

【实验研究】

地塞米松提高 TRAIL 基因修饰的脐带间充质干细胞对急性 B 淋巴细胞白血病细胞的杀伤作用及机制研究

王立华¹, 李欣^{2,3}, 徐立强^{2,3}, 苗丽^{2,3}, 米一^{2,3}, 张晨亮^{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 构建肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体 (TRAIL) 基因修饰的脐带间充质干细胞 (TRAIL-MSCs), 并检测其联合地塞米松 (DEX) 对急性 B 淋巴细胞白血病 (Nalm-6) 细胞的影响。方法 通过慢病毒载体将 SPD-TRAIL 基因转染 UC-MSCs 构建 TRAIL-MSCs, 使其能够表达十二聚体 TRAIL 蛋白 (dTRAIL)。通过 CCK-8 法、流式细胞术、显微镜光镜下观察细胞形态及密度检测 UC-MSCs、TRAIL-MSCs、DEX (25 $\mu\text{mol/L}$)、DEX (25 $\mu\text{mol/L}$) + UC-MSCs 组和 DEX (25 $\mu\text{mol/L}$) + TRAIL-MSCs 对 Nalm-6 细胞增殖、凋亡的影响; 通过实时荧光定量 PCR 及 Western blotting 法检测各组 Nalm-6 细胞表面 DR4、DR5 mRNA 和蛋白表达。结果 成功构建了能够稳定表达 dTRAIL 蛋白的 TRAIL-MSCs 工作库细胞。与对照组比较, UC-MSCs、TRAIL-MSCs 显著抑制 Nalm-6 细胞增殖 ($P < 0.01$), 但抑制率均在 30% 以下, DEX 抑制率约为 43%, 而 DEX 联合 TRAIL-MSCs 抑制率达 85%, 与 TRAIL-MSCs 和 DEX 组比较差异显著 ($P < 0.01$)。显微镜下观察结果显示, 不同处理方式对肿瘤细胞 Nalm-6 均有一定的杀伤作用, 其中以 DEX 与 TRAIL-MSCs 联合用药组的杀伤作用最明显。TRAIL-MSCs 可以促进 Nalm-6 细胞凋亡, 凋亡率达 10%, DEX 组凋亡率达到 15%, 与对照组比较有显著差异 ($P < 0.05, 0.01$); 而 DEX + TRAIL-MSCs 组凋亡率达 36%, 与 DEX 和 TRAIL-MSCs 组比较有显著差异 ($P < 0.01$)。与对照组比较, TRAIL-MSCs 组 DR4、DR5 mRNA 表达量显著降低 ($P < 0.01$); DEX 可以促进 DR4、DR5 mRNA 表达, 与对照组比较差异显著 ($P < 0.01$); DEX + TRAIL-MSCs 组较 DEX 组 DR4、DR5 mRNA 表达均显著降低 ($P < 0.01$); 各组蛋白检测结果与 mRNA 结果基本一致。结论 DEX 可以显著提高 TRAIL-MSCs 对 Nalm-6 细胞的杀伤作用, 或将成为一种颇具潜力的血液肿瘤治疗新手段; 其机制与 DEX 显著提高 DR4、DR5 表达, 增强 Nalm-6 细胞对 TRAIL 蛋白的敏感性相关。

关键词: 脐带间充质干细胞; 肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体 (TRAIL); 急性 B 淋巴细胞白血病; 联合治疗; 死亡受体 4/5

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2021) 08-1653-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2021.08.012

Killing effect of TRAIL gene-modified umbilical cord mesenchymal stem cells enhanced by dexamethasone and its mechanism

WANG Lihua¹, LI Xin^{2,3}, XU Liqiang^{2,3}, MIAO Li^{2,3}, MI Yi^{2,3}, ZHANG Chenliang^{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** Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) gene modified umbilical cord mesenchymal stem cells (TRAIL-MSCs) were constructed, and the effect of TRAIL-MSCs combined with dexamethasone (DEX) on acute B lymphocytic leukemia (Nalm-6) cells was detected. **Methods** We transfected SPD-TRAIL gene into umbilical cord mesenchymal

收稿日期: 2021-07-01

基金项目: 北京市科技计划课题 (Z211100002521006); 河北医科大学第二医院院基金 (2h2201609)

