

肺炎克雷伯菌外膜囊泡研究进展

吴小碟, 沈秀芬, 马润, 王卓, 王玉明, 胡莹*

昆明医科大学第二附属医院检验科, 云南 昆明 650101

吴小碟, 沈秀芬, 马润, 王卓, 王玉明, 胡莹. 肺炎克雷伯菌外膜囊泡研究进展[J]. 微生物学通报, 2024, 51(9): 3317-3326.

WU Xiaodie, SHEN Xiufen, MA Run, WANG Zhuo, WANG Yuming, HU Ying. Progress in outer membrane vesicles derived from *Klebsiella pneumoniae*[J]. Microbiology China, 2024, 51(9): 3317-3326.

摘要: 肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*, KP)是临床上常见的条件致病菌, 其发病机制涉及复杂的病原体-宿主相互作用网络。尽管我们对这种细菌的分子和细胞机制有了深入的了解, 但关于肺炎克雷伯菌外膜囊泡(outer membrane vesicles, OMVs)及其在细菌发病机制中的作用仍未得到充分的阐明。我们总结了目前有关肺炎克雷伯菌外膜囊泡组成成分的知识, 重点阐述了其在肺炎克雷伯菌存活和致病等方面的生物学功能。

关键词: 肺炎克雷伯菌; 外膜囊泡; 生物学功能; 疫苗

Progress in outer membrane vesicles derived from *Klebsiella pneumoniae*

WU Xiaodie, SHEN Xiufen, MA Run, WANG Zhuo, WANG Yuming, HU Ying*

Department of Clinical Laboratory, the Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650101, Yunnan, China

Abstract: *Klebsiella pneumoniae* is a prevalent clinical conditional pathogen. *K. pneumoniae* infection involves a complicated network of pathogen-host interactions. Despite the profound knowledge about the molecular and cellular mechanisms of this bacterium, studies remain to be carried out regarding the outer membrane vesicles (OMVs) derived from *K. pneumoniae* and their role in bacterial pathogenesis. We summarized the current knowledge on the components of OMVs derived from *K. pneumoniae* and reviewed the research progress in the roles of OMVs in the

资助项目: 云南省高层次卫生健康技术人才培养支持计划(D-2018041); 云南省基础研究计划[2019FE001(-229)]; 昆明医科大学研究生创新基金(2024S092)

This work was supported by the High Level Health Technology Talent Training Support Program of Yunnan Province (D-2018041), the Yunnan Fundamental Research Project (2019FE001(-229)), and the Graduate Innovation Fund of Kunming Medical University (2024S092).

*Corresponding author. E-mail: hy2002@126.com

Received: 2023-12-01; Accepted: 2024-01-29; Published online: 2024-03-21

survival and pathogenicity of *K. pneumoniae*.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*; outer membrane vesicles; biological function; vaccine

肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*, KP)是一种常见的机会性病原体,其感染主要发生在免疫功能低下或有基础疾病的人群中。这种细菌能引发一系列严重的感染性疾病,包括肺炎、肝脓肿和脓毒症等^[1]。此外,肺炎克雷伯菌具有广泛的传播途径,并且经常表现出多重耐药性,这给临床治疗带来了巨大的挑战^[2]。

近年来,研究发现细菌可以释放细菌细胞外小泡(bacterial extracellular vesicles, bEVs),为了更好地探索 bEVs 的生物学功能,根据不同的来源对其进行了分类;其中,革兰氏阴性菌释放的 bEVs 被认为是亲本细菌外膜结构的衍生物,因此被称为外膜囊泡(outer membrane vesicles, OMVs)^[3-4]。OMVs 可作为一种重要的毒力因子发挥复杂作用,在多种病原菌中与致病机制密切相关^[5]。与所有革兰氏阴性菌一样,肺炎克雷伯菌也能够释放 OMVs。越来越多的研究正在关注外膜囊泡在肺炎克雷伯菌感染、发生、发展过程中的作用。

本文概述了 OMVs 的形成和结构,并简要描述了其功能,重点讨论了肺炎克雷伯菌外膜囊泡组成,以及外膜囊泡在肺炎克雷伯菌存活、致病和应用等方面的研究进展,以期将来肺炎克雷伯菌外膜囊泡的深入研究和临床应用提供参考。

1 外膜囊泡的概述

革兰氏阴性菌分泌产生的外膜囊泡,包含了多种生物分子,发挥重要的生物功能,对于细菌的生存、定殖、致病和细菌间以及细菌与宿主间的细胞交流均有重大意义。

1.1 OMVs 组成

OMVs 是由致病性和非致病性微生物在生

长过程中释放的球形脂质纳米结构,大小从 20–300 nm 不等^[6]。OMVs 主要由细菌的外膜物质组成,同时也能包含细胞质和周质中的成分^[7]。其内部空腔形成于细胞外环境中,含有脂质,包括脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)、糖脂和磷脂;核酸,包括基因组和质粒 DNA、RNA;蛋白质,包括外膜蛋白(outer membrane proteins, OMPs)、酶和毒素等^[8-9]。OMVs 与多种生理过程有关,如获取营养、形成生物膜、传递毒素及调节宿主免疫反应等^[10]。此外,由于 OMVs 具有膜结构,这使得它们能防止内容物在高浓度下被降解,从而在货物运输中具有优势。这些对揭示细菌交流和发病机制至关重要,并可能最终导致新疗法的发展来对抗细菌感染。

