

文章编号 1672-6634(2024)03-0090-09

DOI 10.19728/j.issn1672-6634.2024020003

枯草芽孢杆菌微囊泡的高效分离及其抗炎活性研究

郑丽雪,康秋艳,娄静怡,冯靖涵,范宗强,王 硕,陈 芳

(聊城大学 药学院,山东 聊城 252059)

摘 要 建立枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)微囊泡(Microvesicles, MV_S)的高效分离方法,评估枯草芽孢杆菌微囊泡(BS-MV_S)的抗菌和抗炎活性。通过筛选 *B. subtilis* 2-1 和 *B. subtilis* 579 菌株培养基和培养条件提高 BS-MV_S 的产量;使用超速离心和密度梯度离心对 BS-MV_S 进行纯化,采用滤纸片扩散法检测 BS-MV_S 的体外抑菌活性,筛选抑菌活性较好的 BS-MV_S,通过建立 DSS 诱导的溃疡性结肠炎模型,进行 BS-MV_S 的抗炎活性研究。确定了高产 BS-MV_S 的培养基为添加 0.5% 葡萄糖的 LB 培养基,培养时间为 24 h,提高了 BS-MV_S 分离效率。抗菌活性研究结果表明 1×10^{10} 颗粒数/mL 的 BS₂₋₁-MV_S 和 BS₅₇₉-MV_S 对白色念珠菌的抑菌效率分别为 135%、99.2%,对金黄色葡萄球菌的抑菌效率分别为 90%、62.5%。基于体外抗菌实验结果,对 BS₂₋₁-MV_S 进行体内抗炎活性研究,结果表明 BS₂₋₁-MV_S 可以有效改善 DSS 诱导的溃疡性结肠炎的病症症状,包括小鼠体重、疾病活动指数、结肠长度和组织病变程度等,有较强的抗炎活性。结论:通过优化培养基和培养条件提高 MV_S 的产量,BS₂₋₁-MV_S 对白色念珠菌、金黄色葡萄球菌的抑菌效率均高于 BS₅₇₉-MV_S,且 BS₂₋₁-MV_S 具有较强的抗炎活性,为今后新型高效抗炎药物的开发奠定基础。

关键词 枯草芽孢杆菌;微囊泡;条件优化;抗炎活性

中图分类号 Q935

文献标志码 A

开放科学(资源服务)标识码(OSID)



Study on the Efficient Isolation and Anti-bacterial Activity of *Bacillus Subtilis* Micro-vesicles

ZHENG Lixue, KANG Qiuyan, LOU Jingyi, FENG Jinghan,
FAN Zongqiang, WANG Shuo, CHEN Fang

(School of Pharmacy, Liaocheng University, Liaocheng 252059, China)

Abstract To establish an efficient isolation method of *Bacillus subtilis* Microvesicles (MV_S) and evaluate the antibacterial and anti-inflammatory activities of *B. subtilis* microvesicles (BS-MV_S). Methods: The yield of BS-MV_S was increased by screening *B. subtilis* 2-1 and *B. subtilis* 579 strains in medium and culture conditions. BS-MV_S was purified by ultra-fast centrifugation and density gradient centrifugation, and

收稿日期: 2024-02-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(31672074); 山东省自然科学基金项目(ZR2020MC126); 聊城大学畜牧学学科开放课题(31946220729); 山东省抗体制药协同创新中心开放课题(CIC-AD1816); 聊城大学大学生创新创业计划(CX-CY2023457, CXCY2023458)资助

通信作者: 陈芳, 女, 汉族, 博士, 教授, 研究方向: 微生物与生物制药, E-mail: chenfang20045@163.com.

the in vitro antibacterial activity of BS-MV_S was detected by filter paper diffusion method, and better antibacterial activity was screened. The anti-inflammatory activity of BS-MV_S was studied by establishing a DSS induced ulcerative colitis model. Results: LB medium with 0.5% glucose was selected as the medium for high yield of BS-MV_S. The culture time was 24 h, and the separation efficiency of BS-MV_S was increased. The antibacterial activity of BS₂₋₁-MV_S and BS₅₇₉-MV_S with 1×10^{10} particle number /mL were 135% and 99.2% against *Candida albicans*, and 90% and 62.5% against *Staphylococcus aureus*, respectively. Based on the results of antibacterial experiments in vitro, the anti-inflammatory activity of BS₂₋₁-MV_S in vivo was studied. The results showed that BS₂₋₁-MV_S can effectively improve the symptoms of DSS induced ulcerative colitis in mice, including body weight, disease activity index, colon length and tissue lesion degree, and has strong anti-inflammatory activity. Conclusion: By optimizing the medium and culture conditions, the yield of MV_S was increased. The antibacterial efficiency of BS₂₋₁-MV_S against *C. albicans* and *S. aureus* was higher than that of BS₅₇₉-MV_S, and BS₂₋₁-MV_S had strong anti-inflammatory activity, which laid the foundation for the development of new high-efficiency anti-inflammatory drugs in the future.

Key words *Bacillus subtilis*; microvesicles; condition optimization; anti-inflammatory activity

0 引言

益生菌已被 WHO(世界卫生组织)和 FAO(联合国粮食及农业组织)列为“活体微生物”^[1],近年来,为促进人类健康和福祉,国内外的 OTC 益生菌日益增加,益生菌对肠道微生态的改善作用备受公众关注^[2]。因此,深入发掘益生菌的营养价值,对改善动物肠道健康意义重大。芽孢杆菌是第一个被人类所认识的细菌^[3,4],枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)是一类具有较强抗菌活性的革兰氏阳性细菌。

