

## 肠道免疫的安全靶向载体:大肠杆菌 Nissle1917

夏芃芃, 朱军, 朱国强\*

扬州大学兽医学院, 禽类预防医学教育部重点实验室, 扬州 225009

**摘要:** 长期以来, 如何激发高效的肠道黏膜免疫应答来预防肠道感染始终是较为棘手的问题。本文旨在对大肠杆菌 (*Escherichia coli*) Nissle 1917 作为肠道黏膜免疫的安全靶向载体, 调理胃肠道菌群紊乱、缓解溃疡性结肠炎以及利用益生菌固有特性或优化特性进行治疗的可能性等相关研究进展作一综述。大肠杆菌 Nissle 1917 (*EcN*) 是一株可口服的优良益生菌, 也可作为生物载体活苗候选株, 兼有较强的肠道局部定殖能力和无免疫原性的特性。该菌株还可以作为载体靶向递呈 TAT-凋亡素融合蛋白治疗结肠直肠癌, 并在研发靶向递呈防御素治疗溃疡性结肠炎和克罗恩病上具有重要的功能。其基因修饰株能够原位递呈特定的抗原分子, 有效激发特异性的黏膜免疫应答。重组大肠杆菌 Nissle-HA110-420 具有体外表达特异性抗原的能力, 但 *EcN* 菌体本身不会引起黏膜免疫应答, 也不影响对自身抗原的外周免疫耐受。同时, *EcN* 具有很好的安全性, 尤其是因炎症导致肠道防御屏障破坏的时候, 重组大肠杆菌 Nissle-HA110-420 在健康或患有急性结肠炎的小鼠体内都没有迁移、克隆扩增和激活特异性 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞的作用。

**关键词:** 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) Nissle 1917, 靶向分子递呈, T 细胞应答, 免疫调节

**中图分类号:** R392      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209 (2013)06-0538-07

患有慢性肠道炎症的患者往往都要接受长期的药物治疗。无论口服或是注射给药, 当前使用的大多数药物的有效成分只有很少一部分能够达到预期的靶点部位。因药物低效递呈而大剂量给药通常会造成本人健康组织和器官出现众多副作用。因此, 研发药物局部分布的新方法十分重要, 而肠道炎症研究的主要任务是研发治疗药物精确靶向于肠黏膜的新方法。鉴于肠道微生物菌群在肠道炎症过程中所起的关键作用<sup>[1-2]</sup>, 作用于肠道微生物区系是一条可行的治疗途径。近几年, 传统治疗方案正被重新考虑作为治疗选择, 例如选用益生菌替代抗生素

来调理胃肠道菌群紊乱和缓解溃疡性结肠炎。而随着分子生物学技术的日益发展, 利用益生菌固有特性或优化特性进行治疗已成为可能。

乳酸杆菌和双歧杆菌, 都是发现于酸奶或发酵类乳制品中的微生物, 是最早用作益生菌的肠道外正常菌群。基因修饰乳酸菌最近常被提议用作胃肠道药物分子的递送系统, 并已成功构建出一些分泌表达载体, 目前正在使用动物模型进行测试<sup>[1]</sup>。Steidler 等<sup>[3]</sup>通过遗传修饰乳酸乳球菌基因组来表达高水平的 IL-10。重复使用分泌 IL-10 的重组乳酸乳球菌灌胃可以使葡聚糖硫酸钠 (dextran sodium

**基金项目:** 国家自然科学基金 (30571374, 30771603, 31072136, 31270171); 江苏省属高校自然科学重大基础科研项目 (08KJA230002); 江苏高校优势学科建设工程资助项目; 教育部创新团队; 科技部转基因生物新品种培育重大专项 (2009ZX08006-004B)

\* 通信作者。Tel: +86-514-87972590; Fax: +86-514-87972218; E-mail: yzgzhu@hotmail.com, yzgzhu@yzu.edu.cn

