生物技术通报
·综述与专论· BIOTECHNOLOGY BULLETIN 2023, 39(6):109-118

大肠杆菌 Nissle 1917 对炎症性肠病治疗作用的研究进展

陈彩萍 任昊 龙腾飞 何冰 鲁兆祥 孙坚
（1. 华南农业大学兽医学院，广州 510000；2. 国家兽医微生物耐药性风险评估实验室，广州 510000；3. 岭南现代农业科学与技术广东省实验室，广州 510000）

摘 要： 炎症性肠病（inflammatory bowel disease，IBD）是一组特定的肠道疾病的统称，主要体现为慢性及复发性的肠道炎症。其全球发病率正在迅速上升，严重影响人们生活质量与生命健康，已成为当前的全球性健康问题。在过去的几十年里，大量研究表明 IBD 的发病率与肠道菌群失调有关。因此，以肠道益生菌为主的治疗策略成为一大热点，其中大肠杆菌 Nissle 1917（*Escherichia coli* Nissle 1917，EcN）备受关注。本文聚焦肠道益生菌 EcN 在治疗 IBD 中的应用与机制，系统地综述了 EcN 的益生菌特性，概述 EcN 在临床实践中对 IBD 的治疗应用，同时从上皮屏障完整性调节、免疫调节、黏液屏障保护和肠道菌群稳态等方面阐述 EcN 治疗 IBD 的具体作用机制。此外，结合当前的研究现状，讨论了未来基于工程化 EcN 新疗法的发展前景，强调 EcN 在 IBD 治疗和预防中的适用性和可行性策略，并对该领域未来的研究方向进行了展望，为进一步深入研究 EcN 治疗 IBD 提供思路和参考。

关键词： 炎症性肠病；大肠杆菌 Nissle 1917；治疗作用；作用机制
DOI:10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2022-1027

Research Advances in the Treatment of Inflammation Bowel Disease Using *Escherichia coli* Nissle 1917

CHEN Cai-ping REN Hao LONG Teng-fei HE Bing LU Zhao-xiang SUN Jian
（1. *Department of Veterinary Medicine, South China Agriculture University, Guangzhou,* 510000; 2. *National Risk Assessment Laboratory for Antimicrobial Resistance of Animal Original Bacteria, South China Agricultural University, Guangzhou* 510000; 3. *Guangdong Laboratory for Lingnan Modern Agriculture, Guangzhou* 510000）

Abstract: Inflammatory bowel disease（IBD）is a general term of a group of specific intestinal diseases, mainly manifested as chronic and recurrent intestinal inflammation. The burden of IBD has been a global health concern since its incidence and prevalence are elevating rapidly, which has seriously affected people's life and health quality. Over the past decades, tremendous studies underlined the association between incidence of IBD with imbalance of intestinal flora. Therefore, the treatment strategy based on probiotics has become the focus, among of them *Escherichia coli* Nissle 1917（EcN）has received accumulative attentions. In the current work, we focused on the application and mechanisms of EcN in the treatment of IBD, systematically reviewed the probiotic properties of EcN and its application for treating IBD through regulating epithelial integrity, immune-modulation, mucus protection and gut microbiota homeostasis. Furthermore, the future perspectives on formulating novel therapies based on engineered EcN were discussed, highlighting the applicable and feasible strategies of EcN in IBD curing and prevention. Besides, the prospects for further research in this field were given, providing ideas and references for further in-depth research on the EcN treatment of IBD.

Key words: inflammatory bowel disease; *Escherichia coli* Nissle 1917; therapeutic effect; mechanisms

收稿日期：2022-08-23
基金项目：国家自然科学基金重点项目（31730097），广东省普通高校创新团队项目（2019KCXTD001），国家自然科学基金青年科学基金项目（32102720）
作者简介：陈彩萍，女，硕士，研究方向：细菌耐药性；E-mail: 2532129689@qq.com
通讯作者：孙坚，男，博士，教授，研究方向：细菌耐药性；E-mail: jiansun@scau.edu.cn

生物技术通报

炎症性肠病（inflammatory bowel disease，IBD）是近几十年以来全球最关注的健康问题之一。但其病因多样，严重阻碍靶向治疗药物的开发，导致探索新的治疗策略迫在眉睫。目前，有关肠道菌群改变是激发IBD炎症发展的关键因素的研究陆续被报道[1-2]，其治疗方案多集中于大肠杆菌Nissle 1917（*Escherichia coli* Nissle 1917，EcN）等益生菌。EcN是Alfred Nissle在1917年一次志贺菌痢大爆发时从未出现腹泻的士兵粪便中分离得到的不具备致病性的大肠杆菌[3]。随后Alfred Nissle证明EcN对不同致病性肠杆菌具有很强的拮抗活性。利用这一特性，Alfred Nissle开发了一种包含EcN的生物治疗产品，被称为Mutaflor，以此推广EcN在临床上的使用。据报道，近100多年以来，EcN被用于各种肠道炎症性疾病的治疗。鉴于此，本文就EcN的菌株特性、EcN对IBD的治疗作用及其作用机制等方面进行综述，以期为探索益生菌EcN治疗IBD提供科学依据。

1 EcN的菌株特性

EcN是一种血清型为O6:K5:H1的需氧革兰氏阴性大肠杆菌。相对于已知的致病性大肠杆菌，EcN独特的基因组不表达P-菌毛黏附素，不合成半粗糙脂多糖，不分泌α-溶血素，即不产生已知的毒力因子，使其具有生物安全性[4-5]。作为一种肠道益生菌，EcN具有良好的定植能力，可定植于各种宿主的肠道，包括人类和动物（如鼠、猪等）[3,6]，这与其自身的菌株特性密切相关。大量研究证明，EcN具有K5型荚膜、H1型可移动鞭毛和F1C型菌毛，分别与细菌的免疫调节反应、运动及生物膜形成密切相关，可促进EcN在肠道上皮细胞表面黏附及定植[7-9]。在复杂的肠道微生态环境中，EcN具有一定的竞争性定植优势。一方面，在有限的铁营养条件下，EcN可通过肠杆菌素、气杆菌素、沙门菌素、耶尔森杆菌素等铁载体获得铁，还可通过独特的铁吸收系统（如依赖于血红素和柠檬酸盐的铁吸收系统）或EfeU亚铁摄取系统吸收铁[10]。因此，EcN在与其他致病菌争夺铁的过程中，表现出优越的铁竞争性[11]，这有利于EcN在肠道内定植。另一方面，EcN通过直接产生抗菌肽微菌素（如微菌素H47及微菌素M）和蛋白酶等特殊适应性因子，或刺激肠上皮细胞产生人β-防御素（human β-defensin，hBD-2），对不同致病性菌株表现出很强的拮抗活性[12-14]。因此，EcN所具备的这些优良特征是其在科研及临床中得到广泛应用的重要依据。

