论文

利用转座子构建靶向侵袭性抗肿瘤工程菌

白利明, 唐斯佳, 文也, 杨琦, 孙运军, 胡胜标, 丁学知, 夏立秋*

湖南师范大学生命科学学院, 微生物分子生物学国家重点实验室培育基地, 长沙 410081

* 联系人, E-mail: xialq@hunnu.edu.cn

收稿日期: 2014-01-16; 接受日期: 2014-04-15; 网络版发表日期: 2015-01-05

国家自然科学基金(批准号: 31070006)、国家重点基础研究发展计划(批准号: 2012CB722301)、国家高技术研究发展计划(批准号: 2011AA10a203)和湖南省高校产业化培育项目(批准号: 20134486)资助

doi: 10.1360/N052014-00101

摘要 转座子是一类在基因组上可以自由跳跃的移动序列, 同时也是对微生物进行基因修饰和插入突变的有效工具, 但尚未见有利用转座子导入革兰氏阴性菌 *E. coli* Nissle1917 菌株的报道. 本研究通过构建 pR6K 转座载体, 对肠道益生菌 *E. coli* Nissle1917 菌株进行了转座插入诱变, 将假结核耶尔森菌的侵袭素基因 *inv* 和单核细胞增多性李斯特菌的溶血素基因 *hly* 随机整合至 *E. coli* Nissle1917 菌株的染色体上, 从而使非致病性大肠杆菌 *E. coli* Nissle1917 获得侵袭哺乳动物细胞的能力. 通过细胞体外侵袭实验发现, 本研究所构建的工程菌对 B16, HCT-116 等肿瘤细胞有较好的侵袭活性, 同时与抗肿瘤蛋白 Azurin 一起作用 B16 细胞, 抗肿瘤效果显著增强, 为进一步运用以大肠杆菌 *E. coli* Nissle1917 作为 DNA 疫苗或者基因治疗的载体开辟了新的技术途径.

关键词大肠杆菌
转座子
细菌载体
抗肿瘤

近年来, 细菌靶向治疗肿瘤成为一大研究热点. 靶向抗肿瘤是指在特定的导向机制作用下, 将具有抗肿瘤活性的物质输送到肿瘤部位, 但在机体其他组织或器官中不存在或存在很少, 从而起到特异性杀伤肿瘤的作用, 具有专一性强、毒副作用低、作用时间久等特点. 细菌作为抗肿瘤制剂的应用已历史悠久, 早在 100 多年前纽约医生 William Coley 就尝试用细菌来治疗肿瘤并取得了一定的疗效^[1], 之后细菌靶向治疗成为了肿瘤生物治疗的一大研究热点. 随着分子生物技术的不断发展, 细菌作为肿瘤基因治疗载体的应用更加广泛. 1947 年, Parker 等人^[2]证实, 将梭状芽孢杆菌(*Clostridium histolyticus*)孢子直接注射小鼠恶性转移肉瘤内, 产生肉瘤消退现象. 1995 年, Eisenstein 等人^[3]通过实验证明, 减毒的伤寒

沙门氏菌疫苗株接种到荷瘤小鼠后, 肿瘤的生长受到抑制, 小鼠的生存期得到了显著的延长. 1976 年, Morales 利用灭活的牛分枝杆菌(*Mycobacterium bovis*)发明了卡介苗(*Bacillus Calmette-Guerin*, BCG), 成功治愈了膀胱癌患者, 降低了肿瘤复发的机率且延长了复发时间, 如今卡介苗已成为膀胱癌患者的首选药物^[4,5]. 除作为疫苗外, 卡介苗还可作为一种免疫调节剂, 激活或者增强机体的免疫细胞, 诱导机体产生细胞因子, 加强机体免疫功能, 从而抑制和杀灭肿瘤细胞. Dang 等人^[6]提出了细菌联合溶瘤疗法(combination bacteriolytic therapy), 这种方法将减毒型诺维氏梭菌(*C. novyi*-NT)治疗和传统的化学药物疗法相结合, 增强了肿瘤对化疗药物的敏感性. 肿瘤基因治疗的主要障碍是不能将抗肿瘤药物直接传递

引用格式: 白利明, 唐斯佳, 文也, 等. 利用转座子构建靶向侵袭性抗肿瘤工程菌. 中国科学: 生命科学, 2015, 45: 200–209

Bai L M, Tang S J, Wen Y, et al. Construction of invasive engineered strain targeted for cancer therapy using transposon. SCIENTIA SINICA Vitae, 2015, 45: 200–209, doi: 10.1360/N052014-00101

到肿瘤组织内部的, 而细菌靶向肿瘤的发现为这一问题的解决带来了希望. 研究发现, 细菌尤其是某些厌氧菌和兼性厌氧菌能够优先聚集在肿瘤的低氧区和坏死区, 使其具有良好的肿瘤靶向性, 从而为肿瘤的治疗提供新的思路^[7,8].

