

- 志, 2011, 8(2): 147-149.
- [23] 俞小飞, 徐燕, 张梦. 妊娠高血压患者与 D-二聚体、维生素 B12、血清同型半胱氨酸的关系[J]. 医学检验与临床, 2015, 26(4): 61-62, 24.
- [24] 郭跃丽, 奚经巧, 孔万仲, 等. 妊娠期 Hcy 和凝血相关指标与胎儿生长发育的临床研究[J]. 中国妇幼保健研究, 2016, 27(2): 210-213.
- 综 述 •

- [25] 黄华, 梁红梅, 罗奇智, 等. 孕妇血清同型半胱氨酸、叶酸、维生素 B12 水平与妊娠高血压综合征关系探讨[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(21): 2869-2871.

(收稿日期: 2017-10-24 修回日期: 2018-01-05)

外泌体在肺结核中的研究进展*

李志强¹综述, 张俊爱^{2△}审核

(1. 广东医科大学医学检验学院, 东莞 523808; 2. 广东医科大学广东省分子诊断重点实验室, 东莞 523808)

摘 要:目的 外泌体可由几乎所有类型细胞产生并释放, 其被发现存在于多种体液中, 包括血液、尿液、唾液、胸腔积液和支气管肺泡灌洗液(BALF)等。外泌体含有的组分在不同生理病理条件下不同, 外泌体在调节细胞功能及疾病发生中扮演重要角色。外泌体在细菌组分传播中起重要作用。本文阐述了外泌体的研究背景、外泌体的形成和分泌、外泌体与结核分枝杆菌(MTB)的相互作用。旨在为结核疫苗和诊断靶标的研究提供新的思路。

关键词:外泌体; 结核分枝杆菌; 巨噬细胞; 疫苗; 诊断

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.09.025

中图法分类号:R529.3

文章编号:1673-4130(2018)09-1107-06

文献标识码:A

外泌体是释放到细胞外的直径为 40~100 nm 膜性胞外囊泡(EVs), 可运载多种蛋白质、脂质及核酸, 是一种重要的细胞间信息传递载体^[1]。结核分枝杆菌(MTB)是肺结核的主要病原菌, 作为一种兼性胞内寄生菌, 通过感染巨噬细胞为自身创造适宜繁殖环境。MTB 在感染后期能诱导宿主细胞死亡以促进胞内 MBT 外排, 也可通过坏死的感染细胞碎片或凋亡小体的释放将致病成分散布到胞外环境。这些外泌体不仅携带各种病原体相关分子模式(PAMPs), 还包含 T、B 细胞抗原蛋白, 核酸和病原体相关毒素。根据产生机制不同^[2], 胞外囊泡分为 3 类: 外泌体、微囊泡和凋亡小体。根据国际外泌体协会建议, 文献中所认为的外泌体往往是各种囊泡的混合物, 以往多数研究中囊泡纯度并无严格明确, 囊泡群中可能包含外泌体, 微囊泡甚至细菌胞外囊泡, 因此, 本文采用“外泌体”一词包括其他类型来源胞外囊泡。本文阐述了 MTB 感染细胞来源外泌体的免疫调节作用, 及其作为结核疫苗和诊断靶标的新思路。

1 外泌体的研究背景

“外泌体”一词最初由 JOHNSTONE 等^[3]在研究网织红细胞成熟过程中囊泡形成时提出。RAPOSO 等^[4]发现 EB 病毒转化人 B 淋巴细胞源囊泡表面表达主要相容性复合体, 具有激活免疫系统作用, 与红细

胞外泌体形成和释放途径相似, 这极大激起研究者对外泌体免疫调节作用的研究热情。定义外泌体在免疫应答中的作用的相关研究大多数在自身免疫和癌症生物学背景下进行, 而阐述外泌体对感染性疾病如肺结核感染的免疫作用的研究少之又少。在对鸟分枝杆菌的研究中, BEATTY 等^[5]观察到鸟分枝杆菌感染过程中相关 PAMPs 如脂阿拉伯甘露糖(LAM)和磷脂酰肌醇甘露糖苷(PIM)从吞噬小体被转运至多囊体并释放到胞外, 可在相邻未感染细胞检测到这些 PAMPs。观察到鸟分枝杆菌、卡介苗或 MTB 感染巨噬细胞释放的囊泡含有 LAM、糖肽脂和相对分子质量为 19×10^3 的脂蛋白等 MTB 组分, 流式细胞术检测发现囊泡释放量与多种内体标志物(包括 LAMP1、LAMP2、MHC I、II 和 4 次跨膜蛋白 CD81)的数量呈正相关^[6-7]。这些具有晚期内体标志物的囊泡通过钙依赖性胞吐释放到胞外, 暗示这些囊泡属于外泌体^[8]。PRADOS-ROSALES 等^[9]发现 MTB 可释放带有菌体成分的胞外囊泡, 可引起 Toll 样受体(TLR)依赖性免疫应答。研究发现, 感染细胞分泌的胞外囊泡中含有脂聚糖与脂蛋白标记的 MTB 胞外囊泡和 CD9、CD63 标记的宿主源性外泌体, 但有部分细菌组分掺入宿主外泌体, 提示外泌体可作为 MTB 胞外囊泡运输的次要途径^[10]。MTB 感染细胞释放的胞