**作者简介:** 夏芃芃 (1988-), 女, 江苏盱眙人, 硕士研究生, 主要从事病原微生物致病机理及免疫机理研究。E-mail: syxyBonnie@yeah.net

**收稿日期:** 2012-11-27; **修回日期:** 2013-02-07

sulfate, DSS) 诱导的小鼠结肠炎的发病率降低 50%, 并且可预防 IL-10<sup>-/-</sup> 小鼠结肠炎的发生。然而, 肠道是一种具有排异性的环境, 常导致这些细菌因机械冲刷作用而从体内排出, 再者, 乳酸杆菌、植物乳杆菌和双歧杆菌等革兰氏阳性菌胞壁转运系统也具有差异性和应用局限性<sup>[4]</sup>。而经过遗传修饰的肠道共栖菌则具有更优秀的定殖特性, 以大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 为例, 益生菌大肠杆菌胞内外源蛋白表达量高; 周质间隙氧化环境可模拟真核细胞内质网环境, 有利于新生肽链折叠、组装成具有天然结构和可溶性的活性重组蛋白; 对肠道组织和细胞生态小境的亲嗜性、存活力和增殖能力强, 在大肠中的数量相对较高; 适于口服免疫接种, 特别是超前口服免疫且方便廉价。近年来在疫苗载体的研究中日益受到重视, 尤其是在基因工程粘膜疫苗方面显现出独特的优越性。

## 1 大肠杆菌 Nissle1917 是优良的益生菌和载体菌

值得注意的是, 大肠杆菌 Nissle 1917 (*EcN*, O6: K5:H1) 于 1917 年分离自腹泻严重流行区周围的健康者的粪便, 是非致病性肠道粪便分离株, 在 19 世纪 20 年代就用作益生菌制剂类药品治疗肠道的慢性炎症和感染性疾病。至今, 该益生菌已在医学和养牛产业中广泛使用, 同时该菌株还具备小鼠用优良益生菌特性, 且在体外能粘附猪肠道上皮细胞并可在健康猪体肠道分离鉴定。该益生菌作为较为理想的安全载体菌能表达重组蛋白, 使产生靶向抗原的系统发生体液免疫和局部粘膜应答<sup>[5-6]</sup>。通过把相关抗性基因导入该菌本身携带的 2 个大质粒 pMUT1 和 pMUT2 中, 获取去除 2 个隐性质粒的克隆(菌), 且其优势在于, 与野生型 *EcN* 比较, 其生长速度和生长对数期几乎一致, 但能兼容接受高、中、低不同拷贝数质粒, 具有较高的外源 DNA 转化效率, 和基因工程菌大肠杆菌 DH5 $\alpha$  和 JM109 等一样, 能作为大肠杆菌工程菌的基因转化、表达操作系统(作者实验室未发表数据)。基于限制性内切酶、连接酶和不同拷贝数质粒为基础的 DNA 重组技术, 极大地推动了体外基因结构和功能研究, 传统 RecA 依赖性大肠杆菌体内同源重组技术克服了限制性内切酶位点限制, 依据 Rac 噬菌体的 ET 重组、 $\lambda$  噬菌

体的 Red 重组和新近 mini $\lambda$ Red 表达盒重组系统而建立起的重组基因工程操作平台, 可简便有效地对细菌染色体基因组、复杂的 DNA 片段如粘附素操纵子基因进行改造和构建。利用携带有条件性复制原点和噬菌体附着 (attP) 位点的 CRIM (conditional-replication, integration, and modular, CRIM) 质粒-宿主系统可针对性开展细菌染色体基因组靶向系统研究。Haldimann 等<sup>[7]</sup> 利用噬菌体点特异性重组酶功能完成同源重组, 将构建的靶基因、多基因或基因文库以单拷贝体分别直接整合到宿主菌染色体, 并能轻易地去除该系统中的温度敏感性辅助质粒和条件性复制 CRIM 质粒, 从而实现 CRIM 质粒-宿主系统介导的染色体靶向系统的构建。Zhou 等<sup>[8]</sup> 和作者实验室都能利用该系统成功表达靶向标记蛋白, 如 GFP 蛋白和粘附素(定植因子)等(作者实验室未发表数据)。由于 *EcN* 具有以下几个显著特性, 即: (1) 细菌素合成和六铁摄取系统有益于该菌与肠道内的其它细菌竞争或适应肠道环境; (2) 无论排泄物中细菌计数有多高, 在悉生小猪或小鼠体内都不会引起结肠炎; (3) 作为治疗药物或者是治疗性分子给药系统, 不会引起肠道疾病和/或上皮细胞屏障功能紊乱。因此, *EcN* 满足作为生物治疗剂的几乎所有要求, 被公认为是安全的医用微生物。

