

甘氨酸诱导细菌外膜囊泡分泌的脂质组学分析

宋静远^{1,2}, 齐秀蕾², 郭怀忠^{1*}, 胡良海^{2*}

(1. 河北大学药学院, 河北 保定 071002; 2. 吉林大学生命科学学院, 吉林 长春 130023)

摘要: 细菌外膜囊泡(outer membrane vesicle, OMV)是由细菌分泌的具有双层磷脂膜结构的外囊泡,携带多种亲本细菌生物活性物质,可作为疾病标志物,因其具有良好的生物相容性,在作为抗癌抗菌药物载体方面也具有很大的潜力。在大肠杆菌培养过程中添加甘氨酸可促进细菌OMV的分泌,但诱导所引起细菌OMV的脂质成分差异未见报道。本研究对甘氨酸诱导前后的细菌OMV的关键质膜组成部分进行脂质组学分析,利用两亲性树枝状聚合物超分子探针对细菌培养上清液进行细菌OMV的捕获,在细菌OMV数量保持一致的条件下,采用甲基叔丁基醚脂质提取法对甘氨酸诱导前后的细菌OMV进行脂质提取。采用超高效液相色谱-离子淌度-飞行时间高分辨质谱仪(UPLC-IMS-QTOF-MS)和MS-DIAL(Mass Spectrometry Data Independent Analysis for Lipidomics)脂质数据分析软件对甘氨酸诱导前后的细菌OMV脂质组成进行分析,确定甘氨酸诱导后细菌OMV关键质膜上的差异脂质种类。研究发现,在大肠杆菌培养过程中添加甘氨酸会引起其大肠杆菌OMV表面和内部脂质成分发生显著变化,神经酰胺(Cer)和溶血磷脂酰胆碱(LPC)的表达呈现出显著升高,双(单酰基甘油)磷酸酯(BMP)的表达显著降低,而甘油三酯(TG)和鞘磷脂(SM)的表达呈现无规律的变化,值得下一步深入探索其调控机制。本研究可为后续的OMV脂质成分深入研究和用于新型药物递送载体的研究提供一定参考。

关键词: 细菌外膜囊泡; 离子淌度质谱; 脂质组学; 甘氨酸

中图分类号: O658 文献标识码: A

Lipidomics analysis of glycine-induced bacterial outer membrane vesicles

SONG Jingyuan^{1,2}, QI Xiulei², GUO Huaizhong^{1*}, HU Lianghai^{2*}

(1. College of Pharmaceutical Sciences, Hebei University, Baoding 071002, China;

2. School of Life Sciences, Jilin University, Changchun 130023, China)

Abstract: Outer membrane vesicles (OMVs) are nanoparticles with double-phospholipid membrane structures that are secreted by gram-negative bacteria and carry a variety of bioactive substances from parental bacterial cells; consequently, OMVs serve as disease markers. Moreover, bacterial OMVs are potential anticancer- and antibacterial-drug carriers. While the addition of glycine during bacterial culturing promotes the secretion of bacterial OMVs, glycine-induced differences in the lipid compositions of such OMVs have not yet been reported.

In this study, the key plasma membrane components of bacterial OMVs before and after glycine induction were analyzed using lipidomics. Bacterial OMVs were captured from bacterial-culture supernatants using an amphiphilic dendritic polymeric supramolecular probe. Two sets of enriched bacterial OMVs were characterized and their enrichment efficiencies determined, after which the numbers and purities of the OMVs within the samples were determined using a nanofluidic assay. Lipids were extracted using the methyl *tert*-butyl ether lipid-extraction method when consistent numbers were recorded. The lipid compositions of the bacterial OMVs

收稿日期: 2024-10-20

* 通讯联系人.E-mail:ghuaizh@aliyun.com(郭怀忠); E-mail:lianghaihu@jlu.edu.cn(胡良海).

基金项目: 国家自然科学基金(22374056).

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 22374056).

before and after glycine induction were analyzed using an ultra-performance liquid chromatography-ion mobility spectrometry-quadrupole time-of-flight mass spectrometer (UPLC-IMS-QTOF-MS) and MS-DIAL software. Differential lipid species in the key plasma membranes of the bacterial OMVs following glycine induction were recorded along with their corresponding amounts. Detection was accomplished in positive-ion scanning mode using an ACQUITY UPLC BEH C18 column following UPLC-MS injection, and MS^E mass-spectrometry data-acquisition mode. The lipid components in the two groups were determined by combining mass-spectrometric and software-analysis data, which revealed that the addition of glycine to the *E. coli* Nissle 1917 culture led to two-to-three-times higher concentrations of OMVs than observed for the untreated group under the same culturing and enrichment conditions. Particle numbers measured for the same volume revealed one-order-of-magnitude more bacterial OMVs after induction than before, with the treated group exhibiting slightly larger particles (on average); however, these particles were better dispersed and less likely to aggregate. The identified lipid components were categorized to determine the amount of each lipid type. Differentially expressed lipids were subsequently screened according to experimental conditions; significantly different expression levels were observed following glycine induction, with 820 lipids identified among the 10 165 components detected. The lipid classes were ranked in order of quantity as: glycerolipids (GL), fatty acids (FA), sphingolipids (SP), glycerophospholipids (GP), saccharolipids (SL), and sterol lipids (ST), among which 463 GL lipid fractions (56.4% of all characterized lipids) were recorded. The ST lipid fraction contained the fewest members (10) and qualitative lipids were determined to make up 1.2% of the total. The addition of glycine to the *E. coli* culture was found to induce significant changes in the surface and internal lipid composition of the *E. coli* OMVs, with significantly more ceramide (Cer) and lysophosphatidyl choline (LPC), and significantly less bis(monoacylglycerol)phosphate (BMP) expressed. Partial triglyceride (TG) and sphingomyelin (SM) were irregularly expressed following glycine treatment, with equal amounts of up-and down-regulated lipids observed. This study provides a reference for subsequent in-depth studies into the lipid compositions of OMVs and their use as novel drug-delivery carriers. The expression of TGs and SM showed irregular changes, which is worthy of the next step of in-depth exploration of its regulatory mechanism, and the present study provides a certain reference for the subsequent in-depth study of the lipid composition of OMV and its use in the study of novel drug delivery carriers.

