

DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2022.04.005

· 基础研究 ·

携带 HPV16 E7 shRNA 和 IL-12 基因的重组短双歧杆菌抗小鼠宫颈癌移植瘤的疗效和安全性

得丽扎尔·热合曼, 卡得了亚·哈依沙尔, 王中香, 刘丹, 李轶杰(新疆生物资源基因工程重点实验室; 新疆大学生命科学与技术学院 生物技术系, 新疆 乌鲁木齐 830046)

[摘要] **目的:** 评价口服携带 HPV16 E7 shRNA 和 IL-12 基因的重组短双歧杆菌在小鼠体内抗宫颈癌移植瘤的效果。**方法:** 将 pMG36e-E7 shRNA、pMG36e-mIL-12D 质粒分别转化短双歧杆菌, 经筛选鉴定并扩增获得携带 HPV16 E7 shRNA 和 IL-12 基因的重组短双歧杆菌。通过小鼠皮下宫颈癌细胞移植建立荷瘤小鼠模型。口服重组短双歧杆菌 1、7 d 后, 检测小鼠主要器官(心、肝、脾、肺、肾)和肿瘤组织匀浆液或血清在 PYG 培养基中形成的菌落数量, 评价短双歧杆菌的肿瘤靶向性, 以小鼠体内肿瘤生长曲线评估重组短双歧杆菌的抗肿瘤效果, 通过主要器官切片 H-E 染色和检测荷瘤小鼠血清相关细胞因子水平评价口服重组短双歧杆菌的安全性。**结果:** 成功制备重组短双歧杆菌和宫颈癌 TC-1 细胞移植瘤小鼠。7 d 后, 移植瘤组织匀浆液和血清的菌落数量证实短双歧杆菌具有靶向体内瘤组织的定殖能力, 口服重组短双歧杆菌明显抑制荷瘤小鼠的肿瘤生长 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 但联合使用携带 HPV16 E7 shRNA 和 IL-12 基因的重组短双歧杆菌的肿瘤抑制率与单独使用的并无显著差异, 治疗后未见对荷瘤小鼠主要器官的损伤和血清中 IL-12 及 IFN- γ 的水平明显变化。**结论:** 短双歧杆菌可用作靶向肿瘤的治疗性基因分子递送载体, 其对宫颈癌移植瘤的疗效明显且安全可控。

[关键词] 短双歧杆菌; 宫颈癌; HPV16; shRNA; IL-12; 抗肿瘤

[中图分类号] Q789; R737.33; R730.54 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2022)04-0301-07

Efficacy and safety of recombinant *Bifidobacterium breve* carrying HPV16 E7 shRNA and IL-12 gene against mouse cervical cancer xenografts

DELIZAER·Reheman, KADIRYA·Kaysar, WANG Zhongxiang, LIU Dan, LI Yijie (Xinjiang Key Laboratory of Biological Resources and Genetic Engineering; Department of Biotechnology, College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, Xinjiang, China)

[Abstract] **Objective:** To evaluate the effect of oral administration of recombinant *Bifidobacterium breve* (*B. breve*) carrying HPV16 E7 shRNA and IL-12 gene in mice against cervical cancer xenografts. **Methods:** pMG36e-E7 shRNA and pMG36e-mIL-12D plasmids were used to modify the *B. breve*. After screening, verification and amplification, recombinant *B. breve* carrying HPV16 E7 shRNA and IL-12 gene were obtained. Tumor-bearing mouse model was established by subcutaneously injecting cervical cancer cells. On the 1st and 7th day after oral administration, the tumor-targeting property of recombinant *B. breve* were evaluated by counting the number of bacteria colonies formed in the homogenate of mouse major organs (heart, liver, spleen, lung and kidney) and tumor tissues or serum that cultured in PYG medium. The antitumor effect of recombinant *B. breve* was evaluated by *in vivo* tumor growth curve. The safety of oral administration of recombinant *B. breve* was evaluated by H-E staining of the tissue sections from major organs and determination of the levels of related cytokines in serum of tumor-bearing mice. **Results:** Recombinant *B. breve* and cervical TC-1 cell transplanted tumor bearing mice were successfully established. After 7 days, the number of colonies in the homogenate of tumor tissues and serum confirmed that recombinant *B. breve* had the property of targeting tumor tissues *in vivo*. Oral administration of recombinant *B. breve* significantly suppressed tumor growth in tumor-bearing mice ($P<0.05$ or $P<0.01$); however, there was no significant difference in tumor inhibition rate between the recombinant *B. breve* carrying both HPV16 E7 shRNA and IL-12 gene and those carrying single one. After the treatment, no major organ damage or significant changes in serum IL-12 and IFN- γ levels was observed in tumor-bearing mice. **Conclusion:** *B. breve* can be used as a safe and controllable therapeutic molecular delivery vehicle for targeting tumors, which exert

[基金项目] 新疆维吾尔自治区自然科学基金资助项目(No.2017D01C048)

[作者简介] 得丽扎尔·热合曼(1994—), 女, 硕士生, 主要从分子肿瘤学研究; E-mail: 2014389385@qq.com

[通信作者] 李轶杰, E-mail: liyijie@xju.edu.cn

significant treatment efficacy against cervical cancer xenografts.

