DOI：10.12287/j.issn.2096-8965.20230102

细菌膜囊泡的工程改造与应用

王玉亭，黄晓楠，饶贤才*

（陆军军医大学基础医学院，重庆 400038）

【摘要】细菌膜囊泡（Bacterial Membrane Vesicles，BMVs）是原核细菌在生长繁殖过程中产生的一种囊泡状结构，直径在20~400 nm之间。BMVs的主要成分为细菌蛋白质、核酸以及脂类。由于BMVs中蛋白和/或膜脂的免疫原性，可有效刺激机体的固有免疫和适应性免疫系统，产生针对相应抗原的免疫能力；同时因BMVs不含完整的基因组，无法自我增殖，具有较高的生物安全性，因而在疫苗制备、抗原/药物递送系统、抗肿瘤制剂研发方面具有广阔的应用前景。野生型细菌产生的BMVs通常产量较低，且携带内毒素等毒性成分，故常常需要对BMVs产生菌或BMVs本身进行工程改造，实现降低BMVs毒性，提高BMVs产量，增强BMVs的免疫原性，促进工程化BMVs的开发应用。

【关键词】细菌外膜囊泡；基因工程改造；疫苗开发；药物递送；肿瘤治疗

中图分类号：Q789，R730.5　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：2096-8965（2023）01-0006-09

Engineering bacterial membrane vesicles for application

Wang Yuting, Huang Xiaonan, Rao Xiancai*

(College of Basic Medical Sciences, Army Medical University, Chongqing 400038, China)

【**Abstract**】Bacterial membrane vesicles (BMVs) are nanoscale vesicular structures produced by prokaryotic bacteria during their growth. The diameter of BMVs varies between 20 and 400 nm. BMVs can incorporate bacterial proteins, nucleic acids, and lipids. On the one hand, BMVs can effectively stimulate host immune response to set up immune protection ability. On the other hand, BMVs are biosafe candidates for vaccine development, drug delivery, and cancer therapy owing to the lack of self-replication ability. However, wild-type bacteria have poor BMV yields, and BMVs from the wild-type bacterial strains may be unsafe due to the carriage of bacterial toxins, such as lipopolysaccharides, hemolysins, and harmful proteins. In this review, we summarize the engineering modification of BMV-producing bacteria as well as BMVs themselves to attenuate BMVs toxicity, enhance vesicle immunogenicity, and increase BMVs production. The engineered BMVs show broad applications in Biomedicine.

【**Keywords**】Bacterial membrane vesicles; Genetic engineering; Vaccine development; Drug delivery; Cancer treatment

0　引言

细胞外膜囊泡（Extracellular Vesicles，EVs）是生物细胞，包括真核生物细胞和原核生物细胞，在生长繁殖过程中自然产生的一种纳米级囊泡状结构[1, 2]。已有研究表明，原核生物细胞，如革兰氏阴性（Gram−negative，G^-）菌具有双层膜结构，其膜囊泡能直接从外膜分泌，故称为外膜囊泡（Outer

收稿日期：2022-07-19；**修回日期**：2022-07-30

基金项目：国家自然科学基金面上项目（82071857）

通信作者：饶贤才（1967-），男，浙江江山人，教授，主要从事细菌膜泡应用研究。E-mail：raoxiancai@126.com

Membrane Vesicles，OMVs）[3]；与之不同的是，革兰氏阳性（Gram-positive，G^+）菌只有1层细胞膜，且膜外覆盖着厚厚的细胞壁肽聚糖层，故G^+菌产生膜囊泡（Membrane Vesicles，MVs）的能力直到2009年才被发现[4]。从结构和组成上看，无论是G^-菌的OMVs，还是G^+菌的MVs，都是纳米级脂质膜结构，大小在20~400 nm之间，既可携带宿主菌来源的蛋白质如膜蛋白、脂蛋白、细菌毒素，以及脂质如G^-菌的脂多糖（Lipopolysaccharide，LPS），也可携带宿主菌来源的核酸如质粒、染色体片段、RNA等，因而统称为细菌膜囊泡（Bacterial Membrane Vesicles，BMVs）[5]。研究证实，BMVs具有多种生物学活性，不仅在病原菌致病及其与宿主相互作用过程中发挥重要作用，而且在开发应用上有巨大潜力[3, 6]。首先，多种细菌抗原可展示在膜囊泡表面或存在于BMVs内部，能够刺激机体固有免疫和适应性免疫应答，具有疫苗开发潜力；第二，BMVs作为一种细菌分泌的产物，不含完整的基因组，因而不具有生长繁殖能力，在开发使用时制剂本身不会引起感染；第三，BMVs可携带外源物质，可作为疫苗或药物递送载体使用；最后，BMVs为纳米级颗粒，具有较好的扩散力和生物利用度[7]。然而，要将BMVs投入实际应用仍具有极大挑战，如BMVs潜在的生物毒性、自然产量较低和免疫原性不足等[3, 7]。随着基因工程等技术的不断发展，以及人们对BMVs研究的不断深入，通过对BMVs产生菌以及膜囊泡本身的工程改造，可以实现BMVs产量提高、安全性进一步改善以及免疫原性的持续增强，所制备的工程化BMVs在疫苗研发、药物递送以及肿瘤治疗领域具有广阔的应用潜力。

1 细菌膜囊泡的工程改造

BMVs的工程改造包括对膜囊泡产生菌的基因工程改造和对已制备膜囊泡的改造两个方面，改造的主要目的是使BMVs减毒、提高产量、增强免疫原性和靶向能力等[5, 7, 8]，其策略如图1所示。

