

研究论文

DOI: 10.12211/2096-8280.2022-010

基于表面涂层益生菌的肿瘤抗原口服递送系统

林思思¹, 潘超¹, 张一帆², 刘尽尧^{1, 2}

(¹ 上海交通大学医学院附属仁济医院, 上海市肿瘤研究所, 上海 200011; ² 上海交通大学医学院附属仁济医院, 分子医学研究院, 上海 200127)

摘要: 肿瘤疫苗是一种通过递送肿瘤抗原进而激活自身特异性抗肿瘤免疫的肿瘤免疫疗法。口服具有方便、简单和高效的优势。然而现有的口服肿瘤疫苗有限, 并且局限于胃肠道肿瘤的治疗。这主要与缺乏先进的口服递送载体有关。本研究设计了一种酵母细胞膜包覆的益生菌应用于口服递送系统。其中, 酵母细胞膜发挥益生菌和抗原保护以及肠道淋巴系统靶向的作用; 益生菌发挥搭载抗原和免疫佐剂的作用。结果显示, 与裸菌相比, 酵母细胞膜包覆能提高益生菌的生物利用度, 增强其在派氏结的富集, 促进树突状细胞的活化和抗原递呈以及小鼠血浆中OVA-IgG水平。实验证明该系统能够保护益生菌和抗原免受胃肠道环境刺激并进一步向肠道淋巴系统递送抗原, 激活抗肿瘤免疫。

关键词: 益生菌; 肿瘤疫苗; 口服疫苗; 口服递送系统; 生物纳米技术

中图分类号: R392 **文献标志码:** A

Coated probiotic-based drug carriers for oral delivery of tumor antigens

LIN Sisi¹, PAN Chao¹, ZHANG Yifan², LIU Jinyao^{1, 2}

(¹ Renji Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai Cancer Institute, Shanghai 200011, China; ² Renji Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Institute of Molecular Medicine, Shanghai 200127, China)

Abstract: Cancer vaccines, as a form of cancer immunotherapy, trigger host anti-tumor immunity by delivering tumor antigens. Oral administration has the advantages of convenience, simplicity and high efficacy. However, oral tumor vaccines have been rarely reported and existing forms are solely suitable for gastrointestinal cancer. The situation is associated with lack of advanced oral delivery systems. In this study, yeast cell membrane-coated probiotics are developed as drug carriers for oral delivery of tumor antigens. Yeast cell membranes play a dual role in protecting probiotics and antigens and facilitating targeted delivery of tumor antigens to the gut lymphatic system, while probiotics serve as both immune adjuvant and antigen carrier. As a model antigen, ovalbumin (OVA) is loaded onto probiotic surface by complexing with polyethyleneimine and hyaluronic acid *via* electrostatic interaction. Subsequently, antigen-loaded probiotics are individually camouflaged with yeast membranes by physical extrusion through a porous

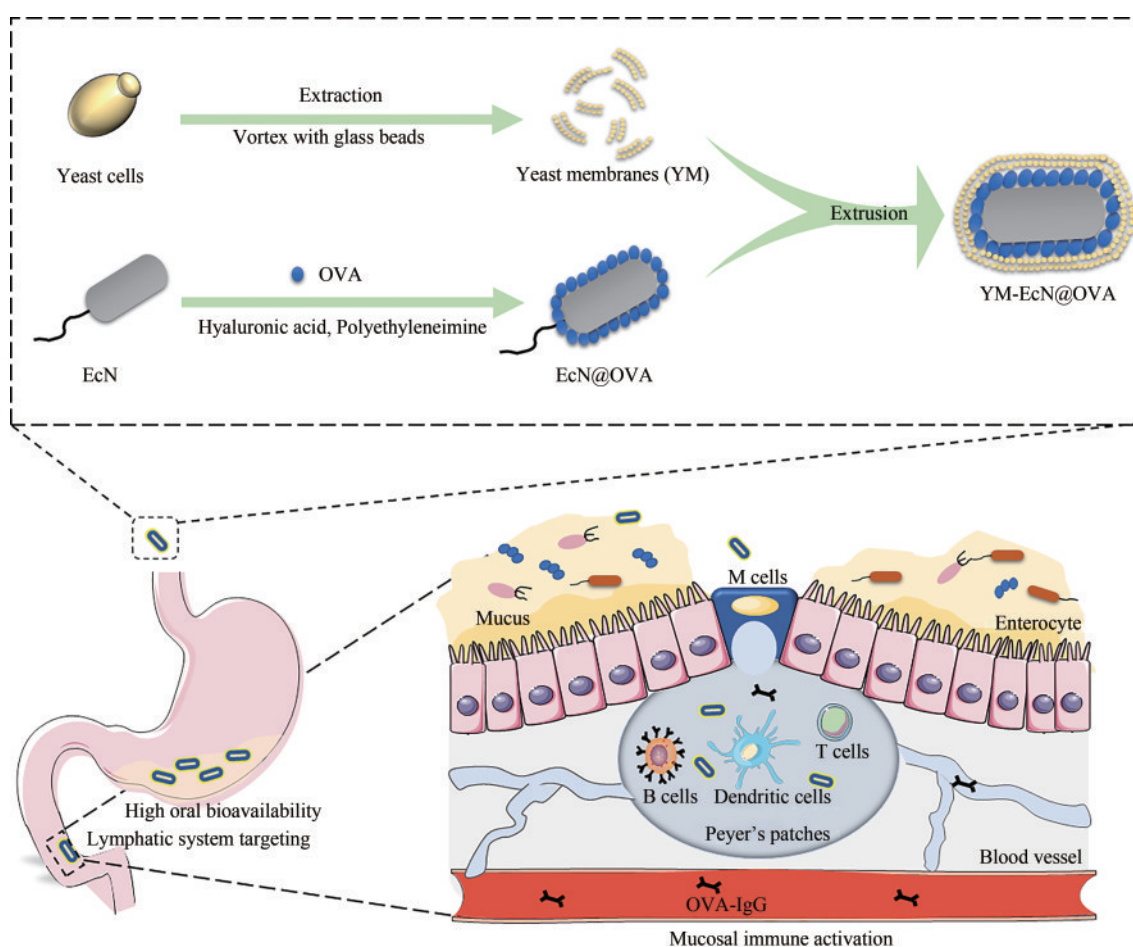
收稿日期: 2022-01-29 修回日期: 2022-03-10

基金项目: 国家自然科学基金 (21875135)

引用本文: 林思思, 潘超, 张一帆, 刘尽尧. 基于表面涂层益生菌的肿瘤抗原口服递送系统[J]. 合成生物学, 2022, 3(4): 810-820

Citation: LIN Sisi, PAN Chao, ZHANG Yifan, LIU Jinyao. Coated probiotic-based drug carriers for oral delivery of tumor antigens[J]. Synthetic Biology Journal, 2022, 3(4): 810-820

membrane. As reflected by similar growth to uncoated probiotics, both the coating and preparation procedures have limited influences on bacterial viability. Experimental results show that, compared to unmodified bacteria, yeast cell membrane coated probiotics retain their ability to grow and divide after incubation in simulated gastrointestinal environments and exhibit an improved bioavailability following oral ingestion. The presence of embedded β -glucan on yeast membranes promotes the phagocytosis by microfold cells that locate in intestinal epithelium. After oral gavage, the coating facilitates the accumulation of wrapped probiotics in Peyer's patches and then in mesenteric lymph nodes. Furthermore, the maturation of dendritic cells and corresponding antigen presentation are enhanced by coated probiotics, which induce an OVA-specific immune response as manifested by an upgraded serum level of OVA-IgG in mice after oral administration. These results demonstrate that yeast cell membrane-coated probiotics show enhanced tolerance against insults in the gastrointestinal environment and improved delivery of antigens into the gut lymphatic system, hence activating anti-tumor immunity.



