

合成生物学在治疗代谢性疾病中的研究进展

白亮^{1,2}, 黄鹤¹, 王苹^{2*}

1.天津大学化工学院, 天津 300380;

2.天津现代创新中药科技有限公司, 天津 300392

摘要: 代谢性疾病 (metabolic disease, MD) 一直以来是健康领域面临的重大挑战, 其发生发展与宿主的代谢和免疫存在密切联系。近年来基于肠道菌群的治疗策略层出不穷, 特别是利用合成生物学改造的微生物, 对于代谢性疾病的预防和治疗展现出良好的应用潜力。通过对微生物基因路线和代谢途径进行合理设计和改造, 可以实现目标物质的稳定输出和精准投递, 进而治疗疾病。着重综述了合成生物学在代谢性疾病预防和治疗中的研究进展, 以期改善和治疗代谢性疾病提供新的思路和方法。

关键词: 代谢性疾病; 肥胖; 合成生物学; 工程菌; 肠道菌群

DOI: 10.19586/j.2095-2341.2022.0196

中图分类号: R598

文献标志码: A

Advances in Synthetic Biology on the Treatment of Metabolic Diseases

BAI Liang^{1,2}, HUANG He¹, WANG Ping^{2*}

1.School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300380, China;

2.Modern Traditional Chinese Medicine Innovation Center Co., Ltd, Tianjin 300392, China

Abstract: Metabolic diseases (MD) has been a major challenge in health care and its occurrence and development are closely related to the metabolism and immunity. In recent years, treatment strategies based on gut microbiota have incompleted, especially the microorganisms modified by synthetic biology, which show good potential application for the prevention and treatment of MD. To cure diseases, the design and transformation of microbial gene routes and metabolic pathways can achieve stable output and accurate of target substances. This review focused on the research progress of synthetic biology in the prevention and treatment of MD, with a view to providing new ideas and methods for improving and treating MD.

Key words: metabolic disease; obesity; synthetic biology; engineering bacteria; gut mircobiota

代谢性疾病 (metabolic disease, MD) 主要由碳水化合物、蛋白质、脂肪等物质的代谢紊乱引起, 包括肥胖、糖尿病、胰岛素抵抗等, 与饮食习惯、遗传背景、生活规律等诸多因素存在密切联系^[1]。近年来, 随着人们生活水平的提高, MD 发病率不断攀升, 流行趋势日益严峻。最新发布的《中国居民营养与慢性病状况报告 (2020 年)》中指出, 我国居民超重肥胖问题凸显, 成人和青少年的超重及肥胖率均已超过 16%, 并且呈现上升速度快、流行水平高、人群影响广的特点。据预测, 全球范围

内 MD 的发病率已经超过 25%, 而我国成年人的患病率也已经达到了 24.2%, 呈现出快速增长的趋势, MD 已经成为全球公共卫生面临的重大挑战^[1-2]。

MD 的发病机理复杂、涉及因素多, 因此治疗手段相对有限。目前主要通过药物和手术治疗相结合的方式, 治疗效果显著, 但同时不良反应也较为明显, 且难以治愈^[3-4]。近年来, 大量研究显示肠道微生态的平衡与 MD 的发生和发展关系密切^[5]。人体肠道中这些数量庞大、种类繁多的微

收稿日期: 2022-11-21; 接受日期: 2023-03-10

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2019YFA09005600)。

联系方式: 白亮 E-mail: bailiang20101@163.com; *通信作者 王苹 E-mail: pingp-w@163.com

生物广泛参与物质代谢和免疫调节等生理活动,对于维持机体代谢稳态具有重要的作用^[6-8]。通过调节肠道菌群来修复失衡的肠道微生态,进而改善营养物质代谢已成为当前研究的热点。研究显示,单株益生菌、混合菌群及益生菌搭配益生元干预均对 MD 患者起到一定的改善和治疗作用,但其也面临着方法不可控、机理不清晰、稳定性差等问题^[9-10]。因此,亟需新的 MD 治疗策略。

合成生物学是近几十年来发展起来的一门新兴学科,为解决代谢性疾病问题提供了新的思路^[11]。利用合成生物学技术可以实现对包括肠道菌群在内的底盘微生物的定向改造,使其具备高效输出、精准靶向、适应性强等优点,在疾病的诊断、干预和治疗中展现出良好的应用潜力^[12-13]。与传统的单株益生菌或者混合菌群干预不同,基于合成生物学改造的工程菌具备输出稳定、靶向精准、递送持续等特点,同时可以实现多维调控和复杂干预、调节肠道菌群和抑制病原菌、递送药物和定点释放等功能^[14-15]。近年来,合成生物学已经在 MD 基础研究和临床治疗中得到广泛应用,本文将对合成生物学在治疗代谢性疾病中的研究进展进行总结,以期对 MD 的缓解和治疗提供新的思路。

