

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2010.06.008

# 膀胱移行细胞癌来源 exosome 的制备及相关蛋白分子的鉴定

张家模<sup>1</sup>, 吴小候<sup>1</sup>, 张尧<sup>1</sup>, 夏雨果<sup>1</sup>, 罗春丽<sup>2</sup>

## Preparation and Identification of exosome Derived from Transitional Cell Carcinoma of Bladder

ZHANG Jia-mo<sup>1</sup>, WU Xiao-hou<sup>1</sup>, ZHANG Yao<sup>1</sup>, XIA Yu-guo<sup>1</sup>, LUO Chun-li<sup>2</sup>

1. Department of Urology, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 2. Department of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University

Corresponding Author: WU Xiao-hou, E-mail: wuxiaohou80@hotmail.com

**Abstract: Objective** To separate and purify exosome derived from transitional cell carcinoma of bladder of T24 cell, and initially analyze the morphology and protein composition in order to offer a foundation for its utilization in immunotherapy. **Methods** The exosomes secreted by T24 cell were purified by ultracentrifugation and sucrose gradient centrifugation, and the electron microscope was used to check the exosome. Proteins were separated by SDS-PAGE, and protein bands were analyzed by software. HSP70, ICAM-1 and CK20 were identified by western blot. **Results** Exosomes were successfully purified by ultracentrifugation and sucrose gradient centrifugation. The exosomes were syngeneous in size about 30~90nm, and were saucer-shaped membrane vesicles. HSP70, ICAM-1 and CK20 were detected by western blot. **Conclusion** It was confirmed that T24 cell can secrete exosome, and the presence of immune proteins of HSP70 and ICAM-1 offer a theoretical foundation for anti-tumor in immunotherapy.

**Key words:** Exosome; Transitional cell carcinoma of bladder; CK20; HSP70; ICAM-1

**摘要:目的** 分离纯化膀胱移行细胞癌 T24 细胞来源的 exosome, 对其形态学和蛋白组成进行初步分析, 为进一步利用 exosome 治疗膀胱移行细胞癌奠定基础。**方法** 采用超滤和蔗糖密度梯度离心法分离 T24 细胞释放的 exosome, 电镜观察形态大小, SDS-PAGE 分离蛋白并用软件分析, Western blot 检测热休克蛋白 70(HSP70)、细胞黏附分子(ICAM-1)、细胞角蛋白 20(CK20)的表达。**结果** 成功的分离出了 exosome, 其大小为 30~90 nm, 类圆碟形小囊泡, Western blot 证实 exosome 表达 HSP70、ICAM-1 和 CK20 分子。**结论** T24 细胞可以分泌 exosome, 并负载了 HSP70、ICAM-1 等免疫相关蛋白, 为肿瘤免疫治疗提供了理论基础。

**关键词:** exosome; 膀胱移行细胞癌; CK20; HSP70; ICAM-1

**中图分类号:** R73-3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2010)06-0636-04

## 0 引言

exosome 是由许多活细胞(血小板、肥大细胞、抗原递呈细胞、肿瘤细胞等)的多泡体(multivesicular bodies, MVBs)形成并与细胞膜融合以胞吐的方式向细胞外分泌的一种扁平半球型小囊泡, 具有脂质双分子层, 密度在 1.13~1.21 g/ml, 具有许多来

源细胞的某些功能相关的蛋白<sup>[1]</sup>。肿瘤细胞来源的 exosome(TEX)可以表达多种免疫相关蛋白、肿瘤共同抗原和(或)肿瘤特异性抗原, 引起抗肿瘤的生物学效应, 有望成为亚细胞结构的肿瘤疫苗; 本研究从 T24 细胞培养液中成功提取了 exosome, 对其所负载的蛋白进行初步分析, 探讨其潜在的免疫调节功能, 为 exosome 用于膀胱癌免疫治疗奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂与仪器

T24 细胞由本实验室保存; RPMI1640 培养液、胎牛血清购自 Gibco 公司; 99.99% 重水、分析纯蔗糖购自 Sigma 公司; Amicon Ultra 超滤离心管(100

收稿日期: 2009-01-14; 修回日期: 2009-08-19

基金项目: 重庆市卫生局科研计划资助项目(2009-2-384)

