

胞数量升高了 5 倍,这对 PAP 阳性的实体瘤治疗具有重要意义。同样,MVA-BN-PSA-C1C2 锚定 exosomes 也提高了 PSA 的抗原性并且在 PSA 阳性的实体瘤中表现出了明显的抗肿瘤活性。

4. 表观遗传药物修饰:前期基础研究表明:DNA 甲基化抑制剂——5-脱氧杂氮胞苷和组蛋白去乙酰化酶抑制剂——丙戊酸钠、TSA 等均可诱导睾丸-肿瘤特异抗原(CTA)的表达、MHC I、II 类抗原的高表达以及共刺激分子表达,并且在动物实验中能显著增强抗 CTA 的特异性免疫反应。国内肖文华等采用表观遗传学药物 5-脱氧杂氮胞苷和 MS-275 处理肝癌细胞后,其产生的 exosomes 中的 CTA 抗原 NYE-ESO、HLA-I 含量显著增加。并能显著改善未经表观遗传药物修饰的肿瘤来源 exosomes 对体外淋巴细胞增殖的影响。近一步发现还可显著增强体外 NK 细胞杀伤活性(资料尚未发表)。此外,肖文华等还发现人卵巢癌腹腔积液中也存在大量不同来源的 exosomes,在这些 exosomes 中存在大量免疫刺激分子,表明腹水来源 exosomes 可是很好的抗肿瘤的亚细胞瘤苗。

5. exosomes 包裹药物:Zhuang 等用 exosomes 包裹抗感染药物通过鼻腔给药治疗炎症介导的脑病。他们首先制作了 3 种小鼠炎症介导的脑疾病模型:脂多糖介导的脑炎模型、自身免疫性脑炎模型、GL26 脑肿瘤模型,然后用 exosomes 包裹姜黄素(Exo-cur)或信号转导蛋白和转录激活抑制因子 3(Exo-JSI124),通过鼻腔给药途径传递给脑小胶质细胞。结果发现:用 Exo-cur 或 Exo-JSI124 鼻腔给药对脂多糖介导的脑炎有保护作用,对 GL26 脑肿瘤的生长起到了明显的抑制作用。鼻腔给药途径能迅速地把 Exo-cur 或 Exo-JSI124 传递到大脑部位,然后选择性的被脑小胶质细胞摄取,最终介导了脑小胶质细胞的凋亡。这个实验为治疗炎症介导的脑病提供了一个新的非侵袭性的治疗方法,也为 exosomes 治疗其他部位肿瘤提供了思路。另有研究表明,exosomes 纳米技术是一个新出现的重要的药物运输途径,开发 exosomes 纳米囊泡运输 RNAi 预示药物可以跳过人体内生物障碍,从而为体内药物应用途径开辟新的篇章。DC 来源的 exosomes 在全身注射以后可以定向的运输 RNAi 到大脑,为这些自然存在的囊泡开发为可以运输药物的囊泡提供了可以信服的证据。就像体内定向应用脂质体和病毒顺从性很好一样,来自病人自身组织的 exosomes 可使运输药物的囊泡具有很

好的组织相容性,并且可以穿过体内的血脑屏障,所以具有更好的安全性和个体化来源。

四、肿瘤细胞来源的 exosomes 疫苗的应用前景

肿瘤的发生是由于机体免疫监视功能低下或缺陷,使肿瘤细胞通过免疫逃逸而克隆性增生的结果。因此,目前可激发荷瘤机体特异性抗瘤应答的肿瘤疫苗成为人们普遍关注的热点。免疫细胞和肿瘤细胞分泌的 exosomes 表面富含 MHC 分子和肿瘤抗原,可有效辅助抗原呈递,打破原有的免疫耐受,在肿瘤免疫治疗中已经显示出一定效果,如在肺癌和晚期黑色素瘤患者中已经观察到明确肿瘤逆转现象^[15]。肿瘤的主动免疫治疗研究最多的是 DC 疫苗,以 DC 为基础的肿瘤免疫治疗能有效激发细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)反应,发挥明确的抗肿瘤效应。但也存在如大量生产和保存及 DC 质量参数确定等难点,导致了 DC 疫苗难以广泛应用于临床实际中,并且由于致敏 DC 所需的抗原剂量尚未明确、以何种方式负载肿瘤抗原效果最好尚不明确、过量的 DC 可能会导致体内 CTL 耗竭,甚至引发自身免疫性疾病等问题的存在也进一步限制了 DC 疫苗在临床上的广泛应用。