Key words: bacterial outer membrane vesicles; ion mobility mass spectrometry; lipidomics; glycine

细菌外膜囊泡 (outer membrane vesicle, OMV) 是由革兰氏阴性菌分泌的具有双层膜结构的纳米级囊泡^[1], 在细菌生长的各个阶段均可分泌。OMV 通过细菌群体感应在细胞通讯中发挥重要作用^[2], 并携带多种亲本细菌细胞生物活性物质^[3], 可反映其母体细胞的生理和病理状态。因其具有高

生物相容性、长循环时间和包封生物分子的固有能力^[4], 在作为免疫刺激剂、疫苗和抗癌、抗菌药物递送载体^[5,6]方面具有很大的潜力和吸引力。目前 OMV 主要来源于细菌培养液, 因培养条件简单, 周期短, 适合进行规模化生产。*Escherichia coli* Nissle1917 (EcN) 是革兰氏阴性益生菌株^[7] (为方

便阅读,下文均以 Nissle 作为通用缩写),可定植并保护肠道,在医学上可用于治疗感染性和炎症性肠道疾病^[8,9],目前已有相关药品上市^[10]。主要原理是 EcN 细菌的 H1 型鞭毛通过细菌之间的相互作用以及锚定识别作用,在肠道上皮表面形成一层紧密的网络结构,从而阻止病原菌对肠道上皮细胞的黏附及侵袭^[11]。此外其表面的脂蛋白还可增强宿主细胞介导的免疫应答^[12],调节促炎性和抗炎性细胞因子之间的平衡。

为实现 OMV 的高纯度和高回收率分离,多种分离方法应运产生,常见的纯化富集手段有超速离心^[13]、密度梯度离心^[14]、尺寸排阻色谱^[15]和分子印迹法^[16]等。其中,超速离心法被认为是 OMV 分离手段的金标准。尽管这些方法可基本满足 OMV 的富集,但操作复杂,耗时较长。为实现 OMV 简便快速的分离,近年来,研究者开发了高通量的 OMV 富集方法,如 Feng 等^[17]制备了一种两亲性树枝状聚合物超分子探针(*amphiphile-dendrimer supramolecular probe*, ADSP),可有效插入 OMV 的磷脂双分子层膜,进而实现对 OMV 的高效捕获与分离,并可进行原位的蛋白质免疫检测。Shi 等^[18]发展了一种从大肠杆菌磁性收获 OMV 的高产率方法,大肠杆菌在聚乙二醇(PEG)化磁性氧化铁纳米颗粒(MNPs)存在下生长,可增加细菌的 MNPs 摄取和磁性 OMV 分泌,从而实现高产量磁性收获 OMV。OMV 由脂质、蛋白质、核酸和小分子代谢物质组成,用于细胞间生物信息的传递^[19],在一定程度上也可反映机体生理状态的变化。甘氨酸,又名氨基乙酸,在细菌培养过程中加入可促进细菌外排泵工作,进而表现为 OMV 分泌的增加,但此过程也伴随着细菌内部物质共流出^[20]。研究发现,在细菌培养液中添加质量分数为 1% 的甘氨酸,可显著促进 OMV 的分泌,对甘氨酸诱导前后分泌的 OMV 进行形态学和免疫学表征,结果表明两者均可引起强烈的免疫反应,但诱导后所分泌 OMV 的表面毒素活性显著降低^[21]。虽然甘氨酸可诱导细菌分泌更多的 OMV,但和正常条件下分泌的 OMV 的成分差异未见报道。OMV 的双层膜由多种脂质构成,对其脂质组成的分析可直接反应甘氨酸诱导前后 OMV 组成的变化,为 OMV 用于药物递送的研究提供重要参考。同时脂质代谢与机体疾病密切相关,且多数脂质代谢物具有良好的稳定性,因此它也常作为疾病生物标志物^[22]。本研究拟采用超高效液相色谱-高

分辨质谱(UPLC-HRMS)对 OMV 进行非靶向脂质组学分析,通过比较甘氨酸诱导前后 OMV 的脂质组差异,考察甘氨酸诱导前后 OMV 的脂质变化规律,为后续 OMV 脂质成分的深入研究和作为药物递送载体的应用提供一定参考。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂与材料

ACQUITY UPLC H-Class PLUS 液相色谱仪-SYNAPT XS 质谱仪(UPLC-IMS-QTOF-MS,美国 Waters); CentriVap 真空离心浓缩仪(美国 Labconco); Zetasizer Pro 纳米粒度和 ZETA 电位分析仪(英国 Malvern Panalytical); 纳米流式检测仪(英国 APPAGE); 全波长光吸收酶标仪(奥地利 Tecan Austria GmbH)。

