

基础研究

青少年特发性脊柱侧凸患者软骨细胞中 Sox9 的表达及意义

黄爱兵,邱勇,殷刚,孙光权,李海波,钱邦平,朱泽章
(南京大学医学院附属鼓楼医院骨科 210008 南京市)

【摘要】目的:检测转录因子 Sox9 在青少年特发性脊柱侧凸(AIS)患者软骨细胞中的表达,探讨其在 AIS 患者生长发育异常中的可能作用。**方法:**14 例(男 1 例,女 13 例)年龄 10~16 岁(平均 13.1 岁)的 AIS 患者(AIS 组),Cobb 角 41° ~ 88° ,平均 51.4° ;8 例(男 1 例,女 7 例)非 AIS 患者(对照组),年龄 10~15 岁,平均 12.9 岁;腰椎骨折 1 例,脊髓室管膜瘤 1 例,腰椎间盘突出症 1 例,脊柱骨样骨瘤 1 例,先天性髋关节脱位 4 例。在行手术治疗时获取髂骨生长板软骨,采用酶消化法体外分离、培养、传代,并观察细胞形态;采用 II 型胶原细胞免疫组织化学法对传至 P2 代的细胞行表型鉴定;采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)、蛋白免疫印迹(Western blotting)法检测两组软骨细胞中 Sox9 mRNA 及蛋白表达情况。**结果:**酶消化法体外单层培养软骨细胞成功;细胞传至 P2 代时具有软骨细胞的典型形态特征,呈多角状;II 型胶原细胞免疫组化染色呈阳性,细胞胞浆内可见棕褐色颗粒,很好地保持了软骨细胞的表型特征;AIS 组患者软骨细胞中 Sox9 核酸表达强度为 1.08 ± 0.14 ,蛋白表达强度为 0.38 ± 0.14 ,均较对照组高($P < 0.05$)。**结论:**转录因子 Sox9 在软骨细胞水平表达强度的异常可能与 AIS 患者生长发育异常有关。

【关键词】Sox9;青少年特发性脊柱侧凸;软骨细胞

中图分类号:R681.5,Q786 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2008)-12-0929-05

Expression and significance of Sox9 in chondrocytes of adolescent idiopathic scoliosis patients/HUANG Aibing, QIU Yong, YIN Gang, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2008, 18(12):929-933

【Abstract】 Objective: To study the expression of Sox9 in chondrocytes of adolescent idiopathic scoliosis (AIS) patients, and investigate its relationship with the pathogenesis of scoliosis. **Method:** 22 volunteers were classified into two groups, AIS group: 14 patients (13 female, 1 male), mean age 13.1 years, range from 10-16 years, the mean Cobb angle of AIS patients was 51.4° , range from 41° to 88° . Control group: 8 non-AIS patients (7 female, 1 male), mean age 12.9 years, range from 10-15 years. Diagnoses included lumbar fracture ($n=1$), spinal ependymoma ($n=1$), hernia of intervertebral discs ($n=1$), spinal osteoid osteoma ($n=1$), and congenital dislocation of the hip ($n=4$). The cartilages were obtained from human iliac growth-plate. Chondrocytes were isolated by collagenase and trypsin digestion, then cultured and passaged in monolayer. The morphology of cells was observed under inverted microscope. The expression of collagen II was detected by immunocytochemistry to identify the phenotype of the cells. Simultaneously, the levels of expression of Sox9 in chondrocytes from two groups were measured by using reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), Western blotting respectively at P2 generation. **Result:** The culture method of human iliac growth-plate chondrocytes is simple and feasible. Chondrocytes cultured as monolayer were typical polygonal in shape. The collagen type II immunohistochemical staining was extensively positive. It demonstrated that the P2 generation cells could effectively maintain the phenotype of chondrocyte in vitro. The average mRNA and protein expression of Sox9 was 1.08 ± 0.14 , 0.38 ± 0.14 respectively in AIS group, which was significantly higher than that in control group ($P < 0.05$). **Conclusion:** The increasing expression of the transcription factor Sox9 may play a role in the abnormal growth pattern of AIS patients.

