

细菌-肿瘤微环境相互作用: 基于细菌的肿瘤治疗

吴万权 赵向前 陈骐* 沈阳坤*

(福建省天然免疫生物学重点实验室, 福建师范大学南方生物医学研究中心, 生命科学学院, 福州 350117)

摘要 在过去十年中, 癌症治疗取得了重大进展。然而, 传统治疗仍存在非癌细胞毒性、药物无法到达深层肿瘤组织以及肿瘤细胞耐药性持续增加的问题。与其他癌症疗法相比, 细菌不仅能作为基因治疗载体, 还能够特异靶向缺氧的肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME), 已被广泛应用于临床研究。由于细菌是一种强免疫原性物质, 即使在免疫抑制的肿瘤微环境中也能有效激活免疫细胞。因此, 在肿瘤免疫治疗中, 基于细菌抗癌的治疗方法具有巨大潜力。更引人注目的是, 随着合成生物学的发展, 可以通过基因技术来操纵细菌, 对其进行重新编程以诱导产生抗癌药物, 从而开发出独特的癌症治疗方法。然而, 作为一种新型肿瘤治疗手段, 细菌的安全性及靶向性受到普遍关注。该文着重介绍了细菌在肿瘤免疫治疗中的应用进展, 并探讨了其安全性及靶向性问题, 为抗癌疗法领域的药物研发提供一个新思路。

关键词 细菌; 肿瘤微环境; 肿瘤治疗; 细菌靶向肿瘤; 工程菌

Bacteria-Tumor Microenvironment Interactions: Bacteria-Based Tumor Therapy

WU Wanquan, ZHAO Xiangqian, CHEN Qi*, SHEN Yangkun*

(Fujian Key Laboratory of Innate Immune Biology, Biomedical Research Center of South China, Fujian Normal University, College of Life Science, Fuzhou 350117, China)

Abstract In the past decade, significant progress has been made in the cancer treatment. However, conventional therapies still suffer from non-cancerous cytotoxicity, the inability of drugs to reach deep tumor tissues, and the continued increase of tumor cell resistance. Compared with other cancer therapies, bacteria have been widely used in clinical research not only as gene therapy vectors but also for specifically targeting the hypoxic TME (tumor microenvironment). Since bacteria are a strong immunogenic substance, they can effectively activate immune cells even in the immunosuppressed tumor microenvironment. Therefore, bacteria-based anti-cancer therapeutic approaches have great potential in tumor immunotherapy. More strikingly, with the development of synthetic biology, bacteria can be manipulated through genetic techniques and reprogrammed to induce the production of anti-cancer drugs, thus developing unique cancer therapies. However, as a novel oncology treatment, the safety and targeting of bacteria are of general concern. This review will focus on the progress of the application of bacteria in tumor immunotherapy, and discuss the safety and targeting issues, providing a new idea for drug development in the field of anti-cancer therapy.

Keywords bacteria; tumor microenvironment; tumor therapy; bacterial targeting of tumors; engineered bacteria

收稿日期: 2022-10-26 接受日期: 2022-11-24

福建省自然科学基金(批准号: 2022J01652)资助的课题

*通讯作者。Tel: 15806023155, E-mail: shenyk@fjnu.edu.cn

Received: October 26, 2022

Accepted: November 24, 2022

This work was supported by the Fujian Natural Science Foundation (Grant No.2022J01652)

*Corresponding authors. Tel: +86-15806023155, E-mail: shenyk@fjnu.edu.cn

表1 过去和正在进行的临床研究
Table 1 Past and ongoing clinical studies

菌株 Bacterial strain	癌症类型 Cancer type	志愿者数量 Number of volunteers	临床阶段 Phase	文献/链接 References/link
<i>Clostridium novyi</i> -NT	Solid tumor malignancies	24	I	https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01924689
	Refractory advanced solid tumors	18- recruiting	Ib	https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03435952
<i>Listeria monocytogenes</i>	Metastatic pancreatic tumors	90	II	[9]
	Pancreatic cancer	63	II	https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03190265
	Cervical cancer	109	II	[10]
	Cervical cancer	450	III	https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02853604
<i>S. typhimurium</i> VNP20009	Metastatic melanoma; metastatic renal cell carcinoma	25		[11]
<i>S. typhimurium</i> Ty21a VXM01	Pancreatic cancer	26	I	[12]
<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917	Advanced/metastatic solid tumors and lymphoma	70	I	https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04167137
PA-MSHA	Metastatic breast cancer	100	II	[13]

人类的免疫系统负责识别自我和非我的危险信号,从而保护机体免受外源性病原体侵袭和内源性细胞的损伤。免疫系统可识别并清除细菌、病毒等各种威胁,以保持体内免疫系统的平衡^[1]。然而存在一个有趣的现象,在特殊情况下,细菌、病毒引起的免疫反应能有效地抑制肿瘤的生长。1891年,COLEY^[2]首次尝试利用丹毒(一种由链球菌感染引起的皮肤疾病)治疗骨癌,观察到癌症患者在患上丹毒后癌症症状得到自然缓解。然而,自1920年代以来放射、化疗等方法的出现,再加上安全性和治疗效果的不确定性,使得使用细菌治疗癌症的临床应用减少了。

随着免疫学和生物技术领域的发展,非靶向细胞毒性、无法治疗深层肿瘤组织以及在肿瘤细胞中诱导耐药性等问题已经得到了部分解决,人们对细菌治疗肿瘤重新重视起来。肿瘤组织内缺氧和免疫抑制是恶性肿瘤的两大特征,可视为开发肿瘤治疗方法的关键。研究显示,正常组织内的氧气浓度为40~60 mm Hg(5%~8%),而在肿瘤组织中的氧气浓度仅为7~28 mm Hg(1%~4%),能够吸引厌氧或者兼性厌氧细菌在肿瘤微环境中富集^[3]。此外,细菌通过病原体相关分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMPs)可以将天然免疫细胞,如树突状细胞

(dendritic cell, DC)、自然杀伤细胞(natural killer cell, NK)和粒细胞(granulocyte)募集到肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME),有效激活患者的免疫系统^[4]。对于细菌疗法会带来感染的风险,可以借助基因修饰将细菌的毒性降至最低,如通过敲除鼠伤寒沙门氏菌(VNP20009)的PurI和msbB基,降低治疗过程中的感染性休克和毒力风险^[5]。另一个成功的典型例子就是使用卡介苗(bacillus calmette guerin vaccine, BCG)治疗膀胱癌。BCG是一种通过多次传代获得的减毒活牛型结核杆菌菌株,不仅解决了细菌治疗的安全性问题,还具有免疫调节活性^[6]。其实,除了通过基因工程技术对细菌进行减毒之外,对细菌进行灭活也可以有效降低细菌的毒性和患者的感染风险。研究表明,细菌即使在灭活后,仍能引发抑制肿瘤生长的免疫反应^[7-8]。如表1所列,目前已有多项基于细菌的癌症治疗临床研究。

