论著

文章编号:1000-5404(2010)09-0938-05

神经营养因子酪氨酸激酶受体B对人永生化成骨细胞hFOB1.19恶性转化细胞体外侵袭力的影响

曾 静,温 磊,黄玉胜,戴欢子,郭乔楠 (400038 重庆,第三军医大学西南医院病理学研究所)

【摘要】 目的 研究神经营养因子酪氨酸激酶受体B(neurotrophic tyrosine kinase receptor B,TrKB)对恶性转化人永生化成骨细胞hFOB1.19体外侵袭力的影响,探讨TrKB在骨肉瘤侵袭和转移机制中发挥的作用。方法 RT-PCR和免疫荧光细胞染色检测hFOB1.19恶性转化细胞和SaOS-2骨肉瘤细胞中TrKB的mRNA和蛋白表达水平;进一步研究hFOB1.19恶性转化细胞中TrKB的功能,处理组hFOB1.19恶性转化细胞加入特异性酪氨酸激酶抑制剂K252a处理24 h,非处理组加入DMSO作对照,倒置相差显微镜下观察细胞形态;Transwell侵袭实验检测细胞侵袭能力;actin免疫荧光细胞染色检测细胞微丝骨架。结果 TrKB在hFOB1.19恶性转化细胞中mRNA和蛋白表达水平均明显高于SaOS-2骨肉瘤细胞($P<0.05$);K252a处理组hFOB1.19恶性转化细胞和未处理组相比,细胞变圆、聚集甚至发生融合,侵袭能力明显减弱($P<0.01$),微丝回缩变短,排列紊乱。结论 人永生化成骨细胞hFOB1.19恶性转化细胞中TrKB的高表达可促进该细胞的体外高侵袭力;该受体被阻断后,可能通过改变细胞微丝骨架结构从而降低细胞的体外侵袭力;TrKB可能在骨肉瘤侵袭和转移机制中起着促进作用。

【关键词】 神经营养因子酪氨酸激酶受体B;K252a;骨肉瘤;微丝;侵袭;转移

【中图法分类号】 R341;R730.23;R738.1 【文献标志码】 A

Effect of neurotrophic tyrosine kinase receptor B on *in vitro* invasiveness of malignant transformed hFOB1.19 cells

Zeng Jing, Wen Lei, Huang Yusheng, Dai Huanzi, Guo Qiaonan (Institute of Pathology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

【Abstract】 Objective To study the effect of neurotrophic tyrosine kinase receptor B (TrKB) on *in vitro* invasiveness of malignant transformed hFOB1.19 cells and the role of TrKB in invasion and metastasis of osteosarcoma. Methods Expression of TrKB in malignant transformed hFOB1.19 cells and SaOS-2 osteosarcoma cells was detected by RT-PCR and immunofluorescence. Function of TrKB of malignant transformed hFOB1.19 cells was further studied. Malignant transformed hFOB1.19 cells were treated with specific tyrosine kinase inhibitor K252a for 24 h as a treatment group, and untreated malignant transformed hFOB1.19 cells into which DMSO was added served as a control group. Morphology of cells was observed under an inverted phase contrast microscope. Cell invasiveness was detected by Transwell assays. Microfilaments of cells were detected by actin immunofluorescence. Results The expression of TrKB was significantly higher in malignant transformed hFOB1.19 cells than in SaOS-2 osteosarcoma cells ($P<0.05$). The cells in treatment group became round, aggregated, and even fused compared to those in control group. The cell invasiveness was significantly lower in treatment group than in control group ($P<0.01$). The microfilaments of cells were shorter and more disordered in arrangement in treatment group than in control group. Conclusion High expression level of TrKB in malignant transformed hFOB1.19 cells can increase the *in vitro* invasiveness of such cells. Blockage of TrKB can decrease the *in vitro* invasiveness of malignant transformed hFOB1.19 cells by changing their microfilament structure. TrKB may play a positive role in invasion and metastasis of osteosarcoma.

