

## 脂多糖诱导血管平滑肌细胞分泌白细胞介素-6 及 p38 丝裂素活化蛋白激酶的调控作用

楚玉峰 姜毅 张继承 任宏生 蒋进蛟 孟玫 王春亭

**【摘要】** 目的 探讨 p38 丝裂素活化蛋白激酶(MAPK)信号转导通路在脂多糖(LPS)作用下血管平滑肌细胞(VSMC)分泌白细胞介素-6(IL-6)中的调节作用。方法 将体外培养的大鼠胸主动脉 VSMC 分为 LPS 刺激组、p38MAPK 抑制剂 SB203580 干预组、SB203580 对照组和溶液对照组。LPS 组以终浓度 100  $\mu\text{g/L}$  的 LPS 与 VSMC 共同孵育;干预组 VSMC 以 p38MAPK 抑制剂 SB203580 10  $\mu\text{mol/L}$  预处理 2 h,再加入终浓度 100  $\mu\text{g/L}$  的 LPS 共同孵育;对照组仅以 SB203580 10  $\mu\text{mol/L}$  预处理 2 h;溶液组仅加入去血清培养液培养。各组于培养 0、3、6、12、24 h 后采用实时聚合酶链反应(real-time PCR)和酶联免疫吸附法(ELISA)分别检测细胞 IL-6 mRNA 和上清液中 IL-6 蛋白表达。结果 LPS 刺激 3 h, VSMC 中 IL-6 mRNA 和蛋白表达即出现明显增高[mRNA( $21.3 \pm 3.2$ ) $\times 10^4$ , 蛋白( $296.2 \pm 19.6$ ) ng/L], 12 h 达高峰[mRNA( $131.4 \pm 11.2$ ) $\times 10^4$ , 蛋白( $897.7 \pm 34.0$ ) ng/L], 24 h 有所降低[mRNA ( $15.3 \pm 4.7$ ) $\times 10^4$ , 蛋白( $194.3 \pm 24.0$ ) ng/L],但仍显著高于溶液组[mRNA( $9.4 \pm 1.9$ ) $\times 10^4$ , 蛋白( $29.4 \pm 4.4$ ) ng/L, 均  $P < 0.05$ ]。干预组 3、6、12 h 可明显抑制 LPS 诱导 VSMC 中 IL-6 的分泌[mRNA( $15.4 \pm 3.6$ ) $\times 10^4$ , ( $43.2 \pm 6.6$ ) $\times 10^4$ , ( $56.2 \pm 5.5$ ) $\times 10^4$ , 蛋白( $180.3 \pm 23.6$ ), ( $432.2 \pm 56.8$ ), ( $546.2 \pm 57.9$ ) ng/L, 均  $P < 0.05$ ]。结论 LPS 诱导 VSMC 可明显增加 IL-6 的 mRNA 和蛋白表达, p38MAPK 抑制剂 SB203580 可显著抑制 IL-6 转录和蛋白合成,表明 p38MAPK 信号转导通路可能通过直接或间接作用参与了 IL-6 的分泌调节作用。

**【关键词】** 白细胞介素-6; p38 丝裂素活化蛋白激酶; 脂多糖; 血管平滑肌细胞

**The role of p38 mitogen-activated protein kinase in interleukin-6 induction by lipopolysaccharide in vascular smooth muscle cells** CHU Yu-feng\*, JIANG Yi, ZHANG Ji-cheng, REN Hong-sheng, JIANG Jin-jiao, MENG Mei, WANG Chun-ting. \* Provincial Hospital Affiliated to Shandong University, Jinan 250021, Shandong, China

