

脑肿瘤干细胞

牛 蕤 廖 红 陈丁丁 黄文辉 张陆勇 *

(中国药科大学新药筛选中心神经生物学实验室, 南京 210038)

摘要 脑肿瘤尤其是恶性脑胶质瘤, 由于生长及复发快, 预后极差, 所以找到胶质瘤复发的根源, 提高胶质瘤病人的存活率, 已成为国内外的肿瘤生物学工作者和临床医学工作者亟待解决的难题。近年来肿瘤干细胞概念的提出及脑肿瘤干细胞的分离及鉴定, 为脑肿瘤的研究提供了新的切入点, 同时可成为肿瘤治疗新的靶标, 为根治脑肿瘤带来了光明的前景。简要综述了脑肿瘤干细胞无限增殖、自我更新、多分化潜能的生物学特性, 脑肿瘤干细胞的起源以及与脑肿瘤相关机制方面的研究进展, 从而为今后脑肿瘤早期诊断、治疗以及以此为靶标的药物开发提供新的思路 and 方向。

关键词 脑肿瘤干细胞; 胶质母细胞瘤; 髓母细胞瘤

脑是人类精神和智力活动的器官, 是思维、性格和情感的中心, 是人类一切活动的中枢。脑的健康与否不但决定着人们的生命, 更重要的是决定着人们的生存质量。脑肿瘤是一种神经系统常见的严重疾病, 常造成神经系统的功能障碍, 对躯体和认知可引起复杂的损害, 轻者给病人带来痛苦或残疾, 严重时甚至威胁病人的生命。星状胶质瘤是中枢神经系统最常见的原发性肿瘤。按照 WHO 的分级, 星状胶质瘤可分为四级^[1]: I 级为纤维状的星状胶质瘤 (pilocytic astrocytoma); II 级为低级的星状胶质瘤 (low-grade astrocytoma); III 级为间变性的星状胶质瘤 (anaplastic astrocytoma); IV 级为多形性的胶质母细胞瘤 (glioblastoma multiforme, GBM), 它的恶性程度最高, 易发于成人的额颞叶和顶叶。人类胶质瘤最典型的特征就是浸润性生长, 浸入到周边正常的脑组织中, 而且级别越高, 浸润性越强, 从而加大了手术切除的难度。

目前临床上对脑瘤患者一般都采取手术或者放疗化疗的治疗方法, 但由于至今未找到脑肿瘤发病的关键环节, 所以这些治疗方案都不尽如意, 特别是恶性脑瘤的治愈率很低, 例如胶质母细胞瘤的患者, 如果不进行任何治疗, 存活期只有 17 个星期, 如果进行手术和放疗, 存活期也只有 30 个星期。因此, 近年来肿瘤干细胞 (tumor stem cells, TSC) 概念的提出及脑肿瘤干细胞 (brain tumor stem cells, BTSC) 的分离与鉴定成功, 为脑肿瘤的研究提供了新的切入点。

1 肿瘤干细胞学说的提出

早在 150 年前, 密西根州大学癌症中心就已经假设, 癌症可能是来自于干细胞。因为从肿瘤发生的条件来看, 具有不断分裂的能力的干细胞的确是癌变基因的理想萌生处和持久的载体。1997 年, Bonnet 等^[2]率先在人类急性粒细胞白血病中找到肿瘤干细胞, 进一步研究发现, 这些细胞类似于成体干细胞, 有着分裂增殖、自我更新、以及分化成其他细胞的能力。随后陆续有文献报道从人类急性粒细胞白血病^[3]、乳腺肿瘤^[4]、前列腺肿瘤^[5]以及中枢神经系统肿瘤^[6-10]中分离得到具有干细胞特性的一类细胞, 并且使其在实验动物身上实现肿瘤再现。

鉴于上述实验结果, 肿瘤干细胞学说^[11]得到了广泛的重视。肿瘤干细胞学说认为所有的肿瘤组织并不是由均一的肿瘤细胞所组成的, 在众多的肿瘤组织中, 不同的细胞具有不同的增殖、浸润和转移能力, 亦即肿瘤的异质性。在一些肿瘤组织中存在为数不多的但担当着干细胞角色的肿瘤细胞, 这些特殊的肿瘤细胞具有干细胞的一切基本特性, 包括自我更新能力、无限增殖能力和多向分化潜能, 于是定义为 TSC。继续研究发现在肿瘤的形成和生长中起着决

