

基础研究

辛伐他汀促进脊髓损伤后神经功能
修复的实验研究韩晓光¹, 杨 宁¹, 徐迎胜², 朱静琳¹, 杨燕琳³, 宋纯理¹

(1 北京大学第三医院骨科; 2 神经内科; 3 中心实验室 100191 北京市)

【摘要】目的:探讨脊髓损伤后急性期应用辛伐他汀对大鼠脊髓神经功能修复的影响。**方法:**成年雌性 SD 大鼠 32 只, 假手术组(A 组)8 只, 只做椎板切除, 不损伤脊髓, 不给药, 重物坠落法制作脊髓损伤模型 24 只, 损伤大鼠随机分为三组: 羧甲基纤维素钠溶液组(B 组)、5mg/kg 辛伐他汀治疗组(C 组)和 10mg/kg 辛伐他汀治疗组(D 组)($n=8$)。术后 1d 开始灌胃给予辛伐他汀每天一次, 连续治疗 5 周。术后 1d、3d 以及 1~8 周, 进行 BBB 评分、斜板试验评价大鼠脊髓神经功能, 在第 8 周时电生理检测大鼠运动及感觉功能的恢复情况, 随后处死取材, 病理学检查(Luxol fast blue 染色)观察残余髓鞘情况。**结果:**术后 2 周时, BBB 评分 D 组高于 B 组($P<0.05$); 建模 3 周~8 周, BBB 评分 D 组及 C 组均高于 B 组($P<0.05$), 且 D 组最高($P<0.05$)。建模 3 周时, 斜板试验 D 组及 C 组均大于 B 组($P<0.05$), 且 4 周~8 周, D 组角度均大于 C 组($P<0.05$)。感觉诱发电位检查发现, D 组, C 组的潜伏期小于 B 组($P<0.05$), 且 D 组波幅高于 B 组($P<0.05$)。病理学检查, D 组, C 组比 B 组有更多的髓鞘残余($P<0.05$)。**结论:**辛伐他汀急性期治疗脊髓损伤可以促进大鼠损伤脊髓神经功能修复。

【关键词】脊髓损伤; 辛伐他汀; 电生理; 大鼠

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2011.03.14

中图分类号: R744.2, R965.1 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2011)-03-0234-05

Therapeutic effect of simvastatin for neurofunction recovery after spinal cord injury in rat/HAN Xiaoguang, YANG Ning, XU Yingsheng, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2011, 21(3): 234~238

【Abstract】 Objective: To determine the therapeutic efficacy of simvastatin for neurofunction recovery after acute spinal cord injury (SCI) in rat. **Method:** spinal cord injury was induced in adult female rats after laminectomy at T9-T10. The SCI animals were randomly divided into 3 groups: sham treated group; 5mg/kg and 10mg/kg simvastatin treated group ($n=8$). Simvastatin was administered orally at 1 day after SCI and then daily administration for 5 weeks. Locomotor functional recovery was assessed during 8 weeks after operation by performing open-field locomotor test and inclined-plane test. After that, motor evoked potentials (MEPs) and somatosensory evoked potential (SEPs) were assessed to evaluate the integrity of spinal cord pathways. Then the animals were killed and Luxol fast blue staining was used to assess the content of spared myelin. **Result:** At 2w after operation, the BBB score in group D was higher than that in group B ($P<0.05$). At 3w, the BBB scores in group D and C were higher than that in group B ($P<0.05$), further, the score in group D was higher than that in group C ($P<0.05$). At 3w after operation, the inclined plate angles in group D and C were higher than that in group B ($P<0.05$), further, at 4w, 5w, 7w and 8w, the angles in group D were higher than those in group C ($P<0.05$). As for the sensory evoked potential, the latency in group D and C were lower than that in group B ($P<0.05$), further, the latency in group D was more lower than that in group C ($P<0.05$); The amplitude in group D was higher than that of B group ($P<0.05$). For the motor evoked potential, the latency in group D and C were lower than that in group B ($P<0.05$), further, the amplitude in group D was more higher than that in group C ($P<0.05$). For the pathological, group D and C had more myelinated than group B ($P<0.05$). **Conclusion:** Acute administration of Simvastatin can improve neurofunction recovery after SCI.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30300352, 30772200)

第一作者简介: 男(1984-), 硕士研究生, 研究方向: 脊柱脊髓损伤

电话: (010)82266736 E-mail: hanxiaoguang@bjmu.edu.cn 通讯作者: 宋纯理 E-mail: schl@bjmu.edu.cn

