

· 综 述 ·

外质体及其源性微 RNA 的研究进展

徐向东 综述, 吴小候[△] 审校

(重庆医科大学附属第一医院泌尿外科, 重庆 400016)

关键词: 微 RNA; 外质体; 提取法; 鉴定; 生物标志物; 靶向治疗

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.10.043

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2014)10-1269-03

外质体(exosomes)因携带有蛋白质、RNA 及信号分子,能够在细胞间穿梭,具有生物标记物、信号传导及靶向治疗载体等作用。微 RNA(microRNA, miRNA)为一类由内源基因编码的长度为 20~22 个核苷酸的非编码单链 RNA 分子,通过与靶基因 3'端非编码区结合从而促进靶基因降解或者抑制其翻译。目前,对 exosomes 中的 miRNA 的研究表明,其能影响很多靶细胞功能,鉴定正常人群血液中 exosomes 的 miRNA,可为人类疾病提供具有预测性的 miRNA,也可探究出特定的 miRNA 所调节的生物学功能^[1], Koh 等^[2]发现 miRNA 也存在于人类胚胎来源的间充质干细胞外环境中,在人类胚胎来源的间充质干细胞的细胞内与细胞外环境中检测到的 miRNA 有明显的不同,且 let-7 miRNA 家族在人类胚胎来源的间充质干细胞的细胞外与细胞内都高表达。先进的 miRNA 检测技术在 exosomes 中的 miRNA 检测取得了重要的进步,对其研究也逐渐便利。exosomes 中包含了一系列的 miRNA,但是与供体细胞相比,很少核糖体 RNA 被检测到^[3]。然而,在某些 exosomes 中的 miRNA 并没有反映出母细胞中的 miRNA 谱。在 T 细胞、B 细胞、树突状细胞中分离出的 exosomes 所含 miRNA 谱有别于母细胞^[4]。相比于细胞内的 RNA,exosomes 中的 RNA 更为稳定,而且在储存及冰冻环境中具有更好地抵抗降解的优势。exosomes 膜结构增强了内容物的稳定性,提高了其作为一种癌或疾病的生物标志物的研究潜能。

1 exosomes 的提取及鉴定

1.1 exosomes 的提取 (1)蔗糖密度梯度超速离心法:其为公认的 exosomes 提取方法。单纯次序离心可能导致部分微粒子或大分子复合物与之重叠,联合蔗糖密度梯度超速离心,可提供高度浓缩的 exosomes。(2)超滤法:Cheruvanky 等^[5]报道使用超滤法能够花更少时间提纯 exosomes,不会需要使用特殊的设备。Momen-Heravi 等^[6]宣布在 ExomiR 试剂盒(exosomes 中 miRNA 提取试剂盒)中第 1 个过滤柱能够移除所有细胞、血小板、细胞碎片,在第 2 个过滤柱中加压液体,能够俘获所有大于 30 nm 的微泡。对于这个方法,exosomes 是不可回收的, RNA 内容物直接在第 2 个过滤柱上萃取,然后被用作 PCR 分析。(3)高效液相层析仪方法:利用高效液相层析仪的方法能够获得高纯度的 exosomes,但这个过程需要专门的设备。血液及细胞培养基中包含大量的纳米粒,有些为非囊泡,大小可能和 exosomes 一样,比如 Wang 等^[7]发现大量 miRNA 在细胞外复合物中而不是在 exosomes 中。以上方法只是为提

