

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.21.002

SL7207/pBud-VP3-IL-24 的肿瘤靶向性及其对胃癌细胞免疫作用研究*

曹红丹¹, 吕琳²

(1. 重庆医药高等专科学校护理学院 401331; 2. 重庆医科大学附属第二医院消化内科 400010)

[摘要] **目的** 探讨基于白细胞介素(IL)-24 的减毒沙门菌载体 SL7207/pBud-VP3-IL-24 对胃癌细胞的靶向性及肿瘤免疫作用。**方法** 建立小鼠胃癌细胞荷瘤模型, 将 SL7207/pBud-VP3-IL-24 (A 组)、SL7207/pBud (B 组)、生理盐水 (C 组) 经口服饲喂胃癌荷瘤小鼠, 分别采用组织匀浆菌落计数、RT-PCR 分析及荧光蛋白定位检测减毒沙门菌株 SL7207、apoptin-EGFP 融合绿色荧光蛋白及 IL-24 基因在小鼠体内的分布, 苏木精-伊红 (HE) 染色观察肿瘤组织病理变化, 通过四甲基偶氮唑盐 (MTT) 法、乳酸脱氢酶 (LDH) 释放法及中性红试验检测淋巴细胞增殖反应、自然杀伤细胞 (NK 细胞) 毒作用及腹腔巨噬细胞吞噬活性。**结果** 在 A 组治疗后 7 d, 小鼠肿瘤组织发现有减毒沙门菌株 SL7207; 随着时间推移, 肿瘤组织中细菌数量逐渐增多, 第 21 天, 肿瘤组织中细菌数量比其他组织明显增多 ($P < 0.05$)。病理切片提示胃癌组织细胞溶解坏死。同时, IL-24 基因和 apoptin-EGFP 蛋白在肿瘤组织有所表达, RT-PCR 定量显示 IL-24 基因在肿瘤组织较其他组织多 ($P < 0.05$)。MTT 和 LDH 实验显示, A 组淋巴细胞增殖 (0.75 ± 0.11) 和 NK 细胞活性 (0.38 ± 0.06)% 明显高于 B、C 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。中性红实验结果提示, A 组小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能增强 (0.49 ± 0.10), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** SL7207/pBud-VP3-IL-24 对胃癌组织具有靶向性, 能在肿瘤组织优先表达其携带基因及蛋白, 并通过增强机体非特异性免疫功能来调节抗肿瘤免疫。

[关键词] 沙门菌属; 白细胞介素 24; 靶向性; 免疫

[中图分类号] R735.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2018)21-2768-05

Tumor-targeting of SL7207/pBud-VP3-IL-24 and its immune effect on gastric cancer cells*

CAO Hongdan¹, LV Lin²

(1. Nursing College, Chongqing Medical and Pharmaceutical College, Chongqing 401331, China;

2. Department of Gastroenterology, Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the targeting of IL-24-based attenuated Salmonella carrier SL7207/pBud-VP3-IL-24 on gastric cells and its tumor immune effect. **Methods** The mice model bearing gastric cancer cells was established and was orally administered with pBud-VP3-IL-24. The mouse in vivo distribution status of attenuated Salmonella SL7207, apoptin-EGFP fusion green fluorescent protein and IL-24 gene was detected by tissue homogenate colony count, MTT assay and RT-PCR. The tumor histopathological change was observed by HE staining. The lymphocyte proliferation reaction and natural killer cells (NK) toxicity and phagocytic activity of peritoneal macrophage were detected by MTT, lactate dehydrogenase (LDH) release and neutral red test. **Results** On 7 d after SL7207/pBud-VP3-IL-24 treatment, attenuated Salmonella was found in mouse tumor tissue. The number of bacteria in tumor tissue gradually increased with the passing of time. On 21 d, the number of bacteria in tumor tissue was significantly higher than that in other tissues ($P < 0.05$). The pathological section indicated that gastric cancer tissues cells were lysed and necrosed, meanwhile IL-24 gene and apoptin-EGFP protein had some expression in tumor tissue. The RT-PCR quantitation analysis showed that the expression level of IL-24 gene in tumor tissue was higher than that in other tissues ($P < 0.05$). MTT and LDH showed that SL7207/pBud-VP3-IL-24 could promote lymphocyte proliferation and enhance NK cell killing activity ($P < 0.05$). The neutral red test results showed that the phagocytic activity of mouse peritoneal macrophages was enhanced ($P < 0.05$). **Conclusion** SL7207/pBud-VP3-IL-24 shows gastric cancer tissue targeting effect, can preferentially express its carrying genes and proteins in tumor tissue, and regulates anti-tumor immunity by enhancing body non-specific immune function.

