doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.31.003

膀胱癌细胞来源外泌体的提取与鉴定*

梅^{1,2} 陈 葳³ 向 安⁴ 潘晶晶³ 庞 欢³ 李 $n^{1,2}$ 薛

(1 西安交通大学第一附属医院转化医学中心 陕西 西安 710061;2 陕西省肿瘤精准医学重点实验室 陕西 西安 710061; 3 西安交通大学第一附属医院检验科 陕西 西安 710061;4 第四军医大学药学系 陕西 西安 710032)

摘要 目的:提取并鉴定膀胱癌 5637 细胞来源外泌体。方法:收集膀胱癌 5637 细胞培养上清液,采用多步骤离心法提取膀胱癌 5637 细胞外泌体。透射电子显微镜观察外泌体形态及颗粒直径。Bradford 法定量外泌体蛋白含量。蛋白质免疫印迹鉴定外泌体 标志蛋白。结果:20 mL 5637 细胞培养基可收集约 50-80 µg 外泌体。膀胱癌 5637 细胞来源外泌体呈典型的茶杯样形态,外泌体颗 粒直径大约在 30-150 nm。 膀胱癌 5637 细胞外泌体提取物中可检测到标志蛋白 CD63、TSG101、Hsp70 和 Hsp90 表达。 结论: 多步 骤离心法可以用于提取膀胱癌 5637 细胞外泌体,为后续开展膀胱癌 5637 细胞外泌体作用与机制的研究奠定了基础。 关键词:膀胱癌细胞;外泌体;离心;鉴定

中图分类号: R-33: R737.14 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2017)31-6010-04

Isolation and Characterization of Exosomes Derived from Bladder Cancer Cells*

XUE Mei^{1,2}, CHEN Wei³, XIANG An⁴, PAN Jing-jing³, PANG Huan³, LI Xu^{1,2Δ}

(1 Center for Translational Medicine, The First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi, 710061, China;

2 Key Laboratory for Tumor Precision Medicine of Shaanxi Province, Xi'an, Shaanxi, 710061, China;

3 Department of Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi, 710061, China;

4 Department of Pharmacology, The Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To isolate and characterize the exosomes derived from bladder cancer 5637 cells. Methods: Exosomes were isolated from the supernatant of 5637 cells by differential centrifugations. Transmission electron microscopy was used to determine the morphology and size distribution of bladder cancer 5637 cell-derived exosomes. Bradford protein assay was used to measure the protein concentration of exosomes. Western blot analysis was used to determine the exosomal protein markers. Results: A total of 50 to 80 µg exosomes were isolated from 20 mL 5637 cell culture medium. The bladder cancer 5637 cell-derived exosomes showed the typical cup-shaped morphology. The size distribution of exosomes is ranging from 30 to 150 nm in diameter. The exosomal protein markers CD63, TSG101, Hsp70 and Hsp90 were positively expressed in exosomes isolated from 5637 cells. Conclusions: The method of differential centrifugations can be used to isolate bladder cancer 5637 cell exosomes which may facilitate further research on the function and mechanism of bladder cancer 5637 cell-derived exosomes.

Key words: Bladder cancer cells; Exosomes; Centrifugation; Characterization

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R737.14 Document code: A Article ID: 1673-6273(2017)31-6010-04

前言

膀胱癌是泌尿系统高发恶性肿瘤,易侵袭转移但作用机制 不明。膀胱镜配合活检是临床上诊断膀胱癌的金标准,但该方 法易给患者造成痛苦与不适[12]。因此,探明膀胱癌侵袭转移的 分子机制,寻找膀胱癌诊断的无创方法是目前丞待解决的问 题。外泌体(Exosomes)是一种由脂质双分子层包裹内部信号分 子形成的细胞外囊泡(直径为 30-150 nm),它可被释放到细胞 外环境亦可进入循环系统发挥生物学作用[34]。外泌体可转运多 种信号分子包括蛋白质、脂类、DNA、mRNA 以及非编码 RNA