作者单位: 1. 400016 重庆医科大学附属第一医院泌尿外科; 2. 重庆医科大学检验系

通信作者: 吴小候, E-mail: wuxiaohou80@hotmail.com

作者简介: 张家模(1982-), 男, 硕士, 住院医师, 主要从事膀胱肿瘤的研究

Ku MWCO) 购自美国 Millipore 公司; 鼠抗人 HSP70、ICAM-1、兔抗人 CK20、辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠和羊抗兔抗体购自美国 Santa Cruz 公司; Bradford 检测试剂盒、BeyoECL 荧光检测试剂购自碧云天生物技术研究所; 主要实验仪器还有 Hitachi-7500 透射电子显微镜; CP100MX 超速冷冻离心机; ECP3000 三恒电泳仪; GeneQuant 影像分析仪; Quantity One 分析软件。

1.2 方法

1.2.1 exosome 提取 胎牛血清在 4℃ 条件下 100 000 g 离心过夜去除内源性 exosome, T24 细胞在含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液中常规培养 72 h 后, 收集细胞培养液 150 ml。按照 GMP (Good Manufacturing Practict) 标准<sup>[2]</sup> 提取 exosome, 在 4℃ 条件下, 300 g 离心 5 min, 800 g 离心 30 min, 10 000 g 离心 30 min, 上清液用 100 Ku MWCO Amico 超滤管 1500 g 离心 30 min, 将浓缩液移至 30 g/L 的蔗糖重水垫上以 100 000 g 超速离心 60 min, 取出蔗糖重水垫用 50 ml PBS 稀释, 再用 Amico 超滤管 1500 g 离心浓缩, 0.22 μm 的滤器过滤除菌, 分装置于 -80℃ 冰箱备用。

1.2.2 exosome 电镜负染 滴 20 μl exosome 悬液于直径为 2 nm 铜网上, 室温静置 1 min, 滴加 20 ml/L 磷钨酸溶液 (pH 6.8) 负染 1 min, 滤纸从侧面吸干液体, 白炽灯烤约 20 min, 透射电镜下观察拍照。

1.2.3 SDS-PAGE 分离蛋白及凝胶图像分析 exosome 经过 10% SDS-PAGE 电泳分离, 考马斯亮蓝 G250 染色 60 min, 脱色液脱色直至背景清晰, GeneQuant 影像分析仪扫描图像, 并用 Quantity One 软件进行分析。

1.2.4 Western blot 分析 exosome 经超声波冲击破膜后, 加入终浓度为 20 g/L 的 SDS 去除脂蛋白的影响, 采用 Bradford 法测定蛋白浓度。取 30 μg exosome 用 SDS-PAGE 凝胶分离, 然后将蛋白转移到 PVDF 膜上, 室温封闭后分别用鼠抗人 HSP70、ICAM-1 和兔抗人 CK20 作为一抗, 辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗体、羊抗兔抗体作为二抗, 用 ECL 化学发光法检测。

1.3 统计学方法

所谓数据采用 SPSS13.0 统计软件进行分析, 结果以  $\bar{x} \pm s$  表示。

2 结果

2.1 exosome 电镜观察

通过电镜负染观察, 发现 T24 来源的 exosome

呈类圆碟形小囊泡, 大小相对均一, 有完整的包膜, 内为低电子密度物质, 见图 1。电镜下随机计数 200 个 exosome, 并测量直径, 约在 30~90 nm 之间, 平均直径约为 (46.06 ± 13.89) nm, 其中直径在 30~40 nm 和 60~70 nm 的 exosome 相对较多, 见图 2。

2.2 exosome 蛋白浓度

经超声冲击破膜, 加 20 g/L 的 SDS 去除脂蛋白的影响, 用 Bradford 法绘制标准曲线, 获得 exosome 的蛋白浓度 (1.24 ± 0.21) μg/μl。

