

• 综 述 •

## 革兰氏阳性菌细胞外囊泡的研究现状

葛艳艳, 李子涵, 王新月, 罗学刚, 王楠, 何红鹏, 张同存, 齐威

天津科技大学 生物工程学院, 天津 300457

葛艳艳, 李子涵, 王新月, 罗学刚, 王楠, 何红鹏, 张同存, 齐威. 革兰氏阳性菌细胞外囊泡的研究现状. 生物工程学报, 2022, 38(4): 1462-1474.

GE YY, LI ZH, WANG XY, LUO XG, WANG N, HE HP, ZHANG TC, QI W. The extracellular vesicles from gram-positive bacteria: a review. Chin J Biotech, 2022, 38(4): 1462-1474.

**摘 要:** 细胞外囊泡 (EVs), 也称为膜小泡, 是真核细胞和细菌分泌的囊泡状小体。它通过携带蛋白质、DNA、RNA 和各种代谢物进行细胞间物质的交流传递。根据内容物的不同发挥不同的生理功能, 如传递营养物质、参与免疫反应、治疗癌症等。目前大多数研究专注于真核细胞和革兰氏阴性菌囊泡的探索, 而对革兰氏阳性菌中分泌的囊泡研究较少。这篇综述总结了目前对于革兰氏阳性细菌 EVs 的产生、内容物成分、生理功能、改造等方面的研究成果, 并探讨了未来革兰氏阳性菌囊泡需研究的关键领域。

**关键词:** 细胞外囊泡; 革兰氏阳性菌; 生理功能; 相互作用; 免疫

## The extracellular vesicles from gram-positive bacteria: a review

GE Yanyan, LI Zihan, WANG Xinyue, LUO Xuegang, WANG Nan, HE Hongpeng, ZHANG Tongcun, QI Wei

School of Biological Engineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China

**Abstract:** Extracellular vesicles (EVs), also known as membrane vesicles, are vesicular bodies secreted by eukaryotic cells and bacteria. EVs can carry proteins, DNA, RNA, and various metabolites for the exchange and transmission of substances between cells. They play contents-dependent physiological functions, such as delivering nutrients, participating in immune response, and treating cancers.

**Received:** July 6, 2021; **Accepted:** September 8, 2021; **Published online:** September 30, 2021

**Supported by:** National Key Research and Development Program of China (2018YFA0901700); Joint Funds of the National Natural Science Foundation of China (U20A20400)

**Corresponding author:** QI Wei. Tel: +86-22-60602099; E-mail: qiweismiling@126.com

**基金项目:** 国家重点研发计划 (2018YFA0901700); 国家自然科学基金联合基金 (U20A20400)

Currently, most studies focus on the exploration of vesicles secreted by eukaryotic cells and gram-negative bacteria, while few studies focus on gram-positive bacteria. This review summarized the production, content composition, physiological function, and engineering of EVs secreted by gram-positive bacteria, and prospected future perspectives in this area.

**Keywords:** extracellular vesicles; Gram-positive bacteria; physiological function; interaction; immunity

细胞外囊泡 (extracellular vehicles, EVs) 是细菌和真核细胞分泌的纳米级囊泡状小体,由细胞膜或细胞器膜上突起部分脱落而产生<sup>[1]</sup>。真核生物、细菌、古细菌、支原体等具有细胞结构的生物都能够释放 EVs。根据直径的大小, EVs 可分为多种亚群,如凋亡小体 (apoptotic bodies, 约 100–5 000 nm)、微囊泡 (microvesicles, 约 100–1 000 nm)、微粒 (shedding particles, 约 100–1 000 nm)、外泌体 (exosomes, 约 50–150 nm)、外泌颗粒 (exocrine granules, 约 30–50 nm) 等<sup>[2]</sup>, 根据其生物发生和分泌途径可描述为 3 种主要的类型: 外泌体、微囊泡和凋亡小体, 外泌体是由胞内体萌发产生的多囊泡体, 与质膜融合后释放到胞外空间, 微囊泡是由直接向外的质膜萌发产生的, 凋亡小体是细胞凋亡过程中形成的膜泡<sup>[3]</sup>。EVs 在不同的生物体中也有不同的名称, 如革兰氏阴性细菌中的外膜小泡 (outer membrane vesicles, OMVs) 和革兰氏阳性细菌中的细胞外小泡或膜小泡 (membrane vesicles, MVs)。

革兰氏阳性菌细胞外囊泡的内容物成分与革兰氏阴性菌相似, 都含有蛋白质、脂质和核酸等物质, 不同的是, 革兰氏阴性菌 EVs 中还含有周质成分, 这在革兰氏阳性菌 EVs 中是不存在的。根据内容物成分的不同, EVs 可以产生不同的生理作用, 主要包括摄取营养物质、调节免疫反应、DNA/RNA 转运及治疗癌症等等。但是目前的多数研究专注于真核细胞和革兰氏阴性细菌, 对革兰氏阳性菌细胞外囊泡的

研究起步较晚, 对 MVs 的深入研究有助于生产药物载体、开发针对革兰氏阳性病原菌的疫苗和抗生素。这篇综述讨论了革兰氏阳性菌细胞外囊泡的产生及组成、生理功能、与肠道菌群的相互作用、以及囊泡改造方面最新的研究进展, 同时展望了在这一快速发展的研究领域中仍需探索的关键问题。

## 1 革兰氏阳性菌细胞外囊泡的产生及组成成分

早在 60 多年以前, 细菌膜产生的囊泡就在革兰氏阴性菌中被发现, 之后在金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌等革兰氏阳性菌的培养上清液中也发现有细胞外囊泡的存在, 因此学者们推测 EVs 的产生在革兰氏阳性菌中可能也是普遍存在的现象。对经过热灭活的细菌进行细胞外囊泡的分离实验时, 发现它们不能合成 EVs, 证明了囊泡的形成主要发生在代谢活跃的细胞中。细菌正常生长和受到应激时都会产生囊泡, 但 MVs 和 OMVs 的产生机制有所不同, 目前对于 OMVs 的产生主要有 3 种说法: 膜交联调节、脂质和脂质结合分子的作用、膜曲率诱导分子的聚集<sup>[4]</sup>。有研究发现, 缺乏外膜孔蛋白 OmpA 的菌种突变体会产生更多的 OMVs, 这可能是因为 OmpA 的缺失导致肽聚糖层和外膜之间的交联作用减少, 导致 OMVs 的分泌量增加。其次, 细胞膜上的脂质影响膜的曲率和流动性, 脂质可能在 EVs 的形成分泌中起到关键作用, 添加脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 结合分

