

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2023.08.004

分泌包载 ANXA2-MS2 RNA 外泌体的稳转细胞株的构建*

胡萌^{1,2,3,4} 胡渊¹ 廖柳房¹ 岳旖旎¹ 肖霞¹ 刘特思^{1,2,3,4} 朱光^{1,2,3,4}

(1 广州医科大学附属第二医院转化医学中心 广东 广州 510260;

2 广州医科大学附属第二医院广东省教育厅纳米免疫调控肿瘤微环境重点实验室 广东 广州 510260;

3 广州医科大学附属第二医院广州市纳米生物医学诊疗技术研发重点实验室 广东 广州 510260;

4 广州医科大学附属第二医院中心实验室 广东 广州 510260)

摘要 目的:基于 MCP-MS2 示踪系统构建能稳定分泌含有标签的膜联蛋白 A2 (ANXA2) RNA 的外泌体的供体细胞株。**方法:**利用慢病毒载体构建稳定表达 MCP-EGFP 的 HEK293 细胞株,采用流式细胞技术筛选具有较好荧光特性的单克隆细胞株。然后再次通过慢病毒稳定表达系统构建出能分泌结合有 MCP-EGFP 标记的 ANXA2 RNA 外泌体的供体细胞株。通过透射电镜、NTA、NanoFCM、共聚焦显微镜等仪器对供体细胞所产生的外泌体进行表征。**结果:**通过慢病毒载体成功构建了 MCP-EGFP 稳定表达细胞株,然后利用该细胞株通过慢病毒载体成功导入含有 MS2 标签的 ANXA2 基因。实验结果表明,构建的供体细胞与正常细胞所分泌的外泌体形态相似,实施实时荧光定量 PCR 的结果显示分泌的外泌体中含有 MS2 特殊序列,而同时 Western blot 的结果显示分泌的外泌体中含有 EGFP 蛋白。**结论:**通过慢病毒法成功建立了能分泌含有 MS2 标记的 ANXA2 RNA 的外泌体供体细胞株,为高效、稳定的装载特定 RNA 外泌体的供体细胞株的构建提供了新的方法和理论基础。

关键词:外泌体;慢病毒载体;MCP-MS2;ANXA2;稳定表达

中图分类号:Q78 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2023)08-1416-08

Cell Line Construction of a Stable ANXA2-MS2 RNA Expression in Exosomes*

HU Meng^{1,2,3,4}, HU Yuan¹, LIAO Liu-fang¹, YUE Yi-ni¹, XIAO Xia¹, LIU Te-si^{1,2,3,4}, ZHU Guang^{1,2,3,4}

(1 Translational Medicine Center, The Second Affiliated Hospital, Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong, 510260, China;

2 Guangdong Provincial Education Department Key Laboratory of Nano-Immunoregulation Tumour Microenvironment, The Second Affiliated Hospital, Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong, 510260, China; 3 Guangzhou Key Laboratory for Research and Development of Nano-Biomedical Technology for Diagnosis and Therapy, The Second Affiliated Hospital, Guangzhou Medical

University, Guangzhou, Guangdong, 510260, China; 4 Central Laboratory, The Second Affiliated Hospital, Guangzhou Medical

University, Guangzhou, Guangdong, 510260, China)

ABSTRACT Objective: To construct a donor cell line which can stably produce exosomes containing MS2 labeled ANXA2 RNA based on the MCP-MS2 system. To explore an efficient construction method of a stable donor cell line containing specific RNA labeled exosomes. **Methods:** The HEK293 cell line stably expressing MCP-EGFP was constructed by lentivirus transfection system, and the monoclonal cell line with better fluorescence characteristics was screened by flow cytometry. Then, a donor cell line, that secrete ANXA2 RNA exosomes labeled with MCP-EGFP, was constructed by lentivirus stable expression system. The exosomes production were characterized by transmission electron microscopy, NTA, NanoFCM, confocal microscopy and other instruments. **Results:** The stable expression cell line of MCP-EGFP was successfully constructed by lentivirus vector, and then the ANXA2-MS2 gene was successfully introduced into the cell line by the same method. The exosomes obtained from the constructed donor cells were similar to those secreted by normal cells. RT - PCR showed that the exosomes also contained the MS2 sequence, while Western blot showed that the exosomes contained the EGFP protein expression. **Conclusion:** A donor cell line, which can produce exosomes containing ANXA2 RNA with MS2 tag, was successfully established by lentivirus system. This research provides a new method and theoretical basis for the construction of a donor cell line that can efficiently and stably loading specific RNA in exosomes.

Key words: Exosomes; Lentivirus vector; MCP-MS2; ANXA2; Stable expression system

Chinese Library Classification(CLC): Q78 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2023)08-1416-08

* 基金项目:广州医科大学附属第二医院在站博士后科研启动专项经费(31010406-083)

作者简介:胡萌(1987-),男,博士,研究方向:微生物学和纳米生物学,电话:020-34152406, E-mail: menghu@gzhmu.edu.cn

(收稿日期:2022-10-23 接受日期:2022-11-18)

前言

外泌体(Exosome),是指直径在 40-100 nm 的盘状囊泡,其主要来源于细胞内溶酶体微粒内陷形成的多囊泡体^[1]。外泌体是经多囊泡体外膜与细胞膜融合后释放到胞外基质中,其中包含了复杂的核酸、蛋白质、脂类、细胞因子、转录因子受体和其他具有生物活性的物质。2007 年,Valadi 等人首先报道了他们分离出的外泌体中含有 mRNA 和 miRNA^[2]。结果显示外泌体含有细胞 RNA 的特定亚群,其中一些集合是具有组织特异性的。这暗示出特定的 RNA 是经主动分选包装入外泌体的^[3]。当外泌体被其他细胞吸收时,这些物质将被转移并能影响受体细胞的表型。有研究证明,原发肿瘤细胞与远端器官的微环境之间可通过外泌体(和微囊泡)进行细胞间的通讯,此过程对肿瘤转移前微环境(pre-metastatic niche,PMN)的形成和发展至关重要^[4]。因此,外泌体被认为是细胞间通信的必要介质^[5]。

