



## 专论与综述

益生菌 *Escherichia coli* Nissle1917 功能研究进展潘秋莎<sup>1</sup> 苏式兵<sup>1</sup> 赵明<sup>\*1,2</sup>

1 上海中医药大学交叉科学研究院中医复杂系统研究中心 上海 201203

2 AntiCancer Inc, San Diego, California 92111, USA

**摘要:** 大肠埃希菌 Nissle1917, 简称 EcN, 是益生菌中为数不多的革兰氏阴性菌, 在临床上主要用于克罗恩病、溃疡性结肠炎等胃肠功能障碍。其机制在于 EcN 能在人体肠道定殖, 并阻止病原菌对肠道黏膜的侵袭, 对肠道黏膜屏障具有保护和修护作用。EcN 还参与机体的免疫调控, 平衡免疫因子的分泌, 增强宿主免疫能力, 进而缓解和治疗炎症。最新研究发现, EcN 具有肿瘤靶向作用, 是良好的药物载体, 且与化疗药物联用可增强药物抗肿瘤的疗效, 为抗肿瘤治疗提供了新的思路。

**关键词:** 益生菌, *Escherichia coli* Nissle1917 (EcN), 肠炎, 肿瘤

Advances in functional studies of probiotic *Escherichia coli* Nissle1917PAN Qiu-Sha<sup>1</sup> SU Shi-Bing<sup>1</sup> ZHAO Ming<sup>\*1,2</sup>

1 Institute of Interdisciplinary Integrative Medicine Research Center for Traditional Chinese Medicine Complexity System, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

2 AntiCancer Inc, San Diego, California 92111, USA

**Abstract:** *Escherichia coli* Nissle1917 (EcN), as a probiotic, is mainly used to treat a variety of gastrointestinal disorder including inflammatory bowel disease, chronic constipation. EcN prevents human intestinal epithelial cells from adherent and invasion of evasive pathogen, and protects intestinal mucosal barrier and inhabits pathological inflammation. EcN also enhances intestinal immune function and regulates cytokine secretion. Recently, EcN has shown anti-cancer efficacy via tumor targeting ability. Furthermore, EcN enhances the tumor targeting effect when combined with chemotherapeutic drugs, providing a promising application of EcN in precise treatment of cancer. EcN provides a great potential in developing novel approach of cancer treatment.

**Keywords:** Probiotics, *Escherichia coli* Nissle1917 (EcN), Intestinal inflammation, Tumors

1917 年, 德国多布罗加暴发了严重的志贺菌感染。德国细菌学家 Alfred Nissle 从一名未感染士兵的粪便中分离出了一株细菌, 并且用它阻止了这场感染的扩散, 这株细菌之后被称为 Nissle1917, 简称

EcN<sup>[1]</sup>。现以 EcN 作为主要成分制成药“Mutaflor”。至今, EcN 的生物学特性及其功能研究已经比较透彻。研究发现 EcN 不仅对多种肠道致病菌具有拮抗作用, 还能调节体内免疫因子的分泌, 增强宿主免

**Foundation items:** National Natural Science Foundation of China (81330084); National Key Research and Development Program of China (2018YFC1704204)

**\*Corresponding author:** E-mail: mingz@hotmail.com

**Received:** 26-12-2018; **Accepted:** 13-05-2019; **Published online:** 02-08-2019

**基金项目:** 国家自然科学基金重点项目(81330084); 国家重点研发计划(2018YFC1704204)

**\*通信作者:** E-mail: mingz@hotmail.com

**收稿日期:** 2018-12-26; **接受日期:** 2019-05-13; **网络首发日期:** 2019-08-02

疫防御能力等功能<sup>[2]</sup>。近年,对细菌抗肿瘤作用有更进一步的认识, EcN 也表现出其独特的优势。本文将对 EcN 功能的研究及其进展进行介绍。

