

## 论著

文章编号:1000-5404(2013)05-0426-05

### 肾癌细胞来源的 exosomes 诱导 Jurkat T 细胞凋亡

杨林<sup>1</sup>, 吴小候<sup>1</sup>, 罗春丽<sup>2</sup>, 王丹<sup>1</sup>, 陈力学<sup>3</sup> (400016 重庆, 重庆医科大学: 附属第一医院泌尿外科<sup>1</sup>, 检验医学院实验诊断教研室<sup>2</sup>, 附属第一医院实验研究中心<sup>3</sup>)

**[摘要]** 目的 体外研究肾癌 786-0 细胞来源的 exosomes 介导肿瘤免疫逃逸的机制。方法 采用 CCK-8 法检测肾癌 786-0 细胞来源的 exosomes 对 Jurkat T 细胞生长的影响, 瑞氏-姬姆萨染色检测 Jurkat T 细胞形态变化, Annexin V-FITC/PI 双染色流式细胞术检测 Jurkat T 细胞凋亡率, ELISA 法检测 Jurkat T 细胞分泌功能, 可溶性 Fas 阻断实验检测 exosomes 对 Jurkat T 细胞凋亡率的影响, Western blot 检测 exosomes 中 FasL、及 Jurkat T 细胞 caspase、Bax 及 Bcl-2 蛋白的表达。结果 肾癌 786-0 细胞来源的 exosomes 可抑制 Jurkat T 细胞生长, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  exosomes 作用于 Jurkat T 细胞 24 h, 生长抑制率为  $(19.64 \pm 0.92)\%$ , 72 h 为  $(36.24 \pm 1.12)\%$ ; 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  exosomes 作用 24 h, 生长抑制率为  $(55.96 \pm 1.35)\%$ , 72 h 为  $(76.51 \pm 1.37)\%$ 。Exosomes 诱导 Jurkat T 细胞凋亡, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  exosomes 作用于 Jurkat T 细胞 8 h, 凋亡率为  $(7.31 \pm 1.32)\%$ , 24 h 为  $(20.19 \pm 1.47)\%$ ; 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  exosomes 作用 8 h, 凋亡率为  $(27.28 \pm 1.29)\%$ , 24 h 为  $(41.72 \pm 0.88)\%$ 。Exosomes 还明显抑制 Jurkat T 细胞 IL-2、IFN- $\gamma$ 、IL-6、IL-10 的分泌水平; exosomes 高表达 FasL, 可溶性 Fas 阻断实验能逆转 Jurkat T 细胞的凋亡; 凋亡诱导过程中 caspase-3、caspase-8、caspase-9 被激活, Bax/Bcl-2 上调。结论 肾癌 786-0 细胞分泌的 exosomes 能诱导 Jurkat T 细胞凋亡, 介导肿瘤免疫逃逸。

**[关键词]** 肾癌; exosomes; 免疫逃逸; 凋亡

**[中图分类号]** R730.23; R730.3; R737.11

**[文献标志码]** A

### Exosomes derived from renal cancer cells induce Jurkat T cell apoptosis *in vitro*

Yang Lin<sup>1</sup>, Wu Xiaohou<sup>1</sup>, Luo Chunli<sup>2</sup>, Wang Dan<sup>1</sup>, Chen Lixue<sup>3</sup> (<sup>1</sup>Department of Urology, <sup>3</sup>Experimental Research Center, First Affiliated Hospital; <sup>2</sup>Department of Laboratory Diagnosis, College of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the underlying mechanism of exosomes derived from renal cancer cell lines 786-0 to mediate tumor immune escape *in vitro*. **Methods** CCK-8 assay was used to determine the effects of exosomes on proliferation in Jurkat T cells. Morphological changes were by wright-giemsa staining; flow cytometry with Annexin V-FITC/PI double staining was used to detect the apoptosis; secretion functions of Jurkat T cell were detected by ELISA assay; effects of exosomes on apoptosis of Jurkat T cell were detected by soluble Fas block experiment; effects on the protein expression of FasL, caspase, Bax and Bcl-2 were assessed by Western blot analysis. **Results** Exosomes could inhibit Jurkat T cell proliferation, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  exosomes act on Jurkat T cell for 24 and 72 h, growth inhibition rate was  $(19.64 \pm 0.92)\%$  and  $(36.24 \pm 1.12)\%$ ; while 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  exosomes act on it for 24 h and 72 h, growth inhibition rate was  $(55.96 \pm 1.35)\%$  and  $(76.51 \pm 1.37)\%$  respectively. Exosomes could induce Jurkat T cell apoptosis, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  exosomes act on Jurkat T cell for 8 h, apoptosis rate was  $(7.31 \pm 1.32)\%$ , extending this monitoring to 24 h, apoptosis rate was  $(20.19 \pm 1.47)\%$ ; while 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  exosomes act on it for 8 and 24 h, apoptosis rate was  $(27.28 \pm 1.29)\%$  and  $(41.72 \pm 0.88)\%$  respectively. Exosomes also suppressed IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-6 and IL-10 secretion obviously. FasL was highly expressed in exosomes, soluble Fas block could reverse Jurkat T cell apoptosis. In this course, caspase-3, caspase-8, caspase-9 were activated, and the ratio of Bax/Bcl-2 increased. **Conclusion** Exosomes could inhibit the growth of Jurkat T cell and induce apoptosis. It could mediate tumor immune escape.

