

DOI: 10.13376/j.cblls/20240105

文章编号: 1004-0374(2024)08-1040-09

# 合成生物学与纳米生物学的交叉融合及其 在肿瘤细菌疗法中的应用进展

宋 健<sup>#</sup>, 袁志君<sup>#</sup>, 邹 丽, 冯贻蕊, 李晓岩, 张佳艺, 于晓丽\*

(山东第二医科大学公共卫生学院, 潍坊 261053)

**摘要:** 肿瘤细菌疗法已有多年历史, 但是生物安全性和肿瘤靶向性较低, 进而导致治疗效果不理想。近年来, 合成生物学和纳米生物学的发展赋予了肿瘤细菌疗法新的希望。合成基因线路有助于实现细菌结构重塑, 降低毒性和增强靶向性, 纳米技术则可助力基因线路递送, 参与介导基因调控, 两者的交叉融合可以构建出纳米级功能模块和纳米人工杂合系统, 增强改造后体系的功能, 有助于解决肿瘤细菌疗法面临的难题, 推动临床转化。本文将着重介绍近期合成生物学和纳米生物学交叉融合及其在肿瘤细菌疗法中的研究进展, 从合成生物学推动肿瘤细菌疗法的发展、合成生物学与纳米生物学的交叉融合、合成生物学与纳米生物学的交叉融合应用于肿瘤细菌疗法这三个角度, 着重阐述该领域近期的研究工作, 剖析并展望相关技术在肿瘤细菌疗法中的应用和前景。

**关键词:** 合成生物学; 纳米技术; 肿瘤细菌疗法; 基因工程

**中图分类号:** Q81; R730.5 **文献标志码:** A

## Integration of synthetic biology and nanobiotechnology for the application of bacterial cancer therapy

SONG Jian<sup>#</sup>, YUAN Zhi-Jun<sup>#</sup>, ZOU Li, FENG Yi-Rui, LI Xiao-Yan, ZHANG Jia-Yi, YU Xiao-Li\*

(School of Public Health, Shandong Second Medical University, Weifang 261053, China)

**Abstract:** Bacterial cancer therapy has a long history, but the biosafety and tumor targeting are relatively low, which leads to unsatisfactory therapeutic effects. In recent years, the development of synthetic biology and nanobiotechnology has given new hope to bacterial cancer therapy. Synthetic gene circuits helps to reshape bacterial structures, reduce toxicity and enhance targeting, while nanotechnology can facilitate gene delivery and participate in mediating gene regulation. The integration of synthetic biology and nanobiotechnology can construct nano-scale functional modules and nano-artificial hybrid system, and enhance the function of the modified system. It will help to solve the problems of bacterial cancer therapy and promote clinical transformation. In this review, we focus on the recent research progress in the integration of synthetic biology and nanobiotechnology and their application in bacterial cancer therapy. Three aspects are included: the promotion of synthetic biology in the development of tumor bacterial therapy, the integration of synthetic biology and nanobiotechnology, and the application of such integration in tumor bacterial therapy. Furthermore, the recent research work in this field is discussed, and the application and prospect of related technologies in bacterial cancer therapy are analyzed and prospected.

**Key words:** synthetic biology; nanotechnology; bacterial cancer therapy; genetic engineering

收稿日期: 2024-03-26; 修回日期: 2024-06-24

基金项目: 山东省自然科学基金青年项目(ZR2021QC079)

<sup>#</sup>共同第一作者

\*通信作者: E-mail: yuxl0814@sdsmu.edu.cn; Tel: 0536-8468563

随着医学技术的不断发展, 恶性肿瘤的治疗方法从最初的“手术、放疗、化疗”到如今新发展的免疫治疗、肿瘤细菌疗法等, 人们对于肿瘤的研究不断创新, 不仅仅是简单地从外部清除, 而是随着对细胞内部生理机制的认识, 利用 CRISPR 等技术对细胞的基因进行编辑从而实现精准治疗。其中, 肿瘤细菌治疗是一种使肿瘤患者感染具有靶向性的减毒细菌, 由于细菌具有主动靶向肿瘤并特异性瘤内定植的独特能力, 所以能进入肿瘤组织<sup>[1-3]</sup>, 在组织内积累增殖, 直接或者间接对肿瘤产生杀伤效果<sup>[4-6]</sup>, 从而导致肿瘤生长减缓, 甚至被根除<sup>[7]</sup>, 同时又不会对患者身体造成其他损伤的一种治疗肿瘤的方法。但是这种方法又存在一些不足。致病菌如鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*) A1-R 虽然抑制了肿瘤生长, 但是天然毒性较强<sup>[8]</sup>, 而非致病菌如大肠杆菌 Nissle 1917 (*Escherichia coli* Nissle 1917, EcN) 虽然能成功靶向肿瘤, 却又不具有直接溶瘤作用<sup>[9]</sup>。由此可见, 细菌的肿瘤靶向性和治疗安全性往往不能兼得, 需要有针对性地对抗肿瘤细菌进一步改造。

因此, 研究者们集中于对天然细菌进行基因改造, 以提高细菌安全性与靶向性、增强侵袭性和定植能力等, 但仍然存在着治疗效果和细菌体内毒性的矛盾以及抗肿瘤作用时空控制性弱等问题。在此

基础上, 随着合成生物学和纳米生物学在医学应用领域快速发展, 改变了以往只能“看”细胞的处境, 而是与细胞相互作用, 联合发挥效应, 纳米技术的应用可以助力基因线路递送, 提升基于合成生物学的应用前景, 两者交叉融合极大地弥补了肿瘤细菌疗法的不足 (图 1), 该方法将是未来肿瘤治疗的重要模式之一<sup>[10]</sup>。

