

文章编号: 1004-0374(2009)03-0452-04

· 技术与应用 ·

肿瘤生物治疗的新方法——减毒鼠伤寒沙门菌的应用

冉 茜, 胡昌华*

(西南大学药学院, 重庆 400715)

摘要: 减毒鼠伤寒沙门菌由于具有肿瘤靶向性, 能在肿瘤组织中复制并产生抗肿瘤效果的能力, 使肿瘤治疗获得了新契机。减毒鼠伤寒沙门菌作为细菌载体使目的基因在肿瘤组织内特异表达, 表现出良好治疗效果。近期研究发现, 单独使用突变后的菌株 A1-R 在裸鼠模型上治疗乳腺癌和前列腺癌分别可达到 40% 和 50% 的治愈率; 在小鼠肿瘤转移模型中也展现出良好的治疗效果。鼠伤寒沙门菌作为肿瘤治疗制剂有诱人的前景。本文就这些研究的最新进展做一综述。

关键词: 减毒鼠伤寒沙门菌; 活载体疫苗; 基因治疗; 细菌疗法

中图分类号: Q813; R691 **文献标识码:** A

New approach of biotherapy for cancer—application of attenuated *Salmonella typhimurium*

RAN Qian, HU Chang-hua*

(School of Pharmaceutical Science, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract: Considering its tumor targeting, replication in tumor tissues and anti-tumor effects, attenuated *Salmonella typhimurium* has offered a new approach to tumor therapy. As a anti-tumor bacteria vector, *S. typhimurium* made gene express specifically in tumor tissue which showed the optimistic curative effect. Recent research revealed that the cure rate of the breast and prostate cancer in athymic mouse were up to 40% or 50% when a mutant of *S. typhimurium* A1-R was treated alone. It also showed a satisfactory treatment effect in the mouse tumor metastasis model. *S. typhimurium* has been the hot pot in the tumor research in recent years for its attractive prospects in tumor therapy. This article mainly reviewed the recent progress of *S. typhimurium* in tumor biotherapy.

Key words: attenuated *Salmonella typhimurium*; live vector vaccine; gene therapy; bacteria therapy

自 20 世纪 40 年代以来, 人们陆续注意到一些厌氧菌可在肿瘤坏死区选择性繁殖生长, 并且导致肿瘤细胞死亡、肿瘤坏死区扩大乃至肿瘤消退, 利用活菌治疗肿瘤的设想就随之产生^[1]。细菌治疗一直受限于其安全问题, 直到获得多种沙门菌属、梭菌属的减毒株后, 利用减毒菌, 尤其是鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*) 作为生物载体^[2,3]、联合化疗^[4]以及单独使用减毒细菌治疗肿瘤的研究才得以大量开展, 并展现出良好的应用前景。鼠伤寒沙门菌作为抗肿瘤制剂研究被广泛研究, 是因为它在安全性、易于侵入、呈递目的基因方式、肿瘤靶

向性、生长区域等方面都具有显著优势^[5]。鼠伤寒沙门菌的全基因组序列已经清楚, 这为降低其致病性和提高抗肿瘤活性创造了有利条件^[6]。巨噬细胞是鼠伤寒沙门菌的天然靶点, 它很容易随巨噬细胞进入肿瘤组织内繁殖; 而肿瘤组织内缺少中性粒细胞使其更容易在肿瘤组织中积累^[7]。鼠伤寒沙门菌还可以将目的基因直接运送到抗原递呈细胞, 是递

收稿日期: 2008-12-02; 修回日期: 2009-02-17

基金项目: 重庆市科技攻关项目 CSTC2009AB2009

*通讯作者: E-mail: chhu@swu.edu.cn

呈核酸疫苗的良好载体^[8]。由于其兼性厌氧,能够在肿瘤坏死区域和生长区域繁殖并引起肿瘤细胞溶解,这为直接使用活菌治疗肿瘤提供可能。另外,鼠伤寒沙门菌还具有易培养、能口服、能长期使用、有免疫佐剂效应、可表达多种蛋白等优势。

