文章编号:1000-5404(2012)17-1701-06

论著

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

周 坤[1],杨 辉[2],周 伟[2],张春青[2],树海峰[2],王 彬[3] (400037 重庆,第三军医大学新桥医院:急诊科[1],神经外科[2];402160 重庆,重庆市永川人民医院神经外科[3])

[摘要] **目的** 探讨应用亲代谢性谷氨酸受体亚型3(mGlu3)特异性拮抗剂 LY341495 阻断受体通路后对脑胶质瘤干细胞(glioma stem cells,GSCs)生物学特性的作用及相关机制。**方法** 将培养人脑胶质瘤干细胞以及裸鼠移植瘤动物模型分为对照组、激动剂组,拮抗剂组,采用 CCK-8 法测定细胞增殖率,流式细胞术观察细胞周期变化,免疫组织化学染色激光共聚焦显微镜观察细胞 CD133 表达情况,RT-PCR 和 Western blot 分别检测 β-catenin、c-myc 等 mRNA 和蛋白表达,观察裸鼠移植瘤生长变化。**结果** 与对照组比较,拮抗剂组 GSCs 增殖率和进入 S 期的比例均显著降低($P<0.05$),且呈时间依赖性;在分化培养基条件下,拮抗剂组 GSCs 向星形胶质细胞分化明显,Nestin 阳性细胞减少而 GFAP 阳性细胞增多($P<0.05$);mGlu3 拮抗剂干预后,诱导 β-catenin、c-myc 等 mRNA 和蛋白表达明显下调($P<0.05$);与对照组比较,拮抗剂组裸鼠移植瘤生长速度及肿瘤体积明显降低($P<0.05$)。**结论** 药物阻断 mGlu3 受体通路可显著抑制体外培养的 GSCs 以及裸鼠体内移植瘤的生长,并促使 GSCs 由去分化状态转向分化状态,此过程可能经由 Wnt/β-catenin 通路发挥作用。

[关键词] 人胶质瘤干细胞;亲代谢性谷氨酸受体;细胞增殖;分化
[中图法分类号] R73-361; R730.23; R739.41 [文献标志码] A

Effect of drug blockade of type-3 metabotropic glutamate receptor on proliferation and differentiation in glioma stem cells

Zhou Kun[1], Yang Hui[2], Zhou Wei[2], Zhang Chunqin[2], Shu Haifeng[2], Wang Bin[3] ([1]Department of Emergency; [2]Department of Neurosurgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University; [3]Department of Neurosurgery, People's Hospital of Yongchuan, Chongqing, 402160, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of type-3 metabotropic glutamate receptor (mGluR3) antagonist LY341495 on the biological behavior of cultured human glioma stem cells (GSCs). **Methods** Cultured human GSCs and nude mouse xenograft models were divided into three groups including a control group, an agonist group and an antagonist group. Cell proliferation rate was assessed by CCK-8 assay. Cell cycle was measured by flow cytometry. Expression of CD133 was assessed by immunohistochemistry and laser scanning confocal microscopy. The mRNA and protein expressions of β-catenin and c-myc were measured by real-time RT-PCR and Western blotting. **Results** As compared with the control group, the cell proliferation rate and the proportion of GSCs at S stage of cell cycle in the antagonist group significantly decreased in a time-dependent manner ($P<0.05$). The number of GSCs differentiating into astrocytes significantly increased in the antagonist group. The number of the nestin-positive cells decreased, but the number of the GFAP-positive cells increased ($P<0.05$). LY341495 significantly decreased the mRNA and protein expressions of β-catenin and c-myc ($P<0.05$). LY341495 significantly decreased the growth and volume of transplanted tumors in nude mouse xenograft models ($P<0.05$). **Conclusion** In the biological behavior of human GSCs, mGluR3 plays an important role. The drug blockade of mGluR3 can inhibit the growth of cultured GSCs and the transplanted tumors in nude mouse xenograft models *via* Wnt/β-catenin pathway.

[**Key words**] human glioma stem cells; metabotropic glutamate receptors; cell proliferation; cell differentiation

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2008BB5283). Corresponding author: Wang Bin, Tel: 86-23-68774210, E-mail: wangwb_66@sina.com

[基金项目] 重庆市自然科学基金(CSTC2008BB5283)
[通信作者] 王 彬,电话:(023)68774210,E-mail: wangwb_66@sina.com

脑胶质瘤是颅内最常见的恶性肿瘤,恶性程度高,患者生存期短,复发、死亡率高[1]。目前认为脑胶质瘤干细胞(glioma stem cells,GSCs)可能在脑胶质瘤的起源、发展、转移、复发和对放、化疗敏感与否等方面起着至关重要的作用[2],选择性杀死脑胶质瘤干细胞可能使脑胶质瘤得到根治[3]。新近研究[4]提示亲代谢性谷氨酸受体(metabotropic glutamate receptors, mGluRs)可能参与了胶质瘤的增殖、分化、凋亡等生物学行为。本研究拟先明确mGluRs在脑胶质瘤干细胞表达的特异亚型,并通过使用该受体亚型特异性激动剂和拮抗剂后观察胶质瘤干细胞出现的生物学行为的改变,同时构建移植瘤动物在体模型,了解其在调控脑胶质瘤干细胞增殖、分化、凋亡等方面所具有的重要功能,并初步阐明其机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

