

• 综 述 •

趋磁细菌及磁小体在肿瘤治疗中的应用

刘召明¹, 林敏², 杨雪¹, 汲霞¹

1 齐鲁医药学院 药学院, 山东 淄博 255300

2 泰安市中心医院 检验科, 山东 泰安 271000

刘召明, 林敏, 杨雪, 等. 趋磁细菌及磁小体在肿瘤治疗中的应用. 生物工程学报, 2021, 37(9): 3190-3200.

Liu ZM, Lin M, Yang X, et al. Application of magnetotactic bacteria and magnetosomes in cancer therapy: a review. Chin J Biotech, 2021, 37(9): 3190-3200.

摘 要: 提高抗肿瘤药物的靶向性是肿瘤治疗、降低药物副作用的重要手段。在肿瘤组织内部由于癌细胞的快速增殖致使其形成低氧区, 低氧区会对多种肿瘤治疗方案产生耐受。趋磁细菌 (Magnetotactic bacteria, MTB) 是一类能在细胞内产生外包生物膜、纳米尺寸、单磁畴磁铁矿 (Fe_3O_4) 或硫铁矿 (Fe_7S_8) 晶体颗粒-磁小体的微生物的统称。在磁场的作用下, 趋磁细菌可凭借鞭毛运动至厌氧区。趋磁细菌在动物体内毒性较低且生物相容性良好, 其磁小体与人工合成的磁性纳米材料相比优势显著。文中在介绍趋磁细菌及其磁小体生物学特点、理化性能的基础上, 综述了趋磁细菌作为载体偶联药物进入肿瘤内部, 并通过感受低氧信号定位于肿瘤低氧区, 以及趋磁细菌竞争肿瘤细胞铁源的研究进展, 总结了磁小体运载化疗药物、抗体、DNA 疫苗靶向结合肿瘤的研究进展, 分析了趋磁细菌及磁小体肿瘤治疗中面临的问题, 并对趋磁细菌和磁小体在肿瘤治疗中的应用进行了展望。

关键词: 趋磁细菌, 磁小体, 肿瘤低氧区, 药物传递系统

Application of magnetotactic bacteria and magnetosomes in cancer therapy: a review

Zhaoming Liu¹, Min Lin², Xue Yang¹, and Xia Ji¹

1 College of Pharmacy, Qilu Medical University, Zibo 255300, Shandong, China

2 Department of Pathology, Taian City Central Hospital, Taian 271000, Shandong, China

Abstract: The targeting of anti-tumor drugs is an important means of tumor treatment and reducing drug side effects. Oxygen-depleted hypoxic regions in the tumour, which oxygen consumption by rapidly proliferative tumour cells, are generally resistant to therapies. Magnetotactic bacteria (MTB) are disparate array of microorganism united by the ability to biomineralize membrane-encased, single-magnetic-domain magnetic crystals (magnetosomes) of minerals magnetite or greigite. MTB by means of flagella, migrate along geomagnetic field lines and towards low oxygen concentrations. MTB have

Received: March 29, 2021; **Accepted:** May 28, 2021

Supported by: Shandong Province Higher Educational Science and Technology Program, China (No. J18KBO85).

Corresponding author: Zhaoming Liu. Tel: +86-533-2829398; Fax: +86-533-2829166; E-mail: liuzm83@163.com

山东省高校科研计划 (No. J18KBO85) 资助。

网络出版时间: 2021-06-07

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20210607.1249.002.html>

advantage of non-cytotoxicity and excellent biocompatibility, moreover magnetosomes (BMs) is more powerful than artificial magnetic nanoparticles(MNPs). This review has generally described the biological and physical properties of MTB and magnetosomes, More work deals with MTB which can be used to transport drug into tumor based on aerotactic sensing system as well as the competition of iron which is a key factor to proliferation of tumor. In addition, we summarized the research of magnetosomes, which be used as natural nanocarriers for chemotherapeutics, antibodies, vaccine DNA. Finally, We analyzed the problems faced in the tumor treatment using of MTB and bacterial magnetosomes and prospect development trends of this kind of therapy.

Keywords: magnetotactic bacteria, magnetosomes, tumour hypoxic regions, drug delivery systems

恶性肿瘤严重威胁着人类的健康。世界卫生组织国际癌症研究机构 (IARC) 发布全球最新的癌症数据显示, 2020 年全球新发癌症病例 1 929 万例, 全球癌症死亡病例 996 万例。在癌症的晚期, 肿瘤细胞会出现多重的药物耐受性导致治疗药物疗效降低, 且治疗药物的副作用对身体造成伤害, 这些因素导致肿瘤治疗的失败^[1-2]。所以, 需要进一步研究新的肿瘤治疗方案, 通过创新治疗方法以期提高癌症治疗的有效率和患者的生存率^[3]。肿瘤药物治疗是一种非常重要的肿瘤治疗手段, 但由于多种原因肿瘤往往会出现耐药性, 使肿瘤细胞对化疗药物无反应。经研究发现, 很多原因致使化疗药物对肿瘤细胞的靶标分子失去反应, 例如, 肿瘤细胞的细胞膜蛋白将化疗药物排出细胞外; 药物被外源性酶类催化反应脱毒; 药物在细胞内被某些结构分子螯合, 使其不能到达作用靶点等^[4]。

在实体瘤中, 能辅助药物识别并靶向作用于肿瘤的输送系统非常关键^[5]。而药物输送系统的有效性受到各种因素的影响, 例如, 机体内的生物学屏障、药物在体内的药物代谢动力学过程、药物释放度等。药物在体内与血清蛋白结合, 药物被体内的吞噬细胞清除, 体内血管通透性降低, 血管网络密集程度及肿瘤大小不同对气体、营养物质及代谢产物的分布产生影响^[6-7], 以上因素降低了药物对肿瘤的治疗效果。

为了解决以上问题, 设计新的有效的肿瘤治疗方案的关键是保证化疗药物能够穿透生物屏障, 并维持结构稳定性和药物有效分布, 最终靶

向地结合目标分子^[8]。趋磁细菌 (Magnetotactic bacteria, MTB) 及其产生的磁小体 (Magnetosomes) 是针对以上问题有效的选择之一, 研究表明, 趋磁细菌和磁小体的优良特性在肿瘤治疗中应用潜力巨大^[9]。

