

# 溶血性葡萄球菌来源的细胞外囊泡对小鼠生长性能、免疫力、肠道形态与微生物区系的影响

罗梅英<sup>1</sup> 凌铭旺<sup>1</sup> 詹洲玲<sup>1</sup> 郑将鸿<sup>1</sup> 钟晓彤<sup>1</sup> 欧春秀<sup>1</sup> 梁樱倩<sup>1</sup> 冯鑫<sup>1</sup>  
王瑞晓<sup>1</sup> 黄得纯<sup>1</sup> 张辉华<sup>1</sup> 柒启恩<sup>1,2\*</sup>

(1.佛山科学技术学院生命科学与工程学院,佛山 528231;2.华南农业大学,广东省动物营养调控重点实验室,广州 510642)

**摘要:** 本试验旨在研究溶血性葡萄球菌来源的细胞外囊泡(SH-EVs)对小鼠生长性能、免疫力、肠道形态与微生物区系的影响。选用体重、日龄接近的20只健康雄性离乳C57BL/6小鼠,采用完全随机试验设计分为2个组,每组10个重复,每个重复1只小鼠。每隔1d给对照组小鼠灌服150 μL磷酸盐缓冲液(PBS),给试验组小鼠灌服150 μL SH-EVs悬液(含500 μg SH-EVs)。试验期为5d。结果显示:1)与对照组相比,灌服SH-EVs显著降低了小鼠的平均日采食量和平均日增重( $P<0.05$ ),并有提高料重比的趋势( $P=0.052$ )。2)与对照组相比,灌服SH-EVs显著提高了小鼠血清肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )和白细胞介素-10(IL-10)含量( $P<0.05$ ),显著降低了血清免疫球蛋白A(IgA)含量( $P<0.05$ ),有降低血清免疫球蛋白G(IgG)含量的趋势( $P=0.067$ )。3)灌服SH-EVs导致小鼠回肠绒毛损伤,肠绒毛稀疏。4)与对照组相比,灌服SH-EVs在门水平上显著降低了小鼠肠道拟杆菌门(Bacteroidetes)的相对丰度( $P<0.05$ ),显著提高了酸杆菌门(Acidobacteria)、绿弯菌门(Chloroflexi)、变形菌门(Proteobacteria)、浮霉菌门(Planctomycetes)的相对丰度( $P<0.05$ );在属水平上显著降低了小鼠肠道普雷沃氏菌科UCG-001(Prevotellaceae\_UCG-001)、拟杆菌属(*Bacteroides*)、拟普雷沃氏菌属(*Alloprevotella*)的相对丰度( $P<0.05$ );在种水平上显著降低了小鼠肠道产酸拟杆菌(*Bacteroides acidifaciens*)的相对丰度( $P<0.05$ ),显著提高了毛螺菌科细菌COE1(Lachnospiraceae\_bacterium\_COE1)的相对丰度( $P<0.05$ )。由此可见,灌服SH-EVs降低了小鼠的生长性能、免疫力,一定程度上损伤了肠道形态发育并扰乱了肠道菌群结构,对小鼠健康产生了不利影响。

**关键词:** 溶血性葡萄球菌;细胞外囊泡;生长性能;免疫指标;肠道微生物;小鼠

中图分类号:S852.6

文献标识码:A

文章编号:1006-267X(2021)08-4719-11

细胞外囊泡(extracellular vesicles, EVs)是细胞分泌至胞外的膜性囊泡<sup>[1]</sup>。近年来,关于它作为细胞间新“细胞信使”的研究越来越多,且受到广泛的重视<sup>[2-3]</sup>。在各种原核和真核微生物中,许多细胞因子与EVs有关,EVs运输是一种普遍现象<sup>[3-4]</sup>。EVs由真核生物、古细菌和细菌产生,由

脂质双分子层组成,形成直径从20~500 nm不等的含腔球体<sup>[5]</sup>。研究显示,EVs参与肿瘤进展、免疫调节、新陈代谢、肠道微生物区系的塑造等过程<sup>[6-10]</sup>。细菌来源的EVs于1965年首次在大肠杆菌中被发现<sup>[11]</sup>。细菌来源的EVs携带多种物质,包括毒力因子、黏附素、DNA、RNA、毒素、免疫

收稿日期:2021-04-21

基金项目:国家自然科学基金项目(31902228);广东省基础与应用基础研究基金项目(2019A1515110780);广东省教育厅高校科研项目(2017GCZX006)

作者简介:罗梅英(1998—),女,广东云浮人,本科生,动物科学专业。E-mail: 1312803380@qq.com

\*通信作者:柒启恩,博士, E-mail: qiqien1987@163.com

调节因子和营养清除因子,与细胞毒性、宿主细胞入侵、膜融合、生物膜的产生、病毒入侵、DNA传递、受体响应和抗生素耐药蛋白的转移过程相关<sup>[12-13]</sup>。

葡萄球菌是一种圆形或卵圆形的革兰氏阳性球菌,呈葡萄状,无鞭毛,无荚膜,不产生芽孢<sup>[14]</sup>。临床上,葡萄球菌病主要是由金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)引起的。金黄色葡萄球菌是一种常见的人兽共患病原菌,在自然界分布广泛,可引起人和动物感染,也可引起细菌性食物中毒或饲料中毒<sup>[15]</sup>,肠毒素是导致金黄色葡萄球菌食物中毒的主要毒力因子<sup>[16]</sup>。相比金黄色葡萄球菌,关于溶血性葡萄球菌(*Staphylococcus haemolyticus*)的研究鲜有报道。溶血性葡萄球菌是一种凝固酶阴性葡萄球菌,以共生菌的形式存在于皮肤中<sup>[17]</sup>,是重要的医院感染病原菌<sup>[18]</sup>。酚可溶性调节肽(phenol-soluble modulins, PSM)是溶血性葡萄球菌的主要毒力因子,是一类具有广泛的细胞溶解活性的两亲性肽毒素,包含一种 $\alpha$ 型PSM和3种 $\beta$ 型PSM,4种PSM均具有较强的促炎活性,可促进中性粒细胞趋化<sup>[19]</sup>。溶血性葡萄球菌来源的细胞外囊泡(SH-EVs)是否携带PSM,是否通过PSM产生促炎活性尚不明确。本试验拟研究SH-EVs对小鼠生长、免疫功能、肠道结构及微生物区系的影响,以期为细菌EVs的深入研究提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株及其培养