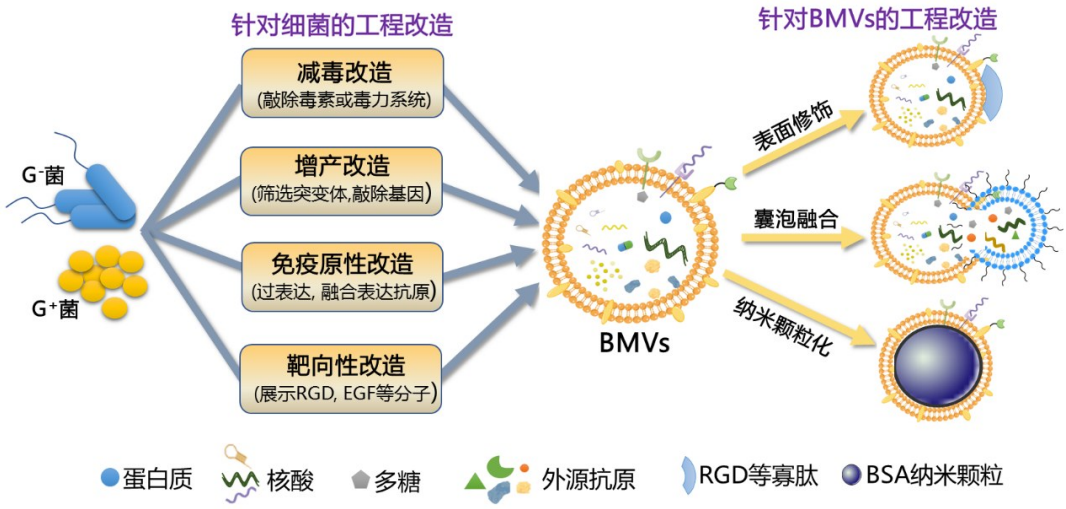


图1 BMVs工程改造策略示意图

1.1 针对BMVs产生菌的基因工程改造

1.1.1 BMVs减毒改造

LPS是G^-菌外膜的主要组成成分，当细菌感染宿主时，LPS能被巨噬细胞上的受体（如TLR4、TLR2、MD-2和CD14）所识别，上调核转录因子κB（Nuclear Transcription Factor-kappa B，NF-κB）和丝裂原活化蛋白激酶（Mitogen-Activated Protein Kinase，MAPK）等信号通路，分泌大量的炎症因子（如TNF-α、IL-6等），引起机体炎症反应乃至导致脓毒性休克[9]。研究表明，G^-菌BMVs中含有大量的LPS和外膜蛋白，其中LPS的结构直接影响BMVs的毒力，此为限制BMVs应用的一大关键因素[7, 9]。G^-菌LPS由类脂A、核心寡糖和O抗原多糖三部分组成[10]，理论上，通过改变和修饰LPS结构可以大大降低BMVs的毒力，具体改造包括类脂A的酰基化和磷酸化，核心寡糖的合成和转运，O抗原多糖的聚合等[11]。类脂A由一个六酰基化的二聚葡萄糖胺骨架，六条酰基链和两个磷酸基团组成。酰基转移酶LpxM、LpxL和PagL是参与大肠埃希菌、沙门菌等G^-菌类脂A修饰的主要功能酶。Lee

等[12]敲除了大肠埃希菌中编码磷酸酶的*lpxF*基因，感染小鼠后，其体重下降和肺部炎症均较野生株轻微。Ranallo等[13]发现敲除了志贺菌*msbB*（*lpxM*）后，类脂A变成五酰基化的TLR4拮抗剂—类脂IVA，免疫小鼠72 h后致死率降至37%~50%（野生株致死率100%）。操纵子*waa*和*wba*（*rfb*）分别为G^-菌中合成核心寡糖和O抗原多糖的基因簇，缺乏全长的O抗原和/或核心多糖不完整则会导致LPS截短[14]。Liu等[15]发现沙门氏菌*waaC*，*rfaH*或*rfbP*缺失菌株的BMVs较野生株BMVs鼻内免疫的小鼠存活率更高。由此可见，针对G^-菌LPS合成关键基因进行基因工程改造，导致LPS合成缺失或结构不完整是BMVs减毒的重要手段，但应当把改造建立在不影响工程菌生长的基础上，以确保工程菌BMVs的产量。

G^+菌细胞壁则不存在外膜结构，故其分泌的BMVs不受G^-菌类似LPS的影响，但却携带了许多与病原菌黏附和侵袭有关的毒力因子，可以发挥促炎作用，刺激宿主细胞因子和趋化因子产生[16]。利用基因工程改造技术，可以降低毒力因子的表达从而减弱BMVs毒性。在金黄色葡萄球菌中，毒力因子的表达受复杂调控网络的调节，该网络可响应宿主或环境的变化，通过感知环境信号，改变自身生存所需的毒力因子表达。在这些调节系统中，研究最深入的是辅助基因调节系统（accessory gene regulator，*agr*）和双组份调节系统SaeR/S。*agr*编码了一个调节细菌毒力的群体感应系统，对金黄色葡萄球菌外毒素分泌和细菌表面蛋白表达有着重要的调节作用[17]；SaeR/S双组份调节系统则由两个启动子P1和P3控制的四个基因（*saeP*、*saeQ*、*saeR*和*saeS*）组成，在调控包括溶血素、杀白细胞素、超抗原、表面蛋白和蛋白酶在内的20多种毒力因子的产生中起重要作用[18]。为研究金黄色葡萄球菌*agr*系统和SaeR/S双组份系统与细菌分泌膜囊泡毒力之间的关系，本课题组Yuan等[19]发现敲除金黄色葡萄球菌RN4220菌株的*agr*系统后，其产生的BMVs对小鼠的致病性显著降低，毒力显著下降。另外，Wang等[20]研究也发现敲除金黄色葡萄球菌JE2菌株的*agr*和*spa*（编码蛋白A，*agr*缺失株过度表达*spa*）后其产生的BMVs显著抑制了*hla*（编码α毒素）和编码所有9个杀白细胞素基因的mRNA表达，对小鼠金黄色葡萄球菌致死性败血症有显著保护作用；敲除金黄色葡萄球菌JE2菌株的*agr*和*sea*（编码肠毒素A）基因后，其产生的BMVs对THP-1细胞毒性大大降低[21]。可见，对细菌的毒力基因以及毒力调控基因进行单一或联合敲除，工程菌产生BMVs的毒力可显著降低，大大提高BMVs的安全性。