枯草芽孢杆菌的活性高、稳定性好、作用广,可通过与病原菌争夺养分,分泌抑菌物质来抑制病原菌生长,此外还可以提高机体免疫力、传递营养物质、促进抗炎细胞因子的分泌、调整肠道微生态平衡等^[5-8]。细胞外囊泡(Extracellular vehicles, EVs)也称膜小泡,是一种由细菌和真核细胞分泌的囊泡状小体^[9,10]。根据大小和来源,主要包括外泌体、微囊泡(MV_S)或微颗粒(MPs)以及凋亡小体^[11]。MV_S是由革兰氏阳性菌细胞直接出芽形成,携带母细胞提供的多种成分,如糖蛋白、脂质和核酸,因此同样具备母细胞的一些生物活性^[10]。近年来已有关于枯草芽孢杆菌微囊泡分离的研究,但由于微囊泡分离纯化技术不完善,在相关研究进展中仍进展缓慢。目前最常见且使用范围最广的分离纯化方法是差速离心法,密度梯度离心与差速离心技术的联用能进一步提高微囊泡的纯度^[12]。目前微囊泡抗炎活性的相关研究较为稀少,已有干细胞微囊泡治疗实验性结肠炎的相关研究,但细菌微囊泡的抗炎活性还有待研究。不同菌株微囊泡的产量并不相同^[13],有研究表明当培养基中添加 0.5%葡萄糖时细菌浓度最高^[14],本文为研究提高 BS-MV_S产量的培养条件及其抗炎活性,对不同培养条件下的 *B. subtilis* 2-1、*B. subtilis* 579 进行了微囊泡分离,检测 BS-MV_S对白色念珠菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌的抑菌活性,筛选出抑菌活性较好的微囊泡进行体内抗炎活性研究。

1 材料与方法

1.1 试验材料

细菌菌株:*B. subtilis* 2-1、*B. subtilis* 579、金黄色葡萄球菌(编号:ATCC25923)、白色念珠菌(编号:ATCC10231)、大肠杆菌(编号:ATCC8739)为本实验室保存。

试剂:DSS(上海 麦克林)、苏木素和伊红染色液(杭州 碧云天),TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 试剂盒(武汉 赛培生物科技),其余试剂均为国内生产的分析纯品。

实验动物:ICR 雄性小鼠,平均重量 18~20 g,SPF 级别,采购自济南朋悦实验动物繁殖有限公司,许可证编号 SCXK(鲁)20190003。

1.2 主要仪器设备

数显鼓风干燥箱:上海 博迅;立式双层智能精密型摇床:上海 博迅;超微量分光光度计:美国 赛默飞;低温高速离心机:德国 艾本德;纳米激光粒度仪:英国 马尔文;超速离心机:美国 贝克曼;透射电子显微镜:美国 赛默飞;光学显微镜:日本 奥林巴斯;石蜡包埋机:德国 徕卡;石蜡切片机:德国 徕卡。

1.3 培养基及试剂

LB1 液体培养基:酵母提取物 1 g、胰蛋白胨 2 g、氯化钠 2 g,用 200 mL 蒸馏水溶解,高压灭菌备用。

LB2 液体培养基:酵母提取物 1 g、胰蛋白胨 2 g、氯化钠 2 g、葡萄糖 1 g,溶解于 200 mL 蒸馏水中,高压灭菌备用。

LB3 固体培养基:酵母提取物 1 g、胰蛋白胨 2 g、氯化钠 2 g、琼脂粉 3 g,溶解于 200 mL 蒸馏水溶解,高压灭菌备用。

PDA 固体培养基:马铃薯葡萄糖肉汤 5.2 g、琼脂粉 3 g,于 200 mL 蒸馏水溶解,高压灭菌备用。

0.1 mol · L⁻¹ PBS(PH7.4),高压灭菌,4 °C 保存。

1.4 发酵培养条件优化

无菌条件下分别将 250 μ L *B. subtilis* 2-1 和 579 冻存种子液接种至 50 mL 无菌 LB1 液体培养基中,于摇床(200 r/min)37 °C 震荡培养 12 h 进行活化,然后分别无菌转接 2 mL *B. subtilis* 2-1 和 579 菌液至 200 mL LB1 和 LB2 液体培养基中,在摇床(200 r/min,37 °C)震荡培养 12 h,确定最佳培养基;进而对培养时间(12 h、18 h、24 h、30 h)进行优化确定最佳培养时间,每个处理设置 3 瓶重复。

1.5 BS-MV_s 的分离纯化与鉴定

培养结束后无菌条件下吸取 1 mL 菌液使用超微量分光光度计测定菌液的 OD₆₀₀ 值,记录不同菌株在不同条件不同时间的菌液浓度。将培养液在低温高速离心机中 4 °C、12 000 × g 离心 20 min,上清液经 0.22 μ m 滤膜(密理博,美国)过滤,得到不含杂质的上清滤液,然后采用 100 ku 超滤浓缩系统将上清滤液进行超滤,4 °C、3 000 r/min、10 min,得到 BS-MV_s 的浓缩液。浓缩液于 180 000 × g、4 °C 离心 2 h,弃上清,将沉淀用适量无菌 PBS 重悬,即为 MV_s 粗提液。为了得到纯度更高的 BS-MV_s,采用 OptiPrep 密度梯度离心法纯化 MV_s,在贝克曼库尔特管(12.5 mL)中依次加入 50%(333 μ LMV_s+1667 μ L60%碘克沙醇)、40%、20%、10%的 OptiPrep 层,以形成 F1、F2、F3、F4 四个不连续的梯度,用 SW41Ti 转子在 4 °C、180 000 × g 下离心 16 h,最终获得每个 OptiPrep 密度梯度组分 2 mL。用纳米颗粒跟踪分析仪确定富含 MV_s 的组分,用适量的 PBS 稀释后在 4 °C、180 000 × g 下离心 3 h 使 MV_s 呈球形,最后,将沉淀用适量无菌 PBS 重悬,经 0.22 μ m 的滤膜过滤除菌,分装后存放于-80 °C 冰箱用于后续试验,分离纯化流程如图 1 所示。测定各组 BS-MV_s 的浓度,通过纳米激光粒度仪来测定 BS-MV_s 的粒径大小并通过透射电子显微镜来观察 BS-MV_s 形态特征。使用 BCA 试剂盒(赛默飞 美国)检测 BS-MV_s 蛋白含量(μ g/mL)。