## 1 EcN 的生物学特性

大肠埃希菌 *E. coli* Nissle1917 (EcN)的特殊生物学结构决定了它不同于其他致病性的大肠埃希菌。一般来说,致病大肠埃希菌可通过其脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)在宿主体内抵抗血清补体系统的清除,研究发现这与细菌表面 O 抗原侧链的长度有关。EcN 属血清 O6:K5:H1 型,其 LPS 表达半粗糙型 O6 抗原,由于抗原上的聚合酶 *wzy* 基因终止点突变导致了其侧链较短,且侧链由单个寡糖重复单位组成,其 K5 型荚膜具有血清敏感性,这导致 EcN 在体内遇血清极易被清除,是其不同于其他大肠埃希菌的特性之一。EcN 缺乏与它同种的病原菌株中普遍存在的致病因子,不携带毒力因子,因此不具有致病性<sup>[3-7]</sup>。EcN 的 H1 型鞭毛通过单个菌之间的相互作用以及锚定识别作用,形成了肠道上皮紧密的网络结构,进而可以抑制病原菌对肠道上皮细胞的黏附及侵袭<sup>[8-9]</sup>。EcN 基因编码 3 种菌毛 F1A、F1C 及卷曲菌毛,是其在肠道内持续性定殖及肠道上皮强黏附的有力助推器<sup>[10-11]</sup>。EcN 的这些生物学特性为其功能及应用打下了基础。

## 2 EcN 在肠道炎症中的作用机制

EcN 在临床主要用于胃肠功能障碍性疾病的治疗,例如:克罗恩病、炎症性肠病及慢性便秘等,其中在治疗炎症性肠病(Inflammatory bowel disease, IBD)的疗效是最为可观的<sup>[12]</sup>,其作用的机理可概括:(1) 增强肠道黏膜屏障,防止病原体对肠道的入侵;(2) 通过与病原体竞争肠道内营养物质,分泌细菌素等方式拮抗病原体黏附肠道上皮;(3) 调节机体免疫因子的分泌,刺激宿主产生免疫反应,间接杀死病原体<sup>[13-14]</sup>。

### 2.1 增强黏膜屏障

EcN 在肠道上皮细胞间可以形成细菌-细胞间的

“串扰”(即宿主细胞信号传导)进而增强肠道黏膜屏障<sup>[15]</sup>。实验研究建立人肠内单层细胞 T84 模型,使用致病性大肠埃希菌(Enteropathogenic *Escherichia coli*, EPEC)标准株 E2348/69 感染细胞后加入 EcN,监测感染细胞的屏障,通过基因测序、Western blot、RT-PCR 等方法检测 EcN 对细胞的作用,结果表明加入 EcN 后, T84 细胞上的 300 种不同的基因表达发生改变,其中闭锁带蛋白 *zo-2* 的表达明显升高,且向细胞边缘分布<sup>[16]</sup>。EcN 对肠道黏膜的保护及修复功能在肠道炎症的治疗中起着关键的作用,用葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导结肠炎小鼠模型, EcN 灌胃小鼠进行治疗观察,发现治疗组小鼠的体重下降、结肠缩短的情况较模型小鼠组相比得到缓解,且发现 EcN 组小鼠的结肠上皮细胞的 *zo-1* 表达显著上调,表明 EcN 在结肠炎的缓解中起到了黏膜保护和修复的作用<sup>[17]</sup>。我们研究小组应用 AOM/DSS 诱导结肠炎模型,在诱导后第 60 天时,将小鼠处死观察肠道变化、模型组的肠道长度稍短于正常组, EcN 组的结肠长度大于模型组,接近正常组的长度。将小鼠的结肠进行 HE 染色,病理结果显示:与正常组小鼠结肠相比,模型组小鼠的结肠可见炎症浸润,核增大,出现异形性灶及癌前病变; EcN 组可见有炎症浸润,肉芽组织,但病变程度较模型组低<sup>[18]</sup>。EcN 这些研究结果均表明 EcN 可通过维护肠道黏膜屏障功能,预防及治疗肠道疾病。

### 2.2 拮抗病原体

EcN 对多种病原体均能产生拮抗作用。Leatham 等<sup>[19]</sup>将链霉素处理后的小鼠进行 EcN 预定殖,感染肠出血性大肠杆菌(Enterohemorrhagic *Escherichia coli*, EHEC),实验对照使用益生菌 K12 预定殖,发现 EcN 组能有效的抑制 EHEC 的生长,但 K12 组并没有产生这样的结果。Kleta 等<sup>[20]</sup>将 EPEC 与肠道上皮细胞 IEPC-2 共培养,研究 EcN 对 EPEC 拮抗的作用机制,结果表明 EcN 通过其 F1 型菌毛及 H1 型鞭毛对肠上皮细胞的黏附,在局部持续性分泌抗菌素,从而抑制了 EPEC 对肠道上皮细胞的黏附。Jiang 等<sup>[21]</sup>

