

细菌外膜囊泡在疾病治疗与预防中的应用

刘 昕, 买冰洁, 郭晓瑜, 常亚炜, 王 攀*

(陕西师范大学生命科学学院, 西安 710119)

摘要: 细菌外膜囊泡(outer membrane vesicles, OMVs)是细菌产生的由膜包裹的纳米结构, 具有非复制性, 影响多种生物过程, 包括毒力因子的运输、DNA转移、噬菌体的拦截、抗生素和真核宿主防御因子、细胞解毒、细胞代谢物输出、细胞间通讯等。OMVs具有细菌源性、免疫原性、稳定性以及同源靶向性等优势, 这使运用OMVs进行疾病治疗与预防具有较好的应用前景。本文基于OMVs的生物学特性、提取方法、脱毒方法以及疾病治疗与预防等方面进行综述, 以期OMVs的应用提供参考。

关键词: 细菌外膜囊泡; 肿瘤治疗; 抗菌; 疫苗

Application of bacterial outer membrane vesicles in the treatment and prevention of diseases

LIU Xin, MAI Bingjie, GUO Xiaoyu, CHANG Yawei, WANG Pan*

(College of Life Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710119, China)

Abstract: Bacterial outer membrane vesicles (OMVs) are membrane-wrapped nanostructures produced by bacteria, which are non-replicative and affect a variety of biological processes, including virulence factor transport, DNA transfer, phage interception, antibiotic and eukaryotic host defense factors, cell detoxification, cell metabolite output, and intercellular communication. OMVs have the advantages of bacterial origin, immunogenicity, stability, homologous targeting and so on, which make the application of OMVs with potential applications in disease treatment. The biological characteristics, extraction methods, detoxification methods, disease treatment and prevention of OMVs were reviewed in order to provide reference for the application of OMVs.

Key Words: bacterial outer membrane vesicles; cancer treatment; antibacterial; vaccine

肿瘤与细菌感染是当前威胁人类健康的两类主要疾病, 给全世界的公共卫生安全带来了严峻的挑战。由于其治疗难度大、康复困难及所用药物昂贵等因素, 给患者造成了巨大的病痛及经济负担^[1]。因此, 探寻肿瘤及耐药细菌治疗新方法是当前研究人员关注的关键问题之一。细菌外膜囊泡(outer membrane vesicles, OMVs)是由细菌分泌

的10~300 nm的囊泡, 在药物递送、肿瘤治疗、细菌感染治疗以及疫苗等方面能够发挥重要作用^[2,3]。一方面, OMVs可以防止所包载内容物的降解以及在体内进行长距离运输, 这为OMVs作为药物载体提供了天然优势^[4]。另一方面, OMVs的内容物及修饰在其膜表面上的蛋白质, 赋予了OMVs免疫原性、同源靶向性、抗菌以及抗黏附等优

收稿日期: 2021-09-26

基金项目: 国家自然科学基金项目(81872497)

