

革兰氏阴性菌外膜囊泡的研究进展

倪秀梅, 刘宇, 刘开云*

四川大学华西医院 生物制药研究院, 四川 成都 610041

倪秀梅, 刘宇, 刘开云. 革兰氏阴性菌外膜囊泡的研究进展[J]. 生物工程学报, 2025, 41(4): 1221-1239.

NI Xiumei, LIU Yu, LIU Kaiyun. Research progress in outer membrane vesicles of Gram-negative bacteria[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(4): 1221-1239.

摘 要: 细菌膜囊泡(membrane vesicles, MVs)是细菌产生的非复制性球形纳米颗粒, 其中由革兰氏阴性菌自发产生的囊泡被称为外膜囊泡(outer membrane vesicles, OMVs)。OMVs 可以介导脂多糖、肽聚糖、蛋白质和核酸等生物分子在群体间进行物质交流, 并发挥着不同的生理学功能。近年来, 基于其独特的结构和功能, OMVs 已被开发应用于疫苗、佐剂、药物递送载体和癌症免疫治疗剂等多种生物制品。本文综述了革兰氏阴性菌 OMVs 的产生途径、组成成分和生理学功能, 归纳总结了近年来 OMVs 在应用开发、修饰改造以及制备鉴定等方面的研究进展, 并对 OMVs 的未来研究方向提出展望, 为拓展 OMVs 在生物医学领域的应用提供了参考。

关键词: 革兰氏阴性菌; 外膜囊泡; 生理学功能; 生物医学应用; 修饰改造

Research progress in outer membrane vesicles of Gram-negative bacteria

NI Xiumei, LIU Yu, LIU Kaiyun*

Biopharmaceutical Research Institute, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan, China

Abstract: Membrane vesicles (MVVs) are non-replicating spherical nanoparticles produced by bacteria. The MVVs actively released from Gram-negative bacteria are termed outer membrane vesicles (OMVs). OMVs carry various biomolecules, such as lipopolysaccharides, peptidoglycans, proteins, and nucleic acids for material exchange between cells and perform component-dependent physiological functions. In recent years, OMVs have been developed into various biological products, such as vaccines, adjuvants, drug delivery carriers, and cancer immunotherapy agents because of their unique structures and functions. This review

资助项目: 四川大学华西医院学科卓越发展 1·3·5 工程项目(ZYXY21003)

This work was supported by the 1·3·5 Project for Disciplines of Excellence, West China Hospital, Sichuan University (ZYXY21003).

*Corresponding author. E-mail: liukaiyun@wchscu.edu.cn

Received: 2024-09-13; Accepted: 2024-11-21; Published online: 2024-11-22

describes the biogenesis, composition, and physiological functions of OMVs of Gram-negative bacteria, summarizes the recent research progress of OMVs in product development and cell modifications or engineering, highlights new methods for OMV preparation and characterization, and provides an outlook on the future research directions, with the aim to provide a good reference for study and development of the application of OMVs in the biomedical field.

Keywords: Gram-negative bacteria; outer membrane vesicles; physiological functions; biomedical applications; modification

细菌膜囊泡(membrane vesicles, MVs)是指由细菌产生的一类纳米级囊泡状小体,根据细菌革兰氏染色进行分类, MVs可分为由革兰氏阳性菌产生的细胞质膜囊泡(cytoplasmic membrane vesicles, CMVs)和革兰氏阴性菌产生的外膜囊泡(outer membrane vesicles, OMVs)^[1]。OMVs 最早在霍乱弧菌的分泌物中发现,后续研究表明几乎所有的革兰氏阴性菌都能产生 OMVs^[2]。OMVs 的粒径一般在 20–400 nm 之间,少数囊泡可以达到 400–500 nm,且在成分组成上存在异质性^[3]。OMVs 携带着来自亲本细菌的各种生物分子,包括脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)、肽聚糖(peptidoglycan, PG)、核酸、各种酶类物质和代谢产物等^[4]。在体外, OMVs 帮助亲本细菌摄取营养、释放毒素杀死或抑制其他细菌生长、促进生物膜形成和传播耐药基因,从而提高细菌的生存能力;在体内, OMVs 还参与调节宿主的免疫功能,它所携带的多种病原体相关分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMP)和特异性抗原能够引起宿主免疫反应,在机体抵抗病原菌或细菌发病机制中发挥着重要作用^[5–6]。

近年来,随着对 OMVs 的研究逐渐深入,发现其在生物医学领域具有巨大的应用前景。目前已成功开发出基于脑膜炎奈瑟菌 OMVs 的细菌疫苗,该疫苗有效控制了多个国家及地区的脑膜炎奈瑟菌疫情。除疫苗外, OMVs 也逐

渐被应用于佐剂、药物递送载体、癌症免疫治疗剂和新型抗菌剂等方面。本综述重点关注革兰氏阴性菌 OMVs 的相关研究,详细介绍了 OMVs 的产生途径、成分组成、生理学功能以及生物医学应用等方面的研究进展,并对囊泡修饰改造、制备鉴定等方面进行了综述,讨论了现阶段研究所面临的挑战和未来的发展趋势,以期拓展 OMVs 在生物医学领域的应用提供参考。

1 OMVs 的产生、类型及组成成分

在革兰氏阴性细菌中, OMVs 主要通过 2 种途径产生,一种是通过典型的外膜“起泡”(非裂解途径)产生,另一种是通过爆炸性细胞裂解后产生的膜片段的卷曲和自退火形成(细菌裂解途径)^[7]。不同的途径会产生不同类型的 OMVs,其对应囊泡的结构和成分也存在一定的差异(图 1)。据报道,外膜“起泡”是由于细胞膜紊乱(如外膜-肽聚糖连接减少、膜曲率增加、周质压力增加以及其它特定疏水性分子插入外膜等)造成,其产生的囊泡富含 LPS、PG、外膜蛋白和疏水性化合物等外膜相关成分,但由于不涉及菌体裂解,因此细胞质 DNA 几乎无法通过这种方式流出到囊泡中^[9–11]。

不同于外膜“起泡”途径,爆炸性细胞裂解是由基因毒性应激所触发,并激活了原噬菌

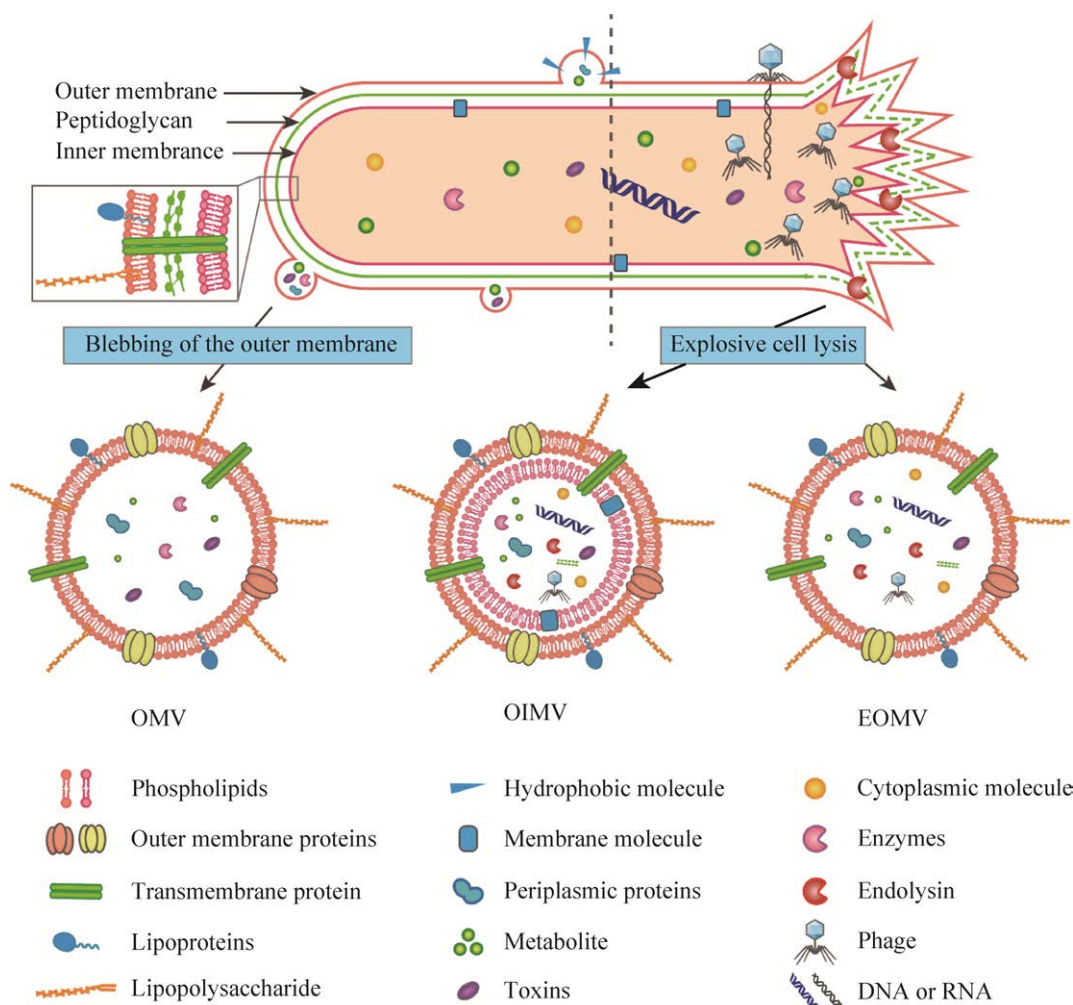


图1 革兰氏阴性菌 OMVs 的产生和组成^[8]

Figure 1 Biogenesis and composition of Gram-negative bacteria OMVs^[8].

体来源内容素的表达,随后内容素降解细菌 PG 层,从而导致菌体破碎和囊泡形成,其产生的囊泡包含 2 种类型:爆炸性外膜囊泡(explosive outer-membrane vesicles, EOMVs)和外内膜囊泡(outer-inner membrane vesicles, OIMV)。EOMVs 是由外膜裂解释放产生,而 OIMV 是由内膜和外膜共同释放产生^[8,12-13]。有研究表明,胞浆蛋白、DNA 和 RNA 等大部分细胞质成分通过 EOMVs 和 OIMV 来进行包装,同时它们也都含有丰富的 LPS、外膜蛋白、周质蛋白以及一系列参与宿主组织黏附和侵袭的毒力因子和信号分子,这与“起泡”产生的 OMVs 所

含组分相似^[14-15]。许多革兰氏阴性菌可同时产生多种类型的囊泡,且在不同细菌中特定类型的囊泡的占比差异很大,如在泡状希瓦氏菌 M₇T 中, OIMV 占囊泡总量的 0.1%,在基尔阿伦斯氏菌中占 7.1%,而在海假交替单胞菌中可以占到 49%^[13,16]。由此可见,囊泡的类型和含量由多种因素共同决定。

此外,研究发现 OMVs 还可通过人工干预的方式诱导菌体产生,如去污剂处理、超声、挤压、抗生素孵育和溶菌酶降解等,但由于不同诱导方式下产生的 OMVs 在成分组成上具有差异性,因此其功能作用也有所不同^[17]。

2 OMVs 的功能作用

OMVs 具有的生理学功能主要取决于它所携带的各种货物分子,如 PAMP 分子、毒素、核酸和酶类物质。根据货物的不同,这些 OMVs 在功能上大致可以分为:促进细菌存活、进行细胞间通讯、介导基因的水平转移、参与生物膜的形成以及调控宿主细胞的免疫反应和诱导宿主致病。

2.1 促进亲本细菌存活

OMVs 可作为诱饵,通过介导微生物防御机制来协助细菌逃避免疫活性物质、噬菌体或抗生素等外源性物质的攻击。由于 OMVs 与其亲本细菌具有相似的表面结构,因此它们可以中和噬菌体并防止噬菌体与细菌直接相互作用。Reyes-Robles 等^[18]的研究表明,霍乱弧菌 OMVs 通过噬菌体尾部纤维与 OMVs 表面上的噬菌体受体部分接合来中和有毒噬菌体,这种结合可能会阻止或干扰噬菌体对霍乱弧菌表面的高效吸附。

