

DOI: 10.13376/j.cbls/2023034

文章编号: 1004-0374(2023)03-0267-10



孙逊, 四川大学华西药学院教授、博士生导师, 药剂学系主任, 国家杰出青年科学基金获得者, 国家药典委员会委员, 英国皇家学会牛顿高级学者, 四川省学术和技术带头人, 中国药学会药剂专业委员会委员, 美国基因和细胞治疗协会官方杂志 *Molecular Therapy* (IF = 12.910) 副主编, 国际药物控释协会官方杂志 *Journal of Controlled Release* (IF = 11.467) 副主编。主要研究方向为疫苗和核酸的高效递释系统及药物的靶向传递。主持国家级及省部级课题 12 项, 主持玛丽居里欧盟第七框架项目等国际合作项目 3 项。以通讯作者在 *Science Advances* 等权威期刊发表 SCI 论文 100 余篇。获国家科技进步奖二等奖、四川省科技进步奖一等奖、四川省青年科技奖、树兰医学青年奖等荣誉。

## 细菌与免疫疗法联用的抗肿瘤策略

陈雯霏<sup>1,2</sup>, 何春婷<sup>2</sup>, 张志荣<sup>2</sup>, 孙 逊<sup>2\*</sup>

(1 四川大学华西医院药剂科, 代谢疾病与药物治疗研究所, 成都 610041;

2 四川大学华西药学院, 靶向药物及释药系统教育部重点实验室, 成都 610064)

**摘要:** 利用细菌作为一种癌症治疗手段已有较长的历史。随着对肿瘤微环境和免疫机制等相关问题的不断探究, 细菌疗法已逐渐发展成为一种平台技术, 为肿瘤的免疫治疗开辟了新策略、新潜能。某些细菌依靠其自身特性, 能够特异性靶向肿瘤组织, 不仅对肿瘤生长产生直接抑制作用, 还能刺激机体产生固有和适应性免疫应答, 从而显著提升抗肿瘤治疗的疗效, 甚至有助于解决转移性肿瘤等难题。通过基因工程技术, 从基因水平上调控细菌的分子机制来定制其生物功能, 高效递送各种免疫治疗剂至肿瘤病灶处而发挥作用, 达到精确调控、有效激活的目的, 这是其他药物传递系统所无法比拟的。此外, 肿瘤靶向型细菌介导的治疗方案既可作为单一疗法应用, 也可与其他治疗方式如化疗、放疗和光热治疗等联合, 以获得更佳的临床治疗结果。因此, 该文主要讨论了活细菌发挥肿瘤靶向性和抗肿瘤免疫作用的关键, 总结了生物工程菌用于免疫治疗的相关研究及其与其他治疗方式联合应用的优势, 为细菌疗法的进一步研究与发展提供依据。

**关键词:** 细菌疗法; 免疫治疗; 生物工程菌; 药物传递载体; 联合治疗策略

中图分类号: Q939.91 文献标志码: A

## Synergistic strategy of bacteria and immunotherapy against tumors

CHEN Wen-Fei<sup>1,2</sup>, HE Chun-Ting<sup>2</sup>, ZHANG Zhi-Rong<sup>2</sup>, SUN Xun<sup>2\*</sup>

(1 Department of Pharmacy, Institute of Metabolic Diseases and Pharmacotherapy, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2 Key Laboratory of Drug-Targeting and Drug Delivery System of the Education Ministry, West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

**Abstract:** Using bacteria as a treatment for cancers has a long history. With the continuous exploration of the tumor microenvironment and immune system, bacterial therapy develops into a platform technology, which opens up new

收稿日期: 2022-09-21

基金项目: 国家杰出青年科学基金项目(81925036); 国家自然科学基金青年科学基金项目(82204286)

\*通信作者: E-mail: sunxun@scu.edu.cn

strategies and potentials for medical immunotherapy. Depending on their own characteristics, certain bacteria specifically target tumor tissues, directly inhibit tumor growth, and also stimulate both innate and adaptive immune responses, thus significantly improving the antitumor efficacy and even helping to solve severe problems such as metastatic tumors. Through genetic engineering technology, the molecular mechanism of bacteria can be regulated at the gene level to customize their biological function, and various therapeutic immuno-agents can be efficiently delivered into the tumor lesions, so as to achieve the purpose of precise regulation and effective activation, of which is unmatched by other drug delivery systems. In addition, the tumor-targeted bacteria-mediated treatment can be used either as monotherapy or in combination with other treatment modalities such as chemotherapy, radiotherapy, and photothermal therapy to gain more promising clinical results. This review mainly discusses the key to the tumor-targeting and antitumor immune effects of live bacteria, summarizes the related studies of bioengineered bacteria for immunotherapy and their advantages when cooperated with other therapeutic modalities, thereby providing a basis for the further research and development of bacterial therapy.

**Key words:** bacterial therapy; immunotherapy; bioengineered bacteria; drug delivery carriers; combined treatment strategy

肿瘤免疫治疗 (immunotherapy) 是一种通过刺激机体免疫系统, 特别是激活肿瘤微环境中的免疫细胞来抑制、杀伤肿瘤细胞的治疗模式<sup>[1]</sup>。近年来, 越来越多的临床数据显示免疫治疗对多种恶性肿瘤有良好的疗效, 引发了科学家们对于该研究领域的浓厚兴趣<sup>[2-3]</sup>。目前最显著的治疗策略集中在, 通过免疫检查点抑制剂或者过继性细胞免疫疗法如嵌合抗原受体 T 细胞免疫疗法等, 来增强 T 淋巴细胞的抗肿瘤免疫效果, 从而达到清除肿瘤细胞的目的<sup>[4-5]</sup>。其中, 已被证实安全、有效的免疫检查点抑制剂主要包括: 程序性死亡受体-1/程序性死亡配体-1 (programmed cell death 1/programmed cell death-ligand 1, PD-1/PD-L1) 抑制剂和细胞毒性 T 淋巴细胞相关蛋白 4 (cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4, CTLA-4) 抑制剂, 它们尤其是能够对晚期转移性癌症起到更持久的治疗效果<sup>[6]</sup>。尽管这些免疫治疗策略在临床前动物试验上已取得了成功, 部分相关产品也已获得美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 或中国国家药品监督管理局 (National Medical Products Administration, NMPA) 批准上市用于临床, 但仍有许多患者未能从中获益<sup>[7]</sup>。临床应用疗效不佳通常与肿瘤抗原性低及其缺乏免疫细胞浸润有关, 导致这类肿瘤对大多数免疫治疗方案均不敏感<sup>[8]</sup>。因此, 科学家们正在作出巨大的努力与探索, 以开发使肿瘤组织对免疫疗法更为敏感、有效的策略。而肿瘤靶向型细菌为克服免疫治疗所提出的挑战性问题的另一种研究思路, 因为它们不仅能够依靠自身特性实现对肿瘤组织的高效靶向, 而且可以诱导强大的瘤内炎症反应, 以激活机体一系列的抗肿瘤免疫应答<sup>[9-12]</sup>。

