

## . 综 述 .

## 胶质瘤干细胞的研究进展

袁凡恩 综述 陈谦学 审校

【关键词】胶质瘤;肿瘤干细胞;肿瘤微环境;免疫治疗;放化疗抵抗

【文章编号】1009-153X(2016)08-0508-04 【文献标志码】A 【中国图书资料分类号】R 739.41

目前,胶质母细胞瘤即使采用手术切除,同时辅助替莫唑胺化疗及放疗,其中位生存期仍然只有12~15个月<sup>[1]</sup>。胶质瘤母细胞瘤治疗的关键问题在于肿瘤细胞的放化疗抵抗性及高复发率<sup>[2]</sup>。有研究表明,胶质瘤干细胞对常规放化疗不敏感<sup>[3]</sup>,很可能是胶质母细胞瘤易复发的原因之一。肿瘤微环境、免疫调控和放化疗抵抗等是胶质瘤干细胞研究的热点。本综述将重点介绍胶质瘤干细胞的肿瘤微环境、免疫调节和放化疗抵抗的研究进展。

## 1 胶质瘤干细胞的肿瘤微环境

胶质瘤干细胞的特征维持和功能发挥与其所处的壁龛微环境密切相关<sup>[4]</sup>。胶质瘤干细胞并不仅仅是生存在壁龛中那么简单,而是参与到壁龛微环境的构建、稳态和重塑中,和壁龛微环境进行相互作用。一般来说,壁龛微环境可以分为两种:缺氧微壁龛和血管周围微壁龛。

在缺氧微壁龛中,缺氧诱导因子(hypoxia-inducible factor, HIF)-1 $\alpha$ 和HIF-2 $\alpha$ 对胶质瘤干细胞的干性特征的维持起重要作用。HIF-1 $\alpha$ 、HIF-2 $\alpha$ 能促进细胞自我更新相关基因的表达,抑制细胞分化,与Notch、c-myc等通路相互影响来维持胶质瘤干细胞的干性特征。当敲除HIF-1 $\alpha$ 、HIF-2 $\alpha$ 基因后,胶质瘤干细胞的自我更新能力受到抑制。当细胞长期受到缺氧诱导后,细胞能够向“干细胞样”特征的细胞表型转变<sup>[5]</sup>,同时伴随着Oct4、Nanog、Sox2等细胞干性转化相关靶标的上调。缺氧介导的胶质瘤干细胞的干性维持依赖与PI3K/Akt、ERK1/2及Notch信号通路。缺氧能够增强胶质瘤干细胞的Notch信号

通路活性,而阻断Notch通路可以减少胶质瘤干细胞的比例,诱导胶质瘤干细胞凋亡,减弱胶质瘤干细胞的相关靶标(如Nestin、CD133、Bmi),同时伴随着p-Akt、p-STAT3的减少<sup>[6]</sup>。Gustafsson等<sup>[7]</sup>发现,HIF-1 $\alpha$ 能够与Notch胞内段结合,增强Notch通路活性,从而在缺氧条件下维持肿瘤干细胞的干性特征。

除了缺氧微壁龛,越来越多的研究表明,胶质瘤干细胞居住在一个血管周微壁龛中,这种围绕血管形成的微环境能维持肿瘤干细胞的干性表型。Calabrese等<sup>[8]</sup>发现,血管内皮细胞与那些具备自我更新能力的脑肿瘤细胞在位置上更靠近,同时能够帮助这些细胞维持“干细胞样”特征。在大鼠原位种植脑肿瘤模型中,增加内皮细胞和微血管的数量能够相应地增多具备自我更新能力的Nestin<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup>细胞;相反地,如果阻断肿瘤微血管生成和减少内皮细胞数量,Nestin<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup>细胞数量将减少,伴随肿瘤生长的阻滞<sup>[8]</sup>。有研究表明Notch通路在微血管壁龛维持脑肿瘤干细胞“干性”特征中发挥重要作用<sup>[9]</sup>。胶质瘤干细胞和血管周微壁龛相互影响、相辅相成,肿瘤干细胞能够重塑血管周围的微壁龛。首先,胶质瘤干细胞分泌的细胞因子能加速血管内皮细胞的增殖,促进肿瘤微血管的生长。其次,胶质瘤干细胞能趋化血管内皮的前体细胞聚集到以干细胞为核心的肿瘤壁龛周围,促进这些前体细胞分化成为内皮细胞从而形成微血管。最后,部分胶质瘤干细胞自身也具有分化为内皮细胞的潜能。

