

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2012.02.004

· 基础研究 ·

## 人脑胶质瘤组织培养的干细胞样细胞具有体外高侵袭能力

仇波,杜江,张东勇,陶钧,王勇,王运杰(中国医科大学附属第一医院 神经外科,辽宁 沈阳 110001)

**[摘要]** **目的:**分离培养人脑胶质瘤干细胞样细胞(glioma stem-like cell, GSLC),研究其体外侵袭力。**方法:**选取中国医科大学第一医院神经外科2008年10月至2009年1月间住院患者手术切除的脑胶质瘤组织8例,以无血清成球培养法培养胶质瘤细胞球;免疫细胞化学实验检测其CD133的表达;荧光免疫显微镜观察其分化后胶质细胞标志物GFAP和神经元标志物TU-20的表达;matrigel侵袭实验检测其侵袭力,并与原代脑胶质瘤细胞进行比较。**结果:**成功分离培养出人脑胶质瘤细胞球细胞,该细胞表达干细胞标志物CD133;能自我更新与增殖;诱导分化后,GFAP和TU-20均为阳性表达,提示其为GSLC。胶质瘤细胞球细胞侵袭细胞数显著多于原代胶质瘤细胞[(261.23±87.20)vs(116.08±63.88)个, $P<0.01$ ];此外,胶质瘤细胞球细胞穿过matrigel胶后可再次聚集成球状生长。**结论:**成功分离培养人脑胶质瘤组织中的GSLC,其体外具有较高的侵袭力,可能参与脑胶质瘤的侵袭和转移。

**[关键词]** 胶质瘤;肿瘤干细胞;胶质瘤干细胞样细胞;侵袭力;转移

**[中图分类号]** R739.4; Q279

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2012)02-0128-05

## Stem-like cells cultured from human brain glioma tissues show high invasiveness *in vitro*

QIU Bo, DU Jiang, ZHANG Dong-yong, TAO Jun, WANG Yong, WANG Yun-jie (Department of Neurosurgery, First Hospital Affiliated to China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning, China)

**[Abstract]** **Objective:** To isolate and culture human brain glioma stem-like cells (GSLCs), and to determine the invasiveness of GSLC *in vitro*. **Methods:** Glioma cell spheres were serum free cultured from 8 surgical specimens of glioma inpatients from October 2008 to January 2009 in the Department of Neurosurgery, First Hospital of China Medical University. CD133 expression was identified by immunocytochemistry assay, and the expressions of GFAP and TU-20 in differentiated glioma cell spheres were detected under an immunofluorescence microscope. With matrigel invasion assay, invasiveness of glioma sphere cells was determined and compared with that of primary glioma cells. **Results:** Glioma cell spheres were cultured successfully. These cells were proved to express stem cell marker CD133, capable of renewal and proliferation, and can differentiate to glia and neurons with positive expressions of GFAP and TU-20, indicating the characteristics of GSLC. The invasiveness of glioma spheres cells *in vitro* was higher than that of primary glioma cells (261.23±87.20 vs 116.08±63.88,  $P<0.01$ ). Moreover, glioma spheres cells preferred to aggregate and reform new spheres after travelling through the matrigel. **Conclusion:** GSLCs are successfully cultured from human glioma tissues, which show higher invasiveness *in vitro*. GSLC may participate in glioma invasion and metastasis.

**[Key words]** glioma; cancer stem cell; glioma stem-like cell; invasion; metastasis

[Chin J Cancer Biother, 2012, 19(2): 128-132]

作为最常见和占首位死因的颅内肿瘤,脑胶质瘤的预后一直不容乐观<sup>[1-2]</sup>,尤其恶性脑胶质瘤(如胶质成细胞瘤和间变性胶质瘤等)。恶性脑胶质瘤具有侵袭性,表现为广泛浸润、弥漫性生长以及放疗耐受性等,导致其顽固难治,且易复发<sup>[3]</sup>。几十年来,脑胶质瘤患者的中位生存期仅仅提高了9~10周<sup>[2,4]</sup>。因此,深入了解脑胶质瘤的病理学机制

