

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2015.04.016

实验研究

温阳化浊通络方对系统性硬化症模型小鼠 TGF- β 1/Smad 信号通路的影响

卞 华^{*}, 吕 芹², 韩 立¹, 杨 雷¹, 胡久略¹, 张璩方¹

(1. 南阳理工学院张仲景国医学院, 河南省南阳市长江路 80 号, 473004; 2. 南阳医学高等专科学校)

摘要 目的 探讨温阳化浊通络方治疗系统性硬化症 (SSc) 的可能作用机制。方法 将 60 只 C3H/He 小鼠随机分为正常组、模型组、西药组和中药低、中、高剂量组, 每组 10 只。除正常组外其余各组给予皮下注射博来霉素 3 周建立 SSc 小鼠模型。西药组小鼠灌服青霉胺片 65 mg/(kg·d), 中药低、中、高剂量组分别灌服温阳化浊通络方水煎剂 11.75、23.50、47.00 g/(kg·d), 模型组和正常组给予等体积的生理盐水, 共干预 8 周。采用 HE 染色观察皮肤组织病理变化, 采用 RT-PCR 法检测皮肤转化生长因子 β 1 (TGF- β 1)、Smad2、Smad7 mRNA 表达, 采用 Western blot 法检测皮肤 I、III 型胶原蛋白 (COL-I、COL-III) 表达。结果 模型组较正常组皮肤真皮变厚, 胶原增加、变粗, 真皮小血管周围炎症细胞浸润, 西药组和中药低、中、高各剂量组与模型组比较真皮变薄、胶原含量减少, 血管周围炎症细胞浸润减轻。与正常组比较, 模型组 TGF- β 1、Smad2 mRNA 及 COL-I、COL-III 蛋白表达升高, Smad7 mRNA 表达降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 西药组和中药低、中、高剂量组 TGF- β 1、Smad2 mRNA 及 COL-I、COL-III 蛋白表达减少, Smad7 mRNA 表达增加 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 中药高剂量组 TGF- β 1、Smad2、Smad7 mRNA 及 COL-I、COL-III 蛋白表达改善优于西药组和中药低剂量组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 温阳化浊通络方可拮抗 SSc 纤维化, 可能与干预 TGF- β 1/Smad 信号通路、降低皮肤胶原蛋白含量有关, 且高剂量效果更佳。

关键词 系统性硬化症; 温阳化浊通络方; TGF- β 1/Smad 信号通路; 胶原蛋白

系统性硬化症 (systemic sclerosis, SSc) 是一种以皮肤增厚和纤维化以及内脏器官 (包括心、肺、肾和消化道等) 受累为特征的自身免疫性疾病。目前该病因未明, 西药治疗效果欠佳。我们前期研究表明, 中药温阳化浊通络方治疗 SSc 具有较好临床疗效^[1], 同时能阻止 SSc 皮肤成纤维细胞周期由 G1 期进入 S 期, 进而控制细胞分裂, 抑制其增殖, 减少胶原合成^[2-3]。本研究建立 SSc 小鼠模型, 观察温阳化浊通络方对 SSc 小鼠转化生长因子 β 1 (TGF- β 1)/Smad 信号通路关键分子的影响, 进一步探讨其治疗 SSc 的可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物

健康 C3H/He 小鼠 60 只, 雌性, 6 周龄, 体

重 18 ~ 22 g, 清洁级, 购自中国科学院上海实验动物中心, 实验动物许可证号: 2012-0002。

1.2 药物

温阳化浊通络方组成: 黄芪 30 g, 党参 15 g, 桂枝 9 g, 淫羊藿 12 g, 积雪草 15 g, 白芥子 9 g 等, 水煎, 取滤液浓缩成含生药 2.5 g/ml。青霉胺片: 每片 0.125 g/ml, 上海信谊药厂有限公司生产, 批号: 052130401。

1.3 主要试剂和仪器

盐酸博来霉素 (日本化学药株式会社, 批号: 540090); Trizol (美国 Gibco 公司, 批号: 15596018); 逆转录试剂盒、PCR 试剂 (美国 Promega 公司, 批号分别为: A3500、K1005S); 兔抗小鼠 I 型胶原蛋白、III 型胶原蛋白 (COL-I、COL-III) 多克隆抗体及辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG 二抗 (美国 SantaCruz 公司, 批号分别为: sc-617、sc-492、sc-9013); 化学发光增强试剂盒

基金项目: 河南省二〇一二年科技发展计划 (122300410223)