[Key words] *Bifidobacterium breve*; cervical cancer; HPV16; shRNA; IL-12; anti-tumor

[Chin J Cancer Biother, 2022, 29(4): 301-307. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2022.04.005]

宫颈癌被认为是女性中仅次于乳腺癌、结直肠癌和肺癌的第四大癌症^[1]。大多数宫颈癌都由高危型人乳头瘤病毒(human papilloma virus, HPV)16和18型等持续感染导致^[1]。尽管HPV疫苗现在已在全球范围内用于阻断HPV感染,但不能有效治疗已感染HPV的数百万患者^[2]。过去的20年中,肿瘤的基因治疗备受瞩目,并已取得令人振奋的成果。然而,被输送到体内用于基因治疗的裸核酸分子常常面临血管内降解、免疫清除、肾滤除、肿瘤组织渗透及吸收困难、内涵体逃逸及脱靶等生理和生物屏障^[3-4]。因而,抗肿瘤基因治疗临床应用的主要挑战就是如何提高治疗分子在体内输送的效率和肿瘤组织的靶向性。研究^[5]表明,某些专性或兼性厌氧菌可以在肿瘤内选择性积聚和增殖,并抑制其生长。一些减毒致病细菌如志贺氏菌、单核增生李斯特菌和鼠伤寒沙门氏菌已被用来作为活载体输送核酸分子到肿瘤组织和细胞。然而,由于担心这些减毒细菌可能出现回复突变到致命的表型,其安全性备受质疑^[6]。基于安全性考虑,研究人员开始探索益生菌如食品或共生乳酸菌用于输送核酸分子到肿瘤组织的可能性^[7]。过去10年中,共生肠道细菌如短双歧杆菌,已被用于乳腺癌、结肠腺癌等体内肿瘤的治疗^[8-9]。本课题组前期工作中已经分别证实了使用瘤内或静脉注射HPV16 E7 shRNA的重组乳酸乳球菌均能抑制小鼠体内肿瘤的生长^[10];携带IL-12基因的乳酸乳球菌抗肿瘤效果优于原核表达重组IL-12的乳酸乳球菌,其中瘤内注射途径抗肿瘤效果优于静脉途径^[11]。为了克服兼性厌氧的乳酸乳球菌能在正常组织内存活的风险,本研究将通过口服输送厌氧的重组短双歧杆菌(*Bifidobacterium breve*, *B. breve*)联合RNAi和细胞因子疗法在小鼠体内抑制HPV16相关肿瘤的方法,通过对小鼠体内的肿瘤生长趋势、正常组织和血清中短双歧杆菌的数量和主要器官组织H-E染色切片的分析,探讨短双歧杆菌作为肿瘤基因治疗载体的可行性和应用风险,为宫颈癌的基因治疗提供相关的实验依据。

1 材料与方法

1.1 质粒、细胞、实验动物与主要试剂

pMG36e-E7 shRNA^[10]和pMG36e-mIL-12D^[11]质粒均由本实验室构建并保存。短双歧杆菌(*B. breve* CICC 6184)购自中国工业微生物菌种保藏管理中心,含有HPV16型E6/E7基因的小鼠肺上皮TC-1肿

瘤细胞为本实验室冻存。6~8周龄、雌性C57BL/6小鼠[SYXK(新)2016-0002]购自新疆医科大学实验动物中心。改良型RPMI 1640培养基、胎牛血清、青/链霉素和0.25%胰蛋白酶(1×)溶液均购自HyClone公司,IFN- γ 、IL-12酶联免疫试剂盒购自武汉博士德公司,HPV16 E7鼠单抗购自Santa Cruz公司,IL-12兔单抗购自BD公司,Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒购自翌圣生物科技(上海)股份有限公司。其他实验所用试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 短双歧杆菌的电转化

将在200 mL PYG培养基中过夜培养的短双歧杆菌,按1:25接种到含0.5 mol/L蔗糖的新鲜PYG培养基中,继续培养至D值达0.3~0.6;菌体用无菌去离子水洗涤2次,50 mmol/L EDTA洗涤1次,无菌去离子水洗涤3次,最后重悬于去离子水配置的含0.5 mol/L蔗糖和10%甘油的溶液中,分装成100 μ L/管。将0.5 μ g pMG36e-E7 shRNA^[10]及pMG36e-mIL-12D质粒与80 μ L细菌液混匀,加入预冷的电穿孔比色杯(1 mm间隙)中。使用Bio-Rad Pulser II电转仪,以1.25 kV、25 μ F、200 Ω 、5.0 ms条件电转后,加入900 μ L PYG培养基重悬细菌,再转到Eppendorf离心管中放置于37 $^{\circ}$ C培养箱中,在厌氧条件下培养3 h。取200 μ L菌液涂布在含10 μ g/mL红霉素的PYG琼脂培养基上,并在37 $^{\circ}$ C、厌氧条件下温育36~48 h后,挑取单菌落筛选鉴定。

