

MAPK 信号通路在复方丹参注射液调节人羊膜上皮细胞 AQP3 表达中的作用研究

马小燕 沈 奇 华 莹 谢爱兰 朱雪琼

摘要 **目的** 探讨丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPKs)—细胞外信号调节激酶 1 和 2(extracellular signal regulated kinase1/2, ERK1/2)信号转导通路在复方丹参注射液对人足月妊娠羊膜上皮细胞水通道蛋白 3(aquaporin 3, AQP3)表达调节中的作用。**方法** 原代培养足月妊娠羊水量正常与羊水过少人羊膜上皮细胞,将人羊膜上皮细胞均分为 4 组:分别为空白对照组、U0126 组、复方丹参注射液组和 U0126 加复方丹参注射液组。采用免疫印迹技术检测人羊膜上皮细胞中磷酸化 ERK1/2(p-ERK1/2)和 AQP3 的表达。**结果** (1)在羊水量正常和羊水过少人羊膜上皮细胞中,均发现 p-ERK1/2 表达水平在 U0126 组较空白对照组明显下降($P < 0.05$),而复方丹参注射液组可以明显上调 p-ERK1/2 表达水平($P < 0.05$),U0126 加复方丹参注射液组人羊膜上皮细胞中 p-ERK1/2 表达水平高于 U0126 组,但低于复方丹参注射液组($P < 0.05$)。(2)在羊水量正常的人羊膜上皮细胞中,U0126 组 AQP3 的表达与空白对照组比较无明显变化($P > 0.05$);复方丹参注射液组和 U0126 加复方丹参注射液组 AQP3 的表达水平均高于空白对照组($P < 0.05$),但两组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。(3)在羊水过少羊膜上皮细胞中,U0126 组 AQP3 的表达较空白对照组下降($P < 0.05$);复方丹参注射液组可以明显上调 AQP3 的表达水平($P < 0.05$),而 U0126 加复方丹参注射液组 AQP3 的表达水平低于复方丹参注射液组($P < 0.05$),但高于 U0126 组($P < 0.05$)。**结论** 羊水过少时,复方丹参注射液通过激活 MAPK-ERK1/2 信号转导通路来调节人羊膜上皮细胞中 AQP3 的表达水平。

关键词 水通道蛋白 3;细胞外信号调节激酶 1/2;复方丹参注射液;人羊膜上皮细胞;羊水过少

The Role of MAPK Signal Pathway in the Regulation of AQP3 Expression Induced by Compound Danshen Injection in Human Amniotic Epithelial Cells MA Xiao-yan, SHEN Qi, HUA Ying, XIE Ai-lan, and ZHU Xue-qiong Department of Obstetrics and Gynecology, Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Zhejiang (325027), China

ABSTRACT **Objective** To investigate the role of mitogen-activated protein kinases (MAPKs)-extracellular signal regulated kinase1/2 (ERK1/2) signal pathway in the regulation of Compound Danshen Injection (CDI) induced AQP3 expression in the human amniotic epithelial cells (hAECs). **Methods** hAECs of term pregnancy with normal amniotic fluid volume (AFV) or isolated oligohydramnios were primarily cultured. And the cells were equally divided into four groups, i.e., the vehicle control group, the U0126 group, the CDI group, the CDI + U0126 group. The expressions of phosphorylated ERK1/2 (p-ERK1/2) and AQP3 in hAECs were detected using Western blot analysis. **Results** (1) When compared with the control group, the expression level of p-ERK1/2 in hAECs in those with normal AFV and oligohydramnios obviously decreased in the U0126 group ($P < 0.05$). The expression level of p-ERK1/2 could be elevated in the CDI group ($P < 0.05$). The expression level of p-ERK1/2 in hAECs was higher in the CDI + U0126 group than in the U0126 group, but lower in the CDI + U0126 group than in the CDI group ($P < 0.05$). (2) There was no obvious change in AQP3 expression in hAECs with normal AFV between the U0126 group and the vehicle control group ($P > 0.05$). There was no statistical difference in the expres-

基金项目:浙江省中医药管理局重点项目(No. 2010ZZ009);温州市对外合作交流科技计划项目(No. H20100067)

作者单位:浙江省温州医学院附属第二医院妇产科(浙江温州 325027)

