·实验研究·

外泌体对炎症性肠病调节巨噬细胞和肠道上皮细胞的影响

肖军华[1]， 周晓燕[2]， 贺志龙[1]， 任天然[1]， 沈佳庆[1]， 黎文华[3]

1. 苏州大学附属第一医院消化内科，江苏 苏州 215006；

2. 上海交通大学附属第一人民医院消化科，上海 200080；3. 无锡第二人民医院消化内科，江苏 无锡 214002

摘要：目的 通过检测炎症性肠病(IBD)患者肠外泌体(EVs)对上皮细胞和巨噬细胞的影响，研究 EVs 对 IBD 的影响。**方法** 选择 2016 年 1 月至 2017 年 12 月收治的 40 例 IBD 患者及肠镜未见异常，既往无慢性病史的正常人群 20 例作为健康对照组(HC 组)，每例入选者行肠镜检查时收集 10 ml 肠腔液(LAs)，分离 EVs。将 EVs 与结肠上皮细胞株(SW-480 细胞系细胞)或者外周血单核细胞来源的巨噬细胞共培养，分别采用 qRT-PCR 及 ELISA 法检测 LAs 中 EVs 裂解液中细胞因子 mRNA 表达水平及其蛋白含量，及与 EVs 共培养的结肠上皮细胞及巨噬细胞吞噬肠 EVs 后细胞因子 mRNA 表达水平和蛋白水平，并行巨噬细胞迁移实验探讨 EVs 对巨噬细胞功能的影响。**结果** (1)与健康受试者(HC)比较，IBD 患者 LAs 中 EVs(IBD-EVs)裂解液中白介素(IL)-6、IL-8、IL-10、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)的 mRNA 及蛋白表达水平均显著升高，转化生长因子 β(TGF-β)及黏蛋白-2(MUC-2)mRNA 及蛋白表达水平均显著降低。(2)与 IBD-EVs 共培养的结肠上皮细胞吞噬 EVs 后 IL-6、IL-8、TNF-α 的 mRNA 表达水平及其蛋白水平均显著高于与 HC-EVs 共培养的水平，而 TGF-β 及 MUC-2 mRNA 及蛋白表达水平均显著低于与 HC-EVs 共培养时的水平，巨噬细胞吞噬肠腔 EVs 后细胞因子水平变化与上皮细胞类似，且 IBD 患者 EVs 显著提升巨噬细胞的迁移率。**结论** IBD 患者肠腔中释放的 EVs 的内含物与健康受试者不同，体外实验表明 IBD-EVs 具有促进肠道上皮细胞、巨噬细胞发生炎症的作用，而该类小体的稳定性及其包含的 mRNA 及蛋白谱等特性可能作为临床诊断 IBD 时潜在的标志物。

关键词： 炎症性肠病；外泌体；巨噬细胞；结肠上皮细胞

中图分类号： R 574 **文献标识码：** B **文章编号：** 1674－8182(2018)12－1681－05

Effect of extracellular vesicles on process of inflammatory bowel disease via regulating intestinal epithelial cells and macrophages

XIAO Jun-hua*, ZHOU Xiao-yan, HE Zhi-long, REN Tian-ran, SHEN Jia-qing, LI Wen-hua

*Department of Gastroenterology, First Hospital Affiliated to Suzhou University, Suzhou, Jiangsu 215006, China

Corresponding author: LI Wen-hua, E-mail: applewang814@163.com

Abstract: Objective To investigate the effect of extracellular vesicles (EVs) on inflammatory bowel disease. (IBD) via detecting the influence of intestinal luminal EVs on intestinal epithelial cells and macrophages. **Methods** Forty patients with IBD from January 2016 to December 2017 and 20 normal population without abnormalities in enteroscopy and without chronic diseases history (HC group) were selected as research objective. The 10 ml intestinal luminal aspirates (LAs) were collected during colonoscopy in all chosen subjects, and the EVs were isolated. EVs were co-cultured with colon epithelial cell line SW-480 cells or macrophages derived from peripheral blood monocytes in vitro. Real-time quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) and enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) were used to detect cytokines mRNAs expressions and contents of their proteins in lysis buffer of EVs and in epithelial cells and macrophages after swallow EVs Macrophage migration test was performed to explore the effect of EVs on functions of macrophages. **Results** (1) Compared with healthy subjects (HC), the expression levels of interleukin (IL)-6, IL-8, IL-10, tumor necrosis factor-α (TNF-α) mRNAs and their proteins contents in lysis buffer of EVs of IBD patients LAs (IBD-EVs) increased significantly, and the expression levels of transforming growth factor-β (TGF-β) and mucoprotein-2 (MUC-2) mRNAs and their protein contents