子能提高 OMVs 的产量,其主要原因是增强菌体表面的阴离子排斥力,从而提高了 OMVs 的产量。另外,在革兰氏阴性菌中细菌周质空间中肽聚糖片段或错误折叠蛋白质的积累会对外膜 (OM) 施加压力,导致 OM 膨胀并最终形成 OMVs 这种小泡的形式释放出来。而革兰氏阳性菌囊泡释放的关键因素在于其细胞膜的流动性和细胞壁的完整性,某些降解酶的存在可以削弱肽聚糖层,可能会促进 MVs 穿过细胞壁<sup>[5]</sup>。MVs 的产生也依赖于基因的调控,例如在结核

分枝杆菌中, *virR* 基因的失活通过一种未知的机制导致囊泡增多;化脓性链球菌的 *CovRS* 双组分系统有参与调控囊泡的产生,囊泡的产生所依赖的是复杂的基因网络,而不是一小部分基因<sup>[6]</sup>。

EVs 具有脂质双层膜结构,其内部主要包裹着 DNA、RNA、蛋白质、多糖、脂质、各种代谢物以及信号分子等,不同的菌所产生的囊泡在内容物的组成上存在差异,进行 MVs 的组成成分分析时,可以把它们分为 3 大类,即:蛋白质、脂质和核酸 (图 1)。

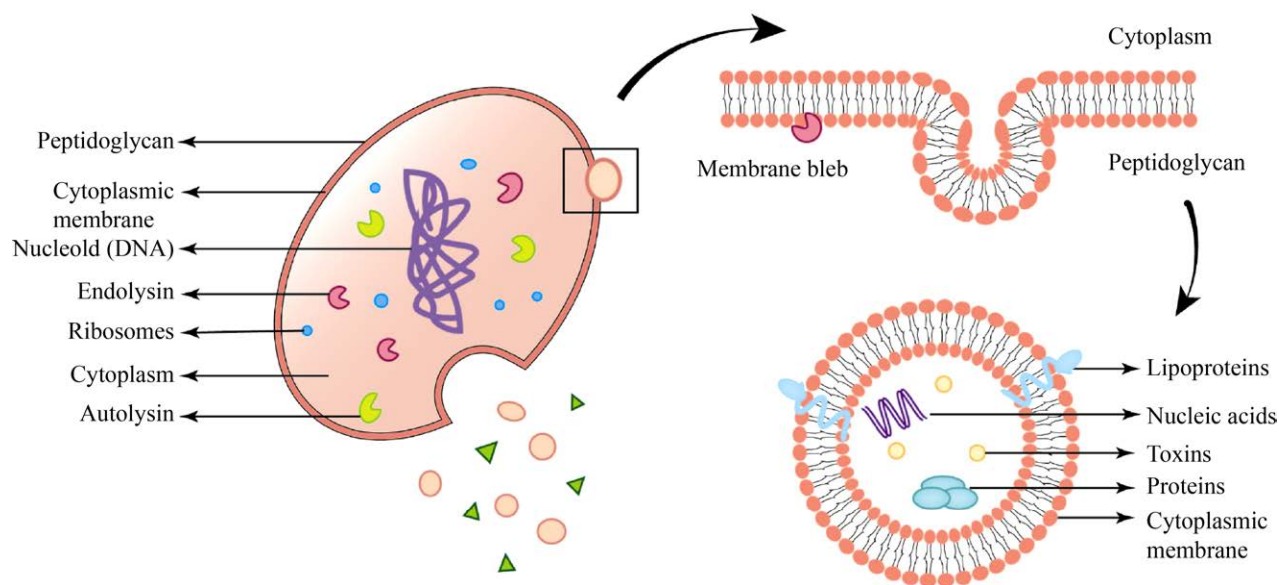


图 1 革兰氏阳性菌细胞外囊泡的形成和组成<sup>[7]</sup>

Figure 1 Origin and composition of Gram-positive EVs (adapted from [7] and redrawn).

EVs 是细菌之间遗传物质相互交换的通道,目前对于阳性菌囊泡内核酸的研究甚少,且多数研究聚焦于 RNA<sup>[8]</sup>。金黄色葡萄球菌所产生的细胞外囊泡中包含有免疫刺激性 DNA、RNA 和肽聚糖,可以激活细胞的免疫受体诱导自噬的发生<sup>[9]</sup>。Resch 等<sup>[10]</sup>观察到化脓性链球菌囊泡 RNA 序列大多数对应于化脓性链球菌中的 rRNAs 和 tRNAs,这表明,存在着某种类型

的选择过程,可以控制某些 RNA 被装载到 MVs 中。Bron 等<sup>[11]</sup>发现核酸组成上的差异会对 MVs 的免疫原性等生物学特性产生一定的影响,使其发挥不同的生物学作用。核酸类内容物的检测方法有免疫印迹法、聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR)、凝胶电泳二代测序技术及芯片技术等,目前最新的研究显示,多色荧光 PCR 的 EV-lncRNA 分析芯片和功能

化金纳米荧光探针可以更加高效地利用荧光来进行 RNA 的检测,具体研究中可根据实验目的选择合适的检测技术。有关革兰氏阳性菌 MVs 的核酸组成的鉴定刚拉开序幕,还需要采用更加先进的方法对其他物种(如结核分枝杆菌)进行更多深入的研究,以确定不同革兰氏阳性菌 MVs 的核酸含量和功能是否存在相同之处。

蛋白质的存在可以体现细胞外囊泡的生理功能状态,大多数革兰氏阳性菌都可分泌蛋白质到周围环境中,这些蛋白质的释放可以增加细胞间的交流、降低毒素含量等。MVs 中包含的蛋白质主要包括细胞质蛋白、膜相关蛋白、热休克蛋白、信号转导因子、各种类型的酶等等<sup>[12]</sup>。Kalra 等<sup>[13]</sup>指出囊泡中含有降解酶,可以使细胞壁重组,从而能够穿透革兰氏阳性菌厚厚的细胞壁。也有研究曾鉴定了金黄色葡萄球菌 MVs 的蛋白质含量,从中发现了 200 多种蛋白质与 MVs 有着一定的关系,这些蛋白质中有 160 种属于胞浆蛋白,同时实验者从人和其他动物中分离的金黄色葡萄球菌菌株中证明了“核心金黄色葡萄球菌 MVs 蛋白质组”的存在,这一结果在其他的细菌如肺炎链球菌和炭疽芽孢杆菌中也得到了验证<sup>[14]</sup>。与菌体的蛋白质组相比较可以发现,囊泡中胞外蛋白含量丰富,占 23%左右,同时还有很多胞质蛋白,如代谢蛋白和核糖体,这些蛋白与革兰氏阴性菌囊泡中所检测到的蛋白质有相似之处。对蛋白质的功能进行分类后发现,它们参与多种功能,如信息的储存和处理、对外界刺激的应激反应、代谢过程、细胞过程等<sup>[15]</sup>。这表明细胞外囊泡的产生是一种新的蛋白质分泌途径,其所装载的物质可以被用作重要的病理、生理学生物标志物,同时也为 MVs 作为治疗剂和药物载体带来了新的机会。传统的蛋白质检测技术如 ELISA (酶联免疫吸附试验)、流式细胞术或者免