1 细菌特异靶向肿瘤微环境

基于细菌治疗肿瘤的最大优势是部分厌氧和兼性厌氧菌能够特异性靶向肿瘤。当全身给药时,细菌会滞留在肿瘤和健康组织。尽管最初到达肿瘤组织的细菌量通常小于到达正常组织的细菌量,但沙门氏菌早已被证明最终将归巢或停留在富含某些

代谢物的肿瘤微环境中^[14-15]。研究表明,全身注射一周后,与其他器官相比,鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)可在肿瘤中积累超过10 000倍^[15]。此外,诺维氏菌和双歧杆菌等细菌属也被证明优先在肿瘤中积聚,且不会对正常组织产生损伤^[16-17]。研究表明,减毒ppGpp合成缺陷的鼠伤寒菌株(Δ ppGpp *S.typhimurium*)和大肠杆菌K-12(MG1655),在各种类型的荷瘤小鼠静脉给药后,细菌仅在肿瘤中积累^[18-19]。

此外,运动性是细菌能够更深入地渗透到肿瘤组织中的关键特征之一。在全身给药后,细菌可以借助其自身的鞭毛主动游离脉管系统,从而扩散到整个肿瘤组织中。FORBES等^[20]观察到沙门氏菌在注射后3天内开始以集落的形式在肿瘤中积聚并扩散到整个肿瘤组织区域。

除了运动性之外,宿主的免疫反应似乎也会影响肿瘤组织中细菌的分布情况。STRITZKER等^[21]的研究表明,大肠杆菌和鼠伤寒沙门氏菌在肿瘤中的定植可能受细菌代谢和宿主TME的影响,因为巨噬细胞耗竭和芳香族氨基酸生物合成缺陷都会导致细菌定植增加,使其显示出更强的肿瘤靶向性。

2 细菌治疗肿瘤的机制

越来越多的细菌,包括大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、沙门氏菌、李斯特菌、梭状芽孢杆菌、双歧杆菌、链球菌、乳酸杆菌等被用于癌症的治疗。但其中兼性或专性厌氧菌,比如李斯特菌、梭状芽孢杆菌和沙门氏菌应用最广泛,它们的抗肿瘤机制可分为直接诱导肿瘤细胞死亡和激活抗肿瘤免疫。研究表明,细菌因本身能够分泌毒素而具有直接杀伤肿瘤细胞的能力,如细菌可通过诱导肿瘤细胞凋亡^[22]、自噬^[23]以及利用自身的毒素导致肿瘤组织坏死来直接杀死肿瘤细胞^[24]。此外,细菌感染通过激活TME中的复杂免疫细胞群对肿瘤消退起到了关键性的作用。研究发现,细菌在治疗肿瘤过程中表现出极好的免疫激活能力,主要体现在以下四个方面,①诱导自噬:细菌感染通过诱导肿瘤细胞的自噬产生ATP^[23],而ATP又可以招募和活化DC细胞^[25];②诱导活性氧(reactive oxygen species, ROS)的产生:细菌感染可以让肿瘤细胞产生ROS,启动肿瘤细胞的免疫原性死亡(immunogenic cell death, ICD),然后激活CD8⁺T细胞以达到抗肿瘤的效果^[26];③抗肿瘤细胞因子的分泌:由细菌感染引起的炎症反应可通过PAMPs被激活,比如LPS、鞭毛蛋白

可以通过与Toll样受体(toll-like receptor, TLR)结合^[27],从而产生IL-1 β 、IFN- γ 触发相应的抗肿瘤反应^[28-30];④调节免疫:细菌还可以直接将免疫抑制的肿瘤微环境转变为免疫激活状态^[26],充分调动由免疫细胞起主导作用的抗肿瘤反应。

细菌治疗为肿瘤免疫治疗提供了一种新的选择,利用基因工程对细菌进行改造可以有效增强肿瘤治疗效果。然而,除了上述普遍性的原理外,不同细菌的抗肿瘤作用还显示出自己不同的免疫学特性,下文将做详细阐述。

2.1 李斯特菌(*Listeria*)

值得注意的是,免疫系统中细菌和宿主相互作用的潜在机制取决于细菌菌株(图1)。李斯特菌的抗肿瘤机制一方面是可以感染肿瘤细胞,激活其胞内烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADP⁺)氧化酶和增加细胞内Ca²⁺的含量^[26],导致具有高度细胞毒性的自由基——ROS的产生^[31]。而ROS又可以诱导肿瘤细胞发生免疫原性死亡,进而激活CD8⁺T细胞,达到抗肿瘤的作用。

而另一方面,李斯特菌还可以通过感染肿瘤部位的髓系抑制性细胞(myeloid suppressor cell, MDSC)和调节性T细胞(regulatory T cell, Treg),导致二者的数量显著降低,随后将肿瘤微环境从免疫抑制的状态转变为免疫激活状态^[26-32]。然后被细菌感染的MDSC在转变为具有免疫刺激表型后,会分泌IL-12,进一步增强T细胞和NK细胞的抗肿瘤免疫反应^[33]。ADXS11-001是一种用于治疗宫颈癌的疫苗。其机理是通过李斯特菌进行大幅度减毒及基因改造,使其表达并分泌靶向人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)相关肿瘤的融合蛋白(Lm-LLO-E7),从而激发机体的免疫反应,攻击由HPV导致的癌变的正常细胞^[10]。

2.2 梭状芽孢杆菌(*Clostridium*)

梭状芽孢杆菌主要通过以下三种方式来达到抗肿瘤的目的(图2): (1) 分泌一些外毒素来杀伤肿瘤细胞。例如,溶血素和磷脂酶可以通过破坏肿瘤细胞的膜结构来杀死肿瘤细胞^[34]; (2) 梭状芽孢杆菌在实体瘤中的早期扩增会引起粒细胞和巨噬细胞的肿瘤内浸润,导致趋化因子分泌增加,进一步启动适应性免疫并将免疫细胞(例如CD8⁺T细胞)募集到肿瘤部位行使杀伤肿瘤的作用^[35]; (3) 梭状芽孢杆菌也可通过触发多形核中性粒细胞(polymorphonuclear neu-

trophils, PMNs)释放肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体(TNF related apoptosis inducing ligand, TRAIL)来诱导肿瘤细胞的凋亡,而基质金属蛋白酶8(matrix metalloproteinase 8, MMP-8)在这一释放过程中发挥了至关重要的作用^[36]。

2.3 沙门氏菌(*Salmonella*)

