

TRAIL 基因修饰间充质干细胞对神经胶质瘤细胞杀伤作用研究

李欣^{1,2}, 徐立强^{1,2}, 米一^{1,2}, 苗丽^{1,2}, 张晨亮^{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** 研究肿瘤坏死因子相关的凋亡配体 (TRAIL) 基因修饰间充质干细胞 (TRAIL-MSCs) 对神经胶质瘤细胞的杀伤作用。 **方法** 复苏冻存的脐带间充质干细胞 (UC-MSCs) 种子库细胞, 通过慢病毒转染的方法制备 TRAIL-MSCs。ELISA 法检测 UC-MSCs、TRAIL-MSCs 细胞上清中 TRAIL 的含量; 采用 CCK-8 试剂盒法检测重组 TRAIL 蛋白 (rTRAIL, 0、25、50、100、200、400 ng/mL) 对 U87MG、U251 细胞的增殖抑制情况; 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 法检测 U87MG、U251 细胞中死亡受体 DR4、DR5 mRNA 表达水平, 比较 2 种细胞对 TRAIL 的敏感性; 将 U87MG、U251 细胞分别分为对照组、UC-MSCs 培养上清 (阴性对照) 组、TRAIL-MSCs 培养上清 (含 TRAIL 约 100 ng/mL) 组和 rTRAIL (100 ng/mL) 组, CCK-8 法检测细胞增殖抑制率; Annexin V-FITC/PI 法检测细胞凋亡率; qRT-PCR 法检测 DR4、DR5 mRNA 表达水平。 **结果** TRAIL-MSCs 培养上清中 TRAIL 表达量显著高于 UC-MSCs ($P < 0.01$); rTRAIL 对 U87MG 细胞的半数抑制浓度 (IC_{50}) 为 162 ng/mL, 而对 U251 细胞的 IC_{50} 大于 800 ng/mL, U87MG 对 TRAIL 的敏感性更高, 差异显著 ($P < 0.01$); U87MG 细胞 DR4、DR5 mRNA 相对表达量均显著高于 U251 细胞 ($P < 0.01$); 与对照组比较, TRAIL-MSCs 培养上清、rTRAIL 对 U87MG、U251 细胞均有显著增殖抑制及促进凋亡的作用 ($P < 0.05, 0.01$), TRAIL-MSCs 培养上清作用效果显著优于 rTRAIL ($P < 0.01$); 与 U251 相比, U87MG 对 TRAIL-MSCs 培养上清的敏感性更强; TRAIL-MSCs 培养上清处理的 U87MG 细胞 DR4、DR5 mRNA 表达量显著降低 ($P < 0.01$)。 **结论** TRAIL-MSCs 对神经胶质瘤细胞有显著增殖抑制和杀伤作用, 其功能可能与其受体 DR4 及 DR5 有关。

关键词: 神经胶质瘤; 间充质干细胞; 基因修饰; 肿瘤坏死因子相关的凋亡配体 (TRAIL)

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2021) 10-2081-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2021.10.005

Killing effect of TRAIL gene modified mesenchymal stem cells on glioma cells

LI Xin^{1,2}, XU Liqiang^{1,2}, MI Yi^{1,2}, MIAO Li^{1,2}, ZHANG Chenliang^{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** To study the killing effect of tumor necrosis factor related apoptosis ligand (TRAIL) gene modified mesenchymal stem cells (TRAIL-MSCs) on glioma cells. **Methods** The cryopreserved umbilical cord mesenchymal stem cells (UC MSCs) seed bank cells were resuscitated and TRAIL-MSCs were prepared by lentivirus transfection. The content of TRAIL in the supernatant of UC-MSCs and TRAIL-MSCs was detected by ELISA. CCK-8 kit was used to detect the inhibition of recombinant TRAIL protein (rTRAIL, 0, 25, 50, 100, 200, 400 ng/mL) on the proliferation of U87MG and U251 cells. The mRNA expression levels of death receptors DR4 and DR5 in U87MG and U251 cells were detected by real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR). U87MG and U251 cells were divided into control group, UC-MSCs culture supernatant (negative control) group, TRAIL-MSCs culture supernatant (containing TRAIL about 100 ng/mL) group and rTRAIL (100 ng/mL) group respectively. The inhibition rate of cell proliferation was detected by CCK-8 method; Annexin V-FITC/PI method was used to detect apoptosis. The mRNA expression levels of DR4 and DR5 were detected by qRT-PCR. **Results** The expression of TRAIL in the supernatant of TRAIL-MSCs was significantly higher than that of UC-MSCs ($P < 0.01$). The IC_{50} of rTRAIL on U87MG cells was about 162 ng/mL, while that on U251 cells was more than 800 ng/mL. U87MG was more sensitive to trail ($P < 0.01$). The relative expressions of DR4 and DR5 mRNA in U87MG cells were significantly higher than those in U251 cells ($P < 0.01$). Compared with control group, TRAIL-