疫印迹法都可以对蛋白质进行检测,但是对于蛋白质的大小会有一定限制,基于此,目前出现的高敏流式细胞术发挥了极大的作用,它能够在囊泡水平上对蛋白质标记物进行高速度、高灵敏性的检测。

除上述两种物质外, MVs 中还包含着胆固醇、神经酰胺等脂质物质,主要的检测方法包括薄层色谱、荧光测定法、高效液相色谱法等比较常见的检测技术,也有研究曾采用拉曼光谱及其他的分析技术发现囊泡中存在的脂质可以作为肿瘤标记物<sup>[16]</sup>。

在囊泡的代谢组学研究中,要想准确测定代谢物质,选择一种可靠的方法是必不可少的,目前已经开发了许多不同的淬灭、提取方法。常用的淬灭试剂如 60% (V/V) 甲醇水溶液、60% (V/V) 甲醇水溶液+70 mmol/L HEPES (4-羟乙基哌嗪乙磺酸)、60% (V/V) 甲醇水溶液+0.85% (W/V) 碳酸铵、60% (V/V) 甘油-盐水溶液、冷乙醇等等,提取试剂主要包括冷甲醇、高氯酸、沸乙醇、氯仿/甲醇 (1 : 1) 和氯仿/水 (1 : 1) 等。Spura 等<sup>[17]</sup>比较了不同方法用于革兰氏阳性菌的淬灭,实验表明乙醇淬灭的样品比甲醇淬灭的样品效果更好,相对标准误差更小,同时还可多鉴定出 3%以上的代谢物。代谢组学证明了 MVs 可能拥有的某些功能作用,如通过囊泡向肿瘤输送营养物质<sup>[18]</sup>。MVs 内容物分析对其功能研究有重要意义,但具体作用及机制还未被彻底阐明,需借助基于质谱的靶向或者非靶向的多平台代谢组学和其他研究手段进一步探索,最终利用系统生物学研究技术阐述囊泡的成分与其生理功能之间的关系。

## 2 功能作用

MVs 具有的生理作用大部分来源于其所携带的物质,如毒素、免疫原性物质、蛋白质、

核酸等<sup>[19]</sup>, Tartaglia 等<sup>[20]</sup>就曾发现革兰氏阳性菌所产生的 MVs 中毒素、铁载体、粘附素和抗生素耐药蛋白是的确存在的。MVs 携带和储存着这些物质, 当周围的环境发生变化时, 细菌可以对自身产生的囊泡的内容物进行调整改变, 从而改变微环境、调节免疫系统、控制遗传等。MVs 可以利用细胞间信息交换和器官间通讯的功能, 参与调节炎症性肠病相关的几个病理生理过程, 具有主动的分选和包装机制<sup>[21]</sup>; MVs 也可以通过与癌症细胞微环境相互作用, 促进癌症的恶化和癌细胞的转移, 这些作用在胃癌、结肠癌中都有研究, 例如, 把细菌放在含有沙门氏菌的环境下, 它所产生的囊泡中会存在伤寒沙门氏菌的细胞膨胀致死毒素<sup>[22]</sup>; 由于囊泡与脂质体相似, 在医学领域中, 囊泡正被尝试作为药物输送系统<sup>[23]</sup>; 通过检测 MVs 中所含的物质, 也可以判断某些疾病状态, 如囊泡内容物可以为 IBD (炎症性肠病) 的诊断提供一种比较理想的生物标志物。

## 2.1 增强对营养物质的摄取

菌体在生长过程中需要进行营养物质的摄取与利用, 而菌体所分泌的具有双层膜结构的囊泡可以帮助其增强这一过程。首先, 囊泡内部包含各种酶, 如水解酶、降解酶以及具有识别功能的酶, 这些物质可以消灭其他菌体, 提高自身菌体在环境中的竞争力, 获得更充足的营养物质, 有利于菌体的生长<sup>[4]</sup>。还有研究发现, 革兰氏阳性菌株迪茨代菌 (*Dietzia* sp.) DQ12-45-1b 在铁含量比较低的情况下可以释放 MVs, 参与细胞外血红素的捕获和转运<sup>[24]</sup>。同时 MVs 的营养物质输送, 避免了化合物降解、靶向性不高等方面的问题, 以更有效的方式增强了宿主有益物质的摄取, 这一功能的应用可能有助于益生菌或食品补充剂新配方的研发。

## 2.2 减缓外界刺激

外界环境条件的不同会对菌体的生长造成一定的影响, 例如温度过高或过低、干燥、抗生素及药物的使用等。囊泡不仅可以运输营养物质, 其表面还有多种受体和转运体, 可以将进入菌体内的抗生素等有害物质包裹, 将其与菌体隔离开来, 提高菌体生长的安全性。将嗜酸乳杆菌 MVs 融合到德氏乳杆菌和大肠杆菌膜上, 嗜酸乳杆菌 MVs 内细菌素 (抗菌肽) 的高含量导致靶细胞的生长受到抑制<sup>[14]</sup>。细胞壁降解酶通常存在于革兰氏阳性囊泡中, 可能与 MVs 的抗菌作用有关<sup>[25]</sup>。同时 MVs 能够传递生长因子、释放胞外多糖、增强生物被膜的作用, 进一步增强菌体对外界伤害的抵抗力。与细菌外膜相比较的话可以发现, 很多的囊泡会携带过氧化氢酶, 具有水解过氧化氢的能力, 使细菌避免受到氧化的伤害<sup>[26-27]</sup>。

细胞外囊泡有时还可以通过产生有害物质来发挥保护作用, 细菌所产生的 MVs 可以传递信号是众所周知的, 特别是在病原菌中, 它给需要交换传递的分子提供了一个封闭的、受保护的环境, 使其避免受到外界环境的影响, 同时也参与了细菌细胞间的营养转移<sup>[28]</sup>。最近的一些研究表明, 细菌受到外界刺激时, 囊泡的释放量会明显增加, 这也表明了囊泡的产生量与菌体的应激状态有一定的关系<sup>[29]</sup>。例如, 温度太高会导致蛋白质变性, 使得细菌外膜的流动性增加, 细胞外囊泡的产生量也随之增加<sup>[30-31]</sup>。这种关系可以帮助细菌适应挑战性的环境, 在物理、化学、生物刺激下也能很好的生存。

## 2.3 调节宿主免疫系统

细菌的免疫系统发挥作用对于对抗病原体的感染至关重要, EVs 在细菌生长的各个阶段都可产生, 作为一种分泌系统影响着宿主与病原体之间的通信与相互作用。它包含许多微生物

