文章编号:1000-5404(2014)04-0375-06

论著

婴儿双歧杆菌介导 HSV-TK/GCV 对裸鼠肾癌组织细胞凋亡及 p-Stat3、Bcl-xL 表达的影响

任 劲,肖 啸,蒋 立,杨 柒,唐 伟 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院泌尿外科)

[摘要] **目的** 评价婴儿双歧杆菌介导单纯疱疹病毒胸苷激酶(HSV-TK)/丙氧鸟苷(GCV)自杀基因治疗系统对裸鼠肾癌的疗效,初步探讨其诱导肾癌组织细胞凋亡及对肾癌组织 p-Stat3、Bcl-xL 表达的影响。**方法** 采用肾癌 786-O 细胞悬液皮下注射法建立裸鼠肾癌模型,将模型裸鼠分为 4 组,分别经尾静脉注射生理盐水(生理盐水组)、婴儿双歧杆菌(婴儿双歧杆菌组)、携带空质粒 pGEX-5X-1 的婴儿双歧杆菌(空质粒组)、携带重组质粒 pGEX-TK 的婴儿双歧杆菌(重组质粒组),再联合腹腔注射 GCV。治疗 4 周结束后,称取各组裸鼠质量及荷瘤质量。TUNEL 染色法检测各组肾癌组织细胞凋亡情况。免疫组化染色法检测各组肾癌组织 p-Stat3、Bcl-xL 蛋白表达情况。Real-time PCR 检测各组肾癌组织 Stat3、Bcl-xL mRNA 表达水平。Western blot 检测各组肾癌组织 p-Stat3、Bcl-xL 蛋白表达水平。**结果** 治疗后,重组质粒组较空质粒组、婴儿双歧杆菌组和生理盐水组裸鼠质量增加($P<0.05$),荷瘤质量降低($P<0.05$)。TUNEL 染色结果显示重组质粒组凋亡指数明显高于空质粒组、婴儿双歧杆菌组和生理盐水组($P<0.01$)。免疫组化染色结果显示重组质粒组肾癌组织 p-Stat3、Bcl-xL 蛋白表达明显低于空质粒组、婴儿双歧杆菌组和生理盐水组($P<0.01$)。重组质粒组肾癌组织 Stat3、Bcl-xL mRNA 及 p-Stat3、Bcl-xL 蛋白表达水平较空质粒组、婴儿双歧杆菌组和生理盐水组明显下调($P<0.01$)。**结论** 婴儿双歧杆菌介导 HSV-TK/GCV 自杀基因治疗系统明显抑制裸鼠肾癌生长,可能通过抑制 Stat3 活化进而阻断 Stat3 信号转导通路,下调其下游抗凋亡蛋白 Bcl-xL 的表达来诱导裸鼠肾癌组织细胞凋亡,发挥抑瘤作用。

[关键词] 婴儿双歧杆菌;HSV-TK/GCV;基因治疗;肾癌;p-Stat3;Bcl-xL
[中图法分类号] R37;R73-362;R737.11 [文献标志码] A

Effects of *Bifidobacterium infantis*-mediated HSV-TK/GCV suicide gene therapy system on apoptosis and p-Stat3 and Bcl-xL expression in renal carcinoma cells transplanted nude mice

Ren Jin, Xiao Xiao, Jiang Li, Yang Qi, Tang Wei (Department of Urology, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To evaluate the curative effect of *Bifidobacterium infantis* (BI)-mediated herpes simplex virus thymidine kinase (HSV-TK)/ganciclovir (GCV) suicide gene therapy system on renal carcinoma in nude mice and investigate the effects of HSV-TK/GCV on renal carcinoma cells apoptosis and p-Stat3 and Bcl-xL expression. **Methods** The renal carcinoma model was established by subcutaneous injection of human renal carcinoma cell line 786-O into nude mice. The model mice were randomly divided into 4 groups, which were treated by intraperitoneal injection of GCV in combination with tail vein injection of normal saline (normal saline group), BI (BI group), BI carrying empty plasmid BI-pGEX-5x-1 (empty plasmid group), and BI carrying recombinant plasmid BI-pGEX-TK (recombinant plasmid group). After 4 weeks treatment, tumor weights and nude mice weights were recorded. The apoptosis of renal carcinoma tissue cells was determined by TUNEL assay. The expression of p-Stat3, Bcl-xL protein was determined by immunohistochemical staining. The expression levels of Stat3, Bcl-xL mRNA and expression levels of p-Stat3, Bcl-xL protein were detected by real-time fluorescent quantitative PCR (real-time PCR) and protein imprinting method (Western blotting) respectively. **Results** After treatment, comparing with the empty plasmid group, the bifidobacterium

