

细胞色素 P450 基因修饰的脐带间充质干细胞联合环磷酰胺对急性 B 淋巴细胞白血病的治疗作用

王立华¹, 李欣^{2,3}, 苗丽^{2,3}, 米一^{2,3}, 张晨亮^{2,3}, 马静^{2,3}, 刘拥军^{2,3}, 刘广洋^{2,3*}

1. 河北医科大学第二医院血液内科, 河北 石家庄 053600

2. 北京贝来生物科技有限公司, 北京 100176

3. 北京市亦创生物技术产业研究院干细胞与再生医学研究所, 北京 100176

摘要: 目的 研究细胞色素 P450 (Cyt P450) 基因修饰的脐带间充质干细胞 (UC-MSCs) 联合环磷酰胺 (CPA) 对急性 B 淋巴细胞白血病的治疗作用。方法 通过基因工程方法设计 Cyt P450 2B6 (CYP2B6) 基因序列, 采用慢病毒载体基因转染 UC-MSCs, 得到可高表达 CYP2B6 蛋白的 CYP2B6-MSC 种子细胞。采用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测 CYP2B6 基因的表达评估转染效果; 采用流式细胞术检测 CYP2B6 细胞表面标志物表达; 采用体外诱导分化检测 CYP2B6 细胞分化能力。将 CYP2B6-MSC 与 Nalm-6 共培养, CCK8 法和 Annexin-V FITC/PI 试剂盒检测 UC-MSCs/CYP2B6-MSC 联合 CPA 对 Nalm-6 细胞的增殖和凋亡的影响。结果 qRT-PCR 检测结果显示, CYP2B6-MSC 可高表达 CYP2B6 蛋白, 而 hUC-MSC (对照组细胞) 不表达 CYP2B6 蛋白; 流式细胞术及诱导分化检测发现, CYP2B6 基因修饰后的 MSC 流式表型及分化能力均未有显著变化; 肿瘤杀伤实验发现, CYP2B6-MSC 与 Nalm-6 细胞共培养, 同时加入 CPA 后, 与 UC-MSC 及未加 CPA 组比较, CYP2B6-MSC+CPA 对 Nalm-6 细胞具有显著的增殖抑制及促凋亡作用 ($P < 0.01$)。结论 CYP2B6 基因修饰后的 MSC 联合 CPA 对 Nalm-6 具有显著的生长抑制和促凋亡作用。

关键词: 基因介导的酶前药治疗; 细胞色素 P450 2B6; 脐带间充质干细胞; 环磷酰胺; 急性 B 淋巴细胞白血病; 增殖抑制; 凋亡

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2020) 03-0423-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2020.03.010

Therapy effect for B acute lymphocytic leukemia using umbilical cord derived mesenchymal stem cells transferred with cytochrome P450 combined with cyclophosphamide

WANG Lihua¹, LI Xin^{2,3}, MIAO Li^{2,3}, MI Yi^{2,3}, ZHANG Chenliang^{2,3}, MA Jing^{2,3}, LIU Yongjun^{2,3}, LIU Guangyang^{2,3}

1. Department of Hematology, The Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 053600, China

2. Beijing Baylx Biotech Co., Ltd., Beijing 100176, China

3. Stem Cell Biology and Regenerative Medicine Institution, Yi-Chuang Institute of Bio- Industry, Beijing 100176, China.

Abstract: Objective To transfect Cytochrome P450 2B6 (CYP2B6) into umbilical cord mesenchymal stem cells (UC-MSCs) with lentivirus vector. The anti-tumor effect of B acute Lymphocytic Leukemia with UC-MSCs-CYP2B6 cooperated with Cyclophosphamide (CPA) was measured to provide laboratory database for gene directed enzyme prodrug therapy (GDEPT) which used BMSCs as vehicles. **Methods** Cyp2502b6 (CYP2B6) gene sequence was designed by gene engineering method, and the CYP2B6-MSC seed cells with high expression of CYP2B6 protein were obtained by transfection of UC MSCs with lentivirus vector gene. The expression of CYP2B6 gene was detected by real-time fluorescent quantitative PCR (qRT-PCR) to evaluate the transfection effect; the expression of CYP2B6 cell surface markers was detected by flow cytometry; the differentiation ability of CYP2B6 cell was detected by inducing differentiation in vitro. The effects of UC-MSCs/CYP2B6-MSC combined with CPA on the proliferation and apoptosis of Nalm-6 cells were detected by CCK8 and annexin-V FITC / PI kit. **Results** The results of qRT-PCR

