



## LPS诱导的巨噬细胞来源外泌体促进巨噬细胞抗结核分枝杆菌自噬

方芳, 杨珂佳, 王瑞祥, 钱中清

引用本文:

方芳,杨珂佳,王瑞祥,钱中清. LPS诱导的巨噬细胞来源外泌体促进巨噬细胞抗结核分枝杆菌自噬[J]. 蚌埠医科大学学报, 2024, 49(4): 438-442,447.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2024.04.004>

### 您可能感兴趣的其他文章

#### Articles you may be interested in

#### 紫杉醇耐药乳腺癌细胞外泌体来源的miR-5585-5p诱导乳腺癌细胞产生耐药表型研究

Study on the drug-resistant phenotypes of breast cancer cells induced by exosomal miR-5585-5p derived from paclitaxel-resistant breast cancer cells

蚌埠医学院学报. 2021, 46(8): 989-993 <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2021.08.001>

#### 自噬在巨噬细胞极化中的作用研究进展

蚌埠医学院学报. 2018, 43(3): 415-417 <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2018.03.041>

#### PM2.5对THP1巨噬细胞TLR4表达及氧化应激水平的影响

Effect of PM2.5 on the TLR4 expression and oxidative stress levels in THP1 macrophages

蚌埠医学院学报. 2020, 45(2): 167-170 <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2020.02.008>

#### 黄连碱促进肝细胞自噬及胆固醇外流改善脂肪肝的脂质蓄积

Coptisine promotes hepatocyte autophagy and cholesterol efflux to improve lipid accumulation in fatty liver

蚌埠医学院学报. 2021, 46(4): 421-424,430 <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2021.04.001>

#### 山茶油对哮喘患儿外周血单个核细胞GATA-3表达和IL-4分泌的影响

Effect of camellia oil on GATA-3 expression and IL-4 secretion in peripheral blood mononuclear cells of children with asthma

蚌埠医学院学报. 2020, 45(12): 1602-1605,1610 <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2020.12.003>

# LPS 诱导的巨噬细胞来源外泌体 促进巨噬细胞抗结核分枝杆菌自噬

方芳<sup>1,2</sup>, 杨珂佳<sup>1</sup>, 王瑞祥<sup>1</sup>, 钱中清<sup>1,2</sup>

(蚌埠医科大学 1. 检验医学院, 2. 慢性疾病免疫学基础与临床安徽省重点实验室, 安徽 蚌埠 233030)

**[摘要]** **目的:** 探讨 LPS 诱导的巨噬细胞来源外泌体对巨噬细胞抗结核分枝杆菌 (*M. tb*) 自噬的作用及机制研究。 **方法:** 使用 THP-1 细胞诱导建立 H37Ra 感染巨噬细胞模型, 抽提并鉴定巨噬细胞外泌体; 抽提 LPS 诱导的巨噬细胞外泌体与 H37Ra 感染巨噬细胞共培养, 使用 Dil 荧光标记外泌体, 荧光显微镜观察外泌体吸收情况, 采用荧光定量 PCR、流式细胞术、Western blotting 等方法, 明确外泌体对巨噬细胞抗 *M. tb* 自噬的影响。 **结果:** 成功抽提并鉴定 LPS 刺激的巨噬细胞外泌体, 吸收普通外泌体的巨噬细胞自噬水平无明显变化, 吸收 LPS 诱导的外泌体后的巨噬细胞其自噬水平显著提高, 共培养时加入外泌体抑制剂后促进巨噬细胞自噬作用消失; H37Ra 感染的巨噬细胞吸收 LPS 诱导的外泌体后, 其自噬水平增强, 显著提高对 *M. tb* 的杀伤能力及人白细胞介素 12 的分泌。 **结论:** LPS 诱导的巨噬细胞来源外泌体可促进巨噬细胞抗 *M. tb* 自噬。

**[关键词]** 巨噬细胞; 外泌体; 结核分枝杆菌; 自噬

**[中图分类号]** R 329.24

**[文献标志码]** A

**DOI:** 10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2024.04.004

## Mechanism of LPS-induced macrophage-derived exosomes promoting macrophage anti-*Mycobacterium tuberculosis* autophagy

FANG Fang<sup>1,2</sup>, YANG Kejia<sup>1</sup>, WANG Ruixiang<sup>1</sup>, QIAN Zhongqing<sup>1,2</sup>

