

肠道菌群与代谢性疾病专题

· 综述 ·

工程菌在代谢性疾病治疗中应用的研究进展

周芳鸣 鲁一兵

南京医科大学第二附属医院内分泌科, 南京 210011

通信作者: 鲁一兵, Email: luyibing2004@126.com

【摘要】 工程菌, 即改造的肠道微生物, 合成生物学利用各类编辑工具和回路设计控制其行为, 对机体产生特定的影响, 从而在代谢性疾病的治疗中精准发挥作用。对于代谢性疾病, 包括糖尿病、肥胖、高脂血症、高尿酸血症、高氨血症及苯丙酮尿症, 已有研究成功构建相关工程菌, 通过分泌特定的治疗因子, 能够针对疾病的发病机制对机体产生有益影响, 有少量研究已进入临床试验。

【关键词】 工程菌; 代谢性疾病; 糖尿病; 肥胖

基金项目: 江苏省卫生健康委科研项目 (ZDB2020034)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121383-20210322-03057

Research progress of engineering bacteria in the treatment of metabolic diseases Zhou Fangming, Lu Yibing. Department of Endocrinology, The Second Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210011, China

Corresponding author: Lu Yibing, Email: luyibing2004@126.com

【Abstract】 Engineering bacteria, that is, modified intestinal microorganisms, use various editing tools and circuit design to control their behavior, and have a specific impact on the body, so as to play a precise role in the treatment of metabolic diseases. For metabolic diseases, including diabetes, obesity, hyperlipidemia, hyperuricemia, hyperammonemia and phenylketonuria, related engineering bacteria have been successfully constructed. By secreting specific therapeutic factors, engineering bacteria can have beneficial effects on the body according to the pathogenesis of diseases. A small number of studies have entered clinical trials.

【Keywords】 Engineering bacteria; Metabolic diseases; Diabetes mellitus; Obesity

Fund program: Scientific Research Project of Jiangsu Provincial Health and Health Commission (ZDB2020034)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121383-20210322-03057

1 工程菌

工程菌, 经合成生物学改造的新型微生物, 选择合适的底盘菌株, 利用生物元件, 设计基因路线, 改造其成为能持续在特定部位, 表达目标因子, 发挥特定作用或者参与宿主代谢的菌株。

首先, 底盘菌株是非致病性、易于遗传操作的, 最理想的是天然适用于要发挥作用的部位。既往研究中, 学者将健康个体微生物群的天然细菌菌株用于治疗患者, 包括乳酸菌、大肠杆菌等, 实践检验可知, 在工程菌的构建开发中这些菌株是合适的底盘选择^[1]。改造过程主要利用两大手段, 一为编辑工具, 二为回路设计。构建工程菌常用的肠道微生物, 均已有相对成熟的编辑工具。如: 改造乳酸杆菌时,

常使用 pWV01、pSH71、pAM β -1 等穿梭质粒^[2-3]。工程菌基因回路的工作机制可简单概括为: 感应元件感应信号, 开启下游相应开关, 计算元件处理信号, 操控细菌行为, 报告元件则主要为下游目的蛋白的表达。

相较于传统药物, 工程菌的优势明显。一是可产生多种治疗因子, 治疗一种或多种疾病; 二是只出现在病灶组织附近, 可实现用量的最小化, 减少副作用; 三是能持续地产生, 相当于延长作用时间, 产生更优疗效^[4]。

2 工程菌与代谢性疾病

2.1 工程菌与糖尿病 糖尿病的治疗是涉及饮食、运动、血糖监测、糖尿病自我管理教育和药物治疗在

内的综合性策略。在药物治疗上,2 型糖尿病的药物主要有磺脲类、格列奈类、二肽基肽酶Ⅳ抑制剂、双胍类、噻唑烷二酮类、 α -糖苷酶抑制剂、钠-葡萄糖共转运蛋白 2 抑制剂和胰岛素;1 型糖尿病的药物除了传统的口服药物和胰岛素外,胰岛移植、免疫治疗也有不俗疗效^[5]。与上述药物相比,新兴的工程菌治疗的针对性强、副作用小,可避免注射引起的疼痛,也具有极大的应用优势。

