

39 - 45

- 7 Perros P, Boelaert K, Colley S, *et al.* Guidelines for the management of thyroid cancer[J]. Clin Endocrinol: Oxf, 2014, 81(1): 1 - 122
- 8 Sun B, Lang L, Zhu X, *et al.* Accuracy of contrast - enhanced ultrasound in the identification of thyroid nodules: a meta - analysis[J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8: 12882 - 12889
- 9 Ma X, Zhang B, Ling W, *et al.* Contrast - enhanced sonography for the identification of benign and malignant thyroid nodules: Systematic review and meta - analysis[J]. J Clin Ultrasound, 2016, 44(4): 199 - 209
- 10 Yu D, Han Y, Chen T. Contrast - enhanced ultrasound for differentiation of benign and malignant thyroid lesions: meta - analysis[J]. Otolaryngol Head Neck Surg, 2014, 151: 909 - 915
- 11 Giusti M, Campomenosi C, Gay S, *et al.* The use of semi - quantitative ultrasound elastosonography in combination with conventional ultrasonography and contrast - enhanced ultrasonography in the assessment of malignancy risk of thyroid nodules with indeterminate cytology[J]. Thyroid Res, 2014, 7: 9
- 12 Cantisani V, Consorti F, Guerrisi A, *et al.* Prospective comparative evaluation of quantitative - elastosonography (Q - elastography) and contrast - enhanced ultrasound for the evaluation of thyroid nodules: preliminary experience[J]. Eur J Radiol, 2013, 82: 1892 - 1898
- 13 Liang XN, Guo RJ, Li S, *et al.* Binary logistic regression analysis of solid thyroid nodules imaged by high - frequency ultrasonography, acoustic radiation force impulse, and contrast - enhanced ultrasonography[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2014, 18: 3601 - 3610
- 14 Zhang B, Jiang YX, Liu JB, *et al.* Utility of contrast - enhanced ultrasound for evaluation of thyroid nodules[J]. Thyroid, 2010, 20: 51 - 57
- 15 Haugen BRM, Alexander EK, Bible KC, *et al.* 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for adult patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer[J]. Thyroid, 2016, 26(1): 1 - 133
- 16 Wu Q, Wang Y, Li Y, *et al.* Diagnostic value of contrast - enhanced ultrasound in solid thyroid nodules with and without enhancement. Endocrine, 2016, epub ahead of print
- 17 Yuan Z, Quan J, Yunxiao Z, *et al.* Association between real - time contrast - enhanced ultrasound characteristics and thyroid carcinoma size[J]. Mol Clin Oncol, 2015, 3: 743 - 746
- 18 Hu Y, Li P, Jiang S, *et al.* Quantitative analysis of suspicious thyroid nodules by contrast - enhanced ultrasonography[J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8: 11786 - 11793
- 19 Jiang J, Huang L, Zhang H, *et al.* Contrast - enhanced sonography of thyroid nodules[J]. J Clin Ultrasound, 2015, 43: 153 - 156

(收稿日期:2016 - 03 - 30)

(修回日期:2016 - 04 - 07)

人胶质瘤自杀基因细胞系的建立及其在胶质瘤治疗研究中的应用

米蕊芳 金贵善 张俊文 周益强 徐恒周 程 森 刘福生

摘 要 **目的** 构建 CD 基因工程化人脑胶质瘤细胞并在此基础上进行胶质瘤治疗研究。**方法** 通过 In - fusion 基因克隆的方法,构建携带 CD 基因慢病毒载体;通过 293T 细胞体外包装获得慢病毒,并测定病毒效价;通过慢病毒体外感染细胞获得 CD 基因工程化人脑胶质瘤细胞;通过流式分选获得基因稳定表达细胞;通过 CCK - 8 评价加入 5 - FC 前药和(或)HSV - 1 后细胞存活率。**结果** 成功构建 pLVX - CD - IRES - ZsGreen1 慢病毒载体并体外包装获得相应慢病毒;慢病毒感染人脑胶质瘤 U87 细胞后获得携带 CD 基因的阳性细胞,并通过体外培养 30 天后流式分选获得稳定阳性细胞;加入前药 5 - FC 和(或)HSV - 1 后对携带 CD 基因的 U87 细胞杀伤作用明显($P < 0.01$),其中 5 - FC 联合 HSV - 1 对胶质瘤细胞作用更加高效($P < 0.01$)。**结论** 成功获得携带 CD 基因的人脑胶质瘤细胞;前药 5 - FC 联合 HSV - 1 对胶质瘤细胞具有更加高效的杀伤疗效。

