



乳酸菌作为重组蛋白药物递送载体的研究

王旭昉, 王彦婷, 姚春萌, 陆斌

Lactic acid bacteria as recombinant protein drug delivery carrier

WANG Xufang, WANG Yanting, YAO Chunmeng, LU Bin

在线阅读 View online: <http://yxsj.smmu.edu.cn/cn/article/doi/10.12206/j.issn.2097-2024.202309021>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

抗肿瘤药物纳米粒载体的制备材料、包载药物及修饰方法

Preparation materials, drug loading and modification of nanoparticles as anticancer drug carrier
药学实践与服务. 2018, 36(4): 307-312,350 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2018.04.005

聚乙二醇衍生物及其蛋白药物修饰研究进展

Advances in the development of PEG derivatives and pegylated protein drugs
药学实践与服务. 2018, 36(4): 301-306,328 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2018.04.004

微凝胶的制备及其在药物缓控释系统中的应用

Preparation and application of micro gels in sustained and controlled release drug delivery systems
药学实践与服务. 2019, 37(3): 212-215,221 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2019.03.004

用疏水改性的白及多糖制备载紫杉醇纳米粒并对其表征

Paclitaxel loaded nanoparticles with cholesterol succinyl bletilla striata polysaccharide as a carrier
药学实践与服务. 2017, 35(1): 48-53 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2017.01.012

适配体C2min介导的可靶向2种前列腺癌基因的递送系统

The C2min aptamer-modified gene delivery system for targeting ADPC/AIPC prostate cancer
药学实践与服务. 2020, 38(1): 47-51,66 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.201906038

中药挥发油临床抑菌作用及其环糊精制剂研究概况

Advances in clinical anti-bacteria and cyclodextrin inclusion of volatile oil
药学实践与服务. 2017, 35(5): 394-397 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2017.05.002



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

· 综述 ·

乳酸菌作为重组蛋白药物递送载体的研究

王旭昉, 王彦婷, 姚春萌, 陆 斌 (海军军医大学药理学系, 上海 200433)

[摘要] 乳酸菌基于其安全性、益生性及肠道可定植性, 是活体药物递送系统的良好候选者, 现阶段众多研究将其作为蛋白药物递送载体用于疾病治疗。作为一种模式生物, 多样化的基因修饰方案使其可以应用于各类疾病并能够发挥显著的治疗效果。乳酸菌药物载体具有多种优势, 包括无创给药、基因可编辑性、可大规模生产等, 因此利用乳酸菌作为重组蛋白表达载体的研究引起了全球范围的关注。本文对乳酸菌药物递送系统的应用基础、生物利用度提升、基因编辑策略以及研究应用现状进行了归纳和总结。

[关键词] 乳酸菌; 生物药物; 递送载体

[文章编号] 2097-2024(2023)00-0001-05

[DOI] 10.12206/j.issn.2097-2024.202309021

Lactic acid bacteria as recombinant protein drug delivery carrier

WANG Xufang, WANG Yanting, YAO Chunmeng, LU Bin (School of Pharmacy, Naval Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] Lactic acid bacteria is a good candidate in living drug delivery system for its safety, beneficial nature, and intestinal colonizability. At present, most studies use it as a protein drug delivery carrier for disease treatment. As a model organism, a variety of gene modification schemes enable it to be applied to various diseases and can play a significant therapeutic effect. Lactic acid bacteria drug carrier has many advantages, including non-invasive drug delivery, gene editing, large-scale production. Therefore, the use of lactic acid bacteria as recombinant protein expression vector has attracted global attention. In this review, the application basis, bioavailability improvement, gene editing strategy and research and application status of lactobacillus drug delivery system were summarized.

