

基于差异凝胶双向电泳技术的冠心病不稳定性心绞痛血瘀证患者血浆差异蛋白特征研究

赵慧辉 陈建新 史琦 王伟

摘要 目的 通过对冠心病心绞痛血瘀证患者和健康人血浆的差异凝胶电泳图谱检测,寻找其血浆差异蛋白,探索其蛋白质组学特点。**方法** 采用差异凝胶双向电泳和串联质谱对 12 例冠心病不稳定性心绞痛气虚血瘀证患者、12 例痰瘀互阻证患者和 12 名健康人去高丰度蛋白血浆进行比较蛋白质组学研究,寻找心绞痛血瘀证血浆差异蛋白。**结果** 初步发现在冠心病不稳定性心绞痛气虚血瘀证和痰瘀互阻证两组患者表达均变化的蛋白有 Haptoglobin β chain、DBP、HBB、HBA、Transthyretin、ApoA- I、ApoA-IV。仅在冠心病不稳定性心绞痛痰瘀互阻证表达变化的蛋白有 Haptoglobin $\alpha 1$ chain、 $\alpha 1$ -acid glycoprotein、ApoC-III、ApoA- II、ApoC- II、ApoJ、Haptoglobin $\alpha 2$ chain。仅在冠心病不稳定性心绞痛气虚血瘀证表达变化的蛋白 $\alpha 1$ -antitrypsin、Fibrinogen γ chain、Fibrin β 。**结论** 冠心病不稳定性心绞痛气虚血瘀证与痰瘀互阻证在蛋白质层面的部分共性特征表现为炎症反应、代谢紊乱(包括血脂、血氧等)。

关键词 不稳定性心绞痛;血瘀证;差异凝胶双向电泳;蛋白质组学

Gel Electrophoresis Analysis on Plasma Differential Protein in Patients with Unstable Angina of Blood-stasis Pattern ZHAO Hui-hui, CHEN Jian-xin, SHI Qi, et al *Beijing University of Chinese Medicine, Beijing (100029)*

ABSTRACT Objective To seek the plasma differential proteins in patients with unstable angina of blood-stasis pattern (UA-BSS) for exploring the proteomic specialty in them by way of two-dimensional difference gel electrophoresis (DIGE) detection on plasma of patients and healthy persons. **Methods** Using DIGE and tandem mass spectrometry, comparative proteomic study was conducted on the plasma of 12 UA patients of qi-deficiency and blood-stasis pattern (UA-QBS), 12 UA patients of phlegm-stasis cross-blocking pattern (UA-PSS) and 12 healthy volunteers. **Results** Preliminary results showed that Haptoglobin β chain, DBP, HBB, HBA, Transthyretin, ApoA- I, ApoA-IV were significantly differentially expressed in both patterns, while Haptoglobin $\alpha 1$ chain, $\alpha 1$ -acid glycoprotein, ApoC-III, ApoA- II, ApoC- II, ApoJ, and Haptoglobin $\alpha 2$ chain were only seen differentially expressed in the UA-PSS patients, $\alpha 1$ -antitrypsin, Fibrinogen γ chain, and Fibrin β were only seen differentially expressed in UA-QBS patients. **Conclusion** The common proteomics characteristics of patients of QBS and PSS patterns may be correlated with inflammatory reaction and metabolic disturbance (including blood lipid and blood oxygen).

