论著

文章编号:1000-5404(2008)13-1260-04

RNAi 沉默 *survivin* 基因表达对膀胱癌 EJ 细胞增殖的影响

杨华安,苟 欣,郑传东,吴 跃,何卫阳 (重庆医科大学附属第一医院泌尿外科,重庆 400016)

摘 要:**目的** 通过 RNA 干扰(RNAi)阻断 EJ 细胞中 *survivin* 基因的表达,研究 *survivin* 基因沉默后对细胞生长和细胞凋亡的影响。**方法** 将合成的 DNA 正义链及反义链变性、退火,形成的双链 DNA 与 pSilencer2.0 线性质粒以 T_4 DNA 连接酶连接,重组质粒经酶切、DNA 测序鉴定后,用脂质体法转染 EJ 细胞,通过 RT-PCR、免疫印迹检测干扰效果。MTT 法检测细胞生长的影响,流式细胞仪检测转染后 EJ 细胞的凋亡变化。**结果** 酶切及测序证实设计合成的 DNA 片段已正确插入载体。RT-PCR、免疫印迹检测实验表明:pSilencer2.0-SVV1、pSilencer2.0-SVV2 重组载体均能有效地阻断 EJ 细胞中 *survivin* 基因的表达,使 *survivin* 基因在 mRNA 和蛋白水平上的表达明显下调($P<0.01$),后者抑制效果更佳。转染后的 EJ 细胞生长速度明显变慢。转染 pSilencer2.0-SVV2 实验组细胞的凋亡增加了 17.0%。**结论** 重组真核载体能有效抑制 EJ 细胞的 *survivin* 表达,抑制细胞的增殖,诱导细胞凋亡。

关键词:RNA 干扰;*survivin* 膀胱癌细胞
中图法分类号:R73-362;R730.23;R735.9 **文献标识码**:A

Effects of RNAi-silenced *survivin* gene on bladder cancer cell lines EJ

YANG Hua-an, GOU Xin, ZHENG Chuan-dong, WU Yue, HE Wei-yang (Department of Urinary Surgery, The First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: **Objective** To construct eukaryotic expression vectors by using the pSilencer2.0 vector for inhibiting human *survivin* gene by RNA interference, and to detect the effect of the silenced *survivin* gene on the growth and apoptosis of EJ cells. **Methods** Two target gene segments were synthesized and cloned into the pSilencer2.0 vector respectively to construct two recombinant eukaryotic expression vectors: pSilencer2.0-SVV1 and pSilencer2.0-SVV2, both of which were identified by enzyme digestion analysis and DNA sequencing. Then the EJ cells were transfected with the recombinant vectors and the interfering effects were detected by RT-PCR and Western blot. The proliferation of the EJ cells was detected by MTT method and their apoptosis index detected by flow cytometry. **Results** The results of Enzyme digestion analysis and DNA sequencing showed that two target segments were cloned into pSilencer2.0 vectors. The results of RT-PCR and Western blot indicated that pSilencer2.0-SVV1 and pSilencer2.0-SVV2 vectors could knock down the transcription and expression of *survivin* gene, but the effect of pSilencer2.0-SVV2 vectors was better than that of the pSilencer2.0-SVV1 vectors. Obvious decrease in growth of the EJ cells was observed after transfected with pSilencer2.0-SVV1 and pSilencer2.0-SVV2 vectors, along with 17% increase of the apoptosis index in the EJ cells transfected with pSilencer2.0-SVV2 vectors. **Conclusion** The transcription and expression of *survivin* gene were inhibited effectively in the bladder cancer cell line EJ. After transfected with pSilencer2.0-SVV2 vectors, the apoptosis index of the EJ cells was increased and the growth inhibited.

Key words: RNA interference; *survivin*; bladder cancer cell

肿瘤的发生是细胞增殖与凋亡失衡所致,受体内外多因素调控,靶向治疗有其明显的特异性强和副作用少等优势。*survivin* 是凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis protein)家族新成员,定位于染色体 17q25,全长 14.7 kb 的基因编码 142 个氨基酸的蛋白质,相对分子质量为 16 500[1]。它广泛表达于人类多种肿瘤,具有抑制细胞凋亡、参与细胞周期调节和促进血管形成等功能。此外 *survivin* 在肿瘤组织中高表达,在绝大多数正常分化成熟的组织中不表达,而且它的上调联系着一系列人类肿瘤疾病发生,并使其更具侵袭性,患者存

