

## 小胶质细胞/巨噬细胞在胶质母细胞瘤中作用的研究进展

李强<sup>1</sup>, 王春红<sup>2</sup>, 吉宏明<sup>2</sup>

1. 山西医科大学, 山西 太原 030001

2. 山西医科大学附属人民医院, 山西 太原 030012

**摘要:** 胶质母细胞瘤 (GBM) 是成人最常见的颅内恶性肿瘤, 具有极强的侵袭性。此外, 由于化疗药物难以通过血脑屏障和胶质母细胞瘤的耐药性, 及对放疗敏感性较差等特点, 故预后极差。其中肿瘤微环境的改变起到了至关重要的作用, 在微环境中胶质瘤相关的小胶质细胞/巨噬细胞 (GAMs) 的作用正逐渐被重视。GAMs 不仅有中枢系统的常驻小胶质细胞, 还有来自外周的巨噬细胞。GAMs 还有截然不同的两种极化类型, 即抑制肿瘤生长的 M1 表型和促进肿瘤生长的 M2 表型。并且 GAMs 不单单和肿瘤细胞具有联系, 还与微环境中其他非瘤性脑细胞也有互动。该文将从 GAMs 的来源、极化、与肿瘤微环境中各种细胞间的相互影响阐述其在 GBM 中的作用, 并且从靶向治疗的角度探讨其最新的研究进展。

**关键词:** 小胶质细胞; 巨噬细胞; 胶质母细胞瘤; 靶向治疗

中图分类号: R739.41

DOI: 10.16636/j.cnki.jinn.2020.05.016

### Research advances in the role of microglia/macrophages in glioblastoma multiforme

LI Qiang<sup>1</sup>, WANG Chun-Hong<sup>2</sup>, JI Hong-Ming<sup>2</sup>. 1. Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China; 2. The Affiliated People's Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030012, China

Corresponding author: JI Hong-Ming, Email: hongmingj@sina.com

**Abstract:** Glioblastoma multiforme (GBM) is the most common intracranial malignant tumor in adults. It is characterized by strong invasiveness. In addition, its prognosis is extremely poor due to the difficulty for chemotherapeutic drugs to pass the blood-brain barrier, drug resistance of GBM, and its low sensitivity to radiotherapy. Among other factors, changes in the tumor microenvironment play a crucial role, and the role of glioma-associated microglia/macrophages (GAMs) in the microenvironment is attracting growing attention. GAMs include not only microglia from the central nervous system but also macrophages from the periphery. GAMs also involve two distinct types of polarization, namely the M1 phenotype that inhibits tumor growth and the M2 phenotype that promotes tumor growth. Furthermore, in addition to the association with tumor cells, GAMs also interact with non-cancerous brain cells in the microenvironment. In this article, we elucidate the role of GAMs in GBM regarding their source, polarization, and interactions with various cells in the tumor microenvironment, and discuss latest research advances from the perspective of targeted therapy.

**Key words:** microglia; macrophage; glioblastoma multiforme; targeted therapy

胶质母细胞瘤 (glioblastoma, GBM) 是最常见的原发性颅内恶性肿瘤, 占所有原发性中枢神经系统肿瘤的 16%, 5 年生存率仅为 3.3%。在可行有效切除、放疗和化疗的情况下, GBM 患者的平均生存

期只有 14.6 个月<sup>[1]</sup>。即使经有效切除后, 依旧会出现瘤体复发。一方面是由于 GBM 对正常脑实质的高度浸润, 另一方面则是产生了对放化疗耐药的 GBM 干细胞, 这正是肿瘤细胞与肿瘤微环境相互

收稿日期: 2020-07-27; 修回日期: 2020-09-22

作者简介: 李强 (1995-) 男, 硕士研究生在读, 研究方向: 颅内肿瘤及神经电生理。

通信作者: 吉宏明 (1963-) 男, 教授, 主任医师, 博士生导师, 神经外科主任, 研究方向: 颅底肿瘤、神经电生理的外科治疗。Email: hongmingj@sina.com

