

## · 基础研究 ·

## 养精种玉汤对高雄激素培养的卵巢颗粒细胞 PCNA、StAR、FSHR mRNA 与蛋白表达的影响

郑艳华<sup>1</sup> 丁涛<sup>2</sup> 马红霞<sup>3</sup> 叶丹凤<sup>3</sup> 苏念军<sup>4</sup> 吴效科<sup>5</sup>

**摘要** **目的** 观察养精种玉汤对高雄激素培养的卵巢颗粒细胞(GC)增殖细胞核抗原(PCNA)、类固醇激素合成急性调节蛋白(StAR)与促卵泡生成素受体(FSHR)mRNA 及其蛋白表达的影响。**方法** 以原代培养猪卵巢 GC 为实验对象。分别将促卵泡生成素(FSH)、养精种玉汤加入受过量丙酸睾酮处理的 GC 培养体系中。48 h 后,利用 RT-PCR 和 Western blot 分别检测 PCNA、StAR、FSHR mRNA 及其蛋白表达量。**结果** 过量雄激素抑制 GC 的 PCNA、StAR、FSHR mRNA 及蛋白的表达,养精种玉汤和 FSH 能逆转雄激素的抑制作用,促进 GC PCNA、StAR、FSHR mRNA 与蛋白的表达。**结论** 养精种玉汤有拮抗过量雄激素对 PCNA、StAR、FSHR mRNA 及其蛋白表达的抑制作用,推测养精种玉汤通过促进 PCNA、StAR、FSHR mRNA 与蛋白的表达以及拮抗过多雄激素的负作用,改善卵泡发育异常。

**关键词** 卵巢颗粒细胞;养精种玉汤;雄激素;增殖;分化

Effect of Yangjing Zhongyu Decoction on mRNA and Protein Expression of PCNA, StAR, and FSHR in Ovarian Granulosa Cells Cultured by Excess Androgen ZHENG Yan-hua<sup>1</sup>, DING Tao<sup>2</sup>, MA Hong-xia<sup>3</sup>, YE Dan-feng<sup>3</sup>, SU Nian-jun<sup>4</sup>, and WU Xiao-ke<sup>5</sup> 1 Department of Traditional Chinese Medicine, Fourth Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou (511447), China; 2 Department of Gynecology and Obstetrics, Jingmen No. 2 People's Hospital, Hubei (448000), China; 3 Department of Traditional Chinese Medicine, The First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou(510120), China; 4 Department of Gynecology and Obstetrics, Guangdong Women and Children Hospital, Guangzhou(511400), China; 5 Department of Obstetrics and Gynecology, The First Affiliated Hospital, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin (150040), China

**ABSTRACT** **Objective** To observe the effect of Yangjing Zhongyu Decoction (YZD) on mRNA and protein expression of PCNA, StAR, and FSHR in ovarian granulosa cells (GCs) cultured by excess androgen. **Methods** Ovarian GCs from porcine follicles were isolated and cultured *in vitro*. Follicular stimulating hormone (FSH) or YZD was added in the GCs treated by excess testosterone propionate. Totally 48 h later mRNA and protein expression of PCNA, StAR, and FSHR were detected by RT-PCR and Western blot. **Results** Excess androgen inhibited mRNA and protein expression of PCNA, StAR, and FSHR of GCs. FSH and YZD could antagonize inhibition of excess androgens, and promote mRNA and protein expression of PCNA, StAR, and FSHR in GCs. **Conclusion** YZD could antagonize the inhibition of excess androgen on mRNA and protein expression of PCNA, StAR and FSHR in GCs. Thus, we inferred that YZD could improve the follicle dysplasia by promoting mRNA and protein expression of PCNA, StAR and FSHR in GCs.