**[基金项目]** 国家自然科学基金(No. 81000565)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81000565)

**[作者简介]** 仇波(1975-),男,黑龙江省东宁县人,博士,主治医师,讲师,主要从事脑胶质瘤及脑胶质瘤干细胞方面的研究。E-mail: fhxue2002@yahoo.com

**[通信作者]** 王运杰(WANG Yun-jie, correspondence author), E-mail: wyj024@vip.sina.com

**[网络出版]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20120328.1608.007.html>

并探索新的治疗方法显得尤为迫切。近年来,肿瘤干细胞理论的提出和深入研究为治疗肿瘤提供了新的思路。脑胶质瘤干细胞( brain glioma stem cell, BGSC )也已从多种类型胶质瘤中被分离鉴定出来,并进行了深入研究<sup>[5-13]</sup>。CD133 作为一种膜表达蛋白,已经公认为首选的 BGSC 标志物<sup>[14-20]</sup>。根据 BGSC 理论,BGSC 是脑胶质瘤的“种子”细胞,决定了胶质瘤的发生、发展、侵袭和复发<sup>[16, 21-22]</sup>。向周围脑组织弥漫性侵袭生长是脑胶质瘤的一个显著生物学特征,从理论上推断也应该是由 BGSC 决定的,但目前并无相关报道证实这种假设。因此,本课题通过从人肿瘤标本中分离培养并鉴定出脑胶质瘤干细胞样细胞( glioma stem-like cell, GSLC ),并检测其侵袭力,从而了解 GSLC 在脑胶质瘤侵袭中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 标本收集

脑胶质瘤标本均来自中国医科大学第一医院神经外科 2008 年 10 月至 2009 年 1 月间住院患者手术切除的肿瘤组织,离体 30 min 内进行处理。所有肿瘤组织均按照 WHO 2000 年制定的分级标准进行病理分级。共有 8 例标本培养成功,其中胶质成细胞瘤 2 例(Ⅳ级)、复发间变性少突胶质细胞瘤 1 例(Ⅲ级)、间变性星形细胞瘤 5 例(Ⅲ级)。

### 1.2 主要试剂

优级胎牛血清购自美国 Bioscience 公司,DMEM/F12 培养基购自美国 Gibco 公司,重组人碱性成纤维细胞生长因子( recombinant human basic fibroblast growth factor, rh-bFGF )和重组人表皮生长因子( recombinant human epidermal growth factor, rh-EGF )购自美国 Invitrogen 公司,B-27 添加剂(无血清和维生素 A)购自美国 Gibco-Invitrogen 公司。小鼠抗人 CD133 单克隆抗体购自美国 ABCam 公司,兔抗人胶质纤维酸性蛋白( glial fibrillary acidic protein, GFAP ) (胶质细胞标志物)单克隆抗体购自美国 Bioworld 公司,小鼠抗人 TU-20(神经元标志物)单克隆抗体购自美国 Chemicon 公司,Cy3 标记的羊抗兔、羊抗小鼠和 FITC 标记羊抗小鼠二抗及核染色剂 DAPI 均购自美国 Sigma 公司。防脱载玻片购自武汉博士德公司,Transwell 小室(8 μm 孔径)购自美国 Corning 公司,Matrigel 基质胶购自美国 BD 公司。其他常用试剂均为国产分析纯。

### 1.3 胶质瘤细胞球的培养

脑胶质瘤标本的处理参照文献[ 15, 17, 20, 23 ]方法并略作修改。肿瘤离体 30 min 内即进行清

洗、切碎、酶解,过 200 目滤网成单细胞,离心后重悬于含 15% 胎牛血清的 DMEM/F-12 培养基中,细胞密度为  $2 \times 10^5$  个/ml。细胞贴壁长成单层后,转移至无血清 DMEM/F-12 干细胞培养基(含 1:50 的 B-27 添加剂、20 ng/ml rh-bFGF、20 ng/ml rh-EGF)。干细胞培养基每周换液 2 次,并每周更换新鲜的 rh-bFGF 与 rh-EGF,培养环境为标准组织培养箱(5% CO<sub>2</sub>、相对湿度 100%、37 °C)。待肿瘤细胞球出现后,机械吹打为单细胞,按照 1:2 或 1:3 比例传代培养,所有细胞均传至 4 代以上。部分肿瘤细胞球制成单细胞悬液后进行连续梯度稀释,种植于 96 孔板,最终密度为每孔 1~2 个单细胞,定期更换新鲜干细胞培养基,1~2 周后进行观察。每个样本另外留取部分细胞,用含血清培养基原代培养为贴壁细胞,传代至 4 代以上,以备后续实验使用。

