

· 基础研究 ·

从骨髓基质干细胞活性的改变探讨
激素性股骨头坏死的肾阳虚本质徐仲翔¹, 吴云刚², 吴春雷²

(1. 浙江省温州市第八人民医院, 浙江 温州 325028;

2. 温州医学院附属第一医院, 浙江 温州 325000)

摘要 目的:探讨激素性股骨头坏死的肾阳虚本质。**方法:**在对 6 例创伤性股骨颈骨折患者(非激素性股骨头坏死组)和 6 例激素性股骨头坏死患者(激素性股骨头坏死组)行髋关节置换术前抽取其静脉血,采用放射免疫法测定血浆皮质醇和促肾上腺皮质激素的含量;行髋关节置换术时分别取其股骨上段骨髓处液态的红骨髓,建立骨髓基质干细胞的体外培养体系,细胞传代培养并经体外成骨诱导后,采用 MTT 法检测成骨细胞的光密度值,进行碱性磷酸酶染色并检测成骨细胞的碱性磷酸酶含量,采用 Von Kossa's 染色法进行成骨细胞矿化结节计数,并在显微镜下观察成骨细胞形态。**结果:**①血浆皮质醇含量和促肾上腺皮质激素含量。激素性股骨头坏死组患者的血浆皮质醇含量和促肾上腺皮质激素含量 [$(328.167 \pm 27.499) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, $(11.450 \pm 2.649) \text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$] 均低于非激素性股骨头坏死组 [$(380.500 \pm 25.618) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, $(15.667 \pm 3.751) \text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$], 差异有统计学意义 ($t = 3.411, P = 0.007; t = 2.249, P = 0.048$)。②成骨细胞形态。随着培养时间的延长,成骨细胞由贴壁→相互融合成单层→多层重叠生长。成骨细胞碱性磷酸酶染色呈强阳性,细胞质中出现黑色、灰褐色颗粒状或片状沉淀;非激素性股骨头坏死组成骨细胞比激素性股骨头坏死组有不同程度的深染和范围扩大。Von Kossa's 矿化结节染色显示,成骨细胞呈集落生长后开始形成矿化结节,细胞间出现致密的、圆形不透光团块,呈现片状的棕染;非激素性股骨头坏死组成骨细胞矿化结节数比激素性股骨头坏死组明显增多。③成骨细胞光密度值、碱性磷酸酶含量及矿化结节数。激素性股骨头坏死组患者的成骨细胞光密度值、碱性磷酸酶含量、矿化结节数均低于非激素性股骨头坏死组 [(0.174 ± 0.035) , (0.233 ± 0.028) , $t = 3.209, P = 0.009$; $(1.685 \pm 0.323) \text{U} \cdot \text{L}^{-1}$, $(2.563 \pm 0.446) \text{U} \cdot \text{L}^{-1}$, $t = 3.911, P = 0.003$; (18.000 ± 3.578) 个, (23.833 ± 2.639) 个, $t = 3.214, P = 0.009$]。 **结论:**激素性股骨头坏死患者的下丘脑-垂体-肾上腺轴功能紊乱时,骨髓分化为成骨细胞的功能下降,成骨细胞的活性下降,这可能是激素性股骨头坏死患者肾阳虚在骨关节系统的具体体现,是大剂量激素导致肾阳虚并最终导致股骨头坏死的细胞学基础。

关键词 股骨头坏死 骨髓细胞 氢化可的松 皮质醇 促肾上腺皮质激素 骨髓基质干细胞 肾阳虚

Study on the essence of Kidney-yang deficiency of steroid-induced avascular necrosis of femoral head from the activity change of marrow stroma cells XU Zhong-xiang*, WU Yun-gang, WU Chun-lei. *The Eighth People's Hospital of Wenzhou City, Wenzhou 325028, Zhejiang, China

