

葡萄球菌细胞外囊泡研究进展

冉朝霞¹, 王俊瑞^{*2,3}

1 内蒙古医科大学第一临床医学院, 内蒙古 呼和浩特 010050

2 内蒙古医科大学附属医院检验科, 内蒙古 呼和浩特 010050

3 内蒙古自治区临床病原微生物重点实验室, 内蒙古 呼和浩特 010050

冉朝霞, 王俊瑞. 葡萄球菌细胞外囊泡研究进展[J]. 微生物学通报, 2022, 49(1): 363-372

Ran Zhaoxia, Wang Junrui. Advances in extracellular vesicles of *Staphylococcus* spp.[J]. Microbiology China, 2022, 49(1): 363-372

摘要: 细胞外囊泡(extracellular vesicles, EV)是由脂质双分子层包裹着蛋白质、核酸等生物分子组成的天然纳米结构颗粒。EV 作为细胞间无细胞通讯的一种方式, 通过传递包括遗传信息在内的大量生物分子来影响细胞间的通讯。此外, EV 还参与多种生物学功能的调控, 如免疫调节、细胞间竞争、水平基因转移和致病性等。革兰氏阳性细菌分泌的 EV 携带多种化合物, 这些化合物在细菌竞争、生存、入侵、抗生素耐药和感染方面发挥多样化作用。目前对于细菌 EV 的研究主要集中在革兰氏阴性细菌中, 对革兰氏阳性细菌 EV 的研究报道较少, 其中对葡萄球菌 EV 的报道主要是金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌。这篇综述介绍了葡萄球菌 EV 的化学成分组成、功能和分泌的影响因素及临床应用。

关键词: 细胞外囊泡; 药物载体; 葡萄球菌

Advances in extracellular vesicles of *Staphylococcus* spp.

RAN Zhaoxia¹, WANG Junrui^{*2,3}

1 The First Clinical Medical College of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010050, Inner Mongolia, China

2 Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010050, Inner Mongolia, China

3 Inner Mongolian Key Laboratory of Clinical Pathogenic Microbiology, Hohhot 010050, Inner Mongolia, China

Abstract: Extracellular vesicles (EV) are particles with natural nanostructure, which are composed of biomolecules such as protein and nucleic acid wrapped in a lipid bilayer. EV is a means of cell-free

基金项目: 国家自然科学基金(81260244, 81660352); 内蒙古自然科学基金(2020MS08110)

Supported by: National Natural Science Foundation of China (81260244, 81660352); Natural Science Foundation of Inner Mongolia Autonomous Region (2020MS08110)

*Corresponding author: E-mail: wangjunrui123@yeah.net

Received: 2021-05-19; Accepted: 2021-07-11; Published online: 2021-08-26

communication between cells and affect cell-to-cell communication by transmitting large quantities of biomolecules, including genetic information. In addition, EV has been associated with many phenomena, such as immune regulation, intercellular competition, horizontal gene transfer, and pathogenicity. EVs secreted by Gram-positive bacteria carry a wide variety of compounds that play important roles in bacterial competition, survival, invasion, antibiotic resistance and infection. Currently, the studies on bacterial EVs mainly focused on Gram-negative bacteria, and few reports on Gram-positive bacteria in which the EVs produced by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* are the most frequently investigated. In this review, the chemical composition, influencing factors, functions and clinical application of *Staphylococcal* EVs are summarized.

Keywords: extracellular vesicles; drug carrier; *Staphylococcus* spp.

细胞外囊泡可由几乎所有种类微生物或哺乳动物细胞产生,是细菌与细菌之间以及细菌与宿主细胞间相互交流及作用的一种介质,这种交流方式高效又经济,是一种进化高度保守的普遍过程,可发生在简单的生物体到复杂的多细胞生物体中^[1]。早在1976年,Allan等发现红细胞从其表面释放细胞外囊泡(extracellular vesicles, EV)^[2],然而与真核细胞EV相比,目前关于细菌EV的研究尚处于早期阶段,人们对其形成机制和生物学功能等仍缺乏足够的认知。研究者们认为不同来源及同种细胞在不同环境条件下所产生的EV在大小、形态、组成和生物合成上均有差异。革兰氏阴性细菌通过磷脂在外膜中积累,然后形成外膜突起,这些突起脱落后形成EV,直径约10–300 nm^[3]。由于革兰氏阳性细菌的细胞壁由多层肽聚糖构成且无外膜,所以之前一直被忽视。在2009年,革兰氏阳性细菌EV首次被证实,电子显微镜证实从金黄色葡萄球菌中释放出双层脂质EV,还发现革兰氏阴性细菌EV和革兰氏阳性细菌EV在许多性质和功能上相同^[4]。革兰氏阳性细菌EV来源于细胞质膜,直径约20–400 nm^[3],蛋白质组学研究表明它们主要由胞浆蛋白、胞浆膜相关蛋白及一些分泌蛋白组成^[5]。重要的是,EV被证明可以稳定和保护其内所含的蛋白质分子不受细胞

