

DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.02.006

· 基础研究 ·

热激胃癌细胞外泌体致敏 DC 诱导显著的抗肿瘤免疫反应

杨云山¹, 蔡志坚², 钟海均¹ (1. 浙江省肿瘤医院 化疗中心, 浙江 杭州 310022; 2. 浙江大学 免疫学研究所, 浙江 杭州 310058)

[摘要] **目的:** 探讨热激胃癌细胞来源外泌体致敏树突状细胞(dendritic cells, DCs)诱导的肿瘤特异性细胞毒T细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)反应。**方法:** 制备小鼠前胃癌细胞(murine foregastric cancer cells, MFC)来源外泌体(Exo)、热激MFC细胞来源外泌体(Exo/HS)及MFC细胞冻融抗原(lysates, Lys),通过电镜观察外泌体的形态,Western blotting检测外泌体的成分。培养小鼠骨髓来源的DCs,将Exo/HS、Exo和Lys冲击致敏DCs,制备的DCs疫苗分别命名为DC-Exo/HS、DC-Exo和DC-Lys。HSP70小干扰RNA(small interference RNA, siRNA)转染MFC细胞,热激后分离上清,用制备外泌体致敏DCs,流式术检测DCs的表型。以DC-Exo/HS、DC-Exo、DC-Lys、DC和PBS免疫小鼠,³H-TdR法检测脾脏T细胞的增殖,LDH法检测脾细胞CTL活性。建立MFC细胞荷瘤小鼠模型,观察各组DCs疫苗的免疫治疗效应。**结果:** 电镜确认外泌体为膜性小囊泡。Western blotting检测表明,Exo/HS含有高水平的HSP70,流式术发现热激MFC细胞来源外泌体能显著上调DCs表面MHC-II、CD80、CD86和CD40分子的表达,HSP70 siRNA干扰能下调热激MFC细胞来源外泌体刺激的DCs表面MHC-II、CD80、CD86和CD40分子的表达。³H-TdR检测结果显示DC-Exo/HS刺激T细胞增殖的能力显著强于DC-Exo、DC-Lys、DC和PBS组(均 $P < 0.01$),LDH检测结果表明DC-Exo/HS诱导的CTL活性显著高于DC-Exo、DC-Lys、DC和PBS组(均 $P < 0.01$),HSP70 siRNA组诱导的CTL活性显著低于对照siRNA组($P < 0.01$)。免疫治疗结果显示,DC-Exo/HS对荷瘤小鼠的肿瘤抑制效应显著优于其他各组($P < 0.01$)。**结论:** 热激胃癌细胞来源外泌体致敏的DCs能诱导显著的抗肿瘤免疫反应。

[关键词] 热激;胃癌细胞;外泌体;树突状细胞;抗肿瘤免疫

[中图分类号] R730.51; R392.12

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-385X(2016)02-0188-07

Efficient antitumor immune response induced by DC sensitized with heat-shocked gastric cancer cell-derived exosomes

YANG Yunshan¹, CAI Zhijian², ZHONG Haijun¹ (1. Center of Chemotherapy, Cancer Hospital of Zhejiang Province, Hangzhou 310022, Zhejiang, China; 2. Institute of Immunology, Zhejiang University, Hangzhou 310058, Zhejiang, China)

[Abstract] **Objective:** To explore response of tumor-specific cytotoxic T lymphocyte (CTL) induced by dendritic cells (DCs) sensitized with exosomes that derived from heat-shocked gastric cancer cell. **Methods:** exosomes from mice murine foregastric cancer (MFC) cells (Exo), heat-shocked MFC cells (Exo/HS), and lysates (Lys) of MFC cells were prepared, respectively. Morphology of the exosomes was observed by electron microscopy and protein components of the exosomes were detected by Western blotting. DCs generated from murine bone marrow were cultured and sensitized with Exo/HS, Exo and Lys, and the prepared DCs vaccines were termed as DC-Exo/HS, DC-Exo, and DC-Lys, respectively. Also, DCs were sensitized with exosomes from heat-shocked MFC tumor cells that transfected with HSP70 siRNA. Phenotypes of DCs were detected by flow cytometry. Mice were immunized with DC-Exo/HS, DC-Exo, DC-Lys, DC, or PBS respectively; the proliferation of splenic T cells was measured by ³H-TdR and activity of spleen CTL was measured by LDH. MFC cells-bearing mouse models were constructed to examine immunotherapy effects of the DCs vaccines. **Results:** exo-

[基金项目] 浙江省自然科学基金资助项目(No. LY14HY160011)。Project supported by the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (No. LY14HY160011)

