

减毒沙门氏菌 VNP20009 的抗肿瘤机制研究

尹 特¹, 刘丽娜², 董世达¹, 黄宝莲¹, 李晨阳², 曹志婷^{1*}, 华子春^{1,2,3*}

(1. 中国药科大学生物药物学院, 江苏 南京 211198; 2. 南京大学生命科学学院, 医药生物技术国家重点实验室, 江苏 南京 210033; 3. 江苏省产业技术研究院医药生物技术研究所, 江苏 常州 213164)

摘要: 减毒沙门氏菌 VNP20009 是一种应用范围较广的天然来源溶瘤细菌, 基于其已证实的临床安全性、可特异性趋化靶向肿瘤和明确已知的基因组序列等优点而被广泛用于抗肿瘤研究。本研究建立黑色素瘤小鼠模型 (所有动物实验均遵循中国药科大学动物伦理委员会的规定), 通过腹腔注射 VNP20009 对其抗肿瘤活性进行验证, 与对照组相比, VNP20009 治疗可显著抑制肿瘤生长; 体外共培养实验证明 VNP20009 能够诱导巨噬细胞向 M1 表型极化并表达相关炎症因子; 通过流式细胞实验分析肿瘤和肿瘤引流淋巴结 (tumor-draining lymph node, TDLN) 内免疫变化, 证明 VNP20009 治疗诱导肿瘤组织免疫细胞增加, 进一步分析发现肿瘤引流淋巴结内 T 细胞浸润增加, 而 VNP20009 治疗能够诱导肿瘤内部的 CD4⁺ T 和 CD8⁺ T 细胞活化。本研究结果证明, VNP20009 可通过诱导巨噬细胞向 M1 表型极化, 招募并激活细胞毒性 T 细胞, 协同其自身组分, 共同抑制小鼠体内黑色素瘤的生长。

关键词: VNP20009; 黑色素瘤; 巨噬细胞; 肿瘤引流淋巴结; 细胞毒性 T 细胞

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)09-2700-07

Research on anti-tumor mechanism of attenuated *Salmonella typhimurium* VNP20009

YIN Te¹, LIU Li-na², DONG Shi-da¹, HUANG Bao-lian¹, LI Chen-yang²,
CAO Zhi-ting^{1*}, HUA Zi-chun^{1,2,3*}

(1. School of Biopharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China; 2. The State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, College of Life Sciences, Nanjing University, Nanjing 210033, China; 3. Institute of Pharmaceutical Biotechnology of Jiangsu Industrial Technology Research Institute, Changzhou 213164, China)

Abstract: Attenuated *Salmonella typhimurium* VNP20009 is a widely used natural oncolytic bacterium, which has great application potential given its unique characteristics, including clinical safety, tumor targeting specificity, and explicit genome sequence. Here, we show that tumor progression can be effectively reduced by intraperitoneal administration with VNP20009 in a mouse model of melanoma (all animal experiments were conducted in accordance with the Animal Ethics Committee of China Pharmaceutical University); co-culture experiment *in vitro* demonstrated that VNP20009 can induce the polarization of macrophage M1, accompanied by expression of inflammation-related factors; flow cytometry analysis showed that VNP20009 induced the increase of immune cell infiltration in tumor. Further analysis showed that T cells infiltration in tumor-draining lymph node (TDLN) increased, and VNP20009 induced the activation of CD4⁺ T cells and CD8⁺ T cells in tumor. Our results demonstrate that VNP20009 treatment significantly inhibited melanoma tumors by remodeling tumor-associated

收稿日期: 2023-03-28; 修回日期: 2023-05-13.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (32250016, 82130106); 南京市生命健康科技专项计划 (202110016); 常州市科技局 (CZ20210010, CJ20210024, CJ20220019).

*通讯作者 Tel: 13814039758, E-mail: 1020192596@cpu.edu.cn;

Tel: 13170153150, E-mail: 1620204641@cpu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-0376

macrophages to an M1-like phenotype, as well as recruiting and activating cytotoxic T cells, combined with its own antigenic activity to exert anti-tumor immunity.

Key words: VNP20009; melanoma; macrophage; tumor-draining lymph node; cytotoxic T cell

实体瘤具有血管异常增生及局部组织缺氧坏死等特征^[1,2], 该微环境适合专性或兼性厌氧菌的定植与生长, 如链球菌、梭状芽孢杆菌、双歧杆菌、沙门氏菌、大肠杆菌和李斯特菌等^[3]。这些细菌能够在肿瘤组织内富集并增殖, 数量可达肝脏或脾脏等组织内部的1 000多倍^[4]。其中, 鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*) 由于其易于培养及遗传操作的特点, 目前已被广泛研究。鼠伤寒沙门氏菌可以在有氧和无氧条件下生长, 因此能够在各种实体肿瘤组织中定植。为了提高治疗效果, 细菌治疗策略被开发与放疗和化疗相结合^[5], 或者设计通过细菌传递抗癌药物分子^[6]。除了作为抗肿瘤治疗药物的传递系统, 它还具有内在的抗肿瘤作用, 这在很大程度上归因于其免疫调节活性。

