

DOI:10.3724/SP.J.1008.2013.00382

荷瘤小鼠口服重组减毒鼠伤寒沙门菌后瘤体内富集效果的观察

江中明*, 殷新民, 俞越, 缪亮, 危薇, 周延, 殷雪萌, 吴莹莹

南京医科大学附属明基医院口腔科, 南京 210019

[摘要] **目的** 观察重组减毒鼠伤寒沙门菌作为基因载体在人涎腺腺样囊性癌裸鼠移植瘤中的富集情况和对外源基因的呈递能力。**方法** 以绿色荧光蛋白基因(*GFP*)为报告基因,以减毒鼠伤寒沙门菌 SL7207 为转基因载体,分别构建原核启动 *GFP* 表达的重组减毒鼠伤寒沙门菌 SL7207-pUC-*GFP* 和真核启动 *GFP* 表达的重组减毒鼠伤寒沙门菌 SL7207-pEGFP-N1。原核菌 SL7207-pUC-*GFP* 在体外连续传代,观察 *GFP* 基因表达的稳定性;同时,对荷人涎腺腺样囊性癌皮下移植瘤裸鼠模型口服给予原核菌 SL7207-pUC-*GFP*(0.1 mL, 1×10^9 cfu/mL),在口服后 24 h、48 h、5 d、10 d、20 d、30 d 处死荷瘤裸鼠,获取肝、脾及肿瘤组织并制成匀浆液进行重组菌培养及 *GFP* 表达检测,观察重组菌在瘤体细胞内富集情况。对荷瘤裸鼠模型口服给予真核菌 SL7207-pEGFP-N1,5 d 后取肝、脾及肿瘤组织进行冰冻组织切片,荧光显微镜下观察 *GFP* 的表达,了解重组菌携带外源基因在肿瘤细胞内的表达。**结果** 携带 *GFP* 原核表达的重组减毒鼠伤寒沙门菌 SL7207-pUC-*GFP* 在体外连续传代 10 次未见表达减少或缺失。荷瘤裸鼠口服原核表达 *GFP* 基因重组菌 SL7207-pUC-*GFP* 菌液实验表明,重组菌 SL7207-pUC-*GFP* 在肝、脾及肿瘤组织中能长期存活,以肿瘤组织中聚集明显($P < 0.05$)且维持时间较长。荷瘤裸鼠口服真核表达 *GFP* 基因重组菌 SL7207-pEGFP-N1 菌液实验表明,相对肝脏和脾脏组织,外源基因在肿瘤细胞内表达量最高。**结论** 重组减毒鼠伤寒沙门菌可以在瘤体细胞内富集存活,并且携带的外源基因可以释放到肿瘤细胞内表达,具有作为基因治疗载体的双重优势。

[关键词] 鼠伤寒沙门菌;绿色荧光蛋白;遗传载体;基因疗法;涎腺肿瘤**[中图分类号]** R 739.87 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2013)04-0382-06

Intratumoral enrichment of gene delivered by oral administration of recombinant attenuated *Salmonella typhimurium* in tumor-bearing nude mice

JIANG Zhong-ming*, YIN Xin-min, YU Yue, MIAO Liang, WEI Wei, ZHOU Yan, YIN Xue-meng, WU Ying-ying

Department of Stomatology, BenQ Medical Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing 210019, Jiangsu, China

[Abstract] **Objective** To observe the distribution and expression of exogenous gene delivered by oral administration of recombinant attenuated *Salmonella typhimurium* in nude mouse model carrying human saliva gland adenoid cystic carcinoma. **Methods** The attenuated *Salmonella typhimurium* of green fluorescent protein (*GFP*) gene expression was constructed by transfecting prokaryotic and eukaryotic expression plasmid vector into the attenuated *Salmonella typhimurium* SL7207, and the recombinant attenuated *Salmonella typhimurium* SL7207-pUC-*GFP* for prokaryotic expression and SL7207-pEGFP-N1 for eukaryotic expression were obtained. The expression stability of *GFP* gene in the prokaryotic SL7207-pUC-*GFP* was tested for 10 times *in vitro*. The nude mouse models carrying human saliva gland adenoid cystic carcinoma were orally administered with prokaryotic SL7207-pUC-*GFP* (0.1 mL, 1×10^9 cfu/mL), and then the distribution of the attenuated *Salmonella typhimurium* in the liver, spleen and tumor tissues were assessed by observing *GFP* expression in SL7207-pUC-*GFP* clones cultured out of the tissues homogenate at 24 h, 48 h, 5 d, 10 d, 20 d, and 30 d after oral administration. The nude mouse models were also orally administered with eukaryotic SL7207-pEGFP-N1, and the expression of *GFP* in the liver, spleen and tumor tissues was observed in frozen tissue sections 5 d later under fluorescence microscope. **Results** The expression of *GFP* harbored by the recombinant attenuated *Salmonella typhimurium* SL7207-pUC-*GFP* was not reduced or lost after 10 times of *in vitro* passaging. After the oral administration of prokaryotic SL7207-pUC-*GFP*, the attenuated *Salmonella typhimurium* could survive in the liver, spleen and tumor tissues for a long time, with the clone numbers in tumor tissues being significantly higher

