

表达内皮抑素基因的内皮祖细胞治疗肝癌的初步研究

陈 蓉^{1*}, 余 辉², 安艳丽³

(¹东南大学附属中大医院肿瘤科, 江苏 南京 210009; ²江苏省肿瘤医院介入科, 江苏 南京 210009; ³东南大学医学院, 江苏省分子影像与功能影像重点实验室, 江苏 南京 210009)

[摘要] 目的:观察内皮抑素(endostatin, ES)基因转染的内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)对小鼠肝癌细胞 H22 增殖的影响,探讨联合自体 EPCs 和 ES 基因治疗肝癌的可行性和有效性。方法:构建表达 ES 基因的慢病毒载体,培养小鼠骨髓源 EPCs,运用 qPCR 检测培养内皮细胞表面标记 CD31、血管内皮生长因子受体(vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR)、血管性血友病因子(von Willebrand factor, vWF)表达,电镜观察内皮细胞特征小体。实验分 EPCs 组、EPCs+LV 空病毒载体组、EPCs+ES 组。CCK-8 法检测各组细胞增殖的情况。同时构建原位肝癌小鼠模型,尾静脉注射 3 组细胞后不同时间点处死小鼠,测量肿瘤大小并进行统计分析。结果:①酶切和测序、PCR 鉴定证实成功构建慢病毒载体 pLenti6.3-ES-Monomer-DsRed;②qPCR 显示培养细胞表达内皮细胞标志 CD31、VEGFR、vWF,透射电镜下在细胞质内可见多个散在内皮细胞特征性 Weibel-Palade 小体(WP 小体);③慢病毒载体 Lenti6.3-ES-Monomer-DsRed 转染小鼠骨髓源性 EPCs 后荧光显微镜下可见细胞呈红色荧光;EPCs+ES 组细胞上清较对照组上清液对小鼠肝癌细胞 H22 体外增殖具有明显抑制作用,体内实验显示 EPCs+ES 组肝癌生长速度慢于对照组。结论:小鼠骨髓源单个核细胞体外可以诱导培养为内皮祖细胞,负载 ES 基因的 EPCs 体外可以抑制小鼠肝癌细胞 H22 的增殖,体内可以抑制小鼠肝癌生长。

[关键词] 内皮祖细胞;内皮抑素;肝癌

[中图分类号] R735.7

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2016)10-1181-07

doi: 10.7655/NYDXBNS20161007

Study of endostatin gene transfected mice bone marrow-derived endothelial progenitor cells for liver carcinoma

Chen Rong^{1*}, Yu Hui², An Yanli³

(¹Department of Oncology, Zhongda Hospital, Medical School of Southeast University, Nanjing 210009; ²Department of Interventional Radiology, Tumor Hospital of Jiangsu Province, Nanjing 210009; ³Jiangsu Provincial Laboratory of Molecular and Functional Imaging, Medical School of Southeast University, Nanjing 210009, China)

[Abstract] **Objective:** To study the endostatin(ES) gene armed endothelial progenitor cells(EPCs) for liver carcinoma H22 of mice and to discuss the feasibility and effectiveness of autologous EPSs combined with ES for treatment of liver carcinoma. **Methods:** We construct a lentiviral vector expressing endostatin gene and cultured the bone-marrow derived EPCs. Cell surface markers were detected with qPCR and cells were observed by electron microscope. There were three groups: EPCs, EPCs+LV, and EPCs+ES. Cell enhancement was detected by CCK-8 assay in the three groups. Liver carcinoma models *in situ* were made and three groups of cells were injected through tail veins. Mice were sacrificed later at different times and the tumors were detected. **Results:** The construction of lentiviral vectors pLenti6.3-ES-Monomer-DsRed was confirmed by cleavage, sequence identification and PCR. The cultured cells expressed endothelial cells' markers CD31, VEGFR and VWF with qPCR. Characteristic WP globule for endothelial cell was observed by transmission electron microscope. EPCs transfected with ES were observed red. Supernatant in the group of EPC+ES could inhibit the enhancement of H22 than the group of EPC and EPC+LV. *In vivo* assay showed that the tumors of EPCs+ES were smaller than the other two groups. **Conclusion:** Mice bone marrow derived MNCs can be induced to EPCs, EPCs transfected with ES could suppress the enhancement of H22 *in vitro* and the liver carcinoma *in vivo*.