氨水(28%)购自国药集团化学试剂有限公司(上海);1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(EDC)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、脂肪酸甲酯磺酸钠(MES)、乙腈(ACN,色谱级)、甲醇(色谱级)、异丙醇(IPA,色谱级)、二甲基亚砜(DMSO,>99%)、甲基叔丁基醚(MTBE,色谱级)、脂质标准品鞘磷脂(SM,>99%)购自阿拉丁生化科技股份有限公司(上海);磷酸缓冲液(PBS)购自普诺赛生命科技有限公司(武汉);BCA 蛋白质定量试剂盒购自碧云天生物技术有限公司(上海);两性霉素(AMB)、Dendrimer、甲酸(色谱级)购自 Sigma(美国);放射免疫沉淀法裂解液(RIPA 裂解液)购自 Thermo Fisher Scientific(美国);外膜蛋白 A(OmpA)兔多克隆抗体(1:2000, CSB-PA359226ZA01EOD)购自 Cusabio(美国);HRP-Anti-Rabbit 二抗购自 Santacruz(美国);底物(ECL)显影液购自 Merck Millipore(德国);脂质标准品 L- α -磷脂酰胆碱(PC,>98%)购自 J&K Scientific(北京)。

硝酸纤维素(NC)膜(0.22 μm)购自 Cytiva(瑞典);透析膜(3500 Da)购自 Solarbio(北京);水性微孔过滤膜(0.45 μm)购自津腾(天津)

1.2 Nissle 的培养和 Nissle 细菌培养液预处理

Nissle 的培养:复苏 Nissle 细菌,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜后进行平板划线,培养形成单菌落。挑取单菌落于试管中进行培养,待培养基浑浊后转移到培养瓶中扩大培养至培养基再次浑浊,呈现半透明状态。为验证甘氨酸对 Nissle 分泌 OMV 的促进作用,在

扩大培养步骤时,向实验组对应的培养瓶中加入培养基质量分数为 1% 的甘氨酸粉末,其他步骤同上。

分别收集两组 Nissle 细菌培养液进行以下处理:6 000 g 下离心 10 min 去除细菌和细菌碎片沉淀,得到的细菌培养上清液采用 0.45 μm 滤膜过滤,进一步去除细菌碎片和大的囊泡。

1.3 ADSP-NC 膜的制备

ADSP 溶液:向 12 mg AMB 中加入 500 μL DMSO,在超声下充分溶解。依次加入 240 mg EDC、144 mg NHS 和 50 mL MES 于锥形瓶中,混合均匀后,加入上述 AMB 溶液和 10 μL Dendrimer,避光条件下磁力搅拌过夜。裁取 2 个 15 cm 大小的透析膜,水煮活化 15 min 后,加入上述制备的溶液进行透析,并间隔 1、2、2、4 h 更换透析液(超纯水)。透析结束后,在 4 ℃ 条件下,保存于避光离心管中。

ADSP-NC 膜的制备:裁取 5 cm×5 cm 大小的 NC 膜,活化后加入 ADSP 溶液,于摇床上孵育 4 h 以上。孵育结束,加入 PBS 洗去 ADSP-NC 膜上未结合的 ADSP,制备的 ADSP-NC 膜保存于 PBS 中。

1.4 ADSP-NC 膜富集细菌 OMV

采用制备的 ADSP-NC 膜并结合抽滤装置对细菌培养上清液中的 OMV 进行高通量富集,得到吸附有 OMV 的 ADSP-NC 膜。为减少 ADSP-NC 膜表面的非特异性吸附,向吸附有 OMV 的 ADSP-NC 膜上加入 PBS 洗涤 10 min。富集 OMV 过程中,抽滤步骤所用的滤膜为制备的 ADSP-NC 膜,目的是通过真空泵的吸力,使细菌培养上清液快速流经 ADSP-NC 膜,加快 OMV 与膜的特异结合。相比传统的直接孵育方法,该法可在短时间内对大量细菌培养上清液中的 OMV 进行富集。

碱性条件下洗脱结合的 OMV:将膜剪碎于 EP 管中,加入适量 4 mmol/L 氨水溶液涡旋洗脱 OMV,5 000 g 离心 10 min,取上清液,调节 pH 至中性后于 -80 ℃ 保存。

1.5 OMV 的表征

利用 BCA 蛋白质定量试剂盒对甘氨酸诱导前后的 OMV 溶液进行蛋白质浓度测定。

1.5.1 免疫印迹分析(WB)和银染

对诱导前后的 OMV 进行免疫印迹分析,考察细菌 OMV 富集情况,选用的一抗为 OMV 标志蛋白 OmpA。按照每孔 15 mg 蛋白质计算所需样品体积,保证每孔蛋白质质量一致(每组样品数为 3 个,即 $n=3$)。

1.5.2 OMV 颗粒数的测定

在相同的采集时间(30 s)下,采用纳米流式检测仪依次对甘氨酸诱导前后 OMV 样品进行颗粒数的测定。为检测样品溶液中 OMV 的纯度,分别向两组样品中加入样品体积 10% 的 RIPA 裂解液,并再次对颗粒数进行测定。颗粒数测定前,需根据实际情况对 OMV 样品进行必要稀释。

1.5.3 OMV 的粒径和 Zeta 电位分析

依次取 1 mL 富集的细菌 OMV 样品于对应测定管中,使用纳米粒度和 Zeta 电位分析仪进行粒径和电位检测。设定温度和稳定时间并选择对应待测材料性质后进行粒径的测定,并记录粒径分布、均值和多分散指数(PI)。Zeta 电位测定步骤同上。

1.6 非靶向脂质组学分析

1.6.1 样本预处理

在后续的非靶向脂质组学中,为探究实验组和对照组 OMV 在相同 OMV 颗粒数下的差异脂质,采用纳米流式仪进行计数后,分别取对应体积的 OMV 样本进行真空冷冻干燥。采用甲醇-MTBE-水溶剂体系提取细菌 OMV 中的脂质,步骤如下:向 OMV 冻干样品中加入 100 μL 甲醇溶液,液氮下反复冻融 3 次使 OMV 破碎裂解;加入 250 μL MTBE 涡旋振荡 15 min,加入 100 μL 去离子水分层,上层脂质 10 000 g 离心 10 min 后,取上清液冷冻干燥于 -20 ℃ 保存。上样分析前进行样品复溶,复溶溶剂为 A(氯仿-甲醇,2:1)和 B(ACN-IPA-水,65:30:5),以 1:2 的体积比混合,总体积为 180 μL,离心后取上清液于进样小瓶中。

