

全反式维甲酸对脑肿瘤干细胞增殖和分化的影响

倪永丰 牛朝诗 陈建民 梅加明 高歌 董永飞

【摘要】 目的 研究全反式维甲酸(ATRA)对脑肿瘤干细胞(BTSCs)增殖和分化的影响。方法 采用有限稀释法从人脑胶质母细胞瘤新鲜标本中分离、克隆筛选 BTSCs;在无血清条件下培养 BTSCs,根据培养基中的成分不同分为对照组、ATRA 组、ATRA/生长因子组、生长因子组,用 MTT 法检测 BTSCs 的增殖效应;在含血清条件下诱导分化 BTSCs,根据血清培养基中的成分不同分为 ATRA 组、对照组,于诱导分化第 10 天用免疫荧光技术检测 BTSCs 子代分化细胞 CD133 和胶质纤维酸性蛋白(GFAP)的表达率;将 BTSCs 子代分化细胞更换培养条件,观察其在无血清培养基中增殖逆转再次形成脑肿瘤干细胞球(BTS)的比例和形成时间。结果 在无血清条件下,ATRA 组 BTSCs 的增殖速度较对照组明显加快,但低于生长因子组和 ATRA/生长因子组,形成的 BTS 亦小于后两者;在含血清条件下,ATRA 组 BTSCs 子代分化细胞 CD133、GFAP 的表达率分别为 $2.29\% \pm 0.27\%$ 和 $75.60\% \pm 4.03\%$,对照组为 $7.05\% \pm 0.49\%$ 和 $12.51\% \pm 0.77\%$,前者的分化程度明显高于后者,差异有统计学意义($P < 0.05$),但前者仍然存在 CD133 的表达;BTSCs 子代分化细胞在回复无血清条件下能够再次增殖形成 BTS,ATRA 组再形成 BTS 的比例为 $4.84\% \pm 0.32\%$,形成时间为 (10.07 ± 1.03) d,对照组分别为 $17.71\% \pm 0.78\%$ 和 (4.08 ± 0.35) d,前者再形成 BTS 的比例较后者更低、时间更长,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 ATRA 能促进 BTSCs 增殖并诱导 BTSCs 子代细胞走向分化,但分化不彻底,细胞不能达到终末分化,可再次形成 BTS。

【关键词】 全反式维甲酸; 脑肿瘤干细胞; 细胞增殖; 细胞分化

【中图分类号】 R739.4 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-8925(2009)03-0240-06

Effect of all-trans retinoic acid on proliferation and differentiation of brain tumor stem cells *in vitro*

NI Yong-feng, NIU Chao-shi, CHEN Jian-min, MEI Jia-ming, GAO Ge, DONG Yong-fei.

Department of Neurosurgery, Anhui Provincial Hospital Affiliated to Anhui Medical University, Anhui Provincial Institute of Stereotactic Neurosurgery, Hefei 230001, China

Corresponding author: NIU Chao-shi, Email: niuchaoshi@163.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the effect of all-trans retinoic acid (ATRA) on the proliferation and differentiation of brain tumor stem cells (BTSCs) *in vitro*. **Methods** Freshly resected glioblastoma multiforme tissues were obtained from 3 surgical patients, and BTSCs were isolated by limited dilution and clonogenic assay. The BTSCs obtained were cultured in serum-free medium and divided into control group, ATRA group, growth factor group, and ATRA/growth factor group with corresponding treatments. The proliferation of the treated BTSCs was evaluated using MTT assay. The BTSCs were induced in serum-containing medium and treated with ATRA or diluted solvent, and the expression of CD133 and glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the cells were detected by immunofluorescence on day 10 of induction. The differentiated BTSCs were cultured in serum-free medium, and the percentage of and time needed for cell sphere formation were observed. **Results** The proliferation of BTSCs in ATRA group was faster than that in the control group and slower than that in growth factor group and ATRA/growth factor group, and the size of brain tumor sphere (BTS) in ATRA group was smaller than that in the latter two groups. The percentage of CD133- and GFAP-positive

