TRAIL基因修饰脐带间充质干细胞联合5-氟尿嘧啶对U-87MG、A549及HeLa细胞杀伤作用研究

苗 丽[1,2]，李 欣[1,2]，米 一[1,2]，徐立强[1,2]，张晨亮[1,2]，陈瑶瑶[1,2]，刘拥军[1,2]，刘广洋[1,2*]

1. 北京贝来生物科技有限公司，北京 100176

2. 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TRAIL基因修饰的脐带间充质干细胞（TRAIL-MSCs）联合化疗药5-氟尿嘧啶（5-FU）对人脑胶质瘤细胞U-87MG、人肺癌细胞A549和人宫颈癌细胞HeLa的杀伤作用。**方法** 通过基因工程手段结合慢病毒转染体系构建高表达十二聚体TRAIL蛋白（dTRAIL）的TRAIL-MSCs，应用流式细胞技术检测TRAIL-MSCs的生物学特性；通过ELISA技术检测TRAIL-MSCs分泌的TRAIL量来评估转染效果；CCK-8法检测低浓度（0、1、2、4、8、16 μg/mL）5-FU对U-87MG、A549、HeLa细胞的增殖抑制率，并计算其对各细胞的半数抑制浓度（IC_{50}）；CCK-8法检测5-FU（IC_{50}）、UC-MSCs培养上清、TRAIL-MSCs培养上清、5-FU（IC_{50}）＋UC-MSCs培养上清和5-FU（1/4 IC_{50}、1/2 IC_{50}和IC_{50}）＋TRAIL-MSCs培养上清对U-87MG、A549、HeLa细胞的增殖抑制率，计算5-FU和TRAIL-MSCs培养上清的相互作用系数（CDI）；Western blotting法检测5-FU对U-87MG、A549、HeLa细胞死亡受体DR4、DR5蛋白表达的影响；台盼蓝染色法观察5-FU、UC-MSCs、TRAIL-MSCs、5-FU＋UC-MSCs和5-FU＋TRAIL-MSCs对U-87MG、A549、HeLa细胞的杀伤作用。**结果** 生物学检测结果表明TRAIL-MSCs在维持UC-MSCs生物学特性的同时能够高表达TRAIL蛋白。5-FU对U-87MG、A549、HeLa细胞均有增殖抑制作用，抑制作用由高到底依次为HeLa细胞（IC_{50}为9.15 μg/mL）＞A549细胞（IC_{50}为10.62 μg/mL）＞U-87MG细胞（IC_{50}为22.37 μg/mL）。与对照组比较，除A549细胞UC-MSCs培养上清组外，各处理组细胞增殖抑制率均显著升高（P＜0.01、0.001）；与相应各5-FU IC_{50}及TRAIL-MSCs培养上清组比较，U-87MG、HeLa细胞5-FU（1/4 IC_{50}、1/2 IC_{50}和IC_{50}）＋TRAIL-MSCs培养上清组细胞增殖抑制率均显著升高（P＜0.001），A549细胞5-FU（IC_{50}）＋TRAIL-MSCs培养上清组细胞增殖抑制率显著升高（P＜0.01、0.001）；5-FU（1/2 IC_{50}）＋TRAIL-MSCs培养上清组对U-87MG的细胞增殖抑制协同效应最显著（CDI＜0.7且P＜0.001）；5-FU（1/4 IC_{50}）＋TRAIL-MSCs培养上清组对A549的细胞增殖抑制具有协同作用，但其协同效果并不显著；5-FU（1/4 IC_{50}）＋TRAIL-MSCs培养上清组对HeLa细胞增殖抑制的协同效果最显著（CDI＜0.7且P＜0.01）。经5-FU处理后U-87MG、A549、HeLa细胞DR4和DR5的蛋白表达明显升高，其中DR5的表达水平高于DR4，与对照组比较差异均具有统计学意义（P＜0.001）。与对照组比较，5-FU、TRAIL-MSCs和5-FU＋TRAIL-MSCs组对于肿瘤细胞U-87MG、A549、HeLa均具显著的杀伤作用（P＜0.001）；与5-FU或TRAIL-MSCs组比较，5-FU＋TRAIL-MSCs组的杀伤效果更显著（P＜0.001）。**结论** TRAIL-MSCs联合低浓度的5-FU对肿瘤细胞U-87MG、A549和HeLa具有显著的细胞杀伤作用，二者联用协同效果显著，机制可能与5-FU提高DR4、DR5蛋白表达、提高肿瘤细胞对TRAIL-MSCs的敏感性相关。

关键词： 间充质干细胞；5-氟尿嘧啶；TRAIL基因修饰MSCs（TRAIL-MSCs）；肿瘤细胞系；细胞增殖；DR4；DR5

中图分类号： R965 **文献标志码：** A **文章编号：** 1674-6376（2021）10-2065-09

DOI： 10.7501/j.issn.1674-6376.2021.10.003

Killing effect of TRAIL gene modified umbilical cord mesenchymal stem cells combined with 5-fluorouracil on U-87MG, A549 and HeLa cells

MIAO Li[1,2], LI Xin[1,2], MI Yi[1,2], XU Liqiang[1,2], ZHANG Chenliang[1,2], CHEN Yaoyao[1,2], LIU Yongjun[1,2], LIU Guangyang[1,2]

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

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

Abstract: Objective Investigation on the therapeutic effects of genetically modified umbilical cord mesenchymal stem cells (TRAIL-MSCs) combined with chemotherapy drugs 5-fluorouracil (5-FU) in tumor cells U-87MG, A549 and HeLa. **Methods** The