* 通讯作者: biancrown@163.com, (0377) 62071311

(美国 Pierce 公司, 批号: 32109); PBS (北京中杉金桥生物技术有限公司, 批号: ZLI-9061)。奥林巴斯 DP70 显微镜 (日本 Olympus 公司); ABI7500 型 PCR 仪 (美国 ABI 公司); GelDocXR + 凝胶成像系统 (美国 Bio Rad 公司); 电泳仪、转膜仪 (美国 Bio Rad 公司)。

1.4 动物分组与模型建立

将 60 只 C3H/He 小鼠按随机数字表法分为正常组、模型组、西药组和中药低、中、高剂量组, 每组各 10 只。将所有小鼠均剃去背部中央区被毛, 正常组给予 PBS 100 μ l 皮下注射, 每日 1 次, 连续 3 周; 其余各组给予 200 μ g/ml 的博来霉素 (用 pH7.4 的 PBS 稀释) 100 μ l 皮下注射, 每日 1 次, 连续 3 周, 建立 SSC 模型^[4]。

1.5 给药方法

正常组和模型组小鼠给予生理盐水 1 ml/d 灌胃, 西药组灌服青霉素片 65 mg/ (kg · d), 中药低、中、高剂量组分别灌服温阳化浊通络方煎剂 11.75、23.50、47.00 g/ (kg · d), 每日 1 次, 连续给药 8 周。

1.6 检测指标及方法

1.6.1 皮肤组织病理学检测 用颈椎脱臼法处死小鼠, 取背部中央约 0.8 mm × 0.8 mm 大小皮肤, 10% 福尔马林液固定, 脱水, 石蜡包埋, 切片 (厚度 5 μ m), HE 染色, 光学显微镜下观察皮肤病理改变。

1.6.2 RT-PCR 法检测皮肤 TGF- β 1、Smad2、Smad7 mRNA 表达 采用 Trizol 试剂一步法提取皮肤总 RNA。逆转合成 cDNA 后, 取模板 cDNA 进行 PCR 扩增。引物由北京赛百盛生物工程公司设计合成, 序列分别为: TGF- β 1: 上游 5'-ACCTG-CAAGACCATCGACAT-3', 下游 5'-GGTTTCTCAT-AGATGCCGT-3'; Smad2: 上游 5'-GTTCAATCCAG-CAAGGAGTAC-3', 下游 5'-CTCATGCGGTGCACAT-TC-3'; Smad7: 上游 5'-CATACTGGGAGGAGAA-GA-3', 下游 5'-CTGTTGAAGATGACCTCTAGCC-3'; GAPDH: 上游 5'-TCCGCCCTTCCGCTGATG-3', 下游 5'-CACGGAAGGCCATGCCAGTGA-3'。PCR 扩增条件: 95℃ 变性 5 min; 95℃ 变性 30s, 退火 30s (TGF- β 1、Smad2、Smad7 和 GAPDH 的退火温度分别为: 55℃、52℃、57℃、57℃), 72℃ 延伸 30s; 30 个循环 (TGF- β 1 和 Smad2) 或 35 个循环 (Smad7 和 GAPDH); 72℃ 延伸 10 min。上述 PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳约 30 min 后, 然后以

凝胶成像仪紫外光下拍照, QuantityOne 图像分析软件进行光密度分析, 分别计算 TGF- β 1、Smad2、Smad7 mRNA 与内参 GAPDH 的灰度比值。

1.6.3 Western blot 法检测皮肤 COL-I、COL-III 蛋白表达 收集皮肤剪碎后加入组织裂解液并充分研磨, 4℃、12000 r/min 离心 15 min, 取上清, 然后采用十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 进行分离, 后电转至聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜上。加入封闭液, 室温封闭 2h 后, 依次加入一抗 (1 : 1000 稀释), 室温下轻摇 2h, 4℃ 孵育过夜。弃去反应液, 用 TBST 缓冲液漂洗 3 次, 每次 10 min; 加入二抗 (1 : 3000 稀释), 37℃ 孵育 1h, 用 TBST 缓冲液漂洗 3 次, 每次 10 min。采用化学发光法系统感光 X 胶片, 凝胶成像系统成像并对免疫印迹条带进行半定量分析, 用 β -actin 作内参, 以与 β -actin 的比值表示各组蛋白表达水平。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 16.0 软件进行统计分析, 计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析。

