

热应激小鼠肝癌细胞(H₂₂)源 Exosomes 的 抗肿瘤免疫机制

孙迪 杨麟 沈宜[△] 汪少华 向自武

(重庆医科大学基础医学院病理生理学教研室 重庆 400016)

【摘要】 目的 制备小鼠肝癌细胞(H₂₂)源 Exosomes 及热应激小鼠肝癌细胞(H₂₂)源 HS-Exo (heat stressed Exosomes, HS-Exo),研究其对小鼠可能的抗肿瘤免疫机制。**方法** 用超速分级离心和蔗糖密度梯度离心纯化获得 Exosomes 及 HS-Exo,透射电镜观察其形态。以 Exosomes 为对照,观察 HS-Exo 的蛋白组分、产量及其激发宿主抗肝癌免疫应答效应,用 Western blot 方法检测两者所含有的相关蛋白情况。用 MTT 法检测免疫小鼠脾细胞增殖和脾淋巴细胞的细胞毒活性。用免疫组化法检测经两者免疫后小鼠肿瘤组织中 CD4⁺、CD8⁺ 淋巴细胞浸润情况。**结果** HS-Exo 与 Exosomes 形态相似,HS-Exo 所含的重要免疫蛋白表达增加($P<0.05$),用 HS-Exo 免疫小鼠后比用 Exosomes 免疫小鼠能更有效地抑制肿瘤生长,更好地诱导淋巴细胞增殖,更显著增强小鼠脾淋巴细胞的细胞毒活性以及更明显的肿瘤治疗作用($P<0.05$)。**结论** 热应激制备 HS-Exo 的方法具有可行性,HS-Exo 比 Exosomes 具有更强的免疫活性和肿瘤治疗作用。

【关键词】 Exosomes; 小鼠肝癌细胞(H₂₂); HS-Exo; 肿瘤免疫

【中图分类号】 R 363 **【文献标志码】** A

The mechanism of immune antitumor effect of HS-Exo derived from heat stressed mouse hepatoma cell line (H₂₂)

SUN Di, YANG Lin, SHEN Yi[△], WANG Shao-hua, XIANG Zi-wu

(Department of Pathophysiology, College of Basic Medicine, Chongqing University, Chongqing 400016, China)

【Abstract】 Objective To prepare Exosomes secreted by mouse hepatoma cell (H₂₂) and heat stressed Exosomes (HS-Exo) derived from heat stress-treated mouse hepatoma cell (H₂₂), in order to study the possible anti-tumor immune mechanism. **Methods** Exosomes and HS-Exo were purified by serial ultracentrifugation and sucrose density gradient centrifugation, and were observed and identified by electron microscope. The components and production of the protein and the effects of the host immune response against hepatocellular carcinoma of HS-Exo were observed by using Exosomes as the control. Their immunological factors were detected by Western blot. Lymphocyte proliferation and specific cytotoxic activity of mouse splenic cells were determined by MTT. CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes infiltration in mouse tumor tissues immunized by both were analysed by immunohistochemical staining. **Results** HS-Exo was similar in morphology to the Exosomes, the important immune-related protein expressed in HS-Exo was increased ($P<0.05$). HS-Exo immunized mouse group showed more effective inhibition of tumor growth, better-induced lymphocyte proliferation, more significantly enhanced the cytotoxic activity of spleen lymphocytes, as well as a more prominent role in tumor therapy than Exosomes immunized mouse control group ($P<0.05$).

Conclusions Heat stress treatment method for the preparation of HS-Exo was feasible. HS-Exo had a stronger role in the immuneactivity and tumor treatment than control Exosomes.