供丰富的 exosomes 样本的好方法,但不是提纯 exosomes 的好方法。(4)ExoQuick 法:低聚物如聚乙二醇常被用来沉淀病毒及小粒,根据这个原理,最近, System Biosciences 公司发明了一种专门试剂,命名为 ExoQuick,其能加到血清、条件培养基及尿液中,沉淀出 exosomes^[8]。虽然这个方法非常快速直接,但缺乏特异性,以及使来自血清的微泡更难悬浮。(5)抗体俘获法:能较好的对 exosomes 进行特异性分离,该方法类似于用抗体对 CD63、CD81、CD82、CD9、EpCAM 和 Rab5 的纯化。但此方法抗体应该被固定在不同的媒介上,包括磁珠、层析基质、平板及微流体设备^[9]。HansaBioMed 提供了一批产品,命名为 ExoTest 试剂盒,主要以抗 CD63、CD81 或 CD9 抗体固定在 96 孔板上,以对 exosome 进行俘获^[10]。作为一个新领域,还需进一步明确整个系统的操作及提供的 exosomes 种类和数量。(6)其他:和抗体相似,别的类似的俘获方法也被使用。比如外源凝集素,它将结合到 exosomes 上特异的糖类产物上,这个方法已经被 Aethlon Medical 所应用^[11]。使用特异的外源性凝集素靶向结合甘露糖产物,其便利性在于被俘获的 exosomes 很容易被自由的 α 甲基甘露糖苷洗脱,但大量细胞在其表面也包含甘露糖,其对 exosomes 特异性不高,是否所有 exosomes 都能被俘获,也有待证明。

1.2 exosomes 鉴定 电镜下可见 exosomes 呈扁平状或球状、直径为 30~100 nm 的低密度物质,在蔗糖溶液中的密度为 1.13~1.21 g/mL,其密度与细胞来源相关,并随蛋白水平而变。所有 exosomes 包含了膜转运及融合蛋白(GTP 酶、强连蛋白、脂筏蛋白),跨膜蛋白(CD9、CD63、CD81、CD82),热休克蛋白(Hsp)70、Hsp90,多泡体来源的蛋白(Alix、TSG101),脂质相关蛋白及磷脂酶等,可用 Western blot、ELISA 等鉴定。mRNA 及 miRNA 有可能成为其新的标志物。

2 exosomes 源性 miRNA 的提取及鉴定

2.1 exosomes 源性 miRNA 的提取方法 其常见的萃取方法有 7 种。分别为: Trizol (Invitrogen, Paisley, 英国)、经 RNeasy Mini 试剂盒修饰纯化的 Trizol、RNeasy Mini 试剂盒、经修饰的 RNeasy Mini 试剂盒、miRNeasy Mini 试剂盒(4 个都来自 Qiagen, Hilden, 德国)、miRCURYTM RNA 分离试剂盒(Exiqon, Vedbaek, 丹麦)、mirVanaTM miRNA 分离试剂盒(Ambion, Austin, TX, 美国),都参照厂商说明书使用。Trizol 主要为提取总 RNA, miRNeasy Mini 试剂盒、miRCURYTM RNA 分离试剂盒、mirVanaTM miRNA 分离试剂盒可提

取总 RNA,也可直接从 exosomes 中提取 miRNA。RNA 提取后用分光光度仪检测其浓度^[12]。

2.2 目前常用的鉴定及分析方法 (1)克隆:主要用来发现新的 miRNA。试验的基本原理是从总 RNA 中提取 miRNA,制备 miRNA 的 cDNA 文库,然后提交到 RedBase 和 NCBI BLASTN 数据库中进行分析的方法。(2)实时荧光定量 PCR:通过 4 个阶段测定成熟 miRNA 的表达水平,分别为 cDNA 的合成、引物设计、扩增、数据标准化处理。与其他基因表达水平检测方法相比,实时荧光定量 PCR 的优点是重复性好,且探测范围小、试验成本低、定量精度与灵敏度高,以及样品消耗少。(3)Northern blotting:是一种常规检测 miRNA 表达的方法。与克隆相比,它检测 miRNA 精确度更高;经改良的 Northern blotting 具有更高灵敏性,并减少了试验时间。(4)miRNA 微阵列芯片技术及微球流式技术:是基于目标分子和它们相应的互补探针间的核酸杂交,也是同时研究数百个 miRNA 表达水平的最佳选择,但因重复性差及实验成本太高还没被普遍使用。(5)新一代大规模测序技术:主要用于对组织中所有 miRNA 进行定量和定性分析,目前大规模测序技术如 454 焦磷酸测序技术、Solexa 合成测序技术、SOLID 连接测序技术等,能一次检测几百万个样本^[13]。依据试验目的不同,选择合适试验方法以获得可靠的、准确的 miRNA 信息。

