

间充质干细胞靶向转运胸苷激酶基因联合更昔洛韦杀伤鼻咽癌细胞*★

钟品能, 文忠, 申聪香, 王海丽, 王军旗

Herpes simplex virus thymidine kinase expressing mesenchymal stem cells in combination with Ganciclovir in targeted-gene therapy for nasopharyngeal carcinoma

Zhong Pin-neng, Wen Zhong, Shen Cong-xiang, Wang Hai-li, Wang Jun-qi

Abstract

Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong Province, China

Zhong Pin-neng★, Studying for master's degree, Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong Province, China
zhongpinpeng@163.com

Corresponding author: Wen Zhong, M.D., Professor, Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong Province, China
wenzhong60@163.com

Supported by: the Science and Technology Development Program of Guangdong Province, No. 2010B031200009*

Received: 2011-11-30
Accepted: 2012-02-12

BACKGROUND: Recent studies have confirmed that mesenchymal stem cells (MSCs) can be used as targeted-gene delivery vehicles for cancer gene therapy.

OBJECTIVE: To investigate the therapeutic effects of herpes simplex virus thymidine kinase expressing mesenchymal stem cells (TK-MSCs) in combination with Ganciclovir (GCV) on nasopharyngeal carcinoma.

METHODS: The pGL3-EGFP-TK plasmid was constructed and transfected into Sprague-Dawley rat MSCs by Lipofectamine™ 2000. Cell proliferation was determined by CCK-8 method. Tumor-homing of TK-MSCs was analyzed by Transwell inserts. BALB/C nude mice were inoculated with TK-MSCs to observe the tumorigenicity. Human nasopharyngeal carcinoma cells 5-8F were interfered with TK-MSCs/GCV to investigate the cell viability and the bystander effect.

RESULTS AND CONCLUSION: TK gene was transfected into MSCs successfully. There was no significant difference in cell proliferation between TK-MSCs and MSCs ($P > 0.05$). TK-MSCs maintained their tumor-homing and had no tumorigenicity. TK-MSCs/GCV significantly inhibited the growth of 5-8F cells ($P < 0.01$). TK-MSCs/GCV suicide gene therapy system exhibits significant inhibitory effects on growth of 5-8F cells, suggesting that MSCs can be used as delivery vehicles for targeted-gene therapy of nasopharyngeal carcinoma.

Zhong PN, Wen Z, Shen CX, Wang HL, Wang JQ. Herpes simplex virus thymidine kinase expressing mesenchymal stem cells in combination with Ganciclovir in targeted-gene therapy for nasopharyngeal carcinoma. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2012;16(10): 1827-1832. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 研究证实, 间充质干细胞能通过基因修饰成为肿瘤治疗的靶向载体。

目的: 观察转染胸苷激酶基因的胸苷激酶-间充质干细胞联合更昔洛韦对鼻咽癌细胞的靶向杀伤作用。

方法: 应用 Lipofectamine™ 2000 将表达胸苷激酶基因的重组质粒 pGL3-EGFP-胸苷激酶转染至 SD 大鼠间充质干细胞, 观察其增殖能力。应用 Transwell 小室观察胸苷激酶-间充质干细胞的归巢特性; 将胸苷激酶-间充质干细胞植入裸鼠, 观察其致瘤性; 用胸苷激酶-间充质干细胞/更昔洛韦干预人鼻咽癌细胞 5-8F, 观察其对细胞的杀伤作用及旁观者效应。

结果与结论: 荧光显微镜观察及 RT-PCR 检测结果提示实验成功将胸苷激酶基因转染至间充质干细胞, CCK-8 检测结果显示胸苷激酶-间充质干细胞与间充质干细胞增殖能力差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。Transwell 小室迁移实验显示胸苷激酶-间充质干细胞具有归巢特性, 裸鼠移植瘤实验显示胸苷激酶-间充质干细胞无致瘤性。CCK-8 检测检测发现胸苷激酶-间充质干细胞/更昔洛韦具有旁观者效应, 可明显降低 5-8F 的生存率 ($P < 0.01$)。提示胸苷激酶-间充质干细胞/更昔洛韦对鼻咽癌细胞具有靶向迁移及杀伤作用, 间充质干细胞可作为治疗鼻咽癌的理想靶向转运载体。

关键词: 鼻咽肿瘤; 间充质干细胞; 基因治疗; 归巢; 旁观者效应

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2012.10.026

钟品能, 文忠, 申聪香, 王海丽, 王军旗. 间充质干细胞靶向转运胸苷激酶基因联合更昔洛韦杀伤鼻咽癌细胞[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(10):1827-1832. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

基因靶向治疗已成为肿瘤治疗的最佳模式之一, 但如何实现靶向性仍是研究的难点。最近研究发现间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)具有归巢特性, 能靶向迁移至肿瘤组织及其远处转移灶^[1], 这为探讨肿瘤靶向治疗开辟了新领域。MSCs来源丰富, 提取方便, 免疫原性低, 且能被转染表达外源基因, 同时保持自身生物学稳定性。目前已有实验通过基因转染使MSCs表达某些蛋白应用于肿瘤靶向治疗, 如: 白细胞介素12, 18、干扰素 β 、胸苷激酶

