

DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2023.01.010

· 综述 ·

## 细菌在肿瘤靶向与免疫治疗中应用的研究进展

### Research progress on the application of bacteria in tumor targeting and immunotherapy

周航<sup>1</sup>综述;刘宝瑞<sup>2</sup>审阅(1. 中国药科大学南京鼓楼医院 肿瘤中心,江苏 南京 210008; 2. 南京大学医学院附属鼓楼医院 肿瘤中心,江苏 南京 210008)

**[摘要]** 细菌用于肿瘤治疗虽然是一个传统的研究领域,但在合成生物学理论与技术日趋完善的背景下,以细菌为载体设计新的抗肿瘤靶向与免疫治疗模式,已经形成一个独特的研究方向。特定细菌可以克服物理障碍特异性地靶向和积聚于肿瘤组织中,并可根据临床需要将外源基因导入细菌,实现基因修饰以产生活性蛋白或因子在肿瘤组织中发挥靶向和抗肿瘤免疫效应,从而提高肿瘤治疗的有效性和安全性。同时,细菌疗法不仅可以作为肿瘤治疗的单一疗法,也可与化疗、放疗和免疫治疗联合使用以获得更好的临床疗效。但是,由于肿瘤微环境的多变性与复杂性,需要进一步充分了解相关细菌和肿瘤微环境的免疫特征,进行有针对性的研究,开发出基于细菌的抗肿瘤免疫精准治疗策略,使细菌疗法在临床肿瘤治疗中得到更广泛的应用。

**[关键词]** 肿瘤靶向细菌;肿瘤免疫治疗;合成生物学

**[中图分类号]** R730.3;R730.51 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2023)01-0067-08

细菌用于肿瘤治疗的尝试有着悠久的历史,早在19世纪90年代,威廉·科里(COLEY W)就用热灭活的细菌混合物(Coley毒素)作为治疗肿瘤的方法。在20世纪70年代,MORALES等<sup>[1]</sup>将卡介苗(*Bacillus Calmette-Guerin*, BCG)用于膀胱灌注非肌层浸润型膀胱癌(non-muscle invasive bladder cancer, NMIBC)复发患者的治疗,并取得一定疗效。BCG是预防NMIBC复发最有效的膀胱内注射剂<sup>[2]</sup>,迄今多数临床指南仍是将BCG作为中-高危NMIBC的标准治疗方法,也是美国食品药品监督管理局(FDA)批准的唯一治疗高危NMIBC的药物。如今,随着探究合成生物学机制和技术的快速发展,对细菌进行基因工程化改造可以在降低细菌本身毒性的同时提高其肿瘤靶向能力,达到增强抗肿瘤疗效的目标。该领域也成了抗肿瘤靶向与免疫治疗令人瞩目的新方向。目前研究较多的肿瘤靶向细菌如鼠伤寒沙门氏菌、大肠杆菌Nissle1917、双歧杆菌和乳酸乳球菌等均可被改造。同时,这些菌株在静脉、瘤内和口服给药途径的模型中显示出良好的肿瘤靶向性和抗肿瘤免疫效果,可延缓肿瘤生长甚至完全清除肿瘤<sup>[3]</sup>。本文主要对近年来与细菌相关的肿瘤治疗策略与进展进行简要介绍(图1)。

#### 1 细菌对肿瘤的天然靶向性

##### 1.1 实体肿瘤微环境的特点

人体肿瘤中超过90%都是实体肿瘤,其中包括肺癌、乳腺癌、肠癌等。肿瘤细胞的快速增殖会限制氧气的供应,因此血液供应不足或缺氧几乎是所有实体肿瘤的典型微环境特征<sup>[4]</sup>。同时,由于供氧不

足,肿瘤细胞会以无氧呼吸的方式进行能量代谢,从而导致乳酸堆积。为避免造成自身酸中毒,肿瘤细胞内部H<sup>+</sup>运输到细胞外,这些细胞反应在不同程度上造成肿瘤微环境pH降低,整体呈现酸性环境,进而形成免疫抑制性微环境,帮助肿瘤细胞发生免疫逃逸<sup>[5]</sup>。此外,乏氧的肿瘤微环境在抗肿瘤药物的多药耐药性方面起着关键作用。实体肿瘤微环境缺氧、低pH的特点使得基于细菌的抗肿瘤免疫疗法有着得天独厚的优势。

##### 1.2 细菌的肿瘤靶向性

细菌在不同类型肿瘤中广泛存在<sup>[6]</sup>,对肿瘤微生物组的操纵可能会影响肿瘤免疫治疗的效果。细菌可主动或被动地“靶向”肿瘤:部分细菌如沙门氏菌和双歧杆菌已被证明可优先在肿瘤中积累,它们能够离开血管系统,穿透肿瘤缺氧区域<sup>[7]</sup>,随后在肿瘤细胞内增殖,促进肿瘤组织局部免疫治疗<sup>[8]</sup>;对于一些厌氧细菌,肿瘤微环境的乏氧性,无异于为其提供了良好的住所,使其能够通过外周血液循环渗入并且优先在肿瘤内部积累和增殖。由于正常组织免疫功能完善,细菌可在数小时或数天内被清除,而肿瘤组织的免疫微环境处于抑制状态,其清除细菌的能力大大降低,这有利于细菌在肿瘤部位的大量繁殖<sup>[9]</sup>。同时,代谢旺盛的肿瘤组织以及坏死凋亡的细胞碎片又可为细菌的繁殖提供极其丰富的养料,使得细菌在肿瘤组织中进一步蓄积。细菌还可通过其