细菌作为肿瘤靶向治疗的载体, 细菌和肿瘤细胞间相互作用的调节显得尤为重要. 已有研究表明, 假结核耶尔森菌(*Yersinia pseudotuberculosis*)染色体上的 *inv* 基因是该菌重要的毒力标志之一, 编码的侵袭素(invasin)能够特异性识别宿主细胞膜上的多种 β 1 家族整联蛋白, 使细菌能够直接黏附到细胞膜上, 促进细菌与宿主细胞膜的融合, 使细菌具有侵袭宿主细胞的能力^[9,10]. 单核细胞增多性李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)的李斯特溶素(listeriolysin, LLO)是由染色体上的溶血素基因 *hly* 编码的, 可使重组菌从入侵细胞吞噬体中逃逸出来, 进入宿主细胞胞浆中, 从而避免重组菌在吞噬体中清除, 大肠杆菌共表达侵袭素和溶血素后能选择性侵入肿瘤细胞且不被机体免疫系统识别^[10,11]. 2006 年, Xiang 等人^[12]将质粒 pT7RNAi-Hly-Inv 转入到大肠杆菌菌 *E. coli* BL21DE3 中, 构建了不仅能侵入哺乳动物细胞而且能合成小分子干扰 RNA 的细菌, 该工程菌侵入裂解后释放携带的小分子干扰 RNA, 从而诱发相关基因沉默.

转座子是一类能够在染色体上“跳越”的 DNA 片段, 是发现新基因和基因功能分析的有效工具, 转座子作为插入突变原或分子标签已被广泛应用于基因的分离和克隆^[13]. 自 1951 年 McClintock 首次在玉米中发现转座子以来, 各种转座子相继被分离出来并被应用于动植物、细菌等的分子生物学研究中. *Mariner* 转座子是在果蝇染色体上发现的, 它存在于几乎所有的真核生物和部分原核生物中, 其转座酶由 345 个氨基酸组成, 能特异性识别 28 bp 的末端反向重复序列. 转座的发生只需要转座酶识别序列, 而不需要宿主编码蛋白的参与, 通过“剪切-黏贴”的方式从一个 DNA 分子“跳”到另一个 DNA 分子上. *Mariner* 转座子家族常被用于将外源基因整合到革兰阴性菌和一些革兰阳性菌的染色体上^[14-17]. 但是, 目前还未见有关应用转座子对大肠杆菌进行遗传修饰的报道.

本研究所使用的肿瘤靶向工程菌 *E. coli* Nissle1917 是一种安全性较高的肠道益生菌, 对各种

胃肠功能紊乱、传染性儿童腹泻及易激综合征等疾病具有良好疗效^[18]. 2010 年, Emmanuelle 等人^[19]通过研究发现, *E. coli* Nissle1917 在防止过敏方面也是一种有效的辅助剂. 随着对 *E. coli* Nissle1917 研究的不断深入以及细菌在肿瘤治疗方面的不断发展, 益生菌 *E. coli* Nissle1917 作为细菌载体得到了更多的关注. 2009 年, 王建生等人^[20]提出了把 *E. coli* Nissle1917 作为载体表达细胞凋亡素 Apoptin 相关融合基因的设想, 为细菌治疗肿瘤带来了曙光. 2011 年, Zhou 等人^[21]在 *E. coli* Nissle1917 中融合表达 TAT-Apoptin 用以治疗结肠癌, 本实验室 Zhang 等人^[22]利用 *E. coli* Nissle1917 载体表达天青蛋白 Azurin 治疗乳腺癌、黑色素瘤以及人结肠癌取得了良好的治疗效果. 这些相关研究均表明, *E. coli* Nissle1917 有望成为传递抗肿瘤外源药物的最佳载体之一. 然而 *E. coli* Nissle1917 是胞外菌, 不能进入肿瘤细胞中, 因而无法传递治疗性基因到达肿瘤细胞内部. 本研究应用转座技术将假结核耶尔森菌的侵袭素基因 *inv* 和单核细胞增多性李斯特菌的溶血素基因 *hly* 随机整合至 *E. coli* Nissle1917 菌株的染色体上, 以期获得能够侵袭肿瘤细胞的高效靶向抗肿瘤工程菌.