### 1 合成生物学推动了肿瘤细菌疗法的发展

合成生物学的出现和发展为肿瘤细菌疗法的深度优化提供了理论基础和技术支撑。合成生物学中常见的基因线路包括遗传振荡器、群体感应、自杀开关、逻辑门控系统等被用于重编程细菌<sup>[11]</sup>, 设计的工程菌具有更强的肿瘤靶向能力、选择性毒性等, 能在体内长时间维持活性并发挥功能, 提高了细菌在肿瘤治疗中的安全性, 进一步推动了肿瘤细菌疗法进入临床试验<sup>[11-12]</sup>。

合成生物学最初是被用于在大肠杆菌中合成双稳定开关和振荡回路, Danino 等<sup>[13]</sup>在大肠杆菌中利用正、负反馈线路构建工程遗传振荡器, 该系统具有快速、稳定和持久性等特点。如果将遗传振荡器联合群体感应, 则可以进一步精准控制抗肿瘤分子的表达。Din 等<sup>[14]</sup>将两种基因线路同时加入细菌后可以最大程度地维持体内较低的细菌定植数量,

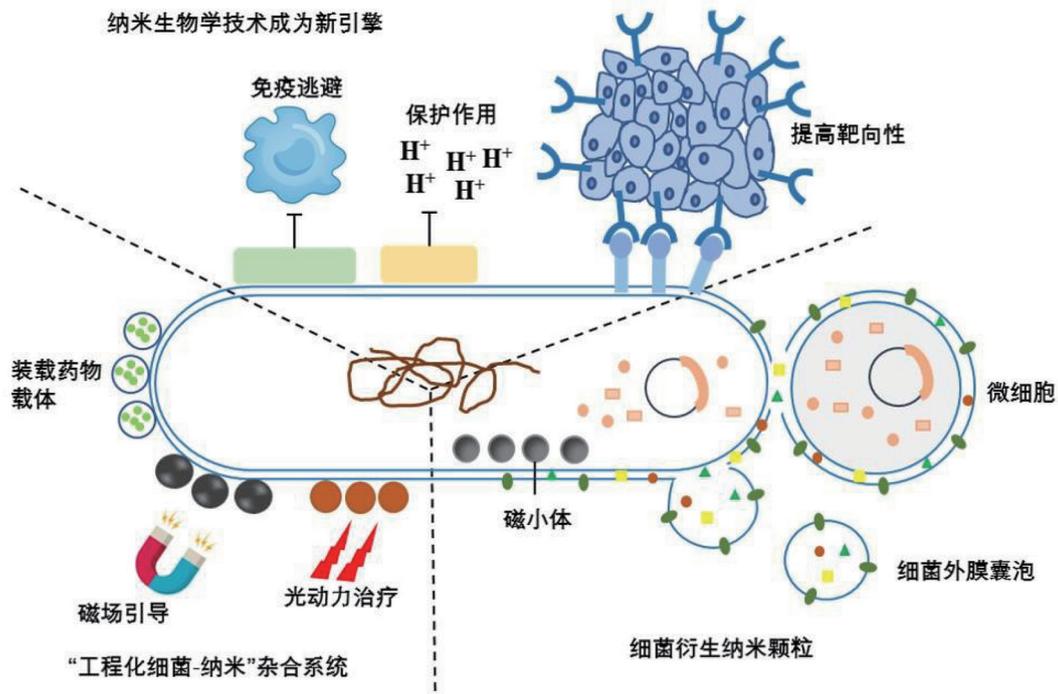


图1 合成生物学与纳米生物学的交叉融合在肿瘤细菌疗法中的应用

不但显著抑制肿瘤的生长,而且还减少了对周围组织的损伤及毒副作用。自杀开关是在限定条件下诱导致死基因表达,从而导致细胞死亡的基因线路<sup>[15]</sup>。有研究利用厌氧启动子  $P_{\text{pepT}}$  控制必需基因 *asd* 转录,有氧启动子  $P_{\text{sodA}}$  促进反义 *asd* 转录以抑制  $P_{\text{pepT}}$  启动子的本底表达,由此构建了专性厌氧鼠伤寒沙门氏菌菌株 YB1<sup>[16]</sup>。YB1 在小鼠肿瘤模型中诱导高达 31.4% 的神经母细胞瘤细胞凋亡<sup>[17-18]</sup>。此外, FNR、ArcA 等氧气敏感调节因子或 PRNP 等温度敏感调节因子被开发应用于自杀系统的设计<sup>[15, 19]</sup>。逻辑门控系统可以整合两个或两个以上输入信号并产生功能性的特异信号输出,在细菌中构建逻辑门控系统可以通过使用特异性响应肿瘤相关信号的启动子,实现肿瘤治疗基因的特异性输出表达,作为诊断、预防和治疗的高度选择性工具<sup>[20]</sup>。Anderson 等<sup>[21]</sup> 构建了群感信号 AI-1 与镁离子的逻辑门控系统,当工程菌密度高、镁离子浓度低时,工程菌可以表达侵袭素入侵哺乳动物细胞。Chien 等<sup>[22]</sup> 利用各种敏感调节因子构建了低氧、低 pH、高乳酸的逻辑门控系统,使工程菌在肿瘤中特异性生长。

综上,为满足肿瘤等疾病的临床诊断和治疗需要,提高治疗效果,合成生物学需要与其他学科交叉融合,进一步将细菌改造成智能化的“细菌工厂”或“细菌机器”。

## 2 合成生物学与纳米生物学的交叉融合

### 2.1 纳米生物学技术助力基因线路与基因编辑体系递送

由于机体免疫系统已经进化到能抵抗和耐受病原体、共生菌、益生菌的定植,免疫系统和体内维持平衡的微生物菌群的严格调控使得在体内引入治疗性细菌面临很多难题。尽管合成基因线路有效地提高了肿瘤细菌疗法的安全性,但是在临床转化方面面临挑战,所以肿瘤细菌疗法应用于临床一直未取得重大进展,这也是目前合成生物学研究的重要方向之一<sup>[23]</sup>。