1 型糖尿病是由自身免疫反应所致的生产胰岛素细胞被破坏而引起的。针对发病机制,抗原特异性方法在有效安全恢复免疫耐受方面有极大潜力,而口服蛋白抗原是诱导耐受性的首选方法。研究者设计了一种用于治疗 1 型糖尿病的人肠道乳酸球菌菌株。经修饰的乳酸球菌能够分泌完整的胰岛素原自身抗原和具有生物活性的免疫调节细胞因子白细胞介素-10 (Interleukin-10, IL-10),与低剂量非特异性免疫调节剂抗 CD3 进行联合给药治疗。结果显示,与对照组相比,实验组 59% 的非肥胖糖尿病小鼠的自身免疫性糖尿病得到稳定恢复^[6]。在另一项研究中,研究者将乳酸球菌构建含有表达人 GAD65₃₇₀₋₅₇₅ 自身抗原和抗炎细胞因子 IL-10 的质粒。将其口服给药于新近发病的非肥胖糖尿病小鼠,在治疗的前 4 d 还给予全身性的低剂量抗 CD3。结果显示,治疗后的小鼠显示出 67% 的糖尿病逆转,并在治疗终止后保持 8 周。由此可知,所构建工程菌的使用恢复了 1 型糖尿病患者对 β 细胞特异性抗体的免疫耐受^[7]。

胰高血糖素样肽-1 (glucagon-like peptide-1, GLP-1) 可调节葡萄糖代谢平衡。有研究表明,其全长形式 GLP-1₁₋₃₇ 可刺激大鼠和人肠上皮细胞向胰岛素分泌细胞转化。在 Duan 等^[8]的研究中,将加氏乳酸杆菌 ATCC 33323 (L) 转化为分泌 GLP-1₁₋₃₇ 的菌株。实验结果显示:饲喂 GLP-1₁₋₃₇ 分泌细菌的糖尿病大鼠的胰岛素水平显著升高,葡萄糖耐受性显著增强。另有研究者将分泌 GLP-1₁₋₃₇ 的细菌应用于链脲佐菌素诱导的 1 型糖尿病大鼠,结果显示:饲喂 50 d 后的糖尿病大鼠与对照组相比,有更高的胰岛素水平和糖耐量^[9]。此外,含 GLP-1 的乳酸球菌也用于 2 型糖尿病的治疗中^[10]。携带编码 GLP-1 质粒载体的工程乳酸杆菌被口服给药于 Zucker 糖尿病肥胖大鼠,胰腺 β 细胞系 HIT-T15 的胰岛素分泌被显著刺激,并且在给药后 2~11 h 内血糖水平降低。虽然用于治疗糖尿病的工程菌在

动物模型方面取得了很大进展,但目前报道的临床试验很少。

2.2 工程菌与肥胖 由各项研究可知,适当改变肠道微生物群可能是长期预防和治疗肥胖的新策略。改善肠道微生物群的一种潜在策略是,加入基因改造的细菌,表达治疗因子,增加饱腹感和对脂肪引发的负反馈信号的敏感性。

N-酰基乙醇酰胺 (N-acylethanolamides, NAEs) 是已知的饱腹感分子,N-酰基磷脂酰乙醇胺 (N-acyl-phosphatidylethanolamines, NAPEs) 是它的前体物质,肠道中 NAPEs 的生物合成可以减少食物摄入量^[11]。据观察,在肥胖个体中 NAPEs 的产生减少。Chen 等^[12]开发了一种表达 NAPEs 的大肠杆菌 Nissle1917 (EcN) 菌来补偿这种减少。改造后的 EcN 在拟南芥中获得了表达 *Atlg78690* 基因的质粒,该基因编码一种 N-酰基转移酶,可催化 NAPEs 的合成。在喂食高脂饮食的小鼠中,以 5×10^{12} CFU/L 饮用水的量添加该工程菌 8 周,与对照组小鼠相比,实验组小鼠的体重增加量和脂肪堆积减少。给药结束后,改良 EcN 的这种调节作用维持了 6 周,这表明活性合成菌疗法在肥胖症的治疗中有希望。

