

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2011.07.009

热休克诱导结直肠癌细胞外泌体的免疫效应

张义平, 郑美蓉, 殷嫦嫦, 吴 萍, 周许峰, 吴建芳, 周小鸥

Immunological Effects of Exosomes from Colorectal Cancer Cells Induced by Shocked Heat

ZHANG Yi-ping, ZHENG Mei-rong, YIN Chang-chang, WU Ping, ZHOU Xu-feng, WU Jian-fang, ZHOU Xiao-ou

School of Basic Medical Science of Jiujiang University, Jiujiang 332000, China

Abstract: Objective To investigate the effect of heat shock exosome (H-exo) from colorectal cancer cell on the protein factor secreted by the induced dendritic cells(DC) and the DC stimulating T-cell toxicity.

Methods Colorectal tubular adenocarcinoma specimens through the clinical pathology diagnosis were isolated and cultured. After 1 hour heat shock at 43°C, the exosomes was obtained by four-step centrifugation and used to induce DC. The induced DC stimulates cytotoxic T lymphocytes for 24 hours. The production of TNF-α, MIP-1α, RANTES by DC was assessed by ELISA assay. By the MTT method T-cell toxicity were evaluated. **Results** We found that the heat shock exosomes (H-Exo) promoted DC to secrete TNF-α, MIP-1α, RANTES, significant differences compared with control group, $P < 0.05$. To compare with the non-heat shock exosomes (Exo) group, The H-Exo induced cytotoxicity, $P < 0.05$, and with the colorectal cancer cell lysate (Lys) group, was significantly different ($P < 0.01$). To compare with the Exo and Lys group, there was significant difference ($P < 0.05$), and the inductive effect of 100 μg/ml dose groups was stronger than 50 μg/ml. **Conclusion** Heat shock of colorectal cancer cells in culture can enhance immunological effects of exosomes with relation to inductive dose.

Key words: Colorectal cancer; Dendritic cell; Exosomes; Heat shocking

摘要:目的 探讨热休克影响结直肠癌细胞外泌体诱导树突状细胞肿瘤相关蛋白因子的释放和细胞毒效应。**方法** 临床经病理学确诊的结直肠管状腺癌细胞分离培养,43°C热休克1 h,四步离心获得细胞上清外泌体。诱导树突状细胞刺激细胞毒反应。酶联免疫测定树突状细胞释放 TNF-α、MIP-1α、RANTES,MTT法测定对结直肠癌细胞的杀伤作用。**结果** 结直肠癌细胞热休克获得的外泌体刺激 DC 分泌 TNF-α、MIP-1α、RANTES,与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。热休克促进外泌体诱导的结直肠癌细胞杀伤活性,与未经热休克培养获得的外泌体诱导组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),与结直肠癌细胞裂解物诱导组比较差异具有统计学意义($P < 0.01$),未经热休克培养获得的外泌体诱导组与癌细胞裂解物诱导组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。100 μg/ml 剂量诱导效应强于 50 μg/ml 组。**结论** 热休克培养可以通过促进效应细胞肿瘤相关蛋白因子释放,增强对结直肠癌细胞的杀伤活性,有剂量依赖性,为开拓高效无细胞疫苗来源提供了实验基础。

关键词: 结直肠癌;树突状细胞;外泌体;热休克

中图分类号:R735.3⁺5,R730.54 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-8578(2011)07-0764-03

0 引言

结直肠癌是最常见的癌症之一,WHO 估计,每年新发 945 万病例,约 49.2 万死亡,在发达国家,终生发病率达 5%^[1-2]。肿瘤细胞能够释放一类外泌体,源于质膜多泡融合,作为一种肿瘤抗原,可以被树突状细胞(DC)提呈给 T 细胞,诱发肿瘤排斥反应^[3-4]。Cho 等^[5]发现热处理小鼠肿瘤提取 exo-

somes 能够诱发更强的肿瘤排斥效应。因此,我们选择临床来源的结直肠癌标本,经热休克培养后提取癌细胞外泌体,希望进一步研究热休克处理对外泌体诱导的免疫效应,为探讨新型高效的肿瘤疫苗提供思路。

