

• 综述 •

乳酸菌作为药物分子粘膜投递载体的研究进展

曾珠^{1,2}

1 西南大学 蚕桑纺织与生物质科学学院, 重庆 400715

2 农业农村部蚕桑生物学与遗传育种重点实验室, 重庆 400715

曾珠. 乳酸菌作为药物分子粘膜投递载体的研究进展. 生物工程学报, 2021, 37(7): 2272-2282.

Zeng Z. Advances in the use of lactic acid bacteria as mucosal delivery vectors of therapeutic molecules. Chin J Biotech, 2021, 37(7): 2272-2282.

摘要: 乳酸菌是被公认为安全的食品级微生物, 广泛地应用于食品生产、保存以及作为益生菌促进人类健康。鉴于发展有效的投递药物分子策略的需要, 乳酸菌成为了极有吸引力的用于口服、鼻饲及阴道进行粘膜投递药物分子的活载体。用乳酸菌作为药物分子的投递载体, 安全性好, 且可直接合成并投递目标蛋白, 显著降低药物生产成本。到目前为止, 乳酸菌作为粘膜投递载体, 已成功地向粘膜组织投递了一系列功能蛋白用以治疗多种疾病。文中综述了近 20 年的数据, 重点聚焦乳酸菌作为药物分子投递载体的发展和应用, 为今后乳酸菌作为活载体的临床研究提供一定参考。

关键词: 乳酸菌, 活载体, 重组表达, 粘膜投递, 药物分子, 疾病治疗

Advances in the use of lactic acid bacteria as mucosal delivery vectors of therapeutic molecules

Zhu Zeng^{1,2}

1 College of Sericulture, Textile and Biomass Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China

2 Key Laboratory of Sericultural Biology and Genetic Breeding, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Chongqing 400715, China

Abstract: Lactic acid bacteria (LAB) are generally recognized as safe food-grade microorganisms and are widely used in food production, preservation, and as probiotics to promote human health. Given the need to develop effective drug delivery strategies, LAB have become attractive live vehicles for the oral, intranasal and vaginal delivery of therapeutic molecules. Being live and safe organisms, LAB are able to directly produce and deliver target proteins for therapeutic purpose, which remarkably reduces the cost for drug production. To date, LAB have been used to deliver a variety of functional proteins to mucosal tissues for the treatment of various diseases. This review summarized the development and application of LAB as mucosal delivery vectors in the last 20 years to provide references for future clinical research.

Keywords: lactic acid bacteria, live vector, recombinant expression, mucosal delivery, therapeutic molecules, treatment

Received: August 3, 2020; **Accepted:** November 16, 2020

Supported by: Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. SWU118081).

Corresponding author: Zhu Zeng. E-mail: zengzhuydyxf@163.com

中央高校基本科研业务费 (No. SWU118081) 资助。

口服给药方便快捷,被认为是最理想的给药方式。然而,多肽或蛋白类药物经过苛刻的胃肠道环境时容易降解或变性,因此不适宜采用口服给药方式。乳酸菌(Lactic acid bacteria)是被公认为安全(Generally regarded as safe, GRAS)的非致病性的食品级微生物^[1],广泛存在于植物、乳制品、人体和动物的消化道及女性阴道中,主要包括双歧杆菌属 *Bifidobacterium*、乳酸杆菌属 *Lactobacillus*、乳球菌属 *Lactococcus*、片球菌属 *Pediococcus*、明串珠菌属 *Leuconostoc* 及链球菌属 *Streptococcus* 等 43 个属^[2]。乳酸菌用于发酵酸奶、奶酪、泡菜等方面已经有非常悠久的历史,近年来,乳酸菌(常用植物乳杆菌)也被用来发酵谷物类和果蔬汁类,以提升和改善食物的营养价值及产生抗菌活性延长食物保质期^[3-4],乳酸菌中的某些菌株被认为是益生菌,根据世界卫生组织(World Health Organization, WHO)对益生菌的定义,益生菌是指当摄入足够量时可对宿主健康发挥有益作用的一类活的微生物,常见的种类有乳酸杆菌和双歧杆菌。近来,益生乳酸菌因其在改善肠道菌群平衡、促进宿主免疫及防治疾病如降低炎症反应、抗糖尿病和抗肿瘤等方面发挥的重要作用引起了广泛关注^[5-9]。例如,益生菌嗜酸乳杆菌 *Lactobacillus acidophilus* La5 和动物双歧杆菌 *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 可显著降低 II 型糖尿病病人餐后血糖水平和增加抗氧化活性^[10];补充多种益生菌(包括嗜酸乳杆菌 *Lactobacillus acidophilus*、乳双歧杆菌 *Bifidobacterium lactis*、两歧双歧杆菌 *Bifidobacterium bifidum* 和长双歧杆菌 *Bifidobacterium longum*)可改善糖尿病前期病人的肠道微生物结构^[11];益生菌干酪乳杆菌 *Lactobacillus casei* 393 可降低结直肠癌小鼠的炎症反应和促进小鼠免疫功能^[12]。乳酸菌的天然、安全、益生特性,被认为是极具前景的口服蛋白类药物的活载体,用于生产和投递人们感兴趣的各种药物分子。目前已实现了以乳酸菌作为粘膜

投递载体表达一系列外源蛋白用于防治各种疾病,如感染性疾病、肠炎性疾病、糖尿病和癌症等^[13-16](表 1)。下面就乳酸菌作为投递载体的优势、乳酸菌的表达系统以及乳酸菌在疾病防治中的应用等相关研究进行综述和讨论。