1 合成生物学治疗代谢性疾病的机制

合成生物学为 MD 提供了新的治疗策略,一方面可以通过调节肠道菌群来修复失衡的肠道微生态,改善代谢紊乱,提高免疫力;另一方面结合基因线路设计和代谢工程精准靶向作用部位,持续递送药物分子,最终实现治疗疾病的目的。

1.1 调节肠道菌群

肠道菌群是肠道微生态的主要参与者,依据其对宿主的影响,可以划分为有益菌、共生菌和致病菌。有益菌是肠道菌群的主体,一般为厌氧菌,主要参与调节宿主代谢和免疫等,对人体健康有益;共生菌在正常条件下不会对人体产生危害,但是当肠道菌群失衡时会表现出入侵性;致病菌在肠道菌群所占的比例较小,并且一般需要特定的触发条件才会在肠道内过度繁殖,引起疾病的发生。由此可见,肠道菌群对于维持人体健康具有重要的作用^[16]。

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)

是一种常见的慢性肠道炎症疾病,研究表明 IBD 患者普遍存在肠道菌群失调现象,主要表现为共生菌和致病菌的比例失调,肠道菌群多样性下降。国内研究人员将过氧化氢酶和超氧化物歧化酶基因片段插入大肠杆菌 Nissle 1917(Ecn)中构建了工程菌 ECN-pE,并且用壳聚糖和海藻酸钠包覆该工程菌,发现该工程菌可以有效缓解 IBD 小鼠的炎症,降低细胞凋亡水平,修复肠上皮屏障,而这些作用与肠道菌群的丰度和多样性提高有关^[17]。肝脏是人体重要的代谢器官,慢性酗酒会引起肝脏代谢功能受损和肠道菌群失调,进而引发炎症。研究人员在罗伊氏乳杆菌(*Lactobacillus reuteri*)中构建了过表达白细胞介素 22(interleukin-22, IL-22)的功能模块,发现与酒精性肝病模型小鼠相比,饲喂工程菌的小鼠体内参与抗微生物免疫的 C-型凝集素的表达增加,细菌移位减少,肠道菌群失调得到有效改善,肝脏炎症明显减轻^[18]。癌症一直是临床上难以攻克挑战,而越来越多的研究揭示肠道菌群的失调与癌症的发生关系密切。Chung 等^[19]将戊糖片球菌作为底盘细胞,为其配备了双基因盒子强启动子和治疗蛋白 P8 的编码序列,构建了完整的细菌给药系统,发现给结直肠癌(colorectal cancer, CRC)模型小鼠灌胃构建的工程菌后,可以显著缩小肿瘤体积并抑制肿瘤生长;同时肠内息肉减少,肠道菌群多样性及特殊细菌类群(如 *Akk* 菌属或 *Turicibacter*)等丰度均得以上调。

1.2 调节物质代谢

人体肠道内的代谢是一个极其复杂的过程,混合了宿主和肠道微生物对碳水化合物、脂质、蛋白质等多种物质的降解和吸收。宿主及其肠道微生物在代谢途径之间存在重叠和互补,宿主肠道代谢不足或者障碍在一定程度上可以通过补充特定代谢物或增加相应的肠道菌群代谢途径来解决。美国 Synlogic 构建了用于治疗苯丙酮尿症(phenylketonuria, PKU)的工程菌 SYN1618,研究人员在 Ecn 中构建了 2 种苯丙氨酸(phenylalanine, Phe)代谢途径,一种是通过表达苯丙氨酸裂解酶来将 Phe 转化为反式肉桂酸,该途径需要在细胞内实现且有跨膜运输活动,可以降低 Phe 含量;另一个 Phe 降解途径是通过膜相关的 L-氨基酸脱氨酶(L-amino acid deaminase, LAAD)将 Phe 转化为苯丙酮酸盐(phenylpyruvate, PP),该途径