1.6.2 色谱条件

色谱柱:ACQUITY UPLC BEH C18 色谱柱(50 mm×2.1 mm, 1.7 μm, Waters),柱温为 50 ℃;流速 0.3 mL/min;进样量为 5 μL;流动相:(A) ACN-水(3:2)和(B) IPA-ACN(1:1);梯度洗脱程序:0~2.0 min, 40% B~43% B; 2.0~2.1 min, 43% B~50% B; 2.1~8.0 min, 50% B~54% B; 8.0~8.1 min, 54% B~70% B; 8.1~10.0 min, 70% B~99% B; 10.0~10.1 min, 99% B~40% B; 10.1~12.0 min, 40% B。

1.6.3 质谱条件

采用电喷雾离子源(ESI),正离子扫描模式检测。离子源温度:300 ℃;锥孔电压为 40 V,二级碰撞能量(CE)范围为 20~50 V,毛细管电压 1 000 V;干燥气(氮气)、碰撞气(氩气)的流速分别是 50 L/h

和 800 L/h, 雾化气压强为 650 kPa, 淌度气体为氮气。采用 MS^E 模式进行数据采集。采用的脂质标准品为 PC 和 SM。

1.7 数据处理与统计分析

利用 MS-DIAL 脂质分析软件(Mass Spectrometry Data Independent Analysis for Lipidomics, 百泰派克生物科技有限公司, 北京)对实验组和对照组数据进行定性, 获得精确质荷比(m/z)、保留时间(RT)、脂质类型等信息, 然后通过 LIPID MAPS 数据库(LIPID Metabolites and Pathways Strategy, National Institutes of Health, 美国)对脂质的结构信息以及分类进行核对。

2 结果与讨论

本研究总体流程如图 1 所示, 首先通过 ADSP-NC 膜对 Nissle 细菌培养液进行 OMV 的高通量捕获, 为验证富集效率, 依次对富集的 OMV 进行表征; 为探究在细菌生长过程添加甘氨酸对细菌分泌的 OMV 脂质成分的影响, 利用 UPLC-IMS-QTOF-MS 对提取的 OMV 脂质成分进行分离分析, 进行非靶向脂质组学分析。

2.1 OMV 的 WB、银染、颗粒数、纯度和粒径分布分析

为评估 OMV 的富集情况, 对甘氨酸诱导前后的 OMV 进行蛋白质浓度检测, 结果分别为 0.3 mg/mL 和 0.6 mg/mL。OmpA 是 Nissle 细菌

OMV 的表面特异蛋白, 维持细菌外膜的完整, 参与 OMV 的形成和分泌过程。为验证 OMV 是否成功富集, 对其进行 WB 分析, 由图 2a 可知, 甘氨酸诱导组和非诱导组均可见 OmpA 双蛋白质条带, 这标示着 OMV 的成功富集。甘氨酸诱导组中 OmpA 蛋白质条带颜色清晰可见, 而非诱导组的蛋白质条带颜色较浅, 通过 Image J 软件进行灰度分析, 得到两者对应的蛋白质条带的灰度值及比值。结果表明, 在细菌培养过程中加入甘氨酸可促进 OMV 分泌。WB 和银染都是检测蛋白质条带的常用手段, 由图 2b 可知, 在保证每孔蛋白质质量一致时, 诱导前后的 OMV 银染条带在 35 kDa 附近处均清晰可见, 两组间及组内平行样本的 OMV 条带均无明显差异。结合 WB 来看, 表明在相同蛋白量条件下, 未经甘氨酸诱导的细菌 OMV 中杂蛋白较多。

采用纳米流式检测仪对 OMV 的颗粒数和纯度进行测定, 由预实验可知, 甘氨酸诱导组细菌 OMV 数约为非诱导细菌 OMV 数量的 10 倍, 为考察相同数量级下制备的 OMV 样品溶液的 OMV 纯度, 诱导组测试前进行 10 倍稀释。RIPA 裂解液可破坏囊泡结构, 对加入 RIPA 裂解液前后的颗粒数进行测定可大致得出 OMV 样品中 OMV 的纯度。由图 2c 可知, 稀释 10 倍的甘氨酸诱导组进行 RIPA 裂解前颗粒数为 2.76×10^9 个/mL, 裂解后的颗粒数为 5.67×10^8 个/mL, 可得诱导组 OMV 样品纯度为 79.5%; 非诱导组裂解前的颗粒数为 1.56×10^9 个/mL, 裂解

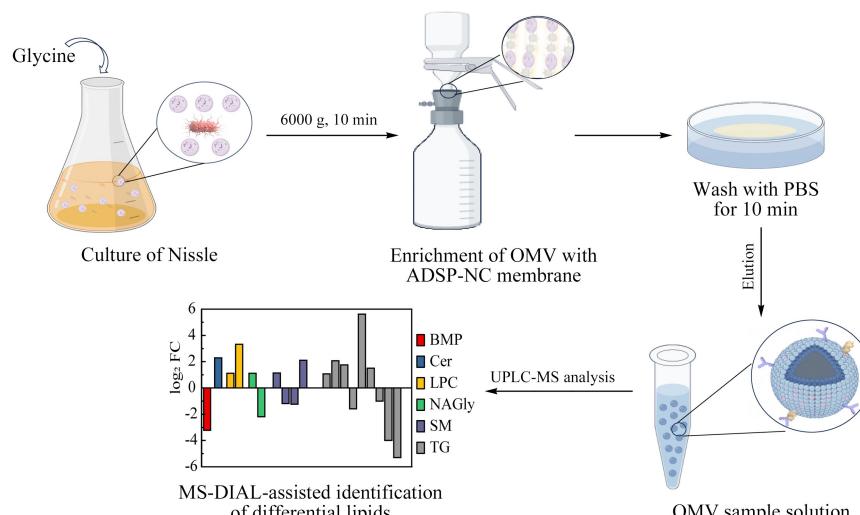


图 1 细菌 OMV 的富集和脂质组学分析流程

Fig. 1 Enrichment and lipidomics analysis process of bacterial outer membrane vesicles