1 乳酸菌作为药物分子粘膜投递载体的优势

乳酸菌的安全、益生特性以及较强的耐受胃肠道环境的能力使得它们成为极具发展潜力的呈递载体,用于向粘膜呈递具有预防或治疗作用的各种药物分子。首先,基因工程重组的乳酸菌介导的药物分子呈递,尤其是通过口服工程菌株进行粘膜呈递,可与菌体同时服用,无需纯化外源蛋白,操作简单方便,降低药物的生产成本,并能有效避免由肌肉或静脉注射带来的副作用和减轻疼痛。其次,通过粘膜呈递的方式可提高感染性疾病或慢性疾病药物的特异性和有效性,将传统疫苗的系统性免疫所带来的副作用降到最低^[17]。另外,许多乳酸菌菌株对极端的胃肠道环境具有很强的耐受能力,能够活着通过胃肠道并且最终定植于肠粘液或肠的内腔中,极大地促进药物分子的粘膜投递。而且乳酸菌属于非致病性的细菌,相比一些减毒的载体更具安全性;并且某些菌株本身作为益生菌株可对宿主发挥多种益生功能,若以其作为药物分子的投递载体可使药物效果加强。同时,重组的乳酸菌可用来表达不同类型的药物分子,比如非嵌合的或嵌合的细胞因子、抗原、各种酶等^[15],还能将多种药物分子串联表达^[18]。最后,通过鼻腔、口腔或生殖道的方式投递不仅能刺激粘膜免疫反应还能刺激系统性的免疫反应。乳酸菌可以激发机体分泌型免疫球蛋白 A (sIgA) 的产生,这是乳酸菌作为粘膜疫苗最主要的优点之一^[19]。总之,不管是与脂质体、微粒和减毒的病原微生物等相比还是与静脉注射裸蛋白的传统的注射方式相比^[17],以上的这些优点使得乳酸菌成为非常具有吸引力的活载体。

2 乳酸菌的表达系统

从 21 世纪初开始,利用乳酸菌防治各种疾病的研究取得快速发展,其中乳酸乳球菌是乳酸菌中的模式菌株。消除了质粒的菌株 *L. lactis* subsp. *lactis* IL1403 和 *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 的基因序列分别在 1999/2001 年和 2007 年完成了测序,是目前应用最广泛的菌株。乳酸菌中使用的第一个克隆载体的构建是基于 2 个具有广宿主范围的复制型质粒 pSH71 和 pWV01^[20-21]。随后,在这两个质粒的基础上又衍生出许多新的质粒^[22]。另外一个应用广泛的复制子是从粪肠球菌中分离的 pAMbeta-1,以此复制子为基础又构建出高拷贝的 pIL253 质粒和低拷贝的 pIL252 质粒^[22-23]。随后,研究者又陆续构建出其他表达载体用于在乳球菌中表达外源蛋白。

乳酸菌的表达载体可分为组成型表达和诱导型表达两种类型。组成型的启动子其优点在于不需要任何诱导剂,并且能够持续稳定地表达目标蛋白。例如,从乳酸菌中分离的组成型启动子 P23、P32 和 P59 已成功地用于 PVE5523、pMG36e 和 pOri23 等组成型表达载体的构建^[24]。诱导型表达载体则需要额外地补充诱导剂,应用最广泛的是乳酸链球菌素 nisin 诱导型的表达载体,即用强的 nisin 诱导的启动子 PnisA 作为目标基因的启动子诱导目标蛋白的表达^[25],其优点在于表达的目标基因可受到严谨调控,并且诱导剂 nisin 是食品级的,具有安全性。

随着分子生物学技术的发展,乳杆菌 *Lactobacillus* 也逐渐被用于基因工程菌株的受体菌。与乳球菌相比,乳杆菌作为药物分子的粘膜投递活载体更具优势。首先,乳杆菌具有更强的耐受极端胃肠道环境的能力,并且对肠上皮细胞的黏附和定植能力也更强。其次,某些乳杆菌菌株本身可对宿主发挥益生特性^[15]。近年来,关于乳杆菌的研究逐渐增加,在 NCBI 可以查到的乳杆菌超过 220 种 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi, September 2020),其中大部分菌种都被证实具有益生功能,主要包括:嗜酸乳杆菌、鼠李糖乳杆菌、植物乳杆菌、干酪乳杆菌、保加利亚乳杆菌、发酵乳杆菌、加氏乳杆菌等。与乳球菌相比,构建用于乳杆菌的基因表达系统受到很大的挑战,原因在于:乳杆菌具有高度的遗传多样性,一些质粒表达系统只针对某些菌株有效;同时一些已知的启动子也会因为菌株不同而产生不同的活性。因此,用乳杆菌作为药物分子粘膜投递载体发展相对缓慢。目前最常用的克隆载体是包含 pSH71、pWV01 和 pAMbeta-1 的复制系统^[26-29]。

乳酸菌重组表达的外源蛋白主要以 3 种形式存在,即位于细胞质内、分泌到细胞外和锚定在细胞壁上^[30-31]。细胞质内表达的优势在于只有当重组菌株死亡裂解以后目的蛋白才会被释放出来,因此可避免消化道中的各种酶对外源蛋白的降解。第二种形式是将重组表达的外源蛋白分泌至细胞外,此方式的优点是可避免某些外源蛋白在细胞内大量积累可能对宿主产生的毒害作用。第三种形式是将外源蛋白表达并展示于细菌的细胞壁上,该方式的优点在于可使重组蛋白与粘膜更好地接触,从而激发机体的免疫反应,通常用于疫苗类蛋白的重组表达。乳酸菌重组表达的外源蛋白所存在的形式是影响重组蛋白功能的一个非常重要的因素,但是具体哪种形式效果最好目前并没有明确的答案,因此在具体的研究中应综合考虑疫苗的免疫策略、重组蛋白本身的结构种类、宿主菌株等因素,通过多种尝试进而选择最适合的表达方式。

