

5-脱氧杂氮胞苷修饰的肝癌细胞来源胞外体对淋巴细胞增殖功能的影响

张彩虹 肖文华 耿排力

摘要 目的 研究经 5-脱氧杂氮胞苷(5-Aza-deoxycytidine, 5-Aza-CdR)处理的肝癌细胞 HepG₂ 分泌的胞外体(exosomes)对免疫细胞增殖能力的影响。方法 采用离心超滤等方法将经 5-Aza-CdR 处理和未处理过的肝癌细胞系 HepG₂ 细胞分泌的 exosomes 分离和纯化。Ficoll 淋巴细胞分层液分离外周血单个核细胞(PBMC);将实验分为 exosomes 实验组(加药组)、exosomes 对照组(未加药组)、加药 exosomes 提取后上清组、未加药 exosomes 提取后上清组、空白对照组。H³-TdR 掺入法检测 PBMC 细胞增殖状况。结果 exosomes 对照组及其上清液对淋巴细胞增殖功能有明显的抑制作用,与空白对照组比较有显著性差异($P < 0.05$);而 exosomes 及其上清液实验组对淋巴细胞增殖功能的影响明显减弱,与 exosomes 和上清液对照组比较存在显著的统计学差异($P < 0.05$),而与空白对照组无统计学上的差异($P > 0.05$)。结论 经 5-Aza-CdR 修饰的 exosomes 及其上清液显著改善 HepG₂ 来源的 exosomes 对淋巴增殖功能的抑制作用。

关键词 exosomes 5-脱氧杂氮胞苷 外周血单个核细胞 肝癌细胞

The Effects of 5-Aza-deoxycytidine Modified Exosomes Derived from Hepatoma Cell on the Lymphocytes Proliferations. Zhang Caihong, Xiao Wenhua, Geng Paili. Department of on Cology, The First Affiliated Hospital, PLA Genera Hospital, Beijing 100048, China

Abstract Objective To investigate the effects of 5-Aza-deoxycytidine (5-Aza-CdR) modified exosomes derived from hepatoma cell HepG₂ on the lymphocytes proliferations. **Methods** Exosomes derived from HepG₂ cells with or without treatment by 5-aza-CdR were isolated and purified using ultrafiltration centrifugation and sucrose gradient ultracentrifugation. The Ficoll reagent was used to isolate peripheral blood mononuclear cells. The experiments were divided five groups as follows: 5-Aza-CdR modified exosomes group and its supernatant group; exosomes control group and its supernatant group; and negative control group. H³-TdR was used to detect lymphocytes proliferations. We added different reagents into the 96 orifices containing PBMC according to the groups. The cells were incubated for 24 hours and the multiplication of PBMC was detected by H³-TdR. **Results** The proliferation of PBMC was significantly suppressed in the exosomes control group and its supernatant group in comparison with negative control group ($P < 0.05$). However, there was no any suppression effect to be found in 5-Aza-CdR modified exosomes group and its supernatant group in comparison with negative control group ($P > 0.05$). **Conclusion** 5-Aza-CdR modified exosomes and its supernatant can significantly improve suppression effect of lymphocyte proliferation by exosomes from hepatoma cell.

Key words Exosomes; 5-Aza-CdR; Peripheral blood mononuclear cells; Hepatoma cell/HepG₂

胞外体(exosomes)是一些介于 30~100nm 的膜性小囊泡,目前发现 T 细胞、B 细胞、上皮细胞、DC 以及肿瘤细胞等可分泌 exosomes。其中肿瘤细胞来源的 exosomes 在肿瘤免疫中可以起到抗原递呈作用,一直是肿瘤免疫治疗的热点,并被考虑作为生产肿瘤疫苗的最佳来源之一^[1]。然而,近年来研究发现,有些肿瘤细胞分泌的 exosomes 对免疫细胞的增殖具有