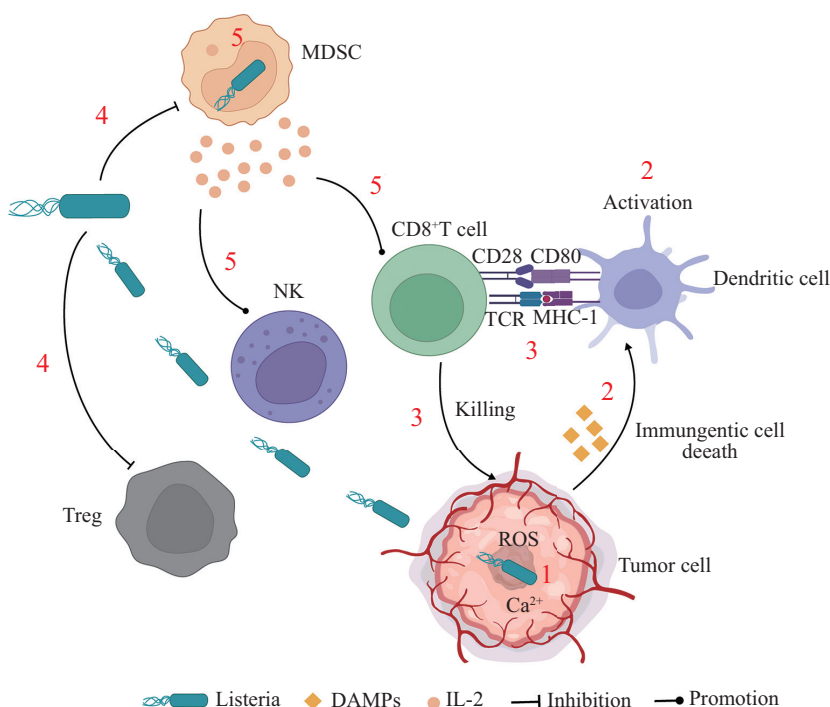
沙门氏菌是另一种在癌症治疗领域被广泛研究的细菌^[37], 其抗肿瘤的机制大致分为两个方面(图3): 一方面, 直接杀伤作用: 被沙门氏菌所感染的肿瘤细胞, 其会通过启动自噬或细胞凋亡途径直接诱导肿瘤细胞死亡^[38]; 另一方面, 沙门氏菌通过调节免疫系统达到抗肿瘤的目的。其中沙门氏菌调节肿瘤免疫微环境主要体现在以下几点。

(1) 病原体相关分子模式(PAMPs)——LPS: ①沙门氏菌的LPS, 可以被巨噬细胞和DC细胞捕获和识别, 二者通过由LPS诱导的TLR4信号通路和肿瘤细胞碎片的刺激下分泌促炎性细胞因子IL-1 β ^[27-29], 从而刺激T细胞的增殖和活化从而抑制其生长; ②除此之外, LPS 还可以通过与巨噬细胞上的TLR4结合促进TNF- α 的分泌^[39], 破坏肿瘤的脉管系统^[30], 导致

肿瘤细胞死亡。

(2) 另一种病原体相关分子模式(PAMPs)——鞭毛蛋白: ①可以直接刺激 NK细胞产生IFN- γ , 而这是触发先天性和适应性免疫的一种重要细胞因子^[40], 且被激活的NK细胞还会分泌穿孔素来杀伤肿瘤细胞; ②鞭毛蛋白也参与巨噬细胞NLRC4炎症小体驱动的IL-1 β 和IL-18分泌^[27], 二者可以作为CD8⁺T细胞和NK细胞分泌IFN- γ 的激活剂, 进一步增强抗肿瘤反应, 且产生的IFN- γ 还会降低TME中CD4⁺CD25⁺Treg的数量^[41-42]; ③被激活的CD8⁺T细胞的抗肿瘤反应还可以由鞭毛蛋白通过TLR5激活进一步增强^[41]; ④此外, 鞭毛蛋白还可通过TLR5信号通路直接抑制肿瘤细胞的增殖^[43]。

(3) 除了通过直接作用于免疫细胞来达到抗肿瘤作用外,沙门氏菌还可以通过间接作用于免疫细胞来达到抗肿瘤的作用。沙门氏菌感染可诱导肿瘤细胞中连接蛋白43(connexin 43, Cx43)的上调^[44]。肿瘤细胞可以通过Cx43与DC细胞形成一种间隙连接,从而将自身的抗原肽呈递给DC细胞,DC细胞再把这些肽呈递给以激活针对肿瘤抗原的CD8⁺T细胞



1: ROS和Ca²⁺的产生; 2: 肿瘤细胞的免疫原性死亡和DC细胞的活化; 3: CD8⁺T细胞的活化; 4: MDSC和Treg细胞的活性被抑制; 5: MDSC转化为免疫刺激表型。

1: ROS and Ca^{2+} production; 2: immunogenic death of tumor cells and activation of DC cells; 3: activation of CD8⁺T cells; 4: suppression of MDSC and Treg cell activity; 5: conversion of MDSC to an immunostimulatory phenotype.

图1 李斯特菌抗肿瘤的机制(根据参考文献[68]修改)

Fig.1 Mechanism of *Listeria monocytogenes* against tumors (modified from the reference [68])

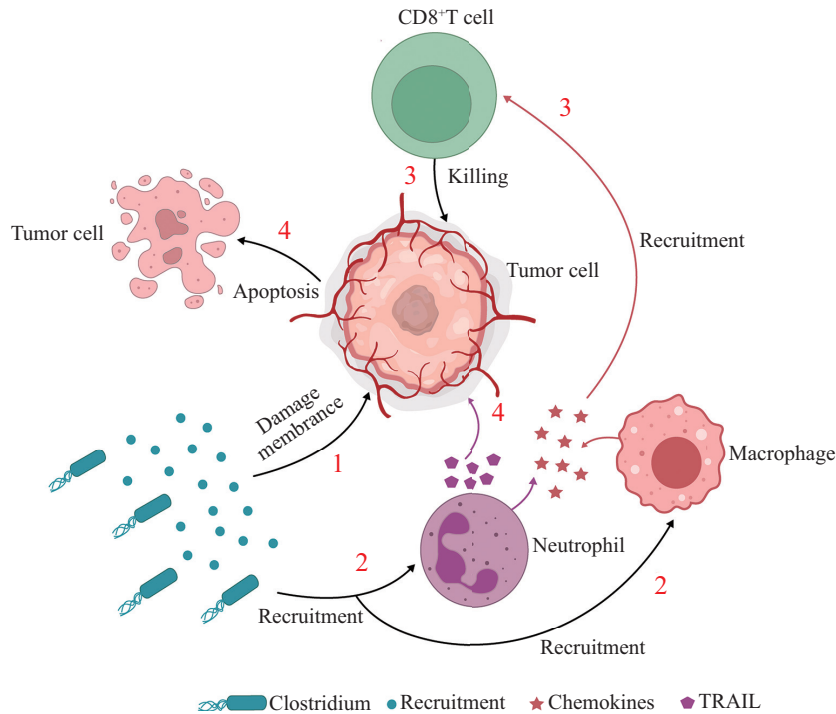


图2 梭状芽孢杆菌抗肿瘤的机制(根据参考文献[68]修改)

