

DOI: 10.13376/j.cbls/2023036

文章编号: 1004-0374(2023)03-0287-09



黄建东博士在复旦大学获得学士学位, 随后加入吉林大学进行研究生学习。他之后通过中美生化联合考试项目 (CUSBEA) 进入美国加州大学洛杉矶分校进行果蝇胚胎转录和生物图形形成的研究, 并获得理学博士 (PhD) 学位。之后, 黄博士在美国国家健康研究院 (NIH) 国立癌症研究所 (NCI) 接受了小鼠遗传学博士后的训练。在这期间, 黄博士在世界上首先发现并报告了哺乳动物细胞两个主要细胞内运输系统间直接相互作用的方式, 即这两个系统是通过它们的马达蛋白——kinesin 和肌球蛋白直接联系的。随后, 黄博士在香港大学建立了他个人的实验室。黄博士现在是香港大学生物医学学院合成生物学讲座教授及慧贤慈善基金教授 (生物医学)。黄博士目前的研究主要集中在两个领域: 合成生物学和细胞内运输。在细胞内运输研究中, 黄博士着重于研究微管运动分子 Kinesin-1 在不同细胞类型中的功能, 旨在了解其在发育和疾病中的作用。在合成生物学方面, 黄博士为控制基因表达和生物行为探索创造新的基因线路。一个成功的例子是通过设计和组装基因线路成功控制了细胞的时空分布和功能。这种新线路可以用于揭示如何产生重复的生物结构, 以及如何控制生物结构中的重复数目。最近, 他的团队进一步设计了多种细胞类型之间的相互作用, 以生成生物结构。对基因活动、细胞-细胞相互作用、细胞分布和功能进行时空控制的能力对于未来的预防和治理医学意义重大, 黄博士正将这些技术与方法用于疫苗开发和癌症治疗研究。

## 沙门氏菌抗肿瘤疗法在合成生物学时代的发展和机遇

荣 丽, 胡叶凡, 刘陈立, 董宇轩, 黄建东\*

(香港大学李嘉诚医学院生物医学系, 香港)

**摘 要:** 在各国, 癌症是导致死亡的主要原因之一, 也是提高人类预期寿命的重要障碍。目前临床上主流的分子靶向疗法和免疫疗法还不能完全治愈肿瘤且常常副作用巨大, 其中原因较为复杂。而以沙门氏菌抗肿瘤疗法为代表的细菌抗肿瘤疗法具有潜力弥补分子靶向疗法和免疫疗法在肿瘤靶向性上的不足。本文将从目前癌症治疗的困境出发, 回顾细菌抗肿瘤疗法的历史, 阐述基因工程与合成生物学时代沙门氏菌抗肿瘤疗法的进展, 论述其作为下一代抗肿瘤微型机器人的潜力。最终, 我们希望在靶向肿瘤治疗领域激发思想火花, 克服沙门氏菌抗肿瘤疗法的局限性, 推进其临床应用。

**关键词:** 癌症; 肿瘤; 沙门氏菌疗法; 合成生物学

中图分类号: Q819; R730.5 文献标志码: A

### The development and opportunity of *Salmonella*-based anti-tumor therapies in the era of synthetic biology

RONG Li, HU Ye-Fan, LIU Chen-Li, DONG Yu-Xuan, HUANG Jian-Dong\*

(School of Biomedical Sciences, Li Ka Shing Faculty of Medicine, University of Hong Kong, Hong Kong SAR, China)

收稿日期: 2022-09-30; 修回日期: 2023-01-05

\*通信作者: E-mail: jdhuang@hku.hk

**Abstract:** As one of the leading causes of death around the world, cancer is an important obstacle to increasing human lifespan. Current major cancer therapies in the clinic, represented by molecularly targeted therapy and cancer immunotherapy, usually cannot completely cure cancer and often have severe side effects. However, the bacterial anti-tumor therapy, represented by *Salmonella*-based anti-tumor therapy, has the potential to make up for the deficiency of molecularly targeted therapy and current cancer immunotherapy in terms of tumor-targeting. This review will start from the current predicament of cancer treatment, review the history of bacterial anti-tumor therapy, expound on the advances of *Salmonella*-based anti-tumor therapy in the era of genetic engineering & synthetic biology, and discuss the potential of genetically engineered *Salmonella* as the next generation of anti-tumor microrobots. Ultimately, we hope to provide a spark of thoughts in the field of tumor-targeting therapies to overcome the limitations of *Salmonella*-based anti-tumor therapy, and to advance its clinical applications.

**Key words:** cancer; tumor; *Salmonella*-based anti-tumor therapy; synthetic biology

## 1 癌症的治疗与困境

世界卫生组织 (WHO) 2019 年的统计数据包括 183 个国家, 在其中 112 个国家中, 癌症是人类 70 岁之前的第一或第二大死因; 在另外 23 个国家中, 因癌症致死仍排在死亡原因的第三或第四位。总体而言, 全球癌症发病率和死亡率正在迅速增加<sup>[1-2]</sup>。肿瘤细胞 (癌细胞) 是由正常细胞变异而来的, 其生长不受控制, 在体内疯狂抢夺营养, 挤压正常细胞的生存空间, 最终导致癌症患者因营养不良或者器官衰竭而死亡。传统的外科手术效果有限。虽然目前许多化学疗法或者放射性疗法有细胞毒性, 可以有效杀死肿瘤细胞, 但这些化学疗法和放射性疗法基本上都无法有效区分正常细胞和肿瘤细胞, 从而导致强烈的副作用。因此在癌症治疗的研究中, 肿瘤学家们一直以来都在追求能特异性地杀死肿瘤细胞而尽量不伤害正常细胞的新疗法。怀着这样的目标, 肿瘤学家们开发出两种抗肿瘤疗法: 分子靶向疗法和免疫疗法, 近年来在临床上大放异彩<sup>[3]</sup>。

