

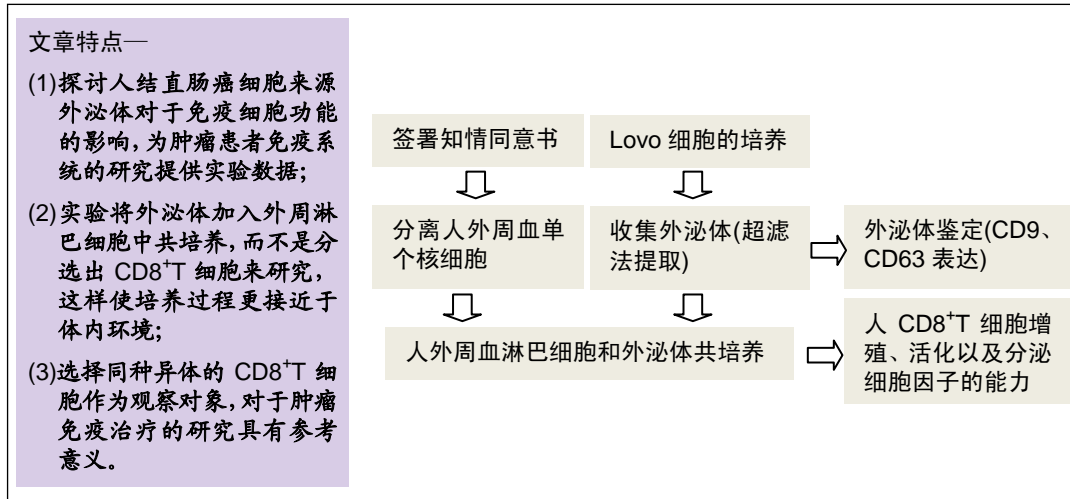
结直肠癌细胞来源外泌体对CD8⁺T细胞的免疫调节

李振想¹, 姜孝奎¹, 申芳芳², 李韶山¹(新乡医学院第三附属医院, ¹普外科, ²科研科, 河南省新乡市 453000)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.2105

ORCID: 0000-0002-3497-0502(李振想)

文章快速阅读:



RESULTS AND CONCLUSION: The CD63 and CD9 landmarks were extracted. Exosomes derived from Lovo cells could inhibit the expression of CD38⁺ and HLA-DR indicators of CD8⁺ T cells and suppress CD8⁺ T cell proliferation. Additionally, it could decrease the level of interferon- γ secreted by CD8⁺ T cells. These results indicate that exosomes derived from Lovo cells can inhibit the activation and function of CD8⁺ T cells.

Key words: colorectal cancer; exosomes; CD8⁺T cells; immunoregulation; interferon- γ

Funding: the National Natural Science Foundation of China for the Youth, No. 1504814 (to SFF)

0 引言 Introduction

结直肠癌是临床常见的恶性肿瘤之一,其发病率及病死率均居全球前5位^[1-2]。中国结直肠癌发病率近年逐渐上升,高居恶性肿瘤的第3位,是主要的致死癌症之一。随着医学研究的发展,结直肠癌的治疗方法有了一定提高,但由于其确诊时常常已经是晚期,大多数患者仍预后不良^[3-4]。因此探索新的治疗靶点和诊疗方法对于提高结直肠癌患者的生存率非常必要。

外泌体是直径为30-100 nm的双层膜结构囊泡,由细胞内多囊泡体与胞膜通过“内吞-融合-外排”等过程向胞外分泌的生物活性物质,携带有蛋白成分、细胞因子、脂质和核酸等物质,能够介导细胞之间的信息交流,进而影响细胞功能^[5-7]。研究表明肿瘤微环境中存在压力及低氧因素,这些因素会促使肿瘤细胞分泌大量外泌体^[8-10]。肿瘤外泌体对于免疫细胞的影响是目前的研究热点,一方面认为肿瘤细胞来源外泌体携带有肿瘤抗原,可以被抗原提呈细胞所识别,促进肿瘤免疫应答^[11-13];另一方面认为肿瘤细胞来源外泌体可促进肿瘤细胞的生长,抑制免疫应答,并帮助癌细胞逃离免疫监视^[14-17]。因此,肿瘤细胞来源外泌体与肿瘤的发生发展、免疫逃逸和微环境建立等方面存在着密切关系。

