

[DOI] 10.12016/j.issn.2096-1456.202550479

· 基础研究 ·

# 变异链球菌囊泡密度感应信号分子-2的鉴定及囊泡对生物膜形成的影响

屠叶, 黄正蔚, 陈占壹, 牛晨光

上海交通大学医学院附属第九人民医院牙体牙髓科, 上海交通大学口腔医学院, 国家口腔医学中心, 口腔疾病国家临床医学研究中心, 上海市口腔医学重点实验室, 上海市口腔医学研究所, 上海(200001)

**【摘要】目的** 研究变异链球菌囊泡是否含有密度感应信号分子-2(autoinducer-2, AI-2), 并初步探讨变异链球菌囊泡对于变异链球菌生长能力和生物膜形成的影响。**方法** 通过差速离心法获取变异链球菌 UA159 株囊泡, 以纳米流式技术、透射电镜对该囊泡进行粒径分析及表征。将哈维弧菌 BB170 稀释液中分别加入 AB 培养基(对照组)、囊泡提取液(MVs组)、超滤前上清(Sup组)、超滤后上清(Sup-af组), 通过哈维弧菌 BB170 生物发光法鉴定其中的 AI-2。以变异链球菌 UA159 株或 *luxS* 缺失株为对照组, 梯度浓度囊泡刺激菌株为实验组(Mvs-2.0E+7组、Mvs-2.0E+8组及 Mvs-2.0E+9组); 通过生长曲线法、MTT、菌落形成单位(colony-forming unit, CFU)计数法测定变异链球菌各株在不同浓度囊泡处理后的生长能力变化; 使用结晶紫染色法、激光共聚焦显微镜观察、葱酮法等方法明确不同浓度囊泡对变异链球菌各株生物膜形成的影响。**结果** 成功获取富集的变异链球菌囊泡, 其平均粒径约 94.19 nm, 囊泡提取液中囊泡浓度达到 1.87E+11 Particles/mL。哈维弧菌 BB170 生物发光法显示 Sup组(超滤前)发光强度高于 Sup-af组(超滤后), MVs组发光强度高于对照组。生长曲线法、MTT法、CFU法测定均显示不同浓度囊泡处理后变异链球菌各株生长能力未见显著差异。结晶紫法定量分析及激光共聚焦显微镜观察显示高浓度囊泡处理(2.0E+9 Particles/mL组)生物膜形成量低于对照组, 葱酮法定量显示高浓度囊泡处理(2.0E+9 Particles/mL组)水可溶性多糖和水不可溶性多糖产量均显著低于对照组。**结论** 变异链球菌囊泡中含有密度感应信号分子 AI-2, 其囊泡对于变异链球菌生长能力影响不显著, 但具有调节生物膜形成的能力, 在高浓度时抑制生物膜形成。

**【关键词】** 变异链球菌; 囊泡; 密度感应信号分子-2; 生长能力; 生物膜; 龋病; 粒径分析; 纳米流式

**【中图分类号】** R78 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 2096-1456(2026)02-0119-10

**【引用著录格式】** 屠叶, 黄正蔚, 陈占壹, 等. 变异链球菌囊泡密度感应信号分子-2的鉴定及囊泡对生物膜形成的影响[J]. 口腔疾病防治, 2026, 34(2): 119-128. doi:10.12016/j.issn.2096-1456.202550479.

**Identification of autoinducer-2 in *Streptococcus mutans* membrane vesicles and effect of membrane vesicles on biofilm formation** TU Ye, HUANG Zhengwei, CHEN Zhanyi, NIU Chenguang. Department of Endodontics, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, College of Stomatology, Shanghai Jiao Tong University, National Center for Stomatology, National Clinical Research Center for Oral Diseases, Shanghai Key Laboratory of Stomatology, Shanghai Research Institute of Stomatology, Shanghai 200001, China

Corresponding author: NIU Chenguang, Email: niuchenguang@shsmu.edu.cn; CHEN Zhanyi, Email: gengarc@sjtu.edu.cn

**【Abstract】Objective** To investigate whether membrane vesicles (MVs) of *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) contain autoinducer-2 (AI-2) and to preliminarily explore the effects of these MVs on the growth and biofilm formation of *S. mutans*. **Methods** MVs were isolated from the *S. mutans* UA159 strain using differential centrifugation. The isolated



微信公众号

**【收稿日期】** 2025-10-22; **【修回日期】** 2025-12-31

**【基金项目】** 国家自然科学基金(82071104, 82571073)

**【作者简介】** 屠叶, 医师, 博士, Email: tuye1021@shsmu.edu.cn

**【通信作者】** 牛晨光, 主治医师, 博士, Email: niuchenguang@shsmu.edu.cn; 陈占壹, 医师, 博士, Email: gengarc@sjtu.edu.cn

MVs were characterized by nanoparticle tracking analysis for particle size and concentration and observed by transmission electron microscopy. The presence of AI-2 was identified using the *Vibrio harveyi* BB170 bioluminescence assay: the BB170 diluent was supplemented with AB medium (control group), MV extract (MVs group), pre-ultrafiltration supernatant (Sup group), or post-ultrafiltration supernatant (Sup-af group). The effects of MVs on growth and biofilm formation were assessed using the *S. mutans* UA159 strain or a *luxS* deletion mutant as the control group, compared with experimental groups stimulated with gradient concentrations of MVs (MVs-2.0E+7, MVs-2.0E+8, and MVs-2.0E+9 groups). Growth curves, MTT assay, and colony-forming unit (CFU) counts were used to determine changes in growth capacity. Biofilm formation was evaluated using crystal violet staining, confocal laser scanning microscopy, and the anthrone method for polysaccharide quantification. **Results** Enriched *S. mutans* MVs were successfully obtained, with an average particle size of approximately 94.19 nm and a concentration of 1.87E+11 particles/mL. The bioluminescence assay showed that the luminescence intensity of the Sup group was higher than that of the Sup-af group, and the MVs group exhibited higher intensity than the control group. Assessments via growth curves, MTT assay, and CFU counts indicated no significant differences in the growth capacity of the various *S. mutans* strains after treatment with different concentrations of MVs. Crystal violet staining quantification and confocal laser scanning microscopy observations revealed that high-concentration MV treatment (2.0E+9 particles/mL group) resulted in lower biofilm mass compared to the control. The anthrone method showed that the production of both water-soluble and water-insoluble polysaccharides was significantly lower in the high-concentration MV group than in the control. **Conclusion** *S. mutans* MVs contain the quorum sensing signal molecule AI-2. These MVs do not significantly affect the growth of *S. mutans*, but they can regulate biofilm formation and exhibit an inhibitory effect at high concentrations.

**【Key words】** *Streptococcus mutans*; membrane vesicles; autoinducer-2; growth ability; biofilm; caries; nanoparticle tracking analysis; nanoflow cytometer

**J Prev Treat Stomatol Dis, 2026, 34(2): 119-128.**

**【Competing interests】** The authors declare no competing interests.

This study was supported by the grants from the National Natural Science Foundation of China (No.82071104, No.82571073).