【Key words】 neurotrophic tyrosine kinase receptor B;K252a;osteosarcoma;microfilament;invasion;metastasis

Corresponding author:Guo Qiaonan,Tel:86-23-68754433, E-mail:qiaonan85@263.net

神经营养因子酪氨酸激酶受体B(neurotrophic tyrosine kinase receptor B,TrKB)是一种酪氨酸激酶受

【通信作者】 郭乔楠,电话:(023)68754433, E-mail:qiaonan85@263.net

体,属于神经营养因子受体家族,和其配体 BDNF 结合,在神经系统的发育和功能发挥方面起着重要的作用,在促进肿瘤侵袭转移等方面也有着重要意义。已有的研究发现 TrKB 在肝癌、肺癌、甲状腺癌、前列腺癌、神经母细胞瘤等多种恶性肿瘤中表达普遍升高[1-5]。我们前期研究发现,骨肉瘤中也普遍存在 TrKB 高表达,在复发转移病例中,TrKB 的表达更是明显升高。我们通过检测本室建立的高度恶性、高致瘤能力的人永生化成骨细胞 hFOB1.19 恶性转化细胞和无成瘤能力的 SaOS-2 骨肉瘤细胞中 TrKB 的mRNA和蛋白表达水平,用特异性酪氨酸激酶抑制剂 K252a 处理 hFOB1.19 恶性转化细胞,比较处理组细胞和未处理组细胞的侵袭力和细胞微丝骨架的改变,探讨 TrKB 在骨肉瘤侵袭、转移机制中所发挥的作用。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

hFOB1.19 恶性转化细胞是由本室以 MNNG 作启动剂,佛波酯(12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate,TPA)作促进剂对人永生化成骨细胞 hFOB1.19 进行恶性转化而建立的一种高度恶性、高致瘤能力的骨肉瘤样细胞系[6],SaOS-2 骨肉瘤细胞(一种低度恶性、无成瘤能力的骨肉瘤细胞系,ATCC),Trizol、逆转录试剂盒和 PCR 扩增试剂盒(TaKaRa),PCR 引物由 TaKaRa 公司合成,TrKB 兔抗人多克隆抗体(Chemicon),罗丹明标记山羊抗兔 IgG 和 FITC 标记山羊抗小鼠 IgG(中杉金桥),Hochest 33258 和抗荧光淬灭封片液(碧云天),K252a(Gibco),Transwell 小室(Millipore),ECM(Sigma),β-actin 鼠抗人多克隆抗体(博奥森)。

1.2 细胞培养

hFOB1.19 恶性转化细胞和 SaOS-2 骨肉瘤细胞培养在含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基中(含 100 U/ml 青霉素,100 U/ml 链霉素),37 ℃,5% CO_2常规培养传代。

1.3 RT-PCR 检测 hFOB1.19 恶性转化细胞和 SaOS-2 细胞中的 TrKB mRNA 水平

Trizol 法分别提取 hFOB1.19 恶性转化细胞和 SaOS-2 细胞的总 RNA,Thermo 酶标仪测其浓度和纯度,按照 TaKaRa 公司的逆转录试剂盒说明逆转录成 cDNA,PCR 条件如下:94 ℃预变性 2 min,94 ℃变性 30 s,59 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 2 min,35 个循环,72 ℃延伸 10 min,4 ℃冷却。PCR 引物根据 GenBank 中提供的基因序列,用 Primer Premier 5.0 设计:TrKB 上游 5′-CCTGCTTCACGATTCTTAC-3′,下游 5′-TGTCTTTGTTCCTCCCATA-3′,扩增片段长度 414 bp;GAPDH:上游 5′-GAGCCAAAAGGGTCATCATCTC-3′,下游 5′-AAAGGTGGAGGAGTAAATATC-3′,扩增片段长度 542 bp。1% 琼脂糖凝胶,DNA 凝胶电泳电压为 100 V,时间为 40 min。PCR 产物采用 Bio-Rad 凝胶图像扫描仪采集图像,Quantity One 软件分析灰度值。

