

细菌靶向治疗肿瘤的研究进展

张允雷¹, 夏立秋¹, 张友明^{1,2}

关键词: 细菌; 靶向性; 抗肿瘤; 基因载体
中图分类号: Q939. 93 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2009)07-0619-04

0 引言

近年来, 针对肿瘤治疗的化学合成药物、天然提取药物、基因工程药物和靶向性药物得到了快速发展, 但仍达不到治疗肿瘤的理想效果, 探索治疗肿瘤新方法的研究越来越受到重视。自 Coley^[1]首次利用细菌治疗肿瘤以来, 细菌靶向治疗肿瘤已成为近年国际研究的热点, 并取得了突破性进展。

1 细菌靶向治疗肿瘤的分子机制

在细菌靶向治疗肿瘤方面, 研究最广泛和深入的有两种细菌: 一种是减毒诺维氏菌(*Clostridium novyi-NT*), 由诺维梭菌(*C. novyi*)通过热休克法敲除其主要毒性基因后的突变体^[2]。另一种是减毒鼠伤寒沙门氏菌 VNP20009 (*Salmonella typhimurium* VNP20009), 由鼠伤寒沙门氏菌(*S. typhimurium*)敲除 *msb* 和 *puri* 毒性基因后的突变体^[3]。他们的肿瘤靶向性机制的假设可以总结为三点: (1) 细菌被困在弯曲混乱的肿瘤血管中, 不易被机体清除; (2) 肿瘤血管的流动不畅以及肿瘤坏死区使细菌逃脱了巨噬细胞的吞噬和机体的免疫监视; (3) 细菌对肿瘤组织环境具有趋化性, 并能优先在其中生长繁殖。

1.1 减毒诺维氏菌

减毒诺维氏菌是厌氧菌, 能在肿瘤的低氧区和坏死区生长繁殖, 其孢子没有移动性, 但肿瘤血管的结构特点^[4]、小泡运输^[5]和吞噬细胞的吞噬作用^[6]使其能从血管进入肿瘤的低氧区和坏死区。诺维氏菌具有消溶肿瘤细胞的作用, 为了找到这种溶细胞因子, Bettgowda 等^[7]对减毒诺维氏菌的基因组和转录物进行了研究。对三个表达量相对较高, 有潜

在溶细胞作用的蛋白酶分析发现, 脂肪酶 NT01CX2047 可以改变脂质双分子层结构使其具有渗透性而发挥溶肿瘤细胞作用; 将脂肪酶 NT01CX2047 基因突变后在大肠杆菌(*E. coli*)中表达, 发现失去了脂肪酶活性的突变体依然能裂解脂质体^[8]。NT01CX2047 对脂质顺序和极性作用试验表明, NT01CX2047 编码的蛋白质能够通过脂质结合结构域与脂质体相互作用引起脂质体结构改变而使其破裂。除了溶肿瘤细胞作用外, 减毒诺维氏菌还能够诱导宿主自身产生抗肿瘤免疫反应^[9]。用减毒诺维氏菌治疗荷 CT26 肿瘤的 BALB/c 小鼠, 治愈后再次注射 CT26 肿瘤细胞, 肿瘤复发率降低了 40%。

1.2 鼠伤寒沙门氏菌

鼠伤寒沙门氏菌是一种兼性厌氧菌, 它在肿瘤坏死区和活性区都可以生长, 尾静脉注射亮氨酸、精氨酸缺陷型鼠伤寒沙门氏菌可以完全消溶肿瘤^[10]。Forbes 等^[11]观察了减毒鼠伤寒沙门氏菌 VNP20009 对 MCa IV 肿瘤血管组织的黏附性和对 LS174T 癌细胞的浸染性。在试管试验中, 鼠伤寒沙门氏菌能黏附于 LS174T 圆柱瘤, 在肿瘤中重新分布并在圆柱瘤中心富集, 而且圆柱瘤越大这种趋化现象越明显, 这说明肿瘤细胞可能分泌了细菌趋化因子。鼠伤寒沙门氏菌还可以诱导机体产生免疫反应, 用转有 LIGHT 细胞因子的减毒鼠伤寒沙门氏菌治疗荷 D2F2 乳腺癌 BALB/c 小鼠^[12]。通过流式细胞仪分析发现, 肿瘤细胞中 B 细胞和 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞大量增加。加入 CD4⁺、CD8⁺ 的抗体后, 细菌抑肿瘤效果会被中和掉。除此之外, 大量的研究证明, 细菌的自身物质能够刺激试验动物产生抗肿瘤的免疫反应抑制新肿瘤的形成和肿瘤的生长^[13-14]。

