

全反式维甲酸协同DAPT抑制胶质瘤干细胞的自我更新

龚爱华^{1,2*} 熊二梦¹ 张 严¹ 杜凤移¹ 彭琬昕¹ 邵根宝¹ 金 洁¹ 程建军¹

(¹江苏大学基础医学与医学技术学院, 镇江 212013; ²癌基因及相关基因国家重点实验室, 上海 200032)

摘要 前期研究脑表明, 脑胶质瘤干细胞(glioma stem cells, GSCs)是胶质瘤发生和发展的重要因素, 探索靶向干预GSCs生长有可能成为脑胶质瘤治疗的有效途径之一。该研究旨在阐明两种药物ATRA和 γ -分泌酶抑制剂DAPT协同抑制GSCs自我更新的生物学效应。通过用台盼蓝排染法、克隆球形成试验和免疫印迹分析了两种药物的单独使用或联用对GSC样细胞PGC1和PGC2生长、成球能力和自我更新以及干细胞标志物表达的影响。结果发现, 单独使用ATRA对PGC1生长有一定的抑制作用, 而对PGC2生长几乎没有影响; DAPT对PGCs的生长抑制作用明显强于ATRA。高浓度ATRA(80 $\mu\text{mol/L}$)能诱导PGCs的分化, 降低PGCs成球大小, 且成球效率降至5%~8%, 而正常对照组为32%~35%; 同样, DAPT(40 $\mu\text{mol/L}$)也能降低PGCs成球大小, 且成球效率降至2%~3%; 低浓度ATRA(20 $\mu\text{mol/L}$)和DAPT(5 $\mu\text{mol/L}$)对PGCs自我更新能力和干性没有明显影响, 而联合使用后其明显降低PGCs的成球大小, 且成球效率降至3%~5%, 促进细胞凋亡, 并且明显抑制了干细胞标志物Nestin、CD133、Sox2、Oct4的表达, 提高了分化标志物GFAP的表达。该研究证明了低浓度的ATRA和DAPT能协同抑制脑胶质瘤干细胞PGCs的自我更新。研究结果将为脑胶质瘤的临床研究提供实验依据。

关键词 ATRA; DAPT; 脑胶质瘤干细胞; 自我更新

Synergistic Inhibition Effects of ATRA and DAPT on the Ability of Self-renewal of Glioma Stem Cells

Gong Aihua^{1,2*}, Xiong Ermeng¹, Zhang Yan¹, Du Fengyi¹, Peng Wanxin¹, Shao Genbao¹, Jin Jie¹, Cheng Jianjun¹

(¹School of Medical Science and Laboratory Science, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China;

²State Key Laboratory for Oncogenes and Related Genes, Shanghai 200032, China)

Abstract Previous studies suggest that glioma stem cells (GSCs) play important roles in tumorigenesis and development of glioma. It is a promising therapeutic strategy to explore the approach to inhibition of GSCs growth. In this study, we assessed synergistic inhibition effects of ATRA and DAPT on GSCs through the ability of GSCs self-renewal. We examined the inhibition efficiency of GSC-like PGCs growth using trypan blue staining, the ability and efficiency of sphere formation by sphere formation assay under microscope, apoptosis and cell cycle by FACS, and the expression of markers of stem cells through Western blot. The results indicated that ATRA had

收稿日期: 2013-04-30 接受日期: 2013-07-22

江苏省高校自然科学基金(批准号: N07KJB310018)、癌基因及相关基因国家重点实验室开放课题(批准号: 90-13-05)和国家自然科学基金(批准号: 31100964、81372718)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0511-80538449, E-mail: ahg5@mail.ujs.edu.cn

Received: April 30, 2013 Accepted: July 22, 2013

This work was supported in part by the Natural Science Fund for Colleges and Universities in Jiangsu Province (Grant No.N07KJB310018), the Grants from the State Key Laboratory of Oncogenes and Related Genes (Grant No.90-13-05) and the National Science Foundation of China (Grant No.31100964, 81372718)

*Corresponding author. Tel: +86-511-85038449, E-mail: ahg5@mail.ujs.edu.cn

网络出版时间: 2013-09-26 09:50 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130926.0950.001.html>

limited inhibition of PGC1 growth, whereas few effects on PGC2 growth. DAPT obviously inhibited the growth of PGCs compared with ATRA. Furthermore, ATRA (80 $\mu\text{mol/L}$) induced the differentiation of PGCs, and reduced sphere formation in size and efficiency by 5%~8% compared with that of control group by 32%~35%. Similarly, DAPT (40 $\mu\text{mol/L}$) decreased sphere formation in size and efficiency by 2%~3%. We also found that the ability of self-renewal and stemness was hardly affected in PGCs treated with ATRA (20 $\mu\text{mol/L}$) or DAPT (5 $\mu\text{mol/L}$), respectively. On the contrary, combination of both drugs resulted in decrease in sphere size and sphere formation efficiency by 3%~5%, promoted apoptosis and significantly downregulated the expression of markers of stem cells Nestin, CD133, Sox2, Oct4 and upregulated the expression of GFAP. Our finding confirmed the synergistic inhibition effects of ATRA and DAPT on GSCs self-renewal, which might provide the evidence for further clinical research against glioma stem cells.

