

· 基础研究 ·

不同脉冲超声参数及培养方式对细胞活力和细胞膜声孔作用的影响

陈智毅 谢明星 王新房 吕清

【摘要】目的 探寻不同脉冲超声(PUS)辐射策略及细胞培养方式对宫颈癌细胞(HeLa)活力和细胞膜声孔作用的影响。**方法** 以2种不同的方式(悬浮培养或贴壁培养)培养HeLa细胞,改变声强(0.4 W/cm^2 、 1.0 W/cm^2 、 1.6 W/cm^2 和 2.2 W/cm^2)、占空比(10%、20%、50%)以及辐射时间(1 min、3 min)等参数,对HeLa细胞进行辐射,运用流式细胞术行细胞活力分析,应用显微镜和扫描电镜观察细胞形态变化及细胞膜表面的超微结构,比较不同参数组合方案的影响。**结果** 低声强和低占空比辐射未造成明显细胞死亡,高声强(1.6 W/cm^2 和 2.2 W/cm^2)和高占空比(50%)辐射显著降低细胞存活率($P < 0.01$),导致细胞脱离。析因设计分析可知,细胞培养方式和3种超声参数均有显著的交互作用($P < 0.01$),对细胞活力有很大的影响。电镜结果显示,适当条件的超声辐射能导致细胞表面出现可逆性孔道。通过优化可获得合理的平衡,细胞存活率大于80%。悬液培养的细胞经 1.0 W/cm^2 、20%占空比的PUS辐射3 min后,声孔作用最强,出现的孔洞最多。**结论** 对培养方式和超声参数进行优化后可减少细胞损伤,产生较强的声孔作用,增加细胞膜通透性,有利于大分子物质的胞内输送。

【关键词】 脉冲超声; 声孔作用; 空化; 细胞膜; 细胞活力

Effects of different pulsed ultrasound parameters and culture conditions on cell viability and sonoporation on cell membrane CHEN Zhi-yi, XIE Ming-xing, WANG Xin-fang, LU Qing. Department of Ultrasonography, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Hubei Province Key Laboratory of Molecular Imaging, Wuhan 430022, China

Corresponding author: XIE Ming-xing, Email: xiemx64@126.com

【Abstract】 Objective To investigate different pulsed ultrasound (PUS) parameters and culture conditions that would affect cell viability and sonoporation on cell membrane of human cervical cancer cells (HeLa). **Methods** HeLa cells were cultured in two different conditions (in suspension or in monolayer). Cells were exposed to different PUS intensity (0.4 W/cm^2 , 1.0 W/cm^2 , 1.6 W/cm^2 , 2.2 W/cm^2), duty cycle (10%, 20%, 50%) and exposure time (1 min or 3 min). Cell viability was analyzed by flow cytometry. Using microscope and scanning electron microscopy (SEM), the changes of shape and the sonoporation on cell membrane induced by PUS were observed. **Results** Low intensity and duty cycle did not exert a great impact on the cell viability. Cell injury was found to increase progressively with high intensity (1.6 W/cm^2 , 2.2 W/cm^2) and duty cycle (50%) ($P < 0.01$), and cell detachment was significantly accompanied by PUS exposure in adherent HeLa cells. Results of factorial design showed that the culture conditions and the PUS parameters had significant interaction ($P < 0.01$). SEM demonstrated in some detail the phenomenon of transient pores in the cell membrane under suitable PUS irradiation. The ideal sonoporation conditions that cell viability was above 80% and more membrane holes were noted to be at 1.0 W/cm^2 exposure for 3 min with a duty cycle of 20% in cell suspension. **Conclusion** The optimized conditions of the PUS parameters and the culture conditions could lower the cell injury and exert a great impact on the sonoporation. It could produce remarkable membrane pores on cells and enhance cell membrane permeability, which facilitate transportation of macromolecules into cells.