通讯作者:朱雪琼, Tel: 0577-88802559, E-mail: zjwzxxq@163.com

sion level of AQP3 between the CDI group and the U0126 + CDI group ($P > 0.05$), but they were higher than those in the vehicle control group ($P < 0.05$). (3) Compared with the vehicle control group, the expression level of AQP3 in hAECs with oligohydramnios significantly decreased in the U0126 group and increased in the CDI group ($P < 0.05$). The expression level of AQP3 was lower in the U0126 + CDI group than in the CDI group, but higher in the U0126 + CDI group than in the U0126 group ($P < 0.05$). Conclusion CDI could regulate AQP3 expression level in hAECs with oligohydramnios via activating the MAPK-ERK1/2 signal transduction pathway.

KEYWORDS Aquaporin 3; extracellular signal regulated kinase1/2; Compound Danshen Injection; human amniotic epithelial cell; oligohydramnion

羊水过少是一种常见的妊娠并发症,严重影响围产儿的预后,使围产儿发病率和死亡率明显升高^[1]。临床上治疗羊水过少的方法有:静脉滴注低渗液、等渗液,口服白开水,经腹羊膜腔内灌注生理盐水,但疗效却不尽人意。Chu HN 等^[2]报道静脉滴注复方丹参注射液治疗羊水过少的有效率在 70%,但是仍有 30% 的羊水过少产妇对复方丹参注射液不敏感。因此,探讨复方丹参注射液治疗羊水过少的分子机制,以期找到更加有效治疗羊水过少的方法,具有重要的临床意义。

近年来发现的水通道蛋白(aquaporin, AQP)是一类能够显著提高细胞膜水通透性的细胞膜蛋白家族,笔者前期研究和国内外其他学者的研究均发现 AQP3 在足月妊娠人羊膜上皮细胞上有表达^[3-5]。笔者的研究^[3]还发现 AQP3 在原因不明的羊水过少产妇羊膜上的表达较羊水量正常产妇羊膜上的表达明显下降。进一步研究发现有效治疗羊水过少的复方丹参注射液可以明显上调羊膜上皮细胞中 AQP3 的表达^[6],但具体的信号转导通路尚未明确。

本研究通过观察复方丹参注射液和细胞外信号调节激酶 1 和 2 (extracellular signal regulated kinase1/2, ERK1/2) 特异性抑制剂 U0126 对羊水过少和羊水量正常产妇羊膜上皮细胞 AQP3 表达的调控,探讨丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPKs)—ERK1/2 信号转导通路在复方丹参注射液调节人足月妊娠羊膜上皮细胞 AQP3 表达中的作用,以明确复方丹参注射液治疗羊水过少的分子机制,为临床有效治疗羊水过少提供实验依据和新思路。

资料与方法

1 诊断标准 参照《妇产科学》^[7]第 7 版中羊水过少的诊断标准,产前 B 超监测羊水指数:正常羊水量羊水指数范围为 8 ~ 18 cm,羊水指数 ≤ 5 cm 为羊

水过少。剖宫产术中进一步核实羊水量情况^[3],实际羊水总量 300 ~ 2 000 mL 为羊水正常,羊水总量 < 300 mL 确定为羊水过少。

2 纳入及排除标准 (1) 纳入标准:年龄 24 ~ 28 岁,原因不明的羊水过少和羊水量正常而行选择性剖宫产产妇;术中实际羊水总量与术前羊水指数诊断相符;均签署知情同意书。(2) 排除标准:有其他妊娠合并症和并发症,如高血压、糖尿病、心血管疾病、胎儿畸形、过期妊娠、胎儿生长受限、胎儿窘迫、胎膜早破、自身免疫疾病等;有催产素引产史;有药物服用史。

3 一般资料 选择 2011 年 1 月—2011 年 11 月温州医学院附属第二医院产科的羊水量正常和不明原因羊水过少足月妊娠产妇各 20 例。产妇年龄 24 ~ 28 岁。羊水量正常组产妇的平均年龄(26.18 ± 1.17)岁,孕周(38.76 ± 0.70)周,平均体重(66.33 ± 7.25)kg。羊水过少组产妇的平均年龄(26.40 ± 0.97)岁,孕周(38.41 ± 0.89)周,平均体重(62.40 ± 7.11)kg。两组产妇的年龄、孕周和体重等一般资料比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

