

异甘草素对 SHG44 人脑胶质瘤干细胞增殖和分化的影响

荔志云, 孙红军, 周杰, 林瑜亮, 党莹, 孙建军, 李长栋, 黄燕萍

兰州军区兰州总医院神经外科, 甘肃 兰州 730050

摘要:目的 探讨不同浓度异甘草素对 SHG44 人脑胶质瘤干细胞增殖和分化的影响及机制。方法 实验分为二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)对照组, 异甘草素(10~160 $\mu\text{mol/L}$)诱导组, 氮-[氮-(3,5-二氟苯乙酰)-L-丙氨酸]-S-苯基甘氨酸丁酯(N-[N-(3,5-difluorophenacetyl)-1-alanyl]-S-ph, DAPT)(2.0 $\mu\text{mol/L}$)阻断剂组, 异甘草素+阻断剂组(10~160 $\mu\text{mol/L}$ +2.0 $\mu\text{mol/L}$ DAPT), 采用 CCK-8 法、免疫荧光染色、Western blot 及 Real-time PCR 分别检测细胞抑制率、相关分化蛋白及 Notch1 通路相关基因表达情况。结果 异甘草素在 12~48 h, 随着浓度增加, 细胞抑制率减弱($P < 0.05$), 且分化细胞越多, 干细胞减少; 72 h 后随着浓度增加, 细胞抑制率增强($P < 0.05$), 分化细胞及干细胞同时减少; 隔日加药至第 7 d 时, 经统计分析胶质瘤干细胞球数目减少、直径减小(与对照组比), 且 $P < 0.05$ 。异甘草素作用 72 h 后: 与对照组比较, 随着异甘草素浓度的增加 Nestin 蛋白表达量逐渐下调($P < 0.05$); 与对照组比较, 10、40、160 $\mu\text{mol/L}$ 组 GFAP 蛋白表达水平平均上调($P < 0.05$), 且 40 $\mu\text{mol/L}$ 组 GFAP 蛋白表达量较其他浓度组均较高, ($P < 0.05$); 与对照组比较, 10、40、160 $\mu\text{mol/L}$ 组 β -Tubulin III 蛋白表达水平平均上调($P < 0.05$), 且 10 $\mu\text{mol/L}$ 组 β -Tubulin III 蛋白表达量较其他浓度组均较高($P < 0.05$)。Notch1 通路阻断剂作用后, 与对照组比较, 各异甘草素组和阻断剂组 Notch1、RBP-JK 及 Hes1 基因表达均显著下调($P < 0.05$); 与异甘草素组比较, Notch1、RBP-JK 及 Hes1 基因表达在异甘草素加 DAPT 组及阻断剂组显著下调($P < 0.05$); 与阻断剂组比较, Notch1、RBP-JK 及 Hes1 基因表达在异甘草素加 DAPT 组显著下调($P < 0.05$)。结论 异甘草素能诱导 SHG44 人脑胶质瘤干细胞向星形胶质细胞和神经元细胞分化, 且能抑制其增殖, 可能与下调 Notch1 信号通路中的 Notch1、RBP-JK 及 Hes1 有关。

关键词: 异甘草素; SHG44 胶质瘤干细胞; Notch1 信号通路; 分化作用; 抑制作用

DOI: 10.16636/j.cnki.jinn.2017.03.004

Effect of isoliquiritigenin on proliferation and differentiation of SHG44 human brain glioma stem cells

Li Zhiyun, Sun Hongjun, Zhou jie, Lin Yuliang, Dang Ying, Sun Jianjun, Li Changdong, Huang Yanping. Department of Neurosurgery, Lanzhou General Hospital of the PLA Lanzhou Military Area Command, Lanzhou 730050, China

