

• 基础研究 •

诺维氏梭菌对小鼠移植性肝癌的抑制作用*

黄筱钧, 邓昭敏, 王红仁, 邝玉, 李婉宜, 李明远[△]

445000 湖北 恩施, 湖北民族大学医学部 病原生物学教研室(黄筱钧); 610041 成都, 西藏自治区人民政府驻成都办事处医院 医学检验科(邓昭敏); 610041 成都, 四川大学华西基础医学与法医学院微生物学教研室(王红仁、邝玉、李婉宜、李明远); 610041 成都, 四川大学华西第二医院 医学检验科(李明远)

[摘要] 目的: 评估无毒诺维氏梭菌对小鼠移植性肝癌的抑瘤效应, 及其在肿瘤和重要器官的定植情况, 并确定瘤内注射的最佳剂量。方法: 建立 H22 皮下移植瘤 BALB/c 小鼠模型后称小鼠重量, 测量肿瘤大小, 并按随机原则分为生理盐水组、无毒诺维氏梭菌低剂量组(1.0×10^7 /mL, 0.5 mL)、中剂量组(1.0×10^8 /mL, 0.5 mL)和高剂量组(1.0×10^9 /mL, 0.5 mL)。每天观察小鼠的一般情况, 每周 3 次定时测量小鼠重量, 每周 2 次测肿瘤大小, 评估细菌的抑瘤效应。采用革兰染色法、细菌培养法、PCR 技术, 了解肿瘤和重要器官中诺维氏梭菌的定植情况。利用 HE 染色、脾脏指数、胸腺指数, 了解细菌干预后荷瘤鼠炎症反应、免疫功能及肿瘤转移的情况。结果: 无毒诺维氏梭菌低、中、高剂量组抑瘤率分别为 8.49%、44.59%、14.84%, 高剂量组小鼠一般情况最差, 中剂量组小鼠一般情况最好。培养结果显示, 肿瘤组织中有诺维氏梭菌定植, 主要脏器无该菌定植。高剂量组和中剂量组荷瘤鼠脾脏质量明显增大, 两组脾脏质量和指数与生理盐水组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。高剂量组胸腺显著缩小, 但胸腺指数各组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论: 无毒诺维氏梭菌能选择性地定植于肝癌区, 中剂量(1.0×10^8 /mL, 0.5 mL)无毒诺维氏梭菌能有效抑制免疫正常小鼠 H22 皮下移植瘤, 可能与抗肿瘤免疫和炎症反应有关。

[关键词] 诺维氏梭菌; 溶菌疗法; 肝细胞癌

[中图分类号] R378.8; R735.7 [文献标志码] A doi:10.3969/j.issn.1674-0904.2021.04.001

引文格式: Huang XJ, Deng ZM, Wang HR, et al. Antitumor effects of *Clostridium novyi* on transplanted hepatocarcinoma in mice[J]. J Cancer Control Treat, 2021, 34(4): 279-285. [黄筱钧, 邓昭敏, 王红仁, 等. 诺维氏梭菌对小鼠移植性肝癌的抑制作用[J]. 肿瘤预防与治疗, 2021, 34(4): 279-285.]

Antitumor Effects of *Clostridium novyi* on Transplanted Hepatocarcinoma in Mice

Huang Xiaojun, Deng Zhaomin, Wang Hongren, Kuang Yu, Li Wanyi, Li Mingyuan

Department of Pathogen Biology, Medical school, Hubei Minzu University, Enshi 445000, Hubei, China (Huang Xiaojun); Department of Laboratory Medicine, Hospital of Chengdu Office of People's Government of Tibetan Autonomous Region, Chengdu 610041, Sichuan, China (Deng Zhaomin); Department of Microbiology, West China School of Basic Medical Sciences & Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan, China (Wang Hongren, Kuang Yu, Li Wanyi, Li Mingyuan); Department of Laboratory Medicine, West China Second University Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan, China (Li Mingyuan)

Corresponding author: Li Mingyuan, E-mail: lmy3985@sina.com

This study was supported by National Science Fund for Talent Training in Basic Science (No. J1103604),

[收稿日期] 2020-11-04 [修回日期] 2021-03-05

[基金项目] * 湖北省教育厅科学研究计划重点项目(编号: D20181903), 湖北民族大学博士启动基金项目(编号: MY2017B031), 国家基础科学人才培养基金(编号: J1103604)

[通讯作者] [△]李明远, E-mail: lmy3985@sina.com

and by grants from Department of Education of Hubei Province (No. D20181903) and Hubei Minzu University (No. MY2017B031).

