

细菌外泌体 DNA 的来源与生物学功能研究进展

刘丁一 孙宏 盛钢 孙照刚

【摘要】 细胞可通过细胞外囊泡,也称为外泌体(extracellular vesicles)将自身物质或代谢产物释放到细胞外。随着研究的深入,研究人员发现,细菌也可以产生包裹许多大分子物质(包括蛋白质、脂类、DNA 和 RNA 等)的外泌体,并且细菌外泌体与细菌生存发育及细菌介导的种内和种间相互作用等多种生物学活动有着密切联系。研究人员还发现,革兰阴性菌与革兰阳性菌均可产生包含 DNA 的外泌体,细菌外泌体 DNA 可发挥介导水平基因的转移、协助生物膜形成及刺激免疫调节机制等生物学功能。本文针对细菌外泌体 DNA 的产生方式及其生物学功能进行阐述,使读者更为深入地了解细菌外泌体 DNA,推动对细菌外泌体 DNA 的进一步研究和发展。

【关键词】 外泌体; 脱氧核糖核苷酸类; 革兰氏阴性菌; 革兰氏阳性菌; 总结性报告(主题)

【中图分类号】 R52; R37

Recent advances in the source and biological function of bacterial DNA in extracellular vesicles Liu Dingyi, Sun Hong, Sheng Gang, Sun Zhaogang. Transformation Research Room, Beijing Chest Hospital, Capital Medical University/Beijing Tuberculosis and Thoracic Tumor Research Institute, Beijing 101149, China
Corresponding author: Sun Zhaogang, Email: sunzg75@163.com

【Abstract】 Cells can release their own substances or metabolites outside the cell through extracellular vesicles, which is also known as EV (exosomes). As research progressed, it is discovered that bacteria can also produce exosomes that encapsulate many macromolecules (including proteins, lipids, DNA and RNA) and that bacterial exosomes are closely linked to a variety of biological activities, including bacterial survival and development, as well as bacterial-mediated intra- and inter-species interactions. Researchers have also found that both Gram-negative and Gram-positive bacteria can produce exosomes containing DNA, and that bacterial exosomes DNA can perform biological functions such as mediating horizontal gene transfer, assisting in biofilm formation, and stimulating immunomodulatory mechanisms. In this paper, the production mode and biological functions of bacterial extracellular DNA have been elucidated, so that readers can have deeper understanding of bacterial exosomes DNA and promote further research and development of bacterial exosome DNA.

【Key words】 Extracellular vesicles; Deoxyribonucleotides; Gram-negative bacteria; Gram-positive bacteria; Consensus development conferences as topic

【Fund program】 National Natural Science Foundation of China (81871691, 82272347); Key Projects of the Capital Health Development Research Project (2022-1G-2161)

外泌体(extracellular vesicles)的生成与释放在自然界中是一种普遍现象,无论是哺乳动物细胞,还是细菌都会释放外泌体,且释放的外泌体大小相近,

一般在 20~400 nm。外泌体内可包含蛋白质、核酸、脂质及一些其他代谢产物,对于细胞或细菌的种内和种间交流都起着十分重要的作用。有研究表明,人体细胞产生外泌体就可参与进行信号传导的信号级联和神经细胞间的相互沟通^[1-2]。同时,对细菌外泌体结构的研究发现,其具有多种形式,如外膜囊泡、外-内膜囊泡、质膜囊泡等^[3]。

细菌外泌体是包裹有细菌部分内容的囊性结构体,呈圆球状,可释放到邻近组织或进行长距离运输。细菌外泌体很早开始进入大众视野。最初,细菌外泌体被认为是细菌死后产生的碎片,被极性脂类包裹而成的囊性结构。在 20 世纪 60 年代,研究人员观察到大肠埃希菌在活性状态下可产生囊泡,首次提出了细菌外泌体的概念,20 世纪 90 年代革



开放科学(资源服务)标识码(OSID)的开放科学计划以二维码为入口,提供丰富的线上扩展功能,包括作者对论文背景的语音介绍、该研究的附加说明、与读者的交互问答、拓展学术圈等。读者“扫一扫”此二维码即可获得上述增值服务。

doi:10.19982/j.issn.1000-6621.20230060

基金项目:国家自然科学基金(81871691,82272347);首都卫生发展科研专项重点项目(首发 2022-1G-2161)

