

利用细菌治疗肿瘤的研究进展

黄建东^{1*}, 韦孟溪¹, 周楠²

¹ 香港大学李嘉诚医学院, 生物医学学院, 中国香港

² 中国科学院深圳先进技术研究院 深圳合成生物学创新研究院 中国科学院定量工程生物学重点实验室

广东省合成基因组学重点实验室 深圳 518055

摘要: 目前癌症的治疗方法副作用大, 药物不能有效到达癌组织内部, 因此治疗效果有限。细菌种类繁多, 可利用性强, 但是由于它本身自带的生物性能的不可控, 以及安全性等问题, 限制了它作为药物来治疗肿瘤。随着合成生物学的发展, 通过合成生物学的方法将细菌进行工程性改造, 使之毒性减弱, 增强靶向定位肿瘤, 特异性感知病灶, 精准定位于病灶。利用工程菌作为载体搭载药物, 或者经过基因修饰表达目的药物分子, 释放治疗药物, 将大大提高细菌治疗肿瘤的可利用性, 提高了对肿瘤的治疗效果, 本文主要总结了近年来工程细菌治疗肿瘤的研究进展。

关键词: 工程菌; 有效载荷; 生物成分; 底盘; 临床挑战

中图分类号: 文献标志码: A doi: 10.12146/j.issn.2095-3135.20210427004

Research Progress in Bacterial Tumor Therapy

HUANG Jiandong^{1*}, WEI Mengxi¹, ZHOU Nan²

¹ School of Biomedical Sciences, Li Ka Shing Faculty of Medicine, University of Hong Kong, 3/F, Laboratory Block, 21 Sassoon Road, Hong Kong

² (CAS Key Laboratory of Quantitative Engineering Biology, Shenzhen Institute of Synthetic Biology, Shenzhen Institutes of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, China)

Abstract: The efficacy of current anti-tumor therapies has suffered from possible side effects and the poor accessibility of drugs to the tumor core. Although a variety of bacteria in nature have the potential to be used as anti-tumor drugs, lacking controllability and potential safety issues have limited their usage in tumor treatment. With the development of synthetic biology, bacteria are extensively programmed under engineering disciplines to possess less toxicity and enhanced ability to target tumors, sense the lesions and locate the lesions accurately. Applying engineered bacteria as vectors to directly carry drugs or express and release molecular therapeutics has greatly improved the efficacy of the tumor treatment. This article will summarize the recent progress in

来稿日期: 2021-04-27 修回日期: 2021-05-17

基金项目: 深圳市科技创新委员会项目 (KQTD2015033117210153)

作者简介: 韦孟溪, 研究助理, 研究方向为合成生物学应用于肿瘤免疫研究; 周楠, 助理研究员, 研究方向为研究方向为合成生物学; 黄建东 (通讯作者), 香港大学讲座教授、中国科学院深圳先进技术研究院研究员, 研究方向为合成生物学理论和应用, E-mail: jdhuang@hku.hk

engineering bacteria for the treatment of tumors.

Keywords: engineering bacteria; payload; biological components; chassis; clinical challenges

Funding: This project is supported by Shenzhen Science Technology and Innovation Commission (KQTD2015033117210153)

1 引言

细菌对肿瘤的治疗作用, 最早源于古埃及的医学著作^[1,2], 发现当使用细菌感染肿瘤, 能使肿瘤减小。19 世纪初叶, Vautier 报道, 发生气性坏疽的癌症患者的肿瘤有消退^[3]。随后的 William B. Coley 试验丹毒的活体感染因子(后来被称为链球菌属'A'组或化脓性链球菌)作为治疗手段, 都取得不错的疗效^[4]。早期的细菌治疗肿瘤使用的是天然野生细菌, 它们主要是通过游走被化学吸引滞留在肿瘤微环境中, 一旦进入肿瘤, 细菌继续增殖, 并通过触发凋亡、坏死和细胞破裂直接杀死癌细胞^[5], 还有一部分细菌能激活机体的适应性免疫细胞来抑制肿瘤的生长。但是治疗中也暴露出天然野生细菌不仅在肿瘤部位游走, 也在血液循环中运动, 这就带来了很高全身感染风险和加大体内毒性等缺陷^[6,7]。在 20 世纪 90 年代中期, 人们发现, 细菌疗法产生的疗效竟然和传统的治疗方法不相上下。同时认识到肿瘤微环境和重组 DNA 技术能够产生更有效和毒性更低的细菌菌株时, 使用活细菌进行癌症治疗的热情被重新点燃^[8]。