### 1.4 免疫细胞化学实验检测胶质瘤细胞球细胞 CD133 的表达

收集 4 代以上的胶质瘤细胞球细胞置于防脱载玻片上,加入无血清干细胞培养基培养 4 h,待贴壁牢固后,以 4% 多聚甲醛固定。4 °C 下加入鼠抗 CD133 单克隆抗体(1:200)孵育过夜,再加入 Cy3 标记羊抗小鼠 IgG 单克隆抗体(1:50),室温下孵育 2 h,DAPI 复染 5 min,镜下观察。所有样本均设置阴性对照,用非特异性 IgG 代替一抗,其他步骤相同。

### 1.5 免疫荧光检测胶质瘤细胞球细胞分化后 GFAP 和 TU-20 的表达

为鉴定胶质瘤细胞球的分化能力,收集胶质瘤细胞球并转移到预涂有多聚赖氨酸的防脱载玻片上,以含 15% 胎牛血清的 DMEM/F-12 进行培养以诱导分化,每 2 d 换液 1 次,7 d 后将玻片漂洗、固定,加入小鼠抗 TU-20 单克隆抗体(1:200)、兔抗 GFAP 单抗(1:200),4 °C 孵育过夜;再用 Cy3 结合羊抗兔和 FITC 标记羊抗小鼠二抗(1:50)37 °C 孵育 30 min;最后 DAPI 染核 5 min,免疫荧光显微镜下观察。所有样本均设置阴性对照,用非特异性 IgG 代替一抗,其他步骤相同。

### 1.6 Matrigel 法检测胶质瘤细胞球细胞的侵袭力

收集胶质瘤细胞球细胞以及相应原代胶质瘤细胞,进行 matrigel 侵袭实验。50 μl 的 matrigel 稀释液包被 Transwell 小室底部膜的上室面,风干后,将胶质瘤球细胞及分化的原代培养胶质瘤细胞均制成单细胞悬液,调整细胞密度至  $1 \times 10^5$  /ml,分别加入上室内,体积为 200 μl。上室培养基为无血清 DMEM/F-12,下室为含 15% 胎牛血清的 DMEM/F-12,上下室内均无细胞因子及添加剂。培养 40 h

后,吸除残余 Matrigel 胶,棉签拭净上室面的底部膜,将下室面贴黏细胞固定后予以 Giemsa 染色。倒置相差显微镜下观察细胞穿过底部膜的情况,随机选取 1 个低倍视野、5~10 个高倍视野进行拍照。计数穿越至膜下的胶质瘤细胞球细胞和原代的分化胶质瘤细胞数。每例标本均重复检测 5 次。

### 1.7 统计学处理

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 Sigmaplot 11.1 (Systat Software) 统计软件,单因素方差分析和双尾法配对  $t$  检验。 $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 胶质瘤细胞球的培养及其分化

最初制成单细胞悬液的胶质瘤细胞在含血清培养基中进行培养,1~2 d 即可长成单层贴壁细胞;待培养瓶壁覆盖率达 80% 以上时,更换为无血清干细胞培养基,2~3 d 内可以观察到单细胞分裂,5~7 d 即有大量细胞球形成,呈圆形或卵圆形,部分细胞球形态不规则,均折光良好,每个细胞球含 4~8 个细胞。2 周内大部分胶质瘤细胞球体积可增大到原来的 5~10 倍(图 1A)。

