

受体酪氨酸激酶抑制剂对兔 OA 模型软骨细胞 NO 的表达及软骨组织形态的影响

潘哲尔, 陈乃钱, 张纯武, 李驰, 黄小敬, 叶澄宇

(温州医学院附属第一医院, 浙江 温州 325000)

摘要 目的:探讨受体酪氨酸激酶抑制剂 genistein 对兔 OA 模型软骨细胞 NO 的表达及软骨组织形态的影响,并探讨其可能的作用机制。方法:参照 Hulth 法建立兔骨关节炎模型,予以 genistein 干预后,分别按照 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $0.3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $0.4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的给药剂量进行分组,行手术侧关节腔内注射,通过测定各组亚硝酸盐含量检测关节腔内 NO 的表达水平,同时进行软骨组织形态学检查。结果: $0.3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $0.4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 浓度 genistein 干预组关节腔内 NO 的表达水平明显低于对照组,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$);对软骨组织行 H. E/SOFG 染色显示,在造模后第 4 周、第 8 周与第 12 周时,genistein 干预组与对照组相比,组织损伤均明显减轻,Mankin 评分均明显下降,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论:受体酪氨酸激酶抑制剂 genistein 在体内能减少骨关节炎软骨细胞 NO 的表达,对于延迟关节软骨在组织形态水平的退变是有效的,但是尚不能最终阻止软骨退变发生发展的进程。

关键词 骨关节炎 软骨细胞 受体酪氨酸激酶抑制剂 一氧化氮

The effects of genistein on the exPression of NO and ultra-microstructure of osteoarthritis cartilage and chondrocyte in OA rats PAN Zhe-er*, CHEN Nai-qian, ZHANG Chun-wu, et al. * The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Ruian 325000, Zhejiang, China

ABSTRACT **Objective:** To investigate the effects of receptor tyrosine kinase inhibitor genistein on the expression of NO and ultra-microstructure of osteoarthritis cartilage and chondrocyte in OA rats, thus try to express the Probable mechanisms involved. **Methods:** According to Hulth method, we built rat OA model and the expression levels of NO was detected by Griess method and the change of ultra-microstructure of cartilage was observed. **Results:** Compared with control group, less levels of NO were detected after the intervention of genistein ($0.3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, $0.4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ and $0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) ($P < 0.05$). At 4, 8 and 12 weeks after operation, cartilage sections made and stain with HE/SOFG stain showed less injury, and Mankin score were significantly decreased in intervention groups compared with control group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Genistein can reduced the expression of NO in-vivo. The results of Mankin score and HE/SOFG stain showed that genistein partly delayed the observation of ultra-microstructure of cartilage explored the alleviation of the ultra-microstructure damage of cartilage after injury.

Key words osteoarthritis, chondrocyte, receptor tyrosine kinase inhibitor, nitric oxide

骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 是指由于老年或其他原因如创伤等引起的关节软骨退行性改变,在诸多的发病机制中,细胞因子所起的作用愈来愈受到人们的重视,其中自由基介质一氧化氮 (nitric oxide, NO) 作为一种信使分子参与炎症反应、信号传导、免疫调节等功能,与各种细胞因子之间有着紧密的联系,与 OA 的发生和发展有着密切的关系^[1-2]。软骨细胞在受到炎症因子 IL-1、TNF- α 或 LPS 等的刺激下,能够诱导一氧化氮合酶 (iNOS) 的表达^[3],合成高浓度的 NO,导致软骨基质降解,抑制蛋白多糖及胶原合成,促使软骨细胞凋亡。目前,NO 被认为在关节软骨

代谢方面处于炎症因子的下游,起着信使传递作用^[4]。蛋白酪氨酸激酶 (Protein tyrosine kinase, PTK) 是蛋白磷酸化激酶家族中重要的成员之一,在炎症、肿瘤等疾病的一系列细胞活动信号传导途径中起着重要的作用。PTK 处于整个细胞信号传导途径的上游部分,通过磷酸化底物蛋白的酪氨酸残基而使其激活,参与多条信号转导途径^[5-6]。资料表明,蛋白酪氨酸激酶的信号转导通路在软骨细胞产生 NO 方面起着重要的作用^[7]。对肿瘤组织的研究表明其可能是通过核因子- κ B (NF- κ B) 参与 iNOS 的基因调控,达到调控 NO 水平的作用^[8-9]。我们自 2009 年至 2010 年应用受体酪氨酸激酶抑制剂 genistein 对 OA 动物模型进行了干预,以此探讨受体酪氨酸激酶抑制

