

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2013.02.003

· 研究快报 ·

## Lenti-TK 介导间充质干细胞对鼻咽癌 CD133<sup>+</sup> 干细胞的靶向迁移及杀伤作用

李冠雪, 申聪香, 文忠, 钟品能, 杨柯柯, 张沈华(南方医科大学珠江医院耳鼻咽喉-头颈外科, 广东广州 510282)

**[摘要]** **目的:** 观察慢病毒-胸苷激酶(lentivirus-thymidine kinase, Lenti-TK)/间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)对鼻咽癌 CD133<sup>+</sup> 干细胞的靶向迁移及杀伤作用。**方法:** 构建包含 TK 基因的重组慢病毒表达载体 Lenti-TK, 感染 MSC 后得到 Lenti-TK-MSC, RT-PCR 及 Western blotting 检测 Lenti-TK-MSC 中 HA-TK 的表达。免疫磁珠法从鼻咽癌 5-8F 细胞中分选 CD133<sup>+</sup> 细胞; Transwell 小室迁移实验检测 Lenti-TK-MSC 对 CD133<sup>+</sup> 5-8F 细胞的趋向性; Lenti-TK-MSC 联合更昔洛韦(ganciclovir, Lenti-TK-MSC/GCV)与 CD133<sup>+</sup> 5-8F 细胞共培养, CCK-8 试剂盒检测其对细胞的杀伤作用和旁观者效应。**结果:** 成功构建重组慢病毒载体 Lenti-TK, 其滴度为  $1 \times 10^8$  UT/ml, Lenti-TK (MOI = 50) 感染 MSC 72 h 时, 感染效率达  $(95.1 \pm 0.1)\%$ 。Lenti-TK-MSC 迁移至 CD133<sup>+</sup> 5-8F 细胞组的细胞数明显多于 CD133<sup>-</sup> 5-8F 细胞组、未分选 5-8F 细胞组 [ $(83.0 \pm 8.7)$  vs  $(29.6 \pm 5.3)$ 、 $(38.3 \pm 5.2)$ ],  $P = 0.000$ 。Lenti-TK-MSC/GCV 处理组与单独 GCV 处理组、Lenti-TK-MSC/GCV 条件培养液(即 Lenti-TK-MSC 加入 1 mg/L GCV 培养 48 h 的培养上清)处理组相比, CD133<sup>+</sup> 5-8F 细胞的存活率明显降低 [ $(37.2 \pm 2.3)\%$  vs  $(98.5 \pm 3.1)\%$ 、 $(83.8 \pm 3.4)\%$ ],  $P = 0.000$ 。Lenti-TK-MSC 数量达到混合细胞总数(Lenti-TK-MSC 和 CD133<sup>+</sup> 5-8F 细胞)的 20% 时, CD133<sup>+</sup> 5-8F 细胞存活率为  $(68.2 \pm 2.3)\%$ , 表现出明显的旁观者杀伤效应。**结论:** Lenti-TK 感染后 MSC 对鼻咽癌 CD133<sup>+</sup> 5-8F 细胞具有靶向迁移及杀伤作用。

**[关键词]** 鼻咽癌; CD133<sup>+</sup> 细胞; 间充质干细胞; 肿瘤干细胞; 肿瘤靶向基因治疗; 旁观者效应

**[中图分类号]** R739.63; R730.54

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2013)02-0145-08

## Targeted migration and killing effect of mesenchymal stem cells infected with Lenti-TK on CD133<sup>+</sup> cancer stem cells in nasopharyngeal carcinoma

Li Guanxue, Shen Congxiang, Wen Zhong, Zhong Pinneng, Yang Keke, Zhang Shenhua (Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the targeted migration and killing effect of mesenchymal stem cells (MSCs) infected with Lenti-TK (thymidine kinase) vector on CD133<sup>+</sup> cancer stem cells in nasopharyngeal carcinoma. **Methods:** The recombinant lentiviral expression vector containing TK gene (Lenti-TK) was constructed and transduced into MSC (Lenti-TK-MSC). Fusion tag-TK (HA-TK) expression was verified by RT-PCR and Western blotting. CD133<sup>+</sup> cells were sorted from nasopharyngeal carcinoma 5-8F cells by immunomagnetic beads. The chemotactic ability of Lenti-TK-MSC to CD133<sup>+</sup> 5-8F cells was analyzed by Transwell assay. The CD133<sup>+</sup> 5-8F cells were co-cultured with Lenti-TK-MSC and GCV to detect its killing effect on cells by CCK-8 Kit. **Results:** The recombinant lentivirus vector Lenti-TK was successfully constructed with titer being  $1 \times 10^8$  UT/ml. The transduction efficiency of Lenti-TK to MSC was  $(95.1 \pm 0.1)\%$ , 72 h after transduction at an MOI of 50. The migration number of Lenti-TK-MSC to CD133<sup>+</sup> 5-8F cells was more than that to CD133<sup>-</sup> 5-8F cells and 5-8F cells [ $(83.0 \pm 8.7)$  vs  $(29.6 \pm 5.3)$  vs  $(38.3 \pm 5.2)$ ];  $P = 0.000$ . The Lenti-TK-MSC/GCV treatment significantly inhibited the growth of the CD133<sup>+</sup> 5-8F cells compared with the GCV group and the Lenti-TK-MSC/GCV condition medium group (the culture supernatant of Lenti-TK-MSC treated with 1 mg/L GCV for 48 h) [ $(37.2 \pm 2.3)\%$  vs  $(98.5 \pm 3.1)\%$  vs  $(83.8 \pm 3.4)\%$ ],  $P = 0.000$ , with the cell survival being  $(68.2 \pm 2.3)\%$

**[基金项目]** 广东省科技计划资助项目(No. 2010B031200009)。Project supported by the Science and Technology Plan in Guangdong Province of China(No. 2010B031200009)

**[作者简介]** 李冠雪(1987-),女,山西省运城市人,硕士,主要从事鼻咽癌干细胞靶向治疗的研究。E-mail:1471251943@qq.com

**[通信作者]** 文忠(Wen Zhong, corresponding author), E-mail: wenzhong60@163.com

**[网络出版]** http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20130424.1310.003.html

when the proportion of Lenti-TK-MSC was 20%, which showed a significant bystander killing effect. **Conclusion:** Lenti-TK infected MSC exert targeted migration and killing effects on CD133<sup>+</sup> 5-8F cells from nasopharyngeal carcinoma.

