

# 母乳胞外囊泡促进乳双歧杆菌 BB-12 生长的转录组学分析

李健坤<sup>1,2</sup>, 郑婷<sup>1</sup>, 刘伊索<sup>1</sup>, 姚昱锟<sup>1</sup>, 郝海宁<sup>1,2</sup>, 刘琦琦<sup>1</sup>, 易华西<sup>\*1,2</sup>

(1.中国海洋大学 食品科学与工程学院, 山东 青岛 266003; 2.国家乳业技术创新中心, 内蒙古 呼和浩特 010110)

**摘要:** 胞外囊泡是母乳中的重要功能成分之一, 作者所在实验室前期研究发现, 母乳胞外囊泡能够显著促进乳双歧杆菌 BB-12 的生长, 但具体机制不清楚。作者采用超速离心法与超滤法相结合从母乳中提取胞外囊泡, 通过纳米颗粒追踪技术、透射电镜以及蛋白质免疫印迹法对母乳胞外囊泡进行了鉴定表征。利用转录组学技术分析母乳胞外囊泡促进乳双歧杆菌 BB-12 生长的关键基因。研究发现, 添加母乳胞外囊泡后, 乳双歧杆菌 BB-12 菌体中 ABC 寡肽转运系统相关基因 *pstC*、*pstA*、*metI*, 淀粉和蔗糖代谢相关基因 *BIF\_02090*, 磷酸戊糖途径相关基因 *prsA*、*BIF\_01321*, D-氨基酸代谢相关基因 *murD*、*BIF\_02122*, 乙醛酸和二羧酸代谢相关基因 *pccA* 的表达显著上升。结果表明, 母乳胞外囊泡可能作为一种新型益生元促进婴幼儿肠道中双歧杆菌的生长, 为母乳胞外囊泡在新一代母乳化奶粉中的开发应用提供了理论依据。

**关键词:** 母乳; 胞外囊泡; 双歧杆菌; 生长; 转录组学

中图分类号: TS201.3 文章编号: 1673-1689(2024)04-0054-08 DOI: 10.12441/spyswjs.20231108002

## Transcriptomic Analysis of Breast Milk Extracellular Vesicles Promoting the Growth of *Bifidobacterium lactis* BB-12

LI Jiankun<sup>1,2</sup>, ZHENG Ting<sup>1</sup>, LIU Yisuo<sup>1</sup>, YAO Yukun<sup>1</sup>, HAO Haining<sup>1,2</sup>, LIU Qiqi<sup>1</sup>, YI Huaxi<sup>\*1,2</sup>

(1. College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 2. National Center of Technology Innovation for Dairy, Hohhot 010110, China)

**Abstract:** Extracellular vesicles are one of the important functional components in breast milk, and previous studies in the author's lab have found that breast milk extracellular vesicles (BM-EVs) could significantly promote the growth of *Bifidobacterium lactis* BB-12 (*B. lactis* BB-12). However, the specific mechanism is unclear. In this study, BM-EVs were extracted from human milk using the combination of ultracentrifugation and ultrafiltration methods, and were characterized by nanoparticle tracking analysis (NTA), transmission electron microscopy (TEM), and Western-blot analysis. Transcriptome data analysis was used to explore and identify the key genes of BM-EVs promoting the growth of *B. lactis* BB-12. The results showed that after BM-EVs intervention, the expression levels of ABC oligopeptide transport system-related genes *pstC*, *pstA*, *metI* in *B. lactis* BB-12 were significantly increased, as well as starch and sucrose metabolism-related genes *BIF\_02090*, pentose phosphate pathway-related genes *prsA* and *BIF\_01321*, D-amino acid

收稿日期: 2023-11-08 修回日期: 2024-03-10

基金项目: 国家乳业技术创新中心开发课题项目(2023-KFKT-7)。

\* 通信作者: 易华西(1976—), 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事乳品生物技术研究。E-mail: yihx@ouc.edu.cn

metabolism-related genes *murD* and *BIF\_02122*, and Glyoxylate and dicarboxylate metabolism-related gene *pccA*. In summary, BM-EVs may serve as a new type of prebiotic to promote the growth of *Bifidobacterium* in the intestine of infants, providing a theoretical basis for the development and application in next generation infant formula milk powder.