[Abstract] Objective: To evaluate the efficacy of nontoxic Clostridium novyi (C. novyi-NT) in the treatment of the

mice bearing subcutaneously implanted H22 hepatocarcinoma, and its colonization in tumors and vital organs, so as to determine the optimum dose. **Methods:** 32 specific pathogen free BALB/c mice were subcutaneously transplanted with H22 hepatocarcinoma. Tumor-bearing mice were assigned to the normal saline group, the low-dose group (1.0×10^7 /mL, 0.5 mL), the medium-dose group (1.0×10^8 /mL, 0.5 mL) and the high-dose group (1.0×10^9 /mL, 0.5 mL) according to the dosage of *C. novyi*-NT. During the experiment, general conditions of mice were observed every day; mice were weighed three times a week; tumor diameter was measured twice a week. The colonization of *Clostridium novyi* (*C. novyi*) in tumors and important organs was studied by Gram stain, bacterial cultivation and PCR. HE stain, spleen index and thymus index were used to investigate the inflammatory response, immune function and tumor metastasis in tumor-bearing mice after bacterial intervention. **Results:** Tumor inhibitory rates of the low-dose group, the medium-dose group, the high-dose group were 8.49%, 44.59% and 14.84%, respectively. Mice in the high-dose group demonstrated the worst general condition, while mice in the medium-dose group showed the best general condition. *C. novyi* populated tumor tissues, but they didn't move to other organs. The spleen mass of tumor-bearing mice in the high-dose group and the medium-dose group increased significantly; and differences between the normal saline group and the above two groups were statistically significant in spleen mass and index ($P < 0.05$). The thymus gland in the high-dose group decreased significantly, but there was no significant difference in the thymus index among groups ($P > 0.05$). **Conclusion:** *C. novyi*-NT selectively populate hepatocarcinoma tissues. Medium-dose (1.0×10^8 /mL, 0.5 mL) could effectively inhibit the growth of H22 hepatocarcinoma in mice with normal immunity. The antitumor effects of *C. novyi*-NT may be related to antitumor immunity and tumor inflammatory response.

[Key words] *C. novyi*-NT; Bacteriolytic therapy; Hepatocarcinoma

2018 年全球 960 万人死于肿瘤,肝癌的死亡率位居第 3 位^[1]。现有的治疗方法都不能显著延长肝癌患者的生存期,其 5 年生存率仅 18%,探寻新的治疗方法迫在眉睫^[2]。促进肝癌发展,影响肝癌等实体瘤治疗效果的最大因素是肿瘤局部微环境^[3-4],其中乏氧是肝癌微环境的重要特点。乏氧微环境是肝癌产生药物抗性和化疗抗性的主要原因,因此,破坏或利用乏氧微环境成为实体瘤治疗的新策略。300 多年前就有肿瘤患者感染后肿瘤自然消退的病例记载,但因为无法解释其原理,用于治疗时无法接受发热等副作用,且治疗过程无法标准化,导致细菌抗肿瘤研究一直没有较大进展。随着生物技术的发展,研究人员利用基因改造的方法去除厌氧菌的毒性基因,或将厌氧菌改造为抗肿瘤药物的载体,从而克服厌氧菌自身的毒副作用和化疗药物选择性差、瘤内浓度低的不足,有效利用肿瘤氧含量低、血供差的微环境^[5]。厌氧菌抗肿瘤随之引起了人们极大关注。

多项研究发现厌氧性细菌对实体瘤的乏氧区和坏死区具有选择性定植的能力,表现出溶瘤效应。诺维氏梭菌(*Clostridium novyi*, *C. novyi*)为厌氧芽胞梭菌属的成员,广泛分布于外界环境中,可从土壤、海洋沉淀物、人类气性坏疽伤口或动物的局部感染伤口中分离得到,热休克法可以获得无毒诺维氏梭菌(nontoxigenic *Clostridium novyi*, *C. novyi*-NT)^[6]。裸鼠研究结果显示,*C. novyi*-NT 对黑色素瘤、结肠癌、肾癌、软组织肉瘤、胰腺癌、脑瘤及恶性胶质瘤均

表现出抑制作用,I 期临床试验证实 *C. novyi*-NT 对人体肿瘤也有抑制作用^[7-11]。目前尚没有单用 *C. novyi*-NT 抗免疫正常小鼠肝癌的报道。本研究选择最常用、易操作、易观察的方法建立 BALB/c 小鼠 H22 皮下移植瘤模型,采用瘤内注射 *C. novyi*-NT 方式进行干预,评估 *C. novyi*-NT 对小鼠移植性肝癌的抑瘤效应,及其在肿瘤和重要器官的定植情况,确定瘤内注射的最佳剂量,并观察细菌干预后荷瘤鼠炎症反应、抗肿瘤免疫及肿瘤转移情况,为后续探索 *C. novyi*-NT 抗肝癌的机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 动物、细菌和细胞