3 乳酸菌作为药物分子粘膜投递载体的应用

3.1 乳酸菌作为投递载体应用于感染性疾病的防治

用乳酸菌重组表达致病微生物的抗原或抗体蛋白进行粘膜免疫来实现感染性疾病的防治。1993 年首次报道用活的乳球菌来投递疫苗^[32],此

研究用乳球菌 *L. lactis* MG1363 重组表达破伤风毒素片段 C (TTFC), 然后探究通过口服和鼻饲两种不同的粘膜途径投递活的重组菌株对小鼠产生的保护效果^[32-34], 结果表明两种途径产生了相同的保护效果, 但鼻腔投递产生了更多的粘膜 IgA 和血清 IgG。随后, 用重组乳酸菌表达各种抗原蛋白进行粘膜投递疫苗的研究陆续展开, 如投递细菌、病毒、寄生虫和真菌的抗原^[15]。Lei 等^[35]用霍乱毒素 B (CTB) 亚单元作为粘膜的辅助剂可加强表达核蛋白 (NP) 的重组乳球菌 *L. lactis* NZ9000 对小鼠的免疫原性, 诱导有效的粘膜和体液免疫, 抵抗不同的流感病毒。另外, 除了重组表达抗原外, 研究者也实现了用乳酸菌重组表达抗体用于各种感染性疾病的治疗。单链可变片段 (scFv) 抗体, 可通过阻止病原菌的黏附或中和细菌毒素从而阻止病原菌入侵上皮细胞, 基于这个特点, Chancey 等^[36]用干酪乳杆菌 *Lactobacillus casei* 表达分泌 scFv 抗体并体外证明重组乳杆菌可封闭人类免疫缺陷病毒 1 型 (Human immunodeficiency virus-1, HIV-1) 侵袭宫颈单层上皮细胞。截止到目前, 已实现用乳酸菌重组表达多种抗体, 如抗炭疽杆菌、牙龈卟啉单胞菌、轮状病毒等的抗体^[37]。这种用乳酸菌作为抗体的活载体的策略将会被考虑用作免疫疗法或者预防法, 有潜能取代传统注射纯化的抗体或者抗体片段的方法。

3.2 乳酸菌作为投递载体应用于肠炎性疾病的防治

肠炎性疾病 (Inflammatory bowel disease, IBD) 是一种引起人类肠道炎症的慢性疾病, 主要症状包括腹泻、腹痛、发烧、疲劳、抽筋及体重减轻等, 影响着全球数百万人的健康。Steidler 等^[38]于 2000 年首次采用乳球菌重组表达鼠源白细胞介素 10 (Interleukin 10, IL-10) 用于治疗 IBD, 研究结果表明重组乳球菌可显著缓解肠炎模型的小鼠肠道炎症状态, 由此拉开了用重组乳酸菌治疗肠炎性疾病的序幕。随后用重组的乳酸菌表达

投递人源 IL-10 的研究被陆续报道^[39-40]。例如, Martin 等^[40]用压力诱导的表达系统构建重组表达 IL-10 的乳球菌 *L. lactis* MG1363, 用重组菌株灌胃慢性肠炎模型的小鼠, 可显著降低肠道的高渗透性、改善不正常的参数和促进免疫小鼠的免疫激活。除了重组表达 IL-10 外, 用乳酸菌重组表达其他细胞因子如 IL-6、IL-17、IL-23 和 IL-27 的研究也逐渐被报道^[41-44]。例如, Hanson 等^[44]用乳球菌重组表达 IL-27, 结果表明重组的工程菌株可保护小鼠免于 T 细胞转移诱导的小肠结肠炎和死亡, 且效果比摄入重组表达 IL-10 的工程菌株或直接摄入 IL-27 效果更好。Bermúdez-Humarán 等^[45]尝试用乳球菌重组表达其他类型的抗炎因子来检验此方法的有效性。作者对比了用重组的乳球菌 *L. lactis* MG1363 和 NZ9000 分泌表达两种不同类型的抗炎因子 (细胞因子和丝氨酸蛋白酶抑制剂) 用于治疗葡聚糖硫酸钠 (DSS) 诱导的小鼠肠炎模型的效果, 结果表明乳球菌重组表达丝氨酸蛋白酶抑制剂-弹性蛋白酶抑制剂 (Elafin) 和分泌型的白细胞蛋白酶抑制剂 (SLPI) 比重组表达抗炎的细胞因子 TGF- β 1 和 IL-10 治疗炎症性肠病更有效。Song 等^[46]用乳球菌 *L. lactis* AMJ1543 重组表达牛乳铁蛋白肽 (Lactoferrampin), 发现重组的乳球菌可显著改善 DSS 诱导的小鼠肠炎症状并逆转了 DSS 诱导的肠道微生态失调现象。Chiabai 等^[47]用重组表达 anti-TNF α scFv 的乳球菌工程菌株灌胃 DSS-诱导的结肠炎小鼠, 发现灌胃菌株 4 d 后, 小鼠的组织学得分和疾病活动指数明显得到改善, 细胞因子 IL-6、IL-17A、IL-1 β 和 IL-10 等的 mRNA 表达水平也与健康小鼠相当, 表明重组菌株可显著改善小鼠的结肠炎症状。除了乳球菌和乳杆菌外, 双歧杆菌也常用作受体菌重组表达外源药物分子用于 IBD 的治疗。如, 用长双歧杆菌 *B. longum* 重组表达一种具有较强抗炎特性的多肽- α 促黑激素, 结果表明该工程菌株可以成功地在肠道实现定植, 并能抑制 DSS 诱

导的大鼠溃疡性结肠炎^[48]。另一项研究中用 *B. longum* 重组表达人的锰超氧化物歧化酶 (rhMnSOD), 该研究发现重组的工程菌株可成功地将 rhMnSOD 投递到肠道, 并产生较好的抗炎效果及抑制 DSS 诱导的小鼠溃疡性结肠炎^[49]。以上的研究进展表明乳酸菌作为抗炎因子的活载体应用于人类 IBD 的治疗非常有前景。