OMV: outer membrane vesicle; ADSP-NC: amphiphile-dendrimer supramolecular probe; PBS: phosphate buffer saline; FC: fold change; MS-DIAL: Mass Spectrometry Data Independent Analysis for Lipidomics; BMP: bis(monoacylglycerol) phosphate; Cer: ceramide; LPC: lysophosphatidyl choline; NAGly: *N*-arachidonylglycine; SM: sphingomyelin; TG: triglyceride.

后的颗粒数为 4.14×10^8 个/mL, 非诱导组 OMV 样品纯度为 73.5%。结果显示, 当两组样品 OMV 颗粒数在同一数量级时, 甘氨酸诱导组 OMV 的纯度稍高于非诱导组, 同时两组 OMV 样品中 OMV 纯度均较高, 表明囊泡结构完整性良好。

对细菌 OMV 的粒径大小和 Zeta 电位进行测

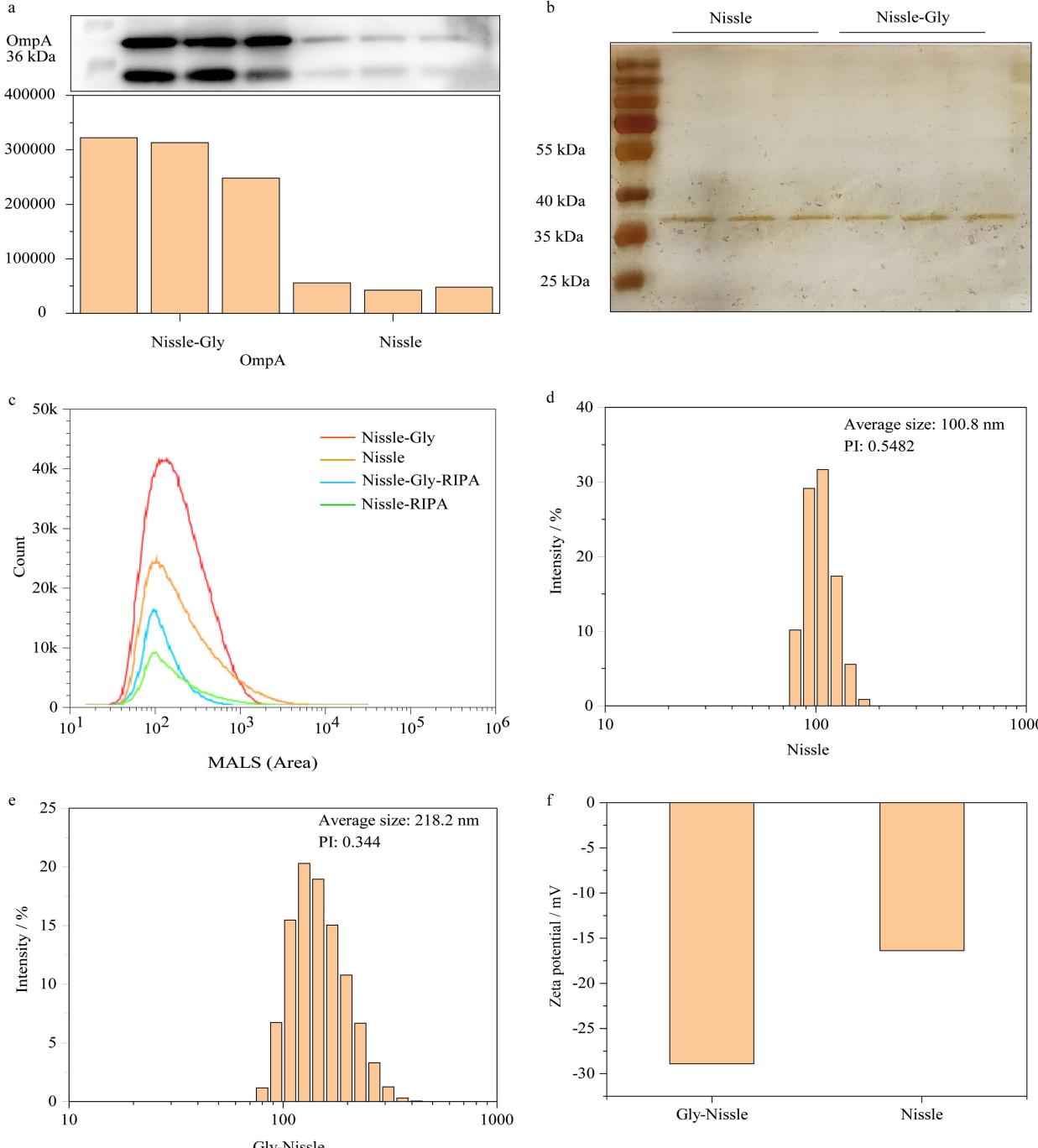


图 2 甘氨酸诱导前后的 OMV 表征

Fig. 2 Characterization of OMV before and after glycine induction

a. WB target stripe and grayscale analysis; b. silver stripe; c. purity analysis of OMV; d, e. size analysis of OMV; f. Zeta potential analysis of OMV.