DMEM/F12培养基、胎牛血清为美国Gibco公司产品,重组人bFGF、EGF购自英国Peprotech EC公司,荧光定量RT-PCR试剂盒及Western blot试剂盒为大连TOYOBO工程有限公司产品,兔抗人CD133多克隆抗体等购自美国Santa Cruz公司,选择性mGlu2/3受体激动剂(LY379268)及特异性mGlu2/3受体拮抗剂(LY341495)购自英国Tocris公司,Trizol试剂、CCK-8试剂盒、S-P免疫组化试剂盒购自北京中山生物技术有限公司。

1.2 人胶质瘤干细胞培养

参考Di-Giorgi-Gerevini等[5]的方法从人胶质母细胞瘤手术标本肿瘤组织中分离GSCs,并按照世界卫生组织指南分级。主要操作过程:将肿瘤组织收集于DMEM/F12培养基中,均匀的切割为约1 mm^3的小块后,1 000 r/min离心3 min,获得的沉淀物以机械方法吹打分离为单个细胞悬液,而后细胞使用无血清的干细胞培养基(含20 ng/ml人重组EGF和10 ng/ml人重组bFGF的DMEM/F12培养基)重悬,并接种于75 cm^2培养瓶。

1.3 免疫组化方法检测CD133表达

GSCs呈肿瘤球样悬浮生长,长至50~100/球时,进行甩片处理,取出玻片,用4%多聚甲醛固定,3% H_2O_2灭活,抗原修复,血清封闭后,依次滴加CD133一抗、二抗试剂孵育后进行脱水、封片,激光扫描共聚焦显微镜观察,IPP软件测定细胞相对荧光强度。阴性对照实验:用PBS代替一抗孵育。实验重复3次。

1.4 细胞分组及处理

细胞分为3组:①对照组:仅使用干细胞培养基;②激动剂组:干细胞培养基+LY379268(100 nmol/L,隔天加入);③拮抗剂组:干细胞培养基+LY341495(100 nmol/L,隔天加入)。

1.5 细胞增殖率测定

采用CCK-8法分析。将GSCs接种于96孔培养板,每孔1 000/200 μl,而后按各组干预条件培养,每组设复孔6个。各组孵育6、12、24、48 h后取出96孔板,每孔加入CCK-8 20 μl,继续孵育1 h,在酶标仪上以450 nm波长测定各孔的吸光度值[$D(450)$]。按以下公式计算细胞增殖率,实验重复3次。

细胞增殖率=[$D(450)_{实验组}-D(450)_{对照组}$]/$D(450)_{对照组}$×100%

1.6 细胞周期测定

将GSCs接种于培养瓶,按各组干预条件培养,孵育6、12、24、48 h后取出培养瓶,制成单细胞悬液后,转移至5 ml离心管中,4 ℃,1 000 r/min离心5 min,弃上清。加入PBS溶液5 ml,吹散细胞,漂洗,4 ℃,1 000 r/min离心5 min,弃上清。加入0.3 ml PBS完全重悬细胞,加入提前预冷的75%乙醇4 ml固定细胞24 h。细胞周期检测:将细胞加入碘化丙啶(PI)染液1 ml,在4 ℃冰箱避光染色30 min,以500目铜网过滤,样品成为合格的单细胞悬液,送流式细胞仪上检测。应用MuticycleAV分析软件对DNA细胞周期拟合分析,计算各时相分布的百分比,以增殖指数(PI)表示细胞的增殖活性。

$PI=(S+G_2/M)/[(G_0/G_1)+S+G_2/M]\times100\%$

1.7 荧光定量RT-PCR

引物序列见表1。按照试剂盒说明书提取细胞总RNA,测定浓度。使用ABI 7500型荧光定量PCR仪,按试剂盒说明书进行荧光定量RT-PCR,采用三步法,反应条件:94 ℃ 60 s,之后94 ℃ 15 s→60 ℃ 15 s→72 ℃ 45 s,共循环40次。完成后以ABI 7500自带软件分析基因表达相对量(RQ值)关系。