【Key words】 Sox9; Adolescent idiopathic scoliosis; Chondrocyte

【Author's address】 Spine Surgery, Drum Tower Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing, 210008, China

基金项目:江苏省卫生厅重点资助项目(项目编号:k200610)

第一作者简介:男(1982-),硕士研究生,研究方向:脊柱外科

电话:(025)83304616-12101 E-mail:hab165@163.com

青少年特发性脊柱侧凸(adolescent idiopathic scoliosis, AIS)是脊柱侧凸中最常见的类型,但其发病机理迄今未明^[1],目前认为与遗传、生长、激

素、力学等多因素异常有关^[2]。Cheung^[3]、Ylikoski^[4]、Guo 等^[5]发现 AIS 患者存在身高、臂长、椎体高度等形态学指标的增加,认为 AIS 患者可能存在软骨内成骨的异常,但病理机理并未涉及。人体躯干和四肢骨的形成主要是通过软骨内成骨途径完成的,转录因子 Sox9 在软骨内成骨周期中发挥着决定性的调控作用^[6],其是否在 AIS 患者软骨内成骨分子调控机制异常中起一定作用?孙强等^[7]研究证实 AIS 患者骨髓间质干细胞中 Sox9 表达异常,而软骨细胞是调节软骨内成骨过程的主要细胞阶段之一,在软骨细胞水平研究 AIS 患者生长发育异常更具有直接性。为此,本实验体外分离、培养、扩增 AIS 患者以及同年龄非 AIS 患者的髌骨生长板软骨细胞,比较 Sox9 在两者间的表达水平。

1 资料和方法

1.1 一般资料

2007 年 5 月~2008 年 2 月在我院行后路矫形手术的 AIS 患者 14 例(AIS 组),男 1 例,女 13 例;年龄 10~16 岁,平均 13.1 岁;术前 Cobb 角 41°~88°,平均 51.4°;Risser 征 0~3 级;根据 Lenke 分型:I 型 5 例,II 型 3 例,III 型 3 例,IV 型 1 例,V 型 2 例;根据 PUMC 分型^[8]:I a 型 5 例,II a 型 3 例,II b 型 3 例,II d 型 2 例,III a 型 1 例。对照组 8 例,男 1 例,女 7 例,年龄 10~15 岁,平均 12.9 岁,Risser 征 0~3 级;专科医师体检排除脊柱侧凸,其中腰椎骨折 1 例,脊髓室管膜瘤 1 例,腰椎间盘突出症 1 例,脊柱骨样骨瘤 1 例,先天性髋关节脱位 4 例。术中取右侧髌骨行植骨融合的同时,用骨刀在距髌后上嵴约 1cm 处沿髌嵴正中间劈开髌嵴,向下切取全层生长板软骨附带少许松质骨(该法保留了部分髌骨生长板,对患者髌骨骨骺发育的影响较小)。本研究获得医院伦理学委员会批准,所有标本都是在患者及家属知情同意下获取。标本置于预装 PBS 的离心管中备用。

1.2 主要实验试剂

DMEM 培养液(pH 值 7.2, Gibco),胎牛血清(FBS, Gibco),0.25%胰蛋白酶-EDTA (Gibco),II 型胶原酶(Gibco),双抗(青霉素、链霉素)(Sigma),II 型胶原一抗、二抗(北京中杉金桥),兔抗人 Sox9 一抗(Santa Cruz, SC-20095),二抗为 HRP 标志羊抗兔抗体(Santa Cruz, SC-2004)。鼠

抗人 β -actin 一抗(Sigma),二抗羊抗鼠抗体(Sigma)。DAB 显色液(北京中杉金桥),总 RNA 提取试剂 Trizol Reagent(Invitrogen),RT-PCR 试剂盒(Invitrogen),琼脂糖(Promega),PVDF 膜(Roche 公司),二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白定量试剂盒(Pierce),Western blotting 发光液(Santa Cruz)。

1.3 软骨细胞的体外分离和培养

在超净台内取出标本仔细去除软骨周围的韧带及结缔组织,将软骨块剪成 1×1×1mm 大小,采用两步酶消化法(0.25%胰蛋白酶-EDTA 消化 30min、0.2% II 型胶原酶消化 4~6h)消化后,收集细胞并计数,台盼蓝试验测定细胞活性后,将未完全消化的软骨块及软骨细胞共同接种于含 10% FBS DMEM 培养皿中,在 5% CO₂ 培养箱中,饱和湿度、37℃条件下培养,每 3~4d 换液 1 次,待细胞近融合时,用 0.25%胰蛋白酶-EDTA 消化 2~3min,计数后按 1:3 或 1:4 传代。