【Key words】 Pulsed ultrasound; Sonoporation; Cavitation; Cell membrane; Cell viability

脉冲超声(pulsed ultrasound, PUS)易透过软组织,常用于物理治疗中,在临床上有广泛的用途。最近,运

用PUS输送特异性药物或基因而进行治疗,或诱导产生有一定治疗作用的生物学效应是迅速发展起来的研究领域^[1-6]。但PUS参数与声孔作用和细胞存活率的关系仍有待优化,解决这些问题对PUS介导的药物或基因治疗及其实际应用有深远的意义。为此,本研究对不同培养方式及PUS参数对细胞的毒性作用进行

基金项目:国家自然科学基金面上项目资助(30670548)

作者单位:430022 武汉,华中科技大学同济医学院附属协和医院超声影像科,湖北省分子影像重点实验室

通讯作者:谢明星, Email: xiemx64@126.com

研究,运用扫描电镜(scanning electron microscope, SEM)对体外培养细胞的细胞膜进行分析,旨在确定最优参数组合,以期在最低细胞损伤的情况下,获得最佳声孔作用(sonoporation),为非侵袭性的药物或基因治疗奠定基础。

材料与方法

一、主要仪器和试剂

1. 仪器:血细胞计数器(Burker Turk);CO₂培养箱(Heraeus公司);超声仪(Accusonic, Metron Medical Australia Pty. Ltd.),使用频率为1.0 MHz、PRF(pulse repetition frequency)为100 Hz,内置数字计时器、强度调节器和占空比(duty cycle, DC)控制器;24孔培养板(Corning公司);倒置相差显微镜(日本Olympus公司);流式细胞仪(FACS Calibur, BD公司);日本Hitachi S-520型扫描电子显微镜。

2. 试剂:碘化丙啶(propidium iodide, PI)和台盼蓝为Sigma公司产品;胰酶、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)和DMEM(dulbecco's modified eagle medium)为GIBCO公司产品;SonoVue微泡(意大利Bracco公司),使用时将5 ml 0.9%无菌氯化钠注射液注入瓶内,用力振摇至冻干粉完全溶解。

二、超声辐射装置

所有超声辐射操作均在无菌净化台内完成。超声探头固定在水槽底部,水槽内含去离子除气水,探头上平台放置培养板,靶孔对准探头中心。盖上培养板盖子,以避免外界环境的污染。为防止超声辐射时邻近培养孔受影响,细胞间隔交叉接种(只种植6个孔)在24孔培养板中。在辐射过程中培养板紧贴探头表面,作缓慢圆周移动,以使细胞辐射均匀。

三、实验设计与步骤

1. 实验设计:为研究空化效应、声孔作用和细胞脱离对细胞损伤的影响,比较不同超声参数、培养方式下存活率的差异,在后续实验中确定最佳参数组合。采用析因设计思路(四因素 $2 \times 4 \times 3 \times 2$),培养方式分为贴壁培养(A组)与悬液培养(S组)二个水平,声强分为0.4 W/cm²、1.0 W/cm²、1.6 W/cm²和2.2 W/cm²四个水平,DC分为10%(1 ms 开,9 ms 关)、20%(2 ms 开,8 ms 关)和50%(5 ms 开,5 ms 关)三个水平,辐射时间分为1 min、3 min两个水平。

2. 细胞:人宫颈癌细胞(HeLa)购自武汉大学中国典型培养物保藏中心,37℃、5% CO₂条件下,在培养瓶中按常规培养,培养基为含10% FBS的DMEM,附以100 U/ml青霉素和100 μg/ml链霉素。在实行超声辐射前,利用台盼蓝染色排斥法和血细胞计数器计

数细胞总数和初始细胞活力。

3. 不同培养方式的样本制备:①A组,辐射前1 d用0.2%胰酶消化细胞,接种在24孔培养板内,细胞密度为 1×10^6 个/ml,培养24 h达80%~90%融合时,用PBS冲洗,加入无血清培养基300 μl/孔、100 μl SonoVue微泡(5 μg/μl)后予以超声辐射。辐射后4 h, PBS洗涤细胞,换以含10% FBS的DMEM培养基,清除非存活细胞和细胞碎片。②S组,通过胰酶消化、收集细胞,制备细胞悬液,并与微泡一起加入24孔培养板内,迅速予以超声辐射。辐射后6 h更换培养基,继续培养。