3.3 乳酸菌作为投递载体应用于糖尿病的防治

近年来, 也有研究者尝试用乳酸菌作为药物分子的投递载体防治糖尿病。其中, 大部分是关于 I 型糖尿病治疗 (T1D) 的研究。I 型糖尿病是一种自身免疫性疾病, 是自身的 T 细胞过度反应而引起对胰岛 β 细胞的损害。基于抗原的免疫疗法被认为是治疗自身免疫疾病的最有潜力的方法, 因为此疗法可选择性地作用于疾病相关的 T 细胞并具有保护免疫系统功能。Takiishi 等^[50]用重组的乳球菌 *L. lactis* MG1363 作为粘膜投递载体分泌表达胰岛素原和 IL-10, 并与低剂量的 CD3 抗体联合使用, 可以增加非肥胖型糖尿病 (NOD) 小鼠 β 细胞的体积并恢复小鼠的血糖值。另一项研究中作者用重组的乳球菌共表达 T1D 的自身抗原 GAD65370-575 和 IL-10, 并联合使用低剂量的 CD3 抗体, 该治疗方式可以稳定 NOD 小鼠的胰腺炎, 保护 β 细胞的体积并恢复正常的血糖值^[18]。Jin 等^[51]用重组的乳球菌融合表达 Hsps 和 P227 的随机重复片段 (Hsp65-6P277), 通过鼻饲的方法可降低 NOD 小鼠 T1D 的发生率。除了用乳球菌表达自身抗原来治疗 T1D 以外, 也有研究者用乳球菌表达胰岛素类似物或其他蛋白类药物。例如, Ng 等^[52]用脂肪细胞模型体外证明重组的乳球菌能够分泌表达具有生物活性的单链胰岛素类似物 SCI-57, 且重组的 SCI-57 能够激活脂肪细胞的 AKT 信号通路。Duan 等^[53]用乳酸杆菌 *L. gasseri* ATCC 33323 重组表达全长的胰高血糖素样肽-1 (GLP-1₁₋₃₇), 将重组菌株连续灌胃 T1D 大鼠 3 个月, 发现大鼠肠道细胞已经“重新编程”, 转变为

具有葡萄糖响应的释放胰岛素的功能, 从而治疗 T1D。

除了 I 型糖尿病外, 用乳酸菌作为口服药物投递载体应用于 II 型糖尿病 (T2D) 的防治同样受到关注。近期, 笔者团队的一项研究探索了用乳球菌 *L. lactis* NZ9000^[54]和副干酪乳杆菌 *L. paracasei* L14^[55]重组表达降血糖的功能肽 Exendin-4, 通过细胞实验发现重组的 Exendin-4 具有生物学功能, 能够显著促进胰岛 β 细胞 INS-1 分泌胰岛素和促进胰岛细胞增殖。2014 年, Agarwal 等^[56]用乳球菌重组表达 GLP-1₇₋₃₇, 该重组菌株灌胃大鼠后的 2-11 h, 大鼠的胰岛素水平显著增加, 血糖水平显著降低, 表明重组的乳球菌表达出了具有功能活性的 GLP-1₇₋₃₇。2016 年, 另一项研究中, Lin 等^[57]用副干酪乳杆菌 *L. paracasei* BL23 重组表达 GLP-1₇₋₃₇ 的五聚体 (5 \times GLP-1), GLP-1 五聚体之间用胰蛋白酶的酶切位点连接, 当在肠道中被释放出来即可被肠腔中的胰蛋白酶酶解成为单体 GLP-1。该研究通过胰岛细胞 HIT-T15 体外模型证实了重组的 5 \times GLP-1 具有促胰岛素分泌的功能。将重组菌株灌胃糖尿病大鼠 1 周后, 不含 GLP-1 的对照菌株显著降低大鼠血糖水平, 而重组菌株并未产生额外的降血糖效果, 原因可能是重组蛋白表达量太低。该研究表明副干酪乳杆菌本身可缓解 T2D, 但还需进一步优化 GLP-1 的表达量以获得更显著的治疗效果。另外, 2019 年, 笔者团队的研究也发现从乳制品中分离的一株副干酪乳杆菌 *L. paracasei* NL41 可通过改善胰岛素敏感性和氧化压力以及保护胰岛 β 细胞的功能从而预防大鼠 II 型糖尿病^[9]; 从健康百岁老人肠道分离的一株动物双歧杆菌 *B. animalis* 01 可通过调节葡萄糖代谢、脂代谢和肝脏氧化压力缓解大鼠 II 型糖尿病^[58]。