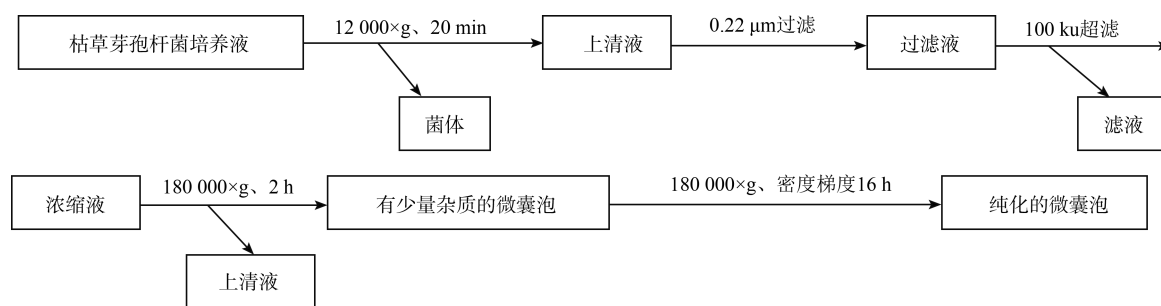


图 1 BS-MV_s 分离纯化流程图

Fig. 1 Production and release of BS-MV_s

1.6 BS-MV_s 的抑菌活性检测

枯草芽孢杆菌可分泌多种抗菌物质发挥其抑菌作用,因此采用滤纸片扩散法检测 BS-MV_s 的抑菌活性,筛选出抑菌活性较高的 BS-MV_s。首先将配制好的 LB 固体培养基、PDA 固体培养基在超净工作台中倒平板,在 LB 平板中分别加入 100 μ L 金黄色葡萄球菌、大肠杆菌的发酵液,在 PDA 平板中加入 100 μ L 白色

念珠菌发酵液,涂布均匀,然后用镊子夹取直径为6 mm的灭菌后的滤纸片置平板上,吸取10 μL BS-MV_S滴加在滤纸片上,以15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的卡那霉素(最小抑菌浓度)作为阳性对照。置于恒温培养箱中培养12 h后测量抑菌圈直径,实验设置三次重复。

$$\rho_{\text{抑菌效率}} = \frac{D_{\text{MVS抑菌圈直径}}}{D_{\text{阳性对照抑菌圈直径}}} \times 100\%。$$

1.7 BS-MVS的抗炎活性检测

1.7.1 微囊泡重悬液制备。将纯化后活性较好的BS-MV_S用0.1 mol $\cdot$ L⁻¹ 无菌PBS稀释为1 $\times$ 10¹⁰ 颗粒数/mL,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.7.2 DSS诱导的溃疡性结肠炎动物模型的建立及实验方案。经过一周的适应性喂养,24只ICR雄性小鼠被随机分成四组,每组6只小鼠。这四组分别是空白对照组(Control)、模型组(DSS)、干预治疗组(DSS+BS-MVS)、阳性药物组(DSS+SASP)。四组小鼠均食用标准饲料,对照组饮用无菌水,其余三组饮用3%的DSS,连续7天,建立急性溃疡性结肠炎模型^[15]。7天内,空白对照组和模型组按10 mL/(kg $\cdot$ d)灌胃无菌PBS,干预治疗组按10 mL/(kg $\cdot$ d)灌胃BS-MVS,阳性药物组给予SASP400 mg/(kg $\cdot$ d)灌胃。饲养期间,每日记录小鼠体重和疾病活动水平(DAI),在给药后第七天进行禁食处理,在12 h后,从小鼠的眼球中取血样。血液经过在4 $^{\circ}\text{C}$ 、3 000 r/min的条件下离心10 min,上清液被冷冻保存在-80 $^{\circ}\text{C}$,以备进行后续的生化分析。取完血液后,对小鼠进行人道安乐死和解剖,收集小鼠的结肠组织。随后,测量结肠的长度,并将一部分组织置于4%多聚甲醛溶液中进行固定处理,另一部分则放入-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存,以备后续组织分析使用。

1.7.3 疾病活动指数(DAI)评估。参照KIM等^[16]的疾病活动指数评估方法,每天检测小鼠体重、粪便和便血情况,每项评分指数有0~4分4个标准,具体评分标准见表1^[16]

表1 疾病活动指数(DAI)评分标准

Table 1 Disease Activity Index (DAI) scoring criteria

体重下降(%)	便血情况	大便性状	评分值/分
$m < 1$	阴性	正常	0
$1 \leq m < 5$	—	—	1
$5 \leq m < 10$	阳性,但无肉眼可见便血	稀软	2
$10 \leq m < 20$	—	—	3
$m \geq 20$	肉眼可见便血	水样便	4

注:“—”表示在上下指标之间。

1.7.4 组织病理学观察。使用4%多聚甲醛液固定的结肠样本,进行梯度乙醇和二甲苯处理,然后经过石蜡包埋,切成4 μm 厚的薄片。对薄片进行HE染色,并在光学显微镜下观察结肠组织的病理变化。

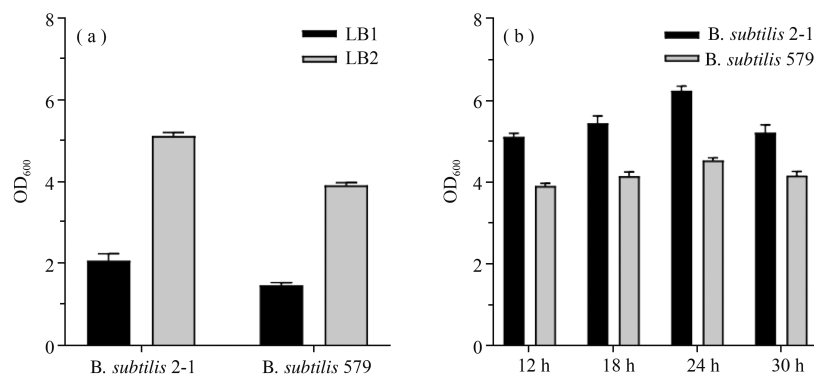


图2 *B. subtilis* 2-1、*B. subtilis* 579在不同培养基和培养时间的OD₆₀₀值(a) *B. subtilis* 2-1、*B. subtilis* 579在LB1、LB2培养12 h后的OD₆₀₀值;(b) *B. subtilis* 2-1、*B. subtilis* 579在LB2中培养12、18、24、30 h后的OD₆₀₀值