抑制作用,如 Clayton 等^[2]的实验证明来源于前列腺癌、霍奇金淋巴瘤、白血病等多种恶性肿瘤细胞系的 exosomes 可以显著抑制白介素-2(interleukin-2, IL-2)的产生,从而抑制人类淋巴细胞的增殖;这给肿瘤来源的 exosomes 用于肿瘤的治疗带来新的问题。5-脱氧杂氮胞苷(5-deoxycytidine, 5-Aza-CdR)是一种 DNA 甲基转移酶抑制剂,可以使许多基因启动子的 CpG 岛去甲基化,从而恢复或增强其表达,其中包括肿瘤相关抗原及免疫分子表达量增加,有利于肿瘤免疫治疗。我们先前的实验已证实 5-Aza-CdR 可显著增加肝癌细胞 exosomes 的肿瘤/睾丸抗原(cancer/testis Antigen, NY-ESO-1)、热休克蛋白 70(heat shock protein 70, HSP70)和免疫识别分

基金项目:首都医学发展科研基金资助项目(2005-3086)

作者单位:100048 北京,解放军总医院第一附属医院(张彩虹、肖文华);810010 西宁,青海大学医学院免疫学教研室(张彩虹、耿排力)

通讯作者:肖文华,电子信箱:w_hxiao@hotmail.com

子 HLA-I^[3]。本实验通过研究 5-Aza-CdR 处理后的肝癌细胞系 HepG₂ 细胞分泌的 exosomes 及其上清液对淋巴细胞增殖功能的影响,进一步明确 5-Aza-CdR 修饰的 exosomes 对免疫功能的影响,为以 exosomes 为基础的肿瘤的免疫治疗打下实验基础。

材料与方法

1. 实验材料:(1)细胞株:HepG₂ 细胞(北京肿瘤研究所吕有勇教授馈赠)。(2)药物与试剂:RPMI1640 培养基、胎牛血清、含 0.25% EDTA 的胰酶(Gibco 公司生产);青链霉素混合液(北京泰格美公司);H³-TdR(上海原子核研究所);植物凝集素、5-Aza-CdR(sigma 公司)。(3)仪器:HIMAC-CP70G 低温超高速离心机,100KU MWCO Millipore Amicon 高回收率高速切向流超滤离心管(Millipore 公司),电泳槽和转膜槽(北京六一仪器厂),β-液体闪烁计数器(FJ-2107G 型)。

2. 实验方法:(1)外周血单个核细胞(PBMC)的制备:抽取健康献血人员外周血 20ml,肝素抗凝,Ficoll 淋巴细胞分层液分离 PMBC, Hank's 液洗涤 2 次,用含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养液调细胞浓度为 10⁶/ml 备用。(2)细胞培养:将 HepG₂ 细胞设两份同时进行体外常规培养,一份为对照组,另外一份为实验组;应用含 100ml/L 胎牛血清的 DMEM 培养液,加入含 50mg/L 链霉素,50 × 10³ U/L 青霉素的青链霉素混合液,在 37℃,50ml/L CO₂ 孵箱中培养,细胞呈单层贴壁生长,每 3~4 天传代 1 次,传代时用 0.25% 胰酶和 0.25% EDTA 室温下消化 2~3min。待细胞生长至对数期时,按 3 × 10⁶/100ml 接种;细胞培养液体积每组严格一致。在实验组,接种 24h 后用 1 × 10⁻⁶ mol/L 的 5-aza-CdR 处理,分别在加药后 24h 收集培养上清液各 150ml;对照组接种后不加药物,24h 后收集上清液 150ml 作为对照,并 4℃ 保存。(3)exosomes 的分离与纯化:参照我们以前的方法进行,简述如下^[4]:将收集到的实验组和对照组 HepG₂ 培养上清液以 300g 离心 10min 去除细胞,取上清液;以 1500g 离心 30min 去除细胞碎片,收集上清液,通过 100ku MWCO Centriplus 离心超滤管浓缩超滤,以 1500g 离心 30min,得到 6ml 浓缩液,将分离纯化的浓缩液移至 1.5ml 的离心管中,4℃ 下用水平转角以 100kg 超速离心 60min,所得沉淀即含有 exosomes。(4)exosomes 的电镜鉴定:滴 20~30μl exosomes 悬液于载样铜网上,室温静置 1min,用滤纸从侧面吸干液体,滴加 20ml/L 磷酸溶液(pH6.8)约 30μl 于铜网上,室温负染 1min 滤纸吸干负染液,室温下晾干约 10min,透射电镜下观察照相。(5)H³-TdR 掺入法检测 PBMC 细胞增殖状况:实验分为 exosomes 实验组(加药组)、exosomes 对照组(不加药组)、exosomes 提取后上清实验组(加药组)、exosomes 提取后上清对照组(不加药组)、空白对照组,其中空白对照组只加植物凝集素(phytohemagglutinin,PHA)和 PBMC 细胞,每组分三复孔,取 96 孔板做好标记,分离好的 PBMC 细胞加入 5ml 含 10% 胎牛血清的新鲜 RPMI1640 培养基,细胞计数后,稀释为 5000 个/50 微升,按照先前做好的标记,以 50 微升/孔加入 96 孔板中,同时以 1:1000 的比例加入

