

· 全健康 ·

DOI: 10.15886/j.cnki.rdswwb.20240039



主持人: 韩 谦、刘萌萌

奇异变形杆菌源外膜囊泡诱导小鼠巨噬细胞 向M1型和M2b型极化

韦君志¹, 刘师佳¹, 宗永泰¹, 张 红², 覃 尧¹

(1. 海南大学 热带农林学院, 海口 570228; 2. 安徽农业大学 动物科技学院, 合肥 230036)

摘要: 为探究条件致病菌奇异变形杆菌 (*Proteus mirabilis*) 分泌的细菌外膜囊泡 (outer membrane vesicles, OMVs) 是否具备诱导巨噬细胞极化以调控肿瘤微环境的功能, 本研究以该 OMVs 刺激小鼠巨噬细胞 RAW264.7, 检测巨噬细胞极化相关表型。首先, 利用透射电镜对分离提取的 OMVs 进行表征; 其次, 用 PKH67 荧光染料示踪 OMVs, 通过荧光显微镜观察 RAW264.7 细胞对 OMVs 的摄取情况; 最后, 利用总一氧化氮 (NO) 检测试剂盒和实时荧光定量 PCR (RT-qPCR), 分别对 RAW264.7 细胞分泌的总 NO 含量和 RAW264.7 细胞极化相关因子表达进行检测。结果表明, OMVs 可被 RAW264.7 细胞摄取并诱导该细胞 NO 分泌增多, 同时上调 IL-10、IL-1 β 、TNF- α 和 IL-6 的表达, 即发生 M1 型和 M2b 型极化, 从而激活巨噬细胞的抗肿瘤活性。上述结果表明奇异变形杆菌分泌的 OMVs 在该菌抗乳腺肿瘤生长和肺脏转移中发挥潜在作用。

关键词: 奇异变形杆菌; 细菌外膜囊泡; 巨噬细胞

中图分类号: Q815 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-7054 (2024) 04-0445-07

韦君志, 刘师佳, 宗永泰, 等. 奇异变形杆菌源外膜囊泡诱导小鼠巨噬细胞向 M1 型和 M2b 型极化 [J]. 热带生物学报, 2024, 15(4): 446-452. doi: 10.15886/j.cnki.rdswwb.20240039

100 多年前, 美国外科医生 Dr. Coley 将链球菌注射入患有骨肉瘤的患者体内, 诱发了患者机体的免疫反应, 从而抑制了肿瘤的进展^[1], 至此拉开了细菌介导的肿瘤免疫治疗的序幕。细菌疗法主要是由于细菌自身携带具有调控肿瘤微环境 (Tumor micro-environment, TME) 的抗原, 靶向作用于肿瘤组织, 激活肿瘤相关巨噬细胞 (Tumor-associated Macrophages, TAMs)。细菌外膜囊泡 (outer membrane vesicles, OMVs) 是细菌不断外排的具有功能性的囊泡结构, 携带核酸、蛋白质等能够调控 TME 的活性物质, 且 OMVs 有脂多糖 (LPS)、DNA 和 RNA 等多种病原相关分子模式^[2]。由于奇异变形杆菌 (*Proteus mirabilis*) 是革兰氏阴性菌, 其 OMVs 中应携带 LPS 等多种可激活巨噬细胞的活性物质。前期研究已证实, 条件致病菌奇异变形杆菌能够发挥抗

乳腺肿瘤生长和肺脏转移的作用^[3-4]。

在先天免疫细胞中, 巨噬细胞尤为重要, 它分布于所有组织中, 并以组织特异性方式在发育、稳态和修复中发挥不可或缺的作用。然而, 巨噬细胞的功能状态受大量信号通路调节, 是动态的且具有可塑性。在受到各种环境因素如微生物产物、受损细胞和活化淋巴细胞等影响时, 巨噬细胞可通过经历不同表型极化以获得不同功能表型。其中, M0 型被认定为巨噬细胞最初状态, 在接受刺激后可极化成经典激活的 M1 型或交替激活的 M2 型, 并发挥不同作用。M1 型巨噬细胞与肿瘤杀伤相关, 而 M2 型巨噬细胞促进组织修复与肿瘤细胞增殖相关^[5]。在肿瘤发生的早期阶段, M1 型巨噬细胞中的 NF- κ B 激活对癌症相关炎症发生至关重要^[6]。然而, 在肿瘤发生晚期, 巨噬细胞被重