收稿日期： 2021-08-01

基金项目： 北京市科技计划课题（Z211100002521006）

第一作者： 苗 丽，研究方向为干细胞基础与转化医学研究。E-mail：15505902258@163.com

***通信作者：** 刘广洋 E-mail：liugy04@163.com

TRAIL-MSCs were constructed by genetic engineering combined with lentivirus transfection system. The biological characteristics of TRAIL-MSCs were detected by flow cytometry. The expression of TRAIL was detected by ELISA technique to evaluate the transfection effect. CCK-8 method was used to detect the proliferation inhibition rate of U-87MG, A549 and HeLa cells with low concentration (0, 1, 2, 4, 8, 16 μg/mL) 5-Fu, and calculate the IC_{50} of 5-FU to each cell. CCK-8 assay was used to detect 5-FU (IC_{50}), UC-MSCs supernatant, TRAIL-MSCs supernatant, 5-FU (IC_{50}) + UC-MSCs supernatant and 5-FU (1/4 IC_{50}, 1/2 IC_{50} and IC_{50}) + TRAIL-MSCs culture supernatant on the proliferation inhibition rate of U-87MG, A549, HeLa cells, the interaction coefficient (CDI) between 5-FU and TRAIL-MSCs culture supernatant was calculated. Western blotting was used to detect the effects of 5-FU on the expression of U-87MG, A549 and HeLa cell death receptors DR4 and DR5. Trypan blue staining was used to observe the killing effect of 5-FU, UC-MSCs, TRAIL-MSCs, 5-Fu + UC-MSCs and 5-Fu + TRAIL-MSCs on U-87MG, A549 and HeLa cells. **Results** The biological detection results showed that TRAIL-MSCs could maintain the biological characteristics of UC-MSCs and at the same time express TRAIL protein. 5-FU could inhibit the proliferation of U-87MG, A549 and HeLa cells, and the order of inhibition was HeLa cells (IC_{50} 9.15 μg/mL) > A549 cells (IC_{50} 10.62 μg/mL) > U-87mg cells (IC_{50} 22.37 μg/mL). Compared with control group, the inhibition rate of cell proliferation was significantly increased in all treatment groups except the UC-MSCs culture supernatant group of A549 cell (P < 0.01, 0.001). Compared with the corresponding 5-FU IC_{50} and TRAIL-MSCs supernatant groups, the proliferation inhibition rate of U-87MG, 5-FU (1/4 IC_{50}, 1/2 $IC_{50}$and IC_{50}) + TRAIL-MSCs supernatant group was significantly increased (P < 0.001). The proliferation inhibition rate of A549 cells cultured with 5-FU (IC_{50}) + TRAIL-MSCs supernatant was significantly increased (P < 0.01, 0.001). The synergistic effect of 5-FU (1/2 IC_{50}) + TRAIL-MSCs culture supernatant on proliferation inhibition of U-87MG cells was the most significant (CDI < 0.7 and P < 0.001). The 5-FU (1/4 IC_{50}) + TRAIL-MSCs supernatant group had a synergistic effect on the proliferation inhibition of A549 cells, but the synergistic effect was not significant. The synergistic effect of 5-FU (1/4 IC_{50}) + TRAIL-MSCs culture supernatant on proliferation inhibition of HeLa cells was the most significant (CDI < 0.7 and P < 0.01). After 5-FU treatment, the protein expression of DR4 and DR5 in U-87MG, A549 and HeLa cells was significantly increased, and the expression level of DR5 was higher than that of DR4, with statistically significant differences compared with control group (P < 0.001). Compared with the control group, 5-FU, TRAIL-MSCs and 5-Fu + TRAIL-MSCs had significant killing effect on tumor cells U-87MG, A549 and HeLa (P < 0.001). Compared with 5-FU or TRAIL-MSCs group, the killing effect of 5-FU+ TRAIL-MSCs group was more significant (P < 0.001). **Conclusion** TRAIL-MSCs combined with low concentration of 5-FU had significant cytotoxic effect on tumor cells U-87MG, A549 and HeLa, and the synergistic effect of the two was significant. The mechanism may be related to the improvement of DR4 and DR5 protein expression and sensitivity of tumor cells to TRAIL-MSCs by 5-FU.

Key words: mesenchymal stem cells; 5-fluorouracil; TRAIL-MSCs; tumor cell lines; cell proliferation; DR4; DR5

5-氟尿嘧啶（5-FU）在20世纪60年代中期首次作为抗癌抑制剂使用，此后一直是实体瘤治疗中最常见的药物[1]。5-FU在给药时转化为活性代谢物氟脱氧尿苷一磷酸（FdUMP）、氟脱氧尿苷二磷酸（FdUDP）和氟脱氧尿苷三磷酸（FdUTP），5-FU作用的中心机制是FdUMP对胸苷酸合成酶的抑制，而FdUDP和FdUTP可以作为嘧啶类似物掺入RNA和DNA中，导致细胞中毒和死亡[2]。尽管5-FU表现出对DNA合成的抑制活性，但由于其亲水性和二氢嘧啶脱氢酶的快速代谢，导致其临床治疗效果有限。而为达到临床治疗效果则需连续给予高剂量的5-FU，从而对胃肠道、血液、神经、心脏和皮肤产生严重的毒性作用[3]。

肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体（TRAIL）又称载脂蛋白2L（Apo2L），属于肿瘤坏死因子家族，通过与其死亡受体DR4或DR5结合来激活凋亡级联反应，从而诱导肿瘤细胞凋亡[4-5]。在大多数肿瘤细胞系中除了外源性凋亡途径，科学家还发现TRAIL诱导的凋亡信号需要通过Bcl-2调节的线粒体途径，从内源性凋亡途径的激活中增强其对肿瘤细胞凋亡的诱导效果[6-7]。无论是外源性还是内源性凋亡途径，TRAIL不会在正常组织中引起副作用[8]。研究证实TRAIL基因修饰间充质干细胞（TRAIL-MSCs）在体外能够通过内源性与外源性凋亡途径同时对非小细胞肺癌细胞系H460和H2170细胞进行增殖抑制、细胞凋亡以及死亡的诱导作用[9]。然而，临床试验表明TRAIL蛋白因其体内半衰期短、肿瘤靶向性差以及对单一疗法的耐药性等原因导致有效性不足[10-13]。因此需要用敏化剂联合治疗来增强TRAIL的抗肿瘤潜力[14]。研究表明，组蛋白乙酰转移酶抑制剂A485提高H1650和HCC827细胞对TRAIL的敏感性[15]。5-FU预处理能够通过上调DR5和下调生存素使肝癌细胞对TRAIL介导的凋亡敏感[16]。

本研究通过基因工程结合慢病毒载体转染脐带间充质干细胞(UC-MSCs)得到TRAIL-MSCs，联合应用化疗药物5-FU来验证5-FU/TRAIL-MSCs对人脑胶质瘤细胞U-87MG、人肺癌细胞A549和人宫颈癌细胞HeLa的杀伤作用。并期望通过对敏化剂5-FU和TRAIL联合用药的研究为人类实体肿瘤提供一种有效的治疗方案。