CD8⁺T细胞是抗病毒感染、移植排斥以及抗肿瘤方面的主要效应细胞。CD8⁺T细胞被活化后可以通过释放细胞因子、穿孔素等毒性物质溶解靶细胞,也可以直接识别病毒感染细胞和肿瘤细胞而发挥杀伤作用,从而承担免疫防御和免疫监视的功能^[18-20]。肿瘤细胞免疫逃逸机制常常使CD8⁺T细胞变得“无能”。该研究旨在初步探讨人结直肠癌细胞系Lovo细胞来源外泌体对人CD8⁺T细胞的免疫调节作用,为结直肠癌的临床治疗研究提供新的思路。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 体外细胞学实验。

1.2 时间及地点 2017年9月至2019年6月在新乡医学院第三附属医院干细胞与脑研究所进行。

1.3 材料

1.3.1 细胞 人结直肠癌细胞系Lovo购自中国科学院上海细胞库,细胞规格:1 \times 10⁸ L⁻¹-1 \times 10⁹ L⁻¹。

1.3.2 实验主要试剂 DMEM培养基、1640培养基、胎牛血清(Gibco公司);0.22 μ m滤过膜(Sigma公司);醛/硫酸乳剂颗粒(Invitrogen公司);抗人CD9-FITC、CD63-APC、CD8-BV510、CD38-PE、HLR-DR-APC抗体(Ebioscience公司);BCA试剂盒(普利莱生物技术有限公司);人淋巴细

胞分离液(天津灏洋);羧基荧光素二醋酸琥珀酰亚胺脂(CFSE)(Sigma公司);Dynabeads Human CD3/CD28 (Thermo Fisher公司);抗人IFN- γ -PE、IL-2-APC抗体(Biolegend公司);佛波酯(Sigma公司);蛋白转运抑制剂Brefeldin A(Biolegend公司);细胞破膜剂、细胞固定剂(Biolegend公司)。

1.3.3 实验主要仪器 离心机(5810R, Eppendorf公司);倒置显微镜(CKX41, Olympus公司);CO₂培养箱(Shellab公司);流式细胞仪(Verse, 碧迪公司)。

1.4 方法

1.4.1 细胞培养 使用含体积分数为10%胎牛血清的DMEM培养基将Lovo细胞重悬,调整细胞浓度为1 \times 10⁸ L⁻¹,置于37 $^{\circ}$ C、体积分数为5%CO₂培养箱中培养,待细胞融合至90%时1:2传代。

1.4.2 Lovo细胞来源外泌体的分离、鉴定 收集传代培养24 h的细胞培养上清,4 $^{\circ}$ C 300 \times g离心10 min,去除细胞碎片,上清转移至新的离心管中,4 $^{\circ}$ C 2 000 \times g离心20 min,0.22 μ m滤器过滤,再将上清转移至新的50 mL离心管中,4 $^{\circ}$ C 10 000 \times g离心30 min,将上清移至高速离心管中,4 $^{\circ}$ C 100 000 \times g离心2 h,弃除上清,PBS重悬,采用BCA蛋白质定量试剂盒对外泌体中的蛋白质进行定量,-80 $^{\circ}$ C冰箱保存备用。将外泌体结合到醛/硫酸乳剂颗粒以扩增通道信号,然后分别孵育抗体CD9-FITC、CD63-APC,上流式细胞仪检测。

