

DOI: 10.20135/j.issn.1006-8147.2025.03.0189

论著

负载肿瘤抗原细菌外膜囊泡口服疫苗抑制肝细胞癌的研究

张亚丽, 张杨, 钟彦至, 左冰峰, 尹海芳
(天津医科大学医学技术学院, 天津 300070)

摘要 目的: 利用负载肿瘤抗原的细菌外膜囊泡(OMVs)作为口服疫苗, 以探究其抑制肝细胞癌的效果。方法: 首先, 利用超速离心法收集益生菌 EcN 1917 来源的 OMVs, 并通过电镜和 DLS 表征其形态及粒径; 其次, 利用考染和流式检测 TAT 介导蛋白负载于 OMVs 内部的效率及抗胃蛋白酶消化的能力; 利用 transwell 实验模拟肠上皮屏障, 评估 OMVs 透过肠上皮屏障诱导树突状细胞(DC)活化的能力; 最后, 在表达模式识别抗原 OVA 的小鼠肝细胞癌皮下瘤 Hepa1-6-OVA 模型上, 评估经口服 OMV_{OVA} 疫苗诱导的肿瘤特异性免疫应答效应。结果: OMV 为球形脂质双层纳米囊泡, 平均直径为 37.8 nm; 流式检测结果显示: TAT 细胞穿膜肽可介导 GFP 荧光报告蛋白在 OMVs 内部高效负载并可保护 GFP 蛋白不被消化降解; 体外模拟肠上皮实验结果证明: OMVs 可穿过肠上皮屏障并激活 DC, 上调共刺激分子 CD80/CD86 表达($t=5.571, 57.64$, 均 $P<0.01$); 在表达 OVA 抗原的 Hepa1-6 肝细胞癌皮下瘤小鼠模型中, 口服 OMV_{OVA} 可有效抑制肿瘤生长, 肿瘤体积($t=4.288, P<0.01$)和肿瘤质量($t=5.812, P<0.01$)均显著降低, 肠系膜淋巴结中 DC 活化($t=10.08, P<0.01$)及对抗原肽的提呈($t=5.853, P<0.01$)均显著增高, 显著激活抗原特异性 T 细胞数量($t=7.863, P<0.01$)。结论: 口服内部负载肿瘤抗原肽新型 OMV 疫苗, 可有效抑制小鼠肝细胞癌皮下瘤生长, 激活黏膜免疫诱导抗原特异性免疫应答。

关键词 肝细胞癌; 细菌外膜囊泡; 细胞穿膜肽; 口服疫苗

中图分类号 Q291 文献标志码 A 文章编号 1006-8147(2025)03-0189-07

Oral administration of tumor antigen-loaded bacterial outer membrane vesicle vaccines effectively inhibits hepatocellular carcinoma

ZHANG Yali, ZHANG Yang, ZHONG Yanzhi, ZUO Bingfeng, YIN Haifang
(School of Medical Technology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract Objective: To investigate the inhibitory effect of bacterial outer membrane vesicles (OMVs) on hepatocellular carcinoma using OMVs loaded with tumor antigens as oral vaccines. **Methods:** OMVs derived from probiotic EcN 1917 were collected by ultracentrifugation, and their morphology and particle size were characterized by transmission electron microscopy and DLS. The loading efficiency of TAT mediated protein loaded into OMVs and the ability to resist gastric protease digestion were examined by Coomassie blue staining and flow cytometry analysis. The ability of OMVs penetrating the intestinal epithelial barrier and inducing dendritic cell (DC) activation was measured by transwell test. The antitumor specific immune responses induced by oral OMV_{OVA} vaccine were evaluated in subcutaneous HCC mouse models Hepa1-6-OVA bearing OVA-overexpressing antigens. **Results:** The OMVs were spherical lipid bilayer nanovesicles with an average diameter of 37.8 nm. The results of flow cytometry showed that TAT cell-penetrating peptide could efficiently load GFP fluorescent reporter protein in OMVs and protect GFP protein from digestion and degradation. The results of *in vitro* intestinal epithelial experiment showed that OMVs could cross the intestinal epithelial barrier and activate DC, and up-regulate the expression of costimulatory molecules CD80/CD86 ($t=5.571, 57.64$, both $P<0.01$). Oral administration of OMV_{OVA} significantly inhibited tumor growth in OVA-expressing subcutaneous Hepa1-6 hepatocellular carcinoma mice, with significantly reduced tumor volume ($t=4.288, P<0.01$) and tumor weight ($t=5.812, P<0.01$). DC activation ($t=10.08, P<0.01$) and antigen peptide presentation ($t=5.853, P<0.01$) in mesenteric lymph nodes were significantly increased, and the number of antigen specific T cells was significantly activated ($t=7.863, P<0.01$). **Conclusion:** The oral administration of the novel OMV vaccine loaded with tumor antigen peptides effectively inhibits the growth of subcutaneous tumors in hepatocellular carcinoma mice and activates mucosal antigen-specific immune responses induced by immunity.

Key words hepatocellular carcinoma; bacterial outer membrane vesicles; cell-penetrating peptides; oral vaccines

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 免疫

基金项目 国家重点研发计划 (2301-2JC280)

作者简介 张亚丽 (2000-), 女, 硕士在读, 研究方向: 药物靶向递送;

通信作者: 尹海芳; E-mail: haifangyin@tmu.edu.cn.

