

^{60}Co γ 射线照射的小鼠肺上皮MLE-12细胞分泌的外泌体对T淋巴细胞的活化作用

Exosome-mediated T cell activation by mouse lung epithelial MLE-12 cells irradiated with ^{60}Co γ ray

Wang Zhixin, Wang Meiyu, Guo Haoxin, Du Li, Wang Yilong, Yang Zhihua, Zhu Maoxiang

引用本文:

王志鑫, 王美玉, 郭浩鑫, 等. ^{60}Co γ 射线照射的小鼠肺上皮MLE-12细胞分泌的外泌体对T淋巴细胞的活化作用[J]. 国际放射医学核医学杂志, 2023, 47(4): 220-228. DOI: 10.3760/cma.j.cn121381-202304003-00296

Wang Zhixin, Wang Meiyu, Guo Haoxin, et al. Exosome-mediated T cell activation by mouse lung epithelial MLE-12 cells irradiated with ^{60}Co γ ray[J]. *International Journal of Radiation Medicine and Nuclear Medicine*, 2023, 47(4): 220-228. DOI: 10.3760/cma.j.cn121381-202304003-00296

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.3760/cma.j.cn121381-202304003-00296>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

电离辐射诱导的外泌体的生物学效应

Biological effects of radiation-induced exosomes

国际放射医学核医学杂志. 2017, 41(2): 121-125 <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2017.02.008>

γ 射线胸部照射小鼠早期肺组织的免疫细胞反应

Early response of immune-related T cells in the lung tissue of mice exposed to gamma rays in the chest

国际放射医学核医学杂志. 2020, 44(5): 286-290 <https://doi.org/10.3760/cma.j.cn121381-202003038-00025>

PET/CT在结外NK/T细胞淋巴瘤诊治中的应用进展

Application progress of PET/CT in the diagnosis and treatments of extranodal natural killer/T-cell lymphoma

国际放射医学核医学杂志. 2021, 45(12): 789-794 <https://doi.org/10.3760/cma.j.cn121381-202012013-00111>

乏氧微环境下外泌体对肿瘤进展及辐射抵抗的影响

The effect of exosome in hypoxic microenvironment on tumor progression and radioresistance

国际放射医学核医学杂志. 2019, 43(5): 450-455 <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2019.05.012>

以肌无力为首发症状的肺内结外NK/T细胞淋巴瘤PET/CT显像一例

Primary pulmonary extranodal natural killer/T cell lymphoma with myasthenia as the initial sign: a case report of PET/CT imaging

国际放射医学核医学杂志. 2020, 44(2): 125-128 <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2020.02.010>

NICD表达下调对辐射损伤小鼠成骨细胞系MC3T3-E1增殖和功能基因表达的影响

Effects of NICD expression downregulation on the proliferation and function-related gene expression of radiation-damaged MC3T3-E1 cells

国际放射医学核医学杂志. 2018, 42(2): 135-142 <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2018.02.007>

·基础研究·

^{60}Co γ 射线照射的小鼠肺上皮 MLE-12 细胞分泌的外泌体对 T 淋巴细胞的活化作用

王志鑫¹ 王美玉² 郭浩鑫³ 杜丽¹ 王易龙¹ 杨陟华¹ 朱茂祥¹

¹军事科学院军事医学研究院辐射医学研究所, 北京市放射生物学重点实验室, 北京 100850; ²河北大学生命科学院, 保定 071002; ³南华大学公共卫生学院, 衡阳 421001

通信作者: 朱茂祥, Email: zhumx2016@126.com

【摘要】目的 探讨小鼠肺上皮 MLE-12 细胞(简称 MLE-12 细胞)受到 ^{60}Co γ 射线照射后分泌的外泌体介导的 T 细胞活化。**方法** 将 MLE-12 细胞分为对照组和 ^{60}Co γ 射线照射组(2、4、6 和 8 Gy), 采用超速离心法分别从其培养液的上清液中提取外泌体, 应用透射电子显微镜和纳米颗粒跟踪分析技术确定外泌体的形态结构和数量特征, 采用蛋白质印迹法(WB)检测外泌体中溶酶体相关膜蛋白 3(CD63)、四次跨膜蛋白 28(CD81)、肿瘤易感基因 101 蛋白(TSG101)、I 型内质网膜蛋白(Calnexin)的表达, 采用流式细胞术(FCM)检测外泌体表面 I 类主要组织相容性复合体(MHC I)、II 类主要组织相容性复合体(MHC II)、免疫调节蛋白 B7-1(CD80)和免疫调节蛋白 B7-2(CD86)的表达水平。将从小鼠脾脏中分离出来的初始 T 细胞分别与对照组 MLE-12 细胞(简称 NC MLE-12)分泌的外泌体(简称 exo/NC-MLE)、6 Gy γ 射线照射组的 MLE-12 细胞(简称 IR MLE-12)分泌的外泌体(简称 exo/IR-MLE)共培养, 采用 FCM 检测 T 细胞亚群 CD3⁺、CD4⁺和 CD8⁺及其活化指标 T 细胞特定表面糖蛋白 CD28 和早期活化抗原 1(CD69)的变化; 将初始 T 细胞分别与 NC MLE-12、IR MLE-12 和外泌体抑制剂 GW4869 处理组的 MLE-12 细胞共培养, 采用 FCM 检测 T 细胞亚群 CD3⁺、CD4⁺和 CD8⁺及其活化指标 CD28 和 CD69 的变化。2 组间比较采用两独立样本 *t* 检验, 多组间比较采用方差分析法, 组间两两比较采用 Bonferroni 调整法。**结果** MLE-12 细胞分泌的外泌体显示出典型的一面凹陷的茶托样结构, 粒径为 30~150 nm; WB 结果显示, 与 MLE-12 细胞相比, 其外泌体中特异性标志物 CD63、CD81 和 TSG101 高表达, 而阴性标志物 Calnexin 低表达。与对照组相比, 在 6 Gy γ 射线照射后不同时间, 单个 MLE-12 细胞分泌的外泌体数量于 24、48 h 时均增加(*t*=5.36、6.66, 均 *P*<0.05); 在不同剂量 γ 射线照射后 24 h, 单个 MLE-12 细胞分泌的外泌体数量增加的现象具有剂量-效应关系, 在照射剂量为 6、8 Gy 时, 差异均有统计学意义(*t*=4.14、5.67, 均 *P*<0.05)。与 exo/NC-MLE 相比, exo/IR-MLE 中 MHC I、MHC II、CD81 和 TSG101 的表达水平均升高。FCM 结果显示, 与 exo/NC-MLE 相比, exo/IR-MLE 中 MHC I、MHC II、CD80 和 CD86 表达水平均升高(*t*=4.04~6.47, 均 *P*<0.05)。与 exo/NC-MLE 相比, 在与 exo/IR-MLE 共培养的 T 细胞中, CD3⁺、CD4⁺和 CD8⁺ T 细胞均出现增殖现象(*t*=3.08~5.88, 均 *P*<0.05), CD28 和 CD69 表达水平均升高(*t*=3.02~8.65, 均 *P*<0.05); 外泌体抑制剂 GW4869 可以抑制 IR MLE-12 所诱导的 T 细胞活化(*t*=3.64~23.03, 均 *P*<0.05)。**结论** ^{60}Co γ 射线照射后的 MLE-12 细胞分泌的外泌体可以通过抗原呈递激活 T 细胞。

