

黄芪注射液联合间质干细胞对大鼠脊髓损伤修复作用的实验研究

余 勤¹ 白月双² 林 洁¹ 盛丽先² 董 勤² 郭 莹¹ 宣晓波²

摘要 目的 研究黄芪注射液与间质干细胞联合应用对大鼠脊髓损伤修复的影响。方法 Wistar 大鼠 120 只随机分成假手术组、模型组、PBS 液对照组、黄芪注射液对照组、大鼠骨髓间质干细胞(rMSCs)移植治疗组和 rMSCs 移植加黄芪注射液治疗组。造模后 3 d 治疗组经脊髓局部注射 rMSCs 和脊髓局部注射 rMSCs 同时加用黄芪注射液腹腔注射,对照组则分别注射 PBS 液和黄芪注射液。移植后 7、14、21、28 天分别行(Basso Beattie Bresnahan, BBB)评分法检测大鼠神经功能恢复情况,进一步取脊髓组织作病理学检查,并应用双标免疫组化检测 5-溴-2 脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)标记 rMSCs 的胶质纤维酸性蛋白(GFAP)和神经元中丝蛋白(NF-M)表达情况。结果 治疗组较对照组损伤脊髓修复明显,神经功能评分显著提高($P < 0.05$)。rMSCs 移植加黄芪注射液治疗组在不同时间点的神经功能评分都高于 rMSCs 移植治疗组。脊髓组织病理切片显示 rMSCs 移植加黄芪注射液治疗组较 rMSCs 移植治疗组组织水肿和炎性细胞浸润减轻更明显,胶质细胞增生更活跃。双标免疫组化显示移植的 rMSCs 在宿主脊髓中存活,从第 7 d 开始即有 GFAP 和 NF-M 表达并向损伤部位迁移。rMSCs 加黄芪注射液治疗组中 GFAP、NF-M 阳性细胞数目均较 rMSCs 移植治疗组增多($P < 0.05$)。结论 rMSCs 移植是治疗脊髓损伤的有效方法;黄芪注射液在体内有诱导 rMSCs 向神经细胞分化的能力,并有协同 rMSCs 促进大鼠脊髓损伤修复的作用。

关键词 黄芪注射液;间质干细胞;脊髓损伤;移植

Effect of Astragalus Injection Combined with Mesenchymal Stem Cells Transplantation for Repairing the Spinal Cord Injury in Rats YU Qin, BAI Yue-shuang, LIN Jie, et al Institute of Bioengineering, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou (310053)

ABSTRACT Objective To observe the effect of Astragalus Injection (ASI) combined with rat's mesenchymal stem cells transplantation (rMSCs) for repairing spinal cord injury in rats. Methods One hundred and twenty Wistar rats were randomly divided into 6 groups, named respectively by letters from A-F. they were treated respectively with none, PBS solution, ASI, rMSCs, and ASI + rMSCs, with the ASI administered via intraperitoneal injection and the rMSCs given by local injection to the spinal cord, on the 3rd day of operation. The condition of nerve function recovery was assessed on the 7th, 14th, 21st and 28th day after treatment by scoring according to the Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) locomotor rating scale. Besides, the pathological change of the injured spinal cord was observed and expressions of glial fibrillary acidic protein (GFAP) and neurofilament-M (NF-M) in the BrdU-labeled rMSCs in the spinal cord tissue were examined by immuno histochemistry. Results The recovery of spinal cord in Group D, E and F was better than that in Group B and C, showing higher BBB scores. As compared with Group E, Group F showed a higher score of nerve function and a milder inflammatory cell infiltration with lessened tissue edema in the spinal cord and more active proliferation of gliocyte. Double-labelled immunohistochemical examination showed that the transplanted rMSCs were alive in the host's spinal cord, revealing the expressions of GFAP and NF-M from the 7th day after transplantation, which were migrating to the injured site. The amount of GFAP and NF-M positive cells in Group F was much more than that in Group E ($P < 0.05$). Conclusion Transplantation of rMSCs is an effective method in treatment of the spinal cord injury; ASI has the capacity for inducing rMSCs differentiated into neurons, and could synergize with rMSCs to promote the repairing of the spinal cord from injury.