【Key words】 Exosomes; mouse hepatoma cell (H₂₂); heat stressed Exosomes; tumor immunity

研究发现 Exosomes 具有免疫调节能力,是能产生有效抗肿瘤效应的生物活性分子^[1-4]。树突状细胞(DC)、肿瘤细胞等都能分泌这类膜性的囊泡^[2,5],抗原递呈细胞分泌的 Exosomes 由于具有潜在的免疫调节功能,因而受到了广泛的关注^[6]。肿瘤来源的 Exosomes 富含热休克蛋白及肿瘤共同抗原,是一种新型的肿瘤排斥抗原的来源,同样引起了人们的广泛兴趣^[5]。但仅仅 Exosomes 自身的免疫调节作用是有限的,进一步增强 Exosomes 的活性及其抗肿瘤作用成为研究的热点之一。已有文献报道对肿瘤细胞来源的 Exosomes 进行基因修饰和蛋白锚定以及增加佐剂 ODN CpG 可进一步提高 Exosomes 的生物效应^[7-10]。

Exosomes 中含有的热休克蛋白以其具有的免疫佐剂效应和提高肿瘤细胞免疫原性的作用在 Exosomes 的抗肿瘤过程中发挥重要作用。热应激处理可启动热休克蛋白基因,选择性高表达热休克蛋白。为了提高 Exosomes 中热休克蛋白等的产量,增强其活性及抗肿瘤作用,我们应用小鼠肝癌细胞株 H₂₂ 制备 Exosomes 及经热应激作用制备 HS-Exo(heat stressed Exosomes),对照研究 HS-Exo 更优越的生物学特性、免疫学功能及抗肿瘤免疫效果,通过 BALB/c 荷瘤小鼠体内实验对照观察 HS-Exo 更显著的激发宿主抗肝癌免疫应答效应的影响,并探讨相关的免疫学机制。希冀通过热应激处理制备 HS-Exo,为进一步提高 Exosomes 的蛋白产量、活性和生物效应提供新的思路和方法。

材料和方 法

主要试剂和仪器 重水(青岛腾龙微波科技有限公司),分析纯蔗糖(国药集团化学试剂公司),预染蛋白质分子量标准(Marker),BeyoECL 荧光检测试剂(碧云天生物技术研究所),PVDF 膜(Millipore 公司),兔抗小鼠热休克蛋白 70(HSP70)、热休克蛋白 60(HSP60)、细胞间黏附分子-1(ICAM-1)(武汉博士德),兔抗小鼠热休克同源蛋白 70(HSC70, Santa Crus 公司),辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG(北京中杉金桥),小鼠淋巴细胞分离液(天津 TBD),大鼠抗小鼠 CD4⁺、CD8⁺ 单克隆抗体(Santa Crus 公司)。酶标仪(Bio-Rad 2500 型,美国),冷冻超速离心机 H-80B(日立公司)。

细胞株与实验动物 细胞:H₂₂细胞(小鼠肝癌细胞系),本教研室保存,复苏后使用。实验动物:

BALB/c 小鼠(H-2d),雌性,6~8 周龄,(20±2)g,购于重庆医科大学实验动物中心,养于清洁级饲养室。

Exosomes 及 HS-Exo 的制备 采用文献^[11,12]所述方法经超速分级离心和蔗糖密度梯度离心纯化分别得到 Exosomes 及 HS-Exo。分别取未经热休克 H₂₂ 细胞及经热休克 H₂₂ 细胞上清液,300 r/min 低温离心(4℃)10 min 去除细胞,800 r/min 低温离心 30 min 去除细胞碎片得上清液,10 000 g 低温离心 30 min 取上清液,100 000 g 低温超速离心 1 h 收集沉淀并重悬于 PBS 12 mL;90 000 g 低温超速离心 75 min 去除与 Exosomes 质量相近的细胞碎片;收集上清液并将其缓慢加到含有 300 g/L 蔗糖的重水垫之上,勿混合,形成分层的密度梯度,100 000×g 低温超速离心 50 min,收集离心管底部的重水缓冲垫用 10 mL PBS 稀释,100 000×g 低温超速离心 1 h,收集沉淀重悬于 PBS,总共约 2 mL,-80℃ 保存。

电镜观察 由重庆医科大学电镜教研室完成。

蛋白定量测定(Bradford 法) 采用文献^[11,12]所述步骤进行蛋白定量测定。

Western blot 分析^[13] 采用 5% 的浓缩胶、10% 分离胶。各取 30 μg 上样,进行蛋白凝胶电泳。蛋白质转膜,加入一抗,常规封闭,4℃ 过夜。加入二抗,室温结合 2 h。加入显色剂,显影定影后观察结果,采用 Quantity One 软件对图像进行光密度分析。

