

兔房水来源 exosomes 的分离与鉴定及其 免疫抑制功能的研究

廖志雄,楼正青,肖 中

(浙江省杭州市中医院,浙江 杭州 310007)

[摘要] **目的:**探讨兔房水中是否能够分离得到具有脂质双分子层结构的纳米级小囊泡 exosomes,并检测其是否表达免疫抑制相关分子,参与眼球免疫耐受状态的维持。**方法:**收集40只健康新西兰大白兔的房水,分级分离,超速离心制备 exosomes,透射电镜对其形态进行鉴定;Western blot 检测 exosomes 标志性蛋白以及免疫抑制相关分子 TGF- β 的表达情况;采用 CCK-8 细胞增殖检测方法判断兔房水来源的 exosomes 对经 ConA 诱导的兔子 T 淋巴细胞增殖情况的抑制功能。**结果:**40 只新西兰大白兔收集到约 8 ml 的房水,从中获得 200 μ g exosomes。经透射电镜鉴定:从房水中分离获得的 exosomes 直径主要集中在 50~100 nm,具有典型的脂质双分子层结构;Western blot 结果表明,该 exosomes 表达热休克蛋白 Hsp70、四次跨膜蛋白 CD9 以及内体相关蛋白 Alix,不表达内质网蛋白 Grp94,具有典型的 exosomes 蛋白表达谱。此外,该 exosomes 还表达免疫抑制相关分子 TGF- β 。体外抑制淋巴细胞增殖实验表明,房水来源的 exosomes 能够明显抑制 T 淋巴细胞的增殖。**结论:**兔房水中能够分离出具有免疫抑制功能的 exosomes;该 exosomes 很有可能参与了眼球免疫耐受的维持。

[关键词] 眼房水/免疫学;纳米粒子;转化生长因子 β /药理学;免疫耐受;免疫抑制法;T 淋巴细胞

[中图分类号] R 9 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1008-9292(2012)03-0315-05

Isolation of rabbit aqueous humor-derived exosomes and their immunosuppression function

LIAO Zhi-xiong, LOU Zheng-qing, XIAO Zhong (*Hangzhou Traditional Chinese Medicine Hospital, Hangzhou 310007, China*)

[Abstract] **Objective:** To isolate exosomes from rabbit aqueous humor and to investigate their immunosuppression function. **Methods:** Aqueous humor was collected from 40 New Zealand rabbits and exosomes were isolated by fractional separation and ultracentrifugation methods; the morphology was studied with electron microscopy. The immunosuppressive-related proteins of exosomes were detected with Western blotting; their inhibitory effect on ConA-induced proliferation of T lymphocyte was estimation with CCK-8 cells proliferation assay. **Results:** Eight milliliters of aqueous humor were collected from 40 New Zealand rabbits and 200 μ g exosomes was yielded. Under electron microscope, the exosomes had typical structure of lipid bi-layer with a diameter of 50 – 100 nm. The results of Western blotting showed

收稿日期:2011-09-27 修回日期:2012-03-20

作者简介:廖志雄(1976-),男,硕士,主管技师,主要从事分子免疫与检验研究;E-mail:liaoqx611@163.com

that these exosomes expressed Hsp70, CD9 and Alix but not Grp94, presenting a typical exosomes protein profile. Moreover, exosomes expressed high level of TGF- β and significantly inhibited the proliferation of T lymphocytes. **Conclusions:** Immunosuppressive exosomes can be isolated from rabbit aqueous humor, which may be involved in immunotolerance of the eye.

[**Key words**] Aqueous humor/immunology; Nanoparticles; Transforming growth factor beta /pharmacology; Immune tolerance; Immunosuppression; T-lymphocytes

[J Zhejiang Univ (Medical Sci), 2012, 41(3):315-319.]