DOI: 10.13429/j.cnki.cjcr.2018.12.022

基金项目： 江苏省自然科学基金青年基金项目 (BK20170372)；南京医科大学科技发展基金重点项目 (2017NJMUZD110)

通讯作者： 黎文华，E-mail：applewang814@163.com

decreased significantly. (2) Compared with co-culture with HC-EVs, the expression levels of IL-6, IL-8, IL-10, TNF-α mRNAs and their proteins contents in epithelial cells co-cultured with IBD-EVs after swallow EVs increased significantly, and the expression levels of TGF-β and MUC-2 mRNAs and their protein contents decreased significantly. The changes of cytokine levels in macrophages co-cultured with IBD-EVs after swallow EVs were similar to epithelial cells co-cultured with IBD-EVs after swallow EVs, and IBD-EVs can significantly increase the migration rate of macrophage. **Conclusion** The inclusions released by EVs in LAs of IBD patients are different from HC. The experiment in vitro shows that IBD-EVs have the functions of promoting inflammation of intestinal epithelial cells and macrophages, and their stability and the characteristics of mRNA and protein profiles contained in them may be used as the potential fecal markers for clinical diagnosis of IBD.

Key words: Inflammatory bowel disease; Extracellular vesicles; Macrophages; Colon epithelial cells

炎症性肠病(IBD)患者的黏膜炎症以固有层中浸润大量淋巴细胞、巨噬细胞及中性粒细胞为特点[1]。肠道这种炎性分布通常是节段性的,体现疾病的病理生理机制。另外,研究表明炎性黏膜分泌物有望作为疾病活动度的生物标记物[2-4]。外泌体(extracellular vesicles,EVs),是一类包括微囊泡及凋亡小体,且介导细胞间交流的囊性小体。通常被认为是一种从细胞分泌,直径范围为 30 ~ 1 000 nm,带有完整包膜的外泌体或微粒子[5]。该类物质被许多学者认为是传递细胞间生物学信息的重要因子[6-7],EVs 包含的各类 RNA 与蛋白不仅间接介导其他细胞下游信号转导,甚至还可以直接介导一些重要的细胞生物学功能[8]。EVs 可从许多体液如血液、尿液、汗液及乳汁中分离出来,由于其具有完整的包膜,可防止携带的内容物被内源性的蛋白酶及核酸酶水解[9-11]。参与 IBD 病理进展的中性粒细胞、巨噬细胞、淋巴细胞、上皮细胞,甚至一些肠道共生菌种均可产生 EVs,并且可从 EVs 携带的内容物追踪其来源细胞[12-14]。尽管目前研究者们发现 IBD 患者血液中 EVs 数量上升,但肠腔中是否分泌有大量 EVs,及关于这些 EVs 的功能证据仍比较缺乏[15]。由于炎症反应及各类细胞均参与 IBD 的发生发展过程,因此笔者假设 IBD 患者肠腔的炎性黏膜可释放大量 EVs,可通过检测肠腔液中 EVs 的含量及种类确定 IBD 疾病活性程度。

1 资料与方法

1.1 样品收集 选择 2016 年 1 月至 2017 年 12 月诊断符合 2018 年中华医学会消化病学分会 IBD 协作组共识意见的 40 例 IBD 患者,年龄在 20 ~ 60 岁,排除其他自身免疫性疾病(如强直性脊柱炎、类风湿性关节炎等),感染性疾病(如急性肠炎、肠结核、肠阿米巴痢疾等)和肿瘤性疾病等。选择肠镜未见异常、排除既往有慢性病史的正常人群 20 例健康对照者(HC)。所有患者及对照者标本留取前均签署知情同意书,并通过医院伦理委员会审核批准。每例入选者在行肠镜检查时收集 10 ml 肠腔液,在 4 ℃下以 2 000 rpm离心 15 min,去除底层固体杂质,保留上清作为肠腔上清液(LAs),置于 -80 ℃保存,待提取 EVs 及相关分析。