H₂₂ 源的 Exosomes 及 HS-Exo 对荷瘤小鼠的免疫保护作用 BALB/c 30 只小鼠随机分成两组(15 只/组):Exosomes 免疫组与 HS-Exo 免疫组。每组小鼠左后腿根部皮下分别注射 H₂₂ 肿瘤细胞来源的 Exosomes 及 HS-Exo,10 μg/100 μL/只,间周 1 次,共免疫 3 次。最后 1 次免疫后的第 7 天,每组分别各取 6 只小鼠脾细胞用于脾细胞增殖试验和细胞毒性试验;并且将其余的每只小鼠右腋皮下接种 5×10⁵ 个 H₂₂ 肿瘤细胞。每 2 天对每只小鼠是否出现肿瘤及出现后肿瘤大小的变化进行观察测量,用游标卡尺测量肿瘤大小,肿瘤体积以公式 V = ab²/2 计算,并记录小鼠的生存时间。当肿瘤直径达 3 cm 时处死小鼠,在统计生存率时将当日记为死亡日期。

免疫小鼠脾细胞增殖试验和细胞毒性试验^[13,14]

免疫小鼠脾细胞的制备^[14] 用小鼠淋巴细胞分离液按常规方法操作,分离得到脾淋巴细胞,用含

10% 新生小牛血清的 RPMI 1640 完全培养液重悬,计数细胞,并调整浓度至 1×10^6 个/mL。

免疫小鼠脾细胞增殖试验 将 Exosomes 组和 HS-Exo 组小鼠脾细胞悬液分别加入 96 孔圆底细胞培养板中,后置于 37 °C,5%CO₂ 孵箱中培养,加二甲亚砜(DMSO),用酶标检测仪测得每孔 570 nm D 值。刺激指数(stimulation index,SI)表示淋巴细胞的增殖程度,SI>1 说明具有增殖作用。(该实验重复 3 次,取其均值计算)。

计算公式:刺激指数(SI) = 刺激检测组 D 值/阴性细胞对照组 D 值。

免疫小鼠脾细胞细胞毒性试验 靶细胞(对数生长期的 H₂₂ 细胞)及效应细胞(同上免疫小鼠脾细胞的制备),计数并分别将之调整成 4 个细胞浓度梯度为 1×10^7 个/mL、 5×10^6 个/mL、 2.5×10^6 个/mL 和 1.25×10^6 个/mL;将各组细胞分别置入 96 孔圆底培养板中,每组 3 个复孔。细胞毒性试验具体方法见表 1。

表 1 MTT 法测脾细胞细胞毒试验各组成分

Tab 1 Specific cytotoxic activity by MTT (μ L)

Group	Target cells	Effector cells	RPMI 1640
Blank control	—	—	200
Target cells control	100	—	100
Effector cells control	—	100	100
Experimental	100	100	—

将培养板置于 37 °C、5%CO₂ 孵箱中培养,加 DMSO,用酶标检测仪测得每孔 570 nm 时的 D 值。实验重复 3 次,取其均值计算。

计算公式:杀伤率(%) = $[1 - (\text{实验组 } D \text{ 值} - \text{效应细胞 } D \text{ 值}) / \text{靶细胞对照组 } D \text{ 值}] \times 100\%$ 。

免疫组织化学法测定肿瘤组织中 CD4⁺、CD8⁺ 的表达 采用即用型 SP 免疫组化法,滴加大鼠抗小鼠 CD4⁺、CD8⁺ 一抗,滴加生物素标记兔抗大鼠 IgG 二抗,加 AEC 显色剂显色,普通光镜下观察,图像分析系统采集图像。

统计学处理 用 SPSS 10.0 统计软件包作数据处理,所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,计量资料采用 *t* 检验,方差分析;计数资料采用卡方检验。*P*<0.05 认为差异有统计学意义。

