

肿瘤细菌疗法概述

卓 越 刘陈立

(中国科学院深圳先进技术研究院合成生物学工程研究中心 深圳 518055)

摘 要 早在 150 年前,活细菌就已经被用来治疗癌症。1868 年,德国医生 Busch 首先报道了部分肿瘤患者在感染肺炎链球菌后,体内的肿瘤生长被抑制甚至被彻底清除。在之后的三十年内,美国医生 Coley 和另外一名德国医生 Fehleisen 又分别报道了细菌感染可以抑制肿瘤这一现象。由于其结果难以重复,细菌的毒力也难以控制,这些早期的研究工作一直存在争议。然而经过严谨的动物实验,细菌的侵染被证实确实可以使肿瘤变小,宿主的免疫系统也会在治疗的过程中被激活。文章将尝试综述肿瘤细菌疗法的发展历程和展望其发展方向。

关键词 细菌;癌症治疗;免疫系统;合成生物学
中图分类号 Q 939.99 **文献标志码** A

Outline of Bacterial Cancer Therapy

ZHUO Yue LIU Chenli

(Center of Synthetic Biology Engineering Research, Shenzhen Institutes of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, China)

Abstract As early as in the second half of the 19th century, bacteria have already been used to treat cancer patients. In 1868, German doctor W. Busch reported that when patients with Sarcoma were intentionally infected by *Streptococcus pyogenes*, the tumors were suppressed or eliminated. Later, similar cases of bacterial cancer treatments were reported by American doctor William B. Coley and German doctor Friedrich Fehleisen, independently. However, these early attempts remain controversial due to lack of repeatability and safety. In recent years, systematically designed animal experiments have proved that bacterial treatments can effectively suppress tumor growth and also stimulate immune system of the hosts. In this article, we will try to give out an outline of the history, development and future of bacterial cancer therapy.

Keywords bacteria; cancer therapy; immune system; synthetic biology

1 引 言

作为威胁人类生命健康的主要疾病之一,对癌症,特别是复发和转移癌症始终缺乏有效的治疗方法。无论是放疗、化疗、手术还是靶向性药

物,往往都不能取得令人满意的疗效。这一现状促使人们不断寻找新的癌症治疗方法。早在 19 世纪初,人们就观察到一些发生严重细菌感染的癌症患者的肿瘤缩小甚至消失。受此启发,开始有人尝试利用细菌来治疗癌症。最早有文献记录使用细菌治疗癌症的案例发生在 1868 年,德国

收稿日期:2015-06-01 修回日期:2015-06-05

作者简介:卓越,博士,副研究员,硕士生导师,研究方向为肿瘤合成生物学治疗、细胞内物质输送与神经退行性疾病的关系;刘陈立(通讯作者),博士,研究员,博士生导师,研究方向为合成细胞(人造生命)、肿瘤合成生物学治疗、生物定向进化及海洋应用微生物研究, E-mail: cl.liu@siat.ac.cn.

医生 Busch 有目的地让恶性肉瘤(Sarcoma)患者感染化脓性链球菌(*Streptococcus pyogenes*), 并观察到感染者的肿瘤体积缩小^[1]。之后, 德国医生 Fehleisen 于 1883 年, 美国医生 Coley 于 1891 年, 分别独立报道了化脓性链球菌感染导致恶性肉瘤患者痊愈的病例^[2,3]。

2 肿瘤细菌疗法的发展

如前所示, 虽然使用细菌治疗肿瘤的早期尝试获得了一定成果, 但存在很大的缺陷: 首先, 使用致病性活菌, 可能造成患者的严重感染, 安全性差; 其次, 细菌对肿瘤的疗效存在很大的个体差异, 缺乏重复性。因此, 在两位接受细菌治疗的肿瘤患者死于感染后, 为了提高可操作性并降低风险, Coley 医生转而使用包含灭活的化脓性链球菌、粘质沙雷菌(*Serratia marcescens*)等细菌的制剂(Coley's Toxin)来进行治疗^[4,5]。他使用这种制剂先后治疗了上千例各类肿瘤患者, 在相当一部分患者身上取得了明显的疗效(图 1)^[6,7]。据后人统计, 其成功率并不低于放疗、化疗和手术等治疗方法^[8]。