[Key words] lactic acid bacteria; biological drug; delivery carrier

乳酸菌(Lactic acid bacteria, LAB)是一类能够通过代谢碳水化合物并发酵产生终产物乳酸的细菌统称, 属于厚壁菌门、乳酸杆菌目。作为一种革兰氏阳性、兼性厌氧菌, LAB无芽孢, 基因组GC含量低^[1]。根据细胞形态分类包括乳球菌属、链球菌属、片球菌属、明串珠菌属、双歧杆菌属和乳杆菌属等^[2]。多种类型的乳酸菌一直被应用于传统的食品发酵领域, 由于其在人类食品营养领域表现出长期的安全性, 被美国食品和药品管理局(FDA)认为是安全的(GRAS), 并成为一种公认的食品级微生物^[3-4]。乳酸菌在乳制品、饮料、肉类、蔬菜以及发酵食品的生产中发挥着重要的作用, 在赋予风味的同时, 乳酸菌普遍能够通过产酸来保存食物, 一些菌株还可以通过产生细菌素来增强抑菌能力。机体经过口服或其它途径摄入的乳酸菌, 往

往能够定植于宿主的肠道中并改善肠道菌群平衡发挥益生性, 因此, 世界卫生组织将其定义为益生菌, 即适量摄入时能够对健康产生益处的活的微生物。人体存在着数以万亿计的微生物, 它们受到机体遗传、环境、饮食和生活方式等多种因素影响, 由这些菌群构成的微生态系统与人体健康和某些疾病的发生发展有着密切的关系。随着下一代测序技术的出现, 揭示出人体内庞大而多样的微生物类群, 共生菌群与机体相关疾病的关系被逐渐阐明^[5]。胃肠道中存在数量庞大的微生物群落, 当群落平衡受到破坏时, 会导致感染性疾病、免疫失调和代谢失衡的发生^[6]。在肠道微生物菌群中一些乳酸菌的功能被逐渐发现, 它们可以在消化道内存活并发挥多种功效, 包括治疗腹泻、刺激免疫系统、改善纤维消化、抗肿瘤和降低胆固醇等, 作为机体的益生菌, 对乳酸菌的研究引起了人们的广泛关注。

基于乳酸菌的安全性、益生性以及胃肠道存活能力, 为乳酸菌成为一种高生物技术潜力工程菌提供了良好的应用基础; 同时得益于基因工程技术的

[作者简介] 王旭昉, 助教, 硕士, 研究方向: 抗肿瘤生物药物研究, Email: 17714334003@163.com

[通信作者] 陆 斌, 副教授, 博士, 研究方向: 肿瘤治疗与抗体药物研发, Email: binlu@smmu.edu.cn

发展,重组乳酸菌可以跨越物种屏障,生产各种重组蛋白和代谢产物,在乳制品发酵、氨基酸生产、生物药物递送以及黏膜疫苗载体中应用广泛^[4,7]。蛋白类的生物活性物质或药物以口服途径给药最为方便快捷,但通常面临胃肠道中蛋白水解和降解变性的问题,因此,亟需开发出一种药物递送系统可以用于口服给药。食品级乳酸菌属于非致病性微生物,适合作为口服或者黏膜治疗药物的递送载体,部分菌种可以在胃肠道恶劣的环境中存活下来。开发乳酸菌作为重组蛋白药物递送系统的载体,一般采用基因工程技术改造乳酸菌,通过口服或黏膜给予乳酸菌的方式,利用黏膜递送系统促使药物吸收进入机体,达到预防或治疗疾病的目的,该药物递送系统为蛋白药物应用提供了一种替代给药方式^[8]。与其他相对成熟的细菌或酵母蛋白表达系统相比,乳酸菌综合了这些蛋白表达系统的优势,无包涵体及内毒素产生,外源蛋白可胞内、外表达或表面展示,多种类型表达载体可供选择,同时具有部分独有的特性如益生性、安全性等,但是由于胃肠道系统对乳酸菌生存的限制以及乳酸菌活体微生物的特殊性,乳酸菌作为药物递送系统也面临着诸多挑战。