可以在有氧环境中进行,特别是在小肠近端部位,效率较高且无需跨膜运输参与^[20-22]。有研究已发现工程菌SYNB1618可以有效地抑制小鼠和食蟹猴血清中Phe浓度的升高,将其转化为反式肉桂酸盐,随后进一步被宿主代谢为马尿酸后排出体外,实现对PKU的缓解和治疗。同样以Ecn作为底盘细胞,Synlogic公司又进一步开发了用于减轻高血氨症的工程菌SYNB1020,该工程菌可以有效地捕获肠道中的系统氨(如NH₃等)并将其转化为L-精氨酸,从而降低鸟氨酸转氨酶缺陷小鼠的血氨,提高其存活率;同时,I期临床研究结果显示,工程菌SYNB1020在健康人群中表现出良好的耐受性^[23]。胰岛血糖素样肽-1(glucagon-like 1, GLP-1)是一种由回肠细胞分泌产生的脑肠肽,受葡萄糖刺激后可以促进胰岛素的分泌,是目前II型糖尿病药物的主作用药。Wang等^[24]在乳酸乳球菌中构建了用于表达GLP-1的功能模块,设计并合成了可以稳定表达GLP-1的工程菌M-GLP-1,发现M-GLP-1可以有效地抑制高脂饮食诱导的小鼠肥胖,促进脂肪酸氧化,改善脂质代谢和葡萄糖耐受性,从而保护肝脏。

1.3 调控信号传导

物质代谢往往伴随着信息的传递,由肠道菌群产生的大量代谢产物会向宿主释放相关的生理活动信号。随着对肠道菌群的深入研究,筛选、识别和利用这些信号成为研究人员关注的焦点。Hwang等^[25]以EcN作为底盘细胞,利用合成遗传操作系统对EcN进行了遗传修饰,分别建立了群体感知(quorum sensing, QS)、运动和杀伤功能模块,其中QS模块可以有效地识别铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)分泌的QS分子酰基高丝氨酸内脂(N-acyl homoserine lactone, AHL),当其感知*P. aeruginosa*存在时会激活运动模块,改造的EcN会依据AHL的趋势作用向高浓度信号源生长,接近*P. aeruginosa*并且激活杀伤模块促进抗菌肽和抗菌膜酶的释放,有效地靶向杀死*P. aeruginosa*,该结论也在秀丽隐杆线虫和小鼠两个动物模型中得到了验证。具备基因开关的工程菌还可以有效地评估病原菌在体内外的复制状态,监控其在体内的感染动力学状态,这为筛选相应治疗药物提供了帮助^[14]。此外,肠道菌群代谢产物可以通过供给途径对宿主的代谢、免疫、发育等过程产生影响。短链脂肪酸(short-chain fatty

acids, SCFA)是微生物发酵膳食纤维的重要产物,可以作为能量底物和信号分子参与宿主生理活动,其中丁酸已被证实具有抗炎、抗氧化、保护肠壁屏障等功能^[26]。为了进一步完善高血氨的治疗策略,Synlogic公司对工程菌SYNB1020进行了改良,在强化L-精氨酸途径基础上进一步引入了丁酸的合成途径,构建了工程菌SYNB1536。结果发现工程菌SYNB1536可以降低胆管结扎大鼠的血氨水平,同时降低系统性促炎标示物单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemotactic protein 1, MCP-1)和10 kD干扰素 γ 诱导蛋白(IFN γ -induced protein 10 kD)水平,预防胆管结扎大鼠的记忆力受损^[27]。此外,我们前期的研究结果也显示,补充产丁酸的工程菌可以抑制高脂饮食诱导的食源性肥胖,提高摄食量,改善小鼠代谢和胰岛素耐受性^[28]。肠道共生菌群和宿主细胞产生的胞外三磷酸腺苷(eATP)可以激活嘌呤能信号,促进炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)的发生。研究人员采用定向进化和合成基因回路技术,以酿酒酵母为底盘细胞构建了一株工程益生菌,该工程菌可以感应eATP的存在,进而表达eATP敏感的人P2Y2嘌呤能突变受体,在接受到反馈信号后会进一步表达三磷酸腺苷双磷酸酶,以降解过多的eATP并抑制促炎腺苷的产生,从而抑制肠道炎症,减少纤维化,调节失衡菌群^[29]。

2 合成生物学治疗代谢性疾病的研究

基因编辑、基因测序和生物信息学等技术水平的不断提升,使合成生物学得以快速发展,合成生物学技术已经在MD治疗中得到了广泛应用。目前,基因工程改造微生物的基础研究得到了广泛的关注,在细胞水平和动物实验中取得了理想的治疗效果。与此同时,部分工程化微生物在临床试验阶段也取得了成效,相关研究见表1。

2.1 肥胖

肥胖是典型的慢性MD,主要表现为明显超重和脂肪层过厚,体内脂肪特别是甘油三酯过度积累,且常常伴随着糖脂代谢异常、胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)和高血压。基于GLP-1的降糖特性,有研究团队构建了可持续释放GLP-1的重组表达载体pMG36e-GLP-1,利用该表达载体构建的工程菌可以显著下调高脂饮食小鼠的体重增

