

# 朗格汉斯细胞源外泌体负载多肽抗原/佐剂的抗肿瘤效果研究

葛安兴

江苏医药职业学院

DOI:10.12238/bmtr.v7i5.16507

**[摘要]** 朗格汉斯细胞(Langerhans Cells, LCs)作为强效的抗原提呈细胞,其来源的外泌体(Exosomes, Exos)作为细胞间通讯的载体,在肿瘤免疫中发挥重要作用。本研究旨在探讨以HPV16 E6多肽片段(E6)作为宫颈癌肿瘤免疫抗原,以CpG寡聚脱氧核苷酸链(Cytosine-Phosphate-Guanine Oligodeoxynucleotide, CpG ODN)作为免疫佐剂,联合刺激朗格汉斯细胞产生的外泌体(LC-Exos)作为治疗性疫苗,评估其诱导的细胞毒性T淋巴细胞(Cytotoxic T Lymphocyte, CTL)对宫颈癌细胞的杀伤活性及潜在的抗肿瘤效果。通过分离培养人外周血单核细胞,诱导分化为朗格汉斯细胞。然后分别利用PBS(对照组)、HPV16 E6多肽(E组)、CpG ODN(P组)、E6多肽联合CpG ODN(E+P组)刺激LCs。提取上述各组LCs分泌的外泌体。将各组外泌体与自体T细胞共培养,诱导产生特异性CTL。采用MTT法检测各组CTL在不同效靶比下对HPV16阳性宫颈癌细胞株(SiHa)的杀伤活性。以人肝癌细胞株(HepG2)作为非特异性对照靶细胞。计算杀伤率,并进行统计学分析。E+P组CTL对宫颈癌细胞的杀伤率最高,显著高于E组、P组、对照组( $P < 0.01$ )。E组和P组的杀伤率也显著高于对照组( $P < 0.05$ )。随着效靶比的降低,各组CTL的杀伤活性均有所下降,但E+P组在各效靶比下均显示出最优的杀伤效果。HPV16 E6多肽联合CpG ODN刺激的朗格汉斯细胞源外泌体能够有效诱导产生特异性CTL,并对HPV16阳性的宫颈癌细胞表现出较强的、特异性的杀伤效应。

**[关键词]** 宫颈癌; 朗格汉斯细胞; 外泌体; 抗原提呈; 免疫治疗

中图分类号: Q939.91 文献标识码: A

## Antitumor Effect of Langerhans Cell-Derived Exosomes Loaded with Peptide Antigen and Adjuvant

Anxing Ge

Jiangsu Medical College

**[Abstract]** Langerhans cells (LCs) are potent antigen-presenting cells, and their derived exosomes (Exos) contribute to intercellular communication in tumor immunity. This study assessed the therapeutic potential of LC-derived exosomes (LC-Exos) stimulated with the HPV16 E6 peptide fragment (E6) and cytosine-phosphate-guanine oligodeoxynucleotide (CpG ODN). Human peripheral blood mononuclear cells were differentiated into LCs and stimulated with phosphate-buffered saline (control), E6 peptide (E group), CpG ODN (P group), or E6 plus CpG ODN (E+P group). Exosomes were collected and co-cultured with autologous T cells to generate cytotoxic T lymphocytes (CTLs). CTL activity against HPV16-positive cervical cancer cells (SiHa) was measured by MTT assay at different effector-to-target ratios, with HepG2 cells serving as nonspecific controls. CTLs induced by E+P LC-Exos displayed the strongest cytotoxicity, significantly exceeding that of the E, P, and control groups ( $P < 0.01$ ). Both E and P groups also showed greater activity than controls ( $P < 0.05$ ). Although cytotoxicity declined with lower effector-to-target ratios across groups, E+P LC-Exos consistently induced the most potent responses. These findings suggest that LC-Exos stimulated with HPV16 E6 peptide and CpG ODN effectively elicit antigen-specific CTLs with strong and selective activity against HPV16-positive cervical cancer cells, supporting their potential as a novel therapeutic cancer vaccine.

