

THP-1 分化的巨噬细胞来源 Exosomes 的生物学特征鉴定

王建军¹, 姚永良¹, 陈 偲², 吴建红¹, 赵淑玲², 汤立军^{2*}

(1. 江苏大学 附属昆山医院, 中国江苏 昆山 215300; 2. 中南大学 生命科学学院 分子生物学系, 中国湖南 长沙 410078)

摘 要: 利用佛波酯体外分化人急性单核白血病细胞形成巨噬细胞, 并用低温超速离心法从巨噬细胞培养上清收集 Exosomes, 并分析其生物学特征。Exosomes 经透射电显微镜分析形态, 并用 Western blot 方法分析 Exosomes 膜上特异性蛋白 CD80、ICAM-3、HSP-70 的表达对其生物学特征进行鉴定。研究结果表明佛波酯成功诱导人急性单核白血病细胞分化成人巨噬细胞。获得的巨噬细胞分泌微小囊泡经透射电镜分析后, 微小囊泡的直径在 30~100 nm, 并且其含有 Exosomes 的特征性蛋白 CD80、ICAM-3、HSP-70 等蛋白, 表明其为 Exosomes。使用低温超速离心法成功收集到 Exosomes, 为后续开展 Exosomes 的成份及功能分析提供了保障。

关键词: 巨噬细胞; Exosomes; 透射电镜; 超速离心

中图分类号: Q28

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2014)04-0283-03

Analysis of the Biological Characterization of Exosomes Secreted from THP-1 Differentiation Macrophage

WANG Jian-jun¹, YAO Yong-liang¹, CHEN Cai², WU Jian-hong¹,
ZHAO Shu-ling², TANG Li-jun^{2*}

(1. Kunshan Hospital Affiliated Jiangsu University, Kunshan 215300, Jiangsu, China; 2. Department of Molecular Biology, School of Life Science, Central South University, Changsha 410078, Hunan, China)

Abstract: Human acute monocytic leukemia cells were induced to differentiate into macrophages with phorbol myristoyl acetate (PMA) *in vitro*, then Exosomes were purified from the culture medium of macrophages supernatant by ultracentrifugation method. The morphology of Exosomes were analyzed by transmission electron microscopy, and specific membrane proteins such as CD80, ICAM-3, and HSP-70 were detected by Western blot. The results show that human acute monocytic leukemia cells were induced into human macrophages successfully. The diameter of tiny vesicles analyzed by transmission electron microscopy (TEM) was 30~100 nm, and Exosomes specific proteins CD80, ICAM-3, and HSP-70 were also be detected successfully. Above all mean Exosomes could be purified by the ultracentrifugation method effectively, and laid a solid functional and components analysis of Exosomes in the following experiments.

Key words: macrophages; Exosomes; transmission electron microscopy; ultracentrifugation

(*Life Science Research*, 2014, 18(4): 283~285)

Johnstone 等^[1]研究网织红细胞发育时, 发现网织红细胞成熟过程中会分泌出一种囊泡状物质, 于是分离纯化了该物质并命名为 Exosomes。

目前研究认为 Exosomes 由细胞内多泡体(multi-vesicular body, MVB) 与细胞膜融合后, 释放到细胞外基质中的一种直径约 30~100 nm 的膜性囊

收稿日期: 2014-02-17; 修回日期: 2014-04-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81071326); 昆山市科技计划项目(KS1347)

作者简介: 王建军 (1986-), 男, 江苏南通人, 硕士, 主要从事白血病发生的分子机制及巨噬细胞先天性免疫机制研究, E-mail: wangjian-jun0520@163.com; * 通讯作者: 汤立军(1971-), 男, 湖南沅江人, 中南大学研究员, 博士, 主要从事白血病发生的分子机制及巨噬细胞先天性免疫机制研究, Tel: 0731-84805449, E-mail: tljxie@csu.edu.cn。