近年来,纳米材料因独特的粒径效应、比表面积大、表面易修饰等优点被广泛应用于生物学研究领域<sup>[24]</sup>。纳米生物学作为生物学中的新兴学科,与合成生物学交叉研究成为生物医药领域发展的重要方向之一。利用纳米生物学技术可以帮助以基因线路为代表的合成生物学元件跨越多重生理屏障有效到达靶标位置<sup>[25]</sup>,同时纳米材料所具有的独特的化学、机械、磁、电和生物特性<sup>[26]</sup>,能够实现信号的响应以达到体内外行为的可控<sup>[26]</sup>。由于纳米材料

具备光、声、热、磁等外部刺激特性,在合成基因线路中引入纳米粒子作为外部信号传导的载体,可以将光、磁等信号转换为能被基因开关识别的输入信号,进而实现基因表达的时空控制,有助于发展出更精准、智能的药物治疗方式。比如有研究就将磁信号经过纳米粒子转换为热信号。Tang 等<sup>[27]</sup> 构建一种热诱导基因表达系统,在交变磁场下由 Mn-Zn 铁氧体磁性纳米粒子产生热能,用于激活热诱导基因表达  $\beta$ -半乳糖苷酶。Yamaguchi 等<sup>[28]</sup> 也利用磁铁矿纳米颗粒作为基因开关,用于肿瘤治疗。

与此同时,纳米技术为实现基因线路和基因编辑系统的多样化、靶向性递送和可控性释放提供更多的选择。有机纳米载体、无机纳米载体、生物仿生纳米载体等广泛作为载体实现基因编辑体系的组织特异性递送(如肺、脾和肝脏靶向)和多样性递送(包括 mRNA、Cas9 mRNA/sgRNA 和 Cas9 RNP 复合物等形式)<sup>[29-31]</sup>。其中,生物仿生纳米材料如细胞外囊泡、DNA 纳米颗粒具有较好的生物相容性,同时具有独特的生物学功能,也被开发为基因线路等合成生物学元件的递送系统<sup>[32-33]</sup>。Zhuang 等<sup>[34]</sup> 设计了连接有 DNA 适配体的四面体 DNA 纳米结构,将该纳米结构修饰到细胞外囊泡表面,实现 Cas9 RNP 特异性靶向癌细胞。

### 2.2 合成生物学助力纳米生物学技术应用与发展

合成生物学技术可以帮助生物源性纳米材料创造特殊的结构与功能,驱动纳米生物学的发展。利用合成生物学构筑生物元件和组装基因线路,可以构建出更精妙的生物源纳米制剂,经过基因工程化的纳米粒子表现出更强的靶向性,在药物靶向递送和肿瘤治疗中具有广阔的应用前景。比如天然外泌体具有丰富的膜蛋白、高生物相容性和低免疫原性,是一种独特的纳米制剂<sup>[35]</sup>。Shi 等<sup>[35]</sup> 开发了双重靶向 T 细胞 CD3 和乳腺癌细胞 HER2 受体的外泌体,其具备更好的乳腺癌免疫治疗效果,合成多价抗体的重定向外泌体有望成为下一代免疫纳米药物的平台技术。Kojima 等<sup>[36]</sup> 利用合成生物学技术设计了一种外泌体生产细胞,能高效地生产定制化外泌体,包装并实现 mRNA 的脑内靶向递送。由此可见,基因工程化细胞外泌体不仅可以实现靶向药物递送,也能诱导免疫效应细胞和靶细胞间的相互作用。

## 3 合成生物学与纳米生物学的交叉融合应用于肿瘤细菌疗法

合成生物学和纳米生物学的交叉融合使得纳米

粒子能够更好地传递治疗性药物,促进了肿瘤细菌疗法的发展,也使智能化“细菌机器”的构建成为可能。这部分将着重介绍近期合成生物学和纳米生物学交叉融合应用于肿瘤细菌疗法中的相关研究进展,未来,两者的交叉融合可能为肿瘤细菌疗法走向临床带来新的突破。

### 3.1 纳米生物学技术成为肿瘤细菌疗法发展的新引擎

在纳米技术中,为了使递送载体规避机体免疫系统的影响,通常采用保护性涂层来伪装递送载体,延长在血液中的时间。同样,EcN被富含自身抗原(如CD47)的红细胞膜包裹,减少了巨噬细胞的吞噬,并在静脉注射时降低体内炎症反应<sup>[37]</sup>。该保护性涂层并未影响细菌的生物活性,反而增加了细菌的活动强度和持续时间。纳米技术还有一种策略是根据环境诱因使用响应材料来动态调节表面特性。基于此,一种控制表面荚膜表达的细菌系统(一种天然存在于某些细菌外膜上的保护层)被开发出来。该系统只能在诱导剂存在的情况下表达荚膜多糖,这样可以在全身给药时能进行最初的免疫逃避,随后荚膜多糖脱落,被免疫细胞快速从靶器官中清除<sup>[38]</sup>。这种系统使小鼠静脉注射细菌的最大耐受剂量增加了10倍,从而提高了治疗效果,并且实现了肿瘤细菌疗法在安全性和有效性之间的微妙平衡。

纳米技术通常采用靶向配体来修饰纳米颗粒,以提高在肿瘤部位的定植,同样细菌表面也可以表达肿瘤靶向配体<sup>[39]</sup>。Geng等<sup>[40]</sup>通过酰胺化将肿瘤特异性适配体与细菌表面结合,产生适配体结合细菌VNP20009(ApCB),ApCB在4T1和H22小鼠肿瘤模型中显示了较强的免疫反应及抗肿瘤作用。除了化学修饰,细菌还可以通过基因工程进行改造表达靶向配体<sup>[41]</sup>。Park等<sup>[42]</sup>改造VNP20009表面OmpA,使其外环上显示Arg-Gly-Asp肽,与对照菌株相比,阳性菌株在肿瘤中的定植量提高了1000倍以上,在人乳腺癌和黑色素瘤小鼠模型中,有效抑制了肿瘤的生长并延长生存期。

