

## 特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2022-067

## 微生物合成生物学在疾病诊疗上的应用进展

高纤云, 牛灵雪, 见妮, 管宁子

(华东师范大学生命科学院, 上海市调控生物学重点实验室, 上海 200241)

**摘要:** 在人体的身体内部居住着数以万亿计的细菌和其他微生物, 寄生在我们的皮肤、胃肠道和口腔等部位, 微生物群失调已成为炎症性肠病、过敏、肥胖、心血管以及神经退行性疾病和癌症等多种疾病发生发展的重要原因。与此同时, 利用微生物制剂改善健康状况、治疗疾病也在研究和临床中得到验证。近年来, 活体生物药不断被开发用于预防、诊断与治疗疾病。采用合成生物学手段在微生物中设计、构建精准可控的基因电路, 获得非致病性、具有疾病微环境感知和响应能力并按需释放治疗药物的活体工程菌, 实施活体微生物疗法, 已成为临床疾病治疗的新思路和新方法。本文对微生物合成生物学在疾病诊疗中的应用进展, 如预防与诊疗病原菌感染、治疗代谢疾病、靶向杀伤肿瘤、缓解炎症等进行了系统性总结, 并针对微生物传感器设计和推广到临床应用面临的问题和未来的发展进行了分析与展望。利用合成生物学在微生物中设计的生物传感器能智能感知疾病微环境并可控地提供药物, 在疾病的监测和治疗中有巨大的应用前景。

**关键词:** 微生物; 合成生物学; 活体生物药; 微生物细胞工厂; 疾病诊疗

**中图分类号:** Q819 **文献标志码:** A

## Applications of microbial synthetic biology in the diagnosis and treatment of diseases

GAO Xianyun, NIU Lingxue, JIAN Ni, GUAN Ningzi

(Shanghai Key Laboratory of Regulatory Biology, School of Life Sciences, East China Normal University, Shanghai 200241, China)

**Abstract:** Numerous bacteria and other microorganisms are living with the human body, which are parasitic in our skin, gastrointestinal tract, mouth, and other organs. While securing stable living environments, these microorganisms also help the human body to resist the invasion of pathogens, generate probiotic components (such as vitamins) and benefit the function of the immune system. Due to effective interactions between microorganisms and human being, the use of microbial agents to improve health status and treat diseases has become a research hotspot in recent years. For example, natural probiotics are used to regulate the intestinal microcommunity, and the bacterial community of healthy people is used to inoculate patients for the complementation of defective functions. Currently, the only FDA-approved

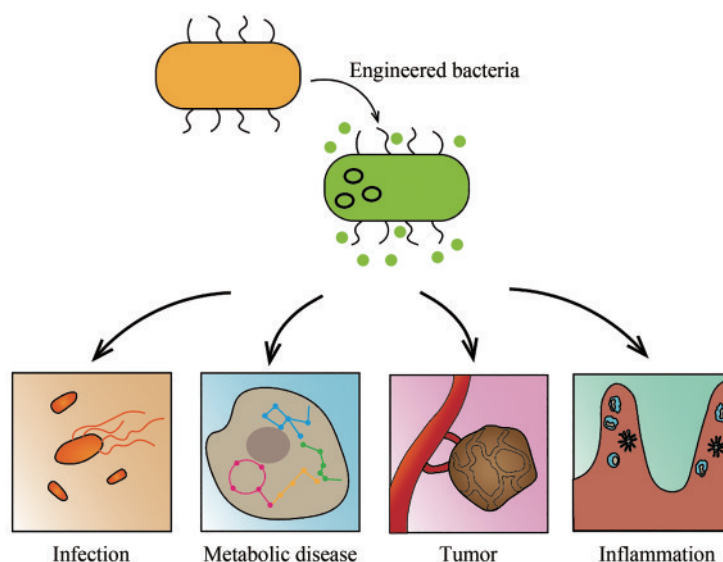
收稿日期: 2022-11-24 修回日期: 2023-01-21

基金项目: 国家重点研发计划 (2019YFA0904500); 国家自然科学基金 (31901023)

引用本文: 高纤云, 牛灵雪, 见妮, 管宁子. 微生物合成生物学在疾病诊疗上的应用进展[J]. 合成生物学, 2023, 4(2): 263-282

Citation: GAO Xianyun, NIU Lingxue, JIAN Ni, GUAN Ningzi. Applications of microbial synthetic biology in the diagnosis and treatment of diseases[J]. Synthetic Biology Journal, 2023, 4(2): 263-282

and commercially available microbionic-based treatment is fecal microbial transplantation for *Clostridium difficile* infections. Although fecal microbial transplantation has achieved some therapeutic effects, unclear mechanism underlying such a treatment and the uncontrollable operation process limit its applications. Therefore, there is an urgent need for better understanding of such a treatment to facilitate its application, and the development of synthetic biology has provided tools and methodology. Synthetic biology employs the ideas of modern molecular biotechnology and engineering principles to design, construct and optimize biological systems, and endow them with specific functions so that they can process information and synthesize target products including drugs. By developing gene circuits with specific functions in microorganisms, their metabolic pathways are intervened, even reconstructed, to sense physical and chemical signals and synthesize therapeutic products for use in smart and controllable treatment of diseases. Live biotherapeutic products (LBPs) have been proposed to prevent, diagnose and treat diseases by design and rebuilding of living organisms. In recent years, customized gene circuits have been continuously developed and introduced into microbial chassis cells to create engineered microorganisms with specific functions, providing a new scheme for disease treatment with recombinant LBPs. In this article, we summarize the latest progress of microbial synthetic biology in disease diagnosis and treatment, including inflammation, metabolic diseases, immune defects, pathogen infections, and cancers. Furthermore, challenges and further development are prospected. It has become a promising idea and method for clinical disease treatment with living microbial therapy by using living non-pathogenic engineered bacteria or probiotics equipped with smart gene circuits to sense and response to disease microenvironment for the controllable deliver of therapeutic agents.



**Keywords:** microorganism; synthetic biology; live biotherapeutic product; microbial cell factory; disease diagnosis and treatment

人体口腔、皮肤、肠道等部位存在大量微生物，它们以共生的方式与人体形成微生态系统。微生物在从人体获得安稳的生存环境的同时，也帮助人体抵抗病原体的侵蚀，分泌益生成分（如维生素等）并促进人体免疫系统的完善<sup>[1]</sup>。由于

微生物与人的密切关系，利用微生物制剂改善健康状况、治疗疾病已成为近年来的研究热点，活体生物药（live biotherapeutic products, LBPs）即在这一大背景下被提出。LBPs被定义为设计和开发用于改善、治疗、预防、诊断疾病的活生物

体<sup>[2]</sup>。例如服用天然益生菌进行肠道微群落的调节<sup>[3]</sup>，采用健康人的菌群对病人菌群进行置换治疗等<sup>[4]</sup>。目前，FDA仅批准了一种粪便微生物药物 Rebyota，用于预防和治疗艰难梭菌 (*Clostridioides difficile*) 感染<sup>[5]</sup>。尽管粪便微生物移植取得了一定的治疗效果，但治疗机理不明确、操作过程不可控等因素限制了该方法的推广。因此，亟需一种技术帮助人们更好地了解及放大微生物的应用价值，而合成生物学的出现极大地激发了微生物在疾病治疗领域的应用潜能<sup>[1]</sup>。

近年来，针对不同的疾病类型，为实现疾病的诊疗，科研工作者针对特定疾病定制化合成基因电路并导入微生物底盘细胞中，创造出具有特异性功能的新型工程菌株，为重组LBP提供了全新的疾病治疗方案。在本文中，我们对最新的微生物合成生物学在生命医学中的应用案例进行了综述分析，包括病原体感染<sup>[6]</sup>、代谢疾病<sup>[7]</sup>、癌症<sup>[8-9]</sup>以及炎症<sup>[10]</sup>等，在此基础上对微生物合成生物学在疾病诊疗方面的应用进行了展望。

## 1 微生物合成生物学技术

合成生物学 (synthetic biology) 是生命学科与工程学科的交叉融合，以应用研究为导向，利用现代分子生物技术和工程的思想来设计、构建和优化生物系统，赋予生物系统新的特定功能，使其能够处理信息、制造新型材料、生产天然产物和能源、改善环境、合成药物、帮助保持和增强人类健康等<sup>[11]</sup>。合成生物学强调的是系统化设计和工程化构建，结合基因操作等手段在微生物体内利用系统最基本的DNA、RNA和蛋白质等作为

设计元件，再利用转录调控、代谢调控等生物功能把这些基本元件组装起来，合成具有特定功能的基因电路，在生理或病理信号刺激下，表达酶、细胞因子、抗菌肽、激素、抗体等特定产物，使微生物按照研究者的设想感知物理化学信号并合成特定的产物，智能化、可控化地发挥其在疾病治疗领域的应用价值。

2000年 Remaut等<sup>[12]</sup>对天然益生菌乳酸乳球菌 (*Lactococcus lactis*) 进行了基因改造，以分泌人类抗炎细胞因子白介素10(IL-10)，在结肠炎小鼠体内观察到良好的治疗效果。这样设计的工程菌组成型地表达与输出治疗分子，是一种传统的工程菌改造形式 [图1(a)]。与传统的基因工程方法不同，合成生物学家使用类似设计电路的方法，即以“感知-计算-响应”的形式对细胞行为进行编程<sup>[13]</sup> [图1(b)]。在微生物合成生物学中，科学家们分别设计工程菌的两个模块：一是“感知”模块，用于检测细胞外或细胞内产生的物质的存在，即传递信号；二是“响应”模块，将检测到的信号转换成输出信号进行报告。将两个模块组合成特定的生物传感器，即对某种物理、化学或生物信号进行特异性感应并能输出可检测信号或功能蛋白。

根据“感知”模块，即“开关”的不同，可大致将生物传感器分为两大类，分别是单组分系统和双组分系统。单组分系统即转录因子被广泛应用于改造微生物代谢途径，当信号因子与转录因子特异性结合时，转录因子的构象发生变化使其能够结合/脱离启动子区域中的特定DNA序列，进而启动/关闭报告基因，从而高效、特异性地动态调控目标代谢途径<sup>[14]</sup>。双组分系统是细菌中最大的一类信号转导途径，经典的双组分系统传感

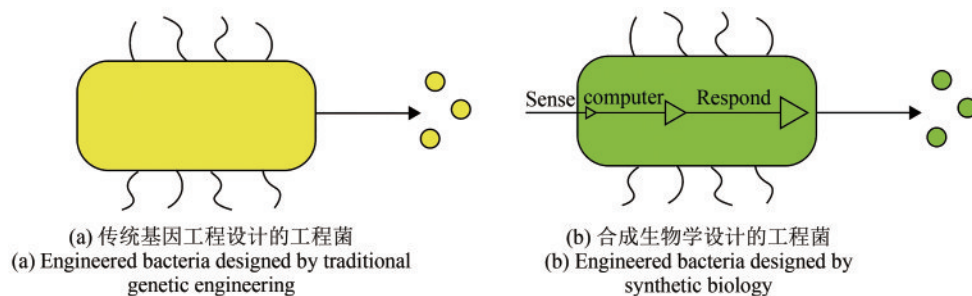


图1 传统基因工程菌和合成生物学工程菌的比较

Fig. 1 Comparison of bacteria engineered by traditional genetic methods and synthetic biology approaches

器包括一个传感器组氨酸激酶、一个反应调节因子和一个输出启动子<sup>[15]</sup>，在特定刺激的存在下，组氨酸激酶使反应调节因子磷酸化，然后反应调节因子结合DNA，激活或抑制来自一个或多个输出启动子的转录<sup>[16]</sup>。双组分传感器能响应多种多样的信号，例如光照、温度、pH、氧气、各种离子、小分子代谢物、抗生素、抗菌肽、糖等<sup>[17]</sup>，被广泛应用于合成生物学的电路设计中。

## 2 预防与诊疗病原菌感染

随着多重耐药病原体的广泛出现，可供选择的抗生素逐渐减少，如何对抗致病微生物的感染成为亟待解决的重大公共卫生问题<sup>[18-19]</sup>。开发具有不同作用模式的抗生素是对抗多重耐药病原体感染的重要手段<sup>[20]</sup>，然而抗生素可能损害患者的微生物群，并且推动耐抗生素细菌的传播<sup>[21]</sup>，因此尽可能减少抗生素的使用以维护体内微生物环境稳态逐渐成为共识。益生菌具有多种不同的抑制病原体感染的机制，包括分泌抗菌化学物质、刺激和调节免疫反应、与病原体竞争营养和特定黏附位点等<sup>[22]</sup>，因此被广泛研究用于病原菌感染的诊断与治疗。目前，利用益生菌治疗幽门螺杆菌和艰难梭状芽胞杆菌感染的研究普遍较多，基于临床试验数据，使用益生菌或可提高幽门螺杆菌（*Helicobacter pylori*）的根除率并防止不良反应<sup>[23]</sup>。此外，利用益生菌还可以降低艰难梭状芽胞杆菌（*Clostridium difficile*）的毒性，促进正常肠道菌群的恢复<sup>[24]</sup>。尽管现有的临床试验表明益生菌治疗幽门螺杆菌和艰难梭菌感染是有效果的，但由于机制不明确等原因，仍然有一些不良影响报道<sup>[25-27]</sup>。