另一方面, 人们也开始寻找更加安全的细菌种类。由于肿瘤组织内部血管系统的异常增生, 无法形成正常的血液循环, 因而会形成一种厌氧、酸性、缺乏营养的特殊微环境。严格厌氧生长的梭状芽孢杆菌(*Clostridium*)就因此成为了肿瘤治疗的理想候选菌种之一^[9]。早在 1955 年就有报道称, 静脉注射破伤风梭菌(*Clostridium tetani*)的荷瘤小鼠在 48 小时内死于破伤风, 而无肿瘤小鼠不受影响^[10]; 1964 年另一则报道指出, 丁酸梭菌(*Clostridium butyricum*)会选择性地生长于实体瘤中^[11]; 在 2001 年有报道指出, 在数十种梭菌中只有败毒梭菌(*Clostridium sordellii*)和诺维氏梭菌(*Clostridium novyi*)能够扩散生长到整个肿瘤厌氧区^[12]; 2014 年, Roberts



(a) 注射了 63 次后, 肿瘤
体积缩小到治疗前一半



(Nature Reviews.Cancer,2009)
(b) 继续治疗后效果

图 1 患有圆形细胞肉瘤的患者, 使用 Coley's Toxin 治疗后, 肿瘤明显缩小(该病人 10 年后仍存活)^[6,7]

Fig. 1 Treatments with Coley's Toxin on a patient with round cell sarcoma of the jaw and abdominal metastases (The patient was still alive 10 years later)^[6,7]

等^[13]通过在狗及人体肿瘤内部直接局部注射诺维氏梭菌, 取得了显著的疗效。

梭菌用作癌症治疗, 除了源自严格厌氧特性的肿瘤靶向性, 还有一个优势是能够产生芽孢, 在操作上具有很大的便利。然而, 绝大多数梭菌都具有很强的致病性, 对生物安全性的顾虑将极大地限制其应用。故而也有很多使用非致病菌来治疗肿瘤的尝试。1980 年有报道称, 嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)对肠癌的发生具有抑制作用^[14], 同年另一则报道指出, 两歧双歧杆菌(*Bifidobacterium bifidum*)能够生长于多种小鼠肿瘤内部^[15]; 据 1997 年一则报道, 嗜酸乳杆菌对人类乳腺癌细胞增殖具有抑制作用^[16]; 2000 年报道, 植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)能对 IL-12 产生受损的晚期肿瘤产生抑制作用^[17], 而长双歧杆菌(*Bifidobacterium longum*)能够选择性地生长于肺癌肿瘤内部厌氧区^[18]。

乳杆菌、双歧杆菌等非致病菌用于肿瘤治疗固然具有较高的安全性, 然而另一方面其抑癌能力也相对较弱。细菌对肿瘤的抑制作用机理至今尚未被完全认识, 已知的抑癌能力主要源自以下

几个方面: (1) 细菌在肿瘤内部增殖, 将同癌细胞竞争营养和氧气; (2) 细菌自身及其产物对癌细胞产生直接杀伤; (3) 细菌的免疫源性激活免疫系统, 从而引发对癌细胞的杀伤。因此, 致病菌的自身毒性和免疫毒性, 在肿瘤治疗中具有积极的方面。有报告指出, 细菌产生的内毒素可以刺激免疫细胞分泌活性因子, 从而抑制癌细胞生长甚至杀死癌细胞^[19,20]。在 2012 年报道的一次一期临床实验中证实, Coley's Toxin 这种灭活致病菌的作用机理是通过激发患者的免疫反应来抑制肿瘤^[21]。在现代医学中, 使用细菌治疗癌症的一个成功临床案例就是对经电灼或局部切除后的膀胱癌患者使用用卡介苗 (BCG) 进行膀胱内灌注, 30 多年来随机对照研究及大量临床循证医学实践证实, 这一疗法能够减少膀胱癌的复发, 提高患者生存率及延长生存时间^[8]。卡介苗是减毒牛型结核杆菌 (*Mycobacterium bovis*) 悬液制成的活菌苗, 灌注膀胱后可在局部产生一系列免疫级联反应, 刺激免疫细胞分泌 TNF α 、IL-12 等因子从而促使肿瘤细胞凋亡^[22-24]。