Key words ATRA; DAPT; glioma stem cells; self-renewal

有证据表明, 肿瘤的发生和发展与肿瘤干细胞相关, 越来越多的证据支持了“肿瘤干细胞学说”^[1]。研究报道较多和较为深入的是脑胶质瘤干细胞(glioma stem cells, GSCs)^[2]。一般认为GSCs具有较强的放、化疗抵抗的特性, 从而导致恶性脑胶质瘤侵袭和复发^[2]。因此, 研究GSCs的生长特性和治疗策略可以为临床研究提供参考依据, 为恶性脑胶质瘤的治疗提供策略^[2]。

全反式维甲酸(all-trans-retinoic acid, ATRA)在胚胎及成年组织的生长、发育、促进细胞分化、视觉、免疫反应以及繁殖等过程中发挥十分重要的作用^[3]。ATRA的抗肿瘤作用被誉为九十年代国际抗癌药物的三大发现之一, 其具有很强的诱导肿瘤细胞分化的作用^[4], 是目前国内治疗急性早幼粒细胞白血病的临床首选药物^[4]。ATRA也能诱导其他肿瘤细胞分化, 影响肿瘤细胞增殖和迁移能力, 如肝癌、直肠癌、脑胶质瘤等^[4]。ATRA还能协同三氧化二砷或 γ -干扰素增强它们的抗肿瘤作用^[5-6]。因此, ATRA可以作为一线化疗药物, 也可以作为放化疗增敏药物用于临床肿瘤治疗, 具有广泛的应用前景。

γ -分泌酶(γ -secretase)是膜表面多个信号通路活化的水解酶, 其底物包括与老年性痴呆相关的APP和Notch-1受体等^[7]。因此, γ -分泌酶已经作为很重要的药物靶点, 开发出一些抑制剂(γ -secretase inhibitors, GSI)。研究表明, 这些GSIs具有明显的抗肿瘤活性^[8]。 γ -分泌酶依赖的Notch-1信号通路是维持GSC自我更新和干性的关键途径, GSI抑制该信号通路可以降低GSC的自我更新和干性^[8-11]。此外, 有研究发现ATRA可以诱导GSC分化而抑制其自我更

新^[12]。基于上述分析, 我们推测ATRA能够增强GSI对GSC生长的抑制作用。因此, 本研究首先分别评价了ATRA和DAPT(GSI)对原代培养的脑胶质瘤干细胞(primary glioma stem cells, PGCs)的生长抑制作用, 然后分析了单独或联合使用ATRA和DAPT对PGCs自我更新和干性的影响。结果发现, ATRA和DAPT确实能够协同抑制GSCs的生长和干性。研究结果将为脑胶质瘤的临床研究提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

ATRA和DAPT均购自Sigma公司。人脑胶质瘤原代培养干细胞PGC1和PGC2由本实验室建立。

1.2 试剂及仪器

D/F12培养基以及干细胞培养添加剂、Accutase购自Gibco公司; 台盼蓝购自Sigma公司; 抗体均购自Cell Signaling Technology公司; 6孔和24孔细胞培养板购自美国Costar公司。CO₂细胞培养箱为美国Forma Scientific公司产品; 倒置显微镜(ZEISS)。

1.3 细胞培养

参照无血清悬干细胞浮培养方法^[12], 分离和原代培养脑胶质瘤组织中肿瘤干细胞。简要描述如下: 新鲜脑胶质瘤肿瘤组织(两个脑胶质瘤病理四级样本)用PBS清洗, 切碎后用0.125%胰蛋白酶消化30 min, 吸管反复吹打后, 经200目滤网过滤制成单细胞悬液, 离心后细胞种植于DMEM/F12无血清培养基, 添加EGF(20 ng/mL)、bFGF(20 ng/mL)和B27(Invitrogen, 1:50), 置于37 °C、5% CO₂、饱和湿度的培养箱中培养4 d后换液, 去除死细胞碎片, 加入新鲜培养基继续培养3~4 d, 用Accutase将克隆球

消化成单个细胞, 半量换液继续培养。照此传4~5代, 两个样本来源的细胞分别命名为PGC1和PGC2, 用于下列实验。

1.4 台盼蓝排染法检测PGCs的生长抑制

取生长状态良好的肿瘤干细胞克隆球, 用Accutase消化, 以 5×10^4 /mL的密度接种于24孔板, 每孔0.5 mL, 置于培养箱中培养24 h后加药。ATRA终浓度分别为0, 10, 20, 40, 80 $\mu\text{mol/L}$, DAPT终浓度分别为0, 5, 10, 20, 40 $\mu\text{mol/L}$ 。培养3 d后, 半量补充培养基和药物, 培养7 d后, 收集细胞, 用Accutase消化, 收集细胞加入0.4%的台盼蓝溶液直接进行计数。实验组均设3个复孔。

1.5 克隆球形成试验

生长状态良好的肿瘤干细胞克隆球, 用Accutase消化成单个细胞, 以2500/孔的密度接种于24孔板。根据实验设计, 用不同浓度药物处理细胞, 培养3 d后, 半量补充培养基和药物, 培养7 d后, 收集细胞, 用Accutase消化成单个细胞, 再以500/孔的密度接种于96孔板, 方法同上, 14 d后显微镜下拍照, 并记录克隆形成数目。