* 基金项目: 广东省医学科学基金项目(A20166063、A20184347); 广东医学院面上培育项目(M2015021); 广东医学院大学生创新实验项目(2016ZZDC003、2016ZYDG002); 国家大学生创新创业训练项目(201610571019)。

△ 通信作者, E-mail: zhangjunai@gdmu.edu.cn。

本文引用格式: 李志强, 张俊爱. 外泌体在肺结核中的研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(9): 1107-1112.

外囊泡来源不同,导致其活性和成分也有差异,不同种类胞外囊泡对受体细胞可有协同或相反作用,这增加了对外泌体功能定义的复杂性和挑战性。

2 外泌体的形成和分泌

不同于细胞出芽脱落的微泡,外泌体是由内体途径生成。晚期内体向内出芽形成管腔状囊泡,经积累转变为多囊体,这些多囊体与溶酶体融合后发生降解,或与质膜融合,将管腔状囊泡释放至胞外空间,即外泌体^[11]。作为一种胞内寄生菌,已被证明通过影响宿主细胞生理活动调节免疫应答,MTB 控制宿主外泌体合成可作为胞内生存机制的一部分。研究发现,MTB 可干扰胞内分选转运复合体合成而影响外泌体产生^[12]。内吞或吞噬作用后 MTB 的一部分作为游离蛋白投放至外泌体^[13],提示某种信号机制对游离蛋白有引导分类作用。有研究者发现,在溶酶体和内体中 MTB 抗原蛋白运输到多囊体形成外泌体,分泌至胞外的机制,这一过程需要依赖 E3 连接酶介导的泛素化^[14]。研究发现 MTB 感染 Rab27a 缺陷小鼠骨髓来源巨噬细胞的外泌体分泌量较野生型小鼠显著减少,且利用表达重组蛋白 Ag85A-DsRed 的牛分枝杆菌卡介苗分别感染两种小鼠,在 Rab27a 缺陷组分离的外泌体中,Ag85A-DsRed 丰度较野生型低 5 倍^[15],以往 Rab27a 已被鉴定为多囊体与质膜融合的关键调节因子,在外泌体生成分泌中发挥重要作用。感染细胞释放的外泌体还可携带 MTB 相关 RNA^[16],但其纳入外泌体的机制目前尚不清楚,有研究发现分枝杆菌可能通过 ESX-1 分泌系统介导的吞噬体膜穿孔,使分枝杆菌 DNA 进入细胞质并与胞内受体结合^[17]。也有研究显示李斯特菌可通过 SecA2 介导细菌核酸的分泌,使感染细胞通过胞浆免疫感受器对胞内细菌进行监测^[18]。此外,有研究者对多囊体检测发现 miRNA 主要伴随诱导沉默复合体 2 种主要成分 GW182 和 AGO2 同时检出^[19],进一步发现对外泌体对 AGO2 分选可控制外泌体中 miRNA 表达水平^[20],研究还发现 miRNA 的沉默诱导和沉默复合物蛋白进入多囊体的能力依赖 ESCRT 复合体^[21]。研究显示, RNA 结合蛋白 Y-box protein 1(YBX1)可结合 miR-223,YBX1 在 HEK293T 细胞把 miRNAs 纳入外泌体过程中起重要作用^[22]。

3 外泌体与 MTB 的相互作用

3.1 外泌体在肺结核病中的免疫调节作用

BHATNAGAR^[6]和 WANG^[23]等发现感染巨噬细胞释放的外泌体携带糖脂等菌体成分,通过 TLK 介导激活未感染巨噬细胞。MTB 或卡介苗感染巨噬细胞释放的外泌体可通过引起肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 激活,调节正常 T 细胞表达和分泌因子(RANTES)和诱导型一氧化氮合酶(iNOS)等因子分泌,进一步激活巨噬细胞抗结核免疫应答^[7]。