龋病是最常见的口腔疾病之一,其主要表现为牙体硬组织的脱矿与有机物的崩解<sup>[1]</sup>。龋病发生发展的过程是宿主、微生物、环境与时间多种因素综合作用的结果,而变异链球菌作为关键致龋菌在产酸、产糖、生物膜形成等方面发挥毒力作用。在口腔微环境中,各菌种间发展出了竞争、共生、确立生态位的密度感应机制,来实现物种间的生态信息交流,而生态环境中的不同细菌可以合成各种密度感应信号分子(autoinducers, AIs),并将其分泌到胞外发挥功能<sup>[2-3]</sup>。

现有研究发现,部分细菌可以通过产生并分泌囊泡(membrane vesicles, MVs)将胞内分泌物转移至细胞外发挥生物学功能<sup>[4]</sup>。细菌囊泡在微环境中可以起到排出代谢物、重塑细胞膜、摄取营养物质、拮抗抗生素、激发宿主免疫、递送生物活性物质等多种功能<sup>[5-10]</sup>。有研究证明,变异链球菌的囊泡可以调控其他菌种糖代谢与生物膜形成等毒力表型<sup>[11]</sup>,提示其囊泡中可能含有生物活性成分,并可以起到调控作用。同时,其他菌来源的囊泡

也可以影响变异链球菌生物膜形成能力,表明其同时具有接收其他囊泡信号的能力<sup>[12]</sup>。在哈维弧菌中,密度感应信号分子AI-2的本质是环化的4,5-二羟基-2,3-戊二酮<sup>[13]</sup>,结构近似小分子五碳糖。其在变异链球菌中的转运途径尚未明确,但其分子本质符合囊泡转运的基本条件。因此,变异链球菌囊泡中是否含有AI-2,其囊泡对于变异链球菌生长能力及生物膜形成能力又有何影响,都有待进一步探索。本研究针对变异链球菌囊泡进行了分离提纯,拟通过哈维弧菌BB170生物发光法鉴定变异链球菌囊泡中的AI-2,通过生长曲线法、噻唑蓝(methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide, MTT)法、菌落形成单位(colony-forming unit, CFU)计数法鉴定变异链球菌囊泡作用下不同菌株的生长能力,通过结晶紫染色、激光共聚焦显微镜观察、葱酮法等实验验证变异链球菌囊泡对生物膜形成能力的影响,为后续龋病防治研究提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

变异链球菌 UA159 标准株 (*Streptococcus mutans* UA159), 在此实验中作为野生株 (wild type, WT), 由口腔疾病国家临床医学研究中心口腔微生物与系统性疾病实验室提供; 变异链球菌 UA159 *luxS* 缺失株 ( $\Delta luxS$ , deletion of *luxS*) 由课题组前期构建。哈维弧菌 (*Vibrio harveyi*) BB170 亦由上述实验室提供。脑心浸液培养基 (BHI, Becton, Dickinson and Company, 美国); Autoinducer bioassay (AB) 培养基 (每 100 mL ddH<sub>2</sub>O 含 0.3 mol/L NaCl, 0.05 mol/L MgSO<sub>4</sub>, 0.2% 酪蛋白氨基酸。调节 pH 至 7.5 后冷却至室温消毒。再加入灭菌的 1 mL pH7.0 1 mol/L K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mL 0.1 mol/L 的 L-精氨酸, 2 mL 50% 甘油完成配制)。磷酸缓冲液; MTT (上海生工生物工程技术服务有限公司, 上海, 中国); 0.1% (w/v) 结晶紫溶液 (上海碧云天生物技术有限公司, 上海, 中国); 葱酮 (上海阿拉丁生化科技股份有限公司, 上海, 中国); Alexa Fluor® 647 (Invitrogen, Life Technologies, 美国); SYTO 9 Nucleic Acid Stain (Invitrogen, Life Technologies, 美国); 0.22  $\mu$ m 过滤器 (Millipore, 美国); 100 kDa Amicon Ultra 过滤器 (Millipore, 美国); 超速离心机 (Beckman, Optima XPN, SW 32 Ti rotor, 美国); 纳米流式检测仪 (厦门福流生物科技有限公司, Flow NanoAnalyzer, 福建, 中国); 透射电镜 (Hitachi, H-7650, 日本); 多功能酶标仪 (美国伯腾仪器, Biotek Epoch, 美国)。

### 1.2 菌株复苏与培养

将 BHI 干粉与 dH<sub>2</sub>O 按照每 100 毫升水配比 3.7 g 干粉的比例混合, 配制 BHI 液体培养基, 120 °C 高温高压灭菌后存储, 备用; BHI 液体培养基中加入 1% 质量分数的蔗糖, 配置 BHI-S 培养基, 备用。变异链球菌野生株于 BHI 培养基中 37 °C 过夜培养, 复苏待用。哈维弧菌 BB170 于 AB 培养基中 28 °C 过夜培养, 复苏待用。

### 1.3 变异链球菌囊泡提取与鉴定

变异链球菌野生株 UA159 于 500 mL BHI 培养基中 37 °C 厌氧培养 16 h, 4 °C 6 000 g 离心 15 min, 收集上清。上清液于 4 °C 10 000 g 离心 15 min, 以清除菌体残留物, 保留上清。使用 0.22  $\mu$ m 过滤器过滤上清, 获得超滤前上清, 留存部分备用。剩余滤液转移至 100 kDa Amicon Ultra 过滤器中, 浓缩后 4 °C 100 000 g 超速离心 70 min, 吸取上清, 获得超滤后上清, 部分保留备用, 无菌 PBS 小心冲洗沉

淀获得含有囊泡的滤液<sup>[12]</sup>, 即囊泡提取液。囊泡大小与浓度使用纳米流式检测仪测定。囊泡提取液送样进行透射电镜观察。

### 1.4 生物发光实验

哈维弧菌 BB170 培养过夜后, 按 1:5 000 比例稀释于新鲜 AB 培养基中, 获得 BB170 稀释液。

将 BB170 稀释液与 1.3 中所得囊泡提取液 (MVs 组)、超滤前上清 (Sup 组)、超滤后上清 (Sup-af 组) 分别按 180  $\mu$ L:20  $\mu$ L 的比例加入 96 孔板中。

将 BB170 稀释液与新鲜 AB 培养基按 180  $\mu$ L:20  $\mu$ L 的比例加入 96 孔板中, 作为对照组, 用以扣除 BB170 本身的发光背景影响。

对照组、MVs 组、Sup 组、Sup-af 组 4 组每组设置 5 个平行孔, 于 28 °C 静置培养, 每隔 1 h 用多功能酶标仪的生物发光模式测 1 次发光度, 连续监测直至差异出现。

### 1.5 囊泡对变异链球菌生长能力的影响

#### 1.5.1 不同浓度囊泡处理下变异链球菌生长曲线测定

变异链球菌野生株 UA159 及 *luxS* 缺失株过夜培养, 分别加入 BHI 培养基调平菌液使 OD<sub>600 nm</sub>=0.5, 按 1:100 比例稀释于 BHI 液体培养基, 加入前文提取的野生株 UA159 来源的囊泡使其颗粒浓度分别为 2.0E+7、2.0E+8、2.0E+9 Particle/mL, 作为实验组, 即 Mvs-2.0E+7 组、Mvs-2.0E+8 组、Mvs-2.0E+9 组。本研究中所涉及囊泡浓度均以此处颗粒浓度为参考。变异链球菌野生株及 *luxS* 缺失株作为对照组。上述每组取 200  $\mu$ L 接种于无菌 96 孔板中, BHI 液体培养基设置空白对照孔。每孔加入矿物油 10  $\mu$ L 以维持厌氧环境。酶标仪选择连续动力学监测, 每隔 1 h 检测 1 次, 共检测 24 h。根据各时间点各组菌液 600 nm 的 OD 值绘制生长曲线。