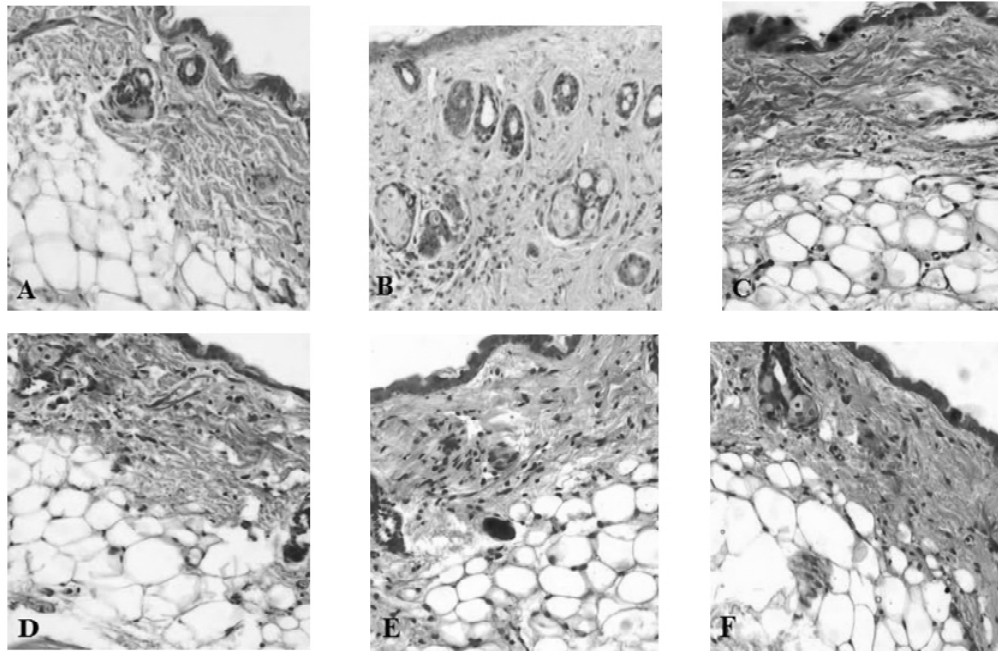
2 结果

2.1 各组小鼠皮肤组织病理学观察

实验过程中模型组小鼠死亡 1 只。图 1 示, 模型组真皮较正常组明显增厚, 致密的玻璃样变胶原明显增加、变粗, 真皮血管周围和间质内有炎症细胞浸润, 血管壁明显增厚, 甚至闭塞, 皮肤附属器减少, 脂肪层变薄、消失。与模型组比较, 西药组和中药低、中、高剂量组小鼠真皮变薄, 胶原含量减少, 血管周围炎症细胞浸润减轻, 脂肪层出现。并且中药中、高剂量组皮肤组织病理改善的程度优于西药组。

2.2 各组小鼠皮肤 TGF- β 1、Smad2、Smad7 mRNA 表达比较

表 1 示, 与正常组比较, 模型组 TGF- β 1、Smad2 mRNA 表达明显升高, Smad7 mRNA 表达明显降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 西药组和中药低、中、高剂量组 TGF- β 1、Smad2 mRNA 表达明显降低, Smad7 mRNA 表达明显升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 中药中、高剂量组 TGF- β 1、Smad2、Smad7 mRNA 表达改善明显优于西药组和中药低剂量组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 且中药高剂量组 Smad2 mRNA 改善程度优于中药中剂量组 ($P < 0.05$)。



注: A 正常组; B 模型组; C 西药组; D 中药低剂量; E 中药中剂量组; F 中药高剂量组

图 1 各组小鼠皮肤组织病理学形态 (HE 染色, $\times 200$)

表 1 各组小鼠皮肤 TGF- $\beta 1$ 、Smad2、Smad7 mRNA 表达的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	TGF- $\beta 1$ mRNA	Smad2 mRNA	Smad7 mRNA
正常组	10	0.516 $\pm$ 0.040	0.308 $\pm$ 0.042	0.579 $\pm$ 0.083
模型组	9	1.051 $\pm$ 0.119*	0.969 $\pm$ 0.140*	0.251 $\pm$ 0.049*
西药组	10	0.974 $\pm$ 0.059 Δ	0.790 $\pm$ 0.063 Δ	0.356 $\pm$ 0.063 $\Delta\Delta$
中药低剂量组	10	0.982 $\pm$ 0.062 Δ	0.828 $\pm$ 0.061 Δ	0.368 $\pm$ 0.059 $\Delta\Delta$
中药中剂量组	10	0.644 $\pm$ 0.065 $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta$	0.664 $\pm$ 0.092 $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta$	0.433 $\pm$ 0.060 $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta$
中药高剂量组	10	0.613 $\pm$ 0.061 $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta$	0.526 $\pm$ 0.084 $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta$	0.426 $\pm$ 0.055 $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta$

