文章编号:1000-5404(2013)04-0307-04

论著

大鼠肠系膜淋巴结和外周淋巴结固有exosome的制备及其对T细胞增殖的影响

孙 祯[1],黄赤兵[1],宋亚军[1],余雪松[1],贺伟峰[2],陈益荣[1],胡文刚[1],王 晋[1] (400037 重庆,第三军医大学新桥医院泌尿外科[1];400038 重庆,第三军医大学西南医院全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室[2])

[摘要] **目的** 从大鼠肠系膜淋巴结、外周淋巴结中分离纯化exosome,鉴定其对T细胞增殖的影响。**方法** 取出BN(RT1n)大鼠的外周淋巴结及肠系膜淋巴结并研磨、离心以获得非细胞组织上清,采用超滤密度梯度离心法提取exosome。透射电镜对收集的exosome进行形态学鉴定,BCA法进行蛋白定量,SDS-PAGE电泳分离蛋白,Western blot检测IL-10的表达,并通过混合淋巴细胞培养检测其对T细胞增殖的影响。**结果** 两种淋巴组织来源的非细胞组织上清均含有exosome,肠系膜淋巴结源性exosome蛋白浓度[(1.92±0.10) μg/μL]显著高于外周淋巴结源性exosome[(1.57±0.06) μg/μL,$P<0.05$],SDS-PAGE显示两种组织源性exosome所含蛋白种类和数量有明显差异,Western blot显示肠系膜淋巴结固有exosome中IL-10的表达显著高于外周淋巴结固有exosome,混合淋巴细胞培养结果显示肠系膜淋巴结固有exosome和外周淋巴结固有exosome对T细胞的增殖均有促进作用($P<0.05$),外周淋巴结源性exosome的促增殖作用显著大于肠系膜淋巴结源性exosome($P<0.05$)。**结论** 肠系膜淋巴结、外周淋巴结均含有组织固有exosome,两种组织来源exosome有蛋白浓度和蛋白种类的差异,且均能促进淋巴细胞增殖,促进程度有显著差异。

[关键词] exosome;淋巴结;超滤密度梯度离心;混合淋巴细胞培养
[中图法分类号] R322.25;R392-33;R392.12 [文献标志码] A

Purification of exosomes from rat mesenteric and peripheral lymph nodes and their effect on T cell proliferation

Sun Zhen[1], Huang Chibing[1], Song Yajun[1], Yu Xuesong[1], He Weifeng[2], Chen Yirong[1], Hu Wengang[1], Wang Jin[1] ([1]Department of Urology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037; [2]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injuries, Institute of Burns, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the purification methods of the exosomes derived form lymphoid tissues of rats and determine their effect on T cell proliferation. **Methods** The peripheral lymph nodes and mesenteric lymph nodes from BN (RT1n) rats were separated, and their impurity were removed by centrifugation. Then, the exosomes were purified from the acellular supernatants by means of differential ultracentrifugation or ultrafiltration and sucrose gradient centrifugation, and confirmed by transmission electron microscopy. The protein expression of the exosomes was analyzed by SDS-PAGE electrophoresis. Western blot analysis was used to test the expression of IL-10. Finally, mixed lymphocyte culture was used to evaluate the immune function of the exosomes from peripheral lymph nodes and mesenteric lymph nodes. **Results** The protein concentration of the exosomes purified from mesenteric lymph nodes were higher than that from peripheral lymph nodes (1.92±0.10 *vs* 1.57±0.06 μg/μL, $P<0.05$). SDS-PAGE displayed the differences in protein contents and types between the exosomes from 2 kinds of lymph nodes. Western blotting indicated that the expression of IL-10 was stronger in the exosomes from mesenteric lymph nodes than those from peripheral lymph nodes. The two kinds of exosomes both promoted lymphocyte proliferation ($P<0.05$), while the exosomes from peripheral lymph nodes exosomes stronger than from mesenteric lymph nodes ($P<0.05$). **Conclusion** There are exosomes in both peripheral and mesenteric lymph nodes, but with significant differences in protein contents and types. The exosomes from 2 kinds of lymph nodes promote lymphocyte proliferation, though with significant differences.

