

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2019.15.021

ExoQuick 法提取人血清外泌体的临床价值

杨 季, 蒋 雯, 李 军[△]

湖北省武汉市第三医院检验科, 湖北武汉 430070

摘要:目的 探讨 ExoQuick 法提取人血清外泌体的方法及临床价值。方法 选取 2016 年 1 月至 2018 年 1 月在该院体检的健康受试者 50 例, 清晨抽取受试者空腹外周静脉血 4 mL, 标本分成 2 等份, 分别采用超速离心法、ExoQuick 法检测人血清外泌体。比较两种方法的检测时间以及透射电镜、BCA 蛋白定量、western blot 的检测结果。结果 透射电镜检查发现, 超速离心法提取的人血清外泌体外形较圆, 为类圆形或椭圆形囊泡状, 绝大多数囊泡外周能观察到膜性结构, 聚集形态既可单个分布, 又可聚集成落, 内部可见低电子密度物质, 人血清外泌体直径分布在 30~100 nm, 背景清晰。ExoQuick 法提取的人血清外泌体外形多为椭圆形, 密度均匀, 直径 30~50 nm, 背景干净、清晰。ExoQuick 法提取的人血清外泌体 BCA 蛋白水平 $[(115.59 \pm 0.84) \text{g/L}]$ 显著高于超速离心法 $[(20.69 \pm 0.57) \text{g/L}, t=52.361, P<0.05]$ 。超速离心法最长提取时间是 66 min, 最短提取时间是 60 min, 平均提取时间为 $(63.58 \pm 1.25) \text{min}$ 。ExoQuick 法最长提取时间是 60 min, 最短提取时间是 52 min, 平均提取时间为 $(55.62 \pm 1.20) \text{min}$ 。ExoQuick 法提取的人血清外泌体的时间少于超速离心法 ($P<0.05$)。结论 ExoQuick 法提取人血清外泌体方便、有效, 能快速提取微小人血清外泌体、提高蛋白检出量, 且对 CD63 敏感, 可推荐使用。

关键词: ExoQuick 法; 超速离心法; 外泌体; CD63

中图分类号: R446

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2019)15-2182-03

Clinical value of ExoQuick for extracting human serum exosomes

YANG Ji, JIANG Wen, LI Jun[△]

Department of Clinical Laboratory, Wuhan Municipal Third Hospital, Wuhan, Hubei 430070, China

Abstract: Objective To investigate the method and value of ExoQuick for extracting human serum exosomes. **Methods** Fifty healthy subjects undergoing the physical examination in this hospital from January 2016 to January 2018 were selected. 4 mL of fasting peripheral venous blood was collected from each selected subject, and the sample in the tube was divided into two equal portions. The human serum exosomes was detected by adopting the ultracentrifugation and ExoQuick respectively. Then the results and detection time by the transmission electron microscopy (TEM), BCA protein quantification and western blot were compared between the two methods. **Results** The TEM detection found that the human serum exosomes extracted by zonal ultracentrifugation were round-like or oval-like vesicle shape. The membrane structure could be observed around most of the vesicles. The aggregation morphology could be both single distribution and aggregation into flora. The low electron density substances could be seen inside. The diameter of human serum exosomes was distributed in 30–100 nm with a clear background. The human serum exosomes extracted by using the ExoQuick method were mainly oval in shape, uniform in density, 30–50 nm in diameter, with clean and clear background. The concentration of human serum exosome BCA protein extracted by ExoQuick was $(115.59 \pm 0.84) \text{g/L}$, which was significantly higher than $(20.69 \pm 0.57) \text{g/L}$ by the ultracentrifugation ($t=52.361, P<0.05$). The longest, shortest and average extraction time of the ultracentrifugation method were 66, 60, $(63.58 \pm 1.25) \text{min}$, which of the ExoQuick method were 60, 52, $(55.62 \pm 1.20) \text{min}$ respectively, the time of ExoQuick for extracting human serum exosomes was less than that of the ultracentrifugation ($P<0.05$). **Conclusion** ExoQuick method is convenient and effective for extracting human serum exosomes, can quickly extract micro-human serum exosomes, increase the protein detection quantity, moreover is sensitive to CD63 and can be recommended to be applied.