SPF 级 BALB/c 小鼠,雄性,体重(18 ± 2)g,购自成都达硕实验动物有限公司(许可证号:SCXK(川)2013-24)。实验动物所有操作取得了四川大学华西基础医学与法医学院实验动物伦理委员会批准(批号 IACUC-20140010)。*C. novyi* 为 ATCC 19402 株,热休克法去毒^[6],获得 *C. novyi*-NT。肝癌 H22 细胞株由四川大学华西基础医学与法医学院药理学教研室保存。

1.2 主要试剂

哥伦比亚血琼脂培养基(OXOID)、细菌基因组 DNA 提取试剂盒(TIANGEN, DP302)、组织基因组 DNA 提取试剂盒(TIANGEN, DP304)、改良型 RPMI-1640 培养基(Hycone, NAD1385)、胎牛血清(Gibco, 1551835)、2000bp DNA Marker (Takara,

DL2000), 2 × Taq Master Mix (Novoprotein, E005)。

1.3 主要仪器

光学显微镜 (Leica, DM750)、紫外分光光度计 (K. O, K5600)、PCR 仪 (BIOER)、电泳仪 (BIO-RAD)、凝胶成像系统 (BIO-RAD)、厌氧罐 (重庆艾奇医疗器械有限公司)。

1.4 主要方法

1.4.1 建立小鼠皮下移植瘤模型 收集 BALB/c 小鼠 H22 腹水, 用生理盐水洗涤、离心, 收集沉淀细胞, 稀释为 $1.0 \times 10^7/\text{mL}$ 。无菌环境下, 每只小鼠左前肢皮下注射 0.2 mL H22 细胞悬液。待肿瘤肉眼可见后每周 2 次用电子数显卡尺测量肿瘤大小, 计算肿瘤体积。 $V = a \times b^2 \times 1/2$ (V 为肿瘤体积, a 为肿瘤的最长径, b 为肿瘤的最短径)

1.4.2 实验分组及干预 按照肿瘤建模要求 (肿瘤平均重量 ≥ 1 g 或 20% 肿瘤重量 ≥ 400 mg) 衡量, 32 只 BALB/c 小鼠均造模成功。于第 10 天称量小鼠重量, 测量肿瘤大小, 随机分为对照组、*C. novyi-NT* 低剂量组、中剂量组和高剂量组, 每组 8 只。对照组瘤内注射 0.5 mL 生理盐水、低剂量组瘤内注射 0.5 mL *C. novyi-NT* ($1.0 \times 10^7/\text{mL}$)、中剂量组瘤内注射 0.5 mL *C. novyi-NT* ($1.0 \times 10^8/\text{mL}$)、高剂量组瘤内注射 0.5 mL *C. novyi-NT* ($1.0 \times 10^9/\text{mL}$)。每天观察小鼠的一般情况, 每周 3 次定时称小鼠重量, 每周 2 次测肿瘤大小, 绘制小鼠重量变化、肿瘤体积变化曲线, 比较组间差异。

1.4.3 采集标本 实验干预后第 12 天处死全部小鼠, 剥离肿瘤、肝、脾、肺、肾、脾脏、胸腺, 肿瘤拍照记录, 称肿瘤重量、脾脏和胸腺质量, 用于 HE 染色的组织置 4% 多聚甲醛固定, 其余组织置 -80°C 保存。计算抑瘤率、脾脏指数、胸腺指数。抑瘤率 = (细菌干预组瘤重 - 生理盐水组瘤重) / 细菌干预组瘤重 $\times 100\%$; 脾脏 (胸腺) 指数 ($\text{mg}/10\text{g}$) = 脾脏 (胸腺) 质量 $\text{mg}/(\text{小鼠重量 g} \times 10)$ 。

1.4.4 细菌培养及鉴定 取剥离的一部分肿瘤、肝、脾、肺、肾、脑组织直接涂片后行革兰染色, 一部分涂布接种于哥伦比亚血琼脂培养基, 37°C 厌氧培养 72 h, 观察细菌情况。按照试剂盒说明书操作步骤提取组织 DNA, 根据 GenBank 中查得的 *C. novyi-NT* 序列 (Gene ID: CP000382.1), 由成都擎科梓熙生物技术有限公司合成引物 (上游引物: 5'-TGC-CCCTTATGTCTAGGGCT-3', 下游引物: 5'-CGACT-TCACCCCAATCACCA-3'), PCR 扩增产物长度为 292 bp。用提取的 *C. novyi* DNA 作为模板进行 PCR