外蛋白水解酶的影响,也可以保护它们的核酸分子不被存在于细胞外空间的核酸酶降解,这一特征使EV能够向细菌感染部位的近端和远端的宿主细胞递送一系列受保护的生物活性大分子^[6]。一般来说,EV通过内吞作用(endocytosis)、胞饮作用(macropinocytosis)或吞噬作用(phagocytosis)被宿主细胞内化,这有助于将细菌来源的免疫调节分子运送到哺乳动物细胞^[6-7]。葡萄球菌是人类主要致病菌之一,比如金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌。随着抗生素的不规范使用,葡萄球菌耐药菌株也随之增多,其中EV在其耐药机制中起着重要作用,研究葡萄球菌EV对控制细菌耐药菌株及其他临床应用有重要意义。本文将针对细菌EV命名、葡萄球菌EV化学成分组成、EV对宿主细胞的致病性及免疫调节效应、EV作为药物传递载体,以及疫苗方面的潜在应用价值等进行综述。

1 EV分类和命名

不同来源的EV常用名称不尽相同。在真核细胞中,EV被称为外泌体(exosomes,是早期内体膜内陷形成的腔内小泡和多泡体,与质膜融合后释放的囊泡)、微囊泡(ectosomes, microvesicles,是细胞膜脱落形成的,所以又称为脱落囊泡或微粒)及凋亡小泡(apoptotic

vesicles, 是由凋亡细胞释放的)^[8]。对细菌而言, 革兰氏阴性细菌来源的 EV 有 2 种形成途径: 外膜起泡和爆炸性细菌裂解, 其中外膜囊泡 (outer membrane vesicles, OMV) 是外膜起泡形成的, 其内膜保持完整, 不包含细胞质成分^[9]; 外-内膜囊泡 (outer-inner membrane vesicles, OIMV) 和爆炸性外膜囊泡 (explosive outer membrane vesicles, EOMV) 是爆炸性细菌裂解形成的, EOMV 随机含有细胞质成分^[10]。革兰氏阳性细菌来源的 EV 形成机制尚不完全清楚, 有学者发现可能与内溶素引发的“鼓泡细胞死亡” (bubbling cell death) 有关, 在这过程中产生细胞质膜囊泡 (cytoplasmic membrane vesicles, CMV), 含有膜和细胞质成分; 一些学者又将其称为膜囊泡 (membrane vesicles, MV)^[11]。另外有研究发现枯草芽孢杆菌可形成一种特殊类型的 EV, 即管状膜状结构 (tube-shaped membranous structure, TSMS), 是链接相邻细胞的细胞间纳米管^[12]。为了保持一致性, 国际细胞外小泡协会 (International Society for Extracellular Vesicle, ISEV) 推荐 EV 作为“细胞自然释放的颗粒, 由脂质双层分隔, 不能复制”的统称^[13]。

2 EV 分泌影响因素

2.1 不同菌属细菌内在差异

不同微生物来源的 EV 组成上表现出一定的差异。例如, 革兰氏阴性细菌 EV 含有肽聚糖、毒力因子、内膜、胞质蛋白、DNA 和 RNA。革兰氏阳性细菌的 EV 含有脂肪酸、磷脂、胞质蛋白、膜相关毒力蛋白、脂磷壁酸、肽聚糖、DNA 和 sRNAs^[3]。不同菌株来源的 EV 组成也有差异。例如, 有研究表明, 金黄色葡萄球菌 EV 中的蛋白直接参与宿主细胞的细胞毒作用, 不同金黄色葡萄球菌临床分离株的 EV 在宿主细胞中的细胞毒活性不同, 这些差异可能是由

于 EV 蛋白质组的不同所致^[14]。毒力因子、核酸也参与宿主细胞的细胞毒作用^[14-15], 可以推测不同菌株来源 EV 中的核酸及其他成分会有所差异。

2.2 环境因素的影响

同一菌株在受刺激前后的 EV 成分也会有所差异。例如, 金黄色葡萄球菌在暴露于抗菌素脂肪酸 (antimicrobial fatty acids, AFA) 的情况下调节 EV 的组成, 但对 AFA 做出反应而分泌的蛋白质是金黄色葡萄球菌 EV 的组成部分^[16]。这可以推测, EV 释放受到环境压力的影响, 产量及化学成分组成会发生变化。有研究进一步证明, 暴露于抗生素治疗、氧化应激、温度、铁缺乏、温度、乙醇和盐等生理或环境应激源会影响 EV 分泌水平, 这表明 EV 的产生可能代表了金黄色葡萄球菌在恶劣宿主环境中生长的一种适应机制^[17]。具体来说, 相同浓度的葡萄球菌在 30 °C 培养条件下产生的 EV 要多于 37 °C 和 40 °C 条件下产生的 EV。在氧化应激、铁缺乏培养基或乙醇浓度低于抑制浓度的情况下培养的金黄色葡萄球菌表现出更高的 EV 产量; 相反地, 高渗应激或亚抑制浓度的红霉素降低了金黄色葡萄球菌 EV 的产量^[17]。另一研究证明, 氨苄青霉素可使耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) 来源的 EV 产量呈剂量依赖性增加, 并且氨苄青霉素处理后的 EV 含有更多降解抗生素的蛋白质, 增加 MRSA 的耐药性^[18]。本项目组前期研究发现, MRSA 临床株暴露于亚抑菌浓度亚胺培南后, 其 EV 蛋白组成成分及含量发生明显改变, 这些差异蛋白参与了金黄色葡萄球菌抗压力应答、致病性及代谢调控过程^[19]。亚抑菌浓度的庆大霉素可增加表皮葡萄球菌 EV 的产量和蛋白含量, 并调节表皮葡萄球菌细胞增殖和黏附, 从而影响在抗生素压力

