

外泌体标记方法的研究现状

刘朝阳¹, 王炜², 李文博², 胡雅茹¹, 张岱², 任伟宏²

(1. 河南中医药大学 第一临床医学院, 郑州 450000; 2. 河南中医药大学第一附属医院 检验科, 郑州 450000)

摘要: 外泌体是细胞分泌的直径为 30~150 nm 的胞外囊泡, 可以运送多种生物活性分子(如 RNA、脂质和蛋白质), 介导细胞间的信息交流。现已发现, 外泌体在各种生理和病理过程中发挥着重要的作用。为了研究外泌体的生物学作用, 现已开发出了多种外泌体标记方法进行外泌体的功能研究。根据现有的文献报道, 文章将结合外泌体自身的结构特点, 对外泌体标记方法, 包括荧光染料、荧光蛋白、荧光素酶和物理标记等作一综述。

关键词: 外泌体; 标记; 荧光染料; 荧光蛋白; 荧光素酶

中图分类号: Q2-33

文献标志码: A

文章编号: 1001-2478(2020)03-0240-05

外泌体是细胞分泌的直径为 30~150 nm 的细胞外囊泡, 具有转移核酸、脂质和蛋白质的能力, 介导细胞间的信息交流。近年来, 研究者发现外泌体与细胞的各种生理和病理过程密切相关, 但外泌体在其中的具体作用还未研究透彻。由于外泌体的大小属于纳米级别, 使用常规的观测方法难以直接观察到, 因此, 外泌体的示踪标记方法成为了外泌体研究的基础手段, 为此, 研究者已经开发出了包括荧光染料、荧光蛋白、荧光素酶和物理标记等多种示踪标记的方法, 本文将分析这些方法各自的特点及其对后续功能研究的影响。

1 外泌体的生物学特性

细胞能分泌多种不同类型的细胞外囊泡, 包括凋亡小体、自噬体、微囊泡和外泌体等, 外泌体来源于细胞中的早期内体, 早期内体依次进展为晚期内体和多囊泡体, 然后多囊泡体与细胞膜融合, 将其内的外泌体释放到细胞外环境^[1]。外泌体具有与细胞膜相似的脂质双分子层结构, 膜上含有多种四跨膜蛋白和脂质, 外泌体的内部也含有多种核酸和蛋白质^[2]。最初研究者认为外泌体的分泌是细胞为了消除不必要蛋白质, 但后来发现外泌体能将多种生物活性分子运送至受体细胞, 介导细胞间的信息交流, 在各种生理和病理过程中发挥重要作用, 尤其

是在免疫应答与肿瘤方面^[3]。

外泌体属于纳米级颗粒, 因此需要对外泌体进行示踪标记处理, 才能观测到外泌体在体内外的踪迹, 研究其在生理和病理过程中的作用。

2 外泌体的示踪标记方法

根据外泌体示踪标记方法所用的介质不同, 将外泌体示踪标记方法分为荧光染料、荧光蛋白、荧光素酶和物理标记法, 这些标记方法可通过不同的方式标记在外泌体的外膜、内膜或其内部。(图 1)

2.1 荧光染料 荧光染料是外泌体示踪标记的常用方法之一。最初, 大多数荧光染料用于细胞的成像, 这些荧光染料通过结合具有不同功能的荧光基团来标记细胞膜脂质成分或膜蛋白。根据荧光染料和外泌体的特性, 发现了也能用于外泌体示踪标记的荧光染料。

