

基于活体微生物及其衍生物的抗细菌感染策略研究进展

蒲薛宇^{1,2}, 王曦^{1,2}, 刘桂全^{1,2}, 杨剑^{1,2,3*}

(1. 天津中医药大学, 省部共建组分中药国家重点实验室, 天津 301617; 2. 天津中医药大学, 中医药研究院, 天津 301617; 3. 现代中医药海河实验室, 天津 301617)

摘要: 近年来, 抗生素滥用导致治疗过程出现细菌感染耐受, 而耐药菌感染会造成的发病率及死亡率大幅提高。由于药物递送系统能够被精准设计, 实现药物的可控释放, 从而能降低抗生素毒不良反应与耐药风险, 因此, 可以寻求新型药物递送系统以应对细菌感染带来的挑战。本综述首先概述细菌感染流行与防控现状, 并进一步围绕微生物天然特性如表面特异性蛋白、生理信号感应、定向运动、抗菌物质分泌等方面系统梳理并总结了近些年报道的活体微生物及其衍生物递药系统, 及它们如何发挥抗菌作用的作用机制, 揭示了基于活体微生物及其衍生物的递药系统在细菌感染类疾病的治疗中显示的巨大应用潜力。本综述旨在为开发基于活体微生物及其衍生物的新型递药系统用于治疗细菌感染类疾病提供思路。

关键词: 抗细菌感染策略; 活体微生物; 细菌衍生物; 药物递送系统; 细菌感染

中图分类号: R943 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)05-1186-10

Research advances of living microorganisms and their derivatives-based strategies for the treatment of bacterial infection

PU Xue-yu^{1,2}, WANG Xi^{1,2}, LIU Gui-quan^{1,2}, YANG Jian^{1,2,3*}

(1. State Key Laboratory of Component-Based Chinese Medicine of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China; 2. Institute of Chinese Medicine of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China; 3. Haihe Laboratory of Modern Chinese Medicine, Tianjin 301617, China)

Abstract: In recent years, the abuse of antibiotics has led to antibiotic tolerance in the process of bacterial treatment, the morbidity and mortality caused by drug-resistant bacterial infection have further increased significantly. Drug delivery systems can be precisely designed to achieve controlled drug release, thereby reducing the risk of antibiotic toxicity and resistance, it is urgent to seek novel drug delivery systems to address the challenges posed by bacterial infections. This review first outlines the epidemic and prevention situation of bacterial infection, and further summarizes living microorganisms and their derivatives-based drug delivery systems, focusing on their natural characteristics such as surface specific proteins, physiological signal sensing, directed movement, and secretion of antibacterial substances, which show great potential in the treatment of bacterial infectious diseases by demonstrating their antibacterial effects. This review aims to provide ideas for the development of novel drug delivery systems based on living microorganisms and their derivatives for the treatment of bacterial infectious diseases.

Key words: anti-bacterial infection strategy; living microorganism; bacterial derivative; drug delivery system; bacterial infection

收稿日期: 2023-09-13; 修回日期: 2024-01-22.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82074032); 现代中医药海河实验室科技项目 (22HHZYSS00011); 组分中药国家重点实验室开放课题基金 (CBCM2020202).

*通讯作者 Tel: 18202231646, E-mail: yang.j2017@tjutc.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-1060

长期以来, 细菌感染类疾病严重威胁着全球人类生命健康, 抗生素治疗是目前对抗细菌感染主要的方法之一。例如, β -内酰胺类抗生素作为世界范围内广泛应用于抗菌治疗的药物之一, 能有效治疗革兰阳性菌感染^[1]。氨基糖苷类抗生素则是首批引入常规临床使用的抗生素之一, 被广泛用于治疗需氧革兰阴性菌感染^[2]。然而, 近年来, 根据世界卫生组织 (world health organization, WHO) 的统计和报道, 抗生素滥用导致越来越多的耐药菌出现, 大幅度削弱了传统抗生素治疗的疗效, 导致全球每年至少有 70 万人死于耐药菌感染, 如果没有新的更好的治疗方法, 到 2050 年, 这一数字可能会上升至每年 1 000 万^[3]。新抗生素或新型抗菌方法亟待开发, 但新抗生素的开发过程缓慢, 耗资巨大, 近几十年来几乎所有投入市场的新型抗生素都是 80 年代发现的抗生素药物类别的变体, 自 2017 年以来, 仅 12 种新的抗菌药物在全球获得批准, 尽管目前有 76 种临床抗菌候选药物, 但能真正向临床转化的抗菌药物仍然难以满足需求^[4]。因此, 传统开发途径之外的新型抗菌方法上升为科研领域关注的亮点和热点。

细菌感染过程中, 微生物与微生物之间, 微生物与宿主之间复杂的相互作用在疾病加剧及发展中发挥决定性作用^[5]。例如, 在细菌性肠道感染中, 肠道微生物组可通过抗菌物质分泌、营养竞争、维持肠道屏障完整性和噬菌体部署来抵抗外源微生物定植, 从而在感染期间修复并维持肠道微生物群平衡, 恢复肠道健康^[6]; 不同于传统递药系统, 益生菌作为活体微生物, 自身就具有抑制病原体、降解毒素和调节免疫等优点, 也是常见细菌感染治疗的方法之一^[7]; 细菌外膜囊泡 (outer membrane vesicles, OMVs) 的免疫原性能够诱导获得性免疫应答, OMVs 包被的纳米材料递药系统能够增

强包裹药物的稳定性, 且靶向性递送药物到病灶部位^[8]。基于微生物本身的重要作用和深入研究, 借助合成生物学和纳米技术的发展, 基于活体微生物及其衍生物的递药系统为细菌感染类疾病治疗提供新的研究方向。本综述首先概述了细菌感染的流行、防控现状, 并重点梳理和总结了近 6 年来基于活体微生物及其衍生物的抗细菌感染策略, 主要包括活细菌水凝胶、“核-壳”结构微生物递送系统、运动型微生物平台及细菌衍生物 (图 1) 几大类, 用于细菌感染治疗的研究, 这些策略为细菌感染提供了新的治疗思路和方法。

1 细菌感染的流行及治疗现状

在人类文明发展史中, 细菌感染始终威胁着人类生命健康, 霍乱、黑死病、炭疽等重大疾病都造成了骇人听闻的致死人数。目前, 细菌感染仍然是现代医学面临的一个主要难题, 当不及时进行诊断和治疗时, 由致病菌导致的败血症、菌血症、肺炎、腹泻、尿道感染等系列疾病可能对人类的健康造成不可逆的损伤, 甚至导致死亡。本节概述细菌感染特别是耐药菌感染的流行与治疗现状, 以强调新型抗菌策略应对细菌感染的重要性和紧迫性。

1.1 细菌感染和耐药菌的流行 感染性疾病带来了巨大的健康威胁与经济负担, 中国微生物耐药性监测与防控平台 (china antimicrobial resistance monitoring system, CARSS) 罗列了 10 种最常见的菌株, 包括大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、肺炎链球菌、金葡菌、表皮葡萄球菌、屎肠球菌、粪肠球菌、不动杆菌、铜绿假单胞菌及沙门菌。此外, 抗生素滥用导致耐药菌, 乃至多重耐药菌 (multidrug-resistant bacteria, 对至少 3 种不同类型的抗生素表现出耐药性的细菌) 变得普遍, 多重耐药菌感染导致的发病率和死亡率激增, 耐药菌的感染导致

