

# 小鼠肝癌细胞外泌体对树突状细胞成熟与功能的影响

许伟兵, 范璐璐

**摘要** 目的 探讨小鼠肝癌细胞(Hepa1-6)来源的外泌体对树突状细胞成熟和功能的影响。方法 提取小鼠 Hepa1-6 细胞的外泌体,用透射电镜来鉴定外泌体的外形,Western blot 方法测定外泌体的标志蛋白 CD63 和 TSG101 的表达,使用小鼠 Hepa1-6 细胞外泌体冲击树突状细胞(DCs),DCs 成熟相关表面分子 CD40、CD80、CD83、CD86、MHC-II 的表达使用流式细胞术检测;将小鼠 T 淋巴细胞和小鼠 Hepa1-6 细胞外泌体致敏的 DCs 一起孵育 5 d,使用 CFSE 染色标记和流式法来测定共孵育 T 细胞的分裂增殖情况。结果 透射电镜可以观察到从 Hepa1-6 细胞的上清液中收集到的外泌体,表现为圆形或类圆形膜性囊泡样结构,符合外泌体的典型特征;Western blot 检测表明小鼠 Hepa1-6 细胞来源的外泌体表达 CD63、TSG101 标志性蛋白,不表达细胞色素 C;从小鼠 Hepa1-6 细胞提取来的外泌体致敏 DCs,可上调表面 MHC-II 类分子、成熟标志分子 CD83 和共刺激分子 CD40、CD80、CD86( $P < 0.05$ )。且随着外泌体浓度的增加,DC 表面分子表达增高;同时可促进 T 淋巴细胞的增殖( $P < 0.05$ )。结论 小鼠 Hepa1-6 细胞提取的外泌体可促进 DC2.4 的朝向成熟表型分化,并促进 T 细胞的增殖。

**关键词** 肝细胞癌;外泌体;树突状细胞

中图分类号 R 735.7

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)08-1197-04  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.08.005

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是严重危害全人类健康的恶性肿瘤之一<sup>[1]</sup>,目前手术治疗是肝细胞癌的主要治疗方法,但由于大部分患者常诊断于疾病的中晚期,只能进行介入治疗、放化疗、药物靶向治疗等综合治疗,其疗效不尽如人意。近来免疫治疗因其显著的疗效和创新型为肝细胞癌治疗带来了新的突破<sup>[2]</sup>,其中以树突状细胞(dendritic cells, DCs)为基础的免疫治疗是目前 HCC 的研究热点。

近年来有学者研究<sup>[3]</sup>证明肿瘤来源的外泌体

(tumor-derived exosome, TDE)可以通过调节肿瘤的免疫微环境来发挥作用。但其在 DC 中的作用及功能目前尚不清楚。该研究首先通过小鼠肝癌细胞来源外泌体致敏 DCs,观察其表面类分子的表达,并将致敏 DCs 与 T 淋巴细胞共同孵育,观察小鼠 T 淋巴细胞的增殖分裂情况,为基于 DCs 的 HCC 的免疫治疗提供理论支持。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** C57 小鼠肝癌细胞 Hepa1-6、树突状细胞 DC2.4 购自中科院上海细胞库。胎牛血清(FBS)购自美国 Gibco 公司;高糖 DMEM 和低糖 DMEM 购自美国 Hyclone 公司;ExoQuick-TC 外泌体提取试剂盒购自美国的 System Biosciences 公司。兔来源 Anti-CD63、Anti-TSG10、Anti-Cytochrome C 单克隆抗体购自美国 Abcam 公司;抗体 FITC anti-Mouse CD86、PerCP/Cy5.5 anti-Mouse CD80、PE anti-Mouse CD83、APC anti-Mouse CD40、Brilliant Violet 650 anti-Mouse MHC-II 购自美国 Biolegend 公司。实验过程中需要的去外泌体的血清通过超速离心机去除(34 000 r/min 14 h),0.22 μm 的过滤器过滤。胰酶消化液、BCA 蛋白浓度检测试剂盒和 1% 青霉素-1% 链霉素(双抗)溶液购自中国上海碧云天科技有限公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** 将小鼠 Hepa1-6 细胞,用 10% 的 FBS 和浓度为 1% 双抗溶液,培养于含 4.5 g/L D-葡萄糖的培养基中;将小鼠 DC2.4 细胞用 10% 的 FBS 和双抗溶液培养于含 1g/L D-葡萄糖的培养基中,置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中,换液时间为 1~2 d,在对数生长期进行实验。