分子靶向疗法主要以肿瘤细胞相对特有的遗传或表观遗传变化为靶点设计药物, 从而最大限度地减少对正常细胞的损伤。尽管针对肿瘤细胞的靶向精度提高了, 但分子靶向疗法远非完美。首先, 这些遗传或表观遗传变化并非完全肿瘤独有, 很多分子靶向疗法的靶蛋白, 如肿瘤相关抗原 (tumor-associated antigens) 只是在肿瘤细胞中相对正常细胞表达多一些, 这样的靶向疗法还是会影响到靶蛋白在正常细胞中的功能, 从而带来副作用<sup>[4]</sup>。其次, 目前很多肿瘤热点突变还不能被靶向成药。最后, 肿瘤细胞基因组不稳定, 很容易通过累积突变产生对分子靶向药耐受的肿瘤细胞亚群, 最后导致肿瘤复发<sup>[5-6]</sup>。

免疫疗法是另一种意义上的“肿瘤靶向”疗法,

它通过激活甚至改造机体的免疫系统来增强免疫系统对肿瘤特异性抗原 (tumor-specific antigens, 又称新抗原, 即 neoantigens) 或肿瘤相关抗原的识别, 从而最终清除肿瘤细胞。以免疫检查点阻断疗法和 CAR T 细胞疗法 (嵌合抗原受体 T 细胞) 为代表的癌症免疫疗法在临床上取得了空前成功, 这进一步激发了肿瘤学家通过操纵免疫反应来对抗癌症的热情<sup>[7-9]</sup>。目前患者对免疫检查点阻断疗法的响应主要还是需要肿瘤细胞的抗原能被抗原递呈细胞正确地递呈给 T 细胞, 从而激活杀伤性 CD8<sup>+</sup> T 细胞依赖于 MHC I 类分子的对肿瘤细胞的识别<sup>[10]</sup>。在这个过程中, 肿瘤细胞缺少突变产生的抗原, 或缺少 MHC I 类分子的表达, 又或者肿瘤组织中缺少免疫细胞的浸润, 都会导致治疗不响应<sup>[11]</sup>。不幸的是, 很多肿瘤都没有表现出丰富的突变和免疫细胞浸润, 因此对免疫检查点阻断疗法不敏感。CAR T 细胞疗法也同样因为无法有效浸润肿瘤组织而对实体瘤的治疗效果欠佳。另外, 肿瘤组织中的血管一般都是不成熟且无序的, 这导致肿瘤组织中氧气等物质的渗透不足, 从而形成特有的以缺氧为特征的肿瘤微环境。肿瘤微环境这样的血管结构一方面让包括分子靶向药在内的抗肿瘤药物难以渗透, 另一方面造成的缺氧环境能极大削弱免疫细胞的功能, 从而让免疫检查点阻断疗法和 CAR T 细胞疗法都很难发挥抗肿瘤作用。

这样的肿瘤微环境是一把双刃剑, 既能阻碍治疗, 也能为肿瘤学家所用。虽然这样独特的肿瘤微环境阻碍了目前临床上各种抗肿瘤疗法的功效, 但也为靶向肿瘤微环境提供了目标: 缺氧环境。于是, 以兼性厌氧菌为代表的抗肿瘤细菌, 如沙门氏菌 (*Salmonella* spp.) 和李斯特菌 (*Listeria* spp.), 以其固有的特异性靶向肿瘤缺氧环境的能力和调控免疫系

统的能力于近年来得到越来越多的关注<sup>[3]</sup>。本综述将回顾细菌抗肿瘤疗法的历史, 概括沙门氏菌天然抗肿瘤的机制, 阐述基因工程与合成生物学时代沙门氏菌抗肿瘤疗法的进展, 以及论述其作为下一代抗肿瘤微型机器人的潜力(图1)<sup>[12]</sup>。

## 2 早期的细菌抗肿瘤疗法

细菌抗肿瘤疗法并不是一个新概念, 它的历史可以追溯到19世纪。早在1813年, Vautier 观察到有肿瘤患者感染了产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)后出现了肿瘤消退的现象<sup>[13]</sup>。德国科学家 W. Busch 和他的同事于1863年在柏林进行了第一次细菌抗肿瘤疗法的“临床试验”。W. Busch 和他的同事收集了由化脓性链球菌(*Streptococcus pyogenes*)感染引发死亡的患者睡过的病床, 然后让另一个女性癌症患者使用此病床, 结果显示该女性癌症患者的肿瘤确实有消退, 但这位女性癌症患者却最终死于化脓性链球菌感染<sup>[14-15]</sup>。

受这些结果的启发, 美国外科医生 William Coley (1862-1936) 进行了大量的细菌抗肿瘤的系统性研究, 他也因此成为细菌抗肿瘤疗法的重要先驱<sup>[16]</sup>。与 Vautier 和 W. Busch 一样, Coley 也观察到细菌感染导致肿瘤消退的现象。他发现一名癌症患者7年前被诊断患有颈部恶性肿瘤, 该患者的肿瘤在链球菌皮肤感染后居然消失了。在查询过往的文献记录后, Coley 发现了大约47例细菌感染对癌症有益影响的案例。于是在1891年, Coley 开始通过给癌症患者注射链球菌来抑制肿瘤生长<sup>[16]</sup>。然而当时抗生素还没有被发现, 控制细菌感染对于当时的医疗水平来说非常具有挑战性, Coley 的两个患

者也死于细菌感染。于是后来 Coley 放弃使用活菌, 转而将热灭活的革兰氏阳性化脓性链球菌和革兰氏阴性黏质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)制成混合物用于治疗肿瘤, 该混合物被命名为 Coley 毒素(Coley's toxins), 这也被认为是最早的免疫疗法之一, Coley 因此被称为“免疫疗法之父”<sup>[17]</sup>。近1000名癌症患者接受了 Coley 毒素的治疗, Coley 在一些包括淋巴瘤、黑色素瘤和骨髓瘤在内的肿瘤患者中观察到肿瘤完全消退的现象<sup>[18-19]</sup>。随后, Coley 毒素很快被其他研究人员和医生广泛使用。然而, 医生们观察到 Coley 毒素的治疗效果参差不齐, 其中原因至今没有定论, 猜测有可能是因为不同医生使用的 Coley 毒素的制备和给药方式不一致。加之 Coley 的患者随访记录不规范, 于是 Coley 的工作后来遭到其他研究人员和医生的质疑<sup>[16]</sup>。当时, 以 Coley 毒素为代表的细菌抗肿瘤疗法疗效不稳定且具体的机制尚不明确, 而新兴的放射性疗法却很快崛起, 并与手术和后来的化疗成为癌症治疗的主流, 如上各因素共同导致细菌抗肿瘤疗法在19世纪后期被放弃<sup>[15]</sup>。