基金项目:重庆市卫生局基金(04-21-30)
Supported by the Bureau of Public Health of Chongqing(04-21-30)
作者简介:杨华安,男,湖北省孝感市人,硕士研究生,医师,主要从事膀胱肿瘤方面的研究。电话:(023)60636623,E-mail:yanghuaany@163.com
通信作者:苟 欣,E-mail:cymnk@163.com
收稿日期:2007-06-15 修回日期:2007-07-10

活时间更短和对化疗药物耐受[2]。

RNA 干扰（RNA interferenc，RNAi）是指双链 RNA 介导的、序列特异的转录后基因沉默的过程。它作为新兴的基因阻断技术，目前已广泛应用于基因功能及基因治疗的相关研究。本研究用真核转录载体pSilencer2.0-U6 在膀胱癌细胞系 EJ 细胞内表达针对 *survivin* 基因的短发卡状 RNA（short hairpin RNA，shRNA），以阻断细胞中 *survivin* 基因的表达，研究*survivin* 基因沉默后对 EJ 细胞凋亡、细胞生长产生的影响。

1　材料与方法

1.1　材料

pSilencer2.0-U6 质粒购自 Ambion 公司；*survivin* 特异性 DNA 片段由上海骏驰公司合成；DL 2000 Marker、*Bam*H Ⅰ、*Hind*Ⅲ限制性内切酶、T_4DNA 连接酶、反转录 RT-PCR 试剂盒购自大连宝生物公司；去内毒素质粒抽提试剂盒购自博大泰克公司；RPMI1640 培养液为 Gibco 产品；标准胎牛血清购自天津 TBD 公司；一步法总 RNA 提取试剂 Trizol、转染试剂 Lipofectamine2000 购自美国 Invitrogen 公司；EJ 细胞株、DH5α 菌种为本室保存；兔抗人 β 肌动蛋白、*survivin* 多克隆抗体 santancruz 公司；二抗（羊抗兔）和 ECL 显色液为中杉公司产品；Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒为南京凯基公司产品。

1.2　方法

1.2.1　*survivin* siRNA 序列设计　　根据 GENBANK 中报道的 *survivin* 的 cDNA 序列（NM-00168）参考 ambion 公司 siRNA 设计原则和在线设计分析（http：//www.ambion.com）分别设计两对 siRNA 干扰序列：序列 1：正义链 5′-GATCCGGACCACCGCATCTCTACATTCGTGTAGAGATG CGGTGGTCCTTTTTT GGAAA-3′；反义链 5′-AGCTTTTCCAAAAAAGGACCACCGCATCTCTACACGAATGTAG AGATGCGGTGGTCCG-3′。序列 2：正义链：5′-GATCCGAATTAACCCTTGGTGAATTTCGATTCACCAAGGGTTAATTCTTTTTTGGAAA-3′；反义链：5′-AGCTTTTCCAAAAAAGAATTAACCCTTGGTGAATCGAAATTCACCAAGGGTTAATTCG-3′。划线部分为 *survivin* 基因特异性序列，序列经同源性分析后，提交上海英骏公司合成。按质粒说明书方法将合成的 DNA 正义链及反义链变性、退火，形成的双链 DNA 与 pSilencer2.0 线性质粒连接，连接产物转化 DH5α 感受态菌种，LB 平板（AMP+）筛选阳性克隆，摇菌抽提质粒进行 *Bam*H Ⅰ、*Hind* Ⅲ双酶切及琼脂糖电泳鉴定，并提交上海生工公司进行 DNA 序列测定。将 2 个测序正确的重组质粒分别命名为 pSilencer2.0-SVV1、pSilencer2.0-SVV2，阴性对照质粒 pSilencer2.0-NC（公司提供）。

1.2.2　实验分组　　共设 4 个实验组，分别为 pSilencer2.0-SVV1 转染组、pSilencer2.0-SVV2 转染组及阴性对照质粒 pSilencer2.0-NC 转染组，同时以未转染质粒的 EJ 细胞为未转染对照组，同步进行实验。