收稿日期: 2007-01-22 接受日期: 2007-03-28

教育部留学归国人员科技活动择优项目 (No. X072002), 新世纪优秀人才 (No. NCET-04-0507) 和江苏省药效研究和评价服务中心 (抗肿瘤药物) (No. BM2005103) 项目资助

* 通讯作者。Tel: 025-83271500, Fax: 025-85303260, E-mail: drugscreen@126.com

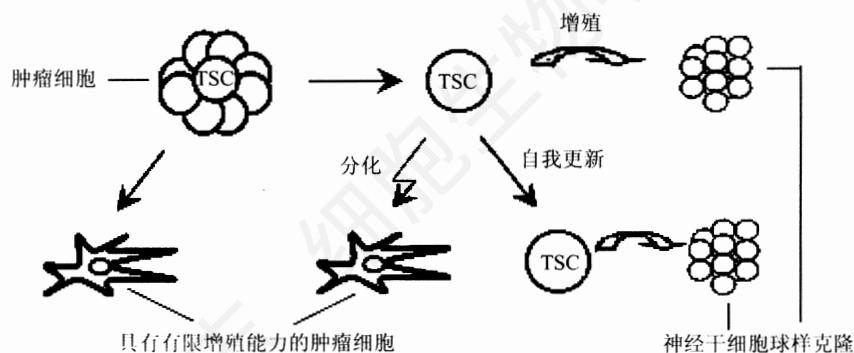


图1 肿瘤干细胞学说示意图^[11]

肿瘤干细胞学说认为肿瘤具有异质性,大部分肿瘤细胞仅具有有限的增殖能力,只有占较小比例的担当着干细胞角色的肿瘤细胞,即TSC才能无限增殖形成新的肿瘤。TSC具有无限增殖、自我更新及多分化潜能的生物学特性,而其他大多数肿瘤细胞经过短暂分化后将死亡。

定性作用的也正是这群特殊的TSC,而其他大多数肿瘤细胞在经过短暂的分化之后会最终走向死亡(图1)。

随着研究的不断深入,已经有越来越多的科学家从恶性脑瘤组织(例如:脑胶质母细胞瘤、髓母细胞瘤等)中分离得到了极少量的但担当着干细胞角色的肿瘤细胞,即BTSC,它们在脑肿瘤的生长与复发中起着关键性的作用。Vescovi等^[11]给BTSC的定义如下:(1)原位移植(即脑内移植)后具有成瘤能力,其继发的脑肿瘤应与原脑肿瘤具有相同的表型;(2)在体外和体内均具有超强的自我更新能力;(3)染色体分析,发现核型改变;(4)多分化潜能;(5)能够分化成非肿瘤性的终末细胞等。这种全新的概念一经提出,便引起人们的广泛关注,它猛烈地撞击着我们对脑肿瘤发病机制及其治疗手段的传统认识。因此,对BTSC的分离及特性的研究成为近年来的研究热点之一。

2 BTSC的起源

现有种种证据支持BTSC的存在,但是其细胞起源尚未明确。目前发现脑肿瘤干细胞与神经干细胞(neural stem cell, NSC)之间存在很多相似之处,因此脑肿瘤干细胞是否来源于神经干细胞这一问题自然而然地就提出来了。

有推测认为BTSC起源于正常NSC。最近有证据指出BTSC可能是由大多数在神经发生区域未分化的NSC的变异衍生而来的^[1]。其中室下区(subventricular zone)是最易发神经胶质瘤的区域^[12]。室下区受到致癌物侵袭后的致癌率明显高于周围皮层区域^[13]。但观察发现,脑肿瘤发生的区域往往不同于脑肿瘤最终发展的区域,这可能是由于BTSC经过不对称分裂后产生的BTSC仍然在室下区,但是前体细胞的迁移会导致脑肿瘤的发展偏离于其发生的区域^[14]。另外,

NSC具有很强的自我更新机制,获得较少突变即有可能恶性转化,而且干细胞存活时间较长,这意味着干细胞比成熟细胞发生细胞复制的错误几率更大,因外界环境的刺激而发生突变的机会更多,最终形成BTSC^[1]。同时调节NSC增殖和自我更新的基因在原发性脑肿瘤的BTSC中也表达,这也是支持NSC是BTSC来源的一个论据。