基金项目:浙江省中医药管理局资助项目(No. 2004C008, No. 2009CA006);浙江省新苗人才计划(No. 2008R40G2120038)

作者单位:1. 浙江中医药大学生物工程学院(杭州 310053); 2. 浙江中医药大学第一临床医学院

通讯作者:余 勤, Tel: 0571-86613712, E-mail: qinyu3587@yahoo.com.cn

KEYWORDS Astragalus Injection; mesenchymal stem cells; spinal cord injury; transplantation

脊髓损伤 (spinal cord injury, SCI) 的治疗一直是医学界的一项难题,干细胞移植是最有希望的方法之一。骨髓间质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 移植治疗神经损伤可使神经细胞再生和神经结构重建,恢复损伤的神经功能,成为治疗神经损伤理想的种子细胞。传统中药黄芪是临床治疗神经系统疾病的常用药之一,是已经证实确有临床疗效并可用于体内注射的中药。本研究小组在前期研究中用黄芪在体外诱导 MSCs 向神经元样细胞转化获得了成功^[1]。本实验通过对大鼠脊髓半横断损伤模型局部移植大鼠骨髓间质干细胞 (rat mesenchymal stem cells, rMSCs) 同时应用黄芪注射液腹腔注射,探讨 rMSCs 移植对脊髓损伤的修复作用,并研究黄芪注射液在大鼠体内是否有诱导间质干细胞向神经细胞分化的作用以及黄芪注射液与间质干细胞联合应用对大鼠脊髓损伤修复的影响。

材料与方法

1 材料

1.1 动物 用于提取骨髓的动物为健康 Wistar 青年雄性大鼠,体重 (100 ± 10) g; 用于造模的动物为健康 Wistar 雄性大鼠,清洁级,体重 (80 ± 10) g,均购于浙江中医药大学实验动物中心。

1.2 药物 黄芪注射液,10 mL/支,每毫升相当于含生药 2 g,由成都地奥九泓制药厂生产 (批号: 0509032)。10% 水合氯醛,30 mL/瓶,由浙江省中医院药房配制 (批号: 060922)。

1.3 主要试剂与仪器 DMEM/F12 1:1 培养基、青-链霉素溶液及 0.25% 胰蛋白酶-1 mmol EDTA (Invitrogen 公司产品)、胎牛血清 (GIBCO 公司)、5-溴-2 脱氧尿嘧啶核苷 (BrdU, Sigma 公司)、兔抗神经胶质纤维酸性蛋白单抗和兔抗神经元中丝蛋白单抗 (Chemicon 公司)、小鼠抗 BrdU 抗体 (Santa Cruz Biotechnology 公司)、Polymer 双染检测试剂盒 (北京中杉金桥生物技术有限公司)、一次性的塑料培养瓶、离心管 (Becton Dickinson and Company)。

倒置相差荧光显微镜 (Nikon 公司)、电热鼓风干燥箱、超净工作台 (苏净集团安泰公司)、CO₂ 细胞培养箱 (美国 FORMA 公司)、低速离心机 (北京医用离心机厂)、电热手提压力蒸气消毒器 (上海医用核子仪器厂)、微量进样器 5 μ L (宁波市镇海三爱仪器厂)、立体定向仪 (第二军医大学)。

2 方法

2.1 rMSCs 的制备 取健康 Wistar 雄性大鼠,脱颈椎处死,无菌条件下取出股骨和胫骨,用 5 mL 含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 1:1 培养基冲出骨髓,离心,制成单细胞悬液,接种于一次性塑料培养瓶中,置于 CO₂ 细胞培养箱中培养。传至 P 3 代的细胞培养 2~3 天后,弃去原培养基,加入含终浓度为 10 μ mol/L BrdU 的 DMEM/F12 1:1 培养基避光继续培养 72 h。当细胞融合达 90% 左右时,消化收集细胞,调成浓度为 $5 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$ cell/ μ L 的细胞悬液待用。