将 EcN 与产气荚膜梭菌 Cp4 共培养, 检测 EcN 对 Cp4 的增长及其生物膜和炎症因子分泌的影响, 结果显示 EcN 对 Cp4 以剂量依赖方式抑制了 Cp4 生长数量、产气量, 降低致肠道组织坏死的 B 毒素的水平, 竞争性影响 Cp4 生物膜的形成, 降低 Cp4 引起的炎症因子高表达。评估 EcN 在极化的人结肠癌细胞 HT-29 中, 空肠杆菌(*Campylobacter jejuni*, *C. jejuni*)对其的感染和黏附, 发现 EcN 预处理 4 h, 空肠弯曲杆菌感染 HT-29 细胞 24 h 之后, 检测发现预处理的 HT-29 无胞内空肠弯曲杆菌, 且实验发现其他益生菌(鼠李糖杆菌 LGG、双歧杆菌 Bb-12、嗜酸乳杆菌 LA)均没有达到同等的效果。分析表明 EcN 预处理 24 h 后与编码 CLDN 一系列的基因表达发生变化, 这与紧密连接蛋白较有关, 因此实验表明 EcN 能够增加肠道屏障功能的相关基因表达, 增加细胞紧密链接完整性<sup>[22]</sup>。这样的抗菌作用在人体内研究也得到相应的验证。在溃疡性结肠炎的病人中, 进行为期 6 周连续口服 EcN 的试验, 对病人口服前后进行肠道微生物数量及种类的分析, 6 周后黏膜组织镜下活检及 PCR 定量等实验结果显示肠道黏膜致病菌及厌氧菌数量均较服用前降低<sup>[23]</sup>。在新生儿随机双盲试验中, 治疗组连续口服 5 d 的 EcN (1 mL/d), 在口服后第二天开始, 对粪便样本进行微生物检测, 与安慰剂对照组相比, 发现在 EcN 治疗组中新生儿的潜在致病菌及病原菌的数量明显低于安慰剂对照组, 且随着时间的延长而表现出更为明显的差异<sup>[24]</sup>。因此, EcN 一方面通过提高肠上皮细胞的闭锁蛋白和紧密连接蛋白的表达从而修复和维护了肠道上皮的完整性, 间接抵抗了病原菌的黏附和侵袭; 另一方面还可直接分泌抗菌素和黏附素参与竞争性拮抗病原菌。

### 2.3 调节机体免疫因子分泌

EcN 干预后肠道细胞因子表达的变化, 可能是 EcN 在抗肠道疾病中发挥保护作用的机制之一<sup>[18]</sup>。研究发现 EcN 通过 NF- $\kappa$ B 和 AP-1 的途径刺激宿主体内肠道上皮细胞产生人  $\beta$  防御(HBD-2)。在 IBD 患

者中进行体内诱导 HBD-2 产生的评测, 使用 EcN 干预后, 宿主体内的 HBD-2 产量较干预前增加了 10–15 倍, 结果表明在 IBD 患者体内使用 EcN 刺激机体免疫应答对治疗起了关键的作用<sup>[25-26]</sup>。研究表明 EcN 对细胞因子 IL-2、TNF- $\gamma$  的表达有明显的抑制作用, 但对 IL-10 的分泌有促进作用, 在 TLR-2 受体基因敲除小鼠实验中得以证实 EcN 对淋巴细胞的抑制作用是呈 TLR-2 受体依赖性的<sup>[27-28]</sup>; Grabig 等<sup>[29]</sup>发现在用 DSS 诱导结肠炎小鼠模型中, EcN 通过 TLR-2 和 TLR4 依赖途径改善炎症状况。给炎症性模型小鼠灌胃 EcN 观察其改善炎症的影响, 实验发现服用 EcN 治疗组的小鼠中, 虽然抗炎因子 IL-10 的水平变化不大, 但是 TNF- $\gamma$ 、IL-5、IL-6 炎症因子表达相对模型组均得以下调<sup>[30]</sup>。研究认为, 这种免疫调节作用与细胞株有很密切的关系, 在细胞株 HCT-15 中, EcN 降低了 TNF- $\alpha$  介导的细胞因子 IL-8 的分泌, 呈剂量依赖性<sup>[31]</sup>; 而在使用细胞 Caco2 中, EcN 是通过刺激宿主产生 HBD-2 缓解了炎症<sup>[32]</sup>。综上, EcN 在参与宿主免疫调节方面, 能通过介导细胞因子分泌, 参与宿主体内的免疫应答调控, 从而维持了肠道内稳态平衡。

