

光热型脂质膜包覆大肠杆菌药物递送系统的构建及体外评价

杨美洋^{1,2}, 王军泽¹, 李文化¹, 赵冰可¹, 邱立朋¹, 陈敬华¹

(1 江南大学生命科学与健康工程学院, 无锡 214122; 2 江南大学化学与材料工程学院, 无锡 214122)

[摘要] **目的:**构建光热型脂质膜包覆大肠杆菌的复合物,并对其性能进行考察。**方法:**通过薄膜分散法制备光热型脂质膜(LMI),利用静电吸附作用制备脂质膜包覆的大肠杆菌(LMI@Ec)。激光散射粒度仪分析LMI@Ec的粒径和电位;透射电子显微镜和激光共聚焦显微镜观察LMI包覆前后大肠杆菌形态;平板计数法和聚丙烯酰胺凝胶电泳分别检测LMI的包覆对大肠杆菌的活性及其蛋白表达谱的影响;红外光热成像仪检测LMI@Ec的光热效应。**结果:**制备的LMI@Ec粒径为 $(1\ 990.5 \pm 132)$ nm,电位为 $-(5.09 \pm 0.52)$ mV,透射电子显微镜图像显示涂层细菌上有一个清晰的外壳;脂质膜的包覆对大肠杆菌的生物活性几乎无影响;激光照射后细菌活性下降,但在LB培养基中进行温度梯度培养10 h后其生长曲线可恢复到与未涂层菌相当。LMI@Ec具有良好的光热性能,能够进行正常的蛋白表达。体外细胞毒性实验表明,LMI@Ec经激光照射后对B16F10和HepG2细胞均具有良好的杀伤作用。**结论:**LMI@Ec的成功制备为后续深入研究工程菌介导的疾病治疗提供了新的研究方向。

[关键词] 脂质膜;大肠杆菌;吲哚菁绿;光热效应**[中图分类号]** R943 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2023)21-2210-08Preparation and evaluation of photothermal lipid membrane coated *Escherichia coli*YANG Mei-yang^{1,2}, WANG Jun-ze¹, LI Wen-hua¹, ZHAO Bing-ke¹, QIU Li-peng¹, CHEN Jing-hua¹

(1 School of Life Science and Health Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2 School of Chemical and Material Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

[Abstract] **Objective:** To prepare photothermal lipid membrane coated *Escherichia coli* and study the properties. **Methods:** The photothermal lipid membrane (LMI) was prepared by thin film dispersion method, and the electrostatic adsorption method was used to coat *Escherichia coli* with the lipid membrane (LMI@Ec). The size and potential of LMI@Ec were analyzed by laser scattering particle size analyzer, the morphology of *E. coli* and LMI@Ec was observed by transmission electron microscopy and laser confocal microscopy, and plate counting method was used to detect cell viability of LMI@Ec. In addition, the effect of protein expression of LMI@Ec was evaluated by polyacrylamide gel electrophoresis, and the photothermal effect of LMI@Ec was detected by Infrared Photothermal Imager. **Results:** LMI@Ec had a smooth surface with the average particle size of $(1\ 990.5 \pm 132)$ nm and the potential of $-(5.09 \pm 0.52)$ mV. The coating of the lipid membrane had little effect on the activity of *E. coli*. Although the bacterial activity decreased after laser irradiation, the growth curve recovered to the same level as wild bacteria after 10 h of temperature gradient culture in LB medium. LMI@Ec had well photothermal properties and can normally express protein. *In vitro* cytotoxicity experiments showed that LMI@Ec under 808 nm laser irradiation presented enhanced antitumor effect on B16F10 and HepG2 cells. **Conclusion:** The successful preparation of LMI@Ec provides a new research direction for the subsequent in-depth study of bacteria-mediated disease treatment.

[Key words] photosensitive lipid membrane; *Escherichia coli*; ICG; photothermal effect**[基金项目]** 国家重点研发计划项目(2021YFC2103100)**[作者简介]** 杨美洋,女,博士研究生,研究方向:肿瘤靶向给药系统研究。E-mail:1229655330@qq.com。**[通讯作者]** 邱立朋,男,副教授,研究方向:药物新剂型、智能药物递送系统、多糖聚合物纳米载体。联系电话:(0510)85329042,E-mail:qiulp@jiangnan.edu.cn。陈敬华,男,教授,研究方向:药剂学、生物医用材料学。联系电话:(0510)85911900,E-mail:chenjinghua@jiangnan.edu.cn。

微生物是生态系统的重要组成部分,特别是在维持哺乳动物体内平衡和宿主健康方面发挥着关键作用^[1]。如病毒和细菌,由于其遗传操作相对简单、快速增殖和特异性靶向疾病位点等特性,已被广泛应用于生物成像、诊断和治疗等领域^[2-5]。特别是细菌,因其容易被基因改造,并且可以被抗生素控制,所以相对来说是可操作和安全的。更重要的是,细菌能够在哺乳动物宿主的特定身体部位定植,如肠道或皮肤以及脓肿和肿瘤组织等疾病部位^[6-7]。基于这些特点,细菌已被广泛作为益生菌口服以防治病原体,或作为肿瘤治疗药物注射到体内。细菌疗法已经应用于人类,并进入了 I 期临床试验^[8]。然而,多数细菌制剂在定植特定的靶点前易被网状内皮系统(reticuloendothelial system, RES)清除,从而导致疗效不佳,此外,细菌严重的不良反应、剂量依赖性也在很大程度上限制了临床应用。据报道,VNP20009 沙门菌的 I 期临床试验因疗效低并且出现高毒性而被迫终止^[9]。目前细菌在体内应用所面临的问题主要是清除速度快、疗效差以及严重的炎症等不良反应。表面修饰是提高植入生物医学器械和治疗剂体内性能的一种有效方法。合成聚合物、脂质体和生物膜等多种材料已被探索用于表面改性,以改善生物相容性、靶向能力和血液循环。特别是脂质体和天然细胞膜衍生的囊泡在包覆纳米颗粒方面得到了广泛应用,显著提高了生物相容性和靶向能力^[10-11]。因此,本研究尝试对细菌进行表面修饰,期望在细菌介导的诊断、成像和治疗中提高其安全性和疗效。