作者单位:首都医科大学附属北京胸科医院/北京市结核病胸部肿瘤研究所转化研究室,北京 101149

通信作者:孙照刚,Email:sunzg75@163.com

革兰阳性菌的外泌体被发现。至此,学界达成共识,细菌外泌体是细菌生命活动中的一种普遍现象,且可由活细菌产生,在细菌的生存生长过程中细菌外泌体发挥着重要作用^[4-6]。

在以往实验中,研究人员通过运用透射电子显微镜、质谱技术、蛋白质组学等多种方式进行分析,发现细菌外泌体携带着多种细胞内含物,包括蛋白质、毒素、核酸、脂质及代谢产物等。这些内容物参与影响了细菌的许多生命活动,如某些毒力因子介导参与了病原菌对宿主的侵袭,某些脂质与外泌体膜的稳定及外泌体的释放有关,外泌体内的 mRNA 也可以进入到宿主细胞内进行转录翻译等^[7]。因此,细菌外泌体在感染性疾病、免疫性疾病和肿瘤等多种疾病中具有广阔的研究前景。

DNA 作为细菌重要的遗传物质,在其生物学功能上有不言而喻的重要作用。诸多研究证实了细菌 DNA 可以被包裹进细菌外泌体中,在细胞毒性、抗生素耐药、水平基因转移、生物膜合成及免疫调节方面发挥作用。同时,受限于现有的外泌体分离纯化及深入分析的方法尚未成熟,目前人们对于细菌外泌体 DNA 的了解还十分有限。笔者对细菌外泌体 DNA 的产生及生物学功能进行了较为系统的整理,并分析讨论该领域未来可能的研究方向。

细菌外泌体 DNA 的产生

细菌外泌体可以包裹细菌 DNA 作为其内容物,实现遗传物质的远距离递送。根据细菌外被结构不同,对细菌外泌体 DNA 的产生进行分类研究,大致可以分为革兰阴性菌外泌体 DNA 分泌机制和革兰阳性菌外泌体 DNA 分泌机制两个方面。革兰阴性菌具有双重双层膜结构,两层之间有一层肽聚糖,并且外膜含有脂多糖;而革兰阳性菌只有一重双层内膜,最外层是由肽聚糖构成的厚细胞壁。因此,从结构理论上讲,革兰阳性菌分泌外泌体比革兰阴性菌分泌外泌体的阻力更大,在这样的假想下,人们对于革兰阳性菌外泌体研究产生了偏见,使其落后于革兰阴性菌外泌体研究长达 30 年之久,直到近些年革兰阳性菌外泌体研究才开始发展起来。而到现在,对于革兰阴性菌和革兰阳性菌细菌外泌体的分泌机制的研究,学者们也仅仅是提出了很多假设模型。

一、革兰阴性菌外泌体 DNA 的分泌机制

早在 1995 年就有报道发现来自铜绿假单胞菌的外泌体中含有 DNA,证明了革兰阴性菌外泌体中

含有 DNA。革兰阴性菌外泌体起泡于细菌外膜,包裹着细菌周质成分,这种细菌外泌体被称为外膜囊泡。然而, DNA 主要在细菌胞质内,肽聚糖成为了胞质内物质进入细菌外泌体的最大阻碍。后来,在对囊泡希瓦氏菌 M7(T)超微结构进行研究时,发现了一种由内膜和外膜,二重双层膜构成的结构更为复杂的细菌外泌体。同时,该研究还运用特异性单克隆 IgM 对双链 DNA 进行免疫金标记,证实了囊泡内有 DNA 的存在^[8]。之后这种特殊的细菌外泌体被命名为外-内膜囊泡。由此,研究人员提出一种细菌 DNA 进入细菌外泌体的假设——内膜和外膜之间的肽聚糖层被削弱溶解,得以让内膜包裹着胞质内容物(其中包括 DNA)向外膜方向突出,最终形成完整的细菌外泌体,即外-内膜囊泡。随后,诸多研究也发现,许多细菌在产生外膜囊泡的同时也会产生外-内膜囊泡,且 DNA 几乎全部被装载在外-内膜囊泡中释放^[9]。

