

非小细胞肺癌源性外泌体提取方法探讨

晏 芾,于韶荣,曹海霞,井昶雯,马 蓉,冯继锋*

(南京医科大学附属江苏省肿瘤医院肿瘤内科,江苏 南京 210009)

[摘要] 目的:比较 3 种提取非小细胞肺癌 A549 细胞培养上清中外泌体(Exosomes)的方法,为获得高质量的 Exosomes 提供参考。方法:分别采取超速离心法、进口 ExoQuick-TC 提取法、国产 Ribo 提取法提取 A549 细胞培养上清中的 Exosomes。利用透射电镜进行形态学观察,2,2-联喹啉-4,4-二甲酸二钠法进行蛋白定量,Western blot 检测 Exosomes 表面标志物 CD63 表达。结果:3 种方法均可提取到 Exosomes,电镜下可观察到圆形膜性囊泡结构。进口 ExoQuick-TC 提取法及国产 Ribo 提取法提取样本浓度显著高于超速离心法 ($P < 0.05$);3 种方法提取样本均有 Exosomes 特异性标志蛋白 CD63 表达,超速离心法 CD63 表达最高。结论:超速离心法、进口 ExoQuick-TC 提取法、国产 Ribo 提取法均可成功分离 Exosomes,超速离心法获得的 Exosomes 纯度较高,应用试剂盒方法获得的 Exosomes 浓度高。

[关键词] 外泌体;超速离心法;Exoquick 提取法;Ribo 提取法

[中图分类号] R734.2

[文献标志码] B

[文章编号] 1007-4368(2016)06-726-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20160616

外泌体(Exosomes)是多泡体与细胞膜融合后释放至细胞外的膜性微囊泡,是直径 30~100 nm 的脂质双层膜球体^[1],其最早在 20 世纪 80 年代初被发现^[2]。Exosomes 的主要成分为蛋白质和脂质^[3],其内包裹与其来源相关的生物信息物质,如 mRNA、micro-RNA、DNA 等,Exosomes 本身可以保护这些遗传物质,使其较胞内环境存在更稳定^[4]。近年来研究表明,Exosomes 是细胞之间膜泡运输的一种形式,参与机体免疫应答、抗原提呈、细胞间通讯、信息物质转运,在各项生理和病理过程,尤其在肿瘤的发生发展及转移中发挥重要作用^[5]。

Exosomes 可由多种细胞产生,包括各种干细胞、内皮细胞、上皮细胞、树突状细胞、肿瘤细胞等,并广泛分布于体液如血液、唾液、乳汁、脑脊液、尿液及肿瘤微环境中^[6]。Exosomes 可从几乎所有体液中有效分离,且肿瘤来源的 Exosomes 可部分反映肿瘤表型,其携带的肿瘤特异性蛋白及 miRNA 可作为诊断标志物运用于早期临床诊断、临床风险或疗效评估及预后判定^[7-8],因此,Exosomes 的成功提取是对其进行相关功能及机制研究的前提。本研究以人非小细胞肺癌细胞株 A549 培养上清液为样本,通过 3 种方法分离其中的 Exosomes,以寻求最为合

适的 Exosomes 提取方法,为 Exosomes 分离纯化方法改进提供技术支持。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞培养

人非小细胞肺癌细胞株 A549 购自中国科学院上海细胞生物研究所,使用含有 10% 灭活胎牛血清(Gibco 公司,美国)和双抗的 RPMI1640(南京凯基生物)培养液,于 37℃、5%CO₂、85%湿度的恒温箱内培养,0.25%胰酶(Gibco 公司,美国)消化液消化传代。所有实验均采用对数生长期细胞。

1.1.2 试剂及仪器

ExoQuick-TC Exosomes Precipitation Solution (System Bioscience 公司,美国),Ribo Exosomes Isolation Reagent (广州锐博生物公司),BCA 蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物公司);鼠抗人 CD63 一抗(System Biosciences 公司,美国),二抗(辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体)(System Biosciences 公司,美国);透射电镜 JEM-1010(JEOL 公司,日本),超低温离心机(Eppendorf 公司,德国),超高速冷冻离心机 70Trotor(Beckman Coulter 公司,美国),酶标仪(BioTek 公司,美国),XR 型凝胶成像仪(Bio-Rad 公司,美国),Nanodrop2000 分光光度计(Thermo 公司,美国)。