在工程菌针对癌症治疗领域, 随着基因工程的发展, 通过合成生物学的方法将细菌进行工程性改造, 使之毒性减弱, 增强靶向定位肿瘤, 特异性感知病灶, 精准定位于病灶, 通过作为载体搭载药物, 或者基因修饰表达目的药物分子, 释放治疗药物, 提高了细菌治疗肿瘤的可利用性, 提高对肿瘤治疗效果, 合成生物学领域开发的一系列基因工具能够使工程化的细菌保留固有的抗肿瘤特异性, 同时为癌症治疗提供各种类型的治疗载荷, 提供更有效安全的治疗策略, 细菌治疗肿瘤有望成为人类对抗肿瘤的新兴趋势, 近期的一些工程菌治疗肿瘤研究进展综述如下。

2 工程菌的改造治疗肿瘤

野生细菌对健康组织的全身毒性可能是由于在不适当的时间、部位释放有毒的物质以及不可控游走引起的。应用合成生物学的方法对基因进行筛选和修饰, 这些基因改造可以控制细菌毒性有效表达, 并推动新的肿瘤特异性结合蛋白的发现和开发, 增强细菌与肿瘤的结合, 使工程改造后的细菌达到新的治疗效果。

2.1 提高安全性以及增强靶向功能

有效的肿瘤靶向和治疗的安全性是当前细菌癌症治疗中的主要问题, 由于肿瘤内存在新成血管未完全发育, 血管分布混乱等问题, 导致血液循环紊乱, 血液流动缓慢, 致使肿瘤组织内氧气和营养物质传递低效, 形成了独特的肿瘤缺氧微环境。为此, 香港大学通过新的合成生物学方法来设计沙门氏菌, 以提高其在抗肿瘤治疗中的减毒性、靶向性, 使之对抗肿瘤更加有效, 更加灵活, 该设计主要是对必需基因(*asd*)进行工程改造, 使其处于缺氧条件启动子的控制之下。在有氧条件下的正常组织中, 不表达 *asd*, 不合成二氨基庚二酸(DAP), 除非由环境提供 DAP, 否则细菌将在生长期溶解。经过改造的沙门氏菌(YB1)在携带

肿瘤的裸鼠中，能靶向定植于肿瘤，抑制肿瘤生长，同时不影响小鼠的正常组织^[9]。另一种解决靶向传递的方法是在细菌表面表达能锚定肿瘤特异性的结合蛋白。临床上，细菌与肿瘤自然结合的依赖性还不够强。为了解决其中的一些限制，研究人员已经开始开发和筛选肿瘤特异性结合蛋白。新加坡国立大学永卢林医学院的研究团队编码大肠杆菌 Nissle 1917

(EcN)，使之与癌细胞表面的硫酸乙酰肝素蛋白多糖 (HSPG) 结合，并分泌芥子酶将膳食硫代葡萄糖苷转化为萝卜硫素。所产生的莱菔硫烷抑制癌细胞的生长和促进凋亡，从而清除结肠直肠癌。清除后，重新编程的微生物从大肠组织分离，并通过粪便排出。这种组合方法在体外几乎完全抑制了癌细胞。在小鼠结直肠癌模型中，观察到肿瘤较小，肿瘤发生率比单独使用工程微生物或膳食硫代治疗减少了七倍^[10]。西班牙国家微生物中心的一项研究是在大肠杆菌表面表达合成粘附素，并测试其与癌症抗原表面结合的能力，以及在体内定植小鼠肿瘤的能力^[11]。与野生型相比，含有合成粘附素的工程大肠杆菌能够在较低剂量下定植于实体肿瘤，并减少与健康组织的非特异性结合，实现对病灶的精准靶向定位。

与野生型相比，改造后的细菌优势在于，能保留野生菌动力活性的同时，毒性被大大减弱，在合适的剂量范围内不会对机体产生危害，并且能够靶向定植于肿瘤。含有合成粘附素的工程大肠杆菌能够在较低剂量下定植于实体肿瘤，并减少与健康组织的非特异性结合。然而工程菌具有不稳定性，随着繁殖时间的增长，可能出现基因变异回归的情况，这就有可能导致细菌部分恢复毒性，对机体产生危害。肿瘤细胞表面的特异性蛋白会随着时间的改变而有所修饰和调控，因此对于表达合成黏附素的工程菌，需要把握好肿瘤细胞表面特异性附着蛋白分子的表达水平，防止因肿瘤表面特异性蛋白表达的变化，致使细菌脱靶而失去应有的治疗效果。