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: 李欣, 研究方向为干细胞基础与转化医学研究。E-mail: 397044807@qq.com

*通信作者: 刘广洋 E-mail: liugy04@163.com

MSCs culture supernatant and rTRAIL significantly inhibited the proliferation and promoted apoptosis of U87MG and U251 cells ($P < 0.05, 0.01$). The effect of TRAIL-MSCs culture supernatant was significantly better than that of rTRAIL ($P < 0.01$). U87MG was more sensitive to the supernatant of TRAIL-MSCs than U251. The expression of DR4 and DR5 mRNA in U87MG cells treated with TRAIL-MSCs culture supernatant decreased significantly ($P < 0.01$). **Conclusion** TRAIL-MSCs can significantly inhibit the proliferation and kill glioma cells, and its function may be related to DR4 and DR5.

Key words: glioma; mesenchymal stem cells; gene engineering; TRAIL

神经胶质母细胞瘤是常见的原发性颅内恶性肿瘤, 占所有原发性中枢神经系统肿瘤的16%, 5年生存率仅为3.3%, 具有高度侵袭性和高度恶性等特点^[1], 被世界卫生组织(WTO)定为IV级星形细胞瘤^[2-3]。即使目前的治疗方法不断完善, 患者的预后仍然很差, 5年生存期仅10%, 通过传统的方法(包括手术切除、放疗和化疗)治疗后, 仍有较高的复发率^[4-5]。

近年来, 间充质干细胞(MSCs)在抗癌治疗中的应用前景受到了广泛的关注, MSCs是一种来源于中胚层的干细胞, 可以从脐带、骨髓等组织中分离^[6], MSCs通过不同的机制(分化、分泌细胞因子、外泌体等)在不同的病理微环境中均有一定的治疗潜力^[7]。此外, 越来越多的实验表明, MSCs既有与免疫相关疾病治疗有关的免疫功能^[8], 也可作为细胞载体, 通过基因工程将抗肿瘤分子运送到特定肿瘤部位, 在肿瘤实质与间质内传递生物活性物质^[9-10]。多项研究表明, MSCs能够表达抗肿瘤因子, 如白细胞介素-2(IL-2)^[11]、干扰素- β (IFN- β)^[12]、肿瘤坏死因子相关的凋亡配体(TRAIL)^[13-14]和IL-15^[15], 这些因子可以随MSCs到达肿瘤部位, 并有效地诱导肿瘤消退^[16]。因此, MSCs有望成为生物疗法治疗肿瘤的首选细胞。

TRAIL又称为载脂蛋白2L(Apo2L), 是诱导细胞凋亡的肿瘤坏死因子家族之一。其作用机制是通过结合其两个特异性死亡受体(DR4、DR5)和诱饵受体(DcR1、DcR2和护骨素OPG), 来激活外源性细胞凋亡^[17]。其中, DR4和DR5主要在肿瘤细胞中表达, 而DcR1和DcR2通常在正常组织细胞中表达^[18]。当TRAIL与DR4或DR5结合时, 可以通过激活caspase-8和caspase-3来诱导肿瘤细胞凋亡^[19], 但在正常细胞中, TRAIL结合诱饵受体后则不会启

动细胞凋亡^[18]。因此, TRAIL的优点是可以杀死肿瘤细胞而不影响正常细胞。由于这种优点, TRAIL成为了研究者长期研究的潜在抗癌药。

本研究通过基因工程技术成功构建了表达TRAIL的基因修饰MSCs(TRAIL-MSCs), 并验证其对神经胶质瘤细胞系(U87MG、U251)的杀伤作用及对肿瘤细胞DR4、DR5表达的影响, 为基因修饰MSCs治疗神经胶质瘤的临床应用提供参考。

1 材料

1.1 细胞

人脑胶质瘤细胞U87MG和U251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、DMEM/F-12培养基等均购于美国Thermo Fisher公司; TRAIL蛋白ELISA检测试剂盒、重组TRAIL蛋白(rTRAIL, 批号752904, 25 μ g)购于Biolegend公司; 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; RNA提取、逆转录试剂盒及SYBR Green qPCR试剂盒购于美国Thermo Fisher公司; 引物DR4、DR5、 β -actin由苏州金唯智生物科技有限公司合成, 引物序列见表1。

