DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.10.010
第24卷第10期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 10
2002年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2002

文章编号:1000-5404(2002)10-1149-04

论著

农杆菌介导鼠源轮状病毒 vp4 基因转化马铃薯条件优化研究

李晋涛,吴玉章,费 蕾,牟芝蓉 (第三军医大学基础医学部全军免疫学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 获得马铃薯再生和农杆菌介导的遗传转化体系。方法 以马铃薯品种"台湾红"为受体材料,对其再生和农杆菌介导的遗传转化体系进行了研究。结果 诱愈培养基为 MS+0.1 mg/L 2,4-D+1 mg/L BA,出芽培养基为 MS+1 mg/L ZT+5.0mg/L GA3,卡那霉素浓度为 50 mg/L,农杆菌液浓度为 A_{600}=0.5。通过该体系将一鼠源轮状病毒外壳蛋白基因 vp4 导入马铃薯中,获得了具卡那霉素抗性的转化植株。经 PCR 验证,外源基因已导入马铃薯基因组中。结论 获得相对高效的马铃薯遗传转化体系,并成功地将外源基因转入马铃薯中。

关键词:基因转化;农杆菌;马铃薯;鼠源 vp4
中图法分类号:Q78;Q933 文献标识码:A

Optimal conditions for transforming murine vp4 gene into potatoes induced by *Agrobacterium tumernfaciens*

LI Jin-tao, WU Yu-zhang, FEI Lei, MOU Zhi-rong (Institute of Immunology of PLA, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To obtain a system of transforming foreign gene into potatoes with regenerating ability. Methods A potato cultivar "taiwanhong" sensitive to Agrobacterium tumerfaciens was used as the transformation receptor. A regeneration system and a transformation system via Agrobacterium tumerfaciens were studied. Results The optimal conditions for regeneration and transformation for foreign gene into potato were listed as following: the callus inducement medium: MS+0.1mg/L 2,4-D+1 mg/L BA; the budding medium: MS+1 mg/L ZT+5.0 mg/L GA3; kanamycin concentration: 50 mg/L; the bacterial concentration: A_{600}=0.5. A murine rotavirus outer capsid protein gene vp4 was introduced into the potato under the condition as above mentioned. PCR analysis of the kanamycin-resistant transformants manifested that the foreign gene was integrated into the potato genome. Conclusion A high effective genetic transformation system is obtained and successfully used in transforming the foreign gene into potatoes.

Key words: gene transformation; Agrobacterium tumerfaciens; potato; murine outer capsid protein genevp4

转基因植物的兴起得益于对农杆菌的研究。农杆菌是一种革兰阴性土壤杆菌,含有一巨大的环形质粒—Ti 质粒,其上有一段 DNA(T-DNA)可插入到植物基因组中使其携带的致瘤基因(细胞分裂素和生长素合成酶基因)在植物中得以表达,从而诱发冠瘿瘤。基于此原理,转基因植物疫苗的基本构建策略是将某些病毒性、细菌性、肠道和非肠道的病原物抗原基因插入到含有 T-DNA 的植物表达载体,通过农杆菌 T-DNA 将其导入植物基因组,并在植物中得以稳定表达[1]。

由于马铃薯对根癌农杆菌的感染较敏感,易于通过农杆菌将靶基因插入其基因组中,因此马铃薯是转基因植物疫苗研究常常采用的转基因受体材料[2]。但是,并非所有马铃薯品种都易于转化。虽然关于马铃薯组织培养的报道很多,但众多研究结果之间产在很大差异,对于不同品种的马铃薯,优化其转化系统仍然是成功进行转基因马铃薯植物疫苗研究的必要前提[3]。本实验以鼠源轮状病毒外壳蛋白基因 vp4 为外源基因,以农杆菌为介导进行马铃薯的遗传转化研究,通过不同的转化体系筛选到了适合马铃薯品种"台湾红"的转化系统。

1 材料与方法

1.1 植物表达载体

重组质粒 PBI121-35S-mvp4 由本实验室构建[4]。

1.2 材料与培养基(组合)

以苗龄为 15 d 的"台湾红"马铃薯品种的幼嫩无菌苗(叶片大小为:0.5 cm^2,茎段长为 0.5~1 cm)为材料,分别剪取叶片或茎段外植体(每种 60 个)接种于下列 4 种不同激素配比的培养基组合上。光照时间为 16/8 h,光强度为 2 000~3000 lx,温度为(23±2)℃。