相关或病原相关的分子模式 (MAMPs/PAMPs), 包括脂多糖、脂蛋白、肽聚糖和核酸等, EVs 的 MAMP 含量使它们能够与免疫细胞和非免疫细胞 (例如粘膜表面的上皮细胞) 中的宿主模式识别受体 (pattern recognition receptors, PRR) 结合, 刺激一系列细胞因子的产生, 在免疫反应中起重要作用。当囊泡进入到宿主细胞内后, 可以将其携带的具有免疫原性的蛋白组分传递至受体细胞, 激活宿主免疫防御反应。EVs 中包含的毒素、毒力因子以及脂质, 也可以释放或传递至宿主细胞, 或是增加毒素半衰期, 这些作用可以调节宿主的免疫反应, 躲避宿主免疫系统的防御作用, 有些情况下也可以帮助细菌进入宿主细胞, 获取生长所需的营养物质<sup>[4]</sup>。如副乳杆菌 MVs 能降低脂多糖诱导的细胞因子 (IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-2 和 TNF $\alpha$ ) 的表达, 增加抗炎性细胞因子 IL-10 和转化生长因子的产生; 革兰氏阳性益生菌弗氏丙酸杆菌可通过细胞外囊泡调节 NF- $\kappa$ B23 转录因子活性和 IL-8 的释放, 减轻体内和体外的炎症反应<sup>[32]</sup>; 肺炎链球菌 MVs 可以诱导人单核细胞来源的树突状细胞产生 IL-6、IL-8、IL-10367 和 TNF<sup>[14,33]</sup>; 另外一些研究报道, 人类的乳酸共生菌就是通过囊泡内容物来提高机体免疫力的, 从乳酸菌中提取的 MVs 可以参与免疫反应, 抑制 Ag 特异性的体液和细胞反应, 治疗炎症性疾病, 在研究者建立的急性结肠炎模型中, MVs 能有效防止结肠缩短。对于骨髓前体细胞和巨噬细胞来说, MVs 是促进 M2 样巨噬细胞极化和抑制细胞分化的帮手, 另外还可以加速部分创面闭合<sup>[34]</sup>。在宿主与病原体对抗的过程中, 乳酸菌囊泡也发挥了极大的作用, Li 等研究了植物乳杆菌来源的 MVs 在治疗耐药病原体中的作用, 发现防御基因 *cpr-1* 和 *clec-60* 的转录显著增加, 上调宿主防御基因的表达,

对宿主起到保护作用<sup>[35]</sup>。

某些细菌所产生的 MVs 利用其免疫功能可以用来制作疫苗, 使抗原蛋白包裹进囊泡中发挥作用, 从而抵抗细菌感染。利用囊泡制作疫苗主要有三方面的优势, 首先它的提取分离是比较方便的, 其次, 囊泡是一种脂质体, 这种组成对于免疫应答有一定的帮助, 不仅增强了免疫力, 而且使得疫苗的安全性大大提升, 最后也是比较重要的一点就是它可以包裹具有免疫原性的物质, 或者经过处理和设计之后包裹上外源的抗原, 递呈至宿主细胞, 被宿主细胞识别并引起免疫反应, 参与细胞免疫、固有免疫、体液免疫, 对抗细菌感染。

据报道, 肺炎链球菌 MVs 的保护活性在小鼠身上表现出比肺炎球菌细胞提取物更强的免疫反应性, 另外一些益生乳杆菌能促进肠道 IgA (分泌型免疫球蛋白 A) 的产生, 如佐氏乳杆菌亚种产生的 MVs 能够通过其细胞壁成分激活 TLR2 (toll 样受体) 信号, 促进小鼠派伊氏结细胞产生 IgA, 这便是肠道微生物与宿主之间通过 MVs 产生的新的作用, 这使得从益生菌中提取的 MVs 可以作为安全佐剂<sup>[36]</sup>。有人建议构建生物工程 MVs, 在去除毒素和有害化合物的同时, 增加免疫反应决定簇, 这一工艺已经被应用于生产疫苗的平台, 以保护小鼠免受金黄色葡萄球菌致死性脓毒症的侵袭。天然产生的囊泡具有成为新型疫苗平台的潜力, 提高其免疫原性、安全性及降低潜在危害将会对疫苗的生产提供强有力的帮助, 这一应用可能会提供一种比目前存在的疫苗更有效的治疗策略

## 2.4 基因转移和信号传递

MVs 可以包裹核酸, 因此, 它们能在水平基因转移中发挥作用, 这在几种革兰氏阴性细菌中已经被证实<sup>[37]</sup>, 例如, 鲍曼不动杆菌可以通过携带 *bla*<sub>OXA-24</sub> 基因的 OMVs 获得对碳青霉

烯类抗生素的抗药性<sup>[38]</sup>,目前在乳球菌属中也发现了这种转移。关于囊泡的水平基因是否可以跨物种甚至细菌属转移尚不清楚,但是,在相同的细菌种类中,由于 MVs 可以融合到细菌膜上,通过 MVs 进行水平基因转移的可能性很高。类似的机制也可能发生在 EV-embedded-RNAs 中,在这种机制中,受体细菌可以使用 MVs 短时间传递 RNA。细胞外囊泡的基因转移还可能通过介导噬菌体的感染来促进,通过对枯草芽孢杆菌的研究,发现抗噬菌体细胞可以接收 MVs 装载的噬菌体受体来获得噬菌体敏感性,也可使噬菌体附着在其他芽孢杆菌上,为噬菌体尽快适应新宿主和交换遗传物质提供帮助<sup>[25]</sup>。这表明,革兰氏阳性菌产生的细胞外囊泡可能为噬菌体进入细菌宿主提供了一条新的途径,同时可以通过水平基因的转移协助建立抗生素耐药亚群。

在复杂的环境中,微生物通过传递和接收化学信号保持物种之间的交流,这些化学信号可以调节基因表达和细胞功能,转移生物分子和代谢物,提高群落的生存能力,并激活防御策略,争夺环境中的宝贵资源。EVs 的存在增强了微生物之间的信号传递,它在群体感应(quorum sensing, QS)的传播中起着重要作用, QS 信号允许细菌相互交流,是许多病原菌毒力的重要驱动力。在革兰氏阴性菌中,假单胞菌喹诺酮信号(PQS)是铜绿假单胞菌的主要 QS 分子之一,介导了许多功能,包括产生毒力因子,调节宿主免疫反应、对竞争微生物的细胞毒性、以及铁的获取,由于其化学组成, PQS 是高度疏水的,因此不太可能在环境中有效地扩散,大约 86%的 PQS 被包裹在细胞外囊泡中发挥作用。革兰氏阳性菌产生的 MVs 可以传递炎症信号,导致宿主发病。如金黄色葡萄球菌 MVs 和上皮细胞相互作用会激活宿主细胞表面