第一作者: 王立华, 研究方向为血液病及干细胞应用。E-mail: 986967510@qq.com

*通信作者: 刘广洋 E-mail: liugy04@163.com

stem cells by lentiviral vector to enable them to express TRAIL protein. Then, the effects of DEX combined with TRAIL-MSCs on the proliferation and apoptosis of Nalm-6 were detected by CCK-8 and flow cytometry, respectively. The mRNA and protein levels of DR4 and DR5 on the surface of Nalm-6 cells treated with DEX and TRAIL-MSCs were further detected. **Results** Compared with control group, UC-MSCs and TRAIL-MSCs significantly inhibited the proliferation of Nalm-6 cells ($P < 0.01$), but the inhibition rate was less than 30%, the inhibition rate of DEX was about 43%, and the inhibition rate of DEX combined with TRAIL-MSCs was 85%, compared with TRAIL-MSCs and DEX groups, there was significant difference ($P < 0.01$). The results of microscope observation showed that different treatment methods had certain killing effect on Nalm-6 tumor cells, among which the combination of DEX and TRAIL-MSCs showed the most obvious killing effect. TRAIL-MSCs could promote the apoptosis of Nalm-6 cells, the apoptosis rate was 10%, and the apoptosis rate of DEX group was 15%, which was significantly different from that of control group ($P < 0.05, 0.01$). The apoptosis rate of DEX + TRAIL-MSCs group was 36%, which was significantly different from that of DEX and TRAIL-MSCs groups ($P < 0.01$). Compared with control group, the mRNA expression levels of DR4 and DR5 in TRAIL-MSCs group were significantly decreased ($P < 0.01$). DEX could promote the mRNA expression of DR4 and DR5, and the difference was significant compared with control group ($P < 0.01$). The mRNA expression of DR4 and DR5 in DEX + TRAIL-MSCs group was significantly lower than that in DEX group ($P < 0.01$). Protein detection results of each group were basically consistent with mRNA results. **Conclusion** DEX can significantly improve the efficacy of TRAIL gene modified umbilical cord mesenchymal stem cells in the treatment of acute B lymphocytic leukemia, which may become a potential new strategy for hematologic tumors. The mechanism was related to the significantly increased expression of DR4 and DR5 by DEX and enhanced sensitivity of NALM-6 cells to TRAIL protein.

Key words: umbilical cord mesenchymal stem cells; TRAIL; B acute lymphocytic leukemia; combination therapy; death receptors 4/5

急性B淋巴细胞白血病(acute B-lymphoblastic leukemia, B-ALL)是一种常见的血液系统恶性疾病,占儿童和成人ALL患者的70%~80%^[1-2]。目前国际上有比较统一的诊断标准和不同的研究组报道的系统治疗方案,B-ALL的完全缓解(CR)率可达70%~90%,3~5年无病生存(DFS)率达30%~60%,儿童ALL的长期DFS率可达85%以上^[3]。但仍有30%~60%的患者出现难治或复发,成为B-ALL患者死亡的主要原因之一。对于复发难治的B-ALL,目前临床上尚缺乏有效的治疗方法,即便进行异基因造血干细胞移植,其DFS率仍不尽人意,因此,亟待寻找新的有效治疗策略。

细胞凋亡是一个复杂的过程,在造血系统中调控良好的细胞死亡程序在控制细胞稳态中起关键作用。细胞凋亡可通过2种不同的机制启动,包括活化死亡受体(外源性途径)或线粒体凋亡过程(内在通路)的激活。在各种死亡受体中,肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL)及其受体(TRAIL-Rs)起着特殊的作用。肿瘤坏死相关凋亡诱导配体(TRAIL/Apo-2L)结合死亡受体4(DR4)和死亡受体5(DR5)均可导致细胞凋亡^[4-6]。间充质干细胞(MSCs)能够浸润肿瘤组织,从而可以作为载体有效地传递基因治疗。研究表明,在结肠癌动物模型中,将表达TRAIL的小鼠MSCs(sTRAIL-mMSCs)与传统的化疗药物相结合,细胞凋亡比单纯化疗明显增加^[7]。值得注意的是,这种治疗效果

是不依赖于蛋白53(p53)的,是由DR5表达上调介导的,证明了该方法在p53缺陷肿瘤中的适用性。在个体化和肿瘤特异性联合治疗中,TRAIL受体选择性变异可以潜在地增强TRAIL-MSCs细胞的治疗效果^[7]。

然而凋亡缺陷存在于许多血液肿瘤细胞类型中,而绝大多数原发性血液学肿瘤对TRAIL介导的细胞凋亡具有抗性,主要因素包括:抗凋亡信号通路(如NF- κ B)的激活,抗凋亡蛋白(如FLIP、Bcl-2、XIAP)的过表达或TRAIL诱骗受体或DR4/DR5的表达减少;而与TRAIL联合使用的药物可增强DR4/DR5的表达,或降低抗凋亡蛋白的表达(c-FLIP、XIAP、Bcl-2),这些组合疗法为血液系统恶性肿瘤治疗的未来发展提供了希望^[6]。糖皮质激素可引起淋巴细胞的凋亡及细胞周期G₁停滞,抑制其生长与增殖,是ALL治疗方案中不可或缺的一种化疗药。国内外重要指南均将强的松单药治疗7d诱导试验的效应作为评估儿童ALL预后的一个独立的危险因素^[8],因此采用地塞米松(DEX)等糖皮质激素联合TRAIL-MSCs为复发难治的B-ALL的治疗提供了可能。

