

## 肿瘤微环境对胶质瘤干细胞影响机制的研究进展

高翔宇<sup>1,2</sup>, 岳康异<sup>1</sup>, 曹源<sup>1</sup>, 韩骅<sup>2</sup>, 梁亮<sup>2</sup>, 蒋晓帆<sup>1</sup>

1. 空军军医大学第一附属医院西京医院神经外科, 陕西 西安 710032

2. 空军军医大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室, 陕西 西安 710032

**摘要:** 胶质瘤干细胞(GSCs)是具有干性特征和功能的胶质瘤细胞,近近年来受到广泛关注。与普通胶质瘤细胞相比,GSCs具有很强的成瘤、侵袭、化疗放疗抵抗能力,可能是导致转移和肿瘤复发的主要因素。随着研究不断深入,人们逐渐发现肿瘤微环境(TME)在GSCs的形成中发挥重要作用,并且TME能够促进GSCs表型的维持。该文将围绕TME对GSCs的影响和机制的前沿进展进行讨论;并详细介绍TME中缺氧、酸性、损伤相关分子模式(DAMP)如高迁移率族蛋白B1(HMGB1)以及外泌体对GSCs的具体作用及机制。

**关键词:** 胶质瘤干细胞; 肿瘤微环境; 缺氧; 损伤相关分子模式; 外泌体

中图分类号: R739.41

DOI: 10.16636/j.cnki.jinn.2020.05.015

### Research advances in effects of tumor microenvironment on glioma stem cells

GAO Xiang-Yu<sup>1,2</sup>, YUE Kang-Yi<sup>1</sup>, CAO Yuan<sup>1</sup>, HAN Hua<sup>2</sup>, LIANG Liang<sup>2</sup>, JIANG Xiao-Fan<sup>1</sup>. 1. Department of Neurosurgery, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China; 2. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China

Corresponding author: JIANG Xiao-Fan, Prof. Dr. Chief Physician, Major in neurosurgery research, Email: jiangxf@fmmu.edu.cn; Liang Liang, Assoc. Prof. Dr. Major in molecular genetics research of tumors, Email: lliang2@fmmu.edu.cn.

**Abstract:** Glioma stem cells (GSCs), glioma cells with the properties and functions of stem cells, have drawn lots of attention in recent years. GSCs exhibit stronger abilities of tumorigenesis, invasion, and resistance to chemotherapy or radiotherapy than general glioma cells, which may be the main cause of tumor metastasis and relapse. Studies have increasingly revealed an important role of the tumor microenvironment (TME) in the generation and the maintenance of phenotypes of GSCs. This article focuses on recent progress in the effects of TME on GSCs, and reviews the influence of TME factors (hypoxia, acidity, damage-associated molecular pattern such as high mobility group box 1 protein, and exosomes) on GSCs.

**Key words:** glioma stem cells; tumor microenvironment; hypoxia; damage-associated molecular pattern; exosome

胶质瘤源自神经上皮,是大脑和脊髓最常见的原发性肿瘤,其恶性程度高、预后差,很难根治,往往会复发。2004年, Singh等通过对胶质瘤细胞膜表面干性标志物CD133阳性的细胞进行分选,成功地从人类手术标本中直接识别并分离出胶质瘤干细胞(glioblastoma stem cells, GSCs)。GSCs具有促

进细胞过度增殖,侵袭性生长,增加血管生成,抵抗细胞凋亡等特点。因此,GSCs的研究对于临床胶质瘤的防治十分重要。近年来,随着对GSCs研究的不断深入,发现肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)对GSCs的生存和发展具有重要作用。现就TME对GSCs影响和机制的最新研究进展作

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81871023)

收稿日期:2020-05-27;修回日期:2020-09-28

作者简介:高翔宇(1995-),男,在读硕士研究生,课题研究方向为胶质瘤干细胞分子机制,E-mail: gxyjingdaihuakai@163.com。

通信作者:蒋晓帆(1965-),男,博士,教授、主任医师,主要从事神经外科学, E-mail: jiangxf@fmmu.edu.cn;梁亮(1981-),女,博士,副教授,主要从事肿瘤分子遗传学研究, E-mail: lliang2@fmmu.edu.cn。