1.1.2 提高BMVs产量改造

BMVs自然产量普遍较低，通常为100~1 000 μg/L，大大限制了其开发应用的进展[7]。阐明BMVs形成和分泌的调控机制是进行基因工程改造、提高BMVs产量的基础和前提。G^-菌产生的BMVs，可通过调控细菌生长、外膜成分积累或降低外膜与肽聚糖交联程度实现BMVs产量提高[22]。G^+菌则因缺乏外膜，其膜泡产生机制研究相对较少。在G^+菌BMVs产生过程中，菌株包膜上的传感器激酶、双组分系统、蛋白分泌系统等可能是BMVs生成的重要调节系统[23, 24]。Obana等[23]研究发现产气荚膜梭菌的芽胞形成途径与其BMVs产生有关，芽胞形成控制基因*spo0A*编码的Spo0A蛋白中一个保守的天冬氨酸残基磷酸化是该菌产生BMVs所必须的；PE1316、ReeS激酶可通过磷酸化Spo0A蛋白从而调控BMVs的产生，*spo0A*基因敲除菌株BMVs产量下降约5倍。在甲型链球菌中，CovRS双组分系统负调控BMVs的产生，该双组分系统失活突变可导致细菌蛋白和RNA在BMVs中富集，促进BMVs产量提高[24]。结核分枝杆菌通过Pst/SenX3-RegX3信号通路调控BMVs产生，敲除*pstA1*（编码Pst系统跨膜组分）后，胞外磷酸盐合成减少，Pst系统的抑制作用减弱，导致SenX3-RegX3的激活，使BMVs产量增高约15倍[25]。其他特异性基因也可参与调控BMVs产生。例如，结核分枝杆菌通过转录调节因子*virR*基因失活刺激BMVs大量产生[26]。Wen等[27]使用功能基因组学方法，鉴定了影响变形链球菌BMVs产生的相关基因，包括*sfp*、*bacA*、*bacA2*、*dac*、*pdeA*等，这些基因可显著增加或降低BMVs的产量，如*sfp*基因缺失菌株BMVs产量较野生株提高1.74倍，而*bacA2*缺失菌株BMVs产量则降低约1.5倍。研究还表明，BMVs的产生依赖于代谢活跃的细菌，应激因子*sigB*可能是革兰氏阳性菌BMVs产生的重要调控分子，在单核细胞增生李斯特菌中，*sigB*敲除株的BMVs产量较野生株降低约9倍[28]。

BMVs释放的第一步常常以细胞包膜出芽的方式进行，通过改变细胞膜流动性可促进细胞膜出

芽，其中脂蛋白在维持细胞膜流动性上起重要作用[20, 29]。Schlatterer等[29]研究发现金黄色葡萄球菌BMVs中含有大量细胞质蛋白，酚可溶性小肽α（Phenol-Soluble Modulin α，PSMα）可从葡萄球菌细胞质膜中动员脂蛋白，增加膜的流动性，促进BMVs的释放。因PSMα与细菌细胞质膜中脂蛋白动员有关，故敲除金黄色葡萄球菌USA300 *psmα*基因后BMVs产量会显著降低，过表达*psmα*则BMVs产量较*psmα*缺失菌株提高约3.5倍[29]。Lgt蛋白催化细菌脂蛋白的酰基化，在脂蛋白脂化和成熟过程中发挥重要作用，脂蛋白的缺乏导致金黄色葡萄球菌膜流动性增加，敲除*lgt*后BMVs产量显著提高[29]。Brown等[30]发现枯草芽胞杆菌产生的BMVs能被脂肽表面活性素破坏，而脂肽表面活性素生物合成中至关重要的Sfp蛋白缺失，会导致BMVs累积。在G^+菌中，高度交联的肽聚糖是BMVs产生的主要限制性屏障，因此，BMVs的高产通常需要肽聚糖层的降解或交联的减少。当金黄色葡萄球菌用亚致死浓度的青霉素G处理时，肽聚糖层交联减少，BMVs产量较未处理菌株增加约10倍；敲除金黄色葡萄球菌细胞壁合成相关基因，如*pbp4*和*tagO*（编码壁磷壁酸与肽聚糖锚定的糖聚合酶），也可导致细菌肽聚糖层交联度下降，BMVs产量提高3~4倍[20]。*sle1*可表达肽聚糖水解酶，敲除*sle1*后金黄色葡萄球菌BMVs产量减少，过表达*sle1*则使BMVs产量显著增加[31]。此外，噬菌体能产生一种被称为内溶酶的肽聚糖水解酶，它能从内部破坏细菌的细胞壁，促进BMVs释放，提高MVs产量[32]。可见，不同的基因对BMVs产生的作用不同，有的正调控BMVs产生，有的则相反。从提高BMVs产量的目标出发，将某些限制BMVs产生的靶基因进行敲除，对提高BMVs产量是有效的。

1.1.3 增强BMVs免疫原性改造

各种病原相关模式分子（Pathogen-Associated Molecular Patterns，PAMP）的存在赋予BMVs一定的佐剂活性，这些PAMP分子可通过宿主细胞的模式识别受体（Pattern Recognition Receptors，PRR）发挥功能[33]。在G^-菌中，位于BMVs膜上的LPS和脂蛋白分别能与宿主抗原提呈细胞表面的TLR4、TLR2和TLR8相互作用，增加抗原提呈细胞对BMVs的识别和吸收，从而激活抗原提呈细胞；位于BMVs囊腔中的DNA和RNA与位于抗原提呈细胞内体中的TLR9和TLR3相互作用，可进一步激活抗原提呈细胞，活化的提呈细胞通过对BMVs的识别和摄取促进抗原呈递、共刺激分子的表达以及促炎性细胞因子的分泌，导致T细胞活化[7]。活化的$CD8^+$ T细胞则可特异性杀灭被细菌感染的细胞，$CD4^+$T细胞还可增强$CD8^+$T细胞的细胞毒性并促进B细胞产生抗体，引起有效的适应性免疫应答[34]。在G^+菌中，与金黄色葡萄球菌BMVs相关的孔毒素（Pore-Forming Toxins，PFTs）可通过K^+通道被人巨噬细胞内化，并激活炎性小体NLRP3（Nucleotide-Binding Oligomerization Domain, Leucine-Rich Repeat and Pyrin Domain-Containing 3），促进IL-1β和IL-18的产生[21]；金黄色葡萄球菌、分枝杆菌BMVs中的脂蛋白还可通过刺激TLR2产生强烈的免疫应答[35]。