脂质膜是一种具有磷脂双分子层的膜结构,在药物递送系统中被广泛应用。其中疏水层能够包载疏水性药物,亲水层能够包覆细菌,可在细菌表面形成载药的膜结构,既能够保护细菌在体液中的运输,又能释放治疗性药物发挥治疗作用。光热疗法在增强化疗效果及其协同作用方面被广泛报道,已经观察到某些抗肿瘤药物与光热具有协同作用,能够增强药物对细胞的杀伤效果。吲哚菁绿(ICG)在体内外消灭恶性肿瘤方面取得了巨大的成功^[4]。由于细菌对肿瘤组织的天然靶向性,研究者利用合成生物学对细菌进行基因编辑,敲除毒力因子,表达治疗性蛋白,使其成为当前癌症治疗的研究热点,但单纯的细菌治疗不能完全消除肿瘤,而且易在注射部位引起严重的炎症反应。因此本研究预通过生物界面自组装脂质膜包覆细菌,以疏水性光敏剂(ICG)为

模型,将其载入脂质双分子层的疏水层,并对光敏型脂质膜包覆的大肠杆菌的性能进行考察,为先进的细菌递药系统及丰富抗癌药物制剂的临床应用提供技术资料和新思路。

材料与方法

1 仪器

RE2000a 旋转蒸发仪(郑州科泰实验设备有限公司);FreeZone 2.5 L 冷冻干燥机(美国 Labconco 公司);Zetasizer Nano ZS 纳米粒度仪(英国 Malvern 公司);JEM 2100 透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM, 日本 Jeol 公司);激光共聚焦显微镜(日本尼康公司);傅里叶红外光谱仪(德国布鲁克红外光谱仪);紫外分光光度计(日本 Shimadzu 公司);CO₂ 恒温细胞培养箱(美国赛默飞世尔科技公司);MULTISKAN GO 酶标仪(英国 Malvern 公司);红外热成像仪(中国海特光电有限公司)。

2 试剂和试剂

三氯甲烷(CHCl₃, 上海泰坦科技股份有限公司);氯化钙(CaCl₂, 国药集团化学试剂有限公司);二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC, 艾伟拓上海医药科技有限公司);胆固醇(Chol, 国药集团化学试剂有限公司);二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-甲氧基聚乙二醇(DSPE-mPEG, 优宁维生物科技股份有限公司);ICG (APExBIO 公司);大肠杆菌 *E. coli* BL21 细胞来自刘立明教授的馈赠;DiR 染料和细菌活力计数试剂盒 8 (CCK-8)试剂盒(翌圣生物有限公司);噻唑蓝(MTT, 上海生工生物工程有限公司,含量≥98.0%);胰酶(美国 Sigma-aldrich 公司);新生牛血清(浙江天杭生物科技股份有限公司);细胞培养基(DMEM, 美国 Gibco Invitrogen 公司);其他试剂均为市售分析纯。

3 光热型脂质膜的构建

采用薄膜分散法制备光热型脂质膜。精密称取 20 mg 的 DSPC, 2.5 mg 的 Chol, 5 mg 的 mPEG-DSPE (摩尔比为 10:2.5:1), 溶于 4 mL 的氯仿溶液中, 称取 1 mg 的 ICG 溶于 1 mL 的甲醇, 取 250 μL 的 ICG 溶液加入到上述氯仿溶液, 40 °C 条件下旋转蒸发仪连续蒸馏 1 h, 最终在圆底烧瓶中形成一层薄的脂质膜, 得到载 ICG 脂质膜(LMI)。

4 光敏型脂质膜包覆的大肠杆菌(LMI@Ec)的制备

取摇床中过夜的大肠杆菌菌液 1 mL, 5 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 用磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4)洗 3 次, 再重悬于 4 mL 的 CaCl₂ (5 mol·L⁻¹) 溶液

中,与 ICG 脂质膜置于垂直混悬仪上避光混合 30 min,然后 $5\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min,得到大肠杆菌脂质膜复合物,重悬于 PBS 中,置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 备用。

5 LMI@Ec 进行优化

为了优化 LMI 对大肠杆菌的包覆效率,将大肠杆菌与不同浓度的 LMI 一起孵育 30 min。设置 6 个浓度梯度 ($35, 70, 140, 220, 300, 380\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$),与 $1\times 10^7\text{ cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$ 大肠杆菌于直混悬仪上共孵育 30 min,分别用荧光分光光度计测定上清液中 ICG 的含量,绘制柱状图。

