

- proliferation and induces apoptosis in multiple myeloma (MM) cells. *Br J Haematol* ,2010 ,149(4) : 518-528.
- [15] Stankov MV , El Khatib M , Kumar Thakur B , et al. Histone deacetylase inhibitors induce apoptosis in myeloid leukemia by suppressing autophagy. *Leukemia* 2013 ,28(3) : 577-588.
- [16] Yasui W , Oue N , Ono S , et al. Histone acetylation and gastrointestinal carcinogenesis. *Ann NY Acad Sci* ,2003 ,983: 220-231.
- [17] Liu LT , Chang HC , Chiang LC , et al. Histone deacetylase inhibitor up-regulates RECK to inhibit MMP-2 activation and cancer cell invasion. *Cancer Res* ,2003 ,63(12) : 3069-3072.
- [18] Jeon HW , Lee YM. Inhibition of histone deacetylase attenuates hypoxia-induced migration and invasion of cancer cells via the restoration of RECK expression. *Mol Cancer Ther* ,2010 ,9(5) : 1361-1370.
- [19] Kim MS , Kwon HJ , Lee YM , et al. Histone deacetylases induce angiogenesis by negative regulation of tumor suppressor genes. *Nat Med* ,2001 ,7: 437-443.
- [20] Deroanne CF , Bonjean K , Servotte S , et al. Histone deacetylases inhibitors as anti-angiogenic agents altering vascular endothelial growth factor signaling. *Oncogene* ,2002 ,21(3) : 427-436.
- [21] Osuka S , Takano S , Watanabe S , et al. Valproic acid inhibits angiogenesis in vitro and glioma angiogenesis in vivo in the brain. *Neurol Med Chir* ,2012 ,52(4) : 186-193.
- [22] Stedt H , Samaranyake H , Pikkarainen J , et al. Improved therapeutic effect on malignant glioma with adenoviral suicide gene therapy combined with temozolomide. *Gene Ther* . 2013 ,20(12) : 1165-1171.
- [23] Brunetto AT , Ang JE , Lal R , et al. First-in-human , Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Phase I Study of Resminostat , an Oral Histone Deacetylase Inhibitor , in Patients with Advanced Solid Tumors. *Clin Cancer Res* ,2013 ,19(19) : 5494-5504.

## 脑胶质瘤干细胞靶向免疫治疗研究进展

陈志杰 综述 石松生\* 陈春美 审校

福建医科大学附属协和医院神经外科 福建 福州 350001

**摘要:** 胶质瘤干细胞(glioma stem cells ,GSCs) 因其具有过度增殖、自我更新以及多向分化潜能、成瘤性以及放、化疗抗拒性等特点,被认为是胶质瘤容易复发和难以根治的原因,因此如何有效清除 GSCs 成为神经外科领域的研究热点。针对 GSCs 的免疫治疗因其具有靶向杀伤性和记忆性,比普通胶质瘤细胞的免疫治疗更能抑制肿瘤的发生、发展。本文对近年来关于 GSCs 靶向免疫治疗研究进行综述。

**关键词:** 胶质瘤干细胞; 免疫治疗; 肿瘤疫苗; 树突状细胞

脑胶质瘤是人类侵袭性最强、治疗难度最大的肿瘤之一,由于呈浸润性生长且与周围正常脑组织之间无明显界限,故手术难以将脑胶质瘤全切除。尽管传统的手术、放疗、化疗等方法不断改进和提高,但是治疗效果依然很差,治愈率低,复发率高,恶性胶质瘤脑胶质瘤患者中位生存期仍然少于15个月<sup>[1]</sup>。GSCs 具有神经干细胞样特性的细胞,目前越来越多的研究均表明 GSCs 是胶质瘤治疗后复发的根源。针对 GSCs 的治疗措施很有可能

成为根治胶质瘤的重要方法,而靶向清除 GSCs 的免疫治疗研究众多,并且取得了很大的进展。本文就近年来有关 GSCs 免疫治疗的研究进展进行综述。

### 1 GSCs 的发现和生物学特性

Singh 等<sup>[2]</sup>最早在人脑肿瘤组织中分离出具有神经干细胞样特性的细胞,并将之命名为胶质瘤干细胞(glioma stem cells ,GSCs)。随后众多学者对 GSCs 进行了大量的研究并发现其不仅具有神经干细胞的特性如自我更新、持续增殖能力、多向分化