[基金项目] 重庆市医学科学技术研究重点项目(2011-1-012)
[通信作者] 唐 伟,E-mail:tangwei2060@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20131022.1410.008.html(2013-10-22)

infants group and the normal saline group, the nude mice weights of recombinant plasmid group increased ($P < 0.05$), the tumor weights decreased ($P < 0.05$). TUNEL assay showed the apoptosis index of recombinant plasmid group was obviously higher than that of the empty plasmid group, the bifidobacterium infants group and the normal saline group ($P < 0.01$). Immunohistochemical staining showed that the expression of p-Stat3, Bcl-xL protein of recombinant plasmid group is significantly lower than that of the empty plasmid group, the bifidobacterium infants group and the normal saline group ($P < 0.01$). The expression levels of Stat3, Bcl-xL mRNA of recombinant plasmid group significantly lower than that of the empty plasmid group, the bifidobacterium group and the normal saline group ($P < 0.01$). the expression levels of p-Stat3, Bcl-xL protein of recombinant plasmid group significantly lower than that of the empty plasmid group, the bifidobacterium group and the normal saline group ($P < 0.01$). **Conclusion** The BI-mediated HSV-TK/GCV suicide gene therapy system effectively inhibits nude mice renal carcinoma tumor growth, probably through inhibiting Stat3 activation and thereby blocking Stat3 signaling pathway, decreases the expression of its downstream antiapoptotic protein Bcl-xL, induces to nude mice renal carcinoma cells apoptosis, and thus plays a role of tumor suppression.

[**Key words**] *Bifidobacterium infantis*; HSV-TK/GCV; gene therapy; renal carcinoma; p-Stat3; Bcl-xL

Supported by the Key Project of Medical Science and Technology Research of Chongqing (2011-1-012). Corresponding author: Tang Wei, E-mail: tangwei2060@163.com

肾癌又称肾细胞癌,是病死率最高的泌尿生殖系恶性肿瘤,其发病率逐年上升[1]。肾癌对放疗和化疗都不敏感,容易发生转移,除早期肾癌手术治疗效果较好外,中晚期肾癌缺乏特异性的有效治疗。肿瘤的基因治疗是目前研究的热点。单纯疱疹病毒胸苷激酶(herpes simplex virus thymidine kinase, HSV-TK)/丙氧鸟苷(ganciclovir, GCV)是目前研究最早、最彻底的,也是最常用的自杀基因系统之一。本课题组前期研究及国内外其他研究均证实,双歧杆菌作为一种革兰阳性厌氧益生菌具有良好的肿瘤靶向定植性,作为肿瘤基因治疗的载体系统具有较高的特异性、高效性和安全性[2-7]。本实验用婴儿双歧杆菌(*bifidobacterium infantis*, BI)介导 HSV-TK/GCV 治疗裸鼠肾癌,观察该治疗系统效果,初步探讨其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料

BI-pGEX-TK、BI-pGEX-5X-1、BI 由本实验室保存,肾癌786-O细胞由重庆医科大学生物化学与分子生物学教研室惠赠。胎牛血清(浙江金华生物制剂厂),RPMI1640 培养基(Gibco公司),0.25%胰酶(Sigma 公司),TUNEL 试剂盒(Roche 公司),SYBRGreen PCR 试剂盒和逆转录试剂盒(Thermo 公司),兔抗人 p-Stat3(Y705)、Bcl-xL、β-actin 多克隆抗体(ImmunoWay 公司),山羊抗兔 HRP 标记的二抗、BCA 蛋白定量试剂盒、SDS-Page 凝胶电泳试剂盒和 ECL 显影剂(上海碧云天生物技术公司),PVDF 膜(北京鼎国生物技术公司),GCV(宜昌长江药业有限公司)。光学显微镜、荧光显微镜 BX51(Olympus 公司),低温高速离心机(长沙湘仪公司),紫外分光仪(GE 公司),Real-time PCR 检测仪(ABI7500),凝胶成像系统(Bio-Rad 公司),电泳仪、电转仪(北京六一仪器厂)。

1.2 实验动物

健康 BALB/c-nu 裸鼠 60 只,4~5 周龄,体质量 15~19 g,雌雄不限,实验和饲养均在重庆医科大学实验动物中心恒温、恒湿的 SPF 动物房,12 h 昼夜节律。裸鼠可以自由进食和饮水。

1.3 方法

1.3.1 肾癌细胞培养及收集 肾癌 786-O 细胞于 10% 胎牛血清 RPMI1640 培养基中,37 ℃,5% CO_2 条件下常规传代培养。当细胞生长至对数生长期时,用 0.25% 胰蛋白酶和 0.02% EDTA 消化液消化离心收集细胞,PBS 洗 3 次,PBS 重悬细胞,调整细胞浓度为 5×10^6/0.2 mL。

1.3.2 裸鼠肾癌模型建立、鉴定及分组给药 BALB/c-nu 裸鼠乙醚吸入麻醉后,用 1 mL 注射器分别将上述肾癌 786-O 细胞悬液 0.2 mL 注射于每只裸鼠后项中部皮下,共 60 只。2 周后皮下瘤块形成,随机选取 2 只裸鼠处死,取出瘤块固定、包埋、切片,HE 染色鉴定,确认肾癌 786-O 细胞建模成功。选取建模成功且荷瘤大小均一的 48 只裸鼠分成 4 组,生理盐水组(生理盐水对照组)、婴儿双歧杆菌组(BI 组)、空质粒组(BI-pGEX-5X-1 组)、重组质粒组(BI-pGEX-TK 组),每组 12 只。分别经尾静脉注射生理盐水、BI 菌液、BI-pGEX-5X-1 菌液、BI-pGEX-TK 菌液 0.2 mL(含婴儿双歧杆菌约 1×10^8 个),每周 1 次,共 4 周。从处理第 1 天开始各组裸鼠连续 4 周腹腔注射 GCV 0.1 mL(约 1 mg)。治疗 4 周结束后,处死各组裸鼠,分别称取各组裸鼠质量及荷瘤质量。

