

# 腺病毒介导野生型 *PTEN* 促胶质瘤干/祖细胞自噬活性的实验研究

赵耀东 魏子龙 张全斌 楼美清 黄强

**【摘要】** 研究背景 *PTEN* 基因为影响中枢神经系统肿瘤细胞失活的抑癌基因,既往研究发现 *PTEN* 基因与细胞自噬活性密切相关。本研究旨在探讨胶质瘤干/祖细胞 *PTEN* 基因失活是否与其自噬活性降低有关。方法 通过腺病毒介导的野生型 *PTEN* 基因转染胶质瘤干/祖细胞,免疫细胞化学染色和 Western blotting 法检测并比较转染前后胶质瘤干/祖细胞自噬活性。结果 转染野生型 *PTEN* 基因后,胶质瘤干/祖细胞胞质内可见大量微管相关蛋白 1 轻链蛋白 3 阳性颗粒,经电子显微镜鉴定为自噬小体,而且转染 *PTEN* 基因的胶质瘤干/祖细胞自噬相关基因 *Beclin-1* 表达水平显著升高。结论 胶质瘤干/祖细胞 *PTEN* 基因失活可能是其自噬活性降低的原因之一。

**【关键词】** 神经胶质瘤; 肿瘤干细胞; 基因,肿瘤抑制; 转染; 自噬; 免疫印迹法

## Adenovirus - mediated wild - type *PTEN* promoting glioma stem/progenitor cells autophagy activity

ZHAO Yao-dong<sup>1</sup>, WEI Zi-long<sup>2</sup>, ZHANG Quan-bin<sup>1</sup>, LOU Mei-qing<sup>1</sup>, HUANG Qiang<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Neurosurgery, the Tenth People's Hospital of Tongji University, Shanghai 200072, China

<sup>2</sup>Department of Neurosurgery, Shanghai Pudong Hospital, Shanghai 201300, China

<sup>3</sup>Department of Neurosurgery, the Second Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215004, Jiangsu, China

Corresponding author: LOU Mei-qing (Email: dm0920@gmail.com)

**【Abstract】** Background *PTEN* is an anti - oncogene frequently inactivating in glioma. The previous study found that *PTEN* was closely related to cellular autophagy activity. The purpose of this paper is to study whether the inactivation of *PTEN* in glioma stem/progenitor cells (GSPCs) is correlative with the low autophagic activity in GSPCs. Methods Wild-type *PTEN* genes were transferred into GSPCs mediated by adenovirus. The autophagic activity in GSPCs before or after the introduction of wild-type *PTEN* was detected by immunocytochemistry, electron microscopy, and Western blotting assay. Results After transfection of wild - type *PTEN*, a large number of microtubule - associated protein 1 light chain 3 (MAP1LC3) - positive granules could be found in the cytoplasm of GSPCs under a confocal microscopy, and these granules were demonstrated to be autophagosomes under an electron microscope. Moreover, the expression of autophagy - related gene *Beclin - 1* significantly increased after the transfection of wild - type *PTEN* gene. Conclusion The inactivation of *PTEN* in GSPCs is one reason of the low autophagic activity of GSPCs.

**【Key words】** Glioma; Neoplastic stem cells; Genes, tumor suppressor; Transfection; Autophagy; Immunoblotting

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81101909) and the Excellent Young Talent Culture Plan of Pudong New District Hygiene System, Shanghai (No. PWRq2012-39).

doi:10.3969/j.issn.1672-6731.2013.05.015

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金资助项目(项目编号:81101909);上海市浦东新区卫生系统优秀青年医学人才培养计划项目(项目编号:PWRq2012-39)

作者单位:200072 上海,同济大学附属第十人民医院神经外科(赵耀东,张全斌,楼美清);201300 上海市浦东医院神经外科(魏子龙);215004 苏州大学附属第二医院神经外科(黄强)

通讯作者:楼美清(Email:dm0920@gmail.com)