收稿日期:2014-02-10; 修回日期:2014-04-08

作者简介:陈志杰(1988-),男,硕士,研究方向:胶质瘤免疫治疗基础研究。

通讯作者:石松生(1961-),男,主任医师,教授,博士,硕士生导师,研究方向:胶质瘤基础与临床研究。

能力(分化为神经元细胞、少突胶质细胞、星形胶质细胞和血管内皮细胞<sup>[3]</sup>)、悬浮球状生长等,还具有成瘤能力和放、化疗抗性。GSCs有一部分处在休眠期,这部分细胞对化疗药物和放射治疗均不敏感。近年来研究发现,GSCs在放、化疗后能够快速修复受损的DNA,保持其致瘤能力,更加验证了GSCs是胶质瘤起始细胞治疗后肿瘤复发根源的设想<sup>[4,6]</sup>。

## 2 胶质瘤免疫治疗现状

胶质瘤免疫治疗是研究者们一直探索的除手术和放、化疗之外的胶质瘤重要治疗策略。目前关于胶质瘤免疫研究主要包括免疫细胞治疗、免疫分子治疗、胶质瘤抗原靶向治疗和免疫基因治疗等<sup>[7]</sup>。随着胶质瘤分子生物学基因工程、细胞工程技术的发展,免疫治疗能够很好的发挥其特异性和记忆性的优点来靶向消灭肿瘤细胞,在胶质瘤治疗学展现出广阔的运用前景。虽然这些免疫治疗有些已经运用于临床,在安全性上有保障,但是由于无法有效清除GSCs,加上存在免疫抑制和免疫逃逸的情况,胶质瘤免疫治疗长期效果仍不令人满意。

## 3 GSCs 靶向免疫治疗研究进展

人体的免疫系统不能主动攻击肿瘤的主要原因是肿瘤相关抗原(tumor-associated antigens,TAAs)不能被有效提呈给淋巴细胞。目前GSCs靶向免疫治疗的治疗策略主要是用抗原肽致敏树突状细胞、人工制备特异性抗体、抗原基因转染到淋巴细胞、人工制备特异性抗体等。

### 3.1 树突状细胞疫苗免疫治疗

树突状细胞(dendritic cell,DCs)是功能最强的专职抗原提呈细胞,将各类型的肿瘤抗原在体外冲击致敏DCs,然后再回输到体内,就能够启动T细胞介导的主动免疫应答。

Pellegatta等<sup>[8]</sup>推测GSCs会比普通的肿瘤细胞表达更多的抗原,利用这些抗原制备的DC疫苗就能有效的清除GSCs和普通肿瘤细胞,从而达到根治肿瘤的目的。为了验证该猜想,他们用GL261肿瘤球和普通肿瘤细胞的裂解物分别致敏DCs,结果发现GL261肿瘤球裂解物致敏的DCs能更好地诱导特异性效应T细胞产生从而抑制肿瘤进展。Xu等<sup>[9]</sup>用辐射凋亡的GSCs致敏DCs,发现该DC疫苗能够诱发很强的特异性T细胞免疫反应。随后的动物实验中他们分别用9L胶质瘤细胞和9L GSCs及其子代细胞致敏DCs,结果发现接受DC-9L GSCs治疗的荷瘤鼠生存期(中位生存期50天)明

显长于其他两组(分别为32天和29天)。在U251胶质瘤的体外实验中,但是上述实验并没有设立对照组分析DC-GSCs疫苗诱导的特异性细胞毒性T细胞免疫反应是否优于普通肿瘤细胞。Qin等<sup>[10]</sup>分别用CD133<sup>+</sup>和CD133<sup>-</sup>细胞与DCs电融合制备成疫苗后,在体外作用于患者的自体T细胞,发现这两者均能显著诱导T细胞毒性反应,但是彼此比较无显著性差异。尽管存在一些争议,但是由于DC能够提呈GSCs相关抗原给T细胞,诱导的效应T细胞能够靶向清除GSCs,所以基于树突状细胞的免疫治疗具有广阔的运用前景。

### 3.2 GSCs 特异性抗原介导免疫治疗

3.2.1 EGFRvIII 相关免疫治疗 表皮生长因子受体突变体III(epidermal growth factor receptor variant III,EGFRvIII)是常见的肿瘤细胞基因突变体。Emlet等<sup>[11]</sup>认为EGFRvIII<sup>+</sup>细胞是GSCs的一个亚群,他们发现EGFRvIII与CD133双阳性的肿瘤细胞在实验鼠上具有很强的致瘤性和自我更新能力,且具有放、化疗抗性等干细胞样特性。