1.3.3 TUNEL 染色法检测裸鼠肾癌组织细胞凋亡 按 TUNEL 试剂盒(POD 法)说明进行操作。裸鼠荷瘤组织用 4% 多聚甲醛固定、石蜡包埋、切片,先后予以脱蜡、水合、细胞通透,加 TUNEL 反应液,在荧光显微镜下观察凋亡细胞并拍照后,加 HRP 标记的抗荧光抗体,DAB 显色。光镜下观察,细胞核固缩、染色质凝集成块或边集、呈棕褐色染色者为凋亡细胞。每个视野计数 100 个细胞,计数 5 个视野,凋亡细胞数占细胞总数的百分率即为凋亡指数(apoptotic index, AI)。

1.3.4 免疫组化染色法检测 p-Stat3、Bcl-xL 蛋白表达情况

采用链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶法(S-P),按照试剂盒说明进行操作。PBS 代替一抗作为阴性对照,已知 p-Stat3 阳性表达和 Bcl-xL 阳性表达的肾癌切片作为阳性对照。光镜下 p-Stat3阳性表达为细胞核着色,Bcl-xL 阳性表达为细胞质着色,呈棕黄色或棕褐色颗粒。在 400 倍视野相同设置下,每例标本随机选择 5 个区域拍照保存,Image Pro Plus 6.0(IPP6.0)图像分析软件测量积分光密度值(integrated optical density,IOD)和area,以平均光密度值(mean density,MD) = IOD/area 进行分析。

1.3.5 Real-time PCR 检测 Stat3、Bcl-xL mRNA 表达水平 分别取各组裸鼠肾癌组织 100 mg,用眼科剪剪碎,用 Trizol 试剂裂解提取总 RNA,逆转录合成 cDNA,以 cDNA 为模板进行 PCR。引物序列:Stat3 基因(NCBI:NM_139276)上游引物:5′-TGTCTAAAGGTCCCTCATC-3′,下游引物:5′-CCATAGTGTGCATCATGTC-3′,扩增片段大小为 104 bp;Bcl-xL 基因(NCBI:NM_138578)上游引物:5′-CAGGTATGGAAGGGTTTG-3′,下游引物:5′-TAGGGATGGAAGGAAAGG-3′,扩增片段大小为 233 bp;内参 GAPDH 基因(NCBI:NM_001256799.1)上游引物:5′- CACCCACTCCTCCACCTTTG-3′,下游引物:5′-CCACCACCCTGTTGCTGTAG-3′,扩增片段大小为 110 bp。引物由重庆博培生物技术有限公司设计和合成。扩增体系(50 μL):SYBR-Green Mix 32.5 μL,上下游引物各 0.5 μL,ddH_2O 14.5 μL,cDNA模板2 μL。扩增条件:95 ℃ 10 min,然后 95 ℃ 15 s,60 ℃ 45 s,共 40 个循环。每个样本设置 3 个重复孔。Real-time PCR 检测仪定量检测,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析。

1.3.6 Western blot 检测 p-Stat3、Bcl-xL 蛋白表达水平 分别取各组裸鼠肾癌组织 100 mg,用眼科剪剪碎,按比例加入含有 PMSF 的细胞裂解液 1 mL,匀浆器匀浆,收集悬液,4 ℃ 12 000 × g 离心 15 min,取上清,用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。总蛋白加入 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液,沸水浴 10 min,取总蛋白 40 μg 上样,10% SDS-PAGE 电泳分离后,切胶,半干式转移至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉(检测磷酸化蛋白用 BSA)室温封闭 1 h,然后分别加入兔抗人 p-Stat3(1∶500 稀释)、Bcl-xL(1∶500 稀释),β-actin(1∶1 000 稀释)一抗,4 ℃孵育过夜,TBST 洗涤 3 次,每次 10 min,加山羊抗兔 HRP 标记二抗,37 ℃孵育 1 h,用 TBST 洗涤 3 次,每次 10 min。ECL 显影。Bio-Rad 凝胶成像系统拍照,Quantity One 软件分析测定各目的条带和内参 β-actin 条带的灰度值,各目的条带与内参条带的灰度值之比为各目的蛋白的相对表达量。实验重复 3 次。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 19.0 统计软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组样本数据间比较行单因素方差分析,各组间两两比较行 SNK-q 检验。

2 结果

2.1 裸鼠肾癌建模情况

裸鼠肾癌建模过程中共死亡 3 只,其余 6 只未成瘤,51 只成瘤。随机选取 2 只成瘤裸鼠处死,取出瘤块固定、包埋、切片,HE 染色鉴定,光镜下见肿瘤细胞呈实性片状排列,排列较紊乱,极性消失,细胞异质性明显,大小不一,为圆形、多边形或立方形,细胞质透明,细胞核深染,为圆形或卵圆形,核仁不明显(图 1)。选取荷瘤均一,直径约 5 mm 的 48 只裸鼠用于治疗,剩下 1 只裸鼠因瘤块体积过小,弃用。治疗过程中无死亡。

