

季德胜蛇药通过调控 miR-335 抑制肝癌 Huh-7 细胞增殖作用机制探讨

张玉 邵建国 陈琳 卞兆连 刁花玉 达坤林

【摘要】 目的 探讨季德胜蛇药对肝癌 Huh-7 细胞增殖作用的影响并进一步从 miRNA 层面探讨其抑制增殖的调控机制。方法 以肝癌 Huh-7 细胞为模型,制备不同浓度的兔含药血清后培养 Huh-7 细胞,并同时设置相应浓度的对照组。CCK-8 实验检测转染 miR-335 入 Huh-7 细胞后对该细胞增殖能力的影响;采用实时定量聚合酶链式反应 qRT-PCR 检测季德胜蛇药含药血清对 Huh-7 细胞中 miR-335 的调控作用;CCK-8 实验检测季德胜蛇药含药血清对 Huh-7 细胞增殖能力的影响;Western-blot 检测 miR-335 潜在靶向 Bcl-w 表达水平的变化。结果 miR-335 过表达后 CCK-8 实验组与空白对照组及阴性对照组相比,其 OD 值显著降低 ($P < 0.01$)。含药血清干预下,与对照组相比,同等浓度的蛇药组 miR-335 表达水平较高,且在一定浓度范围内含药血清浓度越高,miR-335 在 Huh-7 细胞中的表达也相继增高;此外,CCK-8 实验下季德胜蛇药含药血清组都较正常血清组 OD 值低,且浓度越高,其 OD 值越低,都有较明显的统计学差异 ($P < 0.01$)。上调 miR-335 后,Huh-7 细胞 Bcl-w 蛋白表达水平降低。结论 季德胜蛇药通过调控 miR-335 能抑制肝癌 Huh-7 细胞增殖。

【关键词】 季德胜蛇药; 人肝癌细胞; miR-335; Bcl-w

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2017.04.015

Mechanism discussion of JiDeSheng Sheyao inhibiting liver cancer cell Huh-7 proliferation through regulating miR-335 ZHANG Yu, SHAO Jianguo, CHEN Lin, et al. The third people's Hospital of Nantong, Nantong 226000, China

Corresponding author: SHAO Jianguo, E-mail: shaojianguo4144@163.com

【Abstract】 Objective To discuss the mechanism of JiDeSheng Sheyao inhibiting liver cancer cell Huh-7 proliferation through regulating miRNA. **Methods** Cell Huh-7 were used as the model for study. Rabbits were given Jidesheng Sheyao by gastrogavage to prepare medicated serum. Then Huh-7 was cultured with medicated serum by different concentration. At the same time, the corresponding concentrations of the control group were set up. The effect of miR-335 on Huh-7 cells proliferation was tested by CCK-8 assay. QRT-PCR was used to detect the regulation function of miR - 335 on human liver cancer Huh-7 cell. The effect of Jidesheng Sheyao medicated serum on Huh-7 cells proliferation was tested by CCK-8 assay. The effect of miR-335 on potential target protein Bcl-w was tested by Western-blot. **Results** The OD value of the experimental group was decreased significantly compared with blank control group and the negative control group by CCK-8 assay after up-regulation of miR-335 ($P < 0.01$). The miR-335 expression level was higher compared with the control group in the same concentration of snake medicine group. In a certain concentration range, the expression of miR-335 in Huh-7 cells increased with

基金项目:江苏省卫生厅面上项目(H201453);南通市社会事业科技创新与示范计划(HS2014061);2014年度江苏省南通市市级应用研究计划(BK2014073);南通市科技局;新型临床诊疗技术攻关(MS22015105)

作者单位:226000 南通市第三人民医院中医科(张玉、达坤林),肝病研究所(邵建国、陈琳、卞兆连、刁花玉)

作者简介:张玉(1991-),硕士,住院医师。研究方向:中西医结合消化内科。E-mail:1198963491@qq.com

通信作者:邵建国(1965-),博士,主任医师,教授。研究方向:消化系统疾病临床研究。E-mail:shaojianguo4144@163.com

increasing serum concentration; In addition, the OD value of *JiDeSheng Sheyao* medicated serum group were lower compared with normal serum, and the concentration were higher, its OD value were lower by CCK 8 experimental. They had also a significant statistical difference ($P < 0.01$, $P < 0.001$). After raising miR-335, the Bcl-w protein expression levels in Huh-7 cells were lower. **Conclusion** *JiDeSheng Sheyao* can inhibit liver cancer Huh-7 cell proliferation through regulating miR-335.