2 肿瘤靶向性细菌的扩展

一些致病菌如百日咳杆菌(*Bordetella pertussis*)、减毒鼠伤寒沙门氏菌等单一或与传统治疗方法相结合或是作为载体治疗肿瘤取得了一定的效

收稿日期: 2008-08-19; 修回日期: 2008-10-20
作者单位: 1. 410000 长沙, 湖南师范大学生命科学院微生物分子生物学湖南省重点实验室; 2. 德国德累斯顿技术大学基因组系
通信作者: 夏立秋, E-mail: xialq@hunnu. edu. cn
作者简介: 张允雷(1983 -), 男, 硕士, 主要从事抗癌药物的研究

果^[15-17],但无法完全消除其固有的致病性。近年来,人们开始关注肿瘤靶向性益生菌,如双歧杆菌、乳酸菌等。同时发现了具有更高肿瘤靶向性的细菌——大肠杆菌 Nissle 1917 (*E. coli* Nissle 1917)^[18]。

2.1 大肠杆菌 Nissle 1917

很多益生菌已被开发成保健品,如大肠杆菌 Nissle 1917、大肠杆菌 CFT073(*E. coli* CFT073)被用于治疗痢疾和养护肠道。这些益生菌可以作为药物载体,口服给药治疗肿瘤。Stritzker 等^[18]研究了几种肠道细菌对肿瘤的靶向性,发现一种更高肿瘤靶向性细菌——大肠杆菌 Nissle 1917。大肠杆菌 Nissle 1917 对血清敏感,这有助于其对肿瘤的偏好性并能从其他组织被迅速清除;它还对肿瘤活性区和坏死区之间的过渡区有偏好性,而这正是厌氧菌的盲区。荷人结肠癌裸鼠经口服给菌(表达人 CT-NNB1-shRNA 的大肠杆菌 Nissle 1917),能够显著抑制肿瘤中 CTNNB1 的表达^[19]。

2.2 双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)

双歧杆菌属是一类与人共生的益生菌,在人及其他动物的大肠和小肠中都有发现,它同样对肿瘤具有靶向性。把携有 *eCD* 基因的质粒转入长双歧杆菌(*B. longum*)中^[20],结合胃内强饲 5-氟胞嘧啶法治治疗 DMBA 诱导型乳腺癌鼠,肿瘤明显消退,5-氟胞嘧啶仅在肿瘤中存在。早在 2001 年 Yazawa 等^[21]就验证了长双歧杆菌作为细菌靶向治疗肿瘤载体的可行性。静脉注射携带质粒 pBLES100 的长双歧杆菌 105-A(*B. longum* 105-A)到肿瘤小鼠,168 h 后长双歧杆菌 105-A 仅在肿瘤中存留且质粒没有丢失。Hidaka 等^[22]利用短双歧杆菌 I-53-8w(*B. breve* I-53-8w)作为载体表达 *CD* 基因转化 5-氟胞嘧啶显示出比长双歧杆菌更高的转化效能和重组质粒的稳定性。

这些人体益生菌有特殊的优势——可以口服给药,但其自身并不分泌抗癌化合物。但有一些细菌虽然不存在人体肠道内,也可称为益生菌如发光杆菌属(*Photobacterium*),假单胞菌属(*Pseudomonas*),粘细菌(*Myxobacterium*)等,至今的研究表明这些细菌对人体无害并且能够产生次级代谢产物。现在对 PKS/NRPS 等大基因簇的操作技术已经成熟,这些细菌可以作为 I 型 PKS/NRPS (Non ribosomal peptide synthetase) 基因簇表达的异源宿主分泌表达抗肿瘤化合物。这些细菌中任何一个具有肿瘤靶性,我们就可以用其作为异源宿主表达高效抗肿瘤药物实现对肿瘤的靶向治疗。

3 研究手段的创新

细菌在正常器官和肿瘤中的分布情况与其治疗效果及安全性密切相关,好的标记方法可以实时反映细菌在小鼠体内的生长繁殖分布情况,有利于研究其肿瘤靶向性机制及抗肿瘤作用。另外,在细菌中表达异源蛋白时,诱导表达比组成性表达要高得多,诱导肿瘤靶向性细菌中抗肿瘤药物的大量表达是治疗肿瘤的关键因素之一。