溶血性葡萄球菌为本实验室保存菌种,由生工生物工程(上海)股份有限公司通过16S rRNA基因测序进行菌种鉴定,采用YPD液体培养基(含1.0%酵母提取物、2.0%蛋白胨、2.0%葡萄糖)于30℃下在转速为200 r/min的水平摇床上振荡培养14~16 h至OD<sub>600 nm</sub>达到1.0~1.5。

### 1.2 SH-EVs的分离、纯化与鉴定

将保存的溶血性葡萄球菌菌种复苏,在新鲜LB液体培养基中于30℃下在转速为200 r/min的水平摇床上扩大培养,使OD<sub>600 nm</sub>达到1.0~1.5;然后将培养物于4℃、2 000×g离心10 min;收集上清于4℃、10 000×g离心30 min;取上清经过超速离心机于4℃、120 000×g离心90 min,得到SH-EVs沉淀,将获得SH-EVs沉淀经过磷酸盐缓冲液(PBS)重悬后再一次经超速离心机于4℃、

120 000×g离心90 min,富集得到的沉淀即为纯化的SH-EVs,纯化后的SH-EVs用PBS重悬,放入-80℃保存备用。

将10 μL SH-EVs的PBS悬液滴加于铜网上沉淀20 min,用滤纸吸去浮液,接着再用蒸馏水漂洗1~3次。吸取2%的醋酸双氧铀10 μL滴加于铜网上沉淀1 min,滤纸吸去浮液后常温干燥15 min,通过JEM-2000EX透射电子显微镜(transmission electron microscopy, TEM)来观察SH-EVs的外部形态特征<sup>[20]</sup>。利用纳米颗粒跟踪分析仪(Zetasizer Nano ZS)来测定EVs的粒径<sup>[21]</sup>。利用二奎啉甲酸(BCA)蛋白定量试剂盒测定SH-EVs的蛋白质浓度。

### 1.3 试验动物及饲养管理

试验动物为无特定病原体(SPF)级的健康雄性C57BL/6小鼠,14~17 g,28~30日龄,购自广东省医学实验动物中心,许可证号:SCXK(粤)2018-0002。饲养环境温度保持在(22±2)℃,相对湿度保持在(50±10)%,光照周期为12 h光照/12 h黑暗。动物试验开始前先使小鼠习惯动物设施1周,动物试验按照《实验动物管理条例》(2017年修订)执行。

### 1.4 试验设计

选取20只小鼠,采用完全随机试验设计分为2个组,每组10个重复,每个重复1只小鼠。参照Teng等<sup>[9]</sup>的方法,每隔1 d给试验组小鼠灌服150 μL SH-EVs悬液(含500 μg SH-EVs),给对照组小鼠灌服150 μL PBS,共灌服3次。试验期为5 d。试验期内自由饮水、自由采食。试验饲料为购自广东省医学实验动物中心的小鼠标准饲料。

### 1.5 样品采集

#### 1.5.1 小鼠生长性能数据采集

在试验始末清晨对每只小鼠进行空腹称重,记录个体重;试验过程中记录每只小鼠每天的采食量。

#### 1.5.2 小鼠粪便采集

试验结束当天采集小鼠的新鲜粪样,置于2 mL无菌PE管中,于-80℃条件下储存待测。

#### 1.5.3 小鼠血液采集

试验结束后利用蘸有异氟烷的棉球将小鼠麻醉,然后对小鼠进行眼球采血,血液静置1 h后,3 000 r/min离心20 min,分离血清。小心吸取血清分装于1.5 mL的试管中,于-80℃条件下储存

待测。

#### 1.5.4 小鼠回肠组织采集

采血后,断颈处死小鼠,剖开腹腔,于回肠中段采集 2 cm 左右的组织样品,灭菌生理盐水冲洗干净,置于 4% 甲醛缓冲溶液中固定,以备制作切片。

### 1.6 检测指标与方法

#### 1.6.1 小鼠生长性能指标测定

根据试验始末小鼠体重计算平均日增重 (ADG);根据每只小鼠每日的采食量计算平均日采食量 (ADFI);根据平均日增重及平均日采食量计算料重比 (F/G)。

#### 1.6.2 小鼠血清免疫指标测定

血清肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-10 (interleukin-10, IL-10)、免疫球蛋白 A (immunoglobulin A, IgA)、免疫球蛋白 G (immunoglobulin G, IgG) 含量均采用上海酶联生物科技有限公司生产的试剂盒测定,测定方法按照说明书进行。

#### 1.6.3 小鼠肠道形态观察

将固定的回肠标本经脱水、透明、浸蜡、包埋、修块、切片、展片、常规苏木精-伊红 (HE) 染色等处理后,制成石蜡切片。之后用显微镜在 40 倍下随机选择多个非连续性视野观察切片,并挑选典型视野拍摄成图片。

#### 1.6.4 小鼠肠道微生物区系测定

从小鼠粪便样本中提取基因组 DNA 后,利用琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的纯度和浓度。用带有 barcode 的特异引物扩增 16S rDNA 的 V3+V4 区,引物序列为:341F, 5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3'; 806R, 5'-GGACTACHVGGGTATCTAAT-3'。然后 PCR 扩增产物切胶回收,用 QuantiFluor™ 荧光计进行定量。将纯化的扩增产物进行等量混合,连接测序接头,构建测序文库,使用 HiSeq2500 的 PE250 模式上机测序。

测序得到 raw reads 之后,对低质量 reads 进行过滤,再进行序列拼接、序列过滤、序列去嵌合体等处理,得到优化序列 (tags)。用 Uparse 软件以 97% 的一致性 (identity) 对所有样品的优化序列聚类成为操作分类单元 (OTU),获得 OTU 后,根据分析流程,使用 QIIME (version 1.9.1) 依次进行

OTU 分析、Alpha 多样性分析、菌群结构分析<sup>[22]</sup>。

### 1.7 数据处理

试验数据经 Excel 2019 初步整理后,采用 SPSS 19.0 统计软件的独立样本 *t* 检验法进行组间差异显著性比较,以  $P < 0.05$  为差异显著,  $0.05 \leq P < 0.10$  为差异有显著趋势,结果以平均值  $\pm$  标准差表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 SH-EVs 的生物学特性

