

构建大肠杆菌 Nissle 1917 合成 5-氨基乙酰丙酸和精氨酸及其在肿瘤治疗中的应用

尹然^{1#}, 林常森^{2#}, 丁小娣³, 柳晓婧¹, 翟逸轩¹, 于晓丽^{1*}

1 山东第二医科大学 公共卫生学院, 山东 潍坊

2 山东中医药大学附属医院, 山东 济南

3 山东第二医科大学 基础医学院, 山东 潍坊

尹然, 林常森, 丁小娣, 柳晓婧, 翟逸轩, 于晓丽. 构建大肠杆菌 Nissle 1917 合成 5-氨基乙酰丙酸和精氨酸及其在肿瘤治疗中的应用[J]. 微生物学报, 2025, 65(11): 5092-5104.

YIN Ran, LIN Changsen, DING Xiaodi, LIU Xiaojing, ZHAI Yixuan, YU Xiaoli. *Escherichia coli* Nissle 1917 for the biosynthesis of 5-aminolevulinic acid and arginine: engineering and application in tumor treatment[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2025, 65(11): 5092-5104.

摘要: 【目的】利用合成生物学技术构建益生菌大肠杆菌 Nissle 1917 (*Escherichia coli* Nissle 1917, ECN), 使其能够特异性定植于肿瘤组织, 原位转化肿瘤微环境中的葡萄糖及代谢废物氨, 同步合成光敏剂前体 5-氨基乙酰丙酸(5-aminolevulinic acid, 5-ALA)和免疫调节氨基酸精氨酸, 并与免疫检查点抑制剂形成协同抗肿瘤效应。【方法】在 ECN 中共表达 *hemA^M*、*hemL* 和 *argA* 基因, 通过 λ -Red 同源重组系统敲除 *thyA* 基因以增强肿瘤靶向性; 采用摇瓶发酵实验、紫外分光光度法、HPLC 等方法检测工程菌 ECN 合成 5-ALA 和精氨酸的产量; 进一步利用体外细胞实验和小鼠肿瘤模型系统评价工程菌 ECN 对结直肠癌细胞的作用。【结果】工程菌中 5-ALA 和精氨酸的产量分别达到(173.00±11.46) mg/L 和(1.70±0.09) g/L, 较野生型提高 8.2 倍和 20 倍($P<0.0001$)。 *thyA* 基因缺失使工程菌只能在肿瘤细胞 HCT116 和 CT26 中增殖, 与正常组织细胞 Vero 相比, 工程菌在肿瘤细胞中的 OD_{600} 提高了 1 倍($P<0.0001$), 进而提高工程菌 ECN 的肿瘤靶向性。体内外实验证实工程菌可在肿瘤组织中持续合成 5-ALA 和精氨酸, 与野生型 ECN 相比工程菌分别诱导 CD8⁺ 和 CD4⁺ T 细胞浸润密度增加 2.7 倍和 1.9 倍($P<0.0001$), IL-6、TNF- α 分泌水平分别升高 1.7 倍和 2.4 倍($P<0.0001$), 联合抗 PD-L1 治疗使肿瘤体积抑制率达 77.6% ($P<0.0001$)。【结论】本研究成功构建了具有代谢-免疫双重调控功能的 ECN 工程菌平台, 通过原位供给光动力治疗前体药物、精氨酸介导的免疫代谢重编程以及协同免疫检查点阻断的三重作用为实体瘤的联合治疗提供了新的解决方案, 也为肿瘤微环境精准调控策略的发展提供了研究思路。

资助项目: 山东省自然科学基金(ZR2021QC079)

This work was supported by the Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2021QC079).

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author. E-mail: yux10814@sdsu.edu.cn

Received: 2025-04-14; Accepted: 2025-06-03; Published online: 2025-06-24

关键词: 大肠杆菌 Nissle 1917; 5-氨基乙酰丙酸; 精氨酸; 光动力治疗; 免疫治疗

***Escherichia coli* Nissle 1917 for the biosynthesis of 5-aminolevulinic acid and arginine: engineering and application in tumor treatment**

YIN Ran^{1#}, LIN Changsen^{2#}, DING Xiaodi³, LIU Xiaojing¹, ZHAI Yixuan¹, YU Xiaoli^{1*}

1 School of Public Health, Shandong Second Medical University, Weifang, Shandong, China

2 Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan, Shandong, China

3 School of Basic Medical Sciences, Shandong Second Medical University, Weifang, Shandong, China

Abstract: [Objective] The probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 (ECN) is engineered by synthetic biology to construct a tumor-targeting strain capable of colonizing the tumor tissue, converting glucose and metabolic waste ammonia in the tumor microenvironment into the photosensitizer precursor 5-aminolevulinic acid (5-ALA) and the immunomodulatory amino acid arginine, while synergizing with immune checkpoint inhibitors for enhanced antitumor efficacy. [Methods] The genes *hemA^M*, *hemL*, and *argA* were co-expressed in ECN, and *thyA* was knocked out via the λ -Red homologous recombination system to improve the tumor-targeting specificity. Shake-flask fermentation experiments, UV spectrophotometry, and HPLC were employed to quantify 5-ALA and arginine production. The antitumor effects of the engineered ECN were systematically evaluated by *in vitro* cellular assays and a murine colorectal cancer model. [Results] The engineered strain achieved 5-ALA and arginine yields of (173.00±11.46) mg/L and (1.70±0.09) g/L, which represented 8.2-fold and 20-fold increases, respectively, over that of wild-type ECN ($P<0.0001$). The deletion of *thyA* enabled selective proliferation of the strain in tumor cells (HCT116 and CT26), with a two-fold increase in OD_{600} compared with that in normal Vero cells ($P<0.0001$), confirming enhanced tumor targeting. Both *in vitro* and *in vivo* experiments demonstrated sustained synthesis of 5-ALA and arginine in tumors. Compared with wild-type ECN, the engineered strain induced 2.7-fold and 1.9-fold increases in CD8⁺ and CD4⁺ T-cell infiltration ($P<0.0001$), alongside 1.7-fold and 2.4-fold elevations in IL-6 and TNF- α secretion ($P<0.0001$), respectively. The engineered strain combined with the anti-PD-L1 therapy achieved a tumor volume inhibition rate of 77.6% ($P<0.0001$). [Conclusion] This study establishes a metabolically and immunologically dual-functional ECN platform that synergizes localized delivery of photodynamic therapy precursors, arginine-mediated immunometabolic reprogramming, and immune checkpoint blockade, providing a novel solution for the combined therapy against solid tumors. The engineered system offers a groundbreaking strategy for precise tumor microenvironment modulation, advancing the research on targeted cancer therapeutics.