目前在抗病原菌治疗中，由于缺乏病原体特异性会导致非致病性微生物受到影响，存在一定的安全问题。利用合成生物学手段开发精准调控的工程化细菌，可以提高其治疗病原菌感染的安全性和有效性。研究者将目标病原体的识别位点引入到益生菌的抗菌肽中，结合生物传感器调控工程化益生菌特异性释放抗菌剂，从而提供针对病原体的靶向治疗。该治疗手段最大限度地降低了对宿主固有微生物群的伤害，有望缓解目前全球耐药性

病原菌的危害<sup>[28]</sup>。铜绿假单胞菌（*Pseudomonas aeruginosa*）可定植于人体呼吸道与消化道中，对免疫缺陷患者如患囊性纤维化的病人来说是一种致命的病原菌<sup>[29]</sup>。它具有多重耐药性，因此常规的抗生素疗法效果并不理想<sup>[30]</sup>。Matthew团队<sup>[31]</sup>将大肠杆菌（*Escherichia coli*）TOP10设计成一种能够识别和杀死浮游铜绿假单胞菌的传感装置。该系统基于*P. aeruginosa*的I型群体感应机制设计，经过合成生物学改造的*E. coli* TOP10能合成转录抑制因子LasR，与*P. aeruginosa*分泌的群体感应自诱导分子酰基高丝氨酸内酯（AHLs）结合，解除对绿脓菌素S5和E7裂解蛋白的抑制作用。由此，当*P. aeruginosa*达到一定浓度后*E. coli* TOP10在E7裂解蛋白的作用下，通过菌体的裂解释放绿脓菌素S5，从而杀死*P. aeruginosa*。该传感装置可减少*P. aeruginosa* 99%的活细胞及近90%的生物膜的形成。此后，该系统被进一步改进，重新编程的*E. coli* TOP10通过分泌抗菌肽（MccS）和核酸酶DNase I来降解*P. aeruginosa*成型的生物膜并杀死包封在其中的潜伏细胞，由于重新编程的*E. coli* TOP10靶向目标定位，显著提高了对*P. aeruginosa*的杀伤活性<sup>[32]</sup>。在传感装置的基础上，引入一种抗生物膜的酶分散蛋白B（DspB），可促进成熟的生物膜降解，以实现更精准有效的治疗。将该系统装配到改造后的大肠杆菌*Escherichia coli* Nissle 1917（EcN）中，在线虫和小鼠模型中均观察到良好的预防和治疗*P. aeruginosa*感染的效果[图2(a)]<sup>[33]</sup>。这些发现支持进一步开发具有潜在预防和治疗肠道感染活性的工程微生物。

微生物介导的胆盐代谢失调与艰难梭菌感染有关，胆盐可以结合氨基酸如牛磺酸和甘氨酸形成结合型初级胆盐从肝脏中排除，而后被微生物BSH酶、7 $\alpha$ -脱氢酶解离为游离型次级胆盐<sup>[34-36]</sup>。抗生素引起的微生物生态失调导致牛磺酸胆盐积累过多，牛磺酸胆盐诱导艰难梭菌体内芽孢萌发而游离型次级胆盐抑制其芽孢的萌发。依据此机制，研究人员开发了一种工程化益生菌来恢复肠道胆盐代谢。当抗生素治疗后，微生物唾液酸分解代谢失衡导致唾液酸水平升高，工程菌可以感知唾液酸水平从而将结合型初级胆盐解离为游离型次级胆盐进而通过抑制艰难梭菌芽孢的萌发防

止艰难梭菌的感染<sup>[37]</sup>。沙门氏菌是利用四硫酸盐的致病菌，通过构建一株检测并感应四硫酸盐的工程化大肠杆菌菌株，与沙门氏菌竞争四硫酸盐的消耗并分泌抗菌肽 microcin H47 可直接杀死沙门氏菌，形成一种针对病原体的双重防御系统<sup>[38]</sup>。

通过工程化细菌更精准、智能地杀伤病原菌或动态调控疾病微环境从而达到治疗病原菌感染的目的已展示出其巨大的潜力，在病原菌的检测方面，合成生物学同样已展示出巨大的优势。感染革兰氏阳性细菌金黄色葡萄球菌可导致肺炎、尿路感染和严重的败血症，严重危害公众健康<sup>[39]</sup>。目前快速有效地检测金黄色葡萄球菌感染的方法十分昂贵。Lubkowitz 等<sup>[40]</sup>对乳酸菌进行改造，通过在感染过程中由葡萄球菌产生的群体感应分子自诱导肽-I (AIP-I) 实现对感染的检测。在罗伊氏乳杆菌 (*Lactobacillus reuteri*) 中引入来自金黄色葡萄球菌的 Agr 群体感应体系 (agrQS)，使用 AgrA 控制的启动子 P3 表达葡萄糖醛酸酶 GusA，在没有 AIP-I 时，葡萄糖醛酸酶将 4-硝基苯  $\beta$ -D-葡萄糖苷酸水解为对硝基酚（一种可以在 405 nm 处测量的黄色色素），在发生葡萄球菌感染的情况下 AIP-I 增多，AgrC 感应并发生磷酸化，磷酸化后的 AgrC 将磷酸基团级联传递给下游的 AgrA，磷酸化的 AgrA 抑制 P3 启动子从而抑制 GusA 的表达 [图 2(b)]。该工程化的生物传感器能够检测纳摩尔至微摩尔级别的 AIP-I，进一步研究其检测 AIP-I 水平实时变化的功能，可用于医院检测葡萄球菌污染以及高通量药物筛选。

同样的机理也适用于检测并杀伤霍乱弧菌。在大肠杆菌中设计一个闭环的识别杀伤装置，使其能特异性检测肠道中霍乱弧菌的群体感应自诱导因子 CAI-1，激活 YebF-Art-085 的表达使菌体裂解，释放胞内的自溶素 Art-085，杀死霍乱弧菌<sup>[41]</sup> [图 2(c)]。类似地，James Collins 团队<sup>[42]</sup>对乳酸乳球菌 (*Lactococcus lactis*) 进行改造，设计了一种乳酸乳球菌杂交受体 CqsS-NisK，感应诱导因子 CAI-1 并触发一种易于在粪便样本中检测的酶报告基因的表达，结合 *L. lactis* 本身代谢产生的乳酸可降低感染的优势，实现了霍乱弧菌感染的检测与治疗 [图 2(d)]。作为一种普遍的传染性病原体，粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*) 对抗生素的耐药

性限制了相关的治疗手段。Borrero 等<sup>[43]</sup>改造 *L. lactis* 识别 *E. faecalis* 信息素 cCF10 用于检测 *E. faecalis* 细胞密度，随即激活的乳酸杆菌释放可杀死多重耐药 *E. faecalis* 的抗球菌肽。在此基础上，该团队进一步设计了一种以氯化物为诱导物的细菌药物递送系统，在人类肠道对应浓度的氯化物诱导下，*E. faecali* 数量大大减少，弥补了之前改造的 *L. lactis* 无法杀伤非 cCF10 分泌的 *E. faecalis* 的缺陷<sup>[44]</sup>，同时，也体现出使用氯诱导物启动子诱导细菌表达抗菌肽以治疗致病菌感染的前景，将此类药物递送系统与抗生素结合使用，有望减缓致病菌耐药性发展的速度。

科研工作者已经巧妙地利用病原微生物的特点设计基因线路改造工程化细菌以达到诊断与治疗病原菌感染的目的。随着对病原微生物致病机制的了解，以宿主-病原菌微环境为根据，广泛利用微生物的群体感应机制，开发了更智能的工程化细菌动态感应疾病微环境，但仍然存在稳定性差、体内应用难等风险，且在检测速度上劣于传统检测手段。当应用于体内时，面对相对更加复杂的体内环境，干扰因素多，工程菌各元件的稳定性和在体内的可调谐性需要进一步验证。但是，智能化的工程菌可以精准靶向病原体，通过体外仪器监测可定位病原菌的位置。此外，通过设计工程菌传感器检测多种靶标物质，增加逻辑计算基因电路整合多个靶标信号，可以大大提高检测效率；结合可控基因电路精准调控工程菌释放抗菌肽或者疫苗抗原，以及益生菌改善微生物群落结构的优势，将可以实现对病原菌预防、诊疗一体化的愿景。

### 3 治疗代谢疾病

大量研究发现肠道微生物群与人体许多器官之间存在相互作用，肠道生态失调通过最重要的器官间连接如肠-肺、肠-脑、肠-皮肤等在许多疾病中发挥作用<sup>[45]</sup>，包括肺部疾病、精神疾病、心脏疾病、皮肤疾病和代谢疾病等<sup>[46]</sup>。代谢疾病作为一类长期慢性疾病，目前的治疗方法疗效差、副作用大且成本高，并且要求患者严格服从治疗方案，而这些治疗手段包括长期定时服药或打针

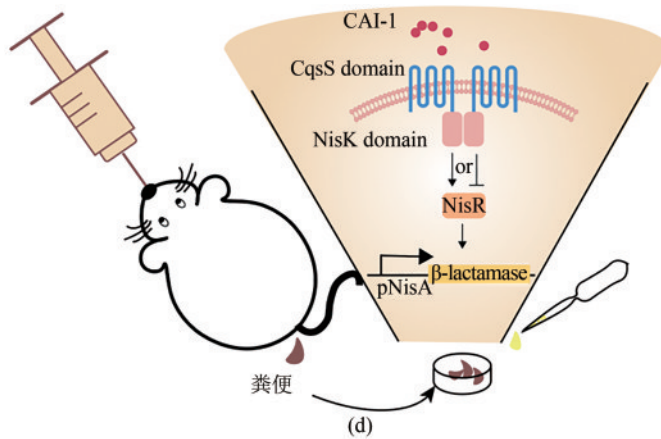
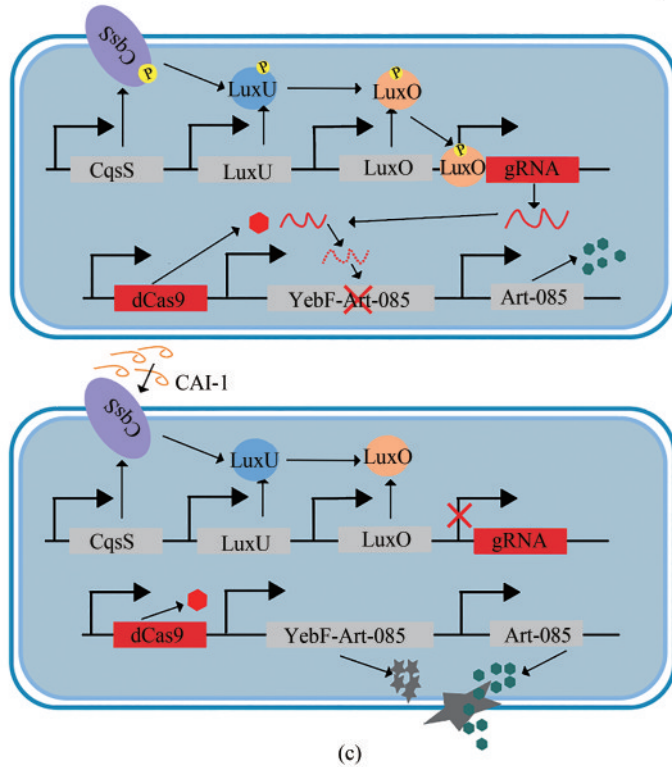
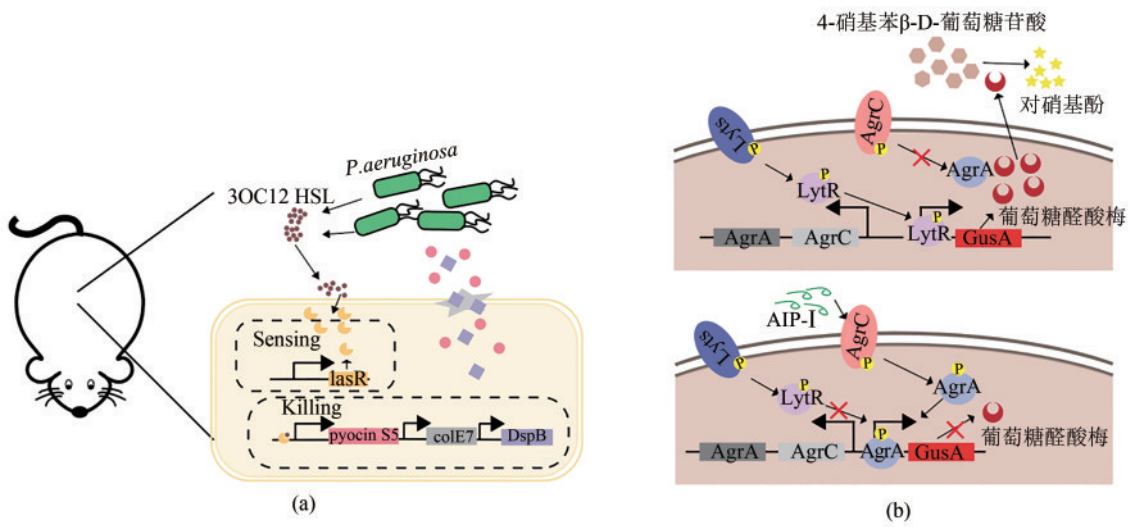