1.6 流式细胞仪检测(FACS)

生长状态良好的PGC1肿瘤干细胞克隆球, 用Accutase消化成单个细胞, 以 1×10^5 /孔的密度接种于6孔板, 根据实验设计, 用不同浓度药物处理细胞, 培养3 d后, 半量补充培养基和药物, 培养7 d后, 收集细胞, 用Accutase消化成单个细胞, 收获细胞, 用PBS洗涤2次, 75%冷乙醇重悬固定, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存过夜。次日用PBS洗涤2次, 0.5 mL PBS重悬, 加800 $\mu\text{g/mL}$ 的RNA

酶A 12.5 μL 后于37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴30 min, 加1 mg/mL的碘化丙啶10 μL 混匀, 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光反应40 min后, 400目尼龙膜过滤, 然后进行流式细胞仪检测(FACS)。

1.7 免疫印迹

取生长状态良好的肿瘤干细胞克隆球, 用Accutase消化成单个细胞, 以 2×10^5 /孔的密度接种于6孔板。根据实验设计, 用不同浓度药物处理细胞, 培养3 d后, 半量补充培养基和药物; 培养7 d后, 用Accutase消化成单个细胞重新种回原6孔板; 继续培养7 d后, 收集细胞, 提取总蛋白, SDS-PAGE胶电泳分离蛋白, 转膜, 封闭, 用Nestin、CD133、Sox2、Oct4和GFAP抗体及相应的二抗检测, ECL发光剂, 化学发光检测仪(北京赛智)记录实验结果。

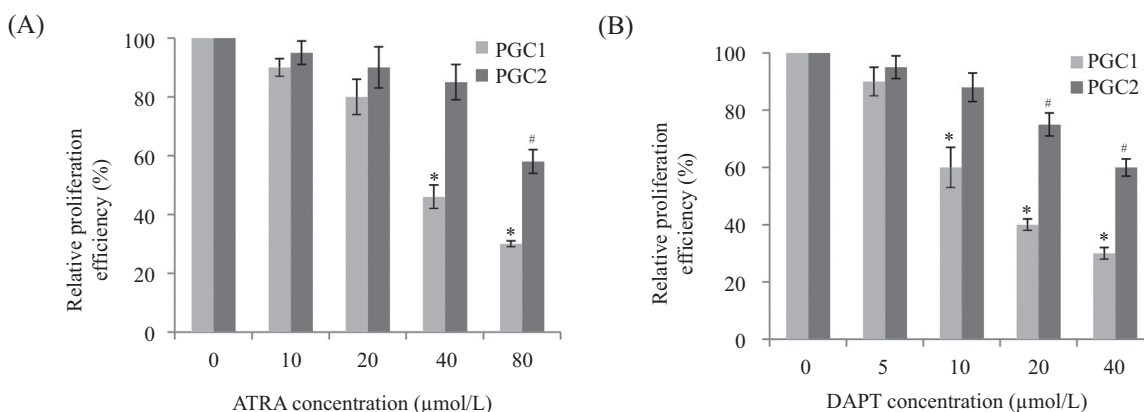
1.8 统计学分析

应用统计学软件SPSS 17.0进行统计学分析, 实验数据采用 $\text{mean} \pm \text{S.D.}$ 表示, 采用单因素方差分析, 以 $P < 0.01$ 为具有显著性差异。

2 结果

2.1 ATRA和DAPT对原代脑胶质瘤干细胞的生长抑制作用

为了评价ATRA和DAPT对原代脑胶质干细胞的生长抑制作用, 我们首先将PGC1和PGC2用Accutase酶消化分散成单个细胞, 然后分别用不同浓度的ATRA(0, 10, 20, 40, 80 $\mu\text{mol/L}$)和DAPT(0, 5, 10, 20, 40 $\mu\text{mol/L}$)处理PGC1和PGC2, 培养7 d后采用台盼蓝排染法检测它们对细胞的生长抑制作用(图1A和1B)。结果表明, 两种细胞对ATRA的敏感性差异



A: 不同浓度的ATRA对PGC1和PGC2生长的影响; B: 不同浓度的DAPT对PGC1和PGC2生长的影响; * $P < 0.01$, # $P < 0.01$ 。
A: effects of different doses of ATRA on the growth of PGC1 and PGC2; B: effects of different doses of DAPT on the growth of PGC1 and PGC2; * $P < 0.01$, # $P < 0.01$.

