

细菌介导肿瘤治疗的进展与思考

汪梓宁,祝映,罗阳,顾玮

(重庆大学医学院智慧检验与分子医学中心,重庆 400030)

【摘要】肿瘤是危害人类健康的严重疾病,探索新型肿瘤治疗方式、提高其靶向性和药物递送效率、避免肿瘤细胞免疫逃逸、降低副反应是目前肿瘤治疗研究的热点问题。细菌既可以依赖天然的特性靶向缺氧、低pH、高渗透性和免疫抑制的肿瘤微环境,又可以通过免疫调节、细菌毒素促凋亡、抑制血管新生等机制发挥抗肿瘤作用。同时,研究者可以利用基因工程技术改造细菌,使之成为靶向性更高、穿透性更好的工程菌。此外,利用细菌外膜囊泡装载化疗药物或结合纳米材料抗肿瘤以及细菌联合化疗、放疗、光热/光动力疗法的出现,使得细菌治疗肿瘤方面研究进展迅速。本文综述了近年来细菌介导肿瘤治疗的最新研究进展,并展望了其未来的发展方向。

【关键词】肿瘤;细菌;靶向治疗;细菌外膜囊泡;联合治疗

【中图分类号】R730.5

【文献标志码】A

【收稿日期】2022-06-13

Advances in and reflections on bacteria-mediated oncology therapy

Wang Zining, Zhu Ying, Luo Yang, Gu Wei

(Center for Intelligent Testing and Molecular Medicine, School of Medicine, Chongqing University)

【Abstract】Tumor is one kind of disease that seriously endangers human health. It is a hot issue in the research of tumor therapy to explore new tumor therapy methods, improve its targeting and drug delivery efficiency, avoid tumor cell immune escape and reduce side effects. Bacteria-mediated cancer-targeted therapy is a novel experimental strategy for the treatment of cancers. Bacteria are preferentially accumulated in tumor microenvironments, characterized by hypoxia, low pH value, high permeability and immunosuppression. They can exert antitumor effects through inhibiting angiogenesis, promoting apoptosis and inhibiting immunomodulatory activity. Meanwhile, researchers can use genetic engineering techniques to modify bacteria to become engineered bacteria with higher targeting and better penetration. In addition, the emergence of using bacterial outer membrane vesicles loaded with chemotherapeutic drugs or combined with nanomaterials to fight tumors, as well as bacterial combination chemotherapy, radiotherapy, and photothermal/photodynamic therapy has led to rapid progress in research on bacterial therapy for tumors. This paper reviews the recent research progress in bacteria-mediated oncology therapy and looks forward to its future development.

【Key words】tumor; bacterium; targeted therapy; bacterial outer membrane vesicle; combined therapy

根据世界卫生组织国际癌症研究机构数据,全球癌症的发病率和死亡率仍持续增高。2020 年全球新发癌症病例 1 929 万例,其中中国新发癌症人数位居全球第一^[1]。目前临床对癌症的治疗方法主要有手术、放疗、化疗和免疫疗法等。但对于已出现转移灶的实体肿瘤,手术治疗很难完全清除肿瘤细胞,且受限于肿瘤低氧、高渗透压和免疫抑制的微环境,放化疗效果均不佳,因此迫切需要开发新的治疗方法。

利用细菌成功治疗肿瘤的案例为肿瘤治疗带来希望。

作者介绍:汪梓宁,Email:1425722163@qq.com,

研究方向:疾病生物标志物的超敏检测。

通信作者:顾玮,Email:guwei@cqu.edu.cn。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81772061);重庆市自然科学基金资助项目(编号:cstc2019jcyj-msxmX0266)。

优先出版:<https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20220831.0933.006.html>
(2022-08-31)

1813 年, Loughlin KR^[2]首次在气性坏疽的癌症患者中观察到肿瘤消退现象。19 世纪 90 年代,美国威廉·科利医生尝试给一些无法手术的肉瘤、淋巴瘤、黑色素瘤和骨髓瘤患者注射热灭活的黏质沙雷菌和化脓性链球菌的混合物(后称科利毒素),也取得了较好的疗效。之后,改造各种细菌或利用细菌成分进行肿瘤治疗的研究层出不穷,但至今 FDA 仅批准了卡介苗作为治疗非侵袭性膀胱癌的抗癌细菌制剂^[3]。

理想的肿瘤治疗细菌需要对宿主没有毒性,具有特定类型肿瘤的靶向性,能够进入肿瘤内部,无免疫原性,不易被宿主清除,对正常组织无害,容易操纵。随着合成生物学、基因编辑及纳米医学技术的发展,近年来在改造细菌使之毒性减弱、肿瘤靶向性增强,以及协同其他治疗方式方面的研究进展迅速。本文总结了细菌靶向肿瘤、治疗肿瘤及细菌联合其他疗法在肿瘤治疗中的研究进展(图 1)。