1 乳酸菌载药系统的安全性和有效性

乳酸菌作为非致病性革兰氏阳性菌,通常被认为对人体健康是安全的。不同于大肠杆菌表达系统,乳酸菌作为工程菌用于外源蛋白表达的过程中不会产生内毒素,避免了对机体造成损伤的可能性^[9]。同时通过口服等途径摄入乳酸菌来进行蛋白药物递送,无需经过复杂的产物分离纯化步骤,定植存活于肠道中的乳酸菌可以持续进行表达,在人体中发挥特定的功效。与传统生物药物需注射给药途径相比,乳酸菌载药系统给药途径便捷,给药频次减少,机体依从性相对较好,因此,食品级乳酸菌成为绝佳的生物药物递送载体。作为人体天然的肠道宿主菌,部分乳酸菌能够定植于肠道直接和肠黏膜接触,利用基因工程的方法使重组乳酸菌表达外源蛋白,乳酸菌可直接将药物通过黏膜吸收到机体,开发出的此类生物活性分子可用于黏膜免疫或黏膜药物递送。人体黏膜约 400 m²,涵盖了胃肠道、呼吸道和泌尿生殖系统,给药面积大,黏膜药物递送载体通过口服、鼻腔、阴道等途径比注射给药途径更加方便^[10]。

为寻求更加安全、有效、易于管理的工程菌,转基因微生物的深入研究使得乳酸菌的遗传和分

子性状被阐明,部分乳酸乳球菌和乳酸杆菌因其固有的佐剂和免疫调节能力而被开发应用,另外一些乳杆菌属因其具有抵抗低 pH 的能力,并可附着于肠道上皮细胞而被用于口服疫苗的开发^[11]。乳酸球菌作为乳酸菌中的一种,具备生长速度快、易于操作、自身抗原性弱、不引起机体强烈免疫应答的特点,被认为是非侵入性和非致病性的种属,同时,由于其自身分泌蛋白和胞外蛋白酶产生较少,极大程度降低了对外源蛋白的干扰程度,保留外源蛋白的完整性和功能性,在多种疾病模型中作为功能性蛋白递送载体具有显著的优势^[12]。乳酸球菌中的亚种 MG1363 已经完成了基因组的测序工作,证明乳酸球菌作为乳酸菌中最具特征性的菌种,同大肠杆菌和枯草芽孢杆菌一样可以成为分泌外源蛋白的最佳工程菌^[13]。基于这些特点,乳酸菌受到了全球研究者的高度关注,其自身的安全性和低风险性更易于在疾病的治疗中得到接受,有望成为一种有前途的细胞工厂。

2 重组乳酸菌在消化系统中的保护策略

由于机体胃肠道的恶劣环境,口服重组乳酸菌后表达的肽类及蛋白类药物往往不能发挥显著的生物学功效,很难在疾病治疗中发挥作用。该问题的主要原因在于乳酸菌经过胃肠道后存活率显著下降,药物表达量不足。多种因素限制乳酸菌的存活,包括胃的酸性 pH 值、消化酶、胆汁盐的存在等^[14]。在一项研究乳酸菌在人体胃肠道药动学的实验中表明,分别口服给予植物乳杆菌 NCIMB8826、发酵乳杆菌 KLD 和乳酸球菌 MG1363,4 h 后收集回肠液进行分析,发现回肠中活菌的存活率分别为 7%、0.5% 和 1.0%,连续口服 7 天后,植物乳杆菌 NCIMB 8826 的存活率为 (25±29)%,没有菌株在体内定植^[15]。在体内和体外模拟胃转运过程测试乳球菌 N7 的存活率,在体外模拟的胃肠道环境(含有 0.5% 胆汁盐、pH 值为 2.5 的 GM17 琼脂板中)时,N7 菌株只显示出中等的存活率,在口服给予小鼠后活菌只能在 24~48 h 的粪便中监测到,只有通过每天给药的方式才能保证活菌株 N7 持续存在于肠道中,这一研究表明胃肠道环境可能会严重降低乳球菌的活性^[16]。传统的蛋白药物保护方式如水凝胶、微球、脂质系统和纳米颗粒等口服递送系统也很难抵抗胃肠道环境,极易导致蛋白质变性和降解,较难用于乳酸菌的保护^[17]。