6 LMI@Ec 的表征

分别取浓度为 $1\times 10^7\text{ cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$ 未涂层的大肠杆菌和 LMI@Ec 悬液各 $200\ \mu\text{L}$,超纯水稀释至 1 mL,室温下平衡 5 min 后,激光散射粒度仪测定其粒径和 Zeta 电位,每个样品都至少进行 3 个平行样的测定取平均值,粒径和电位的结果表示为平均值 \pm 标准差。

取浓度为 $1\times 10^7\text{ cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$ 未涂层的大肠杆菌和 LMI@Ec 悬液各 $500\ \mu\text{L}$, $5\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min,弃去上清,分散在 2.5% 戊二醛溶液中置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜,次日用 PBS 洗 3 次,再用不同浓度的乙醇进行梯度洗脱,最后储存在无水乙醇溶液中,取 $10\ \mu\text{L}$ 均匀滴在 TEM 制样专用铜网上,待液滴自然挥发干后即完成制样,利用 TEM 观察 LMI@Ec 形态。

分别取浓度为 $1\times 10^7\text{ cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的未涂层的大肠杆菌和 LMI@Ec 悬液各 1 mL,采用流式细胞仪检测 FITC 标记的脂质涂层。另外,用红细胞膜染料 DiR 标记大肠杆菌,通过激光扫描共聚焦显微镜观察 LMI 脂质涂层。

取相同浓度未涂层的大肠杆菌、LMI@Ec、游离 ICG 和 LMI 溶液各 $300\ \mu\text{L}$,稀释至 3 mL,分别进行紫外-可见吸收光谱和荧光光谱检测。

7 LMI@Ec 的光热效应

游离的 ICG、LMI@Ec (1 mL ,包含 $25\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 ICG 和 $1\times 10^6\text{ cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 Ec) 和 ICG 浓度为 $25, 50$ 或 $75\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 LMI@Ec。在红外光照射 (808 nm , $1.5\text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$) 条件下,每隔 30 s 记录一次温度,持续记录溶液的温度变化至 15 min。同时用红外热成像仪记录温度变化的图片,可以直观比较不同样品的光热效果。考察经过 5 次循环激光照射后, LMI@Ec 的光热稳定性。

8 LMI 对大肠杆菌生物活力的影响

取相同浓度未涂层的大肠杆菌和 LMI@Ec,按

$1:50$ 转接于 Luria Bertani (LB) 液体培养基、含 50% 血清的 LB 液体培养基和 PBS (pH 7.4) 中,置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $220\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的摇床中,在固定时间 (1, 2, 3, 4, 5 h) 取样,将 $190\ \mu\text{L}$ 的每种培养基接种到 96 孔板中,每个孔中加入 CCK-8 溶液 $10\ \mu\text{L}$ 。使用酶标仪测量 450 nm 处的吸光度。

9 光热效应对细菌活性的影响

将野生大肠杆菌和含等量大肠杆菌的 LMI@Ec (ICG 的质量浓度为 $220\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 经过红外光照射 (808 nm , $1.5\text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$) 10 min 后,置于固体 LB 琼脂上培养 24 h,通过平板计数法计数菌落数来统计细菌的生长情况。另外,将野生大肠杆菌和含等量大肠杆菌的 LMI@Ec 在 $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $220\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的恒温培养箱中培养 9 h 后,转移至 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $220\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 条件下继续培养 11 h,利用紫外分光光度计测定不同时间点 OD_{600} 的变化,绘制细菌的生存曲线。

10 光热效应对细菌蛋白表达的影响

为了考察 LMI 所产生的光热作用对大肠杆菌蛋白表达谱的影响,通过聚丙烯酰胺凝胶电泳检测 LMI@Ec 激光照射前后 (808 nm , $1.5\text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$, 10 min) 的蛋白表达谱变化情况。取 $16\ \mu\text{L}$ 适量浓度的 LMI@Ec 与 $4\ \mu\text{L}$ 的 $5\times$ Loading Buffer 混合后,置于金属浴上 ($100\text{ }^{\circ}\text{C}$) 加热 10 min,每孔上样量为 $10\ \mu\text{L}$,电泳条件为 120 mV, 1.5 h。电泳结束后用考马斯亮蓝染色 30 min,纯化水脱色 1 d,每隔 4 h 换一次水,照凝胶色谱仪。

11 体外肿瘤细胞生长抑制研究

采用 MTT 法考察 Ec, LMI, LMI@Ec 对 B16F10 和 HepG2 肿瘤细胞的毒性作用。将细胞以 5×10^4 的细胞密度铺于 24 孔 Transwell 板中的下室,在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 环境中孵育 24 h 后,弃去孔板中培养液,加入 $100\ \mu\text{L}$ 含 Ec ($1\times 10^6\text{ cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$), LMI ($22\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), LMI@Ec ($1\times 10^6\text{ cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$, $22\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 完全培养基。其中对 LMI, LMI@Ec 进行激光照射 (808 nm , $1.5\text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$, 3 min) 后,继续置于培养箱中培养 24 h,吸出培养基加入 $500\ \mu\text{L}$ 的 MTT 孵育 4 h,加入 $500\ \mu\text{L}$ 二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO),通过酶标仪测定 570 nm 处的 OD 值计算出细胞存活率。