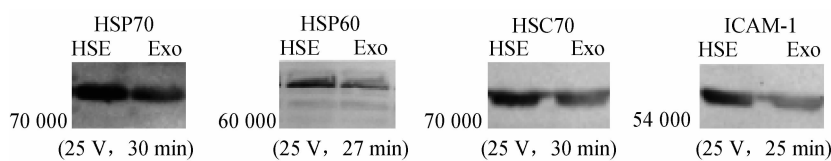


图 2 Western blot 检测相同蛋白上样量的 HS-Exo 及 Exosomes 中 HSP70、HSP60、HSC70、ICAM-1 蛋白表达的情况

Fig 2 The expressions of HSP70, HSP60, HSC70 and ICAM-1 in HS-Exo and Exosomes detected by Western blot

结 果

H₂₂细胞源 Exosomes 及 HS-Exo 的电镜观察

Exosomes 及 HS-Exo 均呈圆形或椭圆形,多个大小不一、外包裹着被膜的囊泡,直径约为 20~90 nm,中心可见为低密度光亮区,常聚集成群(图 1)。

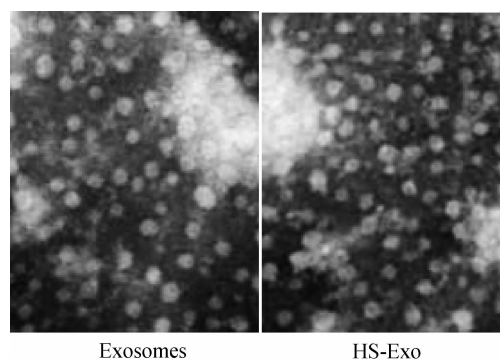


图 1 Exosomes 及 HS-Exo 的形态学特点(TEM×105 000)

Fig 1 Morphological characteristics of H₂₂ cell-derived Exosomes and HS-Exo (TEM×105 000)

蛋白定量测定(Bradford 法) 根据实验所得数据作 BSA 蛋白标准曲线。根据标准曲线得出的公式: $y = 0.006x + 0.009$,分别算出相应的蛋白量,Exosomes 的平均浓度为 (1.13 ± 0.13) mg/mL; HS-Exo 的平均浓度为 (1.23 ± 0.06) mg/mL。HS-Exo 蛋白产量明显增多,经两组间 *t* 检验,差异有统计学意义(*P*<0.05)。

Western blot 分析 Exosomes 及 HS-Exo 的蛋白上样量相同的情况下,两者均表达 HSP70、HSP60、HSC70 和 ICAM-1(表 2),且在 HS-Exo 中以上条带均比在 Exosomes 中加宽、颜色加深(图 2),通过 Quantity One 软件进行光密度分析(表 3),差异有统计学意义(*P*<0.05,图 3)。

表 2 HS-Exo 及 Exosomes 中 HSP70、HSP60、HSC70 和 ICAM-1 蛋白表达的情况

Tab 2 The expression of HSP70, HSP60, HSC70 and ICAM-1 in HS-Exo or Exosomes ($\bar{x} \pm s$,mg/mL)

Group	HSP70	HSP60	HSC70	ICAM-1
HS-Exo ⁽¹⁾	31.13 ± 0.89	20.77 ± 0.78	25.73 ± 0.66	22.19 ± 0.79
Exo	26.81 ± 0.62	17.90 ± 0.36	21.25 ± 0.84	19.76 ± 0.48

vs Exo group, *P*<0.05

表3 HS-Exo及Exosomes中HSP70、HSP60、HSC70和ICAM-1的光密度值

Tab 3 The band density of HSP70, HSP60, HSC70 and ICAM-1 in HS-Exo or Exosomes ($\bar{x} \pm s$)

Group	HSP70	HSP60	HSC70	ICAM-1
HS-Exo ⁽¹⁾	270 715.7 ± 521.2	88 399.95 ± 332.7	160 899.4 ± 411.9	134 960.1 ± 385.5
Exo	198 401.2 ± 446.6	53 523.28 ± 298.3	86 441.12 ± 329.4	68 883.24 ± 345.1

