

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2009.03.011

Exosomes 联合卡介苗的体内抗肿瘤效应

杨云山¹, 钟海均^{1*}, 修方明², 蔡志坚² (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 exosomes(Exo)联合卡介苗(bacillus Calmette-Guérin vaccine, BCG)的体内抗肿瘤效应。方法: 通过密度梯度离心法分离和纯化 E. G7-OVA 肿瘤细胞来源的 Exo, Western blotting 检测其蛋白成分。分别以 Exo、BCG、Exo + BCG、PBS 免疫小鼠, 以 E. G7-OVA 细胞攻击, 观察各组免疫保护效应; 建立 E. G7-OVA 荷瘤小鼠模型, 观察各组免疫治疗效应。LDH 法检测 4 组免疫小鼠脾细胞 CTL 细胞毒性。结果: Western blotting 检测显示, Exo 含有 HSP60、OVA、HSC70 和 CD63 分子; 免疫保护实验结果显示, Exo + BCG 组免疫小鼠 90 d 无瘤率显著高于 Exo 组和 BCG 组(60% vs 20%、0%, $P < 0.01$); 免疫治疗实验结果显示, Exo + BCG 对小鼠移植瘤的抑制显著强于 Exo 组和 BCG 组($P < 0.01$)。CTL 检测结果显示, Exo + BCG 免疫小鼠的 CTL 细胞特异性杀伤 E. G7-OVA 细胞的活性显著高于其他各组($P < 0.01$)。结论: BCG 作为免疫佐剂能显著增强 exosomes 的体内抗肿瘤效应。

[关键词] E. G7-OVA; Exosomes; 卡介苗; 抗肿瘤效应

[中图分类号] R730.51

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2009)03-0263-04

In vivo anti-tumor effect of tumor cell-derived exosomes combined with BCG

YANG Yun-shan¹, ZHONG Hai-jun^{1*}, XIU Fang-ming², CAI Zhi-jian² (1. Chemotherapy Center, Tumor Hospital of Zhejiang Province, Hangzhou 310022, Zhejiang, China; 2. Institute of Immunology, Zhejiang University, Hangzhou 310058, Zhejiang, China)

[Abstract] **Objective:** To study the *in vivo* anti-tumor effect of exosomes (Exo) combined with bacillus Calmette-Guérin vaccine (BCG). **Methods:** Exo was isolated and purified from culture supernatant of E. G7-OVA tumor cells by density gradient centrifugation. Protein components of Exo were detected by Western blotting. Exo, BCG, Exo combined with BCG (Exo + BCG) or PBS were pre-injected into mice before injection of E. G7-OVA cells, and the anti-tumor effects were observed in each group. Mouse model bearing E. G7-OVA cells was established to examine the immuno-therapy effects of Exo with or without BCG. Cytotoxicity of spleen CTL was measured by LDH in different groups. **Results:** Exo derived from E. G7-OVA cells contained HSP60, OVA, HSC70 and CD63 as detected by Western blotting. Tumor-free rate at 90 d was significantly higher in Exo + BCG vaccinated mice than those in Exo or BCG vaccinated mice as measured by immuno-protective assay (60% vs 20% or 0%, $P < 0.01$). Immuno-therapy assay showed that tumor inhibitory effect in Exo + BCG group was significantly higher than those in Exo or BCG groups ($P < 0.01$). CTL results showed that CTL of Exo + BCG vaccinated mice had significantly enhanced ability to specifically kill target E. G7-OVA cells compared with those of Exo and BCG groups ($P < 0.01$). **Conclusion:** BCG as an immuno-adjuvant can significantly enhance the anti-tumor effect of exosomes *in vivo*.

[Key words] E. G7-OVA; exosomes; BCG; anti-tumor effect

[Chin J Cancer Biother, 2009, 16(3): 263-266]

Exosomes(Exo)是一类直径在 30 ~ 100 nm 之间的双层膜性囊泡^[1], 由包括 DCs^[2]、肿瘤细胞^[3]在内的多种活细胞分泌。由肿瘤抗原肽致敏 DC 来源的 exosomes 可诱导强烈的肿瘤特异性免疫应答^[2]。肿瘤细胞来源的 exosomes 含有肿瘤抗原、热休克蛋白等重要的免疫分子, 可诱导肿瘤抗原特异性的 CTL^[3]。由 DC 和肿瘤细胞来源的 exosomes 已完成 I 期临床试验^[4-5]。肿瘤细胞来源的 exosomes 具有