图2 工程微生物预防与治疗病原菌感染

(a) 基于铜绿假单胞菌的 I 型群体感应机制的基因环路。改造的大肠杆菌能合成转录因子 LasR, 与铜绿假单胞菌分泌的群体感应自诱导分子酰基高丝氨酸内酯 (AHLs) 结合, 激活合成绿脓菌素裂解蛋白。(b) 罗伊氏乳杆菌中基于 Agr 群体感应体系 (agrQS) 的金黄色葡萄球菌检测系统。AIP-I 影响下, 罗伊氏乳杆菌表达葡萄糖醛酸酶 GusA 被抑制, 从而抑制 4-硝基苯  $\beta$ -D-葡萄糖苷酸水解为对硝基酚 (一种可以在 405 nm 处测量的黄色色素), 通过检测吸光度变化可检测纳摩尔至微摩尔级别浓度的 AIP-I。(c) 基于霍乱弧菌的群体感应设计的大肠杆菌闭环识别杀伤装置。大肠杆菌分泌自诱导因子 CAI-1, CAI-1 激活表达 YebF-Art-085 使菌体裂解, 释放胞内的自溶素 Art-085, 杀死霍乱弧菌。(d) 乳酸乳球菌杂交受体 CqsS-NisK 的设计。杂交受体可以感应诱导因子 CAI-1 并触发一种易于在粪便样本中检测的酶报告基因的表达, 以此检测霍乱弧菌

Fig. 2 Prevention and treatment of pathogen infection with engineered microorganisms

(a) Gene circuit developed with Type I quorum sensing mechanism in *P. aeruginosa*. The transcription factor LasR synthesized by engineered *Escherichia coli* can bind to acyl hyperserine lactone (AHL), a quorum sensing autoinducer secreted by *P. aeruginosa*, to activate the synthesis of the lysin: pseudomonectin. (b) *Lactobacillus reuteri* engineered with *Staphylococcus aureus* detection system through the Agr quorum sensing mechanism (agrQS). The expression of glucuronidase GusA is repressed by AIP-I to inhibit the enzymatic hydrolysis of 4-nitrobenzen- $\beta$ -D-glucosidic acid to produce *p*-nitrophenol, a yellow pigment that can be detected at 405 nm. Thus, AIP-I from nanomolar to micromolar level can be detected by the change of light absorbance. (c) A closed-loop detection and killing device for *Escherichia coli* based on *Vibrio cholerae* quorum sensing. Autoinductor CAI-1 secreted by *E. coli* can activate the expression of YebF-Art-085 to lyse the bacteria, releasing intracellular autolysin Art-085 to kill *V. cholerae*. (d) Design of *Lactococcus lactate* hybrid receptor CqsS-NisK, which detects *Vibrio cholerae* by sensing inducer CAI-1 to trigger the expression of gene encode an enzyme reporter that can be easily detected in fecal samples.

等, 严重影响患者的生活质量。由此, 科研工作者试图通过合成生物学手段重建微生物以治疗相关代谢疾病。高血压作为慢性病的一种, 是目前国内外受到大众广泛关注的临床常见病和多发病, 同时也是造成心脑血管系统疾病的重要危险因素<sup>[47]</sup>。据预测, 到 2025 年, 全球范围内的高血压患者人数将持续增加到 15.6 亿<sup>[48]</sup>, 亟需有效的新方案来治疗高血压<sup>[49]</sup>。从患有高血压的患者身上获得的粪便样本中发现其中的细菌具有生态失调和分类多样性减少的特征<sup>[49-50]</sup>, 这暗示着高血压可能和人体微生物之间存在关联。动物模型和小型的人类试点研究表明高盐摄入量是高血压的一个危险因素, 高盐消耗了某些乳酸杆菌, 而口服乳酸杆菌可以预防盐敏感的高血压<sup>[7, 51-53]</sup>。此外, 血管紧张素转化酶抑制肽 (ACEIPs) 可促进血管松弛并减少肾脏对水的重吸收, 从而降低血压。基于此, 研究者通过在植物乳酸杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) NC8 中融合表达金枪鱼框架蛋白 (TFP) 和黄鳍框架蛋白 (YFP) 合成 ACEIPs, 从而有效降低高血压大鼠的收缩压、内皮素和血管紧张素 II 的水平<sup>[7]</sup>。相比传统的 ACEIPs 抗高血压有效性较短 (一般只能持续 1 天), 改造的 *L. plantarum* 在体内经过 24 天的治疗期后还能维持 10 天左右的抗高血压作用, 且没有发现副作用。

随着人们对 2 型糖尿病 (T2D) 研究的深入, 越来越多的人认为其不仅仅基于持续升高的血糖

浓度, 更是一种复杂的心血管代谢疾病。全球约有 5.37 亿成年人患有糖尿病, 其中大多数为 T2D, 预计到 2053 年, 这一数字将上升至 7.83 亿<sup>[54]</sup>。T2D 的病理学特点是胰岛素抵抗和最初的高胰岛素血症, 随后胰岛  $\beta$  细胞产生胰岛素的能力下降, 胰岛  $\beta$  细胞的功能障碍和胰岛素抵抗的可变组合使得 T2D 极其复杂。胰高血糖素样肽-1 (glucagon-like peptide-1, GLP-1) 是一种肠促胰岛素衍生的激素, 是肠黏膜 L 细胞、胰岛  $\alpha$  细胞、孤束神经元合成胰高血糖素裂解后的产物, 可以作用于胰岛  $\beta$  细胞上的 GLP-1 受体从而促进其分泌胰岛素, 降低血糖。然而其在血流中半衰期短, 治疗效果不理想<sup>[55]</sup>。有大量的研究表明人体肠道微生物和 T2D 有关联, 例如定植于人肠道中的狄氏副拟杆菌 (*Parabacteroides distasonis*) 可以水解多种胆酸, 同时转化为多种次级胆酸、琥珀酸等改善糖脂代谢紊乱以治疗 T2D 等代谢疾病<sup>[56]</sup>。此外, 微生物代谢产物吡啶可以促进肠道上皮细胞分泌 GLP-1, 每天用工程化的益生菌喂养糖尿病大鼠, 可以通过重新编程肠道细胞显著降低血糖, 重新分泌的胰岛素占总胰岛素的 25%~33%<sup>[57]</sup>。这一系列研究结果似乎暗示我们通过改造人体共生细菌递送 GLP-1 具有刺激肠道上皮细胞分泌 GLP-1 和延长其半衰期的双重益处。进一步, 研究人员通过对长双歧杆菌 (*Bifidobacterium longum*) 等人体共生细菌经改造以穿透蛋白-GLP-1 融合蛋白的形

式直接在结肠中表达和分泌具有生物活性的 GLP-1, 具有潜在的临床应用价值<sup>[58]</sup>。然而, GLP-1 在体内可以被二肽基肽酶 (DPP-4) 降解缩短半衰期。为了抑制体内 DPP-4 对 GLP-1 的切割作用, 科研工作者开发了一系列的 GLP-1 受体激动剂, 即与天然 GLP-1 结构相似并激活 GLP-1 受体的肽。Xu 等<sup>[59]</sup> 对 GLP-1 的氨基酸进行定点突变, 经过密码子优化后在大肠杆菌中表达, 得到了蛋白酶抗性 6×GLP-1 蛋白, 重组 6×GLP-1 蛋白具有高稳定性, 对 2 型糖尿病小鼠有长达 16.7 h 的降血糖作用。作为 GLP-1 受体的长效激动剂, 唾液素-4 (exendin-4) 肽是一种重要的糖尿病的治疗药物, 其传统的给药途径是皮下注射。而通过口服表达 exendin-4 的副干酪乳杆菌 (*Lactobacillus paracasei*), 可增强 β 细胞的胰岛素分泌能力, 将肠道细菌转化为药物传递系统, 为糖尿病患者提供了另一种持续有效的非化学替代药物<sup>[60]</sup>。为了精准调控益生菌在肠道内分泌 GLP-1, 王汉杰课题组<sup>[61-62]</sup> 开发了一种光遗传操作的益生菌系统, 并引入了微胶囊, 实现了远程穿透性光信号控制乳酸乳球菌分泌融合 IgG 抗体 Fc 端的 GLP-1 治疗糖尿病小鼠和大鼠, 血糖和体重等糖尿病相关指标的下降都表现出该系统在代谢性疾病治疗上的医学潜力。

除了高血压和糖尿病, 肥胖作为另一种代谢疾病影响着越来越多人的健康。T2D 和肥胖是相互关联的异质疾病, 具有很多共同的病理生理机制, 包括异位性肥胖、胰岛素抵抗、炎症和 β 细胞功能障碍<sup>[63]</sup>。GLP-1 由于其强大的肠促胰岛素作用, 在肥胖的治疗中也受到了极大的关注。Wang 等<sup>[64]</sup> 在乳酸菌 MG1363 里表达全长形式的 GLP-1, 可以促进肥胖小鼠的脂肪酸氧化, 增加肠道微生物多样性, 从而显著降低肥胖小鼠的体重。小肠消化脂肪时会自然释放 *N*-酰基磷脂酰乙醇胺 (NAPEs), 其活性代谢产物 *N*-acylethanolamides 可发送信号给大脑抑制食欲。给小鼠口服产 NAPEs 的 *EcN* 工程菌, 可以有效降低小鼠的摄食量, 预防肥胖<sup>[65]</sup>。酒精性肝病是一种死亡率高的常见肝脏疾病之一, 肥胖等因素是造成酒精性肝病的风险因素之一。研究人员通过双交叉同源重组成功构建了一种食品级重组枯草芽孢杆菌 *fmb8*, 同时表达酿酒酵母醇脱氢酶 (*scADH*) 和土壤伊萨醇

母的醛脱氢酶 (*istALDH*)<sup>[66]</sup>。口服重组枯草芽孢杆菌可显著缓解酒精引起的小鼠肝指数、血液酒精含量、血清丙氨酸转氨酶、天冬氨酸转氨酶和碱性磷酸酶活性的升高。此外, 重组枯草芽孢杆菌显著降低了小鼠肝脏丙二醛水平, 增加了总抗氧化能力和超氧化物歧化酶水平。总之, 工程化食品级枯草芽孢杆菌可作为酒精解毒和减轻酒精性肝损伤的潜在益生菌。缺铁是最常见的一种微量元素缺乏疾病<sup>[67]</sup>, 食用果糖有利于加强铁的吸收, 但也会增加机体代谢负担。通过口服工程菌 *EcN* (*pqq-glf-mtlk*), 可以同时产生氧化还原因子吡咯并喹啉醌 (*pqq*)、编码葡萄糖促进蛋白 (*glf*) 和甘露醇-2-脱氢酶 (*mtlk*)<sup>[68]</sup>, 激活葡萄糖脱氢酶和甘露醇脱氢酶, 促进果糖转化为葡萄糖酸和甘露醇, 增强铁的吸收, 缺铁小鼠的转铁蛋白结合铁水平显著改善, 且能够有效治疗小鼠果糖引起的脂肪肝, 同时小鼠体内没有表现出因为摄入果糖而引起的代谢综合征<sup>[69]</sup>。

健康人体内的苯丙氨酸 (Phe) 代谢途径是由苯丙氨酸羟化酶 (PAH) 和必需的辅因子四氢生物蝶呤 (BH4) 介导形成酪氨酸。苯丙酮尿症 (PKU) 是一种遗传性代谢疾病, 由于 PAH 发生错义突变所致, 患者无法将饮食中的 Phe 转化为酪氨酸, 血液中过高的 Phe 含量会导致严重的健康问题, 包括癫痫、明显的智力残疾和生长发育迟缓等<sup>[70]</sup>。目前为止, 治疗 PKU 的唯一方法是终生饮食干预。苯丙氨酸解氨酶 (PAL) 能够将苯丙氨酸转化为氨和反式肉桂酸<sup>[71-72]</sup>, 是一种潜在的 PKU 治疗蛋白, 研究发现在肠内酶解 Phe 可以降低大小鼠血液中的 Phe 水平<sup>[73-74]</sup>。然而, 通过口服 PAL 需要以抗酸缓冲液的形式保护其免受胃酸的影响, 且肠道蛋白酶可快速切割 PAL<sup>[75]</sup>。由于口服 PAL 生产的高成本以及稳定性等问题, 需要对其进行进一步的开发。此外, 鉴于肠道菌群在消化中的重要作用, 通过微生物合成 PAH 或 PAL 保护其免受蛋白酶的降解从而在血液吸收 Phe 之前将食物中的部分 Phe 分解, 成为治疗 PKU 的新思路。Sarkissian 等<sup>[65]</sup> 证明在大肠杆菌中异源过表达环孢菌的 PAL 基因, 可以在体外获得大量 PAL 蛋白。研究发现口服插入变异鱼腥藻 PAL 基因的工程乳杆菌可在治疗后 4~5 天内显著降低 PKU 小鼠模型

