

陈思历, 杨洪彬. 骨肉瘤干细胞来源外泌体对 T 细胞增殖及分化的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(10): 21-29.

Chen SL, Yang HB. Effect of exosomes derived from osteosarcoma stem cells on proliferation and differentiation of T cells [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(10): 21-29.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2020.10.004

骨肉瘤干细胞来源外泌体对 T 细胞增殖及分化的影响

陈思历^{1,2}, 杨洪彬^{1*}

(1. 西南医科大学附属医院骨科, 四川 泸州 646000; 2. 四川现代医院骨科, 成都 610041)

【摘要】 目的 探讨骨肉瘤干细胞(osteosarcoma stem cells, OSCs)来源的外泌体对 T 细胞增殖及分化的影响及其相关作用机制。**方法** 采用无血清悬浮培养获得 OSCs, 并利用干细胞标志物流式分选技术进行鉴定。试剂盒提取骨肉瘤干细胞分泌的外泌体(OSCs-exo), 利用透射电镜、粒径分析及 Western blot 实验进行鉴定。将 OSCs-exo 与 PBMC 进行共培养, CFSE 染色及细胞流式实验检测其对 T 细胞增殖的影响。Western blot 实验检测 ERK 信号通路中 ERK 蛋白的磷酸化改变。免疫磁珠分选 CD4⁺T 细胞, 并将其与 OSCs-exo 在不同 CD4⁺T 细胞亚群诱导分化液中进行共培养, 细胞流式实验检测 OSCs-exo 对后者分化的影响。Western blot 实验检测 STAT 信号通路中磷酸化 STAT1、STAT3、STAT5 蛋白的表达。**结果** 成功分离获得了 OSCs CD133⁺MG-63, 透射电镜、粒径分析及 Western blot 实验结果表明 OSCs-exo 为直径在 30~100 nm 的圆形或椭圆形囊泡结构, 其高表达外泌体标志性蛋白 CD63、HSP70。CFSE 染色及细胞流式实验及 Western blot 实验结果显示 OSCs-exo 可能通过抑制 ERK 蛋白磷酸化抑制 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺T 细胞的增殖, 通过抑制磷酸化 STAT1、STAT3 蛋白的表达抑制 CD4⁺T 细胞向 Th1、Th17 并促进其向 Th2、Treg 细胞的分化。**结论** 骨肉瘤干细胞来源的外泌体能够通过下调 ERK 蛋白的磷酸化抑制 T 细胞的增殖, 并降低磷酸化 STAT1 与 STAT3 蛋白的表达以诱导 CD4⁺T 细胞向 Th2、Treg 细胞分化, 而抑制其向 Th1、Th17 的分化, 从而下调细胞免疫功能, 促进肿瘤的进展。

【关键词】 骨肉瘤干细胞; 外泌体; T 细胞; ERK; STAT

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 10-0021-09

Effect of exosomes derived from osteosarcoma stem cells on proliferation and differentiation of T cells

CHEN Sili^{1,2}, YANG Hongbin^{1*}

(1. Department of Orthopaedics, Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China.

2. Department of Orthopaedics, Sichuan Modern Hospital, Chengdu 610041)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of exosomes derived from osteosarcoma stem cells (OSCs) on the proliferation and differentiation of T cells and to explore its mechanism. **Methods** OSCs were obtained using serum-free suspension culture and identified using stem cell marker logistics separation technology. The exosomes (OSCs-exo) secreted by OSCs were extracted using an exosome extraction kit and identified using transmission electron microscopy (TEM), particle size analysis, and Western blot. Coculture of OSCs-exo with peripheral blood mononuclear cells, carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) staining, and flow cytometry were used to detect the effect on T-cell proliferation. Western blot was used to detect the phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) protein in the ERK signaling

[基金项目] 四川省教育厅课题(17ZA0165)。

[作者简介] 陈思历(1983—), 男, 副主任医师, 本科, 研究方向: 骨与关节疾病的诊疗。E-mail: aabu123@163.com

[通信作者] 杨洪彬(1977—), 男, 主任医师, 硕士, 研究方向: 骨与关节疾病的诊疗。E-mail: yanghongbin123@163.com

pathway. Immunomagnetic beads were used to separate CD4⁺ T cells and coculture them with OSCs-exo in the differentiation medium induced by different CD4⁺ T cell subsets. Western blot was used to detect the expression of phosphorylated STAT1, STAT3, and STAT5 proteins in the STAT signaling pathway. **Results** OSCs CD133⁺MG-63 was successfully isolated. The result of TEM, particle size analysis, and Western blot showed that OSCs-exo is a round or oval vesicle with a diameter of 30–100 nm. The CFSE staining, flow cytometry, and Western blot result showed that OSCs-exo inhibits the proliferation of CD3⁺, CD4⁺, and CD8⁺ T cells by inhibiting the phosphorylation of ERK protein, and inhibits the differentiation of CD4⁺ T cells to Th1, Th17, Th2, and Treg cells by inhibiting the expression of phosphorylated STAT1 and STAT3 protein. **Conclusions** Exosomes derived from OSCs can inhibit the proliferation of T cells by downregulating the phosphorylation of ERK protein and reducing the expression of phosphorylated STAT1 and STAT3 protein to induce CD4⁺ T cells to differentiate into Th2 and Treg cells. They can also inhibit the differentiation of CD4⁺ T cells into Th1 and Th17 cells to downregulate cellular immune function and promote tumor progress.