研究表明，诱导有效免疫反应的关键是抗原提呈细胞摄取含抗原的颗粒，抗原的数量与BMVs的免疫原性密切相关，基因工程化增强BMVs免疫原性的策略主要有两种[36-38]。一种是过表达目标抗原。鼠疫耶尔森菌BMVs诱导的免疫反应主要针对免疫优势的LcrV抗原。Wang等[36]通过构建基于Asd的平衡致死宿主载体系统，在pCD1缺失（pCD1质粒上含有编码保护性抗原LcrV的基因）的鼠疫菌中工程化过表达鼠疫耶尔森氏菌的LcrV抗原，则工程菌产生BMVs的LcrV抗原载量相较野生株显著提高，利用该BMVs免疫小鼠可产生针对LcrV、YPL和F1抗原的高滴度IgG、较高水平的Th1型细胞因子（IFN-γ，IL-2，IL-17和TNF-α），显著增强了BMVs的免疫原性。另一种则是基于共价载体融合表达多价抗原。目前研究较多的是ClyA（一种可形成膜通道的溶血分子）、Hbp、AIDA和FLAG共价载体[37, 38]。Hbp由N’端可切割信号序列（ss）、形成蛋白质功能结构域、C’端β结构域组成，成熟的Hbp常可折叠成~100 Å的β螺旋茎结构，作为五个突出侧结构域（D1~D5）的稳定骨架。Daleke-Schermerhorn等[38]将结核分枝杆菌抗原$Ag85B_N$、$Ag85B_C$、ESAT6及Rv2660c分别替换侧结构域D1、D2、D4和D5，在大肠埃希菌中重组表达$HbpD-Ag85B_{N+C}$-ESAT6-Rv2660c，该重组蛋白能通过Hbp靶向到细菌BMVs表面，免疫加载有重组抗原的BMVs可诱导小鼠产生针对结核分枝杆菌抗原的$CD4^+$T细胞反应。另有研究者建立了SpyTag/SpyCatcher蛋白连接技术，将SpyTag与Hbp融合不会影响Hbp在BMVs中的定位，携带不同抗原的SpyCatcher可以BMVs上SpyTag直

接连接，从而将目标抗原加载到BMVs中，可有效刺激机体的免疫应答[39]。

1.1.4 增强BMVs靶向性改造

研究表明，病原性细菌具有良好的肿瘤组织靶向性，因为病原菌多为兼性厌氧菌，而肿瘤组织相对缺氧[40]。临床研究证实，注射减毒的活细菌是安全的，但抗肿瘤的效果有限[41]。BMVs可携带外源物质，如抗肿瘤药物，但其靶向性不强。针对BMVs靶向性，有研究将抗地高辛单链Fv片段融合至膜囊泡相关GlyA蛋白的C-端，使重组的BMVs成为免疫靶向性膜囊泡（immuno-BMVs）[42]。Gao等[5]将RGD寡肽与细菌ClyA融合，获得表达有RGD的BMVs。体内和体外实验均表明RGD修饰的BMVs在肿瘤部位显著富集，其机制可能与RGD小肽靶向免疫细胞、肿瘤血管以及肿瘤细胞等的作用有关。Kim等[43]则将上皮细胞生长因子（Epidermal Growth Factor，EGF）与细菌膜蛋白PrsA融合，制备EGF修饰的重组BMVs，利用A549细胞肺癌表达EGF受体的特性实现重组BMVs的组织靶向性。

由此可见，基于细菌产生BMVs的应用潜力，针对细菌进行基因工程改造，可有效实现BMVs减毒、高产、免疫原性和靶向性增强等目标，为其开发应用奠定基础。

1.2 针对BMVs的工程改造

从应用的实际出发，除对细菌进行基因工程改造以改变BMVs性能外，还可对获得的BMVs进行工程改造，主要策略有三种（见图1）。

第一种，BMVs的表面修饰。如Chen等[44]将RGD寡肽与BMVs表面的特定分子进行共轭交联以提高肿瘤靶向性，而BMVs中装载有聚合物胶束，可形成纳米复合物；注射该复合物可在小鼠乳腺癌移植模型的瘤组织中显著富集。

第二种，BMVs的融合。研究表明，不同细菌乃至同一种细菌的不同菌株产生BMVs的成分都存在异质性；为获得均一性较好的BMVs制剂，将不同来源的BMVs在体外进行融合也是一种改造策略[7]。这种改造一方面可以调整BMVs的大小，另一方面可获得更好的抗原多样性。如Gnopo等[45]在酸性pH条件下（pH=3.6）诱导大肠埃希菌Nissle菌株1917（EcN OMV）和菌株ClearColi（CC OMV）的膜囊泡融合，形成多功能膜囊泡，大大提高了BMVs的免疫原性。