经研究证实,神经干细胞(NSCs)能够分化为脑内多种不同功能的细胞。随着肿瘤干细胞理论的提出,Singh 等<sup>[1]</sup>于 2003 年从胶质瘤细胞中分离获得脑肿瘤干细胞(BTSCs),并发现其具有许多与神经干细胞相似的干细胞特征,进而推断脑肿瘤干细胞是中枢神经系统肿瘤的起源细胞。此后,神经干细胞与脑肿瘤干细胞之间的比较研究逐渐成为热点,尤其关注二者不同的生物学特征。神经干细胞可自发地、完全地分化为神经胶质细胞和神经元,但是脑肿瘤干细胞却不具备这一特点,这是由于肿瘤干细胞的分化抑制性所致<sup>[2]</sup>。然而,二者在分化动力学上的差异,尤其是其中的作用机制尚未阐明。据认为,自噬与细胞分化关系密切<sup>[3]</sup>,我们的前期研究发现,胶质瘤干细胞自噬活性显著低于神经干细胞<sup>[4]</sup>。然而,胶质瘤干/祖细胞(GSPCs)自噬活性降低的原因尚不十分明确。有研究显示,磷脂酶和张力蛋白同系物(PTEN)具有促进细胞自噬活性的作用<sup>[5]</sup>,其表达水平降低可导致细胞自噬活性下降。我们的既往研究发现,胶质瘤干/祖细胞存在 *PTEN* 基因突变<sup>[6]</sup>。因此,阐明 *PTEN* 基因失活是否为胶质瘤干/祖细胞自噬活性降低的原因,对探究胶质瘤干/祖细胞分化抑制至关重要。目前相关文献报道较少,我们尝试在既往研究的基础上,通过基因改造技术证实 *PTEN* 基因失活为胶质瘤干/祖细胞自噬活性降低的分子机制,进而参与胶质瘤干/祖细胞的分化抑制过程。

## 材料与方 法

### 一、实验材料

1. 细胞株与腺病毒载体来源 (1)胶质瘤干/祖细胞株:胶质瘤干/祖细胞取自新鲜胶质瘤手术标本(52 岁女性患者),由苏州大学附属第二医院脑肿瘤研究室分离、体外培养、鉴定及扩增构建细胞株,长期体外传代并由该实验室保存<sup>[6]</sup>。(2)空腺病毒(Ad,5DNA)转化人胚肾细胞(QBI-293A 细胞):由中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所提供,用于腺病毒扩增。(3)腺病毒载体:携带野生型 *PTEN* 含绿色荧光蛋白(GFP)报告基因的重组腺病毒(Ad-*PTEN*),以及含绿色荧光蛋白报告基因的空腺病毒(Ad)均由苏州大学杨吉成教授惠赠。

2. 试剂与仪器 (1)主要试剂:DMEM/F12 无血

清培养基(体积比 1:1)、N2 添加剂(1:100 稀释)和终浓度为 20 ng/ml 的碱性纤维母细胞生长因子(bFGF)均购自美国 Gibco 公司。终浓度为 20 ng/ml 的表皮生长因子(EGF)由美国 Invitrogen 公司提供。免疫试剂中的 I 抗工作液[含兔抗人 PTEN(1:200)、鼠抗人微管相关蛋白 1 轻链 3(MAP1LC3,1:100)、大鼠抗人 Beclin-1(1:1000)单克隆抗体]分别购自武汉博士德生物工程有限公司、美国 MBL 公司和美国 Santa Cruze 公司,免疫组织化学检测试剂盒[含辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔(或羊抗鼠)IgG II 抗(1:2500)],以及二氨基联苯胺(DAB)显色试剂盒由上海科兴生物技术有限公司提供。(2)实验仪器:Nikon Eclipse TE2000-U 型倒置荧光显微镜(精确度:1 μm)购自日本 Nikon 公司。TCS-SP2 型激光共聚焦显微镜(精确度:0.10 μm)为德国 Leica 公司产品。JEOL-1230 型透射电子显微镜(点分辨精确度:0.24 nm、线分辨精确度:0.10 nm)购自日本电子株式会社。

### 二、实验方法

#### 1. 空腺病毒及重组腺病毒转染扩增与鉴定

(1)转染与扩增方法:以空腺病毒和重组腺病毒分别转染 70%贴壁的 QBI-293A 细胞,置含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基中体外培养 3 d,倒置荧光显微镜下观察荧光铺满 90%时收集细胞悬液,离心半径 5.50 cm、转速 2000 r/min 离心 5 min,无菌磷酸盐缓冲液冲洗细胞 3 min,细胞悬液反复冻融 3 次,离心后取上清液,经反复转染获得空腺病毒子和重组腺病毒子。(2)空腺病毒及重组腺病毒鉴定:经转染获得的病毒子再次感染 QBI-293A 细胞,48 h 后收集细胞提取总 RNA,进行逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR),上游引物序列 5'-GCG GTA CCA TGA CAG CCA TCA TCA AAG AG-3',下游引物序列 5'-CGA AGC TTT CAG ACT TTT GTA ATT TGT GT-3'。PCR 反应条件为 94 °C 4 min、94 °C 50 s、55 °C 50 s、72 °C 1 min,共 35 个循环,最终 72 °C 反应 10 min。PCR 扩增产物行 1%琼脂糖凝胶电泳,并拍照。