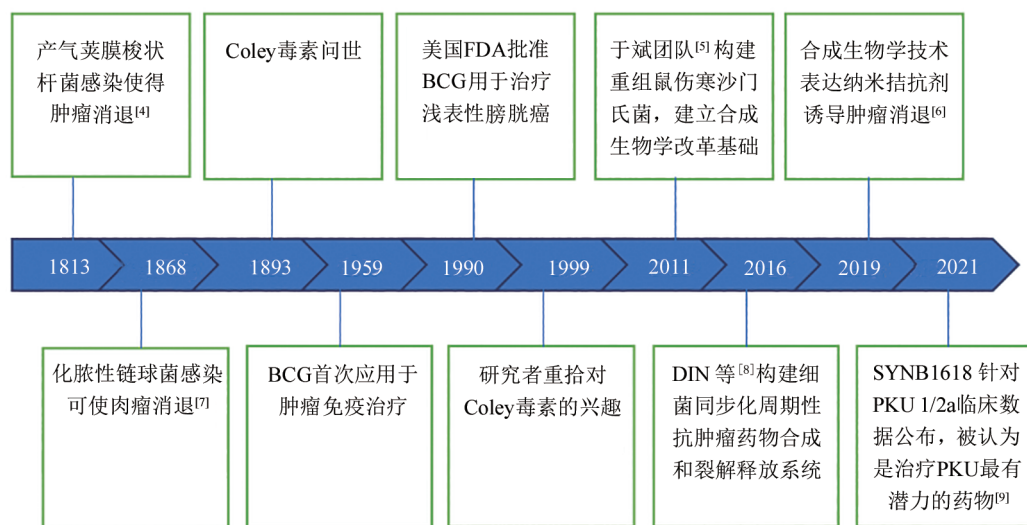
**[基金项目]** 国家自然科学基金青年基金资助项目(No.81903128)

**[作者简介]** 周航(1997—),女,硕士生,主要从事肿瘤免疫治疗研究,E-mail: zhouhang9197@163.com

**[通信作者]** 刘宝瑞,E-mail: baoruiliu@nju.edu.cn

他途经特异性地靶向肿瘤,例如经过基因工程改造的鼠伤寒沙门氏菌YB1在不降低细菌抗肿瘤活性的同时,可精准靶向肿瘤的乏氧区域,实现肿瘤治疗的

安全性和靶向性<sup>[16]</sup>;通过直接瘤内注射细菌或其工程菌可进一步使菌株靶向肿瘤并在肿瘤内产生相应的抗肿瘤制剂。



SYNB1618:大肠杆菌Nissle1917改造而得的候选药物;PKU:苯丙酮尿症(phenylketonuria)

图1 时间轴—细菌相关抗肿瘤疗法发展历程示意图

## 2 细菌自身成分及其产物的抗肿瘤作用

### 2.1 细菌外膜囊泡(outer membrane vesicle, OMV)

OMV是由革兰氏阴性菌所释放的球形纳米囊泡,直径为20~250 nm,可进入淋巴管并被抗原提呈细胞(APC)吞噬<sup>[17]</sup>。革兰氏阳性菌<sup>[18]</sup>和分枝杆菌<sup>[19-20]</sup>等菌群也具释放囊泡的能力。OMV以天然构象呈现一系列表面抗原,并具有免疫原性、自我调节和被免疫细胞摄取等自然特性,因此作为非活性复合疫苗或运载工具具有一定的临床应用潜力<sup>[21]</sup>。KIM等<sup>[22]</sup>研究发现,OMV具有持续有效诱导抗肿瘤反应的能力,且不会出现显著的不良反应。纳米尺寸的OMV可通过实体瘤的高通透性和滞留效应(enhanced permeability and retention effect, EPR)被动靶向穿透肿瘤血管系统,因此通过静脉输送OMV可特异性靶向肿瘤并在肿瘤组织蓄积,随后诱导趋化因子配体10(chemokine CXC motif ligand 10, CXCL10)与IFN- $\gamma$ 的产生。CHEN等<sup>[23]</sup>通过融合黑色素瘤细胞膜囊泡(cytomembrane vesicle, CMV)与减毒沙门氏菌OMV设计并构建了真核-原核(eukaryotic-prokaryotic vesicle, EPV)囊泡纳米平台,进一步的体内动物实验结果表明,EPV纳米制剂可作为一种预防性纳米疫苗刺激免疫系统,引起抗肿瘤免疫反应,提示OMV衍生的纳米技术可以成为肿瘤治疗中的一种免疫预防策略;在黑色素瘤模型中还利用EPV包载聚乳酸-羟基乙酸共聚物(poly lactic-co-glycolic acid, PLGA)

和吲哚菁绿(indocyanine green, ICG)(PI@EPV),联合光热疗法诱导免疫原性细胞死亡,显示出协同抗肿瘤作用。

### 2.2 细菌毒素

细菌毒素是由细菌自身产生的细胞毒素,在浓度不同的情况下对肿瘤细胞表现出双重活性。高浓度剂量下可以杀死肿瘤细胞,而低浓度剂量下细菌毒素可以改变细胞增殖、凋亡和分化的过程<sup>[24]</sup>。具有抗肿瘤活性的细菌毒素包括与肿瘤表面抗原结合的毒素或与其配体结合的毒素。某些细菌毒素可与肿瘤细胞表面的抗原结合并被激活;部分细菌毒素可作为细胞靶向毒素如白喉毒素(diphtheria toxin, DT)、产气荚膜梭菌肠毒素(clostridium perfringens enterotoxin, CPE)和假单胞菌外毒素A(pseudomonas exotoxin A, PEA)<sup>[25]</sup>。有文献构建了基于DT的融合蛋白DAB-IL-2,发现该融合蛋白可消耗CD25阳性细胞,已获批用于治疗持续性或复发性皮肤T细胞淋巴瘤<sup>[26]</sup>。重组的CPE在体内外研究都被证明具有一定的抗肿瘤效应。PIONTEK等<sup>[27]</sup>对CPE结构进行定向修饰,可靶向紧密连接蛋白(claudin)过表达的甲状腺癌与肺癌细胞。利用细菌毒素进行抗肿瘤治疗尽管到目前为止已经取得了一定的成果,但是仍需要进一步的研究来提高这种治疗策略的疗效,以便在临床使用中尽可能地降低其不良反应。