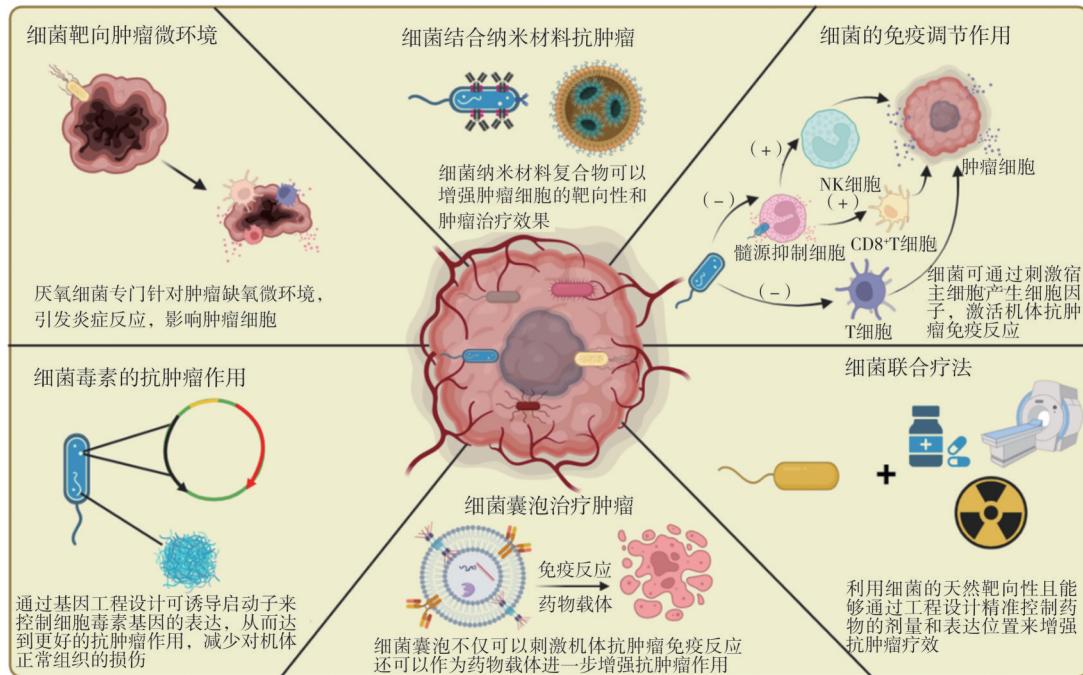


图1 细菌介导肿瘤治疗的原理与分类

1 细菌治疗肿瘤的优势

1.1 细菌靶向肿瘤微环境

肿瘤细胞的生长依赖缺氧、低pH、高渗透性和富营养的肿瘤微环境。而沙门菌、大肠杆菌、双歧杆菌、诺维菌和化脓性链球菌等专性厌氧菌或兼性厌氧菌能利用其化学感受器感知缺氧环境, 对肿瘤缺氧区与坏死区具有天然靶向性。如有研究将 $\Delta ppGpp$ 鼠伤寒杆菌和大肠杆菌K-12经静脉注射到各种类型的荷瘤小鼠后, 细菌均只在肿瘤中积累^[4-6]。Yu B等^[7]将鼠伤寒沙门菌必需基因 asd 置于缺氧条件启动子的控制下, 改造鼠伤寒沙门菌SL7207菌株为仅在缺氧条件下存活的菌株YB1, 既不降低细菌抗肿瘤活性也能实现其肿瘤治疗的安全性和靶向性。肿瘤酸性环境也能诱导细菌特定基因激活。Fleintje K等^[8]将沙门菌与黑色素瘤细胞或结肠癌细胞共培养, 发现5个可被癌细胞特异性激活的基因($adiY$ 、 $yohJ$ 、 $STM1787$ 、 $STM1791$ 和 $STM1793$)。进一步研究发现, 这些基因的激活可能是由肿瘤细胞酸性微环境介导的, 表明细菌能主动响应肿瘤酸性环境。肿瘤高渗环境中的趋化因子具有浓度高且长期滞留的特点。细菌表达的特异性趋化因子受体能够帮助其聚集到肿瘤高渗透环境中。肿瘤血管弯曲混乱, 能够将细菌围困住, 促进细菌定植。此外, 肿瘤组织丰富的血管网络可以为细菌提供充足的营养供应, 有利于细菌增殖。实验证实, 利用亚硝基脲诱导突变筛选得到的亮氨酸/精氨酸依赖的鼠伤寒沙门菌A1在肿瘤组织中的含量比健康组织高2 000倍^[9], 提示可以设计营养依赖型菌种来提高肿瘤靶向性。肿瘤细胞与细菌之间的相互作用也是促

使细菌靶向肿瘤微环境的重要因素。如粪肠杆菌的尿激酶原能够激活结肠癌细胞的尿激酶-纤溶酶原系统, 提高其胶原溶解活性, 方便其迁移转移, Williamson AJ等^[10]也证实胶原溶解细菌优先定植于结肠癌细胞。另枝菌属在重度前列腺癌患者中的相对丰度增加, 其产生的短链脂肪酸可以增加肝脏和前列腺中胰岛素样生长因子1的产生, 从而激活胰岛素样生长因子1下游信号通路, 促进前列腺癌进展^[11]。总之, 肿瘤缺氧、低pH、高渗透性和营养丰富的微环境特征以及细菌与肿瘤的相互作用不仅是细菌天然靶向肿瘤的重要原因, 也为改造细菌、提高其靶向能力奠定基础。

1.2 细菌靶向肿瘤免疫抑制环境

细菌靶向肿瘤的原因可能也跟其免疫抑制微环境相关。肿瘤部位的巨噬细胞和中性粒细胞的杀菌活性受到抑制为细菌提供了良好的生存环境。例如Stritzker J等^[12]研究表明大肠埃希菌与鼠伤寒沙门菌的瘤内定植更加依赖巨噬细胞的减少而非细菌的趋化性与运动性。而胶质母细胞瘤内中性粒细胞局部聚集的部分诺维菌分布明显减少。Tian S等^[13]也证实分泌发育性内皮基因座-1(一种中性粒细胞募集抑制剂)的鼠伤寒沙门菌较普通菌有更好的抗肿瘤活性。这些研究表明细菌更易存活于肿瘤免疫抑制环境中。

1.3 细菌靶向肿瘤标志物

利用基因工程技术改造细菌使其表达肿瘤相关蛋白或特异性抗原, 不仅可以增强细菌的肿瘤靶向性, 也可以明显减少其在患者的肝脏和脾脏中的积聚。表1列出了现有文献报道改造细菌使其靶向肿瘤标志物的相关研究。尽管改造后的细菌与野生型细菌相比具有更好的安全性和抗肿瘤效果, 但随着细菌进入人体的繁殖时间延长, 可能会出现因

繁殖导致的基因变异,这会导致细菌出现毒力恢复或肿瘤表面特异性表达的配体脱靶的可能。对改造菌的稳定性、安全性和精准靶向性仍需进一步研究。

1.4 细菌在肿瘤组织中迁移

由于淋巴液引流不良和血管渗透,肿瘤组织内部常表现出较高的组织间隙液压,许多化疗药物难以克服阻力深入肿瘤深部。此外,肿瘤部位血管系统混乱,毛细血管间距大,也阻碍了药物的输送。细菌作为生物活体,具有高度的自主移动性,可主动在肿瘤组织中迁移,使其可以成为良好的药物载体,弥补传统化疗药物递送效率不足的缺陷。如双歧杆菌和梭状芽孢杆菌可以借助鞭毛运动克服扩散阻力,深入肿瘤组织内部。Ganai S 等^[20]将厌氧性鼠伤寒沙门菌静脉注射到患有 4T1 乳腺癌的 BALB/c 小鼠中,发现 48 h 后细菌开始从肿瘤边缘向中心核迁移,96 h 后所有转移瘤均含有沙门菌,44.0% 的细菌分散在肿瘤转移组织中,而只有 0.5% 的细菌存在于正常的肝组织,表明细菌不仅可以在肿瘤组织中迁

移,还能有效避免对正常组织细胞的损害。但有研究表明,细菌能否在肿瘤组织中迁移的关键在于细菌活性,活性高的细菌能够更好地分布在肿瘤组织中。如沙门菌表现出 3 种肿瘤定植模式:血管附近活跃的大菌落与不活跃的小菌落以及远处的小菌落^[21]。综上,利用细菌进行肿瘤靶向治疗有着天然优势(图 2)。

2 细菌治疗肿瘤的机制

2.1 细菌的免疫调节作用

研究表明,定植肿瘤部位的细菌可通过刺激宿主细胞产生细胞因子,激活炎症反应,诱导机体产生抗肿瘤免疫反应。沙门菌可通过诱导机体固有性免疫反应,激活树突状细胞、中性粒细胞及巨噬细胞等免疫细胞迁移到肿瘤区域,并增强肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介

表 1 细菌靶向肿瘤标志物相关研究

细菌	肿瘤类型	工程化方式	靶向肿瘤标志物	参考文献
鼠伤寒沙门菌	淋巴瘤	将抗人 CD20 肿瘤抗原克隆到 pVUB4 载体中,与 ompA 跨膜蛋白结构域融合	肿瘤抗原 CD20	[14]
人宫颈癌细胞	利用粘连素与大肠杆菌细胞表面融合	黏附素促进细菌与肿瘤的结合	肿瘤膜表面硫酸肝素蛋白多糖	[15]
	控制细菌的组蛋白样蛋白 A (HlpA) 表达,使 HlpA 与硫酸肝素蛋白多糖结合			
大肠杆菌	淋巴瘤、黑色素瘤、乳腺癌	利用群体感应分子控制 ϕ x174E(裂解蛋白)表达,使细菌在临界值处裂解,释放 CD47 纳米体拮抗剂	肿瘤抗原 CD47	[17]
	结肠癌	多巴胺原位聚合形成多巴胺纳米颗粒,连接肿瘤特异性抗原和免疫检查点阻断抗体,并偶联到细菌表面	肿瘤特异性抗原	[18]
	结肠癌	细菌表面偶联肿瘤抗原识别蛋白和细胞因子结合蛋白	肿瘤 EpCAM 受体和 HER2 受体	[19]