1.4 免疫荧光细胞染色检测 TrKB 的蛋白表达水平

细胞爬片制备:待细胞长至 80% 时,0.25% 胰酶 +0.02% EDTA 消化收集细胞,DMEM 培养基重悬,调整浓度为 3×10^5/ml,将无菌盖玻片放入 24 孔培养板中,将细胞悬液在滴在盖玻片上各一滴,37 ℃,5% CO_2培养约 2 h 后,观察细胞已贴壁,各补 1 ml DMEM 培养基,放回培养箱继续培养过夜。免疫荧光染色:弃去培养液基,PBS 漂洗 5 min×3 次,4% 多聚甲醛 4 ℃固定 30 min,PBS 漂洗 5 min×3 次,0.02% Triton X-100 透膜 15 min,PBS 漂洗 5 min×3 次,山羊血清工作液封闭,37 ℃ 20 min,弃去封闭血清,TrKB 兔抗人多克隆抗体(1∶2 000 稀释),阴性对照用 PBS 代替一抗,37 ℃ 1 h,然后 4 ℃过夜,PBS 漂洗 5 min×3 次,罗丹明标记山羊抗兔 IgG(1∶200 稀释),37 ℃ 40 min,PBS 漂洗 5 min×3 次,Hochest33258 衬染细胞核 15 min,PBS 漂洗 5 min×5 次,抗荧光淬灭封片液封片。激光共聚焦显微镜下观察采集图像,IPP6.0 软件分析光密度值。

1.5 K252a 处理细胞

K252a 用 DMSO 溶解,配成 1 mg/ml,-20 ℃储存,使用时用 PBS 稀释成工作液。hFOB1.19 恶性转化细胞长至 80%,生长状态良好,弃去培养基,PBS 漂洗 3 遍,更换新鲜培养基,处理组加入 2×10^{-6} K252a(3.8 μl),非处理组加入 3.8 μl DMSO,放入培养箱中培养 24 h[7],倒置显微镜下观察采集图像,细胞用于下一步实验。

1.6 Transwell 检测侵袭能力

-20 ℃过夜预冷离心管、移液器吸头及 24 孔培养板,冰上操作,ECM 用无血清 DMEM 1∶1稀释,将稀释的 ECM 平铺在小室的滤膜上(约 20 μg/小室),37 ℃温育过夜。胰酶消化收集 K252a 处理组和非处理组细胞,分别用无血清 DMEM 重悬,浓度都调整为 3×10^6/ml,下室加入含 10% 小牛血清的 DMEM 600 μl,上室加入 200 μl 细胞悬液,放入培养箱中培育 24 h。取出小室,PBS 漂洗 5 min×3 次,用棉签拭去 ECM 及未穿过的细胞,4% 多聚甲醛 4 ℃固定 30 min,PBS 漂洗 5 min×3 次,结晶紫染色 15 min,蒸馏水漂洗至水完全变清,倒置显微镜下观察,随机采集 7 个视野,计数细胞。

1.7 actin 免疫荧光细胞染色

胰酶消化收集 K252a 处理组和非处理组细胞,分别用含 10% 小牛血清的 DMEM 重悬,调整细胞数为 3×10^5/ml,β-actin 鼠抗人多克隆抗体(1∶200 稀释),阴性对照用 PBS 代替一抗,FITC 标记山羊抗小鼠 IgG(1∶200 稀释),细胞爬片、免疫荧光染色方法和激光共聚焦采图同 1.4。