[ **Key words** ] nasopharyngeal carcinoma; CD133<sup>+</sup> cell; mesenchymal stem cell; cancer stem cell; tumor targeted gene therapy; bystander effect

[ Chin J Cancer Biother, 2013, 20(2): 145-152 ]

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)是我国南方高发恶性肿瘤之一,目前临床上以放射治疗为主。虽然放疗及化疗方法的改进在一定程度上提高了患者的5年生存率,但放化疗的同时也会损害机体正常细胞,导致局部及全身并发症,严重影响患者的生活质量。因而探讨新的高效治疗方式,尤其是肿瘤基因靶向治疗显得尤为必要。肿瘤基因靶向治疗已成为肿瘤治疗的理想模式之一,如何实现靶向性是其难点之一。最近研究<sup>[1]</sup>发现,间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)具有靶向迁移至肿瘤组织细胞的特性,并已在多种人体肿瘤靶向治疗试验中取得明显效果<sup>[2-6]</sup>。肿瘤干细胞(cancer stem cell, CSC)的发现给肿瘤的发生、复发、转移及耐药等方面带来了全新的认识,目前,在包括鼻咽癌在内的肿瘤中已证实存在肿瘤干细胞<sup>[7-9]</sup>。采用MSC靶向鼻咽癌干细胞来治疗鼻咽癌的研究尚未见文献报道。本课题研究构建含胸苷激酶(thymidine kinase, TK)的慢病毒载体(Lenti-TK),并将其感染MSC,然后联合更昔洛韦(ganciclovir, GCV),观察其对鼻咽癌干细胞的靶向迁移及杀伤作用,为探寻鼻咽癌的基因靶向治疗提供实验依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 主要实验材料

MSC成骨/软骨/成脂诱导分化培养基为Cytogen产品, Percoll分离液为Pharmacia公司产品, PEI和polybrene为Sigma产品, Transwell小室为Corning产品, TK基因扩增引物由博尚公司合成, CCK-8试剂盒为Beyotime产品。空白质粒pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP、 $\Delta 8.9$ 、pVSVG由上海中科院巴斯德研究所蓝柯教授惠赠。人鼻咽癌CD133<sup>+</sup>5-8F细胞由本课题组提取,人鼻咽癌细胞株5-8F、人血管内皮细胞(endothelial cell of vessel, ECV)和质粒pGL3-HA-TK-EGFP为本课题组保存。SD大鼠购自南方医科大学动物中心(动物合格证号为SCXK粤2011-0015), 14只,雌雄不限,8~10周龄,150~250g。

### 1.2 大鼠MSC的分离、培养和鉴定

无菌条件下取SD大鼠双侧股骨,含10%胎牛血清的DMEM/F12培养基冲洗骨髓腔,并将冲洗液缓

慢加入底部装有Percoll分离液(相对密度为1.073g/ml)的离心管中,1200×g离心30min,吸取中间乳白色的单个核细胞层, PBS洗涤2遍,按 $1.5 \times 10^5$ /ml密度接种,37℃、5%CO<sub>2</sub>常规培养,3d后换液,用PBS洗去未贴壁细胞。流式细胞仪测定细胞表面标志物CD29、CD34、CD44、CD45以鉴定MSC。取生长状态良好的第3~5代SD大鼠MSC,采用成脂诱导完全培养基A和B进行2次循环培养,观察脂滴判断比较成熟时,对其进行油红O染色;采用成骨诱导分化完全培养基连续培养,细胞钙结节较多后进行茜素红染色;采用软骨诱导完全培养液重悬细胞,1000×g离心5min,离心后避免吹打细胞团,拧松离心管盖后置于37℃、5%CO<sub>2</sub>中孵育,每次换液后轻弹细胞团使其能脱壁漂浮;直至细胞团直径增至约2mm时做石蜡切片,进行甲苯胺蓝染色。

### 1.3 pCDH-CMV-HA-TK-EF1-copGFP表达载体的构建

使用空白质粒pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP,选取EcoRI和BamHI酶切位点插入TK基因。质粒pGL3-HA-TK-EGFP载体中TK基因(序列登录号AY575228)引物(为检测转染后TK蛋白的表达,上游引物引物设计时在TK基因5'末端引入HA标签序列):上游引物为5'-CGCGAATTCGCCACCATG-TACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTATGGCTTCGTACCCCTGCCATCAAC-3';下游引物为5'-CGCGATCCTCAGTTAGCCTCCCCCATCTCCCGG-3'。载体pGL3-HA-TK-EGFP和pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP以常规方法扩增、纯化、酶切和连接,得到pCDH-CMV-HA-TK-EF1-copGFP表达载体,进一步进行双酶切鉴定及基因测序。

### 1.4 慢病毒Lenti-TK的包装、浓缩及滴定

用PEI将质粒 $\Delta 8.9$ 、pVSVG和pCDH-CMV-HA-TK-EF1-copGFP表达载体共转染293T细胞,收集重组慢病毒Lenti-TK,离心浓缩,并将病毒液稀释7~10个梯度感染293T细胞,计算病毒滴度。

### 1.5 鼻咽癌CD133<sup>+</sup>5-8F细胞的分选及鉴定

将鼻咽癌细胞重悬于缓冲液后,在安装好的免疫磁珠分选架和LS柱上分选纯化CD133<sup>+</sup>5-8F细胞,采用无血清成球实验(即分选细胞在无血清培

培养基中呈团块状悬浮生长,随着时间延长,团块体积渐增大,细胞数量渐增多成球体)及 MTT 法检测 CD133<sup>+</sup>5-8F 细胞、CD133<sup>-</sup>5-8F 细胞和 5-8F 细胞的增殖活性。实验方法具体参见文献[9]。