[Key words] Salmonella; IL-24; targeting; immune

减毒沙门菌是一种常见的侵袭性胞内菌,以它作为基因治疗的载体,可以将外源 DNA 运送至真核细胞并在其中表达,被广泛应用于肿瘤治疗及抗肿瘤药物研究^[1]。此外,它可选择性地聚集到实体肿瘤内,并能明显延缓多种肿瘤包括黑色素瘤、结肠癌、肺癌和乳腺癌等的生长^[2-3]。目前研究显示,减毒沙门菌在体外抗肿瘤实验及动物模型实验中均取得了较满意的治疗效果^[4]。临床试验证实,其具有较高的肿瘤靶向性和安全性^[5]。

本课题组在前期工作中构建了基于白细胞介素-24(IL-24)的减毒沙门菌载体(命名为 SL7207/pBud-VP3-IL-24),发现其对胃癌肿瘤细胞生长具有抑制作用^[6]。本研究主要对其在小鼠体内分布情况及抗肿瘤免疫作用机制进行分析,以进一步探讨其作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

减毒沙门菌载体 SL7207/pBud-VP3-IL-24(含 EGFP)前期已构建。减毒沙门菌 SL7207、大肠杆菌 DH5a、MFC 小鼠胃癌细胞、YAC-1 小鼠淋巴瘤细胞株由重庆医科大学附属第一医院肿瘤分子与表观遗传实验室惠赠;6~8 周龄无特殊病原菌(SPF)级 Balb/c 雌性小鼠,由重庆医科大学实验动物中心提供。RPMI1640 培养液、新生牛血清(fetal bovine serum, FBS)、0.25% 胰酶、博来霉素(Zeocin)、四甲基偶氮唑盐(MTT)购自美国 Gibco 和 Invitrogen 公司。

1.2 方法

1.2.1 荷瘤小鼠模型的建立及治疗

将对数生长期胃癌细胞系 MFC,制备胃癌细胞悬液,用生理盐水将细胞浓度调至 1×10^7 个/mL,取清洁级健康小鼠 90 只,体质量(20 ± 1)g,无菌环境下,在每只小鼠右侧腋窝皮下以 0.1 mL 注射胃癌细胞悬液。接种第 8 天,以皮下肿瘤直径大于 0.5 cm 为成瘤标准。将小鼠分为 3 组,即 A 组为 SL7207/pBud-VP3-IL-24;B 组为 SL7207/pBud;C 组为对照组,每组 30 只。将 SL7207/pBud、SL7207/pBud-VP3-IL-24 菌液接种于含 Zeocin 的 LB 培养液中培养,至对数生长晚期时,测 600 nm 处吸光度值(A_{600})=0.6 时收集菌体,用生理盐水调整细菌为 1×10^7 cfu/mL。A、B 组小鼠用 3% 碳酸氢钠中和胃酸后,利用胃管口服饲喂相应细菌 0.1 mL,每周 1 次,共服 2 次,C 组口服饲喂等量生理盐水。

1.2.2 组织匀浆菌落计数

在治疗后第 7、14、21 天分别将 A 组小鼠 3 只脱颈处死,无菌分离肝、脾、肾脏、心脏、胃和肿瘤,以磷酸盐缓冲液(PBS)清洗,称重,然后以 1:5 的比例(1 g 组织:5 mL 培养液)加入 LB 培养液,玻璃匀浆器中匀浆。将匀浆液按 100 倍比稀释($\times 100$)。参照文献^[7],取 100 μ L 稀释液接种到 10 cm 的 LB 琼脂平板上,37 $^{\circ}$ C 温箱内倒置培

