

·基础研究·

促红细胞生成素对脑出血大鼠脑水肿和缺氧诱导因子的影响

石秋艳¹ 刘超^{1,3} 姜进克¹ 张瑞彪¹ 李倩¹ 陈灵芝² 孙惠芳¹ 丁兆日¹ 何俊芳¹

摘要 目的:研究重组人促红细胞生成素(rhEPO)对大鼠实验性脑出血(ICH)后脑水肿及缺氧诱导因子(HIF-1 α)的影响。方法:实验大鼠随机分为假手术组以及 ICH 与 ICH+ rhEPO 预处理组,后者又分为术后第 3、6、12、24、48、72 小时、第 7、14、21 天各 9 小组;全部 152 鼠共分为 19 组,每组 8 只鼠。采用自体血脑内注射法建立 ICH 动物模型, rhEPO 干预组于 ICH 建模后,每日腹腔注射 rhEPO。应用免疫组化方法检测脑出血后不同时间点水肿周边脑组织中 HIF-1 α 蛋白表达情况,并应用干湿比重法测定脑组织含水量。结果:出血后, HIF-1 α 蛋白阳性表达率随时间进行性增加,并于出血后 72h 达到高峰,此后 HIF-1 α 蛋白表达的阳性率逐渐下降,脑出血后不同时间点阳性率比较具有显著性差异($P<0.05$);脑出血后 3d 内,脑组织含水量进行性增加,此后逐渐下降,脑出血 Epo 干预组较脑出血组及假手术组各时间点脑组织含水量低, HIF-1 α 蛋白阳性率较低。结论:促红细胞生成素能显著降低脑出血后脑组织含水量,减少 HIF-1 α 表达,对脑出血后脑组织有良好的保护作用。

关键词 促红细胞生成素;脑出血;缺氧诱导因子;脑水肿

中图分类号:R651 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2009)-04-0338-04

The experimental study of the effects about rhEPO on brain edema and HIF-1 α in rats with intracerebral hemorrhage/SHI Qiuyan, LIU Chao, JIANG Jinke, et al//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2009, 24(4): 338—341

Abstract Objective: To explore the effects of rhEPO on brain edema and HIF-1 α in rats intracerebral hemorrhage (ICH). **Method:** A total of 152 rats were randomly divided into sham operation group, and 18 groups of the 3rd, 6th, 12th, 24th, 48th, 72nd and 7th, 14th, 21st after ICH and ICH+rhEPO respectively. There were 8 rats in each group. The model of ICH was established in rats by intracerebral injection of autogenous blood. In ICH+rhEPO groups rhEPO was injected (IP) everyday after ICH. The expressions of HIF-1 α in rats brain tissue around hematoma were detected with SP immunohistochemical method. The expressions of HIF-1 α were compared with the degree of brain edema at different time points after ICH and ICH+rhEPO. **Result:** The water contents of brain tissue in ICH+rhEPO group were lower than that in ICH groups. The rates of HIF-1 α in ICH+rhEPO groups were less than that in ICH groups. **Conclusion:** rhEPO can significantly reduce brain edema and the HIF-1 α rhEPO can protect the brain after intracerebral hemorrhage.

Author's address Department of Neurology, Affiliated Hospital of North China Coal Medical College, Tangshan, 063000

Key words erythropoietin; intracerebral hemorrhage; HIF-1 α ; brain edema

脑出血(intracerebral hemorrhage, ICH)是神经科的常见病和多发病,是造成人类死亡和致残的重要原因,其中脑出血约占全部脑卒中的 20%—30%。近年来研究表明促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)及促红细胞生成素受体在脑组织中均有表达,并且重组人促红细胞生成素(recombinant human erythropoietin, rhEPO)预处理对体外培养的神经细胞有明显的保护作用。本实验旨在探讨 rhEPO 对大鼠实验性脑出血后脑水肿及缺氧诱导因子(hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)的影响。

1 材料与方

1.1 材料

健康雌性 SD 大鼠 152 只,体重(250 \pm 30)g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司;鼠抗兔 HIF-1 α 多克隆抗体、二抗及 DAB 显色试剂盒购自武汉博士德公司, rhEPO 购自上海克隆生物高技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及模型制备:健康雌性 SD 大鼠 152

