

树突状细胞来源的 Exosomes 的免疫调节作用

刘袁媛^{1,2} 范华骅^{1*} 陈亮¹¹上海市血液中心血液工程研究室, 上海 200051; ²复旦大学附属华山医院, 上海 200040

摘要 Exosomes 是多种细胞经晚期内体形成的一种膜性小囊泡。最初认为其功能仅为降解内吞物质, 但研究发现 exosomes 的特异功能与其来源细胞相关, 尤其是抗原提呈细胞(APCs)——树突状细胞来源的 exosomes (dendritic cell-derived exosomes, DEXs) 集 MHC-I/MHC-II、共刺激分子、黏附分子、热休克蛋白于一身, 在体内外免疫调节中起非常重要的作用。现对 DEXs 诱导抗肿瘤免疫应答和诱导免疫耐受两方面的功能及可能的免疫调节机制进行综述。

关键词 exosomes; 树突状细胞; 抗肿瘤; 免疫耐受

Exosomes 是多种活细胞分泌的小囊泡体, 这些囊泡介导了细胞间的信息传递, 但不需要细胞间的直接接触。负载肿瘤抗原的树突状细胞来源的 exosomes (dendritic cell-derived exosomes, DEXs) 已被证实在体内外均可引起抗肿瘤效应并已作为亚细胞肿瘤疫苗用于临床试验; 最近有研究发现 DEXs 也有诱导免疫耐受的作用, 从而有望应用于临床诱导移植耐受或治疗自身免疫性疾病, 但 DEXs 诱导免疫耐受的机制尚未明确。

1 Exosomes 的来源、结构和基本功能

Exosomes 是在研究红细胞分化成熟过程中被发现和命名的。Johnston 等^[1]发现网织红细胞分泌直径 30~100 nm 的小囊泡体, 这些小囊泡体是由脂质双分子层包绕的, 呈扁平半球形, 密度在 1.13~1.21 g/ml 之间。Exosomes 的组成与其细胞来源有很大的相关性, 不同细胞来源的 exosomes 组成会有差别。

目前已鉴定的 exosomes 含有的蛋白质大致分为两大类^[1-4]: 一类是普通蛋白质, 包括一些与细胞基本功能相关的蛋白质或与 exosomes 起源相关的蛋白质, 如细胞骨架蛋白(微管蛋白、肌动蛋白和肌动结合蛋白等), 细胞膜融合和转运相关蛋白质(膜联蛋白和 rab), 信号转导蛋白(蛋白激酶、异源三聚体 G 蛋白), 代谢酶类(过氧化酶、丙酮酸酯酶、脂激酶、烯醇酶-1), 热休克蛋白(Hsp70 和 Hsp90)以及跨膜蛋白 tetraspanins(CD9, CD63, CD81, CD82)等; 一类是只存在于特定细胞的特异蛋白质, 可能与特殊的细胞功能相关, 例如 DEXs 和 B 细胞来源的 exosomes 上富含 MHC 和共刺激分子 CD80、CD86, 这些都是激活

T 细胞所必需的; T 淋巴细胞来源的 exosomes 上有特异性识别抗原的 TCR、CD3; 肿瘤细胞来源的 exosomes 则含有大量肿瘤抗原。此外肠上皮细胞 exosomes 含 A33 抗原, 血小板 exosomes 含 P 选择素, 肥大细胞 exosomes 则含氨肽酶 N/CD13^[3,4]。

体内多种细胞均能以胞外分泌的方式释放 exosomes, 根据来源细胞不同 exosomes 的功能也不相同。网织红细胞分泌的 exosomes 主要用来清除废弃的蛋白质; 血小板主要在血管损伤部位释放 exosomes 参与血小板的黏附; 由 APCs 分泌的 exosomes 富含 MHC-I 和/或 MHC-II、共刺激分子及特异性抗原肽, 将抗原刺激信号向 T 淋巴细胞或其他 APCs 传递, 发挥重要的免疫调节作用; 肿瘤来源的 exosomes 富含抗原提呈中的分子伴侣 Hsp70 或 Hsp90, 对肿瘤抗原起交叉提呈作用。