研究表明, 沙门氏菌的抗肿瘤能力与其免疫激活能力相关: 沙门氏菌自身的固有免疫组分如鞭毛蛋白和脂多糖可以通过宿主的固有免疫系统, 招募免疫细胞和细胞因子直接杀死肿瘤细胞^[7]。除此之外, 沙门氏菌还可以诱导针对细菌定植和肿瘤细胞的固有免疫和适应性免疫应答^[8]。静脉注射鼠伤寒沙门氏菌能有效刺激免疫系统, 导致全身性促炎细胞因子如白细胞介素 1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、白细胞介素 18 (interleukin-18, IL-18)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor alpha, TNF- α) 和干扰素 γ (interferon gamma, IFN- γ) 的产生增加, 并引起先天和适应性免疫细胞的激活^[9]。

VNP20009 (以下简称 VNP) 是一种减毒鼠伤寒沙门氏菌菌株, 与野生型相比, VNP 具有更加优良的安全性。其中 *msbB* 突变株诱导产生的 TNF- α 水平显著降低, 减少 TNF- α 引起的感染性休克的风险。同时, 为了提高肿瘤特异性定植能力, 进一步敲除了 VNP 的 *purI* 基因, 使其更易于在高嘌呤的环境中定植和扩增^[10,11], 如肿瘤组织。因此, VNP 在肿瘤内的富集数量较肝脏等主要器官高出 100~1 000 倍^[12], 而传统的抗肿瘤药物递送体系即使引入肿瘤靶向基因也只有不到总量 1% 的药物富集于肿瘤, 高达 80% 的药物滞留在肝肾等器官^[13]。基于此, VNP 已在多种动物肿瘤模型和癌症患者 I 期临床试验中展开广泛研究, 包括黑色素瘤^[14]、乳腺癌^[15]和结肠癌^[16]。

为了进一步探究 VNP 的抗肿瘤机制, 本研究建立黑色素瘤 (B16F10) 小鼠肿瘤模型, 分析 VNP20009 对于黑色素瘤的治疗效果及免疫机制, 旨在为 VNP 的基

因工程改造及其抗肿瘤临床研究提供理论依据。

材料与方法

试剂和材料 蛋白胨 (3256061) 和酵母提取物 (4333726-02) 购自英国 Oxoid 公司; NaCl (2208281) 购自广东西陇科学股份有限公司; 硫酸卡那霉素 (#D2117220) 购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 大肠杆菌脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS, AC11974) 购自上海吉至生化科技有限公司; 细胞因子 IL-4 (400-04) 购自美国 PeproTech 公司; DMEM (KGM12800-500) 和 1640 高糖培养基 (KGM31800-500) 购自南京凯基生物科技发展有限公司; 青霉素-链霉素 (P3203300) 购自上海翌圣生物科技有限公司; 胎牛血清 (10099141C) 购自美国 Gibco 公司; 六孔板 (220811-074-B) 购自广州洁特生物过滤有限公司; real-time qPCR 引物由上海生工生物工程有限公司合成; 氧化锆陶瓷球 (0.4~0.6 mm) 购自湖州雄盛研磨有限公司; 总 RNA 抽提试剂 TRIzol (Total RNA Extraction Reagent, 7F632K2)、cDNA 逆转录试剂盒 (7E601K2) 和 qPCR 试剂盒 One Step RT-qPCR SYBR Green Kit (Q221-01) 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 流式抗体购自美国 BD 公司; 其他试剂均为市售分析纯。

实验仪器 实时荧光定量 PCR 仪 (A28567, 美国应用生物系统公司); 超纯水仪 (Milli-Q, IQ 70055, 美国密理博公司); 高压灭菌锅 (GR85DA, 美国致微仪器); 恒温培养箱 (HDPF-150, 美国赛默飞世尔科技公司); 组织匀浆机 (Scientz-48, 宁波新芝生物科技有限公司); 倒置荧光显微镜 (Vert.A1, 德国蔡司公司); 流式细胞仪 (BD Accuri C6 plus, 美国 BD Biosciences 公司); 酶标仪 (H1MF, 美国 BioTek 公司)。

细菌培养 本研究所用的减毒沙门氏菌 VNP20009 由南京大学生命科学学院构建保存。在治疗前细菌提前划线涂布至含有 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 卡那霉素的 LB 固体培养基, 并挑取单菌落隔夜培养。通过在 600 nm 处测量 A 值 [$1 A = 4 \times 10^8$ 菌落形成单位 (CFU)] 来确定细菌数量。将生长至对数生长期 ($A = 0.6 \sim 0.8$) 的 VNP 调整到所需数量并在无菌 PBS 中洗涤 3 次。

细胞培养 小鼠黑色素瘤细胞 B16F10 和小鼠巨噬细胞 RAW264.7 来自 ATCC 公司并由中国药科大学生物药物学院保存。RAW264.7 使用添加 10% 胎牛血