【关键词】 辐射; 肺上皮细胞; 外泌体; T 淋巴细胞; 抗原呈递

DOI: [10.3760/cma.j.cn121381-202304003-00296](https://doi.org/10.3760/cma.j.cn121381-202304003-00296)

Exosome-mediated T cell activation by mouse lung epithelial MLE-12 cells irradiated with ^{60}Co γ ray

Wang Zhixin¹, Wang Meiyu², Guo Haoxin³, Du Li¹, Wang Yilong¹, Yang Zhihua¹, Zhu Maoxiang¹

¹Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medicine, Academy of Military Sciences, Beijing

Key Laboratory for Radiobiology, Beijing 100850, China; ²College of Life Sciences, Hebei University, Baoding 071002, China; ³School of Public Health, University of South China, Hengyang 421001, China

Corresponding author: Zhu Maoxiang, Email: zhuxm2016@126.com

【Abstract】 Objective To evaluate T cell activation driven by exosomes from mouse lung epithelial MLE-12 cells (MLE-12 cells) irradiated with ⁶⁰Co γ ray. **Methods** MLE-12 cells were divided into a control group and a ⁶⁰Co γ irradiation group (2, 4, 6, and 8 Gy), and exosomes were extracted from the supernatant of their culture medium by using ultracentrifugation. Nanoparticle tracking analysis and transmission electron microscope were used to determine the morphological structure and quantity of exosomes. The expression of lysosomal associated membrane protein (CD63), tetraspanin (CD81), tumor susceptibility gene (TSG101), and type I endoplasmic reticulum protein (Calnexin) in exosomes were identified by Western blot (WB). Flow cytometry (FCM) was used to detect the expression of major histocompatibility complex class I (MHC I), major histocompatibility complex class II (MHC II), immune regulatory protein B7-1 (CD80), and immune regulatory protein B7-2 (CD86) on the surface of exosomes. Naive T cells isolated from mouse spleens were cocultured with exosomes (exo/NC MLE) secreted by MLE-12 cells in the control group (NC MLE-12) and exosomes (exo/IR MLE) secreted by MLE-12 cells in the 6 Gy ⁶⁰Co γ irradiation group (IR MLE-12), respectively. FCM was used to detect the changes of T cell subsets CD3⁺, CD4⁺, and CD8⁺ and their activated proliferation indicators T cell specific surface glycoprotein CD28 and early activation antigen 1 (CD69). Naive T cells were incubated with NC MLE-12, IR MLE-12, and MLE-12 cells from exosome inhibitor GW4869-treated groups, respectively. FCM was used to detect the changes of T cell subsets CD3⁺, CD4⁺, and CD8⁺ and their activation indicators CD28 and CD69. Independent samples *t*-test was used for comparison between two groups. Analysis of variance was used to compare multiple groups. Bonferroni adjustment was applied for pairwise comparison between two groups. **Results** The exosomes produced from MLE-12 cells showed a typical saucer-like structure, with a particle size of 30–150 nm. WB results showed that the exosomes specific markers CD63, CD81, and TSG101 were highly expressed in exosomes, but the negative marker Calnexin was low in expression, compared with the MLE-12 cells. Compared with the control group, at different times after 6 Gy γ ray irradiation, the number of exosomes secreted by a single MLE-12 cell increased at 24 and 48 hours ($t=5.36, 6.66$, both $P<0.05$). The phenomenon of an increase in the number of exosomes secreted by a single MLE-12 cell 24 hours after irradiation with different doses of γ rays has a dose-effect relationship, and the difference is statistically significant at doses of 6 and 8 Gy ($t=4.14, 5.67$, both $P<0.05$) after the MLE-12 cells were irradiated with γ ray. The expression levels of MHC I, MHC II, CD81, and TSG101 increased in exo/IR-MLE compared with exo/NC-MLE. FCM results showed that the expression levels of MHC I, MHC II, CD80, and CD86 increased in exo/IR-MLE compared with exo/NC-MLE ($t=4.04-6.47$, all $P<0.05$). Compared with the exo/NC-MLE, in the T cells cocultured with exo/IR-MLE, the CD3⁺, CD4⁺, and CD8⁺ T cells all proliferated ($t=3.08-5.88$, all $P<0.05$), and the expression levels of CD28 and CD69 increased ($t=3.02-8.65$, all $P<0.05$). The exosome inhibitor GW4869 can suppress T cell activation induced by IR MLE-12 ($t=3.64-23.03$, all $P<0.05$). **Conclusion** Exosomes from MLE-12 cells irradiated with ⁶⁰Co γ ray could activate T cells through antigen presentation.

【 Key words 】 Radiation; Alveolar epithelial cells; Exosomes; T-lymphocytes; Antigen presentation

DOI: [10.3760/cma.j.cn121381-202304003-00296](https://doi.org/10.3760/cma.j.cn121381-202304003-00296)

放射疗法是胸部肿瘤的治疗方法之一，其通常会引引起放射性肺损伤(radiation-induced lung injury, RILI)，发生率为5%~20%^[1]。RILI是一个复杂的动态过程，涉及多种细胞、途径和机制^[2-3]。有研究

结果显示，胸部在受到照射后的早期，肺组织会出现明显的免疫失衡现象^[4-5]。我们的前期研究结果显示，辐射损伤的肺上皮细胞可能会刺激树突状细胞的抗原呈递功能进而激活T细胞；在树突状细

胞不存在的情况下, 辐射损伤的肺上皮细胞依旧能活化 T 细胞^[6]。外泌体是具有双层膜结构的细胞外囊泡, 其可以携带信息物质参与细胞间通信。Ikhlas 等^[7]的研究结果显示, 受损的非专职性抗原呈递细胞分泌的外泌体可以参与免疫反应。而 Liu 等^[8]的研究结果显示, 肺组织中的细胞外囊泡主要来源于 II 型肺上皮细胞。我们通过体外模拟肺部微环境中的细胞间通信, 以期发现外泌体参与 RILI 过程的途径, 为 RILI 的临床研究提供新的实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料与仪器

