

引文格式:

黄建东, 韦孟溪, 周楠. 利用细菌治疗肿瘤的研究进展 [J]. 集成技术, 2021, 10(4): 93-101.

Huang JD, Wei MX, Zhou N. Research progress in bacterial tumor therapy [J]. Journal of Integration Technology, 2021, 10(4): 93-101.

## 利用细菌治疗肿瘤的研究进展

黄建东<sup>1,2\*</sup> 韦孟溪<sup>2</sup> 周楠<sup>2</sup>

<sup>1</sup>(香港大学李嘉诚医学院 生物医学学院 中国香港 999077)

<sup>2</sup>(中国科学院深圳先进技术研究院 深圳合成生物学创新研究院 中国科学院定量工程  
生物学重点实验室 广东省合成基因组学重点实验室 深圳 518055)

**摘 要** 目前用于治疗癌症的方法大多副作用大, 且药物不能有效到达癌组织内部, 治疗效果相当有限。细菌虽种类繁多, 可利用性强, 但其由于自身的生物性能不可控以及安全性等问题, 在肿瘤治疗方面受限。随着合成生物学的发展, 可通过合成生物学的方法对细菌进行工程性改造, 使之毒性减弱, 靶向定位肿瘤, 特异性感知病灶, 精准定位于病灶。利用工程菌作为载体搭载药物, 或者对细菌进行基因修饰来表达目的药物分子, 释放治疗药物, 将大大提高细菌治疗肿瘤的可利用性, 并提升治疗效果。该文主要总结了近年来利用工程细菌治疗肿瘤的研究进展。

**关键词** 工程菌; 有效载荷; 生物成分; 底盘; 临床挑战

中图分类号 R 392.1 文献标志码 A doi: 10.12146/j.issn.2095-3135.20210427004

## Research Progress in Bacterial Tumor Therapy

HUANG Jiandong<sup>1,2\*</sup> WEI Mengxi<sup>2</sup> ZHOU Nan<sup>2</sup>

<sup>1</sup>(School of Biomedical Sciences, Li Ka Shing Faculty of Medicine, University of Hong Kong, Hong Kong 999077, China)

<sup>2</sup>(Guangdong Provincial Key Laboratory of Synthetic Genomics, CAS Key Laboratory of Quantitative Engineering Biology, Shenzhen Institute of Synthetic Biology, Shenzhen Institute of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, China)

\*Corresponding Author: jdhuang@hku.hk

**Abstract** The efficacy of current anti-tumor therapies has suffered from possible side effects and the poor accessibility of drugs to the tumor core. Although a variety of bacteria in nature have the potential to be used as anti-tumor drugs, lacking controllability and potential safety issues have limited their usage in tumor treatment. With the development of synthetic biology, bacteria are extensively programmed under engineering disciplines to possess less toxicity and enhanced ability to target tumors, sense the lesions and

收稿日期: 2021-04-27 修回日期: 2021-05-17

基金项目: 深圳市科技创新委员会项目 (KQTD2015033117210153)

作者简介: 黄建东 (通讯作者), 中国香港大学讲座教授、中国科学院深圳先进技术研究院研究员, 研究方向为合成生物学理论和应用, E-mail: jdhuang@hku.hk; 韦孟溪, 研究助理, 研究方向为合成生物学应用于肿瘤免疫的研究; 周楠, 助理研究员, 研究方向为合成生物学。

locate the lesions accurately. Applying engineered bacteria as vectors to directly carry drugs or express and release molecular therapeutics has greatly improved the efficacy of the tumor treatment. This article will summarize the recent progress in engineering bacteria for the treatment of tumors.

**Keywords** engineering bacteria; payload; biological components; chassis; clinical challenges

**Funding** This work is supported by Shenzhen Science Technology and Innovation Commission (KQTD2015033117210153)

## 1 引 言

利用细菌治疗肿瘤最早记载于古埃及的医学著作<sup>[1-2]</sup>，人们发现细菌感染肿瘤后能减缓肿瘤生长。19 世纪初叶，Vautier 报道称发现气性坏疽的癌症患者肿瘤会消退<sup>[3]</sup>。随后，Coley<sup>[4]</sup>将化脓性链球菌 (*S. pyrogenes*) 和黏质沙雷氏菌 (*Serratia marcescens*) 灭活，制成了细菌制剂“Coley’s Toxins”，并将其作为一种治疗手段，也取得了不错的疗效。早期使用的是天然野生细菌，它们主要通过游走而被化学吸引滞留在肿瘤微环境中，且进入肿瘤后继续增殖，并通过触发凋亡、坏死和细胞破裂直接杀死癌细胞<sup>[5]</sup>，同时还有一部分细菌能激活机体的适应性免疫细胞，从而抑制肿瘤的生长。但治疗过程中发现，天然野生细菌除了会在肿瘤部位游走，还会参与血液循环，这就带来了全身感染的风险<sup>[6-7]</sup>。在 20 世纪 90 年代中期，研究者发现细菌疗法产生的疗效竟然和传统的治疗方法不相上下，同时认识到肿瘤微环境和重组 DNA 技术能够产生更有效和毒性更低的细菌菌株，使用活细菌进行癌症治疗的热情被重新点燃<sup>[8]</sup>。