眼球是一个视功能器官,同时又是一个微型免疫系统。由于解剖、生理、生化等方面的特殊性,使其成为免疫赦免器官之一^[1]。眼免疫赦免是一极其复杂和动态的免疫调节过程,房水对这一过程的调节具有重要的作用。TGF- β 是房水免疫抑制活性的主要来源,它是一多肽类生长因子,对免疫反应的多个环节具有下降性调节作用^[2]。exosomes 是一类直径在 50 ~ 100 nm 之间的具有脂质双分子层结构的小囊泡^[3],各种活细胞均可分泌 exosomes,包括树突状细胞、B 和 T 淋巴细胞、肿瘤细胞^[4]等。exosomes 除具有免疫活化功能,激活机体抗肿瘤免疫之外^[5],还具有免疫抑制功能,参与机体的免疫平衡的维持,如胸腺来源的 exosomes 表达高水平的 TGF- β ,能够诱导 CD4⁺ Foxp3⁺ Treg 的产生,维持外周天然 Treg 的数量。对于眼球这一特殊的免疫赦免器官,房水中是否含有表达 TGF- β 的具有免疫抑制功能的 exosomes 目前尚未见相关报道。本研究在兔的房水中分离并获得了 exosomes,探讨其是否参与了眼球免疫耐受的维持。

1 材料和方法

1.1 主要试剂 小鼠抗兔 Hsp70、CD9 抗体、大鼠抗兔 Grp94 抗体均购于美国 Abcam 公司;兔抗兔 Alix 抗体购于美国 LifeSpan BioSciences 公司;兔抗兔 TGF- β 抗体购于美国 Novus Biologicals 公司;辣根过氧化物酶标记的抗小鼠、大鼠和兔二抗购于美国 Santa Cruz 公司;兔 TGF- β ELISA 试剂盒购于武汉伊艾博科技有限公司;ECL 化学发光底物、BCA 蛋白定量试剂盒购于美国 Pierce 公司;丝裂原 ConA 购于美

国 Sigma 公司;CCK-8 细胞增殖检测试剂盒购于日本同仁化学研究所。

1.2 房水收集 选择成年健康新西兰大白兔 40 只,雌雄不限,体重 2.0 ~ 2.5 kg。实验前用裂隙灯显微镜检查大白兔双眼无疾病,用空气栓塞法处死后,立即用 1 ml 无菌注射器分别自双眼角膜缘做前房穿刺,抽取房水约 0.2 ml,于 -80℃ 保存待用。

1.3 exosomes 的制备及电镜鉴定 8 ml 房水进行分级分离,300 × g 10 min、1 200 × g 30 min、10 000 × g 30 min 收集沉淀,细胞裂解液 (50 mmol/L Tris. Cl pH 6.8、15 mmol/L NaCl、5 mmol/L EDTA、0.5% NP-40、1 mmol/L PMSF) 裂解后,作为细胞裂解物对照;上清进一步超速离心 100 000 × g 60 min,exosomes 沉淀用 200 μ l PBS 重悬。采用 BCA 法对细胞裂解液及 exosomes 蛋白质浓度定量后,分装后于 -80℃ 保存。exosomes 电镜标本的制备过程如下:2.5% 戊二醛和 1% 锇酸固定,2% 醋酸铀染色,乙醇和无水丙酮脱水,制作超薄切片及染色,最后通过 TECN10 透射电镜观察。

1.4 Western blot 检测 30 μ g 细胞裂解液蛋白或 exosomes 蛋白通过 12% 的聚丙烯酰胺电泳分离,随后电转移将蛋白转移到醋酸纤维膜上。膜上的成分与一抗结合 (1:500 稀释,室温孵育 2 h),然后加入标有辣根过氧化物酶的二抗 (1:5000 稀释,室温孵育 1 h),最后经过显影观察结果。

1.5 ELISA 方法定量检测 TGF- β 含量 取 exosomes 或细胞裂解蛋白 10 μ g,其中 exosomes 于 -80℃ 和 37℃ 条件下反复冻融 4 次,使 exosomes 内的 TGF- β 充分释放,然后按 ELISA

试剂盒说明,以双抗体夹心法检测其中 TGF- β 的浓度。

1.6 exosomes 体外抑制 T 淋巴细胞增殖实验

分离兔腹股沟淋巴结淋巴细胞,以 1640 完全培养基调整细胞浓度至 1×10^6 /ml,吸 100 μ l 到平底 96 孔板中,使每孔细胞数为 1×10^5 ,实验组为每孔分别加入 1、5、10 μ g/ml 的 exosomes 或细胞裂解蛋白,对照组不加 exosomes,以完全 1640 调整终体积为 200 μ l,每个组均设 3 复孔,ConA 刺激浓度为 1 μ g/ml,共培养 72 h,在培养终止前 4 h 每孔加入 20 μ l CCK-8 试剂,培养结束后,450 nm 测吸光度。