[作者简介] 杨云山(1971-),男,云南省威信县人,博士,主要从事肿瘤免疫学的研究,E-mail: yyunshan@sina.com

[通信作者] 钟海均(ZHONG Haijun, corresponding author),E-mail: Zhonghaijun1712@sohu.com

[优先发表] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20160331.2023.012.html>

somes were confirmed as small membranous vesicles with electron microscopy. Detection of Western blotting showed that Exo/HS contained high level of HSP70. Flow cytometry demonstrated that the exosomes from heat-shocked MFC cells could significantly up-regulate expressions of MHC-II, CD80, CD86 and CD40 molecules on the DCs, and interference with *HSP70* siRNA could down-regulate expressions of MHC-II, CD80, CD86 and CD40 molecules on the DCs sensitized with the exosomes from heat-shocked MFC tumor cells. Results of ^3H -TdR showed that proliferation ability of T cells in DC-Exo/HS group was markedly enhanced as compared with those in DC-Exo, DC-Lys, DC and PBS groups ($P < 0.01$). Results of LDH showed that higher level of CTL activity was induced in DC-Exo/HS group as compared with those in DC-Exo, DC-Lys, DC or PBS ($P < 0.01$), and induced CTL activity in *HSP70* siRNA group was significantly lower than that in control siRNA group ($P < 0.01$). Results of the immunotherapies showed that inhibitive effect of DC-Exo/HS on tumor in the carcinoma-bearing mice was significantly better than those of all the other groups ($P < 0.01$). **Conclusion:** DCs sensitized with exosomes that derived from heat-shocked gastric cancer cell could induce efficient antitumor immune response.

[**Key words**] heat-shock; gastric cancer cell; exosomes; DC; antitumor immune

[Chin J Cancer Biother, 2016, 23(2): 188-194. DOI:10.3872/j. issn. 1007-385X. 2016. 02. 006]

树突状细胞(dendritic cells, DCs)是唯一能够活化初始 T 细胞并启动早期免疫反应的一类抗原提呈细胞,是免疫反应的始动者,其通过独特的摄取、加工并向 T 细胞提呈抗原的能力调控免疫应答反应^[1]。由于 DCs 参与调节 T 细胞免疫,因此 DCs 被广泛用于疫苗的研制^[2]。外泌体是各种活细胞分泌的具有脂质双分子层结构的小囊泡,直径介于 40 ~ 100 nm,密度介于 1.11 ~ 1.21 g/ml。晚期内体通过内侧出芽方式,在细胞内生成为多膜囊泡,形成多膜囊泡体,多膜囊泡体与质膜融合,内含的囊泡释放到细胞外,即为外泌体^[3-6]。其中来自肿瘤细胞外泌体含有肿瘤抗原、热激蛋白、抗原提呈分子等重要免疫活性分子,是一种理想的抗原载体^[7-9]。

近来研究^[10]发现,来自肿瘤细胞外泌体致敏的 DCs 能发挥抗肿瘤效应其机制是肿瘤细胞外泌体将其携带的肿瘤抗原传递给 DCs,DCs 通过有效加工处理外泌体来源的肿瘤抗原激发抗肿瘤免疫应答。课题组前期研究^[11-12]发现:热激肿瘤细胞来源外泌体含有较高水平的 HSP70 等分子伴侣,能促进 DCs 成熟,诱导肿瘤特异性 CTL 反应。本研究通过制备热激胃癌细胞分泌外泌体,用其致敏 DCs,制备 DCs 瘤苗,观察其诱导的抗肿瘤免疫应答效应。

1 材料与方法

1.1 实验动物、细胞系和主要试剂

雌性 615 小鼠,H-2KK,6 ~ 8 周龄,购自中国医学科学院血液学研究所实验动物中心[动物合格证编号:SCXK(津)2015-0001]。小鼠前胃癌细胞 MFC 购自中国科学院上海细胞库。抗 TSG101、CD63、HSP70、actin 抗体和 HRP 标记的

羊抗兔二抗购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司,INTERFERin™ siRNA 转染试剂购自上海吉玛制药技术有限公司,化学发光试剂购自美国 Pierce Biotechnology 公司,GM-CSF 和 IL-4 购自美国 Pepro Tech 公司,荧光标记的抗 MHC-II、CD80、CD86、CD40 和 CD11c 抗体购自美国 eBioscience 公司, ^3H -TdR 购自德国 Amersham Pharmacia Biotech 公司,LDH 检测试剂购自美国 BioVision 公司,*HSP70* siRNA 购自美国 Santa Cruz 公司。

1.2 外泌体和冻融抗原的制备

MFC 细胞体外培养 72 h 后,43 ℃ 热激 1 h,于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中恢复 4 h,收集上清液,用于制备外泌体。上清液 4 ℃ 离心:300 × g, 10 min;1 200 × g 30 min;10 000 × g, 30 min;100 000 × g 60 min,所得沉淀即为外泌体。最后,将沉淀重悬于蔗糖密度梯度溶液(1.13 ~ 1.15 g/ml)进一步离心纯化。热激 MFC 细胞分离纯化制备外泌体命名为 Exo/HS,MFC 细胞直接分离纯化制备外泌体命名为 Exo^[13]。MFC 细胞用 PBS 冲洗 2 次,调整细胞密度为 2 × 10⁷/ml,反复冻融(-20 ℃/37 ℃)3 次,离心 300 × g, 1 h,吸取上清液,0.22 μm 微孔膜过滤后作为 MFC 冻融抗原。