OMVs 可用于消除胞外有害物质,从而有利于细菌存活。例如,耐 β -内酰胺大肠杆菌释放的 OMVs 中存在孔蛋白 OmpC 和 OmpF 以及 β -内酰胺酶, β -内酰胺抗生素通过孔蛋白门控机制渗入到 OMVs 管腔中,然后在 OMVs 中被 β -内酰胺酶降解。这种涉及 OMVs 的细菌内容物外排机制,可能有助于大肠杆菌敏感菌株在抗生素存在的环境中的存活^[19]。

OMVs 具有细菌杀伤作用,这可能有利于细菌杀死环境中的不利微生物,从而建立亲本细菌的生态位。例如,一些源自革兰氏阴性菌(如肠杆菌和柠檬酸杆菌)的 OMVs 能够通过将肽聚糖水解酶转运到其他细菌体内导致细菌裂解死亡,裂解效果主要与胞壁的肽聚糖化学型有关^[20]。铜绿假单胞菌 OMVs 以剂量依赖性方

式对变形链球菌产生抗菌和抗生物膜作用,其主要依赖于扰乱细菌体内正常代谢和 ROS 介导的细胞死亡。此外,它还能增强抗生素的敏感度,当与氨苄西林或万古霉素联合处理变形链球菌时,可显著增强细菌死亡和生物膜活性抑制的水平^[21]。

2.2 信息交流与通讯

2.2.1 影响细菌间的群体感应

许多细菌利用胞外信号来进行交流和协调群体社会活动,这一过程称为群体感应(quorum sensing, QS)。有研究表明,OMVs 能够促进信号分子传递,增强细菌间的信息交流。例如,铜绿假单胞菌 OMVs 可传递群体感应分子假单胞菌喹诺酮信号(*Pseudomonas* quinolone signal, PQS)并协调群体行为,从细菌群体中去除这些囊泡会导致细胞间的通讯停止和 PQS 控制的群体行为受到抑制^[22]。脱氮副球菌 OMVs 可溶解、稳定和浓缩疏水信号分子 N-十六酰基-L-高丝氨酸内酯(N-hexadecanoyl-L-homoserine lactone, C16-HSL),并将这些信号分子靶向传递给特定类型的细胞,随后诱导细胞中靶基因的表达^[23]。哈维氏弧菌将疏水性群体感应分子 CAI-1 (一种长链氨基酮)包装到 OMVs 中,囊泡可以在不产生 CAI-1 的哈维氏弧菌和霍乱弧菌中触发 QS 表型^[24]。嗜肺军团菌 OMVs 通过传递和释放疏水信号分子 LAI-1 (*Legionella* autoinducer-1)来促进细菌间信号传导以及与真核宿主细胞间的相互作用^[25]。由此可见,OMVs 对于促进细菌群体间的信息交流至关重要。

2.2.2 影响宿主细胞间的通讯

最近的研究表明,OMVs 可作为跨界通讯的生物穿梭系统,用于在细菌和哺乳动物宿主细胞之间水平转移信号分子,从而调节宿主基因表达和细胞功能^[26]。Bittel 等^[27]在非致病性大肠杆菌 OMVs 中首次证实了细菌 OMVs 可以将

功能性 Cre 蛋白和 RNA 等物质从小鼠肠道转移至其他不同组织和器官中,包括心脏、肝脏、肾脏、脾脏和大脑,并通过内吞作用进入细胞发挥功能。随后的研究也证实了 OMVs 可以携带各种信号分子进行远距离通讯,从而调节宿主细胞的功能^[28-30]。其中,病原菌 OMVs 中的信号分子通过下调宿主体内的免疫反应来帮助细菌产生免疫逃逸,促进病原菌在宿主体内建立长期感染并导致慢性炎症的发生。例如,伴放线聚集杆菌 OMVs 从心脏穿过血脑屏障后成功将细菌分泌的胞外 RNAs (extracellular RNAs, exRNAs)信号分子递送至大脑,通过宿主细胞中的 Ago2 整合到宿主 RNA 诱导的沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC)中,调节宿主的靶转录本并干扰基因表达^[28];牙周病原菌 OMVs 具有将外源 sRNA 递送至真核细胞的能力,这些 OMVs-sRNA 可识别与人类免疫相关的潜在靶基因,并抑制 Jurkat T 细胞中某些细胞因子的表达^[29];幽门螺杆菌 OMVs 将富集的 2 种小非编码 RNA (sR-2509025 和 sR-989262)转移至人胃腺癌细胞后减少了由 OMVs 刺激引起的 IL-8 分泌,从而削弱宿主细胞间的通讯并下调先天性免疫反应^[30]。据报道,肠道内的益生菌也可以通过 OMVs 与细胞进行信息交流并调节细胞功能,如益生大肠杆菌、嗜黏蛋白阿克曼菌和普拉梭菌产生的 OMVs 可以上调人结肠腺癌细胞中血清素系统相关基因 *Tph1* 和 *Slc6a4* 的表达,从而提高细胞内血清素水平。此外,嗜黏蛋白阿克曼菌 OMVs 还可通过肠-脑轴影响血清素信号的传导/代谢,这对于机体维持肠道功能和细胞内外血清素稳态具有重要作用^[31-32]。

2.3 介导基因的水平转移

近年来,多项研究已证实由 OMVs 介导的基因转移是除转导、转化和接合这 3 种传统机制以外的第 4 种水平基因转移(horizontal gene

transfer, HGT)机制。OMVs 既可介导基因发生种间交换,也可促进这些遗传物质在细菌物种之间进行跨界传播,从而增大了细菌获得其他病原微生物耐药基因或致病基因的可能性^[33]。例如,在自然条件下,大肠杆菌 OMVs 通过直接接触并吸附于受体细菌细胞膜表面,以膜融合的方式将 OMVs 携带的质粒 DNA 转移至其他受体细菌中,但缺少媒介的游离质粒无法在该条件下发生质粒转移^[34]。鲍曼不动杆菌耐药基因 *bla_{NDM-1}* (编码一种 β -内酰胺酶)的传播也与 OMVs 有关,它可以介导 *bla_{NDM-1}* 连同质粒一起转移至其他非耐药鲍曼不动杆菌和大肠杆菌中,转化子对 β -内酰胺类抗生素的最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)升高^[35]。肺炎克雷伯菌 OMVs 通过与受体细菌的外膜融合,可将载有耐药基因的质粒转移至大肠杆菌、肠炎沙门氏菌、铜绿假单胞菌和洋葱伯克霍尔德菌中,转移能力与供体和受体物种之间的系统发育特征无关^[36]。高毒力肺炎克雷伯菌 OMVs 可将亲本细菌的毒力基因和耐药基因转移至含超广谱 β -内酰胺酶的经典肺炎克雷伯菌中,转化子在体内和体外表现出多重耐药性和高毒力表型,PCR 可检测到来自高毒力肺炎克雷伯菌的关键毒力基因 *prmpA*^[37]。由此可见,通过 OMVs 介导的水平基因转移,受体细菌可以获得来自不同细菌的毒力表型和多重耐药能力。

OMVs 介导耐药基因的转移效率与质粒特性有关,例如拷贝数和大小,可以显著影响质粒加载到囊泡的效率并调节囊泡介导的水平基因转移效率^[38]。Tran 等^[39]首次量化研究了质粒特征与囊泡介导的基因转移之间的关系,结果表明,质粒拷贝数与囊泡质粒 DNA 的负载量及受体菌株摄取囊泡中 DNA 的数量呈线性正相关,质粒大小和复制起点可通过对其拷贝数的

影响间接影响 DNA 的负载量和被摄取量。随后, Dell'Annunziata 等^[36]利用 2 种不同质粒 pGR (高拷贝数质粒) 和 PRM (低拷贝数质粒) 分别进行肺炎克雷伯菌转化实验, 结果证实 OMVs 介导的耐药基因转化效率与其所在质粒的拷贝数呈正相关, 存在于囊泡腔内的 DNA 可免受细胞外核酸外切酶的作用。另一项研究表明, 肺炎克雷伯菌临床分离株产生的 OMVs 可以介导耐药基因 *bla_{OXA-232}* (位于非接合 ColKP3 型质粒上) 在不同肠杆菌属物种间进行水平基因转移, 但对于更为常见的 *bla_{KPC-2}* 和 *bla_{NDM-1}*, 尽管在囊泡腔中能够观察到耐药基因和质粒主链的存在, 但由于其质粒拷贝数较低以及加载到囊泡中的质粒数量较少, 质粒无法发生有效转化, 这也说明了质粒拷贝数直接或间接影响了基因转移效率^[40]。此外, 外界刺激也可以改变 DNA 掺入到囊泡中的效率, 这可能在一定程度上促进低拷贝数质粒上的耐药基因发生水平转移, 如添加 1.0% 甘氨酸可以增加细胞膜的通透性及粒径增大的囊泡数量, 从而使更多胞内 DNA 渗入到囊泡中^[41]。

2.4 影响生物膜的形成

生物膜是指被细菌胞外大分子包裹的有组织的细菌群落, 它的形成有助于细菌避免抗菌物质的作用, 并保护它们免被宿主免疫系统杀死。多项研究表明, OMVs 和相关外膜蛋白及许多生物膜基质蛋白等共同参与生物膜的构建, 例如霍乱弧菌 OMVs 携带关键基质蛋白 RbmA、RbmC、Bap1 和弧菌多糖, 促进了霍乱弧菌生物膜基质的组装, 并且能够根据其组成改变生物膜的结构特性^[42]; 气单胞菌 OMVs 以剂量依赖性方式促进该细菌生物膜的形成, 而用蛋白酶 K 处理 OMVs 后, 生物膜含量不再增加, 这一结果表明 OMVs 中的某些蛋白质参与了细菌生物膜的形成^[43]; 幽门螺杆菌生物膜的

产生能力存在菌株差异性, Yonezawa 等^[44]研究发现, 幽门螺杆菌 TK1402 释放的 OMVs 能够强烈诱导生物膜的产生, 添加胎牛血清对其具有促进作用; 但目前尚未阐明 OMVs 中的哪些成分促进了该细菌生物膜的形成。

某些情况下, OMVs 对生物膜的形成具有抑制和降解作用。例如, 铜绿假单胞菌 PQS 信号诱导产生的 OMVs 促进铜绿假单胞菌生物膜的分散, 经研究发现, 这是由于囊泡中存在的生物膜基质降解酶发挥了作用^[45]。小肠结肠炎耶尔森氏菌 OMVs 抑制该细菌生物膜形成的初始阶段, 抑制作用可持续数天, 并且对肠炎沙门氏菌和金黄色葡萄球菌生物膜的形成也具有抑制作用, 抑制效果在不同菌株之间存在差异^[46]。进一步研究结果表明, OMVs 的抑制作用来源于 LPS, LPS 通过抑制细菌运动以及生物膜相关基因 *pgaABC*、*motB* 和 *flhBD* 的表达来抑制生物膜的形成, 其作用效果具有广谱性和持久性。然而, OMVs 中的蛋白质、DNA 或 RNA 没有生物膜抑制能力^[46]。

2.5 OMVs 与宿主细胞的相互作用

基于 OMVs 所含的多种 PAMP 分子和特异性抗原, 发现其不仅通过多种机制作用于宿主免疫系统, 引起机体的免疫应答, 还通过多种方式影响不同细胞的功能, 与宿主抵抗病原微生物感染及宿主疾病发病机制密切相关。

2.5.1 调节宿主免疫反应

一些细菌 OMVs 所含 LPS、PG 和核酸等 PAMP 分子可以结合并激活宿主细胞上的模式识别受体(pattern recognition receptors, PRRs), 从而诱发免疫效应物分泌并启动宿主细胞内的先天性免疫反应程序, 引起炎症反应。例如, 肠出血性大肠杆菌 OMVs 可被人肠上皮细胞表面的 Toll 样受体(Toll-like receptors, TLRs) TLR4 和 TLR5 识别, 随后激活核因子 NF- κ B,