Fig.2 Mechanism of anti-tumor *Clostridium* (modified from the reference [68])

并抑制肿瘤增殖。同时, Cx43又会降低免疫抑制性吲哚胺2,3-双加氧酶(indoleamine 2, 3-dioxygenase, IDO)的表达^[45], 从而进一步激活CD8⁺T细胞。

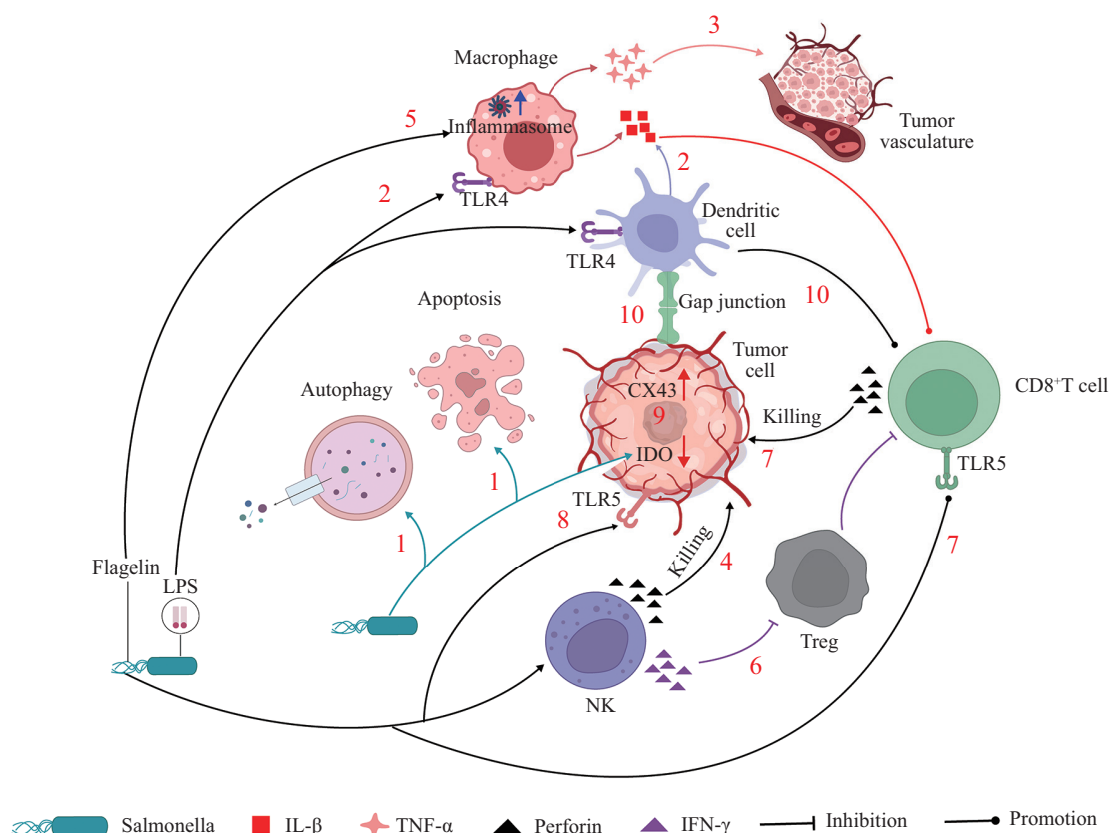
3 基于细菌的肿瘤联合治疗

3.1 细菌联合化疗治疗肿瘤

对于癌症转移的患者来说化疗是一种最重要的治疗手段, 因为化疗药物可以随着血液的流动到达机体的每个癌症转移病灶, 从而达到全身治疗的目的^[46]。但是, 化疗存在三方面的局限性。第一方面, 由于实体瘤内部存在较高的间质性内液压以及较少的血管分布, 无法使药物进到肿瘤内部^[47]。第二方面, 不仅肿瘤细胞会受到化疗药物的杀伤作用, 正常细胞的也会受到损害, 从而产生严重的毒副作用^[48]。第三方面, 长时间使用化疗药物, 容易使机体产生耐药性, 最终导致治疗效果不佳或肿瘤的复发。为了克服这些限制, 已经有许多科研人员进行了相关的研究。BASCUAS等^[49]将减毒的鼠伤寒沙门氏菌菌株通过肿瘤内注射的方式, 改善了非霍奇金淋巴瘤小鼠的环磷酰胺(cyclophosphamide)、多柔

比星(doxorubicin)、长春新碱(vincristine)和泼尼松(prednisone)化疗的治疗效果, 主要体现在联合治疗显著延缓了肿瘤的生长并延长了荷瘤小鼠的存活率、增加了小鼠肿瘤浸润性CD8⁺T细胞的数量和NK细胞的细胞毒活性, 并诱导了小鼠全身肿瘤特异性免疫反应。CHEN等^[50]将减毒的鼠伤寒沙门氏菌菌株VNP20009与雷公藤内酯联合用于小鼠黑色素瘤的治疗, 结果显示该联合疗法在抑制肿瘤血管生成、降低血清和肿瘤组织中的血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)表达等方面的效果都得到了提高。

除此之外, 鉴于细菌本身的天然瘤内靶向性以及易修饰改造的特点, 可以直接利用细菌代谢产物载运化疗药物以实现肿瘤的靶向治疗, 减少化疗药对机体的毒副作用。NGUYE等^[51]将紫杉(paclitaxel)用脂质体(lipidosome)包裹起来, 再依赖链霉素和素(streptomycin)与细菌外膜的生物素(biotin)结合, 从而使它们在肿瘤部位更多地聚集。除此之外, 将多柔比星药物用温度敏感型的脂质体来包裹, 再借助高强度的聚焦超声来进行加热, 更好地诱导药物



1: 自噬和凋亡; 2: IL-1 β 的分泌; 3: 脉管系统的破坏; 4: 穿孔素的分泌; 5: 炎症小体的激活; 6: Treg的活性被抑制; 7: CD8⁺T细胞分泌穿孔素; 8: 鞭毛蛋白直接抑制肿瘤细胞的增殖; 9: 肿瘤细胞Cx43的上调, IDO的下调; 10: DC细胞和CD8⁺T细胞的活化。

1: autophagy and apoptosis; 2: secretion of IL-1 β ; 3: disruption of the vascular system; 4: secretion of perforin; 5: activation of inflammatory vesicles; 6: suppression of Treg cell activity; 7: secretion of perforin by CD8⁺T cells; 8: direct inhibition of tumor cell value-added by flagellin; 9: tumor cell Cx43 upregulation and IDO downregulation; 10: activation of DC cells and CD8⁺T cells.