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金(81201131);江苏省自然科学基金青年基金(BK2012335)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: rr1977@163.com

[Key words] endothelial progenitor cells; endostatin; liver carcinoma

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(10): 1181-1187]

肝细胞癌(hepatic cellular cancer, HCC)是世界上第 5 大常见恶性肿瘤,居我国恶性肿瘤病死率的第 2 位^[1-2]。虽然手术治疗已取得了显著的疗效,但是,由于 HCC 发现时多为中晚期,手术切除率低。即使经肝动脉栓塞化疗术(transcatheter arterial chemoembolization, TACE)在内的多种介入微创治疗方法已被广泛应用于临床,但 5 年生存率仍低于 10%^[3]。生物靶向治疗为近 20 年迅速发展起来的最有希望取得突破性进展的肿瘤治疗方法,基因治疗是其中的研究热点,在肝癌基因治疗方面,也取得了令人鼓舞的结果^[4-6]。

实体肿瘤的生长及存活依赖新生血管形成(angiogenesis)的理论已被逐渐证实和广泛接纳,因此而形成的抗血管形成(anti-angiogenesis)治疗肿瘤生长已成为肿瘤治疗的一个新的途径和手段^[7]。应用内皮抑素(endostatin, ES)基因治疗肝癌显示了令人振奋的结果^[8-9]。血管内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)是血管内皮细胞的前体细胞,能游走、增殖并分化为血管内皮细胞。EPCs 存在于成体骨髓、外周血及脐血中,参与出生后血管形成^[10]。大量研究显示 EPCs 在肿瘤血管新生中也起重要作用^[11],这一发现可能为抗肿瘤治疗提供一个新的靶点。

如何使转导后的基因靶向肿瘤细胞是基因治疗的重要挑战之一,利用 EPCs 向肿瘤血管新生位点定向迁移的特性,以 EPCs 为载体,把抗血管生成基因特异性地导入肿瘤部位,将有可能开辟肿瘤生物靶向治疗的新途径,有效抑制血管新生。本研究拟构建含内皮抑素基因的重组慢病毒载体 pLenti6.3-ES-Monomer-DsRed。观察 ES 基因转染的 EPCs 对小鼠肝癌细胞 H22 增殖的影响,同时将 ES 基因转染的 EPCs 移植入小鼠肝癌模型,利用 EPCs 的肿瘤组织特异性归巢特性将基因靶向运送至瘤体,探讨联合自体 EPCs 和内皮抑素基因治疗肝癌的可行性和有效性,这将有可能为基因治疗肝癌和其他恶性肿瘤提供新思路和新途径。

1 材料和方法

1.1 材料

ES 基因(上海 Invitrogen 公司合成),*Kpn* I、*T₄*

DNA ligase(NEB 公司,美国),pDsRed-Monomer-N1(Clontech 公司,美国),DNA 凝胶回收试剂盒(Axygen 公司,美国),DH5 α 感受态细胞(北京天根生化科技公司),Lipofectamine 2000、HQ 高纯度质粒抽提试剂盒、RNase H、TRIzol、pLenti6.3 V5-DEST、BP 重组酶、LR 重组酶、293FT 细胞、反转录试剂盒(Invitrogen 公司,美国),内皮细胞基础培养液(EBM-2)、Single Quots 组合添加剂(Lonza 公司,美国),抗 CD31 抗体(eBioscience 公司,美国)、抗 VEGFR 抗体(Cell Signaling 公司,美国)。荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad 公司,美国)。实验用鼠为健康昆明鼠(东南大学医学院实验动物中心),体重 20~30 g, C57BL/6J 小鼠(南京医科大学实验动物中心)。

1.2 方法

1.2.1 ES 基因合成及载体构建

根据基因序列合成 ES 基因,基因大小为 3 948 bp,检测用引物序列(5'→3'):F:CAAAACATCTCATTGCTCTACACG;R:GCCACGCTCTAGCTCCAGTC。用 *Kpn* I 对合成的 ES 基因 PCR 产物和 pDsRed-Monomer-N1 同时进行酶切,电泳,回收酶切的目的片段和载体。用 *T₄* DNA 连接酶连接 ES 与 pDsRed-Monomer-N1。连接产物(pDsRed-Monomer-N1-ES)转化感受态细胞 DH5 α ,涂布于卡那霉素平板,37℃培养箱中培养。从转化的平板上挑取多个单克隆接种于 50 mg/L 卡那霉素的 LB 培养基中,于 37℃摇床培养。进行菌落 PCR 鉴定。将鉴定为阳性克隆的菌液进行测序验证。

1.2.2 慢病毒载体构建、慢病毒包装和滴度的测定

使用 Primer 5.0 设计合成引物,以 pDsRed-Monomer-N1-ES 为模板,扩增 ES-Monomer-DsRed 的 BP 重组片段。回收 PCR 产物。使用美国 Invitrogen 公司 LR 重组系统将目的序列分别重组到慢病毒载体 pLenti6.3 V5-DEST 上,筛选阳性克隆并测序验证。