differentiated BTSCs were (2.29±0.27)% and (75.60±4.03)% in ATRA group, and (7.05±0.49)% and (12.51±0.77)% in the control group, respectively. The differentiation rate of BTSCs was significantly higher in ATRA group than in the control group ($P<0.05$), and some of the differentiated BTSCs expressed CD133. The differentiated BTSCs could form BTS in serum-free medium, and in ATRA group, the percentage of BTS formation was significantly lower and time need for BTS formation was significantly longer than those in the control group [(4.84±0.32)% vs (17.71±0.78)%, $P<0.05$; 10.07±1.03 vs 4.08±0.35 days, $P<0.05$]. **Conclusion** ATRA can promote the proliferation and induce the differentiation of BTSCs, but the differentiated BTSCs can not achieve terminal differentiation and tend to form BTS again.

【Key words】 All-trans retinoic acid; Brain tumor stem cells; Proliferation; Differentiation

全反式维甲酸(all-trans retinoic acid, ATRA)是迄今研究最深入、作用最强的诱导分化剂之一,能诱导包括胶质瘤细胞在内的多种肿瘤细胞分化及凋亡^[1]。肿瘤干细胞概念指出肿瘤干细胞才是肿瘤发生、发展和治疗后复发的根源,因此要根治脑肿瘤必须彻底消灭脑肿瘤干细胞 (brain tumor stem cells, BTSCs)。本实验以 BTSCs 作为治疗靶标,研究 ATRA 对其增殖和分化的影响,从一种全新的角度评价 ATRA 的抗肿瘤活性。

材料与方法

一、主要试剂与设备

1. 主要试剂:DMEM/F12、B27 购自美国 Gibco 公司;表皮生长因子(EGF)、碱性成纤维生长因子(bFGF)购自美国 PeproTech 公司;ATRA、四甲基偶氮唑蓝(MTT)、胎牛血清(FBS)、胰酶、Cy3 标记的绵羊抗兔 IgG、二脒基苯基吡啶(DAPI)均购自美国 Sigma 公司;兔抗人 CD133 抗体购自美国 Abcam 公司;兔抗胶质纤维酸性蛋白(glia fibrillary acidic protein, GFAP)抗体、FITC 标记的羊抗兔 IgG 购自武汉博士德公司。

2. 主要设备:德国 Heraeus and Lishen 公司 BB16 型 CO₂ 恒温恒湿培养箱及 HF-safe-1200 型超净工作台,日本 Olympus 公司 CKX41 型倒置相差显微镜及 BX51 型荧光显微镜和成像系统,奥地利 Anthos 公司 2010 型酶标仪。

二、实验方法

1. BTSCs 的分离培养及纯化:3 例肿瘤标本取自 2008 年 2 月至 5 月在安徽医科大学附属省立医院神经外科手术的患者并经病理诊断为胶质母细胞瘤。在新鲜肿瘤组织边缘、无囊变、坏死、钙化及电凝的部位无菌取材。参照文献[2]的方法,于 2 h 内完成原代培养,接种于简化无血清培养基(为 DMEM/F12,内含 2% B27、EGF 20 μg/L、bFGF 20 μg/L),在 37℃、5%CO₂ 饱和湿度培养箱中培养。每

3~4 天换液 1 次,每 7 天按 1:2 传代,倒置相差显微镜下观察。细胞连续传 3 代,待培养液干净、细胞球形形态较为规则后用 0.25%胰酶+机械法分散为单细胞,调整密度以 1 个活细胞/孔接种于 96 孔板,每孔加简化无血清培养基 100 μL,倒置显微镜下观察标记仅含 1 个细胞的孔,并补加 100 μL 简化无血清培养基继续培养,动态观察并选择记录单细胞克隆的形成。细胞培养 1 周左右,倒置显微镜下观察,收集克隆增殖的细胞,移至培养瓶中继续培养扩增。用经过克隆筛选后纯化的 BTSCs 进行以下实验。

