

聚乙二醇沉淀法提取关节液来源外泌体实验研究

阮安民¹ 陈谱¹ 周俊¹ 张晓哲¹ 张栋¹ 沈家豪¹
马玉峰² 彭浩轩¹ 杨统杰¹ 王庆甫^{1,2,△}

[摘要] **目的:**应用聚乙二醇(PEG)沉淀法提取关节液来源外泌体,并检测外泌体的形态及分子生物学特征,为关节液来源外泌体的进一步研究奠定基础。**方法:**用 8% PEG 从关节积液中分离、提取目标颗粒,然后经透射电子显微镜观察其形态,采用纳米颗粒示踪分析仪分析其大小及纯度,蛋白质印迹法检测其标记物蛋白的表达。**结果:**所获目标颗粒呈圆形或椭圆形囊泡,质膜完整,大小不一,直径约为 35~155 nm,且阳性表达 CD9 及 CD63 蛋白。**结论:**对目标颗粒的形态、大小及蛋白分析结果证实 PEG 沉淀法能够从关节积液中分离、提取外泌体,且操作方法简单,可为后续研究奠定基础。

[关键词] 关节积液;外泌体;聚乙二醇

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2020)03-0001-04

Extraction and Identification of Exosomes Derived from Joint Effusion Based on PEG Precipitation Method

RUAN Anmin¹ CHEN Pu¹ ZHOU Jun¹ ZHANG Xiaozhe¹ ZHANG Dong¹
SHEN Jiahao¹ MA Yufeng² PENG Haoxuan¹ YANG Tongjie¹ WANG Qingfu^{1,2,△}

¹Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;

²The Third Affiliated Hospital of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China.

Abstract Objective: Exosomes in joint effusion were purified by polyethylene glycol(PEG) method, their morphology and molecular biological characteristics were detected, which laid a foundation for further research on exosomes from joint effusion. **Methods:** The target particles were separated and purified from the joint effusion by 8% PEG. The morphology was observed by transmission electron microscopy. The size and purity of the target particles were analyzed by nanoparticle tracer analyzer. The expression of the marker protein was detected by Western blotting. **Results:** The target particles were round or elliptical vesicles. The plasma membrane was intact and varied in size, with a diameter of about 35~155 nm, and positively expressed CD9 and CD63 proteins. **Conclusion:** The morphology, size and protein analysis of the target particles confirmed that the PEG precipitation method can successfully separate and purify exosomes from joint effusion, and the operation method is simple, which lays a good foundation for subsequent research.

Keywords: joint effusion; exosomes; polyethylene glycol(PEG)

近年来随着外泌体的研究逐渐深入,其在骨关节的生理、病理调控机制方面的研究也逐渐成为学科热点^[1]。从关节液中分离出纯度高、生物活性好的外泌体是研究外泌体在骨关节疾病中作用机制的重要环

节。本研究用聚乙二醇(PEG)沉淀法提取关节积液来源外泌体,通过检测外泌体的形态、粒径、浓度及外泌体体标标记物,证明 PEG 沉淀法能够简便、高效地从关节液中提取、分离外泌体,可为关节液来源外泌体的后续研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 膝关节积液标本的收集

按照中华医学会骨科学分会 2018 年制定的《骨关节炎诊治指南》,于 2019 年 3 月至 2019 年 6 月从北京中医药大学第三临床医学院收集 6 名膝骨关节炎

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81874475)

北京中医药大学自主选题项目(2019-JYB-XS242)

¹ 北京中医药大学(北京,100029)

² 北京中医药大学第三附属医院

△通信作者 E-mail: qingpu-wang@sohu.com

(KOA) 志愿者。常规消毒,铺单,于门诊手术室用穿刺针沿髌骨下缘入路行膝关节穿刺,抽取关节液原液 5 mL,如不足 5 mL,注入适量生理盐水稀释后再行抽取。将抽取的关节液置于 EP 管中,3 000 r/min,4 ℃ 下离心 30 min,离心后取上清,先后过 0.45 μm 及 0.22 μm 微孔滤过膜后放置 4 ℃ 冰箱保存备用。