**[Key words]** renal cancer; exosomes; immune escape; apoptosis

Supported by the Key Project of Medical Scientific Research of Chongqing Municipal Health Bureau (2012-1-028). Corresponding author: Wu Xiaohou, Tel: 86-23-89012013, E-mail: screnyang@163.com

**[基金项目]** 重庆市卫生局医学科研计划重点项目 (2012-1-028)

**[通信作者]** 吴小候, 电话: (023) 89012013, E-mail: screnyang@163.com

**[优先出版]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20121207.1023.027.html> (2012-12-07)

肾癌是泌尿系统常见的恶性肿瘤,其发病率占所有恶性肿瘤的2%~3%<sup>[1]</sup>。流行病学资料显示,近几十年肾癌的发病率和病死率均有增高的趋势<sup>[2]</sup>。目前肾癌的治疗效果仍欠佳,多数学者认为肿瘤的免疫逃逸是重要原因之一<sup>[3]</sup>。exosomes是真核细胞分泌的纳米级膜性小囊泡,广泛分布于机体微环境中。研究发现肿瘤细胞来源的exosomes可参与肿瘤的免疫调控<sup>[4-5]</sup>,但肾癌细胞来源的exosomes是否介导了肿瘤免疫逃逸目前少见相应报道。本研究以Jurkat T细胞为实验对象,观察肾癌来源的exosomes对Jurkat T细胞生长、凋亡及免疫功能的影响,并探讨其可能机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验对象及主要试剂

肾癌786-0细胞、Jurkat T细胞(上海艾研生物公司),Cell Counting Kit-8(CCK-8)试剂盒(上海七海生物公司),瑞氏-姬姆萨染色液(珠海贝索生物),Annexin V-FITC/PI双染试剂盒(美国Invitrogen公司),可溶性Fas(美国Peptide),人IL-2、IFN- $\gamma$ 、IL-6及IL-10 ELISA检测试剂盒(美国Sigma公司),鼠抗人caspase-3、兔抗人caspase-8、鼠抗人caspase-9(碧云天生物技术研究所),兔抗人FasL抗体、鼠抗人Bcl-2、Bax抗体(美国Santa Cruz),辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠、羊抗兔IgG(北京中杉金桥公司)。

### 1.2 细胞培养

将人肾癌786-0细胞、Jurkat T细胞接种于10%小牛血清RPMI1640培养基(含 $50 \times 10^3$  U/L青霉素、50 mg/L链霉素),于37℃、5% CO<sub>2</sub>条件下进行常规传代培养,2~3 d传代1次。

### 1.3 肾癌细胞分泌exosomes的提取及形态鉴定

取786-0细胞培养上清液100 mL,4℃下 $800 \times g$ 离心40 min,去细胞及碎片,得上清,以 $100\,000 \times g$ 、4℃低温离心1 h,用PBS重悬收集离心管底部沉淀,0.22  $\mu$ m滤膜过滤除菌,-80℃保存备用。Bradford法测定蛋白含量。滴加20  $\mu$ L 100  $\mu$ g/mL的exosomes悬液于载样铜网上,1 min后用滤纸吸干液体,滴加2%磷钨酸溶液20  $\mu$ L负染1 min,用滤纸吸干负染液,白炽灯烘烤约10 min,透射电镜下观察照相。

