

小鼠 CD4⁺ T 细胞外泌体分离及鉴定

张伟鑫, 曾 仲*

(昆明医科大学第一附属医院器官移植中心, 昆明 650000)

【摘要】 目的 探讨 CD4⁺ T 细胞是否具有分泌外泌体的能力, 以及 CD4⁺ T 细胞外泌体参与炎症及肿瘤免疫过程的可能。**方法** 应用断颈处死的方法取出小鼠的脾脏, 用磁珠分选的方法从小鼠脾脏细胞中分选出 CD4⁺ T 细胞, 并尝试从培养基上清液中提取 CD4⁺ T 细胞的外泌体, 在透射电镜下观察, 后用 PCR 技术分析 miR-23a、miR-214 的表达情况。**结果** 在透射电镜下能够观察到提取出的 CD4⁺ T 细胞外泌体, 且用 PCR 技术能检测到小鼠 CD4⁺ T 细胞外泌体中 miR-23a、miR-214 这两个炎症及肿瘤相关的 miRNA 的表达。**结论** 小鼠 CD4⁺ T 细胞有分泌外泌体的能力, 且为 CD4⁺ T 细胞外泌体参与炎症及肿瘤相关过程提供了可能。

【关键词】 CD4⁺ T 细胞; 外泌体; 分离; 鉴定; miRNA

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017) 10-0060-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2017.10.012

Isolation and identification of exosomes of CD4⁺ T cells in mice

ZHANG Wei-xin, ZENG Zhong*

(Organ Transplantation Center, The First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650000, China)

【Abstract】 Objective To explore whether CD4⁺ T cells in mice can secrete exosomes and the possibility of exosomes to participate in the inflammation and immune response process. **Methods** Spleen samples were taken from mice, and CD4⁺ T cells were isolated from the spleen tissue using magnetic bead separation method. Exosomes of CD4⁺ T cells were extracted from the supernatant and observed under transmission electron microscope. PCR assay was used to detect the expression of miR-23a and miR-214. **Results** Exosomes were observed under electron microscope, and the expression of miR-23a and miR-214 were detected by PCR assay. **Conclusions** CD4⁺ T cells in mice can secrete exosomes, which offer possibility to participate in the inflammation and immune response.

【Key words】 CD4⁺ T cells; Exosome; Isolation; Identification; MiRNA

外泌体(exosomes)是可由各种细胞脱落释放的大小均一的直径约为 30 ~ 150 nm 的脂质双分子层结构的囊泡,其外面的脂质双分子层膜可保护它内含物不受降解。其囊泡内含有脂质、蛋白质、mRNA、miRNA、siRNA 等多种遗传物质^[1]。自 1985 年 Pan 等^[2]人首次在成熟哺乳动物的网织红细胞中观察到后,众多学者研究发现几乎所有细胞都可

产生外泌体,其广泛存在于血液、尿液、腹水

等体液中^[3]。外泌体参与着人体许多重要的生理及病理过程,它在细胞的通讯及迁移、血管新生、炎

症及免疫反应和肿瘤细胞的生长及迁徙浸润等方面有着极为重要的作用^[4],因此外泌体的研究引起了众多的关注。本文就小鼠 CD4⁺ T 细胞是否

[基金项目] 云南省卫生科技计划基金资助项目(2014NS155)。

[作者简介] 张伟鑫(1990 -),男,硕士研究生,主要从事肝胆外科疾病的临床研究。E-mail: 815564969@qq.com

[通讯作者] 曾仲(1967 -),男,博士,主任医师,主要从事肝胆外科疾病的临床研究。E-mail: zzong@medmail.com.cn

能够分泌外泌体进行验证从而探寻 CD4⁺T 细胞外泌体参与炎症及肿瘤相关过程提供可能。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级雄性 BALB/c 小鼠, 体重 20 ~ 22 g, 6 ~ 8 周龄, 购自昆明医学院(实验动物中心)[SCXK(滇)2015-0008], 小鼠的组织取材于中国科学院昆明动物研究所动物实验设施内进行[SYXK(滇)2013-0004]。并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