表1 当前已进入临床阶段用于治疗代谢性疾病的工程菌

Table 1 Currently engineering bacteria for treatment of metabolic diseases in clinical stage

适应症	靶标物质	作用机制	参考文献
酒精性脂肪肝	IL-22	上调肠道 <i>Reg3g</i> 表达,减少细菌移位至肝脏,缓解肝损伤	[18]
高血氨症	苯丙氨酸	构建 Phe 代谢途径,降低血氨浓度	[20-22]
肥胖	GLP-1	促进胰岛素的分泌,改善血脂代谢,调节肠道菌群组成	[24,30]
	丁酸	改善物质代谢,调节肠道菌群组成	[28,32]
	泛连接蛋白	与 Gβγ 亚基结合后,通过 β3AR 刺激而被激活,调节细胞产热	[33]
糖尿病	筛选抑制剂	筛选 β 细胞分化抑制剂	[38]
	BSH 和 IL-10	响应乳糖浓度信号,调节肠道菌群组成	[39]
	阿那白滞素	改善物质代谢,抵抗炎症	[40-41]
乳糖不耐受	乳糖	响应乳糖浓度信号,调节肠道菌群组成	[42]
庞贝病	α-葡萄糖苷酶	构建编码 α-葡萄糖苷酶,降解糖原浓度	[44]
粘多糖症	蛋白聚糖	构建编码人 α-N-乙酰氨基葡萄糖苷酶,降解蛋白聚糖浓度	[51]

长,提高葡萄糖耐受性,改善血脂代谢异常和肠道菌群失调,缓解炎症^[24,30]。此外,基于工程菌表达 GLP-1 缓解和治疗肥胖的策略,在其他益生菌中也得到了验证^[31]。除了 GLP-1 之外,肠道菌群代谢产生的短链脂肪酸(short-chain fatty acids, SCFA)也可以调节能量和物质代谢,对肥胖的发生和发展具有重要的影响。本团队前期的研究结果显示,高产丁酸的工程菌具有预防和缓解食源性肥胖的效果,这些影响与物质代谢变化和肠道菌群构成存在密切联系^[28,32]。泛连接蛋白(pannexin-1, Panx1)通道与棕色脂肪组织的激活和产热有关。Senthivayagam 等^[33]发现 Panx1 可以与 Gβγ 亚基结合,在受到 β3AR 刺激后被激活,而在棕色脂肪组织中抑制 Panx1 通道会抑制 β3AR 脂解,降低线粒体解偶联蛋白(uncoupling protein, UCP-1)的表达,减少细胞产热。因此,通过提高 Panx1 蛋白表达,激活相关通道可以提高细胞的产热能力,这对于肥胖的治疗具有重要意义。

2.2 糖尿病

糖尿病是一种典型的 MD,由于胰腺 β 细胞功能渐进性丧失而导致的慢性高血糖症,同时可以引起多种并发症^[34]。人类多功能干细胞(human pluripotent stem cell, hPSC)是一类具有强大分化功能的细胞,可以为发病机制的探索提供有效模型^[35]。借助合成生物学技术,基于 hPSC 衍生的 β 细胞,在糖尿病治疗策略中发挥了重要的作用^[36-37]。基于 Hippo-YAP 的信号通路在 β 细胞分化过程中具有的重要作用,通过使用抑制剂

Verteporfin 在内分泌过程中抑制 Yes 相关蛋白(Yes-associated protein, YAP)可以有效地增加内分泌干细胞中 NGN3 的表达,增强 β 细胞分化和分泌功能^[38]。此外,来自美国的研究人员从正常小鼠中分离和收集了天然的大肠杆菌并对其进行了基因工程改造,使其可以表达胆盐水解酶(bile salt hydrolase, BSH)和白细胞介素 10(interleukin-10, IL-10),结果发现改造的工程菌可以在小鼠肠道中长期定殖,促进葡萄糖和脂肪代谢以及产热,提高免疫力,改善小鼠的胰岛素敏感性和葡萄糖耐量,对糖尿病具有显著的改善作用^[39]。此外,由基因工程技术生产的 IL-1 受体拮抗剂阿那白滞素(anakinra)是目前治疗 1 型糖尿病的药物之一,通过抵抗炎症来增强胰岛细胞的分泌能力,因其良好的临床治疗效果,已经在国外获批上市^[40-41]。