1 材料与方法

1.1 实验材料

大肠杆菌采用 LB 培养基, 接种单克隆或 1% 菌种保藏液于 10 mL 含相应抗生素的 LB 培养集中, 37℃, 200 r/min 摇瓶培养过夜. 本研究所用菌株、质粒与引物见表 1, 2.

抗生素工作浓度分别为: 氨苄青霉素(ampicillin, Amp)100 mg/L, 氯霉素(chloramphenicol, Cm) 15 mg/L, 庆大霉素(gentamycin, Genta) 10 mg/L, 卡那霉素(kanamycin, Kan) 50 mg/L. 抗生素均购自美国 Sigma 公司. 分子生物学实验所用的各种限制性内切酶、高保真 Pyrobest DNA 聚合酶、普通 rTaq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、DNA Marker 亦购自大连宝生物工程有限公司; 质粒小量制备试剂盒、多功能 DNA 纯化回收试剂盒购自北京百泰克公司; 寡聚核苷酸引物的合成以及 DNA 测序由上海英俊生物技术有限公司完成, 其他试剂购自生工生物工程(上海)有限公司.

表 1 菌株和质粒

菌株	特性	来源
<i>E. coli</i> GBRed	含有 Redα/Redβ 重组基因	本实验室
<i>E. coli</i> GB2005	克隆宿主	本实验室
<i>E. coli</i> GBpir116	克隆宿主: 表达复制子 R6K 复制所必需的 pite 蛋白	本实验室
<i>E. coli</i> Nissle1917 Plasmids	受体菌	本实验室
pET28a-pelB-azurin	表达载体, 有卡那霉素抗性	本实验室
pBlue-inv-hly	表达载体, 有氨苄青霉素抗性	向双林实验室
pBlue-gfp	表达载体, 有氨苄青霉素抗性	本实验室
pR6K-cm-inv-hly	克隆载体, 有氯霉素抗性	本研究
pET28a-loxm-cm	表达载体, 有卡那霉素抗性	本研究

表 2 实验中所用到的引物^{a)}

引物	DNA 序列(5'→3')
IR-loxm-genta-F	AAGGGCCCGTCGACCCGTGACATCTTAGAGTC
IR-loxm-genta-R	GCTCTAGAATGTGAAAGTGGGTCT
HA-cm-F	GAAGGCACGAACCCAGTTGACATAAGCCTGTTTCGGTTCGTAAACTGTAATGTCCTGGTGT
HA-cm-R	CCCTGTTGATAC TCGGCTGAACGAATTGTTAGGTGGCGGTACTTGGGTCGATATCAAAGTGAGATCCGTG
Inv-hly-F	ACGCAGTAGC ATCATCTTATTACCGCTTCA
Inv-hly-R	TGGCGTCTTAGGACTTGC

a) 下划线: 酶切位点; 边框: 同源臂

供试细胞株: 小鼠黑色素瘤细胞 B16(murine melanoma B16 cell)、人结肠癌细胞 HCT-116(human colon cancer cell)均为本实验室保存。细胞培养基 RPMI1640 培养基购自美国 Invitrogen 公司; 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自杭州四季青生物工程有限公司; 注射用青霉素钠、硫酸链霉素和胰蛋白酶购自生工生物工程(上海)有限公司。

1.2 质粒的构建、鉴定以及转化

(1) 转座质粒的构建. (i) 以质粒 pR6K-Tps-Genta-tetR-T7RP 为模板, 利用引物 IR-loxm-genta-F 和 IR-loxm-genta-R, PCR 扩增 loxm-genta-loxm, Sal I / Xba I 双酶切后胶回收, 同时将质粒 pET28a 用 Sal I / Xba I 双酶切后胶回收大片段, 将此片段与胶回收的 PCR 产物过夜连接, 构建质粒 pET28a-loxm-genta. 在 Red/ET 重组酶的作用下, 将质粒 pET28a-loxm-genta 上的 genta 抗性基因替换成 cm 抗性基因, 获得重组质粒 pET28a-loxm-cm; (ii) Sal I / Xba I 双酶切质粒 pET28a-loxm-cm 和 pBlue-inv-hly, 分别获得 IR-loxm-cm 和 inv-hly 片段, T4 DNA ligase 连接, 电转化 *E. coli* GBpir116, 获得转座质粒 pR6K-Tps-cm-inv-hly, 构建流程见图 1。

图 1 转座载体 pR6K-Tps-cm-inv-hly 的构建流程图

(2) 重组质粒的鉴定. 重组质粒 pET28a-loxm-cm 电转化 *E.coli* GB2005, 在含有氯霉素(chloramphenicol, Cm)15 mg/L LB 固体抗性板上进行筛选, 挑取转化子对其质粒进行提取, 用限制性内切酶 *Xho* I 进行酶切鉴定.