时间来到20世纪, 分子生物学的快速发展极大地增强了细菌作为抗肿瘤剂的可塑性。同时, 人类对肿瘤微环境、宿主-病原体相互作用的了解也进一步加深, 于是曾经被放弃的细菌抗肿瘤疗法再次回到癌症治疗的舞台并在1900年代中期后得到大力发展<sup>[3]</sup>。比如前面提到的 Coley 毒素在德国、墨西哥和中国仍在使用<sup>[19]</sup>。目前最成功的细菌抗肿瘤疗法是卡介苗(Bacillus Calmette-Guérin, BCG), 这也是迄今为止唯一获得美国食品及药物管理局(Food and Drug Administration)批准的细菌抗肿瘤疗法<sup>[20]</sup>。

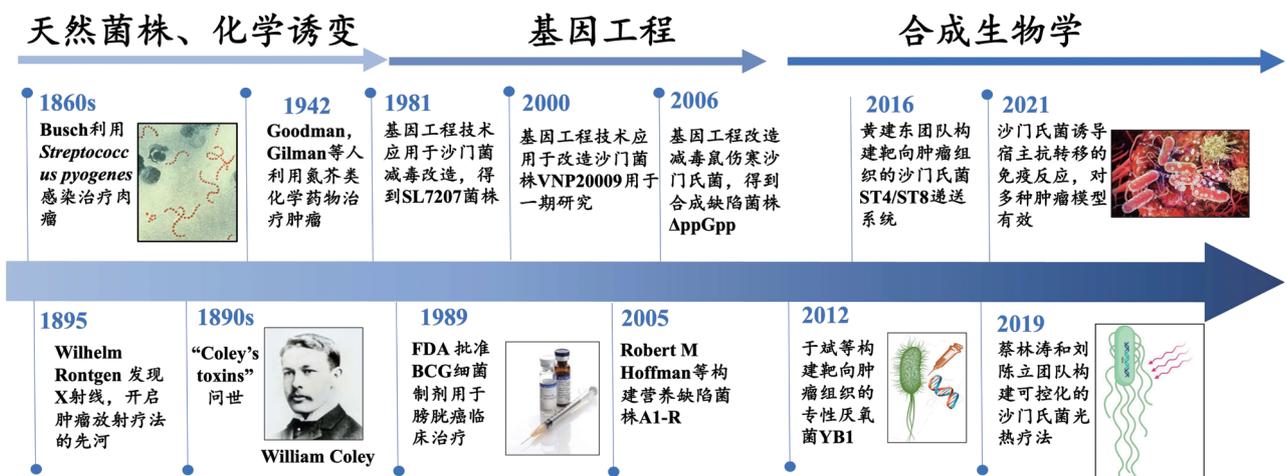


图1 细菌抗肿瘤疗法的发展历程及典型

BCG 是一种减毒的牛结核分枝杆菌 (*Mycobacterium bovis*) 菌株, 在治疗非肌肉浸润性膀胱癌 (NMIBC) 方面取得了巨大的临床成功, 并且从 1970 年代后期一直沿用至今, 这也激励了人们直到现在还在继续开发细菌疗法来对抗肿瘤<sup>[21-22]</sup>。

### 3 沙门氏菌天然抗肿瘤的机理研究

作为兼性厌氧菌抗肿瘤的重要代表之一, 沙门氏菌 (*Salmonella* spp.) 天然地能靶向并定植于缺氧的肿瘤组织<sup>[3, 23-24]</sup>。沙门氏菌天然抗肿瘤的机制可以从多个方面来解释。首先, 在肿瘤中积累的沙门氏菌会直接跟肿瘤细胞竞争营养物质, 从而促进肿瘤细胞凋亡。其次, 肿瘤组织中的沙门氏菌可以通过多种机制抑制肿瘤组织中的血管生成。另外, 沙门氏菌还可以通过释放一些毒力因子来直接杀死肿瘤细胞, 比如脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 和鞭毛蛋白在许多研究中显示出具有抗肿瘤活性<sup>[24]</sup>。也有报道称瘤内沙门氏菌分泌的硝酸盐还原酶可以将硝酸盐和亚硝酸盐转化为一氧化氮, 从而抑制肿瘤的生长<sup>[25]</sup>。同时, 作为机体的外来物, 沙门氏菌也通过发挥其免疫调节功能来抑制肿瘤的生长<sup>[26-28]</sup>。具体而言, 沙门氏菌治疗能诱导全身性的促炎细胞因子, 如白细胞介素 18 (IL-18)、肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素 -1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) 和干扰素 - $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) 等, 从而激活先天性和适应性免疫反应<sup>[26]</sup>。在不同的研究背景下, 减毒的沙门氏菌治疗被报道能极化肿瘤相关巨噬细胞 (tumor-associated macrophages, TAM), 或募集包括中性粒细胞、自然杀伤细胞 (NK 细胞)、CD8<sup>+</sup> 淋巴细胞、CD4<sup>+</sup> 淋巴细胞和  $\gamma\delta$  T 细胞在内的抗肿瘤免疫细胞来抑制原位肿瘤的生长<sup>[29-30]</sup>。

长期以来, 原位瘤是癌症研究的重点, 但限制转移瘤也不可忽视。实际上, 90% 的癌症相关死亡是由肿瘤转移引起的, 因此抑制肿瘤转移能大大延长癌症患者的生存期<sup>[31]</sup>。肿瘤转移涉及一系列连续且复杂的步骤。在此过程中, 转移性癌细胞从原发性肿瘤病灶脱离, 迁移到血液/淋巴管, 进入血液/淋巴循环(内渗), 退出血液/淋巴循环(外渗), 最后在远处的转移目的器官处定植成为继发性转移瘤。在漫长的转移过程中, 转移性癌细胞与周围的多种环境相互作用, 最后大约有 0.01% 的转移性癌细胞可以成功地在远处器官发展出新的转移瘤<sup>[32-33]</sup>。这种肿瘤细胞转移的瓶颈效应导致继发性转移瘤在很多方面与原发性肿瘤有显著差异, 导致原本对原