作用的结果。肿瘤微环境在其中的重要性不言而喻,而在神经系统的肿瘤微环境中,拥有着一些特有的细胞,包括神经元、小胶质细胞,以及作为血脑屏障一部分的血管内皮细胞等<sup>[2]</sup>。血脑屏障作为中枢系统的天然屏障至关重要,然而 GBM 会破坏血脑屏障,并且诱导来自外周骨髓的巨噬细胞浸润,激活常驻小胶质细胞极化。在瘤体中,这些细胞多达 30%,激活的胶质瘤相关的小胶质细胞/巨噬细胞 (glioma-associated microglia and macrophages, GAMs) 大部分起到促进肿瘤形成和产生免疫抑制的作用<sup>[3]</sup>。少部分能够对肿瘤产生抑制作用,所以我们把目标放在这些细胞上来,即通过靶向治疗诱导 GAMs 产生抑制肿瘤生长的作用,来增加 GBM 患者的生存期。本文将回顾小胶质细胞/巨噬细胞的生理和病理功能,特别强调它们在 GBM 进展中的作用以及靶向治疗的可能。

## 1 小胶质细胞/巨噬细胞的来源及功能

小胶质细胞是胚胎发育过程中直接来源于卵黄囊红髓样前体细胞<sup>[4]</sup>。其具有调节神经元的存活和凋亡,帮助轴突的生长,神经元的迁移等功能外<sup>[5]</sup>,还主要充当着大脑的常驻免疫细胞。通过不断延长和收缩它们的细胞突起来扫描中枢神经系统,检测介导免疫反应,并与星形胶质细胞合作,维持血脑屏障的完整性。

在正常生理条件下中枢神经系统由于血脑屏障的存在,外周的巨噬细胞难以通过<sup>[3]</sup>。但在病理条件下,血脑屏障被破坏,GBM 诱导外周的巨噬细胞簇集,而这类外周的巨噬细胞来源于骨髓的造血干细胞<sup>[6]</sup>。簇集的巨噬细胞群体和驻留的小胶质细胞群体互相混杂在一起,虽然它们起源不同,但它们具有共同的组织学特征,使得区分 GBM 中驻留的小胶质细胞和血源性巨噬细胞变得十分不易。部分研究人员通过利用基因工程小鼠模型,证明了 GAMs 中主要由外周巨噬细胞构成,而常驻的小胶质细胞则占少数<sup>[7]</sup>。数量的不同可能带来的影响也不同,针对 GAMs 中来源,还有待进一步研究了解,但其为之后针对来源不同的靶向目标提供了一个新的思路。

## 2 GAMs 与 GBM 之间的影响

瘤体内 GAMs 占据了三成以上,GBM 分泌的趋化因子促进 GAMs 在肿瘤部位簇集,包括巨噬细胞集落刺激因子 (macrophage-stimulating factor, M-CSF)、粒细胞/巨噬细胞集落刺激因子 (granulocyte-

macrophage colony stimulating factor, GM-CSF)、趋化因子 CCL2 (C-C motif chemokine ligand 2)、和基质细胞衍生因子 (stromal cell-derived factor, SDF-1)、肝细胞生长因子和巨噬细胞移动抑制因子<sup>[4]</sup>。

聚集此处的 GAMs 根据诱导因子的不同而分化成不同的类型,即 M1/M2 表型,M1 表型的诱导因子有干扰素  $\gamma$ 、脂多糖、肿瘤坏死因子  $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 和 GM-CSF,其通过产生一氧化氮类、干扰素类因子对肿瘤细胞拥有杀伤能力,还可以分泌趋化因子 CXCL9 (C-X-C motif chemokine 9),CXCL10,白细胞介素 12 激活 Th 辅助细胞来介导肿瘤中的 Th1 反应,最后通过 TNF- $\alpha$  和白细胞介素 1 $\beta$  激活细胞毒性 T 细胞而显示出抗肿瘤活性<sup>[8]</sup>。