Keywords: probiotics; cancer vaccines; oral vaccines; oral delivery system; nanobiotechnology

肿瘤疫苗是一种新兴肿瘤免疫疗法，被视为是肿瘤防治的重要手段之一^[1-2]。尽管转录组测序、计算建模和材料工程等新技术的发展促进了肿瘤

疫苗的发展，但是许多基础研究显示有效的肿瘤疫苗其临床试验结果并不理想^[3-4]。一个重要的原因是尽管皮下或静脉注射是递送肿瘤抗原的常用

手段,但由于淋巴组织对肿瘤抗原的摄取有限,皮下或静脉注射方式难以诱导有效的免疫反应^[5]。胃肠道具有人体最大的黏膜表面,并且涵盖了人体70%的免疫细胞,因此胃肠道不仅是重要的消化吸收器官,也被认为是人体最大的免疫器官^[6-7]。口服诱导的黏膜免疫反应具有剂量小、高效、维持时间长、操作方便、患者依从性好等优势^[8]。然而现有的口服疫苗主要局限于病原体感染及其相关性疾病的预防,如新冠病毒口服疫苗^[9-14]。此外,现有口服肿瘤疫苗的研究主要以胃肠道肿瘤的防治为主,难以实现对胃肠道外其他肿瘤的防治^[15-17]。这主要归因于,一方面肿瘤疫苗成分难以克服胃肠道的特殊环境(胃部酸性、胃肠道富含酶类和胆汁酸)而发生降解;另一方面抗原难以在肠道淋巴系统富集或跨越肠屏障进入外周循环系统。这两方面的因素是制约口服肿瘤疫苗发展的重要因素^[17-19],因此迫切需要发展新的药物递送系统以克服上述口服肿瘤疫苗所面临的难题。为了实现有效的肿瘤抗原递送并诱导黏膜免疫反应,该系统需满足在保护抗原不被降解的同时能够在肠道淋巴系统富集或跨越肠屏障,并且所装载的抗原能够有效被免疫细胞摄取和递呈。

微皱褶细胞,又称M细胞,是位于派氏结上端的吞噬性肠上皮细胞^[20]。派氏结内含有丰富的树突状细胞和B细胞,并且派氏结进一步与肠系膜淋巴结相连,因此抗原通过M细胞转运进入派氏结后,被树突状细胞摄取,树突状细胞一方面可以促进B细胞的活化,产生大量分泌型免疫球蛋白^[21-22],另一方面派氏结中的树突状细胞可进一步转移至肠系膜淋巴结,在肠系膜淋巴结中将抗原递呈给T细胞,激活T细胞分泌细胞因子。与其他肠上皮细胞不同,M细胞表面缺乏黏液,因此相比于其他肠上皮细胞转运途径,M细胞吞噬能够更加高效地实现抗原在淋巴系统的富集^[23-24]。我们前期研究发现酵母细胞膜因其表面含有与M细胞表面Dectin-1受体结合的 β -葡聚糖,能够在保护益生菌免受胃肠道环境刺激的同时进一步靶向M细胞,将益生菌递送至派氏结,并诱导黏膜免疫反应进而发挥调节肠道菌群的作用^[25]。由此可见,该载药体系有望为肿瘤抗原的口服递送提供新机遇。在本文中,我们通过化学修饰将模式抗原卵

清蛋白(ovalbumin, OVA)搭载于细菌表面,并将细菌进一步包裹于酵母细胞膜中。所制备的抗原口服递送系统命名为YM-EcN@OVA。OVA是鸡蛋蛋白中的主要成分,具有免疫原性、较好的稳定性以及成熟的提取工艺等特征,因此作为一种肿瘤模式抗原,被广泛应用于肿瘤免疫研究^[26-28]。我们前期研究中通过化学共价键合、静电作用、物理挤出等方式已实现细菌表面的多样化官能团修饰^[29-32]。本研究采用两步法,先通过静电作用将OVA搭载于益生菌表面,然后采用物理挤出方法使细菌包裹上酵母细胞膜。实验结果表明,与EcN相比,YM-EcN@OVA对外模拟胃液、模拟肠液和胆汁酸具有更高的耐受性,并且能够更有效地在派氏结中富集。此外,YM-EcN@OVA能够有效促进树突状细胞的成熟和抗原递呈。与给予OVA和EcN灌胃的小鼠相比,YM-EcN@OVA干预的小鼠血浆卵清蛋白特异性免疫球蛋白抗体(Ovalbumin specific immunoglobulin G, OVA-IgG)水平显著性提高。这些结果表明,该递送系统能够有效保护益生菌和抗原免受胃肠道环境刺激而失活的同时实现抗原的肠道淋巴系统富集,并进一步诱导抗肿瘤免疫反应。

1 材料与方法

1.1 实验材料

酿酒酵母、大肠杆菌属Nissle 1917 (*E. coli* Nissle 1917, EcN)、异丙醇、丙酮、盐酸、磷酸二氢钾、胃蛋白酶、NaOH、胰蛋白酶、LB培养基、RPMI-1640培养基、青霉素-链霉素溶液、胎牛血清、FITC标记的OVA、APC-OVA流式抗体、PE-MHC II流式抗体。

1.2 酵母细胞膜的制备

将20 g酿酒酵母悬浮在300 mL的1 mol/L NaOH溶液中。将悬浮液80 °C加热2 h后,4000 r/min离心5 min。沉淀物用去离子水洗涤2次后,用pH 4的盐酸重悬沉淀物,并于60 °C搅拌孵育2 h。3000 r/min离心5 min后,用去离子水冲洗沉淀物2次,进一步用异丙醇漂洗沉淀物4次,最后用

丙酮润洗2次。样本离心弃上清后，将沉淀物置于通风橱过夜干燥。所收集的酵母微囊（10 mg/mL）进一步在室温下用直径为300~500 μm的玻璃珠连续振荡2 h以制备酵母细胞膜。

1.3 YM-EcN@OVA的制备

将接种于含有卡那霉素抗生素LB培养基中的EcN置于37 °C、200 r/min的环境中培养。4 h后，细菌样本7000 r/min离心5 min，用200 μL 0.2 mol/L的氯化钠溶液重悬细菌。向菌液中加入100 μL 10 mg/mL的氧化透明质酸于室温混匀20 min后，10 000 r/min离心10 min。进一步用去离子水重悬细菌后，向菌液中加入1 mL 0.5 mg/mL的聚乙烯亚胺，于室温混匀10 min。14 000 r/min离心30 min后，用去离子水重悬细菌沉淀并加入20 μL浓度为5 mg/mL的卵清蛋白，于室温混匀30 min。样本10 000 r/min离心5 min后用PBS重悬EcN@OVA。将酵母细胞膜与搭载卵清蛋白的益生菌按体积比3:7的比例混合，并于室温混匀1 h。然后使用脂质体挤出仪（Avanti Polar Lipids, USA）将混合物通过孔径为1 μm的聚碳酸酯多孔膜连续挤出21次，随后7000 r/min离心5 min，弃上清并用PBS重悬完成YM-EcN@OVA的制备。