1.3 外泌体的电镜观察

将制备外泌体用 2.5% 戊二醛和 1% 锇酸固定,2% 醋酸铀染色,乙醇和无水丙酮脱水,制作超薄切片及染色,最后用 TECN10 透射电镜观察。

1.4 Western blotting 检测外泌体和冻融抗原成分

12% 聚丙烯酰胺电泳分离外泌体和细胞裂解液

蛋白,随后转移到醋酸纤维膜。通过与一抗(抗 HSP70、TSG101、CD63 和 actin 抗体)结合,加入标有辣根过氧化物酶的二抗,经过显影观察膜上蛋白成分。

1.5 小鼠骨髓来源 DCs 的培养

无菌取 615 小鼠股骨,冲洗出骨髓细胞,Tris-NH₄Cl 去除红细胞。PBS 冲洗 2 次后,于 24 孔板(1×10^6 细胞/孔)中培养。加入 GM-CSF (20 ng/ml)、IL-4 (1 ng/ml)培养 2 d,吸去培养基及悬浮细胞,重新加入新鲜培养基及 GM-CSF 和 IL-4,继续培养 3 d。收集的细胞即为小鼠骨髓来源 DCs。

1.6 外泌体体外致敏 DCs

收集制备的小鼠 DCs (5×10^5 /ml),分别加入 Exo/HS (1 g/L)、Exo (1 g/L)、Lys (1 g/L) 和 PBS,于 24 孔培养板中继续培养 24 h。经 Exo/HS、Exo 及 Lys 体外冲击致敏的 DCs 分别命名为 DC-Exo/HS、DC-Exo 和 DC-Lys。

1.7 DCs 表型分析

收集不同处理组 DCs,将 5×10^5 个 DCs 细胞重悬于 100 μ l PBS 中,加入相应剂量的荧光标记抗体抗 MHC-II、CD80、CD86、CD40 和 CD11c 抗体,终质量浓度为 5 g/ml。冰上孵育 30 min,PBS 洗 3 遍后,用流式细胞仪检测,以 CellQuest 软件分析。

1.8 HSP70 RNA 干扰实验

对照 siRNA 和 HSP70 siRNA (40 nmol/L) 双链通过 INTERFERin™ siRNA (3 μ l) 转染试剂分别转入预先铺于 24 孔板的 MFC 细胞 (5×10^5 /500 μ l)。24 h 后,经 43 $^{\circ}$ C 热激 1 h,于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中恢复 4 h,收集细胞并提取上清液中外泌体,通过 Western blotting 法检测在细胞及外泌体中 HSP70 的干扰效率。之后,将纯化外泌体与 DCs 一起孵育 24 h,用流式细胞仪检测 DCs 表型。

1.9 ³H-TdR 法检测 T 细胞的增殖活性

于小鼠右侧腹股沟皮下注射 DC-Exo/HS (5×10^5)、DC-Exo (5×10^5)、DC-Lys (5×10^5) 和 DC (5×10^5) 免疫 615 小鼠 3 次(隔天 1 次),注射 PBS 为阴性对照。在小鼠最后一次免疫后 7 d,取小鼠脾脏细胞浸泡在 RPMI 1640 培养基中,在小钢网上研磨制备单细胞悬液。单细胞悬液经离心去上清,悬浮在 Tris-NH₄Cl 溶液中 5 min,破坏红细胞。用 RPMI 1640 培养基洗 2 遍,随后转移到经醋酸处理过的尼龙毛柱上。在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的培养箱中孵育 5 d 后,收集富含 T 细胞的洗脱液。纯化的 T 细胞 (1×10^6 /ml) 和灭活的 MFC 细胞 (1×10^5 /ml) 共孵育 5 d,在培养结束前加入 ³H-TdR (3.7×10^{10} Bq),

通过液体闪烁计数器测定 T 细胞数量。

1.10 LDH 法检测体外 CTL 的诱导

于右侧腹股沟皮下注射 DC-Exo/HS (5×10^5)、DC-Exo (5×10^5)、DC-Lys (5×10^5) 和 DC (5×10^5) 免疫 615 小鼠 2 次(隔 7 d 1 次),注射 PBS 为阴性对照。最后一次免疫后第 7 天,取小鼠脾细胞 (2×10^7 /ml),加入丝裂霉素灭活的 MFC 细胞 (1×10^6 /ml) 刺激,再加入鼠 IL-2 (20 U/ml) 培养 7 d。淋巴细胞分离液密度梯度离心除去 MFC 细胞,获得经刺激后的小鼠淋巴细胞为效应细胞。靶细胞为 MFC 细胞 (1×10^6 /ml)。LDH 法检测细胞毒活性,检测的效应细胞和靶细胞比分别为 20:1、40:1 和 80:1。将效应细胞和相应靶细胞混合培养 6 h。细胞毒性公式进行计算:特异性裂解 (%) = (实验组 cpm - 自发释放组 cpm) / (最大释放组 cpm - 自发释放组 cpm) $\times 100\%$ 。将 HSP70 siRNA 干扰后热激 MFC 细胞来源外泌体致敏的 DCs (5×10^5) 免疫小鼠,LDH 法检测其细胞毒性。