2. ATRA 影响 BTSCs 的增殖:收集 BTSCs,按后述分组,加入相应培养基中,机械吹打成单细胞悬液,以 1000 个活细胞/孔的密度接种到 96 孔板,每孔 100 μL。根据培养基中的成分不同分为:(1) ATRA 组:含有 ATRA 1 μmol/L;(2)对照组:基础培养基(含 2% B27 的 DMEM/F12)中含有与 ATRA 组等量的无水乙醇(终浓度<0.1%);(3)ATRA/生长因子组:含有 ATRA 1 μmol/L,EGF 和 bFGF 各 20 μg/L;(4)生长因子组:含有 EGF 和 bFGF 各 20 μg/L。置于 37℃、5%CO₂ 饱和湿度培养箱中培养,隔日每孔加入相应培养基 20 μL,每天倒置显微镜下观察细胞增殖情况。于培养后第 1~9 天连续进行 MTT 检测,每孔加 MTT 溶液(5 g/L) 20 μL,培养 4 h 后,终止培养,离心 1000 r/min×10 min,小心吸弃孔内培养基上清液,每孔加入 150 μL 二甲基亚砷(DMSO),振荡 10 min 以溶解结晶,用酶标仪于 570 nm 波长下测定各孔吸光度值。每组细胞设 6 个复孔,实验重复 3 次,计算其平均值。

3. ATRA 诱导 BTSCs 的分化:收集 BTSCs,用含血清培养基(含 10%FBS 的 DMEM/F12)调整细胞密度为 2×10⁵ 个活细胞/mL,接种于放置有预先包被左旋多聚赖氨酸的盖玻片的 6 孔板内,每孔 2 mL。实验分为 2 组:(1)ATRA 组:含血清培养基中加入终浓度为 1 μmol/L 的 ATRA;(2)对照组:含血清培养基中含有与 ATRA 组等量的无水乙醇(终浓度<

0.1%)。置于 37℃、5%CO₂ 饱和湿度培养箱中培养, 每 3 天更换相应培养基, 动态观察 BTSCs 的生长和分化情况。

4. BTSCs 子代分化细胞的免疫荧光检测: 于诱导分化第 10 天取出盖玻片, 用 40 g/L 多聚甲醛固定 30 min, 正常山羊血清封闭 20 min(对 GFAP 染色在血清封闭之前用 0.3%Triton X-100 处理 20 min), 抗 CD133 或抗 GFAP 一抗 4℃孵育过夜, 分别应用 Cy3 和 FITC 标记二抗 37℃孵育 60 min, DAPI 复染核 10 min, 缓冲甘油封片, 每步骤间均用 0.01 mol/L PBS 冲洗 3 次, 每次 5 min。荧光显微镜下随机在每张盖玻片上取 20 个视野, 计算贴壁细胞中 CD133 和 GFAP 阳性细胞的比例。公式为: CD133 (或 GFAP) 阳性细胞百分率 = CD133(或 GFAP) 阳性细胞 / DAPI 阳性细胞 × 100%。

5. BTSCs 子代分化细胞的增殖逆转: 用 0.25% 胰酶消化收集上述 2 组诱导分化 10 d 后的贴壁细胞, 加入简化无血清培养基, 用有限稀释法调整细胞密度, 以 5 个活细胞 / 孔的密度接种到 96 孔板, 每孔加简化无血清培养基 100 μL。置于 37℃、5%CO₂ 饱和湿度培养箱中培养, 以后隔日每孔添加 20 μL 简化无血清培养基, 观察 BTSCs 子代分化细胞的脑肿瘤干细胞球(brain tumor sphere, BTS)的再生情况。每天定时观察其成球情况与生长速度的变化, 以镜下出现较规则球状 BTS(细胞数达 10 个以上)为阳性逆转结果, 并记录时间和 BTS 的数量, 计算克隆形成率和形成时间。取再次生成的 BTS 滴于左旋多聚赖氨酸包被的玻璃片上静置待干, 按前述方法进行 CD133 免疫荧光染色。