M2 表型的诱导因子主要有白细胞介素 4、白细胞介素 13、M-CSF;而 M2 表型的 GAMs 通过分泌基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMPs)、酪氨酸激酶 2、白细胞介素 6 (Interleukin-6, IL-6)、白细胞介素 10 (Interleukin-10, IL-10),增强 GBM 的侵袭和增殖能力。还可以通过 IL-6、巨噬细胞抑制性因子的表达介导免疫抑制环境。最后与内皮细胞的相互作用通过转化生长因子  $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ ) 和整合素  $\alpha v \beta 3$  的表达导致肿瘤周围血管生成<sup>[9]</sup>。其特性是由 CECR1 蛋白介导的。该蛋白激活血小板源性生长因子通路,也可以促进外周细胞的募集和迁移<sup>[10]</sup>。

然而 M1 表型的功能在 GBM 中似乎受到抑制,通过将小胶质细胞植于胶质瘤细胞培养基后的结果可知,几个 M2 极化标志物的表达显著增加,包括 IL-10、CD163 和 CD204 等<sup>[11]</sup>。在胶质瘤的影响下,GAMs 有效的 M1 抗肿瘤功能大多被几种免疫抑制分子和 M2 极化因子如 TGF- $\beta$ 、IL-10 和各种前列腺素的产生所抑制。GBM 则通过大量产生可溶性因子如趋化因子 7、SDF-1、趋化因子 CX3CL1、血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)、人骨膜蛋白 (Periostin, POSTN) 和微泡性因子如表皮生长因子受体 III 型突变体 (epidermal growth factor receptor variant III, EGFRvIII)、微小 RNA-451、微小 RNA-21 控制 GAMs 向 M2 方向极化<sup>[12]</sup>。

GBM 通过调控肿瘤内环境的趋化因子首先引起 GAMs 的募集。虽然微环境中含有 M1/M2 导向的 2 种趋化因子,但 M2 的趋化因子要多于 M1 的

趋化因子。并且抑制了 M1 表型对肿瘤细胞的清除作用,促进了 M2 表型的极化,为其提供一个免疫抑制的环境,M2 表型也会促进 GBM 的生长及发育,形成一个正反馈调节系统。从目前的相关实验来看,GAMs 中的极化不是绝对的,是能够通过改变肿瘤内环境而进行相应的转换,是处于一个动态的过程,故而靶向促进上述 M1 的极化以及抑制 M2 的极化也可以成为靶向治疗的突破口。

### 3 GAMs 与胶质瘤干细胞之间影响

胶质瘤干细胞是具有干细胞样属性(自我更新,多向分化)的细胞亚群。其密度与 GAMs 之间的正相关也强调了胶质瘤干细胞在吸引小胶质细胞方面的重要性,研究表明,胶质瘤干细胞通过分泌 POSTN 可以加强对外周巨噬细胞的募集<sup>[13]</sup>。而 GAMs 分泌的 TGF- $\beta$ 1 能够增进胶质瘤干细胞产生 MMPs,增加其侵袭性<sup>[14]</sup>。此外 GAMs 还能分泌一种富营养蛋白(Pleiotrophin, PTN),能够刺激胶质瘤干细胞表面的 PTN 受体蛋白酪氨酸磷酸酶受体 Z1 型(protein tyrosine phosphatase receptor type Z1, PTPRZ1)。进而刺激胶质瘤干细胞的生长和致瘤能力,达到促进 GBM 的生长目的<sup>[15]</sup>。