1.4 材料表征

卡尔科弗卢尔荧光增白剂标记的酵母细胞膜呈蓝色荧光。异硫氰酸荧光素标记的卵清蛋白呈绿色荧光。转染pBBR1MCS2-Tac-mCherry质粒的EcN呈红色荧光。通过激光共聚焦显微镜（TCS-SP8 SR, Leica, Japan）和流式细胞仪（BD Bioscience, BD, USA）分别对卵清蛋白的细菌搭载和酵母细胞膜的包覆进行定性和定量分析。在48 μm孔径铜网上分别滴加10 μL EcN、EcN@OVA和YM-EcN@OVA样本。样本室温静置30 min后，用滤纸吸取剩余的液体并用去离子水润洗2次。最后将铜网置于透射电镜（Tecnai G2, Thermo Fisher Scientific, USA）。通过观察细菌外貌形态的改变以分析抗原的搭载和酵母细胞膜的包覆情况。将样本加入比色皿并通过使用动态光散射仪（Zetasizer Nano ZS, Malvern, USA）测量样本的粒径和Zeta电位。

1.5 益生菌对模拟性肠胃液和胆汁酸的抵抗力

参考Pan等^[30]和Li等^[31]的方法配制模拟胃液、模拟肠液和胆汁酸。将32.0 g NaCl和2 g胃蛋白酶溶解于1 L去离子水中，然后用稀盐酸将溶液pH调节至2.0以配制模拟胃液。6.8 g KH₂PO₄溶解于250 mL去离子水中，然后向溶液中加入77 mL 0.2 mol/L浓度的NaOH溶液、10 g胰蛋白酶以及200 mL去离子水。上述溶液用稀释的NaOH溶液将pH调节至6.8，从而配制模拟肠液。模拟胃液、模拟肠液和胆汁酸（0.3 mg/mL）在使用前通过0.22 μm的滤膜进行过滤。将含有等量细菌数量的EcN、EcN@OVA和YM-EcN@OVA样本分别加入1 mL的模拟胃液、模拟肠液和胆汁酸溶液中，在200 r/min、37 °C环境下培养一定时间后以7000 r/min的速度离心5 min，并将沉淀物重悬在100 μL PBS中进行涂板。LB琼脂平板培养24 h后进行细菌计数。

1.6 肠腔注射

6~8周雄性C57/BL6J小鼠购自上海杰思捷实验动物有限公司。动物在温度为25 °C ± 2 °C和湿度为55%±5%的环境下适应性喂养至少1周后开始动物实验。所有动物实验获得上海交通大学动物伦理的审批。参考Lin等^[33]的方法，小鼠恩氟烷麻醉后，用小鼠剃毛刀剔除腹部毛发并用酒精棉球消毒。然后纵行剪开约1 cm切口并继续沿腹白线纵行剪开以打开腹腔。在小鼠腹部放置1块无菌生理盐水润湿的纱布，然后用2根润湿的棉棒将小肠肠段从腹腔中取出置于纱布上。在距离派氏结两侧各约1 cm处各放置一段手术缝线，先结扎一侧，另一侧不结扎。用1 mL注射器以30°进针后水平推进针头，进针约占针头2/3时，往肠腔中分别注射PBS、EcN@OVA和YM-EcN@OVA，其中EcN转染了pBBR1MCS2-Tac-mCherry质粒。注射1.5 h后，剪取肠系膜淋巴结进行活体组织成像和细菌涂板，同时收集派氏结进行细菌涂板。

1.7 小鼠骨髓树突状细胞培养与刺激

小鼠脱臼处死后在75%乙醇中浸泡20 min。剪取小鼠后腿并分离出股骨和肱骨后，用剪刀和镊子

剔除骨头周围的肌肉组织。然后用 1 mL 注射器反复冲洗骨髓腔。用 75 μm 孔径尼龙网过滤去除多余的组织后,将收集的骨髓液以 1200 r/min 离心 5 min。用红细胞裂解液重悬细胞并室温孵育 5 min。细胞 1200 r/min 离心 5 min 后,用 PBS 洗涤细胞 1 次,并用含有 1% 双抗和 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基重悬细胞。将细胞接种于 24 孔板 (1×10^6) 并向培养基中加入重组小鼠粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (20 ng/mL) 和白介素 4 (10 ng/mL)。细胞于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% 二氧化碳的细胞培养箱中培养 1 周后分别给予 PBS、OVA (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、 5×10^6 CFUs EcN、EcN@OVA 和 YM-EcN@OVA。刺激 6 h 后,细胞分别与 APC-OVA 和 PE-MHCII 抗体孵育。抗体孵育 30 min 后,样本离心弃上清,用 PBS 漂洗 2 次后重悬细胞于 300 μL PBS 中,然后用流式细胞仪 (BD Bioscience, BD, USA) 进行检测。

1.8 血浆中小鼠卵清蛋白特异性 IgG 水平测量

小鼠连续 7 d 分别给予 PBS、EcN、卵清蛋白、EcN@OVA 和 YM-EcN@OVA 灌胃。灌胃后 1 周和 2 周,分别对小鼠进行取血。5000 r/min、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 15 min 后收集血浆样本,根据小鼠卵清蛋白特异性 IgG 酶联免疫试剂盒说明书检测小鼠血浆中的卵清蛋白特异性 IgG 水平。

1.9 统计学分析

结果以平均值 \pm 标准差表示。使用 IBM SPSS Statistics 19 软件进行单因素方差分析 (one-way analysis of variance, ANOVA),并使用最小显著性差异检验进行两两分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