从而诱导细胞产生促炎症因子 IL-8^[47]。幽门螺杆菌、铜绿假单胞菌和淋病奈瑟菌 OMV 可被上皮细胞内化,随后被胞质受体 NOD1 和 NOD2 识别并激活 MAPK 和 NF- κ B 通路,从而诱导 NOD1 和 NOD2 依赖性炎症反应^[48-49]。含鞭毛细菌释放的 OMVs 还可通过将鞭毛蛋白递送至宿主巨噬细胞,在其细胞质中触发 NLRC4 典型炎症小体激活,引起 NLRC4 介导的 Caspase-1 激活和 IL-1 β 分泌^[50]。一些牙周病原菌产生的 OMVs 能够以剂量依赖性方式被单核细胞和巨噬细胞吞噬,随后诱导 NF- κ B 和体内炎症小体激活,从而导致 TNF α 、IL-8 和 IL-1 β 分泌增加^[51]。此外有研究表明,一些细菌 OMVs 可引发先天免疫细胞的抗炎反应,在机体抗炎反应中同样发挥着重要作用。多形拟杆菌 OMVs 可以刺激小鼠骨髓来源单核细胞产生抗炎因子 IL-10,从而减轻急性结肠炎模型中小鼠体内的炎症反应^[52]。嗜黏蛋白阿克曼菌可以刺激人外周血单核细胞来源的树突状细胞(dendritic cells, DCs)产生耐受性 DCs 并释放 IL-10,在体

外免疫调节中发挥抗炎作用^[53]。但对于免疫力低下的个体,这可能有利于病原菌在宿主持续感染期间产生免疫逃逸,促进病原菌定植并导致慢性炎症的发生^[54]。

OMVs 还能够将携带的特异性抗原递送至 DCs,并通过激活 DCs 来促进抗原呈递,从而诱导抗原特异性 B 细胞、T 细胞参与的适应性免疫反应(图 2)。例如鼠伤寒沙门氏菌 OMVs 可激活 DCs 呈递沙门氏菌特异性抗原,抗原呈递进一步激活 CD4⁺ T 细胞反应,导致 CD4⁺ IFN γ ⁺ T 细胞比率增加;同时抗原呈递还促进体液免疫反应,刺激 B 细胞产生沙门氏菌特异性抗体 IgG^[56]。霍乱弧菌 OMVs 可以激活人单核细胞来源的 DCs,促使 DCs 释放多种炎症细胞因子和趋化因子,随后激活 CD4⁺ T 细胞并使细胞免疫反应偏向 Th2/Th17 发生极化^[57]。但与之相反,脑膜炎奈瑟菌 OMVs 会通过其表面携带的 Opa 蛋白与活化 CD4⁺ T 细胞上的 CEACAM1 结合,并在局部形成免疫抑制区,从而抑制 T 细胞的活化与增殖^[58]。此外,研究还发现

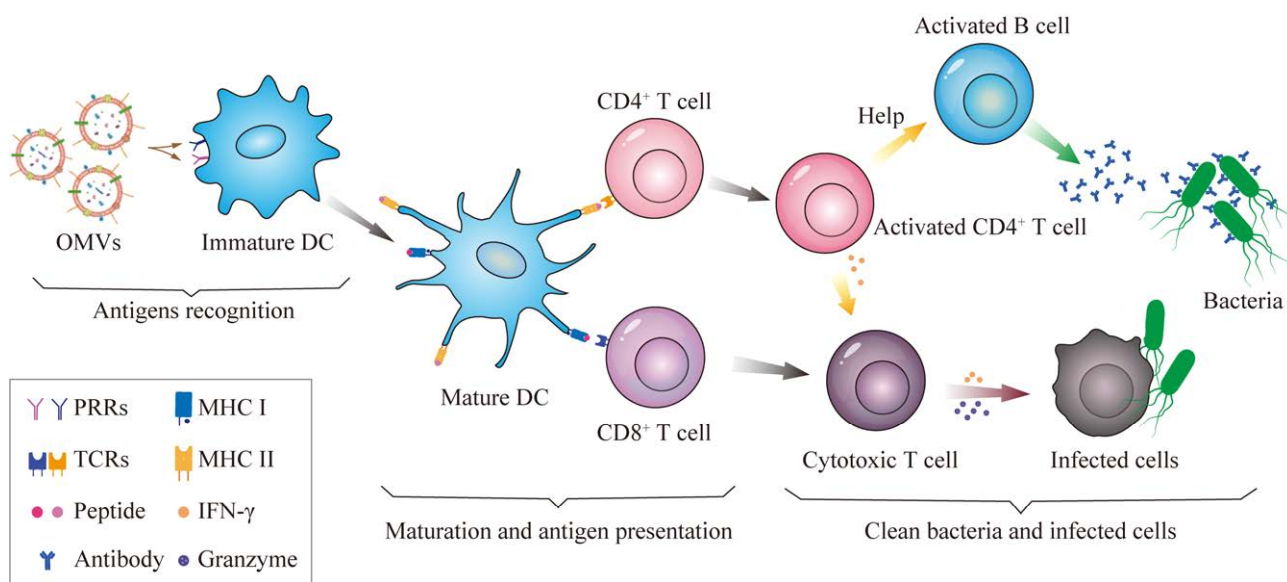


图 2 OMVs 诱导宿主体内抵御细菌的抗原特异性免疫应答过程^[55]

Figure 2 OMVs induce antigen-specific immune responses against bacteria *in vivo*^[55].

一些幽门螺杆菌来源的 OMVs 可以抑制人类 CD4⁺ T 细胞的增殖,并通过介导 Caspase 3 和 7 通路引起 Jurkat 细胞系中的 T 细胞凋亡, VacA 毒素作为非依赖性成分可以增强这种凋亡作用;该结果还表明, OMVs 抑制 T 细胞增殖的能力并非由囊泡中的单一成分所决定,而是多种成分共同作用的结果^[54]。

2.5.2 促使宿主细胞致病

作为细菌的“长距离武器”, OMVs 被用于攻击宿主组织,帮助病原菌在其生物生态位中建立定植,损害宿主细胞功能并打破宿主体内的免疫平衡,从而导致疾病产生或病情加剧^[59]。例如,大肠杆菌 OMVs 在没有细菌存在的情况下,可以在相对较低的浓度(1 $\mu\text{g/mL}$)下直接诱导心肌细胞损伤,且作用效果持久^[60]。幽门螺杆菌 OMVs 将多种胃致病毒力因子(如 CagA 和 VacA)传递至胃黏膜上皮细胞中,可导致细胞内蛋白质组发生变化^[61]。它还可以跨越生物屏障由胃肠道转移至大脑,通过影响中枢神经系统中的补体成分 3(C3)-C3a 受体(C3aR)信号来诱导神经胶质细胞的激活和神经元功能障碍,最终导致 β -淀粉样蛋白积累和认知能力下降加剧^[62]。淋病奈瑟菌 OMVs 将外膜孔蛋白 PorB 传递至巨噬细胞和上皮细胞中的线粒体,可引起线粒体功能在不同程度上受损,从而导致巨噬细胞凋亡,帮助病原菌在宿主上皮细胞内存活^[63-64]。霍乱弧菌 OMVs 通过孔蛋白依赖性方式进入肠上皮细胞中,随后释放霍乱毒素活性物质并持续发挥作用,引起肠道组织中 cAMP 水平的长期增加^[65]。此外,一些病原菌 OMVs 还与关节炎的发病有关,如具核梭杆菌 OMVs 可以转移到关节中释放活性 FadA 蛋白并引发局部炎症反应,这可能是类风湿性关节炎的诱因。在小鼠模型中,具核梭杆菌 OMVs 还会加重小鼠胶原诱导性关节炎的病情^[66]。

3 OMVs 在生物医学领域中的应用

作为高度稳定且无繁殖能力的纳米级颗粒, OMVs 的许多天然特性使其在疫苗、佐剂、药物递送载体和癌症治疗等方面具有巨大的应用前景。

3.1 OMVs 作为疫苗免疫原

疫苗接种是预防和治疗致病致死细菌感染的有效策略^[67-68]。如前所述, OMVs 含有病原体特异性抗原,能够刺激机体产生抗原特异性的抗体,这使得它成为天然抗原成分的候选者。直至目前,已经利用 OMVs 作为抗原组分针对多种病原菌进行了疫苗的研发。最早且最具代表性的 OMV 疫苗是针对脑膜炎奈瑟菌研发的,其中来自 Novartis 公司的 B 型脑膜炎奈瑟菌多价疫苗 4CMenB 已于 2013 年获得欧洲药品管理局(European Medicines Agency, EMA)和美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准上市,商品名为 Bexsero,该疫苗包含 OMVs 成分(主要免疫原为 PorA 蛋白),能够针对多种 B 型脑膜炎奈瑟菌提供广泛有效的保护,有效率为 76% (95%置信区间, 57%–87%)^[69]。在一项回顾性病例对照研究中还发现,基于 OMVs 的 B 型脑膜炎奈瑟菌疫苗 MeNZB 可以预防淋病,其有效率为 21%–39%,这表明 OMVs 还具有跨种属保护的潜力^[70]。除脑膜炎奈瑟菌疫苗外,其他基于 OMVs 的细菌疫苗正处于临床前研发阶段,目前已在动物模型上显示出良好的保护效果。例如,以幽门螺杆菌 OMVs 作为多成分抗原口服免疫小鼠,可显著诱导小鼠体内的保护性免疫应答,并减少幽门螺杆菌在胃内的定植量和小鼠胃组织损伤及胃部炎症反应^[71]。鲍曼不动杆菌 OMVs 作为免疫原可用于预防致死病原菌的感染,其中用纳米颗粒

Au-NPs 对 OMV 内部进行加固后, 获得的 Ab-NPs 纳米颗粒可显著提高 OMV 的稳定性和尺寸一致性(约 45.54 nm); 动物实验表明, Ab-NPs 纳米颗粒可诱导更高的抗体水平和细胞免疫水平, 并且显著提高致死感染模型中小鼠的存活率^[72]。这可能是由于 Ab-NPs 纳米颗粒暴露了更多的 PAMP 分子和病原体特异性抗原表位, 且其适宜的大小更利于被树突状细胞所摄取, 从而有效激活 B 细胞和 T 细胞, 诱导机体内更强的保护性免疫应答^[73]。

3.2 OMVs 作为疫苗佐剂

疫苗佐剂被定义为与抗原一起施用时能够增强疫苗免疫原性的各种成分, 它可以影响免疫应答表型, 增强免疫反应的强度、广度和持久性^[74]。因此, 佐剂的使用对于提高疫苗的有效性至关重要。大量临床前研究表明, OMVs 具有良好的佐剂属性, 它通过靶向先天免疫细胞并激活 PRRs 信号通路来指导和增强适应性免疫反应^[75-77]。1998 年, Haneberg 等^[75]首次提出 OMVs 可作为低免疫原性抗原的佐剂和载体, 并以脑膜炎奈瑟菌 OMVs 为例, 证实了 OMVs 能够显著提高小鼠全身和唾液中针对流感病毒的特异性抗体水平。随后, 这一结论在其他细菌 OMVs 的相关研究中也得到证实, 如负载有融合抗原 ClyA-GFP 的重组大肠杆菌 OMVs 可以诱导小鼠体内显著且持久的体液免疫反应, 其作用效果与氢氧化铝标准佐剂相当^[76]。幽门螺杆菌 OMVs 能够增强抗原特异性的体液免疫和黏膜免疫反应, 同时还可诱导 Th1/Th2/Th17 型细胞免疫应答。与霍乱毒素佐剂相比, 幽门螺杆菌 OMVs 的佐剂效果更好、用量更少, 其安全性已得到初步证实^[77]。由此可见, OMVs 作为疫苗佐剂具有巨大的应用价值。然而, 一些天然 OMVs 存在过量的 LPS 毒性和一些 TLR 拮抗剂(如鞭毛蛋白和脂蛋白),