收稿日期: 2020-02-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81400078)

第一作者: 王立华, 研究方向为血液系统疾病及干细胞的研究。E-mail: 986967510@qq.com

*通信作者: 刘广洋 E-mail: liugy04@163.com

showed that CYP2B6-MSC could highly express CYP2B6 protein, while hUC-MSC (control group cells) did not express CYP2B6 protein. Flow cytometry and induced differentiation detection showed that the flow phenotype and differentiation ability of CYP2B6 gene modified MSC had no significant change. Compared with UC-MSC and without CPA, CYP2B6-MSC + CPA significantly inhibited the proliferation and promoted the apoptosis of Nalm-6 cells ($P < 0.01$). **Conclusion** These data suggest that MSCs expressing CYP2B6 with CPA could represent a promising treatment for B acute Lymphocytic Leukemia to test in future clinical trials.

Key words: gene directed enzyme prodrug therapy; Cytochrome P450 2B6; umbilical cord mesenchymal stem cells; cyclophosphamide; B acute Lymphocytic Leukemia; proliferation inhibition; apoptosis

急性淋巴细胞白血病 (acute lymphoblastic leukemia, ALL) 是一种常见的血液系统恶性疾病, 约占成人急性白血病的 20%~30%^[1], 占儿童急性白血病的 80% 左右^[2], 目前国际上有较为统一的诊断标准及治疗方案, 初治患者完全缓解率 (Complete Remission, CR) 可达 70%~90%^[1], 儿童 ALL 的长期无病生存率 (Disease free survival, DFS) 可达 85% 以上^[3]。目前化疗在急性淋巴细胞白血病的治疗中仍占重要地位, 但多数抗肿瘤药在杀伤肿瘤细胞的同时, 也杀伤正常细胞, 不良反应较为广泛和严重。

环磷酰胺 (Cyclophosphamide, CPA) 是急性淋巴细胞白血病化疗方案中一种重要的药物, 属于烷化剂。CPA 在体外无生物活性, 在体内经肝微粒体中药物代谢酶 P450 代谢为 CPA 氮芥而产生细胞毒作用, 为细胞周期非特异性药物, 可作用于细胞周期的各个时期, 其主要毒副作用是骨髓抑制和出血性膀胱炎。出血性膀胱炎是由于其代谢产物丙烯醛对膀胱壁的刺激引起, 当 CPA 累积量超过 150 mg/kg 时可发生致死性出血性膀胱炎^[4-5]。因此, 需要找到能够增强药物靶向作用, 同时减轻药物副作用的治疗方法。

近年来提出的基因介导的酶前药治疗 (gene directed enzyme prodrug therapy, GDEPT), 通过酶前药外源基因转染相应的靶细胞, 将无细胞毒的化疗前药高效转变为细胞毒药物, 可有效降低化疗药物临床用量, 减少因杀伤正常机体细胞而引起的不良反应, 同时提高癌细胞对化疗的敏感性, 从而达到有效杀伤肿瘤而降低副作用的目的^[6-7]。GDEPT 还具有“旁观者效应”: 死亡的细胞可以通过 NK 细胞、T 细胞或巨噬细胞介导的宿主免疫应答激发全身性的抗癌效应^[8]。

GDEPT 策略发挥杀伤肿瘤的效应需要选择合适的运送载体。近年来的研究发现, 间充质干细胞 (Mesenchymal stem cells, MSCs) 易于从骨髓、脐带等组织中获取、分离及扩增, 且多次传代不失去