外-内膜囊泡结构可以解释胞质内质粒 DNA 的分泌过程,而基因组 DNA 作为细菌最为稳定的遗传物质,其进入细菌外泌体的难度巨大。研究人员曾认为细菌外泌体中出现了基因组 DNA 是由于细菌裂解的缘故。DNA 损伤引发细菌裂解,之后 DNA 片段被包裹进细菌的囊泡,释放到外周环境。这种细菌外泌体 DNA 的出现就意味着细菌生命周期的结束。后来,有研究人员通过对 5 种不同革兰阴性致病菌外膜囊泡内的 DNA 进行分析,发现在指数期,基因组 DNA 被包裹进细胞外膜囊泡后释放到细胞外,这些 DNA 大部分位于外膜囊泡外,少量位于外膜囊泡内部^[10]。因此,通过早期对细菌(主要是革兰阴性菌)外泌体的研究,表明了胞质质粒 DNA 及基因组 DNA 均可作为细菌外囊泡 DNA 的来源。

虽然研究人员对革兰阴性菌外泌体早已展开研究,但对其内容物的选择机制和内容物所含物质的完整分析等方面的研究还存在很多不足。时至今日,在结合大量研究结果进行整理分析后,对于革兰阴性菌外泌体的起泡模型,研究人员基本达成了一致。大致分为 4 种:(1)错误折叠的蛋白质、脂多糖及 DNA 片段在周质的积累导致包膜压力的增加,从而在压迫下形成外泌体;(2)外层膜和肽聚糖层之间共价键断裂或相互错位,以及肽聚糖内肽酶降解破坏肽聚糖的交联,从而使膜的连接呈现不稳定性,促使外泌体在其薄弱部位形成出芽;(3)某些特殊的分子化合物,如脂质、脂多糖和氟喹诺酮假单胞菌信

号(pseudomonas quinolone signal, PQS)等,可通过增加膜弯曲,促进外泌体的形成;(4)存在一种特殊情况:在 DNA 损伤应激条件下,前噬菌体来源的内毒素表达增加会引起肽聚糖变薄,导致细菌裂解,裂解的碎片被包裹形成外-内膜囊泡^[3]。

二、革兰阳性菌外泌体 DNA 的分泌机制

由于厚细胞壁的存在,在很长时间内,研究人员对革兰阳性菌外泌体的研究兴趣不大。最近几年有关革兰阳性菌外泌体的研究开始受到关注,并展现出了巨大的潜力^[11]。有研究人员发现,在对枯草芽孢杆菌的研究中,类似于革兰阴性菌外-内膜囊泡的起泡机制,噬菌体来源内毒素会在肽聚糖细胞壁上产生孔洞,致使细胞质膜包裹物质以囊泡的形式突破到细胞外^[12]。这一过程会致使细菌细胞壁产生缺损,诱导细胞死亡,称为“鼓泡细胞死亡”。此过程中所产生的囊泡被称为细胞质膜囊泡,常出现于革兰阳性菌生命活动中。现有的关于革兰阳性菌外泌体 DNA 的研究中,产生了许多有意义的发现。有研究人员在观察了单核增生李斯特菌的 Δ sigB 突变体和同源的野生型后发现,野生型菌株的外泌体的产量约为 Δ sigB 突变体的 9 倍,同时所产生的外泌体更为完整^[13]。而与毒力相关的双组分调节因子 CovRS 的基因破坏会导致 A 组链球菌(GAS)外泌体产量的增加^[14]。这些均为全局性调控因子,驱动着众多遗传基因的表达。同时也存在着特异性基因,如结核分枝杆菌的 *virR* 基因、*Rv3371* 基因,以及金黄色葡萄球菌中的 *psma* 基因,可调节外泌体的分泌^[15-17]。由此可以看出,革兰阳性菌外泌体的分泌并不是靠少数几个基因,而是需要全局调控因子的参与,同时不可忽视某些特殊基因的调节作用^[18]。