扩增, 预变性 95°C 5 min, 变性 95°C 30 s, 退火 56°C 30 s, 延伸 72°C 20 s, 30 个循环, 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物。

1.4.5 肿瘤和主要脏器组织 HE 染色 将固定 24 h 的组织取出, 梯度脱水, 常规石蜡包埋, 切片后行 HE 染色, 光学显微镜下观察肿瘤细胞、组织坏死及炎症反应情况。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 19.0 统计分析软件分析实验结果, 实验数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间均数比较采用单因素方差分析, 多重组间比较用最小显著性差异法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 荷瘤鼠干预后一般情况、体重变化

干预第 2 天高剂量组小鼠肿瘤部位均可观察到小红点, 其他组无明显变化, 随后实验组小鼠肿瘤部位出现红肿、坏死。小鼠活动量减少, 精神一般, 饮食、饮水量减少。随着时间延长, 局部炎症反应减轻, 部分肿瘤缩小。小鼠重量变化为: 生理盐水组小鼠的重量持续增加; 低剂量组小鼠重量前 3 天变化不大, 随后持续增加; 中剂量组小鼠重量前 8 天呈增加趋势, 且第 3~8 天变化较大, 第 8~12 天变化不明显; 高剂量组小鼠重量前 3 天呈下降趋势, 随后开始快速增加。小鼠干预前和处死后体重情况见表 1, 高剂量组小鼠体重与生理盐水组、中剂量组的差异均有统计学意义 ($P = 0.033, P = 0.001$); 低剂量组小鼠体重与中剂量组比较, 差异也有统计学意义 ($P = 0.049$)。小鼠体重结果分析显示, 中剂量组 8 只小鼠中有 5 只体重明显大于其他组。

表 1 各实验组荷瘤小鼠体重变化 ($\bar{x} \pm s, \text{g}$) ($N=8$)

Table 1. Weights of Different Groups of Tumor-Bearing Mice ($\bar{x} \pm s, \text{g}$) ($N=8$)

Group	Before intervention	After death
Control group	25.229 \pm 1.380	25.396 \pm 2.047 ^{**}
Low-dose group	24.567 \pm 1.287	24.770 \pm 1.636 [#]
Medium-dose group	24.999 \pm 1.971	26.672 \pm 2.341 ^{**}
High-dose group	23.663 \pm 0.832	23.152 \pm 1.194

^{**} Compared with the high-dose group, $P < 0.05$; [#] compared with the medium-dose group, $P < 0.05$.

2.2 肿瘤重量、体积及抑瘤率

剥离肿瘤时可见生理盐水组肿瘤较大,颜色较鲜艳,有较多红色液体,黏连严重。与生理盐水组比较,中剂量组肿瘤颜色较浅,坏死区较大,炎性渗出物多,部分肿瘤包膜完整,与周围组织黏连较轻;高剂量组肿瘤坏死区大,豆腐渣样组织较多,有臭味,黏连严重。肿瘤体积结果显示,中剂量组肿瘤体积第 3~8 天呈增加趋势,且增加速度快,第 8~12 天

变化较小;其他各组肿瘤体积持续增加,第 3 天后增加更快。肿瘤重量结果显示,中剂量组约 50% 的肿瘤重量比其他组小。中剂量组肿瘤重量与生理盐水组、低剂量组和高剂量组比较均有统计学意义($P = 0.006, P = 0.015, P = 0.041$)。根据抑瘤率计算公式计算可得 *C. novyi*-NT 低剂量组、中剂量组和高剂量组的抑瘤率分别为 8.49%、44.59% 和 14.84% (表 2)。

表 2 各实验组肿瘤重量、体积及抑瘤率 ($N=8$)

Table 2. Tumor Weights, Tumor Volumes and Tumor Inhibitory Rates ($N=8$)

Group	Weight of tumor (g)	Volume of tumor (cm ³)	Tumor inhibitory rate (%)
Control group	5.788 ± 2.185 [#]	6.452 ± 1.633	-
Low-dose group	5.297 ± 1.467 [#]	6.612 ± 1.837	8.48
Medium-dose group	3.207 ± 1.486	5.980 ± 2.994	44.59
High-dose group	4.929 ± 1.334 [#]	6.858 ± 1.530	14.84

[#]Compared with the medium-dose group, $P < 0.05$.