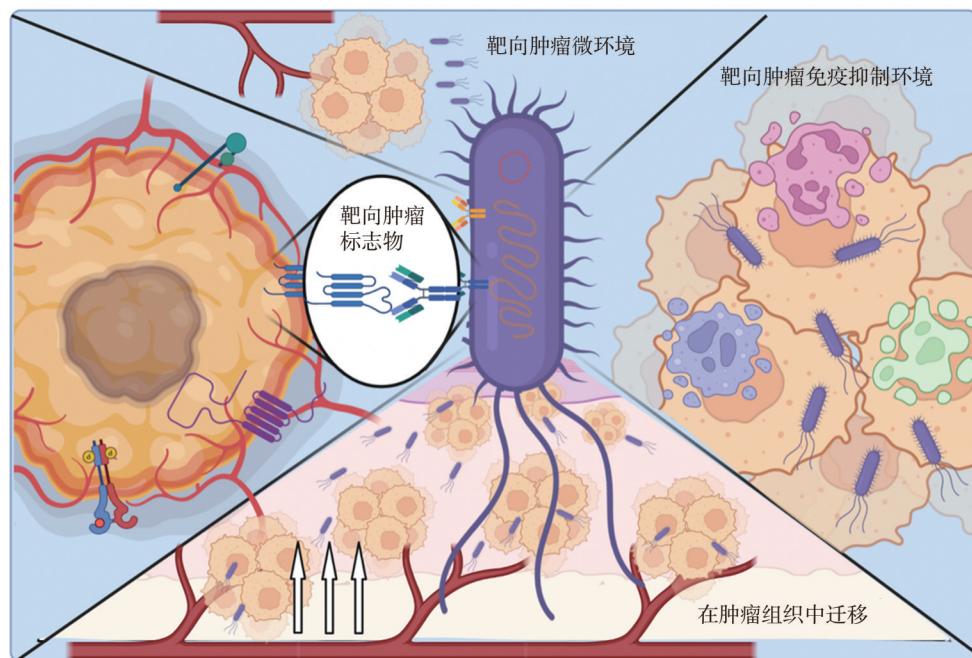


图 2 细菌治疗肿瘤的优势

素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)等炎性细胞因子的表达,产生抗肿瘤免疫反应。Yoon WS 等^[22]将沙门菌表达的 TNF- α 包被到工程菌胶囊中,以减少该蛋白对机体产生的副作用,这种工程菌胶囊主要是通过释放 TNF- α ,激活自然杀伤细胞杀伤肿瘤细胞,在宫颈癌、黑色素瘤、乳腺癌和结肠癌中都取得了较好的治疗效果。含有人白细胞介素-2 基因的鼠伤寒沙门菌减毒菌株经口服接种到肝细胞癌小鼠中,能够活化 T 细胞,产生明显的抗肿瘤作用^[23]。此外,细菌的某些组分,如脂多糖、脂蛋白和病原体相关模式分子可以激活机体免疫反应,达到清除肿瘤的目的。细菌定植肿瘤除了诱导机体的固有性免疫反应外还可诱导产生针对肿瘤细胞的适应性免疫反应。这种抗肿瘤作用主要依赖 CD4 $^{+}$ 和 CD8 $^{+}$ T 细胞和自然杀伤细胞,并通过产生抗肿瘤免疫作用还能在一定程度上抑制肿瘤细胞的肝转移。李斯特菌不仅可以直接感染抗原提呈细胞,还会感染骨髓源性抑制细胞(myeloid-derived suppressor cells, MDSCs)。由于 MDSCs 游走于肿瘤微环境中,因此可将细菌递送到肿瘤微环境中,并将剩余的 MDSC 亚群转化为产生白细胞介素-12 的免疫刺激表型,从而激活 T 细胞产生抗肿瘤免疫反应,产生抗肿瘤效果,同时 MDSCs 还可保护李斯特菌免受免疫清除。

2.2 细菌毒素的促凋亡作用

细菌毒素是由细菌产生的细胞毒性蛋白,某些细菌毒素可抑制肿瘤生长。为避免细菌毒素对机体正常组织造成损伤,可通过基因工程设计可诱导启动子来控制细胞毒素基因的表达。溶血素 A(cytolysin A, ClyA)是一种由鼠伤寒沙门菌、大肠杆菌和甲型副伤寒杆菌产生的 34 kD 大小的成孔溶血蛋白,不仅可以主动杀伤肿瘤细胞,还可以通过分泌膜性小泡,促进细胞凋亡。通过基因改造可使大肠杆菌菌株 K-12 在 L-阿拉伯糖或强力霉素激活的诱导型启动子的控制下

表达溶血素 A,经过实验证这些菌株已显示出优异的抑瘤效果^[4]。由于肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TNF-related apoptosis inducing ligand, TRAIL)的半衰期短和肝毒性大,直接系统性给药诱导产生凋亡配体不可行。研究人员通过在辐射诱导 RecA 启动子的控制下,设计了一种表达 TRAIL 的鼠伤寒沙门菌菌株,经全身注射进入乳腺癌小鼠体内,结果显示小鼠体内肿瘤的生长得到明显抑制,存活时间延长^[24]。

2.3 细菌抑制血管新生的作用

血管生成是恶性实体肿瘤突破上皮基底膜后进一步生长的基础,因此靶向肿瘤新生血管为肿瘤治疗提供了一个有潜力的方向。肿瘤细胞中最常见的促血管生长因子主要包括血管内皮生长因子、碱性成纤维细胞生长因子、表皮生长因子等。目前,针对促肿瘤血管生长因子的几种细菌性疫苗已在构建和临床验证中。Chen Y 等^[25]设计了一种基于减毒鼠伤寒沙门菌的血管内皮生长因子受体-3(vascular endothelial growth factor-3, VEGF-3)口服 DNA 疫苗,结果显示接种疫苗的肺癌小鼠体内 VEGF-3 特异性抗体水平明显增加,肿瘤生长和肿瘤淋巴微血管都受到明显抑制。内皮抑素是一种来自 18 型胶原蛋白 C 末端的内源性血管生成抑制剂,可有效抑制肿瘤血管生成且对正常组织无明显副作用。Jia HJ 等^[26]使用减毒鼠伤寒沙门菌提供的 DNA 载体表达内皮抑素,同时表达抑制信号转导和转录激活因子 3 的 siRNA,结果显示信号转导和转录激活因子 3 和内皮抑素水平以及血管内皮生长因子水平都有明显改变,导致肿瘤细胞增殖明显减少,诱导细胞凋亡和抑制血管生成,这项研究为细菌介导的肿瘤基因治疗提供新的途径。综上,细菌可利用自身产生的细菌毒素、免疫调节作用及抗肿瘤血管生成作用来抑制肿瘤细胞的生长(图 3)。

