

文章编号:1000-5404(2013)08-0733-04

论著

内皮细胞通过 Hedgehog 通路促进胶质瘤干细胞自我更新

闫广宁, 杨浪, 崔有宏, 郭德玉 (400038 重庆, 第三军医大学西南医院病理学研究所, 肿瘤免疫病理学教育部重点实验室)

[摘要] **目的** 探讨 Hedgehog 通路在内皮细胞促进胶质瘤干细胞 (glioma stem cell, GSC) 自我更新中的可能作用。**方法** 实验以 GL261 细胞系中分离的 GSC 和内皮细胞系 b. END3 为研究材料, 采用 Transwell 双室细胞培养、极限稀释法成球实验、实时定量 PCR、Western blot、体内移植瘤实验以及慢病毒载体基因干扰等方法, 检测内皮细胞对 GSC 成球、成瘤能力、干性基因表达以及 Hedgehog 信号通路相关的部分基因表达的影响。**结果** 与对照组相比: ①GSC 与内皮细胞共培养后其体外成球能力明显增强, 表现为形成干细胞球数目明显增多, 体积明显增大, 尤其在每孔 5 个 (24.3% vs 11.3%) 和每孔 10 个细胞 (39.4% vs 25.8%) 的极低浓度下更加明显 ($P < 0.05$)。②共培养体系中, GSC 的干性相关基因 Oligo2、Bmi1 与 Hedgehog 信号通路相关基因 Gli1 的 mRNA 和蛋白表达明显增加 ($P < 0.05$)。③体内移植瘤实验发现, 与内皮细胞共同注射的 GSC 成瘤能力明显增强, 所形成的移植瘤体积显著大于对照组 ($P < 0.05$), 而且出现了部分瘤体破溃、小鼠死亡。④通过慢病毒载体基因干扰 Smo 基因表达抑制 Hedgehog 信号通路后, 内皮细胞促进 GSC 自我更新的上述现象消失。**结论** 内皮细胞可能通过激活 Hedgehog 信号通路促进 GSC 自我更新。

[关键词] 胶质瘤干细胞; 内皮细胞; 信号转导; Hedgehog 通路

[中图分类号] R322.12; R329.28; R730.264

[文献标志码] A

Endothelial cells promote self-renewal of glioma stem cells through Hedgehog pathway

Yan Guangning, Yang Lang, Cui Youhong, Guo Deyu (Institute of Pathology, Key Laboratory of Tumor Immunopathology of Ministry of Education, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[Abstract] **Objective** To explore the role of Hedgehog pathway in endothelial cells promoting self-renewal of glioma stem cell (GSC). **Methods** GSC derived from glioblastoma cell line GL261 and brain microvessel endothelial cell line b. END3 were used. Transwell co-culture system, limit dilution assay, real-time PCR, Western blotting, xenograft experiment and gene knock-down assay were applied to determine the self-renewal, tumorigenic ability and gene expression of Hedgehog pathway in GSC spheres. **Results** (1) More and larger tumor spheres were formed by GSC after co-culture with endothelial cells ($P < 0.05$), especially under a low cell concentration of 5 cells per well (24.3% vs 11.3%) and 10 cells per well (39.4% vs 25.8%). (2) Hedgehog pathway related genes including Gli1, Oligo2 and Bmi1 were up-regulated in the co-cultured GSC spheres ($P < 0.05$). (3) Larger xenografts were generated by GSC spheres mixed with endothelial cells, which also resulted in tumor rupture and model death ($P < 0.05$). (4) The phenomenon above nearly disappeared when Hedgehog pathway had been inhibited by Smo gene knockdown. **Conclusion** Endothelial cells promote self-renewal of GSC through activating Hedgehog pathway.

[Key words] glioma stem cell; endothelial cell; signaling transduction; Hedgehog pathway

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30870965). Corresponding author: Guo Deyu, Tel: 86-23-68765452, E-mail: gdy007@tmmu.edu.cn

肿瘤干细胞起源学说认为肿瘤干细胞是肿瘤发生、演进、治疗抵抗和复发的主要根源, 其所处的微环境对肿瘤干细胞具有重要的调节作用^[1-2]。肿瘤干细

胞与其微环境的相互作用, 是目前肿瘤研究的重要前沿领域。脑胶质瘤是最常见的颅内恶性肿瘤, 其起源于肿瘤干细胞的理论已得到证实^[3-4], 胶质瘤干细胞 (glioma stem cell, GSC) 是胶质瘤发生、演进、治疗研究的热点。目前研究发现 GSC 微环境包括血管旁微环境、缺氧微环境和侵袭前缘微环境等, 其中血管旁微环境与 GSC 的自我更新密切相关^[5-6], 但其具体机制不