KEYWORDS unstable angina; blood-stasis pattern; two-dimensional difference gel electrophoresis; proteomics; biomarker

冠心病(coronary heart disease, CHD)不稳定性心绞痛(unstable angina, UA)已经成为严重危害中国中老年人群健康的重大疾病,但其发病机制目前仍然不完全清楚。蛋白质组学技术的出现,可能为发现其特

征性蛋白提供一定的线索。笔者前期分别采用无标记定量^[1]、双向凝胶电泳^[2]和差异凝胶电泳^[3]技术发现冠心病心绞痛血瘀证患者和对照组人群血浆的确存在差异表达,由于血浆中最高丰度的 6 种蛋白在血浆中占到 85%,严重影响了更多更有意义的低丰度蛋白的检测,同时要进一步探讨心绞痛气虚血瘀证、痰瘀互阻证各自的蛋白质组学特征,并提高研究的准确性和重复性,现采用差异凝胶双向电泳(two-dimensional difference gel electrophoresis, 2D-DIGE)技术对冠心病心绞痛患者和对照组人群去高丰度蛋白血浆进行比较

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(No. 2003CB517105);国家自然科学基金资助项目(No. 30902020);国家科技重大专项基金资助项目(No. 2009ZX09502-018)

作者单位:北京中医药大学(北京 100029)

通讯作者:王伟, Tel: 010-64286283, E-mail: wangwei@bucm.

研究。

材料与方法

1 一般资料 依照下述纳入与排除标准选取 12 例冠心病不稳定心绞痛痰瘀互阻证、12 例冠心病不稳定心绞痛气虚血瘀证患者。其中男 10 例,女 14 例,来自北京中医药大学东直门医院心内科 2006 年 11 月—2008 年 3 月的住院患者,年龄为 55~75 岁,平均(66±9)岁。12 名健康人,男 6 名,女 6 名,为北京中医药大学体检正常的职工,年龄为 55~70 岁,平均(63±7)岁,无血瘀证表现。

诊断标准参照中华医学会心血管病学分会 2000 年制订的“不稳定性心绞痛诊断和治疗建议”标准^[4]。中医辨证分型标准参照《中药新药临床研究指导原则》^[5]。

纳入标准:(1)符合冠心病心绞痛诊断者;(2)符合冠心病中医气虚血瘀证或痰瘀互阻证诊断者;(3)年龄 55~70 岁;(4)自愿签订知情同意书者。

排除标准:排除急性心肌梗死、心肌炎、心脏神经官能症、肋间神经痛;其他疾病引起的心绞痛,如风湿热、梅毒、先天性冠脉畸形、肥厚型心肌病、主动脉瓣狭窄或关闭不全者;合并有脑中风、糖尿病、肺部感染、肾炎、肾衰、泌尿系感染、风湿病、肝、肾、造血系统、内分泌系统等严重疾病及骨关节病者;妊娠期或哺乳期女性,过敏体质患者。

2 样本采集 患者均于入院 2 天内清晨空腹肘静脉取血 2 mL,EDTA 抗凝,经 4℃,3 000 r/min,离心 10 min,取上清,分装,-80℃保存。正常人也于清晨空腹肘静脉取血,方法同上。

3 材料 pH4-7 固相 pH 梯度干胶条(IPG)、IPG buffer(pH4-7)、3-[(3-胆酰胺丙基)-二乙胺]-丙磺酸(CHAPS)、二硫苏糖醇(DTT)、矿物油、尿素、丙烯酰胺、甲叉丙烯酰胺、十二烷基磺酸钠(SDS)、CyDye 染料、考马斯亮蓝 R350 购自美国 GE 公司,过硫酸铵(AP)、琼脂糖(Agarose)、甘氨酸(Glycine)购自美国 Amresco 公司,其他试剂购自北京试剂公司。实验用水为 Milli-Q 去离子水。

4 仪器 Ettan IPGphor II 等电聚焦仪、Ettan DALT six 双向垂直电泳仪、Multi Temp III 温控循环水浴、EPS601 电源、Typhoon Imager 940 成像仪均为美国 GE 公司产品。质谱仪为 Bruker 公司 Ultraflex tof/tof 及美国 ABI-4800 型反射式基质辅助激光解吸附飞行时间串联质谱。

5 血浆高丰度蛋白的去除 采用美国 Agilent 抗

体柱(4.6×50mm Hu6-HC)特异性去除血浆中 6 种丰度最高的蛋白(albumin, IgG, IgA, antitrypsin, transferrin, haptoglobin)。