2.3 Western blot 检测蛋白 经免疫印迹分析, exosome 明显表达 HSP70、ICAM-1 和 CK20 分子, 见图 3。

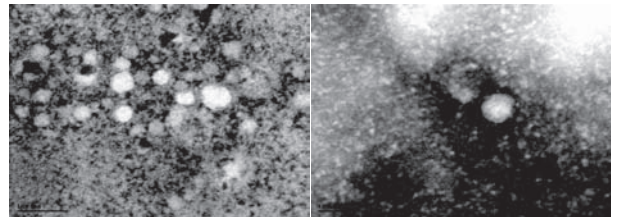


图 1 T24 细胞来源的 exosome 的电镜结构 (×135 000)  
Figure 1 Electron micrograph of Exosome derived from T24 cell (×135 000)

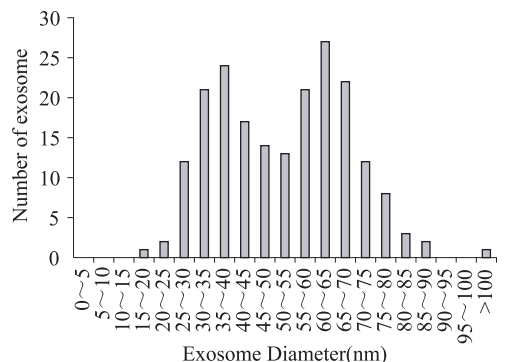


图 2 电镜观察 200 个 exosome 的直径分布范围  
Figure 2 The diameter distribution of 200 exosomes observed by electron microscope

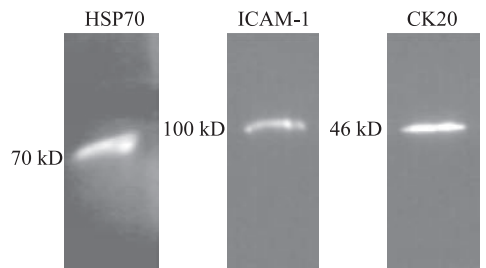


图 3 exosome 中表达 HSP70、ICAM-1 和 CK20 的 Western blot 分析结果  
Figure 3 The presence of HSP70, ICAM-1 and CK20 confirmed by Western blot in exosome

2.4 exosome 蛋白组成分析

10% SDS-PAGE 电泳分离 exosome 后蛋白谱

见图 4,exosome 负载的蛋白丰富,种类繁多,分布广泛,表达量高。Quantity One 软件分析所得各蛋白条带的密度曲线和表观分子量,见图 5,表 1。

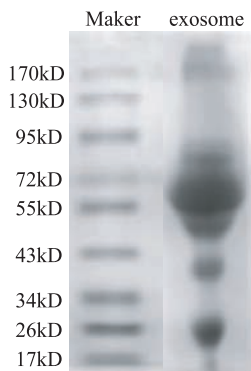


图 4 T24 细胞来源的 exosome 的蛋白图谱

Figure 4 Protein pattern of T24 cell derived exosome

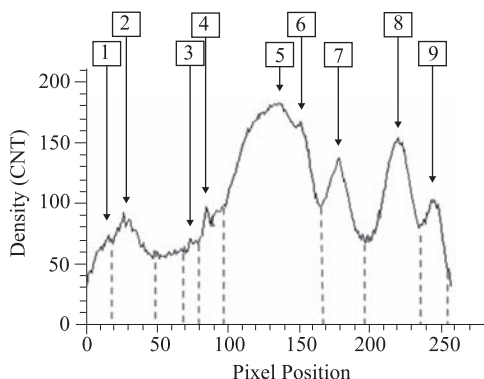


图 5 SDS-PAGE 分离 exosome 的蛋白条带密度曲线

Figure 5 The intensity trace of exosome from lanes of SDS-PAGE

表 1 SDS-PAGE 分离 exosome 的蛋白条带的表达量和表观分子量

Table 1 The volumes and observed molecular weight of exosome from lanes of SDS-PAGE

Protein Band No	Volume	Observed mol wt (kD)
1	1 080.471	240.6
2	3 178.525	189.3
3	1 436.505	93.6
4	1 964.884	87.8
5	10 182.07	65.3
6	7 907.12	48.4
7	4 880.596	37.5
8	7 927.12	26.2
9	1 058.147	14.8

### 3 讨论

exosome 含有丰富的细胞来源蛋白<sup>[3]</sup>:(1)抗原结合和递呈相关蛋白如:MHC- I、MHC- II、热休克蛋白等;(2)信号转导相关蛋白:四次跨膜超家族成员(CD9、CD63、CD81、CD82、CD53、CD37 等)、整联