[基金项目] 国家自然科学基金(30870965)

[通信作者] 郭德玉, 电话: (023)68765452, E-mail: gdy007@tmmu.edu.cn

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130305.1419.006.html> (2013-03-05)

清。本研究从 Hedgehog 信号通路的角
度来探讨内皮细胞促进 GSC 自我更新
的可能机制,希望为胶质瘤的治疗提供
新的线索。

1 材料与方 法

1.1 细胞培 养

小鼠来源胶质瘤细胞系 GL261 和小
鼠来源脑微血管内皮细胞系 b. END3
购自中国科学院上海细胞研究所,均
常规培养在含 10% 小牛血清的 DMEM
培养基中,每 2 天胰酶消化传代。

GSC 参考文献[4-5,7]的方法由悬
浮成球培养法获得。具体为胶质瘤细
胞消化后接种在含有 10 ng/mL EGF、
10 ng/mL bFGF 和 2 mg/mL B27 的无
血清 DMEM/F12 培养基的神经干细
胞培养基中,培养 5 d 后收集悬浮生
长的干细胞球,消化为单细胞悬液,
继续接种于干细胞培养基中。

Transwell 共培养实验时,将 GSC
用 Accutase (millipore, USA) 消化
并制备单细胞悬液,接种于 Transwell
(BD falcon, 0.4 μm 孔径, USA) 下
室,每孔 1.5 × 10⁵ 细胞。将 b. END3
细胞采用常规胰酶消化法制备单细
胞悬液,以含血清的培养基接种于
Transwell 小室上室,每孔 1.5 × 10⁵
细胞。分别培养 24 h 后换液,均换
为神经干细胞培养基,上、下室各 2
mL,并将小室移入下室共培养。

1.2 极限稀 释法

将 GSC 与内皮细胞共培养 48 h
后,利用 Accutase 将干细胞球制备
成单细胞悬液,并接种于 96 板。浓
度从每孔 160 个细胞倍比稀释至每
孔 5 个细胞,每个浓度重复 10 个孔。
培养 3 d 后计数有细胞球形成的孔
数。

1.3 mRNA 反 转录和 Real-time PCR

利用 RNAiso (TaKaRa) 提取 GL261
干细胞球总 RNA,应用反转录试剂盒
和实时定量 PCR 试剂盒 (Fermantas,
Japan) 进行 mRNA 表达水平的检测,
具体实验根据试剂盒操作手册进行。
小鼠 GAPDH、Oligo2、Bmi1、Gli1、
Hes1、β-catenin 引物由 Invitrogen
(USA) 设计合成。各基因引物序列
见表 1。

表 1 各基因引物序列

基因	引物序列(5'→3')	片段长度
GAPDH	正义链:CCTGCACCACATGCTTA	85 bp
	反义链:TCATGAGCCCTCCACAATG	
Gli1	正义链:GAGAATGGGCATCGTCGTCA	168 bp
	反义链:CGGTAICTCGGTTCGGCT	
Hes1	正义链:TCAACACGACACCGACAAC	155 bp
	反义链:ATGCCGGAGCTATCTTCTT	
β-catenin	正义链:GCTTCTATGAAGACCCGAGTTC	311 bp
	反义链:CACTGGGCTAGGTGTCAGGA	
Bmi1	正义链:AATGTGTCTCCTGTGTGG	150 bp
	反义链:ACTGGTCTGCTTTTCTGA	
Oligo2	正义链:GGCGGTGCCTCAAGTCAT	171 bp
	反义链:CATGGCGATGTTGAGTCC	

1.4 Western blot 实 验

收集共培养后的 GSC 细胞,加入 100
μL 细胞裂解液冰上裂解 30 min,然
后 12 000 r/min 离心 5 min。取上清
分装于 0.5 mL 离心管中并置于 -20
℃ 保存待用。配制电泳凝胶 (10%
分离胶和 4% 浓缩胶)。样品加热至
100 ℃,5 min 后冷却,900 × g 离
心 1 min 后上样,电泳后 PVDF 膜
转膜。用脱脂