GIRI 等^[24]发现结核菌感染巨噬细胞释放的外泌

体及其 MTB 培养滤液蛋白都可激活抗原特异性 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞表达 γ 干扰素(IFN- γ)和 IL-2,促进骨髓来源树突状细胞(BMDCs)活化和成熟,而且外泌体处理共培养的 DC 细胞和 T 细胞后,IFN- γ 和 CD69 表达水平显著升高,引起更强烈的 T 细胞活化。ANAND 等^[25]发现这些外泌体表面表达更多热休克蛋白 70(HSP70),可激活核因子 κ B (NF- κ B) 途径诱导巨噬细胞释放肿瘤坏死因子而引起促炎反应。GIRI 等^[13]通过蛋白质组学分析鉴定出一系列众所周知的抗原蛋白如 ESAT-6 (Rv3875)、Ag85 复合物 (Rv3804c、Rv1886c、Rv0129c)、MPT64 (1980c) 和 MPT63(1926c),且发现 MTB 培养滤液蛋白处理细胞后释放的外泌体,可促进巨噬细胞和 DC 细胞活化,体内试验也观察到幼稚 T 细胞的活化。研究发现,MTB 感染 Rab27a 缺陷小鼠巨噬细胞的外泌体分泌量较野生型小鼠显著减少,与细菌负荷增加和活化 T 细胞减少相关^[15]。与 Rab27a 缺陷小鼠分离的外泌体相比,野生型组外泌体诱导表达更高水平的 CCL1、IFN- γ 、RANTES、MIP-2、IL1aR 和 TNF- α ,进一步利用表达 K85R HspX 的 H37Rv 与表达野生型 HspX 的 H37Rv 分别感染处理,已知由 H37Rv 表达的 K85R HspX 并不靶向外泌体,结果前者检测出活化 T 细胞数目显著减少,证明外泌体在体内感染期间介导免疫系统激活,在 MTB 感染期间外泌体可增强 T 细胞活化。引起免疫应答的胞外囊泡类型不仅限于外泌体,RAMACHANDRA 等^[26]发现 MTB 感染巨噬细胞后协同 ATP,使含有组织相容性复合体的微泡和外泌体释放量增加,2 种胞外囊泡都可刺激抗原特异性 T 细胞免疫应答。提示 MTB 感染过程中这种抗原交叉提呈可能是引起获得性免疫反应的重要机制,但与其他抗原提呈途径相比,外泌体所介导的抗原提呈的重要性还需进一步研究,并可根据感染宿主细胞内抗原分布和变化来评估感染的途径和阶段。

另外感染巨噬细胞释放的外泌体所制作的疫苗,鼻内注射可引起 TNF- α 和 IL-12 表达,并观察到中性粒细胞和巨噬细胞募集到肺的现象,且发现感染小鼠分离的 BALF 中含有 MTB 成分的外泌体具有促炎作用^[7],这些外泌体是由肉芽肿中感染巨噬细胞释放的^[27],类似的是,研究者观察到结节病样肉芽肿患者的 BALF 存在更多外泌体有更强促炎作用^[28]。SINGH 等^[29]发现 MTB 或卡介苗感染巨噬细胞释放的外泌体可引起各种趋化因子分泌,诱导巨噬细胞和 T 细胞迁移,促进免疫细胞募集和肉芽肿形成,表明外泌体在 MTB 感染有促进固有免疫应答的作用。值得一提的是,SRINIVASAN 等^[30]发现外泌体淋巴运输可快速将感染信息传递到各个淋巴结,他们观察到外泌体在数分钟内到达淋巴结并被 CD11b⁺ 巨噬细胞吸收,对比上皮抗原呈递细胞,从外周迁移到淋巴结途径需花费数小时,这是一种更高效率的抗原运输和

感染信息传输途径,实时感染应答中外泌体可快速激活先天免疫系统,对后来适应性免疫反应有指导性意义。

MTB 感染细胞来源外泌体可促进免疫细胞的募集和活化,在促进先天性和获得性免疫应答中起重要作用。与直接感染引起的免疫应答相比较,包含 MTB 抗原和 PAMPs 的外泌体具有信号放大效应,可引起更有效率的先天性免疫应答,表明外泌体在对细胞内病原体的免疫监视有着重要作用。

此外 DIAZ 等^[31]比较了感染细胞和对照组来源外泌体中单个蛋白丰度,41 种蛋白在前者外泌体有更丰富表达,western blot 检测有:热休克蛋白 90 (HSP90),波形蛋白、Coronin 1C 和膜组织伸展刺突蛋白(Moesin),研究证明其中的蛋白质在感染期间发挥重要作用。研究者还发现感染巨噬细胞来源外泌体有更丰富的 L-氨基酸氧化酶(LAAO),这种蛋白质作为抗菌酶在先天免疫应答中起重要作用^[32],表明 MTB 感染细胞可利用外泌体输出内源性抗菌分子作为宿主抗结核防御机制。对此进行深入研究有助于提出关于肺结核中复杂的宿主病原体相互作用的新见解。

