



## 白色念珠菌胞外囊泡的组成及其功能研究进展

韦瑜, 程磊, 任彪\*

口腔疾病研究国家重点实验室, 国家口腔疾病临床医学研究中心, 四川大学华西口腔医院牙体牙髓病科, 四川 成都 610000

韦瑜, 程磊, 任彪. 白色念珠菌胞外囊泡的组成及其功能研究进展. 微生物学报, 2022, 62(2): 434–445.

Wei Yu, Cheng Lei, Ren Biao. Research progress on the composition and function of extracellular vesicles of *Candida albicans*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(2): 434–445.

**摘要:** 念珠菌病指念珠菌属引起的急性、亚急性或慢性感染, 通常累及皮肤、黏膜, 也可累及内脏和各个系统器官, 可造成严重后果, 是目前发病率最高的深部真菌病。白色念珠菌是念珠菌种中最为常见的一种机会致病性真菌, 近来, 越来越多的研究证实了白色念珠菌的胞外囊泡对其致病性具有重要的作用, 它参与重要蛋白、遗传物质的转运, 影响白色念珠菌的耐药性, 并与宿主细胞进行信息沟通, 介导宿主的炎症、免疫反应; 还有研究表明胞外囊泡具有免疫活性, 可作为一种疫苗制剂使用。因此, 本文就白色念珠菌胞外囊泡的组成及其功能总结综述, 为未来进一步研究提供参考。

**关键词:** 白色念珠菌; 胞外囊泡; 蛋白质; 脂质; 炎症反应; 免疫反应

**基金项目:** 国家自然科学基金(81870778); 四川省科技计划(2020YJ0227)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81870778) and by the Applied Basic Research Programs of Sichuan Province, China (2020YJ0227)

\*Corresponding author. Tel: +86-28-85501232; E-mail: renbiao@scu.edu.cn

Received: 25 April 2021; Revised: 24 May 2021; Published online: 3 June 2021

## Research progress on the composition and function of extracellular vesicles of *Candida albicans*

WEI Yu , CHENG Lei , REN Biao\*

State Key Laboratory of Oral Diseases, National Clinical Research Center for Oral Diseases, Department of Operative Dentistry and Endodontics, West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610000, Sichuan, China

**Abstract:** Candidiasis refers to the acute, subacute or chronic infection caused by *Candida*, which usually involves the skin and mucosa, as well as internal organs and various system organs, and can cause serious consequences. It is a deep mycosis with the highest incidence at present. *Candida albicans* is one of the most common opportunistic pathogenic fungi in *Candida* species. Recently, more and more studies have confirmed that the extracellular vesicles of *Candida albicans* play an important role in its pathogenicity. They are involved in the transport of important proteins and genetic materials, influence the drug resistance of *Candida albicans*, and communicate with host cells to mediate the inflammatory and immune responses of the host. Some studies have shown that extracellular vesicles have immune activity and can be used as a vaccine preparation. Therefore, this paper reviews the composition and function of extracellular vesicles of *Candida albicans* in order to provide reference for further research in the future.

**Keywords:** *Candida albicans*; extracellular vesicles; protein; lipid; inflammatory response; immune response

细胞外囊泡(extracellular vesicle, EV)是从细胞中自然释放的,被脂质双层包裹,组成不同、大小不同,无法复制的纳米级颗粒<sup>[1]</sup>。根据其大小和形成过程的不同,可以分为外泌体、微囊泡和凋亡小体三大类。外泌体多为直径40–200 nm的小分子,来源于内体;微囊泡多为直径200–2 000 nm的小分子,来源于质膜;凋亡小体多为直径500–2 000 nm的小分子,来源于质膜和内质网。外泌体和微囊泡是细胞间沟通的重要载体,它们的分子组成取决于来源的母体细胞和环境条件<sup>[2]</sup>。EV可以携带脂质、碳水化合物、蛋白质和核酸<sup>[3]</sup>,由于其被磷脂双分子层包裹,这些分子可以受到保护而免受外部干扰。它们曾经被认为是细胞“垃圾”携带者或细胞脱落的碎片,如今越来越多的研究证

明它们是单细胞和多细胞生物中细胞之间交流的重要途径<sup>[4]</sup>,使细胞能够交换物质,并且具有生物标志物潜力<sup>[2]</sup>。在人体中,EV可以被人体几乎所有类型的细胞分泌,如免疫细胞、内皮细胞、红细胞、肝细胞和上皮细胞。它们是癌症<sup>[5–7]</sup>、神经退行性疾病<sup>[8]</sup>、细菌感染<sup>[9]</sup>等许多疾病的进程中的关键因素。近来的研究表明,EV不仅在人体细胞中分泌,它还可以被真菌等各种生物体分泌。

白色念珠菌作为一种最常见的机会致病性真菌<sup>[10]</sup>,它的胞外囊泡是典型的真菌胞外囊泡。白色念珠菌EV的主要成分是蛋白质,脂质,核酸和碳水化合物<sup>[11–12]</sup>,可以参与白色念珠菌致病的各个环节,甚至调节白色念珠菌毒力、影响白色念珠菌的耐药性。近来,越来越多的

研究者开始关注白色念珠菌通过胞外囊泡与宿主的相互作用机制，这对于念珠菌病的防控具有重要意义。

## 1 白色念珠菌胞外囊泡的生物学起源及其分泌机制

1970年代初期的研究表明，不同类型的真菌中都存在细胞外囊泡<sup>[13]</sup>。1977年，Chigaleichik等在分析在烷烃下培养的热带假丝酵母细胞外脂质结构时，首次在真菌文献中使用了“细胞外囊泡”这一名词<sup>[14]</sup>。1990年，首次报道了白色念珠菌中存在“细胞壁丘疹”这一超微结构<sup>[15]</sup>。2007年，真菌胞外囊泡首次被分离出来<sup>[16]</sup>。2013年Raposo等开始认识到细胞外囊泡是一种普遍存在的细胞通讯机制<sup>[2]</sup>(表1)。研究表明，白色念珠菌的胞外囊泡可能起源于细胞质部分，因为在这些囊泡中发现了大量无分泌信

号肽的细胞质蛋白<sup>[3]</sup>，而该信号肽是常规分泌的蛋白质的特征<sup>[17-19]</sup>。Wolf等发现囊泡可以输送形成细胞外基质的物质，囊泡生物膜内皮细胞和基质脂质成分的对比分析显示了鞘脂和磷脂成分的相似性，这表明细胞外基质可能参与囊泡的形成<sup>[20]</sup>。

