

网络出版时间: 2017-3-21 13:44 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170321.1344.034.html>

# 采用高速离心及 ExoQuick-TC 法提取小鼠骨髓间充质干细胞来源外泌体比较及鉴定

韩金秀<sup>1</sup>, 李宏远<sup>1</sup>, 撒亚莲<sup>2</sup>, 严丹<sup>3</sup>, 贺继刚<sup>1</sup>

**摘要** 比较及鉴定超高速离心法及 ExoQuick-TC 法提取小鼠骨髓间充质干细胞来源外泌体。采用 BCA 蛋白检测可见 ExoQuick-TC 法提取的外泌体蛋白含量高于超高速离心法提取的蛋白含量。Exosome Antibodies Array & ELISA Kits 检测可见 ExoQuick-TC 法提取外泌体的纯度优于超高速离心法提取的纯度。两种方法提取的外泌体电镜下形状无差异。随机选取 3 个电镜视野进行计数可见 ExoQuick-TC 法提取外泌体数量多于超高速离心法提取外泌体。ExoQuick-TC 法提取的外泌体具有更高的产量及纯度。

**关键词** 外泌体; 小鼠骨髓间充质干细胞; 超高速离心; ExoQuick-TC 法

中图分类号 R 654.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)04-0611-04  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.04.034

外泌体是由多种细胞分泌的一种大小介于 40~100 nm 的细胞外囊泡中的一种<sup>[1-2]</sup>。其具有多种功能, 主要包括细胞间信息交流、抗原呈递、致癌蛋白、mRNA 和 miRNA 的转移等。生物体液和体外细胞培养物可以通过各种方法和技术对细胞分泌出的外泌体进行纯化<sup>[3-4]</sup>。但是, 无论采用什么纯化方法最终都有可能含有不同比例其它类型的囊泡, 如脱落的微泡和细胞凋亡小体等<sup>[5-6]</sup>。该实验采用国内外最常见的超速离心法及 Exoquick TC 法提取纯化小鼠骨髓间充质干细胞来源的外泌体, 比较两

种方法提取、纯化外泌体的蛋白含量、纯度等, 为进一步探讨过表达 GATA-4 小鼠骨髓间充质干细胞分泌外泌体的生物学功能奠定坚实基础。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 雄性 SPF 级 C57BL/6 小鼠 6 只, 体重 (33.2 ± 1.3) g, 由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供。所有动物的饲养、观察按照非临床研究管理规范规定执行。100 g/L 水合氯醛购自云南省第一人民医院; BCA 试剂盒、青霉素、链霉素购自上海碧云天公司; ExoQuick-TC 及 Exosome Antibodies Array & ELISA Kits 购自美国 SBI 公司; CS150NX 超速离心机及超速离心管 (Hitachi Koki 332245A)、S-3000N 扫描电镜购自日立公司; CO<sub>2</sub> 孵箱购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; PRMI1640、FBS 购自美国 Gibco 公司; CD44、CD29、CD11b、SCA-1 购自美国 eBioscience 公司; CD11bMicroBeads 购自德国 Miltenyi 公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养液准备** 细胞培养液中添加的血清应提前通过超滤离心 (38 400 r/min, 4 °C, 7 h) 去除外泌体。全骨髓培养小鼠 BMSC, 胰酶消化传代至第 3 代时采用 CD11b 的磁珠负选, 去除造血干祖细胞。继续传代至第 6 代, 采用流式细胞仪检测细胞表面标志抗原 CD44、CD29、CD11b、SCA-1 的表达。将第 6 代小鼠骨髓间充质干细胞 (10<sup>6</sup>) 在不含外泌体血清的培养基中培养至少 48 h。

**1.2.2 采用 ExoQuick-TC 法提取 C57BL/6 小鼠骨髓间充质干细胞分泌外泌体** 细胞培养 48 h 后收集培养基 5 430 r/min 离心 15 min, 以去除细胞及细胞碎片; 加入适当体积的 ExoQuick-TC 外泌体沉淀液 (每 5 ml 培养基内加入 1 ml ExoQuick-TC)。反复颠倒或轻弹试管使其混匀, 冷藏 4 °C 过夜。以 3 840 r/min 离心 ExoQuick-TC/体液混合液 30 min。外泌体沉淀位于试管底部, 呈浅褐色或白色。