1.3 流式细胞术检测短双歧杆菌对骨髓细胞活性的影响

将采用注射器冲击法分离的C57BL/6小鼠骨髓细胞在RPMI 1640培养基中制备成单细胞悬液,再按感染复数(短双歧杆菌:每个骨髓细胞)分别为10:1、100:1和1 000:1加入短双歧杆菌并混匀,对照组骨髓细胞培养体系中加入相同体积的PBS,于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂的培养箱中培养24 h。细胞活性检测参考Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒说明书,采用100 μ L结合缓冲液重悬细胞,每个样加入2.5 μ L Annexin V-FITC和2.5 μ L PI染液,室温、避光染色25 min,加150 μ L结合缓冲液,铜网过滤,FACS Calibur流式细胞仪检测短双歧杆菌对细胞活性的影响。

1.4 重组短双歧杆菌感染TC-1细胞及其鉴定

将培养好的TC-1细胞转入35 mm培养皿中培养至细胞总数约 1×10^6 个,实验分为E7干扰重组短双歧杆菌(B-E7R)组和IL-12治疗重组短双歧杆菌

(B-IL-12)组,各组按TC-1细胞:重组短双歧杆菌=1:1 000的比例分别加入预先用100 $\mu\text{g/mL}$ 氨苄青霉素处理1 h的含pMG36e-E7 shRNA或pMG36e-mIL-12D重组短双歧杆菌的PBS悬液,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养3 h后,用灭菌PBS彻底洗去未进入细胞的重组短双歧杆菌。继续培养48 h后离心、收集细胞,加入300 μL 的细胞裂解液冰浴30 min后,将不同处理的细胞裂解液经SDS-PAGE分离后转移至硝酸纤维素膜上,以3 g/L脱脂奶粉溶液封闭2 h。分别以1:2 000稀释倍数加鼠抗HPV16 E7或兔抗IL-12,室温处理2 h、后用PBS洗3次,加入1:1 000稀释的辣根过氧化物酶标记兔抗鼠/羊抗兔IgG,室温处理1 h后PBS洗涤3次,最后加底物DAB显色并拍照。以 β -actin作为内参,用ImageJ软件分析蛋白条带的灰度值。

1.5 小鼠TC-1细胞移植瘤模型的建立与治疗处理

于8~10周龄、雌性C57BL/6小鼠右后背部皮下接种 1×10^5 个TC-1细胞。当皮下移植瘤可触及时(肿瘤直径2~4 mm),随机分为对照组、B-E7R组、B-IL-12组、B-E7R-IL-12组和短双歧杆菌(Bif)组5组,每组8只,各组之间的平均肿瘤大小没有显著差异。按文献[7]方法,收集 1×10^9 个活的重组短双歧杆菌,洗涤3次,重悬于200 μL PBS后,通过灌胃送入小鼠胃部。在重组短双歧杆菌口服后的第1、3和7天,每组各取3只小鼠安乐死,将主要器官解剖取出、称重后,以1 g器官组织对应1 mL PBS,加入9份含0.1%吐温-20的PBS后,用组织匀浆器匀浆。然后取200 μL 不同稀释倍数(1:10和1:100)匀浆液置于红霉素抗性PYG固体培养基上。取部分器官组织制备石蜡切片进行H-E染色。

肿瘤生长抑制检测中,荷瘤小鼠连续3 d分别口服200 μL PBS或悬浮在PBS中的 1×10^9 个活短双歧杆菌(Bif组)、干扰治疗重组短双歧杆菌(B-E7R组)、IL-12治疗重组短双歧杆菌(B-IL-12组)或联合治疗重组短双歧杆菌(B-E7R-IL-12组),1周后重复治疗1次。小鼠注射肿瘤细胞后,每隔1 d记录体质量变化,以后每3~4 d观察并记录肿瘤的生长情况,当肿瘤直径 ≥ 18 mm时小鼠实施安乐死。所有动物研究均按照新疆大学实验动物伦理委员会的规定进行。肿瘤体积计算方法:肿瘤体积(mm^3)=(长径 \times 短径 2)/2。

1.6 ELISA法检测荷瘤小鼠血清中IL-12和IFN- γ 水平

首次短双歧杆菌口服治疗后第3天,用毛细吸管眼静脉采血法收集荷瘤小鼠血液并分离血清。血清IL-12和IFN- γ 水平用ELISA法检测。

1.7 统计学处理

采用Prism 8软件分析数据,所有实验都独立重复3次。符合正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 短双歧杆菌不影响小鼠骨髓细胞的活性

