DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.10.015
第24卷第10期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 10
1162 2002年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2002

论著

文章编号:1000-5404(2002)10-1162-04

以小鼠精子/睾丸特异性抗原为基础的合成肽免疫避孕效应研究

何 畏[1],吴玉章[2],梁志清[1],李玉清[1],史常旭[1] (第三军医大学:[1]附属西南医院妇产科;[2]基础医学部全军免疫研究所,重庆 400038)

提 要:目的 研制以精子/睾丸特异性抗原为基础的多价嵌合肽避孕疫苗。方法 选择小鼠精子/睾丸特异性抗原Sp17、Cyritestin作为对象,采用分子设计的方法与外源性牛核糖核酸酶非选择性T细胞表位组合合成新型嵌合肽-35肽,并对其免疫效应进行研究。结果 该嵌合肽可刺激小鼠产生较高效价的血清和阴道粘膜特异性抗体,诱导脾脏淋巴细胞增殖,促进细胞因子IL-4的分泌;将其与佛氏佐剂混悬,免疫雌性BALB/c小鼠可明显降低受孕率和每胎产仔率,其抗血清可显著抑制体外精-卵结合和融合。结论 新型嵌合肽具有较明确的抗生育作用,提示以分子设计、蛋白质优化方案进行多价避孕疫苗的研究是可行的。

关键词:免疫避孕;疫苗;精子;合成肽
中图法分类号:R169.41;R345.16;R392 文献标识码:A

Immune-contraception of synthetic chimeric peptide

HE Wei, WU Yu-zhang, LIANG Zhi-qing, LI Yu-qing, SHI Chang-xu (Department of Obstetrics and Gynecology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To study a multivalent contraceptive vaccine based on sperm/testicular-specific antigens. **Methods** The immunodominant epitopes of sperm/testicular specific antigens from Sp17 and Cyritestin and promiscuous T-cell epitope of bovine RNase were used to construct a chimeric peptide (35-mer) with molecular modeling technique. A total of 110 female BALB/c mice were equally divided into 5 groups to receive the injections of 35-mer peptide, the other 2 constructed products, nonamer and 21-mer, saline or no injection respectively for their immune effects of contraception. **Results** Immunization BALB/c mice with this 35-mer peptide induced a high level IgG in serum and IgA in vagina, stimulated spleen lymphocytes proliferation and excreted the cytokine IL-4. After immunization, the rate of pregnancy of mice with the 35-mer peptide injection dropped obviously, so did the average number of birth mice. The antiserum can significantly inhibit the binding index and fertilization index *in vitro*. **Conclusion** The new chimeric peptide with 35 amino acid residues has a stable reduction in fertility, indicating the reasonability of using the protein molecule designing method to research the multivalent contraceptive vaccine.

Key words: immune-contraception; vaccine; sperm; synthetic peptide

生殖系统的许多成分,如精子、卵子、胎盘等均具有抗原性,当机体对相应抗原发生免疫反应时将破坏原来具有特定规律的生殖生理过程,从而达到免疫避孕的目的。选择精子/睾丸的特异性抗原作为靶抗原用于免疫性避孕的研究已有几十年的历史,但一直没有取得令人满意的效应,故其发展受到了制约。本研究利用合成肽技术选择精子表面/睾丸特异性抗原Sp17、Cyritestin作为靶抗原,结合外源性T细胞表位,构建含多个表位的嵌和肽,并对其免疫避孕效应做出评价。

1 材料与方法

1.1 合成肽的设计与合成

选择小鼠精子/睾丸特异性蛋白Sp17的线性B细胞表位序列(118~127)、Cyritestin中干扰受精的特异性氨基酸9肽序列以及牛核糖核酸酶非选择性T细胞表位序列(94~104),利用DNAStar软件、蛋白质二级结构预测方案等进行亲水性、保守性及其天然结构构成抗原表位的某些关键氨基酸等原则进行分析,以-GGG-为分子间连接序列,获得新抗原-35肽序列如下:

NH2-KNAETTKYACNGGGDDVKAGWEAGGGEPFDCEDKS-COOH

应用标准Fmoc方案在431A自动肽合成仪(美国PE公司)上合成。合成时分别在第9、21位氨基酸后取出1/3,得到9肽和21肽,剩余的继续合成最终得到35肽。产物经去除保护基团和树脂后获得粗品。粗品行高压液相分析(HPLC,美国PE公司)计算主峰面积,并确定是否需要纯化;经中压液相纯化后的多肽行质谱(美国PE公司)鉴定,计算其质荷比。

1.2 实验动物

雌雄BALB/c小鼠购于军事医学科学院实验动物中心,周龄8~10周,共110只,体重18~25 g。

1.3 免疫方法

分别取3种合成肽(40 μg)经0.1 mol/L磷酸盐缓冲液稀释后(1 mg/ml),与等量完全佛氏佐剂充分混悬;皮下注射小鼠之双侧后肢足垫部位,各40 μl;2周后开始追加免疫,每周1次,佐剂改为不完全佛氏佐剂,共4次。将雌性BALB/c小鼠随机分成5组,每组22只,分别为:A组为空白组,不予任何处理;B组为9肽组,C组为21肽组,D组为35肽组,E组为对照组,用生理盐水加佛氏佐剂免疫。

初次免疫结束后7 d开始,每周取小鼠眼眶动脉血200 μl左右,制备血清;同时每周用生理盐水200 μl冲洗小鼠阴道,反复3次,冲洗液过滤备用。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30000183)
作者简介:何 畏(1970-),女,四川省蓬溪县人,博士,主治医师,主要从事避孕疫苗、妇科肿瘤方面的研究。电话:(023)68754000-73145
通信作者:吴玉章,电话:(023)68752680
收稿日期:2002-05-10;修回日期:2002-08-20

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

全程免疫结束后 10 d 左右雌鼠(动情期)与雄鼠合笼喂养(1∶1)。待观察到雌鼠阴道口之粘液栓或 15 d(3 个周期)时取出雄鼠, 单独饲养, 并统计各个雌鼠的妊娠和产仔情况。

1.4　酶联免疫吸附实验

参照《常用免疫学实验技术》, 以合成肽作为抗原用碳酸盐缓冲液稀释后包被在酶联板上, 以相应的抗血清或阴道冲洗液为一抗, HRP-山羊抗小鼠 IgG 或 IgA 为二抗, 测定 A_{450}。每个样品设有 3 个重复孔, 同时设正常小鼠血清作为阴性对照; 当 A_{450} 为阴性对照的 3 倍以上时, 该样品为阳性, 并稀释以最大稀释倍数作为效价。

1.5　增殖实验(MTT)

全程免疫结束后 1 周, 取小鼠脾脏淋巴细胞, 用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液调整浓度为(2 ~ 5)× 10^6 /ml, 且活细胞 90%以上。标本分别加: PBS、合成肽和 ConA(2.5 mg/ml)。培养 3 d 后离心取上清备检, 另加 150 μl 培养液及 50 μl MTT, 继续培养 4 h 后离心弃上清, 加入 DMSO, 震荡后测定 640 nm 波长的吸光度值(A_{640})。增殖率=(实验组 A − 空白组 A)/(ConA 组 A − 空白组 A)× 100%

1.6　细胞因子检测

按试剂说明书(晶美公司), 测定上面实验中留取的上清液中细胞因子 IL-4 和 INF-γ 的含量。

1.7　组织病理学

取免疫前及免疫结束后 2 个月的小鼠, 经心脏灌注 4% 甲醛后取心脏、肝脏、肾脏、脾脏、卵巢、皮肤等组织; 冷冻切片后常规行 HE 染色, 光镜下观察。

1.8　体外精卵结合实验及干预实验

1.8.1　脱颈椎处死雄鼠, 无菌下取出附睾及部分输精管组织, 在 100 μl 含 1.5% 人血清白蛋白(HAS)的人输卵管液(HTF)中刺破附睾尾部及输精管壁, 静置 10 min; 吸出悬液加入少许含 1.5%HAS 的 HTF 中孵育 4 h; 加入钙离子诱导剂 A_{23187}, 诱导顶体反应后取 20 μl(10× 10^6 /ml)制成液滴, 表面覆以矿物油, 置于 37 ℃培养箱内。