Fig.3 OD₆₀₀ values of *B. subtilis* 2-1 and *B. subtilis* 579 in different medium and culture time(a) OD₆₀₀ value of *B. subtilis* 2-1 and *B. subtilis* 579 after 12 h culture of LB1 and LB2; (b) The OD₆₀₀ value of *B. subtilis* 2-1 and *B. subtilis* 579 cultured in LB2 for 12, 18, 24, 30 h

1.7.5 血清炎症因子测定。利用保存在 -80°C 的血清,按照酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒的操作步骤,对炎症因子(如 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6)进行测定。

1.8 数据处理

试验数据采用 Excel 软件整理后,采用 Prism 软件中的单因素方差分析(one-way ANOVA)和 T 检验完成数据差异性分析,以 $P < 0.05$ 作为显著性差异判断标准。

2 结果与分析

2.1 培养条件的优化

震荡培养 12 h 后测定 LB1、LB2 中发酵液的 OD_{600} 值,在图 2(a)中可以发现 LB2 中发酵液的 OD_{600} 值明显高于 LB1,之后又对培养时间进行优化以确定最佳培养时间,由图 2(b)可知在培养 24 h 时发酵液浓度最高,继续延长培养时间发酵液浓度降低,因此确定最佳培养基为添加 0.5% 葡萄糖的 LB 液体培养基,最佳培养时间为 24 h。由图 3 可以发现,不同菌株的 BS-MVS 的产量(颗粒数/mL)不同,*B. subtilis* 2-1 微囊泡的产量略高于 *B. subtilis* 579,在 LB2 培养基中培养 24 h 时微囊泡浓度最高。

2.2 BS-MVS 分离、纯化、鉴定

将经超速离心获得的微囊泡粗体液采用密度梯度离心的方法进行纯化,分别对不同梯度的 BS-MVS 进行浓度测定,计算不同梯度的相对丰度,结果表明 BS-MVS 主要集中在 20%~40% 之间,如图 4(a),所以选择此密度层的 BS-MVS 进行分离纯化。Fig. 3 Concentrations of BS₂₋₁-MV_s and BS₅₇₉-MV_s in LB2 medium at 12、18、24、30 h (particles/mL)

纯化后的 BS-MVS 大小主要集中在 120 nm,且其粒径范围在 50~400 nm。如图 4(b, c),在透射电镜下观察发现,BS-MVS 呈圆形或椭圆形,大小不一,平均直径为 100~150 nm,如图 4(d, e)符合细菌微囊泡的直径范围。采用 BCA 试剂盒对 BS-MVS 进行蛋白定量,结果表明 1×10^{10} 颗粒数/mL 的 BS₂₋₁-MVS 蛋白含量为 12.4 $\mu\text{g/mL}$ 、BS₅₇₉-MVS 的蛋白含量为 8.3 $\mu\text{g/mL}$ 。

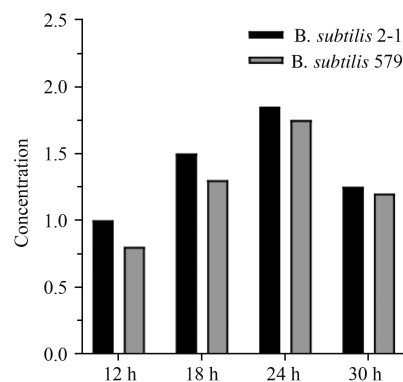


图 3 LB2 培养基中的 BS₂₋₁-MV_s、BS₅₇₉-MV_s 在 12、18、24、30 h 的浓度

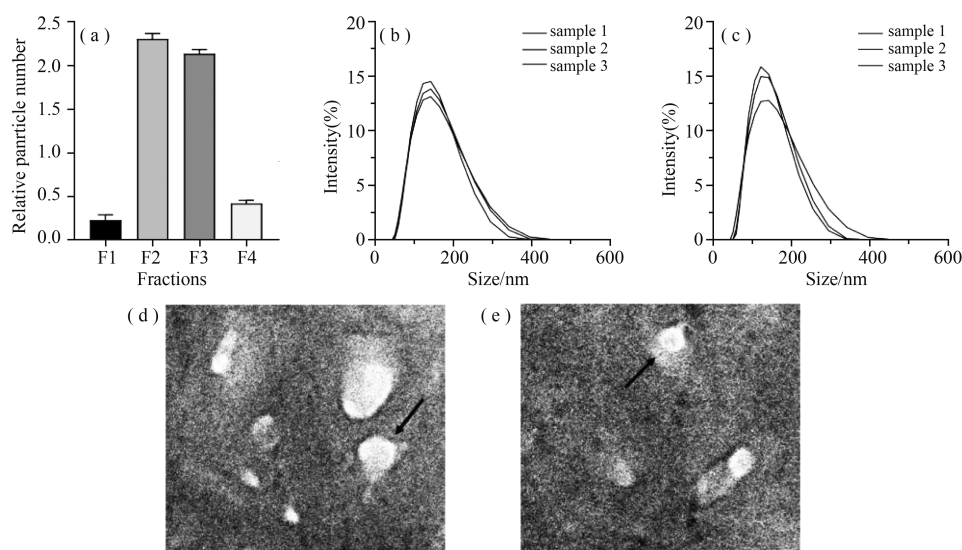
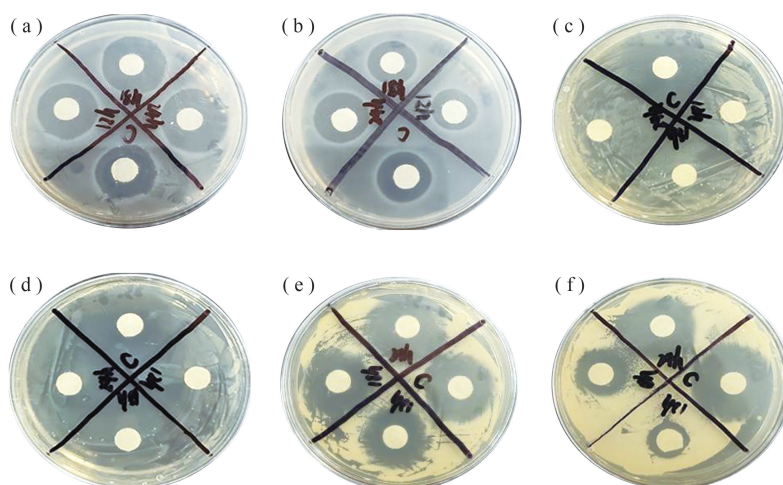