四、细胞活力检测

A组细胞培养24 h、S组细胞培养48 h后,用显微镜对细胞形态、生长状况进行观察,随机选择视野进行照相,至少观察6个视野。然后用胰酶消化、收集细胞,并离心,重悬于PBS缓冲液中,在细胞悬液中加入20 μl PI(40 μg/ml)以标记不能存活的细胞。在室温下孵育15 min后,4℃保存,运用流式细胞仪行细胞活力分析。通过氩激光器在488 nm处激发,575 nm处检测发射光,使用Cell Quest Pro软件分析(BD公司)。每组均分析3份平行样品。

五、扫描电镜观察

A组细胞在超声辐射前1 d,将灭菌盖玻片裁剪成适宜大小置入培养孔内,将细胞种植其上,当充分附着时,添加SonoVue微泡后予以上述参数超声辐射(固定为20% DC)。而S组则在超声辐射后放置载玻片,对照组仅在细胞中添加SonoVue微泡,但不辐射。固定声强为1.0 W/cm²时,分析辐射后6 h、12 h和24 h的变化,其余均在24 h取出载玻片。样本用3%戊二醛固定,梯度乙醇逐步脱水,喷金后用SEM以20 kV加速电压进行观察分析。

六、统计学分析

应用SPSS 13.0版进行统计分析,使用Excel 2007进行数据录入,采用单因素方差分析、配对 t 检验等方法,方差分析组间两两比较采用Tukey法以及Dunnnett- t 法。采用析因设计方差分析比较培养方式、超声参数的单独效应和交互效应。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

结 果

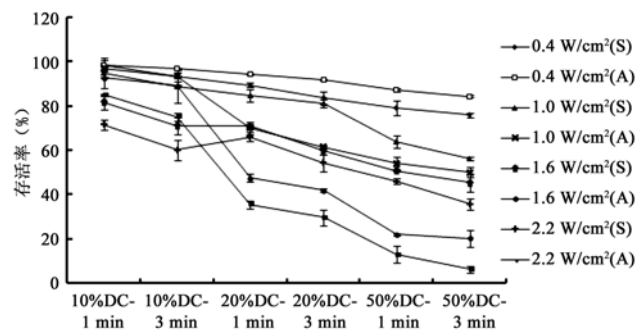
一、超声参数的影响

如表1所示,3种超声参数(声强、DC、辐射时间)的主效应分析,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。如图1所示,固定DC和辐射时间,A组样本声强之间两两比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$);S组样本低声强之间(0.4 W/cm²和1.0 W/cm²)、高声强之间

(1.6 W/cm² 和 2.2 W/cm²) 比较,差异均无统计学意义($P>0.05$),其余两两比较差异均有统计学意义($P<0.01$)。固定声强,A 组 3 种 DC 之间两两比较,差异均有统计学意义($P<0.01$);S 组以 1.0 W/cm² 辐射 1 min、3 min 时,2.2 W/cm² 辐射 3 min 时,20% 与 10% DC 之间比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。A 组以 10% DC 处理时,3 min 存活率低于 1 min,但当 DC 提高为 20% 或 50% 时,高声强在不同时间点之间的差异均不显著($P>0.05$);S 组在低 DC (10% 和 20%) 时,1 min 和 3 min 之间差异无统计学意义($P>0.05$),低声强时,存活率相近($>80\%$),仅观察到少量细胞损伤。

表 1 2 组细胞存活率的析因设计方差分析(% , $n=3, \bar{x} \pm s$)

