

论著·实验研究

Rock2 和 TGF-β1 在哮喘大鼠中的表达及药物干预

郑昌华¹ 童夏生² 李彬斐² 张维溪³ 李昌崇³

(1. 温州医学院附属温岭医院儿科, 浙江 温岭 317500; 2. 台州市中西医结合医院, 浙江 温岭 317500;
3. 温州医学院附属育英儿童医院, 浙江 温州 325027)

[摘要] 目的 探讨 Rho 激酶 2 (Rock2) 和转化生长因子-β1 (TGF-β1) 在哮喘急性发作期的作用及糖皮质激素干预对其表达的影响。方法 48 只大鼠随机分为哮喘组 (AST 组)、对照组 (CON 组)、地塞米松治疗组 (DXM 组) 和布地奈德治疗组 (BUD) 4 组, 每组 12 只。用改良卵白蛋白进行致敏和激发制备大鼠哮喘模型, 观察大鼠肺组织病理变化、分析支气管肺泡灌洗液 (BALF) 中的细胞计数。采用免疫组织化学法测定 Rock2 蛋白质表达和原位杂交法测定 TGF-β1 mRNA 表达。结果 BUD 组和 DXM 组大鼠病理变化较哮喘组明显减轻。哮喘组 BALF 细胞总数、嗜酸性粒细胞 (EOS)、多形核粒细胞 (PMN) 和淋巴细胞 (Lym) 百分率均显著高于 CON 组 ($P < 0.01$), 巨噬细胞 (Mφ) 百分率显著低于对照组 ($P < 0.01$), 而 BUD 和 DXM 组中 BALF 中细胞总数及 EOS、Lym 百分率低于哮喘组, Mφ 百分率显著高于哮喘组。哮喘组肺组织中 Rock2 及 TGF-β1 mRNA 表达显著高于 CON、BUD 和 DXM 组 ($P < 0.01$), 而 BUD、DXM 组与对照组相比, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 哮喘急性发作期 Rock2 和 TGF-β1 的表达显著增加; 糖皮质激素干预可降低 Rock2 和 TGF-β1 的表达水平, 从而减轻哮喘气道炎症。

[中国当代儿科杂志, 2010, 12(11): 877-881]

[关键词] 哮喘; Rho 激酶; 转化生长因子; 糖皮质激素; 大鼠

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2010)11-0877-05

Expression of Rock2 and TGF-β1 mRNA and glucocorticoid intervention in asthmatic rats

ZHENG Chang-Hua, TONG Xia-Sheng, LI Bin-Fei, ZHANG Wei-Xi, LI Chang-Chong. Wenling Affiliated Hospital, Wenzhou Medical College, Wenzhou, Zhejiang 317500, China (Email: zhengchanghua0402@163.com)

Abstract: Objective To study the roles of rho-associated coiled coil forming protein kinase 2 (Rock2) and transforming growth factor-β1 (TGF-β1) mRNA in acute asthma and the effect of glucocorticoid intervention on the Rock2 and TGF-β1 mRNA expression in rats. **Methods** Forty-eight male rats were randomly divided into 4 groups ($n = 12$ each): asthma, control, dexamethasone treated (DXM) and budesonide treated (BUD). Rat model of asthma was prepared by the ovalbumin (OVA) challenge. The animals were sacrificed 24 hrs after the last challenge. The total cell number and differentiation cell number were counted in bronchoalveolar lavage fluid (BALF). The protein expression of Rock2 was ascertained by immunohistochemistry and the mRNA expression of TGF-β1 was ascertained by hybridization *in situ*. **Results** The pathological changes in the BUD and the DXM groups were alleviated when compared with the asthma group. The total cell number and the percentage of eosinophil (EOS), polymorphonuclear leukocytes (PMN) and lymphocytes (Lym) in BALF in the asthma group were significantly higher than those in the control group ($P < 0.01$). The percentage of macrophage (Mφ) in the asthma group was significantly lower than that in the control group ($P < 0.01$). The total cell number and the percentage of EOS and Lym in BALF in the DXM and the BUD groups decreased, while the percentage of Mφ increased significantly compared with those in the asthma group ($P < 0.01$). The Rock2 and TGF-β1 mRNA expression in lung tissues in the asthma group increased significantly compared with those in the control, BUD and DXM groups, while there were no significant differences in the Rock2 expression and TGF-β1 mRNA expression between the DXM or BUD group and the control group. **Conclusions** The expression of Rock2 and TGF-β1 mRNA in lung tissues is increased in rats with acute asthma. Glucocorticoids can significantly decrease the expression of Rock2 and TGF-β1 in lung tissues, thus alleviates airway inflammation. [Chin J Contemp Pediatr, 2010, 12(11): 877-881]