1 鼠伤寒沙门菌减毒株的制备

鼠伤寒沙门菌是一种常见的动物肠道寄生菌,有一定的致病性,同时用于抗肿瘤治疗研究的菌株必须是减毒的,而且在提高安全性的同时,保留甚至增加其肿瘤靶向性。

传统的减毒方法是通过紫外、化学诱变的方法,如耶鲁大学的Pawelek等^[9]通过紫外和化学联合诱变后在肿瘤细胞和小鼠体内筛选的方法获得具有高亲肿瘤性和低毒性的鼠伤寒沙门菌;但是这种方法具有明显的局限:方法相对繁琐、盲目,容易回复突变,而且容易导致免疫原性的丧失。通过基因重组技术突变掉与细菌致病力和感染力密切相关的基因能够更快获得更稳定的减毒株,如芳香族氨基酸合成相关的 *aroA* 基因缺失的减毒株 SL 7207、SL 3235、WR4017 等;与编码腺苷酸环化酶相关的 *cya*、*crp* 基因缺失的菌株 X4064、X4990 等;与编码腺苷酸甲基化酶相关的 *dam* 基因缺失的菌株 ZJ III;参与嘌呤代谢的基因 *purI* 与 *msbB* 基因缺失的菌株 VNP20009 等,但并不是所有致病基因都可以作为减毒基因,如敲除其基因组中致病岛 2 (SPI2) 就可使细菌丧失抗肿瘤活性。

2 鼠伤寒沙门菌作为抗肿瘤基因载体的研究

减毒鼠伤寒沙门菌的靶向肿瘤和能将基因直接递呈至 APC 的特性,使得其成为优良的基因传递载体。一些与抑制肿瘤相关的基因通过鼠伤寒沙门菌介导在人或动物模型肿瘤组织中特异表达,取得良好的治疗效果。

一些细胞因子,如 IL-2、INF、TNF 的抗肿瘤研究已经获得不少成功,但其毒副作用和需长时间大量给药以维持浓度,从而影响其临床应用。目前研究集中在通过靶向载体介导细胞因子在肿瘤细胞内表达,鼠伤寒沙门菌是最佳选择之一。LIGHT 是 TNF 家族的一个细胞因子,在多种上皮癌中表达。带有人 LIGHT 基因 cDNA 序列质粒的减毒鼠伤寒沙门菌在肿瘤组织中富集并表达 LIGHT,在小鼠模型上能有效抑制原发性乳腺癌、结肠癌乃至转移性肺癌。同样,载有 *FasL* 和 *IL-18* 基因的减毒鼠伤寒沙门菌也被证实有显著的抗肿瘤效果^[10]。Sorenson 等^[11]发

现,在小鼠骨肉瘤肺转移模型中注射携带 IL-2 基因的菌减毒株 γ 4550,可大幅减少肺转移瘤的数量和体积,并发现这与 NK 细胞数量显著上升有关。通过减毒鼠伤寒沙门菌在肿瘤组织表达细胞因子,可以长时间维持蛋白浓度却不会带来全身性副反应;还可以提高一些生长因子的抗肿瘤效果,如 Flt3 配体通过鼠伤寒沙门菌表达可提高体外对肿瘤细胞的杀伤和体内抗肿瘤的能力^[12,13]。