参数	均方	F	P
校正模型	0.186	271.523	0.000
培养方式	0.176	256.567	0.000
声强	1.186	1729.582	0.000
DC	1.684	2455.926	0.000
辐射时间	0.139	202.580	0.000
培养方式 × 声强	0.078	113.295	0.000
培养方式 × DC	0.215	313.197	0.000
培养方式 × 辐射时间	0.008	11.493	0.001
声强 × DC	0.007	111.619	0.000
声强 × 辐射时间	0.007	9.913	0.000
DC × 辐射时间	0.001	1.184	0.310
培养方式 × 声强 × DC	0.058	84.532	0.000
培养方式 × 声强 × 辐射时间	0.001	1.138	0.338
培养方式 × DC × 辐射时间	0.000	0.224	0.800
声强 × DC × 辐射时间	0.001	1.212	0.307
培养方式 × 声强 × DC × 辐射时间	0.000	0.649	0.691



注:A:贴壁培养;S:悬液培养;DC:占空比;虚线:细胞存活率=80%

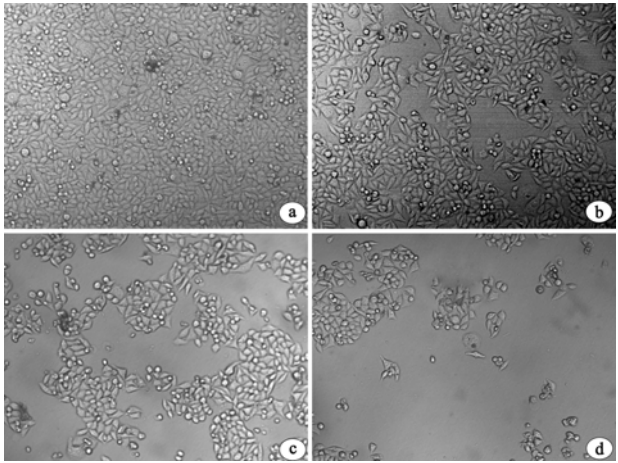
图 1 2 组细胞超声辐射后的存活率比较(% , $\bar{x} \pm s, n=3$)

析因设计方差分析结果显示(表 1),声强和 DC 之间存在交互作用($P<0.01$),高声强和高 DC (50%) 明显降低细胞存活率。声强和辐射时间之间也有交互作用($P<0.01$),高声强和长时间辐射(3 min)也不利于细胞存活。在低 DC 时,1 min 和 3 min 之间的细胞活力差异不明显。当 DC 为 20% 或

50% 时,高声强处理 1 min 即可导致细胞活力明显下降,细胞密度减少。

二、细胞培养方式的影响

A 组与 S 组的整体存活率比较,差异有统计学意义($P<0.01$)。如表 1 所示,培养方式和三种超声参数均有显著的交互作用($P<0.01$)。培养方式、声强与 DC 的三因素交互作用差异有统计学意义($P<0.01$),但其余 3 因素及 4 因素之间均无交互作用($P>0.05$)。如图 2 所示,A 组的存活率随着声强和 DC 的增加而大大减少,高声强(图 2b、d)或高 DC (图 2c、d)辐射会使 A 组细胞脱离培养板底部。在相同超声参数下,S 组细胞活力的下降较 A 组少,很少引起细胞脱离和死亡。



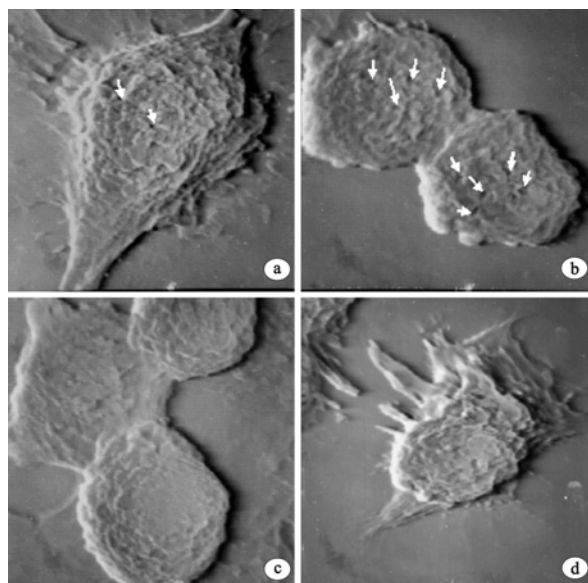
注:辐射 3 min;a:1.0 W/cm²,10% DC,以单细胞层正常生长;b:2.2 W/cm²,10% DC,存活率有所下降;c:1.0 W/cm²,50% DC,部分细胞脱离培养板底部;d:2.2 W/cm²,50% DC,细胞变形,胞膜皱缩,大量细胞脱离,细胞数明显减少