## 2 大肠杆菌 Nissle 1917 作为肠道定向给药载体

近年来的研究发现, 经过遗传修饰的乳酸菌可以分泌高水平的 IL-10 分子, 用其对患有炎症性肠病 (intestinal bowel disease, IBD) 的小鼠进行灌胃治疗, 可起到很好的疗效。但该模型使用的小鼠必须每日接种高剂量的转化菌以确保一定量肠道菌的定殖, 且该转化菌曾被报道会引起免疫抑制或使局部潜在化脓患者发生菌血症。与此不同的是, *EcN* 经口投服一次即可完成肠道定殖, 稳定表达抗原长达两周, 甚至无需给予抗生素治疗<sup>[9]</sup>。由于兼有强定殖能力和无免疫原性的特性, *EcN* 已被用作特异性肠道靶向治疗药物的转运载体来治疗肠道炎症<sup>[10]</sup>。

Westendorf 等<sup>[5]</sup> 针对 *EcN* 作为肠黏膜定向给药载体进行研究, 通过采用与弥散粘附有关的粘附素 (adhesin-involved-in-diffuse-adherence, AIDA) 自身转运系统, 构建出能够在菌体表面展呈背景清晰的

HA110-120 模式肽的重组 *EcN* 菌;同时构建高度特异和敏感的 TCR-HA 转基因小鼠模型系统用于检测。Chen 和 Jenkins 在此前已经成功运用类似的系统研究特异性识别微生物的 CD4<sup>+</sup> T 细胞的克隆扩增和解剖位置<sup>[11]</sup>。

在体外实验中,自身展呈 HA110-120 抗原肽的重组 *EcN* 能够有效刺激特异性识别 HA110-120 的 T 细胞增殖。而有 HA 特异性 CD4<sup>+</sup> T 细胞的小鼠口服大肠杆菌 Nissle-HA110-120 后,观察不到因重组菌抗原在肠道表达后引起 HA 特异性 CD4<sup>+</sup> T 细胞迁移、增殖和活化的明显变化。但是阳性对照组小鼠在灌服具侵袭性的致弱沙门氏菌 (*Salmonella*aroA 突变株) 重组菌株 *S. aroA-HA110-120* 后可见 HA 特异性 T 细胞增殖,并伴随着 CD69 和 CD25 表达的上调<sup>[5]</sup>。

Apostolou 和 von Boehmer<sup>[12]</sup> 使用特异识别 HA 的 INS-HA × TCR-HA 双转基因小鼠作为自身免疫模型,研究重组 *EcN* 在 T 细胞耐受和自身免疫中的作用。实验证明,可溶性的二聚体肽—MHCII 嵌合体可有效的下调 CD4<sup>+</sup> T 细胞介导的自身免疫应答。为了研究 *EcN* 在双转基因小鼠肠道中表达的 HA110-120 是否有利于减少对 T 细胞的耐受,或者是作用于致糖尿病的 CD4<sup>+</sup> T 细胞的减量调节,通过将 *EcN* 和 Nissle-HA110-120 分别接种于 INS-HA × TCR-HA 双转基因怀孕母鼠,获得带有 HA 重组菌的新生杂交小鼠,并进行定殖实验,结果表明 Nissle-HA110-120 的定殖对小鼠自身免疫疾病的诱导发生没有影响。

葡聚糖硫酸钠 (dextran sulfate sodium, DSS) 可诱导啮齿类动物的结肠炎,伴随着诸如巨噬细胞的非淋巴细胞活化和促炎症细胞因子的释放。以 DSS 诱导的结肠炎作为不依赖 T 细胞的 IBD 模型<sup>[13]</sup>,并通过利用先天 T 淋巴细胞缺失的 RAG-1<sup>-/-</sup> 小鼠进行转基因 T 细胞的过继转移实验,确保该模型中只有 HA 特异性 CD4<sup>+</sup> T 细胞能够作为 DSS 诱导性结肠炎的效应细胞。通过在饮水中添加 6% DSS 来诱导急性结肠炎,再经腹腔注射特异识别 HA 的 CD4<sup>+</sup> T 细胞,3 天后,灌服 Nissle-HA110-120。结果表明,即使在肠道发生炎症,上皮的屏障作用已经受到破坏时,Nissle-HA110-120 并没有特异性激活黏膜 T 细胞免疫。进一步证明了 *EcN* 是一种具有靶向治疗肠道疾病潜力的安全载体。