**Keywords:** breast milk, extracellular vesicles, *Bifidobacterium*, growth, transcriptome

母乳含有多种功能活性成分,有助于促进婴幼儿胃肠道和免疫系统的成熟<sup>[1-3]</sup>,是婴幼儿配方奶粉研究与开发的黄金标准。母乳胞外囊泡是一种广泛存在于母乳中的纳米级囊泡,含有 mRNAs、脂质和蛋白质等多种生物活性分子,对于婴幼儿的生长发育具有重要调控作用<sup>[4-5]</sup>。研究表明,母乳胞外囊泡具有预防新生儿坏死性小肠结肠炎<sup>[6]</sup>、预防轮状病毒感染<sup>[7]</sup>以及促进婴幼儿免疫系统成熟<sup>[8]</sup>等作用。婴幼儿在摄取母乳的过程中,母乳胞外囊泡的脂质双分子层结构能够保护其耐受消化道的恶劣环境,使其稳定到达肠道并与肠道菌群发生相互作用<sup>[5-9]</sup>。因此,母乳胞外囊泡可能会对肠道菌群的生长产生影响。Du 等研究发现,口服牛乳胞外囊泡能够增加 C57BL/6 小鼠肠道内益生菌的丰度,降低有害菌的丰度<sup>[10]</sup>。Yu 等研究指出,牛乳胞外囊泡能够促进植物乳杆菌 WCFS1 的生长并调控其基因表达<sup>[11]</sup>。Tong 等研究发现,牛乳分泌体作为牛乳胞外囊泡的一种重要类型,可以通过调节小鼠肠道菌群从而增强其肠道免疫力<sup>[12]</sup>。Luo 等的研究结果表明,母乳胞外囊泡可以被双歧杆菌吸收,并通过加速碳水化合物的代谢促进双歧杆菌的生长<sup>[13]</sup>。

生命早期良好肠道菌群的建立是个体长期保持健康状态的关键因素之一。双歧杆菌是母乳喂养的婴儿肠道中丰度最高的微生物<sup>[14-15]</sup>,已被证明具有改善婴幼儿腹泻、预防过敏性疾病、促进婴幼儿免疫系统发育等多种功效<sup>[16]</sup>。母乳胞外囊泡对双歧杆菌生长的影响具有菌株特异性,但具体作用机制尚不明确。因此,进一步探究母乳胞外囊泡对双歧杆菌生长的影响,挖掘其中的作用机制对研究与开发母乳胞外囊泡具有重要意义。乳双歧杆菌 BB-12 是我国卫生健康委员会认定的可用于婴幼儿食品的菌株,具有改善抗生素相关性腹泻<sup>[17]</sup>、治疗婴儿肠绞痛<sup>[18]</sup>、减少上呼吸道感染<sup>[19]</sup>等功效。作者所在团队前期研究发现,母乳胞外囊泡能够显著促进乳双歧杆菌 BB-12 的生长。作者采用转录组学技术探究母乳胞外囊泡调控乳双歧杆菌 BB-12 生长的关键通

路及关键基因,揭示母乳胞外囊泡影响乳双歧杆菌 BB-12 生长的机制,以期母乳胞外囊泡作为一种新型益生元应用于新一代母乳化奶粉提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

乳双歧杆菌 BB-12:中国海洋大学食品学院功能性乳品与益生菌工程研究室提供;MRS 肉汤:青岛海博生物科技有限公司;BCA 试剂盒:南京诺唯赞生物科技股份有限公司;Marker:北京普利莱基因技术有限公司;Alix、TSG101、Calnexin:上海 Abcam 公司。

### 1.2 仪器与设备

TGL-16S 台式高速冷冻离心机:四川蜀科仪器有限公司;Optima Max-Xp 台式超速离心机:美国贝克曼库尔特有限公司;Mul-tiskan FC 酶标仪:Thermo Fisher 公司;SPX-400B 生化培养箱:上海博泰实验设备有限公司;ZetaView S/N 17-310 纳米粒度追踪仪:德国 Particle Metrix 公司。

### 1.3 研究方法

**1.3.1 母乳胞外囊泡的提取和鉴定** 母乳样品取自不同地区的 13 位志愿者母亲,无慢性基础疾病及家族遗传病,孕期及哺乳期无特殊用药。手动或使用吸奶器采集乳汁后装入无菌储奶袋,用冰袋冷藏后迅速运回实验室,分装于无菌无酶离心管后置于 -80 ℃ 储存。参考 Tong 等的方法<sup>[9]</sup>提取和鉴定母乳胞外囊泡。1)母乳胞外囊泡的提取:胞外囊泡的提取均在 4 ℃ 下进行。向母乳中加入 CaCl<sub>2</sub>,使其质量分数为 0.01%。混合后加入凝乳酶,使其质量分数为 0.04%,分离乳清。第一次超速离心在 100 000 g 下进行,时间为 60 min。去除杂质后以 135 000 g 进行第二次超速离心,离心 90 min 后将胞外囊泡沉淀重悬于 PBS 溶液中,100 000 g 离心 60 min。将离心得到的母乳胞外囊泡溶液移至截留相对分子质量为 100 000 的超滤管进行超滤,PBS 复溶后于 4 ℃