图 2 A 组细胞经超声辐射后的显微镜观察(光镜,×100)

三、扫描电镜观察

固定 DC 为 20%,与对照组相比,S 组细胞 0.4 W/cm² 辐射 1 min 或 3 min 后,细胞膜的形态结构未见显著改变。经 1.0 W/cm² 辐射后,可观察到细胞膜表面变粗糙,有较少的微绒毛样结构,出现孔洞样改变(图 3a);与 1 min 相比,3 min 辐射时产生的孔洞数目明显增多(图 3b);辐射 12 h 后,细胞膜恢复到原有的粗糙度,有更多的微绒毛样结构;辐射 24 h 后,细胞膜与未经超声辐射的对照组相似,未见孔洞样结构(图 3c)。高声强辐射使细胞微绒毛消失,细胞碎片增多。而在相同辐射条件下,A 组细胞外膜微绒毛变得更稀疏,形态变形(图 3d);声强越高,细胞损伤越严重,孔洞较大,并不能完全恢复到正常水平。

综合考虑,细胞死亡率<20% 的最佳参数组合为:悬浮培养,1 W/cm²,20% DC,辐射 3 min。



注:20% DC;a:S 组,1.0 W/cm²,辐射 1 min,细胞膜粗糙,可见少量微绒毛样结构,细胞膜表面出现孔洞(箭头所指);b:S 组,1.0 W/cm²,辐射 3 min,细胞膜表面孔洞增多;c:S 组,为 c 组细胞 24 h 后,未见孔洞;d:A 组,1.0 W/cm²,辐射 1 min,绒毛稀疏,细胞变形

图 3 2 组细胞超声辐射后的扫描电镜观察(×5000)

讨 论

在临床上,PUS 是相对无创、安全的治疗方法^[7,8]。PUS 的强度较低,产热较少,可重复、多次治疗,不会对正常组织造成影响。虽然脉冲波有相对高的压力振幅,但体内相对缺乏空化核。超声微泡可作为空化核,降低空化阈值,在 PUS 条件下诱导空化效应,产生新的治疗方法和生物效应^[9]。空化效应是 PUS 介导治疗的重要机制^[7-10]。利用 PUS 的声孔作用诱导细胞膜短暂性开放,可增加细胞膜通透性,有利于大分子物质进入细胞内^[9,10]。对既往报道进行研究发现,声孔作用的影响和细胞毒性在很大范围内均存在变异性,实验设备不同,声孔效应也不同^[4,5]。运用 PUS 对声孔作用及细胞活力的报道不多,忽视对细胞膜表面显微结构的观察。因此,有必要对各项参数进行优化研究,从而有利于把 PUS 介导的声孔作用用于药物或基因输送。本研究对不同辐射参数和培养方式下的存活率进行评价,通过析因分析可知,2 种培养方式(悬浮、贴壁)和声强(0.4 W/cm²、1.0 W/cm²、1.6 W/cm²和 2.2 W/cm²)、DC(10%、20%、50%)、辐射时间(1 min、3 min)之间存在交互作用,各因素之间关系密切;进行合理的平衡后,细胞存活率大于 80%,可诱导显著的声孔作用,细胞膜上可逆性孔洞最多。

声孔作用可增加细胞通透性。在一定时间的超声辐射下,可诱导细胞膜损伤,但在“无辐射”间隔期可

有一定程度的修复。适当地运用该方法可维持细胞的完整性,以进一步增强或促进大分子物质的细胞内输送。但高声强并不能达到改善细胞活力和提高声孔效应的目的。超声辐射时跨膜电流下降,并在超声断开时间内逐步恢复^[4]。较长的辐射时间使跨膜电流下降明显,从而使膜损害更加严重,而较短的断开时间使细胞没有足够的时间进行膜修复^[5]。因此,较高声强和 DC,以及长时间辐射的孔洞恢复以及细胞存活率明显下降。