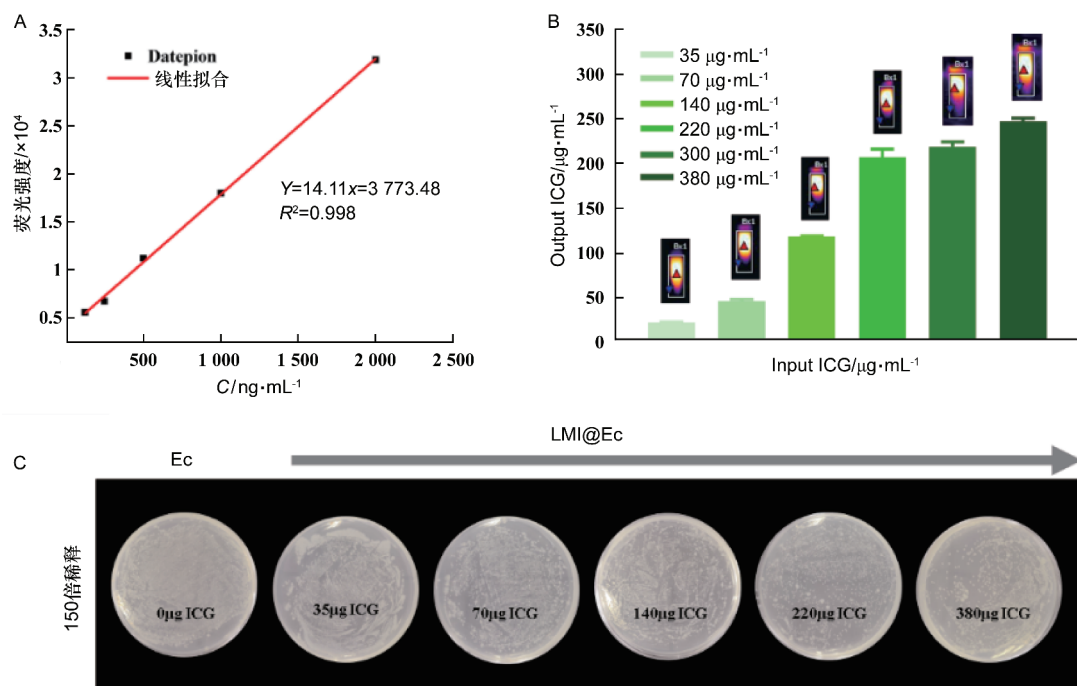
结 果

1 LMI@Ec 的优化

本实验是在氯化钙缓冲液中用 LMI 涂覆大肠

杆菌制备的 LMI@ Ec。其中氯化钙溶液有助于脂质膜在呈负电性的细菌表面进行自组装,胆固醇用于稳定自组装的脂质膜。采用荧光分光光度计对 LMI 中的 ICG 定量,绘制标准曲线,见图 1A。LMI@ Ec 的优化结果如图 1B 所示,随着 ICG 浓度的增加,锚

定在 Ec 表面的 LMI 的质量以剂量依赖性方式增加,当 ICG 浓度达到 $220 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时包覆量达到饱和。通过平板计数法检测大肠杆菌的活性,结果如图 1C 所示,ICG 浓度的增加对大肠杆菌的活性无影响。



A: ICG 标准曲线; B: LMI@ Ec 溶液在 808 nm 处的荧光强度随 ICG 浓度变化直方图; C: LMI@ Ec 的活性

图 1 LMI@ Ec 的优化结果

2 LMI@Ec 的表征

2.1 LMI@Ec 的粒径/Zeta 电位和 TEM 形貌观察 通过对比未涂层的大肠杆菌与 LMI@ Ec 的粒径/电位大小和 TEM 图像,结果见图 2A,未涂层的大肠杆菌平均粒径是 $(1504 \pm 82.27) \text{ nm}$,平均电位是 $-(23.8 \pm 0.361) \text{ mV}$,而 LMI@ Ec 的平均粒径是

$(2534 \pm 33.65) \text{ nm}$,平均电位是 $-(5.09 \pm 1.11) \text{ mV}$ 。可以看出 LMI@ Ec 的粒径略有增加,电位显著提高。如图 2B 和图 2C 所示,与未涂层大肠杆菌的边缘相比,LMI@ Ec 外层有一个清晰的外壳。证实了包被膜的存在。

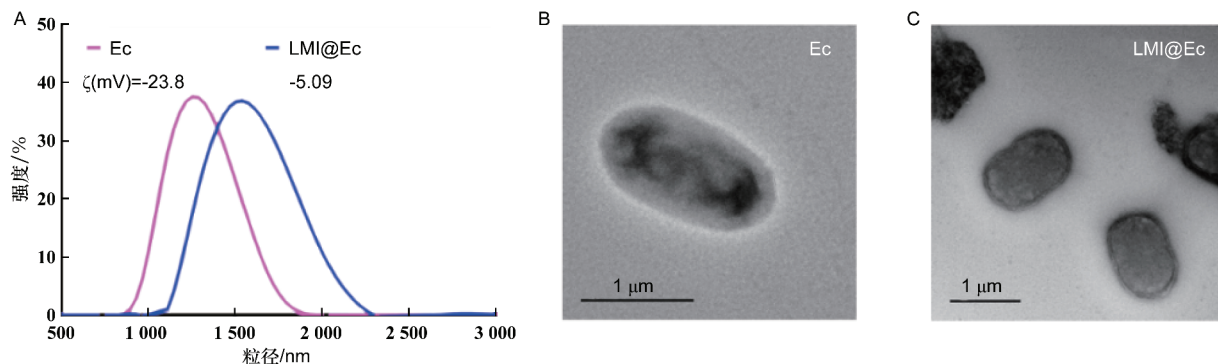


图 2 LMI@ Ec 的粒径/电位图 (A) 和 TEM 图 (B, C)