### 2.4 参与肠道菌群的调节

我们研究小组对野生型 C57BL/6 小鼠给予 EcN 灌胃, 收集小鼠的新鲜粪便进行细菌定量培养以观察其小鼠体内停留的时间。结果发现, 一次灌服 EcN 可以在小鼠体内停留 2 周, 与正常小鼠比较, EcN 干预小鼠的整体状况无差异, 肝脾中未培养出 EcN。进一步, 用 AOM/DSS 的方法建立结肠肿瘤模型, 以及 16S rRNA 基因高通量测序检测肠道菌群的变化, 结肠肿瘤小鼠的肠道菌群与正常小鼠的相比, 在门水平上, 拟杆菌门的丰度增加, 厚壁菌门的丰度下降; 在属水平上, 拟杆菌属的丰度增高, 毛螺菌科菌属的丰度降低。而 EcN 能够降低拟杆菌门的丰度, 增高厚壁菌门的丰度; 在属水平上, EcN 能够增加毛螺菌科的菌属的丰度, 降低拟杆菌属的丰度<sup>[33]</sup>。

### 3 EcN 在抗肿瘤中的研究

至今,癌症的攻克仍是一个亟待解决的问题。尽管对其进行了大量的实验研究及临床调查,部分癌症的死亡率、复发及转移率仍然高居不下,且手术及放疗、化疗带来的副作用更是不容小觑。近年来,新的研究及治疗方法不断涌现。其中细菌抗肿瘤的手段也是备受关注的突破点之一。EcN 作为益生菌,不仅用于治疗炎症性肠病,在靶向抗肿瘤及细菌载体方面的研究中也均有涉及<sup>[34-36]</sup>。EcN 能特异性靶向肿瘤组织,将药物载至肿瘤组织中释放,减轻化疗药物带来的副作用;同时, EcN 能诱导宿主产生免疫因子,调节肠道菌群等方式提高机体免疫能力。

#### 3.1 特异性靶向肿瘤组织

研究发现某些细菌能特异性靶向定植于实体瘤中,在肿瘤内大量增殖,进而刺激机体对肿瘤局部的免疫能力。目前研究报道有沙门氏菌<sup>[37-38]</sup>、大肠埃希菌<sup>[39-40]</sup>、双歧杆菌<sup>[41-42]</sup>等均能在肿瘤内富集。Zhao 等<sup>[43-44]</sup>在对小鼠沙门氏菌 A1-R 研究中发现细菌对肿瘤的特异性靶向和细胞毒作用,并诱导机体抗肿瘤免疫应答等作用。研究表明 EcN 同样具有较强的肿瘤靶向及肿瘤内定植能力。Zhang 等<sup>[45]</sup>建立了乳腺肿瘤 4T1 的 BALB/c 小鼠模型,通过尾静脉注射 EcN,检测 EcN 在肿瘤及体内的定植情况,结果显示 EcN 在肿瘤区聚集程度较高,分布均匀且定植持续时间长达 14 d;而对正常组织检测时,从感染的第 3 天开始 EcN 就从肝脾等各个器官清除,这表明 EcN 具有肿瘤内靶向定植能力,且不会对其他器官造成损害。Stritzker 等<sup>[46]</sup>将 EcN 与沙门氏菌分别作尾静脉注射,比较细菌在小鼠肝和脾内的定植, EcN 在肝和脾内的数量远低于沙门氏菌数量,但在肿瘤活性及坏死组织内的定植与沙门氏菌相同,提示 EcN 可作为很好的肿瘤治疗载体。

#### 3.2 作为肿瘤治疗的载体

EcN 的安全性及肿瘤靶向能力使它成为很有潜力的肿瘤基因治疗载体。肿瘤生长和转移很大程度

上依赖于血管的生长,将 EcN 作为载体,表达人重组基因 45-132 的抗肿瘤血管生成片段 Tum-5,靶向干预小鼠黑色素瘤 B16 及乳腺癌 T41,检测体内体外 Tum-5 的分泌及其抗肿瘤效果,结果显示 EcN 能有效抑制肿瘤的大小。在 EcN 治疗组中,肿瘤区见大量的炎症细胞浸润,血小板内皮细胞黏附分子 PECAM-1/CD31 在 EcN 治疗的小鼠肿瘤组织中的表达相对降低,且小鼠肝脾肾组织形态与对照组无显著性差异<sup>[47]</sup>。将载天青蛋白 Azurin 的 EcN 靶向干预小鼠 B16 黑色素瘤模型和小鼠 4T1 乳腺肿瘤模型,结果表明表达 Azurin 蛋白的 EcN 组明显抑制了肿瘤的大小及乳腺癌的肺转移。埃博霉素是临床上常用于抗癌类抗有丝分裂的药物,为了减轻埃博霉素的副作用,充分和最大化利用它的价值,研究者将埃博霉素(Epothilone B, Epo B)负载于经处理后的 EcN 菌蛻(Bacteria ghosts, BGs),并将其作用于人宫颈癌细胞 Hela,处理 24 h 后观察细胞的形态,结果发现联用处理组的细胞 Caspase3 的激活,细胞色素 C 的释放比单用处理组的更为显著,结果表明载有 EPoB 的 BGs 能诱导 Hela 细胞由线粒体途径介导发生凋亡<sup>[48]</sup>。