### 1.4 CCK-8法测定Jurkat T细胞生长抑制率

消化后的Jurkat T细胞接种于96孔板(100  $\mu$ L/孔),调整细胞浓度为 $1 \times 10^5$ /mL,37℃、5% CO<sub>2</sub>预培养24 h。各实验组分别加入10  $\mu$ L各种浓度的exosomes(10、50、100、200、400  $\mu$ g/mL)作用24、48、72 h,设置正常对照组和空白对照组(前者不加exosomes,后者不加细胞,其他处理均与实验组相同),每组设3个复孔。每孔加入10  $\mu$ L CCK-8溶液,继续孵育2 h,用酶标仪测定波长450 nm时各孔光密度值 $[D(450)]$ 。

细胞生长抑制率 =  $1 - \frac{\text{实验组 } D(450) \text{ 值} - \text{空白组 } D(450) \text{ 值}}{\text{对照组 } D(450) \text{ 值} - \text{空白组 } D(450) \text{ 值}} \times 100\%$

### 1.5 瑞氏-姬姆萨染色检测Jurkat T细胞凋亡

取对数生长期的Jurkat T细胞,用不同浓度exosomes作用24 h后,低速离心,弃上清,取其沉淀物,用推片制片3~5张,使用瑞氏-姬姆萨染色,倒置显微镜下观察Jurkat T细胞形态。

### 1.6 Annexin V-FITC/PI双染流式细胞术检测Jurkat T细胞凋亡

将Jurkat T细胞消化后接种于6孔板,培养24 h,调整细胞数为 $1 \times 10^6$ /mL,分别加入浓度10、50、100、200、400  $\mu$ g/mL exosomes 100  $\mu$ L作用8、16、24 h,每孔终体积1 mL,对照组不加exosomes。取100  $\mu$ L置于5 mL流式管中,加入5  $\mu$ L Annexin V-FITC和10  $\mu$ L 20  $\mu$ g/mL PI溶液,混匀后室温避光孵育20 min,然后加入400  $\mu$ L PBS缓冲液,上流式细胞仪进行凋亡检测,Annexin V-FITC(+)、PI(-)的细胞所占百分比为凋亡率。

### 1.7 酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测Jurkat细胞的分泌功能

T细胞分泌细胞因子水平的变化取对数生长期的Jurkat T细胞,2%台盼蓝染色计数,活细胞比例大于95%。调整细胞数为 $1 \times 10^6$ /mL,将其接种于96孔板,加入400  $\mu$ g/mL的exosomes 100  $\mu$ L,设置正常对照组(除不加exosomes外,其他处理与实验组相同)。培养24 h后, $1\,000 \times g$ 离心20 min,收集细胞上清液,按ELISA说明书操作,用酶标仪测定波长450 nm时各孔光密度值 $[D(450)]$ ,利用标准曲线求出IL-2、IFN- $\gamma$ 、IL-6、IL-10的浓度。

### 1.8 可溶性Fas阻断实验

将400  $\mu$ g/mL的exosomes 1 mL与6  $\mu$ g/mL可溶性Fas 1 mL混合,分别作用Jurkat T细胞8、16、24 h,以100  $\mu$ g/mL的exosomes组为对照组。流式细胞仪操作步骤同1.6。

### 1.9 Western blot分析

收集不同浓度exosomes处理24 h后的Jurkat T细胞 $4 \times 10^6$ 个,4℃加入200  $\mu$ L裂解液中作用30 min, $15\,000 \times g$ 离心30 min,得上清(对exosomes蛋白成分进行鉴定时,则直接收集exosomes 40  $\mu$ L,超声破碎后加入5  $\times$  SDS上样缓冲液,煮沸5 min)。取10  $\mu$ g蛋白上样,电泳3 h,250 mA下转膜。用含5%脱脂牛奶的TBS-T封闭1 h,按1:400稀释一抗,将膜与一抗置于塑料袋中封闭,4℃过夜。TBS-T洗膜3次,加入二抗,室温缓摇1 h,ECL法显色,于凝胶图像分析系统曝光,Image J软件分析图像。

### 1.10 统计学方法

采用SPSS 17.0统计软件,每次至少观察5个实验样本,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组均数之间行 $t$ 检验。

## 2 结果

### 2.1 肾癌786-0细胞来源的exosomes形态

透射电子显微镜观察exosomes形态,见多个大小不一、盘状的脂质膜包绕形成的圆球体,直径为30~100 nm(图1)。

### 2.2 CCK-8法观察exosomes对Jurkat T细胞生长的影响

随着剂量的增加和时间的延长,抑制率随之增加,即exosomes能以剂量和时间依赖性的方式抑制Jurkat T细胞生长(表1)。

### 2.3 Jurkat T细胞细胞凋亡的形态学观察

采用瑞氏-姬姆萨染色检测不同浓度exosomes作用Jurkat T细胞24 h后形态学的变化,倒置显微镜下发现:随着exosomes浓度的增加,Jurkat T细胞的凋亡细胞体积逐渐缩小,细胞质逐渐浓缩,细胞核裂解,直至成碎块,产生凋亡小体(图2)。