膜的重塑机制也可以参与囊泡的生物发生<sup>[3]</sup>，已有多项研究显示某些细胞膜单个分子的缺失会影响囊泡的释放。例如 *SEC6*、*SEC4P*、*SNF7P*、*GRASP* 等基因<sup>[1,21]</sup>，其中，*SEC6* 是真菌中必不可少的蛋白质复合物基因的一部分，该蛋白质复合物负责将囊泡与质膜融合。缺乏 *SEC6* 的真菌可以正常产生囊泡，但胞内囊泡增多，胞外囊泡减少，并且真菌毒力减弱，提示 *SEC6* 基因可能影响囊泡分泌的过程<sup>[22]</sup>。然而，与细胞外囊泡相比，白色念珠菌 EV 的细胞内具体形成通路尚未有系统的报道，这是未来的研究方向之一。

表 1 真菌细胞外囊泡的研究进展

Table 1 Advances in fungal extracellular vesicles

Year	Key findings
1972	Gibson et al. have shown the presence of EVs in fungi
1977	Chigalaichik et al. first used the term “extracellular vesicle” in fungi
1990	Anderson et al. first found EV in <i>Candida albicans</i>
2007	Rodrigues et al. were the first to isolate EV from fungi
2008	Rodrigues et al. proposed three mechanisms for transport of EVs across cell walls
2013	Raposo et al. began to recognize EV as an intercellular communication mechanism
2015	Peres et al. demonstrated that EV mediated fungal RNA output Gil-Bona et al. found that EV was the transport carrier of <i>Candida albicans</i> protein Vargas et al. proved that <i>Candida albicans</i> EV had immunoactivity Wolf et al. found that lipid biosynthesis genes could affect the morphology, composition and immune activity of <i>Candida albicans</i> EV
2018	Robert et al. found that EV had an effect on the drug resistance of <i>Candida albicans</i> Zamith et al. found that EV mediates the interaction between <i>Candida albicans</i> and host cells
2019	Klara et al. conducted virulence factor analysis on <i>Candida albicans</i> EV
2020	Dawson et al. found that Claudin SUR7 family proteins can be used as a marker protein of <i>Candida albicans</i> EV Halder et al. found that <i>Candida albicans</i> can induce monocytes to produce EVs transporting TGF-β1 Vargas et al. found that <i>Candida albicans</i> EV could be used as a stable vaccine preparation

真菌中 EV 的分泌与大多数真核细胞不同, 主要是因为存在细胞壁<sup>[23]</sup>。因此, 跨细胞壁的传代是真菌细胞中分泌的一个必不可少的步骤<sup>[3]</sup>, 但囊泡通过细胞壁到达细胞外环境的机制尚不清楚, 目前提出的可能的机制主要有以下 3 种: (1) 囊泡的积累在细胞膜和细胞壁之间生成一个定向膨压, 迫使囊泡通过细胞壁; (2) 囊泡携带的细胞壁降解酶使细胞壁降解, 又在细胞壁合成酶作用下的细胞壁重塑; (3) 穿过细胞壁的蛋白质通道到达细胞外<sup>[24]</sup> (图 1)。Rodrigues 等的研究已经证实了囊泡上存在细胞壁降解酶<sup>[25]</sup>, 包括不同的葡聚糖酶和葡糖基转移酶, 这证实了第二种机制存在的可能性, 其他可能的机制尚无研究证实。

## 2 白色念珠菌胞外囊泡的组成

白色念珠菌胞外囊泡的主要内容为蛋白质、脂质、遗传物质、碳水化合物和色素(表 2)。

不同内容物会影响 EV 功能, 而白色念珠菌环境和状态可以改变 EV 内容物的组成。已有多项研究表明, 白色念珠菌在不同的营养状态下释放的 EV 组成有所不同, 白色念珠菌的生长环境将影响其 EV 的释放及其组成。作为一种机会致病性真菌, 白色念珠菌有两种基本形态, 分别为共生(酵母)状态和致病(菌丝)状态<sup>[26-27]</sup>。两种状态下的白色念珠菌释放的 EV 的组成成分也截然不同。

### 2.1 不同营养状态下白色念珠菌胞外囊泡的组成

胞外囊泡作为一种细胞间的重要通讯载体, 其组成将会随着白色念珠菌的生长环境、营养状态等条件变化而发生改变, 以达到多种功能用途。Brown 等为了建造更加贴近人体的菌株生长环境模型, 模拟宿主-病原体相互作用期间的许多不利条件, 在营养有限(缺乏氨基酸)的培养基中培养白色念珠菌菌株, 发现营养条

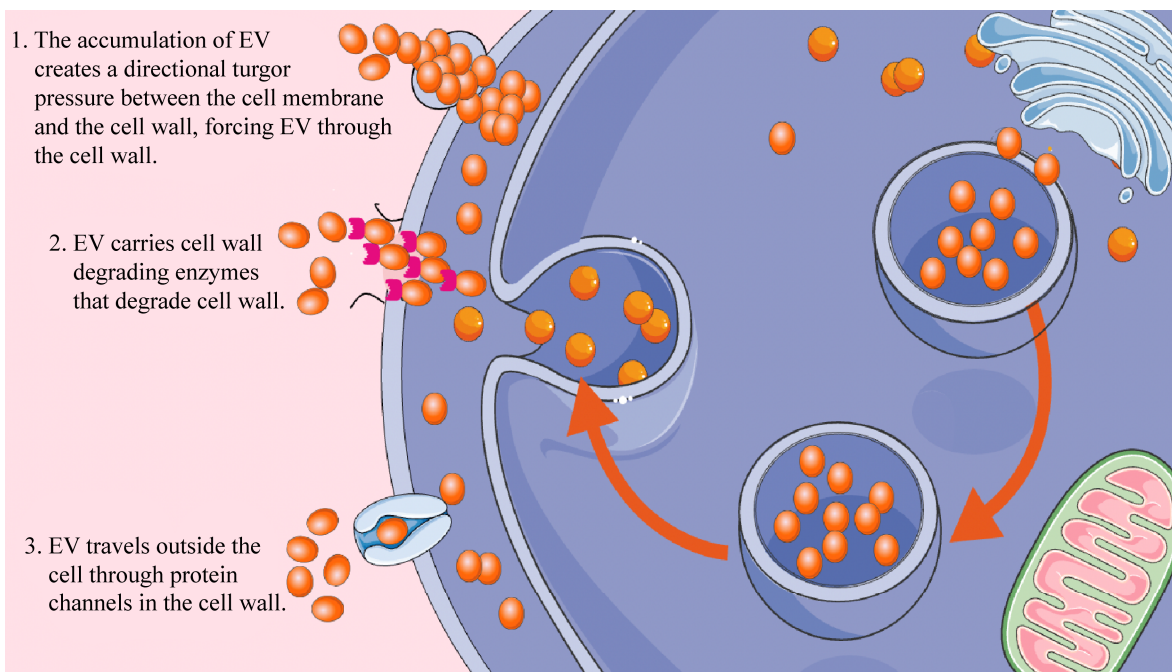


图 1 EV 通过细胞壁的可能机制

Figure 1 Possible mechanisms by which EVs pass through cell walls.