[基金项目] 国家自然科学基金(81402483);江苏省卫生厅课题(H201410)

*通信作者(Corresponding author),E-mail:fjif@vip.sina.com

1.2 方法

1.2.1 Exosomes 的制备

A549 细胞培养 48 h 后收集细胞上清液用于 Exosomes 的制备。分别用传统超速离心法(A 法)、进口 ExoQuick-TC 试剂盒(B 法)及国产 Ribo 提取试剂盒(C 法)提取 9.0 mL 上清液中的 Exosomes。

A 法:收集的上清液通过一系列离心去除细胞碎片及杂质:1 500 r/min 10 min、10 000 r/min 4℃离心 30 min 取上清,最后以 100 000 r/min 4℃离心 2 h,弃上清,沉淀以 200 μL PBS 重悬,所得悬液包含 Exosomes,标本记为代号“A”,于-80℃保存。

B 法:细胞培养上清液以 3 000 r/min 离心 15 min,取上清;按照试剂说明书,加入 1.8 mL 沉淀剂(5:1),混匀后 4℃条件下静置过夜;将孵育好的样品以 1 500 r/min 4℃离心 30 min,弃上清,再 1 500 r/min 4℃离心 5 min,小心吸去残余上清,获得的沉淀即为 Exosomes,以 200 μL PBS 重悬分装,标本记为代号“B”,于-80℃保存。

C 法:细胞培养上清液以 1 500 r/min 离心 15 min,取上清;按照试剂说明书,加入 3 mL 沉淀剂(3:1),混匀后 4℃条件下静置过夜;取 2 mL 孵育好的样品至 2 mL 离心管,以 1 500 r/min 4℃离心 30 min,弃上清,得小部分 Exosomes,再次取 2 mL 样品至同一离心管,重复前一步骤直至全部样品离心完毕,获得的沉淀即为 Exosomes,以 200 μL PBS 重悬分装,标本记为代号“C”,于-80℃保存。

1.2.2 Exosomes 的形态观察

各取 3 种方法提取的 Exosomes 悬液 30 μL 滴加于帕拉胶上,覆盖铜网表面,室温静置 45 min,用 PBS 小心清洗铜网 3 次,3%戊二醛固定 10 min,双蒸水清洗,2%乙酸铀酞对比,用透射电镜观察。

1.2.3 BCA 蛋白定量

根据 BCA 试剂盒说明书,将稀释后浓度为 0.5 mg/mL 的蛋白标准品按 0、1、2、4、8、12、16、20 μL 加至 96 孔板中,每孔体积用 PBS 补充至 20 μL;

3 种样本中各加入含蛋白酶抑制剂的裂解液,4℃下震荡 30 min;15 000 r/min 4℃离心 30 min,取上清液,即为蛋白样品。取适量同样稀释为 20 μL 的 3 种 Exosomes 样品悬液加入 96 孔板,每个样品设置 3 个复孔;各孔加入 BCA 工作液 200 μL,37℃放置 30 min,放入酶标仪 562 nm 处测定蛋白浓度。

1.2.4 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)

按照 BCA 蛋白定量结果调整,3 样品蛋白上样浓度相同,加入 5 μL 5×上样缓冲液使最终上样体积为 25 μL,100℃煮沸 5 min,上样;浓缩胶 80 V 电泳 30 min,分离胶 100 V 电泳 90 min。结束后使用 0.25%考马斯蓝染液染色 2 h,脱色液脱色至条带明显,使用 Biorad 成像仪进行拍照。

1.2.5 Western blot 检测

将进行 SDS-PAGE 分离后的蛋白于 250 mA 恒流下转印 60 min 至 PVDF 膜,用含 5%脱脂奶粉的 TBS-T(含有 0.1%Tween-20 的 TBS)封闭 1 h 后,按 1:400 稀释一抗(兔抗人 CD63 抗体),与膜共置反应,4℃过夜;TBS-T 缓冲液洗膜 3 次,每次 15 min,加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体,室温孵育 2 h,洗膜 3 次,每次 15 min,显色观察。