较低的 T 细胞刺激能力, 因此其抗肿瘤效应需要进

[基金项目] 浙江省医药卫生科研基金资助项目(No. 2008B023)。Supported by the Medicine and Health Research Fund of Zhejiang Province (No. 2008B023)

[作者简介] 杨云山(1971-), 男, 云南省昭通市人, 博士, 主治医师, 主要从事肿瘤免疫治疗研究

* 通讯作者(Corresponding author). E-mail: zhonghaijun@hzcn.com

一步加强。以前的研究^[6]发现,通过 IL-2 基因转染 EG. 7-OVA 肿瘤细胞来源 exosomes 的抗肿瘤效应明显增强;研究^[7]还发现,超抗原锚定在 exosomes 也能显著增强 exosomes 的效应;ODN CpG 亦可增强 exosomes 的抗肿瘤效应^[8],表明佐剂可增强其抗肿瘤免疫反应。卡介苗(bacillus Calmette-Guérin vaccine, BCG)用于预防结核病,其成分是一种有效的免疫佐剂,目前已用于恶性黑色素瘤、肺癌、急性白血病及恶性淋巴瘤等的治疗^[9]。本实验分离和纯化 E. G7-OVA 肿瘤细胞来源的 exosomes,观察其和免疫佐剂卡介苗联合使用的抗肿瘤作用,并对其相关机制进行探讨。

1 材料与方法

1.1 实验动物、细胞和主要试剂

雌性 C57BL/6 小鼠(C57BL/6, H-2^b), 6 ~ 8 周龄,购于中国科学院上海实验动物中心,实验动物合格证号为 SYXK(浙)2007-0098,由动物房按清洁级动物要求饲养。E. G7-OVA 为表达 OVA 转基因的 EL-4 细胞,由美国杜克大学 E. Gilboa 教授提供; B16 黑色素瘤细胞购自 ATCC (Manassas, VA)。E. G7-OVA 细胞在 DMEM 培养液中培养,该培养液含 G 418 (400 $\mu\text{g}/\text{ml}$)。兔抗 HSP70、兔抗 HSP60、兔抗 OVA、兔抗 CD63 购自 Chemicon International (Temecula, CA, USA);鼠抗 HSC 70 单克隆抗体购自 Santa Cruz Biotech (Santa Cruz, CA, USA);羊抗兔辣根过氧化物酶标记的 IgG 二抗购自 Chemicon International (Temecula, CA, USA);卡介苗购自浙江万马药业有限公司。

1.2 Exosomes 的制备

取 E. G7-OVA 细胞 4 $^{\circ}\text{C}$ 下离心, 300 $\times g$ 10 min、1 200 $\times g$ 30 min、10 000 $\times g$ 30 min,去除细胞碎片;然后超速离心 100 000 $\times g$ 60 min 去除残存细胞碎片,所得上清液沉淀即为 exosomes。采用改良方法^[12],用蔗糖密度梯度离心纯化 exosomes,即将沉淀重悬于 1.1 ~ 1.2 g/ml 的蔗糖密度梯度溶液中离心纯化。采用 BCA 法对 exosomes 蛋白质浓度定量,纯化的 exosomes 分装后于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.3 Western blotting 法检测 exosomes 的成分

Exosomes 通过 12% 的聚丙烯酰胺电泳进行分离,随后通过电转移将蛋白转移到醋酸纤维膜上。膜上的成分通过一抗结合,然后加入标有辣根过氧化物酶的二抗,最后经过显影观察结果。一抗包括 HSC70、抗 HSP60、抗 CD63 和抗 OVA 抗体。

1.4 Exosomes 体内免疫保护实验

实验分为 Exo、BCG、Exo + BCG 和 PBS 4 组,每组 10 只小鼠。将 Exo (15 μg)、BCG (100 μg)、Exo (15 μg) + BCG (100 μg) 和 PBS 分别注入各实验组小鼠的左腋皮下,并间隔 2 d 加强 1 次,共 3 次。最后 1 次免疫后第 7 天,用 3.5×10^5 个 E. G7-OVA 肿瘤细胞对小鼠进行接种攻击。观察小鼠的存活期。

1.5 Exosomes 对荷瘤小鼠的免疫治疗实验

通过皮下接种 3.5×10^5 个 E. G7-OVA 肿瘤细胞建立荷瘤小鼠模型,每组 10 只小鼠。在肿瘤接种后的第 3 天,将 Exo (15 μg)、BCG (100 μg)、Exo (15 μg) + BCG (100 μg) 和 PBS 分别注入荷瘤小鼠的左腋皮下,每隔 1 d 治疗免疫 1 次,共 3 次。观察小鼠移植瘤的大小。