可能会导致过度炎症, 因此其潜在毒性依然是 OMVs 进入临床研究的关键限制因素。通过研究不同策略来降低 OMVs 的毒性风险, 有望推进革兰氏阴性菌 OMVs 制剂临床试验及实际应用进程。

3.3 OMVs 作为癌症免疫治疗剂

近年来, 革兰氏阴性细菌 OMVs 被报道具有显著的抗肿瘤活性, 能够有效诱导长期抗肿瘤免疫反应, 减小或完全根除已形成的肿瘤, 且不会产生明显的副作用^[78]。Kim 等^[78]研究发现, 大肠杆菌 *ΔmsbB* 突变体来源的 OMVs 在静脉注射后能够特异性地靶向积聚到结肠癌肿瘤组织中, 随后诱导抗肿瘤细胞因子 CXCL10 和细胞因子 IFN- γ 产生, 这种抗肿瘤作用依赖于 IFN- γ , IFN- γ 缺陷型小鼠无法引发这类型免疫反应; 此外, 该研究还证实来自不同菌株的 OMVs 在多种肿瘤模型中均表现出优异的肿瘤生长抑制作用, 这表明 OMVs 诱导的抗肿瘤功效具有普遍性。受到该研究的启发, Aly 等^[79]研究了鼠伤寒沙门氏菌 OMVs (ST-OMVs) 对肿瘤组织的影响, 研究结果表明, ST-OMVs 具有有效杀死人类结肠癌、乳腺癌和肝癌细胞的能力; 将 ST-OMVs 用于治疗小鼠体内的埃利希实体瘤, 可显著提高肿瘤生长抑制率(89.6%)和减小肿瘤体积, 并且增强自然杀伤细胞的募集, 从而促进细胞凋亡、降低肿瘤侵袭和有丝分裂活性; 当 ST-OMVs 和商用化疗药物紫杉醇联合给药, 可进一步增强肿瘤抑制效果, 肿瘤生长抑制率可达到 94.7%^[79]。由此可见, ST-OMVs 具有显著的抗肿瘤功效, 可用作一种有前途的抗肿瘤免疫疗法或传统化疗药物的佐剂, 帮助解决肿瘤治疗方面的一些问题。最新的研究表明, 大肠杆菌 OMVs 能够有效抑制神经母细胞瘤, 研究者推测可能是 OMVs 在进入细胞质和细胞核后降低了细胞干性, 造成了 DNA 损伤、

细胞凋亡以及细胞周期停滞,从而发挥联合抗肿瘤作用,但具体作用机制尚未阐明^[80]。进一步解析 OMVs 对肿瘤细胞的分子作用机制和功能影响,有助于促进 OMVs 在癌症领域的临床应用。

3.4 OMVs 作为药物递送载体

OMVs 特有的天然磷脂包膜组成和选择性细胞相互作用,使其成为非常具有潜力的新型药物递送载体。它可以远距离输送抗原、药物、RNA 和 DNA 等各种生物分子而不被宿主体内各种酶降解,并通过配体-受体识别结合靶细胞,发生细胞间相互作用,从而将装载到 OMVs 的特异性药物递送到指定位置,针对性地预防、治疗某些疾病或提高治疗效果^[81]。Gujrati 等^[82]于 2014 年首次利用基因工程大肠杆菌 OMVs 作为药物递送载体,通过将癌细胞靶向配体 HER2 与膜表面定位蛋白 ClyA 融合表达使其展示于 OMVs 表面,再采用电穿孔法将治疗剂 siRNA 装载到 OMVs,使得 siRNA 以细胞特异性方式靶向癌细胞,在沉默驱动蛋白纺锤体蛋白基因的表达后,显著抑制了肿瘤的生长。与游离 siRNA 和非靶向 OMVs-siRNA 相比,靶向 OMVs-siRNA 递送策略表现出更高的肿瘤生长抑制能力,这表明 OMVs 作为载体靶向递送肿瘤药物具有切实的可行性。另一项研究表明,OMVs 表面上的 LPS 可被中性粒细胞 Toll 样受体特异性识别,促进中性粒细胞对囊泡的内吞作用^[83]。Pan 等^[81]利用这一特性,将神经保护剂吡格列酮(pioglitazone, PGZ)封装到工程大肠杆菌 W3110 的低内毒素囊泡中,获得的 OMVs@PGZ 纳米颗粒具有与细菌外膜相关的功能,能够诱使中性粒细胞摄取;小鼠实验结果表明,OMVs@PGZ 可以同时抑制 NLRP3 炎症小体的激活和铁死亡,减轻再灌注损伤,发挥神经保护作用。此外,OMVs 还可以作为各

种抗生素和杀菌成分的运输载体,用于对抗病原微生物的黏附与感染,这可能成为一种新型抗菌治疗策略^[84]。但由于 OMVs 组成的复杂性和对其生物发生的理解不完全,可能造成该方法面临巨大挑战。因此,在利用这一治疗途径前,需要更多的基础研究工作为其提供理论和技术支撑^[85]。

4 OMVs 的基因工程改造与修饰

尽管 OMVs 在生物医学领域极具发展前景,但也存在一定的局限性,包括产量普遍较低、免疫原性不足并且具有一定毒性,因此如何获得高产量、毒力适当的 OMVs 是目前该领域拟解决的关键问题。此外,基于各种改造策略开发具有靶向性的新型 OMVs 也是目前的研究热点之一,它可以提高 OMVs 生物制品在疾病预防和治疗中的功效、靶向性、特异性和生物相容性。改造策略大致可分为 2 种:一是通过基因工程技术改造亲本细菌,使改造后的工程菌株能够提供高产囊泡表型或分泌具有特定功能的 OMVs;二是囊泡修饰,即通过物理或化学方法将药物或抗原分子装载到已有的囊泡上,以此来获得新型的重组载药 OMVs。

4.1 OMVs 基因工程改造

OMVs 的低产量是限制其规模化生产的主要原因之一,因此如何提高囊泡产量是目前亟需解决的关键问题,这有助于促进 OMVs 扩大应用范围。通过基因工程改造亲本细菌是实现 OMVs 增产的有效手段,有研究表明,删除大肠杆菌中与包膜应激(如 *nlpI* 和 *degP*)和磷脂积累(如 *mlaA* 和 *mleA*)有关的基因会导致膜应力增加,从而导致囊泡过量产生^[86-87]。删除一些与 PG 层有关的外膜蛋白会造成 PG 与外膜的交联减少,从而导致膜过度泡化和囊泡产量增加^[88]。参与细菌运动的内膜蛋白 TolR 缺失也被

证实可以提高囊泡产量,这是由于它的缺失破坏了细菌内膜和外膜的连接,从而导致包膜的完整性受损^[89]。此外,细菌鞭毛运动和胞外多糖被证实可以通过增加细菌膜表面传感,间接促进生物膜中囊泡的形成^[90]。由此可见,囊泡的形成与膜的不稳定性密切相关。因此未来的基因工程改造策略可以基于高通量的转录组学、代谢组学和蛋白组学等多组学整合分析技术,找出与囊泡形成有关的关键基因,通过破坏革兰氏阴性菌包膜的完整性和增加膜的不稳定性来促进囊泡产生,同时避免给细菌造成严重负担而导致菌体过早死亡。

除了提高 OMVs 产量外,还可通过基因工程方法来降低囊泡 LPS 的毒性,这对于限制炎症反应、提高 OMVs 的安全性至关重要。有研究表明,LPS 的毒性与其酰化程度有关,减少 LPS 酰基链的数量可降低 OMVs 毒性;在脑膜炎奈瑟菌中,破坏与脂质 A 生物合成相关的 *lpxL1* 基因,可使脂质 A 二级酰基链丢失并由六酰化变为五酰化,从而导致 OMVs 毒性降低^[91]。在致病大肠杆菌 O157:H7 和鼠伤寒沙门氏菌中,可通过破坏 *LpxM* 基因来减少 LPS 酰化程度,从而降低 OMVs 的毒性^[92-93]。此外,还可通过鲍曼不动杆菌 *lpxD* 基因的突变直接导致 LPS 合成受阻,从而获得无 LPS 的 OMVs,这种方式从根本上消除了 OMVs 相关 LPS 对机体造成的不良影响,但同时也降低了 OMVs 的免疫原性和佐剂活性^[94]。由此可见,在考虑如何降低或消除 OMVs 毒性的同时,还应当尽可能地保留 OMVs 天然具备的免疫刺激功能。

通过基因工程来控制参与 OMVs 相关蛋白质分选基因可以实现异源蛋白的囊泡定位,并赋予 OMVs 特定的生理学功能。大肠杆菌成孔毒素 ClyA 最早被用作融合定位载体,它可以分别将 β -内酰胺酶和有机磷水解酶共定位到细

菌 OMVs 中,获得的 OMVs 具有水解 β -内酰胺抗生素和对氧磷的功能^[95]。随后,研究人员将 ClyA 蛋白与特定肿瘤抗原融合,发现衍生出的重组 OMVs 可以靶向刺激树突状细胞成熟,并有效抑制肿瘤生长和保护小鼠免受肿瘤的再次攻击^[96]。除了 ClyA 以外,大肠杆菌 Hbp 蛋白和脑膜炎奈瑟菌 fHbp 蛋白等其他具有膜定位功能的蛋白质也同样被设计为多功能自转运平台,以实现异源蛋白在 OMVs 表面的共定位^[97-98]。Daleke-Schermerhorn 等^[99]将大肠杆菌 Hbp 蛋白与结核分枝杆菌来源的 3 种抗原 ESAT6、Ag85B 和 Rv2660c 进行融合表达,可成功将这些抗原展示在大肠杆菌 OMVs 表面;进一步研究还发现,Hbp 自转运平台具有很强的兼容性,它还可以在沙门氏菌 OMVs 上有效展示来自沙眼衣原体和流感病毒的抗原片段。类似地,Schettters 等^[100]通过将大肠杆菌 Hbp 和卵清蛋白肽段 OVA₂₅₀₋₃₄₈ 融合并表达于鼠伤寒沙门氏菌株 SL3261 *AtolRA* 中,获得的 OVA-OMVs 可以表面展示 OVA₂₅₀₋₃₄₈,进一步实验证实该囊泡可以诱导树突状细胞成熟并将抗原有效地交叉呈递给抗原特异性 CD8⁺ T 细胞。

4.2 OMVs 的修饰

除上述方法外,还可通过物理或化学方法对分离后的囊泡进行修饰,使其装载上药物、抗原或其他加固纳米颗粒,涉及的主要方法有电穿孔、皂苷处理、超声、挤压、低渗透析和冻融循环等^[101-103]。其中,电穿孔法是直接将药物与囊泡混合,再通过补偿电信号触发的电压变化来刺激膜中自发孔的形成,这种方法是实现囊泡核酸载药的有效方法,也可以提高其他疏水性药物分子的载药率^[104];皂苷辅助法是通过将囊泡和药物同一定浓度的皂苷共同孵育来制备载药囊泡,与被动方法相比,这种辅助处理的方法可以显著提高亲水性药物吡啶的载药

量^[101]；通过超声和挤压的方式可以提高囊泡的尺寸均匀性，在此基础上如使用纳米颗粒对囊泡进行内部加固，可以进一步提高 OMVs 的稳定性^[105]。综上，相较于基因工程而言，这些方法操作更为简单且用时更短，所获囊泡也被证实具有巨大的应用潜力。但目前仍然面临一些问题，如载药率低、封装效率有限和生产成本高等，因此在未来还需要建立更加有效的修饰方法来进一步提高 OMVs 的载药率，降低生产成本，同时保证其产量和功效，以尽早实现载药囊泡在生物医学领域中的应用。

