

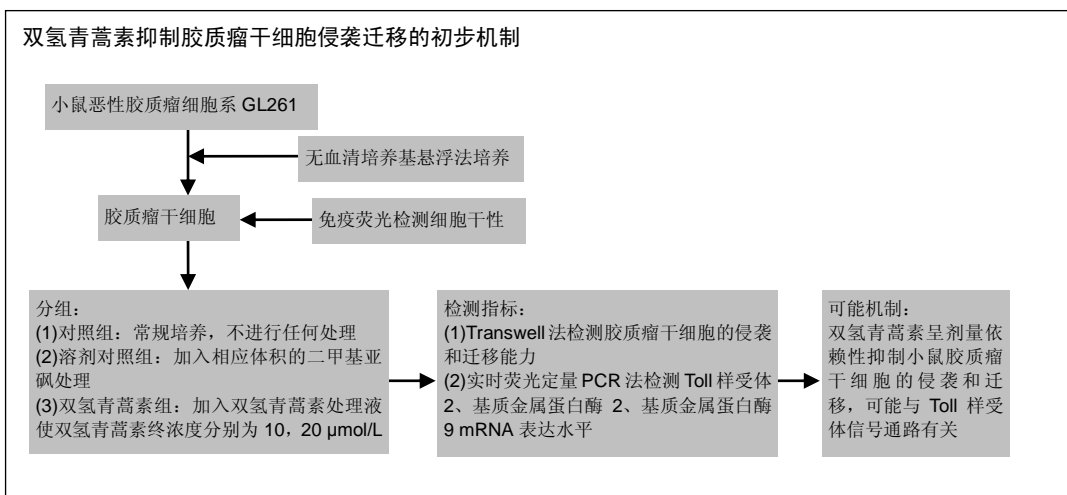
双氢青蒿素抑制胶质瘤干细胞侵袭迁移的机制

吴艳林¹, 蔡政¹, 张明智², 付晓瑞²(¹南阳市中心医院肿瘤科, 河南省南阳市 473000; ²郑州大学第一附属医院肿瘤科, 河南省郑州市 450052)

引用本文: 吴艳林, 蔡政, 张明智, 付晓瑞. 双氢青蒿素抑制胶质瘤干细胞侵袭迁移的机制[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(6):765-770.

DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.2016.06.001 ORCID: 0000-0003-2407-2159 (吴艳林)

文章快速阅读:



吴艳林, 女, 1983 年生, 河南省南阳市人, 汉族, 2008 年郑州大学医学院毕业, 主治医师, 主要从事肿瘤免疫治疗方面的研究。

中图分类号:R394.2

文献标识码:A

文章编号:2095-4344

(2016)06-00765-06

稿件接受: 2016-01-02

http://www.crter.org

文题释义:

CD133: 胶质瘤干细胞标记物 CD133 是一种跨膜蛋白, 于神经胚胎形成早期表达, 神经干细胞分化为神经元和胶质细胞后其停止表达, 研究表明, 从恶性胶质瘤中分离获得的肿瘤干细胞球有 CD133 阳性表达。CD133 阳性细胞具有很强的增殖能力及自我更新能力, CD133 阴性细胞呈贴壁生长。

Toll 样受体: Toll 样受体的表达不仅局限于机体免疫细胞, 在分化组织的上皮细胞、女性生殖系统及造血干细胞同样有 Toll 样受体的表达。近年来, 越来越多研究证实在人类肿瘤及肿瘤细胞系同样有 Toll 样受体的表达, Toll 样受体在由癌前病变进展到肿瘤的过程中发挥重要作用。

摘要

背景: 已有研究表明双氢青蒿素具有促进胶质瘤 GL261 细胞凋亡的作用, 但其对胶质瘤干细胞的作用尚不清楚。

目的: 探讨双氢青蒿素抑制胶质瘤干细胞侵袭迁移及其初步机制。

方法: 从小鼠恶性胶质瘤细胞系 GL261 中分离培养胶质瘤干细胞, 免疫荧光检测胶质瘤干细胞的干性特征; Transwell 法和实时荧光定量 PCR 法检测经不同浓度双氢青蒿素处理后胶质瘤干细胞的侵袭和迁移能力的变化, 以及 Toll 样受体 2、基质金属蛋白酶 2、基质金属蛋白酶 9 mRNA 表达水平。