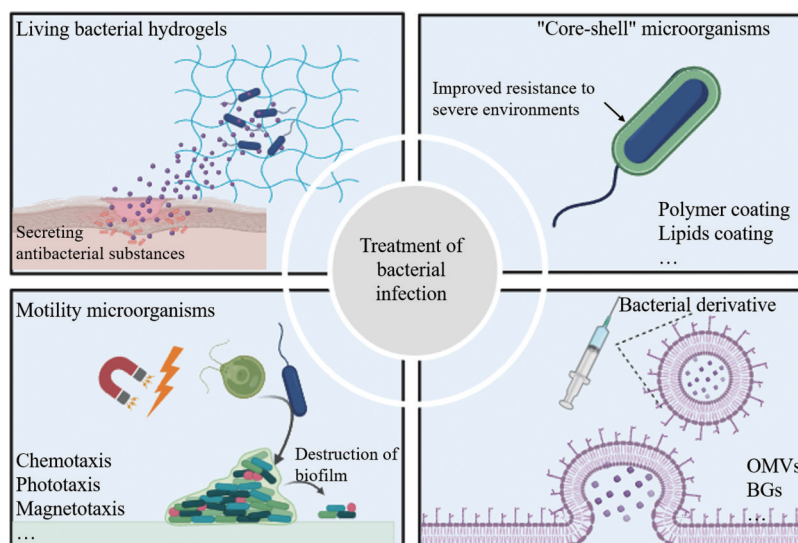


Figure 1 Novel drug delivery system based on living microorganisms and their derivatives for bacterial infection therapy

这一局面加剧: 抗生素耐药性直接对全球公共健康构成了巨大威胁^[9]。在2019年, 耐多药结核杆菌(不包括广泛耐药结核杆菌)、耐第3代头孢菌素大肠埃希菌、耐第3代头孢菌素肺炎克雷伯菌、耐氟喹诺酮类大肠埃希菌和耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌感染分别导致5万至10万人死亡, 耐甲氧西林金葡菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)感染则导致超过10万人死亡^[10]。

细菌耐药性机制复杂, 主要包括^[11]: ① 细菌能产生能使抗生素失活的酶, 这些酶通过水解、基团转移和氧化还原等作用使抗生素失效; ② 细菌发生基因突变, 改变药物的作用靶点或降低药物与靶点的亲和力, 导致耐药性产生; ③ 位于细菌细胞膜的主动外排泵排出对细菌有害的抗生素, 提高细菌的致病性; ④ 细胞壁和细胞膜通透性改变是细菌对抗生素产生耐药性的一个普遍机制, 特别是革兰阴性菌, 其外膜是一种由蛋白质、脂多糖、磷脂等多种物质组成的复合屏障, 该屏障的存在导致大环内酯、氨基香豆素等对革兰阳性菌有效的抗生素无法进入革兰阴性菌内部而难以发挥作用^[12](图2)。此外, 生物膜的形成也是耐药性出现的因素之一, 相比浮游细菌, 产生生物膜结构的细菌对抗生素的耐药性可提高1 000倍^[13,14]。

1.2 细菌感染的治疗现状 抗生素广泛用于治疗细菌感染, 2017年, WHO修订基本药物清单^[15], 将抗生素分为3类: 可用类(access group antibiotics)、慎用类(watch group antibiotics)和备用类(reserve group antibiotics)。“可用类”用于治疗广泛常见的易感病原体, 同时显示出比其他组抗生素更低的耐药性风险。“慎用类”是用于少数特定感染的首选或次选治疗方案, 此类抗生素具有较高耐药性风险。“备用类”用于治疗确诊或疑似由耐多药病原体引起的感染, 此类抗生素应作为最后选择。尽管全球医疗卫生组织正采取显著行动阻止细菌耐药性的不健康发展, 抗生素耐药情况仍然不容乐观。根据首份全球抗生素耐药报告^[16], 在许多

国家与地区, 碳青霉烯类抗生素对半数以上肺炎克雷伯菌感染患者无效, 氟喹诺酮类药物对半数以上大肠杆菌引起的尿道感染的患者无效, MRSA感染患者与非耐药性感染患者相比, 死亡的可能性估计要高64%。

微生物如一些细菌膜表面丰富的糖蛋白和脂质成分, 由于能够感知和响应体内环境信号, 可以被体内特定细胞特异性识别^[17]; 具有鞭毛的菌或微藻可在生理环境中定向运动至靶部位^[18]; 一些微藻在光诱导下产生活性氧(reactive oxygen species, ROS)杀死病原体, 能够实现无抗生素的细菌感染治疗^[19]; 此外, 芽孢杆菌等细菌自身可分泌抗菌物质对抗其他微生物, 黄色黏球菌能够产生含有水解酶的细菌外膜囊泡OMVs来杀死其他竞争细菌^[20,21]。因此, 以微生物及其衍生物为载体, 结合纳米材料的灵活可调性, 能够设计出新型药物递送系统。这些系统依托天然材料与合成材料的双优势, 可以实现抗生素向靶部位的精准递送, 提高局部药物浓度, 减少药物的潜在毒不良反应, 或实现无抗生素的细菌感染治疗, 提高针对细菌感染的治疗效率。综上, 基于微生物及其衍生物的新型抗细菌感染策略可作为防止感染、阻碍细菌耐药性产生的有应用前景的方法之一。

2 基于活体微生物的抗细菌感染策略

近年来, 研究者将一系列功能性材料与活体微生物相结合, 一方面利用活体微生物分泌抗菌物质, 参与微生物-微生物、微生物-宿主相互作用等过程, 以利于在复杂的病理条件下对抗细菌感染, 另一方面利用合成材料保证微生物活性, 同时丰富整个体系的功能以实现多手段联合治疗细菌感染。本节总结并介绍了常见的整合活体微生物材料策略, 主要包括活细菌水凝胶、“壳-核”型微生物递送系统和运动型微生物平台等, 在细菌感染治疗中的研究进展。

2.1 活细菌水凝胶 微生物会争夺有限的营养或空间来生存, 特别是部分益生菌可以通过分泌大量的代谢物来创造适合自身生存的微环境, 抑制其他竞争微

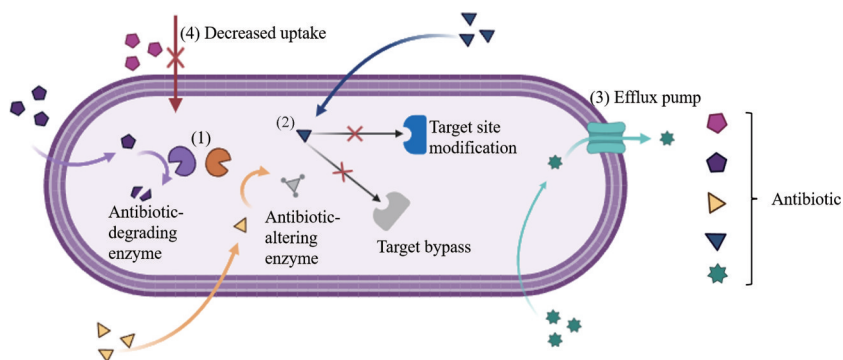


Figure 2 Common mechanisms of bacterial antibiotic resistance. Created with BioRender.com