备用。2) 母乳胞外囊泡的粒径检测: 通过纳米颗粒追踪技术 (nanoparticle tracking analysis, NTA) 检测母乳胞外囊泡的粒径。PBS 稀释的母乳胞外囊泡样品使用 ZetaView S/N 17-310 进行检测, 采用 ZetaView 8.04.02 软件分析粒度及颗粒浓度 (单位: 个/mL)。3) 母乳胞外囊泡的形态观察: 取 5  $\mu$ L 胞外囊泡样本滴加到铜网上, 室温孵育 5 min。向铜网上滴加质量分数为 2% 的乙酸双氧铀, 室温孵育 1 min。室温干燥 20 min 后在透射电镜 80 kV 下观察胞外囊泡形态及大小。4) 母乳胞外囊泡的标志性蛋白质检测: 通过蛋白质免疫印迹法检测母乳胞外囊泡的标志性蛋白质。制备体积分数为 6% 和 12% 的 SDS-PAGE, 取 40  $\mu$ L 样本上样, 在 80 V 电压条件下使样本到达分离胶, 110 V 电压条件下使样本到达分离胶底部。电泳完成后, 确定胞外囊泡标志性蛋白质 TSG101、Alix 以及非标志性蛋白质 Calnexin 对应的条带。将 PVDF 膜浸入甲醇溶液激活, 除去残余甲醇后在 200 mA 电流下进行转膜。转膜完成后, 使用质量分数为 5% 的 BSA 封闭 60 min。加入 TBST 洗涤后按体积比 1:1 000 加入一抗, 4  $^{\circ}$ C 下摇床孵育过夜。一抗孵育完成后, 加入 TBST 洗涤 3 次, 按体积比 1:5 000 加入二抗, 室温摇床孵育 60 min, 洗脱 3 次。将 PVDF 膜与发光液充分接触, 曝光拍照。

**1.3.2 乳双歧杆菌 BB-12 的培养** 取冻干保存的乳双歧杆菌 BB-12 室温解冻, 以接种体积分数 2% 将菌株接种至 10 mL MRS 肉汤培养基, 37  $^{\circ}$ C 恒温培养 24 h 后传代。

**1.3.3 转录组学样品制备与 RNA 提取检测** 向活化传代后的菌株培养体系中添加母乳胞外囊泡溶液, 调整实验组蛋白质质量浓度为 100 mg/L, 对照组中添加等量 PBS。菌株培养至 24 h, 5 000 r/min 离心 15 min, 获取菌体置于液氮中速冻 10 min, 移至 -80  $^{\circ}$ C 保存。每个样品重复 3 次。使用 TRIzol 试剂提取菌体 RNA, 采用 Nanodrop 2000 微量分光光度计和 Agilent 2100 检测 RNA 质量浓度。

**1.3.4 测序数据处理** 样品经过上机测序, 得到图像文件, 经转化后得到原始下机数据。进一步对其进行过滤, 数据过滤的标准主要包括: 1) 采用 fastp (v0.22.0) 去除 3' 端带接头的序列; 2) 去除平均质量分数低于  $Q_{20}$  的序列。通过 Bowtie2 建立参考基因组索引, 然后使用 Bowtie2 (2.5.1) 将过滤后的序列与参考基因组进行比对。

**1.3.5 差异表达分析** 使用 DESeq 软件 (1.38.3) 进行两个组合之间的差异表达分析。筛选差异表达基因的条件为: 表达差异倍数  $\log_2 \text{FCI} > 1$ ,  $P < 0.05$ 。利用 topGO 进行 GO 富集分析, 通过超几何分布方法计算  $P$  (显著富集的标准为  $P < 0.05$ ), 找出差异基因显著富集的 GO 条目, 确定差异基因行使的主要生物学功能。采用 clusterProfiler (4.6.0) 软件进行 KEGG 通路富集分析。

**1.3.6 数据分析** 采用 SPSS 21.0 软件对实验数据进行差异显著性分析,  $P < 0.05$  为差异显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 母乳胞外囊泡的鉴定结果

采用超速离心法提取得到母乳胞外囊泡, 利用纳米颗粒追踪技术分析其粒径大小。图 1 展示了母乳胞外囊泡的粒径分布及颗粒数量。母乳胞外囊泡的粒径分布在 100~300 nm, 平均粒径为 213.3 nm, 符合胞外囊泡的特征。

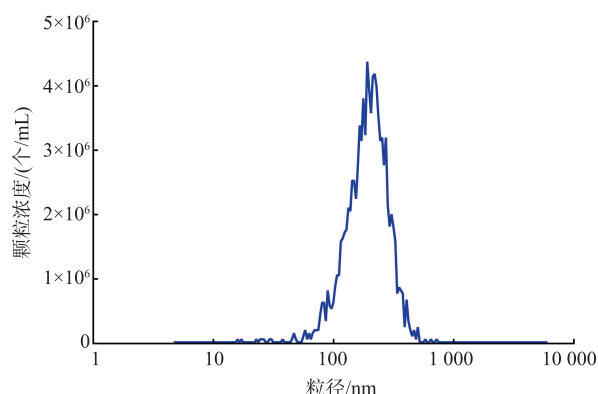


图 1 母乳胞外囊泡粒径分布及数量

Fig. 1 Particle size distribution and number of breast milk extracellular vesicles

利用透射电镜观察母乳胞外囊泡的形态特征, 结果如图 2 所示。所提取出的母乳胞外囊泡被脂质双分子层包裹, 呈现出简单的球形结构, 其直径大小在 100~300 nm, 具有胞外囊泡的典型形态特征。

标志性蛋白质是胞外囊泡鉴定的一项重要指标, 采用蛋白质免疫印迹法检测母乳胞外囊泡的标志性蛋白质, 结果如图 3 所示。所提取的母乳胞外囊泡样本中检测到了胞外囊泡标志性蛋白质 Alix、TSG101, 并未检测到非胞外囊泡标志性蛋白质 Calnexin, 表明成功从母乳中提取获得了胞外囊泡。