2.3 肿瘤和主要脏器细菌培养及鉴定

剥离的肿瘤及脏器组织涂片后行革兰染色,肿瘤组织标本油镜下可见大量棒状或杆状细菌,被染成紫色,其他组织标本未观察到 *C. novyi*。肿瘤及脏器组织细菌培养结果显示,接种肿瘤组织的平板内可见可疑 *C. novyi* 菌落外,高剂量组肝组织标本内可见可疑 *C. novyi*,其他组织标本均未见 *C. novyi* 菌落。菌落行革兰染色,油镜观察显示肿瘤组织标本有大量 *C. novyi*,高剂量组肝脏标本有少许可疑 *C. novyi*。提取各组织 DNA,测定 DNA 浓度后,再经 PCR 扩增、琼脂糖凝胶电泳结果显示除肿瘤组织标本有阳性条带外其余均无阳性条带。

2.4 肿瘤和主要脏器组织 HE 染色

小鼠皮下肿瘤组织行 HE 染色后光学显微镜下观察,可见肿瘤细胞形态多样,大小不一,核深染,核大小、形态、染色不一,核浆比例增大。生理盐水组未见明显组织坏死;*C. novyi*-NT 组均可见组织坏死,中剂量组坏死组织呈粉染、不规则颗粒状,边界不规则,边缘见慢性炎性细胞浸润;高剂量组坏死组织伴少量慢性炎细胞浸润和出血(图 1)。肝、肺、肾组织 HE 染色均未见肿瘤转移灶。

2.5 脾脏指数和胸腺指数

完整剥离脾脏和胸腺,肉眼可见部分小鼠的脾脏明显增大。生理盐水组、*C. novyi*-NT 低剂量组、

中剂量组和高剂量组脾脏平均质量依次增大,分别为(0.284 ± 0.076)g、(0.383 ± 0.108)g、(0.441 ± 0.177)g 和(0.636 ± 0.137)g,中剂量组、高剂量组与生理盐水组脾脏质量比较差异有统计学意义($P = 0.022, P < 0.001$),高剂量组、中剂量组和低剂量组脾脏质量比较差异有统计学意义($P = 0.004, P = 0.017$)。生理盐水组、低剂量组、中剂量组和高剂量组脾脏指数分别为(0.954 ± 0.266)、(1.230 ± 0.359)、(1.463 ± 0.596)和(2.183 ± 0.405),高剂量组脾脏指数明显大于其他组,与生理盐水组、低剂量组、中剂量组脾脏指数比较差异均有统计学意义($P < 0.001, P = 0.001, P = 0.003$),中剂量组与生理盐水组脾脏指数比较差异也有统计学意义($P = 0.026$)。*C. novyi*-NT 中剂量组胸腺平均质量最大,生理盐水组、*C. novyi*-NT 低剂量组、中剂量组和高剂量组胸腺质量分别为(0.162 ± 0.034)g、(0.147 ± 0.019)g、(0.167 ± 0.028)g 和(0.118 ± 0.017)g,高剂量组胸腺平均重量最小,与生理盐水组和中剂量组比较差异有统计学意义($P = 0.004, P = 0.001$)。生理盐水组、*C. novyi*-NT 低剂量组、中剂量组和高剂量组胸腺指数分别为(0.520 ± 0.118)、(0.500 ± 0.101)、(0.566 ± 0.093)和(0.422 ± 0.008),各组间比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

