

# 人外周血单核细胞释放 PrP<sup>C</sup> 与其分泌 Exosomes 相关性研究

王桂花 周向梅 尹晓敏 杨利峰 杨建民 赵德明\*

(中国农业大学动物医学院, 国家动物海绵状脑病实验室, 北京 100193)

**摘要** 为探求人外周血单核细胞是否分泌 exosomes 以及 exosomes 的分泌与细胞外环境中 PrP<sup>C</sup> 的关系。采用密度梯度离心的方法从人外周血单核细胞系的培养基中提取 exosomes, 并利用电镜技术和免疫印迹分析对其形态学和生物学特征进行鉴定。结果显示所提取的 exosomes 主要分布在 1.13~1.16 g/ml 的密度层中, 平均直径在 30~100 nm 之间, 呈杯状, 这与相关报道关于其他细胞分泌的 exosomes 特征分析的结果相一致; 与 exosomes 相关的分子 Tsg101、flotillin-1、Hsp70、PrP<sup>C</sup> 均为阳性标记, 而作为内质网标志蛋白的钙连接蛋白在 exosomes 上没有检测到。以上结果说明人外周血单核细胞分泌的 exosomes 没有被细胞器污染, 而且细胞向培养基中释放 PrP<sup>C</sup> 与其分泌 exosomes 有关。

**关键词** 传染性海绵状脑病; 细胞型朊蛋白; exosomes; flotillin-1; Tsg101

传染性海绵状脑病(transmissible spongiform encephalopathies, TSEs)又称朊病,是由朊病毒(PrP<sup>Sc</sup>)在中枢神经系统聚集引起的人和动物的一组神经退行性疾病<sup>[1-2]</sup>。根据美国加州大学 Prusiner 提出的朊蛋白学说<sup>[3]</sup>, TSEs 是由细胞型朊蛋白(PrP<sup>C</sup>)异常变构所致。PrP<sup>Sc</sup> 可以结合正常的 PrP<sup>C</sup>, 无需 DNA 或 RNA 的参与, 使之发生相同的结构改变, 从而达到复制、传染的目的。外源性 PrP<sup>Sc</sup> 的侵入可以使体内正常的 PrP<sup>C</sup> 发生结构改变, 引起疾病; 体内正常的 PrP<sup>C</sup> 基因突变也可能使 PrP<sup>C</sup> 自发地发生结构改变而患病<sup>[4-6]</sup>。无论哪种方式引起疾病的发生, 都是外周组织首先发生感染, PrP<sup>Sc</sup> 在网状淋巴系统进行复制, 然后才转移到中枢神经系统。目前为止, PrP<sup>Sc</sup> 由外周组织进入到中枢神经系统的感染机制尚不完全清楚, 通过输血导致羊痒病和人的 vCJD 发生的报道<sup>[7-8]</sup>暗示了血液感染的可能性。因此, 明确血细胞表达的正常 PrP<sup>C</sup> 的生物学特性对进一步研究 PrP<sup>Sc</sup> 的感染机制具有重要作用。Exosomes 是活细胞的晚期内含体与质膜融合以后, 通过胞吞作用释放到细胞外的一种小囊泡<sup>[9-10]</sup>, 最初在网织红细胞成熟过程中被发现, 随着研究的不断深入, exosomes 已经被证实可以携带一些特定的蛋白进入细胞外环境中, 作为细胞功能的使者, 调节细胞间的信号转导, 参与体内多种生理病理过程, 因而越来越得到人们的关注。本实验通过从人外周血单核细胞的培养基中提取纯化 exosomes, 并分析

exosomes 与培养基中存在的 PrP<sup>C</sup> 的关系, 旨在从细胞机制上为朊病的感染机制提供一定的理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞来源和抗体

THP-1 单核细胞系来源于人外周血, 购自中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所。

Tsg101 小鼠单克隆抗体(mAb)、flotillin-1 兔多克隆抗体、Hsp70 小鼠 mAb 和 calnexin 兔多克隆抗体均购自美国 Santa Cruz 公司; PrP 小鼠 mAb 购自 Compton 公司; 辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG 和山羊抗兔 IgG 购自北京中杉金桥生物技术有限公司; 山羊抗小鼠和山羊抗兔 IgG- 胶体金 15 nm 购自武汉博士德生物工程有限公司。