Key words: Asthma; Rho-associated coiled coil forming protein kinase; Transforming growth factor; Glucocorticoid; Rats

[收稿日期] 2010-02-18; [修回日期] 2010-05-07

[基金项目] 温岭市科技局基金资助项目 (温科 2006015041)。

[作者简介] 郑昌华, 男, 硕士研究生, 副主任医师。

支气管哮喘(简称哮喘)是呼吸系统的常见病和多发病,在世界范围内哮喘患病率和死亡率仍有上升趋势,尤其在儿童,已成为最常见的慢性疾患。Rho 激酶(rho-associated coiled coil forming protein kinase, Rock)是一类 Rho 相关丝氨酸/苏氨酸激酶,是 Rho/Rock 信号通路的主要信号分子^[1],在调节血管平滑肌细胞收缩及其他细胞功能(如细胞增殖和迁移)中发挥非常重要的作用。Rock 的功能之一是使肌球蛋白轻链(MLC)磷酸化,引起平滑肌收缩。转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)是一个结构相关的生长因子大家族的一员,具有广泛调节细胞增殖、分化和凋亡等生物功能^[2],可通过刺激气道平滑肌细胞增殖、诱导气道肌成纤维细胞转化、促进细胞外基质合成使上皮胶原沉积等,进而直接参与哮喘气道炎症和重构的发生、发展过程。两者均与哮喘的发生和发展具有密切的联系,但两者之间的相关性研究却鲜见报道。本研究通过制备大鼠哮喘模型,观察大鼠肺组织病理变化、分析 BALF 中的细胞总数和分类计数,免疫组织化学法和原位杂交法测定 Rock2 和 TGF- β 1 在支气管平滑肌中的表达情况,探讨它们在哮喘发作中的作用及它们之间的相关性和早期糖皮质激素干预抑制哮喘发展的可能机制和防治前景。

1 材料与方法

1.1 材料

健康清洁级雄性 Sprague-Dawley (SD)大鼠 48 只,6~8 周龄,体重 220~250 g,由温州医学院实验动物中心提供;卵蛋白(OVA)干粉是美国 Sigma 公司产品,4%多聚甲醛-PBS 溶液、TGF- β 原位杂交试剂盒、Rock2 免疫组化试剂盒、DEPC 试剂均为武汉博士德公司产品,布地奈德混悬液为阿斯利康公司产品。

1.2 研究方法

1.2.1 动物模型的建立 SD 大鼠随机分成 4 组,每组 12 只,分别为对照组、哮喘组、地塞米松治疗组(DXM 组)、布地奈德治疗组(BUD 组),参照李昌崇等^[3]报道方法制备大鼠哮喘模型。具体方法如下:哮喘组大鼠分别于第 1 天和第 8 天腹腔注射含 OVA 1 mg 和 Al(OH)₃ 100 mg 的 OVA/Al(OH)₃ 混合液 1 mL 致敏,第 15 天开始用 1% OVA 生理盐水雾化吸入进行激发,每天 1 次,每次 30 min,连续 2 周;DXM 组和 BUD 组处理基本同哮喘组,不同的是 BUD 组于每次抗原激发前 30 min 给予布地奈德混悬液 0.5 mg 雾化吸入,每 12 h 1 次,每次 20 min;

DXM 组于首次抗原激发前 24 h 和每次激发前 1 h 给予地塞米松 1 mg/kg 腹腔注射;对照组在致敏和激发阶段均用生理盐水代替 OVA。

1.2.2 肺组织标本切片观察及 BALF 中细胞总数计数和分类计数 各组大鼠于末次激发 24 h 后,腹腔注射 20% 乌拉坦(5 mL/kg)麻醉致死。结扎左肺门,用含 0.1% DEPC 液的 PBS 处理过的器械取左肺靠近肺门部位组织块,用 4% 多聚甲醛-PBS(含 0.1% DEPC 液)溶液固定,常规石蜡包埋。苏木精-伊红染色光镜观察肺组织、支气管壁炎症细胞浸润情况;免疫组化法和原位杂交法检测 Rock2 和 TGF- β 表达。右肺用 10 mL 生理盐水分 2 次进行支气管肺泡灌洗,回收支气管肺泡灌洗液(BALF),BALF 经离心(3 000 转/min,4℃)10 min,取上清液 -20℃ 保存。沉淀物用 PBS 重悬至 2 mL,在高倍显微镜下进行细胞计数。分类计数用瑞氏液。EOS 计数用伊红染色液。