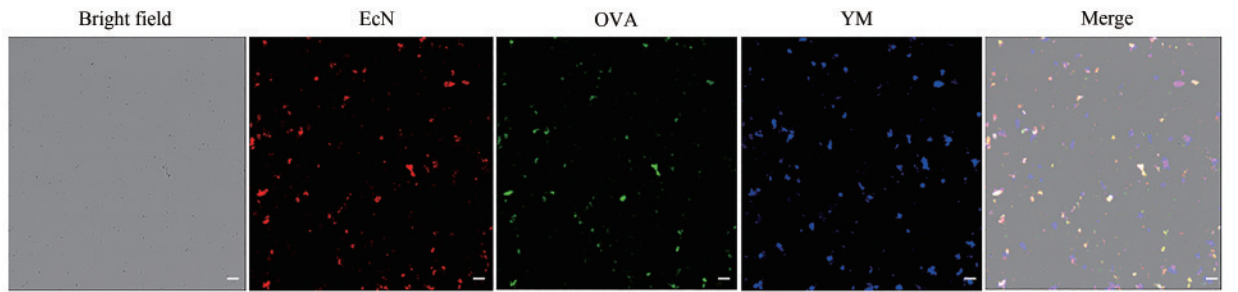
2.1 YM-EcN@OVA 制备与表征

本研究采用层层自组装的方法将卵清蛋白搭载于益生菌表面。然后进一步采用物理挤出的方式,将搭载卵清蛋白的益生菌包裹于酵母细胞膜中。

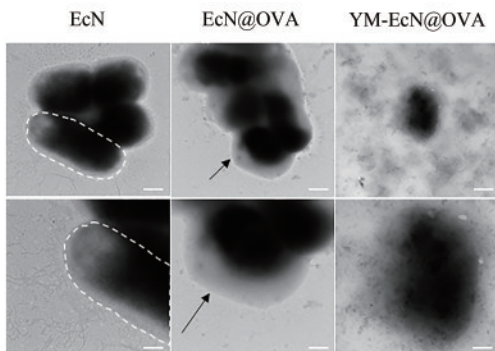
通过共聚焦显微镜观察可见异硫氰酸荧光素标记的卵清蛋白 (绿色) 能够有效搭载于转染 pCMV-mCherry-GFP-LC3B 质粒的 EcN (红色)。搭载了卵清蛋白的 EcN 进一步包裹于酵母细胞膜 [卡尔科弗卢尔荧光增白剂标记,蓝色,图 1(a)]。此外,将样本滴加于铜网,进一步通过透射电子显微镜分别确认卵清蛋白的搭载和酵母细胞膜的包裹。如图 1(b) 所示,与裸菌相比,与卵清蛋白共孵育的细菌表面显示出一层涂层。并且,酵母膜的包裹使得涂层进一步增厚。纳米粒径和 Zeta 电位分析结果显示包裹酵母细胞膜 EcN 的粒径比裸菌增加了 1 倍 [图 1(c)]。EcN 的 Zeta 电位随着卵清蛋白的搭载和酵母细胞膜的包裹由原来的 $-37.80 \text{ mV} \pm 0.36 \text{ mV}$ 分别提高至 $-28.23 \text{ mV} \pm 1.07 \text{ mV}$ 以及 $-5.95 \text{ mV} \pm 0.90 \text{ mV}$ [图 1(d)]。流式细胞检测结果表明卵清蛋白的搭载率高达 68.0% [图 1(e)],而酵母细胞膜的包裹率进一步增加至 80.6% [图 1(f)]。这些结果表明通过层层自组装和物理挤出方法能够有效地将模式抗原搭载于细菌表面并进一步实现细菌的酵母细胞膜包裹。

2.2 酵母细胞膜能够保护益生菌免受胃肠道环境刺激

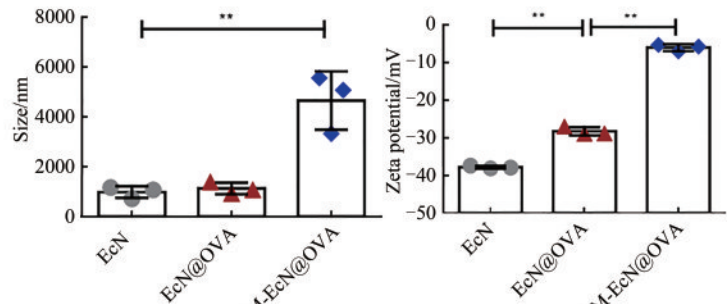
通过口服将搭载卵清蛋白的益生菌递送进入派氏结之前,细菌需要克服胃部酸性以及肠道中多种酶类和胆汁酸等特殊环境的刺激。足够数量且具有活性的益生菌进入肠道淋巴系统是诱导黏膜免疫的关键因素。因此首先评估酵母细胞膜能否保护益生菌免受胃肠道环境刺激。将细菌分别与体外模拟胃液、模拟肠液和胆汁酸共同孵育一段时间后,取样进行细菌涂板。样本培养 24 h 后,细菌计数结果显示经过体外模拟胃液、模拟肠液和胆汁酸刺激相同时间后,酵母细胞膜的包裹能进一步提高益生菌对不利因素的抵抗能力。YM-EcN@OVA 实验组的细菌数量明显多于 EcN 和 EcN@OVA 实验组的细菌数量 (图 2)。上述结果表明酵母膜包裹能够有效保护益生菌免受胃肠道环境的刺激。



(a)

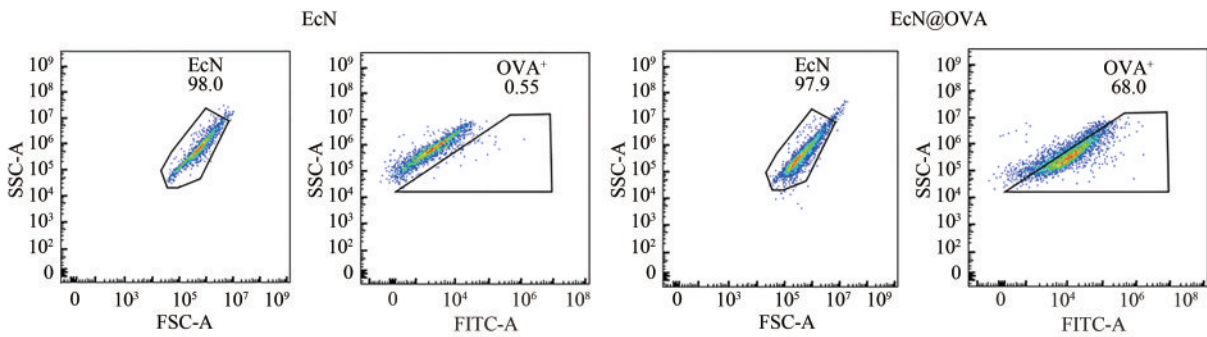


(b)

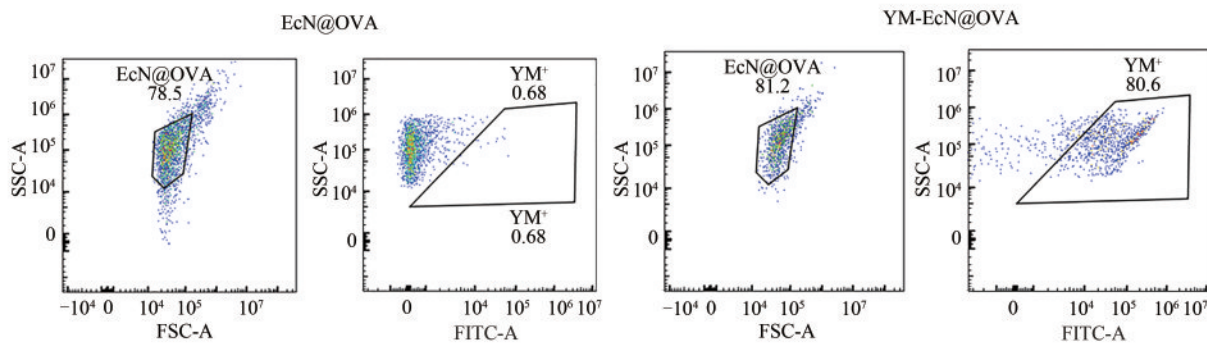


(c)

(d)



(e)



(f)

图1 YM-EcN@OVA表征

(a) YM-EcN@OVA激光共聚焦代表图。转染mCherry质粒的EcN显示红色荧光；异硫氰酸荧光素标记的卵清蛋白为绿色荧光；卡尔科弗卢尔荧光增白剂标记的酵母细胞膜为蓝色荧光；标尺为10 μm。(b) EcN, EcN@OVA和YM-EcN@OVA