表 2 EV 组成及其主要功能

Table 2 EV composition and its main functions

Key component	Main function
Lipid	Affects secretion, size and composition of EV contents
Nucleic acid	It is the key of information communication and pathogenesis between cells
Protein	It is related to the pathogenesis, cell structure and cell metabolism of <i>Candida albicans</i> , and is involved in biofilm formation, tissue invasion and immune escape of <i>Candida albicans</i>

件可能会影响白色念珠菌胞外囊泡的组成<sup>[28]</sup>。当氮源有限或不可用时,白色念珠菌会通过调节关键致病毒力因子的表达来有效地适应环境变化<sup>[28-29]</sup>。因此,这种营养受限的条件可能导致白色念珠菌 EV 中毒力蛋白释放的速率增加。例如,白色念珠菌会增加各种细胞外水解酶(如天冬氨酸蛋白酶 Saps)的分泌,从而从多种多样的氮中提取代谢活动所需要的氮<sup>[30]</sup>。与 Vargas 等<sup>[19]</sup>发表的研究相比,在使用相同的白色念珠菌菌株 ATCC 90028 的情况下, Vargan 在正常营养状态下对白色念珠菌 EV 组成的分析中并未检测到任何 Sap 家族蛋白。另一个对白色念珠菌发病机理有重要贡献的蛋白质家族凝集素样序列(Als)蛋白质,它介导酵母细胞的聚集及其与非生物表面或宿主组织的附着<sup>[31]</sup>。在 Konečná 等<sup>[17]</sup>的研究中,从白色念珠菌中分离出的 EV 中检测到 3 种 Als 亚型,即凝集素样蛋白 2 (Als2),凝集素样蛋白 3 (Als3)和凝集素样蛋白 4 (Als4),这与 Cheng 等在正常营养条件下分离出的 EV 蛋白检测结果截然相反<sup>[32]</sup>。总之,在缺乏氮源的营养条件下, EV 中检测的毒力因子表达增多,包括凝集素样蛋白质 3 (Als3),天冬氨酸蛋白酶 8 (Sap8)和细胞表面超氧化物歧化酶 6 (Sod6)。这表明白色念珠菌可能使用 EV 作为媒介来参与对环境的适应反应, EV 转运的参与生存代谢的分子可以随着营养状态的不同而改变,这可能为白色念珠菌在面临不利条件时生存和繁殖的途径之一。

## 2.2 致病(菌丝)状态下白色念珠菌胞外囊泡的组成

酵母状态的白色念珠菌 EV 和菌丝状态下的白色念珠菌 EV 的蛋白质组成有所差异, Dawson 等分析后发现两种状态下 EV 的大小、含量都有所不同<sup>[33]</sup>。酵母形式的菌株 EV 体积偏大且尺寸浮动范围广,可检测到最大 500 nm 的颗粒。相反,菌丝状态下菌株 EV 体积偏小,显示出以 100 nm 为中心的紧密对称分布。同时,酵母状态下菌株 EV 的蛋白质含量比菌丝状态下 EV 蛋白质含量略高。菌丝状态下菌株 EV 富含在发病机理中起作用的蛋白质,例如,与白色念珠菌毒力紧密相关的天冬氨酸蛋白酶 (Saps), Saps1-3 亚型对黏膜和皮肤念珠菌病的浅表感染至关重要<sup>[34-35]</sup>,而 Sap4-6 亚型似乎在系统性念珠菌病的感染机制中起着重要作用<sup>[36-37]</sup>。简单地说, Sap2 和 Sap3 在宿主-病原体相互作用中主要与宿主产生杀菌肽、细胞粘附中的辅助作用、参与免疫系统的宿主蛋白的降解以及补体系统组分的失活作用有关。菌丝状态下 EV 转运的毒力蛋白更多,这与 EV 对真菌和宿主之间的相互作用至关重要的观点相符。同时,菌丝状态下 EV 中也富含具有 1,3-β-葡糖苷酶活性的蛋白质,这可能与 EV 通过细胞壁的过程有关。在细胞壁中,作为外表面,细胞壁是白色念珠菌与宿主之间的第一接触点。它在细胞的形状、物理强度及其在人体组织中的定殖能力中起着重要作用。白色念珠菌的细胞

壁是由  $\beta$ -1,3-葡聚糖、 $\beta$ -1,6-葡聚糖, 甘露聚糖和蛋白质组成的分层结构<sup>[38]</sup>。这些成分的变化直接影响真菌的生长、细胞附着以及宿主的识别等行为<sup>[39]</sup>。白色念珠菌 EV 中检测到的许多细胞壁蛋白<sup>[17,40]</sup>, 诸如烯醇酶<sup>[41]</sup>、甘油醛 3-磷酸脱氢酶(Gpdh)<sup>[42]</sup>、果糖二磷酸醛缩酶<sup>[43]</sup>、磷酸三糖<sup>[36]</sup>、3-磷酸脱氢酶(Gpdh)、磷酸甘油酸激酶(Pgk)和磷酸甘油酸变位酶<sup>[41]</sup>, 它们均在糖酵解途径中发挥关键作用, 如水解酶涉及与内皮细胞的粘附, 生物膜形成和细胞壁完整性<sup>[44]</sup>。因此, 不同状态下菌株的 EV 中细胞壁蛋白质含量的不同表明了 EV 可能在细胞壁动力学中起着重要作用。此外, 菌丝状态下 EV 中富含热应激反应蛋白, 这可能反映了与酵母状态的菌株不同的生长条件。