取状态良好的 293FT 细胞,计数后接种,CO₂ 培养箱中培养过夜。次日转染前换成 Opti-MEM 培养液,用 Lipofectamine 2000 共转染慢病毒表达质粒和包装质粒混合物;8~12 h 后移去含质粒脂质体复合物的培养基,换为完全培养基,培养 48 h 后收集细胞培养上清,过滤;将病毒原液超速离心后重悬于 DMEM 培养液中,分装置于 -80℃ 备用。

1.2.3 小鼠骨髓 EPCs 的培养

断颈法处死昆明鼠,分离两后肢,将股骨和胫骨两端剪开,用 RPMI1640 培养液冲洗骨髓腔。骨髓细胞悬液缓慢加到小鼠干细胞分离液上,室温 400 g 离心 30 min,获得单个核细胞,PBS 冲洗细胞后接种 1×10^7 个细胞于包被纤维连接蛋白(fibronectin, FN)的培养皿中,37°C、CO₂ 饱和湿度培养箱中培养。2~3 d 更换培养液。

1.2.4 qPCR 法检测 EPCs 中 CD31、vWF、VEGFR mRNA 表达

TRIzol 法抽提细胞总 RNA,-70°C 保存。取总 RNA 5 μ L,加入 50 μ mol/L oligo(dt)0.5 μ L、随机引物 0.5 μ L、10 mmol/L dNTPs 1 μ L、DEPC 水 5 μ L,总

体积 12 μ L,65°C 温浴 5 min,立即置冰上 1 min。再加入 5 \times First-Strand buffer 4 μ L、0.1 mol/L dTT 2 μ L、RNaseout 40 U/ μ L 1 μ L、SuperScript III RT 200 U/ μ L 1 μ L,25°C 5 min,50°C 60 min,70°C 15 min,立即放置到冰上。PCR 扩增体系:10 \times PCR buffer 2 μ L、镁离子(25 mmol/L)2 μ L、dNTPs(25 mmol/L)0.5 μ L、上下游引物(10 μ mol/L)各 0.5 μ L、Taqman probe(20 μ mol/L)0.3 μ L、Taq 酶(5 U/ μ L)0.2 μ L、模板 1 μ L、超纯水 13 μ L,共 20 μ L;PCR 引物由上海英骏生物公司合成(表 1)。95°C,预变性 2 min;95°C 10 s,60°C 30 s,40 个循环;4°C 保存。 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算基因表达量, $\Delta\Delta Ct=(待测样品目的基因 Ct 均值-待测样本看家基因 Ct 均值)-(对样品目的基因 Ct 均值-对照$

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences for PCR

基因	引物(5'→3')	片段大小(bp)
CD31	F:TAGCAAGAAGCAGGAAGGACAG	
CD31	R:AATGACAACCACCGCAATGA	141
CD31	P:FAM-ACAGCCTCCAACAGAGCCAGCAGT-TAMRA	
vWF	F:GAATGTGACTGTGATGGTGTGAA	
vWF	R:CTCAACATATGGGGTGGTAGAGC	111
vWF	P:FAM-ACGTGTGAAGCCTGCCAAGAGCC-TAMRA	
VEGFR-2	F:CCAATGCTCAGCGTATTCT	
VEGFR-2	R:ACCCTGGGAATGGTGTGAGTGT	93
VEGFR-2	P:FAM-ACCGCCGATTTCAGTCACCAATA-TAMRA	
ACTB	F:TCTACGAGGGCTATGCTCTCC	
ACTB	R:CTTTGATGTACGCACGATTT	146
ACTB	P:FAM-CATCCTGCGTCTGGACCTGGCTG-TAMRA	

样本看家基因 Ct 均值)。

1.2.5 电镜显示特征性小体

取约 5×10^7 个细胞用 0.25%胰酶消化后以 400 g 离心 20 min,弃上清。用 2.5%戊二醛 4°C 固定 4 h,1%锇酸后固定 2 h,酒精梯度脱水,环氧丙烷浸泡,Epon812 包埋、聚合,制作超薄切片(70 μ m),铀铅双染色后于透射电镜下观察内皮细胞特有的 Weibel-Palade 小体。

1.2.6 病毒转染小鼠骨髓 EPCs

分离培养小鼠骨髓 EPCs,选取生长良好的细胞进行 Lenti6.3-ES-Monomer-DsRed 病毒转染。病毒转染前进行细胞胰酶消化、计数。转染时将保存于-80°C 冰箱中病毒液冰水浴融化,感染复数为(MOI)=50 PFU,培养液含有 8 μ g/mL 聚凝胺(polybrene),37°C 孵育 6~18 h,之后更换完全培养液继续培养。病毒转染后第 3 天左右,在荧光显微镜下观察荧光表达情况。