1 号:MS+2.5 mg/L BA+0.2 mg/L NAA,2~4 周后换成:MS+2.5 mg/L BA+5.0 mg/L GA3

2 号:MS+0.1 mg/L 2,4-D+1 mg/L BA,2~4 周后换成:MS+1 mg/L ZT+5.0 mg/L GA3

3 号:MS+2.0 mg/L KT+10 mg/L GA3

4 号:MS+1.0 mg/L BA+1.0 mg/L IAA+10 mg/L GA3

上述培养基的 pH 均为 5.8,琼脂浓度为 0.7%,蔗糖浓度为 3%。愈伤诱导率和再生率按下列公式统计计算:愈伤诱导率=愈伤块数/外植体数目×100%,再生率=再生株数/外植体数×100%。

1.3 选择压力的比较

以马铃薯"台湾红"品种为材料。外植体的剪取与培养条件参照 1.2。

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(2001CB510001);国家自然科学基金资助项目(39789010)
作者简介:李晋涛(1970—),女,四川省峨眉山市人,博士,讲师,主要从事分子遗传学及分子免疫学方面的研究。电话:(023)68752236
通信作者:吴玉章,电话:(023)68752680
收稿日期:2002-05-10;修回日期:2002-07-18

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.3.1 愈伤诱导过程中选择压力的比较 将马铃薯无菌苗的茎段和叶片各 30 个分别放在含有 Km 浓度分别为 0、20、50、75、100 mg/L 的脱分化培养基中，待 2～3 周后观察外植体的生长状况。

1.3.2 生根过程中选择压力的比较 将无菌苗幼嫩茎尖培养在 Km 浓度分别为 0、20、50、75、100 mg/L 的无任何激素的培养基上。3 周后观察无菌苗的生根状况。

1.4 根癌农杆菌介导的遗传转化方法

以“台湾红”品种为材料。外植体的剪取与培养条件参照 1.2。

1.4.1 农杆菌浓度对转化的影响 将培养过夜的农杆菌菌液离心后用液体培养基悬浮，以“台湾红”的叶片为受体进行转化，感染时间分别为 3、5、10、15、20 min 的条件下，用 A_{600} 为 0.2、0.5、1.0 菌液浓度，统计抗性愈伤组织。

1.4.2 共培养时间对转化的影响 在相同的菌液浓度条件下，预培养后的外置体投入 A_{600} 为 0.5 的农杆菌菌液中侵染 10 min，取出置于铺有一层滤纸 MS 培养基上，人工气候箱中 22～24 ℃黑暗培养。以共培养时间 1、2、3、4 d 进行比较实验，统计抗性愈伤组织。

1.4.3 茎段预培养对转化的影响 切取台湾红茎段，中剖后置培养基 MS+0.1 mg/L 2，4—D+1 mg/L BA 上预培 0、1、2、3 和 4 d，然后再将其用 A_{600}=0.5 的农杆菌菌液感染 10 min，统计抗性愈伤组织。

1.5 转化植株的分子检测分析

马铃薯转化植株基因组 DNA 采用溴代十六烷基三甲胺(Cetyltrimethyl ammonium bromide，CTAB)法提取[5]。具体操作如下：取叶片 50～100 mg，液氮冷冻后研磨成粉末状。加入 2 倍体积 60 ℃预热的 CTAB 提取液[CTAB 2%(W/V)，NaCl 1.4 mol/L，EDTA 0.02 mol/L，Tris·HCl 0.1 mol/L]，轻轻颠倒混匀，60 ℃保温 45 s。加等体积的氯仿∶异戊醇(24∶1)，混匀。5 000 r/min，15～20 ℃离心 5 min，取上清，加等体积的氯仿/异戊醇，混匀，5 000 r/min 离心 5 min。取上清，加 2/3 体积预冷的异丙醇，混匀。—20 ℃放置 2～3 h。11 000 r/min 离心 10 min，弃上清，干燥沉淀，加适量的 TE 溶解沉淀。加 1/10 体积的 3 mol/L NaAc(pH 5.2)，2～3 倍体积预冷的无水乙醇，—20℃过夜，11 000 r/min，离心 10 min，弃上清。干燥沉淀，加 50～100 μl TE 溶解。取 2 μl 作为以下 PCR 的模板。PCR 反应引物由上海生工合成。P1 5′-ATGGCTTCACTCATTTATAGACAA-3′，P2 5′-TCACAGTCTACACTGCATAATTAA-3′。PCR 扩增条件为：PCR 反应条件为 94℃变性 5 min 后，94℃ 60 s，56℃ 1.5 min 和 72℃ 2 min，循环 30 次，72℃ 10 min 结束反应。PCR 总反应体系为线性化质粒 DNA 模板 2 μl，20 pmol/L 引物各 1 μl，10 mmol/L dNTP 2 μl，10× PCR 反应缓冲液 5 μl 和 Pyrobest DNA 聚合酶 0.5 U，加灭菌双蒸水至总体积 50 μl。扩增产物 1%琼脂糖电泳，具体操作按参考文献[3]介绍的方法进行。