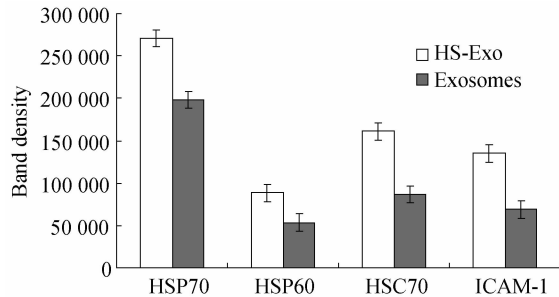
⁽¹⁾ $P < 0.05$, vs Exo

图3 HS-Exo及Exosomes中HSP70、HSP60、HSC70和ICAM-1的光密度情况

Fig 3 The band density of HSP70, HSP60, HSC70 and ICAM-1 in HS-Exo or Exosomes

保护性免疫反应 HS-Exo免疫小鼠组比对照Exosomes免疫小鼠组更有效的抑制了肿瘤的生长($P < 0.05$)。从各组肿瘤生长的情况来看:HS-Exo组小鼠肿瘤生长缓慢,Exosomes组、HS-Exo组在第22天小鼠肿瘤平均体积分别为 4.3346 cm^3 、 2.5122 cm^3 ,测量肿瘤的长径和短径,计算肿瘤大小,绘制免疫保护实验荷瘤鼠生长曲线(图4)。采用SPSS 10.0软件对各时间点进行配对 t 检验, $P < 0.05$,差异有统计学意义。

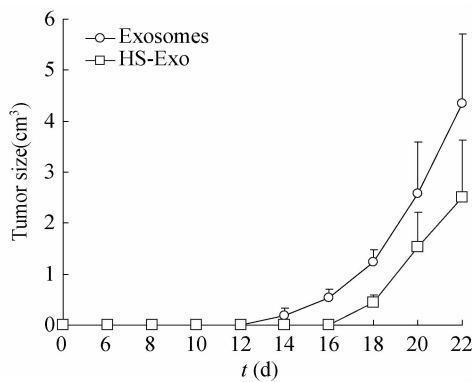


图4 免疫保护实验荷瘤小鼠肿瘤生长曲线

Fig 4 Tumor growth curve in protective immunity

免疫小鼠脾细胞增殖试验和细胞毒性试验

小鼠脾淋巴细胞增殖的检测 各实验组的SI均大于1,HS-Exo刺激组中Exosomes、HS-Exo两种免疫小鼠的脾细胞的SI均大于Exosomes对照组,并且在一定范围内,增殖效应随着剂量浓度的增加而增强(图5)。两者差异有统计学意义($P < 0.05$)。

小鼠脾淋巴细胞细胞毒性试验检测 小鼠脾细

胞细胞毒活性随效靶比的上升而逐渐提高。HS-Exo小鼠免疫组在效靶比为12.5:1、25:1、50:1、100:1时肿瘤细胞杀伤率均高于Exosomes对照组,同一效靶比两组间均数采用LSD- t 检验,差异有统计学意义($P < 0.05$,图6)。