1 材料

1.1 细胞

U-87MG、A549和HeLa细胞均购于中国医学科学院基础医学研究所。

1.2 主要试剂

DMEM高糖培养基、DMEM/F-12培养基、胎牛血清以及胰蛋白酶，购于美国Thermo Fisher公司；TRAIL蛋白ELISA检测试剂盒，R&D System；CCK-8试剂盒，日本东仁化学科技有限公司；5-FU，货号MKCL0445，美国默克公司；TRAIL受体DR4、DR5抗体、GAPDH抗体，英国Abcam公司；Western blotting蛋白裂解液RIPA、PMSF，美国CST公司；5×loading buffer，中科瑞泰(北京)生物科技有限公司；二抗Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HRP)，ab205718，英国Abcam公司；Marker，美国Bio-Rad公司。台盼蓝，RNBK0984，美国默克公司。

1.3 主要仪器

SW-CJ-2FD超净工作台，苏州安泰空气技术有限公司；CX41倒置显微镜，奥林巴斯株式会社；Calibur双激光四色流式细胞仪，美国BD公司；IC1000自动细胞计数仪，上海思默生物科技有限公司；ST16R台式冷冻离心机、311细胞培养箱及51119300酶标仪、CL1500成像系统，美国Thermo Fisher公司。

2 方法

2.1 TRAIL-MSCs制备

UC-MSCs的获得及检测、TRAIL质粒构建及慢病毒转染UC-MSCs获得TRAIL-MSCs的方法参考本课题组已建立方法[17]。

2.2 TRAIL-MSCs细胞生物学功能检测

根据国际细胞治疗学会标准，应用流式细胞技术分别检测UC-MSCs和TRAIL-MSCs表面标志物CD19、CD34、CD11b、CD73、CD90、CD45、CD105、HLA-DR的表达情况。

2.3 TRAIL蛋白表达检测

将UC-MSCs和TRAIL-MSCs分别以1.5×10^6个接种于T75细胞培养瓶中，在37 ℃、5% CO_2细胞培养箱中培养48 h后收集细胞培养上清液。应用ELISA试剂盒检测上清液中TRAIL蛋白的表达量，具体操作参考试剂盒说明书。

2.4 5-FU对肿瘤细胞U-87MG、A549、HeLa的增殖抑制作用

通过文献检索[18-19]，本研究选用低浓度(0、1、2、4、8、16 μg/mL)5-FU进行梯度试验。将U-87MG、A549、HeLa细胞分别以1×10^4/孔接种于96孔板中，置于37 ℃、5% CO_2培养箱中培养。各细胞均分为对照组和5-FU各浓度组，每组设置6个复孔。24 h后吸弃细胞培养液，加入100 μL/孔相应的含药培养液继续培养24 h后，采用CCK-8试剂盒检测细胞活力，酶标仪检测450 nm波长处的吸光度(A)值，并计算细胞增殖抑制率及半数抑制浓度(IC_{50})。

$$细胞增殖抑制率=1-A_{5\text{-}FU}/A_{对照}$$

2.5 5-FU联合TRAIL-MSCs培养上清对U-87MG、A549、HeLa细胞的增殖抑制作用

以1×10^4/孔将U-87MG、A549、HeLa细胞分别接种于96孔板中，分为8组：对照组(DMEM培养液)、5-FU(IC_{50})组、UC-MSCs培养上清组、TRAIL-MSCs培养上清组、5-FU(IC_{50})＋UC-MSCs培养上清组和5-FU(1/4 IC_{50}、1/2 IC_{50}和IC_{50})＋TRAIL-MSCs培养上清组，且每组各6个复孔，并置于37 ℃、5% CO_2培养箱中培养过夜。各肿瘤细胞分别以浓度为1/4 IC_{50}、1/2 IC_{50}和IC_{50}的5-FU预处理24 h后，吸弃培养液，对应加入培养了48 h的UC-MSCs和TRAIL-MSCs培养上清液(制备方法见“2.3”项)，继续培养48 h，而对照组则用DMEM培养基培养，5-FU组则采用浓度为IC_{50}的5-FU细胞培养液培养。采用CCK-8试剂盒检测细胞增殖情况，计算细胞增殖抑制率，并根据细胞活力(波长为450 nm的A值)计算5-FU和TRAIL-MSCs培养上清的相互作用系数(CDI)，并对其进行药物联合作用评价，相关计算公式以及CDI显著性分析参照文献方法进行[20-21]。

2.6 5-FU对DR4、DR5蛋白表达的影响

将U-87MG、A549、HeLa细胞各分为对照组(DMEM培养基)和5-FU组(根据CDI结果将U-87MG、A549、HeLa细胞的5-FU浓度依次选定为1/2 IC_{50}、1/4 IC_{50}和1/4 IC_{50})，每组设置3个复孔。3种细胞分别按5×10^5/孔接种于6孔板中，过夜培养后吸弃培养液，加入含药培养液继续培养48 h。收集细胞提取蛋白，检测TRAIL相关死亡受体DR4和DR5的表达情况，Westren boltting实验方法详见文

献报道[22]。图像定量分析使用 Image J 软件进行。

2.7 5-FU 联合 TRAIL-MSCs 对肿瘤细胞 U-87MG、A549、HeLa 的杀伤作用

将 U-87MG、A549、HeLa 细胞分别设置为对照组（DMEM 培养液）、5-FU 组、UC-MSCs 组、TRAIL-MSCs 组、5-FU＋UC-MSCs 组和 5-FU＋TRAIL-MSCs 组，每组设置 3 个复孔。细胞以 5×10^5/孔接种于 6 孔板中，培养过夜后吸弃培养液，对照组、UC-MSCs 组和 TRAIL-MSCs 组分别加入 2.5 mL DMEM 培养基，UC-MSCs 和 TRAIL-MSCs 组在 Transwell 上室接种 2.5×10^5/孔的 UC-MSCs、TRAIL-MSCs 与各肿瘤细胞共培养；而 5-FU、5-FU＋UC-MSCs 和 5-FU＋TRAIL-MSCs 组分别加入含相应浓度的 5-FU（U-87MG、A549、HeLa 细胞的 5-FU 浓度依次选定为 1/2 IC_{50}、1/4 IC_{50} 和 1/4 IC_{50}）培养液预处理 24 h 后，吸弃含有 5-FU 的细胞培养液，5-FU＋UC-MSCs 和 5-FU＋TRAIL-MSCs 组以 2.5×10^5/孔的 UC-MSCs、TRAIL-MSCs 接种于 Transwell 上室中并与各肿瘤细胞系进行共培养，继续培养 48 h 后，显微镜下观察细胞形态；采用台盼蓝细胞染色计数法[22]检测各处理方法对 U-87MG、A549、HeLa 细胞的杀伤情况，计算死细胞百分比，5-FU+TRAIL-MSCs 组实验方法见文献报道[22]。