既往的研究表明, 天然细菌感染可以诱导产生对恶性肿瘤的抑制作用<sup>[13]</sup>。虽然早在 1813 年, Vautier 就在感染产气荚膜梭状芽孢杆菌的癌症患者身上观测到肿瘤消退的现象, 但直至 19 世纪末, 德国科学家 Busch 和 Fehleisen 以及随后的美国医生 William B. Coley 才开启对细菌治疗的系统性研究<sup>[12, 14]</sup>。Coley 医生将细菌注射到患者体内, 通过激活免疫细胞来控制肿瘤的生长, 开创了细菌介导的肿瘤免疫治疗的新篇章<sup>[15-16]</sup>。然而, 在这些早期研究中, 并没有人考虑利用细菌菌株作为载体, 将治疗性药物携带至肿瘤组织中。后来, 由于科学家们的关注力逐渐转移到了当时更为新颖的放射性治疗上, 因而利用细菌治疗癌症的进一步探究受到了限制。直至 20 世纪 90 年代中期, 当科学界对肿瘤微环境开始有了更深入的了解, 同时基因工程技术的出现使产生更强效、毒性更小的菌株成为可能时, 利用细菌来治疗癌症的研究热情又重新被点燃<sup>[17]</sup>。其中一个成功开发的例子是使用 Bacillus Calmette-Guerin (BCG) 即卡介苗来治疗膀胱癌<sup>[18-19]</sup>。卡介苗是一种来源于牛型结核分枝杆菌的减毒菌株, 最初生产作为结核病疫苗。于 20 世纪 70 年代, 卡介苗首次经膀胱内注射用于临床, 自此成为膀胱移行细胞癌的重要治疗选择之一。通常我们认为卡介苗的治疗作用主要归功于其免疫调节活性, 同时也揭示了细菌与免疫疗法之间密不可分的联系。

尽管目前已有多项细菌介导的癌症治疗方案正在进行 I、II 期临床试验, 但由于活细菌潜在的感染相关毒性和未知的长期毒性等问题, 其作为免疫治疗药物的临床开发还面临着严峻的考验。因此, 在这篇综述中, 我们将根据肿瘤微环境和细菌本身

的特点, 来讨论活细菌发挥肿瘤靶向性和抗肿瘤免疫作用的关键因素; 同时, 以一些研究广泛的细菌类型如沙门氏菌、大肠杆菌和李斯特菌为例, 总结生物工程菌用于免疫治疗的相关研究。接着, 我们将讨论细菌与其他癌症治疗方式如化学治疗、放射治疗和光热治疗相联合的研究特色与应用优势。最后, 随着越来越多的治疗性菌株已进展到临床阶段, 我们也将讨论其应用前景及有待解决的实际问题, 为细菌与免疫疗法联用的抗肿瘤策略提供更多的借鉴思路。

## 1 活细菌自身抗肿瘤性能的发挥

### 1.1 细菌高效靶向肿瘤组织

肿瘤组织的血管系统通常是杂乱不规则的, 导致实体瘤内的某些区域缺乏氧气和营养物质。这些乏氧区域内的癌细胞仍能存活, 同时也极有可能成为化疗或放疗后病症容易复发的原因之一, 例如通过系统递送的化疗药物难以抵达肿瘤核心的乏氧区域, 有效的放疗需要氧气供应才能达到目标<sup>[9, 20]</sup>。此外, 低氧水平会影响体内免疫细胞的相关功能, 导致实体瘤的免疫逃逸现象。然而有趣的是, 正是肿瘤内存在这些缺氧、坏死区域, 为细菌的定植提供了关键的生态环境<sup>[21]</sup>。

与纳米递送系统利用尺度大小被动靶向肿瘤不同, 细菌利用独特的机制靶向实体瘤。1955年, 科学家 Malmgren 和 Flanigan 验证了细菌经系统性注射后能够在肿瘤组织内实现特异性的定位<sup>[22]</sup>。研究表明, 这种选择性定植能力的实现主要依靠厌氧菌, 如梭状芽孢杆菌和双歧杆菌等对实体肿瘤内部缺氧和坏死区域的亲和力; 而兼性厌氧菌株, 如沙门氏菌、大肠杆菌和李斯特菌等, 除了拥有以上特点外, 还被认为对坏死肿瘤组织中大量存在的营养物质具有生存依赖性, 有助于其靶向肿瘤的效力<sup>[23]</sup>。

在此需要指出的一个现象是, 尽管沙门氏菌已被证实优先进入或蓄积在富含某些代谢产物的肿瘤微环境中, 但最初到达肿瘤组织的细菌数量并不比分布于正常组织的细菌数量多<sup>[24]</sup>。然而, 体液循环中的细菌和正常组织中的细菌分别将在数小时和数天内被清除, 而肿瘤组织内的细菌则会继续增殖, 其数量将大大超过最初给予的菌落形成单位 (colony-forming units, CFUs), 最终使细菌在肿瘤内持续发挥抗肿瘤治疗效果。另据报道称, 李斯特菌不仅感染专职抗原提呈细胞 (antigen-presenting cells, APCs), 如单核细胞、巨噬细胞和树突状细胞, 而

且能够感染骨髓来源的抑制细胞 (myeloid-derived suppressor cells, MDSCs)<sup>[25]</sup>。细菌可以被 MDSCs 选择性递送至肿瘤微环境, 并扩散到肿瘤细胞而发挥作用。随着基因工程技术的发展, 我们也可以通过基因改造兼性厌氧菌来使其在正常组织中的生存能力进一步降低, 进而提高靶向效率、降低毒性<sup>[26]</sup>。

### 1.2 细菌激活抗肿瘤免疫的途径

局部的细菌感染通过各种机制导致肿瘤消退。首先, 细菌具有内在的抗肿瘤活性, 而不同种类的细菌菌株或在不同微环境中的细菌抑制肿瘤生长的强度存在一定差异性。除了其本身的抗肿瘤作用外, 细菌能够诱导机体产生固有和适应性免疫反应。尤其是沙门氏菌、大肠杆菌等对肿瘤细胞没有足够细胞毒性的细菌菌株, 其诱导宿主产生的抗肿瘤免疫应答对于治疗效果十分关键<sup>[12, 27]</sup>。有研究表明, 细菌能够打破肿瘤组织内的免疫耐受, 促进系统对肿瘤抗原的识别; 能够刺激多种促炎途径, 在增强对不同类型癌症的抗肿瘤免疫应答方面具有重要的前景<sup>[28]</sup>。

