

· 基础研究 ·

大鼠 T 细胞源性 exosome 提取方法比较*

孙 祯, 黄赤兵[△], 宋亚军, 陈益荣, 李传贵

(第三军医大学新桥医院泌尿外科, 重庆 400037)

摘要:目的 采用 3 种方法从大鼠 T 细胞培养上清中提取纯化 exosome, 以获取高质量的 exosome。方法 分别采用 ExoQuick Precipitation 提取法、超滤密度梯度离心法、差速离心法提取 T 细胞培养上清中的 exosome。利用透射电镜进行形态学观察, 2, 2-联喹啉-4, 4-二甲酸钠(BCA)法进行蛋白定量, 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析蛋白表达的差异, Western blotting 检测白细胞介素 2(IL-2)的表达。结果 3 种方法均可提取出 exosome; ExoQuick Precipitation 提取法、超滤密度梯度离心法所得样本浓度显著高于差速离心法所得样本浓度($P < 0.05$); SDS-PAGE 结果显示 3 种方法所得样本具有蛋白表达强度的差异; Western blotting 显示 3 种方法所得样本均表达 IL-2。结论 ExoQuick Precipitation 提取法、超滤密度梯度离心法可获得高纯度、无蛋白丢失的 exosome 样本。

关键词: exosome; ExoQuick Precipitation; 超滤密度梯度离心; 差速离心

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.29.019

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)29-3512-03

The comparison among extraction methods of exosomes from T cells of rats*

Sun Zhen, Huang Chibing[△], Song Yajun, Chen Yirong, Li Chuangui

(Department of Urology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective The purification methods of the exosomes derived from T cells were established in order to get high quantity exosomes. Methods Exosomes from T cells culture supernatants were purified by ExoQuick Precipitation, ultrafiltration and sucrose gradient centrifugation, differential ultracentrifugation, and confirmed via using transmission electron microscopy. The protein expression of the exosomes were analyzed by SDS-PAGE electrophoresis. Western blotting was used to test the expression of IL-2. Results The protein concentration of the exosomes purified through ExoQuick Precipitation, ultrafiltration and sucrose gradient centrifugation were higher than through differential ultracentrifugation ($P < 0.05$). SDS-PAGE displayed the difference among the exosome purified by three methods. Three kinds of exosomes all expressed IL-2. Conclusion ExoQuick Precipitation, ultrafiltration and sucrose gradient centrifugation technique can obtain high purity and complete exosome sample.

Key words: exosome; ExoQuick Precipitation; ultrafiltration and sucrose gradient centrifugation; differential ultracentrifugation

Exosome 是一种起源于内吞体系统并被排出胞外的膜性囊泡, 直径在 30~100 nm^[1], 含有大量与其来源相关的特异性蛋白, 并由此发挥不同的功能^[2]。T 淋巴细胞是免疫系统的重要组成部分, 并且不同的亚群具有各异的免疫学功能。例如 CD4+CD25+Treg 细胞具有诱导免疫耐受的作用^[3]; 而接触抗原活化后的效应 T 细胞则是介导细胞毒作用的参与者。因此, 作为细胞信号转导与功能信使的 exosome 将有可能是 Treg 细胞进行远端免疫耐受调控及效应 T 细胞上调免疫应答的未知机制^[4]。故获得高纯度和无蛋白丢失的 exosome 样本是进一步探寻其功能和组成的基础。为此, 本研究通过 3 种方法提取 T 细胞分泌的 exosome, 并比较不同方法所得样本的差异, 以找出最适提取 exosome 的方法, 为后续的免疫学功能和蛋白质组成的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物 雄性清洁级 6~8 周龄 SD 大鼠, 购买于第三军医大学实验动物中心。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂与仪器 ExoQuick Precipitation(美国 SBI 公司); 重水、分析纯蔗糖(美国 Sigma 公司); BCA 试剂盒(碧

云天生物技术有限公司); 载破片(海门市神鹰实验器材厂); 超滤离心管 100×10³(美国 Millipore 公司, Amicon Ultra); 高速冷冻离心机(美国 BECKMAN COULTER, Avanti J-30I, 转子 JA-30.50T1); 超高速冷冻离心机(日本 Hitachi, 转子 S55A); 透射电镜(日本 Hitachi, H-7500-TEM); 垂直电泳仪(美国 Biorad 公司); 影像分析扫描仪(美国 Biorad 公司, GS-800)。