图1 ATRA和DAPT对脑胶质瘤干细胞的生长抑制作用

Fig.1 Effects of ATRA and DAPT on growth of glioma stem cells

较大,其中PGC1较为敏感,在40 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组抑制率达55%左右,高浓度80 $\mu\text{mol/L}$ 组抑制率达75%左右;尽管ATRA对PGC2的抑制也呈浓度依赖性,但只有在80 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组抑制率才达到40%左右(图1A),这表明PGC2对ATRA有一定的耐受性。同样地,两种细胞对DAPT的敏感性也不一样,PGC1在10 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组抑制率达40%左右,且呈浓度依赖趋势,在40 $\mu\text{mol/L}$ 高浓度组抑制率达到75%左右(图1B),而对PGC2的抑制率只有40%左右。从趋势上看,DAPT对细胞的抑制作用较ATRA强,PGC2对两种药物均有一定的抵抗作用。两种细胞对药物的敏感性不同,可能是由于不同的遗传背景所致。

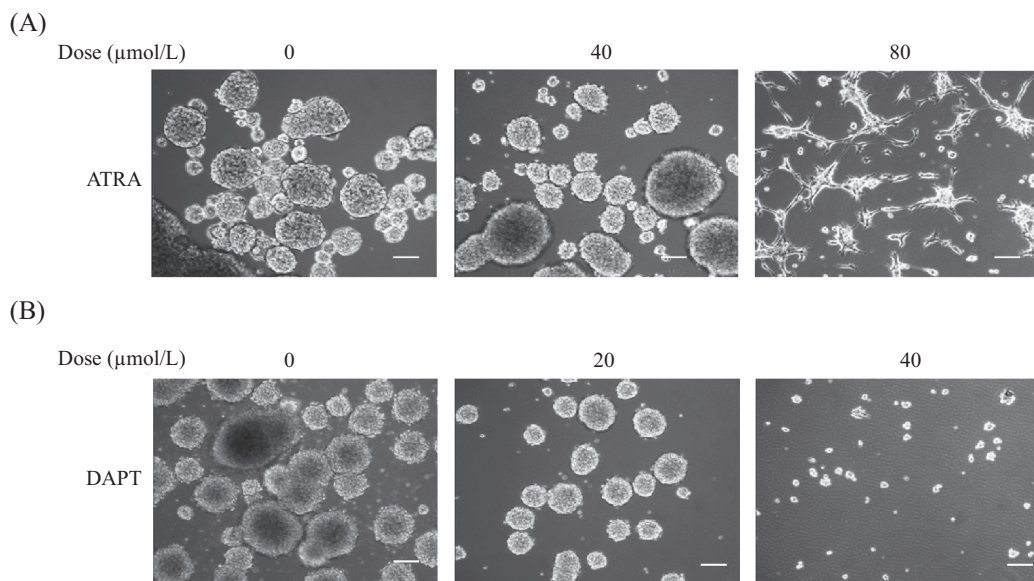
2.2 ATRA和DAPT对PGC1和PGC2成球能力的影响

上述两种药物对PGC1和PGC2生长有不同程度的抑制作用,那么我们推测它们有可能对PGC1和PGC2干细胞特性也有影响。因此,我们用不同浓度的药物处理细胞7 d后,在倒置显微镜下观察并拍照,PGC1的成球大小和数量见图2A和2B,PGC2结果未显示。由图可知与对照组相比,ATRA低浓度组(40 $\mu\text{mol/L}$)对PGC1干细胞球的大小和数目有一定程度的影响,而高浓度组(80 $\mu\text{mol/L}$)多数干细胞分化成星型胶质细胞形态,表明ATRA可能是主要通

过诱导脑胶质瘤干细胞分化来抑制其成球能力,这与已有报道所观察到的结果基本一致^[12]。DAPT低浓度组(20 $\mu\text{mol/L}$)明显抑制了PGC1成球的大小和数目,在40 $\mu\text{mol/L}$ 浓度时几乎看不到明显的干细胞球,表明DAPT有可能通过干扰干细胞生长存活的信号途径而抑制细胞生长,这与以报道的DAPT能抑制Notch信号通路的机制是一致的。

2.3 ATRA和DAPT对PGC1和PGC2自我更新能力的影响

为了进一步定量分析ATRA和DAPT对PGC1和PGC2自我更新能力的影响,我们继续用不同浓度的ATRA和DAPT连续两周处理细胞。第一周结束后,将干细胞球消化成单个细胞后,相同条件继续培养,倒置显微镜下记录各组克隆球(直径大于50 μm)数,分析上述两种药物对PGC1和PGC2二次成球能力的影响。结果发现,ATRA和DAPT低浓度组和高浓度组均能明显影响二次成球能力,且PGC2成球能力较PGC1稍强。对照组细胞二次成球能力在30%~35%,ATRA低浓度组(40 $\mu\text{mol/L}$)细胞的二次成球比例降至10%~15%,高浓组(80 $\mu\text{mol/L}$)降至5%~8%(图3A);而DAPT抑制效应更明显,低浓度组(20 $\mu\text{mol/L}$)降至8%~10%,高浓度组(40 $\mu\text{mol/L}$)降至2%~3%(图3B)。这进一步验证了上述形态学观察结果。