【Key words】 Spinal cord injury; Simvastatin; Electrophysiology; Rat

【Author's address】 Department of Orthopaedics, Peking University Third Hospital, Beijing, 100191, China

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)常导致患者损伤节段平面以下运动和感觉功能不可逆性丧失,治疗难度较大。他汀类药物具有降脂、抗炎、抗氧化和神经保护等功能,国外研究报道在脊髓损伤前 1 周或损伤后 6h 内应用阿托他汀可以促进大鼠后肢运动功能的恢复^[1,2],但作用机理不明确,治疗时间多为损伤前或损伤后数小时^[3],临床应用受限。笔者拟在大鼠脊髓损伤后 1d 给予辛伐他汀治疗,通过行为学、电生理及病理学研究,探讨其作用机制,为他汀类药物治疗脊髓损伤提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 动物分组及模型制作

成年雌性 SD 大鼠 32 只,体重 250~300g,由北京大学医学部动物部提供。1%戊巴比妥钠(50mg/kg)腹腔注射麻醉,俯卧位固定,无菌条件下显露 T9~T10 椎板棘突,切除椎板,暴露硬脊膜,重物坠落法(10g×4cm)制作脊髓损伤模型^[4],假手术组(A 组)仅行椎板切除。术后单笼饲养,每天两次人工排尿直至动物自行排尿恢复为止,术后如有大鼠死亡及时补充。脊髓损伤模型制作成功的标准为打击后脊髓组织水肿,硬膜下充血、出血,且术后 24h 行为学检查 BBB(Basso-Beattie-Bresnahan)评分 ≤ 1 分。取造模成功大鼠 24 只随机分为 3 组($n=8$):羧甲基纤维素钠(carboxymethyl cellulose sodium, CMC-Na)溶液组(B 组);5mg/kg 辛伐他汀治疗组(C 组);10mg/kg 辛伐他汀治疗组(D 组)。辛伐他汀混悬于 CMC-Na 溶液中,术后 1d 开始灌胃给药,每天一次连续五周,在相同时间点,对照组大鼠给予单纯的 CMC-Na 溶液。

1.2 行为学评分

分别于术前、术后 1d、3d 以及随后的 1~8 周进行大鼠 BBB 评分。将动物置于宽阔场地自由活动 5min,观察其后肢运动情况,左右两侧肢体分别评分,取平均值为每只大鼠的功能得分。之后进行斜板试验,将大鼠置于一长方形木制斜板上,大鼠身体纵线与斜板纵轴垂直放置,逐渐升高斜板高度,记录大鼠在斜板上停留 5s 的最大角度值,

每只动物测 5 次,取其平均值为最终测定角度。BBB 评分人员为双盲。

1.3 电生理检查测量

术后 56d 利用肌电图-诱发电位仪(cadwell cascade)进行电生理检测,腹腔注射戊巴比妥钠麻醉,保持大鼠体温在 37~38℃。首先行运动诱发电位(motor evoked potential, MEP)检测,刺激电极为针电极,阳极置于大鼠皮层感觉运动区皮下,阴极置于上额部。给予矩形脉冲刺激,刺激强度 25mA,波宽 50ms,频率 3Hz,记录电极置于大鼠下肢胫前肌,参考电极置于足垫部,滤波器带通为 10~3000Hz,采用触发方式,不做平均。随后进行感觉诱发电位(somatosensory evoked potential, SEP)检测,将针状刺激电极置于下肢外踝部,以电压脉冲方式刺激双侧胫后神经,波宽 100ms,频率 2.72Hz,强度 2mA,以引起大鼠足趾轻微收缩为宜,记录电极置于动物感觉皮层表面,参考电极置于鼻根部皮下,滤波带通为 100~1000Hz,平均 200 次。通过测定感觉诱发电位(SEPs)和运动诱发电位(MEPs)的潜伏期和波幅来比较电生理结果。

1.4 病理学观察

术后 56d 时,过量戊巴比妥钠注射处死所有大鼠,经左心室灌注冰生理盐水约 200ml 至流出澄清液,再用 4%的多聚甲醛约 200ml 灌注固定,以损伤中心区为中点取损伤段约 1cm 脊髓组织,4%多聚甲醛溶液后固定 6~8h,30%蔗糖溶液脱水至组织沉底,OCT 包埋后冰冻切片,片厚 20 μ m,每 500 μ m 进行切片,切片中残存面积最少的设定为为损伤中心,损伤中心相邻的腹侧、头侧再各取 8 张切片(共 17 张),行 Luxol Fast Blue (LFB)特殊染色,显微镜下观察摄影,利用数字图像分析仪进行定量分析每张切片残存髓鞘(LFB 着色部位)的面积。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 13.0 进行数据处理,计量资料用均数 $\pm$ 标准差表示。多组数据间比较采用方差检验(ANOVA),各组间均数比较用 t 检验,设 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 行为学评分结果