1 华北煤炭医学院附属医院神经内科一病区,063000

2 河北医科大学附属第三医院

3 通讯作者

作者简介:石秋艳,女,教授,主任医师

收稿日期:2008-05-14

只。随机分为假手术组、脑出血组、脑出血 rhEPO 干预组。其中脑出血组、脑出血 rhEPO 干预组按时间动态分为术后第 3 小时、第 6 小时、第 12 小时、第 24 小时、第 48 小时、第 72 小时、第 7 天、第 14 天、第 21 天九组, 每组 8 只。干预组大鼠于造模后 5000u/kg 腹腔注射 rhEPO, 以后每天早 9 点腹腔注射相同剂量。

模型制备:大鼠术前禁食 12h, 用 10% 水合氯醛腹腔麻醉大鼠(0.035ml/kg), 按汤继宏等报道方法将其固定在立体定位仪上, 头部正中切开皮肤, 长约 15mm, 过氧化氢剥蚀骨膜, 暴露前囟, 参照大鼠立体定位图谱, 于前囟前 0.2mm、中线向右旁 3mm 处钻一直径为 1mm 的小孔, 用 40℃ 温水浸泡鼠尾数分钟, 消毒后断尾抽取鼠尾血 50 μ l, 用微量注射器沿钻孔方向垂直进针, 深约 6mm, 接着缓慢匀速推注 50 μ l 血入脑, 整个取血注血过程控制在 3min 内完成, 注血后留针 10min 后缓慢退出; 拔除后用医用骨蜡封闭骨孔, 观察无出血后, 缝合头部皮肤, 加压包扎尾部, 术毕将大鼠放回笼中自由活动、进食。假手术组除不注射自体血外, 余操作同实验组。

1.2.2 标本制取:脑出血后不同时间分别再次水合氯醛腹腔麻醉大鼠(0.035ml/kg), 开胸, 暴露心脏及主动脉, 手术剪将右心房及左心室尖剪开, 用事先磨好的钝头 50ml 注射器针头从左心室尖插入心室, 并进入主动脉, 动作轻柔, 防止戳破心室及主动脉。将 37℃ 0.9% 氯化钠水溶液从 50ml 注射器缓慢推入动物的体循环, 约持续 3—5min(200ml)至右心房流出的液体基本无色, 将灌流液换 4% 多聚甲醛磷酸缓冲液, 继续灌流 5min(约 250ml), 断头取血肿靠近皮质侧脑组织约 2mm \times 2mm \times 2mm, 留大脑置于 4% 多聚甲醛后固定 24h 以上。取出固定液中脑组织标本, 常规脱水、石蜡包埋, 固定脑组织。另取血肿周边脑组织约 100mg 进行脑组织含水量测定。

1.2.3 HIF-1 α 免疫组化染色步骤:①切片常规脱蜡至水。②新鲜配制的 3% H₂O₂ 室温 20min 灭活内源性酶。③微波修复抗原。④滴加封闭液 30min。⑤滴加 HIF-1 α 多克隆抗体 37℃ 反应 1h, 或 4℃ 过夜。⑥生物素化山羊抗兔二抗 37℃ 孵育 20min。⑦滴加链霉素抗生物素过氧化物酶溶液, 37℃ 反应 20min, DAB 显色 5min。⑧中性树胶封片。

1.2.4 免疫组化结果判断:HIF-1 α 免疫组化结果阳性为细胞核呈棕黄色, 部分细胞质染色。脑组织细胞无反应为阴性, 高倍镜下(\times 200)随机选取 5 个视野, 计数 200 个神经细胞中阳性染色的细胞并计算 HIF-1 α 标记指数 (label index, LI), LI=阳性染色细

胞数/计数神经细胞总数 \times 100%, LI $>$ 5% 者为 HIF-1 阳性表达。

1.2.5 脑组织含水量测定:采用干/湿比重法进行脑组织含水量测定。将所取的脑组织以滤纸吸净其表面血液和脑脊液, 电子天平快速称重后置于 105℃ 恒温烤箱内烘烤 48h, 间隔 12h, 2 次称重, 重量变化小于 0.2mg 时记录称量结果并取其平均值。换算公式: 脑组织含水量 (%)=(脑组织湿重-脑组织干重)/脑组织湿重 \times 100%。

