

缺血再灌注损伤脑微血管内皮细胞 Necroptosis 模型的建立

胡艳红¹ 雷洪涛² 王淑艳¹ 于雪¹ 张赛¹ 苏靖¹ 马家宝¹
姜昭妍¹ 张凡¹ 万亮琴¹ 臧妍妍¹ 李芳赫¹ 李卫红¹

(1 北京中医药大学, 北京, 100029; 2 中国中医科学院医学实验中心, 北京, 100700)

摘要 目的: 采用拟缺血再灌注损伤结合 z-VAD-FMK (Benzoyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluoromethylketone, z-VAD-FMK) 干预, 探索一种脑微血管内皮细胞 (Brain Microvascular Endothelial Cells, BMECs) Necroptosis 模型。方法: 首先利用原代大鼠脑微血管内皮细胞, 采用氧糖剥夺及复氧复糖方法, 筛选出拟缺血再灌注损伤时间点。在拟缺血再灌注模型基础上, 予 Caspase 抑制剂 z-VAD-FMK 20 $\mu\text{mol/L}$ 干预, 采用 CCK-8 检测细胞活性; 透射电镜观察细胞超微结构; Annexin V-FITC/PI (Propidium Iodide) 双染色法检测细胞死亡方式。结果: 确定氧糖剥夺 2 h 复氧复糖 8 h, 作为拟缺血再灌注时间点; z-VAD-FMK 作用于拟缺血再灌注损伤 BMECs 后, 细胞活性无统计学意义; z-VAD-FMK 干预组在电镜下呈现明显的 Necroptosis 特征; 流式检测显示, 各象限细胞比率无明显变化, 但 Necroptosis 特异性抑制剂 Nec-1 可显著降低 Q2 象限细胞比率, 提示 z-VAD-FMK 干预抑制了细胞晚期凋亡, 诱导了 Necroptosis 的发生。结论: z-VAD-FMK 可诱导拟缺血再灌注脑微血管内皮细胞发生 Necroptosis, 为以后研究缺血性脑中风 necroptosis 机制提供了细胞实验模型。

关键词 脑微血管内皮细胞; Necroptosis; z-VAD-FMK; 缺血再灌注损伤

The Establishment of Necroptosis Model on Mimic Ischemic Reperfusion Injury in Brain Microvascular Endothelial Cells

Hu Yanhong¹, Lei Hongtao², Wang Shuyan¹, Yu Xue¹, Zhang Sai¹, Su Jing¹, Ma Jiabao¹, Kang Soyeon¹,
Zhang Fan¹, Wan Liangqin¹, Zang Yanyan¹, Li Fanghe¹, Li Weihong¹

(1 Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; 2 Medical Research Center of Chinese Academy
of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100700, China)

Abstract Objective: To explore a model of necroptosis in brain microvascular endothelial cells (BMECs) by mimic ischemia-reperfusion injury combined with z-VAD-FMK (Benzoyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluoromethylketone, z-VAD-FMK). **Methods:** First, primary rat BMECs were cultured in oxygen-glucose deprivation (OGD) and reintroduction conditions for various time points to screen a time of mimic ischemia-reperfusion injury. Then, z-VAD-FMK, the caspase inhibitor, was administrated at 20 $\mu\text{mol/L}$ concentration on the ischemia-reperfusion injured BMECs. The cell activity was detected by CCK-8. The ultra-structure was observed using the transmission electron microscope. The death mode of BMECs was detected using cell ultrastructure; Annexin V-FIT C/PI (propidium iodide) double staining to detect the type of cell death. **Results:** OGD 2 h and reintroduction 8 h was determined to be the time point of mimic ischemia-reperfusion injury. After z-VAD-FMK was administrated on ischemia-reperfusion injured BMECs, the cells viability didn't change significantly. The necroptosis characteristic was presented under transmission electron microscope. The flowcytometry results showed that ratio of cells in each quadrant had no significant change. However, Nec-1, a specific inhibitor of necroptosis, could significantly decrease the ratio of cells in quadrant Q2, suggesting that intervention of z-VAD-FMK inhibited the late apoptosis and induced necroptosis occurrence. **Conclusion:** The necroptosis may be induced by z-VAD-FMK in ischemia-reperfusion injured BMECs, which provides the cell experimental model for researching necroptosis mechanism in the ischemic stroke in the future.

