基础研究 文章编号:0253-3626(2010)01-0037-03

肾癌细胞来源 exosome 的制备和免疫相关蛋白组成的初步研究

张 尧[1],张家摸[1],何百成[2],罗春丽[3],吴小候[1]

(1. 重庆医科大学附属第一医院泌尿外科;2. 重庆医科大学药学院药理教研室;3. 重庆医科大学检验系,重庆 400016)

【摘 要】目的:分离纯化肾癌细胞分泌的 exosome,检测 exosome 免疫相关蛋白的组成,探讨其潜在的临床应用价值。方法:体外培养人肾癌细胞株 RC-2。用超滤和蔗糖重水密度梯度超速离心法分离纯化 exosome,透射电镜观察其形态,Western blot 检测其免疫相关蛋白的组成。结果:用超滤和蔗糖重水密度梯度超速离心法成功分离出 exosome。透射电镜下 exosome 为类圆碟形,具有双层膜结构,直径 30~100 nm。exosome 表达肾癌特异性抗原 G250、热休克蛋白 70(Heat shock protein70,HSP70)和细胞间粘附分子(Intercellular Adhesion Molecule-1,ICAM-1)。结论:超滤和蔗糖重水密度梯度超速离心法可以分离纯化肾癌细胞分泌的 exosome,exosome 表达免疫相关蛋白 G250、HSP70、ICAM-1。其负载肾癌特异性抗原,具有免疫原性,可望成为治疗肾癌的新疫苗。

【关键词】肾细胞癌;exosome;免疫相关蛋白

【中国图书分类法分类号】R735.7 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-03-12

Separation and identification of exosomes derived from renalcancer cells and primary study of protein composition

ZHANG Yao, et al

(*Department of Urology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To separate and purify exosomes derived from renal cancer cells and detect their immune associated protein in order to investigate their potential clinical value. *Methods*: Exosomes derived from RC-2 cells culture supematants were separated and purified by ultrafiltration and sucrose gradient centrifugation, which were identified by transmission electron microscope. The expressions of HSP70, ICAM-1 and G250 were detected by western blot. *Results*: Exosomes were successfully purified by ultrafiltration and sucrose gradient centrifugation, which were 30~100 nm in diameter with typical saucer-shape morphology, and expressed HSP70, ICAM-1 and G250 antigen. *Conclusion*: Ultrafiltration and sucrose gradient ultracentrifugation can be used to purify renal cancer cells-secreted exosomes. Exosomes, expressing HSP70, ICAM-1 and G250, might be the novel vaccine for renal cell cancer.

【Key words】Renal cell carcinoma; Exosome; Immune associated protein

肿瘤细胞分泌的 exosome 是一种类似于亚细胞结构的外核体,具有较强的诱导机体产生抗肿瘤免疫效应,近年来成为非细胞性疫苗的研究热点[1]。我们应用超滤和蔗糖重水密度梯度超速离心相结合的方法分离纯化出肾癌细胞分泌的 exosome,用透射电镜观察其形态,并用 Western blot 检测其免疫相关蛋白表达情况,以探讨 exosome 在诱导抗肾癌效应中的潜在的临床应用价值。

作者介绍:张 尧(1974-),男,主治医师,博士,研究方向:肾癌的生物学治疗。

通讯作者:吴小候,男,教授,E-mail:wuxiaohou80@hotmail.com。

1 材料和方法

1.1 细胞和试剂

人肾癌细胞株 RC-2 购于上海细胞库。胎牛血清、RPMI1640(美国 Gibco 公司)。Centriplus 离心超滤管(100 kD)、Amicon Ultra 高回收率高流速切向流超滤离心管(100 kD)、PVDF 膜购自美国 Millipore 公司。鼠抗人 HSP70 单克隆抗体、兔抗人 ICAM-1 单克隆抗体、兔抗人 G250 多克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司)。重水(青岛腾龙微波科技有限公司),分析纯蔗糖(国药集团化学试剂公司)。考马斯亮蓝 G250 和 R250、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒、5×SDS-PAGE 蛋白质上样缓冲液、BeyoECL 荧光检测试剂(碧云天生物技术研究所)。辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG、辣根过氧化物酶标