治疗近年来取得了显著进展, 特别是在免疫检查点抑制剂 (immune checkpoint inhibitor, ICI) 和细胞免疫疗法方面^[1-2]。尽管 ICI (如 PD-1/PD-L1 抑制剂) 在 HCC 中表现出一定疗效, 但只有部分患者能从中获

益,响应率还较低^[3-4]。细胞疗法特别是树突状细胞(dendritic cell, DC)的体外培养、抗原加载以及个性化处理成本较高,极大地限制了DC疗法的临床应用^[5-6]。近年来,作为DC的替代物,DC来源外泌体(DC-derived exosome, DEX)具有安全性更高、货架期长等优点。但在已开展的几项临床试验中,发现DEX免疫原性有限,诱导的抗肿瘤免疫疗效受限^[7-8]。

目前,细菌外膜囊泡(bacterial outer membrane vesicle, OMV)是一种源于革兰阴性细菌的纳米级膜泡,被认为是潜在的肿瘤免疫治疗工具^[9-11]。OMVs可以携带多种免疫刺激分子,具有天然免疫原性^[12-13]。在笔者前期探索中发现肠道益生菌EcN 1917来源的OMV具有抵抗胃肠液消化的特性,但OMV内部载药仍是一个难点。利用来源于人类免疫缺陷病毒的细胞穿透肽(TAT)的胞膜穿透能力,将治疗性蛋白和多肽药物与TAT融合表达,通过简单孵育可在牛奶外泌体内实现高效装载,显示了TAT穿膜肽内部装载药物具有的应用潜力^[14]。因此,本研究尝试利用TAT进行OMVs内部载药,并通过口服疫苗方式来抑制HCC生长。

1 材料与方法

1.1 动物与材料 小鼠肝癌细胞系Hepa1-6来自C57/BL6,购买于中国武汉博士德生物工程有限公司。电镜铜网(中国,北京新兴百业公司),Avanti J-26XP超速离心机(德国,Beckman公司),透射电子显微镜(日本,HITA CHI公司)。TAT-OVA肽在强耀生物(中国)合成。

所有实验均使用6~8周龄C57BL/6野生型小鼠。在温度受控的特定无病原体条件下饲养小鼠。实验已通过天津医科大学动物伦理委员会审批(许可证号:SYXK 2023-0004)。

1.1.1 OMVs分离和收集 选用革兰阴性益生菌Escherichia coli Nissle 1917(简称ECN 1917)作为OMV的来源菌,培养基为LB液体培养基。首先在500 mL锥形瓶中配制300 mL LB液体培养基,加入细菌后在37℃摇床上220 r/min振荡24 h,将菌液进行梯度离心(6 000×g离心10 min,10 000×g离心30 min)去除细胞碎片,将上清液通过0.22 μm滤器,去除杂质;再将滤液以160 000×g离心2 h,弃去上清,用干净的100 μL DPBS反复吹打离心管底部,重悬得到OMV。

1.1.2 醋酸铀染色及电镜观察 OMV的形态及大小将超速离心所得到的20 μL OMV加等量4%多聚甲醛固定,室温放置20 min;将铜网置于OMV固定液上,室温吸附25 min,向铜网上滴加100 μL 1%戊二

醛溶液,室温固定5 min;滴加100 μL去离子水洗涤铜网,洗涤8次,每次2 min;向铜网滴加100 μL草酸铀溶液染色5 min;之后滴加100 μL甲基纤维素-醋酸铀溶液置于冰上复染7 min;用滤纸吸去多余的染色液并放置于滤纸上风干,透射电镜观察。

1.1.3 TAT介导的蛋白或抗原肽在OMV中的负载 OMVs与TAT-GFP(TAT-OVA)按照1:1蛋白质质量,各100 μg,在200 μL体系中置于室温旋转混匀仪上孵育6 h,分OMV组、GFP蛋白组、OMV_{TAT-GFP}组,每组样品做3个重复,流式细胞仪检测FITC通道的荧光阳性率。

1.1.4 蛋白酶消化实验证实OMV能将TAT-GFP装载于内部 设置单独TAT-GFP、单独OMV对照,胃蛋白酶Pepsin在pH=2.0的环境中有最佳酶活性,1% SDS作为破膜剂。各组样品在37℃培养箱孵育60 min后进行考染及流式检测。

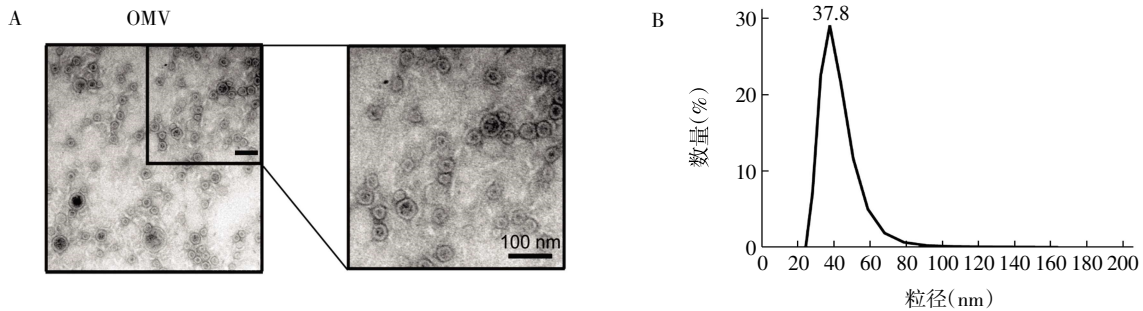
1.1.5 小鼠HCC皮下瘤模型建立及系统治疗 将Hepa1-6-OVA细胞消化、洗涤、计数,每只小鼠皮下接种5×10⁵个细胞,接种后第7天开始治疗。将荷瘤鼠随机分成4组:PBS缓冲液治疗组(PBS)、裸抗原肽单独治疗组、OMV单独治疗组、内部装载抗原肽的OMV治疗组,每组5只。各组给药剂量为200 μL体系,100 μg/只,口服灌胃给药,定期检测小鼠皮下瘤体积。