[收稿日期] 2012-10-24 **[接受日期]** 2013-02-06**[基金项目]** 国家自然科学基金(30572060)。Supported by National Natural Science Foundation of China (30572060)。**[作者简介]** 江中明,博士,副主任医师。

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 025-52238800-6012, E-mail: jiangzhongming-s@163.com

than those in the liver and spleen tissues at all the time points ($P < 0.05$). After oral administration of eukaryotic SL7207-pEGFP-N1, the expression of GFP was higher in tumor tissues than in the liver and spleen tissues. **Conclusion** The recombinant attenuated *Salmonella typhimurium* can be enriched in human saliva gland adenoid cystic carcinoma cells and deliver the harbored exogenous gene into the tumor cells for expression, showing a double advantage for gene therapy.

[Key words] *Salmonella typhimurium*; green fluorescent protein; genetic vectors; gene therapy; salivary gland neoplasms

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(4): 382-387]

减毒鼠伤寒沙门菌(*Salmonella typhimurium*)有黏附和侵袭性,通过肠壁上的M细胞到达Peyer淋巴结,定居在肠系膜相关淋巴组织,并经肠系膜Peyer淋巴结到达肝脏、脾脏等器官和肿瘤组织,有刺激机体免疫、呈递基因等作用^[1-3]。既往研究已报道减毒鼠伤寒沙门菌用于黑色素瘤^[3]、结肠癌^[4]、肺癌^[5]、胃癌^[6]、乳腺癌^[7]和骨肉瘤肺转移^[8]等多种肿瘤的治疗研究,但携带外源基因的重组减毒鼠伤寒沙门菌在口腔来源的肿瘤体内富集生长的时间效应及表达呈递的时间效应均未见详细报道。本研究构建了两种重组减毒鼠伤寒沙门菌——原核表达GFP的重组菌和真核表达GFP的重组菌,分别口服给予携带人涎腺腺样囊性癌移植瘤裸鼠,通过观察GFP蛋白表达,了解重组减毒鼠伤寒沙门菌在瘤体细胞内的富集生长情况和对外源基因的呈递表达能力,评价其作为基因治疗载体的双重优势。

1 材料和方法

1.1 主要材料及试剂 鼠伤寒沙门菌LB5000和减毒鼠伤寒沙门菌SL7207为美国Stanford大学Bruce Stocker教授馈赠;pSG1164(含绿色荧光蛋白基因GFP)、pUC18(含LacZ'基因原核表达框架)、大肠杆菌Top10F由第二军医大学基础部微生物学教研室赵平博士馈赠;pEGFP-N1购自上海欧易生物医学科技有限公司(Clontech公司产品)。T₄DNA连接酶、限制性内切酶购自上海皓嘉科技发展有限公司;质粒抽提试剂盒、异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)试剂购自Watson公司;酵母抽提物、胰化蛋白胨购自Sigma公司。34周龄BALB/c雄性裸鼠购自中国科学院上海实验动物中心,人涎腺腺样囊性癌细胞株ACC-2购自美国ATCC。

1.2 含GFP基因重组减毒鼠伤寒沙门菌的构建 质粒的提取与纯化,质粒的酶切、连接与回收,质粒的转化,感受态细胞的制备均按常规分子克隆方法操作。将pSG1164用经EcoRV/Xba I酶切获得的GFP基因连接入Sma I/Xba I酶切的pUC18多克隆位点,无移码插入LacZ'基因读码框架中。此