纳米颗粒还被设计成多功能颗粒,通过与递送药物之间的协同作用来提高治疗作用。该方法也同样适用于细菌介导的肿瘤免疫治疗,通过用聚多巴胺、肿瘤抗原、抗PD-1抗体共同修饰EcN,构建的EcN工程菌既能进行光热治疗,又能进行免疫治疗,并协同增强了小鼠中卵清蛋白过表达的肿瘤的免疫治疗作用<sup>[43]</sup>。目前,聚多巴胺包被细菌的多功能性已被进一步利用,比如构建有病毒特异性抗原和光敏剂的细菌来刺激抗病毒免疫<sup>[44]</sup>或增强光热

治疗<sup>[45]</sup>。

### 3.2 “工程化细菌-纳米”杂合系统的开发

既然纳米颗粒可以被赋予难以在生物系统中实现的功能,那么细菌也可以被设计成具有当前纳米技术和基因工程策略无法实现的复杂功能。因此,纳米颗粒和细菌具有互补的特性,彼此相互协同发挥更大的功能。由细菌和纳米材料组成的生物杂合系统已经被开发出来,可以利用它们的互补优势进行肿瘤治疗。

细菌可以通过形成生物杂合系统来增强其治疗效果<sup>[46-47]</sup>,并获得新的功能<sup>[48-50]</sup>,从而获得纳米颗粒的独特特性。例如,利用生物素-链霉亲和素的相互作用,将大肠杆菌MG 1655与磁性纳米颗粒偶联,构建了一个能在磁场梯度引导下自我推进的细菌生物杂合系统。生物素化的纳米脂质体能在链霉亲和素存在的情况下修饰细菌,并携带化疗药物和光热剂进行刺激反应性药物释放。该系统能够在模拟肿瘤微环境的3D胶原基质中在磁场的引导下到达肿瘤细胞,并通过近红外光激活释放抗癌药物有效抑制肿瘤生长<sup>[51]</sup>。在该研究中磁性纳米颗粒充当天线,操纵工程菌进行癌症治疗。在另一研究中,细菌VNP20009被阳离子纳米颗粒修饰,能吸收从辐照肿瘤中释放的带有负电荷的肿瘤抗原,随后作为载体将肿瘤抗原运送至树突状细胞丰富的肿瘤组织周围。该生物杂合系统在多种小鼠肿瘤模型体内诱导产生了系统性抗肿瘤作用,并明显地抑制了肿瘤生长<sup>[52]</sup>。在该研究中,阳离子纳米颗粒就像背包一样从环境中收集带负电荷的肿瘤抗原,而细菌鞭毛提供了运动性,协同纳米颗粒共同引起抗肿瘤作用。

当系统给药时,纳米颗粒通过肾脏和/或单核吞噬系统被快速清除,从而进入非特异性组织而损害健康组织。同时,纳米治疗药物在肿瘤内的血管外转运会受到一些物理和生物屏障的限制,肿瘤微血管网络高度不规则的结构、肿瘤内较高的间质液压力等阻碍了纳米载体的被动扩散,进而阻碍了对肿瘤的治疗<sup>[53-54]</sup>。而一些细菌能在瘤内渗透,可以有效地靶向并定植肿瘤微环境<sup>[55]</sup>,并作为载体递送纳米治疗药物<sup>[56-58]</sup>。有研究将载药纳米微粒体附着在趋磁细菌*Magnetococcus marinus* MC-1菌株上,该菌株可以自然迁移到首选的低氧环境并保持位置不变<sup>[59]</sup>。为了进一步引导细菌靶向肿瘤,该生物杂合系统被外部排列有磁小体的磁场控制,每个细菌可以携带大约70个纳米脂质体。在小鼠HCT116

肿瘤模型体内,当注射在肿瘤附近并被磁场引导时,高达 55% 的细菌可以到达肿瘤组织。该研究表明,可以利用细菌介导的肿瘤靶向性来提高现有纳米载体进入肿瘤微环境的效率,从而用于癌症诊断和治疗。另外, Fan 等<sup>[60]</sup>构建大肠杆菌过表达呼吸链酶 II (NDH-II),并在表面修饰磁性 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 纳米粒子,实现在原位催化 Fenton 反应,产生过氧化氢诱导肿瘤死亡。Chen 等<sup>[61]</sup>开发了载有吲哚菁绿(indocyanine green, ICG)的纳米粒子作为纳米光敏剂,利用基因工程化鼠伤寒沙门氏菌 *S. typhimurium* YB1 的缺氧靶向能力将纳米粒子递送入肿瘤缺氧核心,在 NIR 激光照射下实现高效光热治疗。有研究构建大肠杆菌表达过氧化氢酶,结合聚多巴胺的光热转换能力和二氢卟吩 e6 (chlorin e6, Ce6) 的光敏作用,实现细菌的肿瘤靶向和光热疗法、光动力疗法的联合<sup>[62]</sup>。表 1 列出了代表性的工程化细菌-纳米杂合系统。

### 3.3 细菌衍生纳米颗粒的开发

细菌的复制特性是有利的,但同时也存在不受控制进而导致脱靶毒性的情况,细菌尺寸比纳米颗粒大,从而对有效递送至目标组织构成了物理障碍。与使用活细菌不同,纳米颗粒既可以作为工厂,也可以作为基础材料来合成,尽管降低复杂性会导致一些功能的损失,但也是在一个可预测的系统中进行体内应用,而且纳米颗粒通常更容易储存和处理。