【Keywords】 osteosarcoma stem cells; exosomes; T cells; ERK; STAT

骨肉瘤是最常见的原发恶性骨肿瘤之一,约占原发性恶性骨肿瘤的 1/3,其好发于儿童和青少年的长骨干骺端。骨肉瘤的恶性程度极高,早期即可转移,研究报道约 15%~20% 的患者在首次出现症状时就已发生了远端转移^[1-3]。目前临床上针对骨肉瘤的治疗方法包括手术和化疗的联合治疗,但该方法对已发生了转移的骨肉瘤患者效果不佳且仍有部分患者在治疗后发生肿瘤的复发或远处转移^[4]。

肿瘤干细胞(cancer stem cells, CSCs)被认为是肿瘤组织中一小部分具有干细胞自我更新与分化潜能的细胞亚群^[5]。CSCs 的存在是导致肿瘤转移及复发的关键因素,这一方面因为 CSCs 所具有的干细胞特性能够无限增殖,并通过干细胞标志物如 Sox-2、Snail 等促进上皮间质转化,诱导新生血管形成和招募基质细胞等促进肿瘤细胞的增殖及侵袭;另一方面 CSCs 通过与其微环境中其他细胞之间相互作用可分泌多种可溶性因子介导免疫抑制,使肿瘤细胞逃脱机体的免疫监控,进而免于受到免疫攻击^[6]。因此,针对 CSCs 及其微环境的深入研究,对探寻潜在治疗靶点有望解决骨肉瘤早期转移及治疗后复发的难题。

外泌体(exosomes)是由细胞分泌的直径约为 30~100 nm 的膜性囊泡,其广泛存在于多种体液中。研究发现外泌体内包含母体细胞的蛋白(如 CD9、CD63、Hsp70 等)、DNA、mRNA/miRNA/lncRNA、脂类等多种生物活性成分,故其能够参与调节肿瘤微环境的形成并在肿瘤细胞的增殖、免疫逃逸及播散转移等过程中发挥着重要的作用^[7]。而 CSCs 作为恶性肿瘤的种子细胞,对其外泌体的研究尚鲜有报道。基于此,本文重点探讨骨肉瘤干细胞来源的外泌体是否影响 T 细胞的增殖及分化,并初步探究其相关分子机制。现将结果报告如下。

1 材料和方法

1.1 实验材料

人骨肉瘤细胞株 MG-63、HOS、U2OS、MGHOS 均购自中国科学院细胞库。人外周血由健康志愿者提供。所有志愿者已签署知情同意书。

1.2 主要试剂

DMEM/F12、RPMI1640、0.25%胰蛋白酶(美国 Hyclone 公司,批号 8112347、1184655、210175K);胎牛血清(FBS)、青链霉素混合液(均为 100 U/mL)(杭州四季青生物公司,批号 098N0261、023M755);干细胞无血清培养基(加拿大 Stemcell 公司,批号 30984);RIPA 裂解液、BCA 蛋白定量试剂盒(美国 Invitrogen 公司,批号 5571043、044623K);羧基荧光素乙酰乙酸琥珀酰亚胺酯(CFSE)荧光染色(上海麦克林公司,批号 0122763);OKT3、anti-IL-4、anti-INF- γ 、bFGF、EGF、LIF(美国 BioXcell 公司,批号 115848179010、044617K、052723K、c10649、c224616、c779012);IL-2、IL-12、TGF- β (美国 R&D 公司,批号 309316、373528、3136477);CD133/CD3/CD4 细胞磁珠分离试剂盒、MACS 缓冲液、磁力架、磁珠分选柱(德国美天旎公司,批号 1045032549、2470848672、MB07512、MB24403);流式抗体 FITC-CD133 mAb(美国 eBioscience 公司,批号 E0947-712);FITC-CD3 mAb、PE-CD8 mAb、APC-CD4 mAb、Perccy5.5-INF- γ mAb、FITC-Foxp3 mAb、PE-cy7-IL-17 mAb(美国 Biolegend 公司,批号 024137K、277S016、5527190、320186K、077243S、033157K);抗人 T 细胞表面 CD3(OKT3)单克隆抗体(美国 BD Bioscienc 公司,批号 MS-0253L5);ERK、p-ERK、p-STAT1、p-STAT3、p-STAT5、GAPDH、CD63 抗体(美国 Santa Cruz 公司,批号 SC-6641、SC-027、SC-17855-R、SC-

02249、SC-44975、SC-559、SC-5227);其他试剂为国产分析纯。

1.3 实验方法

1.3.1 肿瘤干细胞球的培养及流式鉴定

常规复苏骨肉瘤细胞系 MG-63、HOS、U2OS、MGHOS 后使用含 10% FBS、1%青链霉素的 DMEM/F12 培养基于 37℃、5% CO₂ 恒温培养箱进行培养。待细胞生长融合至 70%~80% 时用 0.25% 的胰酶进行消化,室温下 800 r/min 离心 5 min,弃上清,DMEM/F12 重悬细胞后进行传代。取处于对数生长期的 MG-63、HOS、U2OS、MGHOS 细胞,常规进行消化后,PBS 调整细胞密度至 1×10^5 个/孔接种至低粘附细胞培板中,使用含 20 ng/mL bFGF、10 ng/mL EGF 与 10 ng/mL LIF 的无血清 DMEM/F12 培养基于 37℃、5% CO₂ 恒温培养箱中进行培养。经无血清培养基培养 10 d 后于显微镜下观察到骨肉瘤细胞系可形成典型的悬浮生长骨肉瘤干细胞球,拍照并计数。取无血清培养的骨肉瘤细胞系 MG-63、HOS、U2OS、MGHOS,培养至第 10 天时收集细胞,室温下 300 r/min 离心 5 min,取细胞沉淀用 PBS 调整至细胞密度为每毫升 1×10^5 个,取 2 mL 细胞悬液至流式管中,室温下 300 r/min 离心 5 min,弃上清后,加入 100 μ L 的 PBS 重悬细胞后,加入抗人 FITC-CD133 mAb 抗体,4℃ 避光孵育 30 min,PBS 洗涤细胞 2 次,800 r/min 离心 10 min,弃上清,500 mL PBS 重悬细胞后,0.22 μ m 滤膜过滤后采用流式细胞仪检测上述培养的肿瘤干细胞球中 CD133⁺ 细胞(即骨肉瘤干细胞)所占比例。

1.3.2 分离外周血单个核细胞(PBMC)

采用 Ficoll 密度梯度离心法分离 PBMC,简述如下:将收集的健康志愿者血液标本的抗凝采血管置于离心机中,常温下 1500 r/min 离心 10 min,取下层血细胞与等体积的 PBS 混匀后缓慢匀速加至适量的淋巴细胞分离液面上,并使其形成界面。将上述得到的分层液体于室温下在缓升缓降的离心机中 2320 r/min 离心 20 min,使其分层,移液管小心吸出中间形成的“云雾层”细胞,并加入 5 倍体积的 PBS,室温下 1500 r/min 离心 10 min,底层白色沉淀即为分离所需的 PBMC,PBS 洗涤细胞 2 次进行纯化,并细胞计数。

