

胞外囊泡在细菌致病机制中作用的研究进展



郭尚春¹, 赵丽萍², 陶诗聪³, 张长青^{1,3}

1. 上海交通大学附属第六人民医院四肢显微外科研究所(上海 200233)
2. 上海交通大学材料与工程学院(上海 200240)
3. 上海交通大学附属第六人民医院骨科(上海 200233)

【摘要】 目的 对细菌来源的胞外囊泡(extracellular vesicles, EVs)所含生物活性物质及其在介导细菌-细菌间和细菌-宿主间相互作用中的机制进行综述,并分析其对临床植入物感染防治的指导意义。方法 广泛查阅近年来国内外细菌来源 EVs 相关的文献,并进行分析和总结。结果 无论是革兰阴性菌(G^- 菌)还是革兰阳性菌(G^+ 菌)都能分泌包含了多种生物活性物质(如蛋白质、脂质、核酸和毒力因子)的 EVs,可以介导细菌-细菌间和细菌-宿主间的相互作用,并在细菌的致病机制和生物膜形成等方面发挥重要作用。结论 细菌来源的 EVs 包含的生物活性物质,在细菌感染性疾病的致病机制中发挥着重要作用,深入研究和理解其致病机制,可以为临床早期诊断、预防和治疗植入物感染等提供新思路。但目前该领域研究还处于初级阶段,相关机制尚需深入研究。

【关键词】 胞外囊泡; 外泌体; 感染; 革兰阴性菌; 革兰阳性菌; 致病机制

Research progress on the role of extracellular vesicles in bacterial pathogenesis

GUO Shangchun¹, ZHAO Liping², TAO Shicong³, ZHANG Changqing^{1,3}

1. Institute of Microsurgery on Extremities, Shanghai Jiao Tong University Affiliated Sixth People's Hospital, Shanghai, 200233, P.R.China

2. School of Materials Science and Engineering, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai, 200240, P.R.China

3. Department of Orthopedic Surgery, Shanghai Jiao Tong University Affiliated Sixth People's Hospital, Shanghai, 200233, P.R.China

Corresponding author: TAO Shicong, Email: jerrytao1990@outlook.com

【Abstract】 Objective To summarize the bioactive substances contained in bacterial extracellular vesicles (EVs) and their mechanisms in mediating bacterial-bacterial and bacterial-host interactions, as well as their mechanisms for use in implant infection-associated clinical guidance. **Methods** A wide range of publications on bacterial-derived EVs were extensively reviewed, analyzed, and summarized. **Results** Both gram-negative bacteria (G^- bacteria) and gram-positive bacteria (G^+ bacteria) can secrete EVs which contain a variety of bioactive substances, including proteins, lipids, nucleic acids, and virulence factors, and mediate bacterial-bacterial and bacterial-host interactions. EVs play an important role in the pathogenic mechanism of bacteria. **Conclusion** Bioactive substances contained within bacteria-derived EVs play an important role in the pathogenesis of bacterial infectious diseases. In-depth study and understanding of their pathogenic mechanisms can provide new insights which will improve early clinical diagnosis, prevention, and treatment of implant-associated infection. However, at present, research in this area is still in its infancy, and many more in-depth mechanisms need to be further studied.

【Key words】 Extracellular vesicles; exosomes; infection; gram-negative bacteria; gram-positive bacteria; pathogenic mechanism

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (81871834, 81802226, 81301589); Shanghai Jiao Tong University K.C.Wong Medical Fellowship Funds

地球上所有生物的细胞,无论是包含人类细胞

在内的真核细胞,还是没有核膜或其他膜组分的原核细胞(例如细菌细胞),均可产生纳米尺度的脂双层囊泡^[1]。这些进化上保守的囊泡由球形的磷脂双层膜构成,内含生物活性物质,例如蛋白、脂质、核酸和代谢产物^[2]。用来形容这些囊泡的术语有很

DOI: 10.7507/1002-1892.201805075

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81871834); 国家自然科学基金青年项目(81802226、81301589); 上海交通大学王宽诚医学奖励基金

通信作者: 陶诗聪, Email: jerrytao1990@outlook.com

多,例如用于古细菌和革兰阳性菌(G^+ 菌)来源的膜泡,革兰阴性菌(G^- 菌)来源的外膜囊泡(outer membrane vesicles, OMVs),哺乳动物细胞的外泌体和微泡等^[3]。近年来为了便于学术交流,学术界将这些位于细胞外的囊泡统称为胞外囊泡(extracellular vesicles, EVs)^[1-3]。

革兰染色把细菌分为 G^+ 菌和 G^- 菌两大类, G^+ 菌主要包括葡萄球菌、链球菌、肺炎双球菌、炭疽杆菌、白喉杆菌和破伤风杆菌等, G^- 菌主要包括痢疾杆菌、伤寒杆菌、大肠杆菌、变形杆菌、铜绿假单胞菌、百日咳杆菌、霍乱弧菌及脑膜炎双球菌等。据此,将细菌EVs根据来源分为 G^+ 菌EVs(G^+ -EVs)和 G^- -EVs两类,其中因 G^- -EVs起源于外膜更常被称作OMVs,故采用OMVs来指代 G^- -EVs^[3]。细菌间通过EVs相互交流,这种通过EVs的内容物进行细胞间信息交流的方式,在进化进程中高度保守,无论是细菌还是高等生物的细胞中均存在,可能是一种高效而经济的细胞间协同工作方式^[1]。细菌EVs可以通过介导细菌-细菌和细菌-宿主间相互作用,在生理和病理功能中发挥重要作用^[4]。