条件下的存活^[20]。这些研究说明了 EV 是一种新的葡萄球菌蛋白质分泌系统, 并且有分选机制存在, 目前具体机制尚不清楚。葡萄球菌 EV 会受到各种应激源的影响而发生产量及化学成分组成的改变, 从而影响葡萄球菌的多种生物学功能, 以适应环境促进细菌的生存及稳态。从细胞生物学角度来看, EV 可以被收集和分析, 是研究细胞对应激反应的理想材料。

3 EV 化学成分组成及其作用机制

3.1 蛋白质成分

大多数革兰氏阳性细菌可分泌大量蛋白质进入细胞外环境, 其中大部分通过高度保守的一般分泌途径(*general secretory pathway*, Sec 途径)输出^[21]。最近发现, EV 的脱落是一种新的蛋白质分泌途径^[4]。有研究用液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)对纯化的金黄色葡萄球菌 EV 进行蛋白质组学分析, 鉴定出 165 种蛋白质, 包含胞浆蛋白、胞外蛋白、细胞壁相关蛋白及其他蛋白^[22]。另一研究中发现的许多 EV 蛋白可能参与促进蛋白质向其他细菌转移, 以及竞争性杀死其他生物、介导抗生素耐药性、在全身感染中发挥致病作用并且参与 EV 的生物合成^[4]。有研究发现, 处于 EV 不同位置的蛋白质活性会有差异, EV 膜内的蛋白质活性要比与膜表面暴露的蛋白质弱^[23]。不同临床菌株的 EV 蛋白质组会有所差异, 但核心蛋白质组不会发生变化, 例如, 在金黄色葡萄球菌中, 与 EV 生物合成相关的蛋白质如苯酚可溶性调节素(*phenol-soluble modulins*, PSM)和自溶素, 属于 EV 核心蛋白质组^[24]。说明 EV 成分与其来源细胞保持着某种密切的关系, 可以推测 EV 可为细菌乃至其他生物的诊断及治疗提供帮助。

葡萄球菌 EV 携带的蛋白质成分具有如下功能:

(1) 与 EV 生物合成相关。1) 金黄色葡萄球菌 EV 携带肽聚糖降解酶, 可以促使其穿透富含肽聚糖的革兰氏阳性细菌细胞壁^[4]。例如, Atl 和 Sle1 属于肽聚糖(*peptidoglycan*, PGN)水解酶家族, Sle1 自溶酶被证明是金黄色葡萄球菌细胞壁释放 EV 的关键, 而 Atl 不影响 EV 产量, Atl 还参与细胞壁的翻转和青霉素或洗涤剂诱导的细菌自溶^[22]。2) 金黄色葡萄球菌青霉素结合蛋白 4 (*penicillin-binding protein 4*, PBP4) 是 PGN 二次交联所必需的一种羧肽酶, PBP4 突变体会显著降低 PGN 的交联, PBP4 促进 PGN 交联, 从而降低 EV 产量^[22], PBP4 失活会导致 PGN 交联显著降低, 导致 EV 的释放。3) 金黄色葡萄球菌分泌 PSM, 这是一个具有 α -螺旋的表面活性物质样肽家族, 有 PSM α 肽和 PSM β 肽, 但只有 PSM α 肽支持金黄色葡萄球菌 EV 的生物合成^[22]。这些表面活性蛋白使宿主脂质层变形, 触发细菌的细胞膜弯曲, 导致过量 EV 的释放。

(2) 与抗生素耐药相关。从金黄色葡萄球菌中提纯的 EV 富含抗生素耐药相关蛋白: β -内酰胺酶、青霉素结合蛋白(PBP1、PBP2 和 PBP3)和膜相关全局调控子 *methionine sulfoxide reductase R* (MsrR)^[4]。其中, β -内酰胺酶可以降解 β -内酰胺类抗生素, 青霉素结合蛋白与 β -内酰胺类抗生素天然结合, 而 MsrR 与甲氧西林耐药性有关, 说明 EV 包含的耐药因子可以增加细菌的抗生素耐药性。例如, 耐药 EV 通过降解环境中的氨苄青霉素来保护敏感细菌^[6]; 从金黄色葡萄球菌中提纯的 EV 可以保护细菌免受达托霉素(一种膜靶向抗生素)的侵袭^[25]。MRSA 自然分泌的 EV 含有抗 β -内酰胺类蛋白, 这类蛋白可以拦截抗生素, 帮助细菌在抗生素环境中生存^[18]。这些耐药性蛋白可以通过 EV 这个载体进行物种间的转移传递^[26]。