2 EcN对IBD的治疗作用

目前，研究表明IBD的传统治疗方式主要包括氨基水杨酸类药物、皮质类固醇药物和免疫抑制剂[15-20]。但采用传统治疗方式易使患者出现多种不良反应及药物应答不佳等问题[21-22]。因此，探索有效的新型IBD治疗策略是当前的重要工作。许多研究认为，IBD的关键治疗途径是通过调节肠道菌群趋向正常化，促进机体上皮屏障、黏膜屏障和免疫功能等的修复，使机体达到内环境稳定。在该治疗途径中，益生菌发挥着重要作用。EcN作为一种肠道益生菌，被广泛应用于各种胃肠道疾病的治疗，包括IBD、肠易激综合征、慢性功能性便秘和小儿腹泻等，这里集中介绍EcN对IBD的治疗作用。

在广泛的动物性研究试验中，大量研究数据证明EcN能有效治疗由不同物质诱导产生的动物结肠炎（表1）。在三硝基苯磺酸（trinitrobenzene sulfonic acid，TNBS）诱导的大鼠结肠炎模型中，Sha等[23]证明与未治疗对照组相比，大鼠在使用低剂量EcN治疗后，其疾病活动指数（disease activity index，DAI）显著下降，即体重下降程度减少、粪便硬度趋向正常、直肠出血严重程度下降；其结肠黏膜损伤指数（colonic mucosa damage index，CMDI）亦出现不同程度下降，即组织溃疡、黏膜下水肿、肠壁增厚等病理现象减轻。在3.5%乙酸溶液诱导的大鼠结肠炎模型中，Dembiński等[24]的研究结果表明与单药物治疗组相比，EcN与利福昔明联合应用能更有效地缓解大鼠结肠损伤、炎症浸润和纤维化发展的程度。在葡聚糖硫酸钠（dextran sodium sulfate，DSS）诱导的小鼠结肠炎模型中，Garrido-Mesa等[25]证明与未治疗对照组相比，小鼠灌胃给予EcN后可显著降低其DAI值，且只有在米诺环素治疗过程中补充EcN可使小鼠结肠恢复至正常长度；而Souza等[26]的实验数据表明与未预防性摄入EcN的小鼠相比，通过粪便微生物群移植（faecal microbiota transplantation，FMT）进行预防性摄入EcN的小鼠

在随后的 DSS 诱导的结肠炎试验中具有更低的 DAI 值。因此，EcN 不仅可直接缓解由不同物质诱导产生的动物实验性结肠炎，还可通过联合用药起到增效作用或通过预防性摄入起到保护作用。

临床上，在 EcN 治疗 IBD 的相关试验中，人们主要聚焦于以下两个问题：（1）EcN 与 IBD 的一线治疗药物美沙拉嗪的等效性问题；（2）EcN 治疗 IBD 的群体性问题。针对第一个问题，先后有 3 个临床试验进行了探究。第一项试验由 Kruis 等[27]招募 103 名非活动性 UC 患者进行，共 12 周。试验结果表明二者在治疗 IBD 时具有等效性。但由于试验样本量少、周期短等问题，无法充分说明 EcN 在缓解 UC 方面等效于美沙拉嗪。随后，Rembacken 等[28]进行第二项试验，但该治疗过程涉及 EcN 与抗生素或类固醇的联合应用，试验结果无法真正评估 EcN 维持缓解 UC 效果。最后，Kruis 等[29]仅用 EcN 与美沙拉嗪作对比，将 327 名成年患者随机分成 EcN 组和美沙拉嗪组，并进行一次双盲、随机试验，以评估 EcN 及美沙拉嗪的等效性。结果显示，在符合研究方案分析中，EcN 组和美沙拉嗪组的复发率分别为 36.4%、33.9%；在意向治疗分析中，EcN 组和美沙拉嗪组的内窥镜指数无显著差异；EcN 组的不良事件为 42%，严重不良事件有 17 例，美沙拉嗪组则分别为 35.2% 及 6 例；两组的安全性和耐受性都非常好，没有差异。可见，EcN 与美沙拉嗪在缓解非活动性 UC 方面具有等效性。针对第二个问题，多个试验已对不同年龄段或不同亚型 IBD 患者进行研究。Henker 等[30]将 34 例 11–18 岁的 UC 患者随机分成 EcN 组和美沙拉嗪组，结果发现 EcN 组和美沙拉嗪组的复发率分别为 25%、30%，不良事件分别有 7 例、2 例，结果无显著差异。Kruis 等[29]除了证明 EcN 对 IBD 患者的缓解作用等效于美沙拉嗪外，还表明 EcN 适用于治疗 19–70 岁的 UC 患者。因此，EcN 有利于治疗全年龄段 UC 患者（目前无儿童组及老年组）。此外，相对于发病率较高的 UC 群体，EcN 对 CD 群体的治疗研究相对匮乏。目前唯一一项 EcN 治疗 CD 患者的研究由 Malchow[31]开展。试验者被随机分成 EcN 组和安慰剂对照组，且所有患者每天接受泼尼松龙的减量方案。结果发现 EcN 组和安慰剂对照组的缓解率分别为 85.7%、91.7%；在复发前停止服用类固醇的患者中，EcN 组有 30% 的患者出现了复发，而安慰剂组有 70% 的患者出现复发，证明 EcN 治疗方式可降低 CD 患者的复发风险，但这与糖皮质激素的使用相关。因此，EcN 对 CD 患者的疗效尚未清楚，有待进一步研究。

综上，EcN 无论是在动物性研究试验中，还是在临床试验上，都展现出潜在的治疗作用，且益生菌治疗方式更为温和，具有替代 IBD 常规治疗药物的潜力。但试验存在一个普遍性问题，即患者基数大而试验受试者人数少，导致试验结果的数据量不足，无法从深度和广度上真正评估 EcN 治疗 IBD 的功效，需要更多的患者进行验证性研究。