然而,这些尚不能完全证明BTSC起源于NSC,也有推测认为它可能起源于已分化的细胞,由这些细胞突变发生去分化得来,并通过基因突变而获得了干细胞自我更新的特性,从而形成BTSC^[15]。

3 BTSC的分离与鉴定

3.1 从细胞系中分离和鉴定BTSC

Kondo等^[16]利用Hoechst 33342染料对小鼠脑胶质瘤细胞系C6与大鼠脑胶质瘤细胞系B104进行流式细胞术分析时发现了一群细胞亚群细胞(side population, SP)。SP细胞具有由ABC2/brcp1转运体所介导的泵出染料的能力,因此表现为较弱的Hoechst 33342激发荧光特性。这些SP细胞在体外呈球样悬浮性生长,高表达NSC的标记物nestin,并能分化产生胶质细胞和神经元。同时,这些SP细胞在培养基中可产生SP和非SP细胞,只有SP细胞原位接种后才能在裸小鼠的脑组织中形成肿瘤,非SP细胞无成瘤能力^[17]。

3.2 从脑肿瘤病人外科手术切除的脑肿瘤样本中分离和鉴定BTSC

3.2.1 体外研究 Hemmati等^[6]对小儿髓母细胞瘤(medulloblastoma)和胶质母细胞瘤(glioblastoma multiforme)进行研究,发现存在与NSC基本特性相似的且可能参与了脑肿瘤形成的细胞,这些细胞在体外

培养3~7天即可增殖形成类似NSC的细胞球,通过免疫染色技术发现这些细胞表达nestin,于是鉴定为BTSC。实验中发现这些细胞能够自我更新,同时也具有多分化潜能,在分化培养基中可分化成神经元和星状胶质细胞,且细胞比例与亲代肿瘤组织相似。

CD133(相对分子量为120 kDa的跨膜蛋白)也是公认的人源干细胞的标志物。Singh等^[7]通过免疫磁珠分选技术(magnetic cell sorting, MACS)从病人脑肿瘤组织中分离得到CD133⁺与CD133⁻两类细胞,发现脑肿瘤中几乎所有的细胞增殖均由一小部分表达CD133的细胞产生,即BTSC。这些细胞同样具有自我更新、无限增殖和多分化潜能,并且分化得到的细胞的比例、表型与亲本肿瘤组织一致。通过光谱核型分析还发现这些细胞存在染色体异常,提示这些细胞可能由正常NSC突变而来。

3.2.2 体内研究 在体外,可在加入EGF、bFGF等细胞因子的无血清培养基(free serum medium, FSM)中培养出BTSC,但是把BTSC移植到体内是否能产生与来源肿瘤相同的肿瘤呢?

Yuan等^[8]对成人胶质母细胞瘤进行研究,分离和鉴定出神经球样的BTSC。他们将5万个未形成神经球的单层脑瘤细胞和5万个神经球样的脑瘤细胞分别接种到NOD/SCID小鼠体内,6周后观察发现,所有接种神经球样的脑瘤细胞的NOD/SCID小鼠均有肿瘤生成,但没有一只接种未形成神经球的单层脑瘤细胞的NOD/SCID小鼠体内生成肿瘤。因此,Yuan等把未形成神经球的单层脑瘤细胞的数量提高到25万,把神经球样的脑瘤细胞的数量降到5千,再次分别移植到NOD/SCID小鼠体内,6周后观察仍得出相同的结论。

Galli等^[9]将从胶质母细胞瘤中分离得到的可无限增殖、自我更新,并能分化成多细胞谱系的细胞注射入NOD/SCID小鼠颅内进行原位接种,结果发现可在其活体内产生与亲本肿瘤类似的肿瘤。将子代的肿瘤组织继续移植到到另一只NOD/SCID小鼠颅内,仍可以产生表型相似的肿瘤。

为进一步进行研究脑肿瘤产生的机制,Singh等^[10]将磁性分选获得的CD133⁺和CD133⁻细胞异体原位移植入NOD/SCID小鼠脑中,比较两种细胞的致癌能力。移植后12~24周,仅100个CD133⁺细胞就可以在NOD/SCID小鼠体内导致肿瘤产生,而移植50 000~100 000个CD133⁻细胞则不能致癌。随后,将子代肿瘤组织中所分选得到的CD133⁺细胞移植到NOD/