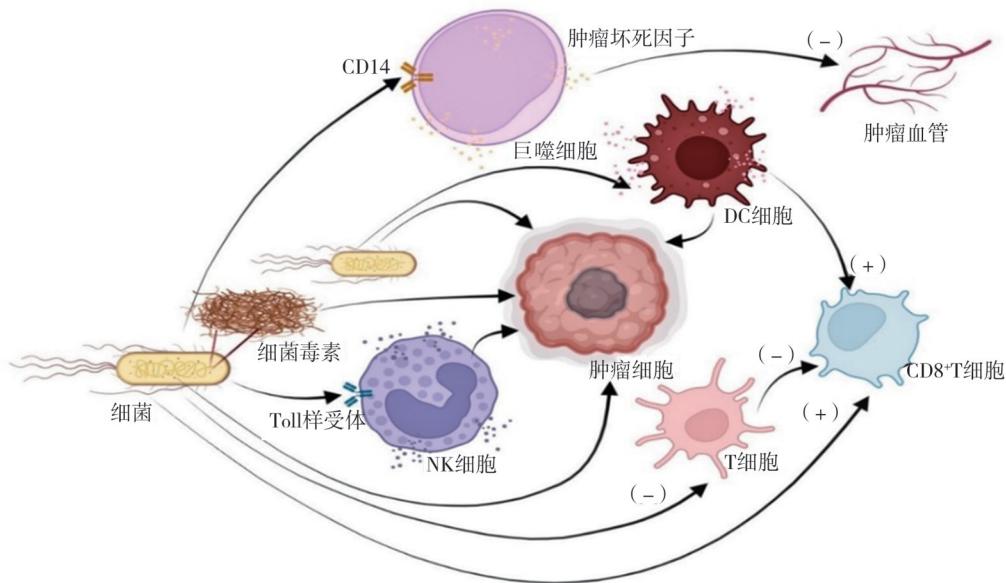


图 3 细菌治疗肿瘤的机制

3 细菌治疗肿瘤最新进展

3.1 细菌外膜囊泡治疗肿瘤

3.1.1 细菌外膜囊泡结构与特性 细菌外膜囊泡(outer membrane vesicles, OMVs)是革兰阴性菌分泌的天然纳米级囊泡, 直径 20~250 nm。少数革兰阳性菌中也会分泌 OMVs。当细菌受到刺激时 OMVs 分泌会增加。OMVs 独特的纳米尺寸使其在肿瘤部位的渗透性与滞留性增强, 表现出良好的抗肿瘤特性。OMVs 可以通过基因工程或化学修饰作为药物载体或其他免疫调节剂的载体。另外, OMVs 上含有与亲本细菌相同的抗原, 可以有效触发抗原提呈细胞的成熟以及树突状细胞的识别, 诱发强大的抗肿瘤免疫反应。

3.1.2 细菌外膜囊泡作为药物载体抗肿瘤 常规的抗肿瘤药物由于受到多种生物屏障(如单核吞噬细胞系统, 以及血管和间质屏障)的阻碍, 无法达到较好的治疗效果。OMVs 与化疗药物联合治疗可进一步增强抗肿瘤作用, 从而彻底根

除肿瘤并防止肿瘤复发和转移。Guo Q 等^[27]设计了针对肿瘤酸性微环境的给药系统, 将紫杉醇负载于 OMVs 内, 该给药系统在 pH 6.8 的酸性环境下被触发, 释放紫杉醇, 剩下的部分会被 M2 型巨噬细胞吸收以提高糖酵解的水平。如图 4 所示, Chen Q 等^[28]将 OMVs 包裹在负载药物的聚合物胶束上, OMVs 可以激活宿主的免疫反应进行肿瘤免疫治疗, 而聚合物胶束内负载的药物可以发挥化疗和免疫调节作用, 使癌细胞对细胞毒性 T 淋巴细胞敏感并直接被杀死, 实验证明这种 OMVs 依赖的生物源性免疫治疗剂能延长黑素瘤小鼠的存活率以及肿瘤向肺的转移。Li M 等^[29]将纳米致病粒包裹在 OMVs 里面, 利用 OMVs 丰富的病原体相关分子模式, 增强循环中性粒细胞的识别与内化, 诱导中性粒细胞向肿瘤迁移, 然后纳米致病粒在炎症刺激下从中性粒细胞中迅速释放, 随后被肿瘤细胞吸收发挥抗癌作用。

3.2 细菌结合纳米材料抗肿瘤

近年来, 纳米技术在细菌抗肿瘤应用中也迅速发展。研究者们发现细菌纳米材料复合物可以增强肿瘤的靶向性。

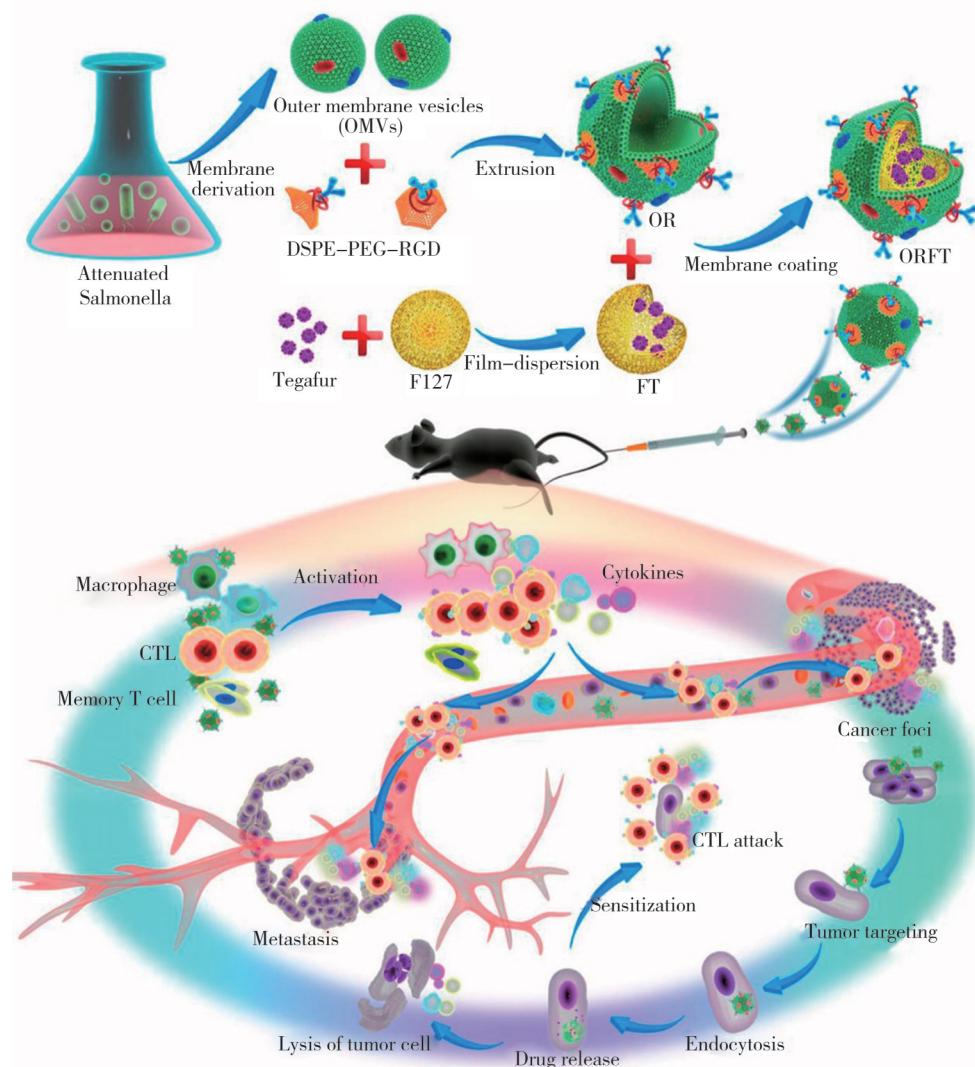


图 4 功能化 OMVs 包被聚合物胶束的生物工程过程的示意图及其提出的免疫治疗机制^[28]