### 4 GAMs 与非癌性脑细胞之间影响

非癌性脑细胞不是肿瘤的一部分,但它们在肿瘤微环境也有着一定的作用。目前研究表明,神经元能够产生刺激 GAMs 表面的 CX3CL1 的趋化因子 CX3CL1R(C-X3-C motif chemokine receptor 1),而 CX3CL1 具有促进 GAMs 募集,增加 MMPs 的表达的作用,从而增加了 GBM 的侵袭性。周围神经系统中,施万细胞是负责髓鞘形成的细胞。施万细胞被证明是通过与肿瘤细胞直接接触来促进癌症的侵袭<sup>[16]</sup>。而在颅内负责髓鞘形成的细胞是少突胶质细胞,因此进一步研究少突胶质细胞在胶质瘤中是否也起到相同的作用是很有意义的。

### 5 GAMs 与放疗之间的关系

关于 GBM 的放疗,目前研究表明 GAMs 参与放射抵抗。放射治疗本身会引起肿瘤微环境的改变,可能会使肿瘤更具侵袭性。放射治疗会诱导快速炎症反应,导致 GAMs 募集。并且 M1 表型比 M2 表型对放射更敏感<sup>[17]</sup>,所以经过放疗后的区域 M2 表型的表达要高于 M1 表型。

关于 GBM 的化疗,替莫唑胺(Temozolomide, TMZ)是最常用药物。目前有的研究表明 GAMs 参与了 TMZ 耐药机制。研究表明 M2 表型中 CD74

表达上调后会诱导 GBM 细胞内的蛋白激酶 B 和细胞外的调节蛋白激酶活化,进而参与 TMZ 耐药。

## 6 GAMs 与靶向治疗研究现状

目前临床应用广泛的靶向药贝伐单抗是一种 IgG1 人源化单克隆抗体,与 VEGF 结合并阻断其生物活性,进而抑制肿瘤血管生存的药物。其针对复发胶质瘤具有一定的成效。而其他靶向药尚处于研究阶段,经过上文描述,让我们知道 GBM 先对 GAMs 进行募集,再诱导分化为 M2 表型,来帮助自身发育。那么首先把目标放在阻止 GAMs 被招募上。通过靶向趋化因子 CCL2/趋化因子受体 2(chemokine CCL2/chemokine receptor2, CCL2/CCR2)轴可以实现。CCL2 可以招募 GAMs 聚集,而药物 Carlumab(CNTO 888)是免疫球蛋白 G1k 单克隆抗体,以高亲和力结合 CCL2,与 CCR2 受体结合位点直接竞争。当 Carlumab 与其他四种化疗药物联合使用时,治疗仍然耐受性良好<sup>[18]</sup>。有关 Carlumab 的临床试验还有待进一步推进。

其次就是通过抑制 GAMs 向 M2 表型转换。上文提到 GAMs 分泌两个大类的趋化因子来诱导其极化为 M2 表型。一类是可溶性因子,另外一类是微泡性因子 EGFRvIII 等,微泡性因子通过内化 GAMs 引起重新排列,向 M2 表型极化,进而介导 GBM 的免疫抑制性。靶向 EGFRvIII 的方法有以下四类方法,包括靶向 T 细胞治疗、治疗性疫苗、抗体和特异性 T 细胞激活剂<sup>[19]</sup>。靶向 T 细胞是经基因工程改造的 T 细胞,在其表面产生特殊的受体,识别并结合肿瘤细胞上的特定抗原,目前有运用于临床的病例分析<sup>[20]</sup>,仍在处于临床试验阶段。治疗性疫苗则于第三期临床试验后未能证明其治疗的用处被叫停<sup>[21]</sup>。其次是抗体疗法,EGFRvIII 治疗胶质瘤的抗生长体主要是单克隆抗体-甲基澳瑞他汀偶联物 depatuxizumab mafodotin (ABT-414)。用抗体-药物结合物靶向肿瘤特异性抗原。ABT-414 是由可以靶向 EGFR 的单克隆抗体 ABT-806 和微管蛋白聚合抑制剂产生的,ABT-414 联合放射治疗和替莫唑胺显著抑制了体内肿瘤的生长,取得了一些临床效果,目前在甄别初发和复发之间的疗效区别<sup>[22]</sup>。最后是双特异性 T 细胞疗法,双特异性 T 细胞结合蛋白(bispecific T cell binding protein, BITE)由 2 种不同抗体的单链抗体组合而成的,其中一种单链抗体通过 CD3 与 T 细胞结合,另一种通过肿瘤细胞表面表达的特定片段与肿瘤细胞结

