

· 基础研究 ·

雪莲强筋壮骨方对膝骨关节炎软骨细胞 p38 丝裂原活化蛋白激酶信号传导通路的影响

赵永胜, 李发东, 杨新成, 孟刚, 郭鑫, 赵辉, 潘有龙, 王晓乐

(新疆维吾尔自治区昌吉回族自治州中医医院, 新疆 昌吉 831100)

摘 要 **目的:**探讨雪莲强筋壮骨方对膝骨关节炎(knee osteoarthritis, KOA)软骨细胞 p38 丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号传导通路的影响。**方法:**将 24 只 3 月龄雄性新西兰大白兔随机分为空白组、模型组、p38 阻断剂组及含药血清组,每组 6 只。除空白组外,其余各组均采用改良 Hulth 法行 KOA 造模。造模成功后含药血清组以雪莲强筋壮骨方水煎剂灌胃($10\text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$),其余各组均以等量生理盐水灌胃,每天 2 次,连续干预 7 d 后静脉采血,分别制成 10% 含药血清和 10% 空白血清的 DMEM 培养液保存备用。血清制备完成后处死动物,分离膝关节软骨进行软骨细胞培养。空白组和模型组以空白血清进行干预,p38 阻断剂组以空白血清和 SB203580 进行干预,含药血清组以含药血清进行干预。血清干预结束后,分别采用免疫荧光技术和蛋白免疫印迹法检测各组软骨细胞磷酸化 p38MAPK 水平。**结果:**免疫荧光检测结果显示,模型组磷酸化 p38MAPK 表达呈强阳性,p38 阻断剂组和含药血清组次之,空白组最弱。蛋白免疫印迹检测结果显示,空白组磷酸化 p38MAPK 表达最弱,模型组磷酸化 p38MAPK 表达最强,p38 阻断剂组和含药血清组磷酸化 p38MAPK 表达水平相当,介于空白组和模型组之间。经扫描定量检测,空白组、模型组、p38 阻断剂组和含药血清组条带的光密度值分别为 0.31 ± 0.06 、 0.83 ± 0.11 、 0.58 ± 0.45 、 0.55 ± 0.56 ,差异有统计学意义($F=3.872, P=0.034$)。空白组的光密度值小于模型组、p38 阻断剂组及含药血清组($P=0.007, P=0.031, P=0.038$);模型组的光密度值大于 p38 阻断剂组和含药血清组($P=0.038, P=0.028$);p38 阻断剂组和含药血清组的光密度值比较,差异无统计学意义($P=0.066$)。**结论:**雪莲强筋壮骨方能阻滞 KOA 软骨细胞 p38MAPK 信号传导通路,其效果与 p38MAPK 阻断剂 SB203580 相当。

关键词 骨关节炎;雪莲强筋壮骨方;软骨细胞;p38 丝裂原活化蛋白激酶类;信号传导

Effect of Xuelian Qiangjin Zhuanggu Fang(雪莲强筋壮骨方) on p38 mitogen-activated protein kinase signaling transduction pathway in chondrocytes of patients with knee osteoarthritis

ZHAO Yongsheng, LI Fadong, YANG Xincheng, MENG Gang, GUO Xin, ZHAO Hui, PAN Youlong, WANG Xiaole
Changji Hospital of Traditional Chinese Medicine, Changji 831100, Xinjiang, China

ABSTRACT **Objective:** To explore the effects of Xuelian Qiangjin Zhuanggu Fang(雪莲强筋壮骨方, XLQJZGF) on p38 mitogen-activated protein kinase(MAPK) signaling transduction pathway in chondrocytes of patients with knee osteoarthritis(KOA). **Methods:** Twenty four three-month-old male New Zealand rabbits were randomly divided into blank group, model group, p38 blocker group and medicated serum group, 6 cases in each group. The KOA rabbit models were created in model group, p38 blocker group and medicated serum group by using modified Hulth method. After successful modeling, the rabbits in medicated serum group were intragastric administrated with XLQJZGF decoction(10 g/kg), while the rabbits in blank group, model group and p38 blocker group were intragastric administrated with isodose normal saline, twice a day for consecutive 7 days. Then their blood were fetched out from veins for making DMEM culture fluid added with 10% medicated serum and DMEM culture fluid added with 10% blank serum respectively for future use. After successful serum preparation, the rabbits were executed, and their chondrocytes were isolated from knee articular cartilages and were cultured in vitro. The chondrocytes were intervened with blank serum(blank group and model group), blank serum and SB203580(p38 blocker group) and medicated serum(medicated serum group) respectively. After the end of serum intervention, the levels of phosphorylated-p38 MAPK in chondrocytes were detected by using immunofluorescence technique and Western blot assay respectively. **Results:** The results of immunofluorescence assay showed that the phosphorylated-p38 MAPK exhibited high-to-low expression in model group, p38 blocker group and medicated serum group and blank group in turn. The results of Western blot assay showed that the phosphorylated-p38 MAPK exhibited low-to-high expression in blank group,