牛奶封闭,一抗 4 ℃ 孵育 16 h, PBS
洗 15 min × 4 次后二抗室温孵育
2 h, PBS 洗 15 min × 4 次后化学发
光试剂检测。所用抗体为 Gli1 (大
鼠抗小鼠, R&D System, USA),
Oligo2 (兔抗小鼠, BD Falcon, USA),
Bmi1 (小鼠抗小鼠, Abcam, USA),
GAPDH (兔抗小鼠, 杭州贤至)。

1.5 移植瘤实 验

按动物实验伦理准则进行。12 只 4
周龄 C57 雌鼠购自第三军医大学实
验动物中心,体质量 13 ~ 15 g。将
GL261 细胞球和 b. END3 细胞分别
制成单细胞悬液并计数。分别注射
3 × 10⁵ 干细胞球细胞至小鼠下腹股
沟,与或不与 3 × 10⁴ b. END3 细胞
共注射。每组注射 5 只小鼠。每 3
天观察移植瘤体积并记录。测量体
积的公式为肿瘤体积 (Tv) = 长 (L) ×
宽的平方 (W²)/2^[8]。在第 3 周末
处死动物并取出移植瘤。

1.6 基因敲 低实验

小鼠 Smo 基因的 mRNA 序列由 NCBI
数据库查得,由广州锐博生物设计
靶点为 Smo 的 shRNA 序列并合成、
包装慢病毒载体。将 GSC 培养于 6
孔板,采用无抗生素培养基培养。培
养 24 h 后将慢病毒悬液按厂商推荐
的稀释倍数稀释后加入培养基中进
行细胞转染。细胞扩增后应用流式
细胞仪纯化细胞。

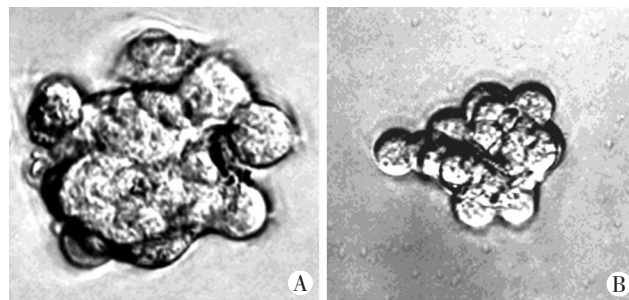
1.7 统计学 分析

实验均重复至少 3 次,应用 SPSS
16.0 统计软件处理,数据以 $\bar{x} \pm s$
表示。2 组间比较采用两独立样本
t 检验方法,移植瘤体积比较采用
两配对样本 t 检验方法。

2 结果

2.1 内皮细胞可 增强 GSC 的体外成球能力

我们利用极限稀释实验检测 GSC
体外成球能力,结果发现:与对照
组相比,内皮细胞与 GSC 共培养 48
h 后,干细胞球形成明显增多,尤其
在 5 个/孔和 10 个/孔的极低浓度
下,共培养组的 GSC 成球也明显多
于对照组 [(24.3 ± 5.2)% vs (11.3
± 3.4)% , P < 0.05; (39.4 ± 5.6)%
vs (25.8 ± 3.3)% , P < 0.05]。我
们利用 2 次成球实验检测 GSC 体
外成球能力变化,发现与对照组相
比,与内皮细胞共培养时 GSC 形成
干细胞球体积更大 (图 1)。



A: 共培养组; B: 对照组

图 1 内皮细胞对 GSC 体外成球能力的影响

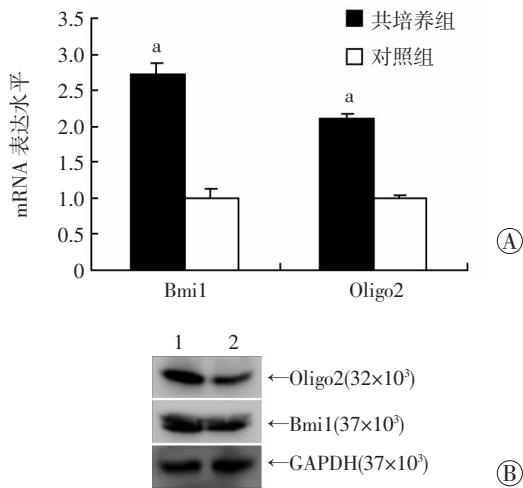
2.2 内皮细胞可 增强 GSC 的体内成瘤能力

我们采用小鼠皮下移植瘤实验检测
内皮细胞对 GSC 体内成瘤能力的影
响。实验发现,与内皮细胞共同注射
的 GSC 所形成的移植瘤体积显著大
于对照组 [(0.87 ± 0.25) cm³ vs
(0.23 ± 0.05) cm³ , P < 0.01], 而且
出现了瘤体破溃、小鼠死亡,

