

• 医药生物技术 •

化学诱导大肠杆菌 Nissle 1917 染色体进化及其应用

刘玉梅^{1#}, 张庆利^{2#}, 邵丽军¹, 柳晓婧¹, 于晓丽^{1*}

1 山东第二医科大学 公共卫生学院, 山东 潍坊 261053

2 诸城市疾病预防控制中心, 山东 潍坊 262200

刘玉梅, 张庆利, 邵丽军, 柳晓婧, 于晓丽. 化学诱导大肠杆菌 Nissle 1917 染色体进化及其应用[J]. 生物工程学报, 2024, 40(12): 4594-4604.

LIU Yumei, ZHANG Qingli, SHAO Lijun, LIU Xiaojing, YU Xiaoli. Establishment and application of chemically inducible chromosomal evolution in *Escherichia coli* Nissle 1917[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(12): 4594-4604.

摘要: 大肠杆菌 Nissle 1917 (EcN) 因生物相容性高、易基因改造等特点, 常常被用于肿瘤细菌疗法。目前, 大多数研究利用质粒载体构建 EcN 工程菌, 存在基因表达不稳定、需要利用抗生素选择性压力来保持高拷贝数等问题。本研究以 EcN 中光敏剂 5-氨基乙酰丙酸(5-aminolevulinic acid, 5-ALA) 的合成例, 利用噬菌体整合技术将 5-ALA 合成的关键基因 *hemA^M*、*hemL* 单拷贝整合 EcN 基因组, 然后利用化学诱导染色体进化(chemically inducible chromosomal evolution, CICH)的方法提高 *hemA^M*、*hemL* 拷贝数, 进而促进 5-ALA 的稳定合成。通过体外细胞实验初步验证了 EcN 工程菌能将稳定合成的 5-ALA 递送至肿瘤细胞并抑制其生长, 实验结果为 EcN 工程菌应用于肿瘤光动力治疗提供理论基础。

关键词: 大肠杆菌 Nissle 1917; 5-氨基乙酰丙酸; 噬菌体整合; 化学诱导染色体进化

Establishment and application of chemically inducible chromosomal evolution in *Escherichia coli* Nissle 1917

LIU Yumei^{1#}, ZHANG Qingli^{2#}, SHAO Lijun¹, LIU Xiaojing¹, YU Xiaoli^{1*}

1 School of Public Health, Shandong Second Medical University, Weifang 261053, Shandong, China

2 Zhucheng Center for Disease Control and Prevention, Weifang 262200, Shandong, China

Abstract: The probiotic strain *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN) with high biocompatibility

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 study.

*Corresponding author. E-mail: yuxl0814@sdsu.edu.cn

Received: 2024-03-21; Accepted: 2024-11-11; Published online: 2024-11-12

and susceptibility to genetic modification is often applied in bacterial therapies for cancer. However, most studies have used plasmids as vectors to construct engineering strains from EcN. Plasmid-based expression systems suffer from genetic instability, and they need antibiotic selective pressure to maintain high copy number. This study aimed to employ EcN for synthesizing the photosensitizer 5-aminolevulinic acid (5-ALA). Firstly, the key genes of 5-ALA synthesis, *hemA^M* and *hemL*, were integrated into the EcN genome by the phage integration technique. Then, chemically inducible chromosomal evolution (CIChE) was adopted to increase the copy number of *hemA^M* and *hemL* and thus improved the stable synthesis of 5-ALA. The *in vitro* cell experiments verified that the constructed engineering strain can deliver stably synthesized 5-ALA to tumor cells and inhibit their growth. This study provided a basis for applying the engineering strains of EcN in the photodynamic therapy for tumors.

Keywords: *Escherichia coli* Nissle 1917; 5-aminolevulinic acid; phage integration technique; chemically inducible chromosomal evolution (CIChE)

在肿瘤细菌疗法中, 细菌能靶向肿瘤并定植于肿瘤缺氧区域, 增强对肿瘤细胞的特异性免疫识别和清除^[1]。随着基因工程与合成生物学技术的发展, 细菌作为可编程活体药物在肿瘤治疗中不断取得新进展。大肠杆菌(*Escherichia coli*) Nissle 1917 (EcN)具有良好的肿瘤靶向能力, 能够在肿瘤坏死和缺氧环境中增殖, 其外膜的血清敏感型脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)能确保其从正常器官中快速清除^[2]。与沙门氏菌、李斯特菌等致病菌相比, EcN 不会产生肠毒素和细胞毒素, 并且能与免疫系统相互作用, 减少炎症发生^[3-4]。另外, EcN 遗传背景清晰、遗传操作方便, 成为了靶向治疗肿瘤的理想活体药物^[5]。

然而, 肿瘤复杂的脉管系统阻碍了细菌的深入递送, 使其难以发挥良好的肿瘤杀伤效果^[6], 细菌单一疗法有时不能彻底消除原发性肿瘤或转移性癌细胞。通过基因工程与合成生物学技术可以重新编程细菌靶向肿瘤细胞并深入递送抗癌药物, 进而增强肿瘤治疗的有效性与特异性^[7]。目前构建响应内在环境信号、感受外部压力、特异性靶向肿瘤及易于临床检测的“细菌机器”是优化肿瘤细菌疗法的重要研究方向^[8]。

Ho 等将来源于辣根(*Armoracia rusticana*)的黑芥子酶基因导入 EcN, 使其组成型表达并分泌黑芥子酶, 进而将宿主摄入的硫代葡萄糖苷转化为具有抗癌活性的萝卜硫素, 有效地抑制结肠癌细胞的生长^[9]。Danino 等将 PROP-Z (programmable probiotics with lacZ)报告系统导入 EcN, 给小鼠口服该工程菌株, 并在一定时间间隔之后通过尾静脉注射交联的化学发光底物, 该底物在 LacZ 存在的情况下被分解并释放化学发光分子, 经肾脏汇集到小鼠尿液中, 通过检测尿液实现对肝癌的诊断检测^[10]。