### 2.3 细菌孢子

细菌孢子是由细菌所产生的一种孢子或类孢子



结构。大多数专性厌氧菌产生具有高度抗性的孢子,它们可以在氧合良好的区域生存而不发芽,当暴露在缺氧区域时,它们会迅速发芽繁殖。厌氧细菌孢子的这一独特特性使其可选择性地向肿瘤靶向输送某些抗癌药物<sup>[25]</sup>。研究<sup>[28-29]</sup>证明,由于细菌孢子可在缺氧的肿瘤区域内复制,瘤内注射减毒诺维氏梭状芽孢杆菌,可导致动物体内肿瘤局限性细胞溶解和炎症反应,具有临床转化潜力。此外,细菌孢子作为抗癌药物的运载工具也显示出良好的应用前景。如将姜黄素分别与芽孢杆菌孢子及叶酸的外层共价连接,芽孢杆菌孢子可通过胃屏障将药物输送到结肠区域,具有结肠靶向释药特性并可提高姜黄素的口服生物利用度,最终可显著抑制结肠癌细胞<sup>[30]</sup>。由此可见,细菌孢子不仅自身可以作为治疗肿瘤的药物,而且可以作为运载工具载负抗癌药物。

### 3 合成生物学推动肿瘤细菌疗法

细菌作为微观的“机器人工厂”,可以按照简单的遗传规则或复杂的合成生物学工程原理进行重新编程,提高细菌的肿瘤靶向定植能力,并降低细菌毒性<sup>[31]</sup>,根据肿瘤的特征与细菌的性状对细菌进行再“设计”改造,已经成为抗肿瘤生物治疗的新方向。

#### 3.1 降低细菌毒性

对于一些致病细菌,天然过强的细菌毒力及免疫不可控性极大限制了细菌疗法在临床上的使用。与传统的灭活减毒细菌相比,基因工程细菌可保留细菌原始活性及增殖能力。细菌的减毒改造可以通过删除细菌毒力基因、产生营养缺陷型突变体来实现。经工程改造的 *purI* 和 *msbB* 基因缺失的鼠伤寒沙门氏菌 VNP20009 与 *relA* 和 *spoT* 基因敲除的 5'-二磷酸-3'-二磷酸(ppGpp)合成缺陷鼠伤寒沙门氏菌( $\Delta$ ppGpp)均具有良好的安全性<sup>[32]</sup>。鼠伤寒沙门氏菌  $\Delta$ ppGpp 毒力较原菌株下降了  $10^5 \sim 10^6$  数量级, VNP20009 菌株在 I 期临床试验中即证明具有临床可接受的安全性<sup>[33]</sup>。亮氨酸-精氨酸营养缺陷型鼠伤寒沙门氏菌 A1-R 可选择性地生长定植在肿瘤组织中,进一步使肿瘤退缩<sup>[34]</sup>。

#### 3.2 增强细菌对肿瘤的靶向性

有效的肿瘤靶向性对于肿瘤治疗效果而言至关重要,肿瘤微环境的乏氧性、低 pH 等特点为靶向肿瘤定位提供思路。YU 等<sup>[16]</sup>通过合成生物学技术将鼠伤寒沙门氏菌的一个必需基因 *asd* 置于缺氧条件启动子下,使其仅在缺氧条件下表达,而对于有氧条件的正常组织则不表达菌株 YB1,如若环境不提供二氨基庚二酸(diaminopimelic acid, DAP),则 YB1 细菌在生长期间会发生裂解。在携带乳腺肿瘤的裸鼠体

内, YB1 可靶向定植于肿瘤并抑制肿瘤生长,在正常组织中则被迅速清除。ZHANG 等<sup>[35]</sup>利用肿瘤微环境的低 pH 性质,通过蛋白质展示技术在大肠杆菌 Nissle1917 表面表达低 pH 响应插入肽 [pH (low) insertion peptide, pHLIP], 该插入肽通过锚定大肠杆菌的细胞壁实现肿瘤靶向作用。此外,在细菌表面表达肿瘤归巢蛋白或肽也可实现肿瘤靶向。有文献<sup>[36]</sup>报道大肠杆菌表达黏附素,可快速特异性黏附以靶向肿瘤细胞表面,提示基因工程大肠杆菌与野生型大肠杆菌相比能更有效定植肿瘤。

#### 3.3 以细菌为载体生产抗肿瘤制剂

单一的减毒细菌治疗肿瘤效果往往有限,基因修饰后的细菌能够表达一些细胞毒性剂、前体药物转化酶、免疫刺激分子如细胞因子和抗体及肿瘤相关性抗原等,这更有利于改善机体免疫功能,提高肿瘤治疗的有效性。

3.3.1 细胞毒性剂 增强抗肿瘤活性的有效方法之一是设计表达细胞毒性剂的细菌载体,利用细菌对肿瘤的靶向定位能力将药物输送至肿瘤部位,实现对肿瘤细胞的杀伤作用。HE 等<sup>[37]</sup>构建表达了 Tum5-p53 双功能融合蛋白,即将 p53 蛋白直接诱导肿瘤细胞凋亡的能力与 Tum5 蛋白的抗血管生成功能相结合,通过大肠杆菌 Nissle1917 将其靶向运输至肿瘤缺氧区域,结果发现,注射该工程大肠杆菌与注射未经修饰的大肠杆菌相比,其肿瘤抑制率明显提升。TAN 等<sup>[38]</sup>构建了表达细胞溶解素 A 的减毒鼠伤寒沙门氏菌以靶向基质细胞与肿瘤细胞,该菌可显著抑制荷瘤小鼠的肿瘤生长,并提高生存期。组织学分析显示,该工程菌在肿瘤部位定植后,可增加中性粒细胞、巨噬细胞等免疫细胞的浸润。