【Key words】 *Jidesheng Sheyao*; Huh-7; miR-335; Bcl-w

肝细胞肝癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是常见的恶性肿瘤之一,其发病率在全球居第五位。目前 HCC 患者的 5 年生存率不到 10%,死亡率位于各大恶性肿瘤第二位^[1-2]。HCC 确诊时已多属中、晚期,又由于肿瘤细胞的侵袭转移、凋亡逃避、血管生成以及肿瘤耐药等复杂的生物学行为也为 HCC 的根治带来一定的困难,预后极差^[3-4]。因此,深入研究肿瘤在这些复杂生物学恶性表型形成中的信号传递及调节机制具有重要的理论和临床应用价值。季德胜蛇药片是中国特色中成药之一,能够清热解毒,活血化瘀止痛。目前主要用于治疗蛇虫咬伤,但近年来在临床实践中运用该药治疗肝癌也起到一定疗效。因此本研究旨在观察季德胜蛇药对肝癌 Huh-7 细胞增殖作用影响并进一步探讨该特色药对 Huh-7 细胞中 miR-335 表达水平及靶蛋白 Bcl-w 表达变化的影响,从转录后调控水平为该药的抗癌作用机制提供新视角,并为 HCC 发病机制及治疗方法提供新思路。

1 材料和方法

1.1 实验动物

6 只中国大耳白兔,体质量(3.0±0.5) kg,购于南通大学动物房(许可证号:SYXK(苏)2012-0031);实验动物饲料:白兔基础饲料,购买于南通大学动物房,实验期间各组实验白兔均服用自来水,自由饮食。

1.2 人肝癌 Huh-7 细胞

购于美国模式培养物集存库(ATCC),由上海交通大学附属仁济医院实验室保种培养并友情提供。

1.3 主要试剂与仪器

季德胜蛇药:购买于南通市第三人民医院,产于南通精华制药集团股份有限公司,药品批号:21150612。DMEM 高糖完全培养基:立菲生物有限公司;胎牛血清:Invitrogen 公司;胰蛋白酶:Invitrogen 公司;Mimics:上海吉玛制药技术有限公司;CCK-8 试剂:上海同仁有限公司;RT-PCR 试剂

盒:广州复能基因有限公司;Bcl-w 抗体:武汉三鹰生物技术有限公司;蛋白抽提及浓度测定试剂盒:上海碧云天有限公司;GeneAmp PCR System 9700、CFX Connect Real-time System、RT-6000 酶标仪(深圳雷桂生命科学有限公司);紫外/可见分光光度计(岛津);细胞培养箱(南通银河生物科技有限公司);25 cm²培养瓶、6 孔板、96 孔板(Corning 公司)。

1.4 兔含药血清的制备

大耳白兔 6 只,分为正常对照组和蛇药组。蛇药组给药剂量为 1540 mg/(kg·d),剂量为正常成人标准体重的 10 倍,每天相同时间灌胃 1 次,每天给药总容量为 10 mL/kg;另对照组给予相同容量的生理盐水灌胃。连续灌胃 7 天,第 8 天禁食不禁水,于当天相同时刻灌胃 4 小时后心脏穿刺取血,分离兔血清。

1.5 Huh-7 细胞的传代及培养

用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液,在 37℃,5% CO₂ 的培养箱中培养,待细胞密度长至 95% 左右时,加入适量的胰酶消化;待大部分细胞变圆时轻轻倒掉胰酶,加入 5 mL 完全培养基终止胰酶消化细胞,用无菌吸管吹打培养瓶的细胞面至细胞脱落。将上述细胞悬液分瓶,加入新的完全培养基后置入培养箱中继续培养。

1.6 CCK-8 检测细胞增殖实验

将 miR-335 过表达入 Huh-7 细胞,分别铺于 96 孔板,每组设 8 个复孔,设空白调零孔,孔板周围予以 PBS 充填。每孔接种约 4×10³ 个细胞。细胞贴壁后分别于 24 小时,48 小时,72 小时取出一块 96 孔板,每孔加入 10 μL CCK-8 试剂及 100 μL PBS,于 2.5 小时后在 RT-6000 酶标仪上选择 450 nm 波长检测其 OD 值。每组 8 个 OD 值,去除最大与最小值,其余 6 个值计算出平均值及方差。实验重复 3 次。

