

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2013.01.002

· 研究快报 ·

## 白血病细胞来源胞外体的生物学特性及其致敏 DC 的抗白血病效应

姚焯<sup>1</sup>, 王椿<sup>2</sup>, 沈畅<sup>2</sup>, 陈琳军<sup>1</sup>, 邓晓辉<sup>1</sup>, 郝思国<sup>1</sup>(1. 上海交通大学医学院附属新华医院 血液科, 上海 200092; 2. 上海交通大学医学院附属第一人民医院 血液科, 上海 200080)

**[摘要]** **目的:**探索白血病细胞来源的胞外体(leukemia cell-derived exosome, LEX)的生物学特性及其致敏 DC 的抗白血病免疫效应。**方法:**超速离心分离纯化 BCR-ABL 阳性的白血病 K562 细胞来源的胞外体(LEX<sub>K562</sub>),采用免疫电镜及 Western blotting 检测 LEX<sub>K562</sub> 中热激蛋白 70(heat shock protein 70, HSP70)及 BCR-ABL 的表达,采用激光扫描共聚焦显微镜及流式细胞术检测 LEX<sub>K562</sub> 靶向结合 DC 的动力学,采用 LDH 释放法以及小鼠模型体内实验检测 LEX 及其致敏 DC 的抗白血病免疫效应。**结果:**与其他细胞来源的胞外体相似, K562 细胞来源的胞外体 LEX<sub>K562</sub> 为直径 50~100 nm 的囊状结构,且表达 K562 细胞特异性的 BCR-ABL 和 HSP70 分子。LEX<sub>K562</sub> 在体外可靶向结合 DC, 3~4 h 到达高峰,并能在 DC 中稳定存在 72 h 以上。LEX<sub>K562</sub> 致敏 DC(DC/LEX<sub>K562</sub>)诱导的细胞毒性 T 淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)可有效杀伤 K562 靶细胞,效靶比为 50:1 时,其杀伤活性显著高于 LEX<sub>K562</sub> 诱导的 CTL[(68.6±5.7)% vs (22.5±2.9)%,  $P < 0.01$ ];体内实验进一步证实,白血病 L1210 细胞来源的胞外体(LEX<sub>L1210</sub>)免疫后小鼠接种 L1210 细胞的成瘤率明显高于 LEX<sub>L1210</sub> 致敏 DC(DC/LEX<sub>L1210</sub>)免疫小鼠的成瘤率[(54.17±8.33)% vs (16.67±4.18)%,  $P < 0.05$ ]。**结论:**LEX 表达白血病细胞相关抗原, LEX 体外可靶向结合 DC, 其致敏的 DC 能诱导更强的抗白血病免疫效应。

**[关键词]** 白血病细胞; K562 细胞; L1210 细胞; 胞外体; 树突状细胞; 免疫治疗

**[中图分类号]** R733.7; R730.54

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2013)01-0013-07

## Biological properties of leukemia cell-derived exosome and anti-leukemia effects of its sensitized DCs

Yao Ye<sup>1</sup>, Wang Chun<sup>2</sup>, Shen Chang<sup>2</sup>, Chen Linjun<sup>1</sup>, Deng Xiaohui<sup>1</sup>, Hao Siguo<sup>1</sup>(1. Department of Hematology, Affiliated Xinhua Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200092, China; 2. Department of Hematology, Affiliated First People's Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200080, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the biological properties of leukemia cell-derived exosomes (LEXs) and the anti-leukemia immunological effect of LEX-sensitized dendritic cells (DCs). **Methods:** LEX from BCR-ABL positive leukemia K562 cells was separated and purified by ultracentrifugation. The expressions of heat shock protein 70 (HSP70) and BCR-ABL were investigated by immuno-electron microscopy and Western blotting. The kinetics of LEX<sub>K562</sub> targeted binding to DCs was examined by laser scanning confocal microscopy and flow cytometry. The anti-leukemia immunological effect of LEX and its sensitized DCs was explored by LDH release assay and *in vivo* mouse model studies. **Results:** K562 cell-derived exosomes (LEX<sub>K562</sub>) had cystic structures between 50 and 100 nm diameter as the other cell-derived exosomes, and expressed K562 cell specific proteins, HSP70 and BCR-ABL. LEX<sub>K562</sub> could target and bind DCs *in vitro*, and reached a plateau after 3 to 4 h of co-culturing. LEX<sub>K562</sub> uptaken in DCs was quite stable for over 72 h. Cytotoxic T lymphocytes (CTLs) induced by LEX<sub>K562</sub>-sensitized DCs (DC/LEX<sub>K562</sub>) could effectively kill K562 target cells, and their cytotoxicity was significantly higher than that of CTLs induced by LEX<sub>K562</sub> [(68.6±5.7)% vs [22.5±2.9)%,  $P < 0.01$ ] at an

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目(No. 81070432);上海市浦江人才计划资助项目(No. 08PJ1407600)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81070432), and the Pujiang Program for Talents of Shanghai (No. 08PJ1407600)

**[作者简介]** 姚焯(1987-),女,上海市人,硕士生,主要从事恶性血液病免疫治疗的基础和临床研究。E-mail: xiaofeiyuan04@163.com

**[通信作者]** 郝思国(Hao Siguo, corresponding author), E-mail: haosghj88@hotmail.com

**[网络出版]** http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20130116.0826.005.html

effector to target ratio of 50:1. Furthermore, the *in vivo* study demonstrated that the incidence of tumor in mice incubation with leukemia L1210 cells after being immunized with L1210-derived exosomes (LEX<sub>L1210</sub>) was significantly higher than that of LEX<sub>L1210</sub>-sensitized DCs ([54.17 ± 8.33]% vs [16.67 ± 4.18]%,  $P < 0.05$ ). **Conclusion:** LEX expresses antigens associated with leukemia cells and can target bind DCs *in vitro*. LEX-sensitized DCs can induce a stronger anti-leukemia immunological effect.