图3 沙门氏菌抗肿瘤的机制(根据参考文献[68]修改)

Fig.3 Mechanism of *Salmonella* anti-tumor (modified from the reference [68])

的释放并有效地抑制了肿瘤的生长^[52]。

3.2 细菌联合放疗治疗肿瘤

与化疗一样, 放疗也存在如细胞毒性和肿瘤复发等类似的局限性。放疗主要是对肿瘤细胞的DNA造成损伤从而杀死肿瘤细胞, 而肿瘤微环境由于极低的氧浓度会导致放疗的疗效显著降低^[53]。因此将细菌疗法与放疗相结合旨在提高肿瘤的整体治疗效果。YOON等^[54]把鼠伤寒沙门氏菌和 γ 辐射组合, 与单独的放射疗法相比, 可以更大程度地诱导B16F10细胞凋亡。他们还表明, 与单一疗法相比, 联合治疗显著抑制了荷瘤黑色素瘤小鼠的肿瘤生长, 并可以延长它们的存活率。另外, 也有研究人员利用工程化的细菌联合放疗来治疗肿瘤。比如, CHANDRA等^[55]通过将减毒的李斯特菌置于生理盐水中使其饥饿, 在生理盐水中加入³²P, 然后再补充有³²P作为营养物的无磷培养基中培养, 让³²P与李斯特菌结合。

最后李斯特菌-³²P通过³²P诱导的电离辐射和李斯特菌诱导的ROS起到协同杀死肿瘤细胞的作用。

3.3 细菌联合免疫治疗杀死肿瘤细胞

免疫治疗作为新型的临床治疗方法已经逐渐成为癌症治疗的重要手段。而肿瘤细胞可以通过分泌免疫抑制类细胞因子, 募集免疫抑制细胞和表达免疫检查点分子等途径来进行免疫逃逸^[56]。因此, 将细菌和免疫检查点抑制剂直接联用, 或者是利用基因工程技术使细菌表达免疫检查点抗体和免疫系统激活剂来重塑肿瘤微环境, 能够更好地激活抗肿瘤免疫。

研究显示, MKRTICHYAN等^[57]将李斯特菌疫苗Lm-LLO与抗程序性死亡分子(programmed death-1, PD-1)抗体联用后, 小鼠体内的Treg和MDSC显著减少, 抗原特异性免疫反应和肿瘤浸润性CD8⁺T显著增加, 极大提高了TC-1小鼠肿瘤模型治

疗效果。此外,动物研究表明,STING激动剂是一款极具前景的肿瘤治疗药物^[58-59]。然而,目前开发的STING激动剂都是以小分子为基础的核苷类药物,在临床开发中极不稳定。LEVENTHAL等^[60]利用大肠杆菌Nissle菌株表达STING激动剂环二腺苷酸(cyclic di-AMP, CDA),在小鼠瘤内注射细菌后观察到CDA的高表达,且TNF- α 、IFN- β 等细胞因子都呈剂量依赖性升高,成功解决了STING激动剂的药物开发难题。除此之外,CANALE等^[61]发现,定植在肿瘤中的大肠杆菌Nissle 1917菌株可以通过提高肿瘤中L-精氨酸的浓度升高肿瘤浸润性T淋巴细胞的数量。接着,CANALE等^[61]将Nissle1917菌株与程序性死亡配体1(programmed death-1 ligand, PD-L1)阻断抗体联用,解除了肿瘤微环境中的免疫抑制,表现出显著的协同抗肿瘤作用。

3.4 细菌联合其他疗法治疗肿瘤

除了与上述治疗手段联用外,细菌还可以与光动力治疗(photodynamic therapy, PDT)、光热治疗(photothermal therapy, PTT)联用。PDT和PTT由于其具有时空精准性、非侵入性、较强的免疫原性等而被广泛关注。然而这两种疗法存在有限的穿透肿瘤组织能力、对正常组织存在一定损伤性、不能有效克服肿瘤复发等局限性。而利用细菌天然靶向肿瘤的独特优势,可以在很大程度上提高光疗法的疗效以及降低对正常组织的损伤性。比如,LIU等^[62]将光敏剂通过酰胺键装载在纳米颗粒中,再将这种纳米颗粒整合到细菌表面,当用特定波长照射肿瘤部位的光敏剂时,会产生大量的ROS,更好地诱导肿瘤细胞发生免疫原性死亡,从而抑制原发肿瘤的生长和防止肿瘤复发。CHEN等^[63]将载有光敏剂多巴胺(pDNA)的沙门氏菌与一种名为AUNP-12的PD-1阻断肽联用,与单独的沙门氏菌疗法相比,联合治疗可更好地激活抗肿瘤免疫反应并表现出对晚期的黑色素瘤有效抑制作用。

4 细菌在肿瘤治疗中面临的挑战

特异性靶向肿瘤和强大的免疫激活能力使得细菌成为理想的肿瘤基因治疗载体。然而,细菌治疗肿瘤仍面临着巨大挑战。第一,对于以细菌为载体的蛋白质药物表达策略,其生产效率有限。尤其是对于肿瘤负荷较大的部位,细菌表达的外源蛋白难以有效发挥足够的作用。研究表明,通过基因工

程技术操纵启动子的强度,mRNA的二级结构和细菌代谢速率等可以提高外源基因表达能力^[64]。第二,因为活细菌会在肿瘤微环境中增殖,给药的有效剂量难以确定。而有效剂量更多是取决于肿瘤组织的坏死或缺氧的程度等。开发例如基于血管造影和缺氧或坏死成像的伴随诊断方法^[65-66]以及对肿瘤中复制的细菌进行成像^[67],有望在一定程度上解决活细菌给药存在的有效剂量难以控制的问题。第三,细菌药物在使用过程中的毒副作用。由于细菌是活的生物体,它们可能会在机体内发生变异和过度增殖,这对患者来说是一种潜在威胁。虽然可以通过基因工程技术减轻菌株的毒性,但是残留的毒性对于免疫力低下的患者来说可能是一个致命缺陷^[37]。与此同时,细菌的大量增殖有可能将肿瘤治疗转化为局部的破坏性感染,如果处理不当可能会造成严重的后果,因此找到二者之间的平衡点至关重要^[68]。实际上这很难实现,因为过早的抗生素干预会使细菌在达到抗肿瘤效果之前而被清除,而晚期的干预又会带来不可预测的全身炎症反应的风险。确定肿瘤内感染后何时以及如何用抗生素进行干预应由不同学科的临床团队决定。另外细菌治疗过程中代谢副产物对机体的影响也是临床应用过程中要考虑的重要问题。第四,对于转移的肿瘤细菌很难靶向肿瘤部位,因为转移灶的缺氧区域很小,而与光热疗法联用或者是改造细菌以表达靶向肿瘤脉管系统的蛋白质可能会有助于扩大细菌在缺氧较少的肿瘤部位的定植,至于是否能达到预期效果仍需要大量的临床数据来说明。