第三种，BMVs的纳米颗粒化。诱导有效免疫反应的关键是抗原提呈细胞摄取含抗原的颗粒[7]。研究表明，纳米颗粒核心可能会增强BMVs上病原体特异性表位的展示，这将有助于树突状细胞等抗原提呈细胞摄取的增加以及抗体和细胞反应的增强[7, 46]。BMVs纳米颗粒的大小、形状和刚性会影响细胞的吸收、抗原呈递和抗原提呈细胞的活化[46]。因此，将BMVs纳米颗粒化不失为一种细菌膜囊泡改造的新手段。Shima等[46]的研究发现，40、100和200 nm大小的聚γ-谷氨酸颗粒在小鼠皮下注射时，吸收40 nm颗粒的树突状细胞的数量是吸收200 nm颗粒的树突状细胞的2倍；而与40 nm颗粒相比，吸收200 nm颗粒的抗原的相对量是其3倍，表明较小尺寸的纳米粒子能更有效地被吸收，但是较大尺寸的纳米粒子可以向抗原提呈细胞递送更多的抗原。因此，适当控制纳米颗粒的形状可以使其免疫效果最大化。Wu等[47]通过机械挤压工艺将肺炎克雷伯菌BMVs包被直径约70 nm的BSA纳米颗粒，合成直径约100 nm的BN-BMVs，相比野生型BMVs，BN-BMVs刺激免疫细胞后CD11c、CD40、CD80、CD86和MHC-Ⅱ的表达均显著升高。

2 工程化细菌膜囊泡的应用

2.1 疫苗方面的应用

疫苗是针对疾病的病原体或与其相关的蛋白抗原、多糖或核酸，以一种或多种成分，通过载体或直接免疫接种进入机体后，可诱导机体产生特异的体液和/或细胞免疫，从而获得预防该病的免疫力或发挥治疗作用。传统疫苗采用灭活/减毒的病原体或病原体毒素或不致病的蛋白质来使机体产生特异性免疫[48]。因BMVs含有病原体相关抗原，同时BMVs本身不具备感染性，安全性较高，故常常被用作疫苗进行开发（见图2）。在BMVs疫苗应用方面，脑膜炎奈瑟氏菌BMVs疫苗研究最多。目前，获准用于预防B型脑膜炎奈瑟氏菌感染的MenB膜囊泡疫苗已有两种（MenB-4C和MenB-FHbp）获批在欧洲上市[49, 50]。研究表明，单价B型脑膜炎奈瑟氏菌BMVs疫苗诱导的免疫应答主要针对免疫优势的PorA，该抗原具有高度的序列多样性，在B型脑膜炎奈瑟氏菌流行菌株覆盖方面存在局限性，而FHbp是几乎所有脑膜炎奈瑟菌分离株都具有的表面蛋白，具有高度的免疫原性，将其重组表达在MenB-4C和MenB-FHbp中，可为致病性脑膜炎奈瑟氏菌感染提供更广泛的保护[51]。

肺炎链球菌和分枝杆菌BMVs富含脂蛋白，免疫小鼠可产生抗肺炎链球菌、分枝杆菌BMVs的抗体，诱导体液免疫应答[52, 53]；接种金黄色葡萄球菌BMVs的小鼠可诱导Th1、Th17和Th2细胞以及IgG抗体反应，从而获得对金黄色葡萄球菌肺部感染的细胞免疫和体液免疫保护，且可以通过抗原提呈细胞增强共刺激分子的表达以及IL-12和IL-6（分别为Th1和Th17极化细胞因子）的产生[16]。工程化BMVs作为疫苗使用具有巨大潜力，通过基因工程敲除金黄色葡萄球菌*agr*、*spa*并表达无毒的HlaH35L、LukE可获得高免疫原性的减毒BMVs，在金黄色葡萄球菌致死性脓毒症模型中保护小鼠，表明这些天然产生的BMVs具有作为新型疫苗的巨大潜力[20]。