乳酸菌通常必须在胃部的酸性环境中存活下来,并以活菌状态到达小肠定植才能发挥治疗功

效。通过现有的技术筛选获得能够抵抗胃肠道系统的菌株作为蛋白药物递送载体,可以有效减少给药频次和剂量,从而达到提高治疗效果的目的,这成为开发乳酸菌应用的一个方向。基于 qPCR 技术通过对 16S rRNA 的研究,已经证实部分乳酸菌可以在人体表面和体内进行很好的定植,迄今为止已经在消化道内检测到超过 20 种乳酸菌,口腔和阴道中乳酸菌的比例达到了最高,表明相比于胃肠道系统,在开放环境中人体更容易获得乳酸菌。从人体或动物的肠道中分离获得的乳酸菌与其他种属的乳酸菌相比有着更强的黏附能力,例如 *B.longum* 和 *Bcateroides thetaiotaiotaomicron*^[18]。另一方面,设计合适的益生菌制剂用于延长保存期限、保持益生菌进入体内后的活力、抵抗胃液环境。利用藻酸盐通过喷雾干燥包封活的益生菌,作为一种高效实用技术,干燥细粉末颗粒状态的益生菌产品在冷藏 8 周后,仍表现出稳定的活性状态,暴露于酸性条件时藻酸提供了隔离保护作用,在局部起到 pH 缓冲的作用,该技术为益生菌在食品和医药行业的商业化应用提供了一种可行的方案^[19]。采用藻酸盐和甘露醇共封装产叶酸的乳酸乳球菌,胶囊化的乳酸菌与普通乳酸菌相比在模拟胃液和肠液的环境中存活率得到明显提升,产生了几乎与游离细胞相当的叶酸,混合包埋方法为乳酸乳球菌提供了很好的保护作用^[20]。此类包封包埋方法对于许多 pH 敏感的乳酸菌有着很好的保护效果,提供了一种提高乳酸菌胃肠道存活能力的方法。

3 重组乳酸菌的蛋白表达系统

乳酸菌作为基因工程中常见宿主菌,重组蛋白的表达多利用质粒载体工具来实现,依赖于外源基因克隆至表达载体并转导进入乳酸菌中。根据功能性外源蛋白表达的目的,一般包括三种表达策略:细胞质表达(CE)、细胞表面展示(SD)和细胞外分泌(ES)。不同的表达策略使乳酸菌可以在机体特定环境中发挥对应功效,用于黏膜免疫或治疗性药物的开发^[21]。最早被开发出来的 pWV01 和 pSH71 质粒复制系统,具有宿主范围广、生物兼容度高的特点,目前基于这些质粒已经衍生出了多种功能性质粒^[22]。质粒上克隆的基因 DNA 片段通常不含有本身的信号肽,选择乳酸乳球菌大量分泌蛋白 LcoB 的信号肽(Usp45 或称为 SP_{LcoB}),信号肽的引入使得乳酸菌具备高效分泌异源蛋白的功能^[23]。根据启动子的不同,乳酸菌表达异源蛋白分为组成型表达和诱导型表达^[24]。组成型表达通常无需诱导剂