Key Words Brain microvascular endothelial cells; Necroptosis; z-VAD-FMK; Ischemia-reperfusion injury

中图分类号: R965 文献标识码: A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2017.04.043

脑中风是严重影响人类身体健康, 甚至威胁生命的疾病。在我国, 位列疾病死因第一位, 每年发生脑中风的患者达 200 万, 其中缺血性脑中风所占的比率为 70% ~ 80%^[1]。缺血再灌注损伤 (Ischemia-

基金项目: 国家自然科学基金项目 (编号: 81273885); 北京市自然科学基金项目 (编号: 7144223)

作者简介: 胡艳红 (1988.12—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 中药复方治疗脑病的配伍机制研究

通信作者: 李卫红 (1973.05—), 女, 医学博士, 副教授, 研究生导师, 从事中医药治疗脑病的基础研究, E-mail: liweihong.403@163.com

reperfusion Injury, IRI) 是该病的重要病理生理过程, 缺血再灌注损伤形式有多种, 其中细胞死亡是主要损伤形式之一。除传统的凋亡和坏死外, 近些年又发现一种新的细胞死亡形式—Necroptosis。已有证据表明, 缺血缺氧模型的心肌细胞、神经细胞以及肿瘤存在 Necroptosis^[24]。脑微血管内皮细胞 (Brain Microvascular Endothelial Cells, BMECs) 作为血脑屏障的主要构成细胞, 其功能受损和死亡参与了脑缺血的病理演变过程, 但目前关于缺血诱导的脑微血管内皮细胞 Necroptosis 的研究甚少。本实验利用原代培养的大鼠脑微血管内皮细胞, 在氧糖剥夺诱导缺血再灌注损伤的基础上, 选用目前应用最为广泛的 caspase 广谱性蛋白抑制剂 z-VAD-FMK (Benzylloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluoromethylketone) 进行处理, 以建立一种脑微血管内皮细胞 Necroptosis 体外模型, 为今后深入研究脑缺血后脑微血管内皮细胞 Necroptosis 的发生机制及血管保护药物的疗效靶点奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 采用本课题组已建立的大鼠脑微血管内皮细胞培养技术^[5], 对 20 g 左右雄性 SD 大鼠进行细胞取材、培养和传代。实验中使用的第 3 代内皮细胞, 其纯度达到 98% 以上^[6]。

1.1.2 试剂与仪器 z-VAD-FMK (美国 Enzo Life Sciences 公司), Nec-1 (美国 Enzo Life Sciences 公司), DMSO (美国 Sigma 公司), 胎牛血清 (excell bio 南美血缘胎牛血清), D-MEM/F-12 培养基干粉 (美国 Gibco 公司), 内皮细胞生长添加剂 (ECGS, 中科迈晨 (北京) 科技有限公司), 明胶 (美国 Sigma 公司), 胰蛋白酶 (美国 Sigma 公司), 胶原酶 II 型 (美国 Sigma 公司), CCK-8 试剂盒 (日本同仁化学研究所), Annexin V-FITC and PI 双染试剂盒 (美国 BD 公司), 倒置相差显微镜 (日本 OLYMPUS 公司), X-Mark 型酶标仪 (美国 BIO-RAD 公司), 流式细胞仪 (美国 BD 公司), 透射电子显微镜 (日本 H7650 公司)。

1.2 方法

1.2.1 分组与模型制备 将传至第 3 代的脑微血管内皮细胞随机分成 3 组: 正常组、IRI 组和 IRI + z-VAD-FMK 组。筛选和制备拟缺血再灌注模型: 在本室已建立的拟缺血损伤模型的基础上, 重新筛选氧糖剥夺时间和复糖复氧时间, 以制备稳定的拟缺血再灌注模型。第 3 代 BMECs 铺满瓶底约 80% ~

90% 时, 吸出培养瓶内原培养液, 用 D-Hank's 洗涤两遍, 换成无糖 Kreb's 液, 放置 37 °C 含 1% O₂、95% N₂ 和 5% CO₂ 的培养箱中培养 2 h 或 3 h, 然后取出培养瓶弃掉上清, 换成 D-MEM/F-12 基础培养基, 放进 37 °C、21.7% O₂ 和 5% CO₂ 正常培养箱分别孵育 0、4、8、12 h, 每个时间点均设立正常对照组。造模结束后用 CCK-8 试剂盒检测细胞活性, 筛选合适的氧糖剥夺时间和复糖复氧时间, 建立拟缺血再灌注损伤模型。