2.2 通过血管生成调节治疗肿瘤

实体瘤的特点是血管生成增加，目前已经有几种工程化的细菌治疗策略侧重于抑制血管生成来产生抗肿瘤作用。深圳市动物遗传工程技术研发中心将长双歧杆菌设计成可以分泌 tumstatin，tumstatin 是一种强大的内源性血管生成抑制剂。该团队将非致病性厌氧长双歧杆菌设计成新型的 tum 给药系统，使之能够在 pBBADs 启动子调控下表达 Tum 载体，细菌精准定位肿瘤的同时，提高靶向给药功能，这种工程菌在 CT26 荷瘤小鼠模型中抑制肿瘤血管内皮细胞的增殖并诱导肿瘤细胞凋亡，首次证明利用长根双歧杆菌 (BL) 转化 tum 作为一种特异的基因传递系统治疗肿瘤^[12]。另一项研究报道了一种基于单核细胞增生李斯特菌减毒疫苗的研制，该疫苗可分泌 tLLO-CD105 融合蛋白，该融合蛋白包含一种胆固醇依赖性细胞溶血素李斯特菌溶血素 O (LLO) 和一种在血管生成中起作用的 TGF- β 受体家族成员 Edoglin (CD105)。改造后的李斯特菌能有效抗血管生成和抑制肿瘤，减轻小鼠的原发性和转移性乳腺癌^[13]。

利用工程化细菌生成血管抑制剂治疗肿瘤的优势在于，一是利用细菌的能动作用靶向到肿瘤，二是在肿瘤部位分泌血管抑制剂，仅针对肿瘤内的血管起作用，减少了不必要的组织伤害。需要注意的是，细菌进驻机体的方式必须和细菌分泌的血管抑制剂相对适宜，这样才能避免治疗后引起健康组织与肿瘤组织并发的安全问题，同时细菌分泌血管抑制剂的合适剂量对肿瘤的抑制也至关重要，分泌过多或者过少都有可能达不到良好的治疗效果。

2.3 通过细胞毒蛋白攻击肿瘤

利用细菌在肿瘤部位产生细胞毒蛋白是癌症治疗的另一种方式，这种设计方式主要是利用细菌能够游走到肿瘤的缺氧病灶区域，然后通过裂解或者分泌特定的抗肿瘤药物，实现对肿瘤的靶向给药，达到抑制病情的效果。两项独立的研究表明大肠杆菌 K-12 和鼠伤寒沙门氏菌 (*S.typhimurium*) ^[14, 15] 中能产生溶血素 A (Cytolysin A, ClyA)。经改造后的菌株在对放射治疗有抵抗力的小鼠 CT26 肿瘤模型中的缺氧区有效。另一种方法在鼠伤寒沙门氏菌中设计生成孔毒素溶血素 E (HlyE) ^[16]。这种经改造后的菌株可以增加小鼠乳腺肿瘤坏死，减

少肿瘤生长。还有研究表明，对大肠杆菌菌株 x 6212 (Δasd) 进行工程改造，可以提供金黄色葡萄球菌衍生的 α -溶血素 (SAH)^[17] 该工程菌株能够使 4T1 荷瘤小鼠的肿瘤消退和加大肿瘤坏死的力度。铜绿假单胞菌的低氧化还原蛋白 Azurin，它能够促进细胞色素链相关酶之间的单电子转移。是一种抗癌治疗蛋白，它能提高细胞内 p53 和 Bax 的水平，导致线粒体细胞色素 c 释放到胞浆中，从而引发细胞凋亡^[18]。有研究表明，表达 Azurin 的 EcN 能够抑制小鼠 B16 黑色素瘤和 4T1 乳腺肿瘤的生长^[19]。还有研究表明，设计鼠伤寒沙门氏菌来表达和释放融合蛋白，该融合蛋白包含转化生长因子 α (TGF α) 和假单胞菌外毒素 a (PE38)，这两者分别是 EGFR 配体和免疫毒素。经改造后的鼠伤寒沙门氏菌释放的 TGF α -PE38 融合蛋白显著抑制小鼠实体瘤的生长^[20]。

大多数癌症药物不能清除肿瘤中的所有癌细胞。它们通常只对抗增殖的细胞，并且不能深入渗透到组织中。这些弱点使许多肿瘤细胞能够逃脱治疗，并增加了复发、转移和死亡的机率。改造后的工程菌利用能动性游走到肿瘤部位，它们相当于提供一个在原位持续生产蛋白质药物的分子工厂。将生产的蛋白药物集中在肿瘤的深处，随着细菌的游走扩散，分泌的蛋白药物撒落肿瘤各个部位，扩大治疗范围，大大提高了治疗效率。然而并不是所有的蛋白药物对健康组织是有益的，因此，严格控制细菌的剂量，把握好细菌分泌蛋白药物的时间、表达能力的稳定性和药物产量大小，才能保证机体的安全。