ABSTRACT Objective: To explore the essence of Kidney-yang deficiency of steroid-induced avascular necrosis of femoral head (SANFH). **Methods:** Venous blood was collected from 6 patients with traumatic femoral neck fractures (non-SANFH group) and 6 SANFH patients (SANFH group) before hip replacement, and radioimmunoassay (RIA) was used to detect the contents of cortisol (CORT) and adrenocorticotrophic hormone (ACTH) in the plasma. During hip replacement, the liquid red marrow was taken from proximal femoral osteoepiphysis to establish the culture system of marrow stroma cells (MSCs) in vitro. After the MSCs were serially subcultured and induced into osteoblasts in vitro, the optical density of osteoblasts was detected through MTT method, and alkaline phosphatase (ALP) staining was processed to measure ALP contents in osteoblasts, and the number of mineralized bone nodules in osteoblasts were counted through Von Kossa's staining method, then the morphology of osteoblasts was observed under microscope. **Results:** Contents of CORT and ACTH in the plasma of patients in SANFH group [$(328.167 \pm 27.499) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, $(11.450 \pm 2.649) \text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$] were all lower than those in non-SANFH group [$(380.500 \pm 25.618) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, $(15.667 \pm 3.751) \text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$], and there were statistical differences between the two groups ($t = 3.411, P = 0.007; t = 2.249, P = 0.048$). As time of culturing were prolonged, the osteoblasts adhered to the wall of the culture bottle, then they concentrated into single-layer, and they concentrated into multilayer in the end. After ALP staining, strong positive expressions of ALP were found in

osteoblasts, and the black or fuscous precipitate in granular or lamellar forms were found in the cytoplasm, and more obvious stain in more areas of osteoblasts were found in non-SANFH group compared with SANFH group. The results of Von Kossa's staining showed that the mineralized bone nodules began to appear after the osteoblasts gathered into colony; and the compact round lighttight clumps appeared between the cells, seen as a brown lamellar stain; and significantly more mineralized bone nodules were found in the osteoblasts of the non-SANFH group compared to SANFH group. The optical density, ALP contents and the number of mineralized bone nodules of osteoblasts in SANFH group were lower than those in non-SANFH group[(0.174 ± 0.035), (0.233 ± 0.028), $t = 3.209, P = 0.009$; (1.685 ± 0.323) U · L⁻¹, (2.563 ± 0.446) U · L⁻¹, $t = 3.911, P = 0.003$; (18.000 ± 3.578), (23.833 ± 2.639), $t = 3.214, P = 0.009$]. **Conclusion:** The dysfunction of hypothalamus-pituitary-adrenal axis is followed by the inhibition of differentiation of marrow into osteoblasts and the inhibition of osteoblast activity, which may be the concrete reflection of Kidney-yang deficiency in the bone joint system of SANFH patients, and may be the cellular basis of the femoral head necrosis induced by Kidney-yang deficiency for the large dose of hormone.

Key words Femur head necrosis; Bone marrow cells; Hydrocortisone; Cortisol; Adrenocorticotrophic hormone; Marrow stroma cells; Kidney-yang deficiency

目前,多数学者比较接受和赞同从神经内分泌学方面所验证的肾阳虚与下丘脑-垂体-肾上腺(hypothalamus-pituitary-adrenal, HPA)轴、下丘脑-垂体-甲状腺(hypothalamus-pituitary-thyroid, HPT)轴、下丘脑-垂体-性腺(hypothalamus-pituitary-gonad, HPG)轴有关的观点^[1]。肖鲁伟等^[2]通过观察激素性股骨头缺血性坏死(steroid-induced avascular necrosis of femoral head, SANFH)患者 HPA 形态和功能的改变,认为 SANFH 与肾阳虚证之间有密切关系,并将 HPA 轴的改变作为肾阳虚的客观指标。但目前尚缺乏从 HPA 的靶细胞骨髓细胞的角度来探讨 SANFH 患者的肾阳虚本质的研究。在以往的研究中发现, SANFH 患者的骨髓基质干细胞(marrow stroma cells, MSCs)分化为成骨细胞的能力下降^[3]。笔者通过检测 SANFH 患者的促肾上腺皮质激素(adrenocorticotrophic hormone, ACTH)和血浆皮质醇(cortisol, CORT)水平,评估其 HPA 的功能状态;同时建立 MSCs 的体外培养体系,评估其 MSCs 分化为成骨细胞的能力,从而从 HPA 靶细胞 MSCs 的角度对 SANFH 患者的肾阳虚本质作初步探讨。