Keywords: *Escherichia coli* Nissle 1917; 5-aminolevulinic acid; arginine; photodynamic therapy; immunotherapy

随着活体生物治疗研究的深入以及合成生物学技术的突破,工程菌在疾病治疗领域的应用价值日益凸显^[1-3]。通过基因工程改造,细菌可实现生物活性分子(如抗原、酶类及维生素)的靶向合成与递送,其能够动态响应环境信号的特性为精准治疗提供了新策略^[4-5]。其中,大肠杆菌 Nissle 1917 (*Escherichia coli* Nissle 1917, ECN)作为非致病性益生菌株,因其独特优势成为肿瘤治疗的重要载体,不仅具备长期应用于人体的安全性,而且 ECN 成熟的基因操作体系为合成生物学改造提供了技术基础^[6];同时,它能在肿瘤微环境的低氧及免疫抑制区域实现有效定殖^[7-8]。研究证实,经工程化改造后的 ECN 可表达同步裂解回路(eSLC),通过局部释放 CD47 纳米抗体拮抗剂(eSLC-CD47nb)激活系统性抗肿瘤免疫^[9];进一步合成治疗性蛋白及前药转化酶可显著提升荷瘤动物的生存率^[10],充分展现了其在肿瘤生物治疗中的潜力。

光动力疗法(photodynamic therapy, PDT)作为一种微创治疗手段,其治疗效应源于光敏剂 5-氨基乙酰丙酸(5-aminolevulinic acid, 5-ALA)在肿瘤细胞内的特异性富集。5-ALA 经酶促代谢转化为原卟啉 IX (protoporphyrin IX, PpIX),在特定波长(660 nm)光照激发下生成具有氧化能力的活性氧(reactive oxygen species, ROS),进而发挥细胞毒性作用^[11-13]。然而,5-ALA 固有的亲水特性及靶向缺陷严重制约了其临床应用。第三代光敏剂通过靶向载体偶联策略可显著改善药代动力学特性,而工程化 ECN 作为活体递送系统为 5-ALA 的精准投递提供了创新解决方案^[14]。此外,PDT 诱导的免疫原性细胞死亡可释放肿瘤相关抗原,与免疫检查点抑制剂联用可产生协同抗肿瘤效应。例如,NCP@pyrolipid 光敏系统联合抗 PD-L1 抗体可同时介导原发灶与远端转移灶消退^[15-16],这表明 ECN 介导的 PDT-免疫联合疗法具有重要研究价值。

最新研究表明,肿瘤微环境中精氨酸匮乏会削弱 PD-L1 阻断疗法的免疫应答^[17]。氨(NH₃)

作为肿瘤代谢副产物,经谷氨酸脱氢酶催化生成谷氨酸,再通过 N-乙酰谷氨酸合成酶(ArgA)转化为精氨酸^[18-19]。该代谢通路与 ECN 中 5-ALA 生物合成的前体物质均为谷氨酸^[20-23]。基于此,本研究构建重组质粒 pCL1920,共表达 *hemA^M*、*hemL* 和 *argA* 基因,使 ECN 工程菌可分别利用葡萄糖和氨作为底物同步合成 5-ALA 与精氨酸,进一步将 5-ALA 与精氨酸靶向递送至肿瘤细胞。通过与抗 PD-L1 抗体的协同作用,可实现:(1) PDT 诱导的局部肿瘤杀伤;(2) 精氨酸代谢重塑增强免疫应答;(3) 系统抗肿瘤免疫激活。这种基于合成生物学的工程菌联合治疗策略为实体瘤治疗提供了新的研究思路(图 1)。

1 材料与方法

1.1 培养基

ECN 培养和分子遗传操作采用 LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母粉 5.0, NaCl 10.0。摇瓶发酵实验采用改良的培养基(g/L): (NH₄)₂SO₄ 6.0, KH₂PO₄ 3.0, Na₂HPO₄·12H₂O 16.0, MgSO₄·7H₂O 1.0, MnSO₄·7H₂O 1.0, 酵母粉 2.0。以葡萄糖作为唯一碳源,同时添加 25 mg/mL 壮观霉素和 3 mmol/L 胸苷以促进 5-ALA 和精氨酸的合成。为诱导基因表达,在培养过程中添加 0.1 mmol/L 异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)。

1.2 主要试剂

PrimeSTAR HS DNA 聚合酶及其 buffer 缓冲液、DNA 限制性内切酶, TaKaRa 公司;用于配制培养基的试剂(胰蛋白胨、酵母粉、NaCl 等)、胰酶、IV 型胶原酶、DNA 酶 I, Solarbio 公司;壮观霉素、IPTG、胸苷,上海碧云天生物技术股份有限公司;Gibson 无缝组装试剂, NEB 公司;抗 PD-L1 抗体, Bio X Cell 公司;多克隆抗 CD3 抗体、抗兔二抗,北京中山金桥生物技术有限公司;抗 CD25 抗体、抗 CD4 抗体、抗 FOXP3⁺抗体、抗 CD8a 抗体, Biolegend 公司。

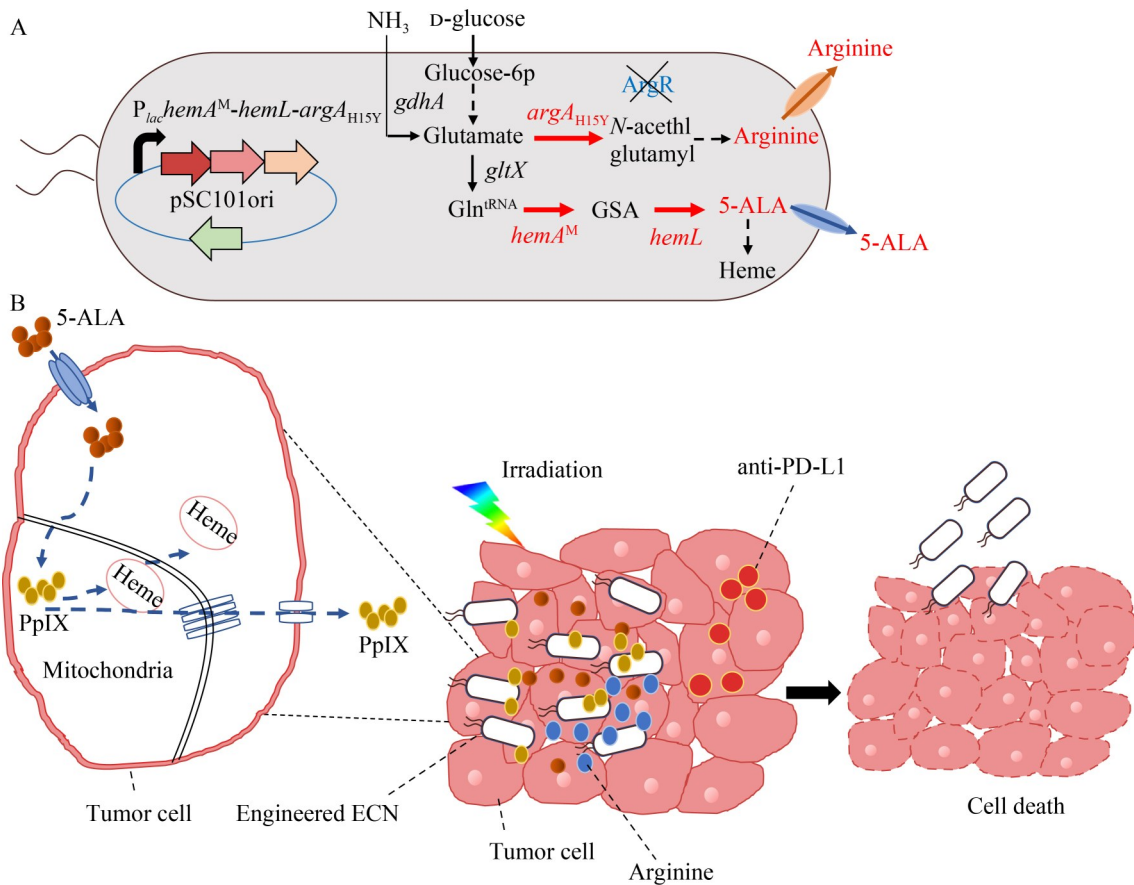


图1 ECN以葡萄糖和氨为前体合成5-ALA和精氨酸并靶向递送至肿瘤细胞

Figure 1 5-ALA and arginine production from glucose and ammonia in ECN and targeted delivery of 5-ALA and arginine into tumor cells. 5-ALA: 5-aminolevulinic acid; GSA: Glutamate-1-semialdehyde aminotransferase; Gln^{tRNA} : Glutamyl-tRNA; PpIX: Protoporphyrin IX.