养过夜,然后直接计数平板上的细菌菌落数。每克组织内的细菌数=菌落数 $\times 10^3 \times 100$ (稀释倍数)。

1.2.3 免疫荧光显微镜和肿瘤组织病理形态学观察

在 A 组治疗后,采用上述方法无菌剥离瘤体组织和分离肝、脾、肾、心脏、胃,制作冰冻切片,荧光显微镜下检测 VP3-EGFP 融合蛋白表达状况。制作石蜡切片,苏木精-伊红(HE)染色观察各组织病理变化。

1.2.4 RT-PCR 半定量分析

Trizol 法提取各组瘤体组织和器官中总 RNA。紫外分光光度计测定 260 nm 处及 280 nm 处吸光度值(A_{260} 及 A_{280}),分析 RNA 纯度并调整浓度。反转录反应制备 cDNA,以 PCR 产物进行 IL-24 基因片段扩增,扩增片段为 530 bp,引物:上游引物 P1 5'-CGA AGC TTA TGA ATT TTC AAC AGA GGC TG-3',P2 下游引物 5'-CGGT CGA CCT AGA TTC AGA GCT TGT AG-3',以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为内参照基因,PCR 扩增条件为:94 $^{\circ}$ C 5 min,94 $^{\circ}$ C 30 s,58 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 40 s 延伸 35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳 30 min,凝胶图像分析仪观察拍照,并测定条带积分吸光度(integral A, IA)值,以待检基因条带与内参条带 GAPDH 的 IA 比值作为目的基因相对表达量。

1.2.5 淋巴细胞增殖实验

3 组小鼠治疗后 14 d,脱颈处死,无菌从小鼠取脾脏,用淋巴细胞分离液分离淋巴细胞,PBS 洗涤 2 次,用 RPMI1640 培养液调整细胞浓度至 1×10^6 个/mL,制得脾淋巴细胞悬液。96 孔培养板每孔加入 150 μ L 脾淋巴细胞悬液,继而加入经 RPMI1640 完全培养液配制的刀豆蛋白 A (ConA)100 μ L(终浓度 5 μ g/mL),每实验组设 5 个复孔,置 37 $^{\circ}$ C,5% CO_2 饱和湿度条件下培养 72 h。培养结束前 4 h,每孔加入 20 μ L MTT(5 g/L),继续培养 4 h。培养结束后加二甲亚砜 150 μ L,在酶标仪 570 nm 处测定吸光度值(A)。

1.2.6 乳酸脱氢酶(LDH)稀释法检测自然杀伤细胞(NK 细胞)活性

采用上述方法分离获得脾淋巴细胞,以 0.83% Tris-NH₄Cl(pH=7.2)破除红细胞,没有黏附的淋巴细胞作为 NK 反应细胞。以小鼠淋巴瘤细胞(YAC-1)作为靶细胞检测 NK 细胞活性。脾淋巴细胞 1×10^6 个/孔和 YAC-1 细胞 5×10^4 个/孔(起始效应:靶细胞比值为 20:1),同时设靶细胞自然释放孔和最大释放孔,每组 5 个平行孔,置 37 $^{\circ}$ C,5% CO_2 孵育 2 h。1 000 r/min 离心 5 min。吸取各孔上清液 0.1 mL 加至 96 孔板中,37 $^{\circ}$ C,10 min。每孔再加入 0.1 mL 新配制的 LDH 底物溶液,室温避光反应 10~15 min,加入 30 μ L 柠檬酸终止液终止酶促反应。在酶标仪 490 nm 处测定 A 值。NK 细胞活性(%)=(反应孔 A-自然释放孔 A)/(最大释放孔 A-自然释放孔 A) $\times 100\%$ 。