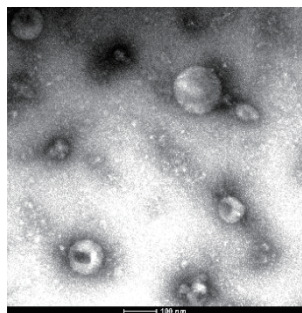


图2 母乳胞外囊泡透射电镜图

Fig. 2 Transmission electron micrograph of breast milk extracellular vesicles

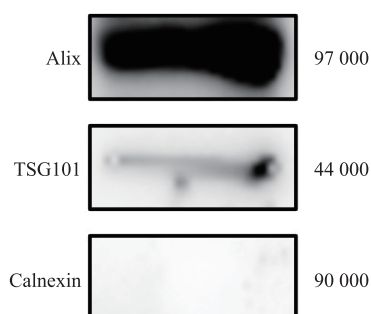


图3 母乳胞外囊泡的标志性蛋白质

Fig. 3 Signature protein of breast milk extracellular vesicles

## 2.2 转录组测序数据分析

作者所在实验室前期研究发现,蛋白质质量浓度为 100 mg/L 的母乳胞外囊泡能够显著促进乳双歧杆菌 BB-12 的生长。对乳双歧杆菌 BB-12 的 6 个样本进行转录组测序,共获得 90 513 730 条序列。进一步对数据进行过滤得到 89 208 258 条高质量序列, $Q_{20}$ (碱基识别准确率在 99.00% 以上的碱基所占百分比)平均达到 98.02%, $Q_{30}$ (碱基识别准确率在 99.90% 以上的碱基所占百分比)平均达到 95.32%。结果表明 GC 所占百分比为 59.24%~59.28%,说明测序质量较高。将过滤后的数据与乳双歧杆菌 BB-12 的参考基因组比对,6 个样品与参考基因组比对到唯一位置的片段比率不低于 97.78%,比对率不低于 97.12%,说明与参考基因组的比对率较高。

## 2.3 差异表达基因的筛选与注释

在  $|\log FC| > 1, P < 0.05$  的条件下,总共筛选到 619 个差异表达基因,包括 320 个上调表达基因和 299 个下调表达基因。差异表达基因的火山图见图 4。样品间基因的表达水平相关性见图 5。结果表明添加

母乳胞外囊泡后,实验组与对照组的组内样本间差异较小,而组间差异较大,说明样品制备合理。

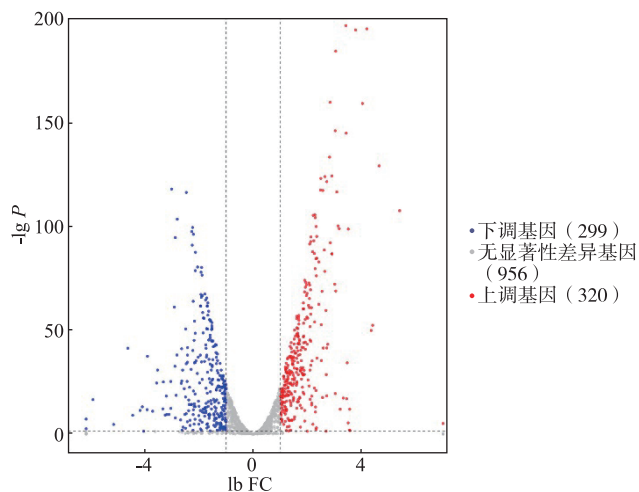
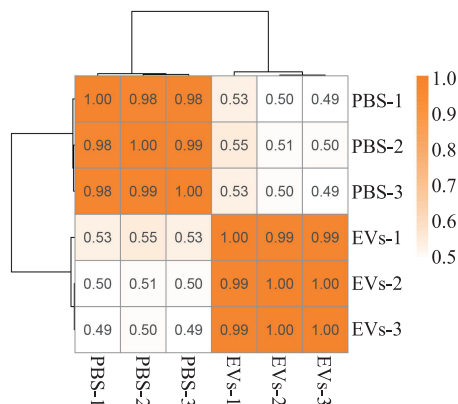


图4 差异表达基因火山图

Fig. 4 Volcano map of differentially expressed genes



PBS 为对照组样本;EVs 为实验组样本。

图5 样品间基因表达水平相关性

Fig. 5 Correlation heatmap among samples

## 2.4 差异基因 GO 功能富集分析

为了进一步分析差异基因的功能,对差异显著的基因进行 GO 注释分析,并按照分子功能、生物过程和细胞组分进行 GO 分类。图 6 显示了每个 GO 分类中富集最显著的前 10 个 GO 条目。其中,在分子功能分类中,富集较为显著的有结构分子活性、rRNA 结合、RNA 结合、糖基转移酶活性等。在生物过程分类中,富集较为显著的有翻译过程、基因表达过程、蛋白质代谢过程、肽生物合成过程、酰胺生物合成过程等。在细胞组分中,富集较为显著的有核糖体、细胞器官、核糖核蛋白复合体等。