5 总结与展望

细菌制剂作为一种新型肿瘤治疗药物,拥有如天然的肿瘤靶向能力、良好的肿瘤组织渗透能力、免疫调节作用和强大的基因改造能力等独特优势,可以有效地弥补现有的癌症治疗手段的不足。事实上,由于肿瘤异质性导致的耐药性,单一的细菌治疗癌症还存在一定的局限性。因此,将细菌疗法和其他抗癌疗法联合起来可以实现交叉互补,达到更好的临床治疗效果。随着更多设计合理的肿瘤靶向性细菌进入临床试验,基于细菌的癌症免疫疗法有望在不久的将来成为我们抗击癌症的另一个强大武器。

除了利用活细菌之外,用灭活的细菌治疗肿瘤

也是该领域的重要研究方向。研究表明, 带有放射性碘元素标记的灭活沙门氏菌 (^{131}I -VNP)^[69] 可以将放射性元素碘输送到肿瘤相关巨噬细胞 (tumor-associated macrophage, TAM) 中, 并长时间滞留, 从而实现原发性肿瘤有效的内部放射性同位素治疗 (internal radioisotope therapy, IRT), 且具有良好的生物安全性。更重要的是, ^{131}I -VNP 能够通过激活先天免疫的 cGAS-STING 通路和促进 DC 细胞的成熟, 从而进一步刺激强大的全身抗肿瘤免疫反应。与免疫检查点抑制剂 ($\alpha\text{PD-L1}$) 联用后, ^{131}I -VNP 可诱导远端肿瘤细胞 PD-L1 表达的上调, 从而抑制原位结肠癌并防止肿瘤的再次攻击。而 Klier 等^[70] 将细菌 (金黄色葡萄球菌、停乳链球菌) 通过加热或用乙醇进行灭活后, 在体内和体外的实验都证明了灭活后的细菌对肿瘤的生长具有抑制作用, 这种作用依赖于 NK 细胞, 且在 T 细胞缺陷小鼠上也得到相类似的结果。除此之外, 作为我国批准在临床上用于恶性肿瘤患者辅助治疗多年的治疗性生物制品, 已有大量研究表明铜绿假单胞菌注射液 (*pseudomonas aeruginosa* mannose-sensitive hemagglutinin, PA-MSHA) 可以促进 DC 细胞的成熟, 表现为 DC 表面共刺激分子 CD86、CD80 和 I-Ab 表达量上调, 进而促进 CD4^+ T 细胞、 CD8^+ T 细胞的增殖, 最终增强抗肿瘤免疫反应^[71-72]。这些研究暗示我们灭活的细菌也可以作为癌症联合治疗的另一个策略。例如, 有研究表明, 经 PA-MSHA 处理过的细胞因子诱导的杀伤细胞 (cytokine-induced killer, CIK) 可以提高其抗肿瘤的活性^[73]。而将经 PA-MSHA 处理过的 CIK 细胞与化疗药物联用, 可以将肺癌患者和四期卵巢癌患者的状态从病情稳定 (stable disease, SD) 改善为部分缓解 (partial response, PR)^[73]。冷冻消融 (cryoablation) 因其具有创伤小、治疗精准、保持肿瘤抗原的天然性等优势而被广泛应用于实体瘤的治疗当中。但是由其于激活免疫的能力不足, 以至于会导致肿瘤的复发和转移。而鉴于 PA-MSHA 能有效激活 DC 细胞, 可以弥补冷冻消融带来的肿瘤复发、转移的不足, 所以将二者联用也不失为一个好的治疗策略。

细菌虽然是癌症联合治疗的理想候选者, 但对于联合疗法更详细的机制研究依旧很少。仍需要大量研究来进一步的拓展目前的研究结果, 并阐明联合治疗后治疗结果得到改善的具体潜在机制。与此同时, 细菌对肿瘤的靶向性、细菌与肿瘤微环境的

相互作用以及细菌与免疫细胞的动态互作等工作都值得进一步深入研究。这些研究将为推动细菌治疗肿瘤提供坚实的理论基础和新的发展方向, 并有可能在不久的将来取得一定的突破性成就。

参考文献 (References)

- [1] MEDZHITOV R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response [J]. *Nature*, 2007, 449(7164): 819-26.
- [2] COLEY W B. II. Contribution to the knowledge of sarcoma [J]. *Ann Surg*, 1891, 14(3): 199-220.
- [3] HUANG X H, PAN J M, XU F N, et al. Bacteria-based cancer immunotherapy [J]. *Adv Sci*, 2021, 8(7): 2003572.
- [4] OZDEMIR T, FEDOREC A J H, DANINO T, et al. Synthetic biology and engineered live biotherapeutics: toward increasing system complexity [J]. *Cell Syst*, 2018, 7(1): 5-16.
- [5] CLAIRMONT C, LEE K C, PIKE J, et al. Biodistribution and genetic stability of the novel antitumor agent VNP20009, a genetically modified strain of *Salmonella typhimurium* [J]. *J Infect Dis*, 2000, 181(6): 1996-2002.
- [6] VAN PUFFELEN J H, KEATING S T, OOSTERWIJK E, et al. Trained immunity as a molecular mechanism for BCG immunotherapy in bladder cancer [J]. *Nat Rev Urol*, 2020, 17(9): 513-25.
- [7] FAN Y, BAI T, TIAN Y, et al. H₂O₂-inactivated *Salmonella typhimurium* RE88 strain as a new cancer vaccine carrier: evaluation in a mouse model of cancer [J]. *Drug Des, Dev Ther*, 2021, 15: 209-22.
- [8] ESTESO G, AGUILÓ N, JULIÁN E, et al. Natural Killer anti-tumor activity can be achieved by *in vitro* incubation with heat-killed BCG [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 622995.
- [9] LE D T, WANG-GILLAM A, PICOZZI V, et al. Safety and survival with GVAX pancreas prime and *Listeria monocytogenes*-expressing mesothelin (CRS-207) boost vaccines for metastatic pancreatic cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2015, 33(12): 1325-33.
- [10] BASU P, MEHTA A, JAIN M, et al. A randomized phase 2 study of ADXS11-001 *Listeria monocytogenes*-Listeriolysin O immunotherapy with or without cisplatin in treatment of advanced cervical cancer [J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2018, 28(4): 764-72.
- [11] 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): 142-52.
- [12] SCHMITZ-WINNENTHAL F H, HOHMANN N, SCHMIDT T, et al. A phase I trial extension to assess immunologic efficacy and safety of prime-boost vaccination with VXM01, an oral T cell vaccine against VEGFR2, in patients with advanced pancreatic cancer [J]. *Oncoimmunology*, 2018, 7(4): e1303584.
- [13] LÜ F, CAO J, LIU Z, et al. Phase II study of *Pseudomonas aeruginosa*-Mannose-Sensitive hemagglutinin in combination with capecitabine for Her-2-negative metastatic breast cancer pretreated with anthracycline and taxane [J]. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0118607.
- [14] PAWELEK J M, LOW K B, BERMUDEZ D. Tumor-targeted *Salmonella* as a novel anticancer vector [J]. *Cancer Res*, 1997, 57(20): 4537-44.
- [15] FORBES N S, MUNN L L, FUKUMURA D, et al. Sparse initial