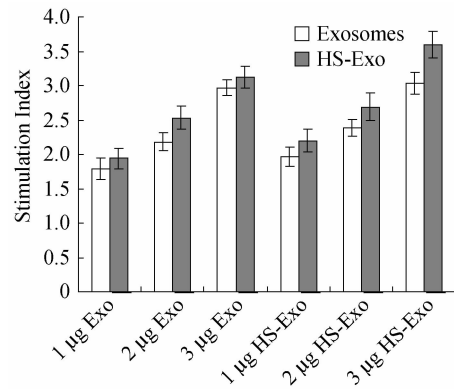


图5 Exosomes、HS-Exo诱导不同来源脾细胞的增殖

Fig 5 Lymphocyte proliferation induced by vaccine Exosomes and HS-Exo

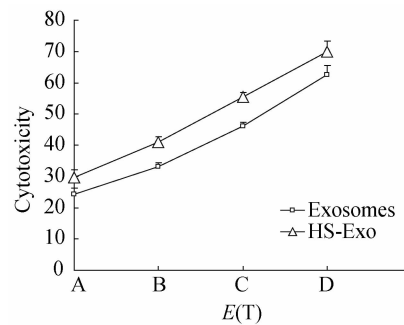


图6 小鼠脾细胞细胞毒性

Fig 6 Specific cytotoxic spleen lymphocyte response

A:12.5:1; B:25:1; C:50:1; D:100:1

肿瘤组织中淋巴细胞的浸润 结果显示HS-Exo免疫小鼠组肿瘤组织中 CD4^+ 、 CD8^+ T淋巴细胞数目高于Exosomes对照免疫小鼠组,两者差异有统计学意义($P < 0.05$)。阳性细胞计数结果见图7。免疫组织化学结果见图8、9。

HS-Exo体内抑制荷瘤小鼠的生长 如图10A示,Exosomes对照组小鼠相比较,HS-Exo治疗组小鼠的肿瘤生长明显受到抑制,对不同时间点肿瘤体积进行配对 t 检验,差异有统计学意义($P < 0.05$)。如图10B示,HS-Exo治疗组小鼠生存期较Exosomes对照组有所延长,HS-Exo治疗组小鼠在肿瘤接种

100 d 时,有 30%小鼠存活($P < 0.01$)。

讨 论

近年来以免疫为基础的生物治疗给肿瘤治疗带来了新的希望,Exosomes 能够激发体内针对肿瘤细胞的全身免疫应答,是一种有前途的肿瘤辅助治疗途径,其研究已成为肿瘤免疫治疗方面的热点之一。

常规方法提取的 Exosomes 产量和疗效有限,热应激处理方法简单并且可诱导热休克蛋白的高表达,我们通过热应激作用寻找具有更高效生物活性

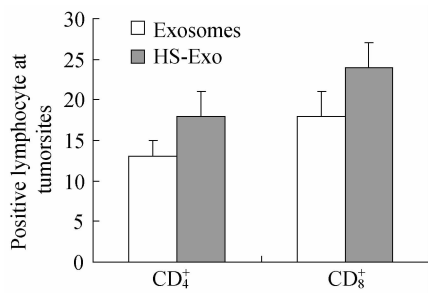


图 7 不同肝癌组织中 CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞数量

Fig 7 Analysis of CD4⁺, CD8⁺ lymphocyte in tumor tissue

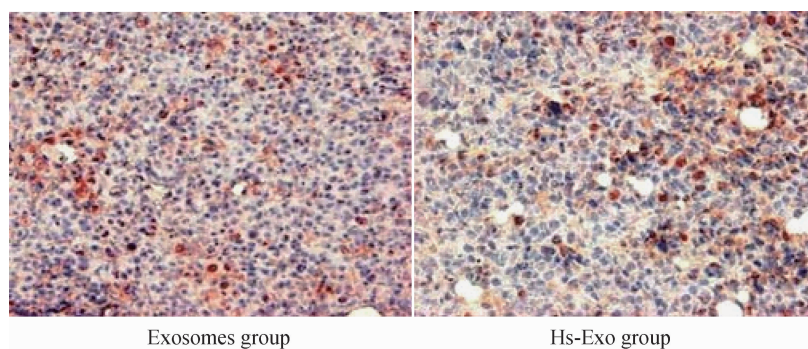


图 8 荷瘤小鼠组织中 CD4⁺ 细胞的浸润(×400)

Fig 8 Infiltration of CD4⁺ positive cells in tumor tissue (×400)

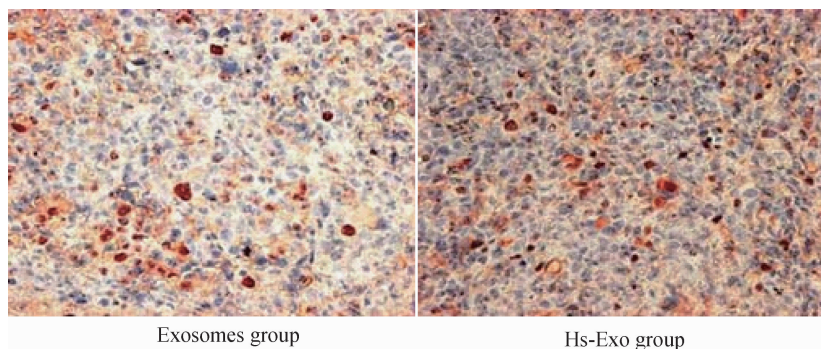


图 9 荷瘤小鼠组织中 CD8⁺ 细胞的浸润(×400)