1.7 统计学处理方法 所有实验重复 3 次,实验数据采用 SPSS 13.0 统计软件处理,两组均数间比较用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

本实验总共进行 3 次 exosomes 的制备,每次收集 40 只兔的房水。3 次结果表明,40 只兔子每次平均能够抽取 8 ml 的房水,320 μ g 的细胞裂解蛋白,200 μ g 的 exosomes,平均每只兔子可以获得 0.2 ml 的房水,8 μ g 的细胞裂解蛋白,5 μ g 的 exosomes (表 1)。

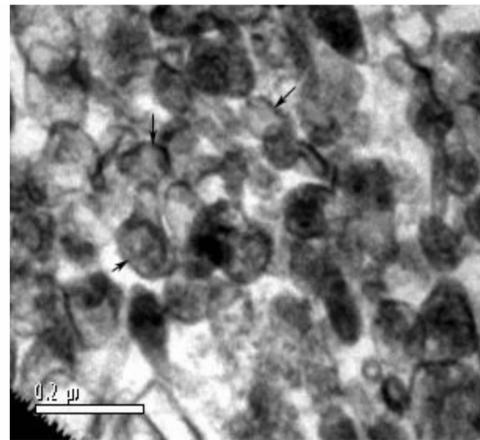
表 1 房水中 3 次实验 exosomes 的量

Table 1 The analyse of rabbit aqueous humour derived exosomes

实验	房水/ ml	细胞裂解 蛋白/ μ g	exosomes/ μ g
第 1 次	7.7	305	190
第 2 次	8.0	320	203
第 3 次	8.3	335	207

2.1 exosomes 形态及蛋白成分鉴定 从透射电镜中可以看出,本实验从房水中分离制备的 exosomes 主要为直径在 50 ~ 100 nm 的小囊泡,某些小囊泡中还可以见到比较清楚的脂质双分子层结构(图 1);另外,Western blot 的结果显示,制备的小囊泡能表达 exosomes 标志性蛋白,如热休克蛋白 Hsp70、4 次跨膜蛋白 CD9 和内体相关蛋白 Alix,不表达内质网相关蛋白

Grp94,而细胞裂解蛋白表达 Grp94(图 2),证实了 exosomes 的内体来源。



箭头所示为脂质双分子层结构。

图 1 exosomes 的电镜鉴定

Fig.1 The scanning electromicroscope of exosomes

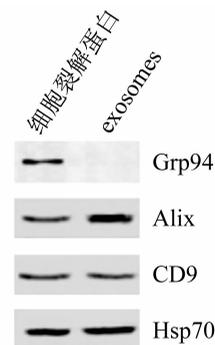


图 2 exosomes 蛋白表达鉴定

Fig.2 The protein expression of exosomes

2.2 exosomes 表达 TGF- β 房水来源的 exosomes 和细胞裂解物均表达 TGF- β ,而且 exosomes 表达 TGF- β 的水平比细胞裂解物高(图 3),细胞裂解物为 3.8 μ g,而 exosomes 为 8.2 μ g,提示房水来源的 exosomes 可能具有较强的免疫抑制功能。

2.3 exosomes 体外抑制 T 淋巴细胞增殖 为了验证表达 TGF- β 的房水来源的 exosomes 是否具有免疫抑制功能,本实验检测了体外 exosomes 对 ConA 引起的 T 淋巴细胞增殖的抑制作用。结果发现(图 4),房水来源的

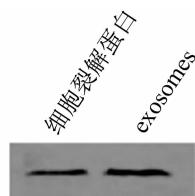
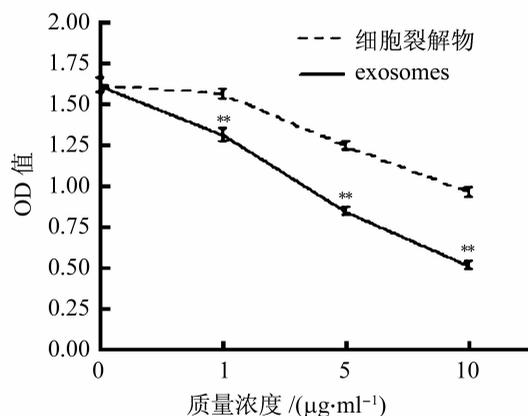


