

高压氧对脑内种植 GL261 胶质瘤 C57 小鼠 尼莫司汀化疗后生存期的影响

兰川 李飞 陈图南 叶信珍 吴南 易良 林江凯 朱刚 冯华

【摘要】 目的 观察高压氧辅助治疗对脑内种植 GL261 胶质瘤细胞系 C57 小鼠尼莫司汀(咪唑亚硝脲)化疗后平均生存期的影响。方法 于 C57 小鼠右侧尾状核种植 GL261 胶质瘤细胞,术后第 7 天分别接受单纯高压氧或单次尼莫司汀化疗或高压氧与尼莫司汀联合治疗,观察不同治疗方法对荷瘤鼠生存期的影响。结果 大体标本观察显示,不同处理组荷瘤鼠肿瘤体积均较大、占位效应明显,正常脑组织受压严重、中线结构偏移,但不同处理组肿瘤体积比较差异无统计学意义($F = 0.602, P = 0.618$)。平均生存期($F = 12.177, P = 0.000$)评价和 Kaplan-Meier 生存曲线分析($\chi^2 = 13.604, P = 0.003$)显示,单纯高压氧治疗($\chi^2 = 0.365, P = 0.546$)和单次尼莫司汀化疗($\chi^2 = 0.884, P = 0.347$)对荷瘤鼠生存期无明显影响;高压氧联合尼莫司汀化疗($\chi^2 = 9.962, P = 0.002$)可延长荷瘤鼠生存时间,且疗效优于单纯高压氧治疗($\chi^2 = 6.925, P = 0.008$)和单次尼莫司汀化疗($\chi^2 = 7.152, P = 0.007$)。结论 高压氧对颅内种植 GL261 胶质瘤细胞系的 C57 小鼠生存期和生长无明显影响和促进作用,联合尼莫司汀化疗则可使荷瘤鼠平均生存期明显延长,提示高压氧对尼莫司汀化疗具有增效作用。

【关键词】 高压氧; 神经胶质瘤; 尼莫司汀; 肿瘤种植; 存活率

DOI:10.3969/j.issn.1672-6731.2012.06.014

The effect of hyperbaric oxygen on survival time of C57 mice implanted with GL261 gliomas after chemotherapy with ACNU

LAN Chuan, LI Fei, CHEN Tu-nan, YE Xin-zhen, WU Nan, YI Liang, LIN Jiang-kai, ZHU Gang, FENG Hua

Department of Neurosurgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

Corresponding author: FENG Hua (Email: fenghua8888@yahoo.com.cn)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of hyperbaric oxygen (HBO) on the survival of C57 mice implanted with GL261 gliomas after chemotherapy with nimustine (ACNU). **Methods** Forty adult male C57 mice were divided into four groups: control, HBO, ACNU and HBO + ACNU randomly by SPSS 10, and planted with GL261 glioma cell suspension in their caudate nucleus to form tumors. From the 7th day after implantation, these groups (except control group) began to receive different treatments (HBO, ACNU and HBO + ACNU), in order to observe the effects of different treatments on the survival time of tumor bearing mice. **Results** There were no significant differences in the tumor volume, mass effect, severe compression of normal brain tissue and midline shift ($F = 0.602, P = 0.618$). The average survival time was significant with one-way ANOVA ($F = 12.177, P = 0.000$) and with the Kaplan-Meier survival analysis of log-rank ($\chi^2 = 13.604, P = 0.003$), while multiple comparisons between groups showed HBO ($\chi^2 = 0.365, P = 0.546$) and single-time ACNU ($\chi^2 = 0.884, P = 0.347$) had no effect on the survival of mice; the effect of HBO + ACNU ($\chi^2 = 9.962, P = 0.002$) was better than that of HBO ($\chi^2 = 6.925, P = 0.008$) and single-time ACNU ($\chi^2 = 7.152, P = 0.007$). **Conclusion** The HBO had no effect on survival time of C57 mice with implantation of GL261 and could not promote the growth of the GL261 glioma. However, combining the treatment with ACNU could extend the survival time of tumor bearing mice, suggesting that HBO could strengthen the therapeutic effects of ACNU.