3.3.2 前体药物转化酶 特异性杀伤肿瘤细胞,减少药物对正常组织细胞的损害是肿瘤靶向治疗研究的方向与热点。细菌介导的前药激活疗法作为肿瘤靶向性治疗的一种重要手段,已在多项临床前研究或临床试验中显示出良好的治疗效率。利用细菌载体将激活前药的特异性酶运输到肿瘤组织,使其在肿瘤组织中特异性表达,从而将系统给药的前药在肿瘤组织内转化为具有杀伤活性的药物,减少药物的“脱靶效应”。常用于肿瘤治疗的前体药物转化酶主要有胞嘧啶脱氨酶(cytosine deaminase, CD)、硝基还原酶、嘌呤核苷酸磷酸酶等。研究<sup>[39]</sup>表明,静脉注射表达大肠杆菌 CD 的鼠伤寒沙门氏菌 VNP20009 联合系统给药 5-氟胞嘧啶(5-FC),前者可将后者转化为 5-FU,与单一治疗相比,明显增强其抗肿瘤活性。

3.3.3 免疫刺激分子 免疫刺激分子主要包括细胞因子、单克隆抗体及肿瘤特异性抗原等,由于其具有

分子量大及水溶性好的特点,即使是纳米载体也不易实现靶向输送。合成生物学的快速发展使研究人员创造性地研发了更多能够在肿瘤局部安全高效表达免疫刺激分子的工程菌,并可诱发强烈的抗肿瘤免疫反应。一个典型范例就是CHOWDHURY等<sup>[6]</sup>使用合成生物学技术设计了具有“群体感应”基因电路的非致病性大肠杆菌菌株Nissle1917,该菌可在肿瘤核心部位定植。当菌群浓度达到阈值时即触发“自杀开关”,菌群发生裂解,从而局部释放编码的CD47纳米抗体拮抗剂,增加肿瘤浸润性T细胞的活化,诱导肿瘤快速消退。鉴于某些细胞因子由于其系统性全身给药所产生的严重副作用限制了其临床应用,利用工程化细菌将细胞因子运输至肿瘤部位在一定程度上降低了不良反应。WANG等<sup>[40]</sup>构建表达IL-24的新型重组短双歧杆菌,在小鼠体内观察到显著的抑制肿瘤生长及诱导肿瘤细胞凋亡的能力。肿瘤靶向细菌也可被设计表达肿瘤相关性抗原,作为肿瘤疫苗的载体,增强肿瘤免疫原性,活化机体免疫效力<sup>[41]</sup>。

## 4 细菌联合传统抗肿瘤疗法

### 4.1 细菌联合化疗药物

增加化疗药物的靶向性可以降低药物对正常组织的副作用。多项研究提示细菌可以作为载体运送化疗药物,实现肿瘤靶向治疗。WANG等<sup>[42]</sup>制备了负载阿霉素(doxorubicin, DOX)与转铁蛋白(transferrin, Tf)的细菌磁小体(Tf-BMs-DOX),开发了一种新型的主动靶向纳米治疗药物。该纳米颗粒通过与肿瘤细胞上的转铁蛋白受体(transferrin receptor, TfR)相互作用识别肿瘤细胞,研究结果显示,Tf-BMs-DOX比正常肝细胞HL-7702更有效地靶向肝细胞肿瘤HepG2细胞,并显著促进肿瘤细胞的凋亡。同时DOX又可通过顺乌头酸酐与大肠杆菌Nissle1917相连接,实现肿瘤部位抗肿瘤药物的定向累积与酸响应性释放<sup>[43]</sup>。富含硒的长双歧杆菌可作为化疗预防剂,降低促炎细胞因子IL-1 $\beta$ 和IL-18释放,缓解伊利替康化疗诱导的肠道和肝脏毒性,被认为是伊利替康治疗肿瘤最有前途的辅助治疗剂<sup>[44]</sup>。因此,细菌疗法与化疗联合治疗肿瘤更为有效。

### 4.2 细菌联合放射治疗

放射治疗是临床上肿瘤治疗的一种常规治疗手段,其有效性主要取决于高能射线对肿瘤细胞的DNA损伤,从而促进肿瘤细胞凋亡,增强新抗原的表达<sup>[45]</sup>。实体肿瘤微环境的乏氧性导致缺氧诱导因子1(hypoxia-inducible factor-1, HIF-1)的累积,进而驱动肿瘤细胞对放疗的抗性。有报道<sup>[46]</sup>提示,诺维氏菌是

一种辐射增强剂,可直接靶向肿瘤缺氧区域,增强辐射效应。放射治疗导致的微血管内皮细胞损伤产生的缺氧区域利于诺维氏菌生长,而诺维氏菌可靶向并破坏肿瘤的缺氧区域,提示两者可相互协同发挥抗肿瘤作用。LIM等<sup>[47]</sup>在小鼠黑色素瘤模型中证明基于单核细胞增多型李斯特菌肿瘤疫苗与放疗的结合可产生协同效应,限制肿瘤生长。此联合治疗通过不同机制诱导抗肿瘤免疫反应,诱导抗原特异性CD8<sup>+</sup>T细胞、NK细胞、IFN- $\gamma$ 和颗粒酶B的产生。多项研究<sup>[48-49]</sup>证明,沙门氏菌也可协同增强放射治疗诱导的肿瘤抑制作用。