1.11 DCs 瘤苗对荷瘤小鼠的免疫治疗效应

通过右腋皮下接种 5×10^5 个 MFC 细胞建立荷瘤小鼠模型。肿瘤细胞接种后第 3 天,将 DC-Exo/HS (5×10^5)、DC-Exo (5×10^5)、DC-Lys (5×10^5)、DC (5×10^5) 和 PBS 分别于右侧腹股沟皮下注入荷瘤小鼠,每隔 7 d 免疫 1 次,共 2 次。用游标卡尺测量小鼠肿瘤的长径和宽径,小鼠肿瘤体积按以下公式计算:体积 = $1/2$ 长 \times 宽²。

1.12 统计分析

采用 SPSS 10.0 统计软件,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。用 *t* 检验行统计学分析, $P < 0.05$ 表示有统计学意义。所有实验重复 3 次

2 结果

2.1 热激 MFC 细胞来源外泌体形态鉴定

通过电镜观察发现,分离到外泌体呈小囊泡状,直径介于 40 ~ 100 nm(图 1A)。当放大倍数增大至 100 000 倍时,电镜下可观察到外泌体的双层膜结构,形态学符合外泌体的特征(图 1B)。

2.2 热激上调 MFC 细胞来源外泌体中 HSP70 的表达

Western blotting 结果发现,HS-Exo、Exo 都含有标志性蛋白 CD63、TSG101 和 HSP70。不过,HS-Exo 比 Exo 含有更多的 HSP70 分子(图 2)。结果证实热激能上调外泌体中 HSP70 的表达量。

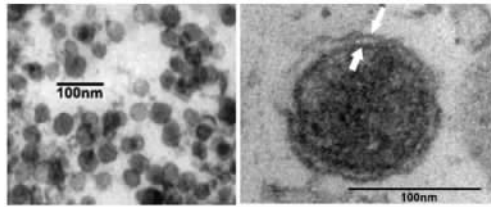


图 1 电镜下观察热激 MFC 细胞来源外泌体

Fig.1 Exosomes derived from heat-shocked MFC cells observed with electromicroscopy

A: Magnification $\times 30\,000$; B: Magnification $\times 100\,000$, bilayer membrane (arrows)

2.3 热激 MFC 细胞来源外泌体上调 DCs 表面 MHC-II、CD80、CD86 和 CD40 分子的表达

用流式细胞仪检测 DCs 结果显示,与 Exo、Lys

和 PBS 相比,HS-Exo 能够显著上调 DCs 表面的 MHC-II、CD80、CD86 和 CD40 分子的表达(图 3)。

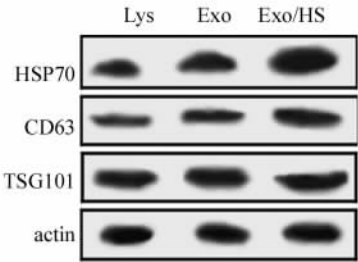


图 2 Western blotting 检测热激 MFC 细胞来源的外泌体中的蛋白组分

Fig.2 Protein compositions of heat-shocked MFC cell-derived exosomes tested by Western blotting

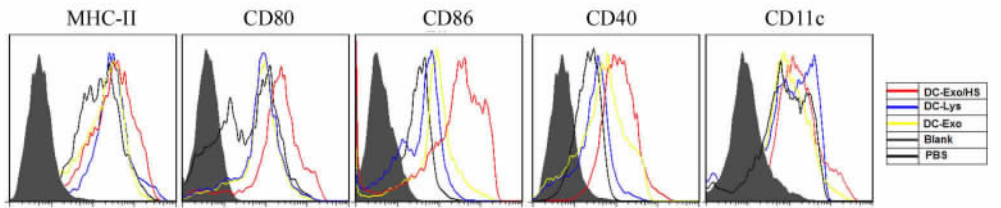


图 3 流式术检测热激 MFC 细胞来源外泌体致敏的 DCs 表面 MHC-II、CD80、CD86、CD40 和 CD11c 分子的表达

Fig.3 Expressions of MHC-II, CD80, CD86, CD40 and CD11c molecules on dendritic cells pulsed with heat-shocked MFC cell-derived exosomes tested by flow cytometry assay