一综述。

## 1 胶质瘤干细胞

2007年WHO根据胶质瘤组织病理学及预后情况将胶质瘤细胞分成4个不同的等级(I~IV级)<sup>[1]</sup>。IV级星型细胞瘤胶质母细胞瘤(Glioblastoma, GBM)是一种具有高度侵袭性和致命性的肿瘤,通常被认为无法治愈。GBM中有一群罕见的亚群细胞,能够自我更新、分化,具有可塑性,研究者们将其命名为GSCs<sup>[2]</sup>。目前,多项研究已经确定并分离出具有肿瘤启动特性的GSCs<sup>[3-4]</sup>。一般认为GSCs具有3个特征:①自我更新能力。GSCs能通过不对称分裂产生一个与之性质相同的GSC和一个普通的胶质瘤细胞,维持GSC数目的稳定。自我更新能力需要通过体外重复形成克隆球和体内重复成瘤等功能实验确定。②增殖和分化能力。GSCs可分化产生快速增殖的祖细胞,再分化和产生“成熟”的、带有神经元和/或胶质细胞标志的胶质瘤细胞。GSCs的快速增殖通常表现为以克隆球的形式生长,而分化成熟能力则依靠特定的分化成熟标志进行判断。③表达干细胞标志分子。GSCs可以表达与正常干细胞类似的“干性”标志分子。这些分子一类是维持干性所需要的分子,如干性相关的转录因子Oct4、c-Myc以及Sox2、端粒酶等;另一类只是干细胞的标志分子,如CD133。

在胶质瘤发生发展的过程中,GSCs处于异质性的肿瘤细胞层级的顶端,能够诱导血管生成、促进肿瘤转移。此外,GSCs拥有强大的DNA修复能力,能够从传统的治疗手段中迅速恢复,从而导致胶质瘤患者产生耐药性,疾病易复发<sup>[5]</sup>。GSCs特异性表达的细胞表面分子不仅能够维持细胞干性,而且是筛选和靶向GSCs群体的理想标记。其中,CD133是用来标记GSCs的经典生物标志物。胶质瘤的CD133<sup>+</sup>亚群细胞能够在体外表现出强大的自我更新和增殖能力。同时在体内试验中,这些细胞能够在脑内形成肿瘤,并保持原始的组织学特征<sup>[4]</sup>。研究发现,通过过表达4种关键基因(Pou3f2、Sox2、Olig2、Sall2),胶质瘤细胞会发生去分化生成GSCs<sup>[6]</sup>。这表明关键的促肿瘤基因能够促进GSCs的形成并且能够调控胶质瘤的发生与发展。

## 2 肿瘤微环境

TME在肿瘤的自我更新、分化、转移过程中都发挥着重要的作用<sup>[7]</sup>。TME包括免疫细胞、血管周细胞、成纤维细胞、胶质细胞等各类细胞,它还包

括细胞分泌的外泌体、细胞因子以及多糖、激素、一氧化氮等各类非生物分子。此外,TME具有低氧、低pH、高压等特点。肿瘤与微环境之间有着重要的交互作用,微环境的改变甚至可以决定肿瘤未来的命运。TME使得肿瘤细胞具有明显的遗传和表观遗传特征。研究发现,侵袭性间充质型肿瘤干细胞存在于细胞密度高的区域<sup>[8-9]</sup>,即肿瘤边缘靠近其他TME细胞的位置<sup>[10]</sup>。这说明了TME在肿瘤干细胞形态和功能特征形成中发挥重要作用,并且当肿瘤细胞脱离TME时,肿瘤的生存能力、侵袭能力将大幅下降。TME具有多种负反馈调节机制,一旦某种不利因素出现,TME会反馈性地形成多种互补或可替代的代谢途径,当某条通路受到阻断时,与其功能相似的通路会迅速启动并发挥作用。