三、统计学方法

实验数据以均数±标准差表示, 使用 SPSS11.0 统计软件进行数据分析, 组间比较采用两独立样本的 *t* 检验, *P* ≤ 0.05 为差异具有统计学意义。

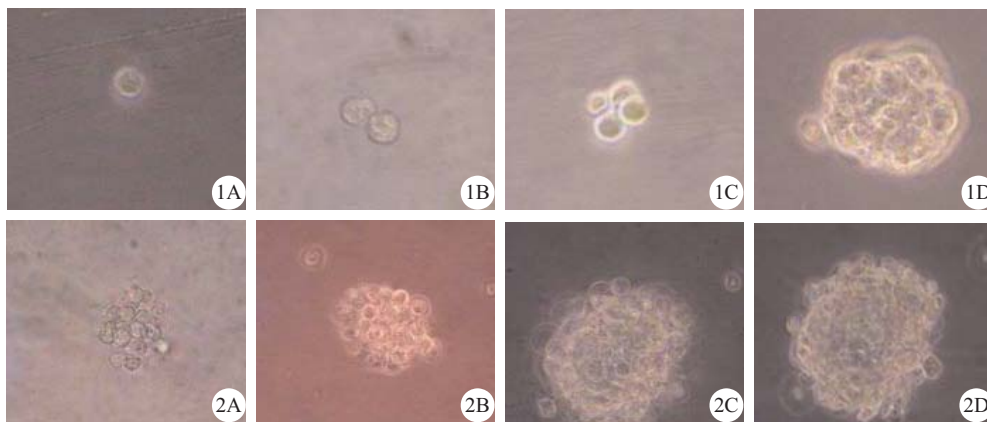
结 果

一、单克隆 BTS 形成过程

通过有限稀释单克隆形成实验, 在倒置显微镜下可观察到单细胞克隆增殖形成 BTS 的全过程。接种后 1~2 d 即可见单细胞分裂形成 2 个至数个细胞组成的细胞集落, 集落内细胞呈圆形, 大小相似; 2~3 d 后可见构成集落的细胞更多; 4~5 d 后形成数十个至上百个细胞构成的单克隆性细胞球, 细胞球呈圆球形或椭圆形, 结构均一, 透光度好。此时可称为 BTS, 为来源于同一细胞的大量亚细胞系克隆球, 所以非 BTSCs 比例少, 纯度高。(图 1)

二、ATRA 促进 BTSCs 的增殖

生长因子组细胞培养 1~2 d 即开始增殖, 形成约 10~20 个细胞组成的细胞球, 此后细胞悬浮快速生长, 细胞球体积逐渐增大, 7 d 后由数十至数百个细胞聚集形成球状结构, 边界清楚, 折光性强; ATRA/ 生长因子组在 2~3 d 后出现细胞增殖, 细胞生长情况基本同生长因子组, 但形成的克隆细胞数量稍低于生长因子组, 细胞球体积略小于生长因子组; ATRA 组亦于 2~3 d 后出现细胞增殖, 细胞球悬浮生长, 但在整个培养过程中仅见到数十个细胞组成的细胞团; 对照组细胞增殖相对缓慢, 形成的克隆较小, 由十余个细胞构成(图 2)。各组细胞均未见明显的贴壁分化现象。以测得的各组吸光度均值为纵



1A: 接种后 1 h, 1B: 接种后 12 h, 1C: 接种后 24 h, 1D: 接种后 3 d; 2A: 对照组, 2B: ATRA 组, 2C: ATRA/ 生长因子组, 2D: 生长因子组

图 1 倒置相差显微镜下观察有限稀释法单细胞克隆成球过程(×400) 图 2 倒置相差显微镜下观察不同组别 BTSCs 的形态(×400)

Fig.1 BTS resulting from the proliferation of a single BTSC (Inverted phase-contrast microscope, ×400) Fig.2 Morphology of BTSCs in different groups (Inverted phase-contrast microscope, ×400)