(thymidine kinase, TK)、嘧啶脱氨酶、诱导型一氧化氮合酶、趋化因子CX3CL1、色素上皮细胞源因子、肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体等^[2-10]。迄今为止, 多种人体肿瘤基因靶向治疗的基础实验都已取得明显效果^[2, 7, 9, 11-16], 但罕见鼻咽癌治疗的相关报道。

实验观察了转染自杀基因的TK-MSCs/更昔洛韦(ganciclovir, GCV)对鼻咽癌细胞的靶向迁移性及杀伤作用。

1 材料和方法

设计: 基因工程水平的观察实验。

时间及地点: 于2010-05/2011-06在南方医科大学珠江医院中心实验室完成。

材料:

实验动物: SPF级SD大鼠2只, 4周龄, 雌雄不限, 体质量90 g左右, 购自南方医科大学实验动物中心, 许可证号: SCXK(粤) 2006-0015; SPF级BALB/c nu/nu裸鼠10只, 四五周龄, 雌雄不限, 体质量18~20 g, 购自中山大学实验动物中心, 许可证号: SYXK(粤)2007-0081。

人鼻咽癌细胞5-8F: 购自中山大学实验动物中心细胞库。

主要试剂:

| 试剂 | 来源 |
|---------------------------------|--------------|
| GCV | 湖北科益药业有限公司 |
| 胎牛血清 | Gibco |
| Percoll 分离液 | Pharmacia |
| SD 大鼠间质干细胞成骨/软骨/成脂诱导分化培养基 | Cyagen |
| Transwell 小室 | Corning |
| Cell Counting Kit-8 (CCK-8 试剂盒) | Beyotime |
| Lipofectamine™ 2000、RT-PCR 试剂盒 | Invitrogen |
| TK 基因扩增引物、GAPDH 基因扩增引物 | 上海英俊生物技术有限公司 |
| 质粒 pGL3- EGFP-TK | 朗日生物技术有限公司 |

实验方法:

MSCs的分离、培养和鉴定: 无菌条件下制备SD大鼠全骨髓细胞悬液, 经Percoll分离液(1.073 g/mL)分离, PBS洗涤, 按 $1.5 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 接种, 37 °C, 体积分数5%CO₂培养箱常规培养。流式细胞仪测定细胞表面标志CD29、CD34、CD44、CD45, 并用SD大鼠MSCs成骨/软骨/成脂诱导分化完全培养基分别进行诱导培养。

质粒pGL3-EGFP-TK转染MSCs及鉴定: 应用Lipofectamine™ 2000进行转染, 共设3个组: 实验组转染质粒pGL3-EGFP-TK, 对照组转染空白质粒pGL3-basic, 空白对照组未进行转染。转染24 h后荧光显微镜下观察EGFP的表达。转染48 h后RT-PCR检测TK基因mRNA的表达, 上游引物为: 5'-CCG CTC GAG ATG GCT TCG TAC CCC TGC-3', 下游引物为: 5'-CCC AAG CTT GTT AGC CTC CCC CAT CTC-3'。内参基因为GAPDH, 选择通用引物。

CCK-8 试剂盒检测转染 pGL3-EGFP-TK 的 MSCs(TK-MSCs)的增殖能力: 取生长状态良好的

TK-MSCs及MSCs, 按 5×10^3 /孔接种于96孔板, 从第2天起, 每天于同一时间点用CCK-8试剂盒检测吸光度值(下同)。连续测10 d, 绘制细胞生长曲线, 计算群体倍增时间。

Transwell小室迁移实验检测TK-MSCs的归巢特性: 选直径6.5 mm, 孔径8.0 μm的Transwell小室。实验设5个组。第1~3组分别在下室加入人鼻咽癌细胞5-8F、乳腺癌细胞MCF7或血管内皮细胞ECV悬液600 μL(1×10^5 个细胞, 无血清培养基), 37 °C, 体积分数5%CO₂培养24 h后在上室加入TK-MSCs悬液200 μL(1×10^5 个细胞, 含体积分数0.1%牛血清白蛋白无血清培养基), 第4, 5组下室细胞为5-8F或ECV, 上室细胞为MSCs。37 °C, 体积分数5%CO₂共同培养12 h后取出小室, 擦去上室面的细胞, 下室面细胞用40 g/L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, 计算迁移细胞数。

裸鼠移植瘤实验检测TK-MSCs的致瘤性: 将10只裸鼠随机分成2组。实验组: 取生长状态良好的TK-MSCs, 制成单细胞悬液并注射到裸鼠单侧腋部皮下, 每只注射量为0.2 mL, 1×10^6 个细胞; 对照组为人鼻咽癌细胞5-8F。饲养于SPF级无菌饲养室, 定期观察。