清和1%双抗的DMEM,在95%湿度和5%CO₂的条件下培养,细胞生长至70%及以上时,将半贴壁细胞吹打重悬并进行细胞传代;B16F10使用添加10%胎牛血清和1%双抗的RPMI1640,在95%湿度和5%CO₂的条件下培养,细胞生长至80%及以上时,使用胰酶消化2 min,重悬并进行细胞传代。

小鼠黑色素瘤移植实验及治疗 雌性SPF级C57BL/6J小鼠(17~19 g,6~8周龄),购自上海必凯科翼生物科技有限公司,许可证编号:SCXK(沪)2018-0006,合格证编号:20180006048738。小鼠被饲养在25±2℃的恒温条件下,保持12 h光-暗循环,自由饮用食物和水,在实验前饲养至少7天。本研究中动物福利和实验过程均遵循中国药科大学动物伦理委员的相关规定,并按照美国国立卫生研究院指南进行。小鼠随机分为2组,每组5只^[17]。首先使用29 G针头于C57BL/6J小鼠前肢腋窝皮下注射黑色素瘤B16F10细胞(每只小鼠2×10⁵个细胞),植瘤4天后,将PBS稀释的VNP经腹腔注射,每只小鼠注射剂量为1×10⁶ CFU,并在第14天解剖小鼠取各脏器分析。

巨噬细胞极化实验 6孔板内将生长至70%~80%的RAW264.7细胞用无菌PBS清洗3次,对照组分别用含LPS(200 ng·mL⁻¹)或IL-4(40 ng·mL⁻¹)的DMEM完全培养基孵育24 h;无菌PBS清洗3次,实验组用含VNP(1×10⁵ CFU·mL⁻¹)的DMEM完全培养基孵育8 h;全部细胞用无菌PBS清洗3次后,更换DMEM完全培养基孵育4 h,于镜下观察细胞形态变化。对于qPCR实验,LPS和IL-4浓度分别为100和10 ng·mL⁻¹,其他处理方式相同,诱导结束后提取细胞RNA。

实时荧光定量PCR 分别制备肿瘤组织和巨噬细胞样本,将肿瘤组织剪碎并加入氧化锆陶瓷球和1 mL TRIzol溶液,在组织匀浆机中70 Hz,90 s匀浆破碎。室温放置5 min,加入200 μL氯仿剧烈震荡45 s,4℃放置5 min,再室温放置10 min。离心(12 000 r·min⁻¹,15 min,4℃)后,吸取上层水相于无核酶EP管中,加入等体积的异丙醇,混匀后-20℃放置10 min。离心(12 000 r·min⁻¹,10 min,4℃)后弃去上清,每管加1 mL 75%乙醇重悬沉淀,室温静置15 min。离心(7 500 r·min⁻¹,5 min,4℃)后弃去上清,室温静置并晾干乙醇,加入适量的DEPC水[用焦炭酸二乙酯(diethyl pyrocarbonate, DEPC)处理后经高温高压灭菌的超纯水]溶解,用酶标仪检测其浓度和纯度;根据逆转录试剂盒配置反应体系,反应程序:98℃,5 min,37℃,15 min,将得到的cDNA保存于-20℃;根据qPCR试剂盒检测mRNA相对表达量,反应程序:95℃

预变性5 min;95℃变性10 s,60℃退火30 s,循环扩增40次;95℃,15 s;60℃,60 s;95℃,15 s;对于细胞样品,不需要匀浆,直接加入TRIzol,方法同上。引物于表1中列出。

Table 1 The primer sequence of RT-qPCR. TNF- α : Tumor necrosis factor alpha; IFN- γ : Interferon gamma; IL: Interleukin; GZMB: Granzyme B; INOS: Inducible nitric oxide synthase; CCL2: C-C motif chemokine ligand 2

Primer	Sequence (5'-3')
m-TNF- α -F	ACTGAACTTCGGGGTGATCG
m-TNF- α -R	TCCACTTGGTGGTTTGTGAGT
m-IFN- γ -F	CGCTACACACTGCATCTTGG
m-IFN- γ -R	TTCATGTCACCATCCTTTTGCC
m-IL-2-F	TCTGCGGCATGTTCTGGATT
m-IL-2-R	TGTGTTGTCAGAGCCCTTTAGT
m-GZMB-F	AGGAGAAGACCCAGCAAGTC
m-GZMB-R	CTCTTGGCCTTACTCTTCAGCTTTA
m-INOS-F	CTAGTGAAGCAAAGCCCAACA
m-INOS-R	CCTCACATACTGTGGACGGG
m-CCL2-F	CACTCACCTGCTGCTACTCA
m-CCL2-R	GCTTGGTGACAAAACTACAGC