含 50mg/L 链霉素,50 × 10³ U/L 青霉素的青链霉素混合液,再加入 50μl 样本,最后加入 100μl PHA。放入 37℃,50ml/L CO₂ 孵箱过夜,第二天可在 10 × 的倒置显微镜下观察到 PBMC 细胞呈团状增殖,将 H³-TdR 加入培养板中,每孔 3.7 × 10⁴ 个 Bq。继续培养 6h 后,去培养基,用 1 × PBS 洗 3 次,1mol/L 的 NaOH 破细胞膜,加入闪烁液及适量反淬灭剂,用 β-液体闪烁计数器测量,记录 cpm 值(每分钟计数)。

3. 统计学处理:采用 SPSS 13.0 软件进行 *t* 检验的统计学处理。结果用($\bar{x} \pm s$)表示,*t* 检验来处理数据,*P* < 0.05 表示有统计学意义。

结 果

1. 透射电镜鉴定 exosomes:电镜下 HepG₂ 细胞分泌的 exosomes 小体直径为 30~80nm 的膜性微囊结构,呈圆形或椭圆形,腔内为低电子密度成分(图 1)。

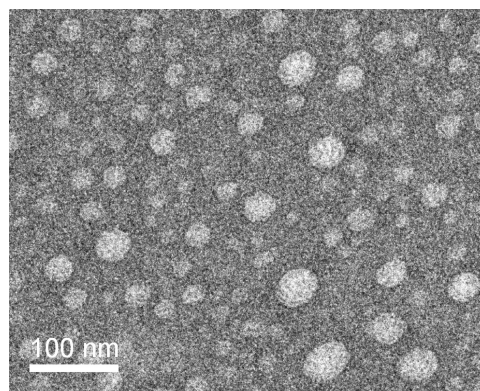


图 1 HepG₂ 细胞来源 exosomes(bar 100nm)

2. H³-TdR 检测 exosomes 及提取后的上清对 PBMC 细胞增殖的影响:未经过药物处理的 exosomes 与 PBMC 细胞共培养后,对淋巴细胞增殖有显著影响,与空白对照组相比,明显降低(*P* < 0.05);经过药物处理,可明显改善 exosomes 对照组对淋巴细胞增殖功能的抑制, PBMC 增殖值与 exosome 对照组比较统计学存在显著差异(*P* < 0.05),与空白对照组比较无显著差异(*P* > 0.05)。在实验组,经 exosomes 提取后的药物处理的上清液与 PBMC 细胞共培养后,对细胞增殖几乎无影响,与空白对照组比较无显著统计学差异(*P* > 0.05),未经药物处理的上清液则对淋巴细胞增殖功能有显著性影响,与空白对照组或上清实验组相比统计学上均有显著差异(*P* < 0.05)(表 1)。

讨 论

exosomes 是在内吞系统中形成、分泌和释放的一种囊泡结构,是一群带有生物活性的微型细胞器,它带有多种特殊的蛋白成分,如抗原递呈相关蛋白, T 细胞活化相关蛋白,同时存在肿瘤抗原运载系统以