的 TLR2,在进入宿主上皮细胞后,内体 PRRs (模式识别受体分子) TLR7、8 和 9 以及细胞质受体 NOD2 可检测到 MVs 相关的 RNA、DNA 和肽聚糖等物质,这些物质激活宿主表面和细胞质的 PRRs,导致 NF- $\kappa$ B (核因子) 的激活,并产生和释放促炎细胞因子和趋化因子,从而促进宿主发病<sup>[9]</sup>(图 2)。一些研究表明,囊泡还含有很多群体感应分子,如假单胞菌喹诺酮信号、N-酰基高丝氨酸内酯等,因此它们可以作为细菌长距离间的信号传递系统<sup>[39]</sup>。同时存在于 MVs 中的群体感应分子的传递可以特异性地激活受体细胞,激活细菌群体中的异源基因。然而,尽管这是一个值得探索的课题,但在革兰氏阳性菌 MVs 中还未能得到透彻研究。

## 2.5 癌症治疗

MVs 通过储存和分泌 miRNA 在癌症的发生和转移中扮演着非常重要的作用。在 Ñahui Palomino 等<sup>[40]</sup>的研究中发现,乳酸菌对于抑制 1 型艾滋病病毒感染有着十分有效的作用,这一作用来源于其共生菌释放的细胞外囊泡,与囊泡内包裹的一些蛋白质和代谢物有关。最近的一份报告显示了 EVs 在癌症免疫治疗中的潜力,该报告显示,来自转基因大肠杆菌的 OMVs 对肿瘤组织具有选择性趋向性,并且通过产生细胞因子 CXCL10 和干扰素- $\gamma$  诱导长期抗肿瘤免疫反应,根除已建立的肿瘤而没有明显的不良反应<sup>[41]</sup>。嗜酸乳杆菌和金黄色葡萄球菌产生的 MVs 也有相似的抗肿瘤作用。如果能够在 EVs 内表达递送某些毒素并与癌细胞作用靶向杀死癌细胞,那么用 EVs 免疫治疗癌症将逐渐成为现实。另外癌症细胞可以产生囊泡,将 miRNA 运输到其他细胞,这在肿瘤的发展、炎症反应的发生中发挥着重要作用<sup>[42]</sup>。同时 MVs 也可以作为癌症药物治疗的分子载体,有效提高治疗的精确性和靶向性。这些研究表明 MVs 可以作为肿瘤诊



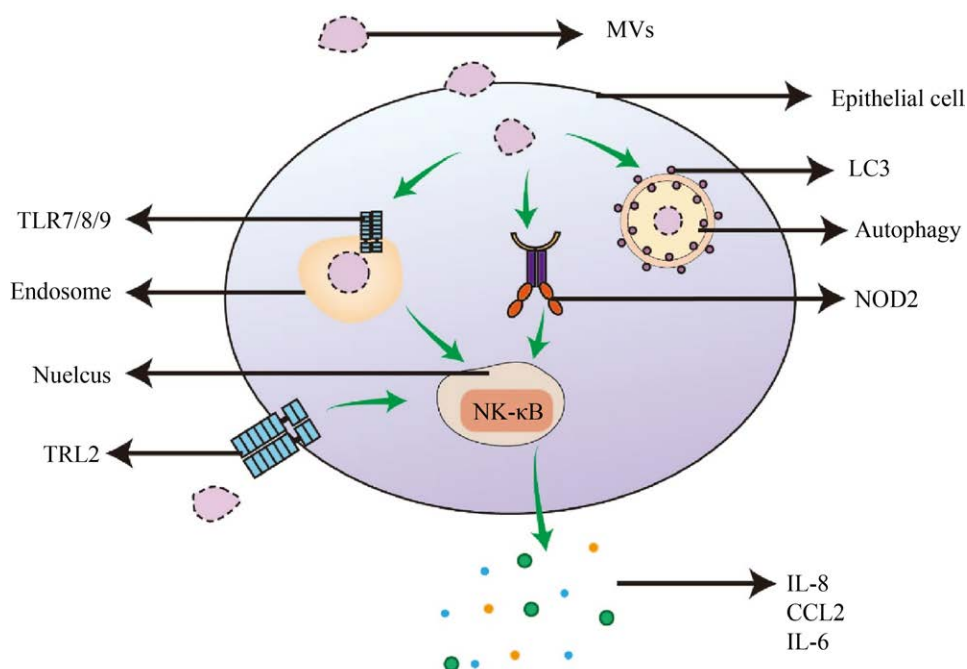


图2 革兰氏阳性菌产生的MV的免疫检测、炎症信号和细胞内去向的模型

Figure 2 Models of immune detection, inflammatory signaling and intracellular fate of MVs produced by Gram-positive bacteria.

断和治疗的靶点，在治疗转移性癌症中有重要的研究价值。今后还需对MV进行深入分析，以揭示多种癌症的特定分子特征，使其能在疾病检测、治疗监测及耐药性方面尽可能大地发挥作用。

### 3 与肠道菌群的相互作用

近年来，肠道微生物群组成与人类健康和疾病之间的联系逐渐被揭示，在这一过程中，MV架起了微生物之间交流的桥梁，在肠道微生物稳态方面发挥了重要的调节作用。首先，菌体所产生的MV能够引发一系列的免疫应答，这对于肠道微生物的调节至关重要，例如，Maerz等<sup>[43]</sup>发现肠道共生菌普通拟杆菌能通过产生细胞外囊泡克服肠上皮粘液层的阻挡，递送相关物质参与肠道免疫反应，预防小鼠结肠炎的发生；也有报道称从大肠杆菌中分离出的

囊泡可以激活肠上皮细胞中的NOD1信号通路，这表明，肠道微生物区系释放的胞外小泡可以参与免疫反应，调节肠道菌群平衡<sup>[44]</sup>；在乳酸菌方面有研究发现，开菲尔粒中乳酸菌的MV在炎症性肠病的小鼠模型中可以减少小鼠的炎症细胞因子，降低血清中过氧化物酶的水平，减少结肠内跨壁白细胞的浸润和杯状细胞的丢失，调节炎症反应<sup>[45]</sup>；在金黄色葡萄球菌诱导的小鼠特应性皮炎模型中，植物乳杆菌来源的MV可减少表皮增厚和IL-4的水平，提示乳酸菌在特应性皮炎中的保护作用<sup>[46]</sup>；嗜热乳杆菌所产生的囊泡还可以用作抗菌剂，它能够将细菌素多肽运送给致病性的乳杆菌，从而抑制其生长并损害致病性乳杆菌膜的完整性，影响一些复杂的微生物群落产生变化<sup>[47]</sup>。另外，细胞外囊泡的产生也会导致一些疾病的发生，据报道，金黄色葡萄球菌产生的MV可以诱导促