6 CyDye 染料标记(表 1) 3 组样品均以 3 例做一混合样本。内标由各样品等量混合而成,总量为 50 μg。样品分别使用 3 种特殊的荧光染料 Cy2、Cy3、Cy5,以 50 μg 蛋白:200 pmol 荧光染料的比例进行标记反应,标记反应在冰浴、无光的条件下进行 30 min,然后加入 20 mmol/L 赖氨酸,继续冰浴 10 min,终止标记反应。

表 1 CyDye 染料标记方法

胶	Cy2	Cy3	Cy5
1	pool	A2	C1
2	pool	B2	C3
3	pool	A1	B1
4	pool	B4	A4
5	pool	C2	A3
6	pool	C4	B3

7 2D-DIGE 参照 Amersham 公司双向电泳手册的方法进行。采用 24 cm IPG 预制胶条(pH 3-10NL)。用 Bradford 法进行蛋白定量,再用水化液调整到合适浓度后上样。蛋白质上样量 50 μg,梯度升压,等电聚焦总伏小时为 100 kVh。平衡后胶条转移至 13.5% 十二烷基磺酸钠——聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)上进行第 2 向电泳。16℃恒温,采用恒功率电泳,开始时 2.5 W/gel,1 h;再用 15 W/gel 至溴酚蓝到达凝胶的底部边缘。

8 胶图扫描及图像分析 电泳后的胶板图像通过 Typhoon Imager 9400 成像仪获取,采用 DeCyder V6.0 软件进行凝胶的蛋白点检测及匹配,配合三维图像、Histogram 及人工校对等方法,以保证点检测及匹配的准确性。

9 统计学方法 采用 DeCyder V 6.0 软件中的胶内差异分析(differential in-gel analysis, DIA)及生物学差异分析(biological variation analysis, BVA)软件进行统计分析。多组间比较用单因素方差分析,然后两组间比较使用 Student's-*t* 检验,所有统计分析均由软件自动完成,检验水准 α=0.05。

10 质谱鉴定 切割蛋白质点置于 Eppendorf 管中,进行胶内蛋白质酶解后,通过 Bruker 质谱仪进行分析,获取蛋白样品的肽质量指纹图(由北京华大蛋白质组研发中心完成),最后应用 Mascot 软件在人类蛋白质公共数据库(NCBI/SWISS-PROT)中搜寻,获得蛋白质的相关信息。

结 果

1 分析胶成像(图1) 经过差异凝胶双向电泳,得到了较清晰的蛋白质表达谱,经 DeCyder 软件处理,不同染料标记的样本呈现不同颜色的图谱,蓝色图谱为内标,由 Cy2 标记;绿色图谱为正常组样本,由 Cy3 标记;红色图谱为心绞痛血瘀证患者的血浆样本,由 Cy5 标记。

2 差异蛋白点的图像分析结果 经 DeCyder V 6.0 软件分析,根据 1.5 倍差异表达作为标准,发现与健康人比较,在两组患者表达均变化的蛋白点有 21 个,仅在冠心病不稳定性心绞痛痰瘀互阻证表达变化的蛋白点有 17 个,仅在冠心病不稳定性心绞痛气虚血瘀证表达变化的蛋白点有 6 个。