虽然研究人员对革兰阳性菌外泌体的研究越来越多,但是其发生机制仍不明确。根据现有的研究成果,革兰阳性菌外泌体的分泌机制大致分为 3 种假说:(1)与革兰阴性菌类似,受迫于膨胀压力,外泌体得以穿过细胞壁,从质膜释放;(2)存在细胞壁修饰酶,在外泌体释放的同时一起到达细胞壁,导致细胞壁结构改变,引起外泌体的释放,如金黄色葡萄球菌通过肽聚糖降解酶促进其外泌体的释放^[19],质膜囊泡是由于细胞壁被破坏,也可归为此类;(3)在细胞壁上存在一些运输通道,外泌体具有变形能力,可以允许它们通过比自身体积更窄的孔隙,如隐球菌细胞壁上的细胞孔径在 50~500 nm 不等,与外泌体直径相似,猜测与其释放有关^[20]。

细菌外泌体 DNA 的生物学作用

细菌通过将某些大分子物质包裹进入外泌体后,将其分泌到细菌细胞外,在细菌的周围环境或对受体细胞产生重要的生物学作用。有研究证明,细菌外泌体 DNA 在物种间和物种内进行运输,促进了种间和种内的 DNA 交换。通过外泌体进行的水平基因转移,在信息传递的同时还防止了酶等物质对 DNA 的破坏,保障了 DNA 信息的完整性。同时,也有研究说明,外泌体相关的外 DNA (eDNA) 协助了细菌生物膜的形成和稳定,辅助宿主定植。在感染发病方面,细菌外泌体 DNA 可以刺激诱导机体的免疫调节反应。通过对以上生物学功能的研究,或许会进一步拓展人们对细菌外泌体 DNA 的了解。

一、细菌外泌体 DNA 促进基因在细菌间的转移

细菌可以通过种间或种内的水平基因的转移和递送,实现其生物学功能的进化,使细菌能在不同环境下都具有更强的生存适应性。利用细菌外泌体进行遗传物质的呈递,避免了热溶解效应,以及核酸酶降解对基因产生的影响,实现了遗传物质长距离稳定的运输^[21]。有研究表明,大肠埃希菌 O157:H7 释放的外泌体内含志贺毒素和毒力基因,之后通过对该外泌体的进一步研究发现,通过外泌体对毒力基因的呈递,使得受体大肠埃希菌 JM109 产生了基于毒力基因生物学功能的表达^[22]。同样,在产气荚膜杆菌外泌体的研究中,研究人员从纯化外泌体中扩增出编码 α 毒素和毒素产气荚膜溶解素 O 的基因^[23],以及在铜绿假单胞菌的细胞外泌体中也发现了 DNA 和毒力因子的存在^[24],进一步确定了外泌体具备毒力基因转移的能力。另一方面,鲍曼不动杆菌通过表达 *bla* (OXA-24) 基因,可产生对碳青霉烯类药物的耐药。有研究发现,将包裹有 *bla* (OXA-24) 基因的外膜囊泡与对碳青霉烯类药物敏感的鲍曼不动杆菌宿主菌株一起进行孵化,使该菌株对碳青霉烯类药物产生了耐药性;同时检测出宿主菌株可以释放出包含携带 *bla* (OXA-24) 基因的原始质粒的外膜囊泡^[25]。这表明细菌外泌体具有抗生素耐药基因转移的能力。另外,在对外泌体 RNA 的研究中也发现,癌症相关成纤维细胞分泌含有 miRNA 的外泌体增强癌症干细胞的生长,从而提高了结肠癌的耐药性,这种依赖外泌体进行的耐药基因的水平转移在乳腺癌中也有发现^[26-27]。