[**Key words**] exosome; lymphoid nodes; ultrafiltration and sucrose gradient centrifugation; mixed lymphocyte culture

Supported by National Natural Science Foundation of China (30872580). Corresponding author: Huang Chibing, E-mail: huangchibing@medmail.com.cn

[基金项目] 国家自然科学基金(30872580)
[通信作者] 黄赤兵,E-mail:huangchibing@medmail.com.cn
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20121225.1250.009.html(2012-12-25)

淋巴结是人体的重要免疫器官,起着过滤淋巴液和进行免疫应答的作用;其中,肠系膜淋巴结还参与了调节肠道对食物抗原和共生菌抗原无应答的免疫调节作用[1]。因此,不同部位的淋巴结因其独特的微环境而表现出不同的免疫功能和特点;与此同时,免疫器官也必须作为一个结构完整的整体才能发挥其独特的功能。外泌体(exosome)是一种由活细胞晚期核内体形成并分泌出胞的膜性囊泡。不同组织细胞来源exosome由于携带的蛋白质不同,而能够发挥不同的生物学功能[2]。例如,肿瘤细胞分泌的 exosome 能够介导血管再生、肿瘤细胞增殖及免疫逃逸[3];而树突状细胞源性 exosome 则能够引起机体有效的抗肿瘤免疫应答[2]。目前研究发现,Exosome 内含有与细胞来源相关的蛋白质、rRNA 和 microRNA[4-5],并且 exosome 能够通过生物屏障,在细胞间传递功能性核酸分子[6],从而发挥各种生物学功能,故 exosome 有望成为一种新型给药途径及基因治疗载体[6-7]。本研究以免疫器官为单位,提取外周淋巴结和肠系膜淋巴结的组织固有 exosome,以探寻在微环境完整的条件下提取出的组织固有 exosome 的特性,并比较两种淋巴结源性exosome对 T 细胞增殖的影响,为后续的蛋白组成和诱导移植免疫耐受潜在的功能学研究提供基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

雄性清洁级 6~8 周龄 BN(RT1n)大鼠 2 只、Lewis(RTl1)大鼠 1 只,体质量约 200 g,购于北京维通利华实验动物有限公司,许可证号:SCXK(渝)200020002;SCXK(军)20002007。

1.2 主要试剂与仪器

重水、分析纯蔗糖(美国 Sigma 公司),BCA 试剂盒(碧云天生物技术有限公司),CCK-8(碧云天生物技术有限公司),淋巴细胞分离液(上海拜沃生物科技有限公司),载破片(海门市神鹰实验器材厂),超滤离心管 100×10^3(美国 Millipore 公司,Amicon Ultra),高速冷冻离心机(美国 BECKMAN COULTER,Avanti J-30I,转子 JA-30. 50T1),超高速冷冻离心机(日本 Hitachi),透射电镜(日本 Hitachi,H-7500-TEM),垂直电泳仪(美国 Biorad 公司),影像分析扫描仪(美国 Biorad 公司,GS-800),酶标仪(美国 VARIOSKAN FLASH,Thermo)。

1.3 非细胞组织上清制备

分别无菌取出 BN(RT1n)大鼠的外周淋巴结(peripheral lymph node, PLN),肠系膜淋巴结(mesenteric lymph nodes, MLN),置于装有 10 mL PBS 的玻璃培养皿中,用载玻片毛玻面轻柔研磨组织得到含细胞的组织悬液,用 200 目筛网过滤后转移至 15 mL 离心管中,600×g 离心 10 min,去除细胞沉淀,收集上清,得到非细胞组织上清。