等[5]。许多不同类型的细胞都可释放外泌体,例如免疫细胞、干 细胞、上皮细胞、神经元及肿瘤细胞间。肿瘤细胞可通过分泌大 量的外泌体进而改变局部及系统微环境,促进肿瘤生长及转移 [89]。近年来研究表明外泌体作为液体活检的主要检测对象,在 肿瘤无创性诊断与监测中具有良好的临床应用前景[10,11]。此外, 研究发现高级别膀胱癌细胞系如 TCC-SUP 和 T24 等细胞来源 的外泌体可促进膀胱癌进展[12,13]。但是低级别膀胱癌细胞系如 5637 细胞是否同样存在外泌体,其标志蛋白组成有何特点都 尚不清楚。因此,本研究以低级别膀胱癌 5637 细胞为研究对 象,提取并鉴定膀胱癌 5637 细胞外泌体形态与标志蛋白,为后 *基金项目:国家自然科学基金项目(81502529,81301513,81372151,81572735);西安交通大学第一附属医院院基金项目(2014YK9)

作者简介:薛梅(1984-),助理研究员,主要研究方向:肿瘤学,电话:13609297863,E-mail: xuemei1984-@163.com

[△] 通讯作者:李旭(1956-),博士生导师,教授,主要研究方向:肿瘤学,电话:029-85323528,E-mail: lixuxjtu2014@126.com

⁽收稿日期:2017-03-08 接受日期:2017-03-31)

续开展膀胱癌 5637 细胞来源外泌体的功能研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

膀胱癌 5637 细胞系由本实验室保存; RPMI 1640 细胞培养基购自美国 Gibco 公司; 胎牛血清购自杭州四季青公司; Bradford 蛋白浓度测定试剂盒购自美国 Bio-Rad 公司;兔抗人 CD63、TSG101、Hsp70 和 Hsp90 单克隆抗体购自美国 Abcam 公司;细胞培养箱购自美国 Thermo 公司;超高速离心机购自美 国 Beckman 公司;高速冷冻离心机购自德国 Eppendorf 公司; 透射电子显微镜购自日本 JEOL 公司;倒置荧光显微镜购自日 本 Nikon 公司;酶标检测仪购自美国 PerkinElmer 公司;凝胶图 像分析系统购自美国 Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 膀胱癌细胞培养 膀胱癌 5637 细胞用含 10%胎牛血清 的 RPMI 1640 细胞培养基,置于 37℃、5% CO₂ 的细胞培养箱 中培养。待细胞融合度达 90%以上,进行常规细胞传代操作。以 无血清 RPMI 1640 培养基重悬细胞,并以无血清 RPMI 1640 培养基培养细胞 48-72 h 后,收集细胞培养上清液,用于提取外 泌体。

1.2.2 膀胱癌细胞外泌体的提取 利用多步骤差速离心结合 过滤法提取膀胱癌细胞外泌体^[14]。收集细胞培养上清液,4℃、 300×g离心10min后弃去沉淀,留取上清液。留取的上清液再 经4℃、16500×g离心20min后弃去沉淀,留取上清液。留取 的上清液,经0.22μm滤膜过滤。过滤后的液体再经4℃、120 000×g离心70min,最后弃去上清液,用200-400μLPBS液重 悬外泌体沉淀,-80℃冰箱保存备用。具体提取流程图见图1。



supernatant of bladder cancer 5637 cells

1.2.3 Bradford 法测定外泌体蛋白浓度 按照 Bradford 法蛋 白浓度测定试剂盒说明书操作。标准品牛血清白蛋白配制成浓 度分别为 0 ng/μL、5 ng/μL、10 ng/μL、20 ng/μL、40 ng/μL、60 ng/μL、80 ng/μL、100 ng/μL 的溶液。每个浓度标准品取 10 μL