轴,以生长天数为横轴,绘制细胞生长曲线(图 3),比较 4 组细胞的增殖速度,可见培养第 1~3 天曲线平坦,细胞增殖不明显,第 5~7 天曲线陡直,为增殖高峰期;对照组细胞增殖最为缓慢,ATRA 组的增殖速度明显加快,以生长因子组最快,而 ATRA/生长因子组的增殖速度稍低于生长因子组。

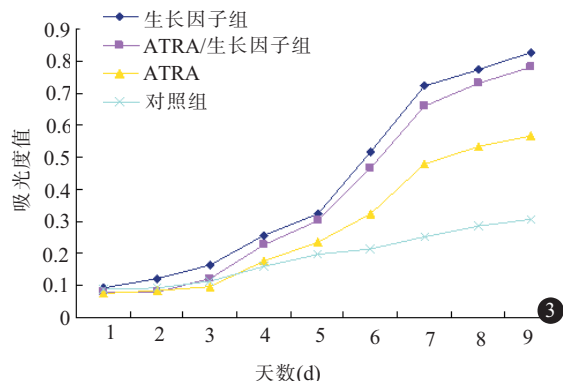


图 3 不同组别 BTSCs 的生长曲线

Fig.3 Growth curves of BTSCs in different groups

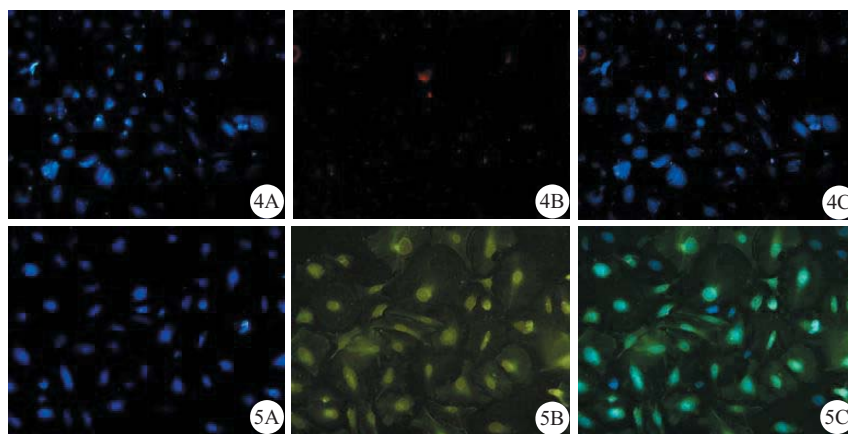
三、ATRA 促进 BTSCs 的分化

普通光镜下见到,6 h 后 2 组 BTSCs 均贴壁并向周围伸出细小突起,之后突起逐渐延长,相邻细胞

间突起相互连接成网状;细胞体积逐渐增大,且大小不一,形态各异,呈多边形、梭形、圆形等,镜下透亮,折光性强;DAPI 染色荧光显微镜下可见细胞核大小形态差异较大,异型性明显。贴壁细胞数量无明显增加,表明 BTSCs 在含血清条件下增殖受到抑制,表现以分化为主。诱导分化 10 d 后 CD133 和 GFAP 免疫荧光检测表达率显示,2 组细胞 CD133 表达均未消失,说明 BTSCs 未能达到终末分化状态,具有分化不彻底的特性;但与对照组比较,ATRA 组 CD133 的表达率降低,GFAP 的表达率明显升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。(图 4,5,表 1)

四、ATRA 降低 BTSCs 子代分化细胞的增殖逆转能力

BTSCs 子代分化细胞在转换到简化无血清培养基中后,24 h 内大部分细胞发生贴壁并伸出突起,少数细胞悬浮在培养基中。2 d 后对照组悬浮细胞中部分细胞增殖形成细胞团,培养 3~6 d 细胞聚集成团的现象增多,陆续出现大量悬浮生长的细胞团,最初由十余个细胞构成,随着时间的延长,细胞团逐渐增大呈球体状,每个克隆球约有 100~200 个细



