

细菌外膜囊泡在抗肿瘤中的研究进展

姬国杰^{1,2}, 王宛晴¹, 李文秘¹, 王晓仪¹, 李冠洁¹, 胡焕焕^{1*}

¹新乡医学院三全学院生育力保存重点实验室, 河南 新乡

²新乡医学院三全学院生物与基础医学实验教学中心, 河南 新乡

收稿日期: 2024年4月29日; 录用日期: 2024年5月21日; 发布日期: 2024年5月31日

摘要

肿瘤是困扰全球健康的主要问题之一, 如何克服目前所使用的治疗手段中的限制, 是亟需解决的问题关键。细菌在分子机制方面得到了充分的证实, 已被广泛的考虑在肿瘤治疗中的应用。外膜囊泡(Outer membrane vesicles, OMVs)是由革兰氏阴性菌分泌的双层脂质纳米囊泡。OMVs含有多种生物分子, 是细菌与细菌、环境和宿主等交流的重要介质, 因此它们可能成为抗肿瘤的有效的方案。本文综述了OMVs的结构、发生机制和生物学功能, 此外, 本文还重点关注了OMVs在抗肿瘤方面的应用进展。

关键词

肿瘤, 细菌, 外膜囊泡, 生物分子, 生物学功能

Research Progress of Bacterial Outer Membrane Vesicles in Anti-Tumor Therapy

Guojie Ji^{1,2}, Wanqing Wang¹, Wenmi Li¹, Xiaoyi Wang¹, Guanjie Li¹, Huanhuan Hu^{1*}

¹Key Laboratory of Fertility Preservation, Sanquan College of Xinxiang Medical University, Xinxiang Henan

²Experimental Teaching Center of Biology and Basic Medicine, Sanquan College of Xinxiang Medical University, Xinxiang Henan

Received: Apr. 29th, 2024; accepted: May 21st, 2024; published: May 31st, 2024

Abstract

Tumor is one of the major global health issues, and overcoming the limitations of currently used treatment methods is a crucial issue that needs to be addressed urgently. Bacteria, with their well-established molecular mechanisms, have been widely considered for application in tumor therapy.

*通讯作者。

文章引用: 姬国杰, 王宛晴, 李文秘, 王晓仪, 李冠洁, 胡焕焕. 细菌外膜囊泡在抗肿瘤中的研究进展[J]. 临床医学进展, 2024, 14(5): 2396-2407. DOI: 10.12677/acm.2024.1451699

Outer membrane vesicles (OMVs) are double-layer lipid nanovesicles secreted by Gram-negative bacteria. OMVs contain a variety of biomolecules and are important mediators of communication between bacteria, the environment, and the host, making them potentially effective candidates for anti-tumor therapy. This article reviews the structure, biogenesis, and biological functions of OMVs. In addition, it focuses on the progress of OMVs in anti-tumor applications.

Keywords

Tumor, Bacteria, Outer Membrane Vesicles, Biomolecules, Biological Function

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

外膜囊泡(Outer membrane vesicles, OMVs)是由革兰氏阴性菌正常生长过程中主动由外膜衍生而来的球形纳米双层膜结构, 粒径介于 20~300 nm 之间[1]。在一些特殊情况下, OMVs 的直径范围会增加到 10~500 nm, 也会出现不规则的形状的变化, 比如古细菌存在管状和细长状结构[2] [3]。早在 1967 年, Chatterjee 等[4]在体外研究霍乱弧菌细胞壁结构时首次发现了 OMVs。然后, OMVs 在越来越多的革兰氏阴性细菌中被观察到, 并且在某些革兰氏阳性细菌和古细菌中也相继被报道[3] [5]。OMVs 基于其与细菌和囊泡相关的内在特性, 已在生物医学领域受到广泛关注。OMVs 除了能抑制同一环境中的其他细菌, 还能在战斗中通过抑制噬菌体和抗菌肽的作用, 提高细菌的生存能力, 细菌还能够通过 OMVs 分泌毒素, 激活宿主细胞的逃避和宿主防御系统[6]。OMVs 含有细菌衍生的多种成分(脂质、蛋白质、核酸及其他小分子), 包括抗原病原体相关分子模式(Pathogen-associated molecular patterns, PAMPs), 这是疫苗的基本成分, 基于此, 天然 OMVs 或生物工程 OMVs 被开发为细菌疫苗, 以对其亲本细菌产生强大的体液(抗体)和细胞(免疫细胞和细胞因子)免疫应答[7]。各种 PAMPs 的存在使 OMVs 成为强大的佐剂, 使与 OMVs 混合或表达的抗原的特异性免疫应答得到增强和调节[8]。最近, OMVs 在抗肿瘤治疗中的潜在应用已被探索[9]。OMVs 包含细菌来源的蛋白, 可以诱导抗肿瘤免疫反应来消除肿瘤组织。此外, 利用含有 PAMPs 的 OMVs 的囊泡还可以作为药物载体, 实现药物的靶向特异性[10]。

本文中, 我们从 OMVs 的结构成分、提取纯化、发生机制、生物学功能及在抗肿瘤中的应用等多个方面进行了综述。以期对研究 OMVs 的学者能有所帮助, 并为 OMVs 的各种生物学应用提供新的参考。

2. OMVs 的结构成分

OMVs 含有细菌多种衍生成分, 主要包括脂质、蛋白质、核酸及其他小分子。接下来将从这四个方面进行概括介绍。

2.1. 脂质

OMVs 膜主要含有磷脂(Phospholipid, PL)和脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS), 主要反映了外膜的结构[11]。不同革兰氏阴性菌的 OMVs 的磷脂含量有所不同。PL 主要包括磷脂酰乙醇胺、磷脂酰甘油等[12] [13]。在大肠杆菌中, OMVs 以甘油磷脂、磷脂酰甘油、磷脂酰乙醇胺(Phosphatidyl ethanolamine, PE)和心磷脂为其主要脂质同样, 其他研究也表明, 磷脂酰甘油是铜绿假单胞菌膜 OMVs 的主要成分脑膜炎奈

瑟菌的 OMVs 含有磷脂酰甘油和 PE 作为最丰富的脂质。LPS 是一种重要的病原体相关分子模式 (Pathogen-associated molecular patterns, PAMPs), 在生物膜中发挥粘附功能, 也是 OMVs 的主要组成部分 [14]。与外膜(Outer membrane, OM)类似, OMVs 的外小叶除脂质外, 主要由 LPS 组成。在早期的研究中, 大肠杆菌的 OMVs 被发现与 OM 具有相似的磷脂谱[15]。