2.3 工程菌与高脂血症 高脂血症可引发冠心病、脑血管病及胰腺炎等多种疾病,降脂对这些相关疾病的治疗至关重要,临床上主要依靠生活方式干预和口服调脂药物进行控制。

研究表明,改造后的乳杆菌分泌 GLP-1 可整体上改善胆固醇代谢,显著降低大鼠血清中的低密度脂蛋白-胆固醇和甘油三酯,载脂蛋白 apoB-48 水平也得到显著降低^[13]。吡咯喹啉醌 (pyrroloquinoline quinone, PQQ) 是一种强效抗氧化剂化合物,EcN 可用于在机体内分泌输送 PQQ。在体内结肠短链脂肪酸 (short-chain fatty acid, SCFAs) 水平的升高与 PQQ 紧密相关,PQQ 和 SCFAs 联合作用可改善高脂血症^[14]。Somabhai 等^[15]通过将果糖脱氢酶 (fructose dehydrogenase, FDH) 和甘露醇脱氢酶 (mannitol dehydrogenase, MTLK) 分别与运动发酵单胞菌 (*Zymomonas mobilis*) 编码的葡萄糖转运蛋白 GLF 结合,对产生 PQQ 的 EcN 进行基因修饰,使其在肠道中将果糖转化为 5-酮果糖和甘露醇。结果发现,小鼠体内的 SCFAs 和 PQQ 均出现上升,显著抑制了肝脏甘油三酯和胆固醇水平的升高,也表明可抑制肝脏脂肪变性的形成。

2.4 工程菌与高尿酸血症 临床常用的降尿酸药

物主要通过减少嘌呤产生和增加尿酸的排泄发挥作用,但药物使用有限制、疗效不如人意或存在一定副作用,而工程菌在增加尿酸排泄方面展示了很好的疗效。

研究者利用重组技术,将短乳杆菌的 S 层蛋白信号肽基因引入 *UOX* 基因的 N 端,该基因是指导尿酸酶细胞外分泌的信号肽基因。因此,在肠内定居的表达尿酸酶的工程菌可分泌内源性尿酸酶^[16]。肠道中的尿酸酶可将尿酸转化为尿囊素后随粪便排出,既能降低肠道内尿酸重吸收回血液的水平,也促进尿酸的排泄。结果显示,表达尿酸酶基因的重组大肠杆菌在高尿酸血症大鼠肠道中定植,相较于对照组,该组大鼠血清尿酸水平显著降低,排泄物中尿囊素含量显著升高。结合大鼠的饮水量、摄食量、体重变化、嗜酸性粒细胞计数和肠道组织病理学结果分析可知,对高尿酸血症模型大鼠予重组尿酸酶基因大肠杆菌工程菌灌胃未对其造成机体损害,均正常生长。

2.5 工程菌与高氨血症 高氨血症是由于参与尿素循环的酶和转运蛋白的缺陷导致血液中氨含量过高。口服益生菌瑞士乳杆菌 NS8 菌株可缓解高氨血症大鼠的认知下降和焦虑样行为,这表明用肠道菌群从肠道中去除氨可作为高氨血症的潜在治疗方法^[17]。

Shen 等^[18]采用改造的菌群 (ASF) 治疗高氨血症性脑病和神经毒性,ASF 是由 8 种肠道共生物组成的联合体,ASF 的定殖能建立新微生物群,导致脲酶活性和氨生成的降低。将 ASF 移植到肝损伤小鼠模型中,成功地降低了血氨水平,并改善了其存活率和行为表现。Kurtz 等^[19]改造 *EcN*,以产生能将氨显著转化为 L-精氨酸的益生菌菌株 SYNBI020。在该菌株中,编码负调节因子的基因 *thyA* 和 *argR* 被删除,以激活参与精氨酸生物合成和运输的几个基因的转录。此外,编码反馈抗性 N-乙酰谷氨酸合酶的基因 *argA215* 被整合到基因组中以增强精氨酸的生物合成。在高氨血症小鼠模型中,用 SYNBI020 可降低血氨水平并提高存活率至 50%。该菌株被进一步推进到 1 期临床研究,并显示出剂量依赖性活性。最近,SYNBI020 已进入 1b/2a 临床试验阶段,测试其安全性、药效学和耐受性 (NCT03447730)。

2.6 工程菌与苯丙酮尿症 苯丙酮尿症 (Phenylketonuria, PKU) 是一种由苯丙氨酸羟化酶 (Phenyl-

alanine hydroxylase, PAH) 缺陷引起的氨基酸代谢病。苯丙氨酸解氨酶 (phenylalanineammonialyase, PAL) 和 L-氨基酸脱氨酶 (L-amino acid deaminase, LAAD) 能将苯丙氨酸转化,这两种酶有可能应用于 PKU 的治疗。