代表性透射电镜图。第2排为局部放大图，标尺分别为500 nm（第1排）和200 nm（第2排）；白色虚线框为细菌的边缘；箭头指示涂层所在区域。（c）EcN，EcN@OVA 和 YM-EcN@OVA 的粒径；（d）EcN，EcN@OVA 和 YM-EcN@OVA 的 Zeta 电位；（e）EcN 和 EcN@OVA 流式代表图；（f）EcN@OVA 和 YM-EcN@OVA 流式代表图。误差棒代表标准差。** $P<0.01$

Fig. 1 Characterization of YM-EcN@OVA

(a) Typical laser scanning confocal microscopy images of YM-EcN@OVA. Red, green and blue channels show EcN expressing mCherry, fluorescein isothiocyanate-OVA, and yeast cell membranes stained with calcofluor-white, respectively; Scale bar: 10 μm . (b) Representative transmission electron microscopy images of EcN, EcN@OVA, and YM-EcN@OVA, respectively. Scale bars: 500 nm and 200 nm for the first and second row of the figure, respectively; The outer edge and coating layers of bacteria are indicated by white dotted line and arrows, respectively. (c) Size of EcN, EcN@OVA, and YM-EcN@OVA, respectively; (d) Zeta potential of EcN, EcN@OVA, and YM-EcN@OVA, respectively; (e) Flow cytometric analysis of EcN@OVA. (f) Flow cytometric analysis of YM-EcN@OVA. Error bars represent standard deviation. ** $P<0.01$

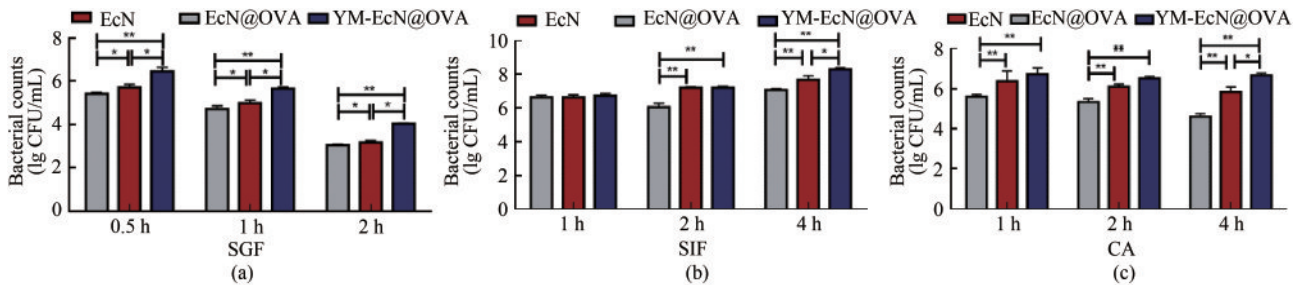


图2 YM-EcN@OVA 在胃肠道中的稳定性

体外模拟胃液（a）、模拟肠液（b）以及胆汁酸（c）刺激一段时间后取样进行涂板和细菌培养 24 h 的 EcN 数量。

SGF—模拟胃液；SIF—模拟肠液；CA—胆汁酸。误差棒代表标准差。** $P<0.01$ ，* $P<0.05$

Fig. 2 Stability of YM-EcN@OVA in simulated gastrointestinal environments

(a) Survived EcN after treatment with SGF for 30 min, 1 h, and 2 h, respectively. (b) Bacterial counts of EcN after culture with SIF for 1 h, 2 h, and 4 h, respectively. (c) Numbers of survived EcN after cultivation with CA for 1 h, 2 h, and 4 h, respectively.

SGF—simulated gastric fluid; SIF—simulated intestinal fluid; CA—cholic acid. Error bars represent standard deviation.

** $P<0.01$ ，* $P<0.05$

2.3 酵母细胞膜促进益生菌的肠道淋巴系统富集

在确认酵母细胞膜包裹能够保护益生菌免受胃肠道环境刺激后，进一步检测益生菌能否有效进入肠道淋巴系统。在包含有派氏结的肠段两侧进行结扎后，向肠腔分别注射 PBS、EcN@OVA 和 YM-EcN@OVA。注射 1.5 h 后，小鼠处死并剪取派氏结进行细菌涂板，收取肠系膜淋巴结进行活体成像和细菌涂板。活体成像结果显示，酵母细胞膜的包裹能够显著性提高细菌在肠道淋巴系统的富集。肠腔注射 YM-EcN@OVA 后，小鼠肠系膜淋巴结中的活体成像荧光强度明显高于肠腔注射 PBS 或 EcN@OVA 小鼠肠系膜淋巴结的荧光强度 [图 3(a)、(b)]。细菌涂板结果同样显示，YM-EcN@OVA 小鼠的派氏结和肠系膜淋巴结中的 EcN 数量明显高于其他两组小鼠 [图 3(c)、(d)]。上述结果表明，借助酵母细胞膜能够实现向肠道淋巴系统靶向递送搭载抗原的益生菌。

2.4 YM-EcN@OVA 诱导肠道黏膜免疫反应

确认了酵母细胞膜包裹能够保护益生菌免受胃肠道环境刺激并进一步将益生菌递送进入肠道淋巴系统后，紧接着分别从细胞和动物水平分析搭载了卵清蛋白的益生菌进入淋巴系统后能否诱导黏膜免疫反应。骨髓来源树突状细胞分别用 PBS、EcN、OVA、EcN@OVA 和 YM-EcN@OVA 进行刺激。如图 4(a)~(d) 所示，培养一定时间后，YM-EcN@OVA 能够显著促进骨髓来源树突状细胞的活化与 OVA 的抗原递呈效果。小鼠分别连续灌胃 PBS、EcN、OVA、EcN@OVA 和 YM-EcN@OVA 7 d。灌胃后 1 周和 2 周，分别取血进行血浆中 OVA-IgG 水平的检测。如图 4(e)、(f) 所示，YM-EcN@OVA 灌胃小鼠血浆中的 OVA-IgG 水平明显高于其他实验组 [图 4(e)]。该免疫效应能够有效维持 14 d [图 4(f)]。上述结果表明，YM-EcN@OVA 不仅能够有效诱导黏膜免疫反应，还能够诱导抗 OVA 的特异性免疫反应。