3 差异蛋白点的质谱分析及搜库结果

3.1 两组均变化的蛋白(表2) 与健康人比较,两组患者表达均变化的蛋白点有 21 个,质谱搜库鉴定出 7 种蛋白质。

表2 在两组患者表达均变化的差异蛋白点的质谱搜库鉴定结果

序 号	鉴 定 方 法	数 据 库 检 索 号	蛋 白 质 名 称	分 子 量	等 电 点	得 分	冠 心 病 不 稳 定 性 心 绞 痛 两 证 与 健 康 人 表 达 量 的 比 值	
							气 虚 血 瘀 互 阻 证	痰 瘀 互 阻 证
1	MS-MS	IPI00641737	Haptoglobin β chain (结合珠蛋白 β 链)	46693.4	6.28	267	3.22	2.78
2	MS	gi118655424	DBP (维生素 D 结合蛋白)	52780	5.17	171	1.51	1.53
3	MS-MS	IPI00654755	HBB (血红素蛋白 β 链)	15857.2	6.81	403	-1.91	-3.32
4	MS-MS	IPI00410714	HBA (血红素蛋白 α 链)	15116.9	8.73	262	-1.59	-1.88
5	MS-MS	IPI00022432	Transthyretin (甲状腺素转运蛋白)	15877	5.52	371	-1.55	-1.53
6	MS	gi12914175	Apo A-I (载脂蛋白 A-I)	23389	5.55	114	-1.55	-1.50
7	MS	gi1178779	ApoA-IV (载脂蛋白 A-IV)	43358	5.22	212	-3.18	-3.32

注:Mw 为分子量,pI 为等电点

3.2 仅在冠心病不稳定性心绞痛痰瘀互阻证表达变化的蛋白(表3) 仅在冠心病不稳定性心绞痛痰瘀互阻证表达变化的蛋白点有 17 个,经质谱搜库鉴定出 7 种蛋白质。

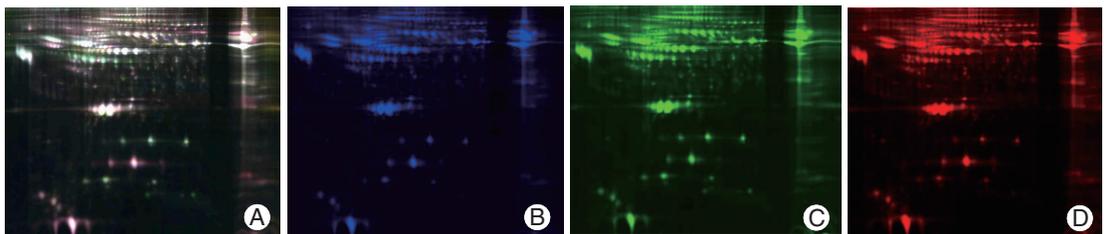
表3 仅在冠心病不稳定性心绞痛痰瘀互阻证表达变化的蛋白点及质谱鉴定结果

序 号	鉴 定 方 法	数 据 库 检 索 号	蛋 白 质 名 称	分 子 量	等 电 点	得 分	与 健 康 人 表 达 量 的 比 值
1	MS	gi13337390	Haptoglobin α1 chain (结合珠蛋白 α1 链)	38209.2	6.14	267	2.02
2	MS-MS	IPI00022429	α-1-acid glycoprotein 1 (α-1-酸性糖蛋白)	23496.8	4.93	385	1.55
3	MS-MS	IPI00021857	ApoC-III (载脂蛋白 C-III)	10845.5	5.23	161	-1.63
4	MS-MS	IPI00021854	ApoA-II (载脂蛋白 A-II)	11167.9	6.26	179	-2.44
5	MS-MS	IPI00021856	ApoC-II (载脂蛋白 C-II)	11276.8	4.72	159	-1.50
6	MS-MS	IPI00291262	ApoJ (载脂蛋白 J)	52461	5.89	430	-1.69
7	MS-MS	gi1223976	Haptoglobinα2 chain (结合珠蛋白 α2 链)	41716.9	6.23	116	3.39

