

· 综 述 ·

# 外质体及其源性微 RNA 的研究进展

徐向东 综述, 吴小侯<sup>△</sup> 审校

(重庆医科大学附属第一医院泌尿外科, 重庆 400016)

关键词: 微 RNA; 外质体; 提取法; 鉴定; 生物标志物; 靶向治疗

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2014.10.043

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2014)10-1269-03

外质体(exosomes)因携带有蛋白质、RNA 及信号分子,能够在细胞间穿梭,具有生物标记物、信号传导及靶向治疗载体等作用。微 RNA(microRNA, miRNA)为一类由内源基因编码的长度为 20~22 个核苷酸的非编码单链 RNA 分子,通过与靶基因 3' 端非编码区结合从而促进靶基因降解或者抑制其翻译。目前,对 exosomes 中的 miRNA 的研究表明,其能影响很多靶细胞功能,鉴定正常人群血液中 exosomes 的 miRNA,可为人类疾病提供具有预测性的 miRNA,也可探究出特定的 miRNA 所调节的生物学功能<sup>[1]</sup>, Koh 等<sup>[2]</sup>发现 miRNA 也存在于人类胚胎来源的间充质干细胞外环境中,在人类胚胎来源的间充质干细胞的细胞内与细胞外环境中检测到的 miRNA 有明显的不同,且 let-7 miRNA 家族在人类胚胎来源的间充质干细胞的细胞外与细胞内都高表达。先进的 miRNA 检测技术在 exosomes 中的 miRNA 检测取得了重要的进步,对其研究也逐渐便利。exosomes 中包含了一系列的 miRNA,但是与供体细胞相比,很少核糖体 RNA 被检测到<sup>[3]</sup>。然而,在某些 exosomes 中的 miRNA 并没有反映出母细胞中的 miRNA 谱。在 T 细胞、B 细胞、树突状细胞中分离出的 exosomes 所含 miRNA 谱有别于母细胞<sup>[4]</sup>。相比于细胞内的 RNA, exosomes 中的 RNA 更为稳定,而且在储存及冰冻环境中具有更好地抵抗降解的优势。exosomes 膜结构增强了内容物的稳定性,提高了其作为一种癌或疾病的生物标志物的研究潜能。

## 1 exosomes 的提取及鉴定

**1.1 exosomes 的提取** (1)蔗糖密度梯度超速离心法:其为公认的 exosomes 提取方法。单纯次序离心可能导致部分微粒子或大分子复合物与之重叠,联合蔗糖密度梯度超速离心,可提供高度浓缩的 exosomes。(2)超滤法:Cheruvanky 等<sup>[5]</sup>报道使用超滤法能够花更少时间提纯 exosomes,不会需要使用特殊的设备。Momen-Heravi 等<sup>[6]</sup>宣布在 ExomiR 试剂盒(exosomes 中 miRNA 提取试剂盒)中第 1 个过滤柱能够移除所有细胞、血小板、细胞碎片,在第 2 个过滤柱中加压液体,能够俘获所有大于 30 nm 的微泡。对于这个方法, exosomes 是不可回收的, RNA 内容物直接在第 2 个过滤柱上萃取,然后被用作 PCR 分析。(3)高效液相层析仪方法:利用高效液相层析仪的方法能够获得高纯度的 exosomes,但这个过程需要专门的设备。血液及细胞培养基中包含大量的纳米粒,有些为非囊泡,大小可能和 exosomes 一样,比如 Wang 等<sup>[7]</sup>发现大量 miRNA 在细胞外复合物中而不是在 exosomes 中。以上方法只是为提