1.3 主要仪器

SW-CJ-ZFD超净工作台, 苏州安泰空气技术有限公司; ST16R台式冷冻离心机, 赛默飞世尔科技公司; SPX-70BIII生化培养箱, 泰斯特仪器有限公司; 311细胞培养箱, 赛默飞世尔科技公司; CX41倒置显微镜, 奥林巴斯株式会社; 51119300酶标仪, 赛默飞世尔科技公司; 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; 7500FAST荧光定量PCR仪, 美国应用生物系统公司; CL1500成像系统, 赛默飞

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

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

世尔科技公司。

2 方法

2.1 TRAIL-MSCs制备及检测

复苏冻存的人脐带MSCs(UC-MSCs)种子库细胞,通过慢病毒转染的方法制备TRAIL-MSCs,具体操作方法参照文献报道^[20]。

2.2 ELISA法检测TRAIL-MSCs中TRAIL表达量

UC-MSCs、TRAIL-MSCs以 7.5×10^5 /瓶接种T75培养瓶各3瓶,置 37°C 、5% CO_2 培养箱培养72 h后,收获上清,细胞消化并计数,上清于 -80°C 保存,用于后续实验。根据ELISA试剂盒说明书操作,检测UC-MSCs、TRAIL-MSCs细胞上清中TRAIL的含量,计算每 1×10^6 细胞TRAIL表达量。

2.3 rTRAIL对U87MG、U251细胞的增殖抑制作用

将U87MG、U251细胞以 1×10^4 /孔接种于96孔板,置于 37°C 、5% CO_2 培养箱过夜后,吸弃培养基,分别更换含0、25、50、100、200、400 ng/mL rTRAIL^[21-22]的新鲜培养基,每孔100 μL ,每组设置6个复孔,继续培养48 h,采用CCK-8试剂盒法检测rTRAIL对U87MG、U251细胞的增殖抑制率,选择适当浓度的rTRAIL进行后续实验。

2.4 U87MG、U251细胞对TRAIL的敏感性

U87MG、U251细胞以 5×10^5 /孔接种于6孔板,置于 37°C 、5% CO_2 培养箱培养48 h后,实时荧光定量PCR(qRT-PCR)法检测U87MG、U251细胞中DR4、DR5 mRNA表达水平,比较2种神经胶质瘤细胞对TRAIL的敏感性。Trizol法提取细胞总RNA,反转录制备cDNA,根据ABI使用说明进行qRT-PCR反应,每个样品重复3次,反应过程如下: 95°C 、20 s,1个循环; 95°C 、3 s, 60°C 、3 s(荧光吸收),40个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法对数据进行分析。

2.5 TRAIL-MSCs培养上清对U87MG、U251细胞增殖的抑制作用

将U87MG、U251细胞分别分为4组,分别为对照组、UC-MSCs培养上清(阴性对照)组、TRAIL-MSCs培养上清(含TRAIL约100 ng/mL)组和rTRAIL(100 ng/mL)组,每组6个复孔。U87MG、U251细胞以 1×10^4 /孔接种于96孔板,置于 37°C 、5% CO_2 培养箱过夜后,吸弃培养基,各组分别更换不同培养液,每孔100 μL ,继续培养,在更换培养基后0、24、48、72、96 h,CCK-8试剂盒法检测肿瘤细胞增殖抑制率。

2.6 TRAIL-MSCs培养上清对细胞凋亡的影响

实验分组情况同“2.5”项,每组设置3个复孔。将U87MG、U251细胞以 5×10^5 /孔接种于6孔板,置于 37°C 、5% CO_2 培养箱过夜后,吸弃培养基,各组分别更换不同培养液,每孔2 mL,培养48 h后,细胞经无EDTA胰酶消化收集,Annexin V-FITC/PI流式细胞法检测肿瘤细胞的凋亡情况。

2.7 TRAIL-MSCs培养上清对DR4、DR5表达的影响

实验分组情况同“2.5”项,每组设置3个复孔。U87MG、U251细胞以 5×10^5 /孔接种于6孔板,置于 37°C 、5% CO_2 培养箱过夜后,吸弃培养基,分别更换不同培养液,每孔2 mL,继续培养24 h后,qRT-PCR法检测DR4、DR5 mRNA表达水平。

2.8 数据统计分析

数据均表示为 $\bar{x} \pm s$,采用SPSS 19.0统计学软件,使用单因素方差分析法分析组间差异性。

3 结果

3.1 TRAIL-MSCs上清中TRAIL的表达量

ELISA试剂盒法检测UC-MSCs、TRAIL-MSCs细胞上清中TRAIL的浓度,并通过细胞数量和溶液体积换算每百万细胞的蛋白表达量,结果如图1所示,TRAIL-MSCs培养上清中TRAIL表达量显著高于UC-MSCs($P < 0.01$)。