为此, 人们开始寻求能够在生物安全性和抑癌能力两方面取得更好平衡的细菌菌株和疗法。革兰氏阴性兼性厌氧的菌鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*) 因为具有遗传背景清晰、遗传操作成熟等优点, 被认为是改造、应用前景最好的细菌种类之一。1997 年有报道指出, 鼠伤寒沙门氏菌具有明显的肿瘤靶向性, 在肿瘤组织与正常组织中生长的数量比为 1000:1^[25]; 2000 年有报道, 敲除鼠伤寒沙门氏菌 lipid A 相关基因 (*waaN*) 的减毒仍能保留其肿瘤靶向性^[26]; 而在 2002 年, 同时敲除 *waaN* 和 *purI* (嘌呤营养缺陷型) 的鼠伤寒沙门氏菌 VNP20009 菌株作为肿瘤治疗药物通过一期临床实验证明了其全性, 但没能取得理想的疗效^[27]。各种早期研究表明, 无论采用驯化、筛选的天然菌株, 还是进行简单基因改造的细菌, 都难以在降低对正常组织毒性的

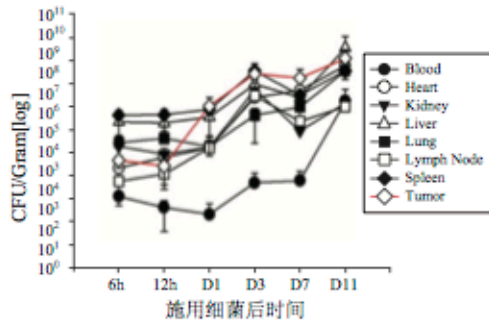
同时保持对肿瘤的杀伤能力, 必须进行各种深度改造。

3 对细菌的深度改造

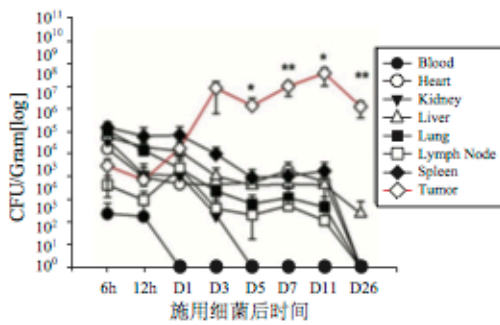
第一种改造途径是努力提高细菌对肿瘤的靶向性。以鼠伤寒沙门氏菌为例, 其本身为兼性厌氧菌, 因而虽然在肿瘤组织与正常组织中生长的数量比能达到 1000:1^[25], 但仍会造成严重的感染, 为了保证生物安全性而大幅度削弱了毒性的菌株则无法取得理想的抑癌效果^[27]。为此, 黄建东教授团队^[28]在具有较强毒性的鼠伤寒沙门氏菌 SL7207 菌株的基础上, 改造出 YB1 菌株, 使其只能在较严格的厌氧环境中生长, 从而特异性地靶向肿瘤内部, 同时还能保持较好的抑制肿瘤生长 (图 2)。

另一种改造途径是提高减毒细菌对癌细胞的杀伤能力。例如细菌与功能纳米材料的结合: 2007 年即有报道, 将李斯特菌 (*Listeria Monocytogenes*) 与包含 DNA 的纳米颗粒结合, 能够将 DNA 投递到细胞中表达目标基因 (图 3(a))^[29]; 在 2013 年的另一则报道中, 携带放射性颗粒的李斯特菌, 能够高效地靶向肿瘤, 并抑制转移性的胰腺癌 (图 3(b))^[30]。或者使细菌能够在肿瘤内部表达活性因子: 2001 年的一则报道中, 通过改造梭菌使其可以在肿瘤内部表达肿瘤坏死因子 A (TNF α), 并且很巧妙地设计其由涉及修复 DNA 单链断裂的 *recA* 启动子控制, 从而可被化疗射线触发^[31]; 2006 年有报道, 利用细菌在肿瘤内部表达 siRNA 可以有效抑制肿瘤生长^[32]。