血液中的 Phe 浓度<sup>[76]</sup>。Synlogic 公司在 *EcN* 中通过表达 Phe 转运体 (PheP) 和 PAL 或 L-氨基酸脱氨酶 (LAAD) 设计了两种 Phe 分解代谢途径, 将该工程菌株命名为 SYNBI1618: 前者通过大肠杆菌的无氧诱导型启动子 FNR 启动 PheP 的表达, Phe 通过 PheP 转运到细胞内, 被 PAL 分解为反式肉桂酸酯 (TCA), TCA 快速被肝脏吸收并转化为马尿酸通过尿液排出; 后者在细胞膜上使用阿拉伯糖诱导 LAAD 的表达, 可以将细胞外 Phe 转化为苯丙酮酸并在尿液中排出 (图 3)。给 PKU 模型小鼠口服工程菌 SYNBI1618, 通过肠再循环过程, 其血液中 Phe 浓度降低了 38%; 在灵长类动物体内实验后, 能在尿液中有效检测到可反映菌株活性的生物标志物马尿酸<sup>[77]</sup>。由于敲除了编码 4-羟基四氢吡啶甲酸合成酶 (*dapA*) 基因, 工程菌依赖外源补充二氨基庚二酸用于细胞壁生物合成, 从而避免了工程菌在人体内长期定植, 实验证明 SYNBI1618 可在最后一次给药后的 4 天内清除, 没有菌落定植的迹象。通过对健康志愿者和苯丙酮尿症患者进行人体实验, 最新公布的 SYNBI1618 治疗苯丙酮尿症的 1/2a 期临床研究数据表示, 该药物的安全性和人体耐受性良好, 在尿液和血浆中能检测到 Phe 的呈剂量效应的代谢产物<sup>[78]</sup>。在 SYNBI1618 菌株的

基础上, 通过高通量筛选技术进一步筛选到活性更高的 PAL 突变体 (mPAL), 相较于 PAL, mPAL 可以抵抗低 PH 和蛋白酶的降解, 使用 mPAL 替换 SYNBI1618 菌株中的 PAL 构建了 SYNBI1934 菌株, 与 SYNBI1618 相比, PKU 模型食蟹猴口服 SYNBI1934 后, 可以检测到血浆更多的 TCA 和尿液中更多的马尿酸<sup>[79]</sup>。以上结果表明, 利用合成生物学开发的工程益生菌具有极大的治疗 PKU 的临床应用潜力。

随着近年来肠道微生物组概念的出现和发展, 改造肠道菌在体内靶向治疗多种疾病具有极大的临床转化应用潜力。改造的工程菌可以进入人体肠道有效递送药物, 其在代谢疾病治疗领域的潜力被广泛关注。然而由于肠道内菌群环境复杂, 多种代谢疾病都与肠道菌群稳态失调有关<sup>[80]</sup>, 使用工程菌对原始菌群结构的影响不可预测, 且可能因患者的个体差异“因人而异”, 从而导致药物的治疗效果受到影响。益生菌为底盘治疗代谢疾病具有明显的优势, *EcN*、乳酸菌等被证明具有改善宿主肠道微生物多样性和群落结构的功能, 长期服用具有正向调控肠道菌群环境的作用, 达到“1+1>2”的效果, 是活体药物的优选底盘菌。然而, 合成的治疗益生菌和人体内共生微生物之间

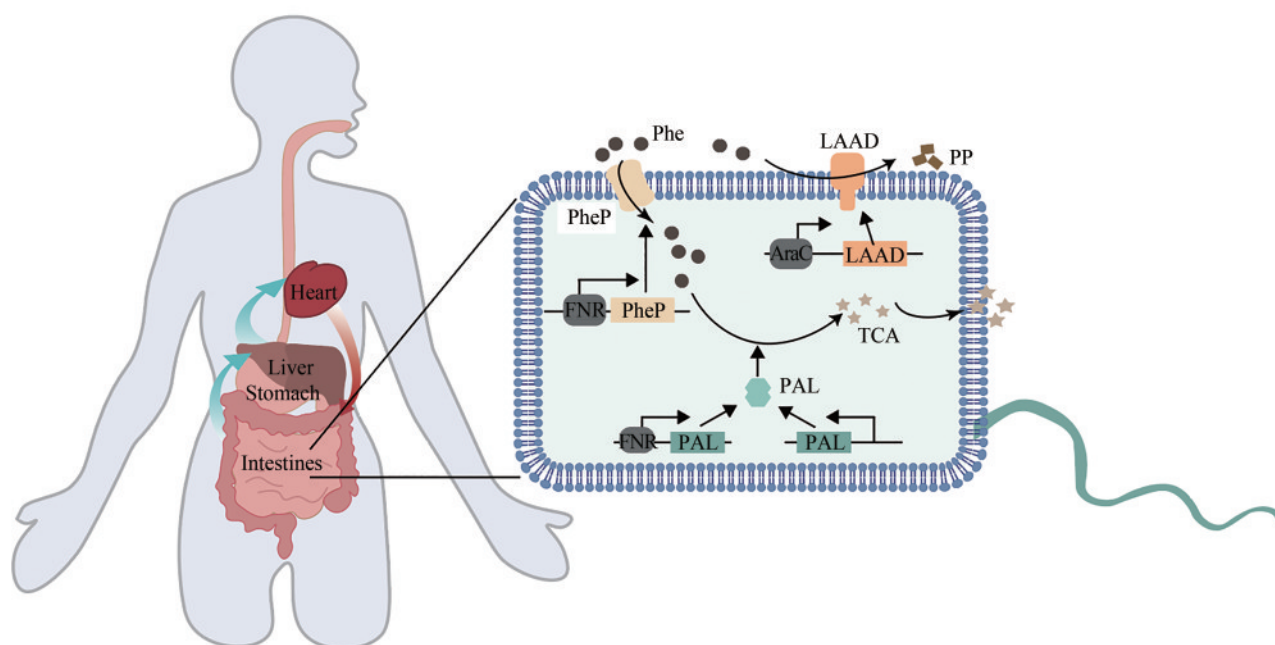


图3 治疗苯丙酮尿症的工程菌 SYNBI1618 的设计

Fig. 3 Design of engineered bacteria SYNBI1618 for PKU treatment

的相互作用仍然知之甚少, 尽管在各种动物模型中观察到了显著的结果, 但由于人体肠道微生物组远比动物模型复杂, 其在人体中的效果仍不明确。与此同时, 为了实现工程菌在肠道内长期可控地分泌治疗分子, 或及时响应疾病信号实现动态监测与诊疗一体化, 筛选具有强定植能力的底盘微生物或经过理性设计延长工程菌在肠道的定植时间, 从而提高工程菌的药物递送效率, 也是未来研究者的攻克方向。

## 4 靶向杀伤肿瘤

肿瘤的病发率逐年递增并且逐渐趋于年轻化状态, 开发有效的肿瘤治疗方法是当前全球人类共同奋斗的一项长期事业。近年来肿瘤靶向治疗技术, 以其特异性与靶向性的特点在肿瘤治疗中发挥着越来越重要的作用<sup>[81-82]</sup>。在19世纪就发现, 细菌感染的患者会出现肿瘤消退的现象, 经过多年的研究, 微生物学家发现某些专性或兼性厌氧细菌可以选择性地在肿瘤缺氧和坏死区域定植, 加上细菌本身具有免疫刺激作用, 可以引导免疫反应靶向肿瘤<sup>[83]</sup>。因此, 它们是理想的天然抗癌药物载体, 可以渗透肿瘤, 并刺激机体产生天然的免疫反应。结合合成生物学的设计理念, 可以进一步提高微生物靶向肿瘤或者通过载荷药物蛋白实现对肿瘤的杀伤。经过工程化改造的细菌可以特异性地在病灶处提供治疗蛋白, 以减少全身药物暴露的风险, 来实现有效肿瘤治疗, 由此肿瘤的细菌疗法开始进入公众的视线<sup>[84]</sup>。在肿瘤的细菌疗法研究中, 研究者发现来自沙门氏菌属 (*Salmonella*)、梭菌属 (*Clostridium*)、双歧杆菌属 (*Bifidobacterium*) 和埃希氏菌属 (*Escherichia*) 的菌株表现出显著的优势<sup>[85-88]</sup>。

沙门氏菌是一种兼性厌氧的革兰氏阴性胞内杆菌, 可以在低氧的肿瘤微环境中靶向积聚<sup>[89]</sup>。由于在临床上使用沙门氏菌具有高感染风险, 所以如何平衡细菌毒性和治疗效力是研究者急需攻克的难题。目前研究者对沙门氏菌进行了多方面的基因工程改造, 主要集中于降低细菌天然毒力。革兰氏阴性细菌外膜最外层锚定了一层脂多糖 (LPS), 其可以激活细胞膜上的LPS受体影响细胞

内信号传递, 导致严重的副反应, 如诱导肿瘤坏死因子 $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 导致感染性休克。1999年, Low等<sup>[90]</sup>将鼠伤寒沙门氏菌中的*msbB*基因敲除, 该基因参与脂多糖中脂质A生物合成的最后一步, 即肉豆蔻酰化, 结果显示敲除后的菌株在没有诱导高水平TNF- $\alpha$ 的情况下, 仍具有肿瘤聚集和抑制肿瘤的特性。此外, 研究者发现沙门氏菌的减毒可以通过营养缺陷来实现, 敲除影响嘌呤<sup>[91]</sup>和芳香族氨基酸<sup>[92]</sup>生物合成的基因, 可将这些突变菌株限制在有大量细胞更替、死亡和细胞碎片的区域, 而肿瘤微环境可以为这些营养缺陷菌株提供必需的营养物质, 进一步提高了其肿瘤聚集性。此外, 研究人员同时突变*msbB*和与嘌呤生物合成相关的基因*PurI*获得减毒鼠伤寒沙门氏菌VNP20009<sup>[93-94]</sup>, 该菌株具有较高的安全性且可靶向小鼠肿瘤并抑制肿瘤生长。然而, 在对转移性临床患者的I期临床试验中静脉注射该菌株并未发现其有抗肿瘤反应<sup>[95]</sup>。随后, 科研工作者试图在VNP20009表达杀伤蛋白以提高其抗肿瘤能力。Yang等<sup>[96]</sup>通过在减毒沙门氏菌VNP20009中利用厌氧型启动子*NirB*表达细胞凋亡相关基因*fadd* (Fas相关的死亡结构域), 成功上调了B16F10黑色素瘤的凋亡通路, 为精准靶向治疗黑色素瘤提供了一种新的治疗方法。与此同时, 猜测VNP20009中*msbB*基因突变后产生的五酰化脂质A是细胞膜TLR4的拮抗剂, 不能很好地诱导免疫反应从而诱导抗肿瘤反应, 因而有更多的研究旨在开发新的减毒且抗肿瘤的鼠伤寒沙门氏菌。信号素鸟苷四磷酸 (ppGpp) 由*relA*和*spoT*基因编码的两个合成酶PS I和PS II合成, 诱导鼠伤寒沙门氏菌毒力基因的表达<sup>[97]</sup>。敲除*relA*和*spoT*的鼠伤寒沙门氏菌 $\Delta$ ppGpp对小鼠几乎无毒, 且该菌株不仅介导小鼠发生细胞免疫, 还能引起全身和黏膜抗体应答<sup>[98]</sup>。Yi等<sup>[99]</sup>对大鼠尾静脉注射减毒沙门氏菌 $\Delta$ ppGpp发现其会在实体瘤内聚集, 而正常的器官中会被快速清除, 不会产生明显的毒性。由于注射减毒沙门氏菌会产生炎症反应, 通过破坏肿瘤部位的血管形成肿瘤血栓, 使肿瘤变为可吸收近红外光的深色, 联合光热疗法 (PTT) 诱发肿瘤产生免疫效应, 有效实现了对肿瘤生长的抑制。PTT治疗后, 小鼠还产生了强烈的免疫记忆, 可以有效抑制肿瘤的转移和复