泡, 这些小囊泡具有呈递生物相关抗原与免疫治疗作用的特性^[2,3]。

巨噬细胞是目前功能最强的抗原呈递细胞, 能刺激初始型 T 细胞增殖, 激发机体免疫应答。巨噬细胞分泌的 Exosomes 主要表达 MHC 分子、共刺激分子及特异性抗原肽, 并能将抗原刺激信号运送到抗原递呈细胞 (antigen-presenting cells, APC) 或 T 淋巴细胞从而诱导特异性免疫应答, 发挥重要的免疫调节作用^[4]。近些年来 Exosomes 在免疫调节、肿瘤治疗、疫苗开发等方面的作用已经引起科研人员的极大关注并已经展开了许多基础与临床研究。

但由于 Exosomes 直径一般在 30~100 nm 内, 很难从细胞上清中分离及获得纯度较高的 Exosomes。本文主要利用低温超速离心方法收集巨噬细胞分泌的 Exosomes, 并对其形态学与生物学特性进行初步的分析鉴定, 为后续实验研究奠定了实验技术基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

人单核白血病细胞系 THP-1 来自武汉大学保藏中心。

1.2 试剂及仪器

RPMI-1640 培养基、胎牛血清购自美国 Hyclone 公司, CD80、ICAM-3、HSP-70 抗体购自美国 Santa Cruz 生物技术公司、佛波酯(12-邻-14-烷酰佛波醇-13-乙酸酯, PMA) 购自德国默克公司, Cocktail 蛋白酶抑制剂购自长沙海扬生物技术公司、蔗糖、磷钨酸均购自南京金斯瑞生物技术公司。

美国 Beckman 超速离心机; 日本日立透射电子显微镜; 美国 Forma Scientific CO₂ 细胞培养箱; 倒置显微镜(Olympas); 中国六一垂直电泳仪。

1.3 细胞培养

THP-1 细胞于含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中, 37 °C, 5% CO₂ 饱和湿度环境中培养 48 h 后, 0.1 mmol/L PMA 诱导 THP-1 细胞 24 h, 使其分化形成巨噬细胞。

1.4 Exosomes 收集

收集巨噬细胞上清液, 4 °C, 4 000 r/min, 离心 20 min, 保留上清; 4 °C, 10 000 r/min, 离心 45 min, 保留上清; 4 °C, 32 000 r/min, 离心 60 min, 保留沉淀, 9% 蔗糖溶液 200 μL、100×蛋白酶抑制剂

2 μL 溶解沉淀; 4 °C, 40 000 r/min, 离心 45 min 保留沉淀, 9% 蔗糖溶液 50 μL、100×蛋白酶抑制剂 1 μL 溶解沉淀, -80 °C 保存备用。

1.5 Exosome 透射电镜鉴定

取 10 μL 新鲜 Exosomes 溶液, 3% 磷钨酸染色 5 min, 将 Exosomes 滴于铜网膜, 65 °C 烤干, 透射电镜下观察其形态大小并拍照保存分析 Exosomes 提纯质量。

1.6 Western blot

Bradford 方法测定 Exosomes 蛋白浓度; 配制 10% SDS-PAGE 电泳凝胶, 将变性后的蛋白质按 50 μg 的蛋白质总量上样电泳, 然后通过电转移法将蛋白质转至 PVDF 膜上, 以免抗人 CD80、ICAM-3、HSP-70 抗体作为一抗, 辣根过氧化物酶标记的二抗进行免疫反应, 凝胶成像系统观察拍照。

2 结 果

2.1 佛波酯(PMA)诱导 THP-1 分化成巨噬细胞

THP-1 细胞培养 48 h 后细胞密集度达 80% 后的生长情况, THP-1 细胞经 0.1 mmol/L PMA 诱导 24 h 后, 分化形成梭形巨噬细胞(图 1), 分化形成的类巨噬细胞具很强的吞噬功能。

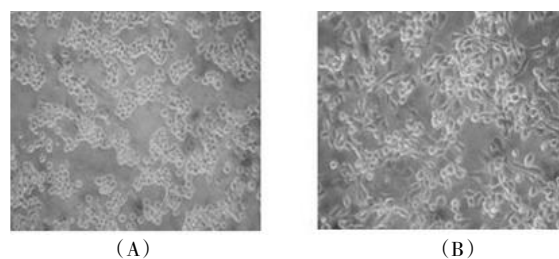


图 1 THP-1 细胞培养及巨噬细胞分化形成 (×40)

(A) THP-1 细胞; (B) THP-1 细胞经 0.1 mmol/L PMA 诱导分化形成巨噬细胞。

Fig.1 THP-1 cells were cultured and differentiated into macrophage (×40)

(A) Human monocytic leukemia cell line THP-1; (B) THP-1 cells differentiated into macrophages by 0.1 mmol/L PMA.

