

DOI:10.13350/j.cjpb.220609

• 论著 •

具核梭杆菌外膜囊泡蛋白组分和抗原性分析及对宿主细胞毒性研究

丁美琪, 李依秋, 张革*

(中山大学药学院微生物与生化药学实验室, 广东广州 511400)

【摘要】 目的 研究具核梭杆菌(*Fusobacterium nucleatum*, Fn)外膜囊泡(Outer membrane vesicle, OMV)蛋白质组学特征及其对宿主细胞的毒性作用。**方法** 使用梯度离心法从Fn的培养上清液中分离纯化出OMV(Fn-OMV),通过中文名称(Nano-LC/MS/MS)分析鉴定Fn-OMV携带的蛋白质;利用GO数据库进行分类,并通过KEGG注释通路进行分类和分析。通过流式细胞术检测Fn-OMV处理人白血病T细胞Jurkat细胞和小鼠巨噬细胞RAW264.7后细胞凋亡的情况,同时使用Fn活菌作为对照;通过细胞增殖毒性实验(CCK8)探究Fn-OMV对人结肠癌RKO细胞增殖的影响。**结果** 通过革兰染色观察确定Fn形态,粒径分析所提取的Fn-OMV平均大小为126.5 nm,质量良好。Nano-LC/MS/MS结果表明Fn-OMV共携带509个蛋白,占Fn全菌蛋白的25%,其中主要的细菌外膜蛋白有10个,均具有良好的抗原性和多个抗原决定簇。通过GO分类发现Fn-OMV携带大量分子功能相关蛋白,经KEGG注释通路分析包含蛋白数目最多的前10个通路为:抗生素合成,碳代谢,核糖体,氨基酸合成,嘌呤代谢,氨酰 tRNA 合成,丁酸盐代谢,糖酵解/糖异生,丙酮酸代谢,氨基酸和核苷酸糖代谢。流式细胞术结果表明Fn活菌可促进Jurkat细胞和RAW264.7细胞凋亡,但Fn-OMV对二者凋亡无显著作用。Fn-OMV对RKO细胞的增殖无显著作用。**结论** Fn-OMV携带的细菌外膜蛋白有10个,均具有良好的抗原性和多个抗原决定簇,与Fn相比,其对细胞凋亡和增殖无显著作用。因此,本研究对基于OMV的Fn疫苗设计提供了基础信息,具有潜在的应用价值。

【关键词】 具核梭杆菌;外膜囊泡;蛋白质组学研究

【中图分类号】 R378.2

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2022)06-0665-06

[*Journal of Pathogen Biology*. 2022 Jun.;17(6):665-670.]

Protein composition and antigenicity analysis of outer membrane vesicles of *Fusobacterium nucleatum* and study on host cytotoxicity

DING Mei-qi, LI Yi-qiu, ZHANG Ge (*Laboratory of Microbiology and Biochemical Pharmacy, School of Pharmacy, Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong, China, 511400*) *

【Abstract】 Objective To study the proteomic characteristics of *Fusobacterium nucleatum* (Fn) outer membrane vesicle (OMV) and to investigate its role in host cells. **Methods** OMV were isolated and purified from the culture supernatant of Fn by gradient centrifugation. Proteins carried by Fn-OMV were identified by Nano-LC/MS/MS analysis. The GO database was used for classification, and KEGG annotated pathways were classified and analyzed. The apoptosis effect of Fn-OMV on Jurkat and RAW264.7 cells was examined by flow cytometry analysis. Live Fn was used as control. RKO cells proliferation was determined by CCK8 assay after been treated with Fn-OMV. **Results** The morphology of Fn was confirmed by Gram staining. the mean particle size of Fn-OMV was 126.5 nm, and it exhibited good quality. Nano-LC/MS/MS analysis identified Fn-OMV carrying 509 proteins, accounting for 25% of the total bacterial protein of Fn, among which there are 10 main bacterial outer membrane proteins, and the outer membrane proteins carried have good antigenicity and many antigenic determinants. Using GO classification, it was found that Fn-OMV carries a large number of proteins related to molecular functions. The KEGG annotation pathway analysis showed that the top ten pathways with the largest number of proteins were: antibiotic synthesis; carbon metabolism; ribosome; amino acid synthesis; purine metabolism; aminoacyl tRNA synthesis; Butyrate metabolism; glycolysis/gluconeogenesis; pyruvate metabolism; amino acid and nucleotide sugar metabolism. Flow cytometry showed that Live-Fn could promote the apoptosis of Jurkat cells and RAW264.7 cells, but Fn-OMV had no apoptosis effect on these cells. Besides, Fn-OMV did not effect RKO cells proliferation. **Conclusion** There are 10 outer membrane proteins of bacteria carried by Fn-OMV, all of them have good antigenicity and multiple antigenic determinants. Compared with Live-Fn, Fn-OMV did not effect cells apoptosis and prolifer-

* **【通讯作者】** 张革, E-mail: zhangge@mail.sysu.edu.cn

【作者简介】 丁美琪(1998-), 女, 辽宁鞍山人, 硕士。研究方向: 微生物与生化药学。E-mail: dingmq@mail2.sysu.edu.cn

ation. Therefore, this study provides basis information for the design of Fn-OMV vaccine which has potential application value.