人体在感染细菌的最初阶段, 大量免疫细胞被招募到感染部位, 引发局部炎症反应。吞噬细胞上的 Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLRs) 或核苷酸结合寡聚化结构域样受体 (nucleotide binding oligomerization domain-like receptors, NLRs) 可以识别存在于细菌内部和细菌表面的病原体相关模式分子 (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs), 包括脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS)、非甲基化寡核苷酸 CpG DNA 和鞭毛蛋白等生物分子<sup>[29-30]</sup>。一旦这些信号通路被触发, 先天免疫细胞启动促炎细胞因子的分泌和细菌的吞噬; 并经过结合主要组织相容性复合体 (major histocompatibility complex, MHC) 呈递到适应性免疫细胞, 产生针对识别抗原的细胞和体液免疫应答<sup>[31]</sup>。例如, 系统性或局部注射减毒菌株能够通过多种方式使免疫“冷”肿瘤转变为“热”肿瘤, 其机制主要包括对肿瘤微环境的免疫调节作用, 导致免疫抑制性细胞减少, 同时增加相关促炎因子的分泌以及效应 T 淋巴细胞在肿瘤组织内的浸润<sup>[32]</sup>。

总的来说, 细菌可以有效地刺激机体免疫系统, 并已成功应用于大量的疫苗设计和研究当中。我们通常在设计免疫治疗方案时需要考虑三方面问题的平衡: 将治疗物质运输到目标免疫细胞、可控的免疫调控作用以及不影响治疗功能的制剂安全性<sup>[33]</sup>。因此, 可以依靠新兴的基因工程技术, 以多种不同的方式进一步提高细菌自身的抗肿瘤活

性,使其成为一种多功能平台,根据临床需求来传递治疗药物。

## 2 构建生物工程菌以用于抗肿瘤免疫治疗

基因工程技术的应用一开始主要是为了降低肿瘤靶向型细菌的体内毒性和免疫原性<sup>[34]</sup>。紧接着,更多研究者发现利用类似的基因改造手段,可以将肿瘤靶向型细菌转化为药物传递载体,有目的地将蛋白质或核酸输送至肿瘤部位<sup>[35]</sup>。自此以后,各种生物工程菌被研发用作运载治疗性物质的递送系统,以应对不同类型的癌症病理情况。

近年来,细菌传递的与免疫治疗相关的治疗剂主要包括细胞因子、趋化因子、鞭毛蛋白、相关抗原和抗体等<sup>[28,36]</sup>。基因工程技术和合成生物学的快速发展,为科学家们开发能够产生或表达免疫治疗剂的基因工程菌提供了更多可能。生物工程菌可以在局部肿瘤中高效表达免疫治疗剂,从而触发强烈的抗肿瘤免疫反应;同时,减少了治疗剂的体内脱靶现象,降低了药物毒副作用。

### 2.1 细胞因子

细胞因子因具有促进免疫细胞激活和增殖的作用而得到广泛的研究,但其全身给药会引发严重的副作用,也在一定程度上限制了其临床应用。肿瘤靶向型细菌可以利用基因工程技术来传递和表达多种细胞因子,包括白介素(interleukin, IL)-1 $\beta$ 、IL-18、IL-2、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- $\alpha$ 、人细胞因子 LIGHT 和促凋亡细胞因子 Fas 配体等,以增强抗肿瘤免疫应答,诱导肿瘤细胞的凋亡与坏死,具有特异性高、副作用小等多方面优势<sup>[37]</sup>。

例如, LIGHT 是一种肿瘤坏死因子家族的细胞因子,已被证明具有良好的抗肿瘤活性。Loeffler 等<sup>[38]</sup>将减毒鼠伤寒沙门氏菌 VNP20009 经基因改造后表达 LIGHT,在小鼠肿瘤模型中显示优良的肿瘤抑制效果,且未产生明显的毒性。肿瘤微环境分析显示,其疗效与炎症细胞大量浸润肿瘤和树突状细胞活化有关。基于该细菌介导策略的良好疗效,研究者们进一步赋予减毒沙门氏菌 VNP20009 合成 IL-18 的能力<sup>[39]</sup>。IL-18 是一种干扰素(interferon, IFN)- $\gamma$  诱导因子,具备多种与免疫细胞增殖和激活相关的功能。在小鼠肿瘤模型中,细菌产生 IL-18 的功能显著增强了其自身抗肿瘤活性,该作用机制主要与肿瘤浸润的 T 细胞和 NK 细胞增加有关,同时多种免疫刺激和炎症因子,如粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte-macrophage colony-stimulating

factor, GM-CSF)、IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的分泌,有利于抑制肿瘤的生长与复发。上述临床前研究结果均表明,产生细胞因子的工程菌可以在未有副作用的前提下引发机体强烈的免疫反应,这为基于细菌的癌症免疫治疗提供了一种新的策略。不仅如此, al-Ramadi 等<sup>[40]</sup>和 Gniadek 等<sup>[41]</sup>总结前人研究经验,新开发了一种表达人类 IL-2 基因的减毒鼠伤寒沙门氏菌(命名为 Saltikva, *Salmonella*-IL2)经口服用于抗肿瘤治疗,已经完成 I 期临床试验,并推进至 II 期临床试验阶段,未来值得期待。

### 2.2 病原体相关模式分子

鞭毛蛋白(flagellin)是构成细菌鞭毛纤维的一种球状蛋白,能识别鞭毛蛋白的人免疫细胞受体,包括膜受体 TLR5、细胞内受体白介素 1 $\beta$  转换酶激活物(interleukin-1 $\beta$  converting enzyme protease-activating factor, Ipa)和 NLR 家族凋亡抑制蛋白 5 (neuronal apoptosis inhibitor protein 5, Naip5)<sup>[30]</sup>。其中, TLR5 受体作为 11 个 TLRs 之一,存在于上皮细胞、单核细胞、树突状细胞(dendritic cells, DCs)和 T 细胞的细胞膜上。TLR5 能够识别鞭毛蛋白保守的 D0 结构域,然后通过激活 MyD88 来招募下游信号,因此鞭毛蛋白也可作为一种免疫佐剂,来进一步激活 DCs 和相关的免疫细胞<sup>[31]</sup>。