#### 3.2.1.1 EGFRvIII 人工疫苗介导免疫治疗

Sampson等<sup>[12]</sup>将EGFRvIII的多肽成分PEPvIII与血蓝蛋白(keyhole limpet hemocyanin,KLH)结合制备成PEPvIII-KLH疫苗,并注射到EGFRvIII<sup>+</sup>的多形性胶质母细胞瘤(glioblastoma multiforme,GBM)患者皮下,发现该疫苗能够诱发很强的免疫效应。注射疫苗组患者的平均生存期为26个月,无进展生存期14.2个月,且绝大部分(9/11)EGFRvIII<sup>+</sup>胶质瘤患者复发的瘤体中不再出现EGFRvIII<sup>+</sup>细胞。相比之下,替莫唑胺治疗组的平均生存期只有15个月。

3.2.1.2 EGFRvIII 单抗免疫治疗 Emlet等<sup>[11]</sup>注射抗EGFRvIII和CD133的双特异性抗体(bi-specific antibody,BsAb)在荷载EGFRvIII<sup>+</sup>和CD133<sup>+</sup>胶质瘤细胞的鼠体内,结果发现该抗体能够诱导自然杀伤细胞攻击肿瘤细胞,并且肿瘤细胞的自我更新和成瘤能力下降。Balyasnikova等<sup>[13]</sup>成功对间质干细胞进行基因修饰,使其能够持续表达EGFRvIII单克隆抗体。基因修饰后的间质干细胞被注射到荷瘤鼠体内后能够显著延缓U87胶质瘤的生长,其抑制作用是对照组(PBS和普通间质干细胞)的1.7倍左右。

3.2.2 细胞信号通路抗体免疫治疗 细胞信号通路在GSCs中异常表达,并且与肿瘤的发生、发展、侵袭性以及血管形成关系密切。PDGFR、

OLIG2、Sonic Hedgehog (SHH)、骨形成蛋白 (bone morphogenetic protein, BMP)、EGFR、Notch<sup>[14]</sup>、Wnt/ $\beta$ -catenin<sup>[15]</sup>、ERK1/2<sup>[16]</sup>等信号通路在维持GSCs的干细胞特性和肿瘤发生过程中发挥重要作用。

白介素-6 (interleukin-6, IL-6) 蛋白与 IL-6 mRNA 在恶性胶质瘤中表达增高,与 GBM 患者的预后差正相关。Wang 等<sup>[17]</sup>将 IL-6 抗体注射到荷瘤鼠腹腔抑制信号传导及转录激活因子 3 (signal transducers and activators of transcription 3, STAT3) 活性,导致 GSCs 逐渐凋亡,使得 GSCs 源性移植瘤的生长受到严重的限制。Turchi 等<sup>[18]</sup>认为 GSCs 的生物学功能是通过多种细胞信号通路共同维持,同时抑制多条细胞信号通路或许有更强的抑瘤作用,因此更多抑制 GSCs 信号转导的抗体或者抑制剂仍有待进一步的研究。

**3.2.3 HER2 特异性免疫治疗** Ahmed 等<sup>[19]</sup>用病毒转染方法将 EGFR 2 型受体 (HER2) 基因转染到 GBM 患者的 T 细胞,获得 HER2 特异性 T 细胞。体外实验结果显示这部分 HER2 T 特异性细胞能够杀伤 HER2<sup>+</sup> GBM 患者包括 CD133<sup>+</sup> 细胞在内的肿瘤细胞。动物实验中,注射 HER2 特异性 T 细胞到免疫缺陷的荷瘤鼠里能够引起瘤体的持续消亡。这种用病毒转染基因获得特异性的 T 细胞的方式为靶向清除 GSCs 的免疫治疗提供了新的思路。