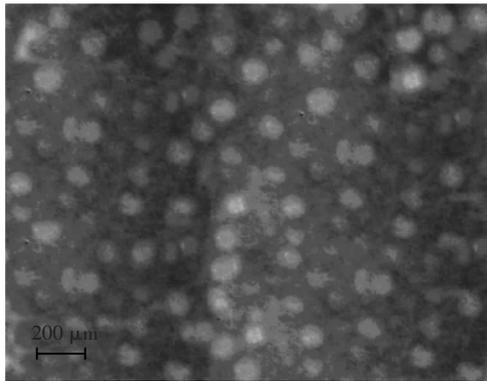
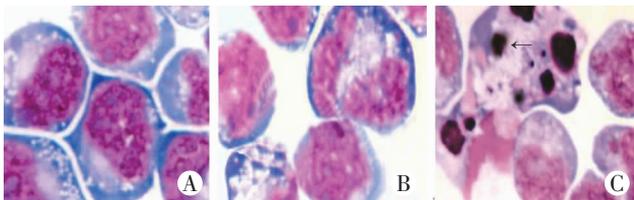


图1 透射电子显微镜观察肾癌786-0细胞来源的exosomes形态变化

表1 不同浓度exosomes对Jurkat T细胞生长抑制率的影响  
[n=5, ( $\bar{x} \pm s$ )%]

exosomes 浓度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	24 h	48 h	72 h
0	0	0	0
10	19.64 $\pm$ 0.92	26.98 $\pm$ 1.01 <sup>a</sup>	36.24 $\pm$ 1.12 <sup>ab</sup>
50	34.32 $\pm$ 2.76	45.01 $\pm$ 2.21 <sup>a</sup>	51.88 $\pm$ 1.93 <sup>ab</sup>
100	44.62 $\pm$ 3.41	54.59 $\pm$ 1.65 <sup>a</sup>	61.37 $\pm$ 2.16 <sup>ab</sup>
200	49.92 $\pm$ 1.92	62.89 $\pm$ 1.33 <sup>a</sup>	70.31 $\pm$ 1.05 <sup>ab</sup>
400	55.96 $\pm$ 1.35	69.11 $\pm$ 1.72 <sup>a</sup>	76.51 $\pm$ 1.37 <sup>ab</sup>

a:  $P < 0.05$ , 与24 h比较; b:  $P < 0.05$ , 与48 h比较



A: 对照组; B: 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  exosomes 组; C: 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  exosomes 组, 箭头示凋亡小体

图2 倒置显微镜观察不同浓度exosomes对Jurkat T细胞形态变化 (瑞氏-姬姆萨  $\times 1000$ )

## 2.4 Annexin V-FITC/PI 双染流式细胞术观察 exosomes 对 Jurkat T 细胞凋亡的影响

Exosomes 促进 Jurkat T 细胞凋亡, 呈剂量和时间依赖性 (表2)。

表2 不同浓度 exosomes 对 Jurkat T 细胞凋亡率的影响 [n=5, ( $\bar{x} \pm s$ )%]

exosomes 浓度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	8 h	16 h	24 h
0	4.16 $\pm$ 1.77	4.39 $\pm$ 0.93	4.47 $\pm$ 1.36
10	7.31 $\pm$ 1.32	14.17 $\pm$ 2.84 <sup>a</sup>	20.19 $\pm$ 1.47 <sup>ab</sup>
50	9.84 $\pm$ 0.68	18.57 $\pm$ 0.81 <sup>a</sup>	26.63 $\pm$ 0.96 <sup>ab</sup>
100	15.57 $\pm$ 1.42	24.09 $\pm$ 1.59 <sup>a</sup>	30.44 $\pm$ 1.61 <sup>ab</sup>
200	19.48 $\pm$ 0.92	29.44 $\pm$ 1.34 <sup>a</sup>	36.59 $\pm$ 0.38 <sup>ab</sup>
400	27.28 $\pm$ 1.29	33.81 $\pm$ 1.53 <sup>a</sup>	41.72 $\pm$ 0.88 <sup>ab</sup>

a:  $P < 0.05$ , 与8 h比较; b:  $P < 0.05$ , 与16 h比较

## 2.5 ELISA 检测 exosomes 对 Jurkat T 细胞分泌细胞因子功能的影响

Jurkat T 细胞分泌 Th1 型细胞因子 (IL-2、IFN- $\gamma$ ) 及 Th2 型细胞因子 (IL-6、IL-10) 的能力均下降 (表3)。