2.4 热激 MFC 细胞来源外泌体通过 HSP70 促进 DCs 表型的成熟

用 Western blotting 检测 MFC 细胞,发现 *HSP70* siRNA 干扰能显著抑制热激 MFC 细胞中 *HSP70* 的表达水平(图 4A)。同样发现 *HSP70* siRNA 干扰能下调热激 MFC 细胞来源外泌体中 *HSP70* 表达水平(图 4B)。用流式细胞仪检测发现,*HSP70* siRNA 干扰后热激 MFC 细胞来源外泌体刺激 DCs 表型成熟的能力比对照 siRNA 干扰组显著下降(图 5)。

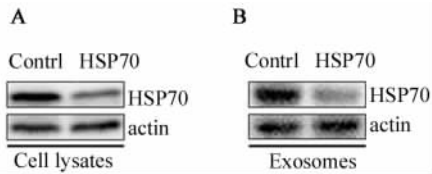


图 4 *HSP70* siRNA 干扰对 MFC 细胞及其外泌体 *HSP70* 表达的影响

Fig 4 Effect of interference with *HSP70* siRNA on expression of *HSP70* in MFC cell and its exosomes

A: Expression of *HSP70* in MFC cells;
B: Expression of *HSP70* in MFC cell-derived 外泌体

2.5 热激 MFC 细胞来源外泌体致敏 DCs 显著刺激 T 细胞增殖

通过热激 MFC 细胞来源外泌体致敏 DCs 刺激 T 细胞增殖实验,检测 DC/Exo-HS 刺激 T 细胞的增殖能力。结果(图 6)表明,与 DC/Exo、DC/Lys、DC 和 PBS 组相比,DC/Exo-HS 能显著刺激 T 细胞增殖 [$(5\,223 \pm 768)$ vs $(3\,357 \pm 321)$ 、 $(2\,412 \pm 325)$ 、 (280 ± 61) 、 (211 ± 52) cpm, $P < 0.01$]。

2.6 热激 MFC 细胞来源外泌体致敏 DCs 显著诱导 CTL 细胞毒性

用 LDH 法检测 DC/Exo-HS 诱导的 CTL 细胞毒性。检测结果(图 7A)表明,DC/Exo-HS 组诱导的 CTL 细胞毒性明显高于 DC/Exo、DC/Lys、DC 和 PBS 组[E:T = 80:1 时, $(57.9 \pm 5.9)\%$ vs $39.7 \pm 4.6\%$ 、 $(27.4 \pm 3.0)\%$ 、 $(4.4 \pm 3.0)\%$ 、 $(4.1 \pm 1.3)\%$, $P < 0.01$]。

进一步检测 *HSP70* siRNA 干扰后热激 MFC 细胞外泌体致敏 DCs 诱导的 CTL 活性。结果(图 7B)发现 *HSP70* siRNA 干扰后热激 MFC 细胞来

源外泌体致敏 DCs 诱导的 CTL 活性比对照 siRNA 干扰组显著下降[(31.4 ± 3.0)% vs (67.3 ± 3.4)% , $P < 0.01$]。

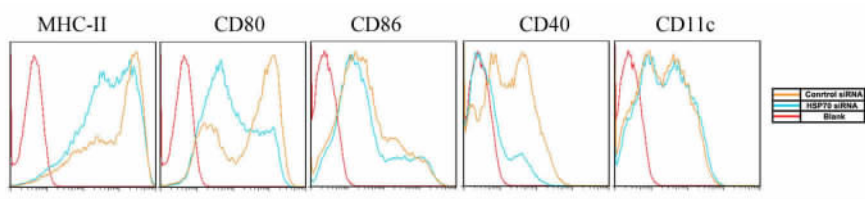


图5 流式术检测 *HSP70* siRNA 干扰后热激 MFC 细胞来源外泌体致敏的 DCs 表面 MHC- II、CD80、CD86、CD40 和 CD11c 分子的表达

Fig. 5 Expression of MHC- II, CD80, CD86, CD40 and CD11c molecules on dendritic cells pulsed with exosomes from heat-shocked MFC cells transfected with *HSP70* siRNA tested by flow cytometry assay

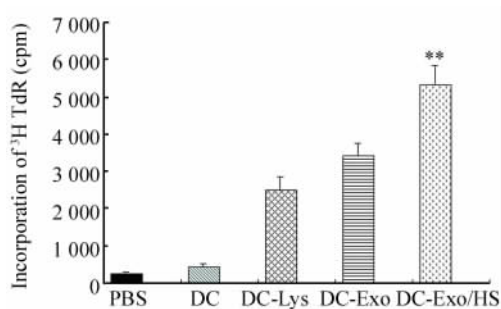


图6 热激 MFC 细胞来源外泌体致敏 DCs 刺激 T 细胞增殖的能力

Fig. 6 Proliferation ability of T cells stimulated by dendritic cells pulsed with heat-shocked MFC cell-derived exosomes