### 3 利用大肠杆菌 Nissle1917 构建 3 组分载体系统用于口服免疫

Buddenborg 等<sup>[6]</sup> 通过 AIDA 自身转运系统进行表面展呈表达和释放重组多肽,构建出表达不同候选疫苗蛋白的重组株,包括 StxB 亚单位、OspA 和 OspG 蛋白。Hondo 等<sup>[14]</sup> 研究发现,散在分布于覆盖有派伊尔氏淋巴集结的滤泡上皮 (FAE) 的 M 细胞在小肠粘膜免疫中具有重要作用,可以通过细胞角蛋白 CK18 和 CK20 进行检测。Pasetti 等的研究表明,粘膜免疫应答的疫苗能够以口服的方式给药,也需要 M 细胞的展呈作用<sup>[15]</sup>。Siebers 等<sup>[16]</sup> 的研究也证实 M 细胞对上皮粘膜屏障的损伤也有一定的修补作用。众所周知,粘膜是机体与外界环境接触的最前沿,是机体的第一道屏障。但是目前使用的疫苗大多都作用于全身性免疫系统,并不关注于高效的粘膜保护能力,而很多病原菌是直接作用于宿主胃肠道、呼吸道和泌尿道的粘膜来引发疾病,同时粘膜免疫必须通过抗原直接递呈作用于粘膜才能获得。因此,研发的粘膜免疫疫苗尤其是口服的活疫苗在临床上会有很好的疗效<sup>[15]</sup>。

Willer 和 Bumann 等<sup>[17-18]</sup> 的研究表明:沙门氏菌和大肠杆菌作用于小肠时都可进入小肠的派伊尔氏淋巴集结,诱导从质与量上都难以区分的炎症反应;而在最初的炎症反应后,才会表现出显著的差异。沙门氏菌随后会增殖并且诱导嗜中性粒细胞的炎症浸润不断增强,这对机体是有害的。而大肠杆菌则迅速从组织中清除,从而使炎症进一步消散,这种迅速的变化避免了重复暴露在病原菌下引起慢性炎症反应的可能。因此,Buddenborg 等<sup>[6]</sup> 研发的粘膜免疫疫苗载体系统是由活载体大肠杆菌益生菌株、AIDA 自动转运系统以及相应的抗原 3 部分组成。研究表明,通过 3 组分载体系统 (tripartite vector system) 研制出的口服活疫苗可以诱导产生可观的粘膜免疫应答,但目前还存在很大的变数。张伟的研究也表明,尽管大肠杆菌 Nissle 1917-pnrBMisL-fedF 重组菌通过口服接种 ICR 小鼠后能刺激有效的免疫应答,并在体内产生特异性的 FedF 抗体,但应答不灵敏且持续时间不长<sup>[19]</sup>。所以,找出克服大肠杆菌在肠道中迅速清除以及导入质粒的稳定性不易控制的方法是解决这些问题的关键。

## 4 大肠杆菌 Nissle1917 作为防御素递呈载体治疗溃疡性结肠炎和克罗恩病

Schultz 等<sup>[10]</sup> 研究发现 *EcN* 具有诱导鞭毛蛋白介导的  $\beta$  防御素 2 (HBD2) 在肠道上皮细胞分泌表达的能力, 其中细菌素 H47 和 M 鞭毛蛋白作为主要的鞭毛亚单位在体内免疫系统中担当有效激活的作用, 对于治疗溃疡性大肠炎和人的克罗恩病 (Crohn's disease) 也具有很高的研究价值。Wehkamp 等研究发现, 利用益生菌诱导防御素在肠道上皮细胞的合成和分泌可以有效地治疗溃疡性结肠炎, 其作用机制是通过诱导产生  $\beta$  防御素 2, 再进一步诱导 NF- $\kappa$ B 和 AP-1 依赖性信号肽通路的形成<sup>[20]</sup>。