1.4 软骨细胞的表型鉴定

对 P2 代细胞用爬片技术培养,待细胞贴壁后 2~3d 取下载玻片,PBS 浸泡 3 次,每次 10min;3%过氧化氢室温下孵育 10min;PBS 浸泡 3 次,每次 5min,加丙酮固定 30min,PBS 浸泡 3 次,每次 10min,10%牛血清白蛋白室温下封闭 20min;弃去液体,滴加 1:100 的一抗 4℃下过夜(空白对照加 PBS);PBS 洗 3 次,每次 10min;滴加 1:100 的二抗,37℃孵育 30min;PBS 浸泡 3 次,每次 10min;DAB 显色(按说明书操作),苏木素复染,脱水,封片。

1.5 Sox9 mRNA 表达的检测

取 (3~4)×10⁶ 个 P2 代软骨细胞,加入 1ml Trizol,静置 5min,加 0.2ml 氯仿,混匀后孵育 2~3min,4℃下 12000r/min 离心 15min,取上层无色液相层(约占总体积的 60%),加 0.5ml 异丙醇,孵育 10min,摇匀。4℃下 12000r/min 离心 10min,见乳白色沉淀。弃去上清,加 75%酒精 1ml 震荡混匀,4℃下 7500r/min 离心 5min。风干酒精后加入 20 μ l 焦碳酸二乙酯(DEPC)液,充分溶解,比色法测定样本 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值,比值在 1.8~2.0 范围内,证明抽提效果良好,计算总 RNA 浓度,并使其均一化。按照 Invitrogen 公司的两步法进行 RT-PCR 反应。Sox9 上游引物:5'-ACTGGGAACAAC-CCGTCTAC-3',下游引物:5'-CGATTCTCCAT-

CATCCTCCAC-3', 产物大小为 376bp; β -actin 上游引物: 5'-GGCATCCTCACCCTGAAGTA-3', 下游引物: 5'-GGGGTGTGAAGGTCTCAAA-3', 产物大小为 200bp。PCR 反应条件: 94℃ 5min, 94℃ 45s, 60℃ 30s, 72℃ 45s, 循环 30 次, 72℃ 延伸 10min 结束。将 PCR 扩增产物进行电泳。采用 Smart-view 2001 生物电泳图像分析系统对电泳条带灰度值进行半定量分析。

1.6 Sox9 蛋白表达的检测

收集 P2 代软骨细胞, PBS 洗 3 次, 加 300 μ l 蛋白裂解液, 置于冰上 30min, 细胞充分裂解后, 12000r/min 离心 5min, 取上清, BCA 法测量总蛋白浓度并使其均一化。加入 5 $\times$ 上样缓冲液, 沸水浴 5min。十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离, 浓缩胶层电压 80V, 30min; 分离胶层电压 120V, 2h, 电泳完毕后, 湿转法, 恒流 200mA, 2h 转膜。转印后, 5% 脱脂奶粉 4℃ 封闭过夜, 分别加入 Sox9 和 β -actin 一抗孵育 4h, 洗膜, 加 Sox9 和 β -actin 二抗孵育 1h, 洗膜, 增强化学发光测定系统 (ECL) 化学发光法检测。

1.7 统计学处理

各组电泳条带灰度值以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 组间比较采用两两比较 t 检验, 所有资料采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞形态观察

AIS 组及对照组软骨细胞分离培养、传代均成功, 倒置相差显微镜下观察 P2 代软骨细胞形态不规则, 呈多边形、星形等, 胞浆丰富, 胞核清晰, 培养 5~6d 后见细胞 90% 融合, 紧密排列成“铺路石”状外观 (图 1, 后插页 II)。

2.2 软骨细胞表型鉴定结果

P2 代软骨细胞 II 型胶原免疫组织化学染色观察, 结果显示软骨细胞胞浆内可见棕褐色颗粒染色呈片状或团块状为阳性 (图 2, 后插页 II); 阴性对照胞浆内不染色 (图 3, 后插页 II)。

2.3 RT-PCR 反应及电泳检测结果

见图 4。AIS 组软骨细胞中 Sox9 mRNA 表达强度为 1.08 ± 0.14 , 对照组为 0.95 ± 0.09 , 两组比较 $t=2.28$, $P<0.05$ 。