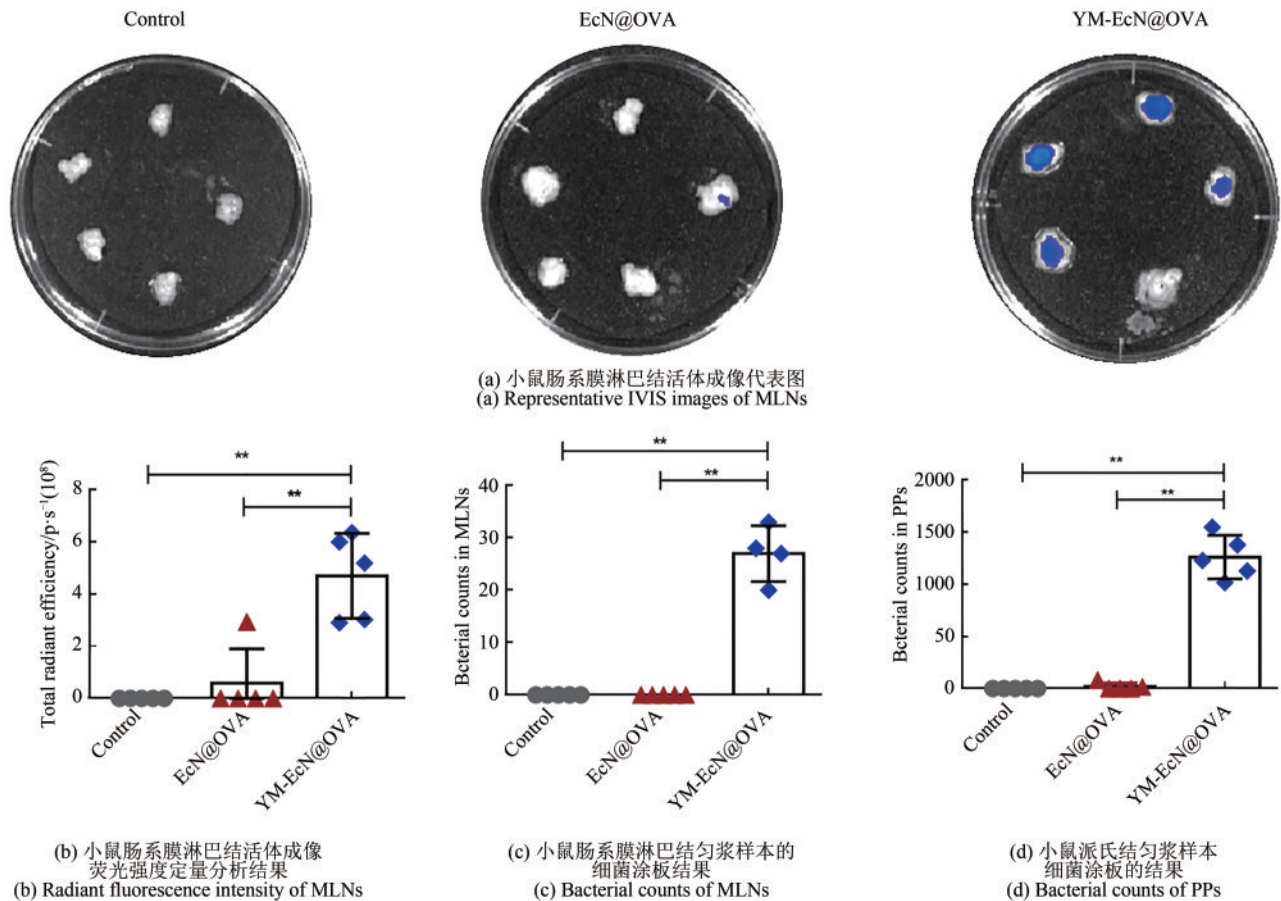


图3 肠道淋巴组织中的EcN数量

(小鼠肠腔分别注射 PBS、EcN@OVA 和 YM-EcN@OVA，其中所使用的细菌为转染 pBBR1MCS2-Tac-mCherry 质粒的益生菌。肠腔注射 1.5 h 后，剪取肠系膜淋巴结进行活体成像，随后肠系膜淋巴结和派氏结分别进行匀浆并涂板。MLNs—肠系膜淋巴结；PPs—派氏结。误差棒代表标准差。** $P < 0.01$)

Fig. 3 Quantification of accumulated EcN

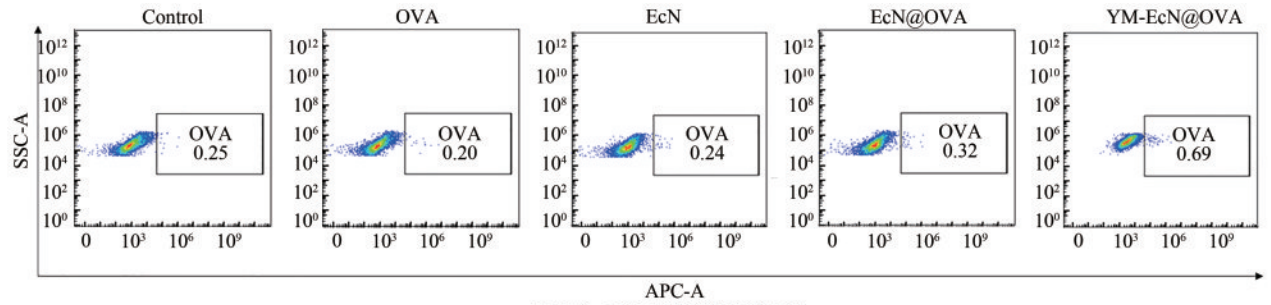
(PBS, EcN@OVA, and YM-EcN@OVA were injected into the intestinal lumen of mice, respectively. EcN used in the experiment was transfected with pBBR1MCS2-Tac-mCherry. At 1.5 h post injection, fluorescence signals of MLNs were captured by in vivo imaging system (IVIS). Homogenates of MLNs and PPs were separately prepared for bacterial culture. MLNs, mesenteric lymph nodes; PPs, Peyer's patches Error bars represent standard deviation. ** $P < 0.01$)

3 结果与讨论

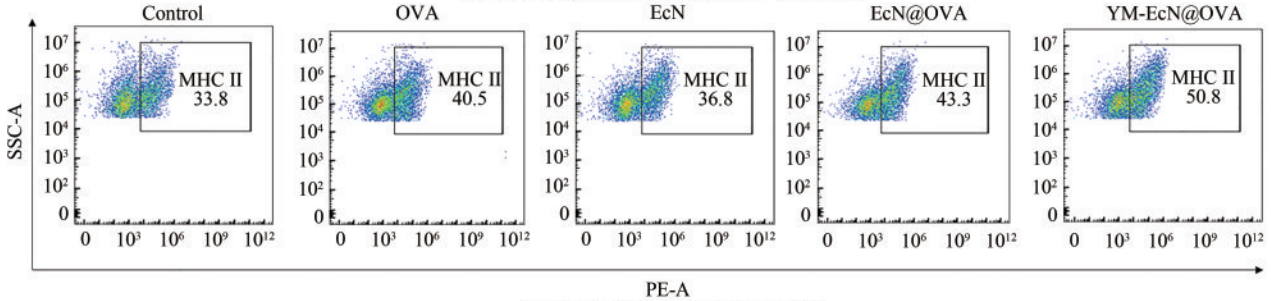
如何有效降低肿瘤的发生率和死亡率是急需解决的公共卫生健康难题^[34]。免疫检查点抑制剂、过继性细胞疗法和肿瘤疫苗被视为是肿瘤免疫疗法的三驾马车^[35-37]。与免疫检查点抑制剂和过继性细胞疗法不同，肿瘤疫苗除了能够发挥清除肿瘤细胞的作用外，还具有预防癌症复发的优势^[36-37]。尽管目前肿瘤疫苗在科学研究和临床转化方面取得了一定的进展。同时这些疫苗主要为皮下或静脉注射型疫苗，目前缺乏口服疫苗^[4, 8]。相比于皮

