DOI:10.16016/j.1000-5404.201909213

缺氧条件下胶质瘤分泌的外泌体通过 JAK/STAT3 信号通路促进胶质瘤干细胞迁移

程 玥,叶秀峰 400016 重庆,重庆医科大学基础医学院病理学教研室

[摘要] **目的** 探讨胶质瘤细胞在缺氧条件下分泌的外泌体对胶质瘤干细胞迁移的作用。**方法** 超高速离心法提取缺氧和常氧条件下胶质瘤细胞分泌的外泌体,采用透射电子显微镜(TEM)和动态光散射(DLS)、Western blot 检测等方法对外泌体进行鉴定;用 DIO 染料标记外泌体,荧光显微镜观察胶质瘤干细胞能否摄取外泌体。将 PBS(空白组)、常氧(20%O_2,常氧组)和缺氧(1%O_2,缺氧组)条件下提取的外泌体与胶质瘤干细胞共培养,CCK-8 法测定胶质瘤干细胞增殖情况,Transwell 实验检测胶质瘤干细胞迁移能力变化,Western blot 检测 JAK/STAT3 通路蛋白磷酸化水平的改变。**结果** 在胶质瘤干细胞的胞质中检测到外泌体携带的荧光染料 DIO。CCK-8 结果显示:提取的外泌体以不同浓度(浓度梯度依次为 1、5、10、20、40 μg/mL)处理不同时间(12、24、48、72 h)后,常氧组和缺氧组胶质瘤干细胞的细胞活力差异无统计学意义。与空白组和常氧组比较,缺氧组提取外泌体共培养组的胶质瘤干细胞迁移能力显著提高($P<0.05$),JAK/STAT3 通路蛋白磷酸化水平也显著增加($P<0.05$)。**结论** 胶质瘤细胞在缺氧条件下分泌的外泌体部分通过提高 JAK/STAT3 通路磷酸化水平促进胶质瘤干细胞迁移。

[关键词] 外泌体;胶质瘤干细胞;缺氧;细胞迁移;JAK/STAT3

[中图法分类号] R364.4;R73-37;R730.264 [文献标志码] A

Exosomes derived from hypoxia-exposed glioma cells promotes glioma stem cell migration by JAK/STAT3 signalling pathway

CHENG Yue, YE Xiufeng Department of Pathology, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of exosomes secreted by hypoxia-exposed glioma cells on the migration ability of glioma stem cells *in vitro*. **Methods** Exosomes were isolated from glioma cells with hypoxia exposure or in normoxic culture by ultracentrifugation and identified by transmission electron microscopy, dynamic light scattering and Western blotting. The exosomes were labeled with DIO to allow observation of their intake by glioma stem cells under fluorescent microscope. The glioma stem cells were co-cultured with the exosomes or PBS for 24, 48, or 72 h, and CCK-8 assay and Transwell assay were performed to assess the changes in the proliferation and migration ability of the cells. The changes in the phosphorylation levels of the proteins in the JAK/STAT3 pathway were detected using Western blotting. **Results** Fluorescence signals were detected in the glioma stem cells co-cultured with the DIO-labeled exosomes. The results of CCK-8 assay showed that the glioma stem cells showed no significant changes in their proliferative activity after co-culture with the exosomes from the glioma cells with or without hypoxic treatment. Co-culture with the exosomes from hypoxia-exposed glioma cells enhanced the migration ability of glioma stem cells, as compared with treatment with PBS or exosomes derived from normally cultured glioma cells ($P<0.05$). The exosomes from hypoxia-exposed glioma cells also significantly increased the phosphorylation levels of the proteins in the JAK/STAT3 pathway. **Conclusion** Co-culture with exosomes from hypoxia-exposed glioma cells can enhance the migration ability of glioma stem cells partly by increasing the phosphorylation

[通信作者] 叶秀峰,E-mail:yxf1960@126.com

levels of the JAK/STAT3 pathway proteins.

[**Key words**] exosomes; glioma stem cell; hypoxia; cell migration; JAK/STAT3

Corresponding author: YE Xiufeng, E-mail: yxf1960@126.com

神经胶质瘤是指原发于中枢神经系统的以高度血管生成为特点的恶性肿瘤,具有弥漫侵袭的特性,对强化联合治疗和抗 VEGF 治疗均有耐药性,预后大都不良,2 年生存率低于 30%。胶质瘤干细胞(glioma stem cell,GSC)是参与胶质瘤自我更新、分化等胶质瘤病理生理的特定细胞群体,受低氧信号传导途径的调节[1]。GSC 在胶质瘤发生、发展和促进维持方面都有一定作用,胶质瘤增殖快速,造成内部高度缺氧,但瘤体能够高度血管化来保证增殖[2]。研究表明 GSC 能够在特定条件下向内皮细胞迁移,分化为血管周细胞维持血管生长及稳定[3]。此外,肿瘤细胞边缘存在缺氧灶是胶质瘤的主要特征之一,低氧被认为是驱动胶质瘤在病灶核心运动的因素之一[4],但缺氧能否促进 GSC 迁移,缺氧信号是直接作用于 GSC 或是通过其他途径到达 GSC 而促进 GSC 迁移,还要进一步探索。

Janus 激酶(Janus kinase,JAK)/信号转导子和转录激活子 3(signal transducer and activator of transcription 3,STAT3)是胶质瘤中肿瘤细胞存活、生长和侵袭的重要机制,是胶质瘤中旁分泌白血病抑制因子、IL-6 或促红细胞生成素信号通路传导的下游常见途径[5]。STAT3 已成为神经胶质瘤的重要治疗靶标,并且 STAT3 上游调节剂 Janus kinase 2(JAK2)的许多小分子抑制剂目前正在进行胶质瘤的临床前研究。已证明用 AG490 或更强效的第二代类似物 WP1066 靶向抑制 JAK2 可降低 U87 和 U251 胶质瘤细胞的存活和增殖,降低 U87 在皮下异种移植物中的致瘤性[6-7]。