[ **Key words** ] leukemia cell; K562 cell; L1210 cell; exosome; dendritic cell; immunotherapy

[ Chin J Cancer Biother, 2013, 20(1): 13-19 ]

微小残留病 (minimal residual disease, MRD) 是引起白血病患者治疗后复发的根本原因<sup>[1]</sup>。目前, 主要依靠大剂量巩固化疗和异基因造血干细胞移植 (allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, allo-HSCT) 来清除 MRD。在 allo-HSCT 中, 移植物抗白血病 (graft versus leukemia, GVL) 免疫效应在清除移植后 MRD、减少复发方面至关重要, 但是这种非特异性的免疫效应常常伴有严重移植物抗宿主病, 是目前造血干细胞移植患者死亡的主要原因<sup>[2]</sup>。研究<sup>[3-4]</sup>显示, 免疫治疗可进一步清除白血病患者治疗后体内残留的白血病细胞, 减少白血病复发, 延长患者的生存期, 改善白血病患者的预后。因此, 探寻针对残留白血病细胞的特异性免疫治疗一直是白血病等治疗研究的热点。

胞外体 (exosome, EXO) 是真核细胞释放的、含有多重细胞膜分子的小囊泡, 由细胞内的多泡体膜与细胞膜融合后, 释放到细胞外。多种类型细胞能释放 EXO, 其中包括树突状细胞 (dendritic cell, DC)、淋巴细胞、肥大细胞、肠上皮细胞以及多种肿瘤细胞<sup>[5-6]</sup>。

近年来有研究<sup>[7-8]</sup>证实, 肿瘤细胞来源的胞外体 (tumor cell-derived exosome, TEX) 可表达肿瘤相关抗原, 并能诱导有效的抗肿瘤免疫效应。从肿瘤患者胸、腹水分离的 TEX 同样能诱导肿瘤抗原特异性的免疫应答<sup>[8-9]</sup>。白血病细胞能释放白血病细胞来源 EXO (leukemia cell-derived exosome, LEX)。Wolfers 等<sup>[9]</sup>研究证实, L1210 白血病细胞体外培养时能释放 LEX。然而, 国内外对 LEX 的生物学特性尚缺乏系统性研究。本课题对 BCR-ABL 阳性的 K562 白血病细胞来源 LEX 的生物学特性及其致敏 DC 的抗白血病免疫效应进行研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞株与主要试剂

白血病细胞株 K562 购于上海市血液学研究

所, L1210 白血病细胞株购于中国医学科学院细胞学研究所。RPMI 1640 细胞培养基、胎牛血清购自美国 Gibco 公司, 重水 (D<sub>2</sub>O) 购自青岛腾龙微波科技有限公司, 兔抗人 ABL 抗体及鼠抗人 HSP70 抗体购自美国 Santa Cruz 公司, 蛋白检测试剂盒购自美国 Bio-Rad 公司, 重组人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, rhGM-CSF)、重组人白细胞介素-4 (recombinant human interleukin-4, rhIL-4)、rhIL-2 购自美国 Peprotech 公司, CytoTox96 细胞毒检测试剂盒为美国 Promega 公司生产, 无血清培养基 AIM-V 购自美国 Invitrogen 公司。DBA/2 小鼠购于上海西普尔-必凯实验动物有限公司 [动物合格证号: SCXK(沪)2008-0016], 饲养于本院动物房。

### 1.2 K562、L1210 细胞来源 LEX 的分离和纯化

将白血病细胞株 K562 和 L1210 置于 37 °C、5% 饱和湿度 CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中, 在含 10% 的灭活胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中培养。在细胞活力较好的情况下, 以无血清培养基 AIM-V 培养细胞 1~2 d, 收集细胞培养上清。培养上清 800 × g 离心 30 min 后, 10 000 × g 高速离心 60 min, 以去除细胞碎片以及颗粒蛋白等; 4 °C 下 100 000 × g 超速离心 60 min, 收集沉淀。将沉淀悬浮于适量 PBS 中, 再采用蔗糖和 D<sub>2</sub>O 密度梯度离心法提纯 LEX<sup>[10]</sup>。简言之, 以 30 g/L 蔗糖和 D<sub>2</sub>O 为密度垫, 4 °C 下 100 000 × g 超速离心 50 min, 收集底部的缓冲垫, PBS 稀释, 于 4 °C 下 100 000 × g 超速离心 60 min, 获得纯化的 K562 及 L1210 细胞的 LEX, 记作 LEX<sub>K562</sub> 和 LEX<sub>L1210</sub>。采用 Bradford 法<sup>[11-12]</sup>对 LEX 进行蛋白定量。