1.2.3　重组质粒转染 EJ 细胞　　用去内毒素质粒提取试剂盒提取各重组质粒，并于核酸分析仪上测定浓度。将 EJ 细胞按 1×10^5/孔的数量转种于 6 孔培养板，RPMI1640 培养液（含 10% 胎牛血清，100 U/ml 青霉素，100 U/ml 链霉素），37 ℃、5% CO_2 培养细胞密度至 60% ~80% 时，更换无抗生素、无血清的 RPMI1640 培养液继续培养 6 h，分别用重组质粒 pSilencer2.0-SVV1、pSilencer2.0-SVV2 及阴性对照质粒pSilencer2.0-NC转染 EJ 细胞，以未转染质粒的 EJ 细胞为对照组。各转染组每孔质粒用量为 2.0 μg，脂质体用量为 5.0 μl。转染后 5 h 后更换为含 10% 血清无抗生素 RPMI1640 培养液终止转染。

1.2.4　RT-PCR　　转染后 24 h，提取各组 EJ 细胞总 RNA 并定量，各实验组取大致等量的 RNA 反转录后进行 PCR。*survivin* PCR 引物正义链：5′-TTTCTCAAGGACCACCGCATCT-3′，反义链：5′-GCGCACTTTCTCCGCAGTTTC-3′，产物长度 359 bp。内参照物为 GAPDH PCR 引物正义链 5′-ACCACAGTCCATGCCAGCAC-3′，反义链 5′-TCCACCACCCTGTTGCAGTA-3′，产物长度 452 bp。PCR 反应条件：95℃变性 4 min；94 ℃ 30 s，60.5 ℃ 30 s，72 ℃ 35 s，循环 35 次；72 ℃延伸 7 min。产物经 2.0% 琼脂糖电泳后于 CHERMI-IMAGER 5500 图像分析系统分析。

EJ *survivin* mRNA 表达抑制率计算：抑制率（%）=［1 -（EJ-siSVV-*survivin* 条带灰度/EJ-siSVV-GAPDH 条带灰度）/（EJ *survivin* 条带灰度/EJ GAPDH 条带灰度）］×100%。

1.2.5　细胞总蛋白的提取及免疫印迹实验　　转染后 72 h 提取各组细胞总蛋白并定量，调整蛋白浓度至大致相同水平进行 SDS-PAGE 电泳，电泳完毕后，凝胶按操作说明装入半干电转印仪，60 mA 电转 40 min 后，PVDF 膜加 5% 脱脂奶粉封闭；加 1∶1 000 PBS（0.01 mol/L，pH 7.4）稀释的抗 *survivin* 抗体，抗 β 肌动蛋白抗体 4 ℃过夜；PBS Tween-20 洗涤，加 1∶4 000 稀释的二抗室温 60 min；PBS Tween-20 洗涤后 ECL 化学发光显影。CHERMI-IMAGER 5500 图像分析系统分析结果。

EJ *survivin* 蛋白表达抑制率计算：抑制率（%）=［1 -（EJ-siSVV-*survivin* 条带灰度/EJ-siSVV-β-actin 条带灰度）/（EJ *survivin* 条带灰度/EJ β-actin 条带灰度）］×100%。

1.2.6　检测转染后 EJ 细胞生长曲线的变化　　消化下各组 EJ 细胞，按 3×10^3/孔的数量转种于 96 孔培养板，设 4 个时间点（24、48、72、96 h），每个点设 6 个复孔，RPMI1640 培养液（含 10% 胎牛血清，无抗生素）37 ℃、5% CO_2 培养至各时间点，MTT 法检测吸光度。

1.2.7　转染后细胞凋亡的检测　　转染后 72 h，消化下 psilencer2.0-NC 和 psilencer2.0-SVV2 组 EJ 细胞，PBS 洗涤，调整细胞数为（2 ~10）$\times10^5$ ml^{-1}，使用 AnnexinV-FICT/PI 双染色法凋亡检测试剂盒按操作说明进行凋亡染色，上流式细胞仪检测细胞凋亡，细胞计数均大于 1×10^4 个。

1.3　统计学分析

使用 SPSS 10.0 统计分析软件，各实验组 EJ 细胞的凋亡率的比较使用 χ^2 检验，其他数据进行方差分析，实验组间的多重比较使用 SNK-*q* 检验。

