



研究报告

单核细胞增生李斯特菌膜囊泡的制备及生物活性

杨丽玉 杨诗怡 林巍 刘赛南 罗勤*

华中师范大学生命科学学院 湖北 武汉 430079

摘要:【背景】细胞外囊泡(Extracellular Vesicles, EVs)是一种在自然界中普遍存在的包含生物学活性物质的囊泡状结构,其中包括革兰氏阳性菌分泌的膜囊泡(Membrane Vesicles, MVs)。近年来,单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*, Lm)作为一种能产 MVs 的革兰氏阳性致病菌引起了众多科研人员的关注,尽管如此,对其 MVs 的了解仍然有限。【目的】建立健全 Lm-MVs 制备方法,同时深入了解其生物活性。【方法】以 Lm 野生菌株 EGDe 及其毒力突变株(EGDe Δ prfA、EGDe Δ prfA+pERL3-prfA*)为研究对象,利用超滤浓缩法和 Optiprep 密度梯度离心法提取 Lm 的 MVs,并对这两种提取 MVs 的方法进行比较。此外,通过检测不同 MVs 对菌株生物被膜的影响,以及不同 MVs 的溶血活性和对棉铃虫的感染毒性来探究 MVs 的生物活性。【结果】相较于超滤浓缩法,Optiprep 密度梯度离心法提取的 Lm-MVs 产率高、电镜观测效果好,但该方法操作相对复杂,耗时较长;不同毒力的 Lm 均可向外分泌直径 20–200 nm 的 MVs,而且 MVs 的形态结构与菌株的毒力无明显关系;但 MVs 可以影响菌株生物被膜的形成,具有一定的溶血活性,并能导致棉铃虫幼虫死亡或者降低其存活率和化蛹率,而且其毒性与菌株本身毒性正相关。【结论】Lm 分泌的 MVs 极有可能直接参与了 Lm 对宿主的致病,并在细菌-细菌之间以及细菌-宿主相互作用中扮演了重要角色。研究结果将对进一步研究革兰氏阳性菌 MVs 的形成和功能以及 Lm 的致病机制具有重要意义。

关键词: 单核细胞增生李斯特菌, 膜囊泡, 生物活性, 致病性

Isolation and activity of *Listeria monocytogenes*-derived membrane vesicles

YANG Liyu YANG Shiyi LIN Wei LIU Sainan LUO Qin*

College of Life Sciences, Central China Normal University, Wuhan, Hubei 430079, China

Abstract: [Background] Extracellular vesicles are lipid bound vesicles harboring specific subsets of bioactive proteins, lipids, nucleic acids, and metabolites, secreted by all living cells into the extracellular space. They have been named as membrane vesicles (MV) in Gram-positive bacteria. Recently, vesicle production is described in *Listeria monocytogenes*, a Gram-positive intracellular foodborne pathogen that

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31571931); Genetic Regulation and Integration Biology Hubei Provincial Key Laboratory Open Project (GRIB201709); Fundamental Research for the Central Universities (CCNU18TS024)

*Corresponding author: Tel: 86-27-67867221; E-mail: qinluo@mail.ccnu.edu.cn

Received: 04-05-2020; **Accepted:** 17-06-2020; **Published online:** 27-08-2020

基金项目: 国家自然科学基金(31571931); 遗传调控与整合生物学湖北省重点实验室开放课题(GRIB201709); 中央高校基本科研业务费专项基金(CCNU18TS024)

*通信作者: Tel: 027-67867221; E-mail: qinluo@mail.ccnu.edu.cn

收稿日期: 2020-05-04; **接受日期:** 2020-06-17; **网络首发日期:** 2020-08-27

causes listeriosis in human as well as in animals. However, the knowledge about the impact of *L. monocytogenes*-derived MVs on host health and disease is still limited. **[Objective]** To establish and improve the isolation method to extract MVs from *L. monocytogenes*, and to explore its roles of biological activities. **[Methods]** Two methods, the ultrafiltration concentration method and Optiprep density gradient centrifugation method, were used to extract MVs from the wild strain EGDe and its virulence mutants (EGDe Δ prfA, EGDe Δ prfA+pERL3-prfA*) and compared. The impact of different virulent *L. monocytogenes*-derived membrane vesicles on the bacterial biofilm formation and pathogenesis to the insect infection model was investigated. **[Results]** Comparing with the ultrafiltration concentration method, the MVs isolated by the Optiprep density gradient centrifugation have got higher yield and presented more uniform and clear image under transmission electron microscope, but it's relatively complicated and took a long time; All different virulent *L. monocytogenes* strains can secrete membrane vesicles with 20–200 nm in diameter, and no obvious differences in their shapes and sizes. However, these vesicles inhibited biofilm formation of *L. monocytogenes*, harbored a certain hemolytic activity, reduced the pupation and survival rate of the *Helicoverpa armigera* larvae, and even caused them death. The toxicity of MVs to the larvae showed a clear link with the virulence of strains they originated. **[Conclusion]** *L. monocytogenes*-derived membrane vesicles have got versatile roles, and likely participate in bacteria-bacteria and bacteria-host interactions. These results may be of great significance for the further study of the formation and function of Gram-positive bacteria-derived MVs and the pathogenic mechanism of *L. monocytogenes*.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, membrane vesicles, biological activity, pathogenicity

单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*, Lm)是一种革兰氏阳性病原菌,自1926年Murray等从兔子和豚鼠的肝脏中首次分离出来并于20世纪80年代被确定为食源性病原菌后,有关该菌的报道就逐渐增多^[1]。尽管每年Lm的感染数量较低,但感染个体的死亡率却很高(20%–30%),被世界卫生组织(World Health Organization, WHO)列为威胁人类健康安全的重要食源性致病菌之一^[2]。据美国疾病控制与预防中心(Centers for Disease Control and Prevention, CDC)报道,美国每年约有1 600例Lm感染病例和260例死亡病例^[3],但目前尚无针对李斯特菌病的疫苗。Lm还可以在不同表面和介质中形成生物被膜^[4],生物被膜的多层结构有助于其获取营养和清除代谢废物,也可阻碍生物杀菌剂的进入^[5],因此这一特性极大地促进了Lm在多变环境中的生存,严重威胁了食品卫生安全。

研究发现不论真核细胞还是原核细胞,均可以产生纳米尺寸大小的双层膜球形小体,即细胞外囊泡(Extracellular Vesicles, EVs)。这些囊泡已被认为是细胞间通讯的通用方式,其进化在真核生物、细

菌和古细菌中保守^[6]。目前有许多用来指代这些双层囊泡的术语,例如将来源于革兰氏阳性菌(G⁺菌)的细胞外囊泡称为膜囊泡(Membrane Vesicles, MVs),将来源于革兰氏阴性菌(G⁻菌)的细胞外囊泡称为外膜囊泡(Outer Membrane Vesicles, OMVs)^[6]。细菌OMVs/MVs最初被认为是细胞碎片,其作用也因此被低估,但随着研究的深入,人们逐渐发现细菌的OMVs/MVs含有功能特定的生物活性蛋白、脂类、核酸和代谢物等,在抗菌防御、基因转移、营养吸收、生物被膜形成以及微生物产物(如毒力因子和毒素)在感染期间的运输等方面也发挥了重要作用^[7]。