形成生物膜是白色念珠菌致病过程中的重要特点, 生物膜状态的白色念珠菌产生的 EV 不同于浮游状态下白色念珠菌所产生的 EV。生物膜状态下白色念珠菌的 EV 主要由 30–200 nm 直径的外泌体大小的小分子组成。蛋白质组学分析显示, 浮游和生物膜状态下白色念珠菌 EV 有相当大比例的不同组成, 其中 34% 的蛋白质组是生物膜状态所独有的。此外, 两种来源的 EV 共有的许多蛋白质在生物膜 EV 中的含量要高 10–100 倍。多糖分析显示, 生物膜白色念珠菌 EV 中占主导地位的是甘露聚糖和葡聚糖, 这是两种主要的生物膜基质成分, 对 EV 和生物膜基质的脂质组成进行的比较分析显示, 鞘脂和磷脂成分具有相似性, 尤其是磷脂酰胆碱, 磷脂酰肌醇和磷脂酰乙醇胺。因此, 生物膜白色念珠菌 EV 可以递送形成细胞外基质的物质<sup>[18]</sup>。

目前, 关于菌丝状态、生物膜状态下白色念珠菌 EV 的研究甚少, 在脂质组成和遗传物质组成方面还尚未有过研究, 是未来研究的潜在方向之一。

## 2.3 共生(酵母)状态下白色念珠菌胞外囊泡的组成

### 2.3.1 脂质

在酵母型白色念珠菌 EV 中发现的主要的脂类是磷脂、麦角固醇和神经酰胺, 他们都是细胞膜的主要成分<sup>[16,19]</sup>。神经酰胺也是一个重要的免疫原性分子, 有“毒力调节器”之称<sup>[45]</sup>, 针对神经酰胺的抗体可以抑制真菌的生长。在动物细胞中, 神经酰胺与将蛋白质定位到不同的细胞部位和细胞器的过度酸化有关<sup>[46]</sup>, 因此我们有理由推测神经酰胺可以促进 EV 生物发生和蛋白质寻址。Shiino 等发现, 脂质生物合成基因会影响白色念珠菌细胞外囊泡的形态、组成和其免疫刺激特性。编码磷脂酰丝氨酸合酶(*CHO1*)和磷脂酰丝氨酸脱羧酶(*PSD1* 和 *PSD2*)的基因是白色念珠菌合成磷脂基因, *CHO1* 参与合成磷脂酰丝氨酸, *PSD1* 和 *PSD2* 参与合成磷脂酰乙醇胺。它们是维持细胞壁稳态, 线粒体功能和微生物毒性的必需条件<sup>[47]</sup>。Wolf 等敲除了这两种基因制成 *CHO1* $\Delta$  和 *PSD1* $\Delta$ /*PSD2* $\Delta$  突变株后, 观察到 *CHO1* $\Delta$  和 *PSD1* $\Delta$ /*PSD2* $\Delta$  菌株的蛋白酶和磷脂酶活性较低, *CHO1* $\Delta$  突变体释放的 EV 的大小与野生型菌株释放的 EV 相当, 但是 *PSD1* $\Delta$ /*PSD2* $\Delta$  菌株产生的 EV 比野生型 EV 大得多, 产生了野生型 EV 中未观察到的 >100 nm 的 EV。蛋白质组学分析显示, 两个突变体的 EV 与野生型 EV 的蛋白质载量明显不同。他们还测试了 EV 在源自骨髓的巨噬细胞中激活 NF- $\kappa$ B 的能力。野生型和 *PSD1* $\Delta$ /*PSD2* $\Delta$  突变体来源的 EV 都能激活 NF- $\kappa$ B, 但 *CHO1* $\Delta$  突变体来源的 EV 未能激活 NF- $\kappa$ B<sup>[20]</sup>。这些研究表明, 白色念珠菌脂质相关基因的存在与否对 EV 的大小, 组成和免疫刺激表型都有定性和定量的影响, 表明了脂质代谢和 EV 产生之间存在复杂的相互作用, 脂

质基因将影响 EV 内容物的分泌、大小及组成。

### 2.3.2 遗传物质

细胞外囊泡是细胞间信息沟通的重要媒介, Peres 等首次表征了真菌产生的 EV 中存在的 RNA 分子。他们鉴定了 114 种 ncRNA, 其中包括所有真菌属共有的 6 个核仁小分子 RNA (snoRNA), 2 个小核 RNA (snRNA), 2 个核糖体 RNA (rRNA) 和 1 个转移 RNA (tRNA), 以及 20 条与 miRNA 一致的序列和一些与囊泡介导的运输和代谢途径有关的共纯化的 mRNA<sup>[48]</sup>。EV 的 RNA 主要由长度小于 250 nt 的分子组成, 获得的读数与 mRNA 中的基因间和内含子区域的位置对齐。在所有真菌 EV 制剂中最常出现的 ncRNA 组是核仁小分子 RNA (snoRNA) 和 tRNA, 占有读段的 22%–75%。在白色念珠菌 EV 中 tRNA 占比很高, 约为所有读数的 60%。snoRNA 可以指导 rRNA 核苷酸的修饰并参与 rRNA 切割<sup>[49]</sup>。他们还在酵母型白色念珠菌的 EV 样品中发现了线粒体 RNA 酶的一种成分 NME1。NME1 是核糖核酸蛋白核糖核酸内切酶的一个亚基, 是加工 pre-rRNA 所必需的。在体外, 它可以促进 5.8S rRNA 和参与细胞周期调控的特定 mRNA 序列的降解<sup>[50]</sup>。在白色念珠菌 EV 中除了鉴定出编码常规蛋白的 mRNA 以外, 也鉴定出了编码细胞色素 b5, 组蛋白乙酰转移酶, 细胞分裂控制蛋白和精氨酸的 mRNA。这些结果表明, 含 RNA 的 EV 可能是各种生物学过程(包括细胞通讯和发病机理)的决定因素。

### 2.3.3 蛋白质

蛋白质对白色念珠菌的生长及致病性有着不可替代的作用, 前人的研究已经鉴定出了白色念珠菌胞外囊泡的 1 202 种蛋白质<sup>[33]</sup>。这些蛋白参与了白色念珠菌的大量生理活动, 如组织粘附和宿主穿透、生物膜形成、菌丝生长、细胞壁组织和建模、细胞动力学细胞分离、热