**KEYWORDS** ovarian granuloma cell; Yangjing Zhongyu Decoction; androgen; proliferation; differentiation

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 30701119);广东省自然科学基金资助项目(No. 9151008901000053)

作者单位:1.广州医科大学附属第四医院中医科(广州 511447);2.湖北省荆门市第二人民医院妇产科(湖北 448000);3.广州医科大学附属第一医院中医科(广州 510120);4.广东省妇幼保健院(广州 511400);5.黑龙江中医药大学第一附属医院妇产科(哈尔滨 150040)

通讯作者:马红霞, Tel:020-83062040, E-mail: doctorhongxia@126.com

DOI: 10. 7661/CJIM. 2014. 03. 0312

雄激素对卵泡发育具有双重调控作用,生理剂量下促进早期卵泡生长,但过量雄激素能诱导颗粒细胞 (granuloma cell, GC) 凋亡和卵泡闭锁,导致卵泡发育异常和排卵障碍<sup>[1]</sup>。养精种玉汤系《傅青主女科》所载,是中医治疗不孕症的常用和基础方剂,有研究发现其能增加 GC 雌二醇 (estradiol, E<sub>2</sub>) 与孕酮 (progesterone, P) 的分泌<sup>[2,3]</sup>,促进子宫内膜细胞外基质降解而适于胚泡种植,还可以促进子宫内膜分化<sup>[4]</sup>,提高子宫内膜对胚泡种植的容受性<sup>[5]</sup>,并可提高其妊娠率和保胎成功率<sup>[6]</sup>。临床上,排卵障碍性疾病如多囊卵巢综合征 (polycystic ovary syndrome, PCOS),其高雄激素血症能引起排卵障碍。因此,可以通过高雄激素处理的 GC,模拟排卵障碍病理状态下的 GC,为研究养精种玉汤治疗卵泡发育异常与排卵障碍的作用机制提供理论依据。

### 材料与方法

**1 GC 细胞及培养** 获取新鲜的猪卵巢(选取性成熟母猪,临近排卵期,具有圆、大、有弹性的卵泡的猪卵巢),放入预先注入高浓度双抗(青、链霉素各含 80 万 U/500 mL PBS 缓冲液)的无菌 PBS 缓冲液中,于 37 ℃ 条件下 1 h 内带回实验室,用此种缓冲液反复冲洗猪卵巢 3 次,在无菌条件下剥离卵巢外膜,然后用 1 mL 注射器抽吸卵泡液。将卵泡液注入装有 PBS(含 2% 双抗)的 50 mL 离心管中 1 500 r/min,离心 15 min,弃上清,再次用此种 PBS 缓冲液洗涤细胞 1 次。离心后弃上清,然后用预先配好的 DMEM 培养(含 10% FBS 和 1% 双抗)稀释细胞并计数,5% CO<sub>2</sub>,95% 空气、饱和湿度 37 ℃ 培养箱培养。

**2 药物** 养精种玉汤复方水溶液(熟地黄 30 g 山茱萸 15 g 白芍 15 g 当归 15 g)由广东药学院统一制备:将 75 g 的上述复方加 6 倍水回流提取 2 次,每次 1 h,过滤浓缩至 75 mL,采用高温高压灭菌方式,最终的复方质量浓度为 1 g/mL。

**3 试剂及仪器** DMEM 高糖培养基(美国 HyClone 公司),胎牛血清、青链霉素、胰酶溶液均购自北京索莱宝科技有限公司;丙酸睾酮(TP,天津金耀氨基酸有限公司),重组人促卵泡生成素(Merck Sero-no SA Aubonne Branch); Western blot 所需一抗与二抗(美国 Santa Cruz 公司),预染蛋白 Maker(美国 MBI 公司);PCR 引物(上海生工生物有限公司)。CO<sub>2</sub> 培养箱(美国 ShellLab 公司),酶标仪(美国 Bio-Rad 公司),凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司),VE-186 转移电泳槽 EPS-300 电泳仪(上海天能科技有限

公司),超净工作台(中国苏净集团有限公司),CK-Z 型普通光学显微镜(日本 Olympus 公司)。

### 4 方法

**4.1 分组及给药方法** 将 GC 培养 48 h 后,随机分为 4 个组。对照组(N 组):加入不含任何药物的培养液(2% FBS 的 DMEM);单纯过量雄激素组(M 组):加入含 200 μmol/L TP 的培养液(2% FBS 的 DMEM);FSH 组:在 M 组基础上加入 FSH(终浓度 10 ng/mL);A 组:在 M 组基础上加上养精种玉汤复方水溶液(终浓度 25 mg/mL)。