1.3.3 免疫磁珠法分选 CD133⁺ OSCs 与 CD4⁺ T 细胞

应用免疫磁珠阳选法分别进行分选 CD133⁺

MG-63 与 CD4⁺ T 细胞,操作参照试剂盒说明书进行,分别简述如下:①CD133⁺ MG-63 的分选:取生长状态良好的 MG-63 细胞球,4℃、1200 r/min 离心 3 min,弃上清,PBS 重悬细胞后用移液管将细胞吹打成单细胞悬液,并计数。取 300 μ L 约含 1×10^8 个细胞的细胞悬液,并依次加入 100 μ L 的 FcR 阻断剂与结合有 CD133 单抗的免疫磁珠 100 μ L,充分混匀后于 4℃ 避光孵育 30 min,PBS 洗涤细胞 3 次,4℃、1200 r/min 离心 3 min,弃上清,用 500 μ L 的 PBS 重悬并制成单细胞悬液。按照试剂盒使用说明书进行组装磁力架及分选柱,MACS 缓冲液冲洗分选柱后加入细胞悬液进行分选。待分选结束后,将分选柱移出磁场,加压收集吸附于分选柱中的细胞,即为 CD133⁺ MG-63 细胞。将收集的 CD133⁺ MG-63 于干细胞无血清培养基中进行培养以备后续实验使用,该培养基用于可长时间培养干细胞,并支持细胞增殖且维持细胞的多能性。②CD4⁺ T 细胞的分选:取生长状态良好的 PBMC,按前述步骤制成单细胞悬液后,加入 100 μ L 的 FcR 阻断剂与结合有 CD4 单抗的免疫磁珠 100 μ L,孵育、洗涤、离心并再次制备单细胞悬液后,组装磁力架及分选柱,按前述方法进行细胞分选,最后收集吸附于分选柱中的细胞,即为 CD4⁺ T 细胞。

1.3.4 骨肉瘤干细胞外泌体(OSCs-exo)提取及鉴定

取传至 3 代后的 CD133⁺ MG-63 骨肉瘤干细胞,待细胞生长达 70%~80% 时收集培养上清液。按照外泌体分离纯化试剂盒说明书方法进行提取细胞上清液中的外泌体,-80℃ 保存备用。取 20 μ L PBS 稀释 2 μ L OSCs-exo,3.5% 的多聚甲醛固定后滴加到铜网上,乙酸双氧铀负染,透射电镜观察 OSCs-exo 形态;用 950 μ L PBS 稀释 50 μ L 外泌体,0.22 μ m 滤膜过滤外泌体稀释液后使用纳米粒度颗粒跟踪分析仪进行外泌体粒径检测;应用 Western blot 实验检测 OSCs-exo 表面特征性蛋白 CD63 的表达。上述实验单独重复 3 次。

1.3.5 T 细胞增殖检测

本研究采取 CFSE 染色检测 OSCs-exo 对 T 细胞的增殖的影响,实验步骤简述如下:取上述分离纯化的 PBMC 进行细胞计数后,调整细胞密度至每毫升 3×10^7 个,加入终浓度为 10 μ mol/L 的 CFSE 进行混匀,室温下避光孵育 10 min,加入 4℃ 预冷的 10 mL 含 10% FBS 的 RPMI-1640 的完全培养基终止

反应,1000 r/min 离心 5 min,取下层细胞沉淀用无血清的 RPMI-1640 洗涤细胞 2 次,1000 r/min 离心 5 min,弃上清,用含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基重悬细胞,进行细胞计数后以备用,整个操作过程中注意避光。将 CFSE 染色的 PBMC 分为三组,分别为 A 组:接种至预先用 30 ng/mL OKT3 进行包被 96 孔板中的 PBMC,使用完全培养基进行培养;B 组:接种至预先用 30 ng/mL OKT3 进行包被 96 孔板中的 PBMC,并使用终浓度为 10 μ g/mL OSCs-exo 的完全培养基进行培养;C 组:接种至未使用 OKT3 包被的 96 孔板中,使用含 10% FBS 的 RPMI-1640 的培养基进行培养的 PBMC 为对照。3 组细胞置于 37℃、5% CO₂ 恒温培养箱中培养 5 d,并于第 3 天更换各组相应的培养基。收集 3 组的 PBMC,调整细胞密度至每毫升 1×10^5 个,取 2 mL 细胞悬液至流式管,每管再分为 3 份,按照上述流式细胞步骤加入抗人 FITC-CD3 mAb、APC-CD4 mAb、PE-CD8 mAb 抗体后进行检测 PBMC 中表达 CD3、CD4、CD8 阳性的细胞。上述实验单独重复 3 次。

1.3.6 T 细胞分化检测

取上述免疫磁珠分离获得的 CD4⁺T,接种至预先使用 1 μ g/mL OKT3 包被的 48 孔板中,并将细胞密度调整至 1×10^6 个/孔。按照实验目的将加入 10 μ g/mL OSCs-exo 的 CD4⁺T 设为实验组,对照组为不加 OSCs-exo 培养的细胞,并分别加入含 Th1、Th2、Th17、Treg 诱导分化培养液(Th1 诱导条件:IL-12 15 ng/mL、IL-2 30 ng/mL、anti-IL-4 5000 ng/mL;Th2 诱导条件:IL-12 20 ng/mL、anti-CD28 2 μ g/mL、anti-IL-4 10 ng/mL;Th17 诱导条件:IL-6 20 ng/mL、TGF- β 5 ng/mL、anti-IL-4 10 μ g/mL、anti-INF- γ 10 μ g/mL;Treg 诱导条件:TGF- β 15 ng/mL、IL-2 30 ng/mL、anti-INF- γ 10 μ g/mL、anti-IL-4 5000 ng/mL)的 DMEM/F12 培养基中,并置于 37℃、5% CO₂ 恒温培养箱中培养 5 d,每 3 天更换培养基一次。取经诱导分化的各组细胞,弃除原培养基后用含 10 ng/mL PMA 与 1000 ng/mL 离子霉素的 DMEM/F12 于细胞培养箱中孵育 5 h,按上述细胞流式实验步骤加入抗人 APC-CD4 mAb、PerCP-cy5.5- INF- γ mAb、PerCP-cy5.5- IL-4、mAb FITC-Foxp3 mAb、PE-cy7-IL-17 mAb 后上机进行检测 Th1、Th2、Th17 及 Treg 细胞所占比例。上述实验单独重复 3 次。