2.1.1 羰花青染料 羰花青染料属于亲脂性染料, 能以非共价的方式嵌入外泌体的膜中, 进入脂质双层膜后, 可以向四周扩散, 使外泌体整个膜结构全部被标记。常用的羰花青染料有 DiR、DiO 和 DiI 等。Lankford 等^[4]用 DiR 标记间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)外泌体后, 将 DiR 标记的外泌体注射到脊髓损伤的大鼠体内, 发现 MSC 外泌体特异性定位于脊髓损伤区域的 M2 型巨噬细胞中, 另外在脾脏中也检测到有 MSC 外泌体的存在。Horibe 等^[5]用 DiO 分别标记不同细胞的外泌体, 将其分别与不同的细胞共培养, 发现细胞能够摄取其他细胞来源的外泌体, 而且细胞摄取外泌体的能力与受体细胞有关。Ma 等^[6]用 DiI 标

收稿日期: 2019-03-22

基金项目: 河南省高等学校重点科研项目(19zx009)

作者简介: 刘朝阳(1992-), 男, 硕士生, 主要从事细胞与分子免疫研究

通信作者: 任伟宏(E-mail: ren_weihong@163.com)

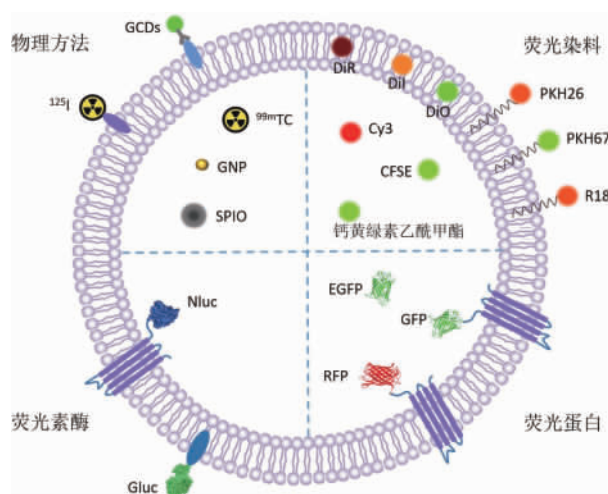


图1 示踪标记物标记在外泌体不同部位示意图

注: DiR 为 1, 1'-二十八烷基-3, 3, 3', 3'-四甲基吡啶三碳菁碘化物(1, 1'-dioctadecyl-3, 3, 3', 3'-tetramethylindotricarbocyanine iodide); DiI 为 1, 1'-二十八烷基-3, 3, 3', 3'-四甲基吡啶碳菁高氯酸盐(1, 1'-dioctadecyl-3, 3, 3', 3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate); DiO 为 3, 3'-二十八烷基碳菁高氯酸盐(3, 3'-dioctadecyloxycarbocyanine perchlorate); PKH26 为 Paul Karl Horan 26; PKH67 为 Paul Karl Horan 67; Cy3 为花青素 3(cyanine 3); CFSE 为羧基荧光素二醋酸琥珀酰亚胺酯(carboxyfluorescein succinimidyl amino ester); R18 为十八烷基罗丹明 B 氯化物(octadecyl rhodamine B chloride); EGFP 为增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein); GFP 为绿色荧光蛋白(green fluorescent protein); RFP 为红色荧光蛋白(red fluorescent protein); Nluc 为纳米荧光素酶(nano luciferase); Gluc 为 Gaussia 荧光素酶(gaussia luciferase); GCD 为金碳量子点(gold-carbon quantum dot); GNP 为金纳米颗粒(gold nanoparticle); SPIO 为超顺磁性氧化铁(superparamagnetic iron oxide)

记小鼠 MSC 的外泌体, 然后与人脐静脉血管内皮细胞(human umbilical vascular endothelial cell, HUVEC)共培养, 证明了 MSC 外泌体可以被 HUVEC 摄取。

2.1.2 PKH 染料 PKH 染料(Paul Karl Horan 发明的染料)也属于亲脂性染料, 与碳花青染料不同的是, PKH 染料分子具有长的脂肪族尾巴, 可以插入脂质双分子层中, 而荧光团在脂质双分子层的外部。常用于外泌体标记的 PKH 染料有 PKH26 和 PKH67。PKH26 能用于外泌体的靶向研究, Zhang 等^[7]用 PKH26 标记小鼠血清中的外泌体, 通过气管内滴注的方式将外泌体注入小鼠体内, 发现被标记的外泌体只存在于肺巨噬细胞中。Kia 等^[8]将 PKH67 标记的人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 外泌体与人乳腺癌细胞 MCF-7 共培养, 证明 MDA-MB-231 外泌体可以被 MCF-7 摄取, 并能