2 Exosomes 与树突状细胞(DC)及 T 细胞的相互作用

DEXs 富含 MHC 和共刺激分子能够活化 T 细胞, 但 DEXs 究竟是直接活化 T 细胞还是通过抗原提呈细胞(APCs)间接活化 T 细胞仍存在争议。They 等^[5]证实体内注射携带抗原肽的 DEXs 介导抗原特异的幼稚 CD4⁺T 活化, 但是除非存在成熟的 DC, 在体外 DEXs 不能介导抗原依赖的 CD4⁺T 细胞的活化, 这提示 DEXs 诱导 T 淋巴细胞增殖是通过 DC 间接完成的。除了携带抗原, DEXs 还充当了 DC 间传递抗原

收稿日期: 2006-12-15 接受日期: 2007-06-20

上海市科委基金资助(No.05XD14029)

* 通讯作者。Tel: 021-62758027-7050, E-mail: fhh021@hotmail.com

或功能性 MHC-I/MHC-II 特异性抗原肽复合物的载体,从而放大了免疫应答的效果。另外 DC 成熟状态不同所分泌 exosomes 的功能可能不同(激活或耐受),成熟 DC 分泌的 exosomes 能够在体内外诱导很强的抗原特异性 T 细胞增殖,而且可以将激活幼稚 T 细胞的能力转移给 B 细胞,而未成熟 DC 分泌的 exosomes 则没有这些功能^[6]。Segura 等^[6]利用基因剔除小鼠研究发现细胞间黏附分子 1(intercellular adhesion molecule 1, ICAM-1)是成熟 DC 分泌的 exosomes 激活幼稚 T 细胞所必需的。

Exosomes 与 DC 相互作用的机制尚不清楚,exosomes 可能结合到 DC 表面与 DC 胞膜融合或被 DC 内化。Morelli 等^[7]用 PKH67 荧光标记的 exosomes 与 DC 共温育,结果发现 DC 将 exosomes 内吞,exosomes 一经内吞就进入富含 MHC-II 的细胞内隔室(MHC-II-enriched compartments, MIICs),exosomes 携带的抗原被加工结合到 MHC-II 上然后转移至 DC 表面被提呈给 CD4⁺ T 细胞。体内外试验均证实未成熟 DC 可有效内吞 exosomes 将其加工处理提呈给 CD4⁺ T 细胞,给荷瘤小鼠体内注射 exosomes 抵抗肿瘤生长可能也是以类似的方式通过交叉提呈引起 CD8⁺ 细胞毒 T 淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)应答。然而近来有人证实在体外 exosomes 可以抗原依赖的方式直接活化人外周 CD8⁺ T 细胞^[8]。

参与 exosomes 靶向 DC 的膜表面分子主要是牛乳脂肪球蛋白 EGF/factor VIII (MFG-E8)。MFG-E8 也称为 lactadherin,是 exosomes 的主要蛋白质之一,也表达在体内脾 DC 上。MFG-E8 含两个结构域:一个序列结合整合素 $\alpha_v\beta_3$ 和 $\alpha_v\beta_5$ (表达在人 DC 和巨噬细胞上),另一序列与含磷脂酰丝氨酸(PS)的膜结合,因此 MFG-E8 很有可能是将 exosomes 靶向 DC 的分子。MFG-E8 能使凋亡细胞趋向巨噬细胞以清除凋亡细胞,在 DC 吞噬 exosomes 的过程中 MFG-E8 可能发挥了类似的作用,即将 exosomes 靶向 DC 从而将 exosomes 携带的抗原提呈给 T 细胞^[9]。

