

^{32}P 胶体体外诱导颅咽管瘤细胞凋亡*

常洪波^① 高 铭^② 王淑为^① 赵思源^① 卢旺盛^① 于 新^① 田增民^① 张剑宁^①

摘要 目的:探讨 ^{32}P 胶体对颅咽管瘤(craniopharyngioma, CP)体外培养细胞诱导凋亡作用及剂量效应和时间效应关系。**方法:**通过原代细胞培养获得CP有限传代细胞系,经不同浓度 ^{32}P 胶体处理不同时间后,应用MTT比色法绘制细胞存活率曲线。流式细胞仪定量检测细胞凋亡率。Hoechst 33342荧光染色检测凋亡细胞形态。TUNEL荧光染色检测DNA特征改变。透射电子显微镜(TEM)检测细胞超微结构。**结果:**Hoechst 33342荧光染色、TUNEL荧光染色、TEM均证实 ^{32}P 胶体确能引起CP细胞产生凋亡。随着 ^{32}P 胶体处理浓度(0~14.80 MBq/mL)及时间(1~14 d)的增加,CP细胞存活率减少、凋亡率增高。**结论:** ^{32}P 胶体能明显抑制CP体外培养细胞生长并诱导凋亡,剂量越大及处理时间越长其杀伤作用越强。

关键词 颅咽管瘤 细胞培养 凋亡 磷-32

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.20140197

^{32}P colloid induced apoptosis of craniopharyngioma cells in vitro

Hongbo CHANG¹, Ming GAO², Shuwei WANG¹, Siyuan ZHAO¹, Wangsheng LU¹, Xin YU¹, Zengmin TIAN¹, Jianning ZHANG¹

Correspondence to: Jianning ZHANG; E-mail: jnzhang2005@163.com

¹Institute of Neurosurgery, Navy General Hospital, Navy Clinical Medical School of the Second Military Medical University, Beijing 100048, China; ²Bayi Children's Hospital Affiliated to General Hospital of Beijing Military Command, Beijing 100700, China

Abstract Objective: This study aimed to investigate the possible mechanism of ^{32}P colloid induced apoptosis of craniopharyngioma (CP) cells in vitro and the relationship between dose effect and time effect. **Methods:** This study established a primary cell culture of CP limited subculture cell line. Methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay was performed to plot the cell survival curve after the CP cells were treated with ^{32}P colloid at different concentrations and time. Apoptotic rate was detected by flow cytometry (FCM). Apoptosis related DNA was investigated by TUNEL fluorescent staining. The morphological characteristics of apoptotic cells were determined by Hoechst33342 fluorescence staining. The ultrastructure of apoptotic cells was investigated by transmission electron microscopy (TEM). **Results:** Hoechst33342 fluorescence staining, TUNEL fluorescence staining, and TEM revealed that ^{32}P colloid induced the apoptosis of CP cells. ^{32}P colloid reduced the survival rate and increased the apoptotic rate of CP cells as concentration (0 MBq/mL to 14.80 MBq/mL) and time (1 d to 14 d) were increased. **Conclusion:** ^{32}P colloid could effectively inhibit the growth of CP cells and induce apoptosis in vitro. High concentrations and prolonged time could induce a remarkable effect.

Keywords: craniopharyngioma, cell culture, apoptosis, phosphorus-32

颅咽管瘤(craniopharyngioma, CP)经初次开颅手术切除后复发率为9%~51%,平均时间26~96个月,再次开颅手术患者往往难以耐受^[1-2]。本科自1985年应用立体定向 ^{32}P 胶体内放疗治疗囊性CP,成功治疗患者1200余例^[3]。 ^{32}P 胶体是否引起CP细胞发生快速凋亡和(或)迟发性凋亡,或引起CP组织营养血管内皮细胞或周围成纤维细胞的凋亡、坏死,使CP细胞失营养而发挥治疗作用尚不得知。 ^{32}P 胶体是否在低剂量辐射条件下利用凋亡途径杀伤肿瘤细胞,而高剂量辐射直接引起细胞坏死,既往鲜见相关报道。验证 ^{32}P 胶体导致的凋亡机制、剂量效应和时间效应关系对治疗剂量选择和治疗方案优化等有重要意义。因此,本研究建立了CP的有限传代细胞株,