即可完成高产异源蛋白的目的,启动子一方面发挥控制表达开关的作用,另一方面其强度也会影响蛋白的表达量。虽然采用组成型启动子能够直接启动目的蛋白表达,但是蛋白在胞内的持续累积会导致其在胞质中发生降解,甚至对宿主造成毒害作用。在用于药物递送系统时,组成型表达不受外界因素调控,因此其在机体内部高强度持续表达也可能存在安全问题。采用诱导型表达系统可以避免蛋白过量表达对宿主本身及机体的毒副作用,同时也能在特定条件下诱导蛋白的表达。多种类型的诱导型启动子构成了不同的诱导表达系统,通过添加诱导物、抑制物或改变培养条件的环境因素(如 pH 值、温度或离子浓度等)来控制外源蛋白的表达。诱导型表达系统中有常见的 NICE 系统,乳链菌肽(Nisin)激活启动子 PnisA 控制基因的表达,主要是由 Nisin 激活膜定位传感器蛋白(NisK)后,使其磷酸化以激活胞质反应调节剂 NisR,进而激活启动子控制转录,诱导水平与添加乳链菌肽的量呈正相关^[25]。P_{Zn}-ZitR 表达系统和更加强效的 Zirex 调控表达系统,可以通过无毒的 Zn²⁺来进行严格的蛋白表达调控,在乳酸乳球菌中引入了链球菌启动子 P_{czcD} 及其调节蛋白 SczA 的编码基因,与 PnisA 启动子耦合形成了双启动子控制下独立调节不同基因表达的系统^[26]。应力诱导可控表达(SICE)系统,基于乳酸菌 groESL 操纵子无需添加外源诱导物,在热休克(42 °C)、高盐(NaCl 2.5%)、低 pH(4.5)或胆汁盐(15ng/ml)暴露条件下可表达蛋白,SICE 系统在两种小鼠模型中分别成功表达了 IL-10 和 HPV-16 E7 抗原,证明了这种受应力调控的乳酸菌蛋白表达系统具有广阔的临床应用前景^[27]。

4 重组乳酸菌在疾病治疗中的应用

合成生物学方法已经使得传统乳酸菌通过基因改造技术展现出多种功能,将尖端的基因修饰技术与新颖的设计理念相结合,重组乳酸菌在疾病治疗领域展现出强大的应用价值。工程化乳酸菌的出现也成为了细胞介导生物疗法的一部分,在多种疾病领域中成为一种全新的治疗手段。重组乳酸菌在进入机体后利用与黏膜系统的相互作用,可以递送各种细胞因子、酶、抗体等,与传统的药物递送系统相比,这种可受调控的生物递送系统更加的安全可靠。通过模拟蛋白类生物活性物质给药的方式,重组乳酸球菌 NZ9000 携带肿瘤抑制肽 KiSS1 的基因,KiSS1 肽作为一种肿瘤细胞的抑制因子,乳酸菌功能性的表达该肽在体外发挥了显著的肿

瘤抑制作用^[28]。治疗性多肽药物的成功表达使重组乳酸菌有了广阔的应用前景,在糖尿病治疗领域多种生物活性肽能够发挥显著的降血糖作用,将胰高血糖素样蛋白-1受体激动剂 Exendin-4 的基因构建到 PNZ8048 载体并导入乳酸菌,异源表达重组 Exendin-4 的乳酸菌在体外显著增强了胰岛细胞的胰岛素分泌功能,促进了胰岛细胞的增殖和葡萄糖依赖性胰岛素分泌,同时激活了相关的信号通路,证实了这种异源表达的多肽同样具有生物活性^[29]。机体内的肠道、阴道菌群基于黏膜免疫发挥对疾病的长期免疫作用已被证实,乳酸菌作为菌群中常见的一类微生物,利用其这一特性在乳酸菌表面锚定抗原制备活菌疫苗,成为了更为安全、高效的一种策略^[30]。相比较于传统的减毒活疫苗,乳酸菌的非致病性和非侵入性更适合被设计成为新一代黏膜活疫苗,全球范围内许多研究都在致力于开发这一新型的黏膜活疫苗,针对 HPV 16、E2、E6、E7 等抗原的多种重组乳酸菌黏膜疫苗均已进入临床前和临床试验^[31]。口服、皮下、滴鼻、阴道等多种途径的给药方式让乳酸菌疫苗在不同疾病治疗中有了更多的应用,与传统的抗原表达系统相比,操作简单、应用安全、成本更低^[32]。