MS2-MCP 系统是目前应用最为广泛和成熟的 RNA 成像技术^[6]。此系统最早被用于标记和观察酿酒酵母 ASH1 mRNA 的运动情况^[7]。MS2-MCP 系统由两部分构成:具有重复结构的 MS2 序列和 MS2 噬菌体外壳蛋白(MS2 phage coat protein, MCP)。MCP 能特异性的识别并结合到 MS2 RNA 序列上,通过在 MCP 蛋白上融合相应的荧光基团或蛋白以达到荧光标记特殊 RNA 的目的^[8]。MS2 序列一般以 24 个拷贝数的串联方式添加到 RNA 的 3'UTR 端,但在特殊情况下 RNA 的 3'UTR 携带许多稳定和定位功能元件,这些元件可能会影响标记效率。由于 MS2 序列是以二聚体的形式存在,所以 24 个拷贝的 MS2 RNA 可以结合有 48 个 MCP 蛋白。这些串联荧光基团能起到信号放大作用,通过共聚焦显微镜便能轻松捕捉到单个 RNA 分子在细胞内的运动情况^[9]。MS2-MCP 结合的解离常数为 5 nmol/L,是属于强亲和力结合。这种结合可能会导致被结合的 RNA 滞留不被降解,影响 RNA 自身命运。Robert H Singer 等人通过突变改造了 MCP 蛋白和其结合域,从而开发出一种改良的 MS2 系统,被称为 MS2V6^[10]。MS2V6 克服了由于 MCP 的结合导致 RNA 不能被正常降解的问题,有利于活细胞成像从而揭示被标记 RNA 的真正命运。

膜联蛋白 A2(Annexin A2)简称 ANXA2,是一种钙依赖性膜磷脂结合蛋白,作为一种细胞外的纤溶受体,不仅能促进肿瘤细胞的蛋白水解、新生血管、侵袭和转移,还能重塑细胞外基质^[11,12]。目前有研究证实,ANXA2 与卵巢癌的 FIGO 分期、病理分级、淋巴结转移等都有显著相关性。此外,ANXA2 的过表达促进了裸鼠卵巢癌细胞的侵袭和转移,并促进了移植肿瘤的发生能力。近年来,蛋白质组学研究也证实了 ANXA2 可能是膀胱癌、结肠直肠癌和卵巢癌细胞分泌的外泌体中的一种重要的功能蛋白^[13]。本课题组通过对人胚胎肾细胞 293(HEK293)和人肺腺癌细胞株(A549)所分泌的外泌体进行测序和分析时发现 ANXA2 RNA 在这些外泌体中同样有着相对较高的表达水平,然而以往对外泌体中 ANXA2 的研究都是基于蛋白质水平上的,人们对 ANXA2 RNA 调节受体细胞的过程仍知之甚少。因此,构建含有融合标签的 ANXA2 基因的外泌体供体细胞,是从分子水平揭示 ANXA2 RNA 借助外泌体调控受体细胞相关生理过程和机制的不可或缺的前期准备的必要前期准备,也是

针对肿瘤设计纳米药物的根本保障。

本研究拟借助稳定表达系统构建一种能分泌含有 MS2 标签的 ANXA2 RNA 的外泌体的稳转细胞株,以期为进一步研究目的基因在受体细胞中的功能和机制提供新的方法。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

慢病毒表达载体 phage-ubc-nls-ha-tdMCP-gfp-T2A-puro、慢病毒包装质粒 pMD2.G、包膜蛋白质粒 psPAX2、pET259-pUC57 24xMS2V6 均为实验室保存。ANXA2 基因序列来自 NCBI 数据库(NM_004039.3)。PCR 引物和基因合成均购买自擎科生物科技公司。高保真聚合酶 Phanta Max Super-Fidelity DNA polymerase 和同源重组试剂盒购买自南京诺唯赞(Vazyme)生物科技股份有限公司;T4 DNA 聚合酶购买自 NEB;E.Z.N.A Cycle Pure Kit、E.Z.N.A Gel Extraction Kit、E.Z.N.A Endo-Free Plasmid Mini Kit II 购买自 Omega Bio-Tek。限制性内切酶 Fast digest 系列和转染试剂 Fugene HD 均购买自 Thermo Fisher。DH5 α 和 Top10 感受态细胞购买自天根科技有限公司;Stable 感受态购买自广州苏玛生物科技有限公司。HEK293 和 293T 细胞均购买自 NECB 国家中心细胞库。DMEM 培养基、胎牛血清、胰酶和双抗(Penicillin/Streptomycin)均购买自 Gibco。Hoechst 33342 购买自 SIGMA。逆转录试剂盒 Prime-ScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser 和荧光定量 PCR 试剂盒 TB Green Premix EX Taq TM II 均购买自 Takara。蛋白质印迹法中所使用的抗体 anti-GFP 抗体(ab290)、重组 Anti-Syntenin 抗体[EPR8102](ab133267)、山羊抗兔 IgG H&L(HRP)(ab7090)均购买自 Abcam。

1.2 慢病毒载体质粒 phage-neo-T2A-ANXA2-24MS2 的构建

基于实验室保存的慢病毒表达载体 phage-ubc-nls-ha-tdMCP-gfp-T2A-puro,使用限制性内切酶 *Not* I 和 *Cla* I 获取慢病毒表达载体骨架。然后使用 *Not* I 和 *Cla* I 酶切位点在骨架载体中引入 Neomycin 抗性基因、T2A 自剪切肽段序列、多克隆位点(MCS)构建工具载体 phage-neo-T2A-MCS。此处引入的多克隆位点序列为:5'-CTAGCGGTACCCCCGGGGGCCCGAATTCTCTAGAAAGCTTCTCGAGAGTACTCTGCAGGGA-TCC-3'。使用限制性内切酶 *Xho* I 和 *Bam* H I 将 24xMS2V6 重复序列从 pET259-pUC57 24xMS2V6 切下,然后通过 T4 连接酶将该片段接入构建的工具载体 phage-neo-T2A-MCS 中,构建 phage-neo-T2A-24xMS2V6。根据 NCBI 数据库中 ANXA2 基因序列(NM_004039.3)以及多克隆位点上的 *Nhe* I 和 *Apa* I 酶切位点,设计同源重组引物(CE-F: 5'-GAGAATCCCGGCCCTGCTAGCATGTCTACTGTTTACGAAATCCTGTG-3' 和 CE-R: 5'-CTTTCTAGAGAATTCGGGCCCTCAGTCATCTCCACCA-CACAGG-3')。利用引物和高保真 DNA 聚合酶 Phanta Max Super-Fidelity DNA polymerase 特异性扩增 ANXA2 基因片段。然后参考同源重组试剂盒说明书,将目的片段通过同源重组连接到 phage-neo-T2A-24xMS2V6 上,构建慢病毒载体质粒 phage-neo-T2A-ANXA2-24MS2V6。连接产物转化入 stable 感受态中,均匀涂布到含有氨苄抗性的营养琼脂 LB 平板上筛选阳性克隆。将筛选到的阳性克隆菌株送公司测序,待测序正确