蛋白、免疫球蛋白超家族成员(ICAM-1/ CD54)、GPI 蛋白等;(3)细胞骨架蛋白及胞浆蛋白;(4)细胞代谢相关的酶类等。其中研究最多的是树突状细胞(DC)来源的 exosome(DEX),因其负载了 MHC- I、MHC- II 和 CD81 等,可以有效地诱导 T 细胞的增殖,并激发出抗肿瘤免疫应答。I 期临床试验<sup>[4]</sup>发现负载肿瘤抗原的 DEX 对晚期非小细胞肺癌患者的治疗是有效的,并且是安全的。

TEX 含有丰富的肿瘤共同抗原和(或)特异性抗原<sup>[5]</sup>如:Mat1、gp100、TRP、Her2-neu 等,同时含有肿瘤抗原运载系统(HSPs)以及与细胞靶向性有关的蛋白(CD9),被认为是肿瘤抗原的天然传递系统。TEX 能够转移肿瘤抗原给 DC,交叉递呈抗原到 MHC- I 分子上,诱导 CTL 的活化,对肿瘤产生有效的保护和治疗效应。Adnre 等<sup>[6]</sup>研究发现在肿瘤患者胸膜恶性渗出液中分离出的 exosome 冲击患者本人外周血来源的 DC,再刺激自身 T 细胞,引起特异性免疫应答。另外,TEX 诱导的免疫应答可以跨越 MHC 和组织的限制,对自体肿瘤、移植瘤和不同组织来源的肿瘤都有交叉保护作用<sup>[5]</sup>。

我们在国内外首次提取了膀胱移行细胞癌 T24 细胞来源的 exosome,其直径约为 30~90 nm,类圆碟形,大小相对均一;同时表达 HSP70、ICAM-1 和 CK20 等丰富的细胞来源相关的蛋白。HSP70 有伴侣抗原肽、提呈和加工处理抗原肽及激活抗原提呈细胞等免疫学功能,在肿瘤免疫应答过程中充当强有力的分子佐剂<sup>[7]</sup>,HSP70 表达阳性的 exosome 很容易地被抗原递呈细胞摄取,递呈给 CTL 或者选择性激活 NK 细胞,使其迁移、增殖,并产生免疫反应<sup>[8]</sup>。ICAM-1 与其配体的结合具有重要的免疫学功能:首先它介导了 T 细胞和 NK 细胞对靶细胞的杀伤作用;其次它还是 T 细胞激活的共刺激信号之一。CK20 是 CK 家族中的一种分布于上皮细胞的中间纤维丝,研究发现<sup>[9]</sup>CK20 在膀胱移行细胞癌患者的尿路上皮中高表达,但是在正常的膀胱上皮中不表达,有望成为膀胱癌高诊断效能的特异性分子瘤标。我们的实验首次证明了 T24 细胞来源的 exosome 表达 CK20,进一步说明了 exosome 的蛋白组成和细胞来源密切相关。

T24 细胞来源的 exosome 携带了 HSP70 和 ICAM-1 等免疫功能相关蛋白,而且有可能含有肿瘤抗原,因此 T24 细胞来源的 exosome 富含将抗原传递给抗原递呈细胞的受体和分子配体,很容易被 DC 摄取<sup>[10]</sup>而诱导 CTL 的抗肿瘤效应;并且为非细胞结构,未经基因修饰和外源基因导入,不含遗传物质,因此对机体潜在危害作用小;具有制备简单易

行,可冷冻储藏,稳定性高,体积小易清除,无繁殖能力等优点,有可能成为优质的肿瘤疫苗。exosome 的提取和免疫相关蛋白组成的初步研究为进一步运用生物技术研究其在体内外的靶向性、生物学功能和作用机制奠定了基础,为膀胱移行细胞癌的免疫治疗提供了新的可能途径。

**参考文献:**

[1] Iero M, Valenti R, Huber V, et al. Tumor-released exosomes and their implications in cancer immunity[J]. *Cell Death Differ*, 2008, 15(1):80-88.