表1 各基因引物序列

基因	引物序列(5′-3′)	片段长度(bp)
β-actin	上游:GCCATGTACGTAGCCATCCA	368
	下游:GAACCGCTCATTGCCGATAG	
mGlu1	上游:GATGGTGGCCCAATGCA	220
	下游:TCGATGTTGCTCCACTCAAGA	
mGlu5	上游:GCGGACAGGTATGATGTGACA	407
	下游:GGAGACTGGAGCTTGATTGTGAT	
mGlu2	上游:CTACAGTGATGTCTCCATCC	198
	下游:CTACAGTGATGTCTCC ATCC	
mGlu3	上游:CAAGTGACTACAGAGTGCAG	136
	下游:CTGTCACCAATGCTCA GCCTC	
β-catenin	上游:ACTGGCAGCAACAGTCTTACC	252
	下游:TTTGAAGGCAGTCTGTCGTAAT	
c-myc	上游:TCACCAGCACAACTACGCCG	302
	下游:CAGGATGTAGGCGGTGGCTT	

1.8 Western blot检测

按试剂盒说明书提取细胞总蛋白并测定浓度。蛋白质提取后进行SDS-PAGE垂直凝胶电泳、转膜,丽春红S染色观察转移效果并标出相对分子质量标准。将硝酸纤维素膜置于含5%脱脂奶粉和3%的牛血清白蛋白的TBST液中封闭,室温1 h;用一抗进行杂交,过夜;用二抗杂交,室温2 h;3,3-二氨基联苯胺(DAB)显色,每步后用TBST液充分洗膜。扫描图像,并用英国UVP公司GDS8000型凝胶成像分析系统分析。

1.9 流式细胞仪分析

胰酶消化肿瘤球,4%多聚甲醛固定,0.1% Triton-100打孔,一抗4 ℃染色过夜。漂洗后,细胞用荧光二抗孵育1 h。染色好的细胞用流式细胞仪分析(10 000个细胞,从约100个单独的肿瘤球获得)。

1.10 分化研究

实验分组,①对照组:DMEM/F12 + 10% FBS 培养基;②激动剂组:DMEM/F12 + 10% FBS + LY379268(100 nmol/L,隔天加入)培养基;③拮抗剂组:DMEM/F12 + 10% FBS + LY341495(100 nmol/L,隔天加入)培养基。培养 8 d 后细胞以 4% 多聚甲醛固定 10 min,随后进行免疫荧光染色和共聚焦分析,检测各种细胞的比例:取 4 个单独的细胞爬片,每个爬片随机选择 3 个视野计数,取平均值后计算 $GFAP^+$ 和 $nestin^+$ 的细胞比例。

1.11 裸鼠移植瘤动物模型

按动物实验伦理准则进行。从肿瘤球分离出的 GSCs($CD133^+$ 细胞在肿瘤球中占 70% 以上),移植于裸鼠右侧腋部皮下,埋针 3 min。干预方法为裸鼠腹腔注射 LY379268 或者 LY341495[均为 1 mg/(kg·d)],对照组在 GSCs 移植后注射等量生理盐水。干预后每 5 天观察 1 次小鼠生长状态,并测量皮下肿瘤短径 a 和长径 b,计算肿瘤体积($V = a^2 \times b/2$)。移植后 3 周处死动物,切取肿瘤组织,常规固定,石蜡包埋,切片,HE 染色观察并与亲本组织进行比较。

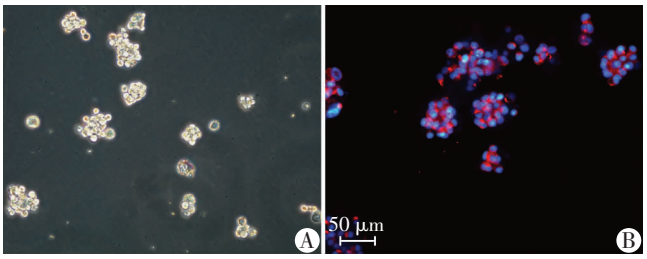
1.12 统计学方法

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件行单因素方差分析和 t 检验。

2 结果

2.1 人脑胶质瘤干细胞培养及鉴定

在无血清干细胞培养基中培养,GSCs 中大部分细胞呈悬浮生长。培养 24 ~ 48 h,可见单个细胞开始分裂生长,形成 2 至数十个细胞聚集生长的球形细胞团,称为肿瘤球(图 1A),4 ~ 6 d 传代 1 次,传代后细胞重复上 1 代的生长过程,呈圆球状悬浮生长,CD133 染色阳性(图 1B),能连续传代并保持较好的增殖生长能力。



A:在干细胞培养基中悬浮呈肿瘤球样生长(LM ×200);B:CD133 染色阳性(免疫组化染色)

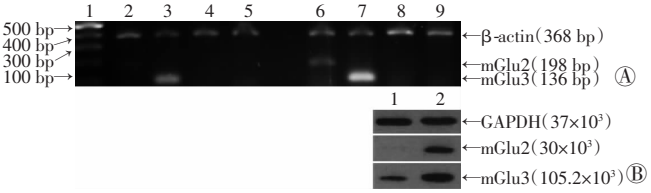
图 1 体外培养人 GSCs 的观察与鉴定

2.2 mGluRs 在人 GSCs 中的表达

RT-PCR 检测发现胶质瘤瘤体组织中有 mGlu2 及 mGlu3 mRNA的表达,但分离培养的 GSCs 中仅表达 mGlu3 mRNA(图 2A)。Western blot 检测同样显示在人 GSCs 中主要表达 mGlu3 蛋白(图 2B),而瘤体组织及 GSCs 中均无 mGlu1、5 的 mRNA 表达。