### 1.3 白血病 K562、L1210 细胞冻融物的制备

按 Pawlowska 等<sup>[13]</sup>的方法略改。简言之, 收集培养的 K562 及 L1210 白血病细胞, PBS 洗涤 2 次, 用 PBS 将细胞制成 5 × 10<sup>7</sup>/ml 细胞悬液, 放入冻存管内, 迅速投入液氮, 待冻结后取出, 在室温下自然解冻, 如此反复 4 次。收集含 1 × 10<sup>9</sup> 个 K562 及 L1210 细胞的冻融物 (记作 Lys<sub>K562</sub> 和 Lys<sub>L1210</sub>), 800 × g 离心 30 min, 取上清液, 0.22 μm 的微孔滤膜过滤, -20 °C

冻存备用。细胞冻融液的蛋白定量同 LEX。

#### 1.4 透射电镜观察 LEX<sub>K562</sub> 的形态

透射电镜观察 LEX<sub>K562</sub> 的形态,参考 Shen 等<sup>[10]</sup>的方法。简言之,将 10 μg LEX<sub>K562</sub> 颗粒重悬于 2 μl PBS 中,短暂旋转以分散颗粒;加入 15 μl 2.5% 戊二醛溶液,室温下孵育 30 min 固定 LEX<sub>K562</sub>;吸取 3~6 μl 固定的 LEX<sub>K562</sub>,滴在铜网上,并让其彻底干燥;滴加 5% 醋酸铀染液约 50 μl 于铜网上,室温负染 10 min;滤纸吸干负染液,待铜网干燥后,透射电镜下观察。

#### 1.5 免疫电镜检测 LEX<sub>K562</sub> 中 HSP70 及 BCR-ABL 的表达

免疫电镜检测 LEX<sub>K562</sub> 中 HSP70 及 BCR-ABL 的表达,参考 Shen 等<sup>[10]</sup>的方法。取 20 μl LEX<sub>K562</sub> 悬浮液,加入 20 μl 2% 多聚甲醛溶液,室温下孵育 1 h 进行标本固定;吸取 3~6 μl 已固定的 LEX<sub>K562</sub>,滴在镍网上,并让其彻底干燥;再分别滴加 30 μl 经 1:100 稀释的鼠抗人 HSP70、1:200 稀释的兔抗人 ABL 一抗溶液,置室温孵育 30 min,4 °C 孵育过夜;取 1:20 稀释的葡萄球菌蛋白 A (staphylococcal protein A, SPA) 25 μl 滴于干净平整的疏水膜上,形成液珠状。镊取电镜载网,膜面向下漂于 SPA 液滴上,室温孵育 2 h 后取出标本,缓冲液漂洗后,滴加 5% 醋酸铀染液约 50 μl 于镍网上,室温负染 10 min。同时以 PBS 代替一抗设立对照。免疫电镜观察 LEX<sub>K562</sub> 的染色情况,LEX<sub>K562</sub> 外膜及腔内含有黑色胶体金颗粒者为 HSP70 阳性或 BCR-ABL 阳性 LEX<sub>K562</sub>。

#### 1.6 Western blotting 检测 LEX<sub>K562</sub> 中 HSP70 及 BCR-ABL 的表达

取 5 μg LEX<sub>K562</sub> 及 5 μg 白血病 K562 细胞裂解物(作为对照),用 SDS 样品缓冲液[40 mmol/L Tris-Cl(pH 6.8),4 mmol/L EDTA,5% SDS,20% 甘油,4% 2-巯基乙醇]重悬,95 °C 下加热 5 min,加 0.13 mol/L DTT,进行 SDS-PAGE。转膜后用 5% BSA 室温封闭 2 h,加入 1:100 稀释的兔抗人 ABL 抗体或鼠抗人 HSP70 抗体,37 °C 孵育 1 h;再与辣根过氧化物酶标记的二抗 37 °C 孵育 1 h,用增强型化学发光 ECL 显色,X 线片曝光,分析结果。

#### 1.7 DC 的体外诱导培养

DC 的诱导培养参考 Hao 等<sup>[11]</sup>的方法。简言之,用淋巴细胞分层液 Ficoll 分离慢性粒细胞白血病(chronic myeloid leukemia, CML)患者外周血或 DBA/2 小鼠骨髓细胞来源的单个核细胞,调整细胞密度至  $4 \times 10^6$ /ml,放置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养

箱中孵育 2 h。保留贴壁细胞,加入含 10% 的胎牛血清、rhGM-CSF 100 ng/ml、rhIL-4 10 ng/ml 的 RPMI 1640 完全培养基,置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养,第 4 天换液并补充相应的细胞因子,第 6 天收集 DC 备用。

#### 1.8 流式细胞术检测 LEX<sub>K562</sub> 靶向结合 DC

前期研究<sup>[11]</sup>显示,DC 释放的胞外体能够在体外靶向结合 DC,并能传递抗原给 DC,使后者能诱导抗原特异性的免疫反应。为了检测 LEX 能否体外靶向结合 DC,本研究对 LEX<sub>K562</sub> 靶向结合 DC 的时效动力学进行了观察。首先应用 CFSE 标记 LEX<sub>K562</sub>,然后将其与 DC 共培养,在不同的时间段收集 DC,并采用流式细胞术及激光扫描共聚焦显微镜观察 DC 中 CFSE 表达水平的变化。同时收集结合高峰期的 DC, PBS 洗涤 2 次,继续培养,观察 DC 中 CFSE 的表达水平。将 LEX<sub>K562</sub> 靶向结合的 DC 记为 DC/LEX<sub>K562</sub>。