死细胞百分比=1−实验组活细胞总数/对照组活细胞总数

2.8 统计学处理

计量结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 26.0 统计学软件进行数据结果分析，使用单因素方差分析以及 t 检验。

3 结果

3.1 TRAIL-MSCs 细胞表型检测

以 UC-MSCs 为对照，对 TRAIL-MSCs 进行细胞表型鉴定，结果表明细胞表面标志物 CD19、CD34、CD11b、CD45 和 HLA-DR 的阳性率均＜2%；而 CD73、CD90、CD105 的阳性率均＞95%，说明 TRAIL 基因修饰并未改变载体细胞 UC-MSCs 的细胞表型（表 1）。

3.2 TRAIL-MSCs 分泌 TRAIL 蛋白水平的检测

如图 1 所示，与 UC-MSCs 组比较，TRAIL-MSCs 可高表达 TRAIL 蛋白，1×10^6 个细胞 TRAIL 蛋白表达量达到 20 ng，且差异具有统计学差异（$P<0.001$）。

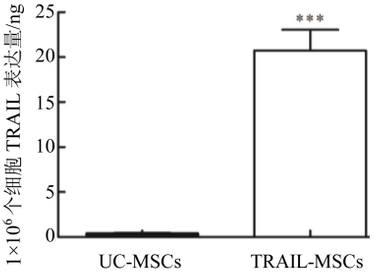
3.3 5-FU 对 U-87MG、A549、HeLa 的细胞增殖抑制作用

5-FU 对 U-87MG、A549、HeLa 细胞均有细胞增殖抑制作用，抑制作用由高到低依次为 HeLa 细胞（IC_{50} 为 9.15 μg/mL）＞A549 细胞（IC_{50} 为 10.62 μg/mL）＞U-87MG 细胞（IC_{50} 为 22.37 μg/mL），但各细胞间 5-FU 的 IC_{50} 无明显差异（图 2）。

表 1 流式细胞表型结果（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Table 1 Flow cytometry phenotype results ($\bar{x}\pm s$, n=3)

细胞	CD19/%	CD34/%	CD11b/%	CD73/%	CD90/%	CD45/%	CD105/%	HLA-DR/%
UC-MSCs	0.04±0.02	0.02±0.02	0.45±0.03	99.89±0.12	99.97±0.01	0.35±0.10	99.87±0.12	0.12±0.12
TRAIL-MSCs	0.16±0.02	0.04±0.04	0.39±0.11	99.98±0.01	99.98±0.02	0.21±0.11	99.92±0.08	0.17±0.12



与 UC-MSCs 组比较：$^{***}P<0.001$

$^{***}P<0.001$ *vs* UC-MSCs group

图 1 TRAIL 表达量检测（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Fig. 1 TRAIL expression detection ($\bar{x}\pm s$, n=3)

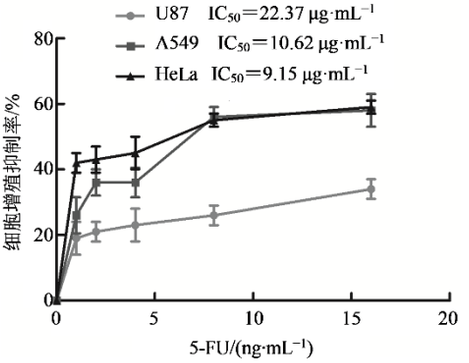


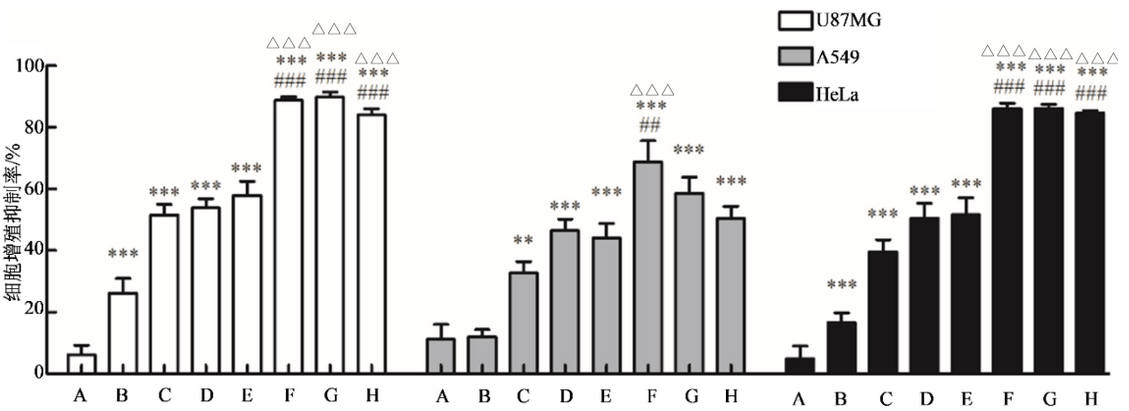
图 2 5-FU 对 U-87MG、A549、HeLa 细胞的增殖抑制作用（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Fig. 2 5-FU inhibits proliferation of U-87MG, A549, and HeLa cells ($\bar{x}\pm s$, n=3)

3.4 TRAIL-MSCs培养上清与5-FU对U-87MG、A549、HeLa细胞增殖抑制的联合作用评价

TRAIL-MSCs培养上清与5-FU联合细胞增殖抑制率结果见图3，联合用药作用结果见表2。与对照组比较，除A549细胞UC-MSCs培养上清组外，各处理组细胞增殖抑制率均显著升高（P＜0.01、0.001）。与相应各5-FU IC_{50}及TRAIL-MSCs培养上清组比较，U-87MG、HeLa细胞5-FU（1/4 IC_{50}、1/2 IC_{50}和IC_{50}）＋TRAIL-MSCs培养上清组细胞增殖抑制率均显著升高（P＜0.001），A549细胞5-FU（IC_{50}）＋TRAIL-MSCs培养上清组细胞增殖抑制率显著升高（P＜0.01、0.001）。

不同浓度的5-FU与TRAIL-MSCs培养上清对U-87MG细胞的CDI均＜1，表明均具有协同作用；5-FU（1/2 IC_{50}）＋TRAIL-MSCs培养上清组对U-87MG的细胞增殖抑制协同效应最显著（CDI＜0.7且P＜0.001）；5-FU（1/4 IC_{50}）＋TRAIL-MSCs培养上清组对A549细胞的CDI＜1，其余组CDI＞1，表明仅5-FU（1/4 IC_{50}）＋TRAIL-MSCs培养上清组对A549的细胞增殖抑制具有协同作用，但其协同效果并不显著；不同浓度的5-FU与TRAIL-MSCs培养上清对HeLa细胞的CDI均＜1，表明均具有协同作用；以5-FU（1/4 IC_{50}）＋TRAIL-MSCs培养上清组的协同效果最显著（CDI＜0.7且P＜0.01）。