1.2 主要试剂

小鼠淋巴细胞分离液(达科为公司)免疫磁珠分选仪(Miltenyi Biotec 公司); 流式细胞仪(BD Biosciences 公司); 小鼠 CD4⁺T 细胞磁珠分选试剂盒(Miltenyi Biotec 公司); 培养细胞 Exosome 提取试剂盒(唯辉公司); Exosome 透射电镜分析试剂盒(唯辉公司); RPMI1640 培养液和青霉素、链霉素双抗(Hyclone 公司); PBS 磷酸盐缓冲液(Hyclone 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 小鼠脾脏淋巴细胞悬液的制备

将小鼠断颈处死后浸泡于 75% 的乙醇中, 于超净台取出小鼠脾脏置于细胞筛网(70 μm) 中, 将细胞筛网置于 60 mm 细胞培养皿中, 加入 5 mL 小鼠淋巴细胞分离液, 仔细研磨后将悬有脾脏细胞的分离液转移到 15 mL 的离心管中, 并小心覆盖上 500 μL 的 RPMI1640 培养基, 室温下 2600 r/min 离心 30 min(需设置较慢的加速度和减速度)。后小心吸出中间的淋巴细胞层, 加入 10 mL 的 RPMI1640 培养基, 颠倒洗涤, 于室温下 1600 r/min 离心 10 min, 弃去上清液, 收集细胞并计数。

1.3.2 CD4⁺T 细胞悬液的制备

将得到的小鼠脾脏淋巴细胞悬浮于 PBS 磷酸盐缓冲液中并调整细胞浓度为 10^7 个/90 μL 。添加美天旌 CD4 (L3T4) 磁性微珠并混匀 4℃ 放置 15 min, 后加入 PBS 磷酸盐缓冲液冲洗并 1600 r/min 离心 10 min, 弃去上清液, 加入 PBS 磷酸盐缓冲液重新悬浮细胞并调整浓度为 10^8 个/500 μL , 将细胞加入已经冲洗好的美天旌 MS 型号分选柱中, 待柱内细胞悬液流干后再加入 500 μL PBS 缓冲液冲洗 3 次, 取下分选柱, 放置在 15 mL 离心管上并加入 1 mL 缓冲液用柱塞冲洗出磁性标记细胞。

1.3.3 CD4⁺T 细胞纯度检测

取上述经磁珠分选后的细胞于室温下 1600 r/min 离心 10 min 后, 弃去上清液, 加入 PBS 磷酸盐缓冲液调节细胞浓度为 10^6 /mL 吹打混匀, 取 80 μL 的细胞悬液, 置于 200 μL 的离心管中, 加入 FITC anti-mouse CD3e 和 PE anti-mouse CD4 各 10 μL 混匀后室温避光放置 30 min, 之后上流式细胞仪进行检测分析。

1.3.4 CD4⁺T 细胞外泌体的提取

将细胞室温下 1600 r/min 离心 8 min 后弃去上清液, 用无血清的 RPMI1640 培养基调整 CD4⁺T 淋巴细胞浓度为 2×10^7 个/mL, 在 24 孔细胞培养板中每孔加入 1 mL 悬浮好的 CD4⁺T 淋巴细胞, 置于细胞培养箱中饥饿处理细胞 48 h 后收集 2 mL 细胞培养基, 于 4℃ 下 4200 r/min 离心 10 min 去除细胞和细胞碎片, 转移 2 mL 上清液到玻璃管中并加入现配好的 exosome 提取液, 涡旋混匀并于 4℃ 中静置 30 min, 可见玻璃管中出现明显分层, 吸出管中的 exosome 层置于 1.5 mL 微量离心管中 9000 r/min 离心 3 min 后弃去管中上层和底层再将中间的 exosome 层转移到 0.5 mL 微量离心管中 9000 r/min 离心 3 min 后弃去管中上层和底层只留下中间的 exosome 层, 将管盖打开晾干 5 min 后加入 80 μL PBS 缓冲液到微量离心管中并用移液枪剧烈吹打后在水平摇床上高速摇动管子 10 min 使 exosome 层再次悬浮, 将管子 9000 r/min 离心 5 min, 转移上清液到试剂盒提供的过滤柱中, 将柱子 4200 r/min 离心 5 min, 收集到的液体即为 exosome 悬液。