3.1 荧光蛋白和发光蛋白标记

实时荧光蛋白如 GFP、RFP 在基因工程中被广泛用作标记蛋白,利用 GFP 标记的鼠伤寒沙门氏菌 A1-R 浸染 GFP 和 RFP 标记的双色 PC-3 肿瘤^[23],能够非常清晰观察细菌黏附及肿瘤细胞崩解全过程。一些发光蛋白如 LUX 也被用来标记细菌,LUX 标记的大肠杆菌 DH5 α (*E. coli* DH5 α)经尾静脉注射裸鼠或免疫耐受小鼠后,在冰冻数位摄影机下,可以清楚的观测细菌在小鼠各组织的分布情况^[24]。

3.2 诱导表达

一般异源基因组成性表达量少,需要诱导异源蛋白才能大量表达。肿瘤中存在低氧区,而正常组织不存在,因此低氧诱导启动子 HIP-1 被用于诱导发光蛋白基因的表达。在 HIP-1 启动子下,发光蛋白诱导性表达量比组成性表达量高出 15 倍^[25];P_{BAD}是 L-阿拉伯糖诱导表达启动子,在试验中被广泛用于诱导外源基因的表达^[18]。尾部静脉注射到小鼠体内的大肠杆菌 Nissle 1917,通过口服 L-阿拉伯糖可以诱导其异源发光蛋白基因表达。

4 治疗方法的创新

为了提高细菌治疗肿瘤的疗效,往往把细菌与传统的化疗^[16]、放疗^[26]等方法相结合来治疗肿瘤,取得了显著效果。随着研究的不断深入,细菌靶向治疗肿瘤的方法也得到不断的创新,并通过提高细菌的肿瘤靶向性达到高效靶向治疗的目的。

4.1 前体药物转换酶

前体药物转换酶(胞嘧啶脱氨酶)先后在双歧杆菌属和鼠伤寒沙门氏菌中被成功表达,无细胞毒性的 5-氟胞嘧啶在肿瘤中被转化为细胞毒性的 5-氟尿嘧啶,从而实现靶向治疗肿瘤,减少化疗药物对正常组织器官的损害^[20,27];在大肠杆菌 DH5 α (*E. coli* DH5 α)中表达 β -葡萄糖醛酸酶,尾静脉注射治疗荷 CL1-5 肿瘤小鼠,同时静脉注射葡萄糖醛酸甘前体药物 9AGG,利用大肠杆菌 DH5 α 的肿瘤靶向性在肿瘤中把前体药物转化生成拓扑异构酶 I 的抑制

物,可以抑制肿瘤的生长^[28]。

4.2 抗癌药物与脂质体包埋

内皮他丁(Endostatin)是抗血管生成药物,以减毒鼠伤寒沙门氏菌 VNP20009 为载体表达内皮他丁治疗荷 B16F10 黑色素瘤 C57BL/6 小鼠^[29],可以显著减少肿瘤血管组织,肿瘤抑制率达到 40%~70%;利用减毒诺维氏菌裂解脂质体释放肿瘤药物阿霉素^[8],仅把细胞毒性物质释放于肿瘤中,从而实现肿瘤靶向治疗的目的。

4.3 细胞因子

肿瘤靶向性细菌还用于细胞因子、干扰 RNAi 等的表达载体治疗肿瘤试验。携带 light 基因的减毒鼠伤寒沙门氏菌治疗免疫敏感型荷 D2F2 胸腺癌或 CT-26 克隆癌细胞的 BALB/c 小鼠,显示出高效的抗癌效果^[12];信号传导子及转录激活子 3 (STAT3)与许多人类肿瘤的发生密切相关^[30],把 STAT3 特异性的 siRNA 质粒转入减毒鼠伤寒沙门氏菌中治疗荷前列腺癌 C57BL/6 裸鼠,结果表明其对原癌和转移癌都有抑制作用。

4.4 口服给药

细菌靶向治疗肿瘤要想最终进入临床必须解决安全问题。给菌方法采用静脉或皮下注射细菌或孢子的给菌方法会使肿瘤以外组织发生出血性坏死,而且注射留下的伤口也易造成细菌感染^[2]。通过口服减毒鼠伤寒沙门氏菌 VNP20009 治疗荷 B16F10 黑素瘤和 Lewis 肺癌的 C57BL/6 鼠,可高效抑制肿瘤的生长并延长鼠的寿命^[15]。与静脉或皮下注射相比较口服减毒鼠伤寒沙门氏菌的肿瘤靶向性更强、对动物的毒性更小。