小鼠肺上皮 MLE-12 细胞(简称 MLE-12 细胞)购自美国模式培养物集存库(ATCC)细胞库。无特定病原体级雄性 C57BL/6 WT 小鼠购自北京维通利华实验动物有限公司[动物许可证号: SCXK(京)2021-0006], 6~8 周龄、体重(20±2) g。所有动物实验均在军事科学院军事医学研究院实验动物管理与使用委员会的指导下进行, 本研究经军事科学院军事医学研究院伦理委员会批准(批准文号: IACUC-DWZX-2021-731)。胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自中国四季青公司; RPMI-1640 培养基购自美国 Gibco 公司; 外泌体流式试剂盒购自日本 Wako 公司; EasySep 小鼠初始 T 细胞分离试剂盒购自加拿大 Stemcell 公司; 外泌体抑制剂 GW4869 购自美国 MedChemExpress 公司; 细胞蛋白裂解液和增强型化学发光试剂(ECL)发光液购自美国 Thermo 公司; 外泌体专用裂解液购自中国宇玫博公司; BCA 蛋白质浓度测定试剂盒和牛血清白蛋白(简称 BSA)购自中国翌圣公司; 鼠抗鼠肿瘤易感基因(tumor susceptibility gene, TSG) 101、溶酶体相关膜蛋白 3[别称分化抗原簇(cluster of differentiation, CD) 63] 和四次跨膜蛋白 28(别称 CD81) 抗体购自美国 Santacruz 公司; 兔抗鼠 I 型内质网膜蛋白(Calnexin) 抗体购自中国爱博泰克公司; 兔抗鼠 I 类主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex class I, MHC I) 抗体和兔抗鼠 II 类主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex class II, MHC II) 抗体购自中国碧云天公司; 山羊抗兔免疫球蛋白(immunoglobulin, Ig) G(H+L)-辣根过氧化物酶

(HRP) 和山羊抗小鼠 IgG(H+L)-HRP 购自中国三箭公司; 抗小鼠 MHC I -AF647、早期活化抗原 1(别称 CD69)-BV421 抗体和死细胞染料购自美国 Biolegend 公司; 抗小鼠 MHC II -异硫氰酸荧光素(FITC)、免疫调节蛋白 B7-1(别称 CD80)-PerCP-Cy5.5、免疫调节蛋白 B7-2(别称 CD86)-PE-Cy7、CD3-FITC、CD4-PE-Cy7、CD8-PerCP 和 T 细胞特定表面糖蛋白 CD28-PE 抗体购自美国 BD 公司。FlowJo 10.6.2 软件购自美国 Tree Star 公司; 37℃ 恒温培养箱购自美国 Thermo 公司; CP100NX 超速离心机购自日本 Himac 公司; Zetaview 纳米颗粒跟踪分析仪购自德国 PMX 公司; H-7650 透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM) 购自日本 HITACHI 公司; BD FACS Aria™ II 流式细胞仪购自美国 BD 公司; R2089 型⁶⁰Co γ 射线照射源购自英国维瑞斯公司, 剂量率为 59.09 cGy/min, 位于军事科学院军事医学研究院⁶⁰Co 源照射室。

1.2 细胞培养、照射及外泌体的分离鉴定

照射前 12 h, 将 2×10⁶ 个 MLE-12 细胞接种于含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基的培养皿中, 培养条件为 37℃、5%CO₂, 并将其分为对照组和 γ 射线照射组(2、4、6、8 Gy)。照射后用 PBS 洗涤细胞 2 次, 将培养基改为含有去外泌体(简称 D-exo) 的 10%FBS 的 RPMI-1640 培养基。在 4℃ 条件下, 将 FBS 经 100 000×g(P70AT 转子) 超速离心 18 h, 以去除 FBS 来源的外泌体, 制为 D-exo FBS。

D-exo FBS 培养基培养 MLE-12 细胞 12、24、48 h 后收集其上清液以提取外泌体。上清液经 300×g 离心 10 min 去除细胞, 经 2 000×g 离心 10 min 去除死细胞, 经 10 000×g 离心 30 min 去除细胞碎片。用 0.22 μm 的过滤器过滤以上经过多步离心的培养基。过滤后的培养基经 100 000×g(P70AT 转子) 超速离心 1.5 h 提取外泌体。弃上清, 加入 13 ml PBS 洗涤外泌体, 100 000×g(P40ST 转子) 条件下再次超速离心 1.5 h 沉淀外泌体。上述离心操作均在 4℃ 条件下完成。将外泌体重悬于 100 μl PBS(或适量蛋白裂解液) 中, 用于进一步分析或细胞共培养。

采用 TEM 和蛋白质印迹法(Western blot, WB) 对外泌体进行鉴定。采用纳米颗粒跟踪分析技术(简称 NTA) 测量外泌体的粒径和数量。外泌体流式试剂盒用于间接分析外泌体表面标志物 MHC I、MHC II、CD80 和 CD86。

1.3 初始 T 细胞的分选及与外泌体共培养

使用 EasySep 小鼠初始 T 细胞分离试剂盒从雄性 C57BL/6 WT 小鼠脾脏的单细胞悬浮液中分离 CD3⁺初始 T 细胞。分离细胞结束后,在含有 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基中将 T 细胞浓度调节至 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 。

为了探索外泌体是否激活 T 细胞,将初始 T 细胞分别与 6 Gy γ 射线(依据前期实验室构建的细胞共培养模型,我们选择 γ 射线照射的剂量为 6 Gy^[6])照射组的 MLE-12 细胞(简称 IR MLE-12)产生的外泌体(简称 exo/IR-MLE)和对照组 MLE-12 细胞(简称 NC MLE-12)分泌的外泌体(简称 exo/NC-MLE)共培养 12、24 h,采用流式细胞术(flow cytometry, FCM)检测 T 细胞活化标志物 CD28 和 CD69。

纳米颗粒跟踪分析技术检测外泌体浓度后,将其稀释至 $5 \times 10^9/\text{ml}$ 。将初始 T 细胞以 1×10^6 个/孔接种在 6 孔板中,并与外泌体以 1 : 500 的比例分别共培养 12、24 h。

1.4 初始 T 细胞与 MLE-12 细胞共培养

为了探索抑制外泌体后的 MLE-12 细胞是否不再激活 T 细胞,将初始 T 细胞分别与 IR MLE-12、NC MLE-12 和外泌体抑制剂 GW4869 处理的 MLE-12 细胞共培养。6 Gy γ 射线照射前 12 h,将 MLE-12 细胞以 4×10^5 个/孔接种在 6 孔板中。照射后,将初始 T 细胞和 MLE-12 细胞以 5 : 2 的比例共培养,于 12、24 h 后收集重悬的细胞。外泌体抑制剂 GW4869 处理组在接种 MLE-12 细胞时和共培养期间均给予 GW4869,其浓度为 $10 \mu\text{mol/L}$ 。