3.4 乳酸菌作为投递载体应用于癌症的防治

目前, 癌症仍然是威胁人类健康的一大杀手, 严重影响人类生活质量。关于癌症的治疗策略有

许多, 乳酸菌是近年来才被应用于癌症领域的研究。最初的研究是采用野生的乳酸菌预防结肠癌, 如乳双歧杆菌 *B. lactis*^[59] 和干酪乳杆菌 *L. casei* strain Shirota^[60]。尽管在体外或动物试验中, 乳酸菌被证实具有预防癌症的潜力, 但是目前还没有在人体上进行研究。另外, 也有研究者利用乳酸菌作为投递载体, 表达一些外源的药物分子用于癌症的治疗^[15]。例如, 利用双歧杆菌的厌氧特征, 可将其作为药物投递载体, 静脉注射动物后, 可到达厌氧环境的实体瘤并在此增殖发挥抗癌作用。Fujimori 用长双歧杆菌 *B. longum* 重组表达胞嘧啶脱氨酶 (Cytosine deaminase), 当静脉注射重组菌株后可到达实体瘤用于抗乳腺癌^[61]。Li 等用青春双歧杆菌 *B. adolescentis* 重组表达内皮抑素 (Endostatin), 当静脉注射重组菌株后, 可选择性抑制肿瘤小鼠血管生成和肿瘤生长^[62]。虽然利用乳酸菌活载体分泌的蛋白比静脉注射的裸蛋白更稳定, 但是静脉注射乳酸菌也存在一些副作用, 因此通过粘膜投递的方式 (如口服投递) 投递乳酸菌活载体更具优势。de Moreno de LeBlanc 等^[63] 发现口服重组表达过氧化氢酶 (Catalase) 的乳球菌 *L. lactis* NZ9000 对化学诱导的结肠癌小鼠具有保护作用。肿瘤细胞的特征是活性氧 (如 H_2O_2) 产量增加, 从而促进肿瘤的侵袭与增殖, 因此用乳酸菌重组表达具有抗氧化活性的酶 (如过氧化氢酶) 可通过降低 H_2O_2 的含量减少结肠损伤和炎症反应。也有研究者用干酪乳杆菌 *L. casei* ATCC393 重组表达 HPV-16E7, 通过粘膜投递活载体的形式用于小鼠宫颈癌的治疗^[64]。笔者团队探索用乳球菌 *L. lactis* NZ9000 重组表达肿瘤转移抑制蛋白 KISS1, 研究结果表明重组菌株可抑制人结肠癌细胞 HT-29 的增殖和迁移^[65]。

4 总结与展望

开发重组表达各种药物分子的工程益生菌, 有望成为治疗多种疾病的替代药物, 具有广泛

的应用前景。用乳酸菌作为蛋白类药物的投递载体, 避免了传统的注射方法带来的痛苦, 同时安全性好, 操作简单方便, 生产成本降低。另外, 应用重组的益生菌可发挥双重效果: 一方面通过重组表达外源蛋白直接治疗相应的疾病, 另一方面菌株本身还可以间接发挥对人体普遍的益生功能。目前, 乳酸菌作为药物投递载体已经成功地表达多种外源蛋白, 证实了乳酸菌作为药物投递载体应用于生物医学方面的可行性, 但是在真正投入市场之前, 还有很多问题需要解决, 如重组菌株的安全性、稳定性等。首先, 导入的外源基因可能会影响乳酸菌本身的安全性, 甚至还可能产生有毒的代谢产物导致对宿主产生无法预料的毒性作用。因此, 必须不断重复进行大量的动物试验和临床试验以确保对人体的安全性。另外, 目前大多数研究只是在动物上进行验证, 且动物试验多采用小型动物, 如大鼠、小鼠, 因此, 为了确定最终的用于人类的药物剂量还需要大型动物试验。其次, 目前大多数研究采用的是质粒表达系统表达外源基因, 而质粒具有不稳定性, 容易丢失, 并且质粒中的抗生素基因容易发生转移。在将来的实际应用中, 应考虑将外源基因直接整合到乳酸菌的基因组中。乳酸菌作为药物分子投递载体首次进入临床试验的研究正是采用基因重组的方法将外源基因 IL-10 整合到了乳球菌的基因组中^[66]。同时为了避免转基因菌株释放到环境中可能对环境造成影响, 可考虑将菌株构建成生物限制型菌株, 如以上提到的进入临床试验的重组 IL-10 的研究采用的是用 IL-10 替换乳球菌基因组中的 *thyA* 基因 (*thyA* 基因负责编码胸腺嘧啶核苷酸合成酶, 是乳酸菌生长所必需的一个酶), 使重组菌株在缺乏外源的胸苷或胸腺嘧啶时不能生存^[39], 因此释放到环境中会死亡。近年来许多新兴技术如 CRISPR/Cas9 的出现可提高乳酸菌基因重组的效率, 从而为将外源基因整合到基因组中提供技术基础。笔者团队近期构建了一种可诱导

表 1 乳酸菌重组表达外源蛋白用于疾病治疗

Table 1 Recombinant proteins produced in LAB for disease treatment

LAB	Application	Recombinant protein	Model	References
<i>L. lactis</i>	Infectious disease	TTFC	Mice	[32]
<i>L. lactis</i>	Infectious disease	CTB	Mice	[35]
<i>L. casei</i>	Infectious disease	scFv antibody	Cervical epithelial monolayer	[36]
<i>L. lactis</i>	IBD	Mouse IL-10	DSS-induced colitis mice and IL-10 ^{-/-} mice	[38]
<i>L. lactis</i>	IBD	Human IL-10	Pigs	[39]
<i>L. lactis</i>	IBD	Human IL-10	DNBS-induced colitis mice	[40]
<i>L. lactis</i>	IBD	IL-6		[41]
<i>L. salivarius</i>	IBD	IL-17		[42]
<i>L. salivarius</i>	IBD	IL-23		[42-43]
<i>L. lactis</i>	IBD	IL-27	T-cell transfer-induced enterocolitis	[44]
<i>L. lactis</i>	IBD	Protein inhibitors Elafin and SLPI	DSS-induced colitis mice	[45]
<i>L. lactis</i>	IBD	Lactoferrampin	DSS-induced colitis mice	[46]
<i>L. lactis</i>	IBD	anti-TNFα scFv	DSS-induced colitis mice	[47]
<i>B. longum</i>	IBD	alpha-melanocyte-stimulating hormone	DSS-induced colitis mice	[48]
<i>B. longum</i>	IBD	rhMnSOD	DSS-induced colitis mice	[49]
<i>L. lactis</i>	Type I diabetes	Proinsulin and IL-10	NOD mice	[50]
<i>L. lactis</i>	Type I diabetes	GAD65370-575 and IL-10	NOD mice	[18]
<i>L. lactis</i>	Type I diabetes	Hsp65-6P277	NOD mice	[51]
<i>L. lactis</i>	Type I diabetes	Insulin analog SCI-57		[52]
<i>L. gasseri</i>	Type I diabetes	GLP-1 ₁₋₃₇	Type I diabetic rats	[53]
<i>L. lactis</i>	Type II diabetes	Exendin-4	INS-1 cells	[54]
<i>L. paracasei</i>	Type II diabetes	Exendin-4	INS-1 cells	[55]
<i>L. lactis</i>	Type II diabetes	GLP-1 ₇₋₃₇	ZDF rats	[56]
<i>L. paracasei</i>	Type II diabetes	5×GLP-1	GK rats	[57]
<i>B. longum</i>	Cancer	Cytosine deaminase	C57BL/6 mice and SD rats	[61]
<i>B. adolescentis</i>	Cancer	Endostatin	Tumor-bearing mice	[62]
<i>L. lactis</i>	Cancer	Catalase	DMH-induced BALB/c mice	[63]
<i>L. casei</i>	Cancer	HPV-16E7	Human papillomavirus type 16-induced tumors in mice	[64]
<i>L. lactis</i>	Cancer	KISS1	HT-29 cells	[65]