## 3 胶质瘤干细胞与肿瘤微环境

GSCs的起源存在争议,很可能在不同情况下有不同的发生机制,但无论是来自于正常神经干细胞的突变,或是来自于体细胞GBM细胞的去分化,GSCs的形成都高度依赖于TME及其旁分泌信号网络。这些信号分子和肿瘤细胞自身内在通路相互作用,促进肿瘤细胞基因组或表观组的不稳定,促使GSCs的形成和维持。临床胶质瘤标本的免疫组织化学结果显示,GSCs仅在胶质瘤内特定的壁龛中普遍存在,而不是在整个肿瘤中均匀分布。这提示我们,实体肿瘤中微环境条件对GSCs的分子和生物学特性的调控至关重要<sup>[11]</sup>。因此,研究GSCs及其与微环境之间的交互作用不仅对理解GSCs的生物学特性有重要意义,而且还可以预测GSCs对治疗的反应,并基于耐药肿瘤细胞确定新的治疗靶点。

### 3.1 GSCs与缺氧微环境

缺氧是肿瘤微环境的重要特征。GBM的快速生长使得细胞处于一个相对缺氧的环境,同时,低氧水平可以通过激活血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)促进肿瘤细胞生长。在胶质瘤中,VEGF能够诱导细胞增殖,促进细胞侵袭,并维持GSCs的未分化状态<sup>[12]</sup>。研究表明,缺氧可以促进已分化的单个胶质瘤细胞形成克隆球,诱导干细胞标志物Sox2、Oct4、Nanog、CD133等表达升高。低氧状态下,细胞会稳定表达低氧诱导因子1 $\alpha$ (hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ , HIF1 $\alpha$ )。研究发现,HIF1 $\alpha$ 能够促进胶质瘤细胞在低氧条件下发生去分化<sup>[13-14]</sup>。Notch、STAT3等信号通路在GSCs

的“干性”维持方面发挥重要作用。HIF1 $\alpha$ 可以通过与NICD相互作用并使其稳定,从而激活Notch信号;缺氧可以激活STAT3信号通路,STAT3还是HIF1 $\alpha$ 的启动分子,诱导其RNA转录和蛋白表达<sup>[15]</sup>。近期还有研究表明,缺氧可以诱导FAT1基因的表达,FAT1可以上调HIF1 $\alpha$ 、VEGF的表达,促进Sox2、Oct4、Nestin等干性标志物表达升高,还可以调控上皮细胞-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)<sup>[16]</sup>。

### 3.2 GSCs与酸性微环境

在绝大多数肿瘤当中,实体瘤的微环境pH值低于正常组织,并可能随着实体瘤体积的增大而降低。酸性微环境以往常被认为与缺氧有一定联系,但Fukumura等<sup>[17]</sup>在体内胶质瘤异种移植的研究中发现,大脑肿瘤中确实存在着pH降低但氧含量正常的微环境,提示低pH可能是微环境中独立存在的特性。酸性微环境能够上调GSCs的Oct4、Nanog、Olig2基因表达,还可以促进VEGF、IL-8等细胞因子的生成,进而通过旁分泌作用促进胶质瘤细胞生长<sup>[18]</sup>。Hu等<sup>[19]</sup>发现,酸性微环境下,GSCs的自我更新能力、线粒体活性以及ATP的产生均有所提升,从而促进和维持了GSCs的干性。研究还发现,活化的1,25-二羟基维生素D3(1 $\alpha$ ,25(OH)2D3)能够抑制Sox2、Oct4、Nestin等干性标志物的表达。酸性微环境下,25-羟化酶(25-hydroxy vitamin D3-24-hydroxylase, CYP24A1)高表达,并且能够催化1 $\alpha$ ,25(OH)2D3的快速降解。