3.2 外泌体的免疫抑制作用 感染巨噬细胞释放的胞外囊泡可有不同来源(包括宿主外泌体和 MTB 胞外囊泡)^[9-10]。研究表明,MTB 释放携带菌体分子的胞外囊泡具有免疫抑制作用。SINGH 等^[33]观察到感染细胞释放的胞外囊泡通过抑制 TLR/MyD88 依赖性的 IFN- γ 对幼稚巨噬细胞激活途径,引起保护性免疫应答。除了对巨噬细胞作用,研究者发现感染巨噬细胞释放含有 MTB 细胞壁成分的胞外囊泡,可通过磷酸化的干扰作用抑制 CD4⁺T 细胞受体复合体信号途径进而抑制 T 细胞活化^[34-35]。此外,研究发现感染巨噬细胞产生具有较高浓度波形蛋白的外泌体^[31],波形蛋白是自然杀伤细胞 NKp46 受体的配体,与 NKp46 之间相互作用介导 NK25 对 MTB 感染细胞的裂解^[36-37],富含波形蛋白的外泌体可干扰 NKp46 与巨噬细胞来源波形蛋白的相互作用,从而延迟对 MTB 感染细胞杀伤,提示胞内 MTB 可通过调节外泌体中波形蛋白的负载而逃逸巨噬细胞杀伤,为 MTB 胞内寄生繁殖提供有利条件,其远程靶向运输能力扩大了感染细胞作用范围和增加了 MTB 逃逸机制的复杂性。

3.3 外泌体中 RNA 在靶细胞发挥免疫调节功能 早前研究者分别以毒性 H37Rv 菌株和无毒力卡介苗感染人巨噬细胞,发现两者 miRNA 表达谱存在差异性^[38]。VALADI 等^[39]首次鉴定外泌体有遗传物质 mRNA 及 miRNA 的存在。研究发现 MTB 感染巨噬细胞来源外泌体含有 miRNA 量较未感染细胞相比显著减少,还发现有超过 100 种 mRNA 选择性包装在外泌体,转运至受体细胞转化参与调节性免疫应

答^[16]。MORTAZ 等^[40]在体外用卡介苗感染人外周血源单核巨噬细胞,对其释放外泌体 miRNA 测序,分析发现主要由 Let-7 家族组成,包括 miR-155、miR-146a、miR-145 和 miR-21,这些 miRNA 被认为可能靶向重要免疫相关基因和途径。最新 miRNA 网络分析显示与分枝杆菌侵袭,细胞内存活,能量产生机制和免疫激活途径相关,miRNA 调控的多数靶基因参与细胞感染过程和能量代谢途径^[41]。LV 等^[42]在潜伏性结核感染(LTBI)和活动性结核病(ATB)样本组鉴定不同上调和下调的差异表达基因,生物通路分析(IPA)分析显示 ATB 组有 25 个信号通路被极大抑制。而 LTBI 组相对较少途径被抑制,对比 ATB 组,其中 12 个项目抑制效果较弱。随着 LTBI 病情发展至 ATB,对外泌体信号通路抑制作用随之增大,在不同 MTB 感染阶段有不同程度细胞活性抑制。“疾病和生物功能”IPA 分析中,发现血清外显子 mRNA 数据中许多免疫反应相关项目有明显变化。ATB 组四类项目被抑制:吞噬、细胞运动、免疫细胞表型和免疫应答;LTBI 组“毒性 T 细胞的细胞毒性”和“B 细胞源细胞系细胞活力”功能明显下降,但在 ATB 组保持不变,这表明在不同 MTB 感染阶段,RNA 选择性地包装外泌体。在结核感染背景下,外泌体 RNA 的发现和鉴定增加了外泌体功能的复杂性,对外泌体相关 RNA 所介导的细胞间功能调控作用进行更深入的研究是未来的方向。

4 外泌体可作为潜在的结核疫苗

世界卫生组织在《2015 年全球结核病报告》指出,世界范围内新发结核病估计有 1040 万例,估计有 140 万结核病患者死亡。卡介苗仍是唯一授权的结核病疫苗,但研究显示成人接种卡介苗产生的保护作用是微乎其微的^[43],迫切开发新型有效的抗结核疫苗。研究显示 MTB 感染巨噬细胞来源外泌体制成的疫苗可使机体产生促炎反应^[7,24]。近来 CHENG 等^[44]利用 MTB 培养滤液蛋白处理巨噬细胞来源外泌体制成的疫苗,使小鼠体内产生免疫应答免受低剂量 MTB 雾化攻击,且发现还可强化已接种卡介苗初始免疫反应,强化作用等于甚至优于卡介苗,提示外泌体有作为肺结核新型疫苗的潜力。