### 1.6 重组慢病毒感染 MSC

实验分 4 组:第 1 组用重组慢病毒 Lenti-TK 感染 MSC(Lenti-TK-MSC),不加助转染剂 polybrene;第 2 组用重组慢病毒 Lenti-TK 感染 MSC,加入 polybrene;第 3 组用不含 TK 基因的空慢病毒(Lenti-Ctrl)感染 MSC(Lenti-Ctrl-MSC),加入 polybrene;第 4 组为未感染组。感染前 1 d 按(3~5)×10<sup>3</sup>个/孔将 MSC 接种于 96 孔板(确保进行病毒感染时细胞的融合度为 30%~50%)。以 MOI=50(由预实验得到的最佳 MOI)计算,用完全培养基稀释病毒液 Lenti-TK,按照分组要求加入(或不加入)终质量浓度为 5 μg/ml 的 polybrene,混匀病毒液。每孔加入病毒稀释液 100 μl,37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养 12 h 后换液继续培养 72 h,观察荧光表达。RT-PCR 检测融合标签-TK(HA-TK)mRNA 的表达,Western blotting 检测 HA-TK 蛋白表达。

### 1.7 Transwell 法检测 Lenti-TK-MSC 的趋向性

选用直径 6.5 mm、孔径 8.0 μm 的 Transwell 小室,分别检测 Lenti-TK-MSC 对 CD133<sup>+</sup>5-8F 细胞、CD133<sup>-</sup>5-8F 细胞、5-8F 细胞、ECV 细胞等 4 种细胞的迁移能力。实验设 4 组(每组设 3 个平行样本):第 1 组下室为 CD133<sup>+</sup>5-8F 细胞;第 2 组下室为 CD133<sup>-</sup>5-8F 细胞;第 3 组下室为 5-8F 细胞;第 4 组下室为 ECV 细胞。具体步骤如下:(1)用 600 μl 无血清培养基重悬细胞,以 1×10<sup>5</sup>个/孔的密度将 CD133<sup>+</sup>5-8F 细胞、CD133<sup>-</sup>5-8F 细胞、5-8F 细胞或 ECV 细胞分别接种到下室,37℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 24 h。(2)用 200 μl 含 0.1% 牛血清白蛋白无血清培养液重悬 Lenti-TK-MSC 细胞,以 1×10<sup>5</sup>个/孔的密度将其接种到各组的上室,37℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下共同培养 12 h。(3)取出小室,用棉签擦去上室面的细胞,下室面细胞用 4% 多聚甲醛固定 15 min 后结晶紫染色,用显微镜在高倍镜(×400)下每张膜随机观察 5 个视野,取平均值,计算并比较各组迁移细胞数。

### 1.8 CCK-8 法检测 Lenti-TK-MSC 联合 GCV(Lenti-TK-MSC/GCV)对 CD133<sup>+</sup>5-8F 细胞增殖的抑制

实验设 4 个组,每组设 3 个复孔,实验重复 3 次。在 96 孔板内按照 2×10<sup>3</sup>个/孔的密度分别接种细胞,具体细胞种类及相应处理如下:(1)CD133<sup>+</sup>5-8F

组:CD133<sup>+</sup>5-8F 细胞,不做任何干预。(2)CD133<sup>+</sup>5-8F/GCV 组:CD133<sup>+</sup>5-8F 细胞加入 GCV(GCV 终质量浓度为 1 mg/L,连续给药 2 d,下同)。(3)CD133<sup>+</sup>5-8F/条件培养液组:CD133<sup>+</sup>5-8F 细胞,加入 Lenti-TK-MSC/GCV 的条件培养液(即 Lenti-TK-MSC 加入 1 mg/L GCV 培养 48 h 的培养上清),条件培养液与原培养液的体积比为 1:1。(4)CD133<sup>+</sup>5-8F/Lenti-TK-MSC + GCV 组:CD133<sup>+</sup>5-8F 细胞和 Lenti-TK-MSC,加入 GCV。2 d 后用 CCK-8 试剂盒检测各组的 450 nm 波长处的 *D* 值,计算细胞生存率。

### 1.9 CCK-8 法检测 Lenti-TK-MSC/GCV 对 CD133<sup>+</sup>5-8F 细胞的旁观者杀伤效应

实验分 6 组,每组 3 个复孔,实验重复 3 次。按照 2×10<sup>3</sup>个/孔的密度将 CD133<sup>+</sup>5-8F 细胞和 Lenti-TK-MSC 接种到 96 孔板,各组 Lenti-TK-MSC 细胞数量占混合细胞的比例分别为 0%、5%、20%、40%、60%、80%,接种后第 2 天加终质量浓度为 1 μg/ml 的 GCV,另设不作处理的 CD133<sup>+</sup>5-8F 细胞为对照组。连续 2 d 给予 GCV 后,用 CCK-8 试剂盒检测各组 450 nm 波长处的 *D* 值,计算细胞生存率。

### 1.10 统计学处理

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,应用 SPSS 13.0 软件统计。多个样本均数比较采用单因素方差分析;参数比较前均先进行方差齐性检验,若方差不齐,用基于方差不齐的近似 *F* 检验 Welch 法;多重比较采用 *LSD*(方差齐时)或 *Dunnnett's T3* 法(方差不齐时)。以  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 成功分离、培养及鉴定 MSC

镜下观察 MSC 为长梭形,贴壁生长。细胞表面标志物鉴定可见 MSC 阳性表达 CD29(99.96%)和 CD44(99.26%),阴性表达 CD34(3.04%)和 CD45(1.14%)。多分化潜能鉴定可见成脂诱导培养经油红 O 染色显示有大量脂质沉淀;成骨诱导培养经茜素红染色见细胞钙红色结节;成软骨诱导培养后细胞表面会变得光滑呈胶质,经甲苯胺蓝染色呈淡蓝色(图 1)。

### 2.2 pCDH-CMV-HA-TK-EF1-copGFP 载体的鉴定

成功构建的重组载体 pCDH-CMV-HA-TK-EF1-copGFP 进行双酶切鉴定可看到预期的片段(图 2),大小约 1 161 bp,与理论一致。测序结果与 NCBI 上已经提交的 *TK*(登录号 AY575228)基因序列比对一致性大于 99%,发现一个同义突变点(G33T)。