用 ^{32}P 胶体处理CP体外培养细胞,观察其诱导细胞凋亡变化,探讨其可能的机理,建立剂量效应和时间效应关系,现报道如下。

1 材料与方

1.1 材料

^{32}P 胶体即磷酸铬(^{32}P -chromic phosphate, ^{32}P -CP)胶体注射剂,由中国原子高科股份有限公司生产。表皮生长因子、1 mg/mL胶原酶、0.25%胰蛋白酶/0.05%乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)及高糖改良Eagle培养基(dulbecco's modified eagle medium, DMEM)购自美国Gibco公司;MTT、Hoechst 33342荧光试剂盒、异硫氰酸荧光素标记的膜联蛋白V(annexin V-fluorescein iso-

作者单位:①第二军医大学海军临床医学院海军总医院神经外科研究所(北京市100048);②北京军区总医院附属八一儿童医院

*本文课题受首都医学发展科研基金(编号:2009-2053)资助

通信作者:张剑宁 jnzhang2005@163.com

thiocyanate, Annexin-V-FITC)、碘化丙啶(propidium iodide, PI)、青霉素均为美国Sigma公司产品。末端脱氧核苷酸转移酶标记(terminal deoxynucleotidyl transferase [TdT]-mediated dUTP nick end labeling, TUNEL)试剂盒为美国Vazyme公司产品。广谱细胞角蛋白(pan cytokeratin, Pan-CK)及鼠二步法免疫组织化学试剂盒为北京中杉金桥公司产品。

1.2 方法

1.2.1 CP细胞原代培养 新鲜CP手术切除组织块来源于本科手术患者,术后病理证实为牙釉质型。采用显微镜下组织修剪、胰酶差速贴壁消化法结合机械刮除法建立CP有限传代细胞系。采用倒置显微镜观察细胞生长情况及细胞形态, Pan-CK(1:500)免疫组织化学染色鉴定。将传代第2代呈对数生长期细胞用不同初始放射性活度的³²P胶体进行不同照射时间处理后行后续检测。

1.2.2 实验方法与分组 取对数生长期的CP细胞,接种 2×10^6 个/孔单细胞悬液于6孔板内,培养24 h并贴壁后分为对照组与处理组。处理组分别加入使用生理盐水稀释的100 μ L初始放射性活度为1.85、3.70、7.40、14.80、29.60 MBq的³²P胶体,每孔加药后用培养液调整总体积为2 mL,5组初始放射性浓度分别为0.925、1.850、3.700、7.400、14.800 MBq/mL;阴性对照组则加入100 μ L的冷胶体,空白对照组为100 μ L的生理盐水。分别于处理1、3、5、9、14 d后进行样本检测,各组每孔均设5个复孔取其均值。

1.2.3 MTT比色法检测细胞存活情况 各组细胞处理后用细胞酶标仪在490 nm测定各孔吸光度值(optical density, OD),取各孔吸光度的平均值。存活率分析为当前存活率=同一浓度处理组OD值均值/阴性对照组OD值均值 $\times 100\%$,设阴性对照组存活率为100%。以浓度为横轴、细胞存活率为纵轴绘制不同天数的细胞存活率曲线。

1.2.4 FCM检测凋亡率 收集浓度为3.700 MBq/mL的³²P胶体处理3 d后CP细胞及阴性对照组CP细胞 1×10^5 个/mL各取2 mL,4 $^{\circ}$ C离心,1 500 r/min \times 10 min,弃上清,重复PBS洗涤操作1次,细胞重悬后分别加入10 μ L Annexin-V-FITC及5 μ L PI,反应后立即行FCM检测,同时对阴性对照组进行检测。FCM激发光波长用488 nm,波长515 nm检测FITC荧光,波长560 nm检测PI荧光,数据用MultiCycle分析软件处理,计算两组凋亡率并进行比较。