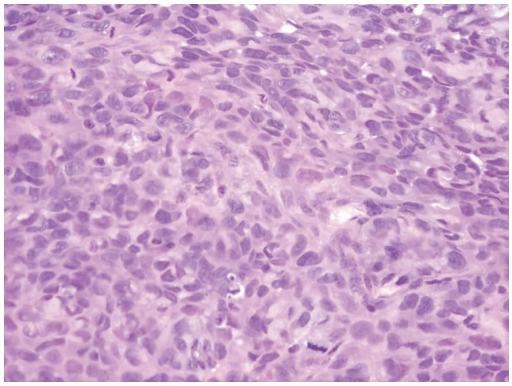


图 1 裸鼠肾癌组织病理学观察 (HE ×400)

2.2 各组裸鼠质量及荷瘤质量比较

重组质粒组较空质粒组、婴儿双歧杆菌组和生理盐水组裸鼠质量增加($P<0.05$),荷瘤质量降低($P<0.05$)。空质粒组、婴儿双歧杆菌组和生理盐水组之间比较,裸鼠质量、荷瘤质量差异均无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。

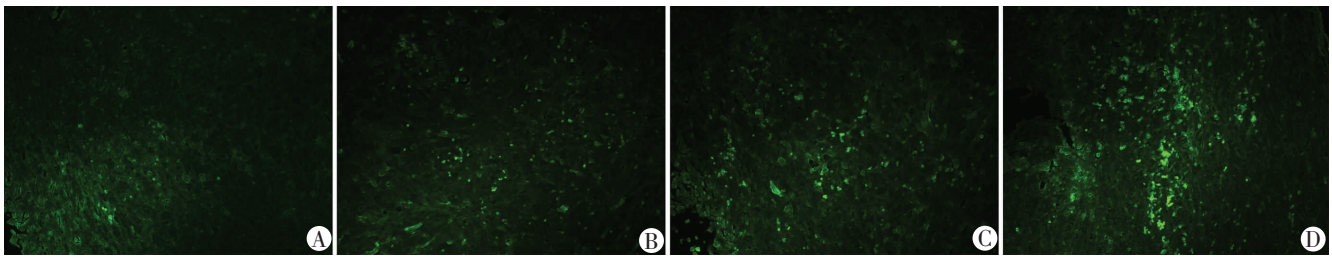
表 1 各组裸鼠质量及荷瘤质量比较 (g, $n=12$, $\bar{x} \pm s$)

组别	裸鼠质量	荷瘤质量
生理盐水组	25.35 ± 1.20[a]	1.70 ± 0.09[a]
婴儿双歧杆菌组	25.34 ± 1.08[a]	1.68 ± 0.08[a]
空质粒组	25.37 ± 1.31[a]	1.67 ± 0.08[a]
重组质粒组	26.35 ± 1.06	1.60 ± 0.09

a: $P<0.05$,与重组质粒组比较

2.3 各组裸鼠肾癌组织凋亡细胞分布及 AI 值比较

TUNEL 染色可见各组肾癌组织均有不同程度的凋亡,但重组质粒组 AI 值为(25.57 ± 4.16)% 明显高于空质粒组的(12.11 ± 2.78)%、婴儿双歧杆菌组的(11.66 ± 2.78)% 和生理盐水组的(8.50 ± 2.35)%($P<0.01$)。空质粒组、婴儿双歧杆菌组和生理盐水组之间 AI 值比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。见图 2。



A:生理盐水组;B:婴儿双歧杆菌组;C:空质粒组;D:重组质粒组

图 2 各组裸鼠肾癌组织荧光显微镜观察 (TUNEL ×200)

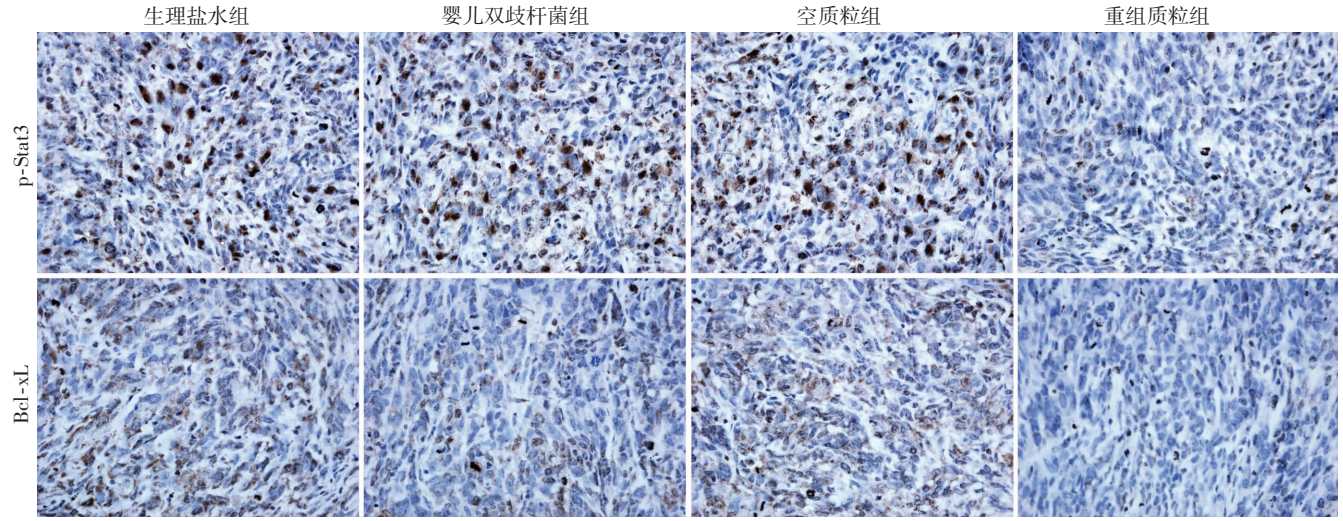
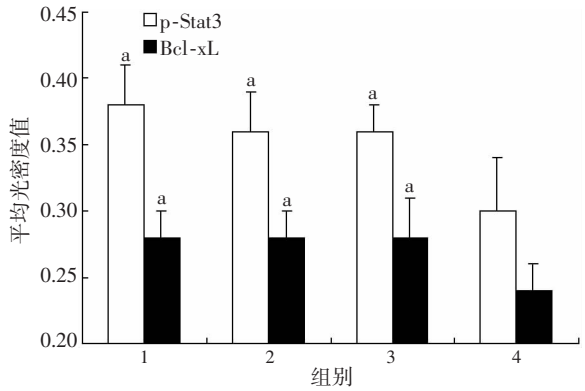