【Key words】 Hyperbaric oxygenation; Glioma; Nimustine; Neoplasm seeding; Survival rate

Fund Project: National Natural Science Foundation of China (No. 30901538); National Natural Science Foundation of China (No. 30973494)

脑胶质瘤具有浸润性生长特点,神经外科手术是目前主要治疗方法,但仍难以彻底切除,大多数患者预后不良,尤其是恶性胶质瘤患者,平均生存期低于 1 年。随着肿瘤治疗学方法的发展,药物化疗已成为治疗颅内肿瘤的重要方法,如何增强治疗效果、减少对全身和系统的损害越来越受到重视。高压氧(HBO)作为一种简单、有效且安全的辅助治疗方法,在颅内恶性肿瘤药物化疗中的作用备受关注^[1]。在本实验中,我们采用尼莫司汀(ACNU,啞啞亚硝脲)联合高压氧对脑内种植 GL261 胶质瘤的 C57 小鼠进行治疗,以观察高压氧辅助药物化疗对荷瘤小鼠生存期的影响。

材料与方 法

一、实验材料

1. 实验动物 清洁级健康雄性 C57 小鼠 40 只,体质量 14.70~18.50 g,平均(16.46±1.02) g,由第三军医大学动物实验中心提供,自由进食、饮水。所有小鼠经编号后按照 SPSS 10.0 统计软件进行完全随机分组,分为不予干预治疗组(对照组)、高压氧治疗组(HBO 组)、尼莫司汀化疗组(ACNU 组),以及尼莫司汀联合高压氧治疗(联合治疗)组,每组 10 只小鼠。

2. 细胞系来源 本实验所用细胞系为小鼠 GL261 胶质瘤细胞系,购于美国模式培养物集存库(ATCC),收集于体外连续传代至 20 代的细胞备用。

3. 药品与试剂 体积分数为 10% 的胎牛血清(FBS)500 ml 和 DMEM/F12 培养基 500 ml(含多种氨基酸、葡萄糖、无机盐、有机化合物和维生素)均购自美国 Hyclone 公司。尼莫司汀(商品名:宁得朗;批号:KPA0026,规格:25 mg/瓶)由日本三共株式会社生产。质量分数为 1% 的戊巴比妥钠(批号:110122,规格:5 g)由上海索莱宝生物科技有限公司提供。

4. 主要实验仪器 68001 型动物标准型单臂脑立体定位仪购自深圳瑞沃德生命科技有限公司[精度:(0.10±0.01) mm]。微量注射器(25 μl)由宁波镇海玻璃仪器厂生产。DWC800 型动物高压氧舱由山东烟台冰轮高压氧舱有限公司提供(容器净质量:469 kg,最高工作压力:0.70 MPa,容积:0.71 m³)。

二、实验方法

1. GL261 胶质瘤细胞系细胞培养 GL261 胶质瘤细胞接种于放置含体积分数为 10% 胎牛血清的

DMEM/F12 培养基的培养瓶中,置于 37 ℃、体积分数为 5% 的二氧化碳、充分湿度恒温孵育箱内培养,每日观察培养基颜色、性状,并于倒置相差显微镜下观察细胞形态及密度;平均每 2 d 换液 1 次,当细胞传代至密度达 80% 时,以质量分数为 0.25% 胰蛋白酶消化传代;消化收集生长状态良好的 GL261 胶质瘤细胞,离心半径 10 cm、800 r/min 离心 5 min,弃上清液后磷酸盐缓冲液重悬。计数板计数细胞密度,调整接种密度为 10×10³/μl 备用。