基金项目:新疆维吾尔自治区卫生计生委青年科技人才专项科研项目(2015Y08)

通讯作者:李发东 E-mail:15001689373@163.com

p38 blocker group and medicated serum group and model group. The scanning and quantitative detection results showed that there was statistical difference in optical density values of strips between blank group, model group, p38 blocker group and medicated serum group ($0.31 \pm 0.06, 0.83 \pm 0.11, 0.58 \pm 0.45, 0.55 \pm 0.56; F = 3.872, P = 0.034$). The optical density values were smaller in blank group compared to model group, p38 blocker group and medicated serum group ($P = 0.007, P = 0.031, P = 0.038$), and were larger in model group compared to p38 blocker group and medicated serum group ($P = 0.038, P = 0.028$), and there was no statistical differences in optical density values between p38 blocker group and medicated serum group ($P = 0.066$). **Conclusion:** XLQJZGF can block the p38 MAPK signaling transduction pathway in chondrocytes in patients with KOA, and it is similar to SB203580 (p38 MAPK blocker) in curative effects.

Keywords osteoarthritis; Xuelian Qiangjin Zhuanggu Fang; chondrocytes; p38 mitogen-activated protein kinases; signal transduction

膝关节炎 (knee osteoarthritis, KOA) 的病因病机较为复杂, 受年龄、遗传、创伤及代谢等多种因素的影响^[1]。临床用于治疗该病的方法较多, 疗效各异。我们在临床应用自拟雪莲强筋壮骨方治疗 KOA, 取得了很好的临床疗效, 但其具体的作用机制尚不明确。p38 丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号传导通路已被证实参与了软骨细胞退变、凋亡的过程^[2]。为探讨雪莲强筋壮骨方治疗 KOA 的作用机理, 我们对雪莲强筋壮骨方含药血清对 KOA 软骨细胞 p38MAPK 信号传导通路的影响进行了研究, 现总结报告如下。

1 材料与仪器

1.1 实验动物 清洁级 3 月龄雄性新西兰大白兔 24 只, 体质量 2 kg 左右, 由新疆医科大学动物实验中心提供, 实验动物合格证号: 20171014。动物饲养和造模均在新疆医科大学动物实验中心完成。实验方案经医学动物实验伦理委员会审查批准。

1.2 药物与试剂 雪莲强筋壮骨方, 药物组成包括雪莲花 1 个、熟地黄 20 g、骨碎补 12 g、威灵仙 15 g、白芍 15 g、怀牛膝 15 g、桂枝 6 g、独活 10 g、地龙 10 g、僵蚕 10 g, 药材均由新疆本草堂药业有限公司提供。SB203580 (Selleck 公司); 兔抗 p38MAPK、兔抗 GAPDH (Thr180 + Thr182) (北京博奥森生物技术有限公司); II 型胶原酶、0.25% 胰蛋白酶 + 0.02% EDTA、DMEM/F-12 细胞培养液 (新疆华普泰克生物科技有限公司); 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚 (4', 6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) (北京鼎丰基业生物科技发展有限公司); Alexa Fluor 555 (上海鼎杰生物科技有限公司)。

1.3 实验仪器 ZHJH-C1109C 超净工作台 (上海智城分析仪器制造有限公司)、分光倒置显微镜、台式离心机 (Eppendorf 公司)、DW-HL388 超低温冰箱 (中科美菱低温科技有限责任公司)、DP2 荧光免疫镜