发。Zheng等<sup>[100]</sup>利用 $\Delta$ pGpp分泌来自创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)的鞭毛蛋白B(FlaB),通过Toll样受体TRL5的信号通路来增强宿主天然的抗肿瘤免疫应答。工程化的沙门氏菌在肿瘤部位定植后,肿瘤内M1型巨噬细胞激活,同时M2型巨噬细胞的抑制活动降低,这些现象为细菌介导肿瘤免疫治疗提供了证据。Zhao等<sup>[101]</sup>开发了亮氨酸和精氨酸营养缺陷型鼠伤寒沙门氏菌A1-R,该菌株靶向肿瘤坏死区域,具有抗肿瘤功效。Hiroshima等<sup>[102]</sup>将该菌株与曲妥珠单抗联合治疗HER2宫颈癌小鼠,展现出了比单独疗法更好的效果。*aro*基因突变可导致鼠伤寒沙门氏菌对芳香族氨基酸营养缺陷,基于此,Yoon等<sup>[103]</sup>利用减毒沙门氏菌BRD509( $\Delta$ *aroA* $\Delta$ *aroD*)表达分泌干扰素- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ ),实现对肿瘤细胞的直接杀伤,成功延长了B16F10黑色素瘤小鼠的存活时间。革兰氏阴性菌中的III型分泌系统(T3SS)可以直接将效应蛋白注射进宿主细胞的细胞质中,利用这一特点,Lei等<sup>[104]</sup>在*aroA*突变的鼠伤寒沙门氏菌中表达抗血管生成蛋白,通过细菌的T3SS直接递送至肿瘤细胞中,干扰肿瘤周围的血管形成。此外,群体感应系统的引入形成了除分泌外在肿瘤部位递送杀伤药物的另一重要形式——裂解释放<sup>[105]</sup>。将细菌群体感应系统与裂解蛋白相结合,成功实现了同步裂解细菌释放药物的目标<sup>[106]</sup>。群体感应系统的引入减少了细菌的脱靶作用,在一定程度上保护了健康组织免受攻击<sup>[107]</sup>。此外还可以通过更复杂的环路控制抗癌剂的释放<sup>[105-106, 108]</sup>,如设计水杨酸调控组件,使沙门氏菌在被水杨酸诱导时释放抗肿瘤剂<sup>[108]</sup>。经过改造的沙门氏菌也可用作肿瘤检测工具,Panteli等<sup>[109]</sup>改造沙门氏菌使其表达荧光蛋白ZsGreen,由于沙门氏菌具有靶向肿瘤微环境的特性,结合药代动力学等特点实现通过检测血液中释放荧光蛋白的速率来快速检测肿瘤大小。此外,沙门氏菌还逐渐被开发用于靶向难以达到或预后不良的肿瘤,如胶质瘤<sup>[110]</sup>、成神经细胞瘤<sup>[111]</sup>等。

除沙门氏菌外,工程化的大肠杆菌也具备作为癌症诊断及治疗工具的功能。通过在*EcN*中表达半乳糖苷酶*lacZ*从而将荧光素与半乳糖的结合体(LuGal)分解产生荧光素,小鼠在口服该基于*EcN*的癌症诊断装置PROP-Z后,静脉注射LuGal,

切割产生的荧光素产物进入尿液中,通过检测尿液中荧光素的含量即可实现对肿瘤发生的检测<sup>[112]</sup>。该方法与常规的肿瘤检测方法相比更加灵敏,能够检测出直径小于1 cm的肿瘤。此外,工程化的*EcN*与十字花科蔬菜的联合使用能够预防结肠癌并杀伤结肠癌细胞。Chun Loong Ho等<sup>[113]</sup>在*EcN*中表达蛋白INP-HlpA(能够特异性靶向结肠癌细胞表面标记物硫酸乙酰肝素蛋白多糖)和蛋白黑芥子酶(能够将十字花科蔬菜富含的硫代葡萄糖苷转化成杀伤癌细胞的萝卜硫素),当给结肠癌模型小鼠同时喂养工程菌和十字花科蔬菜时,工程菌能定位到癌症发生部位,并通过分泌黑芥子酶产生抗癌剂,对癌细胞进行杀伤。该工程菌-蔬菜的组合能够有效地杀灭结肠癌细胞并且在小鼠的结肠癌模型中成功实现了预防肿瘤发生的目标。群体感应系统也被引入大肠杆菌,当菌群生长至一定密度时表达裂解蛋白,细菌的细胞膜发生破裂(图4),可以局部控制释放程序性细胞死亡配体1(PD-L1)、细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4(CTLA-4)的纳米抗体和粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子GM-CSF<sup>[114]</sup>、CD47纳米抗体<sup>[110]</sup>,显著提高肿瘤模型小鼠体内激活的T细胞的比例,在多种肿瘤模型中实现肿瘤的消退以及防止肿瘤的转移。为了进一步提高安全性和患者依从性、降低医疗成本,口服疫苗被认为是一种更具医疗潜力的个性化肿瘤免疫疗法。聂广军团队<sup>[115]</sup>开发了一种基于细菌外膜囊泡(OMVs)的口服肿瘤疫苗,口服后工程化大肠杆菌在肠道内原位产生包裹肿瘤抗原的OMVs,可穿透肠上皮屏障,能被固有层中的抗原递呈细胞有效摄取,进而激活机体肿瘤抗原特异性免疫反应,长期发挥保护作用。

除了群体感应系统、小分子诱导系统等,光系统、超声系统(图4)也已被引入到细菌中以精确调控肿瘤细胞杀伤,减少非特异性死亡和全身副作用。光具有低毒性、非侵入性和空间特异性等优势,是基因表达控制系统良好的诱导剂。Pan等<sup>[116]</sup>将*EcN*设计为响应近红外光从而释放抗肿瘤蛋白的光敏细菌,在体外和体内均能有效抑制肿瘤生长。超声及其能量可以安全、无创地穿透人体。Chen等<sup>[117]</sup>利用超声组织透性高等优势,通

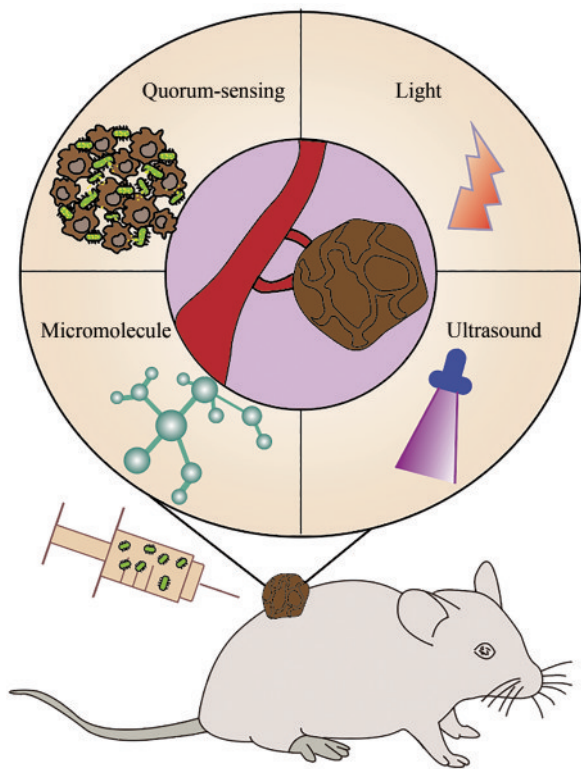


图4 基于调控系统的工程菌用于癌症治疗

Fig. 4 Engineered bacteria for cancer therapy based on multiple control systems

过设计温度驱动的基因开关，采用超声远程控制细菌表达  $IFN-\gamma$ ，实现了安全、准确、可调节的癌症治疗。多种调控系统的引入提高了细菌疗法可控性和安全性，可以促进 LBP 在疾病诊疗领域的应用。

多年来，用于肿瘤治疗目的的微生物工程已经变得越来越复杂。总的来说，利用合成生物学手段，通过敲除表达细菌毒力因子的基因、表达特异性靶向肿瘤的蛋白、表达肿瘤细胞杀伤蛋白或免疫刺激因子以及改善肿瘤微环境等，可以大大提高肿瘤细菌疗法的安全性，增强细菌对肿瘤的靶向性，提高免疫细胞的浸润等，从而增强治疗效果。目前调控抗肿瘤药物蛋白表达释放的策略包括蛋白分泌和菌体裂解。前者依赖于细菌的分泌系统，在维持菌体密度不变的前提下可以不间断地释放抗肿瘤药物；后者利用裂解蛋白裂解细菌释放药物的同时，菌体碎片和内容物可调动免疫系统加强抗肿瘤效果。随着合成生物学的发展，为提高治疗的安全性和特异性，在肿瘤的细

菌疗法中已逐渐减少组成型启动子表达治疗蛋白，主要采用肿瘤相关启动子和更加复杂的诱导系统。肿瘤相关启动子包括厌氧启动子、酸性启动子、特异性代谢产物启动子等，源于肿瘤微环境的特性。近年来，越来越多的基因电路被开发用于精确地控制治疗分子的表达和释放，包括小分子、超声、光等一些物理和化学条件诱导的基因表达系统。通过口服、瘤内注射、静脉注射等给药途径，工程细菌释放药物蛋白促进肿瘤细胞坏死、凋亡以及调动机体免疫系统进行肿瘤的治疗。合成生物学的进步提高了工程微生物作为抗肿瘤药物传递载体的安全性与效率，减少了产生治疗效果所需的细胞数量。随着各项临床试验的推进与合成生物学技术的不断进步，相信工程菌疗法将极大地促进肿瘤治疗的发展。

## 5 缓解炎症

通过口服携带生产和分泌治疗药物模块的工程细菌将效应分子传递到肠道环境治疗炎症性肠病 (inflammatory bowel disease, IBD) 是一个极具吸引力的概念。除了通过黏膜传递抗原引发选择性免疫反应外，工程细菌也已被编程表达其他遗传编码因子，以阻碍病原体定植或解决肠道炎症条件。

开发胃肠道环境原位持续监测的非侵入性技术可加强对肠炎的检测，Archer 等<sup>[118]</sup>利用可结合一氧化氮的转录因子 NorR 改造大肠杆菌，使其可以感知并响应肠道炎症因子一氧化氮。当没有一氧化氮存在时，NorR 与启动子结合阻遏下游基因表达；当存在一氧化氮时，NorR 与一氧化氮相互作用从启动子上解离下来，启动 DNA 重组酶 FilmE 的表达，特异性识别与翻转 DNA 序列。在肠道发生炎症产生肠炎标志物一氧化氮后，工程化细菌由原本表达黄色荧光蛋白 YFP 转变成为表达青色荧光蛋白 CFP，仅通过观察荧光的颜色即可实现对肠炎的诊断。此外，研究人员还设计了一种大肠杆菌菌株 (NGF1) 来感知和记录肠道微环境的四硫代酸盐<sup>[119]</sup>。该工程菌引入噬菌体 CI/Cro 双稳态开关或利用沙门氏菌的双组分系统 trR/S，将四硫代酸盐感应元件与转录因子偶联，构建四

硫酸盐感受器诱导 $\beta$ -半乳糖苷酶表达。收集摄入了工程菌的小鼠粪便,在含 $\beta$ -半乳糖苷酶反应显色底物的培养皿中培养后,通过颜色的改变可以实现对肠炎的诊断,该诊断工程菌在小鼠体内可以稳定工作6个月<sup>[120]</sup>。在此基础上,由于不同患者体内生物标记物水平存在差异,MIT的研究团队开发了用于原位检测不稳定炎症性生物标志物的可食胶囊,用于检测与氧化相关的生物标记物(例如一氧化氮、ROS、硫代硫酸酯[TS]和四硫代硫酸酯[TT]),结合光敏电子元件,综合性地在体外和猪体内评估肠道内炎症水平,有望应用于临床检测<sup>[121]</sup>。

早期研究发现对无菌新生小鼠进行微生物定植可以降低趋化因子CXCL16的甲基化水平从而降低其表达水平,减少自然杀伤T细胞的招募,改善结肠炎<sup>[122]</sup>。口服益生菌缓解肠炎的发生已是一种常见的治疗策略,为了提高益生菌的治疗效果,陈国强团队<sup>[123]</sup>在*EcN*中设计了一条代谢通路,在肠炎发生处原位合成并缓释治疗药物酮体(*R*)-3-羟基丁酸酯(3HB),显著提高了肠炎的治疗效果。溃疡性结肠炎是一种以肠道慢性炎症为特征的复发性疾病,其治疗及护理操作复杂、耗时长,Cui等<sup>[124]</sup>构建了一种光敏大肠杆菌,可以感应手机的光学传感媒介从而分泌IL-10,下调炎症级联反应和基质金属蛋白酶。乳酸菌作为应用最为广泛的益生菌,也被改造用于炎症的治疗。研究者在乳酸乳球菌(*L. lactis*)中表达菌毛蛋白CFA/I,通过给患有关节炎的小鼠饲喂工程菌发酵产生的牛奶,可以将治疗性外源蛋白递送至宿主黏膜。小鼠在食用特殊牛奶后体内的CD39<sup>+</sup>T细胞诱导TGF- $\beta$ 和IL-10的产生,抑制TNF- $\alpha$ 的产生和中性粒细胞进入关节,从而有效缓解关节炎<sup>[125]</sup>。通过*L. lactis*过表达IL-10还可以减少结肠炎的发生<sup>[12]</sup>,利用*L. lactis*递送IL-10的cDNA至宿主体内也具有抗炎效果<sup>[126]</sup>。其他抗炎因子如IL-27<sup>[127]</sup>、胸腺基质淋巴细胞生成素(TSL)<sup>[128]</sup>和血红素氧合酶(PHO-1)<sup>[129]</sup>等也被*L. lactis*合成用以控制消化道的急性炎症。除了乳酸乳球菌,也有研究采用长双歧杆菌(*B. longum*)表达抗炎肽 $\alpha$ -黑素细胞刺激素( $\alpha$ -MSH),通过调节各种细胞因子缓解葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导的结肠炎<sup>[130]</sup>。