目前革兰氏阴性菌OMVs的研究成果较为丰富,相比之下革兰氏阳性菌MVs尚属起步阶段。最早关于Lm MVs的报道见于2013年Lee等^[8]的研究,他们指出Lm能产生MVs,而且压力胁迫调控因子 σ^B 对MVs的产生及其蛋白组成有着重要的影响,野生型Lm所产MVs是 σ^B 缺失菌株的9倍。Vdovikova等^[9]研究发现Lm在体内外均能产生MVs,而且Lm重要的毒力因子溶血素O

(Listeriolysin O, LLO)的活性与 MVs 紧密相关, Lm 的 MVs 对由 LLO 造成的宿主细胞自噬有抑制作用, 能够减少宿主细胞死亡, 从而保护细菌躲避宿主的免疫反应而生存下来。这些研究表明, Lm 产生的 MVs 具有重要的生物活性。

本试验以 Lm 野生菌株 EGDe 及其毒力突变株 (EGDe Δ prfA、EGDe Δ prfA+pERL3-prfA*)为对象, 利用超滤浓缩法和 Optiprep 密度梯度离心法提取 Lm 的 MVs, 并对 2 种方法提取的 MVs 的产率进行比较。另外, 通过测定不同 MVs 对菌株生物被膜的影响, 以及不同 MVs 的溶血活性和对棉铃虫的感染毒性探索其生物活性, 以期为深入解析革兰氏阳性菌 MVs 的生理功能奠定基础, 同时也为 Lm 致病机制的研究提供一些新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

Lm 野生型菌株 EGDe 由德国维尔茨堡大学生物系的 Werner Goebel 教授惠赠, EGDe Δ prfA、EGDe Δ prfA+pERL3-prfA*由本实验室构建并保存^[10]。

1.1.2 主要试剂和仪器及培养基

磷酸缓冲液, 武汉飞扬生物科技有限公司; Optiprep 密度梯度离心液, Sigma-Aldrich 公司; BCA 试剂盒, 碧云天生物技术有限公司; 2%的磷钨酸(PTA)染液, 中国科学院武汉生物病毒研究所。

落地式高速离心机和制备超速离心机, Beckman Coulter 公司; 多功能酶标仪, Bio Tek 公司; 100 千伏透射电子显微镜, HITACHI 公司; 倒置显微镜, 重庆光电仪器有限公司。

DMEM 高糖培养基, HyClone 公司; BHI 培养基(BHI 37.0 g/L), B&D 公司。

1.2 方法

1.2.1 细菌培养

将-80 °C 冻存的菌株接种于固体 BHI 培养基, 置于 37 °C 培养 18 h 进行活化。挑取单菌落于 5 mL 液体 BHI 培养基中, 37 °C、200 r/min 培养过

夜。次日, 按 1:100 的比例转移至 1 L 新鲜液体 BHI 培养基中继续培养至 OD_{600} 为 1.0。

1.2.2 超滤浓缩法提取膜囊泡

当细菌培养至 OD_{600} 为 1.0 时, 4 °C、6 000 r/min 离心 20 min 收集上清液, 经 0.45 μ m 或 0.22 μ m 滤器过滤, 除去细胞碎片等杂质后转移至截留相对分子质量 100 kD 的超滤浓缩管中, 4 °C、4 000 r/min 离心 20 min。取浓缩液, 经 4 °C、31 174 r/min 离心 3 h 后弃上清, 用 10 mL 的磷酸缓冲液悬浮沉淀, 重复离心一次后, 将沉淀重悬于 1 mL 磷酸缓冲液中, 经 0.22 μ m 滤器过滤后进行无菌检验, 鉴定其无菌后于-80 °C 保存, 即为提取的膜囊泡。将所提取的 EGDe、EGDe Δ prfA 和 EGDe Δ prfA+pERL3-prfA*的膜囊泡分别表示为 EGDe-MVs、 Δ prfA-MVs 和 prfA*-MVs。

1.2.3 Optiprep 密度梯度离心法提取膜囊泡

Optiprep 密度梯度离心液用 DMEM 分别配制成浓度为 25%、30%、35%、40%和 45%。吸取经过超滤浓缩法(同 1.2.2)提取的 1 mL 产物转移至 Beckman 离心管中, 再依次加入 2 mL 的 45%、40%、35%、30%和 25% Optiprep, 于 4 °C、31 174 r/min 进行超速离心 15 h。离心完毕后, 小心收集 30%-35%的组分于 Beckman 离心管中, 并加入 10 mL 磷酸缓冲液, 再次进行超速离心。重复离心 3 次后弃上清, 将沉淀重悬于 1 mL 磷酸缓冲液中, 经 0.22 μ m 的滤器过滤后进行无菌检验, 鉴定其无菌后于-80 °C 保存, 即为提取的膜囊泡。

1.2.4 BCA 法测定膜囊泡的蛋白浓度并计算膜囊泡的产率

MVs 蛋白浓度的具体测定方法参见 BCA 蛋白浓度测定试剂盒说明书。利用稀释平板涂布法统计 OD_{600} 为 1.0 时的菌落数, 以每 10^{13} 个 CFU 获得的蛋白量(μ g)为膜囊泡的产率^[11]。

1.2.5 负染电镜观察膜囊泡的形态

将铜网浸泡在 MVs 样品中吸附大约 20 min 后取出, 用滤纸与铜网垂直接触以除去多余液体。随后将铜网浸泡在 PTA 染液中染色 5 min, 取出后于阴凉处自然干燥 2-3 d, 即可用于电镜观察。

1.2.6 不同毒力单核细胞增生李斯特菌的膜囊泡对细菌生物被膜形成的影响

细菌生物被膜的培养及检测参照冯飞飞等^[10]的方法。将 3 株细菌的 MVs 稀释至同一浓度 (0.2 mg/mL) 后, 按照 1:1 的比例分别取 100 μ L 相应的 MVs 加入到含 100 μ L 菌液(同种菌株或者不同种菌株)的 96 孔板中。另设置 2 组不含 MVs 的参照: 一组加入等量菌液, 另一组加入等量的磷酸缓冲液。待上述操作完毕后, 将 96 孔板置于 37 $^{\circ}$ C 分别培养 24、48 和 72 h。培养相应时间后, 酶标仪测定其 OD_{600} 值, 以检测其生长情况; 随后弃去各孔培养基, 所生成的生物被膜经蒸馏水洗涤, 室温干燥后, 用 1% 乙二酸铵结晶紫染色, 并测定其 OD_{595} 的光吸收值。所获得的试验数据使用 Origin 8 和 SPSS 22 进行分析处理。结晶紫染色后的生物被膜直接置于倒置显微镜下观察, 拍照记录。