表3 ELISA 检测 exosomes 作用后 Jurkat T 细胞分泌水平的变化 ( $\text{pg}/\text{mL}$ , n=10,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	IL-2	IFN- $\gamma$	IL-6	IL-10
对照组	292.8 $\pm$ 19.3	117.0 $\pm$ 13.6	327.2 $\pm$ 23.7	119.6 $\pm$ 26.9
实验组	59.2 $\pm$ 14.6 <sup>b</sup>	33.1 $\pm$ 4.55 <sup>a</sup>	62.8 $\pm$ 16.1 <sup>b</sup>	33.7 $\pm$ 14.3 <sup>a</sup>

a:  $P < 0.05$ , b:  $P < 0.01$ , 与对照组比较

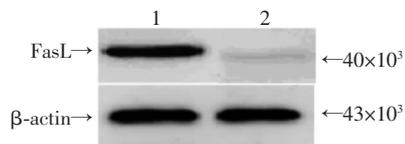
## 2.6 可溶性 FasL 在 exosomes 的表达及对 Jurkat T 细胞凋亡的影响

采用 Western blot 检测显示 FasL 在 exosomes 上高表达, 再用可溶性 Fas 阻断实验检测 Jurkat T 细胞凋亡率的变化, 结果显示: 使用可溶性 Fas 阻断后, Jurkat T 细胞 8、16、24 h 的凋亡率明显降低 ( $P < 0.05$ , 表4、图4)。

表4 可溶性 Fas 逆转 Jurkat T 细胞的凋亡 [n=10, ( $\bar{x} \pm s$ )%]

组别	8 h	16 h	24 h
对照组	27.28 $\pm$ 1.29	33.81 $\pm$ 1.53	41.72 $\pm$ 0.88
实验组	4.93 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	4.89 $\pm$ 0.25 <sup>a</sup>	5.14 $\pm$ 0.29 <sup>a</sup>

a:  $P < 0.05$ , 与对照组比较

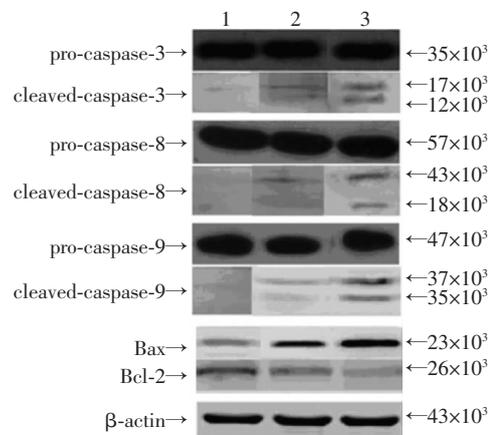


1: exosomes 组; 2: 肾癌7860细胞组

图4 Western blot 检测 FasL 在 exosomes 中的表达

## 2.7 Western blot 检测 exosomes 对 Jurkat T 细胞 caspase-3、caspase-8、caspase-9 以及 Bax、Bcl-2 蛋白表达的影响

Exosomes 作用 24 h 后, 裂解的 caspase-3、caspase-8、caspase-9 片段呈剂量依赖方式表达上调; 同时上调 Bax 蛋白表达, 下调 Bcl-2 的表达 (图5)。



1: 0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  组; 2: 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  组; 3: 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  组