发性肿瘤有效的癌症疗法对继发性转移瘤的治疗效果有限, 甚至无效<sup>[34-35]</sup>。矛盾之处在于, 目前所有癌症疗法的临床前和临床开发的最初评估标准主要是观测这些疗法抑制原位肿瘤发生和(或)原发性生长的能力, 而不是它们的抗肿瘤转移作用<sup>[36]</sup>。因此, 我们迫切地需要能靶向肿瘤转移过程的治疗策略。

沙门氏菌抗肿瘤疗法不仅可以抑制已经形成的肿瘤的生长, 还天然地能靶向阻断肿瘤转移过程。例如, 沙门氏菌菌株 YB1 不仅可以抑制原位肝癌的生长, 还可以阻断肝肿瘤的肺转移<sup>[37]</sup>。当荷乳腺癌肿瘤的小鼠在接受手术移除原位肿瘤后, 44% 的术前接受菌株 YB1 治疗的小鼠存活超过 60 天且无转移迹象, 而所有术前接受对照治疗的小鼠在 26 天内全部死于肺转移。沙门氏菌菌株 YB1 对肿瘤转移过程的抑制作用也在多种肿瘤转移模型中得到进一步证实, 其中包括但不限于结肠癌转移模型、膀胱癌转移模型和黑色素瘤转移模型。其具体机制是沙门氏菌激活了 NK 细胞, 活化的 NK 细胞释放大量的 IFN- $\gamma$ , 而这些 IFN- $\gamma$  能反过来促进 NK 细胞的进一步活化, 最终超活化的 NK 细胞高效地清除掉了转移过程中的肿瘤细胞<sup>[38]</sup>。值得一提的是, 沙门氏菌对转移的特异性靶向阻断并没有菌株特异性, 沙门氏菌其他菌株, 如 SL7207 和 VNP200009, 也有类似的效果。

### 4 合成生物学时代的沙门氏菌疗法——作为抗肿瘤微型机器人

近年来, 合成生物学的迅猛发展让细菌抗肿瘤疗法有了新的发力方向。让我们用工程学顶层设计 (top-down design) 的思路来思考: 什么样的抗肿瘤疗法才能弥补现有的分子靶向疗法和免疫疗法的缺陷? 我们和许多其他研究工作者给出的设计是一个能特异性靶向肿瘤的可编程的微型机器人<sup>[39]</sup>。这个微型机器人至少必须具有如下几个功能: (1) 对机体必须是安全的; (2) 能特异性靶向肿瘤组织而不伤害正常组织, 这让我们能够使用更毒的抗肿瘤药物而不用担心系统性的副作用; (3) 能高效地杀死肿瘤细胞; (4) 能够响应外部的控制信号。

沙门氏菌天然地能直接抑制肿瘤生长<sup>[24]</sup>, 同时作为机体的外来物, 沙门氏菌也天然地能激活免疫系统, 从而增强免疫系统对肿瘤的识别和消除<sup>[3]</sup>。因此, 沙门氏菌完全可以作为底盘生物, 在合成生物学的指导下, 被改造成具有上述四种功能的完美的抗肿瘤微型机器人。事实上, 已有很多基因工程

时代的工作为这个目标提供了研究基础, 后面我们将从上述四个能力出发, 概述已有的相关工作并对未来进行展望。

#### 4.1 沙门氏菌疗法的安全性研究

活细菌作为抗肿瘤治疗剂的临床运用面临的障碍是其潜在的感染相关毒性<sup>[3]</sup>。随着合成生物学的飞速发展, 编辑细菌基因组已经变得可行。经过大量研究, 科学家已经探索出很多减毒方式来降低沙门氏菌的毒性且同时又不影响其抗肿瘤活性。革兰氏阴性菌外膜中的脂多糖(LPS)是导致革兰氏阴性细菌败血症的原因之一。因此, 沙门氏菌的安全性可以通过修饰LPS相关的基因被提高, 如删除毒力基因*msbB*可以降低99.99%的毒性<sup>[40]</sup>。第一个临床上验证安全的沙门氏菌菌株VNP20009就是通过删除*msbB*基因和另一个*purI*基因成功降低了感染性休克的风险<sup>[41]</sup>。很多毒力基因表达所需要的信号分子鸟苷5'-二磷酸-3'-二磷酸(guanosine 5'-diphosphate-3'-diphosphate, ppGpp)合成缺陷菌株 $\Delta$ ppGpp也被证明安全性大大提升。有趣的是, ppGpp合成缺陷会明显减弱沙门氏菌进入宿主细胞并在宿主细胞中复制的能力, 从而有效地将其转化为胞外细菌<sup>[3]</sup>。提高沙门氏菌安全性的另一种方法是产生在缺少特定营养物质的环境中不能有效复制的营养缺陷型突变体。比如, 沙门氏菌菌株SL7207缺失*aroA*基因, 因此无法合成对氨基苯甲酸(*p*-aminobenzoic acid)和2,3-二羟基苯甲酸酯(2,3-dihydroxybenzoate)。这两种化合物并不存在于哺乳动物的组织中, 因此在哺乳动物宿主体内, 沙门氏菌SL7207的毒性会降低, 从而更适合用作治疗工程菌<sup>[42]</sup>。对沙门氏菌菌株ATCC 14028进行亚硝基胍(nitrosoguanidine, NTG)诱变处理, Hoffman实验室获得了一株亮氨酸/精氨酸依赖性营养缺陷型突变体A1<sup>[43]</sup>。随后, Hoffman实验室从荷瘤裸鼠的肿瘤组织中再次富集A1菌株, 从而得到了比A1菌株更能富集于肿瘤组织的营养缺陷型A1-R菌株用于肿瘤治疗<sup>[44]</sup>。这些不同类型的沙门氏菌菌株已被证明在各种肿瘤模型中显示出更好的生物安全性和更强的抗肿瘤功效<sup>[45]</sup>。