加入 96 孔板中,每个标准品设置 3 个复孔。待测外泌体样本同 样取 10 µL 加入 96 孔板中,每个样品设置 3 个复孔。每孔加入 染色液 200 µL,室温孵育 10 min,酶标仪上测定每孔样品 595 nm 处的吸光度。

1.2.4 透射电子显微镜观察外泌体形态及大小 外泌体悬液 50 μL直接滴加于载样铜网,滤纸吸干液体并置于室温静止 5 min。滴 加 3%磷钨酸溶液室温复染 5 min,滤纸吸干液体并置于室温晾干。 透射电子显微镜下观察并拍照记录外泌体形态及大小。

1.2.5 蛋白质免疫印迹鉴定外泌体标志蛋白 外泌体蛋白提取物(上样量 500 ng/孔)和 5637 细胞总蛋白提取物(上样量 5 µg/孔)加入适量 6×上样缓冲液,煮沸 5 min 并上样至 10% SDS-PAGE 电泳 120 V 90 min 终止电泳,湿转印至硝酸纤维素 膜上。5%脱脂牛奶室温封闭 1 h 后,孵育一抗 CD63、TSG101、Hsp70 和 Hsp90,4℃反应过夜。TBST 缓冲液充分洗涤后,孵育 辣根过氧化物酶标记的相应二抗,室温反应 1 h。TBST 缓冲液 充分洗涤后,ECL 发光液显色,凝胶成像系统分析并拍照记录。

2 结果

2.1 膀胱癌 5637 细胞生长状况

以无血清 RPMI 1640 培养基培养 5637 细胞 48 h, 倒置相 差显微镜下观察细胞,细胞生长状态良好,贴壁生长、生长紧 密,细胞形态呈多角形(图 2)。



图 2 膀胱癌 5637 细胞形态(× 100) Fig.2 The morphology of bladder cancer 5637 cells(× 100)

2.2 膀胱癌 5637 细胞外泌体形态及大小

透射电子显微镜观察 5637 细胞来源的外泌体,结果显示 外泌体呈形态均一的杯子样形态(图 3)。外泌体直径约为 30-150 nm,外部有完整的双层膜性结构,内部则含有低电子密 度的物质。有些外泌体呈单个散状分布,有些外泌体则聚集分布。

2.3 膀胱癌 5637 细胞外泌体蛋白定量

根据不同浓度蛋白标准品在 595 nm 处的吸光度值,以蛋 白标准品的浓度为横坐标,以 595 nm 的吸光度值为纵坐标,绘 制标准曲线,根据标准曲线计算待测外泌体蛋白的浓度。细胞 数量约为 5× 10⁶-1× 10⁷ 个 5637 细胞的 20 mL 培养基经超速 离心法共收集 400 μL 外泌体悬液,外泌体蛋白浓度约为 120-200 ng/μL,所收集 5637 细胞外泌体共计 50-80 μg。



Fig.3 The morphology of exosomes derived from bladder cancer 5637 cells

2.4 膀胱癌 5637 细胞外泌体标志蛋白鉴定

蛋白质免疫印迹检测结果显示 5637 细胞培养上清液中提取的外泌体表达 CD63、TSG101、Hsp70 和 Hsp90(图 4)。进一步证明从 5637 细胞培养上清液中提取的纳米级微囊泡是表达外泌体标志蛋白的外泌体。



Fig.4 The expression levels of exosomal protein markers in 5637 cells and exosomes