注: TGF- $\beta 1$, 转化生长因子 $\beta 1$; 与正常组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与西药组比较, $\Delta\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta\Delta P < 0.01$; 与中药低剂量组比较, $\#P < 0.05$, $\#\#P < 0.01$; 与中药中剂量组比较, $\bullet P < 0.05$

2.3 各组小鼠皮肤 COL-I、COL-III 蛋白表达比较

表 2 示, 与正常组比较, 模型组 COL-I、COL-III 蛋白表达明显增加 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 西药组和中药中、高剂量组 COL-I、COL-III 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与

表 2 各组小鼠皮肤 COL-I、COL-III 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	COL-I	COL-III
正常组	10	0.456 $\pm$ 0.061	0.364 $\pm$ 0.064
模型组	9	0.938 $\pm$ 0.064*	0.739 $\pm$ 0.081*
西药组	10	0.862 $\pm$ 0.084 Δ	0.655 $\pm$ 0.067 $\Delta\Delta$
中药低剂量组	10	0.773 $\pm$ 0.083 $\Delta\Delta\Delta\Delta$	0.687 $\pm$ 0.067
中药中剂量组	10	0.618 $\pm$ 0.054 $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta$	0.610 $\pm$ 0.065 $\Delta\Delta\Delta\Delta$
中药高剂量组	10	0.548 $\pm$ 0.055 $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta$	0.582 $\pm$ 0.064 $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta$

注: COL-I, I 型胶原蛋白; COL-III, III 型胶原蛋白; 与正常组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与西药组比较, $\Delta\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta\Delta P < 0.01$; 与中药低剂量组比较, $\#P < 0.05$, $\#\#P < 0.01$; 与中药中剂量组比较, $\bullet P < 0.05$

西药组比较, 中药低、中、高剂量组 COL-I 蛋白表达明显降低 ($P < 0.01$), 并且中药高剂量组低于中药低、中剂量组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 中药高剂量组 COL-III 蛋白表达亦明显低于西药组和中药低剂量组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

3 讨论

在 SSc 的发生和形成过程中, 胶原、纤维粘连蛋白等细胞外基质 (ECM) 代谢异常, 导致大量 ECM 沉积在皮肤、肺、消化道等组织器官。我们建立 SSc 模型小鼠皮肤组织病理显示, 真皮明显增厚, 致密的玻璃样变胶原明显增加、变粗, 真皮血管周围和间质内有炎症细胞浸润, 血管壁明显增厚, 甚至闭塞, 皮肤附属器减少, 脂肪层变薄、消失, 并且皮肤 COL-I、COL-III 蛋白表达显示明显增加, 说明模型成功。TGF- $\beta 1$ 作为关键的促纤维化因子, 主要通过 Smad 信号通路而产生致纤维化

效应^[9]。Smad 蛋白既能促进又能抑制 TGF- β 1 介导的信号转导,其中 Smad2 和 Smad3 能促进信号转导形成纤维化,而 Smad7 能反馈抑制信号转导^[9]。据报道,TGF- β /Smad 信号通路异常在 SSc 的发病机制中具有重要作用^[9]。有研究显示,通过下调 TGF- β 1、Smad2 和 Smad3 表达,上调 Smad7 表达,抑制 TGF- β 1/Smad 信号通路的信号传导可以减轻 SSc 纤维化^[8-9]。