**1.2.3 采用超高速离心法提取 C57BL/6 小鼠骨髓**

2016-12-30 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81460073, 31460298); 云南省科技厅-昆明医科大学应用基础研究联合专项 (编号: 2014FB089); 云南省教育厅科学研究基金 (编号: 2015Z051); 中国博士后科学基金 (编号: 2015M582764XB); 成都医学院校级课题 (编号: CYZ15-18)

作者单位: 昆明理工大学附属云南省第一人民医院<sup>1</sup> 心脏大血管外科、<sup>2</sup> 基础研究所、<sup>3</sup> 重症医学科, 昆明 650032

作者简介: 韩金秀, 女, 硕士研究生;

贺继刚, 男, 主治医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: jianghe999@163.com

间充质干细胞分泌外泌体 细胞培养 48 h 后收集培养基转移到超离心管, 培养基在 4 °C、以 12 736 r/min 离心 20 min 以进一步去除细胞和细胞碎片。再通过 0.2 μm 的过滤膜去除 >200 nm 的颗粒。4 °C 条件下以 34 288 r/min 离心 80 min 收集外泌体, 所得沉淀即为外泌体。

1.2.4 采用 Exosome Antibodies, Array & ELISA Kits 检测两种方法提取外泌体纯度 37 °C 孵育两种方法提取的外泌体 20 min, 以释放外泌体蛋白。在微孔板的孔板中加入 50 μl 准备好的蛋白标准品和外泌体蛋白品。37 °C 孵育过夜, 洗板 3 次。按 1 : 100 的比例, 用 1 × 封闭缓冲液稀释特异性的一抗 (CD9), 并每孔添加 50 μl, 并在室温下摇动孵育 1 h。按 1 : 2 000 的比例, 每孔添加 50 μl 二抗, 加入 50 μl 的超敏感的 TMB ELISA 底物, 加入停止缓冲液, 在吸光度 450 nm 下, 用分光光度仪获取定量结果。

1.2.5 电镜观察两种方法提取外泌体形态 将两种方法来源获取的小鼠骨髓间充质干细胞外泌体, 加入 3% 戊二醇 5 ml 固定后, 常规扫描电镜标本制备 S-3000N 扫描电镜观察。

1.3 统计学处理 使用 SPSS 15.0 软件进行统计分析, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示; 采用两独立样本 *t* 检验, 统计假设检验均为双侧, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 流式细胞术分析小鼠骨髓间充质干细胞表面标志抗原 CD29 和 CD44、CD11b、SCA-1 表达 结果显示超过 90% 小鼠骨髓间充质干细胞性表达 CD29: 98% (细胞整合素分子)、CD44: 100% (黏附分子, 介导细胞对透明质酸和骨桥蛋白的黏附)、SCA-1 (干细胞抗原-1): 99.5%; 但不表达造血祖细胞表面标志 CD11b: 0.1%。

2.2 采用 BCA 法检测超高速离心法及 ExoQuick-TC 法) 提取小鼠骨髓间充质干细胞分泌外泌体的浓度(共 3 次) ExoQuick-TC 法提取的外泌体中蛋白含量与超高速离心法提取外泌体中蛋白含量比较差异有统计学意义 (*P* < 0.05)。ExoQuick-TC 法来源外泌体浓度更高。见表 1。

2.3 采用 Exosome Antibodies, Array & ELISA Kits 检测超高速离心法及 ExoQuick-TC 法提取小

鼠骨髓间充质干细胞分泌外泌体的纯度(共 3 次)

ExoQuick-TC 法提取外泌体的纯度与超高速离心法提取外泌体的纯度比较差异有统计学意义 (*P* < 0.05)。ExoQuick-TC 法来源外泌体纯度更高。见表 1。