后用于后续实验。

1.3 重组病毒的获得

转染前 24 h 用胰蛋白酶消化对数生长期的 293T 细胞,将 293T 细胞接种于 10 cm 皿中,于 37 °C、5% CO₂ 培养箱内培养至细胞密度达 70% 左右即可用于转染。根据转染试剂 Fugene HD 说明书,将慢病毒载体质粒、慢病毒包装质粒 pMD2.G 和慢病毒包膜蛋白质粒 psPAX2 共转染进 293T 细胞中,48 h 后收集细胞培养基。在 4 °C 下,以 2000 rpm 离心 5 min,收集上清液。使用 0.45 μm 滤网过滤,然后将含有病毒的悬液分装于 -80 °C 保存备用。

1.4 感染和筛选稳定表达的单细胞株

1.4.1 HEK293-tdMCP-EGFP 细胞的获得 感染前 24 h 用胰蛋白酶消化对数生长期的 HEK293 细胞,将 HEK293 细胞接种于 6 孔板中,于 37 °C、5% CO₂ 培养箱内培养。第二天,细胞密度达 60% 左右后弃掉培养基,每孔加入 2 mL 病毒悬液,然后每孔补加 200 μL FBS 和 16 μg Polybrene。感染 24 h 后,弃去培养基,加入 DMEM 完全培养基培养。于 48 h 后,更换含有嘌呤霉素 (1.5 μg/mL) 的完全培养基,同时以未感染的细胞作为对照组进行筛选。大约 7-14 天后,待对照组细胞大面积死亡并且实验组细胞形成新的细胞集群后,将筛选出的阳性细胞消化转移至新的培养板中,在保持有嘌呤霉素的前提下进行扩大培养。

对于稳定表达 MCP-EGFP 的阳性细胞而言,通过流式细胞仪依据绿色荧光强度进行初步分选。收集具有强荧光的集群并扩大培养。然后通过极限稀释法,利用 96 孔板筛选单细胞。最后收集荧光特性较好的单克隆细胞株并保存,命名为 HEK293-tdMCP-EGFP。

1.4.2 HEK293-tdMCP-ANXA2 细胞的获得 以筛选到的 HEK293-tdMCP-EGFP 为基础,用上述同样的方法,利用慢病毒将 ANXA2-24MS2V6 稳定转染进细胞中。利用新霉素 (1 mg/mL) 进行筛选并扩大培养,然后利用极限稀释法获得单细胞。最后收集荧光特性较好的单克隆细胞株并保存,命名为 HEK293-tdMCP-ANXA2。

1.5 外泌体的提取

外泌体的提取步骤参考文献方法^[4],具体操作如下:收集细胞培养基,于 4 °C 下,用 2000× g 离心 20 min,收集上清液。然后于 4 °C,以 16000× g 离心 20 min。收集上清液于新的离心管中,在 4 °C,以 160000× g 离心 1.5 h。弃掉上清,使用 0.22 μm 滤网过滤后的 PBS 来重悬底部外泌体,然后于 4 °C 以 160000× g 离心 2 h。弃掉上清,使用 100 μL 已过滤的 PBS 重悬底部外泌体。将外泌体悬液收集到新的 EP 管中保存。

1.6 RNA 的提取和逆转录

本实验使用 Trizol 法提取细胞和外泌体中的 RNA,具体流程如下:使用 1 mL Trizol 试剂重悬外泌体或细胞样品,混匀。加入 1/5 体积的氯仿,上下颠倒混匀 15 s,置于室温下孵育 3 min。于 4 °C,20000× g 离心 15 min。将上清液转移至一个新的 EP 管中,加入 1/2 体积的 RNA 助沉缓冲液 (0.8 M NaCl + 1.2 M 柠檬酸钠)和 1/2 体积的异丙醇,混匀。将混合液于 4 °C 孵育 30 min。然后在 4 °C,以 20000× g 离心 10 min。去掉上清液,加入 1 mL 75% 的乙醇,继续以 20000× g 离心 10 min。去掉上清液,然后在 4 °C 以 20000× g 离心 5 min。除掉残留的乙

醇,然后将 EP 管于 4 °C 静置数分钟。待乙醇除尽,加入 20 μL RNase-free 的水。

参考逆转录试剂盒 (PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser)说明书,将收集的 RNA 逆转录成 cDNA。

1.7 RT-PCR

提取外泌体和供体细胞 total RNA,通过逆转录试剂盒转成 cDNA。针对 MS2V6 序列设计 RT-PCR 引物。引物通过 NCBI 在线工具 Primer Designing Tool 进行设计 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>)。引物设计遵循的如下原则:1,PCR 扩增产物长度在 80-150 bp 较为合适(可延长至 300 bp);2,引物长度在 17-25 mers;3,GC 含量 40%-60%;4,引物对之间的 Tm 值不能相差太大,60-65 °C 最佳;5,A、T、C、G 应该均匀分布,避开 T/C (Polypyrimidine)或 A/G (Polypurine)的连续结构;6,3' 末端序列最好以 G 或 C 结尾,尽量避免为 T;7,避开引物内部或两条引物之间有 3 个碱基以上的互补序列。两条引物间的 3' 末端避开有 2 个碱基以上的互补序列。

最终我们通过实验选择使用的引物分别是:F1:CGAAG-GTTTCCTGACTCGCT;R1:GGACTACCGCGTCTTCACTC。内参选择磷酸脱氢酶 hGAPDH,引物分别是:hGAPDH-F2:GAAGGTGAAGGTCGGAGATC;hGAPDH-R2:GAAGATGGT-GATGGGATTTC。然后利用 Takara 的 TB Green Premix EX Taq TM II 试剂盒对样品进行实时荧光定量 PCR 测定,实验中以正常细胞 HEK293 和 HEK-tdMCP-EGFP 细胞作为对照组,每个基因和引物重复 3 次,其相对表达量均以 GAPDH 的量作为内参照。

1.8 外泌体的表征

根据文献所述^[5],利用流式细胞仪 (Quantenon 4025)、透射电子显微镜 TEM (HT7800)、纳米颗粒检测仪 NTA (Particle Metrix ZetaView120)、纳米流式细胞仪 (NanoFCM Flow NanoAnalyzer)、动态光散射 DLS (Malvern Panalytical-ZETA-SIZER ULTRAPRO)、共聚焦显微镜 (LSM710)对收集到的外泌体进行表征。