生物的生长^[22]。因此,分泌具有抗菌活性物质的部分菌株可用于细菌感染的治疗。以治疗皮肤伤口感染为例,活细菌水凝胶主要有两大优势功能:一方面,封装在水凝胶中的菌株分泌抗菌物质杀死致病菌,促进伤口处微生物生态系统恢复平衡,另一方面,水凝胶作为物理屏障阻挡外界致病菌入侵伤口,并吸收伤口渗出物促进伤口愈合^[23,24]。例如,罗伊氏乳杆菌可以通过在代谢过程中降低局部pH值和产生罗伊氏菌素来抑制致病菌的生长,通过乳液聚合将其包裹在水凝胶微球中,并通过与甲基丙烯酸酯修饰的透明质酸共价交联进一步固定在水凝胶网络中。使用时经光引发交联从而在伤口部位原位生成水凝胶敷料。封装在水凝胶内的罗伊氏乳杆菌正常代谢和生长,分泌抗菌物质且不会向伤口环境逃逸,用活细菌水凝胶处理的小鼠伤口部位炎症较轻,愈合较快,表明这些材料在体内具有显著的抗感染和加速伤口愈合能力^[24]。Lufton等^[25]制备了封装枯草芽孢杆菌的热响应性水凝胶,可在1 min内响应人体温度发生溶胶-凝胶转变而覆盖皮肤,通过活枯草芽孢杆菌产生表面活性素等抗菌物质治疗皮肤感染。

为避免水凝胶的低孔隙率阻碍活性大分子的扩散。Guo等^[26]设计了一种孔径在10~100 μm之间的右旋糖酐基水凝胶,大孔径允许活性大分子自由扩散和大肠杆菌(2~5 μm)正常繁殖。为防止大肠杆菌逃逸,研究者通过基因工程的方法使大肠杆菌表达黏附蛋白MpA,该蛋白与葡聚糖之间具有高亲和力,能够稳定地将大肠杆菌锚定在葡聚糖基水凝胶上,使得细菌泄漏减少到1%。而大孔径允许大肠杆菌分泌的葡萄球菌溶菌素(相对分子量约为50 kDa)到达感染部位特异性杀死金葡菌(图3A)。利用活细菌水凝胶治疗细菌感染,能够避免传统抗生素的使用,克服提纯天然抗菌物质面临的低产量和高成本的困难,降低常见抗生素耐药性产生。

2.2 “核-壳”型微生物递送系统 在菌株表面包被一层“保护壳”能够避免活菌的理化性质受病变部位复杂环境的影响,同时改变和修饰“保护壳”可以丰富微生物递送系统的功能。鼠李糖乳杆菌是一种常见的益生菌,属于兼性厌氧菌,它可以维持宿主的免疫平衡,并抵抗病原微生物入侵^[27]。Fu等^[28]将壳聚糖(chitosan, CS)和透明质酸(hyaluronic acid, HA)包被在活的鼠李糖乳酸杆菌表面,并负载芒柄花苷构建基于活菌的药物递送系统(ononin, HA and CS modified living *Lactobacillus rhamnosus*, OASCLR)用以调节原发性和继发性细菌性肺炎的宿主免疫力。其中,CS和HA保护鼠李糖乳杆菌的生存免受肺内正常氧压的影响,

并充当药物芒柄花苷的载体,HA与CD44相互作用发挥巨噬细胞靶向功能。同时芒柄花苷既具有抗炎抗氧化作用,也具有促进鼠李糖乳杆菌生长,抑制病原菌生长的作用。OASCLR在2个连续的抗菌循环治疗过程中,对金葡菌的杀伤率保持在77%以上,细菌无耐药性产生,治疗后仍可显著减少金葡菌感染菌量,增加益生菌数量,共生菌整体丰富度和多样性,该实验表明,OASCLR包被的各部分能协同有效增强治疗细菌性肺炎的效果。多数微生物外膜因具有丰富的羟基而呈负电荷,CS这一类的阳离子聚合物可以通过简单的正负电荷相互作用包被于微生物表面,这种物理作用较为温和,几乎不影响活体微生物的正常活动。例如,将CS与莱茵衣藻共孵育5 min即可获得约90%的CS包覆的莱茵衣藻,简单快速的包被过程对莱茵衣藻的活性无损伤,在CS的保护下,莱茵衣藻能够在光驱动下携带药物游动至靶部位发挥治疗作用^[29]。

脂质层包被纳米材料具有防止药物突释,增强纳米载体稳定性和生物相容性的功能,脂质体的双分子层结构和内腔分别可以封装疏水药物和亲水药物^[30],脂质类材料包括人工合成脂质及天然细胞膜已用于对微生物的表面进行修饰。Cao等^[31]在磷酸钙缓冲液中加入二油酰基磷脂酸(dioleoylphosphatidic acid, DOPA)、胆固醇和大肠杆菌Nissle 1917 (*Escherichia coli* Nissle 1917, EcN),一起涡旋15 min,制备自组装脂质膜包被的EcN。制备过程中钙离子促进DOPA在EcN表面的自组装,胆固醇发挥稳定脂质体涂层的作用。面对强酸性胃液、消化酶、饮食和胃肠道持续运动等恶劣条件,口服EcN生物利用度低,只能产生有限的肠道定植。然而,脂质涂层之后EcN在小鼠胃中的存活率几乎高了3倍,在肠道中的生物利用度提高了4倍以上,给药后可在肠道保留4天。显著改善的生物利用度和肠道定植有效提高了EcN对鼠伤寒沙门氏菌的杀伤效率和葡聚糖硫酸钠诱导的结肠炎的疗效。为了对微生物提供更持久的保护和胃肠道黏附作用,微生物的自我保护机制引起了研究人员的注意:细菌在生长过程中能够形成生物膜作为保护屏障来抵御抗生素和宿主免疫系统外部威胁^[32]。多聚物和脂类材料涂层能够在细菌分裂前提供临时保护作用,生物膜可能在细菌生长过程中提供持续的保护作用。Wang等^[33]培养枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*, BS)形成生物膜,均质化生物膜制备了单个生物膜包覆的BS。生物膜包覆的BS在巴马小型猪模型中表现出比BS高达125倍的口服生物利用度,17倍的肠道定植量,并在金葡菌定植的小鼠中进一步显示出显著增强的去病原菌定植效应(图3B)。大多数细菌在适当的条件下都可以形