琼脂糖凝胶电泳回收试剂盒, Omega 公司; 质粒快速提取试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司; ELISA 试剂盒, 南京建成生物工程研究所。

1.3 EALA 和 EALA ΔthyA 工程菌构建以及发酵实验

野生型 ECN 由本实验室保存, 并作为出发菌株进行构建。首先, 基因 *argA*_{H15Y} (GenBank 登录号为 AF008116) 由北京擎科生物科技股份有限公司合成^[24]。根据 Gibson 组装方法将其连接到之前研究中构建的 pENAL 载体中^[23], 从而获得过表达载体 pEALA。使用表达 λ -Red 重组系

统的 pTKRED 和作为标记基因 PCR 模板的 pKD4, 通过 PCR 产物进行重组, 敲除 ECN 基因组中 *argR* 和 *thyA* 基因。使用引物 *argR*-F、*argR*-R 和 *thyA*-F、*thyA*-R 验证 *argR* 和 *thyA* 基因的缺失。随后, 将 pEALA 电转化到 *argR* 单突变株和 *argR*、*thyA* 双突变株中, 分别命名为 EALA 和 EALA ΔthyA 。在含有 25 mg/mL 壮观霉素和 3 mmol/L 胸苷的 LB 琼脂平板上筛选菌落, 并使用验证引物 Hema-F 和 Hema-R 筛选阳性克隆。本研究中使用的所有菌株、质粒和引物分别如表 1 和表 2 所示。

工程菌在进行发酵实验时, 利用分光光度

表1 本研究使用的菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

菌株和质粒 Strain and plasmid	相关特性 Relevant properties	来源或参考 Source or reference
Strains		
<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917 (ECN)	Wild-type	Lab stock
ECN $\Delta argR::FRT$	ECN with the deletion of <i>argR</i>	This work
ECN $\Delta argR \Delta thyA::FRT$	ECN with the deletion of <i>argR</i> and <i>thyA</i>	This work
EALA	ECN $\Delta argR::FRT$ harboring pEALA	This work
EALA $\Delta thyA$	ECN $\Delta argR \Delta thyA::FRT$ harboring pEALA	This work
Plasmids		
pTKRED	pSC101 replicon ^{ts} PL- <i>gam-bet-exo</i> , <i>recA cI857</i> , Sm ^r	Lab stock
pKD4	ori _R , FRT::kan::FRT template plasmid, Kan ^r , Amp ^r	Lab stock
pCP20	pSC101 replicon ^{ts} Flp (λ Rp) cI857, Cm ^r , Amp ^r	Lab stock
pENAL	pCL1920 containing <i>hemA^M</i> (<i>S. arizona</i>) and <i>hemL</i> (<i>E. coli</i> Nissle 1917)	Lab stock
pEALA	pCL1920 containing <i>hemA^M</i> (<i>S. arizona</i>), <i>hemL</i> (<i>E. coli</i> Nissle 1917) and <i>argA_{H15Y}</i> (<i>E. coli</i> DH5 α)	This work

表2 本研究使用的引物序列

Table 2 Primers used in this study

引物名称 Primers name	引物序列 Primer sequences (5'→3')
argR-F	GGACTGCGACTTTCATCCTAAACTC
argR-R	GAGAAAGTCACCCGATATGGTGGT
thyA-F	GAAGTATGCAAAAAGTGCTCG
thyA-R	GTGGATCGTATCCTCAATC
Hema-F	ATGACCAAGAAGCTTTTAGCGCTC
Heml-R	TCACAACCTCGCAAACACC

计(岛津公司)测定 OD_{600} 值, 上清液中的葡萄糖浓度使用 SBA-40C 生物传感器(山东省科学院生物研究所)进行分析, 采用改良的 Ehrlich 试剂分析 5-ALA 浓度; 上清液中的精氨酸通过高效液相色谱仪(high performance liquid chromatograph, HPLC) (安捷伦公司)检测, 色谱柱是安捷伦 EC-C18, 所有样品和流动相在 HPLC 分析前均通过 0.22 μ m 滤膜过滤。

1.4 体外细胞实验中 5-ALA 和精氨酸的测定

非洲绿猴肾上皮细胞(Vero)、人结直肠癌细胞(HCT116)和小鼠结肠癌细胞(CT26)均购自中国科学院细胞库, 并在含有 10% 胎牛血清、

100 mg/mL 青霉素和 100 U/mL 链霉素的 DMEM 培养基中培养。细胞在 37 °C、5% CO₂ 的湿润培养箱中维持生长。

将 Vero、HCT116 和 CT26 细胞(每孔约 3 000 个细胞)接种于 96 孔板中培养 24 h, 随后用 ECN 或 EALA $\Delta thyA$ 处理。首先, 将培养 36 h 的 ECN 和 EALA $\Delta thyA$ 发酵液在 4 000 r/min 离心 5 min, 用 PBS 洗涤后重新悬浮于 DMEM 培养基中, 使其浓度为 1×10^7 CFU/mL。取 10 μ L 重新悬浮的 ECN 和 EALA $\Delta thyA$ 加入细胞中, 共同孵育培养 72 h, 同时收集 24、48、72 h 的共培养液用于检测 OD_{600} 。然后, 将所有样品离心收集上清液进行 5-ALA 和精氨酸定量分析。

1.5 对 EALA Δ thyA 进行小鼠体内实验

动物实验设计及实验方法经山东第二医科大学医学实验动物中心伦理委员会批准, 编号为 2025SDL041。雌性 BALB/c 小鼠(4 周龄)购自济南朋悦实验动物繁育有限公司, 动物生产许可证号为 SCXK(鲁) 2022-0006。小鼠在无特定病原体条件下饲养, 使用前至少饲养 3 d。将 CT26 肿瘤细胞 (5×10^5 CFU/mL) 皮下接种到 BALB/c 小鼠体内。当肿瘤平均体积达到约 0.3 cm^3 时, 将 40 只小鼠随机分为以下几组: ECN 组、EALA Δ thyA 组、抗 PD-L1 抗体组、EALA Δ thyA+抗 PD-L1 抗体组, 每组 10 只。肿瘤体积计算如公式(1)所示。

$$\text{肿瘤体积} = (\text{长} \times \text{宽}^2) / 2 \quad (1)$$

将 ECN 和 EALA Δ thyA 培养 36 h, 然后重悬于无菌 PBS 中, 使其浓度达到 1×10^7 CFU/mL。随后, 使用无菌注射器(1 mL)以 50 μ L PBS 为溶剂, 每周 2 次瘤内注射, 总共进行 8 次治疗。每 3 d 给小鼠腹腔注射 200 μ g/100 μ L PBS 的抗 PD-L1 抗体。ECN 和 EALA Δ thyA 单独注射, 或与 200 μ g 抗 PD-L1 抗体联合注射。在整个实验过程中, 这些细菌剂量下的小鼠均表现出正常的表型, 如活动能力和体重。感染 ECN 和 EALA Δ thyA 的小鼠其饮用水中添加 0.5% 葡萄糖和 25.0 mg/mL 壮观霉素, 每 2-3 d 更换 1 次, 并且每 2 d 给小鼠腹腔注射新鲜配制的 IPTG (1.0 mg/200 μ L)。处理 24 h 后, 使用激光器(长春新产业光电技术有限公司)以 660 nm 波长和 150 mW/cm^2 的光照强度对每组小鼠进行 5 min 光照。之后, 每 2 d 测量并记录肿瘤体积和体重, 将相对肿瘤体积和体重与第 1 天测量的数据进行比较。

1.6 肿瘤匀浆液制备和 CFU 计数

从 BALB/c 小鼠肿瘤模型中切除肿瘤, 放入含有 5 mL PBS 的无菌管中, 称重后通过轻柔的机械挤压进行匀浆。将肿瘤匀浆进行连续稀释, 分别接种于含有 25.0 mg/mL 壮观霉素和 3.0 mmol/L 胸苷的 LB 琼脂培养基(用于 EALA Δ thyA 培养)