2. 荧光计数法检测病毒子效价 选择经体外培养生长良好的 QBI-293A 细胞,2.5%胰蛋白酶消化,细胞计数器计数,稀释至细胞密度  $100 \times 10^3$  个/ml,96 孔培养板按每孔 100 μl 接种细胞,培养 24 h 收获重组腺病毒子和空腺病毒子,稀释至细胞密度为  $0.10 \times 10^{-3}$ 、 $0.01 \times 10^{-3}$ 、 $1 \times 10^{-6}$  和  $0.10 \times 10^{-6}$  个/ml。

每一稀释浓度按照每孔 100  $\mu$ l 接种 3 孔, 37  $^{\circ}$ C、体积分数为 5% 二氧化碳培养箱培养 18 h, 倒置荧光显微镜下计数呈绿色荧光的细胞, 按照空斑形成单位 (PFU = 每孔呈绿色荧光的细胞平均数  $\times$  10 / 稀释度), 计算病毒效价。

3. *PTEN* 对胶质瘤干/祖细胞作用的观察 采用感染复数 (MOI) 为 10 的重组腺病毒和空腺病毒分别感染干细胞培养基中胶质瘤干/祖细胞, 48 h 终止培养, 分别收获感染重组腺病毒 (Ad-*PTEN*-GSPCs, 实验组) 和空腺病毒 (Ad-GSPCs, 对照组) 的胶质瘤干/祖细胞, 进行自噬活性检测。(1) 免疫细胞化学法检测 MAP1LC3 表达: 将待测胶质瘤干/祖细胞种植于预铺多聚赖氨酸玻片上, 继续培养 2 h 使细胞固定于玻片表面。弃培养基、预冷磷酸盐缓冲液洗涤 5 min ( $\times$  2 次), 甲醇、乙醇按照体积比 1 : 1 配制固定液, 室温下固定 20 min, 磷酸盐缓冲液洗涤 5 min ( $\times$  2 次), 0.1% Triton-X 100 孵育 10 min, 磷酸盐缓冲液洗涤 5 min ( $\times$  2 次); 1% 牛血清白蛋白 (BSA) 封闭液室温孵育 1 h, 磷酸盐缓冲液洗涤 5 min ( $\times$  2 次)。滴加适量以封闭液稀释的抗 MAP1LC3 I 抗, 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜; 磷酸盐缓冲液洗涤 5 min ( $\times$  3 次), 滴加经 Cy3 耦联的 IgG II 抗, 室温避光孵育 2 h; 磷酸盐缓冲液洗涤 5 min ( $\times$  3 次), 0.50  $\mu$ g/ml 4, 6-二脒基-2-苯基吡啶 (DAPI) 孵育 10 min。分别以体积分数为 50%、70%、95% 和 100% 乙醇梯度脱水, 盖玻片覆盖, 自然晾干, 激光共聚焦显微镜下观察胶质瘤干/祖细胞形态, 并拍照。(2) 透射电子显微镜观察: 将待测胶质瘤干/祖细胞以浓度为 0.10 mol/L 的戊二醛溶液于 4  $^{\circ}$ C 固定 2 h, 磷酸盐缓冲液冲洗后以 1% 锇酸固定 30 min, 乙醇梯度脱水, 70% 丙酮配制的饱和醋酸铀溶液脱水、过夜。环氧树脂包埋、固化, 钻石刀切割制作超薄组织切片, 镍网收集, 枸橼酸铅染色 8 min 后观察自噬小体。

4. Western blotting 法检测 *PTEN* 基因及 Beclin-1 表达变化 (1) 检测方法: Ad-*PTEN*-GSPCs 组和 Ad-GSPCs 组胶质瘤干/祖细胞加入 1 ml 磷酸盐缓冲液混匀, 离心半径 5.50 cm、转速 2000 r/min 离心 5 min、弃上清液, 重复上述步骤, 按照 1 : 5 比例加入十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 上样缓冲液混匀, 煮沸 10 min 进行电泳。取出分离胶于转移缓冲液中将分离胶上的蛋白质转移至硝酸纤维素 (NC) 膜, 经 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 滴加兔抗人 *PTEN* 或大鼠抗人 Beclin-1 单克隆抗体 (I 抗), 37  $^{\circ}$ C