重组质粒电转化入大肠杆菌Top10F后,将细菌涂布于含氨苄青霉素的LB平板培养基上,用IPTG诱导,37℃培养812 h。挑取单个菌落,于荧光显微镜下观察,有绿色荧光的菌落经鉴定为重组阳性克隆,将其携带的重组质粒经酶切鉴定,命名为pUC-GFP。

将原核表达重组载体pUC-GFP和真核表达载体pEGFP-N1分别用电转化法导入感受态鼠伤寒沙门菌LB5000中,提取在LB5000中经修饰过的质粒,再经电转化(电转化条件:电压2.5 kV,电容25 μF,电阻200 Ω,放电时间4.74.8 ms)导入减毒鼠伤寒沙门菌SL7207感受态细菌中,涂布于相应的平板(pUC-GFP应用氨苄青霉素,pEGFP-N1应用卡那霉素)筛选出阳性克隆,含有相应质粒的重组减毒鼠伤寒沙门菌分别命名为SL7207-pUC-GFP和SL7207-pEGFP-N1。

1.3 GFP原核表达重组减毒鼠伤寒沙门菌体外培养传代中目的蛋白表达的稳定性实验 将重组减毒鼠伤寒沙门菌SL7207-pUC-GFP接种于LB固体培养基上,37℃过夜培养,于共聚焦显微镜(Leica TCS NT)下观察GFP蛋白表达情况。同时,挑取单个菌落,于LB固体培养基上37℃继续培养,如此重复10次,最后一次抽提质粒并进行酶切分析。

1.4 口服重组菌液的制备 重组减毒鼠伤寒沙门菌SL7207-pUC-GFP和SL7207-pEGFP-N1分别接种于含相应抗生素选择的LB培养液中,37℃振荡培养过夜,次日取50 μL种子液加入50 mL培养液中扩菌培养,至对数生长中后期收集菌体,1×PBS洗涤3次后,用5% NaHCO₃悬浮,调整细菌数为1×10⁹菌落形成单位(cfu)/mL为口服重组菌液。

1.5 低转移人涎腺腺样囊性癌荷瘤裸鼠模型的制备 ACC-2细胞常规复苏,传代培养,以每只鼠2×10⁶个细胞接种于裸鼠腹部皮下,20 d后断颈处死荷瘤裸鼠,无菌取出瘤组织块,剔除包膜及出血坏死组织后将瘤组织剪成小块制成细胞悬液,调整细胞密度为1.5×10⁷个细胞/mL。每只裸鼠右侧颌下区皮下接种0.2 mL细胞悬液,压迫注射孔2 min,接种10 d后将荷瘤裸鼠随机分组,进行口服重组菌液观

察实验。

1.6 荷瘤裸鼠口服重组减毒鼠伤寒沙门菌后重组菌在体内分布的观察 18只接种后第10天的荷瘤裸鼠胃管饲服 GFP 原核表达重组减毒鼠伤寒沙门菌 SL7207-pUC-GFP,每只 0.1 mL(约 10^8 cfu),分别于 24 h、48 h、5 d、10 d、20 d、30 d 时处死 3 只裸鼠,取其脾脏、肝脏和肿瘤组织各 1 mg,加入 500 μ L 生理盐水,充分匀浆后,500 r/min 低速离心 10 min。取上清 100 μ L 用生理盐水进行连续稀释(1 : 10, 1 : 10^2 , 1 : 10^3)后,分别取原液及各稀释度的溶液 250 μ L 均匀涂布于 LB 平板上,每个时间点和每个浓度下均涂布 6 块平板,37 $^{\circ}$ C 培养 812 h,观察每个稀释度下 6 块平板上的菌落分散情况,选取菌落独立并便于计数的稀释度,进行 6 块平板上的全部绿色菌落计数,计算每毫升匀浆液中含有细菌的个数,并计算每个脏器及每个时间点的菌落均数与标准差。随机挑取 2~4 个菌落扩菌后抽提质粒并行酶切鉴定。同时,取接种后第 10 天的荷瘤裸鼠 2 只,口服单纯 SL7207 菌作为对照,口服 5 d 后处死,取其脾脏、肝脏和肿瘤组织作为检测对照。