2 结果

2.1 培养基的优化

外植体在 4 种培养基上的愈伤诱导率大体都在 80%以上，1 号和 2 号培养基的愈伤诱导率均达 90%以上，而最高愈伤诱导率是基于 2 号培养基，达到 97%。这表明，最适宜于愈伤诱导的培养基是 1 号和 2 号。就不同的外植体而言，茎段的最佳培养基为 2 号，叶片为 1 号。植株再生频率最高的培养基为 1 号，其余培养基的再生诱导频率均在 35%左右，相差不大。这样，我们为后续转化实验确立的最佳外植体愈伤诱导培养基是 1 号和 2 号，最佳的植株再生培养基是 2 号，见表 1。

表 1 不同植物激素组合对马铃薯再生体系的影响

Tab 1 Effect of different plant hormone combination on regeneration system of potato

Combination of different plant hormones	Number of explant	Number of callus formed	Callus formation percentage(%)	Number of budding	Regenaration percent(%)
No.1	112	103	91.96	33	38
No.2	105	102	97	56	57
No.3	108	89	82	0	0
No.4	116	98	81	17	14

2.2 选择压力的确定

2.2.1 愈伤诱导过程中选择压力的确定 经过 3 周的培养，对照组的外植体能长出块大而且鲜绿的愈伤组织，随着抗生素浓度即选择压力的增高，外植体逐渐变黄，长出的愈伤也是弱小的。在 20 mg/L 的压力下，外植体愈伤化情况与对照差异不显著；在 50 mg/L 压力下，外植体有些黄化，不能愈伤化，而在 100 mg/L 的压力下，外植体出现黄化进而死亡。因而确定转化材料愈伤诱导时的选择压力为 50 mg/L。

2.2.2 生根过程中选择压力的确定 经过 3 周的培养，对照组的根毛较长，根白而且纤细，数量多于含 Km 的实验组。随 Km 浓度的增高，根毛数量逐渐少，生长迟缓。在 50 mg/L 的培养基中虽也生根，但生长缓慢，根短且黄，根毛少。当 Km 浓度为 100 mg/L 时，植株出现黄化。因而确定转化植株再生根时的选择压力浓度为 Km 100 mg/L。

2.3 马铃薯转化系统的优化

2.3.1 预培养对欲转化外植体的愈伤效果的影响 欲转化外植体经过预培养使细胞处于“转化感受态”。预培养时间以 2 d 为最佳，这时欲转化外植体经转化后的愈伤诱导率最高，达 99%，见图 1。

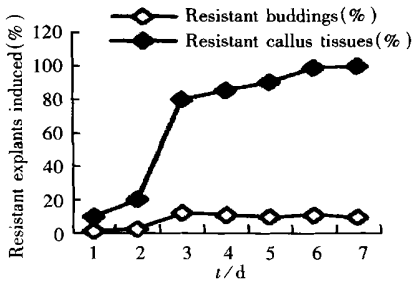


图 1 不同预培养时间对转化的影响

Fig 1 Effect of different preculture time on the transformation

2.3.2 农杆菌浓度对转化的影响 农杆菌与外植体共培养 2 d 后，A_{600} 为 0.5～0.8 时外植体生长良好，而菌液浓度 A_{600} 超过 1.0 时，外植体伤口变黑，且农杆菌生长过于旺盛，选择培养基中的抗生素很难抑制菌的生长，致使外植体被农杆菌污染。感染时间以 5～10 min 为宜，根据农杆菌的浓度而定，浓度高感染时间相应缩短。否则时间过长同样会导致农杆菌污染，见表 2。

2.3.3 共培养时间对转化的影响 共培养是农杆菌实现其所携带的外源基因向外植体转化的过程，给与恰当的时间是农杆菌能否将外源基因成功转化的关键。时间过短，农杆菌感染植物细胞效率偏低，这样的外植体在选择培养中不久就会黄