**[Key words]** Cervical cancer; Langerhans cells; Exosomes; Antigen presentation; Immunotherapy

宫颈癌是全球范围内导致女性癌症死亡的主要原因之一,其发生与高危型人乳头瘤病毒(Human Papillomavirus, HPV)的持续感染密切相关,尤其是HPV16和HPV18型<sup>[1]</sup>。尽管预防性HPV疫苗已显著降低了HPV感染率和宫颈癌前病变的发病率,但对于已感染HPV并发展为宫颈癌的患者,治疗手段仍以手术、放化疗为主,亟需更有效、副作用更小的治疗策略。

近年来,治疗性疫苗通过激活患者自身免疫系统来识别和杀伤肿瘤细胞,显示出巨大潜力。朗格汉斯细胞(LCs)作为皮肤和黏膜组织中特有的抗原提呈细胞(Antigen-presenting cells, APCs),在捕获、处理和呈递抗原,启动适应性免疫应答方面发挥着关键作用<sup>[2]</sup>。外泌体(Exos)是由活细胞分泌的直径约30-150nm的细胞外囊泡,富含蛋白质、脂质、RNA等生物活性分子,能介导细胞间通讯<sup>[3]</sup>,APCs来源的外泌体可以携带抗原信息,有效激活T细胞免疫应答。

HPV16 E6蛋白是宫颈癌中重要的癌蛋白,在肿瘤的发生发展中起关键作用,并且是理想的肿瘤特异性抗原靶点<sup>[4]</sup>。CpG寡聚脱氧核苷酸(CpG ODN)作为Toll样受体9(Toll-like Receptor 9, TLR9)的激动剂,是一种强效的免疫佐剂,能够增强固有免疫和适应性免疫应答,促进Th1型免疫反应和CTL的活化<sup>[5]</sup>。

本研究拟构建一种新型的宫颈癌治疗性疫苗,即联合使用HPV16 E6多肽片段和CpG ODN共同刺激朗格汉斯细胞,利用其产生的外泌体作为抗原和佐剂的载体,进而诱导特异性CTLs反应。从而能够更有效地激活针对宫颈癌细胞的免疫杀伤效应,为宫颈癌的免疫治疗提供新的思路和实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞株与主要试剂

HPV16阳性的宫颈癌细胞株(SiHa细胞,购自美国ATCC),人肝癌细胞株(HepG2细胞,购自美国ATCC)。MTT(购自Sigma);重组人GM-CSF、IL-4、TNF- $\alpha$ (购自PeproTech);HPV16 E6多肽片段(纯度>95%);CpG ODN(购自InvivoGen);人淋巴细胞分离液(Ficoll-Paque PLUS,购自GE Healthcare);外泌体提取试剂盒(购自Thermo Fisher)。

### 1.2 朗格汉斯细胞的诱导与培养

分离健康外周血单个核细胞(Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMCs),调整细胞浓度后接种于培养瓶中,2小时后去除未贴壁细胞,获取单核细胞。加入含GM-CSF(100ng/mL)和IL-4(50ng/mL)的RPMI 1640完全培养基(含10%FBS,100U/mL青霉素,100 $\mu$ g/mL链霉素),诱导单核细胞向未成熟树突状细胞分化。培养第5天,加入TNF- $\alpha$ (20ng/mL)诱导其向成熟朗格汉斯样细胞分化。

### 1.3 朗格汉斯细胞源外泌体的制备

将成熟的LCs分为四组进行刺激:对照组(Contrall-Exo):加入PBS。E组(E6-Exo):加入HPV16 E6多肽(终浓度10 $\mu$ g/mL)。P

组(CpG-Exo):加入CpG ODN(终浓度5 $\mu$ g/mL)。E+P组(E6+CpG-Exo):同时加入HPV16 E6多肽(10 $\mu$ g/mL)和CpG ODN(5 $\mu$ g/mL)。刺激24小时后,收集细胞培养上清。使用外泌体提取试剂盒提取外泌体,BCA法测定蛋白浓度。外泌体的鉴定可通过Nanosight技术分析粒径分布。

### 1.4 CTL的诱导与培养

取自体分离PBMCs后剩余细胞,进一步纯化T淋巴细胞(尼龙毛柱分离法)。将T细胞( $1 \times 10^6$ cells/mL)与上述四组不同来源的外泌体(蛋白浓度20 $\mu$ g/mL)在含IL-2(20U/mL)的RPMI 1640完全培养基中共培养。培养7天后,收集效应细胞(CTLs)。同时,未经任何外泌体诱导的自体T细胞作为初始型T细胞组(T0组)。

### 1.5 CTL杀伤活性检测

#### 1.5.1 实验分组与铺板

取96孔细胞培养板,每孔接种宫颈癌细胞株(SiHa)细胞,置于37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>细胞培养箱中孵育6小时。收集1.4中制备的各组CTLs(对照组来源CTL、E组来源CTL、P组来源CTL、E+P组来源CTL)及T0组细胞。调整各组效应细胞浓度,分别按照效靶细胞比(E:T ratio)40:1、20:1和10:1加入到已贴壁的SiHa细胞孔中。设以下对照组:肿瘤细胞对照组:只含靶细胞和培养液。效应细胞对照组:只含相应浓度的效应细胞和培养液,不含靶细胞。取各组CTLs(对照组、E组、P组、E+P组)与人肝癌细胞株(HepG2)按效靶比40:1接种于96孔细胞培养板,作为非特异性杀伤对照。每组设3个复孔。