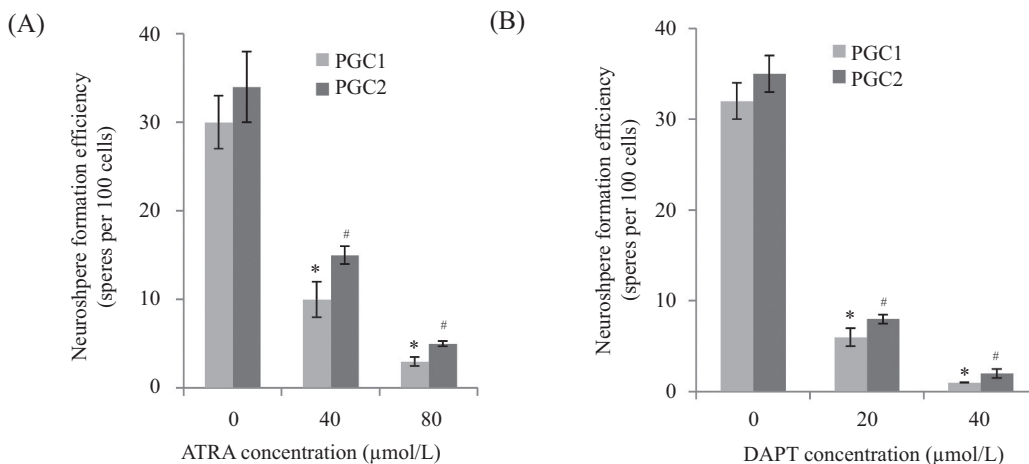


A: 不同浓度的ATRA对PGC1成干细胞球能力的影响; B: 不同浓度的DAPT对PGC1成干细胞球能力的影响。标尺=20 μm 。

A: effects of different doses of ATRA on the ability of PGC1 sphere formation; B: effects of different doses of DAPT on the ability of PGC1 sphere formation. Bars=20 μm .

图2 ATRA和DAPT对PGC1成球能力的影响

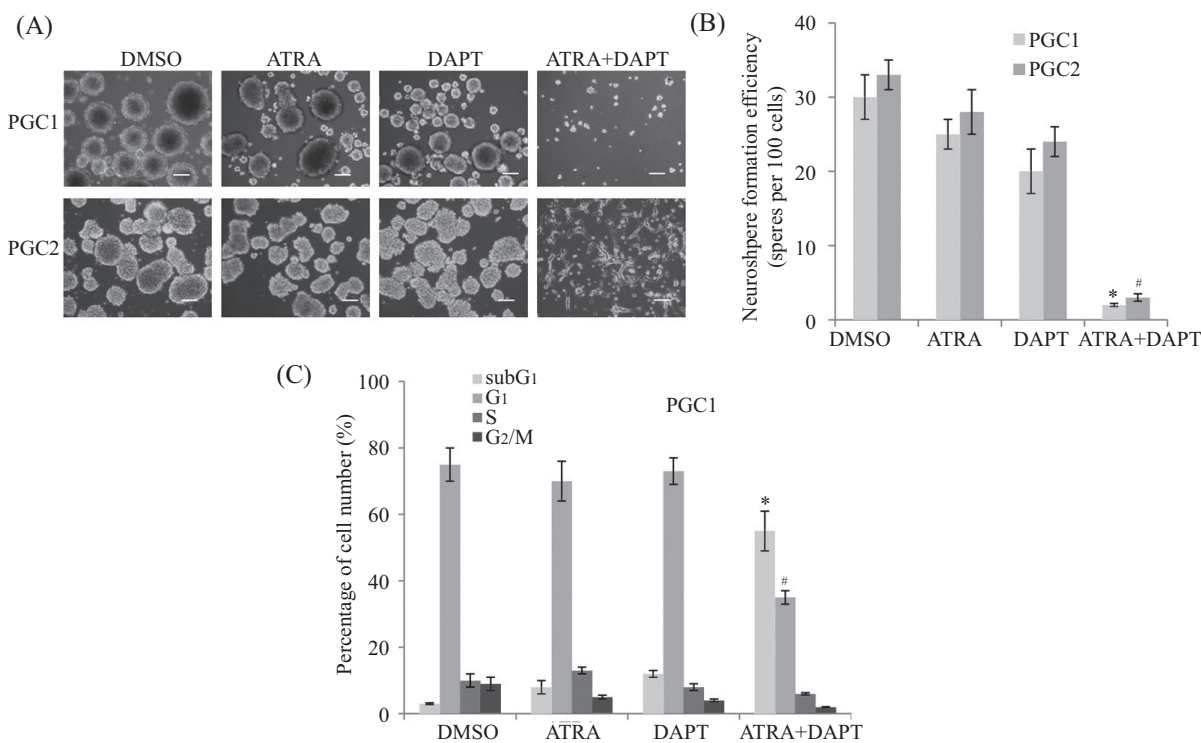
Fig.2 Effects of ATRA and DAPT on the ability of sphere formation of PGC1



A: 不同浓度的ATRA对PGC1和PGC2成干细胞球效率的影响; B: 不同浓度的DAPT对PGC1和PGC2成干细胞球效率的影响; * $P < 0.01$, # $P < 0.01$ 。
A: Effects of different doses of ATRA on the efficiency of PGC1 and PGC2 sphere formation. B: Effects of different doses of DAPT on the efficiency of PGC1 and PGC2 sphere formation; * $P < 0.01$, # $P < 0.01$.