表1 经5-Aza-CdR处理前后的 exosome 及提取后的上清对 PBMC 细胞增殖的影响

组别	n	cpm 值($\bar{x} \pm s$)
空白对照	3	23974 $\pm$ 2024.31 *
上清加药	3	22789 $\pm$ 6644.24 **
上清对照	3	2477 $\pm$ 508.73 ***
Exosome 加药	3	19411 $\pm$ 786.63 Δ
Exosome 对照	3	3863 $\pm$ 20.88 $\Delta\Delta$

* 与 ** 相比较, $P = 0.78$ 无显著性差异; * 与 Δ 相比较, $P = 0.2624$, 无显著性差异; * 与 *** 相比较 $P < 0.001$ 有显著性差异; * 与 $\Delta\Delta$ 相比较, $P < 0.001$, 有显著性差异; ** 与 *** 相比较 $P = 0.0062$ 有显著性差异; Δ 与 $\Delta\Delta$ 相比较, $P = 0.0014$, 有显著性差异

及与细胞靶向性有关的蛋白。肿瘤来源的 exosomes 含有 MHC - I 类分子, HSP70 - 80, 以及肿瘤特异性抗原。肿瘤来源的 exosomes 所富含的 HSP 可以使 exosomes 很容易被抗原递呈细胞 (antigen presenting cell, APC) 摄取, 因而可以诱导增强免疫反应^[1]。同时, 肿瘤来源的 exosomes 所含的 HSP70, 则可以选择性激活自然杀伤细胞 (natural killer cell, NK) 活性, 使其迁移、增殖, 并产生免疫反应^[2]。肿瘤特异性抗原可以从细胞内部的 HSP 上释放, 并被递呈给细胞毒性 T 细胞 (cytotoxicity T lymphocyte, CTL) 或者杀伤细胞, 激活后者进行免疫效应, 而这些经 HSP 激活的免疫细胞可以消除不同的肿瘤。因此, 携带大量 HSP 的肿瘤来源的 exosomes 在肿瘤免疫治疗中有着广泛应用前景。我们前期实验已经证明, 经过 5 - Aza - CdR 处理后的 exosomes, 一些免疫分子包括 HSP70 是显著增加的^[3]。

然而, 近年来却有一些相关实验显示, 一些肿瘤来源的 exosomes, 可以抑制甚至是破坏在肿瘤中发挥作用的免疫细胞, 比如下调一些 NK 受体的表达, 影响到肿瘤免疫中一些固有免疫细胞的激活, 还有的可以显著抑制 IL - 2, 从而抑制人类淋巴细胞的增殖, 因而在肿瘤的免疫治疗中起到一些负面作用^[2]。这些由肿瘤来源的 exosomes 可能就是肿瘤组织逃逸机体免疫系统清除的关键因素, 给肿瘤的免疫治疗带来很多困难和挑战。因此, 如何提高肿瘤细胞来源 exosomes 的免疫刺激能力, 而减少它的免疫抑制能力在肿瘤的免疫治疗中有重大的实际意义。Yang 等^[6]采用转基因技术将 IL - 2 转入癌细胞中, 其产生的 exosomes 中含大量 IL - 2, 并因此而改善了癌细胞来源的 exosomes 的免疫刺激作用。而 Zhang 等^[7]发现姜黄素 (curcumin) 可明显改善肿瘤细胞来源 exosomes 对乳腺癌细胞对 IL - 2 的反应的抑制作用。5 - Aza