关键词 胶质瘤 CD 基因 HSV - 1 U87 细胞

中图分类号 R73 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.05.011

Therapeutic Effect of the Established Glioma Cells Carrying Cytosine Deaminase Suicide Gene. Mi Ruifang, Jin Guishan, Zhang Junwen, *et al.* Brain Tumor Research Center, Beijing Neurosurgical Institute, Beijing Tiantan Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100050, China

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81302186,81372354);北京市自然科学基金资助项目(7151002);北京市医院管理局青年人才培养“青苗”计划(QML20150505);北京市神经外科研究所创新基金资助项目(所青年 - 2014 - 003)

作者单位:100050 首都医科大学附属北京天坛医院、北京市神经外科研究所脑肿瘤研究中心

通讯作者:刘福生,电子信箱:liufushengs@hotmail.com

Abstract Objective To research on the glioma therapy based on the established human glioma cell carrying CD gene. **Methods** CD gene was inserted to the pLVX - IRES - ZsGreen1 lentivirus vector using the In - fusion gene clone method. The lentivirus was packaged and its titer was detected in 293T cells. The glioma cells carrying CD gene were obtained by infected them with the pLVX - CD - IRES - ZsGreen1 lentivirus following the fluorescence activated cell sorting (FACS). The cell survival rate was evaluated when adding the prodrug 5 - FC or/and HSV - 1 using the CCK - 8 method. **Results** The lentivirus vector pLVX - CD - IRES - ZsGreen1 was successfully constructed and the lentivirus was packaged in vitro in 293T cells and then infected the U87 cells. The U87 cells carrying CD gene was successfully obtained following FACS after cultured in vitro for 30 days. The inhibition effect was significant when adding the prodrug 5 - FC or/and HSV - 1 to the U87 - CD cells ($P < 0.01$). And the cytotoxic effect of combined usage of 5 - FC and HSV - 1 was significantly enhanced compared to usage of 5 - FC or HSV - 1 alone ($P < 0.01$). **Conclusion** We successfully obtained the glioma cells carrying CD gene. And the efficacy was enhanced when combined use of the prodrug 5 - FC and the oncolytic virus HSV - 1 in the glioma cells carrying CD gene.

Key words Glioma; CD gene; HSV - 1; U87 cell

脑胶质瘤是颅内最常见的肿瘤,约占颅内原发肿瘤的 45%,组织病理学分 4 级,其中Ⅲ级和Ⅳ级为高级别胶质瘤。由于胶质瘤在脑内呈弥漫浸润性生长并且胶质瘤干细胞(GSCs)对放疗及化疗耐受性等原因,经过手术、放疗和化疗等综合治疗仍有较高的复发率,其中位生存期分别为Ⅲ级 18 个月及Ⅳ级 12 个月,迫切需要探讨新的治疗方法^[1,2]。

基因治疗是一个非常具有前景的治疗方法,主要涉及两个方面:一方面是如何有效地将治疗基因转染到靶细胞,另一方面是如何维持治疗基因的持久表达。胞嘧啶脱氨酶(cytosine deaminase, CD)基因依赖的将前药 5 - 氟胞嘧啶(5 - FC)转变成 5 - 氟尿嘧啶(5 - FU)的系统属于自杀基因(suicide gene)治疗的一种,5 - FU 能够干扰肿瘤细胞的 DNA 复制,从而引起增殖的肿瘤细胞死亡^[3~6]。

溶瘤病毒是新近开展的治疗脑胶质瘤方法之一,到目前为止应用溶瘤性 - 选择复制型单纯疱疹病毒(HSV - 1)治疗脑胶质瘤已经进入了临床Ⅰ期/Ⅱ期临床试验。通过对溶瘤病毒进行基因工程改造,可达到病毒在肿瘤细胞中选择性复制的目的,在治疗过程中只杀伤肿瘤细胞而不会对正常细胞造成损害^[7~9]。

材料与方法

1. 材料:U87 人脑胶质瘤细胞株购自中国医学科学院。pAdTrack - CMV - CD, pLVX - IRES - ZsGreen1 质粒保存于本实验室。