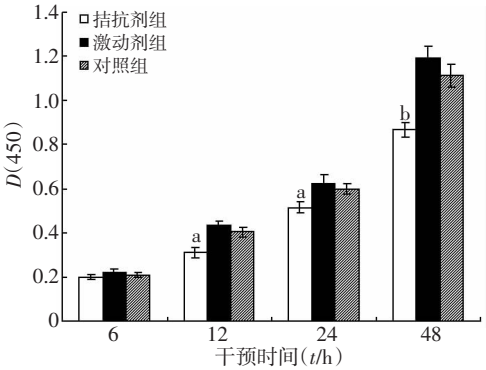
2.3 mGlu3 特异性激动剂 LY379268 和拮抗剂 LY341495 对 GSCs 增殖及细胞周期的影响

应用特异性拮抗剂 LY341495 阻滞 mGlu3 后,GSCs 增殖与对照组相比明显受到抑制($P < 0.05$),同时,进入 S 期的细胞比例降低,增殖指数 PI 值明显降低($P < 0.05$);而 mGlu3 激动剂 LY379268 对 GSCs 增殖的影响与对照组相比无显著差别($P > 0.05$)。见图 3。



A:RT-PCR 检测 1:标准,2 ~ 5:人 GSCs 中 mGlu2、3、1、5 mRNA 表达,6 ~ 9:人胶质瘤瘤体组织中 mGlu2、3、1、5 mRNA 表达;B:Western blot 检测 1:人 GSCs,2:人胶质瘤瘤体组织

图 2 mGluRs 各亚型在人 GSCs 及肿瘤组织中的表达



a:$P < 0.05$,b:$P < 0.01$,与同时相点激动剂组及对照组比较

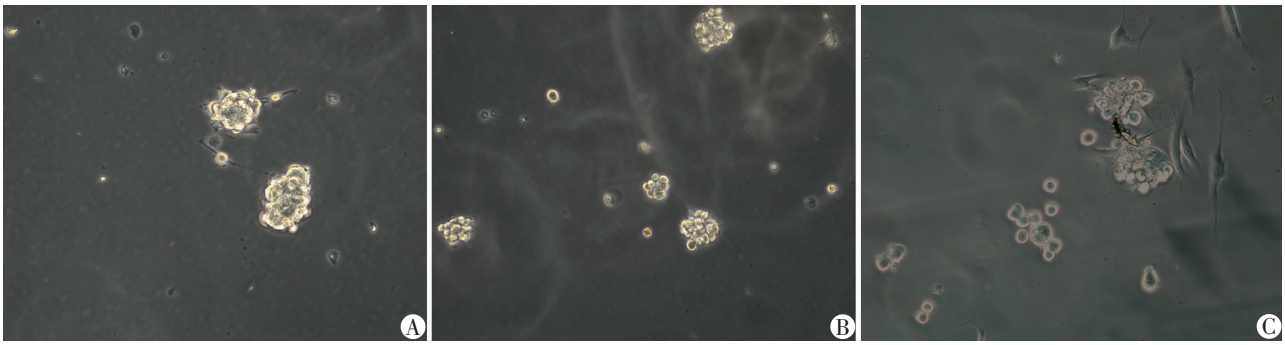
图 3 各组不同时间人 GSCs 增殖的变化

2.4 mGlu3 特异性激动剂 LY379268 和特异性拮抗剂 LY341495 对 GSCs 分化的影响

在应用前述无血清干细胞培养基条件下 GSCs 呈典型的肿瘤球样悬浮生长(图 4A);而加入 mGlu3 特异性激动剂 LY379268 后 3 d,其生长方式无明显变化,细胞仍呈未分化状态的肿瘤球生长(图 4B);应用 mGlu3 特异性拮抗剂 LY341495 后 3 d,即可见到原本悬浮生长的肿瘤球贴壁,并开始出现已分化的胶质瘤细胞从周边游出并贴壁生长(图 4C)。而在使用含 10% FBS 的 DMEM/F12 作为分化培养基诱导呈肿瘤球样生长的 GSCs 贴壁生长,8 d 后可见到拮抗剂组中表达 GFAP 的细胞数量为(61 ± 5)%,明显多于对照组[(31 ± 4)%]和激动剂组[(33 ± 4)%,$P < 0.05$],而表达 nestin 的细胞数量则显著降低[(22 ± 4)% *vs* (40 ± 3)%,(45 ± 5)%,$P < 0.05$],见图 5。进一步证实 mGlu3 拮抗剂 LY341495 有促使 GSCs 向星形胶质细胞方向分化的作用。