1.3.5 CD4⁺T 细胞外泌体的电镜观察

在干净的 Parafilm 膜上滴 10 μL exosome 悬液, 取一张 exosome 透射电镜分析试剂盒中提供的 EM 网, 将其涂层面朝下贴在 exosome 悬液表面让其在干燥环境中吸收 10 min。用镊子将 EM 网(涂层面朝下)转移到清洗缓冲液中清洗 30 s 后再重复清洗一次。于干净的封口膜上, 滴 10 μL 的 EM 溶液, 转移 EM 网(涂层面朝下)到 EM 溶液中静置 10 min 后, 转移 EM 网到清洗缓冲液中清洗 30 s 后再重复清洗一次。转移 EM 网到滤纸上(涂层面朝上), 室温下风干过夜。将 EM 网置于透射电镜下观察。

1.3.6 PCR 技术检测相关的 miRNA 的表达

利用 PCR 技术检测 miR-23a、miR-214 这两个炎症及肿瘤相关的 miRNA 其在小鼠 CD4⁺T 细胞外泌体中的表达。(见表 1)

表 1 引物列表
Tab.1 List of primers

引物 Primers	序列 Sequences
mmu-miR-R	ATCCAGTGCAGGGTCCGAGG
mmu-miR-23a-3p F	CGG CGA TCA CAT TGC CAG GG
mmu-miR-23a-3p RT	GTCGTATCCAGTGCAGG GTCCG AGGTATTCGCACTGGATACGACGAAAT
mmu-miR-23a-5p F	GCA TGG GGT TCC TGG GGA TG
mmu-miR-23a-5p RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCACTGGATACGACAAAATCC
mmu-miR-214-5p F	CGA TAC GTG CCT GTC TAC ACT TG
mmu-miR-214-5p RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCACTGGATACGACGACAG
mmu-miR-214-3p F	CGG CAC AGC AGG CAC AGA CA
mmu-miR-214-3p RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCACTGGATACGACACTGCC

2 结果

2.1 CD4⁺T 纯度检测

从小鼠脾脏细胞中利用磁珠分选的方法分离获得的 CD4⁺T 细胞纯度为 (90.1 ± 5.8)% 可以用于后续实验 (见图 1)。

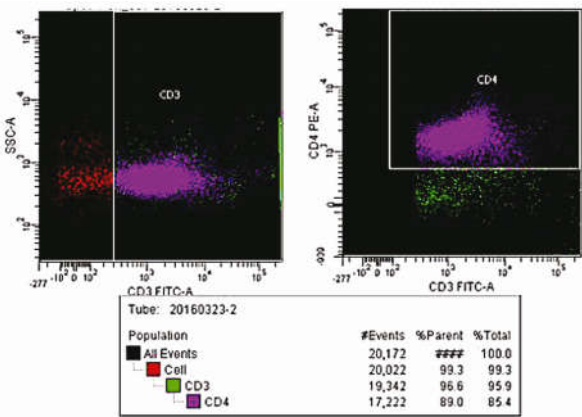


图 1 CD4⁺T 细胞纯度检测结果

Fig.1 CD4⁺T cells purity test results

2.2 CD4⁺T 细胞外泌体的电镜观察

将 CD4⁺T 细胞经饥饿处理后通过分离与纯化其血清液中的外泌体,在透射电镜下观察到小鼠 CD4⁺T 细胞外泌体呈圆形或椭圆形,其大小不一,直径约在 80 nm 左右,可见有明显的膜性结构,其腔内为低电子密度成分 (见图 2)。

2.3 利用 PCR 技术检测特定 miRNA 的表达

利用 PCR 技术能检测到外泌体中 miR-23a、miR-214 这 2 个 miRNA 的表达。在普通 PCR 电泳中在约 100 bp 处,5 个样品都出现条带,由于产物大小和引物二聚体大小比较接近,因此从电泳图看起来是一条单一的条带 (见图 3)。而在 Real Time PCR 中溶解曲线上出现不单一峰,说明除了目标 miRNA 外可能存在其他产物。但是本实验采用的