剂治疗骨关节炎中可能性价值。

1 材料和方法

1.1 实验动物与主要试剂 实验动物为新西兰大白兔, 雄性, 3 月龄, 体重约 2~2.5 kg (温州医学院实验动物中心提供)。受体酪氨酸激酶抑制剂 genistein (购于美国 Sigma 公司), 根据需要用 DMSO 配制成不同浓度的溶液, 置于 -20℃ 保存。二甲基亚砜 (DMSO) (购自德国 Merk 公司)。

1.2 OA 动物造模 参照 Hulth 法^[10] 建立兔 OA 模型: 在动物手术室内无菌条件下, 用 3% 戊巴比妥钠 ($1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 通过兔耳缘静脉行静脉麻醉。麻醉成功后, 将手术部位膝关节处备皮, 固定于手术台上, 常规消毒铺巾, 于右膝关节内侧做手术切口, 逐层切开各层暴露至关节腔, 显示前后交叉韧带后, 将前后交叉韧带切断, 同时一并切除内侧半月板, 止血后用 4-0 丝线缝合各层伤口, 术后即刻行前后抽屉试验检查, 证实手术膝关节处于极度不稳定状态。术后不固定手术侧肢体。以庆大霉素每天 2 万 U 连续肌肉注射 3 d, 分笼饲养, 定期放养。

1.3 动物分组和药物干预 将动物分为对照组以及 genistein 干预组进行研究, 对照组按照 Hulth 法 OA 造模后不给予药物干预, genistein 干预组造模后予 genistein 按照 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $0.3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $0.4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的给药剂量行手术侧关节腔内注射, 每周 1 次, 每组 20 只。

1.4 OA 动物模型各时期关节液 NO 的检测和软骨组织形态学检查 造模后第 4 周、第 8 周、第 12 周时, 3 个时间点随机抽取 5 只大白兔麻醉致死, 于关节腔内注入 1 mL 无菌生理盐水, 多次冲吸后, 抽取关节腔液 0.1 mL, 深低温冰箱保存, 留待检测 NO, 同时取软骨行 HE/SOFG 染色观察和 Mankin 评分。NO 的检测根据 Griess 氏^[11] 反应法, 并加以改进。在酶标板内加入细胞上清液 100 μL , 再加试剂 1 (1% 对氨基苯磺酰胺) 50 μL , 4℃ 放置 15 min, 加入试剂 2 (0.1% 萘基乙二胺), 室温 30 min 后放置于酶标仪 595 nm 处读取 OD 值, 以 10~100 μm 的亚硝酸盐溶液作为标准曲线。组织染色采用 HE/SOFG 双染色。染色后按照 Mankin 评分^[12] 标准由 2 名观察者分别独立进行评分, 取均值。

1.5 统计学分析 用 SPSS 16.0 统计软件进行统计分析, NO 检测结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较用独立

样本 t 检验, 多组间比较用单因素方差分析, 多组与对照组比较用 Dunnett- t 检验。取 $\alpha = 0.05$ 作为检验水准。

2 结果

2.1 动物模型影像学结果 动物造模 4 周后可见关节面尚平整, 内侧关节间隙增宽, 软骨下骨硬化, 密度增高, 未见明显骨赘形成; 8 周时可见内侧关节间隙明显狭窄, 关节面不平, 软骨下骨硬化, 髌关节面也不平整, 边缘可见骨赘形成; 12 周时可见关节肥大, 关节间隙极度狭窄, 内侧平台塌陷, 大量骨赘形成, 软骨下骨密度不均, 明显硬化 (图 1)。