#### 1.9 LEX<sub>K562</sub> 诱导抗白血病 CTL 效应的检测

为了探索 LEX 及其体外靶向结合 DC 能否诱导抗白血病的 CTL 免疫反应,对 LEX<sub>K562</sub> 及 DC/LEX<sub>K562</sub> 诱导的 CTL 杀伤 K562 靶细胞的活性进行了检测,并与 K562 细胞冻融抗原(Lys<sub>K562</sub>)及其体外致敏的 DC(DC/Lys<sub>K562</sub>)进行比较。

1.9.1 T 细胞的分离及 CTL 效应细胞的制备 实验方法参考文献[11,14]略改。Ficoll 淋巴细胞分离液分离 CML 患者的外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC), Tris-NH<sub>4</sub>Cl 裂解红细胞,静置 2 h,轻吸未黏附的细胞,采用尼龙毛柱滤过法分离纯化 T 细胞。锥虫蓝染色法检测存活率 >90%。调整 T 细胞密度至  $1.5 \times 10^6$ /ml,按不同的刺激物分 6 组: PBS 组, Lys<sub>K562</sub> 组, LEX<sub>K562</sub> 组, 未致敏 DC 组, DC/Lys<sub>K562</sub> 组及 DC/LEX<sub>K562</sub> 组。细胞培养于 RPMI 1640 培养基(含 10% 人 AB 血清、 $1 \times 10^5$  U/L 青霉素、100 mg/L 链霉素、 $5 \times 10^5$  mol/L 2-ME 以及  $1 \times 10^3$  mol/L 谷氨酰胺)中,每 3 d 用含 IL-2(100 U/ml)的培养基换液,第 14 天收集细胞作为 CTL 效应细胞。

1.9.2 LDH 释放法检测 CTL 细胞杀伤活性 选取生长较好的 K562 细胞作为靶细胞,采用 CytoTox96 细胞毒检测试剂盒,按说明书进行操作。按 E:T 为 6.25:1、12.5:1、25:1 以及 50:1 将 DC 与 T 细胞混合培养于 96 孔板中,另设 K562 靶细胞自然释放孔、K562 靶细胞最大释放孔、效应细胞自然释放孔、每组设 3 个复孔,37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 4 h 后吸取上清,酶标仪下读取光密度值( $D_{490}$ )。CTL 杀伤活性(%) = (实验组  $D$  - 靶细胞自然释放  $D$  - 效

应细胞自然释放  $D$ )/(靶细胞最大释放  $D$  - 靶细胞自然释放  $D$ )  $\times 100\%$ 。

### 1.10 LEX 致敏的 DC 诱导小鼠抗白血病免疫保护效应

为进一步检测 LEX 及其致敏 DC 诱导的抗白血病免疫效应,应用 L1210 白血病细胞作为细胞模型,分离纯化 L1210 细胞胞外体(LEX<sub>L1210</sub>)及其冻融物(Lys<sub>L1210</sub>)。应用 LEX<sub>L1210</sub> 及 Lys<sub>L1210</sub> 体外致敏 DC,分别记作 DC/LEX<sub>L1210</sub> 和 DC/Lys<sub>L1210</sub>。DBA/2 小鼠作为模型动物,随机分为 6 组,每组 8 只:PBS 组, Lys<sub>L1210</sub> (30  $\mu\text{g}$ ) 组, LEX<sub>L1210</sub> (30  $\mu\text{g}$ ) 组,未致敏的 DC ( $1 \times 10^6$ /只)组,DC/Lys<sub>L1210</sub> ( $1 \times 10^6$ /只)组以及 DC/LEX<sub>L1210</sub> ( $1 \times 10^6$ /只)组。所有小鼠在其大腿内侧接种相应疫苗,接种 7 d 后,在其大腿外侧接种 L1210 白血病细胞 ( $5 \times 10^5$ /只),观察肿瘤生长情况,若肿瘤直径超过 2.5 cm 则处死小鼠。实验重复 3 次。

### 1.11 统计学处理

采用 SPSS10.0 统计学软件,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,进行  $t$  检验,以  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 LEX<sub>K562</sub> 的形态学特征

K562 细胞培养上清经 100 000  $\times g$  超速离心获得 LEX<sub>K562</sub>,透射电镜观察发现,LEX<sub>K562</sub> 与先前报道的 DC 以及其他白血病细胞释放的胞外体在形态和大小上相似<sup>[10]</sup>,为直径 50 ~ 100 nm 的囊泡状结构,圆形或椭圆形(图 1)。

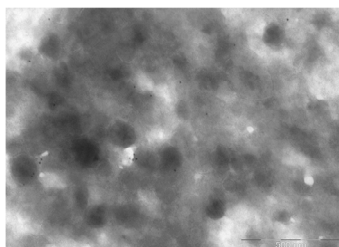


图 1 透射电镜观察 LEX<sub>K562</sub> 的形态(  $\times 40\ 000$  )

Fig.1 Morphology of LEX<sub>K562</sub> observed under transmission electron microscope (  $\times 40\ 000$  )

### 2.2 LEX<sub>K562</sub> 表达 HSP70、BCR-ABL 蛋白

为了解 LEX<sub>K562</sub> 是否表达 K562 细胞特异性的蛋白,本研究采用免疫电镜进行了检测。结果(图 2)显示,( $80 \pm 13.2$ )% 以上的 LEX<sub>K562</sub> 能被 HSP70 单抗标记,( $60 \pm 10.9$ )% 的 LEX<sub>K562</sub> 能被 BCR-ABL 单