本研究旨在通过探究地塞米松联合TRAIL-MSCs对急性B淋巴细胞白血病细胞Nalm-6的杀伤作用以及对肿瘤细胞膜DR4、DR5表达的影响,为开发复发难治的ALL新的有效治疗方法提供参考。

1 材料

Nalm-6细胞购自中国医学科学院基础医学研

究所;RPMI 1640 培养液、DMEM/F-12 培养液、胎牛血清等购于美国 Thermo Fisher 公司;第4代慢病毒载体系统购自美国 AddGene 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;DR4、DR5、 β -actin 引物由苏州金唯智生物科技有限公司合成;CCK-8 试剂盒及 Annexin V-FITC/PI 凋亡试剂盒购于东仁化学科技有限公司;RIPA、PMSF 购于 CST 公司;loading buffer 购于中科瑞泰生物有限公司;Marker 购于 Bio-Rad 公司;DR4、DR5、GAPDH、Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HRP) 购于 Abcam 公司。流式细胞仪购于美国 BD 公司,型号为 FACSCalibur。

2 方法

2.1 TRAIL 基因修饰 MSCs 的制备与检测

人脐带组织来源于合作单位妇产科医院剖宫产出生的健康胎儿,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。人脐带间充质干细胞(hUC-MSCs)制备及种子库、工作库建立及质量检测等均在北京市来生物科技有限公司 GMP 车间及质检中心完成。TRAIL-MSCs 的制备方法按照本团队既往报道的方法操作^[9]:通过慢病毒载体将 SPD-TRAIL 基因转染 UC-MSCs,使其能够表达 dTRAIL 蛋白。

2.2 DEX 对 Nalm-6 细胞增殖的抑制作用

将 Nalm-6 细胞以 1×10^4 /孔接种于 96 孔板中,置于 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养。分为对照组(不加药)和 DEX 6.25、12.50、25.00、50.00、100.00 $\mu\text{mol/L}$ 组,每组设置 6 个复孔。培养 24 h 后,采用 CCK8 试剂盒检测 DEX 对 Nalm-6 细胞的增殖抑制情况,检测细胞 450 nm 处吸光度(A)值,计算细胞增殖抑制率。

$$\text{增殖抑制率} = 1 - A_{\text{DEX}}/A_{\text{对照}}$$

2.3 DEX 联合 TRAIL-MSCs 对 Nalm-6 细胞增殖的抑制作用

将 Nalm-6 细胞分为对照组、UC-MSCs 组、TRAIL-MSCs 组、DEX 组、DEX+UC-MSCs 组和 DEX+TRAIL-MSCs 组。Nalm-6 细胞按照 6.25×10^4 /孔接种于 24 孔 Transwell 板下室中,6 h 后对照

组、UC-MSCs 组和 TRAIL-MSCs 组换正常培养基,DEX 组、DEX+UC-MSCs 组和 DEX+TRAIL-MSCs 组换含有浓度为 25 $\mu\text{mol/L}$ 的 DEX 的培养基,继续培养 24 h。将 3.13×10^4 /孔的 UC-MSCs 分别接种于 UC-MSCs、DEX+UC-MSCs 组的 Transwell 上室中,将 3.13×10^4 /孔的 TRAIL-MSCs 接种于 TRAIL-MSCs、DEX+TRAIL-MSCs 组的 Transwell 上室中,与 Nalm-6 细胞共培养 48 h,共培养结束后弃上室,取下室 Nalm-6 细胞接种于 96 孔板,CCK-8 检测细胞 450 nm 处吸光度(A)值,计算各组细胞增殖抑制率。

2.4 DEX 联合 TRAIL-MSCs 对肿瘤细胞 Nalm-6 凋亡的影响

将 Nalm-6 细胞按照 3×10^5 /孔接种于 6 孔 Transwell 板下室中,操作步骤和分组同“2.3”项,DEX 药物作用 24 h 后, 1.5×10^5 /孔的 UC-MSCs、TRAIL-MSCs 分别接种于 UC-MSCs/DEX+UC-MSCs 组及 TRAIL-MSCs/DEX+TRAIL-MSCs 组的 Transwell 上室中并与 Nalm-6 细胞共培养。共培养 48 h 后,弃上室,取下室 Nalm-6 细胞,显微镜下观察并拍照,流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

2.5 DEX 联合 TRAIL-MSCs 对 Nalm-6 细胞中 DR4、DR5 表达的影响

细胞接种及分组给药同“2.3”项,共培养 24 h 后,弃上室,取下室 Nalm-6 细胞,分别用实时荧光定量 RCR (qRT-PCR) 法及 Western blotting 法检测 DEX 联合 TRAIL-MSCs 对 Nalm-6 细胞的 DR4、DR5 在 mRNA 及蛋白水平的变化。

2.5.1 qRT-PCR 法 Trizol 法提取 Nalm-6 细胞总 RNA,反转录制备 cDNA,根据 ABI 使用说明进行操作,引物序列见表 1。每个样品重复 3 次,qRT-PCR 反应过程如下: 95°C 20 s 1 个循环, 95°C 3 s、 60°C 3 s 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法对数据进行分析。