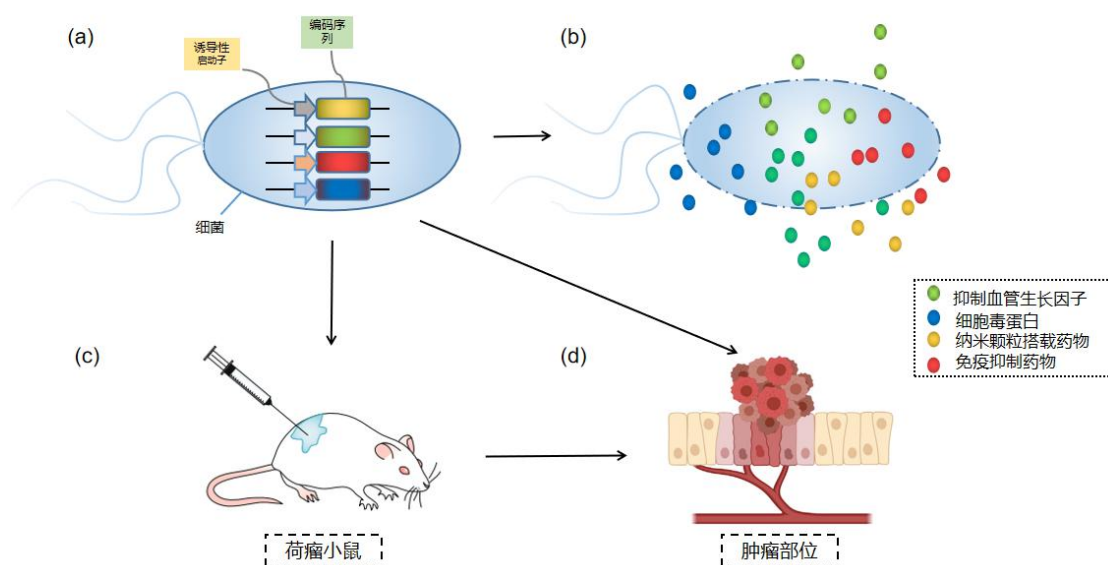


图 1 细菌经工程改造后治疗荷瘤小鼠过程

Fig. 1 Treatment process of tumor bearing mice with engineered bacteria

(a) 对细菌进行基因改造；(b) 改造后的细菌经转录表达，释放各种目的蛋白（注：虚线方框内的颜色颗粒对应 b 图）；(c) 改造后的细菌经静脉注射到小鼠体内；(d) 改造后的细菌直接注射到肿瘤部位。

2.4 通过 RNA 干扰 (RNAi) 阻断肿瘤生长

通过工程细菌系统提供的 RNAi 治疗是将治疗性 RNAi 效应物(短发夹状 RNA, shRNA) 运输到靶细胞中，用来沉默癌症相关的 mRNA。有研究表明，减毒鼠伤寒沙门氏菌经改造后在原位肝细胞癌小鼠模型中递送 STAT3-specific siRNA 和内皮抑素。这两种有效载荷的联合应用能够抑制肿瘤的增殖和转移，减少肿瘤的增殖炎症和肿瘤微血管的数量^[21]。经改造后的减毒鼠伤寒沙门氏菌菌株，在 CT26 和 MC38 结直肠癌小鼠模型中，靶向表达吡咯酮 2,3-双加氧酶的 shRNA 质粒，发现该菌株能增加中性粒细胞在肿瘤中的浸润，导致肿瘤细胞死亡增加^[22]。其他通过细菌介导的 siRNA 靶向表达并在临床前模型中显示出治疗效果的基因

包括 Survivin, B 细胞淋巴瘤 2 (Bcl-2)、性别决定区 Y (SRY) 盒 2 (Sox2)、程序性细胞死亡蛋白 1 (PD-1)、抑制素亚单位 α (INHA)、多药耐药突变 1 (MDR1) 和极性激酶 1 (PLK1) [21, 23-27] 等等。

通过 RNA 干扰阻断肿瘤的工程菌可以抑制肿瘤表面的特异性抗原, 有效地诱发免疫反应, 激活的适应性免疫反应能够持久的抗击肿瘤。而且有的抗肿瘤抗体费用昂贵, 治疗过程还可能产生毒副作用, 譬如用 RNA 干扰 (RNAi) 来抑制肿瘤细胞表面的 PDL-1, 以有效地诱发免疫反应, 该类型的细菌不仅能够作为免疫刺激剂, 而且还降低了治疗成本。弊端在于细菌前期不止在肿瘤部位游走, 还游走于机体的其它部位, 为了避免误伤健康组织, 控制好 RNAi 效应物在时间和空间上的表达至关重要。