例如,芽孢杆菌孢子表面修饰脱氧胆酸用来装载化疗药物,其表面被分解的疏水性蛋白质涂层和亲水性脱氧胆酸可在肠道微环境中通过自组装产生纳米颗粒,这种纳米颗粒可穿透上皮细胞增加用于结肠癌治疗药物的释放^[30]。此外,细菌纳米材料复合物还能提高传统肿瘤治疗方法的治疗效果。Felfoul O 等^[31]将抗肿瘤药物 SN-38 封装在表面羧基官能化的脂质体中,与趋磁细菌表面的氨基反应生成酰胺键来形成细菌纳米材料复合物,通过瘤周注射的方式将该复合物注入模型小鼠体内。对小鼠周围外加磁场,可利用细菌的趋磁性将纳米颗粒靶向递送至缺氧肿瘤部位,结果发现该方法的抗癌效果比直接给药更佳。除了上述利用化学键将细菌与纳米材料结合的方法外,研究者们近期开发了一些新型的细菌纳米材料复合物的结合方式。例如 Liu Y 等^[32]利用电穿孔技术将磷脂酰胆碱包裹在纳米量子点中,然后将其导入经叶酸修饰的短双歧杆菌中,该法利用量子点具有高质量的发光性能和光稳定性,极大地提高了肿瘤的体内成像效果和治疗作用。化学动力学疗法是利用肿瘤微环境激活芬顿反应,产生强氧化性的羟自由基,用于肿瘤特异性治疗^[33]。然而这项技术却因肿瘤自身的抗氧化能力及靶向性等问题受到限制。随着细菌结合纳米材料靶向肿瘤等研究逐渐兴起,研究者们开始利用纳米材料结合细菌应用在化学动力学治疗方面来提高治疗方法的特异性和靶向性。近期,Zhang WY 等^[34]利用金和铂金属复合物(Au⁺Pt)修饰到细菌表面(Bac-Au⁺Pt)开发的新型多功能纳米酶系统,通过细菌对肿瘤的天然靶向能力和Au⁺Pt纳米酶在酸性环境下的催化特性,该纳米系统

可有效地向肿瘤细胞释放活性氧,还可以刺激免疫 T 细胞释放 γ 干扰素,特异性降低肿瘤细胞内的抗氧化性,因此该系统可作为一种反应温和、对人体副作用小的新型药物实现癌症的精准化学动力学治疗。

3.3 细菌联合传统肿瘤治疗方法

目前,化疗、放疗和免疫治疗仍然是非手术治疗肿瘤患者的主要方法。这些传统肿瘤疗法均面临一个重要问题,即对恶性肿瘤细胞缺乏特异性,不能彻底根除患者体内的肿瘤细胞,还会诱导肿瘤细胞耐药,对机体正常组织造成不可逆损伤。研究表明,将细菌疗法与传统肿瘤治疗方法相结合,不仅能够有效根除肿瘤细胞,还能通过细菌控制药物剂量从而减少对正常组织的毒性作用。具体而言,细菌疗法联合化疗能够增强化疗药物对组织穿透性并且诱导破坏肿瘤血管系统。多项研究表明,细菌可作为化疗药物递送的载体,通过刺激反应性连接物与抗癌药物结合可以在很大程度上减少化疗药物对正常组织细胞的副作用。细菌联合放疗的抗肿瘤作用主要是通过细菌对肿瘤厌氧微环境良好的趋向性从而延长放疗的治疗时间,提高放疗治疗效果,还可通过基因工程改造细菌来特异性控制放疗对肿瘤部位的靶向性,减少其对正常部位的毒性作用。利用细菌介导的免疫疗法主要有两个方面:一是利用细菌作为免疫治疗相关制剂运输的载体,保护制剂的免疫活性;另一种是通过基因工程改造细菌使其能够上调肿瘤抗原表达,激活机体的免疫系统,诱导杀死肿瘤细胞。表 2 总结了部分细菌联合传统疗法抗肿瘤的研究进展。

表 2 细菌联合传统方法抗肿瘤

联合细菌 介导疗法	给药方式	细菌	药物	肿瘤类型	参考 文献
化疗	静脉注射	鼠伤寒沙门菌	阿霉素(DOX)	结直肠癌	[35]
化疗	静脉注射	大肠杆菌	阿霉素(DOX)	乳腺癌	[36]
化疗	静脉注射	大肠杆菌 Nissle1917	阿霉素(DOX)	乳腺癌	[37]
化疗	静脉注射	大肠杆菌 Nissle1917	阿霉素(DOX)、 α -生育酚琥珀酸酯(TOS)	乳腺癌	[38]
化疗	静脉注射	鼠伤寒沙门菌	SiRNA、伊立替康(SN-38)	结直肠癌	[39]
化疗	瘤周注射	趋磁细菌 MC-1	伊立替康(SN-38)	结肠癌	[31]
放疗	静脉注射	鼠伤寒沙门菌 Δ ppGpp	细菌荧光素酶(Lux)、溶细胞素 A(Cly-A)	结肠癌	[40]
放疗	腹腔注射	李斯特菌	放射性同位素 188Re	胰腺癌	[41]
放疗	腹腔注射	李斯特菌	32P	胰腺癌	[42]
免疫治疗	静脉注射	大肠杆菌 TOP10		结肠癌	[43]
免疫治疗	瘤内注射	大肠杆菌 Pir1+		淋巴瘤、乳腺癌、黑色素瘤	[17]
免疫治疗	静脉注射	鼠伤寒沙门菌 Δ ppGpp		结肠癌、黑色素瘤	[44]
免疫治疗		李斯特菌	免疫原性破伤风类毒素蛋白(TT856-1313)	胰腺癌	[45]
免疫治疗	腹腔注射	李斯特菌	表达 Kras	胰腺癌	[46]
免疫治疗	腹腔注射	李斯特菌	肿瘤相关抗原(TAA)Mage-b	乳腺癌	[47]
免疫治疗	静脉注射	李斯特菌	GNP-LLO091-99 纳米颗粒	黑色素瘤	[48]
免疫治疗	口服给药	鼠伤寒沙门菌 Δ phoP Δ phoQ		黑色素瘤	[49]
免疫治疗	瘤内注射	耻垢分枝杆菌	PC7A/CpG 多聚体	黑色素瘤、神经母细胞瘤	[50]

3.4 细菌联合光热/光动力疗法抗肿瘤

光热治疗 (photothermal therapy, PTT) 和光动力治疗 (photodynamic therapy, PDT) 是近年来开发的强有力的光学治疗癌症的临床方法, 分别以光热效应和光动力效应为基础。其作为物理化学疗法, 以非侵入性、选择性靶向、时空精准性和低毒性等优势成为肿瘤治疗研究领域的热点。然而这两种疗法都存在光敏剂对肿瘤部位靶向性不高, 无法避免肿瘤转移复发及治疗部位受限等局限性。因此, 如何提高 PDT 和 PTT 治疗肿瘤的疗效仍然是亟待解决的问题。随着细菌疗法的不断发展, 利用细菌对肿瘤细胞的天然靶向性, 将细菌与光敏剂通过化学键或静电相互作用等方式连接可将光敏剂运输到肿瘤部位, 并且细菌能激活机体免疫系统攻击肿瘤, 从而极大提高了 PDT 和 PTT 的肿瘤治疗效果并减弱其对正常组织的毒性作用。Liu L 等^[51]开发了一种活蓝细菌在光合产氧的介导下实现抗肿瘤免疫光动力疗法, 该研究利用活蓝细菌的天然肿瘤靶向性和原位光催化产氧能力, 将其作为氧供体, 利用二硫键装载在包含光敏剂的纳米颗粒中, 通过活蓝细菌的原位光合作用产氧增强 PDT 效应。吲哚菁绿 (indocyanine green, ICG) 是一种代表性的 PTT 光敏剂, 其在近红外光源的照射下, 既能产生热能, 也能产生单线态氧实现对肿瘤细胞双重作用。Chen FM 等^[52]通过酰胺键将 ICG 负载的纳米颗粒连接到鼠伤寒沙门菌表面, 利用伤寒沙门菌的肿瘤缺氧定植性, 将 ICG 递送到肿瘤部位, 在近红外光源