#### 1.5.2 杀伤率计算

MTT检测后,计算杀伤率。杀伤率(%)=[1-(实验组OD值-效应细胞对照组OD值)/(肿瘤细胞对照组OD值-培养基空白OD值)] $\times$ 100%。

### 1.6 统计学分析

所有数据采用均数 $\pm$ 标准差( $\pm$ S)表示。采用GraphPad Prism软件进行数据分析。多组间比较采用单因素方差分析(ANOVA),以P<0.05为差异具有统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 外泌体特性

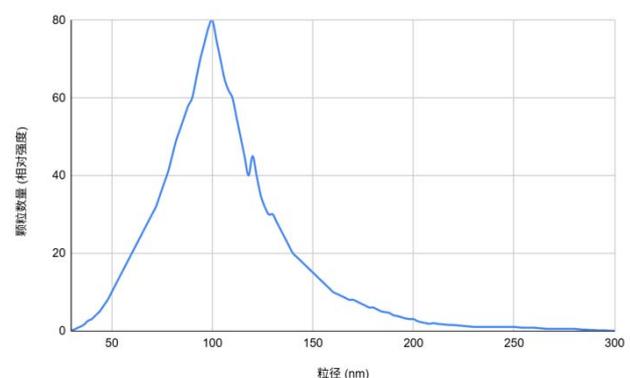


图1 朗格汉斯细胞源外泌体粒径分布曲线

纳米颗粒追踪分析 (NTA) 显示, 外泌体粒径主要分布在 50-150nm, 呈现高斯分布特征, 峰值约为 100nm (图1), 外泌体浓度约为  $1.2 \times 10^{10}$  particles/mL, 符合外泌体的大小分布。

## 2.2 HPV E6+CpG-Exo诱导的CTL对宫颈癌细胞的杀伤活性最强

为了评估不同外泌体诱导的CTL对宫颈癌细胞 (SiHa) 的杀伤效果, 对 SiHa细胞的杀伤活性结果如表1和图2所示。在40:1 效靶比下, E+P组CTL杀伤率最高, 显著高于E组 ( $P < 0.01$ )、P组 ( $P < 0.01$ )、对照组 ( $P < 0.01$ ) 和T0组 ( $P < 0.01$ )。20:1和10:1效靶比下, E+P组杀伤率分别为  $49.73\% \pm 1.78$  和  $34.85\% \pm 1.25$ , 仍显著高于其他组 ( $P < 0.05$ )。

表1 各组CTL对SiHa细胞的杀伤率 (%)

Group	40:1	20:1	10:1
T0	$4.32 \pm 0.15$	$2.68 \pm 0.13$	$1.54 \pm 0.13$
Control	$8.15 \pm 0.29$	$6.84 \pm 0.24$	$4.29 \pm 0.15$
E	$35.43 \pm 1.27$	$24.62 \pm 0.88$	$15.27 \pm 0.55$
P	$29.67 \pm 1.06$	$20.45 \pm 0.73$	$10.18 \pm 0.36$
E+P	$65.28 \pm 2.34$	$49.73 \pm 1.78$	$34.85 \pm 1.25$

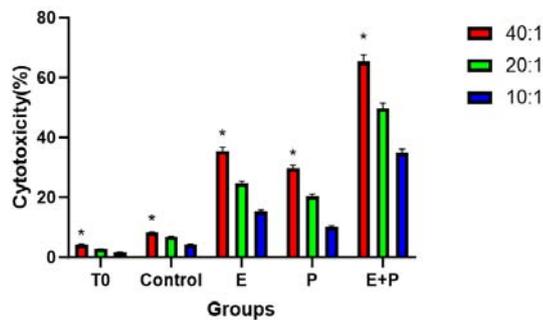


图2 各组CTL对SiHa细胞的杀伤率 (%) (Mean ± SEM)

## 2.3 CTL对宫颈癌细胞的杀伤活性呈效靶比依赖性和特异性

在不同的效靶比 (40:1, 20:1, 10:1) 下, 所有经外泌体诱导的CTL组均显示出对SiHa细胞的杀伤活性, 并且这种杀伤活性随着效靶比的降低而减弱。为了验证CTL杀伤的特异性, 我们将各组CTL (在效靶比40:1时) 与HPV阴性的人肝癌细胞株HepG2共培养。结果显示, 所有实验组 (对照组、E组、P组、E+P组) 对HepG2细胞的杀伤率均非常低。