与溃疡性结肠炎不同, 对于克罗恩病的治疗来说, 目前仍缺少令人信服的临床病例, 主要是因为克罗恩病病人在生成防御素方面有遗传学上的缺陷, 其肠道中抗菌肽的数量较少。研究证实控制细菌胞壁酰二肽胞内载体表达的 NOD2 (nucleotide-binding oligomerization domain 2) 基因的突变与回肠的克罗恩病有关<sup>[21]</sup>。Wehkamp<sup>[22]</sup> 的研究团队证实, TCF4 表达的减少可以调节帕内特细胞 (Paneth cell) 的分化以及  $\alpha$  防御素的分泌。Wang 等<sup>[23]</sup> 研究也发现  $\beta$  防御素 2 基因的拷贝数在结肠克罗恩病病人中趋向于减少。

由于防御素主要是一类富含精氨酸, 大小约为 3.5 - 4 kDa 的阳离子肽, 抗菌的机制主要是带有阳离子的防御素与细菌表面的阴离子结合导致溶菌反应。因此, 对克罗恩病病人展开治疗的关键是构建能够合成和分泌防御素的重组大肠杆菌, 以此提供内源性抗菌肽的合成。但这必须克服两个障碍, 包括阳离子肽对其自身分泌菌株的杀伤力以及离子肽自身的降解。

Derbise 等<sup>[24]</sup> 通过在孵育期添加蛋白酶抑制剂来避免防御素的降解, 进一步的研究发现可通过缺失编码蛋白酶的 OmpT 和 Lon 等基因来阻碍防御素的降解, 以构建可与大肠杆菌 BL21 菌株相媲美的稳定菌株。而 Piers 等<sup>[25]</sup> 发现通过使用低拷贝的 T7 表达载体将最佳编码基因的密码子转入编码序列以克隆防御素基因可以解决另一障碍。Seo 等<sup>[26]</sup> 的研究证实低拷贝的表达载体 pET-28a (+) 也可以用于

构建融合蛋白表达系统, 且其允许 T7 聚合酶特异性启动子控制的融合基因的表达, 使能够检测到的表达都可通过 T7DNA 依赖性的核糖核酸聚合酶诱导产生。因此, 重组菌不仅可以产生 HD5 和 HBD2 防御素诱导物, 而且可产生有抗菌活性的成熟的 HBD2 诱导物, 该诱导物已被批准作为一种药物用于治疗腹泻和溃疡性结肠炎患者。值得注意的是, 防御素通常是由肠道细胞分泌并在细胞表面迅速累积, 但是 Willer 等<sup>[17]</sup> 的研究表明, 重组 *EcN* 分泌的防御素主要分布于肠道粘膜, 这与菌株在体内肠道粘膜上的定殖活动有关, 从而达到高效治疗溃疡性大肠炎和克罗恩病的目的。

## 5 大肠杆菌 Nissle1917 可以作为靶向递呈 TAT-凋亡素融合蛋白的载体治疗结肠直肠癌

近年来, 结肠直肠癌的发病率和死亡率一直较高, 对人类的健康造成了极大的威胁, 而传统的治疗手段常常会使病人在治疗过程中遭受巨大的痛苦, 并且会造成病人免疫系统不同程度的损伤。因此, 发展一种新型治疗方法是十分必要的。Zhou 等<sup>[27]</sup> 设想, *EcN* 可以作为递送载体靶向定位治疗结肠直肠癌。通过 DNA 重组的方法构建出表达 TAT-凋亡素融合蛋白的重组大肠杆菌, 该重组菌具有肿瘤特异性定殖的能力, 并可通过口服的方式给药, 在细胞内能够高效的分泌表达并进行有效地内源性递呈, 从而在肿瘤存在的部位不断累积, 其分泌的凋亡蛋白可以成功作用于病变细胞并诱导凋亡, 达到减少副作用和提高治疗效果的目的。

与常规疗法的局限性和显著的生物毒性不同的是, 该方法具有以下优点: (1) *EcN* 为非致病菌, 对人体无害且易于获取, 使用方便。其六铁摄取系统有利于与肠道内的其它细菌竞争, 更重要的是, 大肠杆菌有特异性的靶向肿瘤定殖的能力, 不会在脾脏和肝脏中定殖。(2) 凋亡基因具有肿瘤细胞特异性靶向作用, 可以使肿瘤处于休眠状态, 也可以诱导细胞凋亡, 有效的杀伤恶性细胞, 但对正常细胞没有毒性, 不会发生杀伤作用。此外, 与编码 TAT 的基因融合后可以有效的进行内源性递呈。(3) 病人可以避免不必要的痛苦, 可通过口服给药。(4) 载体菌是胞外菌, 可使用抗生素来控制其增殖。(5) 具有