炎细胞因子的产生和细胞的死亡,这表明它们有助于金黄色葡萄球菌在宿主中的致病作用<sup>[48]</sup>。

囊泡内部包裹着大量的酶以及碳水化合物,有研究发现囊泡所携带的水解酶能够对肠道的微生态平衡产生至关重要的作用,它们可以被用来吸收多糖,这样其他不能分解多糖的菌种就能在这种囊泡产生的环境中继续生长,宿主肠道的微生态得以稳定<sup>[49]</sup>。有研究关注到脆弱芽孢杆菌和西陶米隆芽孢杆菌会在其所产生的囊泡中优先装载许多水解酶,这些酶只能在囊泡中检测得到<sup>[50]</sup>,因此可以认为细胞外囊泡有助于建立和平衡肠道微生物区系,这一功能在革兰氏阳性菌的 MVs 中还应得到更多的关注。

MVs 的释放通常表明细菌代谢活跃,因此它或许能比菌群本身更好地反映宿主体内的微生物群活动,这为疾病的诊断开辟了新的方法。在以后的研究中,可以开发更快速、有效的检测方法,通过对患者的微生物菌群 MVs 进行评估,更深入地了解微生物群与疾病和健康状况之间的联系。

## 4 囊泡改造

囊泡作为一种生物相容性良好的生物膜,拥有很好的生物渗透性,免疫原性也比较低,能够长距离靶向输送抗生素或其他化合物,以增强吸收,它的载药量在纳米粒和脂质体之间,是一种具有极大发展前景的安全药物载体。因此,近年来有很多专家学者专注于研究囊泡作为酶或者药物载体的应用。

改造的第一步是将 EVs 进行高效、快速地提取分离,同时要保持其结构和生物功能的完整性。目前主要的提取方法有超滤法、超速离心法、蔗糖密度梯度离心法、尺寸排阻色谱法、试剂盒提取法<sup>[51]</sup>,及近年来的微流控技术<sup>[52]</sup>。

在这众多提取方法中,超速离心法虽耗时较长、对仪器的要求高,但由于这一技术已十分成熟,且能保证 EVs 的结构完整性,因而是目前最经典的方法。在之前的研究中,我们采用超速离心法和试剂盒(亲和树脂层析)法提取分离了小鼠粪便菌群的细胞外囊泡(图 3),初步确定 2 种方法均可提取细胞外囊泡且超速离心法提取所得量相对较多。但是单纯依靠一种分离方法得到的细胞外囊泡的纯度和产量可能无法满足实验需要,因此,在进行细胞外囊泡的提取分离时推荐联合使用两种及以上方法。提取分离得到的 EVs 可通过透射电镜、扫描电镜、冷冻电镜及纳米颗粒跟踪分析技术鉴定后装载药物<sup>[53]</sup>。

细胞外囊泡载药方法包括直接载药和间接载药 2 种。直接载药是利用物理或化学的方法把外源性的蛋白质或者药物导入外泌体中,主要包括皂苷处理法、冻融循环法、超声法、孵育法等。这些方法操作起来都比较简单,所需时间短,其中皂苷处理法是指将外泌体、药物、皂苷溶液共同培养,再利用膜透析、色谱柱纯化获得载药的外泌体<sup>[54]</sup>;间接载药比较常用,主要是通过基因工程的技术将核酸转染细胞,表达蛋白质后分离纯化就可以得到载有目的蛋白的外泌体。有研究利用基因工程转染 HEK-293T 细胞,适宜条件下培养,再利用超

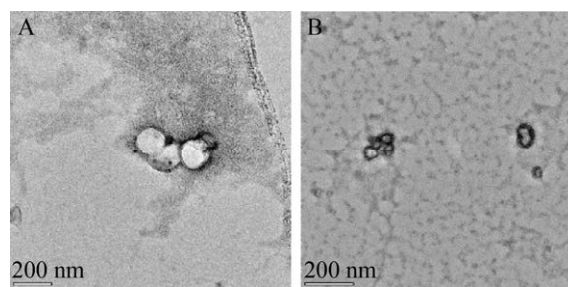


图 3 小鼠粪便菌群的细胞外囊泡  
Figure 3 Extracellular vesicles of mice fecal flora isolated by (A) ultracentrifugation or (B) kit method.

速离心法和蔗糖梯度法进行分离纯化,最终得到所需外泌体<sup>[55]</sup>。但是现有的研究还不是十分完善,在载药方式方法、靶向给药上有局限性,随着不断地深入研究,囊泡载药还会有更加广阔的发展空间。在实际应用中,可以将两种或多种化合物共同装载入 MVs,实现药物的协同作用,同时在自溶素存在的情况下,联合释放可能更有助于药物通过细胞壁。尽管 MVs 在输送化合物方面显示出极大的优势,但这一药物递送系统在产量、装载率、成本方面还有很大的进步空间,仍需更全面、深入地探索。

## 5 展望

近年来,革兰氏阳性菌产生的 MVs 逐渐受到关注,对于 MVs 的组成成分、分离提纯方法及其生物学功能的研究取得了一定的进展,其所具有的功能多样性在疫苗开发、药物递送方面展示出极大的发展潜力。但是目前对革兰氏阳性菌 EVs 的生物学研究不够深入,尤其是在生物发生、组成和摄取方面,其外膜组成和毒力相关因子的表型差异可能需要进一步研究,以解释囊泡形成的确切过程及其在疾病中的作用。

从细菌培养物中分离的 MVs 作为候选疫苗已经取得了一些成功,工程化 MVs 还被用于成功表达和或递送蛋白质和核酸等生物分子,这表明在疫苗开发和工业催化等领域 MVs 具有极大潜力。但是 MVs 在作为疫苗应用时仍然存在一些不可忽视的问题,如:由于我们对 MVs 的产生机制认识不足,限制了它的大规模生产,如何提高 MVs 产量、优化 MVs 的纯化方式仍是目前亟待解决的问题。近年来通过基因工程改造的方式提高细菌分泌膜囊泡的产量,如通过基因突变、通路修饰和敲除某些基因等方式均能达到令人比较满意的效果。因此,今后制

备大量 MVs 时,可以考虑使用基因工程改造获取高产菌株,为大量制备膜囊泡提供可能。另外,我们对如何控制宿主细胞内 MVs 持久性的具体机制及其相关毒力因子(以及有益相互作用情况下的其他成分)如何释放和发挥其功能仍不清楚。同时,由于不同的病原菌表达不同的毒力因子,我们需要揭示 MVs 在细菌毒力方面的共同点及菌株特异性,减小 MVs 的毒性并探索其复杂的递送机制以精准递送抗原。

在癌症治疗方面, MVs 影响癌症发生和肿瘤进展的机制在很大程度上还不清楚,利用基因工程技术修饰细菌并随后提纯重组 MVs 用作癌症疫苗也有巨大的潜力。作为药物和肿瘤疫苗的载体,基于 MVs 的递送被评估为一种新兴的癌症治疗策略,我们需要更多的研究来更好地阐明它们在癌症中的作用和作用机制,以减少靶向效应和治疗失败的风险。在未来,我们希望研究者们增加对 MVs 作为癌症免疫治疗剂的潜力的兴趣,使 MVs 作为癌症免疫治疗剂诱导持久的抗肿瘤免疫反应,或者作为个性化或通用型癌症疫苗。