Abstract: Objective To investigate the effect of isoliquiritigenin on the proliferation and differentiation of SHG44 human brain glioma stem cells and related mechanisms. **Methods** SHG44 cells were divided into dimethyl sulfoxide (DMSO) control group, isoliquiritigenin (10–160 $\mu\text{mol/L}$) induction group, N-[N-(3,5-difluorophenacetyl)-1-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester (DAPT, 2.0 $\mu\text{mol/L}$) antagonist group, and isoliquiritigenin (10–160 $\mu\text{mol/L}$) + antagonist DAPT (2.0 $\mu\text{mol/L}$) group. CCK-8, immunofluorescent staining, Western blot, and real-time PCR were used to measure cell inhibition rate and expression of differentiation proteins and Notch1 pathway genes. **Results** Within 12–48 hours, the cell inhibition rate of isoliquiritigenin decreased with the increasing concentration ($P < 0.05$), and the number of stem cells decreased with the increase in differentiated cells; after 72 hours, cell inhibition rate increased with the increasing concentration ($P < 0.05$), and there were reductions in differentiated cells and stem cells. The drugs were added every other day, and on the seventh day, there were significant reductions in the number and diameter of glioma stem cells (compared with the control group, $P < 0.05$). After 72 hours of isoliquiritigenin treatment, the expression of Nestin protein was gradually downregulated with the increasing concentration of isoliquiritigenin (compared with the control group, $P < 0.05$); compared with the control group, the 10, 40, and 160 $\mu\text{mol/L}$ groups had a significant increase in the expression of GFAP protein ($P < 0.05$), and the 40 $\mu\text{mol/L}$ group had significantly higher expression of GFAP protein than the other groups ($P < 0.05$); compared with the control group,

收稿日期: 2016-11-01; 修回日期: 2017-04-17

作者简介: 荔志云, 男, 教授, 硕士研究生导师, 主任医师, 主要从事脑外伤与颅内肿瘤的基础与临床研究。

the 10, 40, and 160 $\mu\text{mol/L}$ groups had a significant increase in the expression of β -Tubulin III protein ($P < 0.05$), and the 10 $\mu\text{mol/L}$ group had significantly higher expression of β -Tubulin III protein than the other groups ($P < 0.05$). After the treatment with Notch1 pathway antagonist, the isoliquiritigenin groups and antagonist group had significant reductions in the expression of Notch1, RBP-JK, and Hes1 genes compared with the control group ($P < 0.05$); compared with the isoliquiritigenin group, the isoliquiritigenin + DAPT group had significant reductions in the expression of Notch1, RBP-JK, and Hes1 genes ($P < 0.05$); compared with the antagonist group, the isoliquiritigenin + DAPT group had significant reductions in the expression of Notch1, RBP-JK, and Hes1 genes ($P < 0.05$). **Conclusions** Isoliquiritigenin can induce the differentiation of SHG44 human glioma stem cells into astrocytes and neurons and inhibit the proliferation of glioma stem cells, possibly by downregulating the expression of Notch1, RBP-JK, and Hes1 in the Notch1 signaling pathway. **Key words:** Isoliquiritigenin; SHG44 human glioma stem cell; Notch1 signaling pathway; Differentiation; Inhibitory effect

现阶段胶质母细胞瘤标准治疗方案是最大程度保护神经功能基础上最大程度手术切除联合放疗及烷化剂辅助化疗。然而胶质母细胞瘤5年存活率仍低于10%^[1], 总体中位生存期为16~19个月^[2]。究其原因胶质瘤细胞耐受化疗是治疗失败的关键。胶质瘤干细胞(Glioma stem cells, GSC)是胶质瘤耐化疗、抗拒放疗以及复发的根源^[3]。异甘草素(Isoliquiritigenin, ISL)是一种异黄酮类化合物, 主要存在于甘草中, 有着很强的药理活性, 具有抗肿瘤、抗病毒、抗自由基、松弛血管、抑制血小板聚集、抑制脂质过氧化等生物活性^[4,5]。本课题研究ISL诱导作用于GSC后, 细胞形态学改变、分子标志物的表达及Notch1信号通路中关键基因的表达情况。以证实ISL能诱导GSC向星形细胞和神经元细胞分化, 并从分子生物学角度揭示其作用机制, 为异甘草素在治疗人脑胶质瘤的应用提供一定的理论和实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

人脑胶质瘤SHG44细胞系(ATCC公司); 胎牛血清、DMEM培养基、DMEM/F12(1:1)培养(Gibco公司); B27、EGF、FGF(Invitrogen公司); 异甘草素(上海源叶生物科技有限公司, 纯度 $\geq 98\%$); 小鼠抗人Nestin抗体、兔抗人Bcl-2抗体、小鼠抗人 β -actin单克隆抗体、小鼠抗人单克隆抗体 β -Tubulin III、小鼠抗人单克隆抗体GFAP、异硫氢酸荧光素标记的山羊抗兔、多克隆抗体(goat-a-ribbit-FITC)、藻红蛋白(PE)标记的兔抗小鼠(ribbit-a-mouse-PE)和辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠IgG(Abcam公司); 兔抗人CD133抗体(Abnova公司); 反转录试剂盒(Prime Script™ reagent Kit)、实时定量PCR试剂盒(SYBR Premix Ex Taq™ II)(大连宝生物工程有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 SHG44人脑胶质瘤干细胞的提取、鉴定与