2.2 LMI@Ec 的流式细胞术和共聚焦显微镜表征

通过流式细胞仪检测标记的 LMI 的平均荧光强度, 显示出与未包裹的大肠杆菌的荧光强度相比, LMI@Ec 的荧光强度显著增加, 证实 LMI 能够成功包裹

大肠杆菌(见图 3A)。用红细胞膜染料 DiR 标记大肠杆菌, 使用激光共聚焦显微镜对 LMI 涂层进行观察(见图 3B), 进一步证实了利用脂质膜来包裹细菌的可行性。

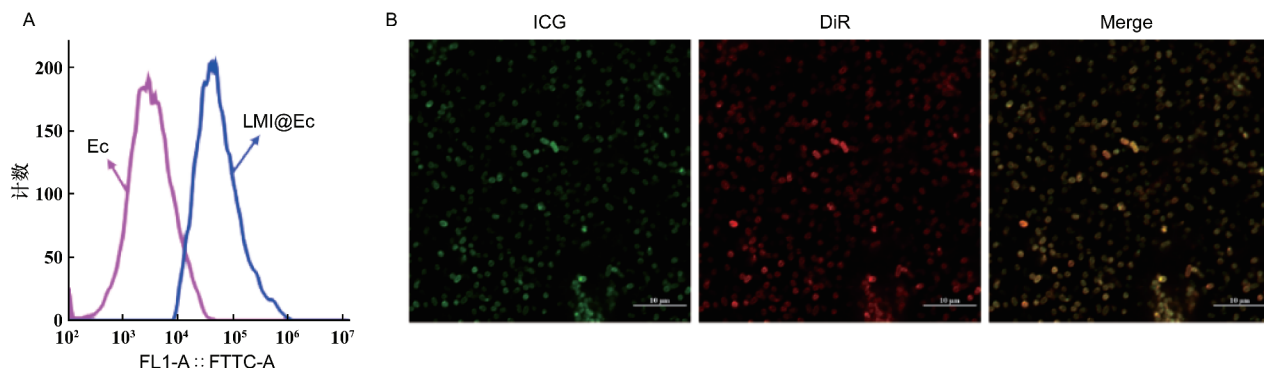


图 3 LMI@Ec 的流式直方图(A)和激光共聚焦图(B)

2.3 LMI@Ec 的紫外-可见分光光度测定和荧光光度测 LMI@Ec 的紫外-可见光谱在 780 nm 处显示出强吸收峰, 这是 ICG 的特征吸收峰, 在 LMI 的光谱中也可以观察到, 而大肠杆菌本身在 780 nm 处没有吸收峰(见图 4A)。此外, 荧光(FL)发射光谱

如图 4B 所示, 在 780 nm 的激发波长下, LMI@Ec 在 808 nm 处显示出荧光发射峰, 与 LMI 和游离的 ICG 一致, 但大肠杆菌本身在 808 nm 处却没有荧光发射峰。以上这些结果证实 LMI 有效地包裹大肠杆菌。

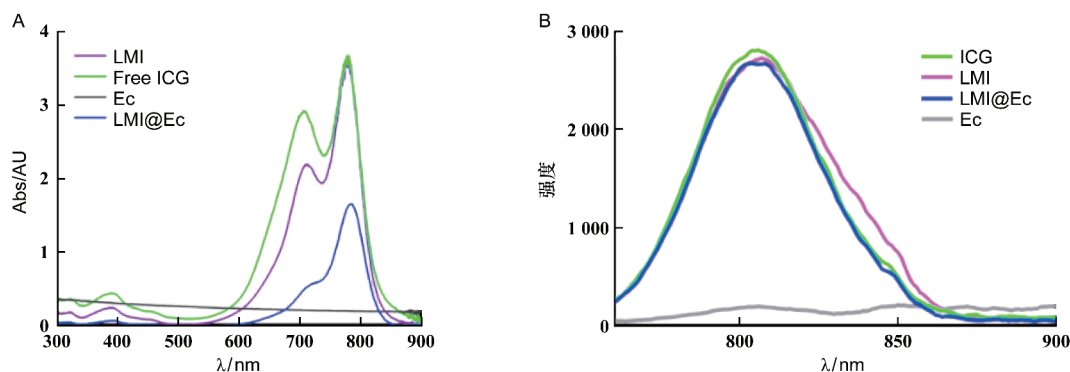


图 4 不同溶液的紫外-可见吸收光谱(A)和荧光光谱(B)

3 LMI@Ec 的光热效应

为了分析 LMI@Ec 用于光热治疗(photothermal therapy, PTT)的可行性, 本研究对其近红外辐射下的温度增量曲线进行了监测。如图 5 所示, LMI@Ec 配方中 ICG 浓度的增加使升温性能增强。图 5A 和图 5B 显示, 在恒定光照条件下, LMI@Ec 溶液的温度升高明显高于游离 ICG。相反, 在没有 ICG 的情况下 PBS 或 LM@Ec 溶液的温度没有明显升高。

这些结果表明, LMI@Ec 具有良好的产热效果。如图 5D 所示的体外热像图显示, 在 808 nm 近红外光照射 10 min 时, LMI@Ec 温度升高至 62.8 °C, 而在相同条件下, 游离 ICG 为 50.9 °C。因此, 在近红外照射下, LMI@Ec 的温度迅速升高(超过 42 °C), 能够对细胞造成不可逆的损伤。另外, 在循环光热试验中, LMI@Ec 经过连续升温 5 次循环, 依然表现出稳定的光热能力(见图 5C)。