2.5.2 Western blotting 法 RIPA 与 PMSF 混合液 0°C 裂解细胞 20 min,提取总蛋白,BCA 蛋白测定试剂盒检测每个样品蛋白质浓度,样品调整至统一浓度后,加入 $5 \times$ 上样缓冲液, 100°C 变性 5 min。样品 (30 μg) 通过 10% SDS-PAGE 分离并转移至

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因	正向引物(5'-3')	反向引物(5'-3')
DR4	GCCCTGGAGTGACATCGAGT	GCCACCAACAGCAACGGA
DR5	ACTTGGTGCCCTTTGACTCCT	TGACCCACTTTATCAGCATCGT
β -actin	CCTGGCACCCAGCACAAAT	GGGCCGGACTCGTCATAC

PVDF膜上,TBST配制5%脱脂奶粉封闭1 h,一抗孵育过夜。TBST洗涤3遍后,室温孵育二抗1 h,TBST洗涤3遍,ECL发光检测试剂观察条带。Image J软件对图像进行定量分析。

2.6 统计方法

采用SPSS 19.0统计学软件,计量资料使用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析及 t 检验进行统计学分析。

3 结果

3.1 DEX对Nalm-6细胞增殖的抑制作用

DEX处理Nalm-6细胞24 h后,如图1所示,DEX对Nalm-6细胞发挥增殖抑制作用,且呈浓度相关性,半数抑制浓度(IC_{50})为34.375 $\mu\text{mol/L}$,在后续实验中选用25 $\mu\text{mol/L}$ 。

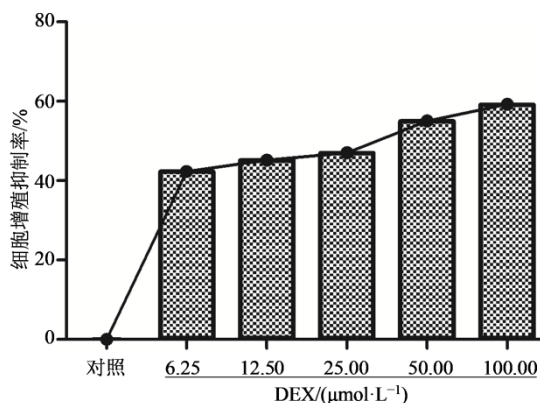


图1 DEX对Nalm-6细胞的增殖抑制作用($\bar{x} \pm s, n=6$)

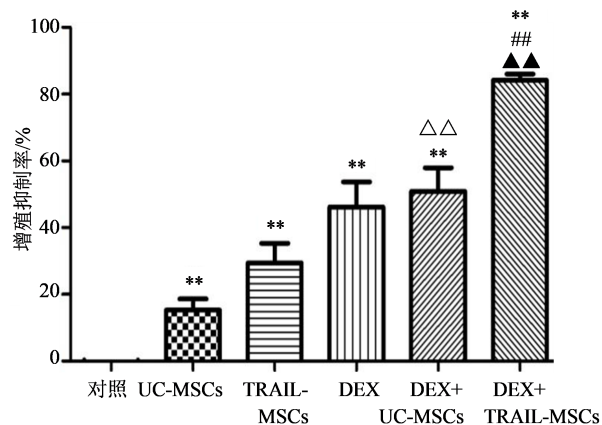
Fig. 1 Inhibitory effect of DEX on proliferation of Nalm-6 cell($\bar{x} \pm s, n=6$)

3.2 TRAIL-MSCs联合DEX对Nalm-6细胞的增殖抑制作用

Nalm-6细胞经DEX处理24 h并与UC-MSCs及TRAIL-MSCs共培养48 h后,CCK-8法检测不同处理对Nalm-6的增殖抑制作用,结果如图2所示,UC-MSCs、TRAIL-MSCs可以抑制Nalm-6的增殖,与对照组比较差异显著($P < 0.01$),但抑制率均在30%以下;DEX可以抑制Nalm-6细胞的增殖,抑制率为43%,与对照组比较差异显著($P < 0.01$);而DEX联合TRAIL-MSCs对Nalm-6细胞的增殖抑制作用最强,抑制率达85%,与对照组、DEX组比较差异显著($P < 0.01$)。同时,DEX可以提高UC-MSCs、TRAIL-MSCs对细胞Nalm-6的增殖抑制作用,与UC-MSCs、TRAIL-MSCs组比较差异显著($P < 0.01$)。

3.3 DEX联合TRAIL-MSCs对Nalm-6细胞凋亡的作用

不同方式处理Nalm-6细胞后,分别通过显微镜



与对照组比较:** $P < 0.01$;与DEX组比较:## $P < 0.01$;与UC-MSCs组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$;与TRAIL-MSCs组比较:▲▲ $P < 0.01$
 ** $P < 0.01$ vs control group;## $P < 0.01$ vs DEX group; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs UC-MSCs group; ▲▲ $P < 0.01$ vs TRAIL-MSCs group