#### 3.3 调节炎症因子及抗肿瘤作用

肿瘤与炎症及相关炎症因子表达关系密切。EcN 在肠道中能参与免疫调控,降低促炎因子,上调抗炎因子的分泌,从而缓解和治疗包括肿瘤在内的肠道炎症引起的疾病。EcN 在对肠道沙门氏菌、李斯特菌等病原体对肠道上皮细胞的侵袭具有积极的拮抗作用,降低促炎因子的表达。Stritzker 等<sup>[49]</sup>观察到 EcN 影响人结肠癌细胞 HT-9 的屏障功能、降低细胞的通透性和侵袭性细菌在细胞内的存活。为了改善和保证 EcN 使用的安全性,实验将 EcN 质粒重组,使其缺失 *msb-B* 的表达,得到突变型 Nissle1917,将小鼠巨噬细胞株 J774 分别与野生型 Nissle1917 ( $2 \times 10^6$  CFU)和突变型 Nissle1917 ( $2 \times 10^4$  CFU)共同孵育 4 h,分别测定 TNF- $\alpha$  和 IL-6 的浓度,结果发现 EcN 突变型诱导细胞因子分泌量少于野生型,同样

在肿瘤的治疗中, 诱导炎症因子分泌也低于野生组, 因此, 不管是野生型的 EcN 还是突变型的, 均能刺激机体产生免疫抵抗, 相对于野生型的 EcN 来说, 经过基因改造后, 诱导炎症因子分泌的程度降低, 安全性更加可控。

EcN 能刺激宿主免疫保护因子的分泌。我们小组用 AOM/DSS 建立溃疡性结肠炎相关的结直肠癌小鼠模型分别在诱导后第 60 天、第 91 天及第 108 天时采用 ELISA 的方法检测小鼠肠组织炎症因子的表达。观察到在第 60 天时 EcN 干预的模型小鼠 IL-6、IL-17、IL-22、IL-23、TNF- $\alpha$  的表达比正常小鼠低, 与非干预模型组小鼠表达无明显差异。在第 91 天时上述 5 个炎症因子表达在 EcN 干预的小鼠均高于非干预模型组小鼠。在第 108 天时, EcN 干预组的小鼠表达 IL-6、IL-17、IL-23 高于非干预模型组。EcN 干预后肠道细胞因子表达的变化, 可能是 EcN 在抗肠道肿瘤疾病中发挥保护作用的机制之一。

我们观察并测量记录上述各组小鼠在实验终点时肿瘤生成的个数以及大小。正常鼠的肠壁整洁, 未见到赘生物。模型组小鼠的结直肠的肠黏膜增厚以及大小不等的肿瘤结节。与模型组相比, 左金丸+EcN 组和 EcN 组的肿瘤的个数及肿瘤的总容积均小于模型组, 其中左金丸+EcN 组( $P<0.05$ )和 EcN 组( $P<0.05$ )具有统计学差异。这些结果表明, EcN 在化学诱导的小鼠结直肠癌模型中, 能够抑制结直肠肿瘤的发生发展。EcN 作用的机制可能是通过调节肠道菌群和肠道炎症因子的分泌<sup>[18]</sup>。EcN 的这些功能为微生物抗肿瘤的治疗和研究提供了新的途径和方法, 有待更多的探索和挖掘。

#### 4 结语

EcN 作为药物, 在肠道疾病的治疗中其疗效及安全性评价已经得到认可。在抗肿瘤中, EcN 能特异性靶向肿瘤组织, 且能诱导宿主产生免疫反应。将 EcN 用于炎症导致的结直肠癌治疗是未来一个值得期待的研究方向和手段。但是 EcN 在肿瘤治疗中的作用及机制目前尚未明确, 本文作者的研究中发