稳定表达分泌重组蛋白的能力。

## 6 展望

联合国粮食和农业组织 (FAO) 和世界卫生组织 (WHO) 提出的新标准要求益生菌产品能够被正确鉴别, 能够被证实确实有特定的医疗益处, 能够用给病人和消费者带来真正益处的方式生产并标注。这个标准是在这个领域中能够得到认可所必须遵循的。分子鉴定和免疫学分析有望解释信号是如何由细菌载体传递给宿主以及环境中的其他微生物的。这些微生物载体的安全性是基本的要求, 事实上, 荷兰当局已经批准遗传修饰菌作为治疗药物进入 IBD 的一期临床试验<sup>[3]</sup>。

一般情况下, 肠道对病原菌会产生明显的炎症反应, 但又可以和非病原性的微生物区系共存。早期研究表明, 实验室分离的菌株在首次引入正常肠道菌群后并不能轻易的长期定殖。因此, 益生菌可以视为促使治疗分子靶向作用于胃肠道的一种创新途径。天然益生菌或者是遗传修饰的益生菌都可以作为特异性抗原递呈的载体。运用益生菌株作为载体进行肠道给药的一个技术障碍就是载体的“安全性”, 即找到一株能够在体内稳定表达目的分子的菌株, 同时该菌株能够稳定定殖于宿主肠道中, 而不产生免疫副作用。Willer 和 Bumann 等<sup>[17]</sup>的研究表明, 以前对于小肠是依据非致病性微生物区系带有不同分子标记来将其与病原菌进行鉴别的看法是错误的。实际上, 小肠之所以对适量的非致病性微生物区系耐受是由于没有超过其负载能力, 一旦肠道中的微生物量超过了负荷就会立刻引发炎症, 只是这种反应会随着细菌的清除而很快消失。在这种情况下, *EcN* 被选作载体菌。这种菌株是正常微生物区系共栖菌的一部分, 完全是非致病株, 具有优秀的肠道定殖特性, 是可以用作人类肠道疾病生物疗法的益生菌株。上述研究充分证明, *EcN* 活菌是一种能够特异性靶向肠道的安全大分子蛋白载体, 具有实际的应用价值和良好的商业前景。但是有关活菌载体以什么方式向黏膜免疫系统提呈抗原, 如何使所表达的外源抗原与免疫系统充分接触继而诱导有效免疫应答, 如何在体内实验中实现多种外源抗原在 *EcN* 中的表达, 如何合理地控制重组菌在宿主肠道内存活时间、避免免疫耐受都是研究过程中需

要面对的巨大的挑战, 也是目前该领域研究的热点。

## 参考文献

- [1] Pouwels PH, Leer RJ, Shaw M, Heijne den Bak-Glashouwer MJ, Tielen FD, Smit E, Martinez B, Jore J, Conway PL. Lactic acid bacteria as antigen delivery vehicles for oral immunization purposes. *International Journal of Food Microbiology*, 1998, 41 (2) : 155-167.
- [2] Hooper LV, Littman DR, Macpherson AJ. Interactions between the microbiota and the immune system. *Science*, 2012, 336 (6086) : 1268-1273.
- [3] Steidler L, Neirynek S, Huyghebaert N, Snoeck V, Vermeire A, Goddeeris B, Cox E, Remon JP, Remaut E. Biological containment of genetically modified *Lactococcus lactis* for intestinal delivery of human interleukin 10. *Nature Biotechnology*, 2003, 21 (7) : 785-789.
- [4] Tsai YT, Cheng PC, Pan TM. The immunomodulatory effects of lactic acid bacteria for improving immune functions and benefits. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 96 (4) : 853-862.
- [5] Westendorf AM, Gunzer F, Deppenmeier S, Tapadar D, Hunger JK, Schmidt MA, Buer J, Bruder D. Intestinal immunity of *Escherichia coli* NISSLE 1917: a safe carrier for therapeutic molecules. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 2005, 43 (3) : 373-384.
- [6] Buddenberg C, Daudel D, Liebrecht S, Greune L, Humberg V, Schmidt MA. Development of a tripartite vector system for live oral immunization using a gram-negative probiotic carrier. *International Journal of Medical Microbiology*, 2008, 298 (1-2) : 105-114.
- [7] Haldimann A, Wanner BL. Conditional-replication, integration, excision and retrieval plasmid-host systems for gene structure-function studies of bacteria. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183 (21) : 6384-6393.
- [8] Berberov EM, Zhou Y, Francis DH, Scott MA, Kachman SD, Moxley RA. Relative importance of heat-labile enterotoxin in the causation of severe diarrheal disease in the gnotobiotic piglet model by a strain of enterotoxigenic *Escherichia coli* that produces multiple enterotoxins. *Infection and Immunity*, 2004, 72 (7) : 3914-3924.
- [9] Aguirre M, Collins MD. Lactic acid bacteria and human clinical infection. *The Journal of Applied Bacteriology*, 1993, 75 (2) : 95-107.

