

DOI: 10.13376/j.cbls/2022157

文章编号: 1004-0374(2022)11-1431-11

· 技术与应用 ·

外膜囊泡在肿瘤疫苗中的应用研究进展

孙 偲, 武彦昊, 郭佳亿, 白 杨, 郝慧芳*

(内蒙古大学生命科学学院, 呼和浩特 010000)

摘 要: 肿瘤发病率逐年上升, 对人类健康产生了极大的威胁。传统的肿瘤治疗方法包括手术、放射治疗、化学疗法及靶向治疗等, 但这些方法都有各自的局限性, 肿瘤的转移、复发及耐药性仍然是迫切需要解决的问题。肿瘤疫苗是肿瘤主动免疫治疗的主要方法, 其可分为预防性肿瘤疫苗和治疗性肿瘤疫苗。细菌外膜囊泡 (outer membrane vesicles, OMVs) 是一种由革兰氏阴性菌外膜产生的球状结构, 在促进细菌生长、感染宿主细胞中十分重要。OMVs 组成成分复杂, 有很强的免疫原性与不可复制性, 通过基因修饰还可将外源抗原呈递于囊泡膜表面, 因此 OMVs 具有作为疫苗、疫苗佐剂以及优良的外源抗原载体的潜力。在肿瘤免疫治疗中, 以 OMVs 为载体将肿瘤抗原、抗癌药物或其他免疫相关因子运送到患者体内, 从而在患者体内建立抗肿瘤环境、杀死肿瘤细胞, 有着特异性强、不良反应少等优势。目前, 不少 OMVs 疫苗产品已经上市, 也有少数 OMVs 疫苗成功应用到肿瘤治疗的临床试验。本文就肿瘤疫苗、OMVs、OMVs 在疫苗和肿瘤疫苗方面的应用做一概述, 并对目前 OMVs 肿瘤疫苗的优势以及研发仍然需要克服的众多挑战进行总结, 为进一步开展 OMVs 在肿瘤疫苗中的应用研究做一参考辅助。

关键词: 肿瘤; 肿瘤免疫治疗; 肿瘤疫苗; 外膜囊泡; 重组外膜囊泡疫苗

中图分类号: R730.51 文献标志码: A

Research progress on the application of outer membrane vesicles in tumor vaccine

SUN Cai, WU Yan-Hao, GUO Jia-Yi, BAI Yang, HAO Hui-Fang*

(School of Life Sciences, Inner Mongolia University, Hohhot 010000, China)

Abstract: The morbidity of tumors is increasing year by year, which poses a great threat to human health. Traditional cancer treatment methods include surgery, radiotherapy, chemotherapy and targeted therapy. However, these methods have their own limitations. Metastasis, recurrence, and drug resistance of tumors are still urgent problems to be solved. Tumor vaccine is the main method of tumor active immunotherapy, which can be divided into preventive tumor vaccine and therapeutic tumor vaccine. Outer membrane vesicles (OMVs) are spherical structures produced by the outer membrane of Gram-negative bacteria, which are very important in promoting bacterial growth and infecting host cells. OMVs have complex components, strong immunogenicity and non-replicability, and exogenous antigens can also be presented on the surface of vesicles by gene modification, so OMVs have the potential to become vaccines, vaccine adjuvants and excellent carriers of exogenous antigens. In tumor immunotherapy, OMVs can be used as carriers to deliver tumor antigens, anticancer drugs or other immune-related factors to patients, so as to establish an anti-tumor environment in patients and kill tumor cells, which have the advantages of strong specificity and fewer adverse reactions. At present, many OMVs vaccine products have

收稿日期: 2022-05-29; 修回日期: 2022-09-02

基金项目: 国家自然科学基金项目(31860309, 31960669); 内蒙古自然科学基金项目(2020ZD15); 内蒙古大学校级大学生创新创业训练计划项目(202214330); 内蒙古大学2020年校级本科教学改革研究与建设项目(NDJG-20-65); 内蒙古大学2021年度校级线上、线上线下混合式一流本科课程建设项目(NDJG-21-21)

*通信作者: E-mail: 111981355@imu.edu.cn; Tel: 0471-4992435

been marketed, and a few OMVs vaccines have been successfully applied to clinical trials of cancer treatment. In this paper, the tumor vaccines, OMVs, and the application of OMVs in tumor vaccines are reviewed, the advantages of OMVs tumor vaccines and many challenges to be overcome in research and development are summarized, aiming to provide references for further research on the application of OMVs in tumor vaccines.

Key words: tumor; tumor immunotherapy; tumor vaccine; outer membrane vesicles; recombinant outer membrane vesicle vaccine

1 肿瘤疫苗

肿瘤发病率呈逐年上升趋势,对人类健康产生了极大的威胁^[1]。传统的肿瘤治疗方法包括手术切除肿瘤、放射治疗、化学疗法和靶向药物治疗等,但它们都有各自的缺点:(1)手术切除难以将肿瘤切除干净,易造成术后复发;(2)放射治疗和化学疗法不仅会直接杀伤肿瘤细胞,还会对人体的正常组织细胞造成损伤,副作用大;(3)靶向药物治疗可以选择性杀死肿瘤细胞而极少损伤正常组织与细胞,其不良反应较小,但容易使肿瘤细胞产生耐药性,增大肿瘤复发风险^[2-3]。针对以上传统肿瘤治疗方法的不足之处,科学家和临床医生都在努力建立和发展新型肿瘤治疗方法。近年来肿瘤免疫疗法蓬勃发展,为肿瘤的治疗带来新的希望。

近年来随着人们对外膜囊泡(outer membrane vesicles, OMVs)的研究不断深入,基于OMVs的抗菌疫苗已取得丰富的成果,为应对耐药菌的防治提供了希望。在分子生物学的帮助下,OMVs丰富的外膜蛋白可以通过修饰携带外源蛋白,因此人们将大肠杆菌等细菌开发成新型疫苗平台,在靶向治疗肿瘤等领域有重要应用前景。本文围绕OMVs在肿瘤治疗方面的研究进展做一概述,为进一步开展OMVs在肿瘤疫苗中的应用研究做一参考辅助。

1.1 肿瘤免疫治疗

肿瘤的发生和发展是一个机体的免疫系统和肿瘤细胞互相博弈的过程。免疫系统在肿瘤发生中既可以起到清除肿瘤细胞的作用,也可以促进肿瘤的生长和转移^[4]。肿瘤免疫治疗可分为主动免疫治疗、被动免疫治疗和免疫调节策略:(1)肿瘤主动免疫治疗是通过增强患者自身免疫系统的免疫力,从而激活针对肿瘤抗原的免疫应答^[5];(2)被动免疫治疗是给机体输入外源性免疫效应物质如相关抗体和效应细胞等,从而在宿主体内发挥抗肿瘤作用^[5];(3)免疫调节策略则不针对特异性抗原,而是通过增强免疫应答能力和放大抗癌免疫反应达到杀伤效果,其中最主要的是免疫检查点治疗^[3]。