**1.2.2 外泌体提取方法** 将 Hepa1-6 细胞于对数生长期时换不含外泌体的 FBS 培养,48 h 后收集 Hepa1-6 细胞培养上清液,在 4 °C 离心机中 5 982 r/min 离心 15 min 去除凋亡细胞以及细胞碎片,在收集的上清液中加入外泌体提取液并充分混匀,置于 4 °C 冰箱中 12 h,第 2 天取出,在 4 °C 离心机上 2 991 r/min 30 min,弃掉上清液,再次 2 991 r/min、

2021-03-10 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81402040)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院肿瘤内科,合肥 230022

作者简介:许伟兵,女,硕士研究生;

范璐璐,女,主治医师,硕士生导师,责任作者,E-mail: fanlulu8332@sina.com

4 °C 离心 5 min ,弃掉上清液 ,用 300 μl PBS 重悬离心沉淀。BCA 蛋白定量 样本分装于 -80 °C 冰箱保存。

**1.2.3 外泌体的鉴定** 通过透射电子显微镜观察外泌体形态 ,用 1 × PBS 稀释外泌体样本 ,取外泌体悬浮液 20 μl 于封口膜上 将铜片放入 20 μl 样本液中 ,并在室温下放置 5 min 晾干。PBS 冲洗后 ,用滤纸吸去残余液体 ,反复冲洗 3 次后 ,再将铜片插入 30 μl 醋酸双氧铀中 ,并放置在封口膜上 ,室温下染色 (3 min) 滤纸吸干残余的染料 ,用 PBS 反复冲洗铜片 3 次 ,室温下干燥铜片 30 min ,电镜下观察外泌体形态。

**1.2.4 蛋白提取和 Western blot 检测外泌体的标记蛋白** 提取蛋白: 收集细胞于 EP 管中 ,加入 RIPA 蛋白裂解液(含 PMSF 溶液) 4 °C 用旋转仪充分接触裂解 30 min ,低温 4 °C 离心机 ,10 000 r/min、10 min 离心 ,去沉淀 ,用 BCA 试剂盒测定样品中的蛋白含量。通过 SDS-PAGE 检测蛋白质样品 ,在恒定电流(350 mA) 下通过湿转法 1.5 h ,转移到 PVDF 膜上 ,使用 5% BSA 封闭 ,分别加入一抗 (1 : 1 000) : Anti-CD63、Anti-TSG101、Cytochrome C 4 °C 孵育过夜。室温孵育二抗 (1 : 4 000) 2 h ,使用化学发光成像仪进行成像显影。

**1.2.5 外泌体冲击 DC2.4 细胞** 培养 DC2.4 细胞 ,分别加入 PBS、外泌体 (20 μg/ml)、LPS (1 μg/ml) ,于 12 孔板中继续培养 48 h。经 PBS、EXO、LPS 体外冲击致敏的 DC2.4 细胞分别命名为 iDC、DC-EXO、DC-LPS。

**1.2.6 DC2.4 表面分子染色及流式细胞仪检测** 收集不同处理组的 DC2.4 细胞于 EP 管中 ,1 × PBS 冲洗 2 次 ,然后在各管分别加入 90 μl 封闭液 ,在 4 °C 环境中避光封闭 15 min。然后于每管中加入荧光标记抗体 FITC anti-Mouse CD86、PerCP/Cy5.5 anti-Mouse CD80、PE anti-Mouse CD83、APC anti-Mouse CD40、Brilliant Violet 650 anti - Mouse MHC-II ,在 4 °C 环境中孵抗体 30 min 后用 PBS 反复冲洗 3 次 ,在每管加入 DAPI 后进行流式仪检测细胞。

**1.2.7 外泌体致敏 DCs 对 T 淋巴细胞增殖的影响** 在超净台下取 C57BL/6 成年健康小鼠的脾脏 ,充分裂解以去除红细胞 ,反复洗涤后制成单个细胞的悬液; 然后采用免疫磁珠分离法来获得小鼠的 T 淋巴细胞 ,将 CFSE 标记的 T 淋巴细胞和各处理组 DCs 按 5 : 1 比例共孵育 5 d。实验分 2 组: 未用外泌体致敏的 DCs 与淋巴细胞共孵育组、外泌体致敏