其干细胞的基本生物学特性; 基因转染率高; 低免疫原性; 能耐受大剂量化疗药物的冲击和可选择性地定位于肿瘤的特性, 因此被认为是一种理想的基因治疗的运载细胞^[9]。本研究将细胞色素 P450 2B6 (CYP2B6) 基因转染脐带来源间充质干细胞 (UC-MSCs), 检测 CYP2B6-MSCs 联合化疗前药 CPA 对人 B 淋巴细胞白血病 Nalm-6 细胞株的作用, 为以 UC-MSCs 为载体、Cyt P450 为外源酶基因靶向治疗肿瘤的 GDEPT 策略提供实验依据。

1 材料

1.1 细胞

人 B 淋巴细胞白血病 (Nalm-6) 细胞株, 购自中国医学科学院基础医学研究所。

1.2 主要试剂

CPA (批号 C33250, 规格 100 mg), 购自 Acme公司; RPMI1640 培养液、DMEM/F-12 培养液、Opti-MEM 培养液、胎牛血清及胰蛋白酶等, 购于美国 Thermo Fisher 公司; 第四代慢病毒载体系统, 购自美国 AddGene 公司; 病毒转染试剂 Lipofectamine LTX with Plus、成骨、成脂分化培养液等, 均购自美国 Thermo Fisher 公司; RNA 提取、逆转录试剂盒及 SYBR Green qPCR 试剂盒, 购于美国 Thermo Fisher 公司; CCK-8 试剂盒及 Annexin V-FITC/PI 凋亡试剂盒, 购于日本东仁化学科技有限公司。

1.3 主要仪器

SW-CJ-ZFD 超净工作台, 苏州安泰; ST16R 台式冷冻离心机, Thermo; SPX-70BIII 生化培养箱, TAISITE; 311 细胞培养箱, Thermo; CX41 倒置显微镜, 奥林巴斯; 51119300 酶标仪, Thermo; Calibur 双激光四色流式细胞仪, 美国 BD; 96-孔板, Costar; IC 1000 自动细胞计数仪, Countstar; 7500FAST 荧光定量 PCR 仪, ABI。

2 方法

2.1 脐带间充质干细胞获取及检测

人脐带组织来源于合作单位妇产科医院, 脐带采集通过医院伦理委员会批准, 并签署供者知情同

意书。选择经剖腹产出生的健康胎儿脐带组织,将脐带组织剪至直径为1.0~1.5 mm的小段,采用贴壁培养法获取原代UC-MSCs。待细胞融合度为80%后,对细胞进行蛋白酶消化和计数,并将细胞按 $1 \times 10^4/\text{cm}^2$ 接种至新的培养瓶。按同样方法将细胞扩增至P2代冻存。

2.2 CYP2B6质粒构建及病毒转染间充质干细胞

按照文献所述方法^[10],本课题组设计并合成了CYP2B6-MSC基因质粒,利用第4代慢病毒载体系统构建LV-CYP2B6慢病毒表达质粒。图1为LV-CYP2B6质粒结构图。

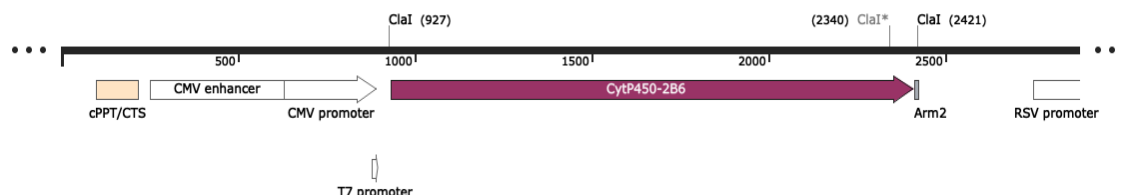


图1 LV-CYP2B6慢病毒质粒结构图

Fig. 1 Lentivirus plasmid structure of LV-CYP2B6

将LV-CYP2B6慢病毒表达质粒与慢病毒框架质粒混合,通过LTX脂质体导入293T细胞,包装得到成熟慢病毒,收获病毒。将收获的病毒转染至脐带间充质干细胞,24 h后加入嘌呤霉素筛选加压,待加压结束后换新鲜完全培养液,获得CYP2B6-MSC细胞,继续培养至80%密度后传代扩增。