(Olympus 公司)、DSHZ-300A 旋转式恒温振荡仪 (新疆华普泰克生物科技有限公司)。

2 方法

2.1 动物分组及造模 将 24 只动物随机分为空白组、模型组、p38 阻断剂组及含药血清组, 每组 6 只。除空白组外, 其余各组均采用改良 Hulth 法^[3]进行 KOA 造模, 经膝关节内入路, 打开关节囊, 离断前交叉韧带和内侧副韧带, 摘除内侧半月板, 然后逐层缝合。术后每天换药 1 次, 连续 1 周。切口愈合后, 每天驱赶动物行走 1 h, 共计 60 d。

2.2 药物干预及含药血清制备 造模成功后, 含药血清组动物按 $10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 以雪莲强筋壮骨方水煎剂灌胃, 其余 3 组以等量生理盐水灌胃, 均每天 2 次, 共 7 d。于末次灌胃后 1 h 静脉采血, 经离心、分离血清、水浴灭活及滤器除菌后分别配成含 10% 含药血清和 10% 空白血清的 DMEM 培养液, 于 4 °C 保存备用。

2.3 细胞分离培养 血清制备完成后, 通过耳缘静脉注射空气处死所有动物, 仔细分离膝关节软骨, 切成约 1 mm^3 的碎块。用 D-Hanks 液清洗后加入胰蛋白酶 + EDTA 溶液, 37 °C 震荡水浴加热。以 DMEM/F12 培养基终止消化, 加入 II 型胶原酶, 置入 37 °C、5% CO₂ 恒温培养箱中消化后, 用 200 目细胞筛过滤, 再将获得的关节软骨细胞接种于 DMEM/F12 培养基中培养。镜下观察细胞生长状况, 隔天换液, 原代细胞 5 d 左右铺满单层, 以 0.25% 胰蛋白酶 + 0.02% EDTA 溶液消化传代, 传代细胞 3 d 左右融合成单层。将各组第 3 代软骨细胞以 5×10^5 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 接种于包埋细胞爬片的 6 孔细胞培养板中进行后续分析。

2.4 血清干预 待各组细胞融合成单层后, 换不含血清的 DMEM 溶液培养 24 h, 再以 D-Hanks 液清洗 3 次后进行干预。空白组和模型组加入含 10% 空白血清的 DMEM 溶液培养 48 h; p38 阻断剂组加入含 10% 空白血清的 DMEM 溶液培养 48 h, 以 D-Hanks

液清洗 3 次后按 $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 以 SB203580 干预 1 h; 含药血清组加入含 10% 含药血清的 DMEM 溶液培养 48 h。

2.5 磷酸化 p38MAPK 免疫荧光检测 血清干预结束后,按以下方法进行磷酸化 p38MAPK 免疫荧光检测:用 4% 多聚甲醛浸泡细胞爬片,室温下放置 15 min。以 TBST 浸泡细胞爬片,每次 5 min,重复 3 次。0.2% 的 Triton X-100 透化液处理 5 min。以 TBST 浸泡细胞爬片,每次 5 min,重复 3 次。以 5% BSA 浸泡细胞爬片 30 min,用 TBST 洗 2 次。在细胞爬片上滴加 p38 抗体 $200 \mu\text{L}$ (稀释倍数为 1:50) 及 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的细胞核染色剂 DAPI,放置在湿盒内于 37°C 温育 1 h。TBST 清洗细胞爬片 3 次,加入 Alexa Fluor 555 红色标记荧光二抗,放置湿盒内于 37°C 温育 30 min。TBST 清洗 3 次后,置于荧光显微镜下进行拍照。

2.6 磷酸化 p38MAPK 免疫印迹检测 将每组处理好的磷酸化 p38MAPK 洗涤,加入细胞裂解液,收集、离心后取 $20 \mu\text{g}$ 变性裂解蛋白进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳,然后电转移至硝酸纤维素膜,封闭后加入

p38 MAPK 一抗,室温下免疫沉淀 1 h。TBST 摇洗后,加入 HRP 标记的二抗(1:2000)并在室温下作用 2 h,再用 ECL 试剂盒进行发光、显影、定影,最后用 Image Tool V3.0 软件分析图像,分别计算各组磷酸化 p38MAPK 光密度值。