1.7 荷瘤裸鼠口服重组减毒鼠伤寒沙门菌后肿瘤细胞内重组菌对外源基因呈递表达能力的观察 将接种后第 10 天的荷瘤裸鼠分成 2 组,每组 5 只: GFP 真核表达重组细菌 SL7207-pEGFP-N1 组和单纯 SL7207 菌对照组,每只荷瘤裸鼠胃管饲服菌液 0.1 mL(约 10^8 cfu),分别在口服后 5 d 处死实验组和对照组裸鼠,取其脾脏、肝脏和肿瘤组织制备成冰冻组织切片,荧光显微镜下观察 GFP 的表达。

1.8 统计学处理 应用 SPSS 18.0 软件进行数据分析,体内分布实验中各脏器及各时间点之间 GFP 原核表达重组菌 SL7207-pUC-GFP 含量比较分析采用重复测量多重比较,检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 含 GFP 基因重组减毒鼠伤寒沙门菌的鉴定 重组质粒 pUC-GFP 转化的大肠杆菌在 UV 和荧光显微镜下均能观察到绿色荧光,而空载体 pUC18 转化的菌体未发现绿色荧光,表明 GFP 基因已成功克隆至 pUC18,并转化至大肠杆菌 Top10F 且获得表达。

将原核表达重组载体 pUC-GFP 和真核表达载体 pEGFP-N1 分别转化至沙门菌中间宿主 LB5000,利用其 DNA 修饰作用使质粒获得鼠伤寒沙门菌的

修饰模式,再从 LB5000 中提取质粒转化减毒鼠伤寒沙门菌终宿主 SL7207,之后再次提取质粒进行酶切鉴定(图略),分别获得阳性重组菌 SL7207-pUC-GFP 和 SL7207-pEGFP-N1。

2.2 GFP 原核表达重组减毒鼠伤寒沙门菌体外培养传代中目的蛋白表达的稳定性观察结果 重组减毒鼠伤寒沙门菌 SL7207-pUC-GFP 于 LB 培养液中过夜培养,可见菌液呈绿色;重组菌于固体培养基上过夜培养,见菌落亦呈绿色;挑取在 LB 固体培养基上培养的重组菌于共聚焦显微镜下观察,可见单个细菌呈绿色,细菌形态十分清晰(图 1),而空载体重组菌无绿色荧光。将重组菌 SL7207-pUC-GFP 于 LB 固体培养基上连续培养 10 代观察 GFP 蛋白的表达,全部细菌均仍呈绿色,并且最后一次培养菌抽提质粒经酶切鉴定,与构建质粒完全相同,表明重组减毒鼠伤寒沙门菌 SL7207-pUC-GFP 在体外稳定表达 GFP 蛋白。

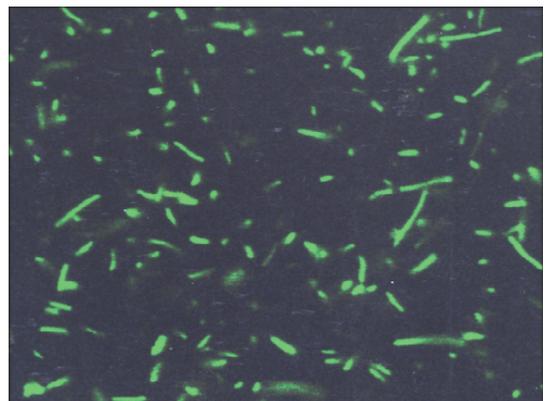


图 1 GFP 在重组减毒鼠伤寒沙门菌 SL7207-pUC-GFP 中表达的共聚焦显微镜观察

Fig 1 Photography of green fluorescent protein expression in recombinant attenuated *Salmonella typhimurium* SL7207-pUC-GFP by confocal microscope

Original magnification: $\times 1\ 000$

2.3 荷瘤裸鼠口服重组减毒鼠伤寒沙门菌后重组菌在体内分布的观察结果 将接种后第 10 天的荷瘤裸鼠胃管饲服 GFP 原核表达重组减毒鼠伤寒沙门菌 SL7207-pUC-GFP 后在 24 h、48 h、5 d、10 d、20 d、30 d 时处死,取其脾脏、肝脏和肿瘤组织匀浆液接种于 LB 平板上过夜培养,观察绿色菌落克隆形成(单位:cfu/mL)。结果可见肝脏和脾脏组织有少量绿色细菌生长,肿瘤组织内有大量绿色细菌生长,随着口服后时间的延长,肿瘤组织中绿色细菌数有所减少,第 10 天时减少约 50%,而口服单纯 SL7207