此外,沙门氏菌 LPS 参与 TLR4 信号转导和炎症小体的作用过程,进而促进抗肿瘤相关细胞因子的分泌<sup>[26]</sup>。因此,生物工程菌在肿瘤微环境中可以通过同时激活 TLR4 和 TLR5 通路,发挥更有效的抗肿瘤作用。例如, Zheng 等<sup>[42]</sup>构建了一种能够分泌创伤弧菌鞭毛蛋白 B (*Vibrio vulnificus* flagellin B, FlaB)的减毒鼠伤寒沙门氏菌菌株,成功抑制小鼠结肠和黑色素瘤模型中的肿瘤细胞生长和转移。与普通沙门氏菌相比,能够分泌鞭毛蛋白的沙门氏菌对肿瘤的抑制作用更显著,说明 TLR4 和 TLR5 通路具有协同抑制肿瘤生长的效果,具体可以解释为: TLR4 信号激活是细菌介导免疫细胞激活和浸润来抑制肿瘤生长的关键因素,而 TLR5 信号激活可以进一步增强宿主反应<sup>[43-44]</sup>。

### 2.3 免疫检查点拮抗剂

免疫检查点阻断作为目前最典型的临床免疫治疗方法,已经取得一定成果<sup>[45-46]</sup>。然而,免疫相关副作用如疲劳、皮疹、内分泌失调和肝毒性等往往限制了其更广泛的应用。要解决这类问题,关键是如何有效地将免疫检查点抑制剂传递到肿瘤部位,并确保其持久且持续的释放。如前所述,细菌的靶

向特性及其良好的可基因编辑性, 使其成为一类向肿瘤传递免疫检查点抑制剂的理想载体。

例如, Gurbatri 等<sup>[47]</sup>通过构建携带 PD-L1 和 CTLA-4 序列的高拷贝质粒的大肠杆菌 Nissle 1917 (EcN), 使其在局部可控地表达 PD-L1 和 CTLA-4 两种拮抗剂。通过瘤内注射该工程菌, 可以在多种小鼠肿瘤模型中观察到显著的肿瘤消退现象。根据流式结果显示, 当 Treg 细胞数量减少时, 瘤内激活的 CD8<sup>+</sup> T 和 CD4<sup>+</sup> T 细胞数量均增加, 表明该智能工程系统使肿瘤微环境从免疫抑制状态转变为响应状态, 从而触发了机体强大的适应性免疫应答。此外, Tsai 等<sup>[48]</sup>和 Chowdhury 等<sup>[49]</sup>报道了一款包含同步裂解回路 (synchronized lysis circuit, SLC) 的大肠杆菌菌株, 其在肿瘤微环境中特异性裂解并释放编码的 CD47 纳米抗体拮抗剂 (CD47nb)。该工程菌的设计优势在于其不仅靶向肿瘤, 而且在肿瘤部位达到临界密度时才会释放治疗剂, 有效防止细菌在其他组织脏器中失控生长。同时, 该工程菌成功实现了对 CD47 的阻断, 进而激活了肿瘤浸润 T 淋巴细胞和更持久的抗肿瘤免疫反应, 有助于肿瘤的长期消退。

### 3 细菌介导的免疫治疗与其他治疗方式的联合应用

在体内环境中, 细菌在生物相容性和生物功能等多方面均显示出了其作为免疫治疗药物传递载体的巨大潜力, 但在同一种细菌中集合理想药物传递系统的所有特征是比较困难的。通过基因工程技术和表面修饰手段, 设计生物杂交“微型机器人”或者“微型泳者”等, 联合其他治疗方式, 为细菌治疗领域提供了新方向、新策略<sup>[50-52]</sup>。接下来, 我们将对生物工程菌联合各种不同类型治疗方案的特点和应用进行总结, 主要包括细菌介导的免疫疗法与化疗、放疗和光热疗法的联合应用。

#### 3.1 与化疗药物相联合

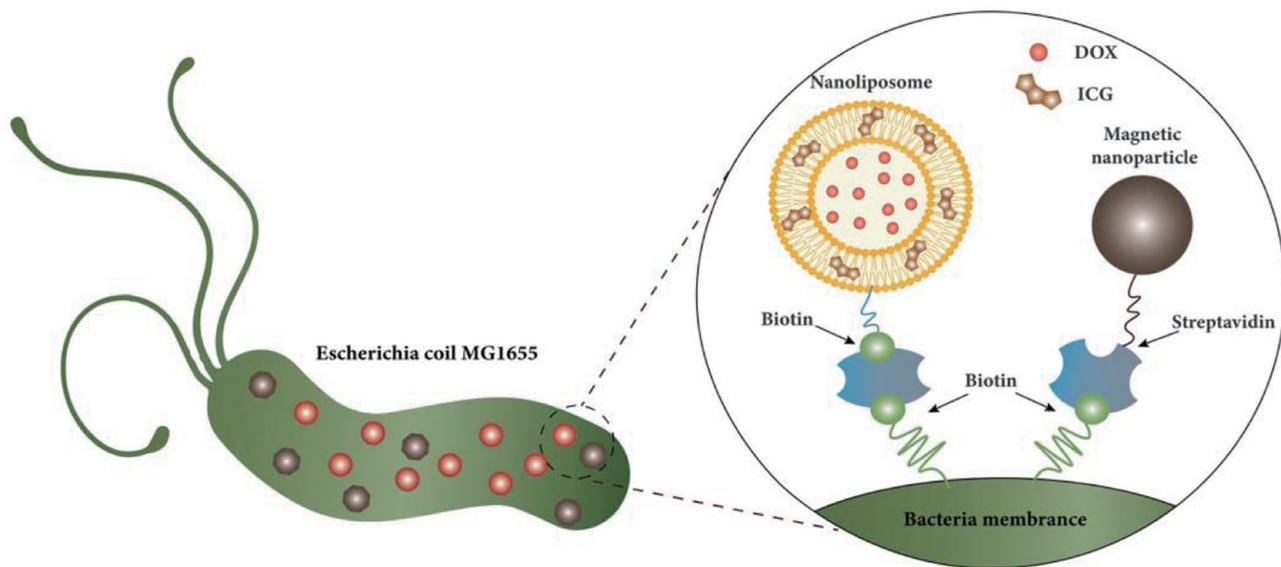
化疗作为癌症患者的一线治疗手段, 在过去几十年来被广泛应用于各种癌症的临床治疗<sup>[53-54]</sup>。然而, 大多数抗癌化疗药物是不能自主靶向肿瘤细胞的, 导致其在肿瘤区域的剂量不足, 降低了治疗效果。此外, 化疗药物由于其非特异性分布, 易损伤机体健康组织器官, 引发严重的毒副作用。因此, 目前迫切需要开发一种可靠的传递系统, 用于化疗药物的肿瘤靶向治疗, 从而显著降低其系统性毒性, 大幅度提高疗效。