成生物膜,生物膜涂层菌能够在复杂的环境中生存和定植,可能成为治疗细菌感染类疾病的一种通用策略。

2.3 运动型微生物平台 常见的运动型微生物包括黏质沙雷氏菌、大肠杆菌、海洋单链趋磁球菌、莱茵衣藻和螺旋藻,它们表现出定向运动,如趋化性、趋光性和趋磁性,可以将不同的货物递送至靶部位^[34]。以趋磁性为例,趋磁细菌沿磁场线运动的速度可以达到 $300 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$, 凭借其小尺寸和较高的磁驱动机械力表现出高穿透力^[35]。生物膜作为细菌的天然保护屏障,抗生素往往难以渗透进入,为提高抗生素在生物膜内的浓度,Stanton等^[36]将海洋单链趋磁球菌与预装抗生素的介孔硅微管在缓冲溶液中轻轻摇晃 15 min 促进二者黏附,制备得到定向游动生物杂交系统。海洋单链趋磁球菌在外部磁场的引导下定向游动至大肠杆菌生物膜中,生物膜酸性微环境触发介孔硅微管中的抗生素释放,杀灭生物膜中存在的浮游大肠杆菌。磁场不仅能够引导趋磁细菌运动,在可变磁场中,趋磁细菌 MO-1 体内的磁小体会产生高热 ($43 \text{ }^\circ\text{C}$),同时,机械力也参与杀灭病原体 (图 3C)。使用金葡球菌特异性结合多克隆抗体对趋磁细菌 MO-1 进行工程化修饰后,磁引导趋磁细菌到达损伤部位并与金葡菌结合,随后可变磁场诱导磁小体产生高热,结合磁场下 MO-1 摆

动产生的机械力作用,可杀灭 38.1% 的金葡菌^[37]。该策略有助于实现无抗生素治疗下的抗耐药菌感染。

螺旋藻的形状赋予了它独特的运动特点,它的藻体可以以自身为轴,快速地旋转运动,向前穿行,螺旋形状使其具有强大的穿透能力。在低强度旋转磁场下,螺旋藻可以在充满生物流体介质的各种复杂环境中进行远程控制游动,如尿液、血液、腹水、生物凝胶和胃液^[38,39]。受此启发,Xie等^[39]通过 Fe_3O_4 纳米粒子对螺旋藻进行磁化,并进一步沉积聚多巴胺 (polydopamine, PDA) 涂层制备磁性螺旋藻机器人 (PDA-MSP)。螺旋藻的旋转运动特性能够有效对低强度旋转磁场中的力矩进行控制,促进 PDA-MSP 向深层组织高精度渗透,而引入 PDA 涂层则能够增强光声信号和光热效应,在无抗生素存在的情况下即可使 PDA-MSP 针对多药耐药肺炎克雷伯菌感染实现光声图像跟踪和光热治疗 (图 3D)。以 PDA 为热元件的磁化螺旋藻不仅能够应用于体内感染,还可以利用其运动特点对液体食品中的病原体进行准确检测和原位杀菌^[40]。

莱茵衣藻是一种双鞭毛单细胞绿藻,具有易培养和固有自发荧光的特点,能够基于鞭毛拍打 ($\geq 110 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) 和趋光性提供自我推进动力^[41]。Zhang等^[42]用叠氮 *N*-羟基琥珀酰亚胺酯对莱茵衣藻进行表面修饰,然后通过点击化学将二苯并环辛炔修饰的中性粒细胞膜涂层的

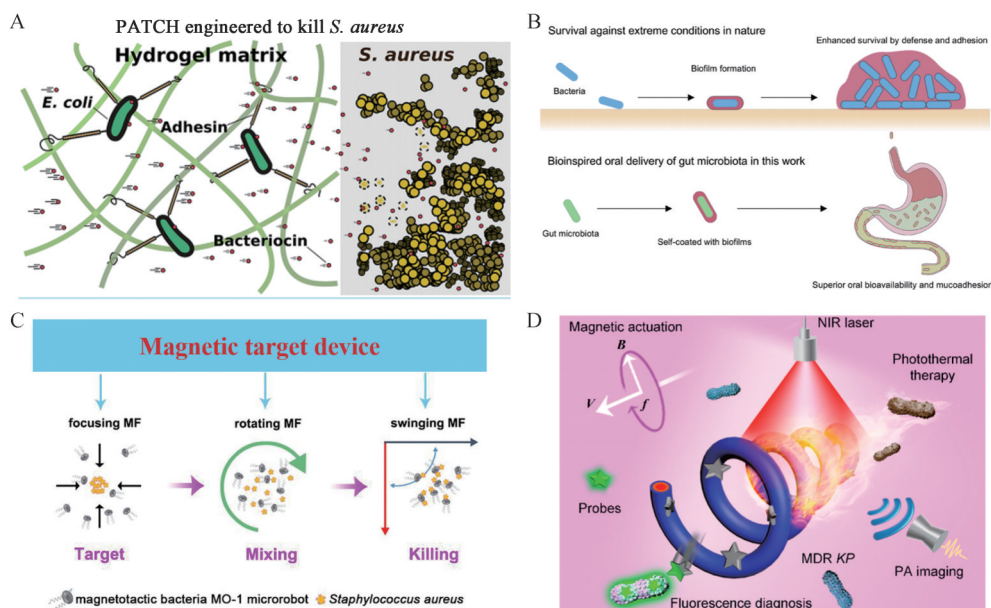


Figure 3 Living microbial drug delivery system for bacterial infections. A: Living dextran matrix hydrogel with anti-*S. aureus* activity. Adapted from Ref. 26 with permission. Copyright © 2022 American Chemical Society; B: Oral delivery of gut microbiota with biofilms coating show decolonization effect in mice colonized with *S. aureus*. Adapted from Ref. 33 with permission. Copyright © 2020 The Authors, some rights reserved; C: MO-1 microrobots was first navigated to the target and mixed with *S. aureus* under rotating magnetic field (MF) for their attachment, and then killed *S. aureus* under swinging MF. Adapted from Ref. 35 with permission. Copyright © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved; D: Polydopamine-coated magnetic micro-swimmer for photoacoustic image tracking and photothermal therapy of multi-drug-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection. Adapted from Ref. 39 with permission. Copyright © 2020 American Chemical Society

聚乳酸-羟基乙酸共聚物 [poly (lactic-co-glycolic acid), PLGA] 纳米颗粒偶联至微藻表面, 构建微藻纳米机器人。在该系统中, 莱茵衣藻的运动行为可以提高微藻纳米机器人在肺部的滞留量, 中性粒细胞膜的修饰可以有效减少免疫系统对微藻纳米机器人的清除, 并促使微藻纳米机器人与目标病原体特异性结合。相同条件下, 微藻纳米机器人在模拟肺液中的游动速度与裸藻的游动速度相当, 纳米粒子的修饰对藻类内在运动行为的影响可以忽略不计。与对照组相比, 微藻纳米机器人治疗的急性肺部感染小鼠的肺部细菌负荷减少了3个数量级, 且小鼠存活率100%, 说明微藻纳米机器人能够结合主动靶向和自我推进进入并滞留在病灶部位发挥抗感染作用。微生物能够定向运动向生物膜中递送抗生素或破坏生物膜结构, 避免因生物膜而发生的耐药性, 与多功能化纳米材料的相结合可以实现无抗生素治疗, 因目前耐药性严重主要源于抗生素特别是合成抗生素的过度使用, 因此, 减少抗生素或取代直接抗生素的治疗是对抗抗生素耐药性产生的可行性途径^[43]。运动型微生物平台可以作为对抗细菌感染, 甚至耐药菌感染的有效方法。

3 基于微生物衍生物的抗细菌感染策略

微生物衍生物主要包括微生物的膜提取物, 细菌本身的分泌物等, 通过合适的方法制备获取的衍生物通常能够保留其原有活性和功能, 如免疫原性、同源靶向、特异性识别等。本节以微生物衍生物——OMVs和菌影 (bacterial ghosts, BGs) 为例, 系统介绍微生物衍生物在抗细菌感染领域显示出的应用案例和前景。