3 讨论

近年来,大量研究证据表明外泌体在肿瘤生长与进展中发 挥了重要调控作用。通过对高级别膀胱癌细胞(如 TCC-SUP 和 T24 细胞)来源外泌体研究发现其能够促进膀胱癌生长与转移 ^[1213]。但是,低级别膀胱癌细胞来源外泌体在膀胱癌发生发展中 的作用仍未探明。本研究对低级别膀胱癌 5637 细胞外泌体的 培养、提取方法及标志蛋白进行了初步研究,为今后深入探索 5637 细胞外泌体功能奠定基础。首先,我们建立了 5637 细胞 外泌体的培养方案,考虑到细胞培养液中添加的胎牛血清含有 大量牛来源外泌体,为了排除血清对实验结果干扰。我们以含 血清培养基培养 5637 细胞,待需要收集外泌体时再更换为无 血清培养基。结果发现更换为无血清培养基对 5637 细胞生长 状态没有影响,细胞数量可以满足外泌体收集需要。

虽然目前外泌体提取方法已成为常规技术,但外泌体提取 并没有统一标准方法。其中超速离心法是使用较多的提取方 法,该方法可获得较高纯度与数量的外泌体,但其耗时较长、操 作复杂。商业化外泌体提取试剂盒虽使用简便,但费用高、提取 纯度低^[1517]。本研究我们采用 Lasser 等报道的一种改良的外泌体提取方法,这种多步骤离心结合过滤的方法适合于从细胞培养上清中提取高质量、高浓度的外泌体并且操作简单、成本低^[14]。利用该方法将 5637 培养上清液用 300×g和 16 500×g离 心力离心,初步去除细胞及细胞碎片对后续实验干扰。其次,细胞外囊泡除了外泌体,还包括细胞微泡(microvesicles)和凋亡 小体(apoptotic bodies)。这三种囊泡在直径上有一定差异,其中外泌体直径在 50-100 nm 之间,细胞微泡直径则在 100-1000 nm 之间,凋亡小体直径最大在 100-5000 nm 之间^[18]。因此,提取中利用 0.22 μm 滤膜过滤经两步离心纯化的上清液,可最大限度减少大直径囊泡(细胞微泡和凋亡小体)对实验结果的干扰。最后,利用超速离心(120 000×g)沉淀已过滤液体中的外泌体。

对于利用不同提取方法所获得的外泌体,目前对其鉴定分析的统一方法主要有电子显微镜技术、蛋白质免疫印迹技术以及流式技术等^[19]。本研究结果显示细胞数量为 5× 10⁶-1× 10⁷ 个 5637 细胞的 20 mL 培养上清液,大约可获得浓度为 50-80 μg 的外泌体,其浓度完全可满足后续实验的需要。透射电子显微镜结果显示提取到的外泌体呈茶杯样形态,具有双层膜包裹的囊性结构,直径约为 100 nm,这与以往文献报道结果完全一致^[20]。此外,提取的外泌体中杂质及其它颗粒较少,表明多步骤离心结合过滤法适合于 5637 细胞外泌体的提取。

考虑到外泌体是由多泡胞内体(endosome)与质膜融合并 通过胞吐作用分泌到细胞外的囊泡^[21]。因此,胞内体相关蛋白 被推荐作为外泌体鉴定的标志物,这些蛋白也被证实表达于所 有类型的细胞外囊泡^[3]。这些标志物包括四次跨膜蛋白超家族 成员(CD9、CD63、CD81)、转运必需内体分选复合物(TSG101 和 Alix)、热休克蛋白(Hsp60、Hsp70 和 Hsp90)等。其中 CD63 是在胞内体中表达丰富的跨膜蛋白,TSG101则在胞内体分选 与转运中发挥重要作用,Hsp70 和 Hsp90 参与了多泡胞内体的 形成^[21-23]。本研究结果显示 5637 细胞上清液提取物中 CD63、 TSG101、Hsp70 和 Hsp90 蛋白均呈阳性表达。有研究报道高级 别膀胱癌 T24 和 TCC-SUP 细胞来源外泌体也存在 CD63、 TSG101、Hsp70 和 Hsp90 蛋白表达^[12,13]。表明低级别膀胱癌细 胞外泌体的标志蛋白组成与高级别膀胱癌细胞外泌体的蛋白 组成一致。