2. GL261 胶质瘤细胞颅内种植 GL261 胶质瘤细胞悬液冰上保存,间歇摇匀。质量分数为 1% 的戊巴比妥钠以 40 mg/kg 剂量腹腔注射麻醉小鼠,然后俯卧位固定于立体定向仪上;于中线上、眼裂后行直切口,长约 1 cm,显露前囟,以磨钻于前囟后 0.14 mm、中线旁 2 mm 颅骨处钻孔,显露硬脑膜。微量注射器汲取 4 μl 细胞悬液,固定于移动架上,调整微量注射器使其垂直且针尖刚触及骨孔处硬脑膜,缓慢垂直进针 4.60 mm、后退 1 mm 使肿瘤细胞种植于右侧尾状核,缓慢注射细胞悬液,注射完毕针头静置 5 min 后缓慢拔出、骨蜡封闭骨孔、缝合头皮。所有 C57 小鼠术后均不予以脱水和糖皮质激素类药物,清洁级常规饲养。实验过程中因麻醉意外死亡 3 只,后补充至 40 只。接种后无一例小鼠发生颅内感染,处死后经尸检证实均有肿瘤生长。

3. 治疗方法 高压氧治疗组小鼠于种植 GL261 胶质瘤细胞后第 7 天进入动物高压氧舱进行治疗(1 次/d),入舱后以纯氧气洗舱 10 min,纯氧加压,15 min 内匀速升压至 2.50 个绝对大气压(ATA),即 0.25 MPa,稳压 80 min、匀速减压 25 min,治疗过程中以压缩纯氧气通风换气 2 次,5 min/次,保持氧浓度 > 95%;连续治疗 10 d。尼莫司汀化疗组和联合治疗组小鼠于种植 GL261 胶质瘤细胞后第 7 天,按照 40 mg/kg 剂量一次性腹腔注射 5 mg/ml 尼莫司汀,联合治疗组小鼠于注射化疗药物后即刻进入动物高压氧舱(1 次/d),治疗过程与高压氧治疗组相同,两组均连续治疗 10 d。对照组小鼠种植 GL261 胶质瘤细胞后不予干预治疗。不同处理组 C57 小鼠接种细胞数目均为 40×10³ 个细胞。

4. 观察项目 种植 GL261 胶质瘤细胞后,观察 C57 小鼠日常活动情况,以种植后 12 h 作为 0.50 d 记录,当小鼠自然死亡或出现明显厌食、偏瘫等神经系统症状与体征、体质量 > 15% 时,处死小鼠进行尸体解剖^[2]:剪开颈部皮肤、肌肉,自枕骨大孔处断

头,剪开枕骨,小心剥离颅骨后完整取出全脑,浸泡于质量分数为 4% 多聚甲醛溶液固定。以 GL261 胶质瘤细胞种植成功至小鼠自然死亡或处死时间作为生存期,测量肿瘤最大左右径(d1)、前后径(d2)和深度(d3),根据参考文献[3]所提供的公式计算肿瘤体积:肿瘤体积 = $d1 \times d2 \times d3 \times \pi / 6$ 。

三、统计分析方法

采用 SPSS 10.0 统计软件对所有实验数据进行计算与分析。计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,不同处理组小鼠生存期的比较采用单因素方差分析,组间两两比较行 Bonferroni(方差齐)或 Tamhane's T²(方差不齐)检验;采用 Kaplan-Meier 法计算生存曲线,Log-Rank 法对各组生存曲线进行整体及两两比较。以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、GL261 胶质瘤细胞生长情况观察

GL261 胶质瘤细胞系细胞生长形成的肿瘤为小鼠同源性大脑胶质瘤,种植于 C57 小鼠后呈侵袭性生长。预实验结果显示,肿瘤种植部位形成的实体瘤呈鱼肉状,无明显包膜,血供丰富、呈浸润性生长(图 1a, 1b);种植第 1 周时,HE 染色可见肿瘤细胞于尾状核呈侵袭性生长,边界不清(图 1c);第 2 周时肿瘤细胞呈圆形、梭形或不规则形,生长活跃,并向基

节浸润生长,肿瘤边界不清晰,细胞核呈圆形或不规则形,染色质为深染(图 1d)。

二、GL261 胶质瘤细胞颅内种植后肿瘤大体标本观察

大体标本观察显示,对照组(图 2a)、高压氧治疗组(图 2b)、尼莫司汀治疗组(图 2c)和联合治疗组(图 2d)荷瘤鼠右侧尾状核均有肿瘤生长,不同处理组荷瘤鼠肿瘤生长部位、浸润生长方式无明显差异,肿瘤体积较大,占位效应明显,正常脑组织严重受压,中线结构偏移,但不同处理组小鼠右侧尾状核肿瘤体积差异无统计学意义($P = 0.618$, 表 1)。

