

铜绿假单胞菌注射液抗肿瘤作用及其相关机制的研究进展

洪义东^{1,2}, 胡楠¹, 卞宝祥¹, 宋子琰¹, 吴风雷^{1,2*} (1.江苏大学医学院, 江苏 镇江 212013; 2.连云港市第一人民医院, 江苏 连云港 221000)

摘要: 绿假单胞菌注射液(PA-MSHA)是一类用于免疫治疗的生物制剂, 在临床应用和基础研究中均表现出良好的抗肿瘤作用。其抗肿瘤作用包括调节免疫、提高化疗药物敏感性和逆转耐药等方面。本文对铜绿假单胞菌注射液抗肿瘤作用及其相关机制研究进展进行综述。

关键词: 铜绿假单胞菌注射液; 肿瘤治疗; 免疫; 信号通路; 耐药

中图分类号: R96 **文献标志码:** A **文章编号:** 1007-7693(2019)02-0256-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.02.027

引用本文: 洪义东, 胡楠, 卞宝祥, 等. 铜绿假单胞菌注射液抗肿瘤作用及其相关机制的研究进展[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(2): 256-259.

Research Advances in the Mechanisms for Anti-tumor Effect of Pseudomonas Aeruginosa Injection

HONG Yidong^{1,2}, HU Nan¹, BIAN Baoxiang¹, SONG Ziyang¹, WU Fenglei^{1,2*} (1.School of Medicine, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China; 2.First People's Hospital of Lianyungang, Lianyungang 221000, China)

ABSTRACT: Pseudomonas aeruginosa injection(PA-MSHA) is a kind of biologics agents for immunotherapy, which demonstrates promising anti-tumor effects in both clinical and basic research. The mechanism of its anti-tumor effects include regulating immunity, increasing the sensitivity of chemotherapy drug and reversing the drug resistance. This review focuses on the research advances in the mechanisms for anti-tumor effect of PA-MSHA injection.

KEYWORDS: pseudomonas aeruginosa injection; tumor therapy; immunity; signal pathway; drug resistance

铜绿假单胞菌注射液是以我国微生物学家牟希亚教授选育的铜绿假单胞菌-甘露糖敏感血凝菌毛株(pseudomonas aeruginosa mannose-sensitive hemagglutinin, PA-MSHA)为载体, 通过生物工程技术制成, 已被CFDA批准用于恶性肿瘤的辅助治疗, 除了抗肿瘤作用外还具有改善人体免疫状况、降低感染并发症发生率的作用。PA-MSHA的菌毛为I型菌毛, 有以下特征: (1)菌体周生许多纤细而直的菌毛; (2)MSHA强阳性; (3)平板菌落红细胞黏附实验强阳性。除了增强机体肿瘤免疫应答, 减少免疫逃逸外^[1], PA-MSHA还可以与甘露糖高表达的肿瘤细胞结合, 影响其生物学行为, 进一步增强抗肿瘤效应^[2]。本文着重介绍PA-MSHA在肿瘤治疗领域的研究进展。

1 PA-MSHA与肿瘤免疫

1.1 肿瘤免疫

免疫分为细胞免疫以及体液免疫, 在肿瘤免疫中以细胞免疫为主, 尤其是以CD8⁺T淋巴细胞(cytotoxic T cells, CTLs)介导并受主要组织相容性

I类分子限制的特异性细胞免疫为抗肿瘤的主要力量。在肿瘤免疫过程中, 抗原提呈细胞(antigen-presenting cell, APC)摄取和加工处理肿瘤抗原, 并将处理后的肿瘤抗原, 递呈T淋巴细胞, 诱导产生抗肿瘤免疫反应。大多数肿瘤均存在肿瘤细胞特有的癌基因或抑癌基因的表达异常或突变, 其产物可为T细胞识别, 已成为肿瘤免疫治疗研究的热点。Daniel Chen对肿瘤免疫反应的全过程进行了全面总结, 在机体激活肿瘤免疫应答, 继而发生肿瘤特异免疫杀伤的过程中涉及一系列环境, 细微精巧而又环环相扣, 被称为肿瘤免疫循环^[3](图1): ①树突状细胞(dendritic cell, DC)的摄取、处理释放的肿瘤抗原; ②通过MHCI类分子或MHCII类分子, DC细胞将抗原递呈给T细胞; ③T细胞活化、增殖成为能识别肿瘤抗原的效应T细胞(effector T cells, ETLs); ④⑤上述ETLs通过血液随循环到达并渗入肿瘤组织; ⑥肿瘤细胞MHCI类分子所递呈的抗原与ETLs表面T细胞受体(T cell receptor, TCR)特异性识别并结合;