2.4 采用扫描电镜检测超高速离心法及 ExoQuick-TC 法提取小鼠骨髓间充质干细胞分泌外泌体的形态并计数 按上述方法将超高速离心法提取 10<sup>6</sup> 的小鼠骨髓间充质干细胞来源外泌体及 ExoQuick-TC 法提取小鼠骨髓间充质干细胞来源外泌体进行扫描电镜观察。结果显示超高速离心法来源外泌体及 ExoQuick-TC 法来源外泌体数量形态无差别, 但易于聚集成团。在电镜下任意选取 3 个视野, 对外泌体进行计数显示, ExoQuick-TC 法提取外泌体与超高速离心法提取外泌体比较差异有统计学意义 (*P* < 0.05)。ExoQuick-TC 法来源外泌体数量更多。见表 1、图 1。

表 1 两种方法提取 C57BL/6 小鼠骨髓间充质干细胞分泌外泌体的浓度、纯度及电镜下随机选取 3 个电镜视野对外泌体进行计数 (*n* = 3  $\bar{x} \pm s$ )

项目	超高速离心法	ExoQuick-TC 法	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
浓度 (μg/μl)	1.960 6 ± 0.054 6	4.595 3 ± 0.062 3	2.876	< 0.001
纯度 (×10 <sup>8</sup> 个)	2.23 ± 0.18	5.50 ± 0.34	2.968	< 0.001
电镜下数量 (个)	13.00 ± 2.00	32.67 ± 4.51	3.187	< 0.001

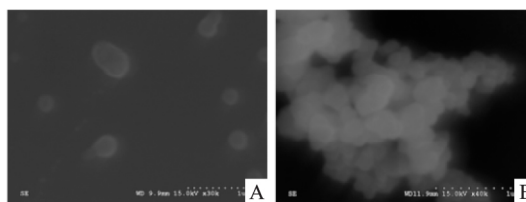


图 1 超高速离心法及 ExoQuick-TC 法提取的小鼠骨髓 MSCs 来源外泌体进行扫描电镜观察 ×3 000 A: 超高速离心法来源外泌体; B: ExoQuick-TC 法来源外泌体

## 3 讨论

外泌体是小的膜性囊泡, 于 1981 年首先被提出来, 是从细胞上产生的鳞片状脱落的囊泡, 具有胞外酶的活性, 从 20 世纪 90 年代起受到极大关注<sup>[7-9]</sup>。最初认为外泌体仅仅起到一种“垃圾袋”的作用, 允许细胞丢掉不需要的蛋白。当内涵体和细胞膜相互融合并且释放囊泡体进入细胞间隔。现证实, 其来

源于细胞后期内涵体,并且可以在造血干细胞和上皮细胞的培养基中检测到。外泌体具有多种生物学功能,可以使细胞在不需直接接触下完成细胞间生物信号的传导,其在细胞保护、免疫、疾病诊断等方面成为研究热点。而对其的提取、纯化则成为进一步研究的基础。目前,国内外对外泌体的提取、纯化,主要包括超速离心法、Optiprep™ 基于密度的分离法、免疫捕获法(使用抗 EpCAM 包被的磁珠分离)及改良 Exoquick TC 法<sup>[10]</sup>。据 Mayfield et al<sup>[11]</sup> 报道,免疫捕获法是分离外泌体的最有效的方法。但该方法费用高。本实验利用目前国内、外常用的超速离心法及改良 Exoquick TC 法提取纯化小鼠骨髓间充质干细胞来源的外泌体,比较两种方法提取及纯化外泌体的效果。

