

doi: 10.3969/j.issn.1009-6469.2020.09.023

◇临床医学◇

白消安对 U87 胶质瘤干细胞增殖和自我更新的影响

赵舰, 张良龙, 金亮, 张维, 兰伟途

作者单位: 沧州市人民医院神经外科, 河北 沧州 061000

基金项目: 河北省沧州市重点研发计划指导项目(183302129)

摘要: **目的** 探究白消安对 U87 胶质瘤干细胞增殖和自我更新的影响。 **方法** 培养 U87 胶质瘤干细胞, 分为四组, A 组加入 200 μ L 含 5% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基, B、C、D 三组分别加入 200 μ L 含 20、50、100 μ mol/L 白消安的 DMEM/F12 培养基。比较四组细胞增殖情况[四甲基偶氮唑盐微量酶反应比色法(MTT法)]、细胞凋亡情况[即 B 细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3(Caspase-3)表达水平], 以及细胞周期。 **结果** 培养 24 h 后, 四组 U87 胶质瘤干细胞吸光度比较差异无统计学意义($P > 0.05$); 培养 48 h、72 h 后, B、C、D 组 U87 胶质瘤干细胞吸光度低于 A 组($P < 0.05$); 培养 48 h、72 h 后, B、C、D 组 U87 胶质瘤干细胞吸光度比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。C 组 U87 胶质瘤干细胞 Bax、Caspase-3、Bax/Bcl-2 的吸光度值、阳性细胞表达率高于 A、B 组, 比较差异有统计学意义[吸光度值: C_{Bax} (0.38 $\pm$ 0.01) 比 A_{Bax} (0.46 $\pm$ 0.04)、 B_{Bax} (0.41 $\pm$ 0.01); $C_{Caspase-3}$ (0.45 $\pm$ 0.02) 比 $A_{Caspase-3}$ (0.54 $\pm$ 0.01)、 $B_{Caspase-3}$ (0.47 $\pm$ 0.02); $C_{Bax/Bcl-2}$ (1.19 $\pm$ 0.04) 比 $A_{Bax/Bcl-2}$ (1.36 $\pm$ 0.01)、 $B_{Bax/Bcl-2}$ (1.22 $\pm$ 0.04); 阳性细胞表达率: C_{Bax} (47.53 $\pm$ 1.34)% 比 A_{Bax} (39.81 $\pm$ 4.02)%、 B_{Bax} (39.51 $\pm$ 1.37)% ; $C_{Caspase-3}$ (65.17 $\pm$ 2.34)% 比 $A_{Caspase-3}$ (54.42 $\pm$ 1.34)%、 $B_{Caspase-3}$ (49.16 $\pm$ 2.31)% ; $C_{Bax/Bcl-2}$ (60.24 $\pm$ 4.10)% 比 $A_{Bax/Bcl-2}$ (35.47 $\pm$ 1.20)%、 $B_{Bax/Bcl-2}$ (37.41 $\pm$ 4.12)% ; $P < 0.05$]; D 组 U87 胶质瘤干细胞 Caspase-3、Bax/Bcl-2 的吸光度值、阳性细胞表达率高于 A、B 组, 比较差异有统计学意义[吸光度值: D_{Bax} (0.37 $\pm$ 0.01) 比 A_{Bax} (0.46 $\pm$ 0.04)、 B_{Bax} (0.41 $\pm$ 0.01); $D_{Caspase-3}$ (0.28 $\pm$ 0.01) 比 $A_{Caspase-3}$ (0.54 $\pm$ 0.01)、 $B_{Caspase-3}$ (0.47 $\pm$ 0.02); $D_{Bax/Bcl-2}$ (0.97 $\pm$ 0.02) 比 $A_{Bax/Bcl-2}$ (1.36 $\pm$ 0.01)、 $B_{Bax/Bcl-2}$ (1.22 $\pm$ 0.04); 阳性细胞表达率: $D_{Caspase-3}$ (68.06 $\pm$ 1.09)% 比 $A_{Caspase-3}$ (54.42 $\pm$ 1.34)%、 $B_{Caspase-3}$ (49.16 $\pm$ 2.31)% ; $D_{Bax/Bcl-2}$ (65.10 $\pm$ 2.15)% 比 $A_{Bax/Bcl-2}$ (35.47 $\pm$ 1.20)%、 $B_{Bax/Bcl-2}$ (37.41 $\pm$ 4.12)% ; $P < 0.05$]。A 组、D 组处于 G1 期细胞分别占 8.20%、3.22%, 处于 G2/M 期细胞分别占 16.07%、12.18%, 两组比较差异有统计学意义($P < 0.05$); A 组、D 组处于 G0/G1 期细胞分别占 52.27%、58.85%, 处于 S 期细胞分别占 23.36%、35.75%, 两组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。 **结论** 白消安可抑制 U87 胶质瘤干细胞的增殖, 促进其凋亡, 并且呈现一定量效关系; 机制可能与白消安上调 Bcl-2、Bax、Caspase-3 表达有关。