2.2 大鼠脊髓半横断损伤模型的制作 将 Wistar 大鼠用 10% 水合氯醛溶液 (0.4 mL/100 g) 腹腔注射麻醉,俯卧位固定在自制固定板上,消毒、备皮,按肋骨确定椎体序列,以 T₁₂ 肋为标志,在背面正中向头侧方向作一长约 1 cm 切口,逐层剥离肌肉,暴露椎骨,咬除 T₁₀~T₁₂ 脊突及相应椎板,在 T₁₀~T₁₂ 椎骨平面打开椎管,充分暴露脊髓背面及两侧,用虹膜剪从脊髓中间插入,横断右侧脊髓,并剪除约 2 mm 左右的脊髓组织,将分离的肌肉逐层缝合,封闭椎管缺损,在缝合的伤口上撒上青霉素粉,缝合皮肤,制成 SCI 模型。

2.3 分组及给药方法 4 周龄的雄性 Wistar 大鼠 120 只,随机分成假手术组 (造模过程中仅咬除脊突及相应椎板,并不横断脊髓,手术后不给予任何治疗)、模型组 (造模后不给予任何治疗)、PBS 液对照组 (简称 PBS 组,于造模后 3 d 脊髓损伤局部注射 5 μ L PBS 液治疗,注射位点、注射液体量同 rMSCs 移植治疗组)、黄芪注射液对照组 (简称黄芪组,于造模后 3 d 按 1.2 mL/100 g 腹腔注射黄芪注射液治疗)、rMSCs 移植治疗组 (简称 rMSCs 组,于造模后 3 d 脊髓损伤局部注射 5 μ L rMSCs 悬液治疗)、rMSCs 移植加黄芪注射液治疗组 (简称 rMSCs 加黄芪组,于造模后 3 d 脊髓损伤局部注射 5 μ L rMSCs 悬液,同时按 1.2 mL/100 g 腹腔注射黄芪注射液治疗)。假手术组 10 只大鼠,其余 5 组各 22 只大鼠。

2.4 rMSCs 移植 大鼠脊髓半横断损伤模型建立后 3 d,收集经 BrdU 标记的 P 3 代 rMSCs,用培养液调成浓度为 $5 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$ cell/ μ L 的细胞悬液待用。将造模大鼠用 10% 水合氯醛溶液腹腔注射麻醉后,固定于立体定向仪上,背部常规备皮、消毒,无菌操作下暴露损伤脊髓,在损伤脊髓头侧注射 5 μ L 经 BrdU 标记的 rMSCs 悬液 (细胞总数约 $2.5 \sim 5 \times 10^5$ 个),注射速度保持 1 μ L/min,注毕停针 5 min,并以 1 mm/min 速度缓慢退针,退针前停针 5 min。注射完毕,常规消

毒后缝合切口。

2.5 行为学检测 各组大鼠分别于治疗后 7、14、21、28 天随机选 6 只进行 BBB (the Basso, Beattie, Bresnahan locomotor rating scale) 评分^[2], 观察大鼠后肢运动功能情况。

2.6 脊髓组织病理学检查及双标免疫组织化学鉴定 在治疗后的相应时间点各组随机选取大鼠经心脏灌流 4% 多聚甲醛固定取脊髓组织。组织块经修剪后制成石蜡包块, 沿冠状位做 4 μm 厚的切片, 每隔 20 μm 取 1 张, 按相应时间取部分切片做 HE 染色, 在光镜下观察脊髓局部的病理变化。取部分切片做双标免疫组化染色, 观察 BrdU 标记 rMSCs 的胶质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 和神经元丝蛋白 (neurofilament protein-M, NF-M) 表达情况。

2.7 阳性细胞的判定和计数 BrdU 阳性使细胞核呈棕黄色或棕褐色, GFAP 阳性使神经纤维网格框架着红色, NF-M 阳性使细胞轴突和胞体着红色。随机计数相应时间点 20 个视野中 BrdU 和 GFAP 及 BrdU 和 NF-M 双标阳性细胞, 计算平均值。