抗标记。结果表明,LEX<sub>K562</sub> 表达 K562 细胞特异性的 HSP70、BCR-ABL 蛋白。

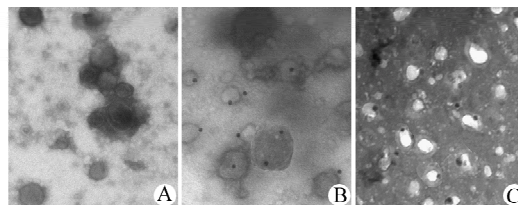


图 2 免疫电镜检测 LEX<sub>K562</sub> 中 HSP70、BCR-ABL 蛋白的表达(  $\times 40\ 000$  )

Fig.2 Expressions of HSP70 and BCR-ABL proteins in LEX<sub>K562</sub> under immuno-electron microscope(  $\times 40\ 000$  )

A: Ctrl; B: HSP70; C: BCR-ABL

为进一步验证 LEX<sub>K562</sub> 表达 HSP70 和 BCR-ABL 蛋白的情况,采用 Western blotting 对 LEX<sub>K562</sub> 中 HSP70 及 BCR-ABL 的表达进行分析。结果(图 3)显示,与 K562 白血病细胞一样,LEX<sub>K562</sub> 也表达 HSP70 及 BCR-ABL 蛋白,提示 LEX<sub>K562</sub> 表达来源于 K562 细胞的蛋白分子 HSP70 和 BCR-ABL。

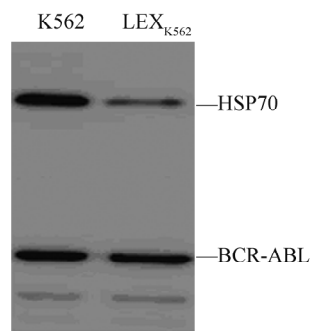
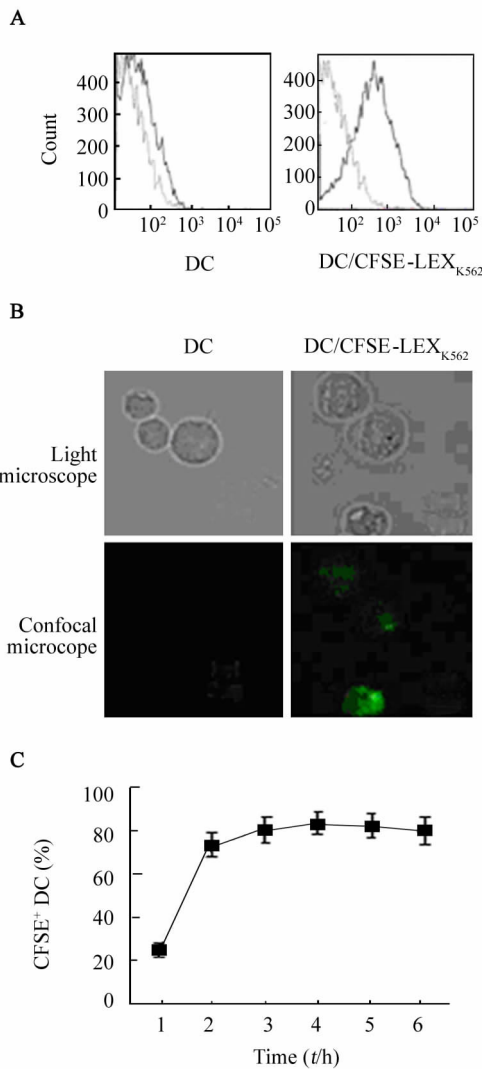


图 3 Western blotting 检测 LEX<sub>K562</sub> 中 HSP70 及 BCR-ABL 的表达

Fig.3 Expressions of HSP70 and BCR-ABL in LEX<sub>K562</sub> detected by Western blotting

### 2.3 LEX<sub>K562</sub> 靶向结合 DC 的时效动力学

为明确 LEX<sub>K562</sub> 能否在体外靶向结合 DC 及其靶向结合 DC 的时效动力学,用 CFSE 标记 LEX<sub>K562</sub>,然后将标记的 LEX<sub>K562</sub> 与 DC 在体外共培养,在培养的不同时间段采用流式细胞术以及共聚焦显微镜检测 DC 中 CFSE 的表达。结果(图 4)显示,DC 在体外可以摄取 LEX<sub>K562</sub>,并在 3 ~ 4 h 达到高峰。通过对靶向结合 DC 的进一步培养观察,发现 LEX<sub>K562</sub> 可在 DC 内保留 72 h 以上。结果说明,LEX<sub>K562</sub> 能够在体外稳定地靶向结合 DC。

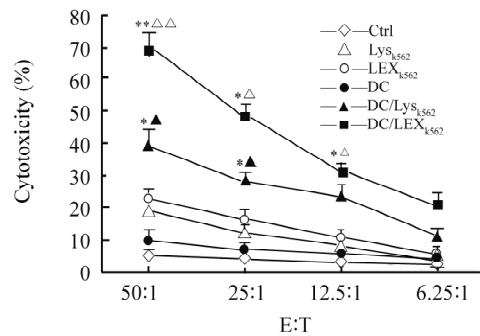
图4 LEX<sub>K562</sub>体外靶向结合DCsFig. 4 *In vitro* targeted binding of LEX<sub>K562</sub> to DCs