(3) 竞争性杀死其他细菌。金黄色葡萄球菌 EV 可能具有捕食作用, EV 相关的 N-乙酰胞浆酰基-L-丙氨酸酰胺酶可以通过肽聚糖降解或细胞裂解杀死其他竞争细菌, 如铜绿假单胞菌 EV 通过降解肽聚糖并溶解细胞竞争性杀死其他细菌^[27]。另一方面, 金黄色葡萄球菌优先在亲水表面形成生物膜, 金黄色葡萄球菌 EV 将疏水表面转变为亲水表面, 使其表面更有利于自身附着和生物膜的形成, 从而降低了其他嗜疏水条件细菌(如鲍曼不动杆菌)结合和形成生物膜的能力^[28]。有研究发现, 在铁限制的条件下, 表面蛋白 IsdA 增加了金黄色葡萄球菌细胞的亲水性, 排除了细菌与疏水性 AFA 的结合^[29]。金黄色葡萄球菌 EV 可能包含使疏水面转变为亲水面的蛋白成分, 例如 IsdA, 这还需要进一步探究。

(4) 与免疫逃逸相关蛋白。金黄色葡萄球菌 EV 含有脂肪酶和 IgG 结合蛋白(如蛋白 A)、凝血因子(葡萄球菌凝固酶和血管性血友病因子结合蛋白)、抗体降解和隔离因子、补体抑制因子, 帮助细菌逃避免疫系统^[4,6,30]。

(5) 细菌黏附与入侵。EV 相关的葡萄球菌蛋白酶 A 是一种胞外蛋白酶, 可能参与组织入侵和感染的传播, 而细胞外基质(extracellular matrix, ECM)和血浆结合蛋白在促进细菌与宿主组织的黏附和定殖方面发挥作用^[31]。

(6) 与毒力因子传递相关蛋白。有研究表明 InlB、LLO、IgG 结合蛋白(SbI)、保护性抗原、致死因子、水肿毒素、花青素等蛋白与细菌毒力因子的传递相关^[30]。例如, EV 通过相关的 IgG 结合蛋白(SbI)在金黄色葡萄球菌中高度富集, 从而导致金黄色葡萄球菌的高毒力^[4]。

(7) 其他蛋白。与铁摄取有关的蛋白及多种其他脂蛋白^[22]。

3.2 核酸成分

革兰氏阴性细菌 EV 核酸包括 RNA (sRNA、mRNA、miRNA、ncRNA、rRNA、tRNA) 和 DNA (外膜和质膜来源), 革兰氏阳性细菌 EV 核酸包括 sRNA、胞外和染色体 DNA^[32-33]。有研究表明, 细菌 EV 的 RNA 被转移到受体细胞, 并定向到上皮细胞的细胞质中, 并且也可以在细胞核中发现^[34]。此外, 金黄色葡萄球菌核酸是宿主细胞中促炎症细胞因子增加和 I 型干扰素信号转导的重要因素^[35]。研究进一步证实, 位于哺乳动物细胞体内的 Toll 样受体(Toll-like receptor, TLR)识别金黄色葡萄球菌来源的 RNA 和 DNA 分子^[36]; 金黄色葡萄球菌 EV 膜内 DNA 和膜表面 DNA 能通过不同的途径诱导宿主细胞的免疫反应^[36]。这些研究表明, 革兰氏阳性细菌的 EV 将核酸递送到宿主细胞内, 并对哺乳动物细胞的免疫调节有重要作用。有研究观察到, 化脓性链球菌中的大多数 EV 中所含 RNA 序列对应于 rRNAs 和 tRNAs, 但总体 RNA 谱与亲本细胞内发现的 RNA 谱不同^[15]。这表明存在某种分选机制调控 EV 中装载的 RNA 种类, 与 EV 蛋白质分选情况类似。研究 EV 核酸对理解细菌 EV 的致病机制及对宿主细胞的免疫调节有一定帮助, 也可以成为一种新的干预治疗手段。