2.4 Western blotting 检测结果

见图 5。转录因子 Sox9 的分子量为 65kDa, AIS 组 Sox9 蛋白表达强度为 0.38 ± 0.14 , 对照组为 0.22 ± 0.06 , 两组比较 $t=3.10$, $P<0.05$ 。



图 4 AIS 组及对照组 (CON) Sox9 mRNA 表达情况 (Sox9 产物大小为 376bp, β -actin 产物大小为 200bp)

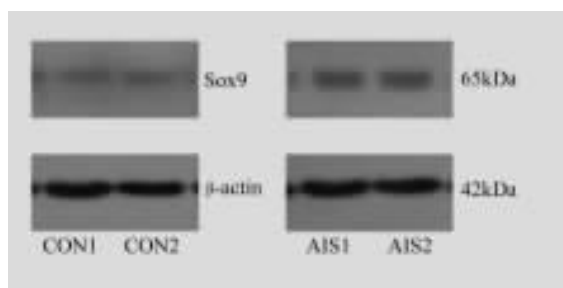


图 5 AIS 组及对照组 (CON) Sox9 蛋白水平的表达 (Sox9 分子量为 65kDa, β -actin 分子量为 42kDa)

3 讨论

3.1 AIS 患者的生长发育情况

AIS 是一种复杂的脊柱三维畸形, 好发于青春发育期。目前多数学者认为 AIS 的发病是多因素共同作用的结果。AIS 的发生及加重均在生长发育高峰的青春期中, 表明在 AIS 的发生发展中, 生长发育可能起着重要的作用。Willner^[9]发现迟发性的 AIS 患者在发生侧凸前其身高就较正常青少年高。Cheung 等^[9]对 AIS 女孩的大体形态学测量分析发现, AIS 患者青春发育启动后 (Pubertal II~V 期, 相当于实足年龄 12~15 岁), 其矫正身高、臂长均显著高于对照组, 且在 Pubertal II~IV 期, 其矫正坐高也显著高于对照组。Ylikoski^[4]在芬兰人群中的研究结果与之类似。Willner^[10]认为 10~12 岁 AIS 患儿胸椎后凸发生较少是由于暂时性的前柱过度生长。Guo 等^[5]采用 MRI 测量 AIS 患儿全脊柱的形态学指标, 结果显示 AIS 患儿脊椎前柱 (椎体) 高度较高, 而后柱 (椎弓根高度) 相对较低, 解释为前后柱成骨机制不同, 前柱软骨内成

骨活跃,后柱膜内成骨迟缓。Zhu 等^[11]采用细胞增殖核抗原(PCNA)指数及原位末端标记法(TUNEL)指数测定 AIS 患者前后柱细胞增殖、凋亡情况,结果显示 AIS 患者前柱(终板软骨)细胞增殖活跃,后柱软骨增殖程度一般。以上大体形态学及组织细胞学的研究表明 AIS 患者存在软骨内成骨活跃,但具体机制并未阐明。有学者提出 AIS 存在的骨骼形成异常可能是内源性基因因素和/或外源性环境因素共同作用的结果^[2]。

3.2 Sox9 在软骨内成骨中的调控作用

软骨内化骨是体内主要的成骨方式,从骨髓间质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)分化为成熟软骨细胞的过程中,众多转录因子参与了调控,但 Sox9 家族是发挥主导作用的调节因子之一。Sox9 蛋白拥有 DNA 结合结构域——高迁移率簇蛋白盒(high mobility group box, HMG 盒),具有与 DNA 结合的能力,除参与性别决定外,其在骨组织的形成中具有重要的调节作用。首先,在软骨细胞形成的初始阶段——间充质细胞向定向祖细胞分化以及间充质细胞聚集过程中,都需要 Sox9 的参与调节^[12],不仅为软骨特异性基因(Ⅱ型胶原)的表达所必需,而且调控着间充质细胞聚集过程所需的细胞膜蛋白的表达;其次,在软骨细胞进一步分化阶段——增殖型软骨细胞向肥大软骨细胞转化过程中,Sox9 起负调控作用,维持软骨细胞增殖,抑制其向肥大软骨细胞分化^[13]。