1 材料与仪器

1.1 实验用骨髓 实验用骨髓均采自 2011 年 1—12 月在我院行髋关节置换术的患者,取材前均向患者说明情况并经其同意志愿捐献。SANFH 患者 6 例(SANFH 组),其中 FicatⅢ期 4 例, FicatⅣ期 2 例,均符合肾阳虚诊断标准^[4];创伤性股骨颈骨折患者 6 例(非 SANFH 组)。2 组患者年龄、性别比较,差异无统计学意义,具有可比性(表 1)。

表 1 2 组髋关节置换术患者基线资料比较

组别	性别(例)		年龄(岁)
	男	女	
SANFH 组	3	3	63.167 ± 9.724
非 SANFH 组	3	3	61.167 ± 7.859
检验统计量			$t = 0.392$
<i>P</i> 值	1.000		0.703

1.2 实验药物及试剂 DMEM 培养液(美国 Gibco 公司)、胎牛血清(美国 Hyclone 公司)、胰蛋白酶(美国 Sigma 公司)、甲基噻唑基四唑(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)(美国 Sigma 公司)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)试剂盒(上海虹桥医用试剂研究所)、125I-ACTH 放射免疫检测药盒及 125I-CORT 放射免疫检测药盒(天津德普生物技术和医学产品有限公司)、Sigma D1756 100 mg 地塞米松(美国 Sigma 公司)、Sigma G6251 50 g β-甘油磷酸钠(美国 Sigma 公司)、Sigma 25 g 维生素 C(美国 Sigma 公司)、二甲基亚砷(dimethyl sulphoxide, DMSO)(美国 Sigma 公司)。

1.3 实验仪器 3111 型二氧化碳(carbon dioxide, CO₂)培养箱(德国 Thermo 电子公司)、AIRTECH SW-CJ-2FD 超净工作台(中日合资苏州安泰空气技术有限公司)、Stat Fax-2100 型酶标仪(美国贝克曼库尔特公司)、IX71-F22PH2 Olympus 倒置显微镜(日本 OLYMPUS 公司)。

2 方法

2.1 血浆 CORT 和 ACTH 含量的测定 术前 1 d 早晨 8:00 快速静脉抽血,用肝素抗凝。血浆 CORT 和 ACTH 含量测定按放射免疫检测药盒说明书进行操作。

2.2 骨髓标本的制备 无菌条件下,注射器肝素化后,在行髌关节置换术时抽取患者股骨上段骨髓处液态的红骨髓约 5 mL,置入装有 DMEM 培养液的 20 mL 无菌离心管中,于 4 ℃ 的环境中保存待用。

2.3 成骨细胞的培养

2.3.1 MSCs 的分离和培养 以密度为 $1.073\text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 Percoll 为分离介质,用梯度离心法分离单个核细胞。多次洗涤后重新悬浮于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中,以 $1.0 \times 10^6 \text{ 个} \cdot \text{cm}^{-2}$ 接种于 25 cm^2 的培养瓶中,置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中,3~5 d 后换液,去除未贴壁的细胞,每 3 d 换液 1 次,每天观察细胞形态、贴壁及生长情况。待细胞融合达 80%~90% 后,用 0.25% 胰蛋白酶消化、传代。

2.3.2 体外成骨的诱导 当第 3 代的 MSCs 贴壁生长达到 70%~80% 融合时,加入含 $5\text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 地塞米松、 $10\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}\beta$ -磷酸甘油钠、 $50\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 维生素 C 的 DMEM 成骨条件培养液中,制成细胞悬液,按 $1 \times 10^5 \text{ 个} \cdot \text{cm}^{-2}$ 接种于 75 cm^2 的培养皿中,置入 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养。