图 3 房水来源 exosomes 表达 TGF- β

Fig. 3 The TGF- β expression of rabbit aqueous humour derived exosomes

exosomes 能明显抑制 T 淋巴细胞的增殖,而且随着 exosomes 浓度的增加,抑制 T 淋巴细胞增殖的效果更加明显,10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 exosomes 能将反映 T 淋巴细胞增殖的 OD 值从 1.61 ± 0.08 降至 0.51 ± 0.04 ;而房水来源的 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 细胞裂解蛋白只能将 OD 值降至 0.96 ± 0.05 ,这可能与 exosomes 表达更高水平的 TGF- β 相关。



exosomes 组与细胞裂解物组比较, ** $P < 0.05$.

图 4 exosomes 体外抑制 T 细胞增殖

Fig. 4 The inhibitory effect of exosomes on T lymphocytes proliferation

3 讨论

眼免疫赦免是一极其复杂和动态的免疫调节过程。在脊椎动物中,眼与免疫系统之间具有独特的交互作用。最终使免疫系统在眼局部形成一种既能发挥去除病原微生物的能力,又能保护眼局部组织免受免疫性炎症反应而招致视觉功能丧失的能力。当眼的免疫调节功能出现紊乱,眼免疫赦免的动态平衡被打破,容易发

生各种自身免疫性眼疾病,如葡萄膜炎、泪腺病以及增殖性视网膜病变等^[8]。此外,角膜移植术后的排斥反应是导致手术失败的主要原因。因此,保持眼的免疫赦免的动态平衡,维持眼的免疫耐受的稳定,对保持眼健康具有非常重要的意义。有研究表明,房水中存在着很多免疫抑制因子,如 TGF- β 、IL-4、IL-10 等细胞因子,对维持眼的免疫耐受发挥着重要作用^[10-11]。而 TGF- β 是房水免疫抑制活性的主要来源,对免疫反应的多个环节具有下降性调节作用。在对角膜移植排斥的抑制中,TGF- β 具有比环孢素 A 更强的免疫抑制功能^[12]。

exosomes 是由各种活细胞分泌的具有脂质双分子层结构的小囊泡,直径一般在 50 ~ 100 nm,它不同于经典的与内质网相关的蛋白分泌途径,而是由内体参与的,通过内体与质膜融合而产生的外排小体^[4]。在体内 exosomes 具有双向的免疫调节功能,一方面 exosomes 能够激活免疫,有助于机体的抗肿瘤免疫,另一方面,exosomes 还具有免疫抑制功能,能够参与机体免疫耐受的平衡或者协助肿瘤细胞的免疫逃逸。人类肿瘤来源的 exosomes 可能通过其表达的 TGF- β 抑制 NK 细胞的活化^[13],肿瘤患者体液中含有表达 TGF- β 的 exosomes,能够诱导并促进调节性 T 细胞的增殖^[14]。由此可见,TGF- β 对 exosomes 的免疫抑制功能具有决定性的作用。

关于表达高水平 TGF- β 的房水中,是否含有 exosomes,该 exosomes 是否表达 TGF- β 并具有免疫抑制功能,国内外至今尚未见相关报道。本研究结果表明,通过经典的 exosomes 分离方法,能够在兔子的房水中获得含量比较稳定的 exosomes,通过形态学鉴定证实了本研究分离得到的 exosomes 具有文献报道的典型的 exosomes 形态特征,而且蛋白组分分析结果表明,制备获得的 exosomes 表达 exosomes 特征性蛋白 Hsp70、CD9 和内体相关蛋白 Alix,却不表达内质网膜蛋白 Grp94,这一结果支持了 exosomes 的内体依赖的起源。本实验结果发现,房水来源的 exosomes 高表达 TGF- β ,虽然房水来源的细胞裂解物也表达 TGF- β ,但是 TGF- β 更倾向于在 exosomes 中富集;体外抑制 T 淋