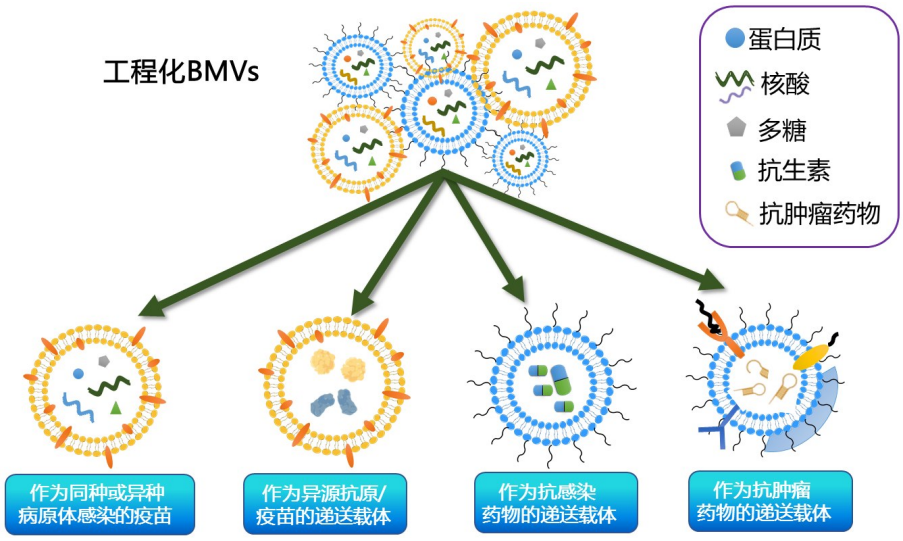


图2 工程化BMVs的应用示意图

2.2 抗原递送载体方面的应用

BMVs是细菌天然产生的、无复制增殖能力的、具有高度免疫原性的纳米级膜状结构，当用作免疫制剂使用时，可以诱导保护性免疫应答[7]。同时，也可以通过与异源抗原融合以及将异源抗原工程化至BMVs，使其呈现在BMVs表面或囊中，将BMVs作为抗原递送载体进行开发利用[7, 8]。革兰氏阴性菌产生的BMVs在表面和囊内载荷抗原以及与抗原融合已有大量研究。如在大肠埃希菌BMVs的囊泡腔中可观察到细菌表达的外源蛋白，其递送过程大致是工程菌表达的外源蛋白先分泌至细菌的周质间隙，BMVs在释放过程中可能从周质间隙摄取外源蛋白，并将其整合入BMVs囊腔内，实现外源蛋白递送[54]。BMVs也能承载大肠埃希菌细胞表面锚定的外源蛋白。在技术上，将外源基因与BMVs主要成分ClyA、HBP或AIDA等编码基因融合，则目标外源蛋白能以融合蛋白的形式被携带到BMVs的表面，实现递送[37, 38]。例如，Huang等[55]研究者在大肠埃希菌DH5α中过表达ClyA-Omp22融合蛋白，该工程菌产生的BMVs中即含有鲍曼不动杆菌的Omp22膜蛋白抗原，可刺激小鼠产生强烈的Omp22特异性体液免疫应答，保护小鼠免受鲍曼不动杆菌的致命性攻击。Irene等[35]利用脂蛋白转运途径工程化制备带有外源蛋白的BMVs，筛选了5种金黄色葡萄球菌抗原HlaH35L、SpAKKAA、LukE、Csa1A和FhuD2作为与脂蛋白序列的融合承载体，表达在大肠埃希菌BL21（DE3）Δ*ompA*/Δ*msbB*/Δ*pagP*三基因敲除菌株中，制备的BMVs免疫小鼠可诱导抗原特异性抗体，保护小鼠免受金黄色葡萄球菌感染。在与抗原融合方面，Salverda等[56]通过设计一组OspA（一种伯氏疏螺旋体脂蛋白）与fHbp（一种脑膜炎奈瑟菌表面暴露的脂蛋白）的融合物，并在脑膜炎奈瑟氏菌BMVs表面成功表达fHbp-OspA融合物，实验证实，这些表面暴露的fHbp-OspA融合物在免疫小鼠中可引起强烈的免疫反应。

革兰氏阳性菌BMVs也可携带抗原，诱导机体产生保护性免疫应答。如肺炎链球菌、结核分枝杆菌、金黄色葡萄球菌BMVs携带的分泌蛋白具有高度免疫原性，能诱导小鼠产生保护性免疫反应[16, 52, 53, 57]。但是，G^+菌BMVs载荷抗原却鲜有研究报道。在BMVs中装载外源抗原的方法通常是将异源抗原通过与周质蛋白或分泌信号分子融合，通过

递送呈现在BMVs中。本课题组曾利用FLAG标签作为外源分子，在金黄色葡萄球菌RN4220菌株中鉴定出至少4种蛋白具有异源抗原递送能力，包括PdhB、Eno、Mntc和PdhA；这些承载分子均可携带FLAG标签并成功呈现在BMVs上。进一步将PdhB、Eno、Mntc蛋白与登革病毒保护性简并抗原EDⅢconA、EDⅢconB及NS1融合表达，所制备的工程化膜囊泡经一次注射免疫小鼠即可诱导产生保护性免疫反应，可保护小鼠抵御4种血清型的登革病毒感染[58]。Chen等[59]则将金黄色葡萄球菌产生的BMVs包被在吲哚菁绿（ICG）的磁性介孔二氧化硅纳米粒子（MSN）上，构建了多抗原疫苗（EV/ICG/MSN），可刺激树突状细胞，通过MHC-Ⅰ类抗原呈递，启动$CD8^+$T细胞应答，同时上调共刺激分子、MHC-Ⅱ分子和细胞因子的表达，发挥促进$CD4^+$T细胞反应和体液免疫作用，不仅可以预防金黄色葡萄球菌的皮肤/软组织感染，还可以降低细菌的侵袭能力。

2.3 抗感染药物递送的应用

合成纳米材料，如脂质体、聚合物和金属纳米粒子，已作为药物载体被广泛研究，但合成纳米粒子不能有效与细胞相互作用[7, 33]。而细菌细胞膜衍生的BMVs不仅具有一定佐剂特性，还可利用膜结构特性有效地与细胞发生相互作用，可以被动地聚集在感染部位，或者主动靶向病原体和巨噬细胞[36]。更为重要的是，在巨噬细胞吞噬过程中，BMVs颗粒与病原体可以共享相同的途径，从而允许将有效药物载荷递送到被感染的细胞中，增强渗透性并允许治疗药物在这些细胞内释放而发挥治疗作用。例如，Gao等[60]研究发现使用包被有金黄色葡萄球菌BMVs的纳米颗粒（即NP@EV）作为活性靶向抗生素载体，在体外和体内均具有主动靶向能力，被金黄色葡萄球菌感染小鼠的巨噬细胞和血行播散的4个主要器官（肾、肺、脾和心）中均检测到比健康对照组更高的药物蓄积浓度。

2.4 抗肿瘤药物递送的应用

近年来，BMVs在肿瘤治疗中的作用引起广泛关注[5, 8]。与大多数其他传统的药物输送系统相比，BMVs具有作为癌症治疗药物载体的独特功能，纳米级BMVs包含各种免疫刺激分子，通过增强渗透保留（Enhanced Permeability and Retention，EPR）效应，在肿瘤组织中富集并启动抗肿瘤免疫反应[7]。目前研究最多的是革兰氏阴性菌[61-63]，将BMVs作为介导选择性靶向肿瘤细胞化疗药物的递送系统，可增强治疗功效并降低全身性治疗毒副作用。如Chen等[44]研究者将减毒沙门氏菌的BMVs涂覆到负载有替加氟的胶束上，激活宿主对癌症免疫治疗的免疫应答，然后将药物主动靶向到肿瘤部位，发挥化疗和免疫调节作用，不仅可提供有效的抗黑色素瘤免疫保护，而且可以显著抑制体内肿瘤的生长，延长黑色素瘤小鼠的寿命。对于革兰氏阳性菌，BMVs作为肿瘤药物载体尚未见研究报道，但李斯特菌对胰腺癌显示出良好的治疗作用，其产生的BMVs未来可能在肿瘤免疫治疗方面具有潜力[64]。