作者简介: 洪义东, 男, 硕士生 Tel: 13675202939 E-mail: hongyidong@163.com
师 Tel: 18961328007 E-mail: wufenglei1981@163.com

***通信作者:** 吴风雷, 男, 博士, 副主任医师

⑦ETLs 杀伤肿瘤。因此提高免疫细胞 ETLs 的绝对数量和增加其在肿瘤局部的浸润并减少肿瘤免疫逃逸是提高肿瘤免疫效应的关键。

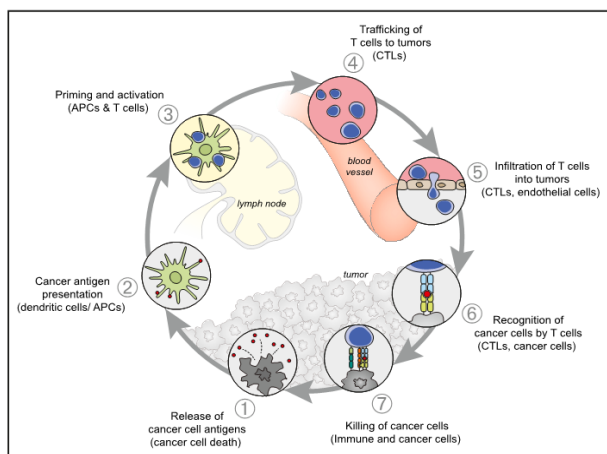


图1 肿瘤免疫循环示意图^[3]

Fig. 1 Diagram of the cancer-immunity cycle^[3]

1.2 促进肿瘤免疫细胞克隆增生

多项研究证实 PA-MSHA 可提高肿瘤免疫效应细胞的数量。Zhang 等^[4]对 Lewis 肺癌(Lewis lung carcinoma, 3LL)荷瘤小鼠皮下注射 PA-MSHA 和 3LL 细胞蛋白萃取物,可促进 DC 成熟,表现为细胞表面共刺激分子(CD86, CD80 和 I-Ab)表达量增加,DC 内吞活性下降,细胞因子 IL-12, TNF- α , IL-6 和 IL-1 β 分泌增加。成熟 DC 促进 CD4+/CD8+T 细胞增殖,上调 CD40L 表达量,增加 IFN- γ 分泌量。并且以剂量和频率依赖的方式抑制小鼠 3LL 肿瘤生长。在膀胱癌研究中,同样证实了 PA-MSHA 能促进 CD4+/CD8+T 细胞增殖^[5]。每周 2 次 PA-MSHA 皮下注射 MB49 膀胱癌细胞荷瘤小鼠,观察 3 周。结果显示,在第 21 天和 28 天 CD4+/CD8+T 水平显著增加, TNF- α 和 IFN- γ 分泌量明显升高,小鼠体内肿瘤生长受到显著抑制。这些研究结果表明 PA-MSHA 可明显提高荷瘤小鼠的肿瘤免疫。

1.3 增加免疫细胞在肿瘤微环境浸润

肿瘤的发生、发展及转移依赖新生血管的形成。在众多促进血管生成的内源性因子中,血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)发挥了关键性作用,VEGF 不仅可介导肿瘤转移,而且可通过控制免疫细胞的运输来抑制肿瘤免疫^[6]。VEGF 过表达可导致多种肿瘤新生血管形成,包括乳腺癌、结肠癌、胃癌、肝癌、膀胱

癌和前列腺癌等恶性肿瘤,促进肿瘤生长。VEGF 还可保护已生成的肿瘤新生血管^[7]。与正常血管相比,肿瘤血管系统结构紊乱,表现为肿瘤微血管密度(microvessel density, MVD)增加,血管形态迂曲、膨胀,血管直径不一,血管壁薄等^[8]。2017 年 Nature 最新研究指出,肿瘤血管的非正常紊乱结构影响淋巴细胞浸润,T 细胞浸润减少也会减少肿瘤血管正常化。肿瘤血管正常化可促进 T 细胞浸润,T 细胞浸润也会促进肿瘤血管正常化,二者之间存在正反馈调节机制。其中分泌干扰素的 TH1 细胞在肿瘤血管正常化过程中起主要作用。CD4+T 细胞可明显减少肿瘤细胞 VEGF 的表达,促进肿瘤血管正常化,并因此进一步促进 T 淋巴细胞浸润^[9]。这一理论的提出对之前 PA-MSHA 皮下注射降低了肿瘤组织的 VEGF 表达量和 MVD,并且促进 CD4+T 和 CD8+T 淋巴细胞增殖的研究提供了理论基础^[5]。因此,PA-MSHA 可通过抑制 VEGF 表达,增加免疫效应细胞在肿瘤局部的浸润,增强肿瘤免疫反应。