三、生存期评价

不同处理组荷瘤鼠平均生存期分析显示,整体差异具有统计学意义($P = 0.000$, 表 2),方差齐性检验不同处理组之间生存时间方差不齐($P = 0.012$),因此行 Tamhane's T²检验。结果显示,与对照组相比,单纯高压氧治疗($P = 0.998$)和单次尼莫司汀化疗($P = 0.953$)对荷瘤鼠平均生存期均无明显影响,而高压氧联合尼莫司汀治疗则可使荷瘤鼠平均生存期提高($P = 0.020$),而且其疗效分别优于单纯高压氧治疗($P = 0.024$)和单次尼莫司汀化疗($P = 0.062$, 表 3)。

Kaplan-Meier 生存曲线分析显示,不同处理组荷瘤鼠生存曲线经 Log-Rank 比较差异有统计学意义

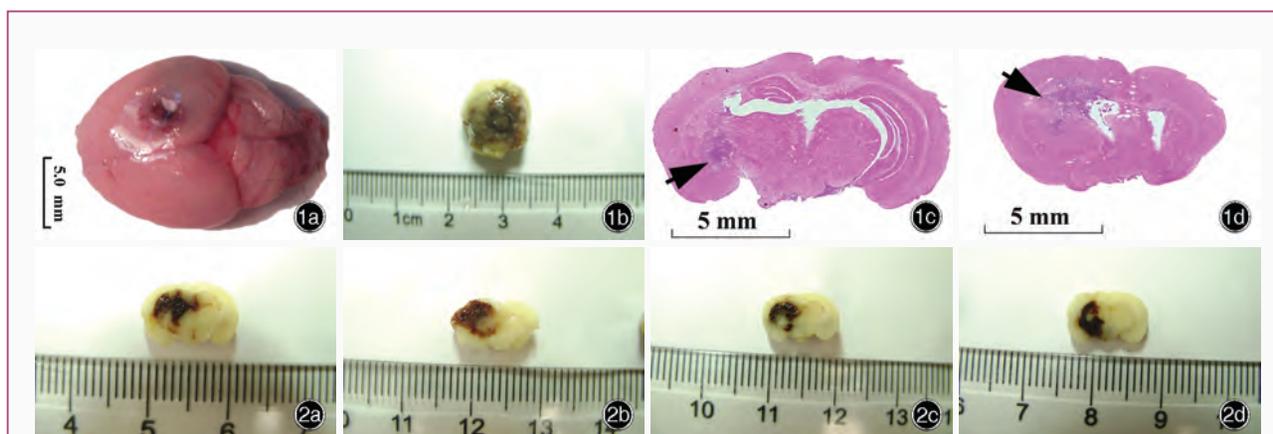


图 1 GL261 胶质瘤细胞颅内种植后形成实体瘤大体标本观察 1a, 1b 肿瘤呈鱼肉状, 无明显包膜, 血供丰富, 呈浸润性生长 1c 种植第 1 周时, 肿瘤于尾状核呈侵袭性生长, 边界不清晰(箭头所示) 1d 种植第 2 周时, 肿瘤向基底节呈浸润性生长, 边界不清晰(箭头所示) **图 2** 右侧尾状核肿瘤大体标本观察显示, 不同处理组荷瘤鼠肿瘤生长部位、大小、浸润生长方式无明显差异, 均体积较大, 占位效应明显, 正常脑组织严重受压、中线结构偏移 2a 对照组 2b 高压氧治疗组 2c 尼莫司汀治疗组 2d 联合治疗组