改变 MCF-7 的迁移和侵袭能力。

2.1.3 渗透型染料 渗透型染料可以穿过外泌体的膜结构, 进入外泌体内部, 进而观察到外泌体的踪迹, 常用的有 CFSE 和钙黄绿素乙酰甲酯。Aliotta 等^[9]用 CFSE 标记小鼠肺上皮细胞外泌体, 将外泌体与小鼠骨髓细胞共培养后发现, 小鼠骨髓细胞能够摄取肺上皮细胞外泌体。Samaeekia 等^[10]用钙黄绿素乙酰甲酯标记 MSC 外泌体, 分别与人角膜上皮细胞和巨噬细胞共培养, 证明 MSC 外泌体能被人角膜上皮细胞和巨噬细胞摄取。

2.1.4 其他染料 能用于外泌体标记的荧光染料种类繁多, 其他染料如 Cy3 和 R18 等。Li 等^[11]将 Cy3 标记的 miR21-5p 转染至胃癌细胞, 提取胃癌细胞外泌体与人腹膜间皮细胞 HMrSV5 共培养, 发现 HMrSV5 能够摄取胃癌细胞外泌体。Tian 等^[12]用 R18 标记外泌体, 发现细胞通过内吞作用摄取外泌体, 外泌体被内吞后, 被靶向运送到溶酶体中。

2.2 荧光蛋白 荧光蛋白是一种常用的报告蛋白, 它能在特定波长的激发光的作用下, 发出相应的荧光信号, 将荧光蛋白与外泌体膜上或内部的蛋白质分子融合, 可构建出特定的融合蛋白, 通过检测融合蛋白发出的荧光信号来进行外泌体的示踪。常用的荧光蛋白有 GFP、EGFP 和 RFP。Matsumoto 等^[13]将 GFP 与外泌体膜上的 CD63 分子融合, 构建出 CD63-GFP 融合蛋白, 通过将标记的外泌体注入小鼠体内, 证实了外泌体可以作为食管癌的潜在预后标志物。Cheng 等^[14]选择 EGFP 标记外泌体, 研究 EGFP 与泛素的融合方式, 证明泛素与 EGFP 的羧基端融合发出的荧光强度最高, 并发现这种融合方式, 能将目的蛋白有效的运送到外泌体中。有人使用纽扣珊瑚绿色荧光蛋白(zoanthus sp. green fluorescent protein, ZsGreen)和 EGFP 来标记牛乳中的外泌体, 发现外泌体主要在肝、脾和脑中积累^[15]。

2.3 荧光素酶 荧光素酶可以与特定底物结合, 产生生物发光, 使用荧光素酶标记外泌体的原理与荧光蛋白相似, 将荧光素酶与外泌体相关蛋白融合, 检测荧光素酶产生的光学信号, 可以示踪外泌体。Hikita 等^[16]使用 Nluc 标记外泌体, 通过构建 CD63-Nluc 融合蛋白进行外泌体研究, 利用活体成像系统(interactive video information system, IVIS)检测 Nluc 的发光强度, 发现结肠癌细胞外

泌体主要聚集在小鼠的胃、肠中。Zhang 等^[17]将 Gluc 与外泌体膜上的乳凝集素融合,利用 IVIS 证明了人 MSC 的外泌体能被 HUVEC 摄取。也有研究者使用 Gluc 标记小鼠细胞的外泌体,用于外泌体的活体示踪,发现即使外泌体来源于不同的细胞,最后都主要分布在肝脏中,并且都能在短时间内从循环中被清除^[18]。