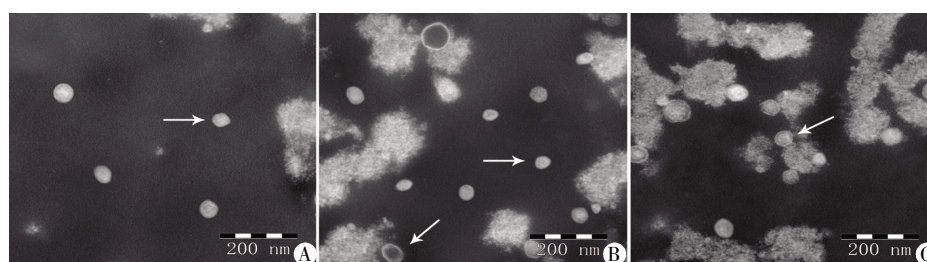
1.3 统计学方法

采用 SPSS16.0 软件进行统计学分析,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,对蛋白质浓度、操作时间、花费金额进行单因素方差分析并进行 Tukey 显著性检验,以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 透射电镜观察 Exosomes 形态

使用透射电镜观察经 3 种方法提取的 A549 细胞培养上清液中的 Exosomes,均可见多个大小不等、有脂质双分子层包绕形成的小体,直径 30~100 nm,呈圆盘状,内部为较均一的浅染区,可散在或聚集分布(图 1)。



A:A 法获得的 Exosomes 分布均匀,大小均一,但稀疏,背景清晰;B:B 法获得的 Exosomes 分布较密,背景有杂质;C:C 法获得的 Exosomes 多聚集成团分布,直径分布跨越较大,背景杂乱,污染较严重。

图 1 透射电镜下 3 种提取方法所得样本形态

2.2 BCA 蛋白定量

根据标准曲线,可测得3种提取方法获得的 Exosomes 蛋白浓度分别为:A法(0.52 ± 0.04) mg/mL、B法(5.23 ± 0.13)mg/mL、C法(8.45 ± 0.10)mg/mL,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。B、C法所得的样本浓度均显著高于A法($P < 0.05$),B、C法所得样本蛋白浓度亦具有统计学差异($P < 0.05$)。

2.3 SDS-PAGE 电泳

SDS-PAGE 电泳图谱显示,3种方法提取的 Exosomes 内所含蛋白质种类丰富,且在蛋白表达强度上具有明显差异(图2)。

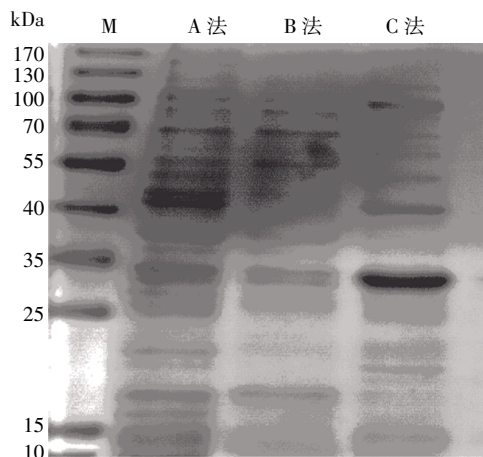


图2 3种提取方法提取 Exosomes SDS-PAGE 电泳图

2.4 Western blot 结果

采用 Western blot 方法检测3种方法提取的 A549 细胞培养上清液中 Exosomes 的特异性标志蛋白——4次跨膜分子 CD63 的表达。结果表明:3种方法提取的 Exosomes 均表达 CD63,在相同蛋白浓度下,CD63 含量比较,A法>B法>C法(图3)。

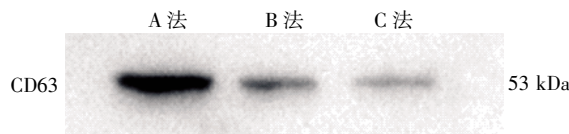


图3 Western blot 检测3种提取方法所得样本 CD63 的表达

2.5 操作时间和经济费用比较

A法平均耗时(172.50 ± 5.10)min,B法平均耗时(56.30 ± 2.60)min,C法平均耗时(220.50 ± 3.80)min。A法及C法操作时间明显长于B法($P < 0.05$),A、C两种方法操作时间亦具有统计学差异,C法>A法>B法($P < 0.05$)。