1.2.5 凋亡细胞的Hoechst 33342荧光检测 收集浓度为3.700 MBq/mL的³²P胶体处理3 d后CP细胞爬片及阴性对照组细胞爬片加入少量Hoechst 33342染色液,覆盖住样品即可,室温放置3~5 min,吸除Hoechst 33342染色

液,用PBS洗涤2~3次,3~5 min/次。直接在荧光显微镜下观察。

1.2.6 TUNEL荧光染色观察 收集浓度为3.700 MBq/mL的³²P胶体处理3 d后CP细胞爬片及阴性对照组细胞爬片,用4%多聚甲醛固定细胞30~60 min,加50 μ L TUNEL检测液,37 $^{\circ}$ C避光孵育60 min,用抗荧光淬灭封片液封片后使用激发波长为450~500 nm,发射波长为515~565 nm,在荧光显微镜下观察。

1.2.7 TEM检测凋亡亚细胞形态学改变 消化收集浓度为3.700 MBq/mL的³²P胶体处理3 d后CP细胞,细胞计数 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$ 个,1 500 r/min离心15 min,4%甲醛固定后按常规程序处理行TEM观察。

1.3 统计学处理

数据采用SPSS 17.0软件进行分析,凋亡率的比较用 χ^2 检验,计量资料结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用方差分析,处理组与阴性对照组比较用Dunnett-*t*检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MTT比色法检测细胞存活率曲线结果

原代培养CP细胞生长良好,最长可传代6代,生存45 d, Pan-CK免疫组织化学染色鉴定为阳性结果符合CP细胞特征(图1),成功建立了CP有限传代细胞系。光镜下观察CP细胞为不规则形,连接成片,呈铺路石状,可见核分裂期细胞,核结构完整,胞浆透明,无明显颗粒,空泡样结构。经³²P胶体处理后细胞随着浓度及时间的增加,可见细胞增殖逐渐减缓,出现固缩死亡情况。将传代第2代呈对数生长期细胞用不同初始放射性活度的³²P胶体进行照射不同时间处理后,MTT比色法检测绘制细胞存活率曲线,可见随着处理浓度的增加细胞存活率明显降低;随着处理时间的延长细胞存活率明显降低(图2)。不同浓度³²P胶体处理1、3、5、9、14 d组OD值方差分析结果比较差异有统计学意义($P < 0.05$);处理组分别与阴性对照组比较,除处理1 d的0.925 MBq/mL处理组与0 MBq/mL阴性对照组之间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)以外,其他各组与0 MBq/mL阴性对照组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$,表1)。

2.2 FCM检测凋亡率比较结果

3.700 MBq/mL作用3 d处理组凋亡率为38.1%,阴性对照组凋亡率为5.5%(均包括早期及晚期凋亡),经比较差异有统计学意义($P < 0.05$,图3)。

2.3 Hoechst 33342荧光染色检测细胞形态学结果

处理组细胞核蓝色深染,形态不规则,体积变小,染色质浓缩、碎裂、边缘化,可见特征性凋亡小体(图4A)。阴性对照组CP细胞核大小较一致,染色质蓝色荧光分布较均匀,细胞形态规整(图4B)。

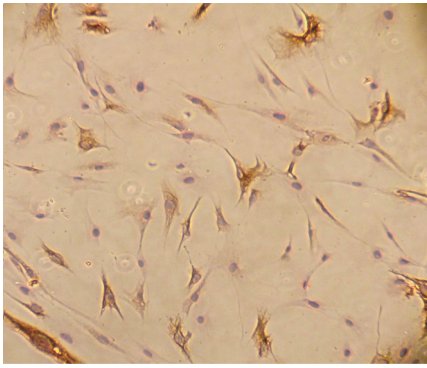


图1 免疫组织化学染色阳性CP细胞(Pan-CK ×200)

Figure 1 Immunohistochemistry of positively stained CP cells (Pan-CK ×200)