Blakemore 于 1975 年报道了能够趋磁运动的细菌, 并分离出第一株趋磁细菌命名为 *Magnetospirillum magnetotacticum* strain (MS-1)^[10]。目前国内外学者对磁小体的应用研究比较深入, 磁小体作为一种新型生物源磁性纳米材料应用广阔, 但对趋磁细菌的医药应用研究相对较少。趋磁细菌的生物学性能适合作为药物载体。研究发现, 趋磁细菌装配有鞭毛, 能在水中主动运动且迅速, 并能自主感知低氧信号并定位低氧或厌氧区域^[11-12], 这与实体肿瘤内部往往存在低氧环境完美契合。趋磁细菌的比表面积大, 且细胞膜上富含活性基团, 可实现与化学药物的连接。趋磁细菌作为嗜铁微生物可以与肿瘤细胞争夺铁源等。笔者对山东省淄博市孝妇河流域沿岸进行取样观察, 发现趋磁细菌分布广泛, 并且其细胞形态存在着极大的多样性。同时我们开展了趋磁细菌与荧光碳点相容性的研究, 使用荧光碳点标记趋磁细菌, 以准确显影其在生物组织中的分布, 为探索趋磁细菌的药物载体应用提供新的菌种资源和方法。因此, 本文在介绍趋磁细菌和磁小体生物学特点的基础上, 重点总结了趋磁细菌和磁小体作为药物载体及菌体代谢对肿瘤治疗的研究进展, 同时还分析了趋磁细菌及磁小体应用肿瘤治疗方面的亟待解决的问题并对后续研究进行了展望。

1 趋磁细菌和磁小体简介

随着研究的逐步深入,发现趋磁细菌的种属分布非常广,已发现的趋磁细菌属于3个门——变形菌门(α -、 δ -、 γ -变形菌纲)、硝化螺旋菌门、Omnitrophica 门^[13-15]。自然界中的趋磁细菌主要分布于海洋和淡水的水生环境的表层沉积物中,最适温度为22℃–30℃,当温度高于37℃或低于15℃时,细菌生长得极慢,且当温度较高时,菌体的形态会发生改变。研究表明,不同种类趋磁细菌的分布与环境中的硫化物和氧梯度有关^[16]。已发现的MTB形态多样,有杆状、弧形、球形和螺旋状以及多细胞聚集体。大部分趋磁细菌形成膜包裹的磁铁矿(Fe_3O_4)或硫铁矿(Fe_3S_4)磁小体,磁小体外包的生物膜与细胞质膜同源,由脂质双分子层和多种蛋白质组成。在水中,趋磁性使趋磁细菌逃避有害的好氧环境而移动至其生长的最适区域——有氧-无氧过渡区(Oxic-anoxic transition zone, OATZ)。不同种类的趋磁细菌的磁小体的形状和尺寸有所区别,现已发现的绝大多数磁小体直径大小在35–80 nm之间,此粒径处在稳定的单畴晶体范围内^[17-18],磁小体的形态复杂多样,现在发现有非链状排列的磁小体,也揭示了其宏观磁性性质的多样性^[19]。

Faramarzi 提出了链状磁小体形成机制假说:首先趋磁细菌生物膜内陷形成囊泡,然后从环境中吸收铁并将其运输到“细胞器”,再将磁小体排列成有序的纳米结构,最后形成具有可控尺寸和形态的磁性纳米颗粒^[20]。分子生物学和基因组学研究发现了在磁小体形成和成熟过程中涉及的相关蛋白质,这些蛋白质均通过磁小体基因岛编码,包括高保守的MamAB、MamM、MamE、MamO、MamN等,这些蛋白质是形成磁小体的必需蛋白,同样发现在形成过程中可能起作用的MamH、MamX、MamY、MamZ、MamC、MamG等蛋白^[21]。其中,MamQ和MamL参与磁小体囊泡的形成,MamJ和MamK控制磁小体链的形成^[22],

MamF、MamD、MamT、MamP、MamR、MamS、Mms6、MamB和MamM控制 Fe_3O_4 的合成^[23-25]。利用分子生物学技术特别是基因敲除实验已经确认了这些磁小体膜蛋白的功能,这为探明磁小体的合成机理及提升磁小体的产量奠定了基础。

2 趋磁细菌和磁小体在肿瘤治疗中的应用

趋磁细菌具有趋磁性、识别低氧信号并定位低氧区、良好的生物学相容性、细胞表面的活性基团丰富、较强的铁富集能力等特点;与人工合成的磁性纳米颗粒相比,磁小体具有外包生物膜易修饰、比表面积大,具有单畴性、良好生物学相容性、形态和大小均一性等优良特性,因此趋磁细菌和磁小体适用于药物载体用于肿瘤治疗,总结归纳趋磁细菌及磁小体用于治疗肿瘤的方式见图1。

2.1 趋磁细菌和磁小体的安全性

趋磁细菌和磁小体对正常细胞的安全性是其应用在肿瘤治疗中的前提条件。为开发趋磁细菌和磁小体的临床应用,必须证实趋磁细菌对正常细胞无致病力,保证磁小体无细胞毒性和基因毒性。最初的研究认为,趋磁细菌属于革兰氏阴性菌,且磁小体外膜上含有内毒素,注射入体内会造成健康隐患,然而动物体内试验表明,磁小体对机体无毒性,也无炎症反应^[26],并且磁小体不会引起体重、器官和组织的功能异常和结构改变^[27]。Revathy 等对趋磁细菌的致病力以及磁小体对正常细胞的细胞毒性和基因毒性进行了研究,发现趋磁细菌和磁小体的安全性较好,并分析了趋磁细菌 *Magnetospirillum gryphiswaldense* (MSR-1) 磁小体的体外毒性,发现其对小鼠J774巨噬细胞系无显著毒性^[28],对小鼠L-292成纤维细胞系也安全性良好^[29]。并且,对红细胞的毒性研究发现,MSR-1和其磁小体均无溶血性,且不改变红细胞的正常形态^[28]。