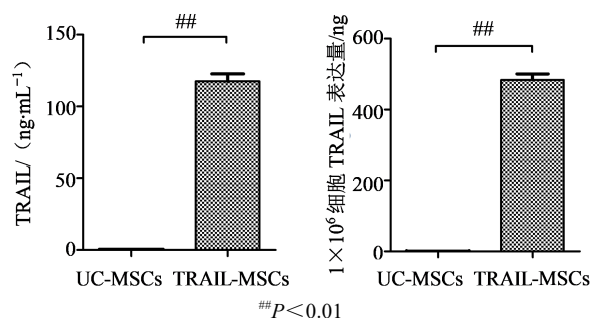


图1 ELISA法检测UC-MSCs、TRAIL-MSCs中TRAIL表达($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 1 TRAIL expression from each MSCs group with ELISA assay ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

3.2 rTRAIL对UC-MSCs、TRAIL-MSCs的增殖抑制作用

rTRAIL对2种神经胶质瘤细胞均有增殖抑制作用,rTRAIL对U87MG的半数抑制浓度(IC_{50})为162 ng/mL,而对U251的 IC_{50} 大于800 ng/mL,U87MG对TRAIL的敏感性更高,2种细胞之间差异显著($P < 0.01$),在后续试验中,rTRAIL的浓度选择100 ng/mL。见图2。

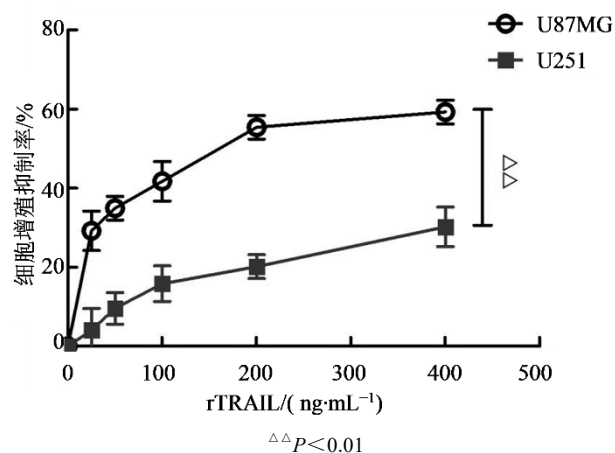


图2 rTRAIL对U87MG、U251细胞的增殖抑制作用
($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig. 2 rTRAIL inhibits proliferation of U87MG and U251 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

3.3 U87MG、U251细胞DR4、DR5 mRNA相对表达量

qRT-PCR法检测U87MG和U251细胞中DR4、DR5 mRNA相对表达量,比较2种细胞对TRAIL的敏感性。U87MG细胞DR4、DR5 mRNA相对表达量均显著高于U251细胞($P<0.01$),与U251细胞比较,U87MG细胞对TRAIL的敏感性更高。见图3。

3.4 TRAIL-MSCs培养上清对U87MG、U251细胞的增殖抑制作用

结果如图4所示,TRAIL-MSCs培养上清和rTRAIL均可以抑制U87MG、U251细胞的增殖,其中TRAIL-MSCs培养上清对U87MG、U251细胞的增殖抑制作用均显著优于rTRAIL($P<0.01$),同时,与U251细胞相比,U87MG细胞对TRAIL-MSCs培养上清的敏感性更强。

3.5 TRAIL-MSCs培养上清对U87MG、U251细胞的凋亡作用

结果如图5所示,与对照组比较,TRAIL-MSCs培养上清及rTRAIL均可以显著促进U87MG和U251细胞的凋亡($P<0.05$ 、 0.01);并且TRAIL-MSCs培养上清对肿瘤细胞的促凋亡作用强于rTRAIL($P<0.01$),与U251细胞相比,U87MG细胞对TRAIL-MSCs培养上清的敏感性更强。