图2 CCK-8检测TRAIL-MSCs联合DEX对Nalm-6细胞的增殖抑制作用($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 2 Proliferation inhibitory of Nalm-6 cell with TRAIL-MSCs and DEX treatment by CCK-8 assays($\bar{x} \pm s, n=6$)

不同倍数(40 $\times$ 和100 $\times$)观察细胞形态及密度,结果如图3所示,不同方式对肿瘤细胞Nalm-6均有一定的杀伤作用,其中以DEX与TRAIL-MSCs联合用药组的杀伤作用最明显。

不同方式处理Nalm-6细胞48 h后,分别用荧光染料Annexin-V和PI对Nalm-6细胞进行染色,流式细胞仪检测不同处理组细胞凋亡情况,结果如图4所示,TRAIL-MSCs可以促进Nalm-6细胞凋亡,凋亡率达10%;DEX单独作用时可以促进Nalm-6细胞凋亡,凋亡率达到15%,与对照组比较有显著差异($P < 0.05, 0.01$);而DEX联合TRAIL-MSCs作用于Nalm-6细胞48 h后,细胞凋亡率升高至36%,与单独使用DEX、TRAIL-MSCs比较有显著差异($P < 0.01$)。

3.4 DEX联合TRAIL-MSCs对Nalm-6细胞中DR4、DR5表达的影响

不同方式处理Nalm-6细胞24 h后,qRT-PCR法检测Nalm-6细胞DR4、DR5在核酸水平的变化,结果如图5所示,与对照组比较,TRAIL-MSCs组DR4、DR5 mRNA表达量显著降低($P < 0.01$);DEX可以促进DR4、DR5的表达,与对照组比较差异显著($P < 0.01$);DEX与TRAIL-MSCs联合作用较单独使用DEX,DR4、DR5表达均显著降低($P < 0.01$)。

Western blotting法检测不同处理方法对Nalm-6细胞DR4、DR5蛋白表达的影响,结果如图6所示,TRAIL-MSCs作用于Nalm-6细胞24 h后,DR4、DR5蛋白表达与对照组比较略有降低,但无显著性差异;DEX可以促进Nalm-6细胞DR4、DR5蛋白表

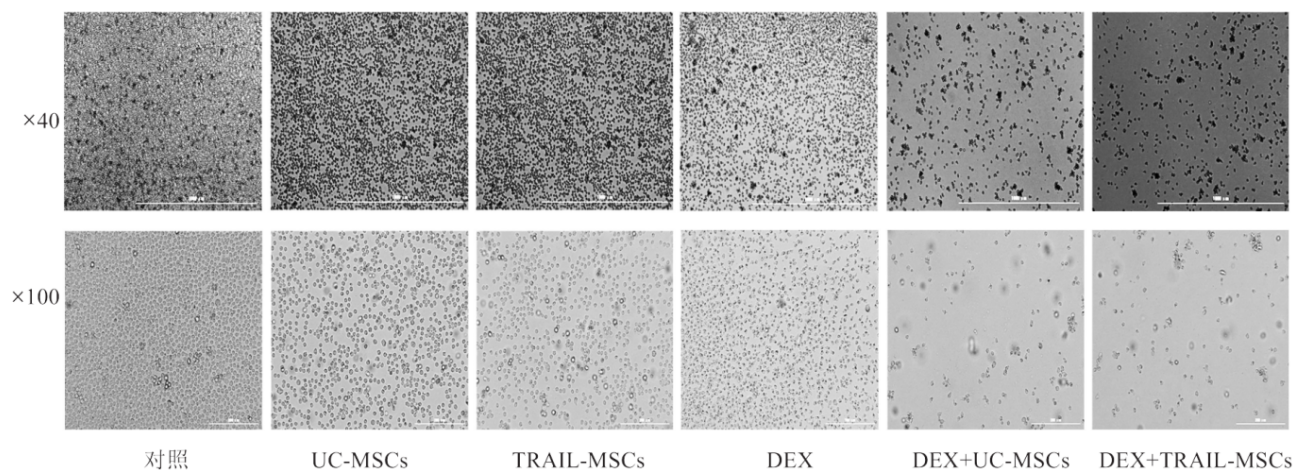
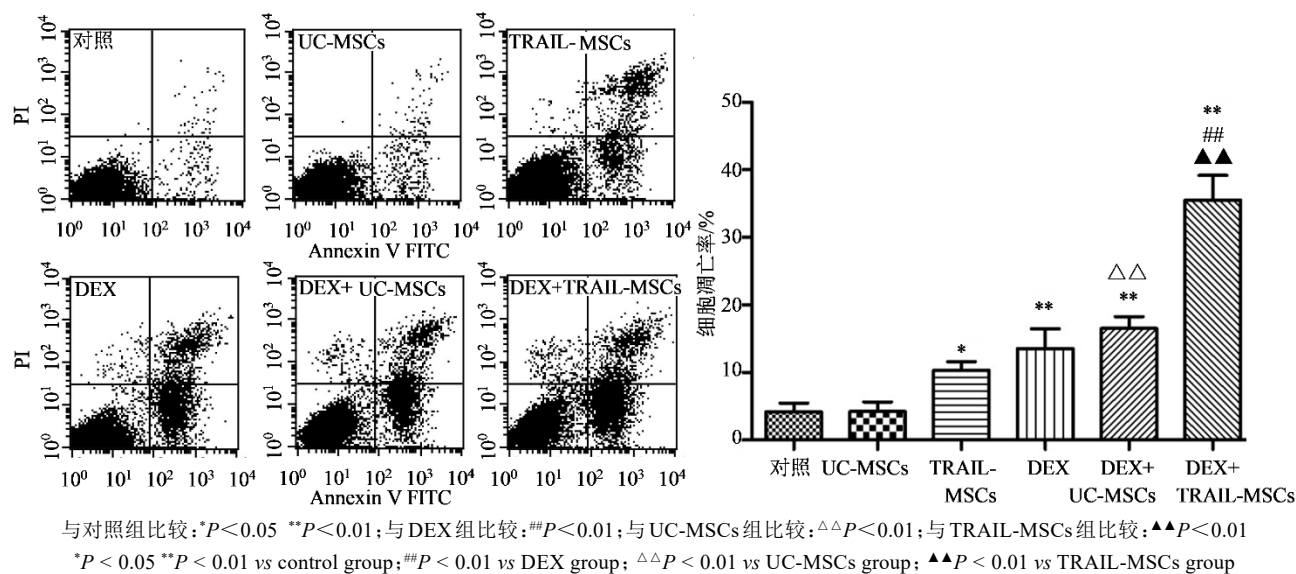