1.1.6 小鼠肠系膜淋巴结细胞分离及DC表面标志物染色 预备无菌培养皿,0.75 μm滤网,1 mL注射器;取小鼠肠系膜淋巴结,用1 mL注射器的柄部研磨小鼠肠系膜淋巴结,用2 mL PBS重悬后过0.75 μm滤网;在高速离心机中4℃,1 500 r/min离心5 min后弃去上清液;用1 mL PBS重悬细胞沉淀并在小型冷冻离心机中4℃,4 500 r/min离心5 min后弃去上清液,并用100 μL PBS重悬细胞沉淀,加入流式抗体在冰上染色后固定细胞,利用流式细胞仪进行检测分析。

1.1.7 小鼠外周血淋巴细胞分离及表面蛋白染色 预备无菌的EP管,加入60 μL 1%肝素钠溶液;取小鼠全血加入提前添加1%肝素钠抗凝剂的EP管中,轻轻翻转以确保混匀;取新的EP管,向其中加入600 μL淋巴细胞分离液,将同等体积抗凝全血沿着EP管的侧壁缓慢加入其中;在小型冷冻离心机中4℃,3 000 r/min离心20 min;离心后,样品分成3层,下层为红细胞,上层为血浆及血小板,中间白膜层为外周血单个核细胞,使用200 μL移液枪小心吸取中间白膜层部分并转移至一个新的EP管里,再补满EP管体积的PBS;4 500 r/min离心5 min后弃去上清液,并用100 μL PBS重悬细胞沉淀,每种抗

体添加 0.2 μL , 使得流式抗体最终浓度为 0.2 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$; 准备一组空白对照样品 Blank 及各个荧光通道的单色对照样品, 便于流式细胞仪补偿矫正; 确保细胞与抗体混匀之后, 将 EP 管置于冰上, 避光孵育 45 min; 向每个样品管中加入 800 μL PBS 终止染色, 离心弃去上清后用 PBS 再洗涤一遍, 之后向细胞沉淀中加入 200 μL 4% 多聚甲醛固定细胞, 利用流式细胞仪进行检测分析。

1.2 统计学处理 使用 Photoshop、Adobe illustrator



注: OMV: 细菌外膜囊泡; A: 透射电镜检测 OMV 的形态特征; B: DLS 检测 OMV 的粒径

图 1 OMV 形态和大小表征

Fig.1 The characterization of OMV morphology and size

2.2 TAT 介导 GFP 蛋白在 OMV 内部负载 利用报告蛋白 GFP, 与 TAT 进行融合表达, 利用考马斯亮蓝染色 SDS-PAGE 胶确认获得了纯化 TAT-GFP 蛋白(图 2A)。为了检测负载效率, 利用流式检测 TAT 穿梭肽介导 OMV 内部装载 GFP 蛋白的效率, 结果显示: 有 72.8% 的 OMV 内部成功负载了 TAT-GFP 蛋白, 说明 TAT 可介导 GFP 蛋白在 OMV 内高效负载(图 2B)。为了检测 TAT 确实介导了 GFP 在 OMV 内部的负载, 利用胃蛋白酶消化实验来验证, 1% SDS 作为破膜剂, 结果显示: 当只有 pepsin 作用时, TAT-GFP 的条带未被消化, 当 pepsin 与 1% SDS 同时作用时, TAT-GFP 被完全消化, 说明 TAT 确实可以介导 GFP 蛋白在 OMV 内部负载(图 2C)。利用流式检测经体外模拟胃肠液消化前后 OMV 内 GFP 荧光, 结果表明: 体外模拟胃肠液消化前后 OMV 内 GFP 蛋白荧光强度变化无差异($P=0.56$), 说明体外模拟胃肠液消化未对 OMV 内负载 TAT-GFP 产生影响(图 2D、E)。

2.3 OMV 穿越肠上皮屏障活化 DC 抗原提呈细胞 为了检测在体外模拟 OMV 口服能够越过肠上皮细胞到达肠固有层, 从而活化抗原提呈细胞的目的, 设计了体外 transwell 实验(图 3A)。利用 FITC-dextran 检测上层小室中肠屏障的形成, 实验组设置 6 个孔, 在上层小室加入 Caco-2 及 HT-26 细胞, 利用 FITC-dextran 验证肠上皮细胞形成屏障的致密

软件作图, 使用 SPSS 16.0 进行统计分析, 符合正态分布的计量数据用均数 \pm 标准差表示, 组间均数比较采用独立样本 t 检验, 小鼠皮下瘤生长采用 *two way ANOVA* 分析, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