外泌体(exosome, Exo)是参与细胞外环境信号交流的重要载体。外泌体起源于多泡体,系脂质双层球形结构,直径 40~150 nm 不等[8]。外泌体内可包含酶、配体、受体、DNA、互补 DNA(cDNA)、mRNA、微小 RNA(miR)等,本身携带 CD9、CD63、CD81、CD83、Alix、Tsg101 等标志物,可以调节受体细胞内的信号转导、基因转录翻译及关键酶促反应过程[9]。几乎所有的细胞都可分泌外泌体,外泌体可以反映供体细胞的部分信息,并将这部分信息传达给受体细胞,实现细胞之间的"间接交流"。研究表明:外泌体是促进细胞间通信和肿瘤微环境内串扰的一种胞外囊泡(extracellular vesicle,EV)[10],胶质瘤衍生的 EV 包含不同促血管生成因子和促进内皮细胞增殖、迁移、分化需要的 miR 和胞外蛋白酶[11]。外泌体被靶细胞摄取后,外泌体内的成分也被转移到靶细胞内发挥病理生理作用。如胃癌细胞衍生的外泌体增强周细胞的增殖和迁移,诱导周细胞表达肿瘤相关成纤维细胞(CAFs)的标记物,而 PI3K/AKT 和 MEK/ERK 途径被胃癌细胞衍生的外泌体激活,BMP 途径的抑制能够逆转癌症外泌体诱导的 CAFs 转变[12]。胶质瘤的肿瘤微环境具有异质性和复杂性,依赖于该环境许多不同组成部分之间的信号交流。因此,由肿瘤细胞衍生的外泌体诱导的微环境改变对靶向原发性肿瘤的生长和转移可能是有一定作用的。在常氧和缺氧条件下,胶质瘤细胞分泌的外泌体内含物的性质和数量是有差异的[13],鉴于外泌体具有信号交流载体的特征,本研究旨在探讨外泌体可否将缺氧信号由胶质瘤细胞传递至 GSC,进而影响 GSC 的迁移能力。

1 材料与方法

1.1 主要材料

人胶质瘤细胞株 U87 来源于中国科学院细胞库。表皮生长因子(epidermal growthfactor, EGF)购自美国 Peprotech 公司,碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)购自美国 Peprotech 公司,B-27、DMEM 高糖培养基、DMEM/F12 培养基、胎牛血清和木瓜蛋白酶均购自美国 Gibco 公司,多聚赖氨酸购自美国 Sigma 公司,鼠抗人巢蛋白(Nestin)单克隆抗体、兔抗人 Sox2 单克隆抗体购自中国 Proteintech 公司,兔抗人 CD81 单克隆抗体、兔抗人 CD9 单克隆抗体、兔抗人 GRP94 单克隆抗体、兔抗人 Tsg101 单克隆抗体和 JAK/p-JAK 单克隆抗体均购自美国 Abcam 公司,STAT3/p-STAT3 购自美国 CST 公司,外泌体 DIO 染色试剂盒购自中国润基生物公司,Transwell 小室购自美国 BD 公司。

1.2 方法

1.2.1 U87 胶质瘤干细胞培养 将对数生长期的 U87 细胞经胰酶消化成单个细胞,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清用无血清培养基(SFM,EGF 20 ng/mL,bFGF 20 ng/mL,2% B-27,1%双抗)重悬,种于低吸附 6 孔板,置于 37 ℃、5%CO_2 细胞培养箱中培养。4~5 d 用木瓜蛋白酶消化,按 1∶3比例传代,均用 SFM 培养。

1.2.2 U87 胶质瘤干细胞标志物鉴定 取 24 孔板,孔内放入细胞爬片,用 0.01%多聚赖氨酸进行包被 30 min,37 ℃,弃去多聚赖氨酸,无菌 PBS 润洗 2 次。将 U87 胶质瘤干细胞球和 U87 接种于 24 孔板内,37 ℃

过夜,观察细胞贴壁后取出细胞爬片,冰 PBS 洗 3 次,4%多聚甲醛固定 30 min 后弃去,PBS 清洗 3 次,即用型山羊血清封闭 30 min,用 PBS 按 1∶200 比例配置 Sox2 和 Nestin 一抗孵育爬片,4 ℃过夜。次日用 PBST 洗 3 次去多余一抗,荧光素标记二抗室温孵育 1 h,PBST 洗涤 3 次加 DAPI 孵育 3 min,再洗涤,抗荧光衰减剂封片后阴暗处风干,荧光显微镜下采集图像。

取 U87 和疑似胶质瘤干细胞的 U87 神经球,PBS 润洗 2 次,置于冰上,加 300 μL RIPA 裂解液、3 μL PMSF 和 3 μL 磷酸酶抑制剂于冰上裂解 20 min。将混合液 4 ℃、13 300 r/min,离心 30 min,取上清,BCA 标准曲线法测浓度后加入 1/4 体积 5×蛋白上样缓冲液,金属浴 100 ℃变性 5 min,按 30 μg/孔上样,8%和 12% SDS-PAGE 分离,250 mA 转至 0.22 μm PVDF 膜上,脱脂牛奶封闭 2 h,TBST 洗涤后分别放入 1∶1 000 一抗稀释液配置的 Nestin、Sox2、GAPDH 一抗中 4 ℃孵育过夜。次日分别放入对应兔鼠二抗中室温孵育 1 h 后,洗涤,发光显色。

1.2.3 外泌体提取 将对数生长至 70%左右的 U87 细胞更换为 DMEM 基础培养基,分为 2 组,常氧组:置于常氧(20%O_2)37 ℃、5%CO_2;缺氧组:置于缺氧(1%O_2)37 ℃、5%CO_2,分别处理 48 h 后,取上清。300×*g* 离心 20 min 后,取上清,再以 10 000×*g* 离心 30 min 后,取上清 0.22 μm 过滤,120 000×*g* 离心 120 min 后,弃上清,PBS 重悬沉淀后再 120 000×*g* 离心 70 min,弃上清,200 μL PBS 重悬外泌体沉淀,BCA 标准曲线法测定悬液蛋白浓度,-80 ℃保存。

1.2.4 Western blot 检测外泌体标志蛋白表达 取外泌体悬液加入 1/4 体积 5×蛋白上样缓冲液,金属浴 100 ℃变性 5 min,与 U87 细胞蛋白按 10 μg/孔上样,15% SDS-PAGE 分离,250 mA 转至 0.22 μm PVDF 膜上,封闭 2 h,TBST 洗涤后分别放入 1∶1 000 稀释液配置的 CD81、CD9、Tsg101、GRP94 一抗中,4 ℃孵育过夜。次日放入兔二抗中室温孵育 1 h 后洗涤发光显色。