巴细胞增殖实验表明,房水来源的 exosomes 具有很强的免疫抑制功能。另外,细胞裂解物也具有免疫抑制功能,但较 exosomes 要弱很多。虽然本实验缺乏针对于兔 TGF- β 的阻断性抗体来直接证实房水来源的 exosomes 的免疫抑制功能是由 TGF- β 所介导的,但是细胞裂解物与 exosomes 中 TGF- β 的差异表达及其对 T 淋巴细胞增殖能力抑制的强弱之别,间接支持 exosomes 的免疫抑制功能是由 TGF- β 所介导的。虽然房水是由睫状体产生的,但是并不代表房水中的 exosomes 全是由睫状体上皮细胞所分泌的,眼内其它组织细胞所分泌的 exosomes 也可能通过血管渗出、回流等方式进入到房水中。本实验没有特异性的抗体去鉴定房水来源的 exosomes 主要是由哪群细胞所分泌,但有一点可以肯定,此 exosomes 并不是由单一的一群细胞所分泌,可能其分泌的细胞相对比较复杂,相关研究正在进一步深入中。但是,不管其来源如何,具有免疫抑制功能的房水来源的 exosomes 很有可能在维持眼免疫耐受的过程中发挥着重要的作用,这为眼部免疫性炎性疾病以及角膜移植后排斥反应等的预防和治疗提供了新的思路。

References:

- [1] CHANG J H, WAKEFIELD D. Uveitis: a global perspective [J]. *Ocul Immunol Inflamm*, 2002, 10 (1):263-279.
- [2] LI W, YUE WJ, YUE Q, et al. Immunotolerance reaction for allograft-limb in rats induced by gene-modified cell transfusion [J]. *Panminerva Med*, 2010, 52(4):289-295.
- [3] COPPIETERS K, BARRAL AM, JUEDES A, et al. No significant CTL cross-priming by dendritic cell-derived exosomes during murine lymphocytic choriomeningitis virus infection [J]. *J Immunol*, 2009, 182(3):2213-2220.
- [4] MIGNOT G, ROUX S, THERY C, et al. Prospects for exosomes in immunotherapy of cancer [J]. *J Cell Mol Med*, 2006, 10(4):376-388.
- [5] ZITVOGEL L, REGNAULT A, LOZIER A, et al. Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes [J]. *Nature Med*, 1998, 4(3):594-600.
- [6] TRAUNER M, FICKERT P, BAGHDASARYAN A, et al. New insights into autoimmune cholangitis through animal models [J]. *Panminerva Med*, 2010, 28(1):99-104.
- [7] QIN Jian-jun, ZHOU Qing-hua, YI Cheng(秦建军, 周清华, 易成). Study on inhibitory effect on dendritic cell of TGF β [J]. *Journal of Medical Forum(医药论坛杂志)*, 2011, 32(1):11-13. (in Chinese)
- [8] WANG G J, LIU Y, QIN A, et al. Thymus exosomes-like particles induce regulatory T cells [J]. *J Immunol*, 2008, 181(4):5242-5248.
- [9] ZHOU Qin, YAN Ying, ZHANG Yan(周勤, 晏颖, 张艳). Research progress of ophthalmic immunology [J]. *International Journal of Ophthalmology(国际眼科杂志)*, 2010, 10:918-920. (in Chinese)
- [10] YANG Y, ZHOU SB. Immunosuppressive action of transforming growth factor beta1 after corneal transplantation [J]. *Int J Ophthalmol*, 2006, 6(1):851-853.
- [11] ROCHA G, DESCHENES J, ROWSEY J J. The immunology of corneal graft rejection [J]. *Crit Rev Immunol*, 1998, 18(2):305-325.
- [12] SPORN Mb, ROBERTS Ab. Transforming growth factor-beta. Multiple actions and potential clinical applications [J]. *JAMA*, 1989, 262(4):938-941.
- [13] CLAYTON A, MITCHELL J P, COURT J, et al. Human tumor-derived exosomes down-modulate NKG2D expression [J]. *J Immunol*, 2008, 180(1):7249-7258.
- [14] SZAJNIK M, CZYSTOWSKA M, SZCZEPANSKI M J, et al. Tumor-derived microvesicles induce, expand and up-regulate biological activities of human regulatory T cells (Treg) [J]. *PLOS One*, 2010, 5(1):1469-1476.

[责任编辑 黄晓花]