** $P < 0.01$ vs DC-Exo, DC-Lys, DC or PBS, respectively

2.7 热激 MFC 细胞来源外泌体致敏 DCs 显著增强荷瘤小鼠的治疗效应

建立 MFC 细胞荷瘤小鼠模型, 观察热激 MFC 细胞来源外泌体冲击 DCs 对荷瘤小鼠的治疗作用。结果(图8)发现 DC/HS-Exo 组荷瘤小鼠的肿瘤体积与 DC/Exo、DC/Lys、DC 和 PBS 组相比, DC/HS-Exo 免疫对 MFC 细胞荷瘤小鼠的肿瘤抑制效应最为显著, 差异具有统计学意义($P < 0.01$)。

3 讨论

外泌体含有 mRNA、microRNA 和蛋白质, 能在供体细胞和受体(靶)细胞之间“穿梭”, 将供体细胞的 mRNA、microRNA 和蛋白质转移给受体细胞, 实现信息交流和传递, 从而影响受体细胞的生物学行为^[14-15]。肿瘤细胞来源外泌体含有肿瘤抗原、HSP70、MHC-II 等重要免疫活性分子^[7]。来自肿瘤细胞外泌体通过与 DCs 互动交流, 将其含有的抗原

信息经 DCs 传递至 T 细胞, 参与肿瘤的免疫应答。研究证实, 肿瘤细胞来源外泌体致敏的 DCs 能诱导抗肿瘤免疫效应^[10]。

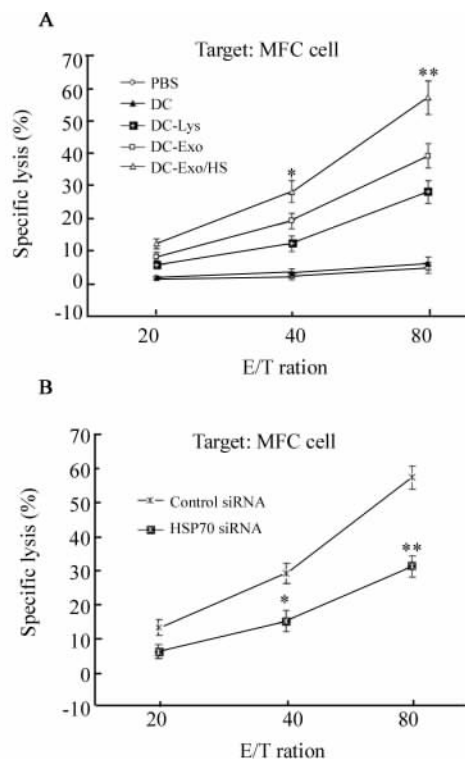


图7 热激 MFC 细胞来源外泌体致敏 DCs 诱导的 CTL 杀伤活性

Fig. 7 CTL activity induced by dendritic cells pulsed with heat-shocked MFC cell-derived exosomes

A: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs DC-Exo, DC-Lys, DC or PBS, respectively;

B: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Control siRNA

本研究发现, 与未经热激 MFC 细胞来源外泌体

致敏 DCs 相比,热激 MFC 细胞来源外泌体致敏 DCs 高表达 MHC-II、CD80、CD86 和 CD40 分子,能显著刺激 T 细胞增殖,有效诱导肿瘤特异性 CTL 反应。

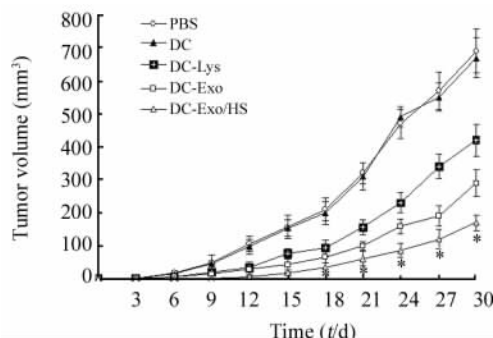


图 8 热激 MFC 细胞来源外泌体致敏的 DCs 对荷瘤小鼠的治疗效应

Fig. 8 Therapeutic effects of dendritic cells pulsed with heat-shocked MFC cell-derived exosomes in mouse model with tumor

* $P < 0.01$ vs DC-Exo, DC-Lys, DC or PBS, respectively

热激 MFC 细胞来源外泌体致敏 DCs 比未经热激 MFC 细胞来源外泌体致敏 DCs 能更有效地启动抗肿瘤免疫应答,其主要机制可能与经热激肿瘤细胞来源外泌体高表达 HSP70 相关。HSP 作为分子伴侣,参与肿瘤抗原的加工、提呈^[16-17]。DCs 作为功能最强大的抗原提呈细胞,要激活“初始”T 细胞必须自身是成熟的 DCs。而 HSP 能作用于 DCs,促进 DCs 的表型和功能成熟,诱导 DCs 分泌促炎细胞因子和趋化因子,增强 DCs 的抗原提呈能力^[16]。已有研究发现:热激小鼠胸腺瘤细胞(E. G7-OVA)^[11]、小鼠淋巴瘤细胞(A20)^[18]、小鼠肺癌细胞(3LL)^[19]、人结肠癌细胞(LS-174T)^[20],以及胃癌患者腹水来源外泌体^[12]比未经热激肿瘤细胞来源外泌体表达更高水平的 HSP70,具有更强的免疫原性,能更有效地诱导 DCs 表型和功能成熟。这些研究表明,热激肿瘤细胞来源外泌体表达的高水平 HSP70 有促进 DCs 成熟、增强外泌体免疫原性的作用。