图5 Western blot 检测 caspase-3、caspase-8、caspase-9 及 Bcl-2、Bax 蛋白的变化

## 3 讨论

Exosomes 是真核细胞内多泡体与细胞膜融合而

分泌到细胞外的纳米级膜性小囊泡,富含蛋白、黏附分子、RNA 等成分<sup>[6-9]</sup>,为细胞间信息传递的重要介质<sup>[10]</sup>,在肿瘤免疫调节中也发挥着重要作用<sup>[11-13]</sup>。我们在前期工作中首次成功分离并纯化了肾癌细胞来源的 exosomes,进行了形态学分析和成分鉴定,发现其富含肾癌特异性抗原 G250、HSP70 和 ICAM-1 等蛋白,用 IL-12 对其锚定修饰后可产生特异性 T 淋巴细胞毒作用<sup>[12-13]</sup>;hepaCAM 蛋白可通过 exosomes 途径分泌到肾癌细胞外并抑制肿瘤细胞增殖<sup>[14]</sup>;肾细胞癌源性 exosomes 可诱导单核细胞分化为 PD-L1 髓源性抑制细胞<sup>[15]</sup>。目前有研究发现 exosomes 与免疫细胞直接作用后可介导免疫逃逸,如卵巢癌来源的 exosomes 可通过抑制 CD3- $\zeta$ /JAK3 途径诱导 T 细胞凋亡<sup>[16]</sup>。但肾癌细胞分泌的 exosomes 是否也能诱导 T 细胞的凋亡,目前少见报道。因此,研究肾癌细胞来源的 exosomes 对 Jurkat T 细胞的影响,有望探明 exosomes 在介导肾癌免疫逃逸中的作用及相关机制。

本实验采用 CCK-8、流式细胞术检测发现,肾癌细胞来源的 exosomes 能以浓度和时间依赖方式抑制 Jurkat T 细胞生长并诱导其凋亡。故我们认为肾癌细胞来源的 exosomes 在肾癌微环境中可能诱导 T 细胞凋亡,下调机体对肿瘤的免疫效应。exosomes 可选择性地促进调节性 T 细胞的作用,而不增强 CTL 的增殖和分化功能<sup>[17]</sup>。为了探明肾癌细胞来源的 exosomes 对 Jurkat T 细胞免疫功能的影响,我们进一步检测了 exosomes 作用后 Jurkat T 细胞免疫分泌水平的变化,结果表明 Jurkat T 细胞上清液中 IL-2、IFN- $\gamma$ 、IL-6 及 IL-10 的浓度均明显降低,说明肾癌细胞分泌的 exosomes 可以通过抑制 Th 细胞,下调 Jurkat T 细胞的免疫功能,对免疫状态起着负性调控作用。

研究发现,前列腺癌和结肠癌来源的 exosomes 诱导 T 细胞凋亡过程中,可分别表达 FasL 和 TRAIL<sup>[18-19]</sup>,进而与 T 细胞表面的死亡受体结合,诱导细胞凋亡而产生免疫逃逸。本实验发现 FasL 在肾癌细胞来源的 exosomes 中高表达,应用可溶性 Fas 阻断 Fas/FasL 系统后, Jurkat T 细胞的凋亡率明显降低,几乎被全部逆转,说明 Fas/FasL 系统参与了肾癌细胞来源的 exosomes 对 Jurkat T 细胞凋亡的诱导。细胞凋亡包括膜受体和线粒体两种途径<sup>[20]</sup>。二者分别通过 Caspase-8、Caspase-9 激活下游的 Caspase-3 触发凋亡<sup>[21]</sup>。本研究发现,在肾癌细胞来源的 exosomes 诱导 Jurkat T 细胞凋亡过程中, Caspase-3 及其两个上游因子 Caspase-8、Caspase-9 均被激活,提示肾癌细胞来源的 exosomes 可能通过膜受体和线粒体途径,触发 Jurkat T 细胞凋亡发生。Bcl-2 蛋白家族是重要的凋亡调

节蛋白,当细胞内 Bcl-2 较多时, Bcl-2 和 Bax 形成的异源二聚体增多,凋亡受抑制;当细胞内 Bax 较多时, Bax 自身形成的同源二聚体增多,凋亡启动<sup>[22]</sup>。因此, Bax/Bcl-2 值是判定细胞进入凋亡状态的重要指标。本研究表明, exosomes 诱导 Jurkat T 细胞凋亡中, Bax 蛋白的表达显著上调,同时 Bcl-2 蛋白的表达下调, Bax/Bcl-2 值升高,启动 Jurkat T 细胞凋亡的发生,说明 Bcl-2 蛋白家族也参与了肾癌细胞来源的 exosomes 对 Jurkat T 细胞凋亡的诱导过程。

综上所述,本研究结果证实了肾癌细胞来源的 exosomes 可诱导 Jurkat T 细胞凋亡,它可能介导了肾癌免疫逃逸, Fas/FasL、Caspase 及 Bcl-2 蛋白家族在此过程中发挥重要作用。这为 exosomes 介导肿瘤免疫逃逸提供了实验基础,也为肾癌免疫治疗提供了新的思路。本实验仅为体外研究,体内的具体机制尚待进一步阐明。