#### 4.2 沙门氏菌疗法的肿瘤靶向性研究

减毒是提升沙门氏菌疗法安全性的策略之一, 提高其靶向肿瘤的特异性, 则可以同时提升安全性和有效性。化疗药和其他一些生物药, 如抗体和细胞因子等, 都主要靠被动扩散进入肿瘤组织, 它们通常很难有效进入肿瘤组织中, 这是传统癌症治疗药物的困境之一。这一方面不仅限制了抗肿瘤药物

的有效性, 另一方面也使得药物的治疗窗口(therapeutic window)剂量过窄, 因为通过增加剂量提高瘤内治疗药物的有效浓度往往会导致更高的药物毒性。作为一种兼性厌氧细菌, 野生型沙门氏菌本身具有靶向肿瘤微环境的特征。野生型沙门氏菌给药后会经过循环系统到正常组织和肿瘤组织。正常组织和循环系统中的治疗性减毒沙门氏菌极易被宿主免疫系统清除, 而缺氧的肿瘤微环境是免疫抑制性的, 可以为肿瘤内的沙门氏菌提供庇护, 躲避免疫攻击, 最终实现沙门氏菌在肿瘤微环境中的相对富集<sup>[3]</sup>。另外, 沙门氏菌也天然地对肿瘤微环境中的某些代谢物具有趋化性<sup>[46]</sup>。有趣的是, 静脉注射的厌氧菌和兼性厌氧菌不会在其他缺氧或炎症病变的非肿瘤组织中定植<sup>[3]</sup>。虽然能富集于肿瘤组织中, 但野生型沙门氏菌并不是完全无法存活于正常组织, 因此这种相对富集于肿瘤组织的肿瘤特异性还不够强, 需要进一步工程学改造。

合成生物学给这种定向改造提供了新思路, 肿瘤微环境的特征可以作为沙门氏菌靶向改造的目标, 其中靶向肿瘤微环境的缺氧特征和代谢特征是比较成熟的策略。通过将必需基因*asd*置于缺氧条件启动的启动子下, 从沙门氏菌营养缺陷菌株SL7207改造而来的沙门氏菌YB1仅在缺氧条件下存活, 因此在体内仅能在肿瘤内部存活, 而在正常组织中会被迅速清除, 从而大大减少了对正常组织的毒性<sup>[47]</sup>。因为沙门氏菌YB1这种极高的肿瘤靶向能力, YB1菌株的安全性远优于常用的SL7207和VNP20009菌株<sup>[48]</sup>。虽然毒性被大大降低, 但沙门氏菌YB1的抗肿瘤能力并没有被削弱。沙门氏菌YB1对实体肿瘤生长的抑制在多种癌症模型中得到验证, 包括但不限于乳腺癌、结直肠癌、神经母细胞瘤和肝癌<sup>[37, 47-50]</sup>。肿瘤微环境的代谢特征与正常组织差别很大, 比如肿瘤微环境富含亮氨酸和精氨酸。因此, 前面提到的亮氨酸/精氨酸依赖性营养缺陷型突变体A1-R比野生型沙门氏菌也有更高的肿瘤靶向效率<sup>[45]</sup>。另一种提高沙门氏菌靶向肿瘤能力的方法是让沙门氏菌表达肿瘤组织特异性配体。整合素 $\alpha$ v $\beta$ 3(integrin  $\alpha$ v $\beta$ 3)常常在肿瘤细胞上过表达, 其识别的配体是RGD(arginine-glycine-aspartate)序列。过表达RGD序列的合成缺陷菌株 $\Delta$ ppGpp在人乳腺癌和人黑色素瘤模型中有更高的靶向肿瘤的能力<sup>[51]</sup>。这些肿瘤靶向性增强的沙门氏菌菌株不仅保留了其固有的抑制肿瘤生长的能力, 还提供了安全的靶向肿瘤组织的药物递呈载体。

### 4.3 沙门氏菌作为抗肿瘤药物递呈载体的研究

野生型沙门氏菌可以抗肿瘤<sup>[24]</sup>，但仅靠沙门氏菌固有的抗肿瘤能力不足以根除实体瘤。经合成生物学改造的沙门氏菌可以精确靶向肿瘤组织递送抗肿瘤药物。非生物药递送尚处早期探索阶段，这样的传递方式一般是直接将抗肿瘤药物偶联在沙门氏菌表面，从而将抗肿瘤药物递送到肿瘤组织，如将具有光热效应的纳米颗粒偶联到沙门氏菌 YB1 表面，从而成功将治疗用纳米颗粒递送到了肿瘤组织<sup>[52]</sup>。沙门氏菌递送的抗肿瘤药物大部分是生物药，这些药物一般需要编辑沙门氏菌，使之携带或表达相关遗传信息<sup>[53-54]</sup>。沙门氏菌可以以两种方式向肿瘤组织递送生物药：(1) 沙门氏菌直接表达并释放具有抗肿瘤活性的生物药；(2) 沙门氏菌可以向肿瘤细胞递送编码特定生物药的真核表达载体，从而让肿瘤微环境中的真核细胞表达具有抗肿瘤能力的 RNA 或蛋白质。目前被验证可被递送的生物类抗肿瘤药物主要包括：(1) 具有细胞毒性的蛋白质、能沉默基因表达的发卡 RNA (hairpin RNAs, shRNAs)；(2) 能阻碍血管生成的信号蛋白；(3) 能调节免疫系统的细胞因子和抗体<sup>[39]</sup>。例如，在靶向肿瘤缺氧微环境的沙门氏菌菌株 ST4 上，科学家搭载了正反馈环维持基因稳定表达的原核真核双表达质粒系统，从而开发出能特异性靶向肿瘤组织的蛋白质或 shRNA 递送系统。白喉毒素 (diphtheria toxin, DT) 是白喉杆菌产生的细菌外毒素，能抑制肿瘤生长。利用沙门氏菌向肿瘤组织递送白喉毒素 A 链 (diphtheria toxin A chain, DTA) 治疗荷瘤小鼠，其中 26% (5/19) 的小鼠完全缓解，肿瘤消失，剩余小鼠也实现了防止疾病进展<sup>[55]</sup>。该系统被验证可以向肿瘤组织特异性地递送细胞周期相关蛋白 PLK1 (polo-like kinase 1) 的 shRNA，从而把肿瘤组织中 PLK1 的表达降低了  $(62.5 \pm 18.6)\%$ <sup>[55]</sup>。沙门氏菌菌株 ST4 的升级版 ST8 菌株在定植于正常组织的前提下，能更好地扩散至整个肿瘤组织，包括肿瘤组织中边缘的并不缺氧或坏死的区域。沙门氏菌菌株 ST8 在肿瘤中积累的水平至少是其更专性厌氧的母本菌株 ST4 的 100 倍。另外，ST8 菌株的一个必需基因 *htrA* 被转移到了搭载质粒 *pcDNA-infA* 上，以保证细菌在瘤内增殖过程中搭载的质粒不会丢失。用 ST8/*pcDNA-infA* 递送抑制血管生成的内皮抑素 (endostatin) 可以非常有效地抑制肿瘤血管生成，从而抑制结直肠癌的生长<sup>[56]</sup>。分泌细胞因子的沙门氏菌能调节肿瘤微环境的免疫反应，从而抑制肿瘤的生长。