图3 Nalm-6经TRAIL-MSCs和DEX联合作用的细胞状态

Fig. 3 Cell status of Nalm-6 by TRAIL-MSCs and DEX treatment

图4 DEX联合TRAIL-MSCs对Nalm-6细胞凋亡的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)Fig. 4 Apoptosis of Nalm-6 cell with TRAIL-MSCs and DEX treatment ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

达,与对照组比较差异显著($P < 0.01$);DEX联合TRAIL-MSCs作用较单独使用DEX,DR4、DR5的表达显著降低($P < 0.01$)。

4 讨论

目前化疗在B-ALL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^[10]。选择性地激活肿瘤细胞内TRAIL所介导的凋亡是一种颇具前景的治疗方法^[11]。近年来的研究发现,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,因此被认为是一种理想的基因治疗的

运载细胞^[12]。MSCs则具有较强的靶向肿瘤迁徙能力,TRAIL具有特异性诱导肿瘤细胞凋亡功能,因此,TRAIL修饰的MSCs可能成为B-ALL的新疗法。

TRAIL为II型跨膜蛋白,其羧基端位于细胞膜外侧,含有受体结合结构域。膜型TRAIL被特异性基质金属蛋白酶切割后,其胞外区形成可溶性分子(sTRAIL)。sTRAIL所形成的同源三聚体是识别受体诱导凋亡的关键结构^[13-14]。目前靶向TRAIL受体的研究主要包括利用TRAIL作为重组配体发挥作用和开发针对DR4、DR5的人源化单克隆抗体这2种。但上述方法有其局限性,临床前研究发现重组的人sTRAIL在体内的半衰期较短,仅为30~60 min^[15];DR4单克隆抗体Mapatumumab的半衰期有所延长(14~21 d),但可能增加潜在毒副作用^[16]。