以前,缺氧微壁龛和血管周微壁龛常常被认为是两种独立的肿瘤微环境,但是近年来越来越多的研究表明,这两种肿瘤微环境之间存在密不可分的关系,彼此交互作用。有研究发现,缺氧刺激能够诱导胶质瘤干细胞向内皮样细胞转化,从而促进肿瘤周血管生成<sup>[10]</sup>。胶质瘤干细胞在缺氧微壁龛和血管周微壁龛中有着相似的靶标基因表达。有一种观点认为,存在于不同肿瘤微环境中的胶质瘤干细胞,代

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2016.08.025

作者单位:430060 武汉,武汉大学人民医院神经外科(袁凡恩、陈谦学)

通讯作者:陈谦学, E-mail: chenqx666@sohu.com

表着肿瘤发生发展的不同阶段。在缺氧微环境中,胶质瘤干细胞去分化、获得并维持干性表型;当缺氧达到一定程度后,胶质瘤干细胞开始诱导微血管生成。同时,缺氧微环境可诱导上皮-间质转化过程,使胶质瘤干细胞具备较强的迁移和侵袭能力。胶质瘤干细胞迁移到血管丰富的位置,这里适宜的微环境又提供给胶质瘤干细胞维持其干性表型的条件。

2 免疫调节在胶质瘤干细胞微环境中的作用

免疫系统在肿瘤的发生发展过程中起重要作用。胶质瘤干细胞能够与免疫细胞相互作用,免疫细胞可能也是胶质瘤干细胞的微环境的组分之一。胶质瘤干细胞和免疫相关细胞处在一种动态的相互调节的关系中。胶质瘤干细胞能吸引炎性细胞的浸润,传造出有利于肿瘤生长的炎性微环境,而这种炎性微环境又可以帮助胶质瘤干细胞维持干性表型。胶质瘤干细胞通过分泌免疫抑制因子和募集具有免疫抑制作用的细胞来逃避免疫监视。肿瘤相关巨噬细胞(tumor-associated macrophages, TAMs)是胶质瘤中主要的炎性浸润细胞。TAMs 主要分布于 CD133<sup>+</sup> 胶质瘤干细胞周围,围绕着微血管和缺氧区域<sup>[11]</sup>。胶质瘤干细胞能够分泌趋化因子,吸引 TAMs 聚集到周围<sup>[12]</sup>,还可以分泌细胞因子促进 TAMs 的增殖。

TAMs 能抑制固有免疫及适应性免疫。许多肿瘤免疫疗法针对胶质瘤干细胞或胶质瘤干细胞微环境,例如单抗、树突状细胞(dendritic cells, DCs)疫苗和嵌合抗原受体 T 细胞(chimeric antigen receptor T cell, CAR-T)治疗。

贝伐单抗是美国食品药品监督管理局批准的针对血管内皮细胞生长因子的单抗制剂。贝伐单抗抑制胶质瘤增殖的机制之一就是破坏、阻断胶质瘤干细胞存在的血管周微壁龛<sup>[13]</sup>。

DCs 疫苗是针对胶质瘤干细胞的综合性治疗方法。将包含有胶质瘤干细胞的胶质瘤标本分离后在体外刺激 DCs,获得肿瘤相关抗原,再被重新注射回人体内。这些 DCs 能将肿瘤相关抗原呈递给 T 细胞,从而增强抗肿瘤的免疫应答。在胶质瘤干细胞介导的 DCs 疫苗的临床试验中,将分离自胶质瘤干细胞的 mRNA 转染 DCs,然后将这些 DCs 注射回对应的病人体内,这些接受 DCs 疫苗的病人的中位生存期得到了明显的提高<sup>[14]</sup>。

体内 T 细胞抗肿瘤效应存在主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)限制性。CAR-T 治疗通过基因工程技术,将能非 MHC 限

制性识别肿瘤相关抗原的单链抗体 scFv、跨膜区及胞内信号区组成重组质粒,再将重组质粒转染入 T 细胞,然后经纯化扩增获得 CAR-T 治疗所需要的 T 细胞,再重输注病人体内,发挥其抗肿瘤效应<sup>[15,16]</sup>。

3 胶质瘤干细胞的放化疗抵抗

胶质瘤对放化疗具有抵抗性是胶质瘤治疗疗效不佳的重要原因,而这种放化疗抵抗性的发生可能与初次治疗后胶质瘤干细胞群落的增多有关。胶质瘤干细胞在整个胶质瘤整体中,处于一种相对“静止”的状态,因此这也使得胶质瘤干细胞比其他分化程度高的肿瘤细胞对治疗更有抵抗力。