Corresponding author: WANG Chun-ting, Email: wangchunting7051@126.com

**【Abstract】** **Objective** To investigate the regulation mechanism of p38 mitogen-activated protein kinase (p38MAPK) in interleukin-6 (IL-6) expression of vascular smooth muscle cell (VSMC) induced by lipopolysaccharide (LPS). **Methods** Rat VSMCs were divided into LPS group, SB203580 + LPS group, SB203580 group and control group. LPS group was treated with 100  $\mu\text{g/L}$  LPS for 0, 3, 6, 12, 24 hours, SB203580 + LPS group was first treated with 10  $\mu\text{mol/L}$  SB203580 for 2 hours and then exposed to 100  $\mu\text{g/L}$  LPS for 0, 3, 6, 12, 24 hours, SB203580 group was pretreated with 10  $\mu\text{mol/L}$  SB203580 for 2 hours. The level of IL-6 mRNA was determined by real-time polymerase chain reaction (PCR) and IL-6 secretion in the culture medium was measured by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) at different time points. **Results** The expression of IL-6 mRNA and the release of IL-6 were increased significantly in VSMC as early as 3 hours after being treated with LPS [mRNA: ( $21.3 \pm 3.2$ ) $\times 10^4$ , protein: ( $296.2 \pm 19.6$ ) ng/L], peaked in 12 hours [mRNA: ( $131.4 \pm 11.2$ ) $\times 10^4$ , protein: ( $897.7 \pm 34.0$ ) ng/L], and the elevation persisted up to 24 hours after treatment [mRNA: ( $15.3 \pm 4.7$ ) $\times 10^4$ , protein: ( $194.3 \pm 24.0$ ) ng/L] compared with control group [mRNA: ( $9.4 \pm 1.9$ ) $\times 10^4$ , protein: ( $29.4 \pm 4.4$ ) ng/L, all  $P < 0.05$ ]. On the other hand, the expression of IL-6 was significantly suppressed by p38MAPK inhibitor SB203580 at 3, 6, 12 hours [mRNA: ( $15.4 \pm 3.6$ ) $\times 10^4$ , ( $43.2 \pm 6.6$ ) $\times 10^4$ , ( $56.2 \pm 5.5$ ) $\times 10^4$ , protein: ( $180.3 \pm 23.6$ ), ( $432.2 \pm 56.8$ ), ( $546.2 \pm 57.9$ ) ng/L, all  $P < 0.05$ ]. **Conclusion** The release of IL-6 and the expression of IL-6 mRNA was increased significantly in LPS-challenged VSMC; however, the induction of IL-6 was significantly suppressed by p38MAPK inhibitor. p38MAPK may play an important role in the release of IL-6 induced by LPS.

**【Key words】** Interleukin-6; p38 mitogen-activated protein kinase; Lipopolysaccharide; Vascular smooth muscle cell

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2010.05.012

基金项目:山东省医药卫生科技发展计划项目(2009HZ055)

作者单位:250021 济南,山东大学附属省立医院(楚玉峰、张继承、任宏生、蒋进蛟、孟玫、王春亭);山东省龙口市人民医院(姜毅) 通信作者:王春亭,Email:wangchunting7051@126.com

在脓毒症的发生发展过程中,白细胞介素-6(IL-6)是启动炎症反应的关键细胞因子,又称前炎症细胞因子<sup>[1]</sup>,被认为与脓毒症的严重程度和高致死率密切相关<sup>[2]</sup>。目前IL-6的相关研究多集中于内皮细胞,而同样作为重要炎性细胞的血管平滑肌细胞(VSMC)是否也具有分泌IL-6的作用,以及通过何种机制调节IL-6分泌,国内尚未见研究报道。本研究中以脂多糖(LPS)诱导VSMC,观察其对IL-6分泌的影响,并探讨p38丝裂素活化蛋白激酶(MAPK)信号转导通路在该过程中的作用,以期对明确脓毒症的早期致病机制提供理论和实验依据。

1 材料与方 法

1.1 VSMC的分离培养:8周龄雄性SD大鼠(购自山东大学实验动物中心),体重150~200g,断头处死后分离胸主动脉,用组织贴块法培养VSMC<sup>[3]</sup>。实验采用3~5代细胞。

1.2 实验分组及处理:细胞用胰蛋白酶消化传代,以细胞数 $2 \times 10^4$ 个/孔接种于96孔板,将细胞分成4组,每组4孔,重复实验3次。①LPS组:以终浓度100 μg/L LPS加入去血清培养液中与VSMC共同孵育;②干预组:以p38MAPK抑制剂SB203580 10 μmol/L预处理2h,加入含终浓度100 μg/L的LPS去血清培养液培养;③对照组:仅以SB203580 10 μmol/L预处理2h;④溶液组:仅加入去血清培养液培养。各组细胞分别培养0、3、6、12、24h并进行指标检测。