CCK-8试剂盒检测TK-MSCs/GCV对5-8F的杀伤作用: 实验设7个组, 在96孔板内按 5×10^3 /孔的浓度分别接种细胞, 具体细胞种类及相应处理如下: ①空白对照组, 5-8F不做任何干预。②阴性对照组1, 5-8F加入GCV(GCV终浓度为1 mg/L, 连续给药2 d, 下同)。③阴性对照组2, 5-8F和MSCs(两者各占混合细胞总数的50%, 下同), 不加GCV。④阴性对照组3, MSCs和5-8F, 加入GCV。⑤阴性对照组4, TK-MSCs和5-8F, 不加GCV。⑥实验组, TK-MSCs和5-8F, 加入GCV。⑦阳性对照组, TK-MSCs和MCF7(该阳性对照组相应地以未处理的MCF7为空白对照计算生存率), 加入GCV。2 d后用CCK-8试剂盒检测7个组的吸光度值, 计算生存率。

旁观者效应检测: 在96孔板内按 5×10^3 /孔的浓度接种TK-MSCs和5-8F, TK-MSCs的比例分别为0%, 5%, 20%, 40%, 60%, 80%, 接种后第2天加入1 mg/L GCV, 另设不作处理的5-8F为对照。连续2 d给予GCV后, 用CCK-8试剂盒检测各组吸光度值, 计算生存率。

主要观察指标: TK-MSCs的归巢性及对5-8F的杀伤作用。

南方医科大学珠江医院耳鼻喉-头颈外科, 广东省广州市 510282

钟品能★, 女, 1985年生, 广东省惠州市人, 汉族, 南方医科大学在读硕士, 主要从事鼻咽癌基础与临床研究工作。zhongpinneng@163.com

通讯作者: 文忠, 博士, 教授, 南方医科大学珠江医院耳鼻喉-头颈外科, 广东省广州市 510282 wenzhong60@163.com

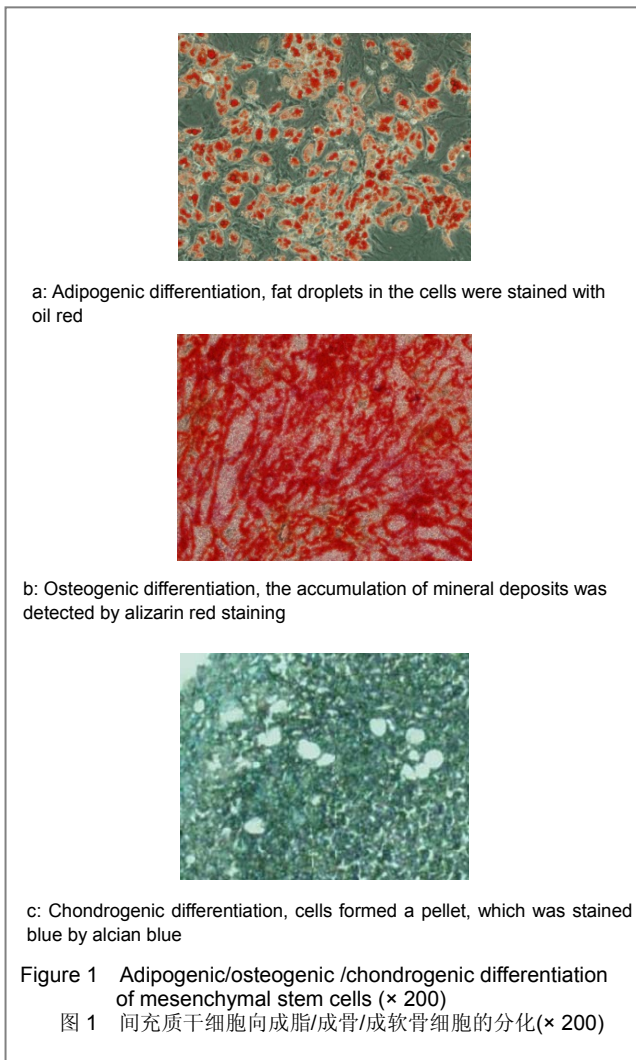
中图分类号:R394.2
文献标识码:B
文章编号:1673-8225
(2012)10-01827-06

收稿日期: 2011-11-30
修回日期: 2012-02-12
(20111130002/
WLM·S)