结果与结论: 经分离培养得到胶质瘤干细胞显示干性标记 CD133 与 Nestin; 经不同浓度双氢青蒿素处理后, 胶质瘤干细胞的侵袭和迁移能力减弱; Toll 样受体 2、基质金属蛋白酶 2、基质金属蛋白酶 9 mRNA 表达水平均降低, 并呈剂量依赖性, 提示双氢青蒿素具有抑制小鼠胶质瘤干细胞的侵袭和迁移能力, 可能与 Toll 样受体信号通路有关。

关键词:

干细胞; 肿瘤干细胞; 双氢青蒿素; 胶质瘤干细胞; 侵袭; 迁移; Toll 样受体 2; 基质金属蛋白酶 2; 基质金属蛋白酶 9

主题词:

青蒿素类; 神经胶质瘤; 肿瘤干细胞; Toll 样受体; 组织工程

基金资助:

河南省教育厅科学技术研究重点资助项目(13A320413)

Wu Yan-lin, Attending physician, Department of Oncology, Nanyang Centre Hospital, Nanyang 473000, Henan Province, China

Mechanism by which dihydroartemisinin inhibits invasion and migration of glioma stem cells

Wu Yan-lin¹, Cai Zheng¹, Zhang Ming-zhi², Fu Xiao-rui² (¹Department of Oncology, Nanyang Centre Hospital, Nanyang 473000, Henan Province, China; ²Department of Oncology, First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Dihydroartemisinin can promote apoptosis of glioma cells GL261, but its effect on glioma stem cells is still unknown.

OBJECTIVE: To investigate the preliminary mechanism that dihydroartemisinin inhibits migration and invasion of glioma stem cells.

METHODS: Glioma stem cells were isolated from mouse malignant glioma cell lines GL261.

Immunofluorescence analysis was conducted to identify the characteristics of glioma stem cells. Migration and invasion abilities of glioma stem cells were analyzed by Transwell assay. The mRNA expressions of Toll-like receptor 2, matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 were examined by real-time fluorescence quantitative PCR.

RESULTS AND CONCLUSION: The characteristics of glioma stem cells were identified by CD133 and Nestin staining. The migration and invasion of glioma stem cells were attenuated by dihydroartemisinin dose-dependently. Moreover, the mRNA expression of Toll-like receptor 2, matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 was also decreased by dihydroartemisinin in a dose dependent manner. These results suggest that dihydroartemisinin inhibits the migration and invasion of glioma stem cells probably through attenuation of Toll-like receptor signaling pathway.

Subject headings: Artemisinins; Glioma; Neoplastic Stem Cells; Toll-Like Receptors; Tissue Engineering

Funding: the Major Scientific Funding Project of Henan Provincial Education Department, No. 13A320413

Cite this article: Wu YL, Cai Z, Zhang MZ, Fu XR. Mechanism by which dihydroartemisinin inhibits invasion and migration of glioma stem cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2016;20(6):765-770.

0 引言 Introduction

胶质瘤是中枢神经系统肿瘤中最常见的实体肿瘤,在脑肿瘤中占40%–50%^[1]。在中枢神经系统的各种组织学类型肿瘤中,星形胶质细胞起源的恶性胶质瘤具有迅速增殖、强侵袭性和化疗耐受性等特点,致死率高,预后较差,平均生存期约为14.6个月^[2-4]。脑胶质瘤治疗的主要障碍在于复发率高,这与胶质瘤细胞的增殖能力和侵袭性生长有密切关系。胶质瘤干细胞是胶质瘤的起源细胞,具有类似神经干细胞的某些生物学特性,如分化成神经元,表达Nestin、CD133等神经干细胞表面标记物。国外研究表明胶质瘤干细胞移植到非肥胖性糖尿病和重症联合免疫缺陷裸鼠中具有致瘤能力^[5]。胶质瘤干细胞可能是引发胶质瘤并维持其生长的主要细胞来源,在胶质瘤的复发过程中起决定作用。

目前脑胶质瘤的治疗方法主要有手术、化疗与放疗等手段,但均不能取得良好的疗效。采用烷化剂联合化疗的患者2年生存率仅为26.5%,中位生存时间为14.6个月,预后效果仍差强人意,复发率高^[6]。对于恶性胶质瘤患者的手术和放化疗效果仍未得到满意的结果,自患者确诊后的生存期不超过15个月^[7]。在过去的20多年,虽然神经影像学技术和显微外科技术的进步取得巨