(1. School of Laboratory Medicine, 2. Anhui Province Key Laboratory of Immunology  
in Chronic Diseases, Bengbu Medical University, Bengbu Anhui 233030, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect and mechanism of LPS-induced macrophage-derived exosomes on macrophage anti-*Mycobacterium tuberculosis* (*M. tb*) autophagy. **Methods:** H37Ra-infected macrophages were induced by THP-1 cells, and macrophage exosomes were extracted and identified; LPS-induced macrophage exosomes were extracted and co-cultured with H37Ra infected macrophages. The exosomes were labeled with Dil fluorescence, and the absorption of exosomes was observed under fluorescence microscope. The effects of exosomes on macrophages' anti-*M. tb* autophagy were determined by fluorescent quantitative PCR, flow cytometry, Western blotting and other methods. **Results:** The macrophage exosomes stimulated by LPS were successfully extracted and identified. There was no significant change in the autophagy level of macrophages that absorbed ordinary exosomes. The autophagy level of macrophages that absorbed LPS-induced exosomes was significantly increased. The effect of promoting macrophage autophagy disappeared when exosomes inhibitor was added during coculture; after the macrophages infected with H37Ra absorbed LPS-induced exosomes, the autophagy level was enhanced, and the killing ability of *M. tb* and the secretion of human interleukin-12 were significantly increased. **Conclusions:** LPS-induced macrophage-derived exosomes can promote macrophage anti-*M. tb* autophagy.

**[Key words]** macrophages; exosomes; *Mycobacterium tuberculosis*; autophagy

作为人类三大感染性疾病之一, 结核病严重威胁人类健康, 致死率位于传染性疾病榜首, 同时也是全球十大致死性疾病之一<sup>[1]</sup>, 结核病由结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, *M. tb*) 引起, 感染结核的病人作为传染源, 由空气途径传播 *M. tb*<sup>[2]</sup>。在全球范围内, 结核感染是重要的公共卫生问题, 每年能

影响超过 1 000 万人, 并有 150 万人会因此丧生<sup>[3]</sup>。中国作为人口大国, 是结核病的高负担国家, 寻找新的抗结核治疗靶点, 为探索结核病防治方法提供实验和临床依据显得尤为重要。自噬作为进化保守的细胞内降解系统以及重要的免疫防御机制, 在人体内各种免疫应答中发挥重要作用<sup>[4-5]</sup>, 近年来外泌

**[收稿日期]** 2023-10-12 **[修回日期]** 2024-01-09

**[基金项目]** 安徽省高校自然科学研究重点项目 (KJ2020A0583)

**[作者简介]** 方芳 (1987-), 女, 硕士, 讲师。

**[通信作者]** 钱中清, 硕士研究生导师, 教授. E-mail: qzq7778@bbmc.edu.cn

体与自噬的相关研究不断更新,有学者<sup>[6-7]</sup>报道在同一种刺激下,外泌体和自噬体在同一位置被观察到,并且通过外泌体对自噬的作用,影响了多种处于生理或病理状态的器官。而自噬和外泌体在抗结核免疫中的作用同样受到广泛的关注,自噬信号的缺乏和抑制是 *M. tb* 逃逸巨噬细胞免疫识别和杀伤的关键<sup>[8-10]</sup>。巨噬细胞释放的外泌体是否参与 *M. tb* 感染的调节目前仍无定论,本研究拟以 H37Ra 感染巨噬细胞为研究对象,采用流式细胞术、Western blotting 等方法,研究外泌体对巨噬细胞抗 *M. tb* 自噬的影响。现作报道。

## 1 材料与方法

### 1.1 H37Ra 感染巨噬细胞模型建立

指数生长期的 THP-1 细胞用完全 RPMI-1640 制成  $5 \times 10^5$ /mL 的悬液接种于 6 孔板,加入 PMA (120 ng/mL) 刺激 24 h 后细胞发生巨噬细胞样变化,细胞被诱导分化为 THP-1 来源巨噬细胞 THP-1 (A)。H37Ra 菌株接种于罗琴氏固体培养基,置于 37 °C 培养箱,对数生长期时用无菌接种环取少许细菌,置入装有 0.9% 氯化钠溶液的匀浆器中,反复研磨,0.9% 氯化钠溶液洗涤 2 次,10 000 r/min 离心 2 min,1 mL 注射器加入少许 0.9% 氯化钠溶液对细菌悬液吹打,使其分散为单个菌悬液。分光光度计 600 nm 处检测菌液浓度,0.9% 氯化钠溶液调细菌至  $5 \times 10^8$ /mL,分装于 EP 管中,置于 4 °C 冰箱保存待用。诱导分化的 THP-1 (A) 巨噬细胞接种于 6 孔板,加入 *M. tb* 单个菌悬液,使其与细胞的比例为 10:1,培养 24 h 后,感染模型建立。

### 1.2 外泌体的抽提与鉴定

细胞采用无外泌体血清培养,48 h 后收集培养液。350 g、2 000 g、10 000 g 离心取上清液后,100 000 g 离心 90 min。将分离得到的外泌体置于 -80 °C 冰箱保存。将外泌体通过透射电镜 (Hitachi 7700) 观察形态和大小,Western blotting 测定外泌体表面分子标志物 CD63 和 TSG101 表达;纳米颗粒跟踪分析测量外泌体浓度。