以上研究大多选择将构建的质粒载体导入 EcN, 一方面基因表达不稳定, 另一方面需要外源添加抗生素作为选择性压力来保持高拷贝数和稳定性^[11]。如果抗生素添加不及时或浓度未达到要求, 质粒载体就会丢失。因此, 可以将目的基因整合至 EcN 基因组, 并通过提高目的基因拷贝数来稳定合成目标产物。Canale 等利用 Red 重组技术将低氧诱导型启动子 P_{fms} 及其调控的基因 *argA* 单拷贝整合 EcN 基因组, 促进精氨酸的合成, 并与抗 PD-L1 抗体协同抑制肿瘤的生长^[12]。但是单拷贝基因往往表达量较低, 有时不能合成足够量的抗癌药物用于肿

瘤治疗。

5-氨基乙酰丙酸(5-aminolevulinic acid, 5-ALA)本身没有光敏活性,但是进入肿瘤细胞后,在肿瘤细胞线粒体内会进一步合成具有光敏活性的原卟啉 IX (protoporphyrin IX, PpIX), PpIX 在吸收 660 nm 波长的光之后,将能量高效转移至氧气,产生活性氧(reactive oxygen species, ROS),进而引起肿瘤细胞凋亡^[13-14]。基于此,本研究利用噬菌体整合技术与化学诱导染色体进化技术(chemically inducible chromosomal evolution, CICHe)将合成 5-ALA 的关键基因 *hemA^M*、*hemL* 多拷贝整合至 EcN 基因组(图 1),以增强 5-ALA 的稳定合成,同时采用体外细胞实验验证工程菌对肿瘤细胞的

抑制作用,以期为 EcN 合成 5-ALA 以及作为递送载体用于癌症光动力治疗提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

所用菌株和质粒见表 1。

1.1.2 培养基

所用的培养基主要为 LB 培养基与 5-ALA 发酵培养基, LB 培养基包括酵母粉 5 g/L、蛋白胨 10g/L、NaCl 10 g/L; 5-ALA 发酵培养基包括 16 g/L (NH₄)₂SO₄、3 g/L KH₂PO₄、16 g/L Na₂HPO₄·12H₂O、1 g/L MgSO₄·7H₂O、0.01 g/L MnSO₄·7H₂O、2-12 g/L 酵母粉、20 g/L 葡萄糖。

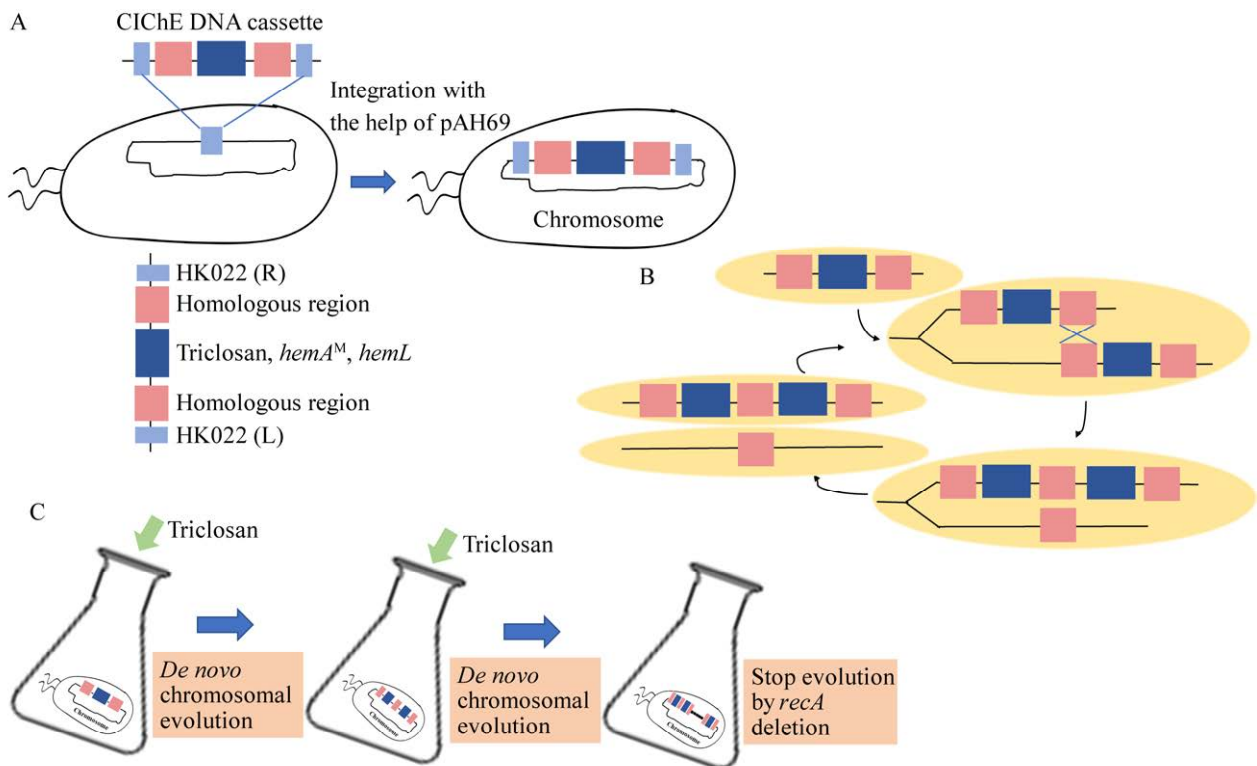


图 1 构建稳定合成 5-ALA 的 EcN 工程菌 A: 采用噬菌体整合技术将 *hemA^M*、*hemL* 单拷贝整合 EcN 基因组. B、C: 利用 CICHe 技术构建 *hemA^M*、*hemL* 多拷贝进化菌株

Figure 1 Construction of EcN engineered bacteria for stable synthesis of 5-ALA. A: Single copy integration of *hemA^M* and *hemL* into ECN genome by phage integration technique. B, C: Construction of multiple-copy *hemA^M* and *hemL* strains by CICHE technique.