2.2 透射电镜鉴定 Exosomes

10 μL 新鲜 Exosomes 溶液, 与 3% 磷钨酸 2 μL 染色 5 min 后, Exosomes 溶液轻轻滴于铜网膜, 65 °C 烤干, 透射电镜下观察 Exosomes 形态学特征(图 2A), 并利用 NanoSight 统计系统分析 Exosomes 溶液中囊泡直径大小, 并绘制曲线(图 2B)。

2.3 Exosomes 膜蛋白表达

CD80、ICAM-3 和 HSP-70 3 种蛋白质在不同细胞来源的 Exosomes 上均有表达, 目前认为这 3

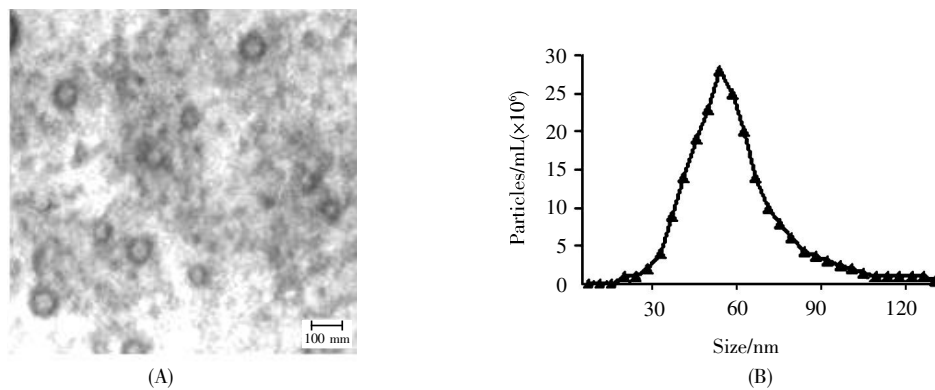


图 2 Exosomes 形态分析

(A) 透射电镜观察 Exosomes 形态 ($\times 100\ 000$); (B) NanoSight 分析 Exosomes 直径并统计绘制区间图。

Fig.2 Analysis of Exosomes morphology

(A) Exosomes morphology observed by TEM ($\times 100\ 000$); (B) The diameter of Exosomes analyzed by NanoSight Statistical System.

种蛋白质可以作为 Exosomes 的特征蛋白质。Western blot 研究分析巨噬细胞分泌的 Exosomes 膜上 CD80、ICAM-3、HSP-70 的表达(图 3)。

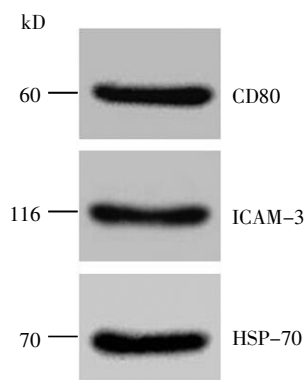


图 3 3 种膜蛋白 CD80、ICAM-3、HSP-7 在巨噬细胞分泌的 Exosomes 中的表达

Fig.3 CD80, ICAM-3, and HSP-70 expressed in membrane of Exosomes secreted from macrophages

3 讨论

近年来,越来越多的实验结果证明:树突状细胞和肿瘤细胞产生的 Exosomes 具有显著的免疫调节功能,可转运肿瘤抗原至抗原提呈细胞,诱导细胞毒性 T-淋巴细胞反应,产生和增强抗原特异性免疫应答; Exosomes 的非细胞性及其不易被体内环境诱导丧失活性、无繁殖能力、稳定性高、体积小易清除、储藏时间长等优点,使 Exosomes 有可能成为一种很有潜力的新型无细胞治疗性肿瘤疫苗^[5]。目前法国科学家研究的树突状来源的 Exosomes 肿瘤疫苗已经进入临床 I 期,并且尚未