合。研究发现靶向 BITE 在体外对表达 EGFRvIII 的胶质瘤具有抗原特异性的溶解作用。动物实验中靶向 BITE 可提高表达 EGFRvIII 的具有胶质瘤小鼠的存活率,并实现持久完全治愈,治愈率高达 75%<sup>[23]</sup>。但是目前还没有其关于临床试验的报道。

最后就是诱导 GAMs 向 M1 表型转换。Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLR) 通常由微生物部分 (包括核酸) 激活,使 GAMs 获得 M1 表型,使用 TLR 激动剂能有诱导其向 M1 表型转换。许多 TLR7 配体、TLR9 配体和一个 TLR8 配体已经在临床试验中测试了它们的抗肿瘤特性。TLR9 激动剂 IMO-2055 与厄洛替尼和贝伐单抗联合使用时在非小细胞肺癌中显示出可能的抗肿瘤活性<sup>[24]</sup>。但针对 TLR 受体与颅内肿瘤的实验目前还未开展,有待进一步的研究。

## 7 展望

GAMs 是与 GBM 密切相关的细胞群体,它们通过促进肿瘤生长和对正常脑实质的侵袭,在 GBM 的发病机制中起着重要作用。目前的研究证明 GAMs 是一个可行的靶向治疗的靶点,但是目前的难点还是在于从实验应用到临床阶段。由于 GAMs 的多变性,其体外培养、体内培养的差异较大,加之中枢系统的特殊性,具有血脑屏障使其变得更为复杂。M1/M2 极化是一个可逆的动态的过程,目前还需要对其在 GBM 的耐药性、免疫抑制性中的作用进行进一步的研究。关于针对 GAMs 的靶向药物,对于非中枢系统的肿瘤作用明显要强于对中枢系统肿瘤的作用,故需要针对血脑屏障开发一些特殊的靶向药物,而纳米载体就是一个新兴的方向,通过研制与靶向药物相互结合的纳米载体来达到目的,纳米载体的安全性以及拓展性还有待考究。总之,我们相信随着对 GAMs 对 GBM 的作用进一步被揭示后,必然会为临床治疗提供一个崭新的思路。

## 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] Haddad-Tóvolli R, Dragano NRV, Ramalho AFS, et al. Development and function of the Blood-brain barrier in the context of metabolic control [J]. *Front Neurosci*, 2017, 11: 224.

[3] Hambardzumyan D, Gutmann DH, Kettenmann H. The role

of microglia and macrophages in glioma maintenance and progression [J]. *Nat Neurosci*, 2016, 19(1): 20-27.

[4] Gomez Perdiguero E, Klapproth K, Schulz C, et al. Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythromyeloid progenitors [J]. *Nature*, 2015, 518(7540): 547-551.

[5] Mosser CA, Baptista S, Arnoux I, et al. Microglia in CNS development: Shaping the brain for the future [J]. *Prog Neurobiol*, 2017, 149-150: 1-20.

[6] Epelman S, Lavine KJ, Randolph GJ. Origin and functions of tissue macrophages [J]. *Immunity*, 2014, 41(1): 21-35.

[7] Chen ZH, Feng X, Herting CJ, et al. Cellular and molecular identity of tumor-associated macrophages in glioblastoma [J]. *Cancer Res*, 2017, 77(9): 2266-2278.