2.2. 蛋白质

不同类型的菌在不同生长阶段或不同应激条件下 OMVs 包含的蛋白谱是不一样的。在 OMVs 的蛋白质组学研究中, 鉴定的蛋白总数在 50~338 范围内[7]。例如, 在脑膜炎奈瑟菌的 OMVs 中共鉴定出 155 个蛋白, 但在大肠杆菌的 OMVs 中鉴定出 141 种蛋白[16]。被鉴定出的蛋白质可以分为三类: 外膜的基本成分, 腔内特定的货物蛋白, 以及未知或污染的蛋白质[7]。第一类属于 OM 蛋白, 如孔蛋白、较大运输系统的 OM 蛋白部分、锚定蛋白黏附蛋白、酶, 如磷脂酶和蛋白酶, 以及鞭毛或菌毛蛋白、补体调节蛋白、结合蛋白、不浊相关蛋白、转运体、离子通道蛋白[17] [18]。第二类包括周质酶、细胞质酶以及一些毒力因子, 如蛋白酶、肽酶、核酸酶、溶细胞素、霍乱毒素、空泡细胞毒素、细胞毒性膨胀毒素和脲酶等酶[9] [19]。最后一类蛋白质是常见的细胞质蛋白包括延伸因子、伴侣蛋白和热休克蛋白等[20]。在 OMVs 中也发现了许多细胞质和细胞内膜蛋白, 这些蛋白被认为是来自培养物中裂解细胞的污染物[2]。

2.3. 核酸物质

OMVs 同时携带腔内和表面相关的 DNA, 除此之外 RNA、质粒、噬菌体 DNA 和染色体 DNA 在 OMVs 中也有报道。有研究认为核酸被 OMVs 携带可能来自于环境中细胞的裂解残留物[21]。Kahn 等[22]在副流感嗜血杆菌的 OMVs 中首次发现了质粒 DNA 的存在。后来, Dorward 等发现其他 OMVs 也含有 RNA 和 DNA; 接着他们发现, 革兰氏阴性菌的 OMVs 中包含有圆形质粒、线性质粒和染色体片段等 DNA [23] [24]。

2.4. 其他分子

OMVs 还可以运输多种离子、群体感应信号和代谢物[25] [26], 但是这些分子在 OMVs 中的出现迄今为止尚未得到广泛的研究。随着研究的深入, 会有更多其他类型的生物分子在 OMVs 中被发现, Kadurugamuwa 等[27]描述了在 OMVs 中存在的细胞壁成分, 如肽聚糖和小鼠氨酸。

3. OMVs 的提取纯化

根据 OMVs 的物理和生化特性, 关于 OMVs 的分离提取方法报道有很多, 如: 超速离心沉淀法、超滤法、蛋白质沉淀法和亲和层析法、体积排阻色谱、场流分馏、微流体等, 下面总结了 OMVs 研究中常见三种方法[28]。

3.1. 超速离心沉淀法

主要原理是在不同的离心力条件下不同大小的颗粒沉降系数不同, 从而实现纯化沉降收集。收集培养液, 在 4℃下, 1500 g 离心 15 min, 去除细胞, 6000 g 离心 10 min 去除细胞碎片, 上清液先用 0.45 μm 过滤器过滤, 4℃下, 150,000 g 离心 2~3 h 收集 OMVs。在磷酸盐缓冲盐水(PBS)中洗涤后-80℃保存备用 [9] [29]。

3.2. 密度梯度超速离心法

一种基于 OMVs 的物理特性(尺寸、形状、质量和密度)改进的方法。在密度梯度溶液中, 不同的颗

粒, 由于密度不同, 从上到下的梯度中积累在不同密度层。超速离心沉淀收集到的 OMVs 悬浮在碘二醇或蔗糖中, 在 4°C 下 200,000 g 通过碘二醇或蔗糖密度梯度离心 2 h。OMVs 从相应的密度层收集。纯化后的 OMVs 再次用 0.22 μm 孔径过滤器过滤, 清洗 OMVs 颗粒两次, 悬浮在 PBS 中, -80°C 保存备用[9] [30] [31]。

3.3. 超滤法

是一种利用压力作为驱动力, 根据分子的大小和形态, 选择性地过滤纳米级物质的技术。简单地说, 在去除细菌细胞和碎片后, 上清液通过 0.45 μm 过滤器过滤, 无菌上清液用 100 kDa 过滤浓缩器浓缩。然后将上清液与 71% 或 75% 硫酸铵混合, 4°C 孵育 3 h, 4°C, 10,000 g 离心 20 min。将含有 OMVs 的微球悬浮在 PBS 中, 4°C 下 150,000 g 离心 1 h, 用 PBS 洗涤两次, 然后在 -80°C 保存备用[32]。

4. OMVs 的产生机制

目前有多种关于 OMVs 形成机制的推论, 相关研究主要集中在以下几个观点。

4.1. 膜的连接

革兰氏阴性细菌的包膜结构的稳定性和完整性由肽聚糖(Peptidoglycan, PG)通过短的 OM 锚定脂蛋白与 OM 共价交联来维持[33]。Schwechheimer 等[34]发现 PG 的重塑和 Lpp-PG 的交联调控 OMVs 的产生。当 PG 的分解-合成被打破平衡, PG 和 OM 的交联率降低或局部交联被破坏时, 外膜上这些交联被破坏的点会向外突起形成芽点, 继而导致 OMVs 的产生[34] [35]。

4.2. 压力聚集

革兰氏阴性细菌包膜中蛋白质折叠发生错误时, 错误折叠的蛋白质会聚集到周质间隙, 细菌会将错误折叠的蛋白质优先包装成囊泡去除, 即外膜囊泡的释放。另外包膜中蛋白质、PG 片段、外膜脂肪酸或 LPS 等这些物质积聚在周质间隙的某些区域后, 会导致了“周质压力”的增加, 从而将外膜向外挤出而出芽, 从而去除不需要的细胞成分[34] [36]。NlpA 是目前已经确定并发现对 OMVs 产生有主导作用的极少数包膜成分之一, nlpA 的增加正向促进 OMVs 的产生[34]。

4.3. LPS 重塑

革兰氏阴性细菌的 OM 内部小叶和外部小叶分别由甘油磷脂(Phosphoglycerides, PL)和 LPS 构成, LPS 由内毒素脂质 A、核心多糖和 O 抗原组成[37], 在外膜中加入特定修饰的 LPS (如: 乙酰化)会增加膜的不稳定性(如: 改变灵活性和流动性), 脂多糖结合分子(Pseudomonas quinolone signal, PQS)能增强菌体表面的阴离子排斥力, 与 LPS 结合, 另外, 阴离子脂多糖(A-LPS)的去酰化可能通过上调某些小叶脂质的产生进一步增加膜曲率, 导致 OM 局部向外弯曲, 继而增加形成 OMVs, 且直径增大[38] [39] [40]。另外 LPS 在 OMVs 中富集, 也可能直接或间接影响 OMVs 的组成。例如, 铜绿假单胞杆菌能表达带中性多糖的 LPS 和带电荷多糖的 LPS, 只表达中性 LPS 的细菌形成的 OMVs 与带电荷 LPS 的细菌形成的 OMVs 相比直径更小[41]。