或仅含 25.0 mg/mL 壮观霉素的 LB 琼脂培养基(用于对照 ECN 培养)。平板在 37°C 下孵育过夜, 随后对细菌菌落进行计数。

1.7 小鼠肿瘤组织 5-ALA 和精氨酸含量的测定

使用胰酶将切除的肿瘤样本消化 30 min, 随后 4°C 、12 000 r/min 离心 5 min, 去除不溶性物质, 上清液用于 5-ALA 检测。

取约 50 mg 肿瘤组织加入 400 μ L 75% 甲醇, 涡旋振荡 60 s。将样本在液氮中冷冻 1 min, 随后超声破碎 10 min, 重复 3 次。之后, 在冰上超声处理 30 min, 并以 17 000 r/min 离心 15 min。取上清液(1 μ L)通过 LC-MS/MS 系统(AB 公司)进行精氨酸检测, 使用 MultiQuant 3.0.3 软件分析数据。

1.8 CD3 免疫组织化学技术

使用多克隆抗 CD3 抗体对小鼠肿瘤的石蜡包埋组织样本进行瘤内 T 细胞浸润分析。组织切片脱蜡后, 使用 pH 9.0 的 EDTA 缓冲液在 98°C 水浴中进行 20 min 的抗原修复。随后使用无血清蛋白封闭液进行抗原封闭 10 min, 一抗以 1:50 稀释度孵育 1 h。切片使用生物素化的抗兔二抗孵育 30 min, 随后用 PBS 和 Tween-20 洗涤, 最后进行 DAB 显色。

1.9 利用流式细胞术检测肿瘤浸润 T 细胞

利用 2 mg/mL IV 型胶原酶和 50 U/mL DNA 酶 I 通过机械方法对肿瘤样本进行酶解处理制备单细胞悬液, 随后分别用以下抗体进行染色: APC 标记的抗小鼠 CD25 抗体、FITC 标记的抗小鼠 CD4 抗体、PE 标记的抗小鼠 FOXP3⁺ 抗体以及 PerCP 标记的抗小鼠 CD8a 抗体。使用流式细胞仪(安捷伦公司)对样本进行检测, 并用 FlowJo 软件对数据进行分析。

1.10 酶联免疫吸附测定(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)

收集经 PBS、ECN 和 EALA Δ thyA 处理的小鼠肿瘤组织, 将采集的肿瘤组织进行匀浆处

理，然后将匀浆液 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min，去除所有不溶性物质。使用 ELISA 试剂盒测定肿瘤匀浆上清液中白细胞介素-6 (IL-6) 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 的浓度。

1.11 数据分析

使用 GraphPad Prism 8 软件进行双向方差分析，并结合 Tukey 检验或 Dunnett 多重比较检验， P 值小于 0.05 被认为具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 构建 ECN 合成 5-ALA 和精氨酸

肿瘤微环境中氨代谢产物的异常积累为靶向生物合成提供了优化方向。本研究采用代谢

工程策略对 ECN 进行遗传改造，通过构建氨代谢转化通路实现 5-ALA 与精氨酸的协同合成。在前期研究中，ECN 中共表达来自沙门氏菌的 *hemA^M* 与内源性 *hemL* 能显著提高 5-ALA 的生物合成^[21]。精氨酸合成的关键第一步是在 N-乙酰谷氨酸合成酶(ArgA)的作用下将谷氨酸乙酰化。因此，本研究选择 pCL1920 质粒过表达 *hemA^M*、*hemL* 和 *argA_{H15Y}* (编码 N-乙酰谷氨酸合成酶的突变体 H15Y)，并敲除精氨酸阻遏蛋白基因 *ArgR*，进一步提高精氨酸的产量^[25]，构建工程菌株 EALA。

如图 2A、2B 所示，3 个基因在工程菌 EALA 中共表达未对工程菌的生长特性及葡萄糖

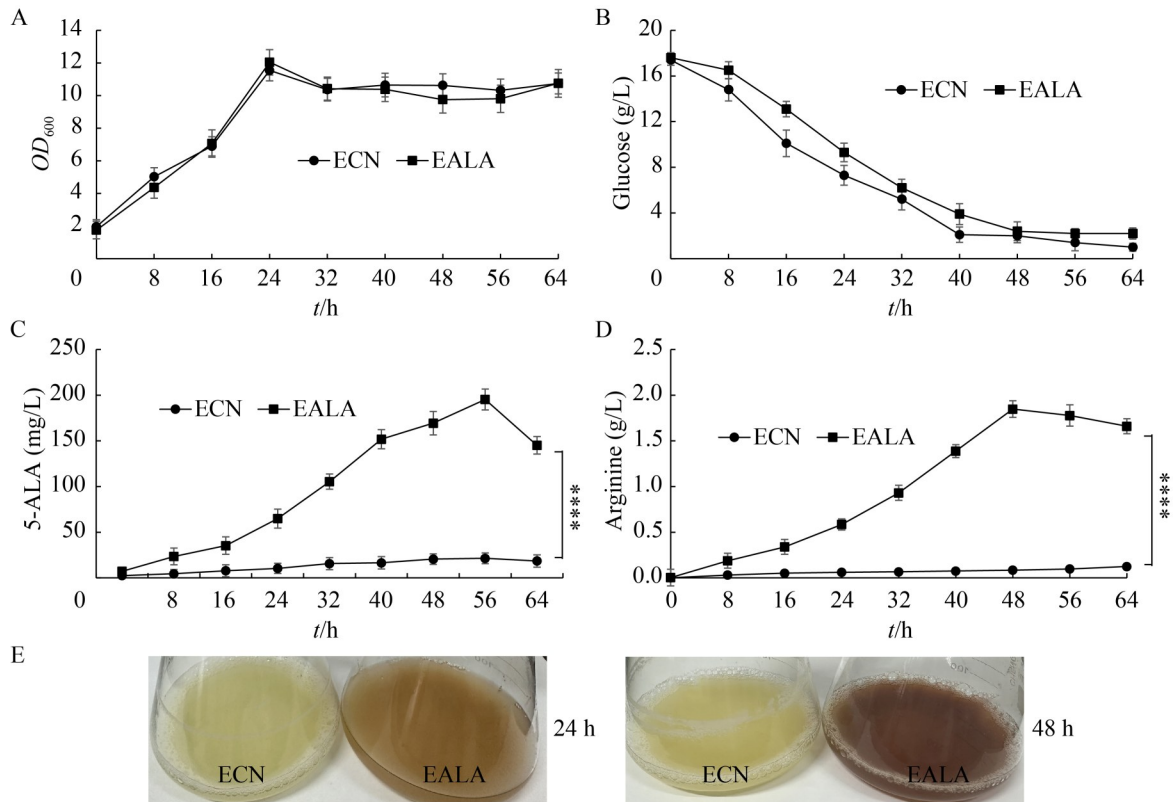


图2 ECN和EALA的发酵实验结果

Figure 2 Fermentation experiment results of ECN and EALA. A: The growth of ECN and EALA; B: The glucose consumption of ECN and EALA; C: The 5-ALA accumulation of ECN and EALA; D: The arginine accumulation of ECN and EALA; E: Color variation of ECN and EALA fermentation medium. Statistical analysis was conducted using two-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test. ****: $P < 0.0001$ ($n = 3$ per group; Each group tested in triplicate; All data were shown as mean \pm SEM).