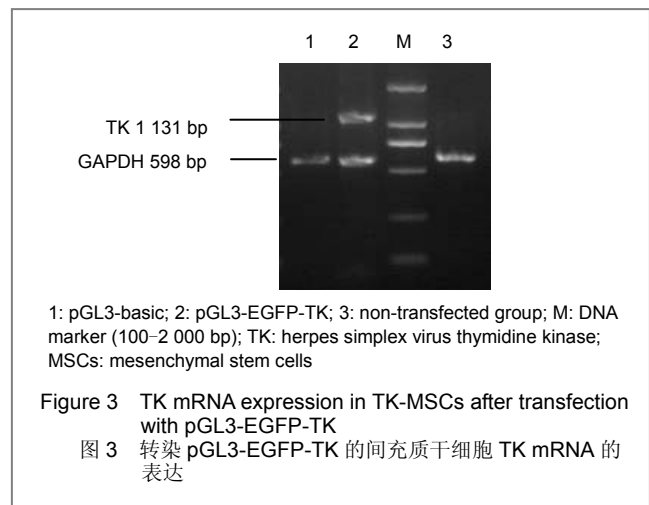
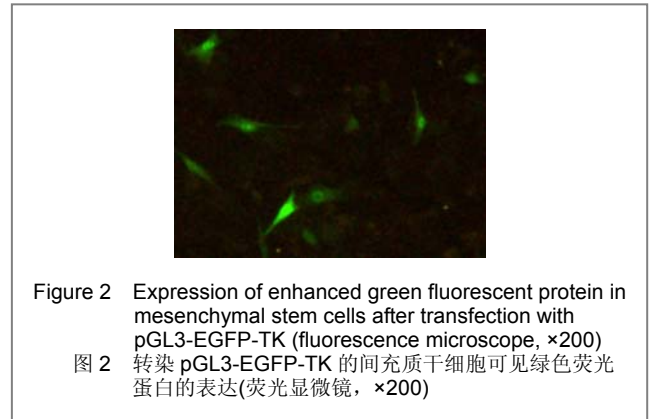
统计学分析:应用SPSS 13.0软件进行统计学处理。结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两独立样本均数间比较采用 t 检验, 多个样本均数比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

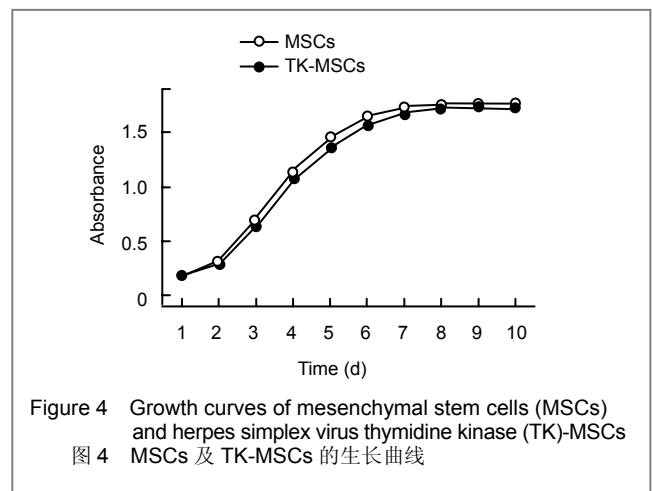
2.1 大鼠MSCs的分离、培养及鉴定结果 分离的MSCs贴壁生长, 呈长梭形, 以分散的克隆集落形式增殖。流式细胞仪检测显示细胞CD29和CD44的表达率分别达到99.96%和99.26%, CD34和CD45表达率分别为3.04%和1.14%。MSCs成脂诱导后经油红O染色显示有大量脂质沉淀, 见图1a; 成骨诱导后经茜素红染色呈红色结节, 见图1b。成软骨诱导后经甲苯胺蓝染色呈淡蓝色, 见图1c。



2.2 转染pGL3-EGFP-TK的MSCs的鉴定结果 转染24 h后, 成功转染的MSCs在荧光显微镜下可见绿色荧光, 见图2。RT-PCR检测TK mRNA的表达结果见图3, 实验组在1 131 bp处可见一特异性条带, 而对照组和空白对照组则未见此条带。