(3) 转座质粒转化 *E. coli* Nissle1917. 将 *E. coli* Nissle1917 菌种保藏液接种于 LB 液体培养基中, 37℃, 200 r/min 培养过夜, 按 2%接种量转接, 培养 2 h 至 A_{600} 为 0.4~0.6, 冰浴 10 min, 用预冷的无菌双蒸水洗涤 2~3 次, 30 μ L 水重悬菌体, 加入 2 μ L 转座质粒(pR6K-Tps-cm-inv-hly), 混匀转入 1 mm 电转杯, 1350 V 电击, 37℃复苏 1 h, 用含 Cm 15 mg/L 的 LB 平板进行筛选, 挑取转化子进行 PCR 鉴定, 获得 *inv* 和 *hly* 基因整合至 *E. coli* Nissle1917 染色体的工程菌 EcNVY.

(4) 侵袭素 invasin 和溶血素 LLO 的表达与检测. 重组工程菌株 EcNVY 接种于 LB 液体培养基, 37℃, 200 r/min 培养过夜, 通过 SDS-PAGE 和 LC-MS 检测目标蛋白的表达.

(5) 质粒 pBlue-gfp 转化工程菌 EcNVY. 将已构建好的质粒 pBlue-gfp 和 pBlue-inv-hly-gfp 分别电转化 EcN, EcNVY, 方法参照(3). 用含 Amp 100 mg/L 的 LB 平板进行筛选, 挑选转化子, 提质粒酶切鉴定, 并用激光共聚焦显微镜观察鉴定, 获得用绿色荧光标记的工程菌.

1.3 工程菌 EcNVY 的细胞活性检测

(1) 工程菌 EcNVY 细胞体外侵袭实验. 将细胞按 1×10^5 个每皿接种于铺有 22 mm×22 mm 盖玻片的六孔板或者细胞培养皿中(35 mm×35 mm), 加入 1 mL 无抗性的 RPMI1640 培养基过夜培养使其贴壁. 将 37℃、200 r/min 过夜培养的 EcN(pBlue-gfp), EcNVY (pBlue-gfp), EcN(pBlue-inv-hly-gfp)用灭菌的 PBS 洗 3 次后, 离心收集菌体, 弃去上清后重悬于细胞培养液. 以 MOI(细菌数/细胞数)值为 100 的比例与细胞共孵育 2 h.

(2) 激光共聚焦荧光显微镜观察. (i) 37℃预热的磷酸盐缓冲液(phosphate-buffered saline, PBS)洗涤细胞 2 次; (ii) 用新配制的 4%多聚甲醛室温固定 8~12 min; (iii) PBS 洗 3 遍, 每次 5 min, 除去甲醛; (iv) 加入 200 μ L 0.1 μ mol/mL MitoTracker Red CMX Ros(PBS 配制)染色 15 min; (v) 用 PBS 洗 3 遍, 去除

多余的 Mitotrack; (vi) 加入 200 μ L 0.5 μ g/mL 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)(PBS 配制)染色 20 min; (vii) 用 PBS 洗 3 遍, 去除多余的 DAPI; (viii) 加入 20 μ L 封片剂封片; (ix) 封片好的细胞样品可直接用激光共聚焦荧光显微镜观察.

(2) 工程菌抗肿瘤活性实验. 将本实验构建的表达天青蛋白的质粒 pET28a-Azurin 及空载体 pET28a 电转化工程菌 EcNVY, SDS-PAGE, Western blot 检测天青蛋白 Azurin 在工程菌中的表达. 其次, 在 96 孔板上接种 B16 细胞, 置于 5% CO₂ 培养箱中, 37℃培养 12 h, 同时将工程菌 37℃, 200 r/min 过夜培养, 用分光光度计分别测 A_{600} (每个 A_{600} 值以 1.0×10^8 CFU 为准), 3000×g 离心 5 min 收集菌液并用无菌水洗涤 3 次稀释至 1.0×10^6 CFU/mL. 然后分别取 10, 50, 100 μ L 的菌液直接与肿瘤细胞共培养, 对照组加等体积的无菌水, 倒置显微镜观察 12, 24, 48 h 的作用效果.