短双歧杆菌与小鼠骨髓细胞共培养24 h后,流式细胞术检测结果如图1所示,在感染复数为10:1、100:1和1 000:1时,短双歧杆菌均没有对骨髓细胞的凋亡和坏死水平造成显著影响(均 $P > 0.05$)。TC-1肿瘤细胞与短双歧杆菌共培养实验也观察到相似的结果,表明短双歧杆菌及其代谢产物不影响肿瘤细胞的活性。

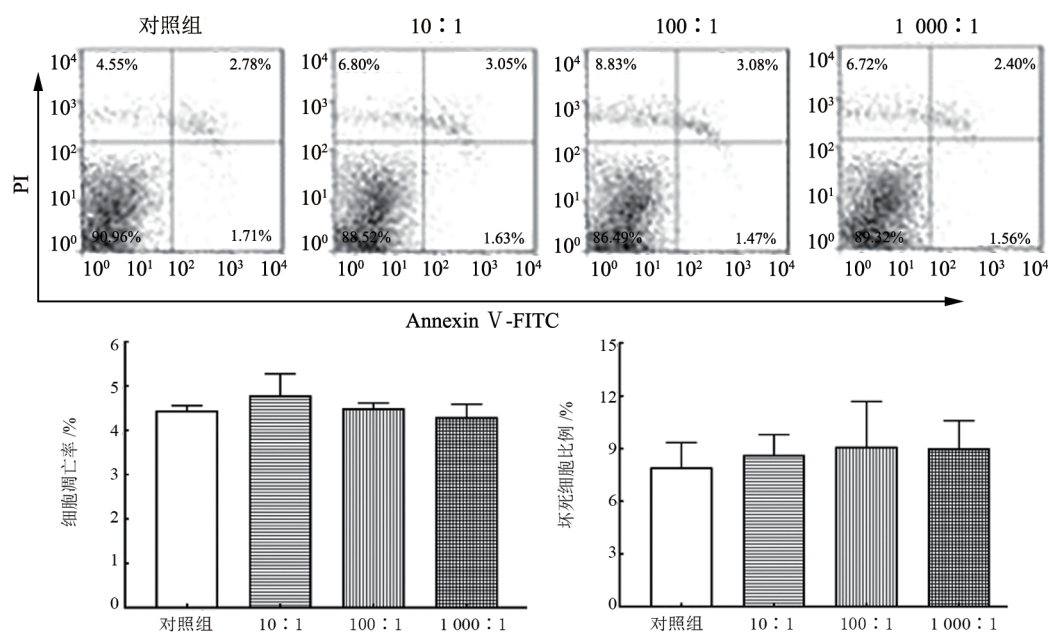


图1 短双歧杆菌对骨髓细胞活性没有显著影响

2.2 感染重组短双歧杆菌对 TC-1 细胞 E7 和 IL-12 表达的影响

WB 法检测结果(图2)显示,与 B-IL-12 组相比, B-E7R 组 TC-1 细胞表达的 E7 蛋白水平明显降低($P<0.01$);B-IL-12 组 TC-1 细胞中有较弱的特异性 IL-12 的表达,而 B-E7R 组的 TC-1 细胞则没有 IL-12 的表达($P<0.01$)。上述结果表明,氨苄青霉素处理的重组短双歧杆菌能够介导携带的 DNA 进入 TC-1 细胞且影响后者 E7 和 IL-2 的表达。

2.3 重组短双歧杆菌经灌胃后可特异性地靶向肿瘤组织

灌胃后 1 d,在荷瘤小鼠心、肝、脾、肺、肾、移植瘤匀浆液和血清中均检测到短双歧杆菌的生长(图 3A)。7 d 后,只在血清和肿瘤匀浆中可见(图 3B)。这些结果表明,重组短双歧杆菌具有体内靶向肿瘤组织的能力,但血液中会维持少量的菌体存在。

2.4 重组短双歧杆菌能明显抑制移植瘤的生长

荷瘤小鼠在注射 TC-1 细胞 22 d 后,PBS 对照组的小鼠先后因肿瘤直径 ≥ 18 mm 实施安乐死,同时, B-E7R 组[(491.8 \pm 320) mm³]、B-IL12 组[(429 \pm 198) mm³]和 B-E7R-IL-12 组[(360 \pm 324) mm³]小鼠肿瘤体积均极显著低于 PBS 对照组[(1 121 \pm 246) mm³] (均 $P<0.01$),且显著低于短双歧杆菌组 [(890 \pm 273)

mm³](均 $P<0.05$),见图 4A,而各组小鼠体质量没有显著差异(图 4B)。该结果表明,携带治疗性分子 E7 shRNA 和 IL-12 的重组短双歧杆菌能够显著抑制小鼠移植瘤的生长,联合使用抑制效果优于单独使用,但差异不显著。