后的 DCs 与淋巴细胞共孵育组。用流式仪来测定不同组 T 淋巴细胞的分裂增殖情况。

**1.3 统计学处理** 所得数据采用 GraphPad prism 6.0 软件进行统计分析 ,用 *t* 检验方法比较每组数据的差异 ,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。每项实验均重复 3 次。

## 2 结果

**2.1 透射电镜观察小鼠 Hepa1-6 细胞外泌体的形态** 通过透射电镜可清晰地看到 ,从 Hepa1-6 细胞的上清液提取的外泌体为双层膜样结构 ,呈圆形或者类圆形 ,直径为 30 ~ 100 nm ,大小相对均一 ,均匀地分布在视野内( ×40 000)。见图 1。

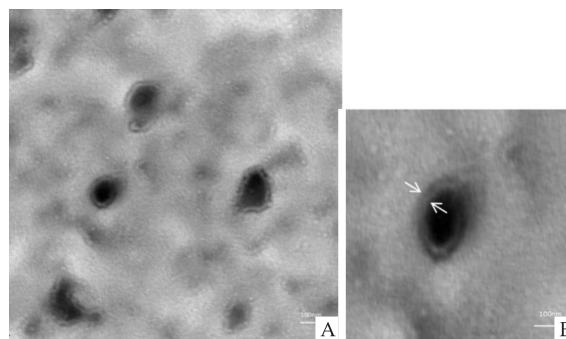


图 1 透射电镜观察小鼠肝癌细胞外泌体的形态 ×40 000  
A: 电镜下外泌体的形态; B: 放大后观察到外泌体双层膜结构

**2.2 Western blot 检测外泌体标志性蛋白** Western blot 结果显示 ,从 Hepa 1-6 细胞的上清液中提取的物质有外泌体标志性蛋白 CD63、TSG101 的表达 ,但无细胞色素 C ( Cytochrome C) 的表达 ,表明提取的外泌体中不含有细胞成分 ,无细胞碎片的污染 ,为纯度较高的外泌体。见图 2。

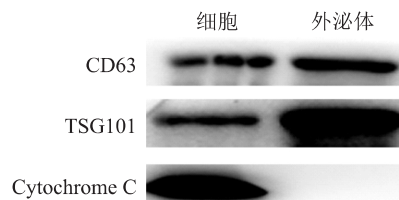


图 2 Western-blot 法检测外泌体标志性蛋白 CD63、TSG101 以及阴性对照 Cytochrome C 的表达水平

**2.3 小鼠肝癌细胞 Hepa 1-6 来源的外泌体对 DC2.4 表型的影响** 将小鼠 Hepa 1-6 细胞来源的外泌体与鼠 DC2.4 细胞共培养 48 h 后见 DC2.4 细胞体积增大 ,半贴壁生长 ,可在 DC2.4 细胞边缘见