1.2.2 细胞提取及培养 无菌取出大鼠的肠系膜淋巴结(Mln)于装有 10 mL RPM1640 培养基(含 10% 胎牛血清)的玻璃培养皿中, 用载破片毛玻面研磨组织得到细胞悬液, 用 100 目筛网过滤后转至 15 mL 离心管中。1 800 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 用 10 mL 磷酸盐缓冲液(PBS)重悬后小心加入预先装有 15 mL 淋巴细胞分离液的 50 mL 离心管中, 保持分界清楚, 2 500 r/min 离心 20 min, 吸出云雾状细胞, 即为淋巴细胞。将培养用胎牛血清在 4 ℃ 条件下 42 000 r/min 离心 70 min 出去内源性 exosome, 接种分离得到的 T 细胞于培养瓶中, 覆盖以 RPM1640 培养基(内含 10% 胎牛血清, 0.1% 青霉素、链霉素), 至于 37 ℃、5% CO₂ 孵箱内培养 3 d, 收集上清液, -20 ℃ 保存备用。

1.2.3 exosome 制备

1.2.3.1 ExoQuick Precipitation 提取法(A法) 将收集的上清利用 ExoQuick Precipitation 进行提取^[5]。收集细胞培养上清 10 mL, 4 ℃ 条件下, 5 500 r/min 离心 15 min 取上清液, 加入 ExoQuick Precipitation 2 mL, 混匀后 4 ℃ 过夜, 3 000 r/min 离心 30 min 弃上清液, 3 000 r/min 离心 5 min 弃残存液体, 100 μ L PBS 重悬, 所得悬液包含 exosome。以此法收集的标本代号为“A”。

1.2.3.2 超滤及密度梯度离心法(B法) 将收集的上清液进行超滤及密度梯度离心法收集 exosome^[6]。收集细胞培养上清液 50 mL, 4 ℃ 条件下, 800 r/min 离心 30 min 取上清液, 10 000 r/min 离心 30 min 取上清液, 上清液加入 100×10^3 超滤管中 3 000 r/min 离心 30 min 进行浓缩, 将浓缩液转移至 30 g/L 的蔗糖重水垫上 42 000 r/min 离心 70 min, 取出蔗糖重水用 50 mL PBS 稀释后置于 Amicon 超滤管中 3 000 r/min 离心 30 min 进行浓缩, 所得滤液即包含 exosome。以此法收集的标本代号为“B”。

1.2.3.3 差速离心法(C法) 将收集的上清液进行差速离心法收集 exosome^[7]。收集细胞培养上清 50 mL, 4 ℃ 条件下, 800 r/min 离心 10 min 取上清液, 4 500 r/min 离心 10 min 取上清液, 10 000 r/min 离心 30 min 取上清液, 42 000 r/min 离心 70 min 取沉淀, PBS 重悬后 42 000 r/min 离心 70 min 取沉淀, 100 μ L PBS 重悬, 所得悬液即包含 exosome。以此法收集的标本代号为“C”。

1.2.4 exosome 的鉴定分析

1.2.4.1 形态观察 取不同方法提取的 exosome 悬液 30 μ L 于载样铜网上, 室温静置 1 min, 用滤纸从侧面小心吸干液体, 滴加 20 g/L 的磷钨酸, 室温复染 1 min, 用滤纸从侧面小心吸干液体, 白炽灯下烘烤 5 min, 透射电镜观察、照相。

1.2.4.2 蛋白定量 将溶解稀释至 0.5 mg/mL 的蛋白标准品按 0.1、2、4、8、12、16、20 μ L 加到 96 孔板中, 将每孔体积用 PBS 补充到 20 μ L; 取 3 种样本溶液各 8 μ L 加入到上述 96 孔板中, 分别设 3 个复孔, 加入 PBS 补充到 20 μ L; 各孔加入工作液 200 μ L, 37 ℃ 放置 30 min 后测定蛋白浓度。

1.2.4.3 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)检测 按照蛋白定量结果调整至上样终浓度相同, 上样终体积为 25 μ L, 100 ℃ 煮沸 5 min, 加样于上样孔内, 浓缩胶 80 V, 35 min; 分离胶 100 V, 100 min。结束后, 使用 0.25% 考