2.8 统计学方法 采用 SPSS 11.5 数据库软件处理, 实验结果为计量资料时, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析和 q 检验; 实验结果为计数资料时, 以百分率表示。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 BBB 分级法行为学检测 (表 1) rMSCs 组和 rMSCs 加黄芪组在各个时间点的评分均高于 PBS 组和黄芪组 ($P < 0.05$)。其中 rMSCs 加黄芪组在不同时间点的评分又都高于 rMSCs 组, 除第 14 d 两者评分比较无明显提高 ($P > 0.05$) 外, 其余各个时间点评分比较均有显著提高 ($P < 0.05$)。

2 脊髓组织病理检查结果 (图 1) rMSCs 组和 rMSCs 加黄芪组脊髓组织镜下观察可见胶质细胞增生活跃, 损伤周围可见到相对完整的神经细胞。相应时间点与 PBS 组和黄芪组比较, 神经细胞变性、坏死数量及程度有较显著减轻。rMSCs 加黄芪组较 rMSCs 组组织水肿和炎性细胞浸润减轻更明显, 而胶质细胞增生更活跃。

表 1 各组大鼠不同时间点 BBB 分级法行为学检测评分比较 (分, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	行为学检测评分			
		7 d	14 d	21 d	28 d
模型	6	1.33 ± 0.52	4.17 ± 0.75	5.50 ± 0.55	6.33 ± 0.52
假手术	6	20.83 ± 0.41 [*]	21.00 ± 0.00 [*]	21.00 ± 0.00 [*]	21.00 ± 0.00 [*]
PBS	6	1.17 ± 0.41 ^Δ	2.33 ± 0.52 ^{*Δ}	3.50 ± 0.55 ^{*Δ}	4.50 ± 0.55 ^{*Δ}
黄芪	6	3.17 ± 0.41 ^{*Δ▲}	4.83 ± 0.75 ^{*Δ▲}	5.60 ± 0.55 ^{*Δ▲}	7.17 ± 0.75 ^{*Δ▲}
rMSCs	6	4.33 ± 0.52 ^{*Δ▲○}	7.50 ± 0.55 ^{*Δ▲○}	9.00 ± 0.63 ^{*Δ▲○}	10.00 ± 0.63 ^{*Δ▲○}
rMSCs 加黄芪	6	5.50 ± 0.55 ^{*Δ▲○●}	7.83 ± 0.41 ^{*Δ▲○}	10.50 ± 0.84 ^{*Δ▲○●}	11.67 ± 0.52 ^{*Δ▲○●}

注: 与模型组同期比较, ^{*} $P < 0.05$; 与假手术组同期比较, ^Δ $P < 0.05$; 与 PBS 组同期比较, [▲] $P < 0.05$; 与黄芪组同期比较, [○] $P < 0.05$; 与 rMSCs 组同期比较, [●] $P < 0.05$