肿瘤特异抗原是良好的肿瘤免疫治疗靶点,尽管已经开展大量实验,但仅有极少数有临床应用前景。通过鼠伤寒沙门菌表达一些特殊抗原也能获得很好的抗肿瘤效果。寻找新的特异抗原和更适宜的载体是当前研究的热点,显然鼠伤寒沙门菌是最好的抗原递呈载体之一。乙型肝炎病毒 x 蛋白 (hepatitis B virus x protein, HBx) 在 HBV 诱导的原发性肝细胞肝癌发展中起重要作用^[14], Wang 等^[15]用携带 HBx 基因的鼠伤寒沙门菌免疫小鼠后,再通过注射表达 HBx 的黑色素瘤细胞建立动物模型,发现免疫后的小鼠肿瘤生长受到明显的抑制。C-Raf 蛋白在多种肿瘤中高表达,是肿瘤免疫治疗的潜在靶点。Gentschev 等^[16]用带有 C-Raf 基因的鼠伤寒沙门菌治疗 C-Raf 过表达诱发的肺腺癌能显著延长实验小鼠生存期。前列腺特异性抗原 (prostate-specific antigen, PSA) 与前列腺癌高度相关, Fensterle 等^[17]构建表达 PSA 和霍乱毒素 B 亚单位 (cholera toxin subunit B) 的鼠伤寒沙门菌用于免疫小鼠,发现能明显抑制肿瘤生长。NY-ESO-1 是用于临床疫苗实验的癌-睾丸抗原 (cancer-testis antigens, 即 CT 抗原) 之一, Nishikawa 等^[18]发现表达 NY-ESO-1 的鼠伤寒沙门菌疫苗在小鼠体内能够使表达 NY-ESO-1 的肿瘤消退。这些抗肿瘤作用都与细胞毒性 T 细胞水平显著上升有关,而鼠伤寒沙门菌能够刺激天然免疫系统,提高肿瘤抗原的抗肿瘤效果,是活菌疫苗的最佳选择。

鼠伤寒沙门菌具有高度的肿瘤靶向性,是 RNA 干扰和自杀基因的良好靶向载体。RNAi 治疗的关键问题是 RNA 片段不能到达有效部位和达到有效剂量, Zhang 等^[19]在小鼠前列腺模型中证实,鼠伤寒沙门菌可以运载 siRNA 片段深入肿瘤内部并抑制肿瘤的生长和转移。自杀基因表达产物可将无毒的前药转化为抗肿瘤药物,但若全身表达会带来毒副作用。King 等^[20]给结肠癌小鼠注射含大肠杆菌胞嘧啶脱氨酶 (cytosine deaminase, CD) 基因的鼠伤寒沙门

菌,同时腹腔注射前药5氟胞嘧啶(5-fluorocytosine, 5-FC),发现仅有肿瘤组织中可检测到5-FC的转化产物5氟尿嘧啶(5-fluorouracil,5-FU),并对肿瘤的生长有明显的抑制作用。

3 鼠伤寒沙门菌抗肿瘤作用

鼠伤寒沙门菌作为肿瘤基因治疗载体的研究已经取得不少进展,其自身抗肿瘤的能力也逐渐显示出良好的应用前景。

鼠伤寒沙门菌以及其他一些厌氧菌主要在肿瘤坏死区生长,对肿瘤的生长有一定的抑制作用,如Low对荷黑色素瘤小鼠以*msbB*减毒鼠伤寒沙门菌治疗后,发现肿瘤生长受到抑制等^[21,22]。不能到达肿瘤组织内部和进入静止期肿瘤细胞是肿瘤治疗的关键问题。Zhao等^[23]对鼠伤寒沙门菌诱变后获得一株亮氨酸和精氨酸双缺陷的营养缺陷型菌株A1,具有很强的抗肿瘤活性。通过荧光蛋白标记细菌,在体外细胞实验中可以观察到A1能够侵入人前列腺癌PC-3细胞并在细胞中富集,引起细胞核裂解,最终导致肿瘤细胞凋亡。在裸鼠体内实验发现,A1能抑制肿瘤生长引起肿瘤消退,并在15-26d时完全消失,可能与其营养缺陷表型相关,A1能在营养丰富的肿瘤组织中大量繁殖生长,而在正常组织中两周内被完全清除。为进一步提高A1的抗肿瘤能力,Zhao等^[24]通过尾静脉将A1注射到结肠癌裸鼠模型,3d后将组织分离并用PBS稀释后在LB平板上涂板,选取表达绿色荧光蛋白最强的菌株,筛选出活力最强的菌株命名为A1-R。A1-R较亲本A1对肿瘤的黏连性增强了6倍左右,很难将其从肿瘤组织上洗脱出来,在肿瘤组织中的侵蚀范围也更广。用A1-R治疗荷人前列腺PC-3瘤裸鼠,40%的荷瘤小鼠被完全治愈,能够显著抑制肿瘤转移和延长裸鼠生存期^[25]。在A1-R用于治疗荷人MARY-X乳腺癌裸鼠模型的实验发现,A1-R具有更好的靶向性,在肿瘤血管区富集,随之破坏非坏死区,治愈率达到50%,治疗效果远好于A1^[26]。A1-R还在人肉瘤肺转移小鼠模型、人骨癌和继发性肺转移小鼠模型等展示出良好的治疗效果;在正常裸鼠中注射A1-R后在14-15d时在体内被完全清除,而注射野生型鼠伤寒沙门菌的裸鼠则在2d内全部死亡,动物实验表明A1-R对宿主没有明显毒性。相比仅在肿瘤坏死区域生长、仅能够减缓肿瘤生长速度的厌氧菌,一些鼠伤寒沙门菌株能够进入肿瘤静止期细胞、在肿瘤非坏死区富集并导致肿瘤完全消退,