休克反应、逃避宿主免疫反应、糖酵解、碳水化合物脂质和蛋白质的代谢、细胞信号传导、细胞氧化还原稳态、核苷生物合成、细胞对药物的反应、过氧化物酶活性、DNA 复制调节、补体激活和蛋白水解调节等<sup>[19]</sup>。在细胞膜中检测到了大量与 EV 的蛋白质组学组成相同的质膜蛋白, 例如葡聚糖合酶 Gsc1、Pma1 跨膜蛋白, 以及参与胞吞胞吐作用的蛋白<sup>[17]</sup>。胞外囊泡内的 GTP 酶与不同的内膜类型有关, 白色念珠菌 Rho 型 GTP 酶的主要作用是极化生长和形态发生<sup>[51]</sup>, 在它们的作用下, 质膜的出芽或重塑可能作为真菌 EV 的生物发生的机制之一<sup>[52–53]</sup>。EV 的存在也解释了非常规分泌蛋白的存在。白色念珠菌 EV 所含的部分蛋白质, 如烯醇酶, Gpdh, Tpi, Pgk 和糖基水解酶 Bgl2 在系统性念珠菌病中能刺激抗体的产生, Bgl2 和烯醇酶的抗体被认为是系统性念珠菌病预后良好的生物标志物<sup>[43]</sup>。非质膜相关蛋白 SNARE 家族在囊泡运输中发挥作用<sup>[54–55]</sup>, 如 t-SNARE Sso2 是一种整合性膜蛋白, 参与分泌性囊泡与质膜的融合<sup>[56]</sup>, v-SNARE Ykt6 参与了囊泡与内质网、高尔基体和液泡的融合<sup>[57]</sup>。这些蛋白质的富集可能反映了某些白色念珠菌胞外囊泡的起源, 类似于哺乳动物细胞中多囊泡体与质膜融合产生的外泌体<sup>[58]</sup>。同时, 由于真菌胞外囊泡中缺少作为哺乳动物胞外囊泡标记物的四跨膜蛋白, Dawson 等通过实验提出, Sur7 和 Evp1 是理想的白色念珠菌囊泡标记物, 因为它们与四跨膜蛋白标记(尤其是 CD9, CD81 和 CD63)的潜在拓扑相似性, 这为未来的白色念珠菌胞外囊泡的研究打下了基础<sup>[33]</sup>。

## 3 白色念珠菌胞外囊泡的功能

EV 是一种通过非经典的分泌途径释放生物分子的载体, 这也是一种生物<sup>[59]</sup>内部和生物<sup>[60]</sup>

之间的细胞间通讯分子, 是一种重要的细胞间通讯机制, 参与了宿主的各项生理活动。目前已有大量研究表明, EV 可以介导宿主的免疫、炎症反应, 并与真菌的耐药性相关。

### 3.1 促进真菌耐药

白色念珠菌产生的 EV 不仅在调节白色念珠菌毒力、致病过程中产生重要作用, 甚至可能影响其耐药性。Zarnowski 等<sup>[18]</sup>的研究表明, 白色念珠菌产生的 EV 在真菌耐药性中起着重要作用。内体分选复合物(ESCRT)在 EV 的形成过程中必不可少, Zarnowski 等<sup>[18]</sup>发现 ESCRT 缺陷的突变体中不仅 EV 的生成减少, 而且基质多糖水平降低, 并极大地增加了对抗真菌药物氟康唑的敏感性。在 ESCRT 缺陷的突变体中加入野生型(WT)白色念珠菌生物膜产生的 EV 可以逆转 ESCRT 突变体的基质累积和药物敏感性<sup>[18]</sup>。EV 互补实验表明, 白色念珠菌 EV 在基质产生和生物膜耐药性中起着关键作用。这一发现将对未来抗真菌新药的研发提供了新的思路和方向, 例如, Zhao 等最近研制了一种新型抗真菌药物 turbinmicin, 它可以抑制真菌 EV 的运输, 并表现出抗真菌的广谱活性<sup>[61]</sup>。他们发现 turbinmicin 破坏了生物膜生长过程中的 EV 输送, 并损害了生物膜基质的后续组装, 从而降低了真菌的耐药性<sup>[62]</sup>。

### 3.2 与宿主的相互作用

白色念珠菌 EV 是参与白色念珠菌与宿主相互作用的重要环节。多项研究发现, 白色念珠菌 EV 可以介导免疫炎症反应, EV 可影响巨噬细胞、树突状细胞、单核细胞等多种免疫细胞的生物学活动<sup>[63-64]</sup>。白色念珠菌 EV 刺激巨噬细胞可产生 NO、IL-10, 而 EV 刺激的树突状细胞产生 TGF- $\beta$ , 两者均产生 TNF- $\alpha$ 。因为 IL-10 和 TGF- $\beta$  可以预防或减轻由加剧的炎症

反应产生的组织损伤, 使炎症以一种更为平衡的方式产生, 所以有利于白色念珠菌的存活<sup>[65]</sup>。另外, EV 的内在化后将树突状细胞激活为抗原呈递状态, 不仅 MHCII 的表达增加, 而且 CD86 的表达也增加。Vargas 等将白色念珠菌 EV 施用给仅具有先天免疫应答的无脊椎动物时, 发现 EV 制剂能够以剂量依赖性方式为随后的白色念珠菌酵母菌攻击提供保护<sup>[19]</sup>。

目前尚无针对真菌的有效疫苗制剂, Vargas 等<sup>[66]</sup>在此领域中进行了初步的尝试, 他们使用白色念珠菌 EV 建立了腹膜内加强免疫小鼠模型, 使用 EVs 制剂对小鼠进行免疫, 所有组在进行第三次免疫后总 IgG 均增加, 证实了来自白色念珠菌的 EV 可激活小鼠的体液免疫反应; 用致死剂量的白色念珠菌腹膜内感染小鼠后发现, EV 免疫可显著降低所有器官的 CFU; 随后, 所有未免疫或用辅剂免疫的小鼠在感染后 15 d 死亡。然而, 仅用 EV 或 EV 和辅剂制剂免疫可产生保护作用, 所有小鼠均可存活直至实验结束<sup>[66]</sup>。疫苗制剂的储存和运输条件受到广泛的关注, 针对这一问题, Vargas 等<sup>[66]</sup>测试了储存在不同温度下的 EV 稳定性, 发现在 4 °C 条件下 EV 的稳定性良好, 证明了白色念珠菌的胞外囊泡确实存在免疫活性, 有作为疫苗制剂使用的潜能; 目前提取真菌 EV 的方法主要是密度梯度分离法和超速离心法, 而这 2 种提取方法所需的时间长, 费力且设备昂贵, 并且提取后 EV 的量较少, 若作为疫苗制剂使用, 可能存在成本高、产量低等问题。最近有研究者使用纳米滤膜通过超滤、静水过滤、凝胶过滤等过滤方法有效地提取了细胞中的 EV<sup>[67]</sup>, 但尚未有人将其应用于真菌 EV。所以如果将 EV 应用于临床, 如何高效率的提取真菌 EV 这一问题仍待解决。