1.2.7 膜囊泡的溶血活性检测

溶血活性的测定参考于新惠等^[12]的方法。将来源于不同菌株的 MVs 稀释至同一浓度 (0.2 mg/mL) 后, 分别取一定量的 MVs 加入含 1 mL 红细胞悬液的离心管中, 阴性对照组加入等量的磷酸缓冲液, 阳性对照组加入等量的无菌水; 另取等量的 MVs 加入 1 mL 红细胞悬液后再添加 2 mmol/L DTT。将以上离心管置于 37 $^{\circ}$ C 孵育 3 h 后, 室温、2 600 r/min 离心 5 min, 吸取 800 μ L 上清于一次性比色皿中测定 OD_{543} 的值, 即为 MVs

的溶血活性值。

1.2.8 膜囊泡对棉铃虫幼虫体重、存活率和化蛹率以及幼虫发育时间的影响

选取生理状态基本一致的 4 龄棉铃虫幼虫置于冰上麻醉 2 h 待用^[13]。将来源于不同菌株的 MVs 稀释至同一浓度 (0.2 mg/mL) 后, 吸取 5 μ L Lm-MVs 自幼虫第一腹足下注入, 对照组注入等量磷酸缓冲液, 每组 18 条幼虫。注射完成后每隔 24 h 称取幼虫体重, 并统计存活率、化蛹率及幼虫发育时间(自购买之日起至末龄), 数据的计算方法为: 化蛹率=蛹数/试虫总数 \times 100%; 存活率=存活数/试虫总数 \times 100%。

2 结果与分析

2.1 不同毒力单核细胞增生李斯特菌膜囊泡的蛋白浓度及产率

利用 BCA 试剂盒分别测定了 2 种方法提取的不同 Lm-MVs 的蛋白浓度, 并计算其相应产率。结果如表 1 所示, 经超滤浓缩法提取的不同 Lm-MVs 在蛋白浓度上没有明显差异, 但在产率方面却有较大差异, 其中, EGDe-MVs 的平均产率最高, 为 24.00 μ g/ 10^{13} CFU; $\Delta prfA$ -MVs 的平均产率(4.38 μ g/ 10^{13} CFU)次之, 约为 EGDe-MVs 平均产率的 1/5; 而 $prfA^*$ -MVs 的平均产率最低, 为 0.14 μ g/ 10^{13} CFU, 仅是 EGDe-MVs 产率的 1/170 左右, 表明不同毒力 Lm 产生 MVs 的产率具有一定

表 1 不同毒力菌株膜囊泡的蛋白浓度及产率

Table 1 The protein concentration and yield of membrane vesicles from the different virulent strains

Membrane vesicles (MVs)	蛋白浓度		产率	
	Protein concentration (mg/mL)		Yield (μ g/ 10^{13} CFU)	
	超滤浓缩法	Optiprep 密度梯度离心法	超滤浓缩法	Optiprep 密度梯度离心法
	Ultrafiltration concentration	Optiprep density gradient centrifugation	Ultrafiltration concentration	Optiprep density gradient centrifugation
EGDe-MVs	0.216 \pm 0.03	0.284 \pm 0.08	24.00 \pm 3.40	31.58 \pm 9.216
$\Delta prfA$ -MVs	0.205 \pm 0.05	0.256 \pm 0.06	4.38 \pm 0.11**	5.47 \pm 1.385**
$prfA^*$ -MVs	0.239 \pm 0.04	0.305 \pm 0.05	0.14 \pm 0.02**	0.18 \pm 0.033**

注: **: 与来源于 EGDe 的 MVs 相比, 来源于 EGDe $\Delta prfA$ 和 EGDe $\Delta prfA$ +pERL3- $prfA^*$ 的 MVs 的蛋白浓度及产率具有极显著差异 ($P\leq 0.01$)

Note: **: Significant differences compared to EGDe-MVs in the protein concentration and yield ($P\leq 0.01$)

的差别。除此之外, 还发现经 Optiprep 密度梯度离心法提取的 Lm-MVs 与超滤浓缩法提取结果基本一致, 但前者提取的 MVs 的平均蛋白浓度及平均产率均明显高于超滤浓缩法(尽管 2 种方法在整体蛋白浓度及产率方面上并无显著性差异)。

2.2 不同毒力单核细胞增生李斯特菌膜囊泡的电镜结果

利用透射电镜对 2 种方法提取的 MVs 进行观察, 结果如图 1 所示: 2 种方法提取的各 Lm-MVs 在形态上并无明显差异, 其结构均是直径为 20–200 nm 的球状小体, 表明细菌毒力的不同以及质粒 pERL3 的存在对 Lm 膜囊泡的形态无明显影响。另外, 超滤浓缩法提取的 MVs 分布较零散, 相较而言, Optiprep 密度梯度离心法提取的 MVs 分布更为均匀且密度更大。两种方法制备的 MVs 尽管存在一些细胞碎片, 但依然可以清楚地观察到其囊泡状结构, 与 Lee 等^[8]从 BHI 培养基中提取的 MVs 的电镜图像一致。

2.3 膜囊泡对细菌生物被膜形成的影响

为了探究不同毒力 Lm 产生的 MVs 是否影响

Lm 生物被膜的形成, 向菌液中分别加入了同等量的自身菌株产生的 MVs 或者异源 MVs (来自另外两株菌产生的 MVs), 分别培养 24、48 和 72 h 后, 通过酶标仪检测细菌的生物被膜形成量, 同时利用结晶紫染色观察细菌生物被膜的结构变化。结果如图 2–4 所示, 当菌液中加入 MVs 后, 无论是自身菌株产生的 MVs 或者异源 MVs, 细菌生物被膜的形成均受到了一定程度的抑制, 其中 EGDe 生物被膜形成受到的抑制最为明显: 当 EGDe 中加入 MVs 后, 培养 24、48 和 72 h 其生物被膜的形成量与未加 MVs 相比均显著下降 ($P \leq 0.01$); EGDe $\Delta prfA$ +pERL3- $prfA^*$ 以及 EGDe $\Delta prfA$ 与 MVs 混合培养后, 生物被膜的形成量也呈现类似下降现象。同时也发现, MVs 对自身菌株生物被膜形成的抑制程度比对异源菌株更为明显。例如, 当培养 24 h 时(图 2A), EGDe 生物被膜的形成量只在加入自身来源的 MVs 即 EGDe-MVs 时具有极显著下降的趋势($P \leq 0.01$), 而加入其他 2 株细菌来源的 MVs ($\Delta prfA$ -MVs 和 $prfA^*$ -MVs)时, 生物被膜的形成虽然受到抑制, 但仅表现为显著性下降($P \leq 0.05$)。