孵育 1.50 h, TBST 缓冲液 [含 10 mmol/L Tris-HCl (pH 值 7.50)、100 mmol/L NaCl、0.50 和 1 g/L Tween-20] 洗膜 5 min ( $\times$  3 次), 加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 (或羊抗鼠) IgG II (1 : 2500) 室温孵育 1 h、TBST 缓冲液洗膜 5 min ( $\times$  3 次), 化学发光法显影于 X 线胶片, 15 min 后进行显影和定影。(2) 结果判断: 根据目的基因条带密度值, 半定量计算 *PTEN* 和 Beclin-1 表达丰度。

### 三、统计分析方法

本实验中计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 行两独立样本的 *t* 检验。以  $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

### 一、空腺病毒及重组腺病毒鉴定

空腺病毒及重组腺病毒反复感染 QBI-293A 细胞后, 倒置荧光显微镜下可见 QBI-293A 细胞呈绿色荧光, 提示病毒骨架携带绿色荧光蛋白报告基因 (图 1), 两种病毒效价均达  $1 \times 10^9$  PFU/ml。RT-PCR 提示, 经重组腺病毒感染的 QBI-293A 细胞含有大量 *PTEN* 基因转录, 而空腺病毒则未见该现象 (图 2)。

### 二、空腺病毒及重组腺病毒转染胶质瘤干/祖细胞

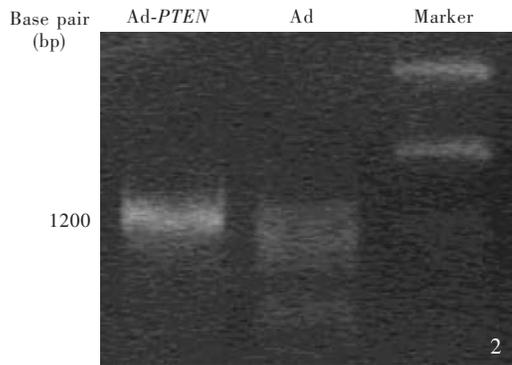
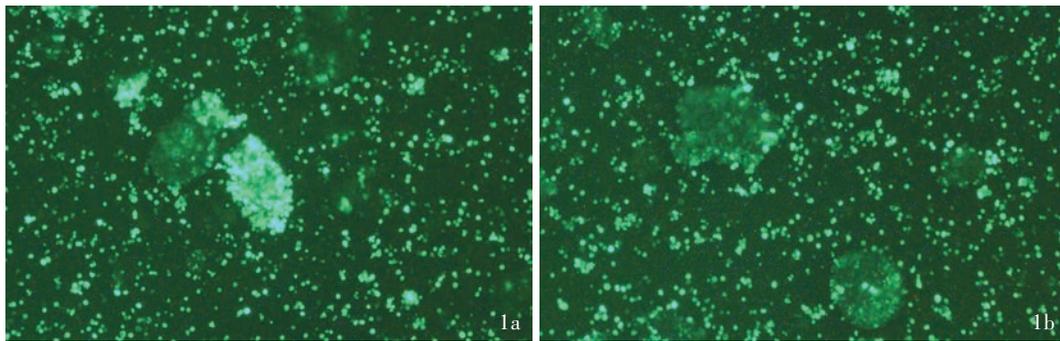
空腺病毒及重组腺病毒分别转染胶质瘤干/祖细胞后 48 h, 于倒置荧光显微镜下可见两组细胞均呈绿色荧光 (图 3), 提示腺病毒转染胶质瘤干/祖细胞获得成功。Western blotting 检测显示, Ad-*PTEN*-GSPCs 组细胞 *PTEN* 基因表达水平显著高于 Ad-GSPCs 组 (图 4)。