2.5 作为底盘进行治疗

开发工程化的细菌为基础方法进行癌症治疗时, 选择合适的细菌底盘作为药物载荷是一个重要的考虑因素, 选择细菌作为底盘来搭载药物的优势在于, 细菌具有良好的兼容性和基因改变的易用性, 同时细菌还具有天然的抗肿瘤活性和侵袭定植肿瘤的能力, 使用细菌作为底盘工具, 能使药物的靶向精准给药方式更加灵活, 更加智能。越来越多的工程菌譬如大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、沙门氏菌、李斯特菌属、梭状芽孢杆菌属、双歧杆菌属、链球菌属、乳酸杆菌属和乳球菌属等都可供应用, 美国哥伦比亚大学生物医学工程系有团队就使用细菌做为底盘来进行免疫检查点的阻断治疗, 他们将非致病性大肠肝杆菌 Pir1+设计成基因裂解电路 (SLC), 并通过该基因裂解电路编码释放纳米体拮抗剂 (CD47nb) 12, 结果表明肿瘤内裂解 CD47nb 可增加肿瘤浸润性 T 细胞的活性, 显著降低小鼠肿瘤的生长^[28]。在另外一个团队的研究中也是使用益生菌设计成基因裂解电路 (SLC), 用来释放程序性细胞死亡配体 1 (PD-L1) 和细胞毒性 T 淋巴细胞相关蛋白 4 (CTLA-4), 在动物实验中验证到, 在同基因小鼠模型中, PD-L1nb 和 CTLA-4nb 局部释放到肿瘤中导致 T 细胞活化增加、记忆 T 细胞群增加, 能引起肿瘤消退。而且, 联合施用产生 PD-L1nb、CTLA-4nb 和 GM-CSF 的细菌菌株比单独或双重施用产生免疫检查点纳米体的菌株更有效^[29]。

2.6 制造癌症活疫苗

细菌疫苗一直是疫苗学的主要研究领域, 使用细菌设计成疫苗来对付癌症也是一种趋势, 日本东京大学医学院就将乳酸杆菌设计成能分泌肿瘤相关抗原 (TAA) 来刺激机体适应性免疫反应。他们在近期的一项 I/IIa 期临床试验中发现, 含有表达 TAA (HPV16 E7) 的干酪乳杆菌 GBL101c 的口服疫苗能够使 70% 的宫颈上皮内瘤样病变患者 (从 CIN3 到 CIN1-2) (UMIN000001686) ii 的症状消退。识别 E7 抗原的初始 T 细胞能够定位于宫颈肿瘤并促使 T 辅助细胞 1 (Th1) 产生^[30, 31]。日本神户大学医学院使用重组长双歧杆菌构建了一种口腔癌疫苗, 这种细菌疫苗能表达肾母细胞瘤 1 (WT1) 蛋白, 将该疫苗口服给接种了 4 周表达 WT1 肿瘤细胞的小鼠, 发现该疫苗能够诱导 WT1 表位特异性细胞毒 T 细胞介导的细胞毒活性来降低 WT1 表达的小鼠肿瘤生长^[32]。在随后的研究当中, 使用该疫苗和抗 PD1 抗体联合治疗能够显著抑制肿瘤生长, 延长表达 WT1 的 TRAMP-C2 荷瘤小鼠的生存期^[33]。

2.7 工程菌在联合治疗中的应用

肿瘤内同一器官 (瘤内异质性) 或患者之间 (瘤间异质性) 之间存在分子和细胞异质性^[34]。肿瘤内异质性可能是由于固有的基因组不稳定性以及周围微环境中的成分引起的, 这些成分会引起癌细胞基因型和酚类的变化。此外, 将药物引入肿瘤微环境可能导致肿瘤获得耐药性, 并产生具有不同类型且未确定癌症特征的耐药癌细胞克隆。

癌症单一疗法不能充分解决异质性肿瘤的问题, 因此产生了使用联合疗法的治疗方案。基于细菌组合的方法是为了获得更好的治疗效果。其中一个关键方案就是细菌工程, 组合方案能同时提供多个有效载荷, 用于不同的癌症标志。例如, EcN 被用来传递 Tum-5 - p53 融合蛋白^[35]。这种方法既可以 Tum-5 抑制血管生成, 又能引入 p53 抑癌基因来解决一些癌症