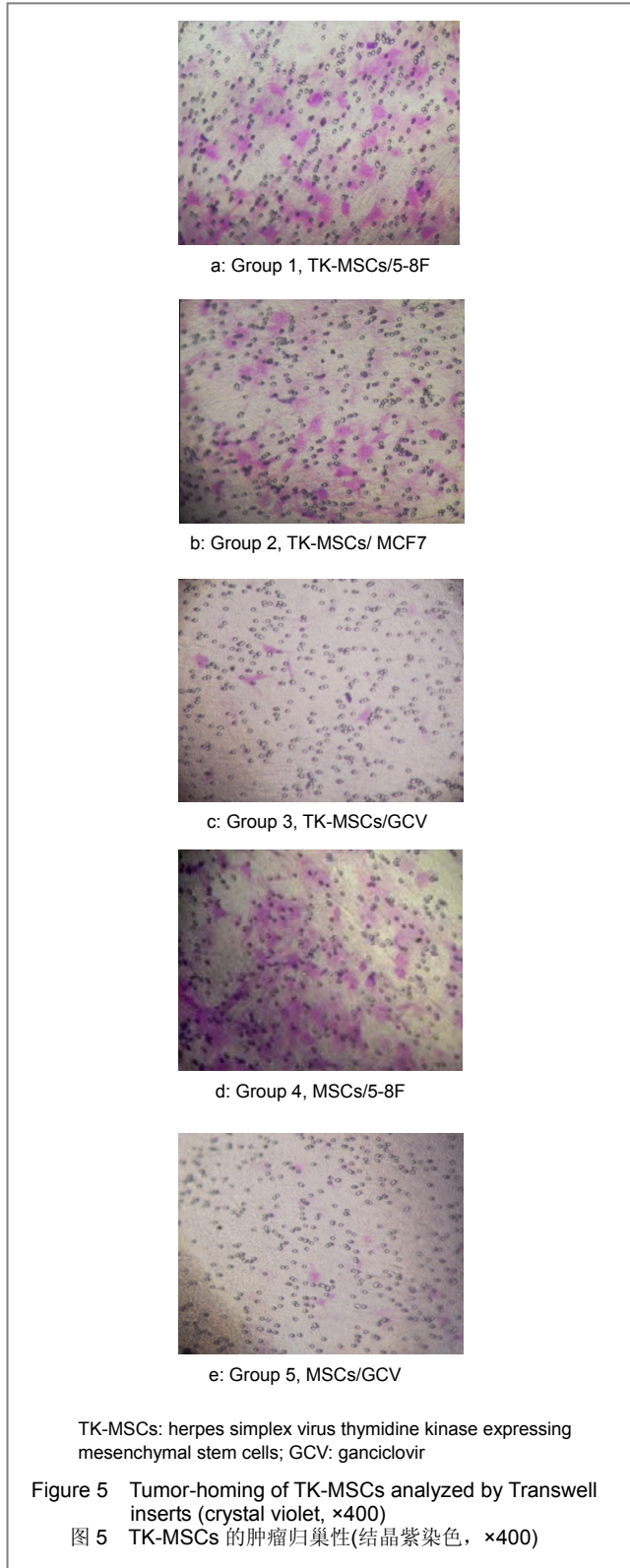
2.3 TK-MSCs的增殖能力 CCK-8检测显示MSCs和TK-MSCs生长曲线接近: 两者生长潜伏期约1 d, 第2~5天为指数生长期, 第6天以后进入平台期, 见图4。



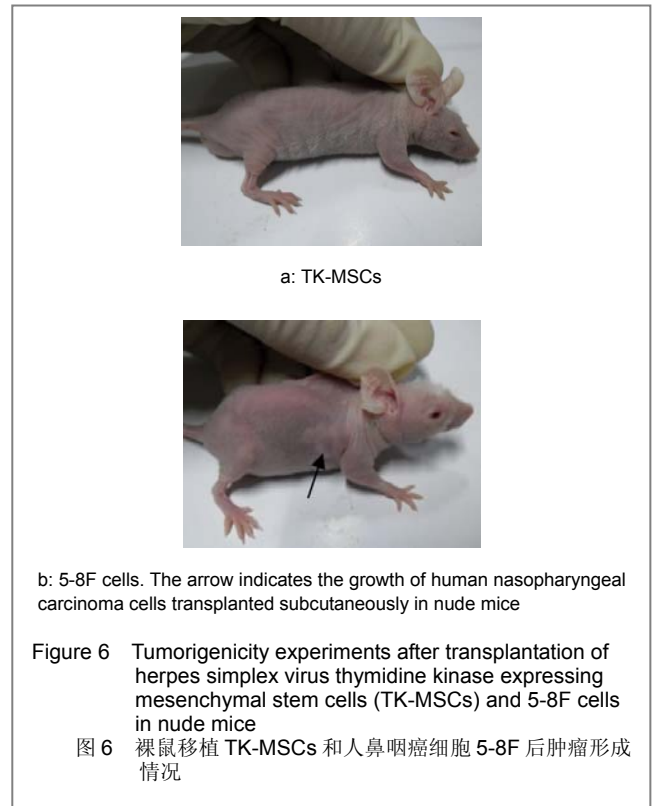
计算MSCs和TK-MSCs的群体倍增时间分别为 (31.7 ± 0.5) h和 (32.3 ± 1.2) h, 两者比较差异无显著性意义($t=0.813$, $P=0.447$)。

2.4 TK-MSCs的归巢性 Transwell小室迁移实验显示第1~5组平均迁移细胞数(个)分别为 38.5 ± 3.1 , 36.7 ± 3.6 , 4.0 ± 1.4 , 41.5 ± 2.6 , 2.3 ± 1.7 , 见图5。第1, 2, 3组比较差异有显著性意义($F=184.342$, $P=0.000$),

再经SNK多重比较发现, 第1, 2组比较差异无显著性意义($P=0.410$), 说明TK-MSCs趋向肿瘤细胞而不趋向正常体细胞, 而且对不同肿瘤细胞均有归巢性。第4, 5组比较差异有显著性意义($t=24.928$, $P=0.000$), 说明MSCs转染前后均趋向肿瘤细胞而不趋向正常体细胞; 第1, 4组比较差异无显著性意义($t=1.470$, $P=0.192$), 说明转染前后肿瘤归巢性不变。