1.2.7 巨噬细胞吞噬功能测定(中性红实验) 每组选取 3 只体质量相近的 6 周龄昆明种小鼠,摘眼球放血,引颈处死。吸取腹腔灌洗液,收集到 50 mL 离心管,4 °C、3 000 r/min 离心 10 min 后,去上清液,加 1 mL 完全 RPMI1640 培养基。计数细胞,并调节细胞密度到 2×10^6 个/mL,接种在 96 孔板(2×10^5 个/mL),培养 4 h,各孔加入 0.075% 中性红(100 μ L/孔),5% CO₂,培养箱 37 °C 培养 1 h,除去中性红溶液,预热 D-Hanks 液洗涤细胞 3 次(pH 7.2)。各孔加入 100 μ L 裂解液,室温静止过液。混合均匀后于酶标仪上测定 540 nm 处的 A 值(A₅₄₀),以 A 值表示巨噬细胞摄取中性红的能力。

1.3 统计学处理 应用 SPSS13.0 软件对数据进行统计分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,比较采用 *t* 检验,计数资料比较采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 减毒沙门菌 SL7207 在小鼠体内分布 组织匀浆菌落计数表明,A 组治疗后 7 d 在小鼠胃、肝、脾和肿瘤组织发现有减毒沙门菌,其中胃组织比其他脏器和肿瘤组织细菌数量要多($P < 0.05$);第 14 天,细菌数目在胃组织内逐渐减少,肿瘤组织中逐渐增多;到第 21 天,除了脾脏和胃有少许细菌分布外,其他正常组织内没有观察到细菌,肿瘤组织中细菌数量却比其他组织明显增多,肿瘤/脾脏的菌量最大比可达 212:1(图 1)。

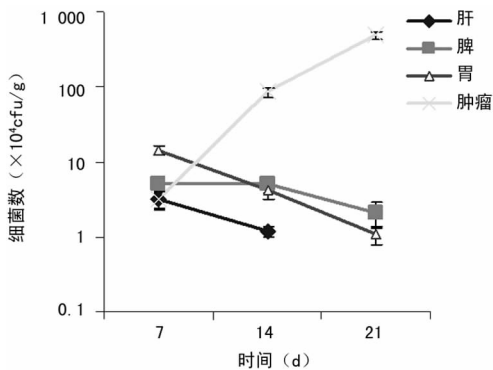


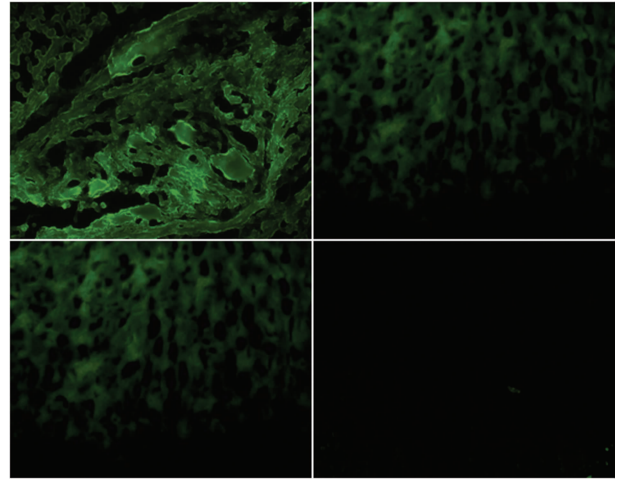
图 1 减毒沙门菌 SL7207 在小鼠体内分布状况

2.2 Apoptin-EGFP 和 IL-24 体内表达状况 在 A 组治疗后 7 d,荧光显微镜下可见肿瘤组织有 VP3 融合绿色荧光蛋白(apoptin-EGFP) 表达,在肿瘤外其他脏器中脾脏和肝脏也发现了荧光蛋白的表达,但其他重要脏器,如心、胃、肾未发现。HE 染色可见肿瘤组织经治疗后,肿瘤组织有较多坏死区,细胞核溶解,其他脏器未见明显异常改变(图 2、3)