总之,本研究利用多步骤离心法结合电子显微镜观察及免 疫印迹等方法,证实膀胱癌 5637 细胞培养上清液中可成功提 取到外泌体,并对膀胱癌 5637 细胞来源的外泌体进行了初步 鉴定。为后续开展膀胱癌 5637 细胞外泌体功能与机制的研究 提供了必要的实验材料。

参考文献(References)

- Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2016[J]. CA-Cancer J Clin, 2016, 66(1): 7-30
- [2] Kamat AM, Hegarty PK, Gee JR, et al. ICUD-EAU international consultation on bladder cancer 2012: screening, diagnosis, and molecular markers[J]. Eur Urol, 2013, 63(1): 4-15
- [3] Tkach M, Thery C. Communication by extracellular vesicles: where we are and where we need to go[J]. Cell, 2016, 164(6): 1226-1232
- [4] Melo SA, Luecke LB, Kahlert C, et al. Glypican-1 identifies cancer ex-

osomes and detects early pancreatic cancer [J]. Nature, 2015, 523 (7559): 177-182

- [5] Zhang L, Zhan S, Yao J, et al. Microenvironment-induced PTEN loss by exosomal microRNA primes brain metastasis outgrowth [J]. Nature, 2015, 527(7576): 100-104
- [6] Valadi H, Ekstrom 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): 654-672
- [7] Melo SA, Sugimoto H, O'Connell JT, et al. Cancer exosomes perform cell-independent microRNA biogenesis and promote tumorigenesis
 [J]. Cancer Cell, 2014, 26(5): 707-721
- [8] Hoshino A, Costa-Silva B, Shen T, et al. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis[J]. Nature, 2015, 527(7578): 329
- [9] Li L, Li C, Wang S, et al. Exosomes derived from hypoxic oral squamous cell carcinoma cells deliver miR-21 to normoxic cells to elicit a prometastatic phenotype[J]. Cancer Res, 2016, 76(7): 1770-1780
- [10] Rak J. Extracellular vesicles-biomarkers and effectors of the cellular interactome in cancer [J]. Frontiers in Pharmacology, 2013, 4(21): 1-14
- [11] Kalluri R. The biology and function of exosomes in cancer [J]. J Clin Invest, 2016, 126(4): 1208-1215
- [12] Silvers CR, Liu Y, Wu C, et al. Identification of extracellular vesicleborne periostin as a feature of muscle-invasive bladder cancer[J]. Oncotarget, 2016, 7(17): 23335-23345
- [13] Berrondo C, Flax J, Kucherov V, et al. Expression of the long noncoding RNA HOTAIR correlates with disease progression in bladder cancer and is contained in bladder cancer patient urinary exosomes[J]. PLoS One, 2016, 11: e01472361

(上接第 6009 页)

- [12] Haase VH. Mechanisms of hypoxia responses in renal tissue[J]. J Am Soc Nephrol, 2013, 24(4): 537-541
- [13] Kirchhoff C, Habben I, Ivell R, et al. A major human epididymis-specific cDNA encodes a protein with sequence homology to extracellular proteinase inhibitors[J]. Biol Reprod, 1991, 45(2): 350-357
- [14] Georgakopoulos P, Mehmood S, Akalin A, et al. Immunohistochemical localization of HE4 in benign, borderline, and malignant lesions of the ovary[J]. Int J Gynecol Pathol, 2012, 31(6): 517-523
- [15] Bolstad N, Øijordsbakken M, Nustad K, et al. Human epididymis protein 4 reference limits and natural variation in a Nordic reference population[J]. Tumour Biol, 2012, 33(1): 141-148
- [16] Urban N, Thorpe J, Karlan BY, et al. Interpretation of single and serial measures of HE4 and CA125 in asymptomatic women at high risk for ovarian cancer [J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2012, 21(11): 2087-2094
- [17] Hertlein L, Stieber P, Kirschenhofer A, et al. Human epididymis protein 4 (HE4) in benign and malignant diseases [J]. Clin Chem Lab Med, 2012, 50(12): 2181-2188
- [18] Hellstrom I, Raycraft J, Hayden-Ledbetter M, et al. The HE4 (WFDC2) protein is a biomarker for ovarian carcinoma [J]. Cancer Res, 2003,63(13): 3695-3700