2.5 TK-MSCs的致瘤性 裸鼠移植瘤实验显示, 移植4周, 实验组5只裸鼠均存活, 且腋部皮下均无肿物形成。对照组裸鼠平均第6天开始形成皮下结节, 结节逐渐增大, 裸鼠一般情况较差, 后期出现恶病质, 见图6。



2.6 TK-MSCs/GCV对5-8F的杀伤作用 CCK-8试剂盒测得各组细胞生存率见表1。

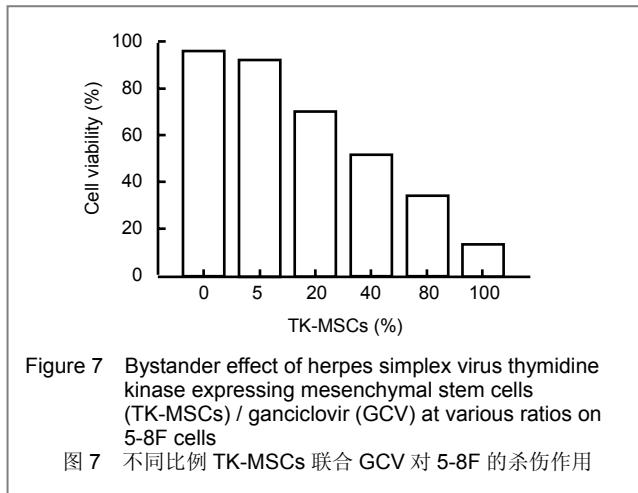
| Group | Cells and intervention | Cell viability |
|--------------------|------------------------|------------------------|
| Blank control | 5-8F | 100.0±0.0 ^a |
| Negative control 1 | 5-8F, GCV | 96.3±2.3 ^a |
| Negative control 2 | 5-8F, MSCs | 95.1±2.5 ^a |
| Negative control 3 | 5-8F, MSCs, GCV | 92.8±4.5 ^a |
| Negative control 4 | 5-8F, TK-MSCs | 91.8±3.5 ^a |
| Experiment | 5-8F, TK-MSCs, GCV | 43.9±1.2 |
| Positive control | MCF7, TK-MSCs, GCV | 46.1±2.0 |

^a $P < 0.01$, vs. experiment group. TK: Herpes simplex virus thymidine kinase; MSCs: mesenchymal stem cells; GCV: ganciclovir

实验组、空白对照组和各阴性对照组细胞生存率比较差异具有显著性意义($F=301.530$, $P=0.000$, 方差不齐, 采用近似F检验Welch法), 结合SNK多重比较结果, 实验组生存率较其余5组低, 说明TK-MSCs/GCV对5-8F有杀伤作用。实验组生存率和阳性对照组生存率比较差异无显著性意义($t=1.527$, $P=0.201$), 说明TK-MSCs/GCV对5-8F和MCF7同样有细胞毒性。

2.7 TK-MSCs/GCV的旁观者效应 CCK-8检测显示, 当TK-MSCs的比例分别为0%和5%时, 细胞的生存率分

别为(96.3±2.3)%和(92.0±3.0)%, 细胞活性仍较高, 旁观者效应不明显; 当TK-MSCs的比例达到20%时, 细胞生存率为(69.9±1.7)%, 旁观者效应较明显, 并且随着TK-MSCs的比例的增加, 细胞毒性增强, 见图7。



3 讨论

MSCs是主要来源于骨髓的成体干细胞。实验成功从骨髓中分离出MSCs, 细胞呈贴壁生长, 在相应的体外诱导培养条件下能分化为脂肪/成骨/软骨细胞, 阴性表达CD34和CD45, 阳性表达CD29和CD44, 且阳性率达到99%以上, 说明实验经Percoll分离液分离的MSCs具有高度同源性。

MSCs具有增殖能力强、免疫原性低、向肿瘤迁移等重要的生物学特性, 且不因转染外源基因而改变^[16-18]。实验成功用TK基因转染MSCs。与MSCs相比, TK-MSCs细胞形态无明显变化; CCK-8试剂盒检测细胞增殖能力无差异; Transwell小室迁移实验证实归巢性不变, 与以往的研究结果一致^[16-18]。

MSCs的归巢特性是近年来实验研究中发现的, 并受到广泛关注。Karp等^[19]将MSCs归巢定义为: MSCs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。实验通过Transwell小室迁移实验也证实了MSCs和TK-MSCs对正常细胞ECV无趋向性, 而对肿瘤细胞5-8F和MCF7则有归巢特性, 但MSCs归巢机制是一个复杂的过程, 实验暂未给予更多的研究。目前认为MSCs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, 但它们的具体作用机制仍有待探讨。

鼻咽癌以放射治疗为主, 配合化疗及其他辅助治疗。近年来, 随着细胞生物学和分子生物学的发展, 出现了一些新型的治疗方法: ①基因治疗, 如针对p53基因、bax基因、EB病毒相关基因的治疗。②细胞因子,