1.3 统计学分析

应用 SPSS14.0 软件进行统计学处理, 计量资料以均数 \pm 标准差表示, 两组计量数据比较采用 *t* 检验, 多组计量数据比较采用方差分析。计数资料用阳性例数和阳性率来表示, 计数资料比较采用 χ^2 检验。HIF-1 α 表达与脑组织含水量进行 Spearman 相关分析, $P<$ 0.05 为有显著差异。

2 结果

2.1 HIF-1 α 蛋白在各组中的表达情况比较

HIF-1 α 主要表达于神经细胞胞核, 胞质中也有少量表达。出血灶边缘及坏死区表达明显增多。假手术组 8 只脑组织标本中 HIF-1 α 蛋白均呈阴性表达, 阳性率为 0%; 脑出血组血肿周边脑组织中有 30 例 HIF-1 α 蛋白呈阳性表达, 阳性表达率为 41.7%(30/72), 脑出血 EPO 干预组血肿周边脑组织中有 13 例 HIF-1 α 蛋白呈阳性表达, 阳性表达率为 18.1%(13/72), 各组比较有显著性差异($P<$ 0.05), 见表 1。

2.2 HIF-1 α 在脑出血组及脑出血 EPO 干预组的动态变化及比较

脑出血后, HIF-1 α 蛋白阳性表达率随时间进行性增加, 并于出血后第 72 小时达到高峰, 此后随着时间的延长, HIF-1 α 蛋白表达的阳性率逐渐下降, 脑出血后第 21 天血肿周边脑组织中尚可见到 HIF-1 α 蛋白的表达。脑出血组与脑出血 EPO 干预组于同一时间点 HIF-1 α 阳性率比较差异有显著性 ($P<$ 0.05); 脑出血组后一时间点与前一时间 HIF-1 α 阳性率比较, 差异有显著性 ($P<$ 0.05); 脑出血 EPO 干预组后一时间点与前一时间 HIF-1 α 阳性率比较, 差异有显著性, ($P<$ 0.05), 见表 2。

2.3 脑组织含水量的比较

颅内血肿形成 72h 内, 脑组织含水量呈进行性增加且于出血后第 72 小时达到高峰, 此后含水量逐渐下降, 出血第 21 天后脑组织含水量与正常对照组相比无明显差异。脑出血组及脑出血 EPO 干预组与假手术组脑组织含水量比较 ($P<$ 0.01), 见表 3—4。

表1 HIF-1 α 蛋白在各组中的表达情况

组别	例数	Hif-1 α (+)	Hif-1 α (-)	阳性率(%)
假手术组	8	0	8	0
脑出血组	72	30	42	41.7 ^{①②}
脑出血 EPO 干预组	72	13	59	18.1 ^{①②}

注:①脑出血组与脑出血 EPO 干预组比较 $P<0.01$;②脑出血组及脑出血 EPO 组与假手术组比较 $P<0.05$ 。

表2 HIF-1 α 在脑出血组及脑出血 EPO 干预组的动态变化及比较

	例数	脑出血组			脑出血 EPO 干预组		
		Hif-1 α (+)	Hif-1 α (-)	阳性率	Hif-1 α (+)	Hif-1 α (-)	阳性率
第3小时	8	0	8	0	0	8	0
第6小时	8	2	6	25.0 ^{①②}	1	7	12.5 ^③
第12小时	8	3	5	37.5 ^{①②}	2	6	25.0 ^③
第24小时	8	4	4	50.0 ^{①②}	2	6	25.0
第48小时	8	5	3	62.5 ^{①②}	3	5	37.5 ^③
第72小时	8	8	0	100.0 ^{①②}	4	4	50.0 ^③
第7天	8	5	4	62.5 ^{①②}	2	6	25.0 ^③
第14天	8	2	6	25.0 ^②	1	7	12.5 ^③
第21天	8	1	7	12.5	0	8	0

①脑出血组与脑出血 EPO 干预组于同一时间点 hif-1 α 阳性率比较 $P<0.05$; ②脑出血组后一时间点与前一时间 hif-1 α 阳性率比较 $P<0.05$;③脑出血 EPO 干预组后一时间点与前一时间 hif-1 α 阳性率比较 $P<0.05$ 。