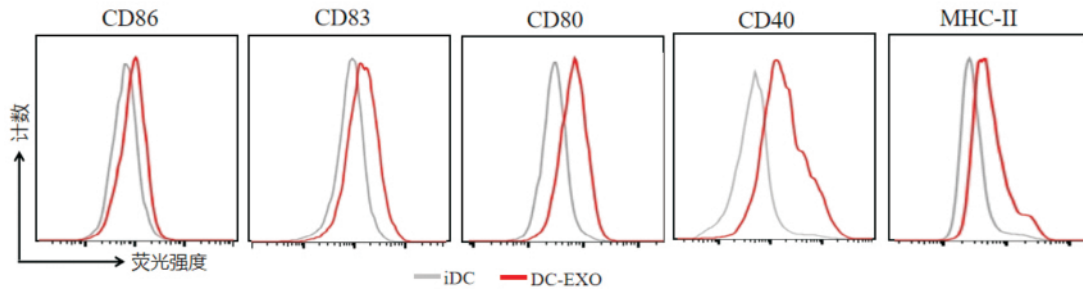


图3 小鼠肝癌细胞来源的外泌体对鼠树突状细胞表型的影响

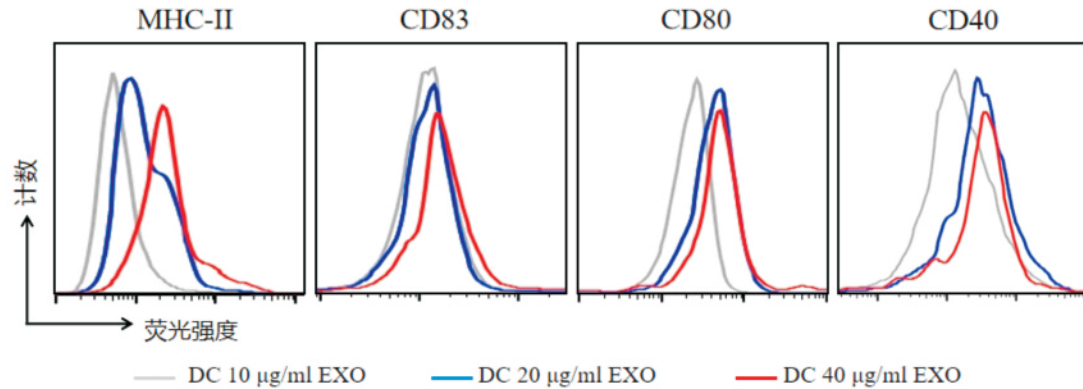


图4 不同浓度的小鼠肝癌细胞来源的外泌体对鼠树突状细胞表型的影响

树突状或者伪足样突起,表明朝向成熟方向分化。流式细胞术检测显示,与 iDC 组相比,外泌体能够上调 DC2.4 表面的 MHC-II、CD80、CD83、CD86 和 CD40 分子的表达 ( $P < 0.05$ ),见图 3。并且随着外泌体浓度的增加,DC2.4 表面分子表达增高,见图 4。

**2.4 小鼠肝癌细胞 Hepa1-6 来源的外泌体致敏 DCs 对 T 淋巴细胞增殖情况的影响** 小鼠肝癌细胞 Hepa1-6 来源的外泌体致敏 DCs(成熟 DCs)共孵育组诱导刺激初始 T 淋巴细胞增殖情况高于未用外泌体致敏的 DCs ( $t = -3.260, P < 0.05$ )。FITC 通道标记的 CFSE 染料,随着 T 淋巴细胞的增值,荧光强度逐渐的减少。见图 5。

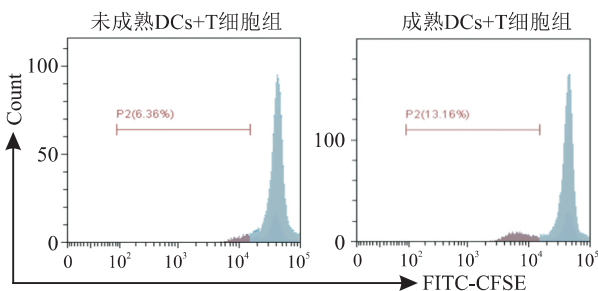


图5 小鼠肝癌细胞来源的外泌体致敏树突状细胞对 T 淋巴细胞增殖情况的影响

### 3 讨论

基于 DC 的抗肿瘤免疫治疗现已成为 HCC 治疗的研究热点之一。DC 是人体内最重要的抗原提呈细胞(antigen presenting cells, APC),DC 首先对抗原进行识别、摄取和加工,然后将加工处理的抗原多肽片段与主要组织相容性复合体(MHC)以复合物的方式提交给 T 细胞表面并活化初始 T 淋巴细胞,进而激活 T 淋巴细胞的免疫应答反应。在人体抗肿瘤特异性免疫应答的启动中发挥着至关重要的作用<sup>[4]</sup>。有研究<sup>[5]</sup>表明,以 DCs 为基础的抗肿瘤免疫治疗具有一定的效果,但是 HCC 患者多数有慢性肝病病史,患者长期处于免疫功能抑制状态,肿瘤组织内浸润 DC 的功能受抑,无法获得具有较强特异免疫原性的 DC 疫苗,严重限制了基于 DC 的疫苗的发展。因此,开发以 DCs 为基础的抗肿瘤免疫治疗的重点是寻找具有更强的免疫原性,但同时又含有较少免疫抑制性物质的肿瘤抗原。

外泌体是双层囊泡样结构的物质,其直径约为 30 ~ 100 nm,并由多种活细胞分泌而来<sup>[6]</sup>。有研究<sup>[7]</sup>表明外泌体是一种细胞间信号传递的重要介质之一,在机体的生理和病理过程中都发挥着重要的作用,在不同恶性肿瘤中也发挥着不同的作用。

