

慢性阻塞性肺疾病急性加重痰热证与痰湿证动物模型炎症因子表达的比较研究

梅雪 李建生 周红艳 乔翠霞 李素云 张艳霞

【摘要】 目的 从炎症因子表达方面揭示慢性阻塞性肺疾病急性加重(AECOPD)痰热证与痰湿证动物模型的特点。方法 按随机数字表法将 48 只 Wistar 大鼠分为正常对照组、AECOPD 组、AECOPD 痰热证组和 AECOPD 痰湿证组,每组 12 只。采用免疫组化法测定肺组织白细胞介素(IL-1 β 、IL-6、IL-10)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的蛋白表达,采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)测定肺组织 IL-1 β 、IL-10 的 mRNA 表达。结果 AECOPD 组、AECOPD 痰热证组和 AECOPD 痰湿证组炎症因子 mRNA 及蛋白表达均显著高于正常对照组。与 AECOPD 组比较,AECOPD 痰热证组、AECOPD 痰湿证组肺组织 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 蛋白和 IL-1 β mRNA 表达显著升高(IL-1 β 蛋白:6.26 \pm 2.43、8.20 \pm 2.61 比 4.30 \pm 2.38,TNF- α 蛋白:10.28 \pm 2.64、10.67 \pm 2.68 比 7.47 \pm 2.90,IL-6 蛋白:8.13 \pm 3.03、10.45 \pm 3.37 比 5.66 \pm 3.18, IL-1 β mRNA:0.41 \pm 0.03、0.48 \pm 0.05 比 0.35 \pm 0.04, 均 $P<0.01$),IL-10 的蛋白和 mRNA 表达显著降低(IL-10 蛋白:7.00 \pm 1.89、4.70 \pm 2.31 比 9.33 \pm 2.58,IL-10 mRNA:0.43 \pm 0.05、0.35 \pm 0.03 比 0.52 \pm 0.06, $P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与 AECOPD 痰热证组比较,AECOPD 痰湿证组的 IL-1 β 蛋白和 mRNA、IL-6 蛋白表达明显增加,IL-10 蛋白和 mRNA 表达明显减弱(均 $P<0.05$)。结论 AECOPD 痰湿证较 AECOPD 痰热证 IL-1 β 、IL-6 表达增强,IL-10 表达减弱,这可能是痰湿证肺组织损伤严重且临床恢复缓慢的主要原因,有待于进一步研究。

【关键词】 肺疾病,阻塞性,慢性; 急性加重期; 痰湿证; 痰热证; 炎症因子

A comparative study of inflammatory factor expression of phlegm-heat syndrome and phlegm-dampness syndrome model with acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease MEI Xue*, LI Jian-sheng, ZHOU Hong-yan, QIAO Cui-xia, LI Su-yun, ZHANG Yan-xia. * Institute of Geriatrics, Henan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, Henan, China
Corresponding author: LI Jian-sheng, Email: li_js8@163.com