3.6 TRAIL-MSCs培养上清对U87MG、U251细胞DR4、DR5表达的影响

结果如图6所示,TRAIL-MSCs培养上清处理U87MG细胞24 h后,DR4、DR5 mRNA的相对表达

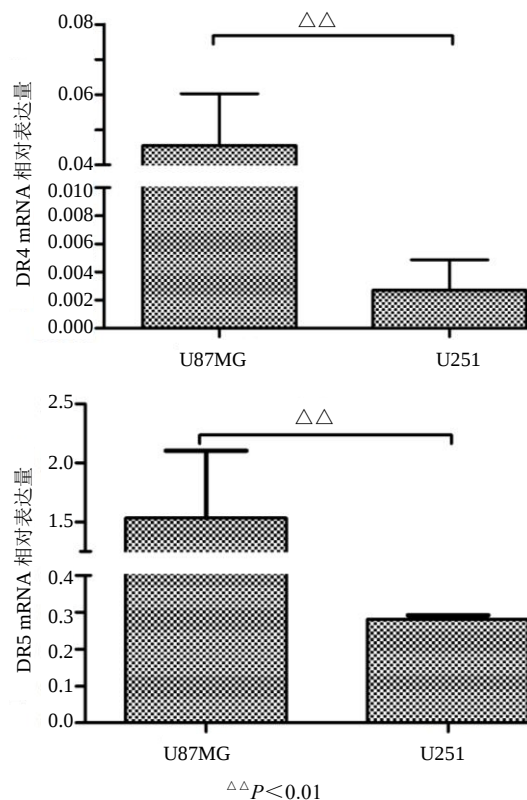


图3 U87MG、U251细胞DR4、DR5 mRNA相对表达量
($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 3 Relative expression of DR4 and DR5 mRNA in U87MG、U251 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

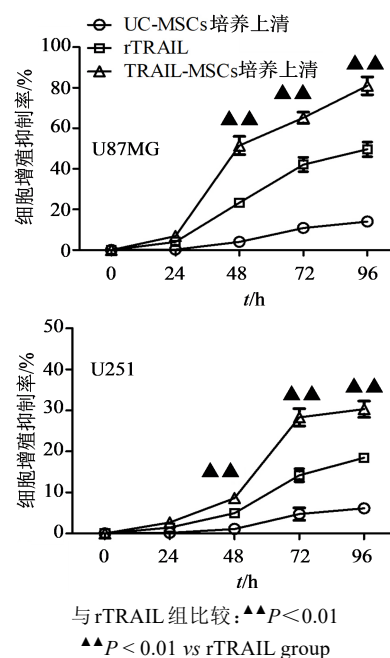
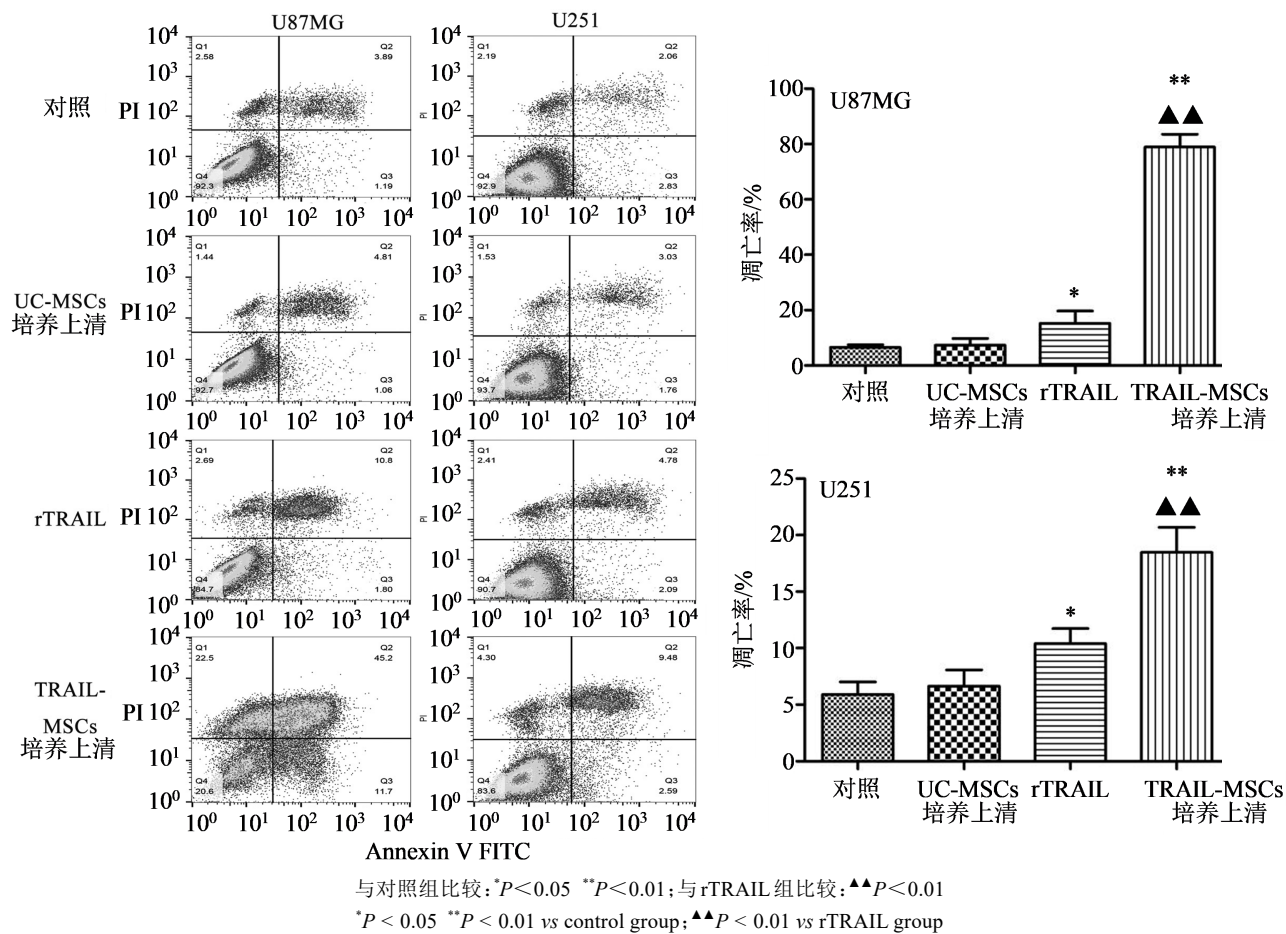
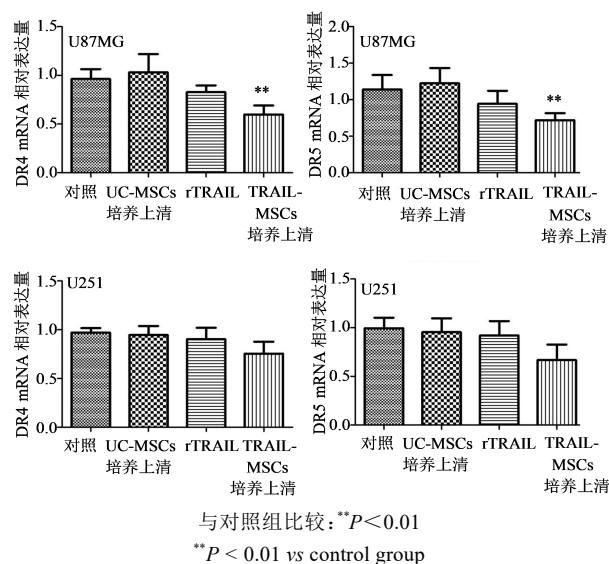


