

• 实验研究 •

活血化瘀通络方对糖尿病肾病大鼠肾脏
骨形态蛋白 7 表达的影响

潘永梅 陈志强* 马 赟 郭 倩 贾 蕊

(河北医科大学, 河北省石家庄市中山路 361 号, 050017)

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81173419)

* 通讯作者: chenzhqiang2011@163.com, (0311)85990281

[摘要] 目的 探讨活血化瘀通络方干预早期糖尿病肾损害的作用机制。方法 选择清洁级健康雄性 SD 大鼠 40 只随机分为正常组 10 只和模型组 30 只, 模型组大鼠按 60 mg/kg 体重一次性大剂量腹腔注射链脲佐菌素 (STZ) 复制糖尿病大鼠模型, 将成模的 28 只大鼠随机分为对照组和干预组各 14 只。干预组大鼠给予活血化瘀通络方定容至灌胃量 1 ml/100 g 体重进行灌胃。活血化瘀通络方由川芎、丹参、地龙、水蛭、全蝎组成分别给予相当于生药量 0.96、1.2、0.8、0.48、0.48 g/(kg·d)。正常组和对照组大鼠按照 1 ml/100 g 体重给予纯净水灌胃。药物干预 16 周后分别观察各组大鼠体重 (BW)、肾脏指数 (KI)、空腹血糖 (FBG)、糖化血红蛋白 (HbA1c) 和尿微量白蛋白 (U-Alb) 水平; 光镜及电镜观察肾组织形态学改变及肾小球基底膜 (GBM) 厚度的改变; 检测骨形态蛋白 7 (BMP-7) 及其 mRNA 的表达。结果 与正常组比较, 对照组大鼠 BW、BMP-7 及其 mRNA 表达明显减少 ($P < 0.05$), KI、FBG、HbA1c 和 U-Alb 水平明显升高 ($P < 0.05$), GBM 明显增厚 ($P < 0.05$)。与对照组比较, 干预组大鼠 BW、BMP-7 及其 mRNA 表达明显增加 ($P < 0.05$); KI、U-Alb 以及 GBM 厚度明显降低 ($P < 0.05$)。结论 活血化瘀通络方具有减轻早期糖尿病肾损害的作用, 其上调 BMP-7 的表达可能是作用机制之一。

[关键词] 活血化瘀通络方; 糖尿病肾病; 骨形态蛋白 7; 微量白蛋白

Effect of Huoxue Huayu Tongluo Formula on the Expression of BMP-7 in Kidneys of Rats with Diabetic Nephropathy

PAN Yongmei, CHEN Zhiqiang, MA Yun, GUO Qian, JIA Rui

(Hebei Medical University, Hebei Province 050017)

ABSTRACT **Objective** To explore the renoprotective effect of Huoxue Huayu Tongluo Formula (blood-quickening, stasis-transforming and network vessels-freeing formula, HHTF) on diabetic renal damage and its possible mechanism. **Methods** Forty male healthy Sprague-Dawley rats of clean grade were randomized into the normal group ($n=10$) and model group ($n=30$). The diabetic rat models were established with a one-time intraperitoneal injection of 60 mg/kg streptozotocin (STZ) in the model group. Twenty-eight successful model rats were randomized into control group and intervention group, with 14 in each. The intervention group was gavaged with 1 ml/100 g HHTF which was composed of 0.96 g/(kg·d) chuanxiong (*Rhizoma Chuanxiong*), 1.2 g/(kg·d) Danshen (*Radix et Rhizoma Salviae Miltiorrhizae*), 0.8 g/(kg·d) Dilong (*Pheretima*), 0.48 g/(kg·d) Shuizhi (*Hirudo*) and 0.48 g/(kg·d) Quanxie (*Scorpio*). The normal group and control group were gavaged with 1 ml/100 g purified water. After 16 weeks, the levels of body weight (BW), kidney index (KI), fasting blood glucose (FBG), HbA1c and urinary albumin (U-Alb) were detected and the morphological changes and thickness of glomerular basement membrane (GBM) in renal tissues were observed with light microscopy and electron microscopy. The expression of bone morphogenetic protein 7 (BMP-7) was detected with Western blotting and the expression of BMP-7 mRNA was detected with real-time polymerase chain reaction (PCR). **Results** Comparing with the normal group, the BW and the expressions of BMP-7 and BMP-7 mRNA in the control group were significantly decreased ($P < 0.05$), but the levels of KI, FBG, HbA1c and U-Alb and the thickness of GBM were significantly increased ($P < 0.05$). Comparing with the control group, the BW and the expressions of BMP-7 and BMP-7 mRNA in the intervention group were significantly increased ($P < 0.05$), but the levels of KI and U-Alb and the thickness of GBM were significantly decreased ($P < 0.05$). There was no significant difference between the intervention group and control group in the levels of FBG and HbA1c. **Conclusion** HHTF can reduce early diabetic renal damage and up-regulate the expression of BMP-7, which may be one of its mechanisms.