表 1 本研究所用菌株与质粒

Table 1 Bacterial strains and plasmids used in this study

Strain and plasmid	Relevant properties	Source or reference
Strains		
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	<i>supE44</i> Δ (<i>lacZYA-argF</i>) <i>U169</i> (Φ 80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i>) <i>hsdR17recA</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>relA1</i>	TransGen Biotech
<i>E. coli</i> Nissle 1917	Wild type	Lab store
HAL	<i>E. coli</i> Nissle 1917 harboring single copy of genome integrated <i>hemA^M</i> and <i>hemL</i>	This work
HAL1	CICHe strain resistant to 1.2 μ mol/L triclosan	This work
HAL1a	HAL1 with the deletion of <i>recA</i>	This work
Plasmids		
pHKKF3T5b	CICHe integration expression plasmid, <i>attP_{HK}</i> site, <i>P_{T5}</i> promoter, Kan ^r	Lab store
pHAL	pHKKF3T5b containing <i>hemA^M</i> and <i>hemL</i>	This work
pAH69	Helper plasmid expressing phage HK022 Int, Amp ^r	Lab store
pCP20	pSC101 replicon ^{ts} Flp(λ Rp) <i>cI857</i> , Cm ^r , Amp ^r	Lab store

1.1.3 主要试剂与仪器

PrimeSTAR HS DNA 聚合酶购自宝生物工程(大连)有限公司, 利用 PCR 产物纯化试剂盒(北京诺博莱德科技有限公司)进行纯化, 采用 Gibson 组装试剂和限制性内切酶用于质粒构建[纽英伦生物技术(北京)有限公司]。质粒小提试剂盒和细菌基因组提取试剂盒均购自天根生化科技(北京)有限公司。SYBR Premix *Ex Taq* 购自宝生物工程(大连)有限公司。DMEM 培养基、抗生素、胰蛋白酶、MTT 试剂盒均购自北京索莱宝科技有限公司。胎牛血清购自上海碧云天生物技术股份有限公司。利用 DCFH-DA 探针试剂盒(北京诺博莱德科技有限公司)检测细胞内 ROS 含量。

主要仪器包括高低温恒温振荡培养箱(上海一恒科学仪器有限公司)、恒温培养摇床(上海一恒科学仪器有限公司)、普通 PCR 仪(杭州博日科技股份有限公司)、实时荧光定量 PCR 仪(赛默飞世尔科技公司)、紫外可见分光光度计(岛津公司)、CO₂ 培养箱(赛默飞世尔科技公司)、

流式细胞仪(BD 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细菌培养与发酵

采用 LB 培养基进行细菌培养, 用 5-ALA 发酵培养基进行发酵实验, 在发酵时加入 IPTG 终浓度为 0.25 mmol/L, 发酵条件是 37 °C、220 r/min, 初始接种量是 2%, 间隔 4 h 取样 1 次, 并用 4 mol/L NaOH 调整 pH 在 6.0–7.0 之间, 最后用分光光度法检测 ALA 浓度^[13]。

1.2.2 利用噬菌体整合技术将 *hemA^M*、*hemL* 整合至 EcN 基因组

本研究所用质粒见表 1。首先利用 PCR 技术检测 EcN 基因组上的 *attB* 位点。以 EcN DNA 为模板, 分别利用特异性引物 xup 与 xdown、hk022up 与 hk022down、80up 与 80down、P21up 与 P21down、P22up 与 P22down、P22up 与 P22(EcoB)down (表 2)扩增 *att λ* 、*attHK022*、*att ϕ 80*、*attP21*、*attP22*、*attP22* (EcoB)位点。

确定 EcN 基因组上 *attB* 位点后, 构建含有特异性 *attP* 位点与目的基因的质粒。以 pDAL

表 2 本研究所用引物

Table 2 Primers used in this study

Primer	Sequence (5'→3')
xup	GGCATCACGGCAATATAC
xdown	TCTGGTCTGGTAGCAATG
hk022up	GGAATCAATGCCTGAGTG
hk022down	GGCATCAACAGCACATTC
80up	CTGCTTGTGGTGGTGAAT
80down	TAAGGCAAGACGATCAGG
P21up	ATCGCCTGTATGAACCTG
P21down	TAGAACTACCACCTGACC
P22up	AAGTGGATCGGCATTGGT
P22down	TTCGTATCGACAGGAAGG
P22(EcoB)down	CGATTGAACCGCAGATTACG
HKP1	GGAATCAATGCCTGAGTG
HKP4	GGCATCAACAGCACATTC
RT-hemA-F	TCACCTGACCGAGGATTTGC
RT-hemA-R	CCATAACCTGAACGAAGACG
hemAL-F	TCCGCATGCGAGCTCGGTACATGACC AAGAAGCTTTTAGC
hemAL-R	GCCGAATATTCTCCAGCACGCTCACA ACTTCGCAAACACC

质粒为模板^[15], 利用引物 hema-F 和 heml-R (表 2) 扩增 *hemA^M*、*hemL* 基因片段连入 pHKKF3T5b^[16], 构建得到 pHAL, 该质粒同时含有三氯生抗性基因、同源臂序列和 *attP* 位点序列, 进一步利用带有噬菌体整合酶、噬菌体切除酶的辅助质粒 pAH69 进行位点特异性重组。利用特异性引物 hema-F 和 heml-R 进行 PCR, 验证 *hemA^M*、*hemL* 基因是否单拷贝整合 EcN 基因组。选取阳性菌株, 分别通过 42 °C、37 °C 过夜培养去除 pAH69^[17], 采用质粒 pCP20 进一步去除卡那霉素抗性基因, 获得无抗性基因片段的单拷贝菌株 HAL。