1.3 细胞总RNA抽提及逆转录反应:TRIzol试剂提取细胞总RNA,预冷磷酸盐缓冲液(PBS)洗细胞3次,每孔加TRIzol 1ml,细胞裂解后加三氯甲烷,混匀后静置,离心沉淀,乙醇洗涤,干燥后加焦碳酸二乙酯(DEPC)处理的双蒸水,同时加RNA酶抑制剂。鉴定RNA纯度,进行逆转录,反应程序为37℃水浴1h,95℃热变性5min,以管家基因β-肌动蛋白(β-actin),取逆转录cDNA 1 μg进行聚合酶链反应(PCR),合成的cDNA于-20℃储存备用。

1.4 细胞中IL-6 mRNA表达测定:根据GeneBank数据库公开发表的基因序列设计IL-6和内参基因β-actin引物,采用实时PCR检测IL-6 mRNA表达。反应条件:95℃预变性300s;95℃20s,60℃退火和延伸45s,40个循环,以SYBER Green 荧光染料在延伸结束后采集数据。取PCR产物测序,确认扩增成功。确定各样本中目的基因和内参基因荧光信号达到阈值时所经历的循环数,即Ct值,根据公式 $\Delta Ct(\text{样本}) = \text{目的基因 Ct 值} - \text{内参基因 Ct 值}$ , $2^{-\Delta Ct}$ 即为样本目的基因的相对表达量。

1.5 各组细胞上清液中IL-6含量测定:采用酶联免疫吸附法(ELISA),操作按试剂盒说明书进行。

1.6 统计学分析:数据以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用ANOVA方法进行统计分析,组间比较采用SNK检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组VSMC中IL-6 mRNA表达(表1):LPS诱导VSMC 3h,IL-6 mRNA表达较溶液组即明显升高,且具有时间依赖性,12h达高峰,24h表达降低,但仍较溶液组明显增高(均 $P < 0.05$ )。与LPS组比较,干预组3、6、12h IL-6 mRNA表达均被明显抑制(均 $P < 0.05$ ),12h抑制作用最显著;对照组各时间点IL-6 mRNA表达无明显变化,与溶液组比较差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$ )。

2.2 各组VSMC中IL-6蛋白表达(表2):LPS诱导VSMC 3h,IL-6蛋白水平较溶液组即有明显增高,且具有一定的时间依赖性,12h达高峰,24h表达降低,但仍较溶液组明显增高(均 $P < 0.05$ )。与LPS组比较,干预组3、6、12、24h IL-6蛋白表达水平明显降低(均 $P < 0.05$ ),12h抑制作用最为显著;对照组IL-6蛋白表达无明显变化,与溶液组比较差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$ )。

3 讨 论

脓毒症是由感染引发的全身炎症反应,以大量细胞因子和炎症介质释放为显著特征,IL-6、肿瘤坏

表1 SB203580 干预 LPS 诱导 VSMC 的 IL-6 mRNA 及 IL-6 蛋白表达的作用( $\bar{x} \pm s$ )

组别	样本数	IL-6 mRNA( $\times 10^4$ )					IL-6 蛋白(ng/L)				
		0 h	3 h	6 h	12 h	24 h	0 h	3 h	6 h	12 h	24 h
溶液组	4	10.8±1.4	10.3±1.2	9.9±1.7	10.4±1.6	9.4±1.9	33.1±5.7	32.3±7.5	31.2±5.8	32.4±5.7	29.4±4.4
LPS组	4	11.0±1.6	21.3±3.2 <sup>ab</sup>	81.6±8.3 <sup>ab</sup>	131.4±11.2 <sup>ab</sup>	15.3±4.7 <sup>ab</sup>	76.1±6.5	296.2±19.6 <sup>ab</sup>	692.3±27.0 <sup>ab</sup>	897.7±34.0 <sup>ab</sup>	194.3±24.0 <sup>ab</sup>
干预组	4	11.2±0.7	15.4±3.6 <sup>ac</sup>	43.2±6.6 <sup>ac</sup>	56.2±5.5 <sup>ac</sup>	18.0±2.9 <sup>a</sup>	56.1±15.7	180.3±23.6 <sup>ac</sup>	432.2±56.8 <sup>ac</sup>	546.2±57.9 <sup>ac</sup>	108.6±21.1 <sup>ac</sup>
对照组	4	9.7±1.6	8.3±3.9 <sup>c</sup>	9.7±1.4 <sup>c</sup>	10.4±1.6 <sup>c</sup>	11.2±1.4 <sup>c</sup>	36.1±6.5	28.8±4.6 <sup>c</sup>	31.1±5.8 <sup>c</sup>	35.1±6.2 <sup>c</sup>	32.2±3.8 <sup>c</sup>