培养: 前期实验中已经完成了分离、鉴定与培养SHG44人脑胶质瘤干细胞^[7]的工作。

1.2.2 实验分组 以无血清DMEM/F12培养基(含EGF、FGF、B27)(含与实验组等量的DMSO)为对照组, 异甘草素(10 $\mu\text{mol/L}$ 、40 $\mu\text{mol/L}$ 、160 $\mu\text{mol/L}$)为诱导组, DAPT(2.0 $\mu\text{mol/L}$)为阻断剂组, 异甘草素+阻断剂组(10~160 $\mu\text{mol/L}$ + 2.0 $\mu\text{mol/L}$ DAPT)。

1.2.3 CCK8法检测ISL作用后细胞抑制率和细胞形态观察

1.2.3.1 CCK8法检测ISL作用后细胞增殖和抑制率 调整胶质瘤干细胞密度至 2.5×10^3 个/孔(100 μl)接种到Cyagen 96孔悬浮细胞培养板中并进行预培养。对照组和ISL每个浓度均设6个复孔。37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、100%湿度培养24 h, 每孔加入CCK-8液8 μl , 继续孵育3 h后使用酶标仪读取450 nm处吸光度值。重复3次。

1.2.3.2 镜下观察ISL作用后胶质瘤干细胞形态

调整胶质瘤干细胞密度至150个/孔(400 μl)接种到Cyagen 24孔悬浮细胞培养板中培养, 同时加入各剂量药物。对照组和ISL每个浓度均设3个复孔。37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、100%湿度培养。隔日加药。实验重复3次。观察药物作用至第7 d胶质瘤干细胞球的形成情况。

Western blot法检测GFAP、 β -Tubulin、Nestin蛋白的表达: 富集ISL作用72 h的胶质瘤干细胞至15 mL离心管, 1500 rpm离心8 min。弃去培养液, 用PBS洗2遍, 离心后用1 mL空针吸尽水分, 然后加入配好的裂解液, 裂解后吸至EP管中, 离心(4 $^{\circ}\text{C}$ 、12000 r离心50 min), 收集上清液。对提取蛋白进行定量及变性处理, 按10% SDS-PAGE胶分离进行上样, 湿法进行转膜。用5%脱脂奶粉室温封闭2 h, GFAP(1:500)、 β -Tubulin(1:1000)、Nestin(1:1000)、 β -actin(1:1000), 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。常温下0.01 mol/L TBST

洗膜后加 HRP 标记的兔抗小鼠二抗 (1:12000) 常温孵育 2 h, 0.01 mol/L TBST 洗膜后进行曝光。用 ipwin 32 软件扫描条带灰度值。

1.2.4 实时定量 PCR PCR 扩增条件为 95℃ 30 s, 95℃ 5 s, 60℃ 31 s, 共进行 40 个循环, PCR 引物见表 1。目标基因的相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法, 其中 $-\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ (标准基因) - ΔCt (目标基因)。

1.3 统计学分析

数据均以均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 使用 SPSS 20.0 软件进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 ISL 对胶质瘤干细胞抑制的影响

2.1.1 ISL 隔日加药至第 7 d 时对 SHG44 人脑胶质瘤干细胞球的影响 隔日加药至第 7 d 时, 胶质瘤干细胞变化 (图 1), 经统计分析胶质瘤干细胞球数目减少、直径减小 (与对照组比), 且 $P < 0.05$,

当异甘草素浓度小于 40 $\mu\text{mol/L}$ 时, 与 160 $\mu\text{mol/L}$ 相比, 干细胞数目、直径均具有统计学意义 ($P < 0.05$), 当异甘草素浓度大于 40 $\mu\text{mol/L}$ 时, 与 160 $\mu\text{mol/L}$ 相比, 干细胞数目、直径均无统计学意义 ($P > 0.05$) (图 2)。