4.5 增强细菌的繁殖力及靶向性

增强细菌的肿瘤靶向性,实现肿瘤靶向性治疗可以减少药物对正常组织的损伤,降低肿瘤治疗的副作用。通过突变或变异可以增强细菌对肿瘤的黏附性和渗透性从而增加细菌的靶向性和在肿瘤中的生长繁殖能力。Zhao 等^[10]把鼠伤寒沙门氏菌 A1 尾静脉注射荷 HT-19 肿瘤裸鼠,然后从肿瘤中分离出鼠伤寒沙门氏菌命名为 A1-R。它对肿瘤细胞的黏附力比 A1 增高了 6 倍;通过腹腔注射抗 Gr1 抗体抑制肿瘤内中性粒细胞对细菌的抑制作用,使肿瘤靶向细菌在肿瘤中克隆数增加了 3~4 倍。另外没有了中性粒细胞的抑制作用,细菌能在肿瘤的浸润区生长繁殖^[31]。

5 展望

细菌治疗肿瘤的历史有 100 多年了,随着微生物基因工程技术的发展和研究方法的不断改

进,细菌的肿瘤靶向性分子机制有望在近期获得突破。传统的肿瘤靶向性细菌如减毒鼠伤寒沙门氏菌 VNP20009^[32]已进行了 I 期临床试验并表现出较好的安全性,新的具有更高肿瘤靶向性并可作为更好基因载体的细菌正在被挖掘出来并倾向于非致病性细菌,因为已有实验表明口服肿瘤靶向性细菌同样能达到治疗肿瘤的目的。从对动物模型的治疗效果来看,细菌与传统方法、脂质体包埋法和基因修饰等相接合的治疗方法要比细菌单独治疗肿瘤更加有效。利用高效的肿瘤靶向性细菌作为抗癌药物的表达载体,分泌表达抗癌肽如天青蛋白(Azurin)、蓖麻毒素(Ricin)等小肽类物质,抑制和消融肿瘤细胞将是一种有效治疗肿瘤的方法。另外,一些多聚酮化合物具有高效的抗癌活性,它们是由 PKS/NRPS 基因簇表达合成的一大类天然产物,在结构和功能上具有多样性,并具有抗细菌、抗真菌和抗肿瘤等生物活性,其代表性物质—埃博霉素(Epothilone)^[33],在肿瘤靶向性细菌中表达 PKS/NRPS 基因簇合成抗肿瘤化合物、抑制和消融肿瘤具有重要的临床应用价值。在传统方法治疗恶性肿瘤始终无法打开局面的时候,利用细菌治疗肿瘤将不失为一个有效途径。

参考文献:

- [1] Wiemann B, Starnes CO. Coley's toxins, tumor necrosis factor and cancer research: a historical perspective[J]. Pharmacol Ther, 1994, 64(3): 529-564.
- [2] Diaz LA Jr, Cheong I, Foss CA, et al. Pharmacologic and toxicologic evaluation of *C. novyi*-NT spores[J]. Toxicol Sci, 2005, 88(2): 562-575.
- [3] Jia LJ, Xu HM, Ma DY, et al. Enhanced therapeutic effect by combination of tumor-targeting *Salmonella* and endostatin in murine melanoma model[J]. Cancer Biol Ther, 2005, 4(8): 840-845.
- [4] Hashizume H, Baluk P, Morikawa S, et al. Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness [J]. Am J Pathol, 2000, 156(4): 1363-1380.
- [5] Kato T, Tsuchida T, Kawamoto K. Blood tumor permeability of experimental brain tumor: An electron microscopic study using lanthanum[J]. Neuropathology, 2005, 25(1): 21-26.
- [6] O'Brien DK, Melville SB. The anaerobic pathogen *Clostridium perfringens* can escape the phagosome of macrophages under aerobic conditions[J]. Cell Microbiol, 2000, 2(6): 505-519.
- [7] Bettgowda C, Huang X, Lin J, et al. The genome and transcriptomes of the anti-tumor agent *Clostridium novyi*-Nt[J]. Nat Biotechnology, 2006, 24(12): 1517-1580.
- [8] Cheong I, Huang X, Bettgowda C, et al. A bacterial protein enhances the release and efficacy of liposomal cancer drugs[J]. Science, 2006, 314(5803): 1308-1311.

[9] Agrawal N, Bettgowda C, Cheong I, et al. Bacteriolytic therapy can generate a potent immune response against experimental tumors[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(42): 15172-15177.

[10] 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[J]. Cancer Res, 2006, 66(15): 7647-7652.

[11] Forbes NS, Munn LL, Fukumura D, et al. Sparse initial entrapment of systemically injected Salmonella typhimurium leads to heterogeneous accumulation within tumors[J]. Cancer Res, 2003, 63(17): 5188-5193.

[12] Loeffler M, LeNegrat G, Krajewska M, et al. Attenuated Salmonella engineered to produce human cytokine LIGHT inhibit tumor growth[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(31): 12879-12883.