### 3.3 GSCs与HMGB1

死亡的肿瘤细胞或应激的肿瘤细胞会释放损伤相关分子模式分子(damage-associated molecular pattern molecules, DAMPs)到TME。如高迁移率族蛋白B1(high mobility group box1, HMGB1)、热休克蛋白70(heat shock protein 70, Hsp70)、三磷酸腺苷(ATP)以及钙网蛋白(calreticulin, CRT)等。在这些DAMPs中,HMGB1在生理条件下通常定位于细胞核内。当肿瘤细胞受到刺激时或者受到化疗、放疗的影响时,HMGB1会移位并释放到细胞外基质<sup>[20]</sup>。细胞外释放的HMGB1可以与GBM表面高亲和力受体结合,包括晚期糖基化终产物受体(receptor for advanced glycation end-products, RAGE)、toll样受体(Toll-like receptor, TLR)-2、TLR-4以及TLR-9。当HMGB1与受体结合时,激活关键信号

通路和免疫反应,参与GBM生长、分化、运动和凋亡的调控<sup>[21-25]</sup>。Cheng等<sup>[26]</sup>发现,细胞内HMGB1的高表达能够促进GBM细胞的增殖和侵袭;HMGB1高表达的患者与低生存曲线相关;GBM释放的HMGB1可以通过自分泌途径激活AKT和ERK信号通路从而提高GBM的侵袭能力。这些信息提示抗HMGB1治疗可能是GBM的一种新兴的治疗方法。有趣的是,Zhao等<sup>[27]</sup>在CD133阳性的人胶质瘤细胞系中,使用慢病毒转染过表达HMGB1,发现肿瘤细胞的增殖受到抑制,细胞凋亡增多。此外,Chen等<sup>[28]</sup>在胶质瘤细胞系U87中加入人重组HMGB1蛋白,Oct4、Nanog干性标志物表达上调。

### 3.4 GSCs与细胞外囊泡

外泌体是直径为50-110纳米的脂质双分子层细胞外囊泡(extracellular vesicles, EVs)。几乎所有与胶质瘤相关的细胞都会释放外泌体,存在于TME中。以外泌体作为载体,GSCs能够与TME中其他的细胞进行通讯和物质交换。外泌体可以携带肿瘤相关的mRNA、miRNA以及蛋白分子,从而对GSCs的生长、侵袭、耐药等过程发挥调控作用。Skog等<sup>[29]</sup>研究发现GBM外泌体中携带的RNA和蛋白质能够促进肿瘤生长;并且可以通过血液检测GBM来源的外泌体为胶质瘤患者提供诊断信息和辅助治疗决策。Figueroa等<sup>[30]</sup>研究发现,来自与GBM相关间充质干细胞的外泌体通过转移miR-1587增加了GSCs的致瘤性。Bronisz等<sup>[31]</sup>研究发现,GBM分泌的外泌体可以将miRNA-1传递给其他的GBM细胞,从而改变GBM的侵袭和增殖能力;此外,来源于GBM的外泌体还可以传递给基质细胞促进血管内皮的形成。van der Vos等<sup>[32]</sup>使用活体荧光显微镜技术直接观察到GBM分泌的外泌体将RNA转移到附近的小胶质细胞。这提示我们,外泌体可能是GBM控制其周围环境的一种手段。Setti等<sup>[33]</sup>研究发现,与正常组织相比,氯离子细胞内通道1(chloride intracellular channel-1, CLIC1)在GBM中过表达,并且在预后差的患者中表达最高;CLIC1能够促进GBM的增殖和自我更新能力。此外,CLIC1可以由GBM以外泌体为载体分泌出细胞。从CLIC1过表达的GBM细胞中提取的外泌体是GBM体外增殖和体内肿瘤移植的强诱导剂。