2. pLVX - CD - IRES - ZsGreen1 载体构建:以 pAdTrack - CMV - CD 质粒为模板,PCR 扩增 CD 基因(1284bp),引物序列为 CD - F:5' - TATTTCCGGTGAATTCATGTCTGAATAACGCTTTACA - 3'; CD - R:5' - CCGCGGCCGCTCTAGATCAACGTTTGTAAATCGATGG - 3',将 CD 基因两端添加 EcoR I/Xba 酶切位点,

EcoR I/Xba 双酶(中国 TaKaRa 公司)切 pLVX - IRES - ZsGreen1 载体。进一步通过 In - Fusion 基因克隆的方法将 CD 基因克隆到 pLVX - IRES - ZsGreen1 载体的多克隆位点区域,构建成功的克隆提取 2 个质粒测序,测序结果显示插入序列正确。

3. 体外包装慢病毒:培养 293T 细胞至对数生长期,收集细胞,接种 5×10^6 的 293T 细胞至 100mm 细胞培养皿中,置于细胞培养箱培养过夜,待细胞融合率约 80%,应用 Lipo2000 转染试剂将目的载体,包装载体(pMDL、pVSVG 以及 pREV)转染 293T 细胞。48h 收集病毒上清,900r/min 5min 离心;用 0.45 μ m 滤器过滤离心后的病毒上清,25000r/min 离心 2.5 h,然后用 DMEM 液体重选,置入 - 80℃ 冰箱备用。病毒效价采用逐级稀释法进行测定,将病毒原液以 1/10 梯度不断稀释,感染 96 孔板中的 293T 细胞,48h 后观察荧光表达情况,具有荧光表达的细胞随病毒的稀释逐渐减少,找到没有荧光表达的临界病毒稀释浓度,计算病毒效价。病毒效价为病毒颗粒数/ml。

4. 慢病毒感染实验:将包装好的目的慢病毒以及对照慢病毒感染胶质瘤细胞 U87,将慢病毒加入到 U87 细胞中(MOI = 1),并于加入慢病毒 48 ~ 72h 后,观察病毒的荧光表达情况。

5. 流式分选实验:带有阳性荧光标记的细胞通过流式分选仪(Becton - Dickinson, Stockholm, Sweden)来分选。所分选细胞用含 20% FBS 和双倍双抗的 DMEM 液收集。收集后立即培养于正常的培养液中。

6. HSV - 1 溶瘤病毒制备及效价测定:Vero 细胞在细胞培养瓶中汇合至 80% ~ 90% 时,从细胞培养瓶中吸出培养基,使用 PBS 漂洗细胞后弃 PBS,以病毒感染复数(multiplicity of infection, MOI)0.1 的 HSV - 1 病毒接种 Vero 细胞,在饱和湿度 5% CO₂、

37℃条件下吸附 30min 后加入含 2% FBS 的 DMEM 细胞培养基至细胞 80% ~ 90% 病变后收获病毒。病毒效价测定:感染病毒前 20h 以 1×10^4 个细胞/200 μ l 的密度将 Vero 细胞接种于 96 孔板中,完全培养基培养。待细胞贴壁完全后,弃去原有培养基,每孔加入 100 μ l 含有 4% FBS 的 DMEM 培养基。将收获得到的 HSV-1 病毒用无血清 DMEM 培养基进行 10 倍的连续倍比稀释($1:1 \sim 1:10^8$)后取不同稀释度的病毒液以每孔 100 μ l 的体积加入已铺种有 Vero 细胞的各个细胞孔中,混匀后正常培养 5 ~ 7 天后观察细胞病变情况。发生细胞病变效应的孔为阳性,未发生的孔为阴性。使用 Reed and Muench 公式计算病毒效价 TCID₅₀:距离比例 = (高于 50% 病变率的百分数 - 50%) / (高于 50% 病变率的百分数 - 低于 50% 病变率的百分数)。LgTCID₅₀ = 距离比例 $\times$ 稀释度对数之间的差 + 高于 50% 病变率的稀释度的对数。TCID₅₀ = $10^{\text{LgTCID}_{50}}$ / 0.1 ml, 即该病毒稀释 $10^{\text{LgTCID}_{50}}$ 倍接种 100 μ l 可使 50% 细胞发生病变。