1.2 肿瘤疫苗

肿瘤疫苗是利用肿瘤相关抗原(tumor-associated antigens, TAAs)、肿瘤多肽或肿瘤细胞裂解产物等诱导机体产生肿瘤特异性免疫应答,保护机体免受肿瘤细胞侵袭,实现对肿瘤的预防和治疗^[6]。肿瘤疫苗按生产原理可分为全细胞疫苗、多肽疫苗、基因工程疫苗和单克隆抗体疫苗等类别。根据使用目的,其又可分为预防性肿瘤疫苗和治疗性肿瘤疫苗两大类,如表1所示。已有临床试验证实,肿瘤全细胞疫苗、肿瘤特异性蛋白或多肽疫苗以及肿瘤核酸疫苗在肿瘤治疗过程中展现了巨大的应用潜力^[22]。

相对其他肿瘤治疗方法,肿瘤疫苗的突出优势在于:(1)肿瘤疫苗利用机体自身免疫系统而非手术、放射等手段,通过携带肿瘤特异性抗原,产生肿瘤特异性免疫应答,并且可以在一定程度上减小癌症复发率^[23-25];(2)肿瘤疫苗激活细胞免疫与体液免疫,可产生更长时间的免疫记忆,抗肿瘤作用更为持久^[26-27];(3)肿瘤疫苗种类多样,治疗方法相对传统方法选择更多,可治愈的肿瘤类型更广,新抗原结合基因工程等技术也体现了其灵活性与先进性^[28-30];(4)肿瘤疫苗安全性高,产生的副作用较小^[31];(5)部分肿瘤疫苗能够有效地降低抗体药物治疗所致的耐药性,避免了反复用药以及其他化疗药物的严重毒副作用等缺陷^[32];(6)此外,肿瘤疫苗还兼具对肿瘤的预防作用以及化疗后的辅助治疗作用^[33-34]。但目前,肿瘤疫苗存在治疗效果较差、需要搭配其他免疫抑制剂使用的弊端^[35];与普通疫苗相比,肿瘤疫苗的特异性肿瘤抗原的选择存在困难,且需要较长的研发时间^[36-37];除此以外,肿瘤疫苗突变或其产生的强副作用等安全性问题也是其发展中的关键限制性因素^[38]。研究者仍需进一步在增强疫苗免疫原性、克服肿瘤免疫逃避机制、提高疫苗安全性等问题上继续寻求更好的改进方法。

2 外膜囊泡

2.1 外膜囊泡的结构和成分

细菌普遍可自然衍生一种纳米级膜囊泡,即细

表1 全球部分已上市和处于III期临床试验阶段的肿瘤疫苗(截至2021年初)

疫苗名称	研发单位	针对的肿瘤	研究阶段	参考文献
BCG疫苗	成都生物制品研究所(中国)	膀胱癌	中国(2013年底), 已上市	[7]
BCG疫苗	MSD OSS BV (荷兰); 默沙东(英国)	膀胱肿瘤	荷兰(2019年2月), 已上市	[7]
M-Vax	Technologies (美国)	黑色素瘤	瑞士(2000年7月), 已上市; 欧洲、美国、以色列(2007年11月), 启动III期临床试验	[8]
Melacine	Corixa (美国); Schering-Plough (美国)	黑色素瘤	加拿大(2001年2月), 已上市	[9]
HybriCell	Genoa Biotecnologia SA (巴西)	黑色素瘤、肾细胞癌	巴西(2005年4月), 已上市	[10]
Sipuleucel-T	Dendreon (美国); 上海丹瑞生物医药科技有限公司(中国)	转移性去势抵抗性前列腺癌	美国(2010年5月), 已上市	[11]
DCVax-Brain	Northwest Biotherapeutics (美国)	胶质母细胞瘤	德国(2014年10月), 已上市; 美国(2012年5月)、英国(2013年5月)、加拿大(2015年2月), 启动III期临床试验	[12]
CimaVax EGF	北京精益泰翔技术发展有限公司(中国); 百泰生物(中国); Bioven Holdings SdnBhd (马来西亚); 创新免疫疗法联盟SA (美国); 分子免疫中心(古巴)	肺癌、非小细胞肺癌	古巴(2008年6月), 已上市; 欧洲(2013年3月), 启动III期临床试验	[10,13]
Rocapuldencel-T (AGS-003®)	Argos Therapeutic (美国)	肾癌	美国(2013年初), 已完成III期临床试验	[14-15]
OSE-2101	IDM Pharma (美国); OSE Immunotherapeutics (法国)	非小细胞肺癌、胰腺癌	法国(2016年2月), 已启动III期临床试验	[14]
VGX-3100	Inovio Pharmaceuticals (美国)	宫颈癌	美国(2017年6月), 已启动III期临床试验	[16]
AXAL	Advaxis Immunotherapeutics (美国)	HPV 引起的宫颈癌	美国(2016年9月), 已启动III期临床试验	[17]
Gemogenovatumel-T (Vigil®)	Gradalis (美国)	卵巢癌、乳腺癌	美国(2020年6月), 已完成III期临床试验	[18]
Eltrapuldencel-T	NeoStem Oncology (美国)	黑色素瘤	美国(III期临床试验进行中)	[19]
GV1001	KAEL-GemVax (韩国)	胰腺癌、黑色素瘤、非小细胞肺癌等	韩国(III期临床试验进行中)	[14]
Onco-Vax	Vaccinogen (美国)	结肠癌、肾癌、黑色素瘤	美国(III期临床试验进行中)	[18]
PAS (Gastrimmune)	Aphton (美国)	胰腺癌、胃癌和结直肠癌	美国(III期临床试验进行中)	[20]
大肠癌树突状细胞治疗性疫苗 (APDC)	曹雪涛院士研究团队(中国)	大肠癌	中国(已启动III期临床试验)	[2]
Adagloxad simolenin (OBI-822, OPT-822, GloboH-KLH)	斯隆凯特琳癌症中心(MSKCC)(美国)	转移性乳腺癌	中国台湾(已启动III期临床试验)	[21]
ProstAtak® (AdV-tk+ valacyclovir)	Advantagene (美国)	前列腺癌(预防肿瘤复发)	启动III期临床试验(其他适应证临床试验开展中)	[14]

菌胞外囊泡 (bacterial extracellular vesicles, bEVs), 在革兰氏阳性菌 (G⁺) 与革兰氏阴性菌 (G⁻) 中有差异。革兰氏阴性菌产生的 bEVs 为 OMVs, 而革兰氏阳性菌产生的 bEVs 称为胞质膜囊泡 (cytoplasmic membrane vesicles, CMVs)^[39]。外膜囊泡大多数为球形双层膜状结构, 少数古细菌还存在着管状、细长状结构^[40], 大小不一, 粒径介于 20~300 nm 之间。如图 1 所示, OMVs 组成成分较复杂, 主要为外膜和周质成分, 也包含少量细胞内成分; 其结构外层包含脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS)、外膜蛋白、受体等, 其内层包含 DNA、RNA、肽聚糖、胞内蛋白等^[41-42]。其中的蛋白质种类十分丰富, 主要包括酶、分子伴侣、毒素蛋白、菌毛蛋白等毒力因子, 还包括部分执行运输功能的蛋白^[43]。外膜囊泡由细菌外膜产生, 但不同的细菌中外膜囊泡的组成具有多样性。已有研究在黏质沙雷氏菌 OMVs 中检测到了其他细菌外膜所不具备的 MipA 蛋白质^[44], 还有研究在铜绿假单胞菌中发现其外膜脂多糖成分中多了一种与其他外膜相区别的 A 型脂多糖^[45]。