采用差速离心法从溶血性葡萄球菌培养液上清中得到较多的纯化 SH-EVs (图 1-a)。对纯化 SH-EVs 进行 TEM 观察 (图 1-b),发现 SH-EVs 大小不一,外形呈现圆形或椭圆形,直径 100 nm 左右,在 20~500 nm 范围之内,符合细菌 EVs 颗粒粒径的要求。随后采用纳米颗粒跟踪分析仪检测纯化 SH-EVs 的粒径分布 (图 1-c),结果显示模式曲线线条平缓流畅,说明含有的杂质较少,纯度较好;检测得到的粒子分布系数 (PDI) 为 0.271,介于 0.08~0.70,证明体系分散度适中,检测结果置信度高;平均粒径为 122.5 nm,粒径主峰为 162.3 nm,粒径 20~200 nm 百分比为 69.9%,与细菌 EVs 的理论颗粒粒径大小基本吻合。

### 2.2 SH-EVs 对小鼠生长性能的影响

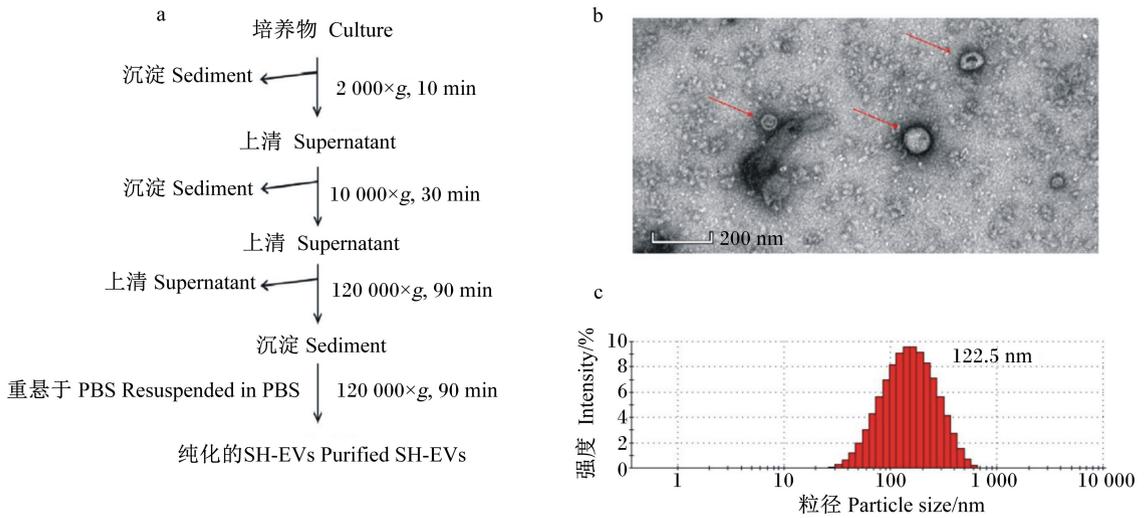
由表 1 可知,与对照组相比,小鼠灌服 SH-EVs 显著降低了平均日采食量和平均日增重 ( $P < 0.05$ ),有提高料重比的趋势 ( $P = 0.052$ ),其中平均日采食量降低了 4.80%,平均日增重降低了 12.87%,料重比提高了 9.20%。

### 2.3 SH-EVs 对小鼠血清免疫指标的影响

由表 2 可知,与对照组相比,小鼠灌服 SH-EVs 显著提高了血清 TNF- $\alpha$  和 IL-10 含量 ( $P < 0.05$ ),显著降低了血清 IgA 含量 ( $P < 0.05$ ),有降低血清 IgG 含量的趋势 ( $P = 0.067$ ),其中 TNF- $\alpha$  和 IL-10 含量分别提高了 16.26% 和 4.54%,IgA 和 IgG 含量分别降低了 9.15% 和 6.03%。

### 2.4 SH-EVs 对小鼠肠道形态的影响

由图 2 可知,对照组小鼠的回肠绒毛生长状态良好,完整性好,数量较多,密度较大;而试验组小鼠的回肠绒毛密度降低,有一定程度的损伤。



a: 分离纯化 SH-EVs 的主要步骤示意图; b: TEM 观察 SH-EVs 的形态; c: Zetasizer Nano ZS 检测 SH-EVs 的粒径分布。

a: schematic diagram of the main steps for the isolation and purification of SH-EVs; b: morphology of SH-EVs observed by transmission electron microscopy; c: particle size distribution of SH-EVs determined by Zetasizer Nano ZS.

图 1 SH-EVs 的分离和表征

Fig.1 Isolation and characterization of SH-EVs

表 1 SH-EVs 对小鼠生长性能的影响

Table 1 Effects of SH-EVs on growth performance of mice

项目 Items	对照组 Control group	试验组 Test group	P 值 P-value
初始体重 IBW/g	15.64±0.66	15.68±0.78	0.898
终末体重 FBW/g	19.83±0.72	19.32±0.67	0.120
平均日采食量 ADFI/g	4.31±0.26 <sup>a</sup>	4.10±0.15 <sup>b</sup>	0.042
平均日增重 ADG/g	0.87±0.08 <sup>a</sup>	0.76±0.07 <sup>b</sup>	0.006
料重比 F/G	5.01±0.39	5.47±0.53	0.052

同行数据肩标不同字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ ), 无字母表示差异不显著 ( $P > 0.05$ )。下表同。

In the same row, values with different letter superscripts mean significant difference ( $P < 0.05$ ), while with no letter superscripts mean no significant difference ( $P > 0.05$ ). The same as below.

表 2 SH-EVs 对小鼠血清免疫指标的影响

Table 2 Effects of SH-EVs on serum immune indicators of mice

项目 Items	对照组 Control group	试验组 Test group	P 值 P-value
肿瘤坏死因子- $\alpha$ TNF- $\alpha$ /(pg/mL)	74.54±4.58 <sup>b</sup>	86.66±6.91 <sup>a</sup>	0.001
白细胞介素-10 IL-10/(pg/mL)	53.65±2.20 <sup>b</sup>	56.08±2.15 <sup>a</sup>	0.026
免疫球蛋白 A IgA/( $\mu$ g/mL)	38.80±1.86 <sup>a</sup>	35.25±2.84 <sup>b</sup>	0.008
免疫球蛋白 G IgG/(mg/mL)	2.31±0.11	2.17±0.18	0.067

## 2.5 SH-EVs 对小鼠肠道微生物区系的影响

### 2.5.1 Alpha 多样性分析

由表 2 可知, 对照组和试验组检测到的物种数量均较高, 在 1934~2010 个; 覆盖度也均在

99.6% 以上, 说明测序结果已基本覆盖样本的多样性。对照组和试验组的 Chao1 指数、ACE 指数、Shannon 指数和 Simpson 指数均差异不显著 ( $P > 0.05$ )。



PBS 代表对照组,SH-EVs 代表试验组。下图同。PBS represented control group and SH-EVs represented test group. The same as below.