收稿日期: 2024-03-12

修回日期: 2024-03-25

基金项目: 国家自然科学基金 (32260904); 海南省研究生创新科研课题 (Qhys2021-162)

第一作者: 韦君志 (1998-), 男, 海南大学热带农林学院 2021 级硕士研究生。E-mail: 21220952000018@hainanu.edu.cn

通信作者: 覃尧 (1988-), 女, 讲师。研究方向: 分子病毒与免疫学。E-mail: qinyao@hainanu.edu.cn

编程为M2型巨噬细胞,显示出低NF- κ B激活但免疫抑制能力增加。M1型巨噬细胞可通过吞噬作用及介导Th1型细胞免疫应答,杀死肿瘤细胞,抑制肿瘤细胞生长;M2型巨噬细胞一般通过产生细胞因子及介导Th2型细胞免疫应答,促进组织修复、血管形成和产生免疫抑制,进一步加快了肿瘤细胞的生长、转移进程^[7]。然而,近期研究发现M2型巨噬细胞可进一步分为M2a型、M2b型、M2c型和M2d型,其中M2b型具有调节免疫反应和炎症反应广度及深度的作用^[8]。目前,对于巨噬细胞抗肿瘤功能的研究多聚焦于M1及M2b两类极化表型方面。小鼠M1型巨噬细胞会分泌TNF- α 和IL-6等促炎因子及CD80、CD86等膜表面受体,并促使诱导型一氧化氮合酶(iNOS)合成增多,从而导致细胞分泌的NO水平上升。而M2型巨噬细胞以IL-10、精氨酸酶1(Arg1)和CD206表达上调为特征,其中IL-10分泌增加是所有M2型巨噬细胞的共同特点;M2b型巨噬细胞属于M2型,但该类型巨噬细胞也会分泌TNF- α 、IL-1 β 、IL-6等促炎细胞因子^[9-11]。

本研究从奇异变形杆菌中分离提取OMVs,用其刺激小鼠巨噬细胞RAW264.7,检测RAW264.7细胞的极化生物标志物,明确该菌OMVs诱导RAW264.7细胞的极化类型,旨在探究奇异变形杆菌源OMVs是否具有刺激肿瘤免疫微环境重编程和抗肿瘤作用的潜力。

1 材料与方法

1.1 菌种及细胞 奇异变形杆菌35659菌株及小鼠巨噬细胞RAW264.7均为本实验室保留株。

1.2 主要试剂耗材 RNA提取试剂盒(R4011-02)购于上海迈跟生物科技有限公司;反转录试剂盒(RR047A)购于宝日医生物技术(北京)有限公司;琼脂、PBS缓冲液(pH=7.2~7.4)购于北京索莱宝科技有限公司;DMEM/HIGH GLUCOSE培养基购于HyClone;胎牛血清(FBS)购于美国Gibco公司;NO检测试剂盒(S0021S),青霉素-链霉素(10 000 U·mL⁻¹)均购于上海碧云天生物技术股份有限公司;PKH67外泌体染色剂购于西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司;BCA蛋白浓度测定试剂盒购于上海生工生物工程有限公司。酵母提取物购于上海麦克林生化科技股份有限公司。细胞上清外泌体提取试剂盒(UR52121)购于上海宇玫