因此, MVs 作为成熟的商品化治疗药物还有很长一段路需要走,我们仍需不断探索,揭示 MVs 的发生机制,使 MVs 的生产朝着高产量、高纯度、低致炎性的方向进行,加快药物载体、疫苗、癌症免疫治疗剂的研发,为基础研究和医学发展开辟全新的道路。

## REFERENCES

- [1] 冯文艳, 张扣兴. 革兰阴性菌外膜囊泡的研究进展. 中国抗生素杂志, 2019, 44(1): 32-39.  
Feng WY, Zhang KX. Research development of outer membrane vesicles in gram-negative bacteria. Chin J Antibiot, 2019, 44(1): 32-39 (in Chinese).
- [2] 王永玉, 徐赵坤, 马春骥, 等. 胞外和胞内菌胞外囊泡的功能及应用. 微生物学杂志, 2021, 41(3): 99-106.  
Wang YY, Xu ZK, Ma CJ, et al. Function and

- application of extracellular vesicles of extracellular bacteria and intracellular bacteria. *Journal of Microbiology*, 2021, 41(3): 99-106 (in Chinese).
- [3] Dudzik D, Macioszek S, Struck-Lewicka W, et al. Perspectives and challenges in extracellular vesicles untargeted metabolomics analysis. *Trac Trends Anal Chem*, 2021, 143: 116382.
- [4] 卞志标, 李冰, 勾红潮, 等. 革兰阴性菌外膜囊泡的研究进展. *畜牧与兽医*, 2020, 52(5): 136-142.  
Bian ZB, Li B, Gou HC, et al. Advances in research on outer membrane vesicles from gram-negative bacteria. *Animal Husb Vet Med*, 2020, 52(5): 136-142 (in Chinese).
- [5] Wang X, Thompson CD, Weidenmaier C, et al. Release of *Staphylococcus aureus* extracellular vesicles and their application as a vaccine platform. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 1379.
- [6] Briaud P, Carroll RK. Extracellular vesicle biogenesis and functions in gram-positive bacteria. *Infect Immun*, 2020, 88(12): e00433-20. DOI:10.1128/iai.00433-20.
- [7] Bose S, Aggarwal S, Singh DV, et al. Extracellular vesicles: an emerging platform in gram-positive bacteria. *Microbial Cell*, 2020, 7(12): 312.
- [8] 刘春辰, 林慧娴, 郑磊. 细胞外囊泡检测技术及其临床应用进展. *检验医学*, 2020, 35(12): 1207-1212.  
Liu CC, Lin HX, Zheng L. Research progress in extracellular vesicle detection technique and its clinical application. *Lab Med*, 2020, 35(12): 1207-1212 (in Chinese).
- [9] Bitto NJ, Cheng L, Johnston EL, et al. *Staphylococcus aureus* membrane vesicles contain immunostimulatory DNA, RNA and peptidoglycan that activate innate immune receptors and induce autophagy. *J Extracell Vesicles*, 2021, 10(6): e12080.
- [10] Resch U, Tsatsaronis JA, Le Rhun A, et al. A two-component regulatory system impacts extracellular membrane-derived vesicle production in group A *Streptococcus*. *mBio*, 2016, 7(6): e00207-e00216.
- [11] Bron PA, Marcelli B, Mulder J, et al. Renaissance of traditional DNA transfer strategies for improvement of industrial lactic acid bacteria. *Curr Opin Biotechnol*, 2019, 56: 61-68.
- [12] Brown L, Wolf JM, Prados-Rosales R, et al. Through the wall: extracellular vesicles in gram-positive bacteria, *Mycobacteria* and fungi. *Nat Rev Microbiol*, 2015, 13(10): 620-630.
- [13] Kalra H, Drummen GP, Mathivanan S. Focus on extracellular vesicles: introducing the next small big thing. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(2): 170.
- [14] Codemo M, Muschiol S, Iovino F, et al. Immunomodulatory effects of pneumococcal extracellular vesicles on cellular and humoral host defenses. *mBio*, 2018, 9(2): e00559-e00518.
- [15] Lee EY, Choi DY, Kim DK, et al. Gram-positive bacteria produce membrane vesicles: proteomics-based characterization of *Staphylococcus aureus*-derived membrane vesicles. *Proteomics*, 2009, 9(24): 5425-5436.
- [16] Smith ZJ, Lee C, Rojalin T, et al. Single exosome study reveals subpopulations distributed among cell lines with variability related to membrane content. *J Extracell Vesicles*, 2015, 4: 28533.
- [17] Spura J, Reimer LC, Wieloch P, et al. A method for enzyme quenching in microbial metabolome analysis successfully applied to gram-positive and gram-negative bacteria and yeast. *Anal Biochem*, 2009, 394(2): 192-201.
- [18] Williams C, Palviainen M, Reichardt NC, et al. Metabolomics applied to the study of extracellular vesicles. *Metabolites*, 2019, 9(11): 276.
- [19] 易洁, 刘青, 孔庆科. 革兰氏阴性菌外膜囊泡作为亚单位疫苗的研究进展. *微生物学报*, 2016, 56(6): 911-921.  
Yi J, Liu Q, Kong QK. Advances in outer membrane vesicles of gram-negative bacteria as sub-unit vaccines-a review. *Acta Microbiol Sin*, 2016, 56(6): 911-921 (in Chinese).
- [20] Tartaglia NR, Breyne K, Meyer E, et al. *Staphylococcus aureus* extracellular vesicles elicit an immunostimulatory response *in vivo* on the murine mammary gland. *Front Cell Infect Microbiol*, 2018, 8: 277.
- [21] Wani S, Man Law IK, Pothoulakis C. Role and mechanisms of exosomal miRNAs in IBD pathophysiology. *Am J Physiol-Gastrointest Liver Physiol*, 2020, 319(6): G646-G654.
- [22] Roier S, Zingl FG, Cakar F, et al. A novel mechanism for the biogenesis of outer membrane vesicles in gram-negative bacteria. *Nat Commun*, 2016, 7: 10515.
- [23] Yumoto H, Hirota K, Hirao K, et al. The pathogenic factors from oral streptococci for systemic diseases. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(18): E4571.
- [24] Wang M, Nie Y, Wu XL. Extracellular heme recycling and sharing across species by novel mycomembrane vesicles of a gram-positive bacterium. *Isme J*, 2021, 15(2): 605-617.