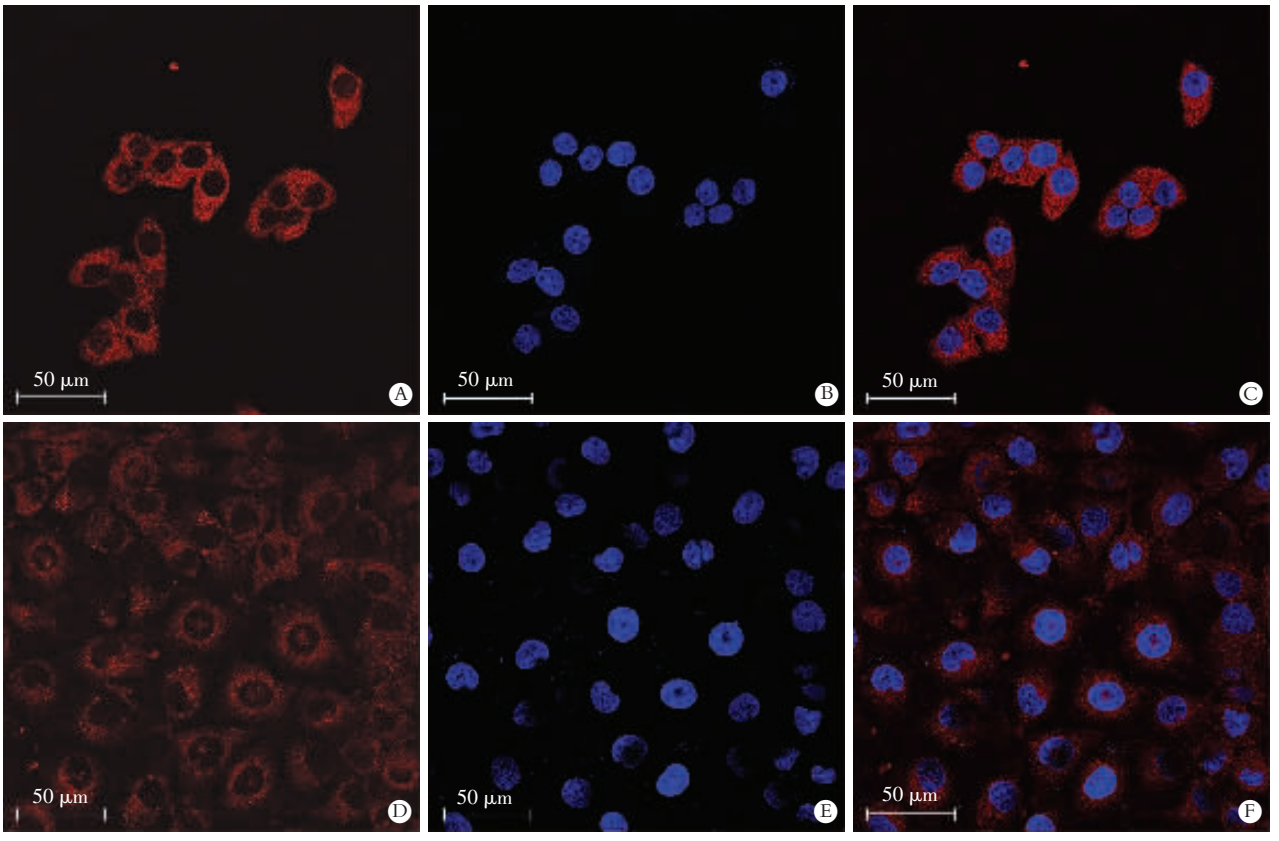
1.8 统计学处理

数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,计数资料 2 组间比较采用 χ^2 检验,计量资料 2 组间比较采用 t 检验。所有数据在 SPSS 13.0 统计软件中进行分析。

2 结果

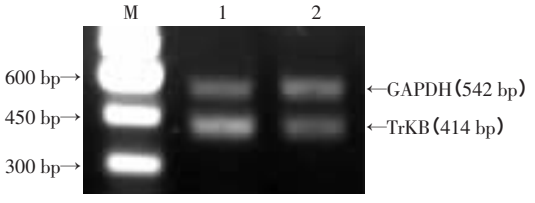
2.1 hFOB1.19 恶性转化细胞和 SaOS-2 骨肉瘤细胞中 TrKB mRNA 和蛋白表达水平

高度恶性、高致瘤能力的 hFOB1.19 恶性转化细胞中 TrKB mRNA 和蛋白表达均高于低度恶性、无成瘤能力的 SaOS-2 骨肉瘤细胞(核酸电泳灰度值比 1.36∶0.92,免疫荧光光密度值比 233∶205,$P<0.05$,图 1、2)。TrKB 蛋白表达定位于 hFOB1.19 恶性转化细胞和 SaOS-2 骨肉瘤细胞的细胞质和细胞核。



A～C:hFOB1.19 恶性转化细胞;D～F:SaOS-2 骨肉瘤细胞;A、D:TrKB 表达定位和表达强度;B、E:Hochest33258 衬染细胞核;C、F:TrKB 与细胞核合成

图1 免疫荧光细胞染色检测 hFOB1.19 恶性转化细胞和 SaOS-2 细胞中 TrKB 蛋白的表达 (激光共聚焦显微镜)