注:SB:SB203580,即p38丝裂素活化蛋白激酶抑制剂;LPS:脂多糖,VSMC:血管平滑肌细胞,IL-6:白细胞介素-6;与本组前一时间点比较,\* $P < 0.05$ ;与溶液组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与LPS组比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$

死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )等被称为前炎症细胞因子<sup>[4]</sup>,是启动全身炎症反应的关键细胞因子,炎症启动后可导致“瀑布样”反应,激发机体产生大量继发性炎症介质<sup>[5-6]</sup>,可进一步发展为多器官功能障碍综合征(MODS)<sup>[7]</sup>。因此,明确前炎症细胞因子的分泌、调节机制对脓毒症的早期防治具有重要意义。

研究显示 IL-6 可诱导急性相蛋白合成,对炎症细胞具有直接激活和毒性作用<sup>[8]</sup>,并且 IL-6 的高表达对脓毒症发展为 MODS 具有一定的预测价值<sup>[9]</sup>。本研究结果显示,LPS 诱导大鼠 VSMC 3 h 即出现 IL-6 mRNA 和蛋白表达水平明显增高,且呈现出一定的时间依赖性,于 12 h 表达达峰值,24 h 明显降低,但仍较溶液组显著增高。表明经 LPS 诱导 VSMC 早期即可明显增强细胞 IL-6 的转录水平,并进一步导致 IL-6 的蛋白合成明显增加,且该作用可延续至 24 h 以上。该结果与 Yang 等<sup>[10]</sup>、Son 等<sup>[11]</sup>的研究结论相一致。Yang 等<sup>[10]</sup>进一步对人冠状动脉 VSMC 进行了检测,发现 LPS 刺激体外培养的人 VSMC 6 h 同样会增加 IL-6 的转录和蛋白合成。本研究中 VSMC 对 LPS 刺激所表现出的敏感性与相关研究中巨噬细胞<sup>[12]</sup>、内皮细胞<sup>[13]</sup>等的反应相类似。提示 VSMC 在内毒素性炎症反应早期与巨噬细胞、内皮细胞可能具有同样的重要性,炎症反应早期即可导致 VSMC 受损,大量释放前炎症细胞因子 IL-6,进而与脓毒症疾病进展关系密切。

MAPK 是介导多种细胞因子从受体激活到效应因子产生过程中的重要信号分子,其家族成员 p38MAPK 主要参与细胞的应激反应<sup>[14]</sup>。因此,本研究中选择 p38MAPK 特异性抑制剂 SB203580 对培养的 VSMC 进行预处理,继而加入 LPS 诱导 VSMC,观察其是否影响 IL-6 的 mRNA 和蛋白表达,以明确 p38MAPK 信号转导通路是否参与了 LPS 诱导 VSMC 的 IL-6 分泌过程。研究结果显示,体外培养的 VSMC 若不加入 LPS 诱导,仅以 p38MAPK 特异性抑制剂 SB203580 预处理 2 h, VSMC 的 IL-6 mRNA 和蛋白表达与溶液组相比并无明显差异,提示在无刺激因素作用时, VSMC 的 IL-6 仅处于低转录水平,且蛋白表达也较少, p38MAPK 信号转导通路对 IL-6 的转录和分泌无明显作用;但由 LPS 诱导 VSMC 后用 SB203580 干预细胞,在不同时间点均可明显抑制 IL-6 mRNA 和蛋白表达,且差异显著。表明抑制 p38MAPK 信号转导通路可显著抑制 LPS 诱导 VSMC 中 IL-6 的转录和蛋白合成。提示 p38MAPK 信号转导通路可能

参与了调节 IL-6 转录和蛋白合成,该结论与 Son 等<sup>[11]</sup>的研究结果一致。本研究表明,通过抑制 p38MAPK 通路可明显抑制 VSMC 生成 IL-6,提示 p38MAPK 信号转导通路可能通过直接或间接作用参与了 IL-6 的分泌调节机制,并可能进一步参与诱导内毒素性早期炎症反应。