图3 ATRA和DAPT对PGC1和PGC2成球效率的影响

Fig.3 Effects of ATRA and DAPT on the efficiency of sphere formation of PGC1 and PGC2



A: ATRA和DAPT单独或联合处理细胞对成球能力的影响(标尺=30 μm); B: ATRA和DAPT单独或联合处理对细胞成球效率的影响; C: ATRA和DAPT协同作用促进了细胞凋亡; * $P < 0.01$, # $P < 0.01$ 。

A: the effects of ATRA or DAPT or combination treatment on the ability of sphere formation (Bars=30 μm); B: the effects of ATRA or DAPT or combination treatment on efficiency of sphere formation; C: synergistic effect of ATRA and DAPT on apoptosis; * $P < 0.01$, # $P < 0.01$.

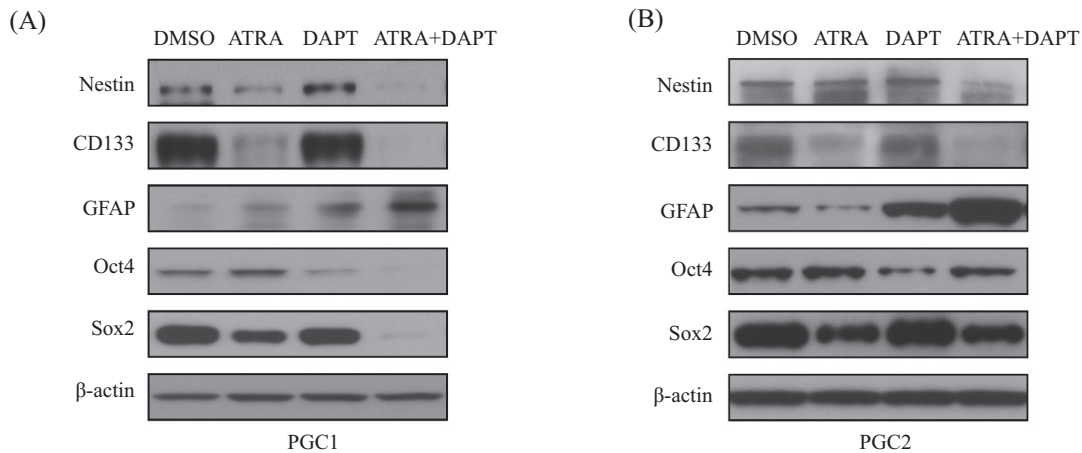
图4 ATRA和DAPT协同作用抑制PGC1和PGC2自我更新能力和促进细胞凋亡

Fig.4 The effects of ATRA and DAPT combination treatment on the ability of self-renewal and apoptosis of PGC1 and PGC2

2.4 ATRA和DAPT协同抑制PGC1和PGC2自我更新和促进细胞凋亡

由于ATRA主要效应是诱导肿瘤干细胞分化, 而DAPT是抑制肿瘤干细胞的自我更新^[9-10], 并且这

两种药物在较高浓度组才具有明显地抑制干细胞的自我更新能力, 所以我们想知道这两种药物是否具有协同作用。于是, 根据上述实验结果, 我们分别选取了对细胞生长没有明显影响的低浓度ATRA



A: ATRA和DAPT单独或联合处理PGC1对其干细胞标志物和分化标志物表达的影响; B: ATRA和DAPT单独或联合处理PGC2对其干细胞标志物和分化标志物的影响。

A: the effects of ATRA or DAPT or combination treatment on expression of PGC1 stem cell markers and differentiation marker; B: the effects of ATRA or DAPT or combination treatment on PGC2 stem cell markers and differentiation marker.

图5 ATRA和DAPT单独或联合处理细胞对干细胞标志物和分化标志物表达的影响

Fig.5 The effects of ATRA or DAPT or combination treatment on expression of PGC1 and PGC2 stem cell markers and differentiation marker

(20 $\mu\text{mol/L}$)和DAPT(5 $\mu\text{mol/L}$), 单独或联合处理细胞, 分析其对PGC1和PGC2自我更新能力的影响。与对照组相比, 单独使用ATRA或DAPT能部分降低PGC1成球大小和数目, 而联合使用几乎完全抑制了PGC1的生长, 这表明这两种药物对PGC1细胞生长抑制具有明显的协同效应(图4A)。对PGC2细胞而言, 单独使用ATRA或DAPT几乎没有抑制效应, 这与上述实验结果完全一致, 但两药联合使用却能诱导细胞分化, 明显地抑制细胞的生长(图4A), 这也明显地表现出了两种药物的协同效应。

二次成球能力试验也进一步证明了上述形态学观察, ATRA单独使用组干细胞成球率为25%~28%, 与对照组比没有明显差异; DAPT单独使用组干细胞成球率为23%~25%, 抑制效应也不理想, 而两药联合使用组干细胞成球率为3%~5%(图4B), 这表明它们能显著地协同抑制PGCs自我更新能力。进一步用流式细胞仪检测细胞周期, 结果发现, 单独使用低浓度的ATRA或DAPT均不能改变细胞周期的进程, 而联合使用组明显引起了细胞凋亡, 达到55%左右(图4C), 这表明两者药物协同作用的生物学效应为促进细胞凋亡。