1.4 exosome 制备

将收集的上清进行超滤及密度梯度离心法[8]收集 exosome。收集非细胞组织上清 100 mL,4 ℃条件下,2 000×g 离心 30 min,收集上清;10 000×g 离心 30 min,收集上清,将收集的上清液转移入 100×10^3 MWCO Amicon 超滤管中,1 500×g 离心 30 min,进行浓缩,将浓缩液转移至 30 g/L 的蔗糖重水垫上,100 000×g 离心 70 min,取出含有 exosome 的蔗糖重水垫并用 50 mL PBS 进行稀释后置于 Amicon 超滤管中,1 500×g 离心 30 min,0.22 μm 滤器过滤,所得滤液即包含 exosome。

1.5 exosome 的鉴定分析

1.5.1 负染透射电镜下观察 分别取两种 exosome 悬液 20 μL 于电镜载样铜网上,室温静置 1 min,用滤纸吸干液体,滴加 20 g/L 的磷钨酸(pH=6.8),室温负染 1 min,用滤纸从侧面吸干液体,白炽灯下烘烤 10 min,透射电镜观察、照相。

1.5.2 蛋白定量 将已经溶解稀释至 0.5 mg/mL 的蛋白标准品按 0、1、2、4、8、12、16、20 μL 加到 96 孔板中,加入 PBS 将每孔体积补充到 20 μL;取两种淋巴组织源性 exosome 溶液 10 μL 加入到上述 96 孔板中,并加入 PBS 补充到 20 μL;各孔加入工作液 200 μL,37 ℃放置 30 min 后入酶标仪,于 562 nm 波长测定蛋白浓度。

1.5.3 SDS-PAGE 电泳检测 取 20 μL exosome 悬液,加入 5 μL 5×上样缓冲液,100 ℃煮沸 5 min,加样于上样孔内,浓缩胶 80 V,30 min;分离胶 100 V,90 min。电泳结束后,使用 0.25%考马斯亮蓝染液染色并过夜,脱色液脱色至条带明显,背景清淡,使用 Biorad(GS-800)图像扫描仪进行拍照。

1.5.4 Western blot 检测 完成 SDS-PAGE 分离样本蛋白后,将蛋白转印至 PVDF 膜上,室温封闭后,一抗采用兔抗鼠 IL-10,4 ℃过夜。二抗采用辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体,室温孵育 2 h,用 ECL 显色试剂盒于成像仪中显色。

1.6 混合淋巴细胞培养

①刺激细胞:于 Lewis(RTl1)大鼠颈静脉抽取 2 mL 外周血,置于 15 mL 无菌离心管中,加 PBS 补充体积至 15 mL,颠倒混匀。于 50 mL 离心管中加入 10 mL 淋巴细胞分离液,后将 15 mL 血细胞液缓慢加入此离心管(保持分界面清楚),2 000 r/min 离心 20 min,吸出云雾状细胞即淋巴细胞至新的 15 mL 离心管中,用 1640(含 10%胎牛血清)培养基补充体积至 15 mL,600×g 离心 5 min,弃上清,重悬细胞并计数。收集淋巴细胞子塑料培养瓶中,加入 30 μg/mL 丝裂霉素,37 ℃水浴 20 min。600×g 离心 10 min 弃上清,PBS 重悬后 600×g 离心 5 min,洗涤 3 次。调整细胞数为 1×10^6/mL。②反应细胞:按照上述方法(删除丝裂霉素处理步骤)收集 exosome 源性 BN(RT1n)大鼠外周血淋巴细胞,调整细胞数为 1×10^6/mL。③混合淋巴细胞培养:反应细胞 1×10^5加刺激细胞 1×10^5(A 组),反应细胞1×10^5加刺激细胞 1×10^5加 50 μg MLN 源性 exosome(B 组),反应细胞 1×10^5加刺激细胞 1×10^5加 50 μg PLN 源性 exosome(C 组)。置于 37 ℃,5% CO_2环境中培养 5 d,培养结束前 4 h,每孔加入 CCK-8 10 μL 置于酶标仪 450 nm 波长处检测光密度值[D(450)]。