1.7 季德胜蛇药含药血清对肝癌 Huh-7 细胞中 miR-335 的调控作用

待肝癌 Huh-7 细胞生长至对数生长期,用胰蛋白酶消化后接种于 6 孔培养板中,培养 12 小时,待细胞贴壁后,设置各浓度含药血清及相应浓度的对

照组血清,分别加入 6 孔培养板中,在细胞培养箱中继续培养 48 小时后,提取细胞 RNA,qRT-PCR 检测 Huh-7 细胞中 miR-335 的表达水平。

1.8 季德胜蛇药含药血清对肝癌 Huh-7 细胞增殖的影响

待肝癌细胞传至 3~4 代,生长状态良好时,用胰蛋白酶消化后进行光学显微镜计数,接种于 96 孔培养板中,每孔加入约 4000 个细胞,每组各 8 孔,加入含 10% 胎牛血清的培养基,每孔各 150 μL ,培养 6 小时待细胞贴壁后吸弃培养上清液,加入无血清的培养基 100 μL ,12 小时后吸弃培养上清液,分别配制 5%、10%、20% 的含药血清(5% 的含药血清配制方法即 100 μL 的总培养液中含 5 μL 的药物血清,依此类推)加入含药血清培养液。加药后分别于 24 小时、48 小时、72 小时取出一块 96 孔板,每孔加入 10 μL CCK-8 试剂及 100 μL PBS,于 2.5 小时后在 RT-6000 酶标仪上选择 450 nm 波长检测其 OD 值。

1.9 Huh-7 细胞 Western-blot 实验

miR-335 过表达入 Huh-7 细胞培养 48 小时后弃去培养液,收集细胞蛋白。进行蛋白定量(BCA 法)后加入 1X 上样缓冲液,制作 SDS 电泳胶,随后进行 SDS-PAGE 电泳,转膜,封闭和孵育抗体,化学发光、显影、定影,Photoshop 进行蛋白图像的采集及后期处理检测靶蛋白 Bcl-w 的表达。

1.10 统计学处理

所有的数据输入计算机,应用 GraphPad Prism 5 软件进行统计分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,判断季德胜蛇药含药血清对肝癌 Huh-7 细胞增殖的影响。实验组与对照组采用单因素方差分析(one-way AVOVA),两两比较采用 *t* 检验分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义, $P<0.01$ 为差异有显著统计学意义。

2 结果

2.1 miR-335 转染效率

将 miR-335 过表达入 Huh-7 细胞,qRT-PCR 检测 Huh-7 细胞中 miR-335 表达水平的变化,其实验组 miR-335 含量显著较空白对照组及阴性对照组升高,且差异具有统计学意义($P<0.01$),说明具有较高的转染效率。

2.2 CCK-8 检测细胞增殖实验

结果发现 miR-335 过表达入 Huh-7 细胞后实验

组与空白对照组及阴性对照组相比,其 OD 值显著降低,说明 miR-335 过表达能显著抑制 Huh-7 细胞增殖($P<0.01$)。而空白对照组及阴性对照组两组之间差异无统计学意义。见表 1。

表 1 各组 Huh-7 细胞增殖实验不同时间段 OD 值变化比较($\bar{x}\pm s$)

OD 值	24 小时	48 小时	72 小时
实验组	0.375 \pm 0.011 ^{ab}	0.474 \pm 0.018 ^{ab}	0.596 \pm 0.037 ^a
空白对照组	0.417 \pm 0.012	0.595 \pm 0.028	0.780 \pm 0.048
阴性对照组	0.417 \pm 0.012	0.575 \pm 0.028	0.750 \pm 0.048

注:与空白对照组比较,^a $P<0.01$;与阴性对照组比较,^b $P<0.01$ 。

2.3 季德胜蛇药含药血清对肝癌 Huh-7 细胞中 miR-335 的调控作用

结果发现与对照组相比,5% 及 10% 浓度的含药组 miR-335 表达水平较高,且在 20% 的浓度范围内含药血清浓度越高,miR-335 在 Huh-7 细胞中的表达也相继增高。而不含药血清对照组之间 miR-335 表达水平变化不明显。见图 1。