的质粒系统 (Inducible plasmid self-destruction, IPSD), 该策略可显著提高外源基因在乳杆菌和双歧杆菌中的同源重组效率^[67]。此外, 大多数乳酸菌只是过路菌, 不能在动物或人体肠道内长时间定植, 因此不利于长期投递外源蛋白, 针对此问题, 可考虑选择黏附定植能力更强的乳酸杆菌作为宿主菌株。

REFERENCES

- [1] Bermúdez-Humaran LG, Aubry C, Motta JP, et al. Engineering lactococci and lactobacilli for human health. *Curr Opin Microbiol*, 2013, 16(3): 278-283.
- [2] 张刚. 乳酸细菌-基础、技术和应用. 北京: 化学工业出版社, 2007: 2-20.
Zhang G. Lactic acid bacteria-basics, technology and application. Beijing: Chemical Industry Press,

- 2007: 2-20 (in Chinese).
- [3] Setta MC, Matemu A, Mbega ER, et al. Potential of probiotics from fermented cereal-based beverages in improving health of poor people in Africa. *J Food Sci Technol*, 2020, 57(11): 3935-3946.
- [4] Szutowska J. Functional properties of lactic acid bacteria in fermented fruit and vegetable juices: a systematic literature review. *Eur Food Res Technol*, 2020, 246(3): 357-372.
- [5] Hutchinson AN, Tingö L, Jan Brummer R. The potential effects of probiotics and ω -3 fatty acids on chronic low-grade inflammation. *Nutrients*, 2020, 12(8): 2402.
- [6] Panebianco C, Latiano T, Pazienza V. Microbiota manipulation by probiotics administration as emerging tool in cancer prevention and therapy. *Front Oncol*, 2020, 10: 679.
- [7] Sun ZK, Sun XJ, Li J, et al. Using probiotics for type 2 diabetes mellitus intervention: advances, questions, and potential. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2020, 60(4): 670-683.
- [8] Castro-Mejía JL, O'Ferrall S, Krych L, et al. Restitution of gut microbiota in Ugandan children administered with probiotics (*Lactobacillus rhamnosus* GG and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12) during treatment for severe acute malnutrition. *Gut Microbes*, 2020, 11(4): 855-867.
- [9] Zeng Z, Yuan QP, Yu R, et al. Ameliorative effects of probiotic *Lactobacillus paracasei* NL41 on insulin sensitivity, oxidative stress, and beta-cell function in a type 2 diabetes mellitus rat model. *Mol Nutr Food Res*, 2019, 63(32): 1900457.
- [10] Ejtahed HS, Mohtadi-Nia J, Homayouni-Rad A, et al. Probiotic yogurt improves antioxidant status in type 2 diabetic patients. *Nutrition*, 2012, 28(5): 539-543.
- [11] Kassaian N, Feizi A, Rostami S, et al. The effects of 6 mo of supplementation with probiotics and synbiotics on gut microbiota in the adults with prediabetes: a double blind randomized clinical trial. *Nutrition*, 2020, 79-80: 110854.
- [12] Casas-Solís J, Del Rosario Huizar-López M, Irecta-Nájera CA, et al. Immunomodulatory effect of *Lactobacillus casei* in a murine model of colon carcinogenesis. *Probiotics Antimicrob Proteins*, 2020, 12(3): 1012-1024.
- [13] Wang M, Gao ZQ, Zhang YG, et al. Lactic acid bacteria as mucosal delivery vehicles: a realistic therapeutic option. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2016, 100(13): 5691-5701.
- [14] Shonyela SM, Wang G, Yang WT, et al. New progress regarding the use of lactic acid bacteria as live delivery vectors, treatment of diseases and induction of immune responses in different host species focusing on *Lactobacillus* species. *World J Vaccines*, 2017, 7(4): 43-75.
- [15] Plavec TV, Berlec A. Engineering of lactic acid bacteria for delivery of therapeutic proteins and peptides. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2019, 103(5): 2053-2066.
- [16] Mazhar SF, Afzal M, Almatroudi A, et al. The prospects for the therapeutic implications of genetically engineered probiotics. *J Food Quality*, 2020: 9676452. DOI: 10.1155/2020/9676452.
- [17] LeBlanc JG, Aubry C, Cortes-Perez NG, et al. Mucosal targeting of therapeutic molecules using genetically modified lactic acid bacteria: an update. *FEMS Microbiol Lett*, 2013, 344(1): 1-9.
- [18] Robert S, Gysemans C, Takiishi T, et al. Oral delivery of glutamic acid decarboxylase (GAD)-65 and IL10 by *Lactococcus lactis* reverses diabetes in recent-onset NOD mice. *Diabetes*, 2014, 63(8): 2876-2887.
- [19] Macpherson AJ, Köller Y, McCoy KD. The bilateral responsiveness between intestinal microbes and IgA. *Trends Immunol*, 2015, 36(8): 460-470.
- [20] Kok J, Van Der Vossen JM, Venema G. Construction of plasmid cloning vectors for lactic streptococci which also replicate in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 1984, 48(4): 726-731.
- [21] De Vos WM. Gene cloning and expression in lactic streptococci. *FEMS Microbiol Rev*, 1987, 46: 281-295.
- [22] Shareck J, Choi Y, Lee B, et al. Cloning vectors based on cryptic plasmids isolated from lactic acid bacteria: their characteristics and potential applications in biotechnology. *Crit Rev Biotechnol*, 2004, 24(4): 155-208.