记的羊抗兔 IgG、免疫组化试剂盒(北京中杉金桥公司)。

1.2　细胞培养

人肾癌细胞 RC-2 培养在 10%小牛血清 RPMI1640 培养液中(内含 0.1%青霉素、链霉素),并置于 37℃、5%CO_2 培养箱内备用。常规传代培养,收集已培养 2～3 d 的上清液,共 300 ml,-20℃保存。

1.3　exosome 制备

取 RC-2 细胞培养上清液 100 ml,300 g 低温离心(4℃)10 min 去除细胞;800 g 低温离心 30 min 去除细胞碎片得上清液;10 000 g 低温离心 30 min 取上清液;通过 100 kD MWCO Centriplus 离心超滤管浓缩超滤,以 1000 g 离心 30 min,得到约 20 ml,将超滤液分别移至 2 ml 含 30 g/L 的蔗糖重水垫的 10 ml 的离心管中,100 000 g 低温超速离心 1 h,收集离心管底部的缓冲垫用 PBS 稀释,置于 100kD MWCO 高回收率高流速切向流超滤离心管中 1 000 g 离心 30 min,得到 3 ml exosome,0.22 μm 滤膜过滤除菌,-80℃保存备用。采用 Bradford 法定量 exosome 的总蛋白。

1.4　exosome 的电镜观察

取 20 μl exosome 悬液滴加于载样铜网上,用滤纸吸干液体,滴加 2%磷钨酸溶液(pH 6.8),负染 1 min,滤纸吸干负染液,白炽灯烤干约 10 min,于透射电镜下观察照相。

1.5　Western blot 分析

(1)灌制电泳凝胶:10%分离胶、5%浓缩胶。(2)上样:exosome40 μl 与 5×SDS 上样缓冲液 10 μl 混合煮沸 5 min,加于凝胶上样孔内,浓缩胶恒压 60 V,分离胶恒压 80～100 V。(3)蛋白质转膜:250 mA 恒流将凝胶中的蛋白质通过湿法电转移至 PVDF 膜上。(4)与第一抗体结合:用含 5%脱脂牛奶的 TBST,室温封闭 1 h,将 HSP70、ICAM-l、G250 抗体分别用含 5%脱脂牛奶的 TBST 按 1:400 稀释,将膜与一抗置于封闭的塑料袋中,4℃过夜。(5)与二抗结合:TBST 缓冲液充分洗膜 3 次,每次 10 min。再与辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠和羊抗兔二抗于室温下平缓摇动 1 h。(6)显色:TBST 充分洗膜 3 次。ECL 增强发光试剂显色后,于凝胶成像系统曝光,显影定影后观察结果。

2　结　果

2.1　exosomes 的透射电镜形态学观察

常规培养人 RC-2 细胞,其光学镜下的形态学表现见图 1。取细胞上清液经超滤和蔗糖重水密度梯度离心获得 exosome。透射电镜照片显示有多个大小不一、呈类圆碟形、由脂质双层膜包绕而形成的扁平半球体,直径约 30～100 nm。其外部为较深染的脂质双层膜,内部为较均一的浅染区。可以散在分布,也可以聚集成群,如图 2。

2.2　exosome 的总蛋白定量测定

采用 Bradford 法定量 exosome 的总蛋白。首先配制蛋白标准品浓度梯度,测定吸光度值,绘制标准曲线及其方程 $y=1.3857x+0.6841$(相关系数 $r=0.9957$)。取 2 μl 稀释 5 倍的样品测吸光度值,并设 3 个复孔。测得吸光度值为 1.002、1.128、1.239,根据标准曲线方程和稀释倍数计算实际样品蛋白浓度为约 1.5 mg/ml～2.0 mg/ml。

2.3　G250 在 exosome 的表达

通过 Western Blot,本试验检测到肾癌细胞源性 exosome 表达肾癌特异性抗原 G250,在分子量为 58 kD 处检测到 G250 的条带信号,如图 2。