Figure 1 Observation of gross specimens of GL261 glioma in mice brain. Implanted tumors were fish-like, without envelop, and in rich blood supply and invasive growth (Panel 1a, 1b). The tumor invaded into the caudate nucleus without clear boundary 1 week after implantation (arrow indicates, Panel 1c). The tumor invaded into the basal ganglia without clear boundary 2 weeks after implantation (arrow indicates, Panel 1d) **Figure 2** Observation of gross specimens after the mice were sacrificed showed no obvious differences of the tumor location, size, and invasive growth mood among different groups. The tumor volumes were big with obvious mass effects and the normal brain tissues were compressed to the other side, with displacement of midline structure. Control group (Panel 2a). HBO group (Panel 2b). ACNU group (Panel 2c). HBO + ACNU group (Panel 2d)

表 1 不同处理组荷瘤鼠右侧尾状核肿瘤体积的比较($\bar{x} \pm s, \text{mm}^2$)

Table 1. Comparison of the tumor volumes in different groups ($\bar{x} \pm s, \text{mm}^2$)

组别	样本例数	肿瘤体积	F 值	P 值
对照组	10	84.08 ± 9.44	0.602	0.618
HBO 组	10	80.86 ± 8.74		
ACNU 组	10	85.28 ± 4.10		
联合治疗组	10	82.58 ± 7.78		

表 2 不同处理组荷瘤鼠平均生存期的比较($\bar{x} \pm s, \text{d}$)

Table 2. Comparison of the median survival time of each group ($\bar{x} \pm s, \text{d}$)

组别	样本例数	生存期	F 值	P 值
对照组(A)	10	18.28 ± 2.33	12.177	0.000
HBO 组(B)	10	18.78 ± 2.36		
ACNU 组(C)	10	20.33 ± 5.24		
联合治疗组(D)	10	32.19 ± 9.17		

表 3 不同处理组荷瘤鼠平均生存期组间两两比较的 Tamhane's T² 检验

Table 3. Pair comparison of median survival time between groups with Tamhane's T² test

组间两两比	P 值	组间两两比	P 值
A : B	0.998	B : C	0.998
A : C	0.953	B : D	0.998
A : D	0.020	C : D	0.062

义($\chi^2 = 13.604, P = 0.003$; 图 3)。与对照组生存曲线比较提示,单纯高压氧治疗($\chi^2 = 0.365, P = 0.546$)和单次尼莫司汀化疗($\chi^2 = 0.884, P = 0.347$)对荷瘤鼠的生存期无明显影响;而高压氧联合尼莫司汀治疗($\chi^2 = 9.962, P = 0.002$)可使荷瘤鼠生存期延长,而且疗效优于单纯高压氧($\chi^2 = 6.925, P = 0.008$)和单次尼莫司汀治疗($\chi^2 = 7.152, P = 0.007$)。

讨 论

恶性胶质瘤组织存在缺氧缺血状态,大量研究证实乏氧细胞群的存在是导致肿瘤治疗后复发和转移的主要原因之一^[4]。肿瘤细胞由于生长迅速、代谢旺盛,其组织内存在大量乏氧细胞群,对药物治疗具有极强的耐受性,而且在乏氧环境下生长的肿瘤细胞更易发生基因突变而成为治疗耐受性基因型,恶性程度提高,侵袭性和迁移性更强^[5]。另外,生存于乏氧区域的这些细胞对放射治疗耐受,而且缺氧还可直接影响与血管生长、细胞凋亡和糖

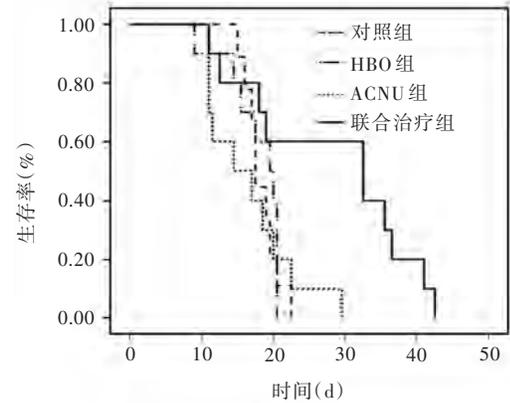


图 3 不同处理组荷瘤鼠生存曲线
Figure 3 The Kaplan-Meier survival curve of each group

酵解有关的基因表达^[5]。高压氧治疗后可明显提高荷瘤鼠肿瘤组织内的氧分压,增加组织含氧量,促进氧扩散,使乏氧细胞转变为富氧细胞,在一定时间内进行放射治疗和药物化疗可明显抑制肿瘤细胞生长,增强其对放射线的敏感性。Stuhr 等^[6]的研究显示,反复高压氧治疗能够使二甲基苯蒽诱导的肿瘤细胞产生抗血管生成效应。