1 资料与方法

1.1 资料

收集 2008 年九江各医院腺癌侵及肠壁全层患者,新鲜手术标本,直径 3~5 cm,标本切开病理送检平行留样,PBS 缓冲液洗涤 -80°C 备用,共获病理确诊管状腺癌 13 例,0.08%胰酶消化分离癌细胞备用。树突状细胞来源健康志愿者抗凝外周全血单个核细

收稿日期:2010-06-10;修回日期:2010-09-14

基金项目:江西省教育厅科技项目资助课题(赣教高字[2008]3号 GJJ08445)

作者单位:332000 江西九江,九江学院基础医学院

作者简介:张义平(1971-),男,博士,副教授,主要从事肿瘤生物治疗和生物制药的研究

胞的诱导;并从部分单个核细胞分离 T 细胞备用。

1.2 方法

1.2.1 结直肠管状腺癌细胞热休克培养和外泌体制备 37℃、5%CO₂ 常规培养。待细胞数达 5 × 10⁶/ml,43℃热休克(水浴)1 h,然后 37℃ CO₂ 培养箱恢复 4 h。癌细胞常规培养和热休克癌细胞培养上清液各 300 ml,四步法离心分离外泌体,低温保存备用。癌细胞冻融裂解物经二喹啉甲酸(BCA)法蛋白定量后备用。

1.2.2 热休克处理前后外泌体诱导 DC 分泌蛋白因子的分析 区分 50 μg/ml 和 100 μg/ml 设置癌细胞外泌体组、热休克癌细胞外泌体组和癌细胞冻融裂解物组,共 6 组,分别加入培养 6 天的 DC,在 37℃培养箱培养 24 h,每组 3 个重复。酶联免疫检测(ELISA)肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、巨噬细胞炎症蛋白-1α(MIP-1α)、人趋化因子(RANTES),操作按试剂盒说明进行。

1.2.3 CTL 诱导和细胞毒性实验 按 1:3 分别混合不同刺激 DC 和 T 淋巴细胞,培养 3 天诱导 CTL 生成。1 × 10⁵/ml 的结直肠管状腺癌细胞加入 96 孔板,每孔 100 μl,培养 24 h。设置效靶比 50:1。MTT 检测,570 nm 酶标仪测量各孔 OD 值,计算杀伤率。CTL 杀伤活性 = [结直肠癌细胞对照组 A 值 - (诱导组 A 值 - PBS 效应细胞组 A 值) / 靶细胞对照组 A 值] × 100%。癌细胞外泌体、热休克癌细胞外泌体和肿瘤细胞裂解物诱导 CTL 为各自诱导组,PBS + DC + T 细胞平行试验为 PBS 效应细胞组,癌细胞平行培养称为结直肠癌细胞对照组。每组设 3 个重复。

1.3 统计学方法

SPSS 13.0 统计软件,方差齐性和 t 检验统计学分析,P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 热休克处理前后外泌体诱导 DC 蛋白因子分泌变化

外泌体诱导影响免疫细胞分泌的蛋白含量和组分变化。我们利用酶联免疫检测(ELISA)热休克处理前后外泌体刺激 DC 分泌肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、巨噬细胞炎症蛋白-1α(MIP-1α)、人趋化因子(RANTES)的变化,结果表明:热休克处理后刺激 DC 分泌 TNF-α、MIP-1α、RANTES 表达上调(P < 0.05),见图 1。

2.2 热休克前后外泌体诱导的 CTL 作用

结直肠管状腺癌细胞热休克前后外泌体作用于 DC 并诱导 CTL 生成,在诱导梯度 50 μg/ml 和 100 μg/ml,效靶比为 50:1 时,热休克来源外泌体作用