图 2 小鼠回肠黏膜组织形态

Fig.2 Ileum mucosa tissue morphology of mice

### 2.5.2 稀释曲线

通过绘制稀释曲线可评价测序量是否足够,并能间接反映样本中物种的丰富程度。由图 3-a 可见,各样本的稀释曲线趋于平缓或者达到平台

期,可以认为继续增加测序深度已经不影响物种多样性,说明测序量足够。

### 2.5.3 韦恩图

韦恩图可用于统计多个样本中所独有与共有的 OTU 数目,能够比较直观地表现样本的 OTU 数目组成相似性及重叠情况。由图 3-b 可知,对照组和试验组共有 1 740 个 OTU,对照组独有 1 355 个 OTU,试验组独有 1 168 个 OTU。

### 2.5.4 基于 OTU 的主成分分析 (PCA)

通过分析不同样本 OTU (97% 相似性) 组成能够反映样本之间的差异和距离,PCA 运用方差分解,将多组数据的差异反映在二维坐标图上,坐标轴取能够最大反映方差值的 2 个特征值。由图 3-c 可知,对照组与试验组样本分散较远,相似性有较大差异。

表 3 Alpha 多样性指数

Table 3 Alpha diversity indexes

项目 Items	对照组 Control group	试验组 Test group	P 值 P-value
检测到的物种数量 Observed species number/个	2 009.67±118.16	1 934.00±84.55	0.263
覆盖度 Coverage/%	99.63±0.02	99.63±0.08	0.973
丰富度 Richness			
Chao1 指数 Chao1 index	2 655.31±176.86	2 623.48±118.18	0.740
ACE 指数 ACE index	2 538.02±187.52	2 504.99±98.43	0.732
多样性 Diversity			
Shannon 指数 Shannon index	7.79±0.44	8.17±0.61	0.252
Simpson 指数 Simpson index	0.98±0.01	0.98±0.01	0.923

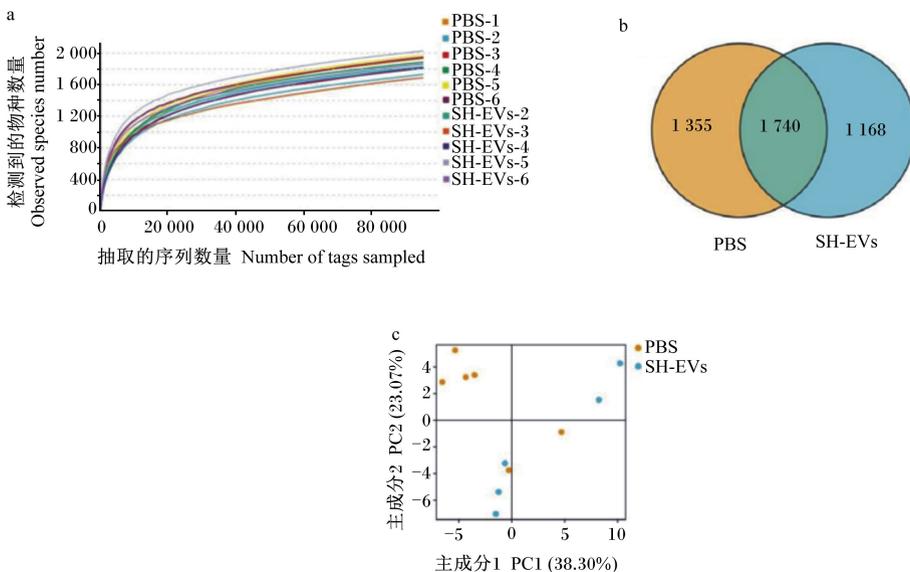
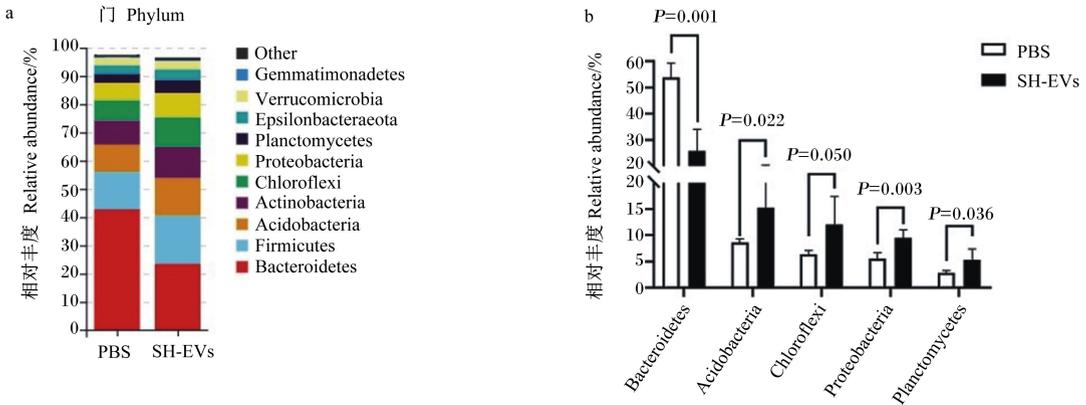


图 3 稀释曲线 (a)、韦恩图 (b) 和 PCA 图 (c)

Fig.3 Rarefaction curves (a), Venn diagram (b) and PCA diagram (c)

### 2.5.5 小鼠肠道菌群结构

灌服 SH-EVs 对小鼠肠道菌群门水平相对丰度的影响如图 4 所示。从样本中获得的主要菌群分别属于拟杆菌门 (*Bacteroidetes*) 和厚壁菌门 (*Firmicutes*), 在对照组中分别占 42.84% 和 13.19%, 在试验组中分别占 23.56% 和 16.99%



*Bacteroidetes*: 拟杆菌门; *Firmicutes*: 厚壁菌门; *Acidobacteria*: 酸杆菌门; *Actinobacteria*: 放线菌门; *Chloroflexi*: 绿弯菌门; *Proteobacteria*: 变形菌门; *Planctomycetes*: 浮霉菌门; *Verrucomicrobia*: 疣微菌门; *Gemmatimonadetes*: 芽单胞菌门; *Other*: 其他。