### 1.2 细胞培养和裂解液的制备

首先对胎牛血清(Gibco 公司)进行 400 000 r/min 超速离心 1.5 h 的前处理。细胞以  $4 \times 10^4$  个/ml 的密度接种于 75 cm<sup>2</sup> 培养瓶, 加入含有 10% 处理后的胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 U/L 硫酸链霉素的 RPMI 1640 培养液(Gibco 公司), 置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub>

收稿日期: 2009-09-07 接受日期: 2009-11-19

国家科技支撑计划(No.2008BA154B06)和国家自然科学基金(No.30871854)资助项目

\* 通讯作者。Tel: 010-62732980, Fax: 010-62732975, E-mail: zhaodm@cau.edu.cn

培养箱中培养, 每隔 48~72 h 更换培养液, 更换培养液时细胞密度达到  $8 \times 10^5$  个/ml, 不超过  $1 \times 10^6$  个/ml。使用时细胞处于对数生长期, 960 r/min 离心 5 min, 收集细胞沉淀, 细胞沉淀用 PBS 缓冲溶液洗涤, 估计细胞沉淀的体积, 每 50~100  $\mu$ l 细胞沉淀加入 5 倍体积 RIPA 裂解缓冲液(普利莱基因技术有限公司), 含有 100 $\times$  蛋白酶抑制剂(诺维森生物科技有限公司), 冰浴 20 min, 隔 5 min 振荡一次, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液,  $-20$   $^{\circ}$ C 冻存。

### 1.3 Exosomes 的提取纯化

收集培养 48~72 h 后的培养基, 800 g 离心 5 min 除去细胞, 10 000 g 离心 30 min 除去细胞碎片, 100 000 g 超速离心 1.5 h, 弃上清液, 2.5 mol/L 蔗糖溶液重悬沉淀, 悬浮液加到 2.25、2.0、1.75、1.5、1.25、1.0、0.75、0.5 和 0.25 mol/L 的线性蔗糖梯度上层, 100 000 g 超速离心 15 h。从离心管顶部开始收集每一部分蔗糖垫, PBS 缓冲液稀释, 100 000 g 超速离心 1.5 h, 含有蛋白酶抑制剂的 PBS 缓冲液重悬每部分沉淀,  $-20$   $^{\circ}$ C 冻存, 以进行进一步的分析。

### 1.4 负染

取 10~15  $\mu$ l 的 exosomes 悬浮液滴加到 200 目的载样铜网上, 室温静置 5 min 使之吸附, 滤纸吸去多余液体, 滴加 1% 的醋酸双氧铀于铜网上, 室温染色不超过 3 min, 滤纸吸干负染液后, 白炽灯下烤 10 min 左右, 透射电镜观察其形态和大小。

### 1.5 Western 印迹分析

BCA 法测定细胞裂解液和 exosomes 悬浮液的蛋白含量, 分别取等量样品加 2 $\times$ SDS 上样缓冲液, 95  $^{\circ}$ C 变性 5 min, 10 000 g 离心 2 min 收集上清液。12% 的 SDS- 聚丙烯酰胺凝胶进行蛋白分离, 电泳转移到 PVDF 膜上后, 5% 的脱脂牛奶封闭 1 h。一抗(Flotillin-1 为 1 : 200, Tsg101 为 1 : 200, Hsp70 为 1 : 200, calnexin 为 1 : 200, PrP 为 1 : 2 000) 37  $^{\circ}$ C 温育 2h, TBST 缓冲液漂洗 3 次, 每次 10 min, 二抗(山羊抗小鼠 1 : 6 000, 山羊抗兔 1 : 6 000) 室温温育 50 min, TBST 缓冲液漂洗 6 次, 每次 5 min。采用增强型 HRP-DAB 底物显色试剂盒(天根生化科技有限公司)提供的标准方法进行显色。