1.2.5 外泌体动态光散射分析(DLS) 将外泌体样本用 PBS 稀释 100 倍,使用马尔文 ZEN3600 仪器进行检测。

1.2.6 透射电镜检测外泌体形态 将外泌体样本在碳支持膜铜网放置 3~5 min,然后用滤纸吸去多余液体。将 2%磷钨酸滴在碳支持膜铜网放置 2~3 min,用滤纸吸去多余液体。在透射电子显微镜(HITACHI HT7700)下观察,采集图像进行分析。

1.2.7 外泌体摄取实验 取试剂盒复温,加 5 μL DIO 染料至 50 μL 反应液,混合至完全溶解。向混合液中加入 50 μL 外泌体样本混合,37 ℃孵育 30 min。准备分离柱,吸去上层保护液,加 200 μL 灭菌 PBS 50×*g* 离心 90 s 清洗 2 次。将孵育好的外泌体样本加入分离柱上层,50×*g* 离心 90 s 更换 EP 管为避光 1.5 mL EP 管,分离柱上层加入 200 μL 灭菌 PBS,50×*g* 离心 90 s 所得到的液体包含荧光标记外泌体。取 24 孔板,0.01%多聚赖氨酸包被细胞爬片,加入适量 U87 胶质瘤干细胞,并将荧光标记外泌体样本加入;以加入等量 PBS 作为对照,37 ℃孵育过夜后取出,用鼠抗人 α-Tubulin 单克隆抗体(1∶200)染色细胞骨架 4 ℃过夜,隔夜洗涤后染 DAPI 后封片荧光显微镜下观察。

1.2.8 CCK-8 法测定 U87 胶质瘤干细胞增殖 取 U87 胶质瘤干细胞,木瓜蛋白酶消化成单细胞,离心后用 DMEM/F12 重悬计数,取 96 孔板,边缘孔加满 PBS,每孔加入 3 000 个细胞,并分别加常氧(20%O_2Exo)和缺氧(1%O_2Exo)提取的外泌体,浓度梯度依次为 1、5、10、20、40 μg/mL,补充 SFM 至 100 μL/孔,每组设置 5 个复孔,分别于 12、24、48、72 h 加 CCK-8 试剂后 37℃孵育 4 h,于 450 nm 波长处测定光密度值 *D*(450)。细胞活力=[加外泌体组 *D*(450)值-空白组 *D*(450)值]/[未加外泌体组 *D*(450)值-空白组 *D*(450)值]×100%。

1.2.9 Transwell 法测 U87 胶质瘤干细胞迁移 取 U87 胶质瘤干细胞,木瓜蛋白酶消化成单细胞,离心后用 DMEM/F12 重悬计数,将细胞稀释至 10^5/mL,分为 3 组,空白组:加入等量 PBS,常氧组:加入常氧提取的外泌体(20%O_2Exo)50 μg/mL,缺氧组:加入缺氧提取的外泌体(1%O_2Exo)50 μg/mL。取出 Transwell 小室,向每组上室加入 200 μL 细胞悬液,下室加入 500 μL 含 10%FBS 的 DMEM 高糖培养液,置于 37 ℃培养箱中培养 24、48、72 h。随后将小室取出,棉签擦去上室细胞,PBS 清洗 3 次,4%多聚甲醛固定 30 min 后 PBS 冲洗,放于结晶紫染液中染色 30 min,再用 PBS 洗涤后晾干,于 200 倍正置显微镜下每个小室随机取 3 个视野计数细胞。

1.2.10 Western blot 检测胶质瘤干细胞迁移相关蛋白表达 取 U87 胶质瘤干细胞,木瓜蛋白酶消化成单细胞,离心后用 SFM 重悬,分组同 1.2.9,于 48 h 提取蛋白,Western blot 检测 JAK/STAT3 通路总蛋白变化和蛋白磷酸化情况。

1.3 统计学分析

采用 Image J 分析 Western blot 条带灰度值并对 Transwell 结果进行细胞计数。使用 GraphPad Prism 6 进行统计学分析。数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间差异分析

采用独立样本 t 检验。$P<0.05$ 即认为差异具有统计学意义。

2　结果

2.1　胶质瘤干细胞标志物的免疫荧光和 Western blot 鉴定

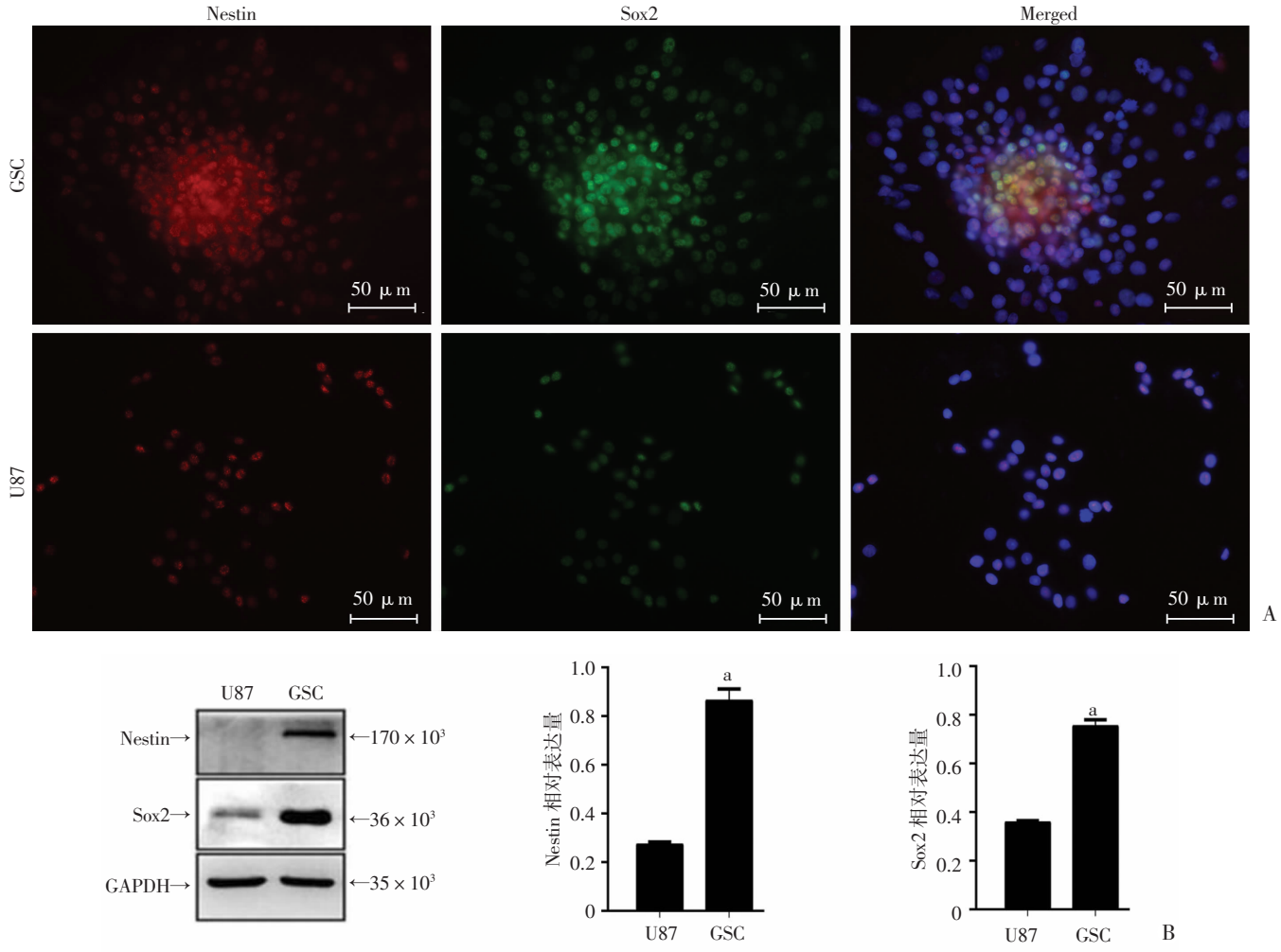
胶质瘤干细胞通常表达 Nestin、Sox2、CD133 等标志物。U87 来源的胶质瘤干细胞免疫荧光检测结果显示:与 U87 细胞株比较,U87 胶质瘤干细胞更高地表达 Nestin(红色荧光)和 Sox2(绿色荧光)。该结果在 Western blot 中也得到了相同的验证(图 1)。