1.5 WB 实验

使用 0.25% 的胰蛋白酶消化并收集 MLE-12 细胞,经 PBS 洗涤 2 次后,在 4℃ 条件下, $300 \times g$ 离心 5 min。将适量的细胞蛋白裂解液加入细胞沉淀中并于冰上孵育 15 min。孵育结束后 $120\,000 \times g$ 离心 10 min 以沉淀细胞碎片,并将上清液转移至新管中。使用外泌体专用裂解液从外泌体中提取蛋白质。使用 BCA 蛋白质浓度测定试剂盒检测提取的蛋白质浓度。

转膜结束后,用含 0.5% 牛血清白蛋白的 TBST(Tris Buffered Saline with Tween 20)缓冲液室温(25℃)孵育膜 1 h 以封闭膜上的未结合位点。封闭结束后,4℃ 孵育一抗 12 h。用于检测目标蛋白的一抗为 TSG101(1 : 500 稀释)、CD63(1 : 500

稀释)、CD81(1 : 500 稀释)、Calnexin(1 : 1 000 稀释)、MHC I(1 : 500 稀释)和 MHC II(1 : 1 000 稀释)。一抗孵育结束后,用 TBST 洗涤膜 3 次,每次 10 min。室温下孵育二抗(1 : 4 000 稀释)1 h,二抗孵育结束后,用 TBST 缓冲液洗涤膜 3 次,每次 10 min。使用增强型化学发光试剂(ECL)曝光条带,曝光时间在 5 min 内。

1.6 FCM

用抗小鼠 MHC I -AF647 抗体、抗小鼠 MHC II -FITC 抗体、CD80-PerCP-Cy5.5 抗体和 CD86-PE-Cy7 抗体标记外泌体-免疫磁珠复合物悬液,以检测外泌体表面抗原呈递相关分子 MHC I、MHC II、CD80 和 CD86;用 CD3-FITC 抗体、CD4-PE-Cy7 抗体、CD8-PerCP 抗体、CD28-PE 抗体、CD69-BV421 抗体和死细胞染料标记 T 细胞悬液,以检测 T 细胞表面标志物 CD3、CD4、CD8、CD28 和 CD69。使用流式细胞仪分析细胞,FlowJo 10.6.2 软件分析数据,基于死细胞染料排除死细胞。

1.7 统计学方法

应用 SPSS 19.0 软件对数据进行统计学分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,2 组间比较采用两独立样本 *t* 检验(方差齐),多组间比较采用方差分析法分析,组间两两比较采用 Bonferroni 调整法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MLE-12 细胞分泌的外泌体

TEM 和纳米颗粒跟踪分析技术结果显示,正常 MLE-12 细胞分泌的外泌体具有典型的一面凹陷的茶托样结构,粒径为 30~150 nm(图 1A、1B)。WB 结果显示,与 MLE-12 细胞相比,其外泌体中特异性标志物 CD63、CD81 和 TSG101 高表达,而阴性标志物 Calnexin 低表达(图 1C)。以上研究结果与国际细胞外囊泡协会发布的细胞外囊泡最小鉴定标准^[9]一致。另外,与对照组相比,在 6 Gy γ 射线照射后不同时间(12、24 和 48 h)以及不同剂量 γ 射线(2、4、6 和 8 Gy)照射后 24 h,单个 MLE-12 细胞分泌的外泌体数量于 24、48 h 时均明显增加($t=5.36、6.66$,均 $P < 0.05$,图 1D),且具有良好的剂量-效应关系,在照射剂量为 6、8 Gy 时差异有统计学意义($t=4.14、5.67$,均 $P < 0.05$,图 1E)。