随着基因工程的发展，可通过合成生物学的方法对细菌进行工程改造，使之毒性减弱，增强靶向定位肿瘤，特异性感知病灶，精准定位于病灶。利用细菌作为载体搭载药物运输至肿瘤部位，或对细菌进行基因修饰来表达目的药物分

子，将大大提高细菌治疗肿瘤的可利用性，也提升了治疗效果。合成生物学领域开发的一系列基因工具能使工程化的细菌保留固有的抗肿瘤特性，同时为癌症治疗提供各种类型的载荷，以及更有效、更安全的策略。利用细菌治疗肿瘤有望成为人类对抗肿瘤的新兴趋势，本文总结了近年利用工程菌治疗肿瘤的研究进展。

## 2 改造工程菌治疗肿瘤

野生细菌对健康组织的全身毒性可能是在不适当的时间、部位释放有毒的物质以及不可控游走引起的。应用合成生物学的方法对基因进行筛选和修饰，通过基因改造可以控制细菌毒性的表达，推动新的肿瘤特异性结合蛋白的开发，增强细菌与肿瘤的结合，使细菌达到更好的治疗效果。

### 2.1 提高细菌治疗的安全性和靶向性

有效的肿瘤靶向和治疗的安全性是细菌癌症治疗中面临的主要问题。由于肿瘤内存在新生血管发育不全、血管分布混乱等问题，导致血液循环紊乱、血液流动缓慢，肿瘤组织内氧气和营养物质传递低效，因此形成了独特的肿瘤缺氧微环境。基于此，中国香港大学 Yu 等<sup>[9]</sup>通过合成生物学方法来设计沙门氏菌，以提高其在抗肿瘤治疗中的减毒性和靶向性，使之抗击肿瘤更加有效、灵活。该设计主要是对必需基因

(*asd*) 进行工程改造, 使其处于缺氧条件启动子的控制之下, 只在缺氧条件下表达。在有氧条件下的正常组织中, 则不表达 *asd*, 也不合成二氨基庚二酸, 此时除非由环境提供二氨基庚二酸, 否则细菌将在生长期间溶解。经过改造的沙门氏菌(YB1)在携带肿瘤的裸鼠体内, 能靶向定植于肿瘤中, 抑制肿瘤生长, 同时不影响小鼠的正常组织<sup>[9]</sup>。另一种解决靶向传递的方法是在细菌表面表达肿瘤特异性结合蛋白。临床上, 细菌与肿瘤自然结合的依赖性还不够强。为了解决其中的一些限制, 研究人员已经开始开发和筛选肿瘤特异性结合蛋白。新加坡国立大学永卢林医学院的 Ho 等<sup>[10]</sup>对大肠杆菌 Nissle 1917(EcN)进行编码, 使之与癌细胞表面的硫酸乙酰肝素蛋白多糖(Heparan Sulfate Proteoglycan, HSPG)结合, 并分泌芥子酶将膳食硫代葡萄糖苷转为具有已知抗肿瘤活性的有机小分子萝卜硫烷, 其中萝卜硫烷能抑制癌细胞的生长, 促进癌细胞凋亡。这种组合方法在体外实验几乎完全抑制了癌细胞。当施用在小鼠结肠癌模型中时, 观察到小鼠荷瘤变小, 肿瘤发生率比单独使用工程微生物或膳食硫代治疗降低了 7 倍<sup>[10]</sup>。西班牙国家微生物中心的一项研究在大肠杆菌表面表达合成黏附素, 并测试其与癌症抗原表面结合的能力、以及该工程菌在体内定植小鼠肿瘤的能力<sup>[11]</sup>。结果显示, 与野生型相比, 含有合成黏附素的工程大肠杆菌能够以较低剂量定植于实体肿瘤, 并减少与健康组织的非特异性结合, 实现对病灶的精准靶向定位。

与野生型相比, 改造后细菌的优势在于, 保留野生菌动力活性的同时, 毒性被大大地减弱, 在合适的剂量范围内不会对机体产生危害, 并且能够靶向定植于肿瘤。但工程菌具有不稳定性, 随着繁殖时间的延长, 可能出现基因变异回归的情况, 这有可能导致细菌部分恢复毒性而对机体产生危害。肿瘤细胞表面特异性蛋白的表达和调控会受时间的影响。因此, 对于表达合成黏附素