Fig 9 Infiltration of CD8⁺ positive cells in tumor tissue(×400)

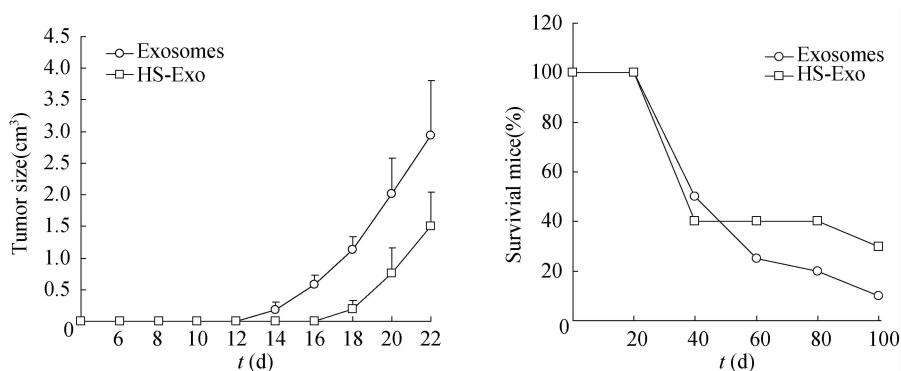


图 10 Exosomes 及 HS-Exo 的肿瘤治疗效果

Fig 10 Tumor therapy effects of Exosomes and HS-Exo

和抗肿瘤效应的 Exosomes。在此基础上我们进行了 Exosomes 及 HS-Exo 的制备,对比观察两者的活性及生物效应,并对其抗肿瘤免疫机制进行了初步探讨。

本文采用超速分级离心和蔗糖密度梯度离心相结合的方法,从 H₂ 培养上清中分离得到 Exosomes,并从热应激 H₂ 培养上清中分离得到 HS-Exo, HS-Exo 纯度有所提高。Western blot 法对其所含蛋白分析,结果显示 HS-Exo 中一些重要的免疫蛋白如 HSP70、HSP60、HSC70 和 ICAM-1 的表达与 Exosomes 相比明显上调。通过体内实验,将 Exosomes 及 HS-Exo 用于小鼠免疫并观察其对小鼠抗肿瘤免疫的保护性作用。结果显示:HS-Exo 免疫小鼠组比 Exosomes 对照免疫小鼠组更有效的抑制了肿瘤的生长,HS-Exo 能够诱导更为显著的保护性抗肿瘤免疫反应。小鼠脾淋巴细胞增殖试验显示 HS-Exo 能更有效地激活淋巴细胞,促进其生长与增殖,从而有效地激活免疫系统。小鼠脾淋巴细胞细胞毒活性试验显示,HS-Exo 免疫小鼠组肿瘤细胞杀伤率高于 Exosomes 组,HS-Exo 能更有效地诱导特异性的杀伤活性,引发特异性的免疫应答。免疫组织化学染色法测得 HS-Exo 免疫小鼠组肿瘤组织中 CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞数目均高于 Exosomes 免疫小鼠组,HS-Exo 可以更好地诱导 T 细胞活化,促进宿主的抗肿瘤细胞免疫应答。HS-Exo 治疗组小鼠的肿瘤生长受到明显的抑制,小鼠生存期有所延长。提示 HS-Exo 可能比 Exosomes 具有更强的免疫活性,能更好的发挥抗肿瘤作用。HS-Exo 这种更显著的肿瘤免疫治疗作用可能与其含有较多的 HSP70、HSP60、HSC70 和 ICAM-1 等重要的免疫蛋白有关,这些免疫蛋白在抗肿瘤作用方面具有极其重要的意义:①HSP70 的生物学功能广泛,又称“分子伴侣”。HSP70 与肿瘤抗原结合,Exosomes 中的 HSP70 可被抗原提呈细胞吸收呈递给免疫系统,肿瘤抗原与 HSP70 解离,激活 T 淋巴细胞或自然杀伤细胞,引发特异性免疫反应^[15]。②HSP60 是吞噬细胞所共有的一个特性,并且结合吞噬细胞表面的 HSP60 受体,迅速引起吞噬细胞的胞饮作用。③研究证明肿瘤来源的 HSC70 可诱导机体产生强大的 CTL 反应并能部分消除肿瘤^[16],其携带的多肽可以有效的转移给抗原提呈细胞(APCs),以便于 MHC-I 和 MHC-II 类抗原的呈递^[17]。④ICAM-1 是属于免疫球蛋白超家族的一类黏附分子,ICAM-1 与其配体的结合具有重要的免疫学功能:首先,它可以介导 APCs 与 T 细胞, T 细胞与靶细胞黏附和细胞间信息传递^[18],还可以介导 T 细胞和 NK 细胞对靶细胞的杀伤作用;其次,