## 4 展望

细胞外囊泡的产生和作用机制是近来医学研究的热点，它参与了癌症的进展、神经退行性疾病的发生、细菌感染、免疫逃逸及耐药性等生理病理过程，在人体微环境中发挥许多重要作用。目前已有大量对细胞外囊泡的生理功能应用等方面的研究报道，但大部分研究集中于细胞产生的EV，关于微生物的EV研究甚少，尤其是真菌EV。本文总结讨论了近年来白色念珠菌胞外囊泡的相关研究。白色念珠菌EV是菌体和宿主之间相互作用的重要通信物质，其内容物主要有蛋白质、脂质、遗传物质以及一些碳水化合物和色素，参与了真菌代谢、致病的各个环节，并参与宿主的炎症、免疫反应。与细胞EV类似，白色念珠菌EV也参与了免疫反应的过程，有作为疫苗制剂使用的潜能。但真菌EV在临床诊断及治疗中的应用仍然受到多种条件的制约，其内容物的具体成分以及其如何与宿主细胞相互作用、共生致病机制尚不明确，仍需要大量的研究来揭示其中机理，为未来抗真菌治疗提供信息。

## 参考文献

- [1] Oliveira DL, Nakayasu ES, Joffe LS, Guimarães AJ, Sobreira TJP, Nosanchuk JD, Cordero RJB, Frases S, Casadevall A, Almeida IC, Nimrichter L, Rodrigues ML. Characterization of yeast extracellular vesicles: evidence for the participation of different pathways of cellular traffic in vesicle biogenesis. *PLoS ONE*, 2010, 5(6): e11113.
- [2] Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *Journal of Cell Biology*, 2013, 200(4): 373–383.
- [3] Rodrigues ML, Franzen AJ, Nimrichter L, Miranda K. Vesicular mechanisms of traffic of fungal molecules to the extracellular space. *Current Opinion in Microbiology*, 2013, 16(4): 414–420.
- [4] Rybak K, Robatzek S. Functions of extracellular vesicles in immunity and virulence. *Plant Physiology*, 2019, 179(4): 1236–1247.
- [5] Xu R, Rai A, Chen MS, Suwakulsiri W, Greening DW, Simpson RJ. Extracellular vesicles in cancer—implications for future improvements in cancer care. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 2018, 15(10): 617–638.
- [6] 时洋洋, 周学东, 程磊, 任彪. 白色念珠菌感染与口腔癌的关系. *口腔疾病防治*, 2021, 29(2): 119–123. Shi YY, Zhou XD, Cheng L, Ren B. The relationship between *Candida albicans* infection and oral cancer. *Journal of Prevention and Treatment for Stomatological Diseases*, 2021, 29(2): 119–123. (in Chinese)
- [7] 童婷, 程磊, 任彪. 白色念珠菌与口腔潜在恶性病变相关研究进展. *口腔疾病防治*, 2020, 28(12): 806–810. Tong T, Cheng L, Ren B. Research progress on the relationship between *Candida albicans* and oral potentially malignant disorders. *Journal of Prevention and Treatment for Stomatological Diseases*, 2020, 28(12): 806–810. (in Chinese)
- [8] Quek C, Hill AF. The role of extracellular vesicles in neurodegenerative diseases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2017, 483(4): 1178–1186.
- [9] Pathirana RD, Kaparakis-Liaskos M. Bacterial membrane vesicles: biogenesis, immune regulation and pathogenesis. *Cellular Microbiology*, 2016, 18(11): 1518–1524.
- [10] 廖敏, 程磊, 周学东, 任彪. 白色念珠菌对口腔黏膜疾病恶性转化作用的研究进展. *华西口腔医学杂志*, 2020, 38(4): 431–437. Liao M, Cheng L, Zhou XD, Ren B. Research progress of *Candida albicans* on malignant transformation of oral mucosal diseases. *West China Journal of Stomatology*, 2020, 38(4): 431–437. (in Chinese)
- [11] Joffe LS, Nimrichter L, Rodrigues ML, Del Poeta M. Potential roles of fungal extracellular vesicles during infection. *mSphere*, 2016, 1(4): e00099-16.
- [12] Bleackley MR, Dawson CS, Anderson MA. Fungal extracellular vesicles with a focus on proteomic analysis. *Proteomics*, 2019, 19(8): 1800232.
- [13] Gibson RK, Peberdy JF. Fine structure of protoplasts of *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 1972, 72(3): 529–538.
- [14] Chigaleichik AG, Belova LA, Grishchenko VM, Rylkin SS. Several properties of the extracellular vesicles of