表3 脑出血组及脑出血 EPO 干预组与假手术组

组别	例数	含水量
假手术组	8	78.88 \pm 0.56
脑出血组	72	85.36 \pm 0.23 ^①
脑出血 EPO 干预组	72	80.74 \pm 0.88 ^{①②}

①脑出血 EPO 组及脑出血组与假手术组比较, $P<0.01$; ②脑出血 EPO 干预组与脑出血组比较 $P<0.05$ 。

表4 脑出血组与脑出血 EPO 组各时间点脑水肿比较比较

	例数	脑出血组含水量	脑出血 EPO 干预组含水量
第3小时	8	77.42 \pm 0.38	76.86 \pm 0.15
第6小时	8	78.94 \pm 0.82 ^{①②}	77.41 \pm 0.51 ^③
第12小时	8	79.32 \pm 0.35 ^{①②}	78.32 \pm 0.19 ^③
第24小时	8	80.46 \pm 0.77 ^{①②}	79.36 \pm 0.43 ^③
第48小时	8	81.71 \pm 0.51 ^{①②}	80.20 \pm 0.18 ^③
第72小时	8	85.43 \pm 0.46 ^{①②}	81.56 \pm 0.36 ^③
第7天	8	80.36 \pm 0.52 ^{①②}	78.92 \pm 0.24 ^③
第14天	8	78.24 \pm 0.71 ^{①②}	77.32 \pm 0.21 ^③
第21天	8	77.22 \pm 0.64	76.65 \pm 0.15

①脑出血组与脑出血 EPO 组于同一时间点脑组织含水量比较, $P<0.01$; ②脑出血组后一时间点与前一时间点脑组织含水量比较, $P<0.01$;③脑出血 EPO 干预组后一时间点与前一时间点脑组织含水量比较, $P<0.01$ 。

对脑出血后不同时间脑水肿的程度和 HIF-1 α 表达进行相关性分析,脑水肿的程度与 HIF-1 α 表达成正相关($r=0.531, P<0.01$)。

3 讨论

促红细胞生成素是一种糖蛋白激素,分子质量为 34kD。血浆中存在的 EPO 由 165 个氨基酸组成,糖基化程度很高,糖基成分主要是唾液酸。位于人染色体 7p22。至少包括 5 个内含子^[1]。EPO 通过其受体 EPOR 发挥作用^[2],EPOR 属于细胞因子超家族成员(包括 IL-2, IL-6, 生长激素受体),是由 508 个氨

基酸残基组成的跨膜蛋白^[3]人体的 EPO 主要由肾脏产生,近年大量研究表明脑组织中有 EPO 和 EPOR 的表达。本研究所应用的 rhEPO 自 1985 年问世以来,临床上已大量应用治疗贫血。它是一种通过基因重组 DNA 技术生产的、含有与天然分离的 EPO 完全相同氨基酸序列的糖蛋白,生物学活性也极为相似,并已被证明很好地通过血-脑脊液屏障^[4]。Schumacker 等^[5]研究发现脑组织中 EPO 的生成量与大脑的供血、供氧情况相关,脑组织高度耗氧,对缺氧又高度敏感,因此在任何由脑缺血造成氧浓度降低的情况下时 EPO 的生成量成倍增加,并通过降低神经元对缺氧缺血的敏感性,增强神经元的存活能力,促进神经祖细胞的增殖和抑制凋亡。EPO 生成量的增加是因为细胞对缺氧的适应性,主要靠 HIF-1 调节^[6]。HIF-1 在缺血/缺氧性脑损伤中发挥极其重要的作用^[7]。而 HIF-1 是由 2 个蛋白质亚基(HIF-1 α 、HIF-1 β)组成的二聚体转录因子,但是其中 α 亚基受低氧诱导表达,是调节 HIF-1 活性的功能亚单位,决定 HIF-1 的转录活性及 DNA 结合活性; β 亚基则属构建型表达,所以缺氧时脑内 EPO 产生的机制^[8-9]可能为细胞缺血导致氧浓度降低,这时 HIF-1 α 产生并处于缺氧应答的关键环节,HIF-1 α 表达水平增加从胞浆移入胞核,与胞核内 HIF-1 β 结合产生 HIF-1,并与靶基因(如 EPO 基因、VEGF 基因^[10]、编码葡萄糖转运蛋白以及与糖酵解相关酶类的基因等)中的 EPO 基因的 HIF-1 结合点结合,促进 EPO 转录,EPO 与 EPO 受体结合使受体形成二聚体后从而发挥对细胞的保护作用,所以进一步研究腹腔注射 rhEPO 是否对大鼠脑出血后脑组织 HIF-1 α 具有干预作用以及对脑组织水肿的影响,以便为临床上应用 rhEPO 治疗脑血管病做铺垫。