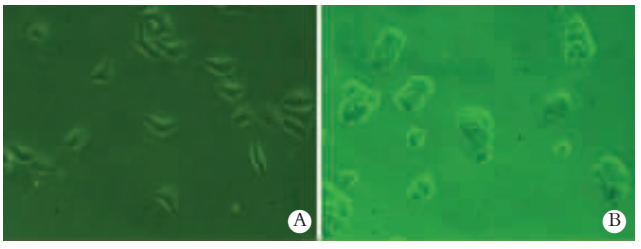


M:DNA 标准;1:hFOB1.19 恶性转化细胞;2:SaOS-2 骨肉瘤细胞

图2 RT-PCR 检测 hFOB1.19 恶性转化细胞和 SaOS-2 细胞中 TrKB mRNA 表达

2.2 非处理组和 K252a 处理组 hFOB1.19 恶性转化细胞的形态差异

如图3所示,倒置显微镜下观察非处理组 hFOB1.19 恶性转化细胞呈多角形,贴壁24 h时细胞分散生长,细胞间边界清晰,细胞间有较多突起连接。K252a 处理组 hFOB1.19 恶性转化细胞变圆,贴壁24 h时2～15个细胞聚集成簇,单个细胞轮廓不清,细胞分界消失。

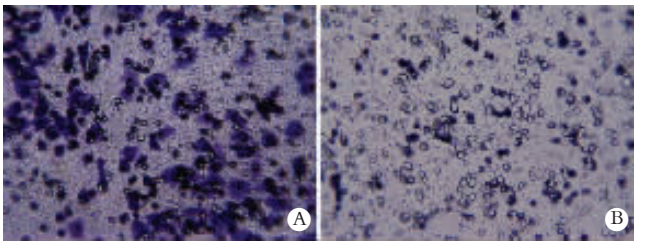


A:非处理组;B:K252a 处理组

图3 非处理组和 K252a 处理组 hFOB1.19 恶性转化细胞形态学观察 (倒置显微镜 ×400)

2.3 非处理组和 K252a 处理组 hFOB1.19 恶性转化细胞侵袭力差异

Transwell 侵袭实验检测非处理组和 K252a 处理组 hFOB1.19 恶性转化细胞侵袭力差异,结果显示,24 h后穿过 ECM 的细胞数,非处理组为(76.29 ± 14.61),明显高于 K252a 处理组[(2.29 ± 1.11),$P<0.01$,图4]。