**4.2 细胞培养液上清 E<sub>2</sub> 与 P 测定** 加药干预 GC 48 h 后,收集细胞上清培养采用放射免疫法测定 E<sub>2</sub> 和 P,按说明书操作。

**4.3 逆转录 - 聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测 mRNA 表达量** (1)提取各实验组总 mRNA。(2)逆转录 (RT) 反应体系为 20 μL,42 ℃、60 min → 95 ℃、5 min → 4 ℃、5 min。(3)PCR 反应体系为 25 μL,预变性,95 ℃、5 min;变性,94 ℃、30 s;退火,59 ℃ (PCNA)、60 ℃ (FSHR)、58.5 ℃ (StAR)、57.3 ℃ (β-actin) 30 s;延伸,72 ℃、30 s;35 个循环,充分延伸,72 ℃、7 min,结束温度为 4 ℃。(4)扩增产物分析:取 2 μL 产物在 110 V 下经 2% 琼脂糖凝胶电泳 30 min,利用凝胶成像系统分析、扫描、拍照,获取条带光密度和面积。计算相对光密度比值 = (测得的目的基因的光密度 × 面积) / (β-actin 的光密度 × 面积),进行半定量分析。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

基因名称	引物序列	产物大小 (bp)
PCNA	上游 5' - ACC GCT GCG ACC GCA ATT TG - 3'	260
	下游 5' - ACG TGC AAA TTC ACC AGA AGG CAT C - 3'	
FSHR	上游 5' - TGG CAA ACT GGA GCA GGC TGT G - 3'	254
	下游 5' - ATG GGC AGG CAG ATG CTC ACC T - 3'	
StAR	上游 5' - TCG TGG GGC CCC GAG ACT TT - 3'	442
	下游 5' - CCA CTG CAA CAT CCC CAC TGT C - 3'	
β-actin	上游 5' - TGT CAT GGA CTC TGG GGA TGG G - 3'	391
	下游 5' - CGA GTT GAA GGT GGT CTC GTG G - 3'	

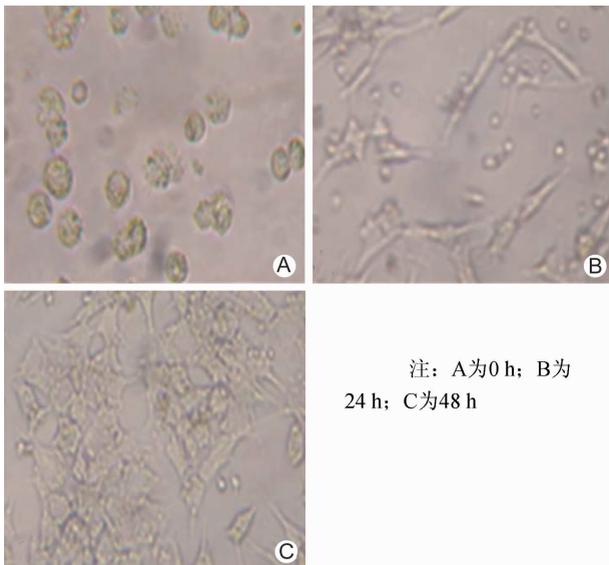
**4.4 蛋白印迹 (Western blot) 检测蛋白表达量** (1)提取各实验组 GC 总蛋白质,Bradford 法测定其浓度。(2)取 40 μg 蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,转膜,封闭,加入增殖细胞核抗原 (PCNA)、类固醇激素合成急性调节蛋白 (StAR)、促卵泡生成素受体 (FSHR) 一抗孵育过夜 (稀释倍数 1:500)。(3)洗涤

后加入辣根过氧化酶标记的二抗, 孵育 2 h (稀释倍数 1:2 000), 充分洗涤, 加入 ECL 超敏发光液, 反应约 5 min 后, 在暗室内用 X 光片曝光数秒到 0.5 h。将最后显液与定液出来的 X 光片利用凝胶成像系统软件分析条带积分光密度值及面积, 计算相对光密度比值 = (测得目的蛋白光密度 × 面积) / (β-actin 的光密度 × 面积), 进行半定量分析。