3.1 基于OMVs的抗细菌感染策略 1966年, Knox等^[44]通过电子显微镜观察到大肠杆菌周围存在球形囊泡, 随后, 研究人员将这种囊泡命名为OMVs。OMVs由脂质、蛋白质、脂多糖等组成, 与多种生物学功能有关, 在细菌群体感应、耐药性、生物膜形成中发挥重要作用, 并参与细菌-宿主间通讯, 将其内容物转移到宿主细胞及在宿主细胞中引发免疫反应^[45]。利用OMVs有效的免疫原性, 可将其构建为佐剂、抗原和递送平台, 用于开发针对细菌感染的疫苗, 在预防细菌感染从而减少对抗生素的需求方面具有非凡的潜力(图4A)^[46]。Irene等^[47]利用脂蛋白转运途径设计具有5种酯化形式金葡菌抗原的OMVs, 该OMVs的注射剂量在5 μg即可引起饱和的抗原特异性抗体滴度, 从而对金葡菌攻击的小鼠表现出强大的保护活性。为了避免对OMVs所含的每一种抗原进行单独的共表达和纯化, Sun等^[48]通过OmpA-SpyCatcher融合体改造大肠杆菌MG1655菌株, 以快速灵活的方式促进多种选定抗原的表达, 该菌株分泌的OMVs作为疫苗可引起体液和

细胞免疫反应, 从而保护小鼠免受金葡菌的感染。

考虑到OMVs的结构稳定性低和尺寸均匀性差, Huang等^[49]采用超滤法制备来自支气管败血波氏杆菌的OMVs, 并通过机械挤出包被甘草酸纳米粒子(GAN-OMV), GAN-OMV尺寸均匀, 具有稳定的核壳结构, 用GAN-OMVs免疫的小鼠的脾淋巴细胞显示出更高比例的CD4⁺/CD8⁺T细胞和CD19⁺B细胞, 并产生更高水平的Th1/Th2/Th17细胞因子, 有效预防支气管败血波氏杆菌感染。来自碳青霉烯耐药性肺炎克雷伯菌(carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*, CRKP)的OMVs包被的白蛋白纳米颗粒(BN-OMV)经皮下接种后, 能够通过体液免疫和细胞免疫显著升高CRKP特异性抗体滴度, 有效应对由CRKP引起的感染, 从而提高小鼠存活率^[50]。以上研究均表明, 控制OMVs所包被的核心纳米材料的尺寸, 对OMVs的中空结构进行有效增强后可获得更加稳定的免疫反应。OMVs疫苗的一个临床应用案例是诺华(中国)生物医学研究有限公司研发的Bexsero, 这是针对B血清组脑膜炎奈瑟菌的首个OMV疫苗, 目前已获欧盟、加拿大、澳大利亚和一些拉丁美洲国家批准, 该疫苗能够用于帮助年龄在2个月以上的人群预防B型脑膜炎^[51]。

1996年Kadurugamuwa团队^[52]揭示了铜绿假单胞菌OMVs中含有自溶素(一种肽聚糖水解酶), 具有天然杀菌活性, 铜绿假单胞菌短暂暴露于庆大霉素后产生的OMVs中还含有少量庆大霉素, 抗生素与自溶素协同作用的杀菌活性是庆大霉素最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)的2.5倍。越来越多的证据表明, 部分细菌产生的OMVs具有强烈的天然杀菌活性, 这些天然杀菌活性主要源于OMVs运输的杀菌物质, 它们杀灭周围竞争细菌以获取生存优势, 或者捕食异种细菌以获取营养成分, 基于OMVs构建的系统不仅具备固有抗菌功能, 还具有增强的药物稳定性、靶向性及生物相容性等优点^[53]。Wu等^[54]提取纯化大肠杆菌分泌的OMVs, 通过超声使OMVs包被于负载利福平的介孔硅表面(Rif@MSN@OMV), 用于治疗腹腔内大肠杆菌感染。OMVs的同源靶向性能够提高大肠杆菌(革兰阴性菌)对Rif@MSN@OMV的摄取, 但不影响金葡菌(革兰阳性菌)对它的摄取。对于细胞内细菌引起的感染, 例如隐藏在巨噬细胞内的MRSA, 药物通常难以到达细胞内部, 来源于大肠杆菌的OMVs包被于纳米颗粒表面可以模拟细菌, 增强巨噬细胞对细菌模拟纳米粒子的识别与摄取, 从而将药物有效地递送至细胞内杀死细胞内的MRSA(图4B)^[55]。从细菌培养液中分离纯化OMVs的产量通常较低, 难以大批量制备, 使用螯合剂、抗生素、溶菌酶等处

理可能增加 OMVs 的产量, 但不同处理方法所获得的 OMVs 在形态、蛋白质组成、毒性、免疫原性甚至血清杀菌活性方面存在差异^[56], 合适的制备方法将有助于 OMVs 作为疫苗平台或药物递送平台向临床转化。

3.2 基于 BGs 的抗细菌感染策略 菌影 (BGs) 是在革兰阴性菌中表达噬菌体 PhiX174 的基因 E, 使菌体形成直径在 40 至 200 nm 之间的跨膜孔道, 导致菌体内容物从该孔道逸出而形成的细菌空壳。BGs 保留了天然细菌细胞壁的结构和成分, 如脂多糖、脂蛋白、肽聚糖和鞭毛蛋白。这些病原体相关分子模式 (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) 的存在使得免疫细胞可以识别 BGs, 并产生先天和/或适应性免疫反应^[57]。Muhammad 等^[58]利用蛋白质 E 特异性裂解机制制备支气管败血波氏杆菌菌影 (*Bordetella bronchiseptica* BGs, BbBG), 皮下接种 BbBG 有效减轻了败血波氏杆菌对犬的感染, 由于维持了原生细菌表面结构完整性, BbBG 既具备与灭活疫苗相当的安全性, 也具有与减毒活疫苗相当的有效性。然而, 使用裂解蛋白 E 制备 BGs 的方法复杂且昂贵, 化学处理是另一种广泛使用的 BGs 生产方法, 通常利用氢氧化钠、十二烷基硫酸钠和过氧化氢等处理细菌获得 BGs, 但化学处理可能会破坏细菌表面的一些相关抗原成分, 从而降低所需的免疫原性^[59,60]。Ali 等^[60]使用 Tween 80 (一种生物相容性良好的药用辅料) 裂解脑膜炎球菌制备菌影疫苗 (NmC-BG), 纯化过程中仅使用生理盐水, 进行简单离心步骤即可除去菌体内蛋白质和核酸, 整个制备过程较为温和。该疫苗安全有效, 在第三次免疫后的抗体反应优于商业脑膜炎球菌多糖疫苗。此外, 疫苗接种途径可能对疫苗免疫原性和疗效产生影响, Mu 等^[61]制备大肠杆菌菌影, 并通过对雌性 BALB/c

小鼠皮下、肌肉注射和口服接种比较不同免疫途径接种疫苗在产生体液和细胞免疫反应方面的差异, 发现肌肉注射大肠杆菌菌影能够引发更强大的抗原特异性免疫反应。BGs 的免疫原性和内部空间加载能力为开发治疗细菌感染的疫苗载体 and 治疗方法提供了理想条件。对 BGs 的生产方法进行进一步优化, 研究其抗原性相关蛋白可能有助于基于 BGs 的疫苗和治疗平台开发。