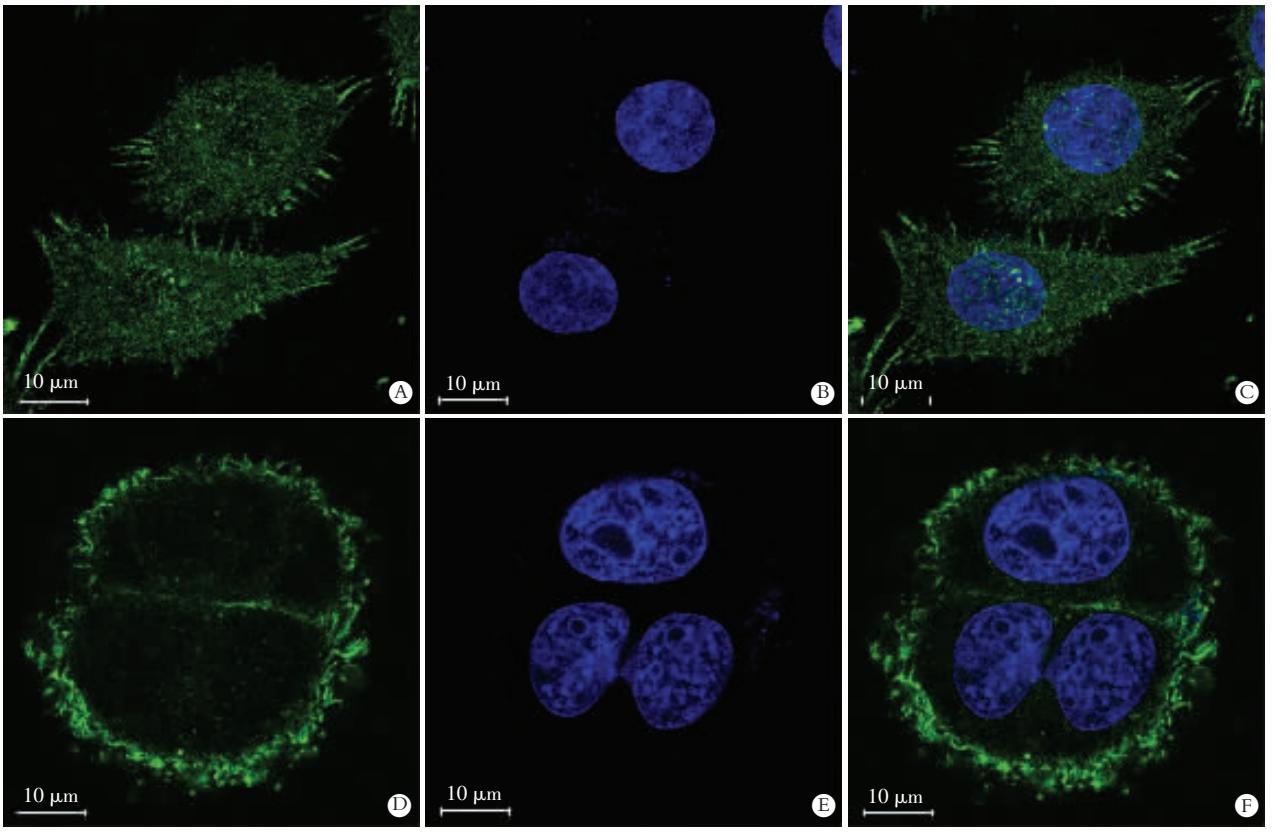


A:非处理组;B:K252a 处理组

图4 Transwell 侵袭实验检测非处理组和 K252a 处理组 hFOB1.19 恶性转化细胞的侵袭能力 (倒置显微镜 ×400)

2.4 非处理组和 K252a 处理组 hFOB1.19 恶性转化细胞 actin 免疫荧光染色显示微丝骨架的改变

如图5所示,非处理组 hFOB1.19 恶性转化细胞呈多角形,界限清晰(和倒置相差显微镜观察一致),细胞微丝较长,分布规则,细胞间有较多微丝相互交接。K252a 处理组 hFOB1.19 恶性转化细胞呈圆形,2～15个细胞聚集成簇,胞间界限模糊或消失(和倒置相差显微镜观察一致),甚至有胞核融合现象,微丝回缩变短,排列紊乱。



A～C：非处理组；D～F：K252a 处理组；A、D：actin 免疫荧光染色；B、E：Hochest33258 衬染细胞核；C、F：actin 与细胞核合成

图 5 actin 免疫荧光染色检测非处理组和 K252a 处理组 hFOB1.19 恶性转化细胞微丝骨架的差异

3 讨论

神经营养因子酪氨酸激酶受体 TrKB，是神经营养因子受体癌家族中的一员。在抑制细胞失巢凋亡、促进肿瘤形成和转移等方面有着重要的意义。Douma 等[8] 用大鼠肠上皮细胞进行研究，做了遗传功能筛选，发现 TrKB 是一种失巢凋亡抵抗基因，TrKB 赋予细胞迁移、异位附着、转移瘤生成及瘤内新血管生成等癌细胞生存、侵袭和转移的特性。Douma 等[8] 用转染后稳定表达 TrKB 受体的鼠肠上皮细胞，静脉途经注入裸鼠体内，发现 TrKB 阳性细胞可转化为恶性细胞，且能在循环系统中存活，移居至裸鼠的肺和心脏并在局部形成快速生长的肿瘤[9-15]。TrKB 与恶性肿瘤发生和转移的关系的研究多集中于上皮类型的肿瘤，不同类型肿瘤间的发病和转移机制有很大差异，而关于 TrKB 在肉瘤中的作用和地位的研究很少。骨肉瘤是骨最常见的原发性恶性肿瘤，好发于青少年，早期即易发生肺转移，预后较差，是严重危害青少年健康的恶性肿瘤之一。骨肉瘤的发生和转移与基因异常表达有一定相关性。