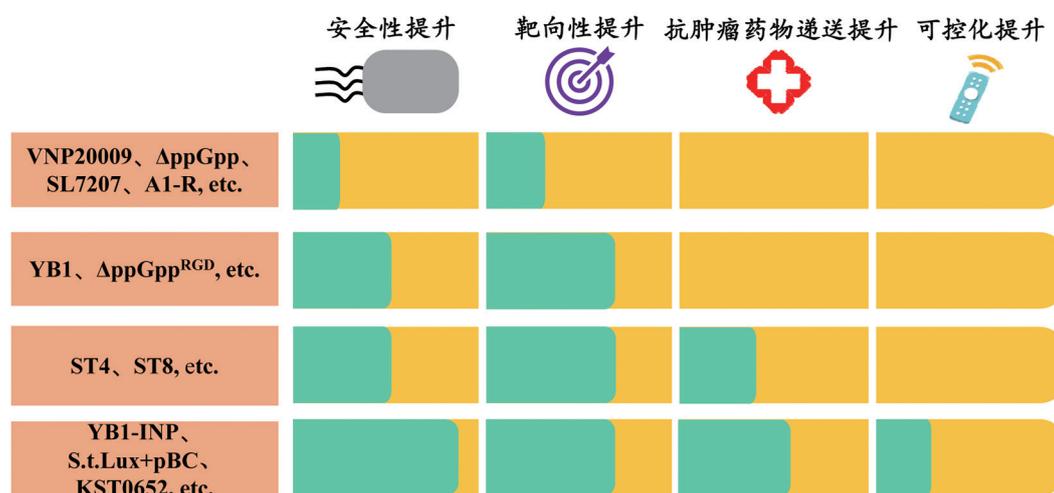
如在不同的研究中，分别分泌 IL-2、IL-4、IL-12、IL-18、IFN- $\gamma$  或 TNF- $\alpha$  的沙门氏菌能显著抑制肿瘤的生长<sup>[57]</sup>。类似地，用靶向肿瘤的沙门氏菌递送生物类抗肿瘤药物的研究很多，也有综述进行了大篇幅的报道，因此此处就不再一一赘述<sup>[3, 45, 57]</sup>。

### 4.4 沙门氏菌疗法的可控化研究

除了提升靶向性和杀伤性，提升沙门氏菌疗法的可控化是另一个改造方向。沙门氏菌所携带的抗肿瘤药物最好能够被外部的信号所调控，从而决定抗肿瘤药物于何时何处起效<sup>[39]</sup>。荷载吖啶菁绿 (indocyanine green, ICG) 的纳米粒子 INP (ICG-loaded nanoparticles) 具有光热效应。在近红外光的激光照射下，INP 可以产生大量的热能。一旦注入，INP 在体内的分布没有组织特异性。但如果将 INP 偶联到靶向肿瘤组织的沙门氏菌菌株 YB1 表面，可将 INP 特异地递送到肿瘤组织。在近红外光的刺激下，肿瘤聚集的 YB1-INP 可以释放大量的热量，使瘤内温度甚至能高达 63 °C，最终可以完全清除小鼠体内的大实体瘤 ( $\geq 500$  mm)<sup>[52]</sup>。有些沙门氏菌递送的生物类抗肿瘤药具有很强的毒副作用，如具有细胞毒性的蛋白质或细胞因子，因此这类抗肿瘤物质不能组成型表达，而是应该等治疗菌都富集到肿瘤组织后再被诱导表达。溶细胞素 A (cytolysin A) 是由一些肠杆菌科的细菌产生的成孔毒素。在用沙门氏菌合成缺陷菌株  $\Delta$ ppGpp 表达细胞素 A (S.t.Lux + pBC) 以抗肿瘤的研究中，为了避免尾静脉注射后细胞素 A 在肝脏和脾脏中的非特异性表达引起毒副作用，其表达被诱导型启动子系统控制。在这项研究中，研究人员使用的诱导型启动子是来自大肠杆菌阿拉伯糖操纵子的 *pBAD* 启动子，它可以被 L-阿拉伯糖 (L-arabinose) 激活<sup>[58]</sup>。类似的研究还有很多，比如用沙门氏菌菌株 KST0650 递送受放疗诱导表达的胞内促凋亡蛋白 sATF6 (菌株 KST0652) 也可以抑制结直肠癌的生长<sup>[59]</sup>。可控的沙门氏菌疗法不仅能提高疗效，还能更有效地控制副作用。

## 5 研究展望

我们简单列举了各沙门氏菌菌株抗肿瘤的四个能力的提升比较 (图 2)。总而言之，从 Coley 毒素到今天，以沙门氏菌为代表的细菌抗肿瘤疗法在降低毒性、增强靶向肿瘤的能力和提高了治疗效果方面已经取得了巨大的进展，也显示出成为下一代智能抗肿瘤微型机器人的潜力。然而，由于临床试验数据比较少，沙门氏菌的强大抗肿瘤作用尚未在