1.2.7 CCK-8 法检测细胞增殖情况

观察 ES 基因转染 EPCs 后对小鼠肝癌细胞 H22 增殖的影响。将生长状态良好的细胞消化后以 5×10^3 个/孔接种于 96 孔板,实验分 3 组:EPCs 组、EPCs+LV 空病毒载体组、EPCs+ES 组。每组 24 个复孔,每天每组取 3 孔吸去悬浮细胞,每孔各加入 10 μ L CCK-8 溶液,37°C 避光孵育 3 h 后使用酶联免疫检测仪 450 nm 波长下检测各孔吸光度值(OD),记录结果,持续 9 d,绘制细胞生长曲线。

1.2.8 小鼠肝癌模型制作和细胞移植

体外培养小鼠肝癌 H22 细胞,将状态良好,处于对数生长期的肝癌细胞离心后以生理盐水稀释,计数 1×10^7 个细胞注入正常昆明鼠腹腔。待癌性腹水出现后抽取小鼠腹水,PBS 洗 2 次后制备成 H22 细胞悬液。10%水合氯醛 0.1 mL/10 g 腹腔注射麻醉 C57BL/6J 小鼠,手术切开腹壁,暴露肝组织。用 10 μ L 微量进样器吸取 1×10^6 个肝癌细胞悬液,小心注入

肝左叶内,注射后以棉签按压2~3 min 尽量避免渗出,术后逐层缝合腹壁。注射后第7天行肝脏磁共振检查,观察成瘤情况,随后进行细胞移植。经不同处理的3组细胞分别吸去培养液,PBS洗3次,胰酶消化后离心,PBS调整细胞密度。每组15只,每只小鼠取 4×10^5 个EPCs,尾静脉注射,1次/d \times 2 d。观察小鼠饮食情况、精神状态、大小便情况。实验动物在移植后不同时间点麻醉后处死,取出肝脏肿瘤组织,计算肿瘤体积并绘制生长曲线。

1.3 统计学方法

采用SPSS18.0软件进行统计检测,结果用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用LSD法,各组不同时间点的差异采用重复测量的方差分析, $P \leq 0.05$ 即认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 慢病毒载体的鉴定及滴度检测

经测序验证,慢病毒载体 pLenti6.3-ES-Monomer-DsRed 构建成功,将病毒梯度稀释后感染 HEK293 细胞,48 h 荧光显微镜观察荧光细胞数量;以最大

稀释度仍然有荧光的病毒稀释度的倒数为病毒滴度,得到重组慢病毒载体 Lenti6.3-ES-Monomer-DsRed 的滴度为 6.5×10^7 TU/mL(图1)。

2.2 小鼠骨髓 EPCs 鉴定

2.2.1 细胞形态学观察

倒置相差显微镜下观察刚分离出的小鼠骨髓单个核细胞呈小圆形;培养24 h后,部分细胞贴壁;培养4 d时,贴壁细胞形成克隆,细胞增大伸展呈梭形;培养7 d时,克隆增大,梭形细胞增多;培养14 d时,细胞生长密集呈铺路石状(图2)。

2.2.2 qPCR 结果

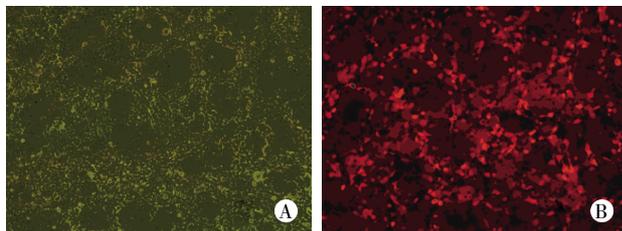
运用 qPCR 反应检测培养细胞 CD31、vWF 和 VEGFR 的 mRNA 表达量。结果显示培养的 EPCs 细胞表达内皮祖细胞特异性标记 VEGFR、vWF 以及成熟的内皮细胞特异性标记 CD31(图3)。

2.2.3 电镜观察 WP 小体

透射电镜下在细胞质内可见多个散在内皮细胞特征性 WP 小体,直径约 $0.2 \mu\text{m}$,呈高电子密度、短棒状。细胞质中还可可见大量吞饮小泡,直径约 $70 \mu\text{m}$ (图4)。