A-对照组，B-UC-MSCs培养上清组，C-TRAIL-MSCs培养上清组，D-5-FU IC_{50}组，E-5-FU IC_{50}＋UC-MSCs培养上清组，F-5-FU IC_{50}＋TRAIL-MSCs培养上清组，G-5-FU 1/2 IC_{50}＋TRAIL-MSCs培养上清组，H-5-FU 1/4 IC_{50}＋TRAIL-MSCs培养上清组；与相应对照组比较：$^{**}P$＜0.01 $^{***}P$＜0.001；与相应5-FU IC_{50}组比较：$^{\#\#}P$＜0.01 $^{\#\#\#}P$＜0.001；与TRAIL-MSCs培养上清组比较：$^{\triangle\triangle\triangle}P$＜0.001

A-control group, B-UC-MSCs culture supernatant group, C-TRAIL-MSCs culture supernatant group, D-5-FU IC_{50} group, E-5-FU IC_{50} + UC-MSCs culture supernatant group,F-5-FU IC_{50}+ TRAIL-MSCs culture supernatant group,G-5-FU 1/2 IC_{50}+ TRAIL-MSCs culture supernatant group,H-5-FU 1/4 IC_{50}+ TRAIL-MSCs culture supernatant group; $^{**}P$ < 0.01 $^{***}P$ < 0.001 *vs* corresponding control group; $^{\#\#}P$ < 0.01 $^{\#\#\#}P$ < 0.001 *vs* corresponding 5-FU IC_{50} group; $^{\triangle\triangle\triangle}P$ < 0.001 *vs* corresponding TRAIL-MSCs culture supernatant group

图3 5-FU与TRAIL-MSCs培养上清对U-87MG、A549、HeLa细胞的增殖抑制作用（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Fig. 3 Interaction of TRAIL-MSCs culture supernatant group combined with 5-FU in U-87MG, A549, and HeLa cells ($\bar{x}\pm s$, n=3)

表2 5-FU与TRAIL-MSCs对肿瘤细胞的联合作用（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Table 2 Interaction of TRAIL-MSCs combined with 5-FU in tumor cells ($\bar{x}\pm s$, n=3)

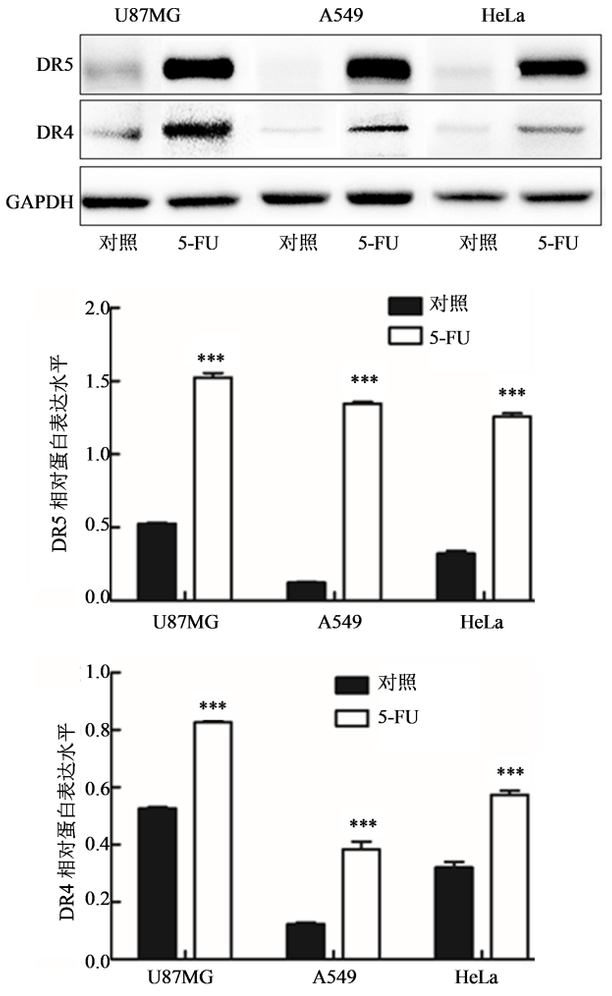
肿瘤细胞	5-FU/(μg·mL^{-1})	CDI
U-87MG	1/4 IC_{50}	0.72
	1/2 IC_{50}	0.40
	IC_{50}	0.89
A549	1/4 IC_{50}	0.99
	1/2 IC_{50}	1.22
	IC_{50}	1.57
HeLa	1/4 IC_{50}	0.50
	1/2 IC_{50}	0.62
	IC_{50}	0.71

CDI＜0.7：显著协同效应；CDI＜1：协同效应；CDI≥1：相加效应或拮抗效应

CDI < 0.7: significant synergistic effect; CDI < 1: synergistic effect; CDI ≥ 1: additive or antagonistic effect

3.5 5-FU对DR4、DR5蛋白表达的影响

如图4所示，在无化疗药5-FU处理的情况下，U-87MG、A549、HeLa细胞的TRAIL死亡受体DR4和DR5均有表达，且各肿瘤细胞对于TRAIL的敏感性大致为U-87MG＞HeLa＞A549；在经5-FU处理后DR4和DR5的表达明显升高，其中DR5的表达水平高于DR4，与对照组比较差异均具有统计学意义（P＜0.001）。



与相应对照组比较：$^{***}P<0.001$

$^{***}P < 0.001$ *vs* corresponding control groups

图4 U-87MG、A549、HeLa细胞TRAIL受体DR4、DR5的表达（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Fig. 4 Expression of TRAIL receptor DR4 and DR5 in U-87MG, A549, and HeLa cells ($\bar{x}\pm s$, n=3)

3.6 TRAIL-MSCs联合5-FU对U-87MG、A549、HeLa细胞的杀伤作用

不同方式处理肿瘤细胞后，通过显微镜观察细胞形态及密度，结果如图5所示，与对照组比较，各处理组对肿瘤细胞均有一定的杀伤作用，其中以5-FU＋TRAIL-MSCs组的杀伤作用最明显。