1.2.3 免疫组织化学法测定肺组织 Rock2 蛋白的表达 按照 Rock2 免疫组化试剂盒步骤操作,检测肺组织 Rock2 蛋白表达。显微镜观察,阳性结果细胞浆着色呈棕黄色。每只大鼠取 2 张肺组织切片,每张切片随机选取 5 个含有支气管黏膜的视野,200 倍光镜下测量阳性部位的吸光度值(OD 值),取其平均值为该大鼠的代表值。

1.2.4 原位杂交技术检测肺组织 TGF- β 1 mRNA 的表达 TGF- β 1 靶基因的 mRNA 序列为:1、5'-ACCTGCAAGACCATCGACATGGAGCTGGTG-3'; 2、5'-TGTACAACAGCACCCGCGACCGGTGGCAG-3'; 3、5'-CTACCAGAAATATAGCAACAATTCCTGGCG-3'; 按照 TGF- β 原位杂交试剂盒步骤操作。显微镜观察,阳性结果细胞浆着色呈棕黄色。采用图像象分析系统,每只大鼠取 2 张肺组织切片,每张切片随机选取 5 个含有支气管腔黏膜的视野,200 倍光镜下测量阳性部位的 OD 值,取其平均值为该大鼠的代表值。

1.3 统计学分析

实验数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 11.0 统计软件进行分析。多组间比较采用方差分析,多组间两两比较采用 LSD 检验或 Tamhane/T2 检验,两变量的相关分析用直线相关分析法分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠症状及 BALF 中细胞计数

哮喘组大鼠经致敏后在激发时出现烦躁不安、

呼吸急促、腹肌抽搐等症状,重者呼吸减慢、节律不齐、出现紫绀、动作迟缓、俯伏不动。典型发作可闻及呼气相喘鸣音,毛色失去光泽,反应迟钝。对照组无上述症状,BUD组和DXM组大鼠喘息症状不明显,部分表现为轻度呼吸急促。

哮喘组BALF细胞总数及嗜酸性粒细胞(EOS)、多形核粒细胞(PMN)、淋巴细胞(Lym)占细胞总数的百分比均显著高于对照组($P < 0.01$),巨噬细胞(M ϕ)占细胞总数的百分比显著低于对照组($P < 0.01$);BUD组和DXM组BALF中PMN与哮

喘组相比差异无统计学意义($P > 0.05$),但细胞总数以及EOS、Lym占细胞总数的百分比均低于哮喘组($P < 0.01$),M ϕ 占细胞总数的百分比均显著高于哮喘组($P < 0.01$);BUD组和DXM组BALF中细胞总数和Lym占细胞总数的百分比与对照组相比差异无统计学意义($P > 0.05$),EOS、PMN占细胞总数的百分比均显著高于对照组($P < 0.01$),M ϕ 占细胞总数的百分比均显著低于对照组($P < 0.01$);BUD组和DXM组相比各指标差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表1。

表1 4组大鼠BALF中细胞总数和分类计数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	细胞总数 ($\times 10^9/L$)	EOS绝对值 ($\times 10^7/L$)	分类计数(%)			
				Lym	PMN	M ϕ	EOS
对照组	10	1.11 \pm 0.11	1.1 \pm 0.7	17 \pm 3	3.3 \pm 0.8	79.3 \pm 3.8	1.0 \pm 0.6
哮喘组	12	2.54 \pm 0.20 ^a	11.2 \pm 2.4 ^a	25 \pm 5 ^a	11.1 \pm 3.0 ^a	58.7 \pm 5.3 ^a	4.4 \pm 0.8 ^a
DXM组	11	0.99 \pm 0.23 ^b	2.2 \pm 1.0 ^{a,b}	19 \pm 5 ^b	10.0 \pm 3.3 ^a	68.3 \pm 7.2 ^{a,b}	2.2 \pm 0.8 ^{a,b}
BUD组	11	1.01 \pm 0.12 ^b	2.7 \pm 1.5 ^{a,b}	18 \pm 5 ^b	13.3 \pm 3.2 ^a	66.2 \pm 5.7 ^{a,b}	2.6 \pm 1.2 ^{a,b}
F值		221.54	99.86	8.05	24.69	24.47	28.68
P值		< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01