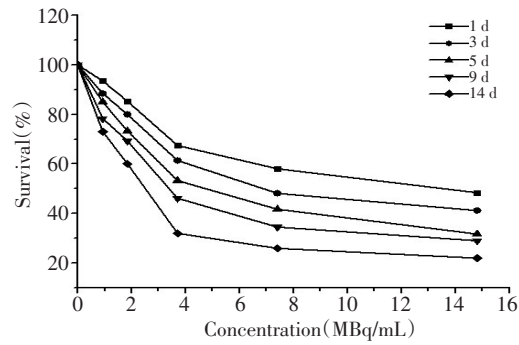


图2 不同初始放射性活度的³²P胶体处理不同时间后各组细胞存活率曲线

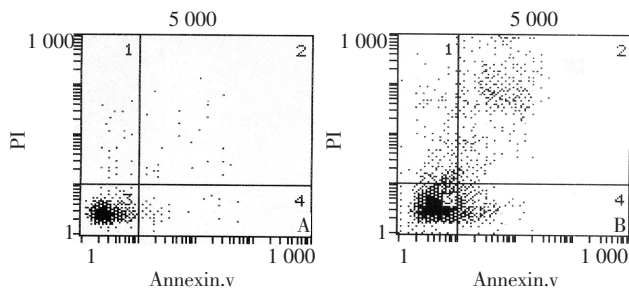
Figure 2 Cell survival curve of each group treated with different initial intensities of radioactivity of ³²P colloid at different time points

表1 ³²P胶体处理CP细胞不同时期各组OD值 $\bar{x} \pm s, n=5$

Table 1 Optical density of CP cells in each group treated with ³²P colloid for different times ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Time(d)	Concentration(MBq/mL)					
	0	0.925	1.850	3.700	7.400	14.800
1	0.31 ± 0.05	0.29 ± 0.05	0.26 ± 0.01 ^a	0.21 ± 0.02 ^a	0.18 ± 0.02 ^a	0.15 ± 0.01 ^a
3	0.43 ± 0.05	0.38 ± 0.05 ^a	0.34 ± 0.01 ^a	0.26 ± 0.01 ^a	0.21 ± 0.01 ^a	0.18 ± 0.01 ^a
5	0.60 ± 0.02	0.51 ± 0.02 ^a	0.44 ± 0.03 ^a	0.32 ± 0.02 ^a	0.25 ± 0.02 ^a	0.19 ± 0.01 ^a
9	0.77 ± 0.02	0.60 ± 0.05 ^a	0.53 ± 0.05 ^a	0.36 ± 0.04 ^a	0.27 ± 0.05 ^a	0.22 ± 0.01 ^a
14	1.00 ± 0.02	0.73 ± 0.02 ^a	0.60 ± 0.05 ^a	0.32 ± 0.03 ^a	0.26 ± 0.02 ^a	0.21 ± 0.02 ^a

^aP<0.05 vs 0MBq/mL, with statistical significance



A: Control group. B: 3.700 MBq/mL treatment group

图3 处理组及对照组凋亡细胞分布

Figure 3 Apoptotic cell distribution in treatment and control groups

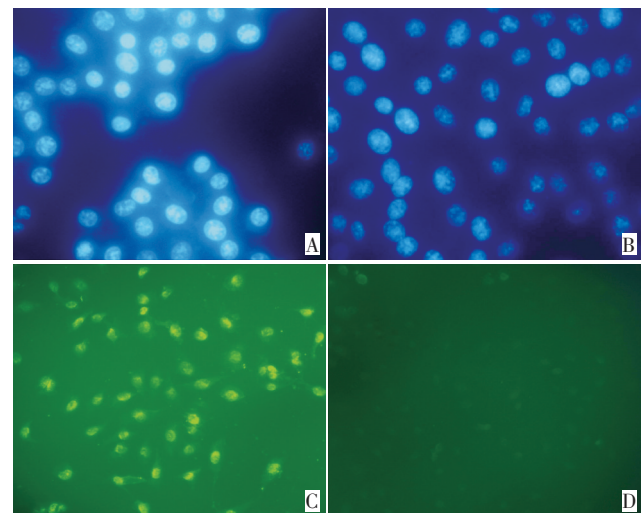
2.4 TUNEL 荧光染色观察结果

处理组 CP 细胞呈现绿色荧光特征的阳性表现,表明经处理后发生了凋亡改变(图 4C)。对照组仅见少量绿色荧光显色,无凋亡发生(图 4D)。

2.5 TEM 检测亚细胞凋亡形态结果

处理组 CP 细胞出现细胞核染色质固缩、核密度增高,细胞变小并核碎裂,胞浆中出现空泡样结构;可见凋亡细胞经核碎裂后形成的染色质块(核碎片),且细胞有发芽、起泡,处于脱落成球形内含细胞质、细胞器和核碎片的凋亡膜包小体早期改变(图 5A)。正常 CP 细胞呈多角形,核内染色质分布较均