马斯亮蓝染液进行烤染 1 min, 立即用摇床缓慢摇晃 10 min, 脱色液脱色至条带明显, 使用 Biorad(GS-800)图像分析仪进行观察拍照。

1.2.4.4 Western blotting 检测 将进过 SDS-PAGE 分离后的蛋白转至 PVDF 膜上, 封闭后, 一抗为兔抗鼠 IL-2, 4 ℃ 过夜孵育。二抗为辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔抗体, 室温孵育 3 h 候进行显色并观察。

1.3 统计学处理 采用 SPSS20.0 软件进行统计学分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 对蛋白质浓度和操作时间进行单因素方差分析并进行 Tukey 显著性检验, 检验水准 $\alpha = 0.05$, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 细胞培养 取培养第 3 天的淋巴细胞照片, 显微镜下可见细胞分布均匀, 已铺满瓶底, 细胞呈球形, 核圆, 胞质少。见图 1。

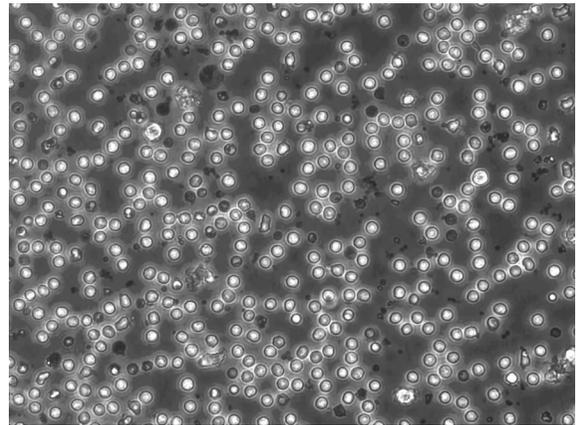
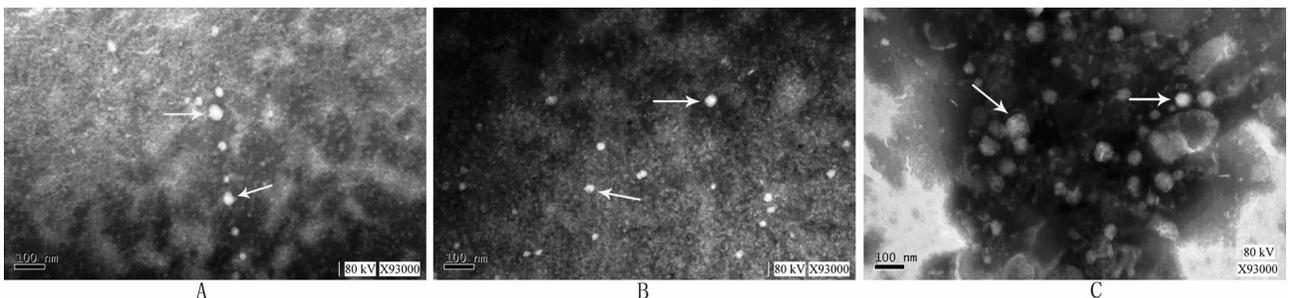


图 1 淋巴细胞培养图($\times 200$)

2.2 透射电镜 经透射电镜观察发现经 3 种方法提取 T 细胞培养上清中的 exosome 均具有以下形态特征: 呈类圆形囊泡, 囊泡外周可见其膜性结构, 直径分布于 30~100 nm, 可以单个分布, 也可聚集成群, 即为 exosome。图 2 可见 A、B 法分离出的 exosome 背景清晰, exosome 囊泡形态显著, 分布均匀; C 方法分离得出的 exosome 背景污染较为严重, 单个囊泡形态显著者较少, 多为成团出现, 分布不均匀。



A: A 法; B: B 法; C: C 法。

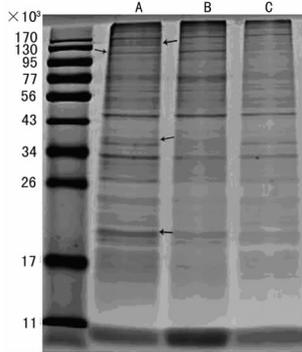
图 2 3 种方法所得 exosome 超微结构图($\times 93\ 000$)

2.3 操作时间比较 A 方法平均耗时(14.8 \pm 1.42)h; B 方法平均耗时(4.58 \pm 0.43)h; C 方法平均耗时(6.75 \pm 0.53)h, A、B、C 法的操作时间呈递减趋势, A 法用时显著多余 B、C 法($P < 0.05$)。