现 EcN 能诱导结肠癌细胞 CT26 发生程序死亡, 且其死亡机制与 Caspase 及 Bcl-2 激活有关(文章尚未发表), EcN 在肿瘤的治疗中的作用仍需更多的研究和探索。细菌抗肿瘤的关键核心在于其使用的安全性和可操控性。虽然 EcN 的基因功能显示其安全性已经得到证实, 但是新的应用范围中仍需要进一步观察。

#### REFERENCES

- [1] Jacobi CA, Malfetheriner P. *Escherichia coli* Nissle1917 (Mutaflor): new insights into an old probiotic bacterium[J]. Digestive Diseases, 2011, 29(6): 600-607
- [2] 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 Nissle1917[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(1): 246-251
- [3] Grozdanov L, Zahringer U, Blum-Oehler G, et al. A single nucleotide exchange in the wzy gene is responsible for the semirough O6 lipopolysaccharide phenotype and serum sensitivity of *Escherichia coli* strain Nissle1917[J]. Journal of Bacteriology, 2002, 184(21): 5912-5925
- [4] Grozdanov L, Raasch C, Schulze J, et al. Analysis of the genome structure of the nonpathogenic probiotic *Escherichia coli* strain Nissle1917[J]. Journal of Bacteriology, 2004, 186(16): 5432-5441
- [5] Blum-Oehler G, Oswald S, Eiteljorge K, et al. Development of strain-specific PCR reactions for the detection of the probiotic *Escherichia coli* strain Nissle1917 in fecal samples[J]. Research in Microbiology, 2003, 154(1): 59-66
- [6] Dziva F, Hauser H, Connor TR, et al. Sequencing and functional annotation of avian pathogenic *Escherichia coli* serogroup O78 strains reveal the evolution of *E. coli* lineages pathogenic for poultry via distinct mechanisms[J]. Infection and Immunity, 2013, 81(3): 838-849
- [7] Delannoy S, Beutin L, Mariani-Kurkdjian P, et al. The *Escherichia coli* serogroup O1 and O2 lipopolysaccharides are encoded by multiple o-antigen gene clusters[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2017, 7: 30
- [8] Valdebenito M, Crumbliss AL, Winkelman G, et al. Environmental factors influence the production of enterobactin, salmochelin, aerobactin, and yersiniabactin in *Escherichia coli* strain Nissle1917[J]. International Journal of Medical Microbiology, 2006, 296(8): 513-520
- [9] Maltby R, Leatham-Jensen MP, Gibson T, et al. Nutritional basis for colonization resistance by human commensal *Escherichia coli* strains HS and Nissle1917 against *E. coli* O157:H7 in the mouse intestine[J]. PLoS One, 2013, 8(1): e53957
- [10] Lévêillé S, Caza M, Johnson JR, et al. Iha from an *Escherichia coli* urinary tract infection outbreak clonal group A strain is expressed *in vivo* in the mouse urinary tract and functions as a catecholate siderophore receptor[J]. Infection and Immunity, 2006, 74(6): 3427-3436
- [11] Patzer SI, Baquero MR, Bravo D, et al. The colicin G, H and X determinants encode microcins M and H47, which might utilize