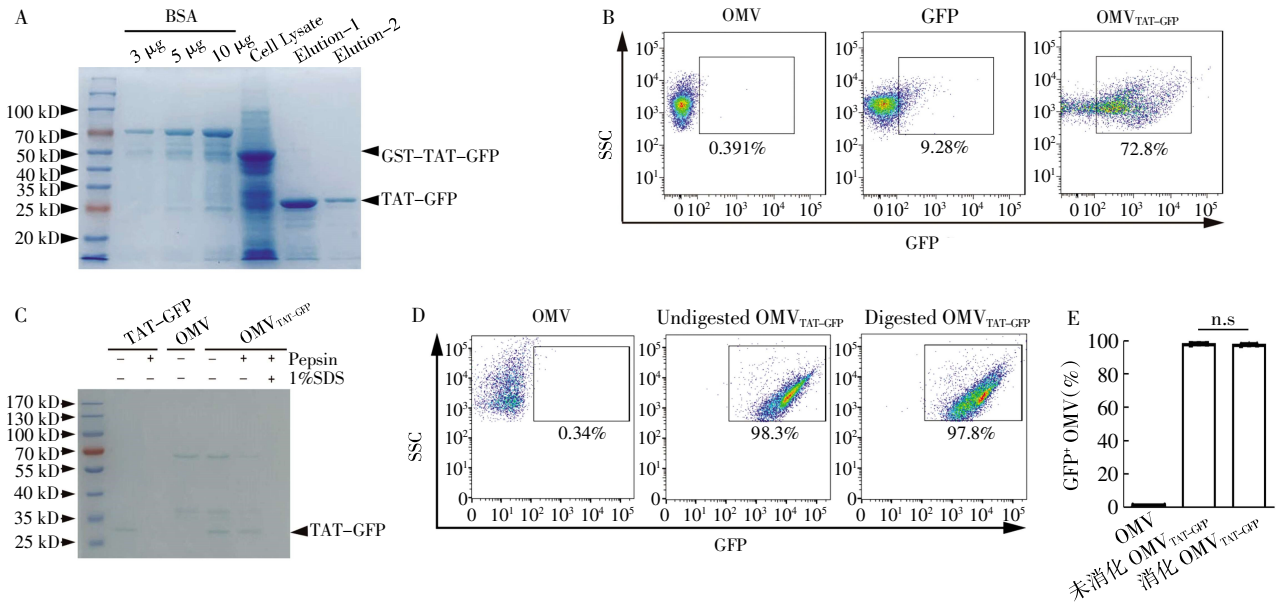
2.1 OMV 形态和大小表征 利用透射电镜检测 OMVs, 显示 OMVs 呈典型的双层膜结构, 结构完整, 大小均一(图 1A)。DLS 检测 OMVs 的粒径, 结果显示利用超速离心法回收的 OMV 平均直径为 37.8 nm(图 1B)。

性, NC 组为上层小室中未加 Caco-2 和 HT-26 细胞, 结果显示: 6 个实验孔中, 有 3 个孔未见 FITC-dextran 荧光($t=14.660, P<0.001$), 见图 3B、3C。为了检测 OMV 接触到下层未成熟 DC 后刺激其成熟的情况, 利用流式检测 DC 表面 CD80/CD86 分子表达情况, 结果显示: 加入 OMV 后, DC 表面 CD80/CD86 等共刺激分子的表达显著上调($t=5.571, 57.64$, 均 $P<0.01$)(图 3D、E)。

2.4 口服 OMV_{OVA} 有效抑制小鼠皮下 HCC 生长 为了测试负载肿瘤抗原细菌外膜囊泡口服疫苗抑制 HCC 的作用, 建立了小鼠 Hepa1-6-OVA HCC 皮下瘤模型, 在第 3、6、11 天分别口服给药 3 次, 最后一次治疗 6 d 后取材(图 4A)。结果显示: 相比于其他 3 组, 口服 OMV_{OVA} 组, 可显著抑制肿瘤生长; 相对于单独口服 OVA 组与 PBS 组, OMV 组单独给药可有效抑制肿瘤生长(图 4B)。在第 11 天, OMV_{OVA} 组和 OMV 组与 PBS 组和 OVA 组的肿瘤体积开始出现差异, 在第 15 天时, OMV_{OVA} 组与 OMV 组的肿瘤体积开始出现差异, 说明口服 OMV_{OVA} 可显著抑制 HCC 皮下瘤生长($t=4.288, P<0.01$), 单独口服 OVA 却没有这种效果, 而 OMV 却具有一定效果(图 4C)。在第 17 天时, 取各组肿瘤组织称重, 结果显示: OMV_{OVA} 组肿瘤重量显著低于其他 3 组($t=5.812, P<0.01$)(图 4D)。