2.2　超高速离心法分离外泌体的鉴定

采用超高速离心法提取细胞上清中的外泌体,透射电镜显示外泌体直径约为 50 nm(图 2A)。动态散射光分析显示在 PBS 水溶液中,考虑水化膜等因素影响,粒子直径集中在 100 nm 左右(图 2B)。此外,Tsg101、CD9、CD81 等外泌体标记物也在提取的外泌体样本中检测到有表达,提取的外泌体样本几乎不表达阴性对照 GRP94(图 2C)。表明外泌体样本中几乎不含细胞碎片等杂质。

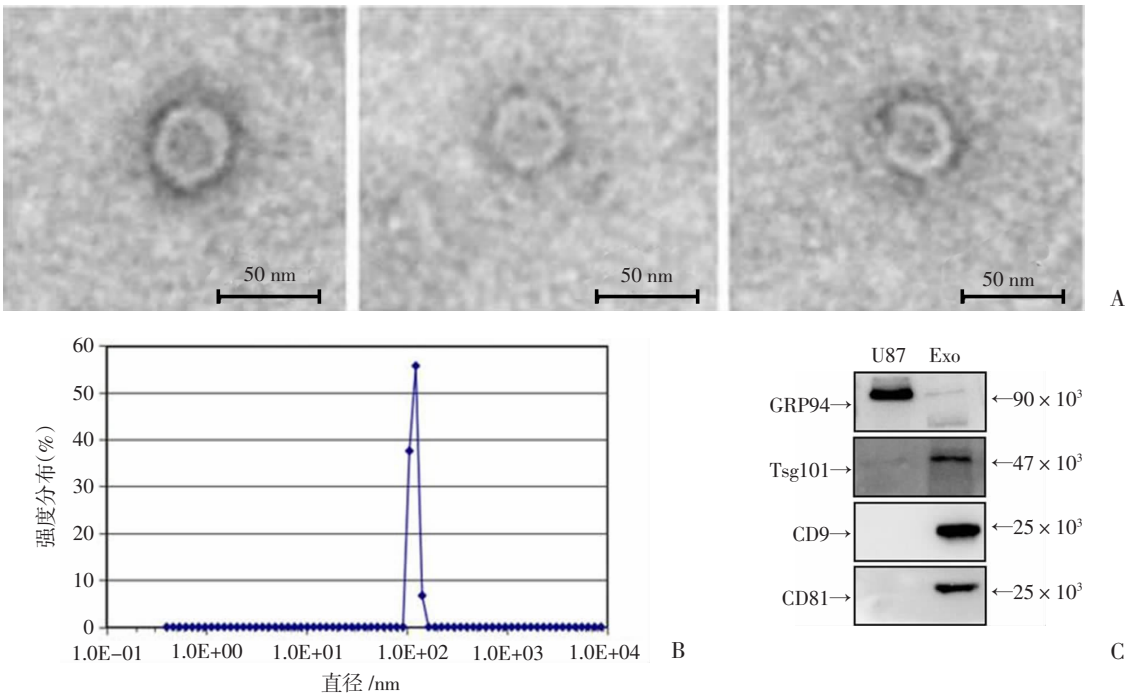
2.3　胶质瘤来源的外泌体能被胶质瘤干细胞摄取

将外泌体用 DIO 标记后,加入胶质瘤干细胞培养基中共培养 12 h,在胶质瘤干细胞的胞质中检测到外泌体携带的荧光染料 DIO(图 3)。表明胶质瘤干细胞摄取了外泌体,并暂时储存于近细胞核部位的胞质中。