绿色的体积表示能力提升的程度。

图2 抗肿瘤沙门氏菌菌株各方面能力提升的案例

人类患者中充分表现出来。2002年,沙门氏菌VNP20009菌株通过静脉注射的方式治疗转移性黑色素瘤的I期临床试验数据证明了沙门氏菌疗法的安全性,但疗效却并不令人满意<sup>[60]</sup>。鉴于VNP20009菌株并没有经过肿瘤靶向能力的提升和搭载任何抗肿瘤药物,因此VNP20009的临床疗效失败并不能代表后来各种加强版的沙门氏菌抗肿瘤疗法也会在人体上无效。另一个关于沙门氏菌疗法的I期临床数据显示,口服表达IL-2的沙门氏菌可以增强循环NK细胞和NK-T细胞的比例,但对转移性胃肠道肿瘤的疗效并不令人满意<sup>[61]</sup>。在大部分动物肿瘤模型中,沙门氏菌疗法强大的抗肿瘤作用主要还是依靠静脉注射产生,而不是口服。因此,为了在人类临床试验中也取得更好的疗效,静脉注射应该是更好的选择。而静脉注射对治疗用的沙门氏菌有着更高的安全性要求,不过这些都是可以靠基因改造实现的,而且目前也还没有具备所有上述四种抗肿瘤功能的沙门氏菌菌株的临床试验。另外值得注意的是,不同的沙门氏菌菌株的抗肿瘤机制不是完全一样的,因此与其他传统抗肿瘤疗法进行联用时要考虑组合疗法是否存在机制冲突。随着合成生物学和肿瘤生态学的发展,我们相信沙门氏菌抗肿瘤疗法的进展不会止步于此,迭代后的沙门氏菌疗法和其他疗法协同作用以产生有效的抑癌作用仍然是未来一个值得研究的主题。

#### [参 考 文 献]

[1] WHO. Global Health Estimates 2020: deaths by cause,

age, sex, by country and by region, 2000-2019.[EB/OL]. [2022-09-30]. <https://www.who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates/ghe-leading-causes-of-death>

- [2] 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. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71: 209-49
- [3] Zhou S, Gravekamp C, Bermudes D, et al. Tumour-targeting bacteria engineered to fight cancer. *Nat Rev Cancer*, 2018, 18: 727-43
- [4] Widakowich C, de Castro G Jr, de Azambuja E, et al. Review: side effects of approved molecular targeted therapies in solid cancers. *Oncologist*, 2007, 12: 1443-55
- [5] Imai K, Takaoka A. Comparing antibody and small-molecule therapies for cancer. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6: 714-27
- [6] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 2011, 144: 646-74
- [7] Yang Y. Cancer immunotherapy: harnessing the immune system to battle cancer. *J Clin Invest*, 2015, 125: 3335-7
- [8] Feng M, Jiang W, Kim BYS, et al. Phagocytosis checkpoints as new targets for cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*, 2019, 19: 568-86
- [9] Kather JN, Halama N. Harnessing the innate immune system and local immunological microenvironment to treat colorectal cancer. *Br J Cancer*, 2019, 120: 871-82
- [10] Garrido F, Aptsiauri N, Doorduijn EM, et al. The urgent need to recover MHC class I in cancers for effective immunotherapy. *Curr Opin Immunol*, 2016, 39: 44-51
- [11] Beatty GL, Gladney WL. Immune escape mechanisms as a guide for cancer immunotherapy. *Clin Cancer Res*, 2015, 21: 687-92
- [12] 董宇轩, 曾正阳, 夏霖, 等. 肿瘤细菌疗法迎来合成生物学时代. *生命科学*, 2019, 31: 332-42
- [13] Mowday AM, Guise CP, Ackerley DF, et al. Advancing Clostridia to clinical trial: past lessons and recent progress.