1.4.3 Lovo细胞来源外泌体与人外周血单个核细胞共培养 无菌抽取健康人外周血20 mL,按1:1比例加入PBS稀释,轻轻加至等体积淋巴细胞分离液面上,2 500 r/min离心25 min,吸取中间白雾层为外周血单个核细胞,PBS洗2遍,用含体积分数为10%胎牛血清的1640培养基重悬,置于37 $^{\circ}$ C、体积分数为5%CO₂培养箱过夜,收集悬浮细胞为人外周血淋巴细胞,然后进行CFSE染色,取1 \times 10⁷淋巴细胞,PBS洗2遍以除去培养液中的血清,加入CFSE使其工作浓度为5 mmol/L,轻轻混匀,置于37 $^{\circ}$ C、体积分数为5%CO₂培养箱中避光孵育8 min,加入等体积血清终止反应,PBS洗去残存的CFSE。将染CFSE的人外周血淋巴细胞以1 \times 10⁵/孔的密度接种于24孔板中,实验组立即加入10 mg/L Lovo细胞来源外泌体,对照组立即加入等量PBS,然后2组加入相同数量的Dynabeads Human CD3/CD28以刺激T细胞的活化、增殖,置于37 $^{\circ}$ C、体积分数为5%CO₂培养箱中培养,96 h后取人外周血淋巴细胞检测。

1.4.4 Lovo细胞来源外泌体对CD8⁺T细胞增殖的影响 取实验组和对照组人外周血淋巴细胞,加入PBS

(1 000 r/min离心10 min)洗去细胞碎片, 加入抗人CD8以及相应同型对照抗体避光孵育30 min, PBS洗去未结合的抗体, 流式细胞术检测CD8⁺T细胞CFSE荧光递减情况。

1.4.5 Lovo细胞来源外泌体对CD8⁺T细胞活化标志表达的影响 取实验组与对照组人外周血淋巴细胞, PBS洗去细胞碎片, 加入抗人CD8、CD38和HLA-DR抗体避光孵育30 min, PBS洗去未结合的抗体, 流式细胞术检测CD8⁺T细胞表面活化标志的表达。

1.4.6 Lovo细胞来源外泌体对CD8⁺T细胞分泌细胞因子的影响 取实验组与对照组人外周血淋巴细胞, PBS洗2次, 以 1×10^5 的细胞密度接种于96孔板中, 加入佛波酯0.2 mol/L, 1 h后加入蛋白转运抑制剂, 置于CO₂培养箱中继续培养3.5 h, 收取细胞, PBS洗1次, 加入表面抗体CD8避光孵育30 min, 加入2 mL固定破膜剂作用20 min, 洗去破膜剂, 加入胞内抗体 γ -干扰素、白细胞介素2避光孵育40 min, 洗涤, 流式细胞术检测CD8⁺T细胞因子的分泌情况。

1.5 主要观察指标 人CD8⁺T细胞增殖、活化以及分泌细胞因子的能力。

1.6 统计学分析 采用SPSS 22.0软件进行数据分析, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用独立样本t检验, 多组间均数比较采用方差分析。检验水准 $\alpha=0.05$, 双侧检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。流式结果用Flowjo 10.0分析, 统计结果均采用GraphPad Prism 7作图。

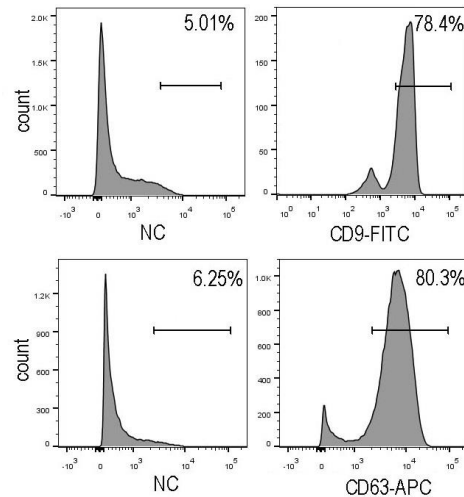
2 结果 Results

2.1 流式细胞术检测Lovo细胞来源外泌体的特异性蛋白表达 经流式细胞术检测均高表达外泌体特异性蛋白CD9和CD63, CD9表达率为(70.2 \pm 10.2)%, CD63表达率为(79.8 \pm 12.6)%, 见图1。