1.2 EVs 分离 将保存于 -80 ℃的肠腔上清液置于冰上溶解后,在预冷至 4 ℃的超速离心机中以 10 000 × g 转速离心 90 min;弃上清,1 × 磷酸盐缓冲液(PBS)重悬沉淀,即为 EVs 混悬液(所有 PBS 缓冲液均用 0.22 μm 滤膜过滤)。

1.3 SW-480 细胞系细胞培养 人结肠上皮细胞系 SW-480 培养于 37 ℃、5% CO_2 细胞培养箱中,细胞融合率为 90% 左右时用 0.5 g/L 胰蛋白酶洗脱收集,预冷 PBS 离心洗涤后换新鲜配置的 RPMI-1640[含 10% 胎牛血清(FBS),1% 青霉素与链霉素]培养基继续培养。用于实验前细胞先用不含 FBS 的培养基过夜培养,随后分别与健康受试者 EVs(HC-EVs)和 IBD 患者 EVs(IBD-EVs)共同孵育 24 h,去除游离 EVs,收集细胞和上清,待做进一步的基因或蛋白检测。

1.4 人外周血巨噬细胞分离及培养 采集受试者新鲜外周抗凝血,用 Ficoll(Sigma-Aldrich)密度梯度离心法分离外周血单核细胞,预冷 PBS(含 2% FBS)洗涤并重悬细胞;40 μm 滤网过滤后细胞计数,用 CD14 磁珠(美天旎,荷兰)分选 2×10^8 个外周单个核细胞:加 200 μl CD14 抗体至细胞混悬液中,移液器轻柔的上下吹打混匀,室温孵育 15 min,加 100 μl 磁珠,充分混匀后室温静置 10 min;分选柱置于磁场后用分选液预处理 5 min,随后加入细胞混悬液,2 ~ 3 倍体积的分选液洗涤后将分选柱从磁场取出,500 μl 分选液洗脱细胞,PBS 洗涤并重悬分选后的细胞。人外周血单个核细胞用 RPMI-1640(含 10% FBS 及 1% 青/链霉素,10 ng/ml M-CSF)培养基于 37 ℃,5% CO_2 细胞培养箱培养 5 d,诱导人成熟巨噬细胞。

1.5 细胞迁移实验 采用 5 μm 孔径聚碳酸酯膜的

trans-well 小室(Costar, Cambridge, MA)进行试验。上层小室接种 100 μl 5×10^4 巨噬细胞(培养液中不含 FBS),下层小室为纯化的 600 μl 患者来源 EVs 或者来源 EVs 处理过的 SW-480 细胞(培养液中不含 FBS)。本次实验以上层小室接种 100 μl 5×10^4 巨噬细胞(培养液中不含 FBS),下层小室加入 10% FBS 的培养基为阳性对照,以下层小室加入不含 FBS 的培养基为阴性对照。将处理好 trans-well 小室置于 37 ℃、5% CO_2 细胞培养箱 10 h;取出上层小室,PBS 清洗两遍,用棉棒轻柔擦除小室内层细胞,将小室置于 4% 多聚甲醛固定 1 h,PBS 清洗两遍,小室用结晶紫染色后倒扣于正置显微镜下观察并拍照记录,计数跨膜细胞,计算其迁移率。

1.6 细胞吞噬 收集并分离受试者肠腔内容物中 EVs,加入 5 μl 核酸染料吖啶橙,室温避光孵育 5 min,PBS 缓冲液洗涤两次清除多余染料;标记的 EVs 与 SW-480 细胞共培养 4 h,或与人外周血来源的巨噬细胞共培养 10 h,流式细胞术检测细胞内吖啶橙荧光强度。