博生物科技有限公司。

1.3 引物序列 引物由生工生物工程(上海)有限公司合成。

1.4 OMVs的分离与提取 将奇异变形杆菌接种于固体LB平板中,培养16 h,挑取单菌落接种于含有15 mL LB液体培养基的50 mL离心管中,于37 °C恒温摇床180 rpm培养过夜,按1:100稀释至1.5 L,再将其于37 °C继续培养。当OD₆₀₀接近1.0时,将上述菌液置于4 °C,7 000 g离心20 min,收集上清液并利用0.45 μ m的真空过滤器过滤。滤液用100 kDa的超滤管进行浓缩。随后,将浓缩的上清液在4 °C,150 000 g离心4 h。得到的沉淀用无菌PBS重悬。并进行分装后,于-80 °C保存。

1.5 OMVs的形态观察 将总蛋白质质量浓度为50 μ g·mL⁻¹的OMVs悬液滴加至透射电镜专用铜网上。用醋酸双氧铀染色法对其进行染色,室温干燥20 min后,用透射电镜进行观察。

1.6 OMVs的蛋白浓度测定 梯度稀释牛血清白蛋白(BSA)标准品,按说明书操作配制BCA工作液。将各稀释度的BSA和OMVs样品分别加入96孔板中,再加入200 μ L BCA工作液,于37 °C孵育30 min,在562 nm处测定样本的吸光度值。建立标准曲线,并计算OMVs的蛋白质浓度。

1.7 OMVs的荧光示踪标记 按照说明书步骤,取一支1.5 mL无菌离心管,加入稀释液C和PKH67染料,配制染料工作液。在无菌条件下,向每管分别加入稀释液C 250 μ L,轻柔吹打混匀30次后振荡15 s。快速将250 μ L外体稀释液加入至250 μ L PKH67染料工作液中,立即轻柔吹打混匀30次,避免产生气泡。混合液孵育3 min后,向每管中加入500 μ L无外泌体血清,并吹打混匀30次,避免产生气泡。然后,按照细胞上清外泌体提取试剂盒说明书进行重新提取,并过分离纯化柱以去除多余染料、杂质及损坏的OMVs,以达到纯化目的^[12]。

1.8 小鼠巨噬细胞系RAW264.7细胞培养 RAW264.7细胞用含有10% FBS的DMEM培养于CO₂培养箱(37 °C,含5% CO₂)中培养,待其生长到80%后进行细胞传代。传代操作中,需待使用的PBS及预先配置好的培养基恢复至室温后再进行操作以避免细胞活化。待其生长稳定后,在24孔

板中铺板。

1.9 OMVs刺激RAW264.7细胞 取3.8 μL 确定蛋白浓度的OMVs, 含15 μg 的OMVs逐滴缓慢加入铺好RAW264.7细胞的24孔板中, 轻柔混匀以保证OMVs能均匀分布。随后, 将与OMVs共孵育的RAW264.7细胞于 CO_2 培养箱(37°C , 含5% CO_2)中培养24 h。在0 h和24 h分别用荧光显微镜对RAW264.7细胞进行观察。保留细胞上清液用于NO检测。无菌PBS洗涤RAW264.7细胞3次, 收集所有细胞沉淀, 并于 -80°C 冰箱保存, 用于后续

RNA提取后进行的RT-qPCR检测相关细胞因子的mRNA水平。

1.10 RAW264.7细胞相关标志物的mRNA表达水平测定 分别收集未经OMVs刺激的RAW264.7细胞(空白组)及经OMVs刺激的RAW264.7细胞。按试剂盒说明书提取细胞总RNA, 反转录为cDNA, 再根据试剂盒说明书配制反应体系, 通过RT-qPCR, 以 β -actin为内参, 检测细胞相关标志物Arg1、IL-10、IL-1 β 、TNF- α 和IL-6的表达量。引物序列见表1。

表1 引物序列

Tab. 1 Primer sequence

| 基因名称 Gene | 上游引物 Forward primer | 下游引物 Reverse primer |
|----------------|--------------------------|-------------------------|
| β -actin | GATTACTGCTCTGGCTCCTAGC | GACTCATCGTACTCCTGCTTGC |
| Arg1 | ATGGAAGAGACCTTCAGCTAC | GCTGTCTTCCCAAGAGTTGGG |
| IL-10 | GGTTGCCAAGCCTTATCGGA | ACCTGCTCCACTGCCTTGCT |
| IL-1 β | GCAACTGTTCTGAACTCAACT | ATCTTTTGGGGTCCGTCAACT |
| TNF- α | CATCTTCTCAAATTCGAGTGACAA | TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC |
| IL-6 | CTCCTCGCCAATCTGAAGTC | CCTCACGGTCTTCTCCATAAAC |