的工程菌, 需要把握好肿瘤细胞表面特异性附着蛋白分子的性能, 防止因肿瘤表面特异性蛋白表达的变化, 致使细菌脱靶而达不到应有的治疗效果。

## 2.2 通过调节血管生成治疗肿瘤

实体瘤的特点是血管生成增加, 目前已经有几种工程化的细菌治疗策略侧重于抑制血管生成来产生抗肿瘤作用。广东省深圳市动物遗传工程技术研究中心的 Wei 等<sup>[12]</sup>对长双歧杆菌进行改造, 使之可以分泌肿瘤血管内皮抑制素(Tumstatin, Tum)。其中, 肿瘤血管内皮抑制素是一种强大的内源性血管生成抑制剂。该团队将非致病性厌氧长双歧杆菌设计成新型的 Tum 给药系统, 使之能够在 *pBADs* 启动子调控下表达 Tum, 细菌精准定位肿瘤的同时, 提高靶向给药功能。这种工程菌在 CT26 荷瘤小鼠模型中抑制肿瘤血管内皮细胞的增殖并诱导肿瘤细胞凋亡(图 1), 首次证明利用长根双歧杆菌转化 Tum 作为一种特异的基因传递系统治疗肿瘤。Wood 等<sup>[13]</sup>报道了一种基于单核细胞增生李斯特菌减毒疫苗的研制, 该疫苗可分泌 tLLO-CD105 融合蛋白。其中, 该融合蛋白包含一种胆固醇依赖性细胞溶血素李斯特菌溶血素 O(LLO)和一种在血管生成中起作用的 TGF- $\beta$  受体家族成员 Edoglin(CD105)。改造后的李斯特菌能有效抗血管生成和抑制肿瘤, 减轻小鼠的原发性和转移性乳腺癌。

利用工程化细菌生成血管抑制剂治疗肿瘤的优势在于: 一是利用细菌的能动作用靶向肿瘤; 二是在肿瘤部位分泌血管抑制剂, 仅针对肿瘤内的血管起作用, 减少了不必要的组织伤害。需要注意的是, 细菌进驻机体的方式必须和细菌分泌的血管抑制剂相对适宜, 这样才能避免治疗后引起健康组织与肿瘤组织并发的安全性问题。同时, 细菌分泌血管抑制剂的剂量对肿瘤的抑制也至关重要, 分泌过多或过少都有可能达不到良好