- [23] Simon D, Chopin A. Construction of a vector plasmid family and its use for molecular cloning in *Streptococcus lactis*. *Biochimie*, 1988, 70(4): 559-566.
- [24] Que YA, Haeffliger JA, Francioli P, et al. Expression of *Staphylococcus aureus* clumping factor A in *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* using a new shuttle vector. *Infect Immun*, 2000, 68(6): 3516-3522.
- [25] Mierau I, Kleerebezem M. 10 years of the nisin-controlled gene expression system (NICE) in *Lactococcus lactis*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005, 68(6): 705-717.
- [26] Stoeker L, Nordone S, Gunderson S, et al. Assessment of *Lactobacillus gasseri* as a candidate oral vaccine vector. *Clin Vaccine Immunol*, 2011, 18(11): 1834-1844.
- [27] Bron PA, Hoffer SM, Van Swam II, et al. Selection and characterization of conditionally active promoters in *Lactobacillus plantarum*, using alanine racemase as a promoter probe. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70(1): 310-317.
- [28] Duong T, Miller MJ, Barrangou R, et al. Construction of vectors for inducible and constitutive gene expression in *Lactobacillus*. *Microb Biotechnol*, 2011, 4(3): 357-367.
- [29] Kajikawa A, Nordone SK, Zhang L, et al. Dissimilar properties of two recombinant *Lactobacillus acidophilus* strains displaying *Salmonella* FliC with different anchoring motifs. *Appl Environ Microbiol*, 2011, 77(18): 6587-6596.
- [30] Wyszzyńska A, Kobierecka P, Bardowski J, et al. Lactic acid bacteria—20 years exploring their potential as live vectors for mucosal vaccination. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, 99(7): 2967-2977.
- [31] Nguyen TT, Nguyen HM, Geiger B, et al. Heterologous expression of a recombinant lactobacillal β -galactosidase in *Lactobacillus plantarum*: effect of different parameters on the sakacin P-based expression system. *Microb Cell Fact*, 2015, 14: 30.
- [32] Wells JM, Wilson PW, Norton PM, et al. *Lactococcus lactis*: high-level expression of tetanus toxin fragment C and protection against lethal challenge. *Mol Microbiol*, 1993, 8(6): 1155-1162.
- [33] Norton PM, Wells JM, Brown HWG, et al. Protection against tetanus toxin in mice nasally immunized with recombinant *Lactococcus lactis* expressing tetanus toxin fragment C. *Vaccine*, 1997, 15(6/7): 616-619.
- [34] Robinson K, Chamberlain LM, Schofield KM, et al. Oral vaccination of mice against tetanus with recombinant *Lactococcus lactis*. *Nat Biotechnol*, 1997, 15(7): 653-657.
- [35] Lei H, Peng XJ, Jiao HF, et al. Broadly protective immunity against divergent influenza viruses by oral co-administration of *Lactococcus lactis* expressing nucleoprotein adjuvanted with cholera toxin B subunit in mice. *Microb Cell Fact*, 2015, 14: 111.
- [36] Chancey CJ, Khanna KV, Seegers JFML, et al. Lactobacilli-expressed single-chain variable fragment (scFv) specific for intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) blocks cell-associated HIV-1 transmission across a cervical epithelial monolayer. *J Immunol*, 2006, 176(9): 5627-5636.
- [37] Andersen KK, Marcotte H, Álvarez B, et al. *In situ* gastrointestinal protection against anthrax edema toxin by single-chain antibody fragment producing lactobacilli. *BMC Biotechnol*, 2011, 11: 126.
- [38] Steidler L, Hans W, Schotte L, et al. Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. *Science*, 2000, 289(5483): 1352-1355.
- [39] Steidler L, Neirynck S, Huyghebaert N, et al. Biological containment of genetically modified *Lactococcus lactis* for intestinal delivery of human interleukin 10. *Nat Biotechnol*, 2003, 21(7): 785-789.
- [40] Martín R, Chain F, Miquel S, et al. Effects in the use of a genetically engineered strain of *Lactococcus lactis* delivering *in situ* IL-10 as a therapy to treat low-grade colon inflammation. *Hum Vacc Immunother*, 2014, 10(6): 1611-1621.
- [41] Shigemori S, Ihara M, Sato T, et al. Secretion of an immunoreactive single-chain variable fragment antibody against mouse interleukin 6 by *Lactococcus lactis*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2017, 101(1): 341-349.