1.8.2　性成熟雌性小鼠腹腔注射 10 IU 的人或兽用绝经促性腺激素, 56 h 后再注射 20 IU 的人或兽用绒毛膜促性腺激素, 14 h 后杀鼠, 刺破输卵管膨胀部、取卵子颗粒细胞复合物; 经透明质酸酶去除颗粒细胞后, 加入糜蛋白酶结合机械吹打去除透明带, 于 37 ℃培养箱内复苏 1 h。

1.8.3　将 10 ~ 12 个去透明带卵子加入一个精子液滴(2× 10^5 /ml)内, 37 ℃孵育 3 h 后洗去游离和疏松附着的精子、将卵子转移到玻片上, 光镜下观察计数每个卵细胞结合的精子平均数目(结合指数, BI); 加入 DAPI 染色 20 min 后洗涤, 于荧光显微镜下观察计数与每个卵细胞融合的精子平均数目(受精指数, FI)。

1.8.4　干预实验方法同上, 区别仅在于向取出的精子液滴中加入 2 μl 抗 35 肽抗血清, 并 37 ℃孵育 30 min 后, 再行精卵结合实验。

1.9　免疫荧光染色

1.9.1　取纯化 35 肽 2 mg 用 200 μl pH 9.5 的碳酸盐缓冲液溶解, 另取 0.2 mg 的 FITC 用 200 μl 相同缓冲液溶解, 两者混合于 37 ℃黑暗中孵育 2 h, 用 1 000 目孔径的滤膜上反复过滤以除去游离的 FITC 和 35 肽, 得到 FITC-35 肽。在 2 μl FITC-35 肽中加入 8 ~ 10 个去颗粒细胞卵子, 孵育 1 h, 洗涤后在荧光显微镜下观察。

1.9.2　按 FITC 抗体纯化及标记试剂盒(Pierce 公司)说明操作, 制备 FITC 标记的抗 35 肽抗体; 取等体积精子悬液(2× 10^5 /ml)与 10 μl 的荧光标记抗体孵育 30 min, 洗涤后在荧光显微镜下观察。

1.10　统计学处理

采用 χ^2 检验。

2　结果

2.1　多肽的合成与纯化

多肽粗品的纯度分别为: 9 肽 95.20%、21 肽 45.72%、35 肽 35.58%; 后两者经纯化后纯度均达 90%以上。质谱分析显示三者的荷质比均与理论分子量一致, 分别是: 9 肽为 1 060.7、535.1(分别带 1 和 2 个电荷), 21 肽为 1 006.2、737.9(分别带 2 和 4 个电荷), 35 肽为 1 202.7、902.1(分别带 3 和 4 个电荷)。

2.2　多肽的特异性抗体的动态变化

应用 ELISA 法检测血清、阴道冲洗液中的特异性抗体含量, 结果表明: 9 肽组免疫前后血清及阴道冲洗液中均未能检出特异性 IgG 或 IgA; 21 肽组初次免疫 4 周后体内出现特异性 IgG 抗体, 效价上升缓慢, 10 周时达高峰(1∶4 000); 阴道粘膜冲洗液中特异性 IgA 抗体滴度于 7 周后出现, 水平较低(1∶120), 持续 1 周左右; 35 肽组在免疫 4 周后体内出现特异性 IgG 抗体, 此后效价逐渐升高, 于 10 周时达高峰(1∶6 000), 持续 3 周左右开始下降; 小鼠阴道粘膜冲洗液中特异性 IgA 抗体于 5 周后出现, 14 周达高峰(1∶300), 持续 1 周左右。

分别以 3 种多肽为抗原包被酶联板, 以 3 种免疫血清为一抗, 行 ELISA 实验, 结果: 9 肽抗血清不能与任意多肽呈现阳性反应, 21 肽抗血清可与 21 及 35 肽呈现阳性反应, 35 肽抗血清与 3 种多肽均呈阳性反应。