Keywords Huoxue Huayu Tongluo Formula (blood-quickening, stasis-transforming and network vessels-freeing formula); diabetic nephropathy; bone morphogenetic protein 7; urinary albumin

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病(diabetes mellitus, DM)严重的慢性微血管并发症,是导致慢性肾功能衰竭的重要原因之一。DN 病理上以肾小球细胞外基质(ECM)聚集、肾小球硬化及进展性小管间质纤维化为特征。骨形态蛋白 7(bone morphogenetic protein-7, BMP-7)为骨形态蛋白家族成员。近年来,国外文献报道 BMP-7 与 DN 的发生发展有关, BMP-7 可调节 ECM 的合成和降解,发挥抗纤维化作用,延缓 DN 的发展^[1]。

我们根据 DN 的临床和病理特点,结合中医学病机理论,认为 DN 主要的病机是瘀血阻于肾络,治疗当活血化瘀通络。课题组采用丹参、川芎、地龙、水蛭、全蝎组成活血化瘀通络方,临床观察和前期实验表明该方对 DN 有较好疗效^[2-3]。本研究旨在探讨其可能的作用机制,为临床应用提供参考。

1 材料

1.1 实验动物

健康雄性 SD 大鼠 40 只,清洁级,4~5 周龄,体重 120~150 g,购自河北医科大学实验动物中心,动物合格证号:1112061。

1.2 药物

本实验所用中药配方颗粒由广东一方制药有限公司惠赠。活血化瘀通络方:丹参(1.8 g/袋,含生药 10 g,批号:1108293);川芎(1.3 g/袋,含生药 6 g,批号:1108827);地龙(1.0 g/袋,含生药 10 g,批号:1105024);水蛭(1.5 g/袋,含生药 3 g,批号:1106113);全蝎(1.0 g/袋,含生药 3 g,批号:1107253)。使用时用纯净水配制成含中药配方颗粒 0.12 g/ml 的混悬液。

1.3 主要试剂和仪器

链脲佐菌素(美国 Sigma 公司,批号 S0130); β -actin 小鼠单抗(美国 Bioworld 公司,批号 110603);BMP-7 兔多抗(美国 Bioworld 公司, G22121);羊抗兔荧光二抗(美国 Rockland 公司,批号 26055)、羊抗小鼠荧光二抗(美国 Rockland 公司,批号 25340);M-MLV 反转录试剂盒(美国 Invitrogen 公司,批号 8212057)、PCR SuperMix(美国 Invitrogen 公司,批号 8211212)、Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG(美国 Invitrogen 公司,批号 8213021);BX63+DP72 正置研究级显微镜(日本 OLYMPUS 株式会社);Real-Time PCR 仪(美国 ECO 公司);引物(上海生工生物工程有限公司)。