关键词: 神经胶质瘤; 细胞分裂; 细胞凋亡; 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3; bcl-2 相关 X 蛋白质; 细胞增殖; 白消安; U87 胶质瘤干细胞

Effect of Busulfan on proliferation and self-renewal of U87 glioma stem cells

ZHAO Jian, ZHANG Lianglong, JIN Liang, ZHANG Wei, LAN Weituo

Author Affiliation: Department of Neurosurgery, Cangzhou People's Hospital, Cangzhou, Hebei 061000, China

Abstract: **Objective** To explore the effect of Busulfan on proliferation and self-renewal of U87 glioma stem cells. **Methods** U87 glioma stem cells were cultured and divided into four groups. Group A was cultured with 200 μ L of DMEM/F12 medium containing 5% fetal bovine serum. Groups B, C, and D were cultured with 200 μ L of DMEM/F12 medium containing 20, 50, and 100 μ mol/L busulfan, respectively. The cell proliferation of the four groups [tetramethyl azo dye trace enzyme reaction colorimetric method (MTT method)], apoptosis [ie. B cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2), Bcl-2 related X protein (Bax), caspase-3 expression levels], and the cell cycle were compared. **Results** After 24 hours of culture, there was no significant difference in the absorbance of U87 glioma stem cells among the four groups ($P > 0.05$); after 48 hours and 72 hours of culture, the absorbance of U87 glioma stem cells in groups B, C, and D was lower than that in group A ($P < 0.05$). After 48 h and 72 h incubation, there was no significant difference in the absorbance of U87 glioma stem cells in groups B, C and D ($P > 0.05$). The absorbance value and positive expression rate of Bax, Caspase-3, Bax/Bcl-2 of U87 glioma stem cells in group C were higher than those in groups A and B, and the differences were statistically significant (absorbance value: C_{Bax} (0.38 $\pm$ 0.01) vs. A_{Bax} (0.46 $\pm$ 0.04), B_{Bax} (0.41 $\pm$ 0.01); $C_{Caspase-3}$ (0.45 $\pm$ 0.02) vs. $A_{Caspase-3}$ (0.54 $\pm$ 0.01), $B_{Caspase-3}$ (0.47 $\pm$ 0.02); $C_{Bax/Bcl-2}$ (1.19 $\pm$ 0.04) vs. $A_{Bax/Bcl-2}$ (1.36 $\pm$ 0.01), $B_{Bax/Bcl-2}$ (1.22 $\pm$ 0.04); positive cell expression rate: C_{Bax} (47.53 $\pm$ 1.34)% vs. A_{Bax} (39.81 $\pm$ 4.02)%, B_{Bax} (39.51 $\pm$ 1.37)% ; $C_{Caspase-3}$ (65.17 $\pm$ 2.34)% vs. $A_{Caspase-3}$ (54.42 $\pm$ 1.34)%, $B_{Caspase-3}$ (49.16 $\pm$ 2.31)% ; $C_{Bax/Bcl-2}$ (60.24 $\pm$ 4.10)% vs. $A_{Bax/Bcl-2}$ (35.47 $\pm$ 1.20)%, $B_{Bax/Bcl-2}$ (37.41 $\pm$ 4.12)% ; $P < 0.05$); absorbance value of caspase