电镜样品的制备过程:使用 200 目碳膜铜网吸附外泌体样品 5 min,除去多余液体后使用 2% 磷钨酸染色 1 min,将铜网于室温静置风干后观察。

1.9 Western Blot

提取外泌体和供体细胞的总蛋白,以正常细胞 HEK293 和 HEK-tdMCP-EGFP 细胞作为对照组,进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,转膜后于 5% BSA 的 PBST 中常温封闭 1 h,加入一抗 anti-GFP 和 anti-Syntenin (1:1000 稀释),于 4 °C 孵育过夜。使用 PBST 洗涤 3 次,每次 10 min,加入二抗 (1:2000 稀释),于常温下孵育 1 h。使用 PBST 洗涤 3 次,每次 10 min,使用化学发光 ECL 增强显色试剂盒显色,分析结果。

2 结果

2.1 稳定表达细胞株 HEK293-tdMCP-EGFP 的构建

通过慢病毒稳定转染系统,将 tdMCP-EGFP 基因转染进 HEK293 细胞中。利用嘌呤霉素进行筛选和扩增,然后通过共聚焦显微镜观察并通过流式细胞仪进行分选。由于 tdMCP-EGFP 融合蛋白带有 NLS 核定位信号,所以未结合 RNA 的

tdMCP-EGFP 蛋白应定位于细胞核内。结果如图 1 所示,共聚焦结果显示绿色荧光信号都集中在细胞核中,在分选前只能观察到少量的细胞中带有荧光信号,通过流式细胞仪分选后,几

乎所有细胞都能检测到荧光信号。以上结果说明,tdMCP-EGFP 融合蛋白在稳定表达细胞中能正确表达和定位。

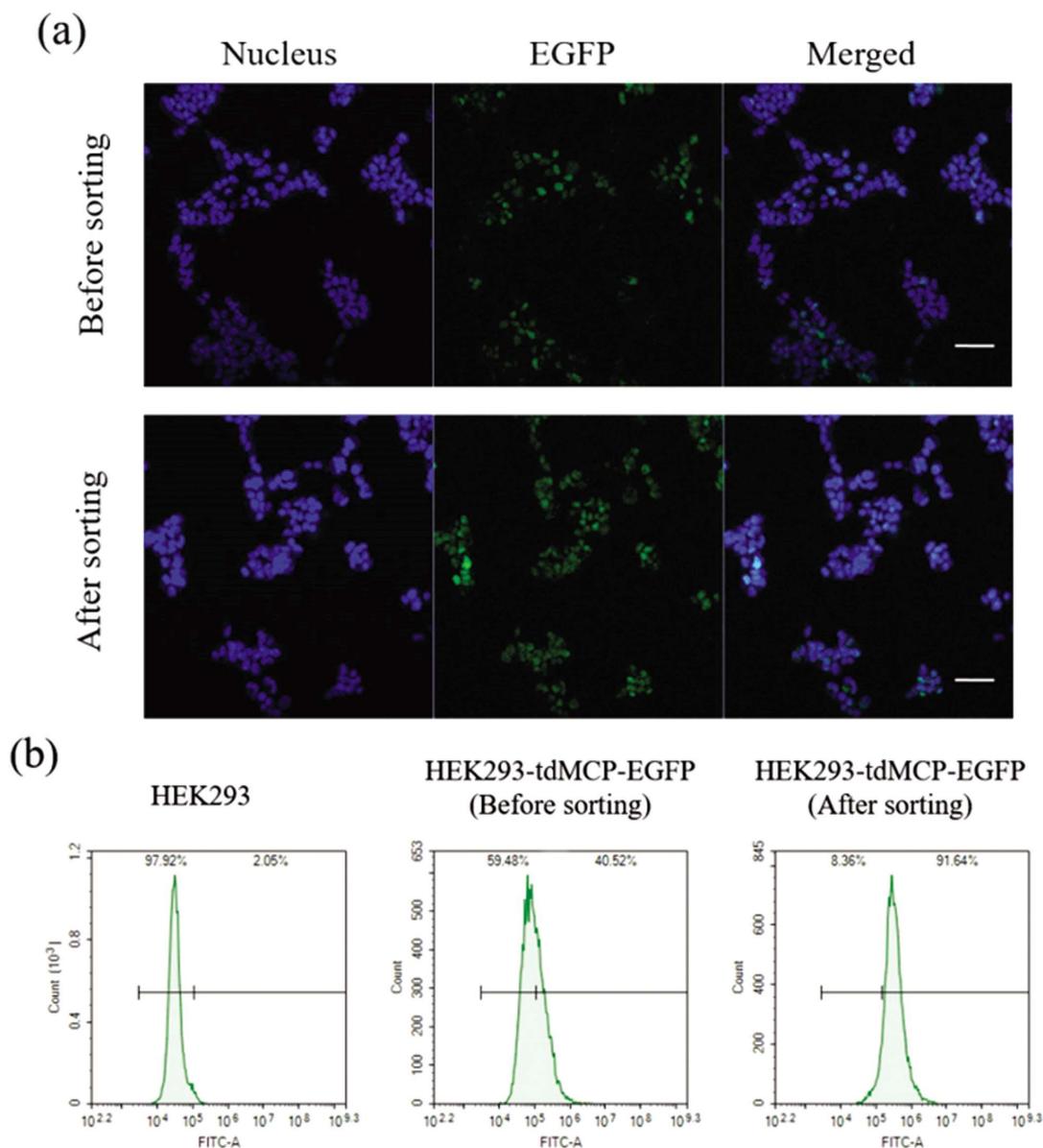


图 1 HEK293-tdMCP-EGFP 稳转细胞株的构建

(a)共聚焦显微镜观察分选前后细胞状态。20 倍镜,Scale Bar:75 μ m;(b)流式细胞仪检测分选前后细胞集群的荧光强度

Fig.1 Construction of the HEK293-tdMCP-EGFP cell lines

(a) the confocal imaging results. 20x lens, Scale bar 75 μ m; (b)The difference of EGFP expression before and after sorting.