2.3 脂肪肝

过度酗酒会引起肝脏代谢功能紊乱,引发酒精性脂肪肝。与健康个体相比,酒精性肝炎患者的肠道中吲哚-3-乙酸(indole-3-acetic acid, IAA)水平降低,肠道菌群失调且多样性下降,IL-22 表达减少。而向酒精性肝病模型小鼠饲喂可以表达 IL-22 的工程菌后,参与抗微生物免疫的 C-型凝集素 Reg3g 和 IAA 水平升高,肠道菌群多样性增加,细菌向肝脏的移位减少,从而缓解了乙醇对肝脏的损伤^[18]。

2.4 乳糖不耐受症

乳糖不耐受是指人体内无法产生足量能够分解乳糖的乳糖酶,从而导致腹痛、痉挛和腹泻等症

状。研究人员通过合成生物学设计并构建了三稳态开关通路,可通过响应肠内乳糖以及pH信号进行功能状态切换,实时表达乳糖酶,该工程菌可以有效地调节模型小鼠失调的肠道菌群,缓解其乳糖不耐受症状^[42]。

2.5 高血氨症

Synlogic 公司研制的工程菌 SYNBI618 在 PKU 模型小鼠和健康食蟹猴中取得了良好的疗效后进一步开展了临床试验,然而目前并没有临床阶段的研究结果公布^[21]。而该公司另外一株用于治疗高血氨的工程菌 SYNBI020 在动物和健康人体实验中均表现出了良好的降氨活性,但在 1b/2a 期临床研究中发现该菌株不能降低血氨水平后便宣布停止了该菌株的后续研发工作^[39]。

2.6 庞贝病

庞贝病属于常染色体隐性遗传病,是一种由于酸性麦芽酶缺陷引起的糖原在溶酶体内过多积累而导致的糖原代谢障碍^[43]。研究人员将酸性 α -葡萄糖苷酶(acid α -glucosidase, GAA)基因导入腺病毒用于治疗庞贝病及其慢性呼吸衰竭,结果表明该基因疗法是安全的,并且可以改善患者的病症和通气指标^[44]。来自宾夕法尼亚大学的研究人员设计了一种新的基因治疗方法,使用一种携带工程 GAA 修饰的泛热带 AAV 衣壳载体,用于修复分泌和吸收功能,可以有效改善麦芽酶缺陷小鼠心脏和中枢神经系统的病理状态^[45]。在另外一项研究中,向麦芽酶缺陷新生小鼠注射血清型 AAV8 和 AAV9 混合串联肝肌启动子(LiMP),可以在肝外组织中实现多系统基因的持续表达,预防抗转基因免疫并且可以改善庞贝病^[46]。

2.7 其他疾病

除了上述代谢性疾病外,合成生物学也逐渐在肿瘤、传染性疾病和血液疾病中开展研究,并且取得了一定效果^[47-49]。例如, Hu 等^[47]使用 CRISPR/Cas 系统切割 HPV16 阳性宫颈癌细胞系中的 E7 癌基因,发现 E7 基因的破坏和随后 E7 癌蛋白的丢失恢复了肿瘤抑制因子 pRb 的表达,从而直接导致 HPV16 阳性细胞的凋亡和生长抑制。因此, HPV16-E7 gRNA-引导的 CRISPR/Cas 是一种潜在的治疗宫颈癌的策略。

粘多糖病是因为先天性缺少蛋白聚糖酶所引起的蛋白聚糖分解代谢障碍,是一种常染色体隐

性遗传病,患者常伴随多系统并发症,且寿命较短^[50]。研究人员以重组腺病毒为载体整合了可以编码人 α -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶的片段,结合免疫抑制疗法用于治疗儿童粘多糖 III B 型综合征,发现该疗法可以有效地改善粘多糖病患儿的认知和精神状态,缓解蛋白聚糖的代谢紊乱。然而本次临床试验只招募了 7 个儿童患者,未来还需要进一步增加临床样本数量以确保治疗的安全性、有效性和稳定性^[51]。

3 展望

近年来,基于合成生物学预防和治疗 MD 得到了快速发展,为未来肥胖、糖尿病、脂肪肝等疾病的治疗提供了新的思路和方法,其中,调节肠道菌群、调控物质代谢和信号传导是其主要的作用机制,并且在多种 MD 中得到了验证。基于合成生物学构建的工程菌集合了天然传统分子药物和益生菌二者的优点,可以精准靶向并且高效输出药物分子,以此达到改善或者治疗疾病的目的。