[13] Shilling DA, Smith MJ, Tyther R, et al. Salmonella typhimurium stimulation combined with tumour-derived heat shock proteins induces potent dendritic cell anti-tumour responses in a murine model[J]. Clin Exp Immunol, 2007, 149(1): 109-116.

[14] Mahfouz M, Hashimoto W, Das Gupta TK, et al. Bacterial proteins and CpG-rich extrachromosomal DNA in potential cancer therapy[J]. Plasmid, 2007, 57(1): 4-17.

[15] Ling J, Dong P, Qi M, et al. Oral delivery of tumor-targeting Salmonella for cancer therapy in murine tumor models[J]. Cancer Sci, 2007, 98(7): 1107-1112.

[16] Smith AB 3rd, Freeze BS, LaMarche MJ, et al. Discodermolide analogues as the chemical component of combination bacteriolytic therapy[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2005, 15(15): 3623-3626.

[17] Dang LH, Bettgowda C, Huso DL, et al. Combination bacteriolytic therapy for the treatment of experimental tumors[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(26): 15155-15160.

[18] Stritzker J, Weibel S, Hill PJ, et al. Tumor-specific colonization, tissue distribution, and gene induction by probiotic Escherichia coli Nissle 1917 in live mice[J]. Int J Med Microbiol, 2007, 297(3): 151-162.

[19] Xiang S, Fruehauf J, Li CJ. Short hairpin RNA-expressing bacteria elicit RNA interference in mammals[J]. Nat Biotechnol, 2006, 24(6): 697-702.

[20] Sasaki T, Fujimori M, Hamaji Y, et al. Genetically engineered Bifidobacterium longum for tumor-targeting enzyme-prodrug therapy of autochthonous mammary tumors in rats[J]. Cancer Sci, 2006, 97(7): 649-657.

[21] Yazawa K, Fujimori M, Nakamura T, et al. Bifidobacterium longum as a delivery system for gene therapy of chemically induced rat mammary tumors[J]. Breast Cancer Research and Treatment, 2001, 66(2): 165-170.

[22] Hidaka A, Hamaji Y, Sasaki T, et al. Exogenous cytosine deaminase gene expression in Bifidobacterium breve I-53-8w for tumor-targeting enzyme/prodrug therapy[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2007, 71(12): 2921-2926.

[23] Zhao M, Geller J, Ma H, et al. Monotherapy with tumor-targeting mutant of Salmonella typhimurium cures orthotopic metastatic mouse models of human prostate cancer[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(24): 10170-10174.

[24] Min JJ, Nguyen VH, Kim HJ, et al. Quantitative bioluminescence imaging of tumor-targeting bacteria in living animals[J]. Nat Protoc, 2008, 3(4): 629-636.

[25] Mengesha A, Dubois L, Lambin P, et al. Development of a flexible and potent hypoxia-inducible promoter for tumor-targeted gene expression in attenuated Salmonella[J]. Cancer Biol Ther, 2006, 5(9): 1120-1128.

[26] Bettgowda C, Dang LH, Abrams R, et al. Overcoming the hypoxic barrier to radiation therapy with anaerobic bacteria[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(25): 15083-15088.

[27] King I, Bermudes D, Lin S, et al. Tumor-targeted Salmonella expressing cytosine deaminase as an anticancer agent[J]. Hum Gene Ther, 2002, 13(10): 1225-1233.

[28] Cheng CM, Lu YL, Chuang KH, et al. Tumor-targeting prodrug-activating bacteria for cancer therapy[J]. Cancer Gene Ther, 2008, 15(6): 393-401.

[29] Lee CH, Wu CL, Shiau AL, et al. Endostatin gene therapy delivered by Salmonella choleraesuis in murine tumor models[J]. J Gene Med, 2004, 6(12): 1382-1393.

[30] Zhang L, Gao L, Zhao L, et al. Intratumoral delivery and suppression of prostate tumor growth by attenuated Salmonella enterica serovar typhimurium carrying plasmid-based small interfering RNAs[J]. Cancer Res, 2007, 67(12): 5859-5864.

[31] Westphal K, Leschner S, Jablonska J, et al. Containment of Tumor-Colonizing Bacteria by Host Neutrophils[J]. Cancer Res, 2008, 68(8): 2952-2960.

[32] 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]. J Clin Oncol, 2002, 20(1): 142-152.

[33] Bollag DM, McQueney PA, Zhu J, et al. Epothilones, a new class of microtubule-stabilizing agents with a taxol-like mechanism of action[J]. Cancer Res, 1995, 55(11): 2325-2333.

[编辑:刘红武;校对:周永红]