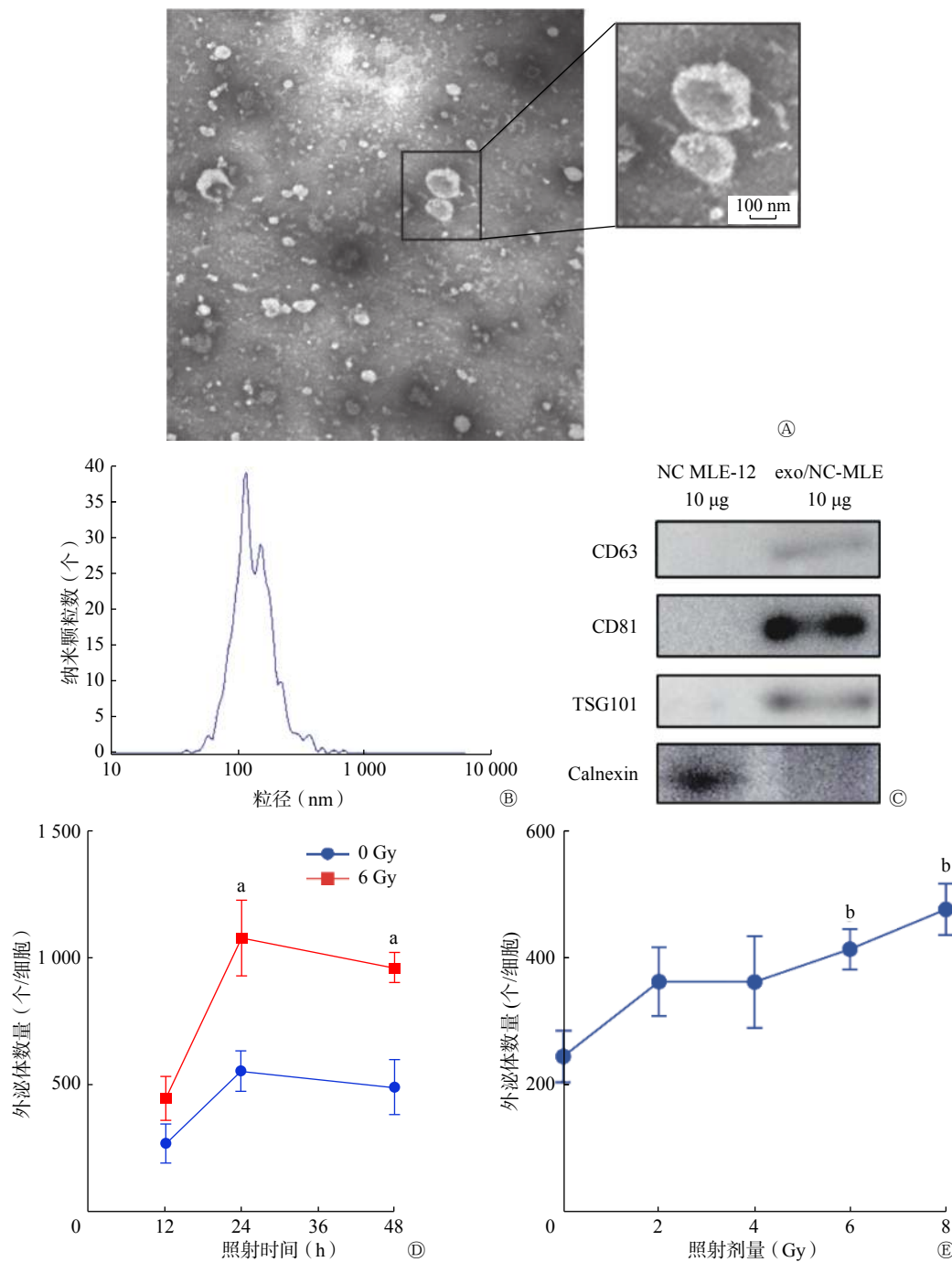


图 1 γ 射线照射前后小鼠肺上皮 MLE-12 细胞分泌的外泌体情况 A 为透射电子显微镜下 NC MLE-12 分泌的外泌体的形态; B 为纳米颗粒跟踪分析技术检测 exo/NC-MLE 的粒径; C 为蛋白质印迹法鉴定的外泌体特异性标志物 (CD63、CD81 和 TSG101) 和阴性标志物 (Calnexin) 的表达情况; D 为 MLE-12 细胞经 0 和 6 Gy γ 射线照射后不同时间 (12、24、48 h) 单个细胞分泌的外泌体数量; E 为不同照射剂量 (0、2、4、6、8 Gy) 照射 MLE-12 细胞后 24 h 单个细胞分泌的外泌体数量。^a 表示与 0 Gy 组比较, 差异均有统计学意义 ($t=5.36、6.66$, 均 $P<0.05$); ^b 表示与 0 Gy 组比较, 差异均有统计学意义 ($t=4.14、5.67$, 均 $P<0.05$)。MLE-12 为一种小鼠肺上皮细胞; NC MLE-12 为对照组 MLE-12 细胞; exo/NC-MLE 为 NC MLE-12 分泌的外泌体; CD63 为溶酶体相关膜蛋白 3; CD81 为四次跨膜蛋白 28; TSG101 为肿瘤易感基因 101 蛋白; Calnexin 为 I 型内质网膜蛋白

Figure 1 Exosomes secreted by mouse lung epithelial MLE-12 cells before and after irradiated with γ ray

2.2 exo/IR-MLE 激活初始 T 细胞

FCM 结果显示, 初始 T 细胞的纯度和活力均 >95% (图 2A、2B), 符合实验需求。与 exo/NC-MLE

相比, exo/IR-MLE 导致 CD3⁺、CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞数量增加 ($t=3.08\sim 5.88$, 均 $P<0.05$, 图 3A)。此外, 在这些 exo/IR-MLE 诱导的 T 细胞及其亚群细

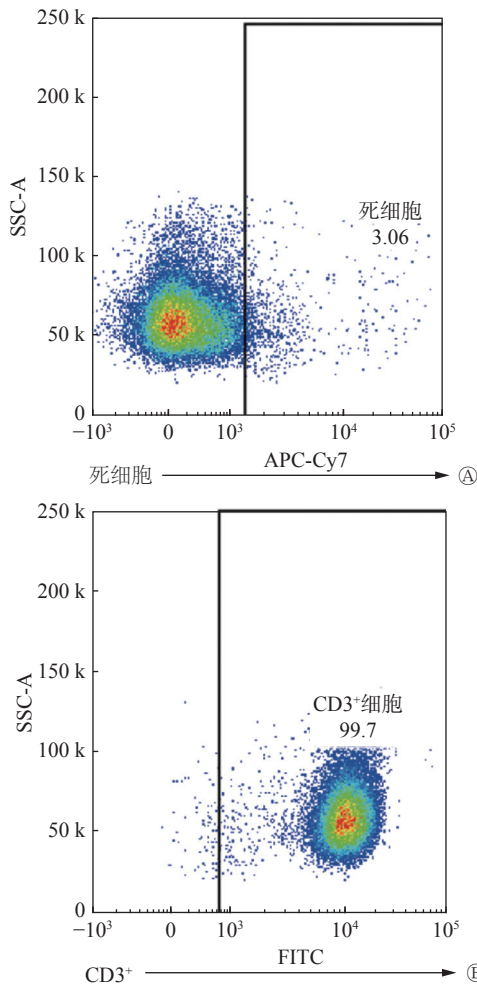


图2 免疫磁珠分选初始T细胞的纯度和活力 A为流式细胞术检测活细胞的百分比；B为流式细胞术检测整个细胞群的纯度。SSC-A为侧向角散射；APC-Cy7为别藻蓝蛋白Cy7复合物；FITC为异硫氰酸荧光素；CD3⁺为T细胞表面特异性标志物

Figure 2 Purity and vitality of naive T cells sorted by immunomagnetic beads

胞中，CD28和CD69的表达水平均升高($t=3.02\sim 8.65$ ，均 $P<0.05$ ，图3B、3C)。结果表明，照射后的MLE-12细胞分泌的外泌体可诱导初始T细胞增殖活化。

2.3 抗原呈递相关分子在exo/IR-MLE中的表达

FCM结果显示，与exo/NC-MLE相比，MHC I、MHC II、CD80和CD86在exo/IR-MLE中的表达水平均升高($t=4.04\sim 6.47$ ，均 $P<0.05$ ，图4A)；WB结果显示，与exo/NC-MLE相比，MHC I和MHC II在exo/IR-MLE中的表达水平均升高(图4B)。因此，受照射细胞的外泌体具有通过抗原呈递直接激活T细胞的能力。