本研究在辐射期间,培养板紧贴探头表面作缓慢圆周移动,以确保细胞辐射均匀。尽管如此,当从细胞板下面传输超声波时,可把本已贴壁的细胞从孔板中敲开,降低存活率。细胞脱离与 PUS 介导的声孔作用密切相关。被固定的细胞单层损伤情况与细胞悬液不同,当足够强的超声辐射一定时间后,培养基中出现了显著的空化活动,可产生足够大的切应力使细胞从培养板上脱离^[11]。在相同的辐射条件下,细胞悬液的存活率明显高于细胞单层,细胞密度没有明显减少,形态正常。同时,培养方式和三种超声参数之间有交互作用。声强和 DC 越高,辐射时间越长,脱离培养板底部的细胞越多,孔中央最明显,存活率明显降低。

应用 SEM 可显示细胞膜更细微的变化,以此来研究受空化气泡照射后的胞膜结构。Taniyama 等^[12]运用 PUS 对内皮细胞和 VSMC 细胞进行辐射,细胞膜出现可逆性孔洞。冉海涛等^[13]对大鼠肺动脉血管平滑肌细胞悬液行辐射后发现,约 20% 的细胞膜表面出现 1~2 μm 的小孔,24 h 后恢复正常。Duvshani-Eshet 等^[14]的原子力显微镜研究也支持上述结果。Ohl 等^[11]对贴壁的 HeLa 细胞行 SEM,发现脱离边界处的细胞堆积,聚集的细胞具有明显的结构损伤,存活的穿孔细胞形态和远离脱离区域的“未处理”细胞基本相同。超声照射期间形成孔洞,其后又重新密封,是细胞存活和保持完整所必需的。但对不同辐射参数和培养方式下细胞膜 SEM 的研究不多^[15]。本研究 SEM 结果与流式细胞术得出的结论相同。辐射时,A 组贴壁细胞较 S 组更敏感,球形的悬浮细胞比单层细胞更易受到声孔作用,S 组细胞经 1.0 W/cm²、20% DC 辐射 3 min 后,出现的暂时性孔洞最多,而这些孔洞在 24 h 后消失。但声孔作用过于剧烈时,会导致细胞膜上产生较大的孔洞或不可逆性孔道,细胞可能不能重新密封而迅速死亡,对细胞形态及细胞膜上的表面大分子或受体造成影响^[16]。另外,因 SEM 成像前的准备过程会对细胞活力及细胞膜形态造成影响。与其他研究不同^[12,16],SEM 结果来自接种于载玻片的贴壁细胞,不经胰酶消化,其超声辐射、固定及摄片均在同一载玻片上,故能保持细胞活性状态与结构。在不同的研究

中,细胞膜通透性变化的确切时间不同,这与超声参数、细胞类型、微泡种类及浓度等有关^[17]。另外,特定的辐射装置和方式匹配的最佳条件不同,导致相关结论也不同^[18]。因此,仍需要深入的研究。

总之,将声孔作用应用于外源药物或基因输送的主要问题为优化超声参数,使其既能获得高转染率的同时无明显细胞毒性。本研究结果显示,合适的辐射参数和细胞悬液更有利于声孔作用,使细胞膜表面出现更多的可逆性孔道,显著增加细胞通透性。PUS 介导的声孔作用是将大分子物质输送至胞内的有力工具,可成为一种很有应用前景的治疗方法。