2.2 外膜囊泡的产生

2.2.1 外膜囊泡产生机制

外膜囊泡产生机制主要有三种假说^[43,46-48]。(1) 肽聚糖与外膜的交联作用。革兰氏阴性菌膜结构由外膜层 (OM) 和内膜层 (IM) 组成, 细胞周质腔位于二者之中, 其上分布有薄肽聚糖层 (PG), 发挥连接内外膜层的作用^[49]。脂蛋白 (lipoprotein, LPP) 在 OMVs 的生物发生过程中起着至关重要的作用, 其

有助于 OM-PG 的连接。当受到某种刺激时, 部分 LPP 被酶水解, PG 结构改变, LPP-PG 交联键减少, 局部外膜突出, 向外释放 OMVs^[50]。(2) 脂质 A 的修饰作用。脂质 A 是 OMVs 外膜 LPS 中的重要活性物质, 在外膜不对称性以及结构改变中非常重要^[51]。脂质 A 的去酰基化会引起外膜的重塑, 增大外膜曲率, 从而促进外膜囊泡的产生。(3) 积累聚集作用。由于周质蛋白或肽聚糖片段在 OM 和 PG 层之间的周质空间积累, OMVs 可以通过 OM 的向外压力释放, 诱导 OMVs 产生的周质蛋白富集于内膜, 对膜产生压力; 当 OM-PG 连接被移除时, 细菌 OM 向外膨胀, 导致 OMVs 的形成^[50]。OMVs 体积小、抗原性强、运输能力好, 是疫苗的重要备选。为了更好地提高 OMVs 产量以制备疫苗并投入临床, 还需要进一步地研究 OMVs 的产生机制。

2.2.2 外膜囊泡产量的提高与纯化

细菌在自然情况下产生的外膜囊泡 (nOMVs) 相对较少、纯度较低, 若只依赖 nOMVs 投入疫苗的制备是远不能满足工业化生产的, 目前已有一些提高 OMVs 产量的方法。(1) 利用洗涤剂 (如脱氧酸盐) 提取不溶性外膜蛋白的聚集物。由于洗涤剂对 LPS 与蛋白质的去除, 洗涤剂提取的 OMVs (detergent-extracted OMVs, dOMVs) 具有低毒性的优点^[50,52]。(2) 通过基因工程的方法, 产生突变体衍生的 OMVs (mutant-derived OMVs, mdOMVs), 也被称为膜抗原的通用模块 (generalized modules for membrane antigens, GMMA)。其常见方法是敲除

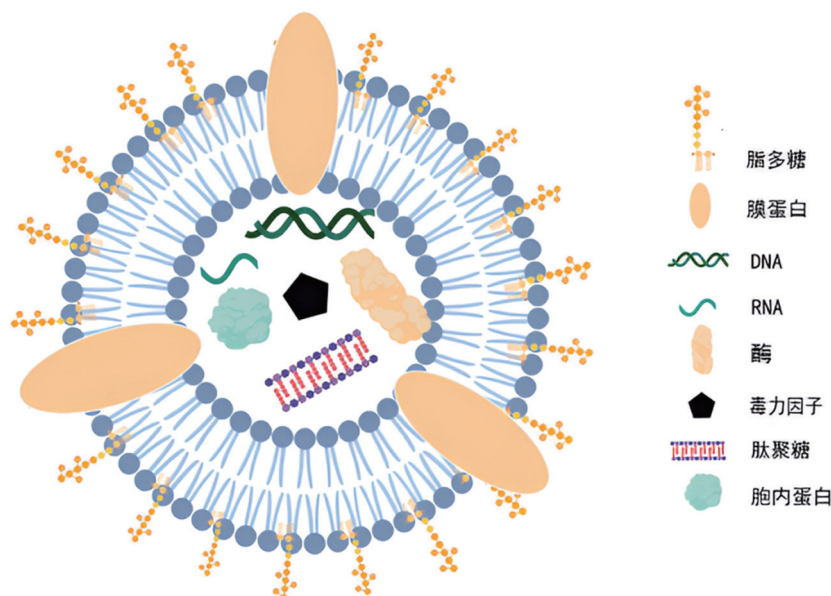


图1 OMVs结构及主要成分

Tol-Pal^[53-56] 基因, 但是在大肠杆菌中该基因的敲除会使 LPS 缺失, 影响其免疫原性^[57], 因此可以通过敲除 *nlpI* 基因来提高大肠杆菌 mdOMV 的产量; 还有研究发现, 在鲍曼不动杆菌中, 锌摄取调节因子 (*Zur*) 调节表达的脂蛋白 A (*ZrlA*) 的缺失增加了 OMVs 的产生, *AzrlA* 突变菌株产生的 mdOMVs 数量是野生型菌株的近 10 倍^[58]; 希瓦氏菌敲除 *degQ* 基因后, 其 mdOMVs 的产量提高了 5 倍^[59]; 在流感嗜血杆菌等多种菌株中均发现, 铁摄取蛋白基因与 OMVs 产量可能存在紧密的联系^[60]; 此外, 大肠杆菌外膜蛋白酶 *OmpT* 基因的过表达显著提高了 OMVs 的产量^[61]。这些实验证明, 通过基因工程的手段能够明显提高 OMVs 的产量。(3) 通过改变氧浓度, 增加细菌培养物的溶解氧张力, 增强其氧化应激进而促进 OMVs 释放。有研究表明, 当大幅提高脑膜炎奈瑟菌培养物环境中的空气饱和度进而增加氧张力时, 能够使其 OMVs 产量提高数倍^[62]。纯化 nOMVs 的方法则很简单, 只要通过两次正切流动过滤 (TFF) 即可分离可溶性蛋白和其他杂质^[63-64], mdOMVs 也可以用 TFF 提取。对于 dOMVs, 洗涤剂提取的 OMVs 通常是不均匀的, 需要超声等更复杂的步骤提取^[65]。

2.3 外膜囊泡生物学作用

2.3.1 外膜囊泡在细菌生长中的作用

革兰氏阴性菌普遍可以产生 OMVs, 这表明 OMVs 很可能对革兰氏阴性菌的生长起积极作用。(1) OMVs 可以增强细菌的环境耐受能力, 使菌体在不利环境中更有强大的生命力^[43]。(2) OMVs 在细菌的营养摄取中发挥着不可或缺的作用。研究发现, 有的细菌可以将蛋白酶与糖苷酶装到 OMVs 中, 通过杀死环境中的其他细菌来获得更多的营养物质^[66]。除了这种方式以外, OMVs 本身也可以作为一种营养物质, 如圆绿球藻的 OMVs 就可以作为另外两种细菌的碳源^[67]。(3) OMVs 已经被证明能够贮存和运输多种多样的生物分子, 在细菌交流中起着信息传递的作用^[68]。(4) OMVs 在细菌防御系统中也十分重要。有实验证实 OMVs 可以作为 T4 噬菌体的作用靶点, 从而达到保护细菌自身的目的^[69]。此外, 研究发现, 金黄色葡萄球菌可以通过分泌 OMVs 的方式, 将抗药性传递给大肠杆菌^[70], 进一步证实了 OMVs 在细菌防御系统中的重要性。