SCID小鼠体内,5周后,所有被接种的NOD/SCID小鼠均可见肿瘤生长,且与前两代肿瘤表型相同。

上述结果说明,脑肿瘤中的CD133⁺细胞即BTSC远比CD133⁻细胞具有更强的成瘤能力,进而为BTSC的存在以及它在脑肿瘤的生长与复发中起着决定性的作用提供了有力的证据。

4 BTSC的生物学特性

4.1 与神经干细胞相似的生物学特性

4.1.1 标记物 BTSC表达与NSC相同的标记物,其中包括中间丝蛋白nestin和跨膜蛋白CD133。此外,musashi-1、bmi-1和sox-2等NSC的标记物,在BTSC上同样有表达^[6]。这些共同基因表达的发现,提示了BTSC与NSC之间有密切的联系^[18]。

4.1.2 自我更新、无限增殖以及多向分化潜能 自我更新能力、无限增殖能力以及多向分化潜能是NSC最基本的生物学特性,BTSC也同样具备NSC的这些基本生物学特性。

从脑肿瘤组织中分离得到的BTSC在无血清培养基中维持未分化状态,添加EGF、bFGF后,干细胞分裂增殖,形成悬浮的神经干细胞球样结构。将亲本脑肿瘤干细胞球制成单细胞悬液进行培养,结果细胞悬液都可再次形成细胞球^[6-10]。

BTSC在分化培养基(含血清)中可以分化成表达神经元、星状胶质细胞、少突胶质细胞相关标记物的细胞,表现出与NSC相同的多分化能力,并且分化得到的细胞的比例、表型与亲本肿瘤组织一致。这表明BTSC在促分化培养时是严格遵循特定方向,即向亲本肿瘤表型方向进行分化^[6-10]。

4.1.3 可能具有与NSC相似的信号转导通路 目前,越来越多的研究认为BTSC可能起源于正常的NSC,调节正常NSC自我更新的基因异常可能导致脑肿瘤生长失控,因此BTSC可能存在与NSC相同的自我更新与分裂增殖的信号转导通路。已经有很多研究证明了一些在成体干细胞以及白血病肿瘤干细胞的自我更新中起重要作用的基因及其信号转导通路^[11],其中包括Wnt、Sonic hedgehog (Shh)^[19,20]等几条与干细胞增殖分化有关的信号转导途径同样可能在脑肿瘤形成的过程中发挥重要的作用^[15]。

Bmi-1是调节染色体重构的转录因子,在中枢神经系统中,bmi-1通过部分抑制某些调节细胞衰老和死亡的基因来调节干细胞的自我更新^[21]。Molofsky等^[22]通过对bmi-1基因缺失小鼠的研究,证实了它在正

常 NSC 的自我更新中所起的重要作用。Hemmati 等^[6]也发现相对于正常的 NSC, 肿瘤衍生的神经样细胞球高表达 bmi-1, 因此提示 bmi-1 以及 bmi-1 的信号转导通路, 在胶质母细胞瘤的增殖以及胶质母细胞瘤中的 BTSC 增殖中均起着关键性作用, bmi-1 的过度表达可能是导致胶质母细胞瘤与髓母细胞瘤发病的原因之一^[23]。

4.2 不同于正常神经干细胞的生物学特性

4.2.1 异常的增殖能力 NSC 在体外具有自我增殖和分化的潜能, 但它的这种能力是受到严格控制的, 且增殖和分化保持平衡状态^[24], 而 BTSC 却表现出异常的增殖能力, 且不受控制, 可多次传代并无限增殖, 在体外保持其增殖活性可维持 16 周甚至更久, 增殖和分化失衡^[6]。

4.2.2 染色体异常 Singh 等^[10]对处于有丝分裂中期的髓母细胞 BTSC 进行染色体核型分析, 结果发现 10 号和 16 号染色体缺失, 18 号染色体增加, 核型为 45XY, 其中 10 号染色体缺失为最显著的特征。Galli 等^[9]对多组胶质母细胞瘤 BTSC 进行核型分析, 发现 7 号、22 号染色体增加以及 1 号染色体缺失出现频率较高, 并且经过长期传代培养染色体的核型保持不变。由此可见 BTSC 存在染色体核型的异常的现象, 并且不同病理类型、不同级别, 染色体核型异常也存在差别。如果进行基因芯片检测, 很可能发现其基因表达与 NSC 存在显著差异。