2.3 CYP2B6-MSC细胞生物学功能检测

将转染后的细胞收获后,以正常UC-MSC作为对照,通过流式细胞术检测CYP2B6-MSC细胞表面抗原(CD73、CD90、CD105、CD34、CD45、CD11b、CD19及HLA-DR)。

将UC-MSC及CYP2B6-MSC细胞接种至24孔板中,待细胞密度达到80%融合度时分别加入成骨诱导培养液及成脂诱导培养液进行诱导,2~3 d换一次诱导培养液。诱导培养3~4周后,成脂诱导的细胞采用油红-O进行染色,成骨诱导的细胞采用茜素红-S进行染色。

2.4 qRT-PCR检测CYP2B6基因表达

采用RNA提取试剂盒,提取UC-MSC及CYP2B6-MSC细胞RNA。采用RNA反转录试剂盒,逆转上述细胞RNA得到cDNA。采用SYBR Green I qRT-PCR试剂盒并使用ABI 7500FAST实时荧光定量PCR仪对上述细胞的CYP2B6基因表达量进行实时荧光定量PCR检测。CYP2B6引物序列为:上游引物5'-TGC CCC TTT TGG GAA ACC TT-3',下游引物5'-GGC CTC TAC TCC ACA CAG CA-3',扩增片段长度为140 bp;内参选择人 β -actin基因,引物序列为:上游引物5'-CCT GGC ACC CAG CAC AAT-3',下游引物5'-GGG CCG GAC TCG TCA TAC -3',扩增片段长度为144 bp。

2.5 CPA对CYP2B6-MSC杀伤效果检测

按照文献报道^[10-11],0.5~2.0 mmol/L的CPA均可有效杀伤已转染CYP2B6基因的细胞及肿瘤细胞,本研究选择0.5 mmol/L的CPA作为实验浓度。

将hUC-MSC、CYP2B6-MSC以 4×10^4 /孔接种24孔板,将两种细胞各分为对照和CPA组,分别加入含0、0.5 mmol/L CPA的DF12培养基,培养细胞24 h后,通过倒置显微镜观察细胞状态,判断CPA对CYP2B6-MSC杀伤效果。

2.6 Nalm-6细胞增殖检测

将hUC-MSC、CYP2B6-MSC以 4×10^3 /孔接种96孔板,DF12培养液(10%FBS)培养过夜;更换含0(对照组)、0.5 mmol/L CPA的1640培养基,50 μL /孔,继续培养24 h;无血清1640培养基将Nalm-6细胞重悬浓度为 $2 \times 10^5/\text{mL}$,取50 μL 与MSC或CYP2B6-MSC共培养,在培养0、24、48、72、96 h,分别将Nalm6细胞吸出置于新的96孔板中;加入10 μL CCK-8,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育4 h,检测各组细胞450 nm处吸光度(A)值。

2.7 Nalm-6细胞凋亡检测

将hUC-MSC、CYP2B6-MSC以 4×10^4 /孔接种24孔板,DF12培养液(10%FBS)培养过夜;更换含0、0.5 mmol/L CPA的1640培养基,500 μL /孔,继续培养24 h;采用无血清1640培养基将Nalm-6细胞重悬浓度为 $2 \times 10^5/\text{mL}$,取500 μL 与MSC或CYP2B6-MSC共培养,在培养24 h将Nalm6细胞吸出,采用Annexin-V FITC/PI试剂盒检测细胞凋亡。

2.8 统计方法

采用SPSS19.0统计学软件,计量资料使用 $\bar{x} \pm s$ 表示,比较使用单因素方差分析及t检验。

3 结果

3.1 LV-CYP2B6病毒转染间充质干细胞

采用流式细胞法检测hUC-MSC及基因修饰后MSC,结果如表1所示,各组细胞均符合MSC表型:CD19、CD34、CD11b、CD45和HLA-DR均为阴性(阳性率<2%);CD73、CD90、CD105均为阳

性(阳性率>95%)。

采用成骨及成脂分化培养液对各组细胞进行分化诱导,结果发现,成骨诱导培养4周后,各组细胞经茜素红-S进行染色均为阳性;成脂诱导3周后,各组细胞经油红-O染色均为阳性。结果见图2。