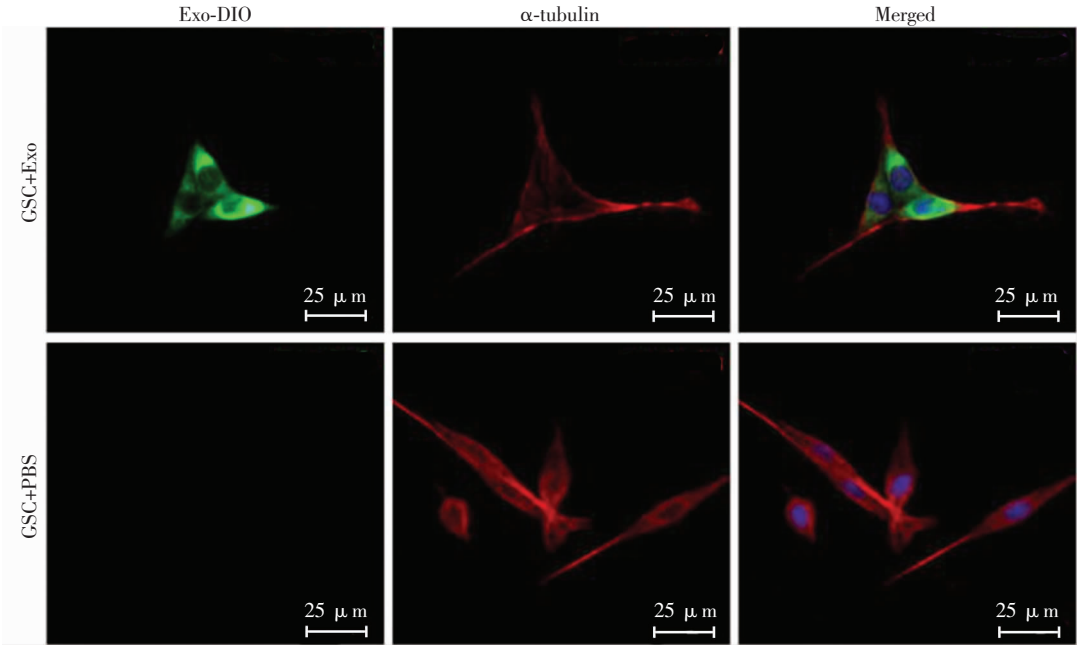
A:U87 胶质瘤干细胞(GSC)和 U87 免疫荧光鉴定;B:Western blot 检测 U87 和 GSC 中 Nestin 和 Sox2 的表达($n=3$)　a:$P<0.05$,与 U87 比较

图 1　胶质瘤干细胞标志物测定



A:透射电镜下显示不同外泌体虽有个体差异,但形态上都呈经典的茶皿状(n>3);B:动态散射光(DLS)分析外泌体样本直径(n=3);C:Western blot 检测外泌体标志蛋白 Tsg101、CD9、CD81 的表达,GRP94 为阴性对照

图 2 超高速离心法分离的外泌体鉴定

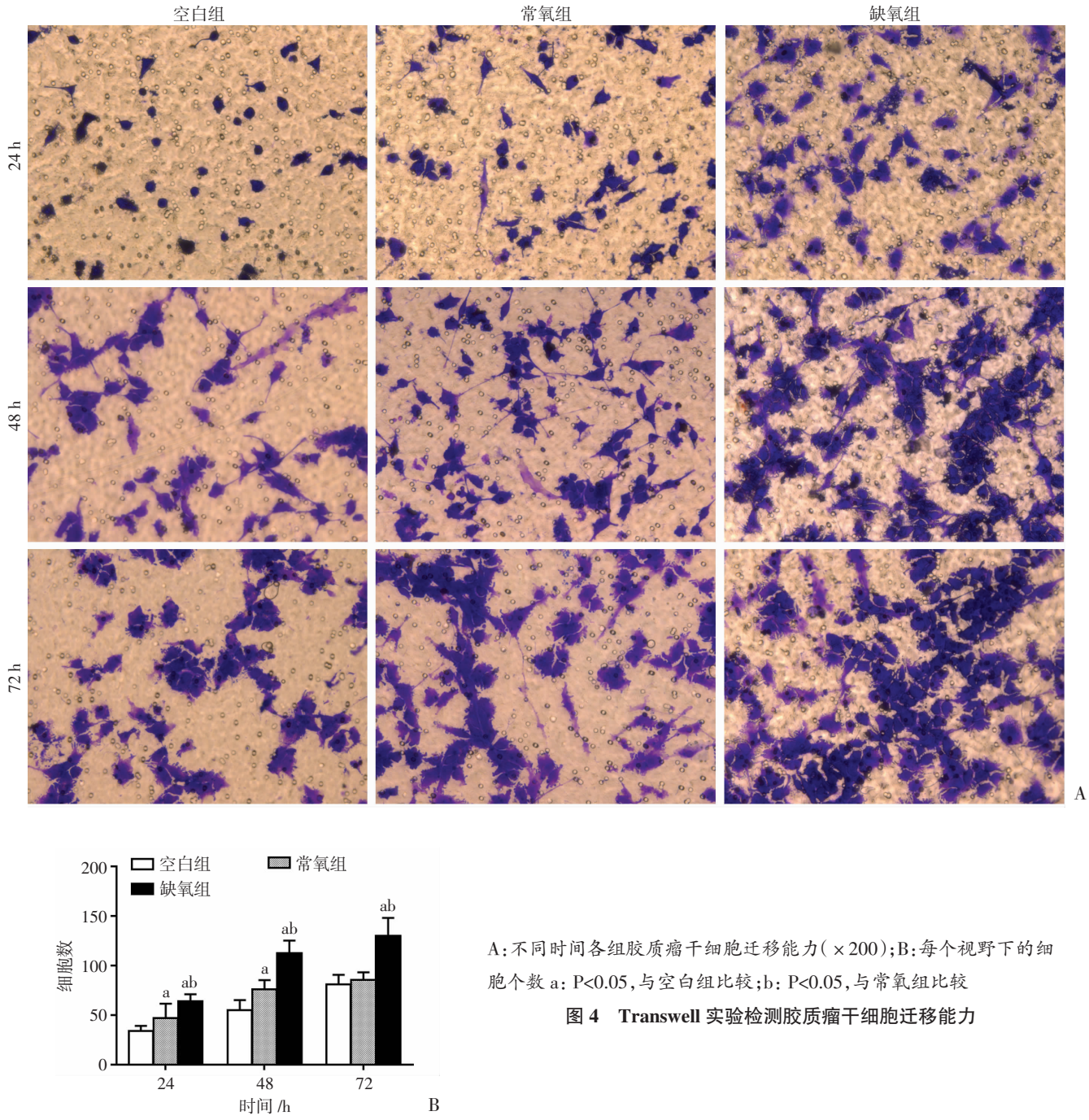


外泌体(DIO 染色,绿光)和胶质瘤干细胞(α-tubulin,红光)共培养 12 h 后能被胶质瘤干细胞摄取

图 3 免疫荧光显微镜观察 GSC 摄取染色外泌体

2.4 Transwell 实验检测胶质瘤干细胞迁移能力

培养 24、48 h,各组胶质瘤干细胞迁移能力差异均有统计学意义(P<0.05);培养 72 h,常氧组的胶质瘤干细胞迁移能力和空白组差异无统计学意义(P>0.05),但缺氧组的胶质瘤干细胞迁移能力较空白组仍然有明显提升(P<0.05,图 4)。