4A,5A:细胞核被 DAPI 染成蓝色;4B,5B:红色荧光为 CD133 染色阳性,绿色荧光为 GFAP 染色阳性;4C,5C:分别为 4A 和 4B 以及 5A 和 5B 融合后的图像

图 4 BTSCs 子代分化细胞 CD133 免疫荧光染色阳性 ($\times 200$) 图 5 BTSCs 子代分化细胞 GFAP 免疫荧光染色阳性 ($\times 200$)

Fig.4 Differentiated BTSCs positive for CD133 ($\times 200$) Fig.5 Differentiated BTSCs positive for GFAP ($\times 200$)

表 1 BTSCs 子代分化细胞的相关标志物表达率、克隆形成率及形成时间($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 Positive expression of the related markers and percentage and time of BTS formation in the differentiated BTSCs (Mean \pm SD)

组别	例数	CD133(%)	GFAP(%)	克隆形成率(%)	克隆形成时间(d)
对照组	3	7.05 \pm 0.49	12.51 \pm 0.77	17.71 \pm 0.78	4.08 \pm 0.35
ATRA组	3	2.29 \pm 0.27	75.60 \pm 4.03	4.84 \pm 0.32	10.07 \pm 1.03
t值		14.737	26.634	26.440	9.537
P值		0.000	0.000	0.000	0.001

细胞,细胞大小相对均匀。ATRA 组于第 9 天开始出现悬浮细胞团,此后 3~4 d 渐增多,但形成克隆球的直径相对较小,生长速度较慢。数据显示,ATRA 组 BTSCs 子代分化细胞的克隆形成率较对照组低,克隆形成时间较对照组长,差异均有统计学意义($P < 0.05$)(表 1)。将逆转增殖所得的 BTS 行 CD133 免疫染色呈强阳性表达(图 6),显示已重新获得干细胞表型。

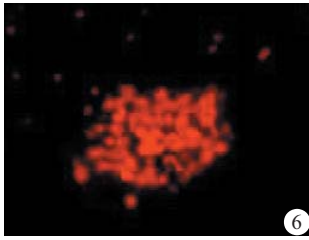


图 6 BTSCs 子代分化细胞逆转增殖形成的 BTS 呈 CD133 免疫荧光染色阳性($\times 400$)

Fig.6 BTS generated from differentiated BTSCs with CD133 positivity($\times 400$)

讨 论

2003 年 Singh 等^[3]首先发现 BTSCs 以来,许多学者相继证实,在脑肿瘤组织及其细胞系中存在 BTSCs,其具有自我更新、无限增殖、多谱系亲本性分化以及强大的致瘤能力^[3-6]。2004 年 Galli 等^[4]、Singh 等^[5]提出了新的肿瘤生成模式,认为 BTSCs 是肿瘤形成的起始细胞,这些细胞遵循与神经干细胞一样的对称和非对称分裂规律进行增殖与分化,即通过对称分裂方式进行自我更新与增殖,通过不对称分裂产生相对成熟的子代细胞,后者可以分化为更成熟的肿瘤细胞。

诱导胶质瘤细胞向良性方向分化是近年来胶质瘤治疗的研究热点之一,应用诱导分化剂能提高肿瘤细胞的分化程度,抑制增殖。ATRA 作为经典的诱导分化剂,在血液系统肿瘤、淋巴瘤的临床治疗中取得了很好疗效。体外研究发现 ATRA 能诱导多种胶质瘤细胞的分化和凋亡^[7]。许多研究已经证实,在含生长因子的无血清培养条件下,BTSCs 可以不断自我更新和增殖,维持干细胞固有特征;而在含血清条件下分化为与亲本肿瘤形态和分子表型相似的肿瘤细胞^[2-6]。本实验我们以 BTSCs 作为治疗靶标,分别在无血清、有血清条件下探讨 ATRA 对 BTSCs 增殖、分化的影响。