2　结果

2.1　重组质粒的酶切鉴定及序列测定

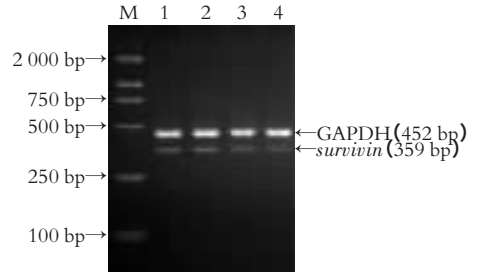
DNA 序列测定结果表明，各序列已成功插入了 pSilencer2.0 载体。

2.2　转染后 EJ 细胞中 *survivin* 的表达

2.2.1　RT-PCR 检测转染后 24 h EJ 细胞中 *survivin* 的表达

图像扫描分析结果显示，与未转染组相比，pSilencer2.0-

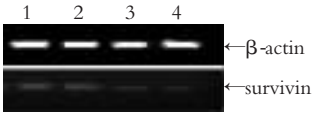
SVV1、pSilencer 2.0-SVV2 重组质粒转染的 EJ 细胞的 *survivin* mRNA 水平明显下调，*survivin* 的灰度值、峰高及密度均明显降低（$P<0.01$）。*survivin* mRNA 水平受到明显抑制，抑制分别达 20.7%、31.9%。pSilencer2.0-NC 转染的 EJ 细胞相比于未转染组 *survivin* mRNA 水平无明显。各组间 GAPDH 和 *survivin* 的 mRNA水平见图 1。



M：DNA 标准（DL 2000）；1：未转染；2：pSilencer2.0-NC 转染；3：pSilencer2.0-SVV1 转染；4：pSilencer2.0-SVV2 转染

图 1 转染后 24 h EJ 细胞中 *survivin* 及 GAPDH 的 RT-PCR 产物琼脂糖电泳图

2.2.2 免疫印迹实验检测转染后 72 h EJ 细胞中 *survivin* 的表达 转染 72 h 后，与未转染重组质粒的 EJ 细胞相比，pSilencer2.0-SVV1 和 pSilencer2.0-SVV2 重组质粒转染的 EJ 细胞，*survivin* 蛋白总量明显下调。蛋白抑制率分别为 40.4% 和 62.3%。未转染对照组和 pSilencer2.0-NC 质粒转染组的 EJ 细胞 *survivin* 的总蛋白水平无明显差别。各组间 β-actin 和 *survivin* 蛋白表达水平见图 2。



1：未转染；2：pSilencer2.0-NC 转染；3：pSilencer2.0-SVV1 转染；4：pSilencer2.0-SVV2 转染

图 2 转染后 72 h EJ 细胞中 *survivin* 及 β-actin 的免疫印迹实验结果

2.3 转染后 EJ 细胞生长曲线的变化

与 pSilencer2.0-NC 转染组和未转染组相比，转染后 24、48、72、96 h，pSilencer2.0-SVV1 和 pSilencer2.0-SVV2 重组质粒转染组的 MTT 法检测的吸光度明显低于 pSilencer2.0-NC 转染组和未转染组（$P<0.01$），表明这两组的 EJ 细胞的生长速度明显变慢 。

2.4 流式细胞仪检测

前述研究结果表明重组质粒 pSilencer2.0-SVV2 较 pSilencer2.0-SVV1 重组质粒转染的 EJ 细胞 *survivin* 蛋白表达的抑制效果更佳，该检测项中以重组质粒 pSilencer2.0-SVV2 组为研究对象。结果显示，转染 72 h 后 EJ 的凋亡率为 22.0% ，而 pSilencer2.0-NC 质粒转染的 EJ 细胞的凋亡率为 4.5%。pSilencer2.0-SVV2 重组质粒转染后细胞凋亡率明显上升（$P<0.01$）。

3 讨论

RNA 干扰（RNAi）是自然界生物体的一种遗传现象，其主要是利用双链 RNA 特异性介导其互补同源 mRNA 序列的降解，从而特异性抑制目的蛋白的表达，抑制作用强[3]。RNAi 具有高效、特异性，且 siRNA 的引入避免了 dsRNA 对哺乳动物细胞的毒性反应和诱导非特异性的干扰素激活途径。