- Cancers (Basel), 2016, 8: 63
- [14] Cheyne WW. Recent essays by various authors on bacteria in relation to disease. *Edinb Med J*, 1886, 32: 257-8
- [15] Felgner S, Kocijancic D, Frahm M, et al. Bacteria in cancer therapy: renaissance of an old concept. *Int J Microbiol*, 2016, 2016: 8451728
- [16] McCarthy EF. The toxins of William B. Coley and the treatment of bone and soft-tissue sarcomas. *Iowa Orthop J*, 2006, 26: 154-8
- [17] Forbes NS, Coffin RS, Deng L, et al. White paper on microbial anti-cancer therapy and prevention. *J Immunother Cancer*, 2018, 6: 78
- [18] Coley WB. The treatment of inoperable sarcoma by bacterial toxins (the mixed toxins of the *Streptococcus erysipelas* and the *Bacillus prodigiosus*). *Proc R Soc Med*, 1910, 3: 1-48
- [19] Richardson MA, Ramirez T, Russell NC, et al. Coley toxins immunotherapy: a retrospective review. *Altern Ther Health Med*, 1999, 5: 42-7
- [20] Kramer MG, Masner M, Ferreira FA, et al. Bacterial therapy of cancer: promises, limitations, and insights for future directions. *Front Microbiol*, 2018, 9: 16
- [21] Herr HW, Schwalb DM, Zhang ZF, et al. Intravesical bacillus Calmette-Guerin therapy prevents tumor progression and death from superficial bladder cancer: ten-year follow-up of a prospective randomized trial. *J Clin Oncol*, 1995, 13: 1404-8
- [22] Lamm DL. BCG immunotherapy for transitional-cell carcinoma *in situ* of the bladder. *Oncology (Williston Park)*, 1995, 9: 947-52, 55, discussion 955-65
- [23] Song S, Vuai MS, Zhong M. The role of bacteria in cancer therapy -- enemies in the past, but allies at present. *Infect Agent Cancer*, 2018, 13: 9
- [24] Wang D, Wei X, Kalvakolanu DV, et al. Perspectives on oncolytic *Salmonella* in cancer immunotherapy -- a promising strategy. *Front Immunol*, 2021, 12: 615930
- [25] Barak Y, Schreiber F, Thorne SH, et al. Role of nitric oxide in *Salmonella typhimurium*-mediated cancer cell killing. *BMC Cancer*, 2010, 10: 146
- [26] Zheng JH, Min JJ. Targeted cancer therapy using engineered *Salmonella typhimurium*. *Chonnam Med J*, 2016, 52: 173-84
- [27] Kaimala S, Mohamed YA, Nader N, et al. *Salmonella*-mediated tumor regression involves targeting of tumor myeloid suppressor cells causing a shift to M1-like phenotype and reduction in suppressive capacity. *Cancer Immunol Immunother*, 2014, 63: 587-99
- [28] Lee CH, Wu CL, Shiau AL. Toll-like receptor 4 mediates an antitumor host response induced by *Salmonella choleraesuis*. *Clin Cancer Res*, 2008, 14: 1905-12
- [29] Kaimala S, Al-Sbiei A, Cabral-Marques O, et al. Attenuated bacteria as immunotherapeutic tools for cancer treatment. *Front Oncol*, 2018, 8: 136
- [30] Hernandez-Luna MA, Luria-Perez R. Cancer immunotherapy: priming the host immune response with live attenuated *Salmonella enterica*. *J Immunol Res*, 2018, 2018: 2984247
- [31] Chaffer CL, Weinberg RA. A perspective on cancer cell metastasis. *Science*, 2011, 331: 1559-64
- [32] Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2: 563-72
- [33] Luzzi KJ, MacDonald IC, Schmidt EE, et al. Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *Am J Pathol*, 1998, 153: 865-73
- [34] Werner-Klein M, Scheitler S, Hoffmann M, et al. Genetic alterations driving metastatic colony formation are acquired outside of the primary tumour in melanoma. *Nat Commun*, 2018, 9: 595
- [35] Avigdor BE, Cimino-Mathews A, DeMarzo AM, et al. Mutational profiles of breast cancer metastases from a rapid autopsy series reveal multiple evolutionary trajectories. *JCI Insight*, 2017, 2: e96896
- [36] Anderson RL, Balasas T, Callaghan J, et al. A framework for the development of effective anti-metastatic agents. *Nat Rev Clin Oncol*, 2019, 16: 185-204
- [37] Li CX, Yu B, Shi L, et al. 'Obligate' anaerobic *Salmonella* strain YB1 suppresses liver tumor growth and metastasis in nude mice. *Oncol Lett*, 2017, 13: 177-83
- [38] Lin Q, Rong L, Jia X, et al. IFN- $\gamma$ -dependent NK cell activation is essential to metastasis suppression by engineered *Salmonella*. *Nat Commun*, 2021, 12: 2537
- [39] Forbes NS. Engineering the perfect (bacterial) cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 2010, 10: 785-94
- [40] Low KB, Ittensohn M, Le T, et al. Lipid A mutant *Salmonella* with suppressed virulence and TNF $\alpha$  induction retain tumor-targeting *in vivo*. *Nat Biotechnol*, 1999, 17: 37-41
- [41] Luo X, Li Z, Lin S, et al. Antitumor effect of VNP20009, an attenuated *Salmonella*, in murine tumor models. *Oncol Res*, 2001, 12: 501-8
- [42] Hoiseth SK, Stocker BA. Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* are non-virulent and effective as live vaccines. *Nature*, 1981, 291: 238-9
- [43] 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 U S A*, 2005, 102: 755-60
- [44] 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: 7647-52
- [45] Chen W, Zhu Y, Zhang Z, et al. Advances in *Salmonella typhimurium*-based drug delivery system for cancer therapy. *Adv Drug Deliv Rev*, 2022, 185: 114295
- [46] Kasinskas RW, Forbes NS. *Salmonella typhimurium* specifically chemotax and proliferate in heterogeneous tumor tissue *in vitro*. *Biotechnol Bioeng*, 2006, 94: 710-21
- [47] Yu B, Yang M, Shi L, et al. Explicit hypoxia targeting with tumor suppression by creating an "obligate" anaerobic *Salmonella typhimurium* strain. *Sci Rep*, 2012, 2: 436
- [48] Yu B, Shi L, Zhang BZ, et al. Obligate anaerobic *Salmonella typhimurium* strain YB1 treatment on xenograft tumor in immunocompetent mouse model.

- Oncol Lett, 2015, 10: 1069-74
- [49] Guo ZL, Yu B, Ning BT, et al. Genetically modified “obligate” anaerobic *Salmonella typhimurium* as a therapeutic strategy for neuroblastoma. *J Hematol Oncol*, 2015, 8: 99
- [50] Ning BT, Yu B, Chan S, et al. Treatment of neuroblastoma with an engineered “obligate” anaerobic *Salmonella typhimurium* strain YB1. *J Cancer*, 2017, 8: 1609-18
- [51] Park SH, Zheng JH, Nguyen VH, et al. RGD peptide cell-surface display enhances the targeting and therapeutic efficacy of attenuated *Salmonella*-mediated cancer therapy. *Theranostics*, 2016, 6: 1672-82
- [52] 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
- [53] Mei Y, Zhao L, Liu Y, et al. Combining DNA vaccine and AIDA-1 in attenuated *Salmonella* activates tumor-specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell responses. *Cancer Immunol Res*, 2017, 5: 503-14
- [54] Cao H, Xiang T, Zhang C, et al. MDA7 combined with targeted attenuated *Salmonella* vector SL7207/pBud-VP3 inhibited growth of gastric cancer cells. *Biomed Pharmacother*, 2016, 83: 809-15
- [55] Shi L, Yu B, Cai CH, et al. Combined prokaryotic-eukaryotic delivery and expression of therapeutic factors through a primed autocatalytic positive-feedback loop. *J Control Release*, 2016, 222: 130-40
- [56] Shi L, Yu B, Cai CH, et al. Angiogenic inhibitors delivered by the type III secretion system of tumor-targeting *Salmonella typhimurium* safely shrink tumors in mice. *AMB Express*, 2016, 6: 56
- [57] Badie F, Ghandali M, Tabatabaei SA, et al. Use of *Salmonella* bacteria in cancer therapy: direct, drug delivery and combination approaches. *Front Oncol*, 2021, 11: 624759
- [58] Nguyen VH, Kim HS, Ha JM, et al. Genetically engineered *Salmonella typhimurium* as an imageable therapeutic probe for cancer. *Cancer Res*, 2010, 70: 18-23
- [59] Gao S, Jung JH, Lin SM, et al. Development of oxytolerant *Salmonella typhimurium* using radiation mutation technology (RMT) for cancer therapy. *Sci Rep*, 2020, 10: 3764
- [60] 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
- [61] 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