流式细胞实验 将肿瘤、脾脏和肿瘤引流淋巴结(tumor-draining lymph node, TDLN)剪碎并研磨,将研磨液通过200目尼龙网过滤至15 mL离心管中。吸取10 μL细胞悬液,混匀后计数。离心(3 000 r·min⁻¹,5 min,4℃)收集细胞,分别用1 mL PBA(0.5% BSA溶于PBS)重悬细胞,于冰上封闭30 min。离心后分别用100 μL抗体混合液(根据说明书用PBS稀释抗体)重悬细胞,使用购自美国Invitrogen公司的APC anti-mouse CD45(#17-0451-83)和购自美国BD Pharmingen公司的PE/Cyanine7 anti-mouse CD4(#552775)、PE anti-mouse CD3(#553063)、FITC anti-mouse CD69(#557392)、PerCP/Cyanine5.5 anti-mouse CD69(#557392)对单细胞进行染色,于冰上避光孵育30 min。通过流式细胞仪检测免疫细胞,结果通过Flow Jo VX软件进行分析。

统计学分析 使用GraphPad 8.0软件进行数据分析。所有数据均使用平均值±标准差表示;比较两组数据时,采用Student's *t*-test检验;比较多组数据时,采用在one-way ANOVA检验;所有统计分析中ns代表着没有统计学差异,*P*<0.05代表有统计学差异。

结果

1 VNP抑制B16F10黑色素瘤原位生长

通过B16F10原位模型评估VNP的体内抗肿瘤效果,根据图1A流程进行造模及治疗。将2×10⁵个小鼠B16F10黑色素瘤细胞悬液经皮下注射接种至C57BL/6J

小鼠腋下建立肿瘤。以 PBS 为对照, 在植瘤 4 天后腹腔注射稀释后 (每只小鼠 1×10^6 CFU) 的 VNP, 通过监测治疗后小鼠的体重及肿瘤大小变化评估 VNP 的体内抗肿瘤效果。并在第 14 天解剖小鼠, 取各脏器样本进行后续分析。结果显示, VNP 治疗后小鼠皮下肿瘤体积发展变缓, 且随时间延长, 对照组和治疗组肿瘤体积差异变大, VNP 治疗组有效抑制肿瘤体积的增长 (图 1B、C)。在治疗结束时, VNP 组小鼠的肿瘤重量仅为对照组的 1/5, 显示出明显的肿瘤杀伤能力。

VNP 的抗肿瘤效果与其免疫激活能力相关, 体内注射后会引起宿主的急性炎症反应。在腹腔注射 VNP 后监测小鼠体重, 可以发现注射后几天内小鼠体重快速下降, 之后缓慢恢复 (图 1D)。治疗 10 天后解剖小鼠取各脏器, VNP 治疗组虽然明显抑制了肿瘤的发展, 但导致小鼠的肝脾肿大 (图 1B、E), 结合体重变化, 表明腹腔注射 VNP 会引起宿主的毒性反应, 一定程度上限制了 VNP 的应用前景。为了解 VNP 的抗肿瘤机制用于指导菌株改造和临床应用, 随后研究了 VNP 对于肿瘤免疫微环境的影响。

2 VNP 体外诱导巨噬细胞向 M1 表型极化

VNP 的抗肿瘤效果与其诱导激活宿主固有免疫能力相关, 其中, 作为固有免疫的主要成分, 巨噬细胞具有强大的抗原提呈能力^[18], 典型的 M1 细胞是 I 型反应中的效应细胞, 它能杀伤微生物和肿瘤细胞, 分泌大量炎症因子, 启动机体抗肿瘤免疫。为探究 VNP 的免

疫激活能力, 通过体外共培养诱导小鼠巨噬细胞 RAW264.7 极化。与对照组 (未极化的 PBS 处理组) 相比, M1 型巨噬细胞 (LPS 组) 发生形态学变化, 表现为轴突细而长, 出现伪足; 而 M2 型巨噬细胞 (IL-4 组) 轴突短而小^[19], 呈椭圆形 (图 2)。将巨噬细胞与 VNP 共培养后, 细胞呈现 M1 型形态学变化。

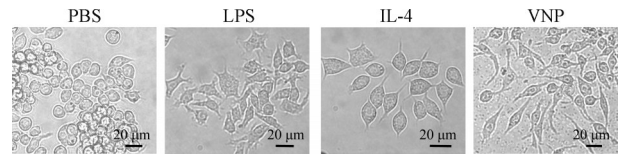


Figure 2 Representative images of RAW264.7 cells under different treatment conditions. RAW264.7 cells were co-cultured with PBS, lipopolysaccharide (LPS, $200 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) and interleukin-4 (IL-4, $40 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) for 24 h, co-cultured with VNP ($1 \times 10^5 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$) for 8 h (scale bar, $20 \mu\text{m}$)

通过 RT-qPCR 进一步检测巨噬细胞极化相关标志物转录水平, 结果表明, VNP 共培养组 TNF- α 、一氧化氮合成酶 (inducible nitric oxide synthase, INOS) 和趋化因子配体 2 (C-C motif chemokine ligand 2, CCL2) 水平 (M1 极化标志物) 明显升高 (图 3), 即 VNP 可诱导巨噬细胞向 M1 表型极化, 增强肿瘤抗原识别能力激活宿主免疫系统, 协同其自身组分共同发挥抗肿瘤效果。