### 3.3 GSCs 相关抗原表达研究

所有 GSCs 靶向免疫治疗的一个重要前提都是假设 GSCs 存在肿瘤相关抗原,而无论是细胞免疫还是体液免疫,GSCs 相关抗原都是细胞或者抗体需要识别的位点。Masahiro<sup>[7]</sup>认为癌-睾丸抗原 (cancer testis antigen, CTA),组织特异性抗原 (如 gp100, TRP-2)、变异抗原 (如 EGFRvIII) 以及其他抗原 (如 HER-2) 等能够被细胞毒性 T 细胞识别的胶质瘤相关抗原。癌-睾丸抗原 (cancer testis antigen, CTA) 在很多肿瘤组织中有着不同频率的表达,而在正常组织的表达仅限于睾丸及卵巢的生殖细胞。Yawata 等<sup>[20]</sup>研究发现,U87 胶质瘤细胞系中 GSCs 比其分化的子代细胞系表达更多的 CTA,其中 LAGE-1 甚至只在肿瘤球中表达,极有可能是胶质瘤干细胞的潜在特异性抗原。随着 GSCs 逐渐分化,其子代肿瘤细胞中的 CTA 表达呈下降趋势。Xu 等<sup>[21]</sup>亦发现肿瘤相关抗原和主要组织相容性复合体在 GSCs 存在大量表达增高的情况。

但是肿瘤相关抗原增高只能表示这些抗原是

潜在的攻击靶点,并不能说明这些抗原能够有效诱发 GSCs 免疫治疗<sup>[22]</sup>。前文提到的 EGFRvIII 就是被证明能够在胶质瘤中建立免疫治疗的少数几个抗原之一。虽然众多学者已经发现 GSCs 能够表达更多的特异性抗原,是其在免疫治疗中的运用价值还需要进一步的求证。此外,作为 GSCs 和神经元干细胞的标记性细胞表面分子,CD133、nestin 和 musashi-1 也被认为是 GSCs 靶向免疫治疗的潜在靶点<sup>[23]</sup>。

但是并不是所有的抗原在 GSCs 都出现表达增多的情况。Fas/Fas-L 凋亡系统在脑胶质瘤中表达增多,针对 Fas/Fas-L 的免疫治疗也有一定效果,有学者发现其治疗效果与 Fas/Fas-L 表达水平呈正相关。但是 Tao 等<sup>[24]</sup>人从 8 例胶质瘤患者的肿瘤标本培养出 GSCs,并对其进行了基因检测,发现 Fas/Fas-L mRNA 表达比普通胶质瘤细胞低很多。

### 3.4 GSCs 小生境与免疫治疗

近年来的研究认为 GSCs 定居于血管周围小生境 (niche) 中。两者相互作用相互影响,niche 可以促进 GSCs 的自我更新和增殖,GSCs 分泌血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 维持 niche 结构<sup>[25, 44]</sup>。Ricci 等<sup>[3]</sup>研究发现 GSCs 能够分化为血管内皮细胞,这一发现使得两者的关系更加密切。

破坏血管 niche 就能够消灭定居在其周边的 GSCs。在免疫缺陷小鼠模型中应用抗 VEGF 单克隆抗体贝伐单抗 (bevacizumab) 治疗后显示与血管密切相关的 Nestin<sup>+</sup> 细胞和 CD133<sup>+</sup> 细胞显著减少,表明靶向破坏血管 niche 可以破坏 GSCs 赖以维持生存的微环境<sup>[25]</sup>。另外一种破坏血管 niche 的免疫治疗方式是将 VEGF 受体 (VEGFR) 的多肽成分作为疫苗注射到体内,使机体产生 VEGFR 特异性 T 细胞,这些细胞便能攻击血管 niche 的内皮细胞。这种方法虽刚开展,但是已经在结肠癌和前列腺癌临床研究中获得很好的效果<sup>[14]</sup>。

### 3 展望

综上所述,免疫治疗有高度的选择性和长效的记忆性,能够有效清除具有放、化疗抗性的 GSCs,很有可能是继手术和放、化疗之后的第四种常规治疗方法,大量的基础和临床研究也证明了其有效性和安全性。虽然免疫治疗在临床运用上仍然存在很多难题如治疗副作用、树突状细胞在体内寿命短、存在免疫抑制和免疫逃逸的情况等,但是随着人们对免疫学、胶质瘤免疫生物学、分子生物学研