有的纳米颗粒可以在细菌中自然合成或通过基因工程合成<sup>[63-65]</sup>。比如磁小体(magnetosome)可以作为包裹在细菌膜中的氧化铁纳米颗粒被提取出来。根据母体细菌的不同,得到的纳米颗粒具有不同的形状和大小,通常直径为 35~120 nm<sup>[66]</sup>。分离的磁小体可以通过靶向配体和药物修饰蛋白质和脂质进一步功能化,用于诊断和治疗。例如,从 *Magnetospirillum magneticum* AMB-1 中提取磁小体用金纳米颗粒修饰后用于癌症治疗<sup>[67]</sup>。在磁场引导下,改造磁小体在肿瘤中积累,并作为光声成像和磁共振成像的造影剂。金纳米颗粒通过消耗葡萄糖充当饥饿剂,作为近红外激光照射的光敏剂,肿瘤微环境的酸性条件触发磁性纳米颗粒释放 Fe<sup>2+</sup>,随后通过 Fenton 反应产生活性氧,从而进行化学动力学治疗。该纳米颗粒对 4T1 小鼠乳腺癌模型和多种人类异种移植模型具有明显的抗肿瘤作用。磁小体可以很容易地在细菌中产生,并通过化学或基因修饰后具有诊断和治疗功能,使其成为生物医学应用中有希望的细菌衍生纳米颗粒。

外膜囊泡(outer membrane vesicles, OMV)是由

表1 代表性的工程化细菌-纳米杂合系统

细菌	细菌改造与修饰	纳米材料	效能	参考文献
<i>E. coli</i> MG 1655	改造细菌在膜表面合成生物素,利用生物素-链霉菌亲和素的相互作用,生物素化的纳米脂质体能在链霉菌亲和素存在的情况下修饰细菌表面	磁性纳米颗粒与含药物纳米脂质体	工程菌携带化疗药物和光热剂,在磁场的引导下到达肿瘤细胞,通过近红外光激活释放抗癌药物,有效抑制肿瘤生长	[51]
<i>S. typhimurium</i> VNP20009	在细菌表面修饰阳离子纳米颗粒	阳离子纳米颗粒	能吸收带有负电荷的肿瘤抗原进而抑制肿瘤生长	[52]
<i>Magnetococcus marinus</i> MC-1	在细菌表面共价结合装载药物的脂质体	药物纳米脂质体	细菌体内含有磁性铁氧化物纳米晶链,在磁场引导下靶向肿瘤组织,进而提高纳米载体进入肿瘤微环境的递送效率	[59]
<i>E. coli</i> MG1655	构建细菌过表达呼吸链酶II (NDH-II)并在其表面修饰纳米颗粒	磁性Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> 纳米粒子	在BALB/c小鼠的CT 26 结肠癌部位原位催化产生H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ,诱导肿瘤细胞死亡	[60]
<i>S. typhimurium</i> YB1	利用细菌缺氧氧靶向性,同时结合装载药物的纳米颗粒	载有吲哚菁绿(ICG)的纳米颗粒	在NIR激光照射下,产生光热杀伤能力,根除C57 BL/6小鼠的MB49 实体瘤	[61]
<i>E. coli</i>	构建细菌过表达过氧化氢酶,并在细菌表面修饰纳米颗粒	含Ce6涂层的聚多巴胺纳米颗粒	NIR光照射下实现光热疗法和光动力疗法,在荷瘤BALB/c裸鼠中抑制肿瘤生长	[62]

革兰氏阴性菌自然产生的一种具有磷脂双分子层的球状纳米颗粒 (直径 10~250 nm)。OMV 的大小和组成各不相同, 外层含有脂多糖、外膜蛋白受体等, 内层由脂蛋白和肽聚糖交联而成<sup>[68]</sup>。通过对 OMV 亲本细菌进行基因工程改造, 产生的 OMV 可被作为药物递送载体。有研究将抗 HER2 affibody 融合到 ClyA 的 C 端, 在细菌及其产生的 OMV 表面表达重组蛋白, 用于靶向过表达 HER2 受体的肿瘤细胞, 同时在 OMV 中装载干扰 RNA 以沉默肿瘤细胞中过表达的激酶纺锤体蛋白。将改造的 OMV 静脉注射到小鼠 HCC-1954 肿瘤模型中, 不仅明显地抑制了肿瘤生长, 而且对非特异性组织没有毒副作用<sup>[69]</sup>。天然的 OMV 具有免疫刺激作用, 本身就具备一定的抗肿瘤活性, 能够刺激 IFN- $\gamma$  介导的抗肿瘤免疫反应<sup>[70]</sup>。Li 等<sup>[71]</sup>在 OMV 表面融合表达了 PD-1 分子的胞外区, 使其在有效刺激免疫系统的基础上还能够抑制肿瘤细胞对免疫细胞的耗竭, 实现更强的抗肿瘤免疫效果。总之, OMV 不仅可以进行基因工程改造和化学修饰, 其多样性和天然免疫调节特性使其在肿瘤细菌治疗中具有更多的潜力。

除了细菌的天然分离产物, 还可以对细菌进行修饰以人工合成纳米颗粒, 比如微细胞 (minicell)。微细胞可通过突变大肠杆菌中 *minB* 基因位点导致细胞异常分裂而产生, 其含有亲本细菌的细胞质物质如质粒<sup>[72]</sup>。与 OMV 类似, 微细胞也可以被设计作为靶向递送载体用于肿瘤治疗。有研究改造亲本细菌使其在外膜上表达纳米抗体以特异性靶向肿瘤细胞, 并通过诱导型基因回路将水杨酸盐转化为儿茶酚用于肿瘤治疗, 从该工程菌上产生的微细胞在体外可以有效地杀死结肠癌细胞<sup>[73]</sup>。与通过合成生物技术构建的纳米颗粒相比, 微细胞可以作为基因工程的“智能生物制品”被编程而具有更多复杂的功能<sup>[74-75]</sup>, 而不会因使用具有复制特性的活细菌而带来风险。表 2 列出了代表性的细菌衍生纳米颗粒。