A: DCs with or without uptake of CFSE-LEX<sub>K562</sub> were analyzed for CFSE expression by flow cytometry; B: DCs were co-cultured with CFSE-LEX<sub>K562</sub> for 4 h and examined under confocal microscope (×100); C: CFSE-positive DCs were monitored at 1 h interval for up to 6 h of culturing under confocal microscope

#### 2.4 LEX<sub>K562</sub>致敏DC诱导抗白血病CTL效应

上述实验结果显示, LEX<sub>K562</sub>表达来源于K562白血病细胞的蛋白,同时能够体外靶向结合DC。为了探索LEX<sub>K562</sub>能否同其他肿瘤细胞释放的胞外体一样诱导抗白血病免疫效应,对LEX<sub>K562</sub>及其致敏的DC诱导的CTL效应进行了初步观察,并与Lys<sub>K562</sub>进行了比较。结果(图5)显示,对照组CTL效应细胞在不同E:T条件下均无杀伤K562靶细胞的活性,LEX<sub>K562</sub>和Lys<sub>K562</sub>组所激活的CTL对K562靶细胞均显示出一定的杀伤活性,其杀伤率明显高于对照组。进一步研究LEX<sub>K562</sub>和Lys<sub>K562</sub>体外致敏DC

(DC/LEX<sub>K562</sub>和DC/Lys<sub>K562</sub>)激活的CTL杀伤活性时发现,DC/LEX<sub>K562</sub>组CTL的杀伤活性明显高于LEX<sub>K562</sub>组( $P < 0.05$ );而DC/Lys<sub>K562</sub>组CTL的杀伤活性也显著高于Lys<sub>K562</sub>组( $P < 0.05$ )。因此,DC/LEX<sub>K562</sub>所诱导的CTL细胞具有更强的杀伤活性。有趣的是,LEX<sub>K562</sub>致敏DC能诱导比Lys<sub>K562</sub>致敏DC更强的杀伤靶细胞的CTL效应[(68.6 ± 5.7)% vs (38.9 ± 5.1)%,  $P < 0.05$ ]。结果提示,LEX较冻融抗原在诱导抗白血病免疫效应方面更具优势,而未被LEX<sub>K562</sub>以及冻融抗原致敏的DC则不能诱导出有效的CTL效应。结果说明,DC/LEX能够诱导抗原特异性的抗白血病效应。

图5 LEX<sub>K562</sub>及DC/LEX<sub>K562</sub>诱导的抗K562白血病细胞的CTL效应Fig. 5 Anti-K562 leukemia cell CTL response induced by LEX<sub>K562</sub> and DC/LEX<sub>K562</sub>

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs Ctrl group;  $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$  vs LEX<sub>K562</sub> group;  $\blacktriangle P < 0.05$  vs Lys<sub>K562</sub> group

#### 2.5 LEX致敏DC诱导小鼠体内抗白血病免疫保护效应

为进一步验证LEX致敏的DC能否在体内诱导抗白血病免疫效应,采用L1210白血病细胞释放的胞外体(LEX<sub>L1210</sub>)及其致敏DC(DC/LEX<sub>L1210</sub>)免疫DBA/2小鼠,再应用L1210白血病细胞攻击,观察LEX<sub>L1210</sub>及DC/LEX<sub>L1210</sub>诱导的抗白血病免疫保护效应,并与L1210细胞冻融抗原(Lys<sub>L1210</sub>)进行了比较。结果(图6)显示,对照组小鼠10 d后注射部位均长出肿瘤,LEX<sub>L1210</sub>接种组小鼠的成瘤率明显低于对照组( $P = 0.03$ );而接种DC/LEX<sub>L1210</sub>组小鼠的成瘤率进一步降低,且显著低于接种LEX<sub>L1210</sub>组[(16.67 ± 4.18)% vs (54.17 ± 8.33)%,  $P = 0.005$ ]。此外,Lys<sub>L1210</sub>致敏DC接种组(DC/Lys<sub>L1210</sub>)小鼠的成瘤率也显著低于接种Lys<sub>L1210</sub>组,

而未致敏 DC 接种组小鼠的成瘤率达到(95.83 ± 4.17)%。结果提示, DC/LEX<sub>L1210</sub> 在体内能够诱导高效的抗原特异性的抗白血病免疫保护作用。

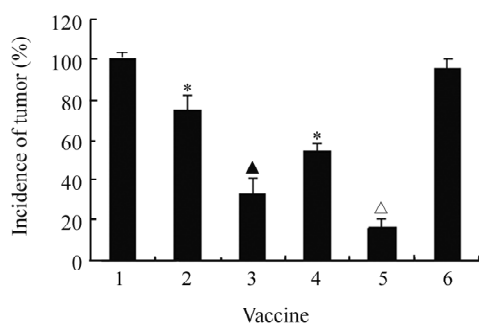


图 6 LEX<sub>L1210</sub> 及 DC/LEX<sub>L1210</sub> 诱导体内抗白血病免疫保护效应(  $\bar{x} \pm s, \%$  )

Fig. 6 *In vivo* anti-leukemia immunological protective effect induced by LEX<sub>L1210</sub> and DC/LEX<sub>L1210</sub> (  $\bar{x} \pm s, \%$  )

1: Ctrl; 2: Lys<sub>L1210</sub>; 3: DC/Lys<sub>L1210</sub>;

4: LEX<sub>L1210</sub>; 5: DC/LEX<sub>L1210</sub>; 6: DC

\*  $P < 0.05$  vs Ctrl group;  $\Delta P < 0.05$  vs LEX<sub>L1210</sub> group;