5 OMVs 的制备及鉴定

根据制备原料的不同，OMVs 大致可以分为 2 大类：一是细菌在生长过程中自然释放的 OMVs (spontaneously released OMVs, sOMVs)；二是通过人为因素诱导菌体产生的 OMVs，根据是否使用去污剂可将这类囊泡产物再分为去污剂提取的 OMVs (OMV extracted from cells with detergent, dOMVs) 和无去污剂提取的 OMVs (OMV extracted from cells with detergent-free methods, nOMVs)。尽管囊泡的制备方式不同，但其小量纯化的方法通常会涉及超速离心(ultracentrifugation, UC)和切向流过滤(tangential flow filtration, TFF)技术。囊泡的物理特征鉴定包括纳米颗粒跟踪分析技术(nanoparticle tracking analysis, NTA)、动态光散射技术(dynamic light scattering, DLS)、高分辨率显微镜技术和 SDS-PAGE 电泳；其成分鉴定主要涉及蛋白质免疫印迹、高分辨率流式细胞术和蛋白质组学分析等方法。

5.1 OMVs 的制备

一般来说，sOMVs 的制备流程主要包括细菌培养液制备、菌体去除、培养液浓缩、产物分离及纯化步骤；制备的细菌培养液通过低速离心(2 000–10 000×g)去除菌体，含囊泡的上清

液用 0.45 μm 或者 0.22 μm 孔径滤膜过滤以去除样品中残余菌体和大分子量细胞碎片，随后利用 TFF、UC 或蛋白质沉淀等方法对样品进行浓缩，通过超速离心(50 000–200 000×g)对囊泡进行收集；根据 OMVs 的大小，密度梯度离心和尺寸排阻色谱技术可用于进一步去除提取物中可能存在的大分子可溶蛋白、鞭毛和菌毛等，从而提高囊泡的纯度和质量，但其主要缺点是操作体积小，难以实现规模化生产^[106]。此外，在研究过程中还发现，对于需添加血清来获取的细菌(如幽门螺杆菌)培养液^[107]，必须使用不含外泌体的血清来避免培养液受到外泌体污染，且后续以 TFF 浓缩上清液的方式周期长、耗时久，二者直接导致生产成本大大增加，因此并不适用于工业化生产。这也是综合考虑后暂时不以 sOMV 作为此类病原菌候选疫苗和佐剂的重要原因。

不同于 sOMVs 的制备，dOMVs 和 nOMVs 是利用菌体进行提取。菌液通过离心或切向流微滤除去上清，获得的菌体颗粒通过去污剂处理，常用去污剂为脱氧胆酸钠(sodium deoxycholate, DOC)，它可以诱导菌体产生 OMVs，例如开发针对 B 型脑膜炎奈瑟菌多价 PorA 疫苗的既定方法就涉及去污剂的使用^[108]。去污剂处理目前存在的问题是可能造成具有免疫原性的 LPS 被过量去除，从而导致 OMVs 免疫原性显著降低和 OMVs 聚集。基于温和化学试剂的无洗涤剂提取工艺，制备出的 nOMVs 可以保留所有 LPS，从而保留其天然囊泡结构，但这会导致 OMVs 毒性高且产量较低^[109]。因此，如何提高 nOMVs 的产量是目前亟待解决的问题，这需要进一步优化无洗涤剂提取工艺来获得高产量、低聚集且毒性适当的 OMVs，以满足疫苗开发中的需求。在最近的研究中，本课题组分别采用了 DOC 和乙二胺四乙酸

(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)对幽门螺杆菌 dOMVs 和 nOMVs 进行了提取,初步结果证实 DOC 提取可以获得更高的囊泡产量,但同时也会加快破坏细菌结构的完整性并导致细菌破裂,这一定程度上增加了囊泡提取物成分的复杂性,使得除杂变得更为困难;而无洗涤剂提取工艺中的 EDTA 对菌体破坏力小,同时也可以刺激囊泡释放;该方法有效减少了提取物中的非囊泡细胞成分,但不足之处在于其囊泡产量相比于 DOC 提取大大减少。有研究表明,如果优化控制菌体收获时间和囊泡提取液的 pH 参数,可显著提高 EDTA 提取法中脑膜炎奈瑟菌 OMVs 的产量和质量^[110]。参考这一研究结果,未来可在其他革兰氏阴性菌 OMV 提取中建立一个适用的过程控制和参数优化模型,有望实现这些细菌囊泡的规模化生产。

5.2 OMVs 的鉴定

由于培养条件和细菌所处生长阶段不同,不同批次间的 OMVs 在大小和组成成分上可能存在差异,这是由于在不同时期或不同条件下多种 OMV 产生机制的存在且某些机制被优先激活。有研究表明,铜绿假单胞菌 OMVs 中的蛋白质组分随细菌所处生长阶段的不同而变化^[111]。幽门螺杆菌在酸性条件下生长会减少 OMVs 的产量和大小,与中性条件下产生的 OMVs 相比,酸性生长条件下产生的 OMVs 增加了蛋白质、DNA 和 RNA 的含量^[112]。通过对幽门螺杆菌不同生长时期分离的 OMVs 进行蛋白组学分析,发现在不同生长阶段分离的 OMVs 中关键毒力决定因子的丰度并不相同,与对数晚期和稳定期分离的 OMVs 相比,对数早期阶段分离的 OMVs 中空泡细胞毒素自转运蛋白、脲酶和 *cag* 致病性岛蛋白富集更为显著,且早期阶段分离的 OMVs 尺寸异质性更大^[113]。

但目前生长条件与 OMVs 组分之间的关系尚不完全清楚,其复杂多样的囊泡响应机制有待更为全面的解析,这需结合生物信息学相关知识来梳理这个庞大且精细的代谢调控网络并建立相应模型,从而阐明其内部存在的联系。

如前所述,由于生长条件和提取方法等的不同,会造成 OMVs 的大小和组成成分存在异质性,这使得后续质量控制变得困难。在目前尚无统一的分离方法和鉴定标准情况下,通常以半定量的方式来确定预期存在于囊泡中的 3 个及以上蛋白质的含量,特别是具有膜结合能力的跨膜蛋白和胞质蛋白^[114]。囊泡所含蛋白质可通过蛋白质印迹、高分辨率流式细胞术、蛋白质组学分析等多种方法进行量化,核酸类物质可通过染料法和基因测序技术进行追踪和检测。由于单一方法存在局限性,通常采用粒径量化和表观鉴定相结合的方式对 OMVs 进行物理表征,NTA、DLS 和可调电阻脉冲感应法等用于粒径量化(并不能区分与 OMVs 尺寸相近的非囊泡膜颗粒),透射电子显微镜(transmission electron microscopy, TEM)和原子力显微镜(atomic force microscopy, AFM)用于物理表观证明(存在视野局限性,因此需尽可能提高待检测物的纯度)^[115-116]。此外,还应当详尽地记录实验细节,并将不同批次间的差异考虑在内,具体量化囊泡的颗粒数量及其组成成分。在大量研究数据的积累和总结基础上,找到囊泡制备所涉及的不同参数与 OMVs 组成成分之间存在的必然联系,获取构成囊泡组分的最低配置信息,后续通过严格控制生产条件,如细菌培养条件和 OMVs 提取工艺参数等,尽可能减少 OMVs 的异质性,提高其批次间的一致性和可重复性。另外,对于特定工艺生产的囊泡提取物,建立一个可行的统一质量检验标准,为囊泡生物制品的临床转化奠定基础。

6 总结与展望

OMVs 作为由细菌产生的非复制性纳米级颗粒,其独特的物理结构和复杂的组成成分赋予了其多种不同的生理学功能,使其在疫苗佐剂开发、药物递送和临床诊断等方面显示出巨大的应用前景。OMVs 相关的疫苗已经成功应用于脑膜炎奈瑟菌的防治,这使得研究人员对于 OMVs 在疫苗开发方面的应用充满了极大的信心。近年来,OMVs 在抗菌治疗和癌症免疫治疗方面也受到了广泛关注。然而,在 OMVs 被广泛临床应用前,仍有一些尚待解决的问题:首先是对于 OMVs 如何影响宿主免疫调控的机制研究还不够深入,特别是有关膜标记和货物不同囊泡亚群所具有的生理学功能和对宿主体内不同细胞群体的作用机制有待阐明,这导致了 OMVs 在疾病防控中的作用无法得到很好的解释,限制了其进行临床应用;其次,细菌内部基因修饰与外部生长条件对囊泡产量和组成成分的影响机制尚未被完全阐明,这使得囊泡的生产具有盲目性和随机性,最终导致不同批次间 OMVs 的异质性较高;另外,OMVs 产量较低,这一定程度上限制了 OMVs 规模化生产。因此在今后的研究中,可以借助高效液相色谱、高分辨率流式细胞术和基于质谱的多组学整合分析技术以及其他可供分析的研究手段,在阐明 OMVs 中具体成分对其功能影响的基础上,解析 OMV 分子对宿主免疫调控机制的影响,并利用囊泡修饰或基因工程技术对 OMVs 进行精细化改造,从而获得具有靶向性的功能型囊泡产物;通过建立标准化生产过程来控制批次间 OMVs 的一致性,并制定所获囊泡产物的质量检验标准;在尽可能提高囊泡产量和降低内毒素含量的同时,保证 OMVs 仍具有足够的免疫活性,并将可能引起的安全性问题纳入

到临床前评估范围内,充分评估 OMV 的安全性和有效性,从而减少临床转化风险。此外,对于囊泡的扩大生产,还需建立一个高产、稳定且经济的细菌培养系统以满足 OMVs 规模化生产的需要。在解决目前所面临的关键问题后,相信会有更多不同物种的革兰氏阴性菌 OMVs 用于生物医学相关领域的实际应用。

作者贡献声明

倪秀梅:构思、文献综述、初稿写作;刘宇:文献综述、稿件润色修改;刘开云:监督指导、稿件润色修改。

作者利益冲突公开声明

作者声明没有任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

REFERENCES

- [1] LEE EY, CHOI DY, KIM DK, KIM JW, PARK JO, KIM S, KIM SH, DESIDERIO DM, KIM YK, KIM KP, GHO YS. Gram-positive bacteria produce membrane vesicles: proteomics-based characterization of *Staphylococcus aureus*-derived membrane vesicles[J]. *Proteomics*, 2009, 9(24): 5425-5436.
- [2] CHATTERJEE SN, DAS J. Electron microscopic observations on the excretion of cell-wall material by *Vibrio cholerae*[J]. *Journal of General Microbiology*, 1967, 49(1): 1-11.
- [3] JARZAB M, POSSELT G, MEISNER-KOBER N, WESSLER S. *Helicobacter pylori*-derived outer membrane vesicles (OMVs): role in bacterial pathogenesis?[J]. *Microorganisms*, 2020, 8(9): 1328-1346.
- [4] TOYOFUKU M, SCHILD S, KAPARAKIS-LIASKOS M, EBERL L. Composition and functions of bacterial membrane vesicles[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2023, 21(7): 415-430.
- [5] PALACIOS E, LOBOS-GONZÁLEZ L, GUERRERO S, KOGAN MJ, SHAO BH, HEINECKE JW, QUEST AFG, LEYTON L, VALENZUELA-VALDERRAMA M. *Helicobacter pylori* outer membrane vesicles induce astrocyte reactivity through nuclear factor-kappa B activation and cause neuronal damage in vivo in a murine model[J]. *Journal of Neuroinflammation*, 2023, 20(1): 66-87.
- [6] MAGAÑA G, HARVEY C, TAGGART CC, RODGERS AM. Bacterial outer membrane vesicles: role in pathogenesis and host-cell interactions[J]. *Antibiotics*, 2023, 13(1): 32-47.
- [7] MANDAL PK, BALLERIN G, NOLAN LM, PETTY NK, WHITCHURCH CB. Bacteriophage infection of