### 4.3 细菌联合免疫治疗

免疫治疗被认为是抗肿瘤疗法最具有潜力的崭新领域,阻断抑制性免疫检查点通路或触发抗原特异性免疫反应能够达到激活免疫系统和杀伤肿瘤细胞的目标。然而,单一免疫疗法的治疗效果有限。因此,免疫疗法常与其他肿瘤治疗方法联合使用以用于肿瘤治疗。细菌可以特异性地定植肿瘤并选择性地生长繁殖,这使得它们成为辅助免疫治疗的理想候选者<sup>[50]</sup>。某些细菌是针对APC的理想载体,可被APC主动吞噬,并通过刺激模式识别受体(如Toll样受体,TLR)触发互补免疫途径。例如,细菌鞭毛蛋白作为一种病原体相关分子模式可以激活机体的固有免疫和适应性免疫,作为佐剂与肿瘤抗原组成的疫苗可以通过TLR5刺激进一步增强活化的DC与CD8<sup>+</sup>T细胞所诱导的抗肿瘤反应<sup>[51-52]</sup>。利用合成生物学技术对大肠杆菌Nissle1917进行工程性改造,使其靶向肿瘤中吞噬性APC的STING激活通路(SYNB8191),能够激活抗肿瘤免疫反应并诱导趋化因子、细胞因子的上调<sup>[53]</sup>。

## 5 临床探索

BCG已被FDA批准用于临床治疗膀胱灌注非肌层浸润型膀胱癌。VNP20009是最早开展临床试验的鼠伤寒沙门氏菌菌株<sup>[33]</sup>。该试验对入组的24例转移性黑色素瘤患者及1例转移性肾细胞癌患者静脉注射 $10^6\sim 10^9$ cfu/m<sup>2</sup>的VNP20009,结果表明患者的最大耐受剂量为 $3\times 10^8$ cfu/m<sup>2</sup>,且在接受 $1\times 10^9$ cfu/m<sup>2</sup>剂量的患者中观察到剂量限制性毒性。VNP20009可靶向定植于肿瘤,虽然安全性尚可,但未观察到明显的抗肿瘤作用。梭状芽孢杆菌孢子针对实体恶性肿瘤的I期临床试验(NCT01924689)已经完成。该试验对24例患者瘤内注射梭状芽孢杆菌孢子,有10例患者在注射剂量下出现了肿瘤的退缩<sup>[28]</sup>。另一项I/II期临床试验正在研究一种基于单核细胞增多型李斯特菌的减毒免疫疗法(ADXS-503)单独或与帕

博利珠单抗联合应用,对转移性鳞状或非鳞状非小细胞肺癌受试者的疗效进行观察(NCT03847519)。这些临床试验为细菌的抗肿瘤疗法的安全性有效

性提供了证据,与细菌相关的抗肿瘤疗法的临床试验也正在不断开展中(表1)。

表1 细菌相关肿瘤治疗临床试验

细菌	受试类型	治疗药物	临床阶段	开始时间	完成时间	临床编号	状态
鼠伤寒沙门氏菌	晚期实体瘤	VNP20009	I	2005-05	2008-01	NCT00006254	完成
门氏菌	晚期/转移性肿瘤	VNP20009	I	2000-03	2002-10	NCT00004988	完成
	难治性浅表实体瘤	VNP20009	I	1999-08	2008-01	NCT00004216	完成
	晚期实体瘤	SGN1	I	2022-03	2025-04	NCT05103345	未招募
	肝癌,肝肿瘤,胆道癌	Salmonella-IL2	I	2010-04	2014-06	NCT01099631	完成
	复发性神经母细胞瘤	DNA 疫苗,沙门氏菌口服疫苗,来那度胺	I	2019-01	2023-12	NCT04049864	招募中
	转移性胰腺癌	Saltikva	II	2020-10	2030-12	NCT04589234	招募中
梭状芽孢杆菌	实体恶性肿瘤	梭状芽孢杆菌孢子	I	2013-10	2017-10	NCT01924689	完成
双歧杆菌	III期非小细胞肺癌	化疗药,双歧杆菌	I	2020-07	2027-12	NCT04699721	招募中
	膀胱尿路上皮癌	双歧杆菌,乳酸杆菌,肠球菌联合	IV	2022-01	2024-11	NCT05220124	招募中
李斯特菌	多种恶性实体瘤	CRS-207	I	2007-12	2009-02	NCT00585845	终止
	恶性胸膜间皮瘤	CRS-207,化疗	I	2014-09	2019-08	NCT01675765	完成
	转移瘤,肝肿瘤	CRS-100	I	2006-10	2008-02	NCT00327652	完成
	多类型宫颈癌	ADXS11-001	II	2011-05	2018-10	NCT01266460	完成
	肺癌,非小细胞转移性鳞状细胞癌,转移性非鳞状细胞癌	ADXS-503	I / II	2019-02	2023-03	NCT03847519	招募中
	转移性去势抵抗性前列腺肿瘤	JNJ-64041809	I	2015-12	2018-07	NCT02625857	完成
大肠杆菌	淋巴瘤与转移性实体瘤	SYNB1891	I	2019-11	2023-06	NCT04167137	招募中
牛结核分枝杆菌	膀胱癌	BCG				已于临床	