综上所述,对TME的研究让我们更加深刻地

了解到 TME 对 GSCs 增殖、侵袭、自我更新等方面具有重要作用,并且 TME 能够促进 GSCs 表型的维持。但目前 GSCs 与 TME 之间的关系的理解尚不全面,究竟是 TME 的存在促进了 GSCs 的形成还是 GSCs 产生了 TME 还未清晰。在 TME 的影响下,GSCs 与非 GSCs 并不是绝对的,是动态变化的。单纯针对 GBM 的治疗或单纯针对 GSCs 的治疗是有局限性的。对 GSCs 与 TME 之间作用机制的进一步研究,不仅可以使我们对胶质瘤有更全面的认识,而且可以针对胶质瘤发展的薄弱环节,开发针对性的药物治疗,以更有效的方式治疗胶质瘤。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system [ J ]. *Acta Neuropathol*, 2007, 114 ( 2 ) : 97-109.
- [ 2 ] Ahmad G, Amiji MM. Cancer stem cell-targeted therapeutics and delivery strategies [ J ]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2017, 14 ( 8 ) : 997-1008.
- [ 3 ] Galli R, Binda E, Orfanelli U, et al. Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma [ J ]. *Cancer Res*, 2004, 64 ( 19 ) : 7011-7021.
- [ 4 ] Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, et al. Identification of human brain tumour initiating cells [ J ]. *Nature*, 2004, 432 ( 7015 ) : 396-401.
- [ 5 ] Ross JA, Ahn BY, King J, et al. Eukaryotic initiation factor 5B ( eIF5B ) regulates temozolomide-mediated apoptosis in brain tumor stem cells ( BTSCs ) [ J ]. *Biochem Cell Biol*, 2019. DOI: 10.1139/bcb-2019-0329. Epub ahead of print.
- [ 6 ] Suvà ML, Rheinbay E, Gillespie SM, et al. Reconstructing and reprogramming the tumor-propagating potential of glioblastoma stem-like cells [ J ]. *Cell*, 2014, 157 ( 3 ) : 580-594.
- [ 7 ] 潘景臻,王帅,张健,等.细胞外基质对胶质瘤侵袭性影响的研究进展 [ J ]. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2019, 46 ( 5 ) : 554-557.
- [ 8 ] Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, et al. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells [ J ]. *Nature*, 2007, 445 ( 7123 ) : 111-115.
- [ 9 ] Bocci F, Gearhart-Serna L, Boaretto M, et al. Toward understanding cancer stem cell heterogeneity in the tumor microenvironment [ J ]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2019, 116 ( 1 ) : 148-157.
- [ 10 ] Lenos KJ, Miedema DM, Lodestijn SC, et al. Stem cell functionality is microenvironmentally defined during tumour expansion and therapy response in colon cancer [ J ]. *Nat Cell Biol*, 2018, 20 ( 10 ) : 1193-1202.
- [ 11 ] Perus LJM, Walsh LA. Microenvironmental heterogeneity in brain malignancies [ J ]. *Front Immunol*, 2019, 10 : 2294.
- [ 12 ] Gaelzer MM, Santos MSD, Coelho BP, et al. Hypoxic and reoxygenated microenvironment: stemness and differentiation state in glioblastoma [ J ]. *Mol Neurobiol*, 2017, 54 ( 8 ) : 6261-6272.
- [ 13 ] Wang P, Lan C, Xiong SL, et al. HIF1 $\alpha$  regulates single differentiated glioma cell dedifferentiation to stem-like cell phenotypes with high tumorigenic potential under hypoxia [ J ]. *Oncotarget*, 2017, 8 ( 17 ) : 28074-28092.
- [ 14 ] Wang P, Wan WW, Xiong SL, et al. HIF1 $\alpha$  regulates glioma chemosensitivity through the transformation between differentiation and dedifferentiation in various oxygen levels [ J ]. *Sci Rep*, 2017, 7 ( 1 ) : 7965.
- [ 15 ] Man JH, Yu XJ, Huang HD, et al. Hypoxic induction of vasorin regulates notch1 turnover to maintain glioma stem-like cells [ J ]. *Cell Stem Cell*, 2018, 22 ( 1 ) : 104-118. e6.
- [ 16 ] Srivastava C, Irshad K, Dikshit B, et al. FAT1 modulates EMT and stemness genes expression in hypoxic glioblastoma [ J ]. *Int J Cancer*, 2018, 142 ( 4 ) : 805-812.
- [ 17 ] Fukumura D, Xu L, Chen Y, et al. Hypoxia and acidosis independently up-regulate vascular endothelial growth factor transcription in brain tumors in vivo [ J ]. *Cancer Res*, 2001, 61 ( 16 ) : 6020-6024.
- [ 18 ] Vander Linden C, Corbet C. Therapeutic targeting of cancer stem cells: integrating and exploiting the acidic niche [ J ]. *Front Oncol*, 2019, 9 : 159.
- [ 19 ] Hu PS, Li SS, Tian NY, et al. Acidosis enhances the self-renewal and mitochondrial respiration of stem cell-like glioma cells through CYP24A1-mediated reduction of vitamin D [ J ]. *Cell Death Dis*, 2019, 10 ( 1 ) : 25.
- [ 20 ] Huang CY, Chiang SF, Ke TW, et al. Cytosolic high-mobility group box protein 1 ( HMGB1 ) and/or PD-1 + TILs in the tumor microenvironment may be contributing prognostic biomarkers for patients with locally advanced rectal cancer who have undergone neoadjuvant chemoradiotherapy [ J ]. *Cancer Immunol Immunother*, 2018, 67 ( 4 ) : 551-562.
- [ 21 ] 胡建宏,王茂林,潘亚文.高迁移率族蛋白 B1 在胶质瘤发生发展中的作用及其机制研究 [ J ]. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2019, 46 ( 2 ) : 222-225.
- [ 22 ] Angelopoulou E, Piperi C, Adamopoulos C, et al. Pivotal role of high-mobility group box 1 ( HMGB1 ) signaling pathways in glioma development and progression [ J ]. *J Mol Med ( Berl)*, 2016, 94 ( 8 ) : 867-874.
- [ 23 ] Hong B, Muili K, Bolyard C, et al. Suppression of HMGB1