第一作者: E-mail: 123liuxin@snnu.edu.cn

*通信作者: E-mail: wangpan@snnu.edu.cn

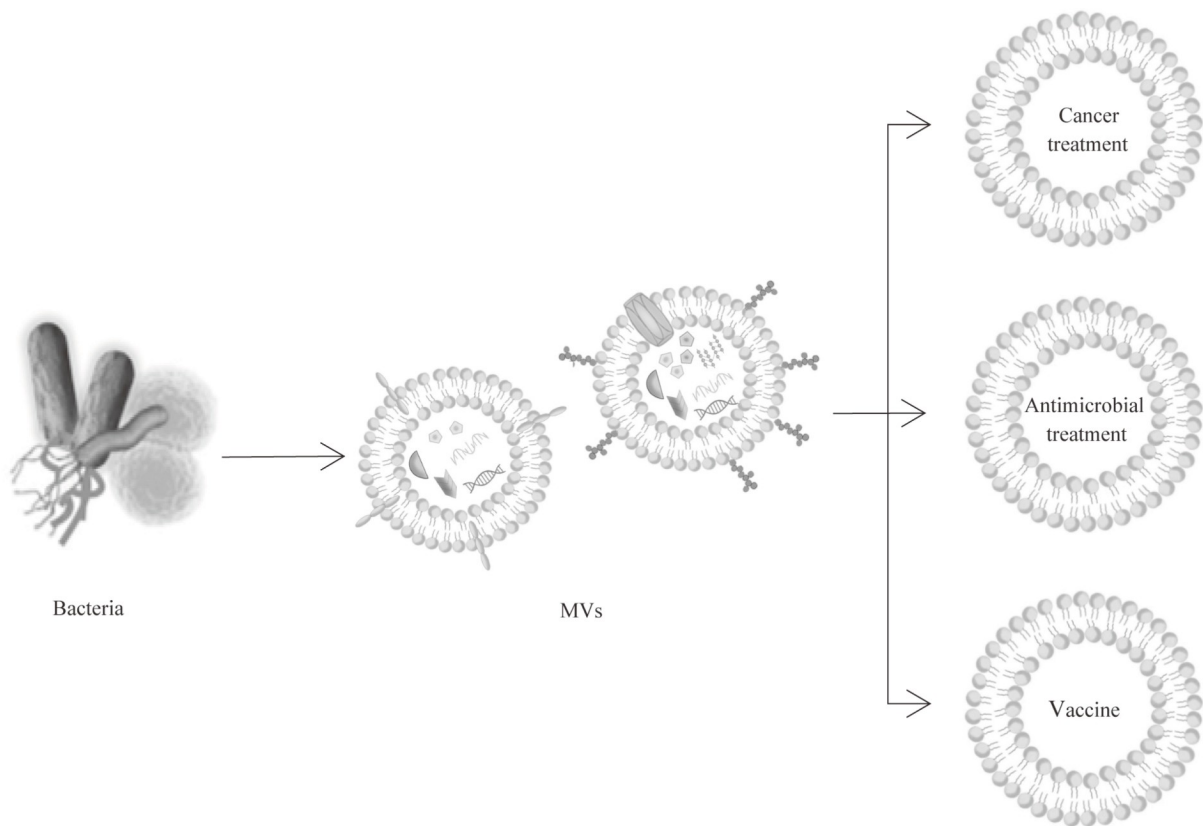


图1 细菌外膜囊泡的应用

势, 使其在肿瘤与细菌感染治疗以及预防方面能够发挥重要作用。本文围绕OMVs的结构与特性, 对基于OMVs的疾病治疗与预防的研究进行了总结, 为OMVs的临床应用提供有价值的参考(图1)。

1 细菌外膜囊泡结构与特性

OMVs是由细菌分泌产生的脂双层近球形膜囊泡, 大小为10~300 nm, 其内部包含了酶、核酸、肽聚糖、脂多糖、脂蛋白以及毒力因子等一系列内含物^[2,3], 其中脂多糖、脑膜炎奈瑟菌OMVs所携带的孔蛋白以及百日咳杆菌OMVs所含的百日咳毒素等毒力因子可以作为细菌特异性抗原^[5-7]。不同种类细菌产生的OMVs的结构和组成也有所区别。有文献报道, 金黄色葡萄球菌OMVs中鉴定出了锰转运蛋白、杀白细胞素E以及杀白细胞素D等165种蛋白质, 大肠杆菌OMVs中鉴定出热不稳定肠毒素B链、溶细胞素A以及志贺毒素等141种蛋白质, 而在脑膜炎奈瑟菌OMVs中则鉴定出了孔蛋白A、孔蛋白B以及周质蛋白等48种蛋白质^[8-11]。OMVs中的

脂多糖、蛋白质、毒力因子以及遗传物质等在细菌侵染过程中发挥了重要作用, 包括促进发病、使细菌在应激条件下存活、向临近细胞传递遗传物质以及调节细菌群落相互作用等^[12-15]。

革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌在细胞结构上有明显的区别, 其产生OMVs的结构与机制也有所不同。脂多糖和外膜蛋白镶嵌在革兰氏阴性菌OMVs膜上, 其内携带肽聚糖、酶、毒力因子、细胞质蛋白以及核酸在内的内容物, 而革兰氏阳性菌OMVs中主要含有脂蛋白、细胞质蛋白、毒力因子、核酸和肽聚糖降解酶等内容物(图2)^[16]。研究发现, 革兰氏阴性菌主要通过以下两种方式产生OMVs。(1)外膜起泡: 由于肽聚糖片段或错误折叠的蛋白质在周质间隙中过度积累^[17], 或是磷脂在外膜靠近外侧的磷脂层中积累^[18], 使革兰氏阴性菌外膜受到较大的压力, 导致外膜向外膨胀, 并最终脱落形成OMVs。(2)爆发性细菌溶解: 自发爆炸性细菌裂解产生OMVs, 从而吞噬周围的细菌成分, 使细菌裂解的膜碎片形成封闭的囊泡^[19]。与

革兰氏阴性菌结构不同,革兰氏阳性菌外部有较厚的肽聚糖层,因此在形成OMVs时也不同于革兰氏阴性菌,目前对革兰氏阳性菌OMVs的产生机制还不完全明确。Wang等^[8]曾报道,枯草芽孢杆菌OMVs是由前驱基因编码的内毒素在肽聚糖层上产生空洞,从而促进OMVs释放。

2 细菌外膜囊泡提取

OMVs广泛存在于血液、尿液、粪便以及唾液等生物液体中^[20,21],可以通过检测液体中OMVs的种类与含量,对疾病发生发展和治疗效果进行有效的诊断和监测。OMVs在细菌生长过程中也可以自然形成,通过洗涤剂刺激、金属螯合剂刺激以及细胞破碎技术等手段可以获得。

目前OMVs的提取方法有较多报道,如密度梯度离心法、超滤法、蛋白沉淀法以及亲和分离法等。这些方法大多通过OMVs的物理或者生化特性将其从细菌培养液上清液中分离出来。下面总结了两种实验中常见的OMVs分离方法^[10]。

2.1 密度梯度离心法

细菌培养上清液中含有不同大小和密度的颗粒,在离心过程中存在不同的离心力,利用平衡沉降原理可进行分离纯化。将培养好的菌液通过高速离心后,过滤上清,之后对其进行超速离心,可得到OMVs的粗提产物,再通过密度梯度离心技术对粗提产物进行分离提纯,得到纯度较高的OMVs。密度梯度离心中一般使用的溶液为蔗糖或optiprep溶液,后者在OMVs提取研究中更为普遍。Wang等^[8]的研究证实,金黄色葡萄球菌OMVs主要分布在20%~35%的optiprep溶液中,其获得的金黄色葡萄球菌OMVs大小为100 nm左右,具有较好的免疫原性,能被用作金黄色葡萄球菌的候选疫苗。