2 结果与分析

2.1 质粒 pET28a-loxm-cm 的构建和鉴定

以质粒 pR6K-Tps-Genta-tetR-T7RP 为模板, 以 IR-loxm-genta-F 和 IR-loxm-genta-R 为引物进行 PCR 扩增, 扩增产物大小约 2.8 kb, 与预期 DNA 片段大小一致(图 2). PCR 产物回收酶切克隆至 pET28a 载体送交美国 Invitrogen 公司测序, 测序结果经 NCBI BLAST 比对, 与理论相符. 在 Red/ET 重组酶的作用下, 将测序正确的质粒 pET28a-loxm-genta 上的 *genta* 抗性基因替换成 *cm* 抗性基因, 获得质粒 pET28a-loxm-cm, 经核酸内切酶 *Xho* I 酶切得到 5387 和 2905 bp 的两条带(图 3), 与预期 DNA 片段大小相符, 说明质粒重组成功.

2.2 转座质粒 pR6K-Tps-cm-inv-hly 的鉴定

Sal I /*Xba* I 双酶切质粒 pET28a-loxm-cm 和 pBlue-inv-hly 后分别胶回收 IR-loxm-cm(3079 bp)和 inv-hly(5990 bp)片段, T4 DNA ligase 连接, 热转 GBpir116, 在含有 Cm 15 mg/L 的 LB 固体抗性板上挑选转化子, 对其质粒进行提取并用 *Sal* I /*Xba* I 或者 *Xho* I 酶切鉴定, 其大小分别为 5990 和 3079 bp 或者是 8386 和 683 bp, 实验结果见图 4.

图2 loxm-genta-loxm 片段的扩增

M: λ -Hind III DNA 分子量标准; 1: loxm-genta-loxm PCR 扩增产物

图3 质粒 pET28a-loxm-cm 的酶切鉴定

M: λ -Hind III DNA 分子量标准; 1~5: 1~5 号转化子的 pET28a-loxm-cm 质粒 *Xho* I 酶切产物

图4 质粒 pR6K-Tps-cm-inv-hly 的酶切鉴定

M: λ -HindIII DNA 分子量标准; 1: *Sal* I/*Xba* I 双酶切质粒 pR6K-Tps-cm-inv-hly; 2: *Xho* I 酶切质粒 pR6K-Tps-cm-inv-hly

2.3 重组菌株的筛选鉴定

转座质粒 pR6K-Tps-cm-inv-hly 电转化 *E. coli* Nissle1917, 在含有 Cm 15 mg/L 的 LB 固体抗性板上挑选转化子. 利用试剂盒提取基因组进行 PCR 鉴定, 检测引物见表 2; 分别扩增 *inv-hly*(1200 bp) 基因和 *cm*(1100 bp) 基因, 实验结果见图 5. 其反应程序为: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 45 s; 55℃ 退火 30 s; 72℃ 延伸 1 min 10 s; 循环 30 次; 72℃ 过度延伸 10 min.

2.4 目标基因的表达与检测

重组工程菌 EcNVY 接种 LB 液体培养基过夜培养, 收集菌体, 经 SDS-PAGE 检测, 工程菌的发酵液分别在 100 和 60 kD 处检测到较弱的条带(invasin104 kD, LLO 60 kD), 而对照组没有检测到该大小条带, 与预测结果相符合(图 6 和 7). 通过 LTQ XL 液质联用质谱仪鉴定, 采用 Sequest 搜索引擎搜库, 搜索数据库为从 NCBI 下载的 *E. coli* 所有种类的蛋白以及假结核耶尔森菌的侵袭素蛋白和单核细胞增多性李斯特菌的溶血素蛋白, 结果显示, 其中一个蛋白为侵袭素. 而溶血素蛋白的质谱数据显示蛋白肽段数覆盖率较低, 致使实验结果不太可靠, 这可能与该蛋白的表达量降低有关.

2.5 工程菌的细胞侵袭活性

绿色荧光标记的工程菌分别与 B16, HCT-116 细胞于 5% CO₂ 培养箱中, 37℃ 培养共同孵育 2 h 后, 对细胞进行荧光染色, 染料 DAPI 与核酸结合, 呈蓝色荧光; Mitotacker 标记线粒体, 呈红色荧光. 通过激光共聚焦荧光显微镜观察肿瘤细胞内的重组菌, 逐层

图5 转化子 EcNVY 的 PCR 验证

A: *inv-hly* 基因的扩增; B: *cm* 基因的扩增; M: DL2000 DNA 分子量标准; 1: 以质粒 pR6K-Tps-cm-inv-hly 为模板做阳性对照; 2: 以工程菌 EcNVY 基因组为模板; 3: 以 EcN 基因组为模板做阴性对照