2.3　小鼠脾脏淋巴细胞增殖率及分泌细胞因子的检测

用 MTT 法分析各抗原诱导小鼠脾脏淋巴细胞增殖的能力, 用双抗体夹心 ELISA 法检测小鼠脾脏淋巴细胞培养上清液中细胞因子的含量。结果表明: 21 和 35 肽免疫后小鼠脾脏淋巴细胞受相应多肽刺激后有明显的增殖反应, 分别为 23.6% 和 36.5%; 而 9 肽组无明显变化; 21 和 35 肽组小鼠脾脏淋巴细胞分泌的 IL-4 分别为 83、137 pg/ml; 分泌的 INF-γ 分别为 135、325 pg/ml, 而 9 肽组分泌的细胞因子与对照组相似, IL-4 为 11 pg/ml, INF-γ 为 8 pg/ml。

2.4　免疫荧光染色

质谱显示 FITC 与 FITC-35 肽两者的荷质比明显不同。FITC-35 肽与去颗粒细胞卵子共孵育后, 在透明带区域可见明显的荧光光环, 提示标记成功, 见图 1; FITC-抗 35 肽抗体与精子共孵育后, 在精子顶体及尾部中段区域可见黄绿色荧光。



图 1　FITC-P3 的免疫荧光染色　(× 1 000)

Fig 1　Immuno-fluorescence staining of FITC-P3　(× 1 000)

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

2.5 避孕效应观察

2.5.1 生育实验中，空白组、对照组和 9 肽组小鼠的受孕率、平均每胎产仔量接近；21 肽组和 35 肽组则明显下降，见表 1。

表 1 3 种合成肽对雌性 BALB/c 小鼠的免疫避孕效应

Tab 1 Immunocontraceptive effect of the 3 peptides in BALB/c female mice

Group	Pregnant rate(%)	Each litter sizes($\bar{x}\pm s$)
P2 group	83.3	6.3±2.0*
P3 group	61.1*	4.3±2.3*
Negative group	90.0	9.2±3.2
Blank group	95.0	9.8±2.8

*: $P<0.05$ *vs* the two contrast groups

2.5.2 在 30 次的体外干预实验中，将抗 P3 特异性抗血清加入精子微滴中，精子均迅速出现凝集现象，精子运动能力显著减弱，无法用自动精子分析仪分析精子的运动能力；预处理后的精子与卵子孵育后，对照组精-卵的平均 BI 和 FI 分别为 18.6 和 1.4，而经 21 肽抗血清处理后，精-卵的 BI 和 FI 显著减低，分别为 5.2 和 0.6($P\leqslant 0.05$)；经 35 肽抗血清处理后，精-卵的 BI 和 FI 降至 3.2 和 0.2($P\leqslant 0.01$)，见表 2；图 2 显示单精受精。

表 2 抗血清对精卵相互作用的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Effects of specific antiserum on the interactions between sperm and egg($\bar{x}\pm s$)

	BI	FI
Experimental group	1.72±0.60#	0.01±0.01#
Negative group	7.56±1.58	1.30±0.46

#: $P<0.01$ *vs* the contrast group



图 2 DAPI 染色显示的单精安精 (×200)

Fig 2 Fertilization with single sperm (×200)

2.6 病理学检查

为评价是否合成嵌和肽对生育的影响源于它引起的自身免疫病理反应，尤其是生殖系统的损伤，我们对实验以及对照小鼠体内重要脏器进行病理学分析。结果未发现明显差别，实验组小鼠卵巢内卵泡形态正常、无萎缩，肝脏、肾脏未见明显淋巴细胞浸润。

3 讨论

开发以精子抗原作为靶抗原的避孕疫苗一直受到国内外研究者的青睐。其原因之一是临床不孕症患者中约 2%～30%体内发现抗精制抗体存在[1]。由于可用于避孕疫苗的靶抗原必须具有高度的组织特异性，才能避免激发出其他非预期的不良反应，尤其是严重的自身免疫病理损害。故本研究选择了睾丸/精子特异性蛋白 Sp17 和 Cyritestin。Sp17 定位于精子顶体的赤道区域[2]，可特异性与卵子透明带(ZP)糖蛋白、葡聚糖、糖酐脂结合。应用小鼠 Sp17 的线性 B 细胞表位与 RNase 的非选择性 T 细胞表位嵌合形成的短肽可使 BALB/c 小鼠受孕率减低，出生仔鼠的数量减少[3]。Cyritestin 属睾丸/精子特异的 ADAM 家族成员，随着睾丸内精子的逐渐成熟，它从一个较大的前体(110×10^3)水解成 55×10^3 的成熟形式；其 N 端含有去整合素域，参与识别或与卵子膜上的整合素相互作用[4,5]。含有 Cyritestin 去整合素域中保守氨基酸序列的短肽可使小鼠的生育力明显受抑制[6]；丧失该基因的纯合子雄鼠无生育能力[7]。故这两种精子抗原均是参与受精过程的关键分子。