表 1 实时定量 PCR 引物

Gene	Upstream primers	Downstream primers	Amplification length(bp)
NOTCH1	5'-AAGCTGCATCCAGA GGCAAAC-3'	5'-TGCCATACACAC TCCGAGAACAC-3'	172
RBP-JK	5'-CAGATGATCCTGTG TCACAAC-3'	5'-GAAGCGCCATCA TTTATCATCTC-3'	154
HES1	5'-GTGTCAACACGACA CCGGATAAAC-3'	5'-CAGAATGTCCGC CTTCTCCAG-3'	185
GAPDH	5'-GCACCCGTC AAGGCT GAGAAC-3'	5'-TGGTGAAGACGC CAGTGA-3'	138

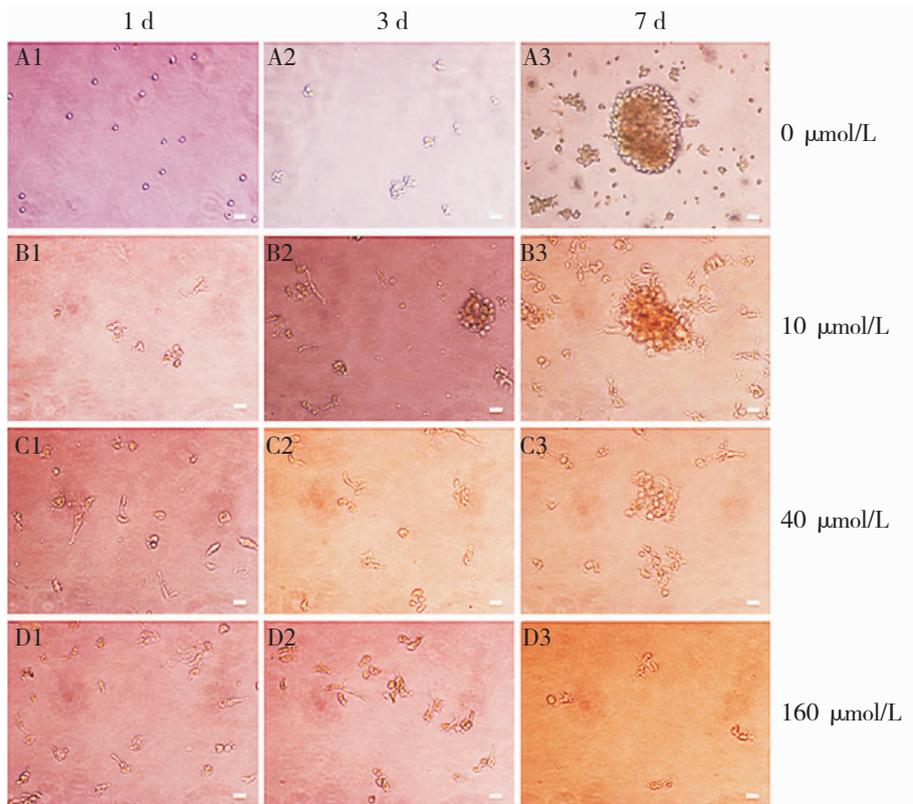


图 1 胶质瘤干细胞变化 ($\times 200$) A1、A2、A3 分别为对照组 1 d、3 d、7 d 胶质瘤干细胞变化; B1、B2、B3 分别为 ISL 10 $\mu\text{mol/L}$ 组 1 d、3 d、7 d 胶质瘤干细胞变化; C1、C2、C3 分别为 ISL 40 $\mu\text{mol/L}$ 组 1 d、3 d、7 d 胶质瘤干细胞变化; D1、D2、D3 分别为 ISL 160 $\mu\text{mol/L}$ 组 1 d、3 d、7 d 胶质瘤干细胞变化, 比例尺为 50 μm 。