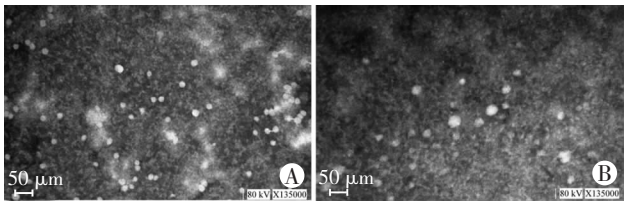
1.7 统计学处理

数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 20.0 统计软件进行单因素方差分析及 Tukey 显著性检验。

2 结果

2.1 形态学观察

透射电镜观察显示：两种淋巴结组织固有囊泡均呈类圆形，囊泡外周可见其膜性结构，直径分布于 30 ~ 100 nm（图 1）。



A：MLN 源性 exosome；B：PLN 源性 exosome

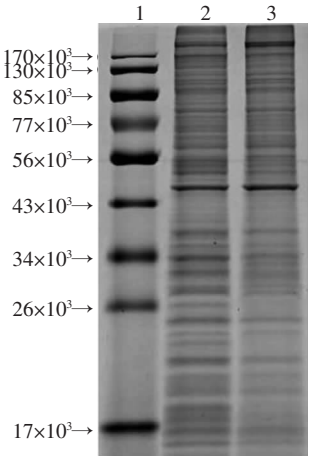
图 1 透射电镜观察肠素膜淋巴结与外周淋巴结源性 exosome 形态

2.2 蛋白浓度

以 BSA 浓度为横坐标，以 $D(562)$ 值为纵坐标，绘制标准曲线方程并以此得到 exosome 浓度：MLN 源性 exosome 蛋白浓度高于 PLN 源性 exosome［(1.92 ± 0.10) μg/μL *vs* (1.57 ± 0.06) μg/μL，$P < 0.05$］。

2.3 SDS-PAGE 检测

电泳分离后蛋白谱见图 2，两种源性的 exosome 所含的蛋白种类繁多，相对分子质量介于 5×10^3 ~ 250×10^3，两种淋巴结源性 exosome 所含蛋白在数量和相对分子质量上均有显著差异。



1：标准；2：MLN；3：PLN

图 2 肠系膜淋巴结与外周淋巴结源性 exosomeSDS-PAGE 电泳结果

2.4 Western blot 检测

以 β-actin 为内参，检测 IL-10 在 MLN 和 PLN 源性 exosome 中的表达情况，结果见图 3，MLN 源性 exosome 相对于 PLN 源性 exosome 呈高表达 IL-10 状态。

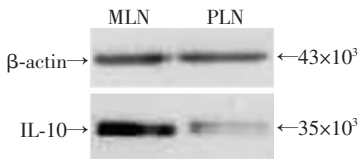


图 3 肠系膜淋巴结与外周淋巴结源性 exosome 中 IL-10 表达

2.5 混合淋巴细胞培养

取 Lewis（RTl1）大鼠外周血淋巴细胞经丝裂霉素处理作为刺激细胞，BN（RT1n）大鼠外周血淋巴细胞作为反应细胞，将两者进行单向混合淋巴细胞培养。B 组（0.270 ± 0.009）和 C 组（0.396 ± 0.023）均促进淋巴细胞的增殖，与对照组（0.191 ± 0.002）比较差异有统计学意义（$P < 0.05$），且 C 组的促增殖作用明显强于 B 组（$P < 0.05$）。