定, 结果如图 2d 和 2e 所示, 非诱导组的粒径尺寸为 80~150 nm, PI 为 0.5482; 甘氨酸诱导组 OMV 整体粒径尺寸增大, 粒径为 90~200 nm, 分布较为均匀, PI 为 0.344; 表明在细菌培养过程中添加甘氨酸对分泌的 OMV 大小和稳定性具有一定影响, 分泌的 OMV 不易聚集, 分散性良好。图 2f 是测定的

Zeta 电位结果, 甘氨酸诱导组的数值为 -28 mV , 非诱导组的数值为 -17 mV , OMV 的双层磷脂膜结构导致其表面带负电。Zeta 电位是表征胶体分散系稳定性的重要指标, Zeta 电位的绝对值越高, 体系越稳定, 表明甘氨酸诱导后所分泌的细菌 OMV 的稳定性增强。

2.2 UPLC-IMS-QTOF-MS 分析

将制备的脂质冻干粉复溶, 离心后取上清液于进样小瓶中, 复溶剂作为空白对照。离子淌度技术可辅助传统的 LC-MS 对检测到的分析物进行多维表征, 在代谢组学、蛋白质组学分析中均有应用。选取淌度时间 (drift time) $20\sim180\text{ Bins}$, m/z $500\sim1000$, 分别调取诱导前(图 3-Nissle)和诱导后(图 3-Nissle-Gly)对应的离子淌度图, 对其中的差异脂质进行标记。

2.3 甘氨酸诱导前后 OMV 脂质差异表达分析

研究发现, 向 Nissle 培养基中补充甘氨酸, 与非诱导组 OMV 相比, 不仅可显著增加分泌的 OMV 数量, 诱导组 OMV 的内膜蛋白 RodZ、胞浆蛋白 Crp 和 AdhE 的表达水平也显著增加。我们通过多变量分析进一步研究总体水平上的脂质紊乱, 结果发现, 甘氨酸诱导后脂质的表达也发生了显著变化。

为探究在 Nissle 培养过程中添加甘氨酸对

OMV 脂质组成的影响, 利用非靶向脂质组学技术分析了甘氨酸诱导前和诱导后的 OMV 脂质组, 共鉴定出 820 个脂质分子, 主要有甘油三酯 (TG)、甘油二酯 (DG)、神经酰胺 (Cer)、SM、N-酰基乙醇胺 (NAE)、PC、双(单酰基甘油)磷酸酯 (BMP)、N-酰基牛磺酸 (NATAU)、溶血磷脂酰胆碱 (LPC) 等。

采用 MS-DIAL 脂质数据分析软件, 通过 m/z 、RT、MS/MS、峰面积一一匹配, 实现 OMV 样品中脂质成分的定性定量。为考察软件和仪器测定的准确性, 采用 PC 和 SM 脂质标准品进行验证, 结果表明测定脂质相对分子质量与精准相对分子质量之间误差为 8×10^{-6} (8 ppm)。结合 LIPID-MAPS 数据库进行脂质分类, 包括以下 8 类, 分别是脂肪酸类 (fatty acids, FA)、甘油脂类 (glycerolipids, GL)、醇脂类 (sterol lipids, ST)、鞘脂类 (sphingolipids, SP)、甘油磷脂类 (glycerophospholipids, GP)、糖脂类 (saccharolipids, SL)、孕烯醇酮脂 (prenol lipids, PR) 和多聚乙烯类 (polyketides, PK)。由图 4a 可知, 本次检测到的 820 个脂质成分中, 按照含量高低排序, 依次是 GL、FA、SP、GP、SL、ST, 其中 GL 类脂质组分有 462 个, 所占比例为 56.4%。由图 4b 可知, 一共鉴定出 24 种脂质, 数量最多的 6 种脂质分别是 TG、DG、Cer、SM、NATAU、NAE, 比例为