#### 4 总结与展望

对于合成生物学和纳米生物学来说, 一个学科进步将为另一个学科提供新的工具, 带来新的启发。两个学科的交叉融合赋予了肿瘤细菌疗法新的希望, 使工程菌转化为临床研究中有前景的活菌药物。目前已经有几种工程菌进入临床试验, 但是由于临床前模型和人类患者之间的差异, 许多活菌药物在临床试验中失败, 主要原因是由于活菌药物疗效不足和毒性过大<sup>[76]</sup>。肿瘤细菌疗法必须克服治疗

表2 代表性的细菌衍生纳米颗粒

细菌	细菌改造与修饰	细菌衍生纳米颗粒	效能	参考文献
<i>M. marinus</i> AMB-1	从AMB-1中提取天然四氧化三铁磁小体, 利用金纳米粒子原位功能化磁小体膜, 构建磁性纳米材料平台MSC-Au	基于金纳米粒子原位的功能化磁小体	用于光声成像和作为磁共振成像的造影剂, 同时还能作为具有选择性磁场引导功能的抗肿瘤治疗剂, 具有良好的抗肿瘤作用	[67]
<i>E. coli</i> W3110	将抗HER2 affibody融合到ClyA的C端, 分离表面能够表达重组蛋白的OMV	细菌外膜囊泡	OMV中装载干扰RNA, 能靶向过表达HER2受体的肿瘤细胞进而抑制肿瘤生长	[69]
<i>E. coli</i> W3110	在OMV表面融合表达PD-1分子的胞外区	细菌外膜囊泡	在有效刺激免疫系统的基础上能够抑制肿瘤细胞对免疫细胞的耗竭, 实现抗肿瘤免疫效果	[71]
<i>E. coli</i> BL21	使细菌在外膜上表达抗 CEA 纳米抗体	微细胞	表面带有抗CEA纳米抗体的微细胞特异性结合表达CEA的癌细胞, 并通过诱导型基因回路将水杨酸盐转化为儿茶酚用于肿瘤治疗	[73]

效果、生物安全性、肿瘤靶向性等差的问题才能应用于临床治疗。

在肿瘤细菌疗法中, 细菌作为载体递送治疗药物时会遇到不同生物屏障, 无论是口服给药还是静脉给药, 对细菌整个过程中的动态调控对于确保治疗的安全性和有效性至关重要。而纳米材料体积小、种类多、功能多样, 可以利用纳米材料本身的性质对活细胞进行功能强化。纳米技术的多样性和合成生物学所提供的复杂基因线路相互补充, 为治疗性细菌的开发带来更多的策略。同时, 纳米颗粒与细菌生物偶联构建的生物杂合系统设计充分利用了各个组件的技术优点, 提高了细菌疗法的体内安全性和有效性。而细菌衍生纳米颗粒则保留了细菌的独特特性, 避免了细菌复制带来的风险, 由细菌合成的纳米颗粒的安全性大大提高。在未来, 还需要不断完善工程化细菌-纳米人工杂合生物系统这种“半生命体”的构建理论和构效关系, 同时对其在体内的生物分布、对非靶向组织的影响以及代谢归宿进行详细研究, 才能够有望实现其临床转化。

综上所述, 本文对合成生物学和纳米医学的交叉融合及其应用于肿瘤细菌治疗进行了简要的概述, 互相交叉并互相赋能的合成生物学和纳米医学将有助于制定更好的给药策略, 以确保安全性和有效性, 从而为肿瘤细菌疗法的临床转化及应用奠定基础。