目前,虽然合成生物学在医药领域开展了广泛的研究,但仍然面临着许多问题。首先,基础研究缺乏系统性和完整性,工程菌的设计一般只考虑底盘特征,缺少对宿主细胞特征和系统鲁棒性等因素的考量,在时间和空间上难以实现精准可控;其次,政策和伦理上受限,美国食品药品监督管理局早在 2016 年就出台指南明确了生物疗法产品使用准则,以及基因工程产品在临床上的适用范围,有利于推动合成生物学在临床中的应用,而我国在这方面的监管较弱,缺乏针对性的政策指导和规范,临床应用也相对较少。因此,尽管合成生物学技术已经在临床中开展了大量的试验,但仍然需要关注基础研究,注重工程菌的合理设计,同时加快政策布局,建立高效的评估体系,促进合成生物学产品的健康发展。相信随着现代生物技术的不断发展和完善,与合成生物学相关的基础研究会进一步深入,并且推动其在临床试验中的应用,为 MD 的治疗提供新思路和方法。

参 考 文 献

- [1] LI Y, ZHAO L, YU D, *et al.* Metabolic syndrome prevalence and its risk factors among adults in China: a nationally representative cross-sectional study[J/OL]. PLoS ONE, 2018, 13(6): e0199293

- [2018-06-19]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199293>.
- [2] SAKLAYEN M G. The global epidemic of the metabolic syndrome[J/OL]. *Curr. Hypertens. Rep.*, 2018, 20(2): 12[2018-02-26]. <https://doi.org/10.1007/s11906-018-0812-z>.
 - [3] FARR O M, MANTZOROS C S. Treating prediabetes in the obese: are GLP-1 analogues the answer? [J]. *Lancet*, 2017, 389(10077): 1371-1372.
 - [4] BOHULA S, SCIRICA B M, INZUCCHI S E, *et al.* Effect of lorcaserin on prevention and remission of type 2 diabetes in overweight and obese patients (CAMELLIA TIMI 61): a randomised, placebo-controlled trial[J]. *Lancet*, 2018, 392(10161): 2269-2279.
 - [5] DABKE K, HENDRICK G, DEVKOTA S. The gut microbiome and metabolic syndrome[J]. *J. Clin. Invest.*, 2019, 129(10): 4050-4057.
 - [6] MACKE E, TASIEMDKI, MASSOL F, *et al.* Life history and eco-evolutionary dynamics in light of the gut microbiota[J]. *OIKOS*, 2017, 126(4): 508-531.
 - [7] 刘梓嘉, 姜雪, 仪杨, 等. 氢气与肠道菌群的关系研究进展[J]. *生物技术进展*, 2022, 12(6): 847-852.
 - [8] VALDES A M, WALTER J. Role of the gut microbiota in nutrition and health[J/OL]. *Brit. Med. J.*, 2018, 361: k2179[2018-06-13]. <https://doi.org/10.1136/bmj.k2179>.
 - [9] DORON S, SNYDMAN D R. Risk and safety of probiotics[J]. *Clin. Infect Dis.*, 2015, 60(S2): 129-134.
 - [10] TAPIOVAARA L, LEHTORANTA L, POUSSA T, *et al.* Absence of adverse events in healthy individuals using probiotics-analysis of six randomised studies by one study group[J]. *Benef. Microbes.*, 2016, 7(2): 161-169.
 - [11] BERMUDZ-HUMARAN L G, LANGELLA P. Live bacterial biotherapeutics in the clinic[J]. *Nat. Biotechnol.*, 2018, 36(9): 816-818.
 - [12] 权春菊, 郑忠亮. CRISPR/Cas 及其衍生编辑技术在基因治疗中的应用进展[J]. *生物技术进展*, 2021, 11(4): 518-525.
 - [13] BOER J R, BEISEL C L, NAIR N U. Synthetic biology approaches to engineer probiotics and members of the human microbiota for biomedical applications[J]. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 2018, 20: 277-300.
 - [14] CERTAIN L K, WAY J C, PEZOEN M J, *et al.* Using engineered bacteria to characterize infection dynamics and antibiotic effects in vivo[J]. *Cell Host Microbe.*, 2017, 22: 263-268.
 - [15] FERENCZI S, SOLYMOSI N, HORVATH I, *et al.* Efficient treatment of a preclinical inflammatory bowel disease model with engineered bacteria[J]. *Mol. Ther.*, 2020, 20: 218-226.
 - [16] LI J, RIAZ R M S, SHAO D, *et al.* Strategies to increase the efficacy of using gut microbiota for the modulation of obesity[J]. *Nat. Rev. Immunol.*, 2017: 17: 219-232.