抗生素的大量使用导致耐药菌群持续增加和快速传播,抗生素治疗细菌性疾病的有效性受到了挑战。细菌来源EVs在细菌感染类疾病的临床诊断、药物治疗和疫苗预防方面的研究日新月异。本文就细菌EVs的生物学特点及其在细菌致病过程中的作用和临床应用前景进行总结和展望。

1 G^+ -EVs

1.1 G^+ -EVs的生成

2009年, Lee等^[5]首次从金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌的培养上清液中分离出 G^+ -EVs。这些EVs直径为20~100 nm,具有球形脂双层膜结构。之后,对其他 G^+ -EVs的研究越来越多,炭疽芽孢杆菌^[4]、天蓝色链霉菌^[6]、李斯特菌^[7]、产气荚膜梭菌^[8]、枯草芽孢杆菌^[9]、变形链球菌^[10]和肺炎链球菌^[11]等均可产生EVs,其形成过程在进化上高度保守。

1.2 G^+ -EVs的组分

对于真核生物EVs组分和作用机制的研究日渐深入^[2,12-13],对 G^+ -EVs特异性脂质、核酸和蛋白质等组分的分析和分子作用机制的解析迫在眉睫。脂质组学分析显示 G^+ -EVs由多种脂肪酸组成:特异性杆菌和肺炎链球菌EVs富含饱和脂肪酸,如肉豆蔻酸和棕榈酸^[4,11];产气荚膜梭菌EVs含有 α -毒素和核酸^[8]。变形链球菌在生物膜形成中主动释放含DNA的EVs,这些EVs有助于生物膜形成并影

响其结构完整性和稳定性,是龋齿的主要致病因子^[10]。蛋白质组学分析表明,金黄色葡萄球菌EVs含有90个囊泡蛋白,富含膜表面相关或胞外毒力蛋白,包括 β -内酰胺酶、凝固酶溶血素、IgG结合蛋白和N-乙酰胞壁酰基-L-丙氨酸酰胺酶。这些 G^+ -EVs因含有核酸、毒素脂蛋白和酶等组分,在细菌感染发病机制中发挥重要作用^[12,14]。

2 OMVs

2.1 OMVs的生成

早在20世纪60年代,OMVs就被发现存在于大肠杆菌的培养基中,细菌通过释放囊泡适应环境,通过OMVs传递细胞外膜蛋白、毒力因子和抗原等作用于宿主细胞^[1]。Chatterjee等^[15]在研究对数生长期霍乱弧菌的超微结构时,发现在液体培养基无菌滤液中有 G^- 菌细胞壁出芽形成的囊泡。OMVs是细菌外膜在一定机制下出芽于细菌表面形成的一种囊泡状结构^[16],普遍存在于 G^- 菌中^[8,17],产生于细菌任何生长阶段,但是它们的产量或组分受环境影响^[18]。

2.2 OMVs的组分

有研究证实,OMVs包含有外膜蛋白、脂蛋白、磷脂和脂多糖、核酸和其他毒力因子^[3,19]。早期通过聚丙烯酰胺凝胶电泳和Western blot等进行蛋白分析发现,OMVs中存在丰富的外膜蛋白、周质蛋白以及毒力因子^[20-21],经蛋白质组学检测发现其含有的蛋白超过3500种^[3]。

Horstman等^[22]首先报道了产肠毒素大肠杆菌OMVs的主要脂质成分为甘油磷脂、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰甘油和心磷脂。而Chowdhury等^[23]对丁香假单胞菌OMVs进行脂质组学分析,发现偶数碳链磷脂酰甘油和磷脂酰乙醇胺是其囊泡双层膜的主要组分。

OMVs携带有囊泡内和囊泡膜表面DNA^[24],由于囊泡内DNA对DNase处理有抗性,因此DNase处理是区分这两种DNA的有效方法^[20]。通过这种方法,已经在来自淋病奈瑟球菌、大肠杆菌、流感嗜血杆菌和铜绿假单胞菌OMVs中鉴定了几种DNA^[20,25-27],且有研究报道淋球菌OMVs内存在RNA酶抗性RNA^[25]。但细菌如何将特定DNA和RNA整合并分选到囊泡中,其详细机制有待进一步阐明。

3 细菌EVs在其致病机制中的可能作用

细菌的毒力分为侵袭力和细菌毒素。构成侵

袭力的主要物质有细菌的酶、荚膜及其他表面结构物质；细菌毒素分为外毒素和内毒素两大类。

3.1 G⁺-EVs 在细菌感染中的作用

现有证据表明具有厚壁细胞壁的 G⁺ 菌生产 EVs, 这些囊泡含有重要毒力因子, 可以导致宿主细胞死亡; 但在某些情况下, 可以引发免疫反应保护机体, 但 G⁺-EVs 经过厚壁细胞壁分泌到细胞外的生成机制和内容物的调控问题仍未阐明^[2]。关于隐球菌的研究发现, 其细胞壁的孔径从 50 nm 到 500 nm 不等^[28], 与 G⁺-EVs 直径相当, 可能是 G⁺-EVs 通过细胞壁的潜在渠道。在新型隐球菌中, 诱导黑化导致细胞壁孔径减小, 可能与质膜和细胞壁间的囊泡累积有关, 这可以解释 EVs 释放所需的孔径偏小^[28-29]。通过细胞壁重塑来促进 EVs 分泌, 结果取决于分泌信号的响应; 或者说, EVs 释放可能发生在细胞壁的自然“折点”, 如子代细胞出芽的薄弱区^[30]。EVs 可能会通过细胞壁重塑酶对细胞壁进行重塑, 其内含物中搭载有细胞壁重塑酶, 如 β-葡糖苷酶和内切酶, 其活性的增加利于 EVs 通过细胞壁^[31-33]。这种机制可能是普遍的, 如金黄色葡萄球菌 EVs 携带肽聚糖降解酶, 可以促使其穿透富含肽聚糖的 G⁺ 菌细胞壁^[5]。