a: 与对照组比较, $P < 0.01$; b: 与哮喘组比较, $P < 0.01$ 。

注: 实验过程中因各种原因大鼠死亡,故表1中例数与原来每组12只不一致,下同。

2.2 各组大鼠肺组织切片苏木精-伊红染色结果

对照组:细支气管形态规则,上皮完整,细支气管、肺泡隔及血管壁周围偶见炎性细胞浸润,支气管腔分泌物少,肺泡形态规则。哮喘组:细支气管形态不规则,平滑肌轻度肥厚;支气管壁和血管壁见较多的炎性细胞浸润,以PMN、M ϕ 和Lym为主;部分上皮细胞在支气管腔内排列不完整,出现损伤、脱落、

基底膜增厚且形态不规则;有炎症细胞嗜上皮现象;M ϕ 、Lym聚集取代上皮;支气管腔内见黏液栓和炎性渗出物;杯状细胞增生;肺间质和肺泡腔内可见炎性细胞浸润,以PMN、M ϕ 和Lym为主,M ϕ 、Lym呈灶状聚集。BUD组及DXM组:肺组织病理改变与哮喘组比较明显减轻,但肺组织中见较多PMN聚集。见图1。

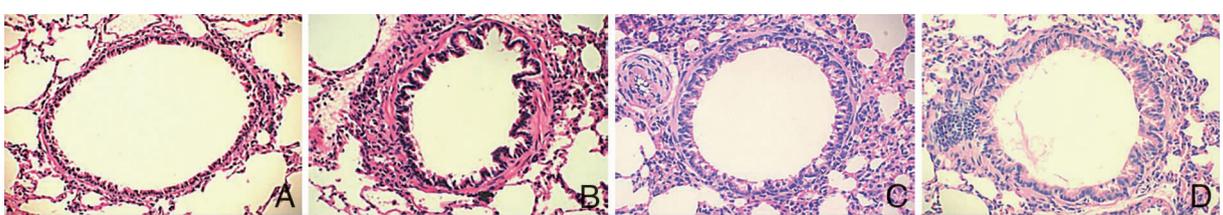


图1 肺组织切片苏木精-伊红染色结果($\times 200$) A: 对照组,细支气管形态规则,上皮完整; B: 哮喘组,支气管壁可见较多炎性细胞浸润; C: DXM组,病理改变较哮喘组减轻; D: BUD组,病变较哮喘组减轻。

2.3 各组大鼠肺组织 Rock2 表达

哮喘组肺组织 Rock2 表达的 OD 值显著高于对照组($P < 0.01$),BUD组和DXM组的 Rock 2 表达与对照组相比差异均无统计学意义($P > 0.05$),但显著低于哮喘组($P < 0.01$)。见表2。

表2 各组大鼠肺组织 Rock2 表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	Rock2
对照组	10	0.077 \pm 0.011
哮喘组	12	0.159 \pm 0.017 ^a
DXM组	11	0.083 \pm 0.010 ^b
BUD组	11	0.086 \pm 0.011 ^b
F值		109.859
P值		< 0.01

a: 与对照组比较, $P < 0.01$; b: 与哮喘组比较, $P < 0.01$ 。

2.4 各组大鼠肺组织 TGF-β1 mRNA 表达

哮喘组肺组织 TGF-β1 mRNA 表达的 OD 值显著高于对照组 ($P < 0.01$), DXM 组和 BUD 组的 TGF-β1 表达与对照组相比, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 但低于哮喘组 ($P < 0.01$)。见表 3。

表 3 各组大鼠肺组织 TGF-β1 mRNA 表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	TGF-β1 mRNA
对照组	10	0.069 ± 0.011
哮喘组	12	0.128 ± 0.012 ^a
DXM 组	11	0.074 ± 0.012 ^b
BUD 组	11	0.070 ± 0.010 ^b
F 值		71.689
P 值		< 0.01