综上, 微生物及其衍生物感知和响应体内复杂环境信号天然特性与合成材料丰富可调节的物理化学性质相结合, 使得基于微生物及其衍生物的递药系统具有对抗细菌感染的巨大潜力 (表 1)。

4 总结与展望

微生物及其衍生物能够进行药物负载并响应周围环境治疗细菌感染。本文通过介绍细菌感染的治疗现状, 阐述了新型抗菌递药系统包括活细菌水凝胶、“核-壳”结构微生物递送系统、运动型微生物平台及细菌衍生物 OMVs 和 BGs 在细菌感染治疗中的研究进展, 这些新型抗菌策略有助于解决目前面临的严峻形势, 为对抗细菌感染特别是耐药菌感染提供研究思路。

作为新型抗菌策略之一, 基于微生物及其衍生物的诊治系统在抗细菌感染的应用中主要设计包括: ① 精准靶向递送—利用微生物本身具有的定向运动能力和免疫逃避功能, 结合人工材料的药物泄露保护、刺激性响应等功能, 达到靶向递送抗生素的目的, 精准靶向递送有利于增强靶部位药物浓度, 降低对健康组织的毒不良反应; ② 无抗生素治疗—一些活体微生物能够分泌抗菌物质, 或具备光热原件, 磁热原件, 能够在无抗生素的情况下杀灭病原菌, OMVs 和 BGs 能够作为疫苗平台预防细菌感染发生。无抗生素治疗有望缓解抗生素耐药频发的紧迫形势; ③ 抗生物膜治疗—微生

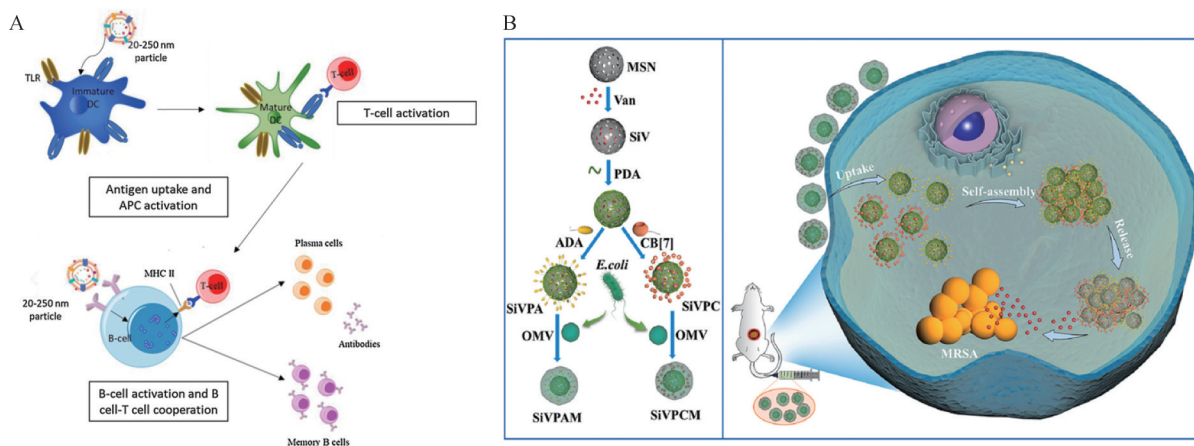


Figure 4 OMVs-based drug delivery system for bacterial infections. A: OMV-induced immune response. Adapted from Ref. 46 with permission. Copyright © 2020 Published by Elsevier Ltd; B: OMVs coated MSNs loaded with Van, and the treatment for MRSA-infected macrophages. Adapted from Ref. 55 with permission. Copyright © 2023 Published by Elsevier B.V.

Table 1 Research progress of living microorganisms and their derivatives in bacterial infection therapy. SP: *Spirulina platensis*; MRSA: Methicillin-resistant *S. aureus*; LR: *Lactobacillus reuteri*; Bs: *Bacillus subtilis*; CA: *Candida albicans*; CS: Chitosan; HA: Hyaluronic acid; St: *Salmonella typhimurium*; MSN: Mesoporous silica; Mg: *Magnetospirillum gryphiswalen*; MO: *Magnetoalga massalia* strain; PDA: Polydopamine; NM: Neutrophil membrane; PLGA: Poly (lactic-co-glycolic acid); Cr: *Chlamydomonas reinhardtii*; OMVs: Outer membrane vesicles; GANs: Glycyrrhizic acid nanoparticles; BSA: Bovine serum albumin; BGs: Bacterial ghosts.

Group	Synthetic material	Microorganism/ Bacterial derivate	Therapeutic strategy	Application	Ref	
Living bacterial hydrogels	Hydrogel	SP	Chemo-photodynamic therapy	MRSA-infected diabetic wound	[19]	
		LR	Secreting antibacterial substances	<i>S. aureus</i> -infected skin	[24]	
		Bs	Secreting antifungal molecules	CA-infected skin	[25]	
		<i>E. coli</i>	Secreting bacteriocin lysostaphin	MRSA infection	[26]	
"Core-shell" microbial delivery system	CS/HA coating	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Modulating lung microbiota	Bacterial pneumonia	[28]	
	Lipids coating	<i>E. coli</i>	Immune modulation and homeostasis maintenance	St induced colitis	[31]	
	Biofilm coating	Bs	Modulating the bacterial composition	Intestinal colonization of <i>S. aureus</i>	[33]	
Microrobots	MSN microtubes	Mg	Magnetically guided drug delivery	<i>E. coli</i> biofilms	[36]	
	Antibodies conjunction	MO-1	Magnetic hyperthermia	<i>S. aureus</i> -infected wound	[37]	
	Fe ₃ O ₄ /PDA modification	Magnetized <i>Spirulina platensis</i>	Photoacoustic imaging-trackable therapy	Multi-drug-resistant <i>K. pneumoniae</i> infection	[39]	
	NM-coated PLGA nanoparticles	Cr	OMVs from <i>E. coli</i>	Deep tissue penetration	<i>P. aeruginosa</i> induced acute pneumonia	[42]
				Eliciting high antigen specific antibody titers	Vaccine against <i>S. aureus</i>	[47]
				Inducing humoral and cellular immune response	Vaccine against <i>S. aureus</i>	[48]
OMVs	GANs	OMVs from <i>B. bronchiseptica</i>	Stimulating immune responses	Vaccine against <i>B. bronchiseptica</i>	[49]	
	BSA nanoparticles	OMVs from <i>K. pneumoniae</i>	Eliciting high specific antibody titers	Vaccine against KP	[50]	
			Homotypic targeting	<i>E. coli</i> infection	[54]	
	MSN nanoparticles	<i>B. bronchiseptica</i> BGs	Macrophages targeting	MRSA infection	[55]	
Inducing humoral and cellular immune response			Vaccine against <i>B. bronchiseptica</i>	[58]		
BGs		<i>Neisseria meningitidis</i> BGs	Inducing humoral immune response	Vaccine against <i>Neisseria meningitidis</i>	[60]	
		<i>E. coli</i> BGs	Inducing humoral and cellular immune response	Vaccine against <i>E. coli</i>	[61]	