【Key words】 *Fusobacterium nucleatum*; outer membrane vesicles; proteomics research

具核梭杆菌(*Fusobacterium nucleatum*, Fn)是一种革兰阴性的专性厌氧菌。Fn作为一种具有促炎作用的侵袭性和粘附性厌氧细菌,主要富集于结直肠癌患者的癌组织和肠道中,与CRC的发生发展密切相关^[1]。虽然Fn在结肠癌中的作用机制尚未完全明确,但研究发现Fn可通过Fap2、FadA、AidA等多种毒力因子发挥作用,是重要的结肠癌致癌和促癌性细菌^[2]。

外膜囊泡(Outer membrane vesicle, OMV)是从革兰阴性菌的外膜释放到细胞外环境中的球形双层(100~300 nm)小泡^[3]。在革兰阴性菌中,关于OMV的蛋白分泌途径研究已经趋于成熟,它定义了一种独立于I-VI型分泌系统之外的独特类型。革兰阴性菌细胞壁的动态特征是其不断地从细胞表面排出OMV。越来越多的证据表明,数以百计的蛋白质、脂类和遗传物质可能通过OMV分泌^[4-7]。

OMV具有理想的疫苗应用特性,如含有母体细菌的大部分生物成分,但没有复制或感染能力;高度稳定和高度免疫原性;能与上皮细胞和免疫细胞以含量依赖的方式相互作用。2013年,欧洲药物管理局(EMA)和美国食品药品监督管理局(FDA)批准了一种含有OMV成分的疫苗,用于接种抗脑膜炎球菌B组感染。该纳米结构能够通过抗原呈递细胞摄取OMV,并促进淋巴系统的高效转运,因此未来极有可能开发出类似的基于OMV的疫苗来对抗Fn感染。虽然Fn的OMV已被证明含有多种抗原元素,但对Fn产生的OMV中所发现的所有成分的全面分析尚未完成,以及其对人体的作用也还不十分清楚。本实验提取Fn的OMV进行蛋白质组学分析,并分析Fn-OMV对宿主细胞凋亡和增殖的影响。

材料与方法

1 材料

1.1 细胞和细菌 Jurkat细胞和RAW264.7细胞由本实验室保存。具核梭杆菌Fn ATCC 25586标准株购自中国普通微生物菌种保藏中心,由本实验室复苏冻存。

1.2 主要试剂 BHI液体培养基购自英国Oxoid公司;DMEM细胞培养基及FBS胎牛血清购自美国Gibco公司;PVDF超滤膜购自美国Bio-Rad公司;Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒购自沈阳万类生物科技有限公司;细胞消化胰酶购自碧云天生物公司;CCK8购自广州旭研生物科技有限公司。

1.3 主要仪器 透射电子显微镜为美国FET公司产品;倒置显微镜ECLIPSE TS100为日本Nikon公司产品;蛋白质谱仪Nano LC-Q Exactive Plus和酶标仪为美国Thermo产品;离心机为上海雄发仪器有限公司产品;马尔文粒径仪Zetasizer Nano Series 90为英国Malvern产品;流式细胞仪为美国guava easyCyte产品。

2 方法

2.1 细胞培养 Jurkat细胞和RAW264.7细胞用含10% FBS的DMEM培养基于37℃、5%CO₂的恒温细胞培养箱中培养。

2.2 OMV的提取 取Fn菌液体培养基以8 000 g离心30 min,弃沉淀,上清液再次以8 000 g离心30 min,收集上清液,经滤膜过滤后于4℃以104 958 g离心70 min,弃上清,沉淀用1 mL已滤PBS进行吹打重悬,收集合并后继续加液离心。所有上清液均离心结束后用1 mL PBS收集沉淀到一个离心管,再次离心,弃上清,沉淀用200 μL PBS重悬,分装EP管,−80℃保存。

