

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2007)06-0553-04

卵巢癌患者 exosomes 来源初探

李奇灵¹, 孙阳珍², 于月成³, 方 静¹, 张媛丽¹, 辛晓燕³ (¹ 西安交通大学医学院第一附属医院妇产科, 陕西 西安 710061, ² 西安市黄河医院妇产科, 陕西 西安 710043, ³ 第四军医大学西京医院妇产科, 陕西 西安 710033)

Comparison of extraction methods of exosomes from patients with ovarian cancer

LI Qi-Ling¹, SUN Yang-Zhen², YU Yue-Cheng³, FANG Jing¹, ZHANG Yuan-Li¹, XIN Xiao-Yan³

¹Department of Gynecology and Obstetrics, First Affiliated Hospital, Medical College, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China, ²Department of Gynecology and Obstetrics, Xi'an Huanghe Hospital, Xi'an 710043, China, ³Department of Gynecology and Obstetrics, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China

【Abstract】 AIM: To compare the extraction methods of exosomes from tissue or ascites of an advanced ovarian cancer patient, to detect the expression of exosomes of two source, and to explore the best pathway of acquiring exosomes. METHODS: The tissue of ovarian cancer was taken and the cancer cells were separated and cultured. The cell culture supernatant was collected. The ascites was collected from the same patient. The exosomes were extracted by ultracentrifugation and ultrafiltration from the cell culture supernatant and the ascites and were examined under electron microscope. HSP70, HSP90, MHC class I molecule and MHC class II molecule on exosomes were tested by Western blotting. The protein concentration of exosomes was tested by BCA method. RESULTS: The time for the centrifugation of ascites was longer than that of supernatant. The exosomes could be obtained from all of the supernatants and the ascites with cancer cells, not from the ascites without cancer cells. The exosomes expressed MHC class I molecule, HSP70 and HSP90 except MHC class II molecule. The protein concentration of exosomes in the ascites was higher than that of the supernatant of cell culture ($P < 0.05$). CONCLUSION: Ascites is a better source of exosomes for the ovarian cancer patient with malignant effusion with positive cancer cells. The exosomes can be extracted from ovarian cancer tissue for the patients without ascites or with

ascites in which cancer cells are negative.

【Keywords】 exosomes; ascites; ovarian neoplasms; cell culture techniques

【摘要】目的:同一晚期卵巢癌患者,对组织来源和腹水来源的 exosomes 进行方法和数量的比较,探讨获得卵巢癌患者 exosomes 的最佳途径。方法:收集晚期卵巢癌患者卵巢癌组织,分离癌细胞进行培养,留上清液,取同一患者的腹水,通过超速离心和超滤等方法提取上清液及腹水中的 exosomes,电镜下检测;Western Blot 测定 exosomes 上 HSP70, HSP90, MHC I 类分子和 MHC II 类分子的表达;用 BCA 蛋白测定法测定 exosomes 的蛋白浓度,计算蛋白总含量。结果:腹水离心时间比上清液离心时间长,所有细胞培养上清液和癌细胞阳性的腹水均能分离出 exosomes,癌细胞阴性的腹水中未分离出 exosomes,两种来源的 exosomes 共同表达 MHC I 类分子、HSP70 和 HSP90 均不表达 MHC II 类分子,腹水中分离出来的 exosomes 蛋白含量比细胞培养上清液的含量高($P < 0.05$)。结论:腹水中癌细胞阳性的患者,腹水是 exosomes 的比较理想的来源,无腹水或腹水中癌细胞阴性的患者,exosomes 可来源于卵巢癌组织。

【关键词】 exosomes 腹水 卵巢肿瘤 细胞培养技术

【中图分类号】 R737.31 **【文献标识码】** A

0 引言

exosomes 是许多种细胞都能分泌的直径 30 ~ 90 nm 的小囊泡,由蛋白质和脂质组成的亚细胞器。近年来,癌症患者的肿瘤细胞和树突状细胞(dendritic cell, DC)分泌的 exosomes,由于它携带所分泌细胞的一些抗原信息,被作为肿瘤特异性抗原的来源,用于恶性肿瘤免疫治疗^[1-2]的研究。由 DC 分泌的 exosomes 已经在黑色素瘤和非小细胞肺癌进入了临床 I 期试验^[3],但 exosomes 在卵巢癌中的研究进展较慢。本研究我们对晚期卵巢癌患者组织来源和腹水来源的 exosomes 分离方法、获得量比较,探讨卵巢癌患者最佳 exosomes 来源途径。