菌对照裸鼠的肝脏、脾脏及肿瘤组织均未见绿色细菌生长。抽提绿色细菌克隆内质粒, 经酶切鉴定, 发现与构建质粒完全相同。统计分析结果显示, 绿色菌落克隆数在肿瘤组织中明显存在, 与肝脏和脾脏组织之间差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 且肿瘤组织中菌落克隆数在各时间点之间差异也有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 2), 表明重组减毒鼠伤寒沙门菌 SL7207-pUC-GFP 在体内具有肿瘤组织靶向富集性, 并可稳定存活生长。同时, 接种菌体后, 观察动物一般状态, 未见裸鼠粪便、精神、体质有异常现象, 初步显现减毒鼠伤寒沙门菌作为基因载体具有一定的安全性。

2.4 荷瘤裸鼠口服重组减毒鼠伤寒沙门菌后肿瘤细胞内重组菌对外源基因特异性呈递表达能力的观察结果 首先将真核表达的重组减毒鼠伤寒沙门菌 SL7207-pEGFP-N1 在体外培养基中传代培养, 在 UV 和荧光显微镜下未见 GFP 表达, 表明真核启动的 GFP 不能在原核细菌内表达。而后, 将第 10 天荷瘤裸鼠分别胃管饲服 GFP 真核表达重组菌 SL7207-pEGFP-N1 和单纯 SL7207 对照菌, 分别于口服后 5 d 处死实验组和对照组裸鼠, 取其脾脏、肝脏和肿瘤组织制备成冰冻组织切片。荧光显微镜下观察发现所有裸鼠肝脏和脾脏内仅见微弱 GFP 表达, 但肿瘤组织内均发现明显 GFP 表达 (图 3)。口

服单纯 SL7207 菌的对照裸鼠肝脏、脾脏及肿瘤组织均未见 GFP 表达。结果表明, 口服的重组减毒鼠伤寒沙门菌可使其携带的真核表达框架较为特异地释放到肿瘤组织细胞中, 并有效表达携带的目的基因, 具有体内转基因能力。

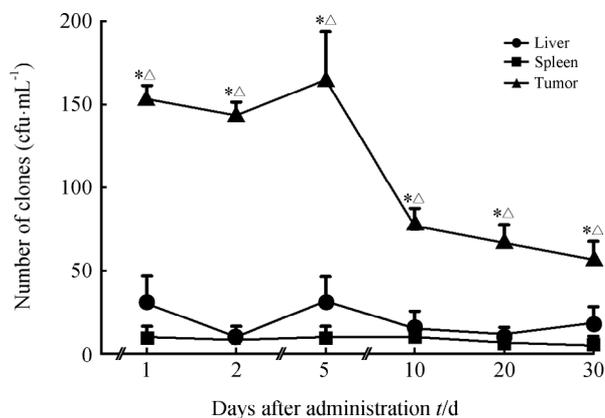


图 2 荷瘤裸鼠口服重组减毒鼠伤寒沙门菌 SL7207-pUC-GFP 后重组菌在肝、脾及肿瘤组织中的分布及存活时间

Fig 2 Distribution and survival time of *Salmonella typhimurium* in the liver, spleen and tumor tissues in nude mice after oral administration of recombinant attenuated *Salmonella typhimurium* SL7207-pUC-GFP

cfu; Colony-forming unit. There was significantly difference between the six time points in tumor tissues ($P < 0.05$). * $P < 0.05$ vs liver tissues; Δ $P < 0.05$ vs spleen tissues. $n = 18$, $\bar{x} \pm s$