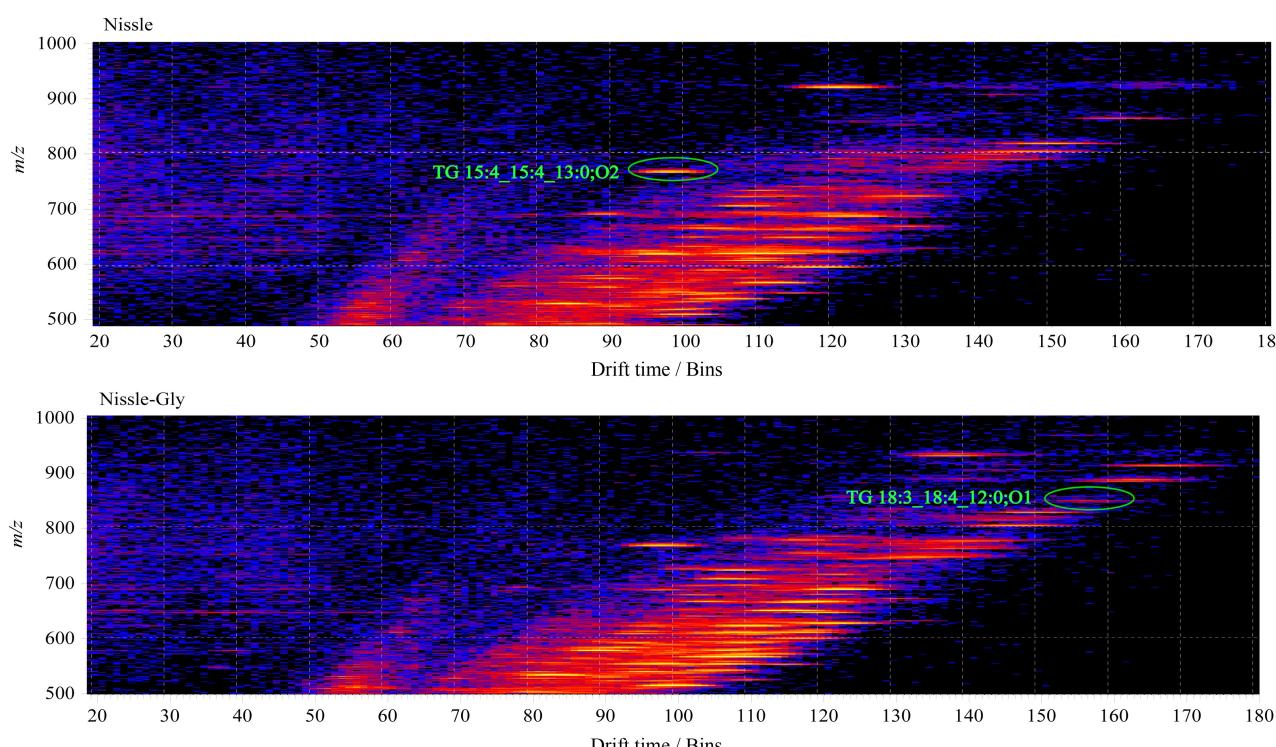


图 3 甘氨酸诱导前后的细菌 OMV 进行离子淌度质谱分析

Fig. 3 Ion mobility mass spectrometry analysis of exosomes before and after inducement with glycine

28.4%、26.9%、6.8%、6.5%、5.2%、5.0%，分别归属于 GL、GL、SP、ST、FA、FA 大类。

对定性到的脂质成分进行差异脂质的筛选。依次计算诱导前后两组脂质成分对应峰面积的比值 (fold change) 和 *P*-value，在满足 *P*-value<0.05 条件下筛选 FC>2 和 FC<0.5，得到甘氨酸诱导后脂质代谢表达发生改变的脂质，按照质荷比大小绘制差异脂质散点分布图(图 4c)。FC>2 和 FC<0.5 分别表示为该物质在甘氨酸诱导后表达上调和该物质在甘氨酸诱导后表达下调。图 4c 中右侧为表达上调的脂质成分在甘氨酸诱导组中高度表达，反之，甘氨酸诱导后部分脂质表达量明显下降。分析此图发现整体差异脂质的 \log_2 FC 的大小范围为 1~4，即差异脂质表达上下调的差异倍数为 2~16。从得到脂质离子的 *m/z* 来看，多数表达差异脂质组分的 *m/z*

分布在 500~1 000 区间，只有脂质表达上调中发现部分 *m/z* 为 300~500 的脂质离子。

考虑到实验的严谨性，再次对 MS-DIAL 脂质数据库匹配的差异脂质结果进行筛选，只保留匹配分数较高的脂质组分。甘氨酸诱导前后具有差异的脂质成分有 19 个，上下调脂质数量分别为 11 和 8 个。因此，在上调差异脂质组分中，共发现 5 种脂质组分，分别为 TG、SM、Cer、LPC、NAGly。在下调差异脂质组分中发现 4 种脂质，分别为 TG、BMP、SM、NAGly。此外还发现了一些特殊脂质成分，它们的表达具有一定规律性，在甘氨酸诱导后表达只发生上调的脂质有 LPC 和 Cer，如 LPC 24:6、LPC 21:2、Cer 15:2；O2/17:0；O；表达只出现下调的脂质有 BMP，如 BMP 19:0_28:6，图 4d 为甘氨酸诱导后脂质表达量发生改变的脂质成分。