据报道, 鼠伤寒沙门氏菌可以通过使其外膜蛋白上表达生物素分子, 与链霉素和素修饰的载有紫杉醇的脂质体结合, 形成一款新型药物传递系统。其与单独的载药脂质体相比, 具有更好的靶向和治疗肿瘤的能力<sup>[55]</sup>。同样利用生物素和链霉素相互作用的原理, Ektate 等<sup>[56]</sup>将温敏阿霉素脂质体连接于减毒沙门氏菌的表面, 用于小鼠的结肠癌治疗。Xie 等<sup>[57]</sup>利用顺乌头酸酐的耐酸连接键将阿霉素偶联到大肠杆菌 EcN 表面, 从而实现肿瘤靶向和应答性药物释放的双重目的。近来, Akolpoglu 等<sup>[58]</sup>利用大肠杆菌 MG1655 为药物传递载体, 将载有吲哚菁绿 (indocyanine green, ICG) 和阿霉素的纳米脂质体以及磁性材料合成的纳米粒共同连接于细菌表面, 构建一种“生物混合型机器人”, 为细菌载体平台的多功能化提供依据 (图 1)。此外, 细菌表面不仅可以搭载载药的合成材料, 还可以与载药的天然材料进行连接, 有利于其在药物包封、生物相容性和降解性等方面表现出更好的性能。例如, Alapan 等<sup>[59]</sup>构建了一种多功能的“微型泳者”, 即将大肠杆菌 MG1655 与载有阿霉素和超顺磁性氧化铁纳米粒 (superparamagnetic iron oxide nanoparticles, SPIONs) 的红细胞通过生物素-亲和素-生物素结合的方式紧密相连, 从而实现按需传递和释放化疗药物的目的。

#### 3.2 与放射治疗相联合

放射治疗是一种有效利用高能射线来应对不同类型癌症的物理治疗策略, 其不仅通过 DNA 损伤而导致肿瘤细胞的死亡, 还可以通过触发促炎因子的释放, 增加肿瘤浸润免疫细胞, 来达到抗肿瘤治疗的目的<sup>[60]</sup>。然而, 放疗在临床应用中也存在一些不足之处: 一是不能避免对正常组织器官的损伤, 可能导致患者严重的副作用; 二是放疗的疗效主要取决于高能射线对肿瘤细胞的 DNA 损伤, 而在此过程中肿瘤组织内的氧含量起着非常重要的作用<sup>[61]</sup>。由于细菌在肿瘤组织中具有特异性靶向和增殖的优势, 因而其在提高药物传递效率、增强放疗疗效和抑制肿瘤复发、转移等方面都显示出巨大的潜力<sup>[62]</sup>。

近年来的研究表明, 多种放射性药物均可被载于细菌表面, 作为“微型泳者”用于抗肿瘤治疗。例如, 利用抗癌放射性同位素 188- 铼 (Re) 修饰的减毒单核李斯特菌, 将高放射性药物运输至小鼠转移瘤部位, 从而在体内实现显著的杀伤肿瘤细胞且不伤害正常细胞的效果<sup>[63]</sup>。另一种放射性治疗药物 32- 磷 (P) 通过李斯特菌的肿瘤靶向传递, 能够诱导



利用大肠杆菌MG1655作为药物传递载体，将载有吲哚菁绿ICG和阿霉素DOX的纳米脂质体以及磁性材料合成的纳米粒共同连接于细菌表面，构建一种“生物混合型机器人”，以用于细菌与化疗相结合的抗肿瘤治疗策略。

图1 细菌与化疗药物的联合应用

电离辐射和活性氧释放，以杀伤肿瘤细胞<sup>[64]</sup>。由于放射性李斯特菌的选择性输送能力以及在肿瘤组织内部的侵袭深度，细菌与放射性药物的联合应用可以有效达到降低副作用、提高疗效的目标。此外，Wang等<sup>[65]</sup>构建了一种表面修饰阳离子聚合物纳米粒的减毒沙门氏菌菌株，瘤内注射后，能够通过离子相互作用吸附带负电荷的经放射治疗产生的肿瘤抗原。该细菌介导的联合抗肿瘤治疗策略有利于抗原和树突状细胞之间相互作用，诱导产生CD8<sup>+</sup>T细胞介导的细胞免疫应答，在多种肿瘤模型上有效延长小鼠的生存期(图2)。

### 3.3 与光热治疗相联合

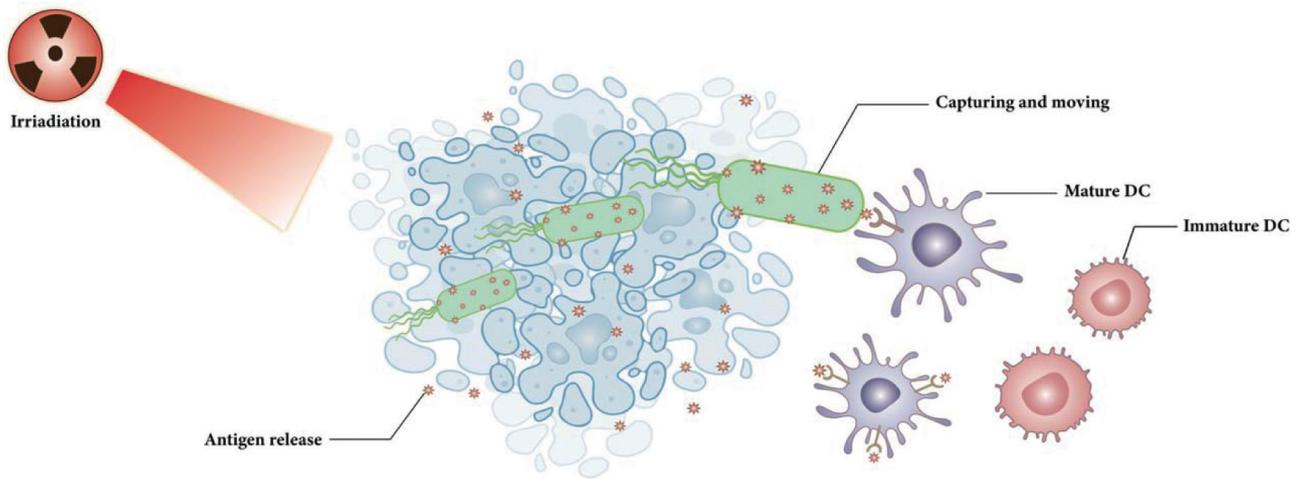
随着细菌疗法的不断发展，由于单一治疗方案的效果往往有限，许多研究都集中在了联合治疗应用上。除了与化疗、放疗技术的联合，细菌介导免疫疗法与光热治疗相结合也是一类重要且有效的癌症治疗策略。