我们前期研究发现，在骨的良性病变骨软骨瘤中几乎不表达 TrKB，而骨肉瘤中却普遍存在 TrKB 的过表达，尤其在复发和局部侵袭病例中，TrKB 表达水平更是明显升高。本研究发现，hFOB1.19 恶性转化细胞这种体外成瘤的骨肉瘤样细胞系中也存在 TrKB 的高表达。用特异性酪氨酸激酶抑制剂 K252a 处理该细胞，阻断 TrKB 下游的信号通路后，和未处理组细胞相比，细胞变圆、聚集甚至发生融合，折光性差，细胞的侵袭能力也随之明显减弱。actin 免疫荧光细胞染色检测细胞微丝骨架，发现处理组细胞微丝回缩变短，排列紊乱，多细胞聚集，细胞间界限模糊或消失，甚至有胞核融合现象。肿瘤细胞的浸润、转移与微丝及其相关蛋白有关，微丝的异常聚合可增强肿瘤细胞的运动能力[16]。而以微丝及其相关调节蛋白为靶点的药物如细胞松弛素阻止肌动蛋白聚合成微丝，从而减少微丝的形成，影响微丝的功能，可用于抗肿瘤治疗。人永生化成骨细胞系 hFOB1.19 恶性转化细胞中神经营养因子酪氨酸激酶受体 TrKB 的高表达可促进该细胞的体外高侵袭力；该受体被阻断后，可能通过改变细胞微丝骨架结构从而降低细胞的体外侵袭力；TrKB 可能在骨肉瘤侵袭、转移机制中起着促进作用，针对 TrKB 为靶点的抗肿瘤治疗存在着巨大潜能。TrKB 改变细胞骨架，促进骨肉瘤侵袭、转移的分子机制值得我们进一步研究。

参考文献：

[1] Edsjo A, Lavenius E, Nilsson H, *et al*. Expression of trkB in human

neuroblastoma in relation to MYCN expression and retinoic acid treatment[J]. Lab Invest, 2003, 83(6): 813-823.

[2] McGregor L M, McCune B K, Graff J R, *et al*. Roles of trk family neurotrophin receptors in medullary thyroid carcinoma development and progression[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 96(8): 4540-4545.

[3] Yang Z F, Ho D W, Lam C T, *et al*. Identification of brain-derived neurotrophic factor as a novel functional protein in hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Res, 2005, 65(1): 219-225.

[4] Dionne C A, Camoratto A M, Jani J P, *et al*. Cell cycle-independent death of prostate adenocarcinoma is induced by the trk tyrosine kinase inhibitor CEP-751 (KT6587)[J]. Clin Cancer Res, 1998, 4(8): 1887-1898.

[5] Ricci A, Graziano P, Mariotta S, *et al*. Neurotrophin system expression in human pulmonary carcinoid tumors[J]. Growth Factors, 2005, 23(4): 303-312.

[6] 温磊, 孟刚, 李懿, 等. 人骨肉瘤抗失巢凋亡细胞的生物学特性研究[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(10): 942-945.

[7] Takai N, Ueda T, Nishida M, *et al*. K252a is highly effective in suppressing the growth of human endometrial cancer cells, but has little effect on normal human endometrial epithelial cells[J]. Oncol Rep, 2008, 19(3): 749-753.

[8] Douma S, Van-Laar T, Zevenhoven J, *et al*. Suppression of anoikis and induction of metastasis by the neurotrophic receptor TrkB[J]. Nature, 2004, 430(7003): 1034-1039.

[9] Klein R, Nanduri V, Jing S A, *et al*. The trkB tyrosine protein kinase is a receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3[J]. Cell, 1991, 66(2): 395-403.

[10] Nakamura K, Martin K C, Jackson J K, *et al*. Brain-derived neurotrophic factor activation of TrkB induces vascular endothelial growth factor expression *via* hypoxia-inducible factor-1alpha in neuroblastoma cells[J]. Cancer Res, 2006, 66(8): 4249-4255.

[11] Geiger T R, Peeper D S. The neurotrophic receptor TrkB in anoikis resistance and metastasis: a perspective[J]. Cancer Res, 2005, 65(16): 7033-7036.

[12] Schneider R, Schweiger M. A novel modular mosaic of cell adhesion motifs in the extracellular domains of the neurogenic trk and trkB tyrosine kinase receptors[J]. Oncogene, 1991, 6(10): 1807-1811.

[13] Middlemas D S, Meisenhelder J, Hunter T. Identification of TrkB autophosphorylation sites and evidence that phospholipase C-gamma 1 is a substrate of the TrkB receptor[J]. J Biol Chem, 1994, 269(7): 5458-5466.