SSc 属中医学“皮痹”“皮痹疽”等范畴,我们基于 SSc 发病多是“风寒痹阻,寒凝血瘀”的传统认识^[10-11],拟温阳化浊通络方治疗 SSc。方中黄芪补气益卫固表,党参补益脾肺之气,淫羊藿补肾壮阳,祛风除湿,故重用为君药;积雪草活血化瘀,白芥子温通经络,善散“皮里膜外”之痰,去除浊邪,俱为臣药;桂枝等辛温通络属佐使之用。诸药相伍,通补并用、标本兼顾,具有补肺健脾益肾、化浊通络之效。本研究结果表明,用温阳化浊通络方水煎剂灌胃后,SSc 模型小鼠真皮变薄,胶原含量减少,特别是 COL-I、COL-III 蛋白表达明显降低,同时血管周围炎症细胞浸润减轻,脂肪层出现,提示温阳化浊通络方水煎剂能有效拮抗 SSc 皮肤纤维化。SSc 模型小鼠的皮损组织中 TGF- β 1、Smad2 mRNA 表达明显升高,Smad7 mRNA 表达明显降低,提示 TGF- β 1/Smad 信号通路中的关键信号分子被激活,负反馈调节失常,促进了 TGF- β 1 相应靶基因的转录和蛋白表达,与既往的研究结果相符^[12]。经高、中、低剂量温阳化浊通络方干预后,小鼠皮肤 TGF- β 1、Smad2 mRNA 表达下调,Smad7 mRNA 表达上调,且中药高剂量组较中药低、中剂量组的改善程度更为显著。这表明温阳化浊通络方能够干预 TGF- β 1/Smad 信号通路的活化,拮抗 TGF- β 1 相应的病理效应。因此,我们认为,温阳化浊通络方通过调节 SSc 模型鼠皮肤 TGF- β 1/Smad 信号通路中关键分子 TGF- β 1、Smad2、Smad7 mRNA 表达,干预 TGF- β 1/Smad 信号通路传导,减轻 ECM 沉积,这可能是其拮抗 SSc

纤维化的分子机制之一,并且以高剂量效果最佳。

参考文献

- [1] 卞华,吕芹. 温阳化浊通络汤治疗早期系统性硬化病临床观察 [J]. 四川中医, 2009, 27(6): 66-67.
- [2] 卞华,范永升,楼兰花,等. 温阳化浊通络方对系统性硬化病成纤维细胞周期和增殖的影响 [J]. 中药材, 2009, 32(6): 936-939.
- [3] 吕芹,卞华,陈志国,等. 温阳化浊通络方含药血清对硬皮病成纤维细胞胶原分泌和 TGF- β 1 表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(16): 184-187.
- [4] Yamamoto T. Animal model of systemic sclerosis [J]. J Dermatol, 2010, 37(1): 26-41.
- [5] Santibañez JF, Quintanilla M, Bernabeu C. TGF- β /TGF- β receptor system and its role in physiological and pathological conditions [J]. Clin Sci (Lond), 2011, 121(6): 233-251.
- [6] Itoh S, ten Dijke P. Negative regulation of TGF- β receptor/Smad signal transduction [J]. Curr Opin Cell Biol, 2007, 19(2): 176-184.
- [7] Viswanath V, Phiske MM, Gopalani VV. Systemic Sclerosis: current concepts in pathogenesis and therapeutic aspects of dermatological manifestations [J]. Indian J Dermatol, 2013, 58(4): 255-268.
- [8] Akhurst RJ, Hata A. Targeting the TGF- β signalling pathway in disease [J]. Nat Rev Drug Discov, 2012, 11(10): 790-811.
- [9] Tomcik M1, Zerr P, Pitkowski J, et al. Heat shock protein 90 (Hsp90) inhibition targets canonical TGF- β signalling to prevent fibrosis [J]. Ann Rheum Dis, 2014, 73(6): 1215-1222.
- [10] 胡东流,陈达,禰国维. 系统性硬皮病中医药研究述评 [J]. 中医杂志, 2005, 46(2): 148-149.
- [11] 闫小宁,韩世荣,李文彬,等. “热敷药”治疗硬皮病患者 35 例临床观察 [J]. 中医杂志, 2012, 53(4): 304-306.
- [12] Wei J, Bhattacharyya S, Warren G. et al. Fibrosis in systemic sclerosis: Emerging concepts and implications for targeted therapy [J]. Autoimmun Rev, 2011, 10(5): 267-275.

Impact of Wenyang Huazhuo Tongluo Formula on TGF- β 1/Smad Signal Pathway of Systemic Sclerosis Mouse Model

BIAN Hua¹, LV Qin², HAN Li¹, YANG Lei¹, HU Jiulue¹, ZHANG Lifang¹

(1. Zhang Zhongjing Traditional Chinese Medicine College, Nanyang Institute of Technology, Henan Province, 473004; 2. Nanyang Medical College)

ABSTRACT Objective To discuss the possible mechanism of Wenyang Huazhuo Tongluo Formula (WYHZTLF) in the treatment of systemic sclerosis (SSc). **Methods** In total 60 C3H/He mice were randomly divided into normal group, model group, western medicine group and the low, medium and high dose TCM groups, with 10 in each.