表1 MSC细胞流式细胞表型结果统计

Table 1 Flow Cytometric Immunophenotype of MSC

细胞	CD19/%	CD34/%	CD11b/%	CD73/%	CD90/%	CD45/%	CD105/%	HLA-DR/%
UC-MSC	0.36±0.21	0.10±0.05	0.46±0.40	99.78±0.22	99.90±0.10	0.25±0.18	99.75±0.25	0.32±0.22
CYP2B6-MSC	0.59±0.36	0.08±0.08	0.52±0.35	99.84±0.16	100.00±0.00	0.18±0.15	99.73±0.20	0.70±0.45

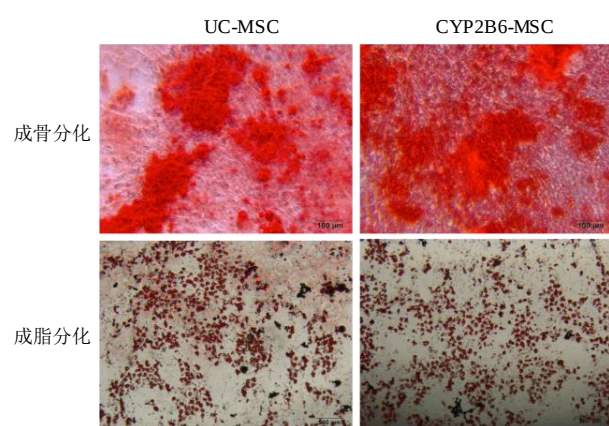
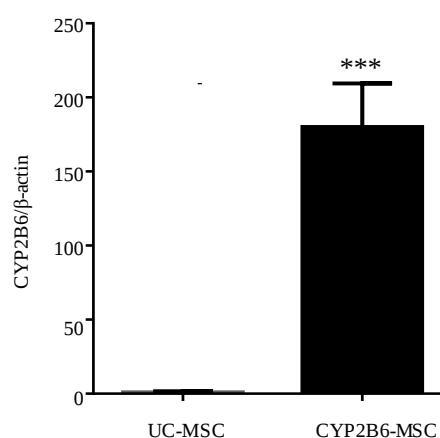


图2 MSC细胞分化检测结果分析

Fig. 2 Differentiation analysis of MSC

3.2 CYP2B6基因表达水平检测

如图3所示,CYP2B6-MSC表达CYP2B6基因水平显著高于UC-MSC,差异具有统计学意义($P < 0.001$)。



与UC-MSC组比较:*** $P < 0.001$

*** $P < 0.001$ vs UC-MSC group

图3 qRT-PCR检测细胞表达CYP2B6基因水平

Fig. 3 CYP2B6 expression of MSC by qRT-PCR

3.3 CPA对CYP2B6-MSC细胞的杀伤作用

采用0.5 mmol/L CPA对hUC-MSC、CYP2B6-MSC进行处理,48 h后观察细胞状态。如图4所示,0.5 mmol/L的CPA对CYP2B6-MSC具有明显杀伤效果,而同等浓度的CPA对UC-MSC杀伤效果不明显。