2.4 成骨细胞的鉴定

2.4.1 细胞 OD 值测定 采用 MTT 法。将诱导后的细胞以 $5 \times 10^3 \text{ 个} \cdot \text{mL}^{-1}$ 接种于 96 孔板中,培养 72 h 后选择 6 孔细胞,每孔加入 MTT 溶液 20 μL ,37 ℃ 孵育 4 h 后终止培养,小心吸弃孔内培养上清液。每孔加入 DMSO 150 μL ,振荡 15 min 裂解细胞,使沉淀物充分溶解,在酶联免疫检测仪上测定每孔细胞在 490 nm 波长处的光密度(optical density,OD)值。

2.4.2 ALP 染色 取生长状态良好的第 3 代成骨细胞,按 $2 \times 10^4 \text{ 个} \cdot \text{mL}^{-1}$ 密度接种于预置盖玻片的 2 个 24 孔板内,培养 2 周后取出 2 张细胞爬片,磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffer solution,PBS)冲洗后,丙酮固定 10 min,蒸馏水冲洗。入孵育液中,37 ℃ 孵育 5 h,自来水冲洗后,置于 2% 硝酸钴溶液中浸透 5 min,蒸馏水洗数次,再置入 1% 的硫化铵溶液(现配)中浸透 2~3 min,自来水冲洗,自然干燥后封固。

2.4.3 ALP 含量测定 取生长状态良好的第 3 代成骨细胞,按 $2 \times 10^4 \text{ 个} \cdot \text{mL}^{-1}$ 密度接种于 2 个 24 孔板内,培养 72 h 后各取 6 孔细胞用 0.1% TritonX-100 裂解后,收集裂解液按 ALP 检测试剂盒的说明进行加样操作,用分光光度计检测各管 OD 值,然后按 ALP 检测试剂盒说明书上的公式计算出 ALP 的含量。

2.4.4 矿化结节计数 采用 Von Kossa's 染色法。将细胞以 $5 \times 10^4 \text{ 个} \cdot \text{mL}^{-1}$ 接种于 24 孔板中,培养 2 周后分别取出 2 张细胞爬片,用 PBS 冲洗 2 次,丙酮固定 10 min,蒸馏水冲洗,放入 2% 硝酸银溶液中置于暗处 1 h,蒸馏水洗 3 次,5% 硫代硫酸钠溶液($0.1\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫代硫酸钠 5 g + 氢氧化钠 0.2 mL + 蒸馏水 100 mL)还原 1 h,干燥,封片。以边界清晰、短径 $> 200\text{ }\mu\text{m}$ 为标准,低倍镜下进行计数。每孔随机选取 5 个视野,取其平均数。

2.5 统计学方法 采用 SPSS14.0 统计软件对所得数据进行统计学处理。2 组患者性别的比较采用 Fisher 确切概率法,2 组患者年龄、血浆 CORT 与 ACTH 含量、成骨细胞 OD 值、ALP 含量、矿化结节数的组间比较采用 *t* 检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结 果

3.1 血浆 CORT 含量和 ACTH 含量 SANFH 组患者的血浆 CORT 含量和 ACTH 含量均较非 SANFH 组低(表 2)。

表 2 2 组髌关节置换术患者血浆 CORT 含量和 ACTH 含量比较

组别	CORT 含量($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	ACTH 含量($\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$)
SANFH 组	328.167 ± 27.499	11.450 ± 2.649
非 SANFH 组	380.500 ± 25.618	15.667 ± 3.751
<i>t</i> 值	3.411	2.249
<i>P</i> 值	0.007	0.048

3.2 成骨细胞形态 细胞悬液接种 24 h 后即可见部分圆形的单个核细胞贴壁;36 h 后贴壁的单个核细胞增多;72 h 后细胞大部分贴壁,并延伸呈成纤维样细胞形态:细胞呈梭形,有少量突起,细胞核较大;细胞生长至 7 d 后,细胞形态基本呈梭形,细胞相互融合成单层;随着培养时间的延长,形成多层细胞而重叠生长。成骨细胞 ALP 染色呈强阳性,细胞质中出现黑色、灰褐色颗粒状或片状沉淀;非 SANFH 组成骨细胞比 SANFH 组有不同程度的深染和范围扩大(图 1)。Von Kossa's 矿化结节染色显示,成骨细胞呈集落生长后开始形成矿化结节,细胞间出现致密的、圆形不透光团块,呈现片状的棕染;非 SANFH 组成骨细胞矿化结节数比 SANFH 组明显增多(图 2)。