胶质瘤干细胞放化疗抵抗涉及许多信号通路,如酪氨酸激酶受体通路、Shh 通路等。抑制 Notch 通路和 Shh 通路可增强替莫唑胺对胶质瘤干细胞的杀伤作用。目前认为,胶质瘤干细胞比不具备干细胞特征的普通细胞更能抵抗化疗药,胶质瘤的复发就来自于这些具备干细胞特征的细胞。给予替莫唑胺后,增殖的肿瘤细胞和干细胞都受到杀伤,但是仍有部分肿瘤干细胞尚存活;替莫唑胺作用 5 d 后,这些胶质瘤干细胞又开始自我更新、增殖,并最终导致胶质瘤的复发。但是,学术界仍存在争议:在同一肿瘤中,胶质瘤干细胞是否真的比那些不具备干细胞特征的普通肿瘤细胞对化疗更具有抵抗性? 干细胞培养所用的神经干细胞培养基也能改变细胞的生长增殖规律,本身也有可能抵抗替莫唑胺的作用。同时,替莫唑胺间歇冲击给药可以抑制胶质瘤干细胞的增殖,减少胶质瘤干细胞的干细胞标志物如 Nestin、CD133 的表达。也就是说,意味着间歇替莫唑胺冲击可以消除具有干细胞特征的细胞。但有趣的是,持续长期给予替莫唑胺可以诱导肿瘤细胞产生一定程度上的多能性,使其具备某些干细胞样特征。

肿瘤微环境可以在一定程度上解释胶质瘤产生放化疗抵抗的原因:居住在缺氧微壁龛中的胶质瘤干细胞可以很好地躲避放疗,从而减少 DNA 损伤。而这也提示我们,研发特异针对胶质瘤干细胞所处的微环境组分的靶向药物可能是解决胶质瘤放化疗抵抗的方向。特异针对胶质瘤干细胞微壁龛组分的治疗手段从理论上来说更具优势,因为特异针对这些壁龛组分(如血管内皮细胞)的药物或者改变微环境中的氧含量,都是比较稳定可控的技术手段。而传统的靶向肿瘤细胞的治疗手段,由于无法兼顾肿瘤细胞异质性及基因组突变等情况,往往疗效较差。Patel 等<sup>[17]</sup>对 5 例原发胶质母细胞瘤、共 470 个细胞进



行单细胞测序后发现,在同一肿瘤中存在着不同的基因表达谱,涉及肿瘤增殖、免疫应答以及放化疗抵抗。许多分子机制如 Notch、EZH2 及 DNA 损伤修复都被认为和胶质瘤干细胞的放化疗抵抗相关<sup>[18]</sup>。因此,胶质瘤干细胞放化疗抵抗的机制是复杂的。

#### 4 存在的争议和未来的研究方向

尽管许多动物实验证明,肿瘤干细胞和前体细胞能够赋予肿瘤组织恶性转化的能力,但尚无定论的是:这些肿瘤干细胞乃至整个肿瘤是否是由单个细胞发展而来?胶质瘤干细胞是不是胶质瘤的唯一来源?有学者认为,所谓的胶质瘤干细胞,仅仅是具备“干细胞样”特征的肿瘤细胞。

胶质瘤具有异质性,而胶质瘤干细胞也有着不同的亚群,这也使得确定胶质瘤干细胞的来源变得困难。比较普遍的观点是,胶质瘤干细胞来源于那些发生恶性转化的神经干细胞。胶质瘤干细胞和神经干细胞具备相似的生物学特征,除了自我更新和极强的增殖能力外,二者也有着相似的体外培养条件。通过基因芯片发现,胶质瘤干细胞和神经干细胞共表达许多关键基因,受调控的信号通路也有很多重合。很多文献表明,通过对神经干细胞的癌基因或者抑癌基因进行干预,可以转化得到相应的脑肿瘤。神经干细胞是中枢神经系统内最为活跃的细胞,具备极强的增殖能力和分化潜能,且容易发生突变,预示着神经干细胞可能是胶质瘤干细胞的来源。事实上,将分化成熟的胶质瘤细胞系如 U87 用神经干细胞培养基培养,也可以培养出能形成神经干细胞球的干细胞样细胞。这表明,在合适的培养条件下,已分化的胶质瘤细胞也可去分化,转化为多向潜能、自我更新的胶质瘤干细胞。所以,肿瘤干细胞和普通肿瘤细胞的关系可能是双向的过程。这也提示了胶质瘤干细胞来源于普通肿瘤细胞转化的可能。从胶质瘤干细胞来源的复杂性和异质性来看,单纯地研发“消灭”胶质瘤干细胞的分子靶向药物是不够的。我们不仅要消灭掉那些具有自我更新能力和放化疗抵抗性的胶质瘤干细胞,也要防止其他细胞向胶质瘤干细胞转化。