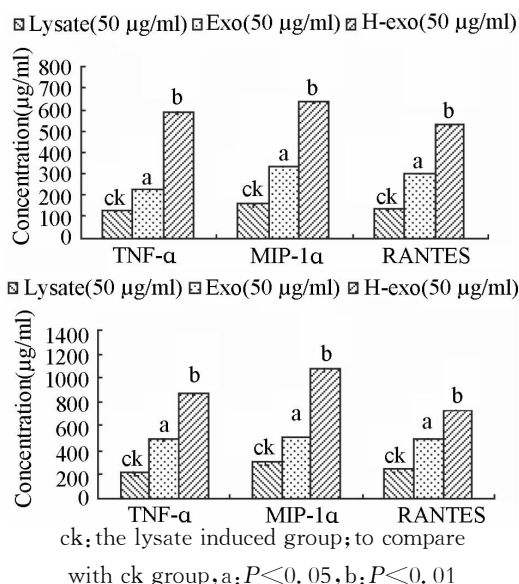


图 1 热休克处理前后外泌体对 DC 分泌蛋白因子的影响

Figure 1 Protein factor secreted by DC induced by exosomes before and after heat shock

后诱导的 CTL 对结直肠癌细胞的杀伤率(实验组)和未经热休克培养来源外泌体诱导的 CTL (对照组)比较,实验组杀伤活性均明显增高(P < 0.05),见表 1,提示热休克提高外泌体作用后的 CTL 对癌细胞的杀伤效应。且发现 100 μg/ml 剂量诱导效应强于 50 μg/ml 组,存在剂量依赖性。

2.3 不同外泌体和肿瘤裂解物诱导的 CTL 作用

热休克处理获得外泌体诱导的杀伤活性与对数期结直肠管状腺癌细胞冻融裂解物刺激树突状细胞的免疫效应比较,差异有统计学意义(P < 0.01)。未经热休克处理获得外泌体诱导的杀伤活性与对数期结直肠管状腺癌细胞冻融裂解物刺激树突状细胞的免疫效应比较,差异也有统计学意义(P < 0.05),见表 2。以上结果进一步提示热休克能够增强外泌体刺激的树突状细胞对同源癌细胞的特异性杀伤活性,而且免疫效应优于普通培养获得的外泌体和癌细胞冻融裂解物。

3 讨论

在结直肠癌治疗领域,结直肠癌分子机制和靶向治疗展现了一个充满希望的前景,发展新的治疗成为未来癌症治疗研究的重要方向之一^[1]。在癌症免疫治疗领域,人们尝试了各种来源抗原,包括肿瘤细胞裂解物,辐射灭活肿瘤细胞,肿瘤 mRNA 等,试图获得能产生肿瘤抗原特异性免疫反应和长期记忆的癌症疫苗^[6]。研究发现从肿瘤细胞株获得外泌体能够诱导有效的免疫反应,可能是一种新的无细胞肿瘤疫苗^[7]。

表 1 热休克前后外泌体诱导的 CTL 作用

Table 1 T lymphocyte cytotoxicity induced by vaccine exosomes and HS-Exo

| Groups | MTT absorbtion | | CTL anti-rate(%) | |
|-------------------------------------|----------------|-------------------|------------------|-------------------|
| | Mean(SD) | $P_{HS-Exo; Exo}$ | Mean(SD) | $P_{HS-Exo; Exo}$ |
| Colorectal cancer cell | 0.727(0.018) | | | |
| Effector cells group | 0.933(0.019) | | | |
| Exo(50 μ g/ml)induced group | 1.427(0.002) | | 31.928(4.510) | |
| Exo(100 μ g/ml)induced group | 1.392(0.006) | | 36.787(4.583) | |
| HS-Exo(50 μ g/ml)induced group | 1.344(0.033) | 0.012 | 43.390(4.061) | 0.031 |
| HS-Exo(100 μ g/ml)induced group | 1.310(0.030) | 0.038 | 48.145(0.767) | 0.047 |