4.5 统计学方法 数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 SPSS 13.0 统计软件进行 Mann-Whitney U 检验,  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

### 结 果

1 细胞培养结果 (图 1) GC 24 h 内贴壁。48 h 倒置显微镜下观察, 细胞生长呈梭形或星状, 细胞与细胞间有延长的伪足相互连接。细胞核大、圆、胞浆饱满、透光好、颗粒丰富均匀。



注: A为0h; B为24h; C为48h

图 1 不同培养时间段的卵巢颗粒细胞 (×100)

2 细胞药物毒性实验 (1) 当 TP 浓度为 15.625、31.25、62.5、125  $\mu\text{mol/L}$  时, OD 值均较 N 组高, 但是差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 当浓度为 250  $\mu\text{mol/L}$  时, OD 值较 N 组低 ( $P > 0.05$ ); 而浓度为 500  $\mu\text{mol/L}$  时, OD 值明显低于 N 组 ( $P < 0.05$ ), 且差异有统计学意义。因此, 根据 TP 对 GC 的毒性性试验, 本研究后期所加的 TP 浓度为 250  $\mu\text{mol/L}$ 。(2) 各不同浓度 FSH 组的 OD 值均较 N 组高, 但是当浓度为 10 ng/mL 时, OD 升高最为明显 ( $P < 0.001$ )。因此, 后续实验中, 所加 FSH 浓度定为 10 ng/mL。(3) 当细胞培养液中含 25 mg/mL 养精种玉汤复方水溶液时, OD 值较 N 组高, 且差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 因此, 后续实

验中, 所加养精种玉汤定为 25 mg/mL。

3 各组细胞培养液上清  $E_2$  及 P 含量测定结果比较 (表 2) 与 N 组比较, 各药物刺激组  $E_2$  分泌均明显升高 ( $P < 0.01$ ), 其中 FSH 组  $E_2$  分泌量升高最为明显, M 组次之, A 组最低; P 分泌量只有 M 组明显低于 N 组 ( $P < 0.01$ )。与 M 组比较, A 组  $E_2$  分泌量明显降低 ( $P < 0.01$ ), FSH 组差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。FSH 组的 P 分泌量较 M 组显著升高 ( $P < 0.01$ ), 与 M 组比较, A 组 P 分泌量差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

表 2 各组细胞培养液上清  $E_2$  及 P 含量测定结果比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	$E_2$ (nmol/L)	P ( $\mu\text{mol/L}$ )
N	3	31.13 ± 0.93	74.25 ± 7.39
M	3	10 474.18 ± 1 489.57 *	46.75 ± 4.09 *
FSH	3	20 265.60 ± 2 358.06 *	98.33 ± 6.00 $\Delta$
A	3	5 605.54 ± 562.98 $\Delta$	59.26 ± 6.82

注: 与 N 组比较, \* $P < 0.01$ ; 与 M 组比较,  $\Delta P < 0.01$

4 各组 PCNA、StAR、FSHR mRNA 表达比较 (图 2、3) M 组 PCNA、StAR、FSHR mRNA 表达较 N 组均明显下降 ( $P < 0.05$ ); FSH 组与 A 组 PCNA、StAR、FSHR mRNA 较 M 组均升高 ( $P < 0.05$ )。

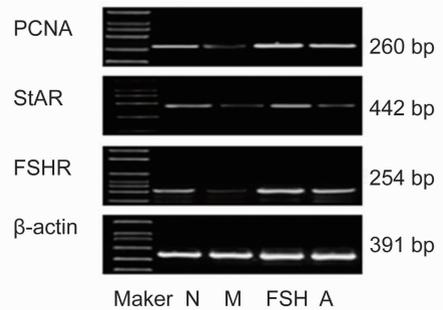
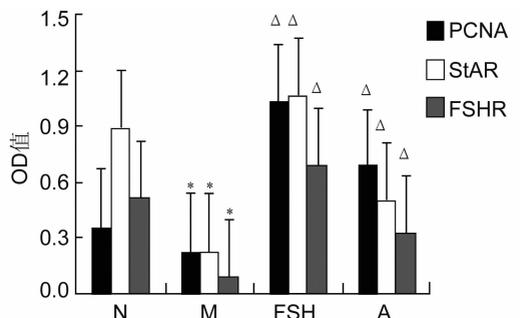