2.3 蛋白质谱检测样品前处理

2.3.1 丙酮沉淀酶解 取300 μg蛋白样品,用50 mmol/L NH₄HCO₃稀释至100 μL,加入4倍体积的预冷丙酮沉淀过夜;4℃、15 000 g离心30 min,弃上清;用500 μL冷丙酮洗一次,同上离心10 min;用500 μL冷70%乙醇洗一次,同法离心;用500 μL冷丙酮洗一次,同法离心;将沉淀冻干,用50 μL UA buffer重悬,涡旋振荡至溶解。DTT:加50 mmol/L DTT 2 μL(DTT终浓度2 mmol/L),30℃水浴放置1.5 h。IAA:加50 mmol/L IAA 13 μL(IAA终浓度10 mmol/L)暗处放置40 min。用50 mmol/L NH₄HCO₃稀释至600 μL(尿素终浓度约为0.7 mol/L),加入Trypsin(约1:80, w/w),37℃酶解4 h(Trypsin用10 mmol/L醋酸重悬,建议浓度0.25 μg/μL);再加入Trypsin,37℃酶解过夜;用10% TFA酸化至终浓度0.4%终止反应,4℃保存。

2.3.2 C18 Stage Tip 肽段脱盐 取1.5 mL离心管,将管盖挖个小洞,刚好能卡住C18 tips上方的圆形端口,用于接流出液。活化C18 tips:加入3×200 μL 100% MeOH,3 000 g离心10 min,弃流出液;condition:加入3×200 μL 80% ACN/0.1% FA,4 000 g离心8 min,弃流出液;平衡C18 tips:加入3×200 μL 0.1% TFA,6 000 g离心8 min,弃流出液;上样:取5 μg样品溶于200 μL 0.1% TFA中,重复上样,6 000

g 离心 10 min,弃流出液;洗脱盐:加入 1×200 μL 0.1% TFA,6 000 g 离心 12 min,弃流出液;洗脱 TFA:加入 2×200 μL 0.1% FA,6 000 g 离心 10 min,弃流出液;收集样品:加入 2×180 μL 80% ACN/ 0.1%FA,6 000 g 离心约 10 min,收集合并流出液,更换干净的 80% ACN/ 0.1% FA 润洗过的离心管;样品旋干 8 h。

2.4 流式凋亡试验 取生长状态良好的 Jurkat 细胞和 RAW264.7 细胞,以每孔 2×10⁵ 个细胞种于六孔板中,37 ℃细胞培养箱培养 24 h;取出六孔板换液,按 Fn 活菌浓度 MOI 1:10 和 Fn-OMV 浓度 10 μg/mL 加到对应孔,37 ℃细胞培养箱培养 24 h;取出六孔板,用 1.5 ml EP 管收集细胞,离心(1 000 r/min),去除上清液,用 PBS 重悬洗涤细胞两次获得细胞沉淀,每管加入 500 μL Binding buffer 重悬细胞;避光下每管加入 5 μL Annexin V-FITC,混匀;加入 10 μL Propidium Iodide,混匀后室温放置 15 min,上机检测。流式细胞仪选择 488 nm 激发波长,530 nm 发射波长呈绿色荧光(Annexin V-FITC);选择 488 nm 激发波长,630 nm 发射波长呈红色荧光(Propidium Iodide)。获得凋亡数据,每组细胞收集不少于 10 000 个。使用 FlowJo 7.6 处理流式数据。

结 果

1 OMV 的鉴定

Fn 经培养鉴定,形态正确(图 1)。通过差速离心法从大量的 Fn 培养上清液中提取 OMV,采用动态光散射对其进行验证,平均大小为 126.5 nm,质量良好(图 2)。