术后 BBB 评分结果见表 1。斜板实验结果见表 2, D 组与 C 组大鼠的行为学随着时间延长有不同改善($P<0.05$)。

2.2 电生理检查结果

感觉诱发电位结果见表 3。D 组, C 组的潜伏期小于 B 组($P<0.05$), 且 D 组的潜伏期小于 C 组($P<0.05$); D 组波幅高于 B 组($P<0.05$)。运动诱发电位结果见表 4。D 组, C 组潜伏期小于 B 组

($P<0.05$), 且 D 组波幅高于 B 组($P<0.05$)。

2.3 病理学检查结果

切片经 LFB 染色后, 髓鞘呈现蓝色, 灰质为红色(图 2), 计算各张切片残余髓鞘的面积, 发现 D、C 组大鼠的髓鞘残余明显多于 B 组。此外, 与 C 组相比, D 组大鼠具有较多的髓鞘残余(表 5)。

3 讨论

他汀类药物作为胆固醇合成的限速酶, 在临床上被广泛应用于降低血清胆固醇和心脑血管疾病的一级预防。最近研究发现, 他汀类药物还具有促进成骨、抗炎、抗氧化和神经保护等功用^[5]。在大鼠脑梗死或脑损伤后, 应用他汀类药物治疗可以明显促进神经再生和运动功能恢复, 在损伤后 1d 开始治疗仍有作用^[6,7]。Punnu 等首次报道在大

表 1 BBB 评分结果 (n=8)

术后时间	A组	B组	C组	D组
1d	21	0±0	0±0	0±0
3d	21	1.44±0.46	1.78±0.44	3.06±0.98
1周	21	7.17±0.79	7.88±1.34	10.1±0.96
2周	21	10.11±0.89	11.33±1.39	13.61±0.60 ^①
3周	21	11.44±1.10	13.17±1.32 ^①	14.67±0.61 ^{①②}
4周	21	11.72±1.425	14.22±0.94 ^①	15.72±0.62 ^{①②}
5周	21	11.78±0.94	14.72±0.90 ^①	16.06±0.73 ^{①②}
6周	21	12.17±0.75	14.83±0.92 ^①	16.11±0.70 ^{①②}
7周	21	12.22±0.83	15.03±0.90 ^①	16.72±0.71 ^{①②}
8周	21	12.33±0.75	15.14±0.95 ^①	16.79±0.74 ^{①②}

注: ①与 B 组相比较 $P<0.05$; ②与 C 组比较 $P<0.05$

表 2 斜板试验结果 (n=8)

术后时间	A组	B组	C组	D组
1d	79.55±3.54	32.56±1.74	34.11±2.2	36.78±3.54
3d	81.11±2.52	34.89±2.32	38.56±2.40	39.89±2.52
1周	81.44±2.70	42.11±4.08	42.88±3.22	45.67±2.73
2周	79.78±2.68	50.33±5.41	55.78±4.91	63.44±2.68
3周	82.56±1.59	55.78±5.48	60.78±4.82 ^①	68.22±1.59 ^①
4周	77.44±2.4	55.89±3.19	61.11±3.4 ^①	68.22±2.4 ^{①②}
5周	82.66±2.15	57.11±3.76	62.89±2.93 ^①	69.22±2.15 ^{①②}
6周	79.67±2.55	57.33±2.78	64.11±3.22 ^①	67.67±2.55 ^①
7周	82.56±3.12	56.89±2.67	64.67±4.35 ^①	70.00±3.12 ^{①②}
8周	83.11±2.32	58.33±3.5	66.44±3.94 ^①	71.22±2.32 ^{①②}

注: ①与 B 组相比较 $P<0.05$; ②与 C 组比较 $P<0.05$

表 3 感觉诱发电位(SEPs)结果 (n=8)