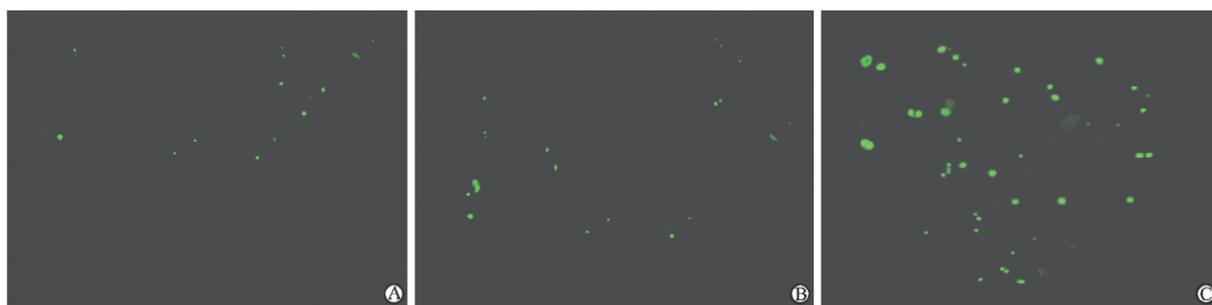


图 3 荷瘤裸鼠口服重组减毒鼠伤寒沙门菌 SL7207-pEGFP-N1 5 d 后在肝、脾及肿瘤组织中 GFP 表达的观察
Fig 3 Photography of green fluorescent protein expression in the liver, spleen and tumor tissues in nude mice after oral administration of the recombinant attenuated *Salmonella typhimurium* SL7207-pEGFP-N1 on day 5

A: Liver; B: Spleen; C: Tumor. Original magnification: $\times 100$

3 讨论

减毒鼠伤寒沙门菌载体经口服可以到达体内肿瘤, 具有靶向转基因的能力^[9]。近年来, 许多研究者尝试将其研制成有效的肿瘤 DNA 疫苗的携带者^[5, 10-11], 但其体内存活的时间依赖性和携带的外源基因释放到肿瘤细胞内能否有效表达, 既往研究

报道不够深入。本研究分别构建两种重组减毒鼠伤寒沙门菌——原核表达 GFP 的重组菌和真核表达 GFP 的重组菌, 一方面, 应用原核表达框架启动 GFP 基因表达, 实时、快捷观察细菌在体内的存活情况, 从而获得减毒鼠伤寒沙门菌靶向感染肿瘤细胞并在细胞内存活生长的证据; 另一方面应用真核表达框架启动 GFP 基因表达, 实时、快捷观察细菌

在体内递呈携带的外源基因表达的情况,从而获得减毒鼠伤寒沙门菌可使外源基因在细胞内表达的证据,客观评价重组减毒鼠伤寒沙门菌作为基因治疗载体的双重优势。

*GFP*可在原核和真核生物中高效表达,凸显出其用于示踪转基因载体构建和观察基因转移效率的价值。1994年,Chalfie等^[12]在研究维多利亚水母(*Aequorea victoria*)发光机制时发现此蛋白基因,其cDNA全长仅2.6 kb,不影响与其连接的目的基因的表达,其相对分子质量只有27 000,也不影响目的基因的结构与功能。在组织或细胞中,*GFP*能耐受各种处理,其发光特性不受影响,使用激发共聚焦显微镜图像效果更佳。*GFP*的表达与否在体内外均可直观观察,体外筛选简单,体内可以作为示踪剂^[13],本研究利用它的这种特点来观察重组减毒鼠伤寒沙门菌在体内组织的分布及与细胞的关系。

本研究发现,在体外LB平板传代培养实验中,10次传代的每个菌落均呈绿色,说明重组减毒鼠伤寒沙门菌在体外培养中较稳定,质粒不易丢失。在荷瘤动物口服体内实验中,我们观察到重组减毒鼠伤寒沙门菌可在肿瘤组织中靶向富集,其原因在于减毒鼠伤寒沙门菌在前期改造和筛选中,除使其合成的脂多糖诱导机体TNF的能力大大下降,避免了机体出现中毒性休克外,还具有嘌呤等多种营养缺陷依赖性和需氧条件下高侵袭性^[9]。肿瘤组织中细胞活力强并伴有一定程度的坏死区域,这些肿瘤微环境较正常组织可提供更为丰富的嘌呤、嘧啶和氨基酸等营养物质,同时血液循环丰富提供了较高氧浓度等,这些因素为减毒鼠伤寒沙门菌提供了生长的良好环境。在既往研究中,这种肿瘤靶向富集能力高于正常肝脏和脾脏组织可达1 000倍^[14],而本研究发现这种肿瘤组织靶向富集比正常肝脏和脾脏高约5倍,此差异的原因可能在于给药方式不同(前者为腹腔注射给菌,本研究为口服给菌)和靶向的肿瘤种类不同(前者为黑素瘤,本研究为低转移人涎腺腺样囊性癌)。另一方面,体内连续观察稳定性时,我们发现10 d后肿瘤组织中富集菌落数可下降约50%,说明在体内无选择压力,且细菌易受到多种影响,如pH值、低氧环境和免疫攻击等,使其有所丢失,但未来可根据需要不断改进,如采用沙门菌启动子或低氧启动子、给予一定的选择压力等,以利于沙门菌体内稳定和蛋白质表达^[15]。