1.6 LDH 法检测 exosomes 联合 BCG 体内免疫对 CTL 细胞活性的影响

免疫小鼠脾细胞用培养液调整为 $2 \times 10^7/\text{ml}$,加入经丝裂霉素灭活的 E. G7-OVA 细胞 $4 \times 10^6/\text{ml}$ 再刺激,加 20 U/ml 的鼠 IL-2,培养 7 d。淋巴细胞分离液密度梯度离心除去 E. G7-OVA 细胞,获得经刺激后的小鼠淋巴细胞为效应细胞。E. G7-OVA、B16 细胞分别作为靶细胞和对照靶细胞,细胞密度为 $2 \times 10^6/\text{ml}$ 。通过 LDH 法检测细胞毒性,检测的效靶比为 1: 20、1: 40、1: 80。效应细胞和相应靶细胞在一起混合培养 6 h,细胞毒性通过下列公式进行计算: 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) $\times 100\%$ 。

1.7 统计学处理

所有实验重复 3 次,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 SPSS 10.0 统计软件,用 *t* 检验行统计学分析。

2 结果

2.1 Exosomes 的组成成分

通过 Western blotting 检测 E. G7-OVA 肿瘤细胞来源的 exosomes 中蛋白的组成成分,结果显示, E. G7-OVA 肿瘤细胞来源的 exosomes 含有 HSP60、OVA、HSC70 和 CD63 分子(图 1)。

2.2 Exo + BCG 具有显著的免疫保护效应

免疫保护实验发现:用 E. G7-OVA 攻击后 40 d 内,所有的 PBS 组对照小鼠全部死亡;用 Exo 免疫小鼠能导致 20% 的小鼠 90 d 无瘤($P < 0.01$);用 Exo + BCG 免疫小鼠则能导致 60% 的免疫小鼠 90 d 无瘤($P < 0.01$);单用 BCG 不具有免疫保护效应($P > 0.05$, 图 2)。结果表明 Exo + BCG 能显著延长小鼠的存活期,诱导更有效的抗肿瘤保护性效应。

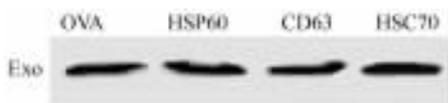


图1 E. G7-OVA 细胞来源 exosomes 的蛋白组成

Fig.1 Protein components of E. G7-OVA cell-derived exosomes

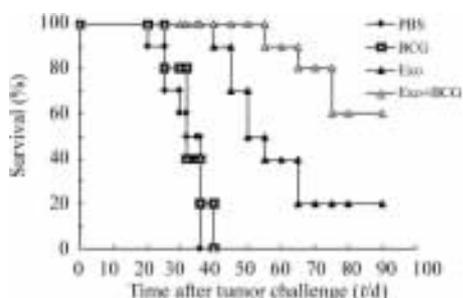


图2 Exo + BCG 对肿瘤细胞攻击的免疫保护效应

Fig.2 Anti-tumor effect of Exo + BCG against tumor cells

2.3 Exo + BCG 具有显著的免疫治疗效应

实验观察了 Exo 及 Exo + BCG 体内免疫对荷瘤小鼠的治疗效应。在荷瘤小鼠的模型中,与 PBS 组相比,Exo 免疫治疗组的肿瘤生长受到显著抑制 ($P < 0.01$); 不过,以 Exo + BCG 免疫治疗的小鼠移植瘤的生长抑制效应更为显著 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 单用 BCG 并无抗肿瘤作用 ($P > 0.05$,图3)。对荷

瘤小鼠的治疗实验表明,Exo 治疗能够抑制荷瘤小鼠的肿瘤生长,但 Exo + BCG 治疗对荷瘤小鼠肿瘤生长的抑制效果更显著 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

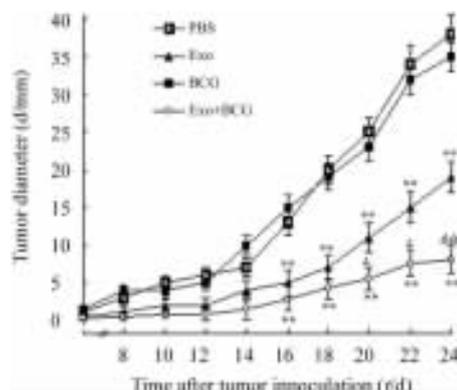


图3 Exo + BCG 对荷瘤小鼠的免疫治疗效应
Fig.3 Immuno-therapy effect of Exo + BCG against pre-established tumors