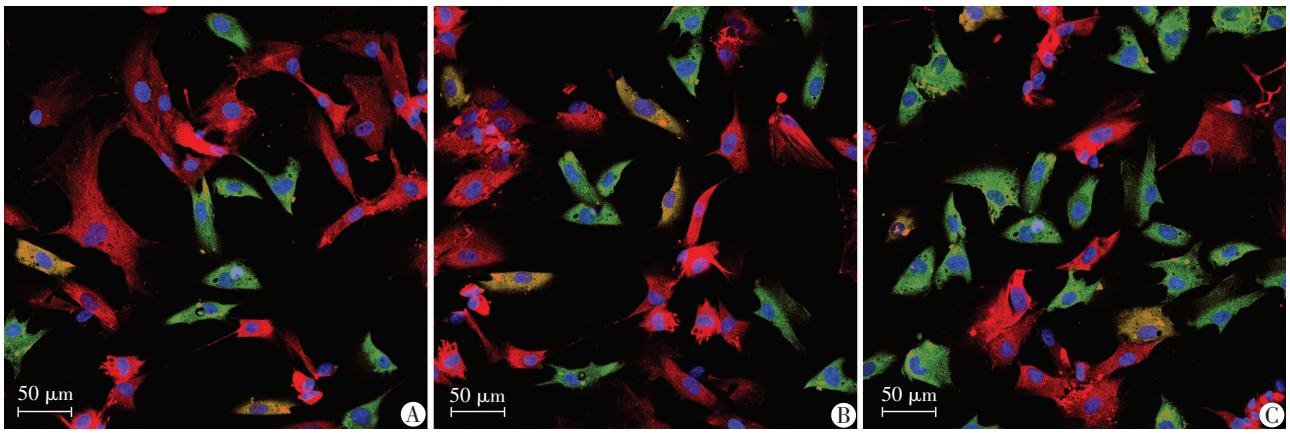
2.5 应用特异性拮抗剂 LY341495 阻滞 mGlu3 后对 Wnt/β-catenin 通路的影响

各组在干预后 6、12、24、48 h 时相点收集细胞,以 RT-PCR 及 Werstern blot 方法检测 Wnt/β-catenin 通路标志分子变化。以 mGlu3 拮抗剂 LY341495 作用后,Wnt/β-catenin 通路标志分子 β-catenin mRNA 及蛋白表达均明显降低(图 6、7)。以同样方法检测 Wnt/β-catenin 通路下游分子 c-myc mRNA 及蛋白表达,在应用拮抗剂阻断 mGlu3 后,其水平也显著降低(图 8、9)。



A:对照组;B:激动剂组(100 nmol/L LY379268);C:拮抗剂组(100 nmol/L LY341495)

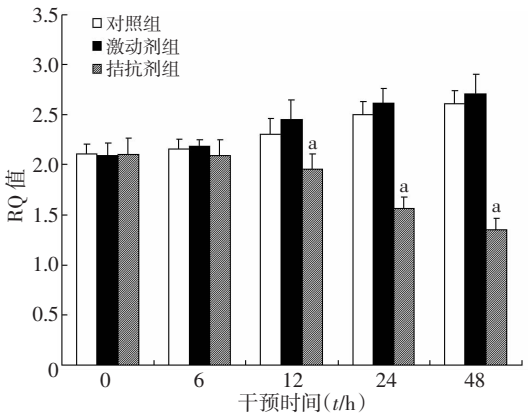
图4　mGlu3特异性激动剂和特异性拮抗剂对各组GSCs分化的影响　(LM　×200)



GFAP$^+$细胞呈绿色荧光，nestin$^+$细胞呈红色荧光，双染的细胞呈黄色荧光

A:对照组;B:激动剂组(100 nmol/L LY379268);C:拮抗剂组(100 nmol/L LY341495)