【Abstract】 Objective To reveal characteristic of phlegm-heat syndrome and phlegm-dampness syndrome of acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease (AECOPD) from expression of inflammatory factor. **Methods** Forty-eight Wistar rats were randomly divided into four groups (each $n=12$): normal control group, AECOPD group, phlegm-heat syndrome of AECOPD group (PHs group) and phlegm-dampness syndrome of AECOPD group (PDs group). The expressions of interleukins (IL-1 β , IL-6, IL-10), tumor necrosis factor- α (TNF- α) proteins in lung tissue were detected by immunohistochemical staining method. IL-1 β mRNA and IL-10 mRNA expressions were measured by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** The mRNA and protein expressions of inflammatory factors in lung tissue in AECOPD group, PHs group and PDs group were remarkably enhanced compared with those in normal control group. Compared with AECOPD group, the protein expressions of IL-1 β , TNF- α and IL-6 and the mRNA expression of IL-1 β in lung tissue in PHs group and PDs group were markedly enhanced (IL-1 β protein: 6.26 \pm 2.43, 8.20 \pm 2.61 vs. 4.30 \pm 2.38, TNF- α protein: 10.28 \pm 2.64, 10.67 \pm 2.68 vs. 7.47 \pm 2.90, IL-6 protein: 8.13 \pm 3.03, 10.45 \pm 3.37 vs. 5.66 \pm 3.18, IL-1 β mRNA: 0.41 \pm 0.03, 0.48 \pm 0.05 vs. 0.35 \pm 0.04, all $P<0.01$), and the expressions of IL-10 protein and IL-10 mRNA were obviously weakened (IL-10 protein: 7.00 \pm 1.89, 4.70 \pm 2.31 vs. 9.33 \pm 2.58, IL-10 mRNA: 0.43 \pm 0.05, 0.35 \pm 0.03 vs. 0.52 \pm 0.06, $P<0.05$ or $P<0.01$). The protein expressions of IL-1 β and IL-6 proteins and the mRNA expression of IL-1 β in PDs group were significantly higher than those in PHs group, while the expressions of IL-10 protein and IL-10 mRNA were evidently lowered (all $P<0.05$). **Conclusions** There were more strong expressions of IL-1 β and IL-6 and more weakened expressions of IL-10 in phlegm-dampness syndrome than in phlegm-heat syndrome, which may be one of the main reason of serious damage in lung tissue and delayed recovery of the patient with phlegm-dampness syndrome of AECOPD. All the above findings need further investigation.

【Key words】 Chronic obstructive pulmonary disease; Acute exacerbation; Phlegm-dampness syndrome; Phlegm-heat syndrome; Inflammatory factor

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2013.06.007

基金项目:国家自然科学基金项目(81202658,30772797)

作者单位:450008 郑州,河南中医学院老年医学研究所(梅雪、李建生、李素云、张艳霞);450004 郑州,河南省中医药研究院(周红艳、乔翠霞) 通信作者:李建生,Email:li_js8@163.com

痰热壅肺证和痰湿阻肺证是慢性阻塞性肺疾病急性加重期(AECOPD)最为多见的两种证型^[1]。本课题组前期成功建立了 AECOPD 痰热证和痰湿证大鼠模型,并从炎症反应、激素水平等方面评价了这两种模型的异同点^[2-3]。在此基础上,本研究从促炎因子和抗炎因子表达方面寻找两种模型的异同和特点,为揭示中医证候的科学内涵和制定治疗策略提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及主要试剂:Wistar 大鼠 48 只,雌雄各半,体质量(200 ± 20) g,由河南省实验动物中心提供,动物合格证号:SCXK(豫)2005-0001。肺炎克雷伯杆菌(菌号 46114,中国生物制品检验鉴定所提供)使用时调整为 6×10^8 CFU/ml、 6×10^{14} CFU/ml。白细胞介素(IL-1 β 、IL-6、IL-10)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)单克隆抗体(单抗)试剂盒为武汉博士德生物工程有限公司产品。逆转录(RT)试剂盒购自立陶宛 Fermentas 公司。IL-1 β 、IL-10 和内参照 β -肌动蛋白(β -actin)的引物序列及扩增片段长度见表 1,引物由上海生物工程技术服务有限公司合成。

表 1 炎症因子引物序列及扩增片段

基因名称	引物序列	扩增片段(bp)
IL-1 β	上游 5'-GCAACTGTCCTGAACTCAAC T-3'	249
	下游 5'-AAGCTCCACGGGCAAGACAT-3'	
IL-10	上游 5'-CACTGCTATGTTGCTGCTCTT -3'	411
	下游 5'-CTGCTCCACTGCCTTGCTTTTAT -3'	
β -actin	上游 5'-GAGAGGGAAATCGTGCGTGAC-3'	454
	下游 5'-CATCTGCTGGAAGCTGGACA-3'	