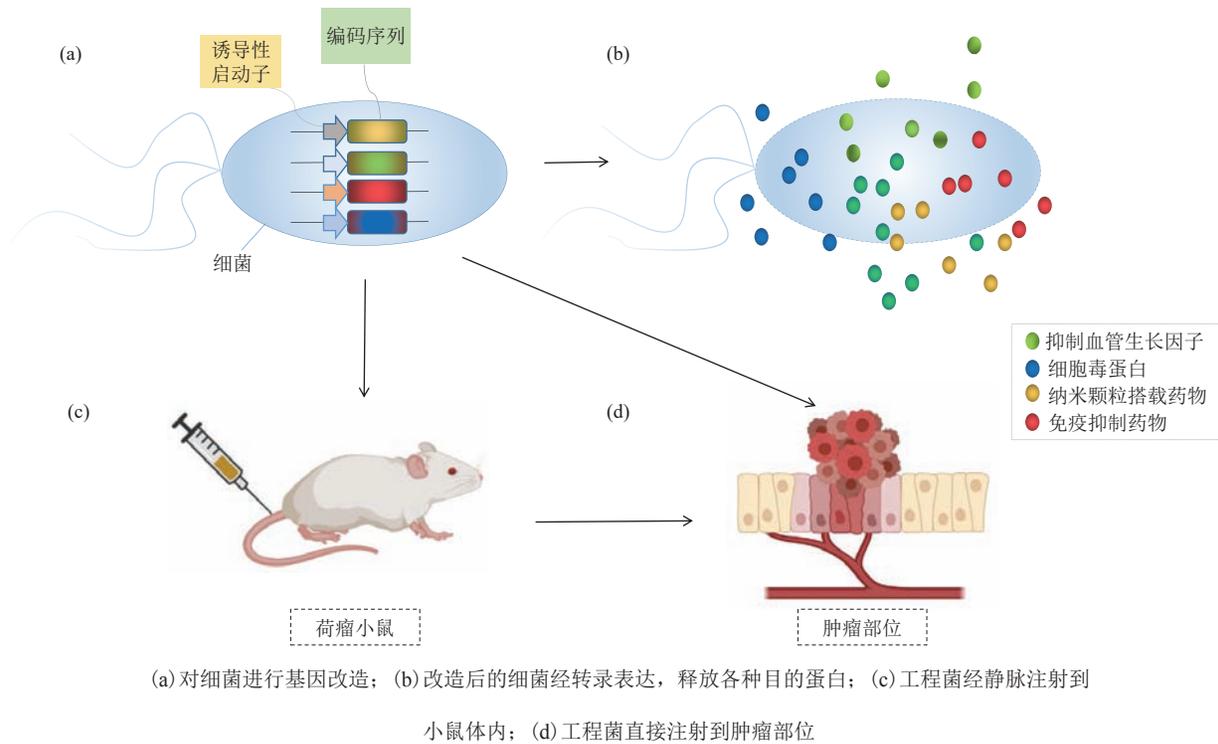


图 1 细菌经工程改造后治疗荷瘤小鼠的过程

Fig. 1 Treatment process of tumor bearing mice with engineered bacteria

的治疗效果。

### 2.3 通过细胞毒蛋白攻击肿瘤

利用细菌在肿瘤部位产生细胞毒蛋白是一种癌症治疗的方式。这种设计方式主要是利用细菌能够游走到肿瘤的缺氧病灶区域，然后通过裂解释放或者分泌特定的抗肿瘤药物，实现对肿瘤的靶向给药，达到抑制病情的效果。两项独立研究<sup>[14-15]</sup>表明，大肠杆菌 K-12 和鼠伤寒沙门氏菌 (*S. typhimurium*) 能产生溶血素 A (Cytolysin A, ClyA)。改造后的菌株在对放射治疗有抵抗力的小鼠 CT26 肿瘤模型中的缺氧区有效。Ryan 等<sup>[16]</sup>在鼠伤寒沙门氏菌中设计生成孔毒素溶血素 E (HlyE)，改造后的菌株能增大小鼠乳腺癌的坏死率，减少肿瘤生长。St 等<sup>[17]</sup>研究表明，对大肠杆菌菌株  $\chi$ 6212 (*Lasd*) 进行工程改造可以提供金黄色葡萄球菌衍生的  $\alpha$ -溶血素 (SAH)。该工程菌株能够使 4T1 荷瘤小鼠的肿瘤消退，促进肿瘤坏死。Yamada 等<sup>[18]</sup>利用铜绿假单胞菌表达低毒性氧化

还原蛋白 Azurin。其中，Azurin 是一种抗癌治疗蛋白，其向细胞核的细胞内转运依赖于 p53。Azurin 与 p53 形成复合物，稳定 p53 并提高细胞内 p53 和 Bax 的水平，导致线粒体细胞色素 c 释放到胞浆中，从而引发细胞凋亡。Zhang 等<sup>[19]</sup>的研究表明，表达 Azurin 的 EcN 能够抑制小鼠 B16 黑色素瘤和 4T1 乳腺肿瘤的生长。Lim 等<sup>[20]</sup>设计鼠伤寒沙门氏菌来表达和释放融合蛋白，该融合蛋白包含转化生长因子  $\alpha$  (TGF $\alpha$ ) 和假单胞菌外毒素 a (PE38)，二者分别是表皮生长因子受体 (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR) 的天然配体和免疫毒素。经改造后的鼠伤寒沙门氏菌释放的 TGF $\alpha$ -PE38 融合蛋白显著抑制小鼠实体瘤的生长。

大多数癌症药物不能清除肿瘤中所有的癌细胞，它们通常只对抗增殖细胞，并且不能深入渗透到组织中。这些弱点使许多肿瘤细胞能够逃脱治疗，增大了复发、转移和致死的概率。改造后

的工程菌利用能动性游走到肿瘤部位, 此时它们相当于提供一个在原位持续生产蛋白质药物的分子工厂: 将生产的蛋白药物集中在肿瘤的深处, 随细菌的游走而扩散, 分泌的蛋白药物撒落于肿瘤的各个部位, 扩大了治疗范围, 显著提高了治疗效果。然而, 并不是所有的蛋白药物对健康的组织都是有益的, 因此, 严格控制细菌的剂量, 把握好细菌分泌蛋白药物的时间、表达能力的稳定性和药物的产量, 才能确保机体的安全。

#### 2.4 通过 RNA 干扰阻断肿瘤生长

通过工程细菌提供的 RNA 干扰(RNAi) 治疗是将治疗性 RNAi 效应物(短发夹状 RNA, shRNA) 运输到靶细胞中, 用来沉默癌症相关的 mRNA。Jia 等<sup>[21]</sup>研究表明, 减毒鼠伤寒沙门氏菌经改造后在原位肝细胞癌小鼠模型中递送 STAT3-specific siRNA 和内皮抑素。这两种有效载荷的联合应用能够抑制肿瘤的增殖和转移, 减少肿瘤的增殖炎症和肿瘤微血管的数量。Phan 等<sup>[22]</sup>对减毒鼠伤寒沙门氏菌菌株进行改造, 表达靶向吲哚胺 2,3-双加氧酶的 shRNA, 使用在 CT26 和 MC38 结直肠癌小鼠模型中发现, 该菌株能增大中性粒细胞在肿瘤中的浸润, 导致肿瘤细胞死亡数量增加。其他通过细菌介导的 RNAi 并在临床前模型中显示出治疗效果的靶基因包括 Survivin(凋亡抑制蛋白家族的新成员, 具有肿瘤特异性)、B 细胞淋巴瘤 2(Bcl-2)、性别决定区 Y(SRY) 盒 2(Sox2)、程序性细胞死亡蛋白 1(PD-1)、抑制素亚单位  $\alpha$ (INH $\alpha$ )、多药耐药突变 1(MDR1) 和极性激酶 1(PLK1)<sup>[21, 23-27]</sup>等。