然后通过极限稀释法进行筛选,以期获得具有明亮荧光特性的单克隆细胞株。通过共聚焦显微镜观察和对比(图2a),结果显示筛选出的单克隆细胞株相对对照组,荧光信号有明显的增强,且信号均一,符合实验要求。多次传代后,提取细胞的 total RNA,利用逆转录试剂盒将 total RNA 逆转录为 cDNA,然后通过 EGFP 全长(大约 720 bp)引物进行 PCR 鉴定。凝胶电泳结果(图 2b)显示 HEK293-tdMCP-EGFP 细胞中 EGFP 基因具有明显条带,而对对照组 HEK293 细胞中并未检测到 EGFP 基因。综上所述,外源性 EGFP 基因在 HEK293-tdMCP-EGFP 细胞株中能稳定表达。

2.2 HEK293-tdMCP-ANXA2 的构建

成功构建慢病毒表达载体 phage-neo-T2A-ANXA2-24MS2V6,载体图谱如图 3 所示:

基于筛选到的 HEK293-tdMCP-EGFP 单克隆细胞,利用慢病毒的稳定表达系统构建 HEK293-tdMCP-ANXA2。

在转染后,使用新霉素进行筛选。2 周后,在保持抗性培养基的前提下,进行扩大培养。通过荧光显微镜观察。结果如图 4 所示,HEK293-tdMCP-ANXA2 和 HEK293-tdMCP-EGFP 相比,能够观察到 EGFP 的荧光信号滞留在细胞质中,说明 ANXA2-24MS2 的 mRNA 结合上 MCP-EGFP 后使得 EGFP 的细胞内定位发生了改变。

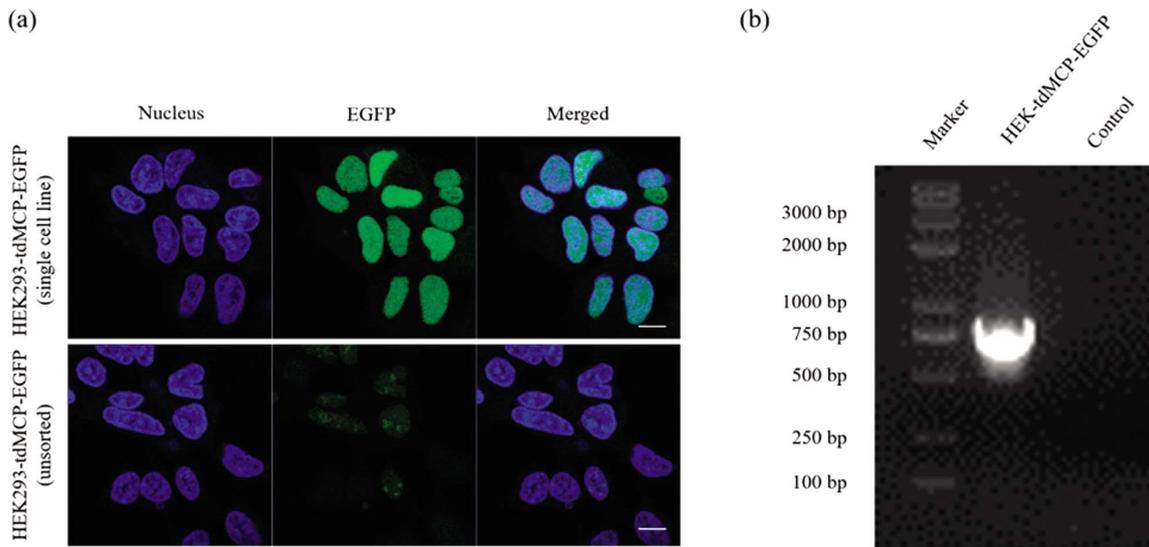


图2 HEK293-tdMCP-EGFP 稳定表达细胞株的鉴定

(a)共聚焦显微镜检测极限稀释法筛选单细胞;(b)PCR 检测 EGFP 基因在 HEK293-tdMCP-EGFP 细胞中的稳定表达情况。

100 倍镜, Scale Bar: 10 μm

Fig.2 Characterization of HEK293-tdMCP-EGFP

(a) Characterization of the fluorescence of the HEK293-tdMCP-EGFP single cell line 100× lens, Scale Bar:10μm; (b) the stable expression of EGFP gene in HEK293-tdMCP-EGFP cells was detected by PCR.