RT-PCR 检测结果显示,第 7 天在肿瘤组织有 IL-24 表达,随着时间推移,其表达量逐渐增多,同时在免疫器官肝脏和脾脏也发现有表达,肿瘤组织内表达量显著高于其他组织($P < 0.05$),见图 4、5。

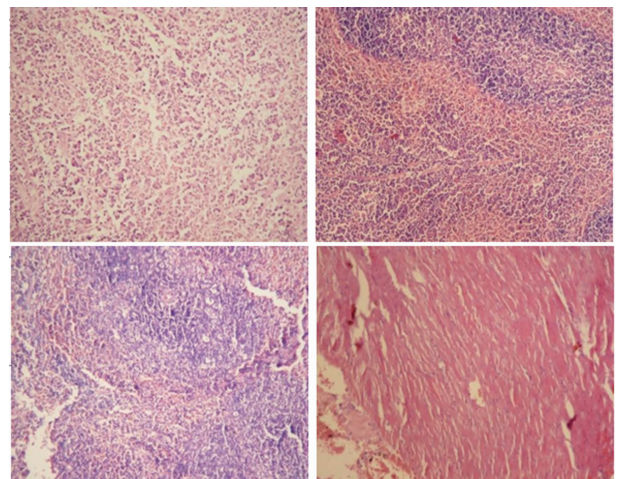
2.3 SL7207/pBud-VP3-IL-24 对小鼠脾淋巴细胞增

殖功能及 NK 细胞杀伤活性的影响 与 C 组相比较,A 组有较强的促进淋巴细胞增殖和 NK 细胞杀伤活性的作用,各组之间差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。



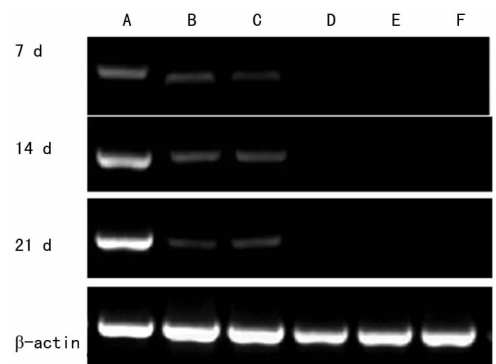
A: 肿瘤组织; B: 脾; C: 肝; D: 心

图 2 A 组治疗后 apoptin-EGFP 融合蛋白在胃癌荷瘤鼠体内分布($\times 200$)



A: 肿瘤组织; B: 脾; C: 肝; D: 心

图 3 A 组治疗后肿瘤组织 HE 染色($\times 100$)

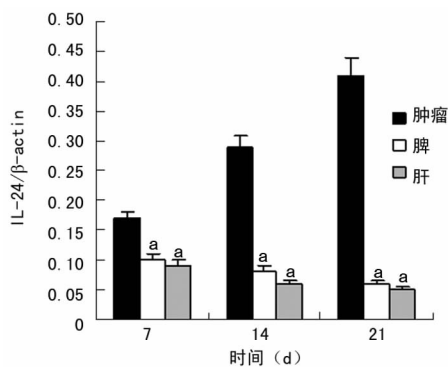


A: 肿瘤组织; B: 脾; C: 肝; D: 心; E: 胃; F: 肾

图 4 RT-PCR 检测 IL-24 在荷瘤小鼠体内表达

2.4 SL7207/pBud-VP3-IL-24 对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能的影响 巨噬细胞吞噬功能实验结果显示,A、B、C 组 A₅₄₀ 值分别为 0.49 ± 0.10 、 0.38 ± 0.02 、 $0.$

12±0.01, SL7207/pBud-VP3-IL-24 可显著提高腹腔巨噬细胞的吞噬活性($P<0.05$)。



$a: P<0.05$, 与肿瘤组织比较

图 5 IL-24 在荷瘤小鼠不同组织中的表达

表 1 小鼠脾淋巴细胞增殖功能及 NK 细胞杀伤活性的检测($\bar{x}\pm s$)