4 试剂与药物 兔抗人磷酸化-ERK1/2 (p-ERK1/2) 抗体(Cell Signaling Technology 公司,美国,稀释比例 1:1 000),兔抗人 AQP3 多克隆抗体(武汉博士德公司,稀释比例 1:300)、鼠抗人 Tubulin 抗体(碧云天公司,稀释比例 1:2 000),增强化学发光试剂(Pierce 公司,美国),辣根过氧化物酶(horse-radish peroxidase, HRP)标记山羊抗兔 IgG、HRP 标记山羊抗小鼠 IgG(碧云天生物技术有限公司),DMEM、胰酶、EDTA (Gibco 公司,美国),胎牛血清(杭州四季青生物工程有限公司),免疫组化 SP 试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司),复方丹参注射液(上海新亚药业高邮有限公司,生产批号:101227-3,规格:每支 2 mL)。

5 方法

5.1 标本收集 选择性剖宫产时胎盘娩出后

10 min 内在无菌状态下取羊膜组织,以无菌的 PBS 缓冲液和无血清培养基反复冲洗。

5.2 人羊膜上皮细胞原代培养 将已处理干净的羊膜组织放置含双抗的无血清培养基中浸泡 20 min,用眼科剪将其剪为 1 mm × 1 mm × 1 mm 碎块,加入无乙二胺四乙酸的 0.25% 的胰蛋白酶消化液 37 °C 消化 60 min,用含 10% 胎牛血清的完全培养基终止消化,吹打数分钟后收集消化液,1 500 r/min 离心 20 min,弃上清,再重悬沉淀,800 r/min 离心 6 min,弃上清,收获细胞,取小部分爬片鉴定为人羊膜上皮细胞后,沉淀中加入完全培养液制成细胞悬液,以 1×10^5 个/mL 密度 2 mL 细胞接种于培养皿中,置 37 °C、饱和湿度、5% CO₂ 培养箱中培养,隔天换液 1 次,5 ~ 7 天以 1:2 传代 1 次。

5.3 分组及给药方法 我们的前期实验发现^[6],在羊水量正常和羊水过少时,0.01 mg/mL 复方丹参注射液作用人羊膜上皮细胞 12 h,其细胞内的 AQP3 水平均达到峰值,故复方丹参注射液作用组选择 0.01 mg/mL 复方丹参注射液作用 12 h。我们的前期研究还发现^[8],U0126 作用于羊水量正常的人羊膜上皮细胞的最佳浓度和作用时间为 10 μmol/L 作用 6 h,但在羊水过少的人羊膜上皮细胞,其最佳浓度和作用时间为 5 μmol/L 作用 2 h。因而将 20 名羊水量正常和 20 例羊水过少的人足月羊膜上皮细胞各分为 4 个组分别予以 4 种不同的处理方法,即空白对照组、U0126 组、复方丹参注射液组和 U0126 加复方丹参注射液组。

6 免疫印迹(Western blot)技术检测羊膜上皮细胞中 p-ERK1/2 和 AQP3 的表达水平 弃去培养基后用冰预冷的 PBS 缓冲液冲洗细胞 2 次。每孔加入 RIPA 裂解液 70 μL,冰上裂解 30 min,14 000 r/min 离心 20 min,收集上清,−80 °C 储存备用,BCA 法测定细胞提取物的蛋白质浓度。

取 10 μg 蛋白质于 10% 十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶中电泳后,转至 PVDF 膜上,于 5% 脱脂奶粉中封闭 2 h,然后加兔抗人 p-ERK1/2 抗体、兔抗人 AQP3 抗体、鼠抗人 Tubulin 抗体等作用,4 °C 摇床过夜。TBS-T 洗 3 次,每次 10 min。加入相应的抗兔或抗鼠 IgG-HRP(1:2 000 稀释于 5% 脱脂奶粉)室温 1 h,TBS-T 洗 3 次,每次 10 min,增强化学发光试剂检测阳性信号,利用 AlphaEaseFC 软件进行灰度扫描,计算其与 Tubulin 吸光度比值来定量 AQP3 的表达水平。每例产妇均重复 3 次。