### 1.3 外泌体与巨噬细胞的共培养

使用 Transwell 小室进行共培养,将 THP-1 (A) 或 LPS 刺激后的 THP-1 (A) 细胞种于小室内,H37Ra 感染巨噬细胞种于 24 孔板内,共培养 48 ~ 72 h 后收集细胞进行试验,对照组加入浓度为 10  $\mu$ mol/L 的 GW4869 (Mce) 抑制外泌体分泌。将 LPS 刺激前后的 THP-1 (A) 外泌体重悬于 PBS 中,

5  $\mu$ mol/L Dil 红色荧光染料孵育 10 min,100 000 g 离心后弃去上清液,使用 PBS 重悬并洗涤 Dil 标记的外泌体,该步骤重复 3 次。将荧光标记的外泌体与 *M. tb* 感染的巨噬细胞培养 24 h 后,采用荧光显微镜观察并拍摄图像。

### 1.4 外泌体对感染的巨噬细胞自噬水平及杀菌能力的影响

外泌体与细胞共培养 48 h 后,Western blotting 检测各组细胞 LC3-II 表达量,观察外泌体对巨噬细胞自噬的影响;用流式细胞仪检测外泌体对巨噬细胞杀菌能力的影响。共培养时在培养液中加入自噬激动剂雷帕霉素 (RAP) 或自噬抑制剂 3-Methyladenine (3-MA) 观察激活或抑制自噬后能否促进或抑制 LPS 刺激的外泌体对巨噬细胞杀伤产生的影响。

### 1.5 Western blotting

外泌体处理过的 THP-1 (A) 细胞提取蛋白并进行 BCA 蛋白浓度测定。SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒配置 10% 的分离胶,电泳时的电压设置为 80 V 运行约 30 min 后观察彩色蛋白分子量标志物的条带分离后将电压调增至 110 V。转 PVDF 膜时电流设置为 200 mA 运行 90 ~ 120 min。封闭使用 5% 的脱脂奶粉,摇床 2 ~ 3 h。孵育一抗使用的抗体分为:  $\beta$ -actin (1:1 000, AA128, 碧云天公司), CD63 (1:2 000, ab134045, Abcam 公司); TSG101 (1:2 000, ab125011, Abcam 公司); LC3 (1:2 000, ab192890, Abcam 公司)。孵育二抗使用的抗体有:羊抗小鼠 (1:1 000, A0216, 碧云天公司), 羊抗兔 (1:1 000, A0208, 碧云天公司)。最后使用 Bio-Rad 公司的曝光仪进行条带发光显影。

### 1.6 ELISA 检测巨噬细胞上清液中人白细胞介素 12 (IL-12) 水平

IL-12 ELISA 试剂盒购买自生工公司 (货号: D711069), 根据说明书操作, 步骤简述如下: 收集共培养后的细胞上清液, 1 000 g 离心去除碎片及杂质, 每个孔中加入 100  $\mu$ L 标准品工作液及检测样本, 封板后于 37 °C 孵箱孵育 90 min 后每孔加入 100  $\mu$ L 生物素标记 IL-12 抗体工作液, 洗涤后加入 100  $\mu$ L HRP 标记链霉亲和素工作液, 洗涤后加入显色剂, 15 min 后加入终止液后即刻使用酶标仪检测 450 nm 波长下的吸光度 (OD) 值。

### 1.7 荧光定量 PCR 实验检测巨噬细胞中 IL-12 的表达水平

使用 Trizol 提取细胞中的 RNA, RNA 样品在

260 nm 和 280 nm 下的  $OD_{260/280} = 1.9 \sim 2.1$  代表 RNA 纯度可用于后续实验。使用逆转录试剂盒按照说明书进行操作将 RNA 逆转录为 cDNA。荧光试剂盒购买自罗氏公司。八连管中加入引物, cDNA 模板、荧光染料, 无菌去离子水补足体积至 20  $\mu$ L。IL-12p35 上游引物序列 5' ~ 3' 为 ACC AGG TGG AGT TCA AAG ACC, 下游引物序列 5' ~ 3' 为 TGG CAC AGT CTC ACT GTT GA; IL-12p40 上游引物序列 5' ~ 3' 为 CAA GAT GCG TGG AAA CTA CC, 下游引物序列 5' ~ 3' 为 CCT GGT TGG CCA TCG TTT TG。扩增条件: 95  $^{\circ}$ C 20 s, 95  $^{\circ}$ C 3 s, 60  $^{\circ}$ C 30 s, 共 40 个循环。反应结束后确认荧光定量 PCR 的扩增曲线

和溶解曲线, 经  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法分析细胞内 IL-12p35 和 IL-12p40 mRNA 的基因表达量。