图 4 BS-MV_s 的分离纯化与鉴定 (a) 密度梯度离心后各密度梯度的颗粒相对丰度; (b, c) BS₂₋₁-MV_s、BS₅₇₉-MV_s 的粒径分布; (d, e) 透射电镜检测 BS₂₋₁-MV_s、BS₅₇₉-MV_s 形态,比例尺为 200 nm

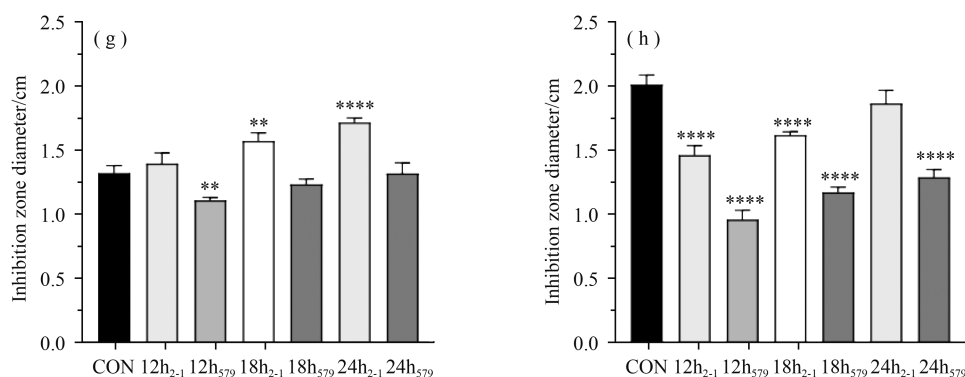
Fig. 4 Isolation, purification and identification of BS-MV_s (a) Density gradient relative abundance of particles at each density gradient after centrifugation; (b, c) Particle size distribution of BS₂₋₁-MV_s and BS₅₇₉-MV_s; (d, e) The morphology of BS₂₋₁-MV_s and BS₅₇₉-MV_s were detected by transmission electron microscopy, bar=200 nm

2.3 BS-MVS 的抑菌作用

为了探究 BS-MVS 的抑菌活性,采用滤纸片扩散法对微囊泡进行抗菌活性检测,实验结果[图 5(a~f)]表明 BS₂₋₁-MVS、BS₅₇₉-MVS 均对大肠杆菌没有抑制作用,对白色念珠菌、金黄色葡萄球菌具有较强的抑制作用,根据图 5(g, h)中 BS₂₋₁-MV_S 和 BS₅₇₉-MV_S 对白色念珠菌和金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径计算出 BS₂₋₁-MV_S 和 BS₅₇₉-MV_S 对白色念珠菌的抑菌效率分别为 135%、99.2%,对金黄色葡萄球菌的抑菌效率分别为 90%、62.5%,并且在培养 24 h 后分离的微囊泡形成的抑菌圈直径最大。结果显示 BS₂₋₁-MV_S 对白色念珠菌和金黄色葡萄球菌的抑制作用均高于 BS₅₇₉-MV_S,因此对 BS₂₋₁-MV_S 进行后续抗炎活性研究。



注:12 h:于培养 12 h 发酵液中分离的 MV_S; 18 h:于培养 18 h 发酵液中分离的 MV_S; 24 h:于培养 24 h 发酵液中分离的 MV_S; (c) 15 μg/mL 的卡那霉素。



注:(g) CON:在以白色念珠菌为病原菌的培养基中 15 μg/mL 的卡那霉素形成的抑菌圈直径;(h) CON:在以金黄色葡萄球菌为病原菌的培养基中 15 μg/mL 的卡那霉素形成的抑菌圈直径。