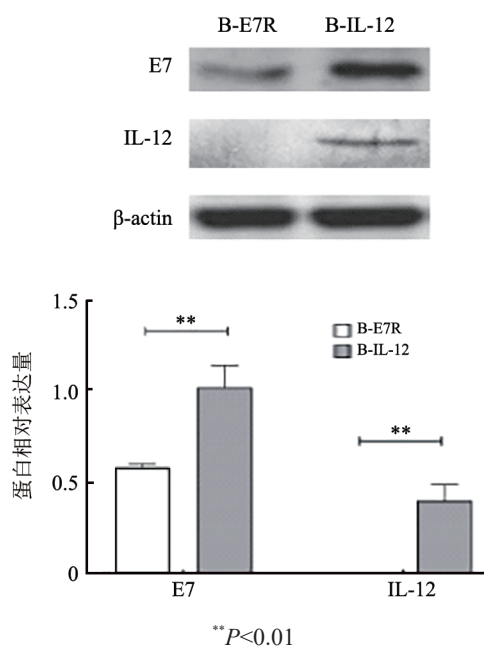


图2 重组短双歧杆菌感染对 TC-1 细胞中 E7 和 IL-12 表达的影响

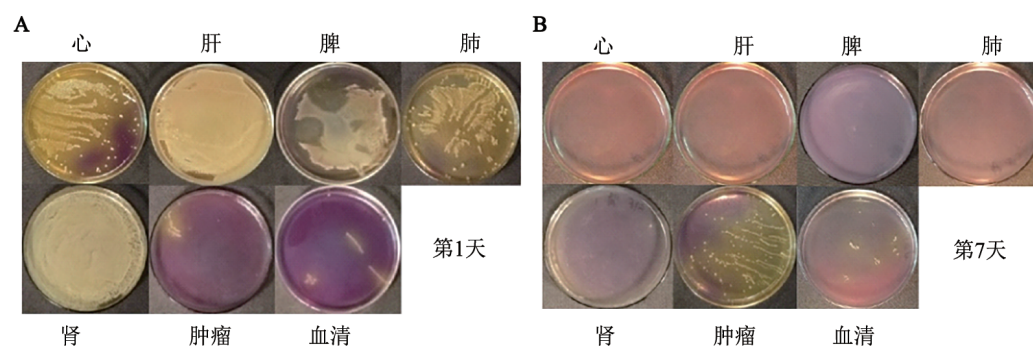
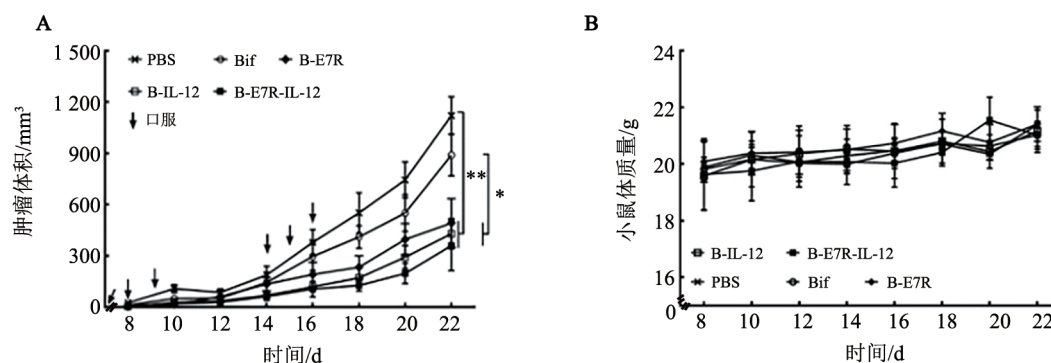