1.3.7 蛋白质免疫印迹

按照外泌体蛋白提取试剂盒说明方法进行提取 OSCs-exo 中的蛋白质,BCA 法进行蛋白定量,按

照 1:4 向上清液中加入 5 $\times$ 蛋白上样缓冲液,并于沸水中加热变性 10 min。取 30 μ g 的蛋白进行聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳进行蛋白分离,采用湿转法将分离的蛋白转至 PVDF 膜上,5%的脱脂牛奶于室温下封闭 2 h 后,分别加入 p-STAT1(1:500)、p-STAT3(1:500)、p-STAT5(1:500)、p-ERK(1:800)、ERK(1:800)、GAPDH(1:2000)、CD63(1:1000)、Hsp70(1:1000)一抗,4℃摇床孵育过夜。TBST 溶液清洗 3 次,每次 5 min,以辣根酶标记的二抗(1:5000)室温孵育 1 h,以 TBST 溶液清洗 3 次,每次 5 min。最后均匀滴加 ECL 发光液后于凝胶成像仪进行曝光拍照。Image J 软件测定条带灰度值,以目标蛋白与内参 GAPDH 的比值作为其相对含量。上述实验单独重复 3 次。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 19.0 和 GraphPad Prism 5.0 进行统计分析,数据结果以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用单因素方差分析(One-way ANOVA)进行多组间分析,两组间比较采用独立样本 *t* 检验。显著性检验水准 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 骨肉瘤干细胞球的形态、干性鉴定

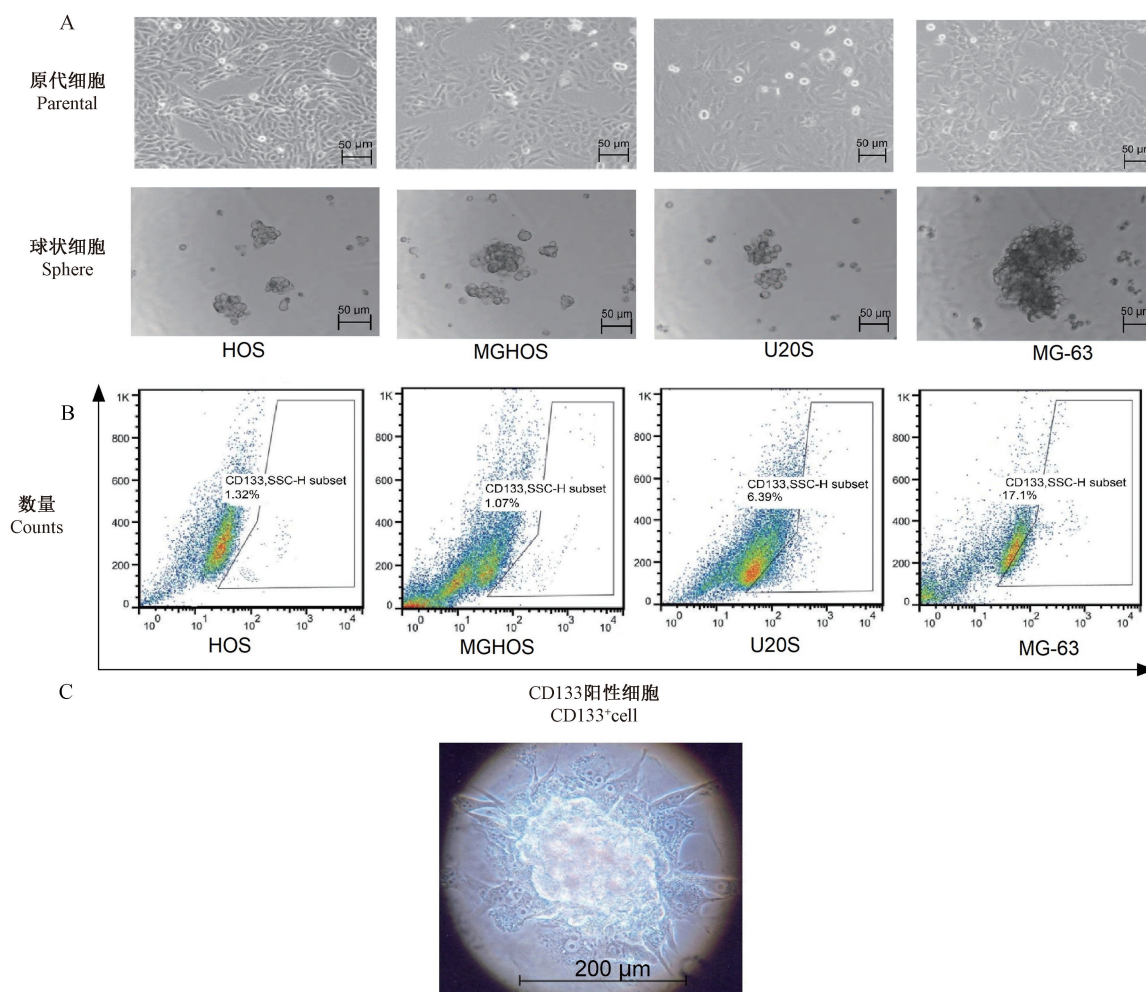
采用无血清悬浮培养法获取 OSCs,细胞悬浮成球实验结果显示在 4 株骨肉瘤细胞系 HOS、MGHOS、U2OS、MG-63 中,MG-63 的细胞成球率显著高于其他三株细胞系。流式细胞术检测 OSCs 标志物 CD133 的实验结果表明,MG-63 细胞系中 CD133 的表达率(17.1%)明显高于其他三株细胞系,见图 1A、1B。光镜下观察 MG63 细胞系分选出的 OSC,可见 OSC 呈不规则球形,表面具有大量棘突伸出,见图 1C。

2.2 OSCs-exo 的形态及鉴定

选取免疫磁珠分选的 CD133⁺MG-63 OSCs 的外泌体进行观察。透射电子显微镜结果表明,外泌体呈圆形或椭圆形囊泡结构;粒径分析显示器直径约为 30~100 nm;Western blot 实验检测外泌体标志性蛋白 CD63、HSP70,结果显示在 OSCs-exo 中均能高表达 CD63、HSP70。见图 2。