3.3 仅在冠心病不稳定性心绞痛气虚血瘀证表达变化的蛋白(表4) 仅在冠心病不稳定性心绞痛气虚血瘀证表达变化的蛋白点有 6 个,经质谱搜库鉴定出 3 种蛋白质。

表4 仅在冠心病不稳定性心绞痛气虚血瘀证表达变化的蛋白点及质谱鉴定结果

序 号	鉴 定 方 法	数 据 库 检 索 号	蛋 白 质 名 称	分 子 量	等 电 点	得 分	与 健 康 人 表 达 量 的 比 值
1	MS-MS	IPI00553177	α1-Antitrypsin (α1-抗胰蛋白酶)	46707	5.37	416	1.52
2	MS	gi119625326	Fibrinogen γ chain (纤维蛋白原 γ 链)	47971	5.54	201	2.33
3	MS	gi1223002	Fibrin β (纤维蛋白原 β 链)	51358	7.95	91	1.55



注:A 为合成图像,包含以下 3 幅图像;B 为 Cy2 图像(内标);C 为 Cy3 图像(健康人);D 为 Cy5 图像(心绞痛血瘀证患者)

图1 5号胶差异凝胶双向电泳(2-D DIGE)图像

讨 论

研究表明,人类血浆中包含数百万种蛋白质^[6],它们与人的状态密切相关,疾病发生时,人体器官病理变化的产物可释放入血,导致血浆蛋白在结构和数量上的改变,因此,研究在疾病状态时的人体血浆蛋白质组变化有着非常重要的意义。

DIGE 是近年发展起来的一种蛋白质组学新技术,与以往传统双向电泳技术相比,其灵敏性和可重复性大幅度提高,明显减少了所需的凝胶数^[7]。该技术使用了一组特殊的 CyDye DIGE 荧光染料(Cy2、Cy3、Cy5),对低丰度蛋白的探测灵敏度大幅度提高。而内标的设立可以去除胶间的差异,极大降低操作者之间的偏差^[8],大幅减少了假阴性及假阳性,非常适合差异蛋白组学的研究。

我们发现,与健康人比较,在两组患者表达均变化的蛋白有 Haptoglobin β chain、DBP、HBB、HBA、transthyretin、ApoA-I、ApoA-IV。仅在冠心病不稳定性心绞痛痰瘀互阻证表达变化的蛋白有 Haptoglobin α 1 chain、 α -1-acid glycoprotein、ApoC-III、ApoA-II、ApoC-II、ApoJ、Transthyretin、Haptoglobin α 2 chain。仅在冠心病不稳定性心绞痛气虚血瘀证表达变化的蛋白 α 1-Antitrypsin、Fibrinogen γ chain、Fibrin β 。Haptoglobin、Transthyretin 均为急性时相反反应蛋白。Haptoglobin 作为一种急性期蛋白,其表达量与炎症反应密切相关。Heliovaara 等^[9]认为,该蛋白与血中总胆固醇水平、体重指数、肥胖率及脂质氧化代谢异常呈正相关。而脂质过多沉积是动脉粥样硬化的最重要原因之一^[10]。Transthyretin 是急性时相负相蛋白,在营养不良、感染、急性应激等疾病中,水平降低;在多种疾病中表达增加,可能是机体代谢失常的潜在标志物。ApoA-I、ApoA-IV、ApoC-III、ApoA-II、ApoC-II、ApoJ 均为载脂蛋白。ApoA-I 是高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)的主要蛋白成分,而 HDL 水平与 CHD 之间负相关。大量临床和流行病学研究证实 ApoA-I 的降低是心肌梗死(myocardial infarction, MI)的独立危险因素^[11]。ApoA-IV 是一种脂结合蛋白,参与胆固醇逆向转运^[12],发挥抗动脉粥样硬化作用^[13]。还可以阻止 P-选择素介导的白细胞与血小板之间的黏附^[14]。ApoJ 存在于包含 ApoA-I 和胆固醇酯传递蛋白的 HDL 和 VLDL 中^[15]。ApoJ 能促进泡沫细胞内的胆固醇外流,并能保护氧化应激所造成的损伤,对 HDL 抗动脉粥样硬化起着协同的作用。HBB、HBA 与血氧运输相关。研究表明,其与心力衰竭的严重程度密切相