### 三、*PTEN* 促胶质瘤干/祖细胞自噬活性观察

免疫细胞化学染色显示, Ad-GSPCs 组细胞胞质内罕见 MAP1LC3 + 点状结构 (图 5a), 而 Ad-*PTEN*-GSPCs 组细胞胞质内可见较多 MAP1LC3 + 点状结构 (图 5b)。透射电子显微镜观察, Ad-GSPCs 组细胞胞质内罕见自噬小体 (图 6a), 而 Ad-*PTEN*-GSPCs 组细胞胞质内自噬小体丰富 (图 6b)。Western blotting 检测可见, Ad-*PTEN*-GSPCs 组细胞 Beclin-1 表达水平高于 Ad-GSPCs 组 (图 7)。提示野生型 *PTEN* 基因能够提高胶质瘤干/祖细胞自噬活性。

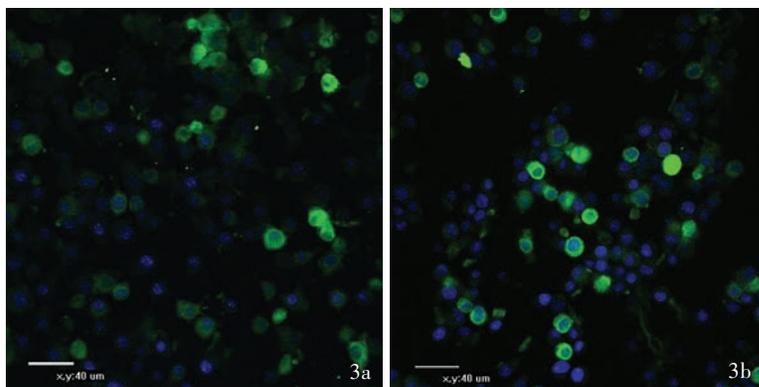
## 讨 论

自噬系指从粗面内质网无核糖体附着区脱落的双层膜包裹部分胞质和细胞内需降解的细胞器、



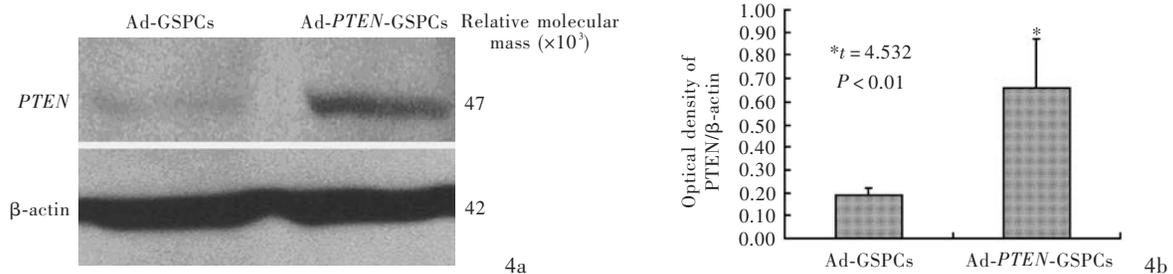
**图 1** 倒置荧光显微镜观察所见 ×40 1a 空腺病毒转染 QBI-293A 细胞后呈绿色荧光 1b 重组腺病毒转染 QBI-293A 细胞后呈绿色荧光 **图 2** 琼脂糖凝胶电泳显示,重组腺病毒在 1200 bp 位置上出现目的电泳条带,而空腺病毒未见相应电泳条带

**Figure 1** Inverted fluorescence microscopic findings. ×40 Green fluorescence from QBI-293A cells infected with blank adenovirus (Panel 1a). Green fluorescence from QBI-293A cells infected with recombinant adenovirus (Panel 1b). **Figure 2** RT-PCR proved the transcription of *PTEN* in QBI-293A cells infected with recombinant adenovirus with a target band about 1200 bp at size.



**图 3** 倒置荧光显微镜观察 (标尺: 40 μm) 3a Ad-GSPCs 组胶质瘤干/祖细胞呈绿色荧光 3b Ad-*PTEN*-GSPCs 组胶质瘤干/祖细胞呈绿色荧光

**Figure 3** Inverted fluorescence microscopic findings (scale: 40 μm). Green fluorescence was shown in GSPCs infected with blank adenovirus (Panel 3a). Green fluorescence was shown in GSPCs infected with recombinant adenovirus (Panel 3b).



**图 4** Western blotting 分析显示, Ad-*PTEN*-GSPCs 组胶质瘤干/祖细胞胞质中 *PTEN* 基因呈高表达, 且显著高于 Ad-GSPCs 组 4a 聚丙烯酰胺凝胶电泳 4b 电泳条带的半定量分析

**Figure 4** Western blotting analysis showed that expression of *PTEN* in Ad-*PTEN*-GSPCs was significantly higher than that of Ad-GSPCs. Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE, Panel 4a). Semiquantitative analysis of electrophoretic bands (Panel 4b).