3.3 其他成分

金黄色葡萄球菌 EV 含有毒素(Hld、Hlg、杀白细胞素、ETA、ETC 等)、超抗原、致孔毒素(α -溶血素和 γ -溶血素)、黏附素等^[14], 它们在人体系统感染中起着关键的病理作用。例如, 有研究确定了超抗原(SEQ、SSaA1 和 SSaA2)可以通过升高 IgG 抗体水平和放大宿主免疫反应来诱导脓毒症^[31]。与金黄色葡萄球菌 EV 相关的致孔毒素对依赖于 NOD-like receptor

family, pyrin domain containing 3 (NLRP3)的人巨噬细胞的 caspase-1 激活至关重要,但对 TLR2 信号转导不起关键作用^[7]。然而 EV 相关脂蛋白不仅介导 TLR2 信号启动 NLRP3 激活的启动步骤,并且还调节 EV 的生物合成和 EV 的毒素含量,导致 IL-1 β 、IL-18 和 caspase-1 活性的改变^[7]。某些金黄色葡萄球菌 EV 相关的杀白细胞素^[7],如 LukAB 很可能与它们位于细胞表面的宿主受体结合,从而导致细胞毒性。这些研究结果表明,金黄色葡萄球菌 EV 毒素、脂蛋白可以引起宿主细胞免疫应答并诱导细胞凋亡, EV 可以保护包裹着的化学成分不被外源性相关酶水解,保持生物学功能,将其运输到宿主细胞发挥功能。

4 EV 功能

4.1 致病性

有研究表明,金黄色葡萄球菌 EV 中存在致病分子,例如,金黄色葡萄球菌 EV 被证明与特应性皮炎有关,并且能增强气道对吸入性过敏原的过敏反应^[37]。研究表明细菌 EV 在宿主细胞感染过程扮演着重要角色:(1) 运送毒力因子。例如,铜绿假单胞菌利用 EV 向宿主细胞运送毒力因子,如溶血性磷脂酶 C^[38]。(2) 共享抗生素耐药基因。例如,鲍曼不动杆菌产生碳青霉烯耐药基因通过 EV 传播,这是一种新的水平基因转移的方法^[39]。(3) 促进生物膜形成。大量关于 EV 在生物膜形成中作用的研究已经在金黄色葡萄球菌等细菌中被调查^[28]。(4) 作为诱饵保护细菌免受噬菌体、抗生素及人类抗菌肽伤害。例如,金黄色葡萄球菌对 AFA 暴露的反应是通过促进 EV 的释放来抵御 AFA 的毒性^[16]。(5) 诱导细胞死亡。例如,与金黄色葡萄球菌 EV 相关的致孔毒素可以诱导细胞死亡^[7]。(6) 浓缩毒素。

例如,可溶性金黄色葡萄球菌 α -溶血素细胞毒性较小,而 EV 包裹的 α -溶血素会引起坏死和特应性皮炎样皮肤炎症^[37]。这些研究不仅表明细菌 EV 对宿主细胞的致病作用及在感染过程中的重要性,而且表明 EV 携带的细菌分子可以功能性地输送到宿主细胞。

4.2 免疫调节

细菌 EV 对宿主细胞的免疫调节有着重要作用。有的是通过 TLR2 信号实现的,例如,金黄色葡萄球菌 EV 对人巨噬细胞的免疫应答是通过 TLR2 信号和 K⁺外流激活 NLRP3 炎症小体,导致 ASC (NLR 炎症小体激活 caspase-1 的关键分子)的积累和 caspase-1 的激活^[7]。此外,对金黄色葡萄球菌 EV 免疫的小鼠可以通过 TLR2 的激活保护其免受致命性金黄色葡萄球菌引起的肺部感染^[40]。此外,TLR2 与 Mtb 配体相互作用既促进了细菌的清除,也促进了细菌逃避宿主免疫反应^[41]。据报道, EV 中的脂阿拉伯甘露聚糖(lipoarabinomannan, LAM)可以抑制 CD4⁺ T 细胞的功能,而清除结核分枝杆菌需要 CD4⁺ T 细胞^[42]。植物乳杆菌来源的 EV 可以纠正 M1 和 M2 巨噬细胞之间的失衡,从而改善皮肤的高度炎症状态和炎症性皮肤病的表型^[43]。这些研究表明,细菌 EV 可以作为抗炎和免疫调节物质在宿主细胞中引起复杂的免疫应答,可能是 EV 的免疫调节分子通过上调或下调宿主细胞的基因表达来控制免疫应答。

5 临床应用

葡萄球菌 EV 的临床应用研究目前包括药物传输载体及基于它的疫苗接种。由于 EV 的脂质双层的结构,可以运送难以通过细胞膜的化合物,如抗生素。EV 具有低免疫原性和低细胞毒性,是抗生素非常有效的载体,可以同时

装载亲水性和亲脂性药物,负载利奈唑胺的 EV 被证明对宿主巨噬细胞内金黄色葡萄球菌的杀菌作用优于游离抗生素(利奈唑胺)^[44]。有另一研究提出,可以通过 EV 实现加入 2 种或 2 种以上化合物达到局部浓缩和同时释放的目的,实现药物之间的协同作用^[6]。另外,有研究利用基因工程生产无毒的金黄色葡萄球菌 EV 作为小鼠的疫苗,可有效保护小鼠免受金黄色葡萄球菌致死性脓毒症的侵袭^[22]。然而另一项研究表明,非工程金黄色葡萄球菌 EV 对小鼠未造成显著的毒性,并且有强大的免疫激活作用^[40]。这可能是由于革兰氏阳性细菌无外膜脂多糖结构成分,所以对宿主细胞毒性小,说明革兰氏阳性细菌 EV 比革兰氏阴性细菌 EV 更适合作为药物传递载体及疫苗载体。