1.2 OMVs 的形成

尽管 OMVs 在生物学领域具有显著的功能和应用,并且所有革兰氏阴性菌都能分泌出这种特殊结构。然而,OMVs 的形成机制是一个复杂且多样化的过程,可能受到多种因素的影响,包括物种和生长条件等^[11]。最初,OMVs 被认为只是生长产物或细胞裂解的副产品,但随后在急性脑膜炎患者的脑脊液样本中观察到 OMVs,这表明 OMVs 不仅仅在实验室条件下产生^[12]。从那时起,OMVs 的生物发生和功能引起了人们的关注。

目前已有研究指出 OMVs 主要有 2 种形成途径:第 1 种是外膜起泡,由于细胞膜紊乱,肽聚糖生物合成不平衡或疏水分子插入外膜,从而形成依赖于外膜的“起泡”,这些起泡被脂质双层包裹,形成纳米囊泡并分泌出细菌^[13]。这一形成方式受到特定蛋白质和途径的调节^[9];第 2 种是爆炸性细胞裂解,由噬菌体衍生的内容素引

发, 内容素通过降解细胞壁的肽聚糖, 使细胞聚集并爆炸, 破碎的膜碎片聚集并自组装成 OMVs, 这些囊泡通常含有丰富的细胞质成分^[13]。

OMVs 根据其组成和来源可分为 3 种类型: 外膜囊泡(OMVs), 由外膜非裂解过程释放产生; 爆炸性外膜囊泡(explosive outer membrane vesicles, EOMVs), 由外膜裂解过程释放产生; 内外膜共同释放产生的内外膜囊泡(outer inner membrane vesicles, OIMVs)^[11]。这些不同类型的 bEVs 由于大小相似, 通常会混合在一起, 因此研究时通常不区分存在的囊泡类型。

2 肺炎克雷伯菌外膜囊泡的组成

肺炎克雷伯菌作为一种常见的革兰氏阴性菌, 也能分泌 OMVs。已有研究采用组学方法深入探讨肺炎克雷伯菌 OMVs 的蛋白质和脂质组成^[14-19] (图 1)。

2.1 蛋白质组成

Lee 等^[14]通过体外培养成功提取了肺炎克雷伯菌分泌的 OMVs, 并对其进行了蛋白质组学分析, 发现与肺炎克雷伯菌 OMVs 相关的不同蛋白质有 159 种, 为深入了解肺炎克雷伯菌

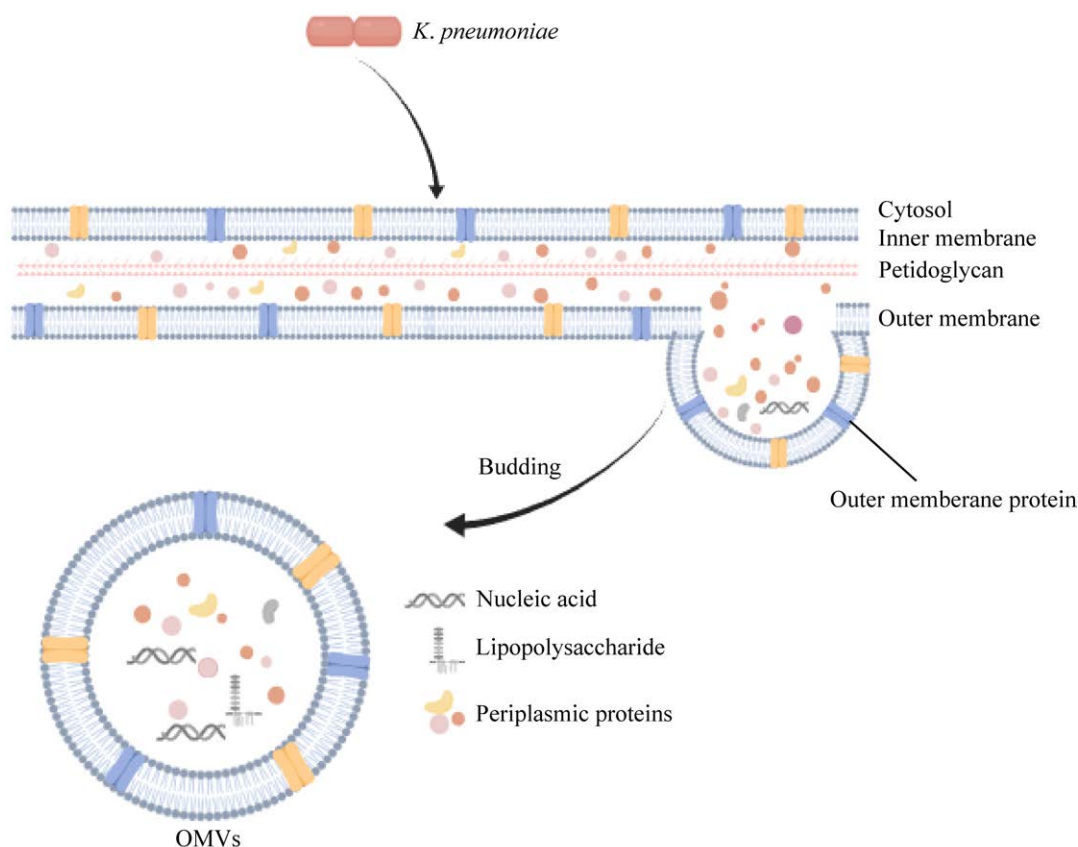


图 1 肺炎克雷伯菌外膜囊泡的形成及组成 肺炎克雷伯菌 OMVs 的形成依赖于外膜的“起泡”, 外膜被脂质双层包裹, 形成纳米囊泡并分泌出细菌, 这些囊泡常含有蛋白质、脂质、核酸等成分

Figure 1 The formation and composition of outer membrane vesicles of *Klebsiella pneumoniae*. The formation of OMVs of *K. pneumoniae* depends on the “blebbing” of the outer membrane, which is double-coated with lipids to form nanovesicles and secrete out of bacteria. These vesicles are enriched in proteins, lipids, nucleic acids and other components.