图3 各组裸鼠肾癌组织 p-Stat3、Bcl-xL 免疫组化染色观察 （S-P ×400）

2.4 各组裸鼠肾癌 p-Stat3 和 Bcl-xL 蛋白的表达

免疫组化染色结果显示重组质粒组的 p-Stat3、Bcl-xL 蛋白表达明显低于空质粒组、婴儿双歧杆菌组和生理盐水组（$P<0.01$）。空质粒组、婴儿双歧杆菌组和生理盐水组之间 IOD 值比较，差异均无统计学意义（$P>0.05$）。见图3、4。



1：生理盐水组；2：婴儿双歧杆菌组；3：空质粒组；4：重组质粒组
a：$P<0.01$，与重组质粒组比较

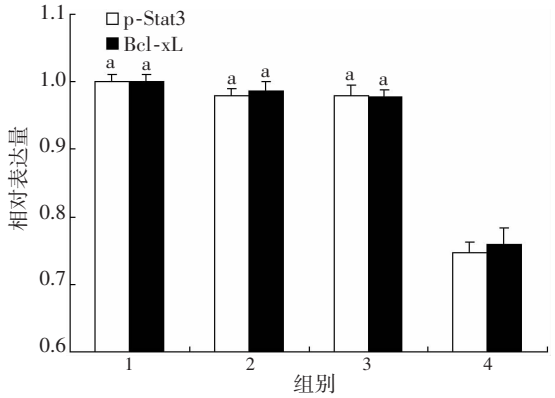
图4 免疫组化定量分析各组裸鼠肾癌组织 p-Stat3、Bcl-xL 蛋白的表达

2.5 各组裸鼠肾癌 Stat3 和 Bcl-xL mRNA 表达水平

Real-time PCR 检测结果显示重组质粒组的 Stat3、Bcl-xL mRNA 表达水平较空质粒组、婴儿双歧杆菌组和生理盐水组明显下调（$P<0.01$）。空质粒组、婴儿双歧杆菌组和生理盐水组之间比较，差异均无统计学意义（$P>0.05$）。见图5。

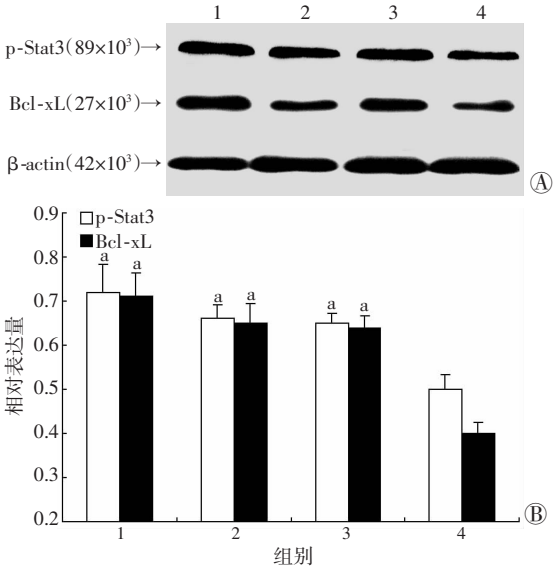
2.6 各组裸鼠肾癌 p-Stat3 和 Bcl-xL 蛋白表达水平

Western blot 检测结果显示，重组质粒组的 p-Stat3、Bcl-xL 蛋白表达水平明显低于空质粒组、婴儿双歧杆菌组和生理盐水组（$P<0.01$）。空质粒组、婴儿双歧杆菌组和生理盐水组之间比较，差异均无统计学意义（$P>0.05$）。见图6。



1：生理盐水组；2：婴儿双歧杆菌组；3：空质粒组；4：重组质粒组
a：$P<0.01$，与重组质粒组比较

图5 Real-time PCR 检测各组裸鼠肾癌组织 Stat3、Bcl-xL mRNA 的表达



A：Western blot 检测结果；B：半定量分析结果 1：生理盐水组；2：婴儿双歧杆菌组；3：空质粒组；4：重组质粒组；a：$P<0.01$，与重组质粒组比较