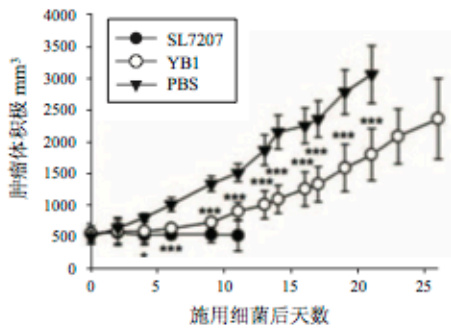
细菌对肿瘤的独特靶向能力, 也可以用于肿瘤的诊断。在 2015 年的一则报道中 (图 4), 大肠杆菌经口服进入小鼠体内后, 将会选择性地生长在肝癌转移瘤内, 即使新生的转移瘤直径只有 1~2 毫米。这些大肠杆菌经 IPTG 诱导表达 β -半乳糖苷酶, 分解静脉注射进入体内的底物



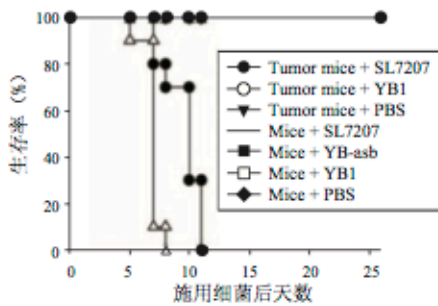
(a) 野生型沙门氏菌 SL7207 在体内各个器官内的数目随时间的分布



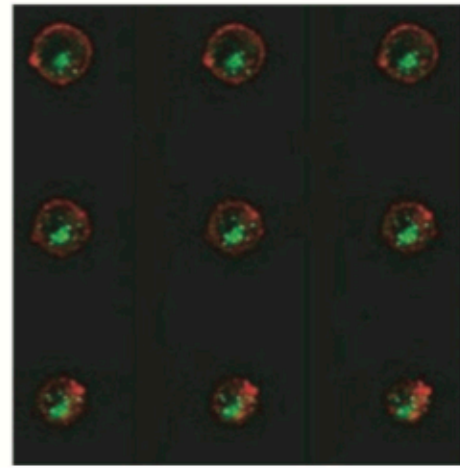
(b) 选择性厌氧改造菌株 YB1 在体内各个器官内的数目随时间的分布



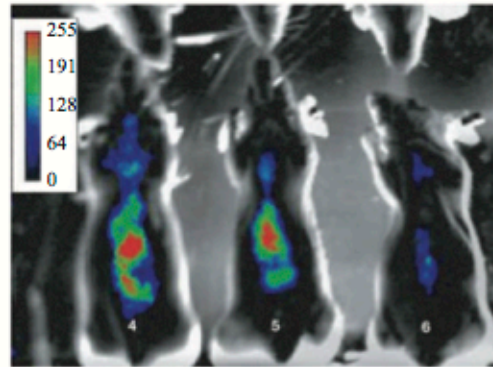
(c) YB1 及对照组肿瘤体积随时间的变化



(d) YB1 和对照菌株的毒性测试及对荷瘤小鼠存活时间的影响

图 2 改造具有肿瘤靶向性的鼠伤寒沙门氏菌 YB1^[28]Fig. 2 Tumor targeting *Salmonella typhimurium* strain YB1^[28]

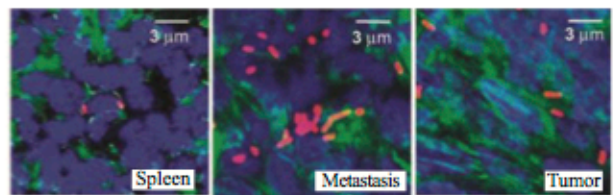
李斯特菌携带纳米颗粒进入细胞



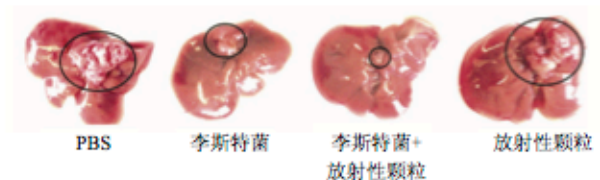
在小鼠体内表达目标基因

(Nature Nanotechnology, 2007)