3.3 AIS 患者软骨细胞中 Sox9 高表达的意义

AIS 患儿存在以身高、臂长、坐高等指标增加为特征的生长发育异常^[3-5],说明其可能存在以软骨内化骨增强为特征的骨纵向生长发育的活跃。软骨内成骨的活跃,细胞学上表现为细胞数量的增多,胞浆丰富,线粒体、高尔基体等细胞器的增多,细胞合成细胞外基质、细胞因子、各种酶等能力增强。另外,软骨细胞的增殖和凋亡指数也可以作为衡量软骨内成骨活跃程度的指标,增殖和凋亡指数的增加表明软骨内成骨活跃^[11]。

Sox9 是调节软骨内成骨的最早决定因子, Sox9 的表达才能启动成软骨过程。Akiyama 等^[13]利用 Cre/loxP 重组技术在未分化间质细胞聚集前使肢芽处的 Sox9 基因失活,导致了软骨及骨成分的完全缺失,而在间质细胞聚集后使 Sox9 基因失活,检测生长板区软骨细胞的 PCNA(细胞增殖能力的标志),结果突变型鼠 PCNA 的阳性率明显下

降,意味着增殖区软骨细胞较野生型减少。Paul 等^[14]采用 Sox9 腺病毒作为载体转染软骨细胞后,Ⅱ型胶原的分泌量增加。赵哲等^[15]测定了不同分期椎间盘细胞中 Sox9 的表达量,认为椎间盘的退变与 Sox9 的表达降低有关,其低表达导致细胞Ⅱ型胶原的合成下降。以上研究显示 Sox9 表达的高低与细胞的活性及细胞的功能密切相关。AIS 患者软骨内成骨活跃,我们推测与 Sox9 的异常表达有关。孙强等^[7]已证实 Sox9 在 AIS 患者 MSCs 中表达量增高,认为高表达 Sox9 可加快骨髓中游离的 MSCs 向成骨部位聚集、浓缩,促进软骨内成骨过程。而在软骨细胞水平解释软骨内成骨机制更直接性。软骨细胞在体外培养过程中随着传代次数的增加,存在去分化现象,P4 以前能较好地保持软骨细胞的表型特征。Ⅱ型胶原是软骨细胞的特异性标志分子,本实验采用Ⅱ型胶原免疫组化法鉴定培养的细胞表型,结果显示Ⅱ型胶原表达于 P2 代细胞胞浆,呈棕褐色,说明 P2 代细胞具有软骨细胞的典型特征。测定 P2 代细胞中 Sox9 的表达量,结果显示 AIS 组 Sox9 mRNA 及蛋白表达量均较对照组高($P<0.05$)。Ganey 等^[16]认为青春期脊柱前柱的生长主要是生长板以软骨内化骨形式进行并持续到 16~18 岁,而后柱的软骨内化骨在 10 岁时就已完成,随后,后柱主要以膜内化骨的形式环行生长。青春期 AIS 患儿软骨细胞中高表达的 Sox9 可能促进了前软骨细胞、成软骨细胞、软骨细胞的增殖、分化,并使其合成Ⅱ型胶原的能力增强,软骨雏形形成加速,引起软骨内成骨的活跃。

本实验初步探讨了 AIS 患儿青春期以软骨内成骨活跃为内因,以身材瘦高、四肢纤细修长为表象的分子生物学机制。但软骨内成骨的调控是一复杂的过程,多种细胞因子参与了调控,Sox9 只是细胞因子网络调控过程的一中间环节,对于 AIS 生长发育异常的具体机制还有待进一步研究。

4 参考文献

1. 邱勇,朱丽华,宋知非,等.脊柱侧凸的临床病因学分类研究[J].中华骨科杂志,2000,20(5):265-268.
2. Cheung KM, Wang T, Qiu GX, et al. Recent advances in the aetiology of adolescent idiopathic scoliosis [J]. Int Orthop, 2007 [Epub].
3. Cheung CSK, Lee WTK, Tse YK, et al. Abnormal peri-pubertal