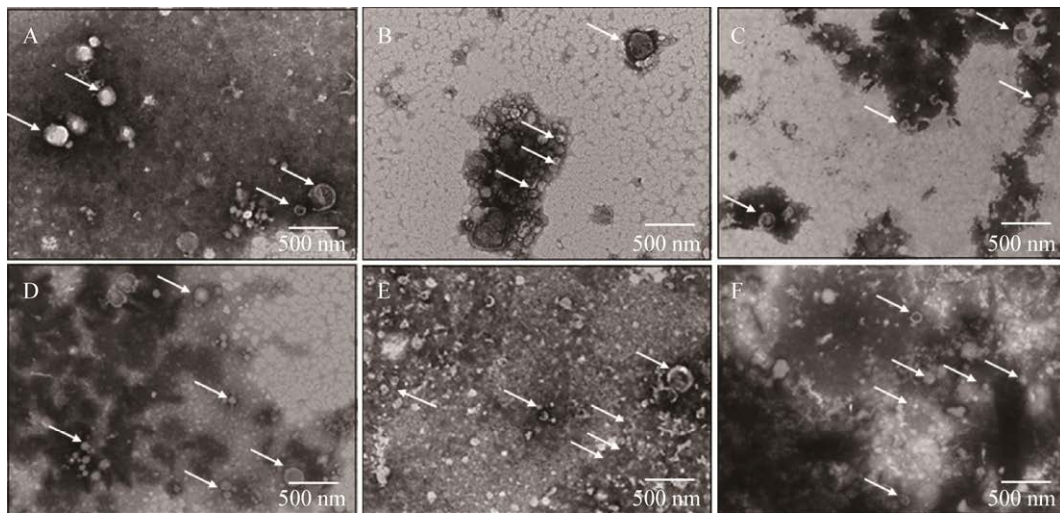


图 1 来源于不同毒力 Lm 的膜囊泡

Figure 1 Membrane vesicles derived from different virulent *L. monocytogenes* strains

注: A: 超滤浓缩法提取的 EGDe-MVs; B: 超滤浓缩法提取的 $\Delta prfA$ -MVs; C: 超滤浓缩法提取的 $prfA^*$ -MVs; D: Optiprep 密度梯度离心法提取的 EGDe-MVs; E: Optiprep 密度梯度离心法提取的 $\Delta prfA$ -MVs; F: Optiprep 密度梯度离心法提取的 $prfA^*$ -MVs

Note: A: The EGDe-MVs extracted by the ultrafiltration concentration; B: The $\Delta prfA$ -MVs extracted by the ultrafiltration concentration; C: The $prfA^*$ -MVs extracted by the ultrafiltration concentration; D: The EGDe-MVs extracted by the Optiprep density gradient centrifugation; E: The $\Delta prfA$ -MVs extracted by the Optiprep density gradient centrifugation; F: The $prfA^*$ -MVs extracted by the Optiprep density gradient centrifugation

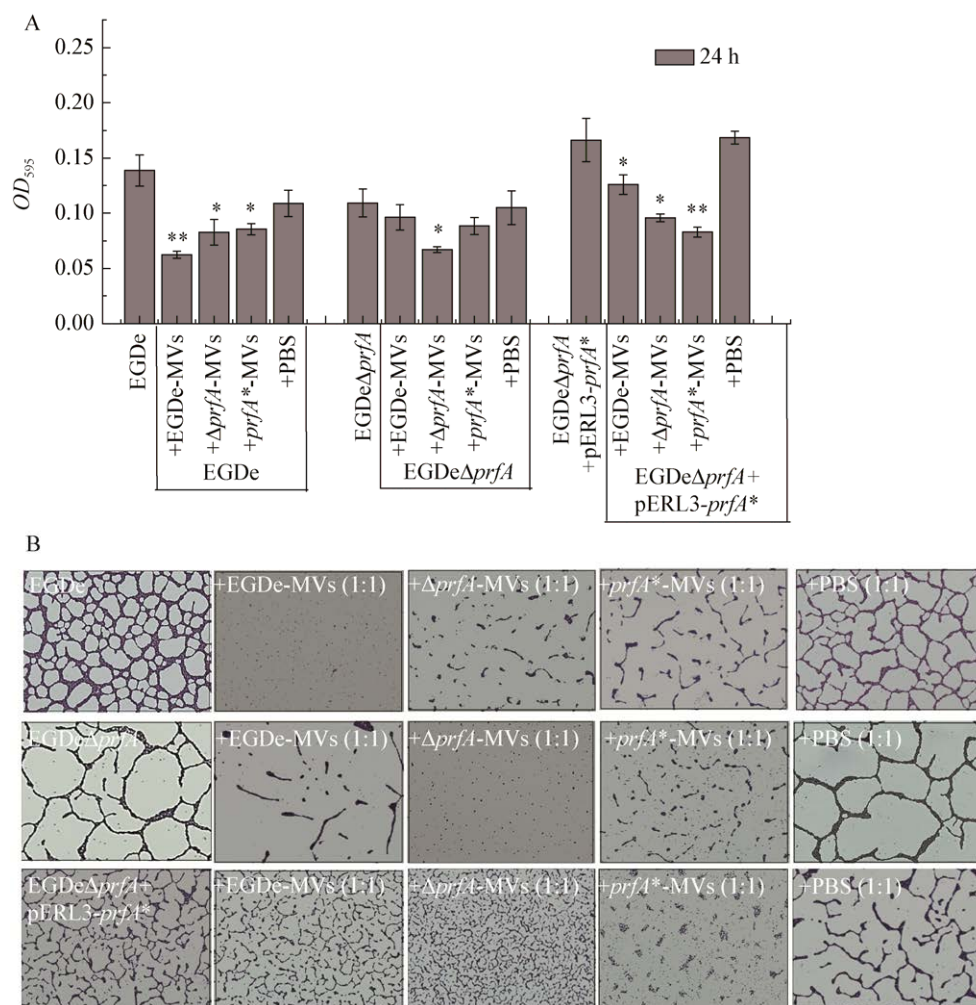


图2 膜囊泡对菌株生物被膜形成量及形态结构的影响(24 h)

Figure 2 The effect of membrane vesicles on the biofilm formation of *L. monocytogenes* (24 h)

注：A：24 h 时细菌生物被膜形成量；B：24 h 时细菌生物被膜形态。细菌生物被膜形态结构于倒置显微镜下观察(20×)。图中 PBS 为磷酸缓冲液；*：细菌的生物被膜形成量显著性下降($P \leq 0.05$)；**：极显著差异($P \leq 0.01$)

Note: A: The amount of bacterial biofilm formation at 24 h; B: The morphology of bacterial biofilm at 24 h. The morphology of the biofilm was observed under a microscope (20×). "PBS" in the figure is the phosphate buffer solution (pH 7.4); *: The biofilm formation of *L. monocytogenes* decreased significantly ($P \leq 0.05$); **: Extremely significant difference ($P \leq 0.01$)