#### 1.5.2 不同浓度囊泡处理下变异链球菌活菌数量测定

变异链球菌分组同前, 培养至对数生长期后每组加入新鲜配制的 MTT 溶液使浓度为 0.5 mg/mL, 避光, 37 °C 厌氧箱孵育 2 h, 收集菌液; 4 °C, 4 500 rpm 离心 5 min; 吸弃上清, 加 1 mL PBS 重悬洗涤, 再次离心弃上清, 得到细菌沉淀。每组加入 100  $\mu$ L DMSO, 振荡 15 min, 溶解脱色, 5 倍稀释后取 100  $\mu$ L 转移至新的 96 孔板, 酶标仪测定 540 nm 的 OD 值。

#### 1.5.3 不同浓度囊泡处理下变异链球菌菌落形成单位计数测定

变异链球菌分组同前, 37 °C 厌氧箱孵育 18 h 后, 按 10、10<sup>2</sup>、10<sup>3</sup>、10<sup>4</sup>、10<sup>5</sup>、10<sup>6</sup> 倍数梯度稀释, 每组稀释液各取 100  $\mu$ L 均匀涂布于 BHI

平板,每个梯度设置3个平行板,37℃厌氧箱孵育24 h后,选取菌落形成数在30~300的平板进行计数。

## 1.6 囊泡对变异链球菌生物膜形成的影响

1.6.1 结晶紫法测定不同浓度囊泡处理下变异链球菌生物膜形成量 变异链球菌野生株 UA159 及 *luxs* 缺失株过夜培养,加入 BHI-S 培养基调平菌液使  $OD_{600\text{nm}}=0.5$ 。按照前述分组处理各组菌液,每组取 200  $\mu\text{L}$  设置 3 个平行孔接种于无菌 96 孔板中, BHI-S 液体培养基设置空白对照孔。整板厌氧培养 24 h。取出 96 孔板,吸弃各孔上清,加入磷酸缓冲液 200  $\mu\text{L}$  漂洗生物膜,重复 3 次。每孔加入甲醇 100  $\mu\text{L}$  固定 15 min。吸去甲醇,加入 0.1% 质量分数的结晶紫溶液 200  $\mu\text{L}$  染色 5 min。吸去染液,同前所述使用磷酸缓冲液漂洗,倒置叩板。室温下晾干后使用 33% 乙酸脱色,每孔加入 200  $\mu\text{L}$  脱色液,摇床振荡 15 min。将各组脱色液转移至新的 96 孔板中测定 575 nm 的 OD 值。

1.6.2 激光共聚焦显微镜观察不同浓度囊泡处理下变异链球菌生物膜形成量 变异链球菌野生株 UA159 过夜培养,加入 BHI-S 培养基调平菌液使  $OD_{600\text{nm}}=0.5$ 。将上述菌液按 1:50 比例加入 BHI-S 液体培养基稀释,囊泡浓度及处理同前。按 Alexa Fluor 647-Dextran 染液终浓度 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  加入荧光染料,每组取 2 mL 接种于无菌 12 孔板中。各孔中加入圆形细胞爬片,避光培养 24 h。吸弃上清,使用磷酸缓冲液轻轻漂洗生物膜爬片,重复 3 次。室温避光,向每个孔中加入 1.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 SYTO9 染液,染色 15 min,重复洗涤 3 次,使用激光共聚焦显微镜观察。

1.6.3 蒽酮法测定不同浓度囊泡处理下变异链球菌胞外多糖产量 变异链球菌野生株 UA159 及 *luxs* 缺失株过夜培养,加入 BHI-S 培养基调平菌液使  $OD_{600\text{nm}}=0.5$ 。按照前述分组处理各组菌液,每组 4 mL 体系设置 3 个平行管,37℃厌氧培养 24 h。4℃,4 500 rpm 离心 20 min,分离上清,向沉淀中加入去离子水 1.5 mL,吹打混匀,再次 4 500 rpm 离心 20 min,合并上清液,得到水可溶性葡聚糖(water-soluble glucan, WSG)溶液。向沉淀中加入 1.5 mL 0.5 mol/L NaOH 溶液,37℃下孵育 2 h,4℃,4 500 rpm 离心 20 min,分离上清,重复该步骤一次,得到水不可溶性葡聚糖(water-insoluble glucan, WIG)溶液。WSG 按经验使用去离子水 20 倍稀释,WIG 按经验使用去离子水 10 倍稀释。各组溶液取 400  $\mu\text{L}$  加

入玻璃试管中,加入 3 mL 新鲜配制的 0.1% 蒽酮试剂,沸水浴加热 15 min,冰浴 15 min,迅速取样 100  $\mu\text{L}$  测定 625 nm 的 OD 值。

## 1.7 统计学处理

本文中柱状图均使用 GraphPad Prism 9.3.1 软件进行作图和统计学分析。发光强度的比较使用非配对 *t* 检验进行组间比较,其余使用单因素方差分析(One-way ANOVA)进行组间比较。统计分析结果  $P < 0.05$  为差异有统计学意义,本研究图注中 \*\*为  $P < 0.01$ , \*\*\*为  $P < 0.001$ , \*\*\*\*为  $P < 0.0001$ 。

## 2 结果

2.1 变异链球菌囊泡中含有密度感应信号分子-2 囊泡平均粒径约 94.19 nm,囊泡提取液囊泡浓度达到  $1.87\text{E}+11$  Particles/mL(表 1)。