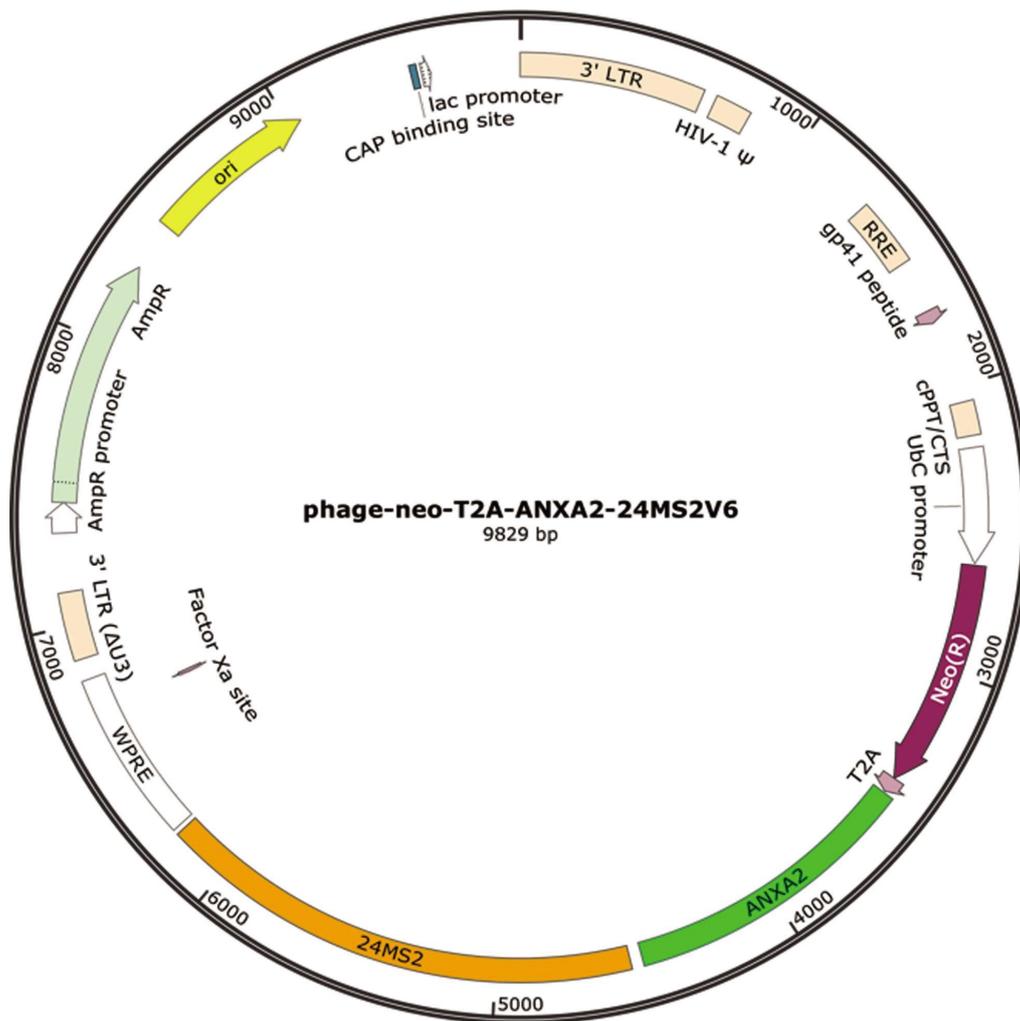


图3 慢病毒表达载体 phage-neo-T2A-ANXA2-24MS2V6 质粒图谱

Fig.3 The map of phage-neo-T2A-ANXA2-24MS2V6

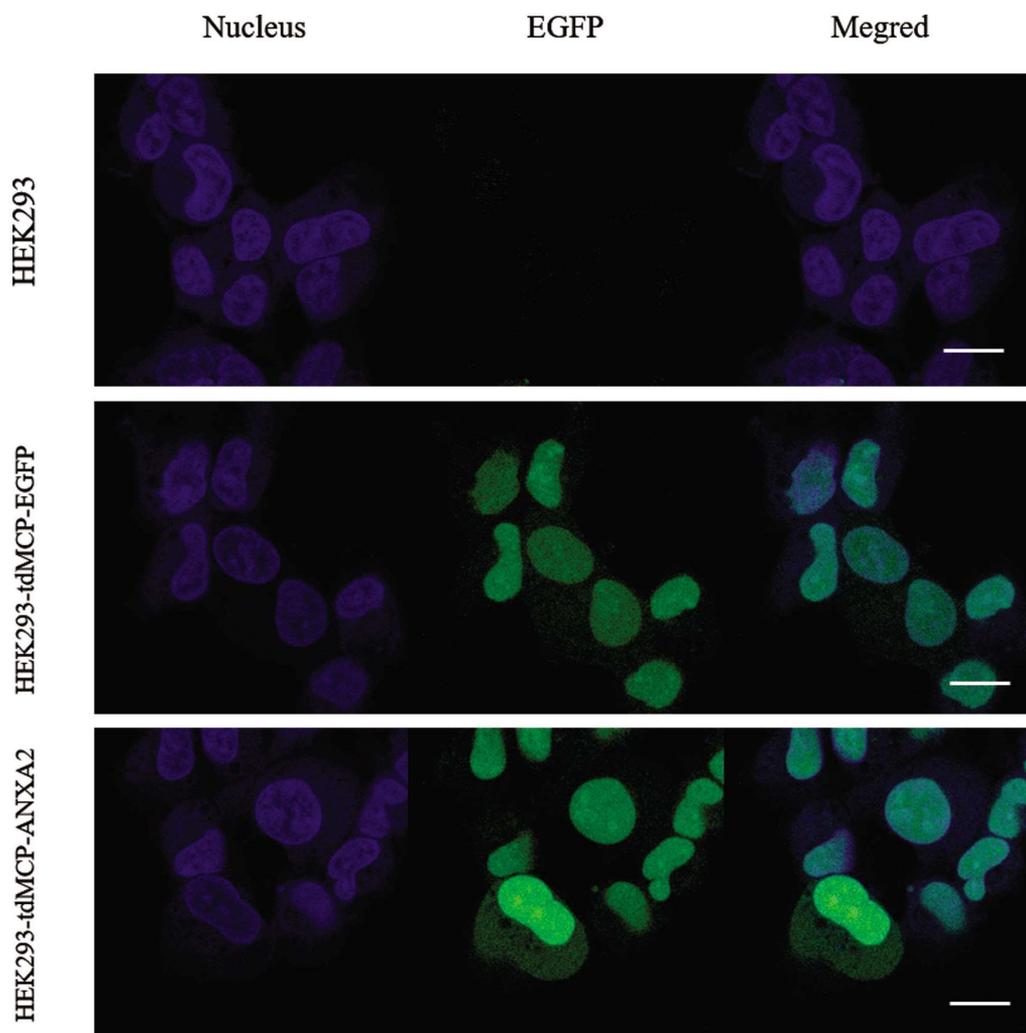


图 4 共聚焦显微镜检测 HEK293-tdMCP-ANXA2 荧光特性

Scale Bar: 10 μ m

Fig.4 Characterization of the fluorescence of the HEK293-tdMCP-ANXA2

100 \times lens, Scale Bar: 10 μ m

2.3 外泌体的表征

成功提取稳定表达细胞 HEK-tdMCP-ANXA2、对照组 HEK-tdMCP-EGFP 和 HEK293 的外泌体。

通过 TEM 对外泌体的进行表征，结果如图 5 所示。

HEK-tdMCP-ANXA2 分泌的外泌体粒径和对照组相当，都在 100-120 nm 左右。

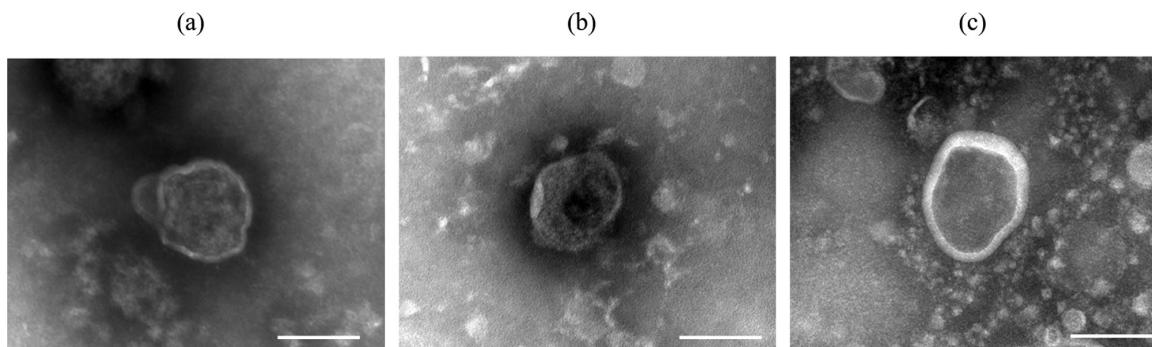


图 5 透射电子显微镜表征外泌体

(a)HEK293 分泌的外泌体(b)HEK293-tdMCP-EGFP 分泌的外泌体(c)HEK293-tdMCP-ANXA2 分泌的外泌体。Scale Bar: 100 nm

Fig.5 Characterization of exosomes by TEM

(a) The TEM imaging of exosomes isolated from HEK293; (b) The TEM imaging of exosomes isolated from HEK293-tdMCP-EGFP; (b) The TEM imaging of exosomes isolated from HEK293-tdMCP-ANXA2. Scale Bar: 100 nm