5 总结

重组乳酸菌在疾病治疗领域已经得到了广泛的研究应用,作为减毒病原菌运载工具的有力替代品,基因工程工具的开发也推动了乳酸菌药物递送系统的长足发展。现阶段大多数的研究还限于体外或动物模型来评估重组乳酸菌的功能,尚缺乏一些临床的实验论证。另外,乳酸菌作为一种活体微生物,在未来的临床应用中应更多关注于其生物安全性,包括抗生素耐药性、免疫不良反应、遗传稳定性等问题,这就对菌种及生物技术手段的选择提出了更高的要求,活载体乳酸菌的安全性成为了不可忽视的一个环节。口服、黏膜、皮下多种给药途径决定了乳酸菌设计不同策略,提高菌种应用效率、确定接种最佳剂量、优化菌种选择、设计合适表达系统等问题也是未来重组乳酸菌研究的关键点。

【参考文献】

- [1] GARBACZ K. Anticancer activity of lactic acid bacteria[J]. *Semin Cancer Biol*, 2022, 86: 356-366.
- [2] SILVA W M, SOUSA C S, OLIVEIRA L C, et al. Comparative proteomic analysis of four biotechnological strains *Lactococcus lactis* through label-free quantitative proteomics[J]. *Microb Biotechnol*, 2019, 12(2): 265-274.
- [3] WU J P, XIN Y P, KONG J, et al. Genetic tools for the development of recombinant lactic acid bacteria[J]. *Microb Cell Fact*, 2021, 20(1): 118.
- [4] SAHA U B, SAROJ S D. Lactic acid bacteria: prominent player in the fight against human pathogens[J]. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2022, 20(11): 1435-1453.
- [5] MAYS Z J, NAIR N U. Synthetic biology in probiotic lactic acid bacteria: At the frontier of living therapeutics[J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2018, 53: 224-231.
- [6] KRISHNAN S, ALDEN N, LEE K. Pathways and functions of gut microbiota metabolism impacting host physiology[J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2015, 36: 137-145.
- [7] HU Y Y, ZHANG L, WEN R X, et al. Role of lactic acid bacteria in flavor development in traditional Chinese fermented foods: a review[J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2022, 62(10): 2741-2755.
- [8] WYSZYŃSKA A, KOBIERECKA P, BARDOWSKI J, et al. Lactic acid bacteria: 20 years exploring their potential as live vectors for mucosal vaccination[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, 99(7): 2967-2977.
- [9] TAGUCHI S, OOI T, MIZUNO K, et al. Advances and needs for endotoxin-free production strains[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, 99(22): 9349-9360.
- [10] HELANDER H F, FÄNDRIKS L. Surface area of the digestive tract—revisited[J]. *Scand J Gastroenterol*, 2014, 49(6): 681-689.
- [11] MORADI-KALBOLANDI S, MAJIDZADEH-A K, ABDOLVAHAB M H, et al. The role of mucosal immunity and recombinant probiotics in SARS-CoV2 vaccine development[J]. *Probiotics Antimicrob Proteins*, 2021, 13(5): 1239-1253.
- [12] SONG A A, IN L L, LIM S, et al. A review on *Lactococcus lactis*: from food to factory[J]. *Microb Cell Fact*, 2017, 16(1): 55.
- [13] WEGMANN U, O'CONNELL-MOTHERWAY M, ZOMER A, et al. Complete genome sequence of the prototype lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363[J]. *J Bacteriol*, 2007, 189(8): 3256-3270.
- [14] DIVYA J B, VARSHA K K, NAMPOOTHIRI K M, et al. Probiotic fermented foods for health benefits[J]. *Eng Life Sci*, 2012, 12(4): 377-390.
- [15] VESA T, POCHART P, MARTEAU P. Pharmacokinetics of *Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826, *Lactobacillus fermentum* KLD, and *Lactococcus lactis* MG 1363 in the human gastrointestinal tract[J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2000, 14(6): 823-828.
- [16] KIMOTO H, NOMURA M, KOBAYASHI M, et al. Survival of lactococci during passage through mouse digestive tract[J]. *Can J Microbiol*, 2003, 49(11): 707-711.
- [17] MORISHITA M, PEPPAS N A. Is the oral route possible for peptide and protein drug delivery?[J]. *Drug Discov Today*, 2006, 11(19-20): 905-910.
- [18] SANDERS M E. Impact of probiotics on colonizing microbiota of the gut[J]. *J Clin Gastroenterol*, 2011, 45: S115-S119.
- [19] TAN L L, MAHOTRA M, CHAN S Y, et al. In situ alginate