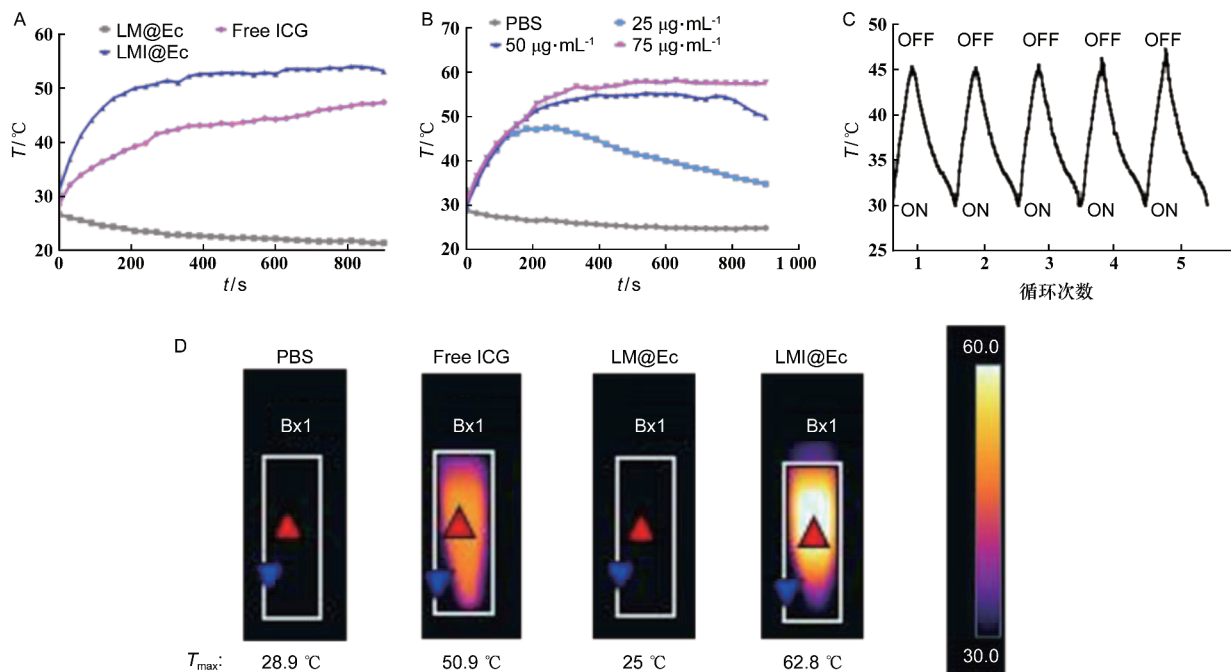
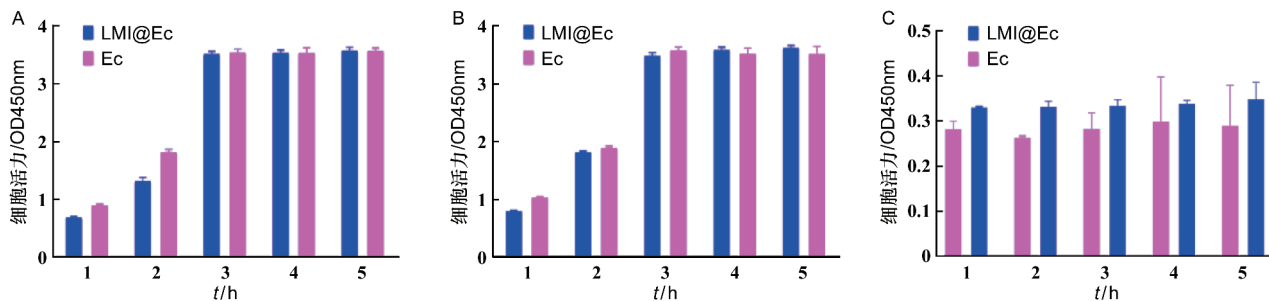


图5 LMI@Ec 的光热效应结果

4 LMI 对大肠杆菌生物活力的影响

为了检查涂层是否对大肠杆菌生存能力有影响,使用 CCK-8 测定法评估细菌活力。从图 6 中可以观察到,未涂层的大肠杆菌与 LMI@Ec 在 LB 培

养基、含血清的 LB 培养基和 PBS 中的生存活性几乎没有区别。包覆 LMI 后的大肠杆菌在 LB 培养基中依然具有分裂能力,能够正常生长。



A: LB 培养基; B: 含 50% 血清的 LB 培养基; C: PBS

图6 Ec 和 LMI@Ec 在不同培养基中的生存活性

5 光热效应对细菌活性的影响

为确定 LMI 产生的光热效应是否会影响细菌的生存和生长,本研究通过平板计数法对激光照射前后的 LMI@Ec 进行计数,如图 7A 所示, LMI@Ec (未经过激光照射) 和野生大肠杆菌的菌落数量相似,说明未经过激光照射的 LMI 对细菌生长没有明

显影响。但可以看到经过激光照射 (808 nm, 1.5 W·cm⁻², 5 min) 后细菌菌落的数量显著减少,这可能是由于 ICG 经光照后产生单线态氧 (¹O₂) 和热量的抗菌作用引起的。另外,从细菌的生长曲线 (图 7B) 可知分别将野生大肠杆菌和 LMI@Ec 在 45°C 和 60°C 孵育 9 h 后,再转移到 37°C 的培养条件下,