A:不同时间各组胶质瘤干细胞迁移能力(×200);B:每个视野下的细胞个数 a:P<0.05,与空白组比较;b:P<0.05,与常氧组比较

图 4 Transwell 实验检测胶质瘤干细胞迁移能力

2.5 CCK-8 检测胶质瘤干细胞增殖能力

CCK-8 检测结果显示:提取的外泌体以不同浓度(1、5、10、20、40 μg/mL)处理不同时间(12、24、48、72 h)后,常氧组和缺氧组胶质瘤干细胞的细胞活力差异无统计学意义(图 5)。可以排除迁移实验中的迁移能力差异是由胶质瘤干细胞内化外泌体后增殖能力提升造成的。

2.6 Western blot 检测 JAK/STAT3 通路蛋白变化

培养 48 h,缺氧组胶质瘤干细胞中的 JAK/STAT3 磷酸化水平较空白组和常氧组明显提高(P<0.05,图 6)。

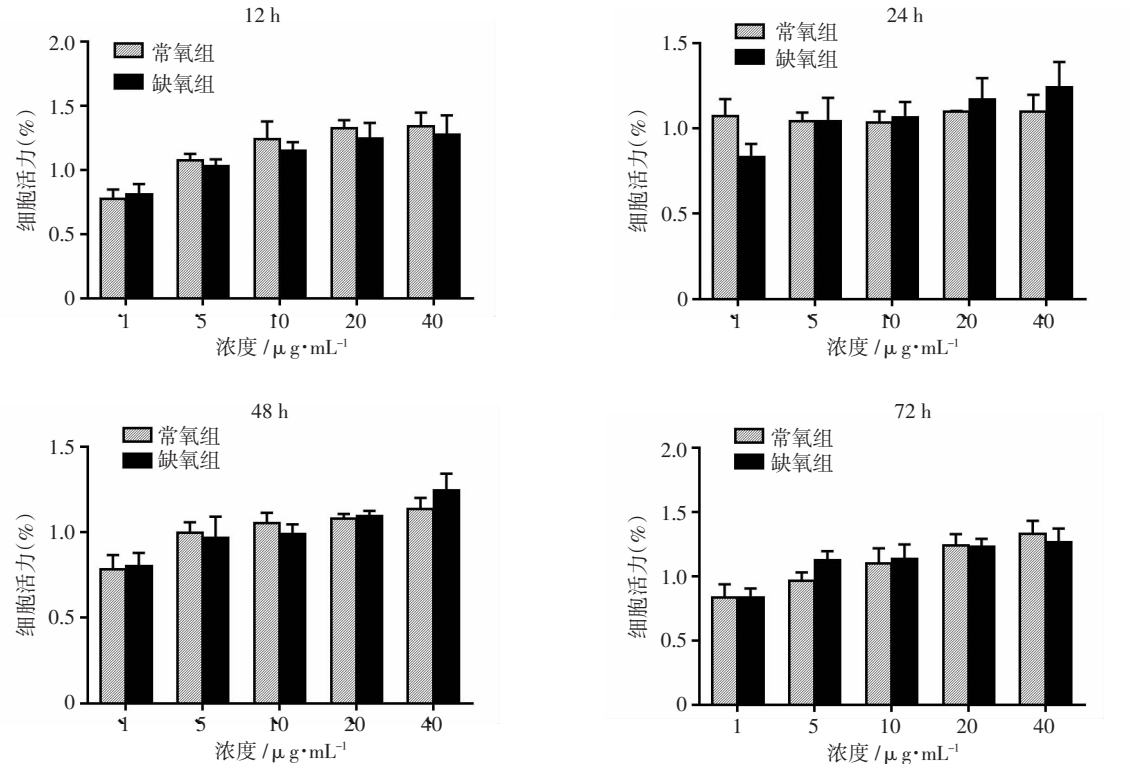
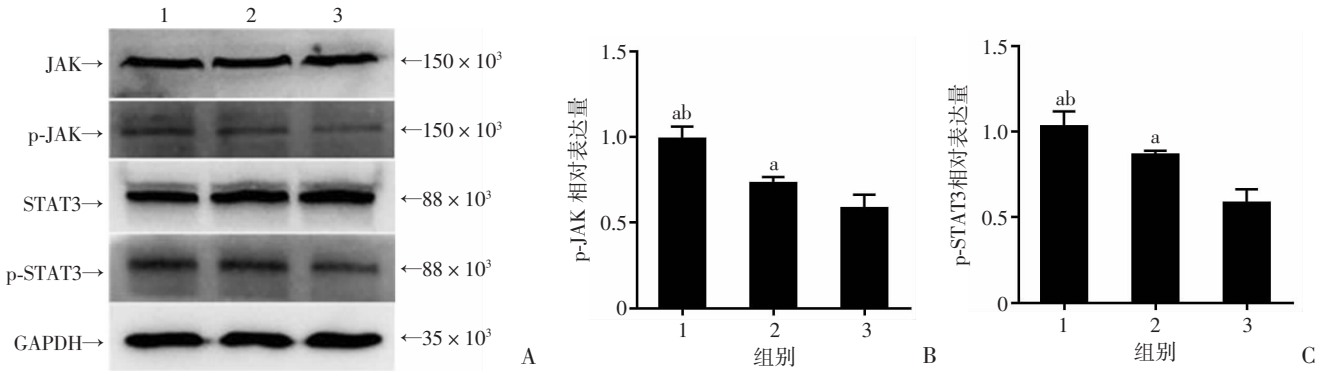


