

Focal Adhesion Kinase (FAK) by cord blood stem cells inhibits angiogenesis in glioblastoma. Aging (Albany NY),

2010, 2(11): 791-803.

胶质瘤干细胞基础与临床研究进展

孙建军^{1,2} 综述 李长栋^{1,2} 荔志云^{1*} 申校

1. 兰州军区兰州总医院神经外科,甘肃 兰州 730050

2. 兰州大学第二临床医学院,甘肃 兰州 730000

摘要:胶质瘤干细胞具有与干细胞增殖、分化和自我更新等干细胞特性,突变后可诱发肿瘤发生。其选择性对 CD133、Nestin 等高表达,在胶质瘤组织、胶质瘤细胞系中对胶质瘤干细胞进行分离、培养并诱导分化,对胶质瘤,特别是恶性胶质瘤的内环境等生物学行为进行深入研究,为胶质瘤在临床诊断、治疗等方面提供分子生物学、细胞生物学方面的依据。

关键词:胶质瘤;干细胞;胶质瘤干细胞;神经干细胞

胶质瘤(glioma)是原发性脑上皮细胞肿瘤,尤其是 WHO III-IV 级属恶性胶质瘤,其在临床上中具有发病率高、复发率高、死亡率高、生存质量低和治疗效果不理想等特点。近年来随着分子生物学、细胞生物学等相关学科的发展,有不少学者提出了胶质瘤干细胞(Glioma Stem Cells, GSCs)学说,并在此方面做了大量深入的研究。本文将对干细胞在胶质瘤基础与临床方面的研究进展进行总结综述。

1 神经干细胞(Neural stem cells, NSCs)

神经系统的一个基本特征就是大脑神经元在胚胎期和出生后早期发生;一旦这些细胞脱离脑室层,他们就处于一种不可逆的分裂期后状态。其结果就是任何大脑损伤所导致的细胞丧失都不可能通过相邻区域神经元的复制来弥补,这对于神经系统损伤,尤其是肿瘤、外伤、退行性变等患者来说是十分残酷的。近年来,在神经再生领域内许多研究都集中于不遵循成人神经细胞不可再分裂法则的神经细胞,并且发现了几种有可能再生能力的神经元^[1],其存在于成人侧脑室的脑室下层,为一薄层上皮细胞,该细胞除了能生成室管膜细胞,还能生成神经元细胞和胶质细胞。有研究将神经元移植于受损的大脑,是一种有希望的治疗方法,但世界上对该方法治疗仍存在较大争议。在神经科疾

病研究中,一条获得足够细胞来进行治疗及神经修复的途径就是应用干细胞及祖细胞^[2]。干细胞的定义特征为通过不对称分裂而具有分化成任何一种细胞的能力,其主要来源是胚胎。目前争议较少的是使用成人组织的干细胞,已经从哺乳类动物大脑及脊髓中发现并分离出多能干细胞,NSCs 可能是发生上较晚产生的神经元的来源。成人中枢神经系统干细胞能生成血细胞^[3],而成人骨髓中的细胞也能生成神经细胞^[4]。因此,这些成人干细胞的存活与否,依赖于维持其局部环境,而不是这些细胞的内在特征。然而,损伤诱导的微环境修饰对于获得成人干细胞表型的多样性可能是必需的^[5]。

中枢神经系统肿瘤干细胞研究的是,找到并鉴定 GSCs 及其特异性表面标志物,并通过改变神经干细胞及肿瘤干细胞的恶性分化增殖潜能,达到治疗肿瘤的目的。

2 胶质瘤干细胞(Glioma Stem Cells, GSCs)

2.1 GSCs 的提出与起源假说

所有的肿瘤组织并不是由单纯、均一的肿瘤细胞所组成的,在肿瘤组织中不同的细胞具有不同的增殖、分化、浸润和转移能力,亦即肿瘤的异质性。其中存在少数担当着干细胞角色的肿瘤细胞具有干细胞的基本特性:包括自我更新能力、无限的增