1.7 实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测 EVs 中细胞因子转录表达水平 收集并分离受试者肠腔内容物 EVs,使用 exoRNeasy Serum/Plasma Maxi Kit(QIAGEN,德国)提取 EVs 总 RNA,反转录试剂盒(TAKARA,日本)将其反转为 cDNA。荧光定量 PCR 采用 SYBR® Green(东洋纺)实时荧光定量 PCR 试剂盒,在 Applied Biosystems StepOnePlusTM 实时荧光定量 PCR 仪上检测目的基因 Ct 值。PCR 反应条件为 95 ℃预变性 5 min→(95 ℃变性 15 s→58 ℃退火 30 s→72 ℃延伸 30 s)(共 40 个循环)→72 ℃10 min→4 ℃保持。qRT-PCR 结果采用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 方法计算,根据得到各个基因的 Ct 值,以 GAPDH 作为内参,$\triangle\triangle Ct = \triangle Ct_{试验样品} - \triangle Ct_{对照}$;$\triangle Ct_{试验样品} = Ct_{试验样品} - Ct_{GAPDH}$;$\triangle Ct_{对照} = Ct_{对照} - Ct_{GAPDH}$。

1.8 ELISA 法检测细胞因子蛋白水平 收集并分离受试者肠腔内容物 EVs,加裂解液(1 × PBS,1% Triton-100,蛋白酶抑制剂)冰上裂解 15 min,离心收集上清待做细胞因子白细胞介素(IL)-6、IL-8、IL-10、肿瘤坏死因子(TNF)-α、转化生长因子(TGF)-β 及黏蛋白(MUC)-2 蛋白含量检测。EVs 中细胞因子检测使用 ELISA 试剂盒(eBioscience 公司)检测。将裂解液及相应标准品加入 ELISA 板中各孔,4 ℃孵育过夜,含 0.5% Tween-20 的 PBS 清洗 3 次后,加入 3% 牛血清白蛋白(BSA)37 ℃封闭 1 h,加入生物素标记的二抗,37 ℃孵育 90 min,用含 0.5% Tween-20 的 PBS 清洗 3 次后,加入显色底物,37 ℃孵育 10 min,终止显色反应。读取 450 nm 和 630 nm 的吸光度(OD),根据标准品 OD 值绘制标准曲线,换算出相应细胞因子浓度。

1.9 统计学方法 所有数据采用 SPSS 19.0 软件进行分析。所有实验均重复 3 次。对正态计量资料采用单因素方差分析及两两比较的 q 检验,对非正态资料采用非参数 Mann-Whitney U 检验。$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 EVs 裂解液中细胞因子 mRNA 相对表达量及蛋白表达水平 比较内镜评分(Endo)≥3 分、Endo < 3 分的 IBD 患者及 HC 组的肠腔 EVs 细胞因子含量及 mRNA 表达水平。其中,Endo≥3 分组和 Endo < 3 分组 IL-6、IL-8、IL-10、TNF-α、TGF-β 及 MUC-2 mRNA 和蛋白表达水平比较无统计学差异($P > 0.05$),而 Endo≥3 分组和 Endo < 3 分组 IL-6、IL-8、IL-10 及 TNF-α mRNA 和蛋白表达水平高于 HC 组,TGF-β 及 MUC-2 mRNA 和蛋白表达水平低于 HC 组($P < 0.05$,$P < 0.01$)。见表 1、表 2。

2.2 流式细胞仪检测 SW-480 细胞内荧光标记情况 检测结果显示,SW-480 中阳性细胞群占 90% 以上。

2.3 结肠上皮细胞吞噬肠腔 EVs 后细胞因子 mRNA 相对表达量和蛋白表达水平 结果显示,与 HC-EVs 共培养的 SW-480 细胞中 IL-6、IL-8、TNF-α 的 mRNA 和蛋白表达水平均显著高于与 IBD-EVs 共培养的 SW-480,其中,PBS 加入 SW-480 为阴性对照。见表 3、表 4。

2.4 巨噬细胞吞噬肠腔 EVs 后细胞因子表达变化及肠腔 EVs 对巨噬细胞迁移的影响 IBD 患者 EVs 与巨噬细胞共培养后促进了巨噬细胞内 IL-6、IL-8、TNF-α 表达。见表 5、6。以 5% PBS(1 ± 0.001)为阳性对照,FBS 组、HC-EVs 组、IBD-EVs 巨噬细胞迁移率分别为(3.2 ± 0.3)%、(0.9 ± 0.1)% 和(2.9 ± 0.5)%,四组间比较差异有统计学意义($F = 49.56$,$P = 0.000$),其中 FBS 组、IBD-EVs 组高于 PBS 组,IBD-EVs 组高于 HC-EVs 组($P < 0.05$)。