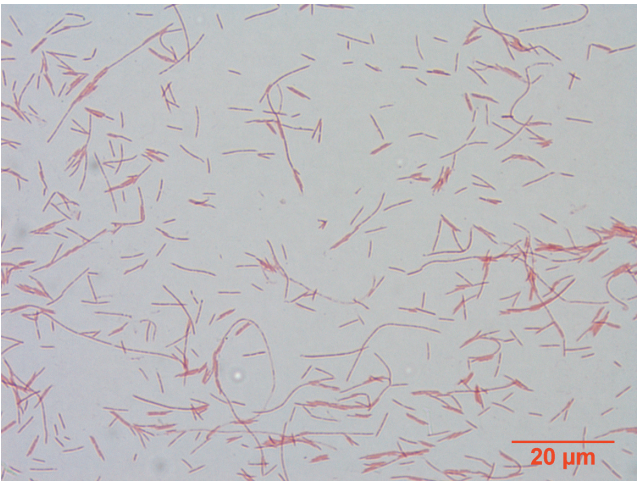


图 1 具核梭杆菌形态(50×)
Fig. 1 Morphological identification of *F. nucleatum*

2 Fn-OMV 蛋白质谱生物信息学分析

2.1 蛋白质定性分析 定性得到 509 个蛋白,占 Fn

全菌蛋白的 25%。其中主要外膜蛋白有 10 个。抗原性分析显示,这 10 个蛋白均具有良好的抗原性并具有多个抗原决定簇(表 1)。

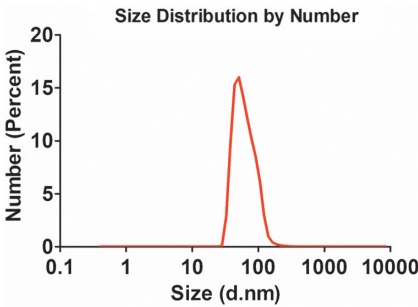
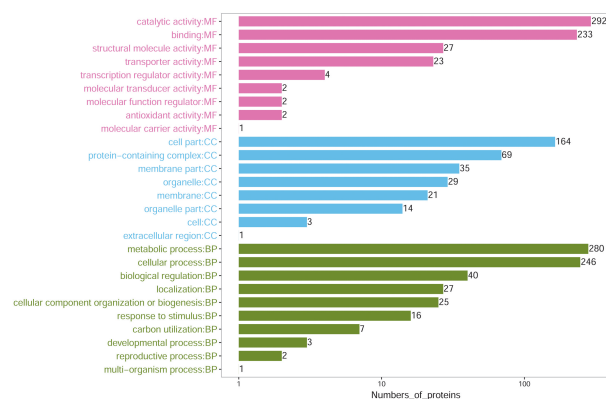


图 2 OMV 的粒径
Fig. 2 OMV particle size measurement results

表 1 Fn-OMV 所含 10 个外膜蛋白的抗原性分析
Table 1 Antigenicity analysis of 10 outer membrane proteins contained in Fn-OMV

Accession	Description	MW [ku]	Average antigenic propensity	Antigenic determinants
Q8RHV1	FN1893	144.5	0.9939	40
Q8RHT4	FN1911	76.2	1.0054	27
Q8RHY1	FN1859	42.3	1.0177	13
Q8RE60	FN1265	20.7	1.0129	7
Q8RIP5	FN1526	221.5	0.9999	72
Q8RET7	FN1003	30.5	1.0074	7
Q8RE53	FN1273	47.0	1.0166	18
Q8RGN7	FN0254	175.9	0.9956	55
Q8RIM1	FN1554	167.8	0.9918	50
Q8RG05	FN0517	50.9	1.0150	13

2.2 GO 分类 GO (Gene Ontology, <http://www.geneontology.org/>)是基因本体论联合会建立的将全世界所有与基因有关的研究结果进行分类汇总的综合数据库,其目的在于标准化不同数据库中关于基因和基因产物的生物学术语,对基因和蛋白功能进行统一的限定和描述。利用 GO 数据库,可以将基因按照其参与的生物过程(Biological Process, BP)、细胞组分(Cellular Component, CC),分子功能(Molecular Function, MF)三个方面进行分类注释。在这三个大分支下面又分很多小层(level),level 级别数字越大,功能越细致。最顶层的三大分支视为 level1,之后的分级依次为 level2,level3 和 level4。因此 GO 注释有助于了解基因背后所代表的生物学意义。通过 GO 分类图可以大致了解某个物种的全部基因产物的分类情况。本实验对鉴定得到的蛋白进行 GO 分类,得到了不同功能蛋白所占比例(图 3,图 4)。参与分子功能的蛋白主要作用是催化活性和整合作用,作为细胞组分的蛋白主要用作细胞组分与含蛋白的复合体,参与生物过程的蛋白主要参与代谢过程以及细胞进程。

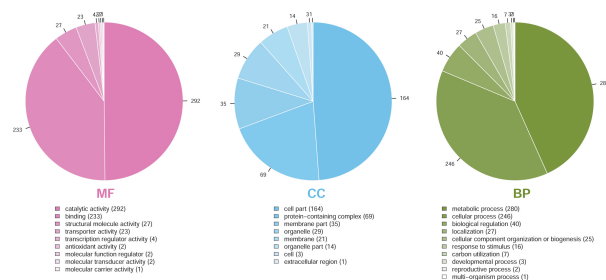


注:图中每一个柱子表示一个GO的二级分类,柱条越高表示此二级分类的蛋白越多;纵坐标表示GO的二级分类术语,术语前面的大写字母为三大类的缩写,代表其从属于何大类;柱子分别用不同的颜色标注,其中绿色代表生物过程,蓝色代表细胞组分,红色代表分子功能。

图3 GO二级分类统计图

Note: Each column in the figure represents the secondary classification of a GO. The higher the bar, the more proteins in this secondary classification; the ordinate represents the secondary classification term of GO, and the capital letters in front of the term are the abbreviations of the three categories. , Represents which category it belongs to; the columns are marked with different colors, where green represents biological processes, blue represents cell components, and red represents molecular functions.