3 VNP 诱导炎症因子表达及 T 细胞活化

巨噬细胞能够将抗原呈递给细胞毒性 T 细胞, 并

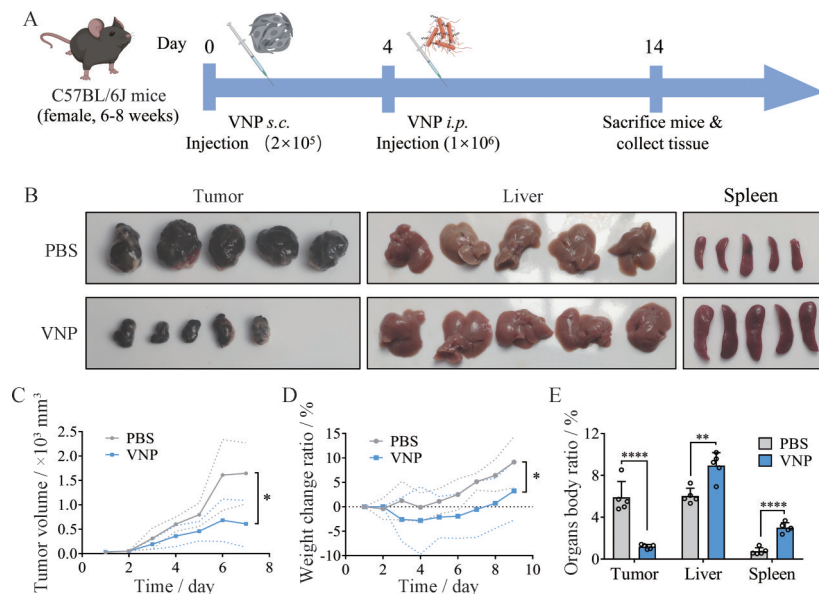


Figure 1 VNP20009 (VNP) treatment suppresses tumor xenograft growth *in vivo*. A: Overall procedures to establish B16F10-C57BL/6 subcutaneous tumor model. Cancer cell inoculation was followed by treatment with VNP or PBS; B: Comparison of tumor, liver and spleen from the tumor-bearing mice; C: The tumor volume of the mice treatment with VNP or PBS was monitored; D: The curves of the mice body weight were recorded every day; E: Organ body weight index of the tumor-bearing mice. $n = 5$, $\bar{x} \pm s$ (analyzed by unpaired two-tailed Student's *t*-test). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$

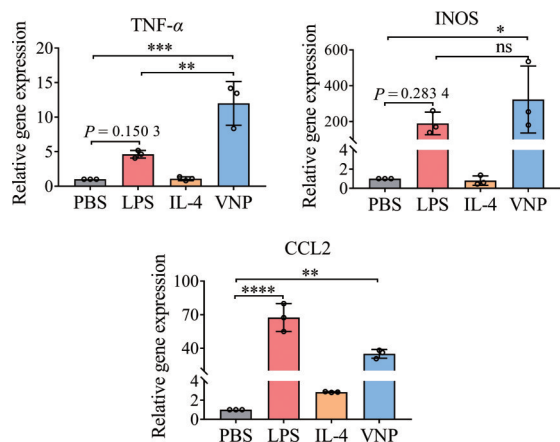


Figure 3 RT-qPCR detection of the levels of M1 markers (TNF- α , iNOS and CCL2) in RAW264.7 in co-culturing system. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$ (analyzed by one-way ANOVA). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$. ns: Not significant

通过细胞毒性T细胞杀伤肿瘤。通过RT-qPCR分析肿瘤部位和TDLN内相关基因表达,结果显示,VNP治疗后,肿瘤组织内细胞毒性T细胞介导分泌的炎症细胞因子(TNF- α 、IFN- γ 和IL-2)和颗粒酶B(granzyme B, GZMB)表达水平升高,表明T细胞功能激活(图4)。GZMB来自细胞毒性T细胞释放的细胞浆颗粒,含有包括穿孔蛋白在内的蛋白酶原,能够引起肿瘤细胞凋亡^[20]。相比之下,TDLN内的升高幅度更大,提示发挥抗肿瘤活性的T细胞主要来自TDLN。

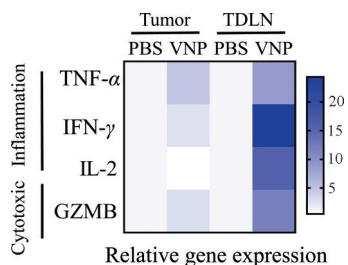


Figure 4 RT-qPCR detection of the levels of TNF- α , IFN- γ , IL-2 and GZMB in tumor and tumor-draining lymph node (TDLN) ($n = 3$)