3 exosomes 中 miRNA 的研究进展

3.1 exosomes 源性 miRNA 作为疾病新的生物标志物 miRNA 的异常表达已经在很多疾病中被检测到,exosomes 源性 miRNA 正逐渐被认为是很多病理过程中的生物标志物。很多患者体内发现的 exosomes 源性 miRNA 并没有在健康人中发现。多种 miRNA,包括病毒 miRNA 存在于 exosomes 中,但是 exosomes 中的 miRNA 对受体细胞的功能还不是很清楚。经 EB 病毒感染 B95-8 LCL 细胞所释放的 exosomes 作用于单核细胞来源的树突状细胞,导致受体细胞的基因沉默^[14],由此可见,载有 miRNA 的 exosomes 能够充当一种运载工具,有助于了解疾病的发展或发病机制。有研究发现,巨噬细胞展现出能够通过分泌带有致瘤性 miRNA 的 exosomes 到瘤细胞,从而影响乳腺癌的侵袭力^[15]。从树突状细胞分泌的 exosomes 能同靶树突状细胞融合,释放出它们的内容物,从而导致 mRNA 沉默^[16]。Lim 等^[17]最近研究指出,包含 miRNA 的骨髓基质细胞来源的 exosomes 对抑制乳腺癌细胞的转移发挥作用。从骨髓基质细胞到乳腺癌细胞的 miRNA 能够参与抑制骨髓转移。在某种疾病中的特异性 miRNA 也许能够有助于了解疾病的发病机制及潜在的修复机制。在心血管疾病的患者中,循环血中来自损伤心肌的 exosomes 含有的 miRNA-133a 升高,miRNA-133a 为靶向调节 NFATc4 基因,其表达产物为调节心肌肥大的蛋白,通过抑制 miRNA-133a 的治疗能够降低心肌肥大的水平^[18]。exosomes 源性 miRNA 潜在肿瘤患者循环血液中相对于健康对照组,有明显的特异性^[19]。对循环血液中 exosomes 所含 miRNA 的筛查,将其作为生物标志物,也许有助于对肿瘤发展的鉴定。在 exosomes 中独特的 miRNA 谱已经在肺癌、胶质母细胞瘤、肝癌中筛出^[20],在肿瘤中,很多过程能被 exosomes 中 miRNA 影响。比如在肺腺癌患者与健康对照组中 miRNA 的组成就有很大的差异,但是肿瘤分离出的 miRNA 实质上与 exosomes 携带的 miRNA 相似,在肝癌中,一些

通过 exosomes 转运的 miRNA 可以下调 TAK1 通路,这个研究说明来自 exosomes 的 miRNA 可调节肝细胞癌的定位分布、肝内转移、多灶性生长^[21]。Liu 等^[22]发现肿瘤源的 exosomes 通过 MyD88 通路,增强骨髓源性抑制性细胞的促炎性细胞因子的扩张,从而促进肿瘤的转移。对 exosomes 源性 miRNA 的研究,为发现疾病新的生物标记物开启了新的途径。