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

化, 表明外源基因未能实现由农杆菌转移并整合到马铃薯基因组中; 若共培养的时间过长, 则农杆菌过度繁殖导致材料严重污染, 这样的外植体在选择培养基上开始是嫩绿的, 不久便会变黑、变软而死亡。实验证明以共培养 2 d 后, 外植体周围刚要出现白色菌落时最佳, 见图 2。

表 2　不同农杆菌浓度和感浸时间对转化的影响

Tab 2　Effect of different concentrates of Agrobacterium tumerfaciens and infection time on the transformation

Infection time (min)	Bacteria concentrate (A_{600})	Explants numbers	Resistant callus numbers	Inducing callus percent (%)	Callus growth station	Contaminated percent (%)
5	0.2	105	73	69.5	+++ (yellow)	1.4
5	0.5	166	127	76.3	++++ (green)	4.7
5	0.8	105	92	87.6	++++ (green)	10.9
5	1.0	76	61	80.3	++ (brown)	14.8
10	0.5	90	71	78.8	+++ (yellow)	4.2
15	0.5	86	34	37.8	++ (brown)	17.6
20	0.5	94	11	12.2	+ (black)	36.4
15	0.2	103	70	66.7	+++ (yellow)	8.6
20	0.2	108	49	47.6	++ (brown)	25.3

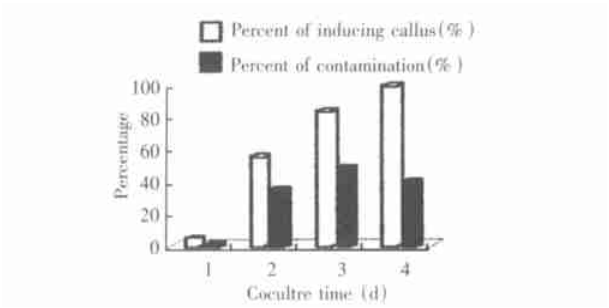
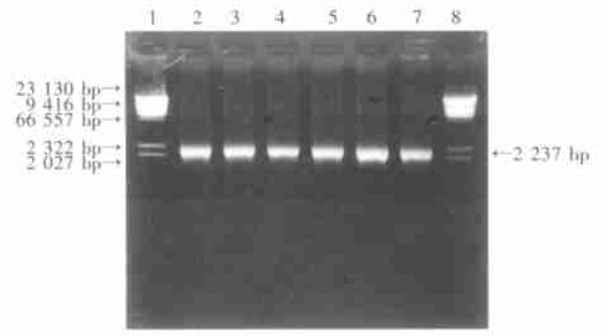


图 2　不同共接时间对诱愈和污染率的影响

Fig 2　Effect of different coculture time on inducement and contaminative rate

2.4　马铃薯转化体的分子检测分析

208 个外植体经选择压力筛选培养获得了 15 个转化植株。PCR 检测分析结果显示, 部分转化植株扩增产生了 2 237 bp 的目的片段, 表明外源基因已导入受体基因组中。实验结果中产生了少量假转化体(“escapes”), 其原因是多方面的。只要扩大遗传转化总量, 就能保证获得足够多的阳性转化植株, 不会限制其后的疫苗研究工作。结果表明, 外源基因确实已导入受体基因组中, 见图 3。



1: λ/Hind Ⅲ DNA marker; 2: Control plant transformed with empty vector; 3～7: Positive transgenic plant; 8: Non-transgenic plants

图 3　转基因植株的 PCR 鉴定: 1% 琼脂糖电泳

Fig 3　PCR of transgenic plants on 1% agarose gel

3　讨论

转基因植物是指通过 DNA 重组技术和植物遗传转化技术, 将外源基因转入植物体内而获得的具有新的遗传性状的植物[6]。转基因技术打破了传统的生物种属间的自然隔离屏障, 人们可将来源于不同物种的基因随心所欲地进行裁剪、拼接和整合, 从而获得综合了许多优良农艺性状的作物[7]。植物是一种多样化、低成本和可再生的材料资源, 而生物技术的发展则使我们进一步拓宽了植物的使用范围, 国外在植物中采用这种“分子农业”的方法, 已成功地生产了越来越多的有用物质, 其中包括一些高价值的药用蛋白多肽和疫苗[8～10]。