### 1.6 免疫电镜

Exosomes 悬浮液滴加到 200 目的聚乙烯醇缩甲醛镍网上, 室温下静置, 吸附 10 min, 2% 的多聚甲醛固定 10 min, 含有 1% BSA 的 PBS 缓冲液封闭 20 min。一抗(flottillin-1 为 1 : 100, Tsg101 为 1 : 100,

PrP 为 1 : 1 000) 37  $^{\circ}$ C 温育 1 h, 含有 0.1% BSA 的 PBS 缓冲液漂洗 3 次, 每次 5 min, 结合 15 nm 胶体金的二抗(羊抗鼠和羊抗兔均为 1 : 50)温育 30 min, 大量的 PBS 缓冲液漂洗 6 次, 每次 5 min。1% 的醋酸双氧铀染色, 白炽灯烤干, 透射电镜观察胶体金颗粒标记的情况。

## 2 结果

### 2.1 人外周血单核细胞分泌 exosomes

Western 印迹分析每部分蔗糖密度层的沉淀中 exosomes 特异性标志蛋白 Tsg101 和 flotillin-1 的分布情况, 结果显示在第 4 和第 5 部分, 1.13~1.16 g/ml 的密度层中检测到 Tsg101 和 flotillin-1 的存在(图 1), 其中 Tsg101 分子量大小为 43 kDa, flotillin-1 为 45 kDa。取 1.13~1.16 g/ml 密度层的沉淀悬液负染后电镜下直接观察, 可见所提取的 exosomes 为杯状的小囊泡, 平均直径大小在 30~100 nm 之间(图 2)。

### 2.2 Exosomes 的鉴定

1.13~1.16 g/ml 密度层的沉淀悬液的免疫电镜结果显示, 大部分 exosomes 小囊泡的外膜或内部均可以见到标记 Tsg101 和 flotillin-1 的黑色胶体金颗粒(图 3, 箭头所示)。同时 Western 印迹分析等量的细胞裂解液和 exosomes 悬液, 结果只在细胞裂解液中检测

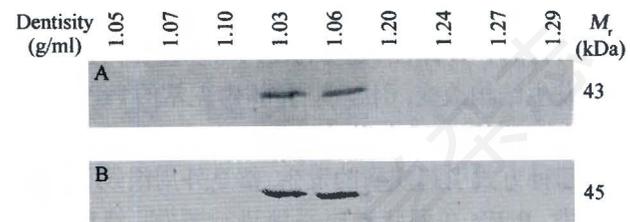


Fig.1 Western blot analysis of gradient fractions

A: Tsg101; B: flotillin-1.

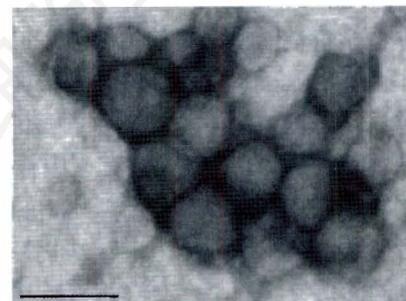
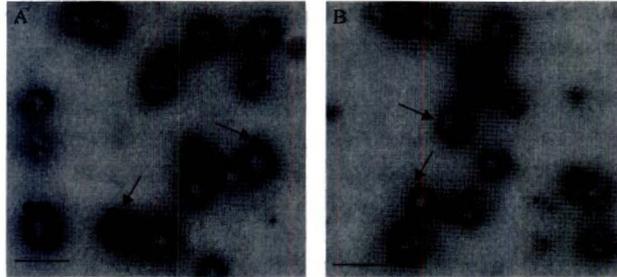


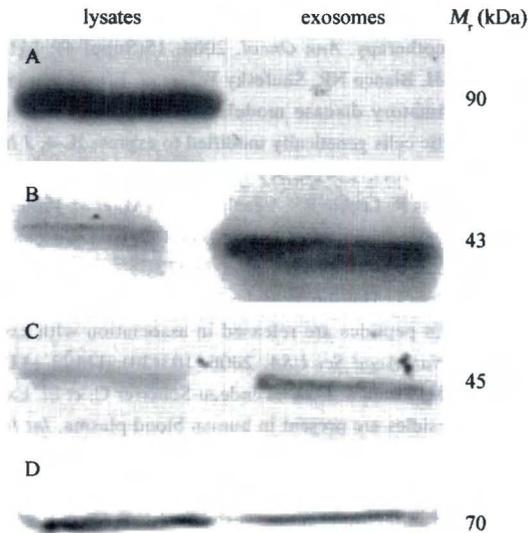
Fig.2 Exosomes morphology (50 000 $\times$ ; Scale bar: 100 nm)