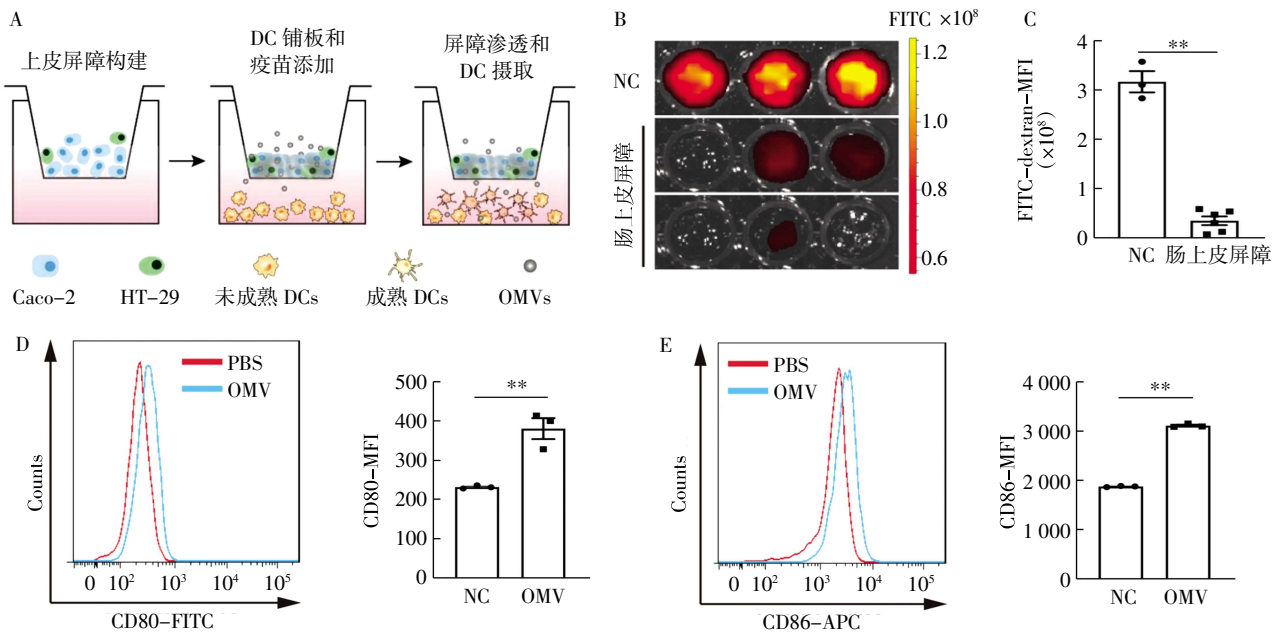
2.5 口服 OMV_{OVA} 提高小鼠肠系膜淋巴结内 DC 抗原提呈 为了检测不同治疗组小鼠肠系膜淋巴结中 DC 的活化情况,利用流式检测肠系膜淋巴结中 DC 表面 CD80/CD86 表达情况,结果显示:与其他 3 组相比,口服 OMV_{OVA} 有效地刺激了肠系膜淋巴结中 DC 表面 CD80/CD86 共刺激分子的显著上调 ($t=10.08, P<0.01$);而与 PBS 组和 OVA 组相比,OMV

组小鼠肠系膜淋巴结中 DC 表面 CD80/CD86 共刺激分子表达上调(图 5A、5B)。同时分析了不同治疗组小鼠肠系膜淋巴结中 DC 抗原提呈情况,检测结合 SIINFEKL 抗原肽的 MHC-I H-2K^b,结果显示:与其他 3 组相比,OMV_{OVA} 明显促进了 DC 对抗原肽的提呈 ($t=5.853, P<0.01$) (图 5C、5D)。



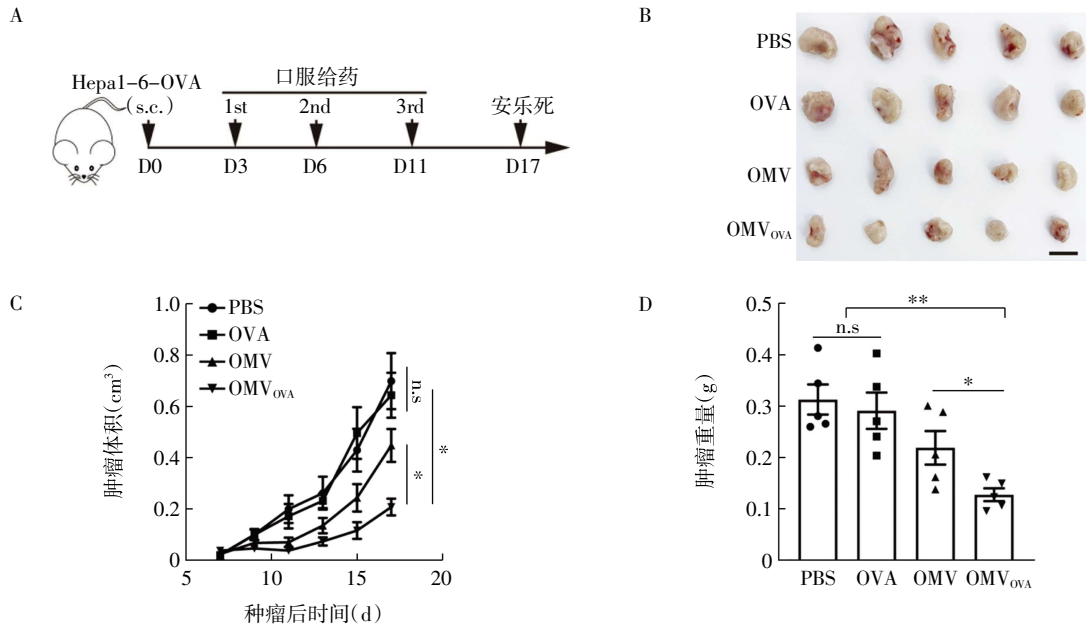
注:Pepsin:胃蛋白酶;A:考马斯亮蓝染色显示纯化的 TAT-GFP 蛋白;箭头指示目标蛋白;B:流式检测 TAT-GFP 在 OMV 内的负载效率;C:Pepsin 消化实验;D、E:流式检测 OMV 经模拟胃肠液消化前后 OMV 内 GFP 的阳性率及流式结果定量;n.s:无显著差异

图 2 TAT 介导 GFP 蛋白在 OMV 内部的负载
Fig.2 TAT mediates GFP protein loading into the OMVs



注:A:Transwell 系统实验示意图;B、C: 体外验证肠上皮屏障形成及荧光定量实验;D、E: 流式检测 OMV 刺激 DC 后细胞表面 CD80/CD86 等共刺激分子表达及定量;DC:树突状细胞;** $P<0.01$