获得高效的马铃薯再生体系的建立是利用马铃薯进行遗传转化的先决条件, 虽然关于马铃薯组织培养的报道很多, 但众多研究结果之间产在很大差异, 获得较高再生频率的实例也不多。一般认为马铃薯具有很强的基因型依赖性, 因此一直未能建立一个较普遍适用的马铃薯再生模式体系。为此, 人们对不同的马铃薯品种的茎段、叶片和薯块的再生作了大量研究。但具有再生频率的品种有限, 而且培养条件尤其是外源激素的使用大相径庭[11]。Ottaviani 报道了最适培养基为 MS 附加 0.1 mg/L 2,4-D+1 mg/L BA 进行愈伤组织的诱导, 然后以 MS 附加 1 mg/L GA3+1 mg/L ZT 的培养基进行诱芽分化。Ynch 则认为 1.75 mg/L ZT+0.87 mg/L IAA 为最适激素组合, Yadav 比较了多种植物激素及其不同组合, 包括 2,4－D、BA、ZT、KT、GA3, 认为 9.0 μmol/L 2,4－D+2.28 μmol/L ZT 最适合愈伤诱导, 而 5.78 μmol/L GA3+2.28 μmol/L ZT 最适合芽分化。

马铃薯的再生包括愈伤组织诱导、芽原基分化、芽的伸长三个阶段, 其中芽原基的分化时间很短。细胞的分化状态在诱愈时即已确定, 愈伤诱导和芽原基分化可能同时进行或间隔时间很短。随着愈伤组织的增殖生长, 芽原基逐步形成, 随后原基伸长而形成不定芽。不定芽在此过程中, 高浓度细胞分裂素和较低浓度生长素的使用是必不可少的。本试验结果证明, BA+NAA、BA+2,4-D 组合诱导愈伤能力较强, 均达 90% 以上, 而诱芽分化则以 ZT+GA3 组合最为显著。这与前人的报道略有差异, 可能是因为基因型的差异所造成。因此, 马铃薯组织培养应针对基因型的不同, 在再生的不同阶段选择相应的生长调节剂。本研究筛选出了适合马铃薯品种“台湾红”组织培养的再生体系, 为下一步利用它作转基因植物疫苗研究奠定了基础。

参考文献:

[1] Dearman R J, Caddick H, Stone S, *et al*. Characterization of antibody responses induced in rodents by exposure to food proteins: influence of route of exposure. Toxicology[J]. 2001, 167(3): 217－231.

[2] Ohya K, Matsumura T, Ohashi K, *et al*. Expression of two subtypes of human ifn－alpha in transgenic potato plants[J]. Interferon Cytokine Res,

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

2001, 21: 595.
[3] Boucoiran C F, Kijine J W, Recourt K. Isolation and partial characterization of thermostable isoperoxidases from potato (Solanum tuberosum L.) tuber sprouts[J]. J Agric Food Chem, 2000, 48(3): 701—707.
[4] 李晋涛, 吴玉章, 费 蕾, 等. 鼠源轮状病毒抗原基因的表达载体构建及农杆菌转化研究[J]. 第三军医大学学报, 2002, 163(8): 892—894.
[5] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: a labroratory manual[M]. Second Ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 1—50.
[6] Yu J, Langridge W H. A plant-based multicomponent vaccine protects mice from enteric diseases[J]. Nat Biotechnol, 2001, 19(6): 548—552.
[7] Carrillo C, Wigdorovitz A, Trono K, *et al*. Induction of a virus-specific antibody response to foot and mouth disease virus using the structural protein VP1 expressed in transgenic potato plants[J]. Viral Immunol, 2001, 14(1): 9—57.
[8] Lauterslager T G, Florack D E, van der Wal T J, *et al*. oral immunisation of naive and primed animals with transgenic potato tubers expressing LT-B. Vaccine[J]. 2001, 19(17—19): 749—755.
[9] Arakawa T, Yu J, Langridge W H. Food plant-delivered cholera toxin B subunit for vaccination and immunotolerization[J]. Adv Exp Med Biol, 1999, 464(1): 71—78.
[10] Castanon S, Marin M S, Martin-Alonso J M, *et al*. Immunization with potato plants expressing VP60 protein protects against rabbit hemorrhagic disease virus[J]. J Virol, 1999, 3(5): 452—455.
[11] Anjum M A. Selection of hydroxyproline-resistant cell lines from Solanum tuberosum L. callus. II. Plant regeneration and frost tolerance of regenerated plants[J]. Acta Biotechnol, 1998, 18(3): 361—365.