1.2 提取外泌体

第一步配置浓度为 16% PEG6000 溶液(16 g PEG6000,5.844 g NaCl 溶于 100 mL 超纯水),经 0.22 μm 微孔滤过膜过滤后待用。将上述溶液与关节液按 1:1 比例混合均匀(使 PEG 终浓度为 8%),4 ℃ 下过夜孵育。次日 10 000 r/min,4 ℃ 下离心 20 min,弃上清,加入 100 μL PBS 重悬,-80 ℃ 下保存备用。

1.3 外泌体的形态学分析

取 20 μL 重悬后的关节液外泌体于载样铜网上,室温静置 5 min,用滤纸从侧面吸干液体,滴加 4% 磷钨酸溶液约 20 μL 于铜网上,室温负染 5 min。滤纸吸干负染液,白炽灯下烤干后,于透射电子显微镜 H-7650(Hitachi,日本)下观察外泌体形态并拍照。

1.4 外泌体粒径检测

纳米颗粒示踪分析仪(NanoSight Analyze,NTA,英国),按照操作说明书设定好参数,测量时间为 60 s。取关节液外泌体,用 PBS 按 1:2 500 比例稀释成 1 mL,通过 NTA 进行测量分析,计算出关节液外泌体的粒径和浓度。

1.5 外泌体体表标记物检测

应用蛋白免疫印迹法检测相应蛋白,兔抗人 CD9,CD63 及羊抗兔 IgG 购于 proteintech(中国),采用 12%SDS-PAGE 电泳分离蛋白,每孔上样 30 μg,电泳(80 V,30 min;120 V,60 min);在 250 mA 恒流下转膜 1.5 h,5% 的脱脂奶封闭 2 h,加入不同的一抗 4 ℃ 过夜后,加入相应的荧光二抗显色,ECL 发光试剂盒显影,Bio-Rad 荧光扫描仪扫描显像。

2 结果

2.1 外泌体的形态学观察及粒径分析

关节液来源外泌体透射电镜检查结果见图 1,图中箭头指示即为外泌体颗粒,电镜(1.5×10⁵ 倍)下外泌体直径较为均一,外泌体为直径 30~150 nm 范围内的膜性微囊泡结构,囊泡内含有致密的云状物质,为外泌体内容物,电子显微镜结果显示与以往文献报道结果大致相同。取关节积液来源外泌体经 PBS 稀释 2 500 倍,检测外泌体颗粒浓度为 3.6×10⁷ 个/mL,粒径峰值为 100 nm,大部分介于 35~155 nm 之间,如图 2 所示,颗粒直径区间累计百分比数据显示 0~35 nm,>35~155 nm 和 >155 nm 的颗粒数占总粒数的百分比分别为 1.421%,82.041%和 17.959%(见表 1)。

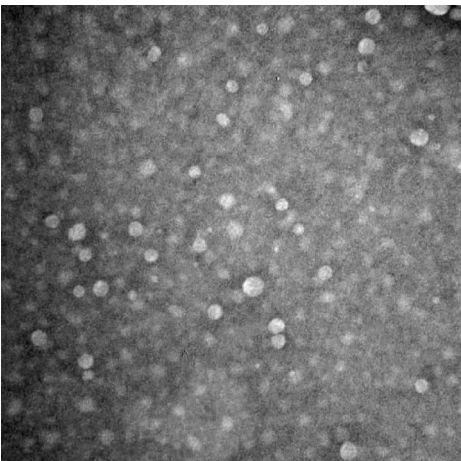


图 1 关节液外泌体形态(1.5×10⁵ 倍)