为了研究减毒鼠伤寒沙门菌作为基因载体能否

有效将其携带的真核表达框架呈递给其感染的肿瘤细胞,我们将*GFP*基因置于真核启动子控制下的pEGFP-N1转化减毒鼠伤寒沙门菌SL7207,获得了稳定携带目的基因*GFP*的重组减毒鼠伤寒沙门菌。真核启动子控制下的*GFP*,经减毒鼠伤寒沙门菌呈递在肿瘤中有表达,口服后5 d,肿瘤组织中显示出高表达*GFP*的信号,表明减毒鼠伤寒沙门菌可以将其携带真核表达框架呈递给其感染的细胞。

2010年,Nguyen等^[4]报道将原核表达调控细菌荧光素酶基因*lux*和真核表达调控细胞毒蛋白*ClyA*基因的两个表达框架同时构建入一个载体内,并制备出重组减毒鼠伤寒沙门菌,而后,在小鼠荷瘤模型上,静脉给予重组减毒鼠伤寒沙门菌进行肿瘤治疗。实验发现,此载体不仅使*ClyA*基因在肿瘤细胞内高表达,发挥抗癌效果,而且在活体动物模型观察到重组减毒鼠伤寒沙门菌在瘤体内富集。本研究虽然应用原核和真核表达载体分别观察目的基因*GFP*在肿瘤细胞内表达和菌体在肿瘤组织中富集情况,与其报道结果一致,但本研究采用口服给菌方式,较其静脉给药具有更好的安全性及应用前景。

将重组减毒鼠伤寒沙门菌口服给荷瘤裸鼠后,在机体内可产生多重抗癌效果。一方面与肿瘤组织竞争营养,抑制和杀死肿瘤细胞;另一方面携带的外源基因可通过其高效表达发挥抗癌作用,如携带免疫调节基因可激发免疫,破坏肿瘤的免疫防御屏障。近年来,以减毒鼠沙门菌作为呈递基因的载体治疗肿瘤多见报道,Flentje等^[16]用减毒沙门菌自身基因启动子调控毒性基因,可将此毒性基因呈递给肿瘤细胞,使减毒沙门菌更加特异地在肿瘤微环境中释放毒性产物,产生更加精确的肿瘤靶向性杀伤作用。Tian等^[17]报道用减毒鼠伤寒沙门菌携带干扰RNA来治疗肿瘤,达到杀伤、免疫激发双重效果。而且,作为基因呈递载体,减毒鼠伤寒沙门菌还被广泛应用在疫苗的制备上,Xin等^[18]发现了一种携带抗原的新鼠伤寒沙门菌疫苗载体,Al-Ojali等^[11]发现减毒鼠伤寒沙门菌携带干扰素的表达可以增加疫苗的效率,Yu等^[19]发现用减毒鼠伤寒沙门菌携带病毒基因作为疫苗可以有效激活系统和黏膜免疫反应,并且安全有效。