图 5 CCK-8 检测胶质瘤干细胞增殖能力 （$n=3$）



1:缺氧组;2:常氧组;3:空白组;a:$P<0.05$,与空白组比较;b:$P<0.05$,与常氧组比较

A:Western blot 检测 JAK/STAT3 总蛋白和磷酸化蛋白的表达;B:p-JAK 水平分析;C:p-STAT3 水平分析

图 6 Western blot 检测 GSC 中 JAK/STAT3 蛋白表达

3 讨论

胶质瘤的高速增殖对人类健康造成极大的危害。因胶质瘤增长极快,瘤内遍布缺氧灶,但是缺氧不仅没有限制胶质瘤的快速增殖,反而促进内皮细胞增殖、迁移和血管生成。胶质瘤干细胞是胶质瘤中具有特定病理特征细胞群体,携带 CD133、Nestin、Sox2、Olig2、Nanog 等特征性蛋白,拥有自我更新、分化、放化疗抗性以及处于静止期的能力[14],是协助肿瘤增殖和促成肿瘤复发的关键。研究表明胶质瘤干细胞在特定的条件下可以向血管周细胞分化稳定血管[3],可部分拮抗抗血管生成药物效力,低化疗药物血管壁的穿透率[3],保证胶质瘤增殖速率,使胶质瘤预后更差。

近年来,外泌体作为肿瘤细胞微环境交流介质被研究、探索,外泌体可以促进肿瘤生长、血管生成、拮抗放化疗药物、促进肿瘤转移、预形成转移微环境等[9]。目前,肿瘤细胞接收来自干细胞外泌体方面的研究较多,如胶质母细胞瘤接收 Wharton's Jelly 间充质干细

胞来源的 miR-124 后,抑制其增殖和迁移,同时增强化疗药物敏感性[15],而肿瘤细胞在不同环境条件下的外泌体对于其干细胞功能的影响有待进一步深入研究。外泌体可以传递与血管生成相关的生长因子如 VEGF、TGF-β、miR-21、CXCR4 等来促进血管生成[9]。缺氧信号可能直接作用于胶质瘤干细胞促成血管生成[2,16],本研究主要探讨缺氧信号可否由胶质瘤细胞通过外泌体传递给胶质瘤干细胞,由外泌体在微环境中的传递来促进胶质瘤干细胞发生一系列行为学和形态学变化。

胶质瘤细胞在缺氧条件下生成的外泌体具有提升胶质瘤干细胞迁移能力的作用,处理后的胶质瘤干细胞可能会向血管迁移并进一步分化,促进肿瘤血管的稳定。本研究结果显示:与空白组和常氧组比较,低氧组胶质瘤干细胞的迁移能力明显提高,该现象部分是通过上调 p-JAK 和 p-STAT3 的水平来实现的。空白组和常氧组在细胞迁移能力上表现出一定差异,低氧组胶质瘤干细胞的迁移能力提高更显著。这说明胶质瘤细胞在常氧浓度处理后,分泌的外泌体本身就可以传递部分促迁移的信号,而低氧浓度处理后分泌的外泌体在此基础上传递了更多的缺氧信号,导致干细胞迁移能力进一步上升。此外,本研究对胶质瘤细胞常氧浓度和缺氧浓度分泌的外泌体从浓度梯度(1~40 μg/mL)和时间梯度(12~72 h)检测其能否促进胶质瘤干细胞的增殖来造成迁移能力的提高。结果显示:胶质瘤细胞常氧浓度和缺氧浓度分泌的外泌体对胶质瘤干细胞的增殖促进作用没有明显的差异,说明胶质瘤干细胞迁移能力的组间差异不是由胶质瘤干细胞增殖能力的差异造成的。外泌体可传递多种可促细胞迁移的信号物质,如外泌体可以向乳腺癌细胞传递 miR-130a-3p,促进其迁移[17],向人脐静脉内皮细胞传递 miR-126,促进其迁移[18]。外泌体增加细胞迁移能力可能通过 Wnt/β-catenin[19]、PI3K/AKT/mTOR[20]、SDF-1α/CXCR4[21]等通路刺激胶质瘤干细胞迁移。本研究对可能造成细胞迁移能力改变的蛋白通路如 Wnt 通路、MAPK 通路和 JAK 通路进行验证,发现胶质瘤干细胞和胶质瘤缺氧条件下生成的外泌体共培养后,JAK 和 STAT3 的磷酸化水平明显提高,Wnt 通路、MAPK 通路蛋白的表达量差异无统计学意义(数据未展示),表明胶质瘤缺氧条件下生成的外泌体至少部分是通过提高 JAK/STAT3 通路磷酸化水平来促进 GSC 迁移的。有研究表明抗坏血酸可靶向 JAK/STAT 信号级联,继而抑制 MMP-2 介导的迁移和侵袭[22];抑制核糖体蛋白 L34 可以抑制 JAK/STAT3 信号通路,下调 p-JAK 和 p-STAT3 表达,抑制神经胶质瘤细胞的增殖和迁移[23];miR-30 的下调能够抑制 JAK/STAT3 通路并降低胶质瘤干细胞的致癌性[24];ALK4 的过表达通过抑制脑胶质瘤中 JAK/STAT3 信号通路的活化抑制细胞增殖和迁移[25]。在今后的研究中可对胶质瘤缺氧条件下生成的外泌体内部传递的因子及通路上下游关系、不同氧浓度处理的外泌体微阵列分析或高通量测序作进一步研究;此外,SAR317461 为 JAK2/STAT3 通路的抑制剂[26],或可设定 SAR317461 抑制组,进一步佐证胶质瘤缺氧条件下生成的外泌体对胶质瘤干细胞迁移能力的影响是否部分通过 JAK/STAT3 通路。

参考文献:

[1] KARSY M, GUAN J, JENSEN R, *et al*. The impact of hypoxia and mesenchymal transition on glioblastoma pathogenesis and cancer stem cells regulation[J]. World Neurosurg, 2016, 88: 222-236. DOI: 10.1016/j.wneu.2015.12.032.

[2] KUCHARZEWSKA P, CHRISTIANSON H C, WELCH J E, *et al*. Exosomes reflect the hypoxic status of glioma cells and mediate hypoxia-dependent activation of vascular cells during tumor development[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110(18): 7312-7317. DOI: 10.1073/pnas.1220998110.

[3] ZHOU W C, CHEN C, SHI Y, *et al*. Targeting glioma stem cell-derived pericytes disrupts the blood-tumor barrier and improves chemotherapeutic efficacy[J]. Cell Stem Cell, 2017, 21(5): 591-603.e4. DOI: 10.1016/j.stem.2017.10.002.

[4] KAHLERT U D, SUWALA A K, RAABE E H, *et al*. ZEB1 promotes invasion in human fetal neural stem cells and hypoxic glioma neurospheres[J]. Brain Pathol, 2015, 25(6): 724-732. DOI: 10.1111/bpa.12240.