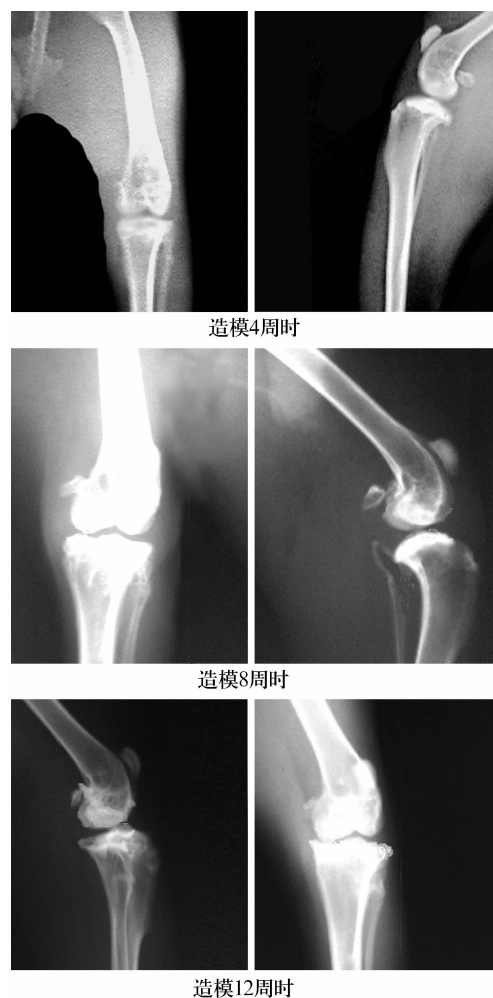


图 1 兔膝关节正侧位 X 线片

随着造模时间的推移, 各组关节液中 NO 表达水平持续升高。每组造模后第 4 周、第 8 周和第 12 周的不同时间点, 膝关节关节液中 NO 水平进行比较, 差异均有统计学意义 ($F_{\text{对照组}} = 27.93$, $P_{\text{对照组}} = 0.000$; $F_{0.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{组}} = 25.54$, $P_{0.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{组}} = 0.001$; $F_{0.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{组}} = 24.35$, $P_{0.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{组}} = 0.000$; $F_{0.3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{组}} = 17.23$, $P_{0.3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{组}} = 0.002$; $F_{0.4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{组}} = 13.98$, $P_{0.4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{组}}$

$=0.000$; $F_{0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{组}} = 14.67$, $P_{0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{组}} = 0.001$)。各组造模后在第 4 周、第 8 周和第 12 周同一时间点, 膝关节关节液中 NO 水平分别进行比较, 差异亦均有统计学意义 ($F_{\text{第4周}} = 4.38$, $P_{\text{第4周}} = 0.001$; $F_{\text{第8周}} = 6.72$, $P_{\text{第8周}} = 0.001$; $F_{\text{第12周}} = 9.67$, $P_{\text{第12周}} = 0.000$)。其中, $0.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组、 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组与对照组相比, 同一时期关节液 NO 表达水平无明显差异 ($P > 0.05$), 而 $0.3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组、 $0.4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组、 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组在同一时期与对照组比较, 关节液中 NO 表达水平显著减少, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。(见图 2)。