1.2.2 干预方法 除正常组外, 其余 2 组按上述筛选出的拟缺血再灌注模型进行造模。IRI + z-VAD-FMK 组, 造模前 30 min 及造模过程中按 20 μmol/L 浓度加入 z-VAD-FMK。造模及处理结束后, 进行下列指标检测。

1.2.3 检测指标与方法 CCK-8 检测各组细胞活性: 造模完成后弃上清, 加入 D-MEM/F-12 培养基, 每孔再加入 10 μL CCK-8 溶液, 在培养箱中继续孵育 2 h 后, 用酶标仪测定各组的吸光光度值, 检测波长为 450 nm, 每组设 6 个复孔。透射电镜观察细胞超微结构: 造模结束后, 消化并收集细胞, 用 D-Hank's 洗涤细胞 2 次, 将细胞悬液置于 1.5 mL EP 管中, 200 g 水平离心 10 min。用预冷 2.5% 戊二醛 (pH 7.3) 1 mL/管进行固定, PBS 漂洗, 之后用 1% 锇酸固定。以不同浓度的丙酮顺次脱水, 环氧树脂包埋, 光镜下进行修块, 超薄切片机切成 60 nm 的薄片, 用醋酸双氧钨和柠檬酸铅染色, 放于电子显微镜下观察并拍片。Annexin V-FITC/PI 双染色法检测细胞死亡方式: 因细胞发生 Necroptosis 与晚期凋亡染色特征相似, 因此本实验在上述 3 组的基础上, 增加 IRI + z-VAD-FMK + Nec-1 (Necrostatin-1, Necroptosis 特异性阻滞剂) 组, 即在造模前 30 min 及造模过程中加入 20 μmol/L z-VAD-FMK 和 10 μmol/L Necrostatin-1。造模结束后, 用不含 EDTA 的胰酶消化细胞, 200 g 离心 5 min, 弃上清; 用预冷的 D-Hank's 洗涤细胞两次, 400 g 离心 5 min; 每管加 500 μL 1 × Binding Buffer、5 μL Annexin V-FITC 吹打混匀, 室温避光放置 15 min 后, 在检测前 5 min 加入 10 μL PI 后, 上流式细胞仪进行检测。

1.3 统计学方法 应用统计学软件 SPSS 20.0 进行数据分析, 实验结果用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 本实验数据处理应用 *t* 检验和单因素方差进行分析, 以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 确定拟缺血及再灌注时间 图 1 为氧糖剥夺 2

h,复氧复糖不同时间点的结果。造模前,正常组和模型组无统计学意义。与正常组比较,氧糖剥夺 2 h 时,细胞活性开始下降,但组间无统计学意义;复氧复糖 4 h 时,细胞活性显著下降($P < 0.01$),复氧复糖 8 h 时,细胞活性持续下降($P < 0.01$),复氧复糖 12 h 时,细胞活性降低,但与复氧复糖 8 h 组比较,变化不大。

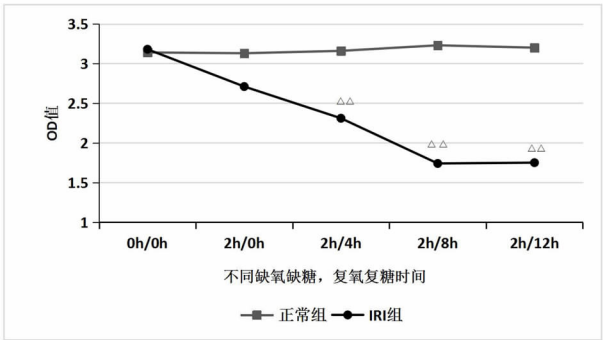


图1 缺氧缺糖 2 h,复氧复糖不同时间点 BMECs 活性的变化

注:与正常组比:△△ $P < 0.01$ 。

图 2 为氧糖剥夺 3 h,复氧复糖不同时间点的结果。造模前,正常组和模型组无统计学意义。与正常组比较,氧糖剥夺 3 h 时,细胞活性明显下降($P < 0.05$);复氧复糖 4 h 时,细胞活性显著下降($P < 0.01$),复氧复糖 8 h 和 12 h 时,细胞活性变化不大。