IBD是一种复杂的胃肠道慢性炎症性疾病,如果不根据肠炎轻重仅仅在细菌中过表达治疗药物可能抑制免疫系统,增加感染和致癌的风险<sup>[131]</sup>。因此,亟需一种局部调控的IBD治疗方法来满足临床需求。肠炎除了会产生一些标记物质,还可以由一些信号通路诱导的一系列生理生化反应所诱导。例如肠道共生菌群和宿主细胞产生的细胞外三磷酸腺苷(eATP)能激活嘌呤信号通路,增强免疫因子的产生,激活T细胞促进肠道免疫神经元的凋亡,诱发肠道炎症的发生。Scott等<sup>[132]</sup>在酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中表达高敏感型人类嘌呤能受体P2Y2,并设计在P2Y2受体激活时分泌eATP降解酶,构建了能够感知促炎分子并依据促炎分子浓度高低来智能调节的工程酵母益生菌(图5)。在IBD小鼠模型中,这些自调节酵母益生菌可以抑制肠道炎症,减少肠道纤维化。

非侵入性的炎症检测与治疗方法可以大大增加患者的依从性。科研工作者以微生物为载体,设计了炎症标志物响应的闭环自调控的基因线路,无需服用额外的诱导物,可在体内实时监测标志物的水平并定制释放相应浓度的治疗药物,达到闭环治疗炎症的目的。利用蛋白质工程、分子定性进化等技术,提高微生物分子元件对疾病标志物响应的灵敏度与特异性,通过精准设计和模块构建使工程菌朝着具有更高靶向性和安全性的方向发展,有望加速其在临床的转化和应用。

## 6 问题与展望

相较于哺乳动物细胞,微生物具有稳定、生长周期短、易培养、成本低等优点,而快速发展的新兴学科合成生物学以微生物为载体,改造微生物细胞或设计构建新的微生物元件,使微生物表现出特定的生物学功能。微生物合成生物学的发展,为一些难以治愈的疾病提供了更加灵敏的诊断方式和新的治疗策略。利用合成生物学可以在微生物中设计生物传感器,感知体内的疾病信号,从而智能监测疾病或者递送药物。这些人工改造的微生物作为一种有效的分子载药系统,可以持续地将药物分子递送到需要的部位,对代谢疾病、病原菌感染、癌症、炎症等疾病的监测和

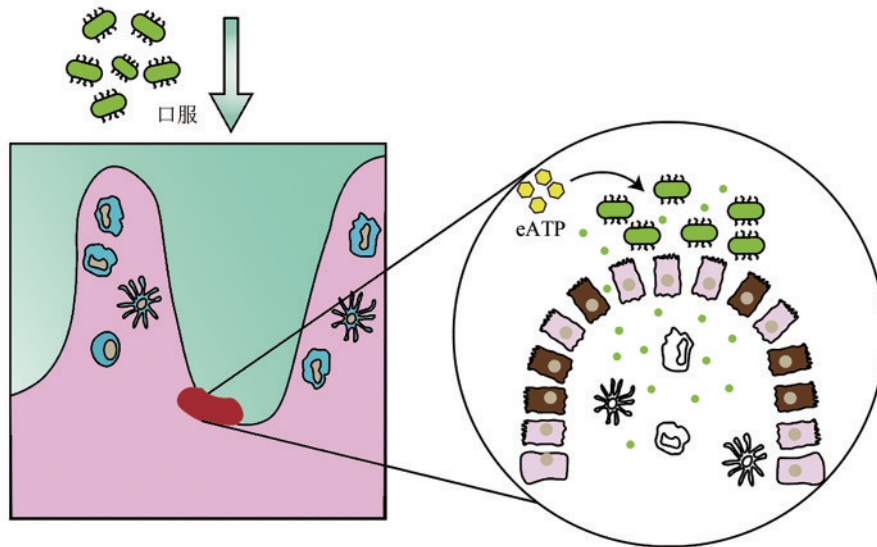


图5 口服工程酿酒酵母缓解肠炎

在酵母中表达高敏感型人类嘌呤能受体P2Y2，在P2Y2受体激活时分泌eATP降解酶，构建了能够感知促炎分子并依据促炎分子浓度高低智能调节的工程酵母益生菌

Fig. 5 Alleviation of enteritis by oral administration of engineered *Saccharomyces cerevisiae*.

Highly sensitive human purinergic receptor P2Y2 is expressed in *S. cerevisiae*, and EATP-degrading enzyme is designed to be secreted when P2Y2 receptor is activated. Engineering *S. cerevisiae* is constructed to sense and regulate the pro-inflammatory molecules

治疗显示出巨大的应用前景。尽管如此，在设计微生物生物传感器领域仍然存在一系列的挑战，例如配体与感应元件的适配性会影响传感器的灵敏度，如何预测和调整传感器的检测范围，避免传感器背景信号过强在正常状态下激活传感器等问题。因此，针对不同的应用场景，需要设计、构建和优化胞内生物传感器的关键元件，如启动子<sup>[133]</sup>、转录调节因子<sup>[134]</sup>、核糖体结合位点<sup>[135]</sup>和拷贝数<sup>[136]</sup>等，进而调节传感器的灵敏度、检测范围、信噪比和响应正交性，对系统进行定制优化。

尽管工程化微生物在治疗疾病方面表现出极大的潜力，但目前大部分微生物合成生物学疗法仍处于试验阶段，要想进一步推广到临床应用，还须应对许多挑战。工程微生物在生物医学领域的应用所面临的主要挑战有：

①安全性。许多菌血症等病例所涉及的对象都是患有不同程度潜在疾病的个体，因此如何避免工程菌治疗过程中可能产生的并发症是工程微生物疗法需要解决的首要问题。同时，用于慢性代谢疾病治疗的工程菌在人体内长期定植可提高其利用率与患者依从性，然而引入的外源基因环路的遗传稳定性需要重点关注。而长期定植引起

的对人体固有微生物组结构的影响也亟待探究。此外，由于这些工程化微生物不是天然存在的，因此在合理的设计中应包括生物遏制策略，以减少这些微生物向环境中的传播。

②普适性。目前许多与生理指标相关的物质，在微生物体内缺乏响应原件。对不同微生物中的生物模块进行有效整合，或引入自然界中其他生物来源的分子模块，并结合生物信息学分析、蛋白质工程、分子定性进化技术等可以极大地扩大工程微生物诊断和治疗疾病的范围，并有效提高基因环路的正交性。

③精准可控性。微生物可以被改造来生产和分泌小分子和蛋白质药物，但是很难严格控制产物的数量。这种控制是至关重要的，特别是对于治疗窗口小的药物。实现对疾病治疗的个性化与动态的精准医疗是未来生物医学的发展目标。

④高效性。Synlogic公司的重要管线——治疗高血氨症的工程益生菌SYNB1020，在2a期临床试验中，治疗高血氨的效果未达到预期，宣布失败。另外，多项临床试验发现，部分活体药物在人体中的效果远弱于其在动物模型中的治疗效果，推测受限于其药物的产生效率。因此如何提高工

程微生物的产物转化效率和维持工程微生物在体内长期正常运转,是工程微生物活体药物研究的重要方向。

总之,利用合成生物学改造微生物为疾病的治疗提供了新思路。目前FDA已批准一些工程化微生物进入临床试验的研究阶段。未来,微生物合成生物学在疾病治疗领域还会有无限可能。

### 参 考 文 献

- [1] CHUA K J, KWOK W C, AGGARWAL N, et al. Designer probiotics for the prevention and treatment of human diseases[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2017, 40: 8-16.
- [2] CHARBONNEAU M R, ISABELLA V M, LI N, et al. Developing a new class of engineered live bacterial therapeutics to treat human diseases[J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 1738.
- [3] VANDENBROUCKE K, DE HAARD H, BEIRNAERT E, et al. Orally administered *L. lactis* secreting an anti-TNF Nanobody demonstrate efficacy in chronic colitis[J]. *Mucosal Immunology*, 2010, 3(1): 49-56.
- [4] 韦瑶, 龚剑峰, 朱维铭, 等. 粪便菌群移植治疗溃疡性结肠炎9例临床分析[J]. *中国实用外科杂志*, 2014, 34(10): 970-973.  
WEI Y, GONG J F, ZHU W M, et al. Effect of fecal microbiota transplantation on ulcerative colitis: a study of 9 patients[J]. *Chinese Journal of Practical Surgery*, 2014, 34(10): 970-973.
- [5] FDA. Enforcement policy regarding investigational new drug requirements for use of fecal microbiota for transplantation to treat *Clostridium difficile* infection not responsive to standard therapies[EB/OL]. [2022-12-01]. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/enforcement-policy-regarding-investigational-new-drug-requirements-use-fecal-microbiota>.
- [6] GOH Y L, HE H F, MARCH J C. Engineering commensal bacteria for prophylaxis against infection[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2012, 23(6): 924-930.
- [7] YANG G L, JIANG Y L, YANG W T, et al. Effective treatment of hypertension by recombinant *Lactobacillus plantarum* expressing angiotensin converting enzyme inhibitory peptide[J]. *Microbial Cell Factories*, 2015, 14(1): 202.
- [8] DUONG M T Q, QIN Y S, YOU S H, et al. Bacteria-cancer interactions: bacteria-based cancer therapy[J]. *Experimental & Molecular Medicine*, 2019, 51(12): 1-15.
- [9] GURBATRI C R, ARPAIA N, DANINO T. Engineering bacteria as interactive cancer therapies[J]. *Science*, 2022, 378(6622): 858-864.
- [10] SOUZA B M, PREISSER T M, PEREIRA V B, et al. *Lactococcus lactis* carrying the pValac eukaryotic expression vector coding for IL-4 reduces chemically-induced intestinal inflammation by increasing the levels of IL-10-producing regulatory cells[J]. *Microbial Cell Factories*, 2016, 15(1): 150.
- [11] AUSLÄNDER S, AUSLÄNDER D, FUSSENEGGER M. Synthetic biology-the synthesis of biology[J]. *Angewandte Chemie International Edition* 2017, 56(23): 6396-6419.
- [12] STEIDLER L, HANS W, SCHOTTE L, et al. Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10[J]. *Science*, 2000, 289(5483): 1352-1355.
- [13] TABOR J J, GROBAN E S, VOIGT C A. Performance characteristics for sensors and circuits used to program *E. coli*[M]// *Systems biology and biotechnology of Escherichia coli*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2009: 401-439.
- [14] WETTSTADT S, LLAMAS M A. Role of regulated proteolysis in the communication of bacteria with the environment[J]. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2020, 7: 586497.
- [15] GAO R, STOCK A M. Biological insights from structures of two-component proteins[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2009, 63: 133-154.
- [16] SCHMIDL S R, EKNESS F, SOFJAN K, et al. Rewiring bacterial two-component systems by modular DNA-binding domain swapping[J]. *Nature Chemical Biology*, 2019, 15(7): 690-698.
- [17] LAZAR J T, TABOR J J. Bacterial two-component systems as sensors for synthetic biology applications[J]. *Current Opinion in Systems Biology*, 2021, 28: 100398.
- [18] THEURETZBACHER U. Accelerating resistance, inadequate antibacterial drug pipelines and international responses[J]. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2012, 39(4): 295-299.
- [19] SPELLBERG B, BARTLETT J, WUNDERINK R, et al. Novel approaches are needed to develop tomorrow's antibacterial therapies[J]. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2015, 191(2): 135-140.
- [20] LI L, KOIRALA B, HERNANDEZ Y, et al. Identification of structurally diverse menaquinone-binding antibiotics with *in vivo* activity against multidrug-resistant pathogens[J]. *Nature Microbiology*, 2022, 7(1): 120-131.
- [21] SMITH D R, TEMIME L, OPATOWSKI L. Microbiome-pathogen interactions drive epidemiological dynamics of antibiotic resistance: a modeling study applied to nosocomial pathogen control[J]. *eLife*, 2021, 10: e68764.
- [22] PALMA M L, GARCIA-BATES T M, MARTINS F S, et al. Correction to: genetically engineered probiotic *Saccharomyces cerevisiae* strains mature human dendritic cells and stimulate Gag-specific memory CD8<sup>+</sup> T cells *ex vivo*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103(13): 5461.
- [23] KAMIYA S, YONEZAWA H, OSAKI T. Role of probiotics in eradication therapy for helicobacter pylori infection[J]. *Ad-*