## 2.5 差异基因 KEGG 富集分析

对聚类后的差异基因进行 KEGG 分析,图 7 显示了  $P$  最小即富集最显著的前 20 条通路,差异基因主要富集在  $D$ -氨基酸代谢、核糖体、赖氨酸生物合成、果糖与甘露糖代谢等途径。

## 2.6 母乳胞外囊泡促进乳双歧杆菌 BB-12 生长的关键基因及功能分析

FPKM 是用来衡量基因表达水平的常用指标。采用 FPKM 定量表示不同样本间基因的表达水平差异。

**2.6.1 ABC 寡肽转运系统** 如图 8 所示,ABC 寡肽转运系统中,*pstC* 和 *pstA* 基因在实验组中的表达水平分别是对照组的 2.89 倍和 4.82 倍。*pstC* 和 *pstA* 基因编码的是磷酸盐转运蛋白,它们在细菌细胞膜

上构成转运无机磷酸盐的跨膜通道。磷是所有细菌的必需营养素,它参与核酸和磷壁酸的生物合成以及通过磷酸化调节蛋白质活性等多种生物过程<sup>[20-21]</sup>。母乳胞外囊泡的添加增强了乳双歧杆菌 BB-12 对于环境中磷元素的摄取,从而进一步促进了菌体的新陈代谢。*metI* 基因在实验组中的表达水平是对照组的 2.69 倍。*metI* 编码的是蛋氨酸转运蛋白,它能够帮助乳双歧杆菌 BB-12 从环境中获取蛋氨酸。Zhang 等研究发现包括蛋氨酸在内的含硫氨基酸的含量与乳双歧杆菌 BB-12 的生长呈密切正相关<sup>[22]</sup>。当缺少含硫氨基酸时,乳双歧杆菌将完全丧失生长活性。因此,母乳胞外囊泡能够通过促进乳双歧杆菌 BB-12 对于环境中蛋氨酸的摄取来促进其生长。

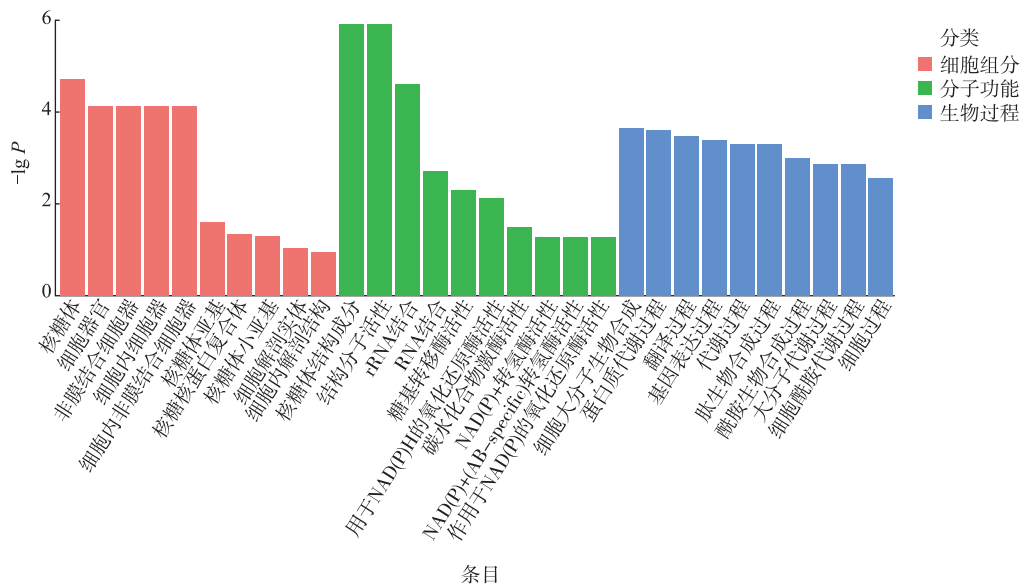


图 6 GO 富集分析

Fig. 6 GO function classification

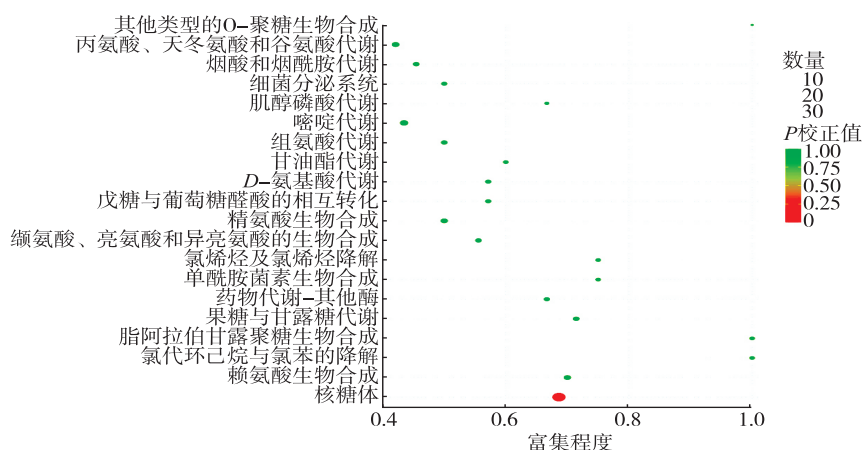
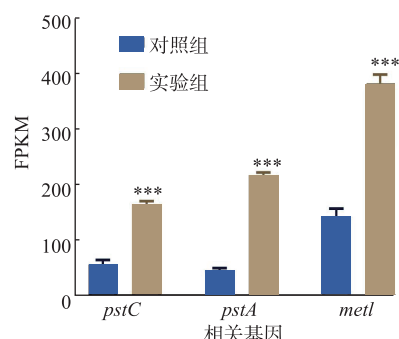