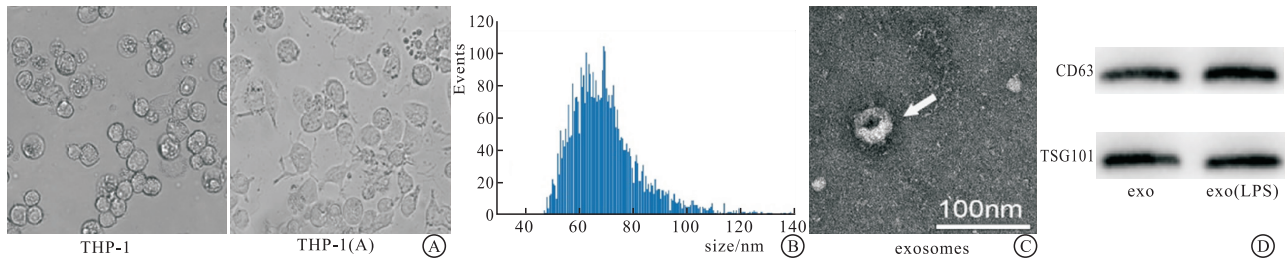
## 1.8 统计学方法

采用方差分析和  $q$  检验。

## 2 结果

### 2.1 巨噬细胞的诱导以及外泌体的抽提鉴定

使用 PMA 刺激 THP-1, 成功将 THP-1 刺激成为巨噬细胞 THP-1 (A), 并使用超速离心法收集 LPS (120 ng/mL) 刺激 24 h 的巨噬细胞外泌体, 并通过粒径分析、电镜拍摄形态照片及 Western blotting 鉴定外泌体标志蛋白 (见图 1)。



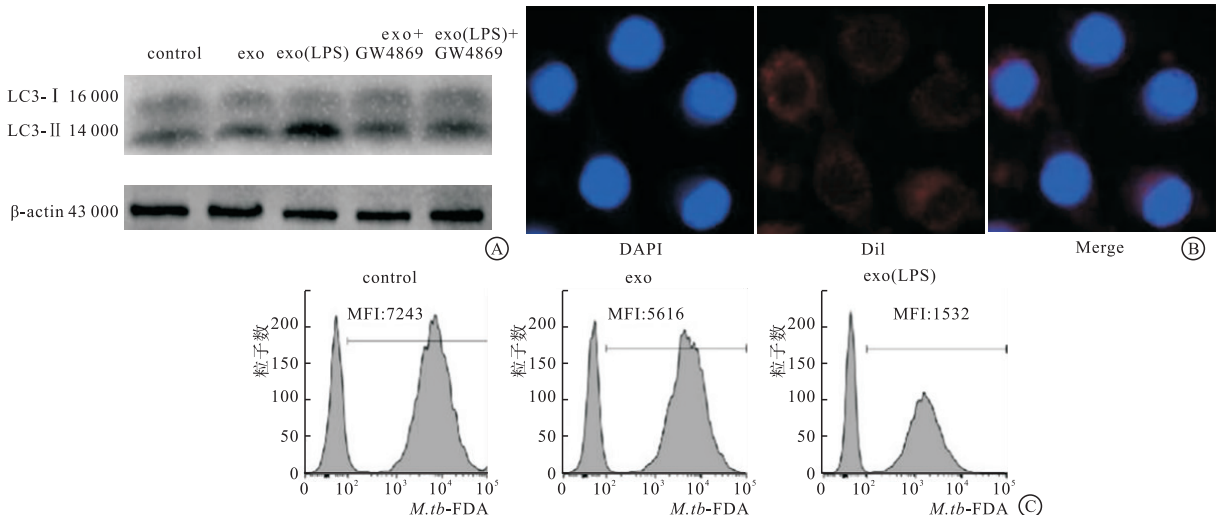
A: THP-1 细胞, 经 PMA 诱导后细胞呈巨噬样变化, 形态不规则, 有伪足伸出, 细胞质内颗粒增多; B: 纳米颗粒跟踪分析分析结果显示, 抽提样本中存在直径集中在 100 nm 左右的囊泡结构, 符合外泌体特征; C: 电镜拍摄结果显示, 样本中存在外泌体样带有清晰膜的茶托型结构; D: Western blotting 检测发现, 样本中存在外泌体标志蛋白 CD63 及 TSG101 的富集表达。

图1 巨噬细胞的诱导以及外泌体的抽提鉴定

### 2.2 LPS 诱导的外泌体被巨噬细胞摄取及其对巨噬细胞自噬和 *M. tb* 杀伤的影响

吸收普通外泌体 (exo 组) 的巨噬细胞与对照组 (control 组) 相比自噬水平无明显变化, 吸收 LPS 诱导的外泌体 [exo (LPS) 组] 后的巨噬细胞其自噬水平较对照组及普通外泌体组显著提高, 加入外泌体

抑制剂 (GW4869) 后与 exo (LPS) 组相比促进巨噬细胞自噬作用消失 (见图 2A)。使用 Dil 标记追踪 LPS 诱导的外泌体, 可见外泌体与 *M. tb* 感染的巨噬细胞共培养后能被巨噬细胞吸收 (见图 2B), 流式细胞仪检测 *M. tb* 的 FDA 平均荧光强度显著低于对照组 ( $P < 0.01$ ) (见图 2C 和表 1)。