图 2 各组 PCNA、StAR、FSHR mRNA 电泳图



注: 与 N 组比较, \* $P < 0.01$ ; 与 M 组比较,  $\Delta P < 0.01$ ; 下同

图 3 各组 PCNA、StAR、FSHR mRNA 表达水平比较

5 各组 PCNA、StAR、FSHR 蛋白表达的比较 (图 4、5) 与 N 组比较, M 组 PCNA、StAR、FSHR 蛋白表达量均下降 ( $P < 0.05$ )。与 M 组比较, FSH 与 A 组 PCNA、StAR、FSHR 蛋白表达量均增加 ( $P < 0.05$ )。A 组 PCNA、FSHR 蛋白表达量均较 N 组高 ( $P < 0.01$ ), 而 StAR 蛋白表达量较 N 组低 ( $P < 0.01$ )。

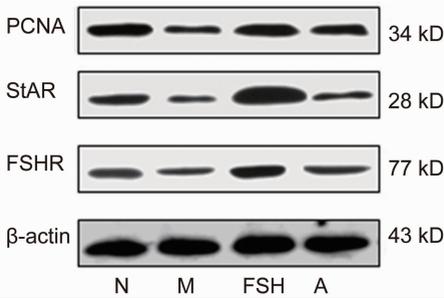


图 4 各组 PCNA、StAR、FSHR 蛋白电泳图

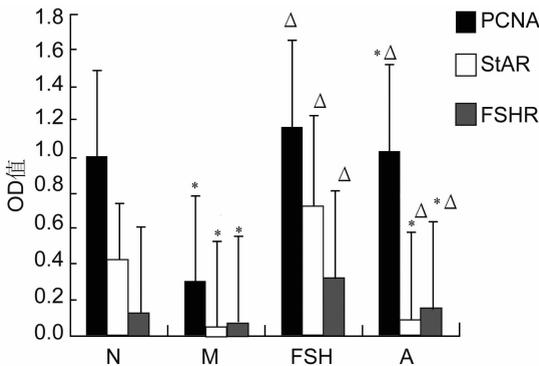


图 5 各组 PCNA、StAR、FSHR 蛋白表达水平比较

### 讨 论

GC 的生长分化是原始卵泡启动和生长的关键, 其通过受体介导途径调控着卵泡期卵泡的发育、闭锁及凋亡, 从而在卵泡发育过程中起重要的调控作用<sup>[7]</sup>, 抑制 GC 增殖或 GC 凋亡, 均能阻断卵泡生长程序而导致无排卵<sup>[8]</sup>。适量的雄激素可提高 GC 芳香化酶的活性和雌激素的产生, 但高雄激素则抑制芳香化酶的活性<sup>[9]</sup>, 并提高血促黄体生成素 (luteinizing hormone, LH) 水平, 阻止卵泡发育而引起卵泡的闭锁与退化<sup>[10]</sup>, 导致妊娠率下降与流产率增高<sup>[11]</sup>。本实验参照文献<sup>[12, 13]</sup>以增 PCNA 评价 GC 的增殖能力, 发现过量雄激素会抑制 PCNA mRNA 及其蛋白在卵巢 GC 中的表达, 推测过量雄激素将抑制 GC 的增殖分化。

芳香化酶受 FSH 的作用而活化, 将 GC 中的雄激素转化为雌激素<sup>[14]</sup>。FSH 与其受体 FSHR 结合后激活 cAMP/PKA 通路, 促进 GC 增殖分化及卵巢性激素的合成<sup>[15]</sup>, 外源性给予 FSH 能诱导 PCOS 患者卵泡