2.3 慢病毒感染 EPCs 后荧光观察

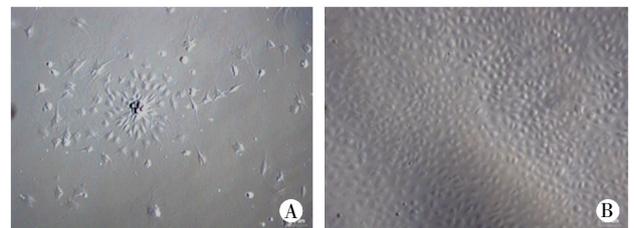
将慢病毒 Lenti6.3-ES-Monomer-DsRed 以 $\text{MOI} =$



A:可见光;B:荧光显微镜下见红色荧光($\times 100$)。

图1 pLenti6.3-ES-Monomer-DsRed 转染 293FT 24 h 荧光表达情况

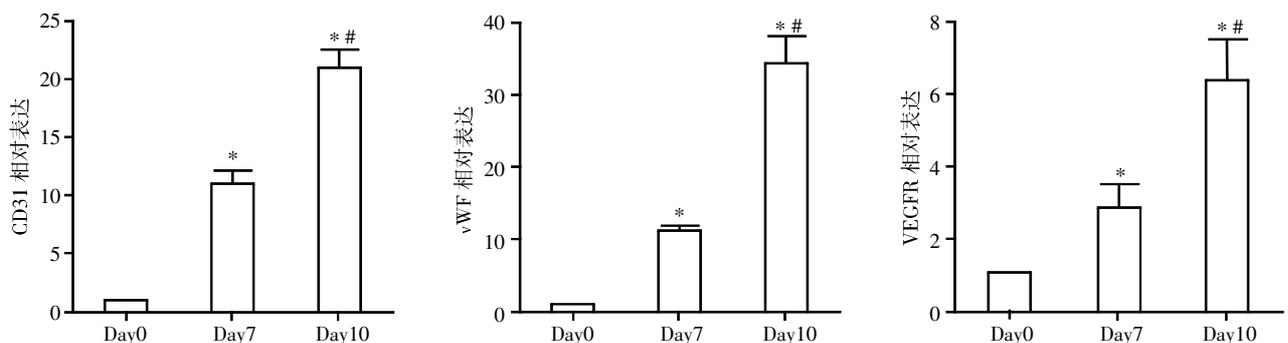
Figure 1 Fluorescence expression of 293FT after transfected with pLenti6.3-ES-Monomer-DsRed 24 h later



A:细胞培养第4天,贴壁细胞克隆增大,伸展呈梭形;B:第7~10天,细胞表现出内皮细胞特有的“铺路石”样形态($\times 100$)。

图2 骨髓源性内皮祖细胞相差显微镜下观察

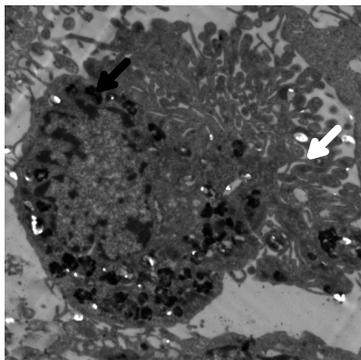
Figure 2 Bone marrow derived endothelial progenitor cells



与 Day0 比较,* $P < 0.05$,与 Day7 比较,* $P < 0.05$ ($n=3$)。

图3 qPCR 检测细胞 CD31、vWF 和 VEGFR 的 mRNA 表达情况

Figure 3 mRNA expression of CD31, vWF and VEGFR detected by qPCR

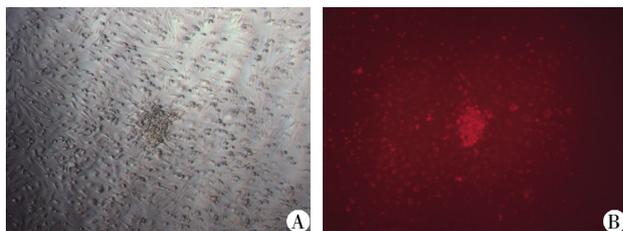


黑箭头示细胞核外典型的 WP 小体,白箭头示细胞质中多量吞饮小泡($\times 7\ 000$)。

图 4 透射电镜下观察特征性 WP 小体

Figure 4 Characteristic WP globule by transmission electron microscope

50, TOI=6~18 h 感染 EPCs 后,吸去病毒液更换完全培养液。转染后 48~72 h 观察细胞荧光表达情况。结果显示,EPCs 感染慢病毒 Lenti6.3-ES-Monomer-DsRed 后,在荧光显微镜下呈红色荧光(图 5)。