Key words: ExoQuick method; zonal ultracentrifuging; exosome; CD63

外泌体直径多介于 30~100 nm, 是一种双层结构 膜源性小囊泡^[1-3], 由肿瘤细胞释放, 几乎可由所有的

有核细胞分泌。外泌体主要分布在多种体液中,内含不同种类蛋白质、脂质、信号分子,容易与临近细胞的细胞膜发生融合^[4-6],能在不同细胞间进行信息传递,调节细胞间的信号传导,发挥多种生物学功能^[7]。因此获得高质量的外泌体能准确评估细胞情况,有利于判定肿瘤。CD63 是外泌体分泌标志物,检测 CD63 水平即可反映人血清外泌体情况。本探究选取 2016 年 1 月至 2018 年 1 月来本院体检的健康人,使用 ExoQuick 法提取人血清外泌体 CD63,分析其检测价值,现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2016 年 1 月至 2018 年 1 月在本院体检的健康受试者 50 例,其中男 26 例,女 24 例;年龄 18~49 岁,平均(36.59±1.97)岁。纳入标准:(1)受试者体检健康;(2)受试者均知情同意;(3)经医院医学伦理委员会批准。排除标准:(1)未成年人;(2)妊娠期、哺乳期体检者;(3)精神病体检者;(4)体检结果异常患者;(5)有明确恶性肿瘤病史;(6)有心脏病者。

1.2 方法 清晨抽取所有受试者空腹外周静脉血 4 mL,标本分成 2 等份,分别采用不同方法检测人血清外泌体 CD63。超离心机法:除去试管内血液细胞碎片,29 500 r/min 离心处理 20 min,使用 0.22 μm 滤膜过滤上清液,100 μL PBS 重悬沉淀,分装存于-80℃恒温冰箱。ExoQuick 法:3 000×g 离心处理 15 min 取上清液,过滤后加入沉淀剂,混合摇匀,置于 4℃冰箱内保存 30 min,将孵育好的样品以 1 500×g 离心处理 5 min,弃上清液后沉淀于 100 μL PBS,分装置于-80℃恒温冰箱。透射电镜形态观察:将上述两种方法提取的 20 μL 载样置于铜网表面,温室内静置 60 s,用滤纸从侧面吸干液体,滴入 20 g/L 的磷钨酸室温复染 5 min,再次吸干,蒸馏水清洗干净,室内晾干,使用透射电镜观察形态。CD63BCA 蛋白定量:完全按照操作说明书进行,将检测样品依次稀释成 1~19 个水平,将标准品加入 96 孔板,每个样品设置 3 个复孔,滴入工作液 20 μL,置于恒温 37℃30 min 测定 CD63 蛋白。以不同 BAS 标准品在 562 nm 处吸光度值为基础,绘制结果标准曲线。western blot 检测:十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳,4℃,250 mA,60 min 电转印至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜,封闭 120 min,使用鼠抗人 CD63 抗体稀释,4℃过夜反应,次日洗膜,二抗室温反应 60 min,洗膜,加入预混化学发光底物显色并观察。

1.3 评价指标 观察比较不同检测方法的检测时间以及透射电镜、BCA 蛋白定量、western blot 的检测结果。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验;以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两种方法提取的外泌体透射电镜检查结果 透

射电镜检查发现,超离心机法提取的人血清外泌体外形较圆,为类圆形或椭圆形囊泡状,绝大多数囊泡外周能观察到膜性结构,聚集形态既可单个分布,又可聚集成落,内部可见低电子密度物质,人血清外泌体直径分布在 30~100 nm,背景清晰。ExoQuick 法提取的人血清外泌体外形多为椭圆形,密度均匀,直径 30~50 nm,背景干净、清晰。见图 1~4。