-3, Bax/Bcl-2, positive cell expression rate of U87 glioma stem cells in group D were higher than those in group A and B, the differences were statistically significant (absorbance value: D_{Bax} (0.37 ± 0.01) vs. A_{Bax} (0.46 ± 0.04), B_{Bax} (0.41 ± 0.01); $D_{Caspase-3}$ (0.28 ± 0.01) vs. $A_{Caspase-3}$ (0.54 ± 0.01), $B_{Caspase-3}$ (0.47 ± 0.02); $D_{Bax/Bcl-2}$ (0.97 ± 0.02) vs. $A_{Bax/Bcl-2}$ (1.36 ± 0.01), $B_{Bax/Bcl-2}$ (1.22 ± 0.04); positive Cell expression rate: $D_{Caspase-3}$ (68.06 ± 1.09)% vs. $A_{Caspase-3}$ (54.42 ± 1.34)%, $B_{Caspase-3}$ (49.16 ± 2.31)%; $D_{Bax/Bcl-2}$ (65.10 ± 2.15)% vs. $A_{Bax/Bcl-2}$ (35.47 ± 1.20)%, $B_{Bax/Bcl-2}$ (37.41 ± 4.12)%; $P < 0.05$). In group A and D, cells in G1 phase accounted for 8.20% and 3.22%, respectively, and cells in G2/M accounted for 16.07% and 12.18%, respectively. The difference between the two groups was statistically significant ($P < 0.05$). In group A and D, cells in the G0/G1 phase accounted for 52.27% and 58.85%, and the cells in the S phase accounted for 23.36% and 35.75%, respectively. There was no statistically significant difference between the two groups ($P > 0.05$). **Conclusion** Busulfan can inhibit the proliferation of U87 glioma stem cells, promote their apoptosis, and show a dose-effect relationship. The mechanism may be related to Busulfan's up-regulation of Bcl-2, Bax, Caspase-3 expression.

Key words: Glioma; Cell division; Apoptosis; Caspase 3; Bcl-2-associated X protein; Cell proliferation; Busulfan; U87 glioma stem cells

研究发现,将神经干细胞的实验理论方法应用于肿瘤干细胞,发现胶质瘤病人的瘤灶中存在肿瘤干细胞,其在胶质瘤发生发展中起着重要作用^[1]。目前临床中对于胶质瘤的治疗原则主要为抑制肿瘤细胞的侵袭、增殖,进而达到抑制肿瘤扩散的目的^[2]。白消安为临床中缓解性治疗慢性粒细胞白血病的常用药物之一,或者与其他药物联合使用,清除体内造血干细胞,为慢性髓性白血病病人进行干细胞移植奠定基础^[3]。白消安应用于胶质瘤干细胞的研究较少,因此,本研究于2018年1月至2019年1月,探究白消安对U87胶质瘤干细胞增殖和自我更新的影响。具体报道如下。

1 材料与方法

1.1 主要材料 U87胶质瘤干细胞由中国科学院上海细胞生物学研究所提供;白消安由Sigma公司提供,与二甲基亚砜相溶(浓度为 $100 \mu\text{mol/L}$),保存于 -20°C 条件中,用时再用DMEM/F12稀释至所需浓度;DMEM/F12培养基(由Hyclone公司提供);胎牛血清(由Gibco公司提供);胰蛋白酶(由Gibco公司提供);二甲基亚砜(由Thermo公司提供);B细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶3(Caspase-3)抗体(由北京中杉金桥生物技术公司提供)。