3.2 OMVs 在细菌感染中的作用

几乎所有 G⁻ 菌均能分泌 OMVs^[34], 通过囊泡介导激活靶细胞或通过将功能性分子转移到受体细胞, 在细菌-细菌和细菌-宿主相互作用中发挥重要作用^[26-27], 有助于生物膜形成、在细菌间递送生物分子、杀灭竞争性微生物细胞、对环境中的物理化学压力做出反应、为细菌细胞提供营养、具有防御和抵抗等功能^[21], 以各种方式影响宿主细胞^[20, 35-37]。

3.2.1 OMVs 介导的细菌-宿主相互作用 由于靶细胞类型、细菌种类和 OMVs 数量不同, OMVs 介导的细菌-宿主相互作用有非免疫原性反应、促炎性反应和细胞毒性反应等^[34]。

① 非免疫原性反应: 体外研究报道了 OMVs 主要刺激上皮细胞、内皮细胞和各种免疫细胞活性^[35-36, 38]。囊泡的不同黏附素靶向黏附不同宿主细胞, 例如黏膜炎莫拉菌 OMVs 的黏附素, 幽门螺杆菌 OMVs 的外膜蛋白血型抗原结合黏附素和空泡细胞毒素, 以及铜绿假单胞菌 OMVs 的氨肽酶^[12]。OMVs 可能被神经节苷脂、脂筏或微囊蛋白介导的内吞作用所整合^[12]。

② 促炎性反应: 有研究报道了不可分型流感嗜血杆菌 OMVs 含有多种毒力相关蛋白, OMVs 除了能传递 DNA 之外, 还能侵入上皮细胞诱导炎性

因子表达和抗菌肽释放^[39]。Bauman 等^[40]提取了铜绿假单胞菌标准株和临床株的 OMVs, 证实了两者 OMVs 均能引起细胞炎性反应。

OMVs 内含的脂多糖可介导模式识别受体表达的巨噬细胞和内皮细胞中的强炎性反应^[36, 38]。能激活 Caspase-11 的大多数 G⁻ 菌并不进入细胞质, 有研究发现 OMVs 可作为载体递送脂多糖, 通过内吞作用进入宿主细胞质, 脂多糖从 OMVs 释放进入细胞质, 在体外和体内实验中触发 Caspase-11 依赖性免疫反应, 对宿主防御 G⁻ 菌感染和败血症的发病极为重要^[41]。

通过小鼠腹腔给药或大鼠连续灌注大肠杆菌 OMVs 可诱发败血症样症状^[42-43], 来自黏膜炎莫拉菌和肺炎克雷伯菌的 OMVs 通过诱导肺中的嗜中性粒细胞淋巴细胞浸润诱发肺部炎症^[44-45]。腹膜内注射大肠杆菌 OMVs 较之等量纯化的脂多糖能更有效地通过 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) 和细胞间黏附分子 1 依赖性方式诱导免疫球蛋白滤过^[38]。此外, 不使用任何活细菌, 可以经鼻内给予铜绿假单胞菌 OMVs, 即可通过 TLR2 和 TLR4 诱发肺部炎症^[46]。

③ 细胞毒性反应: 几种 OMVs 已显示出它们的毒力因子, 如白细胞毒素、腺苷酸环化酶-溶血素和溶细胞素 A 的细胞毒性作用^[47-49]; 来源于嗜肺军团菌和铜绿假单胞菌的 OMVs 具有蛋白水解酶和脂解酶活性^[35, 50], 铜绿假单胞菌 OMVs 传递多种毒素诱发人支气管上皮细胞的细胞毒性^[35]; 来自大肠杆菌的 OMVs, 是导致旅客腹泻和第三世界国家婴儿高死亡率的普遍原因, 这些 OMVs 将热不稳定肠毒素转移到肾上腺和肾上腺受体肠上皮细胞, 通过膜抗性结构域的胞吞作用和触发器激活 NF-κB 通路发挥作用^[51-52]。

纯化的 OMVs^[53] 作为一种分泌系统, 传递细菌的毒力因子作用于原核和真核细胞, OMVs 中含有病原相关分子和其他组分, 因此 OMVs 能影响细菌的感染和激活宿主体内免疫应答^[54]。由于 OMVs 可以强烈诱发先天性和适应性免疫反应, 它们作为抗感染疫苗的潜在用途已被广泛关注^[34, 55]。近年, 基于 OMVs 针对脑膜炎奈瑟菌的疫苗在欧洲临床批准使用^[56]。Norheim 等^[57] 研究证实, 脑膜炎奈瑟菌 OMVs 可帮助机体有效预防脑膜炎, 为开发安全可靠的脑膜炎奈瑟菌疫苗提供了依据。

3.2.2 生物膜形成 生物膜是包裹在胞外聚合物物质中有组织的多细胞群落, 能驻留细菌以破坏免疫力和抗菌剂。金黄色葡萄球菌可能通过 EVs 阻止其

他细菌的表面黏附而促进自身传播,经金黄色葡萄球菌 EVs 处理过的表面亲水性明显增加,不但可以使鲍曼不动杆菌黏附到材料表面产生的生物膜减少达 93%,也可以使其他几种细菌病原体的生物膜减少 40%~70%^[58],EVs 在生物膜的形成和感染中发挥重要作用^[59]。Yonezawa 等^[60]发现,幽门螺杆菌 OMVs 促进生物膜形成,从而增强细菌致病性。有 OMVs 通过提供利于血红素作用的蛋白或者作为成核位点与细胞外 DNA 作用,促成生物膜的形成^[12,34,60]。铜绿假单胞菌 OMVs 是生物膜基质的组分,铜绿假单胞菌菌株 PA01 的生物膜基质成分与 OMVs 相关,OMVs 可能通过与不同生物膜相互作用而参与生物膜形成^[61]。OMVs 在生物膜形成中可能是沉积在表面上,借以调节后面的细菌黏附;也可能与生物膜基质包括蛋白质、胞外多糖和 DNA 等相互作用,借此加强生物膜的结构完整性。

