



具核梭杆菌外膜囊泡的免疫原性

葛树爱, 张旭强, 苏日娜, 孙浩洋, 王豫鑫, 郑维*, 权春善*

大连民族大学 生命科学学院, 生物技术与资源利用教育部重点实验室, 辽宁 大连 116600

葛树爱, 张旭强, 苏日娜, 孙浩洋, 王豫鑫, 郑维, 权春善. 具核梭杆菌外膜囊泡的免疫原性[J]. 微生物学报, 2024, 64(11): 4204-4218.

GE Shu'ai, ZHANG Xuqiang, SU Rina, SUN Haoyang, WANG Yuxin, ZHENG Wei, QUAN Chunshan. Immunogenicity of outer membrane vesicles of *Fusobacterium nucleatum*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(11): 4204-4218.

摘要:【目的】评价模拟正常肠道和肿瘤微环境的 pH 条件下制备的具核梭杆菌外膜囊泡(outer membrane vesicles, OMVs)的安全性和免疫原性, 为后期开发基于外膜囊泡的具核梭杆菌疫苗奠定基础。【方法】采用超高速离心和密度梯度离心方法制备在不同 pH 条件下生成的外膜囊泡, 建立人结肠癌细胞 HCT116、人正常结肠上皮细胞 HCoEpiC、小鼠巨噬细胞 Raw264.7 感染模型; 采用 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT]和细胞活性检测试剂盒(cell counting kit-8, CCK-8)检测细胞增殖的影响; 用流式细胞仪和贴壁细胞原位荧光检测细胞凋亡情况; 通过小鼠的血常规检测体内安全性; 通过酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测免疫原性; 通过细胞黏附抑制实验检测免疫保护效果。【结果】酸性条件生成的外膜囊泡(acidic outer membrane vesicles, aOMVs)和中性条件生成的外膜囊泡(neutral outer membrane vesicles, nOMVs)对人正常结肠上皮细胞 HCoEpiC、人结肠癌细胞 HCT116 和小鼠巨噬细胞 Raw264.7 的细胞增殖均无显著性影响, 也不能引起细胞凋亡; aOMVs 和 nOMVs 在浓度为 25 $\mu\text{g/mL}$ 处理红细胞时仍未见明显的溶血现象产生, 并且在小鼠体内血常规和全血检测指标数据均在正常范围内; aOMVs 和 nOMVs 均具有免疫原性, 可有效减少具核梭杆菌在结肠癌细胞 DLD-1 上的黏附, aOMVs 抗体性能优于 nOMVs 抗体。【结论】aOMVs 和 nOMVs 的安全性均良好, 均具有免疫原性, aOMVs 优于 nOMVs。

关键词: 具核梭杆菌; 外膜囊泡; 免疫原性; 黏附抑制

资助项目: 中央高校基本科研业务费专项资金(0919-140213)

This work was supported by the Fundamental Research Funds for the Central Universities (0919-140213).

*Corresponding authors. E-mail: ZHENG Wei, zhengwei@dlnu.edu.cn; QUAN Chunshan, mikyeken@dlnu.edu.cn

ORCID: ZHENG Wei (0009-0006-7241-401X); QUAN Chunshan (0000-0002-1537-3964)

Received: 2024-04-23; Accepted: 2024-09-18; Published online: 2024-09-23

Immunogenicity of outer membrane vesicles of *Fusobacterium nucleatum*

GE Shu'ai, ZHANG Xuqiang, SU Rina, SUN Haoyang, WANG Yuxin, ZHENG Wei*, QUAN Chunshan*

Key Laboratory of Biotechnology and Bioresources Utilization, Ministry of Education, School of Life Sciences, Dalian Minzu University, Dalian 116600, Liaoning, China

Abstract: [Objective] To evaluate the safety and immunogenicity of outer membrane vesicles (OMVs) of *Fusobacterium nucleatum* prepared under the pH conditions simulating normal intestinal and tumor microenvironments, and to lay a foundation for the later development of OMV-based vaccines against *F. nucleatum*. [Methods] Ultra-high-speed centrifugation and density gradient centrifugation were employed to isolate the OMVs of *F. nucleatum* under different pH conditions. Three models of human colorectal cancer cells (HCT116), human colonic epithelial cells (HCoEpiC), and mouse macrophage Raw264.7 were infected by *F. nucleatum*. The cell proliferation was assessed by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay and cell counting kit-8 (CCK-8) assay, and the cell apoptosis were evaluated by flow cytometry and *in situ* fluorescence of adherent cells. The safety *in vivo* was detected by blood routine and whole blood index of mice. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was employed to examine the cell immunogenicity, and the adhesion inhibition assay was conducted to assess cell immunoprotection. [Results] Acidic outer membrane vesicles (aOMVs) and neutral outer membrane vesicles (nOMVs) had no significant different effects on the proliferation or apoptosis of HCoEpiC, HCT116, and Raw264.7 cells. Both nOMVs and aOMVs at a concentration of 25 µg/mL did not lead to significant hemolysis of red blood cells, and the routine blood and whole blood test results of the mice treated with aOMVs were within the normal ranges. The results demonstrated that both aOMVs and nOMVs exhibited good immunogenicity and reduced the adhesion of *F. nucleatum* to colon cancer cells DLD-1. The aOMVs outperformed nOMVs regarding immunogenicity. [Conclusion] Both aOMVs and nOMVs had good safety and immunogenicity, and aOMVs were superior to nOMVs.

Keywords: *Fusobacterium nucleatum*; outer membrane vesicle; immunogenicity; adhesion inhibition

具核梭杆菌(*Fusobacterium nucleatum*)是一种革兰氏阴性、专性厌氧的无芽孢杆菌,菌体呈梭型,不具备运动能力,是一种机会性致病菌^[1]。研究表明,*F. nucleatum*在肠道中的丰度与结直

肠癌直接相关,其携带多种毒力因子,可诱导促炎症反应、肿瘤细胞的增殖、迁移以及促炎免疫微环境的形成,促进结直肠癌发展与转移^[2-4]。在肿瘤发生早期,研究发现*F. nucleatum*细胞表

面的黏附素 A (FadA)蛋白可以通过与结直肠癌细胞的细胞上皮标记物钙黏蛋白(E-cadherin)结合,进而激活 β -连环蛋白(β -catenin)信号通路,促进肿瘤细胞的增殖能力;此外, *F. nucleatum* 细胞表面的 FadA 蛋白还可增加内皮通透性,促使 *F. nucleatum* 和其他细菌渗透到血液中^[5]。*F. nucleatum* 还可以通过其外膜自转运蛋白(Fap2)定位到高表达半乳糖-N-乙酰-D-半乳糖胺(Gal-GalNAc)的肿瘤细胞表面,使其富集在结直肠癌组织中,通过抑制免疫细胞活性从而帮助肿瘤细胞获得免疫逃逸^[6]。Liu 等^[7]通过蛋白质组学分析发现, *F. nucleatum* 外膜囊泡中包含 98 种蛋白,其中 6 种自体转运蛋白与 V 型分泌系统有关;其中 V 型分泌系统是革兰氏阴性菌中重要的毒力因子分泌途径,又称为自转运蛋白,通常作为细菌的毒力因子参与细菌的黏附、聚集、侵染、生物膜形成、血清抗性和细菌毒性等生理过程。

细菌外膜囊泡(outer membrane vesicles, OMVs)是革兰氏阴性菌外膜释放到细胞外环境中的球形双层小泡,大小约为 100–300 nm^[8-9]。在革兰氏阴性菌中,因其细胞外膜与肽聚糖之间的交联作用减弱、周质空间中错误折叠蛋白积累、细胞外膜局部曲率增加和细胞爆炸性裂解等作用使其不断从细胞表面分泌出 OMVs。革兰氏阴性菌细胞膜由内膜(inner membrane, IM)和外膜(outer membrane, OM)组成,中间是肽聚糖层(peptidoglycan, PG)和周质空间(periplasmic space),外膜和肽聚糖层通过膜锚定蛋白(如 Lpp、OmpA 和 Tol-Pal 复合物)连接^[10-13]。因 OMVs 起源于细菌外膜,因此含有大量细菌外膜成分,如磷脂、脂多糖、多种蛋白质以及一些来自 IM 和 OM 之间的周质成分,它们在释放过程中被包裹在囊泡腔中^[14-16]。OMVs 包含多种病原体相关分子模式,能够与宿主模式识别受体结