而 exosomes 疫苗则有效地避免了 DC 疫苗存在的上述问题。与 DC 疫苗相比,exosomes 疫苗有如下优点:①exosomes 疫苗具有整套细胞自身的抗原成分及自身细胞特殊功能相关的蛋白,可引导 exosomes 准确到达靶细胞;②来源广泛,抗癌效果肯定;③可以在细胞之间传递抗原信息并在体内外产生特异性抗肿瘤免疫应答;④通过 HSPs 携带肿瘤细胞的抗原,传递肿瘤抗原肽,提供 NK 细胞和 T 细胞作用的相关靶点,激发 T 细胞免疫应答、增强 CTL、NK 细胞的抗肿瘤效应;⑤可以通过肿瘤细胞热休克、基因修饰、靶蛋白锚定等方法增强 exosomes 疫苗的肿瘤抑制作用;⑥非细胞成分,无繁殖能力,抗原性弱,不良反应小,稳定高效;⑦exosomes 疫苗稳定,一旦获得即可长时间冷冻贮藏;⑧能使 T 细胞产生记忆性免疫应答;⑨exosomes 可不被激活的 CTL 细胞所抑制,从而发挥更为持久的抗原呈递作用;⑩分离和提纯方法已成熟和完善,国外已可按照药品生产质量管理规范(good manufacturing produces,GMP)进行大规模工业化制备,实际使用中的可操作性和可控性更强。exosomes 疫苗多靶点高效的抗肿瘤作用使之有望取代 DC 疫苗并成为一种新型肿瘤疫苗,从而使其具有更广阔的临床应用前景。

五、结 语

现在已经很清楚不仅免疫细胞,几乎所有的细胞均可分泌 exosomes。而发现 exosomes 中含有丰富遗传物质,比如 mRNA 及 miRNA,是最近该领域一个重大突破,揭示 exosomes 在细胞基因信息传递方面起重要作用。目前对 exosomes 的研究已经远远超过在神经生物学,干细胞以及肿瘤生物学领域,尤其是在肿瘤临床应用方面,比如生物标志物和肿瘤免疫治疗研究等领域,还有广阔的前景。但是由于肿瘤细胞自身携带的信息数量庞大、来源于不同种类细胞 exosomes 的结构功能亦复杂多变,目前对 exosomes 的研究仍处于起始阶段,作为一种新型的抗肿瘤药物或肿瘤疫苗,其发生机制、生物学特性、免疫调节的机制以及如何进一步增强其作用尚需进一步深入研究。

参考文献

- Pfeffer SR. Two Rabs for exosome release[J]. *Nat Cell Biol*,2010, 12(1):3-4
- 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
- Wang K, Tang J. Tumour-derived exosomes and their roles in cancer[J]. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*,2010, 35(12):1288-1292
- Merchant ML, Powell DW, Wilkey DW, *et al*. Microfiltration isolation of human urinary exosomes for characterization by MS[J]. *Proteomics Clin Appl*,2010, 4(1):84-96
- Lachelin G, Pernet-Gallay K, Chivet M, *et al*. Release of exosomes from differentiated neurons and its regulation by synaptic glutamatergic activity[J]. *Mol Cell Neurosci*,2011, 46(2):409-418
- Masyuk AI, Huang BQ, Ward CJ, *et al*. Biliary exosomes influence cholangiocyte regulatory mechanisms and proliferation through interaction with primary cilia[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2010, 299(4):G990-999
- Trams EG, Lauter CJ, Salem N, *et al*. Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1981, 645(1):63-70
- Simpson RJ, Lim JW, Moritz RL, *et al*. Exosomes: proteomic insights and diagnostic potential[J]. *Expert Rev Proteomics*,2009, 6(3):267-283
- Raimondo F, Morosi L, Chinello C, *et al*. Advances in membranous vesicle and exosome proteomics improving biological understanding and biomarker discovery[J]. *Proteomics*,2011, 11(4):709-720
- Ogawa Y, Miura Y, Harazono A, *et al*. Proteomic analysis of two types of exosomes in human whole saliva[J]. *Biol Pharm Bull*,2011, 34(1):13-23
- Ashiru O, Boutet P, Fernandez-Messina L, *et al*. Natural killer cell cytotoxicity is suppressed by exposure to the human NKG2D ligand