通过 RNA 干扰治疗肿瘤的工程菌可以抑制肿瘤表面的免疫检查点蛋白, 使免疫反应更加有效。此外, 有些抗肿瘤抗体不仅费用昂贵, 治疗过程还有可能产生毒副作用。如果使用 RNAi 来抑制肿瘤细胞表面的 PD-L1, 那么可以有效地诱发抗肿瘤反应, 该类型细菌不仅能够作为免疫刺激剂, 还降低了治疗成本。然而, 由于细菌前期

不止在肿瘤部位游走, 还游走于机体的其他部位, 为了避免误伤健康组织, 控制好 RNAi 效应在时间和空间上的表达至关重要。

#### 2.5 作为负载抗肿瘤药物的底盘进行治疗

开发工程化的细菌为基础方法进行癌症治疗时, 一个需重点考虑的因素是选择合适的细菌底盘作为药物载荷。选择细菌作为底盘搭载药物的优势在于, 细菌具有良好的兼容性和基因改变的易用性, 同时还具有天然的抗肿瘤活性和侵袭定植肿瘤的能力, 能使药物的靶向精准给药方式更加灵活和更加智能。越来越多的工程菌, 如大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、沙门氏菌、李斯特菌属、梭状芽孢杆菌属、双歧杆菌属、链球菌属、乳酸杆菌属和乳球菌属等都可供应用。美国哥伦比亚大学生物医学工程系的 Chowdhry 等<sup>[28]</sup>使用细菌作为底盘来进行免疫检查点的阻断治疗, 他们在非致病性大肠杆菌中搭载同步裂解基因线路(Synchronized Lysis Circuit, SLC), 并通过该基因线路编码释放 CD47 纳米抗体。结果表明, 在肿瘤内释放 CD47 纳米抗体可增强肿瘤浸润性 T 细胞的活性, 显著抑制小鼠肿瘤的生长。该团队进一步在益生菌搭载 SLC, 用来释放程序性细胞死亡配体 1(PD-L1) 和细胞毒性 T 淋巴细胞相关蛋白 4(CTLA-4) 的纳米抗体。在动物实验中, PD-L1 和 CTLA-4 纳米抗体的瘤内释放可以增强 T 细胞的活化水平、增加记忆 T 细胞, 进而引起肿瘤消退。此外, 联合使用释放 PD-L1 纳米抗体、CTLA-4 纳米抗体和粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF) 的细菌菌株比单独或双重使用释放免疫检查点纳米抗体的菌株更为有效<sup>[29]</sup>。

#### 2.6 制造癌症活疫苗

细菌疫苗一直是疫苗学的主要研究领域, 将细菌设计成疫苗来治疗癌症也是一种趋势。日本东京大学医学院的 Kawana 等<sup>[30]</sup>将乳酸杆菌设计成能分泌肿瘤相关抗原(Tumor-Associated Antigen, TAA) 来刺激机体适应性免疫反应。他

们在后续的一项 I/IIa 期临床试验中发现, 含有表达 TAA (HPV16 E7) 的干酪乳杆菌 GLBL101c 的口服疫苗能够使 70% 的宫颈上皮内瘤样病变患者 (从 CIN3 到 CIN1-2) 的症状消退。识别 E7 抗原的初始 T 细胞能够定位于宫颈肿瘤并促使 T 辅助细胞 1 (Th1) 产生<sup>[30-31]</sup>。日本神户大学医学院的 Kitagawa 等<sup>[32]</sup>使用重组长双歧杆菌构建了一种口腔癌疫苗——能表达肾母细胞瘤 1 (WT1) 蛋白, 种植表达 WT1 肿瘤细胞的小鼠经口服给药后, 在为期 4 周的观察中发现, 该疫苗能够诱导 WT1 表位特异性细胞毒性 T 细胞的活性, 并且减缓小鼠肿瘤生长。在随后的研究中, 使用该疫苗和 PD1 抗体联合治疗能够显著抑制肿瘤生长, 延长表达 WT1 的 TRAMP-C2 荷瘤小鼠的生存期<sup>[33]</sup>。

### 2.7 工程菌在联合治疗中的应用

肿瘤内同一器官 (瘤内异质性) 或患者之间 (瘤间异质性) 存在分子和细胞异质性<sup>[34]</sup>。肿瘤内异质性可能是固有的基因组不稳定以及肿瘤微环境中的各成分引起的, 这些成分会引起癌细胞基因型和酚类的变化。此外, 将药物引入肿瘤微环境可能导致肿瘤获得耐药性, 并产生具有不同类型且未确定癌症特征的耐药癌细胞克隆。