2.2 CD8⁺T细胞增殖情况 CFSE是一种可对活细胞进行荧光标记的细胞染色剂, 在细胞分裂增殖过程中, CFSE标记荧光可平均分配至2个子代细胞中, 因此其荧光强度是亲代细胞的一半。流式细胞术分析CD8⁺T细胞CFSE荧光发生递减即增殖的百分比。在CD3/CD28抗体刺激下, 与Lovo细胞来源外泌体共培养后CD8⁺T细胞均发生增殖, 见图2, 实验组CD8⁺T细胞增殖比例低于对照组($P < 0.05$)。

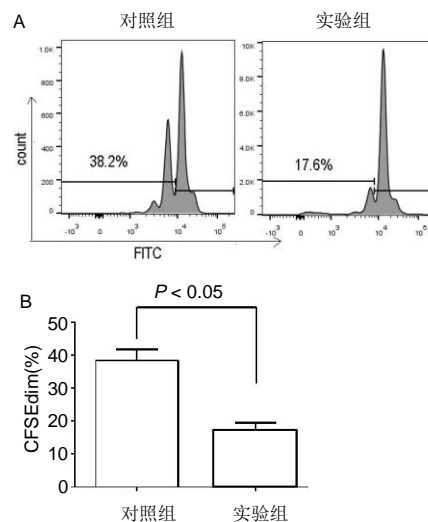
2.3 CD8⁺T细胞表面活化标志的表达 CD3/CD28抗体刺激后, 流式细胞术检测Lovo细胞来源外泌体与人外周血淋巴细胞共培养后CD8⁺T细胞表面活化标志CD38和HLA-DR的表达。与对照组相比, 实验组CD8⁺CD38⁺和CD8⁺HLA-DR⁺在CD3⁺细胞中所占百分比下降($P < 0.05$), 见图3。

2.4 CD8⁺T细胞因子的分泌水平 经佛波酯刺激后, 流式细胞术检测细胞因子分泌情况。与对照组相比, Lovo细胞来源外泌体与人外周血淋巴细胞共培养后CD8⁺T细胞分泌细胞因子 γ -干扰素明显下降($P < 0.05$), 白细胞介素2阳性细胞百分比在两组间差异无显著性意义($P > 0.05$), 见图4。



图注: NC 为醛/硫酸乳胶颗粒对照。Lovo 细胞来源外泌体高表达外泌体特异性蛋白 CD9 和 CD63, CD9 表达率为(70.2 \pm 10.2)%, CD63 表达率为(79.8 \pm 12.6)%

图 1 Lovo 细胞来源外泌体中 CD9 和 CD63 的表达
Figure 1 CD9 and CD63 expression of exosomes derived from Lovo cell lines