- [42] Kosler S, Strukelj B, Berlec A. Lactic acid bacteria with concomitant IL-17, IL-23 and TNF α -binding ability for the treatment of inflammatory bowel disease. *Curr Pharm Biotechnol*, 2017, 18(4): 318-326.
- [43] Škrlec K, Zadavec P, Hlavničková M, et al. p19-targeting ILP protein blockers of IL-23/Th-17 pro-inflammatory axis displayed on engineered bacteria of food origin. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(7): e1933.
- [44] Hanson ML, Hixon JA, Li WQ, et al. Oral delivery of IL-27 recombinant bacteria attenuates immune colitis in mice. *Gastroenterology*, 2014, 146(1): 210-221.e13.
- [45] Bermúdez-Humarán LG, Motta JP, Aubry C, et al. Serine protease inhibitors protect better than IL-10 and TGF- β anti-inflammatory cytokines against mouse colitis when delivered by recombinant lactococci. *Microb Cell Fact*, 2015, 14: 26.
- [46] Song LY, Xie WC, Liu ZH, et al. Oral delivery of a *Lactococcus lactis* strain secreting bovine lactoferricin-lactoferrampin alleviates the development of acute colitis in mice. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2019, 103(15): 6169-6186.
- [47] Chiabai MJ, Almeida JF, De Azevedo MJD, et al. Mucosal delivery of *Lactococcus lactis* carrying an anti-TNF scFv expression vector ameliorates experimental colitis in mice. *BMC Biotechnol*, 2019, 19: 38.
- [48] Wei P, Yang Y, Ding Q, et al. Oral delivery of *Bifidobacterium longum* expressing alpha-melanocyte-stimulating hormone to combat ulcerative colitis. *J Med Microbiol*, 2015, 65: 160-168.
- [49] Liu MG, Li SY, Zhang Q, et al. Oral engineered *Bifidobacterium longum* expressing rhMnSOD to suppress experimental colitis. *Int Immunopharmacol*, 2018, 57: 25-32.
- [50] Takiishi T, Korf H, Van Belle TL, et al. Reversal of autoimmune diabetes by restoration of antigen-specific tolerance using genetically modified *Lactococcus lactis* in mice. *J Clin Invest*, 2012, 122(5): 1717-1725.
- [51] Jin L, Zhu AH, Wang Y, et al. HSP65 serves as an immunogenic carrier for a diabetogenic peptide P277 inducing anti-inflammatory immune response in NOD mice by nasal administration. *Vaccine*, 2010, 28(19): 3312-3317.
- [52] Ng DTW, Sarkar CA. Nisin-inducible secretion of a biologically active single-chain insulin analog by *Lactococcus lactis* NZ9000. *Biotechnol Bioeng*, 2011, 108(8): 1987-1996.
- [53] Duan FF, Liu JH, March JC. Engineered commensal bacteria reprogram intestinal cells into glucose-responsive insulin-secreting cells for the treatment of diabetes. *Diabetes*, 2015, 64(5): 1794-1803.
- [54] Zeng Z, Yu R, Zuo FL, et al. Recombinant *Lactococcus lactis* expressing bioactive exendin-4 to promote insulin secretion and beta-cell proliferation *in vitro*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2017, 101(19): 7177-7186.
- [55] Zeng Z, Yu R, Zuo FL, et al. Heterologous expression and delivery of biologically active exendin-4 by *Lactobacillus paracasei* L14. *PLoS ONE*, 2016, 11(10): e0165130.
- [56] Agarwal P, Khatri P, Billack B, et al. Oral delivery of glucagon like peptide-1 by a recombinant *Lactococcus lactis*. *Pharm Res*, 2014, 31(12): 3404-3414.
- [57] Lin Y, Krogh-Andersen K, Pelletier J, et al. Oral delivery of pentameric glucagon-like peptide-1 by recombinant *Lactobacillus* in diabetic rats. *PLoS ONE*, 2016, 11(9): e0162733.
- [58] Zhang JL, Wang SB, Zeng Z, et al. Anti-diabetic effects of *Bifidobacterium animalis* 01 through improving hepatic insulin sensitivity in type 2 diabetic rat model. *J Funct Foods*, 2020, 67: 103843.
- [59] Le Leu RK, Hu Y, Brown IL, et al. Synbiotic intervention of *Bifidobacterium lactis* and resistant starch protects against colorectal cancer development in rats. *Carcinogenesis*, 2010, 31(2): 246-251.
- [60] Yamazaki K, Tsunoda A, Sibusawa M, et al. The effect of an oral administration of *Lactobacillus casei* strain shirota on azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci and colon cancer in the rat. *Oncol Rep*, 2000, 7(5): 977-982.
- [61] Fujimori M. Genetically engineered *bifidobacterium*

- as a drug delivery system for systemic therapy of metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer*, 2006, 13: 27-31.
- [62] Li X, Fu GF, Fan YR, et al. *Bifidobacterium adolescentis* as a delivery system of endostatin for cancer gene therapy: selective inhibitor of angiogenesis and hypoxic tumor growth. *Cancer Gene Ther*, 2003, 10(2): 105-111.
- [63] De Moreno De Leblanc A, LeBlanc JG, Perdigon G, et al. Oral administration of a catalase-producing *Lactococcus lactis* can prevent a chemically induced colon cancer in mice. *J Med Microbiol*, 2008, 57(1): 100-105.
- [64] Ribelles P, Benbouziane B, Langella P, et al. Protection against human papillomavirus type 16-induced tumors in mice using non-genetically modified lactic acid bacteria displaying E7 antigen at its surface. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97(3): 1231-1239.
- [65] Zhang B, Li AD, Zuo FL, et al. Recombinant *Lactococcus lactis* NZ9000 secretes a bioactive kisspeptin that inhibits proliferation and migration of human colon carcinoma HT-29 cells. *Microb Cell Fact*, 2016, 15: 102.
- [66] Braat H, Rottiers P, Hommes DW, et al. A phase I trial with transgenic bacteria expressing interleukin-10 in Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2006, 4(6): 754-759.
- [67] Zuo FL, Zeng Z, Hammarstro'm L, et al. Inducible plasmid self-destruction (IPSD) assisted genome engineering in *Lactobacilli* and *Bifidobacteria*. *ACS Synth Biol*, 2019, 8(8): 1723-1729.

(本文责编 郝丽芳)