受精是一个复杂的、多步骤过程。已知有许多精子抗原共同参与了受精过程的多个环节，但是应用某一种已知的精子蛋白或多肽作为靶抗原并未产生理想的避孕效应。故将多个作用在受精过程不同环节的关键分子有序地联合在一起构建多价疫苗成为新的突破点。本研究正是以此为出发点，以蛋白质分子设计原理和方法设计并合成了含两种精子/睾丸特异性蛋白关键表位及外源性牛核糖核酸酶非选择性 T 表位的新型嵌合肽-35 肽。实验证实 35 肽主要定位于小鼠精子的头部顶体膜区域和尾部中段区域，并能与卵子透明带结合。鉴于精-卵质膜的最初粘附、结合即发生于顶体膜区域，精-卵的融合在多种种属中均起始于赤道区域[6~10]，提示新抗原可能参与了精-卵结合和融合。与佛氏佐剂混悬后的 35 肽免疫小鼠可激发出较高效价的特异性 IgG 和 IgA；血清的交叉反应实验中 35 肽抗血清可与 3 种多肽发生免疫反应，提示其中的 2 种 B 表位均发生了有效的免疫应答，是免疫优势表位。用双抗体夹心 ELISA 法检测小鼠脾脏淋巴细胞培养上清液中的细胞因子谱的分泌量变化，进而间接分析 T 细胞极化情况，了解机体免疫极化状态，结果 35 肽刺激脾脏淋巴细胞分泌细胞作用较强，且 IL-4 的分泌量大于 INF-γ，提示该合成肽具有促进 Th2 细胞极化的作用，有利于抗体生成。

体内外生育实验显示 35 肽免疫雌性 BALB/C 小鼠可明显降低其受孕率和每胎产仔数量；35 肽抗血清具有非常强大的抑制精子运动的作用，并显著降低精卵的 BI、FI，提示抗血清对精卵的结合与融合均有抑制作用。

良好的安全性是开发疫苗的前提。本研究主要应用来源于精子的抗原来免疫雌性动物，因而理论上较

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

安全;对免疫后动物的重要脏器行病理学检测也证实无明显自身免疫性损害出现,提示精子抗原在雌性体内较安全,但是否对雄性动物有不良影响,实验正在进一步观察中。

由此可知,应用蛋白质分子设计的理论和技术,可成功获得含两种精子/睾丸特异性抗原关键表位的嵌合肽,并显示出可明显抑制生育的作用,充分说明该法可行,值得进一步研究。

参考文献:

[1] Naz R K, Menge A C. Antisperm antibodies: origin, regulation and sperm reactivity in human infertility[J]. Fertil Stenril, 1994, 61(6): 1 001—1 013.

[2] Kong M, Richardson R T, Widgren E E, *et al*. Sequence and localizaton of the mouse sperm autoantigenic protein, Sp17[J]. Biol Reprod, 1995, 53(3): 579—590.

[3] Lea I A, von-Lieropm J, Widgren E E, *et al*. A chimeric sperm peptide induces antibodies and strain-specific reversible infertility in mice[J]. Biol Repeod, 1998, 59(3): 527—536.

[4] Perry A C, Gichuhi P M, Jones R, *et al*. Cloning and analysis of monkey fertilin reveals novel alpha subunit isoforms[J]. Biochem J, 1995, 307(Pt 3): 843—850.

[5] Linder B, Bammer S, Heinlein U A. Delayed translation and posttranslational processing of cyritestin, an integral transmembrane protein of the mouse acrosome[J]. Exp Cell Res, 1995, 221(1): 66—72.

[6] Yuan R, Primakoff P, Myles D G. A role for the disintegrin domain of Cyritestin, a sperm surface protein belonging to the ADAM family, in mouse sperm-egg plasma membrane adhesion and fusion[J]. J Cell Biol, 1997, 137(1): 105—112.