表 1　EcN 对实验性结肠炎的治疗作用

Table 1　Therapeutic effect of EcN on experimental colitis

动物模型 Model	研究目的 Aim	诱导物 Stimuli	持续时间 Duration/d	疗效 Therapeutic fffect	总结 Conclusion	参考文献 Reference
大鼠结肠炎模型	比较不同疗程、不同剂量的 EcN 对大鼠结肠炎的治疗作用	TNBS	15	低剂量 EcN 可治疗大鼠结肠炎，但长期服用大剂量 EcN 可能加重大鼠结肠炎的症状	EcN 与不同抗生素联合使用时，具有协同治疗效果，但 EcN 可能存在产生抗生素耐药性的风险；单独口服一定量 EcN 具有治疗结肠炎的作用，但从多个试验结果表明，EcN 能通过其他方式提高其治疗结肠炎的效果	[23]
大鼠结肠炎模型	比较利福昔明和 EcN 对大鼠结肠炎的治疗作用	乙酸溶液	8	利福昔明与 EcN 联合应用具有协同抗炎作用		[24]
小鼠结肠炎模型	探究 EcN 和米诺环素在小鼠复发性结肠炎中的关联	DSS	31	在米诺环素治疗过程中补充 EcN 可降低小鼠肠道炎症的损伤程度，防止实验性结肠炎的复发		[25]
小鼠结肠炎模型	评估预防性摄入 EcN 在小鼠结肠炎中的作用	DSS	28	小鼠预防性摄入 EcN 能改善结肠炎症状		[26]

3 EcN 对 IBD 的作用机制

大量研究表明，EcN 可作为治疗 IBD 的新策略，其在缓解疾病诱导、预防疾病复发方面具有极大的吸引力，相关的治疗作用机制主要涉及以下四方面（图 1）。

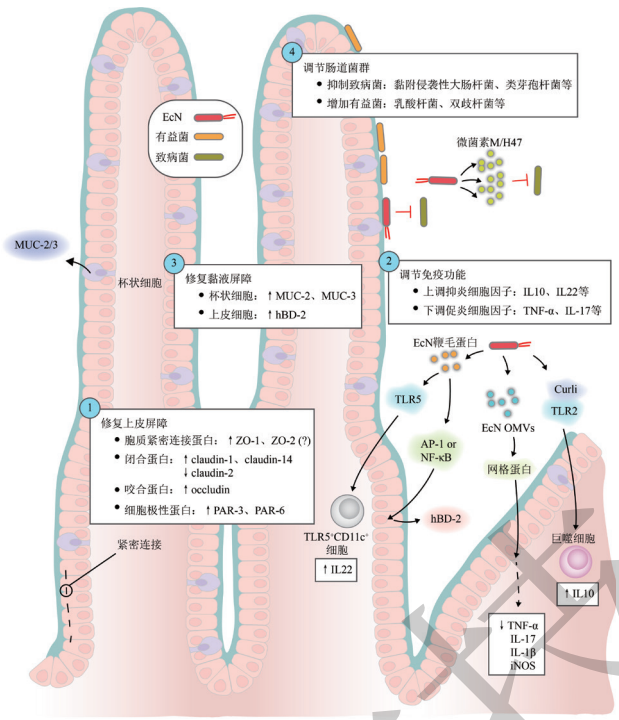

图 1 EcN 治疗 IBD 的作用机制

Fig. 1 Mechanisms of EcN in IBD treatment

3.1 EcN对上皮屏障功能的影响

细胞与细胞之间的黏附是指存在于细胞－细胞接触部位的黏附连接和紧密连接，对组织的发育和维持至关重要。其中，紧密连接的主要成分是胞质紧密黏连蛋白（zonula occludens，ZO）、闭合蛋白（claudins）、咬合蛋白（occludin）和接合黏附分子等，可调节离子和小分子在细胞之间的通行并建立细胞极性[32]。

多项研究表明，EcN 增强肠道上皮屏障的功能与 ZO 家族蛋白（包括 ZO-1 和 ZO-2）密切相关。ZO 家族蛋白是一种多结构域骨架蛋白，可作为紧密连接跨膜蛋白与肌动蛋白或肌球蛋白细胞骨架之间的桥梁[33]。对于 ZO-1 蛋白，Ukena 等[34]和 Sha 等[23]在结肠炎动物模型中发现 EcN 不仅能上调 ZO-1 的 mRNA 转录水平，还可提高其蛋白质表达水平。此外，Alvarez 等[35]还观察到 EcN 通过 TcpC 蛋白提高 ZO-1 表达，促进 ZO-1 从细胞质向细胞间接触处重新分布，以维持 F- 肌动蛋白细胞骨架的结构，提高细胞与细胞之间的连接紧密性，降低结肠上皮屏障通透性。对于 ZO-2 蛋白，早期 Veltmana 等[36]和 Zyrek 等[37]都用人结肠腺癌肺转移细胞（T84 细胞）体外模型进行试验，前者研究发现 EcN 可通过下调多种微小核糖核酸（microRNA，miRNA）如 miR-203、miR-483–3p、miR-595 等的表达，进而上调紧密连接复合物调节蛋白和结构蛋白 mRNA 的转录，如 ZO-2、细胞极性蛋白质 -3（partitioning defective protein-3，PAR-3）和 PAR-6 等，增强肠道屏障功能；后者在 T84 细胞、EcN 和肠致病性大肠杆菌共同孵育期间发现 EcN 能增加 ZO-2 的表达，有利于 ZO-2 向细胞边界分布，提高细胞与细胞之间的紧密性。然而，近期 Alvarez 等[35]以 EcN 分泌的外膜囊泡（outer membrane vesicles，OMVs）进行 T84 细胞和 Caco-2 细胞试验，结果均发现 ZO-2 表达量未发生显著变化。该研究结果与 Zyrek 和 Veltmana 两团队的结果不一致，导致该现象的原因可能是 Alvarez 等以 EcN 分泌物 OMVs 的上清液刺激体外模型细胞，而 EcN 介导 ZO-2 表达则可能取决于细菌相关因子。因此，EcN 介导 ZO-2 表达的具体作用机制仍有待深入研究。