## 3 讨论

本研究旨在探索一种基于朗格汉斯细胞源外泌体的新型治疗性疫苗策略, 通过负载HPV16 E6肿瘤抗原和CpG ODN免疫佐剂, 评估其诱导CTL介导的抗宫颈癌免疫反应的潜力。结果显示, 负载了HPV16 E6多肽和CpG ODN的LC源外泌体 (E+P组) 能够最有效地诱导CTL产生, 并对HPV16阳性的宫颈癌细胞SiHa表现出强劲的杀伤活性, 这一杀伤作用具有明显的效靶比依赖性。单独使用E6多肽 (E组) 或CpG ODN (P组) 刺激LC产生的外泌体也能诱导一

定程度的CTL杀伤效应, 但效果均弱于联合应用组。这提示HPV16 E6抗原的呈递和CpG ODN的佐剂效应在外泌体疫苗介导的免疫激活中具有协同增强作用。

HPV16 E6多肽作为特异性抗原, 其被LCs摄取并加工后, 相关的抗原表位能够通过外泌体传递给T细胞, 从而启动抗原特异性的CTL反应。CpG ODN作为TLR9激动剂, 能激活LCs, 促进其成熟和细胞因子的分泌, 增强其抗原呈递能力, 并促进Th1型免疫应答和CTL的分化与活化。当两者结合时, 外泌体作为一个集成的信号单元, 能够更有效地将抗原信号和共刺激信号传递给T细胞, 从而产生更强的免疫应答。

本研究还发现, 这些诱导产生的CTL对HPV16阴性的人肝癌细胞株HepG2的杀伤活性很低, 表明该疫苗策略诱导的CTL反应具有良好的肿瘤抗原特异性, 这对于减少免疫治疗的脱靶效应至关重要。与传统的疫苗策略 (如肽疫苗、DC疫苗) 相比, 基于外泌体的疫苗具有其独特优势<sup>[6]</sup>。

但是本次研究的体外结果仍存在一些局限性。第一, 本研究仅使用了单一的宫颈癌细胞株, 未来需要扩展到更多不同HLA分型的宫颈癌细胞株甚至原代肿瘤细胞进行验证。第二, 本研究主要集中于CTL的杀伤活性检测, 而外泌体疫苗诱导的免疫反应是复杂的, 涉及多种免疫细胞和细胞因子网络的调控, 其具体机制有待进一步深入。另外, 本实验为体外研究, 其在体内的抗肿瘤效果及安全性需要在动物模型中进一步验证, 这也是我们后续研究的重点方向。

本次研究表明, 联合HPV16 E6多肽和CpG ODN刺激的朗格汉斯细胞来源的外泌体, 能够有效诱导产生对HPV16阳性宫颈癌细胞具有高度特异性和强大杀伤活性的CTL。这一策略为开发安全有效的宫颈癌治疗性疫苗提供了一种有前景的新途径, 值得进一步的体内实验研究和临床转化探索。

## [基金项目]

2021年盐城市医学科技发展计划项目 (普通项目) “朗格汉斯细胞外泌体对宫颈癌细胞免疫作用研究” (YK2021098)。

## [参考文献]

[1] Feixue Wei, Damien Georges, Irene Man, et al. Attribution of human papillomavirus genotypes to invasive cervical cancer worldwide: a systematic analysis of the global literature[J]. Lancet, 2024, 404(10451): 435-444.

[2] Thi Viet Trinh Dang, Kevin R Gillinder, Quan Nguyen, et al. Squamous cell carcinoma is associated with reduced IL34 expression, alterations in the Langerhans cell antigen-processing-presentation machinery and poor patient survival[J]. Clin Transl Immunology, 2024, 13(12): e70018.

[3] Florencia Menay, Federico Cocozza, Maria J Gravisaco, et al. Extracellular vesicles derived from antigen-presenting

cells pulsed with foot and mouth virus vaccine-antigens act as carriers of viral proteins and stimulate B cell response [J].Front Immunol,2024,15:1440667.

[4]Ashish Kumar.Human papillomavirus-16 E6-positive cervical cancer attenuated by potent 2-(4-biphenyl)-N-(1-ethyl-4-piperidyl) acetamide second-generation analogs with improved binding affinity[J].Biotechnol Appl Biochem, 2024,71(6):1428-1439.

[5]Yanqin Du,Mengxiao Zhao,Xiaoqing Zeng,et al.Regulato

ry T cells suppress TLR9-induced formation of intrahepatic myeloid-cell aggregates for T cell population expansion in liver[J].Med Microbiol Immunol,2025,214(1):24.

[6]Zelan Dai, Ruiru Cai, Hong Zeng,et al.Exosome may be the next generation of promising cell-free vaccines[J].Hum Vaccin Immunother,2024,20(1):2345940.

**作者简介：**

葛安兴(1988--),男,汉族,山东日照人,硕士,江苏医药职业学院讲师,从事宫颈癌生物治疗研究工作。