2.3 OSCs-exo 抑制 T 细胞的增殖

流式细胞术检测 OSCs-exo 对 T 细胞增殖的影响,结果显示与对照组 PBMC 相比,OKT3 可显著刺激 PBMC 中 T 细胞增殖($P < 0.01$),而 OSCs-exo 可

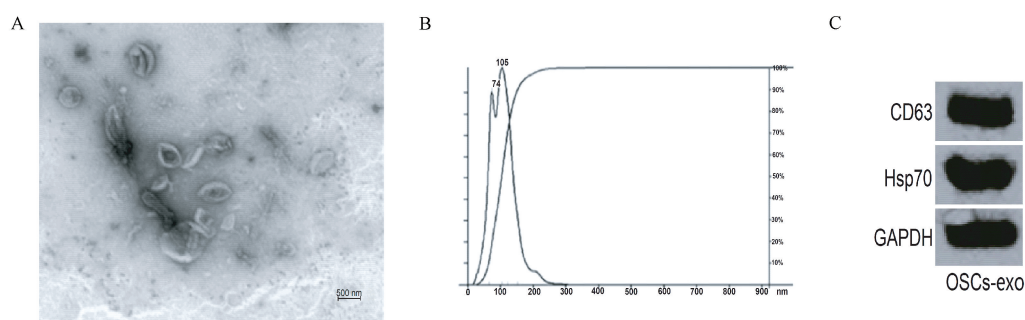


注:A:4株骨肉瘤细胞的形态学改变;B:流式细胞术鉴定4株骨肉瘤细胞的CD133表达情况;C:光镜观察分选出的OSC形态。

图1 骨肉瘤干细胞取的形态及干性鉴定

Note. A, Morphological changes of 4 osteosarcoma cells. B, Flow cytometry identification of CD133 expression of 4 osteosarcoma cells. C, The OSC morphology was observed by optical microscope.

Figure 1 Morphological and phenotypic identification of osteosarcoma stem cells



注:A:透射电镜显示骨肉瘤干细胞外泌体的形态呈圆形或椭圆形囊泡结构;B:骨肉瘤干细胞外泌体的粒径分析;C:Western blot检测证实提取的骨肉瘤外泌体表达CD63及HSP70蛋白。

图2 OSCs-exo的形态结构及鉴定

Note. A, Transmission electron microscopy showed that the shape of exocrine body of osteosarcoma stem cells was round or oval. B, Particle size analysis of exocrine body of osteosarcoma stem cells. C, Western blot analysis confirmed that the extracted exocrine body of osteosarcoma expressed CD63 and HSP70 protein.

Figure 2 Morphological structure and identification of OSCs-exo

显著抑制 OKT3 刺激后 PBMC 中 T 细胞的增殖,包括 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ 的 T 细胞 ($P < 0.05$)。见图 3。

2.4 OSCs-exo 通过下调 ERK 蛋白磷酸化抑制 T 细胞的增殖

Western blot 实验结果表明与对照组 PBMC 相比,OKT3 刺激后 PBMC 中 ERK 蛋白的磷酸化水平显著升高 ($P < 0.05$),而 OSCs-exo 可明显抑制 OKT3 刺激后 PBMC 中 ERK 蛋白的磷酸化水平 ($P < 0.05$)。见图 4。

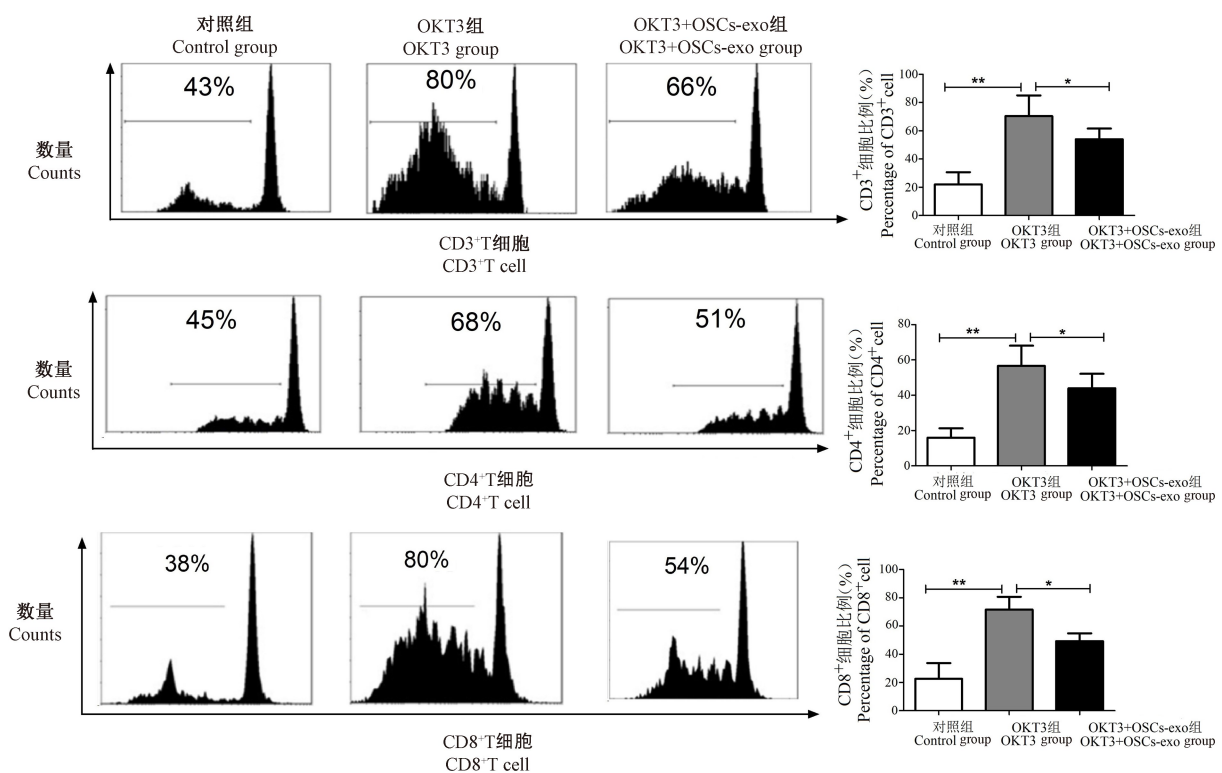
2.5 OSCs-exo 抑制 $CD4^+$ T 细胞的分化

取免疫磁珠分选的 $CD4^+$ T 细胞,在不同的培养基中诱导其定向分化后利用流式细胞术检测 OSCs-

exo 对 $CD4^+$ T 细胞分化的影响,结果显示与对照组细胞相比,OSCs-exo 可显著抑制 $CD4^+$ T 向 Th1、Th17 的分化,而促进 $CD4^+$ T 向 Th2、Treg 分化,差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 5、图 6、表 1。