合,从而激活宿主免疫系统,促进细胞因子分泌和细胞焦亡^[17-18]。此外, OMVs 还携带大量来自细菌的毒素、黏附素等,通过与宿主细胞相互作用,对癌细胞发挥细胞毒性作用,具有内在的抗肿瘤活性^[19-20]。另外,由于 OMVs 独特的中空结构和组成成分,其在革兰氏阴性菌的感染、微生物宿主间相互作用及作为抗菌和抗肿瘤药物递送的载体等方面发挥着重要的功能^[21-24]。

目前,来源于禽致病性大肠杆菌(avian pathogenic *Escherichia coli*)^[25]、副猪嗜血杆菌(*Haemophilus parasuis*)^[26]和胸膜肺炎放线杆菌(*Actinobacillus pleuropneumoniae*)^[27]等细菌的外膜囊泡已被研究证明可作为疫苗或疫苗递送系统,诱导有效的免疫保护反应。OMVs 作为疫苗或疫苗递送系统优势明显。首先,其表面存在多种抗原,可有效降低病原体引起的靶抗原发生突变的可能性,从而减少逃逸变体的产生^[28-29]。其次, OMVs 具有内在佐剂的能力,比传统佐剂更安全且能够引起全面免疫^[30]。最后, OMVs 还可以作为黏膜转运蛋白,将抗原转运到黏膜屏障^[31-32]。

综上所述,细菌外膜囊泡具有良好的抗原性和免疫原性。Zhang 等^[33]研究初步表明,具核梭杆菌外膜囊泡具备刺激宿主引起强大免疫保护的特性。本研究在前期对具核梭杆菌外膜囊泡蛋白组学研究的基础上,评估了不同 pH 条件下培养获得的具核梭杆菌外膜囊泡的安全性,考察了刺激新西兰大白兔产生抗体以及免疫产生的抗体性能,探讨不同 pH 培养条件对具核梭杆菌免疫原性的影响,为更好地开发基于外膜囊泡的具核梭杆菌疫苗提供了理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)购自 Sigma-Aldrich 公司,3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-

二苯基四氮唑溴盐[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT] 购自 Amresco 公司, Cell counting kit-8 (CCK-8) 购自 APEX BIO 公司。RPMI 1640 培养基、0.25%胰蛋白酶(含 EDTA)、0.25%胰蛋白酶(不含 EDTA)、Antibiotic-Antimycotic (100×) 均购自 Gibco 公司。培养细胞用的胎牛血清(fetal bovine serum, FBS) 购自 PAN 公司。人结肠癌细胞株 HCT116 购自武汉普诺赛生命科技有限公司, 人正常结肠上皮细胞株 HCoEpiC 由中国科学院大连化学物理研究所惠赠, 小鼠巨噬细胞株 Raw264.7 和人结肠癌腺癌上皮细胞 DLD-1 均购自武汉尚恩生物技术有限公司, *Fusobacterium nucleatum* ATCC 23726 购自美国菌种保藏中心(American Type Culture Collection)。新西兰大白兔购自南京巴傲得生物科技有限公司, 3 周龄雌性无特定病原体(specific pathogen free, SPF)小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司。

1.2 具核梭杆菌两种外膜囊泡的提取及纯化

哥伦比亚血琼脂平板培养, 置于有厌氧袋的厌氧箱中, 37 °C 静置培养。*F. nucleatum* 种子液培养通过挑取单菌落转接在 30 mL 体系 TSPC (0.03% TSB, 0.01% Bacto™ Peptone, 0.25 mg/mL L-cysteine) 培养基, 通入无菌 N₂, 37 °C 恒温培养箱中密封静置培养。中性条件下 *F. nucleatum* 扩大培养是将种子液按 1% 转接在 2 L 体系 TSPC 液体培养基中, 补充 38.4 mL 中性 L-cysteine (酸性条件下 *F. nucleatum* 扩大培养是补充 30.1 mL 酸性 L-cysteine), 充无菌 N₂, 密封后于 37 °C 恒温培养箱中静置培养 40 h 左右。然后将 2 L 培养好的 *F. nucleatum* 菌液, 在 4 °C、8 500×g 离心 25 min, 取上清。上清液过水膜并浓缩至总体积为 30 mL 左右。浓缩后的液体分装至超速离心管中, 4 °C、200 000×g 离心 4 h, 去掉上清, 沉淀用 400 μL 1×PBS 重悬, 获得粗提的 OMVs。将碘克沙

醇梯度离心液用含 0.85% NaCl 的 30 mmol/L 4-羟乙基哌嗪乙磺酸缓冲液(hydroxyethyl piperazine ethanesulfonic acid, HEPES)稀释至以下浓度: 40%、35%、30%、25%、20%、15%, 并按浓度由大到小加入同一超速离心管中, 每个梯度 500 μL, 最后加入粗提的 400 μL OMVs。4 °C、135 000×g 离心 16 h 后, 去掉最上层 1 mL 液体, 将剩下的液体由上至下每 200 μL 分装至 1.5 mL 离心管中, 依次取样进行 12% SDS-PAGE, 考马斯亮蓝染色, 观察蛋白质条带。蛋白条带对应的液体中含有 OMVs, 收集蛋白条带所对应的样品, 20 倍体积 1×PBS 稀释, 稀释后的液体分装至离心管中, 4 °C、200 000×g 离心 4 h, 去掉上清, 沉淀用 400 μL 1×PBS 重悬, 获得纯化的 OMVs。

1.3 MTT 法测定细胞增殖

将 HCT116 细胞、HCoEpiC 细胞、Raw264.7 细胞(每孔细胞数为 1.2×10^4 个)接种于 96 孔平底培养板中, 与浓度为 0、25、50、100 μg/mL 的 aOMVs 和 nOMVs 共孵育 24 h。每孔加入 100 μL 的 MTT 试剂孵育 4 h, 每孔加入 100 μL 的 DMSO 溶液使用多功能酶标仪检测 OD₄₉₀ 值以评价细胞活力。

1.4 CCK-8 法测定细胞增殖

将 HCT116 细胞、HCoEpiC 细胞、Raw264.7 细胞(每孔细胞数为 1.2×10^4 个)接种于 96 孔平底培养板中, 与浓度为 0、25、50、100 μg/mL 的 aOMVs 和 nOMVs 共孵育 24 h。每孔加入 100 μL 的 CCK-8 溶液孵育 2 h, 使用多功能酶标仪检测 OD₄₅₀ 值以评价细胞活力。

1.5 贴壁细胞原位荧光检测细胞凋亡

将 HCT116 细胞、HCoEpiC 细胞和 Raw264.7 细胞以 5.0×10^5 个/mL 细胞浓度接种于 12 孔细胞培养板中, 向实验组中加入 aOMVs 和 nOMVs 各 10 μL, 阴性对照组中加 10 μL 1×PBS, 空白组直接加完全培养基共孵育 24 h。加入 195 μL

Annexin V-FITC 结合液染, 5 μL Annexin V-FITC 染料, 轻轻混匀, 最后加入 10 μL 碘化丙啶(propidium iodide, PI)染色液, 混匀, 室温避光孵育 15 min, 在倒置荧光显微镜下观察, Annexin V-FITC 为绿色荧光, 碘化丙啶(propidium iodide, PI)为红色荧光。

1.6 流式细胞仪检测细胞凋亡

将 HCT116 细胞、HCoEpiC 细胞、Raw264.7 细胞以 1.0×10^6 个/mL 细胞浓度接种于 6 孔细胞培养板中, 再将细胞放入细胞培养箱中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 12 h, 直至细胞完全贴壁。实验组中分别加入 100 μL aOMVs 和 nOMVs, 阴性对照组中加 100 μL 1 \times PBS, 空白组直接加完全培养基共孵育 24 h。加入适量胰酶细胞消化液(无 EDTA)消化后, 用细胞培养液把细胞吹打下来, 转移到离心管内, 1 000 $\times g$ 离心 5 min, 弃上清, 收集细胞, 用 1 \times PBS 轻轻重悬细胞并计数。加入 195 μL Annexin V-FITC 结合液轻轻重悬细胞, 再加入 5 μL Annexin V-FITC, 轻轻混匀, 加入 10 μL PI 轻混匀。室温避光孵育 15 min, 随后置于冰浴中, 利用流式细胞仪进行检测。