4.4. 环境条件

影响细菌生长的环境因子很多, 如: 温度、湿度、pH、氧气、光照、抗生素、渗透压及营养物质(碳源、氮源、矿物质等)等, 同样也会影响 OMVs 的生成[42]。抗生素(环丙沙星、美罗培南、磷霉素和多粘菌素 B)会影响大肠杆菌 O104:H4 和 O157:H7 生产的 OMVs 的大小、产量、毒力因子及蛋白成分等[27] [43]。相关证据表明, 在受到抗生素应激时, 细菌通过释放 OMVs 起到防御及保护作用[44]。粘质链球菌在不同温度下产生 OMVs 的量不同, 22°C 下产生的量是 37°C 的 5 倍之多[45], 然而温度升高(30°C vs 37°C)会

导致错误折叠的包膜蛋白增加,继而促进大肠杆菌产生外膜囊泡以消除温度应激[36],以上研究说明不同细菌对抗温度应激反应是不一样的。鼠伤寒沙门菌在模拟营养丰富条件下富含参与转录和转运的蛋白[31]。在 LB 培养基中添加硝酸盐,一氧化氮在反硝化条件下诱导铜绿假单胞菌产生大量 OMVs [46]。Sampath 等[47]研究表明, *fumA* 和 *tktAD* 的突变严重影响土拉弗朗西斯菌 OMVs 的产生,说明 OMVs 的生物发生在一定程度上受遗传水平的调控。

5. OMVs 的生物学功能

OMVs 在细菌的生长,生存,毒力等生理活动中行使多种生物学功能。

5.1. 影响生物膜的形成

OMVs 对生物膜的形成既有促进作用又有抑制作用。有生物膜形成能力的幽门螺杆菌产生的 OMVs 能诱导没有这种能力菌株的生物膜形成[48]。泰兰伯克霍尔德氏菌 OMVs 能够抑制部分细菌生物膜的形成,从而抑制细菌的生长[49]。Ma 等研究发现,OMVs 通过 LPS 抑制小肠结肠炎耶尔森菌、肠炎沙门氏菌和金黄色葡萄球菌生物膜的形成[50]。

5.2. 细胞间传送生物分子

OMVs 通过生物分子的传递在细菌与细菌,细菌与宿主之间起着交流的作用。先前的实验已经证明了 OMVs 可以传送各种生物分子(如酶、质粒、DNA、RNA、毒素等)到其他细菌(细胞)中[51]。如淋病奈瑟菌的 OMVs 可以将携带青霉素抗性基因的质粒以及少量的 RNA 转移到青霉素敏感的淋病奈瑟菌中[52],大肠埃希菌 O157:H7 的 OMVs 可以将携带氨基苄西林抗性基因(*AmpR*)和绿色荧光蛋白基因(*pGFP*)的质粒转移到缺乏这个质粒的大肠埃希菌 JM109 中[20],贝氏不动杆菌也可以通过 OMVs 将小片段 DNA 转移到大肠杆菌中[53]。金黄色葡萄球菌可以通过 OMVs 将抗生素运输到细胞内从而消灭胞内金黄色葡萄球菌[54]。相关研究表明,毒力因子或细胞毒素也可以通过 OMVs 转移到宿主真核细胞[55],如霍乱弧菌的具有生物活性的主要致病性毒力因子(CT、TCP 毒素)可以通过 OMVs 以的形式转运到宿主细胞[56],铜绿假单胞菌分泌的 OMVs 也可以作为运输载体将其泡内 sRNA 传递给人呼吸道上皮细胞,减少宿主细胞的炎症反应[57]。

5.3. 自我保护

细菌暴露于危险环境(抗生素、高温、噬菌体、竞争性微生物或抗原位点)时,细菌自身会调控分泌携带有毒成分、噬菌体和错误折叠蛋白等不需要的物质的 OMVs,以减轻自身的应激压力,这是细菌自我保护的一种新机制[58]。当细菌处于抗生素环境中时,会通过分泌 OMVs 将进入胞内的抗生素分泌出来,或通过 OMVs 分泌参与抗生素降解的酶帮助细菌减缓抗生素应激,提高对抗生素抗性[59]。而黏质沙雷菌在高温环境下会减少 OMVs 的产生,以减轻高温的危害[60]。当大肠杆菌[61]和霍乱弧菌[62]受到噬菌体攻击时,可以通过分泌 OMVs 以结合噬菌体形成复合物,降低噬菌体的感染效率以帮助本身逃避噬菌体的攻击。有些细菌分泌的 OMVs 会携带一些活性酶,这些酶可以酶解细菌周围的有害物质或直接抑制周围微生物的活性。有报道证实了铜绿假单胞菌分泌携带自溶素和肽聚糖水解酶的 OMVs 可以抑制枯草芽杆菌和金黄色葡萄球菌的生长[63]。除了抑制细菌活性外,溶酶杆菌 C3 株产生含有肽聚糖水解酶和鼠李糖脂化合物的 OMVs 能直接抑制真菌属酿酒酵母和丝状真菌镰刀菌的生长[64]。

5.4. 摄取营养

细菌分泌的 OMVs 含有多种酶类,不同的酶通过不同的途径帮助细菌本身获得营养。有些酶(蛋白

酶和核酸酶)可以将生物大分子降解为细菌能够利用的小分子从而为细菌的正常生命活动提供营养物质;有些酶(PG 水解酶、肽聚糖水解酶和糖苷酶)能杀死同环境中的其它竞争菌株(包括细菌和真菌),以获得充足的营养物质[63] [65]。有些菌可以通过分泌 OMVs 将受体蛋白释放到菌体外,以捕获周围环境中的金属离子(铁离子和锌离子),以满足自身生存需求[66]。除此之外,OMVs 本身也可以作为一种营养物质,圆绿球藻的 OMVs 就可以作为交替单胞菌和嗜盐单胞菌的碳源[26]。