究的不断深入,GSCs 靶向免疫治疗的部分难题已经得到解决。胶质瘤免疫治疗包括 GSCs 靶向治疗目前还不成熟,其广阔的应用前景值得我们继续深入研究。

#### 参 考 文 献

- [1] Reardon DA, Rich JN, Friedman HS, et al. Recent advances in the treatment of malignant astrocytoma. *J Clin Oncol: Official Journal Of The American Society Of Clinical Oncology*, 2006, 24(8): 1253-1265.
- [2] Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*, 2004, 432(7015): 396-401.
- [3] Ricci-Vitiani L, Pallini R, Biffoni M, et al. Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells. *Nature*, 2010, 468(7325): 824-828.
- [4] Tamura K, Aoyagi M, Ando N, et al. Expansion of CD133-positive glioma cells in recurrent de novo glioblastomas after radiotherapy and chemotherapy. *J Neurosurg*, 2013, 119(5): 1145-1155.
- [5] Angelastro JM, Lame MW. Overexpression of CD133 promotes drug resistance in C6 glioma cells. *Molecular cancer research: MCR*, 2010, 8(8): 1105-1115.
- [6] Bao S, Wu Q, McLendon RE, et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*, 2006, 444(7120): 756-760.
- [7] Daga A, Bottino C, Castriconi R, et al. New perspectives in glioma immunotherapy. *Current Pharmaceutical Design*, 2011, 17(23): 2439-2467.
- [8] Pellegatta S, Poliani PL, Corno D, et al. Neurospheres enriched in cancer stem-like cells are highly effective in eliciting a dendritic cell-mediated immune response against malignant gliomas. *Cancer Res*, 2006, 66(21): 10247-10252.
- [9] Xu Q, Liu G, Yuan X, et al. Antigen-specific T-cell response from dendritic cell vaccination using cancer stem-like cell-associated antigens. *Stem Cells*, 2009, 27(8): 1734-1740.
- [10] Qin K, Tian G, Li P, et al. Anti-glioma response of autologous T cells stimulated by autologous dendritic cells electrofused with CD133<sup>+</sup> or CD133<sup>-</sup> glioma cells. *Journal of neuroimmunology*, 2012, 242(1-2): 9-15.
- [11] Emler DR, Gupta P, Holgado-Madruga M, et al. Targeting a glioblastoma cancer stem-cell population defined by EGF receptor variant III. *Cancer Research*, 2014, 74(4): 1238-1249.
- [12] Sampson JH, Heimberger AB, Archer GE, et al. Immunologic escape after prolonged progression-free survival with epidermal growth factor receptor variant III peptide vaccination in patients with newly diagnosed glioblastoma. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 2010, 28(31): 4722-4729.
- [13] Balyasnikova IV, Ferguson SD, Sengupta S, et al. Mesenchymal stem cells modified with a single-chain antibody against EGFRvIII successfully inhibit the growth of human xenograft malignant glioma. *PLoS One*, 2010, 5(3): e9750.
- [14] Toda M. Glioma stem cells and immunotherapy for the treatment of malignant gliomas. *ISRN Oncology*, 2013, 2013: 673-793.
- [15] Gong A, Huang S. FoxM1 and Wnt/beta-catenin signaling in glioma stem cells. *Cancer Res*, 2012, 72(22): 5658-5662.
- [16] Nakada M, Nambu E, Furuyama N, et al. Integrin  $\alpha 3$  is overexpressed in glioma stem-like cells and promotes invasion. *Br J Cancer*, 2013, 108(12): 2516-2524.
- [17] Wang H, Lathia JD, Wu Q, et al. Targeting interleukin 6 signaling suppresses glioma stem cell survival and tumor growth. *Stem Cells*, 2009, 27(10): 2393-2404.
- [18] Turchi L, Debruyne DN, Almairac F, et al. Tumorigenic potential of miR-148A\* in glioma initiating cells requires NOTCH1 signaling. *Stem Cells* 2013, 31(7): 1252-1265.
- [19] Ahmed N, Salsman VS, Kew Y, et al. HER2-specific T cells target primary glioblastoma stem cells and induce regression of autologous experimental tumors. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 2010, 16(2): 474-485.
- [20] Yawata T, Nakai E, Park KC, et al. Enhanced expression of cancer testis antigen genes in glioma stem cells. *Molecular carcinogenesis*, 2010, 49(6): 532-544.
- [21] Xu Q, Yuan X, Yu JS. Glioma stem cell research for the development of immunotherapy. *Advances In Experimental Medicine And Biology*, 2012, 746: 216-225.
- [22] Parney IF. Basic concepts in glioma immunology. *Advances In Experimental Medicine And Biology*, 2012, 746: 42-52.
- [23] Toda M. Glioma antigen. *Advances In Experimental Medicine And Biology*, 2012, 746: 77-84.
- [24] Tao J, Qiu B, Zhang D, et al. Expression levels of Fas/Fas-L mRNA in human brain glioma stem cells. *Molecular Medicine Reports*, 2012, 5(5): 1202-1206.
- [25] 董雪涛 杨学军. 脑肿瘤干细胞与小生境. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2010, 37(6): 565-569.