关^[16]。

冠心病不稳定性心绞痛气虚血瘀证与冠心病不稳定性心绞痛痰瘀互阻证在蛋白质层面的部分共性特征表现为炎症反应、代谢紊乱(包括血脂、血氧等)。且冠心病不稳定性心绞痛痰瘀互阻证的差异蛋白远多于冠心病不稳定性心绞痛气虚血瘀证,其背后蕴涵的机制可能更为复杂。

综上所述,本研究采用 2D-DIGE 和 MALDI-TOF-MS 技术对冠心病不稳定性心绞痛和对照组人群血浆进行比较蛋白质组学研究,建立了相应的双向电泳、质谱鉴定和生物信息学分析技术路线。虽然这些差异表达的蛋白质究竟属于一过性的差异表达,还是作为心绞痛血瘀证的病理基础,及其是否具有特异性,尚不得而知。但 2D-DIGE 可以为我们的发现疾病特征蛋白质群提供一定的线索,并为预防和早期治疗疾病提供参考。

参 考 文 献

- [1] 赵慧辉,侯娜,王伟,等.冠心病气虚血瘀证的蛋白质组学特征研究[J].中国中西医结合杂志,2009,29(6):489-492.
Zhao HH, Hou N, Wang W, et al. Proteome analysis of plasma from unstable angina with qi deficiency and blood stasis syndrome by LC-MS/MS. [J]. Chin J Integr Tradit West Med, 2009, 29 (6): 489-492.
- [2] 赵慧辉,王伟,郭淑贞.冠心病不稳定型心绞痛血瘀证的蛋白质组学[J].中国动脉硬化杂志,2008,16(7):545-548.
Zhao HH, Wang W, Guo SZ. Proteomics study on unstable angina pectoris patients with blood stasis syndrome [J]. Chin J Arterioscler, 2008, 16 (7): 545-548.
- [3] 赵慧辉,王伟.不稳定性心绞痛血瘀证的血浆蛋白组学研究[J].化学学报,2009,67(2):167-173.
Zhao HH, Wang W. Plasma proteomics study on unstable angina patients with blood stasis syndrome [J]. Acta Chimica Sinica, 2009, 67 (2): 167-173.
- [4] 中华医学会心血管病学分会,中华心血管病杂志编辑委员会.不稳定性心绞痛诊断和治疗建议[J].岭南心血管病杂志,2000,28(6):409-412.
Society of Cardiology, Chinese Medical Association, Editorial Committee of Chinese Journal of Cardiology. Diagnosis and treatment recommendation of unstable angina cordis [J]. Chin J Cardiol, 2000, 28 (6): 409-412.
- [5] 郑筱萸.中药新药临床研究指导原则(试行)[M].北京:中国医药科技出版社,2002:68-73.
Zheng XY. Guiding principle of clinical research on new drugs of traditional Chinese medicine (Trial) [M]. Bei-