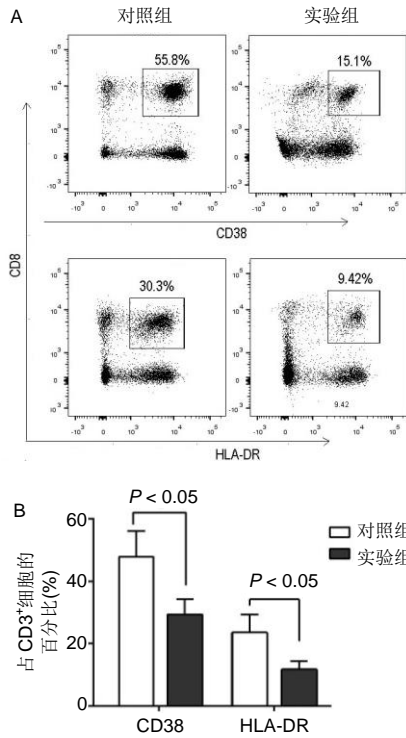


图注: CFSEdim 为 CFSE 荧光减弱即细胞增殖。图中 A 为流式代报表; B 为两组细胞增殖百分比

图 2 两组 CD8⁺T 细胞增殖情况
Figure 2 Proliferation of CD8⁺T cells in both groups

3 讨论 Discussion

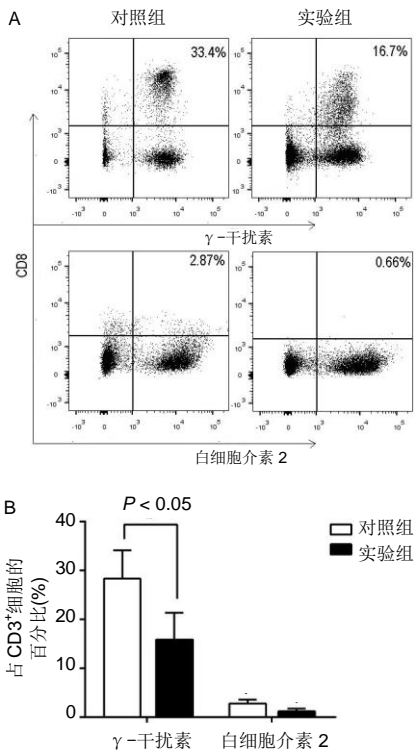
结直肠癌严重威胁了人类健康, 目前关于其分泌外泌体对于免疫细胞影响的研究报道较少。该研究发现与Lovo细胞来源外泌体共培养后CD8⁺T细胞增殖明显减弱, 活化中期标志性蛋白CD38、HLA-DR的表达明显下调, T细胞活化、增殖是其发挥免疫应答的前提, 因此Lovo细胞来源外泌体能够抑制T细胞应答进而促进机体免疫耐受, 这与其他恶性肿瘤外泌体的研究报道相一致^[16-17, 21]。CD8⁺T细胞的活化离不开CD4⁺T细胞的辅助, 提示该研究中CD4⁺T细胞功能也受到抑制。有效的T细胞免疫应答对于肿瘤免疫至关重要。研究表明肿瘤外泌体结构中含有多种对免疫细胞有抑制功能的生物分子如miRNA、DNA和mRNA等组分,



图注: 图中 A 为流式代表图; B 为 CD8⁺CD38⁺和 CD8⁺HLA-DR⁺细胞在 CD3⁺细胞中所占百分比

图 3 两组 CD8⁺T 细胞表面活化标志的表达

Figure 3 Expression of CD8⁺ T cells surface markers in both groups



图注: 图中 A 为流式代表图; B 为 γ-干扰素阳性细胞和白细胞介素 2 阳性细胞在 CD3⁺细胞中所占百分比

图 4 CD8⁺T 细胞分泌细胞因子 γ-干扰素和白细胞介素 2 水平

Figure 4 Levels of interferon-γ and interleukin-2 in CD8⁺ T cells

接触免疫细胞后可以诱导相应免疫细胞发生重编程, 从而影响免疫细胞活化, 将效应性 T 细胞诱导为调节性 T 细胞, 并促进具有负性调节效应的 T 细胞大量增殖, 发挥免疫抑制作用^[22-23]。

许多肿瘤细胞来源外泌体可以使 CD4⁺和 CD8⁺T 细胞分泌白细胞介素 1β、白细胞介素 6 和白细胞介素 10 增多, 而分泌干扰素 γ、白细胞介素 2 和白细胞介素 17 减少, 促进肿瘤发展^[24-26]。该研究发现 Lovo 细胞来源外泌体可抑制 CD8⁺T 细胞分泌细胞因子干扰素 γ, 但对于白细胞介素 2 分泌无明显影响。肿瘤来源外泌体抑制免疫应答的具体机制尚不够清楚, 除了上述的重编程机制外, 有些肿瘤细胞外泌体表面表达凋亡配体如 FasL 分子、PD1-L 和 TRAIL 等膜表面分子等, 可以使 CD4⁺T 和 CD8⁺T 细胞发生凋亡, 使肿瘤细胞得以免疫逃逸^[27-28]。该实验也观察到在共培养过程中淋巴细胞有死亡的现象, 推测 Lovo 细胞来源外泌体在抑制 CD8⁺T 细胞免疫应答的同时, 也诱导免疫细胞发生凋亡, 由于该实验共培养时间较短, 未进一步检测。