图 7 KEGG 富集分析气泡图

Fig. 7 KEGG enrichment bubble diagram

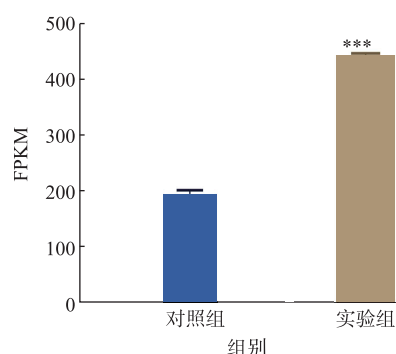


\*\*\* 表示  $P < 0.001$ 。

图 8 ABC 寡肽转运系统相关基因转录水平

Fig. 8 Transcriptional level of genes associated with ABC oligopeptide transport system

**2.6.2 淀粉和蔗糖代谢** 如图 9 所示,淀粉和蔗糖代谢系统中,*BIF\_02090* 基因在实验组中的表达水平是对照组的 2.29 倍。*BIF\_02090* 基因编码蔗糖磷酸化酶,能够催化蔗糖和磷酸盐转化为葡萄糖-1-磷酸。磷酸葡萄糖变位酶能够进一步将葡萄糖-1-磷酸转化为葡萄糖-6-磷酸,从而进入三羧酸循环,为菌体提供能量。因此,母乳胞外囊泡能够通过加强乳双歧杆菌 BB-12 的能量代谢从而促进其增殖。



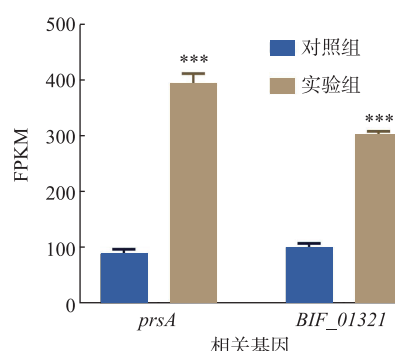
\*\*\* 表示  $P < 0.001$ 。

图 9 淀粉和蔗糖代谢途径 *BIF\_02090* 基因转录水平

Fig. 9 Transcriptional level of gene *BIF\_02090* of starch and sucrose metabolism pathway

**2.6.3 磷酸戊糖代谢** 如图 10 所示,磷酸戊糖代谢途径中,*prsA* 基因在实验组中的表达水平是对照组的 4.38 倍。*prsA* 基因编码的是核糖磷酸焦磷酸激酶,它参与嘌呤和嘧啶核苷酸的生物合成<sup>[23]</sup>。母乳胞外囊泡能够通过促进乳双歧杆菌 BB-12 合成其 DNA 复制和 RNA 转录过程中所需的原料,从而促进其生长。*BIF\_01321* 基因在实验组中的表达水平是对照组的 2.97 倍。*BIF\_01321* 基因编码的是磷酸葡萄糖变位酶,它是乳双歧杆菌 BB-12 生长过程中必需的酶,参与葡萄糖-1-磷酸盐和葡萄糖-6-磷酸

盐的相互转化,在糖代谢中起着重要的作用。因此母乳胞外囊泡能够促进乳双歧杆菌 BB-12 对碳源的代谢。

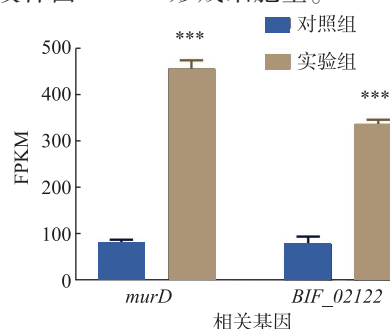


\*\*\* 表示  $P < 0.001$ 。

图 10 磷酸戊糖代谢途径相关基因转录水平

Fig. 10 Transcriptional level of pentose phosphate metabolism pathway-related genes

**2.6.4 D-氨基酸代谢** 如图 11 所示,*D*-氨基酸代谢系统中,*murD* 基因在实验组中的表达水平是对照组的 5.51 倍。*murD* 基因编码的是二磷酸尿核苷-N 乙酰胞壁酸丙氨酸-谷氨酸连接酶,参与细菌细胞壁中肽聚糖的合成<sup>[24]</sup>。*BIF\_02122* 基因在实验组中的表达水平是对照组的 4.18 倍。*BIF\_02122* 基因编码的是丙氨酸消旋酶,它能够协助细菌将环境中的 *L*-丙氨酸转化为构成其细胞壁的 *D*-丙氨酸<sup>[25]</sup>。Qiu 等研究表明,变形链球菌中 *D*-丙氨酸代谢途径的阻断会导致细菌细胞壁缺陷,同时显著抑制细菌的生长及其生物膜形成,而外源 *D*-丙氨酸的添加能够抑制该逆作用<sup>[26]</sup>。因此,母乳胞外囊泡能够促进乳双歧杆菌 BB-12 形成细胞壁。