组别	SEPs			
	潜伏期(ms)		波幅(mV)	
	左侧	右侧	左侧	右侧
A组	16.1±0.7	16.0±0.6	5.0±0.8	4.8±1.1
B组	21.5±1.6	21.5±1.8	1.8±0.8	1.9±0.5
C组	19.8±1.3 ^①	20.4±2.1 ^①	2.0±0.5 ^①	1.9±0.8 ^①
D组	18.1±0.4 ^{②③}	17.2±0.8 ^{②③}	2.6±0.4 ^①	2.5±0.4 ^①

注: ①与 B 组相比较 $P<0.05$, ② $P<0.01$; ③与 C 组比较 $P<0.05$

表 4 运动诱发电位(MEPs)结果 (n=8)

组别	MEPs			
	潜伏期(ms)		波幅(mV)	
	左侧	右侧	左侧	右侧
A组	6.8±0.4	6.9±0.7	126.2±114.1	1290.2±124.0
B组	24.5±0.6	23.4±1.2	62.5±26.4	67.5±20.8
C组	23.1±1.3	23.0±1.6	69.9±20.1	72.3±25.3
D组	20.9±0.9 ^①	20.6±1.7 ^①	154.4±32.1 ^①	167.9±29.9 ^①

注: ①与 B 组相比较 $P<0.05$; ②与 C 组比较 $P<0.05$

表 5 LFB 染色结果

具中心距离	B组	C组	D组
-4	64%±1%	65%±2%	65%±1%
-3.5	64%±1%	65%±1%	65%±2%
-3.0	61%±2%	64%±3%	65%±2%
-2.5	57%±1%	60%±3%	63%±1%
-2	53%±3%	56%±2%	61%±3% ^{①③}
-1.5	47%±3%	52%±2% ^①	58%±3% ^{②③}
-1	40%±2%	45%±3% ^①	49%±3% ^①
-0.5	30%±3%	35%±3% ^①	40%±2% ^①
0	28%±2%	31%±2% ^①	35%±3% ^①
0.5	30%±3%	35%±3% ^①	40%±2% ^①
1.0	37%±3%	41%±2%	46%±3% ^{①③}
1.5	43%±2%	50%±2% ^①	54%±3% ^{②③}
2.0	48%±2%	54%±2% ^①	59%±2% ^{②③}
2.5	55%±2%	59%±4%	61%±2% ^①
3.0	60%±2%	62%±3%	64%±2% ^①
3.5	63%±1%	64%±3%	65%±2%
4.0	65%±1%	65%±2%	66%±3%

注: ①与 B 组相比较 $P<0.05$, ② $P<0.05$; ③与 C 组比较 $P<0.05$

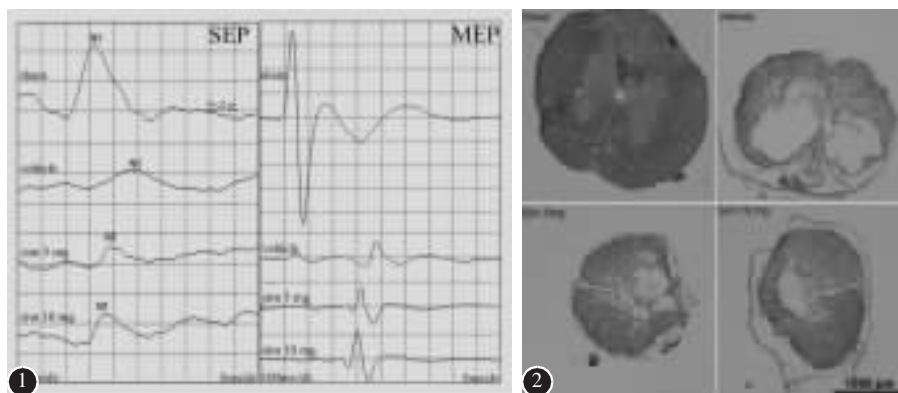


图 1 A、B、C 及 D 各组的电生理图形 图 2 A、B、C 及 D 各组特征性的 LFB 染色

鼠脊髓损伤前一周或损伤后数小时内应用阿托尔他汀可以明显减少神经细胞的凋亡,促进运动功能的恢复,但作用机制尚不明确,可能与他汀类药物的抗炎作用有关^[1,2],但是炎症反应在脊髓损伤中的作用还存在争议,且目前研究的给药时间多集中在损伤前或损伤后数小时内,治疗时间窗较窄。