大的进步,极大地推动了神经外科的发展,但手术仍难以彻底切除肿瘤。手术后辅以放射治疗可以提高胶质瘤的治疗效果,但由于放射剂量的限制和有相当一部分肿瘤对放疗不敏感,大多数肿瘤难免复发^[8]。脑肿瘤干细胞的发现丰富了对胶质瘤发生机制的认识,也为胶质瘤的治疗提供了新模式^[9]。Singh等^[10]从脑肿瘤及其细胞系中分离培养得到脑肿瘤干细胞,并发现这类细胞表达人类干细胞标志物CD133。与其他肿瘤干细胞一样,胶质瘤干细胞也可分化成与原发肿瘤相似的肿瘤细胞表型^[11]。Singh等^[12]从两类具有免疫活性的小鼠模型中提取出肿瘤干细胞,并制备为树突状细胞疫苗,可以强化抗体和T细胞选择性靶向肿瘤干细胞的能力。

双氢青蒿素(dihydroartemisinin, DHA)作为高效低毒的抗疟药已得到全世界的公认,近年来许多国内外学者研究发现双氢青蒿素可诱导多种细胞发生凋亡,尤其是诱导肿瘤细胞凋亡,因此,双氢青蒿素具有广谱抗癌活性。实验从小鼠恶性胶质瘤细胞系GL261中分离培养得到胶质瘤干细胞,给予双氢青蒿素干预,用Transwell小室检测各组细胞的侵袭和迁移能力,并通过qRT-PCR检测其Toll样受体2、基质金属蛋白酶2, 9 mRNA表达水平,为临床利用双氢青蒿素治疗胶质瘤提供实验依据。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞学体外观察实验。

1.2 时间及地点 于2014年2月至11月在郑州大学第一附属医院药理实验室完成。

1.3 材料 小鼠恶性胶质瘤细胞系GL261购自美国典型菌株保藏中心(ATCC); 兔抗CD133(台湾Abnova公司), 小鼠抗Nestin(北京中杉金桥生物技术有限公司), Hoechst33342染色液(美国Invitrogen公司), 胰蛋白酶、胎牛血清、DMEM/F12培养基(美国HyClone公司), Transwell小室(美国Millipore公司), 实时荧光定量PCR试剂盒(美国Fermentas公司), 多聚甲醛(碧云天生物技术有限公司), 结晶紫(美国Sigma公司), 倒置显微镜(日本Olympus公司), 荧光倒置显微镜(日本Leica公司), CFX98荧光定量PCR仪(美国Bio-rad公司)。双氢青蒿素(南京泽郎医药科技有限公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 细胞培养 小鼠恶性胶质瘤细胞系GL261用体积分数为10%胎牛血清的DMEM完全培养基, 置于37 °C、体积分数为5%CO₂、相对湿度95%的培养箱中培养。将处于对数生长期的细胞按2×10³/cm²细胞密度接种于DMEM/F12无血清培养基中, 置于37 °C、体积分数为5%CO₂、相对湿度95%的培养箱中培养, 3 d后换液, 6 d后用胰蛋白酶消化吹打制成单细胞悬液, 再次以2×10³/cm²接种于24孔板中。传代3次后的细胞球认为是胶质瘤干细胞^[13]。

1.4.2 免疫荧光检测细胞干性特征 收集分离培养得到的胶质瘤干细胞, 倾去培养基, PBS洗涤2次, 用40 g/L多聚甲醛固定30 min, PBS洗涤3次。加入封闭液封闭1 h, 加入相应一抗置于湿盒中4 °C孵育过夜, 再加入相应二抗, 37 °C孵育1 h; 加入Hoechst33342染色液10 min, PBS洗涤3次, 封固, 于荧光显微镜下观察。

1.4.3 实验分组 将双氢青蒿素溶解于二甲基亚砜中, 配置成双氢青蒿素处理液。分组如下: ①对照组: 采用常规培养基进行细胞培养, 不进行任何处理。②溶剂对照组: 加入相应体积的二甲基亚砜处理24 h。③药物处理组: 常规培养基中加入双氢青蒿素处理液使双氢青蒿素终浓度为10, 20 μmol/L, 培养24 h。