6. OMVs 抗肿瘤的应用

近年来,OMVs 在肿瘤治疗这一领域得到越来越多研究者得关注,目前主要集中在肿瘤免疫、肿瘤药物载体、肿瘤疫苗和肿瘤诊断等方面。

6.1. 肿瘤免疫

OMVs 具有肿瘤趋向性,发挥抗肿瘤作用,近年来,OMVs 在肿瘤免疫调节方面受到了越来越多的关注。Kim 等[9]收集了来自脂质 A 酰基转移酶基因失活突变体大肠杆菌的 OMVs,直接经尾静脉注射后,OMVs 在肿瘤组织中靶向并积累,激活 APCs 和适应性免疫,导致 NK 和 T 细胞在肿瘤组织中浸润和积累,并诱导趋化因子 CXCL10 和 IFN- γ 的产生,并且这种抗肿瘤作用具有 IFN- γ 依赖性。Li 等[67]通过转基因的方法添加程序性死亡 1 (PD1)来修饰 OMVs 的表面,工程化的 OMV-PD1 激活先天免疫反应,促进 NK 细胞和巨噬细胞在肿瘤组织中的浸润,增加 IFN- γ 、IL-6 和 TNF- α 的表达,并与 PD-L1 竞争性结合,以达到更好的抗肿瘤效果。Chen 等[68]将减毒沙门氏菌 OMVs 黑色素瘤细胞膜囊泡融合,构建了新的纳米平台(EPV),EPV 可以将天然佐剂和肿瘤抗原结合,触发肿瘤免疫反应。在 Chen 等[69]的在另一项研究中,将减毒沙门氏菌中 OMVs 用来包封 5-氟尿嘧啶(5-FU),并用聚乙二醇(PEG)和 RGD 环肽(Arg-Gly-Asp)进行修饰,修饰后的 OMVs 诱导了先天免疫反应,并增强了 TNF- α 、IFN- γ 和 IL-12 的表达,抑制肿瘤的转移。Zhuang 等[70]将鼠伤寒杆菌来源的 OMVs 注射到体内,发现 OMVs 会引发肿瘤内红细胞外渗,积累的血红蛋白增强光吸收作用,通过 PTT 引起免疫反应杀死肿瘤细胞。Chen 等[71]将大肠杆菌中的 OMVs 包被在纳米金颗粒(AuNPs)上,并结合放疗,显著增加了巨噬细胞/单核细胞趋化蛋白 1 和 2 (MCP-1 和 2)的产生,通过增加 ROS 的含量激活 TNF- α 的表达,进而增加巨噬细胞的趋化性,增强抗肿瘤效果。由 ROS、细胞因子和免疫细胞引起的放射增敏作用增强了。

6.2. 肿瘤药物载体

OMVs 具有高度的生物相容性,较强得载药能力和肿瘤靶向能力,易于修饰和工业化,有望成为类脂双层纳米载体。Kuerban 等人[72]将抗肿瘤药物阿霉素(doxorubicin, DOX)装载到减毒肺炎克雷伯菌的 OMVs 中(DOX-OMVs)。DOX-OMVs 显示出显著的细胞毒性作用,并增强向 A549 癌细胞的转运,导致强烈的细胞毒性作用和细胞凋亡,而 OMVs 可以增强 DOX 的抗肿瘤作用,并且在携带肿瘤的裸鼠中没有明显的毒副作用和不良反应。Li 等人[73]将二氢吡吩 e6 (Chlorin e6, Ce6)和 DOX 一起引入用大肠杆菌 OMVs 中。Ce6 作为光敏剂增强 PDT,DOX 作为化疗药物杀死肿瘤细胞,可以根除小鼠体内的三阴性乳腺癌,而没有产生副作用,并防止其转移到肺部。Liu 等人[74]将四氧化三铁-二氧化锰(FMO)装载到大肠杆菌的 OMVs (FMO-OMVs),构建了功能化的纳米平台,增强了 FMO-OMVs 在肿瘤组织中的积累。FMO-OMVs 在肿瘤部位发生反应性分解,产生锰和铁离子,调节肿瘤的缺氧环境此外,氧化锰和四氧化三铁可以直接破坏肿瘤细胞。Shi 等人[75]将 5-FU 载入大肠杆菌 OMVs 中。通过高压共挤压法包封 5-氟尿嘧啶(5-FU)负载的单分散二氧化硅。结合 OMVs 在肠道吸收的优势,OMVs 在肠道表面后释放 5-FU,以达到抑制结肠癌生长得效果。这种靶向传递 5-FU 减少了与常规给药相关的肝和脾损伤的副作用。Gujrati 等人[8]首次证明了将 siRNA 加载到 msbB 突变体大肠杆菌的 OMVs 中以实现肿瘤靶向 siRNA 传递。这

些 OMVs 在细胞膜上显示了一个人表皮生长因子受体 2 (HER2)特异性的附着体作为靶向配体。在肿瘤动物模型中, siRNA 负载的 OMVs 可以在 HER2 过表达细胞系中诱导靶向基因沉默和显著的细胞增殖抑制和肿瘤生长退化。最近, Cui 等人[76]设计了一种高效的 miRNA 纳米传递系统用于肿瘤基因治疗, 基于 PD1 显示的 OMVs 封装包含 miR-34a 的沸石咪唑酸框架-8 (ZIF-8)。工程 OMVs 具有较高的 miRNA 传递效率、肿瘤靶向和检查点抑制, 是一种很有前途的仿生纳米传递载体, 可用于细胞内传递 miRNA, 以提高肿瘤治疗效果。另外, Guo 等人[77]通过种 pH 敏感的给药系统, 将紫杉醇(PTX)和 DNA 损伤反应 1 (Redd1)-siRNA 通过 OMVs 同时传递到肿瘤部位, 通过调节肿瘤代谢微环境, 抑制肿瘤生长。

6.3. 肿瘤疫苗

基于 OMVs 的肿瘤疫苗主要是通过细菌的基因工程技术进行功能修饰, 使外源蛋白在囊泡腔内或其膜表面表达。Wang 等[78]在实验室成功地通过基因重组技术将 HPV 的抗原 E7 蛋白植入大肠杆菌的 OMVs 内, 促进了树突状细胞的肿瘤抗原摄取和内吞体逃逸, 从而显著抑制了小鼠 TC-1 异种移植瘤的生长。Huang 等人[79]利用基因重组技术将硫氧还蛋白(Thioredoxin, Trx)基因与小鼠碱性成纤维细胞生长因子(Basic Fibroblast Growth Factor, BFGF)基因融合, 并装载到 OMVs 上形成 BFGF 修饰的 OMVs (BFGF-OMVs)。BFGF-OMVs 可以诱导机体产生抗血管生成自身抗体, 通过主动抑制肿瘤血管生成发挥肿瘤抑制作用。Grandi 等人[80]使用人表皮生长因子受体变异 III (EGFRvIII)和 B16 细胞的新抗原 M30 表位来修饰 OMVs, 结果显示小鼠完全免受肿瘤侵袭。之后, 在 Cheng 和 Yue 等人的研究中[81] [82], 通过溶血素 A (Cly A)蛋白融合抗原蛋白, 导致各种肿瘤抗原快速同时显示在 OMVs 表面, 使其能够显示多种不同的肿瘤抗原。基于这种方式获得的 OMVs 的疫苗平台不仅抑制了黑色素瘤和皮下结直肠癌的生长, 还消除了黑色素瘤肺转移。Zou 等人[83]将来自肿瘤的细胞膜(TM)和 OMVs 融合形成新的功能囊泡(YM-OMVs)。体外实验表明, TM-OMVs 可以增强肿瘤抗原的摄取, 在体内, TM-OMVs 在腹股沟淋巴结中积累, 并显著抑制肿瘤生长和肺转移。Chen 等人[84]通过手术从小鼠中切除肿瘤以获得肿瘤细胞膜(TM), 并用溶菌酶处理大肠杆菌 DH5a 以制备大肠杆菌细胞质膜(EM)。在 PLGA NP 聚合物作用下, 将 EM 和 TM 混合后挤压得到一种混合膜纳米颗粒疫苗(HM-NPs), 该疫苗显著延长了肿瘤切除后动物的生存期, 甚至在多个小鼠肿瘤模型中导致肿瘤完全消退。这些研究表明, OMVs 作为一种天然佐剂, 是最适合接种癌症疫苗的平台之一。