具有巨大的开发潜力。

尽管如此,鼠伤寒沙门菌的临床应用还有待研究的进一步深入。首先,一些表现出良好抗肿瘤效果的菌株还可能存在着安全性问题,如A1和A1-R由野生菌株诱变得来,一旦发生回复突变将会产生不良的后果,而且可能使其抗肿瘤能力丧失。因此,得到安全性高、遗传稳定的高抗肿瘤活性菌株是研究的关键。其次,鼠伤寒沙门菌的肿瘤靶向性和抗肿瘤能力的机理尚不清楚。对于其肿瘤靶向性,Kasinskas等^[26]认为与肿瘤组织特殊分泌物和细菌趋化性有关。Arrach等^[27]证实细菌在肿瘤内繁殖与特异启动子在肿瘤内被激活相关。Zhao等^[23]认为A1和A1-R的抗肿瘤能力与其营养缺陷相关。但这些都仅从一个方面解释鼠伤寒沙门菌对某种肿瘤细胞靶向性的原因,因此还需要进一步系统而全面地阐明其机制。

4 展望

鼠伤寒沙门菌具有良好的安全性、肿瘤靶向性、兼性厌氧、直接将目的基因递呈至APC细胞等优势,已经有一些方案进入临床研究。VNP20009在转移黑色素瘤患者中做临床I期实验证实其具有较高的肿瘤靶向性和安全性^[28]。A1-R能够侵入肿瘤非坏死区域,使肿瘤完全消退,甚至能治愈前列腺癌和乳腺癌等不同肿瘤。若能验证其安全性和稳定性,A1-R将是最理想的肿瘤治疗生物药。靶向性更强毒性更小的菌株和更加有效的目的基因将会为肿瘤治疗带来新的希望。随着研究的进一步深入,鼠伤寒沙门菌将会为肿瘤治疗带来一种更为安全、有效、方便的新制剂。

[参 考 文 献]

- [1] Parker RC, Plummer HC, Siebenmann CO, et al. Effect of histolytic infection and toxin on transplantable mouse tumors. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1947, 66(2): 461-7
- [2] Yazawa K, Fujimori M, Nakamura T, et al. Bifidobacterium longum as a delivery system for gene therapy of chemically induced rat mammary tumors. *Breast Cancer Res Treat*, 2001, 66(2): 165-70
- [3] Clairmont C, Lee KC, Pike J, et al. Biodistribution and genetic stability of the novel antitumor agent VNP20009, a genetically modified strain of *Salmonella typhimurium*. *J Infect Dis*, 2000, 181(6): 1996-2002
- [4] Dang LH, Bettgowda C, Huso DL, et al. Combination bacteriolytic therapy for the treatment of experimental tumors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(26): 15155-60
- [5] Bermudes D, Zheng LM, King IC. Live bacteria as anticancer agents and tumor-selective protein delivery vectors. *Curr*