图5　激光共聚焦显微镜观察mGlu3特异性激动剂和特异性拮抗剂对各组GSCs贴壁生长后分化的影响

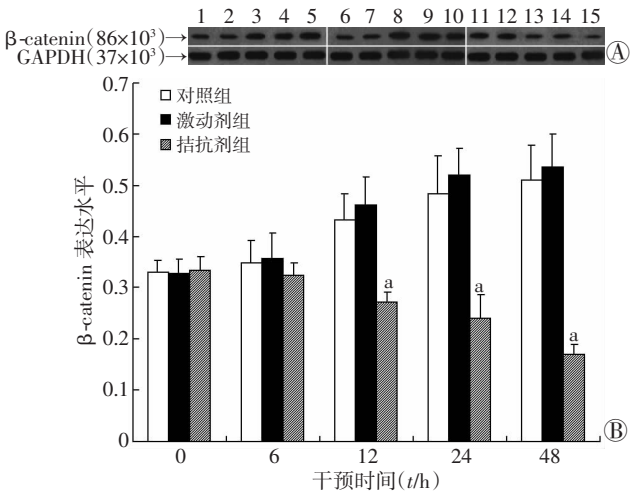


a:$P<0.01$,与同时相点对照组及激动剂组比较

图6　RT-PCR检测LY341495阻滞mGlu3后β-catenin mRNA的表达

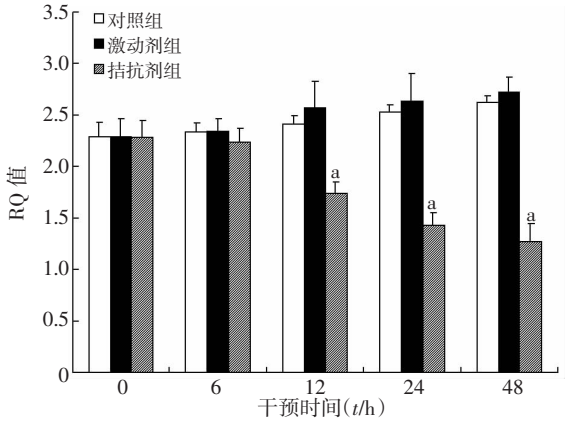
2.6　mGlu3特异性激动剂LY379268和特异性拮抗剂LY341495对GSCs移植至裸鼠成瘤的影响

GSCs具有明显的成瘤能力,裸鼠接受10^4个GSCs细胞移植后,3~5 d可见到右侧腋部皮下肿瘤形成,3周时移植瘤已较大,甚至导致表面破溃。将移植瘤切除,见其包膜完整,以中性甲醛固定,石蜡包埋,切片,HE染色观察发现:由GSCs形成移植瘤细胞核大深染,排列紧密,无明显坏死组织;细胞间异形性显著,血管结构清晰(图10A)。移植瘤的病理表型与亲本肿瘤(图10B)一致。



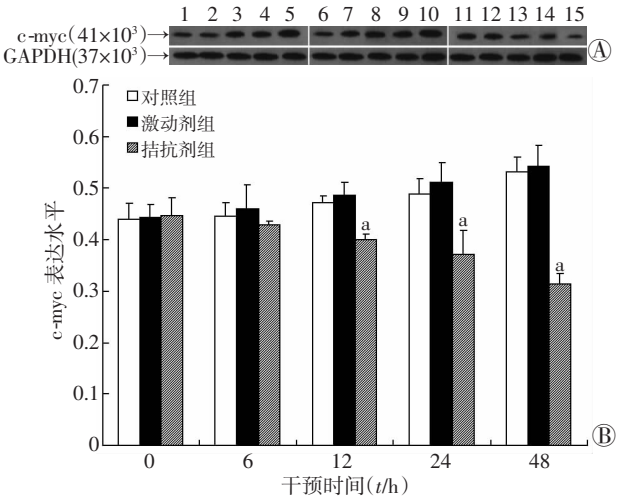
A:Western blot检测　1~5:对照组0、6、12、24、48 h,6~10:激动剂组0、6、12、24、48 h,11~15:拮抗剂组0、6、12、24、48 h;B:半定量分析　a:$P<0.01$,与同时相点对照组及激动剂组比较

图7　Western blot检测LY341495阻滞mGlu3后β-catenin蛋白的表达



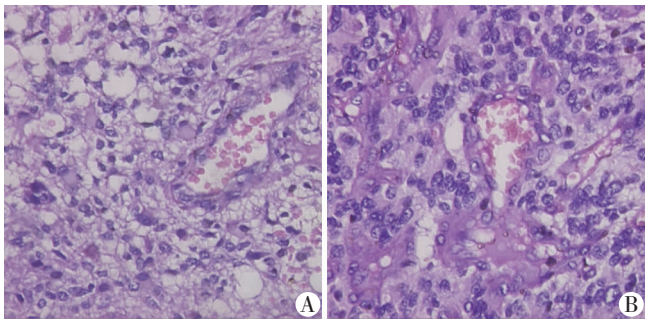
a:$P<0.01$,与同时相点对照组及激动剂组比较

图 8 RT-PCR 检测 LY341495 阻滞 mGlu3 后 c-myc mRNA 的表达



A:Western blot 检测 1~5:对照组 0、6、12、24、48 h,6~10:激动剂组 0、6、12、24、48 h,11~15:拮抗剂组 0、6、12、24、48 h;B:半定量分析 a:$P<0.01$,与同时相点对照组及激动剂组比较