7 统计学方法 采用 SPSS 16.0 统计软件对

数据进行统计学分析,计量资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。各组资料均为正态分布资料,多组间比较采用方差分析。方差齐性的多组间两两比较采用 LSD 法;方差不齐的多组间两两比较采用 Dunnett's T3 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

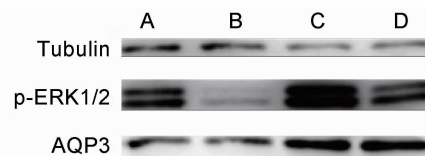
1 复方丹参注射液对羊水量正常人羊膜上皮细胞中 p-ERK1/2 及 AQP3 表达的影响比较(表 1,图 1) 与空白对照组比较,U0126 组及 U0126 加复方丹参注射液组人羊膜上皮细胞中 p-ERK1/2 表达明显下调($P < 0.05$),复方丹参注射液组羊膜上皮细胞中 p-ERK1/2 表达明显上调($P < 0.05$)。U0126 加复方丹参注射液组中 p-ERK1/2 表达较复方丹参注射液组下调,但仍高于 U0126 组($P < 0.05$)。

与空白对照组比较,U0126 组人羊膜上皮细胞中 AQP3 的表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。而复方丹参注射液组及 U0126 加复方丹参注射液组人羊膜上皮细胞中 AQP3 的表达较空白对照组明显上调($P < 0.05$),而两组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 复方丹参注射液对羊水量正常人羊膜上皮细胞中 p-ERK1/2 及 AQP3 表达的影响比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	p-ERK1/2	AQP3
空白对照	20	2.88 ± 0.14	2.40 ± 0.13
U0126	20	$1.56 \pm 0.07^{* \Delta}$	2.40 ± 0.06
复方丹参注射液	20	$3.56 \pm 0.18^{* \Delta}$	$3.53 \pm 0.10^{*}$
U0126 加复方丹参注射液	20	$2.29 \pm 0.10^{*}$	$3.54 \pm 0.11^{*}$

注:与空白对照组比较,* $P < 0.05$;与 U0126 加复方丹参注射液组比较, $\Delta P < 0.05$



注:A 为空白对照组;B 为 U0126 组;C 为复方丹参注射液组;D 为 U0126 加复方丹参注射液组;图 2 同

图 1 复方丹参注射液对羊水量正常人羊膜上皮细胞中 p-ERK1/2 及 AQP3 表达的影响比较

2 复方丹参注射液对羊水过少人羊膜上皮细胞中 p-ERK1/2 及 AQP3 表达的影响比较(表 2,图 2) 与空白对照组比较,U0126 组及 U0126 加复方丹参注射液组人羊膜上皮细胞中 p-ERK1/2 表达明显下调($P < 0.05$),复方丹参注射液组中 p-ERK1/2 表达明显上调($P < 0.05$)。U0126 加复方丹参注射液组中

p-ERK1/2 表达较复方丹参注射液组下调,但仍高于 U0126 组($P < 0.05$)。

与空白对照组比较, U0126 组人羊膜上皮细胞中 AQP3 表达明显下调($P < 0.05$), 复方丹参注射液组中 AQP3 表达明显上调($P < 0.05$)。U0126 加复方丹参注射液组中 AQP3 表达较复方丹参注射液组下调,但仍高于 U0126 组($P < 0.05$)。

表 2 复方丹参注射液对羊水过少羊膜上皮细胞中 p-ERK1/2 及 AQP3 表达的影响比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	p-ERK1/2	AQP3
空白对照	20	2.55 ± 0.10	1.72 ± 0.14
U0126	20	$1.78 \pm 0.06^{* \Delta}$	$1.15 \pm 0.08^{* \Delta}$
复方丹参注射液	20	$3.57 \pm 0.09^{* \Delta}$	$3.52 \pm 0.26^{* \Delta}$
U0126 加复方丹参注射液	20	$2.19 \pm 0.09^{*}$	1.61 ± 0.16