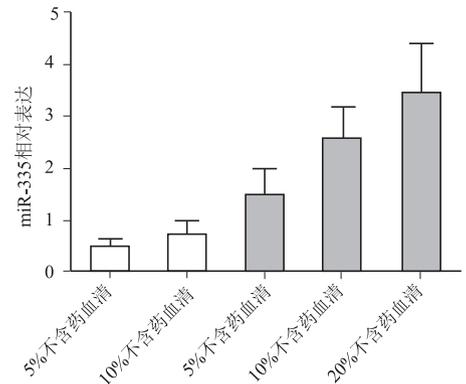


图 1 不同浓度季德胜蛇药含药血清对肝癌细胞中 miR-335 的调控作用

2.4 季德胜蛇药含药血清对肝癌 Huh-7 细胞增殖的影响

结果发现在同一浓度下,同一时间点,季德胜蛇药含药血清组都较正常血清组其 OD 值低,除 5% 浓度 48 小时的 OD 值差异没有统计学意义,其他都有较明显的统计学差异。在同一时间点,不同浓度下,浓度越高,其 OD 值越低。见表 2。说明季德胜蛇药含药血清能抑制肝癌 Huh-7 细胞增殖,且浓度越高对 Huh-7 细胞增殖抑制越明显。

2.5 Huh-7 细胞 Western-blot 实验

在本研究中,通过转染技术在 Huh-7 细胞中高表达 miR-335,随后 Western-blot 实验检测 miR-335 过表达入 Huh-7 细胞后其靶蛋白 Bcl-w 的表达情

况,结果发现上调 miR-335 后,Huh-7 细胞 Bcl-w 蛋白表达水平降低,表明 miR-335 可能是通过抑制其靶基因 Bcl-w 的表达来发挥对肝癌细胞凋亡调控作用。见图 2。

表 2 两组血清干预下 Huh-7 细胞增殖实验
不同时间段 OD 值变化比较($\bar{x}\pm s$)

组别	24 小时	48 小时	72 小时
5% 对照组	0.473±0.066	0.576±0.166	0.770±0.080
10% 对照组	0.390±0.016	0.493±0.064	0.549±0.063
20% 对照组	0.391±0.022	0.397±0.014	0.437±0.045
5% 含药组	0.354±0.022 ^b	0.487±0.027	0.601±0.046 ^b
10% 含药组	0.323±0.014 ^b	0.391±0.028 ^b	0.471±0.035 ^a
20% 含药组	0.310±0.009 ^b	0.335±0.032 ^b	0.349±0.044 ^b

注:与同时段、同浓度正常血清相比,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$ 。



图 2 WB 实验检测 miR-335 过表达入 Huh-7 细胞后靶蛋白 Bcl-w 的表达情况

3 讨论

季德胜蛇药片具有清热解毒、消肿止痛、活血化瘀、镇静排脓等作用,是一种传统的中成药,主要用于治疗蛇伤。它是国家级秘方,具体成分不祥,但所知的四种成分均有抗肿瘤作用。七叶一枝花有止血、抗肿瘤、细胞毒、抗炎、抗菌抑菌、镇静镇痛等多功能的生理作用^[5];蟾酥提取液可以诱导肝癌细胞走向凋亡^[6];蜈蚣提取液主要作用于癌症肿瘤血管,能帮助诱导肿瘤细胞坏死^[7];地锦草中的槲皮素成分能在肝肿瘤细胞和乙肝病毒中起到一定的抑制作用^[8]。近年来它在诸多疾病的治疗中都起到了一定的疗效,其中关于季德胜蛇药治疗肝炎^[9]、肝纤维化^[10]乃至肝癌^[11]相关的报导屡见不鲜,但其内在具体的调控机制却很少有报导。因此本实验将以 miRNA 表达水平为着眼点来探讨中医药治疗肝癌未来可能性的靶点。

miRNA 是约 19~24 个核苷酸的非编码单链小分子 RNA。最新研究发现,随着科学技术的进步,miRNAs 在肝癌中的价值越来越引起人们的关注,它与肝癌细胞的增殖、分化、侵袭、凋亡密不可分。人们通过对不同临床分期、不同病理特征的肝癌

miRNAs 的研究,寻找出与肿瘤诊断、分期、疗效及预后相关的标志性 miRNAs。如在肝脏最丰富的 miRNA:miR-122^[12],能调节 24 种肝细胞中特定基因的表达水平并参与调节肝细胞成熟。miRNA 在肝癌中还能调节细胞周期,如:miR-26a^[13]直接通过针对 D2 和 E2 两个细胞周期蛋白诱导肝癌细胞周期阻滞。Bcl-w 与多种肿瘤的发生及进展密不可分,如:肝癌、大肠癌、胆囊癌及胃癌等;在细胞凋亡的有关研究中 Bcl-2 被最早发现,它的成员都能调控并决定细胞凋亡过程^[14-15]。Bcl-w 基因对于 Bcl-2 家族中抗凋亡基因成员来说发现的较晚,是现在细胞凋亡研究的热点,分子组织学上与 Bcl-2 有较高的同源性。