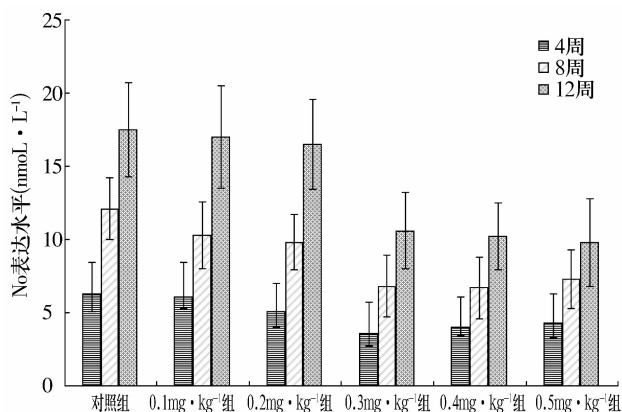


图 2 各组各阶段 NO 表达水平

2.2 HE/SOFG 染色镜下观察结果 根据 NO 检测的结果, 选取 $0.4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组作为实验组进行记录。4 周时, 实验组与对照组软骨组织染色均表现有软骨表面粗糙, 局部有深浅不一的溃疡形成, 部分可深至移行层, 局部细胞弥漫增生簇集, Safranin-O 染色表层较浅, 移行层和深层染色较深, 细胞周围深染, 潮线基本完整。8 周时, 实验组镜下可见软骨变薄, 表层可有溃疡或裂痕, 局部细胞簇集增多, Safranin-O 染色表层淡染, 移行层和深层染色较深, 细胞周围深染, 潮线不完整; 而对照组可见软骨明显变薄, 溃疡可深至移行层, 中深层细胞簇集, Safranin-O 染色中重度减弱, 中深层细胞周围染色较深, 潮线可被血管破坏, 部分可见双重潮线。12 周时, 实验组可见软骨较薄, 裂隙可深至钙化层, 部分区域软骨结构完全破坏, 软骨细胞的数量显著减少并可见有簇集, Safranin-O 染色重度减弱, 部分软骨 ECM 不着色, 潮线被破坏并可见钙化层和软骨下骨的破坏。对照组可见软骨很薄, 溃疡深达钙化层伴软骨下骨暴露, 部分可见软骨结构完全破坏, 细胞数目大量减少, 可见梭形细胞, Safranin-O 染色重度减少, 部分软骨 ECM 不着色, 潮线被破坏并可见钙化层与软骨下骨的破坏(图 3)。

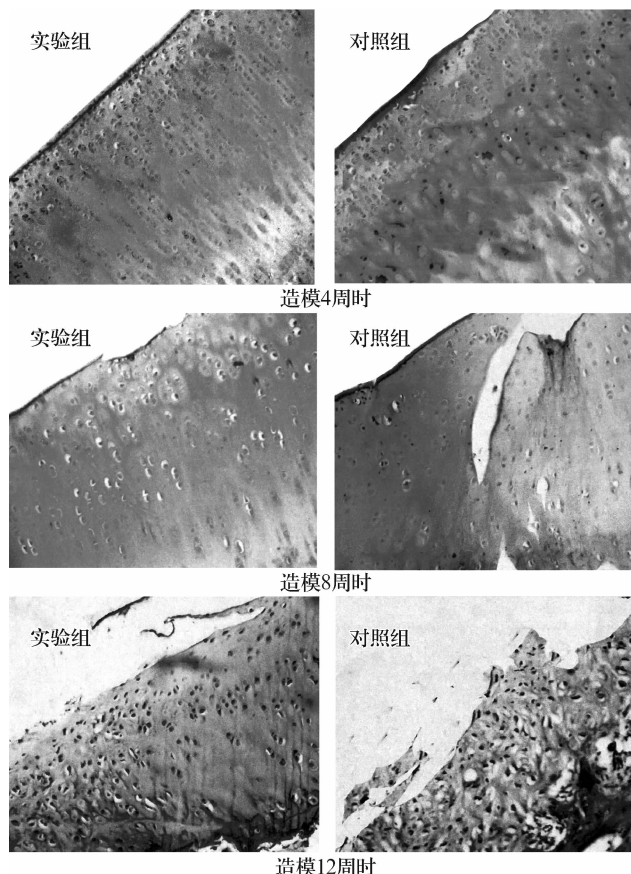


图 3 兔膝关节软骨组织学观察镜片 HE/SOFG 染色 $\times 100$

2.3 Mankin 评分结果 如图 4 所示, 造模第 4 周、第 8 周与第 12 周 3 个时期, 实验组与对照组两组间 Mankin 评分比较, 差异均具有统计学意义(采用独立样本 t 检验, $t_{4\text{周}} = 9.957$, $P_{4\text{周}} = 0.000$; $t_{8\text{周}} = 5.39$, $P_{8\text{周}} = 0.001$; $t_{12\text{周}} = 2.68$, $P_{12\text{周}} = 0.015$)。