3.2.3 递送生物分子 G⁻菌利用 OMVs 进行信号传递,调控微生物环境和细菌本身行为,通过遗传转移增加细菌的遗传多样性^[12,36]。

铜绿假单胞菌毒力因子主要集中在早期 T 淋巴细胞活化 (early T lymphocyte activation, ETA) 蛋白酶等,ETA 可裂解酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD⁺) 中的尼克酰胺部分,催化核糖与延伸因子共价结合,阻断核糖体密码移动过程,从而阻止细胞蛋白合成,致使组织坏死,形成局部或全身疾病^[62]。有研究证实铜绿假单胞菌 OMVs 中同样存在 ETA,可以通过 OMVs 将 ETA 运输到靶细胞,还利用 OMVs 运输假单胞菌喹诺酮信号分子^[63]。此外,OMVs 的脂多糖和蛋白质组分等通过协同作用诱导巨噬细胞中的细胞因子表达^[36],白细胞毒素和脂多糖经 OMVs 传递较之其他形式更有效^[24,38,47]。

有研究通过分析大肠杆菌 OMVs 对小鼠全身性和肺部炎症给药的药理学,发现 OMVs 可以作为体内长距离通讯的有效载体^[64]。Kahn 等^[65]研究发现,流感嗜血杆菌 OMVs 能帮助细菌间的 DNA 传递,但是在不同种类细菌间或者不同环境下宿主间的遗传交换尚未得到证实^[66]。

3.2.4 影响细菌的存活和相应环境变化 一方面,OMVs 可以通过部分削减机体补体反应支持细菌存活,如来自黏膜炎莫拉菌野生型临床菌株 OMVs 可以结合补体 C3 蛋白,与泛表面蛋白 A1/A2 缺陷型菌株的 OMVs 相比,能更大程度上抵消补体级联,抑制补体依赖性杀伤流感嗜血杆菌作用,维持流感嗜血杆菌存活^[67]。OMVs 的释放数量与细胞膜中蛋白质积累的水平直接相关,应激物质攻击或有

毒错误折叠蛋白质积累增强时,机体通过将错误折叠的蛋白质优先包装到囊泡中进行选择性消除,增强细菌在环境突变中的存活能力^[68]。OMVs 还以其他方式影响细菌存活,如携带 β -内酰胺酶的铜绿假单胞菌 OMVs 可以瞬时增强对 β -内酰胺敏感的邻近细菌的耐药性^[69]。

另一方面,OMVs 可以杀死竞争细菌,如铜绿假单胞菌 OMVs 通过递送细胞壁蛋白水解酶降解肽聚糖来杀死竞争性细菌^[12,70];溶菌纤维素菌通过分泌含细菌内肽酶 OMVs,杀死其他竞争性 G⁻菌^[71]。

南极假交替单胞菌 NF3 积累大量高蛋白质含量的胞外聚物质,其 OMVs 的蛋白质组学分析发现,这些蛋白与 G⁻菌中营养物加工和运输有关的外膜蛋白等相作用,可作为营养物传感器和转运蛋白来促进营养素的利用^[72],而 OMVs 相关的多药外排泵也可能导致抗生素耐药^[20]。韩瑟勒巴通菌 OMVs 的结合蛋白有助于减少有毒血红素的细胞浓度^[73]。

4 细菌 EVs 在临床应用中的潜能

EVs 促使细菌间生物分子的交换,对这种信息交流方式的认知增加了对感染性疾病发生发展的理解。

4.1 疫苗研制

细菌感染仍然是导致人类患病和死亡的主要原因之一^[74-75]。由于耐药菌的增加和快速传播,疫苗被认为是后抗生素时代应对细菌性疾病最直接有效的策略^[76]。由于 OMVs 不能复制且含有大量细菌抗原,并能有效激活免疫系统,含有的脂多糖可作为自身佐剂,而且作为非复制性疫苗具有一定安全性,这些因素促使 OMVs 成为开发非复制性高效疫苗的热门选择^[36]。

Petersen 等^[77]用类鼻疽伯克菌 OMVs 免疫猕猴,结果表明该 OMVs 能够激活体内免疫反应,提供针对相关蛋白和脂多糖的体液免疫保护,且临床检测数据显示猕猴的肝、肾功能指标并未受影响,免疫后注射部位也未出现红斑、肿胀和坏死等现象,这使类鼻疽伯克菌 OMVs 具有进一步研发为人类疫苗的可能。

Roier 等^[78]发现用流感嗜血杆菌 OMVs 滴鼻免疫小鼠,不仅可以诱导其产生强大的黏膜免疫和体液免疫反应,还可以保护小鼠免受异源流感嗜血杆菌的感染。他们还尝试用多杀性巴氏杆菌 OMVs 和溶血性曼氏杆菌 OMVs 共同滴鼻免疫小鼠,结果表明混合 OMVs 可以同时诱导产生强大的特异

性黏膜免疫及体液免疫反应^[79],提示可以开发多联 OMVs 疫苗来抵御混合性细菌感染引发的疾病。

4.2 细菌生物膜的形成抑制

近年大量研究证实,许多难愈性疾病,如肺囊性纤维化、慢性呼吸道感染、慢性泌尿系统感染、骨髓炎、心内膜炎、中耳炎、前列腺炎、牙周炎以及某些肾结石的形成等,大都与细菌生物膜有关^[80]。在形成细菌生物膜的这些细菌之间存在相互传递细胞信号的 EVs^[58],目前还没有一种真正彻底有效的治疗细菌生物膜类疾病的方法,如果能够合成出干扰这些信号传递 EVs 的药物,破坏细菌生物膜的形成,将有利于治疗那些例如植入物感染等顽固性的感染。