#### 参考文献:

- [1] Jemal A, Siegel R, Xu J, *et al.* Cancer statistics, 2010 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2010, 60(5): 277-300.
- [2] Jemal A, Clegg L X, Ward E, *et al.* Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2001, with a special feature regarding survival [J]. *Cancer*, 2004, 101(1): 3-27.
- [3] Milella M, Felici A. Biology of metastatic renal cell carcinoma [J]. *J Cancer*, 2011(2): 369-373.
- [4] Ashiru O, Boutet P, Fernandez-Messina L, *et al.* Natural killer cell cytotoxicity is suppressed by exposure to the human NKG2D ligand MIC-6 that is shed by tumor cells in exosomes [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(2): 481-489.
- [5] Boilson B A, Gulati R. Stem cell therapy for the heart: a perspective [J]. *Transl Res*, 2010, 155(1): 3-5.
- [6] Lotvall J, Valadi H. Cell to cell signalling via exosomes through esRNA [J]. *Cell Adh Migr*, 2007, 1(3): 156-158.
- [7] Couzin J. Cell biology: The ins and outs of exosomes [J]. *Science*, 2005, 308(5730): 1862-1863.
- [8] Skokos D, Botros H G, Demeure C, *et al.* Mast cell-derived exosomes induce phenotypic and functional maturation of dendritic cells and elicit specific immune responses *in vivo* [J]. *J Immunol*, 2003, 170(6): 3037-3045.
- [9] Skog J, Wurdinger T, Van-Rijn S, *et al.* Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers [J]. *Nat Cell Biol*, 2008, 10(12): 1470-1476.
- [10] Kharaziha P, Ceder S, Li Q, *et al.* Tumor cell-derived exosomes: A message in a bottle [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1826(1): 103-111.
- [11] Taylor D D, Zacharias W, Gercel-Taylor C. Exosome isolation for proteomic analyses and RNA profiling [J]. *Methods Mol Biol*, 2011(728): 235-246.
- [12] Zhang Y, Luo C L, He B C, *et al.* Exosomes derived from IL-12-anchored renal cancer cells increase induction of specific antitumor response *in vitro*: a novel vaccine for renal cell carcinoma [J]. *Int J*

Oncol, 2010, 36(1): 133-140.

[13] Zhang Y, Wu X H, Luo C L, *et al.* Interleukin-12-anchored exosomes increase cytotoxicity of T lymphocytes by reversing the JAK/STAT pathway impaired by tumor-derived exosomes [J]. *Int J Mol Med*, 2010, 25(5): 695-700.

[14] 刘安全, 吴小候, 罗春丽. HepaCAM 蛋白通过 exosomes 途径分泌到细胞外并抑制肿瘤细胞增殖[J]. *第三军医大学学报*, 2012, 34(2): 168-171.

[15] 张俊, 吴小候, 陈刚, 等. 肾细胞癌源性 exosomes 体外诱导单核细胞分化为 PD-L1 髓源性抑制细胞[J]. *第三军医大学学报*, 2012, 34(2): 172-174.

[16] Taylor D D, Gercel-Taylor C. Tumour-derived exosomes and their role in cancer-associated T-cell signalling defects[J]. *Br J Cancer*, 2005, 92(2): 305-311.

[17] Clayton A, Mitchell J P, Court J, *et al.* Human tumor-derived exosomes selectively impair lymphocyte responses to interleukin-2 [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(15): 7458-7466.

[18] Huber V, Fais S, Iero M, *et al.* Human colorectal cancer cells in-

duce T-cell death through release of proapoptotic microvesicles; role in immune escape [J]. *Gastroenterology*, 2005, 128(7): 1796-1804.

[19] Abusamra A J, Zhong Z, Zheng X, *et al.* Tumor exosomes expressing Fas ligand mediate CD8<sup>+</sup> T-cell apoptosis [J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2005, 35(2): 169-173.

[20] Danial N N, Korsmeyer S J. Cell death; critical control points [J]. *Cell*, 2004, 116(2): 205-219.