1.7 具核梭杆菌外膜囊泡的体外溶血性实验

取得的小鼠血液在 4 $^{\circ}\text{C}$ 、100 $\times g$ 离心 10 min, 去除上层血清, 将取得的红细胞沉淀用 PBS 洗涤 3 次。将所得红细胞沉淀用 PBS 配制成 10% 的红细胞悬液。随后取 500 μL 的血液和 500 μL 不同浓度的外膜囊泡(25、50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)混合, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h。以超纯水作为阳性对照, PBS 作为阴性对照。将孵育管 4 $^{\circ}\text{C}$ 、100 $\times g$ 离心 10 min, 取上清 100 μL 加入到 96 孔板, 于多功能酶标仪检测 540 nm 处吸光度值。对每个处理组进行 3 次重复。溶血率计算如公式(1)所示。

$$\text{溶血率}(\%) = \left[\frac{(OD_{\text{阳性对照}} - OD_{\text{实验组}})}{(OD_{\text{阳性对照}} - OD_{\text{阴性对照}})} \right] \times 100 \quad (1)$$

式中: $OD_{\text{阳性对照}}$ 是样品为纯水所测上清 OD_{450} 值,

$OD_{\text{阴性对照}}$ 是样品为 PBS 所测上清 OD_{450} 值, $OD_{\text{实验组}}$ 是样品为不同浓度囊泡所测上清 OD_{450} 值。

1.8 具核梭杆菌外膜囊泡的小鼠血常规检测

小鼠进行尾部静脉注射浓度为 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 aOMVs 和 nOMVs, 连续给药 3 d 后, 采集适量的小鼠血液样本(空白对照组、实验组)加入到含有肝素的抗凝管中, 利用全自动生化仪测定相关参数, 包括红细胞计数(red blood cell count, RBC)、白细胞计数(white blood cell count, WBC)、血红蛋白浓度(hemoglobin concentration, HGB)、血小板计数(platelet count, PLT)等。另外, 取对照组与实验组小鼠全血进行血项分析, 检测血清中天冬氨酸转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)、谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)和肌酐(creatinine, CREA)等指标的变化, 评估 aOMVs 和 nOMVs 在体内的代谢情况以及对小鼠生理功能的潜在影响, 从而更全面地了解外膜囊泡在体内的安全性。

1.9 具核梭杆菌外膜囊泡的动物免疫

挑选两只健康的新西兰大白兔, 对未免疫的新西兰大白兔进行采血, 作为免疫阴性对照。采用背部脊柱两侧皮下各 3 个点平均注射, 首次免疫 21 d 后进行第一次加强免疫, 之后每次免疫间隔为 10–14 d。在第三次加强免疫 7 d 后进行阳性血的采集。阳性血在 1 200 $\times g$ 离心 15 min, 两次离心后放入无菌 50 mL 冻存管中, 并加入适量体积的 0.02% 叠氮钠溶液, 放入 -20°C 冰箱保存。

1.10 用 ELISA 法检测新西兰大白兔血清抗体水平

将浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ aOMVs 和 nOMVs 抗原分别以 100 μL /孔包被 96 孔酶标板, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h; 用 PBST (PBS+0.05% Tween-20) 洗涤液洗涤 3 次, 5% 脱脂奶粉封闭 1.5 h, 再用 PBST 洗涤液洗涤

3 次;按照 100 μL /孔将待测样品加入对应包被抗原的孔中,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1.5 h 后洗涤 3 次;再将 HRP-羊抗兔 IgG 以 200 μL /孔加入,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h 后洗涤 3 次;加入底物液 150 μL /孔,室温反应 20 min,最后每孔加入终止液 50 μL 。用酶标仪测 OD_{450} 值。以 P/N 值(P 代表阳性值, N 代表阴性值)为参考来表示 aOMVs 和 nOMVs 刺激新西兰大白兔血清抗体分泌水平,标准如公式 (2) 所示。

$$\frac{P}{N} = \frac{OD_{\text{阳性血清}} - OD_{\text{空白对照}}}{OD_{\text{阴性血清}} - OD_{\text{空白对照}}} \quad (2)$$

式中: $OD_{\text{阳性血清}}$ 是来自接受 aOMVs 或 nOMVs 刺激的阳性血清样品的 OD_{450} 值, $OD_{\text{阴性血清}}$ 是未接受抗原刺激的阴性血清样品的 OD_{450} 值, $OD_{\text{空白对照}}$ 是无抗原的空白孔的 OD_{450} 值。

1.11 细胞黏附抑制试验

将 *F. nucleatum* 在 TSPC 培养基中培养 10 h 至 $OD_{600}=0.8$, 25 $^{\circ}\text{C}$ 、6 000 $\times g$ 离心 5 min, 去掉上清, 用 1 \times PBS 重悬沉淀至 $OD_{600}=0.5$, 以适量 Dio 染料标记, 常温染色 5–20 min 后, 室温下 6 000 $\times g$ 离心 5 min, 弃上清, 继续用 1 \times PBS 重悬沉淀, 6 000 $\times g$ 再次离心 5 min, 除去未结合的染料, 加入适量 RPMI 1640 培养基重悬沉淀至 $OD_{600}=0.2$ 。在混有体积分数为 1% 新西兰大白兔血清的 RPMI 1640 培养基中连续稀释 4 倍, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 与荧光标记的 *F. nucleatum* 1:1 孵育 2 h。100 μL 细菌/血清混合物与 HCT116 细胞共培养, 感染细胞在 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 12 h。洗涤去除未结合的细菌后, 利用激光共聚焦显微镜观察, 于酶标仪检测激发和发射波长分别为 488 nm 和 550 nm 的值来定量荧光。

2 结果与分析

2.1 具核梭杆菌外膜囊泡对细胞增殖的影响

为验证 aOMVs 和 nOMVs 对不同细胞增殖

的影响, 分别用 MTT 和 CCK-8 法对 aOMVs 和 nOMVs 处理后的不同细胞的活性进行了检测。如图 1 所示, 当浓度达到 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, HCoEpiC 细胞、HCT116 细胞和 Raw264.7 细胞的生存率达到 90% 以上。随着浓度的上升, 细胞生存率有轻微的下降趋势, 浓度达到 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, HCoEpiC 细胞、HCT116 细胞和 Raw264.7 细胞的生存率依然能保持在 80% 以上, 表明 aOMVs 和 nOMVs 对 HCoEpiC 细胞、HCT116 细胞和 Raw264.7 细胞增殖均无影响。CCK-8 法也验证了该结果(图 1), 初步证明 aOMVs 和 nOMVs 的细胞毒性较低。

2.2 具核梭杆菌外膜囊泡对细胞凋亡的影响

为考察 aOMVs 和 nOMVs 对不同细胞凋亡的影响, 将 2 种外膜囊泡分别与不同细胞共孵育, 随后进行 Annexin V-FITC 染色和 PI 染色, 分别采用倒置荧光显微镜和流式细胞仪进行检测。其中, Annexin V-FITC 标记早期凋亡细胞(绿色荧光); PI 标记坏死细胞或晚期凋亡细胞(红色荧光)。倒置荧光显微镜结果如图 2A 所示, 在空白对照组中出现少许的红色和绿色荧光, 表明只有很少部分 HCoEpiC 细胞、HCT116 细胞和 Raw264.7 细胞发生了凋亡, 这类凋亡通常是细胞自发凋亡造成的(图 2A 中 1、2A 中 4、2A 中 7)。如图 2A 中 2、2A 中 5、2A 中 8 所示, aOMVs 引起极少的 HCoEpiC 细胞、HCT116 细胞和 Raw264.7 细胞发生凋亡, 在视野中看到的红色荧光相较于对照组和 nOMVs 组多一些, 证明 aOMVs 主要使 HCoEpiC 细胞、HCT116 细胞和 Raw264.7 细胞发生晚期凋亡。由图 2A 中 3 观察到, 视野中既有绿色荧光也有红色荧光, 说明 nOMVs 引起 HCoEpiC 细胞发生早期凋亡和晚期凋亡。由图 2A 中 4 和 2A 中 9 观察到, 大多数细胞发红色荧光, 证明 nOMVs 主要引起 HCT116 和 Raw264.7 细胞发生晚期凋亡。综合以上结果,