(a) 李斯特菌与纳米颗粒结合, 将 DNA 投递到细胞中表达目标基因



李斯特菌大量聚集在肿瘤及转移瘤中

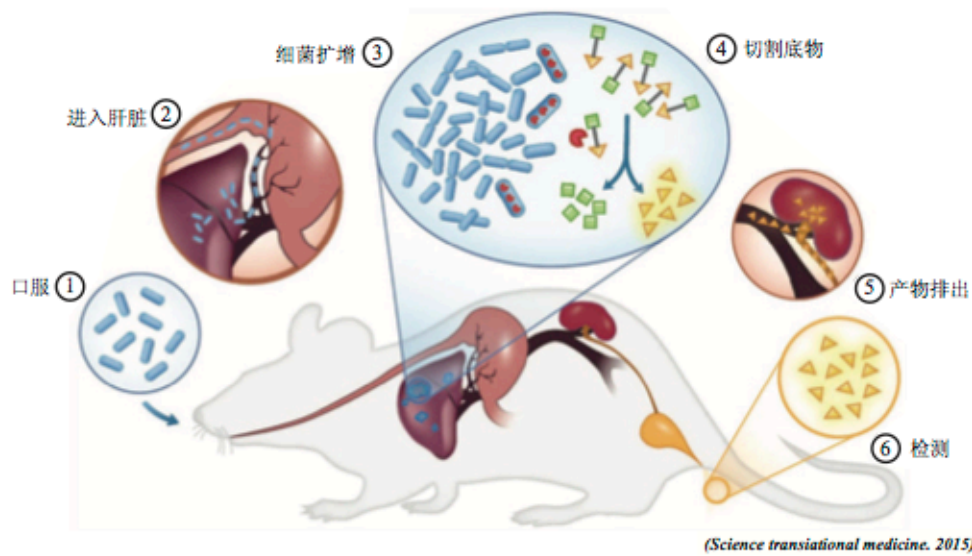


携带放射性纳米颗粒的细菌取得良好抑瘤效果

(PNAS, 2013)

(b) 携带放射性颗粒的李斯特菌, 靶向并抑制转移性的胰腺癌肿瘤

图 3 李斯特菌与功能纳米颗粒结合抑制肿瘤^[29,30]Fig. 3 Combinations of *Listeria monocytogenes* and nanoparticles for cancer therapy^[29,30]

图 4 改造大肠杆菌检测转移肿瘤^[33]Fig. 4 Detection of metastatic tumors with engineered *E. coli*^[33]

LuGal(荧光素-半乳糖融合分子)产生荧光素。最终通过检测尿液中排出的荧光素,就能判断小鼠体内是否有转移肿瘤及其大致数量^[33]。

4 前景展望

多年的研究和实践证明,相比传统药物和疗法,细菌作为具有生命的细胞,应用于癌症治疗中有其先天优势。譬如:(1)对肿瘤区域有天然靶向性,例如生长在厌氧环境中的细菌,会选择性地生长在内部具有厌氧微环境的实体肿瘤中;(2)基因组庞大,可以进行大规模改造,携带多种元件模块;(3)生长简单可控,能深入肿瘤内部并大量繁殖,进而通过营养竞争、产生毒素等方式抑制和杀灭传统放、化疗方法难以起作用的癌细胞;(4)培养成本低;(5)可以作为天然的免疫调节剂,激发自身免疫增强抗癌效果。

而要使细菌,特别是一些原本是致病菌的细菌走出实验室应用于临床治疗,就必须解决如何提高对肿瘤的靶向能力,在降低毒性以保证安全性的前提下,保持良好的肿瘤抑制能力这一关