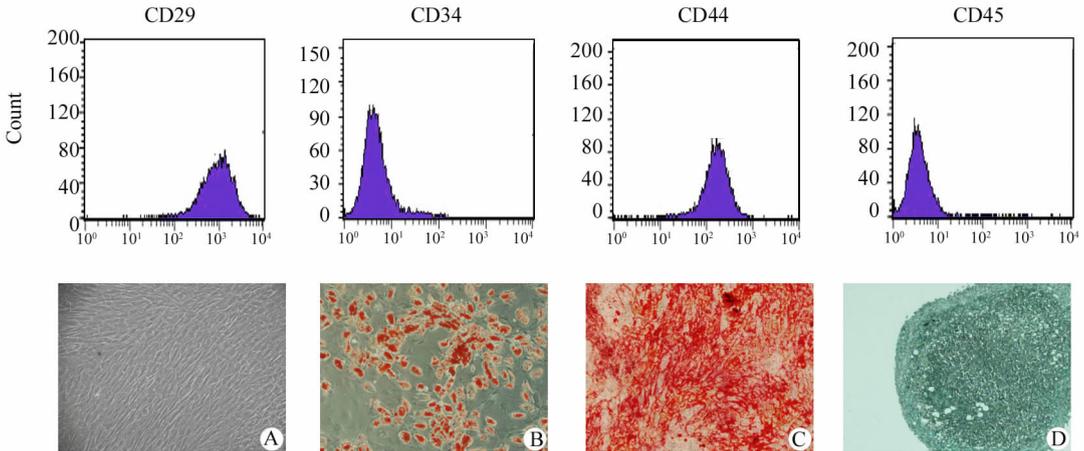


图 1 MSC 的分离、培养和鉴定( ×200 )

Fig. 1 Isolation, culturation and identification of MSC( ×200 )

A: Be induced before; B: Be induced into fat cells ( oil red O staining ); C: Be induced into bone cells ( alizarin red staining ); D: Be induced into cartilage cells ( toluidine blue staining )

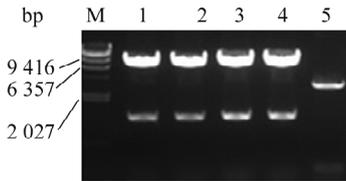


图 2 pCDH-CMV-HA-TK-EF1-copGFP 双酶切鉴定  
Fig. 2 Identification of pCDH-CMV-H-TK-EF1-copGFP vector by double enzyme digestion

M:DNA Marker λ-Hind III ;

1-4: Undigested vector; 5: Digested vector

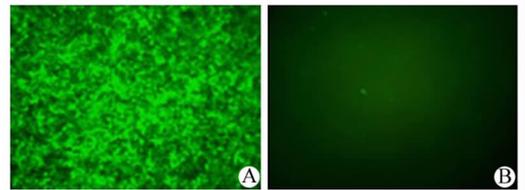


图 3 重组慢病毒 Lenti-TK 的制备及其滴度的检测( ×100 )

Fig. 3 Preparation of recombinant lentivirus Lenti-TK and detection its titer( ×100 )

A:  $1 \times 10^{-1} \mu\text{l}$  virus; B:  $1 \times 10^{-5} \mu\text{l}$  virus

2.3 成功包装和浓缩重组慢病毒 Lenti-TK

293T 细胞转染 72 h 后, 荧光显微镜下呈现绿色荧光( 图 3 )。荧光细胞数随稀释倍数的增加而减少, 在慢病毒原液为  $1 \times 10^{-5} \mu\text{l}$  时仍可观察到绿色荧光表达, 计算出 Lenti-TK 滴度为  $1 \times 10^8$  UT/ml。

2.4 重组慢病毒 Lenti-TK 感染 MSC 的鉴定

慢病毒 Lenti-TK 感染 MSC 后荧光表达见图 4。其中图 4A 是用 Lenti-TK 感染 MSC, 不加助转染剂 polybrene, 转染效率为  $(42.1 \pm 0.3)\%$ ; 图 4B 是用 Lenti-TK 感染 MSC, 加入 polybrene, 镜下观察细胞生长良好, 转染效率为  $(95.1 \pm 0.1)\%$ , 提示 polybrene 有助于提高 Lenti-TK 对 MSC 的感染效率, 且对 MSC 无明显细胞毒性。感染后进行 RT-PCR 实验, 可以在 1 161 bp 处见一特异性条带; Western blotting 结果显示, 相对分子质量 42 600 处见特异性蛋白条带( 图 5 )。

2.5 鼻咽癌 CD133<sup>+</sup> 5-8F 干细胞的鉴定

免疫磁珠法分选鼻咽癌 5-8F 细胞株的 CD133<sup>+</sup> 5-8F 细胞, 该肿瘤干细胞在无血清培养基中开始时呈单细胞悬浮生长, 随着培养时间的延长细胞数量增多, 第 8 天时形成悬浮的球状干细胞团( 图 6 )。

2.6 Lenti-TK-MSC 对 CD133<sup>+</sup> 5-8F 细胞有很强的趋向性

Transwell 实验检测 Lenti-TK-MSC 对 CD133<sup>+</sup> 5-8F 细胞的趋向性, 结果( 图 7 )显示, Lenti-TK-MSC/CD133<sup>+</sup> 5-8F 组、Lenti-TK-MSC/CD133<sup>-</sup> 5-8F 组、Lenti-TK-MSC/5-8F 组中相应的肿瘤细胞对 Lenti-TK-MSC 有趋化作用, 中 Lenti-TK-MSC/CD133<sup>+</sup> 5-8F 组迁移细胞数较 Lenti-TK-MSC/CD133<sup>-</sup> 5-8F 组、Lenti-TK-MSC/5-8F 组明显增多( 均  $P = 0.000$  ), 说明 Lenti-TK-MSC 对 CD133<sup>+</sup> 5-8F 细胞有更强的趋向性。

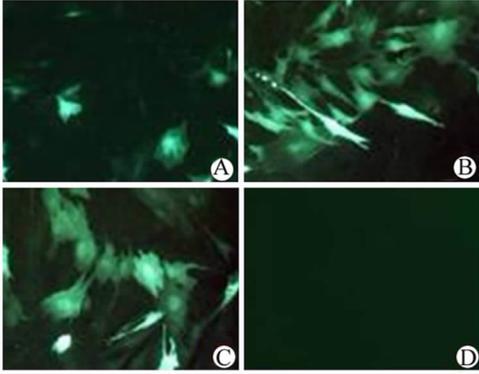


图 4 Lenti-TK 感染 MSC 后的荧光表达( ×400 )

Fig. 4 Fluorescent expression of MSC infected with Lenti-TK ( ×400 )