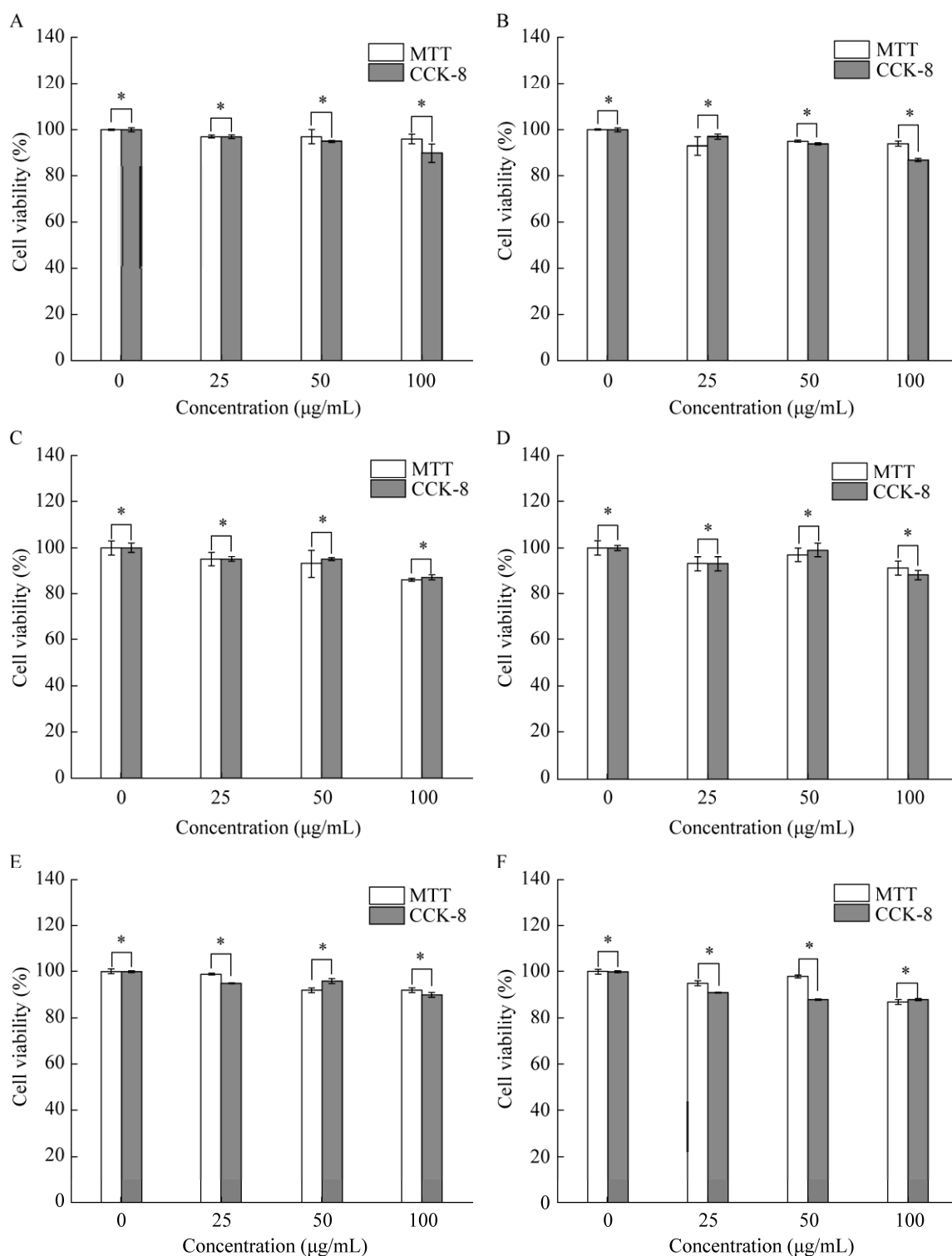


图1 *Fusobacterium nucleatum* aOMVs 和 nOMVs 对细胞生长的抑制作用

Figure 1 Inhibition effects of *Fusobacterium nucleatum* aOMVs and nOMVs on the growth of cells. Cytotoxicity by MTT and CCK-8 assay. A: aOMVs, HCoEpiC cells. B: nOMVs, HCoEpiC cells. C: aOMVs, HCT116 cells. D: nOMVs, HCT116 cells. E: aOMVs, Raw264.7 cells. F: nOMVs, Raw264.7 cells. *: $P < 0.05$.

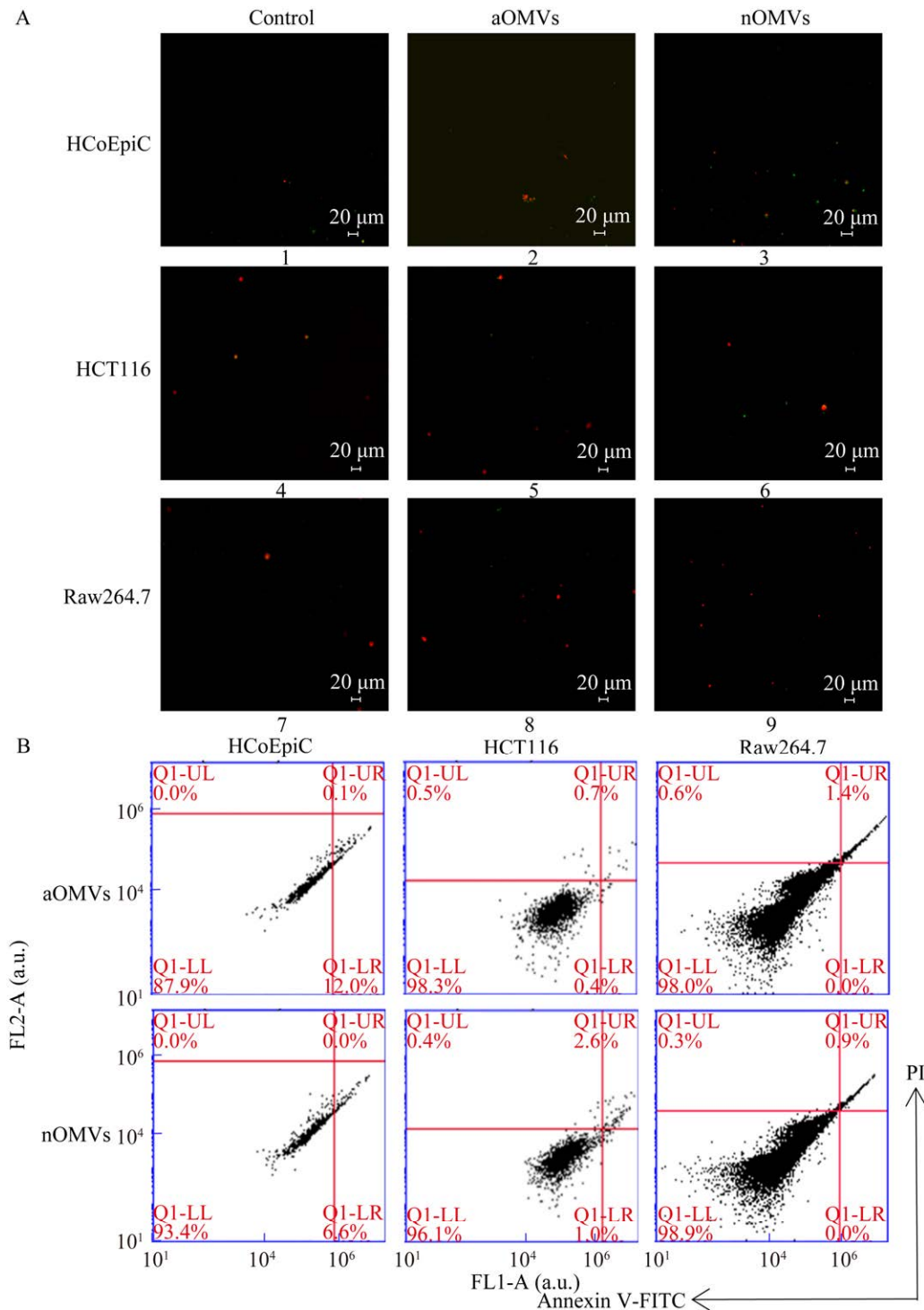


图 2 倒置荧光和流式细胞仪检测 aOMVs 和 nOMVs 感染细胞后的细胞凋亡结果

Figure 2 The apoptosis of cells infected by aOMVs and nOMVs detected by fluorescence-activated cell sorter and fluorescence microscopy. A: The figure of apoptosis results detected by fluorescence microscopy. 1: Control, HCoEpiC cells; 2: aOMVs, HCoEpiC cells; 3: nOMVs, HCoEpiC cells; 4: Control, HCT116; 5: aOMVs, HCT116 cells; 6: nOMVs, HCT116 cells; 7: Control, Raw264.7 cells; 8: aOMVs, Raw264.7 cells; 9: nOMVs, Raw264.7 cells. Red: PI-labelled cells; Green: FITC-labelled cells (scale bar=20 μ m). B: The figure of apoptosis results detected by fluorescence-activated cell sorter.