- crosslinking during spray-drying of lactobacilli probiotics promotes gastrointestinal-targeted delivery[J]. *Carbohydr Polym*, 2022, 286: 119279.
- [20] DIVYA J B, NAMPOOTHIRI K M. Encapsulated *Lactococcus lactis* with enhanced gastrointestinal survival for the development of folate enriched functional foods[J]. *Bioresour Technol*, 2015, 188: 226-230.
- [21] OH S H, KIM S H, JEON J H, et al. Cytoplasmic expression of a model antigen with M Cell-Targeting moiety in lactic acid bacteria and implication of the mechanism as a mucosal vaccine via oral route[J]. *Vaccine*, 2021, 39(30): 4072-4081.
- [22] SÁNCHEZ C, MAYO B. General and specialized vectors derived from pBM02, a new rolling circle replicating plasmid of *Lactococcus lactis*[J]. *Plasmid*, 2004, 51(3): 265-271.
- [23] HERNANDEZ-VALDES J A, HUANG C X, KOK J, et al. Another breaker of the wall: the biological function of the Usp45 protein of *Lactococcus lactis*[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2020, 86(16): e00903-e00920.
- [24] LANDETE J M. A review of food-grade vectors in lactic acid bacteria: from the laboratory to their application[J]. *Crit Rev Biotechnol*, 2017, 37(3): 296-308.
- [25] FRELET-BARRAND A. *Lactococcus lactis*, an attractive cell factory for the expression of functional membrane proteins[J]. *Biomolecules*, 2022, 12(2): 180.
- [26] MU D D, MONTALBÁN L, LÓPEZ M, MASUDA Y, et al. Zirex: a novel zinc-regulated expression system for *Lactococcus lactis*[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2013, 79(14): 4503-4508.
- [27] BENBOUZIANE B, RIBELLES P, AUBRY C, et al. Development of a Stress-Inducible Controlled Expression (SICE) system in *Lactococcus lactis* for the production and delivery of therapeutic molecules at mucosal surfaces[J]. *J Biotechnol*, 2013, 168(2): 120-129.
- [28] ZHANG B, LI A D, ZUO F L, et al. Recombinant *Lactococcus lactis* NZ9000 secretes a bioactive kisspeptin that inhibits proliferation and migration of human colon carcinoma HT-29 cells[J]. *Microb Cell Fact*, 2016, 15(1): 102.
- [29] ZENG Z, YU R, ZUO F L, et al. Recombinant *Lactococcus lactis* expressing bioactive exendin-4 to promote insulin secretion and beta-cell proliferation *in vitro*[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2017, 101(19): 7177-7186.
- [30] SZATRAJ K, SZCZEPANKOWSKA A K, CHMIELEWSKA-JEZNACH M. Lactic acid bacteria - promising vaccine vectors: possibilities, limitations, doubts[J]. *J Appl Microbiol*, 2017, 123(2): 325-339.
- [31] TAGHINEZHAD S, KEYVANI H, BERMÚDEZ-HUMARÁN L G, et al. Twenty years of research on HPV vaccines based on genetically modified lactic acid bacteria: an overview on the gut-vagina axis[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2021, 78(4): 1191-1206.
- [32] LEVIT R, CORTES-PEREZ N G, DE MORENO DE LEBLANC A, et al. Use of genetically modified lactic acid bacteria and bifidobacteria as live delivery vectors for human and animal health[J]. *Gut Microbes*, 2022, 14(1): 2110821.
- [收稿日期] 2023-09-12 [修回日期] 2023-11-30
[本文编辑] 陈盛新