1.4 逆转肿瘤免疫逃逸

目前的观点认为肿瘤是恶变细胞与免疫系统打破平衡并获胜的产物,肿瘤细胞的长期荷瘤状态诱导了机体免疫耐受的产生,从而机体难以杀灭肿瘤细胞^[3]。过去的几十年里,恶性肿瘤的免疫治疗领域进展缓慢。其中针对免疫检查点(Immune-checkpoint-blockade, ICB)的治疗是近几年来肿瘤免疫治疗领域的热点。细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4(cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4, CTLA-4)是第 1 个被发现的负性调节的免疫检查点,伊匹单抗应用在恶性黑色素瘤治疗中显示出了良好的效果。随后,有研究报道了 PD-1 单抗纳武单抗、以及 PD-L1 单抗阿特珠单抗分别治疗恶性黑色素瘤、肾癌和非小细胞肺癌患者获益。免疫检查点治疗药物 CTLA-4 单抗伊匹单抗阻断了图 1 步骤③中的负作用信号,而 PD-1 单抗纳武单抗、派姆单抗以及 PD-L1 单抗阿特珠单抗则通过阻断步骤 7 中的负作用信号起效。Zhang 等的研究^[1]表明,PA-MSHA 可增加其表面共激活受体 CD28 的表达,促进细胞因子诱导的 ETLs 增殖,同时降低共抑制受体 PD-1 和 CTLA-4 表达,降低肿瘤免疫逃逸的发生。因此,PA-MSHA 在逆转肿瘤免疫逃逸方面有一定的应用前景。

2 靶向性抑制表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)信号通路

EGFR 是受体酪氨酸激酶家族成员之一,该家族成员还包括 HER2、HER3 和 HER4。当配体与 EGFR 胞外段结合后,EGFR 形成同源或异源二聚体,进一步激活受体细胞内的酪氨酸激酶,磷酸化自身和一系列底物蛋白,调控细胞应答。EGFR 在多种肿瘤中存在过表达和(或)突变,且 EGFR 信号通路的激活与肿瘤细胞增殖,血管生成和转移密切相关。基于此特点,已开发出一系列针对 EGFR 的靶向药物,阻断信号转导,抑制肿瘤生长,并在临床取得一定疗效^[10]。

研究表明,EGFR 含有大量的甘露糖^[11-12],过表达 EGFR 的细胞,其 EGFR 常以不成熟的高甘露糖表型表达于细胞外^[12-13]。PA-MSHA 的 I 型菌毛含甘露糖结合蛋白,可识别 EGFR 胞外段高表达的甘露糖,抑制 EGFR 的活化,阻断信号转导,抑制肿瘤细胞生长。目前已经证实在乳腺癌^[2]、胰腺癌^[14]、膀胱癌^[15]等过表达 EGFR 的实体瘤中,PA-MSHA 可抑制 EGFR 自身及下游蛋白 AKT、ERK 磷酸化,阻断信号转导,抑制细胞增殖,诱导凋亡,使细胞周期阻滞于 G1 期^[2]或 S 期^[14]。

3 逆转分子靶向药物耐药

相较于手术、放疗、化疗 3 大传统治疗手段,靶向药物治疗能高效并选择性地杀伤肿瘤细胞,减少对正常组织的损伤,不仅疗效显著,且不良反应远远小于放化疗,为肿瘤患者带来了生存和预后获益。然而,靶向药物治疗也面临着与传统治疗手段相同的耐药问题,如何克服耐药成为肿瘤治疗的一大难题。

研究表明,在肺癌中,PA-MSHA 联合 EGFR-TKI 可以逆转非小细胞肺癌靶向治疗后耐药^[16]。该实验选取 3 种不同基因表型的肺腺癌细胞株 A-549、PC-9 和 NCI-H1075,基因表型分别为 EGFR 野生型、19 外显子缺失突变、T790M 和 L85R 突变。研究结果显示,PA-MSHA 单药即可对肿瘤细胞产生抑制,这种抑制作用表现为时间与浓度依赖性。其次,PA-MSHA 将细胞周期阻滞于 Sub-G1 期,而且影响 EGFR 信号通路中关键蛋白 EGFR、ERK 和 AKT 的磷酸化,阻断信号转导。在联合应用了吉非替尼后,这些作用得到增强,即使在吉非替尼原发耐药细胞 A-549 中也同样有效。