Except for the normal group, all groups were injected with bleomycin subcutaneously for 3 weeks to make the SSc mouse model. The western medicine group was given penicillamine tablets 65 mg/(kg · d) by gavage, while the low, medium and high dose TCM groups were given 11.75 g/(kg · d), 23.5 g/(kg · d), or 47 g/(kg · d) of WYHZTLF decoction respectively, and the model group and normal group were given the equal volume of saline. Treatments for all groups lasted for 8 weeks. Pathological changes of skin tissues were observed using HE staining. The expression of skin transforming growth factor- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), Smad 2 and Smad 7 mRNA, type I and III collagen (COL-I, COL-III) in the skin was tested. **Results** The dermis of the model group was thicker than the normal group, with more and thicker collagen, as well as infiltration of inflammatory cells around small vessels, while the western medicine group and all TCM groups showed thinner dermis compared with the model group, with less collagen content and infiltration of inflammatory cells. Compared with the normal group, the expression of TGF- $\beta 1$, Smad 2 mRNA, COL-I and COL-III protein in the model group increased, while the expression of Smad 7 mRNA decreased ($P < 0.01$). Compared with the model group, the expression of TGF- $\beta 1$, Smad 2 mRNA, COL-I and COL-III in the western medicine group and all TCM groups decreased, while the expression of Smad 7 mRNA increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Improvements on the expression of TGF- $\beta 1$, Smad 2, Smad 7 mRNA, COL-I and COL-III in high dose TCM group was better than that in the western medicine group and low dose TCM group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** WYHZTLF could antagonize the fibrosis in SSc, which could be related to its regulation of TGF- $\beta 1$ /Smad signal pathway and reduction of collagen content. This effect of WYHZTLF is better when dose is high.

Keywords systemic sclerosis; Wenyang Huazhuo Tongluo Formula; TGF- $\beta 1$ /Smad signal pathway; collagen

(收稿日期: 2014-03-15; 修回日期: 2014-11-07)

编辑: 邓 媛

头针疗法暨神经系统疾病治疗培训班通知

由世针针灸交流中心、世界中医药学会联合会国际合作部、《世界中医药》杂志社联合主办的国家中医药继续教育培训班 2015 年常年招生。由中国工程院资深院士、中国著名针灸学专家、博士研究生和师带徒导师、国医大师程莘农教授、中国中医科学院针灸医院神经内科主任医师、研究生导师蒋达树教授和中国中医科学院针灸医院神经内科主任、主任医师、研究生导师刘家瑛教授等主讲。

1. 授课内容: 头针疗法理论知识: 头针疗法概述: 定义、发展及流派、中医理论基础; 头针疗法原理及研究进展(现代医学相关内容、古文献相关内容); 头针刺激区的定位、主治及处方特点、辨治规律; 头针操作要点及注意事项。神经系统疾病治疗: 神经系统常见病、多发病的临床经验与体会; 脑血管病; 震颤麻痹; 小舞蹈症; 多动症; 秽语抽动症; 头痛; 周围性面瘫。中风的预防与抑郁症的特色疗法、头痛的诊断与治疗等临床经验与体会。

2. 培训对象: 各类医务人员、临床医生、针灸、推拿、按摩、保健、美容师和基层医务工作者及中医爱好者等。

3. 培训时间与学费: 学期 4 天(报名 1 天,授课 3 天),每位学员学费 1980 元/人、海外学员 2680 元/人(含午餐费、场地费、讲议费、专家课时费、证书费等)。报名时交本人身份证复印件,2 寸免冠照片 2 张,报满 50 人即开班,提前 1 个月通知开学时间及具体地点。

4. 学满课时待遇: 按国家中医药继续教育有关规定,学满课时颁发中英文对照结业证书,并授予 I 类学分 12 学分证书。参加学习班学员的投稿达到《世界中医药》杂志登刊标准者优先发表。

5. 培训地点与住宿: 北京东城区广渠门内夕照寺大街东玖大厦 B 座 7 层,世界针灸学会联合会世针针灸交流中心。邮编: 100061。联系人: 邓爱英,手机: 13051608026。邮箱: info@wfas-acu.org。电话: (010) 87190518。

6. 汇款方式: 邮局汇款收款人: 北京华盛国际医药信息交流中心,地址: 北京市朝阳区小营路 19 号财富嘉园 A 座 301 室。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。

7. 联系方式: 北京市朝阳区小营路 19 号财富嘉园 A 座 301 室,世界中医药学会联合会国际合作部。邮编: 100101。联系人: 王炳岐、徐晖、赵和爱、景晓杨(手机: 13901318403,邮箱: 13901318403@139.com,传真/电话: 010-58239066,电话: 010-58239055)。