2.7 数据统计 采用 SPSS18.0 统计软件进行数据统计分析。4 组软骨细胞免疫印迹检测光密度值的总体比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 q 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

3 结果

3.1 磷酸化 p38MAPK 免疫荧光检测结果 免疫荧光检测结果显示,模型组磷酸化 p38MAPK 表达呈强阳性,p38 阻断剂和含药血清组次之,空白组最弱,几乎看不到荧光信号(图 1)。

3.2 磷酸化 p38MAPK 免疫印迹检测结果 蛋白免疫印迹检测结果显示,空白组磷酸化 p38MAPK 表达最弱,模型组磷酸化 p38MAPK 表达最强,p38 阻断剂和含药血清组磷酸化 p38MAPK 表达水平相当,介于空白组和模型组之间(图 2)。经扫描定量检测,空白组、模型组、p38 阻断剂和含药血清组条带的光

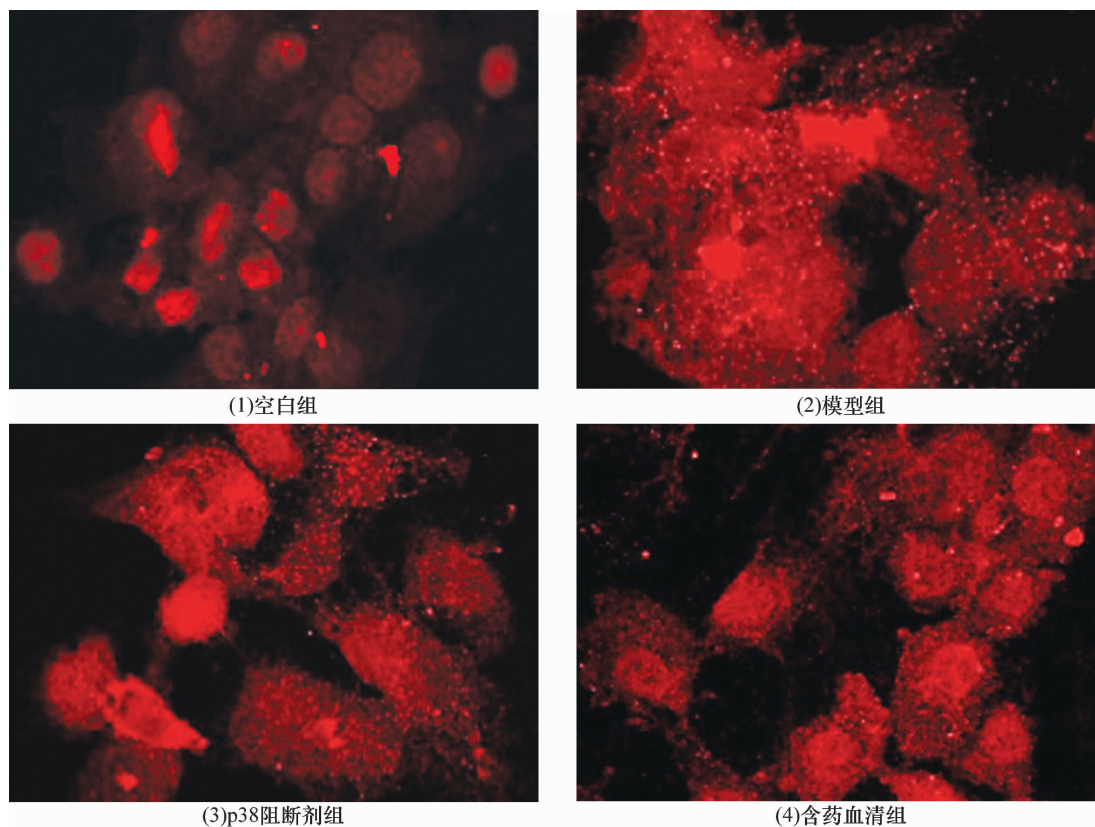


图 1 4 组兔膝关节软骨细胞磷酸化 p38MAPK 免疫荧光染色结果($\times 20$)