4.2.3 耐药性 与一般的肿瘤细胞相比, BTSC 高表达 bcl-2 抗凋亡蛋白以及如 ABC 转运体(ABC-transporter)、多药耐药蛋白(MDR1)等膜转运蛋白, 可泵出进入细胞的药物, 从而达到药物耐受的目的^[12]。同时, 绝大部分 BTSC 处于细胞静止的 G₀ 期, 也是 BTSC 耐受目前的药物疗法的原因之一。

4.2.4 介导辐射耐受(radioreistance) 放射性疗法是现今胶质母细胞瘤最有效的治疗方法^[25]。但是, 由于辐射耐受, 放疗的效果也只是暂时的^[26], 脑瘤复发的可能性很大。Bao 等^[27]认为肿瘤的辐射耐受是由肿瘤干细胞造成的。他们研究发现胶质母细胞瘤经过放射治疗后, CD133⁺ 细胞富集。而且不管是体外细胞培养还是体内肿瘤细胞异种移植, CD133⁺ 细胞比率越高, 经过放疗后的肿瘤细胞的存活率也越高。DNA 损伤检验点反应(DNA damage checkpoint response)在辐射耐受中起着重要的作用^[28], Bao 等^[27]使用其特异性的抑制剂发现可逆转肿瘤干细胞的辐射耐受。因此, 他们认为脑肿瘤干细胞通过激活

DNA 损伤检验点反应从而增强了辐射耐受的能力。

5 BTSC学说的临床意义

5.1 对于脑肿瘤分级的重要意义

当前脑肿瘤的诊断与预后标准是以肿瘤的全体肿瘤细胞群的组织病理学和分子生物学特点为依据的。BTSC 学说提出之后, 当前的这种脑肿瘤的诊断与预后标准不能充分体现占较少比例的 BTSC 的改变, 使得临床上诊断与治疗脑瘤仍存在很多难题。因此, BTSC 的鉴定可为脑肿瘤的监测和诊断提供重要标志物, 假设以 BTSC 在脑瘤组织中所占的比例对脑肿瘤进行分级, 可更好地了解脑肿瘤的生物学行为, 为诊断和治疗提供新的依据, 从而可以进一步预测脑肿瘤的发生、发展和转归。

5.2 对于脑肿瘤治疗的重要意义

BTSC 虽然只占全部脑肿瘤细胞的极少数, 但它却是脑肿瘤形成、发展和恶化的根源, 它的分离具有重要的临床意义。传统的药物治疗针对的是大多数不具有强增殖能力和致瘤能力的脑肿瘤细胞, 往往忽视了占少数的 BTSC, 这种治疗虽能使肿瘤减缩, 但对 BTSC 无法达到最有效的杀灭效果, 脑肿瘤仍会复发。因此以 BTSC 为研究对象, 对阐明脑肿瘤发生发展机制以及临床治疗有重要的价值。另外, 也可以通过寻找 BTSC 的特殊标志, 可以更早检查出脑肿瘤的发生, 为治疗赢得宝贵的时间^[29]。

由于 BTSC 与脑肿瘤细胞具有异质性, 其生物学特性和对治疗手段的敏感程度也并不完全一致^[12, 25]。脑肿瘤治疗应该针对该细胞群的生物学特性制订相应的治疗方案。因此, BTSC 的分离与鉴定有可能彻底改变现有化疗药物的选择配伍、有效剂量和疗程以及放疗疗法的治疗强度与疗程, 以彻底消灭 BTSC 为指标的新化疗、放疗方案有望极大地降低脑肿瘤的复发率和提高其治愈率。

5.3 新的药物靶点

BTSC 是脑肿瘤发生、维持乃至复发的关键所在, 尽管数量极少, 但只有它们才决定着肿瘤发生、发展、侵袭、转移、复发和对治疗敏感与否, 它的发现为研发新一代高效的抗脑肿瘤药物提供了新的靶点。因此, 采取各种针对 BTSC 的措施, 进而找到能特异性杀死 BTSC 的方法, 从而才能提供靶向性的治疗, 达到根治和防止脑肿瘤复发和转移。一方面可通过某些诱导分化剂的应用, 诱导 BTSC 向成熟细胞进行分化。经一定时间, BTSC 分化超过增殖,