Fig. 3 GO secondary classification statistics chart



注:图中每个饼图中的不同颜色代表了不同的GO Term,其面积表示该GO Term中蛋白所占的相对比例;此图包含3个饼图,从左至右共3排,分别表示GO的三大分支,即MF分子功能(粉色)、CC细胞组分(蓝色)、BP生物过程(绿色);每排下面的图注为对应的GO分类术语。

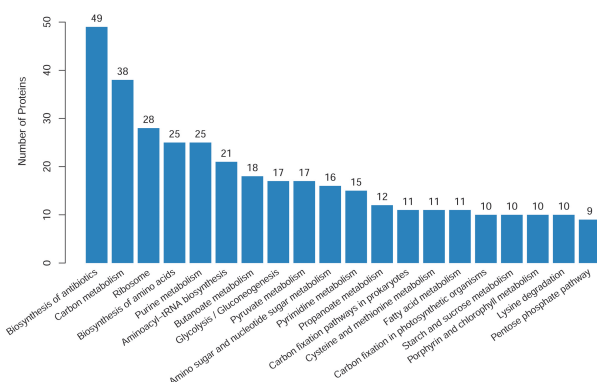
图4 GO二级分类饼图

Note: The different colors in each pie chart in the figure represent different GO Term, and its area represents the relative proportion of protein in the GO Term; this figure contains 3 pie charts, 3 rows from left to right, respectively represent the three branches of GO, namely MF molecular function, pink, CC cell components, blue, BP biological process, green; the legend below each row is the corresponding GO classification term.

Fig. 4 GO secondary classification pie chart

2.3 KEGG注释通路分析 KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes,京都基因和基因组百科全书, <http://www.genome.jp/kegg/>)是基因组破译方面的公共数据库。该数据库是系统分析基因功能、联系基因组信息和功能信息的大型知识库,其中的基因组信息主要从NCBI等数据库中获得,包括完整和部分测序的基因组序列,存储于KEGG GENES数据库中;更高级的功能信息包括图形化的细胞过程如代

谢、膜转运、信号传递、细胞周期等,还包括同系保守的子通路等信息,存储于KEGG PATHWAY数据库中。此外,关于化学物质、酶分子、酶化反应等相关的信息存储于KEGG LIGAND数据库中。图5按从高到低列出了包含蛋白较多的通路,可以根据研究目的的不同选择排序靠前的通路进行分析。目前包含蛋白数目最多的前十个通路为:抗生素合成;碳代谢;核糖体;氨基酸合成;嘌呤代谢;氨酰 tRNA 合成;丁酸盐代谢;糖酵解/糖异生;丙酮酸代谢;氨基酸和核苷酸糖代谢。对蛋白做KO注释后,可根据参与的KEGG代谢通路进行层级分类(图6)。



注:从左至右按照包含蛋白数目从高到低依次排列,柱子越高表明该生物学通路在所测样本中越活跃。

图5 包含蛋白数目最多的前20个通路

Note: From left to right, the number of proteins contained is arranged from high to low. The higher the column, the more active the biological pathway is in the tested sample.

Fig. 5 The top 20 pathways with the largest number of proteins

3 Fn-OMV对Jurkat和RAW细胞凋亡的影响

接下来通过流式细胞仪使用Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒测量Fn-OMV(10 μg/ml, 24 h)对Jurkat细胞和RAW264.7细胞的凋亡影响效果。与空白对照组和Fn活菌对照组相比,Fn可明显促进Jurkat细胞与RAW264.7细胞的凋亡,但是Fn-OMV对Jurkat细胞和RAW264.7细胞的凋亡无影响(图7)。

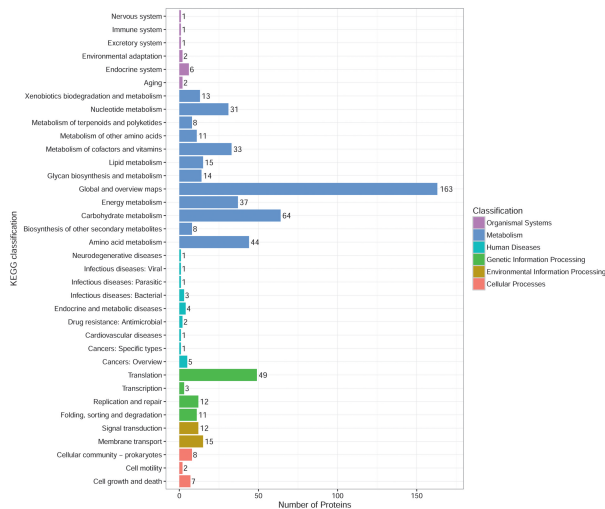
4 Fn-OMV对RKO细胞增殖的影响

为分析Fn-OMV对RKO细胞的增殖的影响进行了CCK8试验。与空白对照和大肠埃希菌对照相比,高浓度或者低浓度Fn-OMV对RKO细胞的增殖均无显著影响(图8A),显微镜下观察也无明显形态或者增殖速度区别(图8B)。