** $P < 0.01$ vs PBS; $^{\Delta}P < 0.05$ vs Exo

2.4 Exo + BCG 诱导更显著的 CTL 细胞毒性

检测结果表明:以 E. G7-OVA 为靶细胞,Exo + BCG 免疫小鼠的 CTL 活性明显高于其他各组 ($P < 0.01$,图4A);以 B16 为靶细胞,各组免疫小鼠的淋巴细胞均不能杀伤靶细胞 ($P > 0.05$,图4B)。结果表明,Exo + BCG 体内免疫能诱导更显著的 CTL 杀伤活性,而且其诱导的 CTL 是抗原特异性的。

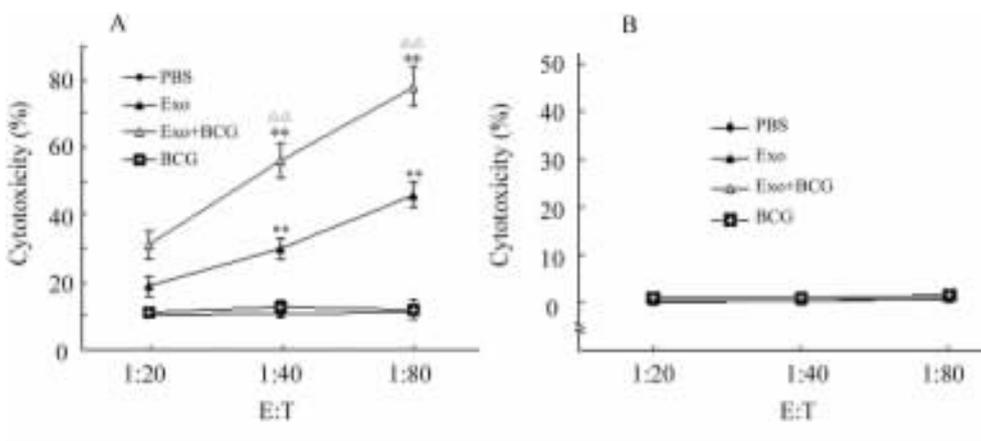


图4 Exo + BCG 诱导的 OVA 特异的 CTL 细胞毒性

Fig.4 OVA specific CTL cytotoxicity induced by Exo + BCG

A: Target cells were E. G7-OVA;B: Target cells were B16; ** $P < 0.01$ vs PBS or BCG; $^{\Delta\Delta}P < 0.01$ vs Exo

3 讨论

Exosomes 是由多种活细胞分泌的来源于多囊体的膜被囊泡,具有独特的蛋白质和脂质成分。抗原肽冲击 DCs 来源的 exosomes 及肿瘤细胞来源 ex-

osomes 能诱导体内抗肿瘤效应,是瘤苗研究的一个热点。DCs 来源的 exosomes 及大肠癌腹水来源的 exosomes 已完成 I 期临床试验。制备 DCs 来源的 exosomes 成本高、耗时多,而肿瘤细胞来源的 exosomes 具有简单、方便的特点。不过,肿瘤细胞来源

的 exosomes 在体内的抗肿瘤效应较有限^[10-12]。研究^[13-14]发现, 通过 IL-2 基因转染肿瘤细胞来源的 exosomes 及通过蛋白锚定的方法将超抗原直接锚定在 exosomes 上能显著增强 exosomes 的抗肿瘤效应。另外, 热休克肿瘤细胞来源的 exosomes 也具有显著的抗肿瘤效应。本研究通过 exosomes 联合卡介苗制备混合型 exosomes, 显示了较强的抗肿瘤作用。