A: Lenti-TK; B: Lenti-TK + polybrene;  
C: Lenti-Ctrl + polybrene; D: Uninfected group

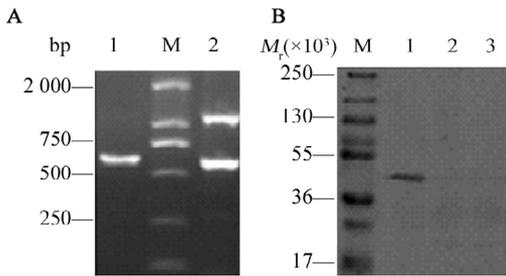


图 5 Lenti-TK-MSC 中 HA-TK 的表达

Fig. 5 HA-TK expression in Lenti-TK-MSC

A: HA-TK gene as detected by RT-PCR  
1: Uninfected group; 2: Infected by recombinant lentivirus; M: Marker D2000  
B: HA-TK protein as detected by Western blotting  
1: Infected by recombinant lentivirus; 2: Infected by empty lentivirus; 3: Uninfected group; M: Protein marker

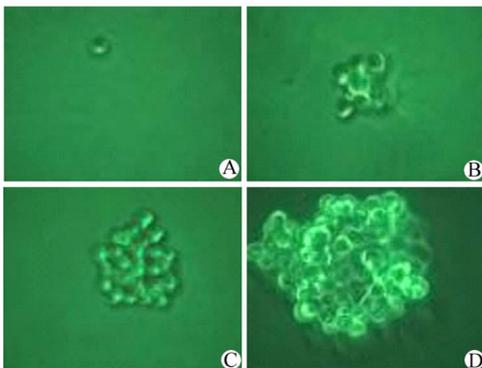


图 6 无血清培养基中 CD133<sup>+</sup> 5-8F 细胞的生长( ×200 )

Fig. 6 Growth of CD133<sup>+</sup> 5-8F cells in serum-free medium( ×200 )

A: 0 d; B: 3 d; C: 5 d; D: 8 d

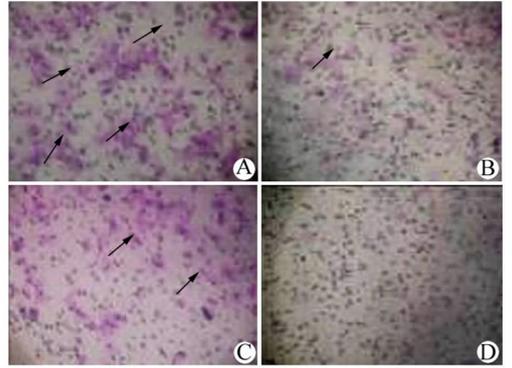


图 7 Lenti-TK-MSC 对 CD133<sup>+</sup> 5-8F、CD133<sup>-</sup> 5-8F、5-8F 和 ECV 细胞的趋向作用( ×400 )

Fig. 7 Chemotactic activity of Lenti-TK-MSC to CD133<sup>+</sup> 5-8F, CD133<sup>-</sup> 5-8F, 5-8F and ECV cells( ×400 )

A: Lenti-TK-MSC/CD133<sup>+</sup> 5-8F; B: Lenti-TK-MSC/CD133<sup>-</sup> 5-8F;  
C: Lenti-TK-MSC/unsorted 5-8F; D: Lenti-TK-MSC/ECV ( all arrows point to migrating cells )

### 2.7 Lenti-TK-MSC/GCV 有效杀伤鼻咽癌 CD133<sup>+</sup> 5-8F 细胞

CD133<sup>+</sup> 5-8F/ Lenti-TK-MSC + GCV 组与 CD133<sup>+</sup> 5-8F 组、CD133<sup>+</sup> 5-8F/GCV 组、CD133<sup>+</sup> 5-8F/条件培养液组比较,  $F = 792.711$ ,  $P = 0.000$ ; 方差齐(  $P = 0.725$  ), 进一步采用 LSD 法多重比较, 结果( 表 2 )显示, CD133<sup>+</sup> 5-8F/GCV 组无明显杀伤作用( 与 CD133<sup>+</sup> 5-8F 组比较  $P = 0.310$  ); CD133<sup>+</sup> 5-8F/条件培养液组和 CD133<sup>+</sup> 5-8F/Lenti-TK-MSC + GCV 组都有杀伤作用( 与 CD133<sup>+</sup> 5-8F 组比较, 均  $P = 0.000$  ), 但 Lenti-TK-MSC + GCV 组杀伤作用明显强于 CD133<sup>+</sup> 5-8F/条件培养液组(  $P = 0.000$  )。

### 2.8 Lenti-TK-MSC/GCV 对 CD133<sup>+</sup> 5-8F 细胞有明显的旁观者杀伤效应

当 Lenti-TK-MSC 占混合细胞( Lenti-TK-MSC 和 CD133<sup>+</sup> 5-8F 细胞 )的比例分别为 0% 和 5% 时, 细胞的生存率分别为(  $98.4 \pm 3.1$  )% 和(  $97.0 \pm 2.3$  )%, CD133<sup>+</sup> 5-8F 细胞活性仍较高, 旁观者效应不明显; 当 Lenti-TK-MSC 的比例达到 20% 时, CD133<sup>+</sup> 5-8F 细胞的生存率为(  $68.2 \pm 2.3$  )%, 旁观者效应较明显, 并且随着 Lenti-TK-MSC 细胞比例的增加, Lenti-TK-MSC/GCV 的旁观者效应不断增强( 图 8 )。

表 1 Lenti-TK-MSC 对 CD133<sup>+</sup>5-8F、CD133<sup>-</sup>5-8F、5-8F 和 ECV 细胞的趋化能力(  $\bar{x} \pm s$  )

Tab. 1 Chemotactic activity of Lenti-TK-MSC to CD133<sup>+</sup>5-8F, CD133<sup>-</sup>5-8F, 5-8F and ECV cells (  $\bar{x} \pm s$  )