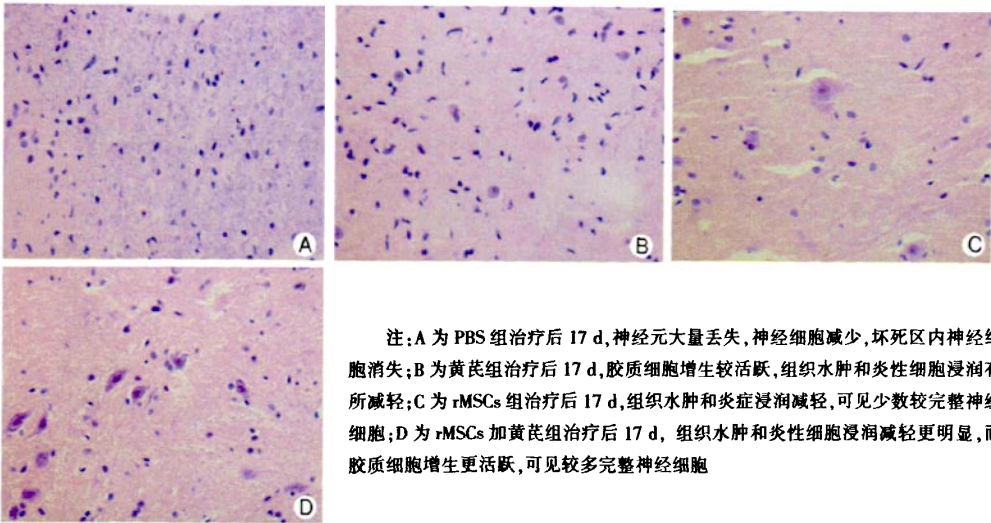
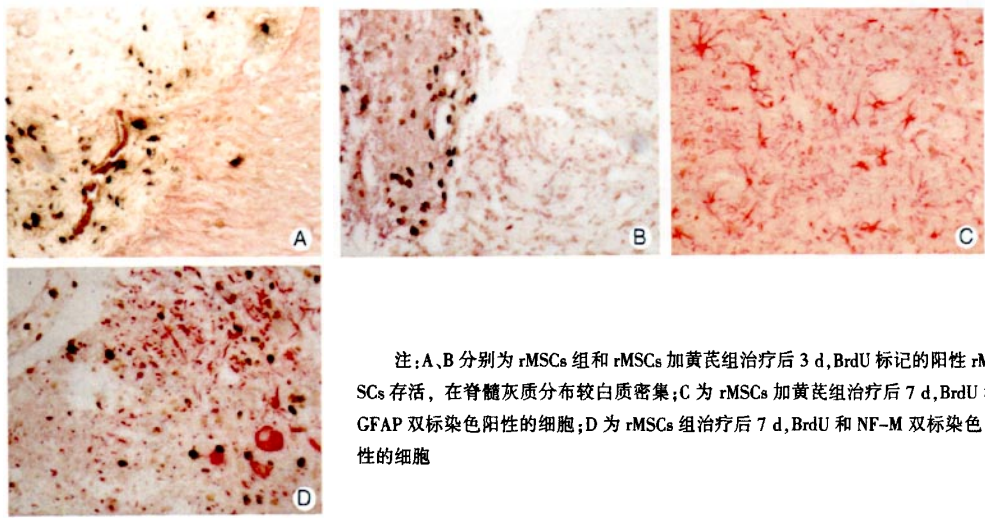


图 1 脊髓组织病理检查结果 (HE 染色, ×400)



注:A、B 分别为 rMSCs 组和 rMSCs 加黄芪组治疗后 3 d,BrdU 标记的阳性 rMSCs 存活,在脊髓灰质分布较白质密集;C 为 rMSCs 加黄芪组治疗后 7 d,BrdU 和 GFAP 双标染色阳性的细胞;D 为 rMSCs 组治疗后 7 d,BrdU 和 NF-M 双标染色阳性的细胞

图 2 脊髓组织双标免疫组化染色结果 (× 400)

3 脊髓组织双标免疫组化染色结果(图 2) rMSCs 组和 rMSCs 加黄芪组脊髓组织内都可见 BrdU 标记的阳性 rMSCs 存活,在脊髓灰质分布较白质密集,rMSCs 加黄芪组中 BrdU 标记的阳性 rMSCs 分布较 rMSCs 组密集,其阳性细胞数目亦相对较多;于移植后的 7d 即可检测到 BrdU 和 GFAP 及 BrdU 和 NF-M 双标染色阳性的细胞。从表 2 可以看出,rMSCs 加黄芪组 BrdU 和 GFAP 及 BrdU 和 NF-M 双标染色阳性的细胞数较 rMSCs 组多,两组差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 2 rMSCs 组及 rMSCs 加黄芪组 BrdU 标记的 GFAP 和 NF-M 双染阳性细胞表达密度比较 (个/目视视野, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	GFAP	NF-M
rMSCs	20	6.35 ± 1.14	1.60 ± 0.75
rMSCs 加黄芪	20	8.75 ± 1.16*	3.30 ± 0.98*

注:与 rMSCs 组比较,* $P < 0.05$

讨 论

国内外学者对间质干细胞移植治疗脊髓损伤进行了研究,认为 MSCs 经损伤局部移植后可向病变部位的组织迁移^[3,4],并与临近的细胞发生融合,整合了临近细胞的基因而表达该细胞的部分特征从而替代或补充损伤的神经细胞。迁移的 MSCs 能对环境、细胞因子和一些信号做出反应,与周围组织发生联系,表达神经细胞特有的标志蛋白如 NSE、GFAP 等^[5]。在本实验中对大鼠脊髓半横断损伤模型采用 rMSCs 移植治疗后,大鼠后肢运动功能明显改善,BBB 分级法行为学检测平均得分较 PBS 组和黄芪组均有明显提高 ($P < 0.05$);脊髓组织病理切片显示受损脊髓较 PBS 组