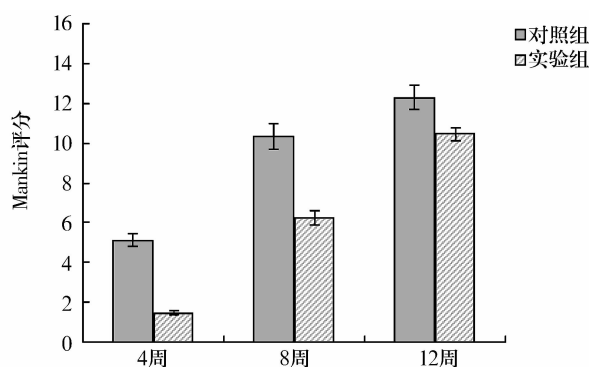


图 4 Mankin 评分结果

3 讨论

NO 是一种非常重要的分解代谢因子, 由软骨细胞对促炎症细胞因子(如 $\text{IL-1}\beta$) 反应后产生^[13]。大量证据证明由软骨细胞过度生成的 NO 在 OA 的持续软骨破坏中起着主要的作用^[13-14]。NO 从多方面作用于软骨细胞, 从而促进关节软骨的退化,

其中最主要包括以下几点^[15-17]:抑制胶原和蛋白多糖合成;激活 MMPs;增加其他氧化剂对组织损伤的易感性(如过氧化氢)。

蛋白酪氨酸激酶(Protein tyrosine kinase, PTK)是蛋白磷酸化激酶家族中重要的成员之一。研究表明,蛋白酪氨酸激酶的信号传导通路在软骨细胞分泌 NO 方面起着重要的作用。genistein 是来源于豆类植物的异黄酮类化合物,是第一个天然的多靶点的受体酪氨酸激酶抑制剂,目前常应用于肿瘤细胞的信号传导机制研究中,对多种蛋白的酪氨酸激酶活性具有抑制作用。近年来已有许多文献报道了 genistein 对软骨细胞的保护作用,但具体的机制仍不清楚。Dias VP^[19]等在体外培养的兔的巨噬细胞中发现 genistein 抑制了脂多糖诱导的巨噬细胞 NO 的表达, Bhatt KH^[18]等则在老鼠的巨噬细胞中发现 genistein 减弱了粘多糖诱导的 iNOS and NO 的表达, Hooshmand S 等^[20]发现 genistein 减少了人类关节软骨前炎症分子的产生,其中就包括 NO。

在实验动物方面,兔的膝关节组织结构与人类相似,生化指标与人 OA 一致^[21],所以我们参照 Hulth 法建立兔 OA 模型。在造模后第 4 周、第 8 周以及第 12 周时的关节 X 线、显微解剖所见均符合早期、中期和晚期骨关节炎的表现,故可以作为不同病理阶段的骨关节炎动物模型进行实验研究。造模后随着时间的推移,各组膝关节关节液中 NO 表达水平持续升高。0.3 mg · kg⁻¹组、0.4 mg · kg⁻¹组、0.5 mg · kg⁻¹组在同一时期与对照组比较,关节液中 NO 表达水平显著减少,但是 0.1 mg · kg⁻¹组、0.2 mg · kg⁻¹组与对照组相比,同一时期关节液 NO 表达水平无明显差异。上述结果表明,在一定浓度范围内 genistein 能够抑制关节软骨细胞产生 NO,从而降低关节液中 NO 的水平。

SOFG 染色和 Mankin 评分是研究软骨组织一组化水平损伤程度的经典方法,结合软骨的结构、细胞数量、基质异染性和潮线完整性等四个方面进行评分。其中 safranin-O 可以和软骨基质 PG 结合显色,反映软骨 PG 的合成代谢能力。本实验研究发现,各个时间点的软骨基质对 Safranin-O 的异染性实验组均优于对照组。从组织学水平观察,genistin 体内代谢后仍对软骨细胞 PG 表型的表达具有维持和保护作用。应用 Mankin 评分实验动物观察评价的结果显

示,造模后第 4 周、第 8 周及第 12 周各时期,实验组与对照组相比, Mankin 评分明显降低。上述结果提示,应用 genistein 对于延迟和缓解关节软骨在组织学水平的退变是有效的,但是尚不能最终阻止软骨退变和 OA 发生发展的进程。