肿瘤细胞来源的 exosomes 是一种新型的肿瘤排斥抗原, 能触发特异性的 CTL 反应。肿瘤细胞来源的 exosomes 能诱导抗肿瘤免疫反应, 产生有效的保护性和治疗性效应, 并且这种抗癌效应能跨越组织和 MHC 限制。肿瘤细胞来源的 exosomes 中存在与细胞靶向性有关的蛋白(CD9) 和肿瘤抗原运载系统热休克蛋白(HSP), 表明 exosomes 是一种抗原传递系统, 能将肿瘤抗原转移到抗原提呈细胞, 如 DC。E. G7-OVA 肿瘤细胞来源的 exosomes 转移肿瘤抗原给 DC, 交叉提呈抗原到 MHC I 分子上, 从而导致 CTL 的活化^[3,12]。Western blotting 检测发现, E. G7-OVA 肿瘤细胞来源的 exosomes 中含有 HSP60、HSC70 及 CD63 等成分。热休克蛋白协助抗原肽的折叠、运输, 结合抗原肽内化到 DCs, 然后转移结合的肽到 MHC I 类分子上, 从而增强 DCs 的抗原提呈能力^[15]。因此, 在 E. G7-OVA 肿瘤细胞来源的 exosomes 中, HSP 在抗原的加工和提呈中发挥重要的作用。

BCG 的免疫增强效应与促进 DCs 的成熟有关。卡介苗的细胞壁骨架可上调 DCs 表面的 MHC I、CD40、CD80、CD86 等分子表达, 促进 DC 的成熟, 增强抗原提呈能力^[16]。Giri 等^[17]发现 BCG 感染的巨噬细胞来源的 exosomes 能诱导抗原特异性的 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞效应, 其机制可能与 BCG 促进 DCs 的成熟, 从而增强其抗原提呈能力有关。

[参 考 文 献]

[1] Coppieters K, Barral AM, Juedes A, *et al.* No significant CTL cross-priming by dendritic cell-derived exosomes during murine lymphocytic choriomeningitis virus infection[J]. *J Immunol*, 2009, 182(4): 2213-2220.

[2] Nolte-t Hoen EN, Buschow SI, Anderton SM, *et al.* Activated T cells recruit exosomes secreted by dendritic cells via LFA-1[J]. *Blood*, 2009, 113(9): 1977-1981.

[3] Klibi J, Niki T, Riedel A, *et al.* Blood diffusion and Th1-suppressive effects of galectin-9-containing exosomes released by Epstein-Barr virus-infected nasopharyngeal carcinoma cells[J]. *Blood*, 2009, 113(9): 1957-1966.

[4] Chaput N, Taïeb J, Scharz NE, *et al.* Exosome-based immuno-

therapy[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2004, 53(3): 234-239.

[5] Dai S, Wei D, Wu Z, *et al.* Phase I clinical trial of autologous ascites-derived exosomes combined with GM-CSF for colorectal cancer[J]. *Mol Ther*, 2008, 16(4): 782-790.

[6] Yang Y, Xiu F, Cai Z, *et al.* Increased induction of antitumor response by exosomes derived from interleukin-2 gene-modified tumor cells[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2007, 133(6): 389-399.

[7] Xiu F, Cai Z, Yang Y, *et al.* Surface anchorage of superantigen SEA promotes induction of specific antitumor immune response by tumor-derived exosomes[J]. *J Mol Med*. 2007, 85(5): 511-521.

[8] Chaput N, Scharz NE, André F, *et al.* Exosomes as potent cell-free peptide-based vaccine. II. Exosomes in CpG adjuvants efficiently prime naive Tc1 lymphocytes leading to tumor rejection [J]. *J Immunol*, 2004, 172(4): 2137-2146.

[9] Udagawa M, Kudo-Saito C, Hasegawa G, *et al.* Enhancement of immunologic tumor regression by intratumoral administration of dendritic cells in combination with cryoablative tumor pretreatment and *Bacillus Calmette-Guérin* cell wall skeleton stimulation[J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(24): 7465-7475.

[10] Xiu FM, Yang YS, Cai ZJ, *et al.* Isolation and characterization of exosomes derived from tumor cells genetically expressing model antigen[J]. *J Microbiol Immunol*, 2004, 2(4): 278-285.

[11] Xiu FM, Cao XT. Exosomes in the immune response and tolerance [J]. *J Microbiol Immunol*, 2004, 2: 231-236.

[12] 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.

[13] 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.

[14] 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.

[15] 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.

[16] Tsuji S, Matsumoto M, Takeuchi O, *et al.* Maturation of human dendritic cells by cell wall skeleton of *Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin*: involvement of toll-like receptors[J]. *Infect Immun*. 2000, 68(12):6883-6890.

[17] Giri PK, Schorey JS. Exosomes derived from M. Bovis BCG infected macrophages activate antigen-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells *in vitro* and *in vivo*[J]. *PLoS ONE*, 2008, 3(6): e2461.

[收稿日期] 2009-02-24

[修回日期] 2009-04-20

[本文编辑] 王莹