2.4 物理标记法 随着技术的发展,研究者利用某些物质的物理学特性来标记外泌体,进行外泌体的示踪研究。

2.4.1 量子点 (quantum dot, QD) QD 是一种半导体纳米晶体,具有宽激发光谱、高亮度和高稳定性等特点,已在生物医学研究中用于生物成像等方面。Jiang 等^[19]使用 GCD 标记人乳腺癌外泌体,通过全内反射荧光显微镜 (total internal reflection fluorescence microscope, TIRF) 成像技术观察外泌体在 HeLa 细胞中的转运情况,发现外泌体被 HeLa 细胞摄取后被转运到溶酶体中。

2.4.2 GNP GNP 因其生物分子结合能力强、生物相容性好、无毒性等特点,已经成为分子成像中最有潜力的材料之一。Betzer 等^[20]使用葡萄糖包

被的 GNP 标记 MSC 外泌体,通过 CT 观察外泌体在小鼠脑部的分布情况,证明外泌体聚集在大脑的损伤区域。

2.4.3 放射性同位素 放射性同位素由于其出色的灵敏度和良好的组织穿透性,早已用于生物医学研究中的生物成像。Morishita 等^[21]用放射性同位素 ¹²⁵I 标记小鼠黑色素瘤外泌体,利用全自动 γ 计数器检测小鼠不同器官的放射性,发现外泌体在肝、脾和肺中的含量最高。

2.4.4 SPIO SPIO 是磁共振成像中一种常用的造影剂,使用磁粒子成像 (magnetic particle imaging, MPI) 技术可以直接显示 SPIO 在体内的分布情况。Jung 等^[22]使用 SPIO 标记人乳腺癌外泌体,通过 MPI 技术发现外泌体主要聚集在小鼠的肝脏中。

3 外泌体不同示踪标记方法的特点

基于外泌体示踪标记物的不同,其标记方法亦有不同,后续的体内和体外功能研究也有所差异,针对这些特点,表 1 根据标记物质的不同概述了现有的外泌体标记方法。

表 1 外泌体示踪标记方法概述

标记方法	标记物	标记部位	检测方法	标记时间	研究目的	参考文献
荧光染料	DiR	膜内	共聚焦显微镜	24 h	靶向分析	[4]
	DiO	膜内	荧光显微镜	3 h	摄取分析	[5]
	PKH26	外膜	荧光显微镜	24 h	靶向分析	[7]
	PKH67	外膜	共聚焦显微镜	24 h	摄取分析	[8]
	CFSE	内部	荧光显微镜	48 h	摄取分析	[9]
	R18	外膜	荧光显微镜	24 h	摄取方式	[12]
荧光蛋白	GFP	内膜	荧光显微镜	6 周	定量分析	[13]
	EGFP	内部	荧光显微镜	—	定性分析	[14]
荧光素酶	Nluc	内膜	IVIS	7 周	生物分布	[16]
	Gluc	外膜	IVIS	24 h	摄取分析	[17]
物理标记	GCD	外膜	TIRF	7 min	胞内分布	[19]
	GNP	内部	CT	24 h	颅内分布	[20]
	¹²⁵ I	外膜	γ 计数器	346 min	生物分布	[21]
	SPIO	内部	MPI	1 h	生物分布	[22]

注: 标记时间指从外泌体完成标记到检测这个时间段

使用荧光染料标记外泌体的方法常用于外泌体的摄取分析与生物分布等研究,具有操作简单,染料易于获取且不影响外泌体生物活性等优点,但荧光染料对于外泌体长时间的示踪可能会不够准确,

即染料的存在时间可能比被标记的外泌体的存在时间长,外泌体被细胞摄取后会在细胞内降解,但荧光染料的性质较稳定,不易被降解,所以荧光染料只能用于外泌体的短期研究。另外,基于目前的外