综上所述,细菌通过外泌体进行水平基因的转移,产生了多样的生物学功能,使细菌可以在多种环境下都具有极强的生存能力。

二、细菌外泌体 DNA 与细菌生物膜的联系

细胞 eDNA 是生物膜细胞外基质的主要组成部分。研究人员发现,幽门螺旋杆菌和罗伊氏乳杆菌产生包裹有 eDNA 的外泌体,并通过对活细胞和死细胞进行荧光染色之后的对比分析,证明外泌体与生物膜的生成有关^[28-29]。并且研究人员通过将变形链球菌的生物膜培养在含有 DNA 酶的培养基中,观察到变形链球菌生物膜的产生显著减少,之后又将用 DNA 酶处理过的生物膜与接受热灭活酶的生物膜进行分析比较,发现前者更脆弱,更容易被破坏,说明 eDNA 在生物膜生成与稳定方面具有十分重要的生物学作用;同时还发现生物膜的形成也促进了 eDNA 的产生,证明二者相辅相成,相互促进^[30]。而在对幽门螺旋杆菌的研究中发现,其产生的外泌体可以通过阻止 DNA 酶对 eDNA 的降解来发挥结构性作用,并且外泌体可以在其表面的 eDNA 链之间发挥桥接作用并促进聚集,说明外泌体对 eDNA 与生物膜的联系可产生积极作用^[29]。Gloag 等^[31]通过运用延时显微镜和计算机视觉算法观察分析铜绿假单胞菌生物膜的运动,发现生物膜在生物表面移动扩张的过程中形成沟壑,扩张的细菌运动首先沿沟壑进行,头部细菌的运动需要 eDNA 的协调,同时 eDNA 使细菌在运动过程中排列保持连贯,形成了高速有效的扩张运动,保障了生物膜的无障碍形成过程。由此证明了 eDNA 的协助和沟通作用促进了生物膜复杂沟壑网络的形成。上述研究可以证明,细菌外泌体 DNA (特别是 eDNA)促进了细菌生物膜的生成并在生物膜结构的稳定方面发挥重要作用。

三、细菌外泌体 DNA 与感染发病

外泌体中包裹的许多物质都有成为免疫调节反应中抗原或者配体成分的潜力,因此研究人员进行诸多研究,发现外泌体存在诱导先天和适应性免疫方面的能力。同时发现,外泌体在免疫调节方面的功能可能与 DNA 介导信号通路、抗原肽的呈递、miRNA 的基因表达操控,以及表面配体诱导不同信号途径有关^[32]。在金黄色葡萄球菌外泌体的研究中发现,外泌体 DNA 可以被 Toll 样受体和含核苷酸结合寡聚化结构域 2 蛋白检测到,最终导致核因子- κ B 的激活,以及上皮细胞产生促炎症细胞因子和趋化因子^[33]。而在另一种革兰阳性菌——单

核增生李斯特菌外泌体 DNA 的研究中也发现,外泌体可以作为载体,将 DNA 作为刺激干扰素生成的病原体相关分子模式,从供体细胞中释放出来,刺激受体细胞环磷酸鸟苷-腺苷酸合成酶-干扰素基因刺激物(cGAS-STING)信号通路,激活其免疫反应,同时外泌体也促进 T 淋巴细胞的干扰素基因刺激物依赖性凋亡^[34]。同样的现象在土拉弗朗西斯菌、结核分枝杆菌和嗜肺军团菌中也存在。在对结核分枝杆菌的研究中还发现,外泌体可以刺激分枝杆菌致敏的 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞,以及促进体内巨噬细胞的招募^[35-36]。而进一步对结核分枝杆菌 DNA 进行分析,其存在 cGAS-STING 信号通路的同时还有其他的结构通路以激活机体的免疫反应。一方面,结核分枝杆菌 DNA 中存在未甲基化的胞嘧啶-磷酸-鸟嘌呤二核苷酸,通过 Toll 样受体 9 可以刺激激活哺乳动物的免疫细胞,另一方面,结核分枝杆菌 DNA 可以通过外泌体的方式向外分泌,二者可能存在联系^[37-38]。而在病毒相关机体免疫反应的研究中,发现 T 细胞通过外泌体将基因组 DNA 和线粒体 DNA 传递到树突状细胞(DC 细胞)内,从而单向地激活抗病毒反应,同时在与外泌体接触后,DC 细胞具备了更强的病毒抵抗力^[39]。同样在寄生虫引起人体免疫反应的研究中也发现,人单核细胞吸收恶性疟原虫产生外泌体,其内部含有 DNA,可引发干扰素基因刺激物依赖性的 DNA 传感。该途径可能是增强疟原虫感染毒力的重要机制^[40]。这证明寄生虫感染引起的机体免疫也与外泌体有关。上述各研究综合说明,外泌体(尤其是外泌体 DNA)在感染性疾病免疫方面起到重要作用,这种现象在细菌、寄生虫和病毒中均存在。