3 讨论

exosome 是一类起源于内吞体系统并被分泌出细胞的膜性囊泡[9]，在免疫应答和信号转导等方面有着重要的作用[10]。最早被用于描述网织红细胞发育成成熟红细胞时释放的膜性囊泡。随着研究的深入，发现它还可由其他的多种细胞分泌，且 exosome 的组成和功能与其来源的细胞有很大关联[11-14]。如人类鼻咽癌来源的 exosome 含 LMP1[15]，能抑制 T 细胞活化效应；某些肿瘤来源的 exosome 能异常地表达 FasL，诱导 AICD；黑素瘤 exosome 还异常表达 HLA-G[16]，能促进肿瘤的耐受作用：这些均与肿瘤细胞逃避宿主的免疫有关。相反，另有多种细胞源性 exosome 具有明确的抗肿瘤作用[17]：肠上皮细胞 exosome 含 A33 抗原，血小板 exosome 含 P 选择素，肥大细胞 exosome 含氨肽酶 N/CD13[2]，这些特异性表达的蛋白质，是 exosome 具有特异性功能的分子基础。因此，不同组织、不同细胞来源的 exosome 有着很大的区别。本研究以淋巴器官为单位进行组织源性固有 exosome 的提取与检测，观察外周淋巴结和肠系膜淋巴结所负载的 exosome 的形态、蛋白表达的差异以及对 T 细胞增殖的不同影响。外周淋巴结是机体发生免疫应答的主要场所之一，其中 T 细胞亚群占外周淋巴结淋巴细胞总数的 75%，主要位于髓质和副皮质区，B 细胞亚群仅占 25% 左右，主要位于浅皮质区。研究发现当机体发生炎症反应时树突状细胞、单核细胞、类浆细胞将进入外周淋巴结，这些对细胞免疫的免疫激活是必不可少的[18]。肠系膜淋巴结是位于肠道系膜区的集合淋巴结，以往的观点认为，肠系膜淋巴结与外周淋巴结只是分布位置不同，结构、功能相似，但是现在发现肠系膜淋巴结的调节性 T 细胞（Treg 细胞）还参与了肠道形成口服免疫耐受的复杂调节机制[1]。综上所述，两种淋巴结各有其结构和功能上的差异，并且有着各自独特的微环境，因此产生的 exosome 所负载的蛋白种类及含量均具有组织特异性，表现出蛋白定量的差别，SDS-PAGE 蛋白条带差异以及 IL-10 表达不同的现象。口服耐受是机体免疫系统对肠道接触的大量微生物和食物抗原形成的不反应状态，是后天条件下机体维持对必须进入机体的外来抗原（食物抗原、肠道共生菌抗原）耐受的调控机制。而肠系膜淋巴结正处于这种

能够对外来抗原产生免疫耐受的肠道系统环境中，MLN中的调节性T细胞的功能在上述免疫耐受中起着至关重要的作用，能够对免疫应答进行选择性抑制[1]。此外，肠道上皮源性exosome具有导致肠道免疫耐受的功能，此作用也与MLN相关[19]。以此同时，机体在发生免疫反应时，T细胞和树突状细胞会归巢入肠系膜淋巴结的副皮质区，并在此决定免疫反应向免疫应答或者向免疫耐受转变[20]。由此推想，MLN具有某种下调局部免疫应答的功能，故其分泌的exosome同样具有类似功能。对此，我们进行了IL-10表达的检测。IL-10在1988年被发现，后来随着研究的深入IL-10的各种功能被逐步阐述，例如：可通过抑制Th1细胞的增殖和IL-2、白三烯等细胞因子的产生而抑制Th1型免疫应答。而实验结果显示MLN源性exosome较PLN源性exosome呈高表达IL-10状态。正如混合淋巴细胞培养结果所示：B组（加入MLN源性exosome组）和C组（加入PLN源性exosome组）均促进淋巴细胞的增殖（$P<0.05$），但C组的促增殖作用显著强于B组（$P<0.05$），与理论相符，因此MLN源性exosome高表达IL-10可能是导致其促增殖作用弱于PLN源性exosome的原因之一。蛋白浓度检测实验提示两种淋巴来源的exosome在数量上有显著差异，MLN源性exosome蛋白浓度高于PLN源性exosome；SDS-PAGE检测提示MLN源性和PLN源性exosome在蛋白数量和分子量上均有显著差异，已有文献证实exosome的来源与蛋白组成决定exosome的生物学功能，因此两种淋巴结来源的exosome在免疫调节中发挥着不同的免疫学功能，导致混合淋巴细胞培养中，虽两种来源的exosome均能促进T淋巴细胞增殖，但在作用强度上有显著差异。