注:IL-1 β :白细胞介素-1 β ,IL-10:白细胞介素-10, β -actin: β -肌动蛋白

1.2 动物分组及不同证型 AECOPD 模型制备:按照随机数字表法将大鼠分为正常对照组、AECOPD 组、AECOPD 痰热证组和 AECOPD 痰湿证组 4 组,每组 12 只。吸取肺炎克雷伯杆菌菌液(6×10^8 CFU/ml) 0.1 ml 滴入大鼠鼻腔,每 5 d 1 次,连续 12 周,并将大鼠置于烟熏箱内(烟雾浓度约为 5%),每日 2 次(间隔 3 h),每次 30 min,连续 12 周,制备慢性阻塞性肺疾病(COPD)稳定期大鼠模型^[4]。于第 13 周开始将大鼠置于鼓风干燥箱[温度(39 ± 1) °C、湿度 50%、风速 1.0 m/s]中,每日 2 次,每次 30 min,连续 9 d,于第 13 周第 6 日经鼻滴菌液(6×10^{14} CFU/ml) 0.3 ml,每日 2 次,连续 4 d,制备 AECOPD 痰热证模型^[2]。第 13 周开始将大鼠置于寒冷环境(温度为 -8 °C,湿度为 75%,风速为 0.6 m/s)中,每日 2 次,

每次 1 h,连续 9 d,于第 13 周第 6 日经鼻滴菌液(6×10^{14} CFU/ml) 0.3 ml,每日 2 次,连续 4 d,制备 AECOPD 痰湿证模型^[3]。于第 14 周第 3 日取材进行指标检测。

本实验动物处置方法符合动物伦理学标准。

1.3 检测指标与方法

1.3.1 肺组织病理观察:苏木素-伊红(HE)染色,光镜下观察。

1.3.2 炎症因子蛋白表达测定:采用免疫组化过氧化物酶标记的链霉卵白素法(SP 法)检测肺组织 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、IL-10 蛋白表达,光镜下观察细胞膜和细胞质染成棕色为阳性。每张切片随机选取 5 个视野,使用 Image pro plus 5.1 图像采集与分析软件拍照并测其积分吸光度(A)值。

1.3.3 炎症因子基因表达测定:采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)测定肺组织 IL-1 β 、IL-10 mRNA 表达。PCR 扩增产物经 2% 琼脂糖电泳后,用 Bio2VT 凝胶成像系统成像。Quantity one 软件对图像进行半定量分析,以待测基因与 β -actin 的电泳带灰度值比值反映该基因的相对表达量。

1.4 统计学方法:采用 SPSS 13.0 统计分析软件进行分析,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各组间比较方差齐时采用单因素方差分析,方差不齐时采用非参数检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺组织病理改变:正常对照组大鼠肺组织结构正常。AECOPD 组可见气管周围大量中性粒细胞弥漫浸润,气管、支气管黏膜纤毛上皮倒伏、脱落,局部变性坏死,黏膜内腺体肥大、增生,肺泡管、肺泡囊扩张,间隔变窄,肺泡间孔扩大,部分肺泡壁间隔断裂,肺泡融合,间质毛细血管扩张、充血。AECOPD 痰热证组气管壁内以中性粒细胞为主的炎性细胞弥漫浸润,气管、支气管黏膜上皮层次变薄,杯状细胞增多,肺泡管、肺泡囊明显扩大,扩张的肺泡融合形成囊腔,可见肺大泡,肺泡毛细血管床减少。AECOPD 痰湿证组气管黏膜层、黏膜下层中性粒细胞、淋巴细胞、浆细胞等弥漫浸润,管腔内充满中性粒细胞、巨噬细胞及黏液,气管、支气管黏膜上皮脱落,多见肺大泡,部分血管内膜呈纤维索性增厚。

2.2 肺组织 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、IL-10 的蛋白表达(表 2):与正常对照组比较,AECOPD 组、AECOPD 痰热证和痰湿证组肺组织 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、IL-10 蛋白表达均显著增强($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与 AECOPD 组比较,AECOPD 痰热证和痰湿证组