的照射下消融小鼠体内的肿瘤组织并展现出良好的荧光成像能力。除了荧光染料外, 一些贵金属对近红外光也具有较高的光热转换效率, 如 Chen QW 等^[53]利用钯纳米颗粒在兼性厌氧菌表面进行生物矿化形成一种自矿化的光热细菌 (photothermal bacterium, PTB), 进一步合成的负载光敏剂亚甲蓝 (methylene blue, MB) 的 ZIF-90 (ZIF-90/MB), 将其偶联在细菌表面形成 PTB[®]ZIF-90/MB 复合物, 到达肿瘤部位后由于 ATP 诱导 ZIF-90 宿主骨架降解, ZIF-90/MB 可从 PTB 表面脱落, 并在线粒体中选择性释放 MB, 其能在光照下产生单线态氧的活性氧, 从而联合杀死肿瘤细胞, 极大地提高肿瘤的靶向性和肿瘤消融能力。

综上, 单一肿瘤疗法的治疗效果往往会受到缺乏靶向性和特异性的限制, 无法彻底根除肿瘤细胞。细菌对肿瘤细胞的天然靶向性可作为肿瘤疗法的补充, 通过细菌介导的联合癌症治疗, 提高抗肿瘤疗效 (图 5)。

4 总结与展望

肿瘤靶向性细菌的高度特异性、给药可控性和便捷的基因改造能力可以有效克服现有临床肿瘤治疗方法无法进入肿瘤内部及潜在转移灶等缺陷。细菌强大的肿瘤选择性和基因包装能力不仅为肿瘤治疗药物提供理想载体, 表达多种治疗性蛋白质还可利用基因工程对细菌进行工程化改造, 使

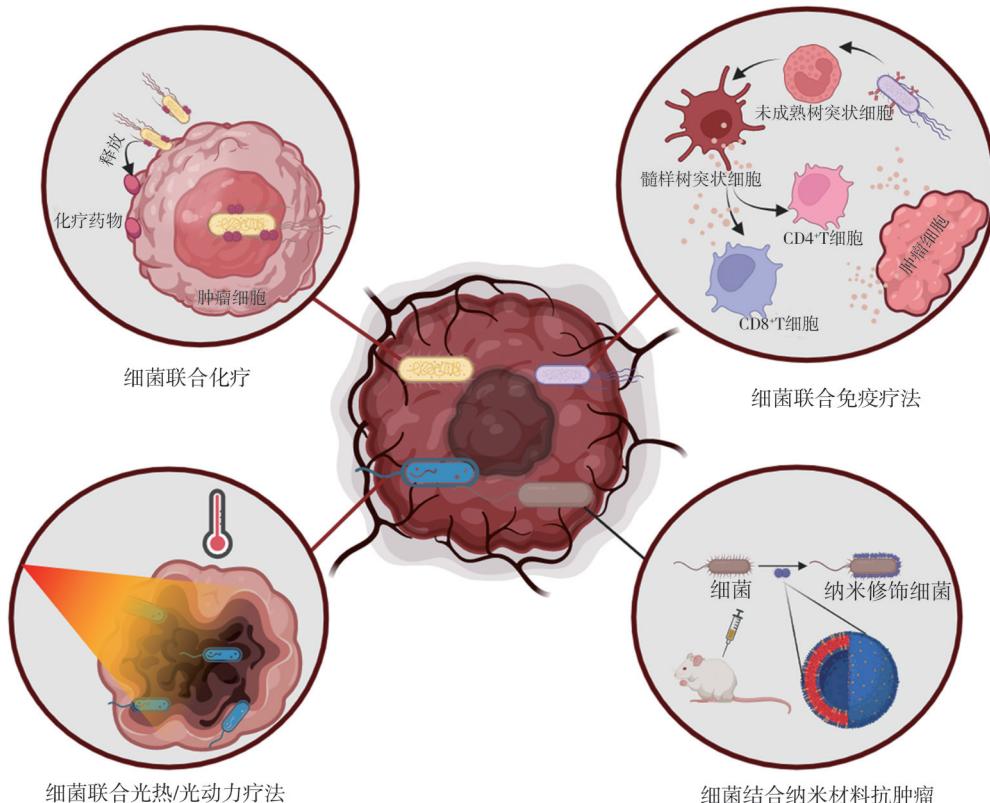


图 5 细菌治疗肿瘤的最新进展

表3 细菌治疗肿瘤的临床试验

菌株	肿瘤类型	治疗机制	例数	临床试验分期	参考文献
鼠伤寒沙门菌(VNP20009)	黑色素瘤、肾细胞癌	对转移癌患者静脉注射 Purl 和 msbB 基因缺失的减毒鼠伤寒沙门菌(VNP20009)靶向并抑制肿瘤生长	25	I	[54]
表达大肠杆菌胞嘧啶脱氨酶基因的鼠伤寒沙门菌(TAPET-CD)	头颈部或食管腺癌	对患者瘤周注射 TAPET-CD 靶向肿瘤细胞引发抗肿瘤作用	3	I	[55]
鼠伤寒沙门菌(VXM01)	胰腺癌	口服携带 VEGFR2 表达质粒的减毒鼠伤寒沙门菌活疫苗获得稳定的抗肿瘤免疫性和抗血管生成靶点	26	I	[56]
鼠伤寒沙门菌(VNP20009)	黑色素瘤、淋巴瘤	对转移癌患者静脉注射 Purl 和 msbB 基因缺失的减毒鼠伤寒沙门菌(VNP20009)靶向并抑制肿瘤生长	41	I	[57]
表达 IL-2 的鼠伤寒沙门菌	肝癌	口服减毒鼠伤寒沙门菌来治疗肝癌转移患者	22	I	https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01099631
诺维梭菌 NT	结直肠癌	静脉注射诺维梭菌 NT 孢子来治疗结石肠癌	2	I	https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00358397
诺维梭菌 NT	实体瘤	静脉注射诺维梭菌 NT 孢子来提高实体瘤恶性肿瘤患者的抗肿瘤活性	5	I	https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01118819
李斯特菌	胰腺癌	表达间皮素的活减毒单核细胞增生李斯特菌(CRS-207)可诱导先天性和适应性免疫反应增强抗肿瘤活性	90	II	[58]
李斯特菌	宫颈癌	利用针对肿瘤免疫系统有广泛影响的单核细胞增生性李斯特菌免疫疗法(ADX11-001)来治疗人乳头瘤病毒相关癌症	109	II	[59]
长双歧杆菌(表达 IL-12)	实体瘤	通过长双歧杆菌定植实体瘤组织并传递编码促炎转基因白细胞介素-12(IL-12)的遗传物质来抗肿瘤	5	I	https://clinicaltrials.gov/ct2/show/results/NCT04025307