与空白组相比, aOMVs 和 nOMVs 对 HCoEpiC 细胞、HCT116 细胞和 Raw264.7 细胞的凋亡无显著影响。其次, 通过流式细胞仪进一步验证了外膜囊泡对细胞凋亡的影响, 结果如图 2B 所示, aOMVs 处理 HCoEpiC 细胞、HCT116 细胞和 Raw264.7 细胞后, 细胞总凋亡比例(12.1%、1.1%、1.4%)与活细胞比例(87.9%、98.3%、98.0%)相比较小, 可视为正常凋亡范围; nOMVs 处理 HCoEpiC 细胞、HCT116 细胞和 Raw264.7 细胞后, 细胞总凋亡比例(6.6%、3.6%、0.9%)与活细胞比例(93.4%、96.1%、98.9%)相比较小, 同样可视为正常凋亡范围, 说明 aOMVs 和 nOMVs 对 HCoEpiC 细胞、HCT116 细胞和 Raw264.7 细胞凋亡无显著影响。

2.3 具核梭杆菌外膜囊泡的体外溶血性评价

为确保材料的生物安全性以便开展后续的

动物实验, 对 aOMVs 和 nOMVs 进行了溶血性能的评估。与阳性对照组相比, 阴性对照组和浓度在 0–50 $\mu\text{g/mL}$ 范围内的 aOMVs 和 nOMVs 均未观察到明显的溶血现象, 未导致大量红细胞的破裂, 其溶血率小于 5%, 当 nOMVs 的浓度达到 100 $\mu\text{g/mL}$ 时, 产生了轻微的溶血现象(图 3A、3B), 由此说明外膜囊泡在静脉注射剂量为 25 $\mu\text{g/mL}$ 时具有良好的血液相容性, 可进行小鼠体内实验。

2.4 具核梭杆菌外膜囊泡的体内安全性

小鼠在接受 25 $\mu\text{g/mL}$ 外膜囊泡注射给药 3 d 后的血检指标如表 1 所示, 其血小板数目(PLT)、血红蛋白(HGB)、红细胞(RBC)等血液指标均在正常范围内, 表明外膜囊泡在血液中具有较好的稳定性。从表 2 可以得出, 在反映肝脏损伤及炎症反应的指标检测中, 注射材料后的小鼠谷草转

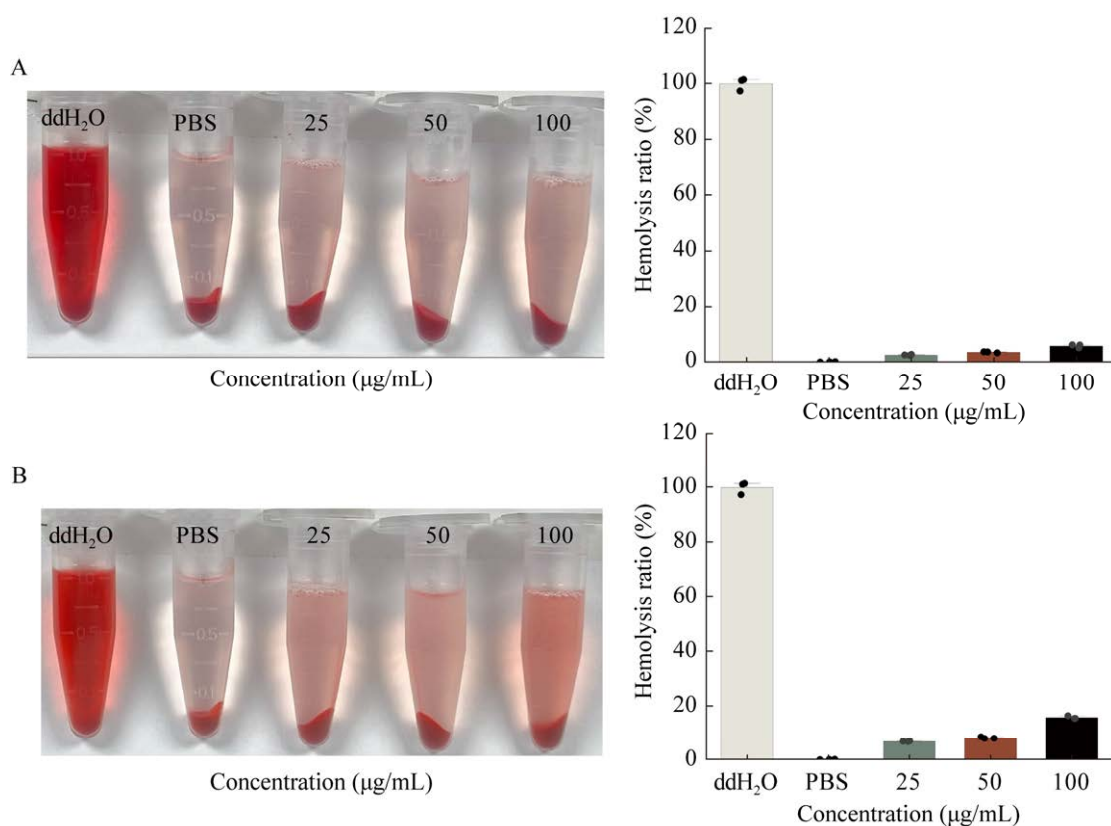


图 3 aOMVs 和 nOMVs 的溶血实验图

Figure 3 Hemolysis test of aOMVs and nOMVs. A: aOMVs; B: nOMVs.

表 1 注射 aOMVs 和 nOMVs 后小鼠的血常规检测结果

Table 1 Blood routine results of mice injected with aOMVs and nOMVs

Parameters (units)	Abbreviations	aOMVs results	nOMVs results	Ranges
White blood cell count ($\times 10^9/L$)	WBC	4.120	5.060	0.800–10.600
Neutrophil count ($\times 10^9/L$)	Neu#	0.640	1.020	0.230–3.600
Lymphocyte count ($\times 10^9/L$)	Lym#	3.290	4.210	0.600–8.900
Monocyte count ($\times 10^9/L$)	Mon#	0.100	0.520	0.040–1.400
Red blood cell count ($\times 10^{12}/L$)	RBC	9.760	9.890	6.500–11.500
Hemoglobin (g/L)	HGB	137.000	140.000	110.000–165.000
Hematocrit (%)	HCT	41.000	47.000	35.000–55.000
Mean corpuscular volume (fL)	MCV	48.500	50.000	41.000–55.000
Mean corpuscular hemoglobin (pg)	MCH	16.000	15.500	13.000–18.000
Mean corpuscular hemoglobin concentration (g/L)	MCHC	338.000	345.000	300.000–360.000
Coefficient of variation of red blood cell distribution width (%)	RDW-CV	15.000	16.100	12.000–19.000
Standard deviation of red blood cell distribution width (fL)	RDW-SD	30.000	26.500	23.000–39.000
Platelet count ($\times 10^9/L$)	PLT	1 250.000	923.000	400.000–1 600.000
Mean platelet volume (fL)	MPV	5.200	5.000	4.000–6.200
Platelet distribution width	PDW	13.600	14.200	12.000–17.500
Plateletcrit (%)	PCT	0.552	0.669	0.100–0.780

表 2 注射 aOMVs 和 nOMVs 后小鼠的血液指标检测结果

Table 2 Blood index detection results of mice injected with aOMVs and nOMVs

Parameter (unit)	Abbreviation	Control group results	aOMVs results	nOMVs results	Range
Aspartate aminotransferase (U/L)	AST	105.000	112.000	134.000	36.310–235.480
Alanine aminotransferase (U/L)	ALT	48.000	51.200	56.440	10.006–96.470
Lactate dehydrogenase (U/L)	LDH	522.230	500.120	514.700	157.410–899.720
Creatine kinase (U/L)	CK	984.200	1 053.000	1 135.000	0.000–2 070.550
Urea (mg/dL)	BUN	17.410	15.220	16.740	10.810–34.740
Creatinine (U/L)	CREA	25.000	24.190	21.890	10.910–85.090
Uric acid (U/L)	UA	76.440	65.230	68.710	44.420–224.770

氨酶(AST)和谷丙转氨酶(ALT), 均与正常组小鼠基本一致; 乳酸脱氢酶(LDH)和肌酸激酶(CK)等心脏炎症损伤的指标也未见异常; 尿素(BUN)、肌酐(CREA)和尿酸(UA)等肾功能指标也处于正常范围内, 表明外膜囊泡在体内具有良好的生物安全性。