正常生长、成熟优势卵泡选择与排卵, 而敲除促卵泡生成素  $\beta$  亚基 ( $\beta$  subunit of follicle stimulating hormone, FSHB) 与 FSHR 都会引起小鼠的不孕<sup>[16]</sup>。StAR 是甾体生成限速蛋白, 胆固醇快速通过线粒体内膜, 在细胞色素 P450 胆固醇侧链裂解酶的作用下, 发生羟化和侧链裂解的类固醇激素合成限速步骤需要 StAR 的参与<sup>[17, 18]</sup>。StAR mRNA 的表达在转录水平上通过 cAMP 激活的信号转导系统来调节, 而 cAMP 依赖的 PKA 介导的磷酸化可使 StAR 蛋白活性快速增强<sup>[19]</sup>。本实验中加入过量雄激素刺激后, FSHR、StAR mRNA 及其蛋白表达较 N 组显著降低 ( $P < 0.01$ ), 而孕酮分泌也显著减少。PCNA、StAR、和 P 分别能评价 GC 的增殖与分化能力。高雄激素能抑制 GC 增殖与分化, 将会影响卵母细胞 (oocyte, OC) 成熟以及激素的合成, 从而导致卵泡的不发育, 进一步导致无排卵。而同时加入养精种玉汤或 FSH, 则上调 GC PCNA、StAR 与 FSHR mRNA 和蛋白的表达, 以及升高  $E_2$  与 P 的分泌。因此, 我们可以推测养精种玉汤能改善高雄激素对 GC 增殖分化的抑制作用, 提高高雄激素处理过的 GC StAR mRNA 与蛋白表达, 拮抗高雄激素对 GC 分泌激素的抑制作用, 并显著升高  $E_2$  与 P 的水平, 维持卵泡的生长与发育。同时可能会提高 GC 对 FSH 的敏感性, 促进 GC 增殖分化。

综上, 通过本次实验发现养精种玉汤能促进 GC 增殖与分化, 通过升高 PCNA、StAR、FSHR mRNA 和蛋白的表达, 促进 GC 分泌  $E_2$  与 P, 并拮抗过多雄激素的抑制作用, 促进 GC 增殖分化。推测养精种玉汤改善高雄激素引起的排卵障碍、低妊娠率与高流产率的机制可能为: (1) 拮抗高雄激素的不利作用; (2) 促进 GC 增殖, 维持 OC 成熟, 并提供营养物质; (3) 促进 GC StAR 的表达, 增加  $E_2$  与 P 的合成。雌激素的正反馈调节使得 FSH 升高, 进一步促进 GC 的增殖; (4) 上调 GC FSHR mRNA 与蛋白的表达, 进而增加 GC 对 FSH 的敏感性以及增强 FSH 的生理活性。

### 参 考 文 献

- [1] Kurzawa R, Ciepiela P, Baczkowski T, et al. Comparison of embryological and clinical outcome in GnRH antagonist vs. GnRH agonist protocols for *in vitro* fertilization in PCOS non-obese patients. A prospective randomized study [J]. J Assist Reprod Genet, 2008, 25(8): 365 - 374.
- [2] 张玮, 王京花, 程龙庆, 等. 养精种玉汤加减提取液对离体培养的兔卵巢颗粒细胞雌二醇生成的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 1996, 16 (Suppl): 206 - 207.