对照组在观察时间内没有发生此类现象。

2.3 内皮细胞可上调 GSC 干性基因表达

我们从转录水平和翻译水平分别检测了 GSC 的干性基因 Oligo2、Bmi1 表达情况。实验结果发现,与对照组相比,与内皮细胞共培养后 GSC 的上述基因在 mRNA 水平有显著上调(图 2A),Western blot 检测到 Bmi1、Oligo2 的蛋白表达水平也明显增强(图 2B)。

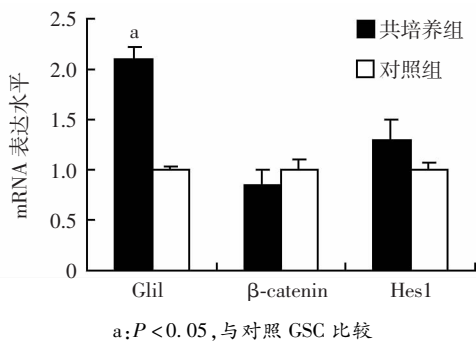


A: RT-PCR 检测 GSC 干性基因 mRNA 表达; a: $P < 0.05$, 与对照 GSC 比较; B: Western blot 检测共培养 GSC 干性基因蛋白表达; 1: 共培养; 2: 对照

图2 内皮细胞对 GSC 的干性基因表达的影响

2.4 内皮细胞上调 GSC 的 Hedgehog 信号通路相关基因的表达

为了探索内皮细胞增强 GSC 自我更新能力的分子机制,我们检测了 GSC 的调节干细胞增殖、自我更新、分化的 3 条重要信号通路 Hedgehog、Notch、 β -catenin 关键分子表达的变化。实验结果发现,与内皮细胞共培养后 GSC 3 条信号通路中以 Hedgehog 信号通路的关键效应分子 Gli1 的变化最为明显,即共培养过后 GSC 中 Gli1 表达明显上调,而 Notch 和 Wnt 信号通路的关键分子 Hes1 与 β -catenin 无显著变化(图 3),提示共培养后 GSC 的 Hedgehog 信号通路的异常激活。



a: $P < 0.05$, 与对照 GSC 比较
图3 RT-PCR 检测内皮细胞对 GSC 的 Gli1、 β -catenin、Hes1 基因 mRNA 的表达

2.5 敲低 Smo 基因后可抑制 GSC 的 Hedgehog 信号通路

为了证实内皮细胞增强 GSC 自我更新的作用与 Hedgehog

信号通路相关,我们利用靶点为 Smo 的 shRNA 稳定敲低 GSC 中 Smo 基因的表达,检测敲低 Smo 基因后 GSC 的 Gli1 基因表达水平。结果表明,敲低 Smo 后 Hedgehog 通路的活性水平得到明显抑制,同时,与内皮细胞共培养后 GSC 的 Hedgehog 信号通路的活性也没有明显上调(图 4)。

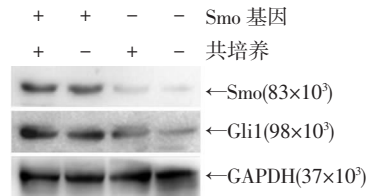


图4 Western blot 检测敲低 Smo 基因前后共培养 GSC 与对照 GSC 的 Gli1、Smo 蛋白表达

2.6 抑制 Hedgehog 信号通路可降低 GSC 的体外成球能力

抑制 Hedgehog 信号通路后 GSC 其体外成球能力明显下降,所成干细胞球体积缩小。将敲低 Smo 的 GSC 与内皮细胞共培养,发现内皮细胞不能增强 GSC 的体外成球能力(图 5)。