7. CCK-8 细胞增殖实验:分选后的细胞接种到 96 孔板中(3×10^3 / 孔),第 2 天加入 5-FC (20 μ g/ml)

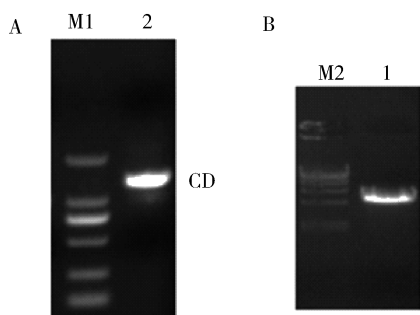


图 1 携带 CD 基因慢病毒载体的构建

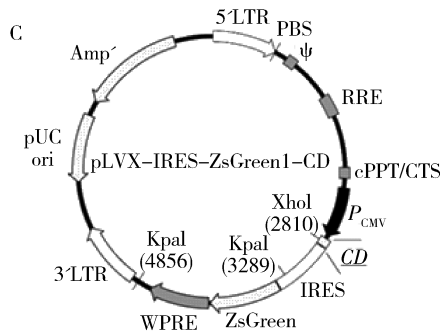
A. PCR 得到 CD 基因,两端添加 EcoR I 和 Xba I 酶切位点;M1. DL2000 DNA Marker; B. EcoR I 和 Xba I 双酶切 pLVX-IRES-ZsGreen1 载体; M2. λ -Hind III digest DNA marker; C. 慢病毒载体 pLVX-IRES-CD-ZsGreen 慢病毒载体模式图,CD 基因插入到慢病毒载体的 IRES 区域

或/和 HSV-1 (MOI = 0.1),加药后 48 h,向每孔中 (100 μ l 培养液)加入 10 μ l CCK-8 (日本 Dojindo Molecular Technologies 公司),常规条件下孵育 1h,酶标仪 (荷兰 Labsystems Dragon 公司)570nm 测定 A 值。

8. 统计学方法:采用 SPSS 16.0 软件进行统计分析,数据应用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, P 采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. CD 基因工程化慢病毒载体构建:设计并合成引物,通过 PCR 的方法分别从相应质粒中得到 CD 基因 (1284bp, 图 1A),PCR 片段两端分别携带 EcoR I/Xba I 酶切位点。并通过 EcoR I/Xba I 双酶切 pLVX-IRES-ZsGreen1 载体,得到酶切片段 (8.2kb, 图 1B)。进一步通过 In-Fusion 分子克隆的方法,将 CD 基因插入到酶切后的 pLVX-IRES-ZsGreen1 载体中,得到 pLVX-CD-IRES-ZsGreen1 载体 (图 1C),提取质粒测序显示插入序列正确。表明 CD 基因插入到载体的多克隆位点 (multiple cloning sites, MCS) 区域,并且与 ZsGreen 基因通过 IRES 相连,细胞在表达 ZsGreen 绿色荧光的同时,也会有 CD 基因的表达。



2. 携带 CD 基因慢病毒体外成功感染人胶质瘤细胞:U87 细胞分别是人源的胶质瘤细胞系,是胶质瘤体外研究常用的细胞模型。通过体外慢病毒包装,在体外成功得到携带有 CD 基因的慢病毒。将此慢病毒感染人脑胶质瘤细胞 U87,感染后 48h 可见大部分胶质瘤细胞有绿色荧光表达,感染效率高 ($> 80\%$, 图 2)。

3. 获取稳定表达 CD 基因的人脑胶质瘤细胞:将慢病毒 (携带 CD) 感染后的胶质瘤细胞传代培养 4 周,可见绿色荧光阳性的细胞明显减少,通过流式分选出绿色荧光表达胶质瘤细胞 (同时表达 CD 基因,

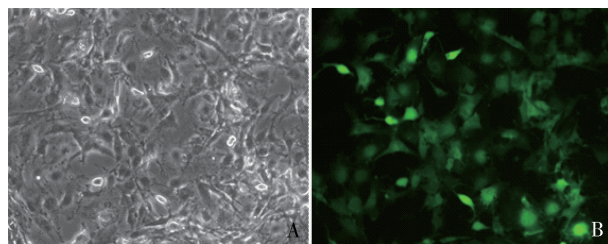


图 2 慢病毒感染人脑胶质瘤细胞 U87 后绿色荧光表达情况 ($\times 200$)