研究<sup>[8]</sup>表明 TDE 既能通过直接作用又可以通过间接作用来影响免疫细胞的成熟和功能,目前尚不清楚其在 DC 中的作用及功能。本研究结果显示小鼠肝癌细胞 Hepa 1-6 来源的外泌体致敏 DCs 能够上调其成熟分子的表达,并且随着外泌体浓度的增加,表面类分子表达增高,同时将致敏的 DCs 与 T 细胞共孵育,可促进 T 淋巴细胞的增殖。提示肝癌细胞 Hepa1-6 提取的外泌体可提供重要抗原性物质为调节 DCs 介导抗肿瘤免疫。但肿瘤的外泌体刺激 DC 成熟并发挥抗肿瘤的机制有待进一步探讨。

综上所述,小鼠 Hepa1-6 细胞提取的外泌体可促进 DC2.4 细胞成熟,并刺激 T 细胞的分裂增殖,为基于 DC 的 HCC 免疫治疗提供潜在的肿瘤抗原谱,并为基于 DCs 的抗肿瘤免疫治疗提供一定理论依据。

### 参考文献

- [1] Feng R M, Zong Y N, Cao S M, et al. Current cancer situation in China: good or bad news from the 2018 Global Cancer Statistics [J]. *Cancer Commun ( Lond )*, 2019, 39(1): 22.
- [2] Elsegood C L, Timitz-Parker J E, Olynyk J K, et al. Immune checkpoint inhibition: prospects for prevention and therapy of hepatocellular carcinoma [J]. *Clin Transl Immunology*, 2017, 6(11): e161.
- [3] Vu L T, Peng B, Zhang D X, et al. Tumor-secreted extracellular vesicles promote the activation of cancer-associated fibroblasts via the transfer of microRNA-425b [J]. *J Extracell Vesicles*, 2019, 8(1): 1599680.
- [4] Constantino J, Gomes C, Falcão A, et al. Dendritic cell-based immunotherapy: a basic review and recent advances [J]. *Immunol Res* 2017 65(4): 798–810.
- [5] Wang C, Huang X, Wu Y J, et al. Tumor cell-associated exosomes robustly elicit anti-tumor immune responses through modulating dendritic cell vaccines in lung tumor [J]. *Int J BiolSci* 2020, 16(4): 633–43.
- [6] Reina S, Kanda T, Yokosuka O, et al. Exosomes and hepatocellular carcinoma: from bench to bedside [J]. *Int J Mol Sci* 2019, 20(6): 1406.
- [7] Rajagopal C, Harikumar K B. The origin and functions of exosomes in cancer [J]. *Front Oncol* 2018 8: 66.
- [8] He C Q, Hua W, Liu J T, et al. Exosomes derived from endoplasmic reticulum-stressed liver cancer cells enhance the expression of cytokines in macrophages via the STAT3 signaling pathway [J]. *Oncol Lett* 2020 20(1): 589–600.

## Effects of exosomes on dendritic cell maturation and function in mouse hepatocellular carcinoma cells

Xu Weibing, Fan Lulu

(Dept of Oncology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

**Abstract Objective** To investigate the effects of exosomes derived from Hepa1-6 cells on dendritic maturation and function. **Methods** Exosomes were extracted from Hepa1-6 cells, and the shape of exosomes was identified by transmission electron microscopy. The expressions of the marker proteins of exosomes, CD63 and TSG101 were determined by Western-blot. Dendritic cells were impacted with exosomes from Hepa1-6 cells, and the expression of maturation related surface molecules CD40, CD80, CD83, CD86 and MHC-II was detected by flow cytometry. Mouse T lymphocytes and exosomes shock DCs from Hepa1-6 cells were co-incubated for 5 d, and the proliferation of T lymphocytes was determined by CFSE staining and flow cytometry. **Results** The exosomes collected from the supernatant of Hepa1-6 cells was observed by transmission electron microscopy and exosomes showed round or circular membranous vesicle-like structure, which was consistent with the typical characteristics of exosomes. Western-blot analysis showed that exosomes derived from Hepa1-6 cells expressed CD63 and TSG101, but did not express Cytochrome C. The exosomes extracted from Hepa1-6 cells were used to shock DCs, and the surface MHC-II molecules, mature marker CD83 and co-stimulating molecules CD40, CD80 and CD86 were up-regulated. Moreover, with the increase of exosomes concentration, the molecular expression of DC surface increased ( $P < 0.05$ ). Exosomes also promoted the proliferation of T lymphocytes ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Exosomes extracted from Hepa1-6 cells could promote the differentiation of DC2.4 toward mature phenotype and promote the proliferation of T cells.

**Key words** hepatocellular carcinoma; exosomes; dendritic cells