发现任何副作用。Bard 等^[6]研究报道,肿瘤来源的 Exosomes 亦可诱导有效免疫应答,如恶性渗出物(胸水、腹水)中的 Exosomes 同样含有肿瘤抗原和抗原提呈分子,可以诱导产生抗肿瘤-细胞反应。

本研究通过佛波酯 PMA 在体外诱导人单核白血病细胞分化形成巨噬细胞,并通过超速离心法收集巨噬细胞培养上清中微小囊泡。经透射电镜分析表明收集到的 95% 的微小囊泡物质的直径在 30~100 nm 范围内,从而证明低温超速多步离心法成功收集获得巨噬细胞分泌的 Exosomes,该方法可以应用于大批量 Exosomes 的收集以满足后续实验 Exosomes 的需求。

根据蛋白质组学的研究分析, Exosomes 蛋白成分可以分为 3 类: 提呈相关蛋白质如热休克蛋白、MHC 类分子; 信号转导相关蛋白质如整合素、膜联蛋白、四跨膜蛋白家族; 细胞骨架蛋白如肌动蛋白、微管蛋白,不同细胞来源的 Exosomes 的蛋白质有一定差别^[7],而脂质成分与质膜的成分相似。Exosomes 介导细胞间信息传递主要通过 Exosomes 表面蛋白复合体与不同细胞表面受体配对,在细胞之间没有直接接触的情况下进行细胞之间的信号传导^[8]。本实验采用 Western blot 方法分析了巨噬细胞来源 Exosomes 表面的 3 种特征性蛋白 CD80、ICAM-3、HSP-70 的表达,实验再次表明 Exosomes 的蛋白种类丰富,且不同来源 Exosomes 的蛋白有一定的共同性。本实验的初步研究为后续大规模收集 Exosomes 及后续免疫动物实验打下了坚实的技术基础。

(下转第 309 页)

参考文献(References):