本研究发现:热激 MFC 细胞来源外泌体能显著上调 DCs 表面 MHC-II、CD80、CD86 和 CD40 分子的表达,而 HSP70 siRNA 干扰能下调热激 MFC 细胞来源外泌体刺激 DCs 的表面 MHC-II、CD80、CD86 和 CD40 分子表达,同时 HSP70 siRNA 干扰后热激 MFC 细胞来源外泌体致敏 DCs 诱导的 CTL 活性显著下降。表明热激 MFC 细胞来源外泌体通过

HSP70 促进 DCs 表型成熟,经热激 MFC 细胞来源外泌体致敏 DCs 能诱导有效的 CTL 反应,激发显著的抗肿瘤免疫应答。

热激肿瘤细胞来源外泌体是一种膜性囊泡,自身携带肿瘤抗原,可作为抗原载体。目前常用的肿瘤抗原来源包括:全细胞抗原、抗原肽、凋亡小体、肿瘤细胞来源的 mRNA、通过基因工程构建的抗原基因等。与以上肿瘤抗原来源相比,热激肿瘤细胞来源外泌体作为抗原载体具有一些独有的特性:(1)高水平的 HSP70 等热激相关蛋白能够显著增强外泌体的免疫原性,活化 DCs,增强其提呈肿瘤抗原的能力;(2)热激肿瘤细胞来源外泌体为脂质双层膜结构,具有稳定性高、不易降解、易储存和运输的优点;(3)热激肿瘤细胞来源外泌体不含基因修饰的载体及具潜在危险的佐剂,有制备方法相对简单、安全性高、利于推广应用的特点。可见,热激肿瘤细胞来源外泌体是一种有效、经济而又广谱的抗原载体。

总之,本研究发现热激 MFC 细胞来源外泌体富含 HSP70,能促进 DCs 的成熟、增强 DCs 的抗原提呈功能,用其冲击致敏的 DCs 能刺激 T 细胞的增殖,诱导肿瘤特异性的 CTL 反应,具有显著的抗肿瘤效应,为 DCs 瘤苗的开发提供了新的思路。

[参考文献]

- [1] BANCHEREAU J, BRIERE F, CAUX C, et al. Immunobiology of dendritic cells [J]. Annu Rev Immunol, 2000, 18: 767-811. DOI: 10.1146/annurev.immunol.18.1.767.
- [2] PALUCKA K, BANCHEREAU J. Cancer immunotherapy via dendritic cells [J]. Nat Rev Cancer, 2012, 12(4): 265-277. DOI: 10.1038/nrc3258.
- [3] ROBBINS P D, MORELLI A E. Regulation of immune responses by extracellular vesicles [J]. Nat Rev Immunol, 2014, 14(3): 195-208. DOI: 10.1038/nri3622.
- [4] CAI Z, YANG F, YU L, et al. Activated T cell exosomes promote tumor invasion via Fas signaling pathway [J]. J Immunol, 2012, 188(12): 5954-5961. DOI: 10.4049/jimmunol.1103466.
- [5] YU L, YANG F, JIANG L, et al. exosomes with membrane-associated TGF- β 1 from gene-modified dendritic cells inhibit murine EAE independently of MHC restriction [J]. Eur J Immunol, 2013, 43(9): 2461-2472. DOI: 10.1002/eji.201243295.
- [6] CAI Z, ZHANG W, YANG F, et al. Immunosuppressive exosomes from TGF- β 1 gene-modified dendritic cells attenuate Th17-mediated inflammatory autoimmune disease by inducing regulatory T cells [J]. Cell Res, 2012, 22(3): 607-710. DOI:10.1038/cr.2011.196.
- [7] WOLFERS J, LOZIER A, RAPOSO G, et al. Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming [J]. Nat Med, 2001, 7(3): 297-303. DOI: 10.1038/85438.