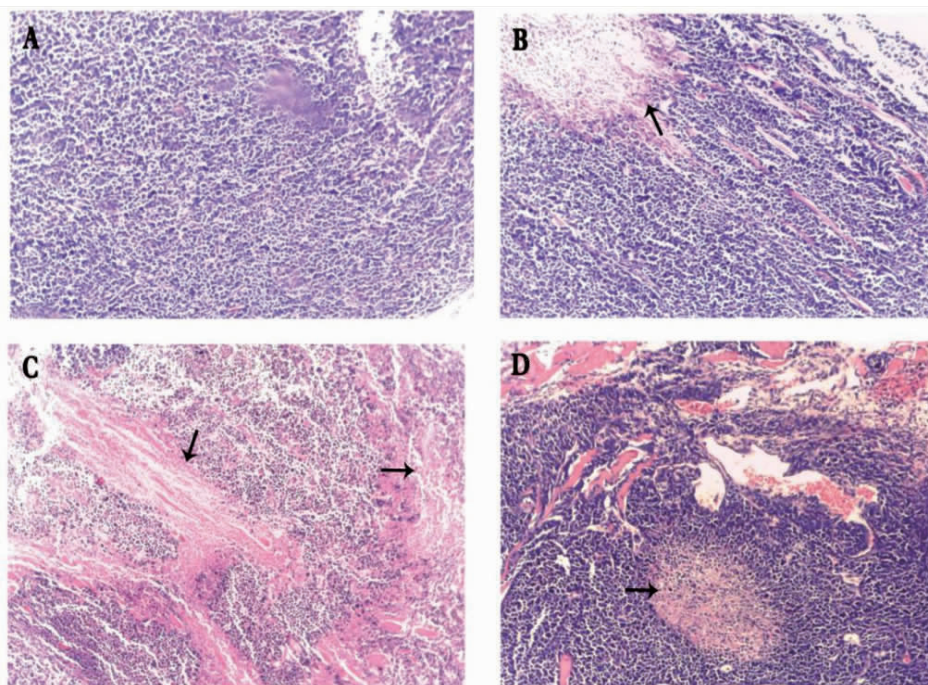


图 1 各实验组肿瘤组织 HE 染色 (×200)

Figure 1. HE Stain of Tumor Tissue (×200)

A. Control group; B. Low-dose group; C. Medium-dose group; D. High-dose group; necrotic tissue as indicated by the arrows.

3 讨论

肝癌是我国最常见的五大恶性肿瘤之一,其死亡率居恶性肿瘤第二位^[12]。我国每年新发肝癌病例数占全球总数的 50% 左右,肝癌已成为严重威胁人类健康和制约社会发展的重大问题^[13]。手术、化学药物治疗、放射治疗、射频消融等仍是肝癌治疗的主要手段,但都不能显著延长患者的生存周期^[14]。肝癌的既往研究主要集中在癌细胞本身,包括癌细胞基因和抑癌基因的改变、分化程度和表型的改变等。随着研究的深入,发现肝癌的微环境在肝癌的发生、发展及预后中同样起着非常重要的作用^[15-18]。氧含量低、血供差是肝癌微环境的普遍特征。药物需要随血液到达作用部位,且要达到一定的浓度才能发挥杀肿瘤细胞的作用,放射线也需要氧发挥细胞毒性作用^[19]。氧含量低、血供差的特殊微环境有利于肿瘤细胞的生存和转移,而限制了传统的肿瘤化学药物和放射治疗方法^[20]。研究者们开始思考,能否破坏或有效地利用此特殊的微环境呢? 1813 年, Vautier 观察到肿瘤患者感染气性坏疽后,肿瘤生长减缓甚至消退,这一现象引起了人们对细菌抗肿瘤的关注。Coley 等^[21]做出了积极的探

索,卡介苗已成功用于临床治疗浅表性膀胱癌。2001 年, Dang 等^[7]从 26 株细菌中筛选出野生型 *C. novyi* 具有高度肿瘤靶向定植能力,后续研究发现 *C. novyi*-NT 具有强大的溶瘤效应。

既往研究中,有研究者选择了 *C. novyi*-NT 静脉注射^[7-9,11,22],另有研究者则选择了瘤内注射^[7,10]。静脉注射容易产生全身反应(25% ~ 30%),到达肿瘤部位的细菌太少^[9]。同时,部分细菌在血液中丢失或死亡,无法有效发挥抗肿瘤作用,而瘤内直接注射就解决了此问题。此外,瘤内注射比传统的局部治疗(如手术、放疗)更简单,易操作。瘤内注射 *C. novyi*-NT 还能引起局部炎症反应和抗肿瘤免疫反应^[9]。所以,本研究选择的是瘤内注射途径。

肝癌是消耗性疾病,荷瘤小鼠重量变化可以反映小鼠自身状况(体重)和肿瘤重量变化的最终结果。荷瘤小鼠重量变化显示,*C. novyi*-NT 中剂量组小鼠重量前 8 天呈增加趋势,随后小鼠重量变化不大,可能是细菌定植后,发挥溶瘤作用,肿瘤生长受抑制或变缓,小鼠体重降低减慢的结果。而高剂量组小鼠重量前 3 天呈下降趋势,随后持续快速增加,可能是因为 *C. novyi*-NT 剂量太大,发挥溶瘤作用迅速,产生的大量代谢产物及导致的强烈炎症反应对

小鼠产生不良影响,此变化趋势与小鼠一般情况(高剂量组最差)和肿瘤局部变化一致。小鼠体重结果显示,高剂量组显著低于生理盐水组和中剂量组。肿瘤大范围较快地溶解,易引起严重的毒血症,出现肿瘤溶解综合征,甚至导致实验动物死亡^[5]。这可能是高剂量组小鼠一般情况差的原因。