- the catecholate siderophore receptors FepA, Cir, Fiu and Iron[J]. Microbiology, 2003, 149: 2557-2570
- [12] Scaldaferri F, Gerardi V, Mangiola F, et al. Role and mechanisms of action of *Escherichia coli* Nissle1917 in the maintenance of remission in ulcerative colitis patients: an update[J]. World Journal of Gastroenterology, 2016, 22(24): 5505-5511
- [13] Remer KA, Bartrow M, Roeger B, et al. Split immune response after oral vaccination of mice with recombinant *Escherichia coli* Nissle1917 expressing fimbrial adhesin K88[J]. International Journal of Medical Microbiology, 2009, 299(7): 467-478
- [14] Otte JM, Mahjuri-Namari R, Brand S, et al. Probiotics regulate the expression of COX-2 in intestinal epithelial cells[J]. Nutrition and Cancer, 2009, 61(1): 103-113
- [15] Guo SH, Chen SW, Pan YS, et al. Research advances in *Escherichia coli* Nissle1917 and intestinal barrier function[J]. Parenteral & Enteral Nutrition, 2018, 25(3): 184-187,192 (in Chinese)  
郭士浩, 陈善稳, 潘义生, 等. 大肠杆菌 Nissle1917 与肠屏障功能的研究进展[J]. 肠外与肠内营养, 2018, 25(3): 184-187,192
- [16] Ukena SN, Singh A, Dringenberg U, et al. Probiotic *Escherichia coli* Nissle1917 inhibits leaky gut by enhancing mucosal integrity[J]. PLoS One, 2007, 2(12): e1308
- [17] Zyrek AA, Cichon C, Helms S, et al. Molecular mechanisms underlying the probiotic effects of *Escherichia coli* Nissle1917 involve ZO-2 and PKC $\zeta$  redistribution resulting in tight junction and epithelial barrier repair[J]. Cellular Microbiology, 2007, 9(3): 804-816
- [18] Gu YQ. Study on the prevention and treatment of colorectal tumor by Zuojin Pill combined with probiotic Nissle1917[D]. Shanghai: Master's Thesis of Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, 2017 (in Chinese)  
顾艳芹. 左金丸联合益生菌 Nissle1917 防治结直肠癌的研究[D]. 上海: 上海中医药大学硕士学位论文, 2017
- [19] Leatham MP, Banerjee S, Autieri SM, et al. Precolonized human commensal *Escherichia coli* strains serve as a barrier to *E. coli* O157:H7 growth in the streptomycin-treated mouse intestine[J]. Infection and Immunity, 2009, 77(7): 2876-2886
- [20] 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* Nissle1917 on atypical enteropathogenic *E. coli* infection[J]. Infection and Immunity, 2014, 82(5): 1801-1812
- [21] Jiang YL, Kong QK, Roland KL, et al. Multiple effects of *Escherichia coli* Nissle1917 on growth, biofilm formation, and inflammation cytokines profile of *Clostridium perfringens* type A strain CP4[J]. Pathogens and Disease, 2014, 70(3): 390-400
- [22] Helmy YA, Kassem II, Kumar A, et al. *In vitro* evaluation of the impact of the probiotic *E. coli* Nissle1917 on *Campylobacter jejuni*'s invasion and intracellular survival in human colonic cells[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 1588
- [23] Adam B, Liebrechts T, Holtmann G. Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle1917 is as effective as with standard mesalazine[J]. Zeitschrift für Gastroenterologie, 2006, 44(3): 267-269
- [24] Aryayev ML, Senkivska LI, Bredeleva NK, et al. Prophylaxis of acute respiratory infections via improving the immune system in late preterm newborns with *E. coli* strain Nissle1917: a controlled pilot trial[J]. Pilot and Feasibility Studies, 2018, 4: 79
- [25] Schlee M, Wehkamp J, Altenhoefer A, et al. Induction of human  $\beta$ -defensin 2 by the probiotic *Escherichia coli* Nissle1917 is mediated through flagellin[J]. Infection and Immunity, 2007, 75(5): 2399-2407
- [26] Wehkamp J, Harder J, Wehkamp K, et al. NF- $\kappa$ B- and AP-1-mediated induction of human beta defensin-2 in intestinal epithelial cells by *Escherichia coli* Nissle1917: a novel effect of a probiotic bacterium[J]. Infection and Immunity, 2004, 72(10): 5750-5758
- [27] Caramalho I, Lopes-Carvalho T, Ostler D, et al. Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide[J]. The Journal of Experimental Medicine, 2003, 197(4): 403-411
- [28] Losurdo G, Iannone A, Contaldo A, et al. *Escherichia coli* Nissle1917 in ulcerative colitis treatment: systematic review and meta-analysis[J]. Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases: JGLD, 2015, 24(4): 499-505
- [29] Grabig A, Paclik D, Guzy C, et al. *Escherichia coli* strain Nissle1917 ameliorates experimental colitis via toll-like receptor 2- and toll-like receptor 4-dependent pathways[J]. Infection and Immunity, 2006, 74(7): 4075-4082
- [30] Schultz M, Strauch UG, Linde HJ, et al. Preventive effects of *Escherichia coli* strain Nissle1917 on acute and chronic intestinal inflammation in two different murine models of colitis[J]. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 2004, 11(2): 372-378
- [31] Loeffler M, Le'Negrat G, Krajewska M, et al. IL-18-producing *Salmonella* inhibit tumor growth[J]. Cancer Gene Therapy, 2008, 15(12): 787-794
- [32] Krämer S, Sellge G, Lorentz A, et al. Selective activation of human intestinal mast cells by *Escherichia coli* hemolysin[J]. The Journal of immunology, 2008, 181(2): 1438-1445
- [33] Yam C, Zhao M, Hayashi K, et al. Monotherapy with a tumor-targeting mutant of *S. typhimurium* inhibits liver metastasis in a mouse model of pancreatic cancer[J]. Journal of Surgical Research, 2010, 164(2): 248-255
- [34] Xia PP, Zhu J, Zhu GQ. *Escherichia coli* Nissle1917 as safe vehicles for intestinal immune targeted therapy—a review[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2013, 53(6): 538-544 (in Chinese)  
夏芑芑, 朱军, 朱国强. 肠道免疫的安全靶向载体: 大肠杆菌 Nissle1917[J]. 微生物学报, 2013, 53(6): 538-544
- [35] Xie SZ, Zhao L, Song XJ, et al. Doxorubicin-conjugated *Escherichia coli* Nissle1917 swimmers to achieve tumor targeting and responsive drug release[J]. Journal of Controlled Release, 2017, 268: 390-399
- [36] Zhang W. Isolation and identification of porcine-originated *Escherichia coli* Nissle1917 and its initial assessment as an oral vaccine vector[D]. Yangzhou: Master's Thesis of Yangzhou University, 2010 (in Chinese)  
张伟. 猪源大肠杆菌 Nissle1917 株的分离鉴定及其作为口服疫苗载体菌的初步评估[D]. 扬州: 扬州大学硕士学位论文, 2010
- [37] King I, Ittersen M, Bermudes D. Tumor-targeted *Salmonella typhimurium* overexpressing cytosine deaminase: a novel, tumor-selective therapy[A]//Walther W, Stein US. Gene Therapy