6.4. 肿瘤诊断

在肿瘤筛查诊断方面, OMVs 具有与细胞外囊泡(Extracellular vesicles, EV)相似的作用[85]。Gujrati 等人[86]对来自大肠杆菌的含酪氨酸酶基因的 OMVs 进行封装, 制备了负载黑色素的 OMVs (OMVs-Mel), OMVs-Mel 在乳腺癌携带模型的体内产生了肿瘤成像的强光声信号。Chen 等人[87]合成了用于抗原结合和信号产生的 OMVs 的传感器, 将 GFP 组装在 INP-Scaf3-Z 支架上, 以癌症特异性表面标记物 MUC1 为靶点, 添加抗 MUC1 抗体后可以检测到 HeLa 细胞, OMVs 与 HeLa 细胞之间的背景相互作用较低。

7. 问题与展望

OMVs 在肿瘤领域中具有多重功能。它们不仅促进肿瘤生长和转移, 还调节肿瘤微环境, 抑制肿瘤的发展。OMVs 中携带的生物标志物还可以作为肿瘤的诊断标志, 有助于肿瘤的早期监测。此外, OMVs 作为药物载体, 可有效传递抗肿瘤药物到肿瘤部位, 提高治疗效果。尽管本文全面审查了 OMVs 在肿瘤治疗和诊断中的应用, 但仍有许多诸多问题亟待解决: 1) 在 OMVs 产生过程中, 如何调控包裹的物质; 2) OMVs 在肿瘤治疗中的机制尚不明确; 3) 如何实现工程化 OMVs 的大量获得, 提高效率; 4) 如何消除 OMVs 在肿瘤治疗中的不良反应, 确保其安全性; 5) 目前 OMVs 的研究尚处于实验室阶段, 如何安

全高效地转化于临床。随着生物工程技术及组学技术的发展, 研究人员可以更深入地了解作用机制及临床研究前景。这些研究可以为 OMVs 成为个性化精准治疗工具提供帮助。

基金项目

河南省科技攻关项目(232102310303, 232102310065), 新乡医学院三全学院骨干教师培养计划(SQ2023GGJS06), 河南省高等学校青年骨干教师培养计划(2023GGJS201), 新乡医学院三全学院学术技术带头人培养计划(SQ2023XSJSDTR01)。

参考文献

- [1] Toyofuku, M., Nomura, N. and Eberl, L. (2019) Types and Origins of Bacterial Membrane Vesicles. *Nature Reviews Microbiology*, **17**, 13-24. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0112-2>
- [2] Kulp, A. and Kuehn, M.J. (2010) Biological Functions and Biogenesis of Secreted Bacterial Outer Membrane Vesicles. *Annual Review of Microbiology*, **64**, 163-184. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.091208.073413>
- [3] McCaig, W.D., Koller, A. and Thanassi, D.G. (2013) Production of Outer Membrane Vesicles and Outer Membrane Tubes by *Francisella novicida*. *Journal of Bacteriology*, **195**, 1120-1132. <https://doi.org/10.1128/JB.02007-12>
- [4] Chatterjee, S.N. and Das, J. (1967) Electron Microscopic Observations on the Excretion of Cell-Wall Material by *Vibrio cholerae*. *The Journal of General Microbiology*, **49**, 1-11. <https://doi.org/10.1099/00221287-49-1-1>
- [5] Moghimipour, E., Abedishirehjin, S., Baghbadorani, M.A., et al. (2021) Bacteria and Archaea: A New Era of Cancer Therapy. *Journal of Controlled Release*, **338**, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.08.019>
- [6] Sadeghi, L., Mohit, E., Moallemi, S., et al. (2023) Recent Advances in Various Bio-Applications of Bacteria-Derived Outer Membrane Vesicles. *Microbial Pathogenesis*, **185**, Article ID: 106440. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2023.106440>
- [7] VanderPol, L., Stork, M. and VanderLey, P. (2015) Outer Membrane Vesicles as Platform Vaccine Technology. *Biotechnology Journal*, **10**, 1689-706. <https://doi.org/10.1002/biot.201400395>
- [8] Gujrati, V., Kim, S., Kim, S.H., et al. (2014) Bioengineered Bacterial Outer Membrane Vesicles as Cell-Specific Drug-Delivery Vehicles for Cancer Therapy. *ACS Nano*, **8**, 1525-37. <https://doi.org/10.1021/nm405724x>
- [9] Kim, O.Y., Park, H.T., Dinh, N.T.H., et al. (2017) Bacterial Outer Membrane Vesicles Suppress Tumor by Interferon- γ -Mediated Antitumor Response. *Nature Communications*, **8**, Article No. 626. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00729-8>
- [10] Jain, S. and Pillai, J. (2017) Bacterial Membrane Vesicles as Novel Nanosystems for Drug Delivery. *International Journal of Nanomedicine*, **12**, 6329-6341. <https://doi.org/10.2147/IJN.S137368>
- [11] Lei, E.K., Azmat, A., Henry, K.A., et al. (2024) Outer Membrane Vesicles as a Platform for the Discovery of Antibodies to Bacterial Pathogens. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **108**, Article No. 232. <https://doi.org/10.1007/s00253-024-13033-5>
- [12] Suh, J.W., Kang, J.S., Kim, J.Y., et al. (2024) Characterization of the Outer Membrane Vesicles of *Pseudomonas aeruginosa* Exhibiting Growth Inhibition against *Acinetobacter baumannii*. *Biomedicines*, **12**, Article No. 556. <https://doi.org/10.3390/biomedicines12030556>
- [13] Tashiro, Y., Inagaki, A., Shimizu, M., et al. (2011) Characterization of Phospholipids in Membrane Vesicles Derived from *Pseudomonas aeruginosa*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **75**, 605-607. <https://doi.org/10.1271/bbb.100754>
- [14] Liu, J., Kang, R. and Tang, D. (2024) Lipopolysaccharide Delivery Systems in Innate Immunity. *Trends in Immunology*. <https://doi.org/10.1016/j.it.2024.02.003>
- [15] Renelli, M., Matias, V., Lo, R.Y., et al. (2004) DNA-Containing Membrane Vesicles of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and Their Genetic Transformation Potential. *Microbiology (Reading)*, **150**, 2161-2169. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26841-0>
- [16] Hoekstra, D., Vander Laan, J.W., De Leij, L., et al. (1976) Release of Outer Membrane Fragments from Normally Growing *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta*, **455**, 889-899. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(76\)90058-4](https://doi.org/10.1016/0005-2736(76)90058-4)
- [17] Pavkova, I., Bavlovic, J., Kubelkova, K., et al. (2024) Protective Potential of Outer Membrane Vesicles Derived from a Virulent Strain of *Francisella tularensis*. *Frontiers in Microbiology*, **15**, Article ID: 1355872. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1355872>