OMVs 的蛋白质组成提供了重要的依据。Fan 等^[15]利用质谱分离了肺炎克雷伯菌 OMVs 蛋白, 并进行生物信息学分析, 共检测到 3 192 种蛋白, 包括胞质蛋白、胞质膜蛋白、质周蛋白、外膜蛋白、胞外蛋白及其他类型的蛋白。此外, 他们还发现 MdtQ 是唯一的多药耐药外膜蛋白。在另一项研究中, 有研究者观察到肺炎克雷伯菌 OMVs 中存在许多核糖体蛋白, 并在 OMVs 中鉴定出外膜蛋白 OmpA 和 OmpK37^[16]。OmpA 是外膜和囊泡的主要结构成分, 参与 OMVs 的形成和分泌, 也是肺炎克雷伯菌的毒力因子^[17]。研究人员通过使用 OMVs 中 OmpA 的成分来间接表示 OMVs 的数量, 发现肺炎克雷伯菌在生长过程中持续释放 OMVs^[18]。

2.2 脂质组成

在肺炎克雷伯菌 OMVs 的脂质组成方面, Jasim 等^[19]通过提取肺炎克雷伯菌 OMVs 的脂质, 并采用液相色谱-串联质谱(liquid chromatograph-mass spectrometer, LC-MS)法分析, 结果显示, 肺炎克雷伯菌 OMVs 的脂质主要由甘油磷脂(35%)、脂肪酸(33%)和鞘脂(20%)组成, 其次是甘油酯(4%)、甾醇脂(3%)和丙烯醇脂(4%); 另外, 耐药菌株分泌的 OMVs 含有更多脂质。

除了蛋白质和脂质外, 肺炎克雷伯菌 OMVs 中还含有核酸, 这些核酸不受细胞外核酸酶的影响, 可以被邻近的细菌或宿主细胞内化, 从而调节基因表达, 促进细菌的毒力和发病机制。此外, OMVs 可能还含有一些细菌代谢物和其他分子。然而, 目前对肺炎克雷伯菌 OMVs 中核酸、多糖等其他成分并不是很清楚。肺炎克雷伯菌 OMVs 的组成受到许多因素的影响, 有研究指出肺炎克雷伯菌脂多糖中 O 抗原的缺失可能会改变其 OMVs 的蛋白质组成^[20]。这些研究结果不仅丰富了我们对于肺炎克雷伯菌 OMVs 组成的认识, 揭示了其组成特点, 同时

也为我们进一步探讨肺炎克雷伯菌 OMVs 的功能和特性提供了重要的学术依据。

3 肺炎克雷伯菌外膜囊泡的功能

外膜囊泡作为物质转运和传播的关键载体^[21], 促进了细菌与细菌、细菌与宿主间的相互作用, 涉及多种功能。在细菌间, 它们担当生物分子转移和营养物质获取的角色, 并参与生物膜的形成。在细菌与宿主之间, OMVs 参与免疫调控。

肺炎克雷伯菌分泌的 OMVs 受到多种环境因素的影响。例如, 有多项研究指出, 当肺炎克雷伯菌接触抗生素时, 其 OMVs 的产量会有所增加^[17,22-23]。这一现象提示我们, OMVs 在肺炎克雷伯菌与外界环境的交互中可能发挥着重要的作用。目前, 关于肺炎克雷伯菌外膜囊泡的功能研究揭示了其在基因水平转移、抗生素抵抗、营养物质获取及免疫调控方面的作用(图 2)。

3.1 基因水平转移

自 1999 年以来, 研究报道 OMVs 可以携带毒力和抗性基因, 并作为一种有效的基因水平转移(horizontal gene transfer, HGT)系统发挥作用^[24]。目前, 共轭、转化和转导是被最广泛描述的 HGT 机制^[25], 尽管这些机制有助于细菌内的基因转移, 但需要依赖于细胞间接触、细菌能力和宿主特异性。OMVs 介导 HGT 的新机制具有一定优势, 囊泡腔可以保护基因和质粒免受 DNA 酶的伤害, 使 OMVs 成为有效的 HGT 载体^[26]。

一方面, OMVs 能传递毒力基因, Wang 等^[18]首次报道肺炎克雷伯菌衍生的 OMVs 携带并运输与肺炎克雷伯菌高毒力有关的毒力质粒进入多药耐药菌株。高毒力肺炎克雷伯菌 OMVs 能介导毒力基因的转移, 提高肺炎克雷伯菌耐