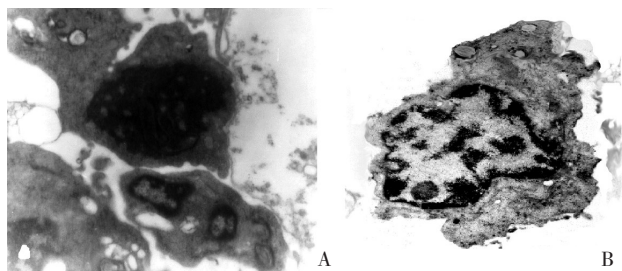
匀,核膜清晰;胞浆丰富,线粒体、内质网、核糖体清晰;细胞膜不规则,有凸起(图 5B)。



A: Hoechst 33342 fluorescence staining result of the treatment group. B: Hoechst 33342 fluorescence staining result of the control group. C: TUNEL fluorescence staining result of the treatment group. D: TUNEL fluorescence staining result of the control group

图4 处理组及对照组Hoechst 33342荧光染色及TUNEL荧光染色结果(x400)

Figure 4 Hoechst 33342 fluorescence staining and TUNEL fluorescence staining results of treatment and control groups (x400)



A: Apoptotic CP cell; B: Normal CP cell

图5 CP凋亡细胞及正常CP细胞TEM结果($\times 10\ 000$)Figure 5 TEM results of apoptotic and normal CP cells ($\times 10\ 000$)

3 讨论

目前国内外对CP的基础研究仍少,本实验为首次应用 ^{32}P 胶体处理CP体外培养细胞后检测其诱导凋亡作用及剂量效应和时间效应关系。研究的前提是建立CP细胞可长期稳定传代存活的有限传代细胞系,国内外已有学者成功建立了CP有限传代细胞系^[4-6]。本研究通过对新鲜切除的肿瘤组织标本采用显微镜下修剪、胰酶差速贴壁消化法结合机械刮除法实现了对CP细胞的分离纯化及有限地连续传代培养,并经过免疫组织化学染色鉴定肿瘤细胞角蛋白阳性表达。CP细胞的倍增时间为3~5 d,细胞对数期生长可维持2~3 w,成功传代第2代及第3代的细胞株生长较稳定,可进行冻存和复苏处理,为本实验使用的稳定细胞株。本实验培养的CP细胞经病理证实为釉质上皮型,其稳定性较好,培养成功率高。

适合CP囊内治疗的药物主要分为化学治疗药物及放射治疗药物。国内外有报道用维甲酸、博莱霉素、干扰素 α (interferon alpha, IFN α)等化学药物临床应用或实验处理体外培养的CP细胞观察疗效,但均具有敏感性不强及毒副反应大等缺点,目前临床应用不多^[7-9]。Cáceres等^[9]总结了既往博莱霉素应用于囊性CP治疗情况后认为其抑制囊液分泌效果好,但也有部分病例产生了神经毒性反应情况。因其半衰期较短,往往需要短时间多次用药控制囊性复发,且其本身渗漏后对神经系统毒副反应较大,近几年相关报道较少。Kickingereder等^[10]总结了博莱霉素与IFN α 的作用后认为其不如 β 射线核素药物更安全有效,并推荐应用 ^{32}P 胶体。Cavalheiro等^[11]应用IFN α 治疗CP结果提示,60例患者的多中心研究报道平均随访44个月,肿瘤控制率为78%,仅有少量相关的不良反应:头痛(10%)、水肿(8%)、发热(8%)以及容易疲劳(2%)。相对于博莱霉素和 ^{32}P 胶体,IFN α 无相关神经毒性副作用及明显禁忌证,但到目前为止,IFN α 的研究经验有限^[12]。Blackburn等^[13]认为理想的放射治疗药物应具有产生纯 β 射线、作用范围局限、半衰期短等特点,可使用磷-32(^{32}P)、钇-90(^{90}Y)、铈-186