(1)空白组细胞 p38MAPK 阳性表达率约 20%;(2)模型组细胞 p38MAPK 阳性表达率约 91.6%;(3)p38 阻断剂组细胞 p38MAPK 阳性表达率约 44.4%;(4)含药血清组细胞 p38MAPK 阳性表达率约 46.3%;MAPK:丝裂原活化蛋白激酶

密度值分别为 0.31 ± 0.06 、 0.83 ± 0.11 、 0.58 ± 0.45 、 0.55 ± 0.56 , 差异有统计学意义 ($F = 3.872$, $P = 0.034$)。空白组的光密度值小于模型组、p38 阻断剂组及含药血清组 ($P = 0.007$, $P = 0.031$, $P = 0.038$); 模型组的光密度值大于 p38 阻断剂组和含药血清组 ($P = 0.038$, $P = 0.028$); p38 阻断剂组和含药血清组的光密度值比较, 差异无统计学意义 ($P = 0.066$)。

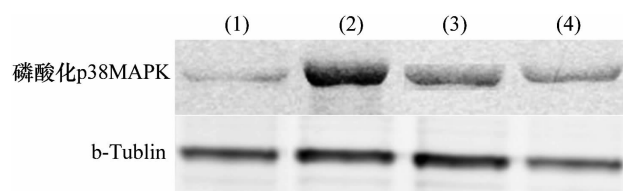


图 2 4 组兔膝关节软骨细胞磷酸化 p38MAPK 蛋白免疫印迹图

(1) 空白组; (2) 模型组; (3) p38 阻断剂组; (4) 含药血清组; MAPK: 丝裂原活化蛋白激酶

4 讨论

p38MAPK 是细胞内重要的信号传递者, 参与细胞增殖、凋亡、分化、表达等多种生理过程的调节^[4], 在软骨细胞凋亡、细胞因子产生中起重要作用, 也参与了胶原蛋白和蛋白多糖降解。p38MAPK 在骨关节炎软骨中明显升高, 被认为是反映骨关节炎病变程度的特异性指标。关节液中的炎症因子、细胞因子等多种细胞外刺激因素可以激活关节软骨细胞内的 p38MAPK 通路, 产生磷酸化级联反应, 引起 p38MAPK 磷酸化, 磷酸化的 p38MAPK 随即转位到细胞核, 激活转录因子, 启动相关基因的表达^[5]。p38MAPK 信号通路激活后能促进炎症因子、基质金属蛋白酶、前列腺素、环氧化酶等物质的靶基因表达, 进而导致软骨成分丢失和破坏及相应临床症状的产生^[6]。同时, 在炎症软骨基质中, 通过 p38MAPK 信号通路诱导基质金属蛋白酶 13 的表达, 可导致 II 型胶原进行性降解, 加速软骨破坏^[7-9]。很多研究表明, 通过抑制 p38MAPK 活性, 可抑制软骨细胞凋亡和退变^[10-11]。p38MAPK 抑制剂 SB203580 能有效抑制软骨细胞凋亡, 改善关节软骨的退变^[12-14]。Rosenzweig 等^[15]的研究表明, 通过阻滞 p38MAPK 通路能够抑制软骨细胞分化为成纤维细胞, 促进软骨细胞再生。

中医学理论认为 OA 的发病与肝肾亏虚、筋骨失养、风寒湿邪侵袭、痰瘀凝滞有关, 属“本虚标实”“本痿标痹”之证。《黄帝内经》曰: “病在骨, 骨重不可举, 骨髓酸痛, 寒气至, 名曰骨痹。”“风寒湿三气杂至,

合而为痹也。”“五脏皆有合, 病久而不去者, 内舍于其合也。故骨痹不已, 复感于邪, 内舍于肾。”以上论述均说明膝痹是痹病入深, 内搏于骨而成。雪莲强筋壮骨方具有强筋壮骨、舒筋通络、活血止痛、祛风除湿、化痰软坚的功效, 方中君药雪莲花性热, 具有活血通经、散寒除湿、强筋助阳等功效; 熟地黄、骨碎补入肝肾经, 能补肾壮骨, 强筋止痛; 威灵仙、桂枝、独活、地龙、僵蚕祛风胜湿、温经通络止痛、消痰水; 白芍以养血柔肝为主; 怀牛膝散瘀血、祛风湿, 并能引药到达腿膝; 全方补肝肾、强筋壮骨以治本, 舒筋通络、活血止痛、化痰软坚、祛风除湿以治标。