注:与空白对照组比较, $^{*}P < 0.05$; 与 U0126 加复方丹参注射液组比较, $^{\Delta}P < 0.05$

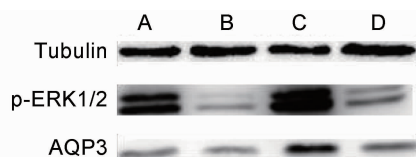


图 2 复方丹参注射液对羊水过少人羊膜上皮细胞中 p-ERK1/2 及 AQP3 表达的影响比较

讨 论

MAPK 存在于哺乳动物的大多数细胞的胞浆内,属于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,可被刺激活化成为生物学作用的磷酸化形式,调节相关基因的表达,进而参与细胞生长、发育、分裂及细胞间的功能同步等多种生理过程^[9]。迄今为止,在哺乳动物中已明确了 5 条 MAPK 途径,即 ERK1/2、c-Jun 氨基末端激酶(JNK)、p38、ERK3/4 和 ERK5 亚家族。U0126 可以特异性地抑制 ERK1/2 (即 p44/42) 的磷酸化,但对 p38 和 JNK 的磷酸化不起作用^[10]。研究表明,人角质形成细胞和胚胎细胞中 AQP3 表达的调控均与 MAPK-ERK1/2 信号转导通路密切相关^[11, 12]。但关于人羊膜细胞中 AQP3 的表达与 MAPK-ERK1/2 信号转导通路的相关性尚未见报道。

本研究发现无论是羊水量正常还是羊水过少时, U0126 均能够明显抑制人羊膜上皮细胞中 p-ERK1/2 表达。同时发现在羊水过少时,人羊膜上皮细胞 AQP3 的表达也明显受到抑制,但在羊水量正常时,人羊膜上皮细胞 AQP3 的表达不受 U0126 影响。提示羊水过少时,人羊膜上皮细胞中 AQP3 的表达受 MAPK-ERK1/2 信号转导通路调控。而羊水量正常

时,人羊膜上皮细胞中 AQP3 的表达不受 MAPK-ERK1/2 信号转导通路调控,有可能与其他 MAPK 信号转导通路如 MAPK/p38 和 MAPK/JNK 等的调控有关。

Chu HN 等^[2]的临床试验发现静脉滴注复方丹参注射液能够有效治疗羊水过少,推测可能与通过调节毛细血管压力,抑制血小板聚集,减少血液黏稠度,改善微循环,增加胎盘的血液灌注有关,但其具体作用机制未明。近年来的研究发现,复方丹参的抗炎、抗肿瘤和保护细胞等多种生物学作用与 MAPK-ERK1/2 信号转导通路密切相关^[13, 14]。

本研究结果发现,与空白对照组比较,复方丹参注射液能够明显上调羊水量正常和羊水过少人羊膜上皮细胞中 AQP3 的表达水平。同时,复方丹参注射液能够上调羊水量正常和羊水过少人羊膜上皮细胞中 p-ERK1/2 的表达水平。在羊水过少时, ERK1/2 抑制剂 U0126 能够下调人羊膜上皮细胞中 AQP3 的表达, U0126 加复方丹参注射液组中 AQP3 表达较 U0126 组上调,但较复方丹参注射液组下调,提示复方丹参注射液上调 AQP3 的表达水平与 MAPK-ERK1/2 信号转导通路相关。但在羊水量正常时, U0126 对人羊膜上皮细胞中的 AQP3 的表达没有影响,虽然复方丹参注射液组中 AQP3 的表达较空白对照组明显上调,而 U0126 加复方丹参注射液组中 AQP3 的表达与复方丹参注射液组比较未见明显变化,提示复方丹参注射液上调 AQP3 的表达水平与 MAPK-ERK1/2 信号转导通路无关。

本研究发现在羊水过少时,人羊膜上皮细胞中 AQP3 表达的调控与 MAPK-ERK1/2 信号转导通路相关。复方丹参注射液通过激活 MAPK-ERK1/2 信号转导通路来上调人羊膜上皮细胞中 AQP3 的表达,进而影响胎膜中液体的转运,达到治疗羊水过少的目的,为临床有效治疗羊水过少提供了理论依据。

参 考 文 献

- [1] Harman CR. Amniotic fluid abnormalities[J]. Semin Perinatol, 2008, 32(4): 288-294.
- [2] Chu HN, Shen MJ. Treating oligohydramnios with extract of *Salvia miltiorrhiza*: a randomized control trial[J]. Ther Clin Risk Manag, 2008, 4(1): 287-290.
- [3] Zhu XQ, Jiang SS, Zhu XJ, et al. Expression of Aquaporin 1 and Aquaporin 3 in fetal membranes and placenta in human term pregnancies with oligohydramnios[J]. Placenta, 2009, 30(8): 670-676.