问题及展望

细菌外泌体 DNA 对于细菌的生存和发育都起着十分重要的作用。从现有研究来看,人们对于细菌外泌体 DNA 有了一定的了解,包括不同的来源、多种的分泌形式,以及其发挥的重要生物学作用。目前已知,对于细菌 DNA,无论是细胞核内 DNA 还是胞质中的质粒 DNA,都可通过外泌体进行运输释放,之后可以通过水平基因的转移引起细菌的抗生素耐药,参与细菌的细胞毒性反应;也可以在生物膜生成与稳定中发挥作用;还可以促进细菌对机体的感染,激活机体的免疫反应。

当前,对于细菌外泌体 DNA 的研究,受限于研究条件的影响,缺乏分离和纯化细菌外泌体的标准

方法,并且缺乏细菌外泌体个体标记物的特异性识别方式,因此对于细菌外泌体还存在许多未知的方面,但这也说明对于细菌外泌体和外泌体 DNA 的研究还存在着十分广阔的发展空间。

对于细菌外泌体介导的其他生命活动功能,如群体感应、抗噬菌体效应、细菌的黏附和入侵,以及宿主免疫调节等,可以明确的是,外泌体内的诸多大分子物质,包括蛋白质、脂质等都参与其中,而外泌体 DNA 是否发挥了一定作用,还需要更进一步的研究。这一方向可能将成为未来外泌体 DNA 研究的重点。另外,在外泌体与临床应用联系方面,现有研究已经证明,所有细胞都可分泌外泌体,且外泌体存在于所有生物液体中,这使得其具备了成为纵向追踪疾病进程的微创活检采集物的潜力。并且,研究人员发现外泌体与人体诸多疾病有着密切的联系,包括感染性疾病、神经退行性疾病、心血管和代谢性疾病及癌症等,这说明了外泌体在疾病的预防和诊疗方面的巨大潜力。未来外泌体将会成为临床上疫苗开发、药物传递、纳米医疗和疾病诊断的重要手段^[32]。现如今针对外泌体 DNA 的临床应用,已经初步开始进行外泌体基因工程的研究,通过添加程序性死亡蛋白 1(programmed death 1, PD1)的胞外域来修饰外泌体的表面。工程化的外泌体 PD1 可以结合肿瘤细胞表面上的程序性死亡受体配体 1(programmed death ligand 1, PD-L1),并促进其减少表面上的 PD-L1,从而抑制 T 细胞和癌细胞之间的 PD1 与 PD-L1 相互作用^[41]。未来还需要继续探究细菌外泌体 DNA 的临床应用领域,深究其优势与潜力方向,同时也要注意解决细菌外泌体 DNA 临床应用出现的问题,包括临床应用的可重复性、细菌外泌体的免疫毒性,以及针对应用的有效性等,如何减轻甚至消除这些影响,也将是我们今后研究的重点方向。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献 刘丁一: 酝酿和设计实验、实施研究、采集数据、分析/解释数据、起草文章;孙宏: 酝酿和设计实验、实施研究、对文章的知识性内容作批评性审阅、指导;盛钢: 采集数据、对文章的知识性内容作批评性审阅、指导;孙照刚: 酝酿和设计实验、对文章的知识性内容作批评性审阅、指导