a: 与对照组比较, $P < 0.01$; b: 与哮喘组比较, $P < 0.01$

2.5 Rock2 与 TGF-β1 的表达水平相关性分析

肺组织中 Rock2 与 TGF-β1 的表达水平呈显著正相关 ($r = 0.859, P < 0.01$)。见图 2。

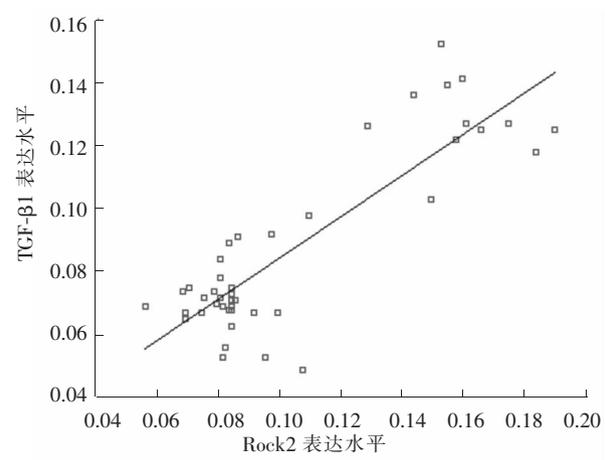


图 2 Rock2 与 TGF-β1 表达水平之间的相关分析

3 讨论

哮喘是一种气道炎症性疾病, 其病理改变以气道嗜酸性粒细胞、肥大细胞和 T 淋巴细胞浸润及包括上皮下基底膜增厚、气道平滑肌肥大和增生在内的组织重构(气道重构)为特征^[4]。最近研究表明, 除炎症细胞外, 一些结构细胞如气道上皮细胞、内皮细胞、成纤维细胞甚至气道平滑肌细胞也在哮喘的发病机理中发挥着作用。在气道的慢性炎症中, 炎症细胞和一些结构细胞被激活, 释放生长因子、细胞因子、炎症介质和酶类, 刺激平滑肌细胞和成纤维细

胞, 使平滑肌增厚和气道壁纤维增生, 使细胞合成分泌细胞外基质, 尤其是胶原纤维增多, 造成基底膜增厚。

Rho 调节细胞的多种行为与功能, 包括收缩、游走黏附、生长分裂以及肿瘤细胞的转化与浸润等。近来的研究表明^[1,4-7], 气道高反应性是哮喘的主要特点, 而呼吸道平滑肌张力和收缩力的增加则是气道高反应性的基础。Rho/Rock 活化使肌球蛋白轻链磷酸化水平增加、呼吸道平滑肌张力增加, 构成了呼吸道高反应性产生的重要机制。TGF-β 超家族包括多种 TGF-β、活化素、骨形态发生蛋白等多种细胞因子, 这些细胞因子发挥包括细胞增殖、分化、凋亡等一系列生物学功能。TGF-β1 下降可恶化哮喘的病理过程, TGF-β1/EGF 的失衡意味着上皮内抑制增生和促进增生的信号间失衡, 导致呼吸道上皮无法正常修复, 进而发生支气管哮喘^[7]。本研究发现, 哮喘组大鼠气道腔明显变小, 气道壁增厚, 气道 Rock2 的表达水平显著增加, 表明在卵蛋白反复激发引起的大鼠哮喘模型存在气道 Rock2 合成和分泌增加, 而 DXM 组和 BUD 组的 Rock2 表达水平显著低于模型组。结果揭示早期糖皮质激素干预可通过减少 Rock2 的表达从而抑制了大鼠哮喘模型早期气道重构过程的发生发展; 哮喘组 TGF-β1 的表达水平较正常对照组显著性增加, 提示哮喘时 TGF-β1 的表达水平增加, 可能参与哮喘急性发作过程。同时发现 Rock 与 TGF-β1 之间呈显著正相关, 表明两者参与哮喘急性发作期的发病过程, 并且相互协同。

糖皮质激素抑制气道炎症的作用, 是通过与细胞浆中的受体结合后, 经由复杂的信号传递, 调节细胞内靶基因的表达而实现。国内外研究表明, 糖皮质激素干预可抑制哮喘气道重构的发生和发展, Hoshino 等^[8]发现哮喘患者吸入二丙酸倍氯米松治疗 6 个月后, 胶原纤维沉积显著减少, 黏膜下 MMP-9 表达减少, TIMP-1 表达增加, 气道黏膜中多种炎症细胞和成纤维细胞数量明显减少。Olivieri 等^[9]观察到轻度哮喘患者吸入丙酸氟替卡松减少了黏膜固有层炎症细胞浸润, 降低气道基底膜的厚度, 减轻了气道重构的程度。本研究中吸入布地奈德干预哮喘大鼠, 与全身应用激素(地塞米松)比较, 具有同样疗效, 均可显著抑制哮喘大鼠模型 Rock2 和 TGF-β1 的合成和分泌, 此结果对哮喘应用糖皮质激素进行干预及减轻哮喘气道重构具有重要意义。