- Escherichia coli* leads to the formation of membrane vesicles via both explosive cell lysis and membrane blebbing[J]. Microbiology, 2021, 167(4): 001021-001029.
- [8] TOYOFUKU M, NOMURA N, EBERL L. Types and origins of bacterial membrane vesicles[J]. Nature Reviews Microbiology, 2019, 17(1): 13-24.
 - [9] JAN AT. Outer membrane vesicles (OMVs) of Gram-negative bacteria: a perspective update[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 1053-1063.
 - [10] MASHBURN-WARREN L, HOWE J, BRANDENBURG K, WHITELEY M. Structural requirements of the *Pseudomonas* quinolone signal for membrane vesicle stimulation[J]. Journal of Bacteriology, 2009, 191(10): 3411-3414.
 - [11] PAULSSON M, KRAGH KN, SU YC, SANDBLAD L, SINGH B, BJARNSHOLT T, RIESBECK K. Peptidoglycan-binding anchor is a *Pseudomonas aeruginosa* OmpA family lipoprotein with importance for outer membrane vesicles, biofilms, and the periplasmic shape[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 639582-639594.
 - [12] TURNBULL L, TOYOFUKU M, HYNEN AL, KUROSAWA M, PESSI G, PETTY NK, OSVATH SR, CÁRCAMO-OYARCE G, GLOAG ES, SHIMONI R, OMASITS U, ITO S, YAP X, MONAHAN LG, CAVALIERE R, AHRENS CH, CHARLES IG, NOMURA N, EBERL L, WHITCHURCH CB. Explosive cell lysis as a mechanism for the biogenesis of bacterial membrane vesicles and biofilms[J]. Nature Communications, 2016, 7: 11220-11232.
 - [13] PÉREZ-CRUZ C, CARRIÓN O, DELGADO L, MARTINEZ G, LÓPEZ-IGLESIAS C, MERCADE E. New type of outer membrane vesicle produced by the Gram-negative bacterium *Shewanella vesiculosa* M7T: implications for DNA content[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(6): 1874-1881.
 - [14] RENELLI M, MATIAS V, LO RY, BEVERIDGE TJ. DNA-containing membrane vesicles of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and their genetic transformation potential[J]. Microbiology, 2004, 150(7): 2161-2169.
 - [15] PÉREZ-CRUZ C, DELGADO L, LÓPEZ-IGLESIAS C, MERCADE E. Outer-inner membrane vesicles naturally secreted by Gram-negative pathogenic bacteria[J]. PLoS One, 2015, 10(1): e0116896.
 - [16] HAGEMANN S, STÖGER L, KAPPELMANN M, HASSL I, ELLINGER A, VELIMIROV B. DNA-bearing membrane vesicles produced by *Ahrensia kielensis* and *Pseudoalteromonas marina*[J]. Journal of Basic Microbiology, 2014, 54(10): 1062-1072.
 - [17] FERRARI G, GARAGUSO I, ADU-BOBIE J, DORO F, TADDEI AR, BIOLCHI A, BRUNELLI B, GIULIANI MM, PIZZA M, NORAI S, GRANDI G. Outer membrane vesicles from group B *Neisseria meningitidis* Agna33 mutant: proteomic and immunological comparison with detergent-derived outer membrane vesicles[J]. Proteomics, 2006, 6(6): 1856-1866.
 - [18] REYES-ROBLES T, DILLARD RS, CAIRNS LS, SILVA-VALENZUELA CA, HOUSMAN M, ALI A, WRIGHT ER, CAMILLI A. *Vibrio cholerae* outer membrane vesicles inhibit bacteriophage infection[J]. Journal of Bacteriology, 2018, 200(15): e00792-17.
 - [19] KIM SW, LEE JS, PARK SB, LEE AR, JUNG JW, CHUN JH, LAZARTE JMS, KIM J, SEO JS, KIM JH, SONG JW, HA MW, THOMPSON KD, LEE CR, JUNG M, JUNG TS. The importance of porins and β -lactamase in outer membrane vesicles on the hydrolysis of β -lactam antibiotics[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(8): 2822-2835.
 - [20] LI Z, CLARKE AJ, BEVERIDGE TJ. Gram-negative bacteria produce membrane vesicles which are capable of killing other bacteria[J]. Journal of Bacteriology, 1998, 180(20): 5478-5483.
 - [21] GURUNATHAN S, THANGARAJ P, DAS J, KIM JH. Antibacterial and antibiofilm effects of *Pseudomonas aeruginosa* derived outer membrane vesicles against *Streptococcus mutans*[J]. Heliyon, 2023, 9(12): e22606.
 - [22] MASHBURN LM, WHITELEY M. Membrane vesicles traffic signals and facilitate group activities in a prokaryote[J]. Nature, 2005, 437(7057): 422-425.
 - [23] TOYOFUKU M, MORINAGA K, HASHIMOTO Y, UHL J, SHIMAMURA H, INABA H, SCHMITT-KOPPLIN P, EBERL L, NOMURA N. Membrane vesicle-mediated bacterial communication[J]. The ISME Journal, 2017, 11(6): 1504-1509.
 - [24] BRAMEYER S, PLENER L, MÜLLER A, KLINGL A, WANNER G, JUNG K. Outer membrane vesicles facilitate trafficking of the hydrophobic signaling molecule CAI-1 between *Vibrio harveyi* cells[J]. Journal of Bacteriology, 2018, 200(15): e00740-17.
 - [25] FAN MZ, KIEFER P, CHARKI P, HEDBERG C, SEIBEL J, VORHOLT JA, HILBI H. The *Legionella* autoinducer LAI-1 is delivered by outer membrane vesicles to promote interbacterial and interkingdom signaling[J]. Journal of Biological Chemistry, 2023, 299(12): 105376-105392.
 - [26] TSATSARONIS JA, FRANCH-ARROYO S, RESCH U, CHARPENTIER E. Extracellular vesicle RNA: a universal mediator of microbial communication?[J]. Trends in Microbiology, 2018, 26(5): 401-410.
 - [27] BITTEL M, REICHERT P, SARFATI I, DRESSEL A, LEIKAM S, UDERHARDT S, STOLZER I, PHU TA, NG M, VU NK, TENZER S, DISTLER U, WIRTZ S, ROTHHAMMER V, NEURATH MF, RAFFAI RL, GÜNTHER C, MOMMA S. Visualizing transfer of microbial biomolecules by outer membrane vesicles in microbe-host-communication *in vivo*[J]. Journal of Extracellular Vesicles, 2021, 10(12): e12159.
 - [28] HAN EC, CHOI SY, LEE Y, PARK JW, HONG SH, LEE HJ. Extracellular RNAs in periodontopathogenic outer membrane vesicles promote TNF- α production in human macrophages and cross the blood-brain barrier in mice[J]. The FASEB Journal, 2019, 33(12): 13412-13422.
 - [29] CHOI JW, KIM SC, HONG SH, LEE HJ. Secretable small RNAs via outer membrane vesicles in periodontal pathogens[J]. Journal of Dental Research, 2017, 96(4): 458-466.
 - [30] ZHANG HX, ZHANG YX, SONG ZF, LI RZ, RUAN H, LIU Q, HUANG XT. sncRNAs packaged by *Helicobacter pylori* outer membrane vesicles attenuate IL-8 secretion in human cells[J]. International Journal of Medical Microbiology, 2020, 310(1): 151356-151362.
 - [31] OLIVO-MARTÍNEZ Y, MARTÍNEZ-RUIZ S, CORDERO-ALDAY C, BOSCH M, BADIA J, BALDOMA L. Modulation of serotonin-related genes by extracellular vesicles of the probiotic *Escherichia*

- coli* Nissle 1917 in the interleukin-1 β -induced inflammation model of intestinal epithelial cells[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2024, 25(10): 5338-5358.
- [32] YAGHOUBFAR R, BEHROUZI A, ZARE BANADKOKI E, ASHRAFIAN F, LARI A, VAZIRI F, NOJOU MI SA, FATEH A, KHATAMI S, SIADAT SD. Effect of *Akkermansia muciniphila*, *Faecalibacterium prausnitzii*, and their extracellular vesicles on the serotonin system in intestinal epithelial cells[J]. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 2021, 13(6): 1546-1556.
 - [33] TRAN F, BOEDICKER JQ. Genetic cargo and bacterial species set the rate of vesicle-mediated horizontal gene transfer[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 8813-8822.
 - [34] QIAO WC, WANG LJ, LUO Y, MIAO JH. Outer membrane vesicles mediated horizontal transfer of an aerobic denitrification gene between *Escherichia coli*[J]. Biodegradation, 2021, 32(4): 435-448.
 - [35] CHATTERJEE S, MONDAL A, MITRA S, BASU S. *Acinetobacter baumannii* transfers the bla_{NDM-1} gene via outer membrane vesicles[J]. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2017, 72(8): 2201-2207.
 - [36] DELL'ANNUNZIATA F, DELL'AVERSANA C, DOTI N, DONADIO G, DAL PIAZ F, IZZO V, DE FILIPPIS A, GALDIERO M, ALTUCCI L, BOCCIA G, GALDIERO M, FOLLIERO V, FRANCI G. Outer membrane vesicles derived from *Klebsiella pneumoniae* are a driving force for horizontal gene transfer[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(16): 8732-8745.
 - [37] HUA YN, WANG JY, HUANG M, HUANG YY, ZHANG RY, BU F, YANG B, CHEN JJ, LIN XM, HU XM, ZHENG L, WANG Q. Outer membrane vesicles-transmitted virulence genes mediate the emergence of new antimicrobial-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*[J]. Emerging Microbes & Infections, 2022, 11(1): 1281-1292.
 - [38] JOHNSTON EL, ZAVAN L, BITTO NJ, PETROVSKI S, HILL AF, KAPARAKIS-LIASKOS M. Planktonic and biofilm-derived *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane vesicles facilitate horizontal gene transfer of plasmid DNA[J]. Microbiology Spectrum, 2023, 11(2): e0517922.
 - [39] TRAN F, BOEDICKER JQ. Plasmid characteristics modulate the propensity of gene exchange in bacterial vesicles[J]. Journal of Bacteriology, 2019, 201(7): e00430-18.
 - [40] SHEN Z, QIN JX, XIANG GX, CHEN TC, NURXAT N, GAO QQ, WANG C, ZHANG HM, LIU Y, LI M. Outer membrane vesicles mediating horizontal transfer of the epidemic bla_{OXA-232} carbapenemase gene among *Enterobacteriales*[J]. Emerging Microbes & Infections, 2024, 13(1): 2290840-2290850.
 - [41] AKTAR S, OKAMOTO Y, UENO S, TAHARA YO, IMAIZUMI M, SHINTANI M, MIYATA M, FUTAMATA H, NOJIRI H, TASHIRO Y. Incorporation of plasmid DNA into bacterial membrane vesicles by peptidoglycan defects in *Escherichia coli*[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 747606-747616.
 - [42] POTAPOVA A, GARVEY W, DAHL P, GUO SQ, CHANG YJ, SCHWECHHEIMER C, TREBINO MA, FLOYD KA, PHINNEY BS, LIU J, MALVANKAR NS, YILDIZ FH. Outer membrane vesicles and the outer membrane protein OmpU govern *Vibrio cholerae* biofilm matrix assembly[J]. mBio, 2024, 15(2): e0330423.
 - [43] SEIKE S, KOBAYASHI H, UEDA M, TAKAHASHI E, OKAMOTO K, YAMANAKA H. Outer membrane vesicles released from *Aeromonas* strains are involved in the biofilm formation[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 11: 613650-613663.
 - [44] YONEZAWA H, OSAKI T, KURATA S, FUKUDA M, KAWAKAMI H, OCHIAI K, HANAWA T, KAMIYA S. Outer membrane vesicles of *Helicobacter pylori* TK1402 are involved in biofilm formation[J]. BMC Microbiology, 2009, 9: 197-208.
 - [45] COOKE AC, FLOREZ C, DUNSHEE EB, LIEBER AD, TERRY ML, LIGHT CJ, SCHERTZER JW. *Pseudomonas* quinolone signal-induced outer membrane vesicles enhance biofilm dispersion in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. mSphere, 2020, 5(6): e01109-20.
 - [46] MA GX, DING Y, WU QP, ZHANG JM, LIU M, WANG Z, WANG ZM, WU S, YANG XJ, LI Y, WEI XH, WANG J. *Yersinia enterocolitica*-derived outer membrane vesicles inhibit initial stage of biofilm formation[J]. Microorganisms, 2022, 10(12): 2357-2374.
 - [47] BIELASZEWSKA M, MAREJKOVÁ M, BAUWENS A, KUNSMANN-PROKSCHA L, MELLMANN A, KARCH H. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 outer membrane vesicles induce interleukin 8 production in human intestinal epithelial cells by signaling via Toll-like receptors TLR4 and TLR5 and activation of the nuclear factor NF- κ B[J]. International Journal of Medical Microbiology, 2018, 308(7): 882-889.
 - [48] KAPARAKIS M, TURNBULL L, CARNEIRO L, FIRTH S, COLEMAN HA, PARKINGTON HC, LE BOURHIS L, KARRAR A, VIALA J, MAK J, HUTTON ML, DAVIES JK, CRACK PJ, HERTZOG PJ, PHILPOTT DJ, GIRARDIN SE, WHITCHURCH CB, FERRERO RL. Bacterial membrane vesicles deliver peptidoglycan to NOD1 in epithelial cells[J]. Cellular Microbiology, 2010, 12(3): 372-385.
 - [49] TRINDADE BC, CHEN GY. NOD1 and NOD2 in inflammatory and infectious diseases[J]. Immunological Reviews, 2020, 297(1): 139-161.
 - [50] YANG J, HWANG I, LEE E, SHIN SJ, LEE EJ, RHEE JH, YU JW. Bacterial outer membrane vesicle-mediated cytosolic delivery of flagellin triggers host NLRC4 canonical inflammasome signaling[J]. Frontiers in Immunology, 2020, 11: 581165-581177.
 - [51] CECIL JD, O'BRIEN-SIMPSON NM, LENZO JC, HOLDEN JA, SINGLETON W, PEREZ-GONZALEZ A, MANSELL A, REYNOLDS EC. Outer membrane vesicles prime and activate macrophage inflammasomes and cytokine secretion *in vitro* and *in vivo*[J]. Frontiers in Immunology, 2017, 8: 1017-1038.
 - [52] FONSECA S, CARVALHO AL, MIQUEL-CLOPÉS A, JONES EJ, JUODEIKIS R, STENTZ R, CARDING SR. Extracellular vesicles produced by the human gut commensal bacterium *Bacteroides thetaiotaomicron* elicit anti-inflammatory responses from innate immune cells[J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 1050271-1050283.