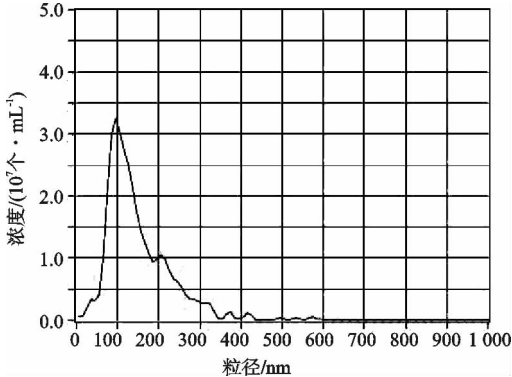


图 2 NTA 分析关节液外泌体

表 1 NTA 检测粒径区间累积百分比

粒径/nm	浓度/(10 ⁶ 个·mL ⁻¹)	该粒径颗粒数累积百分比/%
15	2.512	0.516
35	3.143	1.421
55	9.424	3.359
75	39.681	11.499
95	114.774	35.142
115	103.642	56.458
135	86.515	74.289
155	36.274	82.041
175	27.483	87.726
195	19.468	91.731
215	9.352	93.669
235	5.816	95.090
255	3.676	96.124
275	3.792	97.028
295	2.285	97.674
315	2.652	98.191
335	3.194	98.449
355	0.682	98.578
375	1.884	98.966
395	0.000	98.966
415	1.256	99.224
435	1.256	99.483
455	0.000	99.483
475	0.000	99.483
495	0.628	99.612
515	0.000	99.612

(续表 1)

粒径/nm	浓度/(10 ⁶ 个·mL ⁻¹)	该粒径颗粒数累积百分比/%
535	0.628	99.741
555	0.628	99.870
575	0.628	100.000

2.2 外泌体体表标记物鉴定

蛋白免疫印迹法检测显示,膝关节液 PEG 沉淀提取物中 CD9 和 CD63 表达均为阳性(如图 3 所示),提示所获得的样品中有外泌体存在。

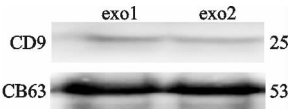


图 3 关节液外泌体标记物

3 讨论

膝骨关节炎是临床发病率较高的退行性疾病,该病因复杂,病理机制尚不完全清楚,临床的主要表现以疼痛、肿胀、僵硬和关节活动障碍为主,严重影响患者的生活质量^[2]。传统观点认为软骨降解、软骨下骨质增生是 KOA 的主要病理变化,而近年来研究发现滑膜炎症改变在 KOA 早期发病过程中起到重要作用,滑膜炎症产生的大量炎症因子刺激软骨导致软骨降解,降解产物不断刺激滑膜从而形成恶性循环,加重软骨损伤^[3-4]。然而膝关节内滑膜及软骨之间的信号传导机制尚不清楚,需要进一步探讨。

外泌体储存在细胞内的多泡体(MVB)中,由晚期的内泌体萌芽形成的直径为 30~150 nm 的具有细胞膜结构的囊泡,当多泡体与细胞膜融合后外泌体被释放到细胞外发挥生物学效应^[5]。因外泌体内富含脂类、蛋白质、RNA 及 microRNA 等成分,在细胞间发挥着重要的通信作用,保证细胞间纷繁复杂的信号交流正常运行,维持机体完成正常生命活动,参与人体许多重要的生理或病理过程^[6]。研究显示外泌体具有与其来源细胞相似的生物学功能,因其低免疫原性,能顺利的通过血脑屏障,不给机体带来负作用,因而在肿瘤的生长与迁移、免疫调控、炎症反应、细胞凋亡、疾病诊断、组织损伤的修复、药物运输等方面起到了广泛的作用,影响疾病的发生发展^[7-9]。近年来外泌体在骨关节疾病中的研究逐渐深入,成为当前学科研究的热点,研究证实外泌体在骨关节疾病中的作用是双向的,功能不同的细胞分泌的外泌体功能亦存在显著差异。

目前外泌体在膝骨关节炎中的功能主要分为两种:一是促进炎症的发展,导致 KOA 进一步加重;二是加速受损的软骨修复,减轻炎症介质的释放。Kato 等^[10]将正常滑膜成纤维细胞和经过 IL-1 β 刺激后的滑膜成纤维细胞所分泌的外泌体分别刺激软骨细胞,结果发现后者能够使关节软骨细胞中 MMP-3, MMP-