组别	n	A ₅₄₀ 值	NK 细胞活性(%)
A 组	5	0.75±0.11 ^a	0.38±0.06 ^a
B 组	5	0.58±0.06	0.21±0.04
C 组	5	0.31±0.03	0.08±0.01
P		<0.05	<0.05

$a: P<0.05$, 与 C 组相比

3 讨 论

自从 1893 年 COLEY 等偶然发现癌症患者术后感染厌氧菌能够使病情好转以来,厌氧菌在肿瘤治疗中的作用逐渐引起研究者的兴趣^[7]。PAWELEK 等^[8]将减毒沙门菌 YS72(pur⁻)及 YS721(pur⁻, ilv⁻)等通过腹腔内注射途径注入荷瘤 C57B6 小鼠体内,发现细菌能够优先聚集在肿瘤组织中;肿瘤组织与正常组织细菌比例最大可达到 1 000 : 1,治疗组小鼠肿瘤体积明显缩小。此后,其他研究者利用静脉、腹腔及瘤体注射也得到了相似结果^[9]。这说明减毒沙门菌可靶向肿瘤组织并能够抑制肿瘤细胞生长,有望成为抗癌治疗中新型载体。

本研究结果显示,SL7207 在肿瘤组织中分布随时间推移逐渐增多,到 21 d 肿瘤组织内细菌数量较其他组织明显增多,这提示减毒沙门菌载体 SL7207 可以远距离优先选择性聚集到肿瘤组织。通过对其携带基因及其表达蛋白的组织定位分析也证实 SL7207/pBud-VP3-IL-24 在肿瘤组织表达要高于其他组织。对于其靶向性的解释,笔者认为主要与作为厌氧菌的减毒沙门菌生物学特性及肿瘤组织的特殊环境有关。PAWELEK 等^[8]认为采用营养缺陷型菌株所需物质如芳香族氨基酸等在正常细胞中含量极少,不足以满足细菌生长的营养需要;而在细胞不断分裂的肿瘤“坏死区”处于相对乏氧的微环境,肿瘤细胞代谢旺盛,有大量中间产物可供细菌利用,能为厌氧菌的定植和繁殖提供条件。而其他研究者认为,肿瘤组织内不规则的血管和肿瘤组织间隙内的高压能

阻止粒细胞、抗体和补体等免疫成分随血流进入肿瘤组织,故沙门菌从肿瘤组织被清除的效率和速度比正常组织低,因此能在该环境中定植生存^[10]。此外,肿瘤组织内也有可能存在某些黏附分子,导致细菌对肿瘤细胞有趋向性。

在本研究中,发现除了肿瘤组织外,其他重要脏器,例如胃、脾、肝,也有减毒沙门菌聚集生长,这主要与给药方式和机体对减毒菌免疫反应有关。具有侵袭力的减毒沙门菌经口服途径饲喂后,可通过胃肠黏膜上皮途径侵入宿主细胞^[11]。动物胃肠道黏膜表面派伊尔结的滤泡上皮细胞中分布着微皱褶细胞(M 细胞),被肠上皮细胞紧紧包围,通过口服的具有侵袭力的沙门菌在胃肠道能增殖侵袭 M 细胞并破坏 M 细胞进入皮下组织,也可通过包围 M 细胞进入皮下组织,从而在本研究中观察到胃肠组织有沙门菌的存在。此外,派伊尔结淋巴细胞激活活化后,开始分化,并向肝、脾脏等淋巴组织迁移^[12],所以重要免疫脏器也有细菌及其携带蛋白的分布。

本研究对免疫细胞在肿瘤非特异性免疫调节中作用进行探讨,结果显示,SL7207/pBud-VP3-IL-24 可激活淋巴细胞和巨噬细胞活性,显著增强 NK 细胞对肿瘤细胞的杀伤作用来发挥抗肿瘤免疫作用。有研究发现,沙门菌通过感染肿瘤细胞,可以充当天然的免疫佐剂,菌体脂多糖成分能够激活宿主免疫系统,刺激炎症介质释放、激活淋巴细胞而增强全身或局部免疫^[13-14]。另外,作为目前为止发现的唯一细胞因子类抑癌基因,IL-24 也发挥重要免疫调节功能。研究显示,IL-24 免疫过的 C3H 系小鼠脾细胞增殖活性增强,CD3⁺ CD8⁺ T 细胞数目明显增多,同时 Th1 细胞因子的表达水平升高,从而促进免疫系统激活来发挥抗肿瘤免疫功能^[15]。结合本次研究,SL7207/pBud-VP3-IL-24 与 SL7207/pBud 比,前者有较强的刺激免疫细胞作用,故 SL7207/pBud-VP3-IL-24 对肿瘤免疫调节作用可能与沙门菌和 IL-24 联合作用的结果有关。