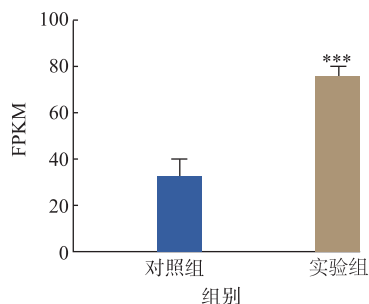
\*\*\* 表示  $P < 0.001$ 。

图 11 *D*-氨基酸代谢相关基因转录水平

Fig. 11 Transcriptional level of *D*-amino acid metabolism-related genes

**2.6.5 乙醛酸和二羧酸代谢** 如图 12 所示,乙醛酸和二羧酸代谢途径中,*pccA* 基因在实验组中的表

达水平是对照组的 2.27 倍。*pccA* 基因编码的是丙酰辅酶 A 羧化酶,将丙酰辅酶 A 羧化为甲基丙二酰辅酶 A,甲基丙二酰辅酶 A 异构化为琥珀酰辅酶 A 后可进入三羧酸循环,从而为菌体提供能量。因此母乳胞外囊泡的添加能够使乳双歧杆菌 BB-12 的乙醛酸代谢得到加强,从而为菌体增殖提供能量支撑。



\*\*\* 表示  $P < 0.001$ 。

图 12 乙醛酸和二羧酸代谢途径 *pccA* 基因转录水平

Fig. 12 Transcriptional level of gene *pccA* of glyoxylate and dicarboxylate metabolic pathway

## 2.7 母乳胞外囊泡促进乳双歧杆菌 BB-12 生长相关机制分析

结合转录组学分析结果,对母乳胞外囊泡促进乳双歧杆菌 BB-12 的生长相关机制进行分析。首先,添加母乳胞外囊泡后,乳双歧杆菌 BB-12 通过

ABC 寡肽转运系统增强磷酸盐转运蛋白和蛋氨酸转运蛋白的跨膜传递能力,提高了乳双歧杆菌 BB-12 对磷元素和氮源的利用能力。磷酸戊糖代谢途径中 *prsA* 基因的上调增强了乳双歧杆菌对碳源的代谢,*BIF\_01321* 基因表达上调为 DNA、RNA 的合成提供了物质储备。*D*-氨基酸代谢系统中,*murD* 基因表达上调促进了乳双歧杆菌 BB-12 细胞壁的合成。其次,母乳胞外囊泡也调控了乳双歧杆菌 BB-12 的能量代谢过程。淀粉和蔗糖代谢系统中 *BIF\_02090* 基因以及乙醛酸和二羧酸系统中 *pccA* 基因的高表达加强了乳双歧杆菌 BB-12 生长的能量供应。最终,母乳胞外囊泡的添加促进了乳双歧杆菌 BB-12 的生长。

## 3 结 语

母乳胞外囊泡通过调控乳双歧杆菌 BB-12 中 ABC 寡肽转运系统相关基因 *pstC*、*pstA*、*metI*, 淀粉和蔗糖代谢相关基因 *BIF\_02090*, 磷酸戊糖代谢相关基因 *prsA*、*BIF\_01321*、*D*-氨基酸代谢相关基因 *murD*、*BIF\_02122*, 乙醛酸和二羧酸代谢相关基因 *pccA* 的表达从而促进其生长。母乳胞外囊泡有望作为一种新型益生元用于新一代母乳化奶粉的开发,发挥其促进肠道双歧杆菌生长的益生功能。

## 参考文献:

- [1] NIETO-RUIZ A, GARCIA-SANTOS J A, BERMUDEZ M G, et al. Cortical visual evoked potentials and growth in infants fed with bioactive compounds-enriched infant formula: results from COGNIS randomized clinical trial [J]. *Nutrients*, 2019, 11(10): 2456.
- [2] REYES S M, BROCKWAY M M, MCDERMID J M, et al. Human milk micronutrients and child growth and body composition in the first 2 years: a systematic review[J]. *Advances in Nutrition*, 2024, 15(1): 100082.
- [3] ZONNEVELD M I, VAN HERWIJNEN M J C, FERNANDEZ-GUTIERREZ M M, et al. Human milk extracellular vesicles target nodes in interconnected signalling pathways that enhance oral epithelial barrier function and dampen immune responses[J]. *Journal of Extracellular Vesicles*, 2021, 10(5): e12071.
- [4] CHEN W J, CHEN X H, QIAN Y, et al. Lipidomic profiling of human milk derived exosomes and their emerging roles in the prevention of necrotizing enterocolitis[J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2021, 65(10): e2000845.
- [5] REIF S, ELBAUM S Y, GOLAN-GERSTL R. Milk-derived exosomes (MDEs) have a different biological effect on normal fetal colon epithelial cells compared to colon tumor cells in a miRNA-dependent manner[J]. *Journal of Translational Medicine*, 2019, 17(1): 325.
- [6] PISANO C, GALLEY J, ELBAHRAWY M, et al. Human breast milk-derived extracellular vesicles in the protection against experimental necrotizing enterocolitis[J]. *Journal of Pediatric Surgery*, 2020, 55(1): 54-58.
- [7] CIVRA A, FRANCESE R, DONALISIO M, et al. Human colostrum and derived extracellular vesicles prevent infection by human rotavirus and respiratory syncytial virus *in vitro*[J]. *Journal of Human Lactation*, 2021, 37(1): 122-134.
- [8] LE DOARE K, HOLDER B, BASSETT A, et al. Mother's milk: a purposeful contribution to the development of the infant