图3 口服重组短双歧杆菌 1 d(A)和 7 d(B)后不同器官匀浆液培养的结果



** $P<0.01$; * $P<0.05$

图4 重组短双歧杆菌治疗后移植瘤体积(A)和荷瘤小鼠体质量(B)的变化

2.5 口服重组短双歧杆菌后荷瘤小鼠主要器官组织无损伤

口服重组短双歧杆菌 7 d 后的主要器官组织 H-E 染色结果(图 5)显示,与 PBS 组处理相比,重组短双

歧杆菌组小鼠主要器官组织并未发生明显的改变,也未发现细菌性脓肿病灶。该结果表明,口服重组短双歧杆菌未对主要器官组织产生损伤。

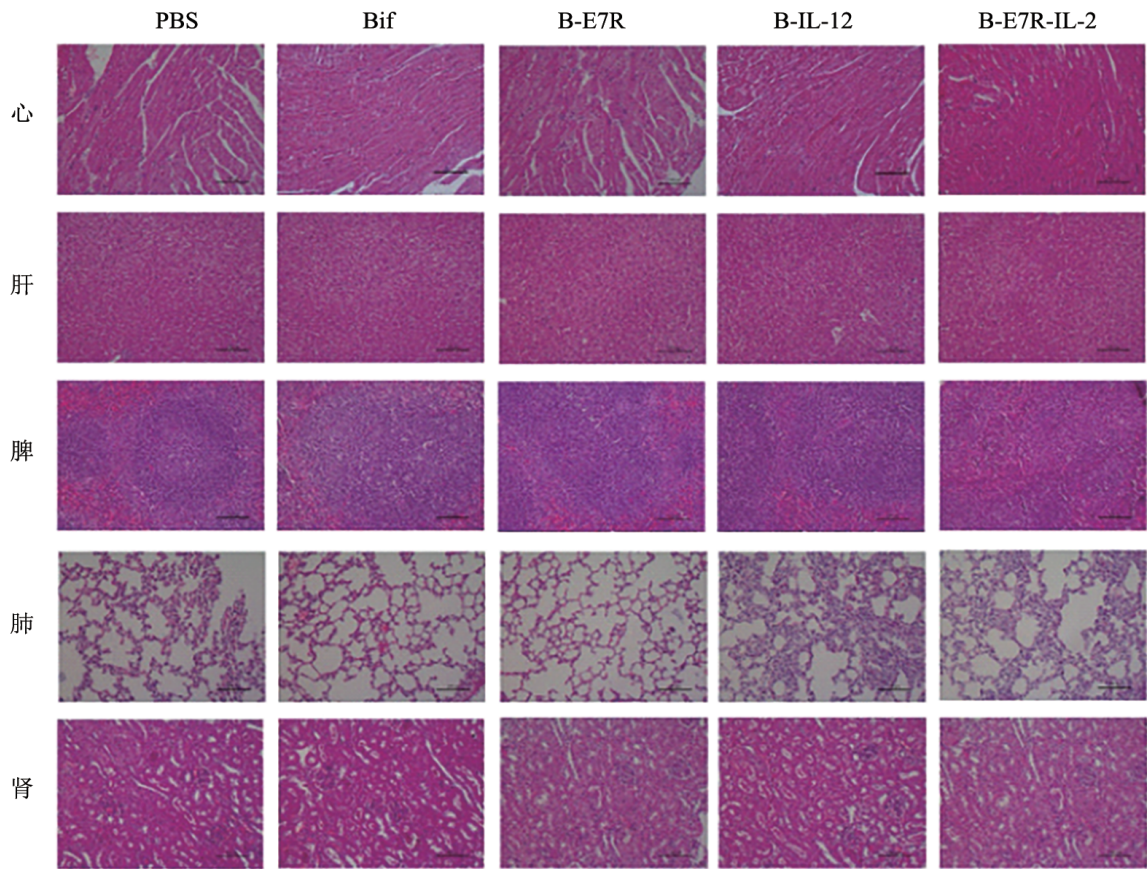


图 5 荷瘤小鼠口服重组短双歧杆菌 7 d 后主要器官组织切片的 H-E 染色结果(标尺:100 μm)

2.6 重组短双歧杆菌不影响荷瘤小鼠血清中 IL-12 与 IFN- γ 的表达水平

ELISA 检测结果(图 6)显示,各组荷瘤小鼠血清中 IL-12 与 IFN- γ 的含量均无显著差异,该结果说明携带治疗基因的重组短双歧杆菌治疗不会影响荷瘤小鼠体内这些分子的表达水平。

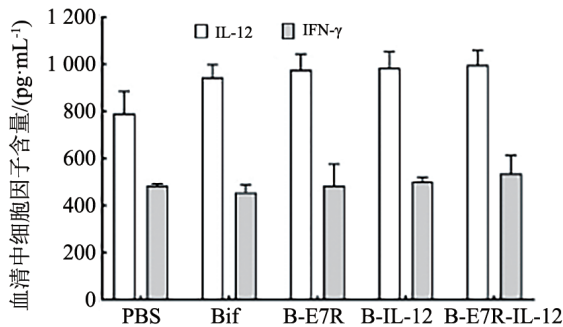


图 6 重组短双歧杆菌治疗不影响荷瘤小鼠血清中 IL-12 和 IFN- γ 水平

3 讨论

RNAi 可应用于癌症治疗的任何阶段,甚至是最难治疗的 IV 期癌症^[12],因而在传染性疾病和恶性肿瘤的治疗上展现出无穷潜力。目前 RNAi 治疗临床应用的主要挑战就是如何提高 RNAi 治疗分子体内输送效率和靶向性^[13]。此外,IL-12 通过激活 T 细胞和 NK 细胞产生 IFN- γ 介导的抗肿瘤活性,长期以来被认为是一种潜在的肿瘤免疫治疗方法,但直接应用 IL-12 会导致发生全身不良反应,甚至危及生命。因而,最大限度地向肿瘤微环境输送 IL-12,同时尽量减少全身暴露的给药系统是当前研究的热点^[14]。采用细菌作为肿瘤靶向的基因治疗输送载体可以很好地解决 RNAi 和细胞因子疗法的肿瘤靶向输送问题。与其他药物输送方法相比,细菌靶向肿瘤的效率不受肿瘤“基因组成”的影响。而作为微观的“机器人工厂”,细菌载体还可以根据临床需要按照遗传法则和生物合成机制生产和靶向肿瘤组织输送分子抗癌