2.3.2 外膜囊泡对宿主细胞作用

对于感染细菌的宿主细胞来说, 细菌分泌的 OMVs 会对机体的免疫系统有一定的损害, 从而促

进细菌的感染。有研究表明: (1) 细菌的 OMVs 可以与宿主细胞进行信息交流, 传递毒力因子, 从而增强细菌的致病性^[71]; (2) 一些病原菌的 OMVs 中携带病原相关分子模式 (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs), 可以被宿主细胞不同部位表达的模式识别受体 (pattern recognition receptors, PRRs) 感知识别, 促进炎症因子的表达和分泌, 并引发炎症反应^[72-75], 例如肺炎克雷伯菌 OMVs 可携带毒力因子或 LPS、外膜孔蛋白等靶向作用于宿主细胞, 从而引发炎症反应^[76]; (3) OMVs 还可以诱导宿主细胞发生细胞凋亡和细胞焦亡。OMVs 可以通过激活细胞内线粒体途径, 引发线粒体诱导的细胞凋亡^[32,77]。例如, 在鲍曼不动杆菌和致病性大肠杆菌中, 其 OMVs 携带外膜蛋白或蛋白毒素定位到线粒体, 并诱导细胞色素 C 的释放, 进而诱导凋亡小体形成, 激活介导凋亡的 caspase-9 和 caspase-3, 导致细胞凋亡的发生^[78-80]。有些细菌的 OMVs 则能够诱导宿主细胞发生焦亡, 如肠细菌, 其 OMVs 可以携带 LPS 并被胞质内 PRRs 识别从而激活 caspase-11/4/5, 将 gasdermin D (GSDMD) 的 N 末端裂解为片段, 导致细胞焦亡^[81-82]。铜绿假单胞菌和鼠伤寒沙门氏菌的 OMVs 也可以通过经典通路诱发细胞焦亡, 如这些细菌的 OMVs 在小鼠巨噬细胞中可以激活 NLRC4 炎性小体, 介导 caspase-1 的活化和炎性细胞因子如 IL-1 β 的分泌, 从而引起细胞焦亡^[77]。

3 外膜囊泡在肿瘤疫苗中的应用

OMVs 在结构和成分上的特点使其具有与活菌类似的免疫诱导能力, 在疫苗研发中有着巨大的应用潜力。目前利用脑膜炎奈瑟菌 OMVs 制成的疫苗已经成功上市, 且取得了较好的保护效果^[83], 这一研究揭示了 OMVs 作为疫苗的可行性。细菌的 OMVs 对宿主有显著的免疫激活作用, 具有全面的免疫原性, 有望开发为新的疫苗佐剂。由于 OMVs 可以通过基因工程或与毒粒融合使外膜囊泡携带特定抗原, 在重组疫苗方面也有巨大的研究前景。

3.1 外膜囊泡作为肿瘤疫苗佐剂

OMVs 作为胞外载体, 携带了许多与细菌毒力相关的蛋白质, 具有与活菌相似的免疫诱导能力; 不同的抗原蛋白可以通过基因工程技术表达在 OMVs 上, 从而有效激活机体的特异性免疫; 部分细菌所产生的 OMVs 并不具有高毒力, 使其在加强免疫应答的同时副作用比较低。OMVs 可被 Raw264.7 及骨髓树突细胞 (BMDCs) 高效摄取, 这与 OMVs

的纳米结构关系密切, OMVs 还能够促进 BMDCs 表面共刺激分子 CD80、CD86、CD83、CD40 等的高表达及 TNF- α 的分泌, 从而促进 BMDCs 的功能成熟, 可以作为一种良好的免疫佐剂^[84]。2011 年, 研究人员将脑膜炎奈瑟氏菌 OMVs 与 HIV 的病毒样颗粒结合, 显著提高了小鼠血清中以 IgG2a 为主的抗 HIV-1 免疫蛋白含量^[85], 证明了外膜囊泡在疫苗的研发中可以起到类似佐剂的重要作用。

在肿瘤疫苗的研发过程中, 外膜囊泡同样起到了重要的作用。2020 年, 研究人员将减毒的沙门氏菌的外膜囊泡与纳米药物结合, 在动物模型上呈现出了针对黑色素瘤的更好的保护效果^[86]; 同年, 研究人员将细菌外膜囊泡与 B16F10 细胞的细胞膜融合, 融合后形成的 OMV-CC 杂交膜对机体的黑色素瘤特异性免疫激活出现了显著的增强效果^[87], 证明了 OMVs 可增强机体对抗原或者免疫原的免疫应答能力, 且具有一定的特异性和抗肿瘤作用^[88]。综上所述, 细菌外膜囊泡在肿瘤疫苗的研发中可以作为一种有潜力的免疫佐剂, 与其他传统的用于肿瘤疫苗的佐剂相比, 细菌外膜囊泡具有副作用更小、特异性更强的特点。虽然目前尚未有外膜囊泡作为佐剂的肿瘤疫苗投入临床试验, 但大量的实验数据均证明了细菌外膜囊泡作为免疫佐剂的可行性。

3.2 外膜囊泡作为肿瘤疫苗递送系统

细胞溶素 A (cytolysin A, ClyA) 是一种 34 kD 的成孔蛋白, 其可以作为引导序列将 C 端融合的外源蛋白定位在菌体及其所分泌的 OMVs 的外膜上,

且将外源蛋白暴露于外膜囊泡外部, 而暴露于表面或分泌的抗原一般相对于细胞质中的抗原免疫原性更强^[89]。如图 2 所示, ClyA 单体进入到周质空间后, 依靠特殊的疏水结构与外膜脂双分子层融合, 随 OMVs 的释放进入宿主^[89]。2008 年, 研究人员通过构建绿色荧光蛋白 (GFP) 连接到 ClyA C 端的重组质粒并转化到大肠杆菌 DH5 α 菌株中, 成功分离得到了大量携带 GFP 蛋白的 OMVs^[90]。由此揭示了细菌外膜囊泡可以呈递外源蛋白的特性, 以及重组外膜囊泡构建与表达的灵活性, 发现了其作为一种理想的递送系统的潜力。基于上述发现, 研究人员开始将 OMVs 作为疫苗的抗原递送系统。2018 年, 黄杰等^[91]利用类似的方法将猪痘病毒 E2 蛋白表达在细菌外膜囊泡上, 由此提出了一种有潜力的疫苗构建模型。

合适的递送系统同样也是肿瘤疫苗研发的必要条件。近年来在肿瘤疫苗领域, ClyA 作为外膜囊泡递送系统的可行性被大量实验所证实。2017 年, 王世杰^[84]利用带有 ClyA 的质粒成功表达 HPV16 的 E7 蛋白并呈递到大肠杆菌 OMVs 表面, 对 TC-1 肿瘤模型有一定的治疗性干预作用。2021 年, Cheng 等^[92]尝试利用 ClyA 平台使 OMVs 携带肿瘤抗原并取得成功, 在小鼠实验中成功激活树突状细胞诱导的免疫反应, 并且具有长期免疫记忆。2022 年, Sepahdar 等^[93]将 EGFR 的特异性抗体通过 ClyA 成功表达在细菌外膜囊泡表面, 并且成功将外膜囊泡递送到靶细胞, 展现出了对癌细胞的杀伤