2.2 超滤法

根据分离物质分子大小与形态差异,利用不同孔径的滤膜,在压力作用下,较大的颗粒被滤膜截留,小分子物质被透过,从而达到分离提纯的效果。与密度梯度离心法相似,该方法也需要将高速离心后的菌液上清过滤,再使用超滤管进行浓缩,之后超速离心获得OMVs。Khushal等^[22]运用此方法成功得到了大小均一的布鲁氏菌

OMVs,其与外膜蛋白有相似的免疫反应性,成为无细胞亚单位疫苗候选物潜在的医用材料。

作为目前实验研究中常用的OMVs分离提取方法,密度梯度离心法提取出的OMVs纯度更高、密度更大、蛋白质含量更高,且具有较高的免疫原性,但其提取步骤比较复杂,实验周期比较长,效率不高且毒性更大^[23]。而超滤法则相对比较简单,提取效率较高,且获得的OMVs均一性强,但提取过程中会破坏部分OMVs蛋白结构,造成一定程度上OMVs的免疫原性下降^[24]。

3 细菌外膜囊泡脱毒

部分OMVs由于含有脂多糖等毒力因子而具有一定的毒副作用^[25],能够对细胞与机体产生部分损伤。据报道,未脱毒的OMVs可以被运输到巨噬细胞的胞质溶胶中,诱导细胞炎症甚至死亡^[26],包含毒力因子OmpA的鲍曼不动杆菌OMVs在小鼠体内可以靶向线粒体,并能破坏小鼠肺泡巨噬细胞的线粒体形态^[27]。因此,在实际应用中对OMVs进行脱毒或减毒处理是非常有必要的。通过生物技术手段对OMVs进行脱毒或减毒处理,可以获得低毒或无毒的OMVs,从而将其作为基因/药物载体用于疾病的治疗。脂多糖是革兰氏阴性菌引发炎症的主要因素之一^[28]。溶菌酶与脂多糖有较高的亲和力,其形成的复合物能够抑制炎症反应^[29],因此可以通过溶菌酶对OMVs进行脱毒处理。Peng等^[30]研究了溶菌酶对大肠杆菌OMVs感染的巨噬细胞与小鼠的作用,发现溶菌酶能够引起小鼠肿瘤坏死因子- α 和白介素-6等炎症因子水平显著下降。他们的研究结果说明,溶菌酶能够有效地去除OMVs中的大部分致炎成分,使OMVs成为安全的生物应用材料。

此外,研究者也可以通过基因工程技术对细菌编码OMVs毒性蛋白的基因进行敲除,从而得到减毒或脱毒的OMVs。由于不同细菌中编码OMVs毒性蛋白的基因不同,在进行基因工程减毒或脱毒时,所敲除的基因也有所不同。研究发现,金黄色葡萄球菌的*agr*基因突变后,可以抑制编码 α 溶血素和杀白素亚基基因的表达,从而降低其毒性;但*agr*基因突变后,会导致*spa*基因过表达,其编码的蛋白A与免疫球蛋白的Fc γ 结构域结合,并

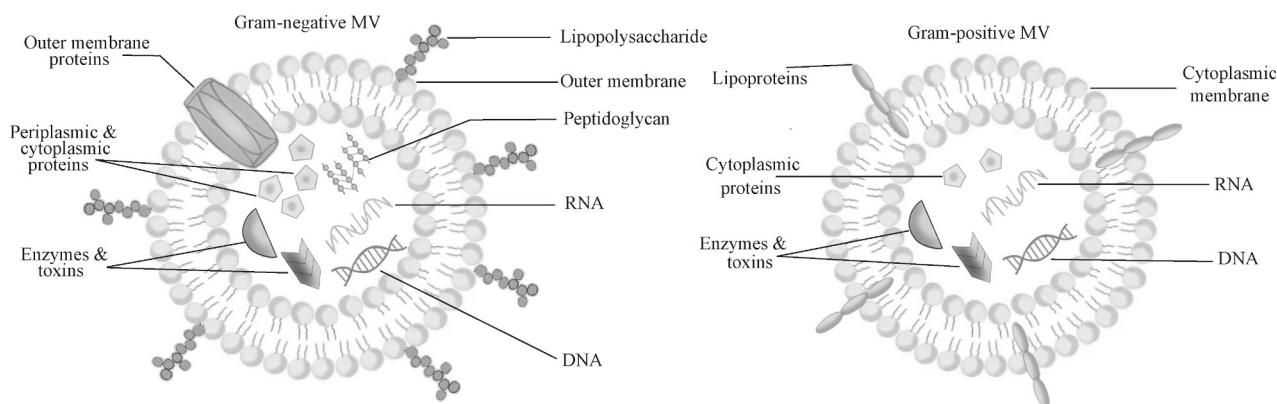


图2 细菌外膜囊泡结构示意图

通过交联VH3型B细胞受体的FAB结构域抑制抗体的产生, 影响其OMVs的免疫原性, 因此, 为获得脱毒且不影响免疫原性的金黄色葡萄球菌OMVs^[8], 需要同时突变*agr*基因和*spa*基因。鼠伤寒沙门氏菌的*relA*基因和*spot*基因突变后, 可以降低其细菌毒性^[31]。Zhuang等^[32]证实了鼠伤寒沙门氏菌OMVs的生物安全性, 该OMVs被注射入小鼠体内后, 可在12 h内迅速代谢, 且引起的小鼠炎症反应几乎消失, 同时也不会引起小鼠的全身性毒性, 血液生化指标、血常规以及组织学检测结果均显示出该OMVs对治疗小鼠的安全性。因此, 对于毒性较大的细菌, 通过基因工程的手段对其进行改造, 可以更好地应用于体内实验, 使OMVs显示出更广泛的研究价值。