4.3 疾病的早期诊断和检测

天然 OMVs 是细菌在正常生长状态下自然释放到周围环境中,包含完整的外膜抗原及天然构象。细菌经培养可以很容易获得大量 OMVs,而且通过基因工程手段改造细菌可进一步修饰 OMVs。有研究报道^[81],将一种天然脂蛋白用作融合伴侣以将纳米荧光素酶包装在 OMVs 内,用于凝血酶检测,检测限为 0.5 nm,基于 OMVs 设计的用于抗原结合和信号生成的多功能传感器,与其他检测方法相当。利用荧光蛋白标记这些生物工程化生成的 OMVs 对癌细胞显像,有望达到早期诊断目的。

4.4 药物治疗

OMVs 包含杀死其他细菌的死亡信息,如胞壁质水解酶,在 OMVs 中富集,结合目标细菌,然后降解其细菌壁的肽聚糖和输送囊泡内容物,引发目标细菌死亡^[70,82]。庆大霉素是一种抑制细菌蛋白质合成的抗生素,常用于治疗铜绿假单胞菌感染,如果志贺菌载有庆大霉素,不仅载有庆大霉素的 OMVs 产率增加,且疗效得到了增强^[16,82]。

来自食源性大肠杆菌的 OMVs 促进沙门菌的基因转移,并由其表达沙门菌或大肠杆菌毒性引发肠道炎。OMVs 转化细菌并非只是增强了细胞毒性,还可以增强细菌对氨基青霉素的抗性^[83]。

因此,OMVs 可能成为临床上预后和生物标志物的有效工具,且有望成为一种能够通过药理学屏障的自身来源药物载体。

5 小结与展望

细菌性疾病是导致每年数百万人感染死亡的全局性和主要公共卫生问题,随着许多病原体耐药性的增加,非常需要开发新的治疗药剂和方法。

通过开发有效的无佐剂疫苗可以最好地管理传染病,但疫苗在递送时具有侵入性,需要优化当前的疫苗递送系统。研究者们发现 OMVs 在免疫应答中有着特殊作用^[84],可激发宿主的免疫应答,为菌体获得营养物质和优势生存条件^[76],并且因带有细菌特异的外膜蛋白能有效刺激巨噬细胞因子分泌,可以作为一种新型疫苗的潜在载体。由于 OMVs 可以由众多 G⁻ 菌产生,基于 OMVs 的纳米载体在免疫治疗中具有广泛应用前景。

生物膜基质通过介导细菌的表面附着、细胞聚集成簇和聚集体稳定,在其形成中发挥各种重要的作用,而 EVs 是生物膜基质的重要组分,通过控制生物膜基质中 EVs,充分利用各 EVs 数据库,或将突破生物膜特异性适应性抵抗,寻找到抵抗高度耐药生物膜的方法。

源于自体的 EVs 应用可能是朝向个性化药物的第一步,其副作用非常小并且疗效和特异性高。尽管 OMVs 已被用作多功能且安全的疫苗以及耐受性良好的输送系统,但将其 EVs 用于临床仍然存在许多问题,例如来源的安全性和 EVs 衍生抗原的正确构象,未来需要解决的另一个重要问题是其可靠和可重复的分离和纯化以及稳健的分析。正在快速发展的生物技术与临床试验相结合,有望促成 EVs 在未来感染治疗中作为诊断工具,且因为 EVs 具有对人体屏障的渗透作用和增加抗生素疗效的作用,可应用于植入物感染的防治。OMVs 也被设计用于其他治疗,例如具有良好耐受低内毒性的药物载体。

生物和仿生疗法是一类相对较新的系统,它们或具有生物来源,或可利用、模仿生理途径以增强靶向作用。尽管大量研究表明 OMVs 具有良好的临床应用前景,但对 OMVs 的产生机制及其与宿主相互作用的机制还不十分了解,未经任何改造的 OMVs 仍会存在一定毒性。所以未来对于破译病原体本身与宿主之间的复杂交流,针对 OMVs 各种模块进行靶向功能设计,发展抗传染因子的治疗策略,应用于临床的早期诊断、药物治疗和细菌感染预防,还有许多工作需要完成。

参考文献

- 1 Deatherage BL, Cookson BT. Membrane vesicle release in bacteria, eukaryotes, and archaea: a conserved yet underappreciated aspect of microbial life. *Infect Immun*, 2012, 80(6): 1948-1957.
- 2 Choi DS, Kim DK, Kim YK, et al. Proteomics of extracellular vesicles: Exosomes and ectosomes. *Mass Spectrom Rev*, 2015, 34(4): 474-490.
- 3 Kim DK, Kang B, Kim OY, et al. EVpedia: an integrated database