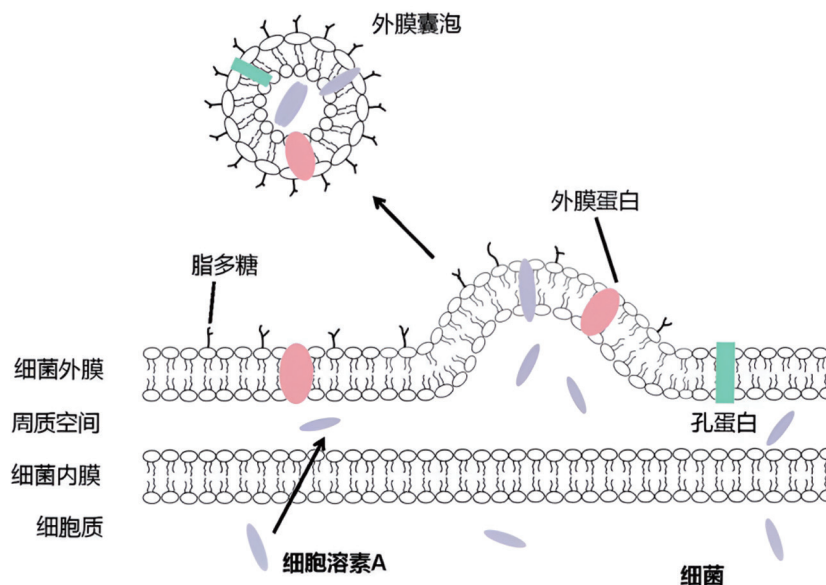


图2 ClyA由外膜囊泡介导的分泌途径

作用。此外, Yue 等^[94]借助肠道共生菌分泌的 OMVs, 将小鼠免疫球蛋白 G (IgG)、肿瘤抗原连接于 ClyA 的 C 端, 由阿拉伯糖 (Ara) 启动子控制, 设计了一种新型的口服 OMVs 肿瘤疫苗, 突破了传统口服肿瘤疫苗载体无法穿过肠上皮屏障的弊端, 也为外膜囊泡肿瘤疫苗的开发提供了一种新思路。

3.3 免疫原性与安全性的平衡

OMVs 已经被证明是一种有潜力的疫苗递送平台, 通过基因工程改造的 OMVs 在动物模型上展现出对肿瘤的治疗作用与预防作用, 提示了细菌 OMVs 肿瘤疫苗的可行性; 但由于 OMVs 本身的特性, 其有一定几率引发机体的不良炎症反应, 因此在 OMVs 肿瘤疫苗的免疫原性和安全性的平衡方面仍有不足。目前相关研究表明: OMVs 的毒性主要体现在 LPS 上, 经过洗涤剂处理产生的 OMVs 中脂蛋白和脂多糖含量下降, 毒性降低, 但相应的免疫原性也有所降低, 而且洗涤剂处理的 OMVs 结构有所损坏, 容易受到胞质蛋白的污染^[95]。因此, 目前具有优势的方法是通过筛选合适菌株或者对细菌进行基因修饰制备合适的 OMVs。2017 年, 陈琪等^[96]利用减毒沙门氏杆菌分泌的 OMVs 成功制备出了一种安全性较高的纳米载体, 有着良好的免疫调节作用, 且这种由减毒沙门氏菌分泌的 OMVs 在 2020 年被证明在肿瘤治疗中同样存在一定的抗肿瘤作用, 能够抑制黑色素瘤的转移^[97]; 也有研究证实, 将脑膜炎球菌中类脂 A 合成相关酰基转移酶基因进行突变, 使六酰化 LPS 变为五酰化 LPS, OMVs 毒性有所降低^[98]; 基因敲除鼠伤寒沙门菌 *msbB* 基因也能够得到低内毒素的 OMVs^[99]; 与筛选适宜菌株相比, 基因修饰制备的 OMVs 可以在降低毒性的基础上, 删除不必要的抗原, 过表达所需抗原, 提升诱发免疫反应的广度和幅度^[95]。此外, OMVs 来源于细菌分泌, 在引发预期免疫反应的同时也可能诱发非期望反应, 这种反应有几率消耗预期反应, 因此这两者之间寻找合适的平衡点对制备疫苗也十分重要^[100]。要想平衡 OMVs 的免疫原性与安全性, 仍需要积累大量的专业知识并投入大量时间来寻找平衡方案, 包括质粒载体的选择、引导序列的确定、动物实验的设计, 从而完善对 OMVs 肿瘤疫苗安全性的评估流程; 此外, 目前在 OMVs 上表达外源蛋白的技术尚不成熟, 如果能够开发一种可操作度更高的生物工程技术, 同时将多种外源蛋白稳定表达在 OMVs 表面, 将会推动相关平衡研究, 从而开发出一种同时兼具安全性与免疫原性的新型肿瘤疫苗。

综上所述, OMVs 在肿瘤疫苗中应用的优势主要有以下五点: (1) OMVs 自身具有天然佐剂活性, 能够刺激免疫系统, 产生持久、高效的抗肿瘤反应^[39]; (2) OMVs 表面的抗原可以通过基因工程等手段进行改造, 从而增强特异性; (3) 重组 OMVs 递送平台具有高肿瘤定位性, 可以作为特异性靶标, 激发特异性肿瘤免疫反应^[39,101]; (4) 工程 OMVs 的大规模生产更具环境友好性, 低成本, 高产量, 无需冗长且昂贵的抗原纯化^[102]; (5) 作为一种纳米颗粒, OMVs 较稳定, 不容易降解, 易与其他合成材料相结合^[103]。但是, OMVs 产生机制仍停留在假说阶段, 其具体免疫机制也需进一步研究, 生产质量好、纯度水平高、安全性好的 OMVs 的技术尚不成熟^[104]。此外, OMVs 内毒素中的 LPS 可引起人体强烈的炎症反应, 要将 OMVs 作为一种肿瘤疫苗, 仍需要对其毒性进行进一步的研究^[105]。OMVs 对不同肿瘤间的治疗作用也存在差异, 且这种差异较为复杂, 这些因素导致 OMVs 尚未在肿瘤疫苗研发中被广泛应用^[106]。要将细菌 OMVs 作为一种肿瘤疫苗生产平台, 还需要对其安全性与免疫原性的平衡展开进一步的研究与讨论, 从而确定最合适的方案。

4 展望

几十年来, 以 OMVs 为平台开发的疫苗已广泛开展测试, OMVs 通过呈递外源抗原激活机体的免疫系统, 可以作为一种有潜力的肿瘤疫苗递送平台, 其固有特性更支持它诱导强免疫反应的能力。但目前对 OMVs 的作用机理了解甚少, 仍然需要更多的研究来阐明, 以推动 OMVs 肿瘤疫苗的研发。虽然通过基因工程改造的 OMVs 在动物模型上展现出对肿瘤的治疗作用与预防作用, 提示了 OMVs 肿瘤疫苗的可行性, 但基因操作也存在改变 OMVs 免疫原性或其他重要特征的可能, 需要花费大量时间并积累足够的专业知识来寻找不影响 OMVs 免疫原性以及其它特征的方案。到目前为止, 科学家仅在大肠杆菌的 OMVs 中形成了较为成熟的外源蛋白表达技术, 这表明在 OMVs 上高水平表达外源抗原可能较为困难, 开发一种可以促进外源蛋白表达并且具有已知表达系统的 OMVs 将解决这一难点。一种使细菌表达外源蛋白并释放到 OMVs 的新方案是 Hbp 自动转运平台: 通过重组质粒将大肠杆菌血红蛋白酶 (Hbp) 基因的一个胞外区段替换成外源基因, 从而在大肠杆菌膜表面表达融合蛋白, 实现在外膜囊泡上同时表达多个抗原段^[107], 但尚未有人将这