因肿瘤组织缺氧限制了化疗药物的治疗效果,且经注射途径给药进入肿瘤组织内的药物成分较低,使得肿瘤组织中的乏氧区域药物浓度较低^[5]。组织缺氧被认为具有促进神经胶质瘤对放射治疗和药物化疗如替莫唑胺的耐药性^[7]。尼莫司汀可使肿瘤细胞 DNA 发生烷基化,从而阻止其 DNA 复制使肿瘤细胞停留在 S 期和 M 期,进而抑制肿瘤细胞生长。目前认为,高压氧可使处于缺氧、缺血或休眠状态的肿瘤细胞活化,乏氧细胞变为富氧细胞、G0 期细胞进入增殖期,从而增加肿瘤细胞对抗肿瘤药物的敏感性。与此同时,高压氧还可提高肿瘤细胞膜的通透性,致使抗肿瘤药物渗透进入肿瘤细胞的量增加,因而增强抗肿瘤药物的细胞毒作用^[8]。尼莫司汀属于亚硝胺类抗肿瘤药物,可溶于水和脂肪并能够透过血-脑脊液屏障,是中枢神经系统肿瘤主要化疗药物之一。本实验结果表明,化疗药物尼莫司汀联合高压氧对脑内种植 GL261 胶质瘤细胞系细胞的 C57 小鼠治疗效果显著优于单纯尼莫司汀,能够明显延长荷瘤鼠的平均生存期。Kawaoe 等^[8]认为,卡铂联合高压氧对在体肿瘤具有抑制肿瘤细胞生长的效果。Dagistan 等^[9]采用替莫唑胺联合高压氧治疗大鼠脑胶质瘤,其结果显示胶质瘤细

胞生长受到明显抑制,而且细胞增殖速度降低、细胞凋亡增加;其他实验结果亦表明高压氧联合化疗药物对肿瘤细胞具有明显的抑制作用^[10-12]。以上研究结果提示,高压氧对多种化疗药物具有增效作用。近年的研究表明,肿瘤组织内的乏氧环境是维持肿瘤干细胞“干性”的原因之一^[13],而干细胞对放射治疗和药物化疗均不敏感,因此,高压氧治疗可通过提高肿瘤组织中的氧分压和供氧水平而改变这些干细胞的生物学特性,使肿瘤细胞对化疗药物的敏感性增强。

但是,高压氧对肿瘤细胞生长的抑制作用尚存有争议。曾有文献报道,高压氧治疗可能起促进肿瘤细胞生长的作用^[14],恶性肿瘤也因而在很长一段时期内被视为高压氧治疗的禁忌证。本项实验结果证实,高压氧治疗对脑内种植 GL261 胶质瘤细胞系细胞的 C57 小鼠平均生存期无明显影响,而且我们的同期研究结果亦表明高压氧治疗对脑内种植 VX2 肿瘤荷瘤兔平均生存期无明显影响^[15]。越来越多的研究结果揭示,高压氧对肿瘤细胞的生长并无促进或抑制作用,一些特定类型和分期的肿瘤患者以高压氧作为化疗药物的辅助治疗措施可能具有良好的效果^[5]。因此,颅内恶性肿瘤不应是高压氧治疗的禁忌证。

高压氧在辅助肿瘤药物化疗中取得了一些进展,尤其对一些中枢神经系统肿瘤的辅助治疗具有良好的应用前景,治疗过程中还可减轻多种因放射治疗和药物化疗所导致的不良反应,同时提高治疗效果。高压氧对肿瘤化疗药物的增敏作用机制值得深入研究。

参 考 文 献

[1] Heys SD, Smith IC, Ross JA, et al. A pilot study with long term follow up of hyperbaric oxygen pretreatment in patients with locally advanced breast cancer undergoing neo - adjuvant chemotherapy. *Undersea Hyperb Med*, 2006, 33:33-43.