- vances in Experimental Medicine and Biology, 2019, 1149: 243-255.
- [24] VALDÉS-VARELA L, GUEIMONDE M, RUAS-MADIEDO P. Probiotics for prevention and treatment of clostridium difficile infection[J]. Advances in Experimental Medicine and Biology, 2018, 1050: 161-176.
- [25] ENACHE-ANGOULVANT A, HENNEQUIN C. Invasive *Saccharomyces* infection: a comprehensive review[J]. Clinical Infectious Diseases, 2005, 41(11): 1559-1568.
- [26] MUÑOZ P, BOUZA E, CUENCA-ESTRELLA M, et al. *Saccharomyces cerevisiae* fungemia: an emerging infectious disease[J]. Clinical Infectious Diseases, 2005, 40(11): 1625-1634.
- [27] BESSELINK M H, VAN SANTVOORT H C, BUSKENS E, et al. Probiotic prophylaxis in patients with predicted severe acute pancreatitis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial[J]. Nederlands Tijdschrift Voor Geneeskunde, 2008, 152(12): 685-696.
- [28] HWANG I Y, LEE H L, HUANG J G, et al. Engineering microbes for targeted strikes against human pathogens[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2018, 75(15): 2719-2733.
- [29] CHANG W, SMALL D A, TOGHROL F, et al. Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* reveals induction of pyocin genes in response to hydrogen peroxide[J]. BMC Genomics, 2005, 6: 115.
- [30] CHANG W, SMALL D A, TOGHROL F, et al. Microarray analysis of toxicogenomic effects of peracetic acid on *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Environmental Science & Technology, 2005, 39(15): 5893-5899.
- [31] SAEIDI N, WONG C K, LO T M, et al. Engineering microbes to sense and eradicate *Pseudomonas aeruginosa*, a human pathogen[J]. Molecular Systems Biology, 2011, 7: 521.
- [32] HWANG I Y, TAN M H, KOH E, et al. Reprogramming microbes to be pathogen-seeking killers[J]. ACS Synthetic Biology, 2014, 3(4): 228-237.
- [33] HWANG I Y, KOH E, WONG A, et al. Engineered probiotic *Escherichia coli* can eliminate and prevent *Pseudomonas aeruginosa* gut infection in animal models[J]. Nature Communications, 2017, 8: 15028.
- [34] BEGLEY M, GAHAN C G M, HILL C. The interaction between bacteria and bile[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2005, 29(4): 625-651.
- [35] RIDLON J M, KANG D J, HYLEMON P B. Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria[J]. Journal of Lipid Research, 2006, 47(2): 241-259.
- [36] ZHU D L, SORG J A, SUN X M. *Clostridioides difficile* biology: sporulation, germination, and corresponding therapies for *C. difficile* infection[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2018, 8: 29.
- [37] KOH E, HWANG I Y, LEE H L, et al. Engineering probiotics to inhibit *Clostridioides difficile* infection by dynamic regulation of intestinal metabolism[J]. Nature Communications, 2022, 13: 3834.
- [38] PALMER J D, PIATTELLI E, MCCORMICK B A, et al. Engineered probiotic for the inhibition of salmonella *via* tetrathionate-induced production of microcin H47[J]. ACS Infectious Diseases, 2018, 4(1): 39-45.
- [39] BLOT S, VANDEWOUDE K, COLARDYN F. *Staphylococcus aureus* infections[J]. The New England Journal of Medicine, 1998, 339(27): 2025-2026, authorreply 2026-2027.
- [40] LUBKOWICZ D, HO C L, HWANG I Y, et al. Reprogramming probiotic *Lactobacillus reuteri* as a biosensor for *Staphylococcus aureus* derived AIP-I detection[J]. ACS Synthetic Biology, 2018, 7(5): 1229-1237.
- [41] JAYARAMAN P, HOLOWKO M B, YEOH J W, et al. Repurposing a two-component system-based biosensor for the killing of vibrio cholerae[J]. ACS Synthetic Biology, 2017, 6(7): 1403-1415.
- [42] MAO N, CUBILLOS-RUIZ A, CAMERON D E, et al. Probiotic strains detect and suppress cholera in mice[J]. Science Translational Medicine, 2018, 10(445): eaao2586.
- [43] BORRERO J, CHEN Y Q, DUNNY G M, et al. Modified lactic acid bacteria detect and inhibit multiresistant enterococci[J]. ACS Synthetic Biology, 2015, 4(3): 299-306.
- [44] GELDART K, BORRERO J, KAZNESSIS Y N. Chloride-inducible expression vector for delivery of antimicrobial peptides targeting antibiotic-resistant enterococcus faecium[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 81(11): 3889-3897.
- [45] GEBRAYEL P, NICCO C, AL KHODOR S, et al. Microbiota medicine: towards clinical revolution[J]. Journal of Translational Medicine, 2022, 20(1): 1-20.
- [46] 刘俊希, 王舒, 魏祯, 等. 中药有效成分通过调节肠道菌群及代谢物组成影响相关疾病治疗作用概述[J]. 中医药学报, 2022, 50(2): 92-97.
- LIU J X, WANG S, WEI Z, et al. Therapeutic effects of active components of Chinese medicinal on related diseases by regulating intestinal flora and metabolite composition[J]. Acta Chinese Medicine and Pharmacology, 2022, 50(2): 92-97.
- [47] 丁萌, 郭栋. 从脾胃论中青年高血压病的中医病机及治疗[J]. 中国中医药现代远程教育, 2022, 20(6): 63-66.
- DING M, GUO D. Discussion on the Chinese medicine pathogenesis and treatment of hypertension in young and middle-aged people from the perspective of spleen and stomach[J]. Chinese Medicine Modern Distance Education of China, 2022, 20(6): 63-66.
- [48] CHOCKALINGAM A. Impact of world hypertension day[J]. The Canadian Journal of Cardiology, 2007, 23(7): 517-519.
- [49] SANTISTEBAN M M, QI Y F, ZUBCEVIC J, et al. Hypertension-linked pathophysiological alterations in the gut[J]. Circu-

- lation Research, 2017, 120(2): 312-323.
- [50] LE CHATELIER E, NIELSEN T, QIN J J, et al. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers[J]. Nature, 2013, 500(7464): 541-546.
- [51] TORAL M, ROMERO M, RODRÍGUEZ-NOGALES A, et al. *Lactobacillus fermentum* improves tacrolimus-induced hypertension by restoring vascular redox state and improving eNOS coupling[J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2018, 62(14): e1800033.
- [52] WILCK N, MATUS M G, KEARNEY S M, et al. Salt-responsive gut commensal modulates T<sub>H</sub>17 axis and disease[J]. Nature, 2017, 551(7682): 585-589.
- [53] ZHANG Z, ZHAO J T, TIAN C Y, et al. Targeting the gut microbiota to investigate the mechanism of lactulose in negating the effects of a high-salt diet on hypertension[J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2019, 63(11): e1800941.
- [54] OGURTSOVA K, GUARIGUATA L, BARENGO N C, et al. IDF diabetes Atlas: global estimates of undiagnosed diabetes in adults for 2021[J]. Diabetes Research and Clinical Practice, 2022, 183: 109118.
- [55] RIGLAR D T, SILVER P A. Engineering bacteria for diagnostic and therapeutic applications[J]. Nature Reviews Microbiology, 2018, 16(4): 214-225.
- [56] WANG K, LIAO M F, ZHOU N, et al. *Parabacteroides distasonis* alleviates obesity and metabolic dysfunctions via production of succinate and secondary bile acids[J]. Cell Reports, 2019, 26(1): 222-235.e5.
- [57] CHIMEREL C, EMERY E, SUMMERS D K, et al. Bacterial metabolite indole modulates incretin secretion from intestinal enteroendocrine L cells[J]. Cell Reports, 2014, 9(4): 1202-1208.
- [58] WEI P J, YANG Y, LI T Y, et al. A engineered *Bifidobacterium longum* secreting a bioactive penetratin-Glucagon-like peptide 1 fusion protein enhances Glucagon-like peptide 1 absorption in the intestine[J/OL]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2015[2022-12-01]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25674803/>.
- [59] XU F F, WANG K Y, WANG N, et al. Modified human glucagon-like peptide-1 (GLP-1) produced in *E. coli* has a long-acting therapeutic effect in type 2 diabetic mice[J]. PLoS One, 2017, 12(7): e0181939.
- [60] ZENG Z, YU R, ZUO F L, et al. Heterologous expression and delivery of biologically active exendin-4 by lactobacillus paracasei L14[J]. PLoS One, 2016, 11(10): e0165130.
- [61] ZHANG X Y, MA N, LING W, et al. Optogenetic operated probiotics to regulate host metabolism by mimicking enteroendocrine[EB/OL]. bioRxiv, 2021[2022-12-01]. <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.11.30.470589v1>.
- [62] ZHANG X Y, MA N, LING W, et al. A micro-nano optogenetic system based on probiotics for *in situ* host metabolism regulation[J]. Nano Research, 2023, 16(2): 2829-2839.
- [63] LINGVAY I, SUMITHRAN P, COHEN R V, et al. Obesity management as a primary treatment goal for type 2 diabetes: time to reframe the conversation[J]. Lancet, 2022, 399(10322): 394-405.
- [64] WANG L F, CHEN T T, WANG H, et al. Engineered bacteria of MG1363-pMG36e-GLP-1 attenuated obesity-induced by high fat diet in mice[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2021, 11: 595575.
- [65] CHEN Z Y, GUO L L, ZHANG Y Q, et al. Incorporation of therapeutically modified bacteria into gut microbiota inhibits obesity[J]. Journal of Clinical Investigation, 2014, 124(8): 3391-3406.
- [66] LU J, ZHU X Y, ZHANG C, et al. Co-expression of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase in *Bacillus subtilis* for alcohol detoxification[J]. Food and Chemical Toxicology, 2020, 135: 110890.
- [67] BAILEY R L, WEST K P, BLACK R E. The epidemiology of global micronutrient deficiencies[J]. Annals of Nutrition & Metabolism, 2015, 66(Suppl 2): 22-33.
- [68] SOMABHAI C A, RAGHUVANSHI R, NARESHKUMAR G. Genetically engineered *Escherichia coli* nissle 1917 synbiotics reduce metabolic effects induced by chronic consumption of dietary fructose[J]. PLoS One, 2016, 11(10): e0164860.
- [69] CHAUDHARI A S, RAGHUVANSHI R, KUMAR G N. Genetically engineered *Escherichia coli* Nissle 1917 synbiotic counters fructose-induced metabolic syndrome and iron deficiency[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2017, 101(11): 4713-4723.
- [70] 顾学范. 苯丙酮尿症的诊断和治疗[J]. 广东医学, 2000, 21(7): 535-536.
- GU X F. Diagnosis and treatment of phenylketonuria[J]. Guangdong Medical Journal, 2000, 21(7): 535-536.
- [71] LEVY H L, SARKISSIAN C N, SCRIVER C R. Phenylalanine ammonia lyase (PAL): from discovery to enzyme substitution therapy for phenylketonuria[J]. Molecular Genetics and Metabolism, 2018, 124(4): 223-229.
- [72] HAUSMANN O, DAHA M, LONGO N, et al. Pegvaliase: immunological profile and recommendations for the clinical management of hypersensitivity reactions in patients with phenylketonuria treated with this enzyme substitution therapy[J]. Molecular Genetics and Metabolism, 2019, 128(1/2): 84-91.
- [73] LIU J Z, JIA X Y, ZHANG J, et al. Study on a novel strategy to treatment of phenylketonuria[J]. Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology, 2002, 30(4): 243-257.
- [74] SARKISSIAN C N, SHAO Z, BLAIN F, et al. A different approach to treatment of phenylketonuria: phenylalanine degradation with recombinant phenylalanine ammonia lyase[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United