- [10] Schultz M. Clinical use of *E. coli* Nissle 1917 in inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, 2008, 14 (7) : 1012-1018.
- [11] Chen ZM, Jenkins MK. Revealing the *in vivo* behavior of CD4 + T cells specific for an antigen expressed in *Escherichia coli*. *Journal of Immunology*, 1998, 160 (7) : 3462-3470.
- [12] Apostolou I, von Boehmer H. The TCR-HA, INS-HA transgenic model of autoimmune diabetes: limitations and expectations. *Journal of Autoimmunity*, 2004, 22 (2) : 111-114.
- [13] Dieleman LA, Palmen MJ, Akol H, Bloemena E, Pena AS, Meuwissen SG, van Rees EP. Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines. *Clinical and Experimental Immunology*, 1998, 114 (3) : 385-391.
- [14] Hondo T, Kanaya T, Takakura I, Watanabe H, Takahashi Y, Nagasawa Y, Terada S, Ohwada S, Watanabe K, Kitazawa H, Rose MT, Yamaguchi T, Aso H. Cytokeratin 18 is a specific marker of bovine intestinal M cell. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2011, 300 (3) : G442-453.
- [15] Pasetti MF, Simon JK, Szein MB, Levine MM. Immunology of gut mucosal vaccines. *Immunological Reviews*, 2011, 239 (1) : 125-148.
- [16] Siebers A, Finlay BB. M cells and the pathogenesis of mucosal and systemic infections. *Trends in Microbiology*, 1996, 4 (1) : 22-29.
- [17] Willer Y, Muller B, Bumann D. Intestinal inflammation responds to microbial tissue load independent of pathogen/non-pathogen discrimination. *PloS One*, 2012, 7 (5) : e35992.
- [18] Stelzer C, Kappeli R, Konig C, Krahl A, Hardt WD, Stecher B, Bumann D. Salmonella-induced mucosal lectin RegIIIbeta kills competing gut microbiota. *PloS One*, 2011, 6 (6) : e20749.
- [19] 张伟. 猪源大肠杆菌 Nissle 1917 株的分离鉴定及其作为口服疫苗载体菌的初步评估. 扬州大学硕士学位论文, 2010: 1-57.
- [20] Schlee M, Wehkamp J, Altenhoefer A, Oelschlaeger TA, Stange EF, Fellermann K. Induction of human beta-defensin 2 by the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is mediated through flagellin. *Infection and Immunity*, 2007, 75 (5) : 2399-2407.
- [21] Santaolalla R, Fukata M, Abreu MT. Innate immunity in the small intestine. *Current Opinion in Gastroenterology*, 2011, 27 (2) : 125-131.
- [22] Wehkamp J, Stange EF. Paneth's disease. *Journal of Crohns & Colitis*, 2010, 4 (5) : 523-531.
- [23] Wang TT, Dabbas B, Laperriere D, Bitton AJ, Soualhine H, Tavera-Mendoza LE, Dionne S, Servant MJ, Bitton A, Seidman EG, Mader S, Behr MA, White JH. Direct and indirect induction by 1, 25-dihydroxyvitamin D3 of the NOD2/CARD15-defensin beta2 innate immune pathway defective in Crohn disease. *The Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285 (4) : 2227-2231.
- [24] Derbise A, Lesic B, Dacheux D, Ghigo JM, Carniel E. A rapid and simple method for inactivating chromosomal genes in *Yersinia*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 2003, 38 (2) : 113-116.
- [25] Piers KL, Brown MH, Hancock RE. Recombinant DNA procedures for producing small antimicrobial cationic peptides in bacteria. *Gene*, 1993, 134 (1) : 7-13.
- [26] Seo EJ, Weibel S, Wehkamp J, Oelschlaeger TA. Construction of recombinant *E. coli* Nissle 1917 (EcN) strains for the expression and secretion of defensins. *International Journal of Medical Microbiology*, 2012, 302 (6) : 276-287.
- [27] Zhou S, Zhang M, Wang J. Tumor-targeted delivery of TAT-Apoptin fusion gene using *Escherichia coli* Nissle 1917 to colorectal cancer. *Medical Hypotheses*, 2011, 76 (4) : 533-534.