下或静脉注射的给药方式，口服被视为是最简单、安全和高效的给药方式。并且，肠道是人体最大的免疫器官，通过口服递送抗原的方式不仅能够诱导肠道黏膜免疫，随着抗原的吸收和转运，还能进一步发挥激活系统性免疫的作用^[7]。虽然口服肿瘤疫苗受到了广泛关注，但其发展严重滞后，主要与肿瘤抗原容易在胃肠道中发生降解和难以穿过肠屏障进入外周循环系统有关^[4]。因此急需发展新的抗原递送载体以实现肿瘤疫苗的口喂递送，进而诱导强有力的抗肿瘤免疫反应。

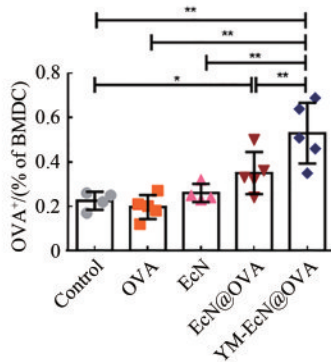
本研究中，我们设计了酵母细胞膜包覆益生菌的口喂递送系统。通过层层自主装的方式将抗



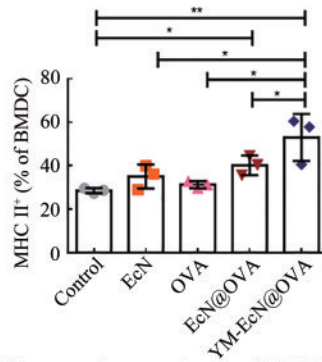
(a) OVA+BMDC流式细胞代表图
(a) Representative FACS images of OVA+BMDC



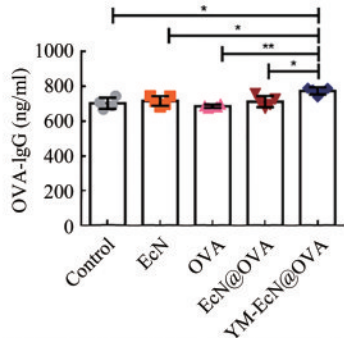
(b) MHC II+BMDC流式细胞代表图
(b) Representative FACS images of MHCII+BMDC



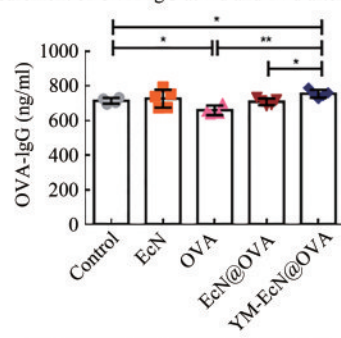
(c) 表达OVA的BMDC占BMDC总数的比例
(c) Percentage of OVA+BMDC



(d) 表达MHC II的BMDC占BMDC总数的比例
小鼠分别连续7 d给予PBS、EcN、OVA、EcN@OVA和YM-EcN@OVA灌胃，并于灌胃1周和2周后分别取血检测血浆中的OVA-IgG水平
(d) Percentage of MHC II+BMDC. Mice were administered daily with PBS, EcN, OVA, EcN@OVA, and YM-EcN@OVA for 7 d. Blood were collected for the measurement of OVA-IgG at 7 d and 14 d after oral gavage



(e) 小鼠灌胃1周后小鼠血浆中的OVA-IgG水平
(e) OVA-IgG level of serum collected one-week after gavage



(f) 小鼠灌胃2周后小鼠血浆中的OVA-IgG水平
(f) OVA-IgG level of serum sampled two weeks post gavage

图4 YM-EcN@OVA对肠道免疫的调节作用。

(BMDC受PBS、EcN、卵清蛋白EcN@OVA和YM-EcN@OVA刺激一段时间后，分别与APC-OVA抗体和PE-MHC II抗体进行孵育，然后用流式细胞仪分别检测OVA⁺和MHC II⁺的BMDC比例。BMDC，骨髓来源的树突状细胞；OVA-IgG，卵清蛋白特异性IgG。误差棒代表标准差。***P*<0.01，**P*<0.05)

Fig. 4 Immune responses mediated by YM-EcN@OVA

(After stimulation with PBS, EcN, OVA, EcN@OVA, and YM-EcN@OVA, BMDC were incubated with APC-OVA and PE-MHC II antibodies, respectively. Cells were measured by FACS. BMDC, mouse bone marrow derived dendritic cells; OVA-IgG, ovalbumin specific IgG. Error bars represent standard deviation. ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$)

原搭载于细菌表面。进一步通过物理挤出方式将搭载了抗原的益生菌包裹于酵母细胞膜中。酵母细胞膜的包裹一方面保护了益生菌和抗原免受胃肠道环境的刺激，另一方面酵母细胞膜表面丰富的 β -葡聚糖能够与肠道M细胞表面的Dectin-1受体结合，进而通过M细胞实现抗原向派氏结的有效递送。由于派氏结与肠系膜淋巴相连，抗原经过派氏结进入肠系膜淋巴后能够进一步转运至外周循环系统，从而激活外周免疫反应。此外，M细胞表面缺乏黏液覆盖，因此与其他覆盖有黏液层的肠上皮细胞相比，靶向M细胞能够更加高效地向肠道淋巴系统递送抗原。与未包裹的益生菌相比，酵母细胞膜能够提高益生菌在肠道免疫系统的富集，从而促进抗原被树突状细胞摄取和递呈，最终诱导肠道黏膜免疫反应。此外，与单纯的抗原、益生菌以及搭载抗原的益生菌相比，酵母膜包裹的抗原搭载益生菌能够更有效地促进树突状细胞的激活和抗原递呈，这可能与酵母细胞膜和益生菌同时具有免疫原性有关。

综上所述，本研究发展了一种新型口服递送载体。该口服递送载体不仅能够保护益生菌和抗原免受胃肠道环境的刺激，还能够实现高效地向肠道淋巴系统递送抗原，并同时发挥佐剂作用而更有效地诱导黏膜免疫反应。