资料引自 <https://clinicaltrials.gov>

## 6 问题与展望

细菌介导的抗肿瘤疗法以其天然的靶向能力及良好的免疫激活特性获得了广泛关注。与传统的肿瘤疗法相比,细菌疗法在对肿瘤的选择性靶向方面具有一定优势,这使得细菌在单一治疗或作为传统肿瘤疗法的补充在实验研究中都显现出良好的疗效。然而细菌本身的固有病毒性、半衰期短、遗传不稳定性及制备工艺复杂等缺点也限制了细菌相关抗肿瘤疗法在临床上的转化。近年来,在合成生物学理论与技术日趋完善的背景下,对细菌进行重新编程,以细菌为载体生产抗肿瘤制剂如细胞毒性剂、前体药物转化酶及免疫刺激分子等可改善机体免疫功能、提高细菌对肿瘤的靶向定植能力和降低细菌毒性。结合本课题组对某些革兰氏阳性菌的基因工程

改造和体内外功能验证结果<sup>[54]</sup>,相信随着合成生物学理论与技术的进一步发展,细菌介导的抗肿瘤疗法可能成为一个极具潜力的临床研究和应用领域,有望作为理想的抗肿瘤治疗策略。

### [参考文献]

- [1] MORALES A, EIDINGER D, BRUCE A W. Intracavitary bacillus calmette-guerin in the treatment of superficial bladder tumors[J]. J Urol, 1976, 116(2): 180-183. DOI: 10.1016/s0022-5347(17) 58737-6
- [2] LARSEN E S, JOENSEN U N, POULSEN A M, et al. Bacillus Calmette-Guérin immunotherapy for bladder cancer: a review of immunological aspects, clinical effects and BCG infections[J]. APMIS, 2020, 128(2): 92-103. DOI: 10.1111/apm.13011.
- [3] SEPICH-POORE G D, ZITVOGEL L, STRAUSSMAN R, et al.



- The microbiome and human cancer[J/OL]. *Science*, 2021, 371(6536): eabc4552[2022-08-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8767999/>. DOI:10.1126/science.abc4552.
- [4] MINTON N P. Clostridia in cancer therapy [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2003, 1(3): 237-242. DOI:10.1038/nrmicro777.
- [5] YU B, YANG M, WONG H Y, *et al*. A method to generate recombinant *Salmonella typhi* Ty21a strains expressing multiple heterologous genes using an improved recombineering strategy [J/OL]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, 91(1): 177-188 [2022-08-05]. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-011-3317-0>. DOI: 10.1007/s00253-011-3317-0.
- [6] CHOWDHURY S, CASTRO S, COKER C, *et al*. Programmable bacteria induce durable tumor regression and systemic antitumor immunity[J]. *Nat Med*, 2019, 25(7): 1057-1063. DOI:10.1038/s41591-019-0498-z.
- [7] PAWELEK J M, LOW K B, BERMUDES D. Bacteria as tumour-targeting vectors[J]. *Lancet Oncol*, 2003, 4(9): 548-556. DOI:10.1016/s1470-2045(03)01194-x.
- [8] DIN M O, DANINO T, PRINDLE A, *et al*. Synchronized cycles of bacterial lysis for *in vivo* delivery[J/OL]. *Nature*, 2016, 536(7614): 81-85[2022-08-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5048415/>. DOI: 10.1038/nature18930.
- [9] PUURUNEN M K, VOCKLEY J, SEARLE S L, *et al*. Safety and pharmacodynamics of an engineered *E. coli* Nissle for the treatment of phenylketonuria: a first-in-human phase 1/2a study[J]. *Nat Metab*, 2021, 3(8): 1125-1132. DOI:10.1038/s42255-021-00430-7.
- [10] SHAO C C, YANG F M, MIAO S Y, *et al*. Role of hypoxia-induced exosomes in tumor biology[J/OL]. *Mol Cancer*, 2018, 17(1): 120[2022-08-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6087002/>. DOI:10.1186/s12943-018-0869-y.
- [11] ROMA-RODRIGUES C, MENDES R, BAPTISTA P V, *et al*. Targeting tumor microenvironment for cancer therapy [J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(4): E840[2022-08-2]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6413095/>. DOI: 10.3390/ijms20040840.
- [12] NEJMAN D, LIVYATAN I, FUKS G, *et al*. The human tumor microbiome is composed of tumor type-specific intracellular bacteria[J]. *Science*, 2020, 368(6494): 973-980. DOI:10.1126/science.aay9189.
- [13] FORBES N S. Engineering the perfect (bacterial) cancer therapy[J]. *Nat Rev Cancer*, 2010, 10(11): 785-794. DOI: 10.1038/nrc2934.
- [14] SHI Y Y, ZHENG W X, YANG K T, *et al*. Intratumoral accumulation of gut microbiota facilitates CD47-based immunotherapy *via* STING signaling[J/OL]. *J Exp Med*, 2020, 217(5): e20192282[2022-08-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7201921/>. DOI:10.1084/jem.20192282.
- [15] GUPTA K H, NOWICKI C, GIURINI E F, *et al*. Bacterial-based cancer therapy (BBCT): recent advances, current challenges, and future prospects for cancer immunotherapy [J/OL]. *Vaccines*, 2021, 9(12): 1497[2022-08-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8707929/>. DOI: 10.3390/vaccines9121497.
- [16] YU B, YANG M, SHI L, *et al*. Explicit hypoxia targeting with tumor suppression by creating an “obligate” anaerobic *Salmonella Typhimurium* strain[J/OL]. *Sci Rep*, 2012, 2: 436 [2022-08-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3365283/>. DOI:10.1038/srep00436.
- [17] SCHWECHHEIMER C, KUEHN M J. Outer-membrane vesicles from gram-negative bacteria: biogenesis and functions[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2015, 13(10): 605-619. DOI:10.1038/nrmicro3525.
- [18] BRIAUD P, CARROLL R K. Extracellular vesicle biogenesis and functions in gram-positive bacteria[J/OL]. *Infect Immun*, 2020, 88(12): e00433-e00420[2022-08-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7671900/>. DOI: 10.1128/IAI.00433-20.
- [19] WANG J J, WANG Y, TANG L J, *et al*. Extracellular vesicles in mycobacterial infections: their potential as molecule transfer vectors[J/OL]. *Front Immunol*, 2019, 10: 1929[2022-08-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6703136/>. DOI:10.3389/fimmu.2019.01929.
- [20] GEORGE E, GOSWAMI A, LODHIYA T, *et al*. Immunomodulatory effect of mycobacterial outer membrane vesicles coated nanoparticles[J]. *Biomater Adv*, 2022, 139: 213003. DOI:10.1016/j.bioadv.2022.213003.
- [21] HUANG W L, MENG L X, CHEN Y, *et al*. Bacterial outer membrane vesicles as potential biological nanomaterials for antibacterial therapy[J/OL]. *Acta Biomater*, 2022, 140: 102-115[2022-08-05]. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1742706121008114?via%3Dihub>. DOI:10.1016/j.actbio.2021.12.005.
- [22] KIM O Y, PARK H T, DINH N T H, *et al*. Bacterial outer membrane vesicles suppress tumor by interferon- $\gamma$ -mediated antitumor response[J/OL]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 626 [2022-08-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5606984/>. DOI:10.1038/s41467-017-00729-8.
- [23] CHEN Q, HUANG G J, WU W T, *et al*. A hybrid eukaryotic-prokaryotic nanoplatfrom with photothermal modality for enhanced antitumor vaccination[J/OL]. *Adv Mater*, 2020, 32(16): e1908185[2022-08-05]. <http://assistant.get-sci.com/service/9dyuhrp095>. DOI:10.1002/adma.201908185.
- [24] PATYAR S, JOSHI R, BYRAV D S P, *et al*. Bacteria in cancer therapy: a novel experimental strategy[J/OL]. *J Biomed Sci*, 2010, 17(1): 21[2022-08-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2854109/>. DOI: 10.1186/1423-0127-17-21.
- [25] WEERAKKODY L R, WITHARANA C. The role of bacterial toxins and spores in cancer therapy[J/OL]. *Life Sci*, 2019, 235: 116839[2022-08-05]. <https://sci-hub.st/downloads/2019-09-12/8d/weerakkody2019.pdf>. DOI: 10.1016/j.lfs.2019.116839.

