

## 细菌作为肿瘤基因治疗载体的研究进展

金明 综述 韩照中 苏国富 审阅

(军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100071)

**摘要** 营养缺陷型细菌能够侵袭肿瘤细胞并呈递外源基因的特性提示我们可以将其设计成新型的肿瘤基因治疗载体。本文综述了细菌作为肿瘤基因治疗载体的历史与现状、机制以及存在的问题。

**关键词** 细菌 肿瘤基因治疗 侵袭

随着近年来人们对肿瘤免疫、肿瘤发病的分子机制以及细胞生长调控规律的深入研究,肿瘤的基因治疗获得了较大进展,并有许多临床试验计划得到批准。但是因为缺少高效和定向的基因转移载体系统,肿瘤的基因治疗还不能广泛应用于临床。目前所采用的病毒载体(逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒等)和非病毒载体(如脂质体等)均无定向性,且基因导入体内后表达水平不够理想<sup>[1]</sup>。这成为基因治疗不能有突破性进展的瓶颈。近来人们发现鼠伤寒沙门氏菌在小鼠体内能够定向并有效地转移自杀基因进行肿瘤的基因治疗。这提示我们细菌有可能作为新型的肿瘤基因治疗载体。本文就此进行综述。

### 1 细菌作为肿瘤基因治疗载体的历史及现状

实际上早在两百年前,人们就已经发现某些肿瘤患者在急性细菌感染后,会导致肿瘤出血性坏死从而肿瘤的生长被抑制<sup>[2]</sup>。对细菌的不同组分进行分离并应用于治疗,发现细菌所含的脂多糖是重要的活性组分,最终人们找到了免疫效应分子——肿瘤坏死因子(TNF $\alpha$ ),在当时被称为恶质素。由于TNF $\alpha$ 的毒副作用太大,限制了细菌应用于肿瘤的治疗。但是人们并没有放弃尝试用细菌治疗肿瘤的努力。1947年,Parker等证实将梭状芽孢杆菌(*Clostridium histolyticum*)直接注射到小鼠的转移性肉瘤内,产生肉瘤消退现象<sup>[3]</sup>。

近年来,Eisenstein<sup>[4]</sup>等通过实验证明减毒的aro $^{-}$ 伤寒沙门氏菌疫苗株接种到荷瘤鼠后,肿瘤的生长被抑制,鼠的生存期得到显著的延长。同时他们还发现只有活菌才能抑制肿瘤的生长,而经丙酮处死的细菌则不产生这种效应,这就说明只有脂多

糖对造成肿瘤坏死是不充分的。

Pawelek和Low等<sup>[5]</sup>进一步尝试将鼠伤寒沙门氏菌作为治疗基因的载体菌应用于肿瘤的基因治疗。首先他们以野生的鼠伤寒沙门氏菌作为出发菌株,通过诱变得到芳香族氨基酸缺陷(aro $^{-}$ ),精氨酸合成缺陷(aro $^{-}$ ),嘌呤合成缺陷(pur $^{-}$ )等单及多重营养缺陷型菌株。这些菌株仍保持对肿瘤细胞的高效侵袭力。他们将鼠伤寒沙门氏菌的野生株和减毒株分别以 $16^6$ cfu的剂量通过腹膜注射到长有B16F10黑色素瘤的C57B6鼠中,2天后发现菌在肿瘤和正常肝组织中的分布极不相同:野生株在肿瘤中为 $6.5 - 6.8 \times 10^9$ cfu/g,在肝组织中为 $2.4 - 2.8 \times 10^7$ cfu/g,分布比例为270:1;而减毒株在肿瘤中为 $1.2 - 1.7 \times 10^9$ cfu/g,在肝组织中为 $1.9 - 2.3 \times 10^5$ cfu/g,分布比例为9000:1。这表明鼠伤寒沙门氏菌能够通过远端接种而富集于肿瘤中,具有肿瘤细胞靶向性。Low等人还证明这些营养缺陷型菌株能够抑制肿瘤的生长,处理组的荷瘤小鼠的生存期是对照组的二倍;他们还构建了带有单纯疱疹病毒胸腺嘧啶核苷酸激酶(herpes simplex-virus thymidine kinase, HSV-tk)基因的表达质粒,并用电脉冲法将质粒转化营养缺陷型鼠伤寒沙门氏菌,腹腔注射到荷瘤鼠体内,通过免疫印迹法证明重组菌能在肿瘤细胞内表达有活性的TK。结果发现引入tk基因后能增强抑制肿瘤生长的效果,TK将本来对动物无毒的原药GCV转化为三磷酸丙氧鸟苷,作为链中止剂,干扰细胞分裂时DNA的合成,导致细胞阻抑或死亡,并且该底物能通过细胞间的缝隙进行扩散,引起邻近细胞死亡(即旁观者效应)<sup>[6]</sup>。这表明伤寒沙门氏菌不但其本身能抑制肿瘤生长,而且能作为良好的外源基因表达载体在体内向肿瘤