- MICA*008 that is shed by tumor cells in exosomes[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(2):481-489
- Lai RC, Arslan F, Lee MM, *et al*. Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury[J]. *Stem Cell Res*,2010, 4(3):214-222
- Nazarenko I, Rana S, Baumann A, *et al*. Cell surface tetraspanin Ts-pan8 contributes to molecular pathways of exosome-induced endothelial cell activation[J]. *Cancer Res*,2010, 70(4):1668-1678
- 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
- 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
- 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
- Sokoll LJ, Ellis W, Lange P, *et al*. A multicenter evaluation of the PCA3 molecular urine test: pre-analytical effects, analytical performance, and diagnostic accuracy[J]. *Clin Chim Acta*,2008, 389(1-2):1-6
- Pogge von Strandmann E, Simhadri VR, von Tresckow B, *et al*. Human leukocyte antigen-B-associated transcript 3 is released from tumor cells and engages the Nkp30 receptor on natural killer cells[J]. *Immunity*,2007, 27(6):965-974
- Simhadri VR, Reiners KS, Hansen HP, *et al*. Dendritic cells release HLA-B-associated transcript-3 positive exosomes to regulate natural killer function[J]. *PLoS One*,2008, 3(10):e3377
- Clayton A, Tabi Z. Exosomes and the MICA-NKG2D system in cancer[J]. *Blood Cells Mol Dis*,2005, 34(3):206-213
- Elsner L, Muppala V, Gehrmann M, *et al*. The heat shock protein HSP70 promotes mouse NK cell activity against tumors that express inducible NKG2D ligands[J]. *J Immunol*,2007, 179(8):5523-5533
- Guerra N, Tan YX, Joncker NT, *et al*. NKG2D-deficient mice are defective in tumor surveillance in models of spontaneous malignancy[J]. *Immunity*,2008, 28(4):571-580
- Whiteside TL, Mandapathil M, Szczepanski M, *et al*. Mechanisms of tumor escape from the immune system: adenosine-producing Treg, exosomes and tumor-associated TLRs[J]. *Bull Cancer*,2011, 98(2):E25-31
- Zhang HG, Grizzle WE. Exosomes and cancer: a newly described pathway of immune suppression[J]. *Clin Cancer Res*,2011,17(5):959-964
- Ashiru O, Boutet P, Fernández-Messina L, *et al*. Natural killer cell cytotoxicity is suppressed by exposure to the human NKG2D ligand MICA*008 that is shed by tumor cells in exosomes[J]. *Cancer Res*, 2010,70(2):481-489

(收稿:2011-11-07)

(修回:2011-12-02)

exosomes: 肿瘤免疫治疗的新进展

董伟伟 肖文华

exosomes 是一类起源于内吞体系统并被排出于细胞外,直径在 40 ~ 100nm 之间的双层膜性囊泡^[1]。exosomes 可以由包括树突状细胞、肿瘤细胞等在内的多种细胞分泌^[2~6]。最早在 1981 年由 Trams 等^[7]在研究正常细胞和肿瘤细胞脱落小体的 5'核苷酸外切酶的活性时发现并被加以描述。exosomes 含有大量与其来源和功能密切相关的蛋白质和脂质成分,做为细胞间传递信息的重要载体,参与多种病理生理过程,但大多数研究集中在免疫细胞和肿瘤细胞释放的 exosomes^[8~13]。肿瘤细胞来源的 exosomes 含有肿瘤共同抗原、热休克蛋白等重要的免疫分子,可以通过多种途径表现出抗肿瘤的作用,且其做为肿瘤疫苗的一种,较 DC 疫苗有明显的优势,其做为一种新的肿瘤排斥抗原的来源,受到了越来越广泛的关注和研究。本文主要就肿瘤细胞来源的 exosomes 在肿瘤治疗中的应用进行阐述。

一、exosomes 抗肿瘤的免疫诱导作用

众多的研究表明,多种细胞来源的 exosomes 抗肿瘤作用确切,目前已进入 I 期临床观察阶段^[14]。但是 exosomes 诱导抗肿瘤作用的确切机制仍不十分明确,目前认为可能有以下几种:

1. MHC 等分子介导的肿瘤免疫:肿瘤细胞来源的 exosomes (TEXs) 中有细胞靶向性相关蛋白(如 CD9)和肿瘤抗原运载系统(HSPs),该系统能将存在于 exosomes 中的肿瘤抗原转移到 APC。对 exosomes 的功能研究表明:肿瘤细胞表面的 MHC - I 分子与抗原结合后,通过内吞方式形成多囊体,然后多囊体向胞外释放 exosomes, exosomes 通过 HSPs 系统将肿瘤抗原转移至 DC,并交叉呈递抗原到 MHC - I 分子上,从而导致 CTL 的活化并产生有效抗肿瘤免疫,并且 exosomes 通过 MHC 等分子引起的肿瘤免疫效应可以跨越组织和 MHC 的限制^[15, 16]。Sokoll 等^[17]将人肿瘤抗原 MHC - I 导入两种 MHC 类型完全不同