- [4] Wang S, Amidi F, Beall M, et al. Aquaporin 3 expression in human fetal membranes and its up-regulation by cyclic adenosine monophosphate in amnion epithelial cell culture[J]. J Soc Gynecol Investig, 2006, 13(3): 181-185.
- [5] 刘慧妹,郝荣增,熊正方. 羊水过多孕妇胎膜组织中水通道蛋白-1、3、8、9 mRNA 的表达[J]. 中华围产医学杂志, 2009, 12(3): 197-200.
- [6] 张译文,马小燕,丁盛娣,等. 复方丹参注射液对人羊膜上皮细胞水通道蛋白 3 表达的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2013, 33(1): 51-55.
- [7] 乐杰主编. 妇产科学[M]. 第 7 版. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 128-129.
- [8] 马小燕,沈奇,王晶晶,等. 水通道蛋白 3 在人羊膜上皮细胞中的表达及调控[J]. 中华围产医学杂志, 2013, 16(5): 229-234.
- [9] Krishna M, Narang H. The complexity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) made simple[J]. Cell Mol Life Sci, 2008, 65(22): 3525-3544.
- [10] Lee SY, Lee YG, Byeon SE, et al. Mitogen activated protein kinases are prime signaling enzymes in nitric oxide production induced by soluble β -glucan from *Sparassis crispa* [J]. Arch Pharm Res, 2010, 33(11): 1753-1760.
- [11] Bell CE, Larivière NM, Watson PH, et al. Mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways mediate embryonic responses to culture medium osmolarity by regulating Aquaporin 3 and 9 expression and localization, as well as embryonic apoptosis[J]. Hum Reprod, 2009, 24(6): 1373-1386.
- [12] Cao C, Wan S, Jiang Q, et al. All-trans retinoic acid attenuates ultraviolet radiation-induced down-regulation of aquaporin-3 and water permeability in human keratinocytes[J]. Cell Physiol, 2008, 215(2): 506-516.
- [13] Xavier CP, Lima CF, Fernandes-Ferreira M, et al. *Salvia fruticosa*, *Salvia officinalis*, and rosmarinic acid induce apoptosis and inhibit proliferation of human colorectal cell lines: the role in MAPK/ERK pathway[J]. Nutr Cancer 2009, 61(4): 564-571.
- [14] Hung YC, Wang PW, Pan TL. Functional proteomics reveal the effect of *Salvia miltiorrhiza* aqueous extract against vascular atherosclerotic lesions[J]. Biochim Biophys Acta, 2010, 1804(6): 1310-1321.

(收稿:2012-08-24 修回:2013-02-24)

第十六届全国中西医结合大肠肛门病学术交流会征文通知

由中国中西医结合学会大肠肛门病专业委员会主办,中山大学附属第六医院(中山大学附属胃肠肛门病医院)、《中华胃肠外科杂志》承办的第十六届全国中西医结合大肠肛门病学术交流会于 2013 年 8 月在广东省广州市召开,现将会议有关事宜通知如下。

会议内容 (1)大会将邀请国内外肛肠界的同道(包括影像、消化内镜)及知名专家就结、直肠肛门外科领域的肛肠良性疾病,结、直肠肿瘤,顽固性便秘等有关的新理论、新技术、新方法、新材料、新器械等,紧扣临床实际问题做专题发言,供大家交流切磋学习;(2)中国中西医结合学会大肠肛门病专业委员会、青年委员会换届改选工作会议。

会议征文 欢迎参会人员针对上述内容踊跃投稿,全文一般不超过 4 000 字,中文、英文稿件均可,文内请注明通讯作者的姓名、工作单位、E-mail、联系电话及地址、邮政编码。投稿为电子邮件形式,稿件一般以全文形式发表,大会发言材料以 PPT 形式提交。

截稿时间 2013 年 7 月 20 日。联系人:李丽,电话:13632407564;万星阳,电话:15999951833;地址:广州市天河区员村二横路 26 号(邮编 510655)中山六院;E-mail:zxyjh2013@163.com。