各处理组死细胞百分比结果如图6所示，与对照组比较，5-FU、TRAIL-MSCs和5-FU＋TRAIL-MSCs组对于肿瘤细胞U-87MG、A549、HeLa均具显著的杀伤作用（$P<0.001$）；与5-FU或TRAIL-MSCs组比较，5-FU＋TRAIL-MSCs组的杀伤效果更显著（$P<0.001$）。因各肿瘤细胞对TRAIL的敏感性不同，且TRAIL-MSCs自身也能够通过提高DR5的表达量来增加肿瘤对TRAIL的敏感性，TRAIL-MSCs对于U-87MG、A549、HeLa细胞表现出不同的杀伤效果；其中联合用药组对U-87MG、HeLa细胞杀伤作用强于A549，这与5-FU对肿瘤细胞U-87MG、A549、HeLa的增敏作用保持一致，该结果充分证明了5-FU和TRAIL-MSCs的联合应用可明显增强TRAIL的杀伤作用。

4 讨论

细胞内代谢是5-FU的功效和毒性的核心，只有一小部分给药剂量转化为活性代谢物FdUMP、FdUDP和FdUTP，而80%～90%的5-FU被转化为无活性的代谢物5，6-二氢5-FU，因此易出现高剂量耐药性，而使其治疗效果受到限制[23]。5-FU在抑制癌细胞增殖的同时也抑制其他快速增殖的细胞，从而导致心脏毒性、胃肠道紊乱、血小板减少、中性粒细胞减少以及皮肤病等一系列副作用[24-26]。相关研究表明，抗癌化疗药物以及TRAIL介导的凋亡可能共享其细胞内共同的信号通路，可以通过TRAIL/化疗药物的联合治疗而提高肿瘤治疗的敏感性[27]。因此，TRAIL/5-FU联合疗法可能在实体肿瘤的治疗中存在一定的临床应用前景。

目前，抗肿瘤药的临床应用受到其高毒性或生物半衰期短的限制。因MSCs显示出向肿瘤部位归巢的能力，且MSCs能够通过抑制血管生成、促进炎症浸润、凋亡和细胞周期停滞以及抑制AKT和Wnt信号通路来抑制肿瘤生长，使得MSCs作为癌症治疗的细胞载体备受关注[28-30]。近年来基因工程化的MSCs用来递送和表达各种抗肿瘤药物，包括I型干扰素、白细胞介素-12（IL-12）、溶瘤病毒以及细胞因子脱氨酶等[31-34]。这些方法不仅降低了全身毒性，同时也增强了抗癌特异性，而且也证明了MSCs作为有效抗癌传递系统的能力。

TRAIL/Apo2L是一种II型膜结合细胞因子[35]。TRAIL与死亡受体DR4和DR5的结合招募Fas相关的死亡结构域蛋白，并最终在癌细胞质膜的内表面形成caspase-8，而活化的caspase-8通过激活下游caspase-3或通过切割Bcl-2家族成员Bid诱导内源性和外源性细胞凋亡途径[36]。因为TRAIL的杀伤活性是癌症特异性的，对大多数正常细胞和组织几乎没有影响，所以TRAIL作为一种有前途的抗癌蛋白已经成为研究热点。研究表明TRAIL-MSCs诱导选定的TRAIL耐药结直肠癌细胞系HCT8的凋亡，并有效地抑制其生长[37]。尽管如此，因TRAIL在体内显示出较短的半衰期（30～60 min），加之不同肿瘤细胞对TRAIL具有一定的耐药性，导致其治

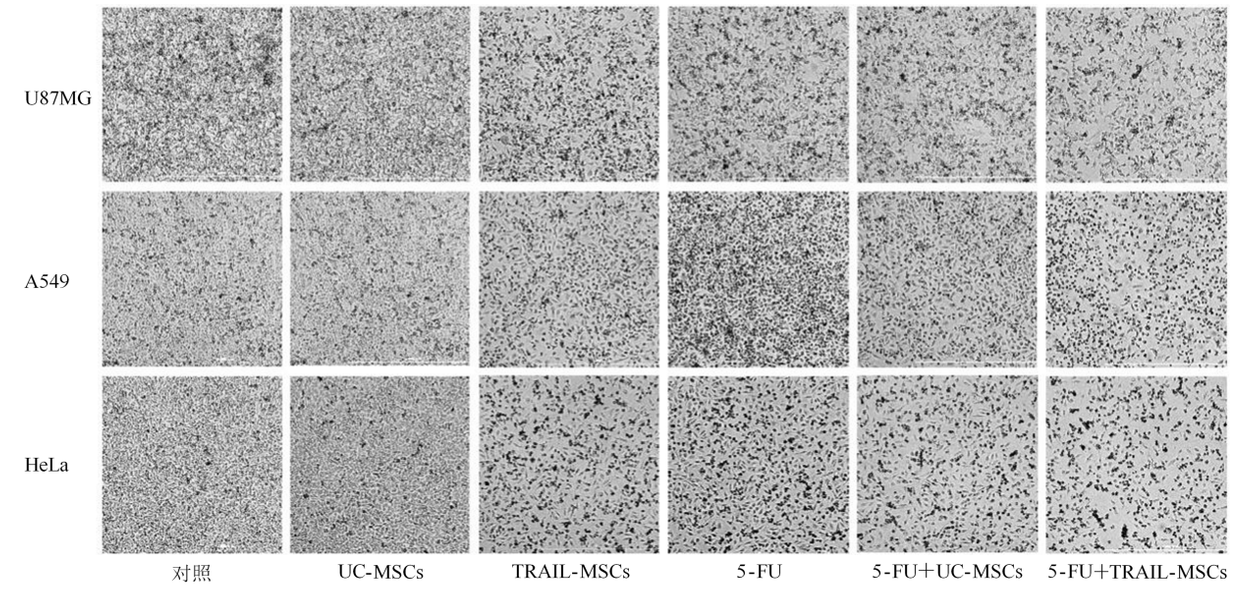
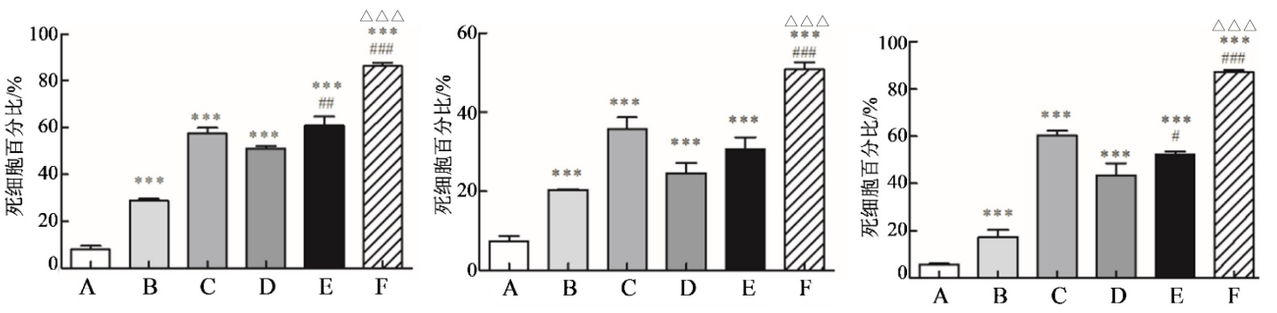