1.2 U87胶质瘤干细胞培养 将U87胶质瘤干细胞接种于含有10%胎牛血清的DMEM/F12培养集中,放置于 37°C 、5%二氧化碳的细胞培养箱中,2~3 d换1次液,当细胞密度达80%~90%时进行传代。

1.3 U87胶质瘤干细胞增殖情况观察 采用四甲基偶氮唑盐微量酶反应比色法(MTT法)检测U87胶质瘤干细胞增殖情况;取对数生长期U87胶质瘤干细胞,接种于平底96孔板中,细胞数为 1×10^4 /孔,培养24 h后,分为A、B、C、D组,A组仅加入 $200 \mu\text{L}$ 含5%胎牛血清的DMEM/F12培养基,B、C、D三组分别

加入 $200 \mu\text{L}$ 含20、50、 $100 \mu\text{mol/L}$ 白消安的DMEM/F12培养基,四组作用24 h、48 h、72 h后弃上清,采用MTT还原法,用酶标仪在490 nm波长检测吸光度,以其中不含细胞的空白孔进行调零。

1.4 U87胶质瘤干细胞凋亡情况观察 (1)酶联免疫吸附试验(ELISA):取对数生长期U87胶质瘤干细胞,接种于有无菌玻片的24孔板中,细胞数为 5×10^5 /孔,培养24 h后,分为A、B、C、D组,A组仅加入 $200 \mu\text{L}$ 含5%胎牛血清的DMEM/F12培养基,B、C、D三组分别加入 $200 \mu\text{L}$ 含20、50、 $100 \mu\text{mol/L}$ 白消安的DMEM/F12培养基,培养72 h;取上清,将上清与包被液按照1:1混匀,加入96孔酶标板中,放置于 4°C 条件下过夜;之后在 37°C 条件下封闭1.5 h,分别加入Bcl-2、Bax、Caspase-3抗体(均按照1:1 000稀释),放置于 4°C 条件下过夜;之后加入二抗(按照1:1 000稀释),在室温下孵育1.5 h,二氨基联苯胺法(DAB)避光显色,当颜色发生改变时,停止显色,在酶标仪490 nm波长处检测吸光度值。

(2)免疫组化法:细胞培养、分组、干预方法与ELISA法相同;U87胶质瘤干细胞培养72 h后,吸出上清,用10%甲醛固定细胞30 min,室温下干燥;用内源性过氧化物酶灭活;四组分别加入Bcl-2、Bax、Caspase-3抗体(均按照1:1 000稀释),放置于 4°C 条件下过夜,之后滴加试剂1,放置于 37°C 条件下20 min,滴加试剂2,放置于 37°C 条件下30 min,DAB避光显色,之后用苏木素复染,常规脱水、透明、封片。将片子放置于显微镜下观察,Bcl-2、Bax、Caspase-3阳性细胞为胞质中黄色或棕褐色颗粒呈弥漫性分布;记录Bcl-2、Bax、Caspase-3阳性表达细胞数,阳性细胞表达率=(阳性细胞数/总细胞数) $\times 100\%$ 。

1.5 U87胶质瘤干细胞细胞周期观察 取对数生长期U87胶质瘤干细胞,按 1×10^6 接种于培养瓶中(T25),培养24 h后,分为A、D组,A组仅加入 200

μL 含5%胎牛血清的DMEM/F12培养基,D组加入200 μL 含100 $\mu\text{mol/L}$ 白消安的DMEM/F12培养基,培养48 h后,用胰酶消化后,80%冷甲醇固定,过夜,用Annexin V/PI染色,采用流式细胞分析仪检测两组细胞周期。

1.6 统计学方法 本研究用SPSS 19.0软件处理,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,符合正态分布计量资料,一般多组间比较采用单因素方差分析,多时点观测资料的比较采用重复测量方差分析,多组之间两两比较采用LSD-*t*检验的方法;计数资料的比较采用 χ^2 检验的方法,当 $P < 0.05$ 时,认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 四组U87胶质瘤干细胞吸光度比较 培养24 h后,四组U87胶质瘤干细胞吸光度比较差异无统计学意义($P > 0.05$);培养48 h、72 h后,B、C、D组U87胶质瘤干细胞吸光度低于A组($P < 0.05$),且B、C、D组U87胶质瘤干细胞大小明显小于A组;培养48 h、72 h后,B、C、D组U87胶质瘤干细胞吸光度比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。具体数据见表1;代表性图片见图1。