Group	Upper chamber cell	Lower chamber cell	Migrating cell
Lenti-TK-MSC/ CD133 <sup>+</sup> 5-8F	Lenti-TK-MSC	CD133 <sup>+</sup> 5-8F	83.0 ± 8.7
Lenti-TK-MSC/ CD133 <sup>-</sup> 5-8F	Lenti-TK-MSC	CD133 <sup>-</sup> 5-8F	29.6 ± 5.3
Lenti-TK-MSC/ 5-8F	Lenti-TK-MSC	5-8F	38.3 ± 5.2
Lenti-TK-MSC/ ECV	Lenti-TK-MSC	ECV	3.1 ± 2.3
<i>F</i> value		541.802	
<i>P</i> value		0.000	

表 2 Lenti-TK-MSC/GCV 对鼻咽癌 CD133<sup>+</sup>5-8F 细胞的杀伤作用(  $\bar{x} \pm s, %$  )

Tab. 2 Cytotoxicity of Lenti-TK-MSC/GCV on CD133<sup>+</sup>5-8F (  $\bar{x} \pm s, %$  )

Group	Cell type	Intervention	Cell survival
CD133 <sup>+</sup> 5-8F	CD133 <sup>+</sup> 5-8F	No	100.0 ± 3.5
CD133 <sup>+</sup> 5-8F/GCV	CD133 <sup>+</sup> 5-8F	GCV	98.5 ± 3.1
CD133 <sup>+</sup> 5-8F/Conditioned medium	CD133 <sup>+</sup> 5-8F	Conditioned medium	83.8 ± 3.4
CD133 <sup>+</sup> 5-8F/Lenti-TK-MSC + GCV	CD133 <sup>+</sup> 5-8F	Lenti-TK-MSC + GCV	37.2 ± 2.3
<i>F</i> value			792.711
<i>P</i> value			0.000

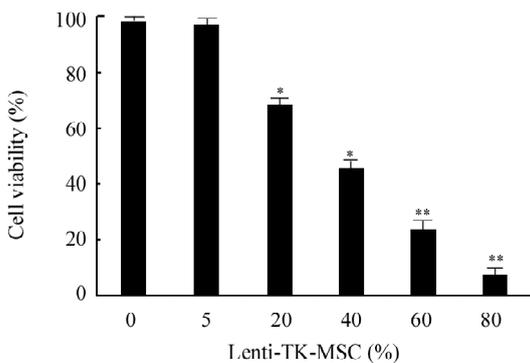


图 8 Lenti-TK-MSC 联合 GCV 对 CD133<sup>+</sup>5-8F 细胞的旁观者效应

Fig. 8 Bystander effects of Lenti-TK-MSC combined with GCV against CD133<sup>+</sup>5-8F cells

\* *P* < 0.05, \*\* *P* < 0.01 vs 0 group

### 3 讨论

MSC 作为肿瘤靶向基因治疗的特异性运载体成为近年来研究的热点之一。MSC 具有对肿瘤的归巢特性, 使将杀肿瘤的药物或基因靶向输送到

肿瘤部位进而杀灭肿瘤细胞成为可能。MSC 在转染表达外源基因的同时, 其本身基本的生物学特性不受影响, 仍保持自身增殖能力、归巢特性及低免疫原性。目前已有将各种治疗基因(如 *TK* 基因、凋亡基因等)修饰的 MSC 应用于全身多个系统肿瘤治疗的报道<sup>[10-12]</sup>。基于以上优点, 利用 MSC 作为基因载体治疗肿瘤显示出良好的应用潜能。

目前 MSC 分离纯化的方法有多种, 包括全骨髓贴壁法、密度梯度离心法、磁珠分选法等。其鉴定包括以下条件: (1) 必须呈贴壁生长; (2) 表达 CD73 (SH4)、CD90、CD105 (SH2)、CD29、CD44, 不表达 CD34、CD45、CD79a、CD14 或 CD11b、CD19 或 HLA-DR; (3) 在相应的体外诱导培养条件下, 具备多向分化潜能。本实验提取的 MSC 贴壁生长; 流式细胞仪鉴定细胞表面标志符合 MSC 的表型特点; 可诱导分化为脂肪细胞、成骨细胞和软骨细胞。

利用 MSC 对肿瘤的趋向性可以将各种肿瘤细胞或肿瘤干细胞的杀伤因子靶向运输到肿瘤或肿瘤干细胞处, 从而起到靶向杀伤作用。Gao 等<sup>[3]</sup>通过实验证实, 表达色素上皮衍生因子的 MSC 在体外和体内对肝癌细胞均有归巢特性。Xiang 等<sup>[13]</sup>实验发现, MSC 能靶向迁移到纤维肉瘤小鼠皮下移植瘤部

位,并表达目的基因。Ren 等<sup>[12]</sup>在前列腺癌肺转移小鼠模型中发现,转染了  $\beta$  干扰素基因的 MSC 能归巢至肺转移灶,杀伤肿瘤细胞,减少肿瘤血管密度。Karp 等<sup>[14]</sup>将 MSC 的归巢特性定义为 MSC 在目标组织的血管被捕获黏附,随后迁移穿过血管内皮的过程。本研究也是利用 MSC 这一特性,在成功分选及鉴定鼻咽癌 CD133<sup>+</sup>5-8F 细胞的基础上,制备重组慢病毒 Lenti-TK,并感染 MSC,获得 Lenti-TK-MSC。Transwell 小室迁移实验证实了 Lenti-TK-MSC 对鼻咽癌 CD133<sup>+</sup>5-8F 细胞具有趋向性。从而可以将 TK 基因靶向运送到鼻咽癌 CD133<sup>+</sup>5-8F 细胞,进而发挥特异性杀伤鼻咽癌干细胞的作用。

MSC 归巢过程与白细胞的归巢过程相似,可分为动员迁移、黏附、跨内皮游出等 3 个步骤,多种细胞因子及受体(如趋化因子、黏附分子、生长因子及其他相关的细胞因子等)参与其中,目前对其机制的认识尚处于探索阶段。Xu 等<sup>[15]</sup>体外研究发现, MSC 表达 CCR2 和 CXCR4,它们分别是 MCP-1 和 SDF-1 $\alpha$  的受体;且 MCP-1 和 SDF-1 $\alpha$  介导 MSC 的迁移,因此 MCP-1 和 SDF-1 $\alpha$  参与介导 MSC 向神经胶质瘤的趋向性。Picinich 等<sup>[16]</sup>也发现, SDF-1 和蛋白激酶 C 在 MSC 迁移中发挥重要作用。Kim 等<sup>[17]</sup>研究显示,将肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL)基因转染 MSC 而构建 MSC-TRAIL,体内及体外实验均发现其向胶质瘤细胞靶向迁移,并且经射线处理后其迁移能力更增强。