1 对象和方法

1.1 对象 选择 2005-01/2005-12 在西安交通大学第一附属医院妇产科住院的原发性卵巢癌患者 15 例,年龄(53 ± 6)岁。临床分期 III ~ IV 期,均伴有腹

收稿日期 2006-11-07; 接受日期 2006-12-18

基金项目 陕西省科学技术研究发展计划 [2006K09-G1(10)]

通讯作者:辛晓燕. Tel: (029) 84775387 Email: gynobs@fmmu.edu.cn

作者简介:李奇灵. 博士生(导师辛晓燕),主治医师. Tel: (029)

81265877 Email: zhaolanbo@126.com

水、腹水中查出癌细胞者 10 例(10/15)、腹水中癌细胞阴性者 5 例(5/15)。取标本前未经化疗,均为第一次剖腹探查,术中无菌操作留取卵巢癌组织,术前或术中留取腹水。术后病理诊断,浆液性囊腺癌 9 例,黏液性囊腺癌 6 例。

99.93% 重水购自 Sigma 公司;RPMI1640 培养液购自 Gibco 公司;Centriplus 离心超滤管(100KDa)、Amicon Ultra 高回收率高流速切向流超滤离心管(100KDa)购自美国 Millipore 公司;兔抗人热休克蛋白(HSP70)多克隆抗体、兔抗人 HSP90 多克隆抗体购自武汉博士德生物工程公司;鼠抗人 MHC I 类分子(HLA-ABC)mAb、鼠抗人 MHC II 类分子(HLA-DR)mAb 购自华美公司;Western Blot 试剂盒(包括酶标记二抗、A 液和 B 液)购自 Pierce 公司;BCA 蛋白浓度测定试剂盒,购自碧云天生物技术研究所。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 采用机械分散法获得肿瘤细胞悬液,将肿瘤组织剪成 5~10 mm³ 的小块组织,弃去结缔组织、坏死组织、血管等。轻轻挤压肿瘤组织过 100 目的筛网,悬液再过 200 目筛网,将所得的细胞悬液置于含 2 mmol/L L-谷氨酰胺和青霉素 1×10⁵ U/L、链霉素 100 mg/L 的无血清 RPMI1640 全培养液中,于 37℃ 含 50 mL/L CO₂ 细胞培养箱中常规培养,隔日传代,待细胞生长至对数时期,收集上清液。用 25 g/L 胰酶消化收集细胞,用 PBS 洗涤重悬,调整细胞浓度为 1×10¹⁰/L。实验均用对数生长期的细胞。

1.2.2 exosomes 的获得 分别取腹水和细胞培养上清液,以 300 g 离心 5 min,取上清液;以 800 g 离心 30 min,去沉淀;再以 10 000 g 离心 40 min,取上清液,加入 Centriplus 超滤离心管中,以 1500 g 离心 1 h,取浓缩液。将 30 g/L 的蔗糖/重水垫、浓缩液和 10 mmol/L PBS 依次放入离心管中,低温下以 100 000 g 超速离心 1 h。取出混有 exosomes 的蔗糖/重水垫,10 mmol/L PBS 悬浮,加入 Amicon Ultra 高回收率高流速切向流超滤离心管中,以 1500 g 离心 30 min,重复 3 次。取浓缩液用 10 mmol/L PBS 悬浮成 5 mL,为待测液。记录离心和超滤次数,置于 4℃ 冰箱中保存备用。

1.2.3 exosomes 的鉴定

1.2.3.1 电镜 将待测液各取 20 μL 滴于载样铜网上,于室温静置 1 min;用滤纸从侧面吸干液体,滴加 20 g/L 磷钨酸(pH 6.8)约 30 μL 于铜网上,室温负染 1 min;用滤纸吸干负染液,在白炽灯下烤干后,于透射电镜下观察,并照相。

1.2.3.2 Western Blot 方法 ① 灌制 SDS-PAGE 电泳胶(6% 浓缩胶,12% 分离胶);② 用细胞培养上清

液中 exosomes 阳性的待测液、腹水中 exosomes 阳性的待测液、癌细胞裂解液和腹水中 exosomes 阴性的待测液各 15 μL,上样于四块 PAGE 凝胶的对称位置,恒压 100 V 电泳,至溴芬蓝带泳至胶底以上约 1 cm 处,终止电泳;③ 用电转移装置将蛋白转至 NC 膜上;④ 电泳转移完毕后,取出膜,用 TBS 洗涤 1 次;⑤ 将膜放入封闭液,室温下封闭 1 h,或 4℃ 封闭过夜;⑥ 用封闭液稀释各抗体上清(HSP70 1:50;HSP90 1:50;MHC I 1:100;MHC II 1:100),与含有目的蛋白条带的膜在室温下作用 1 h;⑦ TBST 洗膜 4 次,每次 15 min;⑧ 按试剂盒说明稀释酶(HRP)标记二抗,与膜室温下作用 30 min;⑨ TBST 洗膜 4 次,每次 15 min;⑩ 按试剂盒说明混合 A 液和 B 液,与膜作用 1 min 后进行 X 光片曝光,显影和定影后观察结果。