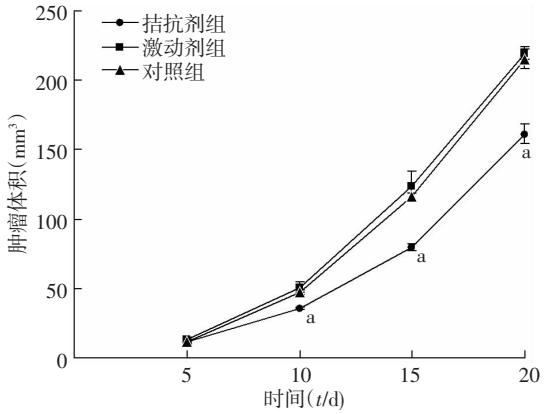
图 9 Western blot 检测 LY341495 阻滞 mGlu3 后 c-myc 蛋白的表达



A:移植瘤;B:亲本肿瘤

图 10 光镜观察裸鼠移植 GSCs 后成瘤情况 (HE ×400)

皮下移植瘤模型建立后,于第 5、10、15、20 天测得皮下肿瘤长短径,根据体积计算公式得出各不同时间点的肿瘤体积,绘制肿瘤生长曲线,可见应用 mGlu3 拮抗剂 LY341495 从移植后第 10 天即可明显抑制移植瘤的生长,而 mGlu3 激动剂的作用与对照组相比无显著差异($P>0.05$,图 11)。



a:$P<0.01$,与对照组及激动剂组比较

图 11 阻滞 mGlu3 后对裸鼠移植瘤生长的作用

3 讨论

脑胶质瘤是最常见的一种原发恶性脑肿瘤,占颅内肿瘤的 33.3% ~58.9%,近年来发病率还有继续增加的趋势[6]。尽管目前采用手术、放疗、化疗等联合治疗手段,但应用于胶质瘤的治疗时却收效甚微,胶质瘤患者的平均生存期仍较短,在过去 30 年恶性脑胶质瘤(如多形性胶质母细胞瘤)的疗效无明显改善,仅不足 5% 患者的生存期能达到 5 年[7-8],平均生存期 26 ~ 52 周。近年有研究者相继从脑胶质瘤组织和细胞株中成功分离出了脑胶质瘤干细胞[9],它们被认为是胶质瘤细胞成分中具有自我更新和分化能力的细胞亚群,在胶质瘤的发生、发展和复发中起决定性作用[2],对其深入研究有助于寻找新的胶质瘤治疗策略。

亲代谢性谷氨酸受体(mGluRs)是 G 蛋白偶联受体(G-protein coupled receptors,GCPRs)成员之一,与钙离子敏感受体、味觉受体、信息素受体等同属 C 类 GCPRs。早期对 mGluRs 的功能研究多集中于神经突触功能方面[10],之后则倾向于将其作为常见的神经、精神疾病药物治疗的潜在靶点[11-12]。新近研究[13]则发现其生物学功能复杂,可能参与细胞增殖、分化和存活,而不再限于突触功能相关。例如分布在胸腺细胞、角质化细胞、肝细胞、成骨细胞和胰岛细胞以及干/祖细胞上的 mGluRs。目前关于 mGluRs 功能研究的焦点之一是其在干/祖细胞上的激活机制,以及激活后生长和分化信号的转导机制[14]。

研究[15]发现,胶质瘤细胞中 mGluRs 存在的亚型主要为第 I 组(包括 mGlu1、5)和第 II 组(包括 mGlu2、3),参与了胶质瘤发生、生长增殖、转移等多种生物学行为,并发挥了重要的作用[16-19]。本研究发现,从手术标本分离培养的人 GSCs 中确有 mGluRs 的表达,主要表达的是 mGlu3。而且 mGlu3 的确参与了支持

GSCs维持去分化状态下的增殖和生长,表现在应用mGlu3的特异性受体拮抗剂LY341459阻断受体通路后,GSCs的生长受到明显抑制,同时由去分化的肿瘤球生长形态向分化的星形胶质细胞的贴壁生长形态转变,其nestin阳性表达率下降而GFAP阳性表达率上升。同时,在建立的裸鼠移植瘤模型中,给予mGlu3的特异性受体拮抗剂LY341459也可明显抑制移植瘤的生长。Wnt/β-catenin通路是与肿瘤发生、发展密切相关的1个信号通路[20]。本实验显示,培养的人GSCs中Wnt/β-catenin通路标志分子β-catenin及其下游重要分子c-myc mRNA和蛋白质水平均显著下调,提示mGlu3对GSCs生物学行为的调节可能经由Wnt/β-catenin通路发挥作用。有趣的是应用mGlu3受体的激动剂干预后,GSCs的生长增殖等与对照组并无显著差别,很可能与中枢神经系统及胶质瘤等组织中存在谷氨酸的旁/自分泌机制[4,21]类似,在体外培养以及裸鼠体内移植成瘤的胶质瘤干细胞亚群中同样均存在谷氨酸旁/自分泌,本身已经使mGlu3受体处于激活状态并基本饱和了。这也提示,在通常的胶质瘤生长状态中,一直处于激活状态的mGlu3受体通路本身就是支持GSCs生长增殖的重要因素。本研究阻断mGlu3受体后对GSCs的种种影响也证实了此点。

综上所述,mGlu3受体参与了GSCs的增殖分化等生物学行为,阻断mGlu3受体通路可明显抑制GSCs的增殖并促使其向星形胶质细胞分化,此过程中伴有Wnt/β-catenin通路标志分子β-catenin及其下游重要分子c-myc mRNA和蛋白质水平均显著下调,提示mGlu3对GSCs的作用可能是通过Wnt/β-catenin信号通路发挥作用,进一步的研究可能为靶向胶质瘤干细胞的一种新的、非细胞毒性的脑胶质瘤的临床治疗策略提供新的思路。

参考文献:

[1] Berger M S. Glioma surgery: a century of challenge[J]. Clin Neurosurg, 2011, 58: 7-9.