A: Western blotting 检测显示 LPS 诱导的外泌体能够促进感染的巨噬细胞 LC3-II 蛋白表达, 加入外泌体抑制剂后促进作用消失; B: 采用 Dil 红色荧光标记 LPS 诱导的巨噬细胞外泌体, 与巨噬细胞共培养 24 h 后使用荧光显微镜观察, 可见巨噬细胞能够摄取荧光标记的外泌体; C: 流式细胞仪检测发现 LPS 诱导的外泌体刺激感染的巨噬细胞能够促进其对 *M. tb* 的杀伤。

图2 LPS 诱导的外泌体被巨噬细胞摄取及其对巨噬细胞自噬和 *M. tb* 杀伤的影响

表 1 LPS 诱导的外泌体对巨噬细胞杀伤 *M. tb* 的影响( $\bar{x} \pm s$ )

分组	<i>n</i>	平均荧光强度	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>MS</i> <sub>组内</sub>
control 组	3	7 225 ± 206.59			
exo 组	3	5 560 ± 184.33 *	910.29	<0.0129	168.066
exo(LPS) 组	3	1 445 ± 104.15 **			

*q* 检验:与 control 组比较 \**P* < 0.05;与 exo 组比较#*P* < 0.05

### 2.3 LPS 诱导外泌体对巨噬细胞产生 IL-12 的影响

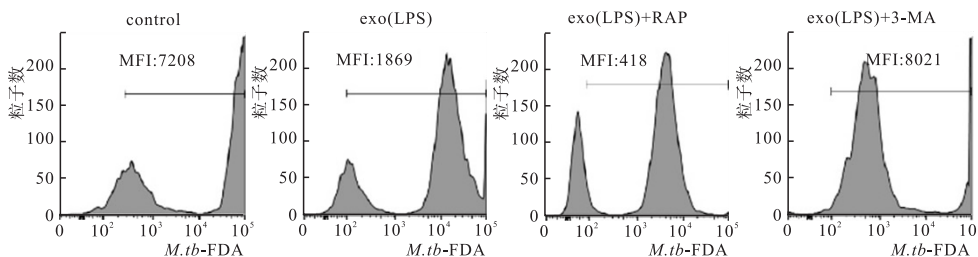
LPS 诱导的外泌体与 *M. tb* 感染的巨噬细胞共培养后,通过荧光定量 PCR 检测巨噬细胞内 IL-12p35 和 IL-12p40 基因表达水平,可见细胞内 IL-12p35 和 IL-12p40 表达量显著升高,共培养后收集巨噬细胞上清液,通过 ELISA 检测上清液中 IL-12 的水平较对照组相比显著升高(*P* < 0.01)(见表 2)。

表 2 LPS 诱导的外泌体对感染的巨噬细胞 IL-12 的表达影响( $\bar{x} \pm s$ )

分组	<i>n</i>	IL-12p35 相对表达量	IL-12p40 相对表达量	上清液 IL-12 水平/(pg/mL)
control 组	3	1.00 ± 0.11	1.00 ± 0.17	45.90 ± 8.41
exo 组	3	1.40 ± 0.16 *	1.43 ± 0.13 *	77.53 ± 11.23 *
exo(LPS) 组	3	2.51 ± 0.22 **	2.62 ± 0.24 **	289.83 ± 12.09 **
<i>F</i>	—	66.02	59.9	461.02
<i>P</i>	—	<0.01	<0.01	<0.01
<i>MS</i> <sub>组内</sub>	—	0.030	0.040	114.500

*q* 检验:与 control 组比较 \**P* < 0.05;与 exo 组比较#*P* < 0.05

### 2.4 促进或抑制自噬可影响 LPS 诱导的外泌体抗

图 3 抽提 LPS 诱导外泌体与 *M. tb* 感染的巨噬细胞共培养,加入 RAP 组平均荧光强度减弱,加入 3-MA 平均荧光强度增强表 3 促进或抑制自噬调节 LPS 诱导的外泌体对巨噬细胞杀伤 *M. tb* 及 IL-12 的影响( $\bar{x} \pm s$ )

分组	<i>n</i>	平均荧光强度	IL-12p35 相对表达量	IL-12p40 相对表达量	上清液 IL-12 水平/(pg/mL)
control 组	3	7 173.67 ± 156.35	1.00 ± 0.18	1.00 ± 0.15	107.77 ± 13.84
exo(LPS) 组	3	1 758.33 ± 107.19 **	2.28 ± 0.20 **	2.06 ± 0.19 **	228.06 ± 26.23 **
exo(LPS) + RAP 组	3	520.67 ± 90.52	4.04 ± 0.12	4.08 ± 0.36	388.50 ± 12.68
exo(LPS) + 3-MA 组	3	8 010.33 ± 115.37	0.76 ± 0.11	0.63 ± 0.10	65.90 ± 6.02
<i>F</i>	—	2 977.05	262.27	149.54	233.32
<i>P</i>	—	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
<i>MS</i> <sub>组内</sub>	—	14 360.080	0.025	0.048	269.100