药物。作为药物的分子既可用于单独治疗,也可辅助其他抗癌疗法,以获得更好的临床效果^[15]。本研究前期采用兼性厌氧乳酸乳球菌作为基因治疗的输送载体分别测试了在小鼠瘤内、尾静脉和鼻腔黏膜输送 shRNA 或重组 IL-12 抗实体肿瘤的效果,结果显示,瘤内途径好于静脉,静脉输送途径优于鼻黏膜途径^[10-11]。鉴于瘤内途径不便于临床操作,静脉输送存在菌血症风险,因而携带治疗性分子的重组菌通过口服输送是否同样具有肿瘤靶向性和抗肿瘤活性是本研究的目的之一。

相比兼性厌氧的乳酸乳球菌,绝对厌氧菌的双歧杆菌靶向肿瘤厌氧区定殖的能力更专一,对正常组织的影响更小,且双歧杆菌在肿瘤微环境中的累积还能促进抗 CD47 机制,抑制肿瘤生长^[9];一些双歧杆菌菌株已在日本用作处方药^[15]。研究^[7-8,15-16]表明,静脉输送的双歧杆菌在 24~96 h 内在小鼠肝、肾、脾、肺、血液和骨髓等非恶性组织中完全消失,而仅在肿瘤组织中生长,但口服输送的短双歧杆菌在组织内会驻留 5 周以上^[17]。本研究证实,口服 7 d 后,短双歧杆菌能特异性地分布在小鼠移植瘤组织中,但与 PBS 组相比抑制肿瘤生长并无显著效果。实验中携带 HPV16 E7 shRNA 的重组短双歧杆菌和携带 IL-12 真核表达框的重组短双歧杆菌均显著抑制了荷瘤小鼠宫颈癌细胞 TC-1 移植瘤的生长,而没有产生体质量减轻和主要器官损害等副作用。在前期实验中发现,携带 IL-12 DNA 的乳酸乳球菌经鼻黏膜或静脉输送后诱导血清中 IL-12 和 IFN- γ 升高^[11]。本研究中口服携带 IL-12 基因的短双歧杆菌的小鼠血清中并未检测到 IL-12 与 IFN- γ 的表达升高,这可能与口服的短双歧杆菌未用氨苄青霉素弱化细胞壁,导致治疗性 DNA 分子进入动物细胞效率较弱^[10-11],或者与 pMG36e 载体在短双歧杆菌体内拷贝数较低有关,这也在一定程度上消除了 IL-12 过量表达对机体产生的副作用。虽然双歧杆菌等益生菌可保护和重建肠道的屏障功能抑制致病菌体内的易位^[18],但本研究显示,口服输送短双歧杆菌 7 d 后血清中仍能检测到短双歧杆菌的存在,这可能与短双歧杆菌等益生菌能抑制病原菌易位,但并不影响自身易位的特性有关^[17]。虽然双歧杆菌对宿主不利的报道很少^[18],这可能与负面结果很难发表有关^[19]。本研究中,口服重组短双歧杆菌 7 d 后主要器官组织病理切片未见异常,表明该治疗方案相对安全;但血清中存在的少量短双歧杆菌提示对免疫低下的人群使用短双歧杆菌等益生菌作为功能食品或基因治疗的载体时,仍需关注可能存在的风险^[20],即使这种风险可用青霉素轻去除^[21]。

综上所述,本研究通过口服输送携带 shRNA 和 IL-12 DNA 的重组短双歧杆菌到荷宫颈癌移植瘤小鼠体内,能够靶向肿瘤组织并显著抑制移植瘤的生长,虽然口服后一段时间内血清中存在易位的短双歧杆菌,但未见对主要器官组织造成明显的损伤,也不影响小鼠骨髓细胞的活性。

[参 考 文 献]