2.5 具核梭杆菌外膜囊泡免疫新西兰大白兔血清抗体水平和效价的测定

为了进一步验证外膜囊泡膜蛋白的抗原性, 对新西兰大白兔进行免疫并检测其血液中抗体水平。结果显示, 41 d 和 48 d 的免疫后, ELISA

试验的 P/N 值均 ≥ 2.1 , 表明新西兰大白兔体内产生了抗体。41 d 时, 检测不同稀释度的特异性血清抗体 P/N 值, aOMVs 为 11.58、8.95、6.77、3.40、1.69, nOMVs 为 28.4、26.25、18.60、17.05、6.50 (图 4A、4C)。48 d 时, 抗体水平达到高峰, aOMVs 和 nOMVs 的 P/N 值分别为 44.25、25.59、20.09、12.53、7.44 和 60.69、52.03、48.50、43.54、22.09 (图 4B、4D)。总之, 经过 3 次加强免疫后, 试验组和阳性对照组的新西兰大白兔都已经较高抗体水平, 尤其是 3 次加免后一周(48 d), 各组抗体水平达到最高峰。

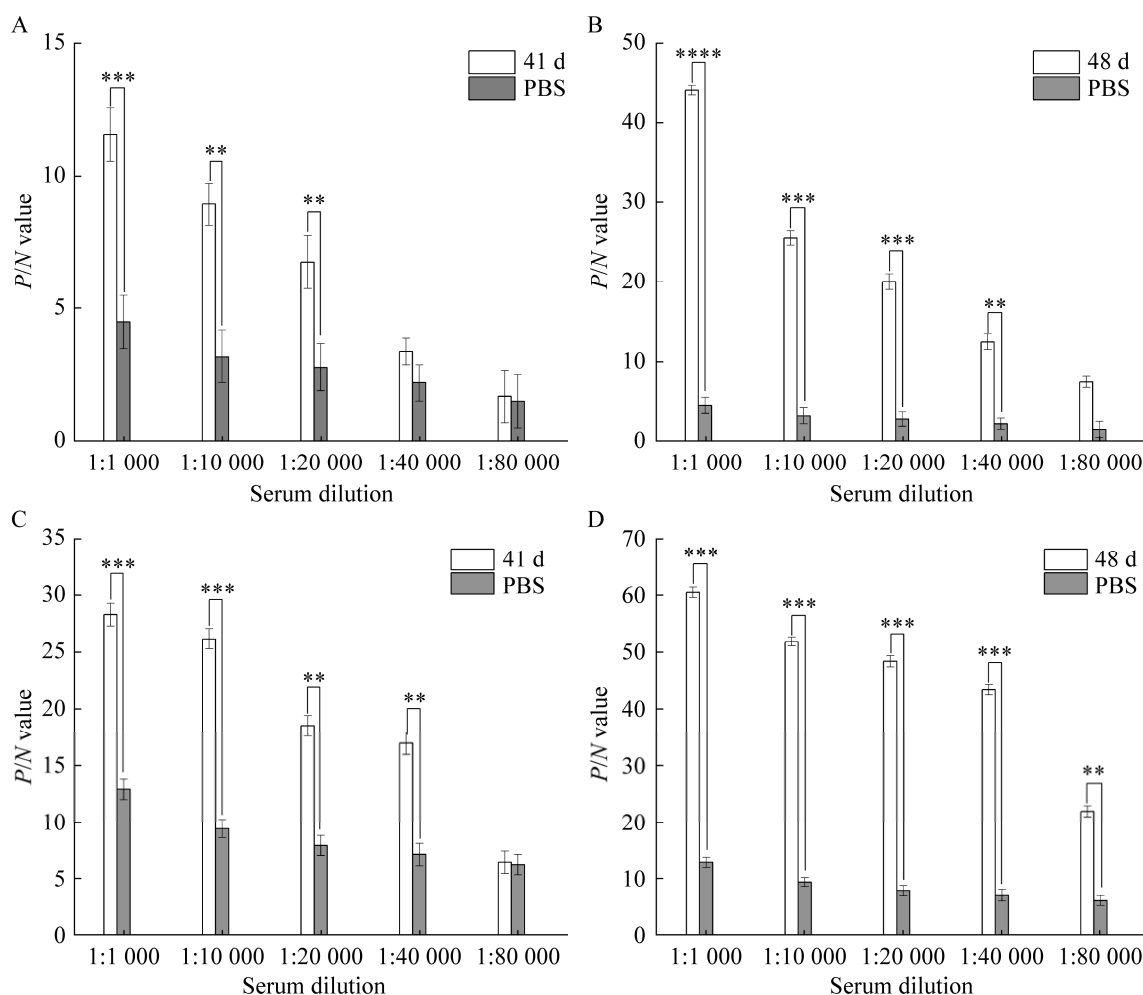


图4 aOMVs和nOMVs免疫新西兰大白兔血清特异性IgG抗体的产生和效价

Figure 4 Production and titer of serum-specific IgG antibodies of New Zealand white rabbits stimulated by aOMVs and nOMVs. A: Antibody secretion stimulated by aOMVs at 41 d. B: Antibody secretion stimulated by aOMVs at 48 d. C: Antibody secretion stimulated by nOMVs at 41 d. D: Antibody secretion stimulated by nOMVs at 48 d. **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$; ****: $P<0.0001$.

2.6 抗体对具核梭杆菌细菌黏附抑制效果

为了分析比较 aOMVs 和 nOMVs 免疫产生抗体的性能,将不同浓度的两种抗体与荧光标记的 *F. nucleatum* 孵育 24 h 后,采用两种方法检测黏附在结肠癌细胞上的 *F. nucleatum* 数量。结果显示,在共聚焦显微镜下观察到,随着 aOMVs 抗体(图 5A)和 nOMVs (图 5B)添加量增加,绿色荧光逐渐减弱,表明经过 aOMVs 抗体和 nOMVs 抗体处理的 DLD-1 细胞可以有效地减少 *F.*

nucleatum 在 DLD-1 上的黏附。图 5C 是通过酶标仪检测激发光的荧光强度的结果,发现在各浓度的抗体作用下,与 aOMVs 抗体共孵育的绿色荧光强度均低于与 nOMVs 抗体共孵育的绿色荧光强度,表明与 aOMVs 抗体共孵育后的 *F. nucleatum* 黏附能力低于与 nOMVs 抗体共孵育后的 *F. nucleatum*,证明 aOMVs 所产生的抗体抑制 *F. nucleatum* 黏附 DLD-1 细胞的能力更强, aOMVs 抗体性能优于 nOMVs 抗体。

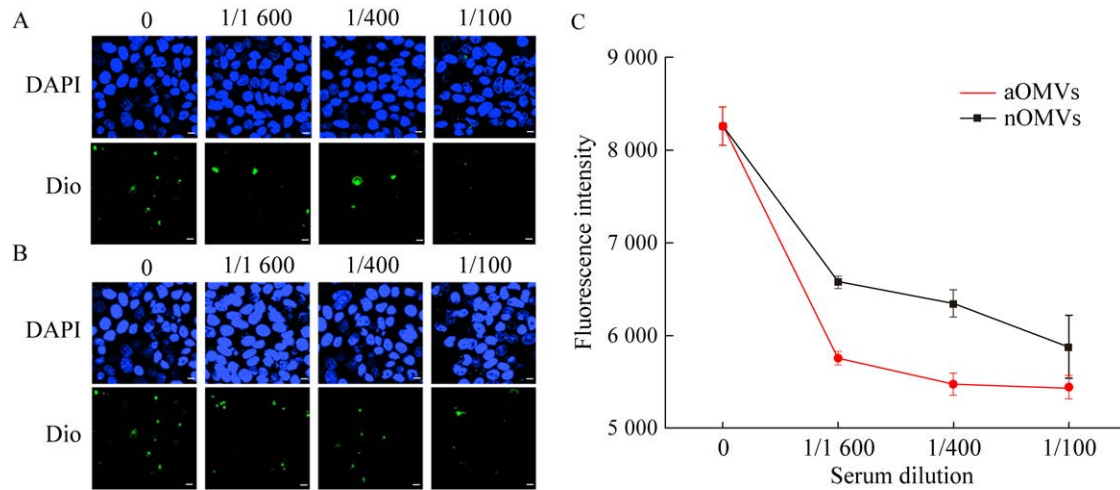


图5 抗 aOMVs 和 nOMVs 血清对 *Fusobacterium nucleatum* 黏附结肠癌细胞的影响

Figure 5 Effect of anti-aOMVs and anti-nOMVs serum on *Fusobacterium nucleatum* adhesive capacity to colon cancer cells. In the images, green represents FITC-labelled *Fusobacterium nucleatum* and blue represents nuclei of DLD-1 cells. Scale bar=25 μ m. A: Effect of anti-aOMVs on *Fusobacterium nucleatum* adherent colon cancer cells. B: anti-nOMVs serum on *Fusobacterium nucleatum* adherent colon cancer cells. C: Quantification of anti-nOMVs and anti-aOMVs serum on *Fusobacterium nucleatum* adherent colon cancer cells.