- [25] Liu Y, Defourny KAY, Smid EJ, et al. Gram-positive bacterial extracellular vesicles and their impact on health and disease. *Front Microbiol*, 2018, 9: 1502.
- [26] Lekmechai S, Su YC, Brant M, et al. *Helicobacter pylori* outer membrane vesicles protect the pathogen from reactive oxygen species of the respiratory burst. *Front Microbiol*, 2018, 9: 1837.
- [27] Caruana JC, Walper SA. Bacterial membrane vesicles as mediators of microbe-microbe and microbe-host community interactions. *Front Microbiol*, 2020, 11: 432. DOI: 10.3389/fmicb.2020.00432.
- [28] D'Souza G, Shitut S, Preussger D, et al. Ecology and evolution of metabolic cross-feeding interactions in bacteria. *Nat Prod Rep*, 2018, 35(5): 455-488.
- [29] Rueter C, Bielaszewska M. Secretion and delivery of intestinal pathogenic *Escherichia coli* virulence factors via outer membrane vesicles. *Front Cell Infect Microbiol*, 2020, 10: 91.
- [30] Urashima A, Sanou A, Yen H, et al. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* produces outer membrane vesicles as an active defence system against antimicrobial peptide LL-37. *Cell Microbiol*, 2017, 19(11): e12758. DOI: 10.1111/cmi.12758.
- [31] Kulp A, Kuehn MJ. Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. *Annu Rev Microbiol*, 2010, 64: 163-184.
- [32] de Rezende Rodvalho V, da Luz BSR, Nicolas A, et al. Environmental conditions modulate the protein content and immunomodulatory activity of extracellular vesicles produced by the probiotic *Propionibacterium freudenreichii*. *Appl Environ Microbiol*, 2021, 87(4): e02263-20. DOI: 10.1128/aem.02263-20.
- [33] Mehanny M, Koch M, Lehr CM, et al. *Streptococcal* extracellular membrane vesicles are rapidly internalized by immune cells and alter their cytokine release. *Front Immunol*, 2020, 11: 80.
- [34] Alpdundar Bulut E, Bayyurt Kocabas B, Yazar V, et al. Human gut commensal membrane vesicles modulate inflammation by generating M2-like macrophages and myeloid-derived suppressor cells. *J Immunol*, 2020, 205(10): 2707-2718.
- [35] Li M, Lee K, Hsu M, et al. *Lactobacillus*-derived extracellular vesicles enhance host immune responses against vancomycin-resistant enterococci. *BMC Microbiol*, 2017, 17(1): 66.
- [36] Yamasaki-Yashiki S, Miyoshi Y, Nakayama T, et al. IgA-enhancing effects of membrane vesicles derived from *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* NBRC15893. *Biosci Microbiota Food Health*, 2019, 38(1): 23-29.
- [37] Domingues S, Nielsen KM. Membrane vesicles and horizontal gene transfer in prokaryotes. *Curr Opin Microbiol*, 2017, 38: 16-21.
- [38] Rumbo C, Fernández-Moreira E, Merino M, et al. Horizontal transfer of the OXA-24 carbapenemase gene via outer membrane vesicles: a new mechanism of dissemination of carbapenem resistance genes in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011, 55(7): 3084-3090.
- [39] Toyofuku M, Morinaga K, Hashimoto Y, et al. Membrane vesicle-mediated bacterial communication. *Isme J*, 2017, 11(6): 1504-1509.
- [40] Ñahui Palomino RA, Vanpouille C, Laghi L, et al. Extracellular vesicles from symbiotic vaginal *Lactobacilli* inhibit HIV-1 infection of human tissues. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 5656.
- [41] Kim OY, Park HT, Dinh NTH, et al. Bacterial outer membrane vesicles suppress tumor by interferon- $\gamma$ -mediated antitumor response. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 626.
- [42] Takahashi RU, Prieto-Vila M, Hironaka A, et al. The role of extracellular vesicle microRNAs in cancer biology. *Clin Chem Lab Med CCLM*, 2017, 55(5): 648-656. DOI: 10.1515/cclm-2016-0708.
- [43] Maerz JK, Steimle A, Lange A, et al. Outer membrane vesicles blebbing contributes to *B. vulgatus* mpk-mediated immune response silencing. *Gut Microbes*, 2018, 9(1): 1-12.
- [44] Cañas MA, Fábrega MJ, Giménez R, et al. Outer membrane vesicles from probiotic and commensal *Escherichia coli* activate NOD1-mediated immune responses in intestinal epithelial cells. *Front Microbiol*, 2018, 9: 498.
- [45] Seo MK, Park EJ, Ko SY, et al. Therapeutic effects of kefir grain *Lactobacillus*-derived extracellular vesicles in mice with 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced inflammatory bowel disease. *J Dairy Sci*, 2018, 101(10): 8662-8671.
- [46] Kim MH, Choi SJ, Choi HI, et al. *Lactobacillus plantarum*-derived extracellular vesicles protect atopic dermatitis induced by *Staphylococcus aureus*-derived extracellular vesicles. *Allergy Asthma Immunol Res*, 2018, 10(5): 516-532.
- [47] Dean SN, Rimmer MA, Turner KB, et al. *Lactobacillus acidophilus* membrane vesicles as a vehicle of

- bacteriocin delivery. *Front Microbiol*, 2020, 11: 710.
- [48] Wang X, Eagen WJ, Lee JC. Orchestration of human macrophage NLRP3 inflammasome activation by *Staphylococcus aureus* extracellular vesicles. *PNAS*, 2020, 117(6): 3174-3184.
- [49] Rakoff-Nahoum S, Coyne MJ, Comstock LE. An ecological network of polysaccharide utilization among human intestinal symbionts. *Curr Biol*, 2014, 24(1): 40-49.
- [50] Elhenawy W, Debelyy MO, Feldman MF. Preferential packing of acidic glycosidases and proteases into *Bacteroides* outer membrane vesicles. *mBio*, 2014, 5(2): e00909-e00914.
- [51] Ding M, Wang C, Lu X, et al. Comparison of commercial exosome isolation kits for circulating exosomal microRNA profiling. *Anal Bioanal Chem*, 2018, 410(16): 3805-3814.
- [52] Liu F, Vermesh O, Mani V, et al. The exosome total isolation chip. *ACS Nano*, 2017, 11(11): 10712-10723.
- [53] Shao HL, Im H, Castro CM, et al. New technologies for analysis of extracellular vesicles. *Chem Rev*, 2018, 118(4): 1917-1950.
- [54] Fuhrmann G, Serio A, Mazo M, et al. Active loading into extracellular vesicles significantly improves the cellular uptake and photodynamic effect of porphyrins. *J Control Release*, 2015, 205: 35-44.
- [55] Mizrak A, Bolukbasi MF, Ozdener GB, et al. Genetically engineered microvesicles carrying suicide mRNA/protein inhibit schwannoma tumor growth. *Mol Ther*, 2013, 21(1): 101-108.

(本文责编 陈宏宇)