图4 不同处理对U87MG、U251细胞的增殖抑制作用
($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig. 4 Effect of different treatments on U87MG and U251 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

图5 不同处理对U87MG、U251细胞凋亡的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)Fig. 5 Apoptosis of U87MG and U251 cells in different treatments groups ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)图6 qRT-PCR法检测各组U87MG、U251细胞DR4、DR5表达($\bar{x} \pm s$, $n=3$)Fig. 6 Expression of DR4 and DR5 in different treatment groups with qRT-PCR ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

量与对照组比较显著降低($P < 0.01$); 而处理U251细胞24 h后, 与对照组比较, TRAIL-MSCs培养上清

组DR4和DR5的mRNA相对表达量均降低, 但无显著性差异。

4 讨论

神经胶质瘤的特点是高度浸润能力、快速增殖、自我更新能力强等, 因此传统的手术治疗不能彻底清除肿瘤组织, 多数情况下会导致肿瘤复发^[5], 因此, 彻底清除肿瘤组织及浸润的细胞具有重要意义^[23]。

MSCs以独特的侵袭肿瘤微环境和表达外源转入基因的能力, 可以追踪、归巢至浸润到组织中的肿瘤细胞, 用来治疗无法通过手术去除的肿瘤^[24], MSCs治疗肿瘤作为一种可行的治疗方法引起了人们极大的兴趣。研究者发现, MSCs可以向胶质瘤迁移^[24-25], 并在肿瘤组织及浸润的肿瘤细胞中发现了MSCs的存在^[25]。MSCs可以分泌大量的与炎症、细胞迁移等相关的因子, 通过增加胶质瘤细胞的凋亡实现抗肿瘤的作用^[26]。脐带来源的MSCs条件培养基可以抑制胶质瘤细胞的增殖、增加胶质瘤细胞的凋亡, 这种抗肿瘤作用是通过激活TRAIL实现