4 细菌外膜囊泡在疾病治疗中的研究进展

OMVs内含有一系列可以刺激免疫系统的内容物(如脂多糖、肽聚糖及细菌核酸), 也被称为病原体相关分子模式, 其可与免疫细胞上的病原识别受体结合, 从而激活先天免疫反应^[33], 使OMVs在抗肿瘤及疫苗制备等领域的应用中发挥巨大优势。同时, OMVs相对稳定, 可以保护内部的物质不受细胞内核酸酶及蛋白质水解酶的降解^[34-36]。有研究表明, OMVs在4 °C下可长期储存, 甚至短暂的高温作用后仍能保持酶活性和抗原性^[37]。因此, OMVs作为药物载体可以防止药物降解并可进行长距离高浓度的运输。

4.1 细菌外膜囊泡用于抗肿瘤研究

4.1.1 细菌外膜囊泡作为药物载体抗肿瘤

OMVs作为药物载体在肿瘤治疗方面有明显的

优势: 一方面, OMVs作为纳米级的囊泡, 能够通过增强渗透和滞留效应维持其在肿瘤中的蓄积能力; 另一方面, 可以通过基因工程等手段对OMVs进行修饰, 使其具有肿瘤特异的靶向性。

OMVs不需要组装任何靶向配体就可被胃肠道细胞识别、内吞和消化, 这对消化道肿瘤的治疗有广泛的应用前景^[38]。Shi等^[39]通过大肠杆菌的OMVs包裹介导孔二氧化硅联合5-氟尿嘧啶, 使其能够在结肠部位富集, 当OMVs破裂后, 其包载的药物能够在结肠癌病灶部位进行集中释放, 以增强对结肠癌的治疗效果。Chen等^[40]将肿瘤靶向配体Arg-Gly-Asp(RGD)修饰在沙门氏菌OMVs表面, 将含有5-氟尿嘧啶的胶束挤压进沙门氏菌OMVs, 构建了稳定的肿瘤靶向递送药物纳米平台, 研究结果显示, 对黑色素瘤有较好的杀伤效应。此外, Gujrati等^[41]通过基因工程技术将靶向肿瘤的人表皮生长因子受体-2特异性亲和体修饰在大肠杆菌OMVs上, 内部负载小干扰RNA, 达到高效靶向肝癌细胞并增强其杀伤力的效果。可见, OMVs作为药物载体已成为肿瘤治疗领域的研究热点。

4.1.2 细菌外膜囊泡增效抗肿瘤治疗

OMVs的特性使其在肿瘤治疗方面也发挥了重要作用。首先, 其天然的免疫原性可以激活机体的免疫系统, 相较于细菌, OMVs的安全性更高。Wang等^[42]的研究显示, 金黄色葡萄球菌OMVs可以激活巨噬细胞, 导致白介素-1 β 、白介素-18和含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-1活性改变, 引发炎症反应, 其激活的免疫反应对癌症治疗起到重要的辅助作用。其次, OMVs可以引起肿瘤组织部位的红细胞外渗, 肿瘤中积累的血红蛋白可以作为

光热治疗的内源性光热剂,对肿瘤细胞产生一定的杀伤作用。研究表明,单次小剂量注射鼠伤寒沙门氏菌OMVs会导致肿瘤内红细胞外渗,使肿瘤呈现黑色,在808 nm的近红外光照射下可以对乳腺癌和结肠癌进行有效清除^[32]。最后,OMVs可以联合传统的肿瘤治疗方式(如化疗或放疗)达到更好的治疗效果。据报道,金纳米颗粒与大肠杆菌OMVs结合构成的Au-OMVs复合物,对2GY放射治疗有增强效果,与单独2GY放射治疗相比,Au-OMVs联合2GY放射治疗诱导巨噬细胞向胶质瘤细胞趋化并增加了胶质瘤细胞活性氧的生成,在小鼠皮下瘤模型与原位瘤模型中,Au-OMVs联合2GY放射治疗对胶质瘤有更好的治疗效果^[43]。综上所述,OMVs联合其他肿瘤治疗有广泛的应用前景,为肿瘤治疗提供了新方向。

4.2 细菌外膜囊泡抗菌研究

4.2.1 细菌外膜囊泡作为抗菌剂

早在20世纪90年代,就有报道证实了铜绿假单胞菌的OMVs可以抑制大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、平肠球菌和金黄色葡萄球菌的生长,其主要原因是铜绿假单胞菌OMVs中的自溶素和肽聚糖水解酶发挥了关键作用^[44,45]。自溶素和肽聚糖水解酶能够水解N-乙酰壁氨酸-N-乙酰葡萄糖胺肽聚糖骨架,从而对竞争性细菌进行降解,显示出其抗菌性能,且不会产生耐药性^[46,47]。最新研究表明,泰兰伯克霍尔德氏菌OMVs对鲍曼不动杆菌、金黄色葡萄球菌、多药耐药鲍曼不动杆菌、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌以及真菌病原菌白色念珠菌和新生隐球菌具有较强的抗菌活性^[48],其抑菌性能不仅是其OMVs中的肽聚糖水解酶发挥作用,也与OMVs中的4-羟基-2-烷基喹啉、鼠李糖脂化合物等分子相关。这些分子具有离子载体、铁螯合、免疫调节和细胞间通讯等多种功能^[49],其中最重要的是离子载体功能,能够扰乱质子动力并抑制嘧啶的生物合成,同时能够抑制部分细菌生物膜的形成,从而起到抑制细菌生长的作用^[50]。相较于铜绿假单胞菌,泰兰伯克霍尔德氏菌几乎没有致病性,更具有临床应用价值^[51]。