据 Letelier et al<sup>[12]</sup> 报道:采用常规超速离心的方法,100 000 r/min 离心 1 h。能够从  $6 \times 10^8$  细胞中得 375  $\mu\text{g}$  的蛋白。采用 Western blot 法分析超高速离心提取的外泌体可见标记物 Alix、HSP70、TSG101 表达。通过电镜对外泌体进行形态分析,可见囊泡群体中含有一些  $\phi 40 \sim 100 \text{ nm}$  的囊泡,这与外泌体大小一致<sup>[13]</sup>,还有一些更大的囊泡聚在一起。这些较大的囊泡性质未知,但多离心步骤和(或)深度冻融处理步骤不应该影响外泌体的大小。本实验采用超高速离心法提取外泌体可见:外泌体量较少且较为分散,本实验并没有观察到外泌体与一些更大的囊泡聚在一起,可能是不同细胞分泌出的外泌体采用超高速离心法分离后表现有不同。据 De Veirman et al<sup>[14]</sup> 报道:采用改良 Exoquick TC 法从尿液中提取及纯化外泌体。并采用 ELISA 法检测 CD9 的表达可见外泌体的纯度可达 96% 以上,Western blot 法检测 Alix、TSG101、TSP 及 Tamm-Horsfall 的表达可见上述外泌体的标志性分子的表达量高。本实验与上述结果一致。采用 Exoquick TC 法提取外泌体可以表达出较高的 CD9。

外泌体具有广泛的诊断和治疗潜力,现在研究外泌体的主要障碍是如何提取及纯化。本实验首次通过采用超高速离心法及改良 Exoquick-TC 法提取、纯化来源于小鼠骨髓间充质干细胞分泌的外泌体进行对比评估。采用 BCA 蛋白测定法测定外泌体中含有的蛋白量,ELISA 法检测外泌体表达 CD9,电镜检测外泌体形态及数量,从而明确证实 Exoquick-TC 法提取的外泌体具有更高的纯度及浓度,

这两种方法得到的小囊泡大小都在  $40 \sim 100 \text{ nm}$ ,都表达有外泌体的标志物 CD9。然而,Exoquick-TC 法分离的外泌体能表达更加丰富的 CD9。Exoquick-TC 法提取外泌体为进一步研究外泌体的生物学特征奠定了基础。

## 参考文献

- [1] Sheridan C. Exosome cancer diagnostic reaches market [J]. *Nat Biotechnol*, 2016, 34(4): 359–60.
- [2] Lässer C, Eldh M, Lötvall J. Isolation and characterization of RNA-containing exosomes [J]. *J Vis Exp*, 2012(59): e3037.
- [3] Lakkaraju A, Rodriguez-Boulan E. Itinerant exosomes: emerging roles in cell and tissue polarity [J]. *Trends Cell Biol*, 2008, 18(5): 199–209.
- [4] Villasante A, Marturano-Kruik A, Ambati S R, et al. Recapitulating the size and cargo of tumor exosomes in a tissue-engineered model [J]. *Theranostics*, 2016, 6(8): 1119–30.
- [5] Kalkan R, Serakinci N. Human mesenchymal stem cells in cancer therapy [J]. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 2016, 26(1): 41–8.
- [6] Akrap I, Thavamani A, Nordheim A. Vps4A-mediated tumor suppression upon exosome modulation? [J]. *Ann Transl Med*, 2016, 4(9): 180.
- [7] Hogue I B, Scherer J, Enquist L W. Exocytosis of alphaherpesvirus virions, light particles, and glycoproteins uses constitutive secretory mechanisms [J]. *MBio*, 2016, 7(3): pii: e00820–16.
- [8] Del Cacho E, Gallego M, Lillehoj H S, et al. Induction of protective immunity against experimental *Eimeria tenella* infection using serum exosomes [J]. *Vet Parasitol*, 2016, 224: 1–6.
- [9] Tan L, Wu H, Liu Y, et al. Recent advances of exosomes in immune modulation and autoimmune diseases [J]. *Autoimmunity*, 2016, 49(6): 357–65.
- [10] Harpole M, Davis J, Espina V. Current state of the art for enhancing urine biomarker discovery [J]. *Expert Rev Proteomics*, 2016, 13(6): 609–26.
- [11] Mayfield A E, Fitzpatrick M E, Latham N, et al. The impact of patient co-morbidities on the regenerative capacity of cardiac explant-derived stem cells [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2016, 7(1): 1–7.
- [12] Letelier P, Riquelme I, Hernández A H, et al. Circulating microRNAs as biomarkers in biliary tract cancers [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(5): pii: E791.
- [13] Desrochers L M, Antonyak M A, Cerione R A. Extracellular vesicles: satellites of information transfer in cancer and stem cell biology [J]. *Dev Cell*, 2016, 37(4): 301–9.
- [14] De Veirman K, Wang J, Xu S, et al. Induction of miR-146a by multiple myeloma cells in mesenchymal stromal cells stimulates their pro-tumoral activity [J]. *Cancer Lett*, 2016, 377(1): 17–24.