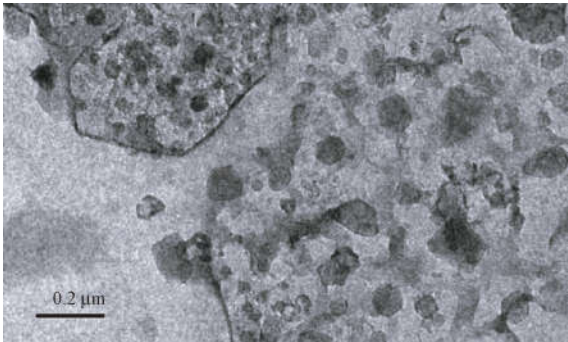
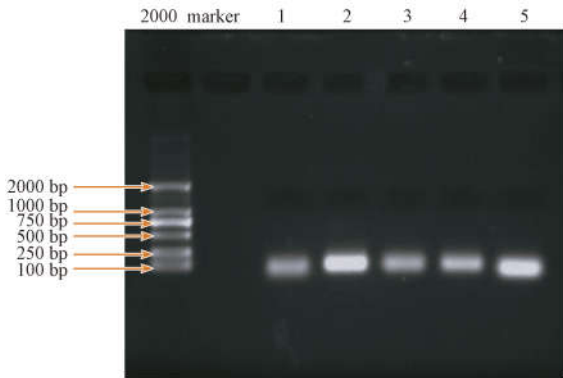


图 2 透射电镜下观察到的 CD4⁺T 细胞外泌体

Fig.2 CD4⁺T cell exosomes observed under TEM

方法为茎环法,其特异性相对较高。产物不单一,存在的可能引物二聚体,因此,胶图和曲线二者结果基本吻合。(见图 4)



注: (1) 为引物 mmu-miR-23-3p-F/mmu-miR-R 组; (2) 为引物 mmu-miR-23-5p-F/mmu-miR-R 组; (3) 为引物 mmu-miR-214-5p-F/mmu-miR-R 组; (4) 为引物 mmu-miR-214-3p-F/mmu-miR-R 组; (5) 为内参 U6-F/U6-R 组。

图 3 普通 PCR 结果

Note. (1) Primer mmu-miR-23-3p-F/mmu-miR-R group; (2) Primer mmu-miR-23-5p-F/mmu-miR-R group; (3) Primer mmu-miR-214-5p-F/mmu-miR-R group; (4) Primer mmu-miR-214-3p-F/mmu-miR-R group; (5) Internal reference U6-F/U6-R group.

Fig.3 Ordinary PCR electrophoresis results

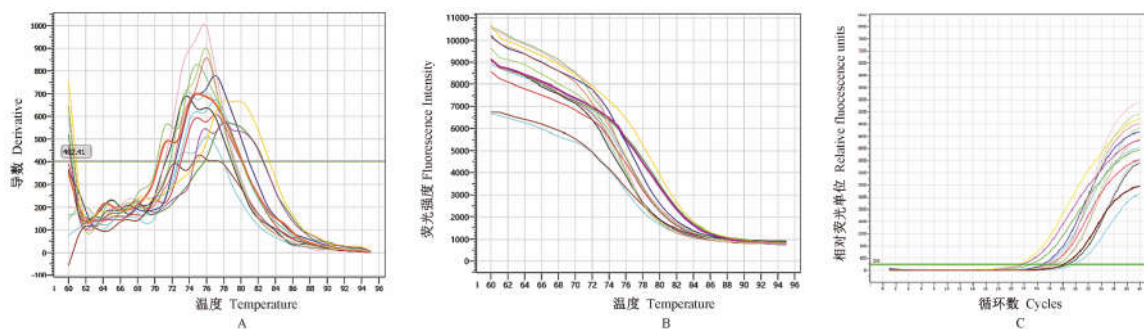
3 讨论

外泌体是由细胞内的多泡体与胞浆膜融合然后释放到胞外的一种脂质双分子层结构的囊泡,直径约 30 ~ 150 nm,其广泛存在于各种体液中如血液、尿液、唾液等,其囊泡内含有脂质、蛋白质、mRNA、miRNA、siRNA 等多种遗传物质^[5,6]。外泌体被细胞释放入外环境后,可以通过受体介导、直接弥散、内吞作用等方式来进入靶细胞,由于其内含有生物活性脂质、蛋白、核酸等,故其可以向受体细胞传递各种遗传信息进而发挥各种生物学功能,从而影响靶细胞细胞的生长状况,进而介导疾病的发生和发展^[7]。这些外泌体所携带的 RNA 被统称为外泌体来源 RNA (exosome shuttle RNA, esRNA)。已经有研究发现 EsRNA 拥有相对稳定的特性,能在一定程度上代表其母细胞的 miRNA 水平。因此,esRNA 拥有作为分子诊断标记和靶向治疗的潜力^[8]。在肿瘤相关方面 esRNA 有着诱导肿瘤细胞的侵袭性以及保持肿瘤细胞的致瘤性的能力^[9]。