泌体提取方法,还不能将外泌体与某些脂蛋白颗粒或小分子蛋白质完全分离开,使用荧光染料标记外泌体不具有特异性,可能会标记在某些脂蛋白颗粒或小分子蛋白质上,对实验结果造成干扰^[23]。

使用荧光蛋白与使用荧光素酶标记外泌体的方法相似,可用于外泌体的定量分析、定性分析、摄取分析和生物分布等研究,具有特异性强、稳定高效和安全可控等优点,但构建荧光蛋白或荧光素酶与外泌体相关蛋白的融合蛋白可能需要花费大量时间,而且需要考虑与荧光蛋白或荧光素酶连接的蛋白质是否具有特异性,以及荧光蛋白或荧光素酶连接在蛋白质的氨基端还是羧基端,同时构建出的融合蛋白是否会影响外泌体的正常生理功能也需要实验验证^[24]。

物理标记法可用于外泌体的生物分布等研究,由于该方法比其他方法具有更高的灵敏度和分辨率,所以更适用于深部组织中的外泌体的示踪成像,但该方法通常操作复杂或需要特殊仪器,另外,使用该方法中的放射性同位素标记会产生电离辐射。

4 结语

外泌体的示踪标记技术对于阐明外泌体的生物学作用发挥着关键作用。不同的标记方法有着各自的特点,使用荧光染料标记外泌体操作简单,但不能用于外泌体的长期研究;使用荧光蛋白和荧光素酶标记外泌体特异性高,但可能需要花费大量时间;使用物理标记法标记外泌体的灵敏度和分辨率更高,但方法复杂,需要特殊仪器。因此,在进行外泌体的示踪标记的时候,需要根据研究目的,比较不同标记方法的特点进行合理选择。

参考文献

- [1] Hessvik NP, Llorente A. Current knowledge on exosome biogenesis and release[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2018, 75(2): 193-208.
- [2] Farooqi AA, Desai NN, Qureshi MZ, *et al.* Exosome biogenesis, bioactivities and functions as new delivery systems of natural compounds[J]. *Biotechnol Adv*, 2018, 36(1): 328-334.
- [3] 伍志泓, 杨陈, 安宁, 等. 外泌体作为狼疮性肾炎诊断与防治新靶点的研究进展[J]. *现代免疫学*, 2017(2): 161-164.
- [4] Lankford KL, Arroyo EJ, Nazimek K, *et al.* Intravenously delivered mesenchymal stem cell-derived exosomes target M2-type macrophages in the injured spinal cord[J]. *PLoS One*, 2018, 13(1): e0190358.
- [5] Horibe S, Tanahashi T, Kawauchi S, *et al.* Mechanism of recipient cell-dependent differences in exosome uptake[J]. *BMC Cancer*, 2018, 18(1): 47.
- [6] Ma T, Chen Y, Chen Y, *et al.* MicroRNA-132, delivered by mesenchymal stem cell-derived exosomes, promote angiogenesis in myocardial infarction[J]. *Stem Cells Int*, 2018, 2018: 3290372.
- [7] Zhang D, Lee H, Wang X, *et al.* Exosome-mediated small RNA delivery: A novel therapeutic approach for inflammatory lung responses[J]. *Mol Ther*, 2018, 26(9): 2119-2130.
- [8] Kia V, Mortazavi Y, Paryan M, *et al.* Exosomal miRNAs from highly metastatic cells can induce metastasis in non-metastatic cells[J]. *Life Sci*, 2019, 220: 162-168.
- [9] Aliotta JM, Pereira M, Sears EH, *et al.* Lung-derived exosome uptake into and epigenetic modulation of marrow progenitor/stem and differentiated cells[J]. *J extracell vesicles*, 2015, 4: 26166.
- [10] Samaeekia R, Rabiee B, Putra I, *et al.* Effect of human corneal mesenchymal stromal cell-derived exosomes on corneal epithelial wound healing [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2018, 59(12): 5194-5200.
- [11] Li Q, Li B, Li Q, *et al.* Exosomal miR-21-5p derived from gastric cancer promotes peritoneal metastasis via mesothelial-to-mesenchymal transition[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(9): 854.
- [12] Tian T, Zhu YL, Hu FH, *et al.* Dynamics of exosome internalization and trafficking[J]. *J Cell Physiol*, 2013, 228(7): 1487-1495.
- [13] Matsumoto Y, Kano M, Akutsu Y, *et al.* Quantification of plasma exosome is a potential prognostic marker for esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Oncol Rep*, 2016, 36(5): 2535-2543.
- [14] Cheng Y, Schorey JS. Targeting soluble proteins to exosomes using a ubiquitin tag[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2016, 113(6): 1315-1324.
- [15] Manca S, Upadhyaya B, Mutai E, *et al.* Milk exosomes are bioavailable and distinct microRNA cargos have unique tissue distribution patterns[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 11321.
- [16] Hikita T, Miyata M, Watanabe R, *et al.* Sensitive and rapid quantification of exosomes by fusing luciferase to exosome marker proteins[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 14035.
- [17] Zhang K, Zhao X, Chen X, *et al.* Enhanced therapeutic effects of mesenchymal stem cell-derived exosomes with an injectable hydrogel for hindlimb ischemia treatment[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2018, 10(36): 30081-30091.
- [18] Charoenviriyakul C, Takahashi Y, Morishita MA, *et al.* Cell type-specific and common characteristics of exosomes derived from mouse cell lines: Yield, physicochemical properties, and pharmacokinetics[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2017, 96: 316-322.
- [19] Jiang X, Zong S, Chen C, *et al.* Gold-carbon dots for the intracellular imaging of cancer-derived exosomes[J]. *Nanotech-*