1.11 统计学分析 统计分析使用 GraphPad Prism 8.0.2 软件, 组间进行单因素方差分析(One-way ANOVA)。每组样本量为3, 若 $P < 0.05$ 代表组间有显著差异, 以“*”标记; 若 $P < 0.01$, 代表组间有极显著差异, 以“**”标记; 若 $P < 0.001$, 以“***”标记。

2 结果分析

2.1 奇异变形杆菌OMVs的形态结构鉴定 革兰氏阴性菌分泌的OMVs直径通常为20~300 nm之间^[13-14]。奇异变形杆菌属于革兰氏阴性菌, 在透射电子显微镜下观察到从其分离出的OMVs直径在20~300 nm之间, 且呈杯状结构(如图1所示), 符

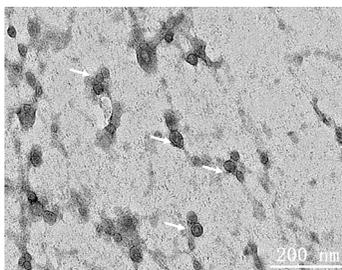


图1 奇异变形杆菌的OMVs透射电镜图

Fig. 1 Transmission electron microscopy of OMVs of *Proteus mirabilis*

合OMVs的结构特征, 表明奇异变形杆菌的OMVs提取成功。

2.2 奇异变形杆菌OMVs的蛋白含量测定 按照BCA蛋白测定试剂盒的说明书, 测定标准品在562 nm下的吸光度, 并制作蛋白浓度标准曲线, 按照标准曲线计算出奇异变形杆菌OMVs的蛋白浓度为 $3.95 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。

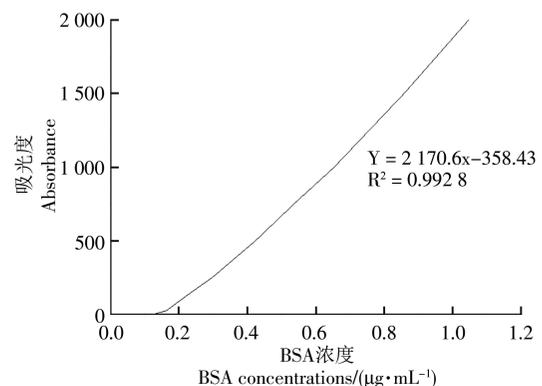


图2 蛋白浓度标准曲线

BSA: 牛血清白蛋白。

Fig. 2 Standard curve for protein concentrations

BSA: bovine serum albumin.

2.3 奇异变形杆菌OMVs诱导RAW264.7细胞的极化 在荧光显微镜下可观察到OMVs经PKH67

染料染色后,发出绿色荧光。OMVs与RAW264.7细胞共孵育24 h后,可观察到RAW264.7细胞内均有绿色荧光信号(图3-C),且符合OMVs的颗粒状

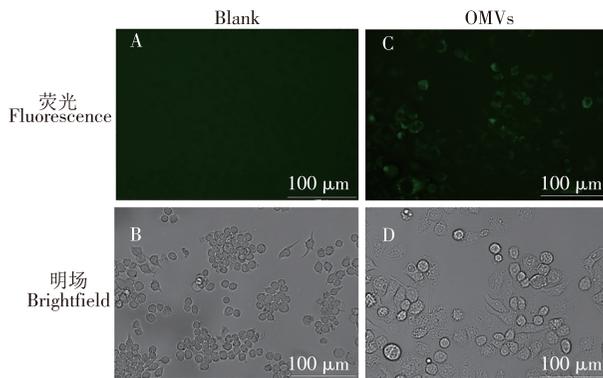


图3 奇异变形杆菌OMVs诱导RAW264.7细胞的极化
Blank: 无细菌外膜囊泡组; OMVs: 细菌外膜囊泡组。

Fig. 3 Polarizations of RAW264.7 cells induced by *Pro-teus mirabilis* OMVs

Blank: group without outer membrane vesicles; OMVs: group with outer membrane vesicles.