近年来，大量研究表明 EcN 增强肠道上皮屏障功能部分得益于 claudins 家族蛋白和 occludin 蛋白。其中，claudins 蛋白家族成员被分成两大类，第一大类为具有肠道黏膜封闭作用的成员，如 claudin-1 和 claudin-14，当其表达水平提高时，可增加上皮屏障细胞间的紧密连接性[38]；第二大类为具有孔道形成蛋白作用的成员，如 claudin-2，能调节离子的通透性，当其表达水平降低时，可减少炎症因子等进入上皮屏障[39]。例如，EcN 分泌的 TcpC 蛋白通过蛋白激酶 Cζ 和 ERK1/2 信号通路上调 claudin-14 蛋白表达水平，从而改善肠道屏障功能[40]。类似的研究表明，EcN 的分泌物 OMVs 和 TcpC 蛋白均可上调表达 claudin-14 蛋白，下调表达 claudin-2 蛋白，但 OMVs 介导 claudins 的表达与 TcpC 蛋白无关[35]。此外，Wang 等[41]通过伊立替康诱导的小鼠肠炎模型

证明 EcN 除了能提高 claudin-1 蛋白表达水平外，还能改变 claudin-1 在上皮细胞中的定位和分布。对于 occludin，研究证明其具有屏障调节功能，主要通过与 ZO 蛋白、接合黏附分子相关蛋白、膜蛋白等相互作用，从而对细胞膜两侧的离子、分子等进行选择性运输，使上皮屏障维持稳态[42-43]。Alvarez 等[44]证明 EcN 分泌的 OMVs 能同时上调 occludin 蛋白及 ZO-1 蛋白在细胞边界紧密连接处的表达水平，既能维持 F- 肌动蛋白细胞骨架结构的完整性，又能降低细胞旁通透性，有利于提高上皮屏障保护功能。

综上，EcN 通过调节上皮细胞中 ZO、claudin、occludin 等多种紧密连接蛋白的表达，加强上皮屏障的封闭性，减少细胞旁通透性，有利于阻止肠内容物渗入上皮屏障，预防病原体入侵，减轻肠道炎症反应。

3.2　EcN对屏障相关免疫功能的影响

大量研究表明，EcN 通过调节肠道内环境的免疫因子，进而调节 IBD 患者或结肠炎动物的屏障功能，以降低患者或动物的炎症反应，使患者或动物的炎症症状得到缓解。

EcN 治疗 IBD 的重要机制之一是诱导肠上皮细胞合成抗菌肽防御素。研究证明，EcN 表达分泌的鞭毛蛋白通过激活 *hBD-2* 基因启动子中的核因子 κB（nuclear factor kappa-B，NF-κB）和激活蛋白 -1（activator protein-1，AP-1）结合位点，促进 *hBD-2* 基因启动子启动，使上皮细胞产生 hBD-2[12, 45]。当上皮细胞产生的 hBD-2 水平上调时，hBD-2 可刺激肠道的先天防御，有助于增强黏膜屏障功能。此外，EcN 可通过 Toll 样受体 -2（toll-like receptors-2，TLR2）和 TLR4 介导 NF-κB 活性增强，进一步促进上皮细胞表达 hBD-2[46]。

EcN 还可调节肠道内环境中各种免疫因子的表达而对结肠炎起抑制作用。在这个过程中，EcN 的自身成分及其分泌的活性成分起关键作用。研究证明，EcN 的生物膜中有一种淀粉样卷曲纤维被称为 curli，可被 TLR2 识别，随后诱导巨噬细胞产生抗炎介质白介素 -10（interleukin-10，IL-10），提高炎症组织中 IL-10 的水平，降低肠道炎症反应[47-48]。鞭毛蛋白是 EcN 分泌的重要的活性成分之一，除了介导上皮细胞过表达 hBD-2 之外，还因其具有一个高变区而可通过 TLR5 介导宿主结肠固有层的 $TLR5^{+}CD11c^{+}$ 细胞产生 IL-22，使小鼠结肠炎得到缓解[49]。OMVs 是 EcN 分泌的另一种常见且重要的活性成分，促进活性化合物在细胞间的远端转移，被称为细胞间通信体[50-51]。OMVs 可参与肠黏膜信号转导，通过网格蛋白介导的内吞作用进入上皮细胞，并通过肠上皮屏障干预免疫系统信号，降低促炎细胞因子 IL-1β、IL-17、肿瘤坏死因子（tumor necrosis factor-α，TNF-α）、诱导型一氧化氮合酶（inducible nitric oxide synthase，iNOS）的表达[50, 52-53]。

综上，肠道中促炎细胞因子的过度表达会导致肠道内环境出现炎症风暴，这是 IBD 或动物结肠炎产生并持续恶化的关键因素之一。而 EcN 可通过不同的免疫途径抑制促炎因子的表达，或促进抑炎因子及抗菌肽的表达，从而对炎症反应进行调控，提高肠道的免疫保护功能。

3.3　EcN对黏液屏障的影响

黏液屏障由肠黏膜上皮细胞分泌的黏液、消化液及肠腔内正常寄生菌产生的抑菌物质构成，是一道天然化学屏障，具有抑制、杀灭病原体的作用。EcN 治疗 IBD 或结肠炎与其对黏液屏障的保护作用密切相关。研究表明，在鼠结肠炎模型和 UC 患者中，肠道病原体可穿透正常情况下难以被穿透的内在结肠黏液层，到达肠上皮细胞，使黏液屏障结构和功能的完整性受损[54]。多项动物试验的研究结果表明，DSS 诱导实验动物鼠获得结肠炎后，黏膜组织中杯状细胞分泌的黏液素将被过度消耗，导致杯状细胞被破坏，使黏液层受损；当 EcN 灌胃后，杯状细胞中的黏蛋白 -2（mucoprotein-2，MUC-2）和 MUC-3 的表达水平明显提高，使杯状细胞内黏蛋白分泌量增加，有利于修复杯状细胞[25, 55]。在二硝基苯磺酸诱导的小鼠结肠炎模型中发现 EcN 灌胃后，小鼠通过下调 miR-223 的表达，提高杯状细胞中 MUC-3 的表达量[56]。此外，EcN 还可增加黏液层中抗菌肽 hBD-2 的表达量，提高黏液屏障对病原微生物的抵抗能力[45]。综上，EcN 通过增加黏液层中黏蛋白及抗菌肽的表达水平，修复炎症对黏液屏障的损伤，使 EcN 达到治疗结肠炎的效果。