3 讨论与结论

OMVs 是细菌在生长过程中自然分泌的一种具有双层膜的囊泡结构,外膜组成部分与亲本细菌类似,无繁殖复制能力,研究证明其比细菌具有更优的生物安全性^[34],并且因其携带多种亲本细菌的抗原,在引发淋巴 B 细胞活化方面非常有效,可刺激一种较强的保护性免疫反应^[35]。因此,将外膜囊泡作为主要抗原应用于具核梭杆菌疫苗研究具有可能性。然而,在不同培养条件下形成的外膜囊泡对具核梭杆菌的免疫效应如何尚不清楚。

本研究利用超速离心技术和密度梯度离心技术,从酸性和中性培养条件下获得的具核梭杆菌液体培养上清液中提取并制备了酸性外膜囊泡(aOMVs)和中性外膜囊泡(nOMVs)。前期研究表明,两种外膜囊泡的物理性质和蛋白组成方面均有差异^[33],本研究进一步对其安全性和免疫原性进行详细分析和验证。通过流式细胞和细胞

毒性试验发现,两种外膜囊泡对人正常结肠上皮细胞 HCoEpiC、人结肠癌细胞 HCT116 和小鼠巨噬细胞 Raw264.7 细胞凋亡以及增殖均无显著影响,经外膜囊泡注射后小鼠体内的血常规和全血的血液指标均在正常范围内,表明两种外膜囊泡具有较好的安全性。将两种外膜囊泡作为抗原免疫刺激新西兰大白兔,在无任何佐剂存在的情况下,均能够引起强烈的 IgG 抗体反应,表明两种外膜囊泡均具有较强的免疫原性, aOMVs 免疫原性优于 nOMVs。体外抗体免疫抑制黏附实验结果表明, aOMVs 和 nOMVs 抗体处理后具核梭杆菌黏附或进入 DLD-1 细胞的数量显著减少, aOMVs 抗体处理组比 nOMVs 抗体处理组细胞数量更少。具核梭杆菌外膜中携带多种黏附蛋白,如 FadA 和 Fap2,这些蛋白可被利用于黏附以及靶向肿瘤细胞^[5]。OMVs 起源于具核梭杆菌的外膜,其外膜中保留着与其母细胞相类似的外膜蛋白,进而与具核梭杆菌竞争黏附并聚集于结肠癌细胞的表面,使 aOMVs 和 nOMVs 抗

体对细胞起到免疫保护作用,减少了具核梭杆菌对肿瘤细胞的侵袭。上述实验表明,两种外膜囊泡均满足疫苗低毒或无毒以及免疫保护性基本条件^[36],可作为具核梭杆菌疫苗候选抗原。

对 aOMVs 实验组和 nOMVs 对照组间的差异蛋白分析结果表明,相较于 nOMVs, aOMVs 中有 8 个外膜蛋白表达量发生显著变化,其中 D5REW7 蛋白上调最为显著, D5REW7 是一种外膜蛋白 A (outer membrane protein A, OmpA) 家族蛋白。OmpA 是革兰氏阴性菌的外膜蛋白,在细菌的侵袭、耐药、形成生物膜及维持菌体外膜完整性上均起重要作用。OmpA 因具有稳定的结构以及已证实的免疫原性表位,使其认定良好的疫苗靶点^[37-39]。截至目前, OmpA 蛋白已经作为大肠杆菌^[40]和铜绿假单胞菌^[41]的候选疫苗。尽管 OmpA 具有免疫原性并显示出一定程度的保护作用,但它们是否可作为替代抗体疗法仍然需要进一步研究。未来可以集中于在 aOMVs 中显著上调的 D5REW7 蛋白的识别和验证,并探讨该蛋白在设计针对具核梭杆菌疫苗和预防结肠癌方面的潜力。综上所述,来自酸性条件下制备的具核梭杆菌外膜囊泡由于具有优良的毒力因子抗原性,因此有望开发为结直肠癌的免疫防治的新手段。

参考文献

- [1] HASHEMI GORADEL N, HEIDARZADEH S, JAHANGIRI S, FARHOOD B, MORTEZAEI K, KHANLARKHANI N, NEGAHDARI B. *Fusobacterium nucleatum* and colorectal cancer: a mechanistic overview[J]. Journal of Cellular Physiology, 2019, 234(3): 2337-2344.
- [2] WONG SH, YU J. Gut microbiota in colorectal cancer: mechanisms of action and clinical applications[J]. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology, 2019, 16(11): 690-704.
- [3] CAO YN, LIN HC. Characterization and function of membrane vesicles in Gram-positive bacteria[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2021, 105(5): 1795-1801.
- [4] TOYOFUKU M, NOMURA N, EBERL L. Types and origins of bacterial membrane vesicles[J]. Nature Reviews Microbiology, 2019, 17(1): 13-24.
- [5] HONG M, LI Z, LIU H, ZHENG S, ZHANG F, ZHU J, SHI H, YE H, CHOU Z, GAO L, DIAO J, ZHANG Y, ZHANG D, CHEN S, ZHOU H, LI J. *Fusobacterium nucleatum* aggravates rheumatoid arthritis through FadA-containing outer membrane vesicles[J]. Cell Host & Microbe, 2023, 31(5): 798-810.e7.
- [6] ABED J, EMGÅRD JEM, ZAMIR G, FAROJA M, ALMOGY G, GRENOV A, SOL A, NAOR R, PIKARSKY E, ATLAN KA, MELLUL A, CHAUSHU S, MANSON AL, EARL AM, OU N, BRENNAN CA, GARRETT WS, BACHRACH G. Fap2 mediates *Fusobacterium nucleatum* colorectal adenocarcinoma enrichment by binding to tumor-expressed gal-GalNAc[J]. Cell Host & Microbe, 2016, 20(2): 215-225.
- [7] LIU JJ, HSIEH CL, GELINCIK O, DEVOLDER B, SEI S, ZHANG S, LIPKIN SM, CHANG YF. Proteomic characterization of outer membrane vesicles from gut mucosa-derived *Fusobacterium nucleatum*[J]. Journal of Proteomics, 2019, 195: 125-137.
- [8] BEHRENS F, FUNK-HILSDORF TC, KUEBLER WM, SIMMONS S. Bacterial membrane vesicles in pneumonia: from mediators of virulence to innovative vaccine candidates[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(8): 3858.
- [9] GUO SH, CHEN J, CHEN FF, ZENG QY, LIU WL, ZHANG G. Exosomes derived from *Fusobacterium nucleatum*-infected colorectal cancer cells facilitate tumour metastasis by selectively carrying miR-1246/92b-3p/27a-3p and CXCL16[J]. Gut, 2020: gutjnl-gu2020-321187.
- [10] 丁美琪, 李依秋, 张革. 具核梭杆菌外膜囊泡蛋白组分和抗原性分析及对宿主细胞毒性研究[J]. 中国病原生物学杂志, 2022, 17(6): 665-670.
- [11] CAI W, KESAVAN DK, WAN J, ABDELAZIZ MH, SU ZL, XU HX. Bacterial outer membrane vesicles, a potential vaccine candidate in interactions with host cells based[J]. Diagnostic Pathology, 2018, 13(1): 95.