- [8] 杨云山, 钟海均, 曹雪涛. exosomes 与肿瘤治疗的研究进展 [J]. 中国肿瘤, 2008, 17(1): 38-40. DOI: 1004- 0242(2008) 01- 0038- 03.
- [9] 杨云山, 钟海均, 林能明. 肿瘤细胞来源的 exosomes 的研究进展 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2014, 21(4): 477-481. DOI: 10.3872/j. issn. 1007-385X. 2014. 04. 022.
- [10] GU X, ERB U, BÜCHLER M W, et al. Improved vaccine efficacy of tumor exosome compared to tumor lysate loaded dendritic cells in mice [J/OL]. Int J Cancer, 2015, 136(4): E74-E84 [2015-10-09]. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ijc.29100/abstract>.
- [11] 钟海均, 杨云山, 马胜林, 等. 热激 E. G7-OVA 肿瘤细胞来源 exosomes 的抗肿瘤作用 [J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2010, 30(2): 164-168. DOI:10.3760/cma.j. issn. 0254-5101. 2010. 02. 014.
- [12] ZHONG H, YANG Y, MA S, et al. Induction of a tumour-specific CTL response by exosomes isolated from heat-treated malignant ascites of gastric cancer patients [J]. Int J Hyperthermia, 2011, 27(6): 604-611. DOI: 10.3109/02656736. 2011. 564598.
- [13] YANG Y, CHEN Y, ZHANG F, et al. Increased anti-tumour activity by exosomes derived from doxorubicin-treated tumour cells via heat stress [J]. Int J Hyperthermia, 2015, 31(5): 498-506. DOI: 10.3109/02656736. 2015. 1036384.
- [14] VALADI H, EKSTRÖM 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. DOI: 10.1038/ncb1596.
- [15] SKOG J, WÜRDINGER T, VAN RIJN S, et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers [J]. Nat Cell Biol, 2008, 10(12): 1470-1476. DOI: 10.1038/ncb1800.
- [16] BINDER R J. Functions of heat shock proteins in pathways of the innate and adaptive immune system [J]. J Immunol, 2014, 193(12): 5765-5771. DOI:10.4049/jimmunol.1401417.
- [17] CHEN T, GUO J, HAN C, et al. Heat shock protein 70, released from heat-stressed tumor cells, initiates antitumor immunity by inducing tumor cell chemokine production and activating dendritic cells via TLR4 pathway [J]. J Immunol, 2009, 182(3): 1449-1459. DOI:10.4049/jimmunol.182.3.1449.
- [18] CHEN W, WANG J, SHAO C, et al. Efficient induction of antitumor T cell immunity by exosomes derived from heat-shocked lymphoma cells [J]. Eur J Immunol, 2006, 36(6): 1598-1607. DOI: 10.1002/eji.200535501.
- [19] CHEN T, GUO J, YANG M, et al. Chemokine-containing exosomes are released from heat-stressed tumor cells via lipid raft-dependent pathway and act as efficient tumor vaccine [J]. J Immunol, 2011, 186(4): 2219-2228. DOI: 10.4049/jimmunol.1002991.
- [20] DAI S, WAN T, WANG B, et al. More efficient induction of HLA-A*0201-restricted and carcinoembryonic antigen (CEA)-specific CTL response by immunization with exosomes prepared from heat-stressed CEA-positive tumor cells [J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(20): 7554-7563. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-05-0810.

[收稿日期] 2015 - 10 - 16

[修回日期] 2016 - 02 - 24

[本文编辑] 宋关鸿

• 读者 • 作者 • 编者 •

坚决贯彻执行国家七部委联合发布的《发表学术论文“五不准”》的规定

为弘扬科学精神,加强科学道德和学风建设,抵制学术不端行为,端正学风,维护风清气正的良好学术生态环境,重申和明确科技人员在发表学术论文过程中的科学道德行为规范,中国科协、教育部、卫生计生委、中科院、工程院和自然科学基金委等七部委联合下发了《发表学术论文“五不准”》的通知。本刊坚决贯彻执行“五不准”规定,加强对学术论文学术不端行为的审查和处罚措施。希望广大科技工作者、读者和作者,以及本刊的编委专家、审稿专家和相关工作人员都应加强学术道德自律,共同努力,捍卫学术尊严,维护良好学风。现将发表学术论文“五不准”摘录如下:

1. 不准由“第三方”代写论文。科技工作者应自己完成论文撰写,坚决抵制“第三方”提供论文代写服务。
2. 不准由“第三方”代投论文。科技工作者应学习、掌握学术期刊投稿程序,亲自完成提交论文、回应评审意见的全过程,坚决抵制“第三方”提供论文代投服务。
3. 不准由“第三方”对论文内容进行修改。论文作者委托“第三方”进行论文语言润色,应基于作者完成的论文原稿,且仅限于对语言表达方式的完善,坚决抵制以语言润色的名义修改论文的实质内容。
4. 不准提供虚假同行评审人信息。科技工作者在学术期刊发表论文如需推荐同行评审人,应确保所提供的评审人姓名、联系方式等信息真实可靠,坚决抵制同行评审环节的任何弄虚作假行为。
5. 不准违反论文署名规范。所有论文署名作者应事先审阅并同意署名发表论文,并对论文内容负有知情同意的责任;论文起草人必须事先征求署名作者对论文全文的意见并征得其署名同意。论文署名的每一位作者都必须对论文有实质性学术贡献,坚决抵制无实质性学术贡献者在论文上署名。

(本刊编辑部)