- jing: China Medic-Pharmaceutical Sciences and Technology Publishing House, 2002: 68-73.
- [6] Anderson NL, Anderson NG. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects [J]. Mol Cell Proteom, 2002, 1 (11): 845-867.
- [7] Van den Bergh G, Clerens S, Vandesande F, et al. Reversed-phase high-performance liquid chromatography pre-fractionation prior to two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry identifies new differentially expressed proteins between striate cortex of kitten and adult cat [J]. Electrophoresis, 2003, 24 (9): 1471-1481.
- [8] Huang HL, Stasyk T, Morandell S, et al. Biomarker discovery in breast cancer serum using 2-D differential gel electrophoresis/MALDI-TOF/TOF and data validation by routine clinical assays [J]. Electrophoresis, 2006, 27 (8): 1641-1650.
- [9] Heliövaara MK, Teppo AM, Karonen SL, et al. Plasma IL-6 concentration is inversely related to insulin sensitivity, and acute-phase proteins associate with glucose and lipid metabolism in healthy subjects [J]. Diabetes Obes Metab, 2005, 7 (6): 729-736.
- [10] Schmitz G, Aslanidis C, Lackner KJ. Recent advances in molecular genetics of cardiovascular disorder - simplifications for atherosclerosis and diseases of cellular lipid metabolism [J]. Pathol Oncol Res, 1998, 4 (2): 153-161.
- [11] Schlitt A, Blankenberg S, Bickel C, et al. Prognostic value of lipoproteins and their relation to inflammatory markers among patients with coronary artery disease [J]. Int J Cardiol, 2005, 102 (3): 477-485.
- [12] Dvorin E, Corder NL, Benson DM, et al. Apolipoprotein A-IV: a determinant for binding and uptake of high density lipoproteins by rat hepatocytes [J]. J Biol Chem, 1986, 261 (33): 15714-15718.
- [13] Robert DC, Lawrence WC, Jian-Hua Qiao, et al. Reduced aortic lesions and elevated high density lipoprotein levels in transgenic mice overexpressing mouse apolipoprotein A-IV [J]. J Clin Invest, 1997, 99 (8): 1906-1916.
- [14] Vowinkel T, Moril M, Kriegelstein CF, et al. Apolipoprotein A-IV inhibits experimental colitis [J]. J Clin Invest, 2004, 114 (2): 260-269.
- [15] de Silva HV, Stuart WD, Duvic CR, et al. A 70-kDa apolipoprotein designated ApoJ is a marker for subclasses of human plasma high density lipoproteins [J]. J Biol Chem, 1990, 265 (22): 13240-13247.
- [16] 叶长青, 郑兴, 赵仙先, 等. 住院慢性心力衰竭患者贫血患病率及血红蛋白浓度变化与其心功能的相关性 [J]. 中国临床康复, 2006, 10 (44): 22-25.
- Ye CQ, Zheng X, Zhao XX, et al. Relationship of prevalence of anemia and hemoglobin concentration with cardiac function in inpatients with chronic cardiac failure [J]. Chin J Clin Rehabil, 2006, 10 (44): 22-25.

(收稿:2009-02-13 修回:2009-11-10)

第十一次全国中西医结合虚证与老年医学研讨会征文通知

中国中西医结合学会虚证与老年医学专业委员会定于 2010 年 10 月在上海举行“第十一次全国中西医结合虚证与老年医学研讨会”。现将会议征文事项通知如下:

征文内容 (1)老年病的中西医结合临床与基础研究,重点征文领域:老年心脑血管疾病、肿瘤、呼吸系统疾病、老年认知功能障碍的中西医结合防治研究等;(2)虚证的中西医结合临床与基础研究;(3)虚证的中西医结合辨证标准研究。

征文要求 (1)所投稿件须为尚未公开发表的论文,要求科学性强,论点鲜明。(2)来稿请寄全文(5 000 字以内),并附 400 字以内的结构式摘要(目的、方法、结果、结论)及关键词;(3)稿件一律用 word 文档排印,标准 A4 版面,标题用 3 号宋体字,作者及单位用小 4 号楷体字,注明单位部门、地址、邮编、电子邮件地址、联系电话。摘要与关键词用小 5 号宋体字。须用文字和电子两种形式投稿,电子版请发到 yg1623402@163.com;文字版请按后述“联系地址”寄送。(4)文字稿件须加盖单位公章,论文如属省部级以上科研基金课题,请予注明。(5)经审评录用的论文将收入“会议学术论文集”,组委会将给论文作者邮寄会议通知,并在会议期间颁发论文证书。(6)请虚证与老年医学专业委员会的委员积极投稿,欢迎相关专业专家积极参与。

截稿日期 2010 年 7 月 31 日(以邮戳日期或电子邮件发送时间为准)

联系方式 联系人:上海市中西医结合学会 张雯菊,张友根;联系地址:上海市北京西路 1623 号 402 室(邮编 200040);联系电话:021-62581714、021-62176165,传真:02162581714,E-mail:yg1623402@163.com