3.3 成骨细胞 OD 值、ALP 含量及矿化结节数 SANFH 组患者的成骨细胞 OD 值、ALP 含量、矿化结节数均低于非 SANFH 组(表 3)。

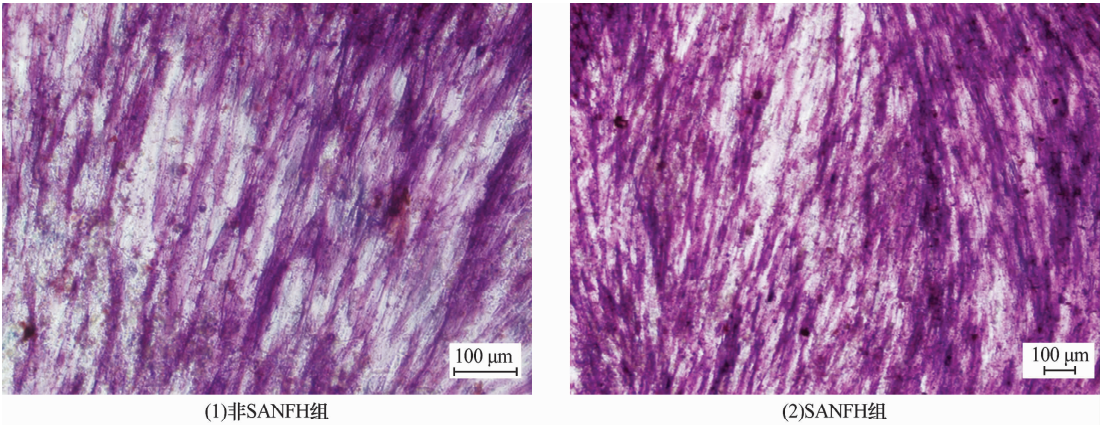


图 1 成骨细胞 ALP 染色 ×200

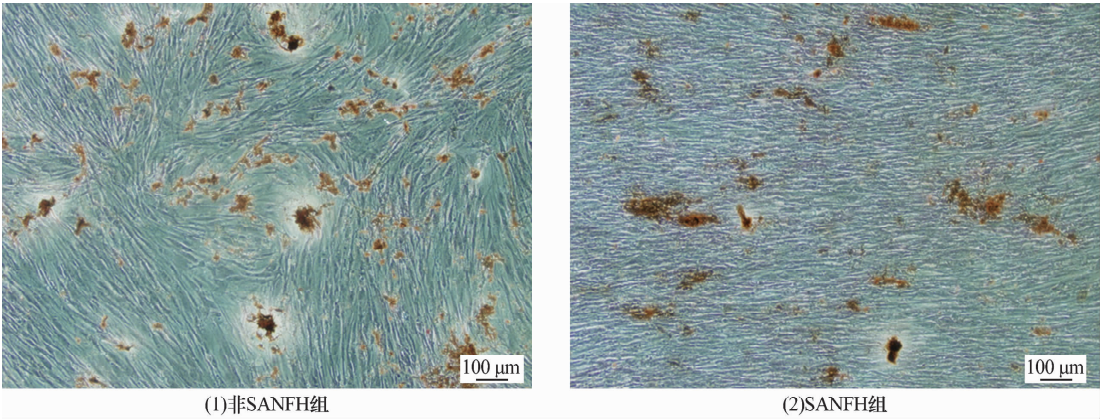


图 2 成骨细胞 Von Kossa's 矿化结节染色 ×10

表 3 2 组髌关节置换术患者成骨细胞 OD 值、ALP 含量和矿化结节数比较			
组别	OD 值	ALP 含量 (U · L ⁻¹)	矿化结节数 (个)
SANFH 组	0.174 ± 0.035	1.685 ± 0.323	18.000 ± 3.578
非 SANFH 组	0.233 ± 0.028	2.563 ± 0.446	23.833 ± 2.639
<i>t</i> 值	3.209	3.911	3.214
<i>P</i> 值	0.009	0.003	0.009