通过流式细胞实验检测免疫变化,结果显示,VNP治疗引起肿瘤组织中免疫细胞(CD45⁺细胞)浸润增加(图5A),但并没有引起T细胞(CD3⁺CD45⁺细胞)数量的明显变化。与RT-qPCR结果一致,T细胞的浸润增加主要发生在TDLN(图5B),表明循环系统内的T细胞被招募至TDLN。TDLN是肿瘤免疫逃逸及转移的关键部位^[21],TDLN中T细胞的增加不但能够抑制原发肿瘤的生长,还能够有效预防肿瘤的复发和转移。进一步分析发现,虽然肿瘤组织和TDLN中CD4⁺T细胞和CD8⁺T的比例没有显著改变(图5C、D),但是经过VNP刺激后,T细胞被大量激活(CD69阳性),肿瘤

组织中活化的细胞毒性T细胞达到对照组的8.0倍(图5E、F)。脾脏是免疫细胞受抗原刺激后增殖和分化的主要场所,VNP治疗后脾脏内细胞毒性T细胞的数量和活化程度均得到显著增加(图5F、G)。结合RT-qPCR及动物实验表明,VNP治疗能够诱导肿瘤部位巨噬细胞向M1表型极化并吞噬肿瘤细胞,随后巨噬细胞进入TDLN招募并呈递抗原至T细胞,诱导细胞毒性T细胞活化并释放炎症因子激活宿主免疫系统,接着进入肿瘤组织发挥抗肿瘤作用。

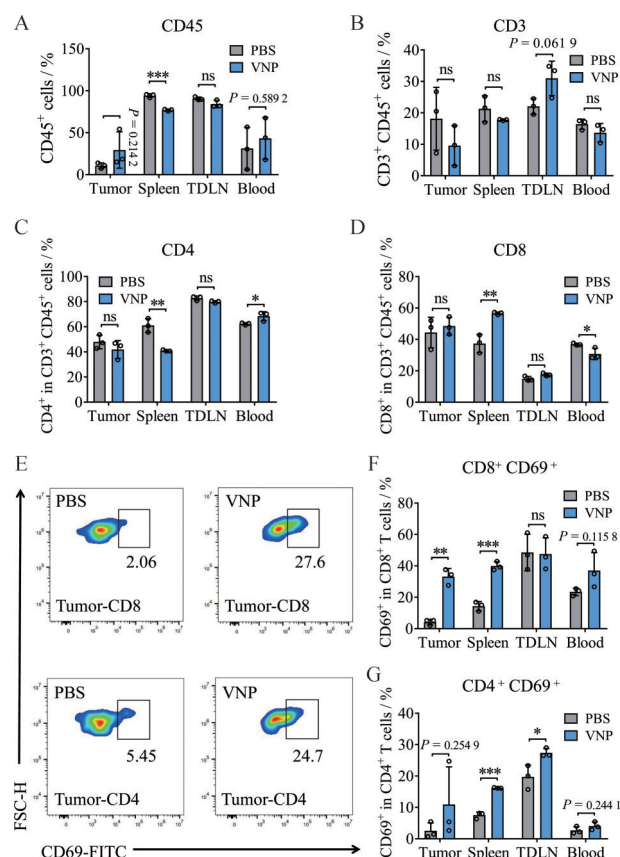


Figure 5 VNP treatment promotes the activation of CD8⁺ T cells in the tumor environment. Flow cytometry detecting the levels of T cell markers in tumor, spleen, TDLN and blood. A: CD45 staining was used to determine leukocyte; B: CD3 staining was used to determine T cells; C, D: CD4 and CD8 staining was used to differentiate T cells; E: CD69 staining was used to determine CD4⁺ and CD8⁺ T cells activation, and the quantification graph show in F, G. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

讨论

VNP20009(以下简述为VNP)是一种天然来源减毒鼠伤寒沙门氏菌菌株,与野生型相比,VNP具有良好的安全性。基于其可特异性趋化靶向肿瘤和基因组序列明确等优点,VNP已在多种动物肿瘤模型和癌症患者I期临床试验中展开广泛研究。研究表明,VNP