$\Delta P < 0.05$  vs Lys<sub>L1210</sub> group

### 3 讨论

TEX 可表达肿瘤相关抗原,并能诱导有效的抗肿瘤免疫效应<sup>[7,9,15]</sup>。Wolfers 等<sup>[9]</sup>研究证实,TEX 的形态学特征与 DC 来源胞外体相似,因此,可以从肿瘤细胞培养上清液、肿瘤患者血液及恶性渗出液中分离纯化得到 TEX。与 DC 来源胞外体相似,TEX 同样表达 MHC-I、LAMP-1、TS、HSP70、HSP80 以及肿瘤相关抗原,并能诱导肿瘤抗原特异性 CTL 免疫效应。Altieri 等<sup>[16]</sup>研究证实,骨髓瘤细胞株 J558 释放的 TEX 表达 P1A 骨髓瘤细胞抗原,并在体内诱导抗骨髓瘤免疫效应,使 80% 的小鼠获得免疫保护效应。从肿瘤患者胸、腹水分离的 TEX 同样能诱导肿瘤抗原特异性的免疫反应<sup>[8]</sup>。目前完成的几个基于 TEX 的肿瘤免疫治疗临床试验,均取得了一定的临床效果<sup>[17-20]</sup>。因此,肿瘤细胞释放的 TEX 有望成为肿瘤免疫治疗的肿瘤抗原的来源。

白血病细胞能否释放胞外体是近年研究的热点,NB4、K562、L1210 等白血病细胞株在体外培养中均能释放 LEX,并能在体外诱导一定的抗白血病 CTL 效应<sup>[10,21]</sup>,但是对 LEX 的生物学特性和体内抗白血病效应缺乏系统研究。本研究对 BCR-ABL 阳性的白血病 K562 细胞释放的 LEX<sub>K562</sub> 进行了初步研

究,发现 K562 白血病细胞释放的 LEX<sub>K562</sub> 与肿瘤细胞释放的胞外体相似,为 50 ~ 100 nm 的囊状结构。免疫电镜和 Western blotting 检测结果显示,LEX<sub>K562</sub> 表达 K562 细胞来源的 BCR-ABL 和 HSP70 蛋白。体外杀伤实验结果发现,LEX<sub>K562</sub> 能诱导抗白血病 CTL 免疫反应;小鼠体内实验也证实,LEX<sub>L1210</sub> 预接种能在体内诱导抗白血病免疫保护效应,使 50% 的小鼠获得免疫保护,明显强于 L1210 细胞冻融抗原 Lys<sub>L1210</sub> 预接种组,提示 LEX 所诱导的抗白血病免疫效应优于白血病细胞冻融抗原。

对 TEX 能否诱导抗肿瘤免疫,目前尚存争议。有报道<sup>[22]</sup>显示,TEX 可能对宿主免疫系统具有抑制效应,甚至可促进肿瘤细胞生长,这可能与肿瘤细胞培养条件不同有关。尽管如此,单用 TEX 所诱导的抗白血病免疫效应较弱,难以满足临床治疗的需要。因此,如何提高 LEX 的抗白血病免疫效应是以 LEX 为基础白血病免疫治疗的关键。本课题组前期研究<sup>[11]</sup>提示,DEX 体外致敏的 DC 能诱导较 DEX 更强的抗肿瘤免疫效应。为此,本研究应用 LEX 体外致敏 DC,并检测其所诱导的体外抗白血病 CTL 免疫反应,以及体内抗白血病免疫保护效应。结果显示,LEX<sub>K562</sub> 体外能在 4 h 内靶向结合 DC,LEX<sub>K562</sub> 致敏的 DC 具有较 LEX<sub>K562</sub> 更强的抗白血病 CTL 反应及抗白血病免疫保护作用。

LEX 有明显的抗白血病作用,是一种有效的抗白血病疫苗。LEX 为非活体细胞,易于分离和纯化,能够长期冻存,稳定,无致瘤性。同时 LEX 在体外能高效地结合 DC,其致敏 DC 能诱导更强的抗原特异性抗白血病免疫效应。因此,LEX 及其致敏 DC 有望开发成高效的白血病疫苗。

### [参考文献]

- Campana D. Minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia [J]. Hematol Am Soc Hematol Educ Program, 2010, (1): 7-12.
- Kolb HJ. Graft-versus-leukemia effects of transplantation and donor lymphocytes [J]. Blood, 2008, 112(12): 4371-4383.
- Oka Y, Tsuboi A, Taguchi T, et al. Induction of WT1 (Wilms' tumor gene)-specific cytotoxic T lymphocytes by WT1 peptide vaccine and the resultant cancer regression [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(38): 13885-13890.
- Mailander V, Scheibenbogen C, Thiel E, et al. Complete remission in a patient with recurrent acute myeloid leukemia induced by vaccination with WT1 peptide in the absence of hematological or renal toxicity [J]. Leukemia, 2004, 18(1): 165-166.
- Skokos D, Le Panse S, Villa I, et al. Mast cell-dependent B and T lymphocyte activation is mediated by the secretion of immunolog-