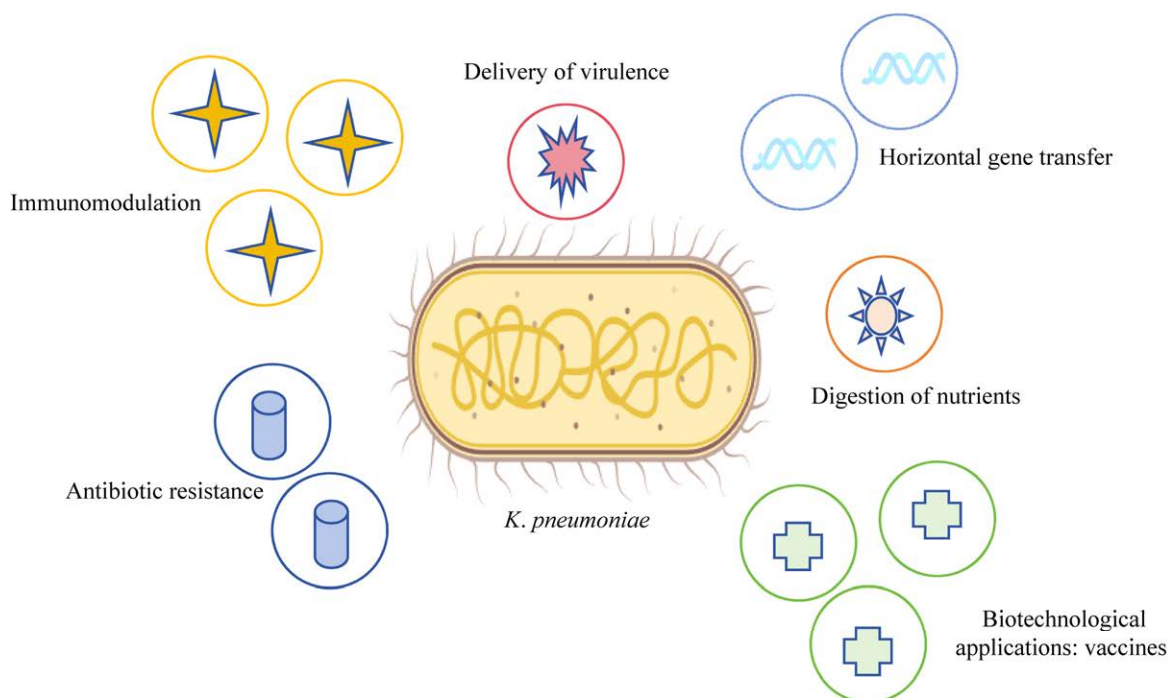


图2 肺炎克雷伯菌外膜囊泡相关生物学功能 OMVs 在肺炎克雷伯菌中的不同作用，包括水平基因转移、传递毒力因子、抗生素抵抗、免疫调控、疫苗

Figure 2 The biological functions of outer membrane vesicles of *Klebsiella pneumoniae*. Different roles of OMVs in *K. pneumoniae* include horizontal gene transfer, delivery of virulence, antibiotic resistance, immunomodulation, digestion of nutrients and vaccines.

药菌株的毒力水平，从而可能促进碳青霉烯耐药高毒力肺炎克雷伯菌株的出现和传播^[27]。另一方面，OMVs 可以传递耐药基因，通过基因工程修饰肺炎克雷伯菌 OMVs，可以将其用作微生物群落中耐药基因传播的载体^[28]。有研究发现在肺炎克雷伯菌 OMVs 中存在转移抗性基因 *bla_{KPC-2}* 和 *bla_{NDM-1}*，这些基因可在种内和种间传播，从而导致原本敏感的菌株对亚胺培南和美罗培南产生耐药性^[29-30]。在实验过程中只需在摇床上共孵育，无须电穿孔转化等预处理即可实现耐药基因的传递，说明在正常条件下，耐药基因可以通过 OMVs 在不同细菌之间转移，同时还发现产生的新耐药菌株进行传代培养后仍具有稳定的抗性；然而，在相同条件

下与大肠杆菌共孵育后并未出现耐药的大肠杆菌，说明肺炎克雷伯菌 OMVs 介导的耐药基因传播可能不是普遍的^[30]。目前还需要更合理的设计来验证 OMVs 介导的耐药传播是否具有种间特异性和不同细菌种属的可遗传性。

3.2 抗生素抵抗

OMVs 不仅可以通过传播抗生素抗性基因来帮助细菌对抗抗生素，同时也可以作为对抗抗生素的保护性盔甲。当耐药细菌受到抗生素的胁迫时，它们会促使携带耐药质粒的菌株释放更多 OMVs。随后，其他细菌甚至不同种类的细菌会对这些 OMVs 进行吸收，从而在整体群落中迅速传播抗性特征^[9]。

通过将肺炎克雷伯菌多黏菌素敏感菌株与

耐药菌株分泌的 OMVs 进行共孵育, 敏感细菌对多黏菌素产生了抗性, 并且蛋白质组学分析表明, 这可能是由于 OMVs 减少了与多黏菌素耐药性相关的蛋白质^[31]。此外, Ciofu 等^[32]首次报道了 OMVs 中存在广谱 β -内酰胺酶 (extended-spectrum beta-lactamase, ESBL), 耐药菌株可能通过分泌含有抗生素灭活酶的 OMVs 来保护敏感菌株免受抗生素的侵害^[33]。多重耐药的肺炎克雷伯菌经过亚抑制浓度的多种药物处理后, 可释放含有活性碳青霉烯酶的 OMVs, 这些 OMVs 可以扩散到邻近细菌, 无论它们是否携带抗性基因, 均可以使它们具有耐药性^[16]。Zhang 等^[22]发现负载碳青霉烯酶的 OMVs 可以通过降解亚胺培南和促进抗微生物耐药性基因 *oprD* 的突变来保护铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*, PA)。最近, 通过研究从耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌 (carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*, CRKP) 中分离的 OMVs, 发现 OMVs 中相关的肺炎克雷伯菌碳青霉烯酶 (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase, KPC) 可以水解美罗培南, 证实了 OMVs 在 CRKP 的耐药性中起关键作用^[34]。这些研究表明细菌通过不同的方式利用 OMVs 来增强自身对抗生素的抵抗力, 并有助于细菌群落的生存。同时, 这也说明 OMVs 介导的基因水平转移不一定是必需的, 至少在抗生素治疗期间的短期生存方面是如此的。