总之,DEXs 在体内对 T 细胞主要起间接作用,通过 APCs 尤其是 DC 协助从而引起全面的免疫应答。

3 DEXs 的免疫调节作用

3.1 DEXs 的抗肿瘤作用

Zitvogel^[10]等首次证实经肿瘤特异性抗原冲击的 DEXs 在荷瘤小鼠体内能诱导出抗原特异性 CD8⁺ T 细胞,发挥有效的 T 细胞依赖的抗肿瘤效应,自此

DEXs 作为一种新型亚细胞疫苗在抗肿瘤免疫治疗中崭露头角。DEXs 集中了 DC 和非细胞载体的优点,有望取代 DC 成为一种新的抗肿瘤免疫治疗手段。

DEXs 抗肿瘤的机制尚不完全清楚。成熟 DC 分泌的 exosomes 可能存在直接的抗原提呈能力,因为 DEXs 表达 MHC-I/ 肽复合物、ICAM-1、B7 等,缺乏 APCs 时负载肿瘤抗原的 DEXs 有直接刺激 CD8⁺ T 细胞的能力。目前更多学者认为在体内 DEXs 是通过 DC 间接激发特异性抗肿瘤免疫应答的,即在体内 DEXs 被 DC 捕获并通过交叉提呈途径活化 CD8⁺ T 细胞,在负载卵清蛋白(ovalbumin, OVA)的骨髓树突状细胞(BM-DC)来源的 exosomes 中观察到了 MHC-I 介导的外源性抗原的交叉提呈^[11]。交叉提呈有两条通路:一是传统通路,外源性抗原以抗原加工相关转运体(transporter associated with antigen processing, TAP)依赖的方式进入胞液;二是通过不依赖 TAP 的非胞质溶液途径。有资料显示负载 OVA 的 TAP^{-/-} 小鼠 BM-DC 来源的 exosomes 没有提呈 OVA 的能力,这说明 exosomes 的交叉提呈是通过传统通路完成的。

在以上研究的基础上,为了加强 exosomes 的抗肿瘤作用,人们又对免疫佐剂展开了研究。目前使用的佐剂一般是通过促进 DC 成熟来增强负载肿瘤抗原的 DEXs 的抗肿瘤作用的。TLR-3 或 TLR-9 的配体如 ODN CpG 寡核苷酸或者双链 RNA 都是有效的佐剂,对于激活 T 细胞延缓肿瘤发展有效^[12]。另外对 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞(Treg)在限制 T 细胞免疫应答中的作用也有了新的认识,有文献报道肿瘤患者体内 Treg 含量高于正常人,Treg 阻止了原发和继发的抗肿瘤 T 细胞应答。环磷酰胺(CTX)则能抑制 Treg 的调节活性,在 CTX 预处理过的荷瘤动物中,DEXs 介导的抗肿瘤疗效得到显著提高,在接种 DEXs 疫苗前用 CTX 预处理能促进抗原特异性继发免疫应答^[13]。在动物实验的基础上,近来法国学者已将 DEXs 用于 I 期临床试验^[14]。在对 15 例患恶性黑色素瘤伴远处转移患者的治疗中,观察到皮肤和淋巴结的肿瘤消退,并已对其安全性和安全剂量做出初步评估,显示了良好的应用前景。总之,DEXs 代表了一种有价值的非多肽性疫苗,当与 TLR-3/TLR-9 配体或抑制调节性 T 细胞的药物联合应用则更有效。

另外通过对肿瘤来源的 exosomes 的研究发现:

- (1) 肿瘤来源的 exosomes 带有相关的肿瘤抗原信息;
- (2) 给荷瘤小鼠免疫同源或异源 exosomes 可以部分抑制肿瘤细胞的生长^[15]。但有研究比较了负载 OVA 的