参 考 文 献

- [1] Liu Y, Uno H, Takatsuki H, et al. Interrelation between HeLa-S3 cell transfection and hemolysis in red blood cell suspension using pulsed ultrasound of various duty cycles. *Eur Biophys J*, 2005, 34: 163-169.
- [2] Feril LB Jr, Ogawa R, Tachibana K, et al. Optimized ultrasound-mediated gene transfection in cancer cells. *Cancer Sci*, 2006, 97: 1111-1114.
- [3] Yoshida T, Kondo T, Ogawa R, et al. Combination of doxorubicin and low-intensity ultrasound causes a synergistic enhancement in cell killing and an additive enhancement in apoptosis induction in human lymphoma U937 cells. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2008, 61: 559-567.
- [4] Pan H, Zhou Y, Izadnegahdar O, et al. Study of sonoporation dynamics affected by ultrasound duty cycle. *Ultrasound Med Biol*, 2005, 31: 849-856.
- [5] Fang HY, Tsai KC, Cheng WH, et al. The effects of power on-off durations of pulsed ultrasound on the destruction of cancer cells. *Int J Hyperthermia*, 2007, 23: 371-380.
- [6] Feril LB Jr, Kondo T. Biological effects of low intensity ultrasound: the mechanism involved, and its implications on therapy and on bio-safety of ultrasound. *J Radiat Res (Tokyo)*, 2004, 45: 479-489.
- [7] 鹿庆华,董兆强,蒋卫东,等. 体外治疗性超声治疗不稳定型心绞痛的临床观察. *中华物理医学与康复杂志*, 2005, 27: 416-417.
- [8] 王海清,曹林生,蒋小燕,等. 体外治疗性超声对人体凝血及纤溶系统的影响. *中华物理医学与康复杂志*, 2004, 26: 551-553.
- [9] Miller DL, Pislaru SV, Greenleaf JE. Sonoporation: mechanical DNA delivery by ultrasonic cavitation. *Somat Cell Mol Genet*, 2002, 27: 115-134.
- [10] 项飞翔,王新房,谢明星,等. 国产超声造影剂在超声辐射下对肝细胞产生的生物效应. *中国医学影像技术*, 2007, 23: 325-328.
- [11] Ohl CD, Arora M, Ikink R, et al. Sonoporation from jetting cavitation bubbles. *Biophys J*, 2006, 91: 4285-4295.
- [12] Taniyama Y, Tachibana K, Hiraoka K, et al. Local delivery of plasmid DNA into rat carotid artery using ultrasound. *Circulation*, 2002, 105: 1233-1239.
- [13] 冉海涛,任红,王志刚,等. 超声波空化效应对体外培养细胞细胞膜作用的实验研究. *中华超声影像学杂志*, 2003, 12: 499-501.
- [14] Duvshani-Eshet M, Baruch L, Kesselman E, et al. Therapeutic ultrasound-mediated DNA to cell and nucleus: bioeffects revealed by confocal and atomic force microscopy. *Gene Ther*, 2006, 13: 163-172.
- [15] 王攀,王筱冰,刘全宏,等. 聚焦超声激活血卟啉对 H-22 肿瘤细胞的杀伤作用. *中华物理医学与康复杂志*, 2007, 29: 590-594.
- [16] Mehier-Humbert S, Bettinger T, Yan F, et al. Plasma membrane poration induced by ultrasound exposure: implication for drug delivery. *J Control Release*, 2005, 104: 213-222.
- [17] 赵应征,罗渝昆,唐杰,等. 脂质体和脂质微泡对细胞膜的声孔作用比较. *药学报*, 2006, 41: 1176-1179.
- [18] Kinoshita M, Hynynen K. Key factors that affect sonoporation efficiency in vitro settings: The importance of standing wave in sonoporation. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 359: 860-865.

(修回日期:2008-07-11)

(本文编辑:松 明)

· 消息 ·

全国理疗康复大专《专业证书》班招生简章

受卫生部委托,全国理疗康复医师培训部继续举办第二十八届全国理疗康复医师进修班及第十四届全国高等教育理疗康复针推大专业证书班。于 2009 年 3 月开学,学制一年,学费 3 200 元,含住宿费、实习费、书费。

本班面向全国医疗单位、部队及个体诊所招生,学习期满考试合格,由国家卫生部及辽宁中医药职业技术学院颁发大专业证书。

联系地址:辽宁省鞍山市汤岗子医院全国理疗康复医师培训部;邮编:114048;联系电话:(0412)2410228;联系人:王先生、唐女士。

辽宁中医学院职业技术学院
全国理疗康复医师培训部