癌症单一疗法不能充分解决异质性肿瘤的问题, 因此产生了使用联合疗法的方案来获得更好的治疗效果。组合方案能同时提供多个有效载荷, 可用于不同的癌症标志。例如, EcN 被用来传递 Tum-5-p53 融合蛋白<sup>[35]</sup>。这种方法既可以用 Tum-5 来抑制血管生成, 又能引入 p53 抑癌基因来解决一些癌症特性, 如基因组稳定性、抗凋亡、组织侵袭和转移以及肿瘤相关炎症<sup>[35-36]</sup>。He 等<sup>[35]</sup>设计了 3 种不同的鼠伤寒沙门氏菌菌株, 分别用来表达 hlyE 毒素、CCL21 以及由 Bcl-2 转录抑制因子 1 (Bit1) 的细胞死亡域和凋亡触发因子 (肿瘤穿透肽 iRGD) 组成的融合蛋白。将 3 种菌株的混合物在小鼠身上使用时发现, 与单一菌株的使用相比, 它在抑制肿瘤生长方面具有更强的

效力<sup>[35,37]</sup>。另一种方法是将工程菌和其他常规疗法联合使用, 也可以提高肿瘤的治疗效果。有临床前研究表明, 与细菌单一疗法相比, 向小鼠联合使用表达 ClyA 的鼠伤寒沙门氏菌和放射疗法能在更大程度上抑制肿瘤生长<sup>[15]</sup>。此外, 表达 hlyE 的鼠伤寒沙门氏菌与化疗药物 5-氟尿嘧啶的联合应用能够抑制 MC26-LucF 荷瘤小鼠肿瘤的生长并延长小鼠的生存期<sup>[37]</sup>。Chen 等<sup>[38]</sup>使用鼠伤寒沙门氏菌来传递人源化毒素 DNase I, 其中 DNase I 是一种 DNA 核酸酶, 在细胞凋亡过程中负责 DNA 断裂。该工程菌株与细胞毒性化合物雷公藤内酯醇的联合使用抑制了肿瘤生长并提高了 B16-F10 荷瘤小鼠的存活率。

### 3 工程菌的临床研究进展与面临的挑战

选择合适的动物模型和患者对临床研究至关重要。目前已有一些在临床前研究显示出有疗效的工程菌用于人体的临床试验<sup>[23,39]</sup>。美国马里兰州的一个实验室利用减毒伤寒沙门氏菌株 VNP20009 表达大肠杆菌胞嘧啶脱氨酶, 该菌株在患者肿瘤内将 5-FC (5-fluorocytosine) 转化为 5-氟尿嘧啶 (5-fluorocytosine, 5-FU)<sup>[23,40]</sup>。该研究结果显示, 三位病人中只有两位的肿瘤中有细菌定植和 5-FU 生成。最后由于所有患者的临床反应都未达到预期, 该研究被终止。美国明尼苏达州大学兽医临床科学院在一项兽医犬类临床试验中使用了减毒鼠伤寒沙门氏菌 X4550, 该菌株能够编码 IL-2 (SalpIL2), 然而临床反应并没有达到预期<sup>[6]</sup>。这些研究显示, 临床前研究和实际临床研究的结果存在差异。

鉴于活性菌作为治疗剂的独特性质, 还需要考虑其临床转化的几个重要问题。首先, 携带抗生素抗性基因的细菌可能含有能够介导水平基因转移的质粒等移动遗传元件, 这通常不适合临床研究<sup>[41]</sup>。其次, 与其他小分子等临床

试剂不同, 活细菌或细菌孢子不能通过加热或过滤来灭菌, 这对生产 GMP (Good Manufacture Practice) 级试验制品提出了挑战。此外, 无菌测试的常规需氧和厌氧培养方法是行不通的。因此, 须遵循严格的无菌条件, 在专用洁净室中进行生产, 并且严格监控生产过程的洁净度。虽然不能证明最终产品无杂菌污染, 但需要确认它们不含疾病或病理状况的致病因子。第三, 活细菌在靶组织中增殖, 有效(无论治疗或毒性)剂量与给药时的剂量不一定相关联。有效剂量更多地取决于靶组织的质量, 由细菌的可及性、肿瘤坏死或缺氧的程度以及预先存在的肿瘤浸润性炎症细胞的丰度来定义。这些因素决定了全身施用的细菌如何进入靶组织, 并且是否会引起增殖和感染。第四, 当在临床环境中使用活的生物制剂时, 其对公共健康和环境的潜在影响是一个问题, 需要妥善解决。此外, 使用溶瘤细菌面临的另一个挑战是, 使用溶瘤细菌进行治疗是将肿瘤转变为局部肿瘤破坏性感染, 若管理不当则可能会产生严重后果。由于强感染会产生毒性效应, 所以平衡各种条件尤为重要。过早地使用抗生素预防可限制毒性, 但可能会干预细菌的抗肿瘤作用。而晚期干预具有不可预测的风险。成功控制感染需要跨学科的专家, 包括肿瘤学家、传染病专家和介入放射科医生或外科医生来把控侵入性治疗的脓肿或非脓肿形成感染。因此, 在确定感染后如何进行干预需要跨学科团队来确定。