2.6 OSCs-exo 通过 STAT 信号通路抑制 T 细胞的分化

Western blot 实验检测 OSCs-exo 对 $CD4^+$ T 中 STAT 信号通路的影响,结果显示与对照组 $CD4^+$ T 细胞相比,OSCs-exo 能够显著抑制细胞中 STAT1、STAT3 蛋白的磷酸化 ($P < 0.05$),而 STAT5 蛋白的磷酸化水平无明显变化 ($P > 0.05$)。见图 7。



注:与 OKT3 组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 3 OSCs-exo 对 T 细胞增殖的影响

Note. Compared with OKT3 group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Figure 3 Effect of OSCs-exo on T cell proliferation

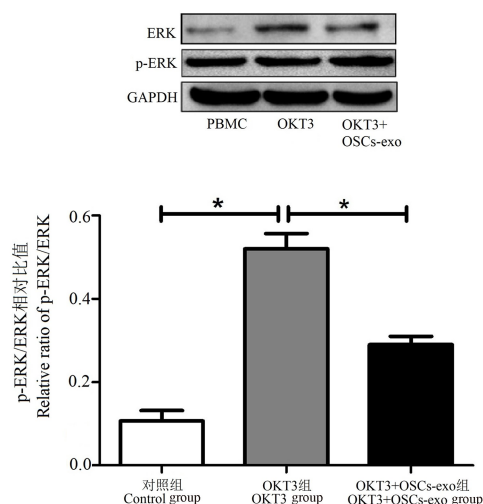
表 1 OSCs-exo 对 $CD4^+$ T 细胞分化影响的结果分析 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Analysis of the effect of OSCs exo on the differentiation of $CD4^+$ T cells

组别 Groups	Th1 (%)	Th2 (%)	Th17 (%)	Treg (%)
$CD4^+$ T 细胞 $CD4^+$ T cell	2.67 ± 1.36	10.17 ± 0.44	2.56 ± 0.17	13.21 ± 1.15
OSCs-exo 与 $CD4^+$ T 细胞 OSCs-exo+ $CD4^+$ T cell	$9.84 \pm 0.80^*$	$3.03 \pm 0.22^*$	$12.95 \pm 1.18^*$	$3.74 \pm 0.56^*$
P	<0.05	<0.05	0.00	0.00

注:与 $CD4^+$ T 细胞组相比, * $P < 0.05$ 。

Note. Compared with $CD4^+$ T group, * $P < 0.05$.



注:与 OKT3 组相比, $*P < 0.05$ 。
图 4 OSCs-exo 抑制 OKT3 所诱导的 ERK 蛋白磷酸化水平
 Note. Compared with OKT3 group, $*P < 0.05$.

Figure 4 OSCs-exo inhibits T cell proliferation by down regulating ERK phosphorylation

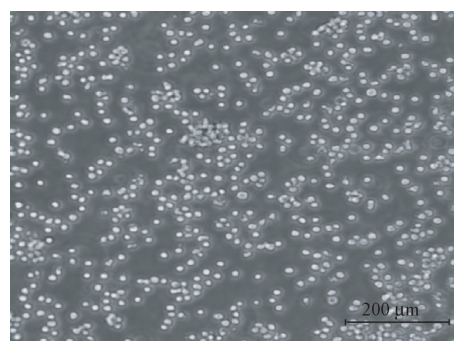


图 5 OSCs-exo 与 CD4⁺T 细胞共培养

Figure 5 Co-culture of OSCs-EXO and CD4⁺T cells

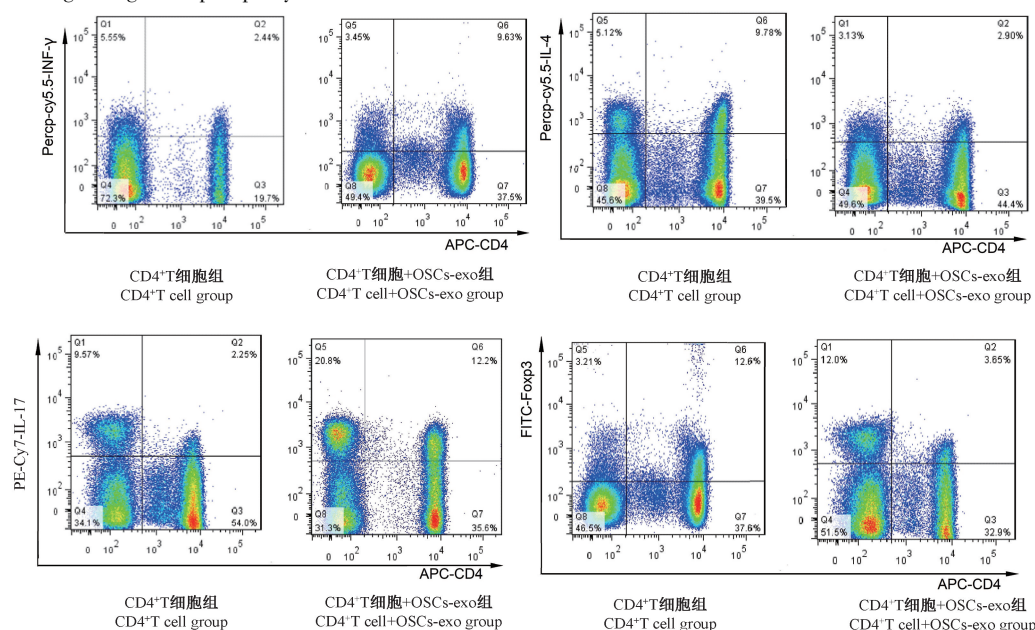
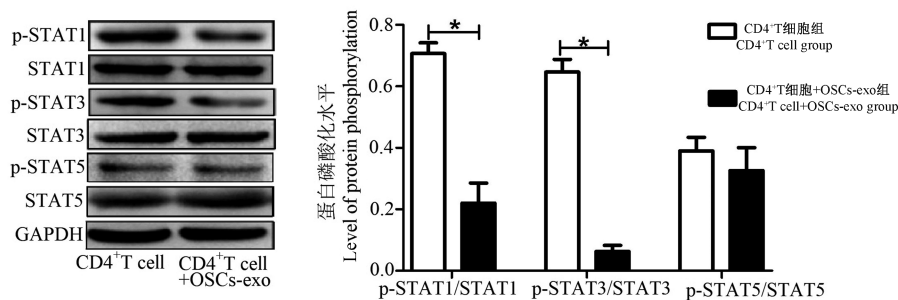


图 6 OSCs-exo 对 CD4⁺T 细胞分化的影响

Figure 6 Effect of OSCs exo on the differentiation of CD4⁺T cells



注:与 CD4⁺T 细胞组相比, $*P < 0.05$ 。

图 7 OSCs-exo 对 CD4⁺T 中 STAT 信号通路的影响

Note. Compared with CD4⁺T cell group, $*P < 0.05$.