讨论

OMV是从革兰阴性菌的外膜释放到细胞外环境中的双层膜囊球状结构的毒力因子,OMV在革兰阴性菌的生长、与周围环境交流等过程中起重要作用,多种细菌的OMV均能通过引起不同程度的免疫应答使

宿主获得相应的免疫保护。因此,OMV 成为新一代生物医药载体和亚单位疫苗研究的候选靶标。



注:纵坐标为 KEGG 代谢通路的名称,横坐标为注释到该通路下的蛋白个数。不用颜色的通路表示其所属不同大类。根据 KEGG 层级(KEGG BRITE)数据库,将 KEGG 数据库划分为 4 个层级(brite),分别用 A、B、C 和 D 表示,层级依次递增。其中 brite A 包括 6 个分支:细胞过程(Cellular Processes),环境信息处理(Environmental Information Processing),遗传信息处理(Genetic Information Processing),人类疾病(Human Diseases),代谢(Metabolism),有机系统(Organismal Systems),在图中对应不同的颜色,见右侧图例;brite B 属于 brite A 中的小分支,在图中对应纵坐标;brite C 为某一个具体的代谢通路;brite D 为通路中的基因产物,本研究中为某一个蛋白。

图 6 KEGG 注释统计

Note: The ordinate is the name of the KEGG metabolic pathway, and the abscissa is the number of proteins annotated to the pathway. Paths that do not use color indicate different categories. According to the KEGG level (KEGG BRITE) database, the KEGG database is divided into 4 levels (brite), which are represented by A, B, C, and D, and the levels increase sequentially. Among them, brite A includes 6 branches: Cellular Processes, Environmental Information Processing, Genetic Information Processing, Human Diseases, Metabolism, Organic Systems, corresponding to different colors in the figure, see the legend on the right; brite B belongs to a small branch in brite A, corresponding to the ordinate in the figure; brite C is a specific metabolic pathway; brite D is the gene product in the pathway. In this study, it is a certain protein.

Fig. 6 KEGG annotation statistics

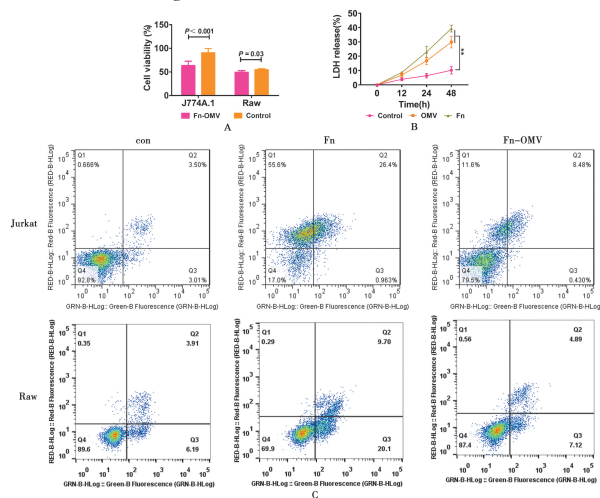


图 7 Fn-OMV 对细胞凋亡的影响

Fig. 7 Effects of Fn-OMV on apoptosis

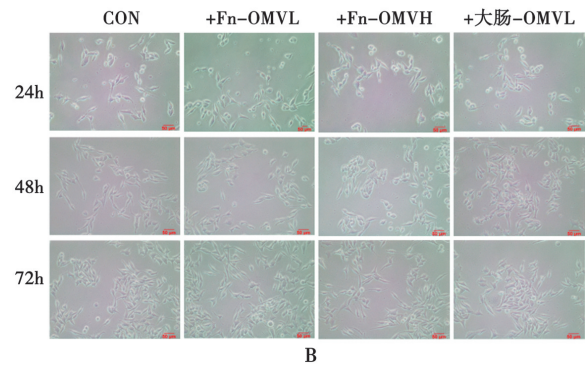
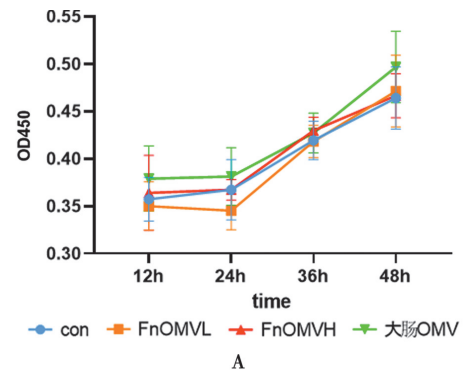