种方法运用到肿瘤疫苗的开发当中。

总之, OMVs 是一种很有前途的肿瘤疫苗开发技术, 它具有免疫原性, 易于分离提取, 且具有纳米颗粒的特点, 这些特点使它成为一种低成本疫苗生产的候选材料, 为肿瘤疫苗研发提供了一种新的思路, 也为肿瘤治疗提供了新的理论依据。

[参 考 文 献]

- [1] 王贝茹, 张思远, 魏陈秋. 肿瘤免疫治疗的研究现状及应用. 中外医学研究, 2019, 17: 184-6
- [2] 杜海洲. 国际治疗性肿瘤疫苗的开发与研究进展. 药学进展, 2018, 42: 685-96
- [3] 邢续扬, 王孝春, 何伟. 肿瘤免疫治疗及其药物研发进展. 中国药科大学学报, 2021, 52: 10-9
- [4] 李龙, 谢成英, 郑明月, 等. 肿瘤免疫治疗研究进展. 自然杂志, 2021, 43: 391-9
- [5] 施米丽, 刘晓波. 肿瘤的免疫疗法及其作用机制概述. 动物医学进展, 2018, 39: 114-8
- [6] Allahverdiyev A, Tari G, Bagirova M, et al. Current approaches in development of immunotherapeutic vaccines for breast cancer. *J Breast Cancer*, 2018, 21: 343-53
- [7] Sylvester RJ. Bacillus Calmette-Guérin treatment of non-muscle invasive bladder cancer. *Int J Urol*, 2011, 18: 113-20
- [8] Berd D. M-Vax: an autologous, hapten-modified vaccine for human cancer. *Expert Rev Vaccines*, 2004, 3: 521-7
- [9] Sosman JA, Sondak VK. Melacine: an allogeneic melanoma tumor cell lysate vaccine. *Expert Rev Vaccines*, 2003, 2: 353-68
- [10] Ogi C, Aruga A. Clinical evaluation of therapeutic cancer vaccines. *Hum Vaccin Immunother*, 2013, 9: 1049-57
- [11] 赵晓斌. 肿瘤疫苗的研究进展. 现代免疫学, 2016, 36: 81-5
- [12] Liao LM, Ashkan K, Tran DD, et al. First results on survival from a large phase 3 clinical trial of an autologous dendritic cell vaccine in newly diagnosed glioblastoma. *J Transl Med*, 2018, 16: 142
- [13] Popa X, García B, Fuentes KP, et al. Anti-EGF antibodies as surrogate biomarkers of clinical efficacy in stage IIIB/IV non-small-cell lung cancer patients treated with an optimized CIMAvax-EGF vaccination schedule. *Oncoimmunology*, 2020, 9: 1762465
- [14] Morse MA, Gwin WR 3rd, Mitchell DA. Vaccine therapies for cancer: then and now. *Target Oncol*, 2021, 16: 121-52
- [15] Figlin RA, Tannir NM, Uzzo RG, et al. Results of the ADAPT phase 3 study of Ropaplumab-T in combination with sunitinib as first-line therapy in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*, 2020, 26: 2327-36
- [16] Wang R, Pan W, Jin L, et al. Human papillomavirus vaccine against cervical cancer: opportunity and challenge. *Cancer Lett*, 2020, 471: 88-102
- [17] Mauricio D, Zeybek B, Tymon-Rosario J, et al. Immunotherapy in cervical cancer. *Curr Oncol Rep*, 2021, 23: 61
- [18] Khan ST, Montroy J, Forbes N, et al. Safety and efficacy of autologous tumour cell vaccines as a cancer therapeutic to treat solid tumours and haematological malignancies: a meta-analysis protocol for two systematic reviews. *BMJ Open*, 2020, 10: e034714
- [19] Javed A, Sato S, Sato T. Autologous melanoma cell vaccine using monocyte-derived dendritic cells (NBS20/eltrapuldencel-T). *Future Oncol*, 2016, 12: 751-62
- [20] Osborne N, Sundseth R, Gay MD, et al. Vaccine against gastrin, a polyclonal antibody stimulator, decreases pancreatic cancer metastases. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2019, 317: G682-93
- [21] Huang CS, Yu AL, Tseng LM, et al. Globo H-KLH vaccine adagloxad simolenin(OBI-822)/OBI-821 in patients with metastatic breast cancer: phase II randomized, placebo-controlled study. *J Immunother Cancer*, 2020, 8: e000342
- [22] 黄芸, 高建鹏, 王辉. 肿瘤疫苗临床研究评价及进展. 肿瘤学杂志, 2019, 25: 196-201
- [23] Huang M, Xiong D, Pan J, et al. Targeting glutamine metabolism to enhance immunoprevention of EGFR-driven lung cancer. *Adv Sci (Weinh)*, 2022, 9: e2105885
- [24] Bellone M, Ceccon M, Grioni M, et al. iNKT cells control mouse spontaneous carcinoma independently of tumor-specific cytotoxic T cells. *PLoS One*, 2010, 5: e8646
- [25] Andersen MH. The targeting of tumor-associated macrophages by vaccination. *Cell Stress*, 2019, 3: 139-40
- [26] 高丽, 李海霞, 施维, 等. 基于树突状细胞的抗肿瘤疫苗研究进展. 生命科学, 2021, 33: 1125-32
- [27] Cho H, Binder J, Weeratna R, et al. Preclinical development of a vaccine-based immunotherapy regimen(VBIR) that induces potent and durable T cell responses to tumor-associated self-antigens. *Cancer Immunol Immunother*, 2022, doi: 10.1007/s00262-022-03245-x
- [28] Liao Z, Huang J, Lo PC, et al. Self-adjuncting cancer nanovaccines. *J Nanobiotechnology*, 2022, 20: 345
- [29] Alarcon NO, Jaramillo M, Mansour HM, et al. Therapeutic cancer vaccines-antigen discovery and adjuvant delivery platforms. *Pharmaceutics*, 2022, 14: 1448
- [30] Liu C, Liu X, Xiang X, et al. A nanovaccine for antigen self-presentation and immunosuppression reversal as a personalized cancer immunotherapy strategy. *Nat Nanotechnol*, 2022, 1: 531-40
- [31] Grimmett E, Al-Share B, Alkassab MB, et al. Cancer vaccines: past, present and future; a review article. *Discov Oncol*, 2022, 13: 31
- [32] 林忠, 谢群莉, 李胜英, 等. HER-2/neu表位肿瘤疫苗研究进展. 中国临床药理学与治疗学, 2019, 24: 1046-52
- [33] 张哲. 新型个性化肺癌预防疫苗的研制及其作用机制[D]. 郑州: 郑州大学, 2020
- [34] Sobhani N, Scaggiante B, Morris R, et al. Therapeutic cancer vaccines: from biological mechanisms and engineering to ongoing clinical trials. *Cancer Treat Rev*,