3 总结与展望

目前对BMVs的产生机制尚不完全清楚，仅发现细菌的双组分系统、蛋白分泌系统、芽胞形成途径等与BMVs的产生有关，但BMVs在激活免疫系统方面的重要作用已得到广泛认可。利用BMVs的天然免疫原性及潜在佐剂特性，通过基因工程改造可获得安全性好、免疫原性高、具有特定靶向能力的工程化BMVs，为多种细菌性和病毒性疾病的新型疫苗设计和特定目标抗原递送提供了新的技术手段和平台，显示了巨大的应用潜力。重要的是，工程化BMVs通过递送肿瘤特异性药物正在改变肿瘤的治疗方向。携带多种抗原且具有广泛治疗活性的工程化BMVs正面临着新的发展机遇，为了开发安全有效的治疗方法，未来的研究应尽早解决BMVs不同批次制剂均一性、纯度、颗粒大小、组织特异性和不良免疫原性等方面的问题。

参 考 文 献

[1] GILL S, CATCHPOLE R, FORTERRE P. Extracellular membrane vesicles in the three domains of life and beyond[J]. FEMS Microbiol Rev, 2019, 43(3): 273-303.

[2] JANDA M, ROBATZEK S. Extracellular vesicles from phytobacteria: Properties, functions and uses[J]. Biotechnol Adv, 2022, 58: 107934.

[3] KAPARAKIS-LIASKOS M, FERRERO R L. Immune modulation by bacterial outer membrane vesicles[J]. Nat Rev Immunol, 2015, 15(6): 375-387.

[4] LEE E Y, CHOI D Y, KIM D K, et al. Gram-positive bacteria produce membrane vesicles: proteomics-based characterization of *Staphylococcus aureus*-derived membrane vesicles[J]. Proteomics, 2009, 9(24): 5425-5436.

[5] GAO J, SU Y, WANG Z. Engineering bacterial membrane nanovesicles for improved therapies in infectious diseases and cancer[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2022, 186: 114340.

[6] HUA Y, WANG J, HUANG M, et al. Outer membrane vesicles-transmitted virulence genes mediate the emergence of new antimicrobial-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*[J]. Emerg Microbes Infect, 2022, 11(1): 1281-1292.

[7] QIAO L, RAO Y, ZHU K, et al. Engineered remolding and application of bacterial membrane vesicles[J]. Front Microbiol, 2021, 12: 729369.

[8] LONG Q, ZHENG P, ZHENG X, et al. Engineered bacterial membrane vesicles are promising carriers for vaccine design and tumor immunotherapy[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2022, 186: 114321.

[9] KONG Q, SIX D A, LIU Q, et al. Phosphate groups of lipid A are essential for *Salmonella enterica* serovar Typhimurium virulence and affect innate and adaptive immunity[J]. Infect Immun, 2012, 80(9): 3215-3224.

[10] RAETZ C R, WHITFIELD C. Lipopolysaccharide endotoxins[J]. Annu Rev Biochem, 2002, 71: 635-700.

[11] 杨君, 李冰, 蔡汝健, 等. 脂多糖修饰对革兰阴性菌毒力及外膜囊泡生物学特性影响的研究进展[J]. 动物医学进展, 2020, 41(2): 98-103.

[12] LEE T Y, KIM C U, BAE E H, et al. Outer membrane vesicles harboring modified lipid A moiety augment the efficacy of an influenza vaccine exhibiting reduced endotoxicity in a mouse model[J]. Vaccine, 2017, 35(4): 586-595.

[13] RANALLO R T, KAMINSKI R W, GEORGE T, et al. Virulence, inflammatory potential, and adaptive immunity induced by *Shigella flexneri msbB* mutants[J]. Infect Immun, 2010, 78(1): 400-412.

[14] LIU Q, LIU Q, ZHAO X, et al. Immunogenicity and cross-protective efficacy induced by outer membrane proteins from *salmonella typhimurium* mutants with truncated LPS in mice[J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(3): 416.

[15] LIU Q, LIU Q, YI J, et al. Outer membrane vesicles derived from *Salmonella Typhimurium* mutants with truncated LPS induce cross-protective immune responses against infection of Salmonella enterica serovars in the mouse model[J]. Int J Med Microbiol, 2016, 306(8): 697-706.

[16] CHOI S J, KIM M H, JEON J, et al. Active immunization with extracellular vesicles derived from *Staphylococcus aureus* effectively protects against staphylococcal lung infections, mainly via Th1 cell-mediated immunity[J]. PLoS One, 2015, 10(9): e0136021.

[17] JENUL C, HORSWILL A R. Regulation of *staphylococcus aureus* virulence[J]. Microbiol Spectr, 2019, 7(2): 669-686

[18] LIU Q, YEO W S, BAE T. The SaeRS two-component system of *staphylococcus aureus*[J]. Genes (Basel), 2016, 7 (10): 81.

[19] 袁吉振, 杨杰, 袁文常, 等. 金黄色葡萄球菌*agr*基因敲除及其对膜泡毒力影响[J]. 第三军医大学学报, 2014, 36(4): 331-335.

[20] WANG X, THOMPSON C D, WEIDENMAIER C, et al. Release of *Staphylococcus aureus* extracellular vesicles and their application as a vaccine platform[J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 1379.

[21] WANG X, EAGEN W J, LEE J C. Orchestration of human macrophage NLRP3 inflammasome activation by *Staphylococcus aureus* extracellular vesicles[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2020, 117(6): 3174-3184.

[22] TOYOFUKU M, NOMURA N, EBERL L. Types and origins of bacterial membrane vesicles[J]. Nat Rev Microbiol, 2019, 17(1): 13-24.

[23] OBANA N, NAKAO R, NAGAYAMA K, et al. Immunoactive clostridial membrane vesicle production is regulated by a sporulation factor[J]. Infect Immun, 2017, 85(5): e00096.

[24] RESCH U, TSATSARONIS J A, LE RHUN A, et al. A two-component regulatory system impacts extracellular membrane-derived vesicle production in group A *Streptococcus*[J]. mBio, 2016, 7(6) : e00207-16.