*q* 检验:与 exo(LPS) + RAP 组比较 \**P* < 0.05;与 exo(LPS) + 3-MA 组比较#*P* < 0.05

### *M. tb* 作用

将 LPS 刺激的外泌体与 *M. tb* 感染的巨噬细胞共培养,加入 RAP 可促进巨噬细胞杀伤效果,显著提高细胞内 IL-12p35 和 IL-12p40 基因表达水平以及上清液中 IL-12 水平(*P* < 0.01),加入 3-MA 则抑制巨噬细胞杀伤效果,显著降低细胞内 IL-12p35 和 IL-12p40 基因表达水平以及上清液中 IL-12 水平(见图 3 及表 3)。

### 3 讨论

人呼吸道的最后一道屏障由肺泡内的巨噬细胞、上皮细胞以及释放的一些可溶性物质组成<sup>[11]</sup>,巨噬细胞能识别入侵人体的病原体,激活杀菌机制并协调随后的免疫反应<sup>[12]</sup>。肺泡内主要有肺泡巨噬细胞和肺泡间质巨噬细胞,肺泡巨噬细胞位于肺泡表面,占肺部免疫细胞的 55%,能够抑制包括 *M. tb* 在内的各种病原体<sup>[13-14]</sup>。*M. tb* 进入肺部后首先攻击肺泡巨噬细胞,作为控制发病机制的先天防御机制,巨噬细胞可以通过激活自噬来对抗 *M. tb* 感染<sup>[15]</sup>,但同时 *M. tb* 驻留在自噬小体中,通过阻止自噬小体成熟而抑制自噬过程<sup>[16]</sup>,不仅如此,*M. tb* 还可利用几种效应蛋白来抑制自噬诱导的杀伤<sup>[17-19]</sup>。本课题组在前期研究<sup>[20]</sup>中同样发现,LPS 诱导的巨噬细胞自噬能够发挥抗结核作用,但具体机制尚不明确。

外泌体是近年来各种疾病中的研究热点,外泌体不仅能够通过包裹 miRNA 对前列腺癌产生影响<sup>[21]</sup>,还和自噬之间存在着特别的联系。脂肪组织源性基质细胞外泌体可能对骨关节炎有益,主要机制为外泌体包裹 miR-429 被软骨细胞吸收促进软骨细胞增殖,miR-429 通过靶向 FEZ2 促进自噬来改善骨关节炎中的软骨损伤<sup>[7]</sup>;在肝癌中,有研究团队发现是肝细胞外泌体中的一种新型肿瘤启动子 circRNA,通过 circTGFBR2/miR-205-5p/ATG5 轴增强 ATG5 介导的保护性自噬来促进肝癌进展,可能成为肝癌的潜在治疗靶点<sup>[22]</sup>。推测在 *M. tb* 感染后的机体内,外泌体也发挥着重要的作用。

本研究诱导人单核细胞 THP-1 分化为巨噬细胞,显微镜下观察可见细胞形态不规则,有伪足伸出,细胞质内颗粒增多,代表诱导成功。诱导成功后建立结核杆菌减毒株 H37Ra 感染巨噬细胞模型,将巨噬细胞与 H37Ra 感染巨噬细胞非接触共培养,考虑到巨噬细胞可以通过激活自噬来对抗 *M. tb* 感染<sup>[15]</sup>,课题组通过 Western blotting 检测自噬标志蛋白 LC3-II,发现 LPS 诱导的巨噬细胞可分泌外泌体激活巨噬细胞自噬,普通外泌体对自噬水平无明显影响,并且加入外泌体抑制剂促进作用消失,提示 LPS 外诱导的外泌体可促进巨噬细胞自噬水平。使用超速离心法抽提 LPS 诱导的巨噬细胞分泌的外泌体,粒径分析结果提示外泌体直径分布于 70 nm 左右,电镜下可见清晰膜的茶托型结构,并且表达外泌体标志蛋白 TSG101 及 CD63。为明确 H37Ra 感染的巨噬细胞能否吸收外泌体,课题组使用 Dil 荧光标记外泌体后与 H37Ra 感染的巨噬细胞共培养,荧光显微镜下观察到巨噬细胞内表达 Dil 荧光,代表巨噬细胞能成功吸收外泌体。在此基础上,通过流式细胞仪检测 *M. tb* 水解的 FDA 平均荧光强度,结果表明外泌体刺激后能促进巨噬细胞对 *M. tb* 的杀伤作用,提示 LPS 诱导的巨噬细胞外泌体可以通过激活巨噬细胞自噬水平起到抗 *M. tb* 的作用。在共培养基础上加入自噬激动剂可促进巨噬细胞抗 *M. tb* 的作用,而加入自噬抑制剂 3-MA 后减弱巨噬细胞抗 *M. tb* 的作用,进一步验证 LPS 诱导的巨噬细胞外泌体可以通过影响巨噬细胞自噬水平。在 *M. tb* 感染过程中,巨噬细胞会产生和分泌一些细胞因子,IL-12 是由 p35 和 p40 两个亚基组成的可诱导细胞因子,是最重要的细胞因子之一,具有调节细胞免疫的抗感染,抗病毒和抗肿瘤作用,通过检测 IL-12 的分泌量可反映细胞对 *M. tb* 的抗感染作用。