2 方法

2.1 动物分组与造模

SD 大鼠 40 只适应性饲养 1 周后,按照随机数字表法分为正常组 10 只和模型组 30 只。实验期间大鼠自由进食、饮水。参考文献[4],模型组大鼠按 60 mg/kg 体重一次性快速腹腔注射 STZ,以大鼠尾静脉取血检测空腹血糖(FBG), $FBG \geq 16.7$ mmol/L 为造模成功^[4]。将造模成功的 28 只大鼠按体重随机分为对照组和干预组各 14 只。

2.2 药物干预方法

大鼠给药量按照体型系数换算给药剂量的基本

公式进行换算^[5], $D_B = D_A \times \frac{R_B}{R_A} \times \frac{\sqrt[3]{W_A}}{\sqrt[3]{W_B}}$ (注: D_A 、 D_B

是 A、B 两种动物每公斤体重剂量, R_A 、 R_B 是 A、B 两种动物体型系数; W_A 、 W_B 是标准动物体重)。计算后,干预组分别给予川芎、丹参、地龙、水蛭、全蝎 0.96 g/(kg·d)、1.2 g/(kg·d)、0.8 g/(kg·d)、0.48 g/(kg·d)、0.48 g/(kg·d),中药配方颗粒溶解后,定容至灌胃量 1 ml/100 g 体重进行灌胃,正常组和对照组大鼠按照 1 ml/100 g 体重给予纯净水灌胃,共干预 16 周。

2.3 观察项目

观察大鼠的饮水量、饮食量、尿量、活动情况、体重(BW)及存活情况;用免疫散射比浊法检测尿微量白蛋白(U-Alb)。大鼠尾静脉取血,用葡萄糖氧化酶法检测 FBG;微粒色谱法检测糖化血红蛋白(HbA1c);剥离肾脏、称重,按公式计算肾脏指数(KI), $KI = \text{双肾重量(g)} / \text{体重(kg)}$ 。

2.4 肾脏病理形态观察

剥离肾脏,迅速留取肾组织置于 FAA 固定液中,Masson 染色后,光镜下观察肾组织病理学变化。部分肾皮质置入 4% 戊二醛固定液中,透射电镜观察病理形态改变及测量肾小球基底膜(GBM)厚度。

2.5 肾组织 BMP-7 的检测

2.5.1 Western blotting 提取肾组织总蛋白,测定蛋白浓度,稀释样品,经 10% SDS-PAGE 电泳,电转移至聚 PVDF 膜上,封闭,加入兔抗大鼠 BMP-7 的一抗及二抗,孵育 1h。红外激光扫描仪拍照并分析荧光条带的灰度值(以内参的吸光度值为相对值 1)。每个样本独立重复 3 次取平均值。由于 BMP-7 蛋白的分子量大小与内参蛋白分子量相差不大,故先进行内参蛋白的抗体温育、显色和检测。然后使用 Stripping 缓冲液洗掉膜上的抗体,重新进

行目的蛋白的抗体温育、显色和检测。

2.5.2 Real Time-PCR 引物由上海生工生物工程有限公司合成,引物序列: β -actin(241bp):上游 AAC CCT AAG GCC AAC CGT AAA AG,下游 TCA TGA GGT AGT CTG CTA GGT; BMP-7 (199bp):上游 CGC TCC AAG ACT CCA AAG A,下游 AGT TCA GAG GGA AGG CAC A。反应条件:UDG Incubation 50℃ 2min、Polymerase Activation 95℃ 10 min、95℃ 10 s 40 Cycles、60℃ 30 s。融解曲线条件:95℃ 15 s、55℃ 15 s、95℃ 15 s。每个样本做 3 个复孔,求出目的基因 mRNA 相对含量。数据分析使用相对定量中常用的 $\Delta\Delta C_q$ 法。相对表达量(Relative Quantification) = $2^{-\Delta\Delta C_q}$; ΔC_q = 目的基因 C_q 平均值 - 内参 C_q 平均值; $\Delta\Delta C_q$ = 实验组 ΔC_q - 对照组 ΔC_q 。