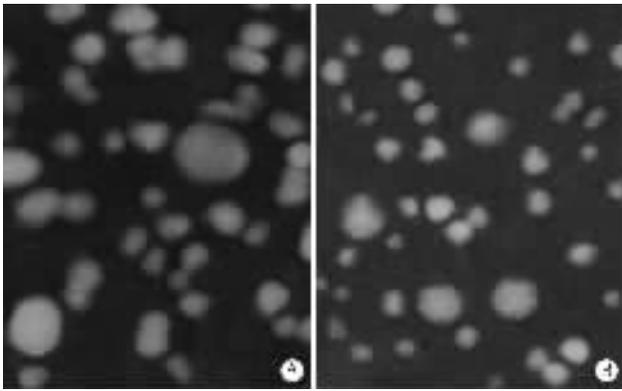
1.2.4 exosomes 浓度测定 取腹水和细胞培养上清液中 exosomes 阳性的待测液,用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒分别测定的蛋白浓度,步骤如下:① 按 50 体积 BCA 试剂 A 加 1 体积 BCA 试剂 B(50:1)配制适量 BCA 工作液,充分混匀。② 完全溶解蛋白标准品,取 10 μL 用 PBS 稀释至 100 μL,使浓度为 0.5 g/L。③ 将标准品按 0,1,2,4,8,12,16,20 μL 加到 96 孔板的标准品孔中,加标准品稀释液补足到 20 μL。④ 加 10 μL 样品到 96 孔板的样品空中,加标准品稀释液到 20 μL。⑤ 各孔加入 200 μL BCA 工作液,37℃ 放置 30 min。⑥ 测定 A_{562 nm} 值,根据标准曲线计算出蛋白浓度。

统计学处理:统计学处理采用 SPSS10.0 统计软件包分析,两组之间均数比较采用 *t* 检验,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 离心及超滤过程的比较 腹水标本与细胞培养上清液标本离心次数相同,而超滤次数多于细胞培养上清液,腹水标本超滤慢,时间长,100 mL 标本需要(70±9)min,易堵塞超滤管的超滤孔;而细胞培养上清液则需要(20±7)min,两者相比有显著性差异(*P* < 0.05),相对腹水标本而言,从细胞培养上清液中分离 exosomes 可节省时间和超滤管。

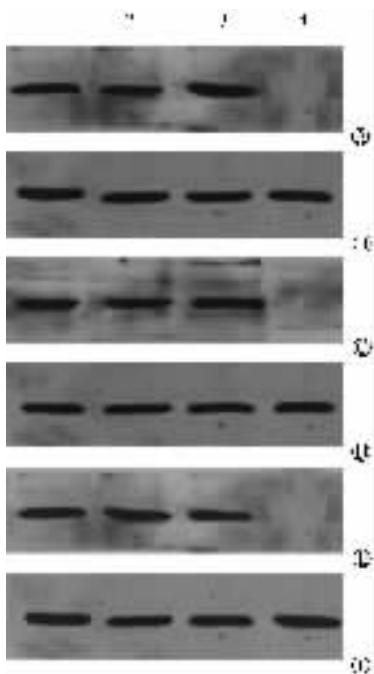
2.2 电镜 分别将两种标本置于透射电子显微镜下观察,可见具有明显异质性的圆形或椭圆形小囊泡,直径约 30~90 nm,有完整的包膜,内为低电子密度物质(图 1)。10 例晚期卵巢癌患者癌细胞阳性腹水标本和 15 例细胞培养上清液中,均能分离出 exosomes,电镜下形态无区别。5 例晚期卵巢癌患者癌细胞阴性腹水标本中未分离出 exosomes。



A:腹水来源的 exosomes ($\times 120$); B:细胞培养上清液来源的 exosomes ($\times 100$).