外泌体中含有多种已知 MTB 抗原蛋白,其中 Ag85 复合物和 ESAT-6 已被证明具有免疫原性并可制成有效的亚单位疫苗^[45]。KOYAMA 等^[46]将编码 MTB 抗原 ESAT-6 转入黑色素瘤 B16 细胞系,其分泌的外泌体可引起明显抗 ESAT-6 和 B16 肿瘤细胞免疫反应进而改善肿瘤的低免疫原性。CHENG 等^[47]利用泛素标记使可溶性蛋白质进入外泌体的方法制作结核疫苗,通过逆转录病毒载体使 2 株转基因 HEK293 细胞系表达 2 种不同 Ag85B-ESAT6 融合蛋白,且这些重组蛋白可引起有效 T 细胞免疫应答。外泌体中可引起特异性免疫应答的抗原仅限于其天

然携带的蛋白质,利用泛素标记使特定可溶性蛋白质富集于外泌体中的方法,可大大提高外泌体中抗原种类的多样性和广泛性,提示可作为制作新型疫苗一种独特的方法。

外泌体作为身体中的天然抗原载体,比传统疫苗载体具有更多的优点:(1)可提供一个相对稳定的环境;(2)外泌体在体液循环使其拥有到达远端器官的能力;(3)拥有膜结构的外泌体和靶细胞结合效率更高^[48],且作为一种无细胞疫苗,可接种不宜接种卡介苗的 HIV 患者。迄今在 I/II 期临床试验中有 3 种基于含有肿瘤抗原的外泌体而制成的候选疫苗^[49],初步显示外泌体疫苗具有良好的安全性和有效性。利用泛素作为可溶性抗原蛋白的分选信号序列的外泌体靶向技术,可在体外对特定可溶性抗原进行大规模生产^[47]。外泌体有作为新型结核疫苗的潜力并展现出良好的应用前景。但外源性抗原外泌体疫苗的临床试验仍处于起始阶段,需确定外泌体中引起机体特异性免疫应答的抗原种类,开发可表达和可通过外泌体释放这些特异性抗原的细胞株。

5 外泌体是潜在的结核病生物标志物

外泌体组分可反映来源细胞生理状态,研究发现 MTB 感染期血清外泌体浓度与感染小鼠细菌负荷呈强相关^[29],有 MTB 成分富集的外泌体提示可作为活动性疾病的生物标记物。GARCIA 等^[50]利用 MRM-MS 对 ATB 患者血清外泌体鉴定分析,与 LTBI 组相比,ATB 组外泌体携带多种强反应原性 MTB 抗原。MEHAFFY 等^[51]利用改良的 MRM 方法检测人血清外泌体中低丰度 MTB 肽,在 92.5% TB 阳性患者中至少检测出一种分枝杆菌肽。与健康组相比,在 ATB 患者中 Cfp2、Mpt32、Mpt64 和 BfrB 4 种分枝杆菌肽的个体标准化总峰面积更高,且发现一些检测到的分枝杆菌肽与特定地理位置明显相关,这提示可检测特定区域内潜在的特异 MTB 菌株标志物。此外,患者外泌体中 MPT64 可作为鉴别肺结核与肺外结核的诊断标志物^[52],且患艾滋病的结核患者与一般结核患者相比,外泌体 MTB 肽数量无显著差异,提示其检测不受宿主免疫活性干扰^[50-51]。值得一提的是,有研究^[53]利用 SWATH 定量质谱技术鉴别非小细胞肺癌和结核性胸膜炎患者尿液来源外泌体,发现其中的差异表达蛋白有作为鉴别两者生物标志物的潜力。研究发现呼出气体中外泌体 miRNA 可作为肺部疾病潜在生物标志物^[54]。研究发现与健康者相比,感染者巨噬细胞外泌体 miRNA 存在特异性表达^[40]。此外, LIN 等^[55]分别对肺炎,肺癌和肺结核患者胸腔积液中胞外囊泡 miRNA 测序,发现结核患者 3 种 miRNA(miR-3615、miR-4516 和 miR-378i)浓度显著高于肺炎患者,与肺癌患者相比,结核患者 miR-378i 表达显著上调,提示胞外囊泡中 miR-378i 可作为鉴别诊断肺结核的生物标志物研究。最新发现 11 种 miRNA 在感染

人巨噬细胞来源外泌体存在特异性表达^[41],研究者在 LTBI 和 ATB 组中鉴定大量不同上调和下调的差异表达基因(DEGs),发现 598 和 833 个基因分别仅在 LTBI 和 ATB 中上调表达;338 和 1272 个基因分别独立下调并在 LTBI 和 ATB 中表达;而在 LTBI 中 5 个基因上调表达,但在 ATB 中表达下调,且发现部分 RNA 仅在 LTBI 外泌体中富集^[42],这些结果表明每种模式最前面 20 个基因可能为 LTBI 和 ATB 的个体诊断提供潜在分子靶点,另外有 14 种 miRNA 表达显著改变,改变程度取决感染菌株,且这些外泌体 miRNA 和血清 miRNA 的表达无重叠^[56],这提示外泌体 miRNA 有检测菌株特异性感染的潜力。外泌体在体液的广泛存在性和不同生理病理状态下包含的蛋白及 RNA 存在选择性表达,使外泌体成为一种非常有潜力的无创性诊断手段。