图 6 SDS-PAGE 检测 invasin 和 LLO 的表达

M: 蛋白分子量标准; 1: 野生菌 EcN 菌体蛋白; 2: 工程菌 EcNVY 菌体蛋白. 考马斯亮蓝染色, 箭头分别指示的是目标蛋白侵袭素 invasin 和溶血素 LLO

扫描细胞不同层面, 可以观察到 EcN(pBlue-gfp)没有进入到肿瘤细胞内部, 无规则地散落在细胞周围, 而重组工程菌 EcNVY(pBlue-gfp), EcN(pBlue-inv-hly-gfp)能够侵入到 B16, HCT-116 细胞内部(图 8).

2.6 工程菌的抗肿瘤活性

(1) 外源蛋白 Azurin 的表达及 Western blotting

检测. 野生菌 EcN 和工程菌 EcNVY, EcNVY(pET28a), EcNVY(pET28a-Azurin) 37°C 200 r/min 过夜培养, 菌体蛋白经 SDS-PAGE 及 Western blotting 检测, 结果显示, 只有 EcNVY(pET28a-Azurin)表达出约 16 kD 大小的特异性蛋白条带, 其他样品均没有检测到天青蛋白的表达(图 9).

(2) 工程菌的抗肿瘤活性. 分别将野生菌和工程菌的发酵液离心并用无菌水洗涤 3 次稀释至 1.0×10^6 CFU/mL. 然后分别取 10, 50, 100 μ L 的菌液直接与 B16 细胞共培养. 倒置显微镜观察 12, 24, 48 h 的作用效果. 图 10 所示的是 50 μ L 菌液作用 24 h 后的细胞状态. B16 细胞呈梭状, 与对照组相比, 菌液作用后的细胞形态出现了明显的变化, 细胞贴壁不紧密并伴有凝结成团的现象. 工程菌 EcNVY, EcN(pET28a-Azurin), EcNVY(pET28a-Azurin)作用后 B16 细胞开始变小聚集在一起, 周围出现细胞碎片, 存活细胞越来越少. 且整合了 *inv* 和 *hly* 基因的工程菌抗肿瘤效果显著增强.

天青蛋白的抗肿瘤作用与肿瘤抑制蛋白 p53 密切相关^[23], 它能提高 p53 在细胞内的水平, 增强 p53 蛋白的稳定性. p53 通过线粒体途径释放细胞色素 C 到细胞质中, 激活 caspase 通路而诱导细胞凋亡, p53 还可通过死亡信号受体(TNF 受体、Fas 蛋白)途径诱导细胞凋亡^[24].

图 7 invasin 肽段 NPYATAGNYTPVPLLTVGVDQRMGK 的肽指纹图谱

图8 工程菌侵袭肿瘤细胞观察

A: EcN(pBlue-gfp); B: EcNVY(pBlue-gfp); C: EcN(pBlue-inv-hly-gfp), 激光共聚焦显微镜(400×), DAPI 与核酸结合, 呈蓝色荧光, 标记细胞核; Mitotracker 标记线粒体, 呈红色荧光; 绿色荧光蛋白标记细菌

图9 Western blotting 检测 Azurin 在工程菌中的表达

M: 蛋白分子量标准; 1: 带有组氨酸标签的 Azurin 纯化蛋白; 2: EcNVY(pET28a-Azurin)菌体蛋白; 3: EcNVY(pET28a)菌体蛋白; 4: EcNVY 菌体蛋白; 5: EcN 菌体蛋白

3 讨论

近年来, 细菌靶向治疗已成为肿瘤生物治疗的一大研究热点, 天然的或者是基因修饰的非致病菌成为了潜在的抗肿瘤制剂. 细菌, 尤其是一些厌氧和兼性厌氧细菌能够专一性地优先累积在肿瘤的低氧区和坏死区域, 使人类有望把它们改造为肿瘤治疗的有效工具, 从而和传统的治疗手段联合使用以达到更好的效果, 或者通过基因工程技术赋予细菌抗肿瘤的特性, 增加其肿瘤治疗效果^[25]. 兼性厌氧菌 *E. coli* Nissle1917 是一类安全性较高的益生菌, 对肿瘤细胞有较好的靶向性, 受肿瘤大小及肿瘤内微环境等因素的限制较小, 因而可以作为肿瘤治疗的理想载体.