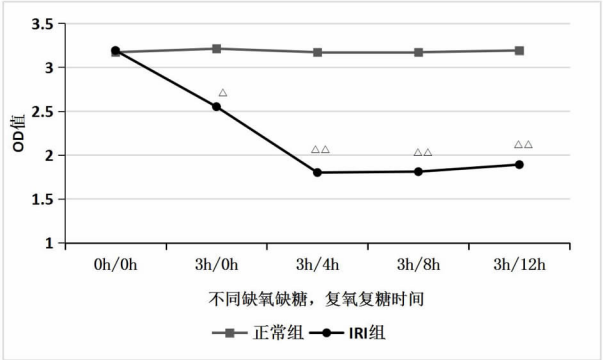


图2 缺氧缺糖 3 h,复氧复糖不同时间点 BMECs 活性的变化

注:与正常组比:△ $P < 0.05$,△△ $P < 0.01$ 。

从图 1 和图 2 综合来看,BMECs 氧糖剥夺 2 h 后,细胞活性稍有下降,但无统计学意义,复氧复糖 4~8 h 是细胞明显损伤期。而氧糖剥夺 3 h 及复氧复糖各时间点细胞活性均显著下降,复氧复糖 0~4 h 是细胞明显损伤期,该损伤更接近于急性缺血性损伤。我们认为,氧糖剥夺 2 h 复氧复糖 8 h,细胞损伤主要发生在再灌注过程中,更符合缺血再灌注损伤的特征,因此确定了氧糖剥夺 2 h 复氧复糖 8 h

来制备拟缺血再灌注损伤模型,以下实验均采用此条件造模。

2.2 CCK-8 检测各组的细胞活性 如表 1 结果所示,IRI 组 OD 值较正常组显著降低($P < 0.01$),提示 IRI 组细胞活性显著下降;与 IRI 组比较,IRI + z-VAD-FMK 组 OD 值变化不明显。这一结果显示加入 z-VAD-FMK 后,细胞活性没有明显升高,与本实验验证 z-VAD-FMK 可能会诱导另一种细胞死亡形式相一致。

表 1 各组 BMECs 活性的变化

组别	OD 值
正常组	3.16 ± 0.25
IRI 组	1.68 ± 0.47 ^{△△}
IRI + z-VAD-FMK 组	1.68 ± 0.27

注:与正常组比:△△ $P < 0.01$ 。

2.3 透射电镜观察各组细胞形态学改变 如图 3 所示,在透射电镜下,正常的脑微血管内皮细胞的细胞膜完整,细胞核呈椭圆形,染色质均匀,细胞器状态良好(图 3a)。IRI 组大多细胞核固缩或破裂,染色质凝聚,但细胞膜基本完整(图 3b、3c)。IRI + z-VAD-FMK 组(图 3d、e、f):细胞膜完整性被破坏和 内容物从胞内释放,细胞器肿胀,线粒体内脊消失呈空泡化,细胞核基本完整,这些变化与 Necroptosis 的形态特征相符合,提示 z-VAD-FMK 可诱导拟缺血再灌注损伤 BMECs 发生 Necroptosis。