[2] Li F, Cheng Y, Lu J, et al. Photodynamic therapy boosts anti-glioma immunity in mice: a dependence on the activities of T cells and complement C3. *J Cell Biochem*, 2011, 112:3035-3043.

[3] Zhao D, Stafford JH, Zhou H, et al. Near - infrared optical imaging of exposed phosphatidylserine in a mouse glioma model. *Transl Oncol*, 2011, 4:355-364.

[4] DeClerck K, Elble RC. The role of hypoxia and acidosis in promoting metastasis and resistance to chemotherapy. *Front*

Biosci, 2010, 15:213-225.

[5] Daruwalla J, Christophi C. Hyperbaric oxygen therapy for malignancy: a review. *World J Surg*, 2006, 30:2112-2131.

[6] Stuhr LB, Raa A, Oyan AM, et al. Hyperoxia retards growth and induces apoptosis, changes in vascular density and gene expression in transplanted gliomas in nude rats. *J Neurooncol*, 2007, 85:191-202.

[7] Spence AM, Muzi M, Swanson KR, et al. Regional hypoxia in glioblastoma multiforme quantified with [18F] fluoromisonidazole positron emission tomography before radiotherapy: correlation with time to progression and survival. *Clin Cancer Res*, 2008, 14:2623-2630.

[8] Kawasoe Y, Yokouchi M, Ueno Y, et al. Hyperbaric oxygen as a chemotherapy adjuvant in the treatment of osteosarcoma. *Oncol Rep*, 2009, 22:1045-1050.

[9] Dagistan Y, Karaca I, Bozkurt ER, et al. Combination hyperbaric oxygen and temozolomide therapy in C6 rat glioma model. *Acta Cir Bras*, 2012, 27:383-387.

[10] Peng ZR, Zhong WH, Liu J, et al. Effects of the combination of hyperbaric oxygen and 5 - fluorouracil on proliferation and metastasis of human nasopharyngeal carcinoma CNE - 2Z cells. *Undersea Hyperb Med*, 2010, 37:141-150.

[11] Selvendiran K, Kuppusamy ML, Ahmed S, et al. Oxygenation inhibits ovarian tumor growth by downregulating STAT3 and cyclin-D1 expressions. *Cancer Biol Ther*, 2010, 10:386-390.

[12] Stuhr LE, Iversen VV, Straume O, et al. Hyperbaric oxygen alone or combined with 5 - FU attenuates growth of DMBA - induced rat mammary tumors. *Cancer Lett*, 2004, 210:35-40.

[13] Heddleston JM, Li Z, McLendon RE, et al. The hypoxic microenvironment maintains glioblastoma stem cells and promotes reprogramming towards a cancer stem cell phenotype. *Cell Cycle*, 2009, 8:3274-3284.

[14] Feldmeier J, Carl U, Hartmann K, et al. Hyperbaric oxygen: does it promote growth or recurrence of malignancy? *Undersea Hyperb Med*, 2003, 30:1-18.

[15] Ye XZ, Li F, Lin JK, et al. Effect of hyperbaric oxygen on growth of implanted intracerebral VX2 tumors in rabbits. *Zhongguo Lin Chuang Shen Jing Wai Ke Za Zhi*, 2011, 16:404-406. [叶信珍, 李飞, 林江凯, 等. 高压氧治疗对兔脑内种植的 VX2 肿瘤生长的影响. *中国临床神经外科杂志*, 2011, 16:404-406.]

(收稿日期:2012-11-12)

本期广告目次

申捷(齐鲁制药有限公司).....	封二
凯时(北京泰德制药股份有限公司).....	前插1
必存(南京先声东元制药有限公司).....	前插2
乐萌(成都国弘医药有限公司).....	前插3
恩必普(石药集团恩必普药业 有限公司).....	前插4
步长倍通(菏泽步长制药有限公司).....	封三
赛捷康(珠海赛隆药业有限公司).....	封四