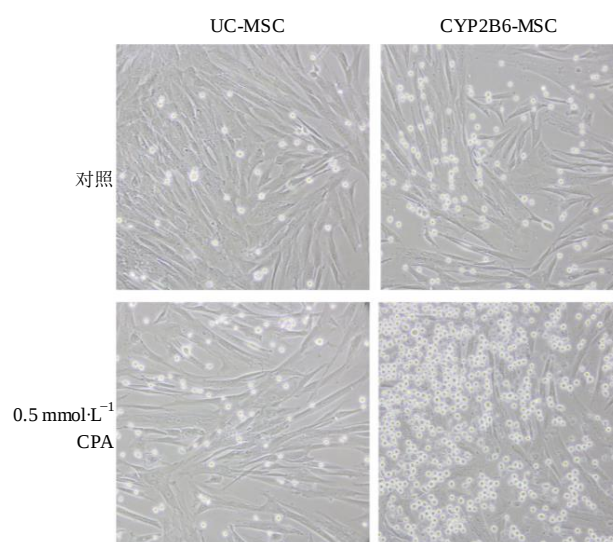


图4 CPA可显著杀伤CYP2B6-MSC细胞

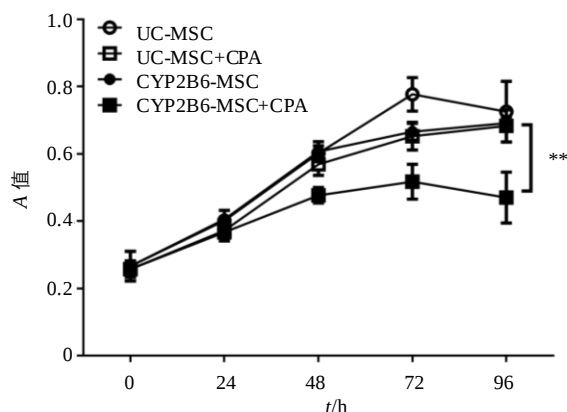
Fig. 4 CPA significantly kills the CYP2B6-MSCs

3.4 CYP2B6-MSC/CPA对Nalm-6细胞的增殖抑制作用

如图5所示,UC-MSC、UC-MSC+CPA对Nalm-6细胞的增殖无明显抑制作用;在不加CPA的情况下,CYP2B6-MSC对Nalm-6细胞增殖影响不明显,而加入CPA后,CYP2B6-MSC可显著抑制Nalm-6细胞的增殖($P < 0.01$)。

3.5 CYP2B6-MSC/CPA对Nalm-6细胞的凋亡作用

与不加CPA组或对照组(UC-MSC/CPA)比较,CYP2B6-MSC+CPA可显著促进Nalm-6细胞凋亡($P < 0.01$),结果见图6和表2。



与 UC-MSC(+CPA) 组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs UC-MSC(+CPA) group

图5 Nalm-6细胞增殖结果

Fig. 5 Proliferation of Nalm-6 cells

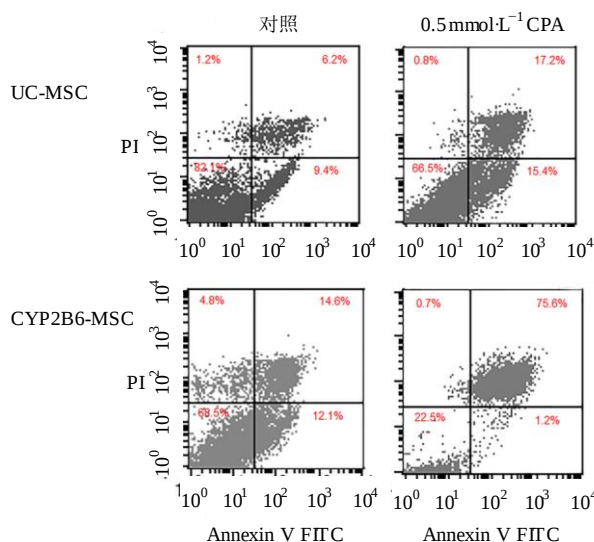


图6 Nalm-6细胞凋亡结果

Fig. 6 Apoptosis analysis of Nalm-6 cells

表2 Nalm-6细胞凋亡率

Table 2 Apoptosis rate of Nalm-6 cells

组别	细胞凋亡率/%
UC-MSC	16.5±5.2
UC-MSC+ CPA	30.8±6.6
CYP2B6-MSC	28.2±4.8
CYP2B6-MSC+ CPA	78.0±8.5***

与 UC-MSC(+CPA) 组比较: ** $P < 0.01$; 与 CYP2B6-MSC 组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs UC-MSC(+CPA) group; ** $P < 0.01$ vs CYP2B6-MSC group

4 讨论

目前,化疗在急性淋巴细胞白血病的治疗中仍具有不可取代的地位,但由于多数抗肿瘤药在杀伤肿瘤细胞的同时,对正常机体细胞也有广泛的杀伤

力,同时,抗肿瘤药物的耐药性问题和变态反应的不断显现,限制了其在临床的应用^[12]。GDEPT策略可联合药物代谢酶和化疗前药治疗白血病或实体肿瘤,具有药物靶向性和降低化疗药副作用的特点,因此在肿瘤治疗中具有一定的临床应用前景^[13-14]。