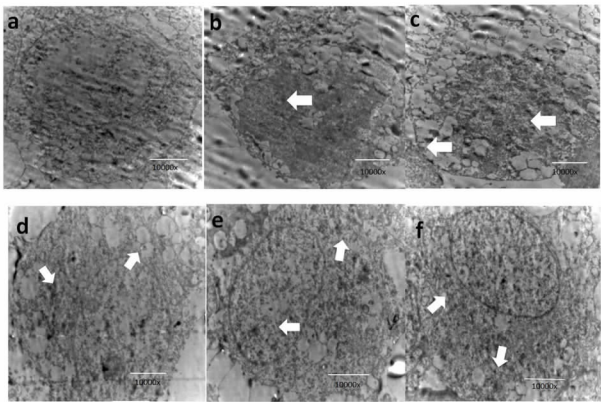


图3 透射电镜观察各组细胞超微结构

注:a:正常组;b、c:IRI 组;d、e、f:IRI + z-VAD-FMK 组。

2.4 Annexin V-FITC/PI 双染色法检测细胞死亡方式 如图 4 结果所示:与正常组相比,IRI 组 Q1、Q2、Q4 象限细胞比率均显著升高(Q2、Q4 象限 $P < 0.01$),Q3 象限细胞比率显著降低($P < 0.01$),提示拟缺血再灌注损伤造成 BMECs 早期凋亡、晚期凋亡以及坏死率均显著增加;与 IRI 组相比,IRI + z-VAD-FMK 组 Q1、Q2、Q3 和 Q4 象限细胞比率变化不明

显,无统计学意义。为了证明 Q2 象限细胞为 Necroptosis,我们另设了 IRI + z-VAD-FMK + Nec-1 组,即在上述处理的基础上,利用 Necroptosis 抑制剂 Nec-1 进行干预,结果显示,与 IRI + z-VAD-FMK 组相比,IRI + z-VAD-FMK + Nec-1 组 Q2 象限细胞比率显著降低($P < 0.05$),Q3 象限比率显著升高($P < 0.01$),具有统计学意义,说明 Nec-1 可显著降低 Q2 象限细胞比率,提示 OGD + z-VAD-FMK 组 Q2 象限细胞死亡形式可能是 Necroptosis。

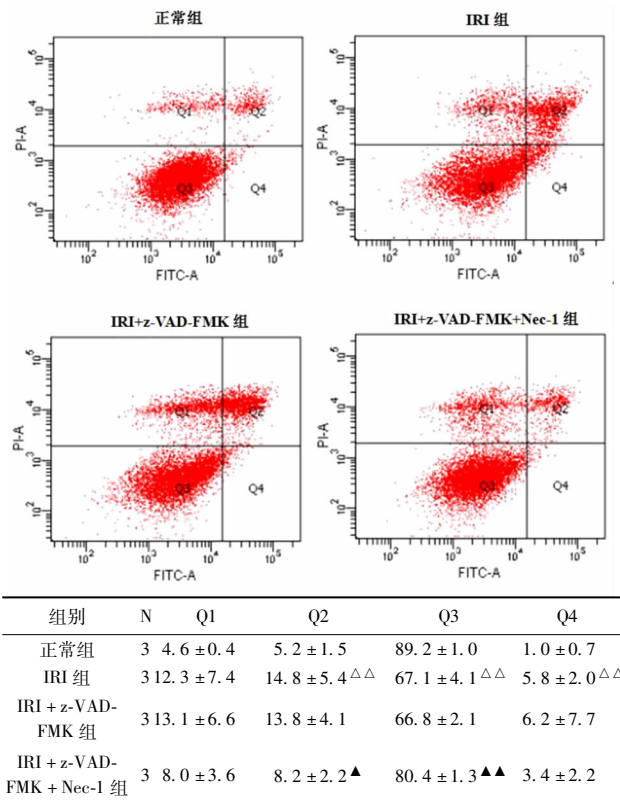


图4 Annexin V-FITC/PI 双染色法检测细胞死亡方式
注:与正常组比:△△ $P < 0.01$;与 IRI + z-VAD-FMK 组比:▲ $P < 0.05$,▲▲ $P < 0.01$ 。Q1:坏死细胞象限;Q2:晚期凋亡细胞象限;Q3:正常细胞象限;Q4:早期凋亡细胞象限。

3 讨论

脑缺血后公认的细胞死亡类型包括缺血核心区即刻发生的细胞坏死,以及随后再灌注过程中的细胞凋亡。因此以往关于缺血再灌注损伤的研究多集中在细胞凋亡。2005 年由哈佛大学课题组发现一种新型的细胞死亡形式,命名为 Necroptosis,在国内被翻译为程序性坏死或坏死性凋亡,但以前者更被认可^[7]。研究表明,Necroptosis 是由死亡受体介导的,被一系列信号传导通路所调控的 caspase 非依赖性细胞死亡方式,同时具有坏死和凋亡的特征。在形态学方面,Necroptosis 具有明显的坏死特征,主要