表 2 结直肠癌裂解物诱导 CTL 作用

Table 2 T lymphocyte cytotoxicity induced by cancer lysate

| Groups | MTT absorbtion | CTL anti-rate (%) | $P_{Exo; lys}$ | $P_{HS-Exo; lys}$ |
|--------------------------------------|----------------|-------------------|----------------|-------------------|
| | Mean(SD) | Mean(SD) | | |
| Lysate(50 μ g/ml) induced group | 1.503(0.016) | 21.550(3.034) | 0.036 | 0.002 |
| Lysate(100 μ g/ml) induced group | 1.472(0.019) | 25.774(2.963) | 0.032 | 0.004 |

为寻找高效生物活性和抗肿瘤效应的外泌体,我们分析热休克结直肠管腺癌细胞外泌体对树突状细胞蛋白因子分泌的影响,发现热休克能够上调 TNF- α 、MIP-1 α 、RANTES 蛋白含量。TNF- α 、MIP-1 α 、RANTES 的合成主要与 Th1 细胞反应相关,并且以剂量依赖方式诱导 Th1 细胞迁移。TNF- α 甚至能直接杀伤肿瘤细胞,对瘤细胞有选择性的杀伤作用^[8-9]。经热休克处理获得外泌体、未经热休克处理获得外泌体和对数期结直肠管腺癌细胞冻融裂解物诱导的杀伤活性比较发现热休克能够增强树突状细胞免疫效应,诱导特异性杀伤活性,与普通培养获得的外泌体和癌细胞冻融裂解物比较差异有统计学意义(前者 $P < 0.05$, 后者 $P < 0.01$)。说明热休克可以影响外泌体促进免疫效应细胞肿瘤相关蛋白因子释放,与热休克来源外泌体诱导增强对结直肠癌细胞的杀伤活性呈正相关,结果与 Wan 等^[9]发现热休克能够促进抗肿瘤免疫资料相符。Gastpar 等^[10]发现表达热休克蛋白的外泌体还能够激活自然杀伤细胞发挥免疫效应。总之,目前对于热休克外泌体的生物学功能尤其在肿瘤免疫治疗方面的认识还处在早期发现阶段,需要进一步观察热休克获得外泌体作为癌症疫苗对不同肿瘤的生物治疗效果及机制,为我们更好地在免疫调节和肿瘤等临床疾病的治疗领域应用热休克外泌体提供理论依据和实验基础。

参考文献:

[1] Urruticoechea A, Alemany R, Balart J, et al. Recent Advances in Cancer Therapy: An Overview[J]. Curr Pharm Des,

2010,16(1):3-10.
 [2] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2009[J]. CA Cancer J Clin, 2009,59(4):225-249.
 [3] 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.
 [4] Cho JA, Yeo DJ, Son HY, et al. Exosomes: A new delivery system for tumor antigens in cancer immunotherapy[J]. Int J Cancer, 2005,114(4):613-622.
 [5] Cho JA, Lee YS, Kim SH, et al. MHC independent anti-tumor immune responses induced by Hsp70-enriched exosomes generate tumor regression in murine models[J]. Cancer Lett, 2009, 275(2):256-265.
 [6] Heiser A, Coleman D, Dannull J, et al. Autologous dendritic cells transfected with prostate-specific antigen RNA stimulate CTL responses against metastatic prostate tumors[J]. J Clin Invest, 2002, 109(3):409-417.
 [7] Andre F, Scharz NE, Movassagh M, et al. Malignant effusions and immunogenic tumour-derived exosomes[J]. Lancet, 2002,360(9329):295-305.
 [8] Obregon C, Rothen-Rutishauser B, Gerber P, et al. Active uptake of dendritic cell-derived exovesicles by epithelial cells induces the release of inflammatory mediators through a TNF- α mediated pathway[J]. AM J Pathol, 2009,175(2):696-705.
 [9] Wan T, Zhou X, Chen G, et al. Novel heat shock protein Hsp70L1 activates dendritic cells and acts as a Th1 polarizing adjuvant[J]. Blood, 2004, 103(5):1747-1754.
 [10] Gastpar R, Gehrmann M, Bausero MA, et al. Heat shock protein 70 surface-positive tumor exosomes stimulate migratory and cytolytic activity of natural killer cells[J]. Cancer Res, 2005,65(12):5238-5247.

[编辑:刘红武;校对:周永红]