A. 光镜下感染 CD 基因慢病毒后的 U87 细胞;
B. 绿色荧光显微镜下感染 CD 基因慢病毒后的 U87 细胞

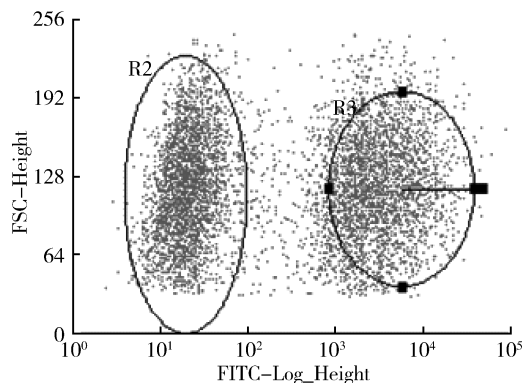


图 3 U87-CD 基因稳定表达细胞系获取及鉴定

流式分选携带绿色荧光的人脑胶质瘤 U87-CD 细胞(R3 群细胞)

图 3A),得到稳定表达 CD 基因的人脑胶质瘤细胞。在分选得到的 U87-CD 细胞中,加入前药 5-FC,细

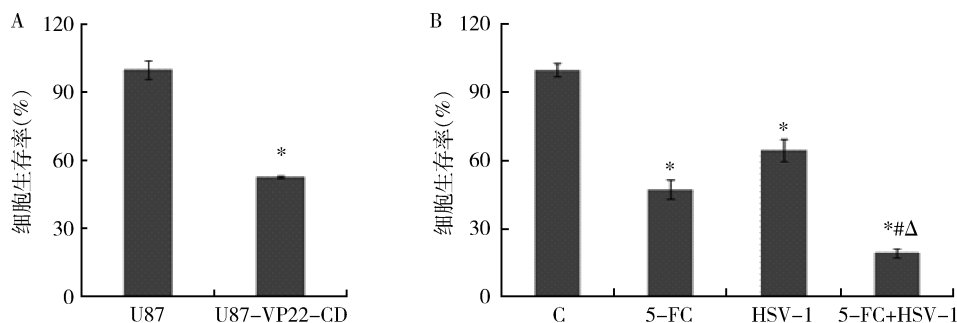


图 4 U87-CD 细胞中加入前药 5-FC 和(或)HSV-1 后细胞毒性实验

A. U87 或 U87-CD 细胞中加入 5-FC(20 μg/ml)后细胞存活率;B. U87-CD 细胞中加入 5-FC 和(或)HSV-1(MOI=0.1)后细胞存活状态;与对照组相比,* $P < 0.01$;与 5-FC 组相比,* $P < 0.01$;与 HSV-1 组相比,Δ $P < 0.01$;n=3

讨 论

脑胶质瘤起源于神经上皮组织,占颅内肿瘤的 40%~50%,是一种神经系统最常见的恶性肿瘤。胶质瘤分为星形胶质细胞瘤、少突胶质细胞瘤、室管膜瘤、髓母细胞瘤、多形性胶质细胞瘤等。应用传统完全手术切除加术后的放射性治疗并替莫唑胺化疗方案,患者的中位生存期大约只有 1.5 年,迫切需要探讨新的治疗方法^[1,2]。

胞嘧啶脱氨酶(cytosine deaminase, CD)基因依赖的将 5-FC 转变成 5-FU 的系统属于自杀基因(suicide gene)治疗的一种。该系统在临床中也得到了广泛的研究,能够强烈的诱导“旁观者效应”^[3-6]。本研究构建携带 CD 基因的胶质瘤细胞,从而在此基础上达到更好的杀伤疗效。

溶瘤性 HSV-1 是研究最广泛的病毒之一。在胶质瘤细胞系中的应用,溶瘤性 HSV-1 比腺病毒更为有效,更为得到实验者的认可。其原因主要在于它

胞对药物敏感,死亡明显,说明分选中的细胞有胞嘧啶脱氨酶(CD)的表达(图 4A)。

4. 前药 5-FC 联合 HSV-1 治疗人脑胶质瘤体外实验研究:在分选得到的 U87-CD 细胞中加入前药 5 氟胞嘧啶(5-FC),5-FC 可在胞嘧啶脱氨酶作用下转化为有毒性的 5 氟尿嘧啶(5-FU),加药 48h 后的 MTT 实验显示,U87 细胞对 5-FC 药物敏感,在低药物浓度下(20 μg/ml),与对照组 U87 细胞相比,细胞的死亡明显(图 4A);在此细胞中加入 HSV-1,联合 5-FC 细胞进行治疗,发现 5-FC 药物和 HSV-1 在 U87-CD 细胞后具有协同效应,对胶质瘤细胞的杀伤效果明显大于单独加 5-FC 药物和 HSV-1 治疗组(图 4B)。