图 4 在门水平上的肠道菌群结构 (a) 以及有显著差异的菌门 (b)

Fig.4 Intestinal bacterial community structure at phylum level (a) and significantly changed phyla (b)

灌服 SH-EVs 对小鼠肠道菌群属水平相对丰度的影响如图 5 所示。从样本中获得的主要菌群分别属于阿里叶柄菌属 (*Alistipes*)、毛螺菌科 NK4A136 组 (*Lachnospiraceae\_NK4A136\_group*)、螺杆菌属 (*Helicobacter*), 在对照组中分别占 4.44%、3.79%、3.07%, 在试验组中分别占 6.05%、3.48%、3.70% (图 5-a)。与对照组相比, 灌服 SH-EVs 显著降低了小鼠肠道普雷沃氏菌科 UCG-001 (*Prevotellaceae\_UCG-001*)、拟杆菌属 (*Bacteroides*)、拟普雷沃菌属 (*Alloprevotella*) 的相对丰度 ( $P < 0.05$ ) (图 5-b)。

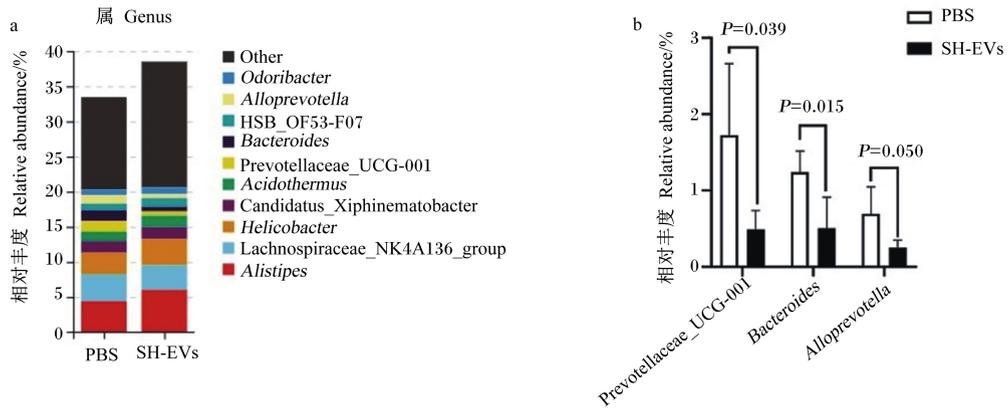
灌服 SH-EVs 对小鼠肠道菌群种水平相对丰度的影响如图 6 所示。从对照组样本中获得的主要菌群为产酸拟杆菌 (*Bacteroides acidifaciens*)、*Helicobacter mastomyrinus*、马赛拟杆菌 dnLKV3 (*Bacteroides massiliensis* dnLKV3), 分别占 0.85%、0.77%、0.59%; 从试验组样本中获得的主要菌群

(图 4-a)。与对照组相比, 灌服 SH-EVs 显著降低了小鼠肠道 *Bacteroidetes* 的相对丰度 ( $P < 0.05$ ), 显著提高了酸杆菌门 (*Acidobacteria*)、绿弯菌门 (*Chloroflexi*)、变形菌门 (*Proteobacteria*)、浮霉菌门 (*Planctomycetes*) 的相对丰度 ( $P < 0.05$ ) (图 4-b)。

为毛螺菌科细菌 28-4 (*Lachnospiraceae\_bacterium\_28-4*)、*Bacteroides massiliensis* dnLKV3、嗜酸细小链孢菌 DSM44928 (*Catenulispora acidiphila* DSM44928), 分别占 0.73%、0.44%、0.43% (图 6-a)。与对照组相比, 灌服 SH-EVs 显著降低了小鼠肠道 *Bacteroides acidifaciens* 的相对丰度 ( $P < 0.05$ ), 显著提高了毛螺菌科细菌 COE1 (*Lachnospiraceae\_bacterium\_COE1*) 的相对丰度 ( $P < 0.05$ ) (图 6-b)。

## 3 讨论

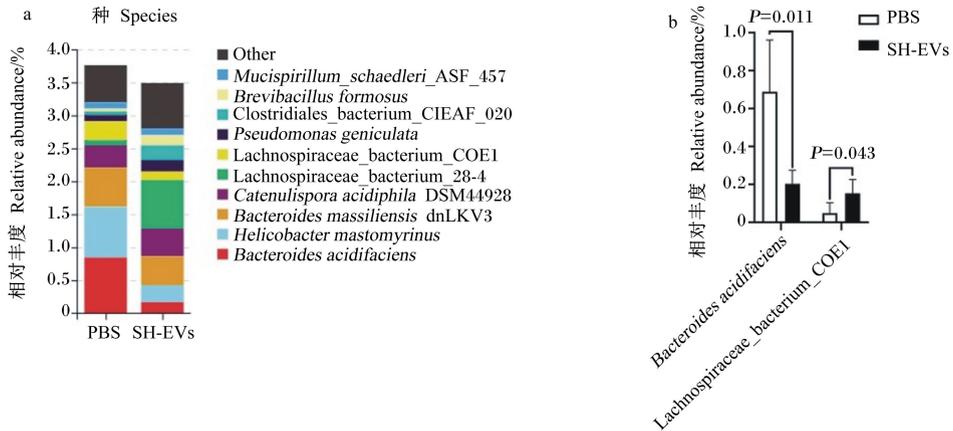
本试验采用 TEM 和 Zetasizer Nano ZS 从形态学和颗粒大小对 SH-EVs 进行了系统分析。结果显示, 大部分 SH-EVs 粒径在 20~500 nm, 外形呈现圆形或椭圆形, 符合文献报道的关于细菌 EVs 的形态特征<sup>[5]</sup>。



*Alistipes*: 阿里叶柄菌属; *Lachnospiraceae\_NK4A136\_group*: 毛螺菌科 NK4A136 组; *Helicobacter*: 螺杆菌属; *Acidothermus*: 热酸菌属; *Prevotellaceae\_UCG-001*: 普雷沃氏菌科 UCG-001; *Bacteroides*: 拟杆菌属; *Alloprevotella*: 拟普雷沃菌属; *Odoribacter*: 臭味杆菌属; Other: 其他。