A法平均花费(23.50 ± 2.10)元,B法平均花费(761.40 ± 3.30)元,C法平均花费(311.50 ± 3.50)元,差异有统计学意义($P < 0.05$)。且3种方法的费

用有明显差别,B法>C法>A法($P < 0.05$)。

3 讨论

Exosomes 可携带并传递各种物质和信息,调节受体细胞蛋白的表达及其信号通路的传导,参与细胞-细胞间通讯^[9]。其携带的标志性蛋白或 RNA 可运用于肿瘤的早期检测和诊断^[7-8];也可改造为不会引起宿主免疫反应的载体,携带药物用于肿瘤免疫治疗^[10-11],具有潜在的临床应用价值。

目前关于 Exosomes 的分离纯化方法已有许多研究,目前常用的主要有超速离心法^[12]、蔗糖密度梯度离心法^[13]、免疫磁珠提取法、试剂盒沉淀法^[14]等,其中应用最为广泛的为超速离心法和试剂盒沉淀法,但其提取方法的选择及各种方法的优势仍在探讨中。本研究应用3种方法,传统的多步超速离心分次去除细胞碎片及杂质获得 Exosomes,ExoQuick-TC 及 Ribo 提取试剂盒对 Exosomes 进行特异性富集沉淀,评价3种提取方法的效率和产物质量,为后续功能实验的开展奠定基础。本研究发现,传统的超速离心法可获得高纯度的 Exosomes,但其操作繁琐,获取效率低,超速离心过程可能丢失大量的 Exosomes,这与 Lobb^[15]及 Van Deun 等^[16]的研究成果相符。若想取得一定量的 Exosomes 需要制备大量的细胞培养上清液,不适用于提取临床患者血样或尿样中的 Exosomes;单用商业试剂盒的方法仅需要简单混匀和常规离心即可从少量样本中获得丰富的 Exosomes,具有快速简单、提取效率高的特点。ExoQuick-TC 试剂盒与 Ribo 试剂盒相比,可获得更高纯度的 Exosomes,且操作过程简单,操作时间短,但试剂价格昂贵,若使用于临床会为患者带来较大的经济负担;Ribo 试剂盒所得 Exosomes 含量丰富,提取效率高,但纯度低,获得的 Exosomes 蛋白质污染严重,可能使后续实验出现假阳性,不利于对 Exosomes 蛋白功能分析,且操作时间随样本量的增大而延长,但试剂价格适中,可用于 Exosomes 遗传物质的分析研究。

综上,超速离心法、进口 ExoQuick-TC 提取法、国产 Ribo 提取法均可成功分离 Exosomes,后两者提取速度快、效率高、浓度高,比较适合研究及临床应用。ExoQuick-TC 耗时短,Ribo 价格适中,在具体应用中可权衡选择。