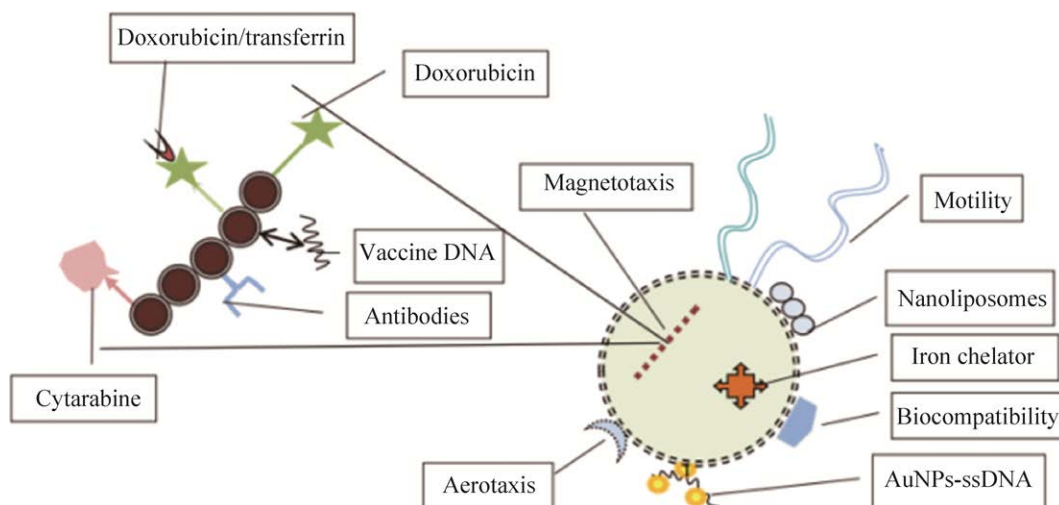


图1 趋磁细菌及磁小体用于治疗肿瘤的方式

Fig. 1 The action of MTB and magnetosomes in treatment of cancer. Features of MTB: motility, magnetotaxis, aerotaxis, biocompatibility, iron chelator, bind to nanoliposomes, AuNPs-ssDNA; magnetosome as carriers of doxorubicin, doxorubicin/transferrin, cytarabine, antibodies, vaccine DNA.

其他的磁小体安全性试验表明,磁小体对正常细胞也不存在基因毒性。通过对粒细胞的毒性研究发现,低浓度的磁小体作用于粒细胞不会导致染色体的异常,仅在最高的试验浓度(150 $\mu\text{g/mL}$)时才会观察到染色体的断裂^[30]。同时对比磁小体和人工合成的磁性纳米颗粒对视网膜色素上皮细胞系 ARPE-19 的基因毒性强弱,发现磁小体长时间作用也不会降低细胞活力,而人工合成的磁性纳米颗粒在一定浓度下长时间作用会产生显著的细胞毒性^[31]。为阐明磁小体在小鼠体内的组织分布情况, Sun 等对大鼠进行舌下静脉注射磁小体,分别取样测定了磁小体在粪便、尿液、血液及主要脏器的含量,实验结果表明,磁小体对大鼠的半数致死量为 62.7 mg/kg,注射后 72 h 从血常规与肝肾检测、脏器系数分析结果获知,给药剂量为 40 mg/kg 的实验组与对照组相比未见异常,且磁小体在血液中能够保持稳态,组织切片观察结果显示,磁小体仅在肝脏内聚集,在尿液和粪便中未发现磁小体存在^[30],由此可推断对于肝病治疗药物磁小体更适合作为载体。因此磁小体对正常的细胞形态、细胞活力和基因组影响较小,同

时体内安全性良好,所以磁小体适合作为纳米载体材料运载药物治疗肿瘤。现今对于趋磁细菌的体内毒理实验的数据较缺乏,例如在体内治疗中如何全面避开内皮吞噬系统的吞噬,防止治疗过程中药物性血栓的生成等指标进行全面评价,因此深入广泛地开展趋磁细菌及磁小体的安全性评价研究是实现趋磁细菌体内应用的关键。

2.2 趋磁细菌作为药物载体

关于趋磁细菌作为药物载体的研究相对较少,最初研究认为磁小体作为亚细胞结构更适合作为药物载体。然而,通过微流体系统分析发现,趋磁细菌在外界磁场的影响下,利用自身的鞭毛驱动,使趋磁细菌主动地在体内沿特定路径运动^[32]。并且,趋磁细菌作为药物载体可使用瘤外注射的方式进行给药,在临床治疗中,瘤内注射药物受到严格限制,因为此操作容易引起瘤转移,所以瘤外注射药物适合后期的临床治疗。显然趋磁细菌可通过瘤外注射,在外界磁场的引导下由注射位点主动进入肿瘤内部,并定位于肿瘤内部的低氧区。对于趋磁细菌导入肿瘤的能力, Felfoul 等进行了深入研究,采用趋磁细菌 *Magnetococcus*

marinus strain (MC-1) 瘤周注射并辅助磁场导入结肠癌小鼠模型, 结果表明 55% 的 MC-1 进入肿瘤并定位于肿瘤的低氧区^[33]。而且研究显示, 通过瘤周注射的 MC-1, 注入体内后依然具有活性和运动性, 即保持了趋磁性和趋低氧性反应, 并使用死亡的 MC-1 菌体作对照, 发现活性的 MC-1 侵入肿瘤的能力更强。通过将 MC-1 偶联载药脂质体, 脂质体增加了 MC-1 的生物相容性, MC-1 实现了运载药物至肿瘤的低氧区。此团队对 MC-1 的体内安全性进行了评价, 惊喜地发现 MC-1 对小鼠无临床感染症状, 不会引起明显的副作用^[33]。这些为趋磁细菌作为药物载体在肿瘤治疗中应用提供了一定依据。另有研究表明, 实体瘤内部的低氧区往往存有肿瘤干细胞, 而肿瘤干细胞是导致肿瘤迁移和易复发的关键原因^[34]。借助趋磁细菌将药物传递至低氧区的能力, 可实现彻底杀灭肿瘤干细胞, 改善癌症患者的预后和避免肿瘤的复发。MC-1 是极生鞭毛, 这种运动可控性和精确定位能力, 使趋磁细菌成为纳米机器人的典型代表^[35]。对于其他种类的趋磁细菌, 其鞭毛着生的不同是否会影响侵入肿瘤的方式和能力, 这个方面的研究也是趋磁细菌作为纳米机器人的主要方向之一。