2.1.2 ISL 对细胞增殖的影响 CCK8 法检测: 不同 ISL (10 ~ 160 $\mu\text{mol/L}$) 在 12 ~ 48 h, 随着浓度增加胶质瘤干细胞活性增强 ($P < 0.05$)。然而, 72 h

后, 不同浓度 ISL 明显抑制胶质瘤干细胞, 且随着浓度增加胶质瘤干细胞活性降低 ($P < 0.05$) (图 3)。

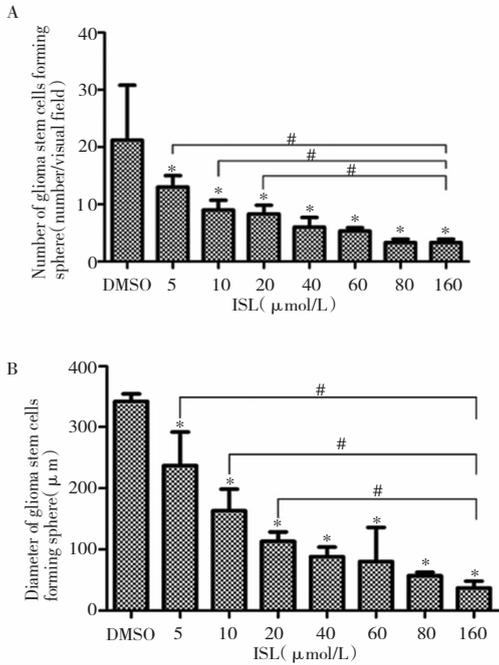


图2 不同浓度 ISL 作用于胶质瘤干细胞至第 7 d 时直径及数目变化。注：* $P < 0.05$ ，与对照组比较；# $P < 0.05$ ，与 160 $\mu\text{mol/L}$ 组比较

2.2 ISL 对胶质瘤干细胞分化的影响

2.2.1 荧光染色观察胶质瘤干细胞分化表达情况 各浓度组随机选取 5 个视野拍照发现(图 4)，对照组胶质瘤干细胞无明显分化，且呈球形，ISL 在 24 ~ 48 h，随浓度增加分化细胞越多，GFAP 蛋白表达组细胞呈星形，触角末端呈板状， β -Tubulin III 蛋白表达组呈梭形且突起细长，且干细胞随之减少，在 72 h 后，随着浓度增加分化细胞及干细胞同时减少。

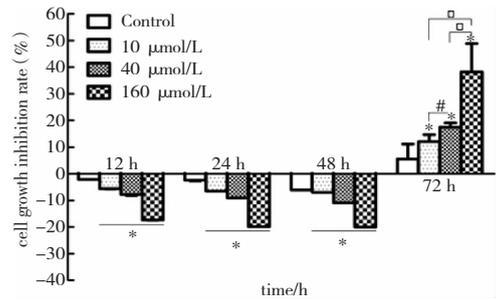
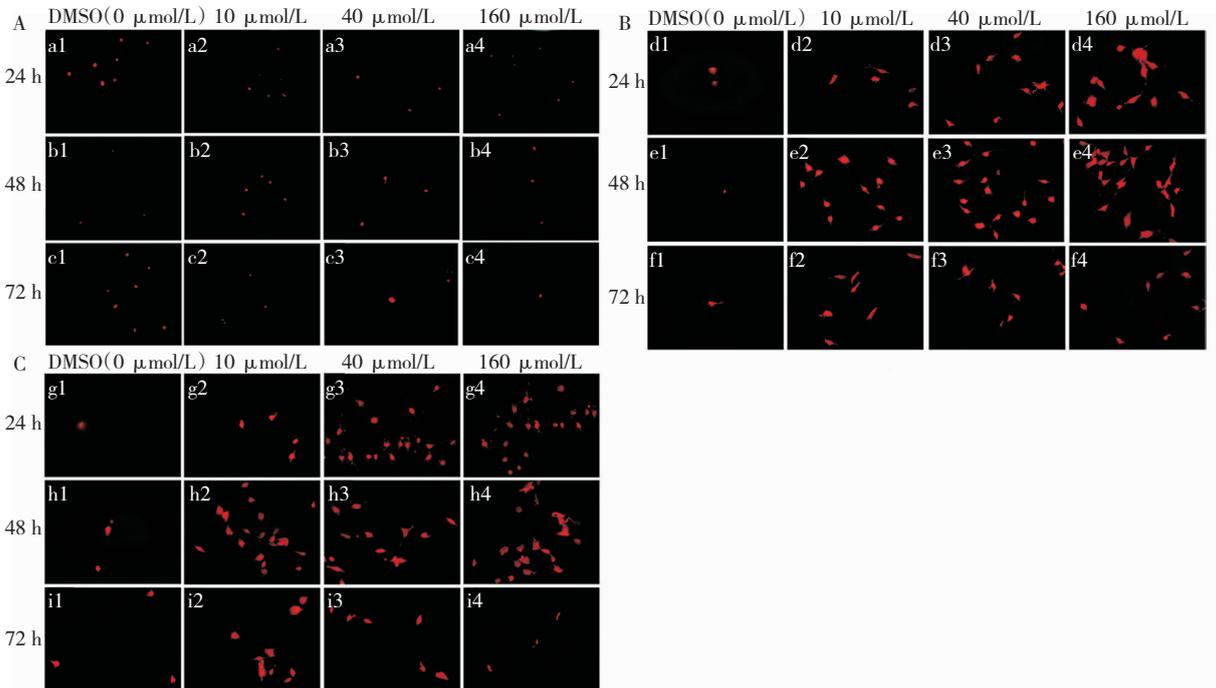