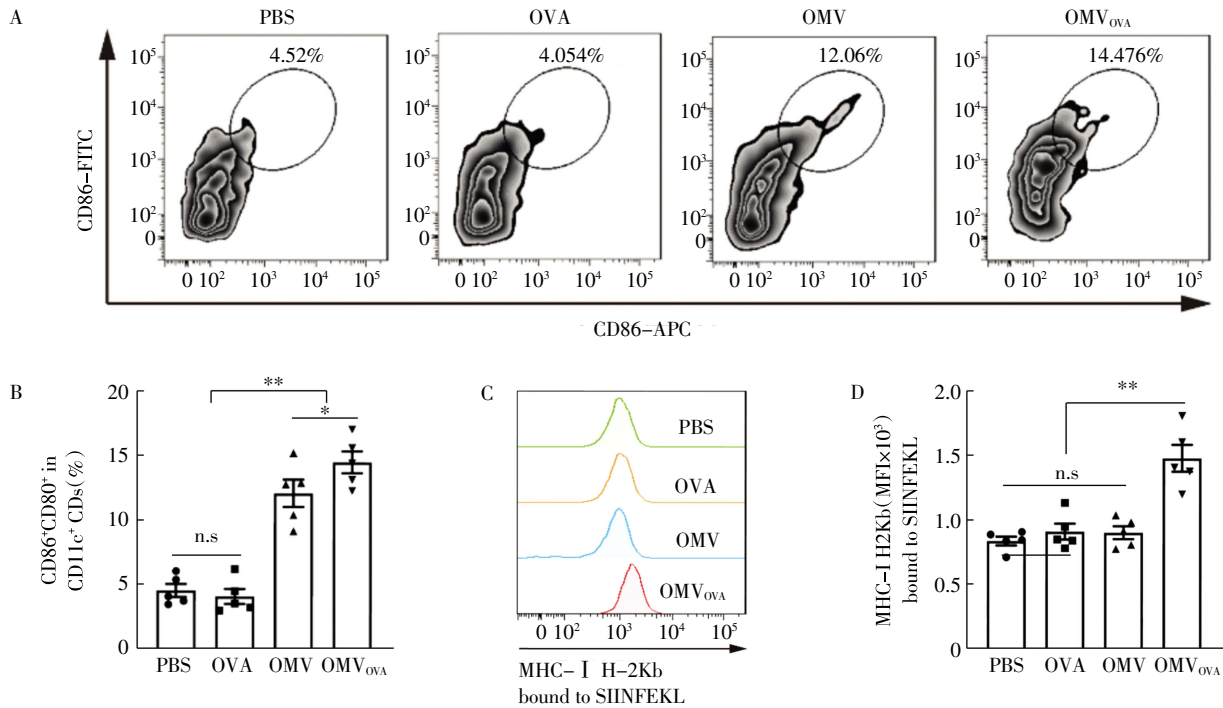
图 3 OMV 穿越肠上皮屏障的探究
Fig.3 The exploration of OMV crossing the intestinal epithelial barrier



注:A:小鼠治疗进程图;B:小鼠皮下瘤代表性图片;C:小鼠皮下瘤体积统计;D:小鼠皮下瘤肿瘤重量比较; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图 4 口服 OMV_{OVA} 有效抑制小鼠皮下 HCC 生长

Fig.4 Oral administration of OMV_{OVA} effectively inhibited the growth of subcutaneous HCC in mice



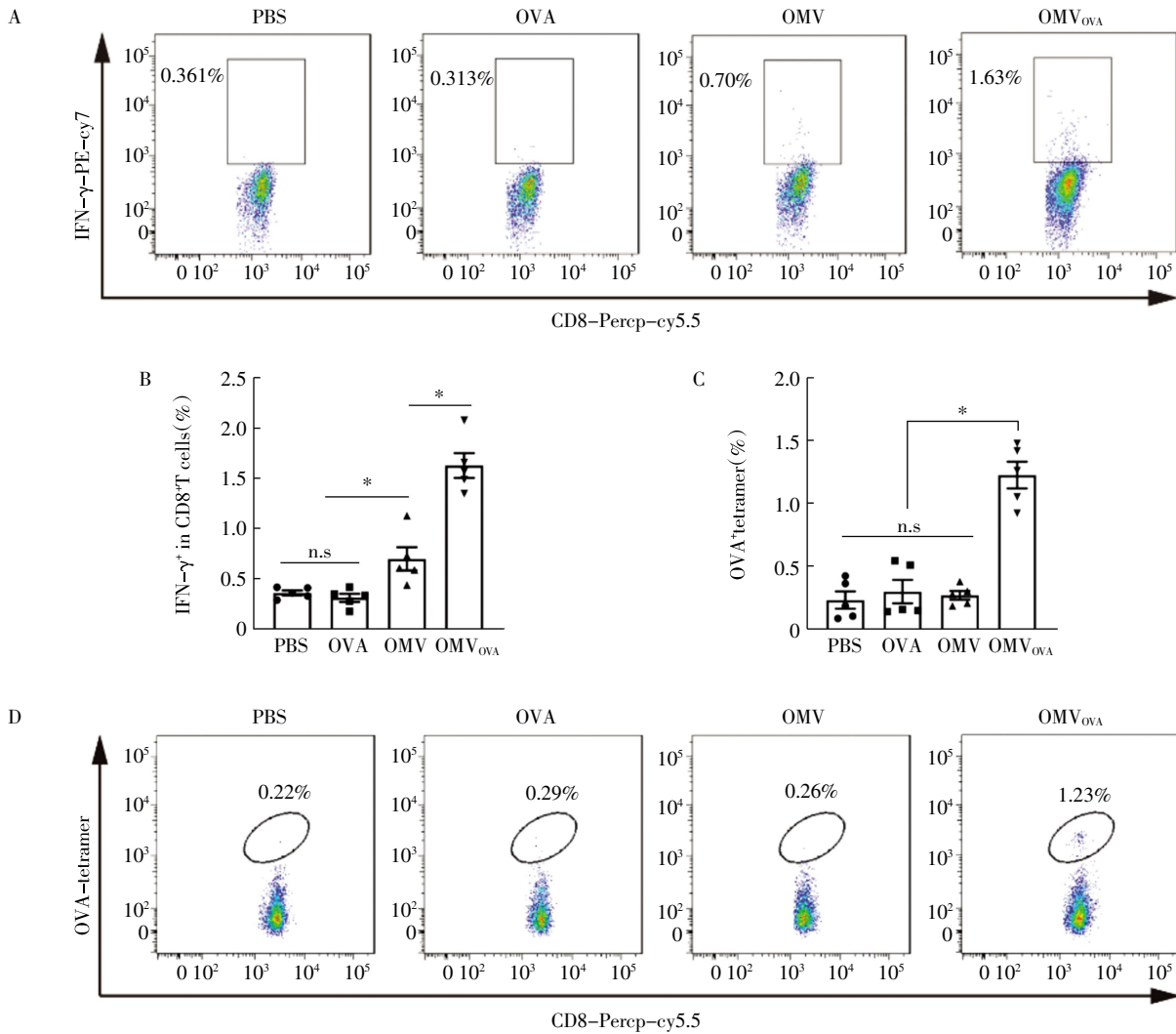
注:A、B:小鼠肠系膜淋巴结中 DC 活化比较;C、D:小鼠肠系膜淋巴结中 DC 抗原提呈情况;DC:树突状细胞; ** $P < 0.01$