表 1 EVs 裂解液中细胞因子 mRNA 相对表达量 ($n=20, \bar{x} \pm s$)

组别	IL-6	IL-8	IL-10	TNF-α	TGF-β	MUC-2
HC 组	3.90 ± 1.50	4.98 ± 1.47	1.56 ± 0.43	3.57 ± 0.93	1.29 ± 0.23	1.57 ± 0.23
Endo < 3 分组	165.30 ± 21.60**	274.83 ± 39.28**	18.39 ± 2.49**	73.39 ± 19.49**	0.39 ± 0.08*	0.02 + 0.00**
Endo ≥ 3 分组	147.90 ± 19.60**	204.86 ± 31.95**	16.37 ± 2.04**	62.37 ± 14.05**	0.18 ± 0.05*	0.01 ± 0.00**
F 值	138.40	114.70	119.90	36.58	86.78	233.00
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.035	0.000

注：与 HC 组相比，* $P<0.05$，** $P<0.01$。

表 2 EVs 裂解液中细胞因子蛋白水平 ($n=20$, pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	IL-6	IL-8	IL-10	TNF-α	TGF-β	MUC-2
HC 组	20.43 ± 2.95	2.85 ± 0.77	2.56 ± 0.42	3.56 ± 0.92	19.59 ± 2.33	1.570 ± 0.220
Endo < 3 分组	438.58 ± 57.30**	49.8 ± 11.27**	28.38 ± 6.48**	43.38 ± 9.48**	5.38 ± 2.48 *	0.019 ± 0.003**
Endo ≥ 3 分组	398.45 ± 49.94**	36.85 ± 9.94**	20.37 ± 4.05**	47.37 ± 11.04**	3.18 ± 0.95**	0.011 ± 0.002**
F 值	138.00	38.96	44.69	41.35	95.34	233.0
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注：与 HC 组相比，* $P<0.05$，** $P<0.01$。

表 3 结肠上皮细胞吞噬肠腔 EVs 后细胞因子 mRNA 相对表达量变化 ($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	IL-6	IL-8	TNF-α
PBS 组	1.80 ± 0.53	1.98 ± 0.47	1.46 ± 0.91
HC-EVs 组	2.48 ± 0.92	4.58 ± 0.72	1.12 ± 0.97
IBD-EVs 组	47.92 ± 7.50*#	81.83 ± 16.90*#	19.37 ± 3.04*#
F 值	115.00	76.09	79.40
P 值	0.000	0.000	0.000

注：与 PBS 组相比，* $P<0.05$；与 HC-EVs 组相比，# $P<0.05$。

表 4 结肠上皮细胞吞噬肠腔 EVs 后细胞因子蛋白水平变化 ($n=10$, pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	IL-6	IL-8	TNF-α
PBS 组	20.48 ± 9.53	19.98 ± 6.47	5.56 ± 2.92
HC-EVs 组	29.28 ± 7.38	21.38 ± 5.97	7.12 ± 0.97
IBD-EVs 组	491.90 ± 53.56**#	149.83 ± 31.90**#	37.37 ± 8.04*#
F 值	341.90	57.28	38.08
P 值	0.000	0.000	0.000

注：与 PBS 组相比，* $P<0.05$，** $P<0.01$。与 HC-EVs 组相比，# $P<0.05$。

表 5 巨噬细胞吞噬肠腔 EVs 后细胞因子 mRNA 相对表达量变化 ($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	IL-6	IL-8	TNF-α
PBS 组	1.90 ± 0.50	1.98 ± 0.47	1.56 ± 0.92
HC-EVs 组	12.48 ± 3.12	3.58 ± 0.72	3.12 ± 0.97
IBD-EVs 组	103.92 ± 12.50*#	132.83 ± 31.90*#	52.37 ± 8.00*#
F 值	105.70	46.47	131.20
P 值	0.000	0.000	0.000

注：与 PBS 组相比，* $P<0.05$；与 HC-EVs 组相比，# $P<0.05$。

表 6 巨噬细胞吞噬肠腔 EVs 后细胞因子蛋白水平表达变化 ($n=10, \bar{x} \pm s$, pg/ml)