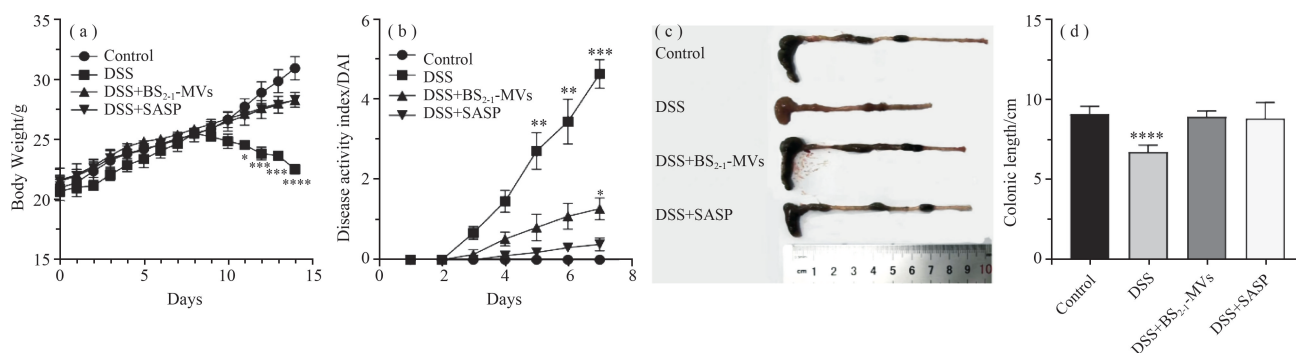
图 5 BS-MV_S 的抗菌活性 (a,b) 以白色念珠菌为病原菌检测 BS₂₋₁-MV_S、BS₅₇₉-MV_S 抗菌活性;(c,d) 以大肠杆菌为病原菌检测 BS₂₋₁-MV_S、BS₅₇₉-MV_S 抗菌活性;(e,f) 以金黄色葡萄球菌为病原菌检测 BS₂₋₁-MV_S、BS₅₇₉-MV_S 抗菌活性;(g) 以白色念珠菌为病原菌测定 BS₂₋₁-MV_S、BS₅₇₉-MV_S 的抑菌圈直径;(h) 以金黄色葡萄球菌为病原菌测定 BS₂₋₁-MV_S、BS₅₇₉-MV_S 的抑菌圈直径

Fig. 5 Antibacterial activity of BS-MV_S (a,b) The antibacterial activities of BS₂₋₁-MV_S and BS₅₇₉-MV_S were detected with *Candida albicans* as the pathogen; (c,d) The antibacterial activities of BS₂₋₁-MV_S and BS₅₇₉-MV_S were detected with *Candida albicans* as the *Escherichia coli*; (e,f) The antibacterial activities of BS₂₋₁-MV_S and BS₅₇₉-MV_S were detected with *Candida albicans* as the *Staphylococcus aureus*; (g) The diameter of inhibition zone of BS₂₋₁-MV_S and BS₅₇₉-MV_S was determined with *Candida albicans* as the pathogen; (h) The diameter of inhibition zone of BS₂₋₁-MV_S and BS₅₇₉-MV_S was determined with *Candida albicans* as the *Staphylococcus aureus*

2.4 BS₂₋₁-MVS 的抗炎活性

2.4.1 BS₂₋₁-MVS 对小鼠体重、DAI 评分和肠长度的影响。由图 6(a)可知,在适应性喂养的一周内,各组

体重增长幅度基本一致,在正常饮用水被 3%DSS 替换后,在对照组小鼠中,体重呈持续增长态势;模型组表现出明显的体重下降,与对照组形成对比;而干预治疗组和阳性药物组的体重变化较为稳定,与之前保持一致,且相较于模型组有显著改善。采用 DAI 评分对 DSS 诱导的溃疡性结肠炎严重程度进行评估,图 6(b)显示,在模型组的造模期间,DAI 评分明显高于对照组,经 BS_{2-1} -MVS 和 SASP 灌胃干预后明显改善了溃疡性结肠炎的症状。图 6(c,d)显示 BS_{2-1} -MVS 和 SASP 明显改善了 DSS 诱导的结肠长度缩短,起到了较好的保护效果。



注:所有数据均以平均值 $MEAN \pm SD$ 表示 ($N=6$),空白组 VS 模型组, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。

图 6 BS_{2-1} -MV_s 对小鼠体重、DAI 评分和肠长度的影响 (a) 小鼠体重变化; (b) 疾病活动指数评分; (c,d) 小鼠结肠长度
Fig. 6 Effects of BS_{2-1} -MV_s on body weight, DAI score and colonic length in mice (a) Weight change of mice; (b) Disease activity index score; (c,d) Mouse colon length

2.4.2 BS_{2-1} -MVS 对组织病理改变的影响。通过 HE 染色分析各组结肠组织的病理变化,由图 7 可知,空白组结肠的隐窝结构和粘膜上皮结构完整,无炎症浸润。模型组的结肠粘膜上皮结构明显损伤,隐窝结构发生改变,杯状细胞数量减少,有明显的炎症细胞浸润和溃疡面。干预治疗组和阳性药物组结肠组织病变程度减轻,组织结构较完整,几乎无炎症浸润。结果表明 BS_{2-1} -MVS 可显著减轻 DSS 诱导的溃疡性结肠炎的症状。

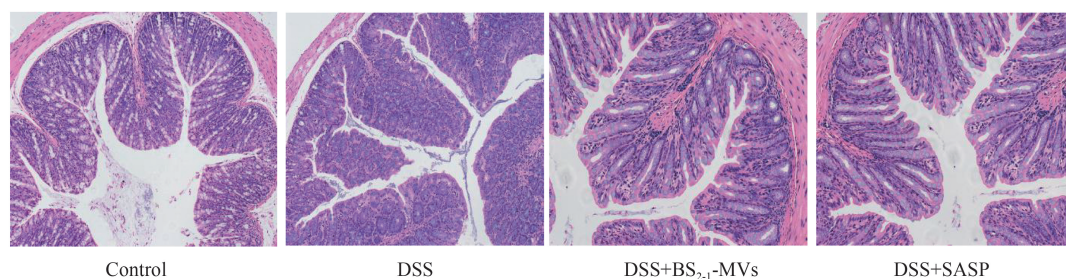


图 7 BS_{2-1} -MVS 对组织病理改变的影响 (20X)

Fig. 7 Effect of BS_{2-1} -MV_s on histopathological changes (20X)