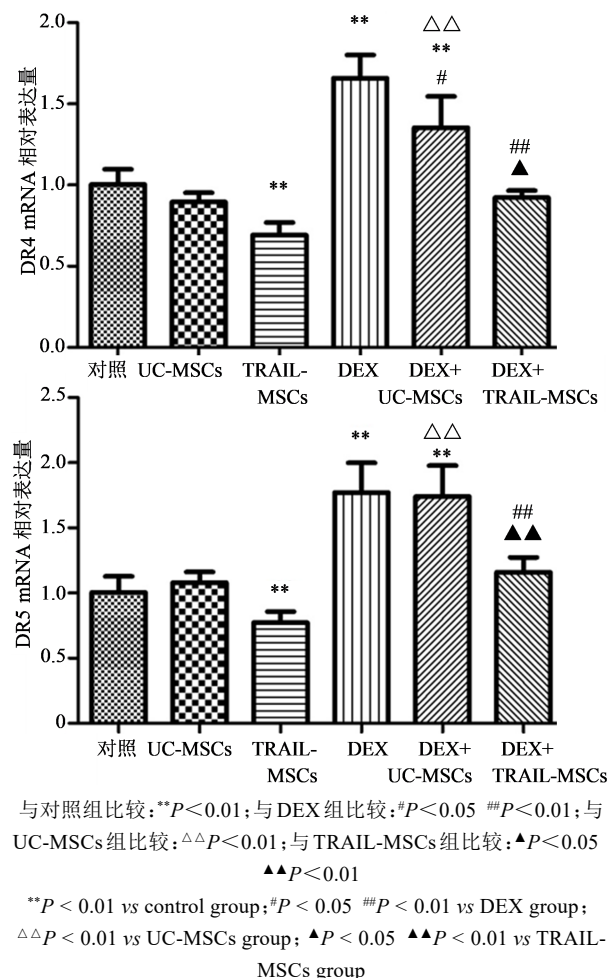


图5 不同处理组 Nalm-6 细胞 TRAIL 受体 DR4、DR5 mRNA 水平相对表达量($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 5 Relative mRNA expression of TRAIL receptor DR4 and DR5 in Nalm-6 cells from different treatment groups($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

大部分原发与血液学和其他实体肿瘤的肿瘤细胞通常是抵抗 TRAIL 介导的细胞凋亡,表现为肿瘤细胞对 TRAIL 的抗性,而其机制涉及 TRAIL-R1/TRAIL-R2 表达不足,TRAIL 诱骗受体水平提高^[6]。DEX 是一种典型的糖皮质激素,通过与糖皮质激素受体结合发挥作用,对淋巴细胞具有强大的杀伤作用,作为临床上常用的处方药物之一,被广泛应用于白血病/淋巴瘤的治疗^[17],其疗效被证实远优于其他的化学合成糖皮质激素^[18]。而且除化疗之外,EDX 还能缓解肿瘤化疗相关的恶心、呕吐、疼痛、炎症等不良反应^[19],故成为临床一线用药中的最佳选择之一^[20]。

本研究成功构建了 TRAIL-MSCs,具有分泌 sTRAIL 的功能,MSCs 特异性地向肿瘤部位迁移并在局部分泌 sTRAIL,靶向发挥促肿瘤凋亡作用,具有更为强大的抗肿瘤作用。同时基因修饰后的 UC-

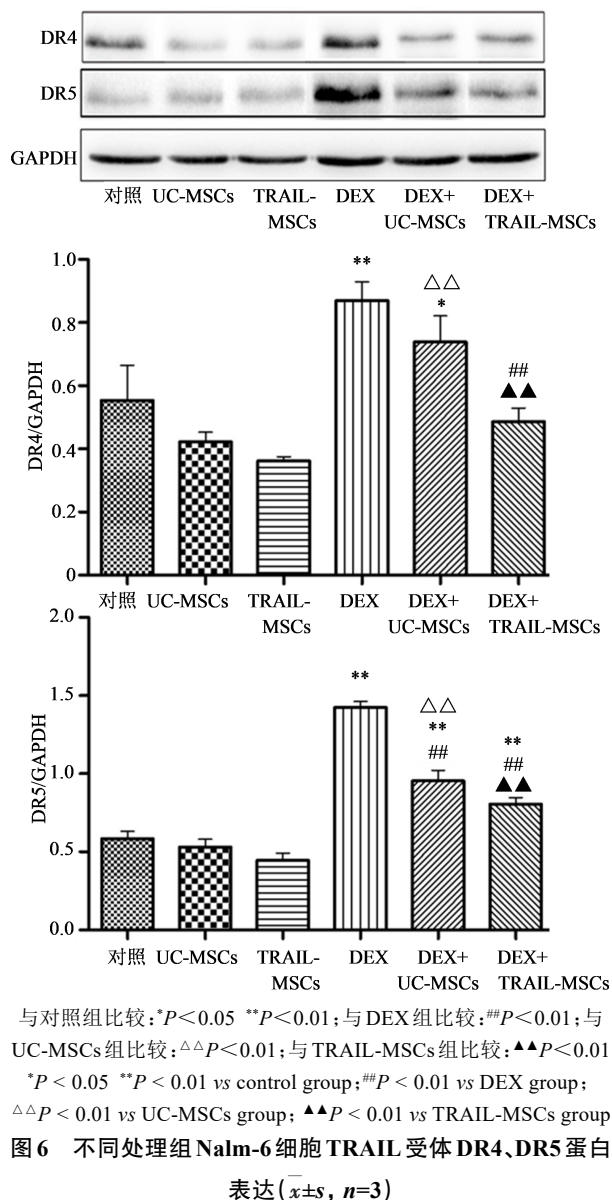


图6 不同处理组 Nalm-6 细胞 TRAIL 受体 DR4、DR5 蛋白表达($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 6 Expression of DR4 and DR5 in Nalm-6 cells from different treatment groups by Western blotting($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