- entrapment of systemically injected *Salmonella typhimurium* leads to heterogeneous accumulation within tumors [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(17): 5188-93.
- [16] FENG X, HE P, ZENG C, et al. Novel insights into the role of *Clostridium novyi*-NT related combination bacteriolytic therapy in solid tumors [J]. *Oncol Lett*, 2021, 21(2): 110.
- [17] DRÓZDŽ M, MAKUCH S, CIENIUCH G, et al. Obligate and facultative anaerobic bacteria in targeted cancer therapy: current strategies and clinical applications [J]. *Life Sci*, 2020, 261: 118296.
- [18] MIN J J, KIM H J, PARK J H, et al. Noninvasive real-time imaging of tumors and metastases using tumor-targeting light-emitting *Escherichia coli* [J]. *Mol Imaging Biol*, 2008, 10(1): 54-61.
- [19] NGUYEN V H, KIM H S, HA J M, et al. Genetically engineered *Salmonella typhimurium* as an imageable therapeutic probe for cancer [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(1): 18-23.
- [20] GANAI S, ARENAS R B, SAUER J P, et al. In tumors *Salmonella* migrate away from vasculature toward the transition zone and induce apoptosis [J]. *Cancer Gene Ther*, 2011, 18(7): 457-66.
- [21] STRITZKER J, WEIBEL S, SEUBERT C, et al. Enterobacterial tumor colonization in mice depends on bacterial metabolism and macrophages but is independent of chemotaxis and motility [J]. *Int J Med Microbiol*, 2010, 300(7): 449-56.
- [22] LI M, LU M, LAI Y, et al. Inhibition of acute leukemia with attenuated *Salmonella typhimurium* strain VNP20009 [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 129: 110425.
- [23] LEE C H, LIN S T, LIU J J, et al. *Salmonella* induce autophagy in melanoma by the downregulation of AKT/mTOR pathway [J]. *Gene Ther*, 2014, 21(3): 309-16.
- [24] LIM D, KIM K S, KIM H J, et al. Anti-tumor activity of an immunotoxin (TGF α -PE38) delivered by attenuated *Salmonella typhimurium* [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(23): 37550-60.
- [25] KROEMER G, GALASSI C, ZITVOGEL L, et al. Immunogenic cell stress and death [J]. *Nat Immunol*, 2022, 23(4): 487-500.
- [26] KIM S H, CASTRO F, PATERSON Y, et al. High efficacy of a listeria-based vaccine against metastatic breast cancer reveals a dual mode of action [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(14): 5860-6.
- [27] THUY XUAN P, VU HONG N, MAI THI-QUYNH D, et al. Activation of inflammasome by attenuated *Salmonella typhimurium* in bacteria-mediated cancer therapy [J]. *Microbiol Immunol*, 2015, 59(11): 664-75.
- [28] LEE S, MARGOLIN K. Cytokines in cancer immunotherapy [J]. *Cancers*, 2011, 3(4): 3856-93.
- [29] KIM J E, PHAN T X, NGUYEN V H, et al. *Salmonella typhimurium* suppresses tumor growth via the pro-Inflammatory cytokine Interleukin-1 β [J]. *Theranostics*, 2015, 5(12): 1328-42.
- [30] LESCHNER S, WESTPHAL K, DIETRICH N, et al. Tumor invasion of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is accompanied by strong hemorrhage promoted by TNF- α [J]. *PLoS One*, 2009, 4(8): e6692.
- [31] BRYNILDSEN M P, WINKLER J A, SPINA C S, et al. Potentiating antibacterial activity by predictably enhancing endogenous microbial ROS production [J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(2): 160-5.
- [32] JAHANGIR A, CHANDRA D, QUISPE-TINTAYA W, et al. Immunotherapy with *Listeria* reduces metastatic breast cancer in young and old mice through different mechanisms [J]. *Oncoimmunology*, 2017, 6(9): e1342025.
- [33] CHANDRA D, JAHANGIR A, QUISPE-TINTAYA W, et al. Myeloid-derived suppressor cells have a central role in attenuated *Listeria monocytogenes*-based immunotherapy against metastatic breast cancer in young and old mice [J]. *Br J Cancer*, 2013, 108(11): 2281-90.
- [34] CHEONG I, HUANG X, BETTEGOWDA C, et al. A bacterial protein enhances the release and efficacy of liposomal cancer drugs [J]. *Science*, 2006, 314(5803): 1308-11.
- [35] AGRAWAL N, BETTEGOWDA 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): 15172-7.
- [36] SHINNOH M, HORINAKA M, YASUDA T, et al. *Clostridium butyricum* MIYAIRI 588 shows antitumor effects by enhancing the release of TRAIL from neutrophils through MMP-8 [J]. *Int J Oncol*, 2013, 42(3): 903-11.
- [37] GUO Y X, CHEN Y, LIU X Q, et al. Targeted cancer immunotherapy with genetically engineered oncolytic *Salmonella typhimurium* [J]. *Cancer Lett*, 2020, 469: 102-10.
- [38] ZHOU S J, ZHAO Z G, LIN Y, et al. Suppression of pancreatic ductal adenocarcinoma growth by intratumoral delivery of attenuated *Salmonella typhimurium* using a dual fluorescent live tracking system [J]. *Cancer Biol Ther*, 2016, 17(7): 732-40.
- [39] DOBROVOLSKAIA M A, VOGEL S N. Toll receptors, CD14, and macrophage activation and deactivation by LPS [J]. *Microbes Infect*, 2002, 4(9): 903-14.
- [40] SACCHERI F, POZZI C, AVOGADRI F, et al. Bacteria-induced gap junctions in tumors favor antigen cross-presentation and antitumor immunity [J]. *Sci Transl Med*, 2010, 2(44): 44ra57.
- [41] SFONDRINI L, ROSSINI A, BESUSSO D, et al. Antitumor activity of the TLR-5 ligand flagellin in mouse models of cancer [J]. *J Immunol*, 2006, 176(11): 6624-30.
- [42] KUPZ A, CURTISS R, 3RD, BEDOUI S, et al. *In vivo* IFN- γ secretion by NK cells in response to *Salmonella typhimurium* requires NLRC4 inflammasomes [J]. *PLoS One*, 2014, 9(5): e97418.
- [43] CAI Z, SANCHEZ A, SHI Z, et al. Activation of toll-like receptor 5 on breast cancer cells by flagellin suppresses cell proliferation and tumor growth [J]. *Cancer Res*, 2011, 71(7): 2466-75.
- [44] CHANG W W, LAI C H, CHEN M C, et al. *Salmonella* enhance chemosensitivity in tumor through connexin 43 upregulation [J]. *Int J Cancer*, 2013, 133(8): 1926-35.
- [45] LIN H C, YANG C J, KUAN Y D, et al. The inhibition of indoleamine 2, 3-dioxygenase 1 by connexin 43 [J]. *Int J Med Sci*, 2017, 14(12): 1181-8.
- [46] GAO L, ZHENG H F, CAI Q Y, et al. Autophagy and tumour radiotherapy [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2020, 1207: 375-87.
- [47] DUFORT C C, DELGIORNO K E, CARLSON M A, et al. Interstitial pressure in pancreatic ductal adenocarcinoma is dominated by a gel-fluid phase [J]. *Biophys J*, 2016, 110(9): 2106-19.
- [48] PEREZ-HERRERO E, FERNANDEZ-MEDARDE A. Advanced targeted therapies in cancer: drug nanocarriers, the future of chemotherapy [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2015, 93: 52-79.
- [49] BASCUAS T, MORENO M, GRILLE S, et al. *Salmonella* immunotherapy improves the outcome of CHOP chemotherapy in non-hodgkin lymphoma-bearing mice [J]. *Front Immunol*, 2018,