物的运动特性,加之人工材料的保护和性能完善,能够将药物递送至生物膜内部,从而抵抗由于生物膜形成而造成的耐药性增加。

然而,每种治疗策略的应用场景都存在一定局限性,例如,OMVs存在产量低、结构稳定性差、载药量低、脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)潜在毒性等问题^[62,63]。此外,微生物及其衍生物的安全性、免疫原性、定植抗性、作用机制等还有待深入研究。该策略向临床应用转化还面临的诸多挑战和难题,例如:①如何进一步确定并深入研究活菌发挥抗细菌感染的作用机制,深入考察治疗菌株所占据的生态位,寻找增强治疗菌株在目标位置定植的方法;②如何利用合成生物学工具,改良并增强治疗菌株与宿主的相容性,使得临床治疗更安全可靠^[64];③如何发展高效率制备技术手

段,并建立良好生产规范,保证产品安全且有活性的同时,实现批次间差异小,可大批量制造。作者相信,基于微生物及其衍生物的抗细菌感染策略可以通过不断优化和完善,为抗细菌感染,尤其是耐药细菌感染的治疗能带来更多科学方案。

作者贡献: 蒲薛宇负责文献检索、文章撰写和图表制作;王曦负责文献补充和文献资料分析;刘桂全负责文献补充和图表制作;杨剑负责文章选题和文章指导。

利益冲突: 本文所有作者声明不存在利益冲突关系。

References

- [1] Lima LM, Silva BNMD, Barbosa G, et al. β -Lactam antibiotics: an overview from a medicinal chemistry perspective [J]. Eur J Med Chem, 2020, 208: 112829.
- [2] Krause KM, Serio AW, Kane TR, et al. Aminoglycosides: an

- overview [J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2016, 6: a027029.
- [3] McCulloch TR, Wells TJ, Souza-Fonseca-Guimaraes F. Towards efficient immunotherapy for bacterial infection [J]. *Trends Microbiol*, 2022, 30: 158-169.
- [4] Butler MS, Gigante V, Sati H, et al. Analysis of the clinical pipeline of treatments for drug-resistant bacterial infections: despite progress, more action is needed [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2022, 66: e0199121.
- [5] Ducarmon QR, Zwitter RD, Hornung BVH, et al. Gut microbiota and colonization resistance against bacterial enteric infection [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2019, 83: e00007-19.
- [6] Khan I, Bai YR, Zha LJ, et al. Mechanism of the gut microbiota colonization resistance and enteric pathogen infection [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2021, 11: 716299.
- [7] Li S, Zhang YX. Sensitive delivery systems and novel encapsulation technologies for live biotherapeutic products and probiotics [J]. *Crit Rev Microbiol*, 2023. DOI: 10.1080/1040841X.2023.2190405.
- [8] Gan YY, Li CN, Peng XR, et al. Fight bacteria with bacteria: bacterial membrane vesicles as vaccines and delivery nanocarriers against bacterial infections [J]. *Nanomedicine*, 2021, 35: 102398.
- [9] Mba IE, Nweze EI. Nanoparticles as therapeutic options for treating multidrug-resistant bacteria: research progress, challenges, and prospects [J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2021, 37: 108.
- [10] Murray CJ, Ikuta KS, Sharara F, et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis [J]. *Lancet*, 2022, 12: 399: 629-655.
- [11] Varela MF, Stephen J, Lekshmi M, et al. Bacterial resistance to antimicrobial agents [J]. *Antibiotics*, 2021, 10: 593.
- [12] Klobucar K, Brown ED. New potentiators of ineffective antibiotics: targeting the gram-negative outer membrane to overcome intrinsic resistance [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2022, 66: 102099.
- [13] Asma ST, Imre K, Morar A, et al. Natural strategies as potential weapons against bacterial biofilms [J]. *Life (Basel)*, 2022, 12: 1618.
- [14] Hou C, Yin FX, Wang S, et al. *Helicobacter pylori* biofilm-related drug resistance and new developments in its anti-biofilm agents [J]. *Infect Drug Resist*, 2022, 15: 1561-1571.
- [15] World Health Organization Model List of Essential Medicines-22nd List, 2021 [R]. Geneva: World Health Organization; 2021 (WHO/MHP/HPS/EML/2021.02). Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- [16] WHO (2018). WHO's First Global Report on Antibiotic Resistance Reveals Serious, Worldwide Threat to Public Health [R]. @ www.who.int. Retrieved from <https://www.who.int/zh/news/item/30-04-2014-who-s-first-global-report-on-antibiotic-resistance-reveals-serious-worldwide-threat-to-public-health>.
- [17] Lin SS, Mukherjee S, Li JJ, et al. Mucosal immunity-mediated modulation of the gut microbiome by oral delivery of probiotics into peyer's patches [J]. *Sci Adv*, 2021, 7: eabf0677.
- [18] Niu JW, Liu CL, Yang XP, et al. Construction of micro-nano robots: living cells and functionalized biological cell membranes [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2023, 11: 1277964.
- [19] Hu HQ, Zhong DN, Li WL, et al. Microalgae-based bioactive hydrogel loaded with quorum sensing inhibitor promotes infected wound healing [J]. *Nano Today*, 2022, 42: 101368.
- [20] Zhao HB, Shao DY, Jiang CM, et al. Biological activity of lipopeptides from bacillus [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2017, 101: 5951-5960.
- [21] Evans AGL, Davey HM, Cookson A, et al. Predatory activity of *Myxococcus xanthus* outer-membrane vesicles and properties of their hydrolase cargo [J]. *Microbiology (Reading)*, 2012, 158: 2742-2752.
- [22] Culp EJ, Goodman AL. Cross-feeding in the gut microbiome: ecology and mechanisms [J]. *Cell Host Microbe*, 2023, 31: 485-499.
- [23] Bhusari S, Kim J, Polizzi K, et al. Encapsulation of bacteria in bilayer pluronic thin film hydrogels: a safe format for engineered living materials [J]. *Biomater Adv*, 2023, 145: 213240.
- [24] Ming ZZ, Han L, Bao MY, et al. Living bacterial hydrogels for accelerated infected wound healing [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2021, 8: e2102545.
- [25] Lufton M, Bustan O, Eylon B, et al. Living bacteria in thermoresponsive gel for treating fungal infections [J]. *Adv Funct Mater*, 2018, 28: 1801581.
- [26] Guo SQ, Dubuc E, Rave Y, et al. Engineered living materials based on adhesin-mediated trapping of programmable cells [J]. *ACS Synth Biol*, 2020, 9: 475-485.
- [27] Liu JW, Feng XW, Li BT, et al. *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 alleviates escherichia coli-induced inflammation via NF- κ B and MAPKs signaling in bovine endometrial epithelial cells [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2022, 12: 809674.
- [28] Fu JN, Liu XM, Cui ZD, et al. Probiotic-based nanoparticles for targeted microbiota modulation and immune restoration in bacterial pneumonia [J]. *Natl Sci Rev*, 2022, 10: nwac221.
- [29] Akolpoglu MB, Dogan NO, Bozuyuk U, et al. High-yield production of biohybrid microalgae for on-demand cargo delivery [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2020, 7: 2001256.
- [30] Amin MU, Ali S, Ali MY, et al. Enhanced efficacy and drug delivery with lipid coated mesoporous silica nanoparticles in cancer therapy [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2021, 165: 31-40.
- [31] Cao ZP, Wang XY, Pang Y, et al. Biointerfacial self-assembly generates lipid membrane coated bacteria for enhanced oral delivery and treatment [J]. *Nat Commun*, 2019, 10: 5783.
- [32] Zhu XF, Guo JQ, Yang YL, et al. Macrophage polarization induced by bacteria-responsive antibiotic-loaded nanozymes for multidrug resistance-bacterial infections management [J]. *Small*, 2023, 19: e2204928.
- [33] Wang XY, Cao ZP, Zhang MM, et al. Bioinspired oral delivery of gut microbiota by self-coating with biofilms [J]. *Sci Adv*, 2020, 6: eabb1952.
- [34] Gotovtsev P. Microbial cells as a microrobots: from drug delivery