在肿瘤内部存在的细胞连接会阻碍趋磁细菌运动, 这是趋磁细菌作为药物载体的主要障碍。为提高趋磁细菌导入肿瘤组织的能力, Mokrani 等将趋磁细菌包埋于单层脂质体中, 利用脂质体的组织相容性使趋磁细菌和药物复合体运输至目标细胞^[36]。Alsaiani 等利用 MSR-1 作为载体运输单链 DNA (ssDNA) 并偶联金纳米颗粒, 金纳米颗粒用作显影剂标识出药物结合和解离两种状态。MSR-1 通过细胞内吞作用将 ssDNA-金纳米颗粒偶联物吸收进入细胞内, 然后将趋磁细菌与人单核细胞孵育, 趋磁细菌被单核细胞吞噬后, 再采用磁热疗方法, 实现偶联物从趋磁细菌中释放至单核细胞内^[37]。另一种可行的策略是将趋磁细菌和其他载体联用形成复合载体, 复合载体能够在肿瘤细胞内定位释放药物。例如, 将趋磁细

菌和纳米脂质体通过碳二亚胺法共价偶联, 即利用趋磁细菌外膜上游离氨基与纳米脂质体上的羧基在碳二亚胺作用下进行缩合反应, 这种复合载体借助纳米脂质体的特性提升了趋磁细菌的生物相容性^[38]。由于趋磁细菌比表面积大, 且细胞表面上富含功能基团, 容易与药物分子直接交联, 随着化学交联技术的发展和改善, 结合趋磁细菌较强的运载能力, 此领域同样具有广阔的发展空间。

2.3 利用趋磁细菌的代谢治疗肿瘤

迄今为止, 利用趋磁细菌的代谢对肿瘤治疗作用较少, 但肿瘤的细菌疗法已经研究非常深入。经研究发现, 细菌疗法涉及通过分泌细胞毒素^[39]、激活机体免疫系统和构建表达外源杀伤肿瘤蛋白的基因工程菌等方式发挥肿瘤治疗效果^[40]。趋磁细菌是否具有类似能力杀伤肿瘤细胞? 一般认为, 趋磁细菌属于厌氧菌或微好氧微生物, 而实体瘤内部存在低氧区, 这为趋磁细菌直接治疗肿瘤提供了必要条件, 但利用趋磁细菌直接治疗肿瘤的研究时间尚短, 在后续研究中可借鉴经典的细菌学疗法开展深入的研究。

利用微生物代谢治疗肿瘤的关键是确定肿瘤细胞的特殊营养需求, 以增强选择性, 避免微生物对正常细胞产生毒性作用。研究发现, 铁代谢与肿瘤细胞增殖密切相关, 肿瘤细胞对铁的需求比正常细胞更旺盛, 分析显示, 肿瘤细胞中许多铁代谢相关分子发生明显改变^[41-42]。显而易见, 趋磁细菌作为高效的铁螯合剂可对肿瘤的增殖产生影响。进而开展了趋磁细菌 *Magnetospirillum magneticum* (AMB-1) 与人类黑色素瘤共培养研究, 发现 AMB-1 在 37 °C 环境中依然具有上调肿瘤细胞的转铁蛋白受体的表达水平并降低肿瘤细胞的活性, 当 AMB-1 的浓度为 10^8 个/mL 时, 在培养基中表现的嗜铁强度等同于 3.78 $\mu\text{mol/L}$ 的脱铁胺——高效的铁螯合治疗剂, 说明了趋磁细菌的铁螯合作用竞争干扰了肿瘤细胞的铁代谢^[43]。但脱铁胺的临床应用存在一定缺陷, 如半衰期短、诱导缺氧诱导因子 1 α 过量表达, 可能影响正常细

胞的铁代谢^[44]。对比而言,趋磁细菌是具有生物学活性的铁螯合剂,可靶向定位于肿瘤,这为肿瘤铁螯合治疗提供了新的方案^[44]。随着肿瘤特别是实体瘤的研究越来越深入,发现肿瘤低氧微环境与肿瘤的代谢、增殖、凋亡、迁移及治疗抵抗关系非常密切,结合趋磁细菌具有趋低氧性和铁富集作用等特点,因此趋磁细菌生理代谢与肿瘤代谢之间的竞争研究开拓了肿瘤治疗的新方法。

2.4 磁小体作为药物载体

2.4.1 磁小体结合蒽环类抗生素

蒽环类抗生素是一类来源于波赛链霉菌青灰变种 *Streptomyces peucetius* var. *caesius* 的肿瘤治疗药物,其中阿霉素和柔红霉素及其衍生物伊达比星和表柔比星 4 种药物在肿瘤治疗中被广泛应用。蒽环类药物的作用机制比较复杂,可通过嵌入 DNA 双链的碱基之间,形成稳定复合物,抑制 DNA 复制与 RNA 合成,从而阻碍快速生长的癌细胞的分裂;还可抑制拓扑异构酶 II,影响 DNA 超螺旋转化成为松弛状态,从而阻碍 DNA 复制与转录^[45];又有螯合铁离子后产生自由基从而破坏 DNA、蛋白质及细胞膜结构的能力,但正常细胞亦受此影响,因此副作用常常表现心脏毒性^[46]。为降低蒽环类抗生素的不良反应,选用以磁小体作为载体提高其靶向性是一种有效方法。研究发现,可将阿霉素共价连接在磁小体上,因磁小体外膜上含有丰富的脂蛋白,脂蛋白分子上存在大量的游离氨基,选用阿霉素分子结构中无药效的基团与脂蛋白上的氨基通过双功能试剂偶联形成阿霉素-磁小体复合物^[47]。并对常见双功能试剂的连接效果进行了比较研究,如戊二醛、辛二酸二琥珀酰亚胺酯、3-(2-吡啶基二硫基)丙酸 N-羟基琥珀酰亚胺酯、N,N'-二琥珀酰亚胺基碳酸酯,发现戊二醛效果最佳,通过戊二醛偶联的阿霉素/磁小体比率为 874 $\mu\text{g}/\text{mg}$,偶联率为 47%,而使用辛二酸二琥珀酰亚胺酯、3-(2-吡啶基二硫基)丙酸 N-羟基琥珀酰亚胺酯的比率分别为 784 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 和 624 $\mu\text{g}/\text{mg}$,偶联率为 44%和 38%^[48]。研究表

明,阿霉素-磁小体复合物在水中分散良好,形态均一,并且保留了磁小体的磁性特征。此复合物还有一个显著特点是在体内正常 pH 下以复合物形式存在,而在环境 pH 为 3.5 时,药物从复合物上解离下来,这对药物运输系统靶向释放非常重要。因为瘤内 pH 常常在 3.5 左右,药物进入人体后在血液和组织液中以复合物的形式存在,仅在瘤内的酸性微环境下发生解离,释放活性药物,从而实现靶向治疗,因而降低阿霉素的心脏毒性^[49]。