- CdR 是 DNA 甲基转移酶抑制剂, 可通过表观遗传学机制使多种免疫分子, 包括 HLA - I 类分子和免疫共刺激分子以及肿瘤特异性抗原——肿瘤/睾丸抗原表达增加, 在体内外实验中均能抗肿瘤特异和非特异免疫反应^[8]。我们前期研究也证明, 经过 5 - Aza - CdR 处理的肝癌细胞 exosomes, 一些重要的免疫分子和肿瘤相关抗原的含量是明显增加的^[3]。然而, 5 - Aza - CdR 对 exosomes 免疫分子和肿瘤相关抗原的提升能否改善 exosomes 对免疫功能的抑制作用并不清楚。本实验进一步明确了 5 - Aza - CdR 处理肝癌细胞分泌的 exosomes 及其上清能显著改善肝癌细胞来源 exosomes 对 PHA 刺激的淋巴细胞增殖能力的影响。我们选用了肝癌细胞系中 HepG₂ 细胞作为 exosomes 的来源细胞, 经 5 - Aza - CdR 修饰的 exosomes 对体外淋巴细胞增殖的抑制作用较未经 5 - Aza - CdR 的 exosomes 是明显降低的, 尤其是经 5 - Aza - CdR 处理肝癌细胞后, 除去 exosomes 后的上清几乎对 PHA 刺激的淋巴细胞增殖能力无任何影响。上述结果说明: 5 - Aza - CdR 可能通过表观遗传学机制使肝癌细胞分泌多种免疫刺激分子, 改善了肝癌细胞来源的 exosomes 对淋巴细胞增殖能力的影响; 特别是肝癌细胞分泌的可溶性分子部分较其分泌的小囊泡部分 (exosomes) 的作用更显著。我们推测经 5 - Aza - CdR 处理后, HepG₂ 细胞所分泌的一些受甲基化调控的免疫蛋白和分子重新恢复表达或是有所增高, 重新恢复了被 exosomes 抑制的 PBMC 细胞增殖。但具体是哪些免疫蛋白或分子, 则需要进一步实验证明。

总之, exosomes 是个复杂的小囊泡结构, 其中包含了许多蛋白、细胞因子甚至一些微小的 RNA, 因此它的功能和作用也是非常复杂的。目前, 由于 exosomes 含有丰富的肿瘤相关抗原及其伴侣和免疫刺激分子, 是最具有研究和发展潜力的肿瘤疫苗; 但同时, 我们也看到 exosomes 也含有大量的免疫抑制因子, 总体来讲对免疫起抑制作用。因此, 如何充分利用 exosomes 有利的一面, 降低甚至消除其负面作用是我们的努力方向。本实验表明: 肝癌细胞 HepG₂ 分泌的纳米级小囊泡——exosomes 及其可溶性免疫分子对淋巴细胞增殖功能具有显著的抑制作用; 而经 5 - Aza - CdR 处理后的 HepG₂ 细胞分泌的 exosomes 及其可溶性免疫分子则能显著改善这种抑制作用。该研究为开发新的 5 - Aza - CdR 修饰的 exosomes 疫苗提供了新的实验基础。

参考文献

- 1 Li XB, Zhang ZR, Schluesener HJ. Role of exosomes in immune regulation. *J Cell Mol Med*,2006,10(2):364-375
- 2 Clayton A, Mitchell JP, *et al*. Human Tumor-Derived Exosomes Selectively ImpairLymphocyte Responses to Interleukin-2. *Cancer Res*, 2007,67(15):7458-7466
- 3 萨仁高娃, 吴岩, 肖文华. 5-脱氧杂氮胞苷对肝癌细胞分泌 exosomes 及其免疫相关分子的影响. *中华肿瘤杂志*,2009,31(7):495-499
- 4 萨仁高娃, 吴岩, 肖文华. 肝癌细胞来源的 exosomes 提取方法的改进及电镜观察. *内蒙古医学院学报*,2008,30:424-426
- 5 Taylor DD, Gercel-Taylor C. Tumour-derived exosomes and their role in cancer-associated T-cell signaling defects. *Br J Cancer*,

2005,92:305-311

- 6 Yang Y, Xiu F, Cai Z, *et al*. Increased induction of antitumor response by exosomes derived from interleukin-2 gene-modified tumor cell. *J Cancer Res Clin Oncol*,2007,133(6):389-399
- 7 Zhang HG, Kim H, Liu C, *et al*. Curcumin reverse breast tumor exosome mediated immune suppression of NK cell tumor cytotoxicity. *Biochem Biophys Acta*,2007,1773(7):1116-1123
- 8 Setiadi AF, David MD, Seipp RP, *et al*. Epigenetic Control of the Immune Escape Mechanisms in Malignant Carcinomas. *Molecular and cellular Biology*,2007,27(22):7886-7894