[25] WHITE D W, ELLIOTT S R, ODEAN E, et al. *Mycobacterium tuberculosis* Pst/SenX3-RegX3 regulates membrane vesicle production independently of ESX-5 activity[J]. mBio, 2018, 9(3): e00778-18.

[26] RATH P, HUANG C, WANG T, et al. Genetic regulation of vesiculogenesis and immunomodulation in *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110(49): E4790-E4797.

[27] WEN Z T, JORGENSEN A N, HUANG X, et al. Multiple factors are involved in regulation of extracellular membrane vesicle biogenesis in *Streptococcus mutans*[J]. Mol Oral Microbiol, 2021, 36 (1): 12-24.

[28] LEE J H, CHOI C W, LEE T, et al. Transcription factor σB plays an important role in the production of extracellular membrane-derived vesicles in *Listeria*

monocytogenes[J]. PLoS One, 2013, 8(8): e73196.

[29] SCHLATTERER K, BECK C, HANZELMANN D, et al. The mechanism behind bacterial lipoprotein release: Phenol-soluble modulins mediate Toll-like receptor 2 activation via extracellular vesicle release from *Staphylococcus aureus*[J]. mBio, 2018, 9(6): e01851-e01818.

[30] BROWN L, KESSLER A, CABEZAS-SANCHEZ P, et al. Extracellular vesicles produced by the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis* are disrupted by the lipopeptide surfactin[J]. Mol Microbiol, 2014, 93(1): 183-198.

[31] ANDREONI F, TOYOFUKU M, MENZI C, et al. Antibiotics stimulate formation of vesicles in *Staphylococcus aureus* in both phage-dependent and -independent fashions and via different routes[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2019, 63(2): e01439-18.

[32] TOYOFUKU M, CáRCAMO-OYARCE G, YAMAMOTO T, et al. Prophage-triggered membrane vesicle formation through peptidoglycan damage in *Bacillus subtilis*[J]. Nat Commun, 2017, 8(1): 481.

[33] LIN L C, CHATTOPADHYAY S, LIN J C, et al. Advances and opportunities in nanoparticle- and nanomaterial-based vaccines against bacterial infections [J]. Adv Healthc Mater, 2018, 7(13): e1701395.

[34] LI M, ZHOU H, YANG C, et al. Bacterial outer membrane vesicles as a platform for biomedical applications: An update[J]. J Control Release, 2020, 323: 253-268.

[35] IRENE C, FANTAPPIÈ L, CAPRONI E, et al. Bacterial outer membrane vesicles engineered with lipidated antigens as a platform for *Staphylococcus aureus* vaccine [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2019, 116(43): 21780-21788.

[36] WANG X, SINGH A K, ZHANG X, et al. Induction of protective antiplague immune responses by self-adjuvanting bionanoparticles derived from engineered *Yersinia pestis*[J]. Infect Immun, 2020, 88(5): e00081-20.

[37] CHEN D J, OSTERRIEDER N, METZGER S M, et al. Delivery of foreign antigens by engineered outer membrane vesicle vaccines[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(7): 3099-3104.

[38] DALEKE-SCHERMERHORN M H, FELIX T, SOPROVA Z, et al. Decoration of outer membrane vesicles with multiple antigens by using an autotransporter approach[J]. Appl Environ Microbiol, 2014, 80(18): 5854-5865.

[39] VAN DEN BERG VAN SAPAROEA H B, HOUBEN D, KUIJL C, et al. Combining protein ligation systems to expand the functionality of semi-synthetic outer membrane vesicle nanoparticles[J]. Front Microbiol, 2020, 11: 890.

[40] PARK S H, ZHENG J H, NGUYEN V H, et al. RGD peptide cell-surface display enhances the targeting and therapeutic efficacy of attenuated *Salmonella*-mediated cancer therapy[J]. Theranostics, 2016, 6(10): 1672-1682.

[41] TOSO J F, GILL V J, HWU P, et al. Phase I study of the intravenous administration of attenuated *Salmonella typhimurium* to patients with metastatic melanoma[J]. J Clin Oncol, 2002, 20(1): 142-152.

[42] KIM J Y, DOODY A M, CHEN D J, et al. Engineered bacterial outer membrane vesicles with enhanced functionality[J]. J Mol Biol, 2008, 380(1): 51-66.

[43] KIM O Y, CHOI S J, JANG S C, et al. Bacterial protoplast-derived nanovesicles as vaccine delivery system against bacterial infection[J]. Nano Lett, 2015, 15 (1): 266-274.

[44] CHEN Q, BAI H, WU W, et al. Bioengineering bacterial vesicle-coated polymeric nanomedicine for enhanced cancer immunotherapy and metastasis prevention[J]. Nano Lett, 2020, 20(1): 11-21.

[45] GNOPO Y M D, MISRA A, HSU H L, et al. Induced fusion and aggregation of bacterial outer membrane vesicles: Experimental and theoretical analysis[J]. J Colloid Interface Sci, 2020, 578: 522-532.

[46] BENNE N, VAN DUIJN J, KUIPER J, et al. Orchestrating immune responses: How size, shape and rigidity affect the immunogenicity of particulate vaccines [J]. J Control Release, 2016, 234: 124-134.

[47] WU G, JI H, GUO X, et al. Nanoparticle reinforced bacterial outer-membrane vesicles effectively prevent fatal infection of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*[J]. Nanomedicine, 2020, 24: 102148.

[48] BACHMANN M F, JENNINGS G T. Vaccine delivery: a matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns [J]. Nat Rev Immunol, 2010, 10(11): 787-796.

[49] RAPPUOLI R, PIZZA M, MASIGNANI V, et al. Meningococcal B vaccine (4CMenB): the journey from research to real world experience[J]. Expert Rev Vaccines, 2018, 17(12): 1111-1121.

[50] SHIRLEY M, TAHA M K. MenB-FHbp meningococcal group B vaccine (Trumenba(®)): A review in active immunization in individuals aged ≥ 10 years[J]. Drugs, 2018, 78(2): 257-268.

（下转第77页）