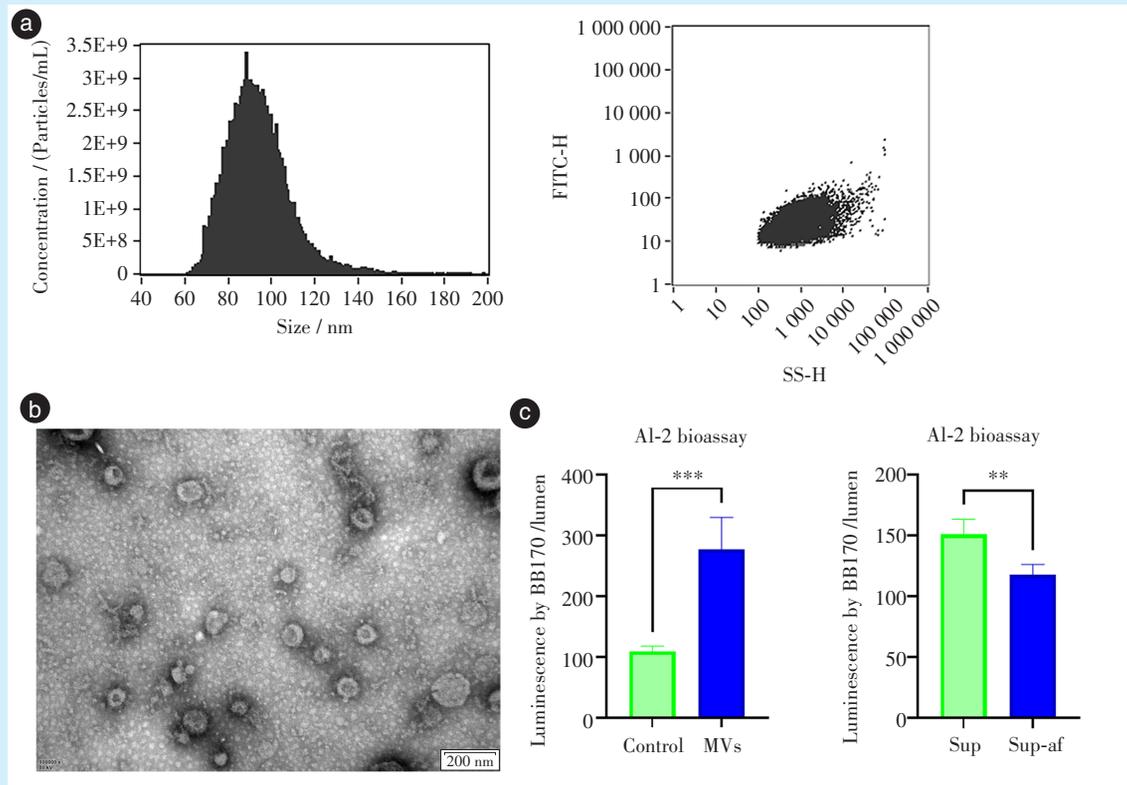
表 1 变异链球菌 UA159 囊泡纳米流式数据

Table 1 Data of nanoflow cytometry of MVs from *S. mutans* UA159

| Information          | Data                           |
|----------------------|--------------------------------|
| Median size          | 92.25 nm                       |
| Mean size            | 94.19 nm                       |
| Standard deviation   | 15.50 nm                       |
| Sample flow rate     | 15.82 nL/min                   |
| Sample concentration | $1.87\text{E}+11$ Particles/mL |

MVs: membrane vesicles. *S. mutans*: *Streptococcus mutans*

囊泡提纯后经纳米流式技术鉴定,图 1a 左图为囊泡粒径分布直方图,粒径为 60~160 nm;图 1a 右图为囊泡分布散点图,横坐标代表侧向散射光强度(side scatter height, SS-H),纵坐标代表荧光通道信号强度,其中囊泡未被特异性标记,荧光强度普遍在 10~1 000,最主要的群体颗粒 SS-H 在 100~10 000,显示经梯度离心与纳米流式分离得到了高浓度的变异链球菌囊泡。如图 1b 所示,透射电镜结果直观显示了囊泡形态与大小。视野中囊泡呈现圆形或类圆形结构,直径小于 200 nm。如图 1c 所示, MVs 组在发光强度上高于对照组 ( $P < 0.001$ ), MVs 组发光强度可达约 300 流明,提示其含有能使 BB170 这株 AI-2 报告株发光的物质,即 AI-2。对提取囊泡各步骤产生的滤液(Sup 组及 Sup-af 组)鉴定,可以发现 Sup 组(超滤前)发光强度高于 Sup-af 组(超滤后) ( $P < 0.01$ ),即超滤步骤使得含有 AI-2 的物质得到分离,即囊泡得到分离,提示变异链球菌囊泡中含有可以使哈维弧菌 BB170 发光的密度感应信号分子 AI-2。



a: nanoflow cytometry particle size distribution plot (left) and dot plot (right) show the size and distribution of membrane vesicles. The size of MVs ranges from 60 to 160 nm. The SS-H of main particles ranges from 100 to 10 000. b: morphology of MVs from *S. mutans* UA159 showed by transmission electron microscopy. The MVs showed in the field were round or round-like shape, and size of MVs in the field was less than 200 nm. c: luminescence by *Vibrio harveyi* BB170 shows luminescence of control group (*Vibrio harveyi* BB170 diluent+AB medium), MVs group (*Vibrio harveyi* BB170 diluent+membrane vesicles), Sup group (*Vibrio harveyi* BB170 diluent+supernatant before ultrafilter), and Sup-af group (*Vibrio harveyi* BB170 diluent+supernatant after ultrafilter). The MVs group shows high luminescence compared with the control group, and the Sup-af group was lower than the Sup group.  $n=5$ . FITC-H: fluorescein isothiocyanate height, the strength of FITC signal. SS-H: side scatter height. MVs: membrane vesicles. AI-2: autoinducer-2. *S. mutans*: *Streptococcus mutans*

Figure 1 Nanoparticle size, morphological characterization of *S. mutans* UA159 membrane vesicles and identification of autoinducer-2

图1 变异链球菌UA159囊泡纳米粒径、形态表征及密度感应信号分子-2的鉴定

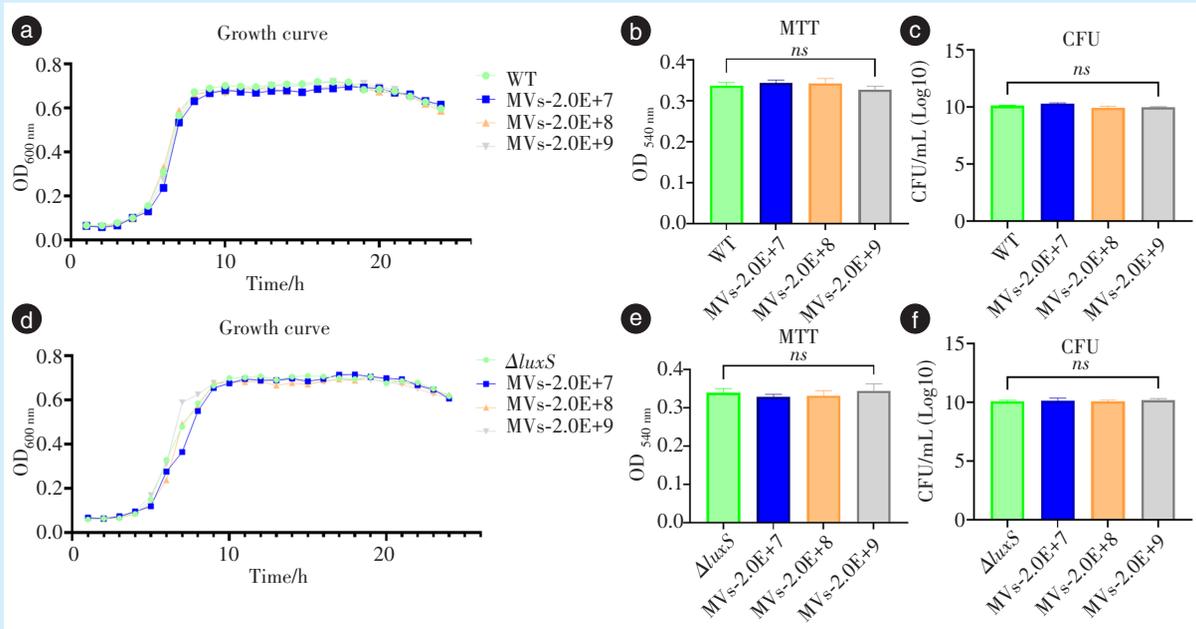
## 2.2 变异链球菌囊泡不影响变异链球菌生长能力

变异链球菌野生株 UA159 在加入不同浓度的囊泡后,其生长曲线未见明显差异,进入对数生长期和平台期时间基本一致,生长速率和最大浓度也未见明显差异(图 2a)。如 MTT 法测定的活菌数量在各组间亦未见明显差异(图 2b) ( $P>0.05$ )。对各组进行 CFU 计数,其每毫升菌液 CFU 均在  $10^{10}$  量级附近,且无显著差异 ( $P>0.05$ ) (图 2c)。因此可以认为,不同浓度的变异链球菌囊泡对于变异链球菌野生株生长能力无显著影响。