(^{186}Rh)、金-198(^{198}Au)。Trippel等^[14]总结了多种放射治疗药物的应用情况,比较了 ^{32}P 和 ^{90}Y 的特点。目前国内外主要以应用 ^{32}P 胶体内放疗为主。本实验选用的 ^{32}P -CP胶体为无菌、绿色溶液,核纯度 $>99.9\%$,pH为7.0,化学浓度为2.32 mg/mL,放射性浓度 $\geq 1\ 850$ MBq/mL。 ^{32}P 是纯 β 衰变核素, β 射线的最大能量为1.711 MeV,半衰期为14.3 d,辐射距离8~12 mm,因其临床安全性及效果肯定而广泛应用。细胞在射线作用下产生增殖抑制、细胞凋亡,与射线的剂量水平和物理特性之间存在一定的相关性。有报道^[15]在一定剂量率条件下对实验动物和体外培养细胞实施低剂量水平的照射可以诱导动物和细胞的适应性反应及兴奋效应,早期表现为细胞增殖明显活跃。其分子机理可能是DNA的损伤与修复同时发生,当用低剂量照射时其水平显著提高,从而发生细胞短暂兴奋性现象(1~3 d),之后才发生迟发相凋亡。这与本实验MTT法测到的数据统计结果符合。本研究采用的剂量率范围基本涵盖了临床 ^{32}P 胶体治疗的剂量范围,但由于实验条件及观察时间限制,对细胞的远期杀伤效果及细胞坏死远期损伤程度观察不够。此外未进行单剂量照射与多次剂量照射的实验比较。

凋亡作为一种可调控的细胞死亡方式在肿瘤放射治疗中的作用日益受到重视。恶性程度较高的细胞其凋亡发生在几个小时之内,表现为快速凋亡,而对CP等增殖较慢的细胞,通常为几天之内发生的迟发性凋亡。虽然用凋亡判断辐射效应的价值仍有争议,但本实验证实 ^{32}P 胶体确可引起CP细胞出现较高的凋亡率并明显抑制其增殖,最终引起细胞的死亡。目前临床上常用多次照射方案,主要因患者CP囊性复发后再次引起压迫症状,需要再次抽吸囊液减压并行内放疗抑制肿瘤增殖。但是多次照射最佳间隔时间很难确定。临床上多因CP复发后再次引起症状时才行二次内放疗手术,一般间隔3个月以上。首次照射后最敏感细胞先被杀伤,随后出现短期细胞修复的放射抗性阶段,随着时间的延长,细胞周期再分布,重新恢复了放射的敏感性,并且初次照射后也影响细胞的DNA修复系统导致再次照射后细胞修复能力减弱,可认为多次照射效果更好。本实验表明随着照射剂量的增加及时间的延长,细胞的杀伤作用逐渐增强。据此,临床上本研究推荐在保证手术及照射相对安全的情况下,早期给予间断、足量内放疗对于CP细胞杀伤效果更好,同时考虑到有发生延迟性凋亡的可能性,在无临床症状和体征等明确复发的情况下不建议贸然进行二次内放疗手术。虽然CP的临床治疗方法较多,但争议较大,公认以手术全切为主。除了开颅手术之外,对于手术残余及复发的

实性肿瘤可以补充放射治疗。随着近年对³²P胶体囊内放疗治疗CP的临床开展及基础研究的深入,其不失为一种较好的控制囊性复发性CP的方法。目前CP的发生、病因、病理及细胞生物学仍不十分明确,加强其细胞、分子水平的研究,找寻影响预后的因素,改进临床治疗措施势在必行^[16]。稳定的CP肿瘤细胞系和动物模型的建立已经为后续实验研究奠定了基础。对于隶属良性肿瘤,却呈恶性表现的CP来说,若获得良好治疗效果尚需要广大研究学者的齐心耕耘。