在此基础上,Wang 等进一步设计了以磁小体为载体偶联阿霉素和转铁蛋白两种成分的阿霉素-磁小体-转铁蛋白三元复合物,转铁蛋白及其受体除了参与运输铁的作用外,还与细胞生长和增殖有关,且发现肿瘤细胞上转铁蛋白受体 (Transferrin receptor, TfR) 往往过表达,其细胞膜上的含量显著高于正常细胞,因此,转铁蛋白受体适合作为肿瘤治疗药物的靶标,此药物复合物以转铁蛋白受体作为靶位点^[50]。分析显示,肝癌细胞 HepG2 比人正常肝细胞 HL-7702 的转铁蛋白受体表达水平高,因此肝癌细胞吸收三元复合物数量比正常肝细胞多。此三元复合物对肿瘤细胞和正常细胞产生的药物效应与阿霉素-磁小体复合物的效应类似,但是三元复合物对肝癌细胞 HepG2 表现出更强的细胞毒性。而且相对于正常细胞,此药物复合物对肿瘤细胞的诱导凋亡能力更强。在移植瘤中,三元复合物抑制肿瘤生长的能力强于阿霉素-磁小体复合物和单一的阿霉素药物,且对小鼠器官特别是心脏不产生病理性损伤^[50]。因此,通过磁小体与特异性配基和药物相偶联,利用配基可以专一性结合肿瘤细胞中特异性表达的受体,这种药物设计方案是非常有价值的。

2.4.2 磁小体偶联阿糖胞苷

利用磁小体偶联阿糖胞苷可降低其毒副作用。阿糖胞苷是胞嘧啶与阿拉伯糖组成的化合物,是主要作用于细胞 S 期的嘧啶类抗代谢药物,通过抑制细胞 DNA 的合成,干扰细胞的增殖。临

床用于急性白血病,对急性粒细胞白血病疗效最好,对急性单核细胞白血病及急性淋巴细胞白血病也有效,对恶性淋巴瘤、肺癌、消化道癌、头颈部癌有一定疗效^[51]。阿糖胞苷临床应用的副作用有剂量依赖性、骨髓抑制、小脑毒性、心肌病、肝肾功能损伤、胰腺炎、急性呼吸道疾病、食管炎、发热等^[52]。利用磁小体作为载体与阿糖胞苷偶联,制备了阿糖胞苷-磁小体复合物,可使用双功能试剂——京尼平连接阿糖胞苷和磁小体形成药物复合物。研究表明,此复合物稳定性强,药物从复合物上脱离时间最长达到3个月^[53]。同样也比较了直接偶联和使用交联剂京尼平、戊二醛偶联的效果,发现直接连接方式更高效,阿糖胞苷易被磁小体外膜吸附形成阿糖胞苷-磁小体复合物,因此对于磁小体与药物偶联方式的研究不仅提高药物的有效性和选择性,并且能够降低其副作用。

2.4.3 磁小体与抗体药物偶联

磁小体与抗体药物偶联可提高抗体的侵入肿瘤组织的能力。4-1BB (CD137/TNFRSF9) 于1989年被鉴定为一种诱导基因,在抗原启动的T细胞上表达,而在静止的T细胞上不表达^[54]。抗4-1BB抗体具有激活细胞毒性T细胞和增加 γ 干扰素 (IFN- γ) 生成的能力,在抗癌方面显示出巨大的潜力^[55],但4-1BB抗体药物在临床试验中出现了肝脏毒性,因此临床开发受到一定限制。为提高此抗体的专一性,Tang等将抗4-1BB抗体与磁小体偶联后得到抗体-磁小体复合物,研究发现,每个磁小体上可以负载115个抗体分子,与单独使用抗体药物相比,抗体-磁小体复合物激活鼠T淋巴细胞的增殖能力更强^[56]。此复合物同样抗体诱导CD8⁺细胞分泌产生肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、干扰素 γ (IFN- γ),而且动物模型的体内试验表明,此复合物同样存在免疫激活作用。在肺癌细胞TC-1诱导的肿瘤小鼠模型体内静脉注射4-1BB抗体-磁小体复合物并在肿瘤部位加以磁场引导,发现肿瘤体积缩小及小鼠存活率上升的良好效

果。而且,抗体-磁小体复合物的显著特点是浸入肿瘤组织的能力更强,可以比单独的抗体分子吸引更多的肿瘤浸润淋巴细胞进入肿瘤^[56]。

2.4.4 磁小体作为DNA疫苗的载体

利用磁小体结合DNA疫苗 (DNA vaccine) 形成复合物,可提高转染率并提高免疫效果。DNA疫苗是由插入一种或多种外源基因的质粒DNA (来自细菌) 和真核启动调控基因等元件构成,可在哺乳动物的各类细胞中表达出相关的抗原蛋白。聚乙烯亚胺 (Polyethyleneimine, PEI) 是一种具有较高的阳离子电荷密度的有机大分子,每隔2个碳原子即有1个质子化的氨基氮原子,使其聚合物网络在任何pH下都能充当有效的质子海绵体 (Protonsponge),可用作基因治疗的载体。使用PEI连接磁小体和DNA构建磁小体-PEI-DNA复合物,可保护DNA不被降解,并且在BHK-21细胞中的转染效率高于PEI-DNA复合物。在体内试验中,同样证实了磁小体-DNA复合物的效果^[57]。在动物转染试验中,将编码 β -半乳糖苷酶的质粒DNA与磁小体结合,在磁场作用下,发现比常规转染方法具有更强的酶表达活性。利用手足口病毒的外壳蛋白 (VP1 protein) 编码基因的质粒作为DNA疫苗,连接磁小体构建复合物,使用此复合物免疫小鼠。分析发现DNA疫苗-磁小体小鼠免疫实验组中VP1蛋白抗体表达量增加,T淋巴细胞的活性更强,并在外界磁场的刺激下效果更明显^[57]。更多的研究进一步证实了此疗法的应用潜力。通过磁小体结合重组的DNA成分,此重组DNA分子含有编码次级淋巴组织趋化因子 (Secondary lymphoid-tissue chemokine, SLC)、IgG抗体Fc片段、人乳头瘤病毒E7蛋白3种结构基因^[58-59],此复合物称为BM/pSLC-E7-Fc。此复合物能够通过转染技术导入鼠黑素瘤B16-F10细胞系中,并发现磁转染技术转染效率更高。通过皮下注射此复合物进入肿瘤小鼠模型,发现此复合物能够侵入肿瘤组织,并表达产生SLC-E7-Fc融合蛋白。在TC-1细胞