的小鼠细胞系中,发现小鼠细胞分泌的 exosomes 携带了导入的人肿瘤抗原,而且这种携带人肿瘤抗原的 exosomes 能够激活小鼠的免疫系统,有效抑制表达 MHC - I 肿瘤细胞的生长。因此,exosomes 有望成为负载肿瘤抗原的一个良好工具。

2 BAT3 蛋白介导的肿瘤免疫:exosomes 膜表面能够表达 BAT3 蛋白,BAT3 蛋白是 NKP30 的一种配体,NKP30 是 NK 细胞上的受体,所以 exosomes 可以通过其表达的 BAT3 蛋白与 NKP30 识别,产生 NK 细胞介导的抗肿瘤免疫反应。Pogge 等^[18]和 Simhadri 等^[19]研究表明,293T 细胞释放的 exosomes 表达的 BAT3 蛋白能够识别 NKP30 受体,BAT3 在 293T 细胞上表达是过量还是衰减,直接与 exosomes 的表达水平及 NK 细胞介导的细胞因子有关。

3. NKG2D 功能配体介导的肿瘤免疫:NKG2D 是一个激活受体,其缺失将导致肿瘤免疫逃逸。Clayton 等^[20]研究发现,包括乳腺癌和间皮瘤在内的大多数肿瘤细胞来源的 exosomes 通过 NKG2D 配体发挥作用。NKG2D 配体被肿瘤来源的 exosomes 表达后,可以导致 NK 细胞增殖从而增强 exosomes 的抗肿瘤免疫效应。肿瘤细胞分泌的 exosomes 还可通过修饰效应细胞上的 NKG2D 受体改变其 NK 活化作用而发挥抗肿瘤作用。Elsner 等^[21]发现 HSP70 作用于肿瘤表达的 NKG2D 配体,导致肿瘤生长减慢甚至凋亡。Guerra 等^[22]对小鼠的研究阐释了 DEXs 对 NK 细胞的生物活性作用,发现 NKG2D 可以改变 NK 细胞的溶解途径,对转化或恶变细胞产生一定的杀伤作用。

二、肿瘤细胞来源 exosome 作为亚细胞瘤苗存在的问题

尽管前期研究,尤其是在动物实验中,肿瘤来源 exosome 都取得了令人兴奋的效果。但是,近几年的研究表明:与常用的来自全肿瘤细胞瘤苗一样,肿瘤细胞分泌的 exosome 携带有大量来自肿瘤细胞的信息,既含有可用作瘤苗的肿瘤抗原和免疫刺激分子,也含有对免疫抑制的肿瘤相关抑制分子,如 exosome 可通过其膜上的 FAS/FASL 通路使大量杀伤性 T 淋

巴细胞凋亡^[23,24];通过 exosome 中含有的可溶性 NKG2D 受体配体使 NK 杀伤活性大大下降^[25];还可通过 exosome 中含有的肿瘤细胞分泌的 VEGF、SCF 等细胞因子刺激机体产生大量髓系来源的抑制性细胞(myeloid-derived suppress cell, MDSC)和 CD4⁺CD25⁺T 调节性淋巴细胞,最终导致机体免疫功能瘫痪^[24]。实际上,肿瘤来源 exosome 作为亚细胞瘤苗的效果是 exosome 中免疫刺激分子和抑制分子的平衡的结果;如果免疫刺激分子占优势,那么这种亚细胞瘤苗将在抗肿瘤中发挥重要作用;相反,这种肿瘤来源 exosome 就不适合作为瘤苗。因此,如何提升 exosome 中的免疫刺激分子,以提高 exosome 瘤苗的免疫效应是当前肿瘤免疫治疗的热点之一。

三、增强肿瘤细胞来源的 exosomes 抗肿瘤作用的策略

肿瘤细胞来源的 exosomes 可以通过多种途径发挥抗肿瘤效应,但在研究中发现 exosomes 单独的抗肿瘤及免疫调节作用却是有限的,因此需要通过借助其他手段增强 exosomes 的活性,以增强其抗肿瘤效应。目前,在研究中常用的增强 exosomes 免疫原性的方法有以下几种:

1. 肿瘤细胞热休克:对小鼠淋巴瘤细胞 A20 进行热休克后发现,热休克后的肿瘤细胞来源的 exosomes 中含有的免疫分子,如 MHC-I、MHC-II、CD86、HSPs 等,较正常 A20 来源的 exosomes 显著升高。上述结果表明,通过热休克的方法可以上调肿瘤细胞及其来源的 exosomes 的众多免疫因子,从而增强 exosomes 的抗肿瘤作用。并且热休克后的肿瘤细胞来源的 exosomes 与正常肿瘤细胞来源的 exosomes 相比较,还有以下优点:可诱导成熟和活化未成熟 DC;能直接刺激同种异体小鼠 T 细胞增殖;具有高效的抗肿瘤免疫作用;可诱导 Th1 型免疫和抗原特异的 CTL。并且热休克来源的 exosomes 含有许多重要的趋化因子,能够趋化、黏附 DC 和直接活化 T 淋巴细胞^[23]。Chen 等也发现从热休克的肿瘤细胞提取出来的 exosomes(HS-TEX)较非热休克肿瘤细胞提取的 exosomes 能更强的吸引并激活 DC 细胞和 T 细胞。研究发现 HS-TEX 包含 CCL2、CCL3、CCL4、CCL5 和 CCL20 等炎症趋化因子,在体内和体外都能很强的吸引 CD11c⁺ DC 和 CD4⁺/CD8⁺ T 细胞。另外,HS-TEX 的产量可以被 ATP 抑制剂、钙螯合剂、胆固醇清除剂所抑制,这些表明趋化因子进入 exosomes 是 ATP 和钙依赖的并且通过一个脂质载体依

赖的途径。同时发现热休克后细胞趋化因子具有聚集在脂质载体上的特性,瘤内注射 HS-TEX 可以更好的介导特异的抗肿瘤免疫反应,而且可以看到明显的肿瘤生长缓慢和荷瘤小鼠寿命的延长。

2. 基因修饰:Yang 等转染 IL-2 基因进入 E. G7-OVA 肿瘤细胞,然后分离 exosomes,通过 ELISA 和 western blotting 在 exosomes 中检测到了 IL-2,然后把 Exo/IL-2 皮下注射到荷瘤 C57BL/C 小鼠体内,并研究其抗肿瘤效果。结果发现 Exo/IL-2 疫苗可以显著上调抗原特异性 Th1 及 CTL 细胞的抗肿瘤免疫反应,明显抑制肿瘤细胞的生长,表达 IL-2 的 exosomes 能使 80% 的小鼠长期存活。另有研究转染 IL-12 到肾癌细胞,然后从上清液中提取 exosomes,检测转染 IL-12 后 exosomes 的抗肿瘤活性。结果发现转染 IL-12 后的肾癌细胞分泌的 exosomes 中 IL-12 的含量及肿瘤相关抗原 G250 明显增加。exosomes-GPI-IL-12 疫苗能高效介导 γ 干扰素的释放及刺激杀伤性 T 淋巴细胞的活性,从而使 exosomes 抗肿瘤效应明显增加。通过 IL-18 基因转染肿瘤细胞也能显著增强肿瘤细胞来源的 exosomes 的抗肿瘤效应。我国学者也证实 IFN- γ 基因转染的肿瘤细胞来源的 exosomes 含有 IFN- γ ,并且发现 Exo/IFN- γ 具有比常规 exosomes 更显著的抗肿瘤效应。

3. 靶蛋白锚定:肿瘤细胞来源的 exosomes 是一种膜被囊泡,经蛋白转染法将靶蛋白锚定在 exosomes 表面,可高效的激活 CD8⁺T 细胞及 CD4⁺T 细胞。通过蛋白转染的方法将靶蛋白锚定在膜上形成的肿瘤疫苗可以明显改善抗原免疫和治疗效果,为增强 exosomes 的功能提供了新的思路。MVA-BN-PRO (BN immunotherapeutics)是一种可以治疗前列腺癌的免疫治疗方法,该产品编码两种相关的特异性抗原,前列腺癌特异性抗原(PSA)和前列腺酸性磷酸酶(PAP),都是从高度稀释并经过处理的牛痘安卡拉病毒(MVA)提取出来的,被称作 MVA-BN。早先研究已经证明把抗原锚定到 exosomes 后可以增强抗原的免疫原性。Rountree 等将锚定方法改善后,即先把抗原融合到乳黏素蛋白的 C1C2 区域,形成 MVA-BN-PSA-C1C2 及 MVA-BN-PAP-C1C2,然后锚定到 exosomes,再来检测 exosomes 锚定后 PSA 或 PAP 的免疫原性是否会改变。结果发现,用 MVA-BN-PAP-C1C2 锚定的 exosomes 治疗鼠前列腺癌获得了惊人的抗 PAP 免疫反应,抗 PAP 抗体效价较 MVA-BN-PRO 升高了 10~100 倍,而 PAP 特异性的 T 细