1.2.3 CICHe 方法

以 HAL 为出发菌株, 在 LB 培养基中添加 0.01 μmol/L 三氯生, 37 °C、200 r/min 过夜培养, 取 1% 菌液加入新的 LB 培养基, 同时加入 0.02 μmol/L 三氯生, 并依次提高三氯生浓度至 0.06、0.1、0.2、0.4 μmol/L 等, 直至菌株生长

速度减慢。与此同时, 分别取不同浓度三氯生诱导菌株进行发酵实验, 检测 5-ALA 的产量变化^[13]。最后利用 pTKRED、pKD4 通过 λ 重组技术敲除 *recA* 基因^[18]。

1.2.4 荧光定量 PCR 技术

取不同浓度三氯生诱导的进化菌株, 利用细菌基因组提取试剂盒提取 DNA, 并将其作为模板, 用 RT-hemA-F 和 RT-hemA-R(表 2) 进行荧光定量 PCR。将带有单拷贝 *hemA^M*、*hemL* 基因的 pDAL 质粒作为标准质粒, 利用绝对定量法检测基因组中 *hemA* 的拷贝数。

1.2.5 细胞培养

采用的结直肠癌细胞 HCT116 购自中国科学院上海细胞生物学研究所细胞库, 用 DMEM 培养基在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中进行培养, 同时要在 DMEM 培养基中添加 10% 胎牛血清、100 mg/mL 青霉素和 100 U/mL 链霉素。

1.2.6 细胞活力测定

将 HCT116 细胞按照 3 000 个细胞/孔的浓度接种在 96 孔板中培养 24 h, 然后分别加入 20、40、60、90 mg/mL 5-ALA·HCl 处理 12 h。HAL1a 发酵培养 48 h 后取发酵液, 用无菌 PBS 清洗 2 遍后, 以 1×10⁷ CFU/mL 的浓度重悬于 DMEM 中。在 HCT116 细胞中加入 100 μL 重悬的 HAL1a 并孵育 90 min。在相同条件下用 PBS 做阴性对照。所有的细胞处理结束后进行光照射 5 min (660 nm LED 光, 29.8 mW/cm²), 孵育 24 h 后利用 MTT 法检测 HCT116 细胞活力。

1.2.7 细胞内 ROS 含量测定

将约 10⁵ 个 HCT116 细胞/孔接种到 24 孔组织培养板中培养 24 h, 分别与 20、40、60、90 mg/mL 5-ALA·HCl 孵育 8 h, 并与感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 为 300:1 的 HAL1a 孵育 90 min。在相同条件下使用 PBS 作为阴性对照。随后将细胞样品照射 5 min (660 nm

LED 光, 29.8 mW/cm²)。培养 2 h 后, 将含有 10 μmol/L DCFH-DA 的 DMEM 加入孔中, 并在 37 °C 下孵育 20 min。最后, 用 PBS 洗涤细胞 3 次, 使用流式细胞仪检测与分析 HCT116 细胞内 ROS 的含量变化。

2 结果与分析

2.1 利用噬菌体整合技术将 *hemA*^M、*hemL* 整合至 EcN 基因组结果

利用普通 PCR 验证 EcN 中 *attB* 位点, 结果显示, EcN 基因组上带有噬菌体 λ 和 HK022 这 2 个 *attB* 位点(图 2A), 之后选择 *att*_{HK022} 位点进一步构建供体质粒 pHAL, 同时利用辅助质粒 pAH69 与 pCP20 成功将含有三氯生抗性基因、*hemA*^M、*hemL* 的目的片段整合到 EcN 基因组(图 2B), 得到工程菌株 HAL。

2.2 利用 CICH E 技术提高 EcN 基因组中 *hemA*^M、*hemL* 拷贝数

以 HAL 为出发菌株, 初始添加 0.01 μmol/L 三氯生, 随后不断提高其浓度, 筛选得到多株进化菌株。选取 0.2、0.4、0.8、1.2、1.6、4.8、

6.4 μmol/L 浓度的三氯生诱导进化菌株, 利用荧光定量 PCR 检测 *hemA* 拷贝数。如图 3 所示, 1.2 μmol/L 三氯生诱导产生的进化菌株(HAL1) 目的基因的拷贝数最高(9 个拷贝/基因组), 同时 ALA 产量也最高(58 mg/L), 与对照相比, 提高了 17 倍左右。随着三氯生浓度的提高, 目的基因拷贝数也随之下降, 而 ALA 产量几乎没有提高。

2.3 对培养基发酵条件进行优化

为了得到基因拷贝数稳定的进化菌株, 对 HAL1 的 *recA* 基因进行敲除, 获得菌株 HAL1a。首先对 HAL1a 发酵条件包括转速、Mg²⁺、Mn²⁺ 等进行优化, 但是 ALA 产量提高不明显。由于 *recA* 基因敲除后菌株生长较缓慢, 所以在发酵实验中提高酵母粉浓度。如图 4 所示, 随着酵母粉浓度的提高, *OD*₆₀₀ 也随之提高, 同时 ALA 产量也有所提高, 达到 68 mg/L。