13, IL-1 β , ADAMTS-5 和血管内皮生长因子表达显著上调, COL2A1 和 ACAN 表达显著下调。当使用 IL-1 β 刺激过的软骨细胞分离出外泌体直接增加成纤维样 B 型滑膜细胞 MMP-13 的产生^[11]。IL-1 β 是介导 OA 软骨退化和关节炎症的一种关键因子,外泌体能够通过传导 IL-1 β 刺激信号进一步干预其他组织成分,从而扩散炎症作用,加速 KOA 的病理进程。Gao 等^[12]研究发现关节积液外泌体中含有大量的炎症因子及趋化因子,不同分级(Kellgren-Lawrence)的 KOA 患者关节液外泌体中的炎症因子含量也存在差异,且 KL3-4 来源的外泌体相比 KL1-2 来源的外泌体能够明显抑制软骨细胞的增殖。Wang 等^[13]通过提取间充质干细胞(ESC-MSCs)分泌的外泌体干预受损的软骨组织,能够显著上调 II 型胶原蛋白,促进损伤的软骨再修复。Tofiño-Vian 等^[14]研究发现,脂肪间充质干细胞分泌的外泌体下调 IL-1 β 诱导的 OA 成骨细胞中的衰老因子表达,这表明外泌体能够在 OA 成骨细胞中起到抗炎症反应和抗氧化应激的作用。同时外泌体在 KOA 的早期诊断中同样发挥着重要的作用,外泌体中的长链非编码 RNA PCGEM1 在早期 KOA 和晚期 KOA 关节滑液外泌体中表达存在显著差异,这表明这种长链非编码 RNA 可能作为 KOA 诊断的标志物^[15]。外泌体在 KOA 的病理过程中十分重要,有利于进一步阐明 KOA 的病变机制。

但是对于关节液来源外泌体的研究仍然处于初始阶段,随着研究的不断深入,面对的困难也将层出不穷。其中分离出纯度高、生物活性好的外泌体是当前面临的难点,也是完成关节液外泌体研究的第一步。尽管目前对外泌体的分离方法有多种,但是每种分离方法都存在一定的不足。当前外泌体的提取及鉴定方法尚无统一标准,主要有超速离心法、蔗糖密度梯度离心法以及商业外泌体提取试剂盒法等。文献分析显示超速离心法耗时虽短,但会因巨大的离心力造成外泌体的损失,并导致外泌体聚集不利于后续分析;而试剂盒法价格昂贵,不利于大样本量的提取;蔗糖密度梯度离心法前期准备工作繁琐,耗时长,获得的外泌体数量少^[16]。无论采用哪一种方法都要确保提取的外泌体纯度高、产量足才能满足进一步的研究。有研究报道聚乙二醇(PEG)沉淀法可以成功富集细胞上清的外泌体,且该方法方便、高效、价廉。PEG 是由环氧乙烷与水或乙二醇的加入而成,可诱导病毒颗粒等大分子在水溶液中聚集,由于外泌体是一种纳米膜性囊泡,其脂质双分子层具有一定疏水特性,可以通过 PEG 结合而形成沉淀^[17]。Rider 等^[18]经过试验研究发现,PEG 浓度为 8% 时提取出的外泌体效果最好,优于商业试剂法,并证实外泌体中总蛋白及 RNA 能够满足蛋白组

学和 RNA 测序分析,且外泌体的生物学功能并未受到影响,但是尚无报道采用 PEG 法提取关节液来源外泌体。因此本研究尝试用 PEG 沉淀法提取关节积液来源外泌体,通过检测外泌体的形态、粒径、浓度及外泌体表面标记物,证明 PEG 沉淀法能够简便、高效地从关节液中提取、分离外泌体,为关节液来源外泌体的后续研究奠定了基础。

本研究应用 8%PEG6000 成功地从膝关节液中提取出外泌体,透射电镜(TEM)、纳米示踪技术(NTA)及蛋白免疫印迹法均验证所获得的颗粒为外泌体,且浓度和纯度满足进一步实验研究。TEM 结果显示提取物中纳米级囊泡呈圆形或椭圆形,散在分布,直径约为 100 nm,内含云状物,符合外泌体形态特征。NTA 结果发现提取物中所含颗粒浓度(3.5×10^7 个/mL),颗粒含量较多,粒径集中,82.041% 颗粒在 35~155 nm 之间,这与电镜结果相符。其中,少部分颗粒超出该范围,可能是由于聚集成块造成粒径增大所造成的。本研究随后通过蛋白免疫印迹检测关节液提取物 CD9 和 CD63 蛋白的表达,结果显示提取物均阳性表达这两种标志蛋白,由此证明 PEG6000 提取关节液中外泌体的可靠性。