6 展 望

外泌体的发现为胞内寄生菌 MTB 与免疫细胞的相互作用方式提供了新思路,不仅开阔了免疫调节方式的新视野,也为新型结核疫苗和结核病诊断方法的开发提供了新方向,但仍存在许多问题亟待解决,如外泌体中引起机体特异性免疫的抗原蛋白尚未被全面了解,外泌体中各种相关的脂质,蛋白和核酸与受体细胞的作用机制尚不清楚,外泌体相关疫苗和诊断的临床应用仍处于起步阶段。外泌体同时具有促进或抑制免疫调节的作用,可加强宿主免疫防御或有助于 MTB 的免疫逃逸,这需要更深层次理解外泌体与 MTB 的关系。

参考文献

- [1] YÁÑEZ-MÓ M, SILJANDER R M, ANDREU Z, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions[J]. J Extracell Vesicles, 2015, 4: 27066.
- [2] SURYADEVARA V, GOVINDUGARI V. Exosomes and Microparticles: The nanosized vesicles released from the cells that act as biomarkers for disease and treatment-riveting on lung diseases[J]. Mater TodayProc, 2015, 2(9): 4626-4631.
- [3] JOHNSTONE R M, ADAM M, HAMMONDS J R, et al. Vesicle formation during reticulocyte maturation: Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes)[J]. J Biol Chem, 1987, 262(19): 9412-9420.
- [4] RAPOSO G, NIJMAN H W, STOORVOGEL W, et al. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles[J]. J Exp Med, 1996, 183(3): 1161-1172.
- [5] BEATTY W L, RUSSELL D G. Identification of mycobacterial surface proteins released into subcellular compartments of infected macrophages[J]. Infect Immun, 2000, 68(12): 6997-7002.
- [6] BHATNAGAR S, SCHOREY J S. Exosomes released from infected macrophages contain Mycobacterium avium