- [53] MOFRAD LZ, FATEH A, SOTOODEHNEJADNEMATALAHI F, ASBI DNS, DAVAR SIADAT S. The effect of *Akkermansia muciniphila* and its outer membrane vesicles on microRNAs expression of inflammatory and anti-inflammatory pathways in human dendritic cells[J]. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 2024, 16(2): 367-382.
- [54] WINTER J, LETLEY D, RHEAD J, ATHERTON J, ROBINSON K. *Helicobacter pylori* membrane vesicles stimulate innate pro- and anti-inflammatory responses and induce apoptosis in Jurkat T cells[J]. Infection and Immunity, 2014, 82(4): 1372-1381.
- [55] 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.
- [56] ALANIZ RC, DEATHERAGE BL, LARA JC, COOKSON BT. Membrane vesicles are immunogenic facsimiles of *Salmonella typhimurium* that potently activate dendritic cells, prime B and T cell responses, and stimulate protective immunity *in vivo*[J]. Journal of Immunology, 2007, 179(11): 7692-7701.
- [57] CHATTERJEE D, CHAUDHURI K. *Vibrio cholerae* O395 outer membrane vesicles modulate intestinal epithelial cells in a NOD1 protein-dependent manner and induce dendritic cell-mediated Th2/Th17 cell responses[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2013, 288(6): 4299-4309.
- [58] LEE HSW, BOULTON IC, REDDIN K, WONG H, HALLIWELL D, MANDELBOIM O, GORRINGE AR, GRAY-OWEN SD. Neisserial outer membrane vesicles bind the coinhibitory receptor carcinoembryonic antigen-related cellular adhesion molecule 1 and suppress CD4⁺ T lymphocyte function[J]. Infection and Immunity, 2007, 75(9): 4449-4455.
- [59] MACION A, WYSZYŃSKA A, GODLEWSKA R. Delivery of toxins and effectors by bacterial membrane vesicles[J]. Toxins, 2021, 13(12): 845-860.
- [60] SVENNERHOLM K, PARK KS, WIKSTRÖM J, LÄSSER C, CRESCITELLI R, SHELKE GV, JANG SC, SUZUKI S, BANDEIRA E, OLOFSSON CS, LÖTVALL J. *Escherichia coli* outer membrane vesicles can contribute to sepsis induced cardiac dysfunction[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 17434-17444.
- [61] WEI SS, LI XY, WANG JJ, WANG YJ, ZHANG C, DAI SL, WANG X, DENG XQ, ZHAO LM, SHAN BE. Outer membrane vesicles secreted by *Helicobacter pylori* transmitting gastric pathogenic virulence factors[J]. ACS Omega, 2021, 7(1): 240-258.
- [62] XIE JH, COOLS L, VAN IMSCHOOT G, VAN WONTERGHEM E, PAUWELS MJ, VLAEMINCK I, DE WITTE C, EL ANDALOUSSI S, WIERDA K, DE GROEF L, HAESBROUCK F, VAN HOECKE L, VANDENBROUCKE RE. *Helicobacter pylori*-derived outer membrane vesicles contribute to Alzheimer's disease pathogenesis via C3-C3aR signalling[J]. Journal of Extracellular Vesicles, 2023, 12(2): e12306.
- [63] GAO S, GAO LY, YUAN DL, LIN XA, VAN DER VEEN S. Gonococcal OMV-delivered PorB induces epithelial cell mitophagy[J]. Nature Communications, 2024, 15(1): 1669-1684.
- [64] DEO P, CHOW SH, HAY ID, KLEIFELD O, COSTIN A, ELGASS KD, JIANG JH, RAMM G, GABRIEL K, DOUGAN G, LITHGOW T, HEINZ E, NADERER T. Outer membrane vesicles from *Neisseria gonorrhoeae* target PorB to mitochondria and induce apoptosis[J]. PLoS Pathogens, 2018, 14(3): e1006945.
- [65] DAVID L, TAIEB F, PÉNARY M, BORDIGNON PJ, PLANÈS R, BAGAYOKO S, DUPLAN-ECHE V, MEUNIER E, OSWALD E. Outer membrane vesicles produced by pathogenic strains of *Escherichia coli* block autophagic flux and exacerbate inflammasome activation[J]. Autophagy, 2022, 18(12): 2913-2925.
- [66] HONG MK, LI Z, LIU HH, ZHENG SY, ZHANG FL, ZHU JQ, SHI H, YE HX, CHOU ZT, GAO L, DIAO JX, ZHANG Y, ZHANG DX, CHEN SX, ZHOU HW, LI J. *Fusobacterium nucleatum* aggravates rheumatoid arthritis through FadA-containing outer membrane vesicles[J]. Cell Host & Microbe, 2023, 31(5): 798-810.
- [67] LIU KY, SHI Y, LUO P, YU S, CHEN L, ZHAO Z, MAO XH, GUO G, WU C, ZOU QM. Therapeutic efficacy of oral immunization with attenuated *Salmonella typhimurium* expressing *Helicobacter pylori* CagA, VacA and UreB fusion proteins in mice model[J]. Vaccine, 2011, 29(38): 6679-6685.
- [68] GU H, ZENG X, PENG LS, XIANG CY, ZHOU YY, ZHANG XM, ZHANG JX, WANG N, GUO G, LI Y, LIU KY, GU J, ZENG H, ZHUANG Y, LI HB, ZHANG JY, ZHANG WJ, ZOU QM, SHI Y. Vaccination induces rapid protection against bacterial pneumonia *via* training alveolar macrophage in mice[J]. eLife, 2021, 10: e69951.
- [69] CASTILLA J, CENOZ MG, ABAD R, SÁNCHEZ-CAMBRONERO L, LORUSSO N, IZQUIERDO C, LLABRÉS SC, ROIG J, MALVAR A, CARRIL FG, BOONE ALD, MARTÍN JP, RECIO MR, GÁLMÉS A, CABALLERO A, ROJAS AG, JUANAS F, NIETO M, VILORIA RAYMUNDO LJ, OCHOA EM, et al. Effectiveness of a meningococcal group B vaccine (4CMenB) in children[J]. The New England Journal of Medicine, 2023, 388(5): 427-438.
- [70] PETOUSIS-HARRIS H, PAYNTER J, MORGAN J, SAXTON P, MCARDLE B, GOODYEAR-SMITH F, BLACK S. Effectiveness of a group B outer membrane vesicle meningococcal vaccine against gonorrhoea in New Zealand: a retrospective case-control study[J]. Lancet, 2017, 390(10102): 1603-1610.
- [71] DAS S, HALDER P, BANERJEE S, MUKHOPADHYAY AK, DUTTA S, KOLEY H. Establishment of an intragastric surgical model using C57BL/6 mice to study the vaccine efficacy of OMV-based immunogens against *Helicobacter pylori*[J]. Biology Open, 2024: bio.060282.
- [72] BJANES E, ZHOU JR, QAYUM T, KRISHNAN N, ZURICH RH, MENON ND, HOFFMAN A, FANG RH, ZHANG LF, NIZET V. Outer membrane vesicle-coated nanoparticle vaccine protects against *Acinetobacter baumannii* pneumonia and sepsis[J]. Advanced Nanobiomed Research, 2023, 3(2): 2200130-2200153.
- [73] BACHMANN MF, JENNINGS GT. Vaccine delivery: a matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns[J]. Nature Reviews Immunology, 2010, 10(11): 787-796.
- [74] ZHAO TM, CAI YL, JIANG YJ, HE XM, WEI YQ, YU YF, TIAN XH. Vaccine adjuvants: mechanisms and platforms[J]. Signal Transduction and Targeted