特性，如基因组稳定性、抗凋亡、组织侵袭和转移以及肿瘤相关炎症^[35, 36]。He L 等人使用三种不同的鼠伤寒沙门氏菌菌株被设计来释放治疗性蛋白，将 hlyE 毒素、CCL21 和由 Bcl-2 转录抑制因子 1 (Bit1) 的细胞死亡域和凋亡触发因子（肿瘤穿透肽 iRGD）组成的融合蛋白。当三种菌株的混合物在小鼠身上使用时，发现与单一菌株的使用相比，它在抑制肿瘤生长方面具有很强的效力^[35, 37]。另一种方法是测试工程菌和其他常规疗法的联合使用，可以提高治疗效果。有临床前研究表明，与细菌单一疗法相比，向小鼠联合施用表达 ClyA 的鼠伤寒沙门氏菌和放射疗法能更大程度上减少了肿瘤生长^[15]。此外，表达 hlyE 的鼠伤寒沙门氏菌与化疗药物 5-氟尿嘧啶的联合应用能够抑制 MC26-LucF 肿瘤生长并延长小鼠的生存期^[37]。Chen T 等人使用鼠伤寒沙门氏菌来传递人源化毒素 DNase I，DNase I 是一种 DNA 核酸酶，在细胞凋亡过程中负责 DNA 断裂。该工程菌株与细胞毒性化合物雷公藤内酯醇的联合施用抑制了肿瘤生长并提高了 B16-F10 荷瘤小鼠的存活率^[38]。

3 工程菌的临床研究进展与面临的挑战

选择合适的动物模型和患者进行治疗实验至关重要，有一些在临床前研究显示出有疗效的工程菌已经用于人体的临床试验^[23, 39]。美国马里兰州的一个实验室施用 TAPET-CD（TAPET-CD 是一种表达大肠杆菌胞嘧啶脱氨酶基因的减毒伤寒沙门氏菌株 VNP20009），该菌株在患者肿瘤内表达胞嘧啶脱氨酶，该酶能将 5-FC（5-fluorocytosine）转化为 5-氟尿嘧啶（5-fluorocytosine, 5-FU）^[23, 40]，结果发现，三个病人中只有两个在肿瘤中有细菌定植和 5-FU 生成。此外，所有患者的临床反应都很小，该研究随后被中止。明尼苏达大学兽医临床科学院在一项兽医犬类临床试验中使用了减毒鼠伤寒沙门氏菌 x 4550，该菌株能够编码 IL-2 (SalpIL2)，然而临床反应并没有符合预期设想的那样^[6]。这些研究显示了临床前研究和实际临床研究之间的结果差异。

鉴于活性菌作为治疗剂的独特性质，还需要考虑临床转化的几个重要问题。首先，携带抗生素抗性基因的细菌或可以介导水平基因转移的质粒等移动遗传元件通常不适合临床研究^[41]。其次，与其他小分子等临床试剂不同，活细菌或细菌孢子不能通过加热或者过滤来灭菌，这对产生良好制造规范 (GMP) 级试验制品提出了重大挑战，此外，用于无菌测试的常规需氧和厌氧培养方法是不可行的。因此，需遵循严格的无菌条件，在专用洁净室中进行生产，并且严格监控生产过程的洁净度。虽然最终产品不能证明是无杂菌污染，但应该确认它们不含疾病或病理状况的致病因子。第三，活细菌在靶组织中增殖，有效（无论治疗或毒性）剂量不一定与给药相关。有效剂量更多地取决于靶组织的质量，由细菌的可及性，肿瘤坏死或缺氧的程度以及预先存在的肿瘤浸润性炎症细胞的丰度来定义。这些因素决定了全身施用的细菌如何进入靶组织，并且是否会引起增殖和感染。第四，当在临床环境中使用活的生物制剂时，其对公共健康和环境的潜在影响是一个问题，需要妥善解决。使用溶瘤细菌还有一个挑战。使用溶瘤细菌进行治疗是将肿瘤转变为局部肿瘤破坏性感染，如果管理不当可能会产生严重后果。由于强感染会产生毒性效应，因此平衡各种条件尤为重要。过早地使用抗生素预防可限制毒性，但可能会干预细菌的抗肿瘤作用。而晚期干预具有不可预测的风险。成功控制感染需要跨学科的专家，包括肿瘤学家，传染病专家和介入放射科医生或外科医生，来把控需要侵入性治疗的脓肿或非脓肿形成感染。因此，在确定感染后如何进行干预应该由跨学科团队来决定。