2.6 统计学方法

用 Statistical Analysis System V8 进行数据统计,定量资料用($\bar{x} \pm s$)表示,均经过正态性和方差齐性检验,组间差异性检验采用单因素方差分析或秩和检验。

3 结果

3.1 各组大鼠一般情况

正常组大鼠毛色光泽,反应敏捷,肌肉丰满,体重逐渐增加。对照组大鼠出现明显多饮、多食、多尿,体重下降,毛色晦暗,反应迟钝,肌肉瘦削,少动抱团,DM 成模后 3 周出现 U-Alb,8 周出现糖尿病

并发症,如白内障等。干预组各种症状均有所减轻。本次实验过程中大鼠共死亡 5 只(对照组 4 只、干预组 1 只),且每组各有 1 只大鼠血糖自行恢复,予以剔除,最终参与统计的大鼠共 31 只,其中正常组 10 只、对照组 9 只、干预组 12 只。

3.2 各组大鼠 BW、KI、FBG、HbA1c 和 U-Alb 的比较

表 1 示,与正常组比较,对照组和干预组大鼠 BW 明显降低($P < 0.05$);而与对照组比较,干预组大鼠 BW 明显升高($P < 0.05$)。与正常组比较,对照组和干预组大鼠 KI、FBG、HbA1c 和 U-Alb 明显升高($P < 0.05$);而与对照组比较,干预组大鼠 FBG 和 HbA1c 差异无统计学意义($P > 0.05$);KI 和 U-Alb 明显降低($P < 0.05$)。

3.3 各组大鼠肾脏病理形态学变化

光镜下,对照组大鼠可见肾小球体积增大,系膜基质增多,肾小管上皮细胞空泡样变;干预组大鼠肾脏病变有一定程度的改善,结果见图 1。

电镜下,正常组大鼠可见 GBM 结构清晰,足突排列整齐、系膜细胞无增殖、系膜基质无增生。对照组可见 GBM 结构欠清晰、均匀弥漫增厚,足突增宽或大片融合,足突裂孔膜增宽。干预组改变较对照组有所减轻,GBM 结构较清晰,足突节段融合,结果见图 2。

表 2 示,与正常组比较,对照组和干预组大鼠 GBM 厚度均明显增加($P < 0.05$);与对照组比较,干预组大鼠 GBM 厚度明显变薄($P < 0.05$)。

表 1 各组大鼠 BW、KI、FBG、HbA1c 和 U-Alb 的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	BW(g)	KI(g/kg)	FBG(mmol/L)	HbA1c(%)	U-Alb(μ g/24 h)
正常组	10	450.90 $\pm$ 30.22	6.23 $\pm$ 0.47	5.49 $\pm$ 0.60	3.26 $\pm$ 0.17	76.67 $\pm$ 16.65
对照组	9	224.86 $\pm$ 34.22*	11.68 $\pm$ 0.51*	29.53 $\pm$ 3.88*	6.10 $\pm$ 0.79*	862.47 $\pm$ 216.45*
干预组	12	292.44 $\pm$ 35.27* Δ	10.05 $\pm$ 0.53* Δ	29.24 $\pm$ 3.79*	6.00 $\pm$ 0.52*	552.78 $\pm$ 119.88* Δ