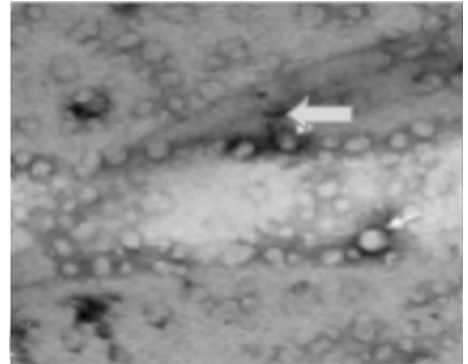


图 1 超离心机法背景图

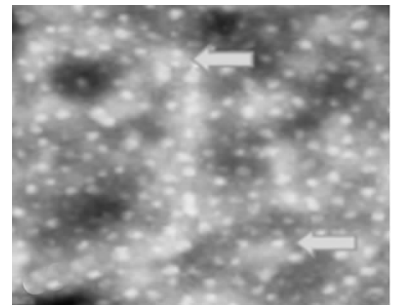


图 2 ExoQuick 法背景图

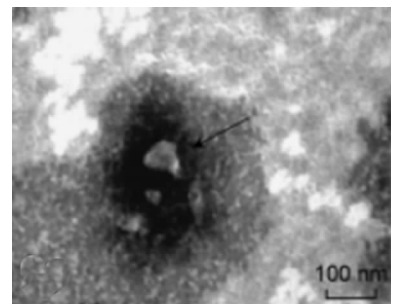


图 3 超离心机法提取的人血清外泌体直径

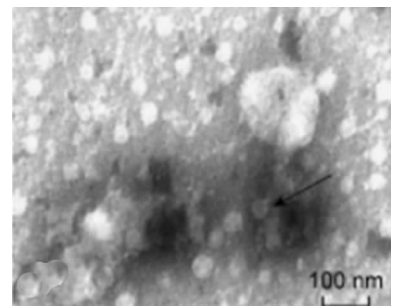


图 4 ExoQuick 法提取的人血清外泌体直径

2.2 两种方法提取的外泌体 BCA 蛋白定量检测结果比较 ExoQuick 法提取的人血清外泌体 BCA 蛋白水平为(115.59±0.84)g/L,显著高于超离心机法的(20.69±0.57)g/L,差异有统计学意义(*t* =

52.361, $P < 0.05$ 。

2.3 两种方法提取的外泌体 western blot 检测结果比较 超离心法及 ExoQuick 法均能显示 CD63, 其中 ExoQuick 法提取的人血清外泌体 CD63 水平显著高于超离心法 ($P < 0.05$)。见图 5~6。



图 5 超离心法提取的人血清外泌体 CD63



图 6 ExoQuick 法提取的人血清外泌体 CD63

2.4 两种方法操作时间比较 超离心法最长提取时间是 66 min, 最短提取时间是 60 min, 平均提取时间为 (63.58 ± 1.25) min。ExoQuick 法最长提取时间是 60 min, 最短提取时间是 52 min, 平均提取时间为 (55.62 ± 1.20) min。ExoQuick 法提取人血清外泌体的时间少于超离心法 ($t = 12.57, P < 0.05$)。

3 讨 论

外泌体是小膜性囊泡, 具有胞外酶的活性^[8], 来源于细胞后期的内涵体^[9-10], 可在造血干细胞及上皮细胞的培养基中找到。外泌体生物学特性较多, 能在不直接接触细胞前提下完成细胞间生物信号的传导^[11-12], 是诊断疾病的研究热点^[13]。外泌体提取主要有超速离心法^[14]、免疫捕获法、超离心法、Exo-Quick 法, 其中超速离心法及 ExoQuick 法较常用。超离心法步骤繁琐, 耗时较长, 对技术要求极高, 所需血清量较多, 普及难度较大。免疫捕获法提取纯度低, 杂质较多, 不能反映外泌体整体情况。ExoQuick 是一种常用的提取血清外泌体的试剂盒, 黄依瑶等^[15]利用 ExoQuick 法提取小鼠骨髓间充质干细胞来源的外泌体, 其提取纯度较高, 质量较好。