- released in the glioblastoma tumor microenvironment reduces tumoral edema [J]. *Mol Ther Oncolytics*, 2019, 12: 93-102.
- [24] Ma C, Chen H, Zhang SM, et al. Exosomal and extracellular HMGB1 have opposite effects on SASH1 expression in rat astrocytes and glioma C6 cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 518(2): 325-330.
- [25] Li CL, Feng SY, Chen L. MicroRNA-142-3p inhibits proliferation and induces apoptosis by targeting the high-mobility group box 1 via the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in glioma [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2018, 11(9): 4493-4502.
- [26] Cheng P, Ma Y, Gao ZQ, et al. High mobility group box 1 (HMGB1) predicts invasion and poor prognosis of glioblastoma multiforme via activating AKT signaling in an autocrine pathway [J]. *Med Sci Monit*, 2018, 24: 8916-8924.
- [27] Zhao WP, Chen QX. Effects of HMGB1 on proliferation and apoptosis of human brain glioma CD133 cells [J]. *Bratisl Lek Listy*, 2015, 116(8): 480-485.
- [28] Chen XL, Cheng F, Liu YF, et al. Toll-like receptor 2 and Toll-like receptor 4 exhibit distinct regulation of cancer cell stemness mediated by cell death-induced high-mobility group box 1 [J]. *EBioMedicine*, 2019, 40: 135-150.
- [29] Skog J, Würdinger T, van Rijn S, et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers [J]. *Nat Cell Biol*, 2008, 10(12): 1470-1476.
- [30] Figueroa J, Phillips LM, Shahar T, et al. Exosomes from glioma-associated mesenchymal stem cells increase the tumorigenicity of glioma stem-like cells via transfer of miR-1587 [J]. *Cancer Res*, 2017, 77(21): 5808-5819.
- [31] Bronisz A, Wang Y, Nowicki MO, et al. Extracellular vesicles modulate the glioblastoma microenvironment via a tumor suppression signaling network directed by miR-1 [J]. *Cancer Res*, 2014, 74(3): 738-750.
- [32] van der Vos KE, Abels ER, Zhang X, et al. Directly visualized glioblastoma-derived extracellular vesicles transfer RNA to microglia/macrophages in the brain [J]. *Neuro Oncol*, 2016, 18(1): 58-69.
- [33] Setti M, Osti D, Richichi C, et al. Extracellular vesicle-mediated transfer of CLIC1 protein is a novel mechanism for the regulation of glioblastoma growth [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(31): 31413-31427.