与此同时，观察细菌生物被膜形态可以发现：当培养 24 h 时(图 2B)，EGDe 可以形成完整生物被膜且具有紧密的网状结构，但当 EGDe 与其自身 MVs 共同培养后，仅能观察到散乱分布的小菌落，而与异源 MVs 共同培养时，细菌聚集形成了零散的“线性”结构且分布不均；当培养 48 h 时(图 3)，EGDe 形成的生物被膜结构更加致密，间隙空间更小，而 EGDe 与 MVs 的培养物虽然形成了线状结构，但分布不均匀、形状不规则且孔隙很大，其中 EGDe 与

自身来源的 MVs 依然呈现散乱分布的小菌落状态；当培养 72 h 时(图 4)，EGDe 与 MVs 的培养物依然没有形成结构致密的生物被膜。与 EGDe 相似，MVs 对 EGDeΔprfA 和 EGDeΔprfA+pERL3-prfA* 在培养 24、48 和 72 h 时生物被膜的形成同样具有显著抑制作用，而且对自身细菌的抑制更为显著。该结果与前面生物被膜形成量的结果相一致，表明在本试验条件下(BHI 作为培养基，37 °C) Lm-MVs 对 Lm 生物被膜的形成具有抑制作用。

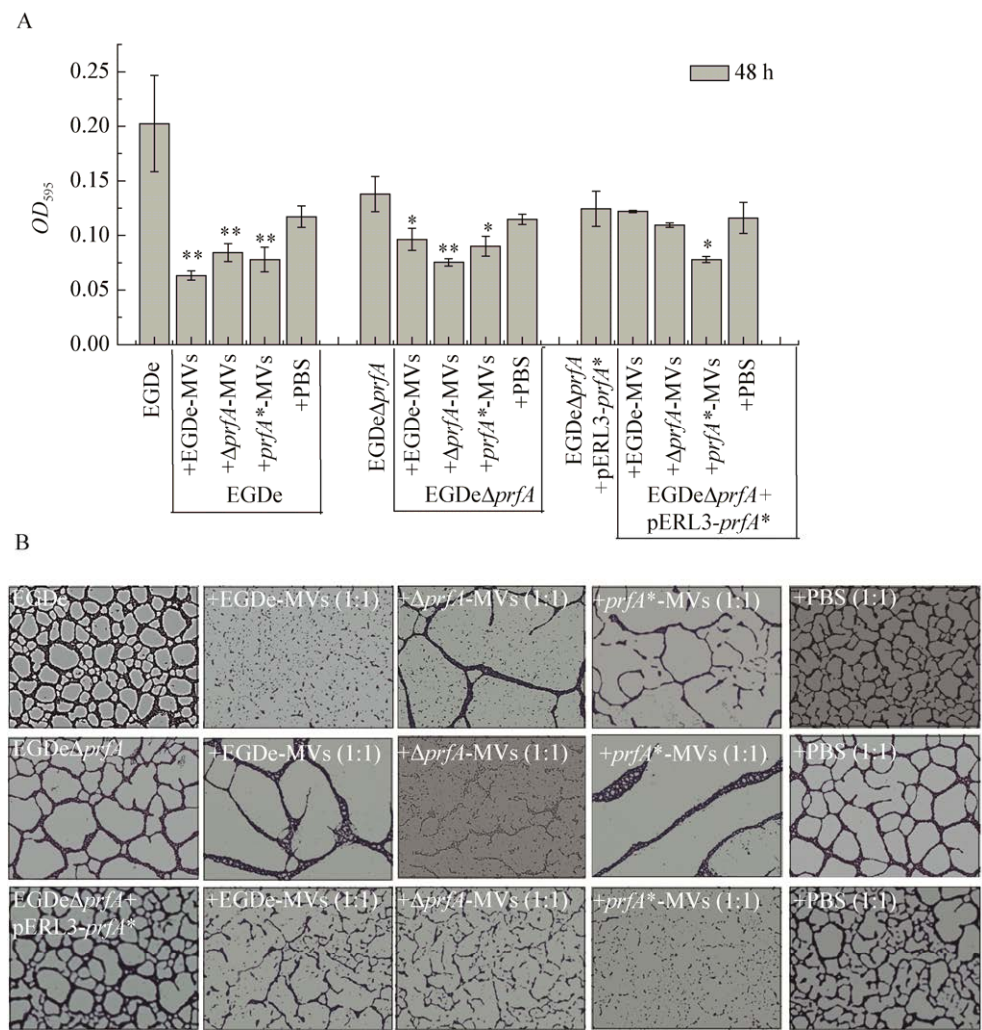


图 3 膜囊泡对菌株生物被膜形成量及形态结构的影响(48 h)

Figure 3 The effect of membrane vesicles on the biofilm formation of *L. monocytogenes* (48 h)

注：A：48 h 时细菌生物被膜形成量；B：48 h 时细菌生物被膜形态。细菌生物被膜形态结构于倒置显微镜下观察(20×)。图中 PBS 为磷酸缓冲液；*：细菌的生物被膜形成量显著性下降($P \leq 0.05$)；**：极显著差异($P \leq 0.01$)

Note: A: The amount of bacterial biofilm formation at 48 h; B: The morphology of bacterial biofilm at 48 h. The morphology of the biofilm was observed under a microscope (20×). "PBS" in the figure is the phosphate buffer solution (pH 7.4); *: The biofilm formation of *L. monocytogenes* decreased significantly ($P \leq 0.05$); **: Extremely significant difference ($P \leq 0.01$)

2.4 不同膜囊泡的溶血活性

LLO 是 Lm 中最为重要的一种毒力蛋白，属于胆固醇结合细胞溶素(Cholesterol-Dependent Cytolysins, CDCs)家族，可通过破坏细胞膜导致红细胞溶血。有研究表明，LLO 主要是在还原状态下结合到含胆固醇的膜上并形成直径为 35 nm 的孔状结构，从而帮助 Lm 逃离吞噬体^[14]。因此，在按照常规方法检测 MVs 溶血活性的同时，另取等量的 MVs 加

入 1 mL 红细胞悬液中，并向其中加入 2 mmol/L 还原剂 DTT，结果如图 5 所示：当 MVs 的蛋白量较低时(例如 2.5 μg)，不管是来源于高毒株的 MVs 还是弱毒株的 MVs 均无明显溶血活性，且加入 DTT 后也无明显变化，而当 MVs 的蛋白量较高时(如增至 40 μg 时)，来源于高毒株及中毒株的 MVs 均有显著溶血活性，且在 DTT 的作用下溶血活性显著提升，而此时来源于弱毒株的 MVs 仍无明显溶血活性。