3.4 EcN对肠道菌群的影响

EcN是一种活的、安全的且能定植于肠道的益生菌，对结肠炎的治疗作用与其调节肠道菌群有关，尤其是调节菌群的多样性。Garrido-Mesa等[25]在小鼠结肠炎模型中发现，与非结肠炎小鼠相比，DSS结肠炎小鼠的非致病性细菌（乳酸杆菌和双歧杆菌）与潜在致病性细菌（拟杆菌和梭状芽孢杆菌）之间的比例下降，而米诺环素与EcN联合应用组、米诺环素组和EcN组均显示该比例增加，但该值只在米诺环素与EcN联合应用组和DSS结肠炎组之间存在显著的统计学差异。由于EcN与抗生素联合应用，因此我们很难正确评价EcN对肠道菌群的调节作用。幸运的是，随后Rodríguez-Nogales等[55]用DSS诱导结肠炎小鼠模型对此进行了验证。与健康小鼠相比，DSS结肠炎组的双歧杆菌和乳酸杆菌显著减少，芽孢杆菌和类芽孢杆菌明显增加。而EcN灌胃后，EcN结肠炎组的微生物群几乎能够恢复到正常水平；三大生态参数，包括Chao丰富度指数、Pielou均匀度指数和香农多样性指数都恢复到正常值。此外，研究发现，EcN分泌的微菌素M和微菌素H47通过特定铁载体受体限制发炎肠道中肠杆菌科细菌的定植，包括黏附侵入性大肠杆菌，这是从CD患者回肠中分离出来的致病性大肠杆菌[13, 57]。由于体外实验难以评估EcN对CD患者体内黏附侵入性大肠杆菌定植的影响，因此科学界需通过体内试验进一步深入研究EcN对黏附侵入性大肠杆菌的影响。综上，肠道菌群紊乱是IBD患者或结肠炎动物的主要疾病特征之一，而EcN在肠道炎症中可调节肠道菌群，使肠道菌群趋向稳态发展。

4 工程化EcN的应用

EcN在动物试验/临床试验上对结肠炎/UC具有潜在的治疗作用，但IBD是一种病因极其复杂（包括环境因素、遗传因素、微生物因素及免疫调节因素等[58]），致病机制尚未被完全解析的疾病。而EcN自身的益生菌疗效有限，进而激发人们对EcN进行修饰、改造及工程化，以探究治疗IBD的新策略。

目前，有关工程化EcN通过递送单一蛋白肽缓解结肠炎的研究不断被报道，使工程化EcN成为当前的研究热点。总体而言，工程化EcN主要通过以下两个途径治疗结肠炎：（1）靶向宿主功能进行调节；（2）强化EcN在宿主内的适应性。首先，靶向宿主功能进行调节主要体现在工程化EcN可通过外源性方式补充宿主体内的必需蛋白，或增强活性蛋白的表达。例如，研究表明IBD患者外周血和结肠黏膜中缺乏Elafin蛋白（天然存在于健康肠道黏膜的蛋白酶抑制剂）[59-60]，Liu等[61]通过工程化EcN补充急性小鼠结肠炎中的Elafin蛋白，证明EcN-Elafin可显著降低小鼠的DAI值及TNF-α等促炎因子的水平，从而减轻小鼠的结肠炎，对肠黏膜炎症起保护作用。类似地，CD患者的*hBD-2*基因拷贝数低[62]，无法提供宿主所需的hBD-2蛋白量，Seo等[63]优化*hBD-2*基因密码子，以工程化EcN提高表达hBD-2蛋白。遗憾的是，EcN-hBD-2未进行进一步的动物结肠炎模型探究及临床试验探究，但过表达hBD-2蛋白的EcN使*hBD-2*基因拷贝数低的CD患者的治疗成为一种可能。此外，靶向宿主功能进行调节还体现在工程化EcN通过合成生物学方法，在EcN原有的功能基础上进一步增强其对宿主的屏障保护功能，改善宿主的肠道菌群。例如，Praveschotinunt等[64]和Yu等[65]以EcN为宿主菌分别表达具有增强上皮屏障功能的三叶肽因子和具有增强黏膜屏障功能的表皮生长因子，并通过DSS诱导的小鼠结肠炎模型证明这两个工程化EcN均具有提高小鼠肠道屏障完整性的功能，进一步缓解小鼠的肠道炎症作用[66-67]。而Yan等[68]通过EcN合成3-羟基丁酸（炎症治疗性化合物）改善小鼠肠道微生物群，如在不同程度上提高阿克曼氏菌属（*Akkermansia*）、罗氏菌属（*Roseburia*）、瘤胃球菌属（*Ruminococcus*）等益生菌的丰度，有利于控制小鼠肠道炎症的发展。因此，在靶向宿主功能进行调节方面，工程化EcN通过产生保护性蛋白、修复性蛋白等，以维持炎症环境下宿主肠道稳定性，缓解结肠炎，是一种潜在的治疗方案。其次，在强化EcN在宿主内的适应性方面，由于EcN不产生毒力因子，其在宿主体内的适应性相对较差，难以实现在肠道内长期驻留，无法长久地发挥功效，因此通过基因修饰的方式，让EcN具有更强地适应宿主内环境的能力，更持久地发挥功能是非常有必要的。Yan等[68]通过EcN合成3-羟基丁酸提高EcN在肠道内的定植水平，增加有效发

挥治疗结肠炎的益生菌总量，提高治疗效果。类似地，在我们近期的研究工作中，以高活性同源重组酶 *recA* 基因替换 EcN 自身的低活性 *recA* 基因，提高 EcN 在小鼠肠道内的定植时间及定植水平（未发表），有利于 EcN 在肠道炎症部位持续性发挥益生菌功效，增强结肠炎的治疗效果。因此，工程化 EcN 通过产生有利于其抵御肠道内环境的蛋白，使其在肠道内更好地定植，具有更长的治疗时间及更强的治疗效果。

综上，EcN 菌株通过工程化，以自身的益生菌功效及其递送至肠道的蛋白肽共同治疗结肠炎，提高治疗效果，体现工程化 EcN 具有良好的 IBD 治疗前景。

5　总结及展望

益生菌 EcN 可持久地定植于人类胃肠道，促进肠上皮屏障及黏液屏障修复，维持屏障结构及功能的完整性和稳定性；调节肠屏障相关免疫因子的表达，抑制肠道炎症反应；调节紊乱的肠道菌群结构，恢复肠道菌群稳态，从而缓解 IBD 症状。自 1917 年 EcN 被发现以来，其结构和功能都得到广泛研究，提高了 EcN 的应用价值。尽管如此，EcN 对 IBD 的治疗仍有许多值得被探究的价值：