[5] STECHISHIN O D, LUCHMAN H A, RUAN Y B, *et al*. On-target JAK2/STAT3 inhibition slows disease progression in orthotopic xenografts of human glioblastoma brain tumor stem cells[J]. Neuro Oncol, 2013, 15(2): 198-207. DOI: 10.1093/neuonc/nos302.

[6] RAHAMAN S O, HARBOR P C, CHERNOVA O, *et al*. Inhibition of constitutively active STAT3 suppresses proliferation and induces apoptosis in glioblastoma multiforme cells[J]. Oncogene, 2002, 21(55): 8404-8413. DOI: 10.1038/sj.onc.1206047.

[7] IWAMARU A, SZYMANSKI S, IWADO E, *et al*. A novel inhibitor of the STAT3 pathway induces apoptosis in malignant glioma cells both in vitro and in vivo[J]. Oncogene, 2007, 26(17): 2435-2444. DOI: 10.1038/sj.onc.1210031.

[8] XU H, ZHANG K, ZONG H, *et al*. Exosomal communication in glioma-a review[J]. J BUON, 2016, 21(6): 1368-1373.

[9] QUEZADA C, TORRES Á, NIECHI I, *et al*. Role of extracellular vesicles in glioma progression[J]. Mol Aspects Med, 2018, 60: 38-51. DOI: 10.1016/j.mam.2017.12.003.

[10] GOURLAY J, MOROKOFF A P, LUWOR R B, *et al*. The emergent role of exosomes in glioma[J]. J Clin Neurosci, 2017, 35: 13-23. DOI: 10.1016/j.jocn.2016.09.021.

[11] CHENG L, HUANG Z, ZHOU W C, *et al*. Glioblastoma stem cells generate vascular pericytes to support vessel function and tumor growth[J]. Cell, 2013, 153(1): 139-152. DOI: 10.1016/j.cell.2013.02.021.

[12] NING X F, ZHANG H R, WANG C, *et al*. Exosomes released by gastric cancer cells induce transition of pericytes into cancer-associated fibroblasts[J]. Med Sci Monit, 2018, 24: 2350-2359. DOI: 10.12659/msm.906641.

[13] ZHANG G B, ZHANG Y S, CHENG S, *et al*. CD133 positive U87 glioblastoma cells-derived exosomal microRNAs in hypoxia- versus normoxia-microenviroment[J]. J Neurooncol, 2017, 135(1): 37-46. DOI: 10.1007/s11060-017-2566-x.

[14] BAO S D, WU Q L, MCLENDON R E, *et al*. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response[J]. Nature, 2006, 444(7120): 756-760. DOI: 10.1038/nature05236.

[15] SHARIF S, GHAHREMANI M H, SOLEIMANI M. Delivery of exogenous miR-124 to glioblastoma multiform cells by wharton's jelly mesenchymal stem cells decreases cell proliferation and migration, and confers chemosensitivity[J]. Stem Cell Rev Rep, 2018, 14(2): 236-246. DOI: 10.1007/s12015-017-9788-3.

[16] SUN X, MA X T, WANG J J, *et al*. Glioma stem cells-derived exosomes promote the angiogenic ability of endothelial cells through miR-21/VEGF signal[J]. Oncotarget, 2017, 8(22): 36137-36148. DOI: 10.18632/oncotarget.16661.

[17] KONG X J, ZHANG J F, LI J, *et al*. MiR-130a-3p inhibits migration and invasion by regulating RAB5B in human breast cancer stem cell-like cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 501(2): 486-493. DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.05.018.

[18] SUN Y, LIU X L, ZHANG D, *et al*. Platelet-derived exosomes affect the proliferation and migration of human umbilical vein endothelial cells *via* miR-126[J]. Curr Vasc Pharmacol, 2019, 17(4): 379-387. DOI: 10.2174/1570161116666180313142139.

[19] MA T, FU B C, YANG X, *et al*. Adipose mesenchymal stem cell-derived exosomes promote cell proliferation, migration, and inhibit cell apoptosis *via* Wnt/β-catenin signaling in cutaneous wound healing[J]. J Cell Biochem, 2019, 120(6): 10847-10854. DOI: 10.1002/jcb.28376.

[20] HUANG W Y, DING X P, YE H B, *et al*. Hypoxia enhances the migration and invasion of human glioblastoma U87 cells through PI3K/Akt/mTOR/HIF-1α pathway[J]. Neuroreport, 2018, 29(18): 1578-1585. DOI: 10.1097/WNR.0000000000001156.

[21] LI M, LU Y, XU Y C, *et al*. Horizontal transfer of exosomal CXCR4 promotes murine hepatocarcinoma cell migration, invasion and lymphangiogenesis[J]. Gene, 2018, 676: 101-109. DOI: 10.1016/j.gene.2018.07.018.

[22] CHO H J, PARK J H, NAM J H, *et al*. Ascochlorin suppresses MMP-2-mediated migration and invasion by targeting FAK and JAK-STAT signaling Cascades[J]. J Cell Biochem, 2018, 119(1): 300-313. DOI: 10.1002/jcb.26179.

[23] JI P G, WANG L, LIU J H, *et al*. Knockdown of RPL34 inhibits the proliferation and migration of glioma cells through the inactivation of JAK/STAT3 signaling pathway[J]. J Cell Biochem, 2019, 120(3): 3259-3267. DOI: 10.1002/jcb.27592.

[24] CHE S S, SUN T T, WANG J P, *et al*. MiR-30 overexpression promotes glioma stem cells by regulating Jak/STAT3 signaling pathway[J]. Tumour Biol, 2015, 36(9): 6805-6811. DOI: 10.1007/s13277-015-3400-8.

[25] SONG C J, FAN B, XIAO Z Z. Overexpression of ALK4 inhibits cell proliferation and migration through the inactivation of JAK/STAT3 signaling pathway in glioma[J]. Biomed Pharmacother, 2018, 98: 440-445. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.12.039.

[26] MUKTHAVARAM R, OUYANG X, SAKLECHA R, *et al*. Effect of the JAK2/STAT3 inhibitor SAR317461 on human-glioblastoma tumorspheres[J]. J Transl Med, 2015, 13: 269. DOI: 10.1186/s12967-015-0627-5.

(收稿:2019-09-28;修回:2019-12-05)

(编辑 汪勤俭)