- Candida tropicalis* yeasts grown on n-alkanes. *Mikrobiologiya*, 1977, 46(3): 467–471.
- [15] Anderson J, Mihalik R, Soll DR. Ultrastructure and antigenicity of the unique cell wall pimple of the *Candida* opaque phenotype. *Journal of Bacteriology*, 1990, 172(1): 224–235.
- [16] Rodrigues ML, Nimrichter L, Oliveira DL, Frases S, Miranda K, Zaragoza O, Alvarez M, Nakouzi A, Feldmesser M, Casadevall A. Vesicular polysaccharide export in *Cryptococcus neoformans* is a eukaryotic solution to the problem of fungal trans-cell wall transport. *Eukaryotic Cell*, 2007, 6(1): 48–59.
- [17] Konečná K, Klimentová J, Benada O, Němečková I, Jandourek O, Jílek P, Vejsová M. A comparative analysis of protein virulence factors released via extracellular vesicles in two *Candida albicans* strains cultivated in a nutrient-limited medium. *Microbial Pathogenesis*, 2019, 136: 103666.
- [18] Zarnowski R, Sanchez H, Covelli AS, Dominguez E, Jaromin A, Bernhardt J, Mitchell KF, Heiss C, Azadi P, Mitchell A, Andes DR. *Candida albicans* biofilm-induced vesicles confer drug resistance through matrix biogenesis. *PLoS Biology*, 2018, 16(10): e2006872.
- [19] Vargas G, Rocha JDB, Oliveira DL, Albuquerque PC, Frases S, Santos SS, Nosanchuk JD, Gomes AMO, Medeiros LCAS, Miranda K, Sobreira TJP, Nakayasu ES, Arigi EA, Casadevall A, Guimaraes AJ, Rodrigues ML, Freire-De-lima CG, Almeida IC, Nimrichter L. Compositional and immunobiological analyses of extracellular vesicles released by *Candida albicans*. *Cellular Microbiology*, 2015, 17(3): 389–407.
- [20] Wolf JM, Espadas J, Luque-Garcia J, Reynolds T, Casadevall A. Lipid biosynthetic genes affect *Candida albicans* extracellular vesicle morphology, cargo, and immunostimulatory properties. *Eukaryotic Cell*, 2015, 14(8): 745–754.
- [21] Kmetzsch L, Joffe LS, Staats CC, de Oliveira DL, Fonseca FL, Cordero RJ, Casadevall A, Nimrichter L, Schrank A, Vainstein MH, Rodrigues ML. Role for Golgi reassembly and stacking protein (GRASP) in polysaccharide secretion and fungal virulence. *Molecular Microbiology*, 2011, 81(1): 206–218.
- [22] Panepinto J, Komperda K, Frases S, Park YD, Djordjevic JT, Casadevall A, Williamson PR. Sec6-dependent sorting of fungal extracellular exosomes and laccase of *Cryptococcus neoformans*. *Molecular Microbiology*, 2009, 71(5): 1165–1176.
- [23] Rodrigues ML, Nosanchuk JD, Schrank A, Vainstein MH, Casadevall A, Nimrichter L. Vesicular transport systems in fungi. *Future Microbiology*, 2011, 6(11): 1371–1381.
- [24] Rodrigues ML, Nimrichter L, Oliveira DL, Nosanchuk JD, Casadevall A. Vesicular trans-cell wall transport in fungi: a mechanism for the delivery of virulence-associated macromolecules? *Lipid Insights*, 2008, 2: 27–40.
- [25] Rodrigues ML, Nakayasu ES, Almeida IC, Nimrichter L. The impact of proteomics on the understanding of functions and biogenesis of fungal extracellular vesicles. *Journal of Proteomics*, 2014, 97: 177–186.
- [26] Chen H, Zhou XD, Ren B, Cheng L. The regulation of hyphae growth in *Candida albicans*. *Virulence*, 2020, 11(1): 337–348.
- [27] Zhou YJ, Cheng L, Liao BY, Shi YY, Niu YL, Zhu CG, Ye XC, Zhou XD, Ren B. *Candida albicans* *CHK1* gene from two-component system is essential for its pathogenicity in oral candidiasis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2021, 105(6): 2485–2496.
- [28] Brown AJP, Brown GD, Netea MG, Gow NAR. Metabolism impacts upon *Candida* immunogenicity and pathogenicity at multiple levels. *Trends in Microbiology*, 2014, 22(11): 614–622.
- [29] Ene IV, Brunke S, Brown AJP, Hube B. Metabolism in fungal pathogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2014, 4(12): a019695.
- [30] Ramachandra S, Linde J, Brock M, Guthke R, Hube B, Brunke S. Regulatory networks controlling nitrogen sensing and uptake in *Candida albicans*. *PLoS ONE*, 2014, 9(3): e92734.
- [31] Hoyer LL, Cota E. *Candida albicans* agglutinin-like sequence (als) family vignettes: a review of als protein structure and function. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 280.
- [32] Cheng G, Wozniak K, Wallig MA, Fidel PL Jr, Trupin SR, Hoyer LL. Comparison between *Candida albicans* agglutinin-like sequence gene expression patterns in human clinical specimens and models of vaginal candidiasis. *Infection and Immunity*, 2005, 73(3): 1656–1663.
- [33] Dawson CS, Garcia-Ceron D, Rajapaksha H, Faou P, Bleackley MR, Anderson MA. Protein markers for *Candida albicans* EVs include claudin-like Sur7 family proteins. *Journal of Extracellular Vesicles*, 2020, 9(1): 1750810.

- [34] Olaya-Abril A, Jiménez-Munguía I, Gómez-Gascón L, Rodríguez-Ortega MJ. Surfomics: shaving live organisms for a fast proteomic identification of surface proteins. *Journal of Proteomics*, 2014, 97: 164–176.
- [35] Zhou YJ, Liao M, Zhu CG, Hu Y, Tong T, Peng X, Li MY, Feng MY, Cheng L, Ren B, Zhou XD. *ERG3* and *ERG11* genes are critical for the pathogenesis of *Candida albicans* during the oral mucosal infection. *International Journal of Oral Science*, 2018, 10(2): 1–8.
- [36] Gil-Bona A, Llama-Palacios A, Parra CM, Vivanco F, Nombela C, Monteoliva L, Gil C. Proteomics unravels extracellular vesicles as carriers of classical cytoplasmic proteins in *Candida albicans*. *Journal of Proteome Research*, 2015, 14(1): 142–153.
- [37] Heilmann CJ, Sorgo AG, Siliakus AR, Dekker HL, Brul S, De Koster CG, De Koning LJ, Klis FM. Hyphal induction in the human fungal pathogen *Candida albicans* reveals a characteristic wall protein profile. *Microbiology*, 2011, 157(8): 2297–2307.
- [38] Childers DS, Avelar GM, Bain JM, Larcombe DE, Pradhan A, Budge S, Heaney H, Brown AJP. Impact of the environment upon the *Candida albicans* cell wall and resultant effects upon immune surveillance. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 2020, 425: 297–330.
- [39] Gow NA, Hube B. Importance of the *Candida albicans* cell wall during commensalism and infection. *Current Opinion in Microbiology*, 2012, 15(4): 406–412.
- [40] Reis FCG, Borges BS, Jozefowicz LJ, Sena BAG, Garcia AWA, Medeiros LC, Martins ST, Honorato L, Schrank A, Vainstein MH, Kmetzsch L, Nimrichter L, Alves LR, Staats CC, Rodrigues ML. A novel protocol for the isolation of fungal extracellular vesicles reveals the participation of a putative scramblase in polysaccharide export and capsule construction in *Cryptococcus gattii*. *mSphere*, 2019, 4(2): e00080-19.
- [41] Karkowska-Kuleta J, Kedracka-Krok S, Rapala-Kozik M, Kamysz W, Bielinska S, Karafova A, Kozik A. Molecular determinants of the interaction between human high molecular weight kininogen and *Candida albicans* cell wall: identification of kininogen-binding proteins on fungal cell wall and mapping the cell wall-binding regions on kininogen molecule. *Peptides*, 2011, 32(12): 2488–2496.
- [42] Gil ML, Dagan S, Eren R, Gozalbo D. Evaluation of the usefulness of anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase antibodies as a treatment for invasive candidiasis in a murine model. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2006, 89(3/4): 345–350.
- [43] Pitarch A, Jiménez A, Nombela C, Gil C. Decoding serological response to *Candida* cell wall immunome into novel diagnostic, prognostic, and therapeutic candidates for systemic candidiasis by proteomic and bioinformatic analyses. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, 2006, 5(1): 79–96.
- [44] Sandini S, Stringaro A, Arancia S, Colone M, Mondello F, Murtas S, Girolamo A, Mastrangelo N, De Bernardis F. The *MP65* gene is required for cell wall integrity, adherence to epithelial cells and biofilm formation in *Candida albicans*. *BMC Microbiology*, 2011, 11: 106.
- [45] Nimrichter L, Rodrigues ML. Fungal glucosylceramides: from structural components to biologically active targets of new antimicrobials. *Frontiers in Microbiology*, 2011, 2: 212.
- [46] Van Der Pol L, Stork M, Van Der Ley P. Outer membrane vesicles as platform vaccine technology. *Biotechnology Journal*, 2015, 10(11): 1689–1706.
- [47] Shiino H, Furuta S, Kojima R, Kimura K, Endo T, Tamura Y. Phosphatidylserine flux into mitochondria unveiled by organelle-targeted *Escherichia coli* phosphatidylserine synthase PssA. *The FEBS Journal*, 2021, 288(10): 3285–3299.
- [48] Peres Da Silva R, Puccia R, Rodrigues ML, Oliveira DL, Joffe LS, César GV, Nimrichter L, Goldenberg S, Alves LR. Extracellular vesicle-mediated export of fungal RNA. *Scientific Reports*, 2015, 5(1): 1–12.
- [49] Bousquet L, Hemon C, Malburet P, Bucchini F, Vandepoele K, Grimsley N, Moreau H, Echeverria M. The medium-size noncoding RNA transcriptome of *Ostreococcus tauri*, the smallest living eukaryote, reveals a large family of small nucleolar RNAs displaying multiple genomic expression strategies. *NAR Genomics and Bioinformatics*, 2020, 2(4): lqaa080.
- [50] Yin C, Bai G, Zhang Y, Huang J. Crystal structure of human RPP20-RPP25 proteins in complex with the P3 domain of lncRNA RMRP. *Journal of Structural Biology*, 2021, 213(2): 107704.
- [51] Corvest V, Bogliolo S, Follette P, Arkowitz RA, Bassilana M. Spatiotemporal regulation of Rho1 and Cdc42 activity during *Candida albicans* filamentous growth. *Molecular Microbiology*, 2013, 89(4): 626–648.
- [52] Nimrichter L, De Souza MM, Del Poeta M, Nosanchuk