1.4.4 Transwell侵袭实验 分别收集胶质瘤干细胞, 离心弃去上清液, 调整细胞浓度为2.5×10⁸ L⁻¹, 向已用Matrigel包被的小室底部膜上室面的小室中加入200 μL细胞悬液, 并在下室中加入500 μL含有体积分数为10%胎牛血清的DMEM培养基; 将Transwell小室置于37 °C,

体积分数为5%CO₂的培养箱中培养24 h, 弃去上室培养液, 用40 g/L多聚甲醛固定15 min, PBS洗涤, 结晶紫染色5 min, 蒸馏水漂洗, 用棉签轻轻擦去小室底膜上方的细胞, 晾干, 将小室置于光学显微镜下观察, 计数。

1.4.5 Transwell迁移实验 迁移实验操作步骤与侵袭实验基本相同, 其中Transwell小室不需要用Matrigel包被。

1.4.6 qRT-PCR检测Toll样受体2、基质金属蛋白酶2、基质金属蛋白酶9 mRNA表达水平 按照Trizol说明书裂解细胞, 使用氯仿提取总RNA, 建立反转录反应, 引物序列见表1。

表1 目的基因引物序列

Table 1 Primer sequence of target genes

目的基因	引物序列	目的片段大小
Toll 样受体 2	5'-AGT TTT CAC CAC TGC CCG TA-3'	208 bp
基质金属蛋白酶 2	5'-CCC AGC TCG CTC ACT ACG TC-3'	143 bp
基质金属蛋白酶 9	5'-GGG TGG AAG GCT CGT CAA TG-3'	229 bp
GAPDH	5'-TGG GTT TTT AGG AGA CAC CAA TG-3'	241 bp
	5'-GCA GAG GCA TAC TTG TAC CG-3'	
	5'-TGA TGT TAT GAT GGT CCC ACT TG-3'	
	5'-GGG AGA CAG AAC CCA ACA G-3'	
	5'-CGC TCC TGG AAG ATA CTG AT-3'	

扩增条件为: 95 °C 5 min; 93 °C 35 s、65 °C 30 s、72 °C 1 min, 35个循环。反应结束后, 标准曲线和扩增曲线由PCR仪器自动生成, 用紫外分光光度法测定RNA样品的A_{260 nm}值, 并进行定量。将目的基因与内参基因进行比较, 得出目的基因相对表达量的变化, 所得结果直接在荧光定量操作软件中进行分析比较。

1.5 主要观察指标 ①CD133与Nestin蛋白表达水平。②胶质瘤干细胞的侵袭和迁移能力。③Toll样受体2、基质金属蛋白酶2、基质金属蛋白酶9 mRNA表达水平。

1.6 统计学分析 各实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。方差分析采用Bonferoni(LSD)法进行比较, 由SPSS 15.0软件包完成, P < 0.05为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 对培养的胶质瘤干细胞干性的鉴定 收集第3代以上的肿瘤球细胞, 采用免疫细胞化学法对干细胞的表面标记物CD133与Nestin的表达情况进行鉴定。对细胞球进行Nestin与CD133免疫荧光染色后, CD133主要表达在细胞膜上, Nestin可表达在细胞膜和细胞浆中, 观察到细胞团分别呈现强绿色荧光和红色荧光, 如图1所示, 细胞团中富集了大量CD133与Nestin阳性的胶质瘤干细胞。