图3 不同时间段不同浓度 ISL 对 SHG44 胶质瘤干细胞增殖抑制情况。注：* $P < 0.05$ ，与对照组比较；# $P < 0.05$ ，40 $\mu\text{mol/L}$ 组与 10 $\mu\text{mol/L}$ 组比较；□ $P < 0.05$ ，与 160 $\mu\text{mol/L}$ 组比较



注：A. Nestin 蛋白表达情况；B. GFAP 蛋白表达情况；C. β -Tubulin III 蛋白表达情况

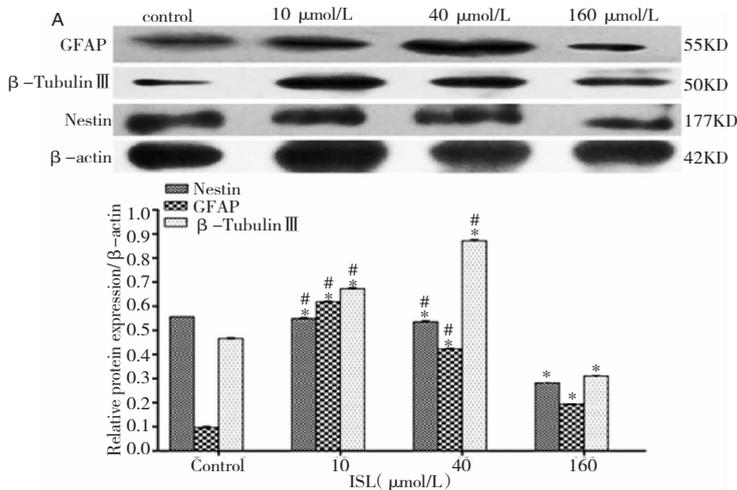
图4 不同浓度 ISL 诱导 SHG44 胶质瘤干细胞分化情况 (IF $\times 400$)。

2.2.2 ISL 诱导胶质瘤干细胞分化后相关蛋白表达量 ISL 作用 72 h 后 Western blot 检测结果(图 5)：与对照组比较，随着 ISL 浓度的增加 Nestin 蛋

白表达量逐渐下调，差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)；与对照组比较，10、40、160 $\mu\text{mol/L}$ 组 GFAP 蛋白表达水平均上调，差异具有统计学意义 ($P <$

0.05), 且 40 μmol/L 组 GFAP 蛋白表达量较其他浓度组均较高, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 与对照组比较, 10、40、160 μmol/L 组 β-Tubulin III 蛋白

表达水平均上调, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 且 10 μmol/L 组 β-Tubulin III 蛋白表达量较其他浓度组均较高, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。



注: 与空白对照组比较, * $P < 0.05$; 与 160 μmol/L 异甘草素组比较, # $P < 0.05$

图 5 不同浓度 ISL 诱导 72 h 后胶质瘤干细胞分化相关蛋白的表达

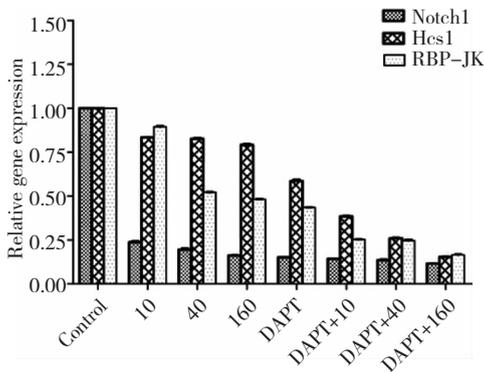
2.3 阻断 Notch1 通路 Notch1、RBP-JK 和 Hes1 的 mRNA 表达