图 8 Fn-OMV 对 RKO 细胞增殖的影响

Fig. 8 Fn-OMV has no effect on RKO cell proliferation

本实验从 Fn 的液体培养基的上清液中通过超速离心法提取 OMV,经动态光散射(DLS)鉴定其平均直径为 126.5 nm。本实验的 OMV 蛋白组经重复实验质谱分析,鉴定出 509 个蛋白,占全菌蛋白的 25%。其中主要的细菌外膜蛋白有 10 个,并且所携带的外膜蛋白有良好的抗原性和多个抗原决定簇。对 509 个蛋白进行 GO 功能注释,并且进一步进行 KEGG 注释通路分析,包含蛋白数目最多的前十个通路为:抗生素合成;碳代谢;核糖体;氨基酸合成;嘌呤代谢;氨酰 tRNA 合成;丁酸盐代谢;糖酵解/糖异生;丙酮酸代谢;氨基酸和核苷酸糖代谢。本研究中检测到的 Fn 的 OMV 中膜蛋白可能来自于由外膜层和内膜层组成的双膜泡^[8-10]。尽管 OMV 所包含的蛋白种类繁多,但外膜蛋白似乎是 OMV 所携带的主要类别。流式细胞分析表明 Fn 可促进 Jurkat 和 RAW264.7 细胞凋亡,但是 Fn-OMV 对 Jurkat 和 RAW264.7 细胞凋亡无显著影响,Fn-OMV 对 RKO 细胞的增殖也无显著影响。

V 型分泌又称自转运体分泌,在这种依赖于 sec 的分泌系统中无净能量消耗^[11]。在 Fn 的 OMV 内可重复鉴定的蛋白中,有 6 个自转运蛋白因其多样性而被识别为主要成分,占总蛋白载量的 31%~51%^[12]。自转运蛋白是一类结构特殊、能通过细菌的细胞膜系统,并最终定位到细菌表面的外膜蛋白(或分泌蛋白)的总称。自转运蛋白广泛存在于革兰阴性菌中,并作为细菌的毒力因子参与细菌的黏附、聚集、侵染、生物

膜形成、血清抗性和细菌毒性等生理过程。自转运蛋白由3个主要结构域组成:N-末端有一段能与 sec 分泌子(sec translocon)相互作用的信号肽,中间是承担自转运蛋白生理功能的乘客区域,C-末端是被称作转运单元(translocation unit, TU)的结构域^[13-14]。大多数鉴定的自转运蛋白是已知的或预测的毒性因子;自身转运蛋白乘客区域的多样性表现出多种与病毒相关的功能,包括粘附和细胞毒素^[15]。例如,Fn 的自身转运蛋白 Fap2 参与多种发病途径,包括与结直肠癌细胞结合,诱导淋巴细胞凋亡,与 Ig 和 ITIM domain (TIGIT)的 T 细胞免疫受体相互作用,促进免疫逃避^[16-17]。自转运蛋白的富集表明,Fn 的 OMV 可能在组织定植和侵袭中发挥重要作用。基因修饰的自转运蛋白已被开发为平台,以暴露 OMV 表面的多种多肽作为抗原,并探索其作为疫苗的潜在用途^[18]。携带已知抗原自身转运体抗原域和表位的 OMV 可能被证明是诱导宿主有效免疫反应的有力工具。

OMV 的大小范围使其成为囊泡转移到淋巴结的理想选择,在那里它们很容易被 B 细胞识别。了解这些成分将为疫苗设计和免疫反应研究提供必要的知识。据预测,另外两种已鉴定的细胞表面蛋白含有抗原域和表型的关键细菌片段,在引发 B 细胞活化方面非常有效,从而刺激一种较强的保护性体液免疫反应。来自 Fn 的天然分泌的 OMV 携带大量的自体转运蛋白。因此,利用这些已经装载了高抗原病原体衍生蛋白的 OMV 载体,可能有助于开发和表达大量重组结构,从而获得更好的优化疫苗。像 Fn 这种病原体的 OMV 可以被开发用于高效的生产和分子设计的“现成”疫苗。或者,OMV 可以被用作一个或几个重组构建的载体,这些重组构建的载体被证明具有高抗原性,比如用重组 Fn-AhpC 蛋白免疫能够诱导强大的体液免疫力,并能抑制小鼠肠道中的 Fn 负荷,具有高滴度的抗 AhpC 抗体的血清能够在体外抑制 Fn 生长^[19], Fn-OMV 可作为 AhpC 抗体的载体开发多价亚单位疫苗。未来的研究可以集中于 Fn 的 OMV 携带的假定毒力因子的识别和验证,并探讨这些因子在设计针对 Fn 的疫苗和预防结肠癌方面的潜力。综上所述,来自 Fn 的非复制 OMV 由于所具有的毒力因子抗原性,所以具有很大的开发潜力用于研制有效的疫苗来对抗 CRC。