 - [17] ZHAO J, LI M Y, CHEN Q F, *et al.* Programmable probiotics modulate inflammation and gut microbiota for inflammatory bowel disease treatment after effective oral delivery[J/OL]. *Nat. Commun.*, 2022, 13(1): 3432[2022-06-14]. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31171-0>.
 - [18] HENDRIKX T, DUAN Y, WANG Y H, *et al.* Bacteria engineered to produce IL22 in intestine induce expression of REG3G to reduce ethanol-induced liver disease in mice[J]. *Gut*, 2019, 68(8): 1504-1515.
 - [19] CHUNG Y, RYU Y, AN B C, *et al.* A synthetic probiotic engineered for colorectal cancer therapy modulates gut microbiota[J/OL]. *Microbiome*, 2021, 9(1): 122[2021-05-26]. <https://doi.org/10.1186/s40168-021-01071-4>.
 - [20] 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]. *Nat. Biotechnol.*, 2018, 36(9): 857-864.
 - [21] HOU Y, HOSSAIN G S, LI J H, *et al.* Two-step production of phenylpyruvic acid from L-phenylalanine by growing and resting cells of engineered *Escherichia coli*: process optimization and kinetics modeling[J/OL]. *PLoS ONE*, 2016, 11(11): e0166457 [2016-11-16]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166457>.
 - [22] PANTALEONE D P, GELLER A M, TAYLOR P, *et al.* Purification and characterization of an L-amino acid deaminase used to prepare unnatural amino acids[J]. *J. Mol. Catal. B Enzym.*, 2001, 11(4-6): 795-803.
 - [23] KURTZ C B, MILLET Y A, PUURUNEN M K, *et al.* An engineered *E. coli* Nissle improves hyperammonemia and survival in mice and shows dose-dependent exposure in healthy humans[J/OL]. *Sci. Transl. Med.*, 2019, 11(475): eaau7975 [2019-01-16]. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aau7975>.
 - [24] 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/OL]. *Front. Cell. Infect. Mi.*, 2021, 11: 595575 [2021-02-25]. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.595575>.
 - [25] 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/OL]. *Nat. Commun.*, 2017, 8: 15028[2017-04-11]. <https://doi.org/10.1038/ncomms15028>.
 - [26] KOH A, DE-VADER F, KOVATCHEVA-DATCHARY P, *et al.* From dietary fiber to host physiology: short-chain fatty acids as key bacterial metabolites[J]. *Cell*, 2016, 165(6): 1332-1345.
 - [27] OCHOA-SANCHEZ R M, OLIVEIRA M, TREMBLAY M, *et al.* Genetically engineered *E. coli* nissle attenuates hyperammonemia and prevents memory impairment in bile-duct ligated rats[J]. *Liver Int.*, 2021, 41(5): 1020-1032.
 - [28] BAI L, GAO M X, CHENG X M, *et al.* Engineered butyrate-producing bacteria prevents high fat diet-induced obesity in mice[J/OL]. *Microb. Cell Fact.*, 2020, 19: 94[2020-04-25]. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01350-z>.
 - [29] MSCOTT B, GUTIERREZ-VAZQUEZ C, SANMARCO L M, *et al.* Self-tunable engineered yeast probiotics for the treatment of inflammatory bowel disease[J]. *Nat. Med.*, 2021, 27(7): 1212-1222.
 - [30] TIAN P Y, HUANG Z X, ZHAO X X, *et al.* Engineered commensal bacteria prevent systemic inflammation-induced memory impairment and amyloidogenesis via producing GLP-1[J]. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2018, 102(17): 7565-7575.
 - [31] MA J, LI C Y, WANG J R, *et al.* Genetically engineered *Escherichia coli* Nissle 1917 secreting GLP-1 analog exhibits potential antiobesity effect in high-fat diet-induced obesity mice[J]. *Obesity*, 2020, 28(2): 315-322.