图5 5-FU+TRAIL-MSCs对肿瘤细胞的杀伤作用

Fig. 5 Killing effect of 5-FU combined with TRAIL-MSCs on tumor cells



A-对照组，B-UC-MSCs组，C-TRAIL-MSCs组，D-5-FU，E-5-FU+UC-MSCs，F-5-FU+TRAIL-MSCs组；与相应对照组比较：$^{***}P<0.001$；与相应5-FU组比较：$^{\#}P<0.05$ $^{\#\#}P<0.01$ $^{\#\#\#}P<0.001$；与相应TRAIL-MSCs组比较：$^{\triangle\triangle\triangle}P<0.001$

A-control group, B-UC-MSCs group, C-TRAIL-MSCs group, D-5-FU group, E-5-FU + UC-MSCs group, F-5-FU + TRAIL-MSCs group; $^{***}P < 0.001$ *vs* corresponding control group; $^{\#}P < 0.05$ $^{\#\#}P < 0.01$ $^{\#\#\#}P < 0.001$ *vs* corresponding 5-FU group; $^{\triangle\triangle\triangle}P < 0.001$ *vs* corresponding TRAIL-MSCs culture supernatant group

图6 5-FU+TRAIL-MSCs对肿瘤细胞的杀伤作用（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Fig. 6 Killing effect of 5-FU combined with TRAIL-MSCs on tumor cells ($\bar{x}\pm s$, n=3)

疗效果受到限制。本研究采用化疗药物5-FU与TRAIL-MSCs联合用药作为一种肿瘤选择性治疗方式，以期能够对肿瘤细胞起到一定的治疗效果。

本研究首先通过基因工程手段构建TRAIL质粒，并采用慢病毒转染体系获得TRAIL-MSCs细胞。生物学相关检测表明，TRAIL-MSCs在不改变UC-MSCs生物学特性的同时能够高表达TRAIL蛋白；其次，通过体外实验筛选出浓度为1/2 IC_{50}、1/4 IC_{50}、1/4 IC_{50}的5-FU依次对U-87MG、A549、HeLa细胞进行处理，实验结果表明，不同肿瘤细胞系对TRAIL的敏感性不同，而5-FU能够通过增加TRAIL死亡受体DR4和DR5的表达量来增加肿瘤细胞对TRAIL的敏感性，同时较低浓度5-FU与TRAIL-MSCs联用的杀伤肿瘤的效果与高浓度5-FU+TRAIL-MSCs组相同。实验结果直接证明了5-FU不仅能够对肿瘤细胞起到一定的增殖抑制作用，在与TRAIL-MSCs联用时，能够在保持增殖抑制效果不变的情况下，不仅降低使用浓度，也增加肿瘤细胞系对TRAIL-MSCs的敏感性，进而促进TRAIL-MSCs对肿瘤细胞的凋亡诱导效果，增强杀伤作用。

本研究结果表明低浓度的5-FU与TRAIL-MSCs联合用药是一种有效的肿瘤选择性治疗手段，接下来本课题组将进一步通过体内和体外实验来优化5-FU+TRAIL-MSCs的联合用药方案，以期能够最大限度地减少化疗药物的使用剂量以减轻

其对正常细胞和组织的损伤，最大程度地增加肿瘤细胞对 TRAIL 的敏感性，在减少肿瘤细胞对 5-FU 和 TRAIL 耐药性的同时优化治疗效果。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Detailleur S, Segelov E, Re M D, et al. Dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency in patients with severe toxicity after 5-fluorouracil: a retrospective single-center study [J]. Ann Gastroenterol, 2021, 34(1): 68-72.

[2] Udofot O, Affram K, Israel B, et al. Cytotoxicity of 5-fluorouracil-loaded pH-sensitive liposomal nanoparticles in colorectal cancer cell lines [J]. Integr Cancer Sci Ther, 2015, 2(5): 245-252.

[3] Smith T, Affram K, Nottingham E L, et al. Application of smart solid lipid nanoparticles to enhance the efficacy of 5-fluorouracil in the treatment of colorectal cancer [J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 16989.

[4] Zhong H H, Wang H Y, Li J, et al. TRAIL-based gene delivery and therapeutic strategies [J]. Acta Pharmacol Sin, 2019, 40(11): 1373-1385.

[5] Schneider-Brachert W, Heigl U, Ehrenschwender M. Membrane trafficking of death receptors: implications on signalling [J]. Int J Mol Sci, 2013, 14(7): 14475-14503.

[6] Gonzalvez F, Ashkenazi A. New insights into apoptosis signaling by Apo2L/TRAIL [J]. Oncogene, 2010, 29(34): 4752-4765.

[7] Holland P M. Targeting Apo2L/TRAIL receptors by soluble Apo2L/TRAIL [J]. Cancer Lett, 2013, 332(2): 156-162.

[8] Wong S H M, Kong W Y, Fang C M, et al. The TRAIL to cancer therapy: Hindrances and potential solutions [J]. Crit Rev Oncol, 2019, 143: 81-94.

[9] Fakiruddin K S, Lim M N, Nordin N, et al. Targeting of $CD133^{+}$ cancer stem cells by mesenchymal stem cell expressing TRAIL reveals a prospective role of apoptotic gene regulation in non-small cell lung cancer [J]. Cancers (Basel), 2019, 11(9): E1261.

[10] Herbst R S, Eckhardt S G, Kurzrock R, et al. Phase I dose-escalation study of recombinant human Apo2L/TRAIL, a dual proapoptotic receptor agonist, in patients with advanced cancer [J]. J Clin Oncol, 2010, 28(17): 2839-2846.

[11] Soria J C, Smit E, Khayat D, et al. Phase 1b study of dulanermin (recombinant human Apo2L/TRAIL) in combination with paclitaxel, carboplatin, and bevacizumab in patients with advanced non-squamous non-small-cell lung cancer [J]. J Clin Oncol, 2010, 28(9): 1527-1533.

[12] Trivedi R, Mishra D P. Trailing TRAIL resistance: novel targets for TRAIL sensitization in cancer cells [J]. Front Oncol, 2015, 5: 69.