图 5 口服 OMV_{OVA} 提高小鼠肠系膜淋巴结内 DC 抗原提呈

Fig.5 Oral administration of OMV_{OVA} improved DC antigen presentation in mesenteric lymph nodes of mice

2.6 口服 OMV_{OVA} 激活抗原特异性免疫应答效应
 为了进一步验证口服治疗的效果,采集不同治疗组荷瘤小鼠外周血,分离淋巴细胞并染色检测,结果显示:与 PBS 组和 OVA 组相比,OMV 组和 OMV_{OVA} 组中 IFN- γ ⁺CD8⁺T 细胞显著增加,且 OMV_{OVA} 组增加

显著高于 OMV 组(图 6A、6B)。CD8⁺T 细胞 OVA-tetramer 检测结果表明:与 PBS 组相比,OVA 组和 OMV 组均无显著增加,而 OMV_{OVA} 组的 OVA-tetramer 阳性率显著高于其他 3 组($t=7.863, P < 0.01$)(图 6C、6D)。



注:A、B:不同治疗组小鼠外周血 IFN-γ⁺CD8⁺T 细胞数量及流式结果定量;C、D:不同治疗组小鼠外周血 CD8⁺T 细胞中 OVA-tetramer 阳性率及结果定量;*P<0.05

图 6 口服 OMV_{OVA} 激活抗原特异性免疫应答效应

Fig.6 Oral OMV_{OVA} activated antigen-specific immune response effects

3 讨论

在 HCC 免疫治疗中，激发患者自身的抗肿瘤免疫反应是一个重要治疗策略。目前常用的免疫治疗方式，如 ICI、细胞因子治疗、CAR-T 细胞等，尽管取得了一定成效，但在 HCC 中仍然存在效果受限和肿瘤免疫逃逸等问题^[15]。OMV 是一种源于革兰阴性细菌的纳米级膜囊泡，也被认为是潜在肿瘤免疫治疗工具^[16]。OMVs 可以携带多种免疫刺激分子，具有天然的免疫原性。利用 OMVs 可进一步激活先天免疫反应，同时引导宿主获得性免疫系统产生强烈的抗肿瘤反应^[17-18]。此外，OMVs 还可通过负载 HCC 肿瘤抗原来特异性激活抗肿瘤免疫。由于肠道是最大的免疫器官，含有约 70% 的机体免疫细胞，口服肿瘤疫苗是一种很有前途的治疗选择，可以诱导强大的抗肿瘤免疫反应，并且口服相较于肌肉或皮下

注射的患者依从性更好^[19]。所以本研究选择益生菌 ECN 1917 来源的 OMV 作为疫苗载体，通过细胞透皮 TAT 介导小鼠肝癌抗原负载于 OMV 内，并通过口服激活体内黏膜免疫，从而诱导抗肿瘤免疫反应。

流式检测结果表明由 TAT 介导的 GFP 蛋白在 OMVs 内负载效率可达 72.8%。通过蛋白酶消化联合破膜剂说明 TAT-GFP 确实被负载于 OMV 内部。体外模拟胃肠液消化实验表明消化前后并未影响 OMV 内 GFP 蛋白的荧光信号。体外 transwell 实验中，OMV 可穿过肠上皮细胞形成的屏障，到达下层小室接触未成熟 DC，并刺激其表面 CD80/CD86 共刺激活化信号表达上调促进其成熟，说明 OMV 具有越过肠上皮屏障到达固有层并刺激固有层抗原提呈细胞成熟的功能。小鼠皮下荷 Hepa1-6-OVA