- [3] 谷长任,张玮,周健秋,等.养精种玉汤对兔卵巢颗粒细胞孕酮生成的影响及机制[J]. 中医学报, 2002, 30(3):55-56.
- [4] 吴瑞瑾,周馥贞.养精种玉汤对原因不明不孕患者子宫内膜基质金属蛋白酶-9 表达及性激素调节的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2004, 24(4):294-298.
- [5] 吴瑞瑾,周馥贞.养精种玉汤对原因不明不孕症患者子宫内膜胰岛素样生长因子-Ⅱ及其受体表达的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2002, 22(7):490-493.
- [6] 姜萍,傅萍.傅萍运用养精种玉汤治疗试管婴儿术前术后临床经验[J]. 浙江中医杂志, 2009, 44(3):170-171.
- [7] 金艳梅.颗粒细胞对卵泡发育的影响[J]. 中国畜牧兽医, 2010, 37(8):69-72.
- [8] Zeleznik AJ. The physiology of follicle selection[J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2004, 18(2):31-37.
- [9] Jonard S, Dewailly D. The follicular excess in polycystic ovaries, due to intraovarian hyperandrogenism, may be the main culprit for the follicular arrest[J]. *Human Reprod Update*, 2004, 10(2):107-117.
- [10] Kurzawa R, Ciepiela P, Baczkowski T, et al. Comparison of embryological and clinical outcome in GnRH antagonist vs. GnRH agonist protocols for *in vitro* fertilization in PCOS non-obese patients. A prospective randomized study [J]. *J Assist Reprod Genet*, 2008, 25(8):365-374.
- [11] Stouffer RL, Martínez-Chequer JC, Molskness TA, et al. Regulation and action of angiogenic factors in the primate ovary [J]. *Arch Med Res*, 2001, 32(6):567-575.
- [12] Kushlinskii NE, Orinovskii MB, Gurevich LE, et al. Expression of bio-molecular maker (Ki-67, PCNA, Bcl-2, BAX, VEGF) in breast tumors [J]. *Bull Exp Biol Med*, 2004, 137(2):182-185.
- [13] Ketcha M, Wanda GJ, Njamen D, et al. Regulation of CD1, Ki-67, PCNA mRNA expression, and Akt activation in estrogen-responsive human breast adenocarcinoma cell line, MCF-7 cells, by griffonianone C, an isoflavone derived from *Millettia griffoniana* [J]. *Pharm Biol*, 2011, 49(4):341-347.
- [14] 丁涛,马红霞.肿瘤坏死因子 $\alpha$ 在多囊卵巢综合征中的作用[J]. 国际妇产科杂志, 2010, 37(6):412-415.
- [15] 陈悦群,黄荷凤.颗粒细胞增殖分化中卵泡刺激素的 cAMP-PKA 通路 [J]. 国际生殖健康/计划生育杂志, 2011, 30(1):65-68.
- [16] Bernard DJ, Fortin J, Wang Y, et al. Mechanisms of FSH synthesis: what we know, what we don't, and why you should care [J]. *Fertil Steril*, 2010, 93(8):2465-2485.
- [17] Hiort O, Holterhus P M, Werner R, et al. Homozygous disruption of P450 side-chain cleavage (CYP11A1) is associated with prematurity, complete XY sex reversal, and severe adrenal failure [J]. *Clin Endocrinol Metab*, 2005, 90(1):538-541.
- [18] Miller WL. Steroidogenic acute regulatory protein (StAR), a novel mitochondrial cholesterol transporter [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1771(6):663-676.
- [19] Jones PM, Sayed SB, Persaud SJ, et al. Cyclic AMP-induced expression of steroidogenic acute regulatory protein is dependent upon phosphoprotein phosphatase activities [J]. *J Mol Endocrinol*, 2000, 24(2):233-239.

(收稿:2013-01-31 修回:2013-10-23)

## 第 23 次全国中西医结合肝病学术会议征文通知

中国中西医结合学会肝病专业委员会 2014 年学术年会——“第 23 次全国中西医结合肝病学术会议”拟于 2014 年 8 月中旬在贵州省贵阳市举行。会议将以常见慢性肝病(慢性病毒性肝炎、肝纤维化、肝硬化、肝癌、脂肪性肝病、酒精性肝病)的中西医结合防治研究进展和临床经验总结交流为重点内容,并将邀请国内知名专家做特邀报告。

**征文要求** (1)提交 500—1 000 字中英文摘要。摘要须按照“目的、方法、结果、结论”格式撰写,用于会刊印刷(注意结果中提供重要的数据资料)。另提交中文论文全文(用于评审优秀论文)。写明作者姓名,单位名称、电子邮箱、地址及邮编。通过电子邮件发送至 [CARL95@163.com](mailto:CARL95@163.com)。会议筹备组联系人:张华, Tel: 021-20256520。本次征文不接受纸质文稿。(2)投稿论文文本格式如下:中文标题用黑体、小四号字体,作者姓名及单位用楷体小五,正文宋体五号,1.5 倍行距,英文及数字用 Times New Roman 字体。(3)已在学术刊物公开发表过的论文,不再受理。

**截稿日期** 2014 年 6 月 15 日。