对变异链球菌 *luxS* 缺失株重复上述实验,其生长曲线与 MTT 法测定结果与野生株结果相似,在不同组别间无显著差异(图 2d~2f)。

## 2.3 变异链球菌囊泡具有调控生物膜形成的功能

对野生株 UA159 结晶紫生物膜定量检测结果显示,囊泡浓度达到  $2.0E+7$  Particles/mL 时,生物膜形成量差异不明显; $2.0E+8$  Particles/mL 时,生物膜形成量相比野生株下降;达到  $2.0E+9$  Particles/mL 时,生物膜形成量显著下降至野生株一半左右 ( $P < 0.000 1$ )。对 *luxS* 缺失株进行结晶紫定量检测,各组趋势与野生株处理时基本一致,在高浓度囊泡处理下出现了生物膜形成量的进一步降低 ( $P < 0.000 1$ ) (图 3a、图 3b)。激光共聚焦显微镜观察结果显示,野生株在高浓度囊泡组的生物膜形成量显著降低,*luxS* 缺失株也同样在高浓度囊泡组的生物膜形成量显著降低,且整体较野生株组别低(图 3c、3d)。葱酮法对野生株各组进行胞



a: growth curves of *S. mutans* WT strains treated by MVs shows insignificant differences. MVs-2.0E+7 means the strains in this group were treated by 2.0E+7 Particles/mL MVs. MVs-2.0E+8 and MVs-2.0E+9 refer to the concentration of 2.0E+8 Particles/mL and 2.0E+9 Particles/mL ( $n=3$ ). b: MTT assay shows fewer differences between the groups of *S. mutans* WT strains, indicating similar quantities of living bacterium ( $n=3$ ). c: CFU of *S. mutans* WT strains treated by MVs show CFU about  $10^{10}$  per milliliter and insignificant differences between the groups ( $n=3$ ). d: growth curves of *S. mutans*  $\Delta luxS$  strains treated by MVs show insignificant differences ( $n=3$ ). e: MTT assay of *S. mutans*  $\Delta luxS$  strains shows similar tendency with *S. mutans* WT strains, presenting no significant differences ( $n=3$ ). f: CFU counting of *S. mutans*  $\Delta luxS$  strains shows insignificant differences between the groups ( $n=3$ ). WT: wild type.  $\Delta luxS$ : luxS-deficient mutant. MVs: membrane vesicles. MTT: methylthiazolyl-diphenyl-tetrazolium bromide. CFU: colony-forming units. MVs from *S. mutans* UA159 were isolated using differential centrifugation. *S. mutans*: *Streptococcus mutans*

Figure 2 Effect on growth capacity of *S. mutans* UA159 and  $\Delta luxS$  strains treated by different concentration of membrane vesicles

图2 不同浓度囊泡对变异链球菌 UA159 株及 luxS 缺失株生长能力的影响

外多糖的定量检测结果显示,在囊泡浓度达到 2.0E+9 Particles/mL 时,WSG 和 WIG 均出现显著下降 ( $P < 0.0001$ )。对于 luxS 缺失株的蒽酮法检测结果,其趋势与野生株相似 ( $P < 0.01$ ) (图 3e、3f)。综上,变异链球菌囊泡在野生株和 luxS 缺失株中均具有调控生物膜形成的功能,且高浓度时都可以抑制生物膜形成。

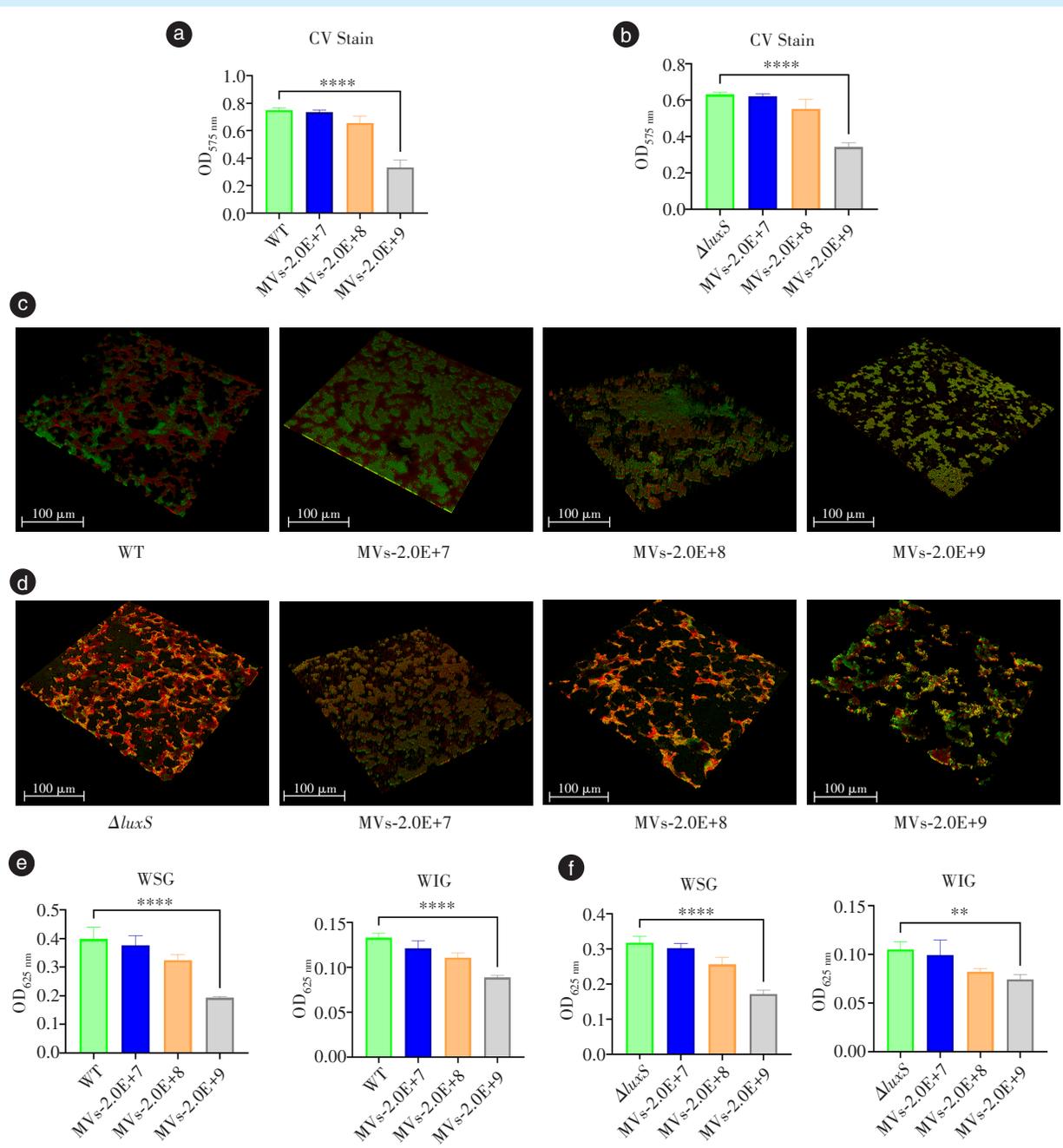
### 3 讨论

#### 3.1 囊泡与密度感应信号分子-2

龋病作为一个慢性感染性疾病,微生物在其中起到的作用不可或缺<sup>[14]</sup>。近年研究显示,在全球范围内龋病的年龄标准化患病率达 27 500/10 万人<sup>[15]</sup>,而我国第四次全国口腔健康流行病学调查显示,我国成年人患龋率高达 89%~98%<sup>[16]</sup>。变异链球菌作为致龋生物膜中的关键菌,研究其在龋病发生中的作用对于龋病的防治举足轻重。而局