- nology, 2018, 29(17): 175701.
- [20] Betzer O, Perets N, Ange A, *et al.* *In vivo* neuroimaging of exosomes using Gold nanoparticles[J]. ACS Nano, 2017, 11(11): 10883-10893.
- [21] Morishita M, Takahashi Y, Nishikawa M, *et al.* Quantitative analysis of tissue distribution of the B16BL6-Derived exosomes using a Streptavidin-Lactadherin fusion protein and iodine-125-Labeled biotin derivative after intravenous injection in mice[J]. J Pharm Sci, 2015, 104(2): 705-713.
- [22] Jung KO, Jo H, Yu JH, *et al.* Development and MPI tracking of novel hypoxia-targeted theranostic exosomes[J]. Biomaterials, 2018, 177: 139-148.
- [23] Takov K, Yellon DM, Davidson SM. Confounding factors in vesicle uptake studies using fluorescent lipophilic membrane dyes[J]. J Extracell Vesicles, 2017, 6(1): 1388731.
- [24] Sutaria DS, Badawi M, Phelps MA. Achieving the promise of therapeutic extracellular vesicles: the devil is in details of therapeutic loading[J]. Pharm Res, 2017, 34(5): 1053-1066.

=====

(上接第 215 页)

region have targeted binding sites, and overexpression of miR-129-5p inhibited the expression of HMGB1, and the relative luciferase activity after transfection of miR-129-5p mimics is significantly down-regulated ($P < 0.05$). After miR-129-5p was over-expressed, the proliferation ability of SKOV3 cells was significantly weakened, and the invasion and migration ability were significantly inhibited ($P < 0.05$). Furthermore, transfection with HMGB1 siRNA also significantly inhibited the proliferation, invasion and migration of SKOV3 cells ($P < 0.05$). The above results indicate that miR-129-5p inhibits the proliferation, invasion and migration of SKOV3 cells through targeted regulation of HMGB1 expression.

Key words: miR-129-5p; high mobility group box 1 protein; ovarian cancer; proliferation; invasion; migration