# *Escherichia coli* Nissle 1917 as safe vehicles for intestinal immune targeted therapy—A review

Pengpeng Xia, Jun Zhu, Guoqiang Zhu\*

College of Veterinary Medicine, Ministry of Education Key Lab for Avian Preventive Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China

**Abstract:** It is difficult to stimulate efficient gut mucosal immune response to intestinal infection. This article critically reviews the research progress in *Escherichia coli* strain Nissle1917 (*EcN*) acting as a safe vehicle for the intestinal mucosal immunity, to restore gastrointestinal disorder and relieve ulcerative colitis. *EcN* is an orally administered probiotics, combining the excellent colonization and non-immunogenic character, and can be an ideal live vector candidate. This strain could be a tumor-targeted delivery of TAT-Apoptin fusion gene to colorectal cancer. In the treatment of ulcerative colitis and Crohn's disease, the recombinant strain of *EcN* can be used as a target therapeutics for defensins presenting. Genetically modified *EcN* could be an ideal carrier organism for gut-focused in situ synthesis and expression of specific localized antigen delivery into the intestine, and stimulate specific mucosal immune response. In vitro trial demonstrated that intestinal recombinant *E. coli* Nissle-HA110-120 has the potential to stimulate antigen specific response, but *EcN* itself does not induce mucosal immune response and influence peripheral tolerance to self-antigen. At the same time, there are evidences that *EcN* is safe. Recombinant *E. coli* Nissle-HA110-120 does not migrate, clonally expand and activate specific CD<sup>4+</sup> T cells, neither in healthy mice nor in other animals with acute colitis, even when the intestinal epithelium suffer from inflammation and the barrier function of the epithelial layer being destroyed.

**Keywords:** *Escherichia coli* Nissle 1917, localized molecule delivery, T cell response, immune modulation

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30571374, 31072136, 30771603, 31270171), by the Jiangsu High Education Key Basic Science Foundation (08KJA230002), by the Priority Academic Program of Development Jiangsu Higher Education Institutions, by the Program for Changjiang Scholars and Innovative Research Team in University "PCSIRT": IRT0978 and by the Genetically Modified Organisms Technology Major Project of China (2009ZX08006-004B)

\* Corresponding author. Tel: + 86-514-87972590; Fax: + 86-514-87972218; E-mail: yzqzhu@hotmail.com, yzqzhu@yzu.edu.cn

Received: 27 November 2012/Revised: 7 February 2013

## 《微生物学报》关于署名

经过本刊审查通过后即将发表的稿件,作者在修改时,如果对“作者或单位的署名”进行变更,与最初的投稿不同,本刊要求:作者必须再提供有关证明,否则不能生效!此项规定早已公布在本刊的网页上、并且在本刊的纸质出版物中也多次公布。请作者登陆本刊网页(<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>),在首页内、“常见问题”中有显示,点开左侧的“署名”,其中有详细的说明和办理方法。

- (1) 如变单位署名顺序,需要原研究内容所属单位(通常是第一署名单位)的证明信,证明内容:原署名顺序→现署名顺序→盖章。
- (2) 如变更作者署名顺序,需要通讯作者和第一作者同意的签字证明。证明内容:原作者姓名及顺序→修改之后的作者姓名及顺序。
- (3) 将此证明信返回编辑部(邮寄原件或扫描后 E-mail 发来),新的变更即可生效。