2.4 检测工程菌 HAL1a 对 HCT116 细胞的影响

利用人结直肠癌细胞 HCT116 检测 HAL1a 是否能抑制肿瘤细胞。取发酵时间为 48 h 的发

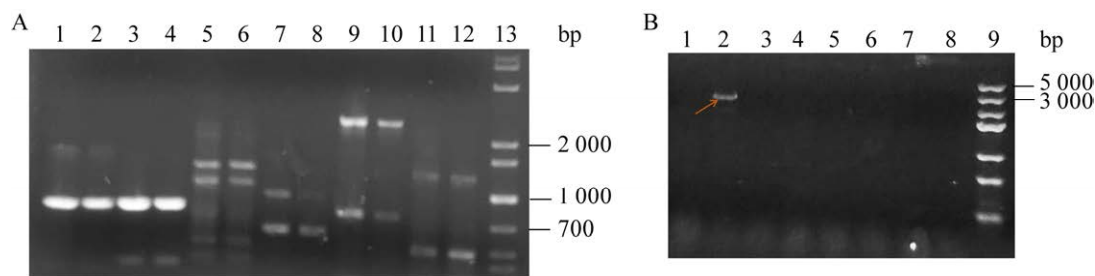


图 2 PCR 结果验证 A: PCR 验证 EcN 染色体上 *attB* 位点. Lane 1、2: *att*_λ 位点; Lane 3、4: *att*_{HK022} 位点; Lane 5、6: *att*_{P22} (EcoB)位点; Lane 7、8: *att*_{φ80} 位点; Lane 9、10: *att*_{P21} 位点; Lane 11、12: *att*_{P22} 位点; Lane 13: DNA marker. B: PCR 验证三氯生抗性基因以及 *hemA*^M、*hemL* 整合 EcN 基因组情况. Lane 2: *hemA*^M、*hemL* 基因 PCR 扩增结果; Lane 9: DNA marker

Figure 2 Validation of PCR results. A: The *attB* sites on ECN chromosome were verified by PCR. Lane 1, 2: *att*_λ; Lane 3, 4: *att*_{HK02}; Lane 5, 6: *att*_{P22} (EcoB); Lane 7, 8: *att*_{φ80}; Lane 9, 10: *att*_{P21}; Lane 11, 12: *att*_{P22}; Lane 13: DNA marker. B: The integration of triclosan resistance gene, *hemA*^M and *hemL* was verified by PCR. Lane 2: The PCR amplification of *hemA*^M and *hemL*; Lane 9: DNA marker.

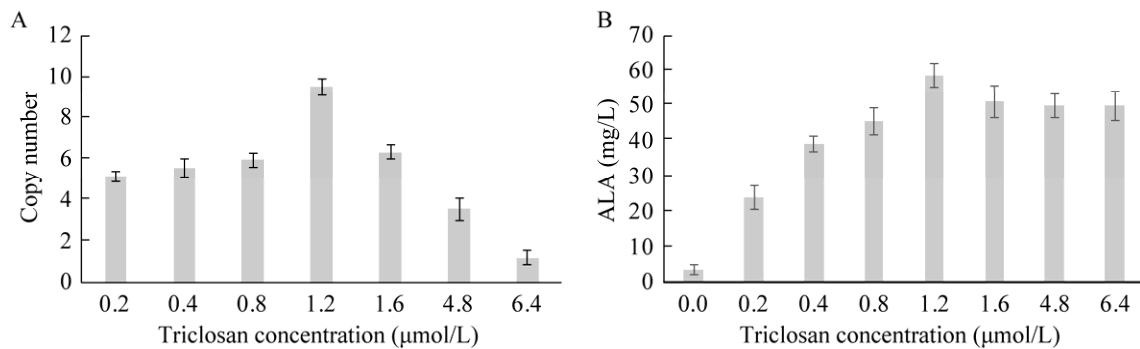


图3 *hemA* 拷贝数及 ALA 产量的检测 A: 不同浓度三氯生诱导产生不同进化菌株中 *hemA* 拷贝数分析. B: 发酵 48 h 时不同进化菌株中 ALA 产量分析

Figure 3 Detection of *hemA* copy number and ALA yield. A: Analysis of *hemA* copy number in different evolution strains induced by different concentrations of triclosan. B: Analysis of ALA production in different evolutionary strains during 48 h fermentation.

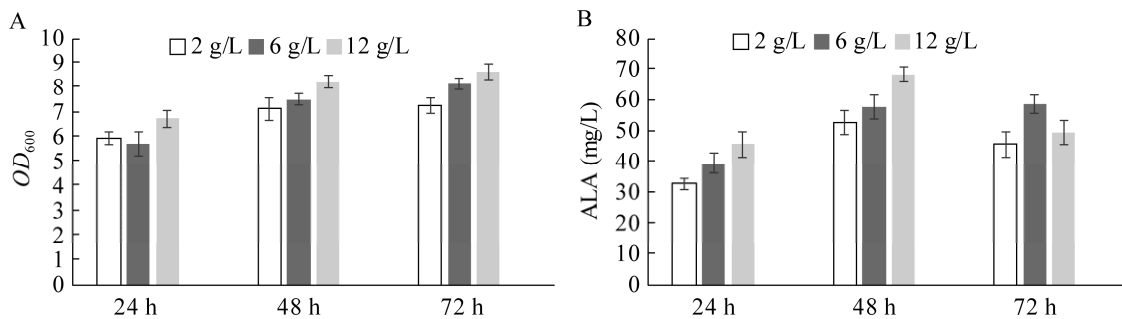


图4 不同酵母粉浓度条件下 HAL1a OD_{600} (A)与 ALA 产量(B)分析

Figure 4 Analysis of HAL1a OD_{600} (A) and ALA production (B) under different yeast extract concentration.