键问题。利用合成生物学等新兴生物技术来改造细菌,能够实现很多传统方法无法完成的改造,赋予细菌更复杂的功能:对多种肿瘤和癌细胞进行更智能的识别、在肿瘤深处释放理想的活性治疗因子杀死癌细胞、吸引并集聚免疫细胞到肿瘤内进而激活自身免疫系统的抑癌作用,等等(图5)。合成生物学也必将会是肿瘤细菌疗法最重要、最有潜力的发展方向。

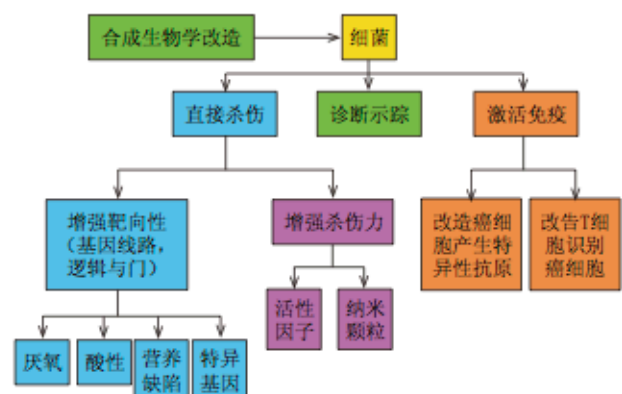


图 5 合成生物学改造细菌治疗肿瘤

Fig. 5 Bacterial cancer therapy powered by synthetic biological technologies

参 考 文 献

- [1] Pawelek JM, Low KB, Bermudes D. Bacteria as tumour-targeting vectors [J]. *The Lancet Oncology*, 2003, 4(9): 548-556.
- [2] Fehleisen F. Die etiologie des erysipels [M]. Berlin: Theodor Fischer, 1883: 48.
- [3] Coley WB. II. Contribution to the knowledge of sarcoma [J]. *Annals of Surgery*, 1891, 14(6): 199-220.
- [4] Nauts HC, Swift WE, Coley BL. The treatment of malignant tumors by bacterial toxins as developed by the late William B. Coley, M.D., reviewed in the light of modern research [J]. *Cancer Research*, 1946, 6: 205-216.
- [5] Nauts HC, Fowler GA, Bogatko FH. A review of the influence of bacterial infection and of bacterial products (Coley's toxins) on malignant tumors in man; a critical analysis of 30 inoperable cases treated by Coley's mixed toxins, in which diagnosis was confirmed by microscopic examination selected for special study [J]. *Acta Medica Scandinavica. Supplementum*, 1953, 276: 1-103.
- [6] Coley WB. The treatment of inoperable sarcoma by bacterial toxins (the mixed toxins of the *Streptococcus erysipelas* and the *Bacillus prodigiosus*) [J]. *Proceedings of Royal Society Medicine*, 1910, 3 (Surg Sect): 1-48.
- [7] Balkwill F. Tumour necrosis factor and cancer [J]. *Nature Reviews Cancer*, 2009, 9(5): 361-371.
- [8] Alexandroff AB, Jackson AM, O'Donnell MA, et al. BCG immunotherapy of bladder cancer: 20 years on [J]. *Lancet*, 1999, 353(9165): 1689-1694.
- [9] Van Mellaert L, Barbé S, Anné J. *Clostridium* spores as anti-tumour agents [J]. *Trends in Microbiology*, 2006, 14(4): 190-196.
- [10] Malmgren RA, Flanigan CC. Localization of the vegetative form of *Clostridium tetani* in mouse tumors following intravenous spore administration [J]. *Cancer Research*, 1955, 15(7): 473-478.
- [11] Möse JR, Möse G. Oncolysis by clostridia. I. Activity of *Clostridium butyricum* (M-55) and other nonpathogenic clostridia against the Ehrlich carcinoma [J]. *Cancer Research*, 1964, 24: 212-216.
- [12] Dang LH, Bettegowda C, Huso DL, et al. Combination bacteriolytic therapy for the treatment of experimental tumors [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98(26): 15155-15160.
- [13] Roberts NJ, Zhang LP, Janku F, et al. Intratumoral injection of *Clostridium novyi*-NT spores induces antitumor responses [J]. *Science Translational Medicine*, 2014, 6(248): 249ra111.
- [14] Goldin BR, Gorbach SL. Effect of *Lactobacillus acidophilus* dietary supplements on 1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride-induced intestinal cancer in rats [J]. *Journal of the National Cancer Institute*, 1980, 64(2): 263-265.
- [15] Kimura NT, Taniguchi S, Aoki K, et al. Selective localization and growth of *Bifidobacterium bifidum* in mouse tumors following intravenous administration [J]. *Cancer Research*, 1980, 40(6): 2061-2068.
- [16] Biffi A, Coradini D, Larsen R, et al. Antiproliferative effect of fermented milk on the growth of a human breast cancer cell line [J]. *Nutrition and Cancer*, 1997, 28(1): 93-99.
- [17] Murosaki S, Muroyama K, Yamamoto Y, et al. Antitumor effect of heat-killed *Lactobacillus plantarum* L-137 through restoration of impaired interleukin-12 production in tumor-bearing mice [J]. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 2000, 49(3): 157-164.
- [18] Yazawa K, Fujimori M, Amano J, et al. *Bifidobacterium longum* as a delivery system for cancer gene therapy: selective localization and growth in hypoxic tumors [J]. *Cancer Gene Therapy*, 2000, 7(2): 269-274.
- [19] Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, et al. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1975, 72(9): 3666-3670.
- [20] Beg AA, Baltimore D. An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death [J]. *Science*, 1996, 274(5288): 782-784.