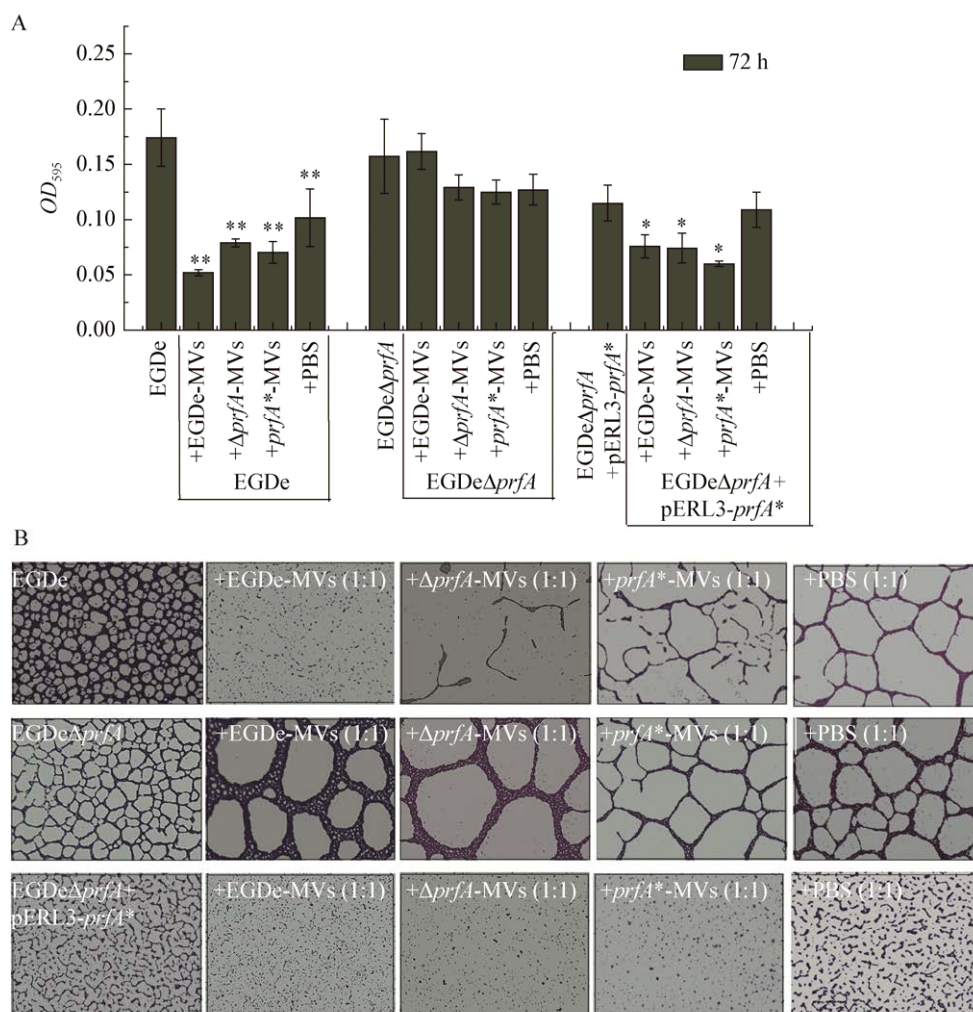


图 4 膜囊泡对菌株生物被膜形成量及形态结构的影响(72 h)

Figure 4 The effect of membrane vesicles on the biofilm formation of *L. monocytogenes* (72 h)

注: A: 72 h 时细菌生物被膜形成量; B: 72 h 时细菌生物被膜形态。细菌生物被膜形态结构于倒置显微镜下观察(20×)。图中 PBS 为磷酸缓冲液; *: 细菌的生物被膜形成量显著性下降($P \leq 0.05$); **: 极显著差异($P \leq 0.01$)

Note: A: The amount of bacterial biofilm formation at 72 h; B: The morphology of bacterial biofilm at 72 h. The morphology of the biofilm was observed under a microscope (20×). "PBS" in the figure is the phosphate buffer solution (pH 7.4); *: The biofilm formation of *L. monocytogenes* decreased significantly ($P \leq 0.05$); **: Extremely significant difference ($P \leq 0.01$)

2.5 膜囊泡对棉铃虫的毒性

将等量不同毒力 Lm-MVs 注入体重和生理状态基本一致的 4 龄棉铃虫幼虫, 结果如表 2 所示, 与对照组相比, 24 h 时, 注射了 EGDe-MVs 和 *prfA**-MVs 的棉铃虫体重出现显著下降($P \leq 0.05$), 而注射了 Δ *prfA*-MVs 的棉铃虫体重虽有降低, 但并不显著; 48 h 和 72 h 时, 注射了 EGDe-MVs 和 Δ *prfA*-MVs 的棉铃虫体重均显著下

降($P \leq 0.05$), 而此时注射了 *prfA**-MVs 的棉铃虫的体重表现为极显著下降($P \leq 0.01$)。另外, 我们还发现 3 种不同的 MVs 均致棉铃虫的幼虫发育时间延长, 而且对棉铃虫的存活率及化蛹率也有一定影响, 其中 *prfA**-MVs 的影响最大, 致使棉铃虫的平均存活率和化蛹率分别下降了 33.00% 和 48.58% (表 3), EGDe-MVs 的影响次之, 而 Δ *prfA*-MVs 对棉铃虫存活率基本无影响, 但使其化蛹率下降了

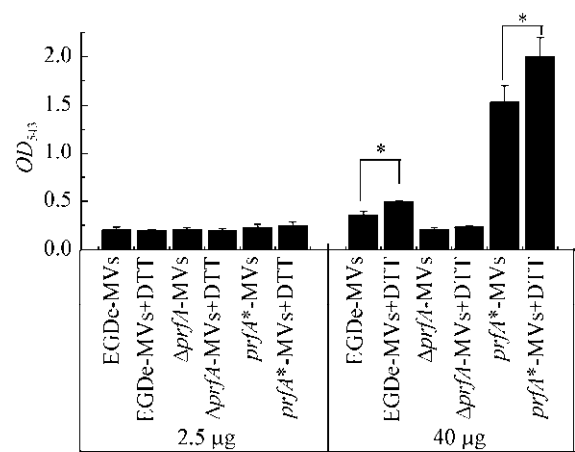


图 5 不同 MVs 的溶血活性
Figure 5 The hemolytic activity of different Lm-MVs

注：*：MVs 的溶血活性显著性增高($P\leq0.05$)
Note: *: Significant difference ($P\leq0.05$)

9.28%。综上所述，我们认为 Lm-MVs 对棉铃虫具有一定的致病性，而且该致病能力大小与菌株本身毒性呈正相关。

3 讨论与结论

高效获得完整而纯净的细胞外囊泡对于研究其功能和应用至关重要。目前有多种方法用于提取细胞外囊泡，其中超滤浓缩法和密度梯度离心法是最常用的两种方法，本试验利用这两种方法对 Lm 的 MVs 进行了提取，发现超滤浓缩法提取 MVs 产率较低且密度较小、分布较稀疏，但提取步骤较为简单；然而 Optiprep 梯度离心法尽管所提 MVs 的产率高、密度大且分布均匀，但在试验过程中为了保证 MVs 在负染电镜时不受 Optiprep 离心液的影响，

表 2 棉铃虫感染不同 MVs 后的体重变化

Table 2 Changes in body weight of *Helicoverpa armigera* larvae injected with different Lm-MVs (g, $\bar{x} \pm SD$)