为检测胶质瘤细胞球细胞的自我更新能力,将其吹打成单细胞后连续稀释种植于 96 孔板,每孔 1~2 个细胞,动态观察可发现 2 d 左右即有细胞分裂出现,1 周左右即能形成新的次级胶质瘤细胞球,证实来自肿瘤细胞球的单个细胞具有自我更新能力,可以形成新的细胞球。

胶质瘤细胞球增大到 100~200 个细胞/球时,机械吹打成单细胞继续传代培养。随着培养时间延长,胶质瘤细胞球增殖速度加快,传代周期逐渐缩短,3~4 d 即可传代 1 次。连续传代后细胞仍保持良好的增殖能力,来自每个样本的细胞球均传至 4 代以上。按照原代培养方式培养的胶质瘤细胞均呈贴壁方式生长,连续传代至 4 代以上。

胶质瘤细胞球转移到防脱载玻片上,以含血清培养基进行诱导分化后,2~3 d 内可观察到细胞分裂速度减慢,细胞变扁平,放射状贴壁生长,细胞不断迁移,形成单层细胞,呈现出多种细胞形态以及明显异型性(图 1B)。

### 2.2 胶质瘤细胞球细胞表达 CD133

将胶质瘤细胞球移至防脱载玻片上固定后进行 CD133 检测,结果(图 2)显示,胶质瘤细胞球细胞膜性表达 CD133,在显微镜下呈红色(Cy3 染色),提示其可表达 BGSC 的标志物,具有 BGSC 的表型特点。

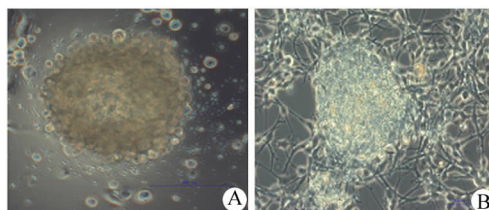


图 1 胶质瘤细胞球的培养及分化(×200)

Fig.1 Culture and induced differentiation of glioma cell spheres(×200)

A: Glioma cell spheres in stem cell media;

B: Induced differentiation of glioma cell spheres in serum-containing media

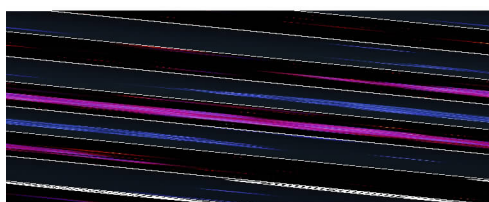


图 2 胶质瘤细胞球细胞表达 CD133(×200)

Fig.2 Glioma cell spheres expressed CD133(×200)

A: Glioma cell spheres stained with CD133 antibody;

B: Glioma cell spheres stained with isotype IgG

### 2.3 胶质瘤细胞球细胞可分化为胶质细胞和神经元细胞

胶质瘤细胞球转移诱导分化 7 d 后,予以固定并进行免疫细胞化学检测。结果(图 3)显示,诱导后的胶质瘤细胞球细胞可表达胶质细胞标志物 GFAP(Cy3 染色,呈红色)和神经元标志物 TU-20(FITC 染色,呈绿色),说明其可以分化为胶质细胞和神经元,具有多向分化能力。

### 2.4 胶质瘤细胞球细胞具有更强的侵袭性

侵袭性生长是脑胶质瘤恶性程度的一个重要标志<sup>[24]</sup>,因此 matrigel 实验对胶质瘤细胞球细胞侵袭力进行了检测。结果(图 4)显示,胶质瘤细胞球细胞体外侵袭性明显高于原代胶质瘤细胞,迁移至下室面的胶质瘤细胞球细胞较相应的原代胶质瘤细胞在数量上显著增高[(261.23 ± 87.20) vs (116.08 ± 63.88) 个,  $P < 0.01$ , 表 1]。

另外,胶质瘤细胞球细胞到达膜的下室面之后,依然保持了部分干细胞特性,倾向于聚集成团状并重新形成细胞球样外观,细胞突起很短甚至无细胞突起。相反,分化的胶质瘤细胞则散布在膜的下室面,带有明显的长的细胞突起。