2.2 四组U87胶质瘤干细胞凋亡情况比较 C组U87胶质瘤干细胞Bax、Caspase-3、Bax/Bcl-2的吸光度值、阳性细胞表达率高于A、B组($P < 0.05$);D组U87胶质瘤干细胞Caspase-3、Bax/Bcl-2的吸光度值、阳性细胞表达率高于A、B组($P < 0.05$)。见表2。

表1 四组U87胶质瘤干细胞吸光度比较/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	24 h	48 h	72 h
A组	5	0.95±0.03	1.20±0.03	1.12±0.04
B组	5	0.84±0.03	0.93±0.02 ^a	0.84±0.03 ^a
C组	5	0.92±0.02	0.92±0.02 ^a	0.74±0.04 ^a
D组	5	0.95±0.04	0.94±0.03 ^a	0.77±0.03 ^a
组间 <i>F</i> , <i>P</i> 值			26.14, < 0.01	
时间 <i>F</i> , <i>P</i> 值			19.40, < 0.01	
交互 <i>F</i> , <i>P</i> 值			26.10, < 0.01	

注:与A组相比,^a $P < 0.05$

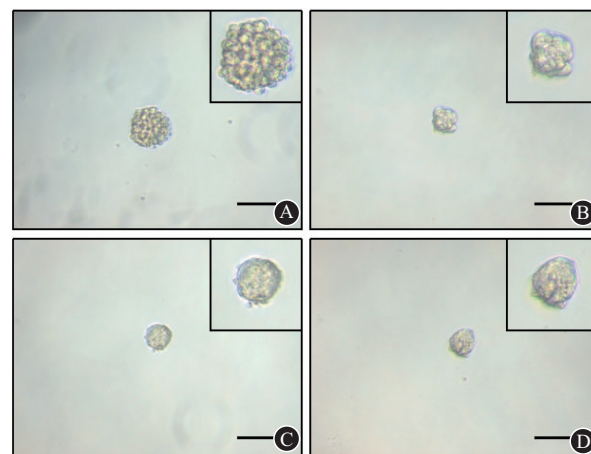


图1 四组U87胶质瘤干细胞代表性图片(标尺=100 μm ,中心细胞 $\times 100$,右上角特写 $\times 400$):A~D分别为A、B、C、D组

2.3 两组U87胶质瘤干细胞周期比较 A组、D组处于G1期细胞分别占8.20%、3.22%,处于G2/M期细胞分别占16.07%、12.18%,两组比较差异有统计学意义($P < 0.05$);A组、D组处于G0/G1期细胞分别占52.27%、58.85%,处于S期细胞分别占23.36%、25.75%,两组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

3 讨论

研究统计发现,脑胶质瘤为恶性程度较高的一种原发性脑肿瘤,约占颅内肿瘤的45%^[4]。根据胶质瘤的病理及免疫组化,可分为星形细胞瘤、少突胶质细胞瘤^[5]。研究发现,致癌基因高表达、抑癌基因失活、细胞信号通路调节,均可影响胶质瘤的发生、发展^[6]。因此,相关致癌基因及其病理机制的研究在胶质瘤的诊治中具有重要的意义,成为胶质瘤研究热点。

肿瘤干细胞学说的提出,促进学者了解肿瘤发生机制^[7-8],同时为探寻治疗肿瘤的药物提供依据。Ignatova等^[9]首次发现胶质瘤中存在胶质瘤干细胞,随后大量研究证实实体胶质瘤组织及细胞中,存在胶质瘤干细胞。齐玲等^[10]研究发现,通过分离人新鲜脑肿瘤,直接进行培养,能够获得脑肿瘤干细胞;