- glycopeptidolipids and are proinflammatory[J]. J Biol Chem, 2007, 282(35):25779-25789.
- [7] BHATNAGAR S, SHINAGAWA K, CASTELLINO F J, et al. Exosomes released from macrophages infected with intracellular pathogens stimulate a proinflammatory response in vitro and in vivo[J]. Blood, 2007, 110(9):3234-3244.
- [8] BEATTY W L, ULLRICH H J, RUSSELL D G. Mycobacterial surface moieties are released from infected macrophages by a constitutive exocytic event[J]. Eur J Cell Biol, 2001, 80(1):31-40.
- [9] PRADOS-ROSALES R, BAENA A, MARTINEZ L R, et al. Mycobacteria release active membrane vesicles that modulate immune responses in a TLR2-dependent manner in mice[J]. J Clin Invest, 2011, 121(4):1471-1483.
- [10] ATHMAN J J, WANG Y, MCDONALD D J, et al. Bacterial membrane vesicles mediate the release of Mycobacterium tuberculosis lipoglycans and lipoproteins from infected macrophages[J]. J Immunol, 2015, 195(3):1044-1053.
- [11] SIMONS M, RAPOSO G. Exosomes-Vesicular carriers for intercellular communication[J]. Curr Opin Cell Biol, 2009, 21(4):575-581.
- [12] MEHRA A, ZAHRA A, THOMPSON V, et al. Mycobacterium tuberculosis type VII secreted effector EsxH targets host ESCRT to impair trafficking[J]. PLoS Pathog, 2013, 9(10):e1003734.
- [13] GIRI P K, KRUH N A, DOBOS K M, et al. Proteomic analysis identifies highly antigenic proteins in exosomes from M. tuberculosis-infected and culture filtrate protein-treated macrophages[J]. Proteomics, 2010, 10(17):3190-3202.
- [14] SMITH V L, JACKSON L, SCHOREY J S. Ubiquitination as a mechanism to transport soluble mycobacterial and eukaryotic proteins to exosomes[J]. J Immunol, 195(6):2722-2730.
- [15] SMITH V L, CHENG YONG, BRYANT B R, et al. Exosomes function in antigen presentation during an in vivo Mycobacterium tuberculosis infection[J]. Sci Rep, 2017, 7:43578.
- [16] SINGH P P, LI LI, SCHOREY J S. Exosomal RNA from Mycobacterium tuberculosis-Infected Cells Is Functional in Recipient Macrophages[J]. Traffic, 2015, 16(6):555-571.
- [17] MANZANILLO P S, SHILOH M U, PORTNOY D A, et al. Mycobacterium tuberculosis activates the DNA-dependent cytosolic surveillance pathway within macrophages[J]. Cell Host Microbe, 2012, 11(5):469-480.
- [18] ABDULLAH Z, SCHLEE M, ROTH S, et al. RIG-I detects infection with live Listeria by sensing secreted bacterial nucleic acids[J]. EMBO J, 2012, 31(21):4153-4164.
- [19] GIBBINGS D J, CIAUDO C, ERHARDT M, et al. Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity[J]. Nat Cell Biol, 2009, 11(9):1143-1149.
- [20] MCKENZIE A J, HOSHINO D, HONG N H, et al. KRAS-MEK signaling controls ago2 sorting into exosomes[J]. Cell Rep, 2016, 15(5):978-987.
- [21] KAWAMATA T, TOMARI Y. Making RISC[J]. Trends Biochem Sci, 2010, 35(7):368-376.
- [22] SHURTLEFF M J, TEMOCHE-DIAZ M M, KARFILIS K V, et al. Y-box protein 1 is required to sort microRNAs into exosomes in cells and in a cell-free reaction[J]. Elife, 2016, 5(2):e19276.
- [23] WANG J, CHEN C, XIE P, et al. Proteomic analysis and immune properties of exosomes released by macrophages infected with Mycobacterium avium[J]. Microbes Infect, 2014, 16(4):283-291.
- [24] GIRI P K, SCHOREY J S. Exosomes derived from M. Bovis BCG infected macrophages activate antigen-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells in vitro and in vivo[J]. PLoS One, 2008, 3(6):e2461.
- [25] ANAND P K, ANAND E, BLECK C K, et al. Exosomal Hsp70 induces a pro-inflammatory response to foreign particles including mycobacteria[J]. PLoS One, 2010, 5(4):e10136.
- [26] RAMACHANDRA L, QU YAN, WANG YING, et al. Mycobacterium tuberculosis synergizes with ATP to induce release of microvesicles and exosomes containing major histocompatibility complex class II molecules capable of antigen presentation[J]. Infect Immun, 2010, 78(12):5116-5125.
- [27] KRUH-GARCIA N, SCHOREY J, DOBOS K. Exosomes: New tuberculosis biomarkers-prospects from the bench to the clinic[J]. IntechOpen, 2012:395-410.
- [28] MARTINEZ-BRAVO M J, WAHLUND C J, QAZI K R, et al. Pulmonary sarcoidosis is associated with exosomal vitamin D-binding protein and inflammatory molecules[J]. J Allergy Clin Immunol, 2017, 139(4):1186-1194.
- [29] SINGH P P, SMITH V L, KARAKOUSIS P C. Exosomes isolated from Mycobacteria-Infected mice or cultured macrophages can recruit and activate immune cells in vitro and in vivo[J]. J Immunol, 2012, 189(2):777-785.
- [30] SRINIVASAN S, VANNBERG F O, DIXON J B. Lymphatic transport of exosomes as a rapid route of information dissemination to the lymph node[J]. Sci Rep, 2016, 6:24436.
- [31] DIAZ G, WOLFE L M, KRUH-GARCIA N A, et al. Changes in the Membrane-Associated proteins of exosomes released from human macrophages after Mycobacterium tuberculosis infection[J]. Sci Rep, 2016, 6:37975.
- [32] MOT Y Y, OTHMAN I, SHARIFAH S H. Synergistic antibacterial effect of co-administering adipose-derived mesenchymal stromal cells and Ophiophagus hannah L-amino acid oxidase in a mouse model of methicillin-resistant Staphylococcus aureus-infected wounds[J]. Stem Cell Res Ther, 2017, 8(1):5.