本文研究结果显示, 超离心法提取的人血清外泌体外形较圆, 绝大多数囊泡外周能观察到膜性结构, 聚集形态既可单个分布, 又可聚集成落, 内部可见低电子密度物质, 人血清外泌体直径分布在 30~100 nm。ExoQuick 法提取的人血清外泌体外形多为椭圆形, 密度均匀, 直径 30~50 nm, 背景干净。提示, ExoQuick 法所得的人血清外泌体背景较好, 能有效反映小直径人血清外泌体, 有利于临床医生判断受试者整体情况。BCA 蛋白定量检测结果发现, ExoQuick 法提取的人血清外泌体 BCA 蛋白水平显著高于超离心法, 提示 ExoQuick 法可反映高丰度蛋白, 且敏感性更高。ExoQuick 法提取人血清外泌体的时间少于超

离心法, 说明 ExoQuick 法较超离心法便捷、简单。

综上所述, ExoQuick 法提取外泌体方便、简单, 能有效反映微小外泌体, 提高蛋白检出量, 且对 CD63 敏感, 可推广使用。

参考文献

- [1] 崔琮, 靳杨, 谭招丽, 等. 结直肠癌患者血清外泌体代替肿瘤组织检测 K-Ras 基因突变的研究[J]. 临床肿瘤学杂志, 2017, 22(5): 395-399.
- [2] 韩金秀, 李宏远, 撒亚莲, 等. 采用高速离心及 ExoQuick-TC 法提取小鼠骨髓间充质干细胞来源外泌体比较及鉴定[J]. 安徽医科大学学报, 2017, 52(4): 611-614.
- [3] 渠香云, 程懿睿, 高鹏, 等. 一种新型血清外泌体分离方法的构建及其在乳腺癌微 RNA 检测中的应用[J]. 肿瘤, 2016, 36(11): 1225-1232.
- [4] 王倩倩, 卢川, 陈良, 等. 不同血清量标本外泌体提取及微小 RNA 的检测比较[J]. 微生物与感染, 2018, 13(3): 165-170.
- [5] 王鑫伟, 毛建文. 试剂盒法与超速离心法所提血清外泌体的形态学比较[J]. 临床与病理杂志, 2016, 36(11): 1837-1841.
- [6] 张庆, 刘杰, 高晓红. HCV 感染者中血清外泌体 miRNA-122 的检测及其临床意义[J]. 中华临床感染病杂志, 2016, 9(5): 439-443.
- [7] 李腾达, 刘鹏, 龙曙萍, 等. 隐球菌脑膜炎患者血清外泌体 CD93 表达增高及意义[J]. 现代检验医学杂志, 2017, 32(6): 156-158.
- [8] 张云, 虞敏, 刘胜武. 血清外泌体来源的 miRNA-122 对肝癌诊断的研究[J]. 检验医学与临床, 2017, 14(9): 1260-1261.
- [9] 张小艺, 郑宏, 王永强, 等. 梓醇外泌体对低血清培养致人神经母细胞瘤(SH-SY5Y)细胞损伤的保护作用[J]. 环球中医药, 2017, 33(2): 1123-1126.
- [10] 颜晓慧, 安泰学, 覃思华, 等. 血清外泌体 miR-21 在肺癌中的表达水平及其诊断效能[J]. 实用医学杂志, 2017, 33(16): 2666-2669.
- [11] 梁亚会, 郭子宽, 王芳, 等. PEG6000 快速提取间充质干细胞外泌体[J]. 空军医学杂志, 2017, 33(3): 176-179.
- [12] 辛毅, 李娜, 黄然, 等. 人脐带间充质干细胞外泌体对高糖诱导脐静脉内皮细胞功能的影响[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2017, 32(3): 220-225.
- [13] 李汉成, 李婵, 周玉婷, 等. 微小 RNA-181a-5p 在甲基苯丙胺依赖大鼠血清外泌体中的表达及生物信息学分析[J]. 中国临床药理学杂志, 2018, 32(1): 45-48.
- [14] 刘丽, 丘福满, 赵祝香, 等. 小细胞肺癌血清外泌体的分离鉴定及其内 RNA 表达谱分析[J]. 广东医学, 2018, 14(12): 148-151.
- [15] 黄依瑶, 唐月汀, 覃思华, 等. 血清中外泌体及外泌体 RNA 提取方法的比较[J]. 中华检验医学杂志, 2016, 39(6): 427-432.