图 1　RC-2 细胞形态(x400)

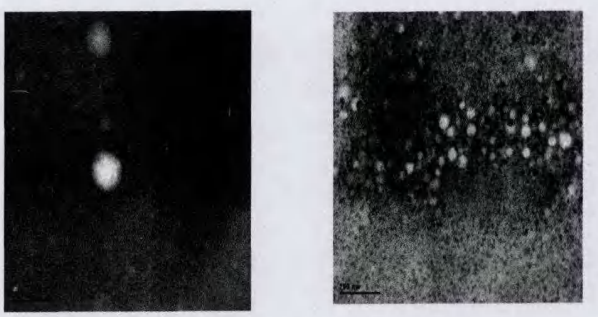


图 2　Exosome 的电镜形态特点(TEM x100 000)

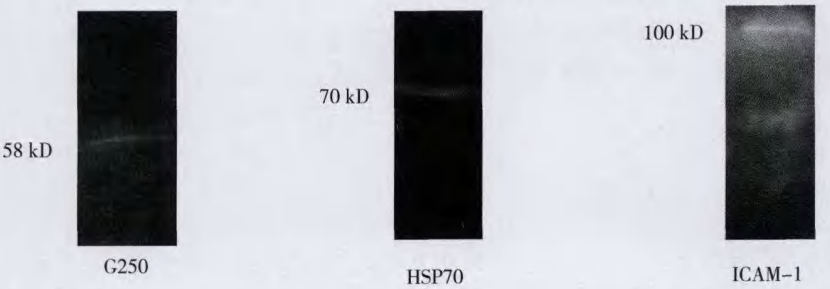


图 3　Western Blot 检测 Exosomes G250、HSP70、ICAM-l 蛋白的表达

2.4 exosome 的免疫相关蛋白的检测

通过 Western Blot,在分子量为 70 kD 处检测到亮度较强的条带信号,为 HSP70 分子;在分子量约为 100 kD 处有 I-CAM-1 分子条带信号。说明 HSP70、ICAM-1 在 exosome 有表达,如图 3。

3 讨 论

Exosome 最早在网织红细胞被发现,是细胞内的多泡体(Multivesicular bodies,MVBs)向细胞外以胞吐方式分泌释放的小囊泡,直径在 30 ~ 100nm 之间,有脂质双层膜包绕而形成的半球体,在蔗糖梯度溶液中的密度约为 1.13 ~ 1.21 g/ml。后来证实多种类型的细胞可以分泌 exosome,如 B 细胞、树突状细胞和一些肿瘤细胞等。在对某些肿瘤细胞(如乳腺癌细胞、结肠癌细胞等)分泌的 exosome 的研究发现,肿瘤细胞分泌 exosome 可以负载肿瘤相关抗原并能诱导机体产生抗肿瘤免疫效应,从而引起人们的广泛关注[1]。目前国内外对肾癌细胞分泌的 exosome 尚无研究报道。对放、化疗不敏感而对免疫治疗有较好疗效的肾癌而言,探讨肾癌分泌的 exosome 的免疫相关蛋白的表达情况及是否负载肾癌特异性抗原是十分有必要的。

本试验通过超滤和蔗糖重水密度梯度超速离心相结合的方法,从人肾癌细胞培养上清液中分离纯化出 exosome。我们首先以低速离心去除细胞培养上清液中的细胞和细胞碎片,再用 100 kD(直径约 30 nm 大小)分子量截留的超滤管去除小于 30 nm 的蛋白质、膜性结构和大量的液体,再经过蔗糖重水密度梯度 100 000 g 超速离心,将密度为 1.10 ~ 1.20 g/ml 的物质(主要是 exosome)保留在蔗糖重水垫中,大分子蛋白和螯合物被沉淀在离心管低部。取蔗糖重水垫用 PBS 稀释后,用高回收率高流速切向流超滤离心管纯化 exosome。通过蛋白质定量测定,本试验方法获得的 exosome 约 1.5 ~ 2.0 mg/ml(浓缩后),与文献报道的一致[2]。与单一的超速离心相比,该法提高了 exosome 的产量和纯度,在开放系统中暴露的时间短,不易被环境和细胞碎片污染,更能满足试验和临床的需要。通过透射电镜鉴定,分离纯化得到的 exosome 为类圆碟形,具有脂质双分子层结构,与其他细胞分泌的 exosome 形态相似。