形态,表明RAW264.7细胞可吞噬OMVs^[15]。OMVs处理组(图3-D)与对照组(图3-B)对比发现,RAW264.7细胞在摄入OMVs后形态发生了明显变化,有清晰的突起,形成了不规则形状,说明RAW264.7细胞在OMVs诱导下发生了极化。

2.4 OMVs诱导RAW264.7细胞极化相关因子表达量的测定 为进一步明确经OMVs诱导RAW264.7细胞极化表型,分别对其M1型和M2型巨噬细胞因子进行检测。NO是一种巨噬细胞发生M1型极化的代表性产物,结果表明,OMVs被RAW264.7细胞摄取后,可诱导其分泌的NO水平显著上调,且与M1极化高度正相关的TNF- α 、IL-6细胞因子也较对照组高表达;而典型的具有免疫抑制功能的M2型巨噬细胞相关生物标志物Arg的mRNA表达量降低,但IL-10和IL-1 β 表达量升高,符合M2b极化表型。上述结果说明OMVs刺激RAW264.7细胞24 h后,该细胞向M1型和M2b型巨噬细胞极化。

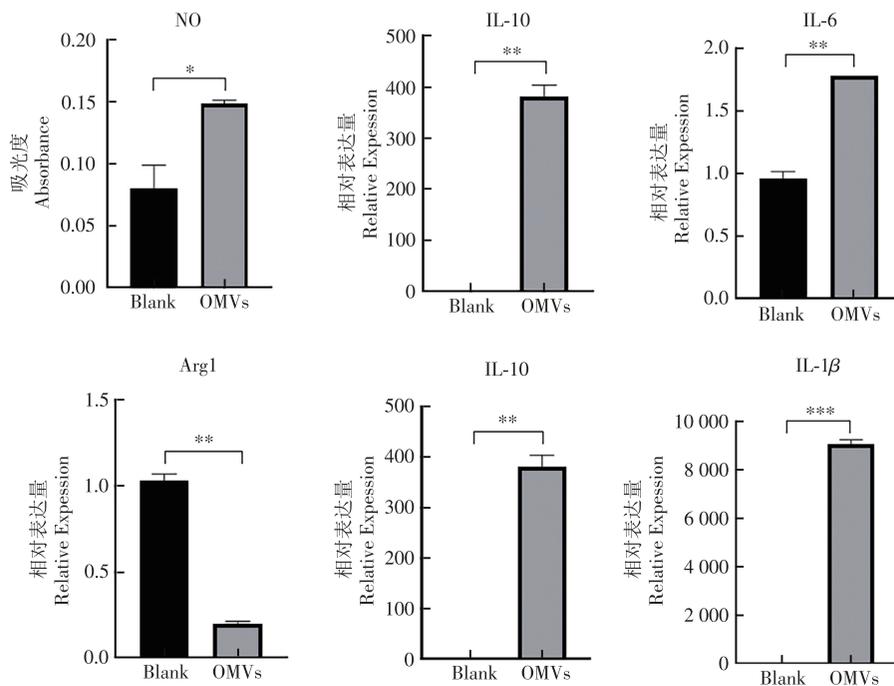


图4 RAW264.7细胞极化相关因子表达量分析

*表示 $P < 0.05$, **表示 $P < 0.01$, ***表示 $P < 0.001$ 。

Fig. 4 Analysis of the expression of polarization-related factors in RAW264.7 cells

* indicates $P < 0.05$; ** indicates $P < 0.01$; *** indicates $P < 0.001$.