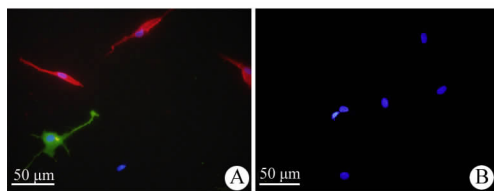


图3 分化后胶质瘤细胞球细胞表达 GFAP 和 Tu-20

Fig. 3 Glioma sphere cells differentiated to express GFAP ( red ) and Tu-20 ( green )

A: Differentiated glioma sphere cells stained with GFAP ( red ) and Tu-20 ( green ); B: Differentiated glioma sphere cells stained with isotype IgG

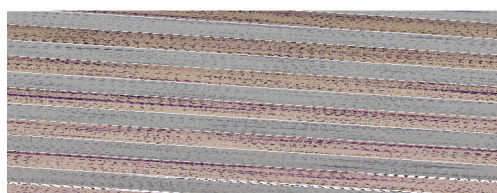


图4 胶质瘤细胞球细胞较原代胶质瘤细胞具有更强的侵袭性( ×200 )

Fig. 4 Glioma sphere cells showed higher invasiveness than primary glioma cells( ×200 )

A: Glioma sphere cells; B: Primary glioma cells

表1 胶质瘤细胞球细胞与原代胶质瘤细胞侵袭细胞数的比较(  $\bar{x} \pm s$  )

Tab. 1 Comparison of invasive cell numbers between glioma sphere cells and primary glioma cells(  $\bar{x} \pm s$  )

Case	Glioma sphere cells	Primary glioma cells
BG1	241.0 ± 96.09	102.2 ± 62.34
BG2	171.0 ± 97.41	54.8 ± 32.69
BG3	156.4 ± 52.19	70.2 ± 57.89
BG4	255.8 ± 93.45	69.0 ± 34.15
BG5	403.6 ± 130.71	221.6 ± 68.27
BG6	373.2 ± 135.16	206.6 ± 44.64
BG7	232.6 ± 94.41	85.2 ± 41.30
BG8	256.2 ± 35.01	119.0 ± 58.55
General mean	261.2 ± 87.20**	116.1 ± 63.88

\*\*  $P < 0.01$  vs primary glioma cells

### 3 讨论

脑胶质瘤作为一种高侵袭性的恶性肿瘤,约占原发性脑肿瘤的一半。尤其是高级别胶质瘤,如胶

质成细胞瘤和间变性星形细胞瘤等,是脑胶质瘤中发病率最高也是最致命的,即使予以包括手术、放疗在内的联合治疗,其预后仍然无明显改观<sup>[2]</sup>。除了 WHO 分型 I 级的毛细胞性星形细胞瘤之外,其他类型脑胶质瘤均有较高复发率。脑胶质瘤的复发主要是由于其高侵袭性,使肿瘤细胞不断迁移到周围的正常脑组织中,呈现弥漫浸润性生长的生物学行为,从而导致临床治疗上的困境<sup>[3,25]</sup>;因此,近 30 年来即使对脑胶质瘤的认识大大提高,患者的生存率却无明显改观<sup>[22]</sup>。所以,有必要寻找新的治疗靶点、探索新的治疗方式并深入研究脑胶质瘤的病理学机制,以期能治愈脑胶质瘤。

近年来, BGSC 理论为脑胶质瘤的研究指明了新的方向,同时也为脑胶质瘤提供了一个确切的治疗靶点。基于 BGSC 假说,可以推断脑胶质瘤的侵袭也应该是由 BGSC 驱动的,从而导致肿瘤的扩散和进展。因此,本研究通过一系列实验从人脑胶质瘤标本中分离培养出 GSLC,并对 GSLC 和相应分化的脑胶质瘤细胞的侵袭力进行了检测和比较。通过生物学特性以及免疫细胞化学检测,显示胶质瘤细胞球细胞具有增殖、多向分化和自我更新能力,并表达干细胞标志物 CD133,提示其为 GSLC,具有 BGSC 的生物学特性和表性特征,此结果与文献报道相符<sup>[14-15,17]</sup>。