通过对肾癌细胞分泌的 exosome 用 Western blot 对免疫相关蛋白的检测,exosome 表达 G250、HSP70 和 ICAM-1。肾癌特异性抗原 G250 率先被 Osterwijk 发现[3],后来证实它具有碳酸酐酶(CA)活性并与碳酸酐酶 IX (MN/the carbonic anhydrase IX,MN/CA IX)基因结构相同,故被定名为 G250/MN/CA IX ,简称 G250。大量研究发现,在所有的肾透明细胞癌和大多数其他类型肾细胞癌中都存在 G250 的高表达,而在正常肾脏及所有的良性病变如肾盂肾炎、肾囊肿、腺瘤、大嗜酸粒细胞瘤和其他肿瘤等中很少或根本不表达。G250 在肾癌的特异性高表达,且免疫治疗如细胞因子可以上调 G250 在肾癌细胞的表达[4],这为肾癌的免疫治疗带来了新的契机。热休克蛋白 70 和细胞间粘附因子 -1 主要与抗原的提呈和诱导淋巴细胞活化有关。热休克蛋白 70,又称"分子伴侣",是高效的抗肿瘤免疫反应的诱导剂。HSP70 与肿瘤抗原结合并参与将抗原负载至 MHC 分子上,肿瘤抗原与 HSP70 解离,激活 T 淋巴细胞或自然杀伤细胞,引起特异性免疫反应[5]。ICAM-1 是属于免疫球蛋白超家族的一类粘附分子,ICAM-1 与其配体淋巴细胞功能相关抗原结合,在促进免疫细胞的分化和发育、介导淋巴细胞和自然杀伤细胞对靶细胞的杀伤作用、调节淋巴细胞的激活、增殖、细胞毒作用和细胞因子产生等方面具有重要的免疫学功能[6]。

本试验通过对肾癌细胞分泌的 exosome 进行电镜形态学观察和 western blot 检测免疫相关蛋白的组成发现:exosome 为一种类圆碟形含脂质双分子层的膜性亚细胞结构,表达肾癌特异性抗原 G250 和免疫相关蛋白 HSP70、ICAM-1。其负载肾癌特异性抗原,并具有将抗原信息传递给树突状细胞和/或 T 淋巴细胞诱导机体产生特异性的抗肿瘤免疫的物质基础。这为我们进一步运用基因修饰 exosome 作为治疗肾癌的疫苗研究提供必要的理论依据。

参 考 文 献

[1] Joseph W,Anne L,Graca R,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.

[2] 杨 麟,沈 宜,李 静,等.热休克小鼠肝癌细胞(H22)源 Exosome 的制备及其蛋白组成的初步研究[J].重庆医科大学学报,2008,33(6):669-672.

[3] Oosterwijk E,Ruiter D J,Hoedemaeker P J,et al.Monoclonal antibody G 250 recognizes a determinant present in renal-cell carcinoma and absent from normal kidney[J]. Int J Cancer,1986,38:489-494.

[4] 温儒民,郑骏年,武 艺,等.细胞因子对肾癌特异抗原 G250 表达的影响[J].中华实验外科杂志,2007,24(9):1115-1117.

[5] Gastpar R,Gehrmann M,Bausero M A,et al. Heat shock protein 70 surface-positive tumor exosomes stimulate migratory and cytolytic activity of natural killer cells[J].Cancer Res,2005,65(12):5238-5247.

[6] Segura E,Nicco C,Lombard B,et al. ICAM-1 on exosomes from mature dendritic cells is critical for efficient naive T-cell priming[J].Blood,2005,106(1):216-223.

(责任编辑:冉明会)