本实验已经证实了小鼠 CD4⁺T 细胞分泌的外泌体中能够检测到 miR-23a、miR-214 这 2 个 miRNA 的表达。对于 miRNA-23a,已有研究证明其参与炎症反应以及肿瘤相关的过程。研究学者 Li 等^[10]研究了临床肝炎患者血清中的 miRNA 表达谱后发现,乙型肝炎患者血清中 miR-23a 的表达明显升高。还有研究学者研究发现,在牙周炎患者其牙龈组织中的 miR-23a 的表达高于健康者^[11,12],提示了 miR-23a 极有可能与炎症反应的发生以及发展有关。miRNA-23a 在肿瘤相关方面,已有研究显示其与肿瘤的发生、发展具有非常密切的关系,其一般扮演致癌基因的作用,参与着多种癌症的发生、发展过程。如:有研究学者发现,miR-23a 能够直接地靶

向抑制转移抑制因子 1 蛋白的表达,进而能够促进结肠癌细胞的生长以及侵袭转移的能力。其临床研究还说明 miR-23a 在结肠癌中的表达上调,并且随着临床分期的演进以及浸润深度的增加而增加,其有可能成为肠黏膜恶性转变以及结肠癌发生浸润转移的重要的生物学标志^[13,14]。而对于 miR-214,近几年的研究发现发现,miR-214 在多种恶性肿瘤中均有异常表达,但在不同肿瘤中的表达情况却不尽相同,具有一定的肿瘤特异性。有研究学者 Zhang 等^[15]人研究发现,miR-214 在胰腺癌中呈现高表达,其能够促进胰腺癌细胞的生存并能降低肿瘤细胞对吉西他滨的敏感性。还有 Yang 等^[16]人研究发现:miR-214 可以促进卵巢癌细胞的存活,并能够降低对化疗药物顺铂的敏感性。而另外有一些学者报道:miR-214 在肿瘤中则呈低表达,如研究显示,在宫颈癌细胞系 Hela 以及 Caski 细胞中,TFAM 蛋白的表达量明显升高,但 miR-214 的表达量却呈现明显的下降。而当在这两种细胞中上调 miR-214 的表达,能够明显的抑制宫颈癌细胞的增殖及细胞周期进展,进一步的研究显示:TFAM 是 miR-214 的靶基因之一,而且 miR-214 可以通过降低 TFAM 的表达来达到延缓肿瘤发展,并增加宫颈癌细胞对化疗药物的敏感性的目的^[17]。

CD4⁺T 细胞不是功能单一的一类细胞,它是一群功能复杂的细胞群。其各亚群在细胞免疫反应都有着极为重要的作用。其不仅能辅助细胞毒性 T 细胞,还可以协助 NK 细胞清除和杀灭肿瘤,甚至还有着不依赖于 CD8⁺T 细胞的肿瘤杀伤作用,它在机体抗肿瘤免疫中有着重大的意义^[18,19]。在现阶段在临床研究中,已经有学者研究得出输注 CD4⁺T 细胞,可以有效防止接种了血液或实体肿瘤细胞的动物发病^[20]。



注:(A)溶解曲线;(B)荧光曲线;(C)扩增曲线。

图4 Real Time PCR 结果

Note. (A) Melting curve; (B) Fluorescence curve; (C) Amplification curve.

Fig.4 Real-time PCR results

本实验已经证实了 CD4⁺T 细胞具有分泌外泌体的能力,且在其分泌的外泌体中检测到 miR-23a、miR-214,这两个免疫及肿瘤相关的 miRNA 的表达,而恰恰 CD4⁺T 细胞的功能也与炎症及肿瘤相关,是否 CD4⁺T 细胞在执行其免疫及肿瘤相关的功能时有着 miR-23a、miR-214 的参与? 值得我们去深入研究。本实验为 CD4⁺T 细胞外泌体参与 CD4⁺T 细胞执行其炎症及肿瘤过程提供了可能,并且 CD4⁺T 细胞是一群功能较为复杂的细胞群,其分泌的外泌体必定是多种多样的,其中所含的 miRNA 必定更为复杂,这些 miRNA 是否能发挥作用? 怎样去发挥作用? 我们依旧不甚清楚,这值得广大学者们深入探索。