3 讨论

巨噬细胞具有很强的可塑性,能够通过极化调

节宿主免疫反应^[16]。巨噬细胞极化导致两种具有不同功能的极化表型,M1型和M2型,只有当它们处于平衡状态时才能维持宿主的免疫稳态。研究

表明,OMVs刺激巨噬细胞能够诱导其向M1型极化并发挥抗肿瘤活性^[17-18]。本研究发现,当OMVs与RAW264.7细胞共孵育24 h后(图3-C),在荧光显微镜下能观察到RAW264.7细胞吞噬OMVs,并观察到RAW264.7细胞大多数具有M1型极化的形态特点,即形成多突触状的细胞结构(图3-D)。经RT-qPCR检测,进一步证实了经OMVs刺激组较空白组RAW264.7细胞M1型极化的细胞因子TNF- α 和IL-6有更高的表达量及NO的分泌显著上调。上述结果表明,奇异变形杆菌OMVs与已报道具有抗肿瘤活性的OMVs类似,因其富含LPS、细菌DNA及RNA等多种病原相关分子模式,可显著诱导巨噬细胞M1型极化,具有强免疫刺激能力。

然而,在检测M2型巨噬细胞相关标志物时,经OMVs刺激组较空白组RAW264.7细胞的IL-10和IL-1 β 表达量显著上调,而Arg1含量显著下调,符合M2b型极化特征。结果说明,在极化的过程中,未发生M1型极化的RAW264.7细胞主要是以M2b型存在。有研究报道,TLR激动剂(LPS)和免疫复合物(ICs,抗体/抗原复合物)的联合作用可通过下调IL-12和上调IL-10的表达量,诱导巨噬细胞的表型从M1转变为M2^[19-20]。这个新的M2型子集后来被称为M2b。所以,LPS和ICs现被认为是诱导巨噬细胞向M2b极化的诱导剂。奇异变形杆菌OMVs中存在LPS,且在细胞培养过程中所使用的血清成分含有免疫复合物,因此,本研究中检测到OMVs诱导M2b型极化具有合理性。小鼠M2b巨噬细胞产生高水平的NO,这是iNOS途径的代谢物^[21]。相比之下,有研究者在免疫复合物(IC)和LPS刺激的小鼠巨噬细胞中既未发现iNOS,也未发现Arg1 RNA的表达^[19-20,22]。与此发现一致的是,从中期肝细胞癌患者肝组织中分离的TAMs被鉴定为M2b型巨噬细胞,但几乎没有观察到iNOS mRNA的表达^[23]。因此,NO的上调可能主要由OMVs诱导的M1型巨噬细胞分泌。

OMVs参与肿瘤相关免疫过程中所发挥的作用与巨噬细胞M1型和M2b型极化相关^[22]。在肿瘤治疗过程中,M1型巨噬细胞发挥着重要作用,M2b型巨噬细胞在一定程度可与M1型巨噬细胞共同发挥抑制肿瘤和杀灭肿瘤的作用^[24]。虽然,M2b型在其他研究中有促进肿瘤转移的活性,但在本研究中由于OMVs的性质,M2b型极化被激活有客

观存在的合理性,但以诱导M1型极化为主。在许多恶性肿瘤发生过程中,往往M2b型逐渐取代M1型,成为主要亚群。然而,在M1型主导的肿瘤免疫微环境中,M2b型可调控炎症反应的强度,如M2b型抑制Th1型反应,促进Th2型反应等,避免肿瘤区域引发过强的炎症反应导致机体不耐受^[25]。此外,OMVs被用作免疫原性抗原递送载体的研究表明,其可刺激小鼠骨髓来源的树突状细胞(Bone Marrow-derived Dendritic Cell, BMDCs)CD86和MHC I类分子的表达,即诱导树突状细胞的活化以递呈抗原^[26]。Schetters等^[27]以卵清蛋白(Original Video Animation, OVA)为模式抗原,将其负载于OMVs表面,结果表明OMVs能诱导BMDCs和脾脏CD11c⁺树突状细胞的活化。并且,这些抗原递呈细胞与CD8⁺T细胞发生有效的抗原交叉呈递,从而有效地诱导细胞毒性T细胞(Cytotoxic T lymphocyte, CTL)应答。据此,OMVs在诱导巨噬细胞以M1型极化促进Th1型细胞免疫应答,从而实现肿瘤免疫微环境重编程,同时可通过肿瘤抗原载入OMVs中以促进肿瘤抗原的递呈,以期实现肿瘤免疫的回忆性CTL反应,从而实现长程的抗肿瘤效果。