细胞呈递药物蛋白。

此外,有人利用沙门氏菌作为在体内呈递外源药物蛋白载体表达了 IL - 2 基因<sup>[7]</sup>。人们还用单核细胞增多性李斯特菌(*Listeria monocytogenes*),福氏志贺氏菌(*Shigella flexneri*)<sup>[8]</sup>和拜氏梭状芽孢杆菌(*Clostridium beijerinckii*)<sup>[9]</sup>在体内外将外源基因或蛋白呈递给真核细胞。利用细菌尤其是沙门氏菌作为肿瘤基因治疗载体的研究正方兴未艾。

## 2 细菌作为肿瘤基因治疗载体的机制

一种肿瘤基因治疗方法有用与否除了要有一种有效的治疗基因外,还取决于:1. 必须有一定量表达外源基因的载体达到肿瘤内;2. 载体在肿瘤的微环境内能有效地表达外源基因;3. 通过一定的机制对载体表达的时序及表达量进行调控。载体在到达肿瘤细胞的过程中面临着生理、生化和免疫上的多重障碍:首先肿瘤组织血管增生,血流紊乱导致载体不能全部进入病灶;目前所用的病毒和非病毒载体本身的理化性质的限制使其较难穿过血管壁和组织间质,肿瘤组织血管通透性和渗透压高,导致血管容易外排已进入的载体;并且人类相对完善的免疫系统通过免疫监视和免疫防御也破坏了载体的治疗作用<sup>[10]</sup>。

现阶段所采用的载体大都无法克服这些障碍,导致其在肿瘤内的有效浓度较低,定向性差;临床上一般只能采用在肿瘤病灶原位注射治疗方案,对于转移性肿瘤和内脏肿瘤往往束手无策。

病原菌自身的进化机制使其能逃过宿主体内的免疫系统的监视,并能通过各种屏障到达特定部位。以肠道病原菌伤寒沙门氏菌为例,它们能表达侵袭基因 *invA* 和 *invG* 等,通过细胞侵袭作用进入肠道上皮的巨噬细胞,逃脱巨噬细胞的胞内杀伤并使细胞破裂,从而穿过肠壁进入细胞间质。再穿过血管后,通过血流富集于肝、脾中<sup>[11]</sup>。现在国外对细胞侵袭作用研究较多并找到一些相关的侵袭基因,有人还找到超侵袭基因(*super invasion gene*)即该基因的引入会导致细菌侵袭效果显著增加。有人通过实验进一步证实细菌只要能侵袭进入真核细胞,就能够将遗传物质呈递给宿主细胞<sup>[12]</sup>。研究者将鼠疫杆菌(*Yersinia pseudotuberculosis*)编码的 3.2kb 的侵袭基因 *inv* 转至原本只在细胞外生活的大肠杆菌中,使其也具有了侵袭细胞的能力,分别以 HeLa 细胞和 CHO 细胞为模型,证明大肠杆菌能穿过细胞膜进入胞内。研究者将带有绿色荧光蛋白(*green-*

*fluorescent protein GFP*) 基因的报道质粒导入细胞壁合成缺陷型(DAP<sup>-</sup>)且具有侵袭力的菌株,在侵袭 2 天后用流式细胞术(FACS)检测,只在细胞中发现有表达,在细菌中未检测到表达;这表明细菌确实是将质粒呈递给细胞来表达。同时他们还发现在经 X 射线处理过的(2500rads) HeLa 和 COS1 细胞中也能检测到表达,这说明和腺病毒不同,细菌还可以将质粒呈递给不分裂的细胞。这种新的载体系统比原来的载体所靶向的细胞谱更为广泛。

侵袭真核细胞并进行基因呈递使细菌可能成为下一代的基因治疗载体,特别是现在还有人报道细菌在细胞内呈递基因后会被宿主细胞杀死。当减毒的志贺氏菌进入细胞传递质粒后,质粒编码的  $\alpha$ -半乳糖苷酶引起粘膜免疫,造成细菌被杀灭<sup>[13]</sup>。

在上文中提到的用伤寒沙门氏菌作为肿瘤基因治疗载体研究中,载体对肿瘤有如此高靶向性的机制现在还不是很清楚。Pawelek 等认为<sup>[5]</sup>采用的营养缺陷型菌株所需物质如芳香族氨基酸等在正常细胞中含量极少,不足以满足细菌生长的营养需要,而在细胞不断分裂的肿瘤“坏死区”(necrotic area)却含量甚丰,导致细菌的相对集中;也有可能是某些粘附分子存在导致细菌对肿瘤细胞有靶向性。

更令人感兴趣的是为何细菌本身对肿瘤就有如此强的抑制作用。这可能存在多方面的原因。细菌所含的脂多糖(LPS)能刺激淋巴细胞增殖和分化,诱发 TNF $\alpha$  等细胞因子的产生,从而增强和扩大免疫应答的能力。另外还可能是细菌和肿瘤细胞之间进行营养竞争;细菌分泌蛋白水解酶杀伤肿瘤细胞。