要对 BTSCs 开展研究,首先必须获得纯度较高的 BTSCs。目前国内外研究经常采用免疫磁珠分选

法获取 CD133 阳性的 BTSCs,但其成本昂贵且原代分离效率仅 46.9%~79.8%^[9]。而车晓明等^[2]采用有限稀释法,通过克隆分选达到相似的目的,收获具有克隆增殖能力的细胞在 82%左右,我们借鉴该方法以获得高纯度的 BTSCs。

众所周知,EGF 和 bFGF 作为强有力的细胞分裂促进因子,是干细胞培养基必不可少的关键成分,能维持干细胞处于不断增殖状态。我们通过 MTT 实验对比发现,ATRA 能单独促进 BTSCs 的增殖,增殖效应较 EGF+bFGF 弱,ATRA 与 EGF+bFGF 间无明显的协同或拮抗效应。既往的研究显示 ATRA 能抑制含血清培养条件下普通胶质瘤细胞的增殖,促其凋亡。我们观察到,对照组 BTSCs 在无血清无生长因子条件下培养,细胞呈悬浮球样生长;与对照组相比,ATRA 组细胞同样未发生贴壁现象,且形成的克隆球更大,增殖速度更快,表明 ATRA 对悬浮状态下生长的 BTSCs 不仅未表现诱导分化作用,反而促进 BTSCs 的增殖。究其原因,在无血清培养条件下,BTSCs 通过对称分裂可以不断自我更新和增殖,维持在干细胞状态;在含血清条件下,由于血清中某些物质的影响,BTSCs 通过不对称分裂维系自身的存在,同时产生大量相对成熟的子代细胞,后者最终分化为普通肿瘤细胞,所以整个细胞群中 BTSCs 仅占极少的比例。ATRA 产生的诱导分化作用的靶点在已经走向分化的细胞上,对干细胞状态的 BTSCs 则起着促增殖作用。ATRA 对处于不同分化阶段的细胞产生截然相反的作用,其作用机制有待阐明。ATRA 诱导分化脑胶质瘤的临床试验结果表明,ATRA 单独应用于临床时诱导分化效应较弱,疗效并不显著^[8,9]。我们推测,单独应用 ATRA 诱导大部分普通胶质瘤细胞分化和凋亡,但其对占少数不经历分化过程的 BTSCs 具有重要的促增殖作用,也就是说真正导致肿瘤发生、发展和复发的“种子”不仅未减少反而增多了,这可能正是疗效欠佳的重要原因。

Singh 等^[9]研究表明,只有 CD133 阳性细胞具有自我更新、无限增殖、多谱系亲本性分化的干细胞特征,目前 CD133 作为分选和鉴定 BTSCs 的标志物已获得公认;而 GFAP 是 BTSCs 分化后子代细胞的主要标志物之一,胶质瘤细胞向成熟状态分化后 GFAP 的表达也升高,所以我们选择 CD133 和 GFAP 从分子生物学水平检测 ATRA 对 BTSCs 的诱导分化作用。BTSCs 在含血清条件下走向分化,而加入 ATRA 诱导后的子代分化细胞表达更多的 GFAP 和更少的 CD133,同时增殖逆转能力降低,可

以认为, ATRA 诱导 BTSCs 向更成熟方向分化, 并阻断了分化后细胞去分化产生 BTSCs 的通路, 一定程度上降低了细胞去分化的能力。因此, ATRA 对 BTSCs 产生双重作用: (1) 通过促进增殖和自我更新扩增 BTSCs 部分; (2) 诱导 BTSCs 子代分化细胞走向更为成熟的分化状态。

本实验发现, BTSCs 在含血清培养基中经 ATRA 诱导分化后, CD133 的表达并未消失, 将分化形成的 BTSCs 子代细胞再次接种回添加生长因子的无血清培养基, 仍然能够去分化并增殖形成 BTSCs。而 NSCs 分化后, 虽然在分化细胞中存在具有 NSCs 表型的细胞, 但不具备再次形成神经球的能力^[9]。这些异常现象提示 ATRA 诱导分化治疗尚不足以使 BTSCs 发生终末分化并失去增殖能力, 在一定条件下还能够回复其干细胞特性, 这可能是治疗不彻底的重要原因。随着对 BTSCs 研究的深入, 进一步揭示 BTSCs 增殖和分化的分子机制, 开发针对 BTSCs 的特异诱导分化剂是该领域获得突破的关键。

参 考 文 献

[1] Haque A, Banik NL, Ray SK. Emerging role of combination of all-trans retinoic acid and interferon-gamma as chemotherapeutic in the management of human glioblastoma [J]. Neurochem Res, 2007, 32(12): 2203-2209.