参 考 文 献

- [1] Jin Y, Ma L, Zhang W, et al. Extracellular signals regulate the biogenesis of extracellular vesicles. *Biol Res*, 2022, 55(1): 35. doi:10.1186/s40659-022-00405-2.
- [2] Kim G, Chen X, Yang Y. Pathogenic Extracellular Vesicle (EV) Signaling in Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS). *Neurotherapeutics*, 2022, 19(4): 1119-1132. doi:10.1007/s13311-022-01232-9.
- [3] Toyofuku M, Nomura N, Eberl L. Types and origins of bacterial membrane vesicles. *Nat Rev Microbiol*, 2019, 17(1): 13-24. doi:10.1038/s41579-018-0112-2.
- [4] Ellis TN, Kuehn MJ. Virulence and immunomodulatory roles of bacterial outer membrane vesicles. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2010, 74(1): 81-94. doi:10.1128/MMBR.00031-09.
- [5] Schooling SR, Beveridge TJ. Membrane vesicles: an overlooked component of the matrices of biofilms. *J Bacteriol*, 2006, 188(16): 5945-5957. doi:10.1128/JB.00257-06.
- [6] György B, Szabó TG, Pásztói M, et al. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci*, 2011, 68(16): 2667-2688. doi:10.1007/s00018-011-0689-3.
- [7] 周舒扬, 张丕奇, 戴肖东, 等. 细菌外膜囊泡(OMV)研究进展. *微生物学杂志*, 2021, 41(6): 83-89. doi:10.3969/j.issn.1005-7021.2021.06.011.
- [8] Pérez-Cruz C, Carrión O, Delgado L, et al. New type of outer membrane vesicle produced by the Gram-negative bacterium *Shewanella vesiculosa* M7T: implications for DNA content. *Appl Environ Microbiol*, 2013, 79(6): 1874-1881. doi:10.1128/AEM.03657-12.
- [9] Pérez-Cruz C, Delgado L, López-Iglesias C, et al. Outer-inner membrane vesicles naturally secreted by gram-negative pathogenic bacteria. *PLoS One*, 2015, 10(1): e0116896. doi:10.1371/journal.pone.0116896.
- [10] Bitto NJ, Chapman R, Pidot S, et al. Bacterial membrane vesicles transport their DNA cargo into host cells. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 7072. doi:10.1038/s41598-017-07288-4.
- [11] 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. doi:10.1038/nrmicro3480.
- [12] Toyofuku M, Cárcamo-Oyarce G, Yamamoto T, et al. Prophage-triggered membrane vesicle formation through peptidoglycan damage in *Bacillus subtilis*. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 481. doi:10.1038/s41467-017-00492-w.
- [13] Lee JH, Choi CW, Lee T, et al. Transcription factor σ B plays an important role in the production of extracellular membrane-derived vesicles in *Listeria monocytogenes*. *PLoS One*, 2013, 8(8): e73196. doi:10.1371/journal.pone.0073196.
- [14] 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): e00207-16. doi:10.1128/mBio.00207-16.
- [15] 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. doi:10.1038/s41467-018-03847-z.
- [16] Rath P, Huang C, Wang T, et al. Genetic regulation of vesiculogenesis and immunomodulation in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(49): E4790-E4797. doi:10.1073/pnas.1320118110.
- [17] Rastogi S, Singh AK, Chandra G, et al. The diacylglycerol acyltransferase Rv3371 of *Mycobacterium tuberculosis* is required for growth arrest and involved in stress-induced cell wall alterations. *Tuberculosis (Edinb)*, 2017, 104: 8-19. doi:10.1016/j.tube.2017.02.001.
- [18] 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.
- [19] 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. doi:10.1002/pmic.200900338.
- [20] Jacobson ES, Ikeda R. Effect of melanization upon porosity of the cryptococcal cell wall. *Med Mycol*, 2005, 43 (4): 327-333. doi:10.1080/13693780412331271081.
- [21] Gaudin M, Gauliard E, Schouten S, et al. Hyperthermophilic archaea produce membrane vesicles that can transfer DNA. *Environ Microbiol Rep*, 2013, 5(1): 109-116. doi:10.1111/j.1758-2229.2012.00348.x.
- [22] 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. doi:10.1128/AEM.66.10.4414-4420.2000.