- Therapy, 2023, 8(1): 283-306.
- [75] HANEBERG B, DALSEG R, OFTUNG F, WEDEGE E, HØIBY EA, HAUGEN IL, HOLST J, ANDERSEN SR, AASE A, MEYER NAESS L, MICHAELSEN TE, NAMORK E, HAAHEIM LR. Towards a nasal vaccine against meningococcal disease, and prospects for its use as a mucosal adjuvant[J]. *Developments in Biological Standardization*, 1998, 92: 127-133.
- [76] CHEN DJ, OSTERRIEDER N, METZGER SM, BUCKLES E, DOODY AM, DELISA MP, PUTNAM D. Delivery of foreign antigens by engineered outer membrane vesicle vaccines[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(7): 3099-3104.
- [77] LIU Q, LI BX, LU JH, ZHANG YJ, SHANG YP, LI Y, GONG T, ZHANG CS. Recombinant outer membrane vesicles delivering eukaryotic expression plasmid of cytokines act as enhanced adjuvants against *Helicobacter pylori* infection in mice[J]. *Infection and Immunity*, 2023, 91(11): e0031323.
- [78] KIM OY, PARK HT, DINH NTH, CHOI SJ, LEE J, KIM JH, LEE SW, GHO YS. Bacterial outer membrane vesicles suppress tumor by interferon- γ -mediated antitumor response[J]. *Nature Communications*, 2017, 8(1): 626-634.
- [79] ALY RG, EL-ENBAAWY MI, ABD EL-RAHMAN SS, ATA NS. Antineoplastic activity of *Salmonella* Typhimurium outer membrane nanovesicles[J]. *Experimental Cell Research*, 2021, 399(1): 112423-112433.
- [80] JIN LM, ZHANG ZX, TAN XJ, WANG ZY, TANG B, WANG Z, LI MJ, MI T, SHEN LJ, LONG CL, WEI GH, HE DW. Antitumor effect of *Escherichia coli*-derived outer membrane vesicles on neuroblastoma *in vitro* and *in vivo*[J]. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2022, 54(9): 1301-1313.
- [81] PAN JM, WANG ZH, HUANG XH, XUE J, ZHANG SL, GUO X, ZHOU SB. Bacteria-derived outer-membrane vesicles hitchhike neutrophils to enhance ischemic stroke therapy[J]. *Advanced Materials*, 2023, 35(38): e2301779.
- [82] GUJRATI V, KIM S, KIM SH, MIN JJ, CHOY HE, KIM SC, JON S. Bioengineered bacterial outer membrane vesicles as cell-specific drug-delivery vehicles for cancer therapy[J]. *ACS Nano*, 2014, 8(2): 1525-1537.
- [83] LI M, LI SY, ZHOU H, TANG XF, WU Y, JIANG W, TIAN ZG, ZHOU XC, YANG XZ, WANG YC. Chemotaxis-driven delivery of nano-pathogenoids for complete eradication of tumors post-phototherapy[J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 1126-1141.
- [84] GONZÁLEZ LJ, BAHR G, NAKASHIGE TG, NOLAN EM, BONOMO RA, VILA AJ. Membrane anchoring stabilizes and favors secretion of New Delhi metallo- β -lactamase[J]. *Nature Chemical Biology*, 2016, 12(7): 516-522.
- [85] XIE JH, LI QQ, HAESBROUCK F, VAN HOECKE L, VANDENBROUCKE RE. The tremendous biomedical potential of bacterial extracellular vesicles[J]. *Trends in Biotechnology*, 2022, 40(10): 1173-1194.
- [86] MCBROOM AJ, JOHNSON AP, VEMULAPALLI S, KUEHN MJ. Outer membrane vesicle production by *Escherichia coli* is independent of membrane instability[J]. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188(15): 5385-5392.
- [87] OJIMA Y, SAWABE T, KONAMI K, AZUMA M. Construction of hypervesiculation *Escherichia coli* strains and application for secretory protein production[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2020, 117(3): 701-709.
- [88] CHEN YX, JIE KW, LI BX, YU HY, RUAN H, WU J, HUANG XT, LIU Q. Immunization with outer membrane vesicles derived from major outer membrane protein-deficient *Salmonella* Typhimurium mutants for cross protection against *Salmonella* Enteritidis and avian pathogenic *Escherichia coli* O78 infection in chickens[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 588952-588965.
- [89] JIANG X, CHU C, WANG ZY, GU JJ, HONG YM, LI QC, JIAO XN. Preclinical evaluation of OMVs as potential vaccine candidates against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis infection[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2022, 12: 1037607-1037616.
- [90] KANNO M, SHIOTA T, UENO S, TAKAHARA M, HANEDA K, TAHARA YO, SHINTANI M, NAKAO R, MIYATA M, KIMBARA K, FUTAMATA H, TASHIRO Y. Identification of genes involved in enhanced membrane vesicle formation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: surface sensing facilitates vesiculation[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2023, 14: 1252155-1252170.
- [91] VAN DER LEY P, STEEGHS L, HAMSTRA HJ, TEN HOVE J, ZOMER B, VAN ALPHEN L. Modification of lipid A biosynthesis in *Neisseria meningitidis* lpxL mutants: influence on lipopolysaccharide structure, toxicity, and adjuvant activity[J]. *Infection and Immunity*, 2001, 69(10): 5981-5990.
- [92] KIM SH, KIM KS, LEE SR, KIM E, KIM MS, LEE EY, GHO YS, KIM JW, BISHOP RE, CHANG KT. Structural modifications of outer membrane vesicles to refine them as vaccine delivery vehicles[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 2009, 1788(10): 2150-2159.
- [93] LEE SR, KIM SH, JEONG KJ, KIM KS, KIM YH, KIM SJ, KIM E, KIM JW, CHANG KT. Multi-immunogenic outer membrane vesicles derived from an MsbB-deficient *Salmonella enterica* serovar typhimurium mutant[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2009, 19(10): 1271-1279.
- [94] PULIDO MR, GARCÍA-QUINTANILLA M, PACHÓN J, MCCONNELL MJ. A lipopolysaccharide-free outer membrane vesicle vaccine protects against *Acinetobacter baumannii* infection[J]. *Vaccine*, 2020, 38(4): 719-724.
- [95] KIM JY, DOODY AM, CHEN DJ, CREMONA GH, SHULER ML, PUTNAM D, DELISA MP. Engineered bacterial outer membrane vesicles with enhanced functionality[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2008, 380(1): 51-66.
- [96] YUE YL, XU JQ, LI Y, CHENG KM, FENG QQ, MA XT, MA NN, ZHANG TJ, WANG XW, ZHAO X, NIE GJ. Antigen-bearing outer membrane vesicles as tumour vaccines produced *in situ* by ingested genetically engineered bacteria[J]. *Nature Biomedical Engineering*, 2022, 6(7): 898-909.
- [97] 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: 162-176.
- [98] SALVERDA MLM, MEINDERTS SM, HAMSTRA HJ, WAGEMAKERS A, HOVIUS JWR, VAN DER ARK A, STORK M, VAN DER LEY P. Surface display of a borrelial lipoprotein on meningococcal outer membrane vesicles[J]. Vaccine, 2016, 34(8): 1025-1033.
- [99] DALEKE-SCHERMERHORN MH, FELIX T, SOPROVA Z, TEN HAGEN-JONGMAN CM, VIKSTRÖM D, MAJLESSI L, BESKERS J, FOLLMANN F, DE PUNDER K, VAN DER WEL NN, BAUMGARTEN T, PHAM TV, PERSMA SR, JIMÉNEZ CR, VAN ULSEN P, DE GIER JW, LECLERC C, JONG WSP, LUIRINK J. Decoration of outer membrane vesicles with multiple antigens by using an autotransporter approach[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 80(18): 5854-5865.
- [100] SCHETTERS STT, JONG WSP, HORREVORTS SK, KRUIJSSEN LJW, ENGELS S, STOLK D, DALEKE-SCHERMERHORN MH, GARCIA-VALLEJO J, HOUBEN D, UNGER WWJ, DEN HAAN JMM, LUIRINK J, VAN KOOYK Y. Outer membrane vesicles engineered to express membrane-bound antigen program dendritic cells for cross-presentation to CD8⁺ T cells[J]. Acta Biomaterialia, 2019, 91: 248-257.
- [101] FUHRMANN G, SERIO A, MAZO M, NAIR R, STEVENS MM. Active loading into extracellular vesicles significantly improves the cellular uptake and photodynamic effect of porphyrins[J]. Journal of Controlled Release, 2015, 205: 35-44.
- [102] HUYNH DT, NOLFI E, MEDFAI L, VAN ULSEN P, JONG WSP, SIJTS AJAM, LUIRINK J. Intranasal delivery of *Salmonella* OMVs decorated with *Chlamydia trachomatis* antigens induces specific local and systemic immune responses[J]. Human Vaccines & Immunotherapeutics, 2024, 20(1): 2330768-2330779.
- [103] 葛艳艳, 李子涵, 王新月, 罗学刚, 王楠, 何红鹏, 张同存, 齐威. 革兰氏阳性菌细胞外囊泡的研究现状. 生物工程学报, 2022, 38(4): 1462-1474.
- GE YY, LI ZH, WANG XY, LUO XG, WANG N, HE HP, ZHANG TC, QI W. The extracellular vesicles from Gram-positive bacteria: a review. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(4): 1462-1474 (in Chinese).
- [104] RONG YL, WANG ZH, TANG PY, WANG JX, JI CY, CHANG J, ZHU YF, YE W, BAI JL, LIU W, YIN GY, YU LP, ZHOU XH, CAI WH. Engineered extracellular vesicles for delivery of siRNA promoting targeted repair of traumatic spinal cord injury[J]. Bioactive Materials, 2023, 23: 328-342.
- [105] WU GX, JI HY, GUO XY, LI YY, REN TB, DONG HQ, LIU JX, LIU YQ, SHI XY, HE B. Nanoparticle reinforced bacterial outer-membrane vesicles effectively prevent fatal infection of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*[J]. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 2020, 24: 102148-102158.
- [106] KASHYAP D, PANDA M, BARAL B, VARSHNEY N, R S, BHANDARI V, PARMAR HS, PRASAD A, JHA HC. Outer membrane vesicles: an emerging vaccine platform[J]. Vaccines, 2022, 10(10): 1578-1598.
- [107] LIU KY, DU FC, FU Q, ZHANG WJ, SUN HW, ZHANG Y, GAN LL, YUE ZY, ZOU QM, GUO G. Efficacy and pharmacological mechanism of pronase-enhanced low-dose antibiotics for *Helicobacter pylori* eradication[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2014, 58(6): 3348-3353.
- [108] FREDRIKSEN JH, ROSENQVIST E, WEDEGE E, BRYN K, BJUNE G, FRØHOLM LO, LINDBAK AK, MØGSTER B, NAMORK E, RYE U. Production, characterization and control of MenB-vaccine "Folkehelsa": an outer membrane vesicle vaccine against group B meningococcal disease[J]. NIPH Annals, 1991, 14(2): 67-80.
- [109] VAN DE WATERBEEMD B, STREEFLAND M, VAN DER LEY P, ZOMER B, VAN DIJKEN H, MARTENS D, WIJFFELS R, VAN DER POL L. Improved OMV vaccine against *Neisseria meningitidis* using genetically engineered strains and a detergent-free purification process[J]. Vaccine, 2010, 28(30): 4810-4816.
- [110] VAN DE WATERBEEMD B, STREEFLAND M, VAN KEULEN L, VAN DEN IJSSEL J, DE HAAN A, EPPINK MH, VAN DER POL LA. Identification and optimization of critical process parameters for the production of NOMV vaccine against *Neisseria meningitidis*[J]. Vaccine, 2012, 30(24): 3683-3690.
- [111] ZAVAN L, FANG HY, JOHNSTON EL, WHITCHURCH C, GREENING DW, HILL AF, KAPARAKIS-LIASKOS M. The mechanism of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane vesicle biogenesis determines their protein composition[J]. Proteomics, 2023, 23(10): 2200464.
- [112] JOHNSTON EL, GUY-VON STIEGLITZ S, ZAVAN L, CROSS J, GREENING DW, HILL AF, KAPARAKIS-LIASKOS M. The effect of altered pH growth conditions on the production, composition, and proteomes of *Helicobacter pylori* outer membrane vesicles[J]. Proteomics, 2024, 24(11): 2300269.
- [113] ZAVAN L, BITTO NJ, JOHNSTON EL, GREENING DW, KAPARAKIS-LIASKOS M. *Helicobacter pylori* growth stage determines the size, protein composition, and preferential cargo packaging of outer membrane vesicles[J]. Proteomics, 2019, 19(1-2): 1800209.
- [114] THÉRY C, WITWER KW, AIKAWA E, ALCARAZ MJ, ANDERSON JD, ANDRIANTSITOHAINA R, ANTONIOU A, ARAB T, ARCHER F, ATKIN-SMITH GK, AYRE DC, BACH JM. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the international society for extracellular vesicles and update of the MISEV2014 guidelines[J]. Journal of Extracellular Vesicles, 2018, 7(1): 1535750-1535792.
- [115] LI YF, SUN HW, GAO R, LIU KY, ZHANG HQ, FU QH, QING SL, GUO G, ZOU QM. Inhibited biofilm formation and improved antibacterial activity of a novel nanoemulsion against cariogenic *Streptococcus mutans* *in vitro* and *in vivo*[J]. International Journal of Nanomedicine, 2015, 10: 447-462.
- [116] LI CC, XUE H, DU XJ, NYARUABA R, YANG H, WEI HP. Outer membrane vesicles generated by an exogenous bacteriophage lysin and protection against *Acinetobacter baumannii* infection[J]. Journal of Nanobiotechnology, 2024, 22(1): 273-289.