## Comparison of ultracentrifugation and ExoQuick-TC for the identification of exosomes extracted from mouse bone marrow mesenchymal stem cells

Han Jinxiu<sup>1</sup>, Li Hongyuan<sup>1</sup>, Sa Yalian<sup>2</sup>, et al

(<sup>1</sup>Dept of Cardiovascular, <sup>2</sup>Dept of Basic Researcher, The First People's Hospital of Yunnan Province, Affiliated Hospital of Kunming University of Science and Technology, 650032)

**Abstract** To compare ultracentrifugation and ExoQuick-TC in identifying the characteristics of exosomes extracted from mouse bone marrow mesenchymal stem cells. BCA protein assay revealed that the protein contents in the ExoQuick-TC-extracted exosomes were higher than those in the ultracentrifugation-extracted exosomes. Analysis using exosome antibodies, array, and ELISA kits indicated that the purity of the ExoQuick-TC-extracted exosomes was higher than that of the ultracentrifugation-extracted exosomes. Electronmicroscopy demonstrated that the morphological characteristics of the ExoQuick-TC-extracted exosomes did not significantly differ from those of the ultracentrifugation-extracted exosomes. Three electron microscope visual fields were randomly selected to count the number of exosomes. Results showed that the number of the ExoQuick-TC-extracted exosomes was more than that of the ultracentrifugation-extracted exosomes. Therefore, the production and purity of ExoQuick-TC-extracted exosomes are higher than those of ultracentrifugation-extracted exosomes.

**Key words** exosome; mouse bone marrow mesenchymal stem cells; ultra-high speed centrifuge; ExoQuick-TC

(上接第 610 页)

的可靠性及其影响因素分析[J]. 中华超声影像学杂志, 2011, 20(4): 314-7.

[8] 郝少云, 欧冰, 钟文景, 等. 弹性成像对新版 BI-RADS-US 评估乳腺肿物良恶性的价值[J]. 中国超声医学杂志, 2015, 31

(4): 292-5.

[9] 陈晓姣, 陈曼, 李丽蟾, 等. 乳腺疾病超声弹性成像对 BI-RADS-US 分类评估的价值探讨[J]. 中国超声医学杂志, 2016, 32(7): 586-9.

## Diagnostic value of real-time tissue elastography for BI-RADS category 4 breast lesions

Gan Lu, Tong Qingping, Du Huan, et al

(Dept of Ultrasound Center, 105th Hospital of PLA, Hefei 230031)

**Abstract** One hundred and thirty-five cases of patients with a total of 147 breast lesions were examined by conventional ultrasound and diagnosed as breast imaging report and data system (BI-RADS) category 4 level, then elastography was performed using real-time tissue elasticity imaging (RTE). Taking pathological results as golden standard, we evaluated the efficiency of improved 5-point method and constructed receiver operating characteristic curve (ROC) of strain ratio (SR) measurement method in the differential diagnosis of benign and malignant breast lesions. The sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) of improved 5-point method for diagnosis of BI-RADS category 4 breast lesions were 82.26%, 83.53%, 78.46% and 86.59%, respectively. The SR values of benign and malignant breast lesions had significant difference ( $t = 8.65$ ,  $P < 0.001$ ). The area under the curve (AUC) of SR measurement method in differential diagnosis of breast benign and malignant lesions was 0.866. When the diagnostic cut-off point was 2.365, the sensitivity and specificity was 93.5% and 65.9%, respectively, suggesting that ultrasound elastography has a high diagnostic power in the identification of BI-RADS grade 4 breast lesions.

**Key words** real-time tissue elastography; breast lesions; improved 5-point method; strain ratio; diagnostic efficacy