- [1] AGUILAR P S, de MENDOZA D. Control of fatty acid desaturation: a mechanism conserved from bacteria to humans[J]. *Molecular Microbiology*, 2006, 62(6): 1507-1514.
- [2] SAMPATH H, NTAMBI J M. Polyunsaturated fatty acid regulation of genes of lipid metabolism[J]. *Annual Review of Nutrition*, 2005, 25: 317-340.
- [3] THIJSSSEN M A, MENSINK R P. Fatty acids and atherosclerotic risk[J]. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 2005, 170: 165-194.
- [4] HEIRD W C, LAPILLONNE A. The role of essential fatty acids in development[J]. *Annual Review of Nutrition*, 2005, 25: 549-571.
- [5] PEREIRA S L, LEONARD A E, MUKERJI P, *et al.* Recent advances in the study of fatty acid desaturases from animals and lower eukaryotes[J]. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2003, 68(2): 97-106.
- [6] SCHMITZ G, ECKER J. The opposing effects of $n-3$ and $n-6$ fatty acids[J]. *Progress in Lipid Research*, 2008, 47(2): 147-155.
- [7] AGEITOS J M, VALLEJIO J A, VEIGA-CRESPO P, *et al.* Oily yeasts as oleaginous cell factories[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, 90(4): 1219-1227.
- [8] 张琦, 李明春, 孙颖, 等. Δ^6 -脂肪酸脱氢酶的分子生物学研究进展[J]. *生物工程学报*(ZHANG Qi, LI Ming-chun, SUN Yin, *et al.* Progress on molecular biology of Δ^6 -fatty acid desaturases[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*), 2004, 20 (3): 319-323.
- [9] LIU Y, KOH C M, SUN L, *et al.* Characterization of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene *RtGPD1* and development of genetic transformation method by dominant selection in oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(2): 719-729.
- [10] SPERLING P, LEE M, GIRKE T, *et al.* A bifunctional delta-fatty acyl acetylenase/desaturase from the moss *Ceratodon purpureus*. A new member of the cytochrome b5 superfamily[J]. *European Journal of Biochemistry*, 2000, 267(12): 3801-3811.
- [11] HONG H, DATLA N, REED D W, *et al.* High-level production of gamma-linolenic acid in Brassica juncea using a delta6 desaturase from *Pythium irregulare*[J]. *Plant Physiology*, 2002, 129(1): 354-362.
- [12] 张琦, 李明春, 孙颖, 等. Δ^6 -脂肪酸脱氢酶对 $n-6$ 和 $n-3$ 途径中脂肪酸底物的偏好[J]. *微生物学通报*(ZHANG Qi, LI Ming-chun, SUN Yin, *et al.* Preference of *Rhizopus arrhizus* Δ^6 -fatty acid desaturase for $n-3$ and $n-6$ substrates of unsaturated fatty acid[J]. *Microbiology*), 2004, 31(6): 57-61.
- [13] PULIGUNDLA P, VARIYAR P S, KO S, *et al.* Emerging trends in modification of dietary oils and fats, and health implications—a review[J]. *Sains Malaysiana*, 2012, 41(7): 871-877.
- [14] HUANG Y S, CHAUDLHARY S, THURMOND J M, *et al.* Cloning of delta12- and delta6-desaturases from *Mortierella alpina* and recombinant production of gamma-linolenic acid in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Lipids*, 1999, 34(7): 649-659.
- [15] CHUANG L T, CHEN D C, NICAUD J M, *et al.* Co-expression of heterologous desaturase genes in *Yarrowia lipolytica*. *New Biotechnology*, 2010, 27(4): 277-282.
- [16] 李明春, 孙颖, 张琦, 等. 高山被孢霉 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因在毕赤酵母中的胞内表达[J]. *生物工程学报*(LI Ming-chun, SUN Yin, ZHANG Qi, *et al.* Expression of Δ^6 -fatty acid desaturase gene from *Mortierella alpina* in *Pichia pastoris*[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*), 2004, 20(1): 34-38.
- [17] 张琦, 李明春, 孙颖, 等. 少根根霉 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因在毕赤酵母中的表达[J]. *生物工程学报*(ZHANG Qi, LI Ming-chun, SUN Yin, *et al.* Heteroexpression of *Rhizopus arrhizus* Δ^6 -fatty acid desaturase gene in *Pichia pastoris*. *Chinese Journal of Biotechnology*), 2005, 21(6): 871-877.

(上接第 285 页)

- formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (Exosomes)[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1987, 262(19): 9412-9420.
- [2] DELCAYRE A, LE PECQ J B. Exosomes as novel therapeutic nanodevices[J]. *Current Opinion in Molecular Therapeutics*, 2006, 8(1): 31-38.
- [3] HUANG D, CHEN C Y, ZHANG M, *et al.* Clonal immune responses of *Mycobacterium*-specific $\gamma\delta$ T cells in tuberculous and non-tuberculous tissues during *M. tuberculosis* infection[J]. *PLoS One*, 2012, 7(2): e30631.
- [4] da SILVA C A, HARTL D, LIU W, *et al.* TLR-2 and IL-17A in chitin-induced macrophage activation and acute inflammation[J]. *Journal of Immunology*, 2008, 181(6): 4279-4286.
- [5] HSU D H, PAZ P, VILLAFLOR G, *et al.* Exosomes as a tumor vaccine: enhancing potency through direct loading of antigenic peptides[J]. *Journal of Immunotherapy*, 2003, 26(5): 440-450.
- [6] BARD M P, HEGMANS J P, HEMMES A, *et al.* Proteomic analysis of Exosomes isolated from human malignant pleural effusions[J]. *Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 2004, 31(1): 114-121.
- [7] SIMPSON R J, LIM J W, MORITZ R L, *et al.* Exosomes: proteomic insights and diagnostic potential[J]. *Expert Review of Proteomics*, 2009, 6(3): 267-283.
- [8] JI H, GREENING D W, BARNES T W, *et al.* Proteome profiling of Exosomes derived from human primary and metastatic colorectal cells reveal differential expression of key metastatic factors and signal transduction components[J]. *Proteomics*, 2013, 13(10-11): 1672-1686.