我们实验室的研究表明，减毒鼠伤寒沙门氏菌VNP20009经表面修饰聚多巴胺而形成的pDA-VNP制剂，依旧保持细菌的活力，联合光热疗法后展现出优越的抗肿瘤疗效<sup>[66]</sup>。pDA-VNP经单次尾静脉注射给药和单次近红外激光照射后，能够成功清除肿瘤细胞，同时产生“肿瘤相关抗原”，联合细菌本身的免疫作用，激活机体强大的免疫应答，从而有效抑制肿瘤的生长和复发，显著延长小鼠生存期。

此外，VNP20009作为一种乏氧靶向的传递载体，能够同时搭载两种小分子药物——新合成的近红外七甲川花菁染料NHS-N782和JQ-1衍生物，得到的新型N-V-J制剂，联合光热治疗，最终实现多维度免疫调动的联合治疗效果(图3)<sup>[32]</sup>。另鉴于吲哚菁绿ICG的光热转换效率较高，Chen等<sup>[67]</sup>将载有光敏剂ICG的纳米粒(INPs)与鼠伤寒沙门氏菌菌株YB1相结合，构建了一种细菌介导的光热治疗系统(YB1-INPs)，从而实现实体肿瘤乏氧区域的靶向性、优良的光热转换效率以及高效的荧光成像功能。总的来说，在细菌和光热治疗药物的协同作用下，有效激活机体免疫应答以抑制或清除肿瘤细胞，为抗肿瘤免疫治疗提供了一种新的研究手段。

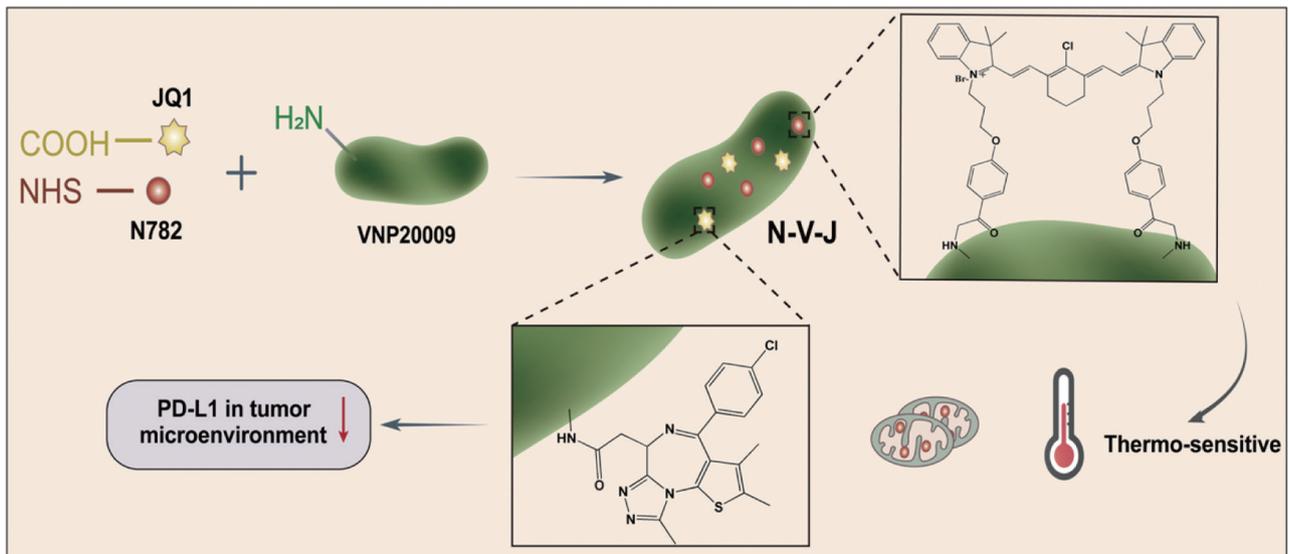
## 4 展望与挑战

在过去的几十年间，各种天然的或基因改造的细菌菌株用于免疫治疗的优势已经超出了传统概念，许多研究已经在动物模型中得到了验证，少部分研究也已进入临床试验阶段。活的减毒菌可以作为一种强大的免疫刺激物，唤醒先天免疫系统和适应性免疫系统，以应对复杂而多样的肿瘤微环境。一项使用减毒鼠伤寒沙门氏菌的I期临床试验证明了其应用安全性和肿瘤靶向性；然而遗憾的是，该治疗方案未能在人体中产生显著的抗肿瘤疗效<sup>[68]</sup>。之后又有多项关于细菌介导的免疫治疗方案进入I期，



通过瘤内注射一种表面修饰阳离子聚合物纳米粒子的减毒沙门氏菌VNP20009, 其能够通过离子相互作用吸附经放射治疗产生的肿瘤抗原, 有利于树突状细胞的活化及后续一系列的免疫反应。

图2 细菌与放疗的联合应用



利用减毒沙门氏菌作为乏氧肿瘤靶向递药系统, 共载两种小分子药物(新合成的七甲川花菁染料NHS-N782和JQ-1衍生物)递送至肿瘤组织深部, 联合光热治疗以激活机体的免疫应答。

图3 细菌与光热治疗的联合应用

甚至 II 期临床试验, 通过注射或口服等多种途径, 探究其应对不同类型、不同发展阶段肿瘤的适用性和有效性。

在此我们需要强调, 在细菌真正应用于临床之前必须解决的关键问题与挑战: 一是细菌的剂量依赖型毒性可能会限制其药效; 二是机体对高浓度细菌所产生的免疫应答可能导致细菌的快速清除, 甚至自身免疫反应; 三是基因改造手段虽然在降低细菌自身毒性和免疫原性方面展示了优越性, 但必须

谨慎使用, 其也可能限制细菌治疗的适用性, 进而降低其疗效并限制其应用范围<sup>[36]</sup>。此外, 我们必须在后续研究和应用中继续关注并控制细菌毒性, 任何保留的生物毒性对于免疫功能低下的患者都可能产生副作用。

### 5 结语

综上所述, 我们正在见证细菌疗法的曙光, 从一个多世纪前癌症患者意外感染细菌而开始的研

究, 目前已经发展成为了一种平台技术, 为医学免疫治疗开辟了新的领域。通过基因工程技术, 我们能够从基因水平上改造细菌, 从而定制其生物功能, 设计一些其他治疗方式难以实现的独特治疗作用。虽然已经有许多生物工程菌被成功构建并逐步应用, 但目前看来, 完全依赖于细菌疗法成为医学上的“灵丹妙药”是不现实的。癌症具有多因素的发病机制, 若要完全根除这类疾病, 多种治疗方案的联合应用是非常必要的。因此, 我们应当加强对细菌群落生态学和对人类疾病分子机制的基础研究, 全面分析免疫应答和肿瘤微环境之间的相互关系, 进一步探索细菌作为癌症治疗手段的潜能。