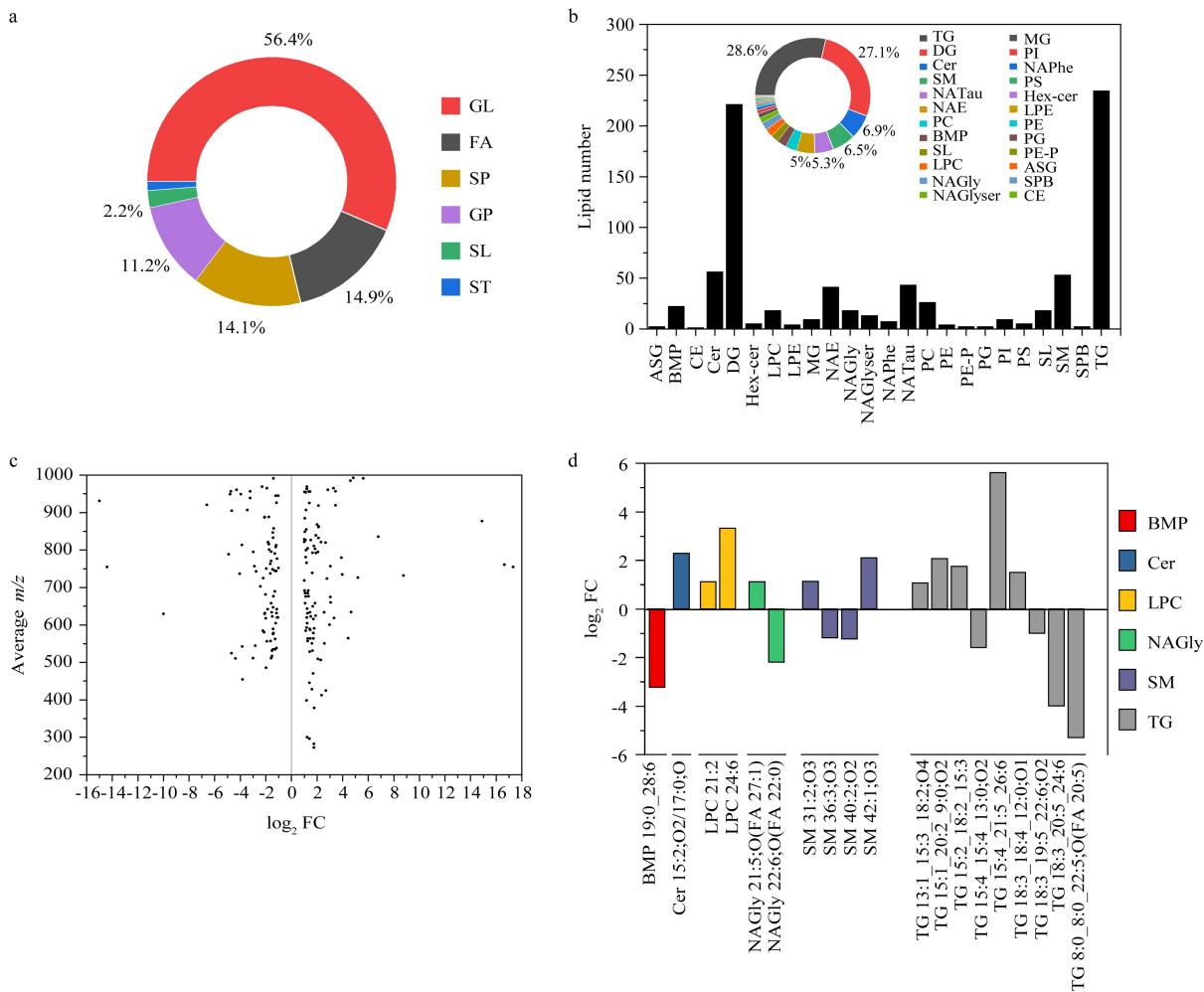


图 4 诱导前后的细菌 OMV 的脂质组学分析

Fig. 4 Lipidomic analysis of bacterial OMV before and after glycine induction

a. broad categorization of the identified lipids; b. continued lipid breakdown to the number and percentage of each lipid; c. scatter plots of up- and down-regulation of different lipids in the two groups; d. TOP15 names of up- and down-regulated lipids.

3 结论

本研究利用 ADSP-NC 膜对甘氨酸诱导前后的细菌培养上清液中的 OMV 进行富集,并对富集的 OMV 进行了一系列表征,包括 WB、银染、蛋白质浓度、粒径分布和 Zeta 电位以及细菌 OMV 颗粒数和纯度,结果表明细菌 OMV 成功富集。进一步对其富集的 OMV 进行脂质提取,基于 UPLC-IMS-QT-OF-MS 和 MS-DIAL 软件对其进行非靶向脂质组学分析。结果表明两组的差异脂质组分的种类大致相同,但不同类型的脂质变化较大,后期可结合其他研究(如蛋白质组学)进行综合分析,对其差异脂质成分进行通路和机制的分析,探究其作为新型药物递送载体应用的科学依据。

参考文献:

- [1] Kalluri R, LeBleu V S. Science, 2020, 367(6478): 6977
- [2] Díaz-Garrido N, Badia J, Baldomà L. J Extracell Vesicles, 2021, 10(13): e12161
- [3] Pathan M, Fonseka P, Chitti S V, et al. Nucleic Acids Res, 2019, 47(1): 516
- [4] Sun J, Rutherford S T, Silhavy T J, et al. Nat Rev Microbiol, 2022, 20(4): 236
- [5] Liu H, Geng Z, Su J. Extracell Vesicles Circ Nucleic Acids, 2022, 3(2): 63
- [6] Naskar A, Cho H, Lee S, et al. Pharmaceutics, 2021, 13(11): 1887
- [7] Behnson J, Deriu E, Sassone-Corsi M, et al. Cold Spring Harbor Perspect Med, 2013, 3(3): a010074
- [8] Grabig A, Paclik D, Guzy C, et al. Infect Immun, 2006, 74(7): 4075
- [9] Olovo C V, Wiredu Ocansey D K, Ji Y, et al. Gut Microbes, 2024, 16(1): 2341670
- [10] Henker J, Laass M, Blokhin B M, et al. Eur J Pediatr, 2007, 166: 311
- [11] Maltby R, Leatham-Jensen M P, Gibson T, et al. PLoS One, 2013, 8(1): e53957
- [12] Trebichavsky I, Splichal I, Rada V, et al. Nutr Rev, 2010, 68(8): 459
- [13] Liu H, Zhang Q, Wang S, et al. Bioact Mater, 2022, 14: 169
- [14] Windle H J. Methods Mol Biol, 2021, 2283: 123
- [15] Monguió-Tortajada M, Gálvez-Montón C, Bayes-Genis A, et al. Cell Mol Life Sci, 2019, 76(12): 2369
- [16] Li X, Qi X, Liu X, et al. Anal Chem, 2024, 96(49): 19803
- [17] Feng X, Iliuk A, Zhang X, et al. Anal Chem, 2023, 95(5): 2812
- [18] Shi R, Dong Z, Ma C, et al. Small, 2022, 18(48): 2204350
- [19] Lundstedt E, Kahne D, Ruiz N. Chem Rev, 2020, 121(9): 5098
- [20] Roier S, Zingl F G, Cakar F, et al. Nat Commun, 2016, 7(1): 10515
- [21] Hirayama S, Nakao R. Microb Biotechnol, 2020, 13(4): 1162
- [22] Guo M K, Zhang J. Chinese Journal of Chromatography, 2022, 40(2): 123
郭民康, 张健. 色谱, 2022, 40(2): 123