代谢产生显著影响。与 ECN 相比, EALA 的 5-ALA 产量提高了 8.2 倍($P<0.0001$), 在 56 h 内达到(173.00 ± 11.46) mg/L; 同时, 精氨酸的积累量增加了 20 倍($P<0.0001$), 在 48 h 内达到(1.70 ± 0.09) g/L(图 2C、2D)。此外, 培养基的颜色变深(图 2E), 间接证实了卟啉类化合物及血红素在胞内富集。上述结果表明, 通过代谢通路的优化成功合成了高产量的 5-ALA 和精氨酸, 为下一步肿瘤治疗提供了基础。

2.2 提高工程菌 EALA 的肿瘤靶向能力

为了进一步提高 EALA 的肿瘤靶向能力, 本研究敲除了肿瘤细胞特异性表达的胸苷酸合成基因(*thyA*), 构建工程菌 EALA Δ *thyA*。发酵

结果显示, *thyA* 的敲除未影响 5-ALA 和精氨酸代谢途径, 产物积累水平与原始菌株保持稳定(图 3A、3B)。体外细胞共培养实验显示, EALA Δ *thyA* 在正常细胞 Vero 中呈现生长抑制($OD_{600}<0.1$), 而在 CT26 和 HCT116 肿瘤细胞中则表现出特异性增殖能力, 72 h 培养后 OD_{600} 达到 0.2(图 3C), 表明肿瘤微环境中的外源性胸苷酸可有效补偿 *thyA* 缺失的代谢缺陷。与此同时, EALA Δ *thyA* 的 5-ALA 和精氨酸在肿瘤细胞中也有一定的积累, 72 h 内分别达到 35 mg/L 和 0.25 g/L(图 3D、3E)。上述结果显示, EALA Δ *thyA* 通过代谢依赖性调控实现了肿瘤特异性定殖, 并在肿瘤细胞内高效合成 5-ALA 和精氨酸。

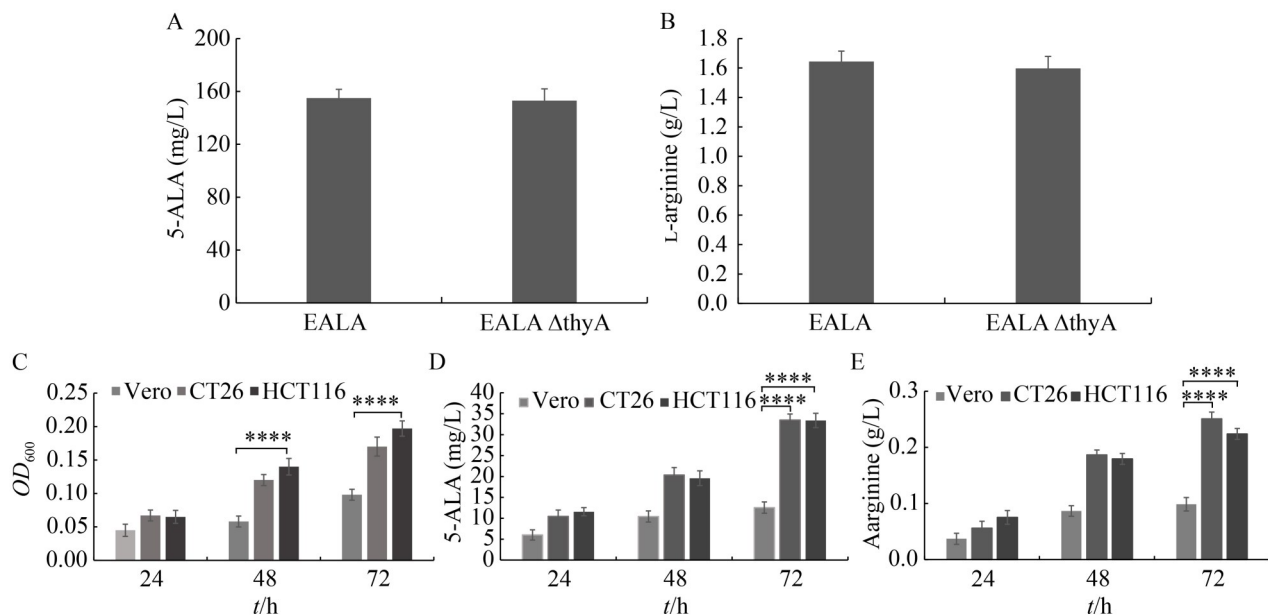


图3 工程菌EALA Δ *thyA*在发酵实验以及与Vero、CT26和HCT116共培养过程中合成5-ALA和精氨酸的情况

Figure 3 Engineered EALA Δ *thyA* producing 5-ALA and arginine during fermentation experiment and co-culture with Vero, CT26, and HCT116 cells. A: 5-ALA accumulation by fermentation experiment; B: Arginine accumulation by fermentation experiment; C: The growth of EALA Δ *thyA* co-cultured with Vero, CT26, and HCT116 cells at 24, 48, and 72 h; D: 5-ALA production of EALA Δ *thyA* co-cultured with Vero, CT26, and HCT116 cells at 24, 48, and 72 h; E: Arginine production of EALA Δ *thyA* co-cultured with Vero, CT26, and HCT116 cells at 24, 48, and 72 h. Statistical analysis was conducted using two-way ANOVA with Dunnett's multiple comparisons test. ****: $P<0.0001$ ($n=3$ per group; Each group tested in triplicate; All data were shown as mean \pm SEM).

2.3 EALA Δ thyA 在小鼠体内的抗肿瘤作用

为进一步分析 EALA Δ thyA 的抗肿瘤效应, 本研究采用 BALB/c 小鼠皮下接种 CT26 结肠癌细胞构建异种移植瘤模型。当肿瘤体积达到 0.3 cm^3 时, 通过瘤内注射途径给予 ECN 和 EALA Δ thyA 治疗。如图 4A 所示, EALA Δ thyA 在 CT26 肿瘤中的定殖情况与 ECN 几乎一致, 且具有持续性。与 ECN 处理组相比, EALA Δ

thyA 处理组肿瘤匀浆中 5-ALA 及精氨酸浓度显著升高(图 4B、4C)。通过组织切片分析发现, EALA Δ thyA 处理组肿瘤微环境中 CD3^+ T 细胞浸润密度显著高于 ECN 组及空白对照组(图 4D)。随后, 利用流式细胞术进一步证实 EALA Δ thyA 可特异性增加肿瘤浸润性 CD4^+ 和 CD8^+ T 淋巴细胞亚群比例(图 4E)。与野生型 ECN 相比, 工程菌分别诱导 CD8^+ 和 CD4^+ T 细胞浸润密度增加 2.7 倍和 1.9 倍($P < 0.0001$), 同时降低