2.5 ATRA和DAPT协同抑制PGC1和PGC2干细胞标志物的表达

上述实验结果表明, ATRA和DAPT能够协同抑

制脑胶质瘤干细胞的自我更新, 我们推测它们也可能影响肿瘤干细胞标志物的表达。因此, 我们用上述处理方法处理细胞两周后, 用免疫印迹的方法来检测干细胞标志物表达水平的变化。结果表明, 低浓度的ATRA处理PGC1细胞能明显减少神经干细胞标志物Nestin和CD133的表达, 分化标志物GFAP仅微弱增加, 多能性标志物Oct4和Sox2没有明显变化; DAPT仅明显降低Oct4的表达, GFAP微弱增加(图5A); 但两药联合使用组不但明显抑制了神经干细胞标志物, 而且降低了多能性标志物的蛋白质水平, 且GFAP表达水平明显增加(图5A), 这表明两种药物具有明显的协同效应。PGC2各处理组标志物变化趋势与PGC1细胞基本一致, 但联合使用组的协同效应与PGC1相比明显偏低(图5B), 这与上述PGC1细胞对这两种药物敏感性较高的结果相一致。

3 讨论

肿瘤干细胞具有自我更新的能力, 也是肿瘤恶性发展的重要原因。尽管学者们对肿瘤干细胞的起源和鉴定还存在争议, 但目前针对肿瘤干细胞放、化治疗的临床前研究依然是肿瘤研究领域的热点之一^[1]。多形性脑胶质母细胞瘤是最为恶性的脑肿瘤, 学者们已经针对其干细胞的起源和生长特性开展了较为深入的研究^[2]。分子靶向治疗药物对GSC生长

抑制的研究也有不少报道,但由于肿瘤细胞存在异质性,就决定了分子靶向治疗的局限性^[2]。因此,探索不同化疗药物和分子靶向药物的联合施用已成为肿瘤治疗研究的主要策略。本研究体外评价了两种药物ATRA和DAPT抗脑胶质瘤干细胞的协同效应。结果表明,与单独使用组相比,两种药物联用组明显抑制了肿瘤干细胞的自我更新能力和干性,促进了肿瘤干细胞的凋亡,这为针对肿瘤干细胞治疗的临床研究奠定了实验基础。

ATRA是维生素A在体内的天然衍生物,其在胚胎发育、视觉形成、免疫功能、诱导正常分化等生理过程中具有一定作用^[13]。研究发现,ATRA具有诱导多种肿瘤细胞分化的作用,已成为治疗急性早幼粒细胞白血病首选药物,并广泛应用于乳腺癌、甲状腺癌、非小细胞肺癌、前列腺癌及宫颈癌等实体肿瘤的预防和治疗^[14]。ATRA发挥作用的分子机制主要有两种途径^[14]:核受体(RXR)途径和非受体途径。核受体(RXR)途径是维甲酸通过与其受体(RXRs)结合,进一步作用于基因启动子区域内维甲酸反应原件(RARE)调节基因的转录,从而诱导细胞分化或凋亡,最终引起细胞生长抑制而发挥生物学效应^[14],例如通过核受体(RXR)途径上调*cox2*等基因的表达来促进肿瘤细胞分化^[15]。非受体途径可以通过直接影响转录因子CREB的磷酸化来促进Caspase-8的表达,从而诱导细胞凋亡^[16-17]。此外,目前的证据表明,ATRA可以通过抑制Wnt/ β -catenin途径或下调Notch信号途径组分以及抑制MAPKs的活性诱导肿瘤干细胞的分化^[18-20]。本研究中,ATRA是否通过上述途径抑制脑胶质瘤细胞的自我更新有待进一步研究。ATRA应用于脑胶质瘤治疗尚处于实验研究阶段,单独使用ATRA对脑胶质瘤细胞的抑制作用是有限的,而且其仅能诱导脑肿瘤干细胞的分化,不能影响细胞的存活^[14]。本研究中,我们也发现即使在高浓度组ATRA仅能部分诱导GSC分化和抑制其自我更新能力,其生长抑制率最高达50%左右,这与其他研究组的报道基本一致^[14]。多靶点联合用药是目前临床研究和治疗的主要策略,因此,我们探索了ATRA与 γ -分泌酶抑制剂DAPT联合使用的抗脑胶质瘤干细胞的作用。

γ -分泌酶是一个膜蛋白多聚体复合物,主要定位于膜表面,能水解I型跨膜蛋白的跨膜区,早老素-1(presenilin-1, PS-1)是其催化活性部位^[8]。至今

已发现的依赖 γ -分泌酶水解发生核转位的膜表面分子有ErbB-4、VEGFR-1、Notch^[8]等。水解Notch等产生的胞内片段可以参与核内信号转导,进而调节细胞的生物学功能^[7-10]。上述途径在多种肿瘤包括脑胶质瘤的发生和发展中发挥了重要作用^[9]。因此,目前已经针对 γ -分泌酶已开发出了许多类型的抑制剂用于实验研究,部分已经用于临床研究。而且 γ -分泌酶依赖的Notch信号通路在胶质瘤发生和胶质瘤干细胞的生长中发挥了重要作用^[9]。因此,本研究选择了 γ -分泌酶抑制剂DAPT与ATRA联合使用,探讨其协同抑制胶质瘤干细胞自我更新和干性的生物学效应。结果表明,低浓度的DAPT或ATRA对GSC的自我更新和干性影响较小,而两者联合使用组显示出非常显著的抑制效应和促进凋亡作用,这表明两种药物确实具有协同效应。我们推测其作用机制可能主要通过协同调控Wnt/ β -catenin信号通路、MAPKs通路以及Notch信号通路来发挥生物学效应。