[2] Lamparski HG, Metha-Damani A, Yao JY, et al. Production and characterization of clinical grade exosomes derived from dendritic cells[J]. *Immunol Meth*,2002, 270(2):211-226.

[3] Li XB, Zhang ZR, Schluesener H, et al. Role of exosomes in immune regulation[J]. *J Cell Mol Med*,2006,10(2),364-375.

[4] Morse MA, Garst J, Osada T, et al. A phase I study of dexo-some immunotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer[J]. *J Transl Med*,2005,3(1):9.

[5] 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.

[6] Andre F, Schartz NE, Movassagh M, et al. Malignant effusions and immunogenic tumor-derived exosomes[J]. *Lancet*, 2002,360(9329):295-305.

[7] Srivastava P. Interaction of heat shock proteins with peptides and antigen presenting cells; chaperoning of the innate and adaptive immune responses[J]. *Annu Rev Immunol*, 2002,20(4):395-425.

[8] Robert G, Mathias G, Maria AB, 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.

[9] Rotem D, Cassel A, Lindenfeld N, et al. Urinary Cytokeratin 20 as a Marker for Transitional Cell Carcinoma [J]. *Eur Urol*, 2000,37(5):601-604.

[10] Morelli AE, Larregina AT, Shufesky WJ, et al. Endocytosis, Intracellular Sorting, and processing of Exosomes by Dendritic Cells[J]. *Blood*,2004,104(10):3257- 3266.

[编辑:周永红;校对:安 凤]

(上接第 635 页)

力,并显著降低 MTA1 mRNA 的表达,这表明 Genistein 可能通过降低 MTA1 的表达水平从而抑制卵巢癌的侵袭转移,说明 Genistein 有望开发成有效的抗卵巢癌转移的药物。

**参考文献:**

[1] Duffy C, Perez K, Partridge A. Implications of phytoestrogen intake for breast cancer[J]. *CA Cancer J Clin*, 2007, 57(5): 260-277.

[2] Banerjee S, Li Y, Wang Z, et al. Multi-targeted therapy of cancer by genistein[J]. *Cancer Lett*, 2008,69(2):226-242.

[3] 袁鹏,黄艳红,辛晓燕,等. Genistein 对耐药卵巢癌细胞 SK-OV3 增殖、凋亡和顺铂敏感性的影响[J]. *肿瘤防治研究*, 2006, 33(3):187-190.

[4] 宋丹凤,王新建,张晓娟,等. 金雀异黄素对胃癌细胞 iNOS 表达影响与抑癌作用研究[J]. *肿瘤防治研究*, 2003,30(1): 29-31.

[5] 刘国红,王波. NF- $\kappa$ B 抑制剂二硫代氨基甲酸吡咯烷提高卵巢癌细胞顺铂化疗的敏感性[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2008,15(4):356-360.

[6] Sarkar FH, Adsule S, Padhye S, et al. The role of genistein

and synthetic derivatives of isoflavone in cancer prevention and therapy[J]. *Mini Rev Med Chem*, 2006, 6(4):401-407.

[7] Büchler P, Gukovskaya AS, Mouria M, et al. Prevention of metastatic pancreatic cancer growth in vivo by induction of apoptosis with genistein, a naturally occurring isoflavonoid[J]. *Pancreas*, 2003, 26(3): 264-273.

[8] Sasaki H, Moriyama S, Nakashima Y, et al. Expression of the MTA1 mRNA in advanced lung cancer[J]. *Lung Cancer*, 2002,35(2):149-154.

[9] Toh Y, Ohga T, Endo K, et al. Expression of the metastasis-associated MTA1 protein and its relationship to deacetylation of the histone H4 in esophageal squamous cell carcinomas[J]. *Int J Cancer*, 2004,110(3):362-367.

[10] Kawasaki G, Yanamoto S, Yoshitomi I, et al. Overexpression of metastasis-associated MTA1 in oral squamous cell carcinomas: correlation with metastasis and invasion[J]. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 2008,37(11):1039-1046.

[11] Hofer MD, Kuefer R, Varambally S, et al. Expression of MTA1 promotes motility and invasiveness of PANC21 pancreatic carcinoma cells[J]. *British J Cancer*, 2004, 90(2): 455-462.

[编辑:刘红武;校对:安 凤]