本研究的结果提示, 雪莲强筋壮骨方能阻滞 KOA 软骨细胞 p38MAPK 信号传导通路, 其效果与 p38MAPK 阻断剂 SB203580 相当。中药方剂含有多种药用成分, 其作用机制也是一个综合、复杂的过程, 阻滞 p38MAPK 传导通路可能只是雪莲强筋壮骨方治疗 KOA 的一种作用机制, 其他的作用机制还有待进一步研究。

5 参考文献

- [1] HEIJINK A, GOMOLL AH, MADRY H, et al. Biomechanical considerations in the pathogenesis of osteoarthritis of the knee [J]. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2012, 20(3): 423 - 435.
- [2] 周江涛, 王庆来, 赵依娜, 等. 牛膝含药血清对骨关节炎软骨细胞 P38 丝裂原活化蛋白激酶信号转导通路的影响 [J]. 中医正骨, 2012, 24(12): 15 - 19.
- [3] 刘献祥, 李西海, 周江涛. 改良 Hulth 造模法复制膝骨性关节炎的实验研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 2005, 25(12): 1104 - 1108.
- [4] CHEN J, LI Y, HAO H, et al. Mesenchymal stem cell conditioned medium promotes proliferation and migration of alveolar epithelial cells under septic conditions in vitro via the JNK - P38 signaling pathway [J]. Cell Physiol Biochem, 2015, 37(5): 1830 - 1846.
- [5] GALLELLI L, GALASSO O, FALCONE D, et al. The effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on clinical outcomes, synovial fluid cytokine concentration and signal transduction pathways in knee osteoarthritis. A randomized open label trial [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2013, 21(9): 1400 - 1408.
- [6] 陈松, 吴松, 王华, 等. P38 信号转导通路与疾病谱的研究进展 [J]. 湖北中医药大学学报, 2017, 19(1): 110 - 113.
- [7] HAMAMURA K, GOLDRING MB, YOKOTA H. Involvement of p38 MAPK in regulation of MMP13 mRNA in chon-

- drocytes in response to surviving stress to endoplasmic reticulum[J]. Arch Oral Biol, 2009, 54(3): 279-286.
- [8] LONG DL, LOESER RF. p38gamma mitogen-activated protein kinase suppresses chondrocyte production of MMP-13 in response to catabolic stimulation[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2010, 18(9): 1203-1210.
- [9] LIM H, KIM HP. Matrix metalloproteinase-13 expression in IL-1 β -treated chondrocytes by activation of the p38 MAPK/c-Fos/AP-1 and JAK/STAT pathways[J]. Arch Pharm Res, 2011, 34(1): 109-117.
- [10] KANWAR JR, SAMARASINGHE RM, KUMAR K, et al. Cissus quadrangularis inhibits IL-1 β induced inflammatory responses on chondrocytes and alleviates bone deterioration in osteotomized rats via p38 MAPK signaling[J]. Drug Des Devel Ther, 2015, 9: 2927-2940.
- [11] ZHOU Y, LIU SQ, YU L, et al. Berberine prevents nitric oxide-induced rat chondrocyte apoptosis and cartilage degeneration in a rat osteoarthritis model via AMPK and p38 MAPK signaling[J]. Apoptosis, 2015, 20(9): 1187-1199.
- [12] LI Z, MENG D, LI G, et al. Celecoxib combined with diacerein effectively alleviates osteoarthritis in rats via regulating JNK and p38MAPK signaling pathways[J]. Inflammation, 2015, 38(4): 1563-1572.
- [13] PRASADAM I, MAO X, WANG Y, et al. Inhibition of p38 pathway leads to OA-like changes in a rat animal model[J]. Rheumatology (Oxford), 2012, 51(5): 813-823.
- [14] YU SM, KIM SJ. Production of reactive Oxygen species by withaferin A causes loss of type collagen expression and COX-2 expression through the PI3K/Akt, p38, and JNK pathways in rabbit articular chondrocytes[J]. Exp Cell Res, 2013, 319(18): 2822-2834.
- [15] ROSENZWEIG DH, OU SJ, QUINN TM. P38 mitogen-activated protein kinase promotes dedifferentiation of primary articular chondrocytes in monolayer culture[J]. J Cell Mol Med, 2013, 17(4): 508-517.