大多数关于中医药能发挥其抑制癌细胞增殖等功能是通过中药及其有效成分调节编码蛋白的肿瘤相关基因的表达来实现的^[16-17],并没有将 miRNA 当成中医药治疗肿瘤未来可能性的靶点。假设中医药通过调节 miRNA 靶基因相关的表达,使异常表达的 miRNA 基因趋向正常化,最终能够抑制肿瘤细胞的增殖,促进肿瘤细胞凋亡等,起到防治肿瘤的效用。如果这种假说成立,那么所调控的 miRNA 可能是中药直接或间接调节的靶基因,因此,可以从 miRNA 水平揭示中医药防治肿瘤的调控机制。

本实验通过研究过表达 miR-335 入 Huh-7 细胞后,通过 CCK-8 实验来检测 miR-335 对细胞增殖能力的影响,结果发现 miR-335 过表达入 Huh-7 细胞后能显著抑制 Huh-7 细胞增殖,说明 miR-335 在肝癌中可能扮演一个抑癌因子的角色。通过 qRT-PCR 检测季德胜蛇药含药血清干预下肝癌 Huh-7 细胞中 miR-335 表达水平的变化,结果发现季德胜蛇药含药血清在一定浓度范围内浓度越高,miR-335 在 Huh-7 细胞中的表达也相继增高。本研究中通过不同浓度的季德胜蛇药含药血清来干预肝癌 Huh-7 细胞后检测 Huh-7 细胞的增殖情况,结果发现季德胜蛇药含药血清能抑制肝癌 Huh-7 细胞增殖,且浓度越高对 Huh-7 细胞增殖抑制越明显。最后总结出季德胜蛇药含药血清通过调节 miR-335 能抑制肝癌 Huh-7 细胞增殖。在本研究中,笔者通过转染技术在 Huh-7 细胞中高表达 miR-335,随后 Western-blot 实验检测 miR-335 过表达入 Huh-7 细胞后其靶蛋白 Bcl-w 的表达情况,结果发现上调 miR-335 后,Huh-7 细胞 Bcl-w 蛋白表达水平降低,表明 miR-335 可能是通过抑制其靶基因 Bcl-w 的表达来发挥对肝癌细

胞凋亡调控作用的。但目前实验尚存在某些不足之处:其一,含药血清对肝癌 Huh-7 细胞中 miR-335 的调控作用及增值影响只限定在 20% 的浓度范围内进行实验,而对 20% 的浓度之外的影响尚不知晓。其二,若能进一步实验探讨季德胜蛇药干预 Huh-7 细胞后其细胞 Bcl-w 的表达情况,得到的结论是 Bcl-w 表达降低,且浓度越高,降低的越明显,则更说明 miR-335 与 Bcl-w 可能是季德胜蛇药抑制细胞增殖的通路之一,因此有待后续实验进一步研究。

总之,季德胜蛇药含药血清通过调节 miR-335 能抑制肝癌 Huh-7 细胞增殖,进一步反映出 miR-335 将有望成为中药直接或间接调节的靶基因,从 miRNA 基因水平阐述中药作用的药效学物质基础,为中药防治肿瘤提供有效的分子靶点,且也为季德胜蛇药治疗肝癌提供一定的实验基础。

参 考 文 献

- [1] Forner A, Llovet JM, Bruix J. Hepatocellular carcinoma[J]. Lancet,2012,379(9822):1245-1255.
- [2] Goh BK, Chow PK, Teo JY, et al. Number of nodules, Child-Pugh status, margin positivity, and microvascular invasion, but not tumor size, are prognostic factors of survival after liver resection for multifocal hepatocellular carcinoma[J]. Journal of gastrointestinal surgery,2014,18(8):1477-1485.
- [3] Salgia R, Singal AG. Hepatocellular carcinoma and other liver lesions[J]. The Medical clinics of North America. 2014, 98(1):103-118.
- [4] Zhu K, Dai Z, Zhou J. Biomarkers for hepatocellular carcinoma: progression in early diagnosis, prognosis, and personalized therapy[J]. Biomarker research, 2013,1(1):10.
- [5] 汤海峰,赵越平,蒋永培,等.重楼属植物的研究概况[J].中草药,1998,29(12):839-842.
- [6] 顿爱社,王凡,陆长青,等.蟾酥胶囊含药血清诱导人肝癌细胞凋亡的实验研究[J].山东中医杂志,2006,25(2):