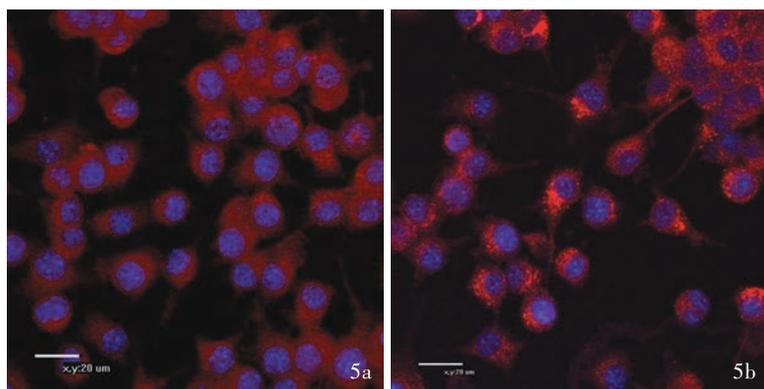


图5 于激光共聚焦显微镜下观察胶质瘤干/祖细胞的自噬活性 免疫细胞化学染色(标尺: 20 μm) 5a Ad-GSPCs 组胶质瘤干/祖细胞胞质罕见 MAP1LC3+ 点状结构 5b Ad-PTEN-GSPCs 组胶质瘤干/祖细胞胞质可见大量 MAP1LC3+ 点状结构

Figure 5 Autophagic activities observed in GSPCs. Immunocytochemical staining (scale: 20 μm) Rare MAP1LC3+ dots in cytoplasm of Ad-GSPCs group cells (Panel 5a). Abundant MAP1LC3+ dots in cytoplasm of Ad-PTEN-GSPCs group cells (Panel 5b).

图6 透射电子显微镜观察胶质瘤干/祖细胞自噬活性 枸橼酸铅染色(标尺: 20 μm) 6a Ad-GSPCs 组胶质瘤干/祖细胞胞质内未发现明显自噬小体 6b Ad-PTEN-GSPCs 组胶质瘤干/祖细胞胞质内自噬小体丰富(箭头所示)

Figure 6 Transmission electron microscopic (TEM) observation. Plumbum citrate staining (scale: 20 μm) No obvious autophagosomes in Ad-GSPCs (Panel 6a). Abundant autophagosomes (arrows indicate) in GSPCs infected with Ad-PTEN (Panel 6b).

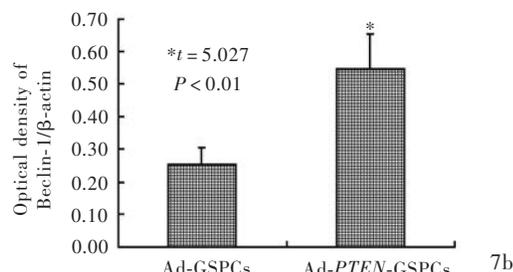
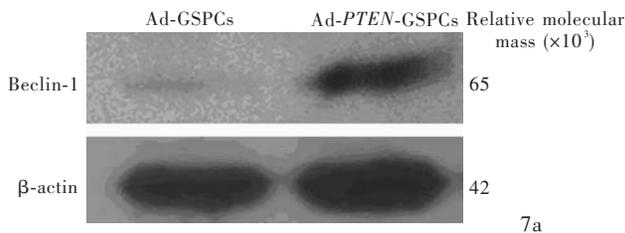
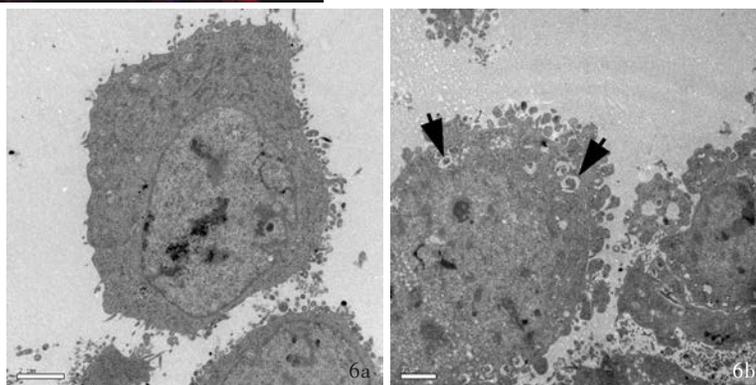