DEXs 和表达 OVA 的一种转染的 EG7 肿瘤细胞来源的 exosomes 诱导 OVA 特异的免疫应答的效应, 结果发现在体内 DEXs 可以更有效地刺激幼稚 OVA 特异的 CD8⁺ T 细胞的增殖并分化成 CTL^[16]。该研究显示 DEXs 较肿瘤来源的 exosomes 免疫原性高, 无论在体内还是在体外均可诱导更有效的抗肿瘤免疫。此外该研究首次提出明确的证据证明体内 exosomes 需要宿主 DC 的参与来激活 CD8⁺ CTL, 因为应用药物消除 DC 后两者均丧失了刺激 CD8⁺ T 细胞增殖分化从而诱导抗肿瘤免疫的能力。

3.2 DEXs 诱导免疫耐受的作用

越来越多的证据表明 DEXs 也有诱导免疫耐受的作用, 这为解决同种移植排斥和自身免疫病提供了新的思路和方法。最早报道有耐受作用的 exosomes 是从肠上皮细胞(intestinal epithelial cells, IECs)获得的。Karlsson 等^[17]报道给大鼠口服抗原可产生一种血清因子 tolerosomes, 该血清因子与 exosomes 具有相同的结构, 表达 MHC-II 并调节抗原特异的 MHC-II 依赖的耐受, 重要的是当 tolerosomes 转移给未致敏受鼠可介导耐受, 但 tolerosomes 仅在同源受者起作用。Tolerosomes 可引起 IL-10、TGF- β 等抑制性细胞因子的分泌, 促进 Treg 的产生从而下调免疫应答, 诱导口服耐受。

Peche 等^[18]证实了 BM-DC 来源的 exosomes 诱导免疫耐受的能力, 他们在对 MHC 完全不匹配的大鼠进行心脏移植前两次给受鼠静脉注射供鼠 DEXs, 结果大大延长了同种心脏移植物的存活而且该效应是供者特异的。DEXs 处理组大鼠抗供者 CD4⁺ T 细胞增殖较对照组明显减少, 且移植物中浸润的白细胞减少, IFN- γ mRNA 的表达明显下降。Peche 等^[19]又报道单独采用供者 DEXs 虽然能延长同种移植物的存活但并不诱导耐受, 而联合应用 DEXs 和 LF15-0195 (体内可阻断 DC 成熟) 则诱导了供者特异的同种移植耐受, 该发现说明在体内为了诱导同种移植耐受将 DC 维持在不成熟状态是很重要的。

Kim 等^[20]证实在某些培养条件下, DEXs 可减轻炎症和减少自身免疫病的发展。用重组 IL-10(rIL-10) 培养的 BM-DC 或用含 IL-10 DNA 序列的重组腺病毒载体感染的 BM-DC 分泌的 exosomes(exo/rIL-10 和 exo/Ad.vIL-10) 可以 MHC-II 和抗原依赖的方式抑制迟发型超敏反应(DTH) 和胶原质诱导的关节炎(CIA)。DEXs 抑制 DTH 和 CIA 的机制还不清楚, 有趣的是表达 vIL-10 的 DEXs Hsp70 水平下降, 已知

Hsp70 在体内可改变 T 细胞的耐受状态从而引发自身免疫病, 比如类风湿关节炎(RA) 患者的滑膜组织中 Hsp70 表达相对较高。Kim 等^[21]还发现表达 FasL 的 DEXs 与 exo/rIL-10 有类似的下调免疫的作用, 一方面可能通过下调共刺激分子的表达或活性, 另一方面可能由于表达凋亡相关蛋白而诱导抗原特异性 T 细胞的凋亡, FasL 似乎在这一过程中起了重要作用。这些发现说明优化耐受 DC 的培养条件, 例如用 TGF β -1、IL-10 或 CTLA4-Ig 处理 DC 均可产生耐受性 exosomes。