荧光定量 PCR 检测巨噬细胞内 IL-12 表达量升高,ELISA 检测上清液中 IL-12 表达量显著升高,表明 LPS 诱导的外泌体可促进巨噬细胞抵抗 *M. tb* 的感染。但外泌体内可包裹许多种类的 RNA 以及蛋白质,具体发挥作用的是哪种成分,目前作用机制不明,需要进一步探讨。

#### [ 参 考 文 献 ]

- [1] AMERE GA, NAYAK P, SALINDRI AD, *et al.* Contribution of smoking to tuberculosis incidence and mortality in high-tuberculosis-burden countries [J]. *Am J Epidemiol*, 2018, 187 (9):1846.
- [2] RAHLWES KC, DIAS BRS, CAMPOS PC, *et al.* Pathogenicity and virulence of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Virulence*, 2023, 14 (1):2150449.
- [3] BAGCCHI S. WHO's global tuberculosis report 2022 [J]. *Lancet Microbe*, 2023, 4 (1):e20.
- [4] AYLAN B, BERNARD EM, PELLEGRINO E, *et al.* ATG7 and ATG14 restrict cytosolic and phagosomal *Mycobacterium tuberculosis* replication in human macrophages [J]. *Nat Microbiol*, 2023, 8 (5):803.
- [5] DEBNATH J, GAMMOH N, RYAN KM. Autophagy and autophagy-related pathways in cancer [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2023, 24 (8):560.
- [6] WANG Y, REN L, BAI H, *et al.* Exosome-autophagy crosstalk in enveloped virus infection [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24 (13):10618.
- [7] MENG C, NA Y, HAN C, *et al.* Exosomal miR-429 derived from adipose-derived stem cells ameliorated chondral injury in osteoarthritis via autophagy by targeting FEZ2 [J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 120:110315.
- [8] ZHANG S, ZHOU X, OU M, *et al.* Berbamine promotes macrophage autophagy to clear *Mycobacterium tuberculosis* by regulating the ROS/Ca<sup>2+</sup> axis [J]. *mBio*, 2023, 14 (4):e0027223.
- [9] MUÑOZ-SÁNCHEZ S, VARELA M, VAN DER VAART M, *et al.* Using zebrafish to dissect the interaction of mycobacteria with the autophagic machinery in macrophages [J]. *Biology*, 2023, 12 (6):817.
- [10] KINSELLA RL, KIMMEY JM, SMIRNOV A, *et al.* Autophagy prevents early proinflammatory responses and neutrophil recruitment during *Mycobacterium tuberculosis* infection without affecting pathogen burden in macrophages [J]. *PLoS Biol*, 2023, 21 (6):e3002159.
- [11] GRAVES DT, MILOVANOVNA TN. Mucosal immunity and the FOXO1 transcription factors [J]. *Front Immunol*, 2019, 10:2530.
- [12] RAVESLOOT-CHÁVEZ MM, VAN DIS E, STANLEY SA. The innate immune response to *Mycobacterium tuberculosis* infection [J]. *Annu Rev Immunol*, 2021, 39:611.
- [13] HOU F, XIAO K, TANG L, *et al.* Diversity of macrophages in lung homeostasis and diseases [J]. *Front Immunol*, 2021, 12:753940.