Matrigel 侵袭实验证实,胶质瘤细胞球细胞的侵袭性高于普通的原代胶质瘤细胞即分化胶质瘤细胞,这个结果符合 BGSC 理论,并可解释为何脑胶质瘤以浸润性生长的方式侵袭周围组织,并导致肿瘤进展。因为根据 BGSC 理论,脑胶质瘤细胞中只有 BGSC 具有自我更新和无限增殖能力,能够导致肿瘤复发或在远隔部位形成新的肿瘤;脑胶质瘤的侵袭和转移实质上是由于 BGSC 的播散所致,而非分化的脑胶质瘤细胞,因为分化细胞只能形成微小转移灶,但不能进一步增殖形成新的肿瘤<sup>[22,26-27]</sup>。BGSC 不但具有高活力和高侵袭性,而且可以逃避免疫反应和多种抗肿瘤治疗,然后继续进展、播散、增殖并形成新的胶质瘤病灶。最近 Molina 等<sup>[28]</sup>发现,在侵袭的胶质瘤细胞中有 Akt 信号通道激活,并且这些细胞表现出干细胞的特点,例如表达干细胞标志物、能形成细胞球、可自我更新等,而且可耐受雷帕霉素诱导的细胞凋亡。这些发现与 BGSC 理论及本研究结果相吻合。

脑胶质瘤细胞的侵袭是一个复杂的病理过程,涉及多种细胞因子和信号通路,不同的细胞因子可能以自分泌和旁分泌两种模式单独存在或者并存,

并对侵袭过程施加影响;而侵袭过程亦包括多种类型细胞间的反应和细胞与细胞外基质的反应、蛋白酶的释放和基质降解等;以及细胞内多种信号通路的整合、肌动蛋白细胞骨架的重组、迁移途径支架的形成等;此外还包括炎症细胞及其他因子的参与等<sup>[29]</sup>。对应本实验结果以及 BGSC 理论,可以推测 BGSC 除了自身侵袭力以外,还可能通过其他机制调节和控制着侵袭过程,使脑胶质瘤中的 BGSC 更容易迁移到正常脑组织内,从而在生物学行为上体现出肿瘤的恶性程度。因此,还需进一步的研究才可能更深入了解脑胶质瘤以及 BGSC 在侵袭过程中的病理机制。

总的说来,本研究证实了从临床标本培养的胶质瘤细胞球细胞比原代脑胶质瘤细胞具有更强的侵袭力,这可能是脑胶质瘤浸润性生长和高复发率的原因之一。实验结果有助于更好地理解脑胶质瘤侵袭性生长的生物学特性为,并且有力地支持了胶质瘤干细胞理论。

#### [ 参 考 文 献 ]

[ 1 ] Ohgaki H, Kleihues P. Epidemiology and etiology of gliomas [ J ]. *Acta Neuropathol*, 2005, 109( 1 ): 93-108.

[ 2 ] 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.

[ 3 ] Park DM, Rich JN. Biology of glioma cancer stem cells [ J ]. *Mol Cells*, 2009, 28( 1 ): 7-12.

[ 4 ] Davis FG, Freels S, Grutsch J, et al. Survival rates in patients with primary malignant brain tumors stratified by patient age and tumor histological type: An analysis based on surveillance, epidemiology, and end results ( SEER ) data, 1973-1991 [ J ]. *J Neurosurg*, 1998, 88( 1 ): 1-10.

[ 5 ] Field M, Alvarez A, Bushnev S, et al. Embryonic stem cell markers distinguishing cancer stem cells from normal human neuronal stem cell populations in malignant glioma patients [ J ]. *Clin Neurosurg*, 2010, 57: 151-159.

[ 6 ] Huang Q, Zhang QB, Dong J, et al. Glioma stem cells are more aggressive in recurrent tumors with malignant progression than in the primary tumor, and both can be maintained long-term *in vitro* [ J ]. *BMC Cancer*, 2008, 8: 304.

[ 7 ] Inoue A, Takahashi H, Harada H, et al. Cancer stem-like cells of glioblastoma characteristically express MMP-13 and display highly invasive activity [ J ]. *Int J Oncol*, 2010, 37( 5 ): 1121-1131.