- [14] Lasser C, Eldh M, Lotvall J. Isolation and characterization of RNA-containing exosomes[J]. J Vis Exp, 2012, (59): e3037
- [15] Rider MA, Hurwitz SN, Meckes DJ. ExtraPEG: a polyethylene glycol-based method for enrichment of extracellular vesicles[J]. Sci Rep, 2016, 6: 23978
- [16] Valencia K, Lecanda F. Microvesicles: isolation, characterization for in vitro and in vivo procedures [J]. Methods Mol Biol, 2016, 1372: 181-192
- [17] Lobb RJ, Becker M, Wen SW, et al. Optimized exosome isolation protocol for cell culture supernatant and human plasma[J]. J Extracell Vesicles, 2015, 4: 27031
- [18] Buzas EI, Gyorgy B, Nagy G, et al. Emerging role of extracellular vesicles in inflammatory diseases [J]. Nat Rev Rheumatol, 2014, 10 (6): 356-364
- [19] Lo CA, Stahl PD, Raposo G. Extracellular vesicles shuffling intercellular messages: for good or for bad[J]. Curr Opin Cell Biol, 2015, 35: 69-77
- [20] Zhou W, Fong MY, Min Y, et al. Cancer-secreted miR-105 destroys vascular endothelial barriers to promote metastasis [J]. Cancer Cell, 2014, 25(4): 501-515
- [21] Harding CV, Heuser JE, Stahl PD. Exosomes: looking back three decades and into the future[J]. J Cell Biol, 2013, 200(4): 367-371
- [22] Mathivanan S, Fahner CJ, Reid GE, et al. ExoCarta 2012: database of exosomal proteins, RNA and lipids [J]. Nucleic Acids Res, 2012, 40 (Database issue): D1241-D1244
- [23] 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
- [19] Escudero JM, Auge JM, Filella X, et al. Comparison of serum human epididymis protein 4 with cancer antigen 125 as a tumor marker in patients with malignant and nonmalignant diseases [J]. Clin Chem, 2011, 57(11): 1534-1544
- [20] Yang Z, Zhang Z, Qin B, et al. Human Epididymis Protein 4: A Novel Biomarker for Lupus Nephritis and Chronic Kidney Disease in Systemic Lupus Erythematosus[J]. J Clin Lab Anal, 2016, 30(6): 897-904
- [21] Harris RC, Neilson EG. Toward a unified theory of renal progression[J]. Annu Rev Med, 2006, 57: 365-380
- [22] Liu M, Ning X, Li R, et al. Signalling pathways involved in hypoxiainduced renal fibrosis[J]. J Cell Mol Med, 2017, 18
- [23] Brocato J, Chervona Y, Costa M. Molecular responses to hypoxia-inducible factor 1alpha and beyond [J]. Mol Pharmacol, 2014, 85(5): 651-657
- [24] Tanaka T. Expanding roles of the hypoxia-response network in chronic kidney disease[J]. Clin Exp Nephrol, 2016, 20(6): 835-844
- [25] Higgins DF, Kimura K, Bernhardt WM, et al. Hypoxia promotes fibrogenesis in vivo via HIF-1 stimulation of epithelial-to-mesenchymal transition[J]. J Clin Invest, 2007, 117(12): 3810-3820
- [26] LeBleu VS, Teng Y, O'Connell JT, et al. Identification of human epididymis protein-4 as a fibroblast-derived mediator of fibrosis [J]. Nat Med, 2013, 19(2): 227-231