3.3 营养摄取-铁吸收

铁对几乎所有细菌都至关重要, 细菌主要利用 TonB 依赖性转运蛋白 (TonB-dependent transporters, TBDTs)^[35] 摄入铁。在高毒力肺炎克雷伯菌的铁获取过程中, OMVs 具有潜在作用。研究人员在缺铁和足铁两种培养条件下, 对细菌分泌的 OMVs 进行了差异蛋白质组学分析, 发现在缺铁条件下 OMVs 的产生增加, 同

时与铁摄取相关的蛋白质表达增加^[36]。这一研究表明 OMVs 与高毒力肺炎克雷伯菌的铁捕获能力之间存在潜在联系, 并有助于我们进一步了解肺炎克雷伯菌的铁获取机制。

3.4 免疫调控

OMVs 中含有细菌抗原和各种病原体相关分子模式 (pathogen-associated molecular pattern, PAMP) 可被宿主模式识别受体 (pattern recognition receptors, PRRs) 识别, 从而增强细胞因子和共刺激分子的表达, 促进抗原呈递, 有效激活宿主免疫系统^[37]。

在体外试验中, 肺炎克雷伯菌 OMVs 不会对宿主细胞产生毒性, 但可以引发免疫系统的先天反应^[14]。这一点得到了免疫相关基因在肺炎克雷伯菌 OMVs 处理的上皮细胞和肥大细胞中表达上调的证实, 这些基因的表达变化进一步说明了肺炎克雷伯菌 OMVs 具有致病性^[38]。Martora 等^[17]研究发现肺炎克雷伯菌 OMVs 具有刺激炎症反应的能力, 能够导致 IL-8、IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 等炎症因子的表达显著增加。随后, 他们研究了暴露于肺炎克雷伯菌 OMVs 后细胞 miRNA 的大规模表达谱并预测基因靶点, 发现 miRNA 表达谱也发生了改变^[39]。更深入的研究表明, 肺炎克雷伯菌分泌的 OMVs 能够通过 NF- κ B 信号途径激活 IL-8 的产生^[40]。这一发现揭示了肺炎克雷伯菌利用 OMVs 激活宿主细胞的炎症反应, 从而在感染过程中占据优势。此外, 通过添加亚胺培南抗生素, CRKP 会分泌更多的 OMVs, 并显著提高 GroEL (一种 60 kDa 的热休克蛋白) 的表达, 这种变化会促进巨噬细胞对 OMVs 的吞噬, 引发焦亡, 并释放促炎细胞因子, 从而加剧炎症^[23]。在体内试验中, 对免疫正常的野生型小鼠接种高毒力肺炎克雷伯菌 OMVs 也会导致促炎因子 IL-6、IL-8 和 TNF- α 水平升高^[41]。

这些研究结果不仅揭示了肺炎克雷伯菌 OMVs 在感染过程中的作用机制, 还强调了 OMVs 作为一种重要的调控途径, 通过激活先天免疫反应和炎症反应来影响感染的进展。然而, 必须谨慎解释这些实验结果, 因为感染期间产生的 OMVs 的组成可能与在培养基中产生的 OMVs 的组成存在显著差异。

4 肺炎克雷伯菌外膜囊泡作为疫苗的应用前景

相较于传统疫苗, OMVs 具备诸多优势, 使其成为理想的候选疫苗。首先, OMVs 的尺寸范围使其成为囊泡转移到淋巴结的理想选择, 这使得它们更容易被 B 细胞识别。其次, OMVs 含有多种能够刺激机体免疫反应的成分, 具有更强的诱导主动免疫的能力, 克服了单一抗原的缺陷。最后, 相较于活细胞疫苗, OMVs 疫苗的安全性更高^[42]。

在防治肺炎克雷伯菌感染方面, 利用肺炎克雷伯菌 OMVs 作为新颖的候选疫苗已经成为研究的热点。研究表明, 通过直接从体外细菌培养上清液中分离出肺炎克雷伯菌衍生的 OMVs, 并通过腹膜内途径接种于脓毒症模型小鼠, 可引发 OMVs 反应性抗体和产生 γ 干扰素的 T 细胞反应, 从而有效保护细菌诱导的死亡^[43]。然而, 另一项研究发现, 通过气管内注射肺炎克雷伯菌 OMVs 可能会引发肺部病理变化, 对其安全性产生担忧^[44]。此外, 直接提取的 OMVs 存在尺寸均匀性差和结构稳定性低的问题, 这在一定程度上限制了其应用效果。因此, 为了提高肺炎克雷伯菌 OMVs 的免疫原性及稳定性, 对其进行适当的改造是必要的。