- 9: 7.
- [50] CHEN J, QIAO Y, TANG B, et al. Modulation of salmonella tumor-colonization and intratumoral anti-angiogenesis by triptolide and its mechanism [J]. *Theranostics*, 2017, 7(8): 2250-60.
 - [51] NGUYEN V D, HAN J W, CHOI Y J, et al. Active tumor-therapeutic liposomal bacteriobot combining a drug (paclitaxel)-encapsulated liposome with targeting bacteria (*Salmonella typhimurium*) [J]. *Sens Actuators, B*, 2016, 224: 217-24.
 - [52] EKTATE K, MUNTEANU M C, ASHAR H, et al. Chemo-immunotherapy of colon cancer with focused ultrasound and *Salmonella*-laden temperature sensitive liposomes (thermobots) [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 13062.
 - [53] HORSMAN M R, MORTENSEN L S, PETERSEN J B, et al. Imaging hypoxia to improve radiotherapy outcome [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2012, 9(12): 674-87.
 - [54] YOON W S, KIM S, SEO S, et al. *Salmonella typhimurium* with gamma-radiation induced H(2)AX phosphorylation and apoptosis in melanoma [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2014, 78(6): 1082-5.
 - [55] CHANDRA D, SELVANESAN B C, YUAN Z Q, et al. 32-phosphorus selectively delivered by listeria to pancreatic cancer demonstrates a strong therapeutic effect [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(13): 20729-40.
 - [56] SIEOW B F L, WUN K S, YONG W P, et al. Tweak to treat: reprogramming bacteria for cancer treatment [J]. *Trends Cancer*, 2021, 7(5): 447-64.
 - [57] MKRTICHYAN M, CHONG N, ABU EID R, et al. Anti-PD-1 antibody significantly increases therapeutic efficacy of *Listeria monocytogenes* (Lm)-LLO immunotherapy [J]. *J Immunother Cancer*, 2013, 1: 15.
 - [58] WANG H, HU S, CHEN X, et al. cGAS is essential for the anti-tumor effect of immune checkpoint blockade [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114(7): 1637-42.
 - [59] LAI J, FU Y, TIAN S, et al. Zebularine elevates STING expression and enhances cGAMP cancer immunotherapy in mice [J]. *Mol Ther*, 2021, 29(5): 1758-71.
 - [60] LEVENTHAL D S, SOKOLOVSKA A, LI N, et al. Immunotherapy with engineered bacteria by targeting the STING pathway for anti-tumor immunity [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 2739.
 - [61] CANALE F P, BASSO C, ANTONINI G, et al. Metabolic modulation of tumours with engineered bacteria for immunotherapy [J]. *Nature*, 2021, 598(7882): 662-6.
 - [62] LIU L, HE H, LUO Z, et al. *In situ* photocatalyzed oxygen generation with photosynthetic bacteria to enable robust immunogenic photodynamic therapy in triple-negative breast cancer [J]. *Adv Funct Mater*, 2020, 30(10): 1910176.
 - [63] CHEN W, GUO Z, ZHU Y, et al. Combination of bacterial-photothermal therapy with an anti-PD-1 peptide depot for enhanced immunity against advanced cancer [J]. *Adv Funct Mater*, 2020, 30(1): 1906623.
 - [64] PFLEGER B F, PITERA D J, D SMOLKE C, et al. Combinatorial engineering of intergenic regions in operons tunes expression of multiple genes [J]. *Nat Biotechnol*, 2006, 24(8): 1027-32.
 - [65] KASHIWAGI N, NAKANISHI K, KOZUKA T, et al. Vascular supply with angio-CT for superselective intra-arterial chemotherapy in advanced maxillary sinus cancer [J]. *Br J Radiol*, 2010, 83(986): 171-8.
 - [66] FLEMING I N, MANAVAKI R, BLOWER P J, et al. Imaging tumour hypoxia with positron emission tomography [J]. *Br J Cancer*, 2015, 112(2): 238-50.
 - [67] LIU G, BETTEGOWDA C, QIAO Y, et al. Noninvasive imaging of infection after treatment with tumor-homing bacteria using Chemical Exchange Saturation Transfer (CEST) MRI [J]. *Magn Reson Med*, 2013, 70(6): 1690-8.
 - [68] ZHOU S, GRAVEKAMP C, BERMUDEZ D, et al. Tumour-targeting bacteria engineered to fight cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2018, 18(12): 727-43.
 - [69] PEI P, ZHANG Y, JIANG Y, et al. Pleiotropic immunomodulatory functions of radioactive inactivated bacterial vectors for enhanced cancer radio-immunotherapy [J]. *ACS Nano*, 2022, 16(7): 11325-37.
 - [70] KLIER U, MALETZKI C, GOETTMANN N, et al. Avitalized bacteria mediate tumor growth control via activation of innate immunity [J]. *Cell Immunol*, 2011, 269(2): 120-7.
 - [71] ZHANG M, LUO F, ZHANG Y, et al. *Pseudomonas aeruginosa* mannose-sensitive hemagglutinin promotes T-cell response via toll-like receptor 4-mediated dendritic cells to slow tumor progression in mice [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2014, 349(2): 279-87.
 - [72] LI T, YANG L, FU S J, et al. Subcutaneous injections of the mannose-sensitive hemagglutination pilus strain of *pseudomonas aeruginosa* stimulate host immunity, reduce bladder cancer size and improve tumor survival in mice [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2015, 73(1): 245-52.
 - [73] ZHANG C, ZHANG Z, WANG L, et al. *Pseudomonas aeruginosa*-mannose sensitive hemagglutinin injection treated cytokine-induced killer cells combined with chemotherapy in the treatment of malignancies [J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 51: 57-65.