BTSC 库渐趋衰竭,从而达到治疗的目的。另一方面可通过研究脑肿瘤干细胞的基因及信号转导通路,寻找 BTSC 靶向治疗的靶点。

总之, BTSC 的分离与鉴定是脑肿瘤病理学、诊断学以及治疗学上的一次重大革命^[1], BTSC 的研究丰富了人们对脑肿瘤的认识。同时,在正常 NSC 和 BTSC 之间有许多关联,对它们的了解也是极为重要的,研究 NSC 生物学借以洞察脑肿瘤的起源也将最终产生新的对抗这一疾病的方法。通过对上述问题的探讨,将有助于对 BTSC 的进一步深入研究,进而为脑肿瘤发病机制的研究以及临床治疗提供新的思路 and 方向,将使人类从根本上抑制脑肿瘤的发生发展成为可能。

参考文献 (References)

- [1] Vescovi AL *et al. Nat Rev Cancer*, 2006, **6**: 425
- [2] Bonnet D *et al. Nat Med*, 1997, **3**: 730
- [3] Cox CV *et al. Blood*, 2004, **104**: 2919
- [4] Al-Hajj M *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**: 3983
- [5] Maitland NJ *et al. BJU Int*, 2005, **96**: 1219
- [6] Hemmati HD *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**: 15178
- [7] Singh SK *et al. Cancer Res*, 2003, **63**: 5821
- [8] Yuan X *et al. Oncogene*, 2004, **23**: 9392
- [9] Galli R *et al. Cancer Res*, 2004, **64**: 7011
- [10] Singh SK *et al. Nature*, 2004, **432**: 396
- [11] Reya T *et al. Nature*, 2001, **414**: 105
- [12] Sanai N *et al. N Engl J Med*, 2005, **353**: 811
- [13] Hopewell JW *et al. Cancer Res*, 1969, **29**: 1927
- [14] Berger F *et al. Lancet Oncol*, 2004, **5**: 511
- [15] Nakano I *et al. Pediatr Res*, 2006, **59**: 54R
- [16] Kondo T *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**: 781
- [17] Zhou S *et al. Nature*, 2001, **7**: 1028
- [18] Ignatova TN *et al. Glia*, 2002, **39**: 193
- [19] Lai K *et al. Nat Neurosci*, 2003, **6**: 21
- [20] Chenn A *et al. Science*, 2002, **297**: 365
- [21] Bea S *et al. Cancer Res*, 2001, **61**: 2409
- [22] Molofsky AV *et al. Nature*, 2003, **425**: 962
- [23] Leung C *et al. Nature*, 2004, **428**: 337
- [24] Clarke MF. *Biol Blood Marrow TR*, 2005, **11**: 14
- [25] Legler J *et al. Natl Cancer Inst*, 1999, **91**: 1382
- [26] Garden AS *et al. Radiother Oncol*, 1991, **20**: 99
- [27] Bao S *et al. Nature*, 2006, **444**: 756
- [28] Zhou BB *et al. Nature*, 2000, **408**: 433
- [29] Al-Hajj M *et al. Curr Opin Genet Dev*, 2004, **14**: 43

Brain Tumor Stem Cells

Rui Niu, Hong Liao, Ding-Ding Chen, Wen-Hui Huang, Lu-Yong Zhang*

(Neurobiology Lab, New Drug Screening Center, China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, China)

Abstract Brain tumors, especially malignant glioblastoma and medulloblastoma, are often lethal just because of their proliferation and recurrence very quickly. Therefore, it will be difficult problem be solved urgently that exploring of the arising of brain tumor and reasons of brain tumor recur in tumor researching and clinical therapy. Recently, the conception of tumor stem cells and the isolation and identification of brain tumor stem cells provide a new approach to explore the puzzle about the brain tumors. In this review, we will discuss the proposing of tumor stem cell theory and introduce some progress about brain tumor stem cells (including unlimited proliferation, self-renewal, multipotent differentiation, genesis, and so on). All these researching work will provide one kind of new direction for brain tumor clinical implication such as diagnosis, therapy and development of drug for targeting the tumor stem cells.

Key words brain tumor stem cells; glioblastoma; medulloblastoma

Received: January 22, 2007 Accepted: March 28, 2007

The work was supported by the Project of Scientific and Technological Activity for the Returned Overseas Chinese Scholars from the Ministry of Education of China (No. X072002), the New Century Project for Excellent Scholar (No.NCET-04-0507), and the Jiangsu Center for Pharmacodynamics Research and Evaluation (No.BM2005103)

*Corresponding author. Tel: 86-25-83271500, Fax: 86-25-85303260, E-mail: drugscreen@126.com