4 讨 论

中医理论认为“肾主骨,生髓”,肾与骨骼相互影响、相互作用,这为骨病从肾治奠定了理论基础。吴承亮等^[5]研究发现,具有补肾作用的右归饮可促进 MSCs 向成骨方向分化增殖,同时可以降低骨内压,改善股骨头内微循环,从而加速骨坏死的修复。赵万军等^[6]研究表明,温补肾阳的中药可以通过改善 HPA 轴、HPG 轴的功能,增加体内的性激素水平,抑制骨吸收,增加骨形成,从而起到防治 SANFH 的作用。我们以前的实验研究表明,在培养成骨细胞时,右归饮能促进 SANFH 骨髓的成骨细胞增殖,增加正常骨髓的成骨细胞矿化结节数和 ALP 含量^[7];在培养破骨细胞时,右归饮能抑制 SANFH 骨髓分化为破骨细胞^[8]。

以上研究结果均提示,右归饮能有效改善机体的肾虚状态,促进 MSCs 分化为成骨细胞并增加其活性,同时抑制 MSCs 分化为破骨细胞并降低其活性。这可能是右归饮治疗 SANFH 的作用机理,同时也为中医“肾主骨”理论提供了实验依据。

人体在长时间或大剂量地使用激素后,往往会出现中医肾阳虚的证候群。蔡定芳等^[1]从神经内分泌学方面验证了肾阳虚与 HPA 轴、HPT 轴、HPG 轴有关。肖鲁伟等^[2]的实验研究显示, SANFH 家兔的 HPA 轴从形态到功能均发生变化,表现为血浆 CORT、ACTH 降低,垂体、肾上腺重量减轻,镜下观察垂体、肾上腺明显萎缩,尤以肾上腺皮质萎缩更加明显,从而认为 SANFH 与肾阳虚证之间关系密切。骨和骨髓是 HPA 轴、HPT 轴、HPG 轴作用的靶器官。从中医角度理解为:MSCs 存在于骨髓中,属肾精所生,而在肾阳虚状态下,神经内分泌轴的功能紊乱,则 MSCs 的增殖转化活力就会衰退。股骨头近端骨髓丰富,与股骨头毗邻,最有可能成为股骨头处成骨细胞的种子细胞发源地。蔡定芳、肖鲁伟等^[1-2]的研究仅探讨了 HPA 轴、HPT 轴、HPG 轴的改变与肾阳虚有

关,没有从其靶器官骨和骨髓的功能改变的角度探讨 SANFH 发病的本质——肾阳虚。因此,立足于 HPA 轴,进一步对 MSCs 分化为成骨细胞的能力进行研究,将更能诠释 SANFH 发病的本质是肾阳虚这一观点。

中医基础理论认为肾阳是建立在肾气的基础上,具有温煦、蒸腾、气化、推动以及激发等生理作用,具体表现在能增强组织器官的功能活动,促进机体新陈代谢。在本研究中,SANFH 组患者的血浆 CORT 与 ACTH 含量均较非 SANFH 组偏低,说明 SANFH 患者的 HPA 轴存在不同环节、不同程度的功能紊乱;而其骨髓成骨细胞 OD 值、ALP 含量及矿化结节数均低于非 SANFH 组,说明 SANFH 患者的成骨细胞数量减少且分化成熟程度降低。本实验结果提示,SANFH 患者的 HPA 轴功能紊乱时,骨髓分化为成骨细胞的功能也会下降,并且伴有成骨细胞的活性下降,这可能是 SANFH 患者肾阳虚在骨关节系统的具体体现,是大剂量激素导致肾阳虚并最终导致股骨头坏死的细胞学基础。本实验是针对 SANFH 的肾阳虚本质学说从 HPA 轴理论向细胞分化理论进一步深入研究的尝试,使中医学“肾主骨,生髓”这一宏观理论在微观的细胞功能水平上得到初步证实。但体外细胞实验已脱离体内环境,且 MSCs 的分化、增殖在骨骼的重建中存在耦联机制,其间的相互接触和分子之间的信息传递对其各自的生理功能有很大的影响。因此,尽量