【参考文献】

- [1] Sun Y, Liu J. Potential of cancer cell derived exosomes in

- clinical application;a review of recent research advances [J]. *Clin Ther*,2014,36(6):863-872
- [2] Yu S,Cao H,Shen B,et al. Tumor-derived exosomes in cancer progression and treatment failure[J]. *Oncotarget*, 2015,6(35):37151-37168
- [3] Théry C,Ostrowski M,Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses[J]. *Nat Rev Immunol*, 2009,9(8):581-593
- [4] Valadi H,Ekström K,Bossios A,et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells[J]. *Nat Cell Biol*, 2007,9(6):654-659
- [5] Azmi AS,Bao B,Sarkar FH. Exosomes in cancer development,metastasis,and drug resistance;a comprehensive review[J]. *Cancer Metastasis Rev*,2013,32(3/4):623-642
- [6] Silva J,Garcia V,Rodriguez M,et al. Analysis of exosome release and its prognostic value in human colorectal cancer [J]. *Genes Chromosomes Cancer*,2012,51(4):409-418
- [7] 赵晓琦,程敏.外泌体相关微小RNA的生物学特性及其在多种心血管疾病中的诊断价值[J].*临床心血管病杂志*,2015(9):924-928
- [8] Ciravolo V,Huber V,Ghedini GC,et al. Potential role of HER2-overexpressing exosomes in countering trastuzumab-based therapy [J]. *J Cell Physiol*,2012,227(2):658-667
- [9] Villagrasa A,Alvarez PJ,Osuna A,et al. Exosomes derived from breast cancer cells,small Trojan horses? [J]. *Mammary Gland Biol Neoplasia*,2014,19(3/4):303-313
- [10] Sun DM,Zhuang XY,Xiang XY,et al. A novel nanoparticle drug delivery system;the anti-inflammatory activity of curcumin is enhanced when encapsulated in exosomes [J]. *Mol Ther*,2010,18(9):1606-1614
- [11] Tian Y,Li S,Song J,et al. A doxorubicin delivery platform using engineered natural membrane vesicle exosomes for targeted tumor therapy [J]. *Biomaterials*,2014,35(7):2383-2390
- [12] Kalra H,Adda CG,Liem M,et al. Comparative proteomics evaluation of plasma exosome isolation techniques and assessment of the stability of exosomes in normal human blood plasma[J]. *Proteomics*,2013,13(22):3354-3364
- [13] Yamada T,Inoshima Y,Matsuda T,et al. Comparison of methods for isolating exosomes from bovine milk [J]. *J Vet Med Sci*,2012,74(11):1523-1525
- [14] Voelkerding KV,Sandhaus LM,Kim HC,et al. Plasma cell malignancy in the acquired immune deficiency syndrome. Association with Epstein-Barr virus [J]. *Am J Clin Pathol*, 1989,92(2):222-228
- [15] Lobb RJ,Becker M,Wen SW,et al. Optimized exosome isolation protocol for cell culture supernatant and human plasma[J]. *J Extracell Vesicles*,2015,4:27031-27041
- [16] Van Deun J,Mestdagh P,Sormunen R,et al. The impact of disparate isolation methods for extracellular vesicles on downstream RNA profiling [J]. *J Extracell Vesicles*, 2014,3:24858-24871

[收稿日期] 2015-11-18

(上接第 720 页)

- ischemia [J/OL]. *Mol Neurobiol*,2015 [2015-01-14]. <http://link.springer.com/article/10.10072Fs12035-015-9455-0>. DOI:10.1007/s12035-015-9455-0
- [10] 王磊.小鼠海马CA1区轴棘突触相关特性的研究[D].石家庄:河北医科大学,2006
- [11] Potier M,Georges F,Brayda-Bruno L,et al. Temporal memory and its enhancement by estradiol requires surface dynamics of hippocampal CA1 N-Methyl-D-Aspartate receptors[J]. *Biol Psychiatry*,2015 [2015-01-14]. [http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006-3223\(15\)00611-3](http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006-3223(15)00611-3). DOI:10.1016/j.biopsych.2015.07.017
- [12] AartsM,Liu Y,Liu L,et al. Treatment of ischemic brain damage by per-turbing NMDA receptor-PSD-95 protein interactions[J]. *Science*,2002,298(5594):846
- [13] Fang SK,Yan B,Wang DY,et al. Chronic effects of venlafaxine on synaptophysin and neuronal cell adhesion molecule in the hippocampus of cerebral ischemic mice [J]. *Biochem Cell Biol*,2010,88(4):655-663
- [14] 赵晖,王少烽,张秋霞,等.丰富环境干预对慢性低灌注血管性痴呆大鼠学习记忆及突触素蛋白和微管相关蛋白的影响[J].*中国康复医学杂志*,2012,27(8):687-691
- [15] Di X,Li CZ,Götz J. Pseudophosphorylation of Tau at distinct epitopes or the presence of the P301L mutation targets the microtubule-associated protein Tau to dendritic spines [J]. *Biochim Biophys Acta*,2015,1852(5):913-924
- [16] Ittner L,Ke YD,Delerue F,et al. Dendritic function of Tau mediates amyloid-beta toxicity in Alzheimer's disease mouse models[J]. *Cell*,2010,142(3):387-397
- [17] Li CJ,Brake WG,Romeo RD,et al. Estrogen alters hippocampal dendritic spine shape and enhances synaptic protein immunoreactivity and spatial memory in female mice[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,2004,101(7):2185-2190

[收稿日期] 2015-10-14