- of Cancer: Methods and Protocols[M]. 2nd ed. New York: Humana Press, 2009: 649-659
- [38] Low KB, Ittensohn M, Le T, et al. Lipid A mutant *Salmonella* with suppressed virulence and TNF $\alpha$  induction retain tumor-targeting *in vivo*[J]. Nature Biotechnology, 1999, 17(1): 37-41
- [39] Yu YA, Shabahang S, Timiryasova TM, et al. Visualization of tumors and metastases in live animals with bacteria and vaccinia virus encoding light-emitting proteins[J]. Nature Biotechnology, 2004, 22(3): 313-320
- [40] Staedtke V, Bai RY, Sun WY, et al. *Clostridium novyi*-NT can cause regression of orthotopically implanted glioblastomas in rats[J]. Oncotarget, 2015, 6(8): 5536-5546
- [41] Cairns MD, Preston MD, Hall CL, et al. Comparative genome analysis and global phylogeny of the toxin variant *Clostridium difficile* PCR ribotype 017 reveals the evolution of two independent sublineages[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2017, 55(3): 865-876
- [42] Sivan A, Corrales L, Hubert N, et al. Commensal *Bifidobacterium* promotes antitumor immunity and facilitates anti-PD-L1 efficacy[J]. Science, 2015, 350(6264): 1084-1089
- [43] Zhao M, Suetsugu A, Ma HY, et al. Efficacy against lung metastasis with a tumor-targeting mutant of *Salmonella typhimurium* in immunocompetent mice[J]. Cell Cycle, 2012, 11(1): 187-193
- [44] Zhao M, Yang M, Ma HY, et al. Targeted therapy with a *Salmonella typhimurium* leucine-arginine auxotroph cures orthotopic human breast tumors in nude mice[J]. Cancer Research, 2006, 66(15): 7647-7652
- [45] Zhang YL, Zhang YM, Xia LQ, et al. *Escherichia coli* Nissle1917 targets and restrains mouse B16 melanoma and 4T1 breast tumors through expression of azurin protein[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(21): 7603-7610
- [46] Stritzker J, Weibel S, Hill PJ, et al. Tumor-specific colonization, tissue distribution, and gene induction by probiotic *Escherichia coli* Nissle1917 in live mice[J]. International Journal of Medical Microbiology, 2007, 297(3): 151-162
- [47] He L, Yang HJ, Liu F, et al. *Escherichia coli* Nissle1917 engineered to express Tum-5 can restrain murine melanoma growth[J]. Oncotarget, 2017, 8(49): 85772-85782
- [48] Zhu WX, Hao LJ, Liu XL, et al. Enhanced anti-proliferative efficacy of epothilone B loaded with *Escherichia coli* Nissle1917 bacterial ghosts on the HeLa cells by mitochondrial pathway of apoptosis[J]. Drug Development and Industrial Pharmacy, 2018, 44(8): 1328-1335
- [49] Stritzker J, Hill PJ, Gentschev I, et al. Myristoylation negative *msbB*-mutants of probiotic *E. coli* Nissle1917 retain tumor specific colonization properties but show less side effects in immunocompetent mice[J]. Bioengineered Bugs, 2010, 1(2): 139-145