(收稿:2010-11-23)

(修回:2011-05-28)

白三烯受体基因多态性与孟鲁司特治疗反应性关系的研究

宣妙燕 蔡晓红 李 宁 俞晨艺 陈小剑 陈新宇 曹顺顺 李秀翠

摘 要 **目的** 评价哮喘患儿半胱氨酰白三烯受体 1(CysLTR1)927 T/C 位点基因多态性对白三烯受体拮抗剂治疗的反应性。**方法** 选择 2007 年 4 月~2008 年 11 月在笔者医院门诊就诊的哮喘患儿 86 例。用 DNA 直接测序法测定 CysLTR1 927 T/C 位点的基因型,根据基因型将其分为 TT、CT、CC 3 组,予白三烯受体拮抗剂(LTRA)孟鲁司特治疗 6 个月。观察 3 组患儿过敏性鼻炎和临床症状的控制情况,监测治疗前后血清总免疫球蛋白 E(TIgE)、尘螨免疫球蛋白(D1IgE)和肺功能的变化。**结果** 3 组基因型患儿过敏性鼻炎和临床症状的控制情况比较无明显差异($P>0.05$),患儿治疗前后 TiGE、D1IgE 和肺功能第一秒用力呼气容积(FEV1)、呼气峰流速(PEF)的改善,3 组比较亦无差异, P 均 >0.05 。**结论** 本研究表明,温州地区汉族哮喘患儿 CysLTR1 927 T/C 位点基因多态性与白三烯受体拮抗剂治疗的反应性无关。

关键词 白三烯受体拮抗剂 基因多态性 哮喘 儿童

The Relationship between Polymorphisms of CYSLTR1 and Therapeutic Efficacy of Montelukast. Xuan Miaoyan, Cai Xiaohong, Li Ning, Yu Chenyi, Chen Xiaojian, Chen Xinyu, Cao Shunshun, Li Xiucui. Department of Respiratory Medicine, Yuying Children's Hospital Affiliated to Wenzhou Medical College, Zhejiang 325027, China

Abstract Objective To estimate if there is different reaction in three genotypes of CYSLTR1 927T/C in the children with asthma who took leukotriene receptor antagonist (LTRA) montelukast. **Methods** Eighth-six children with asthma admitted to the out-patient clinic of the Affiliated Yuying Children's Hospital to Wenzhou Medical College from April 2007 to November 2008 were analyzed. Sequence analysis was used for detecting the gene polymorphism of 927T/C of the CYSLTR1 in 86 patients, and we divided patients into three genotype groups of TT, CT and CC. These patients took leukotriene receptor antagonist (LTRA) montelukast for six months. Children in the three genotype groups were monitored for clinical symptom control and allergic rhinitis during the stage of therapy. Total serum immune globulin E (TiGE), dust mite immune globulin E (D1IgE), lung function prior and post-treatment were recorded. **Results** There was no difference found among the three genotype groups in clinical symptom control and allergic rhinitis, either in the improvement in TiGE, D1IgE, lung function such as forced expiratory volume in 1 second (FEV1) and peak expiratory flow (PEF) prior and post-treatment, with all $P>0.05$. **Conclusion** The gene polymorphism of 927T/C of the CYSLTR1 has no relationship with the therapeutic efficacy of

基金项目:浙江省人口和计划生育科技项目;浙江省医学会临床科研基金(2008ZYC26)

作者单位:325027 温州医学院附属育英儿童医院呼吸科(宣妙燕、蔡晓红、俞晨艺、曹顺顺、李秀翠);518028 深圳市妇幼保健院儿科(李宁);325027 温州医学院附属第二医院检验科(陈小剑、陈新宇)

通讯作者:蔡晓红,电子邮箱:caixh839@sina.com