综上所述,本实验初步证实 genistein 通过抑制受体酪氨酸激酶的信号传导通路,在体内降低了 NO 的表达水平,组织形态观察提示 genistein 在一定程度上延缓了 OA 的病程,但是无法阻止 OA 的发病。因为目前临床上所有治疗 OA 的药物都无法阻止 OA 的发生发展,尽管没有人体的直接实验,但 genistein 在兔 OA 身上初步的有效性使其在未来可能也会成为其中的一类药物,同时也期待能够阻止 OA 发病的药物出现。

4 参考文献

- [1] Aigner T, McKenna. Molecular Pathology and Pathobiology of osteoarthritic cartilage [J]. Cell Mol Life Sci, 2002, 59 (1): 5-18.
- [2] Tamamura Y, Iwamoto M. Interleukin-1 beta-induced expression of the urokinase-type Plasminogen activator receptor and its co-localization with MMPs in human articular chondrocytes [J]. Histol HistoPathol, 2004, 19(1): 105-112.
- [3] Rajamaki M, T Sorsa. Osteoarthritis: linking nitric oxide and metalloproteinases in canine articular ligament pathology [J]. Vet J, 2006, 172(3): 400-401.
- [4] White WB. The Potential role of nitric oxide in cardiovascular safety when treating osteoarthritis in Patients with hypertension [J]. Introduction. Am. 2009, 122(5): 1-2.
- [5] Shrivastava AC, Radziejewski E, Campbell, et al. An orphan receptor tyrosine kinase family whose members serve as nonintegrin collagen receptors [J]. Mol Cell, 1997, 1(1): 25-34.
- [6] Wang J, Lu H, Liu X, et al. Functional analysis of discoidin domain receptor 2 in synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis [J]. Autoimmun, 2002, 19(3): 161-168.
- [7] Xu L, Peng H, Wu D, et al. Activation of the discoidin domain receptor 2 induces expression of matrix metalloproteinase 13 associated with osteoarthritis in mice [J]. Biol Chem, 2005, 280(1): 548-555.
- [8] Banerjee S, Li Y, Wang Z, et al. Multi-targeted therapy of cancer by genistein [J]. Cancer Lett, 2008, 269(2): 226-242.
- [9] Solomon LA, Ali S, Banerjee S, et al. Sensitization of ovarian cancer cells to cisplatin by genistein; the role of NF- κ B [J]. Ovarian Res, 2008, 1(1): 9.

- [10] Hulth A, Lindberg L, Telhag H. ExPerimental osteoarthritis in rabbits. Preliminary rePort [J]. Acta OrthoP Scand, 1970, 41(5):522-530.
- [11] Green LC, Wagner DA, Glogowski J, et al. Analysis of nitrate, nitrite, and ¹⁵N nitrate in biological fluids [J]. Anal Biochem, 1982, 126(1):131-138.
- [12] Vander Sluijs JA, Geesink AJ, vander Linden, et al. The reliability of the Mankin score for osteoarthritis [J]. OrthoP Res, 1992, 10(1):58-61.
- [13] Loeser RF. Molecular mechanisms of cartilage destruction in osteoarthritis [J]. Musculoskelet Neuronal Interact, 2008, 8(4):303-306.
- [14] Ting Y, P Ared. A fibronectin fragment induces tyPe II collagen degradation by collagenase through an interleukin-1-mediated Pathway [J]. Arthritis and Rheumatism, 2002, 8(4):303-306.
- [15] Abramson SB, M Attur, AR Amin, et al. Nitric oxide and inflammatory mediators in the PerPetuation of osteoarthritis [J]. Curr Rheumatol ReP, 2001, 3(6):535-541.
- [16] Hirai Y, Migita K, Honda S, et al. Effects of nitric oxide on matrix metalloProteinase-2 Production by rheumatoid synovial cells [J]. Life Sci, 2001, 68(8):913-920.
- [17] Huang CY, Hung LF, Liang CC, et al. COX-2 and iNOS are critical in advanced glycation end Product-activated chondrocytes in vitro [J]. Eur J Clin Invest, 2009, 39(5):417-428.
- [18] Dia VP, Berhow MA, Gonzalez E, et al. Bowman-Birk Inhibitor and Genistein among Soy ComPounds That Synergistically Inhibit Nitric Oxide and Prostaglandin E2 Pathways in LiPoPolysaccharide-Induced MacroPhages [J]. Agric Food Chem, 2008, 56(24):11707-11717.
- [19] Bhatt KH, Pandey RK, Dahiya Y, et al. Protein kinase Cdelta and Protein tyrosine kinase regulate PePtidoglycan-induced nuclear factor-kaPPaB activation and inducible nitric oxide synthase exPression in mouse Peritoneal macroPhages in vitro [J]. Mol Immunol, 2010, 47(4):861-870.
- [20] Hooshmand S, Soundo Y, Lucas EA, et al. Genistein reduces the Production of Proinflammatory molecules in human chondrocytes [J]. J Nutr Biochem, 2007, 18(9):609-614.
- [21] Young RD, Lawrence PA, Duance VC, et al. Immunolocalization of collagen tyPes II and III in single fibrils of human articular cartilage [J]. Histochem Cytochem, 2000, 48(3):423-432.