表现为细胞器肿胀、细胞膜完整性破坏,细胞核完整等^[8]。此外,在 Necroptosis 过程中,会释放大量的损伤相关分子,引发严重的局部炎症反应,导致大量炎症反应细胞浸润和激活^[9];而在其发生机制方面类似于凋亡,由特定因子启动,依赖于死亡受体并按照一定信号通路和程序发生,可以对其过程进行调控,但其过程不依赖于 caspase 系统。随着研究的深入,发现 Necroptosis 与脑缺血再灌注损伤关系十分密切,在缺血性脑中风发病机制中占有重要地位,现已成为研究的热点^[10],这也为研制开发神经保护药物提供了新的靶点。

为了深入研究抑制 Necroptosis 对缺血性脑损伤的意义,人们探索了一些体外诱导细胞发生 Necroptosis 的方法,其中最常用的是在诱导凋亡的基础上加用 z-VAD-FMK 进行干预^[11]。其原理为细胞的死亡受体激活后,如果凋亡通路活化则诱导凋亡,凋亡过程是依赖 caspase 的,在 caspase 活性被抑制时会启动 Necroptosis。z-VAD-FMK 是一种人工合成的广谱 caspase 抑制剂,能够抑制细胞凋亡发生过程中多种 caspase 酶的活性,因此可以诱导 Necroptosis 的发生。

本实验采用拟缺血再灌注损伤结合 z-VAD-FMK,探索了脑微血管内皮细胞 Necroptosis 模型。首先用 cck-8 筛选了缺血再灌注时间,由于实验室前期发现氧糖剥夺 6 h 时,脑微血管内皮细胞已经发生急性缺血性损伤,因此本次实验从氧糖剥夺 5 h 以内摸索缺氧缺糖时间,再摸索再灌时间。结果缺氧 4 h 和 5 h 时,细胞损伤已很严重(数据未显示),最后弃掉,只做了缺氧缺糖 2 h 和 3 h 不同再灌时间点的模型。实验结果显示缺氧缺糖 2 h 再灌注 8 h 时,细胞损伤明显,且损伤主要发生在再灌后 4 ~ 8 h,比较符合缺血再灌注损伤特点,因此确定该时间点作为模拟缺血再灌注损伤的时间点,建立了稳定的 IRI 模型。

然后,在 IRI 的基础上利用 z-VAD-FMK 进行诱导,cck-8 结果显示 IRI 组 OD 值降低,IRI + z-VAD-FMK 组与 IRI 组相比无统计学意义,可能的原因为 z-VAD-FMK 在抑制凋亡的同时诱导了另一种细胞死亡形式 Necroptosis 的发生,因此该组细胞活性总体没有明显升高。为了进一步揭示 z-VAD-FMK 诱导的细胞死亡形式,本实验又用 Annexin V-FITC/PI 双染色法通过流式细胞仪来检测,结果显示 z-VAD-FMK 干预后各象限细胞比率变化不大。这一结果可能与 Annexin V-FITC/PI 双染色法的原理和 Nec-

roptosis 的细胞形态变化特征有关。在细胞发生凋亡的早期,Annexin V-FITC 可与外翻到细胞表面的磷脂酰丝氨酸结合,因此 Annexin V-FITC 阳性被作为检测细胞早期凋亡的灵敏指标之一。PI 是一种核酸染料,它不能透过正常细胞或早期凋亡细胞的完整的细胞膜,但可以透过凋亡晚期和坏死细胞的细胞膜而使细胞核染红。z-VAD-FMK 主要通过阻断 caspase 来抑制凋亡,对早期凋亡影响不大;Q2 象限为 Annexin V 和 PI 染色均为阳性的细胞,一般代表晚期凋亡细胞,z-VAD-FMK 阻断 caspase 后,通过磷酸化 RIP3 诱导 Necroptosis 的发生,Necroptosis 细胞 Annexin V 和 PI 染色也表现为双阳性,因此,z-VAD-FMK 抑制了晚期凋亡,但增加了 Necroptosis 的发生,使得 Q2 象限细胞比率变化不明显。为了证明 Q2 象限细胞的死亡方式为 Necroptosis,我们另设了 IRI + z-VAD-FMK + Nec-1 组,即在上述处理的基础上,增加了 Necroptosis 特异性抑制剂 Nec-1 干预,结果显示 Nec-1 可有效降低 Q2 象限细胞比率,证明了 Q2 象限的细胞发生 Necroptosis。该结果在投射电镜中再次被证实,IRI + z-VAD-FMK 组细胞膜破坏明显,线粒体肿胀,内脊消失呈空泡化,细胞核基本完整,这些变化符合 Necroptosis 的形态特征。总之,综合以上实验结果证实了:z-VAD-FMK 可诱导拟缺血再灌注脑微血管内皮细胞发生 Necroptosis,为以后研究缺血性脑中风发生 Necroptosis 提供了细胞实验模型。