图6 Western blot 检测各组裸鼠肾癌组织 p-Stat3、Bcl-xL 蛋白的表达

3 讨论

肿瘤的基因治疗正逐渐成为恶性肿瘤治疗的一种新模式和发展趋势。然而阻碍其应用的一大瓶颈在于缺少具有肿瘤特异性的基因转移载体系统[8]。Vaupel[9]研究发现恶性实体瘤组织中的氧分压特别是中心区域的氧分压远低于正常组织。双歧杆菌具有趋低氧环境的特性。本课题组前期研究及国内外其他研究均证实,双歧杆菌具有良好的肿瘤靶向定植性及作为肿瘤基因治疗载体的可行性[2-7]。双歧杆菌本身还具有抑制病原菌改善宿主微生态平衡、刺激免疫功能、激活巨噬细胞、增强宿主抗感染和抗肿瘤的功能[10]。本实验利用严格厌氧的婴儿双歧杆菌介导 HSV-TK/GCV 自杀基因治疗系统治疗荷瘤裸鼠,治疗过程中未发现败血症、死亡等不良反应。结果表明,婴儿双歧杆菌作为基因治疗的载体是安全、有效的。

HSV-TK/GCV 是目前研究最为深入、应用最为广泛的自杀基因系统之一。其治疗肿瘤的机制有两个:自杀效应与旁观者效应[11]。本课题组前期实验利用婴儿双歧杆菌将 HSV-TK 基因转导入到荷瘤大鼠膀胱癌,治疗后发现肿瘤质量减轻,肿瘤组织细胞凋亡增加,caspase3 表达量也增高[5]。本实验利用携带重组质粒 pGEX-TK 的婴儿双歧杆菌经尾静脉注射入荷瘤裸鼠体内,再联合 GCV 治疗后,裸鼠质量增加,荷瘤质量减轻。TUNEL 染色显示重组质粒组凋亡指数明显高于空质粒组、婴儿双歧杆菌组和生理盐水组。表明婴儿双歧杆菌介导 HSV-TK/GCV 自杀基因治疗系统可能通过自杀效应和旁观者效应诱导裸鼠肾癌组织细胞凋亡,从而发挥抑瘤作用。

Stat3 是信号转导和转录活化因子家族(Stat1 ~ 4、Stat5a、Stat5b 和 Stat6)中的重要成员。Stat3 持续激活磷酸化后可诱导抗凋亡基因 Bcl-2、Bcl-xL、survivin、Mcl-1、XIAP,细胞周期调控基因 cyclin D1、c-myc 和血管生成相关基因 VEGF 的表达而导致细胞异常增殖与恶性转化,增强肿瘤抗凋亡的能力以及促进肿瘤侵袭、转移与血管新生,并增强肿瘤的多重耐药性[12-13]。研究证实,Stat3 在肾细胞癌中呈持续激活高表达并在抗凋亡信号通路中起关键作用[14-15]。其中抗凋亡基因 Bcl-xL 是 Stat3 主要的调控基因之一。本实验利用婴儿双歧杆菌介导 HSV-TK/GCV 自杀基因系统治疗裸鼠肾癌,与空质粒组、婴儿双歧杆菌组和生理盐水组比较,重组质粒组除裸鼠质量增加,荷瘤质量减轻外,TUNEL 染色显示肾癌组织细胞凋亡指数达到(25.57 ± 4.16)%,明显高于空质粒组的(12.11 ± 2.78)%、婴儿双歧杆菌组的(11.66 ± 2.78)% 和生理盐水组的(8.50 ± 2.35)%,诱导凋亡、抑制肿瘤作用明显。Real-time PCR 结果显示重组质粒组 Stat3、Bcl-xL mRNA表达水平明显低于其他 3 组。免疫组化染色结果显示重组质粒组 p-Stat3、Bcl-xL 蛋白表达量均明显降低。Western blot 检测结果显示重组质粒组 p-Stat3、Bcl-xL 表达水平也均明显低于其他 3 组。因此推测婴儿双歧杆菌介导 HSV-TK/GCV 自杀基因治疗系统治疗裸鼠肾癌除可能通过自杀效应和旁观者效应诱导裸鼠肾癌组织细胞凋亡外,还可能通过三磷酸丙氧鸟苷(GCV-TP)来抑制 Stat3 的活化进而阻断 Stat3 信号转导通路,下调其下游抗凋亡蛋白 Bcl-xL 的表达来诱导其凋亡,从而发挥抑瘤作用。

综上所述,目前抑制 Stat3 信号通路已成为恶性肿瘤治疗的热点之一[16]。阻断 Stat3 活化除利用 JAK 激酶抑制剂 AG490、反义寡核苷酸、RNA 干扰、显性负性技术以及姜黄素、白藜芦醇天然抑制剂等方法外[17],婴儿双歧杆菌介导 HSV-TK/GCV 自杀基因治疗系统可能有望成为一种更为安全、有效、新颖的抑制剂。另外本实验结合本课题组前期实验[6]已证实的 BI-TK/GCV 系统可激活外源性 Fas/FasL 死亡受体途径和内源性 Cyt-C 为中心的线粒体途径来诱导肿瘤组织细胞凋亡,进一步阐明了 BI-TK/GCV 系统治疗肿瘤的分子机制。然而,BI-TK/GCV 系统阻断 Stat3 活化的具体机制,还有是否存在其他诱导凋亡的信号通路和起主导作用的凋亡途径以及 BI 介导 TK 基因如何转导肿瘤细胞和逃避自杀基因的影响等一系列问题,还有待进一步研究。