本研究中虽然发现 VSMC 可能是脓毒症炎症反应的早期受累细胞,并可早期大量释放 IL-6,但 IL-6 对于自身分泌细胞和其他细胞的作用及相关功能影响并未涉及,有待于进一步探讨。另外,有研究表明,LPS 可并行激活细胞的多种信号转导通路,仅就 MAPKs 通路即包括 p38、细胞外信号调控激酶(ERK)、c-Jun 氨基末端激酶(JNK)等多种亚途径<sup>[15-16]</sup>。本研究中仅就 p38 进行了初步研究,而且,细胞因子的调节机制又相当复杂,除受到信号转导通路的调节外,其生物合成尚受到其他细胞因子的直接或间接调节。Yang 等<sup>[10]</sup>的研究发现,通过对细胞表面 Toll 样受体 4(TLR4)和 CD14 的调节,也会影响 VSMC 的 IL-6 生成。所以,若要真正明确 IL-6 的调节机制,尚有待于大量的深入研究。

#### 参考文献

- [1] Bonnemeyer H. Effects of proinflammatory cytokines and hemofiltration on ventricular repolarization in septic shock. *Crit Care Med*, 2008, 36:3272-3273.
- [2] Ventetuolo CE, Levy MM. Biomarkers: diagnosis and risk assessment in sepsis. *Clin Chest Med*, 2008, 29:591-603.
- [3] 司徒镇强,吴军正. 细胞培养. 西安:世界图书出版社,1996, 186-194.
- [4] Frost RA, Nystrom GJ, Lang CH. Lipopolysaccharide regulates proinflammatory cytokine expression in mouse myoblasts and skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2002, 283:R698-709.
- [5] 董晨明,张红松,张正义,等. 大黄制剂与抗生素联用对重症脓毒症小鼠细胞因子的影响. *中国中西医结合急救杂志*, 2005, 12:8-9.
- [6] 李鑫,马晓春. 血必净注射液对脂多糖诱导大鼠肾脏微血管内皮细胞组织因子表达的影响及机制探讨. *中国中西医结合急救杂志*, 2009, 16:218-222.
- [7] Maier B, Lefering R, Lehnert M, et al. Early versus late onset of multiple organ failure is associated with differing patterns of plasma cytokine biomarker expression and outcome after severe trauma. *Shock*, 2007, 28:668-674.
- [8] Watanabe S, Mu W, Kahn A, et al. Role of JAK/STAT pathway in IL-6-induced activation of vascular smooth muscle cells. *Am J Nephrol*, 2004, 24:387-392.
- [9] 郑贵军,孙茜,李银平. 炎症、内皮、凝血与脓毒症. *中国危重病急救医学*, 2009, 21:573-576.
- [10] Yang X, Cogliano D, Murthy V, et al. Proinflammatory phenotype of vascular smooth muscle cells: role of efficient Toll-like receptor 4 signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005, 289:H1069-1076.

[11] Son YH, Jeong YT, Lee KA, et al. Roles of MAPK and NF-kappa B in interleukin-6 induction by lipopolysaccharide in vascular smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2008, 51:71-77.

[12] Erridge C, Stewart J, Poxton IR. Monocytes heterozygous for the Asp299Gly and Thr399Ile mutations in the Toll-like receptor 4 gene show no deficit in lipopolysaccharide signalling. *J Exp Med*, 2003, 197:1787-1791.

[13] Pugin J, Schürer-Maly CC, Leturcq D, et al. Lipopolysaccharide activation of human endothelial and epithelial cells is mediated by lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90:2744-2748.

[14] Shida Y, Igawa T, Hakariya T, et al. p38MAPK activation is involved in androgen-independent proliferation of human prostate cancer cells by regulating IL-6 secretion. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 353:744-749.

[15] Aouadi M, Binetruy B, Caron L, et al. Role of MAPKs in development and differentiation: lessons from knockout mice. *Biochimie*, 2006, 88:1091-1098.

[16] 郑曦云, 付小兵, 徐建国, 等. 酸性成纤维细胞生长因子对大鼠缺血/再灌注损伤肠上皮细胞丝裂素活化蛋白激酶的影响. *中国危重病急救医学*, 2006, 18:9-12.