- 2022, 109: 102429
- [35] Batista- Duharte A, Hassouneh F, Alvarez-Heredia P, et al. Immune checkpoint inhibitors for vaccine improvements: current status and new approaches. *Pharmaceutics*, 2022, 14: 1721
- [36] 冯炜红, 杜学明. 个体化肿瘤疫苗的作用机理及临床研究进展. *医学理论与实践*, 2022, 35: 1299-301
- [37] 虞淦军, 吴艳峰, 曹雪涛. 个性化新抗原肿瘤疫苗: 道阻且长, 未来可期. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2022, 29: 1-10
- [38] 范亲. 基于红细胞构建的生物活性材料在生物医学中的应用[D]. 江苏: 苏州大学, 2021
- [39] Xie J, Li Q, Haesebrouck F, et al. The tremendous biomedical potential of bacterial extracellular vesicles. *Trends Biotechnol*, 2022, 40: 1173-94
- [40] McCaig WD, Koller A, Thanassi DG. Production of outer membrane vesicles and outer membrane tubes by *Francisella novicida*. *J Bacteriol*, 2013, 195: 1120-32
- [41] 李笋, 戚远通, 苟强, 等. 外膜囊泡医学应用研究进展. *免疫学杂志*, 2021, 37: 179-84
- [42] Cai W, Kesavan DK, Wan J, et al. Bacterial outer membrane vesicles, a potential vaccine candidate in interactions with host cells based. *Diagn Pathol*, 2018, 13: 95
- [43] 赵光夫, 雷桂花, 彭远义. 细菌外膜囊泡合成机制, 功能及应用研究进展. *中国预防兽医学报*, 2018, 40: 761-5
- [44] 卞志标, 李冰, 勾红潮, 等. 革兰阴性菌外膜囊泡的研究进展. *畜牧与兽医*, 2020, 52: 136-42
- [45] Macdonald IA, Kuehn MJ. Stress-induced outer membrane vesicle production by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 2013, 195: 2971-81
- [46] Florez C, Raab JE, Cooke AC, et al. Membrane distribution of the *Pseudomonas quinolone* signal modulates outer membrane vesicle production in *Pseudomonas aeruginosa*. *mBio*, 2017, 8: e01034-17
- [47] Malinverni JC, Silhavy TJ. An ABC transport system that maintains lipid asymmetry in the Gram-negative outer membrane. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 8009-14
- [48] Roier S, Zingl FG, Cakar F, et al. Bacterial outer membrane vesicle biogenesis: a new mechanism and its implications. *Microb Cell*, 2016, 3: 257-9
- [49] Silhavy TJ, Kahne D, Walker S. The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2010, 2: a000414
- [50] Schwechheimer C, Kulp A, Kuehn MJ. Modulation of bacterial outer membrane vesicle production by envelope structure and content. *BMC Microbiol*, 2014, 14: 324
- [51] Bonnington KE, Kuehn MJ. Breaking the bilayer: OMV formation during environmental transitions. *Microb Cell*, 2017, 4: 64-6
- [52] van de Waterbeemd B, Mommen GP, Pennings JL, et al. Quantitative proteomics reveals distinct differences in the protein content of outer membrane vesicle vaccines. *J Proteome Res*, 2013, 12: 1898-908
- [53] Bernadac A, Gavioli M, Lazzaroni JC, et al. *Escherichia coli tol-pal* mutants form outer membrane vesicles. *J Bacteriol*, 1998, 180: 4872-8
- [54] Dubuisson JF, Vianney A, Hugouvieux-Cotte-Pattat N, et al. Tol-Pal proteins are critical cell envelope components of *Erwinia chrysanthemi* affecting cell morphology and virulence. *Microbiology (Reading)*, 2005, 151: 3337-47
- [55] Turner L, Praszquier J, Hutton ML, et al. Increased outer membrane vesicle formation in a *Helicobacter pylori tolB* mutant. *Helicobacter*, 2015, 20: 269-83
- [56] Mitra S, Sinha R, Mitobe J, et al. Development of a cost-effective vaccine candidate with outer membrane vesicles of a *tolA*-disrupted *Shigella boydii* strain. *Vaccine*, 2016, 34: 1839-46
- [57] Vinés ED, Marolda CL, Balachandran A, et al. Defective O-antigen polymerization in *tolA* and *pal* mutants of *Escherichia coli* in response to extracytoplasmic stress. *J Bacteriol*, 2005, 187: 3359-68
- [58] Kim N, Kim HJ, Oh MH, et al. The role of Zur-regulated lipoprotein A in bacterial morphology, antimicrobial susceptibility, and production of outer membrane vesicles in *Acinetobacter baumannii*. *BMC Microbiol*, 2021, 21: 27
- [59] Ojima Y, Mohanadas T, Kitamura K, et al. Deletion of *degQ* gene enhances outer membrane vesicle production of *Shewanella oneidensis* cells. *Arch Microbiol*, 2017, 199: 415-23
- [60] Roier S, Zingl FG, Cakar Fet al. A novel mechanism for the biogenesis of outer membrane vesicles in Gram-negative bacteria. *Nat Commun*, 2016, 7: 10515
- [61] Premjani V, Tilley D, Gruenheid S, et al. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* OmpT regulates outer membrane vesicle biogenesis. *FEMS Microbiol Lett*, 2014, 355: 185-92
- [62] Song T, Mika F, Lindmark B, et al. A new *Vibrio cholerae* sRNA modulates colonization and affects release of outer membrane vesicles. *Mol Microbiol*, 2008, 70: 100-11
- [63] Gerke C, Colucci AM, Giannelli C, et al. Production of a *Shigella sonnei* vaccine based on generalized modules for membrane antigens(GMMA), 1790GAHB. *PLoS One*, 2015, 10: e0134478
- [64] Gerritzen MJH, Salverda MLM, Martens DE, et al. Spontaneously released *Neisseria meningitidis* outer membrane vesicles as vaccine platform: production and purification. *Vaccine*, 2019, 37: 6978-86
- [65] van der Pol L, Stork M, van der Ley P. Outer membrane vesicles as platform vaccine technology. *Biotechnol J*, 2015, 10: 1689-706
- [66] Evans AGL, Davey HM, Cookson A, et al. Predatory activity of *Myxococcus xanthus* outer-membrane vesicles and properties of their hydrolase cargo. *Microbiology (Reading)*, 2012, 158: 2742- 52
- [67] Biller SJ, Schubotz F, Roggensack SE, et al. Bacterial vesicles in marine ecosystems. *Science*, 2014, 343: 183- 6
- [68] Aldick T, Bielaszewska M, Uhlin BE, et al. Vesicular stabilization and activity augmentation of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* haemolysin. *Mol Microbiol*, 2009, 71: 1496-508
- [69] Kulp A, Kuehn MJ. Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. *Annu Rev Microbiol*, 2010, 64: 163-84
- [70] Lee AR, Park SB, Kim SW, et al. Membrane vesicles from

- antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* transfer antibiotic-resistance to antibiotic-susceptible *Escherichia coli*. *J Appl Microbiol*, 2022, 132: 2746-59
- [71] 张智颖, 刘东娟, 潘亚萍. 牙龈卟啉单胞菌外膜囊泡的研究进展. *国际口腔医学杂志*, 2019, 46: 670-4
- [72] Cañas MA, Fábrega MJ, Giménez R, et al. Outer membrane vesicles from probiotic and commensal *Escherichia coli* activate NOD1-Mediated immune responses in intestinal epithelial cells. *Front Microbiol*, 2018, 9: 498
- [73] Kuipers ME, Hokke CH, Smits HH, et al. Pathogen-derived extracellular vesicle-associated molecules that affect the host immune system: an overview. *Front Microbiol*, 2018, 9: 2182
- [74] Man SM, Karki R, Kanneganti TD. DNA-sensing inflammasomes: regulation of bacterial host defense and the gut microbiota. *Pathog Dis*, 2016, 74: ftw028
- [75] Elizagaray ML, Gomes MTR, Guimaraes ES, et al. Canonical and non-canonical inflammasome activation by outer membrane vesicles derived from *Bordetella pertussis*. *Front Immunol*, 2020, 11: 1879
- [76] Lee JC, Lee EJ, Lee JH, et al. *Klebsiella pneumoniae* secretes outer membrane vesicles that induce the innate immune response. *FEMS Microbiol Lett*, 2012, 331: 17-24
- [77] Yang J, Hwang I, Lee E, et al. Bacterial outer membrane vesicle-mediated cytosolic delivery of flagellin triggers host NLRC4 canonical inflammasome signaling. *Front Immunol*, 2020, 11: 581165
- [78] Jin JS, Kwon SO, Moon DC, et al. *Acinetobacter baumannii* secretes cytotoxic outer membrane protein A via outer membrane vesicles. *PLoS One*, 2011, 6: e17027
- [79] Rumbo C, Tomás M, Fernández Moreira E, et al. The *Acinetobacter baumannii* Omp33-36 porin is a virulence factor that induces apoptosis and modulates autophagy in human cells. *Infect Immun*, 2014, 82: 4666-80
- [80] Deo P, Chow SH, Han ML, et al. Mitochondrial dysfunction caused by outer membrane vesicles from Gram-negative bacteria activates intrinsic apoptosis and inflammation. *Nat Microbiol*, 2020, 5: 1418-27
- [81] Macia L, Nanan R, Hosseini-Beheshti E, et al. Host- and microbiota-derived extracellular vesicles, immune function, and disease development. *Int J Mol Sci*, 2019, 21: 107
- [82] Santos JC, Dick MS, Lagrange B, et al. LPS targets host guanylate-binding proteins to the bacterial outer membrane for non- canonical inflammasome activation. *EMBO J*, 2018, 37: e980893
- [83] 刘畅, 李桂玲. 细菌外膜囊泡的研究及其在医药生物技术领域的应用进展. *中国医药生物技术*, 2018, 13: 452-57
- [84] 王世杰. 呈递HPV16E7抗原的重组细菌外膜囊泡在TC-1肿瘤模型中的治疗性干预[D]. 北京: 北京协和医学院, 2017
- [85] Aghasadeghi MR, Salmani AS, Sadat SM, et al. Application of outer membrane vesicle of *Neisseria meningitidis* serogroup B as a new adjuvant to induce strongly Th1-oriented responses against HIV-1. *Curr HIV Res*, 2011, 9: 630-5
- [86] 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: 11-21
- [87] Wang D, Liu C, You S, et al. Bacterial vesicle-cancer cell hybrid membrane-coated nanoparticles for tumor specific immune activation and photothermal therapy. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2020, 12: 41138-47
- [88] Kim OY, Park HT, Dinh NTH, et al. Bacterial outer membrane vesicles suppress tumor by interferon- γ -mediated antitumor response. *Nat Commun*, 2017, 8: 626
- [89] Murase K. Cytolysin A (ClyA): a bacterial virulence factor with potential applications in nanopore technology, vaccine development, and tumor therapy. *Toxins*, 2022, 14: 78
- [90] Kim JY, Doody AM, Chen DJ, et al. Engineered bacterial outer membrane vesicles with enhanced functionality. *J Mol Biol*, 2008, 380: 51-66
- [91] 黄杰, 龚永平, 文继峰, 等. 大肠埃希菌外膜囊泡递呈猪瘟病毒E2蛋白的表达及其免疫效果评价. *浙江农业学报*, 2018, 30: 1460-6
- [92] 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: 2041
- [93] Sepahdar Z, Miroliaei M, Bouzari S, et al. Surface engineering of *Escherichia coli*-derived OMVs as promising nano-carriers to target EGFR-overexpressing breast cancer cells. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 719289
- [94] Yue Y, Xu J, Li Y, et al. Antigen-bearing outer membrane vesicles as tumour vaccines produced in situ by ingested genetically engineered bacteria. *Nat Biomed Eng*, 2022, 6: 898-909
- [95] Micoli F, MacLennan CA. Outer membrane vesicle vaccines. *Semin Immunol*, 2020, 50: 101433
- [96] 陈琪, 吴敏, 白宏震, 等. 细菌外膜囊泡纳米载体的制备及其免疫调节作用. *浙江大学学报(医学版)*, 2017, 46: 7
- [97] 陈琪. 基于细菌外膜囊泡的生物膜材料构建及抗肿瘤研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2020
- [98] Vesikari T, Esposito S, Prymula R, et al. Immunogenicity and safety of an investigational multicomponent, recombinant, meningococcal serogroup B vaccine (4CMenB) administered concomitantly with routine infant and child vaccinations: results of two randomised trials. *Lancet*, 2013, 381: 825-35
- [99] Lee SR, Kim SH, Jeong KJ, et al. Multi-immunogenic outer membrane vesicles derived from an MsbB-deficient *Salmonella enterica* serovar typhimurium mutant. *J Microbiol Biotechnol*, 2009, 19: 1271-9
- [100] Zhang Y, Fang Z, Li R, et al. Design of outer membrane vesicles as cancer vaccines: a new toolkit for cancer therapy. *Cancers (Basel)*, 2019, 11: 1314
- [101] Mat Rani NNI, Alzubaidi ZM, Butt AM, et al. Outer membrane vesicles as biomimetic vaccine carriers against infections and cancers. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, 2022, 14: e1784

- [102] Zhang LY, Yang X, Wang SB, et al. Membrane derived vesicles as biomimetic carriers for targeted drug delivery system. *Curr Top Med Chem*, 2020, 20: 2472-92
- [103] Liu H, Zhang Q, Wang S, et al. Bacterial extracellular vesicles as bioactive nanocarriers for drug delivery: advances and perspectives. *Bioact Mater*, 2021, 14: 169-81
- [104] 张蒙蒙, 王桂琴, 徐飞. 革兰阴性菌外膜囊泡及其作用机制的研究进展. *中国兽医科学*, 2021, 51: 1182-9
- [105] Balhuizen MD, Versluis CM, van Grondelle MO, et al. Modulation of outer membrane vesicle-based immune responses by cathelicidins. *Vaccine*, 2022, 40: 2399-408
- [106] 毛露珈, 史恩宇, 王瀚平, 等. 细菌外膜囊泡在抗肿瘤治疗方面的研究进展. *中国生物工程杂志*, 2022, 42: 100-5
- [107] van den Berg van Saparoea HB, Houben D, Kuijl C, et al. Combining protein ligation systems to expand the functionality of semi-synthetic outer membrane vesicle nanoparticles. *Front Microbiol*, 2020, 11: 890