在一项研究中,携带 PAL 的工程罗伊乳酸杆菌可降低 PKU 小鼠模型的血苯丙氨酸,且工程菌在治疗后 8 个月从肠道中消失^[20]。最近,有研究者将 PAL 和 LAAD 引入 *EcN*,构建出工程菌 SYNBI1618,被编程的益生菌株可分泌 PAL、LAAD 这两种在肠道缺氧条件下被激活的酶。与对照组相比,用 SYNBI1618 口服治疗 PKU 小鼠模型的血苯丙氨酸降低 38%。此外,给健康食蟹猴服用 SYNBI1618 后,发现其抑制了饮食诱导血苯丙氨酸的增加^[21]。Crook 等^[22]证明了在 PKU 的小鼠模型中使用工程 *EcN* 菌株可使血苯丙氨酸降低达 50%,同时发现编码 PAL 的活性在体内是稳定的,工程菌的基因组或质粒没有发生重大变化。这种治疗目前正在临床试验 (NCT03516487) 中,研究其安全性及药理学动力学,以确定在人体内的有效剂量^[23]。

3 工程菌应用的安全性

在安全性方面,目前选择的底盘菌株属于无毒菌株,体内应用时是无害的。重组 DNA 在染色体上的稳定整合是最简单的减少基因流的方法,或是依靠基于复制的条件起源的相互依赖的宿主-质粒平台和缺陷生长等^[24]。此外,工程菌必须有自己的遏制策略,现有的生物封闭技术多数基于营养缺陷设计。在大肠杆菌菌株中插入特定的氨酰-tRNA 合成酶,重新分配 UAG 来编码非标准氨基酸,将其整合到必需蛋白的功能区,缺乏时因其不能用天然化合物补充,工程菌株生存的必需基因无法表达,不能存活^[25]。另有封闭技术采用宿主细胞的功能元件,弥补工程菌株的基因缺陷,使其只能在特定宿主细胞中存活。有研究探讨了开发工程菌作为药物的监管考虑因素,提供评估其药代动力学和药效学特性的策略,并考虑工程微生物的可制造性以及支持患者需求的配方和剂量^[26]。已有相关项目进入临床试验,但仍须进一步的研究来检验保障其安全性。

4 小结

工程菌作为一种新兴治疗手段,在研究者们的探索单中占有一席之地。上述代谢性疾病中,都已在动物水平上构建工程菌并带来可见疗效,有项目已进入临床试验。工程菌,不仅在治疗上更具精准