供丰富的 exosomes 样本的好方法,但不是提纯 exosomes 的好方法。(4)ExoQuick 法:低聚物如聚乙二醇常被用来沉淀病毒及小粒,根据这个原理,最近, System Biosciences 公司发明了一种专门试剂,命名为 ExoQuick,其能加到血清、条件培养基及尿液中,沉淀出 exosomes<sup>[8]</sup>。虽然这个方法非常快速直接,但缺乏特异性,以及使来自血清的微泡更难悬浮。(5)抗体俘获法:能较好的对 exosomes 进行特异性分离,该方法类似于用抗体对 CD63、CD81、CD82、CD9、EpCAM 和 Rab5 的纯化。但此方法抗体应该被固定在不同的媒介上,包括磁珠、层析基质、平板及微流体设备<sup>[9]</sup>。HansaBioMed 提供了一批产品,命名为 ExoTest 试剂盒,主要以抗 CD63、CD81 或 CD9 抗体固定在 96 孔板上,以对 exosome 进行俘获<sup>[10]</sup>。作为一个新领域,还需进一步明确整个系统的操作及提供的 exosomes 种类和数量。(6)其他:和抗体相似,别的类似的俘获方法也被使用。比如外源凝集素,它将结合到 exosomes 上特异的糖类产物上,这个方法已经被 Aethlon Medical 所应用<sup>[11]</sup>。使用特异的外源性凝集素靶向结合甘露糖产物,其便利性在于被俘获的 exosomes 很容易被自由的  $\alpha$  甲基甘露糖苷洗脱,但大量细胞在其表面也包含甘露糖,其对 exosomes 特异性不高,是否所有 exosomes 都能被俘获,也有待证明。

**1.2 exosomes 鉴定** 电镜下可见 exosomes 呈扁平状或球状、直径为 30~100 nm 的低密度物质,在蔗糖溶液中的密度为 1.13~1.21 g/mL,其密度与细胞来源相关,并随蛋白水平而变。所有 exosomes 包含了膜转运及融合蛋白(GTP 酶、强连蛋白、脂筏蛋白),跨膜蛋白(CD9、CD63、CD81、CD82),热休克蛋白(Hsp)70、Hsp90,多泡体来源的蛋白(Alix、TSG101),脂质相关蛋白及磷脂酶等,可用 Western blot、ELISA 等鉴定。mRNA 及 miRNA 有可能成为其新的标志物。

## 2 exosomes 源性 miRNA 的提取及鉴定

**2.1 exosomes 源性 miRNA 的提取方法** 其常见的萃取方法有 7 种。分别为: Trizol (Invitrogen, Paisley, 英国)、经 RNeasy Mini 试剂盒修饰纯化的 Trizol、RNeasy Mini 试剂盒、经修饰的 RNeasy Mini 试剂盒、miRNeasy Mini 试剂盒(4 个都来自 Qiagen, Hilden, 德国)、miRCURY<sup>TM</sup> RNA 分离试剂盒(Exiqon, Vedbaek, 丹麦)、mirVana<sup>TM</sup> miRNA 分离试剂盒(Ambion, Austin, TX, 美国),都参照厂商说明书使用。Trizol 主要为提取总 RNA, miRNeasy Mini 试剂盒、miRCURY<sup>TM</sup> RNA 分离试剂盒、mirVana<sup>TM</sup> miRNA 分离试剂盒可提

取总 RNA,也可直接从 exosomes 中提取 miRNA。RNA 提取后用分光光度仪检测其浓度<sup>[12]</sup>。

**2.2 目前常用的鉴定及分析方法** (1)克隆:主要用来发现新的 miRNA。试验的基本原理是从总 RNA 中提取 miRNA,制备 miRNA 的 cDNA 文库,然后提交到 RedBase 和 NCBI BLASTN 数据库中进行分析的方法。(2)实时荧光定量 PCR:通过 4 个阶段测定成熟 miRNA 的表达水平,分别为 cDNA 的合成、引物设计、扩增、数据标准化处理。与其他基因表达水平检测方法相比,实时荧光定量 PCR 的优点是重复性好,且探测范围小、试验成本低、定量精度与灵敏度高,以及样品消耗少。(3)Northern blotting:是一种常规检测 miRNA 表达的方法。与克隆相比,它检测 miRNA 精确度更高;经改良的 Northern blotting 具有更高灵敏性,并减少了试验时间。(4)miRNA 微阵列芯片技术及微球流式技术:是基于目标分子和它们相应的互补探针间的核酸杂交,也是同时研究数百个 miRNA 表达水平的最佳选择,但因重复性差及实验成本太高还没被普遍使用。(5)新一代大规模测序技术:主要用于对组织中所有 miRNA 进行定量和定性分析,目前大规模测序技术如 454 焦磷酸测序技术、Solexa 合成测序技术、SOLID 连接测序技术等,能一次检测几百万个样本<sup>[13]</sup>。依据试验目的不同,选择合适试验方法以获得可靠的、准确的 miRNA 信息。