细菌感染需要细菌黏附在宿主细胞和定植在组织中,进而扩散到其他组织^[52]。目前,通过抑制细菌黏附到宿主细胞的抗菌黏附疗法已成为一

种新型抗菌治疗方法^[53]。抗菌黏附剂主要通过破坏细菌上特定的黏附素或者通过竞争性与宿主细胞结合,抑制细菌与宿主细胞结合^[54]。OMVs中含有丰富的细菌黏附素,可以竞争性与宿主细胞结合,达到抗菌效果。Zhang等^[55]通过带有黏附素的幽门杆菌OMVs包裹纳米颗粒,构建了一种抗菌黏附剂纳米平台,其实验结果显示,该OMVs纳米平台能够降低幽门杆菌对宿主细胞的黏附性,同时,通过对小鼠胃组织幽门杆菌的研究也证实了该OMVs能够减少细菌的黏附。

4.2.2 细菌外膜囊泡作为药物载体抗菌

目前关于OMVs作为药物载体进行肿瘤治疗的报道较多,可以通过基因修饰或者化学修饰靶向性元件,从而递送药物至肿瘤部位,同时激活机体免疫系统,最终达到癌细胞清除效果^[56,57],但OMVs作为抗菌载体治疗的文献较少。OMVs是由细菌自然分泌的,成分与细菌外膜相似^[12],更加容易与细菌融合,将抗菌药物装载到自然产生的OMVs中,可以有效地将药物引入细菌,从而提高药物的杀菌能力。研究表明,包载左氧氟沙星的鲍曼不动杆菌OMVs能够有效入侵大肠杆菌、铜绿假单胞菌和鲍曼不动杆菌,且对大肠杆菌造成有效杀伤,在小鼠肠道大肠杆菌感染模型中也产生了良好的治疗效果^[7]。Gao等^[58]也证实,金黄色葡萄球菌OMVs包载纳米颗粒作为靶向细菌的抗生素载体的抗菌效果,结果发现,与人工合成的脂质体及大肠杆菌OMVs相比较,修饰后的金黄色葡萄球菌OMVs能够靶向到转移性感染器官中,对溶血症及其并发症有较好的治疗效果。同时,包载亲水性药物的OMVs与包载疏水性药物的OMVs对细胞内的细菌杀伤效果几乎无差异,但包裹疏水性药物的OMVs对细胞外细菌的杀伤效果更强。因此,OMVs作为抗菌药物载体,包载疏水性药物的效果可能会更好。

5 细菌外膜囊泡在疫苗开发应用中的研究进展

5.1 细菌疫苗的研究

细菌肽聚糖及细菌外膜蛋白均具有免疫原性,可被用于疫苗接种^[59]。OMVs也含有肽聚糖、细菌外膜蛋白等一系列相关蛋白,有望成为疫苗

制备的潜在材料。事实上,早在20世纪80年代,预防B群脑膜炎奈瑟菌的OMVs疫苗就已经在古巴投入使用。由诺华公司生产的多组分脑膜炎球菌B群疫苗经过重重临床试验,证实了该疫苗的安全性并且可以在儿童和青少年中产生高免疫原性,目前,该疫苗已经在35个国家被批准使用^[60]。其他细菌的OMVs疫苗虽然还未投入临床应用,但在动物实验中也取得了较好的效果。通过基因工程表达的无毒溶血素 α 的脱毒金黄色葡萄球菌OMVs可以诱导小鼠产生毒素中和抗体,且对于耐甲氧西林金黄色葡萄球菌引起的脓毒症具有一定的保护效果^[8]。此外,有报道显示,大肠杆菌OMVs可以产生诱导树突状细胞强烈的Th1型以及Th17免疫应答,促进其细菌的黏附和内化,其OMVs被注入小鼠体内,免疫42 d后,能够产生更强的体液免疫与细胞免疫反应,显示出对小鼠具有一定的保护作用^[61]。

5.2 肿瘤疫苗的研究

肿瘤疫苗也是近年来的研究热点领域,其主要利用肿瘤相关抗原克服肿瘤引起的免疫抑制,增强免疫原性,激活人体的免疫系统。基因工程手段修饰的OMVs作为肿瘤抗原的展示平台,OMVs本身就具有免疫原性,而其携带的肿瘤抗原进一步刺激了机体产生免疫反应,这更有利于肿瘤疫苗的开发。Huang等^[3]通过基因修饰手段将BFGF修饰于大肠杆菌OMVs上,成功构建了BFGF-OMVs肿瘤疫苗,在小鼠接种该疫苗3次后,小鼠体内抗BFGF抗体水平最高,具有显著的肿瘤抑制功能并显著减少了肿瘤细胞的转移。Cheng等^[62]基于OMVs设计了多肿瘤抗原的展示平台,实现了个性化肿瘤疫苗的开发,其主要是将SpC/SpT与SnC/SnT这类以共价键连接的多肽分别修饰在大肠杆菌OMVs和肿瘤抗原上,构建了一个灵活的肿瘤疫苗平台,研究结果显示,60%小鼠的结肠癌肿瘤完全消退,且预先注射该疫苗的小鼠可以形成长期的免疫记忆,能够保护50%的小鼠免受黑色素瘤细胞的攻击。