表 2 不同证型 AECOPD 大鼠肺组织炎症因子蛋白及基因表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	蛋白表达(A 值)				mRNA 表达	
		IL-1 β	TNF- α	IL-6	IL-10	IL-1 β	IL-10
正常对照组	12	0.53 \pm 0.45	2.22 \pm 1.40	1.70 \pm 0.54	1.80 \pm 1.96	0.24 \pm 0.01	0.20 \pm 0.02
AECOPD 组	12	4.30 \pm 2.38 ^a	7.47 \pm 2.90 ^a	5.66 \pm 3.18 ^a	9.33 \pm 2.58 ^a	0.35 \pm 0.04 ^a	0.52 \pm 0.06 ^a
AECOPD 痰热证组	12	6.26 \pm 2.43 ^{ac}	10.28 \pm 2.64 ^{ac}	8.13 \pm 3.03 ^{ac}	7.00 \pm 1.89 ^{ac}	0.41 \pm 0.03 ^{ac}	0.43 \pm 0.05 ^{ac}
AECOPD 痰湿证组	12	8.20 \pm 2.61 ^{ade}	10.67 \pm 2.68 ^{ac}	10.45 \pm 3.37 ^{ade}	4.70 \pm 2.31 ^{bde}	0.48 \pm 0.05 ^{ade}	0.35 \pm 0.03 ^{ade}

注:AECOPD:慢性阻塞性肺疾病急性加重期,IL-1 β :白细胞介素-1 β ,IL-6:白细胞介素-6,IL-10:白细胞介素-10,TNF- α :肿瘤坏死

因子- α ;与正常对照组比较,^a $P < 0.01$,^b $P < 0.05$;与 AECOPD 组比较,^c $P < 0.05$,^d $P < 0.01$;与 AECOPD 痰热证比较,^e $P < 0.05$

IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 蛋白表达升高,而 IL-10 蛋白表达降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与 AECOPD 痰热证组比较,AECOPD 痰湿证组 IL-1 β 、IL-6 蛋白表达增加,IL-10 蛋白表达降低(均 $P < 0.05$)。

2.3 肺组织 IL-1 β 、IL-10 的 mRNA 表达(表 2): AECOPD 组、AECOPD 痰热证和痰湿证组肺组织 IL-1 β 、IL-10 的 mRNA 表达均较正常对照组显著增强(均 $P < 0.01$)。与 AECOPD 组比较,AECOPD 痰热证和痰湿证组 IL-1 β mRNA 表达增强,IL-10 mRNA 表达减弱($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与 AECOPD 痰热证组比较,AECOPD 痰湿证组 IL-1 β mRNA 表达较强,IL-10 mRNA 表达较弱(均 $P < 0.05$)。

3 讨论

COPD 已成为造成人类死亡的主要原因。研究表明,中医辨证治疗 AECOPD 效果明显,廖文生等^[5]给予 AECOPD 患者具有益气温阳作用的参附注射液治疗发现,其可通过调节细胞因子 TNF- α 、IL-2 而明显改善患者症状。李建生等^[6]临床研究发现:采用活血化瘀方药治疗 AECOPD 血瘀证患者临床疗效明显,可明显改善患者的临床症状和肺功能,促进炎症吸收,提高氧合和降低 CO₂ 潴留,最终提高生活质量。张楚明等^[7]较长时间应用中西医结合治疗 73 例 COPD 合并呼吸衰竭(呼衰)并机械通气的患者,其疗效明显优于单纯西医治疗组。赵巍等^[8]研究亦发现:在常规西医综合治疗基础上针对患者证候的不同加用中药治疗,其血气分析指标、总有效率均高于对照组。本课题组基于已成功建立的 AECOPD 痰热证和痰湿证模型,从 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、IL-10 表达方面比较两种证型的特点,为临床辨证分型提供参考。

IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 在炎症发生发展过程中起关键的作用。IL-1 β 、TNF- α 作为关键细胞因子激活炎症级联反应可导致慢性炎症的加剧^[9]。研究证实,IL-1 β 、TNF- α 水平是反映肺部感染及损伤程度的良好指标^[10]。另有研究证实:COPD 患者痰液中 TNF- α 、IL-6 含量增加预示病情恶化^[11]。本研究