Figure 7 Effect of OSCs-exo on STAT signaling pathway in CD4⁺T

3 讨论

骨肉瘤是好发于儿童和青少年的高度恶性肿瘤,复发及转移是骨肉瘤预后不良的主要因素^[8]。肿瘤干细胞是指在肿瘤中少量存在的具有自我更新能力与多向分化潜能的肿瘤细胞,研究表明其与肿瘤的侵袭、转移、及复发密切相关^[9]。因此,探寻靶向骨肉瘤干细胞的治疗方法可能是改善患者预后的主要策略。

随着 Gibbs 等^[9]于 2005 年在骨肉瘤组织中首次发现并报道了骨肉瘤干细胞的存在,相继有大量学者从鼠及犬类骨肉瘤细胞系中分离鉴定出具有干细胞特性的骨肉瘤类肿瘤干细胞^[10-11]。CD133 是一种细胞膜蛋白,研究发现其在脑肿瘤、结肠癌等多种肿瘤干细胞表明均有表达^[12]。Tirino 等^[12]对 SAOS2、MG-63、U2OS 3 种骨肉瘤细胞系中分离出 CD133 阳性骨肉瘤细胞,进一步实验证实该类细胞能够表达 Oct3/4、Nanog、Sox-2 等干细胞基因,并具有向间质细胞分化的能力,且在体外具有很强的肿瘤诱发功能,因此认为 CD133 同样是骨肉瘤干细胞的特征性表面蛋白。

研究表明 CD4⁺T 细胞经刺激后可分化为不同的亚群,如 Th1、Th2、Th17 及 Treg 细胞等,其中 Th1 细胞主要通过分泌 IL-2、IFN- γ 等细胞因子介导细胞免疫,Th2 细胞主要分泌 IL-4、IL-10 等,参与体液免疫^[13]。肿瘤免疫主要是细胞免疫,Th1 细胞诱导的免疫应答能够抑制肿瘤细胞的增殖,而 Th2 细胞主要诱导 B 细胞的分化并抑制机体的细胞免疫。Th17 细胞通过分泌 IL-17、TNF- α 等细胞因子,参与募集中性粒细胞与促进树突状细胞的成熟、协同刺激 Th1 细胞的活化^[14]。

而 Treg 细胞是一群具有免疫抑制作用的 CD4⁺T 细胞,其主要通过分泌 IL-10 及 TGF- β 并负向调控免疫应答^[13]。近年来,有研究发现肿瘤干细胞能够优先通过对其微环境中的进行免疫调控以逃逸机体的免疫攻击,从而激发和维持肿瘤的生长及疾病的进展。如在胶质瘤中,Di 等^[15]研究报道胶质瘤干细胞能够抑制来自健康志愿者外周血 T 细胞的增殖并下调 Th1、Th17 亚群细胞的免疫应答。外泌体作为携带母体细胞相关抗原,如 MHC-1 类分子、粘附分子 1、共刺激分子 86 等免疫信息分子的重要信息传递介质,在参与肿瘤干细胞对其微环境的免疫调控中发挥着不可忽视的作用,如 Wang

等^[16]研究发现在多发性骨髓瘤中,骨髓基质干细胞来源的外泌体可激活 STAT1 与 STAT3 信号通路促进抗凋亡蛋白 BCL-1 与 MCL-1 的表达,直接诱导骨髓源性抑制性细胞(MDSC)存活,并进一步刺激后者释放更多的一氧化氮以抑制 T 细胞功能,从而有助于肿瘤细胞的免疫逃逸。本研究首先通过无血清悬浮培养与干细胞标志物 CD133 流式分选方法成功获得了人骨肉瘤干细胞,又通过免疫磁珠分选法对其进行分离纯化,采用外泌体分离纯化试剂盒收集 OSCs-exo,并利用透射电镜、粒径分析检测及 Western blot 进行鉴定,实验结果表明获取的 OSCs-exo 呈圆形或椭圆形囊泡结构,直径约为 30~100 nm 且高表达外泌体标志性蛋白 CD63、HSP70。

研究发现肿瘤干细胞免疫逃逸的根源在于肿瘤微环境中免疫细胞生物学行为的改变^[9]。而 T 细胞的增殖与活化并不偶联,Dietz 等^[17]应用抗肿瘤药伊马替尼处理经 PMA 刺激的人初始 CD4⁺T 细胞发现,伊马替尼可通过降低 ERK 信号通路的磷酸化水平抑制 T 细胞的增殖,但其并不影响 T 细胞活化标志物 CD25 与 CD69 的表达。细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)作为 MARK/ERK 通路中的一个关键成分,广泛参与调节细胞的分化、增殖、侵袭、凋亡等多种生物学过程。在细胞中,被激活的 ERK 发生磷酸化,并由随后胞质转移至细胞核内,进而活化下游相关转录因子,参与细胞的多种生物学反应^[18]。Dumont 等^[19]研究表明 ERK 信号通路特异性阻滞剂 PD98059 能够明显抑制 OKT3 刺激后的 T 细胞增殖能力。这提示 ERK 信号通路在 T 细胞的增殖过程中发挥着重要作用。STAT 是潜在的信号转录因子和转录激活因子,其作为 JAK 信号通路的底物,能够被后者磷酸化,而磷酸化的 STAT 形成二聚体,依赖核蛋白作用因子穿膜进入核内,从而激活或抑制靶基因的转录,产生生物学效应。其中 STAT1/3/5 在免疫细胞的活化中发挥重要的调节作用^[20-21]。为明确 OSCs-exo 对 T 细胞生物学行为的影响,笔者将 OSCs-exo 与健康志愿者来源的 PBMC 进行共培养,CFSE 染色及细胞流式实验检测其对 T 细胞增殖的影响,实验结果表明 OSCs-exo 能够明显抑制 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺T 细胞的增殖。Western blot 进一步实验检测其相关作用机制,结果表明 OSCs-exo 可能通过下调 ERK 蛋白磷酸化抑制 T 细胞的增殖。在探究 OSCs-exo 对 T 细胞分化的实验中,本研究发现 OSCs-exo