其能够在抗肿瘤治疗中执行更为复杂的任务。除了细菌本身的抗肿瘤作用外,也可利用细菌分泌的 OMVs 经过基因工程或膜修饰作为抗肿瘤药物载体或其他免疫调节剂的载体,OMVs 与细菌具有类似的功能,但比细菌的安全性高,在肿瘤治疗领域中显示出巨大的潜力。此外,通过纳米材料的良好化学治疗优势和细菌的天然靶向性,将两者巧妙地结合可特异性增强肿瘤治疗的效果,同时也能明显降低人体对治疗所产生的副作用。尽管工程化肿瘤靶向细菌具有巨大的治疗潜力,但由于肿瘤在分子和组织水平上的异质性使得单一的抗肿瘤方法可能无法彻底根除肿瘤细胞,因此成功的肿瘤治疗可能需要联合方法。细菌可以特异性递送多种药物和蛋白质,且能够通过工程设计精准控制药物的剂量和表达位置。目前细菌介导肿瘤治疗的相关研究已进入 I 期或 II 期临床试验,表 3 列举了部分临床试验。因此,对这种“智能”细菌进行临床研究有望成为人类对抗恶性肿瘤的一个强大武器,将肿瘤靶向性细菌与肿瘤疗法进行联合可能是未来肿瘤治疗的新发展方向。

参 考 文 献

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209–249.
- [2] Loughlin KR, William B. Coley: his hypothesis, his toxin, and the birth of immunotherapy[J]. Urol Clin North Am, 2020, 47(4): 413–417.
- [3] Lenis AT, Lec PM, Chamie K, et al. Bladder cancer: a review[J]. JAMA, 2020, 324(19): 1980–1991.
- [4] Jiang SN, Phan TX, Nam TK, et al. Inhibition of tumor growth and metastasis by a combination of *Escherichia coli*-mediated cytolytic therapy and radiotherapy[J]. Mol Ther, 2010, 18(3): 635–642.
- [5] Nguyen VH, Kim HS, Ha JM, et al. Genetically engineered *Salmonella typhimurium* as an imageable therapeutic probe for cancer[J]. Cancer Res, 2010, 70(1): 18–23.
- [6] Jiang SN, Park SH, Lee HJ, et al. Engineering of bacteria for the visualization of targeted delivery of a cytolytic anticancer agent[J]. Mol Ther, 2013, 21(11): 1985–1995.

- [7] Yu B, Yang M, Shi L, et al. Explicit hypoxia targeting with tumor suppression by creating an “obligate” anaerobic *Salmonella typhimurium* strain[J]. *Sci Rep*, 2012, 2:436.
- [8] Flentie K, Kocher B, Gammon ST, et al. A bioluminescent transposon reporter-trap identifies tumor-specific microenvironment-induced promoters in *Salmonella* for conditional bacterial-based tumor therapy [J]. *Cancer Discov*, 2012, 2(7):624–637.
- [9] Zhao M, Yang M, Li XM, et al. Tumor-targeting bacterial therapy with amino acid auxotrophs of GFP-expressing *Salmonella typhimurium* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(3):755–760.
- [10] Williamson AJ, Jacobson R, van Praagh JB, et al. *Enterococcus faecalis* promotes a migratory and invasive phenotype in colon cancer cells[J]. *Neoplasia*, 2022, 27:100787.
- [11] Matsushita M, Fujita K, Hatano K, et al. Connecting the dots between the gut-IGF-1-prostate axis: a role of IGF-1 in prostate carcinogenesis[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2022, 13:852382.
- [12] Stritzker J, Weibel S, Seubert C, et al. Enterobacterial tumor colonization in mice depends on bacterial metabolism and macrophages but is independent of chemotaxis and motility[J]. *Int J Med Microbiol*, 2010, 300(7):449–456.
- [13] Tian S, Lin G, Piao L, et al. Del-1 enhances therapeutic efficacy of bacterial cancer immunotherapy by blocking recruitment of tumor-infiltrating neutrophils[J]. *Clin Transl Oncol*, 2022, 24(2):244–253.
- [14] Massa PE, Paniccia A, Monegal A, et al. *Salmonella* engineered to express CD20-targeting antibodies and a drug-converting enzyme can eradicate human lymphomas[J]. *Blood*, 2013, 122(5):705–714.
- [15] Piñero-Lambea C, Bodelón G, Fernández-Periáñez R, et al. Programming controlled adhesion of *E. coli* to target surfaces, cells, and tumors with synthetic adhesins[J]. *ACS Synth Biol*, 2015, 4(4):463–473.
- [16] Ho CL, Tan HQ, Chua KJ, et al. Engineered commensal microbes for diet-mediated colorectal-cancer chemoprevention[J]. *Nat Biomed Eng*, 2018, 2(1):27–37.
- [17] Chowdhury S, Castro S, Coker C, et al. Programmable bacteria induce durable tumor regression and systemic antitumor immunity[J]. *Nat Med*, 2019, 25(7):1057–1063.
- [18] Li JJ, Xia Q, Guo HY, et al. Decorating bacteria with triple immune nanoactivators generates tumor-resident living immunotherapeutics[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2022, 61(27):e202202409.
- [19] Zahirović A, Plavec TV, Berlec A. Dual functionalized *Lactococcus lactis* shows tumor antigen targeting and cytokine binding *in vitro*[J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2022, 10:822823.
- [20] Ganai S, Arenas RB, Sauer JP, et al. In tumors *Salmonella* migrate away from vasculature toward the transition zone and induce apoptosis[J]. *Cancer Gene Ther*, 2011, 18(7):457–466.
- [21] Zhang MM, Forbes NS. Trg-deficient *Salmonella* colonize quiescent tumor regions by exclusively penetrating or proliferating[J]. *J Control Release*, 2015, 199:180–189.
- [22] Yoon WS, Chae YS, Hong J, et al. Antitumor therapeutic effects of a genetically engineered *Salmonella typhimurium* harboring TNF- α in mice[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, 89(6):1807–1819.
- [23] Feltis BA, Miller JS, Sahar DA, et al. Liver and circulating NK1.1 $^{+}$ CD3 $^{-}$ cells are increased in infection with attenuated *Salmonella typhimurium* and are associated with reduced tumor in murine liver cancer[J]. *J Surg Res*, 2002, 107(1):101–107.
- [24] Ganai S, Arenas RB, Forbes NS. Tumour-targeted delivery of TRAIL using *Salmonella typhimurium* enhances breast cancer survival in mice[J]. *Br J Cancer*, 2009, 101(10):1683–1691.
- [25] Chen Y, Liu X, Jin CG, et al. An orally administered DNA vaccine targeting vascular endothelial growth factor receptor-3 inhibits lung carcinoma growth[J]. *Tumor Biol*, 2016, 37(2):2395–2404.
- [26] Jia HJ, Li Y, Zhao TS, et al. Antitumor effects of Stat3-siRNA and endostatin combined therapies, delivered by attenuated *Salmonella*, on orthotopically implanted hepatocarcinoma[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2012, 61(11):1977–1987.
- [27] Guo Q, Li XW, Zhou WX, et al. Sequentially triggered bacterial outer membrane vesicles for macrophage metabolism modulation and tumor metastasis suppression[J]. *ACS Nano*, 2021, 15(8):13826–13838.
- [28] Chen Q, Bai HZ, Wu WT, et al. Bioengineering bacterial vesicle-coated polymeric nanomedicine for enhanced cancer immunotherapy and metastasis prevention[J]. *Nano Lett*, 2020, 20(1):11–21.
- [29] Li M, Li SY, Zhou H, et al. Chemotaxis-driven delivery of nano-pathogenoids for complete eradication of tumors post-phototherapy[J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1):1126.
- [30] 焦建梅, 徐桂英, 辛霞. 胆酸盐参与的自组装及微纳米材料制备[J]. 物理化学学报, 2019, 35(7):684–696.
- Jiao JM, Xu GY, Xin X. Effect of bile salts on self-assembly and construction of micro-/ nanomaterials[J]. *Acta Phys Chimica Sin*, 2019, 35(7):684–696.
- [31] Felfoul O, Mohammadi M, Taherkhani S, et al. Magneto-aerotactic bacteria deliver drug-containing nanoliposomes to tumour hypoxic regions[J]. *Nat Nanotechnol*, 2016, 11(11):941–947.
- [32] Liu Y, Zhou M, Luo D, et al. Bacteria-mediated *in vivo* delivery of quantum dots into solid tumor[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 425(4):769–774.
- [33] Zhang C, Bu WB, Ni DL, et al. Synthesis of iron nanometallic glasses and their application in cancer therapy by a localized Fenton reaction[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2016, 55(6):2101–2106.
- [34] Zhang WY, Liu JW, Li XY, et al. Precise chemodynamic therapy of cancer by trifunctional bacterium-based nanozymes[J]. *ACS Nano*, 2021, 15(12):19321–19333.
- [35] Ektate K, Munteanu MC, Ashar H, et al. Chemo-immunotherapy of colon cancer with focused ultrasound and *Salmonella*-laden temperature sensitive liposomes (thermobots)[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1):13062.
- [36] Sun MC, Ye H, Shi QH, et al. Both-In-one hybrid bacteria suppress the tumor metastasis and relapse via tandem-amplifying reactive oxygen species-immunity responses[J]. *Adv Health Mater*, 2021, 10(21):e2100950.
- [37] Xie SZ, Zhao L, Song XJ, et al. Doxorubicin-conjugated *Esch-*