- of high-throughput data for systemic analyses of extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles*, 2013, 2. doi: 10.3402/jev.v2i0.20384. eCollection 2013.
- 4 Rivera J, Cordero RJ, Nakouzi AS, *et al.* Bacillus anthracis produces membrane-derived vesicles containing biologically active toxins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(44): 19002-19007.
 - 5 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.
 - 6 Schrempf H, Koebsch I, Walter S, *et al.* Extracellular Streptomyces vesicles: amphorae for survival and defence. *Microb Biotechnol*, 2011, 4(2): 286-299.
 - 7 Lee T, Jun SH, Choi CW, *et al.* Salt stress affects global protein expression profiles of extracellular membrane-derived vesicles of Listeria monocytogenes. *Microb Pathog*, 2018, 115: 272-279.
 - 8 Jiang Y, Kong Q, Roland KL, *et al.* Membrane vesicles of Clostridium perfringens type A strains induce innate and adaptive immunity. *Int J Med Microbiol*, 2014, 304(3-4): 431-443.
 - 9 Brown L, Kessler A, Cabezas-Sanchez P, *et al.* Extracellular vesicles produced by the Gram-positive bacterium Bacillus subtilis are disrupted by the lipopeptide surfactin. *Mol Microbiol*, 2014, 93(1): 183-198.
 - 10 Liao S, Klein MI, Heim KP, *et al.* Streptococcus mutans extracellular DNA is upregulated during growth in biofilms, actively released via membrane vesicles, and influenced by components of the protein secretion machinery. *J Bacteriol*, 2014, 196(13): 2355-2366.
 - 11 Olaya-Abril A, Prados-Rosales R, McConnell MJ, *et al.* Characterization of protective extracellular membrane-derived vesicles produced by Streptococcus pneumoniae. *J Proteomics*, 2014, 106: 46-60.
 - 12 MacDonald IA, Kuehn MJ. Offense and defense: microbial membrane vesicles play both ways. *Res Microbiol*, 2012, 163(9-10): 607-618.
 - 13 Choi DS, Kim DK, Kim YK, *et al.* Proteomics, transcriptomics and lipidomics of exosomes and ectosomes. *Proteomics*, 2013, 13(10-11): 1554-1571.
 - 14 Huang W, Wang S, Yao Y, *et al.* Employing Escherichia coli-derived outer membrane vesicles as an antigen delivery platform elicits protective immunity against Acinetobacter baumannii infection. *Sci Rep*, 2016, 6: 37242.
 - 15 Chatterjee SN, Das J. Electron microscopic observations on the excretion of cell-wall material by Vibrio cholerae. *J Gen Microbiol*, 1967, 49(1): 1-11.
 - 16 Kadurugamuwa JL, Beveridge TJ. Membrane vesicles derived from Pseudomonas aeruginosa and Shigella flexneri can be integrated into the surfaces of other gram-negative bacteria. *Microbiology*, 1999, 145(Pt 8): 2051-2060.
 - 17 Manning AJ, Kuehn MJ. Functional advantages conferred by extracellular prokaryotic membrane vesicles. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 2013, 23(1-2): 131-141.
 - 18 Manning AJ, Kuehn MJ. Contribution of bacterial outer membrane vesicles to innate bacterial defense. *BMC Microbiol*, 2011, 11: 258.
 - 19 Roier S, Zingl FG, Cakar F, *et al.* Bacterial outer membrane vesicle biogenesis: a new mechanism and its implications. *Microb Cell*, 2016, 3(6): 257-259.
 - 20 Lee EY, Choi DS, Kim KP, *et al.* Proteomics in gram-negative bacterial outer membrane vesicles. *Mass Spectrom Rev*, 2008, 27(6): 535-555.
 - 21 Kulkarni HM, Jagannadham MV. Biogenesis and multifaceted roles of outer membrane vesicles from Gram-negative bacteria. *Microbiology*, 2014, 160(Pt 10): 2109-2121.
 - 22 Horstman AL, Kuehn MJ. Enterotoxigenic Escherichia coli secretes active heat-labile enterotoxin via outer membrane vesicles. *J Biol Chem*, 2000, 275(17): 12489-12496.
 - 23 Chowdhury C, Jagannadham MV. Virulence factors are released in association with outer membrane vesicles of Pseudomonas syringae pv. tomato T1 during normal growth. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1834(1): 231-239.
 - 24 Kuehn MJ, Kesty NC. Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction. *Genes Dev*, 2005, 19(22): 2645-2655.
 - 25 Dorward DW, Garon CF, Judd RC. Export and intercellular transfer of DNA via membrane blebs of Neisseria gonorrhoeae. *J Bacteriol*, 1989, 171(5): 2499-2505.
 - 26 Kolling GL, Matthews KR. Export of virulence genes and Shiga toxin by membrane vesicles of Escherichia coli O157:H7. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65(5): 1843-1848.
 - 27 Mashburn-Warren LM, Whiteley M. Special delivery: vesicle trafficking in prokaryotes. *Mol Microbiol*, 2006, 61(4): 839-846.
 - 28 Jacobson ES, Ikeda R. Effect of melanization upon porosity of the cryptococcal cell wall. *Med Mycol*, 2005, 43(4): 327-333.
 - 29 Wolf JM, Espadas-Moreno J, Luque-Garcia JL, *et al.* Interaction of Cryptococcus neoformans extracellular vesicles with the cell wall. *Eukaryot Cell*, 2014, 13(12): 1484-1493.
 - 30 Kopecká M, Gabriel M, Takeo K, *et al.* Microtubules and actin cytoskeleton in Cryptococcus neoformans compared with ascomycetous budding and fission yeasts. *Eur J Cell Biol*, 2001, 80(4): 303-311.
 - 31 Albuquerque PC, Nakayasu ES, Rodrigues ML, *et al.* Vesicular transport in Histoplasma capsulatum: an effective mechanism for trans-cell wall transfer of proteins and lipids in ascomycetes. *Cell Microbiol*, 2008, 10(8): 1695-1710.
 - 32 Rodrigues ML, Nimrichter L, Oliveira DL, *et al.* Vesicular polysaccharide export in Cryptococcus neoformans is a eukaryotic solution to the problem of fungal trans-cell wall transport. *Eukaryot Cell*, 2007, 6(1): 48-59.
 - 33 Oliveira DL, Nakayasu ES, Joffe LS, *et al.* Characterization of yeast extracellular vesicles: evidence for the participation of different pathways of cellular traffic in vesicle biogenesis. *PLoS One*, 2010, 5(6): e11113.
 - 34 Unal CM, Schaar V, Riesbeck K. Bacterial outer membrane vesicles in disease and preventive medicine. *Semin Immunopathol*, 2011, 33(5): 395-408.
 - 35 Bomberger JM, Maceachran DP, Coutermarsh BA, *et al.* Long-distance delivery of bacterial virulence factors by Pseudomonas aeruginosa outer membrane vesicles. *PLoS Pathog*, 2009, 5(4): e1000382.
 - 36 Ellis TN, Leiman SA, Kuehn MJ. Naturally produced outer membrane vesicles from Pseudomonas aeruginosa elicit a potent innate immune response via combined sensing of both lipopolysaccharide and protein components. *Infect Immun*, 2010, 78(9): 3822-3831.
 - 37 Soult MC, Dobrydyneva Y, Wahab KH, *et al.* Outer membrane vesicles alter inflammation and coagulation mediators. *J Surg Res*, 2014, 192(1): 134-142.