- [26] CHEUNG L S, FU J, KUMAR P, *et al.* Second-generation IL-2 receptor-targeted diphtheria fusion toxin exhibits antitumor activity and synergy with anti-PD-1 in melanoma [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116(8): 3100-3105. DOI:10.1073/pnas.1815087116.
- [27] PIONTEK A, EICHNER M, ZWANZIGER D, *et al.* Targeting claudin-overexpressing thyroid and lung cancer by modified *Clostridium perfringens* enterotoxin[J]. *Mol Oncol*, 2020, 14(2): 261-276. DOI: 10.1002/1878-0261.12615.
- [28] JANKU F, ZHANG H H, PEZESHKI A, *et al.* Intratumoral injection of *Clostridium novyi*-NT spores in patients with treatment-refractory advanced solid tumors[J]. *Clin Cancer Res*, 2021, 27(1): 96-106. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-20-2065.
- [29] PARK W, CHO S, HUANG X K, *et al.* Branched gold nanoparticle coating of *Clostridium novyi*-NT spores for CT-guided intratumoral injection[J/OL]. *Small*, 2017, 13(5): 10.1002/sml. 201602722[2022-08-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5288294/>. DOI:10.1002/sml.201602722.
- [30] YIN L, MENG Z, ZHANG Y X, *et al.* *Bacillus* spore-based oral carriers loading curcumin for the therapy of colon cancer[J/OL]. *J Control Release*, 2018, 271: 31-44[2022-08-05]. <http://assistant.get-sci.com/service/thnpyqe6w1>. DOI: 10.1016/j.jconrel.2017.12.013.
- [31] ZHOU S B, GRAVEKAMP C, BERMUDEZ D, *et al.* Tumour-targeting bacteria engineered to fight cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2018, 18(12): 727-743. DOI: 10.1038/s41568-018-0070-z.
- [32] LIU X Q, GUO Y X, SUN Y J, *et al.* Comparison of anticancer activities and biosafety between *Salmonella enterica* serovar typhimurium ΔppGpp and VNP20009 in a murine cancer model[J/OL]. *Front Microbiol*, 2022, 13: 914575[2022-08-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9277105/>. DOI:10.3389/fmicb. 2022.914575.
- [33] TOSO J F, GILL V J, HWU P, *et al.* Phase I study of the intravenous administration of attenuated *Salmonella typhimurium* to patients with metastatic melanoma[J]. *J Clin Oncol*, 2002, 20(1): 142-152. DOI:10.1200/JCO.2002.20.1.142.
- [34] HAMADA K, AOKI Y, YAMAMOTO J, *et al.* *Salmonella typhimurium* A1-R exquisitely targets and arrests a matrix-producing triple-negative breast carcinoma in a PDOX model[J]. *In Vivo*, 2021, 35(6): 3067-3071. DOI:10.21873/invivo.12602.
- [35] ZHANG Y L, JI W, HE L, *et al.* *E. coli* Nissle 1917-derived minicells for targeted delivery of chemotherapeutic drug to hypoxic regions for cancer therapy[J]. *Theranostics*, 2018, 8(6): 1690-1705. DOI: 0.7150/thno.21575.
- [36] PIÑERO-LAMBEA C, BODELÓN G, FERNÁNDEZ-PERÍAÑEZ R, *et al.* Programming controlled adhesion of *E. coli* to target surfaces, cells, and tumors with synthetic adhesins[J]. *ACS Synth Biol*, 2015, 4(4): 463-473. DOI: 10.1021/sb500252a.
- [37] HE L, YANG H J, TANG J L, *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/OL]. *J Biol Eng*, 2019, 13: 58[2022-08-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6599283/>. DOI: 10.1186/s13036-019-0189-9.
- [38] TAN W Z, DUONG M T Q, ZUO C H, *et al.* Targeting of pancreatic cancer cells and stromal cells using engineered oncolytic *Salmonella typhimurium*[J]. *Mol Ther*, 2022, 30(2): 662-671. DOI:10.1016/j.ymthe. 2021.08.023.
- [39] KING I, BERMUDEZ D, LIN S, *et al.* Tumor-targeted *Salmonella* expressing cytosine deaminase as an anticancer agent[J]. *Hum Gene Ther*, 2002, 13(10): 1225-1233. DOI: 10.1089/104303402320139005.
- [40] WANG L, VULETIC I, DENG D, *et al.* *Bifidobacterium breve* as a delivery vector of IL-24 gene therapy for head and neck squamous cell carcinoma *in vivo*[J]. *Gene Ther*, 2017, 24(11): 699-705. DOI:10.1038/gt.2017.74.
- [41] SHIRAKAWA T, KITAGAWA K. Antitumor effect of oral cancer vaccine with *Bifidobacterium* delivering WT1 protein to gut immune system is superior to WT1 peptide vaccine[J]. *Hum Vaccin Immunother*, 2018, 14(1): 159-162. DOI:10.1080/21645515.2017.1382787.
- [42] WANG J J, GENG Y Y, ZHANG Y P, *et al.* Bacterial magnetosomes loaded with doxorubicin and transferrin improve targeted therapy of hepatocellular carcinoma[J]. *Nanotheranostics*, 2019, 3(3): 284-298. DOI: 10.7150/ntno.34601.
- [43] XIE S Z, ZHAO L, SONG X J, *et al.* Doxorubicin-conjugated *Escherichia coli* Nissle 1917 swimmers to achieve tumor targeting and responsive drug release[J/OL]. *J Control Release*, 2017, 268: 390-399[2022-08-05]. <http://assistant.get-sci.com/service/dacpx76cmq>. DOI: 10.1016/j.jconrel.2017.10.041.
- [44] ZHU H, LU C Y, GAO F, *et al.* Selenium-enriched *Bifidobacterium longum* DD98 attenuates irinotecan-induced intestinal and hepatic toxicity *in vitro* and *in vivo*[J/OL]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 143: 112192[2022-08-05]. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332221009768?via%3DIihub>. DOI: 10.1016/j.biopha. 2021.112192.
- [45] SHARABI A B, LIM M, DEWEESE T L, *et al.* Radiation and checkpoint blockade immunotherapy: radiosensitisation and potential mechanisms of synergy[J/OL]. *Lancet Oncol*, 2015, 16(13): e498-e509[2022-08-05]. <http://assistant.get-sci.com/service/cvfaodeyja>. DOI: 10.1016/S1470-2045(15)00007-8.
- [46] BETTEGOWDA C, DANG L H, ABRAMS R, *et al.* Overcoming the hypoxic barrier to radiation therapy with