45 °C 对细菌生长曲线无影响,但 60 °C 会使细菌停止生长,当温度降到 37 °C 后,细菌会恢复正常生长。说明光热作用能够影响大肠杆菌的生长,但结束持

续光热作用后,大肠杆菌在一定时间内能够恢复正常生长。

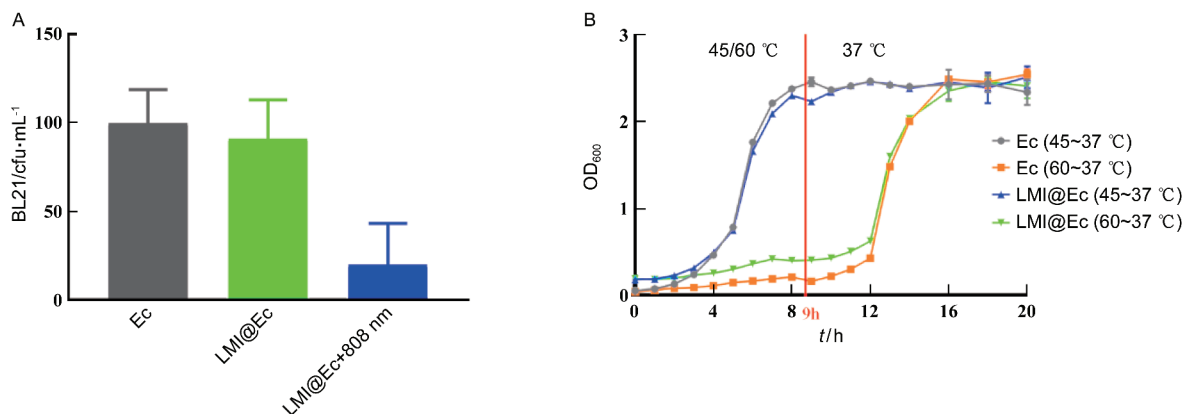


图 7 不同处理后 Ec 和 LMI@Ec 的相对生存能力(A)和生长曲线(B)

6 光热效应对细菌蛋白表达的影响

本研究通过聚丙烯酰胺凝胶电泳考察光热效应是否影响细菌蛋白表达谱,结果见图 8,LMI@Ec 激光照射前后的蛋白表达谱一致,表明细菌蛋白能够完整地保留在 LMI@Ec 中,光热作用不影响蛋白表达谱,为后续 LMI@Ec 表达功能性蛋白提供依据。

性显著降低。上述结果证明 LMI 包覆大肠杆菌可以通过光热作用杀伤肿瘤细胞。

7 体外抗肿瘤活性

利用 MTT 法检测了 Ec,LMI 或 LMI@Ec 在激光照射前后(808 nm,1.5 W·cm⁻²,3 min)对不同肿瘤细胞的毒性作用。由图 9A 可以看出,Ec,LMI 或 LMI@Ec 在没有激光照射时,B16F10 黑色素瘤细胞的活性在 90% 左右,但当 LMI 或 LMI@Ec 经过激光照射后细胞的存活率显著下降,细胞的存活率仅为 10%,且 LMI@Ec 经过激光照射后细胞的存活率更低。另外本研究也对 HepG2 肝癌细胞进行了细胞毒性测定,结果如图 9B 所示,经激光照射后细胞活