- [21] Karbach J, Neumann A, Brand K, et al. Phase I clinical trial of mixed bacterial vaccine (Coley's toxins) in patients with NY-ESO-1 expressing cancers: immunological effects and clinical activity [J]. *Clinical Cancer Research*, 2012, 18(19): 5449-5459.
- [22] Luo Y, Han R, Evanoff DP, et al. Interleukin-10 inhibits Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin (BCG)-induced macrophage cytotoxicity against bladder cancer cells [J]. *Clinical and Experimental Immunology*, 2010, 160(3): 359-368.
- [23] Yuksel ZS, Buber E, Kocagoz T, et al. Mycobacterial strains that stimulate the immune system most efficiently as candidates for the treatment of bladder cancer [J]. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2011, 20(1): 24-28.
- [24] Newton MR, Askeland EJ, Andresen ED, et al. Anti-interleukin-10R1 monoclonal antibody in combination with bacillus Calmette-Guerin is protective against bladder cancer metastasis in a murine orthotopic tumour model and demonstrates systemic specific anti-tumour immunity [J]. *Clinical and Experimental Immunology*, 2014, 177(1): 261-268.
- [25] Pawelek JM, Low KB, Bermudes D. Tumor-targeted Salmonella as a novel anticancer vector [J]. *Cancer Research*, 1997, 57(20): 4537-4544.
- [26] Bermudes D, Low B, Pawelek J. Tumor-targeted Salmonella. Highly selective delivery vectors [J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2000, 465: 57-63.
- [27] 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]. *Journal of Clinical Oncology*, 2002, 20(1): 142-152.
- [28] 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: 436.
- [29] Akin D, Sturgis J, Ragheb K, et al. Bacteria-mediated delivery of nanoparticles and cargo into cells [J]. *Nature Nanotechnology*, 2007, 2: 441-449.
- [30] Quispe-Tintaya W, Chandra D, Jahangir A, et al. Nontoxic radioactive *Listeria*^{at} is a highly effective therapy against metastatic pancreatic cancer [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(21): 8668-8673.
- [31] Theys J, Landuyt W, Nuyts S, et al. Specific targeting of cytosine deaminase to solid tumors by engineered *Clostridium acetobutylicum* [J]. *Cancer Gene Therapy*, 2001, 8(4): 294-297.
- [32] Xiang S, Fruehauf J, Li CJ. Short hairpin RNA-expressing bacteria elicit RNA interference in mammals [J]. *Nature Biotechnology*, 2006, 24(6): 697-702.
- [33] Danino T, Prindle A, Kwong GA, et al. Programmable probiotics for detection of cancer in urine [J]. *Science Translational Medicine*, 2015, 7(289): 289ra84.