[8] Pyonteck SM, Akkari L, Schuhmacher AJ, et al. CSF-1R inhibition alters macrophage polarization and blocks glioma progression [J]. *Nat Med*, 2013, 19(10): 1264-1272.

[9] Cui X, Morales RT, Qian WY, et al. Hacking macrophage-associated immunosuppression for regulating glioblastoma angiogenesis [J]. *Biomaterials*, 2018, 161: 164-178.

[10] Zhu C, Chrifi I, Mustafa D, et al. CECR1-mediated cross talk between macrophages and vascular mural cells promotes neovascularization in malignant glioma [J]. *Oncogene*, 2017, 36(38): 5356-5368.

[11] Lisi L, Stigliano E, Lauriola L, et al. Proinflammatory-activated glioma cells induce a Switch in microglial polarization and activation status, from a predominant M2b phenotype to a mixture of M1 and M2a/B polarized cells [J]. *ASN Neuro*, 2014, 6(3): 171-183.

[12] Grégoire H, Roncali L, Rousseau A, et al. Targeting tumor associated macrophages to overcome conventional treatment resistance in glioblastoma [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 368.

[13] Zhou W, Ke SQ, Huang Z, et al. Periostin secreted by glioblastoma stem cells recruits M2 tumour-associated macrophages and promotes malignant growth [J]. *Nat Cell Biol*, 2015, 17(2): 170-182.

[14] Ye XZ, Xu SL, Xin YH, et al. Tumor-associated microglia/macrophages enhance the invasion of glioma stem-like cells via TGF- $\beta$ 1 signaling pathway [J]. *J Immunol*, 2012, 189(1): 444-453.

[15] Shi Y, Ping YF, Zhou W, et al. Tumour-associated macrophages secrete pleiotrophin to promote PTPRZ1 signalling in glioblastoma stem cells for tumour growth [J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 15080.

[16] Stratton JA, Holmes A, Rosin NL, et al. Macrophages regulate schwann cell maturation after nerve injury [J]. *Cell Rep*, 2018, 24(10): 2561-2572.

- [17] Leblond MM, Pérès EA, Helaine C, et al. M2 macrophages are more resistant than M1 macrophages following radiation therapy in the context of glioblastoma [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(42): 72597-72612.
- [18] Brana I, Calles A, Lorusso PM, et al. Carlumab, an anti-C-C chemokine ligand 2 monoclonal antibody, in combination with four chemotherapy regimens for the treatment of patients with solid tumors: an open-label, multicenter phase 1b study [J]. *Target Oncol*, 2015, 10(1): 111-123.
- [19] Yang J, Yan J, Liu B. Targeting EGFRvIII for glioblastoma multiforme [J]. *Cancer Lett*, 2017, 403: 224-230.
- [20] Brown CE, Badie B, Barish ME, et al. Bioactivity and safety of IL13R $\alpha$ 2-redireceted chimeric antigen receptor CD8<sup>+</sup> T cells in patients with recurrent glioblastoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(18): 4062-4072.
- [21] Malkki H. Trial watch: glioblastoma vaccine therapy disappointment in phase III trial [J]. *Nat Rev Neurol*, 2016, 12(4): 190.
- [22] Reardon DA, Lassman AB, van den Bent M, et al. Efficacy and safety results of ABT-414 in combination with radiation and temozolomide in newly diagnosed glioblastoma [J]. *Neuro Oncol*, 2017, 19(7): 965-975.
- [23] Choi BD, Kuan CT, Cai M, et al. Systemic administration of a bispecific antibody targeting EGFRvIII successfully treats intracerebral glioma [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(1): 270-275.
- [24] Smith DA, Conkling P, Richards DA, et al. Antitumor activity and safety of combination therapy with the toll-like receptor 9 agonist IMO-2055, erlotinib, and bevacizumab in advanced or metastatic non-small cell lung cancer patients who have progressed following chemotherapy [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2014, 63(8): 787-796.