总之,减毒鼠沙门菌可有效作为转基因治疗呈递载体。重组减毒鼠伤寒沙门菌可以在瘤体细胞内富集存活,并且携带的外源基因可以释放到肿瘤细胞内表达,具有作为基因治疗载体的双重优势。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Mei S, Theys J, Landuyt W, Anne J, Lambin P. Optimization of tumor-targeted gene delivery by engineered attenuated *Salmonella typhimurium* [J]. *Anticancer Res*, 2002, 22(6A): 3261-3266.
- [2] Basu D, Herlyn M. *Salmonella typhimurium* as a novel RNA interference vector for cancer gene therapy [J]. *Cancer Biol Ther*, 2008, 7: 151-152.
- [3] Chen G, Tang B, Yang B Y, Chen J X, Zhou J H, Li J H, et al. Tumor-targeting *Salmonella typhimurium*, a natural tool for activation of prodrug 6MePdR and their combination therapy in murine melanoma model [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012 Aug 7. [Epub ahead of print]
- [4] Nguyen V H, Kim H S, Ha J M, Hong Y, Choy H E, Min J J. Genetically engineered *Salmonella typhimurium* as an imageable therapeutic probe for cancer [J]. *Cancer Res*, 2010, 70: 18-23.
- [5] Zuo S G, Chen Y, Wu Z P, Liu X, Liu C, Zhou Y C, et al. Orally administered DNA vaccine delivery by attenuated *Salmonella typhimurium* targeting fetal liver kinase 1 inhibits murine Lewis lung carcinoma growth and metastasis [J]. *Biol Pharm Bull*, 2010, 33: 174-182.
- [6] Cao H D, Yang Y X, Lü L, Liu S N, Wang P L, Tao X H, et al. Attenuated *Salmonella typhimurium* carrying *TRAIL* and *VP3* genes inhibits the growth of gastric cancer cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *Tumori*, 2010, 96: 296-303.
- [7] Ganai S, Arenas R B, Forbes N S. Tumour-targeted delivery of *TRAIL* using *Salmonella typhimurium* enhances breast cancer survival in mice [J]. *Br J Cancer*, 2009, 101: 1683-1691.
- [8] Sorenson B S, Banton K L, Frykman N L, Leonard A S, Saltzman D A. Attenuated *Salmonella typhimurium* with *IL-2* gene reduces pulmonary metastases in murine osteosarcoma [J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2008, 466: 1285-1291.
- [9] Wall D M, Srikanth C V, McCormick B A. Targeting tumors with *Salmonella typhimurium*-potential for therapy [J]. *Oncotarget*, 2010, 1: 721-728.
- [10] Zhu X, Cai J, Huang J, Jiang X, Ren D. The treatment and prevention of mouse melanoma with an oral DNA vaccine carried by attenuated *Salmonella typhimurium* [J]. *J Immunother*, 2010, 33: 453-460.
- [11] Al-Ojali S M, Tara Moore C B, Fernandez-Cabezudo M J, Al-Ramadi B K. IFN γ expression by an attenuated strain of *Salmonella enterica serovar typhimurium* improves vaccine efficacy in susceptible TLR4-defective C3H/HeJ mice [J]. *Med Microbiol Immunol*, 2013, 202: 49-61.
- [12] Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward W W, Prasher D C. Green fluorescent protein as a marker for gene expression [J]. *Science*, 1994, 263: 802-805.
- [13] Khatchatourians A, Lewis A, Rothman Z, Loew L, Treinin M. GFP is a selective non-linear optical sensor of electrophysiological processes in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Biophys J*, 2000, 79: 2345-2352.
- [14] Pawelek J M, Low K B, Bermudes D. Tumor-targeted *Salmonella* as a novel anticancer vector [J]. *Cancer Res*, 1997, 57: 4537-4544.
- [15] Leschner S, Deyneko I V, Lienenklaus S, Wolf K, Bloecker H, Bumann D, et al. Identification of tumor-specific *Salmonella typhimurium* promoters and their regulatory logic [J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40: 2984-2994.
- [16] Flentie K, Kocher B, Gammon S T, Novack D V, McKinney J S, Piwnicka-Worms D. A bioluminescent transposon reporter-trap identifies tumor-specific microenvironment-induced promoters in *Salmonella* for conditional bacterial-based tumor therapy [J]. *Cancer Discov*, 2012, 2: 624-637.
- [17] Tian Y, Guo B, Jia H, Ji K, Sun Y, Li Y, et al. Targeted therapy via oral administration of attenuated *Salmonella* expression plasmid-vectored Stat3-shRNA cures orthotopically transplanted mouse HCC [J]. *Cancer Gene Ther*, 2012, 19: 393-401.
- [18] Xin W, Wanda S Y, Zhang X, Santander J, Scarpellini G, Ellis K, et al. The Asd⁺-DadB⁺ dual-plasmid system offers a novel means to deliver multiple protective antigens by a recombinant attenuated *Salmonella* vaccine [J]. *Infect Immun*, 2012, 80: 3621-3633.
- [19] Yu X, Jia R, Huang J, Shu B, Zhu D, Liu Q, et al. Attenuated *Salmonella typhimurium* delivering DNA vaccine encoding duck enteritis virus *UL24* induced systemic and mucosal immune responses and conferred good protection against challenge [J]. *Vet Res*, 2012, 43: 56.