MSCs 表面标志物表达及成骨、成脂分化等基本生物学特性没有改变。DEX 联合 TRAIL-MSCs 可以抑制 Nalm-6 细胞增殖,本研究还进一步检测了 DEX 联合 TRAIL-MSCs 对 Nalm-6 细胞中 DR4、DR5 表达的影响,发现 DEX 可以显著提高肿瘤细胞 DR4、DR5 的表达,且 DEX 对 DR5 表达的促进作用优于 DR4,证实 DEX 通过提高 Nalm-6 表面的 TRAIL 凋亡受体从而增强肿瘤细胞对 TRAIL 的敏感性;而值得注意的是,通过 DEX 与 TRAIL-MSC 联合作用于 Nalm-6 相较于单独使用 DEX,DR4、DR5 的表达均显著降低,可能的原因是 DEX 与 TRAIL-MSC 联合作用更易杀伤对 TRAIL 更加敏感的肿瘤细胞(这些细胞高表达 DR4/5),而将 DR4/5 低表达

的肿瘤细胞留存下来。

TRAIL-MSCs是一种颇具潜力的肿瘤靶向治疗新方法,为因化疗的“脱靶效应”所致的严重不良反应以及肿瘤耐药所致的复发难治的肿瘤患者带来了希望,但其安全性和有效性问题以及进一步应用于临床仍有待更深入的研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

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] Yagita H, Takeda K, Hayakawa Y, et al. TRAIL and its receptors as targets for cancer therapy [J]. *Cancer Sci*, 2004, 95(10): 777-783.
- [5] Henson E S, Johnston J B, Gibson S B. The role of TRAIL death receptors in the treatment of hematological malignancies [J]. *Leuk Lymphoma*, 2008, 49(1): 27-35.
- [6] Testa U. TRAIL/TRAIL-R in hematologic malignancies [J]. *J Cell Biochem*, 2010, 110(1): 21-34.
- [7] Yu R, Deedigan L, Albarenque S M, et al. Delivery of sTRAIL variants by MSCs in combination with cytotoxic drug treatment leads to p53-independent enhanced antitumor effects [J]. *Cell Death Dis*, 2013, 4(2): e503.
- [8] Hamilton A, Gallipoli P, Nicholson E, et al. Targeted therapy in haematological malignancies [J]. *J Pathol*, 2010, 220(4): 404-418.
- [9] 米一, 王立华, 李欣, 等. SPD-TRAIL基因修饰间充质干细胞及其杀伤肺腺癌细胞的研究 [J]. *中国医药生物技术*, 2020, 15(2): 157-162.
Mi Y, Wang L H, Li X. Study of engineered mesenchymal stem cells with SPD-TRAIL gene and their killing effect on the lung adenocarcinoma cells [J]. *Chin Med Biotechnol*, 2014, 55(8): 1715-1724.
- [10] 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(12): 5171-5184.
- [11] Stiegelmaier J, Bremer E, Kellner C, et al. Selective induction of apoptosis in leukemic B-lymphoid cells by a CD19-specific TRAIL fusion protein [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2008, 57(2): 233-246.
- [12] 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(1): 8-16.
- [13] Ashkenazi A, Pai R C, Fong S, et al. Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand [J]. *J Clin Invest*, 1999, 104(2): 155-162.
- [14] Cha S S, Shin H C, Choi K Y, et al. Expression, purification and crystallization of recombinant human TRAIL [J]. *Acta Crystallogr D Biol Cryst*, 1999, 55(5): 1101-1104.
- [15] Petersen K A, Matthiesen F, Agger T, et al. Phase I safety, tolerability, and pharmacokinetic study of recombinant human mannan-binding lectin [J]. *J Clin Immunol*, 2006, 26(5): 465-475.
- [16] Takeda K, Kojima Y, Ikejima K, et al. Death receptor 5 mediated-apoptosis contributes to cholestatic liver disease [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(31): 10895-10900.
- [17] Hennawy F S K, Elzimaity M M T, Moustafa N N, et al., Incidence and outcomes of invasive fungal disease in adult patients with acute lymphoblastic leukemia treated with hyperfractionated cyclophosphamide, vincristine, doxorubicin and dexamethasone: implications for prophylaxis [J]. *Leuk Lymphoma*, 2013, 54(6): 1329-1331.
- [18] Bostrom B C. Dexamethasone versus prednisone and daily oral versus weekly intravenous mercaptopurine for patients with standard-risk acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Cancer Group [J]. *Blood*, 2003, 101(10): 3809-3817.
- [19] Kim M S, Cot C J, Cristoloveanu C, et al. There is No dose-escalation response to dexamethasone (0.0625—1.0 mg/kg) in pediatric tonsillectomy or adenotonsillectomy patients for preventing vomiting, reducing pain, shortening time to first liquid intake, or the incidence of voice change [J]. *Anesth Analg*, 2007, 104(5): 1052-1058.
- [20] Matsuda A, Tanaka A, Amagai Y, et al. Glucocorticoid sensitivity depends on expression levels of glucocorticoid receptors in canine neoplastic mast cells [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2011, 144(3/4): 321-328.

[责任编辑 兰新新]