酵液,用无菌 PBS 缓冲液清洗菌体 2 次后,与 HCT116 在 37 °C 条件下共同孵育 90 min,同时用 PBS 缓冲液和野生型菌株 EcN 作为对照,用不同浓度的 5-ALA·HCl 作用于 HCT116 细胞,660 nm 光照射后,利用 MTT 法检测对 HCT116 细胞活性的影响。结果发现,与对照相比,HAL1a 明显抑制了肿瘤细胞的生长,其抑制水平与 40 mg/L 5-ALA·HCl 的抑制水平基本一致,而 5-ALA·HCl 浓度越高,对肿瘤细胞的抑制作用越强(图 5)。HAL1a 与 HCT116 共同孵育超过 2 h,会影响 HCT116 的生长。同时还检测了 HAL1a 对非洲绿猴肾细胞 Vero 的抑制作用。

EcN 与 HAL1a 均能在 Vero 细胞中生长,用 660 nm 光照射后,HAL1a 对正常细胞的生长具有一定的抑制作用,而 5-ALA·HCl 也会影响 Vero 细胞的生长(图 5)。以上结果表明,HAL1a 与 5-ALA·HCl 不仅能够抑制肿瘤细胞的生长,也会影响正常细胞的活性。

为了进一步了解 HAL1a 抑制 HCT116 生长的原因,采用同样的方法处理 HAL1a 发酵液,用 PBS 缓冲液和野生型菌株 EcN 作为对照,将不同浓度的 5-ALA·HCl 作用于 HCT116 细胞,然后利用 DCFH-DA 荧光探针检测 HCT116 细胞内 ROS 含量的变化。如图 6 所示,与对照相

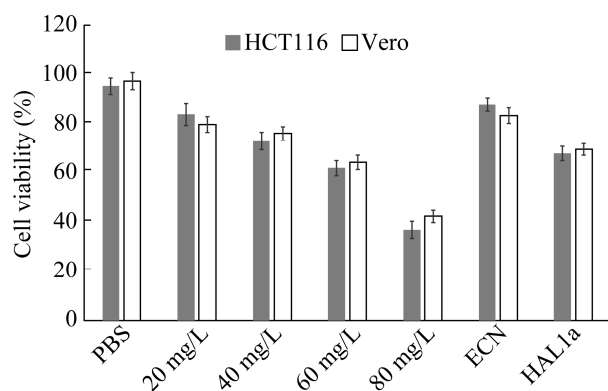


图5 利用 MTT 法检测 ECN、HAL1a 及不同浓度 5-ALA·HCl 对 HCT116 和 Vero 细胞活性的影响
Figure 5 Analysis of the effect of ECN, HAL1a and different concentrations of 5-ALA·HCl on cell viability of HCT116 and Vero cells by MTT.

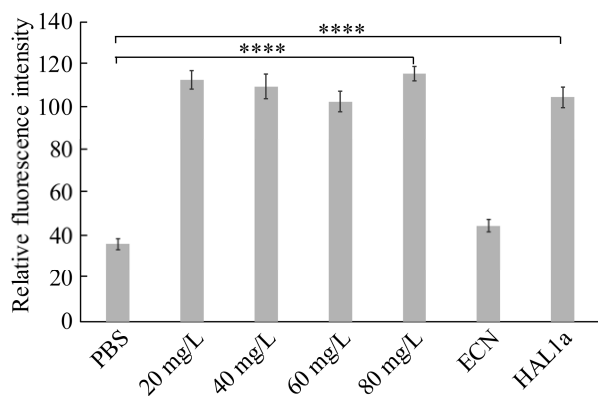


图6 利用 DCFH-DA 荧光探针法检测 ECN、HAL1a 及不同浓度 5-ALA·HCl 对 HCT116 细胞内 ROS 含量的影响 随机分 3 组, 每组 3 个重复, 利用 GraphPad Prism 8 软件进行双向方差分析及 Dunnett 多重比较分析, **** $P < 0.0001$

Figure 6 DCFH-DA assay for detecting intracellular ROS generation of HCT116 cells with ECN, HAL1a and different concentrations of 5-ALA·HCl. $n=3$, two-way ANOVA with Dunnett's multiple comparisons test by GraphPad Prism 8, **** $P < 0.0001$.

比, HCT116 在添加不同浓度的 5-ALA·HCl 处理 8 h, 再用 660 nm 进行光照后, 80 mg/L 5-ALA·HCl 显著提高了细胞内 ROS 含量。而加入 HAL1a 处理 90 min 后, 用 660 nm 进行光照,

发现 HAL1a 也明显提高了细胞内 ROS 含量。以上结果表明, HAL1a 合成 5-ALA 后可能会诱导肿瘤细胞产生 ROS, 促进肿瘤细胞的凋亡。

3 讨论与结论

为了避免质粒表达系统不稳定等缺点, Tyo 等^[19]利用无质粒的基因组整合方法, 通过传代使微生物基因组进化, 增加抗生素的浓度来筛选目的基因拷贝数较高的进化菌株, 即 CICHe。该方法只需要具备靶向基因组的整合方法和 RecA 同源重组系统。EcN 是从健康个体中分离出的一种益生菌株, 既带有 RecA 同源重组系统又能利用整合技术将目的基因靶向整合基因组^[20], 因生物相容性高、极易基因改造等特点, 常常被作为工程菌活药底盘用于肿瘤治疗。目前, 在 EcN 中利用 CICHe 方法构建工程菌的研究较少。

噬菌体整合系统由带有噬菌体特异性结合位点 *attP*、抗性标记的供体质粒、表达有噬菌体整合酶和噬菌体切除酶的辅助功能质粒组成。目的基因的插入位点仅限于染色体的 *attB* 位点, 且每次整合都必须构建特定的带有 *attP* 的供体质粒, 而供体质粒的骨架和抗性标记也会被一同整合到染色体上^[21]。目前, EcN 中噬菌体整合系统的研究尚未见报道。本研究以 5-ALA 的合成例^[17], 首先利用噬菌体整合技术将 *hemA^M*、*hemL* 整合至 EcN 基因组, 噬菌体整合技术能够高效地将大片段整合到染色体上, 且被整合的片段可以在噬菌体切除酶的作用下被去除。然而, 其插入位点仅限于染色体的 *attB* 位点, 且每次整合都必须构建特定的带有 *attP* 的供体质粒, 同时供体质粒的骨架和抗性标记会被一同整合到染色体上。研究表明, 大肠杆菌 K-12 中存在 phages λ 、HK022、P21、P22 等 *attB* 位点^[21], 但是本研究采用 PCR 技术