表2 四组U87胶质瘤干细胞凋亡情况比较/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	Bcl-2		Bax		Caspase-3		Bax/Bcl-2	
		吸光度	阳性表达率/%	吸光度	阳性表达率/%	吸光度	阳性表达率/%	吸光度	阳性表达率/%
A组	5	0.34±0.01	33.91±1.24	0.46±0.04	39.81±4.02	0.54±0.01	54.42±1.34	1.36±0.01	35.47±1.20
B组	5	0.32±0.01	31.64±1.32	0.41±0.01	39.51±1.37	0.47±0.02	49.16±2.31	1.22±0.04	37.41±4.12
C组	5	0.37±0.04	37.24±4.16	0.38±0.01 ^{ab}	47.53±1.34 ^{ab}	0.45±0.02 ^{ab}	65.17±2.34 ^{ab}	1.19±0.04 ^{ab}	60.24±4.10 ^{ab}
D组	5	0.38±0.01	38.13±1.40	0.42±0.01	46.74±2.30	0.28±0.01 ^{ab}	68.06±1.09 ^{ab}	0.97±0.02 ^a	65.10±2.15 ^a
<i>F</i> 值		2.30	1.86	6.27	31.18	19.62	24.07	15.34	26.08
<i>P</i> 值		0.09	0.24	0.04	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01

注:Bcl-2为B细胞淋巴瘤/白血病-2,Bax为Bcl-2相关X蛋白,Caspase-3为半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶3。与A组相比,^a $P < 0.05$;与B组相比,^b $P < 0.05$

而该类细胞的存在,可能是导致肿瘤发生、耐药、复发的原因。虽然胶质瘤干细胞在胶质瘤实质中占的比例较低,但是在肿瘤的生长、转移、复发、耐药中起着关键作用^[11-12]。

目前,学者分离培养胶质瘤干细胞主要有两种方法:(1)利用流式细胞仪或者免疫磁珠筛选CD133阳性细胞或ABCG2阳性细胞,得到含量较高的胶质瘤干细胞;(2)用无血清培养基培养胶质瘤细胞,采用非胶质瘤干细胞凋亡,而胶质瘤干细胞成球的特性,进行胶质瘤干细胞筛选^[13-14]。

白消安为一种甲烷磺酸类的双功能烷化剂,研究表明,白消安具有清除骨髓作用,但目前尚无证据证实白消安对成熟的淋巴细胞有杀伤作用,因此,有学者认为,在进行干细胞移植治疗血液疾病时,可采用白消安联合环磷酰胺进行异基因造血干细胞移植预处理;若环磷酰胺剂量不足时,可引起早期移植排斥,而白消安剂量不足时,可引起晚期移植排斥^[15-17]。李程程等^[18]研究发现,白消安可降低机体外周血白细胞数目,同时降低造血干细胞、造血祖细胞的比例及数目,诱导造血干细胞损伤,建立造血干细胞损伤模型,为探寻造血干细胞损伤机制提供基础。

本次研究发现,高浓度白消安可抑制U87胶质瘤干细胞增殖,但具体机制需进一步研究。Caspase-3为凋亡过程中关键蛋白酶之一,起着重要的枢纽作用;是凋亡过程中最关键的执行蛋白酶,起着重要枢纽作用;Bcl-2在细胞凋亡过程中扮演重要角色,其高表达,可抑制细胞凋亡;Bax在细胞凋亡过程中的作用与Bcl-2相反,二者产生负反馈调节,进而影响细胞的存活,通过计算Bax/Bcl-2值,可了解细胞生存状况^[19-20]。本次研究结果显示,B、C、D组细胞吸光度低于A组,Caspase-3、Bax、Bcl-2的吸光度值及阳性表达率升高,G1期、G2/M期细胞所比例较高;结果说明白消安可抑制U87胶质瘤干细胞的增殖,促进其凋亡,并且呈现一定量效关系,机制可能与白消安上调Bcl-2、Bax、Caspase-3表达有关。

参考文献

- [1] 袁凡恩,陈谦学.胶质瘤干细胞的研究进展[J].中国临床神经外科杂志,2016,21(8):508-511.
- [2] 郑立影,吕红,林赋桂,等.脑胶质瘤治疗策略及其研究进展[J].吉林医药学院学报,2016,37(1):50-53.
- [3] 王敏,张晓辉.白消安在异基因造血干细胞移植预处理方案中的研究进展[J].临床血液学杂志,2016,29(1):77-82.