- JD, Joffe L, De M Tavares P, Rodrigues ML. Extracellular vesicle-associated transitory cell wall components and their impact on the interaction of fungi with host cells. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 1034.
- [53] Rodrigues ML, Godinho RMC, Zamith-Miranda D, Nimrichter L. Traveling into outer space: unanswered questions about fungal extracellular vesicles. *PLoS Pathogens*, 2015, 11(12): e1005240.
- [54] Barelle CJ, Richard ML, Gaillardin C, Gow NAR, Brown AJP. *Candida albicans* VAC8 is required for vacuolar inheritance and normal hyphal branching. *Eukaryotic Cell*, 2006, 5(2): 359–367.
- [55] Jedd G, Mulholland J, Segev N. Two new ypt GTPases are required for exit from the yeast trans-Golgi compartment. *Journal of Cell Biology*, 1997, 137(3): 563–580.
- [56] Bernardo SM, Rane HS, Chavez-Dozal A, Lee SA. Secretion and filamentation are mediated by the *Candida albicans* t-SNAREs Sso2p and Sec9p. *FEMS Yeast Research*, 2014, 14(5): 762–775.
- [57] Kweon Y, Rothe A, Conibear E, Stevens TH. Ykt6p is a multifunctional yeast R-SNARE that is required for multiple membrane transport pathways to the vacuole. *Molecular Biology of the Cell*, 2003, 14(5): 1868–1881.
- [58] Verweij FJ, Bebelman MP, Jimenez CR, Garcia-Vallejo JJ, Janssen H, Neefjes J, Knol JC, De Goeij-De Haas R, Piersma SR, Baglio SR, Verhage M, Middeldorp JM, Zomer A, Van Rheenen J, Coppolino MG, Hurbain I, Raposo G, Smit MJ, Toonen RFG, Van Niel G, Pegtel DM. Quantifying exosome secretion from single cells reveals a modulatory role for GPCR signaling. *The Journal of Cell Biology*, 2018, 217(3): 1129–1142.
- [59] Maas SLN, Breakefield XO, Weaver AM. Extracellular vesicles: unique intercellular delivery vehicles. *Trends in Cell Biology*, 2017, 27(3): 172–188.
- [60] Schorey JS, Cheng Y, Singh PP, Smith VL. Exosomes and other extracellular vesicles in host–pathogen interactions. *EMBO Reports*, 2015, 16(1): 24–43.
- [61] Zhao M, Zhang F, Zarnowski R, Barns K, Jones R, Fossen J, Sanchez H, Rajski SR, Audhya A, Bugni TS, Andes DR. Turbinmicin inhibits *Candida* biofilm growth by disrupting fungal vesicle-mediated trafficking. *Journal of Clinical Investigation*, 2021, 131(5): e145123.
- [62] Roszkowiak J, Jajor P, Guła G, Gubernator J, Żak A, Drulis-Kawa Z, Augustyniak D. Interspecies outer membrane vesicles (OMVs) modulate the sensitivity of pathogenic bacteria and pathogenic yeasts to cationic peptides and serum complement. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(22): 5577.
- [63] Yang B, Wang JY, Jiang HY, Lin HX, Ou ZH, Ullah A, Hua YN, Chen JJ, Lin XM, Hu XM, Zheng L, Wang Q. Extracellular vesicles derived from *talaromyces marneffei* yeasts mediate inflammatory response in macrophage cells by bioactive protein components. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 11: 603183.
- [64] Reales-Calderón JA, Vaz C, Monteoliva L, Molero G, Gil C. *Candida albicans* modifies the protein composition and size distribution of THP-1 macrophage-derived extracellular vesicles. *Journal of Proteome Research*, 2017, 16(1): 87–105.
- [65] Zamith-Miranda D, Nimrichter L, Rodrigues ML, Nosanchuk JD. Fungal extracellular vesicles: modulating host-pathogen interactions by both the fungus and the host. *Microbes and Infection*, 2018, 20(9/10): 501–504.
- [66] Vargas G, Honorato L, Guimarães AJ, Rodrigues ML, Reis FCG, Vale AM, Ray A, Nosanchuk JD, Nimrichter L. Protective effect of fungal extracellular vesicles against murine candidiasis. *Cellular Microbiology*, 2020, 22(10): e13238.
- [67] Shao HL, Im H, Castro CM, Breakefield X, Weissleder R, Lee H. New technologies for analysis of extracellular vesicles. *Chemical Reviews*, 2018, 118(4): 1917–1950.

(本文责编 张晓丽)