的^[27]。这些研究表明,TRAIL-MSCs可以选择性地针对肿瘤细胞起到抑制增殖、促进凋亡的作用。

TRAIL 与其死亡受体(DR4 和 DR5)的结合启动外源性凋亡途径并抑制肿瘤的增殖,死亡受体衔接 Fas 相关死亡结构域(FADD)形成诱导凋亡的信号复合物(DISC),激活天冬氨酸蛋白水解酶,例如 caspase-3,并最终导致细胞凋亡^[28]。多项研究已经证明,TRAIL 单独作为抗肿瘤药物是有效的^[29],但其半衰期短,在体内的作用有限,将 MSCs 进行基因改造,选择性的高表达 TRAIL 成为了更多研究者的选择。有研究发现,在体外神经胶质瘤实验模型中,可表达分泌 TRAIL 的基因修饰 MSCs 有抑制肿瘤生长的特性^[25,30],并且这种治疗优于重组 rTRAIL 蛋白、抗 DR5 抗体等传统治疗方法^[31-32]。一些研究就通过增强肿瘤细胞对 TRAIL 的敏感性而增强 TRAIL 的作用做了进一步的研究,例如,小剂量顺铂能够增加 TRAIL 死亡受体 DR4/DR5 的表达,增强 TRAIL 的疗效,进而抑制多形性胶质母细胞的生长^[33]。在一项使用小鼠恶性胶质瘤异种移植模型的研究中也观察到了类似的结果,在该模型中通过增加 DR5 受体的表达,提高了肿瘤对 TRAIL 的敏感性^[34]。有研究表明,MSCs 可以显著上调肿瘤细胞中的 TRAIL 受体蛋白的表达,并且分泌某些细胞因子和转录因子,导致肿瘤微环境中 TRAIL 基因转录和后续相应蛋白的表达量增加^[3],进而增强后续 TRAIL 的作用。

本研究通过慢病毒包装感染 UC-MSCs 制备了 TRAIL-MSCs,选择 2 种不同神经胶质瘤细胞 U87MG、U251,通过检测发现,与 U251 比较,U87MG 对 TRAIL 的敏感性更强,而 TRAIL-MSCs 培养上清对 U87MG 也具有更加显著的增殖抑制及杀伤作用。同时,与 rTRAIL 相比,TRAIL-MSCs 对神经胶质瘤细胞也表现出更强的增殖抑制和杀伤作用,有趣的是,TRAIL-MSCs 处理神经胶质细胞 U87MG、U251 后,其 TRAIL 受体 DR4、DR5 的表达量均降低,有可能是由于 TRAIL-MSCs 处理后 DR4/5 阳性的肿瘤细胞已死亡,残留的细胞为 DR4/5 阴性。因此,上述研究说明 TRAIL-MSCs 对肿瘤细胞的增殖抑制和杀伤作用可能与 DR4、DR5 有关。

本研究通过体外实验充分证实了 TRAIL-MSCs 培养上清是治疗神经胶质瘤的有效手段,为后续深入机制研究及临床应用提供参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Deng X, Zhao W, Song L J, et al. Pro-apoptotic effect of TRAIL-transfected endothelial progenitor cells on glioma cells [J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(4): 5004-5012.
- [2] Louis D N, Ohgaki H, Wiestler O D, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system [J]. *Acta Neuropathol*, 2007, 114(2): 97-109.
- [3] Hardiany N S, Yo E C, Ngadiono E, et al. Gene expression of molecules regulating apoptotic pathways in glioblastoma multiforme treated with umbilical cord stem cell conditioned medium [J]. *Malays J Med Sci*, 2019, 26(6): 35-45.
- [4] Li M, Sun S J, Dangelmajer S, et al. Exploiting tumor-intrinsic signals to induce mesenchymal stem cell-mediated suicide gene therapy to fight malignant glioma [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 88.
- [5] Omuro A, DeAngelis L M. Glioblastoma and other malignant gliomas: A clinical review [J]. *JAMA*, 2013, 310(17): 1842-1850.
- [6] Dominici M, le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement [J]. *Cytotherapy*, 2006, 8(4): 315-317.
- [7] D'Souza N, Rossignoli F, Golinelli G, et al. Mesenchymal stem/stromal cells as a delivery platform in cell and gene therapies [J]. *BMC Med*, 2015, 13: 186.
- [8] Munir H, McGettrick H M. Mesenchymal stem cell therapy for autoimmune disease: risks and rewards [J]. *Stem Cells Dev*, 2015, 24(18): 2091-2100.
- [9] Grisendi G, Bussolari R, Veronesi E, et al. Understanding tumor-stroma interplays for targeted therapies by armed mesenchymal stromal progenitors: the Mesenkillers [J]. *Am J Cancer Res*, 2011, 1(6): 787-805.
- [10] Vizoso F J, Eiro N, Cid S, et al. Mesenchymal stem cell secretome: toward cell-free therapeutic strategies in regenerative medicine [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(9): 1852.
- [11] You Q, Yao Y, Zhang Y L, et al. Effect of targeted ovarian cancer therapy using amniotic fluid mesenchymal stem cells transfected with enhanced green fluorescent protein-human interleukin-2 *in vivo* [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(4): 4859-4866.
- [12] Studeny M, Marini F C, Champlin R E, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for interferon-beta delivery into tumors [J]. *Cancer Res*, 2002, 62(13): 3603-3608.
- [13] Ciavarella S, Grisendi G, Dominici M, et al. *In vitro* anti-myeloma activity of TRAIL-expressing adipose-derived mesenchymal stem cells [J]. *Br J Haematol*, 2012, 157(5): 586-598.