6 总结与展望

虽然人们很早就知道细菌可以分泌OMVs^[63],但对其作用效果并没有进行深入探讨。近年来,

随着科学技术的发展以及研究的深入,OMVs在癌症治疗、疫苗开发以及抗菌治疗等方面显示出了巨大的应用前景,但仍有很多重要科学问题尚未解决^[64,65]。首先,OMVs的大规模标准化生产还存在一定的难度,达不到目前临床应用的标准。虽然有研究表明可以通过洗涤剂来刺激细菌获得更高的OMVs产量^[66],但其会对OMVs的性质造成一定程度的改变。Hu等^[67]通过将肿瘤细胞外泌体与人造脂质体融合起来,这种合成的囊泡包含了外泌体的特性,又提高了外泌体的产量。因此,将OMVs与人造脂质体融合,有可能解决OMVs产量低的问题。其次,OMVs具有一定毒性,能够对机体产生部分毒副作用。目前可通过生物技术方法对毒蛋白基因进行突变,降低其毒性,但不同菌种的相关基因都不相同且操作复杂不利于广泛应用,而通过溶菌酶进行OMVs脱毒的方法相对操作简便、具有一定的广泛性,但可能会降低部分OMVs的某些特性,因此,发展更好的OMVs脱毒方法能够对推进其临床应用发挥重要的作用。

OMVs作为抗菌剂、药物载体以及一些辅助剂在肿瘤及细菌感染治疗中能够发挥一定的作用,但在如何提高其靶向性、药物包载率、治疗效果、生物活性,以及具体治疗机制等方面仍然需要深入研究。这些问题的解决也会给相关疾病治疗带来新的思路。总之,OMVs在疾病治疗与预防领域都展现出一定的临床应用价值,值得人们进一步研究、探索与开发。

参考文献

- [1] Malik B, Bhattacharyya S. Author correction: antibiotic drug-resistance as a complex system driven by socioeconomic growth and antibiotic misuse. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 15184
- [2] Kaparakis-Liaskos M, Ferrero RL. Immune modulation by bacterial outer membrane vesicles. *Nat Rev Immunol*, 2015, 15(6): 375-387
- [3] Huang W, Shu C, Hua L, et al. Modified bacterial outer membrane vesicles induce autoantibodies for tumor therapy. *Acta Biomater*, 2020, 108: 300-312
- [4] Alves NJ, Turner KB, Walper SA. Directed protein packaging within outer membrane vesicles from *Escherichia coli*: design, production and purification. *J Vis Exp*, 2016, (117): 54458