参考文献

- [1]贾建平,陈生弟.神经病学[M].北京:人民卫生出版社,2013:170.

- [2]Liu X,Zhang C,Zhang C,et al. Heat shock protein 70 inhibits cardiomyocyte necroptosis through repressing autophagy in myocardial ischemia/reperfusion injury[J]. In Vitro Cell Dev Biol Anim,2016,52(6):690-698.
- [3]Zhao Y,Huang G,Chen S,et al. Homocysteine Aggravates Cortical Neural Cell Injury through Neuronal Autophagy Overactivation following Rat Cerebral Ischemia-Reperfusion[J]. Int J Mol Sci,2016,17(8):523.
- [4]Hu X,Han W,Li L. Targeting the Weak Point of Cancer by Induction of Necroptosis[J]. Autophagy,2014,3(5):490-492.
- [5]李卫红,李澎涛,华茜,等.不同内皮细胞条件培养液对皮层神经元线粒体功能的影响及通络救脑注射液的保护作用[J].中国中西医结合杂志,2007,27(2):131-134.
- [6]青雪梅,李澎涛,胡京红,等.不同脑微血管内皮细胞条件培养液抗缺血及再灌神经元损伤的比较[J].中西医结合学报,2007,5(2):183-188.
- [7]Degterev A,Huang Z,Boyce M,et al. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury[J]. Nat Chem Biol,2005,1(2):112-119.
- [8]Vanden Berghe T,Kaiser WJ,Bertrand MJ,et al. Molecular crosstalk between apoptosis, necroptosis, and survival signaling[J]. Mol Cell Oncol,2015,2(4):e975093.
- [9]Gautheron J,Vucur M,Schneider AT,et al. The necroptosis-inducing kinase RIPK3 dampens adipose tissue inflammation and glucose intolerance[J]. Nat Commun,2016,7:11869.
- [10]Dong Y,Bao C,Yu J,et al. Receptor-interacting protein kinase 3-mediated programmed cell necrosis in rats subjected to focal cerebral ischemia-reperfusion injury[J]. Mol Med Rep,2016,14(1):728-736.
- [11]张翠翠. HIF-1 α 在缺糖缺氧诱导的原代皮质神经元 Necroptosis 中的表达及其意义[D]. 徐州:徐州医学院,2011.

(2016-08-16 收稿 责任编辑:徐颖)

世界中医药大会第三届夏季峰会暨大健康产业博览会

由世界中医药学会联合会主办的“世界中医药大会”是全球中医药领域规模大、参与广、层次高的学术盛会,至今已经成功举办十三届。为进一步扩大世界中医药大会的学术影响力,世界中联特决定在境内召开世界中医药大会夏季峰会,至今已经成功主办两届。世界中医药大会第三届夏季峰会,将于2017年6月10—12日在安徽合肥召开,本次大会主题为“聚焦中医药大健康,助力‘一带一路’发展”,现诚挚邀请来自世界各国(地区)的中医药相关专家、学者与会,交流中医药理论研究、临床经验、科研成果以及新技术、新疗法,聚焦大健康产业发展。大会将制作《世界中医药大会第三届

夏季峰会特刊》,收录具备一定资质的机构和个人的相关宣传资料,将赠与参会人员及我会67个国家的251个会员团体、各国驻华使馆、我国驻外使馆及有关国际组织和相关机构收藏。大会将制作大会论文集,论文截稿日期2017年5月20日,欢迎大家积极投稿。

报名联系人:邹建华、关涛、焦云洞、刘香玉、刘晓婷、陈安
电话:010-58650042/0043,010-58650242,传真:010-58650043

报名网站:<http://wccmss2017.medmeeting.org/cn>

联系邮箱:wfcmsxshb@vip.163.com