和黄芪组有明显修复;双标免疫组化结果显示在 rMSCs 移植后 3 d,1、2、3、4 w,在损伤灶及临近的脊髓组织中检测到存活的 rMSCs,表明 rMSCs 能在损伤灶内存活、迁移,从移植后第 7 d 开始即有 BrdU 标记的 NF-M 和 GFAP 表达并向损伤部位迁移,提示这些细胞可补充丢失的神经元及神经胶质细胞,重建轴突环路,从而增加残存神经原的可塑性。证实 rMSCs 移植是治疗脊髓损伤的有效方法。

黄芪注射液是中药黄芪的提取物,其主要成分为黄芪异黄酮、皂甙、黄芪多糖及微量元素硒等。近年来药理研究提示黄芪具有改善脑部循环、抗缺血缺氧、增强神经生长因子作用、对神经细胞损伤有保护作用等功效^[6,7]。马永刚等^[8]研究发现黄芪可以减少脊髓损伤后内源性单核细胞趋化蛋白-1 (monocyte chemokine protein-1, MCP-1) 的产生,从而缓解继发性脊髓损伤,发挥脊髓保护作用。在本实验中我们观察到 rMSCs 加黄芪组大鼠 BBB 分级法检测平均得分在不同时间点都高于 rMSCs 组,除第 14 d 两者评分比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$) 外,其余各个时间点平均得分比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。脊髓组织病理切片观察到 rMSCs 加黄芪组较 rMSCs 组组织水肿和炎性细胞浸润减轻更明显,而胶质细胞增生更活跃。双标免疫组化显示 rMSCs 加黄芪组中 GFAP、NF-M 阳性细胞数目均较 rMSCs 组增多 ($P < 0.05$),提示黄芪注射液在体内有诱导 rMSCs 向神经细胞分化的作用,并有促进间质干细胞修复脊髓损伤的作用。分析其机制可能为黄芪能抑制脂质过氧化,降低脊髓损伤后的组织损害,促进神经功能恢复。任宪盛等^[9]研究表明黄芪可以抑制脊髓损伤后的脂质过氧化反应,减轻脊髓

继发性损害,促进脊髓损伤后的神经功能恢复,从而发挥神经保护作用。在脊髓损伤中,细胞表面钙离子通道的异常开放导致大量钙离子内流,是引起继发性脊髓损伤的重要病理机制。黄芪属于非选择性钙通道阻滞剂,能有效的抑制钙通道的开放,阻断了继发性损伤的链式反应,从而有效地保护脊髓组织^[9]。再次,近年来药理研究提示黄芪又具有改善脑部循环,抗缺血缺氧、增强神经因子作用、对神经细胞损伤有保护作用等功效^[6,10],黄芪通过改善损伤脊髓微环境,减轻脊髓的继发性损伤,同时改善损伤脊髓局部生化条件,形成一个更加有利于移植的 MSCs 生存和向神经细胞分化的环境,促进其成活与功能建立。

与 MSCs 研究的整体水平相比,中医药对 MSCs 作用的研究尚处于探索阶段,特别是有关中药在体内联合 MSCs 治疗中枢神经损伤的报道极少。本研究结果表明,黄芪注射液在体内有诱导 rMSCs 向神经细胞分化的能力,并有协同 rMSCs 促进大鼠脊髓损伤修复的作用,为中药与间质干细胞移植联合应用治疗中枢神经损伤提供了实验依据,显示出良好的临床应用前景。