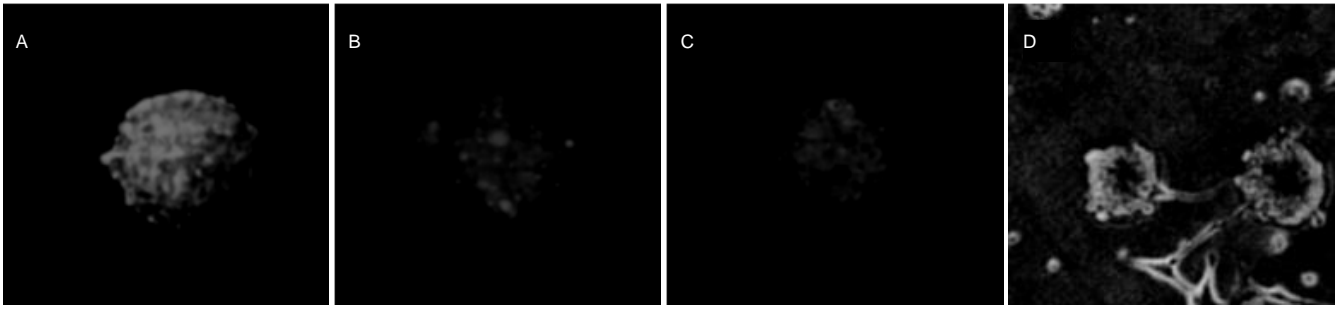


图1 肿瘤球细胞免疫荧光细胞染色(x400)

Figure 1 Immunofluorescence staining of tumor spheres (x400)

图注: 图中 A 为 Nestin 染色, 显示强绿色荧光; B 为 CD133 染色, 显示强红色荧光; C 为阴性对照; D 为培养基中培养形成的肿瘤球细胞。

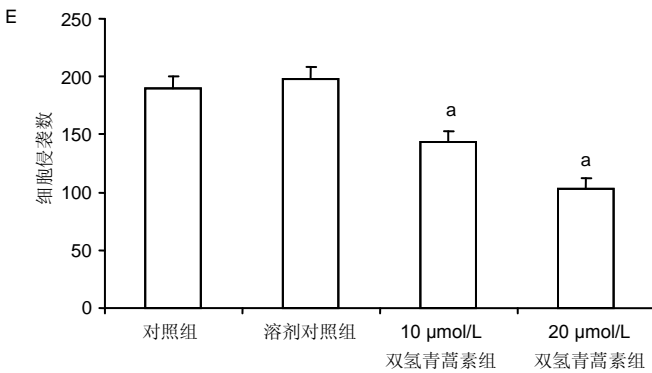
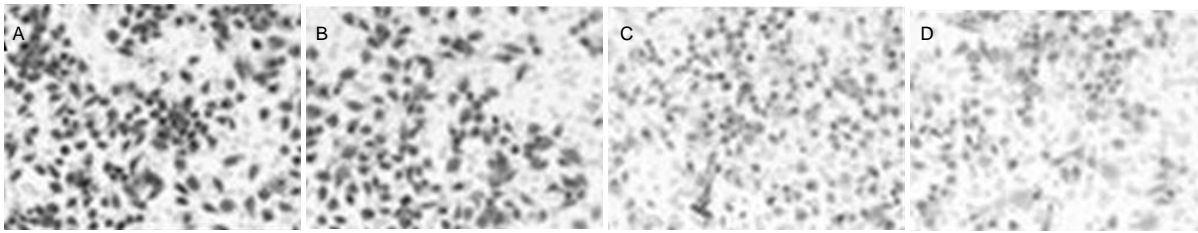


图2 不同浓度双氢青蒿素对各组细胞侵袭能力的影响(x200)

Figure 2 Effect of different concentrations of dihydroartemisinin on the invasion ability of glioma stem cells (x200)

图注: 图中 A 为对照组; B 为溶剂对照组; C 为 10 μmol/L 双氢青蒿素处理组; D 为 20 μmol/L 双氢青蒿素处理组; E 为显微镜下计数分析结果, 与对照组相比, ^a $P < 0.05$ 。

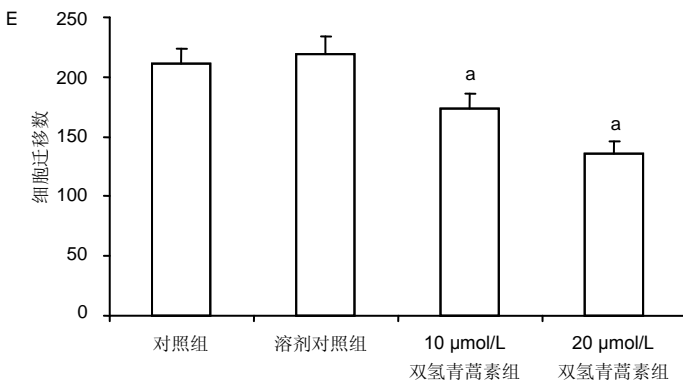
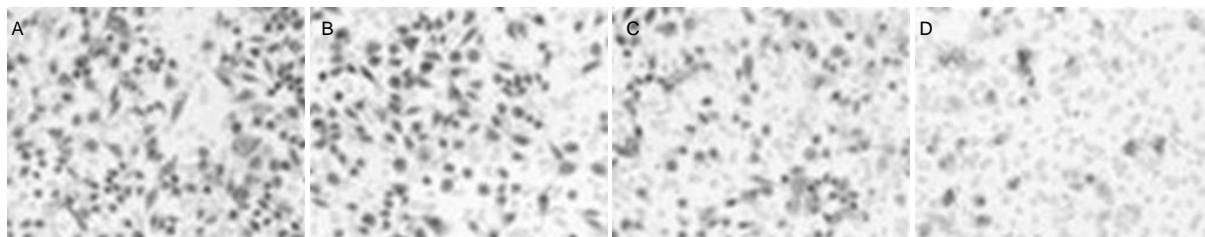