能感染大多数类型的肿瘤细胞,具有比较大的基因组(152kb)能够允许一个较大的或者多重的转移基因插入并且有易得的抗病毒药物(该病毒对阿昔洛韦和更昔洛韦均敏感)。到目前为止,溶瘤性 HSV 通过删除非必需基因及插入治疗基因等基因改造,已发展到第 3 代。第 1 代包括 HSV-1F 株、1716、NV1020(R7020),第 2 代为 G207,第 3 代为 G47Δ。多种病毒株的临床前及临床 I/II 期表明该病毒安全性良好并能够显著抑制多种恶性肿瘤的生长,其后续的研究工作正密切进行中^[7-9]。

本研究通过慢病毒感染的方法得到了携带 CD 基因的人脑胶质瘤细胞,在此基础上联合前药 5-FC 及 HSV-1 治疗胶质瘤,在溶瘤病毒的溶瘤过程当中,结合 CD/5-FC 系统的药物杀伤作用以及溶瘤病毒在胶质瘤细胞中不断复制扩增的双重优势,从而达到了协同杀伤胶质瘤细胞的效果,为胶质瘤的治疗提供新的思路和方法。

(下转第 151 页)

有研究显示,在糖尿病早期, β 细胞代偿增生,但由于 α 细胞存在胰岛素抵抗,导致 Gg 相对增加;随着病程进展, β 细胞存在不同程度衰竭,对 α 细胞的抑制作用减弱,导致 Gg 增高^[11,12]。本研究也与英国(UKPDS)的研究结果一致,提示 2 型糖尿病在诊断后 7~10 年 C 肽水平才降低,胰岛功能才表现出明显的衰竭^[13]。

本研究结果显示,糖尿病 FPG 与糖化血红蛋白水平与胰岛 α 细胞功能呈正相关。糖化血红蛋白与血糖浓度呈正比,对于糖尿病患者来讲,FBG 对糖化血红蛋白贡献非常大。FPG 受多种因素影响,研究认为 Gg/胰岛素是调节 FBG 水平的主要因素,正常人餐后 30min 时胰岛素水平迅速升高 10 倍,此时无论 Gg 是否受抑制均可导致门静脉 Gg/胰岛素明显下降,维持正常血糖^[14,15]。而在 T2DM 患者由于胰岛素第一时相分泌减弱,胰岛素仅升高 2~3 倍,无法有效抑制 Gg 的分泌,导致 Gg/胰岛素异常升高,从而加剧了高血糖。

综上所述,胰岛素抵抗和胰岛素分泌不足导致了胰岛素对胰高血糖素的抑制减弱,出现高胰高血糖素血症;血中 Gg 增加,使血糖升高,胰岛素的生物效应下降,胰岛素抵抗进一步加重;胰岛素对胰高血糖素的抑制进一步减弱,血糖更加难以控制,形成恶性循环,这是 2 型糖尿病发病的重要机制。目前对胰岛 β 细胞功能的研究已取得较大成就,但要打破此循环,获得 2 型糖尿病的突破性进展,调控 Gg 的药物的应用及后续研究将起重要作用。

参考文献

- 1 邓尚平. 提高胰岛 β 细胞功能的临床检测水平[J]. 中华内分泌代谢杂志,1999,15(2): 65-66
- 2 Bansal P, Wang Q. Insulin as a physiological modulator of glucagon secretion[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab,2008,295(4):751-761

(上接第 49 页)

参考文献

- 1 Meyer MA. Malignant gliomas in adults[J]. New England Journal of Medicine,2008,359(17):1850
- 2 Chen J, McKay RM, Parada LF. Malignant glioma: lessons from genomics, mouse models, and stem cells[J]. Cell,2012,149(1):36-47
- 3 Murphy AM, Rabkin SD. Current status of gene therapy for brain tumors[J]. Translat Res,2013,161(4):339-354
- 4 Duarte S, Carle G, Faneca H, et al. Suicide gene therapy in cancer: where do we stand now? [J]. Cancer Lett,2012,324(2):160-170
- 5 Ostertag D, Amundson KK, Lopez EF, et al. Brain tumor eradication and prolonged survival from intratumoral conversion of 5-fluorocytosine to 5-fluorouracil using a nonlytic retroviral replicating vector[J]. Neuro-Oncol,2012,14(2):145-159