部微环境中微生物之间的互动正在成为疾病防控研究的新趋势。对于龋病的微环境,变异链球菌以其 LuxS/AI-2 系统进行种群间的密度感应和交流<sup>[2]</sup>,而其分泌的形式、囊泡的具体功能等研究尚不完善。因此,本研究在此基础上针对变异链球菌囊泡进行富集提取,并验证其中的 AI-2,并确定囊泡在细菌生长、生物膜形成等方面的影响。

在以往研究中,真核细胞的囊泡研究较为深入,其产生的囊泡粒径大、功能丰富,在维持营养、传递信息等多种层面发挥着生物学功能<sup>[17]</sup>。革兰阴性菌可通过两种不同的方式产生囊泡,并具有不同的内容物与功能<sup>[18]</sup>;革兰阳性菌目前已有研究证实其可以产生囊泡,但具体产生机制仍待进一步研究<sup>[19]</sup>。本研究中囊泡的粒径分析及透射电镜均为囊泡形态的表征实验。目前已有相关的变异链球菌囊泡相关的研究证实,其囊泡通过葡萄糖基转移酶的作用促进白假丝酵母菌生物膜形



a: CV staining of *S. mutans* WT strains UA159 treated by MVs shows a significant biofilm biomass reduction in the MVs-2.0E+9 group compared with the WT group ( $n=3$ ). b: CV staining of *S. mutans*  $\Delta luxS$  strains treated by MVs shows a similar trend with Figure 3a. The MVs-2.0E+9 group formed less biofilm than the  $\Delta luxS$  group ( $n=3$ ). c: confocal laser microscopy of *S. mutans* WT strain biofilm. The green color refers to bacteria and the red color refers to biofilm. The MVs-2.0E+9 group has less "red" than the other groups, indicating its biomass of biofilm is less than the others. d: confocal laser microscopy of *S. mutans*  $\Delta luxS$  strain biofilm. The green color refers to bacteria while red color refers to biofilm. The MVs-2.0E+9 group has less "red" part compared to other groups, indicating a lower biomass of biofilm. e: WSG and WIG of *S. mutans* WT strains UA159 treated by MVs both show a relative lower mass in the MVs-2.0E+9 group compared with the WT group ( $n=3$ ). f: WSG and WIG of  $\Delta luxS$  strains treated by MVs show a similar trend with Figure 3e ( $n=3$ ). CV: crystal violet. WT: wild type. MVs: membrane vesicles. WSG: water-soluble glucan. WIG: water-insoluble glucan. *S. mutans*: *Streptococcus mutans*

Figure 3 Effect on biofilm formation ability of *S. mutans* UA159 and  $\Delta luxS$  strains treated by different concentration of membrane vesicles

图3 不同浓度囊泡对变异链球菌UA159株及luxS缺失株生物膜形成的影响

成<sup>[11]</sup>,同时还可以调控其泛素化修饰<sup>[20]</sup>。这表明,其囊泡发挥了跨物种信息传递的作用,也为细菌-真菌互作的研究开拓了新思路。也有研究表明,变异链球菌的囊泡可以通过tRNA转运等机制促进伤口愈合<sup>[21]</sup>,进一步完善了其囊泡的作用。上述研究表明,变异链球菌囊泡中含有多种生物活性物质,可以起到信息传递、物质转运等多方面的作用。

密度感应信号分子AI-2,也是生物信号的一种。其在革兰阳性和革兰阴性菌中高度保守普遍存在,并可以被跨种属细菌识别,主要负责种群间的交流<sup>[22]</sup>。在最早发现AI-2系统的哈维氏弧菌中,依据种群密度的不同,其LuxQ蛋白相应的结构域被激活,将导致不同的发光效应<sup>[23]</sup>。本研究即根据该原理,参考改良后的AI-2发光实验<sup>[24]</sup>,对变异链球菌囊泡及提取过程中各组分进行AI-2的鉴定。由实验结果可知,囊泡组发光强度远高于对照,其和囊泡的富集有关。本研究在囊泡提取过程中进行了超滤,具有更多的AI-2使得发光强度更高。而超滤前的液体发光强度高于超滤后的废液,而废液发光强度和对照近似,说明大部分AI-2在囊泡中被富集提取,但不排除囊泡不稳定或是分散在滤液中的AI-2分子存在。该部分实验也直接证实了变异链球菌囊泡中含有能使哈维弧菌BB170发光的密度感应信号分子AI-2。

### 3.2 变异链球菌囊泡对变异链球菌生长能力及生物膜形成的影响

为了进一步研究囊泡的作用,本研究对于变异链球菌在不同浓度囊泡作用下的生长能力和生物膜形成能力进行测定。如结果所示,各组细菌生长能力无显著差异。该部分使用的检测方法分别为生长曲线法、MTT法和CFU计数法:生长曲线法即通过连续检测培养体系吸光度变化来反应细菌生长情况;MTT则可以被活细胞还原为水不溶性的蓝紫色结晶,以反应活菌代谢能力;CFU计数则直观反映单位体积内能形成菌落的单菌数量。本研究中,不同浓度梯度的囊泡并不影响野生株与*luxS*缺失株的生长能力。这可能与LuxS/AI-2系统的原有作用有关:AI-2作为信号分子主要调控生物膜形成,其本身浓度的增减对细菌生长能力影响较小。

有研究指出,AI-2对于变异链球菌的影响呈现浓度依赖性<sup>[25]</sup>,即在特定较低的浓度区间内促进生物膜形成,而过低浓度或高浓度时转变为抑制

作用<sup>[26]</sup>。本研究中,向野生株中加入不同颗粒浓度的囊泡,生物膜形成能力随浓度增高而减少,而*luxS*缺失株也表现出了相同趋势。在野生株中,可能由于正常分泌的AI-2与囊泡中AI-2相叠加,导致在低囊泡浓度( $2.0E+7$  Particles/mL)时生物膜形成能力差异不明显,而高浓度( $2.0E+9$  Particles/mL)时抑制生物膜形成。在*luxS*缺失株中,高浓度的囊泡使得AI-2浓度过高亦出现了抑制生物膜形成的表现。激光共聚焦显微镜观察的结果直观地显示了这一点,两株中均表现为高浓度囊泡组生物膜形成的抑制。为了更好地定量分析生物膜主要多糖成分的差异,分别对WSG和WIG进行蒽酮法测定,测定结果在两株菌中均表现为高浓度囊泡刺激时WSG和WIG生成能力下降。其中,WSG主要起到为生物膜提供能量储备的作用,而WIG则与生物膜结构的支撑和表面黏附相关<sup>[27]</sup>。该部分实验结果表明其生物膜形成量与胞外多糖产量在高浓度囊泡刺激下均出现了减退。