要实现细菌 EV 的靶向治疗,可利用 EV 这种天然纳米载体制作独特的药物输送系统,再运用基因工程技术进行远程定向输送。有研究表明,NP@EV (包被金黄色葡萄球菌 EV 膜的纳米颗粒)的 EV 膜使其在体内和体外都具有主动的靶向能力^[45]。因此,装载抗生素的 NP@EV 在感染金黄色葡萄球菌的巨噬细胞以及金黄色葡萄球菌菌血症小鼠模型中有显著疗效;并且疗效明显高于 NP@Lipo (脂质体纳米颗粒)和 NP@OMV (包被大肠杆菌 OMV 膜的纳米颗粒),这种主动靶向给药平台可能对细胞内病原体及相关并发症有一定临床意义。使用细菌 EV 作为药物传递载体要注意排除 EV 与其他细胞的非特异性结合,避免导致毒性或疗效减弱的现象。革兰氏阳性细菌 EV 比革兰氏阴性细菌 EV 更适合作为药物传递载体,可以对葡萄球菌 EV 进行基因工程改造,从而实现精准靶向治疗,避免副作用并提高疗效。这些 EV 包裹的药物能够绕过肝脏代谢,还可穿过血脑屏障和细胞膜,靶向到达病变

组织和细胞,减少非靶点效应或药物毒性。

6 结论与展望

细胞外囊泡在葡萄球菌与其他菌属细菌之间以及细菌和宿主之间的细胞间信号传递中发挥着关键作用。葡萄球菌来源的 EV,化学成分组成复杂、功能多样化,并且其分泌受多种因素影响,具有多样化的生物学活性,但细菌 EV 的研究仍有很多亟须完善之处。(1) 与真核细胞相比,目前国际及国内学者对于细菌细胞外囊泡的分离纯化技术、鉴定方法的认知仍处于探索阶段,尚未确立标准化的检测流程,鉴定仍需要通过 3 项实验共同验证:纳米颗粒跟踪分析(nanoparticle tracking analysis,NTA)检测粒径分布及浓度、透射电子显微镜(transmission electron microscope,TEM)分析形态、Western Blot 检测特征蛋白。但由于研究深度和广度的限制,包括金黄色葡萄球菌在内的细菌 EV 特征蛋白仍需进一步筛选和确立。(2) 同真核细胞类似,金黄色葡萄球菌 EV 组分复杂,可能作为一种感染标志物,在区分定殖与感染、快速识别侵袭性感染、检测菌株耐药性方面具有潜在的应用价值。(3) 由于葡萄球菌 EV 上述的特征和优势,在药物高效靶向输送、疫苗研发等方面的应用前景广泛。基础研究和临床应用方面的深度合作会对细菌 EV 机制探究及更广泛的应用提供更广阔的思路。

REFERENCES

- [1] Schatz D, Vardi A. Extracellular vesicles: new players in cell-cell communication in aquatic environments[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2018, 43: 148-154
- [2] Allan D, Billah MM, Finean JB, Michell RH. Release of diacylglycerol-enriched vesicles from erythrocytes with increased intracellular (Ca^{2+}) [J]. *Nature*, 1976, 261(5555): 58-60