- [12] TOYOFUKU M, CÁRCAMO-OYARCE G, YAMAMOTO T, EISENSTEIN F, HSIAO CC, KUROSAWA M, GADEMANN K, PILHOFER M, NOMURA N, EBERL L. Prophage-triggered membrane vesicle formation through peptidoglycan damage in *Bacillus subtilis*[J]. Nature Communications, 2017, 8(1): 481.
- [13] NAGAKUBO T, NOMURA N, TOYOFUKU M. Cracking open bacterial membrane vesicles[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 10: 3026.
- [14] LI M, ZHOU H, YANG C, WU Y, ZHOU XC, LIU H, WANG YC. Bacterial outer membrane vesicles as a platform for biomedical applications: an update[J]. Journal of Controlled Release, 2020, 323: 253-268.
- [15] BERNADAC A, GAVIOLI M, LAZZARONI JC, RAINA S, LLOUBÈS R. *Escherichia coli* tol-pal mutants form outer membrane vesicles[J]. Journal of Bacteriology, 1998, 180(18): 4872-4878.
- [16] MOON DC, CHOI CH, LEE JH, CHOI CW, KIM HY, PARK JS, KIM SI, LEE JC. *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein a modulates the biogenesis of outer membrane vesicles[J]. The Journal of Microbiology, 2012, 50(1): 155-160.
- [17] RUSSO AJ, BEHL B, BANERJEE I, RATHINAM VAK. Emerging insights into noncanonical inflammasome recognition of microbes[J]. Journal of Molecular Biology, 2018, 430(2): 207-216.
- [18] CHEN LL, MA X, LIU WJ, HU QQ, YANG HH. Targeting pyroptosis through lipopolysaccharide-triggered noncanonical pathway for safe and efficient cancer immunotherapy[J]. Nano Letters, 2023, 23(18): 8725-8733.
- [19] GOMAA EZ. Human gut microbiota/microbiome in health and diseases: a review[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2020, 113(12): 2019-2040.
- [20] RUETER C, BIELASZEWSKA M. Secretion and delivery of intestinal pathogenic *Escherichia coli* virulence factors via outer membrane vesicles[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2020, 10: 91.
- [21] 李一帆, 王丹, 王瑞琳, 费冰, 刘莹, 任彦颖, 郭梦雨, 刘心伟, 李永伟. 革兰氏阴性菌外膜囊泡在抗肿瘤治疗中的研究进展[J]. 现代检验医学杂志, 2023, 38(4): 201-204.
- LI YF, WANG D, WANG RL, FEI B, LIU Y, REN YY, GUO MY, LIU XW, LI YW. Research progress of gram-negative bacterial outer membrane vesicles in anti-tumor therapy[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2023, 38(4): 201-204 (in Chinese).
- [22] 孙偲, 武彦昊, 郭佳亿, 白杨, 郝慧芳. 外膜囊泡在肿瘤疫苗中的应用研究进展[J]. 生命科学, 2022, 34(11): 1431-1441.
- SUN C, WU YH, GUO JY, BAI Y, HAO HF. Research progress on the application of outer membrane vesicles in tumor vaccine[J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2022, 34(11): 1431-1441(in Chinese).
- [23] BALHUIZEN MD, VELDHUIZEN EJA, HAAGSMAN HP. Outer membrane vesicle induction and isolation for vaccine development[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 629090.
- [24] PRIOR JT, DAVITT C, KURTZ J, GELLINGS P, McLACHLAN JB, MORICI LA. Bacterial-derived outer membrane vesicles are potent adjuvants that drive humoral and cellular immune responses[J]. Pharmaceutics, 2021, 13(2): 131.
- [25] MARTIN JK, SHEEHAN JP, BRATTON BP, MOORE GM, MATEUS A, LI SHJ, KIM H, RABINOWITZ JD, TYPAS A, SAVITSKI MM, WILSON MZ, GITAI Z. A dual-mechanism antibiotic kills Gram-negative bacteria and avoids drug resistance[J]. Cell, 2020, 181(7): 1518-1532.e14.
- [26] FERRI M, RANUCCI E, ROMAGNOLI P, GIACCONE V. Antimicrobial resistance: a global emerging threat to public health systems[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2017, 57(13): 2857-2876.
- [27] van BOECKEL TP, PIRES J, SILVESTER R, ZHAO C, SONG JL, CRISCUOLO NG, GILBERT M, BONHOEFFER S, LAXMINARAYAN R. Global trends in antimicrobial resistance in animals in low- and middle-income countries[J]. Science, 2019, 365(6459): eaaw1944.
- [28] ZOU MZ, LI ZH, BAI XF, LIU CJ, ZHANG XZ. Hybrid vesicles based on autologous tumor cell membrane and bacterial outer membrane to enhance innate immune response and personalized tumor immunotherapy[J]. Nano Letters, 2021, 21(20): 8609-8618.
- [29] 毛露珈, 史恩宇, 王瀚平, 单天贺, 王银松, 王悦. 细菌外膜囊泡在抗肿瘤治疗方面的研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2022, 42(5): 100-105.
- MAO LJ, SHI EY, WANG HP, SHAN TH, WANG YS, WANG Y. Research progress of bacterial outer membrane vesicles in anti-tumor therapy[J]. China Biotechnology, 2022, 42(5): 100-105 (in Chinese).

- [30] PIZZA M, GIULIANI MM, FONTANA MR, MONACI E, DOUCE G, DOUGAN G, MILLS KHG, RAPPUOLI R, DEL GIUDICE G. Mucosal vaccines: non toxic derivatives of LT and CT as mucosal adjuvants[J]. *Vaccine*, 2001, 19(17/18/19): 2534-2541.
- [31] 谢臻, 汤晶晶, 沈锡辉, 郭抗抗, 徐磊. 细菌外膜囊泡调节宿主天然免疫反应机制研究进展[J]. *动物医学进展*, 2022, 43(5): 78-83.
XIE Z, TANG JJ, SHEN XH, GUO KK, XU L. Progress on the mechanism of bacterial outer membrane vesicles in regulating host innate responses[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2022, 43(5): 78-83 (in Chinese).
- [32] JONG WSP, DALEKE-SCHERMERHORN MH, VIKSTRÖM D, TEN HAGEN-JONGMAN CM, DE PUNDER K, VAN DER WEL NN, VAN DE SANDT CE, RIMMELZWAAN GF, FOLLMANN F, AGGER EM, ANDERSEN P, DE GIER JW, LUIRINK J. An autotransporter display platform for the development of multivalent recombinant bacterial vector vaccines[J]. *Microbial Cell Factories*, 2014, 13: 162.
- [33] ZHANG XQ, WANG YX, FAN RC, ZHANG LY, LI ZT, ZHANG YM, ZHENG W, WANG LL, LIU BQ, QUAN CS. Quantitative proteomic analysis of outer membrane vesicles from *Fusobacterium nucleatum* cultivated in the mimic cancer environment[J]. *Microbiology Spectrum*, 2023, 11(4): e0039423.
- [34] 陈欧亮, 张红, 赵鑫铨, 罗尹琳, 岑怡静. 细菌外膜囊泡的抗肿瘤机制及其应用研究进展[J]. *动物医学进展*, 2022, 43(9): 85-89.
CHEN OL, ZHANG H, ZHAO XC, LUO YL, CEN YJ. Progress on the antitumor mechanism and application of bacterial outer membrane vesicles[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2022, 43(9): 85-89 (in Chinese).
- [35] HUANG WL, MENG LX, CHEN Y, DONG ZQ, PENG Q. Bacterial outer membrane vesicles as potential biological nanomaterials for antibacterial therapy[J]. *Acta Biomaterialia*, 2022, 140: 102-115.
- [36] FENG C, LI YJ, FERDOWS BE, PATEL DN, OUYANG J, TANG ZM, KONG N, CHEN EG, TAO W. Emerging vaccine nanotechnology: from defense against infection to sniping cancer[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2022, 12(5): 2206-2223.
- [37] NIE D, HU Y, CHEN Z, LI MK, HOU Z, LUO XX, MAO XG, XUE XY. Outer membrane protein A (OmpA) as a potential therapeutic target for *Acinetobacter baumannii* infection[J]. *Journal of Biomedical Science*, 2020, 27(1): 26.
- [38] 伍娜娜, 荣娜, 康超, 刘祥, 陈琛, 陈春琳, 丁锐, 吴三桥. 大肠杆菌免疫蛋白 OmpA 生物信息学分析及表位多肽疫苗设计[J]. *河南农业科学*, 2019, 48(6): 131-138.
WU NN, RONG N, KANG C, LIU X, CHEN C, CHEN CL, DING R, WU SQ. Bioinformatics analysis of *Escherichia coli* immune protein OmpA and epitope polypeptide vaccine design[J]. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 2019, 48(6): 131-138 (in Chinese).
- [39] GRUND ME, SOO JC, COTE CK, BERISIO R, LUKOMSKI S. Thinking outside the bug: targeting outer membrane proteins for *Burkholderia* vaccines[J]. *Cells*, 2021, 10(3): 495.
- [40] GU H, LIAO YL, ZHANG J, WANG Y, LIU ZY, CHENG P, WANG XY, ZOU QM, GU J. Rational design and evaluation of an artificial *Escherichia coli* K1 protein vaccine candidate based on the structure of OmpA[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2018, 8: 172.
- [41] BAHEY-EL-DIN M, MOHAMED SA, SHEWEITA SA, HAROUN M, ZAGHLOUL TI. Recombinant N-terminal outer membrane porin (OprF) of *Pseudomonas aeruginosa* is a promising vaccine candidate against both *P. aeruginosa* and some strains of *Acinetobacter baumannii*[J]. *International Journal of Medical Microbiology*, 2020, 310(3): 151415.