综上所述,SL7207/pBud-VP3-IL-24 能够靶向胃癌组织,在肿瘤组织,优先表达其携带基因及蛋白,并能通过增强机体非特异性免疫功能来调节抗肿瘤免疫,这为进一步研究其抗肿瘤作用机制奠定了基础。为优化该生物制剂治疗肿瘤作用效果,将在后续研究中针对 SL7207/pBud-VP3-IL-24 作用途径,例如口服、静脉注射、瘤体注射等,进一步探讨。

参考文献

[1] FELGNER S, KOCIJANCIC D, PAWAR V, et al. Biomimetic salmonella: a next-generation therapeutic vector? [J]. Trends Microbiol, 2016, 24(11): 850-852.
 [2] ZHENG J H, MIN J J. Targeted cancer therapy using engineered salmonella typhimurium [J]. Chonnam Med J, 2016, 52(3): 173-184.

- [3] ZHANG X, CHENG X, LAI Y, et al. Salmonella VNP20009-mediated RNA interference of ABCB5 moderated chemoresistance of melanoma stem cell and suppressed tumor growth more potently [J]. *Oncotarget*, 2016, 7 (12): 14940-14950.
- [4] MURAKAMI T, IGARASHI K, KAWAGUCHI K, et al. Tumor-targeting Salmonella typhimurium A1-R regresses an osteosarcoma in a patient-derived xenograph model resistant to a molecular-targeting drug[J]. *Oncotarget*, 2017 (8): 8035-8042.
- [5] KIYUNA T, MURAKAMI T, TOME Y, et al. High efficacy of tumor-targeting Salmonella typhimurium A1-R on a doxorubicin- and dactolisib-resistant follicular dendritic cell sarcoma in a patient-derived orthotopic xenograft PDOX nude mouse model[J]. *Oncotarget*, 2016, 7 (22): 33046-33054.
- [6] 曹红丹, 张朝鸿, 吕琳, 等. IL-24 联合靶向减毒沙门菌载体 SL7207/pBud-VP3 对胃癌细胞的生长抑制作用[J]. *重庆医学*, 2016, 45(19): 2610-2613.
- [7] NGUYEN V H, MIN J J. Salmonella-mediated cancer therapy: roles and potential[J]. *Nucl Med Mol Imaging* (2010), 2017, 51(2): 118-126.
- [8] PAWELEK J M, LOW K B, BERMUDES D. Tumor-targeted Salmonella as a novel anticancer vector[J]. *Cancer Res*, 1997, 57(20): 4537-4544.
- [9] KAWAGUCHI K, MURAKAMI T, SUETSUGU A, et al. High-efficacy targeting of colon-cancer liver metastasis with Salmonella typhimurium A1-R via intra-portal-vein injection in orthotopic nude-mouse models[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(12): 19065-19073.
- [10] ZHAO M, GELLER J, MA H, et al. Monotherapy with a tumor-targeting mutant of Salmonella typhimurium cures orthotopic metastatic mouse models of human prostate cancer[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104 (24): 10170-10174.
- [11] THEYS J, BARBE S, LANDUYT W, et al. Tumor-specific gene delivery using genetically engineered bacteria [J]. *Curr Gene Ther*, 2003, 3(3): 207-221.
- [12] WEISS S. Transfer of eukaryotic expression plasmids to mammalian hosts by attenuated Salmonella spp[J]. *Int J Med Microbiol*, 2003, 293(1): 95-106.
- [13] BINDER D C, WAINWRIGHT D A. The boosting potential of bacteria in cancer immunotherapy[J]. *Trends Mol Med*, 2017, 23(7): 580-582.
- [14] KOCIJANCIC D, LESCHNER S, FELGNER S, et al. Therapeutic benefit of Salmonella attributed to LPS and TNF- α is exhaustible and dictated by tumor susceptibility[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(22): 36492-36508.
- [15] MA Y F, REN Y, WU C J, et al. Interleukin (IL)-24 transforms the tumor microenvironment and induces anticancer immunity in a murine model of colon cancer[J]. *Mol Immunol*, 2016, 75(7): 11-20.