转座子进行基因修饰和插入突变的有效工具, 利用转座子原件可以方便地将目标基因转入受体菌中, 且不需要对受体菌的遗传背景了解得十分详细, 只需要在转座完成后经过有效率的筛选策略就可以得到满意的重组子. 在许多细菌中, 大片的 DNA 整合由于重组效率低而存在困难. 而与重组不同的是, 转座子不需要同源片段, 只需要反向重复序列和重组酶的存在便可完成 DNA 片段的整合^[26]. 另一方面, 目标基因插入到细菌染色体上的方式比目标基因位于质粒上所构建的重组子遗传稳定性要好, 但是这种插入染色体上的目标基因往往以单拷贝的形式存在, 表达目标基因的强度往往较弱.

E. coli Nissle1917 是胞外菌, 对肿瘤细胞没有侵袭性, 致使抗肿瘤物质不能直接传递到肿瘤细胞内部. 本研究首次利用转座的方式将侵袭素基因 *inv* 和溶血素基因 *hly* 随机整合至 *E. coli* Nissle1917 菌株的染色体上, 使益生菌 *E. coli* Nissle1917 获得了侵袭肿瘤细胞的能力, 为进一步建立以 *E. coli* Nissle1917 作为肿瘤基因治疗的载体奠定了重要基础. 然而侵袭素(*invasin*)通过特异性识别细胞膜上的β1家族整联蛋白, 使细菌直接粘附到细胞膜上, 促进细菌与细胞

图 10 工程菌对 B16 细胞的作用效果(24 h)

A: 阴性对照; B: EcN; C: EcN(pET28a); D: EcN(pET28a-Azurin); E: EcNVY; F: EcNVY(pET28a-Azurin). 倒置显微镜观察图(10×20); B~F 分别表示的是不同菌液与 B16 细胞的作用效果

膜的融合^[9]. 因此本研究所构建的工程菌 EcNVY 可能仅对细胞膜上表达 $\beta 1$ 家族整联蛋白的肿瘤细胞有侵袭活性^[27,28]. 同时该工程菌转化天青蛋白的表达载体 pET28a-azurin 后, 细胞活性检测实验发现该工

程菌 EcNVY(pET28a-Azurin)对 B16 细胞的抗肿瘤效果显著增强, 这可能与工程菌 EcNVY 可以传递抗肿瘤蛋白 Azurin 到肿瘤细胞内部有关, 但具体机制还有待进一步研究.

参考文献

- Wiemann B, Starnes C O. Coley's toxins, tumor necrosis factor and cancer research: a historical perspective. *Pharmacol Ther*, 1994, 64: 529–564
- Pawelek J. Agents and methods for treatment of disease by oligosaccharide targeting agents. US Patent: 20050026866 A1, 2003, July 7
- Baban C K, Cronin M, O'Hanlon D, et al. Bacteria as vectors for gene therapy of cancer. *Bioeng Bugs*, 2010, 1: 385–394
- Nuyts S, Van Mellaert L, Theys J, et al. Clostridium spores for tumor-specific drug delivery. *Anticancer Drugs*, 2002, 13: 115–125
- Chakrabarty A M. Microorganisms and cancer: quest for a therapy. *J Bacteriol*, 2003, 185: 2683–2686
- Dang L H, Bettegowda C, Huso D L, et al. Combination bacteriolytic therapy for the treatment of experimental tumors. *Proc. Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 15155–15160
- Nauts H C, Fowler G A, Bogatko F H. A review of the influence of bacterial infection and of bacterial products (Coley's toxins) on malignant tumors in man. *Acta Med Scand Suppl*, 1953, 276: 1–103
- Patyar S, Joshi R, Byrav D S, et al. Bacteria in cancer therapy: a novel experimental strategy. *J Biomed Sci*, 2010, 17: 21
- Wong K W, Isberg R R. Emerging views on integrin signaling via Rac1 during invasin-promoted bacterial uptake. *Curr Opin Microbiol*, 2005, 8: 4–9
- Anderson J C, Clarke E J, Arkin A P, et al. Environmentally controlled invasion of cancer cells by engineered bacteria. *J Mol Biol*, 2006, 355: 619–627
- Schnupf P, Portnoy D A. Listeriolysin O: a phagosome-specific lysin. *Microbes Infect*, 2007, 9: 1176–1187
- Xiang S L, Fruehauf J, Li C J. Short hairpin RNA-expressing bacteria elicit RNA interference in mammals. *Nat Biotechnol*, 2006, 24: 697–70