4 总结与展望

癌症的治疗手段目前还集中在手术, 化疗, 放疗和免疫治疗, 由于肿瘤本身缺氧, 微血管紊乱等微环境, 限制了各种治疗的疗效, 细菌治疗的优势在于可以利用自身运动和生长的驱动性, 深入到肿瘤内部。目前不少研究成果表明细菌通过基因改造, 可以作为药物载体, 药物疫苗等手段可以有效治疗肿瘤, 随着科学研究的不断发展, 合成生物学以及各项机理研究不断深入, 细菌治疗肿瘤有希望成为理想的治疗方法, 为癌症治疗带来福音。

参考文献

- [1] Wiemann B, Starnes C O. Coley's toxins, tumor necrosis factor and cancer research: a historical perspective[J]. *Pharmacol Ther*, 1994,64(3):529-564.
- [2] Hoption Cann S A, van Netten J P, van Netten C, et al. Spontaneous regression: a hidden treasure buried in time[J]. *Medical Hypotheses*, 2002,58(2):115-119.
- [3] Mowday A, Guise C, Ackerley D, et al. Advancing Clostridia to Clinical Trial: Past Lessons and Recent Progress[J]. *Cancers*, 2016,8(7):63.
- [4] Coley W B I I. Contribution to the knowledge of sarcoma[J]. *Surg*, 1891,14:199-220.
- [5] Kasinskas R W, Forbes N S. Salmonella typhimurium specifically chemotax and proliferate in heterogeneous tumor tissue in vitro[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2006,94(4):710-721.
- [6] Fritz S E, Henson M S, Greengard E, et al. A phase I clinical study to evaluate safety of orally administered, genetically engineered Salmonella enterica serovar Typhimurium for canine osteosarcoma[J]. *Veterinary Medicine and Science*, 2016,2(3):179-190.
- [7] 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]. *Journal of clinical oncology*, 2002,20(1):142-152.
- [8] NS F. Engineering the perfect (bacterial) cancer therapy[J]. *Nat Rev Cancer*, 2010,10(11):785-794.
- [9] Yu B, Yang M, Shi L, et al. Explicit hypoxia targeting with tumor suppression by creating an “obligate” anaerobic Salmonella Typhimurium strain[J]. *Scientific Reports*, 2012,2(1).
- [10] Ho C L, Tan H Q, Chua K J, et al. Engineered commensal microbes for diet-mediated colorectal-cancer chemoprevention[J]. *Nature Biomedical Engineering*, 2018,2(1):27-37.
- [11] 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[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2014,4(4):463-473.
- [12] Wei C, Xun A Y, Wei X X, et al. Bifidobacteria Expressing Tumstatin Protein for Antitumor Therapy in Tumor-Bearing Mice[J]. *Technology in Cancer Research & Treatment*, 2016,15(3):498-508.
- [13] Wood L M, Pan Z, Guirnalda P, et al. Targeting tumor vasculature with novel Listeria-based vaccines directed against CD105[J]. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 2011,60(7):931-942.
- [14] Jiang S, Park S, Lee H J, et al. Engineering of Bacteria for the Visualization of Targeted Delivery of a Cytolytic Anticancer Agent[J]. *Molecular therapy*, 2013,21(11):1985-1995.
- [15] Liu X, Jiang S, Piao L, et al. Radiotherapy combined with an engineered Salmonella typhimurium inhibits tumor growth in a mouse model of colon cancer[J]. *Experimental animals*, 2016,65(4):413-418.
- [16] Ryan R M, Green J, Williams P J, et al. Bacterial delivery of a novel cytolysin to hypoxic areas of solid tumors[J]. *Gene therapy*, 2009,16(3):329-339.