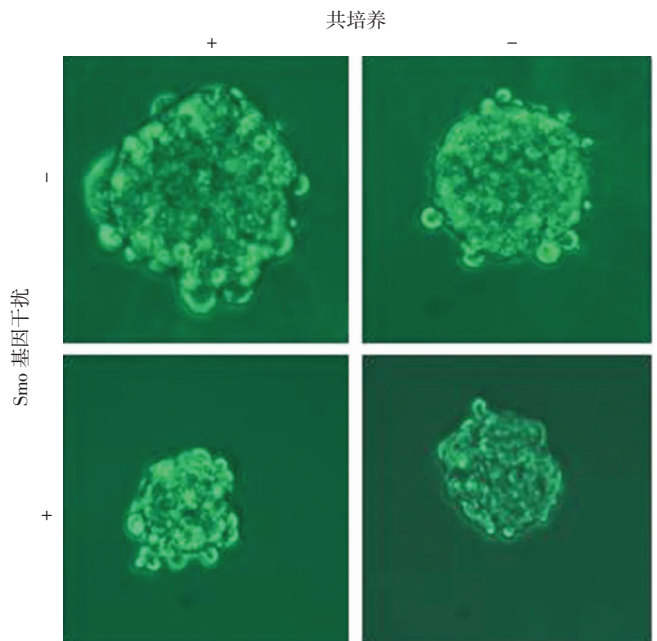


图5 敲低 Smo 基因以及共培养因素对 GSC 体外成球能力的影响 (LM $\times 200$)

3 讨论

胶质母细胞瘤 (glioblastoma, GBM) 是一种高度恶性的颅内肿瘤,目前临床上主要采用手术切除、放射治疗、化学药物治疗等多种疗法结合使用的综合治疗方法,但是由于 GBM 的高度侵袭性生长,手术常常不能将肿瘤完全切除,再加上 GBM 不同程度的放化疗耐受,因而造成非常高的肿瘤复发率^[9],其生存率在近几十年的医疗发展中并没有令人满意的提高。寻找和发现新的胶质瘤治疗方法与策略仍然任重道远。

肿瘤干细胞 (cancer stem cells, CSCs) 在绝大多数

恶性肿瘤(包括胶质瘤)中都被证明存在,数量很少却是肿瘤起始和增殖的关键^[10]。CSCs最突出的特征是它和正常干细胞有相似的自我更新能力和多向分化能力^[5]。CSCs如何获得自我更新能力,以及如何抑制以致完全去除CSCs,成为肿瘤研究的热点^[11]。

肿瘤干细胞微环境(CSC niche)是新近提出的概念,提供了一种维持和调控其干性、增强侵袭和抗凋亡的假说^[12]。已有研究^[13]表明,GSC多位于微血管旁,与微血管密切相关。血管周微环境是GSC微环境的一种,其中血管内皮细胞占主要成分,我们前期实验及文献^[13]提示内皮细胞可能与GSC的自我更新有关。本实验中,我们利用极限稀释实验检测GSC的成球能力,发现内皮细胞与GSC共培养48h后,GSC所成干细胞球数量明显增多,体积更大。GSC与内皮细胞混合注射入小鼠皮下,所形成的移植瘤显著大于对照组,而且出现了瘤体破溃、小鼠死亡,说明移植瘤的增殖和侵袭能力增强。在此基础上我们检测到GSC干性基因Bmi1、Oligo2的表达在共培养后也明显增强。以上实验结果证明,内皮细胞在体内和体外都可以促进GSC的自我更新。

关于内皮细胞促进GSC自我更新的分子机制,研究^[14-15]报道,内皮细胞分泌的一氧化氮及Notch信号通路配体可以活化血管旁的胶质瘤细胞内的Notch通路,从而增强其增殖和自我更新能力。而血管周微环境中的缺氧诱导因子(HIF)-2 α 蛋白可以激活胶质瘤细胞中PI3K-AKT通路,从而诱导出肿瘤干细胞样表型^[16-17]。很多血管源性因子仍被列为可能参与肿瘤干细胞微环境调控的因子,诸如骨成型蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)家族分子,血小板源性生长因子(platelet derived growth factor, PDGF),转化生长因子(TGF)- β 还有色素上皮衍生因子(pigment epithelium-derived factor, PEDF)等^[12]。我们的实验检测了Hedgehog、Notch、 β -catenin通路中关键分子表达的变化,实验结果发现,与内皮细胞共培养后GSC 3条信号通路中以Hedgehog信号通路的关键效应分子Gli1的变化最为明显,即共培养过后GSC中Gli1表达明显上调,而Notch和 β -catenin信号通路的关键分子Hes1与 β -catenin无显著变化。进一步实验证明敲低GSC的Smo基因后,GSC的Hedgehog信号通路受到明显抑制,与内皮细胞共培养后也不能增加GSC的Gli1基因表达,同时GSC的体外成球能力明显降低,所形成的细胞球数量少、体积也明显小于对照组,且内皮细胞促进GSC自我更新能力的作用也基本消失。以上实验结果证明GSC内Hedgehog通路的活化是内皮细胞促进GSC自我更新的重要通路。至于内皮细胞激活GSC内Hedgehog通路的机制有待进一步深入研究。