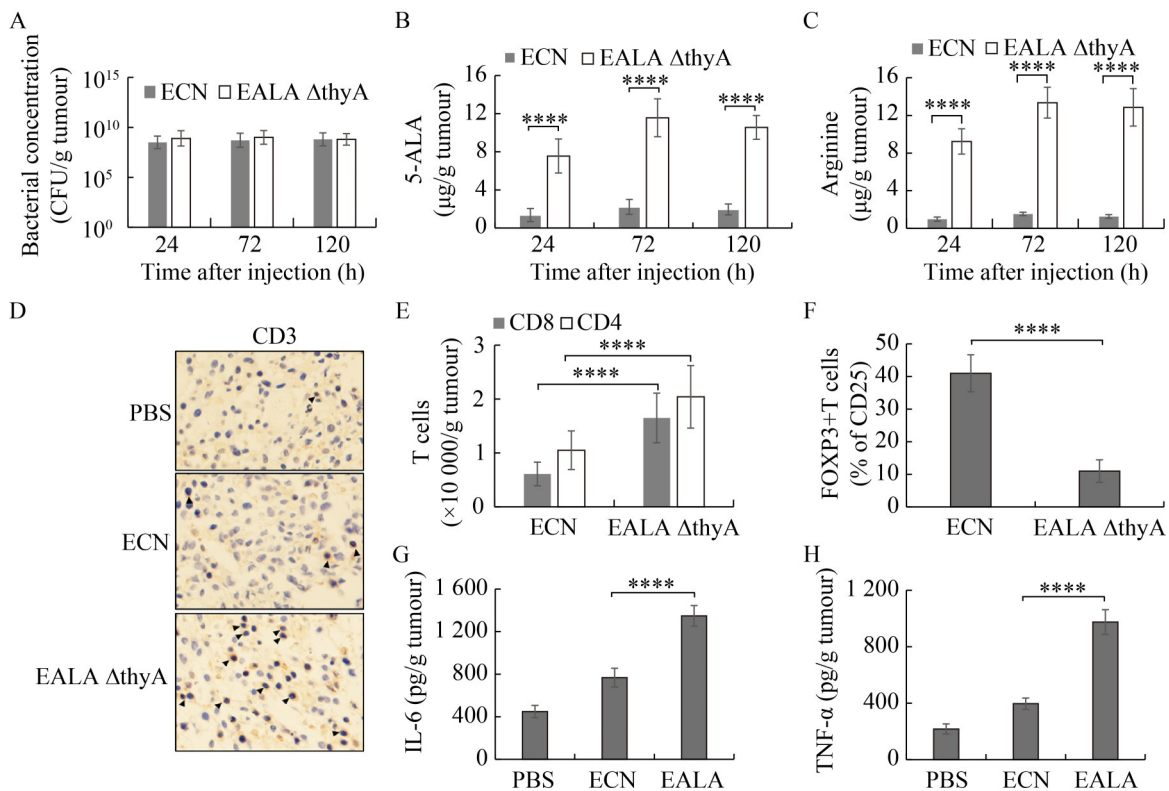


图4 EALA Δ thyA 在肿瘤组织中有效积累并产生免疫调节作用

Figure 4 EALA Δ thyA for enabling efficient tumor accumulation and causing the immunomodulatory effect. A: Five million CFU of EALA Δ thyA or ECN were injected into CT26 tumors. The tumors were collected and homogenized after 24, 72, or 120 h and bacterial abundance was measured by CFU assay; B: 5-ALA level was measured after 24, 72, or 120 h; C: Arginine level was measured after 24, 72, or 120 h; D: Detection of CD3^+ T cells in tumor tissue using immunohistochemical techniques after 72 h; E: CD4^+ and CD8^+ cells were analyzed by flow cytometry after 24 h; F: FOXP3^+ cells were analyzed by flow cytometry after 24 h; G: IL-6 in tumors was measured by ELISA kit; H: $\text{TNF-}\alpha$ in tumors was measured by ELISA kit. Statistical analysis was calculated via two-way ANOVA with Dunnett's multiple comparisons test. ****: $P < 0.0001$ ($n = 3$ per group; Each group tested in triplicate; All data were shown as mean \pm SEM).

免疫抑制性 FOXP3⁺调节性 T 细胞浸润(图 4F)。细胞因子检测结果显示, EALA Δ thyA 处理组肿瘤组织中 IL-6 和 TNF- α 分泌水平显著上调(图 4G、4H), 分别升高 1.7 倍和 2.4 倍($P<0.0001$)。上述结果提示, EALA Δ thyA 可通过调节肿瘤微环境中免疫代谢物水平及增强抗肿瘤免疫应答展现出潜在的肿瘤免疫治疗应用价值。

2.4 EALA Δ thyA 与抗 PD-L1 抗体联合给药并抑制肿瘤生长

本研究进一步探讨 EALA Δ thyA 与抗 PD-L1 免疫检查点阻断疗法的协同抗肿瘤效应。通过构建 CT26 结肠癌荷瘤小鼠模型, 实验组进行 8 次瘤内注射 EALA Δ thyA 菌液, 并联合腹腔注射抗 PD-L1 抗体; 对照组分别接受 PBS、野生型 ECN 或单一抗 PD-L1 治疗。实验结果表明, 相较于 ECN 对照组, PBS 对照组的肿瘤组织显著增大(数据未显示), 而接受 EALA Δ thyA 治疗的

小鼠平均肿瘤体积降低了 22.7% ($P<0.01$, 图 5A); 当与抗 PD-L1 抗体联用时协同效应更为显著, 肿瘤生长抑制率提升至 77.6% ($P<0.0001$, 图 5A 和 5B), 表现出显著的协同效应。此外, 除 PBS 对照组的小鼠体重显著下降(数据未显示)外, 其他各治疗组的小鼠体重始终维持稳定(图 5C), 表明 EALA Δ thyA 治疗具有良好的生物安全性。上述结果表明, EALA Δ thyA 协同抗 PD-L1 抗体可以进一步增强肿瘤抑制效果。

3 讨论与结论

本研究成功构建了一种工程化益生菌, 通过代谢工程改造实现了葡萄糖和氨(肿瘤代谢废物)向 5-ALA 及精氨酸的生物转化。该工程菌能够在肿瘤组织中正常增殖, 其原位合成的 5-ALA 和精氨酸可有效提高肿瘤微环境中 T 淋巴细胞浸润密度以及 IL-6、TNF- α 等细胞因子

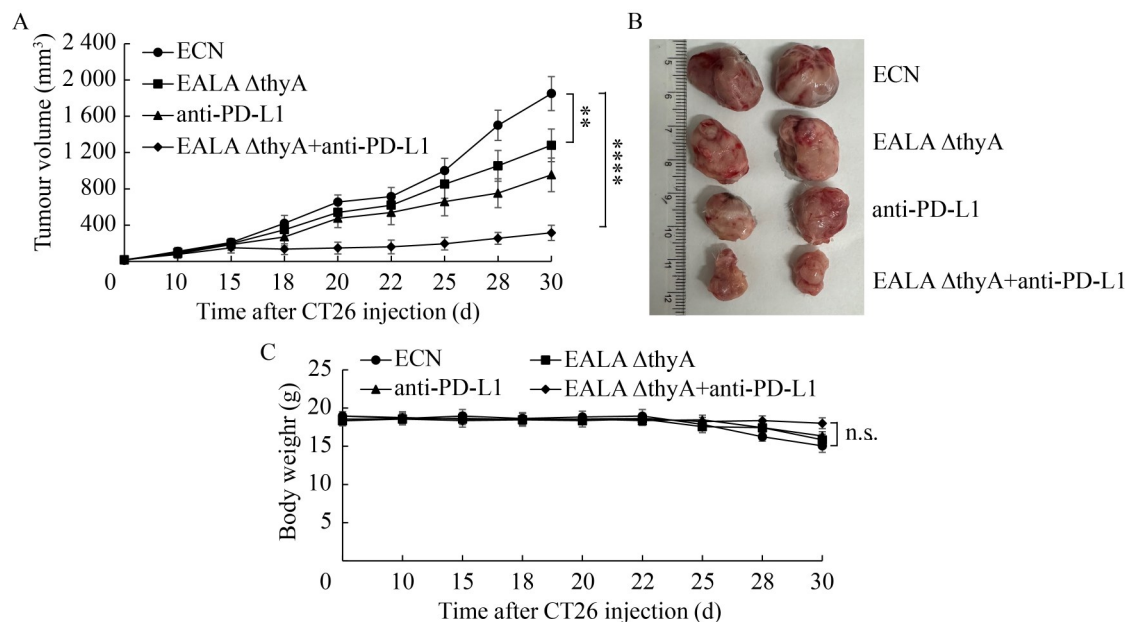


图5 EALA Δ thyA协同抗PD-L1抗体抑制CT26肿瘤组织的生长

Figure 5 EALA Δ thyA synergizing with PD-L1 blockade to promote CT26 tumor growth inhibition. A: The size of tumor tissue in mice at different times ($n=4-5$ per group. **: $P<0.01$; ****: $P<0.0001$. Two-way ANOVA with Dunnett's multiple comparisons test); B: Size of tumor tissue in mice on the 30th day; C: Body weight of mice at different times ($n=4-5$ per group. n.s.: Not significant ($P>0.05$). Two-way ANOVA with Dunnett's multiple comparisons test). All data were shown as mean \pm SEM.