Wu 等^[45]设计了一种创新的策略, 将肺炎克雷伯菌 OMVs 与牛血清白蛋白(bovine serum

albumin, BSA)结合, 制备出一种结构稳定、大小均一的 BSA-OMVs 纳米疫苗。这种组合不仅能促进树突状细胞的活化和募集, 还能导致 MHC-II、CD40、CD80 和 CD86 等重要免疫应答分子的过表达。在体外试验中, 经 BSA-OMVs 免疫后, 致死剂量 CRKP 感染的小鼠存活率显著提高, 显示了该疫苗的强大免疫保护效果。在我们的研究中, 利用高压驱动肺炎克雷伯菌通过间隙, 成功诱导形成稳定的人工细菌仿生囊泡(bacterial biomimetic vesicles, BBVs)。这些 BBVs 几乎不包含细菌细胞内蛋白或核酸, 产量高且无毒性作用。在动物实验中, BBVs 能诱导产生细菌特异性体液免疫和细胞免疫反应, 提高动物存活率, 显著减少肺部炎症和细菌负荷^[46]。这些研究结果揭示了肺炎克雷伯菌 OMVs 在疫苗开发中的巨大潜力。作为一种有效的疫苗候选成分, OMVs 有可能为预防和治疗肺炎克雷伯菌感染提供新的策略。然而, 为了更好地评估其作为疫苗的可行性, 还需要进一步地研究来验证其在不同感染模型中的效果, 并深入探讨其诱导免疫应答的机制。

5 总结和展望

近年来对肺炎克雷伯菌外膜囊泡的研究在不断增长, 并且评估了其在细菌传播和感染中所起的作用。这些研究表明, 它在细菌的存活和致病机制中发挥着重要作用。然而, 目前提取 OMVs 主要依赖超速离心法, 由于产量较低且易污染, 难以满足临床研究的需求。因此, 建立一种高效的 OMVs 分离和提取方法成为当务之急。同时, 对于肺炎克雷伯菌 OMVs 的功能研究主要集中在耐药方面, 研究仍需更进一步。

首先, 肺炎克雷伯菌 OMVs 在生物膜形成中的作用并不清楚。其次, 在物质转运方面,

肺炎克雷伯菌 OMVs 携带的遗传物质, 包括抗生素抗性基因和毒力基因, 能够转移到受体菌株。然而, 并非所有基因都能成功转移, 其选择性机制及在物种中的普遍性仍需进一步研究。此外, 在免疫调控方面, 目前尚无法确定肺炎克雷伯菌 OMVs 中哪些成分诱导了炎症反应。

总的来说, 未来的研究应深入探讨肺炎克雷伯菌 OMVs 在细菌间, 以及细菌与宿主间的相互作用, 这有助于更好地理解其致病机制, 从而设计更有效的预防措施防止肺炎克雷伯菌的感染。此外, 考虑到肺炎克雷伯菌 OMVs 作为疫苗开发的候选者, 还需进一步探索其在细菌感染和肿瘤等方面的潜在作用。

REFERENCES

- [1] GUERRA MES, DESTRO G, VIEIRA B, LIMA AS, FERRAZ LFC, HAKANSSON AP, DARRIEUX M, CONVERSO TR. *Klebsiella pneumoniae* biofilms and their role in disease pathogenesis[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2022, 12: 877995.
- [2] ZHANG YW, JIN LY, OUYANG PW, WANG Q, WANG RB, WANG J, GAO H, WANG XJ, WANG H, NETWORK CCR E. Evolution of hypervirulence in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in China: a multicentre, molecular epidemiological analysis[J]. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2020, 75(2): 327-336.
- [3] WEN MH, WANG JY, OU ZH, NIE GJ, CHEN Y, LI M, WU ZW, XIONG SD, ZHOU HW, YANG ZF, LONG G, SU JC, LIU H, JING YY, WEN ZK, FU YX, ZHOU TL, XIE H, GUAN WD, SUN X, et al. Bacterial extracellular vesicles: a position paper by the microbial vesicles task force of the Chinese society for extracellular vesicles[J]. *Interdisciplinary Medicine*, 2023, 1(3): e20230017.
- [4] XIE JH, HAESBROUCK F, van HOECKE L, VANDENBROUCKE RE. Bacterial extracellular vesicles: an emerging avenue to tackle diseases[J]. *Trends in Microbiology*, 2023, 31(12): 1206-1224.
- [5] CARUANA JC, WALPER SA. Bacterial membrane vesicles as mediators of microbe-microbe and microbe-host community interactions[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 432.
- [6] AVILA-CALDERÓN ED, RUIZ-PALMA MDS, AGUILERA-ARREOLA MG, VELÁZQUEZ-GUADARRAMA N, RUIZ EA, GOMEZ-LUNAR Z, WITONSKY S, CONTRERAS-RODRÍGUEZ A. Outer membrane vesicles of gram-negative bacteria: an outlook on biogenesis[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 557902.
- [7] Dell'ANNUNZIATA F, Dell'AVERSANA C, DOTI N, DONADIO G, dal PIAZ F, IZZO V, de FILIPPIS A, GALDIERO M, ALTUCCI L, BOCCIA G, GALDIERO M, FOLLIERO V, FRANCI G. Outer membrane vesicles derived from *Klebsiella pneumoniae* are a driving force for horizontal gene transfer[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(16): 8732.
- [8] JALALIFAR S, MOROVATI KHAMSI H, HOSSEINI-FARD SR, KARAMPOOR S, BAJELAN B, IRAJIAN G, MIRZAEI R. Emerging role of microbiota derived outer membrane vesicles to preventive, therapeutic and diagnostic proposes[J]. *Infectious Agents and Cancer*, 2023, 18(1): 3.
- [9] VILLAGELIU DN, SAMUELSON DR. The role of bacterial membrane vesicles in human health and disease[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 828704.
- [10] AVILA-CALDERÓN ED, ARAIZA-VILLANUEVA MG, CANCINO-DIAZ JC, LÓPEZ-VILLEGAS EO, SRIRANGANATHAN N, BOYLE SM, CONTRERAS-RODRÍGUEZ A. Roles of bacterial membrane vesicles[J]. *Archives of Microbiology*, 2015, 197(1): 1-10.
- [11] JUODEIKIS R, CARDING SR. Outer membrane vesicles: biogenesis, functions, and issues[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 2022, 86(4): e0003222.
- [12] DEVOE IW, GILCHRIST JE. Pili on meningococci from primary cultures of nasopharyngeal carriers and cerebrospinal fluid of patients with acute disease[J]. *The Journal of Experimental Medicine*, 1975, 141(2): 297-305.
- [13] TOYOFUKU M, NOMURA N, EBERL L. Types and origins of bacterial membrane vesicles[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2019, 17: 13-24.
- [14] LEE JC, LEE EJ, LEE JH, JUN SH, CHOI CW, KIM SI, KANG SS, HYUN S. *Klebsiella pneumoniae* secretes outer membrane vesicles that induce the innate immune response[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2012, 331(1): 17-24.