根据上述结果,我们可以从GSC血管微环境中内皮细胞对其自我更新和增殖能力调控的Hedgehog通路入手,为设计和探索临床治疗胶质母细胞瘤新的思路和方法提供线索和依据。

参考文献:

- [1] O'Brien C A, Kreso A, Jamieson C H. Cancer stem cells and self-renewal[J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(12): 3113-3120.
- [2] Borovski T, De-Sousa-E-Melo F, Vermeulen L, et al. Cancer stem cell niche: the place to be[J]. *Cancer Res*, 2011, 71(3): 634-639.
- [3] Singh S K, Hawkins C, Clarke I D, et al. Identification of human brain tumour initiating cells[J]. *Nature*, 2004, 432(7015): 396-401.
- [4] 黄强,董军,朱玉德,等. 人脑胶质瘤组织中分离与培养肿瘤干细胞[J]. *中华肿瘤杂志*, 2006, 28(5): 331-333.
- [5] Barami K. Relationship of neural stem cells with their vascular niche: implications in the malignant progression of gliomas[J]. *J Clin Neurosci*, 2008, 15(11): 1193-1197.
- [6] 闫广宁,郭德玉. 胶质瘤干细胞血管旁微环境的研究进展[J]. *中华医学杂志*, 2011, 91(44): 3161-3163.
- [7] 周坤,杨辉,周伟,等. 药物阻断mGlu3受体通路对脑胶质瘤干细胞增殖与分化的影响[J]. *第三军医大学学报*, 2012, 34(17): 1701-1706.
- [8] Naito S, von-Eschenbach A C, Giavazzi R, et al. Growth and metastasis of tumor cells isolated from a human renal cell carcinoma implanted into different organs of nude mice[J]. *Cancer Res*, 1986, 46(8): 4109-4015.
- [9] Li J, Di C, Mattox A K, et al. The future role of personalized medicine in the treatment of glioblastoma multiforme[J]. *Pharmgenomics Pers Med*, 2010, 3: 111-127.
- [10] Li Y, Lateral J. Cancer stem cells: distinct entities or dynamically regulated phenotypes? [J]. *Cancer Res*, 2012, 72(3): 576-580.
- [11] Yu X, Lin Y, Yan X, et al. CD133, Stem Cells, and Cancer Stem Cells: Myth or Reality? [J]. *Curr Colorectal Cancer Rep*, 2011, 7(4): 253-259.
- [12] Butler J M, Kobayashi H, Rafii S. Instructive role of the vascular niche in promoting tumour growth and tissue repair by angiocrine factors[J]. *Nat Rev Cancer*, 2010, 10(2): 138-146.
- [13] Calabrese C, Poppleton H, Kocak M, et al. A perivascular niche for brain tumor stem cells[J]. *Cancer Cell*, 2007, 11(1): 69-82.
- [14] Seoane J. NO Signals from the Cancer Stem Cell Niche[J]. *Cell Stem Cell*, 2010, 6(2): 97-98.
- [15] Zhu T S, Costello M A, Talsma C E, et al. Endothelial cells create a stem cell niche in glioblastoma by providing NOTCH ligands that nurture self-renewal of cancer stem-like cells[J]. *Cancer Res*, 2011, 71(18): 6061-6072.
- [16] Hambardzumyan D, Becher O J, Rosenblum M K, et al. PI3K pathway regulates survival of cancer stem cells residing in the perivascular niche following radiation in medulloblastoma *in vivo*[J]. *Genes Dev*, 2008, 22(4): 436-448.
- [17] Seidel S, Garvalov B K, Wirta V, et al. A hypoxic niche regulates glioblastoma stem cells through hypoxia inducible factor 2 alpha[J]. *Brain*, 2010, 133(Pt 4): 983-995.

(收稿:2012-12-28;修回:2013-01-31)

(编辑 王红)