重物坠落法制作脊髓损伤模型,能够较好的模拟人类脊髓损伤的病理生理特点及变化规律,我们在脊髓损伤 24h 对大鼠行为学评分,剔除不符合要求大鼠,之后随机分组。神经诱发电位作为一种比较客观、准确的指标,被越来越多地应用于脊髓损伤程度判断及疗效评估。MEP 和 CSEP 的主要神经传导通路分别对应于脊髓腹侧和背侧部分,即 CSEP 主要沿着脊髓背侧上行通路传导,而 MEP 主要沿着脊髓腹侧下行传导通路传导,因此两者联合应用再结合行为学评分及病理学检查,可较全面、可靠的评价大鼠脊髓功能的恢复情况。

与其他他汀类药物相比,辛伐他汀为脂溶性,较易通过血脑屏障,在脑损伤中具有较强的神经保护和神经再生功能^[8],选用剂量分别为 5mg/kg 和 10mg/kg^[9],持续给药 5 周。空白对照组大鼠运动功能也有一定的恢复,但恢复程度较小,第 3 周后基本稳定,而辛伐他汀治疗组大鼠运动功能恢复明显,且持续时间长。电生理和病理学检查发现辛伐他汀组大鼠具有较好的电生理指标和较多髓鞘残余,大剂量治疗组恢复效果最好,故辛伐他汀治疗可以促进大鼠脊髓损伤后运动功能的恢复,且和药物剂量有一定关系。

脊髓损伤主要包括原发性损伤和继发性损伤,是一个复杂的多机制过程。脊髓损伤后髓鞘的丢失,引起运动功能的丧失,运动功能的恢复情况

常与髓鞘的修复密切相关^[10]。国外研究表明他汀类药物能够保护少突胶质前体细胞,促进向成熟的少突胶质细胞分化,进而促进髓鞘再生^[11]。本研究发现辛伐他汀治疗可以明显减少髓鞘的损失,最终促进运动功能的恢复。脊髓损伤后的局部缺血是引起继发性损伤的主要原因,而血管生成是脊髓损伤修复的重要组成部分^[12]。研究发现他汀类药物可以动员内皮祖细胞到外周血^[13],促进血管再生,改善局部缺血环境,他汀类药物还可以促进血管生成、神经再生、突触再生,而改善大鼠运动功能^[7,14,15],但在脊髓损伤后应用他汀类药物治疗是否通过改善损伤部位缺血环境,促进髓鞘再生,从而促进运动功能恢复,尚需进一步研究;电生理检查在脊髓损伤临床诊断、治疗及预后评估方面的应用及其作用机制尚需大样本、多中心进一步研究。

4 参考文献

1. Pannu R, Christie DK, Barbosa E, et al. Post-trauma Lipitor treatment prevents endothelial dysfunction, facilitates neuroprotection, and promotes locomotor recovery following spinal cord injury[J]. *J Neurochem*, 2007, 101(1): 182-200.
2. Pannu R, Barbosa E, Singh AK, et al. Attenuation of acute inflammatory response by atorvastatin after spinal cord injury in rats[J]. *J Neurosci Res*, 2005, 79(3): 340-350.
3. Chan CC. Inflammation: beneficial or detrimental after spinal cord injury[J]. *Recent Pat CNS Drug Discov*, 2008, 3(3): 189-199.
4. Han X, Yang N, Xu Y, et al. Simvastatin treatment improves functional recovery after experimental spinal cord injury by upregulating the expression of BDNF and GDNF[J]. *Neurosci Lett*, 2011, 487(3): 255-259.
5. Song C, Guo Z, Ma Q, et al. Simvastatin induces osteoblastic differentiation and inhibits adipocytic differentiation in mouse bone marrow stromal cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*,