注:与正常组比较,* $P < 0.05$;与对照组比较, $\Delta P < 0.05$

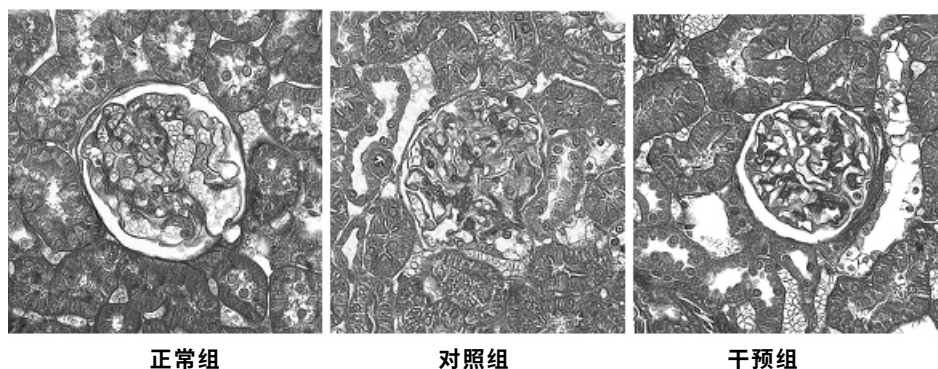
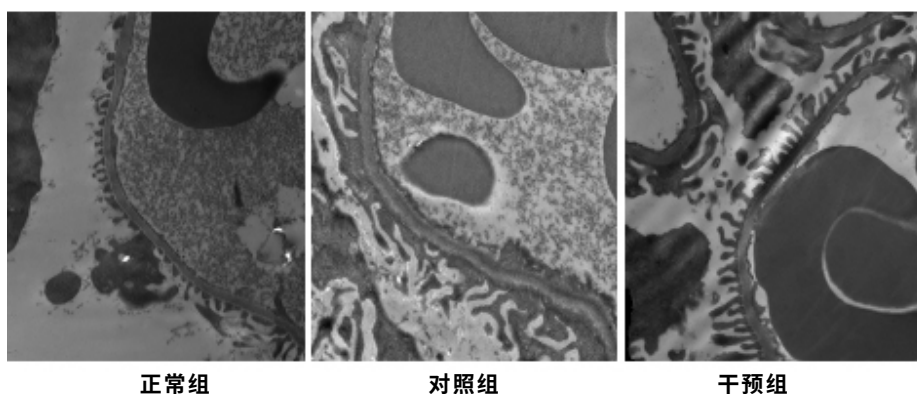


图 1 各组大鼠肾组织光镜下形态(Masson 染色)

图 2 各组大鼠肾组织电镜下形态($\times 20\,000$)表 2 各组大鼠肾小球基底膜厚度的比较(nm, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	基底膜厚度
正常组	10	156.73 $\pm$ 31.59
对照组	9	315.12 $\pm$ 47.23
干预组	12	197.66 $\pm$ 21.36* Δ

注:与正常组比较,* $P<0.05$;与对照组比较, $\Delta P<0.05$

3.4 各组大鼠肾脏 BMP-7 及其 mRNA 表达比较

表 3 示,与正常组比较,对照组和干预组肾组织 BMP-7 及其 mRNA 表达量均明显降低($P<0.05$);与对照组比较,干预组肾组织 BMP-7 及其 mRNA 表达量明显增加($P<0.05$)。

表 3 各组大鼠肾脏 BMP-7 及其 mRNA 表达的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	BMP-7 (灰度值)	BMP-7mRNA (相对值 $2^{-\Delta\Delta C_q}$)
正常组	10	0.388 $\pm$ 0.027	1
对照组	9	0.127 $\pm$ 0.011*	0.665 $\pm$ 0.038*
干预组	12	0.275 $\pm$ 0.024* Δ	0.833 $\pm$ 0.051* Δ

注:与正常组比较,* $P<0.05$;与对照组比较, $\Delta P<0.05$

4 讨论

DN 肾组织早期病理改变为肾小球肥大,ECM 聚集,基底膜增厚,晚期出现弥漫性肾小球硬化、肾小管萎缩及间质纤维化,导致肾功能衰竭。正常肾小球是由毛细血管球构成,中医学认为应属“络脉”范畴。我们在临床实践中,根据中医学病机理论,结合 DN 的发病机制、临床及病理特点,逐步认识到本病从 DM 发展到出现肾损害时,是因 DM 日久不愈,“久病入络”,引起瘀血内阻,深入于络所致,因此,治疗当以活血化瘀通络为主。为此课题组结合多年的临床用药经验,拟定了活血化瘀通络方,由丹参、川芎、地龙、水蛭、全蝎组成。丹参性微寒,可消散瘀滞之血;药理研究表明丹参有降血脂、抑制血栓形成等作用^[6]。川芎味辛,活血行气,为血中之气