图7 Western blotting 分析显示, Ad-PTEN-GSPCs 组胶质瘤干/祖细胞胞质中 Beclin-1 表达水平显著高于 Ad-GSPCs 组 7a 聚丙烯酰胺凝胶电泳 7b 电泳条带的半定量分析

Figure 7 Western blotting analysis showed that expression of Beclin-1 in Ad-PTEN-GSPCs was obviously higher than that in Ad-GSPCs. Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE, Panel 7a). Semiquantitative analysis of electrophoretic bands (Panel 7b).

蛋白质等成分形成自噬体,并与溶酶体融合形成自噬溶酶体,降解其所包裹的内容物,以实现细胞本身的代谢需要和某些细胞器的更新<sup>[7]</sup>。多项研究表明,自噬与细胞分化发育密切相关<sup>[3]</sup>。然而,我们的前期研究发现,胶质瘤干/祖细胞自噬活性显著降低<sup>[4]</sup>,也是胶质瘤干/祖细胞分化受到抑制的原因之一。然而,其深层分子机制尚待进一步探讨。有研究表明,自噬在肿瘤中的作用似“双刃剑”,肿瘤组织缺氧时,自噬通过动员肿瘤细胞内长寿蛋白分解为细胞提供营养,进而“度过难关”,此时对肿瘤细胞的增殖呈“正性作用”;但是,过度自噬则可诱发

肿瘤细胞死亡,进而起“负性作用”。然而,既往有关肿瘤干细胞的“小生境(niche)”理论认为,肿瘤干细胞主要生长在血管周围,与血管内皮细胞共同构成其生存小生境<sup>[7]</sup>,一般不存在缺氧的风险。故自噬对肿瘤干细胞的作用以负性为主,对胶质瘤干/祖细胞亦是如此。结合我们既往研究的胶质瘤干/祖细胞自噬活性降低<sup>[4]</sup>,因此认为,提高胶质瘤干/祖细胞自噬活性,无论是通过动员分化还是增加细胞死亡均能起到抑制肿瘤增殖之目的。同样,其深层次的分子机制值得进一步研究。

PTEN 基因具有促进细胞自噬活性的作用,其

作为一种脂质磷酸酶可将其底物 3,4,5-三磷酸磷脂酰肌醇(PIP<sub>3</sub>)转化为 4,5-二磷酸磷脂酰肌醇(PIP<sub>2</sub>),进而对磷脂酰肌醇 3-激酶(PI<sub>3</sub>K)-Akt 信号转导通路发挥负向调控作用。该通路涉及多种下游事件,包括抑制凋亡、经雷帕霉素靶蛋白(mTOR)通路刺激蛋白质合成等<sup>[8]</sup>。*PTEN* 基因突变引起的细胞功能缺失、PI<sub>3</sub>K 和 Akt 表达水平升高是人类肿瘤频发事件。Akt 途径激活使肿瘤细胞自噬活性下降,相反,Akt 活性降低则可促进细胞自噬作用。据此推测,胶质瘤干/祖细胞是否存在 *PTEN* 基因失活而引起自噬活性降低,进而成为胶质瘤干/祖细胞分化抑制的分子机制。在我们的前期实验中,已于体外构建了野生型 *PTEN* 基因的空腺病毒载体(Ad-*PTEN*),通过转染野生型 *PTEN* 基因<sup>[2]</sup>,实现后者在胶质瘤干/祖细胞的正常表达,进而研究其自噬活性的变化。

本研究结果表明,转染空腺病毒的胶质瘤干/祖细胞胞质内可见大量 MAP1LC3 阳性颗粒,经透射电子显微镜观察证实为自噬小体,而转染空腺病毒的胶质瘤干/祖细胞未发现上述现象。与此同时,通过 Western blotting 半定量检测方法对两组胶质瘤干/祖细胞 Beclin-1 表达水平进行检测,结果显示,转染重组腺病毒的胶质瘤干/祖细胞 Beclin-1 表达水平显著升高。*Beclin-1* 为自噬过程所必须的抑癌基因<sup>[9]</sup>,*Beclin-1*/PI<sub>3</sub>K-III 复合物参与自噬小体形成,以及自噬的启动。因此,检测胶质瘤干/祖细胞 Beclin-1 表达水平可间接反映自噬活性。然而,唯有通过透射电子显微镜观察到自噬小体方是检测自噬活性的金标准。本研究结果显示,转染重组腺病毒的胶质瘤干/祖细胞胞质中存在大量自噬小体,而转染空腺病毒的胶质瘤干/祖细胞则鲜见自噬小体,提示胶质