（1）目前，EcN 对 CD 患者疗效评估的研究数据相对匮乏，是否存在 EcN 对不同的 CD 宿主因素（不同年龄段、不同疾病程度、不同地域饮食、不同性质工作等）呈现不同疗效？此外，IBD 是一种全球性疾病，不同地区患者的发病机制不同，那么 EcN 对不同地区 UC 患者的疗效是否均等效于美沙拉嗪？

（2）ZO-2 蛋白作为紧密连接成分的重要组成之一，其对上皮屏障功能完整性及稳定性的维持具有重要作用。然而，EcN 及其分泌物 OMVs 对 ZO-2 表达调控呈现不同的结果，该结果是否由益生菌自身相关因子所导致，有待我们进一步探究，并阐明 EcN 对 ZO-2 的具体调控机制。

（3）有关 EcN 重组菌株缓解或治疗 IBD 的研究多数为控制实验，且都处于实验室研究阶段，注重某一基因对结肠炎病理现象和疾病症状的改善，但这与 IBD 疾病发生发展过程存在较大差别，容易忽略 IBD 疾病发展过程中伴随而来的是多种病理现象。因此，未来我们可以在单基因克隆菌株进行结肠炎疗效评估的基础上，对多种单基因克隆菌株混合物或多基因克隆菌株进行结肠炎疗效研究。

（4）EcN 作为一种益生菌，是具有生命的微生物，其生产、运输、保存及口服等过程都易受自然环境因素、人为因素、胃肠道内环境因素等的影响，进而降低其治疗 IBD 的效果。为解决该问题，有关研究多集中于对 EcN 进行包裹[69]，并递送至肠道，从而进行结肠炎治疗。但非生命物质，如鞭毛蛋白、微菌素 M/H47 及未知活性成分等对结肠炎的治疗是否等效于 EcN？因此，未来我们可用递送载体对 EcN 产生的活性成分进行包装，并评估其对结肠炎的治疗效果。

（5）研究证明 EcN 具有替代 IBD 一线治疗药物美沙拉嗪的潜力，因此 EcN 治疗 IBD 的作用机制值得人们继续深入探索。目前，有关 EcN 分泌物修复上皮屏障功能、抑制炎症反应及调节肠道菌群的研究多集中在于 OMVs、鞭毛蛋白和微菌素 M/H47。但 EcN 的基因组大小超过 5 Mb，可表达的分泌物不仅 4 种，因此，未来我们可以提取不同的 EcN 分泌物，探析具有 IBD 治疗功效的分泌物，进一步探明其具体的作用靶点，完善 EcN 治疗 IBD 的作用机制。

随着研究的不断深入和广泛的应用开发，EcN 将为真正用于临床治疗 IBD 提供科学依据，使其为人类健康发挥越来越重要的作用。

参 考 文 献

[1] Aggeletopoulou I, Konstantakis C, Assimakopoulos SF, et al. The role of the gut microbiota in the treatment of inflammatory bowel diseases [J]. Microb Pathog, 2019, 137: 103774.

[2] Stange EF, Schroeder BO. Microbiota and mucosal defense in IBD: an update [J]. Expert Rev Gastroenterol Hepatol, 2019, 13(10): 963-976.

[3] Wassenaar TM. Insights from 100 years of research with probiotic *E. coli* [J]. Eur J Microbiol Immunol (Bp), 2016, 6(3): 147-161.

[4] Grozdanov L, Raasch C, Schulze J, et al. Analysis of the genome structure of the nonpathogenic probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 [J]. J Bacteriol, 2004, 186(16): 5432-5441.

[5] Nougayrède JP, Chagneau CV, Motta JP, et al. A toxic friend:

genotoxic and mutagenic activity of the probiotic strain *Escherichia coli* nissle 1917 [J]. mSphere, 2021, 6(4): e0062421.

[6] Monteiro C, Saxena I, Wang XD, et al. Characterization of cellulose production in *Escherichia coli* Nissle 1917 and its biological consequences [J]. Environ Microbiol, 2009, 11(5): 1105-1116.

[7] Zhao ZJ, Xu SM, Zhang WY, et al. Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 for inflammatory bowel disease applications [J]. Food Funct, 2022, 13(11): 5914-5924.

[8] Lasaro MA, Salinger N, Zhang J, et al. F1C fimbriae play an important role in biofilm formation and intestinal colonization by the *Escherichia coli* commensal strain Nissle 1917 [J]. Appl Environ Microbiol, 2009, 75(1): 246-251.

[9] Kleta S, Nordhoff M, Tedin K, et al. Role of F1C fimbriae, flagella, and secreted bacterial components in the inhibitory effect of probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 on atypical enteropathogenic *E. coli* infection [J]. Infect Immun, 2014, 82(5): 1801-1812.

[10] Behnsen J, Deriu E, Sassone-Corsi M, et al. Probiotics: properties, examples, and specific applications [J]. Cold Spring Harb Perspect Med, 2013, 3(3): a010074.

[11] Deriu E, Liu JZ, Pezeshki M, et al. Probiotic bacteria reduce *Salmonella typhimurium* intestinal colonization by competing for iron [J]. Cell Host Microbe, 2013, 14(1): 26-37.

[12] Schlee M, Wehkamp J, Altenhoefer A, et al. Induction of human beta-defensin 2 by the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is mediated through flagellin [J]. Infect Immun, 2007, 75(5): 2399-2407.

[13] Sassone-Corsi M, Nuccio SP, Liu H, et al. Microcins mediate competition among Enterobacteriaceae in the inflamed gut [J]. Nature, 2016, 540(7632): 280-283.

[14] Mőndel M, Schroeder BO, Zimmermann K, et al. Probiotic *E. coli* treatment mediates antimicrobial human beta-defensin synthesis and fecal excretion in humans[J]. Mucosal Immunol, 2009, 2(2): 166-172.

[15] Langan RC, Gotsch PB, Krafczyk MA, et al. Ulcerative colitis: diagnosis and treatment [J]. Am Fam Physician, 2007, 76(9): 1323-1330.

[16] Fumery M, Singh S, Dulai PS, et al. Natural history of adult ulcerative colitis in population-based cohorts: a systematic review [J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2018, 16(3): 343-356. e3.