- Opin Drug Discov Dev, 2002, 5(2): 194-9
- [6] Low KB, Ittensohn M, Le T, et al. Lipid A mutant *Salmonella* with suppressed virulence and TNF α induction retain tumor-targeting *in vivo*. Nat Biotechnol, 1999, 17: 37-41
- [7] Yu Y, Shabahang S, Timiryasova TM, et al. Visualization of tumors and metastases in live animals with bacteria and vaccinia virus encoding light-emitting proteins. Nat Biotechnol, 2004, 22(3): 313-20
- [8] Darji A, Carlos A, Guzm AN. Oral somatic transgene vaccination using attenuated *S. typhimurium*. Cell, 1997, 91(6): 766-75
- [9] Pawelek JM, Low KB, Bermudes D. Tumor-targeted *Salmonella* as a novel anticancer vector. Cancer Res, 1997, 57(20): 4537-44
- [10] Loeffler M, Le'Negrate G, Krajewska M, et al. Attenuated *Salmonella* engineered to produce human cytokine LIGHT inhibit tumor growth. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(31): 12879-83
- [11] Sorenson BS, Banton KL, Frykman NL, et al. Attenuated *Salmonella typhimurium* with IL-2 gene reduces pulmonary metastases in murine osteosarcoma. Clin Orthop Relat Res, 2008, 466(6): 1285-91
- [12] Sang H, Pisarev VM, Chavez J, et al. Murine mammary adenocarcinoma cells transfected with p53 and/or Flt3L induce antitumor immune responses. Cancer Gene Ther, 2005, 12(4): 427-37
- [13] Yoon WS, Choi WC, Sin JI, et al. Antitumor therapeutic effects of *Salmonella typhimurium* containing Flt3 ligand expression plasmids in melanoma-bearing mouse. Biotechnol Lett, 2007, 29(4): 511-6
- [14] Tang H, Oishi N, Kaneko S, et al. Molecular functions and biological roles of hepatitis B virus x protein. Cancer Sci, 2006, 97(10): 977-83
- [15] Wang YJ, Hou Y, Huang H, et al. Two oral HBx vaccines delivered by live attenuated *Salmonella*: both eliciting effective anti-tumor immunity. Cancer Lett, 2008, 263(1): 67-76
- [16] Gentschev I, Fensterle J, Schmidt A, et al. Use of a recombinant *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* strain expressing C-Raf for protection against C-Raf induced lung adenoma in mice. BMC Cancer, 2005, 5: 15
- [17] Fensterle J, Bergmann B, Yone CL, et al. Cancer immunotherapy based on recombinant *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* Δ strains secreting prostate-specific antigen and cholera toxin subunit B. Cancer Gene Ther, 2008, 15(2): 85-93
- [18] 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 Clin Invest, 2006, 116(7): 1946-54
- [19] Zhang L, Gao LF, Zhao LJ, et al. Intratumoral delivery and suppression of prostate tumor growth by attenuated *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* carrying plasmid-based small interfering RNAs. Cancer Res, 2007, 67(12): 5859-64
- [20] King I, Bermudes D, Lin S, et al. Tumor-targeted *Salmonella* expressing cytosine deaminase as an anticancer agent. Hum Gene Ther, 2002, 13(10): 1225-33
- [21] Pawelek JM, Low KB, Bermudes D. Tumor-targeted *Salmonella* as a novel anticancer vector. Cancer Res, 1997, 57(20): 4537-44
- [22] Zhao M, Yang M, Li XM, et al. Tumor-targeting bacterial therapy with amino acid auxotrophs of GFP-expressing *Salmonella typhimurium*. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(3): 755-60
- [23] 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. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(24): 10170-4
- [24] Zhao M, Yang M, Ma H, et al. Targeted therapy with a *Salmonella typhimurium* leucine-arginine auxotroph cures orthotopic human breast tumors in nude mice. Cancer Res, 2006, 66(15): 7647-52
- [25] Kasinskas RW, Forbes NS. *Salmonella typhimurium* lacking ribose chemoreceptors localize in tumor quiescence and induce apoptosis. Cancer Res, 2007, 67(7): 3201-9
- [26] Kasinskas RW, Forbes NS. *Salmonella typhimurium* specifically chemotax and proliferate in heterogeneous tumor tissue *in vitro*. Biotechnol Bioeng, 2006, 94(4): 710-21
- [27] Arrach N, Zhao M, Porwollik S, et al. *Salmonella* promoters preferentially activated inside tumors. Cancer Res, 2008, 68(12): 4827-32
- [28] 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 Clin Oncol, 2002, 20(1): 142-52