CYP450为单加氧酶,可催化药物代谢、脂类代谢等多种反应,是机体对内、外源性物质尤其是药物进行生物转化的重要酶系。CYP450是一个超家族,目前已经确定的人类CYP450分属于18个家族,42个亚家族^[15]。人类已合成的近25万个化合物中绝大多数为P450的底物¹⁶。其中,CYP2B6是CYP450家族中重要的药物代谢酶,广泛分布于人体肝脏、肾脏、外周血淋巴细胞等,参与多种内源性和外源性物质的合成和代谢。CYP2B6基因位于染色体19q13.2,全长28 kb,编码蛋白由491个氨基酸组成,定位于细胞内质网。CYP2B6可代谢包括抗癌药CPA和异CPA等多种前体药物,这些药物的共同特点是它们本身并无毒性或致癌作用,但在体内通过CYP2B6/NADPH还原酶(RED)体系代谢为对肿瘤具有毒性的抗肿瘤药物^[17-18]。其中,CPA是一种广泛用于抗肿瘤的烷化剂,主要用于肿瘤免疫,对多种肿瘤有明显的抑制作用,其在体外无活性,经CYP2B6催化变为活化作用型的磷酸氮芥,从而与DNA发生交叉联结,抑制DNA合成,干扰RNA功能,从而发挥抗肿瘤作用^[19]。

作为一种广泛应用的抗肿瘤药物,CPA的骨髓抑制等不良反应也不容忽视,在减少用量的同时达到理想的疗效成为科学家一直努力的研究方向。在寻找外源酶基因和相应的化疗前药过程中发现CYP450 GDEPT有一些重要的特征:CYP450前药如CPA和异CPA等具有强大的旁观者细胞毒性;利用人类P450基因从而避免对治疗基因产生免疫反应的能力;在低氧肿瘤环境中使用公认的传统化疗前药以及P450还原酶激活的生物还原药物;以及通过选择性抑制肝脏P450活性而减少全身暴露于活性药物代谢物的可能性,这些特征使P450 GDEPT在癌症的临床治疗中成为颇具潜力的治疗方案²⁰。

我们构建的含CYP2B6基因的慢病毒表达载体,导入UC-MSCs后对细胞的CYP2B6基因表达及生物学特性进行检测;qRT-PCR检测发现,CYP2B6基因可在基因修饰后CYP2B6-MSC细胞中高表达,说明慢病毒载体成功构建并在真核细胞内表达;同时基因修饰后的UC-MSCs,其表面标志物表达及成

骨、成脂分化等基本间充质干细胞生物学特性没有改变。对CYP2B6-MS C细胞进行CPA处理后发现, CPA可显著杀伤CYP2B6-MS C细胞,说明CYP2B6-MS C细胞可将对细胞无毒性的CPA转化成有毒性的4OH-CPA。通过Nalm-6细胞增殖和凋亡检测的方法观察CYP2B6体外联合CPA的抗急性B淋巴细胞白血病作用,结果发现,CYP2B6基因修饰后的MS C联合CPA对Nalm-6具有显著的生长抑制和凋亡作用,说明CYP2B6的高表达可以通过联合化疗前药CPA,增强其杀伤血液肿瘤细胞的作用。

采用重组CYP2B6基因介导的酶前药治疗是一种颇具潜力的肿瘤治疗的新方法,为因化疗严重不良反应影响治疗的肿瘤患者带来了希望,但其安全性和问题和进一步应用于临床仍有待更深入的研究。