显示,AECOPD 组、AECOPD 痰热证组、AECOPD 痰湿证组肺组织促炎因子 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 的蛋白及基因表达均较正常对照组显著升高,表明这些促炎因子参与了 AECOPD、AECOPD 痰热证、AECOPD 痰湿证的发生发展。AECOPD 痰热证组、AECOPD 痰湿证组 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 表达水平较 AECOPD 组明显升高,且 AECOPD 痰湿证组 IL-1 β 、IL-6 表达强于痰热证组,这可能是导致肺组织炎症损伤在 AECOPD 痰湿证组 > AECOPD 痰热证组 > AECOPD 组的原因。此外,本课题组以往的研究结果证实,肺功能的损伤程度由重到轻依次是痰湿证、痰热证、AECOPD^[3]。结合本实验结果可以推测,炎症因子的表达与肺功能损伤呈正相关,与文献[9]结果一致。

IL-10 是机体主要的抗炎因子,在 AECOPD、AECOPD 痰热证和痰湿证情况下,TNF- α 等促炎因子大量合成和释放,刺激 IL-10 大量生成并参与负反馈调节炎症反应的过程。另外,本研究发现,AECOPD 痰热证和痰湿证组大鼠肺组织 IL-10 的 mRNA 及蛋白表达较 AECOPD 组显著降低,其中痰湿证组尤为明显;表明抗炎因子 IL-10 表达减弱以及上述促炎因子表达增强导致的炎症失衡可能是 AECOPD 痰湿证模型肺组织损伤较 AECOPD 痰热证重的原因,也可能是临床上痰湿证患者恢复缓慢的主要因素,其机制有待进一步探讨。

参考文献

- [1] 余学庆,李建生,李力.慢性阻塞性肺疾病(COPD)中医证候分布规律研究.河南中医学院学报,2003,18:44-46.
- [2] 李建生,周红艳,乔翠霞,等.慢性阻塞性肺疾病急性加重期痰热证模型的建立与评价.中国中医基础医学杂志,2010,16:553-556.
- [3] 李建生,李素云,张艳霞,等.慢性阻塞性肺疾病急性加重期痰热证与痰湿证模型生物学指标的比较研究.中国危重病急救医学,2010,22:267-270.
- [4] 许浒,熊密,黄庆华.细菌感染导致慢性阻塞性肺疾病大鼠模型的探讨.中华结核和呼吸杂志,1999,22:739-742.
- [5] 廖文生,李卫青,陈世伟,等.参附注射液对慢性阻塞性肺疾病急性加重期患者炎症细胞因子和肺功能的影响.中国中西医结合急救杂志,2008,15:149-151.
- [6] 李建生,李彬,余学庆,等.活血化瘀方药治疗血瘀证慢性阻塞性肺疾病急性加重期的临床疗效评价.中国中西医结合急救杂志,2011,18:9-13.

- [7] 张楚明, 林彬. 中西医结合治疗慢性阻塞性肺疾病合并呼吸衰竭机械通气患者 73 例临床观察. 中国中西医结合急救杂志, 2011, 18:49-50.
- [8] 赵巍, 刘战英. 中西医结合治疗慢性阻塞性肺疾病急性加重期的疗效观察. 中国中西医结合急救杂志, 2012, 19:232-234.
- [9] Hackett TL, Holloway R, Holgate ST, et al. Dynamics of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokine release during acute inflammation in chronic obstructive pulmonary disease: an vivo study. *Respir Res*, 2008, 9:47.
- [10] 姚丽君, 师晶丽, 吕明庄, 等. 短期针刺对急性肺损伤大鼠血浆白细胞介素-1 β 含量及海马 c-fos 基因表达的影响. 中国中西医结合急救杂志, 2011, 18:159-162.
- [11] Hacievliyagil SS, Gunen H, Mutlu LC, et al. Association between cytokines in induced sputum and severity of chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med*, 2006, 100:846-854.