A: 可见光;B: 慢病毒载体 Lenti6.3-ES-Monomer-DsRed 转染 EPCs 后荧光显微镜下见红色荧光($\times 100$)。

图 5 Lenti6.3-ES-Monomer-DsRed 载体转染 EPCs 72 h 荧光表达情况

Figure 5 Fluorescence expression of EPCs transfected with Lenti6.3-ES-Monomer-DsRed 72 h later

2.4 EPCs 转染后对小鼠肝癌细胞 H22 增殖的影响

CCK-8 法检测 EPC 转染 Lenti6.3-ES-Monomer-DsRed 后细胞上清对小鼠肝癌细胞 H22 体外增殖的影响。结果显示 EPCs 组和 EPCs+LV 组细胞生长曲线接近,说明 LV 阴性对照液转染后对细胞生长无明显影响。转染负载 ES 基因的病毒后细胞生长均明显受到抑制,组间不同时间点差异采用重复测量的方差分析显示 $P < 0.001 (n=3)$,差异有统计学意义,说明 ES 表达产物体外具有一定的细胞杀伤作用(图 6)。

2.5 ES 转染 EPCs 后体内抑瘤作用

根据各组肿瘤体积生长曲线发现,对照组肿瘤体积增长最多、最快,实验组中 EPCs +ES 组肿瘤体积增长最少、最慢,变化较对照组稳定($n=15$)(图 7)。

细胞移植后各组肿瘤体积均有增大,负载 ES

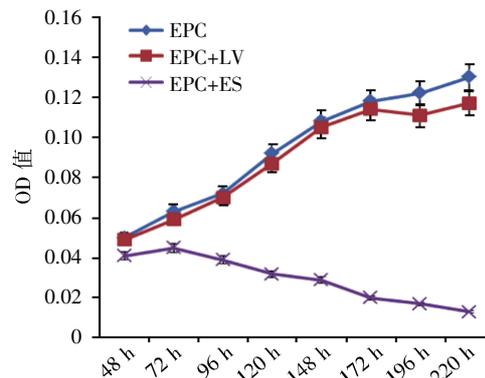


图 6 CCK-8 法绘制病毒转染 EPCs 对小鼠肝癌细胞 H22 增殖的影响

Figure 6 Proliferation of H22 after EPCs transfected with different virus by CCK-8

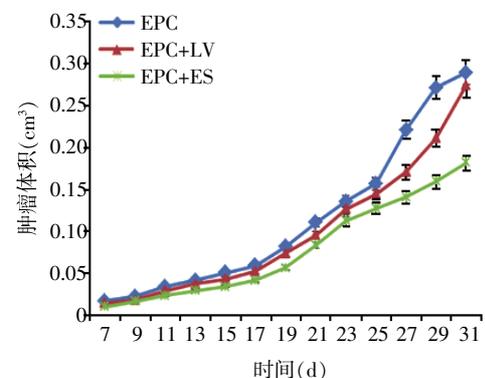


图 7 肿瘤生长曲线

Figure 7 Growth curves of carcinomas

的 EPCs 回输后肿瘤增长速度受到抑制。组间不同时间点差异采用重复测量的方差分析, $P < 0.001$,有统计学意义。

3 讨论

肝癌治疗的发展史中,生物治疗作为继手术、放疗、化疗之后的第 4 种治疗模式,将在未来肿瘤治疗中起着举足轻重的地位^[6]。肝癌的发生是一个多因素、多基因、多阶段和多途径的复杂过程,是遗传与环境风险因子相互作用对体细胞基因组稳定性影响的结果之一。基因治疗通过直接在基因水平上进行操作和介入来干预疾病的发生、发展和进程,从而达到治疗疾病的目的。肿瘤基因治疗已成为肿瘤治疗研究的热点^[12]。在国际上已得到批准用于临床的基因治疗方案中 60%以上是针对肿瘤的。目前肝癌的基因治疗主要有自杀基因治疗、抗血管生成基因治疗、免疫基因治疗、反义基因治疗、抑癌基因治疗、多耐药基因治疗、联合基因治疗等。随着第一个内源性血管形成抑制剂 angiostatin 和 ES 相

继发现^[13],抗肿瘤血管生成药物的研制进入迅速发展时期,多种抗血管生成药物如 Bevacizumab、BAY43-9006 (Sorafenib)、PTK787、Endostar (rh-endostatin, YH-16)、ZD6474 等目前已获准进入临床应用^[14-15]。研究表明 ES 可以抑制 VEGF 诱导的 EPCs 增殖及血管生成。腺病毒介导的 ES 在体内表达可以导致血浆 ES 水平的升高,明显减低肿瘤生长的速度及体积。在实验模型中 ES 可以很大程度上抑制肺肿瘤的转移^[16]。