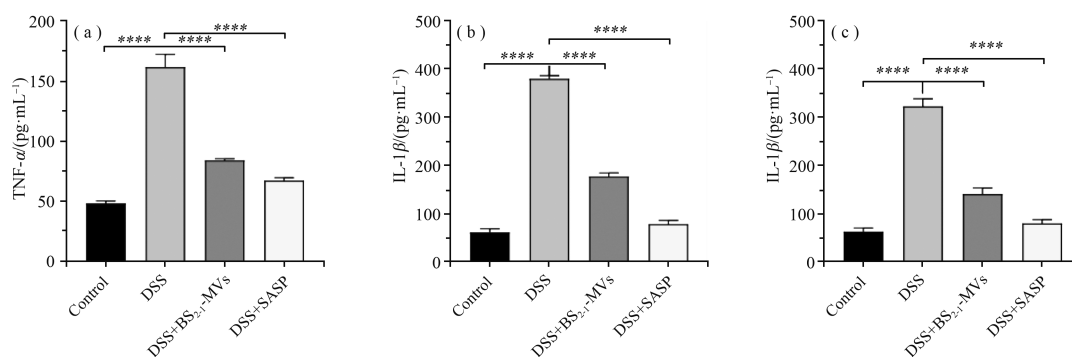


图 8 BS_{2-1} -MVS 对小鼠炎症因子含量的影响 (a) TNF- α 的含量; (b) IL-1 β 的含量; (c) IL-6 的含量

Fig. 8 Effect of BS_{2-1} -MV_s on the content of inflammatory factors in mice (a) Content of TNF- α ; (b) Content of IL-1 β ; (c) Content of IL-6

2.4.3 BS₂₋₁-MVS 对小鼠炎症因子含量的影响。为评估 DSS 诱导的溃疡性结肠炎的严重程度,本文研究了小鼠体内促炎细胞因子(TNF- α 、IL-1 β 、IL-6)的表达。图 9 结果表明,与对照组相比,模型组 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 三种促炎细胞因子水平均显著上升,此外,经过 BS₂₋₁-MVS 和 SASP 处理后这三种炎症因子水平显著降低。

3 讨论

革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌都通过基于细胞结构的不同机制产生细胞外囊泡,细菌微囊泡(MV_s)是由革兰氏阳性细菌分泌的双层脂质结构的球形纳米尺寸颗粒,直径为 20~250 nm^[17,18]。它们含有一系列来自细菌的货物,如核酸、蛋白质和脂质,是细菌与其环境之间沟通的重要信使^[19,20]。

近年来,细菌胞外囊泡受到国内外学者的广泛关注,但仍处于初级探索阶段^[21,22]。目前提取 MV_s 的方法主要有低温超速离心法、沉淀法、差速离心法和微流体纳米颗粒分离法^[23]。不同的分离提取方式可能会使 MV_s 的大小形态产生差异。本研究通过对不同实验方法的探索,采用低温超速离心、过滤超滤、密度梯度离心的方法实现对 BS-MV_s 的分离与纯化,但使分离纯化过程更省时省力还需更深入地研究。采用透射电镜这一常用的鉴定细菌微囊泡形态的方法观察 BS-MV_s 的形态,呈椭圆形或圆形,大小不一,然后通过纳米激光粒度仪分析 BS-MV_s 的粒径大小。在枯草芽孢杆菌在培养 12 h 趋于稳定后^[24],在培养基中添加 0.5%葡萄糖时,细菌会通过分解葡萄糖来获取所需能量,不需要启用那些不常用且难以获得能量的基因,因此细菌浓度会上升,随着细菌浓度的增加,BS-MV_s 浓度增大,在培养 24 h 后 BS-MV_s 浓度最高,这可能与培养环境的改变相关,还需进一步探究。

枯草芽孢杆菌作为新兴起的益生菌制剂,可以通过多种机制发挥抗菌作用如降低肠道 pH 值、分泌抗菌物质、抑制和竞争性地排挤有害菌的生长等,具有很强的抗菌能力和稳定性,其能抑制有害菌群,促进有益菌群繁殖,从而维持机体健康^[25,26]。BS-MV_s 是由枯草芽孢杆菌释放的脂质双层结合的小颗粒,其中可能含有重要的生物活性分子,如脂质、RNA、各种外膜蛋白、内膜蛋白、胞浆蛋白、LPS 等^[27]。白色念珠菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌均为人体正常菌群,若这三种菌群比例失调,就可能导致某些疾病的发生。为了探究 BS-MV_s 的抗炎活性,采用滤纸片扩散法分别检测了 BS₂₋₁-MV_s、BS₅₇₉-MV_s 对白色念珠菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌三种病原菌的抑制效率,通过检测发现 BS₂₋₁-MV_s、BS₅₇₉-MV_s 对大肠杆菌没有抑制作用,对白色念珠菌、金黄色葡萄球菌的抑菌效率均高于 BS₅₇₉-MV_s,为体内抗炎活性研究进一步提供了理论基础。

近年来,炎症性肠病(IBD)的发病率愈来愈高,虽然临床上一些治疗药物的发展取得了很大进步,极大地丰富了治疗手段,但由于用药不良反应和免疫不耐受等风险存在,临床上药物需求仍然无法满足,因此还要进一步开发 IBD 治疗药物。本研究在小鼠体重、DAI 评分、肠长度、组织病理改变、炎症细胞因子水平等方面显示出 DSS 诱导的溃疡性结肠炎的症状,与模型组相比,经 BS₂₋₁-MV_s 处理的小鼠显著改善了小鼠肠长度缩短、肠粘膜溃疡、杯状细胞和促炎细胞因子增多等症状。据研究表明,肠道炎症与肠道微生物群丰度和多样性减少有关^[28]。目前本课题组正开展相关工作,以期进一步阐明 BS₂₋₁-MV_s 对肠道菌群的影响以及对结肠炎发挥保护作用的机制。