实验证实,腹腔注射 rhEPO 后明显减少 HIF-1 α 蛋白在脑水肿周边神经元中的表达,这和 JiangY 等^[11]的研究结果大致相同,HIF-1 α 的表达提示神经细胞缺血、缺氧,其可能机制^[12]是由于脑出血后血肿的占位效应,脑血管自动调节发生障碍,再灌注期出现"无再流现象"以及血液活性物质随出血时间延长逐渐释放等原因导致血肿周边局部脑血流下降,血肿周边脑组织存在不同程度的缺血、缺氧,从而引起 HIF-1 α 在神经细胞中表达增加,降解减少。腹腔注射 rhEPO 明显减少血肿周围 HIF-1 α 表达,说明 rhEPO 具有对神经细胞在缺血、缺氧时起到明显的保护作用。李创华等^[13]的研究表明,脑出血 6h 后,血肿周围开始出现水肿,24-48h 内脑水肿的程度加重,一般认为,脑出血后第 3 天水肿程度达到高峰,本

实验也证实了脑组织水肿的上述变化过程。同时本实验证实 rhEPO 能降低脑组织的含水量, 表明 rhEPO 能明显减轻脑出血后的脑水肿。此外本研究显示, HIF-1 α 蛋白在脑出血后 72h 阳性表达率为 100%, 此后随着时间的延长, HIF-1 α 蛋白表达的阳性率逐渐下降, 与脑组织水肿程度存在一致性。经过对脑出血后不同时间 HIF-1 α 表达的情况和脑水肿的程度进行了相关性分析, 结果显示: HIF-1 α 的表达与脑水肿的程度成正相关($P < 0.01$)。可能是脑组织抗损伤的一种机制的体现, 可能为: 缺氧状态下细胞线粒体能够产生大量的活性氧 (ROS), ROS 能稳定 HIF-1 α , 使 HIF-1 α 免于被迅速降解^[4], 缺血再灌注后发生的 Fenton 反应所产生的羟自由基亦可稳定 HIF-1 α ^[15]。

本研究揭示了在 rhEPO 的干预下 HIF-1 α 和脑水肿在脑出血后的动态表达规律, 为在脑出血后的一定时间点进行药物干预和基因治疗提供了时间参考, 同时对 EPO 干预各种脑血管疾病的 HIF-1 及其目的基因为靶点进行基因治疗指明了方向。