- [1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424. DOI:10.3322/caac.21492.
- [2] WANG R J, PAN W, JIN L, *et al.* Human papillomavirus vaccine against cervical cancer: opportunity and challenge[J]. *Cancer Lett*, 2020, 471: 88-102. DOI:10.1016/j.canlet.2019.11.039.
- [3] SAW P E, SONG E W. siRNA therapeutics: a clinical reality[J]. *Sci China Life Sci*, 2020, 63(4): 485-500. DOI: 10.1007/s11427-018-9438-y.
- [4] DONG Y Z, SIEGWART D J, ANDERSON D G. Strategies, design, and chemistry in siRNA delivery systems[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2019, 144: 133-147. DOI:10.1016/j.addr.2019.05.004.
- [5] GUO Y X, CHEN Y, LIU X Q, *et al.* Targeted cancer immunotherapy with genetically engineered oncolytic *Salmonella typhimurium*[J]. *Cancer Lett*, 2020, 469: 102-110. DOI:10.1016/j.canlet.2019.10.033.
- [6] LIN I Y C, VAN T T H, SMOOKER P M. Live-attenuated bacterial vectors: tools for vaccine and therapeutic agent delivery[J]. *Vaccines*, 2015, 3(4): 940-972. DOI:10.3390/vaccines3040940.
- [7] WANG L, VULETIC I, DENG D, *et al.* *Bifidobacterium breve* as a delivery vector of IL-24 gene therapy for head and neck squamous cell carcinoma *in vivo*[J]. *Gene Ther*, 2017, 24(11): 699-705. DOI: 10.1038/gt.2017.74.
- [8] SHIMIZU Y, ISODA K, TAIRA Y, *et al.* Anti-tumor effect of a recombinant *Bifidobacterium* strain secreting a claudin-targeting molecule in a mouse breast cancer model[J/OL]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 887: 173596[2021-10-25]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32979353/>. DOI:10.1016/j.ejphar.2020.173596.
- [9] SHI Y Y, ZHENG W X, YANG K T, *et al.* Intratumoral accumulation of gut microbiota facilitates CD47-based immunotherapy via STING signaling[J/OL]. *J Exp Med*, 2020, 217(5): e20192282[2021-10-25]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32142585/> DOI: 10.1084/jem.20192282.
- [10] 得丽扎尔·热合曼, 刘丹, 孙素荣, 等. 重组乳酸乳球菌不同途径发送 shRNA 抗肿瘤的研究[J]. *生物技术*, 2019, 29(5): 478-484. DOI:10.16519/j.cnki.1004-311x.2019.05.0079.
- [11] 李铁杰, 刘欢欢, 李新苹, 等. 不同途径的乳球菌介导重组 IL-12 基因抗小鼠黑色素瘤的效果[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2013, 29(4): 392-395. DOI:10.13423/j.cnki.cjcmi.006767.
- [12] JUNG H S, RAJASEKARAN N, JU W, *et al.* Human papillomavirus: current and future RNAi therapeutic strategies for cervical cancer[J]. *J Clin Med*, 2015, 4(5): 1126-1155. DOI:10.3390/jcm4051126.
- [13] MADURI S. Applicability of RNA interference in cancer therapy: current status[J]. *Indian J Cancer*, 2015, 52(1): 11-21. DOI:10.4103/0019-509X.175598.

- [14] NGUYEN K G, VRABEL M R, MANTOOTH S M, *et al.* Localized interleukin-12 for cancer immunotherapy[J/OL]. *Front Immunol*, 2020, 11: 575597 [2021-10-25]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33178203/>. DOI:10.3389/fimmu.2020.575597.
- [15] ZHOU S B, GRAVEKAMP C, BERMUDEZ D, *et al.* Tumour-targeting bacteria engineered to fight cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2018, 18(12): 727-743. DOI:10.1038/s41568-018-0070-z.
- [16] XIAO S, SHI H, ZHANG Y, *et al.* Bacteria-driven hypoxia targeting delivery of chemotherapeutic drug proving outcome of breast cancer[J]. *J Nanobiotechnology*, 2022, 20(1): 178. DOI: 10.1186/s12951-022-01373-1.
- [17] CRONIN M, MORRISSEY D, RAJENDRAN S, *et al.* Orally administered bifidobacteria as vehicles for delivery of agents to systemic tumors[J]. *Mol Ther*, 2010, 18(7): 1397-1407. DOI: 10.1038/mt.2010.59.
- [18] SATO S, UCHIDA T, KUWANA S, *et al.* Bacteremia induced by *Bifidobacterium breve* in a newborn with cloacal exstrophy[J]. *Pediatr Int*, 2016, 58(11): 1226-1228. DOI:10.1111/ped.13103.
- [19] LIU Y Y, ALOOKARAN J J, RHOADS J M. Probiotics in autoimmune and inflammatory disorders[J/OL]. *Nutrients*, 2018, 10(10): 1537[2021-10-25]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30340338/>. DOI: 10.3390/nu10101537.
- [20] CASTRO-GONZÁLEZ J M, CASTRO P, SANDOVAL H, *et al.* Probiotic lactobacilli precautions[J/OL]. *Front Microbiol*, 2019, 10: 375[2021-10-25]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30915041/>. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00375.
- [21] TANIGUCHI S. *In Situ* delivery and production system (iDPS) of anti-cancer molecules with gene-engineered bifidobacterium[J/OL]. *J Pers Med*, 2021, 11(6): 566[2021-10-25]. <https://doi.org/10.3390/jpm11060566>. DOI:10.3390/jpm11060566.

[收稿日期] 2021-10-25

[修回日期] 2022-04-06

[本文编辑] 向正华, 沈志超