参考文献

- Liubinas SV, Munshey AS, Kaye AH. Management of recurrent craniopharyngioma[J]. J Clin Neurosci, 2011, 18(4):451-457.
- Chen D, Dong XM, Guan JH, et al. Craniopharyngioma: an analysis of microsurgery and factors influencing prognosis[J]. Chin J Clin Oncol, 2007, 34(5):266-268.[陈 铎,董欣明,关俊宏,等.46例颅咽管瘤显微外科治疗及预后影响因素分析[J].中国肿瘤临床,2007,34(5):266-268.]
- Hao Q, Xiao X, Yin F, et al. Long-term efficacy analysis of stereotactic brachytherapy for cystic craniopharyngiomas[J]. Chin J Stereotact Funct Neurosurg, 2012, 25(2):97-99.[郝秋星,肖 霞,尹丰,等.囊性颅咽管瘤立体定向内放疗的长期疗效分析[J].立体定向和功能性神经外科杂志,2012,25(2):97-99.]
- Hölsken A, Gebhardt M, Buchfelder M, et al. EGFR signaling regulates tumor cell migration in craniopharyngiomas[J]. Clin Cancer Res, 2011, 17(13):4367-4377.
- Xu J, You C, Zhou L, et al. The cell-cycle kinetics of craniopharyngioma and its clinical significance[J]. J Neurooncol, 2010, 98(1):71-76.
- Zhou J, Qi ST, Pan J, et al. Cell culture and characterization of solid adamantinomatous craniopharyngioma[J]. Chin J Neurosurg, 2012, 28(4):368-371.[周 杰,漆松涛,潘 军,等.造釉细胞型颅咽管瘤细胞体外培养与检测[J].中华神经外科杂志,2012,28(4):368-371.]
- Li Q, You C, Zhou L, et al. All-trans retinoic acid inhibits craniopharyngioma cell growth: study on an explant cell model[J]. J Neurooncol, 2013, 112(3):355-364.
- Liu W, Fang Y, Cai B, et al. Intracystic bleomycin for cystic craniopharyngiomas in children (abridged republication of cochrane systematic review)[J]. Neurosurgery, 2012, 71(5):909-915.
- Cáceres A. Intracavitary therapeutic options in the management of cystic craniopharyngioma[J]. Childs Nerv Syst 2005, 21(8-9):705-718.
- Kickingeder P, Maarouf M, El Majdoub F, et al. Intracavitary brachytherapy using stereotactically applied phosphorus-32 colloid for treatment of cystic craniopharyngiomas in 53 patients[J]. J Neurooncol, 2012, 109(2):365-374.
- Cavalheiro S, Di Rocco C, Valenzuela S, et al. Craniopharyngiomas: intratumoral chemotherapy with interferon- α : a multicenter preliminary study with 60 cases[J]. Neurosurg Focus, 2010, 28(4):E12.
- Yeung JT, Pollack IF, Panigrahy A, et al. Pegylated interferon- α -2b for children with recurrent craniopharyngioma[J]. J Neurosurg Pediatr, 2012, 10(6):498-503.
- Blackburn TP, Doughty D, Plowman PN. Stereotactic intracavitary therapy of recurrent cystic craniopharyngioma by instillation of 90yttrium[J]. Br J Neurosurg, 1999, 13(4):359-365.
- Trippel M, Nikkhah G. Stereotactic neurosurgical treatment options for craniopharyngioma[J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2012, 14(3):63.
- Vaganay-Juéry S, Muller C, Marangoni E, et al. Decreased DNA-PK activity in human cancer cells exhibiting hypersensitivity to low-dose irradiation[J]. Br J Cancer, 2000, 83(4):514-518.
- Hussain I, Eloy JA, Carmel PW, et al. Molecular oncogenesis of craniopharyngioma: current and future strategies for the development of targeted therapies[J]. J Neurosurg, 2013, 119(1):106-112.

(2014-02-10 收稿)

(2014-04-10 修回)

(本文编辑:邢颖)



作者简介

常洪波 医学博士,主治医师。研究方向为颅咽管瘤及胶质瘤的基础和临床研究。

E-mail: changhongbo2000@gmail.com