(2011-01-09 收稿 2011-03-28 修回)

· 通 知 ·

全国水针刀三氧消融术尸体解剖研修班及中华筋骨三针法学习班通知

水针刀三氧消融术及筋骨针法是由中国骨伤微创水针刀学术委员会会长、张仲景国医学院教授、广东省中医院主任医师吴汉卿教授在水针刀疗法的基础上,结合三氧治疗仪所研发的新技术,研制发明的多用系列筋骨针具已获国家专利,并创立了十大筋骨针法(已编入骨伤教材),出版了《中华筋骨三针疗法》。该项技术的培训班已举办 180 余期,来自国内包括台湾、香港等地区及国外(马来西亚、新加坡、韩国)的万余名医生学习、掌握了该技术。为满足广大医师要求,现继续举办以下研修、学习班:

水针刀三氧融盘术及尸体解剖研修班:由吴汉卿教授主要传授:水针刀新针法治疗骨伤颈肩腰腿痛病、水针刀三氧融盘术。应用水针刀法结合新鲜尸体详细讲解三针法安全入路法、配合独特松解液及椎间孔扩张术、侧隐窝分离术。新颖的三针法理论、独特的十大针法、结合尸体法入路、水针刀挂图,有专科医院手术病人治疗,同时讲解影像诊断,保证每位学员能够独立操作。临床上可治疗腰椎间盘突出症,对颈肩腰腿痛患者具有较好的疗效。

脊柱九病区药磁线植入技术:传授独特的脊背九大诊疗区,临床应用水针刀分离、磁线留置并配合整脊手法,快速治疗脊柱相关病,如颈源性心脏病、颈性咽炎、面瘫、三叉神经痛、癫痫、慢性支气管炎、哮喘、胃炎、胃溃疡、结肠炎、生殖疾病等。

中华筋骨三针法学习班:中华筋骨三针法是吴汉卿教授在水针刀针法九针疗法基础上,根据人体生物力学,提出了人体软组织立体三角平衡学说,创立了平衡三针法。该班传授筋骨三针法原理、三针定位法、十大针法技巧。该法主要治疗:颈椎病、颈 1 横突综合症、颈 7 棘突综合症、肩关节周围炎、肌筋膜炎、腰椎间盘突出症、股骨头坏死症、膝关节骨关节炎、神经痛、类风湿性关节炎、脊柱相关病等。

其他:参加学习班者将授予国家级中医药 I 类继续教育学分(项目编号:390206382)

开学时间:2011 年每月 1 日开课,需提前 2 日报到

报到地址:河南省南阳市仲景路与天山路口(水针刀专科医院)

邮政编码:473000 **联系电话:**0377-63282507,13721820657 **联系人:**黄建

网址:www.shuizhendao.com **邮箱:**shuizhendao@163.com