- 3 Brunicardi FC, Kleinman R, Moldovan S, et al. Immunoneutralization of somatostatin, insulin and glucagon causes alterations in islet cell secretion in the isolated perfused human pancreas[J]. Pancreas,2001,23(3):302-308
- 4 Salehi A, Vieira E, Gylfe E. Paradoxical stimulation of glucagon secretion by high glucose concentrations[J]. Diabetes,2006,55(8):2318-2323
- 5 Abdul-Ghani M, DeFronzo RA. Fasting hyperglycemia impairs glucose-but not insulin-mediated suppression of glucagon secretion[J]. J Clin Endocrinol Metab,2007,92(5):1778-1784
- 6 杨篷,韩玉麒,程晓芸,等. 胰高血糖素与 2 型糖尿病的相关性研究[J]. 同济大学学报:医学版,2005,26(06):50-53
- 7 刘俊,郭毅,刘晴,等. 超重、肥胖与 2 型糖尿病相关性的 Meta 分析[J]. 中国循证医学杂志,2013,13(2):190-195
- 8 牟晓华,王家琳. 肥胖型 2 型糖尿病胰岛素抵抗机制及治疗研究[J]. 中医药临床杂志,2015,12(08):1063-1066
- 9 Arce-Cerezo A, Garcia M, Rodriguez-Nuevo A, et al. HMGA1 overexpression in adipose tissue impairs adipogenesis and prevents diet-induced obesity and insulin resistance[J]. Sci Rep,2015,5(3):144-187
- 10 Araujo EP, Amaral ME, Souza CT, et al. Blockade of IRS1 in isolated rat pancreatic islets improves glucose-induced insulin secretion[J]. FEBS Lett,2002,531(3):437-442
- 11 杜菲菲,李社莉. 从病理生理学上探讨胰高血糖素与 2 型糖尿病[J]. 医学综述,2014,20(20):3768-3770
- 12 Quesada I, Tuduri E, Ripoll C, et al. Physiology of the pancreatic alpha-cell and glucagon secretion: role in glucose homeostasis and diabetes[J]. J Endocrinol,2008,199(1):5-19
- 13 UK Prospective Diabetes Study (UKPDS). XI: Biochemical risk factors in type 2 diabetic patients at diagnosis compared with age-matched normal subjects[J]. Diabet Med,1994,11(6):534-544
- 14 Sloop KW, Michael MD, Moyers JS. Glucagon as a target for the treatment of type 2 diabetes[J]. Expert Opin Ther Targets,2005,9(3):593-600
- 15 Meier JJ, Kjems LL, Veldhuis JD, et al. Postprandial suppression of glucagon secretion depends on intact pulsatile insulin secretion: further evidence for the intra-islet insulin hypothesis[J]. Diabetes,2006,55(4):1051-1056

(收稿日期:2015-12-06)

(修回日期:2015-12-17)

- 6 Jin G, Zhou Y, Chai Q, et al. VP22 and cytosine deaminase fusion gene modified tissue-engineered neural stem cells for glioma therapy[J]. J Cancer Res Clin Oncol,2013,139(3):475-483
- 7 Wakimoto H, Kesari S, Farrell C J, et al. Human glioblastoma-derived cancer stem cells: establishment of invasive glioma models and treatment with oncolytic herpes simplex virus vectors[J]. Cancer Res,2009,69(8):3472-3481
- 8 Zhu G, Su W, Jin G, et al. Glioma stem cells targeted by oncolytic virus carrying endostatin-angiostatin fusion gene and the expression of its exogenous gene in vitro[J]. Brain Res,2011,1390:59-69
- 9 Zhang GB, Jin GS, Nie XT, et al. Enhanced antitumor efficacy of an oncolytic herpes simplex virus expressing an endostatin-angiostatin fusion gene in human glioblastomas stem cell xenografts[J]. PLoS One,2014,9(4):e95872

(收稿日期:2015-12-09)

(修回日期:2015-12-23)