诱导的荷瘤小鼠模型中, DNA 疫苗诱导机体对肿瘤免疫应答, 表现为肿瘤体积缩小, 肿瘤转移抑制, 动物存活期延长。DNA 疫苗的免疫原性通过病理学分析也证实, 在肿瘤的微环境中出现大量的淋巴细胞浸润, 而对于单独使用磁小体的对照组, 不出现淋巴细胞浸润和临床的作用, 而且免疫注射后使用磁场刺激, 会出现更强的疫苗效力^[59]。由于磁小体优良的理化性质和生物相容性, 在体内已用作造影剂或磁热疗剂, 作为药物载体的潜力巨大。

3 趋磁细菌及磁小体在肿瘤治疗中的不足

虽然大量的研究数据表明, 趋磁细菌和磁小体可作为生物源的药物载体材料, 在肿瘤治疗中应用潜力巨大。然而, 实现临床应用同样需要解决一些问题。比如, 趋磁细菌的生长条件难以模拟、营养要求苛刻及对氧气浓度的敏感度高等特性, 在实验室条件下很难对其进行分离纯化, 导致只有少数菌株得到了纯培养, 实现高产的发酵菌种更少, 限制了其大规模的应用^[60]。可用于肿瘤治疗的菌种资源更加缺乏, 因此从环境中分离纯化新的趋磁细菌菌株的研究需要持续进行, 以扩充趋磁细菌菌种资源, 为肿瘤治疗提供更多的有力材料。一般而言, 趋磁细菌合成磁小体的产量也较低, 磁小体的生物合成受到基因和环境因子严密调控^[61], 并且磁小体的分离纯化也存在诸多困难。除了通过常规的发酵条件调控磁小体的产量之外, Kolinko 采用基因工程提高磁小体的产量, 以具有光合作用的深红螺菌为受体菌, 导入合成磁小体的基因簇, 实现了磁小体的异源生物合成^[62]。经过多年研究, 纳米载体的临床应用缺陷也逐渐显现, 为保证纳米载体的安全性和有效性, 在载体设计及应用中综合考虑以下问题^[63]: 载体-药物复合物的生物相容性、体内药代动力学、对正常细胞的免疫原性和细胞毒性、透过组织屏障及靶向定位能力等, 所以, 对于趋磁细菌及磁小体的药理毒理、药代动力学、体内稳定性

等性质需要进一步探索。药物分子与磁小体往往通过化学交联剂连接形成复合物, 由于交联技术的落后, 可能存在药物分子提前释放进入全身循环的安全性问题。现在的研究主要局限于磁小体的药物运载作用, 对于趋磁细菌导入肿瘤内部、作为药物载体及其生理代谢杀伤癌细胞的作用研究较少。因此笔者在前期研究中, 利用荧光碳点对趋磁细菌进行标记, 借助磁场引导使趋磁细菌侵入肿瘤内部, 对肿瘤切片并结合碳点荧光分析准确判断趋磁细菌的位置及导入效率, 在后续实验中, 拟对比端生鞭毛和周生鞭毛两种形式的趋磁细菌侵入肿瘤组织的能力差别, 并负载适宜肿瘤药物, 观察趋磁细菌对肿瘤细胞系或动物模型的作用效果, 为实现趋磁细菌和磁小体的肿瘤治疗临床应用提供参考。

4 总结与展望

趋磁细菌作为自然界中重要的一类微生物资源, 在生物矿化、环境保护、生物工程、医药研究、磁性纳米材料研究中具有重要的理论意义和应用价值。趋磁细菌具有趋磁性、趋低氧性、良好的生物学相容性、较强的铁螯合能力, 可偶联多种化疗药物靶向作用于肿瘤组织; 磁小体可运载常规化疗药物、抗体、DNA 疫苗等导入肿瘤组织, 提高其靶向性, 因此趋磁细菌和磁小体适用于药物载体用于肿瘤治疗。

趋磁细菌及磁小体真正实现临床应用还需要突破一些技术瓶颈, 比如趋磁细菌分离培养及高密度发酵技术、磁小体合成机理研究、磁小体分离纯化技术、磁小体与药物的偶联技术、体内毒性研究等。对此, 新的菌种分离纯化技术、微好氧发酵技术及基因组学技术的发展, 为解决以上问题提供技术支持。目前, 磁小体在医药应用研究取得了诸多成果, 在肿瘤治疗中作为药物载体偶联多种抗肿瘤药物, 并表现出巨大的应用潜力。进一步研究可创新磁小体与药物的偶联方式, 不断优化连接技术, 保证药物偶联物在达到靶标细

胞后才释放药物, 解决临床研究中的难点。为解决抗肿瘤治疗中的多重药物耐受性, 可探索磁小体多重载药能力, 避免出现肿瘤细胞逃逸现象。利用趋磁细菌作为药物载体的研究开展较少, 可能受限于趋磁细菌的安全性, 因此针对趋磁细菌的体内外生物安全性探索更加迫切, 以期为临床研究提供安全数据。随着研究逐步深入, 趋磁细菌及其磁小体可为肿瘤的临床治疗提供新的方案和资源。