- [33] SINGH P P, LEMAIRE C, TAN J C, et al. Exosomes released from *M. tuberculosis* infected cells can suppress IFN- γ mediated activation of naive macrophages[J]. *PLoS One*, 2011, 6(4): e18564.
- [34] MAHON R N, SANDE O J, ROJAS R E, et al. *Mycobacterium tuberculosis* ManLAM inhibits T-cell-receptor signaling by interference with ZAP-70, Lck and LAT phosphorylation[J]. *Cell Immunol*, 2012, 275(1/2): 98-105.
- [35] ATHMAN J J, SANDE O J, GROFT S G, et al. *Mycobacterium tuberculosis* Membrane Vesicles Inhibit T cell Activation[J]. *J Immunol*, 2017, 198(5): 2028-2037.
- [36] GARG A, BARNES P F, PORGADOR A, et al. Vimentin expressed on *Mycobacterium tuberculosis*-infected human monocytes is involved in binding to the Nkp46 receptor [J]. *J Immunol*, 2006, 177(9): 6192-6198.
- [37] MAK T N, BRÜGGEMANN H. Vimentin in bacterial infections[J]. *Cells*, 2016, 5(2): 2-18.
- [38] FURCI L, SCHENA E, MIOTTO P, et al. Alteration of human macrophages microRNA expression profile upon infection with *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Int J Mycobacteriol*, 2013, 2(3): 128-134.
- [39] VALADI H, EKSTR? M K, BOSSIOS A, et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells[J]. *Nat Cell Biol*, 2007, 9(6): 654-659.
- [40] MORTAZ E, ALIPOOR S D, TABARSI P, et al. The analysis of exosomal micro-RNAs in peripheral blood mononuclear cell-derived macrophages after infection with bacillus Calmette-Guérin by RNA sequencing [J]. *Int J Mycobacteriol*, 2016, 5(Suppl 1): S184-185.
- [41] ALIPOOR S D, MORTAZ E, TABARSI P, et al. Bovis bacillus Calmette-Guerin (BCG) infection induces exosomal miRNA release by human macrophages[J]. *J Transl Med*, 2017, 15(1): 105.
- [42] LV L, LI C, ZHANG X, et al. RNA profiling analysis of the serum exosomes derived from patients with active and latent *Mycobacterium tuberculosis* infection [J]. *Front Microbiol*, 2017, 8: 1051.
- [43] TEN DAM H G. Research on BCG vaccination[J]. *Adv Tuberc Res*, 1984, 21(21): 79-106.
- [44] CHENG Y, SCHOREY J S. Exosomes carrying mycobacterial antigens can protect mice against *Mycobacterium tuberculosis* infection[J]. *Eur J Immunol*, 2013, 43(12): 3279-3290.
- [45] DA COSTA C, WALKER B, BONAVIA A. Tuberculosis vaccines-state of the art, and novel approaches to vaccine development[J]. *Int J Infect Dis*, 2015, 32: 5-12.
- [46] KOYAMA Y, ITO T, HASEGAWA A, et al. Exosomes derived from tumor cells genetically modified to Express *Mycobacterium tuberculosis* antigen: a novel vaccine for cancer therapy[J]. *Biotechnol Lett*, 2016, 38(11): 1857-1866.
- [47] CHENG Y, SCHOREY J S. Targeting soluble proteins to exosomes using a ubiquitin tag [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2016, 113(6): 1315-1324.
- [48] QIAN X, XU C, FANG S, et al. Exosomal MicroRNAs derived from umbilical mesenchymal stem cells inhibit hepatitis C virus infection[J]. *Stem Cells Transl Med*, 2016, 5(9): 1190-1203.
- [49] RAFI M A, OMIDI Y. A prospective highlight on exosomal nanoshuttles and cancer immunotherapy and vaccination[J]. *Bioimpacts*, 2015, 5(3): 117-122.
- [50] KRUH-GARCIA N A, WOLFE L M, CHAISSON L H, et al. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* peptides in the exosomes of patients with active and latent *M. tuberculosis* infection using MRM-MS[J]. *PLoS One*, 2014, 9(7): 1-11.
- [51] MEHAFFY C, DOBOS K M, NAHID P, et al. Second Generation multiple reaction monitoring assays for enhanced detection of ultra-low abundance *Mycobacterium tuberculosis* peptides in human serum [J]. *Clin Proteomics*, 2017, 14: 21.
- [52] PUROHIT M R, SVILAND L, WIKER H, et al. Rapid and specific diagnosis of extrapulmonary tuberculosis by immunostaining of tissues and aspirates with Anti-MPT64[J]. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2017, 25(4): 282-288.
- [53] LEE K, KIM H, CHOI D, et al. 981: Proteomic analysis of urinary exosomes in patients with non-small cell lung cancer and tuberculosis pleurisy using SWATH technique [J]. *Eur J Cancer*, 2014, 50(5): S239-239.
- [54] SINHA A, YADAV A K, CHAKRABORTY S A, et al. Exosome-enclosed microRNAs in exhaled breath hold potential for biomarker discovery in patients with pulmonary diseases[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2013, 132(1): 219-222.
- [55] LIN J, WANG Y, ZOU Y, et al. Differential miRNA expression in pleural effusions derived from extracellular vesicles of patients with lung cancer, pulmonary tuberculosis, or pneumonia [J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(12): 15835-15845.
- [56] WANG C, YANG S, SUN G, et al. Comparative miRNA expression profiles in individuals with latent and active tuberculosis[J]. *PLoS One*, 2011, 6(10): e25832.

(收稿日期: 2017-09-14 修回日期: 2017-11-04)