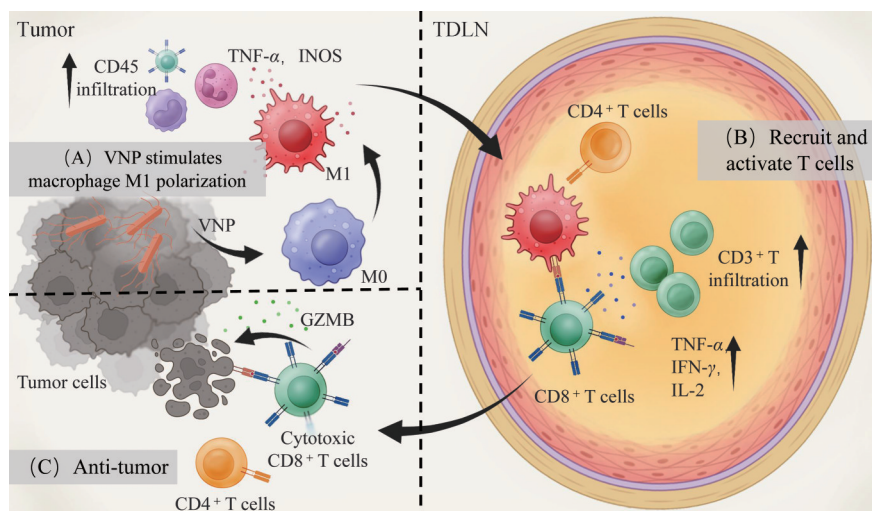


Figure 6 Schematic models demonstrating the VNP treatment for tumor immunotherapy. Step A: VNP treatment stimulates macrophage M1 polarization and promotes the accumulation of leukocyte in the tumor environment; Step B: After being polarization in the tumor, M1 macrophages, which is loaded with tumor antigens, recruit and activate T cells in TDLN; Step C: Cytotoxic $CD8^+$ T cells, which is activated by M1 macrophages, can interact with tumor cells, thereby releasing GZMB and enhancing the tumor killing effect together with VNP

的肿瘤组织特异性来源于其对肿瘤微环境的靶向性, 主要机制如下^[1]: ① 肿瘤的正常生长导致肿瘤的乏氧和坏死区域形成, VNP 趋化肿瘤乏氧微环境, 在肿瘤部位特异性定植; ② VNP 的鞭毛增加其运动性, 有助于其在肿瘤组织渗透和迁移; ③ 肿瘤免疫抑制微环境可以协助 VNP 避免被巨噬细胞和中性粒细胞清除。随后肿瘤组织内大量富集并增殖的 VNP 激活机体免疫系统, 招募免疫细胞杀伤肿瘤。

VNP 的抗肿瘤效果与其免疫激活能力相关, 通过抑制自噬等方法增加 VNP 在肿瘤内的定植效率, 能够显著提高肿瘤组织免疫细胞浸润, 从而增强抗肿瘤效果^[22]。本研究在黑色素瘤小鼠模型上探讨 VNP 的抗肿瘤机制。结果显示, VNP 显著抑制了 B16F10 肿瘤的生长。由于肿瘤抑制效果与其免疫激活能力相关, 因此在肿瘤治疗的同时会伴随肝脾肿大^[4,14]。具体而言, 兼性厌氧细菌 VNP 在进入循环系统后, 会高效富集在肿瘤乏氧部位, 这一肿瘤免疫抑制微环境可以减少 VNP 被免疫系统清除^[12]。因此, 肿瘤部位的 VNP 逐渐增殖, 细菌组分如 LPS 和鞭毛蛋白能够激活肿瘤部位的固有免疫细胞如巨噬细胞, 并诱导巨噬细胞向抗肿瘤 M1 表型极化, 释放包括 TNF- α 在内的炎症因子, 引起局部炎症反应, 大量招募免疫细胞至肿瘤组织^[23,24]。随后 M1 型巨噬细胞进入 TDLN 招募并呈递抗原至 T 细胞, 诱导 T 细胞活化并大量释放炎症因子 (TNF- α 、IFN- γ 和 IL-2) 激活宿主免疫系统。肿瘤组织内的 M1 型巨噬细胞激活后会上调促炎细胞因子和表面共刺激分子的表达水平, 介导 Th1 (T helper 1) 反应^[25], 诱导细胞毒性 T ($CD8^+$ T) 细胞瘤内浸润并将抗

原呈递至 $CD8^+$ T 细胞, 促进 $CD8^+$ T 细胞活化^[26,27], 释放颗粒酶 B, 协同 VNP 发挥抗肿瘤作用 (图 6)。

综上所述, VNP 能够通过诱导肿瘤部位的巨噬细胞向 M1 分型极化, 招募并激活细胞毒性 T 细胞, 协同细菌自身组分共同发挥对黑色素瘤的抑制效果。近年来, 随着对微生物抗肿瘤治疗及合成生物学的研究不断深入, 进一步对 VNP 的抗肿瘤机制研究及基因工程改造也显得尤为重要, 以充分发挥 VNP 的抗肿瘤优势, 提高其临床应用效果。而本研究为 VNP 的基因工程改造及用于抗肿瘤临床研究提供了理论依据。

作者贡献: 尹特负责主要实验操作与设计、结果分析与统计、文章写作; 刘丽娜负责部分实验操作及结果分析; 董世达负责资料搜集和部分文章撰写; 黄宝连对实验中遇到的问题给予帮助和指导; 李晨阳对文章修改过程中遇到的问题给予数据分析和指导; 华子春和曹志婷负责论文的构思、指导和论文修改。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

References

- [1] Brown JM, Wilson WR. Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment [J]. *Nat Rev Cancer*, 2004, 4: 437-447.
- [2] Wei W, Shi Q, Remacle F, et al. Hypoxia induces a phase transition within a kinase signaling network in cancer cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110: E1352-E1360.
- [3] Zheng JH, Min JJ. Targeted cancer therapy using engineered *Salmonella typhimurium* [J]. *Chonnam Med*, 2016, 52: 173-184.
- [4] Clairmont C, Lee KC, Pike J, et al. Biodistribution and genetic stability of the novel antitumor agent VNP20009, a genetically modified strain of *Salmonella typhimurium* [J]. *J Infect Dis*,