EPCs 具有良好的肿瘤组织趋化性,在趋化因子作用下,靶向归巢到肿瘤组织。研究发现肿瘤组织缺血缺氧区域 VEGF 显著升高,对 EPCs 有阳性趋化作用,从而使该区域 EPCs 明显增多^[17-19]。EPCs 的数量与肿瘤内的氧张力呈明显负相关,说明 EPCs 能感应肿瘤微环境发出的信号,可以靶向肿瘤^[17]。目前利用 EPCs 靶向治疗低毒性、一次用药有效等优点,多把 EPCs 用作基因治疗载体,制备转染了自杀基因或抑癌基因的治疗细胞,再回输至肿瘤动物模型体内,实现对肿瘤细胞的精确打击^[20-21]。目前尚无 ES 基因转染自体 PECs 治疗肝癌方面的研究报告。本研究选用慢病毒为载体构建了含 ES 基因的慢病毒 Lenti6.3-ES-Monomer-DsRed,由于新生血管的形成对肿瘤的生长、浸润和转移具有重要意义,血管内皮细胞生长因子及其受体在增生活跃的肿瘤血管内皮细胞及肿瘤组织中均呈高表达,但在正常组织中不表达或表达甚微,可以作为一个有效的靶点。ES 基因的产物能特异性抑制内皮细胞增生、转移和新血管的生成,导致肿瘤细胞因缺乏营养物质而死亡,也能抑制肿瘤细胞的远端转移^[4-5]。本研究所采用的载体为复制缺陷性慢病毒载体,对分裂细胞和非分裂细胞均具有感染能力,只将外源基因有效地整合到宿主染色体中,从而达到持久性的表达^[22]。近年来,该载体研究发展快,并不断深入,安全性更高,感染宿主范围更广,病毒滴度得到显著提高。

本实验结果显示分离的 EPCs 在细胞形态、表面标记方面都符合 EPCs 的生物学特性,可以在体外增殖、分化为内皮细胞,表达 ES 的慢病毒感染 EPCs 后,上清液可以杀伤小鼠肝癌细胞 H22,抑制 H22 增殖。体内实验进一步证实 ES 转染 EPCs 后肝癌生长速度降低,为下一步实验研究打下了基础。

综上所述,利用内皮祖细胞作为内皮抑素基因载体靶向治疗肝癌可能是今后肝癌治疗发展的一个方向。但目前进行的工作还是探索性的,尚处于实验阶

段,要成为临床安全有效的治疗方法,还有许多问题需要解决,包括基因转染效率的提高、靶向的精确、调控长效的稳定表达以及安全性提高等问题。

[参考文献]

- [1] He J, Gu D, Wu X, et al. Major causes of death among men and women in China [J]. *N Engl J Med*, 2005, 353(11): 1124-1134
- [2] Parkin DM, Bray FI, Devesa SS. Cancer burden in the year 2000. The global picture [J]. *Eur J Cancer*, 2001, 37(Suppl 8): S4-66
- [3] Marelli L, Stigliano R, Triantos C, et al. Transarterial therapy for hepatocellular carcinoma: which technique is more effective? A systematic review of cohort and randomized studies [J]. *Cardiovasc Intervent Radiol*, 2006, 30(1): 6-25
- [4] Tommasi S, Pinto R, Pilato B, et al. Molecular pathways and related target therapies in liver carcinoma [J]. *Curr Pharm Des*, 2007, 13(32): 3279-3287
- [5] Hwang LH. Gene therapy strategies for hepatocellular carcinoma [J]. *J Biomed Sci*, 2006, 13(4): 453-468
- [6] Lee K, Yun ST, Kim YG, et al. Adeno-associated virus-mediated expression of apolipoprotein (a) kringles suppresses hepatocellular carcinoma growth in mice [J]. *Hepatology*, 2006, 43(5): 1063-1073
- [7] Folkman J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2007, 6(4): 273-286
- [8] Liu F, Tan G, Li J, et al. Gene transfer of endostatin enhances the efficacy of doxorubicin to suppress human hepatocellular carcinomas in mice [J]. *Cancer Sci*, 2007, 98(9): 1381-1387
- [9] Graepler F, Verbeek B, Graeter T, et al. Combined endostatin/sFlt-1 antiangiogenic gene therapy is highly effective in a rat model of HCC [J]. *Hepatology*, 2005, 41(4): 879-886
- [10] Asahara T, Masuda H, Takahashi T, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization [J]. *Circ Res*, 1999, 85(3): 221-228
- [11] Moore XL, Lu J, Sun L, et al. Endothelial progenitor cells' "homing" specificity to brain tumors [J]. *Gene Ther*, 2004, 11(10): 811-818
- [12] 卢叶挺, 丁文周, 于建军, 等. 肾母细胞瘤过表达基因促进肝癌细胞的侵袭与转移 [J]. *南京医科大学(自然科学版)*, 2015, 35(8): 1087-1091
- [13] O'reilly MS, Boehm T, Shing Y, et al. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth [J]. *Cell*, 1997, 88(2): 277-285
- [14] Escudier B, Eisen T, Stadler WM, et al. Sorafenib in ad-