(收稿日期: 2017-11-18 修回日期: 2018-02-15)

(上接第 2767 页)

- [7] RATZIU V, BELLENTANI S, CORTEZ-PINTO H, et al. A position statement on NAFLD/NASH based on the EASL 2009 special conference [J]. *J Hepatol*, 2010, 53 (2): 372-384.
- [8] 赵泽华, 刘晓琳, 范建高. 重视非酒精性脂肪性肝病自然史的研究[J]. *中华肝脏病杂志*, 2017, 25(2): 81-84.
- [9] MICHITAKA K, NISHIGUCHI S, AOYAGI Y, et al. Etiology of liver cirrhosis in Japan: a nationwide survey[J]. *J Gastroenterol*, 2010, 45(1): 86-94.
- [10] Nayak N C, Vasdev N, Saigal S, et al. End-stage nonalcoholic fatty liver disease: evaluation of pathomorphologic features and relationship to cryptogenic cirrhosis from study of explant livers in a living donor liver transplant program[J]. *Hum Pathol*, 2010, 41(3): 425-430.
- [11] European Association for Study of Liver, Asociacion Latinoamericana para el Estudio del Hgado. EASL-ALEH clinical practice guidelines: non-invasive tests for evaluation of liver disease severity and prognosis[J]. *J Hepatol*, 2015, 63(1): 237-264.
- [12] XU L, LU W, LI P, et al. A comparison of hepatic steatosis index, controlled attenuation parameter and ultrasound as noninvasive diagnostic tools for steatosis in chronic hepatitis B[J]. *Dig Liver Dis*, 2017, 49(8): 910-917.
- [13] SHEN F, ZHENG R D, SHI J P, et al. Impact of skin capsular distance on the performance of controlled attenuation parameter in patients with chronic liver disease[J]. *Liver Int*, 2015, 35(11): 2392-2400.
- [14] KARLAS T, PETROFF D, SASSO M, et al. Individual patient data meta-analysis of controlled attenuation parameter (CAP) technology for assessing steatosis[J]. *J Hepatol*, 2017, 66(5): 1022-1030.
- [15] NEUSCHWANDER-TETRI B A, LOOMBA R, SANYAL A J, et al. Farnesoid X nuclear receptor ligand obeticholic acid for non-cirrhotic, non-alcoholic steatohepatitis (FLINT): a multicentre, randomised, placebo-controlled trial[J]. *Lancet*, 2015, 385(9972): 956-965.
- [16] RATZIU V, HARRISON S A, FRANCQUE S, et al. Elafibranor, an agonist of the peroxisome proliferator-activated receptor- α and - δ , induces resolution of non-alcoholic steatohepatitis without fibrosis worsening [J]. *Gastroenterol*, 2016, 150(5): 1147-1159.
- [17] BARREYRO F J, HOLOD S, FINOCCHIETTO P V, et al. The pan-caspase inhibitor Emricasan (IDN-6556) decreases liver injury and fibrosis in a murine model of non-alcoholic steatohepatitis[J]. *Liver Int*, 2015, 35 (3): 953-966.
- [18] ROTMAN Y, SANYAL A J. Current and upcoming pharmacotherapy for non-alcoholic fatty liver disease[J]. *Gut*, 2017, 66(1): 180-190.

(收稿日期: 2018-01-18 修回日期: 2018-03-21)