- [14] Sun X Y, Nong J, Qin K, et al. MSC(TRAIL)-mediated HepG2 cell death in direct and indirect co-cultures [J]. *Anticancer Res*, 2011, 31(11): 3705-3712.
- [15] Jing W, Chen Y, Lu L, et al. Human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells producing IL15 eradicate established pancreatic tumor in syngeneic mice [J]. *Mol Cancer Ther*, 2014, 13(8): 2127-2137.
- [16] Fakiruddin K S, Ghazalli N, Lim M N, et al. Mesenchymal stem cell expressing TRAIL as targeted therapy against sensitised tumour [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(8): 2188.
- [17] 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.
- [18] Wu X W, Scott M L. An intermittent approach for cancer chemoprevention [J]. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11(12): 879-885.
- [19] Abdulghani J, El-Deiry W S. TRAIL receptor signaling and therapeutics [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2010, 14(10): 1091-1108.
- [20] 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.
- [21] Kim S M, Woo J S, Jeong C H, et al. Effective combination therapy for malignant glioma with TRAIL-secreting mesenchymal stem cells and lipoxigenase inhibitor MK886 [J]. *Cancer Res*, 2012, 72(18): 4807-4817.
- [22] Yoon M J, Kang Y J, Kim I Y, et al. Monensin, a polyether ionophore antibiotic, overcomes TRAIL resistance in glioma cells via endoplasmic reticulum stress, DR5 upregulation and c-FLIP downregulation [J]. *Carcinogenesis*, 2013, 34(8): 1918-1928.
- [23] Pacioni S, D'Alessandris Q G, Giannetti S, et al. Mesenchymal stromal cells loaded with paclitaxel induce cytotoxic damage in glioblastoma brain xenografts [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2015, 6: 194.
- [24] Wang X, Gao J Q, Ouyang X, et al. Mesenchymal stem cells loaded with paclitaxel-poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles for glioma-targeting therapy [J]. *Int J Nanomedicine*, 2018, 13: 5231-5248.
- [25] Sasportas L S, Kasmieh R, Wakimoto H, et al. Assessment of therapeutic efficacy and fate of engineered human mesenchymal stem cells for cancer therapy [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(12): 4822-4827.
- [26] Bajetto A, Thellung S, Dellacasagrande I, et al. Cross talk between mesenchymal and glioblastoma stem cells: Communication beyond controversies [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2020, 9(11): 1310-1330.
- [27] Yang C, Lei D Q, Ouyang W X, et al. Conditioned media from human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells and umbilical cord-derived mesenchymal stem cells efficiently induced the apoptosis and differentiation in human glioma cell lines *in vitro* [J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014: 109389.
- [28] Kuijlen J M, Bremer E, Mooij J J, et al. Review: on TRAIL for malignant glioma therapy? [J]. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2010, 36(3): 168-182.
- [29] Younes A, Kadin M E. Emerging applications of the tumor necrosis factor family of ligands and receptors in cancer therapy [J]. *J Clin Oncol*, 2003, 21(18): 3526-3534.
- [30] Bagci-Onder T, Wakimoto H, Anderegg M, et al. A dual PI3K/mTOR inhibitor, PI-103, cooperates with stem cell-delivered TRAIL in experimental glioma models [J]. *Cancer Res*, 2011, 71(1): 154-163.
- [31] 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): 1527-33.
- [32] Camidge D R, Herbst R S, Gordon M S, et al. A phase I safety and pharmacokinetic study of the death receptor 5 agonistic antibody PRO95780 in patients with advanced malignancies [J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(4): 1256-1263.
- [33] Redjal N, Zhu Y N, Shah K, et al. Combination of systemic chemotherapy with local stem cell delivered S-TRAIL in resected brain tumors [J]. *Stem Cells*, 2015, 33(1): 101-110.
- [34] Kim S M, Woo J W, Jeong C H, et al. Potential application of temozolomide in mesenchymal stem cell-based TRAIL gene therapy against malignant glioma [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2014, 3(2): 172-182.