图1 电镜下晚期卵巢癌患者来源的 exosomes

2.3 免疫蛋白的表达 在细胞培养上清 exosomes 阳性待测液、腹水中 exosomes 阳性的待测液、癌细胞裂解液标本中发现大约在 $M_r(\times 10^3)$ 为 90、35 和 73 处有一明显的特异蛋白带,通过 Western Bolt 检测后,该蛋白带可被 HSP90, MHC I 类分子抗体和 HSP70 抗体特异性识别(图 2),从而肯定其为 HSP90, MHC I 类分子和 HSP70 基因的蛋白表达产物。在 $M_r(\times 10^3)$ 为 40 处无蛋白带表达,故无 MHC II 类分子表达。腹水中 exosomes 阴性的待测液中无蛋白表达。



A 热休克蛋白 70 ;B β -actin ;C 热休克蛋白 90 ;D β -actin ;E 主要组织相容性抗原 I 类分子 ;F β -actin. 1 细胞培养上清待测液 2 癌细胞阳性腹水待测液 3 癌细胞裂解液 4 癌细胞阴性腹水待测液。

图2 HSP70, HSP90 和 MHC I 类分子的 Western Blot 表达情况

2.4 腹水及细胞培养上清液中分离 exosomes 的各种参数(表 1 和表 2) 蛋白总量(mg) = 最终体积(mL) \times BCA 法测的蛋白浓度(g/L)。腹水来源标本:平均每个患者的 exosomes 蛋白总量为(3.27 ± 1.44) mg 。组织来源标本的 exosomes 蛋白总量为(0.77 ± 0.40) mg ,与腹水来源标本蛋白含量(3.27 ± 1.44) mg 相比 $P=0.00$, $P<0.01$,有显著性差异。

表1 晚期卵巢癌 10 例患者癌细胞阳性的腹水中分离的 exosomes 参数

| 患者编号 | 开始体积 (mL) | 最终体积 (mL) | 蛋白浓度 (g/L) | 蛋白总量 (mg) |
|------|-----------|-----------|------------|-----------|
| 1 | 1240 | 5.8 | 0.33 | 1.91 |
| 2 | 930 | 5.0 | 0.94 | 4.70 |
| 3 | 1500 | 7.5 | 0.44 | 3.30 |
| 4 | 2100 | 8.5 | 0.67 | 5.70 |
| 5 | 1500 | 7.5 | 0.68 | 5.10 |
| 6 | 1700 | 8.0 | 0.22 | 1.76 |
| 7 | 1600 | 8.0 | 0.33 | 2.64 |
| 8 | 2000 | 9.5 | 0.27 | 2.57 |
| 9 | 1500 | 7.5 | 0.43 | 3.22 |
| 10 | 1500 | 7.0 | 0.25 | 1.75 |

表2 晚期卵巢癌 15 例患者组织来源的 exosomes 参数

| 患者编号 | 开始体积 (mL) | 最终体积 (mL) | 蛋白浓度 (g/L) | 蛋白总量 (mg) |
|------|-----------|-----------|------------|-----------|
| 1 | 100 | 1.4 | 0.33 | 0.46 |
| 2 | 105 | 1.5 | 0.94 | 1.41 |
| 3 | 96 | 1.2 | 0.44 | 0.53 |
| 4 | 100 | 1.4 | 0.67 | 0.94 |
| 5 | 103 | 2.0 | 0.68 | 1.36 |
| 6 | 102 | 1.6 | 0.22 | 0.35 |
| 7 | 100 | 1.5 | 0.33 | 0.50 |
| 8 | 98 | 1.7 | 0.27 | 0.46 |
| 9 | 98 | 1.6 | 0.43 | 0.69 |
| 10 | 100 | 1.5 | 0.25 | 0.38 |
| 11 | 97 | 1.2 | 0.45 | 0.54 |
| 12 | 102 | 1.9 | 0.78 | 1.48 |
| 13 | 100 | 1.8 | 0.56 | 1.01 |
| 14 | 103 | 1.3 | 0.35 | 0.46 |
| 15 | 99 | 1.5 | 0.68 | 1.02 |

3 讨论

经研究证实 exosomes 来源于细胞内的多囊体,多囊体内的富含肽段-MHC 分子的小泡被释放到细

胞间隙中,形成所谓的 exosomes. 在鼠实验中,DC 来源的 exosomes 显示了具有免疫原性的特征,可以消除肿瘤,表明 exosomes 是具有生物活性的囊泡,具有免疫调节作用和潜在的抗肿瘤作用^[4]. 面向临床应用的 GMP 级外来体的制备和纯化程序,即通过一系列标准离心和超滤的方法分离 exosomes,用电镜鉴定其形态和直径,Western Blot 或免疫电镜方法证明其上表达细胞膜成分,目前已用于肿瘤免疫治疗,其来源包括肿瘤细胞来源,DC 来源以及恶性浆液^[5-7].