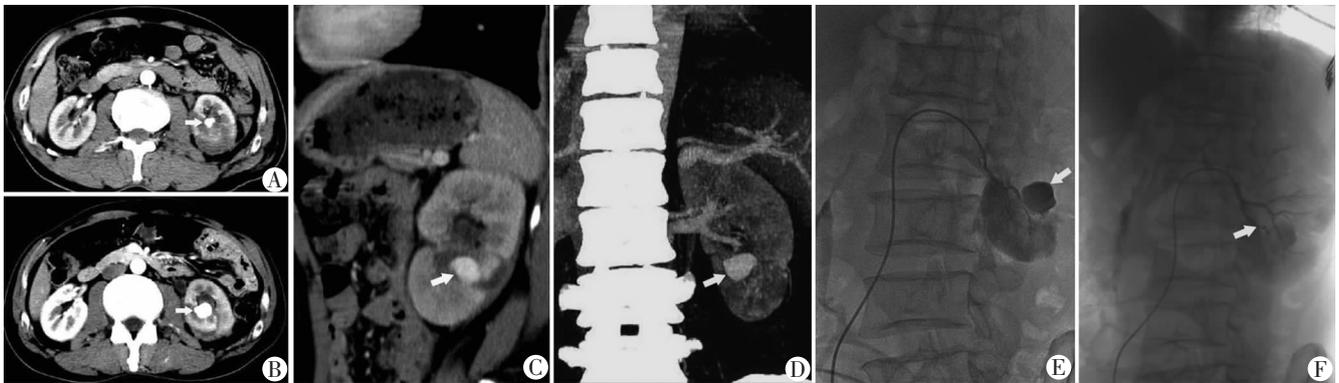
[21] Hellwig C T, Passante E, Rehm M. The molecular machinery regulating apoptosis signal transduction and its implication in human physiology and pathophysiology [J]. *Curr Mol Med*, 2011, 11(1): 31-47.

[22] Tsukahara S, Yamamoto S, Tin-Tin-Win-Shwe, *et al.* Inhalation of low-level formaldehyde increases the bel-2/bax expression ratio in the hippocampus of immunologically sensitized mice [J]. *Neuroimmunomodulation*, 2006, 13(2): 63-81.

(收稿:2012-09-25;修回:2012-11-19)

(编辑 龙亮)

(上接 425 页)



A: 入院时,左肾中下份近肾盂处动脉瘤;B:常规治疗7d后,瘤体明显增大;C:矢状位显示动脉瘤进入肾盂;D:CTA 显示瘤体及供血动脉;E、F:肾动脉造影栓塞治疗前、后显示动脉瘤及其血供情况

图1 肾外伤性动脉瘤患者常规治疗及栓塞治疗前后的对比观察

本例患者为典型的外伤后假性动脉瘤,在 CTA 上呈典型表现,并发肾挫裂伤伴肾包膜下血肿,瘤体入院时较小,常规治疗 7 d 后复查瘤体明显增大,于 2012 年 2 月 19 日行左肾假性动脉瘤栓塞术治疗。对明确外伤史并有肾实质挫伤或挫裂伤患者,增强 CT 见到肾实质或肾盂内点状或结节状异常强化影,强化程度与同层大血管相当时,当考虑此病,并行 CTA 检查。彩色多普勒超声,在显示全肾动脉的走行及病变动脉与瘤体的空间关系上不如 CTA。肾动脉造影术为假性动脉瘤诊断的金标准,属有创性检查,且费用较高,一般不用于常规诊断<sup>[5]</sup>。CTA 通过不但能清晰的显示全肾动脉的走行,而且能直观显示瘤体及瘤体与病变动脉间的空间关系,有的患者可能存在肾动脉变异或畸形,CTA 能够及时准确的发现,从而为介入治疗或者临床干预提供准确和详细术前的影像资料,且对于治疗后效果评估和随访具有重要价值,故 CTA 应作为早期诊断此类疾病的首选。

### 参考文献:

[1] Osman I, Barrero R, Leon E, *et al.* Mycotic pseudoaneurysm following a kidney transplant: a case report and review of the literature [J]. *Pediatr Transplant*, 2009, 13(5): 615-619.

[2] Grenier N, Douws C, Morel D, *et al.* Detection of vascular complications in renal allografts with color Doppler flow imaging [J]. *Radiology*, 1991, 178(1): 217-223.

[3] Ngo T C, Lee J J, Gonzalzo M L. Renal pseudoaneurysm: an overview [J]. *Nat Rev Urol*, 2010, 7(11): 619-625.

[4] Helek A, Hoffmann R T, Sommer W H, *et al.* Diagnosis, therapy monitoring and follow up of renal artery pseudoaneurysm with contrast-enhanced ultrasound in three cases [J]. *Clin Hemorheol Microcirc*, 2010, 46(2): 127-137.

[5] 陈正, 潘光辉, 谢晋良, 等. 移植肾假性动脉瘤的诊断和治疗 4 例报告 [J]. *中华器官移植杂志*, 2009, 30(9): 552-555.

(收稿:2012-11-28;修回:2012-12-24)

(编辑 汪勤俭)