参考文献

- [1] Dinner S, Lee D, Liedtke M. Current therapy and novel agents for relapsed or refractory acute lymphoblastic leukemia [J]. *Leuk Lymphoma*, 2014, 55(8): 1715-1724.
- [2] Frey N V, Luger S M. How I treat adults with relapsed or refractory philadelphia chromosome-negative acute lymphoblastic leukemia [J]. *Blood*, 2015, 126(5): 589-596.
- [3] Maude S L, Teachey D T, Porter D L, et al. CD19-targeted chimeric antigen receptor T-cell therapy for acute lymphoblastic leukemia [J]. *Blood*, 2015, 125(26): 4017-4023.
- [4] Monach P A, Arnold L M, Merkel P A. Incidence and prevention of bladder toxicity from cyclophosphamide in the treatment of rheumatic diseases: a data-driven review [J]. *Arthritis Rheum*, 2010, 62(1): 9-21.
- [5] Travis L B, Curtis R E, Glimelius B, et al. Bladder and kidney cancer following cyclophosphamide therapy for non-Hodgkin's lymphoma [J]. *J Natl Cancer Inst*, 1995, 87: 524-530.
- [6] Mancini L, Davies L, Friedlos F, et al. A novel technique to monitor carboxypeptidase G2 expression in suicide gene therapy using 19F magnetic resonance spectroscopy [J]. *NMR Biomed*, 2009, 22: 561-566.
- [7] Schepelmann S, Springer C J. Viral vectors for gene-directed enzyme prodrug therapy [J]. *Curr Gene Ther*, 2006, 6: 647-670.
- [8] Khatri A, Russell P J. Targeted, gene-directed enzyme prodrug therapies to tackle diversity and aggression of late stage prostate cancer [J]. *Discov Med*, 2007, 7: 39-45.
- [9] Hall B, Dembinski J, Sasser A K, et al. Mesenchymal stem cells in cancer: tumor-associated fibroblasts and cell-based delivery vehicles [J]. *Int J Hematol*, 2007, 86: 8-16.
- [10] Tychopoulos M, Corcos L, Genne P, et al. A virus-directed enzyme prodrug therapy (VDEPT) strategy for lung cancer using a CYP2B6/NADPH-cytochrome P450 reductase fusion protein [J]. *Cancer Gene Ther*, 2005, 12: 497-508.
- [11] Amara I, Pramila E, Senamaud-Beaufort C, et al. Engineered mesenchymal stem cells as vectors in a suicide gene therapy against preclinical murine models for solid tumors [J]. *J Control Release*, 2016, 239: 82-91.
- [12] Minniti G, Muni R, Lanzetta G, et al. Chemotherapy for glioblastoma: current treatment and future perspectives for cytotoxic and targeted agents [J]. *Anticancer Res*, 2009, 29: 5171-5184.
- [13] Altaner C. Prodrug cancer gene therapy [J]. *Cancer Lett*, 2008, 270: 191-201.
- [14] Hedley D, Ogilvie L, Springer C. Carboxypeptidase-G2-based gene-directed enzyme-prodrug therapy: a new weapon in the GDEPT armoury [J]. *Nat Rev Cancer*, 2007, 7: 870-879.
- [15] Guengerich F P, Martin M V. Purification of cytochromes P450: products of bacterial recombinant expression systems [J]. *Methods Mol Biol*, 2006, 320: 31-37.
- [16] Wang J S, Zhang F, Jiang M, et al. Transfection and functional expression of CYP4A1 and CYP4A2 using bicistronic vectors in vascular cells and tissues [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2004, 311: 913-920.
- [17] Schmidt R, Baumann F, Knapf H, et al. CYP3A4, CYP2C9 and CYP2B6 expression and ifosfamide turnover in breast cancer tissue microsomes [J]. *Br J Cancer*, 2004, 90: 911-916.
- [18] Song Q, Zhou X, Yu J, et al. The prognostic values of CYP2B6 genetic polymorphisms and metastatic sites for advanced breast cancer patients treated with docetaxel and thiotepa [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 16775.
- [19] Nakajima M, Komagata S, Fujiki Y, et al. Genetic polymorphisms of CYP2B6 affect the pharmacokinetics/pharmacodynamics of cyclophosphamide in Japanese cancer patients [J]. *Pharmacogenet Genomics*, 2007, 17: 431-445.
- [20] Roy P, Waxman D J. Activation of oxazaphosphorines by cytochrome P450: application to gene-directed enzyme prodrug therapy for cancer [J]. *Toxicol In Vitro*, 2006, 20: 176-186.