### 3 exosomes 中 miRNA 的研究进展

**3.1 exosomes 源性 miRNA 作为疾病新的生物标志物** miRNA 的异常表达已经在很多疾病中被检测到,exosomes 源性 miRNA 正逐渐被认为是很多病理过程中的生物标志物。很多患者体内发现的 exosomes 源性 miRNA 并没有在健康人中发现。多种 miRNA,包括病毒 miRNA 存在于 exosomes 中,但是 exosomes 中的 miRNA 对受体细胞的功能还不是很清楚。经 EB 病毒感染 B95-8 LCL 细胞所释放的 exosomes 作用于单核细胞来源的树突状细胞,导致受体细胞的基因沉默<sup>[14]</sup>,由此可见,载有 miRNA 的 exosomes 能够充当一种运载工具,有助于了解疾病的发展或发病机制。有研究发现,巨噬细胞展现出能够通过分泌带有致瘤性 miRNA 的 exosomes 到瘤细胞,从而影响乳腺癌的侵袭力<sup>[15]</sup>。从树突状细胞分泌的 exosomes 能同靶树突状细胞融合,释放出它们的内容物,从而导致 mRNA 沉默<sup>[16]</sup>。Lim 等<sup>[17]</sup>最近研究指出,包含 miRNA 的骨髓基质细胞来源的 exosomes 对抑制乳腺癌细胞的转移发挥作用。从骨髓基质细胞到乳腺癌细胞的 miRNA 能够参与抑制骨髓转移。在某种疾病中的特异性 miRNA 也许能够有助于了解疾病的发病机制及潜在的修复机制。在心血管疾病的患者中,循环血中来自损伤心肌的 exosomes 含有的 miRNA-133a 升高,miRNA-133a 为靶向调节 NFATc4 基因,其表达产物为调节心肌肥大的蛋白,通过抑制 miRNA-133a 的治疗能够降低心肌肥大的水平<sup>[18]</sup>。exosomes 源性 miRNA 潜在肿瘤患者循环血液中相对于健康对照组,有明显的特异性<sup>[19]</sup>。对循环血液中 exosomes 所含 miRNA 的筛查,将其作为生物标志物,也许有助于对肿瘤发展的鉴定。在 exosomes 中独特的 miRNA 谱已经在肺癌、胶质母细胞瘤、肝癌中筛出<sup>[20]</sup>,在肿瘤中,很多过程能被 exosomes 中 miRNA 影响。比如在胰腺癌患者与健康对照组中 miRNA 的组成就有很大差异,但是肿瘤分离出的 miRNA 实质上与 exosomes 携带的 miRNA 相似,在肝癌中,一些

通过 exosomes 转运的 miRNA 可以下调 TAK1 通路,这个研究说明来自 exosomes 的 miRNA 可调节肝细胞癌的定位分布、肝内转移、多灶性生长<sup>[21]</sup>。Liu 等<sup>[22]</sup>发现肿瘤源的 exosomes 通过 MyD88 通路,增强骨髓源性抑制性细胞的促炎性细胞因子的扩张,从而促进肿瘤的转移。对 exosomes 源性 miRNA 的研究,为发现疾病新的生物标记物开启了新的途径。