- [23] 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. doi:10.1016/j.ijmm.2014.02.006.
- [24] Kadurugamuwa JL, Beveridge TJ. Virulence factors are released from *Pseudomonas aeruginosa* in association with membrane vesicles during normal growth and exposure to gentamicin: a novel mechanism of enzyme secretion. *J Bacteriol*, 1995, 177 (14): 3998-4008. doi:10.1128/jb.177.14.3998-4008.1995.
- [25] 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. doi:10.1128/AAC.00929-10.
- [26] Chen WX, Liu XM, Lv MM, et al. Exosomes from drug-resistant breast cancer cells transmit chemoresistance by a horizontal transfer of microRNAs. *PLoS One*, 2014, 9(4): e95240. doi:10.1371/journal.pone.0095240.
- [27] Hu Y, Yan C, Mu L, et al. Fibroblast-Derived Exosomes Contribute to Chemoresistance through Priming Cancer Stem Cells in Colorectal Cancer. *PLoS One*, 2015, 10 (5): e0125625. doi:10.1371/journal.pone.0125625.
- [28] Puca V, Ercolino E, Celia C, et al. Detection and Quantification of eDNA-Associated Bacterial Membrane Vesicles by Flow Cytometry. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(21): 5307. doi:10.3390/ijms20215307.
- [29] Grande R, Di Marcantonio MC, Robuffo I, et al. *Helicobacter pylori* ATCC 43629/NCTC 11639 Outer Membrane Vesicles (OMVs) from Biofilm and Planktonic Phase Associated with Extracellular DNA (eDNA). *Front Microbiol*, 2015, 6: 1369. doi:10.3389/fmicb.2015.01369.
- [30] 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. doi:10.1128/JB.01493-14.
- [31] Gloag ES, Turnbull L, Huang A, et al. Self-organization of bacterial biofilms is facilitated by extracellular DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(28): 11541-11546. doi:10.1073/pnas.1218898110.
- [32] Kalluri R, LeBleu VS. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science*, 2020, 367 (6478): eaau6977. doi:10.1126/science.aau6977.
- [33] 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. doi:10.1002/jev2.12080.
- [34] Nandakumar R, Tschismarov R, Meissner F, et al. Intracellular bacteria engage a STING-TBK1-MVB12b pathway to enable paracrine cGAS-STING signalling. *Nat Microbiol*, 2019, 4(4): 701-713. doi:10.1038/s41564-019-0367-z.
- [35] Giri PK, Schorey JS. Exosomes derived from *M. Bovis* BCG infected macrophages activate antigen-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells *in vitro* and *in vivo*. *PLoS One*, 2008, 3(6): e2461. doi:10.1371/journal.pone.0002461.
- [36] Singh PP, Smith VL, Karakousis PC, et al. Exosomes isolated from mycobacteria-infected mice or cultured macrophages can recruit and activate immune cells *in vitro* and *in vivo*. *J Immunol*, 2012, 189 (2): 777-785. doi:10.4049/jimmunol.1103638.
- [37] Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*, 2000, 408 (6813): 740-745. doi:10.1038/35047123.
- [38] Pompei L, Jang S, Zamlynny B, et al. Disparity in IL-12 release in dendritic cells and macrophages in response to *Mycobacterium tuberculosis* is due to use of distinct TLRs. *J Immunol*, 2007, 178 (8): 5192-5199. doi:10.4049/jimmunol.178.8.5192.
- [39] Torralba D, Baixauli F, Villarroya-Beltri C, et al. Priming of dendritic cells by DNA-containing extracellular vesicles from activated T cells through antigen-driven contacts. *Nat Commun*, 2018, 9 (1): 2658. doi:10.1038/s41467-018-05077-9.
- [40] Sisquella X, Ofir-Birin Y, Pimentel MA, et al. Malaria parasite DNA-harboring vesicles activate cytosolic immune sensors. *Nat Commun*, 2017, 8 (1): 1985. doi:10.1038/s41467-017-02083-1.
- [41] Li Y, Zhao R, Cheng K, et al. Bacterial Outer Membrane Vesicles Presenting Programmed Death 1 for Improved Cancer Immunotherapy via Immune Activation and Checkpoint Inhibition. *ACS Nano*, 2020, 14(12): 16698-16711. doi:10.1021/acsnano.0c03776.

(收稿日期:2023-03-02;网络出版日期:2023-05-29)

(本文编辑:郭萌)