参 考 文 献

- [1] ZHAO T, LI C W, GE H L, et al. Glioblastoma vaccine tumor therapy research progress[J]. Chinese Neurosurgical Journal, 2022, 8(1): 2.
- [2] GOLDMAN B, DEFRANCESCO L. Erratum: the cancer vaccine roller coaster[J]. Nature Biotechnology, 2010, 28(6): 624.
- [3] BERGERON D, CHANDOK H, NIE Q, et al. RNA-Seq for the detection of gene fusions in solid tumors: development and validation of the JAX FusionSeq™ 2.0 assay[J]. Journal of Molecular Medicine, 2022, 100(2): 323-335.
- [4] VELA RAMIREZ J E, SHARPE L A, PEPPAS N A. Current state and challenges in developing oral vaccines[J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2017, 114: 116-131.
- [5] BITTNER B, RICHTER W, SCHMIDT J. Subcutaneous administration of biotherapeutics: an overview of current challenges and opportunities[J]. BioDrugs: Clinical Immunotherapeutics, Biopharmaceuticals and Gene Therapy, 2018, 32(5): 425-440.
- [6] TAKIISHI T, FENERO C I M, CÂMARA N O S. Intestinal barrier and gut microbiota: shaping our immune responses throughout life[J]. Tissue Barriers, 2017, 5(4): e1373208.
- [7] AHLMAN H, NILSSON O. The gut as the largest endocrine organ in the body[J]. Annals of Oncology, 2001, 12: S63-S68.
- [8] PURCHASE C, PICARD J, MCDONALD R, et al. A comparison of the oral application and injection routes using the understepoort biological products fowl typhoid vaccine, its safety, efficacy and duration of protection in commercial laying hens[J]. Journal of the South African Veterinary Association, 2008, 79(1): 39-43.
- [9] KIM L, MARTINEZ C J, HODGSON K A, et al. Systemic and mucosal immune responses following oral adenoviral delivery of influenza vaccine to the human intestine by radio controlled capsule[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 37295.
- [10] HARRELL J E, KURTZ J R, BAUER D L, et al. An outer membrane vesicle-adjuvanted oral vaccine protects against lethal, oral salmonella infection[J]. Pathogens (Basel, Switzerland), 2021, 10(5): 616.
- [11] LEE B, KADER M A, COLGATE E R, et al. Oral rotavirus vaccine shedding as a marker of mucosal immunity[J]. Scientific Reports, 2021, 11: 21760.
- [12] FOCOSI D, MAGGI F, CASADEVALL A. Mucosal vaccines, sterilizing immunity, and the future of SARS-CoV-2 virulence[J]. Viruses, 2022, 14(2): 187.
- [13] SERRADELL M C, RUPIL L L, MARTINO R A, et al. Efficient oral vaccination by bioengineering virus-like particles with protozoan surface proteins[J]. Nature Communications, 2019, 10(1): 361.
- [14] COFFEY J W, GAIHA G D, TRAVERSO G. Oral biologic delivery: advances toward oral subunit, DNA, and mRNA vaccines and the potential for mass vaccination during pandemics[J]. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 2021, 61: 517-540.
- [15] SONG Q L, JIA J J, NIU X X, et al. An oral drug delivery system with programmed drug release and imaging properties for orthotopic colon cancer therapy[J]. Nanoscale, 2019, 11(34): 15958-15970.
- [16] NACIUTE M, NIEMI V, KEMP R A, et al. Lipid-encapsulated oral therapeutic peptide vaccines reduce tumour growth in an orthotopic mouse model of colorectal cancer[J]. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2020, 152: 183-192.
- [17] VELA RAMIREZ J E, SHARPE L A, PEPPAS N A. Current state and challenges in developing oral vaccines[J]. Advanced

- Drug Delivery Reviews, 2017, 114: 116-131.
- [18] ZHANG H M, CHEN J B. Current status and future directions of cancer immunotherapy[J]. *Journal of Cancer*, 2018, 9(10): 1773-1781.
- [19] RIDDELL S R. Progress in cancer vaccines by enhanced self-presentation[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98(16): 8933-8935.
- [20] MABBOTT N A, DONALDSON D S, OHNO H, et al. Microfold (M) cells: Important immunosurveillance posts in the intestinal epithelium[J]. *Mucosal Immunology*, 2013, 6(4): 666-677.
- [21] KOBAYASHI N, TAKAHASHI D, TAKANO S, et al. The roles of peyer's patches and microfold cells in the gut immune system: Relevance to autoimmune diseases[J]. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10: 2345.
- [22] REBOLDI A, ARNON T I, RODDA L B, et al. IgA production requires B cell interaction with subepithelial dendritic cells in Peyer's patches[J]. *Science*, 2016, 352(6287): aaf4822.
- [23] BELOQUI A, BRAYDEN D J, ARTURSSON P, et al. A human intestinal M-cell-like model for investigating particle, antigen and microorganism translocation[J]. *Nature Protocols*, 2017, 12(7): 1387-1399.
- [24] JANG M H, KWEON M N, IWATANI K, et al. Intestinal villous M cells: an antigen entry site in the mucosal epithelium[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(16): 6110-6115.
- [25] LIN S S, MUKHERJEE S, LI J J, et al. Mucosal immunity-mediated modulation of the gut microbiome by oral delivery of probiotics into Peyer's patches[J]. *Science Advances*, 2021, 7(20): eabf0677.
- [26] LUO M, WANG H, WANG Z H, et al. A STING-activating nanovaccine for cancer immunotherapy[J]. *Nature Nanotechnology*, 2017, 12(7): 648-654.
- [27] PERSANO S, GUEVARA M L, LI Z Q, et al. Lipopolyplex potentiates anti-tumor immunity of mRNA-based vaccination[J]. *Biomaterials*, 2017, 125: 81-89.
- [28] ZHU L B, GE F, YANG L J, et al. Alginate particles with ovalbumin (OVA) peptide can serve as a carrier and adjuvant for immune therapy in B16-OVA cancer model[J]. *Medical Science Monitor Basic Research*, 2017, 23: 166-172.
- [29] WANG L, CAO Z P, ZHANG M M, et al. Spatiotemporally controllable distribution of combination therapeutics in solid tumors by dually modified bacteria[J]. *Advanced Materials*, 2022, 34(1): e2106669.
- [30] PAN C, LI J J, HOU W L, et al. Polymerization-mediated multifunctionalization of living cells for enhanced cell-based therapy[J]. *Advanced Materials*, 2021, 33(13): e2007379.
- [31] LI J J, HOU W L, LIN S S, et al. Polydopamine nanoparticle-mediated dopaminergic immunoregulation in colitis[J]. *Advanced Science*, 2022, 9(1): e2104006.
- [32] WANG X Y, CAO Z P, ZHANG M M, et al. Bioinspired oral delivery of gut microbiota by self-coating with biofilms[J]. *Science Advances*, 2020, 6(26): eabb1952.
- [33] LIN S S, ZHANG R Q, SHEN L, et al. Alterations in the gut barrier and involvement of Toll-like receptor 4 in murine post-operative ileus[J]. *Neurogastroenterology & Motility*, 2018, 30(6): e13286.
- [34] SIEGEL R L, MILLER K D, FUCHS H E, et al. Cancer statistics, 2021[J]. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 2021, 71(1): 7-33.
- [35] YE Z L, QIAN Q M, JIN H J, et al. Cancer vaccine: learning lessons from immune checkpoint inhibitors[J]. *Journal of Cancer*, 2018, 9(2): 263-268.
- [36] SINGH J, BOWNE W B, SNOOK A E. Cancer vaccines and immunotherapy for tumor prevention and treatment[J]. *Vaccines*, 2021, 9(11): 1298.
- [37] ZHANG L, WANG W, WANG S X. Effect of vaccine administration modality on immunogenicity and efficacy[J]. *Expert Review of Vaccines*, 2015, 14(11): 1509-1523.



通讯作者: 刘尽尧(1983—),男,研究员,博士生导师。研究方向为新型生物医用高分子的可控制备、药物传递系统的生物制备新技术、智能仿生材料的生物合成新方法以及细菌改造与菌群调控介导的疾病治疗新策略等。

E-mail: jyliu@sjtu.edu.cn



共同第一作者: 林思思(1990—),女,助理研究员。研究方向为肠屏障损伤防治、屏障生物医用材料等。

E-mail: linsisi@renji.com



共同第一作者: 潘超(1990—),男,助理研究员。研究方向为表面改性等。

E-mail: pca123@mail.ustc.edu.cn