[13] Wang S L, El-Deiry W S. TRAIL and apoptosis induction by TNF-family death receptors [J]. Oncogene, 2003, 22 (53): 8628-8633.

[14] 刘广洋, 张晨亮, 李 欣, 等. TRAIL 基因修饰间充质干细胞治疗恶性肿瘤的研究进展 [J]. 药物评价研究, 2021, 44(10): 2058-2064.
Liu G Y, Zhang C L, Li X, et al. Treatment of TRAIL gene modified stem cells on malignant cells [J]. Drug Eval Res, 2021, 44(10): 2058-2064.

[15] Zhang B, Chen D, Liu B, et al. A novel histone acetyltransferase inhibitor A485 improves sensitivity of non-small-cell lung carcinoma cells to TRAIL [J]. Biochem Pharmacol, 2020, 175: 113914.

[16] Yang L J, Wang Y T, Zheng H F, et al. Low-dose 5-fluorouracil sensitizes HepG2 cells to TRAIL through TRAIL receptor DR5 and survivin-dependent mechanisms [J]. J Chemother, 2017, 29(3): 179-188.

[17] 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, et al. Study of engineered mesenchymal stem cells with SPD-TRAIL gene and their killing effect on the lung adenocarcinoma cells [J]. Chin Med Biotechnol, 2020, 15(2): 157-162.

[18] Yang L J, Wang Y T, Zheng H F, et al. Low-dose 5-fluorouracil sensitizes HepG2 cells to TRAIL through TRAIL receptor DR5 and survivin-dependent mechanisms [J]. J Chemother, 2017, 29(3): 179-188.

[19] Tan X X, Zhang C C, Gao W D, et al. Overexpression of microRNA-124-5p sensitizes non-small cell lung cancer cells to treatment with 5-fluorouracil via AEG-1 regulation [J]. Oncol Lett, 2021, 21(1): 5.

[20] 汤秀红, 秦叔逵, 陈惠英, 等. 三氧化二砷与顺铂合用抗人肝癌细胞株 QGY-7701 的实验研究 [J]. 肿瘤防治研究, 2002, 29(5): 362-364.
Tang X H, Qin S K, Chen H Y, et al. Increasing ant-i tumor effect of arsenic trioxide combining with cisplatin on the QGY-7701human hepatocarcinoma cells line [J]. Can Res Prevent Treat, 2002, 29(5): 362-364.

[21] 廖志勇, 张胜华, 甄永苏. Geldanamycin 增强顺铂的抗肿瘤作用 [J]. 癌症, 2000, 19(8): 731-734.
Liao Z Y, Zhang S H, Zhen Y S. Geldanamycin enhances antitumor efficacy of cisplatin [J]. Chin J Can, 2000, 19 (8): 731-734.

[22] 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: e503.

[23] Wörmann B, Bokemeyer C, Burmeister T, et al. Dihydropyrimidine dehydrogenase testing prior to treatment with 5-fluorouracil, capecitabine, and tegafur: a consensus paper [J]. Oncol Res Treat, 2020, 43(11): 628-636.

[24] Levit R, Savoy de Giori G, de Moreno de LeBlanc A, et al. Evaluation of vitamin-producing and immunomodulatory lactic acid bacteria as a potential co-adjuvant for cancer therapy in a mouse model [J]. J Appl Microbiol, 2021, 130(6): 2063-2074.

[25] AlQahtani S A, Harisa G I, Alomrani A H, et al. Improved pharmacokinetic and biodistribution of 5-fluorouracil loaded biomimetic nanoerythrocytes decorated nanocarriers for liver cancer treatment [J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2021, 197: 111380.

[26] Leelakanok N, Geary S, Salem A. Fabrication and use of poly(d, l-lactide-co-glycolide) -based formulations designed for modified release of 5-fluorouracil [J]. J Pharm Sci, 2018, 107(2): 513-528.

[27] Mizutani Y, Nakanishi H, Yoshida O, et al. Potentiation of the sensitivity of renal cell carcinoma cells to TRAIL-mediated apoptosis by subtoxic concentrations of 5-fluorouracil [J]. Eur J Cancer, 2002, 38(1): 167-176.

[28] Nowakowski A, Walczak P, Lukomska B, et al. Genetic engineering of mesenchymal stem cells to induce their migration and survival [J]. Stem Cells Int, 2016, 2016: 1-9.

[29] Nowakowski A, Walczak P, Janowski M, et al. Genetic engineering of mesenchymal stem cells for regenerative medicine [J]. Stem Cells Dev, 2015, 24(19): 2219-2242.

[30] Liang W, Chen X, Zhang S, et al. Mesenchymal stem cells as a double-edged sword in tumor growth: focusing on MSC-derived cytokines [J]. Cell Mol Biol Lett, 2021, 26(1): 3.

[31] Komarova S, Kawakami Y, Stoff-Khalili M A, et al. Mesenchymal progenitor cells as cellular vehicles for delivery of oncolytic adenoviruses [J]. Mol Cancer Ther, 2006, 5(3): 755-766.

[32] Chen X C, Wang R, Zhao X, et al. Prophylaxis against carcinogenesis in three kinds of unestablished tumor models via IL12-gene-engineered MSCs [J]. Carcinogenesis, 2006, 27(12): 2434-2441.

[33] Studeny M, Marini F C, Dembinski J L, et al. Mesenchymal stem cells: potential precursors for tumor stroma and targeted-delivery vehicles for anticancer agents [J]. J Natl Cancer Inst, 2004, 96(21): 1593-1603.

[34] Niu J, Xing C Y, Yan C, et al. Lentivirus-mediated CD/TK fusion gene transfection neural stem cell therapy for C6 glioblastoma [J]. Tumour Biol, 2013, 34(6): 3731-3741.

[35] Wiley S R, Schooley K, Smolak P J, et al. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis [J]. Immunity, 1995, 3: 673-662.

[36] Nazim U M, Rasheduzzaman M, Lee Y J, et al. Enhancement of TRAIL-induced apoptosis by 5-fluorouracil requires activating Bax and p53 pathways in TRAIL-resistant lung cancers [J]. Oncotarget, 2017, 8 (11): 18095-18105.

[37] Mueller L P, Luetzkendorf J, Widder M, et al. TRAIL-transduced multipotent mesenchymal stromal cells (TRAIL-MSC) overcome TRAIL resistance in selected CRC cell lines *in vitro* and *in vivo* [J]. Cancer Gene Ther, 2011, 18(4): 229-239.

[责任编辑 兰新新]