3.2 靶向 exosomes 中 miRNA 的治疗潜能 由于 exosomes 能在细胞间高效的转运小分子物质,因此,可成为很多疾病极为有前景的治疗方式,因在诸多疾病中 exosomes 携带的 miRNA 为引起疾病的重要因素,集中在这些靶向的 exosomes 源性 miRNA 的药物研发意义重大,作为治疗的运输小泡 exosomes 覆盖了很多疾病,包括癌症、病毒诱导的疾病,以及寄生虫疾病等。Aivarez-Erviti 等^[23]在实验室成功的在老鼠来源的树突状细胞中,将嗜神经元性狂犬病毒糖蛋白肽融合到 exosomes 膜蛋白 Lamp2b 上,通过电传技术将这些细胞来源的 exosomes 与外源性甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphatedehydrogenase, GAPDH) 干扰 RNA 连接上,静脉注射具有嗜神经元的 exosomes,将 GAPDH 干扰 RNA 特异性转入大脑神经元、微神经胶质及少突细胞中,从而导致特殊的基因敲出。Akao 等^[24]报道经修饰的 miRNA (miRNA-143BPs 等)可在 miRNA-143BPs 转染后的单核巨噬细胞分泌的 exosomes 中检测到,更重要的是,当老鼠被注射 miRNA-143BPs 转染后的单核巨噬细胞后,在其血液、肿瘤及肾脏中可检测到升高的 miRNA-143BPs。这些数据说明,通过体外操纵 exosomes 的 miRNA 为靶向特异性转运 miRNA 的一个有效手段。在小鼠体内 exosomes 对转运干扰 RNA 到其靶细胞也是一个重要手段,目前研究 exosomes 转运 miRNA 主要是在动物模型上,其主要作用:(1)exosomes 能够作为靶向治疗手段;(2)通过 exosomes 转运 miRNA 到达靶细胞是可行的,在很多疾病中,体内功能性操纵 exosomes 内 miRNA 以转运 miRNA 将是一个新的治疗干预措施。随着技术的进步,允许操纵 exosomes 中 miRNA 及其蛋白,exosomes 中的 miRNA 的研究将通过其诊断和靶向治疗功能造福于患者。

4 展望

miRNA 作为在翻译水平影响基因表达的非编码 RNA,其参与调节多种生物学进程,在患者中检测具有预警作用的 miRNA,对预测疾病的发生、发展具有重要意义。exosomes 可在细胞间穿梭,携带 miRNA 等物质,运用 exosomes 转运人工干预的 miRNA,具有潜在对细胞和组织靶向治疗的功能。

目前,在 134 个 exosomes 的研究中,已经发现其包含 11 261 种蛋白,2 375 种 mRNA,764 种 miRNA^[25],用 exosomes 运输 miRNA 到靶细胞有以下几种优势:(1)exosomes 能直接运送 miRNA 到受体细胞,增加了改变靶细胞功能的可能性;(2)exosomes 能加强细胞与细胞的联系,而不必担心细胞与细胞的距离;(3)exosomes 可在体液及血液中检测出来,说明器官之间可通过 exosomes 交换信息;(4)exosomes 中包含特异性细胞因子,允许 exosomes 运送自身携带物(蛋白、mRNA、miRNA 等)高效的到达靶细胞,以发挥特有的生物学功能;(5)exosomes 携带的 miRNA 能独特的影响疾病,可通过鉴定在体液中分离出的 miRNA 来达到诊断疾病的目的;(6)exosomes 中的 miRNA 能够提供有效的工具来靶向治疗

特异性细胞和器官疾病。但 exosomes 及其携带的 miRNA 在技术上目前还不是很成熟,检测及处理成本均较高,不适合普遍在临床上使用,且其治疗手段均未应用于临床,仍需继续加大其提取、处理及安全性的研究,使其切实造福于患者。

参考文献:

- [1] Hunter MP, Ismail N, Zhang X, et al. Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles[J]. PLoS One, 2008, 3(11): e3694.
- [2] Koh W, Sheng CT, Tan B, et al. Analysis of deep sequencing microRNA expression profile from human embryonic stem cells derived mesenchymal stem cells reveals possible role of let-7 microRNA family in downstream targeting of hepatic nuclear factor 4 alpha[J]. BMC Genomics, 2010, 11 Suppl 1: S1-6.
- [3] 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.
- [4] Mittelbrunn M, Gutiérrez-Vázquez C, Villarroya-Beltri C, et al. Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells[J]. Nat Commun, 2011(2): 282.
- [5] Cheruvanky A, Zhou H, Pisitkun T, et al. Star Rapid isolation of urinary exosomal biomarkers using a nanomembrane ultrafiltration concentrator[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2007, 292(5): 1657-1661.
- [6] Momen-Heravi F, Balaj L, Alian S, et al. Current methods for the isolation of extracellular vesicles[J]. Biol Chem, 2013, 394(10): 1253-1262.
- [7] Wang K, Zhang S, Weber J, et al. Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells[J]. Nucleic Acids Res, 2010, 38(20): 7248-7259.
- [8] Taylor DD, Zacharias W, Gerçel-Taylor C. Exosome isolation for proteomic analyses and RNA profiling Methods[J]. Mol Biol, 2011, 728(1): 235-246.
- [9] Chen C, Skog J, Hsu CH, et al. Microfluidic isolation and transcriptome analysis of serum microvesicles[J]. Lab Chip, 2010, 10(4): 505-511.
- [10] Logozzi M, De Milito A, Lugini L, et al. High levels of exosomes expressing CD63 and caveolin-1 in plasma of melanoma patients[J]. PLoS One, 2009, 4(4): e5219.
- [11] Vlassov AV, Magdaleno S, Setterquist R, et al. Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials[J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1820(7): 940-948.
- [12] Eldh M, Lötval J, Malmhäll C, et al. Importance of RNA isolation methods for analysis of exosomal RNA: Evaluation of different methods[J]. Mol Immunol, 2012, 50(4): 278-286.
- [13] 景花, 宋沁馨, 周国华. microRNA 定量检测方法的研究进展[J]. 遗传, 2010, 32(1): 31-40.
- [14] Pegtel DM, Cosmopoulos K, Thorley-Lawson DA, et al. Functional delivery of viral miRNAs via exosomes[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(14): 6328-6333.
- [15] Yang M, Chen J, Su F, et al. Microvesicles secreted by macrophages shuttle invasion-potentiating microRNAs into breast cancer cells[J]. Mol Cancer, 2011(10): 117.
- [16] Montecalvo A, Larregina AT, Shufesky WJ, et al. Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes[J]. Blood, 2012, 119(3): 756-766.
- [17] Lim PK, Bliss SA, Patel SA, et al. Gap junction-mediated import of microRNA from bone marrow stromal cells can elicit cell cycle quiescence in breast cancer cells[J]. Cancer Res, 2011, 71(5): 1550-1560.
- [18] Kuwabara Y, Ono K, Horie T, et al. Increased microRNA-1 and microRNA-133a levels in serum of patients with cardiovascular disease indicate myocardial damage[J]. Circ Cardiovasc Genet, 2011, 4(4): 446-454.
- [19] Taylor DD, Gerçel-Taylor C. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer[J]. Gynecol Oncol, 2008, 110(1): 13-21.
- [20] Rabinowits G, Gerçel-Taylor C, Day JM, et al. Exosomal microRNA: a diagnostic marker for lung cancer[J]. Clin Lung Cancer, 2009, 10(1): 42-46.
- [21] Kogure T, Lin WL, Yan IK, et al. Intercellular nanovesicle-mediated microRNA transfer: a mechanism of environmental modulation of hepatocellular cancer cell growth[J]. Hepatology, 2011, 54(4): 1237-1248.
- [22] Liu Y, Xiang X, Zhuang X, et al. Contribution of MyD88 to the tumor exosome-mediated induction of myeloid derived suppressor cells[J]. Am J Pathol, 2010, 176(5): 2490-2499.
- [23] Alvarez-Erviti L, Seow Y, Yin H, et al. Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes[J]. Nat Biotechnol, 2011, 29(4): 341-345.
- [24] Akao Y, Iio A, Itoh T, et al. Microvesicle-mediated RNA molecule delivery system using monocytes/macrophages[J]. Mol Ther, 2011, 19(2): 395-399.
- [25] Mathivanan S, Fahner CJ, Reid GE, et al. ExoCarta 2012: database of exosomal proteins, RNA and lipids[J]. Nucleic Acids Res, 2012, 40(1): 1241-1244.

(收稿日期: 2013-10-03 修回日期: 2013-12-10)