虽然免疫治疗已经成为肿瘤综合治疗的一部分, 但是其临床效果对于大多数的肿瘤患者而言不够理想。肿瘤患者自身的免疫缺陷是主要原因, 患者体内存在免疫抑制即肿瘤调节, 由肿瘤细胞合成分泌的活性物质分别在细胞、分子和基因水平抑制免疫系统发挥有效的抗肿瘤效应。目前已发现肿瘤来源的多种活性物质具有调节免疫系统功能, 使用相应的拮抗剂并不能完全改变其免疫抑制作用, 提示在肿瘤患者体内还存在未知的具有免疫调节作用的活性物质。对于这些活性物质的进一步研究为肿瘤免疫逃逸机制提供新的实验基础, 为发现肿瘤免疫治疗的新靶点以及探讨新的生物治疗策略提供思路。该研究正是从研究新的免疫逃逸机制这个角度进行的, 主要关注 CD8⁺T 细胞, 观察到 Lovo 细胞来源外泌体对其增殖、活化以及分泌细胞因子都有一定的抑制作用, 但是具体的机制仍需进一步研究。

作者贡献: 实验设计为李韶山、李振想, 外泌体收集、鉴定实验实施为李振想、姜孝奎, 人外周血分离及人外周血淋巴细胞培养实验实施为李振想、申芳芳。李韶山负责实验数据分析, 文章审核。

经费支持: 该文章接受了“国家自然科学基金青年基金项目(1504814)”的资助。所有作者声明, 经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