### [参 考 文 献]

- [1] Scheetz L, Park KS, Li Q, et al. Engineering patient-specific cancer immunotherapies. *Nat Biomed Eng*, 2019, 3: 768-82
- [2] Gong F, Xu J, Liu B, et al. Nanoscale CaH<sub>2</sub> materials for synergistic hydrogen-immune cancer therapy. *Chem*, 2022, 8: 268-86
- [3] Zhang H, Chen J. Current status and future directions of cancer immunotherapy. *J Cancer*, 2018, 9: 1773-81
- [4] Gong J, Chehrizi-Raffle A, Reddi S, et al. Development of PD-1 and PD-L1 inhibitors as a form of cancer immunotherapy: a comprehensive review of registration trials and future considerations. *J Immunother Cancer*, 2018, 6: 8
- [5] Sharma P, Allison JP. The future of immune checkpoint therapy. *Science*, 2015, 348: 56-61
- [6] Ribas A, Wolchok JD. Cancer immunotherapy using checkpoint blockade. *Science*, 2018, 359: 1350-5
- [7] Waldman AD, Fritz JM, Lenardo MJ. A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice. *Nat Rev Immunol*, 2020, 20: 651-68
- [8] Pitt JM, Vétizou M, Daillère R, et al. Resistance mechanisms to immune-checkpoint blockade in cancer: tumor-intrinsic and -extrinsic factors. *Immunity*, 2016, 44: 1255-69
- [9] Cao Z, Liu J. Bacteria and bacterial derivatives as drug carriers for cancer therapy. *J Control Release*, 2020, 326: 396-407
- [10] Fan JX, Niu MT, Qin YT, et al. Progress of engineered bacteria for tumor therapy. *Adv Drug Deliv Rev*, 2022, 185: 114296
- [11] Shen H, Aggarwal N, Wun KS, et al. Engineered microbial systems for advanced drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 2022, 187: 114364
- [12] Zhou S, Gravekamp C, Bermudes D, et al. Tumour-targeting bacteria engineered to fight cancer. *Nat Rev Cancer*, 2018, 18: 727-43
- [13] Wu L, Bao F, Li L, et al. Bacterially mediated drug delivery and therapeutics: strategies and advancements. *Adv Drug Deliv Rev*, 2022, 187: 114363
- [14] Coley WB. II. Contribution to the knowledge of sarcoma. *Ann Surg*, 1891, 14: 199-220
- [15] Coley WB. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. 1893. *Clin Orthop Relat Res*, 1991, (262): 3-11
- [16] Nauts HC, Swift WE, Coley BL. The treatment of malignant tumors by bacterial toxins as developed by the late William B. Coley, M.D., reviewed in the light of modern research. *Cancer Res*, 1946, 6: 205-16
- [17] Forbes NS. Engineering the perfect (bacterial) cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 2010, 10: 785-94
- [18] Lamm DL. BCG immunotherapy for transitional-cell carcinoma *in situ* of the bladder. *Oncology (Williston Park)*, 1995, 9: 947-52, 955, discussion 955-65
- [19] Kawai K, Miyazaki J, Joraku A, et al. Bacillus Calmette-Guerin (BCG) immunotherapy for bladder cancer: current understanding and perspectives on engineered BCG vaccine. *Cancer Sci*, 2013, 104: 22-7
- [20] Jain RK. Normalizing tumor microenvironment to treat cancer: bench to bedside to biomarkers. *J Clin Oncol*, 2013, 31: 2205-18
- [21] Li S, Yue H, Wang S, et al. Advances of bacteria-based delivery systems for modulating tumor microenvironment. *Adv Drug Deliv Rev*, 2022, 188: 114444
- [22] Malmgren RA, Flanigan CC. Localization of the vegetative form of *Clostridium tetani* in mouse tumors following intravenous spore administration. *Cancer Res*, 1955, 15: 473-8
- [23] Rong L, Lei Q, Zhang XZ. Engineering living bacteria for cancer therapy. *ACS Appl Bio Mater*, 2020, 3: 8136-45
- [24] 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: 1996-2002
- [25] Chandra D, Jahangir A, Quispe-Tintaya W, et al. Myeloid-derived suppressor cells have a central role in attenuated *Listeria monocytogenes*-based immunotherapy against metastatic breast cancer in young and old mice. *Br J Cancer*, 2013, 108: 2281-90
- [26] Sawant SS, Patil SM, Gupta V, et al. Microbes as medicines: harnessing the power of bacteria in advancing cancer treatment. *Int J Mol Sci*, 2020, 21: 7575
- [27] Avogadri F, Martinoli C, Petrovska L, et al. Cancer immunotherapy based on killing of *Salmonella*-infected tumor cells. *Cancer Res*, 2005, 65: 3920-7
- [28] Huang X, Pan J, Xu F, et al. Bacteria-based cancer immunotherapy. *Adv Sci (Weinh)*, 2021, 8: 2003572
- [29] Phan TX, Nguyen VH, Duong MT, et al. Activation of inflammasome by attenuated *Salmonella typhimurium* in bacteria-mediated cancer therapy. *Microbiol Immunol*, 2015, 59: 664-75
- [30] Hajam IA, Dar PA, Shah Nawaz I, et al. Bacterial flagellin -- a potent immunomodulatory agent. *Exp Mol Med*, 2017, 49: e373
- [31] Long Q, Zheng P, Zheng X, et al. Engineered bacterial membrane vesicles are promising carriers for vaccine design and tumor immunotherapy. *Adv Drug Deliv Rev*, 2022, 186: 114321