按照抗肿瘤药物药效学指导原则,只有当抑制率 > 30% 才能评定该药物对肿瘤有一定疗效。本实验结果显示中剂量组抑瘤率达 44.59%,而其他组均低于 30%,所以可以判定中剂量 *C. novyi*-NT 对免疫正常小鼠皮下 H22 移植瘤有疗效。

研究 *C. novyi* 抗肿瘤效应,细菌的转移是不可忽视的问题。本研究中,各组小鼠的肝、脾、肺、肾、脑组织 DNA 鉴定均未发现 *C. novyi* 定植,但高剂量组肝脏标本细菌培养和革兰染色可见可疑 *C. novyi*,分析其原因可能是操作污染所致或因剂量太大少量细菌经血液到达肝脏,但经肝组织细菌 DNA 提取后 PCR 检测无 *C. novyi*,可以判定 *C. novyi*-NT 瘤内注射是安全的。*C. novyi* 能选择性地靶向定植于 H22 移植瘤的乏氧区,而不转移至其他组织的可能原因有:肿瘤细胞生长速度快,而瘤内血管形态不规则,血流紊乱,导致肝癌内部缺氧,形成乏氧微环境,为 *C. novyi* 生长繁殖提供了理想条件;肿瘤细胞代谢旺盛,产生大量代谢产物,为 *C. novyi* 生长提供了丰富的营养物质,*C. novyi* 在瘤内比正常组织的增殖能力更强,更易在肿瘤内富集;肝癌血管分布和结构异常、肿瘤组织间隙的高压使瘤内免疫细胞、抗体、补体等数量减少,功能的发挥受到抑制,*C. novyi* 在瘤内较难被免疫系统识别、清除^[5]。

免疫器官质量的变化可作为判断药物对免疫系统影响的指标之一。本研究分析了各组胸腺、脾脏的质量及胸腺、脾脏指数的差异,结果显示中剂量组脾脏质量和指数显著大于生理盐水组。脾脏质量和指数不能完全反映免疫系统的活化程度,但脾脏是 B 细胞发育、分化的场所,B 细胞与体液免疫有关,后续实验应借助流式细胞术检测免疫细胞亚群,全面评价诺维氏梭菌瘤内注射后对 H22 移植瘤小鼠免疫系统的影响。

综上所述,*C. novyi*-NT 能选择性地定植于肝癌乏氧区,中剂量(1.0×10^8 /mL, 0.5 mL) *C. novyi*-NT 能有效抑制免疫正常小鼠 H22 皮下移植瘤。

C. novyi-NT 抗 H22 移植瘤的作用机制可能是细菌局部定植肿瘤乏氧区后,其菌体成分和代谢产物本身具有细胞毒性,直接对肿瘤细胞发挥杀伤作用,也可能是 *C. novyi* 诱发肿瘤相关炎症反应和抗肿瘤免疫反应间接发挥杀伤肿瘤细胞的作用^[5,23]。*C. novyi* 能在肿瘤组织中优先增殖,与肿瘤细胞竞争微环境中的营养素和生长因子;*C. novyi* 分泌的蛋白水解酶、脂肪酶等破坏肿瘤细胞;细菌代谢产物(如磷脂酶 C、脂质体酶、毒素)破坏肿瘤微环境^[24];*C. novyi* 菌体成分刺激白细胞增殖分化,诱发 TNF- α 等细胞因子的释放,从而增强小鼠的免疫应答能力;*C. novyi* 聚集于肿瘤部位,引起局部炎症反应,富集大量特异性与非特异性免疫效应细胞,诱导了与肿瘤抗原有关的交叉免疫以及抗肿瘤免疫反应。肝癌的治疗方法包括肝切除术、肝移植、经导管动脉化疗栓塞术、射频消融、分子靶向治疗等,但总体疗效并不高^[25]。本研究丰富了 *C. novyi* 抗肿瘤的种属,拓展了肿瘤生物治疗的新思路,为深入探讨 *C. novyi* 治疗肝癌奠定了重要基础,后续将围绕乏氧微环境及炎症反应和抗肿瘤免疫探索其可能的机制。

作者声明: 本文全部作者对于研究和撰写的论文出现的不端行为承担相应责任;并承诺论文中涉及的原始图片、数据资料等已按照有关规定保存,可接受核查。

学术不端: 本文在初审、返修及出版前均通过中国知网(CNKI)科技期刊学术不端文献检测系统的学术不端检测。

同行评议: 经同行专家双盲外审,达到刊发要求。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

文章版权: 本文出版前已与全体作者签署了论文授权书等协议。

[参考文献]

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424.
- [2] Asrani SK, Devarbhavi H, Eaton J, et al. Burden of liver diseases in the world[J]. J Hepatol, 2019, 70(1): 151-171.