性,且可用于疾病诊断及病情监测,若能通过进一步的研究解决改造环节中的生物安全问题,在未来将有更大的发展,更多地应用于临床诊疗。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] Chua KJ, Kwok WC, Aggarwal N, et al. Designer probiotics for the prevention and treatment of human diseases[J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2017, 40: 8-16. DOI: 10. 1016/j. cbpa. 2017. 04. 011.
- [2] Bober JR, Beisel CL, Nair NU. Synthetic biology approaches to engineer probiotics and members of the human microbiota for biomedical applications[J]. *Annu Rev Biomed Eng*, 2018, 20: 277-300. DOI: 10. 1146/annurev-bioeng-062117-121019.
- [3] 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[J]. *Cancer Gene Ther*, 2003, 10 (2): 105-111. DOI: 10. 1038/sj. cgt. 7700530.
- [4] Piñero-Lambea C, Ruano-Gallego D, Fernández LÁ. Engineered bacteria as therapeutic agents. *Curr Opin Biotechnol* [J]. 2015, 35: 94-102. DOI: 10. 1016/j. copbio. 2015. 05. 004.
- [5] Herold KC, Bundy BN, Long SA, et al. An Anti-CD3 antibody, teplizumab, in relatives at risk for type 1 diabetes[J]. *N Engl J Med*, 2019, 381 (7): 603-613. DOI: 10. 1056/NEJMoa1902226.
- [6] 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]. *J Clin Invest*, 2012, 122 (5): 1717-1725. DOI: 10. 1172/JCI60530.
- [7] 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[J]. *Diabetes*, 2014, 63 (8): 2876-2887. DOI: 10. 2337/db13-1236.
- [8] Duan FF, Liu JH, March JC. Engineered commensal bacteria reprogram intestinal cells into glucose-responsive insulin-secreting cells for the treatment of diabetes[J]. *Diabetes*, 2015, 64 (5): 1794-1803. DOI: 10. 2337/db14-0635.
- [9] Holmes D. Diabetes. Genetically engineered *Lactobacilli* reprogram intestinal cells to secrete insulin and ameliorate hyperglycaemia[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2015, 11 (4): 192. DOI: 10. 1038/nrendo. 2015. 45.
- [10] Agarwal P, Khatri P, Billack B, et al. Oral delivery of glucagon like peptide-1 by a recombinant *Lactococcus lactis* [J]. *Pharm Res*, 2014, 31 (12): 3404-3414. DOI: 10. 1007/s11095-014-1430-3.
- [11] Gillum MP, Zhang D, Zhang XM, et al. N-acylphosphatidylethanolamine, a gut-derived circulating factor induced by fat ingestion, inhibits food intake[J]. *Cell*, 2008, 135 (5): 813-824. DOI: 10. 1016/j. cell. 2008. 10. 043.
- [12] Chen Z, Guo L, Zhang Y, et al. Incorporation of therapeutically modified bacteria into gut microbiota inhibits obesity[J]. *J Clin Invest*, 2014, 124 (8): 3391-3406. DOI: 10. 1172/JCI72517.
- [13] Ryan PM, Patterson E, Kent RM, et al. Recombinant incretin-secreting microbe improves metabolic dysfunction in high-fat diet fed rodents[J]. *Sci Rep*, 2017, 7 (1): 13523. DOI: 10. 1038/s41598-017-14010-x.
- [14] Singh AK, Pandey SK, Naresh Kumar G. Pyrroloquinoline quinone-secreting probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 ameliorates ethanol-induced oxidative damage and hyperlipidemia in rats[J]. *Alcohol Clin Exp Res*, 2014, 38 (7): 2127-2137. DOI: 10. 1111/acer. 12456.
- [15] Somabhai CA, 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. DOI: 10. 1371/journal.pone. 0164860.
- [16] Cai L, Li Q, Deng Y, et al. Construction and expression of recombinant uricase-expressing genetically engineered bacteria and its application in rat model of hyperuricemia[J]. *Int J Mol Med*, 2020, 45 (5): 1488-1500. DOI: 10. 3892/ijmm. 2020. 4512.
- [17] Sarkissian CN, Shao Z, Blain F, et al. A different approach to treatment of phenylketonuria: phenylalanine degradation with recombinant phenylalanine ammonia lyase[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999, 96 (5): 2339-2944. DOI: 10. 1073/pnas. 96. 5. 2339.
- [18] Shen TC, Albenberg L, Bittinger K, et al. Engineering the gut microbiota to treat hyperammonemia[J]. *J Clin Invest*, 2015, 125 (7): 2841-2850. DOI: 10. 1172/JCI79214.
- [19] Kurtz CB, Millet YA, Puurunen MK, et al. An engineered *E. coli* Nissle improves hyperammonemia and survival in mice and shows dose-dependent exposure in healthy humans[J]. *Sci Transl Med*, 2019, 11 (475): eaau7975. DOI: 10. 1126/scitranslmed. aau7975.
- [20] Durrer KE, Allen MS, 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. DOI: 10. 1371/journal.pone. 0176286.
- [21] Isabella VM, Ha BN, Castillo MJ, et al. Development of a synthetic live bacterial therapeutic for the human metabolic disease phenylketonuria[J]. *Nat Biotechnol*, 2018, 36 (9): 857-864. DOI: 10. 1038/nbt. 4222.
- [22] Crook N, Ferreira A, Gasparrini AJ, et al. Adaptive strategies of the candidate probiotic *E. coli* nissle in the mammalian gut[J]. *Cell Host Microbe*, 2019, 25 (4): 499-512. DOI: 10. 1016/j. chom. 2019. 02. 005.
- [23] Puurunen MK, Vockley J, Searle SL, 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]. *Nat Metab*, 2021, 3 (8): 1125-1132. DOI: 10. 1038/s42255-021-00430-7.
- [24] Wright O, Delmans M, Stan GB, et al. GeneGuard: a modular plasmid system designed for biosafety[J]. *ACS Synth Biol*, 2015, 4 (3): 307-316. DOI: 10. 1021/sb500234s.
- [25] Mandell DJ, Lajoie MJ, Mee MT, et al. Biocontainment of genetically modified organisms by synthetic protein design[J]. *Nature*, 2015, 518 (7537): 55-60. DOI: 10. 1038/nature14121.
- [26] Charbonneau MR, Isabella VM, Li N, et al. Developing a new class of engineered live bacterial therapeutics to treat human diseases[J]. *Nat Commun*, 2020, 11 (1): 1738. DOI: 10. 1038/s41467-020-15508-1.

(收稿日期:2021-03-22)