- [15] FAN FF, WANG JQ, CHEN H, WEI L, ZHANG Z. Isolation and protein MdtQ analysis of outer membrane vesicles released by carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*[J]. Microbial Pathogenesis, 2023, 183: 106325.
- [16] LUCENA ACR, FERRARINI MG, de OLIVEIRA WK, MARCON BH, MORELLO LG, ALVES LR, FAORO H. Modulation of *Klebsiella pneumoniae* outer membrane vesicle protein cargo under antibiotic treatment[J]. Biomedicines, 2023, 11(6): 1515.
- [17] MARTORA F, PINTO F, FOLLIERO V, CAMMAROTA M, Dell'ANNUNZIATA F, SQUILLACI G, GALDIERO M, MORANA A, SCHIRALDI C, GIOVANE A, GALDIERO M, FRANCI G. Isolation, characterization and analysis of pro-inflammatory potential of *Klebsiella pneumoniae* outer membrane vesicles[J]. Microbial Pathogenesis, 2019, 136: 103719.
- [18] WANG ZX, WEN Z, JIANG M, XIA FF, WANG M, ZHUGE XK, DAI JJ. Dissemination of virulence and resistance genes among *Klebsiella pneumoniae* via outer membrane vesicle: an important plasmid transfer mechanism to promote the emergence of carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*[J]. Transboundary and Emerging Diseases, 2022, 69(5): e2661-e2676.
- [19] JASIM R, HAN ML, ZHU Y, HU XH, HUSSEIN MH, LIN YW, ZHOU QT, DONG CYD, LI J, VELKOV T. Lipidomic analysis of the outer membrane vesicles from paired polymyxin-susceptible and-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19(8): 2356.
- [20] CAHILL BK, SEELEY KW, GUTEL D, ELLIS TN. *Klebsiella pneumoniae* O antigen loss alters the outer membrane protein composition and the selective packaging of proteins into secreted outer membrane vesicles[J]. Microbiological Research, 2015, 180: 1-10.
- [21] AYTAÇ ÇELİK P, DERKÜŞ B, ERDOĞAN K, BARUT D, BLAISE MANGA E, YILDIRIM Y, PECHA S, ÇABUK A. Bacterial membrane vesicle functions, laboratory methods, and applications[J]. Biotechnology Advances, 2022, 54: 107869.
- [22] ZHANG XT, QIAN CR, TANG MR, ZENG WL, KONG JC, FU C, XU CQ, YE JZ, ZHOU TL. Carbapenemase-loaded outer membrane vesicles protect *Pseudomonas aeruginosa* by degrading imipenem and promoting mutation of antimicrobial resistance gene[J]. Drug Resistance Updates: Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy, 2023, 68: 100952.
- [23] YE C, LI WR, YANG Y, LIU QW, LI SJ, ZHENG P, ZHENG X, ZHANG Y, HE JR, CHEN YJ, HUA LQ, YANG ZQ, LI D, REN ZL, YANG Y, QI JL, HUANG WW, MA YB. Inappropriate use of antibiotics exacerbates inflammation through OMV-induced pyroptosis in MDR *Klebsiella pneumoniae* infection[J]. Cell Reports, 2021, 36(12): 109750.
- [24] KOLLING GL, MATTHEWS KR. Export of virulence genes and Shiga toxin by membrane vesicles of *Escherichia coli* O157: H7[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(5): 1843-1848.
- [25] HALL RJ, WHELAN FJ, MCINERNEY JO, OU YQ, DOMINGO-SANANES MR. Horizontal gene transfer as a source of conflict and cooperation in prokaryotes[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 1569.
- [26] SCHWECHHEIMER C, KUEHN MJ. Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions[J]. Nature Reviews Microbiology, 2015, 13: 605-619.
- [27] HUA YN, WANG JY, HUANG M, HUANG YY, ZHANG RY, BU F, YANG B, CHEN JJ, LIN XM, HU XM, ZHENG L, WANG Q. Outer membrane vesicles-transmitted virulence genes mediate the emergence of new antimicrobial-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*[J]. Emerging Microbes & Infections, 2022, 11(1): 1281-1292.
- [28] LI P, LUO WY, XIANG TX, JIANG YH, LIU P, WEI DD, FAN LP, HUANG SS, LIAO WJ, LIU Y, ZHANG W. Horizontal gene transfer via OMVs co-carrying virulence and antimicrobial-resistant genes is a novel way for the dissemination of carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*[J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 945972.
- [29] TANG B, YANG AW, LIU PL, WANG ZQ, JIAN ZJ, CHEN X, YAN Q, LIANG XH, LIU WE. Outer membrane vesicles transmitting *bla*_{NDM-1} mediate the emergence of carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2023, 67(5): e0144422.
- [30] CHEN LJ, JING XP, MENG DL, WU TT, ZHOU H, SUN RL, MIN XC, LIU R, ZENG J. Newly detected transmission of *bla*_{KPC-2} by outer membrane vesicles in *Klebsiella pneumoniae*[J]. Current Medical Science, 2023, 43(1): 80-85.
- [31] HUSSEIN M, JASIM R, GOCOL H, BAKER M,