- 38 Kim JH, Yoon YJ, Lee J, *et al.* Outer membrane vesicles derived from *Escherichia coli* up-regulate expression of endothelial cell adhesion molecules *in vitro* and *in vivo*. *PLoS One*, 2013, 8(3): e59276.
- 39 Sharpe SW, Kuehn MJ, Mason KM. Elicitation of epithelial cell-derived immune effectors by outer membrane vesicles of nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun*, 2011, 79(11): 4361-4369.
- 40 Bauman SJ, Kuehn MJ. Purification of outer membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa* and their activation of an IL-8 response. *Microbes Infect*, 2006, 8(9-10): 2400-2408.
- 41 Vanaja SK, Russo AJ, Behl B, *et al.* Bacterial outer membrane vesicles mediate cytosolic localization of LPS and Caspase-11 activation. *Cell*, 2016, 165(5): 1106-1119.
- 42 Park KS, Choi KH, Kim YS, *et al.* Outer membrane vesicles derived from *Escherichia coli* induce systemic inflammatory response syndrome. *PLoS One*, 2010, 5(6): e11334.
- 43 Shah B, Sullivan CJ, Lonergan NE, *et al.* Circulating bacterial membrane vesicles cause sepsis in rats. *Shock*, 2012, 37(6): 621-628.
- 44 Schaar V, de Vries SP, Perez Vidakovic ML, *et al.* Multicomponent *Moraxella catarrhalis* outer membrane vesicles induce an inflammatory response and are internalized by human epithelial cells. *Cell Microbiol*, 2011, 13(3): 432-449.
- 45 Lee JC, Lee EJ, Lee JH, *et al.* *Klebsiella pneumoniae* secretes outer membrane vesicles that induce the innate immune response. *FEMS Microbiol Lett*, 2012, 331(1): 17-24.
- 46 Park KS, Lee J, Jang SC, *et al.* Pulmonary inflammation induced by bacteria-free outer membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2013, 49(4): 637-645.
- 47 Wai SN, Lindmark B, Söderblom T, *et al.* Vesicle-mediated export and assembly of pore-forming oligomers of the enterobacterial ClyA cytotoxin. *Cell*, 2003, 115(1): 25-35.
- 48 Kato S, Kowashi Y, Demuth DR. Outer membrane-like vesicles secreted by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* are enriched in leukotoxin. *Microb Pathog*, 2002, 32(1): 1-13.
- 49 Hozbor D, Rodriguez ME, Fernández J, *et al.* Release of outer membrane vesicles from *Bordetella pertussis*. *Curr Microbiol*, 1999, 38(5): 273-278.
- 50 Galka F, Wai SN, Kusch H, *et al.* Proteomic characterization of the whole secretome of *Legionella pneumophila* and functional analysis of outer membrane vesicles. *Infect Immun*, 2008, 76(5): 1825-1836.
- 51 Chutkan H, Kuehn MJ. Context-dependent activation kinetics elicited by soluble versus outer membrane vesicle-associated heat-labile enterotoxin. *Infect Immun*, 2011, 79(9): 3760-3769.
- 52 Chen DJ, Osterrieder N, Metzger SM, *et al.* Delivery of foreign antigens by engineered outer membrane vesicle vaccines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(7): 3099-3104.
- 53 Klimentová J, Stulik J. Methods of isolation and purification of outer membrane vesicles from gram-negative bacteria. *Microbiol Res*, 2015, 170: 1-9.
- 54 Ellis TN, Kuehn MJ. Virulence and immunomodulatory roles of bacterial outer membrane vesicles. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2010, 74(1): 81-94.
- 55 Kim OY, Hong BS, Park KS, *et al.* Immunization with *Escherichia coli* outer membrane vesicles protects bacteria-induced lethality via Th1 and Th17 cell responses. *J Immunol*, 2013, 190(8): 4092-4102.
- 56 Acevedo R, Fernández S, Zayas C, *et al.* Bacterial outer membrane vesicles and vaccine applications. *Front Immunol*, 2014, 5: 121.
- 57 Norheim G, Tunheim G, Næss LM, *et al.* An outer membrane vesicle vaccine for prevention of serogroup A and W-135 meningococcal disease in the African meningitis belt. *Scand J Immunol*, 2012, 76(2): 99-107.
- 58 Im H, Lee S, Soper SA, *et al.* *Staphylococcus aureus* extracellular vesicles (EVs): surface-binding antagonists of biofilm formation. *Mol Biosyst*, 2017, 13(12): 2704-2714.
- 59 Chebotar IV, Konchakova ED, Maiankii AN. Vesicle formation as a result of interaction between polymorphonuclear neutrophils and *Staphylococcus aureus* biofilm. *J Med Microbiol*, 2013, 62(Pt 8): 1153-1159.
- 60 Yonezawa H, Osaki T, Kurata S, *et al.* Outer membrane vesicles of *Helicobacter pylori* TK1402 are involved in biofilm formation. *BMC Microbiol*, 2009, 9: 197.
- 61 Renelli M, Matias V, Lo RY, *et al.* DNA-containing membrane vesicles of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and their genetic transformation potential. *Microbiology*, 2004, 150(Pt 7): 2161-2169.
- 62 Corbo MJ, Draper RK. Elevation of vacuolar pH inhibits the cytotoxic activity of furin-cleaved exotoxin A. *Infect Immun*, 1997, 65(6): 2240-2242.
- 63 Mashburn LM, Whiteley M. Membrane vesicles traffic signals and facilitate group activities in a prokaryote. *Nature*, 2005, 437(7057): 422-425.
- 64 Jang SC, Kim SR, Yoon YJ, *et al.* *In vivo* kinetic biodistribution of nano-sized outer membrane vesicles derived from bacteria. *Small*, 2015, 11(4): 456-461.
- 65 Kahn ME, Barany F, Smith HO. Transformasomes: specialized membranous structures that protect DNA during *Haemophilus* transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1983, 80(22): 6927-6931.
- 66 Bitto NJ, Chapman R, Pidot S, *et al.* Bacterial membrane vesicles transport their DNA cargo into host cells. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 7072.
- 67 Tan TT, Morgelin M, Forsgren A, *et al.* *Haemophilus influenzae* survival during complement-mediated attacks is promoted by *Moraxella catarrhalis* outer membrane vesicles. *J Infect Dis*, 2007, 195(11): 1661-1670.
- 68 McBroom AJ, Kuehn MJ. Release of outer membrane vesicles by Gram-negative bacteria is a novel envelope stress response. *Mol Microbiol*, 2007, 63(2): 545-558.
- 69 Ciofu O, Beveridge TJ, Kadurugamuwa J, *et al.* Chromosomal beta-lactamase is packaged into membrane vesicles and secreted from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother*, 2000, 45(1): 9-13.
- 70 Kadurugamuwa JL, Beveridge TJ. Bacteriolytic effect of membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa* on other bacteria including pathogens: conceptually new antibiotics. *J Bacteriol*, 1996, 178(10): 2767-2774.
- 71 Vasilyeva NV, Tsfasman IM, Suzina NE, *et al.* Secretion of bacteriolytic endopeptidase L5 of *Lysobacter* sp. XL1 into the medium by means of outer membrane vesicles. *FEBS J*, 2008, 275(15): 3827-3835.
- 72 Nevot M, Deroncelé V, Messner P, *et al.* Characterization of outer membrane vesicles released by the psychrotolerant bacterium *Pseudoalteromonas antarctica* NF3. *Environ Microbiol*, 2006, 8(9): 1523-1533.
- 73 Roden JA, Wells DH, Chomel BB, *et al.* Hemin binding protein C