细胞凋亡和细胞周期调控异常是恶性肿瘤无限增殖的重要原因。*survivin* 作为目前发现的凋亡抑制蛋白家族中唯一与细胞凋亡和周期调控都相关的成员，对维持快速增殖细胞的存活以及肿瘤细胞恶性增殖具有非常重要的功能。*survivin* 主要通过直接或间接抑制凋亡终末效应器半胱氨酸蛋白酶 Caspase-3、Caspase-7 及 Caspase 9 的活性，阻断各种刺激因素诱导的细胞凋亡过程[4,5]，还能通过调节 mdm2 和其蛋白表达，干扰 p53 的功能[6]。它还参与形成细胞周期过客蛋白复合体，是调节细胞周期进行的重要因子[7,8]。有研究表明特异性沉默 *survivin* 表达的肿瘤细胞，其成瘤率明显降低、血管发生显著减少[9,10]。有研究显示 *survivin* 过度表达可能是预测、诊断、提示膀胱癌预后不良及产生耐药性的主要因素之一[11,12]。由于它广泛表达于人类各种肿瘤包括膀胱癌，因此 *survivin* 可能成为膀胱肿瘤基因治疗的新靶点。

肿瘤的发生并非单个分子事件，而是一个多步骤过程，一般需要多个基因的改变，其中最广为人知的肿瘤抑制基因 p53 的突变是常见现象，膀胱癌的形成也不例外。多数人膀胱癌组织 *survivin* 的异常高表达的同时伴随着野生型 p53 基因的突变。本实验选用 p53 无义突变的膀胱癌 EJ 细胞株，其 *survivin* 高表达。并非所有针对靶基因的 19 个特异的序列都能起到沉默基因的作用，在我们的实验设计中构建了 2 个针对 *survivin* 基因的重组真核转录载体 pSilencer2.0-SVV1 和 pSilencer2.0-SVV2。其中 SVV1 序列已经被证实能显著干扰软组织肉瘤、肝癌和 HALA 细胞系中 *survivin* 基因的表达；SVV2 也符合干扰序列筛选原则。本实验结果表明两者均可有效地抑制 EJ 细胞中 *survivin* 基因的表达，但 SVV2 序列抑制效果更佳。这可能是由于不同细胞其靶 RNA 的空间构象、位点以及许多其他未知因素的影响，使得并非所有的 siRNA 均可对靶 RNA 产生高效的 RNA 干扰效应。细胞生长抑制检测表明它们均能抑制 EJ 生长，该抑制作用呈时间依赖性，在 72 h 时抑制作用最强，这同载体在细胞内最佳表达时间点相吻合。凋亡检测显示 pSilencer2.0-SVV2 转染作用后的 EJ 细胞凋亡指数明显强于对 pSilencer2.0-NC 对照转染的 EJ 细胞。此外，干扰 *survivin* 表达能以不依赖 p53 的方式诱导细胞的凋亡发生显著加强. 上述结果表明：RNAi 特异性阻断了 *survivin* 的抗凋亡作用，可能同时延缓了细胞周期的进程，使细胞生长活性明显降低。近年来，基因治疗是肿瘤治疗研究的

热点之一，从本实验研究的数据分析：*survivin* 基因可作为膀胱癌基因治疗的靶点，为 siRNA 介导的膀胱肿瘤基因沉默治疗提供实验依据。但 siRNA 在体内对 *survivin* 基因表达和膀胱癌细胞凋亡的影响有待于进一步研究。

参考文献：

[1] Ambrosini G, Adida C, Altieri D C. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma[J]. Nat Med, 1997, 3(8): 917-921.
[2] Johnson M E, Howerth E W. survivin: a bifunctional inhibitor of apoptosis protein[J]. Vet Pathol, 2004, 41(6): 599-607.
[3] McManus M T, Sharp P A. Gene silencing in mammals by small interfering RNAs[J]. Nat Rev Genet, 2002, 3(10): 737-747.
[4] Zangemeister-Wittke U, Simon H U. An IAP in action: the multiple roles of survivin in differentiation, immunity and malignancy[J]. Cell Cycle, 2004, 3(9): 1121-1123.
[5] Blanc-Brude O P, Mesri M, Wall N R, *et al*. Therapeutic targeting of the survivin pathway in cancer: initiation of mitochondrial apoptosis and suppression of tumor-associated angiogenesis [J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(7): 2683-2692.
[6] Sah N K, Khan Z, Khan G J, *et al*. Structural, functional and therapeutic biology of survivin[J]. Cancer Lett, 2006, 244(2): 164-171.
[7] Yang D, Welm A, Bishop J M. Cell division and cell survival in the absence of survivin[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(42): 15100-15105.
[8] Beardmore V A, Ahonen L J, Gorbsky G J, *et al*. survivin dynamics increases at centromeres during G2/M phase transition and is regulated by microtubule-attachment and Aurora B kinase activity[J]. J Cell Sci, 2004, 117(Pt 18): 4033-4042.
[9] Li Q X, Zhao J, Liu J Y, *et al*. survivin stable knockdown by siRNA inhibits tumor cell growth and angiogenesis in breast and cervical cancers[J]. Cancer Biol Ther, 2006, 5(7): 860-866.
[10] 陈　莹，钟　玲，王　勇，等. RNA 干扰沉默 survivin 基因在抑制卵巢癌裸鼠移植瘤中的作用[J]. 第三军医大学学报，2007，29(6)：530-533.
[11] Shariat S F, Ashfaq R, Karakiewicz P I, *et al*. survivin expression is associated with bladder cancer presence, stage, progression, and mortality[J]. Cancer, 2007, 109(6): 1106-1113.
[12] Mowla S D, Emadi-Baygi M, Ziaee S A, *et al*. Evaluating expression and potential diagnostic and prognostic values of survivin in bladder tumors: a preliminary report[J]. Urol J, 2005, 2(3): 141-147.