Morelli 等^[22]的研究提出了循环中的 exosomes 维持外周耐受的可能机制: 在体内稳定状态下, 循环中的 exosomes 被脾脏中未成熟 DC 和巨噬细胞或肝脏中的 Kupffer 细胞捕获并内吞(缺乏危险信号刺激时内吞 exosomes 的 DC 不会成熟), exosomes 一经内吞就进入内体途径, 然后以 MHC-II 复合物的形式将 exosomes 的抗原提呈给 CD4⁺ T 细胞。这样循环或细胞外液中的 exosomes 可能就是 DC 在稳态中维持外周耐受或在移植中维持受者对移植物耐受的重要原因, 因此移植前输注供者 exosomes 可延长同种移植物的存活时间。

肿瘤免疫抑制是肿瘤逃避免疫系统破坏的一个主要机制, 这也是临床上各种肿瘤免疫治疗方法收效甚微的主要原因。Abusamra 等^[23]发现肿瘤来源的 exosomes 表达 FasL, 通过 Fas-FasL 途径诱导 CD8⁺ T 细胞凋亡, 应用抗 FasL 抗体可阻断这一效应。他们还指出携带膜结合形式 FasL 的 exosomes 存在于外周循环中, 可远距离地靶向循环的 T 细胞从而有效地诱导凋亡。此外某些黑色素瘤细胞株可分泌携带 HLA-G 的 exosomes, HLA-G 是一种膜蛋白通过与 NK 细胞和 T 细胞上的抑制受体相互作用调节 NK 细胞的细胞毒活性和 T 细胞依赖的免疫应答^[24]。说明黑色素瘤细胞可利用携带 HLA-G 的 exosomes 使宿主维持在耐受状态从而逃逸宿主免疫细胞的攻击。人类鼻咽癌细胞来源的 exosomes 含对 T 细胞有直接抑制效应的 LMP1(latent membrane protein 1) 从而逃脱宿主免疫^[25]。另外, 妊娠中胎盘可能通过分泌表达 FasL 的 exosomes 保持一种免疫赦免状态, 以保持带有半同源基因的胎儿在母体内存活^[25]。

3.3 DEXs 诱导作用的双重性

DC 的功能具有双重性, 即未成熟 DC 和成熟 DC 诱导不同功能的 T 细胞反应(耐受或激活), 那么是否 DC 分泌的 exosomes 的功能也具有双重性呢? DC 的

成熟状态会不会影响其分泌的 exosomes 的功能呢? 已显示脂多糖(LPS)处理的成熟 DC 分泌的 exosomes 体外诱导抗原特异的 T 细胞活化的能力是未成熟 DC 分泌的 exosomes 的 50~100 倍^[6]。体内, 仅成熟 DC 分泌的 exosomes 触发效应 T 细胞应答导致快速皮肤移植排斥。在稳定状态下未成熟 DC 在淋巴器官捕获自身或同种 exosomes, 以耐受的方式提呈 exosomes 的抗原诱导外周 T 细胞耐受, 而且重要的是未成熟 DC 内吞 exosomes 后并不会进一步成熟。事实证明 DEXs 的作用具有双重性, 成熟 DC 分泌的 exosomes 有免疫激活作用, 而未成熟 DC 分泌的 exosomes 则有诱导免疫耐受的作用。因此 DC 是否接受了成熟信号直接影响了它们分泌的 exosomes 启动免疫应答的能力。Exosomes 是在晚期内吞体中形成的, 随 DC 成熟晚期内吞体逐渐消失, 所以一旦 DC 成熟 DEXs 的产生就减少了, 说明 exosomes 主要由未成熟 DC 在外周组织产生。成熟 DC 产生的 exosomes 平均比未成熟 DC 产生的 exosomes 少 2~3 倍^[21]。大鼠静脉注射供者 DEXs 延长了同种心脏移植物的存活, 而皮下注射 DEXs 并采用免疫佐剂时则诱导抗肿瘤的强免疫原性 T 细胞应答^[10]。因此 exosomes 应用的途径以及 DC 所处的环境中是否存在危险信号决定了已经内吞 exosomes 的 DC 诱导的 T 细胞应答的类型^[7]。可见 DEXs 的作用不是固定的, 而是依赖于分泌 exosomes 的 DC 的成熟状态以及 DC 与 exosomes 相互作用时内环境的情况。