组别	注射 0 h	注射 24 h	注射 48 h	注射 72 h
The groups	0 h after injection	24 h after injection	48 h after injection	72 h after injection
对照组	0.120±0.010	0.233±0.019	0.438±0.066	0.718±0.050
Control				
EGDe-MVs	0.112±0.015	0.155±0.024*	0.290±0.073*	0.392±0.086*
$\Delta prfA$ -MVs	0.118±0.016	0.184±0.027	0.293±0.058*	0.489±0.092*
$prfA^*$ -MVs	0.115±0.017	0.144±0.044*	0.248±0.066**	0.376±0.111**

注：对照组为注射了磷酸缓冲液的棉铃虫。*：与对照组相比，棉铃虫的体重显著下降($P\leq0.05$)；**：极显著差异($P\leq0.01$)
Note: The control group is the larvae of *H. armigera* injected with 0.1 mol/L pH 7.4 phosphate buffer. *: Significant difference ($P\leq0.05$); **: Extremely significant difference ($P\leq0.01$)

表 3 棉铃虫感染不同 MVs 后的幼虫发育时间以及化蛹率变化

Table 3 The variation of the development time and pupation rate of *Helicoverpa armigera* larvae injected with different Lm-MVs

组别	幼虫发育时间	平均化蛹率	平均存活率
The groups	Larval development time (d)	Average pupation rate (%)	Average survival rate (%)
Control	8–9	90.28	100.00
EGDe-MVs	9–10	72.00*	75.00*
$\Delta prfA$ -MVs	9–10	81.00*	100.00
$prfA^*$ -MVs	9–10	41.70**	66.67**

注：对照组为注射磷酸缓冲液的棉铃虫。*：与对照组相比，平均化蛹率或存活率显著下降($P\leq0.05$)；**：极显著差异($P\leq0.01$)
Note: The control group is the *H. armigera* larvae injected with 0.1 mol/L pH 7.4 phosphate buffer. *: Significant difference ($P\leq0.05$); **: Extremely significant difference ($P\leq0.01$)

会将产物进行多次洗涤,如此一来 MVs 容易受到机械力影响而破碎,而且最后收集到的产物量也因多次洗涤而大大减少,我们初步推测这也是造成密度梯度离心法提取 MVs 产率误差较大的原因之一。除此之外,密度梯度离心法的操作过程复杂且耗时(经过超滤浓缩后,需要再进行密度梯度离心,制备时间达 30 h 以上)。同时,我们还发现 MVs 的提取时间和储存时间在一定程度上会影响 MVs 的生物学活性,即提取和储存时间过长会导致 MVs 的生物活性降低,甚至通过银染无法检测到 MVs 的条带。尽管截至目前研究者们并未就提取时间及储存时间对 OMVs/MVs 是否有影响达成共识,但是我们依然建议在进行 MVs 的相关试验时,尽量缩短 MVs 提取及储存过程,以防 MVs 受损。事实上,很多通过密度梯度离心法进行 MVs 提取的工作都会利用 Millipore Labscale TFF 系统或 QuixStand Benchtop System 来缩短样品制备的时间^[15],从而达到高效和快速提取的目的。

在探究 Lm-MVs 对细菌生物被膜影响的研究中,我们发现 Lm-MVs (不管是细菌自身产生的 MVs 还是异源 MVs)会在一定程度上抑制 Lm 生物被膜的形成。关于 Lm-MVs 与细菌生物被膜之间的关系,早在 2018 年, Lee 等^[16]就尝试对其进行相关研究,他们分别提取了盐胁迫和能量胁迫下 Lm 的 MVs,并将其添加到野生型和 $\Delta sigB$ 突变体中,发现盐胁迫下的 MVs 会抑制 Lm 生物被膜形成能力,而能量胁迫下 Lm-MVs 却会显著增强细菌的生物被膜形成能力。本次试验提取的是正常培养下(BHI 作为培养基, 37 °C)的 Lm-MVs,但我们的结果依然显示添加 MVs 会显著抑制 Lm 生物被膜的形成。Kadurugamuwa 等发现细菌释放的 MVs 能够裂解多种革兰氏阳性和革兰氏阴性细菌,对于革兰氏阳性细胞, MVs 会附着在细胞壁上,释放肽聚糖水解酶,消化细胞壁的肽聚糖层,随后在消化部位进行裂解^[17-18]; Li 等研究认为细胞外囊泡的存在可以作为一种攻击性工具从而裂解竞争性细菌^[19]。另外,作为细胞间的通讯工具^[20], MVs 可以

模仿细菌细胞表面^[21]传递信号分子而感应细胞密度,影响生物被膜的形成。例如: Mashburn 等^[22]发现铜绿假单胞菌释放的群体感应系统信号分子——假单胞菌喹诺酮信号(*Pseudomonas* Quinolone Signal, PQS)可通过膜囊泡 MVs 在细菌细胞之间运输, PQS 不仅包装在 MVs 中,而且是生物被膜形成所必需的。由此我们推测, Lm-MVs 可能携带了某种或多种因子或者信号分子,其随着 MVs 的加入可能会对 Lm 的生理状态造成一定的影响,导致细菌密度的降低(在某些情况下也可能促进细胞密度增加,如能量胁迫^[16]),甚至使细胞裂解,从而影响细胞聚集成稳定三维膜结构(即生物被膜)。Lm-MVs 中是否存在这些蛋白因子或化学分子尚不清楚,有待进一步研究。

细菌 OMVs/MVs 作为毒力因子的载体已成为国内外研究的热点。为了进一步研究 Lm-MVs 的毒力作用,我们对不同 Lm-MVs 的毒性进行了研究,结果显示菌株的毒力大小与 MVs 的溶血活性高低呈正相关,而且在还原剂 DTT 的作用下, MVs 的溶血效果会有一定程度的增强,表明 LLO 在 MVs 中可能部分以氧化状态存在,因此当加入还原剂后, MVs 中一部分 LLO 在还原条件下被激活,从而引起红细胞的剂量依赖性溶血,该结果与 Vdovikova 等^[9]的报道一致。除此之外,我们利用棉铃虫作为 Lm-MVs 的感染模型^[13],将不同毒力 Lm-MVs 注射进入棉铃虫体腔中,结果发现 Lm-MVs 对棉铃虫幼虫具有一定的毒性,而且 Lm-MVs 的毒力大小与菌株本身毒性呈正相关,表明 Lm-MVs 在 Lm 的感染过程中发挥了毒力作用,并参与了 Lm 致病进程,然而, MVs 究竟如何引起棉铃虫感染?是 MVs 中哪些组成成分在起作用? MVs 是否会引起棉铃虫先天免疫系统应答? 这些问题都有待进行进一步的研究。总的来说,对 Lm-MVs 生物活性的研究将有助于进一步诠释革兰氏阳性菌膜囊泡形成的分子机制、生理功能以及开发其应用潜能,并为预防 Lm 污染、建立经济有效的食品生产和保藏方法、提高食品卫生安全提供新的思路。