- [3] Yu YJ, Wang XH, Fan GC. Versatile effects of bacterium-released membrane vesicles on mammalian cells and infectious/inflammatory diseases[J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2018, 39(4): 514-533
- [4] Lee EY, Choi DY, Kim DK, Kim JW, Park JO, Kim S, Kim SH, Desiderio DM, Kim YK, Kim KP, et al. Gram-positive bacteria produce membrane vesicles: proteomics-based characterization of *Staphylococcus aureus*-derived membrane vesicles[J]. *Proteomics*, 2009, 9(24): 5425-5436
- [5] 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
- [6] Liu Y, Defourny KAY, Smid EJ, Abee T. Gram-positive bacterial extracellular vesicles and their impact on health and disease[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1502
- [7] Wang XG, Eagen WJ, Lee JC. Orchestration of human macrophage NLRP3 inflammasome activation by *Staphylococcus aureus* extracellular vesicles[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020, 117(6): 3174-3184
- [8] György B, Szabó TG, Pásztói M, Pál Z, Misják P, Aradi B, László V, Pállinger É, Pap E, Kittel Á, et al. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2011, 68(16): 2667-2688
- [9] Roier S, Zingl FG, Cakar F, Durakovic S, Kohl P, Eichmann TO, Klug L, Gadermaier B, Weinzerl K, Prassl R, et al. A novel mechanism for the biogenesis of outer membrane vesicles in Gram-negative bacteria[J]. *Nature Communications*, 2016, 7: 10515
- [10] Turnbull L, Toyofuku M, Hynen AL, Kurosawa M, Pessi G, Petty NK, Osvath SR, Cárcamo-Oyarce G, Gloag ES, Shimoni R, et al. Explosive cell lysis as a mechanism for the biogenesis of bacterial membrane vesicles and biofilms[J]. *Nature Communications*, 2016, 7: 11220
- [11] Toyofuku M, Cárcamo-Oyarce G, Yamamoto T, Eisenstein F, Hsiao CC, Kurosawa M, Gademann K, Pilhofer M, Nomura N, Eberl L. Prophage-triggered membrane vesicle formation through peptidoglycan damage in *Bacillus subtilis*[J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 481
- [12] Dubey GP, Malli Mohan GB, Dubrovsky A, Amen T, Tsipshtein S, Rouvinski A, Rosenberg A, Kaganovich D, Sherman E, Medalia O, et al. Architecture and characteristics of bacterial nanotubes[J]. *Developmental Cell*, 2016, 36(4): 453-461
- [13] Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, Antoniou A, Arab T, Archer F, Atkin-Smith GK, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines[J]. *Journal of Extracellular Vesicles*, 2018, 7(1): 1535750
- [14] Jeon H, Oh MH, Jun SH, Kim SI, Choi CW, Kwon HI, Na SH, Kim YJ, Nicholas A, Selasi GN, et al. Variation among *Staphylococcus aureus* membrane vesicle proteomes affects cytotoxicity of host cells[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2016, 93: 185-193
- [15] Resch U, Tsatsaronis JA, Le Rhun A, Stübiger G, Rohde M, Kasvandik S, Holzmeister S, Tinnefeld P, Wai SN, Charpentier E. A two-component regulatory system impacts extracellular membrane-derived vesicle production in group A *Streptococcus*[J]. *mBio*, 2016, 7(6): e00207-16
- [16] Kengmo Tchoupa A, Peschel A. *Staphylococcus aureus* releases proinflammatory membrane vesicles to resist antimicrobial fatty acids[J]. *mSphere*, 2020, 5(5): e00804-20
- [17] Wang XG, Koffi PF, English OF, Lee JC. *Staphylococcus aureus* extracellular vesicles: a story of toxicity and the stress of 2020[J]. *Toxins*, 2021, 13(2): 75
- [18] Kim SW, Seo JS, Park SB, Lee AR, Lee JS, Jung JW, Chun JH, Lazarte JMS, Kim J, Kim JH, et al. Significant increase in the secretion of extracellular vesicles and antibiotics resistance from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* induced by ampicillin stress[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10: 21066
- [19] Wang JC, Wang JR, Wang YY, Sun P, Zou XH, Ren L, Zhang CX, Liu EM. iTRAQ®-based quantitative proteomics reveals the proteomic profiling of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-derived extracellular vesicles after exposure to imipenem[J]. *Folia Microbiologica*, 2021, 66(2): 221-230
- [20] Zaborowska M, Taulé Flores C, Vazirisani F, Shah FA, Thomsen P, Trobos M. Extracellular vesicles influence the growth and adhesion of *Staphylococcus epidermidis* under antimicrobial selective pressure[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 1132