[2] Dietrich J, Diamond E L, Kesari S. Glioma stem cell signaling: therapeutic opportunities and challenges[J]. Expert Rev Anticancer Ther, 2010, 10(5): 709-722.

[3] Frosina G. Stem cell-mediated delivery of therapies in the treatment of glioma[J]. Mini Rev Med Chem, 2011, 11(7): 591-598.

[4] de-Groot J, Sontheimer H. Glutamate and the biology of gliomas[J]. Glia, 2011, 59(8): 1181-1189.

[5] Di-Giorgi-Gerevini V, Melchiorri D, Battaglia G, *et al*. Endogenous activation of metabotropic glutamate receptors supports the proliferation and survival of neural progenitor cells[J]. Cell Death Differ, 2005, 12(8): 1124-1133.

[6] Hess K R, Broglio K R, Bondy M L. Adult glioma incidence trends in the United States, 1977-2000[J]. Cancer, 2004, 101(10): 2293-2299.

[7] Quick A, Patel D, Hadziahmetovic M, *et al*. Current therapeutic paradigms in glioblastoma[J]. Rev Recent Clin Trials, 2010, 5(1): 14-27.

[8] Chaichana K L, McGirt M J, Laterra J, *et al*. Recurrence and malignant degeneration after resection of adult hemispheric low-grade gliomas[J]. J Neurosurg, 2010, 112(1): 10-17.

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

[10] Chaki S, Hikichi H. Targeting of metabotropic glutamate receptors for the treatment of schizophrenia[J]. Curr Pharm Des, 2011, 17(2): 94-102.

[11] Lima V C, Molchanov M L, Aguiar D C, *et al*. Modulation of defensive responses and anxiety-like behaviors by group I metabotropic glutamate receptors located in the dorsolateral periaqueductal gray[J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2008, 32(1): 178-185.

[12] Conn P J, Battaglia G, Marino M J, *et al*. Metabotropic glutamate receptors in the basal ganglia motor circuit[J]. Nat Rev Neurosci, 2005, 6(10): 787-798.

[13] Nicoletti F, Battaglia G, Storto M, *et al*. Metabotropic glutamate receptors: beyond the regulation of synaptic transmission[J]. Psychoneuroendocrinology, 2007, 32 Suppl 1: S40-S45.

[14] Pollock P M, Cohen-Solal K, Sood R, *et al*. Melanoma mouse model implicates metabotropic glutamate signaling in melanocytic neoplasia[J]. Nat Genet, 2003, 34(1): 108-112.

[15] Stepulak A, Luksch H, Gebhardt C, *et al*. Expression of glutamate receptor subunits in human cancers[J]. Histochem Cell Biol, 2009, 132(4): 435-445.

[16] Viwatpinyo K, Chongthammakun S. Activation of group I metabotropic glutamate receptors leads to brain-derived neurotrophic factor expression in rat C6 cells[J]. Neurosci Lett, 2009, 467(2): 127-130.

[17] Arcella A, Carpinelli G, Battaglia G, *et al*. Pharmacological blockade of group II metabotropic glutamate receptors reduces the growth of glioma cells *in vivo*[J]. Neuro Oncol, 2005, 7(3): 236-245.

[18] Lennon S M, Rivero G, Matharu A, *et al*. Metabotropic glutamate receptor mGlu2 is resistant to homologous agonist-induced desensitization but undergoes protein kinase C-mediated heterologous desensitization[J]. Eur J Pharmacol, 2010, 649(1/3): 29-37.

[19] Wroblewska B, Wegorzewska I N, Bzdega T, *et al*. Type 2 metabotropic glutamate receptor (mGluR2) fails to negatively couple to cGMP in stably transfected cells[J]. Neurochem Int, 2011, 58(2): 176-179.

[20] Yao H, Ashihara E, Maekawa T. Targeting the Wnt/β-catenin signaling pathway in human cancers[J]. Expert Opin Ther Targets, 2011, 15(7): 873-887.

[21] Platt S R. The role of glutamate in central nervous system health and disease--a review[J]. Vet J, 2007, 173(2): 278-286.

(**收稿**:2012-04-23;**修回**:2012-06-06)

(编辑 汪勤俭)