验证了 EcN 染色体中只存在 phages λ 和 HK022 这 2 种 *attB* 位点。通过与大肠杆菌 K-12 比较基因组分析结果显示, 两者的代谢能力有所不同, 而且 EcN 具有 108 个特异性编码区序列 (coding sequences, CDS), 并被划分为 4 个大的基因组岛屿以及许多小的基因群^[22], 表明 EcN 与大肠杆菌 K-12 在基因组序列与结构上存在不同之处。

有研究利用 CICH_E 方法成功构建了不携带质粒和抗生素标记的大肠杆菌莽草酸生产菌株, 将莽草酸的产量提高了 8.9 倍^[23]。Xu 等^[24] 利用 CICH_E 方法将 *pipA* 基因多拷贝整合大肠杆菌基因组, 提高了 L-赖氨酸高产菌株中 L-哌啶酸的生产效率。为了提高 *hemA^M*、*hemL* 拷贝数, 本研究通过 CICH_E 方法筛选进化菌株, 最高拷贝数只有 9 个。与其他研究相比, EcN 进化菌株整合拷贝数较低。在 CICH_E 进化过程中, 目的基因的拷贝数与筛选标记基因同步增加, 可通过不断增加筛选压力筛选出所需拷贝数的进化菌株。随着拷贝数不断增加, 细胞承受的代谢压力也会不断增加, 这就使得基因组上的拷贝数并不能一直增加, 甚至达到一定代谢压力时会下降。推测 EcN 与其他大肠杆菌如 K-12 基因组序列与结构不同, 其代谢调控也有所不同。在进化过程中, EcN 代谢压力逐渐增大, 当拷贝数达到 9 个以上时, EcN 无法继续承担代谢压力, 最终使得 *hemA^M*、*hemL* 整合到 EcN 基因组中的拷贝数较少。但是与对照相比, 5-ALA 产量大大提高。研究发现 CICH_E 能直接控制进化过程中的基因拷贝数, 将染色体一条单链上的所有拷贝进行串联并使其强制有序遗传^[25], 相比之下, 同一时间存在于不同宿主细胞的质粒拷贝数差别会很大, 并且在生长期和稳定期之间质粒拷贝数也可能有很大的变化。因此, 本研究构建的进化菌株 HAL1a 虽然与传

统质粒表达系统相比^[17], 5-ALA 产量相对较低, 但是不需要外源添加抗生素维持质粒的稳定和目的基因的高表达。

EcN 在稳定合成 5-ALA 的同时, 还能作为递送载体将 5-ALA 递送至肿瘤细胞, 诱导产生 ROS 并降低肿瘤细胞的活性。5-ALA 作为第二代光敏剂, 是一种内源性光敏剂, 其本身并没有光敏活性, 但是它可以进一步合成并转化形成原卟啉 IX 和其他具有光敏活性的卟啉化合物等中间产物。原卟啉 IX 及卟啉化合物吸收 630 nm 波长的光之后, 会导致活性氧 ROS 的产生, 从而引起细胞凋亡^[26]。本研究中 HAL1a 合成的大量 5-ALA 被 EcN 递送至肿瘤细胞后, 可能进入肿瘤细胞内的血红素合成途径并产生原卟啉 IX, 在 630 nm 光照后诱导产生大量 ROS。如图 5 和图 6 所示, HAL1a 与 40 mg/L 5-ALA·HCl 诱导肿瘤细胞产生的 ROS 含量及其对肿瘤细胞的抑制作用基本一致, 当肿瘤细胞处于高水平 ROS 环境时, 更易发生氧化应激等反应从而引发细胞凋亡, 所以与对照相比, HAL1a 所诱导产生的高水平 ROS 有效地抑制了肿瘤细胞的生长并引起细胞凋亡。与此同时, HAL1a 与 5-ALA·HCl 也影响 Vero 细胞活性, 表明 HAL1a 的靶向性较低。目前许多工程菌进行临床试验时以失败告终, 主要原因之一是存在生物安全性和肿瘤靶向性低等问题^[27-28], HAL1a 还需要进一步改造以降低其对正常细胞的影响。

综上所述, 本研究利用噬菌体整合技术与 CICH_E 技术将合成 5-ALA 的关键基因 *hemA^M*、*hemL* 整合到 EcN 基因组, 使 EcN 稳定合成 5-ALA, 并通过体外细胞实验初步验证了 EcN 能作为载体将 5-ALA 递送至肿瘤细胞进而抑制其生长, 为 EcN 工程菌用于肿瘤光动力治疗提供了研究依据。但是本研究还存在不足之处,

CiChE 技术在 EcN 中的应用还需要进一步优化以提高目的基因的拷贝数, 进而提高 5-ALA 的浓度, 其靶向性还需要进一步提高以降低对正常组织细胞的影响, 并需要利用小鼠肿瘤模型进行体内验证, 增强该工程菌的有效性与安全性。