水平，并与抗 PD-L1 抗体产生显著协同抗肿瘤效应。本研究将 5-ALA 介导的光动力疗法(PDT)与免疫治疗相结合，为肿瘤联合治疗提供了理论基础。

前期研究证实，ECN 中 5-ALA 通过 C5 途径从谷氨酸(TCA 循环的直接衍生物)进行生物合成^[21]。大肠杆菌中精氨酸则由谷氨酸和乙酰辅酶 A 起始，通过八步酶促反应合成，由 *argA* 编码的 N-乙酰谷氨酸合成酶是整个反应中的关键限速酶，且受到精氨酸浓度的反馈抑制^[26]；*argR* 编码的 ArgR 蛋白对精氨酸合成基因的转录具有负调控作用^[27]。因此，在 ECN 中共表达 *hemA^M*、*hemL* 和 *argA*，并敲除 *argR*，可合成高水平的 5-ALA 和精氨酸。为进一步提高工程菌的生物安全性，通过构建 *thyA* 基因缺陷型菌株实现严格的营养依赖调控。*thyA* 基因编码胸苷酸合成酶，该酶是合成脱氧胸苷单磷酸所必需的，而脱氧胸苷单磷酸进一步转化为 DNA 合成所必需的脱氧胸苷三磷酸^[28]。敲除 *thyA* 会使工程菌在缺乏外源胸苷的生理环境中无法存活，而肿瘤组织特有的胸苷富集特性则确保了菌株的特异性定殖^[8]。

研究显示，5-ALA 作为前体进入肿瘤细胞内，进一步通过血红素合成途径转化为 PpIX^[29]。PpIX 在激光照射下被激活，迅速产生游离的活性氧，进而杀死肿瘤细胞^[30]。ECN 作为益生菌本身具有多种生物学活性，如抑制肿瘤生长、调节免疫反应等。本研究基于 ECN 构建的工程菌 EALA Δ *thyA* 能够将合成的 5-ALA 和精氨酸靶向递送至小鼠的肿瘤组织。通过光动力治疗不仅增加了肿瘤浸润效应 T 淋巴细胞的数量，降低了 FOXP3⁺调节性 T 细胞的数量，而且提高了细胞因子 IL-6 和 TNF- α 的分泌水平，而细胞因子可促进抗肿瘤免疫反应。然而，单一光动力治疗本身不足以完全消除肿瘤^[31]。有报道称，光动力治疗能产生 ROS，诱导癌细胞凋亡、免疫原性细胞死亡以引发树突状细胞成熟，进而激活 CD8⁺和 CD4⁺ T 细胞^[32]；同时

产生肿瘤相关抗原，诱导强烈的适应性免疫反应，并显著增加 CD8⁺和 CD4⁺ T 细胞的表达水平^[33-34]。光动力治疗与免疫治疗的联用可能会增强抗肿瘤作用。研究表明，免疫检查点抑制剂在抑制肿瘤微环境中 T 细胞介导的抗肿瘤免疫反应中起着重要作用^[35]。PD-1/PD-L1 阻断疗法在多种恶性肿瘤(如结直肠癌 CRC)的临床治疗中取得了显著成果^[36]。当与其他治疗方法联合使用时抗肿瘤效果显著增强。在肿瘤内补充精氨酸可以提高免疫检查点抑制剂的抗肿瘤反应^[22]。本研究进一步表明，肿瘤局部精氨酸的持续供给可重塑免疫抑制微环境，增强 T 细胞介导的抗肿瘤应答。

综上所述，本研究构建的细菌递送系统为肿瘤细菌疗法提供了创新策略，主要体现在：代谢调控模块实现 5-ALA 和精氨酸原位合成；胸苷营养缺陷型设计保障生物安全性；多机制协同增强抗肿瘤免疫应答。以上研究结果为开发下一代智能型肿瘤治疗生物制剂奠定了重要基础。然而，该研究还存在不足之处，后续研究需着重解决以下关键问题：(1) 工程菌静脉给药的安全性评估；(2) 抗肿瘤免疫应答的具体分子机制解析；(3) IPTG 诱导系统的临床适用性优化可采用温度敏感型或氧气响应型启动子替代。

作者贡献声明

尹然：负责实验、数据收集、分析；林常森：实验验证、分析，撰写论文；丁小娣：负责实验，修改论文；柳晓婧：实验验证、分析；翟逸轩：数据收集、分析；于晓丽：提出概念，获取基金与提供资源，修改论文。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] HO CL, TAN HQ, CHUA KJ, KANG A, LIM KH, LING KL, YEW WS, LEE YS, THIERY JP, CHANG MW. Engineered commensal microbes for diet-mediated colorectal-cancer chemoprevention[J]. *Nature Biomedical Engineering*, 2018, 2(1): 27-37.
- [2] ZHOU SB, GRAVEKAMP C, BERMUDEZ D, LIU K. Tumour-targeting bacteria engineered to fight cancer[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2018, 18(12): 727-743.
- [3] LEVENTHAL DS, SOKOLOVSKA A, LI N, PLESCIA C, KOLODZIEJ SA, GALLANT CW, CHRISTMAS R, GAO JR, JAMES MJ, ABIN-FUENTES A, MOMIN M, BERGERON C, FISHER A, MILLER PF, WEST KA, LORA JM. Immunotherapy with engineered bacteria by targeting the STING pathway for anti-tumor immunity[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 2739.
- [4] PEDROLI DB, RIBEIRO NV, SQUIZATO PN, de JESUS VN, COZETTO DA, TUMA RB, GRACINDO A, CESAR MB, FREIRE PJC, da COSTA AFM, LINS MRCR, CORREA GG, CERRI MO. Engineering microbial living therapeutics: the synthetic biology toolbox[J]. *Trends in Biotechnology*, 2019, 37(1): 100-115.
- [5] SINGH B, MAL G, MAROTTA F. Designer probiotics: paving the way to living therapeutics[J]. *Trends in Biotechnology*, 2017, 35(8): 679-682.
- [6] WASSENAAR TM. Insights from 100 years of research with probiotic *E. coli*[J]. *European Journal of Microbiology & Immunology*, 2016, 6(3): 147-161.
- [7] GURBARI CR, ARPAIA N, DANINO T. Engineering bacteria as interactive cancer therapies[J]. *Science*, 2022, 378(6622): 858-864.
- [8] KURTZ CB, MILLET YA, PUURUNEN MK, PERREAULT M, CHARBONNEAU MR, ISABELLA VM, KOTULA JW, ANTIPOV E, DAGON Y, DENNEY WS, WAGNER DA, WEST KA, DEGAR AJ, BRENNAN AM, MILLER PF. An engineered *E. coli* Nissle improves hyperammonemia and survival in mice and shows dose-dependent exposure in healthy humans[J]. *Science Translational Medicine*, 2019, 11(475): eaau7975.
- [9] CHOWDHURY S, CASTRO S, COKER C, HINCHLIFFE TE, ARPAIA N, DANINO T. Programmable bacteria induce durable tumor regression and systemic antitumor immunity[J]. *Nature Medicine*, 2019, 25(7): 1057-1063.
- [10] YU XL, LIN CS, YU J, QI QS, WANG Q. Bioengineered *Escherichia coli* Nissle 1917 for tumour-targeting therapy[J]. *Microbial Biotechnology*, 2020, 13(3): 629-636.
- [11] CASTANO AP, MROZ P, HAMBLIN MR. Photodynamic therapy and anti-tumour immunity[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2006, 6(7): 535-545.
- [12] LOVELL JF, LIU TWB, CHEN J, ZHENG G. Activatable photosensitizers for imaging and therapy[J]. *Chemical Reviews*, 2010, 110(5): 2839-2857.
- [13] GIUNTINI F, BOURRÉ L, MacROBERT AJ, WILSON M, EGGLESTON IM. Improved peptide prodrugs of 5-ALA for PDT: rationalization of cellular accumulation and protoporphyrin IX production by direct determination of cellular prodrug uptake and prodrug metabolization[J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2009, 52(13): 4026-4037.
- [14] ALZEIBAK R, MISHCHENKO TA, SHILYAGINA NY, BALALAEVA IV, VEDUNOVA MV, KRYSKO DV. Targeting immunogenic cancer cell death by photodynamic therapy: past, present and future[J]. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 2021, 9(1): e001926.
- [15] CHEN Q, XU LG, LIANG C, WANG C, PENG R, LIU Z. Photothermal therapy with immune-adjunct nanoparticles together with checkpoint blockade for effective cancer immunotherapy[J]. *Nature Communications*, 2016, 7: 13193.
- [16] HE CB, DUAN XP, GUO NN, CHAN C, POON C, WEICHSELBAUM RR, LIN WB. Core-shell nanoscale coordination polymers combine chemotherapy and photodynamic therapy to potentiate checkpoint blockade cancer immunotherapy[J]. *Nature Communications*, 2016, 7: 12499.
- [17] HE XJ, LIN HQ, YUAN L, LI BH. Combination therapy with L-arginine and α -PD-L1 antibody boosts immune response against osteosarcoma in immunocompetent mice[J]. *Cancer Biology & Therapy*, 2017, 18(2): 94-100.
- [18] ZHAO ZQ, CAI MM, LIU YR, HU MK, YANG FY, ZHU RS, XU MJ, RAO ZM. Genomics and transcriptomics-guided metabolic engineering *Corynebacterium glutamicum* for l-arginine production[J]. *Bioresource Technology*, 2022, 364: 128054.
- [19] CANALE FP, BASSO C, ANTONINI G, PEROTTI M, LI N, SOKOLOVSKA A, NEUMANN J, JAMES MJ, GEIGER S, JIN WJ, THEURILLAT JP, WEST KA, LEVENTHAL DS, LORA JM, SALLUSTO F, GEIGER R. Metabolic modulation of tumours with engineered bacteria for immunotherapy[J]. *Nature*, 2021, 598(7882): 662-666.
- [20] MAJUMDAR R, BARCHI B, TURLAPATI SA, GAGNE M, MINOCHA R, LONG S, MINOCHA SC. Glutamate, ornithine, arginine, proline, and polyamine metabolic interactions: the pathway is regulated at the post-transcriptional level[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 78.
- [21] CHEN JH, LI XH, LIU YM, SU TY, LIN CS, SHAO LJ, LI LH, LI WW, NIU GY, YU J, LIU L, LI MM, YU XL, WANG Q. Engineering a probiotic strain of *Escherichia coli* to induce the regression of colorectal cancer through production of 5-aminolevulinic acid[J]. *Microbial Biotechnology*, 2021, 14(5): 2130-2139.
- [22] GEIGER R, RIECKMANN JC, WOLF T, BASSO C, FENG YH, FUHRER T, KOGADEEVA M, PICOTTI P, MEISSNER F, MANN M, ZAMBONI N, SALLUSTO F, LANZAVECCHIA A. L-arginine modulates T cell metabolism and enhances survival and anti-tumor activity[J]. *Cell*, 2016, 167(3): 829-842.e13.
- [23] YU XL, JIN HY, LIU WJ, WANG Q, QI QS. Engineering *Corynebacterium glutamicum* to produce 5-aminolevulinic acid from glucose[J]. *Microbial Cell*