图3 不同浓度双氢青蒿素对各组细胞迁移能力的影响(x200)

Figure 3 Effect of different concentrations of dihydroartemisinin on the migration ability of glioma stem cells (x200)

图注: 图中 A 为对照组; B 为溶剂对照组; C 为 10 μmol/L 双氢青蒿素处理组; D 为 20 μmol/L 双氢青蒿素处理组; E 为显微镜下计数分析结果, 与对照组相比, ^a $P < 0.05$ 。

2.2 Transwell侵袭和迁移实验结果 采用10, 20 μmol/L 双氢青蒿素处理24 h后, 进行Transwell侵袭和迁移实验, 见图2, 3。经过不同浓度的双氢青蒿素处理后, 侵

袭和迁移的细胞数显著低于对照组($P < 0.05$), 并与双氢青蒿素浓度呈负相关。对照组和溶剂对照组间差异无显著性意义($P > 0.05$), 提示双氢青蒿素呈浓度依赖性

能抑制胶质瘤干细胞的侵袭和迁移能力。

2.3 Toll样受体2、基质金属蛋白酶2、基质金属蛋白酶9 mRNA表达水平 采用qRT-PCR检测经不同浓度双氢青蒿素处理后, 胶质瘤干细胞中Toll样受体2 mRNA表达水平显著低于对照组($P < 0.05$), 基质金属蛋白酶2和基质金属蛋白酶9 mRNA表达水平显著低于对照组($P < 0.05$), 并随双氢青蒿素的浓度增加而降低程度增加。对照组和溶剂对照组间差异无显著性意义($P > 0.05$), 其中20 $\mu\text{mol/L}$ 双氢青蒿素处理组的Toll样受体2、基质金属蛋白酶2和基质金属蛋白酶9 mRNA表达最低, 见图4。双氢青蒿素呈浓度依赖性抑制胶质瘤干细胞的机制可能与Toll样受体2、基质金属蛋白酶2和基质金属蛋白酶9有关。

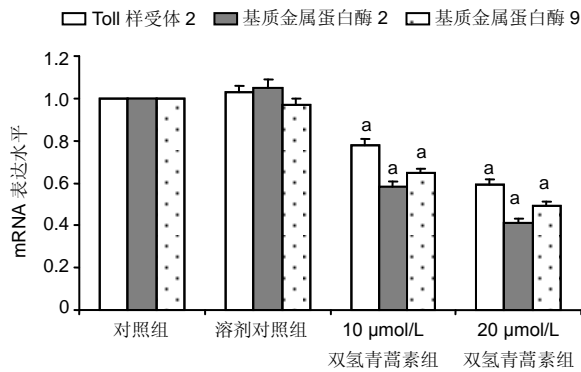


图4 不同浓度的双氢青蒿素对 Toll 样受体 2、基质金属蛋白酶 2、基质金属蛋白酶 9 mRNA 表达水平的影响

Figure 4 The mRNA expression of Toll-like receptor 2, matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 after intervention with different concentrations of dihydroartemisinin
 图注: 与对照组相比, $^aP < 0.05$ 。