- States of America, 1999, 96(5): 2339-2344.
- [75] KANG T S, WANG L, SARKISSIAN C N, et al. Converting an injectable protein therapeutic into an oral form: phenylalanine ammonia lyase for phenylketonuria[J]. *Molecular Genetics and Metabolism*, 2010, 99(1): 4-9.
- [76] DURRER K E, ALLEN M S, HUNT VON HERBING I. Genetically engineered probiotic for the treatment of phenylketonuria (PKU); assessment of a novel treatment *in vitro* and in the PAHenu2 mouse model of PKU[J]. *PLoS One*, 2017, 12(5): e0176286.
- [77] ISABELLA V M, HA B N, CASTILLO M J, et al. Development of a synthetic live bacterial therapeutic for the human metabolic disease phenylketonuria[J]. *Nature Biotechnology*, 2018, 36(9): 857-864.
- [78] PUURUNEN M K, VOCKLEY J, SEARLE S L, et al. Safety and pharmacodynamics of an engineered *E. coli* Nissle for the treatment of phenylketonuria: a first-in-human phase 1/2a study[J]. *Nature Metabolism*, 2021, 3(8): 1125-1132.
- [79] ADOLFSEN K J, CALLIHAN I, MONAHAN C E, et al. Improvement of a synthetic live bacterial therapeutic for phenylketonuria with biosensor-enabled enzyme engineering[J]. *Nature Communications*, 2021, 12: 6215.
- [80] FAN Y, PEDERSEN O. Gut microbiota in human metabolic health and disease[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2021, 19(1): 55-71.
- [81] CHEN H C, HE C K, CHEN T Y, et al. New strategy for precise cancer therapy: tumor-specific delivery of mitochondria-targeting photodynamic therapy agents and *in situ* O<sub>2</sub>-generation in hypoxic tumors[J]. *Biomaterials Science*, 2020, 8(14): 3994-4002.
- [82] SAHU A, KWON I, TAE G Y. Improving cancer therapy through the nanomaterials-assisted alleviation of hypoxia[J]. *Biomaterials*, 2020, 228: 119578.
- [83] TANIGUCHI S I, FUJIMORI M, SASAKI T, et al. Targeting solid tumors with non-pathogenic obligate anaerobic bacteria[J]. *Cancer Science*, 2010, 101(9): 1925-1932.
- [84] HOFFMAN R M, ZHAO M. Methods for the development of tumor-targeting bacteria[J]. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 2014, 9(7): 741-750.
- [85] BADIE F, GHANDALI M, TABATABAEI S A, et al. Use of *Salmonella* bacteria in cancer therapy: direct, drug delivery and combination approaches[J]. *Frontiers in Oncology*, 2021, 11: 624759.
- [86] ASADOLLAHI P, GHANAVATI R, ROHANI M, et al. Anti-cancer effects of *Bifidobacterium* species in colon cancer cells and a mouse model of carcinogenesis[J]. *PLoS One*, 2020, 15(5): e0232930.
- [87] PIONTEK A, EICHNER M, ZWANZIGER D, et al. Targeting claudin-overexpressing thyroid and lung cancer by modified *Clostridium perfringens* enterotoxin[J]. *Molecular Oncology*, 2020, 14(2): 261-276.
- [88] VEZIANI J, VILLÉGER R, BARNICH N, et al. Gut microbiota as potential biomarker and/or therapeutic target to improve the management of cancer: focus on colibactin-producing *Escherichia coli* in colorectal cancer[J]. *Cancers*, 2021, 13(9): 2215.
- [89] ANDINO A, HANNING I. *Salmonella* enterica: survival, colonization, and virulence differences among serovars[J]. *The Scientific World Journal*, 2015, 2015: 520179.
- [90] LOW K B, ITTENSOHN M, LE T, et al. Lipid A mutant *Salmonella* with suppressed virulence and TNF $\alpha$  induction retain tumor-targeting *in vivo*[J]. *Nature Biotechnology*, 1999, 17(1): 37-41.
- [91] BACON G A, BURROWS T W, YATES M. The effects of biochemical mutation on the virulence of *Bacterium typhosum*; the loss of virulence of certain mutants[J]. *British Journal of Experimental Pathology*, 1951, 32(2): 85-96.
- [92] HOISETH S K, STOCKER B A D. Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* are non-virulent and effective as live vaccines[J]. *Nature*, 1981, 291(5812): 238-239.
- [93] LOW K B, ITTENSOHN M, LE T, et al. VNP20009, a genetically modified *Salmonella typhimurium* for the treatment of solid tumors[J]. *Proceedings of the American Association for Cancer Research*, 1999, 40: 87.
- [94] CLAIRMONT C, LEE K C, PIKE J, et al. Biodistribution and genetic stability of the novel antitumor agent VNP20009, a genetically modified strain of *Salmonella typhimurium*[J]. *The Journal of Infectious Diseases*, 2000, 181(6): 1996-2002.
- [95] TOSO J F, GILL V J, HWU P, et al. Phase I study of the intravenous administration of attenuated *Salmonella typhimurium* to patients with metastatic melanoma[J]. *Journal of Clinical Oncology*, 2002, 20(1): 142-152.
- [96] YANG Y W, ZHANG C M, HUANG X J, et al. Tumor-targeted delivery of a C-terminally truncated FADD (N-FADD) significantly suppresses the B16F10 melanoma *via* enhancing apoptosis[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 34178.
- [97] SONG M, KIM H J, KIM E Y, et al. ppGpp-dependent stationary phase induction of genes on *Salmonella* pathogenicity island 1[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(33): 34183-34190.
- [98] NA H S, KIM H J, LEE H C, et al. Immune response induced by *Salmonella typhimurium* defective in ppGpp synthesis[J]. *Vaccine*, 2006, 24(12): 2027-2034.
- [99] YI X, ZHOU H L, CHAO Y, et al. Bacteria-triggered tumor-specific thrombosis to enable potent photothermal immunotherapy of cancer[J]. *Science Advances*, 2020, 6(33): eaba3546.
- [100] ZHENG J H, NGUYEN V H, JIANG S N, et al. Two-step enhanced cancer immunotherapy with engineered *Salmonella typhimurium* secreting heterologous flagellin[J]. *Science Transla-*

- tional Medicine, 2017, 9(376): eaak9537.
- [101] ZHAO M, YANG M, LI X M, et al. Tumor-targeting bacterial therapy with amino acid auxotrophs of GFP-expressing *Salmonella typhimurium*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, 102(3): 755-760.
- [102] HIROSHIMA Y, ZHANG Y, ZHAO M, et al. Tumor-targeting *Salmonella typhimurium* A1-R in combination with trastuzumab eradicates HER-2-positive cervical cancer cells in patient-derived mouse models[J]. PLoS One, 2015, 10(6): e0120358.
- [103] YOON W, PARK Y C, KIM J, et al. Application of genetically engineered *Salmonella typhimurium* for interferon-gamma-induced therapy against melanoma[J]. European Journal of Cancer, 2017, 70: 48-61.
- [104] SHI L, YU B, CAI C H, et al. Angiogenic inhibitors delivered by the type III secretion system of tumor-targeting *Salmonella typhimurium* safely shrink tumors in mice[J]. AMB Express, 2016, 6(1): 56.
- [105] SWOFFORD C A, VAN DESSEL N, FORBES N S. Quorum-sensing *Salmonella* selectively trigger protein expression within tumors[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015, 112(11): 3457-3462.
- [106] DIN M O, DANINO T, PRINDLE A, et al. Synchronized cycles of bacterial lysis for *in vivo* delivery[J]. Nature, 2016, 536(7614): 81-85.
- [107] WU M R, JUSIAK B, LU T K. Engineering advanced cancer therapies with synthetic biology[J]. Nature Reviews Cancer, 2019, 19(4): 187-195.
- [108] CAMACHO E M, MESA-PEREIRA B, MEDINA C, et al. Engineering *Salmonella* as intracellular factory for effective killing of tumour cells[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 30591.
- [109] PANTELI J T, FORKUS B A, VAN DESSEL N, et al. Genetically modified bacteria as a tool to detect microscopic solid tumor masses with triggered release of a recombinant biomarker[J]. Integrative Biology, 2015, 7(4): 423-434.
- [110] CHEN J Q, ZHAN Y F, WANG W, et al. The engineered *Salmonella typhimurium* inhibits tumorigenesis in advanced glioma[J]. OncoTargets and Therapy, 2015, 8: 2555-2563.
- [111] HE L, ZHANG Y W, MA G L, et al. Near-infrared photoactivatable control of Ca<sup>2+</sup> signaling and optogenetic immunomodulation[J]. eLife, 2015, 4: e10024.
- [112] DANINO T, PRINDLE A, KWONG G A, et al. Programmable probiotics for detection of cancer in urine[J]. Science Translational Medicine, 2015, 7(289): 289ra84.
- [113] HO C L, TAN H Q, CHUA K J, et al. Engineered commensal microbes for diet-mediated colorectal-cancer chemoprevention [J]. Nature Biomedical Engineering, 2018, 2(1): 27-37.
- [114] GURBATHRI C R, LIA I, VINCENT R, et al. Engineered probiotics for local tumor delivery of checkpoint blockade nanobodies[J]. Science Translational Medicine, 2020, 12(530): eaax0876.
- [115] YUE Y L, XU J Q, LI Y, et al. Antigen-bearing outer membrane vesicles as tumour vaccines produced *in situ* by ingested genetically engineered bacteria[J]. Nature Biomedical Engineering, 2022, 6(7): 898-909.
- [116] PAN H Z, LI L Y, PANG G J, et al. Engineered NIR light-responsive bacteria as anti-tumor agent for targeted and precise cancer therapy[J]. Chemical Engineering Journal, 2021, 426: 130842.
- [117] CHEN Y H, DU M, YUAN Z, et al. Spatiotemporal control of engineered bacteria to express interferon- $\gamma$  by focused ultrasound for tumor immunotherapy[J]. Nature Communications, 2022, 13: 4468.
- [118] ARCHER E J, ROBINSON A B, SÜEL G M. Engineered *E. coli* that detect and respond to gut inflammation through nitric oxide sensing[J]. ACS Synthetic Biology, 2012, 1(10): 451-457.
- [119] RIGLAR D T, GIESSEN T W, BAYM M, et al. Engineered bacteria can function in the mammalian gut long-term as live diagnostics of inflammation[J]. Nature Biotechnology, 2017, 35(7): 653-658.
- [120] NEURATH M F. Targeting immune cell circuits and trafficking in inflammatory bowel disease[J]. Nature Immunology, 2019, 20(8): 970-979.
- [121] INDA M, JIMENEZ M, LIU Q, et al. Ingestible capsule for detecting labile inflammatory biomarkers *in situ*[EB/OL]. bioRxiv, 2022[2022-12-01]. <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2022.02.16.480562v1>.
- [122] OLSZAK T, AN D D, ZEISSIG S, et al. Microbial exposure during early life has persistent effects on natural killer T cell function[J]. Science, 2012, 336(6080): 489-493.
- [123] YAN X, LIU X Y, ZHANG D, et al. Construction of a sustainable 3-hydroxybutyrate-producing probiotic *Escherichia coli* for treatment of colitis[J]. Cellular & Molecular Immunology, 2021, 18(10): 2344-2357.
- [124] CUI M H, PANG G J, ZHANG T, et al. Optotheranostic nano-system with phone visual diagnosis and optogenetic microbial therapy for ulcerative colitis At-home care[J]. ACS Nano, 2021, 15(4): 7040-7052.
- [125] MADDALONI M, KOCHETKOVA I, JUN S M, et al. Milk-based nutraceutical for treating autoimmune arthritis via the stimulation of IL-10- and TGF- $\beta$ -producing CD39<sup>+</sup> regulatory T cells[J]. PLoS One, 2015, 10(1): e0117825.
- [126] DEL CARMEN S, MARTÍN ROSIQUE R, SARAIVA T, et al. Protective effects of lactococci strains delivering either IL-10 protein or cDNA in a TNBS-induced chronic colitis model[J]. Journal of Clinical Gastroenterology, 2014, 48(Suppl 1): S12-S17.
- [127] HANSON M L, HIXON J A, LI W Q, et al. Oral delivery of IL-27 recombinant bacteria attenuates immune colitis in mice[J]. Gastroenterology, 2014, 146(1): 210-221.e13.
- [128] AUBRY C, MICHON C, CHAIN F, et al. Protective effect of TSLP delivered at the gut mucosa level by recombinant lactic

- acid bacteria in DSS-induced colitis mouse model[J]. *Microbial Cell Factories*, 2015, 14: 176.
- [129] SHIGEMORI S, WATANABE T, KUDOH K, et al. Oral delivery of *Lactococcus lactis* that secretes bioactive heme oxygenase-1 alleviates development of acute colitis in mice[J]. *Microbial Cell Factories*, 2015, 14: 189.
- [130] WEI P J, YANG Y, LIU Z B, et al. Oral Bifidobacterium longum expressing alpha-melanocyte-stimulating hormone to fight experimental colitis[J]. *Drug Delivery*, 2016, 23(6): 2058-2064.
- [131] MAYER L. Immunology of inflammatory bowel disease[J]. *Current Opinion in Gastroenterology*, 1990, 6(4): 556-560.
- [132] SCOTT B M, GUTIÉRREZ-VÁZQUEZ C, SANMARCO L M, et al. Self-tunable engineered yeast probiotics for the treatment of inflammatory bowel disease[J]. *Nature Medicine*, 2021, 27(7): 1212-1222.
- [133] MUTALIK V K, GUIMARAES J C, CAMBRAY G, et al. Precise and reliable gene expression *via* standard transcription and translation initiation elements[J]. *Nature Methods*, 2013, 10(4): 354-360.
- [134] ZHANG Y, ZOU Z P, CHEN S Y, et al. Design and optimization of *E. coli* artificial genetic circuits for detection of explosive composition 2, 4-dinitrotoluene[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2022, 207: 114205.
- [135] KOSURI S, GOODMAN D B, CAMBRAY G, et al. Composability of regulatory sequences controlling transcription and translation in *Escherichia coli*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(34): 14024-14029.
- [136] 孙怡, 张腾, 吕波, 等. 胞内生物传感器提高微生物细胞工厂的精细调控[J]. *化工学报*, 2022, 73(2): 521-534.
- SUN Y, ZHANG T, LYU B, et al. Improvement for fine regulation of microbial cell factory by intracellular biosensors[J]. *CI-ESC Journal*, 2022, 73(2): 521-534.



**通讯作者:** 管宁子(1987—),女,副研究员,硕士生导师。研究方向为微生物医学合成生物学,包括智能微生物药物工厂设计构建、益生菌传感器开发、原核细胞使能技术开发、精准可控的肿瘤免疫治疗等。

E-mail: nzguan@bio.ecnu.edu.cn



**第一作者:** 高纤云(1999—),女,硕士研究生。研究方向为益生菌传感器的开发与应用。

E-mail: Xianyun\_gao@163.com