- [4] DE ROBLES P, FIEST KM, FROLKIS AD, et al. The worldwide incidence and prevalence of primary brain tumors: a systematic review and meta-analysis[J]. Neuro Oncol, 2015, 17(6): 776-783.
- [5] 苏昌亮,李丽,陈小伟,等.2016年WHO中枢神经系统肿瘤分类总结[J].放射学实践,2016,31(7):570-579.
- [6] 李元元,朱淑霞.SOX家族在脑胶质瘤中的表达及作用[J].国际肿瘤学杂志,2017,44(8):601-603.
- [7] PUISIEUX A, POMMIER RM, MOREL AP, et al. Cellular plasticity and the multistep process of tumorigenesis[J]. Cancer Cell, 2018, 33(2): 164-172.
- [8] PARK SY, PIAO Y, JEONG KJ, et al. Periostin (POSTN) regulates tumor resistance to antiangiogenic therapy in glioma models[J]. Molecular Cancer Therapeutics, 2016, 15(9): 2187.
- [9] IGNATOVA TN, KUKEROV VG, LAYWELL ED, et al. Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro[J]. Glia, 2002, 39(3): 193-206.
- [10] 齐玲,金宏,丁丽娟,等.脑肿瘤干细胞的培养及生物学特性研究[J].中国实验诊断学,2011,15(2):227-228.
- [11] YAMADA R, NAKANO I. Glioma stem cells: their role in chemoresistance[J]. World Neurosurgery, 2012, 77(2): 237-240.
- [12] 王婷,刘鹏飞.CD133+胶质瘤干细胞在胶质瘤中的分布[J].国际免疫学杂志,2016,39(5):518-521.
- [13] BRESCIA P, ORTENSIO B, FORNASARI L, et al. CD133 is essential for glioblastoma stem cell maintenance[J]. Stem Cells, 2013, 31(5): 857-869.
- [14] 桂燧.人脑胶质瘤原代细胞及其干细胞的分离、培养和鉴定[D].济宁:济宁医学院,2017.
- [15] RAJAGOPAL R, GCP M, KOTTECHA R S. High-dose chemotherapy with thiopeta, busulfan, and cyclophosphamide and autologous stem cell transplantation for pediatric primary central nervous system lymphoma in first complete remission[J]. Cancer, 2017, 123(14): 2781-2782.
- [16] FLOWERS CR, COSTA LJ, PASQUINI MC, et al. Efficacy of pharmacokinetics-directed busulfan, cyclophosphamide, and etoposide conditioning and autologous stem cell transplantation for lymphoma: comparison of a multicenter phase II study and CIBMTR outcomes[J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2016, 22(7): 1197-1205.
- [17] SAKELLARI I, GAVRIILAKI E, CHATZIOANNOU K, et al. Long-term outcomes of total body irradiation plus cyclophosphamide versus busulfan plus cyclophosphamide as conditioning regimen for acute lymphoblastic leukemia: a comparative study[J]. Annals of Hematology, 2018, 97(10): 1987-1994.
- [18] 李程程,管博文,苏路,等.白消安对小鼠造血干细胞功能的损伤作用[J].中国比较医学杂志,2018,28(2):26-32.
- [19] MAHDAVI S, KHODARAHMI P, ROODBARI NH. Effects of cadmium on Bcl-2/Bax expression ratio in rat cortex brain and hippocampus[J]. Hum Exp Toxicol, 2018, 37(3): 321-328.
- [20] 董雅洁,高维娟.bcl-2、bax、caspase-3在细胞凋亡中的作用及其关系[J].中国老年学杂志,2012,32(21):4828-4830.

(收稿日期:2019-03-27,修回日期:2019-05-19)