组别	IL-6	IL-8	TNF-α
PBS 组	29.48 ± 9.53	49.98 ± 13.47	7.56 ± 2.92
HC-EVs 组	34.28 ± 7.30	59.38 ± 11.90	6.12 ± 0.90
IBD-EVs 组	752.92 ± 83.56*#	214.83 ± 51.94*#	41.37 ± 8.04*#
F 值	281.80	48.78	49.08
P 值	0.000	0.000	0.000

注：与 PBS 组相比，* $P<0.05$；与 HC-EVs 组相比，# $P<0.05$。

3 讨 论

本研究结果表明 EVs 所含细胞因子的 mRNA 水平在不同内镜评分的 IBD 患者中有显著差异，从而提示 EVs 可在一定程度上反映疾病活性程度。此外在 IBD 病理进程中，由于释放入肠腔中的 EVs 可被上皮细胞和巨噬细胞吞噬，导致 IL-6、IL-8 等炎症因子水平上升，且还可促进巨噬细胞的迁移，这可能参与了肠黏膜局部炎症的进展。

目前研究表明 EVs 在各种初始来源的细胞中起多样化的作用。如血清中 EVs 的 mRNA[16] 和蛋白谱[17] 可作为临床诊断及鉴别肿瘤类型的依据。由于黏膜表层存在多种细胞的交互作用，那么肠腔可以为 IBD 疾病特异性 EVs 提供丰富来源，且共生菌也可释放大量信号微粒[18-19]，此外，树突状细胞及调节性 T 细胞 Treg 亦可释放大量抗炎活性的囊泡[20-21]。本研究表明肠腔液中 EVs 所含的 mRNA 非常稳定，该特性可能作为将来诊断肠炎的一种有效的且非侵入性的手段。尽管目前已有研究证明粪便中的钙卫蛋白和血清中的 C 反应蛋白与 IBD 的内镜评分有相关性，但并未提供任何特异炎症通路在个体中占优势的证据。本研究结果提示 EVs 可在一定程度反映炎症发生部位的来源细胞，使它们成为通路特异性药物的潜在诊断依据。

在不同内镜评分等级患者间检测到 mRNA 差异表达谱，观察到 EVs mRNA 在肠腔液中具有稳定性，提示 EVs 在评估疾病严重程度中具有潜在的地位。此外，还有关于利用 EVs 作为治疗介质的动物实验报道[22]。因此，EVs 可能对未来的 IBD 治疗手段有重要意义。

此外，本研究结果表明具有特定的功能分子如细

胞因子及一些细胞因子的 mRNA 由于被包裹在 EVs 中而受到保护，通过检测总蛋白或总 mRNA 表达量可作为预测疾病程度的诊断方式，但其在临床应用前需要做更多的测试以确保其准确性。另外，肠腔分泌液中包含各种细胞来源的 EVs，结果提示这些 EVs 多数来源于中性粒细胞，但也有可能来源于 IBD 患者上皮细胞、淋巴细胞及肠腔中的微生物，因此，进一步寻找并区分这些 EVs 的来源也非常重要。

综上所述，肠腔是 EVs 的丰富来源，且这些 EVs 中所含的功能性 mRNA 及蛋白对黏膜层细胞具有直接或间接作用，提示需要进一步的研究将 EVs 与疾病发病机制联系起来，并进一步明确可作为生物标记物的特异性通路。

参考文献

[1] Thaiss CA, Zmora N, Levy M, et al. The microbiome and innate immunity[J]. Nature, 2016, 535(7610): 65 - 74.

[2] Mondot S, Lepage P, Seksik P, et al. Structural robustness of the gut mucosal microbiota is associated with Crohn's disease remission after surgery[J]. Gut, 2016, 65(6): 954 - 962.

[3] Rehman A, Rausch P, Wang J, et al. Geographical patterns of the standing and active human gut microbiome in health and IBD[J]. Gut, 2016, 65(2): 238 - 248.

[4] 杨晓鸥，钱家鸣，杨红，等. 粪便钙卫蛋白对炎症性肠病和肠易激综合征的鉴别诊断价值研究[J]. 临床消化病杂志，2011，23(5)：259 - 262.

[5] Coumans FAW, Brisson AR, Buzas EI, et al. Methodological guidelines to study extracellular vesicles[J]. Circ Res, 2017, 120(10): 1632 - 1648.