MSC 的主要作用是将杀肿瘤因子靶向转运到瘤组织灶,然后由杀肿瘤因子杀伤肿瘤。本实验中 MSC 将 TK 自杀基因成功转运到鼻咽癌 CD133<sup>+</sup>5-8F 细胞。进一步 CCK8 检测显示, CD133<sup>+</sup>5-8F/Lenti-TK-MSC + GCV 组(细胞存活率 < 40%)分别与 CD133<sup>+</sup>5-8F 组、CD133<sup>+</sup>5-8F/GCV 组、CD133<sup>+</sup>5-8F/条件培养液组(存活率均 > 80%)比较, TK 基因运送到鼻咽癌 CD133<sup>+</sup>5-8F 细胞后明显发挥了特异性杀伤鼻咽癌干细胞的作用。另外,由于该种干细胞体外培养呈悬浮生长,与贴壁生长的 Lenti-TK-MSC 不易充分接触,在一定程度上削弱了 Lenti-TK-MSC 对鼻咽癌 CD133<sup>+</sup>5-8F 细胞的杀伤作用。此外,在实验中还发现, Lenti-TK-MSC 杀灭 CD133<sup>+</sup>5-8F 细胞作用要比杀灭 CD133<sup>-</sup>5-8F 细胞及未分选 5-8F 细胞稍弱,可能因为 CD133<sup>+</sup>5-8F 细胞具有更强的耐药性,但尚需进一步实验证实。

Lenti-TK-MSC 联合 GCV 杀伤肿瘤细胞或肿瘤干细胞的一个重要机制是对肿瘤(干)细胞产生的

旁观者效应。对于其机制目前有以下 3 个假说:(1) 缝隙连接作用。有实验<sup>[18]</sup>发现, Lenti-TK-MSC/GCV 不能有效地诱导 HeLa 或 MCF7 细胞凋亡,原因是 Lenti-TK-MSC 与 HeLa 或 MCF7 细胞间不存在缝隙连接;相反, Lenti-TK-MSC 与胶质瘤细胞之间能形成缝隙连接,从而对胶质瘤产生细胞毒性。根据该原理,将缝隙连接蛋白 CX43 转染胶质瘤细胞,加强细胞间通信,能明显增强 Lenti-TK-MSC/GCV 杀伤胶质瘤细胞的效果<sup>[19]</sup>。本研究将不同比例 Lenti-TK-MSC 与 CD133<sup>+</sup>5-8F 细胞共培养(联合 GCV),当 Lenti-TK-MSC 的比例  $\leq 5\%$  时, CD133<sup>+</sup>5-8F 细胞的生存率仍较高;当 Lenti-TK-MSC 的比例达到 20% 时,旁观者效应较明显,并且随着 Lenti-TK-MSC 比例的增加,细胞毒性逐步增强,提示 Lenti-TK-MSC 达到一定比例,肿瘤干细胞与其建立有效的连接通信才能更好地发挥旁观者效应。(2) 凋亡机制。有研究<sup>[20]</sup>认为, Lenti-TK-MSC/GCV 培养上清液通过凋亡小体杀伤胶质瘤细胞。本实验中, Lenti-TK-MSC/GCV 条件培养基能抑制 CD133<sup>+</sup>5-8F 细胞的生长,考虑是条件培养基中的凋亡小体介导旁观者效应所致;但对比发现, Lenti-TK-MSC 与 CD133<sup>+</sup>5-8F 细胞共培养联合 GCV 表现出的细胞毒性远强于条件培养基( $P = 0.000$ ),考虑 Lenti-TK-MSC/GCV 发挥细胞毒效应不单是通过凋亡机制,更主要的是通过相互接触的缝隙连接作用。

本组研究对象是鼻咽癌 CD133<sup>+</sup>5-8F 细胞,目的为探寻针对肿瘤干细胞治疗的新方法。目前认为, CSC 是肿瘤细胞中具有自我更新能力的一类种子细胞,是肿瘤发生、发展、转移、复发、耐药的根源,从理论上讲,针对肿瘤干细胞的治疗才能彻底杀灭肿瘤。有实验<sup>[21]</sup>证实,利用病毒载体将 TK 基因转染到胶质瘤干细胞,结合 GCV 可获得良好的治疗效果。本实验利用 MSC 对肿瘤的趋向性作为治疗基因的靶向载体,携带 TK 自杀基因趋向并杀伤鼻咽癌干细胞,将为鼻咽癌干细胞的靶向基因治疗提供新思路。

本实验采用 Lenti-TK/MSC 对鼻咽癌 CD133<sup>+</sup>5-8F 细胞的靶向转运特性进行了探讨,并对 Lenti-TK-MSC/GCV 杀伤鼻咽癌 CD133<sup>+</sup>5-8F 细胞的旁观者效应进行了研究,但尚未进行体内实验研究,今后将对 MSC 体内应用的安全性及其杀伤效应作进一步研究。