3 讨论 Discussion

青蒿素及其衍生物作为高效低毒的抗疟药已经得到了很好的临床验证。研究指出双氢青蒿素对乳腺癌、肺癌以及血液系统等肿瘤细胞具有明显地杀灭作用^[14-15]。尹怡等^[16]研究发现双氢青蒿素能够通过抑制抗凋亡蛋白 Bcl-xl、诱导 Caspase-3 激活途径促进胶质瘤 GL261 细胞凋亡。已有报道指出双氢青蒿素可以通过血脑屏障, 使之在脑内可达到有效的药物浓度, 可以用于治疗中枢神经系统肿瘤^[17-18]。胶质瘤干细胞是导致胶质瘤侵袭的重要细胞基础, 且对放化疗具有明显的抗性, 外科手术无法彻底清除肿瘤细胞^[19]。实验研究发现双氢青蒿素处理后的小鼠胶质瘤干细胞的侵袭和迁移能力显著下降, 提示双氢青蒿素可能具有降低胶质瘤复发率的疗效。

研究表明 Toll 样受体具有促进肿瘤细胞增殖生长和侵袭的作用, 抑制肿瘤细胞发生凋亡^[20-22]。多项报道指

出 Toll 样受体在结肠癌细胞、乳腺癌细胞、前列腺癌细胞、肝癌细胞等多种肿瘤细胞中均有表达^[23-25]。有报道发现 Toll 样受体 2 可以通过激活 NF- κ B 通路来促进 MDA-MB-231 乳腺癌细胞发生侵袭, 从而导致乳腺癌细胞的迅速扩散^[26]。基质金属蛋白酶具有降解细胞外基质中各种蛋白成分, 从而破坏肿瘤细胞侵袭的组织学障碍, 从而促进细胞移动, 因此, 在肿瘤细胞的侵袭迁移中起关键作用^[27], 其中基质金属蛋白酶 2 和基质金属蛋白酶 9 的高表达与胶质瘤恶性程度呈正相关^[28]。qRT-PCR 检测发现, 经双氢青蒿素处理后的胶质瘤干细胞中 Toll 样受体 2、基质金属蛋白酶 2、基质金属蛋白酶 9 mRNA 表达水平均显著下降, 提示双氢青蒿素抑制胶质瘤细胞侵袭和迁移的机制可能与 Toll 样受体 2、基质金属蛋白酶 2、基质金属蛋白酶 9 有关, 详细机制需要开展进一步实验。

由于恶性脑胶质瘤的浸润性生长特性, 肿瘤组织与周围脑组织边界不清, 手术治疗完全切除肿瘤组织十分困难。在过去的 20 多年, 神经影像学技术和显微外科技术取得巨大的进步, 极大地推动了神经外科的发展, 但手术仍难以彻底切除肿瘤^[29]。放疗化疗的不良反应大, 部分患者对此不敏感, 仍有较高的复发率^[30]。实验发现双氢青蒿素对胶质瘤干细胞具有抑制迁移和侵袭的作用, 估计能有效降低肿瘤的复发, 因此具有良好的发展前景。

作者贡献: 实验设计为吴艳林, 实验实施为吴艳林、蔡政, 实验评估为张明智, 资料收集为付晓瑞。

利益冲突: 所有作者共同认可文章无相关利益冲突。

伦理问题: 没有与相关伦理道德冲突的内容。

文章查重: 文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 本刊实行双盲外审制度, 文章经国内小同行外审专家审核, 符合本刊发稿宗旨。

作者声明: 文章第一作者对研究和撰写的论文中出现的不端行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁, 可接受核查。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

4 参考文献 References

- [1] Hess KR, Broglio KR, Bondy ML. Adult glioma incidence trends in the United States, 1977-2000. *Cancer*. 2004;101(10):2293-2299.