[17] Bruscoli S, Febo M, Riccardi C, et al. Glucocorticoid therapy in inflammatory bowel disease: mechanisms and clinical practice [J]. Front Immunol, 2021, 12: 691480.

[18] Yang VW. Eicosanoids and inflammatory bowel disease [J]. Gastroenterol Clin North Am, 1996, 25(2): 317-332.

[19] 张国兴, 石荣. 溃疡性结肠炎治疗进展 [J]. 现代中西医结合杂志, 2019, 28(25): 2842-2847.
Zhang GX, Shi R. Progerss in the treatment of ulcerative colitis [J]. Mod J Integr Tradit Chin West Med, 2019, 28(25): 2842-2847.

[20] Ko JK, Auyeung KK. Inflammatory bowel disease: etiology, pathogenesis and current therapy [J]. Curr Pharm Des, 2014, 20(7): 1082-1096.

[21] Loftus EV Jr, Kane SV, Bjorkman D. Systematic review: short-term adverse effects of 5-aminosalicylic acid agents in the treatment of ulcerative colitis [J]. Aliment Pharmacol Ther, 2004, 19(2): 179-189.

[22] Rogler G. Gastrointestinal and liver adverse effects of drugs used for treating IBD [J]. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2010, 24(2): 157-165.

[23] Sha S, Xu B, Kong X, et al. Preventive effects of *Escherichia coli* strain Nissle 1917 with different courses and different doses on intestinal inflammation in murine model of colitis [J]. Inflamm Res, 2014, 63(10): 873-883.

[24] Dembiñski A, Warzecha Z, Ceranowicz P, et al. Synergic interaction of rifaximin and mutaflor (*Escherichia coli* Nissle 1917) in the treatment of acetic acid-induced colitis in rats [J]. Gastroenterol Res Pract, 2016, 2016: 3126280.

[25] Garrido-Mesa N, Utrilla P, Comalada M, et al. The association of minocycline and the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 results in an additive beneficial effect in a DSS model of reactivated colitis in mice [J]. Biochem Pharmacol, 2011, 82(12): 1891-1900.

[26] Souza ÉL, Elian SD, Paula LM, et al. *Escherichia coli* strain Nissle 1917 ameliorates experimental colitis by modulating intestinal permeability, the inflammatory response and clinical signs in a faecal transplantation model [J]. J Med Microbiol, 2016, 65(3): 201-210.

[27] Kruis W, Schütz E, Fric P, et al. Double-blind comparison of an oral *Escherichia coli* preparation and mesalazine in maintaining remission of ulcerative colitis [J]. Aliment Pharmacol Ther,

1997, 11（5）: 853-858.

[28] Rembacken BJ, Snelling AM, Hawkey PM, et al. Non-pathogenic *Escherichia coli* versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial [J]. Lancet, 1999, 354（9179）: 635-639.

[29] Kruis W, Fric P, Pokrotnieks J, et al. Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine [J]. Gut, 2004, 53（11）: 1617-1623.

[30] Henker J, Müller S, Laass MW, et al. Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917（EcN）for successful remission maintenance of ulcerative colitis in children and adolescents: an open-label pilot study [J]. Z Gastroenterol, 2008, 46（9）: 874-875.

[31] Malchow HA. Crohn's disease and *Escherichia coli*. A new approach in therapy to maintain remission of colonic Crohn's disease? [J]. J Clin Gastroenterol, 1997, 25（4）: 653-658.

[32] Campbell HK, Maiers JL, DeMali KA. Interplay between tight junctions & adherens junctions [J]. Exp Cell Res, 2017, 358（1）: 39-44.

[33] González-Mariscal L, Quirós M, Díaz-Coránguez M. ZO proteins and redox-dependent processes [J]. Antioxid Redox Signal, 2011, 15（5）: 1235-1253.

[34] Ukena SN, Singh A, Dringenberg U, et al. Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 inhibits leaky gut by enhancing mucosal integrity [J]. PLoS One, 2007, 2（12）: e1308.

[35] Alvarez CS, Badia J, Bosch M, et al. Outer membrane vesicles and soluble factors released by probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 and commensal ECOR63 enhance barrier function by regulating expression of tight junction proteins in intestinal epithelial cells [J]. Front Microbiol, 2016, 7: 1981.

[36] Veltman K, Hummel S, Cichon C, et al. Identification of specific miRNAs targeting proteins of the apical junctional complex that simulate the probiotic effect of *E. coli* Nissle 1917 on T84 epithelial cells [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2012, 44（2）: 341-349.

[37] Zyrek AA, Cichon C, Helms S, et al. Molecular mechanisms underlying the probiotic effects of *Escherichia coli* Nissle 1917 involve ZO-2 and PKCξ redistribution resulting in tight junction and epithelial barrier repair [J]. Cell Microbiol, 2007, 9（3）: 804-816.

[38] Krause G, Winkler L, Mueller SL, et al. Structure and function of claudins [J]. Biochim Biophys Acta, 2008, 1778（3）: 631-645.

[39] 冯燕海，王凤君. 紧密连接蛋白 Claudin-2 研究进展 [J]. 重庆医学，2018, 47（5）: 697-699.
Feng YH, Wang FJ. Progerss of tight junction associated protein Claudin-2 [J]. Chongqing Med, 2018, 47（5）: 697-699.

[40] Hering NA, Richter JF, Fromm A, et al. TcpC protein from *E. coli* Nissle improves epithelial barrier function involving PKCζ and ERK1/2 signaling in HT-29/B6 cells [J]. Mucosal Immunol, 2014, 7（2）: 369-378.

[41] Wang YR, et al. The administration of *Escherichia coli* Nissle 1917 ameliorates irinotecan-induced intestinal barrier dysfunction and gut microbial dysbiosis in mice [J]. Life Sci, 2019, 231: 116529.

[42] Feldman GJ, Mullin JM, Ryan MP. Occludin: structure, function and regulation [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2005, 57（6）: 883-917.

[43] 徐妹燕，富建华. 紧密连接相关蛋白 Occludin 的研究进展 [J]. 国际儿科学杂志，2012（5）:451-454.
Xu MY, Fu JH. Progress of tight junction associated protein occludin [J]. Int J Pediatr, 2012（5）:451-454.

[44] Alvarez CS, Giménez R, Cañas MA, et al. Extracellular vesicles and soluble factors secreted by *Escherichia coli* Nissle 1917 and ECOR63 protect against enteropathogenic *E. coli*-induced intestinal epithelial barrier dysfunction [J]. BMC Microbiol, 2019, 19（1）: 166.