## [参考文献]

[1] Reagan MR, Kaplan DL. Concise review: Mesenchymal stem cell

- tumor-homing: Detection methods in disease model systems [ J ]. *Stem Cells*, 2011, 29( 6 ): 920-927.
- [ 2 ] Gao P, Ding Q, Wu Z, et al. Therapeutic potential of human mesenchymal stem cells producing IL-12 in a mouse xenograft model of renal cell carcinoma [ J ]. *Cancer Lett*, 2010, 290( 2 ): 157-166.
- [ 3 ] Gao Y, Yao A, Zhang W, et al. Human mesenchymal stem cells overexpressing pigment epithelium-derived factor inhibit hepatocellular carcinoma in nude mice [ J ]. *Oncogene*, 2010, 29( 19 ): 2784-2794.
- [ 4 ] Gu C, Li S, Tokuyama T, et al. Therapeutic effect of genetically engineered mesenchymal stem cells in rat experimental leptomeningeal glioma model [ J ]. *Cancer Lett*, 2010, 291( 2 ): 256-262.
- [ 5 ] Cavarretta IT, Altanerova V, Matuskova M, et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells expressing prodrug-converting enzyme inhibit human prostate tumor growth [ J ]. *Mol Ther*, 2010, 18( 1 ): 223-231.
- [ 6 ] Xiang J, Tang J, Song C, et al. Mesenchymal stem cells as a gene therapy carrier for treatment of fibrosarcoma [ J ]. *Cytotherapy*, 2009, 11( 5 ): 516-526.
- [ 7 ] Zhang HB, Ren CP, Yang XY, et al. Identification of label-retaining cells in nasopharyngeal epithelia and nasopharyngeal carcinoma tissues [ J ]. *Histochem Cell Biol*, 2007, 127( 3 ): 347-354.
- [ 8 ] Wang J, Guo LP, Chen LZ, et al. Identification of cancer stem cell-like side population cells in human nasopharyngeal carcinoma cell line [ J ]. *Cancer Res*, 2007, 67( 8 ): 3716-3724.
- [ 9 ] 关小芳, 文忠, 申聪香, 等. 人鼻咽癌细胞株中类肿瘤干细胞的分离、培养及鉴定 [ J ]. *解放军医学杂志*, 2008, 33( 12 ): 1461-1464.
- [ 10 ] Ren C, Kumar S, Chanda D, et al. Therapeutic potential of mesenchymal stem cells producing interferon-alpha in a mouse melanoma lung metastasis model [ J ]. *Stem Cell*, 2008, 26( 9 ): 2332-2338.
- [ 11 ] Kidd S, Caldwell L, Dietrich M, et al. Mesenchymal stromal cells alone or expressing interferon-beta suppress pancreatic tumors *in vivo*, an effect countered by anti-inflammatory treatment [ J ]. *Cytotherapy*, 2010, 12( 5 ): 615-625.
- [ 12 ] Ren C, Kumar S, Chanda D, et al. Cancer gene therapy using mesenchymal stem cells expressing interferon-beta in a mouse prostate cancer lung metastasis model [ J ]. *Gene Ther*, 2008, 15( 21 ): 1446-1453.
- [ 13 ] Xiang J, Tang J, Song C, et al. Mesenchymal stem cells as a gene therapy carrier for treatment of fibrosarcoma [ J ]. *Cytotherapy*, 2009, 11( 5 ): 516-526.
- [ 14 ] Karp JM, Leng Teo GS. Mesenchymal stem cell homing: The devil is in the details [ J ]. *Cell Stem Cell*, 2009, 4( 3 ): 206-216.
- [ 15 ] Xu F, Shi J, Yu B, et al. Chemokines mediate mesenchymal stem cell migration toward gliomas *in vitro* [ J ]. *Oncol Rep*, 2010, 23( 6 ): 1561-1567.
- [ 16 ] Picinich SC, Glod JW, Banerjee D. Protein kinase C zeta regulates interleukin-8-mediated stromal-derived factor-1 expression and migration of human mesenchymal stromal cells [ J ]. *Exp Cell Res*, 2010, 316( 4 ): 593-602.
- [ 17 ] Kim SM, Oh JH, Park SA, et al. Irradiation enhances the tumor tropism and therapeutic potential of TRAIL-secreting human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in glioma therapy [ J ]. *Stem Cells*, 2010, 28( 12 ): 2217-2218.
- [ 18 ] Matuskova M, Hlubinova K, Pastorakova A, et al. HSV-tk expressing mesenchymal stem cells exert bystander effect on human glioblastoma cells [ J ]. *Cancer Lett*, 2010, 290( 1 ): 58-67.
- [ 19 ] Huang Q, Liu XZ, Kang CS, et al. The anti-glioma effect of suicide gene therapy using BMSC expressing HSV/TK combined with overexpression of Cx43 in glioma cells [ J ]. *Cancer Gene Ther*, 2010, 17( 3 ): 192-202.
- [ 20 ] 李春晖, 焦保华. 转染 HSV-tk 骨髓基质干细胞旁观者效应机制的研究 [ J ]. *中华肿瘤防治杂志*, 2007, ( 23 ): 1778-1782.
- [ 21 ] Huszthy PC, Giroglou T, Tsinkalovsky O, et al. Remission of invasive, cancer stem-like glioblastoma xenografts using lentiviral vector-mediated suicide gene therapy [ J ]. *PLoS One*, 2009, 4( 7 ): e6314-e6327.

[ 收稿日期 ] 2013-01-09

[ 修回日期 ] 2013-02-20

[ 本文编辑 ] 王莹, 黄静怡

· 读者 · 作者 · 编者 ·

## 文稿中计量单位使用的要求

本刊严格执行国务院颁发的《中华人民共和国法定计量单位》, 全面贯彻国家标准 GB3100-3102-1993《量和单位》的规定, 正确使用量和单位的名称和符号。(1)量符号以斜体拉丁和希腊字母表示( pH 用正体除外), 例如  $m$  (质量)、 $t$  (时间)、 $c$  (浓度)、 $V$  (体积)、 $p$  (压力)、 $F$  (力)等。(2)单位符号一律以正体拉丁或希腊字母表示, 例如 kg( 千克)、m( 米)、h( 小时)、mol/L( 摩尔每升)等。(3)表示人体检验指标的量浓度或质量浓度时, 一般使用 L( 升)作为检验组成含量单位的分母。(4)表示用药剂量单位时, 不能写成 mg/kg/d 的形式, 应写成 mg/( kg · d )或  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  的形式。(5)单位符号常见书写错误: 长度单位符号  $\text{Å}$  ( 埃)已不用, 应写作 0.1 nm; 时间单位“小时”符号为 h( 不是 hr )、“秒”符号为 s( 不是 sec ); 转速单位符号为 r/min( 不是 rpm ); 量浓度单位符号为 mol/L( 不是 M、N, 也不是 mol/mm<sup>3</sup> ); 力的单位“牛顿”符号为 N[ 不是 dyn( 达因)、kgf( 千克力), 换算 1 dyn = 10<sup>-5</sup>N ]; 热量单位“焦耳”符号为 J[ 不是 cal( 卡)、kcal( 千卡), 换算 1 cal = 4.187 J ]; 放射性活度单位符号为 Bq[ 不是 Ci( 居里), 换算 1 Ci = 3.7 × 10<sup>10</sup>Bq ]。

( 本刊编辑部 )