REFERENCES

- [1] Zugazagoitia J, Guedes C, Ponce S, et al. Current challenges in cancer treatment. *Clin Ther*, 2016, 38(7): 1551-1566.
- [2] Nikolaou M, Pavlopoulou A, Georgakilas AG, et al. The challenge of drug resistance in cancer treatment: a current overview. *Clin Exp Metastasis*, 2018, 35(4): 309-318.
- [3] Banerjee A, Pathak S, Subramaniam VD, et al. Strategies for targeted drug delivery in treatment of colon cancer: current trends and future perspectives. *Drug Discov Today*, 2017, 22(8): 1224-1232.
- [4] Kartal-Yandim M, Adan-Gokbulut A, Baran Y. Molecular mechanisms of drug resistance and its reversal in cancer. *Crit Rev Biotechnol*, 2016, 36(4): 716-726.
- [5] Kutova OM, Guryev EL, Sokolova EA, et al. Targeted delivery to tumors: multidirectional strategies to improve treatment efficiency. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(1): E68.
- [6] Sriraman SK, Aryasomayajula B, Torchilin VP. Barriers to drug delivery in solid tumors. *Tissue Barriers*, 2014, 2: e29528.
- [7] Kim SM, Faix PH, Schnitzer JE. Overcoming key biological barriers to cancer drug delivery and efficacy. *J Control Release*, 2017, 267: 15-30.
- [8] Kibria G, Hatakeyama H, Harashima H. Cancer multidrug resistance: mechanisms involved and strategies for circumvention using a drug delivery system. *Arch Pharm Res*, 2014, 37(1): 4-15.
- [9] Chen C, Wang P, Li L. Applications of bacterial magnetic nanoparticles in nanobiotechnology. *J Nanosci Nanotechnol*, 2016, 16(3): 2164-2171.
- [10] Blakemore R. Magnetotactic bacteria. *Science*, 1975, 190(4212): 377-379.
- [11] Moskowitz BM, Bazylinski DA, Egli R, et al. Magnetic properties of marine magnetotactic bacteria in a seasonally stratified coastal pond (Salt Pond, MA, USA). *Geophys J Int*, 2008, 174(1): 75-92.
- [12] Frankel RB, Bazylinski DA, Johnson MS, et al. Magneto-aerotaxis in marine coccoid bacteria. *Biophys J*, 1997, 73(2): 994-1000.
- [13] Lin W, Pan Y, Bazylinski DA. Diversity and ecology of and biomineralization by magnetotactic bacteria. *Environ Microbiol Rep*, 2017, 9(4): 345-356.
- [14] 张文燕, 张圣姐, 肖天, 等. 趋磁细菌的地域分布特征. *环境科学*, 2010, 31(2): 450-458.
Zhang WY, Zhang SD, Xiao T, et al. Geographical distribution of magnetotactic bacteria. *Environ Sci*, 2010, 31(2): 450-458 (in Chinese).
- [15] Lefèvre CT, Bazylinski DA. Ecology, diversity, and evolution of magnetotactic bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2013, 77(3): 497-526.
- [16] Heywood BR, Bazylinski DA, Garratt-Reed A, et al. Controlled biosynthesis of greigite (Fe_3S_4) in magnetotactic bacteria. *Naturwissenschaften*, 1990, 77(11): 536-538.
- [17] Ghaisari S, Winklhofer M, Strauch P, et al. Magnetosome organization in magnetotactic bacteria unraveled by ferromagnetic resonance spectroscopy. *Biophys J*, 2017, 113(3): 637-644.
- [18] Dieudonné A, Pignol D, Prévéral S. Magnetosomes: biogenic iron nanoparticles produced by environmental bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2019, 103(9): 3637-3649.
- [19] Li JH, Menguy N, Leroy E, et al. Biomineralization and magnetism of uncultured magnetotactic *Coccus* strain THC-1 with non-chained magnetosomal magnetite nanoparticles. *J Geophys Res: Solid Earth*, 2020, 125(12): e2020JB020853.
- [20] Faramarzi MA, Sadighi A. Insights into biogenic and chemical production of inorganic nanomaterials and nanostructures. *Adv Colloid Interface Sci*, 2013, 189/190: 1-20.
- [21] Yan L, Da H, Zhang S, et al. Bacterial magnetosome and its potential application. *Microbiol Res*, 2017,

- 203: 19-28.
- [22] Abreu N, Mannoubi S, Ozyamak E, et al. Interplay between two bacterial actin homologs, MamK and MamK-like, is required for the alignment of magnetosome organelles in *Magnetospirillum magneticum* AMB-1. *J Bacteriol*, 2014, 196(17): 3111-3121.
- [23] Zeytuni N, Ozyamak E, Ben-Harush K, et al. Self-recognition mechanism of *MamA*, a magnetosome-associated TPR-containing protein, promotes complex assembly. *PNAS*, 2011, 108(33): E480-E487. DOI:10.1073/pnas.1103367108.
- [24] Lohße A, Kolinko I, Raschdorf O, et al. Overproduction of magnetosomes by genomic amplification of biosynthesis-related gene clusters in a magnetotactic bacterium. *Appl Environ Microbiol*, 2016, 82(10): 3032-3041.
- [25] Uebe R, Junge K, Henn V, et al. The cation diffusion facilitator proteins MamB and MamM of *Magnetospirillum gryphiswaldense* have distinct and complex functions, and are involved in magnetite biomineralization and magnetosome membrane assembly. *Mol Microbiol*, 2011, 82(4): 818-835.
- [26] Sun J, Tang T, Duan J, et al. Biocompatibility of bacterial magnetosomes: acute toxicity, immunotoxicity and cytotoxicity. *Nanotoxicology*, 2010, 4(3): 271-283.
- [27] Cypriano J, Werckmann J, Vargas G, et al. Uptake and persistence of bacterial magnetite magnetosomes in a mammalian cell line: implications for medical and biotechnological applications. *PLoS ONE*, 2019, 14(4): e0215657.
- [28] Revathy T, Jayasri MA, Suthindhiran K. Toxicity assessment of magnetosomes in different models. *3 Biotech*, 2017, 7(2): 126.
- [29] Xiang L, Wei J, Jianbo S, et al. Purified and sterilized magnetosomes from *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 were not toxic to mouse fibroblasts *in vitro*. *Lett Appl Microbiol*, 2007, 45(1): 75-81.
- [30] Sun JB, Wang ZL, Duan JH, et al. Targeted distribution of bacterial magnetosomes isolated from *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 in healthy sprague-dawley rats. *J Nanosci Nanotech*, 2009, 9(3): 1881-1885.
- [31] Qi L, Lv X, Zhang TW, et al. Cytotoxicity and genotoxicity of bacterial magnetosomes against human retinal pigment epithelium cells. *Sci Rep*, 2016, 6: 26961.
- [32] Martel S, Mohammadi M, Felfoul O, et al. Flagellated magnetotactic bacteria as controlled MRI-trackable propulsion and steering systems for medical nanorobots operating in the human microvasculature. *Int J Rob Res*, 2009, 28(4): 571-582.
- [33] Felfoul O, Mohammadi M, Taherkhani S, et al. Magneto-aerotactic bacteria deliver drug-containing nanoliposomes to tumour hypoxic regions. *Nat Nanotechnol*, 2016, 11(11): 941-947.
- [34] Mohyeldin A, Garzón-Muvdi T, Quiñones-Hinojosa A. Oxygen in stem cell biology: a critical component of the stem cell niche. *Cell Stem Cell*, 2010, 7(2): 150-161.
- [35] Mathuriya AS. Magnetotactic bacteria: nanodriviers of the future. *Crit Rev Biotechnol*, 2016, 36(5): 788-802.
- [36] Mokrani N, Felfoul O, Afkhami Zarreh F, et al. Magnetotactic bacteria penetration into multicellular tumor spheroids for targeted therapy. *Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc*, 2010, 2010: 4371-4374.
- [37] Alsaiani SK, Ezzedine AH, Abdallah AM, et al. Magnetotactic bacterial cages as safe and smart gene delivery vehicles. *Open Nano*, 2016, 1: 36-45.
- [38] Taherkhani S, Mohammadi M, Daoud J, et al. Covalent binding of nanoliposomes to the surface of magnetotactic bacteria for the synthesis of self-propelled therapeutic agents. *ACS Nano*, 2014, 8(5): 5049-5060.
- [39] Sawant SS, Patil SM, Gupta V, et al. Microbes as medicines: harnessing the power of bacteria in advancing cancer treatment. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(20): 7575.
- [40] Sarotra P, Medhi B. Use of bacteria in cancer therapy//Recent Results in Cancer Research. Cham: Springer International Publishing, 2016: 111-121.
- [41] Wang YF, Yu L, Ding J, et al. Iron metabolism in cancer. *Int J Mol Sci*, 2018, 20(1): 95.
- [42] Torti SV, Torti FM. Iron and cancer: more ore to be mined. *Nat Rev Cancer*, 2013, 13(5): 342-355.
- [43] Menghini S, Ho PS, Gwisai T, et al.