2.4 蛋白定量 以 BSA 各级蛋白浓度对 OD562 处的吸光度

值作图, 得到标准曲线方程, 以此得到 A、B、C 法提取 exosome 的蛋白浓度分别为: (2.18 \pm 0.09) μ g/ μ L、(2.16 \pm 0.15) μ g/ μ L、(1.67 \pm 0.17) μ g/ μ L。其中 A、B 法所得样本蛋白浓度均显著高于 C 法($P < 0.05$); A、B 法所得样本蛋白浓度差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.5 SDS-PAGE 电泳 蛋白质电泳图谱见图 3:3 种方法提取的同源 exosome 所含蛋白质种类丰富,且在蛋白表达强度上具有明显差异。



A: A 法; B: B 法; C: C 法。

图 3 3 种方法所得样本 SDS-PAGE 电泳图

2.6 Western blotting 结果 以 β -actin 为内参,检测白细胞介素 2(IL-2)在 3 种方法提取出的 exosome 中的表达情况,见图 4。ExoQuick Precipitation 提取法(A)、超滤密度梯度离心法(B)、差速离心法(C)3 种方法所得样本中均表达 IL-2。

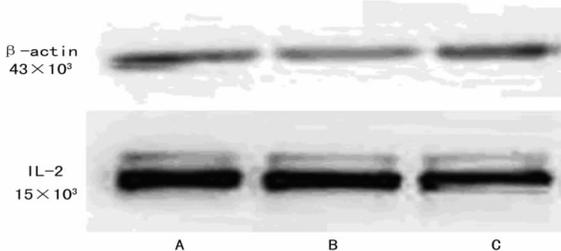


图 4 Western blotting 检测 3 种方法所得样本中 IL-2 的表达

3 讨论

Exosome 是一种可由多种细胞分泌的纳米级膜性囊泡,最早是在研究红细胞成熟时被发现^[8]。随着研究的进展,还发现除红细胞之外的其他多种细胞均可分泌 exosome,如 B 细胞、T 细胞、树突状细胞、肥大细胞、肿瘤细胞等^[9-11]。各种细胞来源的 exosome 小体均具有类似的结构:直径 30~100 nm,含有与其来源密切相关的蛋白质和功能性核酸分子^[12-14]。

C 法是传统的 exosome 提取方法,采用多步离心,分层去除污染物:800 r/min 与 4 500 r/min 分别离心 10 min 以去除液体中残留细胞,10 000 r/min 离心 30min 去除细胞碎片,第 1 次 42 000 r/min 离心 70 min 沉淀下 exosome 和蛋白质聚合物,经过 PBS 重悬后进行第 2 次 42 000 r/min,70 min 离心,得到沉淀为 exosome^[7]。此方法操作步骤繁琐,耗时长,易污染,不适合进行大量生产。超滤密度梯度离心(B 法)最初由 Henry 等^[16]建立,经过不断演变和改进发展至今,是由差速离心法演变而来,耗时段、成本低,并且能够有效的去除蛋白聚合物以及细胞凋亡时产生的核小体碎片而获得较高纯度的 exosome 样本^[9]。ExoQuick Precipitation 提取法(C 法)是利用 exosome 的特异性提取试剂,根据免疫共沉淀原理进行 exosome 的提取,操作简便,能够获得高纯度的 exosome 样本^[5],是 1 种较为新兴的提取方法。本研究首次以 T 细胞培养上清作为共同样本来源比较现行主要的 3 种 exosome 提取方法的操作耗时、样本电泳照片、样本蛋白质浓度、蛋白质表达种类以及特定细胞因子的表达情况。能够从提取步骤及结果分析层面有效的说

明 3 种方法的优劣,从而可为接下来的蛋白质组成及功能学研究打下坚实的基础。从操作耗时分析, A 法耗时显著高于 B、C 法。由电镜观察可得, C 法所得样本单个囊泡形态显著者较少,多为成团出现,分布不均匀,背景浑浊; A、B 法所得样本则 exosome 形态显著,分布均匀,背景清晰,其中 A 法所得样本密度高,视野中 exosome 囊泡数量众多。蛋白质浓度检测可得, A、B 法所得样本浓度显著高于 C 法所得样本。已有文献报道差速离心法会导致部分蛋白质的丢失^[5],而本研究的结果与其一致。SDS-PAGE 结果显示,3 种方法所得样本含蛋白种类繁多。通过 Western blotting 检测可知 3 种样本均有 IL-2 的表达。综上所述,传统的差速离心法会造成 exosome 蛋白丢失、囊泡破损以及相互融合等现象;而超滤密度梯度离心法和 ExoQuick Precipitation 提取法则能获得高纯度、无蛋白丢失、样本保持完好的 exosome 囊泡,考虑到提取成本,则 B 方法更适合进行批量提取。