- 2003, 308(3): 458-462.
6. Lu D, Goussev A, Chen J, et al. Atorvastatin reduces neurological deficit and increases synaptogenesis, angiogenesis, and neuronal survival in rats subjected to traumatic brain injury[J]. J Neurotrauma, 2004, 21(1): 21-32.
 7. Wu H, Lu D, Jiang H, et al. Simvastatin-mediated upregulation of VEGF and BDNF, activation of the PI3K/Akt pathway, and increase of neurogenesis are associated with therapeutic improvement after traumatic brain injury[J]. J Neurotrauma, 2008, 25(2): 130-139.
 8. Karki K, Knight RA, Han Y, et al. Simvastatin and atorvastatin improve neurological outcome after experimental intracerebral hemorrhage[J]. Stroke, 2009, 40(10): 3384-3389.
 9. Shunmugavel A, Khan M, Te CP, et al. Simvastatin protects bladder and renal functions following spinal cord injury in rats[J]. J Inflamm (Lond), 2010, 7(1): 17.
 10. Wu B, Ren X. Promoting axonal myelination for improving neurological recovery in spinal cord injury [J]. Journal Neurotrauma, 2009, 26(10): 1847-1856.
 11. Paintlia AS, Paintlia MK, Khan M, et al. HMG-CoA reductase inhibitor augments survival and differentiation of oligodendrocyte progenitors in animal model of multiple sclerosis[J]. FASEB J, 2005, 19(11): 1407-1421.
 12. Sasaki H, Ishikawa M, Tanaka N, et al. Administration of human peripheral blood-derived CD133+ cells accelerates functional recovery in a rat spinal cord injury model[J]. Spine, 2009, 34(3): 249-254.
 13. 宋泉生, 王晶莹, 朱静琳, 等. 辛伐他汀对骨髓源性内皮祖细胞动员及迁移的影响 [J]. 中国微创外科杂志, 2009, 9 (12): 1152-1155.
 14. Chen J, Zhang ZG, Li Y, et al. Statins induce angiogenesis, neurogenesis and synaptogenesis after stroke [J]. Ann Neurol, 2003, 53(6): 743-751.
 15. Lu D, Qu C, Goussev A, et al. Statins increase neurogenesis in the dentate gyrus, reduce delayed neuronal death in the hippocampal CA3 region, and improve spatial learning in rat after traumatic brain injury [J]. J Neurotrauma, 2007, 24 (7): 1132-1146.
- (收稿日期: 2010-09-21 修回日期: 2010-12-22)
(英文编审 蒋欣/刘思麒)
(本文编辑 刘彦)

消息

第十一届全国经椎弓根内固定学习班暨脊柱固定新理念研讨会通知

近 20 年来国内外脊柱内固定器械发展迅猛, 内固定的应用领域也不断拓宽, 取得了明显疗效。但同时也出现了只重视内固定而忽视融合的问题, 结果使部分疗效丧失, 内固定失败率增高等问题也日渐突出。另一方面, 在融合基础上发展起来的脊柱非融合技术(人工椎间盘、动态内固定等)也快速发展, 但适应证选择存在较多争议。为了加强对脊柱融合重要性及非融合技术的正确认识, 中华医学会骨科分会脊柱学组、《中华骨科杂志》、《中国脊柱脊髓杂志》、《脊柱外科杂志》和海军总医院骨科拟定于 2011 年 4 月中旬在北京联合举办第十一届全国经椎弓根内固定学习班暨脊柱固定新理念研讨会, 届时邀请国内著名脊柱外科专家做专题报告, 同时安排学员进行尸体标本(或模型)操作训练。现将有关事宜通知如下:

时间:2011 年 4 月 15~19 日。**地点:**北京。

内容:(一)学习班授课及专题研讨内容:(1)颈胸腰椎椎弓根应用解剖学研究;(2)经椎弓根内固定生物力学研究;(3)颈椎经椎弓根内固定及侧块螺钉内固定;(4)经椎弓根内固定的并发症与其预防措施;(5)后路腰椎间融合术(PLIF)、前路腰椎间融合(ALIF)及后外侧融合(PLF)的适应证及其优缺点;(6)前路植骨融合在胸腰段骨折治疗中的作用;(7)脊柱手术并发症分析与处理;(8)人工颈、腰椎间盘置换的临床应用;(9)椎间盘源性腰痛的诊断与治疗原则;(10)导航系统在脊柱经椎弓根内固定中的应用;(11)棘突间非融合系统、动态内固定系统的临床应用等。(二)实践内容:(1)标本操作:学员 6~8 人为一组, 利用尸体脊柱标本(或模型)进行颈椎或胸腰椎椎弓根螺钉及人工椎间盘操作练习;(2)看手术录像:通过操作及观看手术录像提高对经椎弓根内固定应用技术的理性及实践认识。

报名及征文:北京阜成路 6 号海军总医院骨科何勃主任收, 邮编 100048。截止日期:2011 年 3 月 31 日。有意大会发言者请寄 500~800 字摘要(最好 E-mail 发送), 欢迎代表自带争议性病例参会并进行现场讨论。联系电话:010-68780323, 010-66958224, E-mail: nghortho@yahoo.com.cn。

费用:参加学习班及研讨会的学员每人交会务费资料费 1000 元, 同时参加标本操作者每人交材料费 500 元, 统一安排食宿, 费用自理。本学习班属国家级继续教育 I 类项目, 学习结束颁发结业证书, 记 6 学分。