#### 4 总结与展望

目前癌症的治疗手段还集中在手术、化疗、放疗和免疫治疗, 由于肿瘤本身缺氧、微血管紊乱等微环境, 限制了各种治疗的疗效。细菌治疗的优势在于可以利用自身运动和生长的驱动性, 深入到肿瘤内部。不少研究表明, 细菌通过基因改造后可以作为药物载体、药物疫苗等, 有效治

疗肿瘤。随着科学研究的不断发展, 合成生物学以及各项机理研究不断深入, 利用细菌治疗肿瘤有望成为理想方法, 为癌症治疗带来希望。

#### 参考文献

- [1] Wiemann B, Starnes CO. Coley's toxins, tumor necrosis factor and cancer research: a historical perspective [J]. *Pharmacology & Therapeutics*, 1994, 64(3): 529-564.
- [2] Hopton Cann SA, van Netten JP, van Netten C, et al. Spontaneous regression: a hidden treasure buried in time [J]. *Medical Hypotheses*, 2002, 58(2): 115-119.
- [3] Mowday A, Guise C, Ackerley D, et al. Advancing clostridia to clinical trial: past lessons and recent progress [J]. *Cancers*, 2016, 8(7): 63.
- [4] Coley WB. II. Contribution to the knowledge of sarcoma [J]. *Annals of Surgery*, 1891, 14(3): 199-220.
- [5] Kasinskas RW, Forbes NS. *Salmonella typhimurium* specifically chemotax and proliferate in heterogeneous tumor tissue *in vitro* [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2006, 94(4): 710-721.
- [6] Fritz SE, Henson MS, Greengard E, et al. A phase I clinical study to evaluate safety of orally administered, genetically engineered *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* for canine osteosarcoma [J]. *Veterinary Medicine and Science*, 2016, 2(3): 179-190.
- [7] 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]. *Journal of Clinical Oncology*, 2002, 20(1): 142-152.
- [8] Forbes NS. Engineering the perfect (bacterial) cancer therapy [J]. *Nature Reviews Cancer*, 2010, 10(11): 785-794.
- [9] Yu B, Yang M, Shi L, et al. Explicit hypoxia targeting with tumor suppression by creating an "obligate" anaerobic *Salmonella typhimurium* strain

- [J]. *Scientific Reports*, 2012, 2(1): 436.
- [10] Ho CL, Tan HQ, Chua KJ, et al. Engineered commensal microbes for diet-mediated colorectal-cancer chemoprevention [J]. *Nature Biomedical Engineering*, 2018, 2(1): 27-37.
- [11] Piñero-Lambeck 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 Synthetic Biology*, 2014, 4(4): 463-473.
- [12] Wei C, Xun AY, Wei XX, et al. Bifidobacteria expressing tumstatin protein for antitumor therapy in tumor-bearing mice [J]. *Technology in Cancer Research & Treatment*, 2016, 15(3): 498-508.
- [13] Wood LM, Pan Z, Guirnalda P, et al. Targeting tumor vasculature with novel *Listeria*-based vaccines directed against CD105 [J]. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 2011, 60(7): 931-942.
- [14] Jiang S, Park S, Lee HJ, et al. Engineering of bacteria for the visualization of targeted delivery of a cytolytic anticancer agent [J]. *Molecular Therapy*, 2013, 21(11): 1985-1995.
- [15] Liu X, Jiang S, Piao L, et al. Radiotherapy combined with an engineered *Salmonella typhimurium* inhibits tumor growth in a mouse model of colon cancer [J]. *Experimental Animals*, 2016, 65(4): 413-418.
- [16] Ryan RM, Green J, Williams PJ, et al. Bacterial delivery of a novel cytolysin to hypoxic areas of solid tumors [J]. *Gene Therapy*, 2009, 16(3): 329-339.
- [17] St JA, Swofford CA, Panteli JT, et al. Bacterial delivery of *Staphylococcus aureus* alpha-hemolysin causes regression and necrosis in murine tumors [J]. *Molecular Therapy*, 2014, 22(7): 1266-1274.
- [18] Yamada T, Goto M, Punj V, et al. Bacterial redox protein azurin, tumor suppressor protein p53, and regression of cancer [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99(22): 14098-14103.
- [19] Zhang Y, Zhang Y, Xia L, et al. *Escherichia coli* nissle 1917 targets and restrains mouse B16 melanoma and 4T1 breast tumors through expression of azurin protein [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(21): 7603-7610.
- [20] Lim D, Kim KS, Kim H, et al. Anti-tumor activity of an immunotoxin (TGF $\alpha$ -PE38) delivered by attenuated *Salmonella typhimurium* [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(23): 37550-37560.
- [21] Jia H, Li Y, Zhao T, et al. Antitumor effects of Stat3-siRNA and endostatin combined therapies, delivered by attenuated *Salmonella*, on orthotopically implanted hepatocarcinoma [J]. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 2012, 61(11): 1977-1987.
- [22] Phan T, Nguyen VH, D'Alincourt MS, et al. *Salmonella*-mediated therapy targeting indoleamine 2, 3-dioxygenase 1 (IDO) activates innate immunity and mitigates colorectal cancer growth [J]. *Cancer Gene Therapy*, 2020, 27(3-4): 235-245.
- [23] Duong MT, Qin Y, You S, et al. Bacteria-cancer interactions: bacteria-based cancer therapy [J]. *Experimental & Molecular Medicine*, 2019, 51(12): 1-15.
- [24] Yoon W, Yoo Y, Chae YS, et al. Therapeutic advantage of genetically engineered *Salmonella typhimurium* carrying short hairpin RNA against inhibin alpha subunit in cancer treatment [J]. *Annals of Oncology*, 2018, 29(9): 2010-2017.
- [25] Zhao T, Wei T, Guo J, et al. PD-1-siRNA delivered by attenuated *Salmonella* enhances the antimelanoma effect of pimozide [J]. *Cell Death & Disease*, 2019, 10(3): 164-176.
- [26] Zhao C, He J, Cheng H, et al. Enhanced therapeutic effect of an antiangiogenesis peptide on lung cancer *in vivo* combined with *Salmonella* VNP20009 carrying a Sox2 shRNA construct [J]. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2016, 35(1): 107-118.
- [27] Deng J, Guo Y, Jiang Z, et al. Enhancement of ovarian cancer chemotherapy by delivery of multidrug-resistance gene small interfering RNA using tumor targeting *Salmonella* [J]. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 2015, 41(4):