[7] Shamsading R, Adharm I M, Nayernia K, *et al*. Male mice deficient for germ-cell cyritestin are infertile[J]. Biol Reprod, 1999, 61(5): 1 445—1 451.

[8] Naz R K, Alexander N J, Isahakia M, *et al*. Monoclonal antibody to a human sperm membrane glycoprotein that inhibits fertilization[J]. Science, 1984, 225(4 659): 342—344.

[9] Yee A J, Silver L M. Contraceptive vaccine formulations with sperm proteins. Reprod Immunology. Bronson RA (ed)[M]. Blackwell Science, Inc. Boston, 1996 693—712.

[10] Yamagata K, Murayama K, Okabe M, *et al*. Acrosin accelerates the dispersal of sperm acrosomal proteins during acrosome reaction[J]. J Biol Chem, 1998, 273(17): 10 470—10 474.

(编辑　王　红)

文章编号: 1000-5404(2002)10-1165-01

个案与短篇

表现为腹部包块的空肠异位胰腺 1 例

A case report of heterotopic pancreas presenting as an abdominal mass

王细文　(第三军医大学附属新桥医院肝胆外科, 重庆 400037)

患者, 男, 35 岁, 主诉中腹部无痛性包块 3 个月, 于 2000 年 9 月 11 日入院。患者于 2000 年 6 月, 无意间发现中腹部一肿大包块, 类圆形, 直径约 5 cm, 位置较深, 易活动, 无压痛, 以腹部包块收入院。入院检查: 血压 110/75 mmHg, 意识清楚, 发育正常, 营养良好。心肺检查无异常, 腹平软, 无肠型及蠕动波, 全腹无压痛, 脐区可触及一肿大包块, 直径约 4.5 cm, 位置较深, 边缘清楚, 表面光滑, 无压痛, 包块触诊时不易活动。肠鸣音正常。经进一步检查后, 于 2000 年 9 月 20 日在持续硬膜外麻醉下行剖腹探查术。术中见距屈氏韧带约 4 cm 处空肠壁有一约 2 cm× 2 cm× 1.5 cm 灰白色隆起组织, 表面呈颗粒状突起, 边界清楚。于上、下距病变约 1.5 cm 处切除受累空肠, 行空肠-空肠端端吻合。术后病人顺利恢复出院。将包块及对应空肠系膜根部淋巴结送冰冻病理组织检查, 报告为空肠异位胰腺。

讨论

异位胰腺(Heterotopic pancreas)是一种较常见的先天性发育异常[1~3]。在异位胰腺中, 最常见的部位为胃及十二指肠及空肠[4,5]。临床上异位胰腺多于术中偶然发现。而表现为腹部包块则比较少见。与正常胰腺相比, 异位胰腺癌变的几率更高[6]。

关键词: 腹部包块; 异位胰腺
中图法分类号: R572　　文献标识码: B

参考文献:

[1] Anseline P, Grundfest S, Carey W, *et al*. Pancreatic heterotopia-a rare cause of bowel obstruction[J]. Surgery, 1981, 90(1): 110—113.

[2] 郭礼镒, 姚育修. 异位胰腺——附 202 例分析[J]. 临床医学, 1990, 2(1): 57—59.

[3] Fam S, O'Briain D S, Borger J A. Ectopic pancreas with acute inflammation[J]. J Pediatr Surg, 1982, 17(1): 86—87.

[4] Hamada Y, Yonekura Y, Tanano A, *et al*. Isolated heterotopic pancreas causing intussusception[J]. Eur J Pediatr Surg, 2000, 10(3): 197—200.

[5] Moen J, Mack E. Small-bowel obstruction caused by heterotopic pancreas in an adult[J]. Am Surg, 1989, 55(8): 503—504.

[6] Jeng K S, Yang K C, Kuo S H F. Malignant degeneration of heterotopic pancreas[J]. Gastrointest Endosc, 1991, 37(1): 197.

(编辑　冷怀明)

作者简介: 王细文(1964—), 男, 湖北省鄂州市人, 博士, 副主任医师, 副教授, 主要从事胆管癌方面的研究, 发表论文 10 余篇。电话: (023)68755000-74606

收稿日期: 2001-01-15; 修回日期: 2001-06-10

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