收稿日期:2011-10-11;修回日期:2011-11-29

作者简介:孙建军(1981-),男,主治医师,硕士,主要从事胶质瘤基础与临床研究工作。

通讯作者:荔志云(1963-),男,教授、主任医师,硕士,主要从事胶质瘤及颅脑外伤基础与临床研究工作,

殖能力和多向分化潜能,近年来被学者称之为肿瘤干细胞(Tumor Stem Cells, TSCs)。在神经系统中, NSCs 因具有很强的自我更新能力,在增殖、更新过程中就有可能因外界环境等因素影响使基因发生突变,干细胞分化走向发生变化引起恶变,且干细胞在神经系统中生存时间较长,其发生突变的机会更多,最终形成具有诱发肿瘤发生的干细胞,即 GSCs^[6, 7]。

有学者认为,同时调节神经干细胞增殖和自我更新的基因在 GSCs 中也有表达,如 Necht 等^[8]用 ENU 致瘤模型,选择巢蛋白(nestin)为标志物进行胶质瘤起源的研究,发现在实验鼠的室管膜下区存在 nestin 阳性的细胞团,随着时间增加,这些细胞转化为实体瘤细胞,为 GSCs 来源于存在于室管膜下区的 NSCs 提供了间接依据。也有学者认为单一细胞经过一定周期的突变后也可向恶性转变,如 Reya 等^[9]认为单一细胞经过 4~7 次的突变后也可向恶性转变,组织更新越快,基因复制、转录、翻译过程中发生突变的几率就越高, NSCs 是神经系统中最活跃的细胞,容易在分化过程中发生突变引起恶性变,可能转化为 GSCs,至于是星形细胞瘤、少突胶质细胞瘤、胶质母细胞瘤还是室管膜瘤取决于转化过程中 GSCs 所处的微环境^[10]。也有推测认为它可能起源于已分化的细胞,由这些细胞突变发生去分化得来,并通过基因突变而获得了干细胞自我更新的特性,从而形成 GSCs。目前,关于 GSCs 的起源与发生在学术界还存在很多争议,近来也有学者提出 TSCs 存在异质性,即 TSCs 不是一个均一的群体,也可能是有不同的 TSCs 亚群所组成^[11],这些亚群主要区别在于其表面标志物、逃逸能力、诱导供瘤血管生成能力及迁移侵袭能力等方面,且不同的干细胞亚群在肿瘤生长发生中充当不同角色,这也说明 GSCs 可能存在异质性,故在病理类型上有不同的差异。但这些起源均为一些学说或假说,尚不完全肯定。

2.2 GSCs 的分离、培养与鉴定

2.2.1 胶质瘤组织分离培养 GSCs 有学者利用胶质瘤组织体外分离、培养出 GSCs^[12, 13]。这一发现对于胶质瘤起源、发生、治疗的研究具有重要意义。目前有学者提出了运用无血清培养及免疫磁珠法(Immunomagnetic Bead Techniques, IBD),在胶质瘤组织中培养 GSCs^[12, 14],其方法如下:

取胶质瘤手术标本,制成单细胞悬液用无血清

培养基培养,加入表皮生长因子(Epidermal Growth Factor, EGF)、碱性成纤维细胞生长因子(basic Fibroblast Growth Factor, bFGF)进行诱导分化;用免疫组化法检测巢蛋白(Nestin)和胶质源性纤维酸蛋白(Glial Fibrillary Acidic Protein, GFAP);用免疫磁珠分选系统进行细胞分离,流式细胞仪检测分化前后 CD133 阳性细胞的比率。结果培养出悬浮生长的脑胶质瘤干细胞球, Nestin 表达呈阳性,分化后 GFAP 表达亦呈阳性。