AI-2的多向调控作用也和密度感应的基本功能相贴合,即调控种群密度,使之处于动态平衡中发展<sup>[28-30]</sup>。同时,也有研究表明,变异链球菌囊泡可以抑制戈登链球菌与血链球菌生物膜形成<sup>[31]</sup>。在本研究中,加入不同梯度浓度的囊泡抑制了变异链球菌生物膜形成,而未展现出低浓度促进生物膜形成的现象。这可能和囊泡浓度过高、细菌本身也可分泌AI-2有关。同时,变异链球菌囊泡中含有多种物质,且会受到其他因素调控<sup>[32]</sup>,其中起到调控作用的生物信号并不单一,这可能是在不影响野生株生物膜形成的低浓度囊泡处理下,*luxS*缺失株的AI-2信号得到弥补但生物膜形成能力未表现出明显差异的原因之一。在*luxS*缺失株缺乏自身AI-2合成能力的情况下,其生物膜形成依然受到囊泡的抑制,这提示囊泡中可能存在不依赖于细菌自身AI-2合成的、其他的生物膜抑制机制。而高浓度囊泡本身可能通过物理覆盖、竞争吸附位点、非特异性结合营养物质或改变液体表面张力等方式<sup>[33]</sup>,机械性地干扰了细菌的粘附和生物膜形成,这也可能是在细菌本身无法合成AI-2时高浓度仍能抑制生物膜形成的另一原因。

细菌囊泡作为细菌生产的微型结构,在细菌中因其独特且丰富的功能而具有良好的科研和应用前景<sup>[34]</sup>:因其在免疫方面的作用,部分囊泡具有制作疫苗的潜力<sup>[35]</sup>;有研究专注于囊泡经免疫系统作用而抗肿瘤<sup>[36]</sup>,或是研究囊泡本身的抗肿瘤

活性<sup>[37]</sup>,揭示其在抗肿瘤方面的功效;其作为微小递送系统也可以转运化疗药物、小干扰RNA等以达到治疗目的<sup>[38-39]</sup>。在口腔疾病领域,牙龈卟啉单胞菌及其囊泡在牙周炎发展中起到重要作用<sup>[40]</sup>,其囊泡也可以调节细菌共聚等功能<sup>[41]</sup>,甚至影响牙周炎相关系统性疾病的发展过程<sup>[42]</sup>。而对变异链球菌囊泡的研究尚有不足,本研究所得结论为开发以其囊泡为基础的生物疗法提供一定的理论支持,但囊泡的具体作用仍待进一步研究。

### 3.3 小结

综上所述,本研究通过体外实验验证了变异链球菌 UA159 囊泡中含有 AI-2,且不同颗粒浓度的 UA159 囊泡对于变异链球菌生长能力影响不明显,但高浓度囊泡 (2.0E+9 Particles/mL) 可以抑制变异链球菌生物膜的形成能力。本研究为龋病防治提供了新思路,比如富集口腔菌群囊泡以调控致龋生物膜形成。同时,本研究仍存在部分不足。正如前文所讨论的,本研究并未针对高浓度囊泡的机械性作用进行排除研究,后续可在该方面继续开展相关探索。考虑到囊泡内容物的复杂性,后续研究也将针对单一组分进行进一步研究,以弥补研究的不足。同时口腔这一复杂的微生态系统存在各种微生物,可在本研究基础上继续开展基于囊泡的多菌种生物膜研究,以更好地促进龋病防治研究的发展。

**【Author contributions】** Tu Y performed the experiments and wrote the article. Chen ZY analyzed the data and wrote the article. Niu CG, Huang ZW designed the study and reviewed the article. All authors read and approved the final manuscript as submitted.

### 参考文献

- [1] Cheng L, Zhang L, Yue L, et al. Expert consensus on dental caries management[J]. Int J Oral Sci, 2022, 14(1): 17. doi: 10.1038/s41368-022-00167-3.
- [2] Mayer C, Borges A, Flament-Simon SC, et al. Quorum sensing architecture network in *Escherichia coli* virulence and pathogenesis [J]. FEMS Microbiol Rev, 2023, 47(4): fuad031. doi: 10.1093/fems-re/fuad031.
- [3] Hu X, Wang Y, Gao L, et al. The impairment of methyl metabolism from luxS mutation of *Streptococcus mutans*[J]. Front Microbiol, 2018, 9: 404. doi: 10.3389/fmicb.2018.00404.
- [4] Toyofuku M, Schild S, Kaparakis-Liaskos M, et al. Composition and functions of bacterial membrane vesicles[J]. Nat Rev Microbiol, 2023, 21(7): 415-430. doi: 10.1038/s41579-023-00875-5.
- [5] Biller SJ, Lundeen RA, Hmelo LR, et al. Prochlorococcus extracellular vesicles: molecular composition and adsorption to diverse microbes[J]. Environ Microbiol, 2022, 24(1): 420-435. doi: 10.1111/1462-2920.15834.
- [6] Henriquez T, Falciani C. Extracellular vesicles of *Pseudomonas*: friends and foes[J]. Antibiotics (Basel), 2023, 12(4): 703. doi: 10.3390/antibiotics12040703.
- [7] Wang M, Nie Y, Wu XL. Extracellular heme recycling and sharing across species by novel mycomembrane vesicles of a gram-positive bacterium[J]. ISME J, 2021, 15(2): 605-617. doi: 10.1038/s41396-020-00800-1.
- [8] Luthe T, Keuer L, Thormann K, et al. Bacterial multicellular behavior in antiviral defense[J]. Curr Opin Microbiol, 2023, 74: 102314. doi: 10.1016/j.mib.2023.102314.
- [9] Doré E, Boilard E. Bacterial extracellular vesicles and their interplay with the immune system[J]. Pharmacol Ther, 2023, 247: 108443. doi: 10.1016/j.pharmthera.2023.108443.
- [10] Gopal C, Al Tarify H, Pirhadi E, et al. Membrane stress enhances specific PQS-lipid interactions that drive bacterial outer membrane vesicle biogenesis[J]. Membranes (Basel), 2025, 15(8): 247. doi: 10.3390/membranes15080247.
- [11] Wu R, Cui G, Cao Y, et al. *Streptococcus mutans* membrane vesicles enhance *Candida albicans* pathogenicity and carbohydrate metabolism[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2022, 12: 940602. doi: 10.3389/fcimb.2022.940602.
- [12] Wang Y, Hoffmann JP, Baker SM, et al. Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilms with bacterial-derived outer membrane vesicles [J]. BMC Microbiol, 2021, 21(1): 234. doi: 10.1186/s12866-021-02296-x.
- [13] Ye J, Qiu W, Xie J. Quorum sensing systems in biofilm formation and the potential application of natural quorum sensing inhibitors in aquatic product preservation[J]. Food Res Int, 2025, 221(Pt 4): 117623. doi: 10.1016/j.foodres.2025.117623.
- [14] Gao Z, Chen X, Wang C, et al. New strategies and mechanisms for targeting *Streptococcus mutans* biofilm formation to prevent dental caries: a review[J]. Microbiol Res, 2023, 278: 127526. doi: 10.1016/j.micres.2023.127526.
- [15] GBD 2021 Oral Disorders Collaborator. Trends in the global, regional, and national burden of oral conditions from 1990 to 2021: a systematic analysis for the global burden of disease study 2021 [J]. Lancet, 2025, 405(10482): 897-910. doi: 10.1016/S0140-6736(24)02811-3.
- [16] 王兴.第四次全国口腔健康流行病学调查报告[M].北京:人民卫生出版社,2018:25-33.  
Wang X. The fourth national oral health epidemiological survey report[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2018: 25-33.
- [17] Fusco C, De Rosa G, Spatocco I, et al. Extracellular vesicles as human therapeutics: a scoping review of the literature[J]. J Extracell Vesicles, 2024, 13(5): e12433. doi: 10.1002/jev2.12433.
- [18] Chen S, Lei Q, Zou X, et al. The role and mechanisms of gram-negative bacterial outer membrane vesicles in inflammatory diseases[J]. Front Immunol, 2023, 14: 1157813. doi: 10.3389/fimmu.2023.1157813.
- [19] Briaud P, Carroll RK. Extracellular vesicle biogenesis and functions in gram-positive bacteria[J]. Infect Immun, 2020, 88(12): 1462-2920.15834.