[6] Carrasco - Ramírez P, Greening DW, Andrés G, et al. Podoplanin is a component of extracellular vesicles that reprograms cell-derived exosomal proteins and modulates lymphatic vessel formation[J]. Oncotarget, 2016, 7(13): 16070 - 16089.

[7] Kerkelä E, Laitinen A, Räbinä J, et al. Adenosinergic immunosuppression by human mesenchymal stromal cells requires co-operation with T cells[J]. Stem Cells, 2016, 34(3): 781 - 790.

[8] Votteler J, Ogohara C, Yi S, et al. Designed proteins induce the formation of nanocage-containing extracellular vesicles[J]. Nature, 2016, 540(7632): 292 - 295.

[9] Arbelaiz A, Azkargorta M, Krawczyk M, et al. Serum extracellular vesicles contain protein biomarkers for primary sclerosing cholangitis and cholangiocarcinoma[J]. Hepatology, 2017, 66(4): 1125 - 1143.

[10] Zijlstra C, Stoorvogel W. Prostasomes as a source of diagnostic biomarkers for prostate cancer[J]. J Clin Invest, 2016, 126(4): 1144 - 1151.

[11] 梁婕，姜勇，刘爱华. 外泌体在呼吸系统疾病诊治中的作用[J]. 国际呼吸杂志，2015，35(4)：300 - 304.

[12] Rossaint J, Kühne K, Skupski J, et al. Directed transport of neutrophil-derived extracellular vesicles enables platelet-mediated innate immune response[J]. Nat Commun, 2016, 7: 13464.

[13] Morrison TJ, Jackson MV, Cunningham EK, et al. Mesenchymal stromal cells modulate macrophages in clinically relevant lung injury models by extracellular vesicle mitochondrial transfer[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2017, 196(10): 1275 - 1286.

[14] Jiang L, Shen Y, Guo D, et al. Corrigendum: EpCAM-dependent extracellular vesicles from intestinal epithelial cells maintain intestinal tract immune balance[J]. Nat Commun, 2017, 8: 16006.

[15] Kang CS, Ban M, Choi EJ, et al. Extracellular vesicles derived from gut microbiota, especially Akkermansia muciniphila, protect the progression of dextran sulfate sodium-induced colitis[J]. PLoS One, 2013, 8(10): e76520.

[16] Severino V, Dumonceau JM, Delhaye M, et al. Extracellular vesicles in bile as markers of malignant biliary stenoses[J]. Gastroenterology, 2017, 153(2): 495 - 504.

[17] 张浩亮，吴恺，侯智亮，等. 食管鳞状细胞癌血浆外泌体肿瘤标志物的蛋白质组学筛选[J]. 中华实验外科杂志，2016，33(5)：1370 - 1373.

[18] Carrière J, Bretin A, Darfeuille-Michaud A, et al. Exosomes released from cells infected with crohn's disease-associated adherent-invasive escherichia coli activate host innate immune responses and enhance bacterial intracellular replication[J]. Inflamm Bowel Dis, 2016, 22(3): 516 - 528.

[19] Choi HI, Choi JP, Seo J, et al. Helicobacter pylori-derived extracellular vesicles increased in the gastric juices of gastric adenocarcinoma patients and induced inflammation mainly via specific targeting of gastric epithelial cells[J]. Exp Mol Med, 2017, 49(5): e330.

[20] Liu Q, Rojas-Canales DM, Divito SJ, et al. Donor dendritic cell-derived exosomes promote allograft-targeting immune response[J]. J Clin Invest, 2016, 126(8): 2805 - 2820.

[21] Torri A, Carpi D, Bulgheroni E, et al. Extracellular microRNA signature of human helper T cell subsets in health and autoimmunity[J]. J Biol Chem, 2017, 292(7): 2903 - 2915.

[22] Gregorini M, Corradetti V, Pattonieri EF, et al. Perfusion of isolated rat kidney with mesenchymal stromal cells/extracellular vesicles prevents ischaemic injury[J]. J Cell Mol Med, 2017, 21(12): 3381 - 3393.

收稿日期：2018 - 05 - 14 **修回日期**：2018 - 06 - 02 **编辑**：王国品