它在 T 细胞迁移过程中也发挥重要作用^[19];此外,它还是 T 细胞激活的共刺激信号之一^[11]。对比研究发现 HS-Exo 含有更为丰富的热休克蛋白和黏附分子,具有更显著的肿瘤免疫治疗作用。

本实验说明,热应激处理能提高 HS-Exo 蛋白组分的产量,更好的刺激机体的特异性肿瘤免疫,抑制肿瘤生长以及更显著的肿瘤免疫治疗作用,并有统计学意义,优化了 Exosomes 的应用。热应激制备获得 HS-Exo 这种方法简单可行,进一步提高了 Exosomes 的生物活性和抗肿瘤免疫治疗作用,为肿瘤免疫学提供了新工具。

参 考 文 献

- [1] Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W, *et al.* B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles[J]. *J Exp Med*, 1996, 183(3):1 161-1 172.
- [2] Zivogel L, Regnault A, Lozier A, *et al.* Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic-cell-derived Exosomes[J]. *Nat Med*, 1998, 4(5): 594-600.
- [3] Hwang I, Shen X, Sprent J. Direct stimulation of naïve T cells by membrane vesicles from antigen-presenting cells: distinct roles for CD54 and B7 molecules[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(11):6 670-6 675.
- [4] Thery C, Zitvogel L, Amigorena S. Exosomes: composition, biogenesis and function[J]. *Nat Rev Immunol*, 2002, 2: 569-579.
- [5] Wofers J, Lozier A, Raposo G, *et al.* Tumor-derived Exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming[J]. *Nat Med*, 2001, 7(3):297-303.
- [6] Denzer K, Van Eijk M, Kleijmeer MJ, *et al.* Follicular dendritic cells carry MHC class II expressing microvesicles at their surface[J]. *J Immunol*, 2000, 165(3):1 259-1 265.
- [7] Yang Y, Xiu F, Cai Z, *et al.* Increased induction of antitumor response by Exosomes derived from interleukin-2 gene-modified tumor cells[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2007, 133(6):389-399.
- [8] Dai S, Wan T, Wang B, *et al.* More efficient induction of HLA-A * 0201-restricted and carcinoembryonic antigen (CEA)-specific CTL response by immunization with Exosomes prepared from heat-stressed CEA-positive tumor cells[J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(20):7 554-7 563.
- [9] Xiu F, Cai Z, Yang Y, *et al.* Surface anchorage of superantigen SEA promotes induction of specific antitumor immune response by tumor-derived Exosomes[J]. *J Mol Med*, 2007, 85(5):511-521.
- [10] Chaput N, Sehaaz NE, And F, *et al.* Exosomes as potent cell-free peptide based vaccine. II. Exosomes in CpG adjuvants efficiently prime naïve Tc1 lymphocytes leading to tumor rejection[J]. *J Immunol*, 2004, 172(4):2 137-2 146.