[14] Nonomura T, Kubo T, Oka T, *et al*. Signaling pathways and survival effects of BDNF and NT-3 on cultured cerebellar granule cells[J]. Brain Res Dev Brain Res, 1996, 97(1): 42-50.

[15] 苏立新, 张陈平. 肿瘤失巢凋亡的研究进展[J]. 国际口腔医学杂志, 2006, 33(5): 387-389.

[16] Pawlak G, Helfman D M. Cytoskeletal changes in cell transformation and tumorigenesis[J]. Curr Opin Gen Dev, 2001, 11(1): 41-47.

(收稿:2009-12-09 修回:2010-02-10)

(编辑 邓强庭)

(上接937页)

共有动脉瘤101个。

其中3D-CTA查出动脉瘤97个,占手术证实动脉瘤总个数的96%(97/101),敏感性为96%;阳性检查结果均得到手术证实,特异性为100%;假阴性病例4例(4例患者3D-CTA检查阴性,2D-DSA检查发现颅内动脉瘤,经手术证实2D-DSA诊断)。无假阳性病例。

DSA检查确诊颅内动脉瘤93个,占手术确诊动脉瘤总个数的92%(93/101),敏感性为92%;阳性检查结果均经手术证实,特异性为100%;假阴性病例5例(3D-CTA发现前交通动脉瘤1个、大脑前动脉瘤1个、大脑中动脉瘤1个、大脑后动脉瘤1个、小脑上动脉瘤1个,DSA检查为阴性,经手术证实3D-CTA诊断)。假阳性3例(后交通动脉瘤3个)。

经χ^2检验,3D-CTA与2D-DSA的检出率间差异无统计学意义($P>0.05$)。

3 讨论

早在20世纪80年代初Fulan等[3]就较系统地报道了DSA在诊断颅内动脉瘤中的应用。DSA是诊断颅内动脉瘤最基本的方法,应用于临床以来一直被誉为脑血管疾病检查的"金标准",但其存在有创性、有并发症等缺点。CTA因其无创、检查快速、方便、经济等优点在临床上应用日益广泛[2]。但其诊断动脉瘤的准确程度以及能否替代DSA一直是神经外科医师最关心的问题。围绕该疑问国内外已经进行了大量的研究,但研究结果存在一定程度上的差异。

本研究对115例SAH患者先后进行了3D-CTA和2D-DSA检查,并以显微外科手术或血管内介入治疗结果作为参照标准进行比较,对2种检查方法的检出情况、敏感度、特异性、准确性进行比较。我们的结果发现,CTA在诊断颅内动脉瘤方面有较高的敏感度、特异度和准确性,与2D-DSA比较无明显差异[4]。

结合文献,总结3D-CTA指导动脉瘤治疗的优势如下:①检查时机方面的优势;②安全性方面的优势;③对三维空间显示方面的优势;④获得数据方面的优势;⑤模拟手术入路方面的优势。但同时我们注意到,2D-DSA能显示血流动力学改变,为显微手术提供血流动力学信息,并作为血管内治疗的基础仍具有CTA、MRA无可替代的作用[5]。

参考文献:

[1] 李忠信, 肖树凤, 于淑靖, 等. 脑动脉瘤破裂出血的CTA与DSA对比研究[J]. 河北医药, 2009, 31(16): 2058-2059.

[2] 阮健, 孙晓川, 吕发金, 等. 64层三维CT血管成像对颅内血管畸形的诊断及治疗[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(13): 封3.

[3] Fulan A J, Weinstein M A, Little J R, *et al*. Digital subtraction angiography in the evaluation of cerebrovascular disease[J]. J Neurol Clin, 1983, 1(1): 55-72.

[4] 郑超, 孙晓川. 3D-CTA在颅内动脉瘤诊治中的价值[J]. 重庆医科大学学报, 2009, 34(6): 756-759.

[5] Matsumoto M, Sato M, Nakano M, *et al*. Three-dimensional computerized tomography angiography-guided surgery of acutely ruptured cerebral aneurysms[J]. J Neurosurg, 2001, 94(5): 718-727.

(收稿:2010-01-14 修回:2010-03-23)

(编辑 王 红)