[ 8 ] Jin F, Gao C, Zhao L, et al. Using CD133 positive U251 glioblastoma stem cells to establish nude mice model of transplanted tumor [ J ]. *Brain Res*, 2011, 1368: 82-90.

[ 9 ] Jordan CT, Guzman ML, Noble M. Cancer stem cells [ J ]. *N Engl J Med*, 2006, 355( 12 ): 1253-1261.

[ 10 ] Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, et al. Stem cells, cancer, and cancer stem cells [ J ]. *Nature*, 2001, 414( 6859 ): 105-111.

[ 11 ] Silvestre DC, Pineda JR, Hoffschir F, et al. Alternative lengthening of telomeres in human glioma stem cells [ J ]. *Stem Cells*, 2011, 29( 3 ): 440-451.

[ 12 ] Sunayama J, Sato A, Matsuda K, et al. Dual blocking of mTor and PI3K elicits a prodifferentiation effect on glioblastoma stem-like cells [ J ]. *Neuro Oncol*, 2010, 12( 12 ): 1205-1219.

[ 13 ] Thirant C, Bessette B, Varlet P, et al. Clinical relevance of tumor cells with stem-like properties in pediatric brain tumors [ J ]. *PLoS One*, 2011, 6( 1 ): e16375.

[ 14 ] 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.

[ 15 ] Hemmati HD, Nakano I, Lazareff JA, et al. Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors [ J ]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100( 25 ): 15178-15183.

[ 16 ] Hide T, Takezaki T, Nakamura H, et al. Brain tumor stem cells as research and treatment targets [ J ]. *Brain Tumor Pathol*, 2008, 25( 2 ): 67-72.

[ 17 ] Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors [ J ]. *Cancer Res*, 2003, 63( 18 ): 5821-5828.

[ 18 ] Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, et al. Identification of human brain tumour initiating cells [ J ]. *Nature*, 2004, 432( 7015 ): 396-401.

[ 19 ] Taylor MD, Poppleton H, Fuller C, et al. Radial glia cells are candidate stem cells of ependymoma [ J ]. *Cancer Cell*, 2005, 8( 4 ): 323-335.

[ 20 ] Yuan X, Curtin J, Xiong Y, et al. Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme [ J ]. *Oncogene*, 2004, 23( 58 ): 9392-9400.

[ 21 ] Nakano I, Kornblum HI. Brain tumor stem cells [ J ]. *Pediatr Res*, 2006, 59( 4 Pt 2 ): 54R-58R.

[ 22 ] Rich JN, Elyer CE. Cancer stem cells in brain tumor biology [ J ]. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 2008, 73: 411-420.

[ 23 ] Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system [ J ]. *Science*, 1992, 255( 5052 ): 1707-1710.

[ 24 ] Claes A, Idema AJ, Wesseling P. Diffuse glioma growth: a guerilla war [ J ]. *Acta Neuropathol*, 2007, 114( 5 ): 443-458.

[ 25 ] Hoelzinger DB, Demuth T, Berens ME. Autocrine factors that sustain glioma invasion and paracrine biology in the brain microenvironment [ J ]. *J Natl Cancer Inst*, 2007, 99( 21 ): 1583-1593.

[ 26 ] Oliver TG, Wechsler-Reya RJ. Getting at the root and stem of brain tumors [ J ]. *Neuron*, 2004, 42( 6 ): 885-888.

[ 27 ] Wicha MS. Cancer stem cells and metastasis: Lethal seeds [ J ]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12( 19 ): 5606-5607.

[ 28 ] Molina JR, Hayashi Y, Stephens C, et al. Invasive glioblastoma cells acquire stemness and increased Akt activation [ J ]. *Neoplasia*, 2010, 12( 6 ): 453-463.

[ 29 ] Thorsen F, Tysnes BB. Brain tumor cell invasion, anatomical and biological considerations [ J ]. *Anticancer Res*, 1997, 17( 6B ): 4121-4126.

[ 收稿日期 ] 2011 - 11 - 01

[ 修回日期 ] 2012 - 02 - 22

[ 本文编辑 ] 王莹