药,辛香走窜通络,能散能行,既可透达络邪使其外出,又可引其他药物达于络中^[6],与丹参相须为用,以加强活血之力。水蛭咸苦入血分,擅长破血逐瘀,力专效宏;全蝎味辛,性善通窜,有通络散结之功;地龙长于通行经络。水蛭、全蝎、地龙皆为虫类通络药,可化瘀剔邪通络,为肾络瘀滞之良药。诸药合用,则肾络瘀阻可消。该方在临床上对早、中期的 DN 确有良好的临床疗效。

骨形态蛋白家族(BMPs)属于转化生长因子 β (TGF- β)超家族成员。TGF- β 家族包括超过 20 种的骨形态发生蛋白,其中 BMP-7 是参与肾发育和疾病的最重要的成员^[1]。近年来研究显示,BMP-7 与 DN 的发生发展有关,BMP-7 信号通路可阻断 TGF- β 1 对肾小管上皮细胞转分化的促进作用,逆转上皮细胞向间质细胞转化(EMT)^[8],诱导间质成纤维细胞向上皮细胞分化(MET)^[9],调节 ECM 的合成和降解,发挥抗纤维化作用,延缓 DN 的发展^[10-11]。DM 大鼠内源性 BMP-7 的表达缺失与纤维化活动有关。Morrissey 等^[12]发现,在实验性 DN 中外源性给予重组人 BMP-7 可以延缓肾小球和肾小管间质的纤维化,减轻肾脏损害。

本研究发现,活血化瘀通络方能增加 DN 大鼠的体重,降低 DN 大鼠的 KI,减少尿 U-Alb 的排泄;并且能改善 DN 大鼠肾组织病理形态学的改变,降低 GBM 的厚度,对 DN 大鼠发挥了肾脏保护作用。本研究还发现,对照组大鼠肾脏 BMP-7 蛋白及其 mRNA 表达明显减少,而干预组 BMP-7 及其 mRNA 表达较之明显增高。说明活血化瘀通络中药能够在转录水平上调 BMP-7 的表达,促进内源性 BMP-7 增多,进一步发挥其肾脏保护作用,延缓 DN 肾脏纤维化的进程。

综上所述,活血化瘀通络方能减轻 DN 大鼠肾

脏的病理损伤,减少肾脏 ECM 积聚,延缓肾脏纤维化进程。其机制可能与增加肾脏 BMP-7 表达有关。

参考文献

- [1] Zhang Y, Zhang Q. Bone morphogenetic protein-7 and Gremlin: New emerging therapeutic targets for diabetic nephropathy[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 383(1):1-3.
- [2] 王凤丽,陈志强,王月华,等. 益气养阴消癥通络方治疗早期糖尿病肾病临床观察[J]. 中国中西医结合杂志, 2012, 32(1):35-38.
- [3] 赵雯红. 益气养阴消癥通络中药对糖尿病肾病的干预及其对氧化应激和 p38MAPK 信号转导通路的影响[D]. 石家庄:河北医科大学, 2010.
- [4] 雷作熹,罗仁,董晓雷,等. STZ 诱导糖尿病肾病大鼠模型的建立[J]. 中国实验动物学报, 2005, 13(3):163-165.
- [5] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 2 版. 北京:人民卫生出版社, 2006:33-34.
- [6] 司富春,李建省. 中医药治疗糖尿病肾病证型方药分析[J]. 中医研究, 2010, 23(8):26-28.
- [7] 曹式丽,王宁. 肾络病证的核心特征与临床药物筛选原则[J]. 天津中医药, 2007, 12(6):486-488.
- [8] Yoshikawa M, Hishikawa K, Marumo T, et al. Inhibition of histone deacetylase activity suppresses epithelial-to-mesenchymal transition induced by TGF-beta 1 in human renal epithelial cells [J]. J Am Soc Nephrol, 2007, 18(1):58-65.
- [9] Zeisberg M, Shah AA, Kalluri R. Bone morphogenetic protein-7 induces mesenchymal to epithelial transition in adult renal fibroblasts and facilitates regeneration of injured kidney [J]. J Biol Chem, 2005, 280(9):8094-8100.
- [10] 杜月光,杨明华,柴可夫,等. 骨形成蛋白-7 在糖尿病大鼠肾脏中的表达及意义[J]. 浙江中医药大学学报, 2011, 35(4):559-562.
- [11] Veerasamy M, Nguyen TQ, Motazed R, et al. Differential regulation of E-cadherin and alpha-smooth muscle actin by BMP-7 in human renal proximal tubule epithelial cells and its implication in renal fibrosis [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2009, 297(5):1238-1248.
- [12] Morrissey J, Hruska K, Guo, G, et al. Bone morphogenetic protein-7 improves renal fibrosis and accelerates the return of renal function [J]. J Am Soc Nephrol, 2002, 13(Suppl 1):14-21.