参考文献:

- [1] Pfeffer SR. Two rabs for exosome release[J]. Nat Cell Biol, 2010, 12(1): 3-4.
- [2] Simpson RJ, Lim JW, Moritz RL, et al. Exosome: proteomic insights and diagnostic potential [J]. Expert Rev Proteomics, 2009, 6(3): 267-283.
- [3] Wood KJ, Sakaguchi S. Regulatory T cells in transplantation tolerance [J]. Nat Rev Immunol, 2003, 3(3): 199-210.
- [4] Camussi G, Deregibus MC, Bruno S, et al. Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication [J]. Kidney Int, 2010, 78(9): 838-848.
- [5] Douglas DT, Wolfgang Z, Cicek GT. Serum/Plasma Proteomics[M]. Australia: Ludwig Institute for Cancer Research Ltd, 2011: 235-246.
- [6] Lamparski HG, Met ha-Damani A, Yao JY, et al. Production and characterization of clinical grade exosomes derived from dendritic cells[J]. Immunol Meth, 2002, 270(2): 211-226.
- [7] Clotilde T, Aled C, Sebastian A, et al. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids[J]. Cell Biology, 2006, 3(22): 1-29.
- [8] Johnstone RM, Adam M, Hammond JR, et al. Vesicle from action during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes) [J]. J Biol Chem, 1987, 262(19): 9412-9420.
- [9] Thery C, Zitvogel L, Amigorena S. Exosomes: composition, biogenesis and function[J]. Nat Rev Immunol, 2002, 2(8): 569-579.
- [10] Pant S, Hilton H, Burczynski ME. The multifaceted exosome: Biogenesis, role in normal and aberrant cellular function, and frontiers for pharmacological and biomarker opportunities[J]. Biochem Phar, 2012, 83(11): 1484-1494.
- [11] Zakharova L, Svetlova M, Fomina AF. T cell exosomes induce cholesterol accumulation in human monocytes via phosphatidyserine receptor[J]. J Cell Physiol, 2007, 212(1): 174-181.

子^[5],对其表达的抑制,将使缺血再灌注损伤程度均明显减轻^[6-7]。对众多研究结果归纳显示炎症因子、心肌细胞凋亡、微血管损伤、钙离子超载、自由基等与复苏后心功能不全密切相关^[8]。本次实验显示,心肺复苏后大鼠体内 TNF- α 和 IL-12 表达较对照组明显升高,提示复苏后大鼠体内存在炎症细胞激活。

UTI 可竞争性抑制酶底物结合部位,同时独立抑制多种酶的活性^[9],具有拮抗心肺复苏后 TNF- α 及降低心肌再灌注损伤作用^[10-11],对 SIRS、MODS 等引起的组织或器官损伤具有保护作用^[12]。鉴于乌司他丁研究资料的结果与本实验具有较大的相关性,特选为本实验研究用药。

动物实验结果显示:与 A 组比较,B、C 组复苏后 6 h 土 LVdp、dt-1max 值均低于 A 组($P < 0.01$),而复苏后 6 h LV-EDP 值均高于 C 组($P < 0.01$);与同组 0 h 比较,B、C 组复苏后 6 h 土 LVdp、dt-1max 值均降低($P < 0.01$),而复苏后 6 h LV-EDP 值均升高($P < 0.01$),提示复苏后心功能不全普遍存在,结果也印证相关资料的报道^[1]。

对心肌损伤的标志物 cTnT^[13]和心脏负荷的标志物 BNP 的监测结果显示:心肺复苏前各组 cTnT 和 BNP 值差异无统计学意义($P > 0.05$),复苏成功后 6 h B、C 组均有不同程度升高,尤以 B 组升高幅度最大,推测复苏后存在一定程度的急性心肌损伤及心肌细胞坏死。然而 C 组升高幅度小于 B 组($P < 0.01$),从另外一个角度证实 UTI 具有减轻心肺复苏后心肌损伤的作用^[14]。

实验结果表明 UTI 可有效的调节 IL-12、TNF- α ,与 B 组及 A 组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$);同时,C 组 MAP、土 LVdp、dt-1max、LVEDP 数据优于 B 组,揭示 UTI 还具有改善了复苏后心功能不全的作用^[15]。