- [3] 章诺贝,张吉翔. 肝癌微环境的研究进展[J]. 世界华人消化杂志, 2014,22(31):4774-4784.
- [4] 何香川,刘明斌,张晓燕,等. 靶向肿瘤微环境(TME)免疫治疗策略的研究进展[J]. 复旦学报(医学版),2020,47(1):128-134.
- [5] 黄筱钧,邓昭敏,张硕,等. 厌氧菌在肿瘤生物治疗中的研究进展[J]. 中国老年学杂志,2014,34(22):6507-6509.
- [6] Hofmann F, Herrmann A, Habermann E, et al. Sequencing and analysis of the gene encoding the alpha-toxin of *Clostridium novyi* proves its homology to toxins A and B of *Clostridium difficile*[J]. Mol Gen Genet,1995, 247(6):670-679.
- [7] Dang LH, Bettgowda C, Huso DL, et al. Combination bacteriolytic therapy for the treatment of experimental tumors [J]. Proc Natl Acad Sci USA,2001,98(26):15155-15160.
- [8] Maletzki C, Gock M, Klier U, et al. Bacteriolytic therapy of experimental pancreatic carcinoma [J]. World J Gastroenterol, 2010, 16(28):3546-3552.
- [9] Agrawal N, Bettgowda C, Cheong I, et al. Bacteriolytic therapy can generate a potent immune response against experimental tumors [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004,101(42):15172-15177.
- [10] Roberts NJ, Zhang L, Janku F, et al. Intratumoral injection of *Clostridium novyi*-NT spores induces antitumor responses[J]. Sci Transl Med, 2014,6(249):249ra111.
- [11] Staedtke V, Bai RY, Sun W, et al. *Clostridium novyi*-NT can cause regression of orthotopically implanted glioblastomas in rats [J]. Oncotarget, 2015, 6(8):5536-5546.
- [12] 孙可欣,郑荣寿,张思维,等. 2015 年中国分地区恶性肿瘤发病和死亡分析[J]. 中国肿瘤, 2019,28(1):1-11.
- [13] 陈东风,孙文静,刘凯军,等. 非酒精性脂肪性肝病相关性肝癌的流行病学现状与发病机制[J]. 中华肝脏病杂志,2017,25(2):111-114.
- [14] 刘子荣,张雅敏. 肝癌肝移植术后复发转移的防治与评估[J]. 中华肝胆外科杂志, 2018,24(6):424-426.
- [15] 商安全,李冬. 中性粒细胞与肿瘤的相关性[J]. 临床与病理杂志,2020,40(2):448-457.
- [16] 肖乾坤,孙淼森. 肿瘤微环境下中性粒细胞的研究进展[J]. 河南大学学报(医学版),2019,38(1):58-61.
- [17] 刘宇佳,张轶雯,钟里科,等. 肿瘤微环境对肿瘤代谢的影响及研究进展[J]. 肿瘤学杂志,2020,26(1):47-52.
- [18] 汤钊猷. 肝癌研究的变迁与趋势[J]. 临床肝胆病杂志,2014,30(3):193-196.
- [19] Nordmark M, Overgaard M, Overgaard J. Pretreatment oxygenation predicts radiation response in advanced squamous cell carcinoma of the head and neck [J]. Radiother Oncol,1996,41(1):31-39.
- [20] 秦越,丁宁,陈艺,等. 肿瘤微环境与肿瘤演进作用的研究进展及展望[J]. 临床普外科电子杂志,2018,6(1):37-40.
- [21] Coley WB. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With areport of ten original cases. 1893 [J]. Clin Orthop Relat Res, 1991, 262:3-11.
- [22] Dang LH, Bettgowda C, Agrawal N, et al. Targeting vascular and avascular compartments of tumors with *C. novyi*-NT and antimicrotubule agents[J]. Cancer Biol Ther,2004, 3(3):326-37.
- [23] DeClue AE, Axiak-Bechtel SM, Zhang Y, et al. Immune response to *C. novyi*-NT immunotherapy [J]. Vet Res, 2018,49(1):38.
- [24] Cheong I, Huang X, Bettgowda C, et al. A bacterial protein enhances the release and efficacy of liposomal cancer drugs[J]. Science, 2006, 314(5803):1308-1311.
- [25] 马婧,王霄,宋争放,等. 肝癌 AASLD、EASL、JSH 指南及中国诊疗规范比较[J]. 肿瘤预防与治疗,2019,32(11):1031-1038.