(收稿日期: 2018-03-21 本文编辑: 李晓乐)

· 通 知 ·

全国水针刀微创技术及中医筋骨三针法学习班通知

水针刀微创技术、中医筋骨三针疗法是由北京世针联中医微创针法研究院院长吴汉卿教授经过 30 余年潜心研究, 在传统九针、刀针、水针疗法、针挑疗法、运动针法及太极针法基础上, 根据中医经筋学说及软组织解剖学所总结的融中西医针法于一体的中医微创技术。该技术已被纳入国家中医药管理局“中医医疗适宜技术”, 写入全国高等中医药院校创新教材, 确定为中医药 I 类继续教育推广项目。该技术问世以来, 全国性培训班已成功举办 200 余期, 培训学员数万名, 学员来自国内包括台湾、香港等地区及国外, 如: 马来西亚、新加坡、韩国、俄罗斯、澳大利亚、美国等, 其“短、平、快”的治疗特点受到了国内外专家及广大学员的好评。为满足广大医师要求, 继续举办学习班, 培训内容如下。

水针刀微创技术、三氧融盘技术 ①水针刀微创技术结合三氧融盘技术治疗软组织损伤病, 如: 颈椎病、肩关节周围炎、肘关节病变、腕管综合征、腰椎间盘突出症、膝关节病变、坐骨神经痛、臀上皮神经痛、风湿类风湿关节炎、腱鞘炎、跟痛症等骨伤疼痛疾病。②水针刀尸体解剖微创入路内容: 该班在医学院解剖馆进行, 结合新鲜尸体全面讲解人体全身三维解剖以及三针法定位、进针方向、针下层次、危险区的划分、常用针法及操作技巧等内容, 学员能自己动手练习。

中医筋骨三针疗法 中医筋骨三针疗法分为微型筋骨三针疗法与巨型筋骨三针疗法 2 种, 微型筋骨三针疗法的优点: 该针具针体细如银针, 创伤微、痛苦小, 融合了中医针法和西医刀法, 定位独特, 针法灵活多变, 既有微创针刀的松解分离功能, 又有针灸的补泻候气、疏通经络功能; 该疗法主治: 中风偏瘫、失语症、三叉神经痛、面瘫、肋间神经痛、坐骨神经痛、皮神经卡压症、四肢末端病等。巨型筋骨三针疗法的优点: 该针法有钝性松解、安全可靠、通透力强、松解力度大等特点。其主要针法有: 筋膜扇形撬拨法、筋骨减压术、椎间孔针旋转术等 10 大针法; 该疗法主治: 颈腰椎术后综合征、腰椎管狭窄症、强直性脊柱炎驼背、颈 1 横突综合征、颈 7 棘突综合征等临床疑难病。同时培训水针刀松解埋线技术内容: 脊背九大诊疗区, 应用水针刀松解、注射、磁线留置并配合整脊手法快速治愈颈性心脏病、颈性咽炎、面瘫、癫痫、慢性支气管炎、哮喘、胃炎、胃溃疡、结肠炎、生殖疾病等; 并教授三氧自血疗法治疗心脑血管疾病, 乙肝、丙肝、脂肪肝等肝病, 妇科疾病及皮肤病性病等。

培训时间: 每月 1 日正式上课, 学期 12 天, 请提前 1 天报到。

培训方式及待遇: 学习班由吴汉卿教授主讲, 采用小班授课, 理论结合临床实习和尸体解剖操作, 学期结束后颁发培训证书及 I 类继续教育学分证书。

培训地址: ①北京班地址: 北京市东城区广渠门内夕照寺街东玖大厦 B 座 703 室, 北京世针联中医微创针法研究院。②河南南阳班地址: 河南省南阳市仲景路与天山路口, 水针刀研究院。

联系电话: 400 8377 618 **联系人:** 黄建老师 13721820657, 0377-63282507

网址: www.shuizhendao.com (中华水针刀微创网)