- 2000, 181: 1996-2002.
- [5] Ganai S, Arenas RB, Forbes NS. Tumour-targeted delivery of TRAIL using *Salmonella typhimurium* enhances breast cancer survival in mice [J]. Br J Cancer, 2009, 101: 1683-1691.
- [6] Jeong JH, Kim K, Lim D, et al. Anti-tumoral effect of the mitochondrial target domain of Noxa delivered by an engineered *Salmonella typhimurium* [J]. PLoS One, 2014, 9: e80050.
- [7] Forbes NS. Engineering the perfect (bacterial) cancer therapy [J]. Nat Rev Cancer, 2010, 10: 785-794.
- [8] Zhou S, Gravekamp C, Bermudes D, et al. Tumour-targeting bacteria engineered to fight cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2018, 18: 727-743.
- [9] Hernandez-Luna MA, Luria-Perez R. Cancer immunotherapy: priming the host immune response with live attenuated *Salmonella enterica* [J]. J Immunol Res, 2018, 2018: 2984247.
- [10] Flentie K, Kocher B, Gammon ST, et al. 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.
- [11] Din MO, Danino T, Prindle A, et al. Synchronized cycles of bacterial lysis for *in vivo* delivery [J]. Nature, 2016, 536: 81-85.
- [12] Ganai S, Arenas RB, Sauer JP, et al. In tumors *Salmonella* migrate away from vasculature toward the transition zone and induce apoptosis [J]. Cancer Gene Ther, 2011, 18: 457-466.
- [13] Wilhelm S, Tavares AJ, Dai Q, et al. Analysis of nanoparticle delivery to tumours [J]. Nat Rev Mater, 2016, 1: 16014.
- [14] Wu L, Li L, Li S, et al. Macrophage-mediated tumor-targeted delivery of engineered *Salmonella typhimurium* VNP20009 in anti-PD1 therapy against melanoma [J]. Acta Pharm Sin B, 2022, 12: 3952-3971.
- [15] Low KB, Ittensohn M, Le T, et al. Lipid A mutant *Salmonella* with suppressed virulence and TNF α induction retain tumor-targeting *in vivo* [J]. Nat Biotechnol, 1999, 17: 37-41.
- [16] Liu L, Zhang J, Gu M, et al. Antitumor effect of cycle inhibiting factor expression in colon cancer via *Salmonella* VNP20009 [J]. Anticancer Agents Med Chem, 2020, 20: 1722-1727.
- [17] Kuang Z, Dong J, Feng Y, et al. Salvianolic acid B exerts its anti-tumor immunity by targeting USP2 and reducing the PD-L1 level [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2023, 58: 954-962.
- [18] Gordon S, Martinez FO. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions [J]. Immunity, 2010, 32: 593-604.
- [19] Luo J, Zhu R, Wang P, et al. Effect of sinomenine on mouse RAW264.7 macrophage cells line polarization induced by LPS or IL-4 [J]. Chin J Immunol (中国免疫学杂志), 2015, 31: 56-60.
- [20] Chen M, Zhou K, Dai SY, et al. *In vivo* bioluminescence imaging of granzyme B activity in tumor response to cancer immunotherapy [J]. Cell Chem Biol, 2022, 29: 1556-1567.
- [21] du Bois H, Heim TA, Lund AW. Tumor-draining lymph nodes: at the crossroads of metastasis and immunity [J]. Sci Immunol, 2021, 6: eabg3551.
- [22] Zhang X, Xu Q, Zhang Z, et al. Chloroquine enhanced the anticancer capacity of VNP 20009 by inhibiting autophagy [J]. Sci Rep, 2016, 6: 29774.
- [23] Liang K, Liu Q, Li P, et al. Genetically engineered *Salmonella typhimurium*: recent advances in cancer therapy [J]. Cancer Lett, 2019, 448: 168-181.
- [24] Wei B, Pan J, Yuan R, et al. Polarization of tumor-associated macrophages by nanoparticle-loaded combining immunogenic cell death for cancer immunotherapy [J]. Nano Lett, 2022, 22: 543.
- [25] Peña-Romero AC, Orenes-Piñero E. Dual effect of immune cells within tumour microenvironment: pro- and anti-tumour effects and their triggers [J]. Cancers, 2022, 14: 1681.
- [26] Xiao J, Sun F, Wang YN, et al. UBC9 deficiency enhances immunostimulatory macrophage activation and subsequent antitumor T cell response in prostate cancer [J]. J Clin Invest, 2023, 133: e158352.
- [27] Liu N, Wang X, Steer CJ, et al. MicroRNA-206 promotes the recruitment of CD8 T cells by driving M1 polarisation of Kupffer cells [J]. Gut, 2022, 71: 1642-1655.