- is found in outer membrane vesicles and protects *Bartonella henselae* against toxic concentrations of hemin. *Infect Immun*, 2012, 80(3): 929-942.
- 74 Murphy TF, Parameswaran GI. *Moraxella catarrhalis*, a human respiratory tract pathogen. *Clinical Infectious Diseases*, 2009, 49: 124-131.
- 75 Simon J, Kotloff K. New and candidate vaccines for gastrointestinal infections. *Curr Opin Gastroenterol*, 2010, 26(1): 12-16.
- 76 Gerritzen MJH, Martens DE, Wijffels RH, *et al*. Bioengineering bacterial outer membrane vesicles as vaccine platform. *Biotechnol Adv*, 2017, 35(5): 565-574.
- 77 Petersen H, Nieves W, Russell-Lodrigue K, *et al*. Evaluation of a *Burkholderia pseudomallei* outer membrane vesicle vaccine in nonhuman primates. *Procedia Vaccinol*, 2014, 8: 38-42.
- 78 Roier S, Leitner DR, Iwashkiw J, *et al*. Intranasal immunization with nontypeable *Haemophilus influenzae* outer membrane vesicles induces cross-protective immunity in mice. *PLoS One*, 2012, 7(8): e42664.
- 79 Roier S, Fenninger JC, Leitner DR, *et al*. Immunogenicity of *Pasteurella multocida* and *Mannheimia haemolytica* outer membrane vesicles. *Int J Med Microbiol*, 2013, 303(5): 247-256.
- 80 Moskowitz SM, Foster JM, Emerson J, *et al*. Clinically feasible biofilm susceptibility assay for isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol*, 2004, 42(5): 1915-1922.
- 81 Chen Q, Rozovsky S, Chen W. Engineering multi-functional bacterial outer membrane vesicles as modular nanodevices for biosensing and bioimaging. *Chem Commun (Camb)*, 2017, 53(54): 7569-7572.
- 82 Kadurugamuwa JL, Beveridge TJ. Delivery of the non-membrane-permeative antibiotic gentamicin into mammalian cells by using *Shigella flexneri* membrane vesicles. *Antimicrob Agents Chemother*, 1998, 42(6): 1476-1483.
- 83 Yaron S, Kolling GL, Simon L, *et al*. Vesicle-mediated transfer of virulence genes from *Escherichia coli* O157:H7 to other enteric bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66(10): 4414-4420.
- 84 Stevenson TC, Cywes-Bentley C, Moeller TD, *et al*. Immunization with outer membrane vesicles displaying conserved surface polysaccharide antigen elicits broadly antimicrobial antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115(14): E3106-E3115.

收稿日期: 2018-05-16 修回日期: 2018-10-26

本文编辑: 王雁