综上所述,采用 PEG 沉淀法可以快速、高效、便捷地提取关节液外泌体,为后续进一步研究关节液来源外泌体生物学功能及其在 KOA 发病机制中的作用奠定了基础。

参考文献

- [1] LI Z, WANG Y, XIAO K, et al. Emerging role of exosomes in the joint diseases[J]. Cellular Physiology and Biochemistry, 2018, 47(5): 2008-2017.
- [2] MALEMUD C J. Biologic basis of osteoarthritis; state of the evidence [J]. Current Opinion in Rheumatology, 2015, 27(3): 289-294.
- [3] 王欢,王庆甫,石鑫超,等. TLRs 与 NF-kB 在大鼠骨关节炎滑膜中的表达及意义[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2016, 24(6): 4-8.
- [4] ASHRAF S, MAPP P I, WALSH D A. Contributions of angiogenesis to inflammation, joint damage, and pain in a rat model of osteoarthritis[J]. Arthritis Rheum, 2011, 63(9): 2700-2710.
- [5] QIN J, XU Q. Functions and application of exosomes[J]. Acta Poloniae Pharmaceutica, 2014, 71(4): 537-543.
- [6] GRECO K A, FRANZEN C A, FOREMAN K E, et al. PLK-1 silencing in bladder cancer by siRNA delivered with exosomes[J]. Urology, 2016, 91: 241. e1-7.
- [7] SZEMPRUCH A, SYKES S, KIEFT R, et al. Extracellu-

lar vesicles from trypanosoma brucei mediate virulence factor transfer and cause host anemia[J]. Cell, 2016, 164(1/2): 246-257.

- [8] REGEVRUDZKI N, WILSON D W, CARVALHO T G, et al. Cell-cell communication between malaria-infected red blood cells via exosome-like vesicles[J]. Cell, 2013, 153(5): 1120-1133.
- [9] MELO S A, LUECKE L B, KAHLERT C, et al. Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer[J]. Nature, 2015, 523(7559): 177-182.
- [10] KATO T, MIYAKI S, ISHITOBI H, et al. Exosomes from IL-1 β stimulated synovial fibroblasts induce osteoarthritic changes in articular chondrocytes[J]. Arthritis Research & Therapy, 2014, 16(4): R163.
- [11] WITHROW J, MURPHY C, LIU Y, et al. Extracellular vesicles in the pathogenesis of rheumatoid arthritis and osteoarthritis[J]. Arthritis Research & Therapy, 2016, 18(1): 286-295.
- [12] GAO K, ZHU W, LI H, et al. Association between cytokines and exosomes in synovial fluid of individuals with knee osteoarthritis[J]. Mod Rheumatol, 2019, 19: 1-7.
- [13] WANG Y, YU D, LIU Z, et al. Exosomes from embryonic mesenchymal stem cells alleviate osteoarthritis through balancing synthesis and degradation of cartilage extracellular matrix[J]. Stem Cell Res Ther, 2017, 8(1): 189-197.
- [14] TOFIÑO-VIAN M, GUILLÉM M I, PÉREZ DEL CAZ M D, et al. Extracellular vesicles from adipose-derived mesenchymal stem cells downregulate senescence features in osteoarthritic osteoblasts [J]. Oxid Med Cell Longev, 2017; 7197598.
- [15] ZHAO Y, XU J. Synovial fluid-derived exosomal lncRNA PCGEM1 as biomarker for the different stages of osteoarthritis[J]. International Orthopaedics, 2018, 42(12): 2865-2872.
- [16] ZERINGER E, BARTA T, LI M, et al. Strategies for isolation of exosomes[J]. Cold Spring Harb Protoc, 2015(4): 319-323.
- [17] LV C Y, DING W J, WANG Y L, et al. A PEG-based method for the isolation of urinary exosomes and its application in renal fibrosis diagnostics using cargo miR-29c and miR-21 analysis[J]. International Urology & Nephrology, 2018(2): 1-10.
- [18] RIDER M A, HURWITZ S N, MECKES J. ExtraPEG: a polyethylene glycol-based method for enrichment of extracellular vesicles[J]. Sci Rep, 2016, 12(6): 23978.

(收稿日期: 2019-09-15)