通过 NTA、NanoFCM 和 DLS 对所提取的外泌体进行检测 (表格 1)。NTA 检测到的结果发现所提取的外泌体的粒径在 149 nm 左右, zeta 电位在 -25 mV。而 NanoFCM 测量外泌体的粒径则在 73 nm 左右。外泌体粒径存在的误差可能是不同实验测量粒径的原理不同造成的。另一方面, 通过 NanoFCM 对外泌体的所携带荧光信号进行检测, 以对照组 HEK293 的荧光信

号作为参照。结果显示 HEK293-tdMCP-ANXA2 分泌的外泌体中能检测到少量较为明显的绿色荧光信号 (阳性率 0.2%), 可能仪器的灵敏度不足以检测到外泌体中单个 RNA 分子所携带的绿色荧光信号。另外一方面, DLS 结果显示, 各组外泌体的多分散系数 (PI) 相差不大, 均具有良好的分散性。

表 1 外泌体的表征 (n=3)
Table 1 Characterization of exosomes (n=3)

Sample Name	NTA		NanoFCM		DLS
	Size (nm)	Zeta potential (mV)	Size (nm)	Positive Ratio (%)	Polydispersity Index (PI)
HEK293	146.1	-23.56± 0.42	72.19	0	0.1769
HEK293-tdMCP-EGFP	149.9	-24.35± 0.40	75.06	0	0.1617
HEK293-tdMCP-ANXA2	149.4	-29.50± 0.51	73.17	0.2	0.1761

2.4 Western Blot

收集不同细胞分泌的外泌体, 然后提取外泌体中的总蛋白, 分别对内参蛋白 synenin 和目的蛋白 EGFP 进行 Western Blot 检测 (图 6)。结果显示, 每一组中 Syntenin 都具有较明显的条带, 证明提取的外泌体完整性较好。而除了 HEK293 的细胞提取的外泌体外, 其他外泌体中均能检测到 EGFP 蛋白, 证明稳定表达的 tdMCP-EGFP 能成功被包装进入外泌体中。

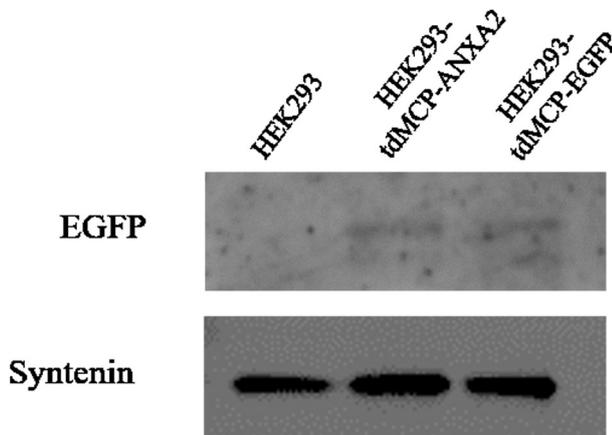


图 6 Western blot 的结果

Fig.6 The Western blot results of EGFP

2.5 实时荧光定量 PCR 检测 MS2V6 的相对表达量

实施荧光定量 PCR 检测结果如图 7 所示。相对于对照组 HEK293-tdMCP-EGFP 细胞内或其分泌的外泌体而言, 包含有 MS2V6 的 RNA 在转染细胞 HEK293-tdMCP-ANXA2 细胞内和其所分泌的外泌体中都具有较高的表达量 ($P < 0.001$)。该结果表明, HEK293-tdMCP-ANXA2 的稳定表达细胞株中, 带有 ANXA2-24MS2V6 的 RNA 能成功被包装进细胞分泌的外泌体中。

3 讨论

外泌体是目前研究的热点, 受到了国内外研究者的广泛关注。越来越多的研究发现外泌体内 RNA 作为其主要装载物, 在

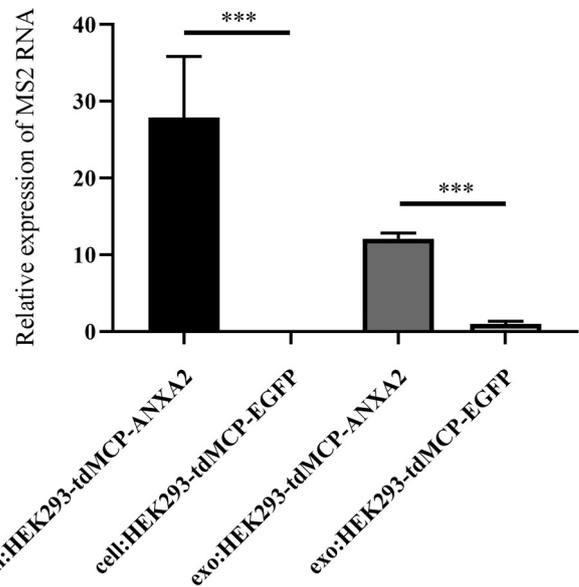


图 7 实时荧光定量 PCR 检测稳定表达细胞株分泌的外泌体中带有 MS2 序列的 RNA 相对表达量 (n>3)。*** $P < 0.001$

Fig.7 The relative expression of MS2 sequence in exosomes. (n>3)

*** $P < 0.001$

多种生理过程中都起着非常重要的作用^[16,17]。此外, 外泌体是肿瘤微环境的重要组成部分, 其能通过细胞间通讯参与多种癌症的发生、发展、侵袭和转移^[18-20]。而肿瘤细胞来源的外泌体可以调节受体细胞的生物学特性和信号通路, 并通过传递多个靶向分子, 重塑肿瘤微环境^[21]。有研究指出, 来自卵巢癌细胞的外泌体携带的 ANXA2 可以调节 HMrSV5 细胞, 导致其上皮-间充质转化和细胞外基质降解, 最终形成适合腹腔内植入和转移的转移前微环境^[22]。该研究从蛋白质水平证明, ANXA2 不仅可以调节卵巢癌细胞分泌的外泌体的形成和释放, 还可以通过外泌体转移到 HMrSV5 细胞, 从而对靶细胞的生物学特性产生潜在的影响。但此研究未从 ANXA2 RNA 水平对肿瘤来源的外泌体进行更进一步的系统研究。