(收稿日期:2012-01-31)

(本文编辑:李银平)

·学术活动预告·

第六届首都急危重症医学高峰论坛会议通知

由首都医科大学急诊医学系及其 28 家附属医疗机构、卫生部中日友好医院、北京大学人民医院、北京大学第三医院、北京大学积水潭医院主办的第六届首都急危重症医学高峰论坛将于 2013 年 8 月 30 日至 9 月 1 日在北京国际会议中心举行。

- 主要论坛及议题:**三类会前会:①急诊科主任论坛:医改、医疗风险控制、急诊专业知识;②全民急救知识普及教育:心脑血管疾病、呼吸系统疾病、急性胸痛、急性腹痛、急性中毒、如何拨打急救电话、如何向医生陈述病情及配合等;③workshop:FAST 超声在急诊的应用、心肺复苏、肺复张-ARDS、血流动力学监测、PiCCO、无创心排、呼吸机的设置、CRRT、亚低温治疗。
- 专题分论坛及部分议题:**①心肺复苏专题论坛;②脓毒症专题论坛;③感染专题论坛;④循环支持专题论坛;⑤呼吸支持专题论坛;⑥临床思维专题论坛(以病例为导向);⑦急危重症评估及识别论坛(以评分为导向);⑧急性综合征专题论坛(以病例为导向);⑨急诊临床危象专题论坛(以病例为导向);⑩常见急危重症专题论坛(以病例为导向);⑪急性中毒专题论坛;⑫危重症护理专题论坛;⑬儿科急危重症专题论坛;⑭急诊急救新技术创新论坛;⑮院前急救论坛;⑯社区急诊急救论坛。
- 大会秘书处联系方式:**联系人:武晓辰;在线注册:www.cfeccm.org;报名电话:010-57108106; Email:cfeccm@163.com。

《中华危重病急救医学》杂志天津生化杯有奖征文通知

《中华危重病急救医学》杂志编辑委员会与天津生物化学制药有限公司拟于 2013 年共同举办《中华危重病急救医学》杂志天津生化杯有奖征文活动,现将有关事项通知如下。

- 征文内容及时间:**有关注射用氢化可的松琥珀酸钠在急诊、危重症领域的临床应用经验总结和基础研究。可为论著或病例报告形式,具体书写要求和格式请参考本刊稿约(刊登于每年第 1 期第 63~64 页和第 7 期第 447~448 页),以及在本刊刊出的论著和病例报告类论文。稿件请以“第一作者姓名+论文题目”命名,发送至 cccm@em120.com 或 tjbp-xueshuzu@163.com, 邮件主题请注明“琥珀氢可征文”。征文截至 2013 年 10 月 30 日。
- 注意事项:**①尚未公开发表的论文;②内容须具有科学性、先进性和实用性,数据须准确无误;③本活动只接受电子邮件投稿;④为方便联系,稿件上请注明:单位、地址、邮编、电话、邮箱以及所有作者姓名。
- 奖项设置:**获奖名单刊登于《中华危重病急救医学》杂志上。一等奖 2 名,赞助参加国际重要学术会议 1 次;二等奖 3 名,赞助参加国内重要学术会议 1 次;三等奖 5 名,赞助参加省内学术会议 1 次;凡参与者均可获得精美纪念礼品 1 份。
- 联系人:**徐津鹏;电话:022-24891391, 13820882016。

科研思路与论文发表培训班通知

由中国中西医结合学会编辑工作委员会主办、天津市第一中心医院和《中国中西医结合急救杂志》杂志社承办的国家级中医药继续教育项目科研思路与论文发表培训班将于 2013 年 9 月 13 日至 15 日在天津召开,参加者将授予国家级继续教育学分 6 分。

培训班将邀请国内著名专家就科研设计和标书书写、国家自然科学基金申报方法以及医学论文的写作及投稿方法等内容进行详细剖析。希望通过培训能使广大中西医结合等专业的医务工作者对所在专业的临床工作、科研设计、医学论文写作等多方面有更深入了解,提高业务水平以及科研和论文写作能力。

- 会议时间:**2013 年 9 月 13 日至 15 日。
- 会议费用:**会务费 300 元/人,食宿统一安排,费用自理。
- 报名办法:**①电话报名:022-23306917, 23197150;联系人:李银平;②将报名信息发至会务组邮箱([Email:cccm@em120.com](mailto:cccm@em120.com), 邮件主题请注明参会回执),也可邮寄到会务组(天津市和平区睦南道 122 号《中国中西医结合急救杂志》杂志社,邮编:300050),信封上请注明参会回执。我们会在收到参会回执后尽快与您联系。