**3.2 靶向 exosomes 中 miRNA 的治疗潜能** 由于 exosomes 能在细胞间高效的转运小分子物质,因此,可成为很多疾病极为有前景的治疗方式,因在诸多疾病中 exosomes 携带的 miRNA 为引起疾病的重要因素,集中在这些靶向的 exosomes 源性 miRNA 的药物研发意义重大,作为治疗的运输小泡 exosomes 覆盖了很多疾病,包括癌症、病毒诱导的疾病,以及寄生虫疾病等。Aivarez-Erviti 等<sup>[23]</sup>在实验室成功的在老鼠来源的树突状细胞中,将嗜神经性狂犬病毒糖蛋白肽融合到 exosomes 膜蛋白 Lamp2b 上,通过电传技术将这些细胞来源的 exosomes 与外源性甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphatedehydrogenase, GAPDH) 干扰 RNA 连接上,静脉注射具有嗜神经元的 exosomes,将 GAPDH 干扰 RNA 特异性转入大脑神经元、微神经胶质及少突细胞中,从而导致特殊的基因敲出。Akao 等<sup>[24]</sup>报道经修饰的 miRNA (miRNA-143BPs 等)可在 miRNA-143BPs 转染后的单核巨噬细胞分泌的 exosomes 中检测到,更重要的是,当老鼠被注射 miRNA-143BPs 转染后的单核巨噬细胞后,在其血液、肿瘤及肾脏中可检测到升高的 miRNA-143BPs。这些数据说明,通过体外操纵 exosomes 的 miRNA 为靶向特异性转运 miRNA 的一个有效手段。在小鼠体内 exosomes 对转运干扰 RNA 到其靶细胞也是一个重要手段,目前研究 exosomes 转运 miRNA 主要是在动物模型上,其主要作用:(1)exosomes 能够作为靶向治疗手段;(2)通过 exosomes 转运 miRNA 到达靶细胞是可行的,在很多疾病中,体内功能性操纵 exosomes 内 miRNA 以转运 miRNA 将是一个新的治疗干预措施。随着技术的进步,允许操纵 exosomes 中 miRNA 及其蛋白,exosomes 中的 miRNA 的研究将通过其诊断和靶向治疗功能造福于患者。

### 4 展望

miRNA 作为在翻译水平影响基因表达的非编码 RNA,其参与调节多种生物学进程,在患者中检测具有预警作用的 miRNA,对预测疾病的发生、发展具有重要意义。exosomes 可在细胞间穿梭,携带 miRNA 等物质,运用 exosomes 转运人工干预的 miRNA,具有潜在对细胞和组织靶向治疗的功能。

目前,在 134 个 exosomes 的研究中,已经发现其包含 11 261 种蛋白,2 375 种 mRNA,764 种 miRNA<sup>[25]</sup>,用 exosomes 运输 miRNA 到靶细胞有以下几种优势:(1)exosomes 能直接运送 miRNA 到受体细胞,增加了改变靶细胞功能的可能性;(2)exosomes 能加强细胞与细胞的联系,而不必担心细胞与细胞的距离;(3)exosomes 可在体液及血液中检测出来,说明器官之间可通过 exosomes 交换信息;(4)exosomes 中包含特异性细胞因子,允许 exosomes 运送自身携带物(蛋白、mRNA、miRNA 等)高效的到达靶细胞,以发挥特有的生物学功能;(5)exosomes 携带的 miRNA 能独特的影响疾病,可通过鉴定在体液中分离出的 miRNA 来达到诊断疾病的目的;(6)exosomes 中的 miRNA 能够提供有效的工具来靶向治疗

特异性细胞和器官疾病。但 exosomes 及其携带的 miRNA 在技术上目前还不是很成熟,检测及处理成本均较高,不适合普遍在临床上使用,且其治疗手段均未应用于临床,仍需继续加大其提取、处理及安全性的研究,使其切实造福于患者。