REFERENCES

- [1] Radoshevich L, Cossart P. *Listeria monocytogenes*: towards a complete picture of its physiology and pathogenesis[J]. Nature Reviews Microbiology, 2018, 16(1): 32-46
- [2] McLauchlin J. Human listeriosis in Britain, 1967-1985, a summary of 722 cases: 1. Listeriosis during pregnancy and in the newborn[J]. Epidemiology and Infection, 1990, 104(2): 181-189
- [3] Centers for Disease Control and Prevention[CDC]. OutbreakNet, foodborne outbreak online database[EB/OL]. [2016-10-26]. <http://www.cdc.gov/foodborneoutbreaks>
- [4] Harvey J, Keenan KP, Gilmour A. Assessing biofilm formation by *Listeria monocytogenes* strains[J]. Food Microbiology, 2007, 24(4): 380-392
- [5] Pan Y, Breidt F Jr, Kathariou S. Resistance of *Listeria monocytogenes* biofilms to sanitizing agents in a simulated food processing environment[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(12): 7711-7717
- [6] Guo SC, Zhao LP, Tao SC, Zhang CQ. Research progress on the role of extracellular vesicles in bacterial pathogenesis[J]. Chinese Journal of Reparative and Reconstructive Surgery, 2018, 32(12): 1597-1604 (in Chinese)
郭尚春, 赵丽萍, 陶诗聪, 张长青. 胞外囊泡在细菌致病机制中作用的研究进展[J]. 中国修复重建外科杂志, 2018, 32(12): 1597-1604
- [7] Coelho C, Brown L, Maryam M, Vij R, Smith DFQ, Burnet MC, Kyle JE, Heyman HM, Ramirez J, Prados-Rosales R, et al. *Listeria monocytogenes* virulence factors, including listeriolysin O, are secreted in biologically active extracellular vesicles[J]. Journal of Biological Chemistry, 2019, 294(4): 1202-1217
- [8] Lee JH, Choi CW, Lee T, Kim SI, Lee JC, Shin JH. Transcription factor σ^B plays an important role in the production of extracellular membrane-derived vesicles in *Listeria monocytogenes*[J]. PLoS One, 2013, 8(8): e73196
- [9] Vdovikova S, Luhr M, Szalai P, Nygård Skalmann L, Francis MK, Lundmark R, Engedal N, Johansson J, Wai SN. A novel role of *Listeria monocytogenes* membrane vesicles in inhibition of autophagy and cell death[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2017, 7: 154
- [10] Feng FF, Zhang Q, Wang L, Feng XQ, Yin XJ, Luo Q. The virulence regulator PrfA plays a significant role in the *Listeria monocytogenes* biofilm formation[J]. Microbiology China, 2011, 38(9): 1450-1457 (in Chinese)
冯飞飞, 张强, 王莉, 冯晓琴, 尹晓蛟, 罗勤. 毒力基因调控蛋白 PrfA 促进单核细胞增生李斯特菌生物被膜的形成[J]. 微生物学通报, 2011, 38(9): 1450-1457
- [11] Zhang JX, Shen L, Hua ZY, Liu L, Zhou W, Jiang JR. Comparison of two methods of extraction outer membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Journal of Shanghai Jiaotong University (Medical Science), 2014, 34(3): 279-282 (in Chinese)
张佳星, 沈犁, 华子瑜, 刘岚, 周薇, 姜俊如. 两种提取铜绿假单胞菌外膜囊泡的方法比较[J]. 上海交通大学学报: 医学版, 2014, 34(3): 279-282
- [12] Yu XH, Zhang Y, Wang WJ, Luo Q. Contribution of *rmlB* in envelope-acting antibiotic resistance, biofilm formation and virulence in *Listeria monocytogenes*[J]. Microbiology China, 2017, 44(1): 161-171 (in Chinese)
于新惠, 张颖, 王文静, 罗勤. *rmlB* 基因在单核细胞增生李斯特菌耐药性、生物被膜形成和毒力方面的作用[J]. 微生物学通报, 2017, 44(1): 161-171
- [13] Yang LY, Liu CJ, Yang SY, Wang JY, Luo Q. Initial study on bollworm (*Helicoverpa armigera*) as an infection model of *Listeria monocytogenes*[J]. Journal of Microbiology, 2019, 39(6): 47-55 (in Chinese)
杨丽玉, 刘婵娟, 杨诗怡, 王菁妍, 罗勤. 棉铃虫作为单核细胞增生李斯特菌感染模型的初步研究[J]. 微生物学杂志, 2019, 39(6): 47-55
- [14] Westbrook DG, Bhunia AK. Dithiothreitol enhances *Listeria monocytogenes* mediated cell cytotoxicity[J]. Microbiology and Immunology, 2000, 44(6): 431-438
- [15] Gurung M, Moon DC, Choi CW, Lee JH, Bae YC, Kim J, Lee YC, Seol SY, Cho DT, Kim SI, et al. *Staphylococcus aureus* produces membrane-derived vesicles that induce host cell death[J]. PLoS One, 2011, 6(11): e27958
- [16] Lee T, Jun SH, Choi CW, Kim SI, Lee JC, Shin JH. Salt stress affects global protein expression profiles of extracellular membrane-derived vesicles of *Listeria monocytogenes*[J]. Microbial Pathogenesis, 2018, 115: 272-279
- [17] Kadurugamuwa JL, Beveridge TJ. Bacteriolytic effect of membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa* on other bacteria including pathogens: conceptually new antibiotics[J]. Journal of Bacteriology, 1996, 178(10): 2767-2774
- [18] Kadurugamuwa JL, Mayer A, Messner P, Sára M, Sleytr UB, Beveridge TJ. S-layered *Aneurinibacillus* and *Bacillus* spp. are susceptible to the lytic action of *Pseudomonas aeruginosa* membrane vesicles[J]. Journal of Bacteriology, 1998, 180(9): 2306-2311
- [19] Li ZS, Clarke AJ, Beveridge TJ. Gram-negative bacteria produce membrane vesicles which are capable of killing other bacteria[J]. Journal of Bacteriology, 1998, 180(20): 5478-5483
- [20] Chen M, Yin Y. Generation and function of extracellular vesicles in prokaryotes[J]. Medical Recapitulate, 2020, 26(1): 24-29 (in Chinese)
陈鸣, 殷勇. 原核生物胞外囊泡的生成与功能[J]. 医学综述, 2020, 26(1): 24-29
- [21] Schooling SR, Beveridge TJ. Membrane vesicles: an overlooked component of the matrices of biofilms[J]. Journal of Bacteriology, 2006, 188(16): 5945-5957
- [22] Mashburn LM, Whiteley M. Membrane vesicles traffic signals and facilitate group activities in a prokaryote[J]. Nature, 2005, 437(7057): 422-425