

羊水中外切体的鉴定与其 RNA 浓度测定

谢钧韬¹, 周 祎², 高文宗¹, 商梅娇², 周 李^{1*}

(中山大学附属第一医院 1.小儿外科; 2.胎儿医学中心, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】分离鉴定羊水外的外切体,并测定羊水中外切体中 RNA 的浓度,探讨从羊水中外切体中提取 RNA 的可行性,从而进一步为胎儿肾脏疾病产前诊断和胎儿肾功能监测寻找生物指标提供研究基础。【方法】对 8 例妊娠 22~30 周并有产前诊断指征的孕妇分别采用常规羊膜腔穿刺术收集到羊水 10 mL 进行检测分析,通过多步离心法及蔗糖密度梯度离心法提取羊水中的外切体,采用透射电镜、流式细胞术及激光共聚焦对其进行鉴定,trizol 法对分离到的外切体进行 RNA 提取,紫外分光光度计测定其 RNA 浓度。【结果】透射电镜结果显示微囊小体形态均一、大小相近,直径范围 40~100 nm,呈外切体典型的杯状结构,由脂质双层膜包裹的扁平球体,其外周及内含物均可见负染效应;流式细胞仪上可见 CD24 阳性率为(92.23±3.8)%;共聚焦显微镜下进行检测,于胶珠表面可见到荧光带;紫外分光光度计测得的 RNA 浓度分别为 28.67、30.02、37.57、21.08、49.41、24.57、24.24、26.77 ng/μL,平均浓度为 30.29 ng/μL。【结论】羊水中含有外切体,且其表面 CD24 分子阳性,说明其来源于胎儿肾脏。羊水中外切体含有 RNA,由羊水中分离外切体并提取 RNA 可为进一步对胎儿肾脏疾病的产前诊断和胎儿肾功能的监测寻找生物指标提供基础材料。

关键词: 外切体,羊水,胎儿,肾,产前诊断

中图分类号:R726.9

文献标志码:A

文章编号:1672-3554(2013)03-0446-05

Identification of Exosomes in Human Amniotic Fluid and Confirmation of RNA Concentration in Exosomes from Human Amniotic Fluid

XIE Jun-tao¹, ZHOU Yi², GAO Wen-zong¹, SHANG Mei-jiao², ZHOU Li^{1*}

(Department of Pediatric Surgery and Fetal Medical Center, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objectives】 To isolate and identify exosomes from human amniotic fluid and determine their RNA concentration, hence provide a potential biomarker for prenatal diagnosis of fetal kidney disease and evaluation of fetal kidney function. 【Methods】 Using routine amniocentesis to acquire 10 mL of amniotic fluid respectively from eight gravidas in the second trimester. The amniotic fluid was subjected to differential centrifugation in order to obtain the purified exosomal pellet. Exosomes were identified by using transmission electron microscopy (TEM), flow cytometry (FCM), and confocal laser scanning microscope (CLSM). TRIzol was applied to extract RNA from exosomes. The concentration of total RNA was determined through ultraviolet spectrophotometer. 【Results】 A pure exosomal population was present with typical cup-shaped morphology, surrounded by a two-layer lipid membrane, and varying in size between 40 nm -100 nm under TEM. Negative staining effect was manifested both surround and inside the exosomes. We confirmed the presence of exosomes through its specific marker by FCM with anti-CD24 antibody, with a positive rate of (92.23±3.8)%. Fluorescent light emitted by FITC mouse anti-human CD24 antibodies binding to the exosomes was observed surrounding the latex beads under CLSM. The concentration of RNA from amniotic fluid were 28.67 ng/μL, 30.02 ng/μL, 37.57 ng/μL, 21.08 ng/μL, 49.41 ng/μL, 24.57 ng/μL, 24.24 ng/μL, and 26.77 ng/μL, with the average amount of 30.29 ng/μL. 【Conclusion】 Expression of kidney-specific CD24 molecule on exosomes from human amniotic fluid could serve as an evidence of its origination from the fetal kidneys. RNA in exosomes could be used as a novel material for the prenatal diagnosis of fetal kidney diseases and to evaluate fetal kidney function in the future.