缺氧微壁龛、血管周微壁龛和免疫细胞作为胶质瘤干细胞微环境的重要组成部分,对于胶质瘤干细胞的干性特征的维持、肿瘤的发生发展和放化疗抵抗起着关键的作用。而有趣的是,缺氧微环境、血管周微环境和免疫系统这三者又紧密联系、相互影响、共同调节。血管使免疫细胞能够运达浸润在肿

瘤周围,缺氧微环境则调控免疫细胞的稳定性和免疫功能。胶质瘤干细胞重塑乃至构建了其生存的微环境,而这些微环境反过来也为胶质瘤干细胞抵抗放化疗提供了基础。更深入地研究胶质瘤干细胞和壁龛微环境的相互调节机制,可以为我们的研发更特异、有效治疗方法提供理论基础。

Lathia 等<sup>[19]</sup>提出胶质瘤干细胞有六大主要调控机制,其中内源性因素调节的有基因调控、表观遗传层面调节和细胞代谢调节,外源性因素调节包括肿瘤壁龛、细胞微环境和免疫调节。由此可见,胶质瘤干细胞的调控机制非常复杂,不能简单地把胶质瘤干细胞看作一群具备自我更新和多向分化的细胞的集合。肿瘤干细胞不仅仅可用来简化胶质瘤和其他肿瘤的模式,还可用于研究、了解恶性肿瘤的复杂性和多样性。

#### 【参考文献】

- [1] Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, *et al.* Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma [J]. *N Engl J Med*, 2005, 352(10): 987-996.
- [2] Osswald M, Jung E, Sahm F, *et al.* Brain tumour cells interconnect to a functional and resistant network [J]. *Nature*, 2015, 528(7580): 93-98.
- [3] Liu G, Yuan X, Zeng Z, *et al.* Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133<sup>+</sup> cancer stem cells in glioblastoma [J]. *Mol Cancer*, 2006, 5: 67.
- [4] Ye J, Wu D, Wu P, *et al.* The cancer stem cell niche: cross talk between cancer stem cells and their microenvironment [J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(5): 3945-3951.
- [5] Heddleston JM, Li Z, McLendon RE, *et al.* The hypoxic microenvironment maintains glioblastoma stem cells and promotes reprogramming towards a cancer stem cell phenotype [J]. *Cell Cycle*, 2009, 8(20): 3274-3284.
- [6] Fan X, Khaki L, Zhu TS, *et al.* NOTCH pathway blockade depletes CD133-positive glioblastoma cells and inhibits growth of tumor neurospheres and xenografts [J]. *Stem Cells*, 2010, 28(1): 5-16.
- [7] Gustafsson MV, Zheng X, Pereira T, *et al.* Hypoxia requires notch signaling to maintain the undifferentiated cell state [J]. *Dev Cell*, 2005, 9(5): 617-628.
- [8] Calabrese C, Poppleton H, Kocak M, *et al.* A perivascular niche for brain tumor stem cells [J]. *Cancer Cell*, 2007, 11(1): 69-82.

[9] Zhu TS, Costello MA, Talsma CE, *et al.* Endothelial cells create a stem cell niche in glioblastoma by providing NOTCH ligands that nurture self-renewal of cancer stem-like cells [J]. *Cancer Res*, 2011, 71(18): 6061–6072.

[10] Soda Y, Marumoto T, Friedmann–Morvinski D, *et al.* Trans-differentiation of glioblastoma cells into vascular endothelial cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(11): 4274–4280.

[11] Yi L, Xiao H, Xu M, *et al.* Glioma-initiating cells: a predominant role in microglia/macrophages tropism to glioma [J]. *J Neuroimmunol*, 2011, 232(1–2): 75–82.

[12] Wu A, Wei J, Kong L Y, *et al.* Glioma cancer stem cells induce immunosuppressive macrophages/microglia [J]. *Neuro Oncol*, 2010, 12(11): 1113–1125.