本研究我们利用标准方法制备 exosomes,从 10 例癌细胞阳性的卵巢癌患者腹水和 15 例组织来源的细胞培养上清液中分离出了 exosomes,用电镜证实了其形态. 我们发现对同一卵巢癌患者肿瘤细胞培养上清液和腹水来源的 exosomes 进行了比较,发现从细胞培养上清液和腹水中分离的 exosomes 与腹水中的癌细胞裂解液表达相同的免疫原性蛋白分子 HSP70、HSP90 和 MHC I 类分子,这些与肿瘤密切相关的分子表明腹水和细胞培养上清液中 exosomes 均来源于卵巢癌细胞. 有学者研究发现,肿瘤来源的 exosomes 除了含有携带高浓度的肿瘤抗原候选分子、抗原提呈分子及其伴侣分子外,还含有四次跨膜蛋白, GPI 锚定蛋白等^[8]. Bard 等^[9]从 4 例间皮瘤、2 例肺癌、2 例乳腺癌和 1 例卵巢癌的胸水中分离出外来体,其上包含有特异性抗原:SNX25, BTG, PEDF, thrombospondin2. 卵巢癌患者的腹水来源的 exosomes 所携带的抗原信息可能也是很丰富的,需要进一步证实.

每次抽腹水可获得 930 ~ 2100 mL,其内含有 exosomes 蛋白总量为(3.27 ± 1.44)mg,而经过 10 余次的细胞培养传代,可获得细胞培养上清液 100 mL,获得 exosomes 的蛋白总量为(0.77 ± 0.40)mg,明显少于腹水来源的 exosomes. 所以对于腹水中癌细胞阳性的患者而言,腹水是 exosomes 的理想来源,不但量丰富,而且采集方法简单、痛苦小,可直接分离. 相对于体外培养细胞上清而言,腹水来源的 exosomes 具有几个优势:① 可以大量制备,免除了繁琐的细胞培养. ② 电镜结果证实腹水中含有大量的大小不一

的 exosomes. ③ exosomes 上的 HSP70, HSP90 和 MHC I 类分子为相关性最密切的肿瘤抗原,这些是被自身抗原呈递细胞摄取和呈递的关键分子. ④ exosomes 表达 HSP70, HSP90 和 MHC I 类分子,这些本源性肿瘤抗原表明这些 exosomes 是来自于肿瘤细胞. Andre 等用抗 MHC I 类分子 ABC mAb 进行的免疫吸附试验证实每毫升恶性积液中平均含有 8×10^{10} 个 exosomes 性 MHC I 分子,而体外培养的肿瘤细胞上清约为每毫升 7×10^9 个 exosomes 性 MHC I 分子. 所有这些数据说明恶性积液是肿瘤细胞源性 exosomes 的丰富来源,而且其上的肿瘤抗原/MHC I 复合物非常适合临床应用.

本研究虽然发现对于同一卵巢癌患者来说,在分离方法和获得量上比较,从癌细胞阳性的腹水中获得 exosomes 比细胞培养理想,但哪一种来源的 exosomes 在免疫治疗中会发挥更大的作用需进一步研究.

【参考文献】

- [1] Delcayre A, Estelles A, Sperinde J, et al. Exosome display technology: Applications to the development of new diagnostics and therapeutics [J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2005, 35(2): 158-168.
- [2] 牟丹蕾, 贾战生, 白雪帆. 胞体外-免疫治疗中的“特洛伊木马” [J]. *生理科学进展*, 2005, 36(2): 113-118.
- [3] Delcayre A, Le Pecq JB. Exosomes as novel therapeutic nanodevices [J]. *Curr Opin Mol Ther*, 2006, 8(1): 31-38.
- [4] Chaput N, Taieb J, Andre F, et al. The potential of exosomes in immunotherapy [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2005, 5(6): 737-747.
- [5] Bu N, Li QL, Sun BZ, et al. Anti-leukaemia activity of cord blood cytotoxic T lymphocytes induced by CML-derived exosomes [J]. *Haema*, 2006, 9(2): 222-229.
- [6] Chaput N, Taieb J, Scharz NE, et al. Exosome-based immunotherapy [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2004, 53(3): 234-239.
- [7] 白俊, 任军, 王均, 等. 离心过滤法提取外切体的实验研究 [J]. *第四军医大学学报*, 2004, 25(10): 890-892.
- [8] Mignot G, Roux S, Thery C, et al. Prospects for exosomes in immunotherapy of cancer [J]. *J Cell Mol Med*, 2006, 10(2): 376-388.
- [9] Bard MP, Hegmans JP, Hemmes A, et al. Proteomic analysis of exosomes isolated from human malignant pleural effusions [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2004, 31(1): 114-121.

编辑 井晓梅