（编辑　汪勤俭）

文章编号：1000-5404(2008)13-1263-01

个案与短篇

臭氧介入治疗腰椎间盘突出症的近期疗效分析

唐拥军[1]，曾凡伟[2]，池雷霆[2]　（[1]大竹县人民医院骨科，四川 大竹，635100；[2]达州市中心医院骨科，四川 达州，635000）

经皮穿刺臭氧注射治疗椎间盘突出症是近几年来在欧洲兴起的微创介入治疗技术。动物实验证实了该技术的有效性和安全性[1,2]。现将我院开展该项技术治疗 122 例腰椎间盘突出症患者疗效报告如下。

1　资料与方法

1.1　临床资料

筛选我科 2006 年 1 月至 2008 年 1 月腰椎间盘突出患者 122 例，其中男性 67 例，女性 55 例；平均年龄 48(21～84)岁，病程 3 个月至 20 年。临床症状：单纯腰痛 45 例，腰痛伴单侧或双侧下肢疼痛或麻木 68 例，单纯下肢疼痛麻木 9 例。所有患者均行 CT 或 MRI 检查，病变部位在 $L_{2/3}$ 间隙 3 例，$L_{3/4}$ 间隙 12 例，$L_{4/5}$ 间隙 38 例，L_5S_1 间隙 34 例，$L_{4/5}L_5S_1$ 间隙 20 例，$L_{3/4}L_{4/5}L_5S_1$ 间隙 10 例，$L_{2/3}$ $L_{3/4}L_{4/5}L_5S_1$ 间隙 10 例。纳入标准：有腰腿痛的症状，可伴有节段性的感觉障碍和肌力的缺失，经 CT 和(或) MRI 检查证实相应节段的椎间盘膨出、突出、脱出的影像学表现。排除标准：影像学检查为骨性增生、突出的椎间盘骨化、骨性椎管狭窄或侧隐窝狭窄为主。

1.2　设备及器材

臭氧发生器(意大利 MULTIOSSIGEN SRL 99IR) C 型臂 X 光机，腰椎间盘穿刺针(18 号)，医用纯氧。

1.3　方法

患者俯卧位，在 C 型臂 X 光机下定位，取患侧棘突旁 8～12 cm 为进针点，局麻，Ghiba 针与皮肤的失状面成 30°～45°，经安全三角区进入椎间隙，针尖位于椎间盘突出处，抽取 O_3 约 10～15 ml 在透射下注入。对有下肢神经症状者将针退至椎间孔处注射 5～10 ml[3]。术后绝对卧床休息 24 h。出院后 2 周内休息为主，按康复计划进行腰背肌锻炼，3 个月内禁止负重及参加剧烈的体育运动。

2　结果

本组病例均成功穿刺，未见椎间盘感染、神经损伤、大血管及重要脏器损伤等并发症。12 例患者效果不佳 1 周后行第 2 次注射治疗，3 例患者 1 个月后再次注射治疗。

（下转 1267 页）

作者简介：唐拥军，男，重庆市潼南县人，主治医师，主要从事脊柱病变外科治疗方面的研究。电话：(0818)6246819，E-mail：tangyongjun1968@163.com

收稿日期：2008-03-15；修回日期：2008-05-30