图 5 在属水平上的肠道菌群结构 (a) 以及有显著差异的菌属 (b)

Fig.5 Intestinal bacterial community structure at genus level (a) and significantly changed bacterial genera (b)



*Bacteroides\_acidifaciens*: 产酸拟杆菌; *Bacteroides\_massiliensis\_dnLKV3*: 马赛拟杆菌 dnLKV3; *Catenulispora\_acidiphila\_DSM44928*: 嗜酸细小链孢菌 DSM44928; *Lachnospiraceae\_bacterium\_28-4*: 毛螺菌科细菌 28-4; *Lachnospiraceae\_bacterium\_COE1*: 毛螺菌科细菌 COE1; *Pseudomonas\_geniculata*: 弯曲假单胞菌; *Clostridiales\_bacterium\_CIEAF\_020*: 梭菌目细菌 CIEAF020; *Brevibacillus\_formosus*: 美丽短芽胞杆菌; Other: 其他。

图 6 在种水平上的肠道菌群结构 (a) 以及有显著差异的菌种 (b)

Fig.6 Intestinal bacterial community structure at species level (a) and significantly changed bacterial species (b)

本试验研究了 SH-EVs 对小鼠生长性能、血清免疫指标的影响,结果显示小鼠灌服 SH-EVs 后平均日采食量和平均日增重以及血清 IgA、IgG 含量降低,血清 TNF- $\alpha$  和 IL-10 含量升高。血清免疫球蛋白含量是反映动物机体免疫功能的重要指标之一,血清中 IgA、IgG 含量的降低表明动物免疫功能减弱;TNF- $\alpha$  和 IL-10 参与炎症反应和免疫反应,是炎症因子<sup>[23-25]</sup>。溶血性葡萄球菌的典型

毒力途径是:形成生物膜<sup>[26]</sup>,产生 PSM<sup>[19]</sup>,由于大量的插入序列导致频繁的表型重排<sup>[27]</sup>。溶血性葡萄球菌感染主要由血液和器械相关感染引起,对免疫功能低下患者的影响尤为明显<sup>[28]</sup>。溶血性葡萄球菌产生的 PSM 具有较强的促炎活性<sup>[29]</sup>,引起发烧、发冷、心动过速和呼吸急促等症状。过激的免疫反应以败血症为特征<sup>[19]</sup>。溶血性葡萄球菌通过产生抑制剂作用于淋球菌细胞的生长和休

眠<sup>[30]</sup>。炎症反应导致采食量减少,进而影响动物的生长<sup>[31]</sup>。本试验中,试验组小鼠生长性能的下降低可能与灌喂 SH-EVs 引起的炎症反应有关。由此可见,SH-EVs 的作用与其来源菌(溶血性葡萄球菌)较为相似,提示 SH-EVs 中可能含有来自于溶血性葡萄球菌的毒力因子 PSM。

有些肠道炎症局限于结肠和直肠,有些则遍布全肠段<sup>[32]</sup>。小肠是吸收营养物质的主要场所<sup>[33]</sup>,小肠炎症直接影响到营养物质的吸收利用率。因此,本试验选择回肠作为观察点,研究 SH-EVs 对小鼠肠道形态的影响,结果显示,灌服 SH-EVs 后小鼠的回肠绒毛密度下降,出现一定程度的损伤。研究显示溶血性葡萄球菌的毒力因子 PSM 具有广泛的细胞溶解活性<sup>[19]</sup>。上述结果再次提示,SH-EVs 中可能携带了来自于溶血性葡萄球菌的毒力因子 PSM,PSM 感染肠道上皮细胞,诱发了炎症反应和细胞损伤。

哺乳动物的肠道中有数万亿微生物,被视为是一个额外的器官。肠道微生物在维持肠道环境稳定和宿主健康方面起着重要作用<sup>[34-35]</sup>。肠道微生物在宿主免疫系统发育<sup>[36]</sup>、肠上皮细胞分化<sup>[35]</sup>、肠道黏膜屏障维持<sup>[37]</sup>中发挥了重要作用。肠道微生物的组成受多种环境因素的影响,包括抗生素、生活方式、饮食和卫生条件<sup>[35]</sup>。研究显示,动植物来源的 EVs 可改变动物肠道菌群结构<sup>[7-9]</sup>。本试验研究了 SH-EVs 对小鼠肠道菌群结构的影响,结果显示,从样本中获得的最主要菌门是 Bacteroidetes,与文献报道<sup>[38]</sup>中关于小鼠肠道菌群的研究结果一致。在门水平上,灌服 SH-EVs 显著降低了小鼠肠道拟杆菌门的相对丰度,下降幅度高达 52.25%,可见灌服 SH-EVs 对小鼠肠道菌群产生了较大的影响。在属水平上,灌服 SH-EVs 显著降低了小鼠肠道 Prevotellaceae\_UCG-001、*Bacteroides*、*Alloprevotella* 的相对丰度,三者均属于 Bacteroidetes,拟杆菌纲(Bacteroidia),拟杆菌目(Bacteroidales)。发生这种变化主要可能是基于 Bacteroidales 的共同特征,而这种共同特征可能是 SH-EVs 的作用靶点。Bacteroidales 的细菌可能通过摄取 SH-EVs 而摄入了 PSM,进而诱发了细胞损伤。

SH-EVs 含有哪些主要成分?是否携带了 PSM,本研究没有直接的证据。引起小鼠炎症反应、免疫力下降、肠道菌群紊乱的物质基础及作用

机制是什么?还需要更为深入地研究。

## 4 结 论

① 灌服 SH-EVs 降低了小鼠的平均日采食量和平均日增重,进而降低了小鼠的生长性能。

② 灌服 SH-EVs 提高了小鼠血清 TNF- $\alpha$  和 IL-10 含量,降低了血清 IgA 含量,进而降低了小鼠的免疫力。

③ 灌服 SH-EVs 降低了小鼠回肠绒毛密度,损伤了回肠形态结构。

④ 灌服 SH-EVs,在门水平降低了小鼠肠道 Bacteroidetes 的相对丰度,提高了 Acidobacteria、Chloroflexi、Proteobacteria、Planctomycetes 的相对丰度;在属水平降低了小鼠肠道 Prevotellaceae\_UCG-001、*Bacteroides*、*Alloprevotella* 的相对丰度;在种水平降低了小鼠肠道 *Bacteroides acidifaciens* 的相对丰度,提高了 Lachnospiraceae\_bacterium\_COE1 的相对丰度。