#### 参考文献:

- [1] Hunter MP, Ismail N, Zhang X, et al. Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles[J]. PLoS One, 2008, 3(11): e3694.
- [2] Koh W, Sheng CT, Tan B, et al. Analysis of deep sequencing microRNA expression profile from human embryonic stem cells derived mesenchymal stem cells reveals possible role of let-7 microRNA family in downstream targeting of hepatic nuclear factor 4 alpha[J]. BMC Genomics, 2010, 11 Suppl 1: S1-6.
- [3] Valadi H, Ekström 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): 654-659.
- [4] Mittelbrunn M, Gutiérrez-Vázquez C, Villarroya-Beltri C, et al. Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells[J]. Nat Commun, 2011(2): 282.
- [5] Cheruvanky A, Zhou H, Pisitkun T, et al. Star Rapid isolation of urinary exosomal biomarkers using a nanomembrane ultrafiltration concentrator[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2007, 292(5): 1657-1661.
- [6] Momen-Heravi F, Balaj L, Alian S, et al. Current methods for the isolation of extracellular vesicles[J]. Biol Chem, 2013, 394(10): 1253-1262.
- [7] Wang K, Zhang S, Weber J, et al. Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells[J]. Nucleic Acids Res, 2010, 38(20): 7248-7259.
- [8] Taylor DD, Zacharias W, Gerçel-Taylor C. Exosome isolation for proteomic analyses and RNA profiling Methods[J]. Mol Biol, 2011, 728(1): 235-246.
- [9] Chen C, Skog J, Hsu CH, et al. Microfluidic isolation and transcriptome analysis of serum microvesicles[J]. Lab Chip, 2010, 10(4): 505-511.
- [10] 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.
- [11] Vlassov AV, Magdaleno S, Setterquist R, et al. Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials[J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1820(7): 940-948.
- [12] Eldh M, Lötval J, Malmhäll C, et al. Importance of RNA isolation methods for analysis of exosomal RNA: Evaluation of different methods[J]. Mol Immunol, 2012, 50(4): 278-286.
- [13] 景花, 宋沁馨, 周国华. microRNA 定量检测方法的研究进展[J]. 遗传, 2010, 32(1): 31-40.
- [14] Pegtel DM, Cosmopoulos K, Thorley-Lawson DA, et al. Functional delivery of viral miRNAs via exosomes[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(14): 6328-6333.
- [15] Yang M, Chen J, Su F, et al. Microvesicles secreted by macrophages shuttle invasion-potentiating microRNAs into breast cancer cells[J]. Mol Cancer, 2011(10): 117.
- [16] Montecalvo A, Larregina AT, Shufesky WJ, et al. Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes[J]. Blood, 2012, 119(3): 756-766.
- [17] Lim PK, Bliss SA, Patel SA, et al. Gap junction-mediated import of microRNA from bone marrow stromal cells can elicit cell cycle quiescence in breast cancer cells[J]. Cancer Res, 2011, 71(5): 1550-1560.
- [18] Kuwabara Y, Ono K, Horie T, et al. Increased microRNA-1 and microRNA-133a levels in serum of patients with cardiovascular disease indicate myocardial damage[J]. Circ Cardiovasc Genet, 2011, 4(4): 446-454.
- [19] Taylor DD, Gerçel-Taylor C. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer[J]. Gynecol Oncol, 2008, 110(1): 13-21.
- [20] Rabinowits G, Gerçel-Taylor C, Day JM, et al. Exosomal microRNA: a diagnostic marker for lung cancer[J]. Clin Lung Cancer, 2009, 10(1): 42-46.
- [21] Kogure T, Lin WL, Yan IK, et al. Intercellular nanovesicle-mediated microRNA transfer: a mechanism of environmental modulation of hepatocellular cancer cell growth[J]. Hepatology, 2011, 54(4): 1237-1248.
- [22] Liu Y, Xiang X, Zhuang X, et al. Contribution of MyD88 to the tumor exosome-mediated induction of myeloid derived suppressor cells[J]. Am J Pathol, 2010, 176(5): 2490-2499.
- [23] Alvarez-Erviti L, Seow Y, Yin H, et al. Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes[J]. Nat Biotechnol, 2011, 29(4): 341-345.
- [24] Akao Y, Iio A, Itoh T, et al. Microvesicle-mediated RNA molecule delivery system using monocytes/macrophages[J]. Mol Ther, 2011, 19(2): 395-399.
- [25] Mathivanan S, Fahner CJ, Reid GE, et al. ExoCarta 2012: database of exosomal proteins, RNA and lipids[J]. Nucleic Acids Res, 2012, 40(1): 1241-1244.

(收稿日期: 2013-10-03 修回日期: 2013-12-10)