瘤干/祖细胞自噬活性降低与 *PTEN* 基因失活有关。

由于本研究仅观察了胶质瘤干/祖细胞自噬活性变化,研究结果十分局限,因此对于自噬活性在分化增殖的胶质瘤细胞中的变化,以及 *PTEN* 基因对普通的胶质瘤细胞能够产生何种作用,尚待今后进一步研究。

#### 参 考 文 献

- [1] Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, Dirks P. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res*, 2003, 63:5821-5828.
- [2] Zhang QB, Ji XY, Huang Q, Dong J, Zhu YD, Lan Q. Differentiation profile of brain tumor stem cells: a comparative study with neural stem cells. *Cell Res*, 2006, 16:909-915.
- [3] Zeng M, Zhou JN. Roles of autophagy and mTOR signaling in neuronal differentiation of mouse neuroblastoma cells. *Cell Signal*, 2008, 20:659-665.
- [4] Zhao Y, Huang Q, Zhang T, Dong J, Wang A, Lan Q, Gu X, Qin Z. Ultrastructural studies of glioma stem cells/progenitor cells. *Ultrastruct Pathol*, 2008, 32:241-245.
- [5] Amaravadi RK, Lippincott-Schwartz J, Yin XM, Weiss WA, Takebe N, Timmer W, DiPaola RS, Lotze MT, White E. Principles and current strategies for targeting autophagy for cancer treatment. *Clin Cancer Res*, 2011, 17:654-666.
- [6] Zhao YD, Zhang QB, Lou MQ, Huang Q. Research of *PTEN* mutation in glioma stem/progenitor cells. *Zhongguo Xian Dai Shen Jing Ji Bing Za Zhi*, 2010, 10:646-651. [赵耀东, 张全斌, 楼美清, 黄强. *PTEN* 在胶质瘤干/祖细胞中变异状态的研究. *中国现代神经疾病杂志*, 2010, 10:646-651.]
- [7] Calabrese C, Poppleton H, Kocak M, Hogg TL, Fuller C, Hamner B, Oh EY, Gaber MW, Finklestein D, Allen M, Frank A, Bayazitov IT, Zakharenko SS, Gajjar A, Davidoff A, Gilbertson RJ. A perivascular niche for brain tumor stem cells. *Cancer Cell*, 2007, 11:69-82.
- [8] Shintani T, Klionsky DJ. Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science*, 2004, 306:990-995.
- [9] Wang RC, Wei Y, An Z, Zou Z, Xiao G, Bhagat G, White M, Reichelt J, Levine B. Akt-mediated regulation of autophagy and tumorigenesis through Beclin 1 phosphorylation. *Science*, 2012, 338:956-959.

(收稿日期:2013-04-18)

## 欢迎订阅 2013 年《中国现代神经疾病杂志》

《中国现代神经疾病杂志》为国家卫生和计划生育委员会主管、中国医师协会主办的神经病学类专业期刊。办刊宗旨为:理论与实践相结合、普及与提高相结合,充分反映我国神经内外科临床科研工作重大进展,促进国内外学术交流。所设栏目包括述评、专论、论著、临床病理报告、应用神经解剖学、神经影像学、综述、短篇论著、临床医学图像、学术争鸣、病例报告、临床病理(例)讨论、新技术新方法、技术改进、临床药理学、药物与临床、会议纪要以及国外研究动态等。

《中国现代神经疾病杂志》为国家科技部中国科技论文统计源期刊,国内外公开发行。中国标准连续出版物号:ISSN 1672-6731;CN 12-1363/R。国际大 16 开型,彩色插图,48 页,月刊,每月 25 日出版。每期定价 15 元,全年 12 册共计 180 元。2013 年仍由邮政局发行,邮发代号:6-182。请向全国各地邮政局订阅,亦可直接向编辑部订阅(免邮寄费)。

编辑部地址:天津市河西区气象台路 122 号天津市环湖医院内,邮政编码:300060。

联系电话:(022)60367623;传真:(022)60367927。