参考文献:

[1] Cairns P. Renal cell carcinoma[J]. Cancer Biomark, 2010, 9(1/6): 461 - 473.
[2] Yazawa K, Fujimori M, Amano J, *et al*. Bifidobacterium longum as a delivery system for cancer gene therapy: selective localization and growth in hypoxic tumors[J]. Cancer Gene Ther, 2000, 7(2): 269 - 274.
[3] 江虹锐,鲁志刚,马玉彦,等. 两歧双歧杆菌在荷瘤鼠模型中的靶向定植及对巨噬细胞的免疫激活[J]. 肿瘤,2009,29(8): 721 - 726.
[4] Hu B, Kou L, Li C, *et al*. Bifidobacterium longum as a delivery system of TRAIL and endostatin cooperates with chemotherapeutic drugs to inhibit hypoxic tumor growth[J]. Cancer Gene Ther,2009,16(8): 655 - 663.
[5] Tang W, He Y, Zhou S, *et al*. A novel bifidobacterium infantis - mediated TK/GCV suicide gene therapy system exhibits antitumor activity in a rat model of bladder cancer[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2009, 28: 155.
[6] Yin X, Yu B, Tang Z, *et al*. *Bifidobacterium infantis*-mediated HSV-TK/GCV suicide gene therapy induces both extrinsic and intrinsic apoptosis in a rat model of bladder cancer[J]. Cancer Gene Ther, 2013, 20(2): 77 - 81.
[7] 吴瑜,易成,王树人,等. 婴儿双歧杆菌对小鼠黑色素瘤模型肿瘤组织的靶向性[J]. 四川大学学报: 医学版,2003,34(3): 435 - 438.
[8] Liu S C, Minton N P, Giaccia A J, *et al*. Anticancer efficacy of systemically delivered anaerobic bacteria as gene therapy vectors targeting tumor hypoxia/necrosis[J]. Gene Ther, 2002, 9(4): 291 - 296.
[9] Vaupel P W. Oxygenation of solid tumors[M]//Teicher B A. Drug

Resistance in Oncology. New York: Marcel Dekker, 1993: 53-85.
[10] Yazawa K, Fujimori M, Nakamura T, *et al*. Bifidobacterium longum as a delivery system for gene therapy of chemically induced rat mammary tumors[J]. Breast Cancer Res Treat,2001,66(2): 165-170.
[11] Wang Y, Canine B F, Hatefi A. HSV-TK/GCV cancer suicide gene therapy by a designed recombinant multifunctional vector[J]. Nanomedicine, 2011, 7(2): 193-200.
[12] 李海东,裘正军. Stat3在恶性肿瘤中的研究进展[J]. 国际肿瘤学杂志, 2011, 38(1): 3-5.
[13] Germain D, Frank D A. Targeting the cytoplasmic and nuclear functions of signal transducers and activators of transcription 3 for cancer therapy[J]. Clin Cancer Res, 2007, 13(19): 5665-5669.
[14] Guo C, Yang G, Khun K, *et al*. Activation of Stat3 in renal tumors [J]. Am J Transl Res,2009,1(3): 283-290.
[15] 雷文晖,辛军,伍伯聪,等. PSTAT3和VEGF蛋白在肾癌组织中的表达及其临床意义[J]. 肿瘤基础与临床,2011,24(4): 277-280.
[16] Haura E B, Turkson J, Jove R. Mechanisms of disease: Insights into the emerging role of signal transducers and activators of transcription in cancer[J]. Nat Clin Pract Oncol, 2005, 2(6): 315-324.
[17] Al-Zaid-Siddiquee K,Turkson J. STAT3 as a target for inducing apoptosis in solid and hematological tumors[J]. Cell Res, 2008, 18(2): 254-267.

(**收稿**:2013-08-16;**修回**:2013-09-20)
(编辑 龙 亮)

(上接374页)

本病的典型病理表现:瘤细胞多侵犯肝、脾、骨髓,特征性的表现为现为窦内侵犯[7]。骨髓侵犯多见,而骨髓累及时多为疾病晚期。免疫表型为T细胞标志:CD2(+)、CD3(+),CD7(+/-)、CD4(-)、CD8(-),$TCR_{\gamma\delta}$(+),常表达NK细胞相关抗原CD16、CD56。多表达细胞毒性颗粒蛋白TIA-1,而成熟T细胞标志颗粒酶B、穿孔素常为阴性。TCR基因重排δ链阳性[8]。遗传学异常主要表现为Iso7q、tri8等。我科诊治的患者表现典型,伴盗汗、LDH升高,无明显淋巴结肿大,流式分型主要表达CD2、CD3、CD7、CD11b、CD11c、CD16、CD38、$TCR_{\gamma/\delta}$(dim),而B细胞相关抗原CD20、CD19等为阴性,诊断明确未再行TCR基因重排检测及染色体分析。肝脾αβT细胞淋巴瘤多见于女性,表达$TCR_{\alpha\beta}$,基因重排β链阳性,临床表现与$HS_{\gamma\delta}$TCL相似。而临床上许多患者的表现不典型,与αβT细胞淋巴瘤、其他发热伴肝脾肿大的疾病不易区分,容易误诊漏诊。因此当患者有不明原因的高热、肝脾进行性肿大时,临床医生需警惕本病可能,以便及时行病理、流式分型、基因重排等检查,尽可能避免延误治疗时机。