- vanced clear-cell renal-cell carcinoma[J]. *N Engl J Med*, 2007,356(2):125-134
- [15] Gralow J, Ozols RF, Bajorin DF, et al. Clinical cancer advances 2007: major research advances in cancer treatment, prevention, and screening--a report from the American Society of Clinical Oncology [J]. *J Clin Oncol*, 2008,26(2):313-325
- [16] Khan ZA, Melero-Martin JM, Wu X, et al. Endothelial progenitor cells from infantile hemangioma and umbilical cord blood display unique cellular responses to endostatin [J]. *Blood*, 2006,108(3):915-921
- [17] Raida M, Weiss T, Leo C, et al. Circulating endothelial progenitor cells are inversely correlated with the median Oxygen tension in the tumor tissue of patients with cervical cancer[J]. *Oncol Rep*, 2006,16(3):597-601
- [18] Dome B, Timar J, Dobos J, et al. Identification and clinical significance of circulating endothelial progenitor cells in human non-small cell lung cancer [J]. *Cancer Res*, 2006,66(14):7341-7347
- [19] Rabascio C, Muratori E, Mancuso P, et al. Assessing tumor angiogenesis: increased circulating VE-cadherin RNA in patients with cancer indicates viability of circulating endothelial cells [J]. *Cancer Res*, 2004,64 (12):4373-4377
- [20] Asakage M, Tsuno NH, Kitayama J, et al. Early-outgrowth of endothelial progenitor cells can function as antigen-presenting cells [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2006,55(6):708-716
- [21] Wei J, Blum S, Unger M, et al. Embryonic endothelial progenitor cells armed with a suicide gene target hypoxic lung metastases after intravenous delivery [J]. *Cancer Cell*, 2004,5(5):477-488
- [22] Pfeifer A, Kessler T, Yang M, et al. Transduction of liver cells by lentiviral vectors; analysis in living animals by fluorescence imaging[J]. *Mol Ther*, 2001,3(3):319-322
- [收稿日期] 2016-05-31

(上接第 1169 页)

- [8] Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, et al. New response evaluation criteria in solid tumours; Revised RECIST guideline (version 1.1)[J]. *Eur J Cancer*, 2009,45(2):228-247
- [9] Abrams MJ, Rakszawski K, Vasekar M, et al. Recent advances in pancreatic cancer; updates and insights from the 2015 annual meeting of the American Society of Clinical Oncology [J]. *Therap Adv Gastroenterol*, 2016,9(2):141-151
- [10] An SG, Kim DU, Song GA, et al. Prognostic factors in patients with advanced pancreatic cancer treated with gemcitabine chemotherapy; clinical characteristics of long-term survivors [J]. *Korean J Gastroenterol*, 2014,64(6):356-363
- [11] De Sousa Cavalcante L, Monteiro G. Gemcitabine; metabolism and molecular mechanisms of action, sensitivity and chemoresistance in pancreatic cancer [J]. *Eur J Pharmacol*, 2014,741(15):8-16
- [12] Fusaroli P, Eloubeidi MA. Diagnosis of pancreatic cancer by contrast-harmonic endoscopic ultrasound (EUS); complementary and not competitive with EUS-guided fine-needle aspiration[J]. *Endoscopy*, 2014,46(5):380-381
- [13] Yang R, Lu M, Qian X, et al. Diagnostic accuracy of EUS and CT of vascular invasion in pancreatic cancer; a systematic review [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2014,140(12):2077-2086
- [14] Kaufman HL, Kohlhapp FJ, Zloza A. Oncolytic viruses; a new class of immunotherapy drugs[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2015,14(9):642-662
- [15] Seymour LW, Fisher KD. Oncolytic viruses; finally delivering[J]. *Br J Cancer*, 2016,114(4):357-361
- [16] 蔡 晔,张红燕,江春华,等.内镜下 H101 瘤内注射联合吉西他滨治疗胰腺癌护理[J].*医药前沿*, 2014(17):327-327
- [17] 陆永奎,胡晓桦,黎福祥,等.放疗联合化疗及瘤内注射 EIB 缺失腺病毒 (H101) 综合治疗鼻咽癌的临床研究[J].*肿瘤*, 2006,26(5):453-455
- [收稿日期] 2016-03-28