REFERENCES

- [1] GURBATRI CR, ARPAIA N, DANINO T. Engineering bacteria as interactive cancer therapies[J]. *Science*, 2022, 378(6622): 858-864.
- [2] GROZDANOV L, ZÄHRINGER U, BLUM-OEHLER G, BRADE L, HENNE A, KNIREL YA, SCHOMBEL U, SCHULZE J, SONNENBORN U, GOTTSCHALK G, HACKER J, RIETSCHEL ET, DOBRINDT U. A single nucleotide exchange in the *wzy* gene is responsible for the semirough O6 lipopolysaccharide phenotype and serum sensitivity of *Escherichia coli* strain Nissle 1917[J]. *Journal of Bacteriology*, 2002, 184(21): 5912-5925.
- [3] ARRIBAS B, RODRÍGUEZ-CABEZAS M, CAMUESCO D, COMALADA M, BAILÓN E, UTRILLA P, NIETO A, CONCHA A, ZARZUELO A, GÁLVEZ J. A probiotic strain of *Escherichia coli*, Nissle 1917, given orally exerts local and systemic anti-inflammatory effects in lipopolysaccharide-induced sepsis in mice[J]. *British Journal of Pharmacology*, 2009, 157(6): 1024-1033.
- [4] SHEN HK, ZHAO ZT, ZHAO ZJ, CHEN YY, ZHANG LH. Native and engineered probiotics: promising agents against related systemic and intestinal diseases[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(2): 594.
- [5] LYNCH JP, GOERS L, LESSER CF. Emerging strategies for engineering *Escherichia coli* Nissle 1917-based therapeutics[J]. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2022, 43(9): 772-786.
- [6] WU MR, JUSIAK B, LU TK. Engineering advanced cancer therapies with synthetic biology[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2019, 19(4): 187-195.
- [7] ZHOU SB, GRAVEKAMP C, BERMUDEZ D, LIU K. Tumour-targeting bacteria engineered to fight cancer[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2018, 18(12): 727-743.
- [8] FORBES NS. Engineering the perfect (bacterial) cancer therapy[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2010, 10(11): 785-794.
- [9] 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.
- [10] DANINO T, PRINDLE A, KWONG GA, SKALAK M, LI H, ALLEN K, HASTY J, BHATIA SN. Programmable probiotics for detection of cancer in urine[J]. *Science Translational Medicine*, 2015, 7(289): 289ra84.
- [11] WEGMANN U, CARVALHO AL, STOCKS M, CARDING SR. Use of genetically modified bacteria for drug delivery in humans: Revisiting the safety aspect[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 2294.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] FUJINO M, NISHIO Y, ITO H, TANAKA T, LI XK. 5-Aminolevulinic acid regulates the inflammatory response and alloimmune reaction[J]. *International Immunopharmacology*, 2016, 37: 71-78.
- [15] 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: 183.
- [16] WANG RY, SHI ZY, CHEN JC, CHEN GQ. Cloning large gene clusters from *E. coli* using *in vitro* single-strand overlapping annealing[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2012, 1(7): 291-295.
- [17] CHEN YY, SHEN HJ, CUI YY, CHEN SG, WENG ZM, ZHAO M, LIU JZ. Chromosomal evolution of *Escherichia coli* for the efficient production of lycopene[J]. *BMC Biotechnology*, 2013, 13: 6.
- [18] CUI ZY, JIANG ZN, ZHANG JH, ZHENG HH, JIANG X, GONG K, LIANG QF, WANG Q, QI QS. Stable and efficient biosynthesis of 5-aminolevulinic acid using

- plasmid-free *Escherichia coli*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(5): 1478-1483.
- [19] TYO KEJ, AJIKUMAR PK, STEPHANOPOULOS G. Stabilized gene duplication enables long-term selection-free heterologous pathway expression[J]. Nature Biotechnology, 2009, 27(8): 760-765.
- [20] 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.
- [21] HALDIMANN A, WANNER BL. Conditional-replication, integration, excision, and retrieval plasmid-host systems for gene structure-function studies of bacteria[J]. Journal of Bacteriology, 2001, 183(21): 6384-6393.
- [22] SUN JB, GUNZER F, WESTENDORF AM, BUER J, SCHARFE M, JAREK M, GÖBLING F, BLÖCKER H, ZENG AP. Genomic peculiarity of coding sequences and metabolic potential of probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 inferred from raw genome data[J]. Journal of Biotechnology, 2005, 117(2): 147-161.
- [23] CUI YY, LING C, ZHANG YY, HUANG J, LIU JZ. Production of shikimic acid from *Escherichia coli* through chemically inducible chromosomal evolution and cofactor metabolic engineering[J]. Microbial Cell Factories, 2014, 13: 21.
- [24] XU X, RAO ZM, XU JZ, ZHANG WG. Enhancement of L-pipecolic acid production by dynamic control of substrates and multiple copies of the *pipA* gene in the *Escherichia coli* genome[J]. ACS Synthetic Biology, 2022, 11(2): 760-769.
- [25] LOVE AM, BIGGS BW, TYO KEJ, AJIKUMAR PK. Chemically inducible chromosomal evolution (CIChE) for multicopy metabolic pathway engineering[J]. Methods in Molecular Biology, 2019, 1927: 37-45.
- [26] CHANDRATRE S, OLSEN J, HOWLEY R, CHEN B. Targeting ABCG2 transporter to enhance 5-aminolevulinic acid for tumor visualization and photodynamic therapy[J]. Biochemical Pharmacology, 2023, 217: 115851.
- [27] 宋健, 袁志君, 邹丽, 冯贻蕊, 李晓岩, 张佳艺, 于晓丽. 合成生物学与纳米生物学的交叉融合及其在肿瘤细菌疗法中的应用进展[J]. 生命科学, 2024, 36: 1040-1048.
- SONG J, YUAN ZJ, ZOU L, FENG YR, LI XY, ZHANG JY, YU XL. Integration of synthetic biology and nanobiotechnology for the application of bacterial cancer therapy[J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2024, 36: 1040-10485 (in Chinese).
- [28] HAHN J, DING SW, IM J, HARIMOTO T, LEONG KW, DANINO T. Bacterial therapies at the interface of synthetic biology and nanomedicine[J]. Nature Reviews Bioengineering, 2024, 2(2): 120-135.

(本文责编 郝丽芳)