- [32] Chen W, He C, Qiao N, et al. Dual drugs decorated bacteria irradiate deep hypoxic tumor and arouse strong immune responses. *Biomaterials*, 2022, 286: 121582
- [33] Holay M, Guo Z, Pihl J, et al. Bacteria-inspired nanomedicine. *ACS Appl Bio Mater*, 2021, 4: 3830-48
- [34] Felgner S, Kocijancic D, Frahm M, et al. Engineered *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* overcomes limitations of anti-bacterial immunity in bacteria-mediated tumor therapy. *Oncoimmunology*, 2018, 7: e1382791
- [35] Camacho EM, Mesa-Pereira B, Medina C, et al. Engineering *Salmonella* as intracellular factory for effective killing of tumour cells. *Sci Rep*, 2016, 6: 30591
- [36] Hosseinidoust Z, Mostaghaci B, Yasa O, et al. Bioengineered and biohybrid bacteria-based systems for drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 2016, 106: 27-44
- [37] Lin IY, Van TT, Smooker PM. Live-attenuated bacterial vectors: tools for vaccine and therapeutic agent delivery. *Vaccines (Basel)*, 2015, 3: 940-72
- [38] Loeffler M, LeNegrata G, Krajewska M, et al. Attenuated *Salmonella* engineered to produce human cytokine LIGHT inhibit tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104: 12879-83
- [39] Loeffler M, Le'Negrata G, Krajewska M, et al. IL-18-producing *Salmonella* inhibit tumor growth. *Cancer Gene Ther*, 2008, 15: 787-94
- [40] al-Ramadi BK, Fernandez-Cabezudo MJ, El-Hasasna H, et al. Potent anti-tumor activity of systemically-administered IL2-expressing *Salmonella* correlates with decreased angiogenesis and enhanced tumor apoptosis. *Clin Immunol*, 2009, 130: 89-97
- [41] Gniadek TJ, Augustin L, Schottel J, et al. A phase I, dose escalation, single dose trial of oral attenuated *Salmonella typhimurium* containing human IL-2 in patients with metastatic gastrointestinal cancers. *J Immunother*, 2020, 43: 217-21
- [42] Zheng JH, Nguyen VH, Jiang SN, et al. Two-step enhanced cancer immunotherapy with engineered *Salmonella typhimurium* secreting heterologous flagellin. *Sci Transl Med*, 2017, 9: eaak9537
- [43] Sfondrini L, Rossini A, Besusso D, et al. Antitumor activity of the TLR-5 ligand flagellin in mouse models of cancer. *J Immunol*, 2006, 176: 6624-30
- [44] Kim JE, Phan TX, Nguyen VH, et al. *Salmonella typhimurium* suppresses tumor growth via the pro-inflammatory cytokine interleukin-1 $\beta$ . *Theranostics*, 2015, 5: 1328-42
- [45] Zhang T, Xie J, Arai S, et al. The efficacy and safety of anti-PD-1/PD-L1 antibodies for treatment of advanced or refractory cancers: a meta-analysis. *Oncotarget*, 2016, 7: 73068-79
- [46] Shi Y, Zheng W, Yang K, et al. Intratumoral accumulation of gut microbiota facilitates CD47-based immunotherapy via STING signaling. *J Exp Med*, 2020, 217: e20192282
- [47] Gurbatri CR, Lia I, Vincent R, et al. Engineered probiotics for local tumor delivery of checkpoint blockade nanobodies. *Sci Transl Med*, 2020, 12: eaax0876
- [48] Tsai RK, Rodriguez PL, Discher DE. Self inhibition of phagocytosis: the affinity of 'marker of self' CD47 for SIRP $\alpha$  dictates potency of inhibition but only at low expression levels. *Blood Cells Mol Dis*, 2010, 45: 67-74
- [49] Chowdhury S, Castro S, Coker C, et al. Programmable bacteria induce durable tumor regression and systemic antitumor immunity. *Nat Med*, 2019, 25: 1057-63
- [50] Duong MT, Qin Y, You SH, et al. Bacteria-cancer interactions: bacteria-based cancer therapy. *Exp Mol Med*, 2019, 51: 1-15
- [51] Liang K, Liu Q, Li P, et al. Genetically engineered *Salmonella typhimurium*: recent advances in cancer therapy. *Cancer Lett*, 2019, 448: 168-81
- [52] Park BW, Zhuang J, Yasa O, et al. Multifunctional bacteria-driven microswimmers for targeted active drug delivery. *ACS Nano*, 2017, 11: 8910-23
- [53] Ouyang C, Zhang S, Xue C, et al. Precision-guided missile-like DNA nanostructure containing warhead and guidance control for aptamer-based targeted drug delivery into cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *J Am Chem Soc*, 2020, 142: 1265-77
- [54] Zylberberg C, Gaskill K, Pasley S, et al. Engineering liposomal nanoparticles for targeted gene therapy. *Gene Ther*, 2017, 24: 441-52
- [55] Nguyen VD, Han JW, Choi YJ, et al. Active tumor-therapeutic liposomal bacteriobot combining a drug (paclitaxel)-encapsulated liposome with targeting bacteria (*Salmonella typhimurium*). *Sens Actuators B Chem*, 2016, 224: 217-24
- [56] Ektate K, Munteanu MC, Ashar H, et al. Chemo-immunotherapy of colon cancer with focused ultrasound and *Salmonella*-laden temperature sensitive liposomes (thermobots). *Sci Rep*, 2018, 8: 13062
- [57] Xie S, Zhao L, Song X, et al. Doxorubicin-conjugated *Escherichia coli* Nissle 1917 swimmers to achieve tumor targeting and responsive drug release. *J Control Release*, 2017, 268: 390-9
- [58] Akolpoglu MB, Alapan Y, Dogan NO, et al. Magnetically steerable bacterial microrobots moving in 3D biological matrices for stimuli-responsive cargo delivery. *Sci Adv*, 2022, 8: eabo6163
- [59] Alapan Y, Yasa O, Schauer O, et al. Soft erythrocyte-based bacterial microswimmers for cargo delivery. *Sci Robot*, 2018, 3: eaar4423
- [60] Harrington KJ, Billingham LJ, Brunner TB, et al. Guidelines for preclinical and early phase clinical assessment of novel radiosensitisers. *Br J Cancer*, 2011, 105: 628-39
- [61] Sharabi AB, Lim M, DeWeese TL, et al. Radiation and checkpoint blockade immunotherapy: radiosensitisation and potential mechanisms of synergy. *Lancet Oncol*, 2015, 16: e498-509
- [62] Mi Z, Feng ZC, Li C, et al. *Salmonella*-mediated cancer therapy: an innovative therapeutic strategy. *J Cancer*, 2019, 10: 4765-76
- [63] Quispe-Tintaya W, Chandra D, Jahangir A, et al. Nontoxic radioactive *Listeria*<sup>at</sup> is a highly effective therapy against metastatic pancreatic cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110: 8668-73
- [64] Chandra D, Selvanesan BC, Yuan Z, et al. 32-Phosphorus

- selectively delivered by *Listeria* to pancreatic cancer demonstrates a strong therapeutic effect. *Oncotarget*, 2017, 8: 20729-40
- [65] Wang W, Xu H, Ye Q, et al. Systemic immune responses to irradiated tumours via the transport of antigens to the tumour periphery by injected flagellate bacteria. *Nat Biomed Eng*, 2022, 6: 44-53
- [66] Chen W, Wang Y, Qin M, et al. Bacteria-driven hypoxia targeting for combined biotherapy and photothermal therapy. *ACS Nano*, 2018, 12: 5995-6005
- [67] Chen F, Zang Z, Chen Z, et al. Nanophotosensitizer-engineered *Salmonella* bacteria with hypoxia targeting and photothermal-assisted mutual bioaccumulation for solid tumor therapy. *Biomaterials*, 2019, 214: 119226
- [68] 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: 142-52