肝脾γδT细胞淋巴瘤是一种具有高度侵袭性的外周T细胞淋巴瘤,生存期短,传统化疗反应差,预后不好,中位生存期<2年[8-13]。Belhadj等[9]分析了21例$HS_{\gamma\delta}$TCL,给予CHOP、CHOP样或含大剂量阿糖胞苷的方案诱导,仅9例达完全缓解,以化疗、自体或异基因移植巩固或挽救性治疗,仅2例自体移植患者长期存活,其余均死亡,2例行异基因移植的患者均因移植相关并发症死亡,其中位生存期仅16个月。该病例起病时骨髓淋巴瘤细胞达25%,临床Ⅳ期,诊断为γδT细胞淋巴瘤,淋巴瘤白血病。给予淋巴瘤、白血病的化疗方案均无缓解,再次以治疗难治性淋巴瘤DHAP方案诱导仍无反应,且瘤负荷进行性升高。患者骨髓浸润,瘤负荷高,异体移植为唯一可行的挽救性方案。移植后并发出血性膀胱炎,无其他移植相关并发症,目前随访6个月骨髓未见到瘤细胞。Falchook等[10]总结了15例$HS_{\gamma\delta}$TCL的治疗反应及预后,7例(46.7%)化疗后完全缓解,其中2例行异体移植1例行自体移植,均无病生存,至随访截止共4例长期存活,中位生存时间11个月。预后差的危险因素有:男性,未达完全缓解,免疫抑制病史,缺乏TCRγ链基因重排。$HS_{\gamma\delta}$TCL进展快,自然生存期短,而骨髓常常受侵犯,一旦骨髓累及,异体移植为有望根治本病的唯一手段。但移植后较高的复发率、移植相关并发症可能仍限制其应用。我科的病例在异基因移植后获完全缓解,但是由于样本量小,随访时间短,移植前瘤负荷极高,尚不能判断远期预后及复发风险。总之,国内外文献报道仍提示该病目前的预后不佳,有待在长期的临床及科研工作探讨行之有效的治疗手段,改善远期预后。

参考文献:

[1] 童春容, 王卉, 林跃辉, 等. 9例γδT细胞淋巴瘤/白血病患者的临床及实验室特征[J]. 中华血液学杂志, 2011, 32(7): 445-449.
[2] 刘艳辉, 庄恒国. γδT细胞淋巴瘤[J]. 国外医学: 生理、病理科学与临床分册, 2002, 22(1): 28-30.
[3] Arnulf B, Copie-Bergman C, Delfau-Larue M H, *et al*. Nonhepatosplenic gammadelta T-Cell Lymphoma: a subset of cytotoxic lymphomas with mucosal or skin localization[J]. Blood, 1998, 91(5): 1723-1731.
[4] 魏拴增, 刘彤华. 肝脾γδT和αβT细胞淋巴瘤[J]. 中华病理学杂, 2003, 32(1): 62-64.
[5] Miyazaki K, Yamaguchi M, Imai H, *et al*. Gene expression profiling of peripheral T-cell lymphoma including gammadelta T-cell lymphoma [J]. Blood, 2009, 113(5): 1071-1074.
[6] 张纯, 陈燕. 肝脾γδT细胞淋巴瘤合并Evans综合征一例报告并文献复习[J]. 临床内科杂志, 2007, 24(4): 271-272.
[7] Farcet J P, Gaulard P, Marolleau J P, *et al*. Hepatosplenic T-cell lymphoma: sinusal/sinusoidal localization of malignant cells expressing the T-cell receptor gamma delta[J]. Blood, 1990, 75(11): 2213-2219.
[8] Foroni L, Laffan M, Boehm T, *et al*. Rearrangement of the T-cell receptor delta genes in human T-cell leukemias[J]. Blood, 1989, 73 (2): 559-565.
[9] Belhadj K, Reyes F, Farcet J P, *et al*. Hepatosplenic gammadelta T-cell lymphoma is a rare clinicopathologic entity with poor outcome: report on a series of 21 patients[J]. Blood, 2003, 102(13): 4261-4269.
[10] Falchook G S, Vega F, Dang N H, *et al*. Hepatosplenic gamma-delta T-cell lymphoma: clinicopathological features and treatment[J]. Ann Oncol, 2009, 20(6): 1080-1085.
[11] 王彩霞, 常红. 肝脾γδT细胞淋巴瘤2例并文献复习[J]. 华西医学, 2009, 24(3): 590-592.
[12] 陈立, 贺振新, 邹塞英. 伴有皮肤浸润的肝脾γδT细胞淋巴瘤1例[J]. 临床荟萃, 2004, 19(4): 227.
[13] Toro J R, Liewehr D J, Pabby N, *et al*. Gamma-delta T-cell phenotype is associated with significantly decreased survival in cutaneous T-cell lymphoma[J]. Blood, 2003, 101(9): 3407-3412.

(**收稿**:2013-06-26;**修回**:2013-07-27)
(编辑 王 红)