- microbiota and immunity[J]. **Frontiers in Immunology**, 2018, 9:361.
- [9] TONG L J, ZHANG S T, LIU Q Q, et al. Milk-derived extracellular vesicles protect intestinal barrier integrity in the gut-liver axis [J]. **Science Advances**, 2023, 9(15):5041.
- [10] DU C, QUAN S, NAN X, et al. Effects of oral milk extracellular vesicles on the gut microbiome and serum metabolome in mice [J]. **Food and Function**, 2021, 12(21):10938-10949.
- [11] YU S R, ZHAO Z H, XU X Y, et al. Characterization of three different types of extracellular vesicles and their impact on bacterial growth[J]. **Food Chemistry**, 2019, 272:372-378.
- [12] TONG L J, HAO H N, ZHANG X Y, et al. Oral administration of bovine milk-derived extracellular vesicles alters the gut microbiota and enhances intestinal immunity in mice[J]. **Molecular Nutrition and Food Research**, 2020, 64(8):e1901251.
- [13] LUO Y, BI J, LIN Y, et al. Milk-derived small extracellular vesicles promote bifidobacteria growth by accelerating carbohydrate metabolism[J]. **LWT-Food Science and Technology**, 2023, 182:114866.
- [14] STEWART C J, AJAMI N J, O'BRIEN J L, et al. Temporal development of the gut microbiome in early childhood from the TEDDY study[J]. **Nature**, 2018, 562(7728):583-588.
- [15] ZHANG S, LI T L, XIE J, et al. Gold standard for nutrition; a review of human milk oligosaccharide and its effects on infant gut microbiota[J]. **Microbial Cell Factories**, 2021, 20(1):108.
- [16] HIDALGO-CANTABRANA C, DELGADO S, RUIZ L, et al. Bifidobacteria and their health-promoting effects[J]. **Microbiology Spectrum**, 2017, 5(3):1-19.
- [17] MERENSTEIN D, FRASER C M, ROBERTS R F, et al. *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 protects against antibiotic-induced functional and compositional changes in human fecal microbiome[J]. **Nutrients**, 2021, 13(8):2814.
- [18] CHEN K, ZHANG G, XIE H, et al. Efficacy of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, BB-12® on infant colic-a randomised, double-blinded, placebo-controlled study[J]. **Beneficial Microbes**, 2021, 12(6):531-540.
- [19] MENG H C, LEE Y J, BA Z Y, et al. Consumption of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 impacts upper respiratory tract infection and the function of NK and T cells in healthy adults[J]. **Molecular Nutrition and Food Research**, 2016, 60(5):1161-1171.
- [20] ALVAREZ-MARTIN P, FERNANDEZ M, O'CONNELL-MOTHERWAY M, et al. A conserved two-component signal transduction system controls the response to phosphate starvation in *Bifidobacterium breve* UCC2003[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2012, 78(15):5258-5269.
- [21] BRUNA R E, KENDRA C G, PONTES M H. Phosphorus starvation response and PhoB- independent utilization of organic phosphate sources by *Salmonella enterica*[J]. **Microbiology Spectrum**, 2023, 11(6):e0226023.
- [22] ZHANG H, HUANG X, ZHANG Y, et al. Silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) by-product hydrolysates: a new nitrogen source for *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* BB-12[J]. **Food Chemistry**, 2023, 404:134630.
- [23] ZHOU W J, TSAI A, DATTMORE D A, et al. Crystal structure of *E. coli* PRPP synthetase[J]. **BMC Structural Biology**, 2019, 19(1):1-7.
- [24] GAUR V, BERA S. Recent developments on UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanine-D-gutamate ligase (Mur D) enzyme for antimicrobial drug development: an emphasis on in-silico approaches [J]. **Current Research in Pharmacology and Drug Discovery**, 2022, 3:100137.
- [25] 杨金茹, 范琴, 韩楠玉, 等. 抗菌药物靶标丙氨酸消旋酶及其抑制剂研究进展[J]. 微生物学通报, 2021, 48(12):4894-4903.
- YANG J R, FAN Q, HAN N Y, et al. Research progress of antibacterial drug target alanine racemase and its inhibitors [J]. **Microbiology China**, 2021, 48(12):4894-4903. (in Chinese)
- [26] QIU W, ZHENG X, WEI Y, et al. D-alanine metabolism is essential for growth and biofilm formation of *Streptococcus mutans* [J]. **Molecular Oral Microbiology**, 2016, 31(5):435-444.