如干扰素、白细胞介素、肿瘤坏死因子等。③过继性免疫治疗, 如肿瘤特异性淋巴细胞、NK细胞等。④单克隆抗体。⑤肿瘤疫苗。这些治疗方法已有部分应用于临床, 在晚期鼻咽癌的治疗中发挥重要作用, 但仍存在靶向性差, 不良反应等问题。

HSV-TK/GCV自杀基因治疗系统是最有应用前景的肿瘤基因治疗方案之一^[20]。将TK基因转染至MSCs, 既利用了MSCs的靶向肿瘤部位的特性, 又能发挥自杀基因治疗效应, 是理想的基因治疗策略。实验证明TK-MSCs/GCV在荷瘤小鼠体内能特异性杀伤肿瘤细胞而不影响正常脑细胞^[21]。另有实验发现转染TK基因后的MSCs聚集到肿瘤部位, 联合GCV对肝癌细胞抑制率达到56.4%^[22]。自杀基因治疗系统强大的细胞毒性效应主要在于其旁观者效应。对于旁观者效应的机制目前有以下3个假说: ①缝隙连接作用。Matuskova等^[23]实验发现TK-MSCs对胶质瘤有明显的细胞毒性, 但不能有效地介导HeLa或MCF7细胞凋亡, 原因是MSCs与胶质瘤细胞之间能形成缝隙连接, 与HeLa或MCF7细胞则不存在缝隙连接。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TK-MSCs/GCV杀伤胶质瘤细胞的效果^[24]。②凋亡机制。自杀基因诱导转染细胞凋亡后释放凋亡小体介导旁观者效应。有研究表明, TK-MSCs/GCV培养上清液通过凋亡小体杀伤胶质瘤细胞^[25]。③免疫介导机制。细胞凋亡可以激活细胞免疫, 通过免疫介导机制发挥旁观者效应。实验用CCK-8试剂盒检测TK-MSCs/GCV对5-8F的作用, 结果显示实验组和阳性对照组的生存率明显低于各阴性对照组, 说明TK-MSCs/GCV对5-8F和MCF7均有明显的杀伤作用, 这和前面Matuskova等^[23]的研究结果(TK-MSCs与MCF7之间无缝隙连接, 因而TK-MSCs/GCV不能有效杀伤MCF7)不同, 考虑TK-MSCs/GCV杀伤MCF7的机制主要不是通过缝隙连接作用, 而是通过凋亡小体或免疫介导等其他途径。实验将不同比例TK-MSCs与5-8F共培养(加GCV), 当TK-MSCs的比例≤5%时, 细胞的生存率仍较高; 当TK-MSCs的比例达到20%时, 旁观者效应较明显, 并且随着TK-MSCs的比例的增加, 细胞毒性增强, 说明TK-MSCs达到一定比例, 肿瘤细胞与其充分接触, 建立有效的通信才能更好地发挥旁观者效应, 该实验结果与以往的研究是一致的^[26]。

MSCs的基因转染方法常用的有病毒转染和脂质体转染。前者转染效率高, 可实现持续表达, 但可能发生免疫反应和染色体突变的危险; 后者操作简便, 不受引入基因大小的限制, 但转染效率较低。出于安全方面考虑, 实验采用脂质体转染法, 所以转染效率较低(约10%), 也在一定程度上影响了转染后的实验结果。近年来出现了一些新型的非病毒转染方法, 如核转染法、纳

米材料基因转移载体等^[27], 但其实用性仍有待进一步验证。因此, 病毒转染仍是目前MSCs转染的较常用的方法, 课题组也将采用病毒法转染MSCs进一步开展动物体内实验。