- 615-622.
- [28] Chowdhury S, Castro S, Coker C, et al. Programmable bacteria induce durable tumor regression and systemic antitumor immunity [J]. *Nature Medicine*, 2019, 25(7): 1057-1063.
- [29] Gurbatri CR, Lia I, Vincent R, et al. Engineered probiotics for local tumor delivery of checkpoint blockade nanobodies [J]. *Science Translational Medicine*, 2020, 12(530): x876.
- [30] Kawana K, Adachi K, Kojima S, et al. Oral vaccination against HPV E7 for treatment of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 (CIN3) elicits E7-specific mucosal immunity in the cervix of CIN3 patients [J]. *Vaccine*, 2014, 32(47): 6233-6239.
- [31] Komatsu A, Igimi S, Kawana K. Optimization of human papillomavirus (HPV) type 16 E7-expressing lactobacillus-based vaccine for induction of mucosal E7-specific IFN $\gamma$ -producing cells [J]. *Vaccine*, 2018, 36(24): 3423-3426.
- [32] Kitagawa K, Oda T, Saito H, et al. Development of oral cancer vaccine using recombinant *Bifidobacterium* displaying Wilms' tumor 1 protein [J]. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 2017, 66(6): 787-798.
- [33] Kitagawa K, Gonoï R, Tatsumi M, et al. Preclinical development of a WT1 oral cancer vaccine using a bacterial vector to treat castration-resistant prostate cancer [J]. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2019, 18(5): 980-990.
- [34] Tellez-Gabriel M, Ory B, Lamoureux F, et al. Tumour heterogeneity: the key advantages of single-cell analysis [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17(12): 2142-2161.
- [35] He L, Yang H, Tang J, et al. Intestinal probiotics *E. coli* Nissle 1917 as a targeted vehicle for delivery of p53 and Tum-5 to solid tumors for cancer therapy [J]. *Journal of Biological Engineering*, 2019, 13(1): 58-71.
- [36] Solomon H, Madar S, Rotter V. Mutant p53 gain of function is interwoven into the hallmarks of cancer [J]. *The Journal of Pathology*, 2011, 225(4): 475-478.
- [37] Din MO, Danino T, Prindle A, et al. Synchronized cycles of bacterial lysis for *in vivo* delivery [J]. *Nature*, 2016, 536(7614): 81-85.
- [38] Chen T, Zhao X, Ren Y, et al. Triptolide modulates tumour-colonisation and anti-tumour effect of attenuated *Salmonella* encoding DNase I [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103(2): 929-939.
- [39] Zhou S, Gravekamp C, Bermudes D, et al. Tumour-targeting bacteria engineered to fight cancer [J]. *Nature Reviews Cancer*, 2018, 18(12): 727-743.
- [40] 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 Therapy*, 2003, 10(10): 737-744.
- [41] Mignon C, Sodoyer R, Werle B. Antibiotic-free selection in biotherapeutics: now and forever [J]. *Pathogens*, 2015, 4(2): 157-181.