- to advanced biosensors [J]. *Biomimetics* (Basel), 2023, 8: 109.
- [35] Chen CY, Chen LJ, Wang PP, et al. Steering of magnetotactic bacterial microrobots by focusing magnetic field for targeted pathogen killing [J]. *J Magn Magn Mater*, 2019, 479: 74-83.
- [36] Stanton MM, Park BW, Vilela D, et al. Magnetotactic bacteria powered biohybrids target *E. coli* biofilms [J]. *ACS Nano*, 2017, 11: 9968-9978.
- [37] Chen CY, Chen LJ, Wang PP, et al. Magnetically-induced elimination of *Staphylococcus aureus* by magnetotactic bacteria under a swing magnetic field [J]. *Nanomedicine*, 2017, 13: 363-370.
- [38] Yan XH, Zhou Q, Vincent M, et al. Multifunctional biohybrid magnetite microrobots for imaging-guided therapy [J]. *Sci Robot*, 2017, 2: eaaq1155.
- [39] Xie LS, Pang X, Yan XH, et al. Photoacoustic imaging-trackable magnetic microswimmers for pathogenic bacterial infection treatment [J]. *ACS Nano*, 2020, 14: 2880-2893.
- [40] Sun FF, Yao MR, Su H, et al. A magnetic fluorescent spirochetes micromotor: dynamic monitoring and *in situ* sterilization of food-borne pathogens [J]. *Sens Actuators B Chem*, 2023, 385: 133679.
- [41] Tran NT, Kaldenhoff R. Achievements and challenges of genetic engineering of the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Algal Res*, 2020, 50: 101986.
- [42] Zhang FY, Zhuang J, Li ZX, et al. Nanoparticle-modified microrobots for *in vivo* [J]. *Nat Mater*, 2022, 21: 1324-1332.
- [43] Wang Y, Yang YN, Shi YR, et al. Antibiotic-free antibacterial strategies enabled by nanomaterials: progress and perspectives [J]. *Adv Mater*, 2020, 32: e1904106.
- [44] Knox KW, Vesik M, Work E. Relation between excreted lipopolysaccharide complexes and surface structures of a lysine-limited culture of *Escherichia coli*. [J]. *J Bacteriol*, 1966, 92: 1206-1217.
- [45] Cheng KM, Zhao RF, Li Y, et al. Bioengineered bacteria-derived outer membrane vesicles as a versatile antigen display platform for tumor vaccination *via* plug-and-display technology [J]. *Nat Commun*, 2021, 12: 2041.
- [46] Micoli F, MacLennan CA. Outer membrane vesicle vaccines [J]. *Semin Immunol*, 2020, 50: 101433.
- [47] 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: 21780-21788.
- [48] Sun JJ, Lin XS, He YG, et al. A bacterial outer membrane vesicle-based click vaccine elicits potent immune response against *Staphylococcus aureus* in mice [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1088501.
- [49] Huang YE, Nan L, Xiao CW, et al. Outer membrane vesicles coating nano-glycyrrhizic acid confers protection against *Bordetella bronchiseptica* through Th1/Th2/Th17 responses [J]. *Int J Nanomedicine*, 2022, 17: 647-663.
- [50] Wu GX, Ji HY, Guo XY, et al. Nanoparticle reinforced bacterial outer-membrane vesicles effectively prevent fatal infection of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* [J]. *Nanomedicine*, 2020, 24: 102148.
- [51] Petousis-Harris H, Radcliff FJ. Exploitation of *Neisseria meningitidis* group B OMV vaccines against *N. gonorrhoeae* to inform the development and deployment of effective gonorrhea vaccines [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 683.
- [52] Kadurugamuwa JL, Beveridge TJ. Bacteriolytic effect of membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa* on other bacteria including pathogens: conceptually new antibiotics [J]. *J Bacteriol*, 1996, 178: 2767-2774.
- [53] Huang WL, Meng LX, Chen Y, et al. Bacterial outer membrane vesicles as potential biological nanomaterials for antibacterial therapy [J]. *Acta Biomater*, 2022, 140: 102-115.
- [54] Wu S, Huang Y, Yan JC, et al. Bacterial outer membrane-coated mesoporous silica nanoparticles for targeted delivery of antibiotic rifampicin against gram-negative bacterial infection *in vivo* [J]. *Adv Funct Mater*, 2021, 31: 2103442.
- [55] Xie BB, Zhao HC, Zhang RX, et al. Bacteria-mimetic nanomedicine for targeted eradication of intracellular MRSA [J]. *J Control Release*, 2023, 357: 371-378.
- [56] Li S, Chen DQ, Ji L, et al. Development of different methods for preparing *Acinetobacter baumannii* outer membrane vesicles vaccine: impact of preparation method on protective efficacy [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 1069.
- [57] Chen HJ, Ji H, Kong XJ, et al. Bacterial ghosts-based vaccine and drug delivery systems [J]. *Pharmaceutics*, 2021, 13: 1892.
- [58] Muhammad A, Kassmannhuber J, Rauscher M, et al. Subcutaneous immunization of dogs with *Bordetella bronchiseptica* bacterial ghost vaccine [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 1377.
- [59] Ma Y, Cui L, Wang M, et al. A novel and efficient high-yield method for preparing bacterial ghosts [J]. *Toxins* (Basel), 2021, 13: 420.
- [60] Ali RH, Ali ME, Samir R. Production and characterization of bacterial ghost vaccine against *Neisseria meningitidis* [J]. *Vaccines* (Basel), 2022, 11: 37.
- [61] Mu J, Lei L, Zheng YC, et al. Comparative study of subcutaneous, intramuscular, and oral administration of bovine pathogenic *Escherichia coli* bacterial ghost vaccine in mice [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 1008131.
- [62] Liu S, Wu X, Chandra S, et al. Extracellular vesicles: emerging tools as therapeutic agent carriers [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2022, 12: 3822-3842.
- [63] Sun CH, Qin Y, Zhuang HD, et al. Membrane vesicles as drug delivery systems: source, preparation, modification, drug loading, *in vivo* administration and biodistribution, and application in various diseases [J]. *Pharmaceutics*, 2023, 15: 1903.
- [64] Kang SR, Nguyen DH, Yoo SW, et al. Bacteria and bacterial derivatives as delivery carriers for immunotherapy [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2022, 181: 114085.