4 结论

B. subtilis 2-1 的 MV_s 产量高于 *B. subtilis* 579,在 LB 液体培养基中添加 0.5%的葡萄糖,于摇床培养 24 h 后可提高 BS-MV_s 的浓度。BS₂₋₁-MV_s、BS₅₇₉-MV_s 均对大肠杆菌没有抑制作用,但对白色念珠菌、金黄色葡萄球菌具有较强的抑制作用。 1×10^{10} 颗粒数/mL 的 BS₂₋₁-MV_s 和 BS₅₇₉-MV_s 对白色念珠菌的抑菌效率分别为 135%、99.2%,对金黄色葡萄球菌的抑菌效率分别为 90%、62.5%。筛选出抑菌效率较高的 BS₂₋₁-MV_s 进行体内抗炎活性研究,BS₂₋₁-MV_s 可以显著改善 DSS 诱导的溃疡性结肠炎,起到较强的保护作用。然而,BS-MV_s 浓度增加和 BS₂₋₁-MV_s 保护 DSS 诱导的溃疡性结肠炎的机制还有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] KIM S, GUEVARRA R, KIM Y, et al. Role of probiotics in human gut microbiome-associated diseases[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2019, 29(9): 1335-1340.
- [2] SUEZ J, ZMORA N, SEGAL E, et al. The pros, cons, and many unknowns of probiotics[J]. *Nature Medicine*, 2019, 25(5): 716-729.
- [3] 惠明, 窦丽娜, 田青, 等. 枯草芽孢杆菌的应用研究进展[J]. *安徽农业科学*, 2008 (27): 11623-11624.
- [4] 李明, 双宝, 李海涛, 等. 枯草芽孢杆菌的研究与应用[J]. *东北农业大学学报*, 2009, 40(9): 111-114.
- [5] 王红革, 李文清, 徐柏年, 等. 地衣芽孢杆菌 α -淀粉酶基因在枯草芽孢杆菌中的诱导表达[J]. *微生物学报*, 1997(2): 101-106.
- [6] 韩永先, 林华, 廖搏浪, 等. 枯草芽孢杆菌胞外囊泡的分离及其对巨噬细胞免疫功能的影响[J]. *家畜生态学报*, 2021, 42(8): 15-21.
- [7] 李晶, 杨谦. 生防枯草芽孢杆菌的研究进展[J]. *安徽农业科学*, 2008 (1): 106-111.
- [8] 李泽然. 枯草芽孢杆菌对肉鸡生长性能、屠宰性能、肉品质、免疫功能、抗氧化功能和肠道形态的影响[J]. *饲料研究*, 2023(11): 51-55.
- [9] NIEL G, D'ANGELO G, RAPOSO G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2018, 19(4): 213-228.
- [10] 葛艳艳, 李子涵, 王新月, 等. 革兰氏阳性菌细胞外囊泡的研究现状[J]. *生物工程学报*, 2022, 38(4): 1462-1474.
- [11] 王璵, 陈建英. 细胞外囊泡研究新进展[J]. *中国组织工程研究*, 2017, 21(4): 621-626.
- [12] 贾万欣, 邹聪, 段琦颖, 等. 生物囊泡分离鉴定方法及其在兽医学中的应用[J]. *现代畜牧兽医*, 2023 (8): 90-96.
- [13] 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[J]. *Molecular Microbiology*, 2014, 93(1): 183-198.
- [14] 韩旭东. 芽孢杆菌 ZYCHH-01 产抑菌物质条件优化及其性质研究[D]. 海口: 海南大学, 2020.
- [15] 蒋嘉瑞, 董跨, 金玉春, 等. 五味子甲素调控 FXR 信号通路改善 DSS 诱导的小鼠急性溃疡性结肠炎[J]. *药学报*, 2024(2): 1-12.
- [16] KIM J J, SHAJIB M S, MANOCHA M M, et al. Investigating intestinal inflammation in DSS-induced model of IBD[J]. *Journal of Visualized Experiments*, 2012, 80(60): e3678-3693.
- [17] DEAN S N, THAKUR M, SPANGLER J R. Extracellular vesicle production in Gram-positive bacteria[J]. *Microbial Biotechnology*, 2021, 15(4): 1055-1057.
- [18] 刘晋倩, 王福贵, 范宗强, 等. 枯草芽孢杆菌对小鼠炎症性肠病的保护作用及其机制研究[J]. *聊城大学学报(自然科学版)*, 2023, 36 (1): 99-106.
- [19] HOSSEINI-GIV N, BASAS A, HICKS C, et al. Bacterial extracellular vesicles and their novel therapeutic applications in health and cancer[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2022 (12): 962216.
- [20] LI D, ZHU L, WANG Y, et al. Bacterial outer membrane vesicles in cancer: biogenesis, pathogenesis, and clinical application[J]. *Bio-medicine & Pharmacotherapy*, 2023, 165: 115302.
- [21] CABLE J, WITWER K W, COFFEY R J, et al. Exosomes, microvesicles, and other extracellular vesicles-a Keystone Symposia report [J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2023, 1523(1): 24-37.
- [22] COCOZZA F, GRISARD E, MARTIN-JAULAR L, et al. SnapShot: extracellular vesicles[J]. *Cell*, 2020, 182(1): 262.
- [23] YEO J C, KENRY N, ZHAO Z, et al. Label-free extraction of extracellular vesicles using centrifugal microfluidics[J]. *Biomicrofluidics*, 2019, 12(2): 024103.
- [24] KACENA M A, MERRELL G A, MANFREDI B, et al. Bacterial growth in space flight: logistic growth curve parameters for *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1999, 51: 229-234.
- [25] 韩雪林, 张磊, 张娟, 等. 枯草芽孢杆菌在青贮饲料中的应用[J]. *家畜生态学报*, 2023, 44(11): 81-86.
- [26] 袁尽涛. 肉鸭养殖中枯草芽孢杆菌的应用分析[J]. *中国动物保健*, 2023, 25(11): 67-68.
- [27] TAKAHASHI Y, TAKAKURA Y. Extracellular vesicle-based therapeutics; extracellular vesicles as therapeutic targets and agents[J]. *Pharmacology & Therapeutics*, 2023, 242: 108352.
- [28] CABRÉ E, A. GASSULL M. Probiotics for preventing relapse or recurrence in Crohn's disease involving the ileum: are there reasons for failure? [J]. *Journal of Crohn's and Colitis*, 2007, 1(1): 47-52.

(责任编辑:刘庆松)