- [2] Rosenfeld MR, Pruitt AA. Management of malignant gliomas and primary CNS lymphoma: standard of care and future directions. *Continuum (Minneapolis, Minn)*. 2012;18(2):406-415.
- [3] Bexell D, Svensson A, Bengzon J. Stem cell-based therapy for malignant glioma. *Cancer Treat Rev*. 2013;39(4):358-365.
- [4] Cheng L, Wu Q, Guryanova OA, et al. Elevated invasive potential of glioblastoma stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;406(4):643-648.
- [5] Khoshnevisan A. An overview of therapeutic approaches to brain tumor stem cells. *Med J Islam Repub Iran*. 2012;26(1):31-40.
- [6] 戴宜武,王振光,秦家振.脑胶质瘤治疗进展[J].中华临床医师杂志:电子版,2013,7(14):6225-6228.
- [7] Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*. 2005;352(10):987-996.
- [8] 孙增峰,李文良,谷峰,等.胶质瘤耐药相关机制的研究进展[J].中华肿瘤防治杂志,2011,18(7):551-556.
- [9] Van Meir EG, Hadjipanayis CG, Norden AD, et al. Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma. *CA Cancer J Clin*. 2010;60(3):166-193.
- [10] Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*. 2004;432(7015):396-401.
- [11] 陈垒.MicroRNA-107在胶质瘤和胶质瘤干细胞中的生物学功能研究[D].广州:南方医科大学,2013.
- [12] Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res*. 2003;63(18):5821-5828.
- [13] 王凡.Toll样受体2在胶质瘤干细胞侵袭迁移中的作用及其机制探讨[D].重庆:第三军医大学,2012.
- [14] Mao H, Gu H, Qu X, et al. Involvement of the mitochondrial pathway and Bim/Bcl-2 balance in dihydroartemisinin-induced apoptosis in human breast cancer in vitro. *Int J Mol Med*. 2013;31(1):213-218.
- [15] Zhang JL, Wang Z, Hu W, et al. DHA regulates angiogenesis and improves the efficiency of CDDP for the treatment of lung carcinoma. *Microvasc Res*. 2013;87:14-24.
- [16] 尹怡,曹鏊,李飞,等.双氢青蒿素促进胶质瘤GL261细胞的凋亡[J].第三军医大学学报,2013,35(12):1179-1182.
- [17] Davis TM, Binh TQ, Ilett KF, et al. Penetration of dihydroartemisinin into cerebrospinal fluid after administration of intravenous artesunate in severe falciparum malaria. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47(1):368-370.
- [18] Zhou HJ, Wang Z, Li A. Dihydroartemisinin induces apoptosis in human leukemia cells HL60 via downregulation of transferrin receptor expression. *Anticancer Drugs*. 2008;19(3):247-255.
- [19] Chen J, McKay RM, Parada LF. Malignant glioma: lessons from genomics, mouse models, and stem cells. *Cell*. 2012;149(1):36-47.
- [20] Jego G, Bataille R, Geffroy-Luseau A, et al. Pathogen-associated molecular patterns are growth and survival factors for human myeloma cells through Toll-like receptors. *Leukemia*. 2006;20(6):1130-1137.
- [21] Szczepanski MJ, Czystowska M, Szajnik M, et al. Triggering of Toll-like receptor 4 expressed on human head and neck squamous cell carcinoma promotes tumor development and protects the tumor from immune attack. *Cancer Res*. 2009;69(7):3105-3113.
- [22] Huang B, Zhao J, Li H, et al. Toll-like receptors on tumor cells facilitate evasion of immune surveillance. *Cancer Res*. 2005;65(12):5009-5014.
- [23] Nair P, O'Donnell CM, Janasek K, et al. Lipopolysaccharide-treated mammary carcinomas secrete proinflammatory chemokines and exhibit reduced growth rates in vivo, but not in vitro. *Immunol Invest*. 2009;38(8):730-748.
- [24] Xie W, Huang Y, Xie W, et al. Bacteria peptidoglycan promoted breast cancer cell invasiveness and adhesiveness by targeting toll-like receptor 2 in the cancer cells. *PLoS One*. 2010;5(5):e10850.
- [25] Watts C, West MA, Zaru R. TLR signalling regulated antigen presentation in dendritic cells. *Curr Opin Immunol*. 2010;22(1):124-130.
- [26] Xie W, Wang Y, Huang Y, et al. Toll-like receptor 2 mediates invasion via activating NF-kappaB in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;379(4):1027-1032.
- [27] 董玮.基质金属蛋白酶2诱导大肠癌肿瘤细胞增殖与侵袭的试验研究[D].吉林:吉林大学,2012.
- [28] Forsyth PA, Wong H, Laing TD, et al. Gelatinase-A (MMP-2), gelatinase-B (MMP-9) and membrane type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) are involved in different aspects of the pathophysiology of malignant gliomas. *Br J Cancer*. 1999;79(11-12):1828-1835.
- [29] Van Meir EG, Hadjipanayis CG, Norden AD, et al. Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma. *CA Cancer J Clin*. 2010;60(3):166-193.
- [30] 程金湘.胶质瘤患者健康相关生命质量研究[D].西安:第四军医大学,2013.