到内质网标志蛋白钙连接蛋白, 而在 exosomes 悬液中没有发现其存在(图 4A)。但是与等量的细胞裂解液相比, exosomes 悬液中 Tsg101 和 flotillin-1 的含量较高(图 4B, 图 4C), 而分子伴侣蛋白 Hsp70 的含量虽



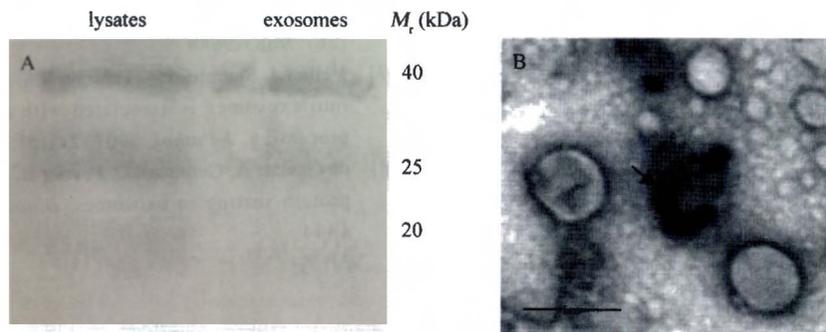
**Fig.3** The results of immunoelectron microscopy (40 000 $\times$ ; Scale bars: 100nm)

A: Tsg101; B: flotillin-1.



**Fig.4** Western blot analysis of cell lysates and exosomes

A: calnexin; B: Tsg101; C: flotillin-1; D: Hsp70.



**Fig.5** The express of PrP<sup>C</sup> on exosomes

A: Western blot; B: Immunoelectron microscopy (40 000 $\times$ ; Scale bars: 100 nm).

然也不低, 却不及细胞裂解液中的高(图 4D)。

### 2.3 培养基中的 PrP<sup>C</sup> 与 exosomes 的分泌有关

Western 印迹分析细胞裂解液以及 1.13~1.16 g/ml 密度层的沉淀悬液中 PrP<sup>C</sup> 的表达情况显示, 人外周血单核细胞表达 PrP<sup>C</sup>, 而且向培养基中分泌的 exosomes 上也携带 PrP<sup>C</sup> (图 5A)。胶体金对 1.13~1.16 g/ml 密度层的沉淀悬液中 PrP<sup>C</sup> 的标记结果显示, 有 PrP<sup>C</sup> 阳性标记的小囊泡平均直径大小在 30~100 nm 之间。

## 3 讨论

细胞培养之前我们首先对血清进行了超速离心的前处理, 目的是为了除去血清中存在的 exosomes, 以避免对实验结果造成干扰<sup>[11]</sup>。

本实验中, 我们参考 Rajendran 等<sup>[12]</sup>的方法, 采用传统的分级离心和蔗糖密度梯度离心法, 从人外周血单核细胞的培养基中提取和纯化 exosomes, 并从物理学、形态学和生物学特征三个方面对其进行了研究和鉴定。首先, 蔗糖梯度离心对提取的 exosomes 进行纯化后, Western blot 分析的结果显示 exosomes 主要分布在 1.13~1.16 g/ml 的密度层中。第二, 负染电镜下观察到 exosomes 为平均直径大小在 30~100 nm 之间的杯状小囊泡。第三, Western 印迹和免疫电镜分析结果共同证实了所提取的小囊泡携带 exosomes 的标志蛋白 Tsg101 和 flotillin-1, 而且在其它细胞分泌的 exosomes 上普遍都有存在的分子伴侣蛋白 Hsp70 也可以检测到, 但是没有检测到内质网标志蛋白钙连接蛋白, 从而可以排除提取的 exosomes 被细胞在裂解过程中释放的细胞器污染的可能性。以上三个方面与资料报道其他细胞分泌的 exosomes 特征<sup>[13-14]</sup>相一致, 从而确定人外周血单核细胞分泌 exosomes, 这在一定程度上, 有利于解释人的血浆<sup>[13]</sup>和奶<sup>[15]</sup>中 exosomes 的存在。