4 结论

本研究从条件致病菌奇异变形杆菌中成功分离提取了OMVs,结果表明该OMVs能诱导RAW264.7细胞向以M1型极化为主并伴随部分M2b型极化的表型。该OMVs可作为强免疫刺激剂诱导肿瘤微环境的重编程,且可作为具有高渗透性和长滞留效应的纳米级天然囊泡结构。另外,该OMVs制备成本较低,使其开发成肿瘤药物递送载体具有巨大潜力。

参考文献:

- [1] STARNES C O. Coley's toxins[J]. Nature, 1992, 360: 23.
- [2] 陈欧亮, 张红, 赵鑫铖, 等. 细菌外膜囊泡的抗肿瘤机制及其应用研究进展[J]. 动物医学进展, 2022, 43(9): 85-89.
- [3] ZHANG H, DIAO H, JIA L, et al. *Proteus mirabilis* inhibits cancer growth and pulmonary metastasis in a mouse breast cancer model[J]. PLoS One, 2017, 12(12): e0188960.
- [4] ZHANG H, SANG S, XU H, et al. Lovastatin suppresses bacterial therapy-induced neutrophil recruitment to the tumor by promoting neutrophil apoptosis[J]. Journal of Functional Foods, 2021, 86: 104693.

- [5] 隋阳, 赵治宇, 吴长君. 肿瘤相关巨噬细胞在三阴性乳腺癌中的研究进展[J]. 中国免疫学杂志, 2023, 39(2): 444-448.
- [6] 王玉玮, 杨长青, 魏子白, 等. 肿瘤相关巨噬细胞与胃癌的研究进展[J]. 临床医药实践, 2023, 32(2): 121-124.
- [7] 卢昕雅, 孔令慧. 肿瘤免疫微环境中的免疫细胞与肺癌关系的研究进展[J]. 癌症进展, 2023, 21(7): 703-706.
- [8] 陈玉涛, 王艳, 池铭偲, 等. 巨噬细胞在母胎免疫耐受及妊娠并发症中的作用机制和研究进展[J]. 妇产与遗传(电子版), 2022, 12(2): 47-52.
- [9] 叶润发, 王淳, 韩东河, 等. 小胶质细胞和巨噬细胞极化与多发性硬化症的研究进展[J]. 医学研究生学报, 2021, 34(7): 761-764.
- [10] 王硕, 彭欢, 田锐. 免疫调节在急性心肌梗死后炎症导致心肌重构的治疗进展[J]. 心肺血管病杂志, 2022, 41(9): 1018-1022.
- [11] 罗维, 景涛, 戴剑松. 代谢性疾病中巨噬细胞极化的机制及运动对其调控作用的研究进展[J]. 中国免疫学杂志, 2023, 39(2): 421-426.
- [12] 邢蕊文, 谢言, 覃尧. 脂多糖刺激的鸡巨噬细胞源外体对文昌鸡树突状细胞的活化作用[J]. 热带生物学报, 2023, 14(4): 433-440.
- [13] GUERRERO-MANDUJANO A, HERNÁNDEZ-CORTEZ C, IBARRA J A, et al. The outer membrane vesicles: secretion system type zero[J]. Traffic, 2017, 18(7): 425-432.
- [14] SARTORIO M G, PARDUE E J, FELDMAN M F, et al. Bacterial outer membrane vesicles: from discovery to applications[J]. Annual Review of Microbiology, 2021, 75: 609-630.
- [15] 姚崧源, 孙述学. 细菌外膜囊泡在疫苗领域的研究进展[J]. 微生物学免疫学进展, 2021, 49(1): 78-82.
- [16] 杨霞, 宁宗. 巨噬细胞极化调控信号通路及M1/M2失衡在肺部炎症性疾病中作用的研究进展[J]. 山东医药, 2023, 63(26): 88-91.
- [17] CHEN Q, BAI H, WU W, et al. Bioengineering bacterial vesicle-coated polymeric nanomedicine for enhanced cancer immunotherapy and metastasis prevention[J]. Nano Letters, 2020, 20(1): 11-21.
- [18] LI M, ZHOU H, YANG C, et al. Bacterial outer membrane vesicles as a platform for biomedical applications: an update[J]. Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society, 2020, 323: 253-268.
- [19] ANDERSON C F, MOSSER D M. A novel phenotype for an activated macrophage: the type 2 activated macrophage[J]. Journal of Leukocyte Biology, 2002, 72(1): 101-106.
- [20] WANG L X, ZHANG S X, WU H J, et al. M2b macrophage polarization and its roles in diseases[J]. Journal of Leukocyte Biology, 2019, 106(2): 345-358.
- [21] ZHANG Q, SIOUD M. Tumor-associated macrophage subsets: shaping polarization and targeting [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(8): 7493.