排除各种干扰因素,充分模拟机体内环境直至进行活体研究,是今后研究的方向。

5 参考文献

- [1] 蔡定芳,沈自尹,张玲娟,等. 右归饮对大鼠下丘脑-垂体-肾上腺-胸腺轴抑制模型的影响[J]. 中国免疫学杂志,1994,10(4):236-239.
- [2] 肖鲁伟,童培建,赵万军,等. 激素诱导股骨头坏死与肾阳虚之间的关系[J]. 中医正骨,1998,10(4):3-4.
- [3] 吴云刚,肖鲁伟,童培建. 激素性股骨头坏死患者股骨近端骨髓成骨活性下降的研究[J]. 中国中医骨伤科杂志,2008,16(6):18-20.
- [4] 全国中西医结合虚证与老年病专业委员会. 中医虚证辨证参考标准[J]. 中国中西医结合杂志,1986,6(11):593.
- [5] 吴承亮,季卫锋,俞索静,等. 右归饮对家兔激素性股骨头坏死骨髓脂肪化的影响[J]. 中医正骨,2006,18(7):4-5.
- [6] 赵万军,肖鲁伟,童培建,等. 右归饮、鹿马片对激素诱导的兔股骨头坏死的血浆雌二醇、睾酮的影响及疗效观察[J]. 中医正骨,2000,12(1):3-5.
- [7] 吴云刚,肖鲁伟,童培建. 右归饮对激素性股骨头坏死患者股骨近端骨髓成骨活性影响的实验研究[J]. 中国骨伤,2009,22(2):115-117.
- [8] 吴云刚,杜文喜,肖鲁伟,等. 从股骨近端骨髓分化为破骨细胞能力的改变探讨激素性股骨头的坏死机制[J]. 浙江实用医学,2010,15(4):256-258.

(2012-11-21 收稿 2012-12-05 修回)

· 通 知 ·

第 20 届全国中西医结合骨伤科学术研讨会 暨第 2 届中国医师协会中西医结合医师分会骨伤科专家委员会、 第 19 届浙江省中西医结合学会骨伤科专业委员会学术年会 征文通知

由中国中西医结合学会骨伤科专业委员会、中国医师协会中西医结合医师分会骨伤科专家委员会主办,浙江省中西医结合学会、浙江中医药大学、浙江省萧山市中医院承办的第 20 届全国中西医结合骨伤科学术研讨会暨第 2 届中国医师协会中西医结合医师分会骨伤科专家委员会、第 19 届浙江省中西医结合学会骨伤科专业委员会学术年会,将于 2013 年 6 月 21—23 日在浙江杭州召开。大会主题为“融汇中西、美丽骨伤”,大会将同时开设青年论坛。

征文内容:关节、脊柱、创伤、骨病、手足外科(包括显微外科)、小儿骨科及微创骨科、中医骨伤疗法等的基础、理论及临床研究;骨伤科康复、护理的相关研究。

征文要求:① 未公开发表过的论文。② 字数 2 000~5 000 字,且附有 500 字左右的结构式中文摘要(包括目的、方法、结果、结论)。③ 论文文责自负,请勿涉及保密内容。④ 务必注明作者姓名、单位名称、通讯地址、邮政编码、E-mail、手机号码及是否参加青年论坛,参加者请注明作者出生年月。⑤ 稿件请用 office2000 以上版本的 word 文档格式以“附件”形式发送至 gys15507@163.com,邮件主题请注明“会议投稿”。⑥ 截稿日期:2013 年 4 月 30 日。

联系人电话:孙燕 13958011323,陈欣怡 13867180693。