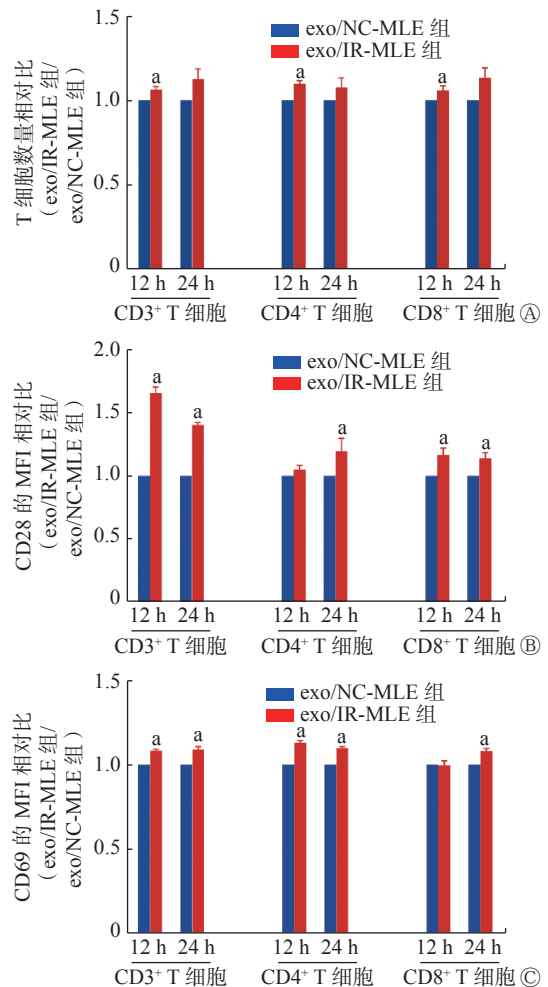


图3 γ 射线照射的小鼠肺上皮MLE-12细胞分泌的外泌体诱导T细胞活化 A为与exo/IR-MLE和exo/NC-MLE共培养后不同时间的CD3⁺T细胞及其亚群CD4⁺和CD8⁺T细胞数量的相对比；B为与exo/IR-MLE和exo/NC-MLE共培养后不同时间的CD3⁺T细胞及其亚群CD4⁺和CD8⁺T细胞中CD28的平均荧光强度的相对比；C为与exo/IR-MLE和exo/NC-MLE共培养后不同时间的CD3⁺T细胞及其亚群CD4⁺和CD8⁺T细胞中CD69的平均荧光强度的相对比。^a表示与exo/NC-MLE组比较，差异均有统计学意义($t=3.02\sim 8.65$ ，均 $P<0.05$)；exo/NC-MLE组的数值设定为1.0。MLE-12为一种小鼠肺上皮细胞；exo/NC-MLE为对照组MLE-12细胞分泌的外泌体；exo/IR-MLE为6 Gy γ 射线照射组MLE-12细胞分泌的外泌体；CD28为T细胞特定表面糖蛋白；CD69为早期活化抗原1；CD3⁺为T细胞表面特异性标志物；CD4⁺为T细胞中的一个亚群；CD8⁺为T细胞中的一个亚群；MFI为平均荧光强度

Figure 3 Activation of T cells by exosomes secreted by mouse lung epithelial MLE-12 cells irradiated with γ ray

2.4 外泌体抑制剂GW4869抑制照射后MLE-12细胞诱导的T细胞活化

外泌体抑制剂GW4869抑制MLE-12细胞分泌外泌体的能力后，结果显示，IR MLE-12引起的CD3⁺、CD4⁺和CD8⁺T细胞的数量增加以及CD28

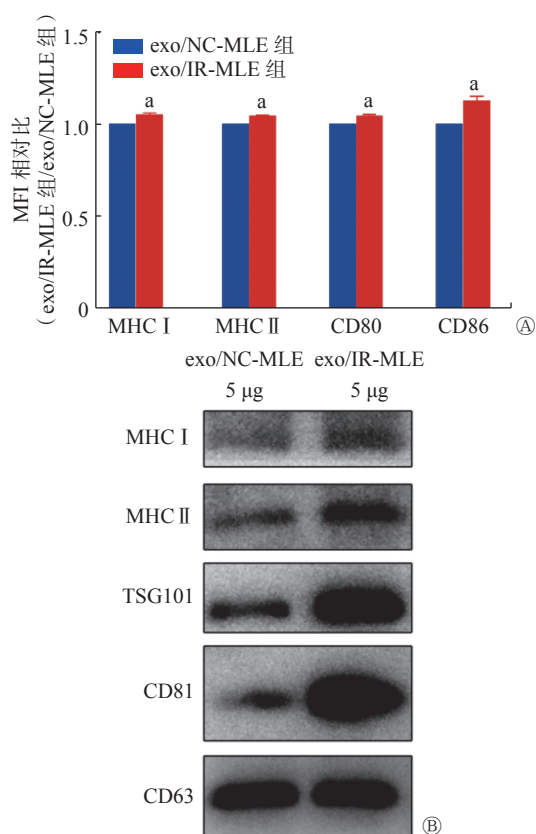


图4 抗原呈递相关分子在 γ 射线照射前后小鼠肺上皮 MLE-12 细胞分泌的外泌体中的表达 A 为 exo/IR-MLE 和 exo/NC-MLE 中抗原呈递相关分子 MHC I、MHC II、CD80 和 CD86 的平均荧光强度的相对比, ^a 表示与 exo/NC-MLE 组比较, 差异均有统计学意义 ($t=4.04\sim6.47$, 均 $P<0.05$), exo/NC-MLE 组的数值设定为 1.0; B 为蛋白免疫印迹法检测 exo/NC-MLE 和 exo/IR-MLE 中特征性分子 CD63、CD81、TSG101 和抗原呈递相关分子 MHC I、MHC II 的表达。MFI 为平均荧光强度; MLE-12 为一种小鼠肺上皮细胞; exo/IR-MLE 为 6 Gy γ 射线照射组的 MLE-12 细胞分泌的外泌体; exo/NC-MLE 为对照组 MLE-12 细胞分泌的外泌体; MHC I 为 I 类主要组织相容性复合体; MHC II 为 II 类主要组织相容性复合体; CD80 为免疫调节蛋白 B7-1; CD86 为免疫调节蛋白 B7-2; TSG101 为肿瘤易感基因 101 蛋白; CD81 为四次跨膜蛋白 28; CD63 为溶酶体相关膜蛋白 3

Figure 4 Expression of antigen presentation related molecules in exosomes secreted by mouse lung epithelial MLE-12 cells before and after irradiated with γ ray

和 CD69 的表达增加 ($t=1.51\sim15.66$, 均 $P<0.05$, 图 5) 的现象均被明显抑制 ($t=3.64\sim23.03$, 均 $P<0.05$), 几乎与 NC MLE-12 细胞处理后的 T 细胞水平相同。上述研究结果显示, 照射后的 MLE-12 细胞通过外泌体的抗原呈递激活 T 细胞。