- [22] ITO I, ASAI A, SUZUKI S, et al. M2b macrophage polarization accompanied with reduction of long noncoding RNA GAS5[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2017, 493(1): 170-175.
- [23] ASAI A, TSUCHIMOTO Y, OHAMA H, et al. Host anti-tumor resistance improved by the macrophage polarization in a chimera model of patients with HCC [J]. Oncoimmunology, 2017, 6(4): e1299301.
- [24] 丁祝进, 崔虎军, 谷昭天, 等. 鱼类巨噬细胞标记物的研究进展[J]. 水产科学, 2023, 42(3): 517-526.
- [25] BOSCO M C. Macrophage polarization: reaching across the aisle?[J]. The Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2019, 143(4): 1348-1350.
- [26] CHENG K, ZHAO R, LI Y, et al. Bioengineered bacteria-derived outer membrane vesicles as a versatile antigen display platform for tumor vaccination via Plug-and-Display technology [J]. Nature Communications, 2021, 12(1): 2041.
- [27] SCHETTERS S T T, JONG W S P, HORREVORTS S K, et al. Outer membrane vesicles engineered to express membrane-bound antigen program dendritic cells for cross-presentation to CD8⁺ T cells[J]. Acta Biomaterialia, 2019, 91: 248-257.

Polarization of mouse macrophages towards M1 and M2b types induced by outer membrane vesicles derived from *Proteus mirabilis*

WEI Junzhi¹, LIU Shijia¹, ZONG Yongtai¹, ZHANG Hong², QIN Yao¹

(1. School of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Haikou, 570228, China; 2. School of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei, 230036, China)

Abstract: To investigate whether bacterial outer membrane vesicles (OMVs) secreted by the conditionally

pathogenic bacterium *Proteus mirabilis* have the function of inducing macrophage polarization to regulate the tumor microenvironment, the mouse macrophage RAW264.7 was stimulated with the OMVs to detect macrophage polarization-related phenotype. The OMVs were isolated, extracted and then characterized using transmission electron microscopy. The OMVs were traced with PKH67 fluorescent dye, and the uptake of OMVs by RAW264.7 cells was observed by using fluorescence microscopy. The total NO content secreted by RAW264.7 cells and the expression of polarization-associated factors in RAW264.7 cells were detected by using total nitric oxide (NO) detection kit and real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR), respectively. The results showed that OMVs could be taken up by RAW264.7 cells, induced an increase in NO secretion in these cells, and up-regulated the expression of IL-10, IL-1 β , TNF- α , and IL-6, i. e., the occurrence of M1-type and M2b-type polarizations, which activated anti-tumor activity of macrophages. The above results suggest a potential role of OMVs secreted by *P. mirabilis* in the bacterium's resistance to breast tumor growth and lung metastasis.

Keywords: *Proteus mirabilis*; Bacterial outer membrane vesicles; macrophages

(特邀编辑:胡晓莘)