- 117-120.
- [7] 刘细平,钟德珩.蜈蚣提取液治疗肝细胞肝癌的实验研究[D].长沙:中南大学,2007,6(38).
- [8] 柳润辉,王汉波,孔令义,等.地锦草化学成分的研究[J].中草药,2001,32(2):107.
- [9] 刘炜炜,姚建华,丁俊琪,等.季德胜蛇药联合拉米夫定治疗湿热中阻型慢性乙型肝炎临床观察[J].亚太传统医药,2012,8(10):2012-2015.
- [10] 徐爱东,李慧,汤伟,等.季德胜蛇药抗四氯化碳致小鼠肝纤维化的作用及机制研究[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(19):287-290.
- [11] 姚建华,田芝奥,李慧,等.季德胜蛇药联合 TACE 治疗中晚期肝癌的临床观察[J].实用肝脏病杂志. 2011,14(5):379-380.
- [12] Xu H, He JH, Xiao ZD, et al. Liver-enriched transcription factors regulate microRNA-122 that targets CUTL1 during liver development[J]. Hepatology,2010,52(4):1431-1442.
- [13] Kota J, Chivukula RR, O'Donnell KA, et al. Therapeutic microRNA delivery suppresses tumorigenesis in a murine liver cancer model[J]. Cell,2009,137(6):1005-1017.
- [14] Lee WS, Woo EY, Kwon J, et al. Bcl-w Enhances Mesenchymal Changes and Invasiveness of Glioblastoma Cells by Inducing Nuclear Accumulation of beta-Catenin[J]. Plus one. 2013, 8(6):e68030.
- [15] Zhang X, Zhang Y, Liu X, et al. MicroRNA-203 Is a Prognostic Indicator in Bladder Cancer and Enhances Chemosensitivity to Cisplatin via Apoptosis by Targeting Bcl-w and Survivin[J]. Plus one. 2015,10(11):e0143441.
- [16] Wu C, Chen F, Rushing JW, et al. Antiproliferative activities of parthenolide and golden feverfew extract against three human cancer cell lines[J]. Journal of medicinal food, 2006,9(1):55-61.
- [17] Lau FY, Chui CH, Gambari R, et al. Antiproliferative and apoptosis-inducing activity of Brucea javanica extract on human carcinoma cells[J]. International journal of molecular medicine. 2005,16(6):1157-1162.

(收稿日期:2016-06-14)

(本文编辑:禹佳)

· 启 事 ·

第三届全国中西医心脑血管学科创新论坛邀请函暨征文通知

中华国际医学交流基金会主办、环球中医药杂志社承办的第三届全国中西医心脑血管学科创新论坛将于 2017 年 7 月 8 日在北京召开。本届论坛的主题是“预防血栓,心脑血管健康”。

中国中医科学院院长、天津中医药大学校长张伯礼院士和中国中医科学院首席研究员、中国中医科学院西苑医院副院长史大卓教授联袂担任本次论坛的主席。本次论坛荣幸的邀请到中国科学院院士、国医大师陈可冀教授、北京天坛医院副院长王拥军教授做主旨发言。本论坛分为临床分会场和科研分会场,分别从临床新进展和科研新进展的不同的角度展开讨论。欢迎各位临床和科研相关专家们的莅临指导。

本次论坛拟进行征文。要求稿件字数 4000 字左右,投稿邮箱:hqzyy@126.com。请在邮件标题注明“论坛征文”。征文截止时间为 2017 年 6 月 20 日。

本次论坛 2017 年 7 月 8 日正式开会,会期 1 天。会务费 600 元/人(含餐费、资料费、会场费、合影照片费),在校学生减半(凭学生证报到);6 月 10 日前交款可优惠至 500 元/人(学生优惠至 200 元/人)。交通费、住宿费自理,住宿统一安排。