2.2.2 用胶质瘤细胞系培养 GSCs 近年来,随着胶质瘤干细胞的研究,许多学者运用胶质瘤细胞系(Glioma Cells line)进行 GSCs 的培养,分离^[15, 16],在胶质瘤研究中成果显著,为胶质瘤研究提供了一种全新的思路。运用 C6、U87、U251 等胶质瘤细胞研究后发现在胶质瘤细胞接种于无血清培养基上时,部分细胞存活,并存在增殖和自我更新等干细胞特性,且分离出来的 GSCs 中 CD133 和 Nestin 等表达阳性,且 GSCs 球中的部分细胞和其分化的肿瘤细胞均可以具有神经元、星形胶质细胞、少突胶质细胞的表型;同时 GSCs 可以在裸鼠颅内导致肿瘤发生。研究发现胶质瘤细胞系中含一定比例 GSCs,此种细胞可在体外分离,培养和诱导分化;GSCs 具有自我更新和多向分化能力;GSCs 裸鼠颅内原位移植法是一种新的建立肿瘤模型的方法;GSCs 的发现可能将为脑胶质瘤研究提供全新的思路。

2.3 临床研究方面

在临床研究方面,有学者通过 GSCs 与间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)共培养能明显降低代表细胞分裂的活性物质细胞周期蛋白 D1(cyclin D1)、CD133 及 nestin 的表达,同时可分泌更多的免疫反应蛋白,如白介素-2(Interleukin-2, IL-2)及肿瘤坏死因子(interferon-gamma, IFN-gamma)等,说明改变 GSCs 内环境可有效抑制其分化增殖,可推定对胶质瘤治疗可能有效^[17-21]。

3 GSCs 研究的意义及展望

3.1 基础研究方面

GSCs 的起源及发生目前还只是假说,还没有确切理论支持,还需要进一步进行研究。其表面标志物 CD-133 及 Nestin 也不是唯一表达产物,在有些 GSCs 中表达可能为阴性,这不代表其不是 GSCs,还有待发现更多新的标志物来鉴别 GSCs,为进一步研究提供帮助。

3.2 胶质瘤诊断方面

不管基础研究从哪个方向、用哪种方法,其最终目的都是为临床服务,为广大胶质瘤患者的诊断、治疗及预后提供可行的方法与依据。胶质瘤的诊断和预后判断目前主要依靠病理学和分子生物学方法,GSCs的研究可能从另一个方面对其生物学行为进行准确判断及评价,例如,可以通过检测肿瘤细胞 CD133 及 Nestin 等的表达来进行恶性程度判断、分型及预后判断,GSCs 的数目可能与肿瘤的恶性程度成正相关。

3.3 治疗方面

虽然以手术为主,辅以放疗、化疗和生物治疗等胶质瘤综合治疗方法,使很多胶质瘤患者延长了生命,提高了生活质量,但因为胶质瘤的侵袭性,其仍为一种姑息治疗。目前研究认为 GSCs 为胶质瘤的起源细胞,虽然手术切除了可见肿瘤,但 GSCs 持续存在,这也是导致肿瘤复发的一个重要因素。因此,探索一种以 GSCs 为靶向的治疗方法为目前及今后研究的重点及主要方向,如诱导 GSCs 向正常方向分化、研究以 GSCs 为靶点的化疗药物等均作为今后需要进一步研究的方向。

3.4 今后的研究方向

虽然 GSCs 研究目前成为胶质瘤研究的热点,但是还有很多未知的问题需要进一步研究及探索,如:GSCs 的特异性标志物究竟是什么? GSCs 与 NSCs 究竟有无关系,能否诱导 NSCs 向 GSCs 方向发展,以进一步证实二者关系? 如何对胶质瘤的信号转导及基因进行有效干预以控制 GSCs 进一步分化增殖? 能否通过改变胶质瘤细胞微环境来阻断或者削弱胶质瘤细胞的侵袭性/力? 能否及如何对 GSCs 进行干预使其向正常方向诱导分化? 多能干细胞移植能否使 GSCs 向正常方向分化? 是否能找到新型的放化疗药物及方法控制已发生的肿瘤及 TSCs 的恶性分化及浸润? 上述问题目前虽有大量研究,但具体结论尚不十分肯定,也未得到学术界认可,因此,未来对这些问题的深入研究将是 GSCs 研究的一个重点。