- anaerobic bacteria[J]. PNAS, 2003, 100(25): 15083-15088. DOI:10.1073/pnas.2036598100.
- [47] LIM J Y, BROCKSTEDT D G, LORD E M, *et al.* Radiation therapy combined with *Listeria monocytogenes*-based cancer vaccine synergize to enhance tumor control in the B16 melanoma model[J/OL]. Oncoimmunology, 2014, 3: e29028 [2022-08-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4106167/> DOI:10.4161/onci.29028.
- [48] KUN C, TAO L, LEIYUAN H, *et al.* Heat-killed *Salmonella typhimurium* mitigated radiation-induced lung injury[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2019, 46(12): 1084-1091. DOI: 10.1111/1440-1681.13135.
- [49] YOON W, PARK Y, KIM S, *et al.* Combined therapy with microRNA-expressing *Salmonella* and irradiation in melanoma [J/OL]. Microorganisms, 2021, 9(11): 2408[2022-08-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8621892/>. DOI: 10.3390/microorganisms9112408.
- [50] HUANG X, PAN J, XU F, *et al.* Bacteria-based cancer immunotherapy[J/OL]. Adv Sci (Weinh), 2021, 8(7): 2003572[2022-08-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8025040/>. DOI:10.1002/adv.202003572.
- [51] SHARMA P, LEVY O, DOWLING D J. The TLR5 agonist flagellin shapes phenotypical and functional activation of lung mucosal antigen presenting cells in neonatal mice [J/OL]. Front Immunol, 2020, 11: 171[2022-08-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7039933/>. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00171.
- [52] CHOI J M, LIM S H, LIU Z P, *et al.* Flagellin synergistically enhances anti-tumor effect of EGFRvIII peptide in a glioblastoma-bearing mouse brain tumor model[J/OL]. BMC Cancer, 2022, 22(1): 986[2022-08-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9479269/>. DOI:10.1186/s12885-022-10023-6.
- [53] LEVENTHAL D S, SOKOLOVSKA A, LI N, *et al.* Immunotherapy with engineered bacteria by targeting the STING pathway for anti-tumor immunity[J/OL]. Nat Commun, 2020, 11(1): 2739[2022-08-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7264239/> DOI:10.1038/s41467-020-16602-0.
- [54] ZHU J, KE Y, LIU Q, *et al.* Engineered *Lactococcus lactis* secreting Flt3L and OX40 ligand for in situ vaccination-based cancer immunotherapy[J/OL]. Nat Commun, 2022, 13(1): 7466[2022-12-06]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9719518/>. DOI:10.1038/s41467-022-35130-7.

[收稿日期] 2022-08-10

[修回日期] 2022-12-10

[本文编辑] 阮芳铭