本研究采用超滤密度梯度离心法提取exosome，能够有效地去除非特异性可溶性蛋白和较大的蛋白聚合物，电镜照片背景清晰，exosome形态显著，是一种较为高效的exosome制备方法，同时对两种源性exosome进行蛋白定量和功能分析，为接下来的蛋白质组学研究和潜在的移植免疫耐受功能学研究奠定基础。

参考文献：

[1] Chen W, Perruche S, Li J. $CD4^+CD25^+$ T regulatory cells and TGF-beta in mucosal immune system: the good and the bad[J]. Curr Med Chem, 2007, 14(21): 2245 - 2249.

[2] Thery C, Zitvogel L, Amigorena S. Exosomes: composition, biogenesis and function[J]. Nat Rev Immunol, 2002, 2(8): 569 - 579.

[3] Pant S, Hilton H, Burczynski M E. The multifaceted exosome: biogenesis, role in normal and aberrant cellular function, and frontiers for pharmacological and biomarker opportunities[J]. Biochem Pharmacol, 2012, 83(11): 1484 - 1494.

[4] Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, *et al*. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells[J]. Nat Cell Biol, 2007, 9(6): 654 - 659.

[5] Pegtel D M, Cosmopoulos K, Thorley-Lawson D A, *et al*. Functional delivery of viral miRNAs via exosomes[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(14): 6328 - 6333.

[6] O'Loughlin A J, Woffindale C A, Wood M J. Exosomes and the emerging field of exosome-based gene therapy[J]. Curr Gene Ther, 2012, 12(4): 262 - 274.

[7] Kooijmans S A, Vader P, Van- Dommelen S M, *et al*. Exosome mimetics: a novel class of drug delivery systems[J]. Int J Nanomedicine, 2012, (7): 1525 - 1541.

[8] Bu N, Wu H, Sun B, *et al*. Exosome-loaded dendritic cells elicit tumor-specific $CD8^+$ cytotoxic T cells in patients with glioma[J]. J Neurooncol, 2011, 104(3): 659 - 667.

[9] Pfeffer S R. Two Rabs for exosome release[J]. Nat Cell Biol, 2010, 12(1): 3 - 4.

[10] Bobrie A, Colombo M, Raposo G, *et al*. Exosome secretion: molecular mechanisms and roles in immune responses[J]. Traffic, 2011, 12(12): 1659 - 1668.

[11] Li X B, Zhang Z R, Schluesener H J, *et al*. Role of exosomes in immune regulation[J]. J Cell Mol Med, 2006, 10(2): 364 - 375.

[12] Simpson R J, Lim J W, Moritz R L, *et al*. Exosomes: proteomic insights and diagnostic potential[J]. Expert Rev Proteomics, 2009, 6(3): 267 - 283.

[13] 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.

[14] 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.

[15] Xiu F M, Cao X T. Exosomes in the immune response and tolerance[J]. J Microbiol Immunol, 2004, 2(4): 231 - 236.

[16] Riteau B, Faure F, Menier C, *et al*. Exosomes bearing HLA-G are released by melanoma cells[J]. Hum Immunol, 2003, 64(11): 1064 - 1072.

[17] 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.

[18] Martin-Fontecha A, Lanzavecchia A, Sallusto F. Dendritic cell migration to peripheral lymph nodes[J]. Handb Exp Pharmacol, 2009(188): 31 - 49.

[19] Mallegol J, van-Niel G, Heyman M. Phenotypic and functional characterization of intestinal epithelial exosomes[J]. Blood Cells Mol Dis, 2005, 35(1): 11 - 16.

[20] Forster R, Braun A, Worbs T. Lymph node homing of T cells and dendritic cells *via* afferent lymphatics[J]. Trends Immuonl, 2012, 33(6): 271 - 280.

（收稿：2012-10-16；修回：2012-11-19）

（编辑 龙 亮）