本课题组通过对人胚胎肾细胞 293 (HEK293) 和人肺腺癌细胞株 (A549) 所分泌的外泌体进行测序和分析发现 ANXA2

RNA 在这些细胞来源的外泌体中同样有着相对较高的表达水平。外泌体中携带的 ANXA2 RNA 可能在这一系列生理过程中同样也扮演着重要角色。与此同时,细胞内 RNA 包装进入外泌体的详细过程以及外泌体内的 RNA 进入受体细胞后的运动情况同样也是亟待解决的科学问题。但由于缺乏有效的工具,通过瞬时转染的方法持续获得质量均一旦带有标记的外泌体工作量且难度大,这在很大程度上限制对这些问题的进一步研究^[23]。为了克服上述难题,本研究利用了慢病毒介导构建稳定转染细胞株和 MS2-MCP 系统的优势^[24,25],构建了能自主分泌"含有 MS2 标签的 ANXA2 RNA 的外泌体"的供体细胞株。为提供能持续获得质量均一旦带有标记 RNA 的外泌体提供了实践基础。后续实验结果证明,所构建的细胞分泌的外泌体和正常细胞分泌的外泌体在大小和形态上无明显差异。Western blot 和实时荧光定量 PCR 检测结果也说明 MCP-EGFP 融合蛋白和 ANXA2-MS2V6 mRNA 均被成功包裹进所分泌的外泌体中。上述结果证实 HEK293-tdMCP-ANXA2 细胞株构建成功。本课题后续将对 HEK293-tdMCP-ANXA2 细胞株所分泌外泌体的过程进行动态实时追踪,并观察携带的 ANXA2 mRNA 外泌体被受体细胞吸收后的 RNA 运动情况。

综上所述,本研究借助慢病毒载体成功构建了一种能稳定分泌含有 MS2 标记的 ANXA2 RNA 的外泌体供体细胞株 HEK293-tdMCP-ANXA2。此研究为研究外泌体中 RNA 的包装过程以及被受体细胞吸收后外泌体内 RNA 的运动研究奠定了基础,有良好的科研和应用价值。

参考文献(References)

- [1] Yang XX, Sun C, Wang L, et al. New insight into isolation, identification techniques and medical applications of exosomes [J]. J Control Release, 2019, 308: 119-129
- [2] Clayton A, Turkes A, Dewitt S, et al. Adhesion and signaling by B cell-derived exosomes: the role of integrins [J]. FASEB J, 2004, 18: 977-979
- [3] Gibbins DJ, Ciaudo C, Erhardt M, et al. Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity[J]. Nat Cell Biol, 2009, 11: 1143-1149
- [4] Wortzel I, Dror S, Kenific CM, et al. Exosome-Mediated Metastasis: Communication from a Distance[J]. Dev Cell, 2019, 49(3): 347-360
- [5] Babaei G, Vostakolaei MA, Bazl MR, et al. The role of exosomes in the molecular mechanisms of metastasis: Focusing on EMT and cancer stem cells[J]. Life Sci, 2022, 310: 121103
- [6] LeCuyer KA, Behlen LS, Uhlenbeck OC. Mutagenesis of a stacking contact in the MS2 coat protein-RNA complex[J]. EMBO J, 1996, 15 (24): 6847-653
- [7] Bertrand E, Chartrand P, Schaefer MS, et al. Localization of ASH1 mRNA particles in living yeast[J]. Mol Cell, 1998, 2(4): 437-445
- [8] Fusco D, Bertrand E, Singer RH. Imaging of single mRNAs in the cytoplasm of living cells[J]. Prog Mol Subcell Biol, 2004, 35: 135-150
- [9] George L, Indig FE, Abdelmohsen K, et al. Intracellular RNA-tracking methods[J]. Open Biol, 2018, 8(10): 180104
- [10] Vera M, Tutucci E, Singer RH. Imaging Single mRNA Molecules in Mammalian Cells Using an Optimized MS2-MCP System [J]. Methods Mol Biol, 2019, 2038: 3-20
- [11] Bharadwaj A, Bydoun M, Holloway R, et al. Annexin A2 heterotetramer: structure and function [J]. Int J Mol Sci, 2013, 14(3): 6259-6305
- [12] Lokman NA, Ween MP, Oehler MK, et al. The role of annexin A2 in tumorigenesis and cancer progression[J]. Cancer Microenviron, 2011, 4(2): 199-208
- [13] Staubach S, Razawi H, Hanisch FG. Proteomics of MUC1-containing lipid rafts from plasma membranes and exosomes of human breast carcinoma cells MCF-7[J]. Proteomics, 2009, 9(10): 2820-2835
- [14] Mathieu M, Martin-Jaular L, Lavie G, et al. Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication[J]. Nat Cell Biol, 2019, 21(1): 9-17
- [15] Doyle LM, Wang MZ. Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis[J]. Cells, 2019, 8(7): 727
- [16] Tkach M, Théry C. Communication by Extracellular Vesicles: Where We Are and Where We Need to Go[J]. Cell, 2016, 164: 1226-132
- [17] Tran N. Cancer Exosomes as miRNA Factories[J]. Trends in Cancer, 2016, 2: 329-331
- [18] Yu B, Du Q, Li H, et al. Diagnostic potential of serum exosomal colorectal neoplasia differentially expressed long non-coding RNA (CRNDE-p) and microRNA-217 expression in colorectal carcinoma [J]. Oncotarget, 2017, 8(48): 83745-83753
- [19] Zhang J, Liu SC, Luo XH, et al. Exosomal Long Noncoding RNAs are Differentially Expressed in the Cervicovaginal Lavage Samples of Cervical Cancer Patients[J]. J Clin Lab Anal, 2016, 30: 1116-1121
- [20] Suzuki H, Tsukahara T. A view of pre-mRNA splicing from RNase R resistant RNAs[J]. Int J Mol Sci, 2014, 15: 9331-9342
- [21] Li Y, Zheng Q, Bao C, et al. Circular RNA is enriched and stable in exosomes: a promising biomarker for cancer diagnosis [J]. Cell Res, 2015, 25: 981-984
- [22] Gao L, Nie X, Gou R, et al. Exosomal ANXA2 derived from ovarian cancer cells regulates epithelial-mesenchymal plasticity of human peritoneal mesothelial cells [J]. J Cell Mol Med, 2021, 25 (23): 10916-10929
- [23] Stremersch S, Vandenbroucke RE, Van Wouterghem E, et al. Comparing exosome-like vesicles with liposomes for the functional cellular delivery of small RNAs [J]. J Control Release, 2016, 232: 51-61
- [24] Perry C, Rayat ACME. Lentiviral Vector Bioprocessing [J]. Viruses, 2021, 13(2): 268
- [25] Shav-Tal Y, Darzacq X, Shenoy SM, et al. Dynamics of single mRNPs in nuclei of living cells [J]. Science, 2004, 304 (5678): 1797-1800