（编辑 王 红）

个案与短篇

文章编号: 1000-5404(2002)10-1152-02

食管癌三切口术后功能性胃排空障碍的预防探讨

Prevention of FDGE in postoperative cervico-thoraco-abdominal triple incision for esophageal carcinoma

郝 明, 何泽友, 郑志诚, 郭利明, 邱胜春, 孙 梅 （第三军医大学成都军医学院第 47 医院胸外科, 新都 610500）

功能性胃排空障碍（Functional delayed gastric emptying FDGE）又称为胃无张力症、功能性胃潴留、胃瘫等, 是胃大部切除术较常见的近期并发症, 也是高位食管癌术后偶见的并发症。治疗采用非手术保守疗法, 时间长, 费用高, 因此三切口食管癌术中采取必要的预防措施有着重要意义。

1 临床资料

1.1 一般资料

我院自 1992 年 7 月至 2001 年 9 月进行经左颈、右胸前外、上腹正中三切口食管次全切, 食管-胃底颈部吻合术（以下称三切口术）102 例, 男 78 例, 女 24 例, 平均年龄 58 岁, 肿瘤部位为食管胸中段和上段, 平均病变长度 5.3 cm, 术后发生 FDGE4 例, 发生率 3.9%。1996 年 9 月前行三切口术 46 例（前期组）, 本组关闭肺门以上纵隔胸膜, 未行幽门成形术, 术后发生 FDGE 4 例, 发生率 8.7%。1996 年 9 月以后行三切口术 56 例（改良组）, 本组采用全纵隔胸膜关闭, 将胃完全缩缝于食管床内, 常规行幽门成形术, 术后未发生 FDGE。

1.2 临床特点及治疗结果

食管癌术后 FDGE 患者症状多发生术后 5～14 d, 平均 7 d。主要临床表现: 肠功能恢复后拔胃管, 进食的当日或次日出现呼吸困难, 反复呕吐胃内容物, 不含胆汁, 呕吐后症状可暂时缓解, 查体患侧呼吸音低, 腹部不膨隆, 无压痛, 肠鸣音正常, 无气过水声。前期组 4 例 FDGE 在术后 6～10 d 出现症状, 胸片示右胸胃高度扩张达外带, 并有巨大气液平面。稀钡剂造影检查可见钡剂通过幽门部受阻, 钡剂呈线状缓慢通过梗阻处进入十二指肠, 胃镜检查均可顺利通过幽门部。1 例 FDGE 术后 16 d 胃液量仍达 800 ml/d 左右, 行剖腹探查, 幽门部无扭曲、成角, 食管裂孔够大, 未压迫胃窦及幽门部, 仅行空肠造瘘, 继续胃肠减压 18 d, 共计胃肠减压 34 d, 胃液量由 800～1000 ml/d 降至 300 ml/d, 造影钡剂顺利过幽门, 拔胃管进半流后无不适。其余 3 例坚持胃肠减压 14～18 d 治愈。4 例患者均肌注胃复安, 管饲吗丁啉。

2 讨论

2.1 FDGE 发病率

食管癌术后胸胃功能性排空障碍近年来屡见报告, 有上升趋势, 文献[1, 2]报道发生率为 0.8%～5.4%, 且多发生于经右胸三切口术后和右胸顶吻合术后。我院三切口 102 例总发病率 3.96%, 前期组高达 8.7%（4/46）, 改良组为 0（0/56）, 说明采用的预防措施确切有效。

2.2 发病机制

2.2.1 外科手术可通过多种途径激活抑制性交感神经反射系统, 激活的交感神经纤维不仅可通过抑制胃肠神经丛的兴奋神经元抑制胃动力, 还可以通过交感神经末梢释放的儿茶酚胺直接与胃平滑肌细胞膜上的 α 和 β 受体结合抑制平滑肌细胞收缩, 这目前被认为是产生术后胃瘫的主要原因[3]。文献[4]报道即使非胃肠道手术也可以产生胃排空障碍。

2.2.2 食管癌手术双侧迷走神经干切断, 它所支配的脏器失去内脏神经平衡, 使胃肠的运动功能及胃肠壁张力减低, 幽门处于暂时性痉挛状态。

2.2.3 胃体形态改变, 全胃游离后失去原周围附着韧带, 置入

（下转 1155 页）

基金项目: 四川省教育厅立项课题（2000-B36）; 成都军医学院院长基金资助项目（200059）
作者简介: 郝 明（1964—）, 男, 四川省古蔺县人, 副主任医师, 主要从事食管癌外科治疗和先心病及瓣膜外科治疗方面的研究, 发表论文 8 篇。电话: （028）83016607（地）、（0821）572742（军）
收稿日期: 2001-11-03; 修回日期: 2002-06-20

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net