- [32] WANG L N, CHENG X M, BAI L, *et al.* Positive interventional effect of engineered butyrate-producing bacteria on metabolic disorders and intestinal flora disruption in obese mice[J/OL]. *Microbiol. Spectr.*, 2022, 10(2): e0114721[2022-04-27]. <https://doi.org/10.1128/spectrum.01147-21>.
- [33] SENTHIVINAYAGAM S, SERBULEA V, UPCHURCH C M, *et al.* Adaptive thermogenesis in brown adipose tissue involves activation of pannexin-1 channels[J/OL]. *Mol. Metab.*, 2020, 44: 101130[2020-11-25]. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2020.101130>.
- [34] ATKINSON M A, VON HERRATH M, POWERS A C, *et al.* Current concepts on the pathogenesis of type 1 diabetes-considerations for attempts to prevent and reverse the disease[J]. *Diabetes Care*, 2015, 38(6): 979-988.
- [35] ABDELALIM E M. Modeling different types of diabetes using human pluripotent stem cells[J]. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2021, 78: 2459-2483.
- [36] VETHE H, BJORLYKKE Y, GHILA L M, *et al.* Probing the missing mature β -cell proteomic landscape in differentiating patient iPSC-derived cells[J/OL]. *Sci. Rep.*, 2017, 7(1): 4780 [2017-07-06]. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04979-w>.
- [37] JINNG N H, BINTEJASMEN J, LIM C S, *et al.* HNF4A haplo-insufficiency in MODY1 abrogates liver and pancreas differentiation from patient-derived induced pluripotent stem cells[J]. *iScience*, 2019, 16: 192-205.
- [38] ROSADA-O, IVERI E A, ANDERSON K, KENTY J H, *et al.* YAP inhibition enhances the differentiation of functional stem cell-derived insulin-producing β cells[J/OL]. *Nat. Commun.*, 2019, 10(1): 1464[2019-04-01]. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09404-6>.
- [39] RUSSELL B J, BROWN S D, SIGUENZA N, *et al.* Intestinal transgene delivery with native *E. coli* chassis allows persistent physiological changes[J]. *Cell*, 2022, 185(17): 3263-3277.
- [40] SUMPTER K M, ADHIKARI S, GRISHMAN E K, *et al.* Preliminary studies related to anti-interleukin-1 β therapy in children with newly diagnosed type 1 diabetes[J]. *Pediatr. Diabet.*, 2011, 12(7): 656-667.
- [41] KRON J, CRAWFORD T, MIHALICK V, *et al.* Interleukin-1 blockade in cardiac sarcoidosis: study design of the multimodality assessment of granulomas in cardiac sarcoidosis: anakinra randomized trial (MAGiC-ART) [J/OL]. *J. Transl. Med.*, 2021, 19(1): 460[2021-11-08]. <https://doi.org/10.1186/s12967-021-03130-8>.
- [42] CHENG M Y, CHENG Z Y, YU Y Y, *et al.* An engineered genetic circuit for lactose intolerance alleviation[J/OL]. *BMC Biol.*, 2021, 19: 137[2021-07-05]. <https://doi.org/10.1186/s12915-021-01070-9>.
- [43] SMITH B K, COLLINS S W, CONON T J, *et al.* Phase I/II trial of adeno-associated virus-mediated alphaglucohydrolase gene therapy to the diaphragm for chronic respiratory failure in Pompe disease: initial safety and ventilatory outcomes[J]. *Hum. Gene Ther.*, 2013, 24: 630-640.
- [44] CORTI M, LIBERATI C, SMITH B K, *et al.* Safety of intradiaphragmatic delivery of adeno-associated virus-mediated alpha-glucosidase (rAAV1-CMV-hGAA) gene therapy in children affected by Pompe disease[J]. *Hum. Gene Ther. Clin. Dev.*, 2017, 28(4): 208-218.
- [45] TUSKE S, YU T, HORDEAUX J, *et al.* Development of a novel gene therapy for pompe disease: engineered acid alpha-glucosidase transgene for improved expression and muscle targeting[J]. *Mol. Ther.*, 2002, 5(1): 571-578.
- [46] COLELLA P, SELLIER P, VERDERA H C, *et al.* AAV gene transfer with tandem promoter design prevents anti-transgene immunity and provides persistent efficacy in neonate pompe mice[J]. *Mol. Ther.*, 2018, 12: 85-101.
- [47] HU Z, LAN Y, ZHU D, *et al.* Disruption of HPV16-E7 by CRISPR/Cas system induces apoptosis and growth inhibition in HPV16 positive human cervical cancer cells[J/OL]. *Biomed. Res. Int.*, 2014, 2014: 612832[2014-07-20]. <https://doi.org/10.1155/2014/612832>.
- [48] XU L, WANG J, LIU Y L, *et al.* CRISPR-edited stem cells in a patient with HIV and acute lymphocytic leukemia[J]. *New Engl. J. Med.*, 2019, 381: 1240-1247.
- [49] OU L, PRZYBILLA M J, AHLAT O, *et al.* A highly efficacious PS gene editing system corrects metabolic and neurological complications of mucopolysaccharidosis type I[J]. *Mol. Ther.*, 2020, 28(6): 1442-1454.
- [50] SAWAMOTO K, CHEN H H, ALMECIGA-DIAZ C J, *et al.* Gene therapy for mucopolysaccharidoses[J]. *Mol. Genet. Metab.*, 2018, 123: 59-68.
- [51] TARDIEU M, ZERAH M, GOUGENON M L, *et al.* Intracerebral gene therapy in children with mucopolysaccharidosis type IIIB syndrome: an uncontrolled phase 1/2 clinical trial[J]. *Lancet Neurol.*, 2017, 16(9): 712-720.