4 提高患者自身免疫功能

恶性肿瘤患者常存在明显的免疫功能低下,机体处于免疫抑制状态。放化疗作为肿瘤治疗的常规方法,又会造成机体免疫功能进一步下降。因此,需要提高肿瘤患者的免疫功能,避免感染等继发性疾病的发生。临床研究表明^[17],PA-MSHA 能有效提高肺癌患者的免疫功能,包括细胞免疫和体液免疫。该研究将 89 例肺癌患者随机分为试验组与对照组,试验组 44 例患者,对照组 45 例患者。2 组患者采用相同的化疗方案,实验组加用 PA-MSHA,分别于试验第 1 周(1, 3, 5 d)上臂皮下注射 PA-MSHA 菌苗 0.5 mL,第 2 周起每周第 5 天注射 0.8 mL,共 10 周 12 次。在治疗前、中、后检测患者免疫功能。结果表明,PA-MSHA 可增加肺癌患者 C3、C4、CD4/CD8 比值、NK 细胞活性和 IL-2 水平,降低感染率、减轻感染程度。可能原因为 PA-MSHA 菌苗为多价菌苗,可使肺癌患者绿脓杆菌、大肠杆菌、肺炎克雷白氏杆菌和变形杆菌抗体滴度增加。

5 提高化疗药物敏感性

化疗目前仍是治疗肿瘤的重要手段,但整体有效率偏低,即使是治疗有效的患者,大多数因疾病进展或转移而导致治疗失败。因此,通过适当的干预提高现有治疗方法的效果,对提升肿瘤患者治疗效果,改善预后有重要的意义。多项研究表明 PA-MSHA 联合化疗药物能提高肿瘤治疗效果。陈卫东等^[18]比较了 PA-MSHA 皮下注射联合 TAC 方案与单独应用 TAC 方案在乳腺癌新辅助治疗中的疗效,结果显示,单纯应用 TAC 方案 2 周期有效率为 56.7%,而 PA-MSHA 皮下注射联合 TAC 方案 2 周期有效率为 76.7%,有效证实 PA-MSHA 联合其他化疗药物较单一使用化疗药物能发挥更好的抗肿瘤作用。联合用药同时增加了患者对化疗药物的耐受性,降低化疗不良反应,减少术后并发症。而 PA-MSHA 本身的主要不良反应为注射局部皮肤的红、肿、热、痛、硬结以及高热寒颤,大部分患者均无需特殊处理,可自行消退。另一项 II 期临床试验表明,PA-MSHA 皮下注射联合卡培他滨用于二线及以上治疗 Her2 阴性转移性乳腺癌,出现免疫相关不良反应(如发热、注射部位皮肤硬结)的患者 PFS 明显长于无免疫不良反应的患者(8.2 月 vs 3.1 月, $P=0.003$)。总生存期也有一定程度的延长(25.4 月 vs 16.4 月,

$P=0.044$)^[19]。

6 结语

微生物及其产物被用于肿瘤的治疗已有 100 多年历史,并取得了一定的疗效,例如卡介苗在膀胱癌中的应用等^[20]。然而在其治疗肿瘤的过程中常常伴随着微生物相关的感染或其他不良反应^[21],这在一定程度上限制了其临床应用。铜绿假单胞菌注射液作为新型的生物制剂,不仅具有调节肿瘤免疫的作用,还有直接杀伤肿瘤细胞的细胞毒作用,其安全性好,不良反应少,已被批准用于恶性肿瘤的辅助治疗。但是仍然有一些问题值得探讨:①目前对于 PA-MSHA 的使用剂量和频率仍没有统一的意见,如何调整给药剂量及频率以达到最佳效果有待进一步研究。②已证实 PA-MSHA 的作用靶点为 EGFR,而 EGFR 家族的其他成员如 Her-2,与 EGFR 有一定的同源性,是否也可能是 PA-MSHA 的作用靶点,有待进一步证实。相信通过进一步对其抗肿瘤机制的研究,PA-MSHA 在肿瘤治疗领域将会有广阔的临床应用前景。