本研究的体外试验结果证明了DAPT和ATRA具有抗GSC的协同效应,尚需进一步的体内实验证实上述结果。此外,其具体的作用机制也需进一步深入探讨。

参考文献 (References)

- 1 Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144(5): 646-74.
- 2 Chen J, McKay RM, Parada LF. Malignant glioma: Lessons from genomics, mouse models, and stem cells. *Cell* 2012; 149(1): 36-47.
- 3 Lewandoski M, Mackem S. Limb development: the rise and fall of retinoic acid. *Curr Biol* 2009; 19(14): R558-61.
- 4 Tang XH, Gudas LJ. Retinoids, retinoic acid receptors, and cancer. *Annu Rev Pathol* 2011; 6: 345-64.
- 5 徐双年, 陈洁平, 刘建平, 夏芸. 三氧化二砷与全反式维甲酸治疗急性早幼粒细胞白血病疗效比较的系统评价. 第三军医大学学报(Xu Shuangnian, Chen Jieping, Liu Jianping, Xia Yun. Arsenic trioxide vs all-trans retinoic acid to treat acute promyelocytic leukemia: A systematic comparative review. *Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae*) 2009; 31(21): 2098-102.
- 6 杨艳敏, 车玉琴, 卢岩, 佟海霞, 李慧, 何平. 全反式维甲酸联合 γ -干扰素对神经母细胞瘤细胞诱导分化及生长抑制作用的研究. *中国实用内科杂志*(Yang Yanmin, Che Yuqin, Lu Yan, Tong Haixia, Li Hui, He Ping. ATRA combined with IFN γ to induce differentiation and growth inhibition of NB cells. *Chinese Journal of Practical Internal Medicine*) 2006; 26(10): 755-7.
- 7 Bai G, Pfaff SL. Protease regulation: the Yin and Yang of neural development and disease. *Neuron* 2011; 72(1): 9-21.
- 8 Imbimbo BP. Therapeutic potential of gamma-secretase inhibitors and modulators. *Curr Top Med Chem* 2008; 8(1): 54-61.

- 9 Turchi L, Debruyne DN, Almairac F, Virolle V, Fareh M, Neirijnck Y, *et al.* Tumorigenic potential of miR-18A in glioma initiating cells requires NOTCH-1 signaling. *Stem Cells* 2013; 31(7): 1252-65.
- 10 Stockhausen MT, Kristoffersen K, Poulsen HS. Notch signaling and brain tumors. *Adv Exp Med Biol* 2012; 727: 289-304.
- 11 Bautch VL. Cancer: Tumour stem cells switch sides. *Nature* 2010; 468(7325): 770-1.
- 12 Karsy M, Albert L, Tobias ME, Murali R, Jhanwar-Uniyal M. All-trans retinoic acid modulates cancer stem cells of glioblastoma multiforme in an MAPK-dependent manner. *Anticancer Res* 2010; 30(12): 4915-20.
- 13 Cvekl A, Wang WL. Retinoic acid signaling in mammalian eye development. *Exp Eye Res* 2009; 89(3): 280-91.
- 14 Bour G, Lalevée S, Rochette-Egly C. Protein kinases and the proteasome join in the combinatorial control of transcription by nuclear retinoic acid receptors. *Trends Cell Biol* 2007; 17(6): 302-9.
- 15 Alique M, Herrero JF, Lucio-Cazana FJ. All-trans retinoic acid induces COX-2 and prostaglandin E2 synthesis in SH-SY5Y human neuroblastoma cells: Involvement of retinoic acid receptors and extracellular-regulated kinase 1/2. *J Neuroinflammation* 2007; 4: 1.
- 16 Feliciano DM, Edelman AM. Repression of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IV signaling accelerates retinoic acid-induced differentiation of human neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 2009; 284(39): 26466-81.
- 17 Jiang M, Zhu K, Grenet J, Lahti JM. Retinoic acid induces caspase-8 transcription via phospho-CREB and increases apoptotic responses to death stimuli in neuroblastoma cells. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1783(6): 1055-67.
- 18 Lim YC, Kang HJ, Kim YS, Choi EC. All-trans-retinoic acid inhibits growth of head and neck cancer stem cells by suppression of Wnt/ β -catenin pathway. *Eur J Cancer* 2012; 48(17): 3310-8.
- 19 Karsy M, Albert L, Tobias ME, Murali R, Jhanwar-Uniyal M. All-trans retinoic acid modulates cancer stem cells of glioblastoma multiforme in an MAPK-dependent manner. *Anticancer Res* 2010; 30(12): 4915-20.
- 20 Lu J, Zhang F, Zhao D, Hong L, Min J, Zhang L, *et al.* ATRA-inhibited proliferation in glioma cells is associated with subcellular redistribution of beta-catenin via up-regulation of Axin. *J Neurooncol* 2008; 87(3): 271-7.