Notch1 通路阻断剂作用后, Real-time PCR 检测结果(图 6): 与对照组比较, 各 ISL 组和阻断剂组 Notch1、RBP-JK 及 Hes1 的 mRNA 表达均显著下调, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 ISL 组比较, Notch1、RBP-JK 及 Hes1 基因表达在 ISL 加 DAPT 组及阻断剂组显著下调, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 与阻断剂组比较, Notch1、RBP-JK 及 Hes1 基因表达在 ISL 加 DAPT 组显著下调, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

3 讨论

目前胶质瘤细胞耐化疗是胶质瘤患者治疗失败的关键。胶质瘤干细胞是胶质瘤细胞克隆源性细胞^[8], 是胶质瘤抗拒放疗、耐化疗、进展及复发的根源^[9], 因此研发新型靶向阻断 GSC 耐药途径增强化疗敏感性成为了胶质瘤研究的主要目标。

本实验异甘草素浓度按等比例进行选择, 最低浓度为 5 μmol/L, 最高浓度为 160 μmol/L。首先通过细胞增殖抑制实验 (CCK-8) 法检测不同浓度异甘草素对胶质瘤干细胞的抑制率, 发现 72h 内、160 μmol/L 浓度内: 72 h、160 μmol/L 时抑制率最强; 另外隔日加药至第 7 天, 通过统计分析胶质瘤干细胞球数目及直径, 当异甘草素浓度小于 40 μmol/L 时, 与 160 μmol/L 相比, 干细胞数目、直径均具有统计学意义, 当异甘草素浓度大于 40 μmol/L 时, 与 160 μmol/L 相比, 干细胞数目、直径均无统计学意义。综上所述, ISL 160 μmol/L 浓度作用 72 小时后, GSC 数目减少比例最多, 分化成星形细胞和神经元细胞最多。前期实验研究发现 ISL 具有抑制 SHG44 胶质瘤干细胞增殖的作用, 且呈时间和剂量依赖性, 同时发现不同浓度 ISL 在 12 ~ 48 h 主要促进胶质瘤干细胞分化, 胶质瘤干细胞形态由球形向星形及多角形转变, 由于分化过程中必然伴随着分裂, 致使吸光度值升高; 然而 72 h 时 ISL 主要抑制胶质瘤干细胞增殖, 且呈剂量



注: * $P < 0.05$, 与对照组比较; # $P < 0.05$, 与阻断剂 (DAPT) 组比较

图 6 不同浓度 ISL 诱导下胶质瘤干细胞 Notch1、Hes1 及 RBP-JK 基因表达情况。

依赖性。以上结果主要原因可能是 ISL 早期促进胶质瘤干细胞分化且使其化疗敏感性增强,后期大部分胶质瘤干细胞进入分化状态且化疗敏感性强, ISL 以杀伤抑制为主。李雅娟等^[6]研究发现 ISL 能抑制大鼠 C6 胶质瘤细胞的增殖,并能诱导 C6 细胞向星形胶质细胞分化,且呈时间、剂量依赖性。

Notch1 通路属于 Notch 通路的主要分支通路,是肿瘤干细胞(Tumor stem cells, TSC)和正常干细胞命运的主要决策者^[10]。近年来,大量的研究发现随着胶质瘤恶性程度增加,GSC 含量越高^[11,12],且 Notch1 通路相关蛋白表达水平也随之升高^[13,14];另外,化疗敏感性与 GSC 的数量密切相关^[10]。GSC 通过活化 Notch1 通路调控其自我更新、抑分化和激发下游分子途径启动新生肿瘤^[15]。因此,研发新型靶点阻断剂阻断 Notch1 通路相关节点是治疗胶质瘤潜在的临床治疗策略。

DAPT 是一种 γ 分泌酶复合物抑制剂,并间接抑制 γ -分泌酶底物 Notch 的活性,进而影响细胞信号传导和细胞分化。DAPT 介导的 Notch 反应抑制效应能增强胚胎体干细胞向神经分化的功能,且此过程不受 SHH 信号的干扰^[16]。