### [参 考 文 献]

- [1] Kasinskas RW, Forbes NS. *Salmonella typhimurium* specifically chemotax and proliferate in heterogeneous tumor tissue *in vitro*. *Biotechnol Bioeng*, 2006, 94: 710-21
- [2] Kasinskas RW, Forbes NS. *Salmonella typhimurium* lacking ribose chemoreceptors localize in tumor quiescence and induce apoptosis. *Cancer Res*, 2007, 67: 3201-9
- [3] 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
- [4] Freeman ML, DiSario JA, Nelson DB, et al. Risk factors for post-ERCP pancreatitis: a prospective, multicenter study. *Gastrointest Endosc*, 2001, 54: 425-34
- [5] Syvanen M. Churning out safer microbes for drug delivery. *Nat Biotechnol*, 2003, 21: 758-9
- [6] Koji K, Jun M, Akira J, et al. Bacillus Calmette-Guerin (BCG) immunotherapy for bladder cancer: current understanding and perspectives on engineered BCG vaccine. *Cancer Sci*, 2013, 104: 22-7
- [7] Nauts HC, Swift WE, Coley BL. The treatment of malignant tumors by bacterial toxins as developed by the late William B. Coley MD, reviewed in the light of modern research. *Cancer Res*, 1946, 6: 205-16
- [8] Igarashi K, Kawaguchi K, Kiyuna T, et al. Tumor-targeting *Salmonella typhimurium* A1-R is a highly effective general therapeutic for undifferentiated soft tissue sarcoma patient derived orthotopic xenograft nude-mouse models. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 497: 1055-61
- [9] Yu X, Lin C, Yu J, et al. Bioengineered *Escherichia coli* Nissle 1917 for tumour-targeting therapy. *Microb Biotechnol*, 2020, 13: 629-36
- [10] Hahn J, Ding S, Im J, et al. Bacterial therapies at the interface of synthetic biology and nanomedicine. *Nat Rev Bioeng*, 2024, 2: 120-135
- [11] Ruder WC, Lu T, Collins JJ. Synthetic biology moving into the clinic. *Science*, 2011, 333: 1248-52
- [12] 陈家文, 黄建东, 孙海涛. 工程菌在肿瘤治疗方面的应用进展. *合成生物学*, 2023, 4: 690-702
- [13] Danino T, Mondragón-Palomino O, Tsimring L, et al. A synchronized quorum of genetic clocks. *Nature*, 2010, 463: 326-30
- [14] Din MO, Danino T, Prindle A, et al. Synchronized cycles of bacterial lysis for *in vivo* delivery. *Nature*, 2016, 536: 81-5
- [15] Stirling F, Bitzan L, O'Keefe S, et al. Rational design of evolutionarily stable microbial kill switches. *Mol Cell*, 2017, 68: 686-97
- [16] 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
- [17] 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
- [18] 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
- [19] Piraner DI, Abedi MH, Moser BA, et al. Tunable thermal bioswitches for *in vivo* control of microbial therapeutics. *Nat Chem Biol*, 2017, 13: 75-80
- [20] 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
- [21] Anderson JC, Voigt CA, Arkin AP. Environmental signal integration by a modular AND gate. *Mol Syst Biol*, 2007, 3:133
- [22] Chien T, Harimoto T, Kepecs B, et al. Enhancing the tropism of bacteria via genetically programmed biosensors. *Nat Biomed Eng*, 2022, 6: 94-104
- [23] Church GM, Elowitz MB, Smolke CD, et al. Realizing the potential of synthetic biology. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15: 289-94
- [24] Razzacki SZ, Thwar PK, Yang M, et al. Integrated microsystems for controlled drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 2004, 56: 185-98
- [25] Jahangirian H, Lemraski EG, Webster TJ, et al. A review of drug delivery systems based on nanotechnology and green chemistry: green nanomedicine. *Int J Nanomedicine*, 2017, 12: 2957-78
- [26] Patra JK, Das G, Fraceto LF, et al. Nano based drug

- delivery systems: recent developments and future prospects. *Int J Nanomedicine*, 2018, 16: 71
- [27] Tang QS, Zhang DS, Cong XM, et al. Using thermal energy produced by irradiation of Mn-Zn ferrite magnetic nanoparticles (MZF-NPs) for heat-inducible gene expression. *Biomaterials*, 2008, 29: 2673-9
- [28] Yamaguchi M, Ito A, Ono A, et al. Heat-inducible gene expression system by applying alternating magnetic field to magnetic nanoparticles. *ACS Synth Biol*, 2014, 3: 273-9
- [29] Cheng Q, Wei T, Farbiak L, et al. Selective organ targeting (SORT) nanoparticles for tissue-specific mRNA delivery and CRISPR-Cas gene editing. *Nat Nanotechnol*, 2020, 15: 313-20
- [30] Lee B, Lee K, Panda S, et al. Nanoparticle delivery of CRISPR into the brain rescues a mouse model of fragile X syndrome from exaggerated repetitive behaviours. *Nat Biomed Eng*, 2018, 2: 497-507
- [31] Xu Q, Zhang Z, Zhao L, et al. Tropism-facilitated delivery of CRISPR/Cas9 system with chimeric antigen receptor-extracellular vesicles against B-cell malignancies. *J Control Release*, 2020, 326: 455-67
- [32] Lu M, Zhao X, Xing H, et al. Cell-free synthesis of connexin 43-integrated exosome-mimetic nanoparticles for siRNA delivery. *Acta Biomater*, 2019, 96: 517-36
- [33] Sun W, Ji W, Hall JM, et al. Efficient delivery of CRISPR-Cas9 for genome editing via self-assembled DNA nanoclews. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2015, 54: 12029-33
- [34] Zhuang J, Tan J, Wu C, et al. Extracellular vesicles engineered with valency-controlled DNA nanostructures deliver CRISPR/Cas9 system for gene therapy. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48: 8870-82
- [35] Shi XJ, Cheng Q, Hou T, et al. Genetically engineered cell-derived nanoparticles for targeted breast cancer immunotherapy. *Mol Ther*, 2020, 28: 536-47
- [36] Kojima R, Bojar D, Rizzi G, et al. Designer exosomes produced by implanted cells intracerebrally deliver therapeutic cargo for Parkinson's disease treatment. *Nat Commun*, 2018, 9: 1305
- [37] Cao Z, Cheng S, Wang X, et al. Camouflaging bacteria by wrapping with cell membranes. *Nat Commun*, 2019, 10: 3452
- [38] Harimoto T, Hahn J, Chen YY, et al. A programmable encapsulation system improves delivery of therapeutic bacteria in mice. *Nat Biotechnol*, 2022, 40: 1259-69
- [39] Li W, Zhang Z, Liu J, et al. Nanodrug-loaded *Bifidobacterium bifidum* conjugated with anti-death receptor antibody for tumor-targeted photodynamic and sonodynamic synergistic therapy. *Acta Biomater*, 2022, 146: 341-56
- [40] Geng Z, Cao Z, Liu R, et al. Aptamer-assisted tumor localization of bacteria for enhanced biotherapy. *Nat Commun*, 2021, 12: 6584
- [41] 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. *ACS Synth Biol*, 2015, 4: 463-73
- [42] 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
- [43] Li J, Xia Q, Guo H, et al. Decorating bacteria with triple immune nanoactivators generates tumor-resident living immunotherapeutics. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2022, 61: e202202409
- [44] Liu Y, Zhang M, Wang X, et al. Dressing bacteria with a hybrid immunoactive nanosurface to elicit dual anticancer and antiviral immunity. *Adv Mater*, 2023, 35: e2210949
- [45] Guo H, Cao Z, Li J, et al. Integrating bacteria with a ternary combination of photosensitizers for monochromatic irradiation-mediated photoacoustic imaging-guided synergistic photothermal therapy. *ACS Nano*, 2023, 17: 5059-71
- [46] Zheng DW, Chen Y, Li ZH, et al. Optically-controlled bacterial metabolite for cancer therapy. *Nat Commun*, 2018, 9: 1680
- [47] Chen QW, Wang JW, Wang XN, et al. Inhibition of tumor progression through the coupling of bacterial respiration with tumor metabolism. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2020, 59: 21562-70
- [48] Luo Y, Xu D, Gao X, et al. Nanoparticles conjugated with bacteria targeting tumors for precision imaging and therapy. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 514: 1147-53
- [49] 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
- [50] Chu B, Yang Y, Tang J, et al. Trojan nanobacteria system for photothermal programmable destruction of deep tumor tissues. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2022, 61: e202208422
- [51] 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
- [52] 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
- [53] van der Meel R, Sulheim E, Shi Y, et al. Smart cancer nanomedicine. *Nat Nanotechnol*, 2019, 14: 1007-17
- [54] Suh S, Jo A, Traore MA, et al. Nanoscale bacteria-enabled autonomous drug delivery system (NanoBEADS) enhances intratumoral transport of nanomedicine. *Adv Sci (Weinh)*, 2019, 6: 1801309
- [55] Duong MT, Qin Y, You SH, et al. Bacteria-cancer interactions: bacteria-based cancer therapy. *Exp Mol Med*, 2019, 51: 1-15
- [56] Ye Z, Liang L, Lu H, et al. Nanotechnology-employed bacteria-based delivery strategy for enhanced anticancer therapy. *Int J Nanomedicine*, 2021, 16: 8069-86
- [57] Luo CH, Huang CT, Su CH, et al. Bacteria-mediated hypoxia-specific delivery of nanoparticles for tumors imaging and therapy. *Nano Lett*, 2016, 16: 3493-9
- [58] Moreno VM, Álvarez E, Izquierdo-Barba I, et al. Bacteria