- [5] Avila-Calderón ED, Lopez-Merino A, Jain N, et al. Characterization of outer membrane vesicles from *Brucella melitensis* and protection induced in mice. *Clin Dev Immunol*, 2012, 2012: 1-13
- [6] Granoff DM. Review of meningococcal group B vaccines. *Clin Infect Dis*, 2010, 50(s2): S54-S65
- [7] Huang W, Zhang Q, Li W, et al. Development of novel nanoantibiotics using an outer membrane vesicle-based drug efflux mechanism. *J Control Release*, 2020, 317: 1-22
- [8] Wang X, Thompson CD, Weidenmaier C, et al. Release of staphylococcus aureus extracellular vesicles and their application as a vaccine platform. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 1379-1392
- [9] Lee EY, Bang JY, Park GW, et al. Global proteomic profiling of native outer membrane vesicles derived from *Escherichia coli*. *Proteomics*, 2007, 7(17): 3143-3153
- [10] Li M, Zhou H, Yang C, et al. Bacterial outer membrane vesicles as a platform for biomedical applications: an update. *J Control Release*, 2020, 323: 253-268
- [11] Vaughan TE, Skipp PJ, O'Connor CD, et al. Proteomic analysis of *Neisseria lactamica* and *Neisseria meningitidis* outer membrane vesicle vaccine antigens. *Vaccine*, 2006, 24(25): 5277-5293
- [12] Schwechheimer C, Kuehn MJ. Outer-membrane vesicles from gram-negative bacteria: biogenesis and functions. *Nat Rev Microbiol*, 2015, 13(10): 605-619
- [13] Kim JH, Yoon YJ, Lee J, et al. Outer membrane vesicles derived from *Escherichia coli* up-regulate expression of endothelial cell adhesion molecules *in vitro* and *in vivo*. *PLoS One*, 2013, 8(3): e59276
- [14] Rumbo C, Fernández-Moreira E, Merino M, et al. Horizontal transfer of the OXA-24 carbapenemase gene via outer membrane vesicles: a new mechanism of dissemination of carbapenem resistance genes in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011, 55(7): 3084-3090
- [15] Gnopo YMD, Watkins HC, Stevenson TC, et al. Designer outer membrane vesicles as immunomodulatory systems – reprogramming bacteria for vaccine delivery. *Adv Drug Deliver Rev*, 2017, 114: 132-142
- [16] Bitto NJ, Kaparakis-Liaskos M. The therapeutic benefit of bacterial membrane vesicles. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(6): 1287
- [17] Zhou L, Srisatjaluk R, Justus DE, et al. On the origin of membrane vesicles in gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Lett*, 1998, 163(2): 223-228
- [18] Roier S, Zingl FG, Cakar F, et al. A novel mechanism for the biogenesis of outer membrane vesicles in gram-negative bacteria. *Nat Commun*, 2016, 7(1): 10515
- [19] Tulkens J, De Wever O, Hendrix A. Analyzing bacterial extracellular vesicles in human body fluids by orthogonal biophysical separation and biochemical characterization. *Nat Protoc*, 2020, 15(1): 40-67
- [20] Yáñez MM, Siljander PRM, Andreu Z, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J ExtraCell Vesicles*, 2015, 4(1): 27066
- [21] Jang SC, Kim SR, Yoon YJ, et al. *In vivo* kinetic biodistribution of nano-sized outer membrane vesicles derived from bacteria. *Small*, 2015, 11(4): 456-461
- [22] Solanki KS, Kumar P, Sahoo M, et al. Isolation and characterization of OMPs and OMVs of *Brucella abortus* S19 and *Brucella abortus* S19Δper. *J Pure Appl Microbiol*, 2016, 10(3): 2121-2126
- [23] van der Pol L, Stork M, van der Ley P. Outer membrane vesicles as platform vaccine technology. *Biotechnol J*, 2015, 10(11): 1689-1706
- [24] 张佳星, 沈犁, 华子瑜, 等. 两种提取铜绿假单胞菌外膜囊泡的方法比较. *上海交通大学学报(医学版)*, 2014, 34(3): 279-282
- [25] Brown L, Wolf JM, Prados-Rosales R, et al. Through the wall: extracellular vesicles in gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nat Rev Microbiol*, 2015, 13(10): 620-630
- [26] Vanaja SK, Russo AJ, Behl B, et al. Bacterial outer membrane vesicles mediate cytosolic localization of LPS and caspase-11 activation. *Cell*, 2016, 165(5): 1106-1119
- [27] Tiku V, Kofoed EM, Yan D, et al. Outer membrane vesicles containing OmpA induce mitochondrial fragmentation to promote pathogenesis of *Acinetobacter baumannii*. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 618
- [28] Simpson BW, Trent MS. Pushing the envelope: LPS modifications and their consequences. *Nat Rev Microbiol*, 2019, 17(7): 403-416
- [29] Takada K, Ohno N, Yadomae T. Binding of lysozyme to lipopolysaccharide suppresses tumor necrosis factor production *in vivo*. *Infect Immun*, 1994, 62(4): 1171-1175
- [30] Peng LH, Wang MZ, Chu Y, et al. Engineering bacterial outer membrane vesicles as transdermal nanoplateforms for photo-TRAIL-programmed therapy against melanoma. *Sci Adv*, 2020, 6(27): eaba2735
- [31] Jiang SN, Park SH, Lee HJ, et al. Engineering of bacteria for the visualization of targeted delivery of a cytolytic anticancer agent. *Mol Ther*, 2013, 21(11): 1985-1995
- [32] Zhuang Q, Xu J, Deng D, et al. Bacteria-derived membrane vesicles to advance targeted photothermal tumor ablation. *Biomaterials*, 2021, 268: 120550
- [33] Dowling JK, Mansell A. Toll-like receptors: the swiss army knife of immunity and vaccine development. *Clin Trans Immunol*, 2016, 5(5): e85