肿瘤,以 OVA 257-264(SIINFEKL)作为肿瘤特异性抗原,TAT 介导其负载于 OMV 内部,通过口服方式激活黏膜免疫系统。抑瘤结果表明其有效抑制了小鼠皮下 HCC 生长,抑瘤效果也显著优于 OVA 组和 OMV 组。在 OMV 组和 OMV_{OVA} 组小鼠肠系膜淋巴结内 DC 表面 CD80/CD86 共刺激分子表达显著上调,且两组之间存在差异。进一步检测到 OMV_{OVA} 组 DC 表面结合 SIINFEKL 的 MHC-I H-2K^b 显著上调。同时,OMV_{OVA} 组小鼠外周血淋巴细胞内具有杀伤功能的 IFN- γ ⁺CD8⁺T 细胞显著上调,并且 CD8⁺T 细胞表面 OVA-tetramer 阳性率显著高于其他组,口服 OMV_{OVA} 疫苗激活了小鼠体内抗原特异性免疫应答效应。这些体内结果表明通过口服的方式成功激活小鼠黏膜免疫,OMV 被 DC 等抗原提呈细胞摄取,并将肿瘤特异性抗原成功提呈至 DC 表面从而激活 CD8⁺T 细胞,相应地,识别 OVA 抗原肽的 TCR 阳性率也随之增高,最终激活抗原特异性抗肿瘤免疫效应达到抑瘤效果。

综上所述,本研究通过体内外研究,证实了 TAT 可介导蛋白、短肽类分子负载于 OMV 内,并可通过口服方式激活黏膜免疫,将肿瘤抗原肽提呈于肠固有层 DC 表面,并激活外周血 CD8⁺T 细胞,从而诱导抗原特异性抗肿瘤免疫反应,抑制小鼠皮下瘤的生长,为 HCC 治疗提供了新思路 and 策略。同时为了更好的模拟 HCC 发生和复杂的免疫微环境,后续研究中,将在小鼠原位或原发肝癌模型中,进一步验证口服负载 HCC 抗原肽 OMV 的抑瘤效果。

参考文献:

- [1] LLOVET J M, CASTET F, HEIKENWALDER M, et al. Immunotherapies for hepatocellular carcinoma[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2022, 19(3):151-172.
- [2] LIU Z, LIU X, LIANG J, et al. Immunotherapy for hepatocellular carcinoma: current status and future prospects[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 765101.
- [3] BARRUETO L, CAMINERO F, CASH L, et al. Resistance to checkpoint inhibition in cancer immunotherapy[J]. *Transl Oncol*, 2020, 13(3):100738.
- [4] 张杨,游阿彬,齐寒,等. 负载化疗药物的外泌体对肝癌的靶向治疗研究[J]. *天津医科大学学报*, 2021, 27(3):229-233.
- [5] SANGRO B, SAROBE P, HERVÁS-STUBBS S, et al. Advances in immunotherapy for hepatocellular carcinoma[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2021, 18(8):525.
- [6] JENG L B, LIAO L Y, SHIH F Y, et al. Dendritic-cell-vaccine-based immunotherapy for hepatocellular carcinoma: clinical trials and recent preclinical studies[J]. *Cancers*, 2022, 14(18):4380.
- [7] ESCUDIER B, DORVAL T, CHAPUT N, et al. Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous dendritic cell (DC) derived-exosomes: results of the first phase I clinical trial[J]. *J Transl Med*, 2005, 3(1):10.
- [8] MORSE M A, GARST J, OSADA T, et al. A phase I study of dextran-exosome immunotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer[J]. *J Transl Med*, 2005, 3(1):9.
- [9] VAN DER POL L, STORK M, VAN DER LEY P. Outer membrane vesicles as platform vaccine technology[J]. *J Biotechnol*, 2015, 10(11):1689-1706.
- [10] SCHWECHHEIMER C, KUEHN M J. Outer-membrane vesicles from gram-negative bacteria: biogenesis and functions[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2015, 13(10):605-619.
- [11] MICOLI F, MACLENNAN C A. Outer membrane vesicle vaccines[J]. *Semin Immunol*, 2020, 50:101433.
- [12] MANCINI F, ROSSI O, NECCHI F, et al. Omv vaccines and the role of TLR agonists in immune response[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(12):4416.
- [13] LI M, ZHOU H, YANG C, et al. Bacterial outer membrane vesicles as a platform for biomedical applications: an update [J]. *JCR*, 2020, 323:253-268.
- [14] JING R, ZHANG L, LI R, et al. Milk-derived extracellular vesicles functionalized with anti-tumour necrosis factor- α nanobody and anti-microbial peptide alleviate ulcerative colitis in mice[J]. *J Extracell Vesicles*, 2024, 13(6):e12462.
- [15] LADD A D, DUARTE S, SAHIN I, et al. Mechanisms of drug resistance in HCC[J]. *Hepatology (Baltimore, Md)*, 2024, 79(4):926-940.
- [16] JAIN S, PILLAI J. Bacterial membrane vesicles as novel nanosystems for drug delivery[J]. *Int J Nanomedicine*, 2017, 12:6329-6341.
- [17] KIM O Y, PARK H T, DINH NTH, et al. Bacterial outer membrane vesicles suppress tumor by interferon- γ -mediated antitumor response[J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1):626.
- [18] KAPARAKIS-LIASKOS M, FERRERO R L. Immune modulation by bacterial outer membrane vesicles[J]. *Nat Rev Immunol*, 2015, 15(6):375-387.
- [19] YUE Y, XU J, LI Y, et al. Antigen-bearing outer membrane vesicles as tumour vaccines produced in situ by ingested genetically engineered bacteria[J]. *Nat Biomed Eng*, 2022, 6(7):898-909.

(2024-11-21 收稿)