[13] Esparza R, Azad TD, Feroze AH, *et al.* Glioblastoma stem cells and stem cell–targeting immunotherapies [J]. *J Neuro-oncol*, 2015, 123(3): 449–457.

[14] Vik–Mo E O, Nyakas M, Mikkelsen B V, *et al.* Therapeutic vaccination against autologous cancer stem cells with mRNA-transfected dendritic cells in patients with glioblastoma [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2013, 62(9): 1499–1509.

[15] Brown CE, Starr R, Aguilar B, *et al.* Stem–like tumor–initiating cells isolated from IL13Ralpha2 expressing gliomas are targeted and killed by IL13–zetakine–redirected T Cells [J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(8): 2199–2209.

[16] Zhu X, Prasad S, Gaedicke S, *et al.* Patient–derived glioblastoma stem cells are killed by CD133–specific CAR T cells but induce the T cell aging marker CD57 [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(1): 171–184.

[17] Patel AP, Tirosh I, Trombetta JJ, *et al.* Single–cell RNA–seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma [J]. *Science*, 2014, 344(6190): 1396–1401.

[18] Kim Y, Kim E, Wu Q, *et al.* Platelet–derived growth factor receptors differentially inform intertumoral and intratumoral heterogeneity [J]. *Genes Dev*, 2012, 26(11): 1247–1262.

[19] Lathia JD, Mack SC, Mulkearns–Hubert EE, *et al.* Cancer stem cells in glioblastoma [J]. *Genes Dev*, 2015, 29(12): 1203–1217.

(2016–05–13 收稿, 2016–07–23 修回)

(上接第468页)

[3] Zou WX, Leung TW, Yu SC, *et al.* Angiographic features collaterals and infarct topography of symptomatic occlusive radiation vasculopathy: a case–referent study [J]. *Stroke*, 2013, 44: 401–406.

[4] Reinhard M, Muller T, Roth M, *et al.* Dynamic cerebral autoregulation and collateral flow patterns in patients with severe carotid stenosis or occlusion [J]. *Ultrasound Med Bid*, 2003, 29(8): 1105.

[5] 杨 华, 夏章勇, 张 敏, 等. 症状性颈动脉完全闭塞患者的临床干预和随访研究[J]. *中华神经医学杂志*, 2011, 10(11): 1092–1096.

[6] Binning MJ, Veznedaroglu E. Endovascular advances for intracranial occlusive disease [J]. *Neurosurgery*, 2014, 74: 126–132.

[7] Merino H, Parthasarathy S, Singla DK. Partial ligation–induced carotid artery occlusion induces leukocyte recruitment and lipid accumulation: a shear stress model of atherosclerosis [J]. *Mol Cell Biochem*, 2013, 372: 267–273.

[8] Xu Z, Ma N, Mo D, *et al.* Endovascular recanalization for chronic symptomatic intracranial vertebral artery total occlusion [J]. *Minim Invasive Surg*, 2014, 2014: 949585.

[9] 李天晓, 李钊硕, 王子亮, 等. Wingspan 支架治疗症状性颅内动脉粥样硬化严重狭窄的临床研究[J]. *中华放射学杂志*, 2010, 44(9): 969–974.

[10] Wang B, Miao ZR, Li GL, *et al.* Treatment of symptomatic complex posterior circulation cerebral artery stenosis with balloon–mounted stents: technique feasibility and outcome [J]. *Neuroradiology*, 2009, 51: 319–326.

[11] Toshinori T, Shinichi Y, Kiyofumi Y, *et al.* Angioplasty and stenting of totally occluded common carotid artery at the chronic stage [J]. *Neurol Med Chir (Tokyo)*, 2010, 50(11): 998–1000.

[12] Kobayashi N, Miyachi S, Hattori K, *et al.* Carotid angioplasty with stenting for chronic internal carotid artery occlusion: technical note [J]. *Neuroradiology*, 2006, 48(11): 847–851.

[13] 张 茹, 张桂莲. 急性脑梗死动脉内药物溶栓和机械支架再通比较[J]. *中华神经外科疾病研究杂志*, 2010, 9(2): 149–152.

[14] 贺雄军, 刘亚杰. 症状性颈内动脉闭塞九例介入治疗的短期疗效观察[J]. *中华临床医师杂志(电子版)*, 2012, 16(6): 4939–4940.

(2016–04–03 收稿, 2016–07–01 修回)