4 参考文献

- [1] Reagan MR, Kaplan DL. Concise review: Mesenchymal stem cell tumor-homing: detection methods in disease model systems. *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. *Cancer Lett*. 2010;290(2): 157-166.
- [3] Xu G, Jiang XD, Xu Y, et al. Adenoviral-mediated interleukin-18 expression in mesenchymal stem cells effectively suppresses the growth of glioma in rats. *Cell Biol Int*. 2009;33(4):466-474.
- [4] 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. *Gene Ther*. 2008;15(21): 1446-1453.
- [5] Conrad C, Husemann Y, Niess H, et al. Linking transgene expression of engineered mesenchymal stem cells and angiopoietin-1-induced differentiation to target cancer angiogenesis. *Ann Surg*. 2011;253(3):566-571.
- [6] Chang DY, Yoo SW, Hong Y, et al. The growth of brain tumors can be suppressed by multiple transplantation of mesenchymal stem cells expressing cytosine deaminase. *Int J Cancer*. 2010;127(8): 1975-1983.
- [7] Xiang J, Tang J, Song C, et al. Mesenchymal stem cells as a gene therapy carrier for treatment of fibrosarcoma. *Cytotherapy*. 2009; 11(5):516-526.
- [8] Xin H, Kanehira M, Mizuguchi H, et al. Targeted delivery of CX3CL1 to multiple lung tumors by mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2007;25(7):1618-1626.
- [9] Gao Y, Yao A, Zhang W, et al. Human mesenchymal stem cells overexpressing pigment epithelium-derived factor inhibit hepatocellular carcinoma in nude mice. *Oncogene*. 2010;29(19): 2784-2794.
- [10] Mueller LP, 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. *Cancer Gene Ther*. 2011;18(4):229-239.
- [11] Gu C, Li S, Tokuyama T, et al. Therapeutic effect of genetically engineered mesenchymal stem cells in rat experimental leptomeningeal glioma model. *Cancer Lett*. 2010;291(2):256-262.
- [12] Cavarretta I, Altanerova V, Matuskova M, et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells expressing prodrug-converting enzyme inhibit human prostate tumor growth. *Mol Ther*. 2010;18(1):223-231.
- [13] Kucerova L, Matuskova M, Pastorakova A, et al. Cytosine deaminase expressing human mesenchymal stem cells mediated tumour regression in melanoma bearing mice. *J Gene Med*. 2008; 10(10):1071-1082.
- [14] Stoff-Khalili MA, Rivera AA, Mathis JM, et al. Mesenchymal stem cells as a vehicle for targeted delivery of CRAds to lung metastases of breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat*. 2007; 105(2):157-167.
- [15] Komarova S, Kawakami Y, Stoff-Khalili MA, et al. Mesenchymal progenitor cells as cellular vehicles for delivery of oncolytic adenoviruses. *Mol Cancer Ther*. 2006;5(3):755-766.
- [16] Kucerova L, Altanerova V, Matuskova M, et al. Adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells mediated prodrug cancer gene therapy. *Cancer Res*. 2007;67(13):6304-6313.
- [17] Song C, Xiang J, Tang J, et al. Thymidine Kinase Gene Modified Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells as Vehicles for Antitumor Therapy. *Hum Gene Ther*. 2011;22(4):439-449.
- [18] Ramos CA, Asgari Z, Liu E, et al. An inducible caspase 9 suicide gene to improve the safety of mesenchymal stromal cell therapies. *Stem Cells*. 2010;28(6):1107-1115.
- [19] Karp JM, Leng TG, Alejandro Erices. Mesenchymal Stem Cell Homing: The Devil Is in the Details. *Cell Stem Cell*. 2009;4(3): 206-216.
- [20] Shen CX, Wen Z, Guan XF, et al. Zhongguo Xiandai Yixue Zazhi. 2010;20(20):3048-3052.
申聪香, 文忠, 关小芳, 等. hTERT及CMV双调控TK基因靶向杀灭鼻咽癌细胞的实验研究[J]. 中国现代医学杂志, 2010, 20(20):3048-3052.
- [21] Amano S, Gu C, Koizumi S, et al. Tumoricidal bystander effect in the suicide gene therapy using mesenchymal stem cells does not injure normal brain tissues. *Cancer Lett*. 2011;306(1):99-105.
- [22] Niess H, Bao Q, Conrad C, et al. Selective targeting of genetically engineered mesenchymal stem cells to tumor stroma microenvironments using tissue-specific suicide gene expression suppresses growth of hepatocellular carcinoma. *Ann Surg*. 2011; 254(5):767-775.
- [23] Matuskova M, Hlubinova K, Pastorakova A, et al. HSV-tk expressing mesenchymal stem cells exert bystander effect on human glioblastoma cells. *Cancer Lett*. 2010;290(1):58-67.
- [24] 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. *Cancer Gene Ther*. 2010;17(3):192-202.
- [25] Li CH, Jiao BH. Zhonghua Zhongliu Fangzhi Zazhi. 2007;14(23): 1778-1782.
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, 14(23):1778-1782.
- [26] Amano S, Li S, Gu C, et al. Use of genetically engineered bone marrow-derived mesenchymal stem cells for glioma gene therapy. *Int J Oncol*. 2009;35(6):1265-1270.
- [27] Ding XP, Jin XQ, Wang ZY, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2008;12(6):1035-1038.
丁辛坡, 金先庆, 王智勇, 等. 纳米载体介导人胰岛素样生长因子1基因转染兔骨髓间充质干细胞及其表达. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(6):1035-1038.

来自本文课题的更多信息--

基金声明: 广东省科技计划项目(2010B031200009), 课题名称: 间充质干细胞靶向转运增强型 TK 载体抑制鼻咽癌干细胞的实验研究。

作者贡献: 文忠进行实验设计, 实验实施为钟品能, 实验评估为文忠, 所有作者参与资料收集, 钟品能成文, 文忠审校, 文忠对文章负责。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求: 实验过程中对动物的处置符合 2006 年科技部颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》的规定。

本文创新性: 目前已有实验通过基因转染使 MSCs 表达某些蛋白应用于肿瘤靶向治疗并已取得明显效果, 但未见鼻咽癌治疗的相关报道。