-
- [17] St J A, Swofford C A, Panteli J T, et al. Bacterial delivery of Staphylococcus aureus alpha-hemolysin causes regression and necrosis in murine tumors[J]. *Molecular therapy*, 2014,22(7):1266-1274.
- [18] Yamada T, Goto M, Punj V, et al. Bacterial redox protein azurin, tumor suppressor protein p53, and regression of cancer[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002,99(22):14098-14103.
- [19] Zhang Y, Zhang Y, Xia L, et al. Escherichia coli Nissle 1917 Targets and Restrains Mouse B16 Melanoma and 4T1 Breast Tumors through Expression of Azurin Protein[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012,78(21):7603-7610.
- [20] Lim D, Kim K S, Kim H, et al. Anti-tumor activity of an immunotoxin (TGFalpha-PE38) delivered by attenuated Salmonella typhimurium[J]. *Oncotarget*, 2017,8(23):37550-37560.
- [21] Jia H, Li Y, Zhao T, et al. Antitumor effects of Stat3-siRNA and endostatin combined therapies, delivered by attenuated Salmonella, on orthotopically implanted hepatocarcinoma[J]. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 2012,61(11):1977-1987.
- [22] Phan T, Nguyen V H, D'Alincourt M S, et al. Salmonella-mediated therapy targeting indoleamine 2, 3-dioxygenase 1 (IDO) activates innate immunity and mitigates colorectal cancer growth[J]. *Cancer gene therapy*, 2020,27(3-4):235-245.
- [23] Duong M T, Qin Y, You S, et al. Bacteria-cancer interactions: bacteria-based cancer therapy[J]. *Experimental & Molecular Medicine*, 2019,51(12):1-15.
- [24] Yoon W, Yoo Y, Chae Y S, et al. Therapeutic advantage of genetically engineered Salmonella typhimurium carrying short hairpin RNA against inhibin alpha subunit in cancer treatment[J]. *Annals of Oncology*, 2018,29(9):2010-2017.
- [25] Zhao T, Wei T, Guo J, et al. PD-1-siRNA delivered by attenuated Salmonella enhances the antimelanoma effect of pimozide[J]. *Cell Death & Disease*, 2019,10(3):164-176.
- [26] Zhao C, He J, Cheng H, et al. Enhanced therapeutic effect of an antiangiogenesis peptide on lung cancer in vivo combined with salmonella VNP20009 carrying a Sox2 shRNA construct[J]. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2016,35(1):107-118.
- [27] Deng J, Guo Y, Jiang Z, et al. Enhancement of ovarian cancer chemotherapy by delivery of multidrug-resistance gene small interfering RNA using tumor targeting Salmonella[J]. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 2015,41(4):615-622.
- [28] Chowdhury S, Castro S, Coker C, et al. Programmable bacteria induce durable tumor regression and systemic antitumor immunity[J]. *Nature Medicine*, 2019,25(7):1057-1063.
- [29] Gurbatri C R, Lia I, Vincent R, et al. Engineered probiotics for local tumor delivery of checkpoint blockade nanobodies[J]. *Science translational medicine*, 2020,12(530):x876.
- [30] Kawana K, Adachi K, Kojima S, et al. Oral vaccination against HPV E7 for treatment of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 (CIN3) elicits E7-specific mucosal immunity in the cervix of CIN3 patients[J]. *Vaccine*, 2014,32(47):6233-6239.
- [31] Komatsu A, Igimi S, Kawana K. Optimization of human papillomavirus (HPV) type 16 E7-expressing lactobacillus-based vaccine for induction of mucosal E7-specific IFN γ -producing cells[J]. *Vaccine*, 2018,36(24):3423-3426.
- [32] Kitagawa K, Oda T, Saito H, et al. Development of oral cancer vaccine using recombinant Bifidobacterium displaying Wilms' tumor 1 protein[J]. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 2017,66(6):787-798.
- [33] Kitagawa K, Gonoi R, Tatsumi M, et al. Preclinical Development of a WT1 Oral Cancer

-
- Vaccine Using a Bacterial Vector to Treat Castration-Resistant Prostate Cancer[J]. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2019,18(5):980-990.
- [34] Tellez-Gabriel M, Ory B, Lamoureux F, et al. Tumour Heterogeneity: The Key Advantages of Single-Cell Analysis[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016,17(12):2142-2161.
- [35] He L, Yang H, Tang J, 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]. *Journal of Biological Engineering*, 2019,13(1):58-71.
- [36] Solomon H, Madar S, Rotter V. Mutant p53 gain of function is interwoven into the hallmarks of cancer[J]. *The Journal of Pathology*, 2011,225(4):475-478.
- [37] Din M O, Danino T, Prindle A, et al. Synchronized cycles of bacterial lysis for in vivo delivery[J]. *Nature*, 2016,536(7614):81-85.
- [38] Chen T, Zhao X, Ren Y, et al. Triptolide modulates tumour-colonisation and anti-tumour effect of attenuated *Salmonella* encoding DNase I[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019,103(2):929-939.
- [39] Zhou S, Gravekamp C, Bermudes D, et al. Tumour-targeting bacteria engineered to fight cancer[J]. *Nature reviews. Cancer*, 2018,18(12):727-743.
- [40] Nemunaitis J, Cunningham C, Senzer N, et al. Pilot trial of genetically modified, attenuated *Salmonella* expressing the *E. coli* cytosine deaminase gene in refractory cancer patients[J]. *Cancer gene therapy*, 2003,10(10):737-744.
- [41] Mignon C, Sodoyer R, Werle B. Antibiotic-Free Selection in Biotherapeutics: Now and Forever[J]. *Pathogens*, 2015,4(2):157-181.