参 考 文 献

- [1] 余勤,罗依,董勤,等.黄芪对间质干细胞分化为神经元样细胞的定向诱导作用[J].中华急诊医学杂志,2004,13(12):826-829.
Yu Q, Luo Y, Dong Q, et al. Experiment study on the differentiation of adult human mesenchymal stem cells (MSC) into neuron-like cells with astragalus[J]. Chin J Emerg Med, 2004, 13(12): 826-829.
- [2] Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats[J]. Neurotrauma, 1995, 12(1):1-12.
- [3] Svetlana MS, Parvin S, Richard FK, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 regulation of blood-brain barrier permeability[J]. Cerebral Blood Flow Metab, 2005, 25(5): 593.
- [4] Simard AR, Rivest S. Role of inflammation in the neurobiology of stem cells[J]. Neuroreport, 2004, 15(15): 2305.
- [5] Mahmood A, Lu D, Wang L, et al. Intracerebral transplantation of marrow stromal cells cultured with neurotrophic factors promotes functional recovery in adult rats subjected to traumatic brain injury[J]. Neurotrauma, 2002, 19(12): 1609.
- [6] 刘世清.中药黄芪对实验性脊髓损伤的神经保护作用[J].中国骨伤杂志,2003,16(8):463-465.
Liu SQ. Neuroprotective effects of astragalus root on experimentally spinal cord injury in rats[J]. Chin J Orthop Traumatol, 2003, 16(8): 463-465.
- [7] 姚晨玲.黄芪注射液对培养神经细胞损伤的保护作用[J].中国临床医学杂志,2002,9(2):163-165.
Yao CL. The protective effect of astragale on the culturing neural cells[J]. J Clin Med, 2002, 9(2): 163-165.
- [8] 马永刚,刘世清,刘敏,等.中药黄芪对脊髓星形胶质细胞单核细胞趋化蛋白-1分泌的影响[J].中国骨伤杂志,2004,17(11):653-655.
Ma YG, Liu SQ, Liu M, et al. Effects of astragalus root on the secretion of MCP-1 by astrocytes *in vitro* from spinal cord of adult rats[J]. Chin J Orthop Traumatol, 2004, 17(11): 653-655.
- [9] 任宪盛,冷向阳,杨有庚,等.黄芪对大鼠实验性脊髓损伤的神经保护作用[J].中国临床康复杂志,2006,10(7):31-33.
Ren XS, Leng XY, Yang YG, et al. Neuro-protective effect of astragalus root on experimentally injury of spinal cord in rats[J]. Chin J Clin Rehabil, 2006, 10(7): 31-33.
- [10] 张刚.黄芪注射液临床应用进展[J].河北中医,2002,24(9):712-713.
Zhang G. Study on progress of astragalus injection in Clinics[J]. Hebei J Tradit Chin Med, 2002, 24(9):712-713.

(收稿:2008-07-21 修回:2009-01-20)

第十一次全国中西医结合防治呼吸系统疾病学术研讨会征文通知

由中国中西医结合学会呼吸病专业委员会主办,中国中医科学院广安门医院承办的“第十一次全国中西医结合防治呼吸系统疾病学术研讨会暨全国呼吸病中西医结合研究高级进修班”定于2010年10月底在北京召开。会议主题突出“临床实用”。届时将邀请呼吸内科领域的名老中医及北京协和医院、北大医院等单位的著名专家进行学术讲座,交流中医、中西医结合防治呼吸系统疾病的基础理论、临床治疗经验和最新进展。现将会议征文事宜通知如下。

征文内容 与肺部感染、哮喘、慢性阻塞性肺疾病、弥漫性肺间质疾病、肺血管病、呼吸睡眠暂停综合征、肺动脉血栓栓塞症、胸膜和纵隔疾病及其他呼吸疾病的临床治疗经验、综合防治策略或基础研究等方面的文章,呼吸系统少见病、疑难病中西医结合诊治的临床报道,临床治疗上述疾病的名老中医专家经验总结及介绍等。

征文要求 论文须尚未公开发表,字数不超过3000字,摘要不超过300字,注明作者姓名、工作单位、通讯地址、邮编及第一作者的电子邮箱及联系电话。论文格式为word文档,标题黑体3号字,内容宋体5号字。

截稿日期 2010年8月31日。

联系方式 联系人:边永君,刘志国,吴若菡;联系电话:010-88001444;稿件请发至电子邮箱:hxn2010@163.com或hxn2010@sina.com。