- THOMBARE VJ, ZIOGAS J, PUROHIT A, RAO GG, LI J, VELKOV T. Comparative proteomics of outer membrane vesicles from polymyxin-susceptible and extremely drug-resistant *Klebsiella pneumoniae*[J]. mSphere, 2023, 8(1): e0053722.
- [32] CIOFU O, BEVERIDGE TJ, KADURUGAMUWA J, WALTHER-RASMUSSEN J, HØIBY N. Chromosomal beta-lactamase is packaged into membrane vesicles and secreted from *Pseudomonas aeruginosa*[J]. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2000, 45(1): 9-13.
- [33] MARTÍNEZ MMB, BONOMO RA, VILA AJ, MAFFÍA PC, GONZÁLEZ LJ. On the offensive: the role of outer membrane vesicles in the successful dissemination of new Delhi metallo- β -lactamase (NDM-1)[J]. mBio, 2021, 12(5): e0183621.
- [34] YAO LF, WEI BW, WANG YX, XU BH, YANG M, CHEN X, CHEN FX. A critical role of outer membrane vesicles in antibiotic resistance in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*[J]. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, 2023, 22(1): 95.
- [35] NOINAJ N, GUILLIER M, BARNARD TJ, BUCHANAN SK. TonB-dependent transporters: regulation, structure, and function[J]. Annual Review of Microbiology, 2010, 64: 43-60.
- [36] LAN Y, ZHOU M, LI X, LIU X, LI J, LIU WE. Preliminary investigation of iron acquisition in hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* mediated by outer membrane vesicles[J]. Infection and Drug Resistance, 2022, 15: 311-320.
- [37] 毛露珈, 史恩宇, 王瀚平, 单天贺, 王银松, 王悦. 细菌外膜囊泡在抗肿瘤治疗方面的研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2022, 42(5): 100-105.
- MAO LJ, SHI EY, WANG HP, SHAN TH, WANG YS, WANG Y. Research progress of bacterial outer membrane vesicles in anti-tumor therapy[J]. China Biotechnology, 2022, 42(5): 100-105 (in Chinese).
- [38] YOU HS, OK YJ, LEE SH, KANG SS, HYUN SH. Changes in gene expression in human epithelial and mast cells in response to vesicles from *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883[J]. Indian Journal of Microbiology, 2019, 59(2): 241-245.
- [39] Dell'ANNUNZIATA F, ILISSO CP, Dell'AVERSANA C, GRECO G, COPPOLA A, MARTORA F, dal PIAZ F, DONADIO G, FALANGA A, GALDIERO M, ALTUCCI L, GALDIERO M, PORCELLI M, FOLLIERO V, FRANCI G. Outer membrane vesicles derived from *Klebsiella pneumoniae* influence the miRNA expression profile in human bronchial epithelial BEAS-2B cells[J]. Microorganisms, 2020, 8(12): 1985.
- [40] LI P, PENG TX, XIANG TX, LUO WY, LIAO WJ, WEI DD, LUO S, HE ZY, LIU P, ZHANG W, LIU Y. *Klebsiella pneumoniae* outer membrane vesicles induce strong IL-8 expression via NF- κ B activation in normal pulmonary bronchial cells[J]. International Immunopharmacology, 2023, 121: 110352.
- [41] ZHANG J, ZHAO JX, LI JX, XIA Y, CAO J. Outer membrane vesicles derived from hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* stimulate the inflammatory response[J]. Microbial Pathogenesis, 2021, 154: 104841.
- [42] 邱晓涵, 李泳江, 吴军勇, 蔡佳歆, 刘季华, 徐文杰, 向大雄. 细菌外膜囊泡: 疾病治疗的新途径[J]. 药学报, 2021, 56(12): 3441-3450.
- QIU XH, LI YJ, WU JY, CAI JX, LIU JH, XU WJ, XIANG DX. Bacterial outer membrane vesicles: a new approach to diseases therapy[J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2021, 56(12): 3441-3450 (in Chinese).
- [43] LEE WH, CHOI HI, HONG SW, KIM KS, GHO YS, JEON SG. Vaccination with *Klebsiella pneumoniae*-derived extracellular vesicles protects against bacteria-induced lethality via both humoral and cellular immunity[J]. Experimental & Molecular Medicine, 2015, 47(9): e183.
- [44] ASSONI L, GIRARDELLO R, CONVERSO TR, DARRIEUX M. Current stage in the development of *Klebsiella pneumoniae* vaccines[J]. Infectious Diseases and Therapy, 2021, 10(4): 2157-2175.
- [45] WU GX, JI HY, GUO XY, LI YY, REN TB, DONG HQ, LIU JX, LIU YQ, SHI XY, HE B. Nanoparticle reinforced bacterial outer-membrane vesicles effectively prevent fatal infection of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*[J]. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine, 2020, 24: 102148.
- [46] LI WR, HU Y, ZHANG QS, HUA LQ, YANG ZQ, REN ZL, ZHENG X, HUANG WW, MA YB. Development of drug-resistant *Klebsiella pneumoniae* vaccine via novel vesicle production technology[J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2021, 13(28): 32703-32715.