虽然多种细胞和组织都表达PrP<sup>C</sup>,但大部分实验都采用神经细胞作为模型研究PrP<sup>C</sup>生物学功能。而本研究中通过Western印迹分析证实人外周血单核细胞表达PrP<sup>C</sup>,并进一步证实其分泌的exosomes携带PrP<sup>C</sup>,表明人外周血单核细胞分泌exosomes与PrP<sup>C</sup>的释放有密切联系。尽管本研究中没有证明感染后的人外周血单核细胞也可以通过分泌exosomes向细胞外释放PrP<sup>Sc</sup>,但是单核细胞可以随血液循环进入到各组织当中,进而分化为巨噬细胞,进入到脑组织后分化为小胶质细胞。Fevrier等<sup>[16]</sup>通过对感染羊痒病病毒之前和之后的上皮细胞系和神经胶质细胞系进行研究,发现两种细胞分泌的exosomes既可以携带PrP<sup>C</sup>,也可以携带PrP<sup>Sc</sup>。Vella等<sup>[17]</sup>的研究则进一步证实了exosomes携带的PrP<sup>Sc</sup>在同源细胞间和异源性细胞间均可相互感染。于是,我们推测exosomes可能为PrP<sup>Sc</sup>在细胞间的转移提供了载体。因此,我们证明单核细胞分泌exosomes与PrP<sup>C</sup>的释放有关的结果,增强了外周血单核细胞一旦被感染,同样也可以通过分泌exosomes向细胞外释放PrP<sup>Sc</sup>的可能性,也从细胞机制方面,为由于输血导致感染羊痒病和vCJD而提出的血液感染机制提供了一定的理论基础。

Exosomes是活细胞的晚期内含体与质膜融合后释放到细胞外的一种小囊泡<sup>[9,10]</sup>,PrP<sup>C</sup>是一种通过GPI锚定在细胞膜脂筏内的糖蛋白,因此,人外周血单核细胞分泌的exosomes表达PrP<sup>C</sup>与exosomes的形成相一致。Flotillin-1也是脂筏的重要蛋白组成成分之一,也是exosomes富含的蛋白成分之一<sup>[18]</sup>。人外周血单核细胞可以通过分泌exosomes向细胞外释放PrP<sup>C</sup>是否与其在细胞上的亚细胞定位有关,flotillin-1是否在此过程中起了重要作用,以及是否有其他蛋白的参与,这些都有待进一步研究。此外,本研究仅从定性的角度证明了人外周血单核细胞可以通过分泌exosomes向细胞外环境中释放PrP<sup>C</sup>,而并未对培养基中全部的PrP<sup>C</sup>和exosomes携带的PrP<sup>C</sup>进行定量比较,因此,通过分泌exosomes释放PrP<sup>C</sup>是否是人外周血单核细胞释放PrP<sup>C</sup>的唯一途径有待进一步研究。相信随着对PrP<sup>C</sup>生物学特性的深入研究,将会对朊病的发生发展机制有新的认识,为临床上诊断和治疗朊病带来新的希望。