(收稿日期: 2009-12-24)

(本文编辑: 李银平)

• 启事 •

国家级继续医学教育项目“危重病基础生命支持学习班”第一轮通知

重症医学涉及范围广, 牵涉学科多, 涵盖领域多, 这就对危重病从业医师提出了更高的要求。因此, 规范化、专科化的培养显得尤为重要, 而基础生命支持项目更是其中最重要的一环, 是所有从业人员必须掌握的基本技能, 在全世界尤其是发达国家广受推崇, 都纳入到准入培训甚至相关专业人员培训中。

我国危重病学科建设起步晚, 专科从业人员少; 往往来自不同学科, 从业人员水平参差不齐, 很多未经过系统的专科培训。为了解决实际问题和改善现状, 经批准, 上海市第一人民医院危重病科拟于 2010 年 6 月 23 日至 27 日在上海举办国家级继续医学教育项目“危重病基础生命支持学习班”[项目编号: 2010-10-00-023 (国)]。

本学习班邀请著名学者传授危重病诊治的规范化知识、理论和技能, 传播该领域的最新理念和论点。主要内容包括: 重症患者的评估和监测, 气道管理的进展及误区, 创伤的基本支持, 规范化救治危重病输液、输血管理, 危重病患者感染、镇静镇痛、CRRT 的运用以及危及生命内环境紊乱的诊断及救治等内容, 对提高专业水平有很大裨益。现将相关事宜通知如下。

时间: 2010 年 6 月 23 日至 27 日。

地点: 上海市第一人民医院 (上海市虹口区海宁路 100 号)。

学分: 学习合格者授予国家级继续教育 I 类学分 10 分。

费用: 学费 600 元/人 (含资料和证书费用), 食宿统一安排, 费用自理。

联系人: 陆健 (021-37798522, 15921216558, Email: lujian@live.cn); 王瑞兰 (021-37798522, 13917138008, Email: wangyusun@hotmail.com); 传真: 021-37798529。

(上海市第一人民医院危重病科)

授课教授名单及授课内容: ①危重症患者的识别和评估 (上海交通大学附属瑞金医院陆一鸣教授); ②脓毒性休克微循环障碍的诊断及治疗 (上海长征医院林兆奋教授); ③危重患者机械通气应用策略 (上海市第一人民医院俞康龙教授); ④重症监护病房多重耐药菌治疗策略 (上海市第一人民医院周新教授); ⑤围手术期危重患者输血、输液策略 (上海市第一人民医院郑毅教授); ⑥危重患者内环境紊乱的诊断与治疗 (上海市第一人民医院王瑞兰教授); ⑦危重患者血液净化措施的选择及液体管理 (上海市第一人民医院于青教授); ⑧危重患者镇静镇痛措施的实施 (上海中山医院朱杜明教授); ⑨危重患者肠道功能障碍的诊断与救治 (上海长征医院陈德昌教授); ⑩心肺复苏争论的焦点 (上海市第一人民医院贡伟教授); ⑪严重创伤基本支持和规范化救治 (上海市第一人民医院俞康龙教授); ⑫威胁生命感染的诊断及抗微生物治疗的选择 (上海市第一人民医院王瑞兰教授); ⑬危重患者的气道管理 (上海市第一人民医院田锐医生); ⑭危重患者的监护 (上海市第一人民医院吴俊梅医生); ⑮危重病例讨论及诊疗技能演示 (上海市第一人民医院金卫医生)。

“危重病基础生命支持学习班”报名回执

姓名:	性别: <input type="checkbox"/> 男 <input type="checkbox"/> 女	职称/职务:
单位:		
电话:	手机:	邮箱:
安排住宿: <input type="checkbox"/> 是 <input type="checkbox"/> 否	其他问题:	

回执须知: 请认真填写 (复印有效), 并于 2010 年 5 月 15 日前邮至 lujian@live.cn 或寄至上海市松江区新松江路 650 号上海市第一人民医院南部 危重病科 陆健 收, 邮编 201620。同时在信封 (或邮件标题) 标明“学习班报名”字样, 我们会在收到后尽快与您联系, 届时再向报名者发第二轮正式通知。