- [18] Manabe, T., Kato, M., Ueno, T., *et al.* (2013) Flagella Proteins Contribute to the Production of Outer Membrane Vesicles from *Escherichia coli* W3110. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **441**, 151-156. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.10.022>
- [19] Lee, E.Y., Bang, J.Y., Park, G.W., *et al.* (2007) Global Proteomic Profiling of Native Outer Membrane Vesicles Derived from *Escherichia coli*. *Proteomics*, **7**, 3143-3153. <https://doi.org/10.1002/pmic.200700196>
- [20] Yaron, S., Kolling, G.L., Simon, L., *et al.* (2000) Vesicle-Mediated Transfer of Virulence Genes from *Escherichia coli* O157:H7 to Other Enteric Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**, 4414-4420. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.10.4414-4420.2000>
- [21] Berlanda Scorza, F., Doro, F., Rodríguez-Ortega, M.J., *et al.* (2008) Proteomics Characterization of Outer Membrane Vesicles from the Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* DeltatolR IHE3034 Mutant. *Molecular & Cellular Proteomics*, **7**, 473-485. <https://doi.org/10.1074/mcp.M700295-MCP200>
- [22] Kahn, M.E., Maul, G. and Goodgal, S.H. (1982) Possible Mechanism for Donor DNA Binding and Transport in *Haemophilus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **79**, 6370-6374. <https://doi.org/10.1073/pnas.79.20.6370>
- [23] Dorward, D.W., Garon, C.F. and Judd, R.C. (1989) Export and Intercellular Transfer of DNA via Membrane Blebs of *Neisseria gonorrhoeae*. *Journal of Bacteriology*, **171**, 2499-2505. <https://doi.org/10.1128/jb.171.5.2499-2505.1989>
- [24] Dorward, D.W. and Garon, C.F. (1990) DNA Is Packaged within Membrane-Derived Vesicles of Gram-Negative but Not Gram-Positive Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, **56**, 1960-1962. <https://doi.org/10.1128/aem.56.6.1960-1962.1990>
- [25] Schertzer, J.W. and Whiteley, M. (2012) A Bilayer-Couple Model of Bacterial Outer Membrane Vesicle Biogenesis. *MBio*, **3**, E00297-11. <https://doi.org/10.1128/mBio.00297-11>
- [26] Biller, S.J., Schubotz, F., Roggensack, S.E., *et al.* (2014) Bacterial Vesicles in Marine Ecosystems. *Science*, **343**, 183-186. <https://doi.org/10.1126/science.1243457>
- [27] Kadurugamuwa, J.L. and Beveridge, T.J. (1995) Virulence Factors Are Released from *Pseudomonas aeruginosa* in Association with Membrane Vesicles during Normal Growth and Exposure to Gentamicin: A Novel Mechanism of Enzyme Secretion. *Journal of Bacteriology*, **177**, 3998-4008. <https://doi.org/10.1128/jb.177.14.3998-4008.1995>
- [28] Li, M., Zhou, H., Yang, C., *et al.* (2020) Bacterial Outer Membrane Vesicles as a Platform for Biomedical Applications: An Update. *Journal of Controlled Release*, **323**, 253-268. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.04.031>
- [29] Zhou, L., Chen, D.Y., *et al.* (2019) *Escherichia coli* Outer Membrane Vesicles Induced DNA Double-Strand Breaks in Intestinal Epithelial Caco-2 Cells. *Medical Science Monitor Basic Research*, **25**, 45-52. <https://doi.org/10.12659/MSMBR.913756>
- [30] Choi, M.S., Ze, E.Y., Park, J.Y., *et al.* (2021) *Helicobacter pylori*-Derived Outer Membrane Vesicles Stimulate Interleukin 8 Secretion through Nuclear Factor Kappa B Activation. *The Korean Journal of Internal Medicine*, **36**, 854-867. <https://doi.org/10.3904/kjim.2019.432>
- [31] Bai, J., Kim, S.I., Ryu, S., *et al.* (2014) Identification and Characterization of Outer Membrane Vesicle-Associated Proteins in *Salmonella enterica* Serovar typhimurium. *Infection and Immunity*, **82**, 4001-4010. <https://doi.org/10.1128/IAI.01416-13>
- [32] Bauman, S.J. and Kuehn, M.J. (2006) Purification of Outer Membrane Vesicles from *Pseudomonas aeruginosa* and Their Activation of an IL-8 Response. *Microbes and Infection*, **8**, 2400-2408. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2006.05.001>
- [33] Mat Rani, N.N.I., Alzubaidi, Z.M., Butt, A.M., *et al.* (2022) Outer Membrane Vesicles as Biomimetic Vaccine Carriers against Infections and Cancers. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*, **14**, E1784. <https://doi.org/10.1002/wnan.1784>
- [34] Schwachheimer, C., Kulp, A. and Kuehn, M.J. (2014) Modulation of Bacterial Outer Membrane Vesicle Production by Envelope Structure and Content. *BMC Microbiology*, **14**, Article No. 324. <https://doi.org/10.1186/s12866-014-0324-1>
- [35] Schwachheimer, C., Rodriguez, D.L. and Kuehn, M.J. (2015) NlpI-Mediated Modulation of Outer Membrane Vesicle Production through Peptidoglycan Dynamics in *Escherichia coli*. *Microbiologyopen*, **4**, 375-389. <https://doi.org/10.1002/mbo3.244>
- [36] Hua, L., Kaiser, M., Carabadjac, I., *et al.* (2023) Vesicle Budding Caused by Lysolipid-Induced Asymmetry Stress. *Biophysical Journal*, **122**, 4011-4022. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2023.08.023>
- [37] May, K.L. and Silhavy, T.J. (2018) The *Escherichia coli* Phospholipase PldA Regulates Outer Membrane Homeostasis via Lipid Signaling. *MBio*, **9**, E00379-18. <https://doi.org/10.1128/mBio.00379-18>
- [38] Bonnington, K.E. and Kuehn, M.J. (2016) Outer Membrane Vesicle Production Facilitates LPS Remodeling and Outer Membrane Maintenance in *Salmonella* during Environmental Transitions. *MBio*, **7**, E01532-16.