- Factories, 2015, 14(1): 183.
- [24] RAJAGOPAL BS, 3RD JD, TUCHMAN M, MALAMY MH. Use of inducible feedback-resistant N-acetylglutamate synthetase (*argA*) genes for enhanced arginine biosynthesis by genetically engineered *Escherichia coli* K-12 strains[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(5): 1805-1811.
- [25] WANG HD, XU JZ, ZHANG WG. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for efficient production of L-arginine[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2022, 106(17): 5603-5613.
- [26] SHI DS, ALLEWELL NM, TUCHMAN M. The N-acetylglutamate synthase family: structures, function and mechanisms[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16(6): 13004-13022.
- [27] GINESY M, BELOTSERKOVSKY J, ENMAN J, ISAKSSON L, ROVA U. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for enhanced arginine biosynthesis[J]. *Microbial Cell Factories*, 2015, 14: 29.
- [28] STEIDLER L, NEIRYNCK S, HUYGHEBAERT N, SNOECK V, VERMEIRE A, GODDEERIS B, COX E, REMON JP, REMAUT E. Biological containment of genetically modified *Lactococcus lactis* for intestinal delivery of human interleukin 10[J]. *Nature Biotechnology*, 2003, 21(7): 785-789.
- [29] HINO H, MURAYAMA Y, NAKANISHI M, INOUE K, NAKAJIMA M, OTSUJI E. 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy using light-emitting diodes of different wavelengths in a mouse model of peritoneally disseminated gastric cancer[J]. *Journal of Surgical Research*, 2013, 185(1): 119-126.
- [30] GUO ZX, ZHOU XH, HOU C, DING ZY, WEN CC, ZHANG LJ, JIANG BP, SHEN XC. A chloroplast-inspired nanoplatform for targeting cancer and synergistic photodynamic/photothermal therapy[J]. *Biomaterials Science*, 2019, 7(9): 3886-3897.
- [31] CAO YT, WANG KQ, ZHU PY, ZOU XW, MA GQ, ZHANG WX, WANG DQ, WAN JP, MA YL, SUN X, DONG J. A near-infrared triggered upconversion/MoS₂ nanoplatform for tumour-targeted chemo-photodynamic combination therapy[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2022, 213: 112393.
- [32] HOU YJ, YANG XX, LIU RQ, ZHAO D, GUO CX, ZHU AC, WEN MN, LIU Z, QU GF, MENG HX. Pathological mechanism of photodynamic therapy and photothermal therapy based on nanoparticles[J]. *International Journal of Nanomedicine*, 2020, 15: 6827-6838.
- [33] YANG GB, XU LG, CHAO Y, XU J, SUN XQ, WU YF, PENG R, LIU Z. Hollow MnO₂ as a tumor-microenvironment-responsive biodegradable nanoplatform for combination therapy favoring antitumor immune responses[J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 902.
- [34] YANG WJ, ZHU GZ, WANG S, YU GC, YANG Z, LIN LS, ZHOU ZJ, LIU YJ, DAI YL, ZHANG FW, SHEN ZY, LIU Y, HE ZM, LAU J, NIU G, KIESEWETTER DO, HU S, CHEN XY. *In situ* dendritic cell vaccine for effective cancer immunotherapy[J]. *ACS Nano*, 2019, 13(3): 3083-3094.
- [35] MASUGI Y, NISHIHARA R, YANG JH, MIMA K, da SILVA A, SHI Y, INAMURA K, CAO Y, SONG MY, NOWAK JA, LIAO XY, NOSHO K, CHAN AT, GIANNAKIS M, BASS AJ, HODI FS, FREEMAN GJ, RODIG S, FUCHS CS, QIAN ZR, OGINO S. Tumour CD274 (PD-L1) expression and T cells in colorectal cancer[J]. *Gut*, 2017, 66(8): 1463-1473.
- [36] UGAI T, ZHAO M, SHIMIZU T, AKIMOTO N, SHI SS, TAKASHIMA Y, ZHONG R, LAU MC, HARUKI K, ARIMA K, FUJIYOSHI K, LANGWORTHY B, MASUGI Y, da SILVA A, NOSHO K, BABA Y, SONG MY, CHAN AT, WANG ML, MEYERHARDT JA, et al. Association of PIK3CA mutation and PTEN loss with expression of CD274 (PD-L1) in colorectal carcinoma[J]. *Oncology*, 2021, 10(1): 1956173.