- Magnetospirillum magneticum* as a living iron Chelator induces TfR1 upregulation and decreases cell viability in cancer cells. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(2): 498.
- [44] Lang J, Zhao X, Wang X, et al. Targeted co-delivery of the iron Chelator deferoxamine and a HIF1 α inhibitor impairs pancreatic tumor growth. *ACS Nano*, 2019, 13(2): 2176-2189.
- [45] Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, et al. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev*, 2004, 56(2): 185-229.
- [46] Ichikawa Y, Ghanefar M, Bayeva M, et al. Cardiotoxicity of doxorubicin is mediated through mitochondrial iron accumulation. *J Clin Invest*, 2014, 124(2): 617-630.
- [47] Sun JB, Duan JH, Dai SL, et al. Preparation and anti-tumor efficiency evaluation of doxorubicin-loaded bacterial magnetosomes: magnetic nanoparticles as drug carriers isolated from *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *Biotechnol Bioeng*, 2008, 101(6): 1313-1320.
- [48] Liang PC, Chen YC, Chiang CF, et al. Doxorubicin-modified magnetic nanoparticles as a drug delivery system for magnetic resonance imaging-monitoring magnet-enhancing tumor chemotherapy. *Int J Nanomedicine*, 2016, 11: 2021-2037.
- [49] Guo L, Ji H, Zhang X, et al. Bacterial magnetic nanoparticles as drug carriers. *J Mater Chem*, 2008, 18(48): 5993-5997.
- [50] Wang J, Geng Y, Zhang Y, et al. Bacterial magnetosomes loaded with doxorubicin and transferrin improve targeted therapy of hepatocellular carcinoma. *Nanotheranostics*, 2019, 3(3): 284-298.
- [51] Li Z, Guo JR, Chen QQ, et al. Exploring the antitumor mechanism of high-dose cytarabine through the metabolic perturbations of ribonucleotide and deoxyribonucleotide in human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Molecules*, 2017, 22(3): E499.
- [52] Doval D, Kumar Sharma S, Kumar M, et al. Cytarabine ears — A side effect of cytarabine therapy. *J Oncol Pharm Pract*, 2020, 26(2): 471-473.
- [53] Deng Q, Liu Y, Wang S, et al. Construction of a novel magnetic targeting anti-tumor drug delivery system: cytosine Arabinoside-loaded bacterial magnetosome. *Materials (Basel)*, 2013, 6(9): 3755-3763.
- [54] Kwon BS, Weissman SM. cDNA sequences of two inducible T-cell genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86(6): 1963-1967.
- [55] Thum E, Shao Z, Schwarz H. CD137, implications in immunity and potential for therapy. *Front Biosci Landmark Ed*, 2009, 14: 4173-4188.
- [56] Tang YS, Wang DM, Zhou CX, et al. Preparation and anti-tumor efficiency evaluation of bacterial magnetosome-anti-4-1BB antibody complex: bacterial magnetosome as antibody carriers isolated from *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *Biotechnol Appl Biochem*, 2019, 66(3): 290-297.
- [57] Li X, Wang B, Jin HL, et al. Bacterial magnetic particles (BMPs)-PEI as a novel and efficient non-viral gene delivery system. *J Gene Med*, 2007, 9(8): 679-690.
- [58] Tang YS, Wang D, Zhou C, et al. Bacterial magnetic particles as a novel and efficient gene vaccine delivery system. *Gene Ther*, 2012, 19(12): 1187-1195.
- [59] Tang YS, Zhou CX, Ma WB, et al. An enhanced anti-tumor response by using bacterial magnetosomes gene administration platform. *Arch Clin Biomed Res*, 2018, 2(4): 145-150.
- [60] Liu Y, Li GR, Guo FF, et al. Large-scale production of magnetosomes by chemostat culture of *Magnetospirillum gryphiswaldense* at high cell density. *Microb Cell Factories*, 2010, 9: 99.
- [61] Jogler C, Schüller D. Genomics, genetics, and cell biology of magnetosome formation. *Annu Rev Microbiol*, 2009, 63: 501-521.
- [62] Kolinko I, Lohße A, Borg S, et al. Biosynthesis of magnetic nanostructures in a foreign organism by transfer of bacterial magnetosome gene clusters. *Nat Nanotechnol*, 2014, 9(3): 193-197.
- [63] Pedziwiatr-Werbicka E, Horodecka K, Shcharbin D, et al. Nanoparticles in combating cancer: opportunities and limitations. a brief review. *Curr Med Chem*, 2020, 28(2): 346-359.

(本文责编 陈宏宇)