参考文献

- [1] 赵荣瑞. 缺氧诱导因子-1 (HIF-1) 的基础研究与临床意义[J]. 山西医科大学学报, 2006, 37(3): 225—230.
- [2] 王岩松, 姚猛, 董大明, 等. 促红细胞生成素(EPO)的神经保护作用[J]. 中华神经外科杂志, 2005, 21(7): 445—448.
- [3] Oda A, Sawada K, Druker BJ, et al. Erythropoietin induces tyrosine phosphorylation of JAK2, STAT5A, and STAT5B in primary cultured human erythroid precursors [J]. Blood, 1998, 92(2): 443—447.
- [4] 赵晔, 丁文元, 张为, 等. 促红细胞生成素对大鼠急性脊髓损伤后后肢功能及 NF- κ B 表达的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2007, 22(10): 904—342.
- [5] Schumacker PT. Hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) [J]. Crit Care Med, 2005, 33(12 supply): s423—s425.
- [6] 孙忠玲, 赵仁亮. 脑缺血耐受大鼠 EPO mRNA 和 HIF-1 mRNA 表达的实验研究[J]. 中国老年学杂志, 2007, 6(27): 1151—1154.
- [7] 赵仁亮, 王春霞, 孙忠玲. 脑缺血耐受大鼠缺氧诱导因子-1 α 和促红细胞生成素的表达[J]. 中国康复医学杂志, 2007, 22(10): 881—884.
- [8] 魏灿杰, 唐涛罗, 杰坤, 等. 脑出血大鼠脑内 Angiopoietin-1 及其受体 Tie-2 表达的动态变化[J]. 中国康复医学杂志, 2007, 22(4): 881—884.
- [9] 鲍永霞, 吕福祯, 马迎军. 低氧对小鼠缺氧诱导因子-1 α , P53 和血管内皮生长因子表达的影响 [J]. 中国康复医学杂志, 2006, 21(5): 408—411.
- [10] Driesang IM, Hunziker EB. Delamination rates of tissue flaps used in articular cartilage repair [J]. J Orthop Res, 2000, 18(6): 909—911.
- [11] Jiang Y, Wu J, Keep RF, et al. Hypoxia inducible factor-1 α accumulation in the brain after experimental intracerebral hemorrhage [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2002, 22(6): 689—696.
- [12] 李强, 王爱岳, 刘运生. HIF-1 α 在脑出血灶周的表达及其与脑水肿的关系[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2007, 12(3): 161—164.
- [13] 李创华, 刘运生, 梁有明, 等. 局灶性低温治疗对创伤性脑损伤后脑水肿和一氧化氮合酶的影响[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2006, 12(5): 339—342.
- [14] Pang Y, Cui P, Chen W, et al. Quantitative study of tissue engineered cartilage with human bone marrow mesenchymal stem cells [J]. Arch Facial Plast Surg, 2005, 7(1): 7—11.
- [15] Lee JW, Kim YH, Kim SH, et al. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells and its clinical applications [J]. Yonsei Med, 2004, 45(Suppl): 41—47.

2009 年康复医学新技术与新进展国际研讨班招生通知

随着科学技术的进步, 神经生理学、神经生物学、功能神经影像学、计算机学、生物工程学等学科的发展, 极大地推动了康复医学的快速前进, 特别是各种新技术的应用给康复医学带来了新的气息。在传统治疗的基础上, 各种康复新技术的应用有助于提高康复治疗效果, 带来良好的经济效益和社会效益。推广先进的康复治疗技术是康复医学发展的需要。由中国医师协会康复医师分会、首都医科大学宣武医院举办的“2009 年康复医学新技术与新进展国际研讨班”于 2009 年 5 月在北京举行, 届时将邀请美国纽约大学 Rusk 康复中心 Bryan O'young 教授、美国约翰·霍普金斯大学康复系 Zorowitz 教授、德国 Orthotrain Berlin 骨科和运动损伤康复医院 Oliver Kieffe 教授、德国科隆体育大学康复医院 PT 长 Eibo Schwitters 教授等国内外知名康复专家介绍最新的康复治疗技术和新进展。

授课主要内容: 卒中康复治疗的新进展; 脑损伤植物状态促醒研究的新进展; 经颅磁刺激(TMS)在康复医学中的应用; 功能性电刺激(FES)在康复医学中的应用; 骨科康复治疗技术的基本理论及新进展; 骨科康复治疗的临床原则实例; 下腰背疼痛的康复、前交叉韧带重建术后的康复; 肩痛的康复; 疼痛的康复治疗技术及最新进展; 康复治疗技术的新动态; 失语症心理语言评价及吞咽障碍评价治疗技术进展; 临床各种康复治疗新技术实习。

培训对象: 康复科医师、治疗师、神经科医师、骨科医师以及相关临床、科研及治疗人员; **报到时间:** 2009 年 5 月 7 日; **报到地点:** 大府宾馆(北京市宣武区长椿街 45 号); **培训地点:** 首都医科大学宣武医院(大府宾馆斜对面); **培训时间:** 2009 年 5 月 8—10 日; **收费标准:** 培训费 1000 元(包括学费和资料费), 住宿费、膳食费、差旅费及往返车船机票自理。

培训结束后, 将授予国家级继续教育 I 类学分及培训合格证书; 届时符合条件人员可以现场办理中国医师协会康复医师分会会员证(会员费 100 元)。请于 2009 年 4 月 20 日前将报名回执寄到: 北京市宣武区长椿街 45 号宣武医院康复医学科, 100053, 张艳明收; 欢迎电话报名和电子邮件报名, 咨询电话: 010-83198326, 手机: 13641026802, 传真: 010-83156838; 联系人: 张艳明; 电子信箱: kfysfh@yahoo.cn。