- anthropometric measurements and growth pattern in adolescent idiopathic scoliosis: a study of 598 patients [J]. *Spine*, 2003, 28 (18): 2152-2157.
4. Ylikoski M. Height of girls with adolescent idiopathic scoliosis [J]. *Eur Spine J*, 2003, 12(3): 288-291.
5. Guo X, Chau WW, Chan YL, et al. Relative anterior spinal overgrowth in adolescent idiopathic scoliosis: results of disproportionate endochondral-membranous bone growth [J]. *J Bone Joint Surg*, 2003, 85B(7): 1026-1031.
6. Akiyama H, Chaboissier MC, Martin JF, et al. The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6 [J]. *Genes Dev*, 2002, 16(21): 2813-2828.
7. 孙强, 邱勇, 刘臻, 等. Sox9 在青少年特发性脊柱侧凸患者骨髓间质干细胞的表达及意义 [J]. *中国脊柱脊髓杂志*, 2006, 16(3): 215-219.
8. 邱贵兴, 仇建国, 王以朋, 等. 特发性脊柱侧凸的 PUMC(协和)分型系统 [J]. *中华骨科杂志*, 2003, 23(1): 1-9.
9. Willner S. Growth in height of children with scoliosis [J]. *Acta Orthop Scand*, 1974, 45(6): 854-866.
10. Willner S. Development of trunk asymmetries and structural scoliosis in prepuberal school children in Malmo: follow-up study of children 10-14 years of age [J]. *J Pediatr Orthop*, 1984, 4(4): 452-455.
11. Zhu F, Qiu Y, Yeung HY, et al. Histomorphometric study of the spinal growth plates in idiopathic scoliosis and congenital scoliosis [J]. *Pediatr Int*, 2006, 48(6): 591-598.
12. Bi W, Deng JM, Zhang Z, et al. Sox9 is required for cartilage formation [J]. *Nat Genet*, 1999, 22(1): 85-89.
13. Akiyama H, Chaboissier MC, Martin JF, et al. The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6 [J]. *Genes Dev*, 2002, 16(21): 2813-2828.
14. Paul R, Haydon RC, Cheng HW, et al. Potential use of SOX9 gene therapy for intervertebral degenerative disc disease [J]. *Spine*, 2003, 28(8): 755-763.
15. 赵哲, 王文波, 李吉友, 等. 椎间盘髓核细胞中 Sox9 与 II 型胶原基因表达的关系 [J]. *中国脊柱脊髓杂志*, 2007, 17(5): 384-387.
16. Ganey TM, Ogden JA. Development and maturation of the axial skeleton. In: Weinstein SL, ed. *The Pediatric Spine: Principles and Practice* [M]. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2001. 3-54.
- (收稿日期: 2008-06-11 修回日期: 2008-07-01)
(英文编审 郭万首)
(本文编辑 朱琳)

消息

第 3 届湘雅国际脊柱外科学术大会 暨 2009 中国骨科医师协会(长沙)脊柱外科新技术培训班通知

随着脊柱外科新技术的不断进步及脊柱外科新手术在各级医院的逐步开展,使该专业的治疗水平得到很大的提高。但随着技术使用的深入和病例数的增加,也暴露出相关问题。有鉴于此,我们在成功举办前两届会议的基础上,拟于 2009 年 1 月 9~11 日,举办“第 3 届湘雅国际脊柱外科学术大会暨 2009 中国骨科医师协会(长沙)脊柱外科新技术培训班”。本次大会将邀请国内外脊柱外科领域的多位著名专家到会演讲、授课,将就脊柱外科领域疾病的诊断、手术指征的把握、手术策略的制定、术中陷阱的防范及手术并发症的防治等方面展开深入的讨论。

会议征文: 脊柱外科临床新理论、新经验、新技术及基础研究新进展; 稿件通过 E-mail 发至 xiangyaspine@163.com。截稿日期: 2008 年 12 月 10 日。

通讯地址: 湖南省长沙市湘雅路 87 号, 中南大学湘雅医院脊柱外科, 邮编: 410008。联系人: 刘少华 (13054178014), 郭超峰 (13873167839), 张宏其 (13707313601)。

会议时间: 2009 年 1 月 9~11 日, 地点: 长沙好来登大酒店, 注册费: 700 元/人, 食宿统一安排, 费用自理。2009 年 1 月 9 日 11:00~21:00 在好来登酒店一楼报到、注册。

参会代表将授予国家级 I 类继续教育学分证书。

详情请登录湘雅脊柱外科中心网: [Http://www.xiangyaspine.com](http://www.xiangyaspine.com)。

期待您的积极参与、交流, 以便共同进步, 造福患者。