- ically active exosomes [ J ]. J Immunol, 2001, 166( 2 ): 868-876.
- [ 6 ] Hao S, Moyana T, Xiang J. Cancer immunotherapy by exosome-based vaccines [ J ]. Cancer Biother Radiopharm, 2007, 22( 5 ): 692-703.
- [ 7 ] Andre F, Scharz NE, Chaput N, et al. Tumor-derived exosomes: A new source of tumor rejection antigens [ J ]. Vaccine, 2002, 20 ( Suppl 4 ): A28-A31.
- [ 8 ] Andre F, Scharz NE, Movassagh M, et al. Malignant effusions and immunogenic tumour-derived exosomes [ J ]. Lancet, 2002, 360( 9329 ): 295-305.
- [ 9 ] 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.
- [ 10 ] Shen C, Hao SG, Zhao CX, et al. Antileukaemia immunity: Effect of exosomes against NB4 acute promyelocytic leukaemia cells [ J ]. J Int Med Res, 2011, 39( 3 ): 740-747.
- [ 11 ] Hao S, Bai O, Li F, et al. Mature dendritic cells pulsed with exosomes stimulate efficient cytotoxic T-lymphocyte responses and antitumour immunity [ J ]. Immunology, 2007, 120( 1 ): 90-102.
- [ 12 ] Hao S, Ye Z, Li F, et al. Epigenetic transfer of metastatic activity by uptake of highly metastatic B16 melanoma cell-released exosomes [ J ]. Exp Oncol, 2006, 28( 2 ): 126-131.
- [ 13 ] Pawlowska AB, Hashino S, McKenna H, et al. *In vitro* tumor-pulsed or *in vivo* Flt3 ligand-generated dendritic cells provide protection against acute myelogenous leukemia in nontransplanted or syngeneic bone marrow-transplanted mice [ J ]. Blood, 2001, 97 ( 5 ): 1474-1482.
- [ 14 ] Delluc S, Tourmeur L, Fradelizi D, et al. DC-based vaccine loaded with acid-eluted peptides in acute myeloid leukemia: The importance of choosing the best elution method [ J ]. Cancer Immunol Immunother, 2007, 56( 1 ): 1-12.
- [ 15 ] 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.
- [ 16 ] Altieri SL, Khan AN, Tomasi TB. Exosomes from plasmacytoma cells as a tumor vaccine [ J ]. J Immunother, 2004, 27( 4 ): 282-288.
- [ 17 ] Escudier B, Dorval T, Chaput N, et al. Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous dendritic cell ( DC ) derived-exosomes: Results of the first phase I clinical trial [ J ]. J Transl Med, 2005, 3( 1 ): 10-22.
- [ 18 ] Morse MA, Garst J, Osada T, et al. A phase I study of dexosome immunotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer [ J ]. J Transl Med, 2005, 3( 1 ): 9-16.
- [ 19 ] Viaud S, Terme M, Flament C, et al. Dendritic cell-derived exosomes promote natural killer cell activation and proliferation: A role for NKG2D ligands and IL-15 $\alpha$  [ J ]. PLoS One, 2009, 4 ( 3 ): e4942-e4953.
- [ 20 ] 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.
- [ 21 ] Bu N, Li QL, Feng Q, et al. Immune protection effect of exosomes against attack of L1210 tumor cells [ J ]. Leuk Lymphoma, 2006, 47( 5 ): 913-918.
- [ 22 ] Keller S, Konig AK, Marme F, et al. Systemic presence and tumor-growth promoting effect of ovarian carcinoma released exosomes [ J ]. Cancer Lett, 2009, 278( 1 ): 73-81.
- [ 收稿日期 ] 2012 - 10 - 27 [ 修回日期 ] 2012 - 12 - 05  
[ 本文编辑 ] 周玲琳

· 读者 · 作者 · 编者 ·

## 文稿中须写成斜体的外文字符

在科技文稿中出现许多外文字符,它们有的是正体、有的是斜体。正体和斜体外文字符各有其特定含义和用法,切不可混淆使用。现根据有关标准和规则,把生物医学文稿中须要写成斜体的外文字符归纳为以下几类:

(1)生物学中拉丁学名的属名和种名(包括亚属、亚种、变种)应斜体,例如大肠杆菌 *Escherichia coli*、幽门螺杆菌 *Helicobacter pylori* 等。(2)各种基因的缩写符号应斜体(基因表达产物缩写符号应写成正体),例如人脆性 X 智力低下基因 1 的符号为 *FMRI*、原癌基因 *RAF1*(人)、病毒癌基因 *v-raf-1*(鼠)、抑癌基因 *p53*(鼠)等。(3)限制性内切核酸酶缩写符号中前 3 个字母应斜体,例如 *Hind III*、*BamH I*、*Sal I* 等。(4)各种统计学符号应斜体,例如样本数 *n*、均数  $\bar{x}$ 、样本差 *s*、*t* 检验、*F* 检验、概率 *P*、相关系数 *r* 等。(5)各种物理量的量符号应斜体(*pH* 用正体除外),例如长度 *l*、面积 *A*(或 *S*)、体积 *V*、质量 *m*、时间 *t*、压力 *p*、相对分子质量 *M<sub>r</sub>*、物质的量浓度 *c<sub>B</sub>* 等。(6)化学中表示旋光性、分子构型、构象、取代基等符号应斜体,例如左旋 *L*-、右旋 *D*-、邻位 *o*-、对位 *p*-、反式 *trans*-、顺式 *cis*-等。(7)数学中用字母表示的变数和一般函数应斜体。(8)英文中使用的某些拉丁词应斜体,例如 *vs*、*in situ*、*in vivo*、*in vitro* 等。

(本刊编辑部)