[45] Wehkamp J, Harder J, Wehkamp K, et al. NF-κB- and AP-1-mediated induction of human beta defensin-2 in intestinal epithelial cells by *Escherichia coli* Nissle 1917: a novel effect of a probiotic bacterium [J]. Infect Immun, 2004, 72（10）: 5750-5758.

[46] Grabig A, Paclik D, Guzy C, et al. *Escherichia coli* strain Nissle 1917 ameliorates experimental colitis via toll-like receptor 2- and toll-like receptor 4-dependent pathways [J]. Infect Immun, 2006, 74（7）: 4075-4082.

[47] Gardlik R, Palffy R, Celec P. Recombinant probiotic therapy in experimental colitis in mice [J]. Folia Biol（Praha）, 2012, 58（6）: 238-245.

[48] Oppong GO, Rapsinski GJ, Tursi SA, et al. Biofilm-associated bacterial amyloids dampen inflammation in the gut: oral treatment with curli fibres reduces the severity of hapten-induced colitis in mice [J]. NPJ Biofilms Microbiomes, 2015, 1: 15019.

[49] Steimle A, Menz S, Bender A, et al. Flagellin hypervariable region

生物技术通报

determines symbiotic properties of commensal *Escherichia coli* strains [J]. PLoS Biol, 2019, 17(6): e3000334.

[50] Behrouzi A, Mazaheri H, Falsafi S, et al. Intestinal effect of the probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 and its OMV [J]. J Diabetes Metab Disord, 2020, 19(1): 597-604.

[51] Shen QC, Huang ZZ, Yao JC, et al. Extracellular vesicles-mediated interaction within intestinal microenvironment in inflammatory bowel disease [J]. J Adv Res, 2021, 37: 221-233.

[52] Fábrega MJ, Rodríguez-Nogales A, Garrido-Mesa J, et al. Intestinal anti-inflammatory effects of outer membrane vesicles from *Escherichia coli* Nissle 1917 in DSS-experimental colitis in mice [J]. Front Microbiol, 2017, 8: 1274.

[53] Cañas MA, Giménez R, Fábrega MJ, et al. Outer membrane vesicles from the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 and the commensal ECOR12 enter intestinal epithelial cells via clathrin-dependent endocytosis and elicit differential effects on DNA damage [J]. PLoS One, 2016, 11(8): e0160374.

[54] Johansson MEV, Gustafsson JK, Holmén-Larsson J, et al. Bacteria penetrate the normally impenetrable inner colon mucus layer in both murine colitis models and patients with ulcerative colitis [J]. Gut, 2014, 63(2): 281-291.

[55] Rodríguez-Nogales A, Algieri F, Garrido-Mesa J, et al. The administration of *Escherichia coli* Nissle 1917 ameliorates development of DSS-induced colitis in mice [J]. Front Pharmacol, 2018, 9: 468.

[56] Algieri F, Garrido-Mesa J, Vezza T, et al. Intestinal anti-inflammatory effects of probiotics in DNBS-colitis via modulation of gut microbiota and microRNAs [J]. Eur J Nutr, 2021, 60(5): 2537-2551.

[57] Chervy M, Barnich N, Denizot J. Adherent-invasive *E. coli*: update on the lifestyle of a troublemaker in Crohn's disease [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(10): 3734.

[58] Zhang YZ, Li YY. Inflammatory bowel disease: Pathogenesis [J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(1): 91-99.

[59] 张维, 滕贵根, 田雨, 等. Elafin 在炎症性肠病患者外周血中的表达及其临床意义[J]. 中华医学杂志, 2016, 96(14): 1120-1123.
Zhang W, Teng GG, Tian Y, et al. Expression of elafin in peripheral blood in inflammatory bowel disease patients and its clinical significance [J]. Natl Med J China, 2016, 96(14): 1120-1123.

[60] Zhang W, Teng GG, Wu T, et al. Expression and clinical significance of elafin in inflammatory bowel disease [J]. Inflamm Bowel Dis, 2017, 23(12): 2134-2141.

[61] 刘子麟, 王蔚虹, 刘芸, 等. 表达 Elafin 的益生菌 Nissle 1917 对小鼠实验性结肠炎的保护作用[J]. 中华医学杂志, 2021, 101(46): 3819-3824.
Liu ZL, Wang (W/Y)H, Liu Y, et al. Elafin-expressing probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 protects against experimental colitis [J]. Natl Med J China, 2021, 101(46): 3819-3824.

[62] Fellermann K, Stange DE, Schaeffeler E, et al. A chromosome 8 gene-cluster polymorphism with low human beta-defensin 2 gene copy number predisposes to Crohn disease of the colon [J]. Am J Hum Genet, 2006, 79(3): 439-448.

[63] Seo EJ, Weibel S, Wehkamp J, et al. Construction of recombinant *E. coli* Nissle 1917 (EcN) strains for the expression and secretion of defensins [J]. Int J Med Microbiol, 2012, 302(6): 276-287.

[64] Praveschotinunt P, Duraj-Thatte AM, Gelfat I, et al. Engineered *E. coli* Nissle 1917 for the delivery of matrix-tethered therapeutic domains to the gut [J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 5580.

[65] Yu M, Kim J, Ahn JH, et al. Nononcogenic restoration of the intestinal barrier by *E. coli*-delivered human EGF [J]. JCI Insight, 2019, 4(16): e125166.

[66] Taupin D, Podolsky DK. Trefoil factors: initiators of mucosal healing [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003, 4(9): 721-732.

[67] Pai R, Tarnawski A. Signal transduction cascades triggered by EGF receptor activation: relevance to gastric injury repair and ulcer healing [J]. Dig Dis Sci, 1998, 43(9 Suppl): 14S-22S.

[68] Yan X, Liu XY, Zhang D, et al. Construction of a sustainable 3-hydroxybutyrate-producing probiotic *Escherichia coli* for treatment of colitis [J]. Cell Mol Immunol, 2021, 18(10): 2344-2357.

[69] Luo XM, Song HX, Yang J, et al. Encapsulation of *Escherichia coli* strain Nissle 1917 in a chitosan-alginate matrix by combining layer-by-layer assembly with $CaCl_2$ cross-linking for an effective treatment of inflammatory bowel diseases [J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2020, 189: 110818.

(责任编辑 张婷婷)