本研究发现,不同浓度 ISL 可诱导胶质瘤干细胞向星形细胞及神经元细胞分化,且在 12 ~ 48 h 以诱导分化为主,在 72 h 后以杀伤为主;通过阻断 Notch1 信号通路,检测 ISL 组发现 Notch1、Hes1 及 RBP-JK 的 mRNA 表达均下降,反应出 ISL 可能通过阻断 Notch1 通路促胶质瘤干细胞分化且抑制其增殖;此外异甘草素联合 DAPT 对 Notch1 通路抑制更强,具有协同效应。

综上所述,本研究证明 ISL 可能通过阻断 Notch1 通路促进胶质瘤干细胞向星形细胞及神经元细胞分化,且能抑制其增殖。因此,继续深入研究 ISL 对胶质瘤干细胞的作用机制, ISL 可能是更具选择性、有效性以及低毒的新型抗胶质瘤干细胞药物,与目前的治疗方式相结合,可能将大大改善胶质瘤患者的预后和延长其寿命。

参 考 文 献

[1] Clarke J, Penas C, Pastori C, et al. Epigenetic pathways and glioblastoma treatment [J]. *Epigenetics*, 2013, 8(8): 785-795.

[2] Agarwal S, Manchanda P, Vogelbaum MA, et al. Function of the blood-brain barrier and restriction of drug delivery to invasive glioma cells: findings in an orthotopic rat xenograft model

of glioma [J]. *Drug Metab Dispos*, 2013, 41(1):33-39.

[3] Stockhausen MT, Kristoffersen K, Poulsen HS. The functional role of Notch signaling in human gliomas [J]. *Neuro Oncol*, 2010, 12(2):199-211.

[4] Li D, Wang Z, Chen H, et al. Isoliquiritigenin induces monocytic differentiation of HL-60 cells [J]. *Free Radic Biol Med*, 2009, 46(6):731-736.

[5] Ye L, Gho WM, Chan FL, et al. Dietary administration of the licorice flavonoid isoliquiritigenin deters the growth of MCF-7 cells overexpressing aromatase [J]. *Int J Cancer*, 2009, 124(5):1028-1036.

[6] 李雅娟,甘露,王占洋,等. 异甘草素对大鼠 C6 胶质瘤细胞增殖和分化的影响 [J]. *中国药理学通报*, 2015,31(9):1298-1303.

[7] 孙红军,荔志云. 不同无血清培养方式提取 SHG44 人脑胶质瘤干细胞的比较研究 [J]. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2016,43(3):193-197.

[8] Crueru ML, Neagu M, Demoulin JB, et al. Therapy targets in glioblastoma and cancer stem cells: lessons from haematopoietic neoplasms [J]. *J Cell Mol Med*, 2013, 17(10):1218-1235.

[9] Schonberg DL, Lubelski D, Miller TE, et al. Brain tumor stem cells: Molecular characteristics and their impact on therapy [J]. *Mol Aspects Med*, 2014, 39:82-101.

[10] Garner JM, Fan M, Yang CH, et al. Constitutive activation of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) and nuclear factor κ B signaling in glioblastoma cancer stem cells regulates the Notch pathway [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(36):26167-26176.

[11] Laks DR, Masterman-Smith M, Visnyei K, et al. Neurosphere formation is an independent predictor of clinical outcome in malignant glioma [J]. *Stem Cells*, 2009, 27(4):980-987.

[12] Panosyan EH, Laks DR, Masterman-Smith M, et al. Clinical outcome in pediatric glial and embryonal brain tumors correlates with in vitro multi-passageable neurosphere formation [J]. *Pediatr Blood Cancer*, 2010, 55(4):644-651.

[13] Li J, Cui Y, Gao G, et al. Notch1 is an independent prognostic factor for patients with glioma [J]. *J Surg Oncol*, 2011, 103(8):813-817.

[14] Dell'albani P, Rodolico M, Pellitteri R, et al. Differential patterns of NOTCH1-4 receptor expression are markers of glioma cell differentiation [J]. *Neuro Oncol*, 2014,16(2):204-216.

[15] Wang J, Wakeman TP, Lathia JD, et al. Notch promotes radioresistance of glioma stem cells [J]. *Stem Cells*, 2010, 28(1):17-28.

[16] Crawford TQ, Roelink H. The notch response inhibitor DAPT enhances neuronal differentiation in embryonic stem cell-derived embryoid bodies independently of sonic hedgehog signaling [J]. *Dev Dyn*, 2007, 236(3):886-892.