- [34] Kolling GL, Matthews KR. Export of virulence genes and shiga toxin by membrane vesicles of *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65(5): 1843-1848
- [35] Alves NJ, Turner KB, Medintz IL, et al. Protecting enzymatic function through directed packaging into bacterial outer membrane vesicles. *Sci Rep*, 2016, 6(1): 24866
- [36] Horstman AL, Kuehn MJ. Enterotoxigenic *Escherichia coli* secretes active heat-labile enterotoxin via outer membrane vesicles. *J Biol Chem*, 2000, 275(17): 12489-12496
- [37] Arigita C, Jiskoot W, Westdijk J, et al. Stability of mono- and trivalent meningococcal outer membrane vesicle vaccines. *Vaccine*, 2004, 22(5-6): 629-642
- [38] Bielaszewska M, Rüter C, Bauwens A, et al. Host cell interactions of outer membrane vesicle-associated virulence factors of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: intracellular delivery, trafficking and mechanisms of cell injury. *PLoS Pathog*, 2017, 13(2): e1006159
- [39] Shi J, Ma Z, Pan H, et al. Biofilm-encapsulated nano drug delivery system for the treatment of colon cancer. *J Microencapsulation*, 2020, 37(7): 481-491
- [40] Chen Q, Bai H, Wu W, et al. Bioengineering bacterial vesicle-coated polymeric nanomedicine for enhanced cancer immunotherapy and metastasis prevention. *Nano Lett*, 2020, 20(1): 11-21
- [41] Gujrati V, Kim S, Kim SH, et al. Bioengineered bacterial outer membrane vesicles as cell-specific drug-delivery vehicles for cancer therapy. *ACS Nano*, 2014, 8(2): 1525-1537
- [42] Wang X, Eagen WJ, Lee JC. Orchestration of human macrophage NLRP3 inflammasome activation by *Staphylococcus aureus* extracellular vesicles. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117(6): 3174-3184
- [43] Chen MH, Liu TY, Chen YC, et al. Combining augmented radiotherapy and immunotherapy through a nano-gold and bacterial outer-membrane vesicle complex for the treatment of glioblastoma. *Nanomaterials*, 2021, 11(7): 1661
- [44] Kadurugamuwa JL, Beveridge TJ. Bacteriolytic effect of membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa* on other bacteria including pathogens: conceptually new antibiotics. *J Bacteriol*, 1996, 178(10): 2767-2774
- [45] MacDonald KL, Beveridge TJ. Bactericidal effect of gentamicin-induced membrane vesicles derived from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 on gram-positive bacteria. *Can J Microbiol*, 2002, 48(9): 810-820
- [46] Li Z, Clarke AJ, Beveridge TJ. Gram-negative bacteria produce membrane vesicles which are capable of killing other bacteria. *J Bacteriol*, 1998, 180(20): 5478-5483
- [47] Watt SR, Clarke AJ. Isolation, purification, and characterization of the major autolysin from *Pseudomonas aeruginosa*. *Can J Microbiol*, 1997, 43(11): 1054-1062
- [48] Wang Y, Hoffmann JP, Chou CW, et al. *Burkholderia thailandensis* outer membrane vesicles exert antimicrobial activity against drug-resistant and competitor microbial species. *J Microbiol*, 2020, 58(7): 550-562
- [49] Déziel E, Lépine F, Milot S, et al. Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) reveals a role for 4-hydroxy-2-heptylquinoline in cell-to-cell communication. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(5): 1339-1344
- [50] Wu Y, Seyedsayamdost MR. Synergy and target promiscuity drive structural divergence in bacterial alkylquinolone biosynthesis. *Cell Chem Biol*, 2017, 24(12): 1437-1444.e3
- [51] Brett PJ, DeShazer D, Woods DE. Note: *Burkholderia thailandensis* sp. nov., a *Burkholderia pseudomallei*-like species. *Int J Systematic Bacteriol*, 1998, 48(1): 317-320
- [52] Asadi A, Razavi S, Talebi M, et al. Correction to: A review on anti-adhesion therapies of bacterial diseases. *Infection*, 2019, 47(1): 25-26
- [53] Denis K, Le Bris M, Le Guennec L, et al. Targeting type IV pili as an antivirulence strategy against invasive meningococcal disease. *Nat Microbiol*, 2019, 4(6): 972-984
- [54] Sharon N. Carbohydrates as future anti-adhesion drugs for infectious diseases. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1760(4): 527-537
- [55] Zhang Y, Chen Y, Lo C, et al. Inhibition of pathogen adhesion by bacterial outer membrane-coated nanoparticles. *Angew Chem Int Ed*, 2019, 58(33): 11404-11408
- [56] Cao Z, Liu J. Bacteria and bacterial derivatives as drug carriers for cancer therapy. *J Control Release*, 2020, 326: 396-407
- [57] Chen Q, Huang G, Wu W, et al. A hybrid eukaryotic-prokaryotic nanoplatfrom with photothermal modality for enhanced antitumor vaccination. *Adv Mater*, 2020, 32(16): 1908185
- [58] Gao F, Xu L, Yang B, et al. Kill the real with the fake: eliminate intracellular *Staphylococcus aureus* using nanoparticle coated with its extracellular vesicle membrane as active-targeting drug carrier. *ACS Infect Dis*, 2019, 5(2): 218-227
- [59] Pore D, Chakrabarti MK. Outer membrane protein A (OmpA) from *Shigella flexneri* 2a: a promising subunit vaccine candidate. *Vaccine*, 2013, 31(36): 3644-3650
- [60] Flacco ME, Manzoli L, Rosso A, et al. Immunogenicity and safety of the multicomponent meningococcal B vaccine (4CMenB) in children and adolescents: a

- systematic review and meta-analysis. [Lancet Infect Dis](#), 2018, 18(4): 461-472
- [61] Kim OY, Hong BS, Park KS, et al. Immunization with *Escherichia coli* outer membrane vesicles protects bacteria - induced lethality via Th1 and Th17 cell responses. [J Immunol](#), 2013, 190(8): 4092-4102
- [62] 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. [Nat Commun](#), 2021, 12(1): 2041
- [63] Deatherage BL, Cookson BT. Membrane vesicle release in bacteria, eukaryotes, and archaea: a conserved yet underappreciated aspect of microbial life. [Infect Immun](#), 2012, 80(6): 1948-1957
- [64] Kim OY, Park HT, Dinh NTH, et al. Bacterial outer membrane vesicles suppress tumor by interferon- γ -mediated antitumor response. [Nat Commun](#), 2017, 8(1): 626
- [65] van de Waterbeemd B, Streefland M, van der Ley P, et al. Improved OMV vaccine against *Neisseria meningitidis* using genetically engineered strains and a detergent-free purification process. [Vaccine](#), 2010, 28(30): 4810-4816
- [66] Zollinger WD, Mandrell RE, Griffiss JM, et al. Complex of meningococcal group B polysaccharide and type 2 outer membrane protein immunogenic in man. [J Clin Invest](#), 1979, 63(5): 836-848
- [67] Hu M, Zhang J, Kong L, et al. Immunogenic hybrid nanovesicles of liposomes and tumor-derived nanovesicles for cancer immunochemotherapy. [ACS Nano](#), 2021, 15(2): 3123-3138