- patients with node-positive prostate cancer at radical prostatectomy and pelvic lymph node dissection; a systematic review[J]. *Eur Urol Oncol*,2020,3(5):565.
- [3] THURING M, KNUCHEL R, PICCHETTA L, *et al.* The prognostic value of indoleamine-2,3-dioxygenase gene expression in urine of prostate cancer patients undergoing radical prostatectomy as first treatment of choice[J]. *Front Immunol*,2020,11:1244.
- [4] 伍宏亮, 关翰, 陈志军, 等. 经腹与经腹腔镜下根治性前列腺切除术的结局指标比较[J]. *蚌埠医学院学报*,2020,45(10):1392.
- [5] 李星, 曾晓勇. 中国前列腺癌流行病学研究进展[J]. *肿瘤防治研究*,2021,48(1):98.
- [6] VANNINI I, FANINI F, FABBRI M. Emerging roles of microRNAs in cancer[J]. *Curr Opin Genet Dev*,2018,48:128.
- [7] 王艳秋. miR-20a 靶向 PTEN 调控垂体腺瘤细胞的增殖与侵袭[J]. *蚌埠医学院学报*,2022,47(5):561.
- [8] ZHANG J, BAI R, LI M, *et al.* Excessive miR-25-3p maturation via N(6)-methyladenosine stimulated by cigarette smoke promotes pancreatic cancer progression[J]. *Nat Commun*,2019,10(1):1858.
- [9] CHEN H, PAN H, QIAN Y, *et al.* MiR-25-3p promotes the proliferation of triple negative breast cancer by targeting BTG2[J]. *Mol Cancer*,2018,17(1):4.
- [10] ZHANG L, TONG Z, SUN Z, *et al.* MiR-25-3p targets PTEN to regulate the migration, invasion, and apoptosis of esophageal cancer cells via the PI3K/AKT pathway[J]. *Biosci Rep*,2020,40(10):BSR20201901.
- [11] VEECK J, DAHL E. Targeting the Wnt pathway in cancer: the emerging role of Dickkopf-3[J]. *Biochim Biophys Acta*,2012,1825(1):18.
- [12] HUO J, ZHANG Y, LI R, *et al.* Upregulated microRNA-25 mediates the migration of melanoma cells by targeting DKK3 through the WNT/beta-catenin pathway[J]. *Int J Mol Sci*,2016,17(11):1124.
- [13] ZENG H, HUANG Y, LIU Q, *et al.* MiR-145 suppresses the motility of prostate cancer cells by targeting cadherin-2[J]. *Mol Cell Biochem*,2021,476(10):3635.
- [14] GE J, MAO L, XU W, *et al.* MiR-103a-3p suppresses cell proliferation and invasion by targeting tumor protein D52 in prostate cancer[J]. *J Invest Surg*,2021,34(9):984.
- [15] NING L, ZHANG M, ZHU Q, *et al.* MiR-25-3p inhibition impairs tumorigenesis and invasion in gastric cancer cells *in vitro* and *in vivo*[J]. *Bioengineered*,2020,11(1):81.
- [16] LU H, ZHANG L, LU S, *et al.* MiR-25 expression is upregulated in pancreatic ductal adenocarcinoma and promotes cell proliferation by targeting ABI2[J]. *Exp Ther Med*,2020,19(5):3384.
- [17] CHEN H, PAN H, QIAN Y, *et al.* MiR-25-3p promotes the proliferation of triple negative breast cancer by targeting BTG2[J]. *Mol Cancer*,2018,17(1):4.
- [18] PENG W, WANG Z, FAN H. LncRNA NEAT1 impacts cell proliferation and apoptosis of colorectal cancer via regulation of Akt signaling[J]. *Pathol Oncol Res*,2017,23(3):651.
- [19] LUO S, LI N, YU S, *et al.* MicroRNA-92a promotes cell viability and invasion in cervical cancer via directly targeting Dickkopf-related protein 3[J]. *Exp Ther Med*,2017,14(2):1227.
- [20] LIU B, ZHOU W, JIANG H, *et al.* MiR-1303 promotes the proliferation, migration and invasion of prostate cancer cells through regulating the Wnt/beta-catenin pathway by targeting DKK3[J]. *Exp Ther Med*,2019,18(6):4747.
- [21] KARDOONI H, GONZALEZ-GUALDA E, STYLIANAKIS E, *et al.* CRISPR-mediated reactivation of DKK3 expression attenuates TGF-beta signaling in prostate cancer[J]. *Cancers (Basel)*,2018,10(6):165.

(本文编辑 周洋)

(上接第 442 页)

- [14] HUME PS, GIBBINGS SL, JAKUBZICK CV, *et al.* Localization of macrophages in the human lung via design-based stereology[J]. *Am J Respir Crit Care Med*,2020,201(10):1209.
- [15] CHAI Q, WANG L, LIU CH, *et al.* New insights into the evasion of host innate immunity by *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Cell Mol Immunol*,2020,17(9):901.
- [16] VERGNE I, CHUA J, DERETIC V. *Mycobacterium tuberculosis* phagosome maturation arrest: selective targeting of PI3P-dependent membrane trafficking[J]. *Traffic*,2003,4(9):600.
- [17] BUSSI C, GUTIERREZ MG. *Mycobacterium tuberculosis* infection of host cells in space and time[J]. *FEMS Microbiol Rev*,2019,43(4):341.
- [18] LERNER TR, BOREL S, GREENWOOD DJ, *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* replicates within necrotic human macrophages[J]. *J Cell Biol*,2017,216(3):583.
- [19] ROMAGNOLI A, ETNA MP, GIACOMINI E, *et al.* ESX-1 dependent impairment of autophagic flux by *Mycobacterium tuberculosis* in human dendritic cells[J]. *Autophagy*,2012,8(9):1357.
- [20] FANG F, GE Q, LI R, *et al.* LPS restores protective immunity in macrophages against *Mycobacterium tuberculosis* via autophagy[J]. *Mol Immunol*,2020,124:18.
- [21] 关翰, 孙文衍, 汪盛, 等. M2 型巨噬细胞外泌体包裹 miR-374a 促进前列腺癌恶性进展的机制研究[J]. *蚌埠医学院学报*,2023,48(6):701.
- [22] WANG X, DONG FL, WANG YQ, *et al.* Exosomal circTGFB2 promotes hepatocellular carcinoma progression via enhancing ATG5 mediated protective autophagy[J]. *Cell Death Dis*,2023,14(7):451.

(本文编辑 刘梦楠)