- <https://doi.org/10.1128/mBio.01532-16>
- [39] Gui, M.J., Dashper, S.G., Slakeski, N., *et al.* (2016) Spheres of Influence: *Porphyromonas gingivalis* Outer Membrane Vesicles. *Molecular Oral Microbiology*, **31**, 365-378. <https://doi.org/10.1111/omi.12134>
- [40] Reidl, J. (2016) Outer Membrane Vesicle Biosynthesis in Salmonella: Is There More to Gram-Negative Bacteria? *MBio*, **7**, E01282-16. <https://doi.org/10.1128/mBio.01282-16>
- [41] Murphy, K., Park, A.J., Hao, Y., *et al.* (2014) Influence of O Polysaccharides on Biofilm Development and Outer Membrane Vesicle Biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Bacteriology*, **196**, 1306-1317. <https://doi.org/10.1128/JB.01463-13>
- [42] Orench-Rivera, N. and Kuehn, M.J. (2016) Environmentally Controlled Bacterial Vesicle-Mediated Export. *Cellular Microbiology*, **18**, 1525-1536. <https://doi.org/10.1111/cmi.12676>
- [43] Bauwens, A., Kunsmann, L., Karch, H., *et al.* (2017) Antibiotic-Mediated Modulations of Outer Membrane Vesicles in Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O104:H4 and O157:H7. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **61**, E00937-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.00937-17>
- [44] Kulkarni, H.M., Nagaraj, R. and Jagannadham, M.V. (2015) Protective Role of *E. coli* Outer Membrane Vesicles against Antibiotics. *Microbiological Research*, **181**, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.07.008>
- [45] McMahon, K.J., Castelli, M.E., García Vescovi, E., *et al.* (2012) Biogenesis of Outer Membrane Vesicles in *Serratia marcescens* Is Thermoregulated and Can Be Induced by Activation of the Rcs Phosphorelay System. *Journal of Bacteriology*, **194**, 3241-3249. <https://doi.org/10.1128/JB.00016-12>
- [46] Toyofuku, M., Zhou, S., Sawada, I., *et al.* (2014) Membrane Vesicle Formation Is Associated with Pyocin Production under Denitrifying Conditions in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Environmental Microbiology*, **16**, 2927-2938. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12260>
- [47] Sampath, V., McCaig, W.D. and Thanassi, D.G. (2018) Amino Acid Deprivation and Central Carbon Metabolism Regulate the Production of Outer Membrane Vesicles and Tubes by *Francisella*. *Molecular Microbiology*, **107**, 523-541. <https://doi.org/10.1111/mmi.13897>
- [48] Yonezawa, H., Osaki, T., Kurata, S., *et al.* (2009) Outer Membrane Vesicles of *Helicobacter pylori* TK1402 Are Involved in Biofilm Formation. *BMC Microbiology*, **9**, Article No. 197. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-197>
- [49] Wu, Y. and Seyedsayamdost, M.R. (2017) Synergy and Target Promiscuity Drive Structural Divergence in Bacterial Alkylquinolone Biosynthesis. *Cell Chemical Biology*, **24**, 1437-1444.E3. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2017.08.024>
- [50] Ma, G., Ding, Y., Wu, Q., *et al.* (2022) *Yersinia enterocolitica*-Derived Outer Membrane Vesicles Inhibit Initial Stage of Biofilm Formation. *Microorganisms*, **10**, Article No. 2357. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10122357>
- [51] Vanaja, S.K., Russo, A.J., Behl, B., *et al.* (2016) Bacterial Outer Membrane Vesicles Mediate Cytosolic Localization of LPS and Caspase-11 Activation. *Cell*, **165**, 1106-1119. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.04.015>
- [52] Behrouzi, A., Mazaheri, H., Falsafi, S., *et al.* (2020) Intestinal Effect of the Probiotic *Escherichia coli* Strain Nissle 1917 and Its OMV. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*, **19**, 597-604. <https://doi.org/10.1007/s40200-020-00511-6>
- [53] Gao, F., Xu, L., Yang, B., *et al.* (2019) Kill the Real with the Fake: Eliminate Intracellular *Staphylococcus aureus* Using Nanoparticle Coated with Its Extracellular Vesicle Membrane as Active-Targeting Drug Carrier. *ACS Infectious Diseases*, **5**, 218-227. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.8b00212>
- [54] Fulsundar, S., Harms, K., Flaten, G.E., *et al.* (2014) Gene Transfer Potential of Outer Membrane Vesicles of *Acinetobacter baylyi* and Effects of Stress on Vesiculation. *Applied and Environmental Microbiology*, **80**, 3469-3483. <https://doi.org/10.1128/AEM.04248-13>
- [55] Furuta, N., Takeuchi, H. and Amano, A. (2009) Entry of *Porphyromonas gingivalis* Outer Membrane Vesicles into Epithelial Cells Causes Cellular Functional Impairment. *Infection and Immunity*, **77**, 4761-4770. <https://doi.org/10.1128/IAI.00841-09>
- [56] Elluri, S., Enow, C., Vdovikova, S., *et al.* (2014) Outer Membrane Vesicles Mediate Transport of Biologically Active *Vibrio cholerae* Cytolysin (VCC) from *V. cholerae* Strains. *PLOS ONE*, **9**, e106731. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106731>
- [57] Koeppen, K., Hampton, T.H., Jarek, M., *et al.* (2016) A Novel Mechanism of Host-Pathogen Interaction through SRNA in Bacterial Outer Membrane Vesicles. *PLOS Pathogens*, **12**, e1005672. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005672>
- [58] Aldick, T., Bielaszewska, M., Uhlin, B.E., *et al.* (2009) Vesicular Stabilization and Activity Augmentation of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Haemolysin. *Molecular Microbiology*, **71**, 1496-1508. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06618.x>