- e00433-e00420. doi: 10.1128/IAI.00433-20.
- [20] Zhang Y, Gu Z, Li Z, et al. *Streptococcus mutans* regulates ubiquitin modification of *Candida albicans* in the bacterial-fungal interaction[J]. PLoS Pathog, 2025, 21(2): e1012887. doi: 10.1371/journal.ppat.1012887.
- [21] Oh SY, Kim DY, Lee KY, et al. *Streptococcus mutans*-derived extracellular vesicles promote skin wound healing via tRNA cargo[J]. J Nanobiotechnology, 2025, 23(1): 322. doi: 10.1186/s12951-025-03410-1.
- [22] Sahreen S, Mukhtar H, Imre K, et al. Exploring the function of quorum sensing regulated biofilms in biological wastewater treatment: a review[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(17): 9751. doi: 10.3390/ijms23179751.
- [23] Reuter K, Steinbach A, Helms V. Interfering with bacterial quorum sensing[J]. Perspect Medicin Chem, 2016, 8: 1-15. doi: 10.4137/PMC.S13209.
- [24] Jing Y, Zuo J, Phouthapane V, et al. An optimized method for detecting AI-2 signal molecule by a bioassay with *Vibrio harveyi* BB170[J]. Microbiology, 2021, 90(3): 383-391. doi: 10.1134/S0026261721030048.
- [25] Rajamani S, Sayre R. Biosensors for the detection and quantification of AI-2 class quorum-sensing compounds[J]. Methods Mol Biol, 2018, 1673: 73-88. doi: 10.1007/978-1-4939-7309-5\_6.
- [26] Rickard AH, Palmer RJ Jr, Blehert DS, et al. Autoinducer 2: a concentration-dependent signal for mutualistic bacterial biofilm growth[J]. Mol Microbiol, 2006, 60(6): 1446-1456. doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05202.x.
- [27] Han KI, Jung EG, Kwon HJ, et al. Gene expression analysis of inflammation-related genes in macrophages treated with  $\alpha$ -(1  $\rightarrow$  3, 1  $\rightarrow$  6)-D-glucan extracted from *Streptococcus mutans*[J]. Int J Biol Macromol, 2021, 166: 45-53. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.10.054.
- [28] Bin Mohammad Muzaki MZ, Subramoni S, Summers S, et al. *Klebsiella pneumoniae* AI-2 transporters mediate interspecies interactions and composition in a three-species biofilm community[J]. NPJ Biofilms Microbiomes, 2024, 10(1): 91. doi: 10.1038/s41522-024-00546-0.
- [29] Liu X, Liu Q, Sun S, et al. Exploring AI-2-mediated interspecies communications within rumen microbial communities[J]. Microbiome, 2022, 10(1): 167. doi: 10.1186/s40168-022-01367-z.
- [30] Fan Q, Sun H, Lin X, et al. Autoinducer-2-mediated communication network within human gut microbiota[J]. ISME J, 2025, 19(1): wrf204. doi: 10.1093/ismej/wraf204.
- [31] Cui G, Li P, Wu R, et al. *Streptococcus mutans* membrane vesicles inhibit the biofilm formation of *Streptococcus gordonii* and *Streptococcus sanguinis*[J]. AMB Express, 2022, 12(1): 154. doi: 10.1186/s13568-022-01499-3.
- [32] Leiva-Sabadini C, Berríos P, Saavedra P, et al. Biofilm formation on collagen substrates modulates *Streptococcus mutans* bacterial extracellular nanovesicle production and cargo[J]. Nanoscale Adv, 2025, 7(18): 5670-5680. doi: 10.1039/d5na00248f.
- [33] Parihar K, Liu DA, Hassan G, et al. Mechanical regulation of extracellular vesicle activity during tumour progression[J]. Nat Biomed Eng, 2025, 9(8): 1202-1221. doi: 10.1038/s41551-025-01446-0.
- [34] Aytar Çelik P, Derkuş B, Erdoğan K, et al. Bacterial membrane vesicle functions, laboratory methods, and applications[J]. Biotechnol Adv, 2022, 54: 107869. doi: 10.1016/j.biotechadv.2021.107869.
- [35] Zhao X, Zhao R, Nie G. Nanocarriers based on bacterial membrane materials for cancer vaccine delivery[J]. Nat Protoc, 2022, 17(10): 2240-2274. doi: 10.1038/s41596-022-00713-7.
- [36] Wang H, Zhan H, Pan B, et al. Engineering CRISPR system-based bacterial outer membrane vesicle potentiates T cell immunity for enhanced cancer immunotherapy[J]. Adv Mater, 2025, 37(39): e2501565. doi: 10.1002/adma.202501565.
- [37] Aly RG, El-Enbaawy MI, Abd El-Rahman SS, et al. Antineoplastic activity of *Salmonella* Typhimurium outer membrane nanovesicles [J]. Exp Cell Res, 2021, 399(1): 112423. doi: 10.1016/j.yexcr.2020.112423.
- [38] You H, Zhang S, Zhang Y, et al. Engineered bacterial outer membrane vesicles-based doxorubicin and CD47-siRNA co-delivery nanoplateform overcomes immune resistance to potentiate the immunotherapy of glioblastoma[J]. Adv Mater, 2025, 37(15): e2418053. doi: 10.1002/adma.202418053.
- [39] Liu C, Yang C, Jiang X, et al. Bacterial membrane vesicles as heteroantigen reservoirs for potentiated colorectal cancer immunotherapy[J]. ACS Nano, 2025, 19(26): 23760-23777. doi: 10.1021/acsnano.5c03862.
- [40] Zhang S, Jiao Y, Liu S, et al. Effects of *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles (OMVs) on macrophages in periodontitis [J]. Oral Dis, 2025, 31(7): 1973-1981. doi: 10.1111/odi.15264.
- [41] du Teil Espina M, Haider Rubio A, Fu Y, et al. Outer membrane vesicles of the oral pathogen *Porphyromonas gingivalis* promote aggregation and phagocytosis of *Staphylococcus aureus*[J]. Front Oral Health, 2022, 3: 948524. doi: 10.3389/froh.2022.948524.
- [42] Zhang Z, Liu D, Liu S, et al. The role of *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles in periodontal disease and related systemic diseases[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2021, 10: 585917. doi: 10.3389/fcimb.2020.585917.

(编辑 张琳)



Open Access

This article is licensed under a Creative Commons

Attribution 4.0 International License.

Copyright © 2025 by Editorial Department of Journal of

Prevention and Treatment for Stomatological Diseases



官网