- 13 Liao M J, Dong A H, Wang Z D, et al. Plant transposon and the application in functional genomics. *Hereditas*, 2000, 22: 345–348
- 14 Kopp M, Irschik H, Gross F, et al. Critical variations of conjugational DNA transfer into secondary metabolite multiproducing *Sorangium cellulosum* strains *So ce12* and *So ce56*: development of a mariner-based transposon mutagenesis system. *J Biotechnol*, 2004, 107: 29–40
- 15 Le Breton Y, Mohapatra N P, Haldenwang W G. *In vivo* random mutagenesis of *Bacillus subtilis* by use of TnYLB-1, a mariner-based transposon. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72: 327–333
- 16 Fu J, Wenzel S C, Perlova O, et al. Efficient transfer of two large secondary metabolite pathway gene clusters into heterologous hosts by transposition. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36: 113–113
- 17 Youderian P, Burke N, White D J, et al. Identification of genes required for adventurous gliding motility in *Myxococcus xanthus* with the transposable element mariner. *Mol Microbiol*, 2003, 49: 555–570
- 18 Gronbach K, Eberle U, Müller M, et al. Safety of probiotic *Escherichia coli* strain Nissle1917 depends on intestinal microbiota and adaptive immunity of the host. *Infect Immun*, 2010, 78: 3036–3046
- 19 Adam E, Delbrassinne L, Bouillot C, et al. Probiotic *Escherichia coli* Nissle1917 activates DC and prevents house dust mite allergy through a TLR4-dependent pathway. *Eur J Immunol*, 2010, 40: 1995–2005
- 20 王建生, 张明鑫. 益生菌在消化系统肿瘤治疗中的潜在应用价值. *世界华人消化杂志*, 2009, 17: 539–543
- 21 Zhou S, Zhang M, Wang J. Tumor-targeted delivery of TAT-Apoptin fusion gene using *Escherichia coli* Nissle1917 to colorectal cancer. *Med Hypotheses*, 2011, 76: 533–534
- 22 Zhang Y L, Zhang Y M, Xia L Q, et al. *Escherichia coli* Nissle1917 targets and restrains mouse B16 melanoma and 4T1 breast tumors through expression of azurin protein. *Appl Environ Microbiol*, 2012, 78: 7603–7610
- 23 Apiyo D, Wittung-Stafshede P. Unique complex between bacterial azurin and tumor-suppressor protein p53. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 332: 965–968
- 24 Ye Z M, Miao X D, Yang D S, et al. Selective inducement effect of bacterial redox protein azurin on apoptosis of human osteosarcoma cell line U2OS. *Ai Zheng*, 2005, 24: 298–304
- 25 强火亮, 陈代杰, 戈梅, 等. 细菌作为抗肿瘤剂的研究进展. *生命科学*, 2008, 20: 633–637
- 26 Basu J, Stromberg G, Compitello G, et al. Rapid creation of BAC-based human artificial chromosome vectors by transposition with synthetic alpha-satellite arrays. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33: 587–596
- 27 Critchley R J, Jezzard S, Radford K J, et al. Potential therapeutic applications of recombinant, invasive *E. coli*. *Gene Ther*, 2004, 11: 1224–1233
- 28 Fajac I, Grosse S, Collombet J M, et al. Recombinant *Escherichia coli* as a gene delivery vector into airway epithelial cells. *J Control Release*, 2004, 97: 371–381

Construction of Invasive Engineered Strain Targeted for Cancer Therapy Using Transposon

BAI LiMing, TANG SiJia, WEN Ye, YANG Qi, SUN YunJun, HU ShengBiao, DING XueZhi & XIA LiQiu

State Key Laboratory Breeding Base of Microbial Molecular Biology, College of Life Science, Hunan Normal University, Changsha 410081, China

Transposons are a kind of genome sequence jumping freely on the genome sequence and are also valuable tools for gene transfer modification and insertional mutagenesis of microorganisms. However, there has been no report about applications of transposons in gram-negative bacteria *E. coli* Nissle1917. In this study, we constructed pR6K translocation vector that contains the *inv* gene from *Yersinia pseudotuberculosis* and the *hly* locus from *Listeria monocytogenes*. Introduction of the *inv* and *hly* genes into the chromosomes of *E. coli* Nissle1917 confers it the ability to invade mammalian cells. Through *in vitro* experiments, we found that engineered bacteria have good activity for a wide variety of tumor cells, such as B16 and HCT-116. Besides, we transferred Azurin protein expressing vector into the engineered bacteria acting on the B16 cells, greatly improving treatment efficacy. This work has opened up a new way for further application with *E. coli* Nissle1917 as a carrier of DNA vaccine or gene therapy.

***Escherichia coli*, transposons, bacteria carrier, antitumor**

doi: 10.1360/N052014-00101