- [21] Tjalsma H, Antelmann H, Jongbloed JDH, Braun PG, Darmon E, Dorenbos R, Dubois JYF, Westers H, Zanen G, Quax WJ, et al. Proteomics of protein secretion by *Bacillus subtilis*: separating the “secrets” of the secretome[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2004, 68(2): 207-233
- [22] Wang XG, Thompson CD, Weidenmaier C, Lee JC. Release of *Staphylococcus aureus* extracellular vesicles and their application as a vaccine platform[J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 1379
- [23] Lee J, Lee EY, Kim SH, Kim DK, Park KS, Kim KP, Kim YK, Roh TY, Gho YS. *Staphylococcus aureus* extracellular vesicles carry biologically active β -lactamase[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2013, 57(6): 2589-2595
- [24] Tartaglia NR, Nicolas A, Rodvalho VDR, Luz BSRD, Briard-Bion V, Krupova Z, Thierry A, Coste F, Burel A, Martin P, et al. Extracellular vesicles produced by human and animal *Staphylococcus aureus* strains share a highly conserved core proteome[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10: 8467
- [25] Andreoni F, Toyofuku M, Menzi C, Kalawong R, Mairpady Shambat S, François P, Zinkernagel AS, Eberl L. Antibiotics stimulate formation of vesicles in *Staphylococcus aureus* in both phage-dependent and -independent fashions and via different routes[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2019, 63(2): e01439-18
- [26] Brown L, Wolf JM, Prados-Rosales R, Casadevall A. Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, *Mycobacteria* and fungi[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2015, 13(10): 620-630
- [27] 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
- [28] Im H, Lee S, Soper SA, Mitchell RJ. *Staphylococcus aureus* extracellular vesicles (EVs): surface-binding antagonists of biofilm formation[J]. *Molecular BioSystems*, 2017, 13(12): 2704-2714
- [29] Clarke SR, Mohamed R, Bian L, Routh AF, Kokai-Kun JF, Mond JJ, Tarkowski A, Foster SJ. The *Staphylococcus aureus* surface protein IsdA mediates resistance to innate defenses of human skin[J]. *Cell Host & Microbe*, 2007, 1(3): 199-212
- [30] Kim JH, Lee J, Park J, Gho YS. Gram-negative and Gram-positive bacterial extracellular vesicles[J]. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2015, 40: 97-104
- [31] Sibbald MJJB, Ziebandt AK, Engelmann S, Hecker M, Jong AD, Harmsen HJM, Raangs GC, Stokroos I, Arends JP, Dubois JYF, et al. Mapping the pathways to staphylococcal pathogenesis by comparative secretomics[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2006, 70(3): 755-788
- [32] Velimirov B, Ranftler C. Unexpected aspects in the dynamics of horizontal gene transfer of prokaryotes: the impact of outer membrane vesicles[J]. *Wiener Medizinische Wochenschrift*, 2018, 168(11/12): 307-313
- [33] Ghosal A, Upadhyaya BB, Fritz JV, Heintz-Buschart A, Desai MS, Yusuf D, Huang D, Baumuratov A, Wang K, Galas D, et al. The extracellular RNA complement of *Escherichia coli*[J]. *MicrobiologyOpen*, 2015, 4(2): 252-266
- [34] Blenkiron C, Simonov D, Muthukaruppan A, Tsai P, Dauros P, Green S, Hong J, Print CG, Swift S, Phillips AR. Uropathogenic *Escherichia coli* releases extracellular vesicles that are associated with RNA[J]. *PLoS One*, 2016, 11(8): e0160440
- [35] Bergström B, Aune MH, Awuh JA, Kojen JF, Blix KJ, Ryan L, Flo TH, Mollnes TE, Espevik T, Stenvik J. TLR8 senses *Staphylococcus aureus* RNA in human primary monocytes and macrophages and induces IFN- β production via a TAK1-IKK β -IRF5 signaling pathway[J]. *Journal of Immunology*, 2015, 195(3): 1100-1111
- [36] Rodriguez BV, Kuehn MJ. *Staphylococcus aureus* secretes immunomodulatory RNA and DNA via membrane vesicles[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10: 18293
- [37] Hong SW, Choi EB, Min TK, Kim JH, Kim MH, Jeon SG, Lee BJ, Gho YS, Jee YK, Pyun BY, et al. An important role of α -hemolysin in extracellular vesicles on the development of atopic dermatitis induced by *Staphylococcus aureus*[J]. *PLoS One*, 2014, 9(7): e100499
- [38] Bomberger JM, Maceachran DP, Coutermarsh BA, Ye SY, O'Toole GA, Stanton BA. Long-distance delivery of bacterial virulence factors by *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane vesicles[J]. *PLoS Pathogens*, 2009, 5(4): e1000382
- [39] Chatterjee S, Mondal A, Mitra S, Basu S. *Acinetobacter*

- baumannii* transfers the *bla_{NDM-1}* gene via outer membrane vesicles[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2017, 72(8): 2201-2207
- [40] Choi SJ, Kim MH, Jeon J, Kim OY, Choi Y, Seo J, Hong SW, Lee WH, Jeon SG, Gho YS, et al. Active immunization with extracellular vesicles derived from *Staphylococcus aureus* effectively protects against staphylococcal lung infections, mainly via Th1 cell-mediated immunity[J]. PLoS One, 2015, 10(9): e0136021
- [41] Prados-Rosales R, Baena A, Martinez LR, Luque-Garcia J, Kalscheuer R, Veeraghavan U, Camara C, Nosanchuk JD, Besra GS, Chen B, et al. *Mycobacteria* release active membrane vesicles that modulate immune responses in a TLR2-dependent manner in mice[J]. Journal of Clinical Investigation, 2011, 121(4): 1471-1483
- [42] Athman JJ, Sande OJ, Groft SG, Reba SM, Nagy N, Wearsch PA, Richardson ET, Rojas R, Boom WH, Shukla S, et al. *Mycobacterium tuberculosis* membrane vesicles inhibit T cell activation[J]. The Journal of Immunology, 2017, 198(5): 2028-2037
- [43] Kim W, Lee EJ, Bae IH, Myoung K, Kim ST, Park PJ, Lee KH, Pham AVQ, Ko J, Oh SH, et al. *Lactobacillus plantarum*-derived extracellular vesicles induce anti-inflammatory M2 macrophage polarization *in vitro*[J]. Journal of Extracellular Vesicles, 2020, 9(1): 1793514
- [44] Yang XH, Shi GM, Guo J, Wang CH, He Y. Exosome-encapsulated antibiotic against intracellular infections of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. International Journal of Nanomedicine, 2018, 13: 8095-8104
- [45] Gao F, Xu LL, Yang BQ, Fan F, Yang LH. Kill the real with the fake: eliminate intracellular *Staphylococcus aureus* using nanoparticle coated with its extracellular vesicle membrane as active-targeting drug carrier[J]. ACS Infectious Diseases, 2019, 5(2): 218-227