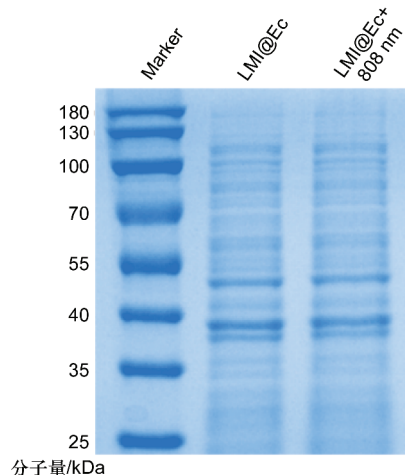


图 8 LMI@Ec 激光照射前后的蛋白表达

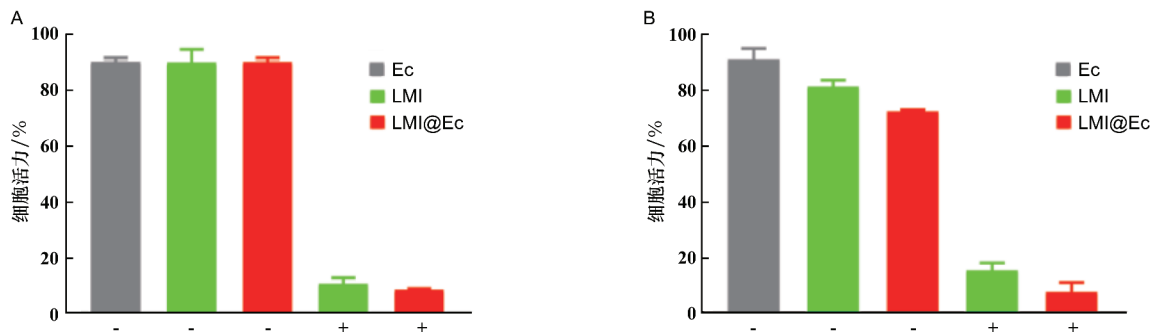


图 9 用 Ec,LMI 或 LMI@Ec 处理的 B16F10(A)和 HepG2(B)的细胞活力

讨 论

目前,癌症的治疗方法主要有化疗、放射疗法、免疫疗法。存在的主要问题是不良反应大,药物不能有效到达实体瘤深部,导致其疗效不佳。细菌以其独特的肿瘤靶向性和免疫激活能力为癌症治疗提供了一个有潜力的平台^[12],它们种类繁多、可利用性强,但由于本身自带的生物性能不可控以及安全性等问题,限制了其应用^[13]。随着合成生物学的发展,通过合成生物学的方法对细菌进行基因水平的改造,使之毒性减弱,增强靶向性,并能定位肿瘤病灶^[14]。利用工程菌作为载体搭载药物,或经过基因修饰表达目的蛋白分子,可控地释放治疗药物,将大大提高细菌治疗肿瘤的可利用性,提高抗肿瘤的疗效^[15-16]。

本实验构建了具有光热作用的 LMI@ Ec,通过透射电子显微镜、激光共聚焦显微镜、流式细胞术、紫外-可见分光光度计和荧光分光光度计验证了 LMI@ Ec 的成功制备。考察了包覆后的大肠杆菌的生物活性、光热效应、蛋白表达谱。结果显示 LMI@ Ec 具有良好的光热作用,经激光照射后产生的热量更持久,温度可达到 62.8 °C,已有大量的研究证明了在近红外光照射下,局部温度高于 42 °C 时就会对肿瘤细胞产生明显的杀伤作用。虽然近红外光照射同时能够引起脂质膜内部的细菌部分死亡或停止生长进入休眠期,但当停止照射后,细菌能够迅速繁殖,并不影响蛋白表达谱,从体外细胞水平结果可以看出,LMI@ Ec 经 808 nm 激光照射后能显示出良好的抗肿瘤活性。

利用合成生物学技术使细菌可控地表达不同的治疗性蛋白,拓展工程化细菌在不同肿瘤治疗领域的应用,为开发基于工程菌介导的协同癌症疗法提供通用性的技术平台。未来将继续探究工程化细菌在体内的作用机制、生物分布和毒性,以期进一步探索在疾病诊疗方面的应用潜力。

[参 考 文 献]

[1] AM, WALTER J, SEGAL E, *et al.* Role of the gut microbiota in

- nutrition and health[J]. *BMJ*, 2018, 361: k2179.
- [2] HUANG L, LI S, LING X, *et al.* Dual detection of bioaccumulated Hg²⁺ based on luminescent bacteria and aggregation-induced emission[J]. *Chem Commun (Camb)*, 2019, 55(52): 7458 - 7461.
- [3] HWANG IY, KOH E, WONG A, *et al.* Engineered probiotic *Escherichia coli* can eliminate and prevent *Pseudomonas aeruginosa* gut infection in animal models[J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 15028.
- [4] LIU LL, HE HM, LUO ZY, *et al.* *In situ* photocatalyzed oxygen generation with photosynthetic bacteria to enable robust immunogenic photodynamic therapy in triple-negative breast cancer[J]. *Adv Funct Mater*, 2020, 30(10): 1910176.
- [5] CRONIN M, STANTON RM, FRANCIS KP, *et al.* Bacterial vectors for imaging and cancer gene therapy: a review[J]. *Cancer Gene Ther*, 2012, 19(11): 731 - 740.
- [6] DUONG MT, QIN Y, YOU SH, *et al.* Bacteria-cancer interactions; bacteria-based cancer therapy[J]. *Exp Mol Med*, 2019, 51(12): 1 - 15.
- [7] FORBES NS, COFFIN RS, DENG L, *et al.* White paper on microbial anti-cancer therapy and prevention [J]. *J Immunother Cancer*, 2018, 6(1): 78.
- [8] OU BM, YANG Y, THAM WL, *et al.* Genetic engineering of probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 for clinical application[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2016, 100(20): 8693 - 8699.
- [9] 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]. *J Clin Oncol*, 2002, 20(1): 142 - 152.
- [10] LU T, HU F, YUE H, *et al.* The incorporation of cationic property and immunopotentiator in poly (lactic acid) microparticles promoted the immune response against chronic hepatitis B[J]. *J Control Release*, 2020, 321: 576 - 588.
- [11] WANG H, MOONEY DJ. Biomaterial-assisted targeted modulation of immune cells in cancer treatment[J]. *Nat Mater*, 2018, 17(9): 761 - 772.
- [12] RAZA MH, GUL K, ARSHAD A, *et al.* Microbiota in cancer development and treatment[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2019, 145(1): 49 - 63.
- [13] SONG SY, VUAI MS, ZHONG MT. The role of bacteria in cancer therapy-enemies in the past, but allies at present[J]. *Infect Agent Cancer*, 2018, 13: 9.
- [14] CHOWDHURY S, CASTRO S, COKER C, *et al.* Programmable bacteria induce durable tumor regression and systemic antitumor immunity[J]. *Nat Med*, 2019, 25(7): 1057 - 1063.
- [15] PAN P, DONG X, CHEN Y, *et al.* Engineered bacteria for enhanced radiotherapy against breast carcinoma [J]. *ACS Nano*, 2022, 16(1): 801 - 812.
- [16] HAN C, ZHANG X, PANG G, *et al.* Hydrogel microcapsules containing engineered bacteria for sustained production and release of protein drugs[J]. *Biomaterials*, 2022, 287: 121619.

编辑:刘卓越/接受日期:2023-05-12