## 参考文献(References)

- [1] Johnson RT. Prion diseases, *Lancet Neurol*, 2005, 4(10): 635-642
- [2] Prusiner SB. Prions, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(23): 13363-13383
- [3] Prusiner SB. Novel proteinaceous infection particles cause scrapie, *Science*, 1982, 216(4542): 136-144
- [4] Chiarini LB, Freitas AR, Zanata SM, et al. Cellular prion protein transduces neuroprotective signals, *EMBO J*, 2002, 21(13): 3317-3326
- [5] Zou WQ, Zheng J, Gray DM, et al. Antibody to DNA detects scrapie but not normal prion protein, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(5): 1380-1385
- [6] Adler V, Zeiler B, Kryukov V, et al. Small, highly structured RNAs participate in the conversion of human recombinant PrP<sup>Sc</sup> to PrP<sup>Sc</sup> in vitro, *J Mol Biol*, 2003, 332(1): 47-57
- [7] Fischer MB, Roeckl C, Parizek P, et al. Binding of disease-associated prion protein to plasminogen, *Nature*, 2000, 408(6811): 479-483
- [8] Houston F, Foster JD, Chong A, et al. Transmission of BSE by blood transfusion in sheep, *Lancet*, 2000, 356(9234): 999-1000
- [9] Andre F, Escudier B, Angevin E, et al. Exosomes for cancer immunotherapy, *Ann Oncol*, 2004, 15(Suppl 4): 141-144
- [10] Kim SH, Bianco NR, Shufesky WJ, et al. Effective treatment of inflammatory disease models with exosomes derived from dendritic cells genetically modified to express IL-4, *J Immunol*, 2007, 179(4): 2242-2249
- [11] Wubbolts R, Leckie RS, Veenhuizen PTM, et al. Proteomic and biochemical analyses of human B cell-derived exosomes, *J Biol Chem*, 2003, 278(13): 10963-10972
- [12] Rajendran L, Honsho M, Zahn TR, et al. Alzheimer's disease  $\beta$ -amyloid peptides are released in association with exosomes, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(30): 11172-11177
- [13] Caby MP, Lankar D, Vincendeau-Scherrer C, et al. Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma, *Int Immunol*, 2005, 17(7): 879-887
- [14] Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W, et al. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles, *J Exp Med*, 1996, 183(3): 1161-1172
- [15] Admyre C, Johansson SM, Qazi KR, et al. Exosomes with immune modulatory features are present in human breast milk, *J Immunol*, 2007, 179(3): 1969-1978
- [16] Fevrier B, Vilette D, Archer F, et al. Cells release prions in association with exosomes, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(26): 9683-9688
- [17] Vella LJ, Sharples RA, Lawson VA, et al. Packaging of prions into exosomes is associated with a novel pathway of PrP processing, *J Pathol*, 2007, 211(5): 582-590
- [18] de Gassart A, Geminard C, Fevrier B, et al. Lipid raft-associated protein sorting in exosomes, *Blood*, 2003, 102(13): 4336-4344

## Human Peripheral Blood Monocytes Release PrP<sup>C</sup> in Association with Exosomes

Gui-Hua Wang, Xiang-Mei Zhou, Xiao-Min Yin, Li-Feng Yang, De-Ming Zhao\*

(National Animal Transmissible Spongiform Encephalopathy Laboratory, College of Veterinary Medicine,  
China Agricultural University, Beijing 100193, China)

**Abstract** In order to investigate whether human peripheral blood monocytes secrete exosomes, and exosomes associate with PrP<sup>C</sup> released into extracellular. Exosomes were isolated from the human peripheral blood monocytes medium by density gradient centrifugation, and their morphology and biological characteristics were identified by electron microscope and Western blot analysis. The results showed the density of fractions containing exosomes was between 1.13 and 1.16 g/ml. The exosomes were 30–100 nm in size and cup-shaped morphology, which are similar to the previous report for exosomes released from other cells. The associated molecules, Tsg101, flotillin-1, Hsp70, PrP<sup>C</sup> were probed. While calnexin, a luminal marker of the endoplasmic reticulum, was not detected. We suggest that human peripheral blood monocytes can secrete exosomes without contaminated by organelles, and the release of PrP<sup>C</sup> associated with exosomes.

**Key words** transmissible spongiform encephalopathies; PrP<sup>C</sup>; exosomes; flotillin-1; Tsg101

Received: September 7, 2009

Accepted: November 19, 2009

This work was supported by the National Science and Technology Supporting Program of China (No.2008BAI54B06) and the National Natural Science Foundations of China (No.30871854)

\*Corresponding author. Tel: 86-10-62732980, Fax: 86-10-62732975, E-mail: zhaodm@cau.edu.cn