3 讨论

本研究结果显示, 照射后的 MLE-12 细胞分泌

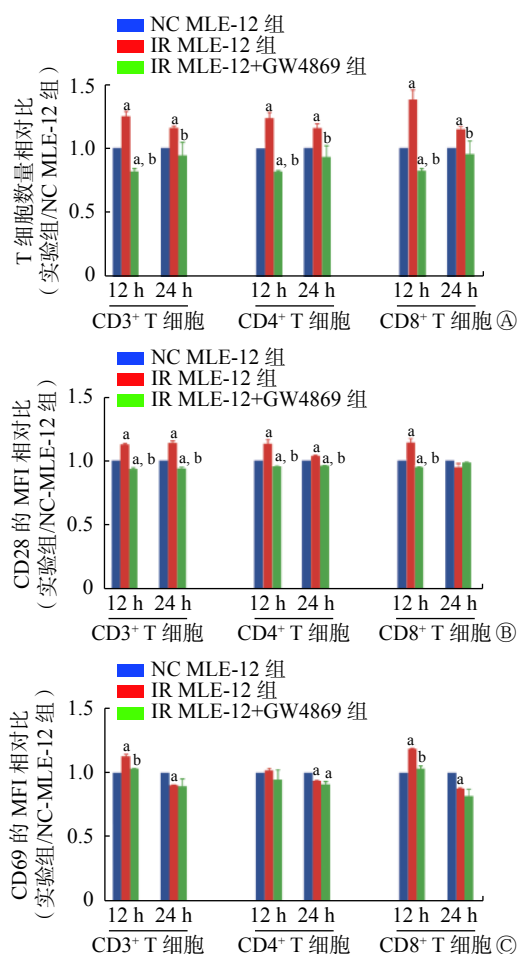


图5 外泌体抑制剂 GW4869 抑制 γ 射线照射后的小鼠肺上皮 MLE-12 细胞诱导的 T 细胞活化 A 为 NC MLE-12 组、IR MLE-12 组和 IR MLE-12+GW4869 组中的 CD3⁺ T 细胞及其亚群 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞数量的相对比; B 为 NC MLE-12 组、IR MLE-12 组和 IR MLE-12+GW4869 组中 CD3⁺ T 细胞及其亚群 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞中 CD28 的平均荧光强度的相对比; C 为 NC MLE-12 组、IR MLE-12 组和 IR MLE-12+GW4869 组中 CD3⁺ T 细胞及其亚群 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞中 CD69 的平均荧光强度的相对比。^a 表示与 NC MLE-12 组比较, 差异均有统计学意义 ($t=1.51\sim15.66$, 均 $P<0.05$); ^b 表示与 IR MLE-12 组比较, 差异均有统计学意义 ($t=3.64\sim23.03$, 均 $P<0.05$); NC MLE-12 组的数值设定为 1.0。MLE-12 为一种小鼠肺上皮细胞; IR MLE-12 为 6 Gy γ 射线照射组的 MLE-12 细胞; NC MLE-12 为对照组 MLE-12 细胞; MFI 为平均荧光强度; CD28 为 T 细胞特定表面糖蛋白; CD3⁺ 为 T 细胞表面特异性标志物; CD4⁺ 为 T 细胞中的一个亚群; CD8⁺ 为 T 细胞中的一个亚群; CD69 为早期活化抗原 1

Figure 5 T cell activation by mouse lung epithelial cells (MLE-12) irradiated with γ ray is suppressed by exosome inhibitor GW4869

的外泌体可以诱导 T 细胞增殖活化, 且 T 细胞表面 CD28 和 CD69 的表达水平均升高。由于 CD28 在 T 细胞活化期间接收第 2 信号参与抗原呈递^[10], 因此我们推测该活化 T 细胞的过程可能与抗原呈

递有关。早期激活指标 CD69 的表达水平在 12 h 时升高,但在 24 h 时降低。Reddy 等^[11]的研究结果显示, T 细胞活化后, CD69 的表达水平首先随着时间的延长而升高,然后出现了显著降低的现象,原因是 CD69 的信号随着细胞增殖而被稀释^[12],与本研究结果一致,即 T 细胞在 12 h 时被激活。上述研究结果表明,照射后的肺上皮细胞可以直接影响 T 细胞的活化,这与 Berg 等^[13]报道的研究结果一致,其证实了 RILI 患者肺组织中存在 T 细胞活化的现象,即机体受到辐射后产生的应激反应会引起免疫反应^[14]。因此 T 细胞活化参与 RILI 的进程,这可能是减缓 RILI 进展的关键潜在治疗靶标。

在共培养实验中, exo/IR-MLE 激活 T 细胞并使其增殖。给予外泌体抑制剂 GW4869 后, T 细胞活化现象受到抑制。同时,我们检测了一些抗原呈递相关分子在外泌体中的变化。与 exo/NC-MLE 相比, exo/IR-MLE 中抗原呈递相关分子 MHC I、MHC II、CD80 和 CD86 表达水平均升高。结果显示,照射后的 MLE-12 细胞可以通过其分泌的外泌体激活 T 细胞,该激活过程可由抗原呈递介导。这一结果与 Kulshreshtha 等^[15]的研究结果相似,他们证明了气道上皮细胞分泌的外泌体可以驱动单核细胞增殖,并增强其趋化性。Admyre 等^[16]的研究结果显示,人类肺泡灌洗液中的外泌体上存在共刺激分子,表明其具有直接调节 T 细胞活化的能力。上述研究结果为研究 T 细胞参与 RILI 的机制提供了新的视角。

此外,我们发现部分外泌体标志物如 TSG101 和 CD81 在 exo/IR-MLE 中的表达水平升高,而 CD63 的表达水平没有明显的变化,这表明外泌体中蛋白质的差异性变化包含更多信息。有研究结果显示,微小 RNA 可以参与 T 细胞功能的调节^[17-18]。作为含有丰富核酸和蛋白质的小囊泡,外泌体具有相同的潜力。因此,未来我们会进一步研究受照射后肺上皮细胞分泌的外泌体中蛋白质和核酸物质的差异变化,这可能为该领域的研究提供新的见解。

综上,我们提出了 RILI 中存在新抗原的可能性的设想。我们假设照射后的肺上皮细胞分泌的外泌体可以激活 T 细胞,进而破坏正常肺上皮细胞并加重辐射诱导的不良影响。外泌体可作为一种抗原呈递亚细胞,携带来源细胞经照射后暴露的内部抗原,即机体以前从未识别过的新抗原,并通过其

本身携带的、与参与抗原呈递相关的共刺激分子,如 MHC I、MHC II、CD80、CD86 等,依赖自身远程递送信息的特性,将抗原传递给初始 T 细胞。而 T 细胞通过自身表面的 T 细胞抗原受体和 CD28 识别抗原信号后发生活化并出现抗原依赖的增殖现象。

本研究的优势在于证明了外泌体作为抗原呈递亚细胞的作用,揭示了 T 细胞抗原依赖性活化参与 RILI 的可能,为今后关于 RILI 的临床研究和治疗提供了新的思路和实验证据,但仍存在局限性。简单的细胞共培养实验不足以完全模拟机体内部环境;关于抗原呈递的所有结论都来自间接而非直接的证据。我们今后的研究方向将着重于 RILI 过程中特异性活化 T 细胞的筛选以及新抗原的鉴定等,同时开展外泌体蛋白质组学分析和测序研究,以期 RILI 的研究提供新的实验证据,为今后治疗 RILI 提供新的实验依据。

综上所述,照射后的 MLE-12 细胞通过外泌体激活 T 细胞,这种激活可被外泌体抑制剂所抑制。同时, MLE-12 细胞经照射后分泌的外泌体中抗原呈递相关分子高表达,这表明激活机制可能是抗原呈递。本研究为 RILI 的产生和发展提供了新证据,并为未来的临床研究提供了新的视角。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明 王志鑫负责实验实施、论文的撰写;王美玉、郭浩鑫负责取材、文献的调研与整理;杜丽负责研究方案可行性的调查分析;王易龙负责实验的设计、论文的修订与审核;杨陟华负责研究思路与方案的设计;朱茂祥负责研究命题的提出、论文的修订与终审

参 考 文 献

- [1] Giuranno L, Ient J, De Ruyscher D, et al. Radiation-induced lung injury (RILI)[J/OL]. *Front Oncol*, 2019, 9: 877[2023-04-02]. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2019.00877/full>. DOI: 10.3389/fonc.2019.00877.
- [2] Zhang ZF, Zhou JL, Verma V, et al. Crossed pathways for radiation-induced and immunotherapy-related lung injury[J/OL]. *Front Immunol*, 2021, 12: 774807[2023-04-02]. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.774807/full>. DOI: 10.3389/fimmu.2021.774807.
- [3] Yan YJ, Fu JM, Kowalchuk RO, et al. Exploration of radiation-induced lung injury, from mechanism to treatment: a narrative review[J]. *Transl Lung Cancer Res*, 2022, 11(2): 307-322.

