8) mice [J]. Brain Res, 2010, 1334(2): 73-83.
- [12] Canudas AM, Gutierrez-Cuesta J, Rodriguez MI, et al. Hyperphosphorylation of microtubule-associated protein tau in senescence-accelerated mouse (SAM) [J]. Mech Ageing Dev, 2005, 126(12): 1300-1304.
- [13] Castillo CA, Albasanz JL, León D, et al. Age-related expression of adenosine receptors in brain from senescence-accelerated mouse [J]. Exp Gerontol, 2009, 44(6-7): 453-461.
- [14] 董靖德, 王小嫻. 快速老化型小鼠 SAMP8 在阿尔茨海默病研究中的应用 [J]. 医学综述, 2011, 17(6): 804-806.
- [15] Miyamoto M. Characteristics of age-related behavioral changes in senescence-accelerated mouse SAMP8 and SAMP 10 [J]. Exp Gerontol, 1997, 32(1-2): 139-148.
- [16] 唐玲, 唐荣伟, 唐晶, 等. 突触可塑性与学习记忆关系的研究进展 [J]. 川北医学院学报, 2012, 27(1): 89-92.
- [17] Saura CA, Valero J. The role of CREB signaling in Alzheimer's disease and other cognitive disorders [J]. Rev Neurosci, 2011, 22(2): 153-169.
- [18] Gong B, Pan Y, Zhao W, et al. IVIG immunotherapy protects against synaptic dysfunction in Alzheimer's disease through complement anaphylatoxin C5a-mediated AMPA-CREB-C/EBP signaling pathway [J]. Mol Immunol, 2013, 56(4): 619-629.
- [19] Tomás Pereira I, Coletta CE, Perez EV, et al. CREB-binding protein levels in the rat hippocampus fail to predict chronological or cognitive aging [J]. Neurobiol Aging, 2013, 34(3): 832-844.

Effect of *Yishen Huazhuo Prescription* on Learning and Memory Ability and Hippocampal Synapses Key Protein CREB of SAMP8 Mice

ZHANG Yulian¹, CUI Yuanwu¹, ZHOU Zhen¹, ZHANG Linlin¹, SONG Wanshan², HAN Wenwen¹

(1. The Second Affiliated Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300150; 2. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To observe the effect of *Yishen Huazhuo Prescription* on learning and memory ability and hippocampal synapses key protein CREB of senescence-accelerated prone mouse (SAMP8) model. **Methods** Totally 30 SAMP8 mice of 12 months were randomized into SAMP8 group, donepezil group and *Yishen Huazhuo Prescription* group. Another 10 senescence-resistant (SAMR1) mice were selected as the control group. The SAMP8 group and the control group were not intervened, *Yishen Huazhuo Prescription* group was given *Yishen Huazhuo Decoction* (9.62 mg/kg), and donepezil group was treated with donepezil (0.01 mg/g). The learning and memory ability was detected with Morris water maze task. The microcosmic morphology of hippocampal neuron synapses of mice in each group was observed under electron microscope. The CREB protein expression in the hippocampus was detected with Western blot method. **Results** In place navigation test, the latent time and total swimming distance of mice in the SAMP8 group were significantly prolonged as compared with the SAMR1 group ($P < 0.05$). The latent time and total swimming distance of mice in *Yishen Huazhuo Prescription* group were apparently shortened as compared with the SAMP8 group ($P < 0.05$). In spatial probe test, the number of mice through target quadrant and t/t in the SAMP8 group were significantly reduced as compared with the SAMR1 group ($P < 0.05$). The number of mice through target quadrant and t/t in *Yishen Huazhuo Prescription* group were significantly increased as compared with the SAMP8 group ($P < 0.05$). The number of mice through target quadrant in the donepezil group was apparently increased as compared with the SAMP8 group ($P < 0.05$). Under electron microscope, the brain samples of mice in SAMR1 group showed that synaptic clefts of hippocampal neuron were clear, presynaptic mitochondrial cristae and membrane were complete, and synaptic vesicle count was normal with average size. While in the SAMP8 group, synaptic cleft was indistinct and completely fused, presynaptic swelling occurred with no mitochondria, and synaptic vesicle count was dramatically decreased with different sizes. In *Yishen Huazhuo Prescription* group, small part of synaptic cleft was fused, presynaptic swelling was relieved, and the relief degree of synaptic damage was better than that in the donepezil group. Comparing with the SAMR1 group, CREB expression of hippocampus in the SAMP8 group was obviously decreased ($P < 0.05$). *Yishen Huazhuo Prescription* and donepezil could up-regulate the expression of CREB ($P < 0.05$). **Conclusion** *Yishen Huazhuo Prescription* can significantly improve learning and memory ability of SAMP8 mice. The possible mechanism may be related to the up-regulation of CREB protein expression in hippocampus, protection effect on microstructure of hippocampus neuronal synapse and function improvement of neuronal synapse.

Keywords *Yishen Huazhuo Prescription*; SAMP8 mice; neuron; synapse; CREB

(收稿日期: 2014-02-11; 修回日期: 2014-05-22)

编辑: 洪 涛

欢迎邮购 《中医杂志》

2000 年合订本 85 元, 2001 年合订本 95 元, 2002 年合订本 105 元, 2003 年合订本 105 元, 2004 年合订本 115 元, 2005 年合订本 125 元, 2007-2010 年合订本每年 140 元。2011 年(半月刊), 每册 9.80 元(缺 5、6 期), 2011-2013 年合订本(每年 4 本), 每年 280 元, 2014 年上半年合订本(共 2 本) 200 元。《中医杂志》2006-2009 年增刊每册 40 元。以上免费邮寄, 如需挂号每件另加 3 元。

欲购者请汇款至北京东直门内南小街 16 号中医杂志社读者服务部, 邮编: 100700, 电话: (010) 64014411-3036

欢迎邮购 《中医杂志》光盘合订本

1951-1986 年(4 张光盘) 480 元; 1987-1994 年(1 张光盘) 260 元; 1995-2004 年(1 张光盘) 280 元。

光盘合订本为计算机用数据光盘, 收入了同期出版的全部《中医杂志》的内容, 可对所有文章进行任意字检索, 方便实用。

汇款地址: 北京东直门内南小街 16 号中医杂志社北京医海林音像书店, 邮政编码: 100700

电话: (010) 64035632

网址: <http://www.jtcm.net.cn>