REFERENCES

- [1] ZHANG Z, WANG L P, ZHAO X L, et al. Pseudomonas aeruginosa injection enhanced antitumor cytotoxicity of cytokine-induced killer cells derived from cord blood [J]. Biomed Pharmacother, 2014, 68(8): 1057-1063.
- [2] LIU Z B, HOU Y F, ZHU J, et al. Inhibition of EGFR pathway signaling and the metastatic potential of breast cancer cells by PA-MSHA mediated by type I fimbriae via a mannose-dependent manner [J]. Oncogene, 2010, 29(20): 2996-3009.
- [3] CHEN D S, MELLMAN I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle [J]. Immunity, 2013, 39(1): 1-10.
- [4] ZHANG M, LUO F, ZHANG Y, et al. Pseudomonas aeruginosa mannose-sensitive hemagglutinin promotes T-cell response via toll-like receptor 4-mediated dendritic cells to slow tumor progression in mice [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2014, 349(2): 279-287.
- [5] LI T, YANG L, FU S J, et al. Subcutaneous injections of the mannose-sensitive hemagglutination pilus strain of pseudomonas aeruginosa stimulate host immunity, reduce bladder cancer size and improve tumor survival in mice [J]. Cell Biochem Biophys, 2015, 73(1): 245-252.
- [6] FUKUMURA D, KLOPPER J, AMOOZGAR Z, et al. Enhancing cancer immunotherapy using antiangiogenics: opportunities and challenges [J]. Nat Rev Clin Oncol, 2018, 15(5): 325-340.
- [7] MCMAHON G. VEGF receptor signaling in tumor angiogenesis [J]. Oncologist, 2000, 5(Suppl 1): 3-10.
- [8] CARMELIET P, JAIN R K. Angiogenesis in cancer and other diseases [J]. Nature, 2000, 407(6801): 249-257.
- [9] TIAN L, GOLDSTEIN A, WANG H, et al. Mutual regulation of tumour vessel normalization and immunostimulatory reprogramming [J]. Nature, 2017, 544(7649): 250-254.
- [10] SIGISMUND S, AVANZATO D, LANZETTI L. Emerging functions of the EGFR in cancer [J]. Mol Oncol, 2018, 12(1): 3-20.
- [11] KAWASHIMA N, YOON S J, ITOH K, et al. Tyrosine kinase activity of epidermal growth factor receptor is regulated by GM3 binding through carbohydrate to carbohydrate interactions [J]. J Biol Chem, 2009, 284(10): 6147-6155.
- [12] JOHNS T G, MELLMAN I, CARTWRIGHT G A, et al. The antitumor monoclonal antibody 806 recognizes a high-mannose form of the EGF receptor that reaches the cell surface when cells over-express the receptor [J]. Faseb J, 2005, 19(7): 780-782.
- [13] HELENIUS A, AEBI M. Intracellular functions of N-linked glycans [J]. Science, 2001, 291(5512): 2364-2369.
- [14] CHENG X, WANG B, JIN Z, et al. Pseudomonas aeruginosa-mannose-sensitive hemagglutinin inhibits pancreatic cancer cell proliferation and induces apoptosis via the EGFR pathway and caspase signaling [J]. Oncotarget, 2016, 7(47): 77916-77925.
- [15] CHANG L, XIAO W, YANG Y, et al. Pseudomonas aeruginosa-mannose-sensitive hemagglutinin inhibits epidermal growth factor receptor signaling pathway activation and induces apoptosis in bladder cancer cells *in vitro* and *in vivo* [J]. Urol Oncol, 2014, 32(1): 36.
- [16] ZHAO X M, PAN S Y, HUANG Q L, et al. PA-MSHA in combination with EGFR tyrosine kinase inhibitor: A new strategy to overcome the drug resistance of non-small cell lung cancer cells [J]. Oncotarget, 2016, 7(31): 49384-49396.
- [17] LI Z, HAO D, LI L, et al. A clinical study on PA-MSHA vaccine in adjuvant therapy of lung cancer [J]. Chin J Lung Cancer(中国肺癌杂志), 1999, 2(1): 20-22.
- [18] CHEN W D, TANG Z H, XU F. Application of PA-MSHA vaccine adjuvant therapy and TAC scheme for treatment of breast carcinoma [J]. J Southern Med Univ(南方医科大学学报), 2009, 29(6): 1204-1207.
- [19] LV F, CAO J, LIU Z, et al. Phase II study of Pseudomonas aeruginosa-Mannose-Sensitive hemagglutinin in combination with capecitabine for Her-2-negative metastatic breast cancer pretreated with anthracycline and taxane [J]. PLoS One, 2015, 10(3): e0118607.
- [20] PUNJ V, SAINT-DIC D, DAGHFAL S, et al. Microbial-based therapy of cancer: A new twist to age old practice [J]. Cancer Biol Ther, 2004, 3(8): 708-714.
- [21] DANG L H, BETTEGOWDA C, HUSO D L, et al. Combination bacteriolytic therapy for the treatment of experimental tumors [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(26): 15155-15160.

收稿日期: 2018-03-27

(本文责编: 李艳芳)