本研究表明:乌司他丁对心搏骤停-心肺复苏实验大鼠,具有拮抗炎症介质、减轻心肌损伤和改善了复苏后心功能不全的作用。乌司他丁使用方式对实验结果的影响评价后续实验将继续进行。

参考文献:

- [1] 胡春林,夏金明,魏红艳,等. 乌司他丁对心肺复苏后兔脑损伤和心功能的影响[J]. 中华急诊医学杂志,2012,21(1):12-17.
- [2] 唐万春,孙士杰. 心肺脑复苏及心脑血管急诊[M]. 北京:科学技术出版社,2008:397-399.
- [3] 周厚荣,张谦,杨秀林,等. 血必净对窒息大鼠心肺复苏后免疫因子及补体变化的实验研究[J]. 重庆医学,2010,39

(17):2248-2250.

- [4] 陈振娟,阮冰. 全身炎症反应综合征的分子发病机制及其治疗研究[J]. 国际流行病学及传染病学杂志,2007,34(6):402-405,414.
- [5] 朱宇麟,周荣胜,杨会,等. 乌司他丁对肝大部切除合并缺血再灌注损伤后肝再生及 TNF- α /IL-6/STAT-3 信号通路的影响[J]. 南方医科大学学报,2012,32(9):1301-1306.
- [6] 刘作金,严律南. Kupffer 细胞与肝脏缺血再灌注损伤的研究进展[J]. 世界华人消化杂志,2008,16(24):2741-2745.
- [7] Husted TL, Blanchard J, Schuster R, et al. Potential role for IL-23 in hepatic ischemia/reperfusion injury[J]. Inflamm Res, 2006,55(5):177-178.
- [8] 刘海健,张谦,周厚荣,等. 心肺复苏后心功能不全研究进展[J]. 贵州医药,2010,34(1):87-89.
- [9] 周世方,陈寿权,李章平,等. 乌司他丁对大鼠心肺复苏后血清与海马 CA1 区 S100 β 蛋白变化的作用[J]. 中华急诊医学杂志,2009,18(2):170-174.
- [10] 严跃红,黄爱群,李显波,等. 乌司他丁对心肺复苏后兔肾损伤的影响[J]. 中国病理生理杂志,2011,27(6):1138-1142.
- [11] Wada T, Kawai, Ihara K, et al. Construct validity of the Enneking score for measuring function in patients with malignant or aggressive benign tumours of the upper limb [J]. J Bone Joint Surg Br,2007,89(5):659-663.
- [12] 黄顺伟,管向东,陈娟,等. 乌司他丁联合胸腺肽 $\alpha 1$ 改善脓毒症患者免疫功能的作用机制研究[J]. 中国病理生理杂志,2009,25(11):2168-2172.
- [13] 农天雷,林敏. 肌钙蛋白两个亚单位在急性心肌梗死诊断中的应用分析[J]. 海南医学院学报,2011,17(3):325-327.
- [14] 刘刚,王晶,赵研. 乌司他丁对心肺复苏大鼠心功能及心肌组织 CD11b、ICAM-1 的影响[J]. 海南医学院学报,2010,16(4):413-416.
- [15] 彭娜,向定成,罗国新,等. 乌司他丁对脓毒症休克大鼠心功能及 p38MAPK 活化的影响[J]. 南方医科大学学报,2012,32(11):1620-1622.

(收稿日期:2013-05-09 修回日期:2013-05-28)

(上接第 3514 页)

- [12] Nazarenko I, Rana S, Baumann A, et al. Cell surface tetraspanin Tspan8 contributes to molecular pathways of exosome-induced endothelial cell activation[J]. Cancer Res, 2010,70(4):1668-1678.
- [13] Ashiru O, Boutet P, Fernández-Messina L, et al. Natural killer cell cytotoxicity is suppressed by exposure to the human NKG2D ligand MICA * 008 that is shed by tumor cells in exosomes[J]. Cancer Res, 2010,70(2):481-489.

- [14] Pegtel DM, Cosmopoulos K, Thorley-Lawson DA, et al. Functional delivery of viral miRNAs via exosomes [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010,107(14):6328-6333.
- [15] Henry GL, Anita MD, Sanjay P, et al. Production and characterization of clinical grade exosomes derived from dendritic cells [J]. J Immunol Methods, 2002, 270(2):211-226.

(收稿日期:2013-06-01 修回日期:2013-06-27)