参 考 文 献

- [1] Gage FH. Mammalian neural stem cells Science 2000,287:1433-1438.
- [2] Huang QA, Dong J, Zhao YD, et al. Glioma stem/progenitor cells contribute to neovascularization via transdifferentiation. Stem Cell Rev Rep 2011,7:141-152.
- [3] Bjornson CR, Rietze RL, Reynolds BA, et al. Turning brain into blood: A hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells into vivo. Science 1999,283:534-537.
- [4] Eglitis MA, Mezey E. Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brain of adult mice. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1997,94:4080-4085.
- [5] Van der kooy D, Weiss S. Why stem cells? Science 2000,287:1439-1441.
- [6] Venere M, Fine HA, Dirks PB, et al. Cancer Stem Cells in Gliomas: Identifying and Understanding the Apex Cell in Cancer's Hierarchy. Glia 2011,59:1148-1154.
- [7] Temme A, Geiger KD, Hendrusch S, et al. The prostate stem cell antigen represents a novel glioma-associated antigen. Oncology Reports 2011,26:13-21.
- [8] Recht L, Jang T, Savarese T, et al. Neural stem cells and neuro-oncology: quo vadis? Journal of cellular biochemistry 2003,88:11-9.
- [9] Rerger F, Gay E, Pelletier L, et al. Development of gliomas: potential role of asymmetrical cell of division of neural stem cells. Lancet oncol 2004,5:51151-4.
- [10] Li XN, Du ZW, Huang Qiang, et al. Growth-inhibitory and differentiation-inducing activity of dimethylformamide in cultured human malignant glioma cells. Neurosurgery 1997,40:1250-1259.
- [11] Hope KJ, Jin LQ, Qick JE, et al. Acute myeloid leukemias originate from a hierarchy of leukemic stem cell classes that differ in self-renewal capacity. Nature Immunol 2004,5:738-743.
- [12] 惠小波. 人脑胶质瘤干细胞的培养及分离方法. 山东医药 2010,50:2.
- [13] Singh SK, Clarke ID, Teraaaki M, et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumor. Cancer Res 2003,63:5821-5828.
- [14] 王显婷. 胶质瘤干细胞分离鉴定及其化疗敏感性研究. 现代医学 2010,38:6.
- [15] Kondo T, Setoguchi T, Tago T, et al. Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2004,101:781-786.
- [16] 刘于海. 血清剥夺法分离 U87 细胞系中的胶质瘤干细胞. 中国组织工程研究与临床康复 2010,14:15.
- [17] Yang B, Jiao HL, Guan FX, et al. The mixed human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells show higher antitumor effect against C6 cells than the single in vitro. Neurological Research 2011,33:405-414.
- [18] Velpula KK, Dasari VR, Tsung AJ, et al. Regulation of Glioblastoma Progression by Cord Blood Stem Cells Is Mediated by Downregulation of Cyclin D1. Plos One 2011,6.
- [19] Ries C, Egea VE, Von Baumgarten L, et al. TNF-alpha re-specifies human mesenchymal stem cells to a neural fate and

promotes migration toward experimental glioma. Cell Death and Differentiation 2011,18:853-863.

- [20] Kim SK, Choi SA, Hwang SK, et al. Therapeutic efficacy and safety of TRAIL-producing human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells against experimental brainstem glioma.

Neuro-Oncology 2011,13:61-69.

- [21] Wang WX, Tu HJ, Hu JT, et al. Bone marrow stromal cell versus neural stem cell transplantation in a C6 glioma rat model. Neural Regeneration Research 2010,5:502-507.