4 小结

综上所述, DEXs 在制备肿瘤疫苗、解决移植排斥和自身免疫病等方面都显示了诱人的前景。但对 DEXs 的认识尚不完全而且将其用于临床还有很多问题需要克服。但随着分子免疫学和分子生物学技术的进步以及对 DEXs 关注程度的增加, 对 DEXs 的认识必将逐步完善。

参考文献(References)

- [1] Johnstone RM *et al.* *J Biol Chem*, 1987, **262**: 9412
- [2] Xiu F *et al.* *J Microbiol Immunol*, 2004, **2**: 231
- [3] Thery C *et al.* *Nat Rev Immunol*, 2002, **2**: 569
- [4] Chaput N *et al.* *Cancer Immunol Immunother*, 2004, **53**: 234
- [5] Thery C *et al.* *Nat Immunol*, 2002, **3**: 1156
- [6] Segura E *et al.* *Blood*, 2005, **106**: 216
- [7] Morelli AE *et al.* *Blood*, 2004, **104**: 3257
- [8] Admyre C *et al.* *Eur J Immunol*, 2006, **36**: 1772
- [9] Veron P *et al.* *Blood Cells Mol Dis*, 2005, **35**: 81
- [10] Zitvogel L *et al.* *Nat Med*, 1998, **4**: 594
- [11] Utsugi-Kobukai S *et al.* *Immunol Lett*, 2003, **89**: 125
- [12] Chaput N *et al.* *J Immunol*, 2004, **172**: 2137
- [13] Taieb J *et al.* *J Immunol*, 2006, **176**: 2722
- [14] Chaput N *et al.* *Adv Exp Med Biol*, 2003, **532**: 215
- [15] Wolfers J *et al.* *Nat Med*, 2001, **7**: 297
- [16] Hao S *et al.* *Cell Mol Immunol*, 2006, **3**: 205
- [17] Karlsson M *et al.* *Eur J Immunol*, 2001, **31**: 2892
- [18] Peche H *et al.* *Transplantation*, 2003, **76**: 1503
- [19] Peche H *et al.* *Am J Transplantat*, 2006, **6**: 1541
- [20] Kim SH *et al.* *J Immunol*, 2005, **174**: 6440
- [21] Kim SH *et al.* *Mol Ther*, 2006, **13**: 289
- [22] Morelli AE. *Am J Transplantat*, 2006, **6**: 254
- [23] Abusamra AJ *et al.* *Blood Cells Mol Dis*, 2005, **35**: 169
- [24] Riteau B *et al.* *Hum Immunol*, 2003, **64**: 1064
- [25] Frangmyr L *et al.* *Mol Hum Reprod*, 2005, **11**: 35

Immunoregulatory Role of Dendritic Cell-derived Exosomes

Yuan-Yuan Liu^{1,2}, Hua-Hua Fan^{1*}, Liang Chen¹

¹Laboratory for Blood Engineering, Shanghai (Red Cross) Blood Center, Shanghai 200051, China;

²Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China)

Abstract Exosomes are small vesicles that form within late endocytic compartments by various cell types. In addition to the original function of discarding the uselesful membrane molecules, exosomes are involved in a range of immunoregulatory functions *in vivo* and *in vitro*, especially dendritic cell-derived exosomes (DEXs) which richly contain MHC-I/MHC-II, costimulatory molecules, adhesion molecules and heat shock proteins. Potent anti-tumor effect and induction of immune tolerance by DEXs are addressed in this review.

Key words exosomes; dendritic cell; anti-tumor function; immunotolerance

Received: December 15, 2006 Accepted: June 20, 2007

This work was supported by the Shanghai Municipal Science and Technology Commission (No.05XD14029)

*Corresponding author. Tel: 86-21-62758027-7050, E-mail: fhh021@hotmail.com