总之,对外泌体的研究国内依旧处于初级阶段,对外泌体的研究还有着诸多的困难,对于外泌体发挥作用的具体机制,也需进一步的探究。相信随着科技的发展以及人们对外泌体认识的日益加深,外泌体中蕴含的丰富信息将会被人们所了解并运用到对疾病的治疗中去。

参考文献:

- [1] 刘长红,武明花,李桂源. 肿瘤细胞来源的外泌体与恶性肿瘤的进展及化疗[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2014, 30(06):526-532.
- [2] Pan BT, Teng K, Wu C, et al. Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes [J]. J Cell Biol, 1985, 101(3):942-948.
- [3] Bang C, Thum T. Exosomes; new players in cell-cell communication [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2012 Nov; 44(11):2060-2064.
- [4] 卢婉,杨人强,王伶. 外泌体的研究进展[J]. 生命的化学, 2013, 33:438-442.
- [5] Rodriguez M, Silva J, López-Alfonso A, et al. Different exosome cargo from plasma / bronchoalveolar lavage in non-small-cell lung cancer [J]. Genes Chromosomes Cancer, 2014, 53(9):713-724.
- [6] 张敏,张晨光,丁卫. 外泌体及其在肿瘤诊疗中的意义[J]. 生理科学进展, 2014, 45:372-378.
- [7] Record M, Carayon K, Poirot M, et al. Exosomes as new vesicular lipid transporters involved in cell-cell communication and various pathophysiological [J]. Biochim Biophys Acta, 2014, Jan; 1841(1):108-120.
- [8] Südhof TC, Rothman JE. Membrane fusion: grappling with SNARE and SM proteins [J]. Science. 2009 Jan 23; 323(5913):474-477.
- [9] Pollard JW. Macrophages define the invasive microenvironment in breast cancer [J]. J Leukoc Biol. 2008 Sep; 84(3):623-630.
- [10] Li LM, Hu ZB, Zhou ZX, et al. Serum microRNA profiles serve as novel biomarkers for HBV infection and diagnosis of HBV-positive hepatocarcinoma [J]. Cancer Res. 2010 Dec 1; 70(23):9798-9807.
- [11] Lee YH, Na HS, Jeong SY, et al. Comparison of inflammatory microRNA expression in healthy and periodontitis tissues [J]. Biocell. 2011 Aug; 35(2):43-49.
- [12] Xie YF, Shu R, Jiang SY, et al. Comparison of microRNA profiles of human periodontal diseased and healthy gingival tissues [J]. Int J Oral Sci. 2011 Jul; 3(3):125-134.
- [13] 周雪鹏. miR-23a 通过靶向 MTSS1 促进结肠癌侵袭转移及临床意义 [D]. 衡阳:南华大学, 2011.
- [14] 周雪鹏,刘彦宇,刘德勇. miR-23a 对人结肠癌 SW480 细胞生长增殖的影响 [J]. 医学信息, 2011, 24(9):6088.
- [15] Zhang XJ, Ye H, Zeng CW, et al. Dysregulation of miR-15a and miR-214 in human pancreatic cancer [J]. J Hematol Oncol. 2010 Nov 24; 3:46. doi: 10.1186/1756-8722-3-46.
- [16] Yang H, Kong W, He L, Zhao JJ. MicroRNA expression profiling in human ovarian cancer: miR-214 induces cell survival and cisplatin resistance by targeting PTEN [J]. Cancer Res. 2008 Jan 15; 68(2):425-433.
- [17] Wen Z, Lei Z, Jin-An M, et al. The inhibitory role of miR-214 in cervical cancer cells through directly targeting mitochondrial transcription factor A (TFAM) [J]. Eur J Gynaecol Oncol. 2014; 35(6):676-682.
- [18] 孙君重,肖文华,于力. CD4⁺T 淋巴细胞功能研究新进展 [J]. 中国实验血液学杂志, 2010, 18(2):544-548.
- [19] Perez-Diez A, Joncker NT, Choi K, et al. CD4 cells can be more efficient at tumor rejection than CD8 cells [J]. Blood, 2007, Jun 15; 109(12):5346-5354.
- [20] Greenberg PD, Kern DE, Cheever MA. Therapy of disseminated murine leukemia with cyclophosphamide and immune Lyt-1⁺, 2-T cells. Tumor eradication does not require participation of cytotoxic T cells [J]. J Exp Med, 1985, May 1; 161(5):1122-1134.

[收稿日期] 2017-02-28