【参考文献】

- [1] Hashemi GN, Heidarzadeh S, Jahangiri S, et al. *Fusobacterium nucleatum* and colorectal cancer: A mechanistic overview [J]. J Cell Physiol, 2019, 234(3): 2337-2344.
- [2] Guo SH, Chen J, Chen FF, et al. Exosomes derived from *Fusobacterium nucleatum* infected colorectal cancer cells facilitate tumor metastasis by selectively carrying miR-1246/92b-3p/27a-3p and CXCL16 [J]. Gut, 2021, 70: 1507-1519.
- [3] Masanori T, Nobuhiko N, Leo E. Types and origins of bacterial membrane vesicles [J]. Nat Rev Microbiol, 2019, 17(1): 13-24.
- [4] Han EC, Choi SY, Lee YK, et al. Extracellular RNAs in periodontopathogenic outer membrane vesicles promote TNF- α production in human macrophages and cross the blood-brain barrier in mice [J]. FASEB J, 2019, 33(12): 13412-13422.
- [5] Choi MS, Ze EY, Park JY, et al. *Helicobacter pylori*-derived outer membrane vesicles stimulate interleukin 8 secretion through nuclear factor kappa B activation [J]. Kor J Intern Med, 2021, 36(4): 854-867.
- [6] Mariana GS, Evan JP, Mario FF, et al. Bacterial outer membrane vesicles: From discovery to applications [J]. Annu Rev Microbiol, 2021(75): 609-630.
- [7] Subendu S. Release mechanisms and molecular interactions of *Pseudomonas aeruginosa* extracellular DNA [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2020, 104(15): 6549-6564.
- [8] Carla PC, Lidia D, Carmen L, et al. Outer-inner membrane vesicles naturally secreted by gram-negative pathogenic bacteria [J]. PLoS One, 2015, 10(1): e0116896.
- [9] Simon D, Wouter VP, Jolien V, et al. Membrane vesicle secretion and prophage induction in multidrug-resistant *Stenotrophomonas maltophilia* in response to ciprofloxacin stress [J]. Environ Microbiol, 2017, 19(10): 3930-3937.
- [10] Carla PC, Ornella C, Lidia D, et al. New type of outer membrane vesicle produced by the Gram-negative bacterium *Shewanella vesiculosa* M7T: implications for DNA content [J]. Appl Environ Microbiol, 2013, 79(6): 1874-1881.
- [11] Ian RH, Fernando NG, Mickael D, et al. Type V protein secretion pathway: the autotransporter story [J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2004, 68(4): 692-744.
- [12] Liu JJ, Hsieh CL, Ozkan G, et al. Proteomic characterization of outer membrane vesicles from gut mucosa-derived fusobacterium nucleatum [J]. J Proteomics, 2019(195): 125-137.
- [13] Timothy JW, Jai JT, Glen CU, et al. Autotransporter proteins: novel targets at the bacterial cell surface [J]. FEMS Microbiol Lett, 2007, 274(2): 163-172.
- [14] Peter VU, Sadeeq UR, Wouter SP, et al. Type V secretion: from biogenesis to biotechnology [J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1843(8): 1592-611.
- [15] Stefan P, Amy T, Derek S, et al. Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the Dictyostelium host model system [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(5): 1528-1533.
- [16] Christopher WK, Ma XY, Avina P, et al. *Fusobacterium nucleatum* outer membrane proteins Fap2 and RadD induce cell death in human lymphocytes [J]. Infect Immun, 2010, 78(11): 4773-4778.
- [17] Copenhagen-Glazer S, Sol A, Abed J, et al. Fap2 of *Fusobacterium nucleatum* is a galactose-inhibitable adhesin involved in co-aggregation, cell adhesion, and preterm birth [J]. Infect Immun, 2015, 83(3): 1104-1113.
- [18] Maria HD, Tristan F, Zora S, et al. Decoration of outer membrane vesicles with multiple antigens by using an autotransporter approach [J]. Appl Environ Microbiol, 2014, 80(18): 5854-5865.
- [19] Guo SH, Wang HF, Nian ZG, et al. Immunization with alkyl hydroperoxide reductase subunit C reduces *Fusobacterium nucleatum* load in the intestinal tract [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 10566.

【收稿日期】 2022-02-14 【修回日期】 2022-05-10