(收稿日期:2013-04-27;修回日期:2013-08-05)

[编辑:焦 爽]

关于举办第二期“中医药 SCI 论文写作与发表提高班”的通知

科技论文写作是科研工作的重要组成部分,发表高水平的研究论文是反映科研工作成果和学术交流的重要手段。继第一期“中医药 SCI 论文写作与发表提高班”2013 年 5 月在北京成功举办后,Journal of Traditional Chinese Medicine (《中医杂志》英文版)编辑部将于 2013 年 10 月于北京举办第二期“中医药 SCI 论文写作与发表提高班”,将邀请有丰富审稿经验的 SCI 期刊编委主编、具有高水平 SCI 论文投稿经验的专家授课。从专家视角和编辑部视角就 SCI 论文写作与发表的相关问题进行交流,切实提高科研人员论文写作能力,探讨如何解决目前面临的写作难、投稿难、发表更难的问题。

现将有关事宜通知如下:

一、培训内容:1. 中医药 SCI 论文写作的基本规则和要求;2. 中医药 SCI 论文特点及其在 SCI 杂志发表的难点分析与应对策略;3. 部分中医药论文在 SCI 杂志成功发表的经验总结与分析;4. 中医药科研设计与难点探讨;5. 医药学相关科研中常用统计方法的分析与探讨;6. SCI 杂志投稿的程序与技巧、文章评审流程、常见问题及注意事项介绍。

二、培训对象:1. 承担国家级、省部级中医药项目的科研人员;2. 医疗机构、医药院校、科研机构等从事科研并有志于发表 SCI 论文者;3. 在校硕士、博士、博士后研究人员、青年教师;4. 其他任何有志于中医药研究的科技工作者。

三、培训时间与地点:时间:2013 年 10 月 26 日至 27 日两天,10 月 25 日下午报到。地点:北京京东宾馆(北京市东直门内海运仓 1 号)。报名截止时间:2013 年 10 月 10 日,名额有限,额满为止。

四、汇款方式:邮局汇款:北京东直门内南小街 16 号,中医杂志英文版,邮编:100700。附言请注明 SCI 培训、发票开具单位和具体邮寄地址,银行转账:开户行:中国工商银行北京北新桥支行,户名:中医杂志社,帐号:0200004309089131376,转账后请发电子邮件通知我们,电子邮件中请写明详细转账信息,以便查账,同时写明发票开具单位和具体邮寄地址。

五、联系人:曲编辑、王编辑,电话:010-57208655,传真:010-64050201,地址:北京东直门内南小街 16 号《中医杂志》英文版,邮编:100700。

六、其他事项:各参会代表可准备一篇待发表的论文(可以提前发至邮箱),经专家评选的优秀论文,JTCM 将开辟绿色通道,现场优先录用。参会代表将获国家级继续教育学分(I 类学分)。食宿:提供会议餐,其余自理。收费:1800 元/人(在校学生 1500 元/人)。请于官网 <http://www.journaltcm.com> 下载回执,填写后发至 jtcmsci@126.com