## 参考文献:

- [1] 边素艳,刘宏斌.细胞外囊泡的分离及鉴定方法[J].新医学,2019,50(9):658-662.  
BIAN S Y,LIU H B.Isolation and identification methods of extracellular vesicles[J].New Medicine,2019,50(9):658-662.(in Chinese)
- [2] BELL B M,KIRK I D,HILTBRUNNER S,et al.Designer exosomes as next-generation cancer immunotherapy[J].Nanomedicine:Nanotechnology,Biology and Medicine,2016,12(1):163-169.
- [3] BANG C,THUM T.Exosomes:new players in cell-cell communication[J].The International Journal of Biochemistry & Cell Biology,2012,44(11):2060-2064.
- [4] RODRIGUES M L,NAKAYASU E S,OLIVEIRA D L,et al.Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence[J].Eukaryotic Cell,2008,7(1):58-67.
- [5] DEATHERAGE B L,COOKSON B T.Membrane vesicle release in bacteria,eukaryotes,and archaea;a conserved yet underappreciated aspect of microbial life[J].Infection and Immunity,2012,80(6):1948-1957.
- [6] FONG M Y,ZHOU W Y,LIU L,et al.Breast-cancer-secreted miR-122 reprograms glucose metabolism in

- premetastatic niche to promote metastasis [ J ]. *Nature Cell Biology*, 2015, 17 ( 2 ) : 183-194.
- [ 7 ] TONG L J, HAO H N, ZHANG X Y, et al. Oral administration of bovine milk-derived extracellular vesicles alters the gut microbiota and enhances intestinal immunity in mice [ J ]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2020, 64 ( 8 ) : e1901251.
- [ 8 ] ZEMPLÉNI J, SUKREET S, ZHOU F, et al. Milk-derived exosomes and metabolic regulation [ J ]. *Annual Review of Animal Biosciences*, 2019, 7 : 245-262.
- [ 9 ] TENG Y, REN Y, SAYED M, et al. Plant-derived exosomal microRNAs shape the gut microbiota [ J ]. *Cell Host & Microbe*, 2018, 24 ( 5 ) : 637-652.e8.
- [ 10 ] ZHOU F, PAZ H A, SADRI M, et al. Dietary bovine milk exosomes elicit changes in bacterial communities in C57BL/6 mice [ J ]. *American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2019, 317 ( 5 ) : G618-G624.
- [ 11 ] BISHOP D G, WORK E. An extracellular glycolipid produced by *Escherichia coli* grown under lysine-limiting conditions [ J ]. *The Biochemical Journal*, 1965, 96 ( 2 ) : 567-576.
- [ 12 ] SCHOOLING S R, BEVERIDGE T J. Membrane vesicles: an overlooked component of the matrices of biofilms [ J ]. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188 ( 16 ) : 5945-5957.
- [ 13 ] BROWN L, WOLF J M, PRADOS-ROSALES R, et al. Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi [ J ]. *Nature Reviews Microbiology*, 2015, 13 ( 10 ) : 620-630.
- [ 14 ] 黄婧文, 李欢, 万振鹏, 等. 仔猪溶血性葡萄球菌的分离鉴定及体外抑菌试验分析 [ J ]. *江西畜牧兽医杂志*, 2021 ( 1 ) : 13-16.  
HUANG J W, LI H, WAN Z P, et al. Isolation and identification of hemolytic *Staphylococcus* from piglets and analysis of antibacterial test *in vitro* [ J ]. *Jiangxi Journal of Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2021 ( 1 ) : 13-16. ( in Chinese )
- [ 15 ] 刘保光, 谢苗, 董颖, 等. 金黄色葡萄球菌研究现状 [ J ]. *动物医学进展*, 2021, 42 ( 4 ) : 128-130.  
LIU B G, XIE M, DONG Y, et al. Research status of *Staphylococcus aureus* [ J ]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2021, 42 ( 4 ) : 128-130. ( in Chinese )
- [ 16 ] 刘杰, 叶海梅, 刘秀峰, 等. 一起金黄色葡萄球菌食物中毒病原学检测及耐药分析 [ J ]. *中国卫生检验杂志*, 2020, 30 ( 4 ) : 484-486, 489.  
LIU J, YE H M, LIU X F, et al. Pathogenic detection and drug resistance analysis of *Staphylococcus aureus* from a food poisoning sample [ J ]. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*, 2020, 30 ( 4 ) : 484-486, 489. ( in Chinese )
- [ 17 ] ELTWISY H O, ABDEL-FATTAH M, ELSISI A M, et al. Pathogenesis of *Staphylococcus haemolyticus* on primary human skin fibroblast cells [ J ]. *Virulence*, 2020, 11 ( 1 ) : 1142-1157.
- [ 18 ] 连双庆, 陈榆生, 许能鑫, 等. 重症监护室溶血性葡萄球菌医院感染危险因素病例对照研究 [ J ]. *中国感染控制杂志*, 2011, 10 ( 5 ) : 357-360.  
LIAN S Q, CHEN Y S, XU N L, et al. A case-control study on risk factors for nosocomial *Staphylococcus haemolyticus* infections in intensive care units [ J ]. *Chinese Journal of Infection Control*, 2011, 10 ( 5 ) : 357-360. ( in Chinese )
- [ 19 ] DA F, JOO H S, CHEUNG G Y C, et al. Phenol-soluble modulins of *Staphylococcus haemolyticus* [ J ]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2017, 7 : 206.
- [ 20 ] XIE M Y, HOU L J, SUN J J, et al. Porcine milk exosome miRNAs attenuate LPS-induced apoptosis through inhibiting TLR4/NF- $\kappa$ B and p53 pathways in intestinal epithelial cells [ J ]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67 ( 34 ) : 9477-9491.
- [ 21 ] CHEN P F, ZHENG L, WANG Y Y, et al. Desktop-stereolithography 3D printing of a radially oriented extracellular matrix/mesenchymal stem cell exosome bioink for osteochondral defect regeneration [ J ]. *Theranostics*, 2019, 9 ( 9 ) : 2439-2459.
- [ 22 ] CAPORASO J G, KUCZYNSKI J, STOMBAUGH J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data [ J ]. *Nature Methods*, 2010, 7 ( 5 ) : 335-336.
- [ 23 ] FERNÁNDEZ-CRUZ E, ALECSANDRU D, SÁNCHEZ RAMÓN S. Mechanisms of action of immune globulin [ J ]. *Clinical and Experimental Immunology*, 2009, 157 ( S1 ) : 1-2.
- [ 24 ] AKDIS C A, BLASER K. Mechanisms of interleukin-10-mediated immune suppression [ J ]. *Immunology*, 2001, 103 ( 2 ) : 131-136.
- [ 25 ] SUN W P, YANG J. Functional mechanisms for human tumor suppressors [ J ]. *Journal of Cancer*, 2010, 1 : 136-140.
- [ 26 ] FREDHEIM E G A, KLINGENBERG C, ROHDE H, et al. Biofilm formation by *Staphylococcus haemolyticus* [ J ]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2009, 47