- as nanoparticles carrier for enhancing penetration in a tumoral matrix model. *Adv Mater Interfaces*, 2020, 7: 1901942
- [59] Felfoul O, Mohammadi M, Taherkhani S, et al. Magneto-aerotactic bacteria deliver drug-containing nanoliposomes to tumour hypoxic regions. *Nat Nanotechnol*, 2016, 11: 941-7
- [60] Fan JX, Peng MY, Wang H, et al. Engineered bacterial bioreactor for tumor therapy via Fenton-like reaction with localized H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation. *Adv Mater*, 2019, 31:1808278
- [61] Chen FM, Zang ZS, Chen Z, et al. Nanophoto sensitizer engineered *Salmonella* bacteria with hypoxia targeting and photothermal-assisted mutual bioaccumulation for solid tumor therapy. *Biomaterials*, 2019, 214: 119226
- [62] Deng XY, Yang WB, Shao ZW, et al. Genetically modified bacteria for targeted phototherapy of tumor. *Biomaterials*, 2021, 272: 120809
- [63] Xie J, Chen K, Chen X. Production, modification and bio-applications of magnetic nanoparticles gestated by magnetotactic bacteria. *Nano Res*, 2009, 2: 261-78
- [64] Kang SH, Bozhilov KN, Myung NV, et al. Microbial synthesis of CdS nanocrystals in genetically engineered *E. coli*. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2008, 47: 5186-9
- [65] Park TJ, Lee SY, Heo NS, et al. *In vivo* synthesis of diverse metal nanoparticles by recombinant *Escherichia coli*. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2010, 49: 7019-24
- [66] Prozorov T. Magnetic microbes: bacterial magnetite biomineralization. *Semin Cell Dev Biol*, 2015, 46: 36-43
- [67] Ye P, Li F, Zou J, et al. *In situ* generation of gold nanoparticles on bacteria-derived magnetosomes for imaging-guided starving/chemodynamic/photothermal synergistic therapy against cancer. *Adv Funct Mater*, 2022, 32: 202110063
- [68] Gerritzen MJH, Martens DE, Wijffels RH, et al. Bioengineering bacterial outer membrane vesicles as vaccine platform. *Biotechnol Adv*, 2017, 35: 565-74
- [69] Gujrati V, Kim S, Kim SH, et al. Bioengineered bacterial outer membrane vesicles as cell-specific drug-delivery vehicles for cancer therapy. *ACS Nano*, 2014, 8: 1525-37
- [70] Kim OY, Park HT, Dinh NTH, et al. Bacterial outer membrane vesicles suppress tumor by interferon- $\gamma$ -mediated antitumor response. *Nat Commun*, 2017, 8: 626
- [71] Li Y, Zhao R, Cheng K, et al. Bacterial outer membrane vesicles presenting programmed death 1 for improved cancer immunotherapy via immune activation and checkpoint inhibition. *ACS Nano*, 2020, 14: 16698-711
- [72] de Boer PA, Crossley RE, Rothfield LI. A division inhibitor and a topological specificity factor coded for by the minicell locus determine proper placement of the division septum in *E. coli*. *Cell*, 1989, 56: 641-9
- [73] Lim B, Yin Y, Ye H, et al. Reprogramming synthetic cells for targeted cancer therapy. *ACS Synth Biol*, 2022, 11: 1349-60
- [74] Schroeder A, Goldberg MS, Kastrup C, et al. Remotely activated protein-producing nanoparticles. *Nano Lett*, 2012, 12: 2685-9
- [75] Krinsky N, Kaduri M, Zinger A, et al. Synthetic cells synthesize therapeutic proteins inside tumors. *Adv Healthc Mater*, 2018, 7: e1701163
- [76] Dowden H, Munro J. Trends in clinical success rates and therapeutic focus. *Nat Rev Drug Discov*, 2019, 18: 495-96