- erichia coli* Nissle 1917 swimmers to achieve tumor targeting and responsive drug release[J]. *J Control Release*, 2017, 268:390–399.
- [38] Xie SZ, Chen MH, Song XJ, et al. Bacterial microbots for acid-labile release of hybrid micelles to promote the synergistic antitumor efficacy[J]. *Acta Biomater*, 2018, 78:198–210.
- [39] MacDiarmid JA, Amaro-Mugridge NB, Madrid-Weiss J, et al. Sequential treatment of drug-resistant tumors with targeted minicells containing siRNA or a cytotoxic drug[J]. *Nat Biotechnol*, 2009, 27 (7) : 643–651.
- [40] Liu XD, Jiang SN, Piao LH, et al. Radiotherapy combined with an engineered *Salmonella typhimurium* inhibits tumor growth in a mouse model of colon cancer[J]. *Exp Anim*, 2016, 65(4):413–418.
- [41] Quispe-Tintaya W, Chandra D, Jahangir A, et al. Nontoxic radioactive *Listeria*^{at} is a highly effective therapy against metastatic pancreatic cancer[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(21):8668–8673.
- [42] Chandra D, Selvanesan BC, Yuan ZQ, et al. 32-*Phosphorus* selectively delivered by listeria to pancreatic cancer demonstrates a strong therapeutic effect[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(13):20729–20740.
- [43] Stern C, Kasnitz N, Kocjancic D, et al. Induction of CD4⁺ and CD8⁺ anti-tumor effector T cell responses by bacteria mediated tumor therapy[J]. *Int J Cancer*, 2015, 137(8):2019–2028.
- [44] Zheng JH, Nguyen VH, Jiang SN, et al. Two-step enhanced cancer immunotherapy with engineered *Salmonella typhimurium* secreting heterologous flagellin[J]. *Sci Transl Med*, 2017, 9(376):eaak9537.
- [45] Selvanesan BC, Chandra D, Quispe-Tintaya W, et al. *Listeria* delivers tetanus toxoid protein to pancreatic tumors and induces cancer cell death in mice[J]. *Sci Transl Med*, 2022, 14(637):eabc1600.
- [46] Keenan BP, Saenger Y, Kafrouni MI, et al. A *Listeria* vaccine and depletion of T-regulatory cells activate immunity against early stage pancreatic intraepithelial neoplasms and prolong survival of mice[J]. *Gastroenterology*, 2014, 146(7):1784–1794. e6.
- [47] Singh M, Ramos I, Asafu-Adjei D, et al. Curcumin improves the therapeutic efficacy of *Listeria*^{at}-Mage-b vaccine in correlation with improved T-cell responses in blood of a triple-negative breast cancer model 4T1[J]. *Cancer Med*, 2013, 2(4):571–582.
- [48] Terán-Navarro H, Calderon-Gonzalez R, Salcines-Cuevas D, et al. Pre-clinical development of *Listeria*-based nanovaccines as immunotherapies for solid tumours: insights from melanoma[J]. *Oncoimmunology*, 2019, 8(2):e1541534.
- [49] Nishikawa H, Sato E, Briones G, et al. *In vivo* antigen delivery by a *Salmonella typhimurium* type III secretion system for therapeutic cancer vaccines[J]. *J Clin Invest*, 2006, 116(7):1946–1954.
- [50] Patel RB, Ye MZ, Carlson PM, et al. Development of an *in situ* cancer vaccine via combinational radiation and bacterial-membrane-coated nanoparticles[J]. *Adv Mater*, 2019, 31(43):e1902626.
- [51] Liu L, He H, Luo Z, et al. *In situ* photocatalyzed oxygen generation with photosynthetic bacteria to enable robust immunogenic photodynamic therapy in triple-negative breast cancer[J]. *Advanced Functional Materials*, 2020, 30(10):1910176.
- [52] Chen FM, Zang ZS, Chen Z, et al. Nanophotosensitizer-engineered *Salmonella* bacteria with hypoxia targeting and photothermal-assisted mutual bioaccumulation for solid tumor therapy [J]. *Biomaterials*, 2019, 214:119226.
- [53] Chen QW, Liu XH, Fan JX, et al. Self-mineralized photothermal bacteria hybridizing with mitochondria-targeted metal-organic frameworks for augmenting photothermal tumor therapy[J]. *Adv Funct Mater*, 2020, 30(14):1909806.
- [54] Toso JF, Gill VJ, Hwu P, et al. Phase I study of the intravenous administration of attenuated *Salmonella typhimurium* to patients with metastatic melanoma[J]. *J Clin Oncol*, 2002, 20(1):142–152.
- [55] Nemunaitis J, Cunningham C, Senzer N, et al. Pilot trial of genetically modified, attenuated *Salmonella* expressing the *E. coli* cytosine deaminase gene in refractory cancer patients[J]. *Cancer Gene Ther*, 2003, 10(10):737–744.
- [56] Schmitz-Winnenthal FH, Hohmann N, Schmidt T, et al. A phase 1 trial extension to assess immunologic efficacy and safety of prime-boost vaccination with VXM01, an oral T cell vaccine against VEGFR2, in patients with advanced pancreatic cancer[J]. *Oncoimmunology*, 2018, 7(4):e1303584.
- [57] Thamm DH, Kurzman ID, King I, et al. Systemic administration of an attenuated, tumor-targeting *Salmonella typhimurium* to dogs with spontaneous neoplasia: phase I evaluation[J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(13):4827–4834.
- [58] Le DT, Wang-Gillam A, Picozzi V, et al. Safety and survival with GVAX pancreas prime and *Listeria monocytogenes*-expressing mesothelin(CRS-207) boost vaccines for metastatic pancreatic cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2015, 33(12):1325–1333.
- [59] Basu P, Mehta A, Jain M, et al. A randomized phase 2 study of ADXS11-001 *Listeria monocytogenes*-listeriolysin O immunotherapy with or without cisplatin in treatment of advanced cervical cancer[J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2018, 28(4):764–772.

(责任编辑:唐秋姗)