- (4):1172-1180.
- [27] TAKEUCHI F, WATANABE S, BABA T, et al. Whole-genome sequencing of *Staphylococcus haemolyticus* uncovers the extreme plasticity of its genome and the evolution of human-colonizing staphylococcal species[J]. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187(21): 7292-7308.
- [28] PAIN M, HJERDE E, KLINGENBERG C, et al. Comparative genomic analysis of *Staphylococcus haemolyticus* reveals key to hospital adaptation and pathogenicity[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10:2096.
- [29] FOURNIER B, PHILPOTT D J. Recognition of *Staphylococcus aureus* by the innate immune system[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2005, 18(3): 521-540.
- [30] FRENETTE M, BEAUDET R, BISAILLON J G, et al. Site of action of a gonococcal growth inhibitor produced by *Staphylococcus haemolyticus*[J]. *Journal of Medical Microbiology*, 1988, 26(3): 199-204.
- [31] LIU Y L. Fatty acids, inflammation and intestinal health in pigs[J]. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 2015, 6(1): 41.
- [32] HE F, WU C L, LI P, et al. Functions and signaling pathways of amino acids in intestinal inflammation[J]. *BioMed Research International*, 2018, 2018: 9171905.
- [33] PARSONS S P, HUIZINGA J D. Nitric oxide is essential for generating the minute rhythm contraction pattern in the small intestine, likely via ICC-DMP[J]. *Frontiers in Neuroscience*, 2020, 14:592664.
- [34] HU J, CHEN L L, TANG Y M, et al. Standardized preparation for fecal microbiota transplantation in pigs[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9:1328.
- [35] SOMMER F, BÄCKHED F. The gut microbiota—masters of host development and physiology[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2013, 11(4): 227-238.
- [36] IVANOV I I, ATARASHI K, MANEL N, et al. Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria[J]. *Cell*, 2009, 139(3): 485-498.
- [37] GARRETT W S, GORDON J I, GLIMCHER L H. Homeostasis and inflammation in the intestine[J]. *Cell*, 2010, 140(6): 859-870.
- [38] 孙东方, 王晨, 刘颖, 等. 双乙酸钠对小鼠肠道菌群结构和功能的影响[J]. *微生物学杂志*, 2020, 40(2): 57-65.
- SUN D F, WANG C, LIU Y, et al. Effects of sodium diacetate on the structure and function of mice intestines microbial community[J]. *Journal of Microbiology*, 2020, 40(2): 57-65. (in Chinese)

## Effects of *Staphylococcus haemolyticus*-Derived Extracellular Vesicles on Growth Performance, Immunity, Intestinal Morphology and Microbiota of Mice

LUO Meiyang<sup>1</sup> LING Mingwang<sup>1</sup> ZHAN Zhouling<sup>1</sup> ZHENG Jianghong<sup>1</sup> ZHONG Xiaotong<sup>1</sup>  
OU Chunxiu<sup>1</sup> LIANG Yingqian<sup>1</sup> FENG Xin<sup>1</sup> WANG Ruixiao<sup>1</sup>  
HUANG Dechun<sup>1</sup> ZHANG Huihua<sup>1</sup> QI Qien<sup>1,2\*</sup>

(1. School of Life Science and Engineering, Foshan University, Foshan 528231, China; 2. Guangdong Province Key Laboratory of Animal Nutritional Regulation, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** This experiment was conducted to study the effects of *Staphylococcus haemolyticus*-derived extracellular vesicles (SH-EVs) on growth performance, immunity, intestinal morphology and microflora of mice. Twenty healthy male C57BL/6 mice with similar body weight and age were randomly assigned into 2 groups with 10 replicates per group and 1 mouse per replicate. Mice in control group were fed 150  $\mu$ L phosphate buffer solution (PBS), and those in test group were fed 150  $\mu$ L SH-EVs suspensions (containing 500  $\mu$ g SH-EVs) every other day. The experiment lasted for 5 days. The results showed as follows: 1) compared with the control group, administration of SH-EVs significantly decreased the average daily feed intake (ADFI) and average daily gain (ADG) of mice ( $P < 0.05$ ), and tended to increase the ratio of feed to gain (F/G) ( $P = 0.052$ ). 2) Compared with the control group, administration of SH-EVs significantly increased the serum tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and interleukin-10 (IL-10) contents ( $P < 0.05$ ), significantly decreased serum immunoglobulin A (IgA) content ( $P < 0.05$ ), and tended to decrease serum immunoglobulin G (IgG) content ( $P = 0.067$ ). 3) Administration of SH-EVs resulted in ileum villi injury and sparse of mice. 4) Compared with the control group, administration of SH-EVs significantly reduced the relative abundance of Bacteroidetes in intestine of mice ( $P < 0.05$ ), and significantly increased the relative abundances of Acidobacteria, Chloroflexi, Proteobacteria and Planctomycetes at phylum level ( $P < 0.05$ ); significantly reduced the relative abundances of Prevotellaceae\_UCG-001, *Bacteroides* and *Alloprevotella* in intestine of mice at genus level ( $P < 0.05$ ); significantly reduced the relative abundance of *Bacteroides acidifaciens* in intestine of mice ( $P < 0.05$ ), and significantly increased the relative abundance of Lachnospiraceae\_bacterium\_COE1 at species level ( $P < 0.05$ ). In conclusion, administration of SH-EVs reduces the growth performance and immunity of mice, damages the morphological development of intestine and disturbs the structure of intestinal microflora to a certain extent, and has adverse effects on the health of mice. [*Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2021, 33(8): 4719-4729]

**Key words:** *Staphylococcus haemolyticus*; extracellular vesicles; growth performance; immune indicators; intestinal microorganism; mouse