调节性 T 细胞与胶质瘤免疫研究进展

韦浩 综述 陈春美 杨卫忠 审校

福建医科大学协和临床学院神经外科,福建 福州 350001

福建医科大学附属协和医院神经外科,福建 福州 350001

摘要:调节性 T 细胞(regulatory T cell, Treg)是一群具有抑制其他免疫细胞功能的负调控细胞, Treg 细胞通过多种机制抑制 CD4⁺ T 和 CD8⁺ T 淋巴细胞、NKT 细胞、B 淋巴细胞、树突状细胞以及单核细胞/巨噬细胞等的分化和效应功能,是肿瘤免疫逃逸的关键因素;同时肿瘤细胞可以通过分化、扩增或招募 Treg 细胞有效地抑制抗肿瘤免疫,所以 Treg 细胞在肿瘤的发生、发展过程中发挥着极为重要的作用,是免疫治疗新的有效靶点。文章就其近年来在胶质瘤免疫领域的研究进展做一综述。

关键词:调节性 T 细胞;胶质瘤;免疫逃逸;免疫治疗

早在 1980 年研究者就发现,荷瘤小鼠脾脏来源的细胞可以抑制抗肿瘤免疫效应,证实了抑制性 T 细胞对抗肿瘤免疫的抑制作用^[1],同时也验证了抑制性 T 细胞的存在。1995 年 Sakaguchi 等^[2]的研究发现了一种组成性表达白细胞介素-2(IL-2)受体 α 链(CD25)的 CD4⁺ T 细胞,它能抑制小鼠自身免疫性疾病的发生,被命名 CD4⁺ CD25⁺ 免疫调节 T 细胞。近年来,因其在自身免疫性疾病、肿瘤免疫及器官移植耐受诱导中具有广泛的应用前景而备受瞩目。但是存在于肿瘤微环境中的肿瘤抗原和细胞因子可通过对 Treg 细胞的募集、扩展和诱导来削弱机体的抗肿瘤免疫反应。多项研究发现,在胃癌、食管癌、乳腺癌、卵巢癌等不同恶性肿瘤患者的外周血、淋巴结及肿瘤浸润组织中,均存在 Treg 细胞比例增高的现象^[3]。随着研究的进一步深入,Treg 细胞在胶质瘤发展过程中的作用已经成为研究热点。本文就 Treg 细胞在胶质瘤免疫领域的新近进展做一综述。

1 Treg 细胞概述

1.1 Treg 细胞分类、来源及其特性

Treg 细胞目前尚无统一的分类,有人将 Treg 细胞简略分为如下 4 类: CD4⁺ Treg、CD8⁺ Treg、自然杀伤细胞(natural killer T cell, NKT) Treg、双阴性 Treg(Double Negative Treg, DNTreg)细胞等 4 大类。其中 CD4⁺ CD25⁺ Treg 是目前研究的热点。根据 CD4⁺ Treg 的起源可将其分为天然 Treg 和诱导性 Treg。其来源如下:①天然 Treg 由胸腺 T 细胞自然分化而来,胚胎早期和新生期正常胸腺可持续不断产生,也可由 CD4⁺ CD25⁻ T 细胞在特定条件下转化而来。其表型主要为 CD4⁺ CD25⁺, 转录因子 Foxp3(forkhead/winged helix transcription factor)是参与其发育和功能的关键分子。用携带 Foxp3 逆转录病毒载体向初始 T 细胞导入 Foxp3,可促使初始 T 细胞向 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞转化^[4]。②诱导性 Treg 主要包括 1 型 Treg(Tr1)和辅助性 T 细胞 3(Th3)等,由静息 T 细胞在特定微环境和某些细胞

收稿日期:2011-08-14;修回日期:2011-11-29

作者简介:韦浩(1987-),男,硕士研究生,主要研究方向:神经外科微创技术。

通讯作者:陈春美,男,副教授,副主任医师,主要研究方向:胶质瘤免疫治疗和脊髓脊柱微创外科技术。

杨卫忠,男,教授,主任医师,主要研究方向:脑血管病基础与临床研究。