机构伦理问题: 该研究的实施符合新乡医学院第三附属医院的相关伦理要求(医院伦理批件号: K2019-15-1)。

知情同意问题: 实验所用人外周血来源于健康人群志愿者, 并签署知情同意书。

写作指南: 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发表宗旨。

生物统计学声明: 文章统计学方法已经新乡医学院生物统计学专家审核。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] SIEGEL RL, MILLER KD, FEDEWA SA, et al. Colorectal cancer statistics, 2017. *CA Cancer J Clin.* 2017;67(3): 177-193.
- [2] 孙洁,赵君宁.结直肠癌筛查的研究进展[J].实用老年医学,2019, 33(3):294-297.
- [3] 董茜,王琪玮,张敬东.晚期结直肠癌靶向治疗的现状及进展[J].实用肿瘤杂志,2019,34(2):99-105.
- [4] 刘天池,贾为国,赵荣华,等.结直肠癌免疫治疗的现状、挑战和出路[J].中国肿瘤生物治疗杂志,2018,25(10):967-978.
- [5] RAHBARGHAZI R, JABBARI N, SANI NA, et al. Tumor-derived extracellular vesicles: reliable tools for Cancer diagnosis and clinical applications. *Cell Commun Signal.* 2019;17(1):73.
- [6] TKACH M, THÉRY C. Communication by Extracellular Vesicles: Where We Are and Where We Need to Go. *Cell.* 2016;164(6):1226-1232.
- [7] ZHANG X, YUAN X, SHI H, et al. Exosomes in cancer: small particle, big player. *J Hematol Oncol.* 2015;8:83.
- [8] TRAMS EG, LAUTER CJ, SALEM N JR, et al. Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles. *Biochim Biophys Acta.* 1981;645(1):63-70.
- [9] QIU GZ, JIN MZ, DAI JX, et al. Reprogramming of the Tumor in the Hypoxic Niche: The Emerging Concept and Associated Therapeutic Strategies. *Trends Pharmacol Sci.* 2017;38(8): 669-686.
- [10] LUDWIG N, HONG CS, LUDWIG S, et al. Isolation and Analysis of Tumor-Derived Exosomes. *Curr Protoc Immunol.* 2019;127(1):e91.
- [11] GAO L, WANG L, DAI T, et al. Tumor-derived exosomes antagonize innate antiviral immunity. *Nat Immunol.* 2018; 19(3):233-245.
- [12] YAO Y, CHEN L, WEI W, et al. Tumor cell-derived exosome-targeted dendritic cells stimulate stronger CD8⁺ CTL responses and antitumor immunities. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013;436(1):60-65.
- [13] LI Q, HUANG Q, HUYAN T, et al. Bifacial effects of engineering tumour cell-derived exosomes on human natural killer cells. *Exp Cell Res.* 2018;363(2):141-150.
- [14] 郑琦,侯炜.肿瘤外泌体在肿瘤调控中的作用[J].河北医药,2019, 41(9):1418-1422.
- [15] KURYWCHAK P, TAVORMINA J, KALLURI R. The emerging roles of exosomes in the modulation of immune responses in cancer. *Genome Med.* 2018;10(1):23.
- [16] ABUSAMRA AJ, ZHONG Z, ZHENG X, et al. Tumor exosomes expressing Fas ligand mediate CD8⁺ T-cell apoptosis. *Blood Cells Mol Dis.* 2005;35(2):169-173.
- [17] MAYBRUCK BT, PFANNENSTIEL LW, DIAZ-MONTERO M, et al. Tumor-derived exosomes induce CD8⁺ T cell suppressors. *J Immunother Cancer.* 2017;5(1):65.
- [18] 刘畅,王红艳.CD8⁺T细胞活化与分化的分子机制[J].中国免疫学杂志,2017,33(4):481-487.
- [19] WHERRY EJ, AHMED R. Memory CD8 T-cell differentiation during viral infection. *J Virol.* 2004;78(11):5535-5545.
- [20] KAECH SM, HEMBY S, KERSH E, et al. Molecular and functional profiling of memory CD8 T cell differentiation. *Cell.* 2002;111(6):837-851.
- [21] YE SB, LI ZL, LUO DH, et al. Tumor-derived exosomes promote tumor progression and T-cell dysfunction through the regulation of enriched exosomal microRNAs in human nasopharyngeal carcinoma. *Oncotarget.* 2014;5(14): 5439-5452.
- [22] WHITESIDE TL. Exosomes and tumor-mediated immune suppression. *J Clin Invest.* 2016;126(4):1216-1223.
- [23] CEREGHETTI DM, LEE PP. Tumor-Derived Exosomes Contain microRNAs with Immunological Function: Implications for a Novel Immunosuppression Mechanism. *Microna.* 2014;2(3):194-204.
- [24] ZHANG Y, WU XH, LUO CL, et al. Interleukin-12-anchored exosomes increase cytotoxicity of T lymphocytes by reversing the JAK/STAT pathway impaired by tumor-derived exosomes. *Int J Mol Med.* 2010;25(5):695-700.
- [25] CLAYTON A, MITCHELL JP, COURT J, et al. Human tumor-derived exosomes selectively impair lymphocyte responses to interleukin-2. *Cancer Res.* 2007;67(15): 7458-7466.
- [26] CHEN JH, XIANG JY, DING GP, et al. Cholangiocarcinoma-derived exosomes inhibit the antitumor activity of cytokine-induced killer cells by down-regulating the secretion of tumor necrosis factor- α and perforin. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2016;17(7):537-544.
- [27] LI P, LIU D, CHEN J, et al. Exosomes derived from hepatocellular carcinoma inhibit CD4⁺ and CD8⁺ T cell function through the PD-1/PD-L1 pathway. *Int J Clin Exp Med.* 2019;12(5):5333-5340.
- [28] XU HY, LI N, YAO N, et al. CD8⁺ T cells stimulated by exosomes derived from RenCa cells mediate specific immune responses through the FasL/Fas signaling pathway and, combined with GM-CSF and IL-12, enhance the anti-renal cortical adenocarcinoma effect. *Oncol Rep.* 2019;42(2): 866-879.