能够抑制 CD4⁺ 初始 T 细胞向 Th1 及 Th17 细胞的分化, 但能够促使其向 Th2 与 Treg 细胞的分化, Western blot 实验结果表明 OSCs-exo 对 CD4⁺ T 细胞分化的影响可能是通过抑制 STAT 信号通路中 STAT1 与 STAT3 蛋白的磷酸化而发挥作用。

综上所述, 本研究发现骨肉瘤干细胞来源的外泌体能够通过下调 ERK 蛋白的磷酸化抑制 T 细胞的增殖, 并降低磷酸化 STAT1 与 STAT3 蛋白的表达以诱导 CD4⁺ T 细胞向 Th2、Treg 细胞分化, 而抑制其向 Th1、Th17 的分化, 从而下调骨肉瘤干细胞微环境中的细胞免疫功能, 最终达到促进肿瘤的进展目的。然而, 上述作用机制可能仅仅是一个方面, 有关骨肉瘤干细胞外泌体的其他作用, 尚需进一步研究探讨。

参考文献:

- [1] Sheridan GA, Mellon L, Thompson EM, et al. Prognostic importance of pathologic fractures in osteosarcomas [J]. *Ir Med J*, 2020, 112(10): 1021.
- [2] Schiavone K, Garnier D, Heymann MF, et al. The heterogeneity of osteosarcoma: the role played by cancer stem cells [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1139: 187–200.
- [3] 黄纲, 董忠信, 谢显彪, 等. 骨肉瘤预后个体化预测模型列线图的建立 [J]. *中华骨科杂志*, 2015, 35(2): 133–141.
- [4] 罗雄, 张春林. 外泌体在骨肉瘤诊断与治疗中的应用进展 [J]. *国际骨科学杂志*, 2019, 40(3): 136–139.
- [5] Zhong Z, Mao S, Lin H, et al. Alteration of intracellular metabolome in osteosarcoma stem cells revealed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Talanta*, 2019, 204: 6–12.
- [6] Di Fiore R, Marcatti M, Drago-Ferrante R, et al. Mutant p53 gain of function can be at the root of dedifferentiation of human osteosarcoma MG63 cells into 3AB-OS cancer stem cells [J]. *Bone*, 2014, 60: 198–212.
- [7] 耿婷, 张晓红, 南琼. 外泌体检测 KRAS 突变在结直肠癌中的研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2019, 29(12): 122–126.
- [8] Martins-Neves SR, Corver WE, Paiva-Oliveira DI, et al. Osteosarcoma stem cells have active Wnt/ β -catenin and overexpress SOX2 and KLF4 [J]. *J Cell Physiol*, 2016, 231(4): 876–886.
- [9] Gibbs CP, Kukekov VG, Reith JD, et al. Stem-like cells in bone sarcomas: implications for tumorigenesis [J]. *Neoplasia*, 2005, 7(11): 967–976.
- [10] Fujii H, Honoki K, Tsujiuchi T, et al. Sphere-forming stem-like cell populations with drug resistance in human sarcoma cell lines [J]. *Int J Oncol*, 2009, 34(5): 1381–1386.
- [11] Wilson H, Huelsmeyer M, Chun R, et al. Isolation and characterisation of cancer stem cells from canine osteosarcoma [J]. *Vet J*, 2008, 175(1): 69–75.
- [12] Tirino V, Desiderio V, D' Aquino R, et al. Detection and characterization of CD133⁺ cancer stem cells in human solid tumours [J]. *PLoS One*, 2008, 3(10): e3469.
- [13] 王丽华, 王亮亮, 张兢, 等. 卵巢癌患者外周血 Th1/Th2 及 Treg/Th17 细胞平衡关系 [J]. *南方医科大学学报*, 2017, 37(8): 1066–1070.
- [14] Chen YQ, Li PC, Pan N, et al. Tumor-released autophagosomes induces CD4⁺ T cell-mediated immunosuppression via a TLR2-IL-6 cascade [J]. *J Immunother Cancer*, 2019, 7(1): 178.
- [15] Di Tomaso T, Mazzoleni S, Wang E, et al. Immunobiological characterization of cancer stem cells isolated from glioblastoma patients [J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(3): 800–813.
- [16] Wang J, De Veirman K, De Beule N, et al. The bone marrow microenvironment enhances multiple myeloma progression by exosome-mediated activation of myeloid-derived suppressor cells [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(41): 43992–44004.
- [17] Dietz AB, Souan L, Knutson GJ, et al. Imatinib mesylate inhibits T-cell proliferation *in vitro* and delayed-type hypersensitivity *in vivo* [J]. *Blood*, 2004, 104(4): 1094–1099.
- [18] Kim SM, Kim EM, Ji KY, et al. TREM2 Acts as a Tumor suppressor in colorectal carcinoma through Wnt1/ β -catenin and erk signaling [J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(9): 1315.
- [19] Dumont FJ, Staruch MJ, Fischer P, et al. Inhibition of T cell activation by pharmacologic disruption of the MEK1/ERK MAP kinase or calcineurin signaling pathways results in differential modulation of cytokine production [J]. *J Immunol*, 1998, 160(6): 2579–2589.
- [20] Qian W, Miner CA, Ingle H, et al. A Human STAT1 Gain-of-Function Mutation Impairs CD8⁺ T Cell Responses against Gamma herpesvirus 68 [J]. *J Virol*, 2019, 93(19): e00307–e00319.
- [21] Morichika K, Karube K, Kayo H, et al. Phosphorylated STAT3 expression predicts better prognosis in smoldering type of adult T-cell leukemia/lymphoma [J]. *Cancer Sci*, 2019, 110(9): 2982–2991.

[收稿日期] 2020-01-19