- [2] 车晓明, 崔大明, 汪洋, 等. 胶质母细胞瘤肿瘤干细胞体外分离培养鉴定及生物学特性的研究[J]. 中国临床神经科学, 2007, 15(6): 561-569.
- [3] Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors[J]. Cancer Res, 2003, 63(18): 5821-5828.
- [4] Galli R, Binda E, Orfanelli U, et al. Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma [J]. Cancer Res, 2004, 64(19): 7011-7021.
- [5] Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, et al. Identification of human brain tumour initiating cells[J]. Nature, 2004, 432(7015): 396-401.
- [6] Kondo T, Setoguchi T, Taga T. Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(3): 781-786.
- [7] Zang C, Wachter M, Liu H, et al. Ligands for PPARgamma and RAR cause induction of growth inhibition and apoptosis in human glioblastomas[J]. J Neurooncol, 2003, 65(2): 107-118.
- [8] Kaba SE, Kyritsis AP, Conrad C, et al. The treatment of recurrent cerebral gliomas with all-trans-retinoic acid (tretinoin) [J]. J Neurooncol, 1997, 34(2): 145-151.
- [9] Phuphanich S, Scott C, Fischbach AJ, et al. All-trans-retinoic acid: a phase II Radiation Therapy Oncology Group study (RTOG 91-13) in patients with recurrent malignant astrocytoma[J]. J Neurooncol, 1997, 34(2): 193-200.
- [10] 牛锋, 邓艳春. 肿瘤干细胞与脑胶质瘤干细胞的研究现状[J]. 中华神经医学杂志, 2007, 6(11): 1171-1177.

(收稿日期: 2008-10-24)

(本文编辑: 卢丽玉)

· 消息 ·

第二十一届全国立体定向技术推广学习班通知

安徽省立医院、安徽省立体定向神经外科研究所为全国立体定向神经外科培训中心, 已培养大批立体定向神经外科专业技术医师, 现定于 2009 年 4 月 21 日至 4 月 24 日在广西南宁市举办第二十一届全国立体定向技术推广学习班, 授予国家级继续教育学分。现通知如下。

1. 学习内容: 系统学习立体定向和功能性神经外科学; 立体定向技术新进展及临床应用; 神经导航临床应用; 各种定向仪的应用; X 线、CT 及 MRI 定位计算方法; 微电极记录技术; 运动障碍性疾病、疼痛、精神病外科治疗; 立体定向内窥镜; 立体定向血肿排空术; 立体定向放射外科; 深部脑刺激(DBS); 立体定向手术戒毒现状和未来; 手术录像示教等。

2. 学习费用: 学习费 1000 元, 教材费 300 元。食宿统一安排, 费用自理。

3. 时间安排: 2009 年 4 月 21 日报到, 4 月 22 日~24 日理论学习和手术录像示教。2009 年 3 月 31 日前将回执通过 Email 发回。回执内容包括姓名、性别、职称、单位及地址、电话。

4. 举办地点: 广西南宁凤凰宾馆(广西南宁市朝阳路 63 号, 邮编 530011, 总台电话: 0771-2119842, 2119839)。

5. 联系人: 牛朝诗主任, 安徽省合肥市庐江路 17 号, 安徽省立医院神经外科, 邮编 230001 合肥电话: 0551-2282374、2283483(0), 手机: 13855186208; Email: gnsjwk@163.com。

安徽省立医院

安徽省立体定向神经外科研究所