## 3 存在的问题

虽然细菌在应用于肿瘤的基因治疗有它自身的优势,但也存在着一些问题,如:细菌携带的脂多糖所诱发的全身性 TNF $\alpha$  大量产生,对动物毒性太大,更不可能应用于人体。但只要能在毒力与效力之间找到平衡点,就能解决这些问题。Eisentein 等在用减毒伤寒沙门氏菌抑制肿瘤生长的实验中发现低剂量的沙门氏菌能更显著地延长荷瘤鼠的生存期<sup>[4]</sup>。

人们以前的研究证实脂多糖分子上的脂质 A (lipidA)是某些细菌引起机体炎症反应的主要活性组分,而且从生物化学和遗传学上几乎全部弄清了它在大肠杆菌体内的合成途径,并且找到了 lipidA 活化巨噬细胞使之释放 TNF $\alpha$  过程中的关键基因 *msbB*。Pawelek 和 Low 等人在此研究基础之上用

基因工程的方法重新改造了沙门氏菌<sup>[14]</sup>,试图降低脂多糖的毒性,使此种治疗方案能适用于临床。他们敲除了鼠伤寒沙门氏菌的 *msbB* 基因,但仍保留了该菌株的高侵袭力和芳香族氨基酸合成等营养缺陷的特性。以前克隆的大肠杆菌和沙门氏菌突变株如 *kdo*<sup>-</sup> 能够少量地诱发 *TNF*<sup>-</sup> 的产生,但却是温度敏感型的条件致死菌,不适于在动物细胞中生存,其应用受到限制。现在克隆的 *msbB*<sup>-</sup> 突变株则不再受温度的限制,能够在动物细胞的环境中生存,仍保持其在肿瘤细胞与在正常细胞中的高比例(2000:1)和抑瘤活性,且不再大量诱发 *TNF*<sup>-</sup> 的产生。同时, *msbB*<sup>-</sup> 突变株对多种抗生素都很敏感,这就避免了细菌在体内大量繁殖造成脓毒和菌血症。这样使沙门氏菌更能适用于人体进行基因治疗。

革兰氏阴性菌除脂多糖外,还有鞭毛等也能引起 *TNF*<sup>-</sup> 的产生,所以有待于进一步对细菌作为载体的安全性进行研究。

以上所提到的肿瘤治疗实验都是用鼠伤寒沙门氏菌为载体,以小鼠为动物模型做的。但是,在真正应用到人体时,用鼠伤寒沙门氏菌的效力和安全性可能都不会很好。采用重组的人伤寒沙门氏菌尽管在理论上是可行的,但在效力和安全性上都要经过大量的研究和实践:离临床应用仍有很大距离。

#### 4 展望

因为肿瘤组织的一些特殊性(代谢异常,营养丰富,与机体的免疫系统隔离),肿瘤组织表现出对营养缺陷型细菌的特异性富集:细菌能够侵袭进入细

胞并呈递外源基因,这有可能成为高效特异的新型肿瘤基因治疗载体。国外在这方面也处于起步阶段,尽管已解决了脂质 A 等细菌内毒素带来的安全上的问题,但用细菌作基因治疗载体应用到临床,还需要在安全性、效力以及一些基础研究上进行探索。

#### 参考文献

- [1] W. French Anderson. Human gene therapy. *Nature*, 1998, 392: 25.
- [2] Nauts, H. C., Swift, W. E., and Coley, B. L. *Cancer Res.*, 1946, 38:9.
- [3] Parker, R. S., Plummer, H. C., Chapman, M. G et al. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1947, 66:461.
- [4] Eisentein, T. K., Bushnell, B., Meissler, J. J. Jr. et al. *Med. Oncol.* 1995, 12:103
- [5] Pawelek J., Low, K. B., and Bermudes *Cancer Res.* 1997, 57: 4537.
- [6] 郭善禹. 国外医学肿瘤学分册 1998, 4:193.
- [7] Saltzman, D. A., Katsants, E., Heise, C. P. et al. *Cancer Biother Radiopharm.*, 1997, 12:37.
- [8] Sizemore, D. R., Branstator, A. A., and Sadoff, J. C. *Science* 1995, 270:299.
- [9] Fox, M. E., Lemmon, M. J., Mauchline, M. L., et al. *Gene Ther.*, 1996, 3:173.
- [10] Rakesh K. J., *Nature Medicine* 1998, 4:655.
- [11] Harry Smith, *Trends In Micro.* 1998, 6:239.
- [12] Catherine G. C., Sylvie, G., Francois H. et al. *Nature Biote.* 1998, 16:862.
- [13] Sizemore, D. R., Branstator, A. A., and Sadoff, J. C. *Vaccine* 1997, 15:804.
- [14] K. Brooks Low, Martina I. John M. P., et al. *Nature Biote.* 1999 17:37.

#### Tumor-targeted bacterial as a novel anti-cancer vector

**Abstract** Auxotroph bacterial can invade tumor cell and deliver therapy gene suggest to us that bacterial can be made a novel anti-cancer vector. The article review the past and actuality, mechanism and problem in the research field.

**Key words** Bacterial Tumor-targeted invasion