综上所述, 研究结果显示哮喘急性发作期 Rock2 和 TGF-β1 的表达显著增加, 它们相互之间呈显著正相关, 且糖皮质激素早期干预可减少 Rock2

和 TGF-β1 的表达,通过降低它们的表达水平,从而减轻哮喘气道炎症。深入研究 Rock 和 TGF-β 在信号通路及其受体拮抗剂在哮喘发生、发展中的作用,不仅有助于阐明哮喘的发病机制,也有助于为哮喘的治疗提供新的靶点。

[参 考 文 献]

[1] 孙兴珍,王大为,李军,杨世伟,程学英. Rock-1 基因在缺氧性肺动脉高压大鼠肺组织中的表达及法舒地尔的预防作用[J]. 南京医科大学学报:自然科学版,2006,26(2):96-100.

[2] Scherf W, Burdach S, Hansen G. Reduced expression of transforming growth factor beta 1 exacerbates pathology in an experimental asthma model[J]. Eur J Immunol, 2005, 35(1):198-206.

[3] 李昌崇,叶辉,陈利中,应小明. 布地奈德对哮喘大鼠碱性成纤维细胞生长因子蛋白和 mRNA 表达的影响[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2006, 11(7):739-742.

[4] Mylonis I, Chachami G, Samiotaki M, Panayotou G, Paraskeva E, Kalousi A, et al. Identification of MAPK phosphorylation sites and their role in the localization and activity of hypoxia-inducible factor -1-alpha[J]. J Biol Chem, 2006, 281(44): 33095-33106.

[5] 杨敏,邵玉霞,邓立力,王金山. 早期吸入糖皮质激素对哮喘大鼠气道重塑及 IGF1 表达的影响[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2004, 38(2):175-176.

[6] Henry P, Mann T. A Rho kinase inhibitor, Y227632 inhibits pulmonary eosinophilia, bronchoconstriction and airways hyperresponsiveness in allergic mice[J]. Pulm Pharnal Ther, 2005, 18(1):67-74.

[7] Jin L, Ying Z, Webb RC. Activation of Rho/Rho kinase signaling pathway by reactive oxygen species in rat aorta[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004, 287(4):H1495-1500.

[8] Hoshino M, Takahashi M, Takai Y, Sim J. Inhaled corticosteroids decrease subepithelial collagen deposition by modulation of the balance between matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 expression in asthma[J]. J Allergy Clin Immunol, 1999, 104(2 Pt 1):356-363.

[9] Olivieri D, Chetta A, Del Donno M, Bertorelli G, Casalini A, Pesci A, et al. Effect of short-term treatment with low-dose inhaled fluticasone propionate on airway inflammation and remodeling in mild asthma: a placebo-controlled study[J]. Am J Respir Crit Care Med, 1997, 155(6):1864-1871.

(本文编辑:俞 燕)

· 消息 ·

2011 中国儿童血液净化论坛征文通知

为了提高认识在我国开展儿童血液净化工作的重要性和紧迫感,由中国医师协会儿科医师分会儿科血液净化专业学组主办、珠海健帆生物科技有限公司协办,“2011 中国儿童血液净化论坛”将于 2011 年 3 月 10 ~ 12 日在长沙举行。论坛主题为“推进儿童血液净化,提高儿科救治水平”。论坛将邀请我国儿童血液净化专家作如下专题讲座:(1)儿童血液净化的适应证与禁忌证;(2)儿童血液净化血管通路的建立;(3)儿童腹膜透析;(4)儿童血液透析;(5)儿童血液透析滤过;(6)儿童血液灌流;(7)儿童血浆置换;(8)儿童血液免疫吸附;(9)儿童连续肾脏替代治疗;(10)儿童血液净化时机的确定;(11)儿童血液净化模式的选择;(12)慢性肾衰竭儿童营养与透析;(13)儿童透析并发症;(14)儿童血液净化机构的设置与装备。

为了让广大儿科同仁参加此次学术盛会,特向全国征文。征文内容包括以上专题相关的科研论著、临床研究、循证研究、病例报告、综述等。请于 2011 年 2 月 12 日前将 800 字以内的摘要以 Word 文档发至下列邮箱。联系人:中南大学湘雅二医院儿科肾脏病专科易著文,联系电话:0731-85292170, E-mail:yizhuwen@yahoo.com.cn。

中国医师协会儿科医师分会
2011 中国儿童血液净化论坛组委会