- DOI: [10.21037/tlcr-22-108](https://doi.org/10.21037/tlcr-22-108).
- [4] Guo TT, Zou LQ, Ni JJ, et al. Regulatory T cells: an emerging player in radiation-induced lung injury[J/OL]. *Front Immunol*, 2020, 11: 1769[2023-04-02]. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.01769/full>. DOI: [10.3389/fimmu.2020.01769](https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01769).
- [5] Cui WC, Zhang P, Hankey KG, et al. AEOL 10150 alleviates radiation-induced innate immune responses in non-human primate lung tissue[J]. *Health Phys*, 2021, 121(4): 331–344. DOI: [10.1097/hp.0000000000001443](https://doi.org/10.1097/hp.0000000000001443).
- [6] 李倩, 耿爽, 鄢成名, 等. DC 细胞在辐射损伤抗原递呈及 T 细胞活化中的作用[J]. *中国辐射卫生*, 2022, 31(6): 657–662, 668. DOI: [10.13491/j.issn.1004-714X.2022.06.003](https://doi.org/10.13491/j.issn.1004-714X.2022.06.003).
- Li Q, Geng S, Yan CM, et al. Antigen presentation and T cell activation by dendritic cells in radiation damage[J]. *Chin J Radiol Health*, 2022, 31(6): 657–662, 668. DOI: [10.13491/j.issn.1004-714X.2022.06.003](https://doi.org/10.13491/j.issn.1004-714X.2022.06.003).
- [7] Ikhlas S, Usman A, Kim D, et al. Exosomes/microvesicles target SARS-CoV-2 via innate and RNA-induced immunity with PIWI-piRNA system[J/OL]. *Life Sci Alliance*, 2022, 5(3): e202101240[2023-04-02]. <https://www.life-science-alliance.org/content/5/3/e202101240>. DOI: [10.26508/lsa.202101240](https://doi.org/10.26508/lsa.202101240).
- [8] Liu BW, Jin Y, Yang JY, et al. Extracellular vesicles from lung tissue drive bone marrow neutrophil recruitment in inflammation[J/OL]. *J Extracell Vesicles*, 2022, 11(5): e12223[2023-04-02]. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jev2.12223>. DOI: [10.1002/jev2.12223](https://doi.org/10.1002/jev2.12223).
- [9] Théry C, Witwer KW, Aikawa E, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines[J/OL]. *J Extracell Vesicles*, 2018, 7(1): 1535750[2023-04-02]. <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/20013078.2018.1535750>. DOI: [10.1080/20013078.2018.1535750](https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1535750).
- [10] Hill GR, Koyama M. Cytokines and costimulation in acute graft-versus-host disease[J]. *Blood*, 2020, 136(4): 418–428. DOI: [10.1182/blood.2019000952](https://doi.org/10.1182/blood.2019000952).
- [11] Reddy M, Eirikis E, Davis C, et al. Comparative analysis of lymphocyte activation marker expression and cytokine secretion profile in stimulated human peripheral blood mononuclear cell cultures: an in vitro model to monitor cellular immune function[J]. *J Immunol Methods*, 2004, 293(1/2): 127–142. DOI: [10.1016/j.jim.2004.07.006](https://doi.org/10.1016/j.jim.2004.07.006).
- [12] Chattopadhyay PK, Roederer M. Good cell, bad cell: flow cytometry reveals T-cell subsets important in HIV disease[J]. *Cytometry A*, 2010, 77A(7): 614–622. DOI: [10.1002/cyto.a.20905](https://doi.org/10.1002/cyto.a.20905).
- [13] Berg J, Halvorsen AR, Bengtson MB, et al. Circulating T cell activation and exhaustion markers are associated with radiation pneumonitis and poor survival in non-small-cell lung cancer[J/OL]. *Front Immunol*, 2022, 13: 875152[2023-04-02]. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.875152/full>. DOI: [10.3389/fimmu.2022.875152](https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.875152).
- [14] 郝婷婷, 耿爽, 孙译文, 等. γ 射线胸部照射小鼠早期肺组织的免疫细胞反应[J]. *国际放射医学核医学杂志*, 2020, 44(5): 286–290. DOI: [10.3760/cma.j.cn121381-202003038-00025](https://doi.org/10.3760/cma.j.cn121381-202003038-00025).
- Xi TT, Geng S, Sun ZW, et al. Early response of immune-related T cells in the lung tissue of mice exposed to gamma rays in the chest[J]. *Int J Radiat Med Nucl Med*, 2020, 44(5): 286–290. DOI: [10.3760/cma.j.cn121381-202003038-00025](https://doi.org/10.3760/cma.j.cn121381-202003038-00025).
- [15] Kulshreshtha A, Ahmad T, Agrawal A, et al. Proinflammatory role of epithelial cell-derived exosomes in allergic airway inflammation[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2013, 131(4): 1194–1203. DOI: [10.1016/j.jaci.2012.12.1565](https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.12.1565).
- [16] Admyre C, Grunewald J, Thyberg J, et al. Exosomes with major histocompatibility complex class II and co-stimulatory molecules are present in human BAL fluid[J]. *Eur Respir J*, 2003, 22(4): 578–583. DOI: [10.1183/09031936.03.00041703](https://doi.org/10.1183/09031936.03.00041703).
- [17] Shahbaz S, Okoye I, Blevins G, et al. Elevated ATP via enhanced miRNA-30b, 30c, and 30e downregulates the expression of CD73 in CD8⁺ T cells of HIV-infected individuals[J]. *PLoS Pathog*, 2022, 18(3): e1010378. DOI: [10.1371/journal.ppat.1010378](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010378).
- [18] Xu YY, Liu ZC, Lv LX, et al. MiRNA-340-5p mediates the functional and infiltrative promotion of tumor-infiltrating CD8⁺ T lymphocytes in human diffuse large B cell lymphoma[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2020, 39(1): 238. DOI: [10.1186/s13046-020-01752-2](https://doi.org/10.1186/s13046-020-01752-2).

(收稿日期: 2023-04-03)



微信公众号



官网二维码



微信服务号(微平台)