- [59] Kim, S.W., Park, S.B., Im, S.P., *et al.* (2018) Outer Membrane Vesicles from β -Lactam-Resistant *Escherichia coli* Enable the Survival of β -Lactam-Susceptible *E. coli* in the Presence of β -Lactam Antibiotics. *Scientific Reports*, **8**, Article No. 5402. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23656-0>
- [60] Whitworth, D.E. (2011) Myxobacterial Vesicles Death at a Distance? *Advances in Applied Microbiology*, **75**, 1-31. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387046-9.00001-3>
- [61] Manning, A.J. and Kuehn, M.J. (2011) Contribution of Bacterial Outer Membrane Vesicles to Innate Bacterial Defense. *BMC Microbiology*, **11**, Article No. 258. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-258>
- [62] Reyes-Robles, T., Dillard, R.S., Cairns, L.S., *et al.* (2018) *Vibrio cholerae* Outer Membrane Vesicles Inhibit Bacteriophage Infection. *Journal of Bacteriology*, **200**, E00792-17. <https://doi.org/10.1128/JB.00792-17>
- [63] Wang, Y., Hoffmann, J.P., Chou, C.W., *et al.* (2020) *Burkholderia thailandensis* Outer Membrane Vesicles Exert Antimicrobial Activity against Drug-Resistant and Competitor Microbial Species. *Journal of Microbiology*, **58**, 550-562. <https://doi.org/10.1007/s12275-020-0028-1>
- [64] MacDonald, K.L. and Beveridge, T.J. (2002) Bactericidal Effect of Gentamicin-Induced Membrane Vesicles Derived from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 on Gram-Positive Bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, **48**, 810-820. <https://doi.org/10.1139/w02-077>
- [65] MacDonald, I.A. and Kuehn, M.J. (2012) Offense and Defense: Microbial Membrane Vesicles Play both Ways. *Research in Microbiology*, **163**, 607-618. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2012.10.020>
- [66] Lappann, M., Otto, A., Becher, D., *et al.* (2013) Comparative Proteome Analysis of Spontaneous Outer Membrane Vesicles and Purified Outer Membranes of *Neisseria meningitidis*. *Journal of Bacteriology*, **195**, 4425-4435. <https://doi.org/10.1128/JB.00625-13>
- [67] Li, Y., Zhao, R., Cheng, K., *et al.* (2020) Bacterial Outer Membrane Vesicles Presenting Programmed Death 1 for Improved Cancer Immunotherapy via Immune Activation and Checkpoint Inhibition. *ACS Nano*, **14**, 16698-16711. <https://doi.org/10.1021/acsnano.0c03776>
- [68] Chen, Q., Huang, G., Wu, W., *et al.* (2020) A Hybrid Eukaryotic-Prokaryotic Nanoplatfrom with Photothermal Modality for Enhanced Antitumor Vaccination. *Advanced Materials*, **32**, e1908185. <https://doi.org/10.1002/adma.201908185>
- [69] Chen, Q., Bai, H., Wu, W., *et al.* (2020) Bioengineering Bacterial Vesicle-Coated Polymeric Nanomedicine for Enhanced Cancer Immunotherapy and Metastasis Prevention. *Nano Letters*, **20**, 11-21. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.9b02182>
- [70] Zhuang, Q., Xu, J., Deng, D., *et al.* (2021) Bacteria-Derived Membrane Vesicles to Advance Targeted Photothermal Tumor Ablation. *Biomaterials*, **268**, Article ID: 120550. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.120550>
- [71] Chen, M.H., Liu, T.Y., Chen, Y.C., *et al.* (2021) Combining Augmented Radiotherapy and Immunotherapy through a Nano-Gold and Bacterial Outer-Membrane Vesicle Complex for the Treatment of Glioblastoma. *Nanomaterials (Basel)*, **11**, Article No. 1661. <https://doi.org/10.3390/nano11071661>
- [72] Kuerban, K., Gao, X., Zhang, H., *et al.* (2020) Doxorubicin-Loaded Bacterial Outer-Membrane Vesicles Exert Enhanced Anti-Tumor Efficacy in Non-Small-Cell Lung Cancer. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, **10**, 1534-1548. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2020.02.002>
- [73] Li, Y., Wu, J., Qiu, X., *et al.* (2022) Bacterial Outer Membrane Vesicles-Based Therapeutic Platform Eradicates Triple-Negative Breast Tumor by Combinational Photodynamic/Chemo/Immunotherapy. *Bioactive Materials*, **20**, 548-560. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2022.05.037>
- [74] Liu, X.Z., Wen, Z.J., Li, Y.M., *et al.* (2023) Bioengineered Bacterial Membrane Vesicles with Multifunctional Nanoparticles as a Versatile Platform for Cancer Immunotherapy. *ACS Applied Materials & Interfaces*, **15**, 3744-3759. <https://doi.org/10.1021/acsnano.1c05613>
- [75] Shi, J., Ma, Z., Pan, H., *et al.* (2020) Biofilm-Encapsulated Nano Drug Delivery System for the Treatment of Colon Cancer. *Journal of Microencapsulation*, **37**, 481-491. <https://doi.org/10.1080/02652048.2020.1797914>
- [76] Cui, C., He, Q., Wang, J., *et al.* (2023) Targeted MiR-34a Delivery with PD1 Displayed Bacterial Outer Membrane Vesicles-Coated Zeolitic Imidazolate Framework Nanoparticles for Enhanced Tumor Therapy. *International Journal of Biological Macromolecules*, **247**, Article ID: 125692. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.125692>
- [77] Guo, Q., Li, X., Zhou, W., *et al.* (2021) Sequentially Triggered Bacterial Outer Membrane Vesicles for Macrophage Metabolism Modulation and Tumor Metastasis Suppression. *ACS Nano*, **15**, 13826-13838. <https://doi.org/10.1021/acsnano.1c05613>
- [78] Wang, S., Huang, W., Li, K., *et al.* (2017) Engineered Outer Membrane Vesicle Is Potent to Elicit HPV16E7-Specific Cellular Immunity in a Mouse Model of TC-1 Graft Tumor. *International Journal of Nanomedicine*, **12**, 6813-6825. <https://doi.org/10.2147/IJN.S143264>
- [79] Huang, W., Shu, C., Hua, L., *et al.* (2020) Modified Bacterial Outer Membrane Vesicles Induce Autoantibodies for

- Tumor Therapy. *Acta Biomaterialia*, **108**, 300-312. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.03.030>
- [80] Grandi, A., Tomasi, M., Zanella, I., *et al.* (2017) Synergistic Protective Activity of Tumor-Specific Epitopes Engineered in Bacterial Outer Membrane Vesicles. *Frontiers in Oncology*, **7**, Article No. 253. <https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00253>
- [81] Cheng, K., Zhao, R., Li, Y., *et al.* (2021) Bioengineered Bacteria-Derived Outer Membrane Vesicles as a Versatile Antigen Display Platform for Tumor Vaccination via Plug-and-Display Technology. *Nature Communications*, **12**, Article No. 2041. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22308-8>
- [82] Yue, Y., Xu, J., Li, Y., *et al.* (2022) Antigen-Bearing Outer Membrane Vesicles as Tumour Vaccines Produced *in Situ* by Ingested Genetically Engineered Bacteria. *Nature Biomedical Engineering*, **6**, 898-909. <https://doi.org/10.1038/s41551-022-00886-2>
- [83] Zou, M.Z., Li, Z.H., Bai, X.F., *et al.* (2021) Hybrid Vesicles Based on Autologous Tumor Cell Membrane and Bacterial Outer Membrane to Enhance Innate Immune Response and Personalized Tumor Immunotherapy. *Nano Letters*, **21**, 8609-8618. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.1c02482>
- [84] Chen, L., Qin, H., Zhao, R., *et al.* (2021) Bacterial Cytoplasmic Membranes Synergistically Enhance the Antitumor Activity of Autologous Cancer Vaccines. *Science Translational Medicine*, **13**, Eabc2816. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abc2816>
- [85] Hu, T., Wolfram, J. and Srivastava, S. (2021) Extracellular Vesicles in Cancer Detection: Hopes and Hypes. *Trends Cancer*, **7**, 122-133. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2020.09.003>
- [86] Gujrati, V., Prakash, J., Malekzadeh-Najafabadi, J., *et al.* (2019) Bioengineered Bacterial Vesicles as Biological Nano-Heaters for Optoacoustic Imaging. *Nature Communications*, **10**, Article No. 1114. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09034-y>
- [87] Chen, Q., Rozovsky, S. and Chen, W. (2017) Engineering Multi-Functional Bacterial Outer Membrane Vesicles as Modular Nanodevices for Biosensing and Bioimaging. *Chemical Communications (Camb)*, **53**, 7569-7572. <https://doi.org/10.1039/C7CC04246A>