Key words: exosome; amniotic fluid; fetus; kidney; prenatal diagnosis

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2013, 34(3):446-450]

收稿日期:2013-02-26

基金项目:广东省科技计划项目(2012B031800297)

作者简介:谢钧韬,临床医学博士,住院医师,研究方向:小儿泌尿外科,E-mail:xiejt1609@163.com; *通信作者:周李,医学博士,教授,博士研究生导师,研究方向:小儿泌尿外科,E-mail:lizhou18@hotmail.com。

1980年 Rose Johnstone 第一次描述了外切体(exosome),它是在网织红细胞成熟过程中由于脂质膜的退变形成的直径范围为30~100 nm由脂质双层膜包裹的小囊泡,它没有细胞器如线粒体、溶酶体、内质网、细胞核和高尔基体等。与凋亡小体和其他细胞脱落的囊泡(直径范围为100~1000 nm)相比,外切体的形态较均一,而且更加稳定^[1]。后来人们发现外切体是由多泡体(multivesicular bodies, MVB)通过内陷芽生形成的胞吞间隔。研究发现外切体可由多种细胞分泌产生,包括树突状细胞、巨噬细胞、淋巴细胞、唾液腺上皮细胞和肿瘤细胞等^[2],同时也在多种体液中发现了外切体,如唾液、血浆、尿液、羊水、恶性腹水、支气管肺泡灌洗液、关节滑液和乳汁等^[3]。外切体中含有丰富的生物学信息,包括 mRNA、miRNAs、蛋白质、脂质和 DNA 等,具有重要的生物功能。不同细胞来源的 exosomes 包含的生物信息不同,决定其生物学功能也有差异。外切体通过在细胞之间传递生物信息,协助相邻细胞之间的抗原提呈和介导细胞之间的信号传导。最近有人观察到外切体能够将其包含的 mRNA 和 microRNA,传递给另外一个细胞从而改变其遗传信息^[3]。这个发现对于解开外切体的神秘面纱是一个令人兴奋的进步,它揭示了细胞之间传递信息的一种新的机制,即通过靶细胞对外切体的摄取或外切体与靶细胞膜上受体的结合后激活细胞信号传导通路来完成^[4-5]。胎儿先天性泌尿系疾病是由各种病因引起胎儿肾脏的病理生理改变,造成胎儿肾脏的急性或慢性损伤,与胎儿出生后肾脏的病理改变或死亡率密切相关。对先天性泌尿系统疾病的产前诊断和对胎儿肾功能的监测与评价是目前胎儿医学仍未解决的难题,也是近年来的研究热点。自从1956年羊膜腔穿刺术问世以来,经过不断改进,它已经成为目前全球各地最常用而且安全有效的产前诊断取材方法,被广泛用于检查羊水中胎儿细胞的染色体、DNA 和生化成分等,是最常用的一种产前诊断技术,目前主要应用于检测羊水中胎儿细胞的染色体来对唐氏综合征进行产前诊断。羊水的主要来源为胎儿的尿液,我们试图在羊水中分离出外切体,对其进行鉴定并检测其中的 RNA 含量,希望进一步可利用胎儿羊水中外切体所携带的生物信息来为胎儿肾脏疾病的产前诊断和监测胎儿肾功能变化提供基础材料。

1 材料与amp;方法

1.1 仪器与试剂

主要仪器设备:Optima™ L-80 XP 超速离心机(美国 BD 公司),JEM-1400 透射电子显微镜(transmission electron microscopy, TEM, 日本 JEOL 公司),FACS Calibur 流式细胞仪(美国 BD 公司),共聚焦显微镜 LSM510 (德国蔡司),荧光显微镜 axioplan2 (德国蔡司)。主要试剂:FITC 鼠抗人 CD24 抗体 (BD 公司),PBS 液 (自配),staining buffer(自配),2%磷钨酸(自配)。

1.2 样品的收集及储存

收集于2010年12月至2012年12月期间于我院产前检查行羊水穿刺的孕妇8例,所有孕妇均有产前检查羊水穿刺指征,为高龄孕妇或唐氏高风险孕妇,年龄22~36岁,平均年龄为30.5岁,孕周22~30周,8例,所有受检者均排除含有其他已知的先天性畸形,染色体结果异常的标本予以剔除,所有孕妇受检过程中均未发生与穿刺相关的并发症。予签署知情同意书(已过医学伦理委员会审查,伦审号:[2012]103),于孕22~24周对其进行羊水穿刺,通过常规的羊膜腔穿刺方法获得羊水10 mL,置于-80℃冰箱保存。

1.3 外切体的分离

取先前保存于-80℃冰箱的羊水标本10 mL,置于4℃中进行溶化,充分溶化后进行剧烈震荡2 min,于4℃离心机进行差速离心去除细胞(300 × g, 20 min)和细胞碎片(10 000 × g, 20 min),取上清,上述上清进行超速离心(100 000 × g, 2.5 h),去上清,PBS 2 mL 洗涤管壁,取清洗液于4℃进行蔗糖密度梯度离心分离外切体:蔗糖梯度从下到上依次为2、1.3、1.16、0.8、0.5、0.25 mol/L,上清铺于最上层,离心(100 000 × g, 2.5 h),取上清液,每个样本所得上清液约200 μL。

1.4 外切体的鉴定

1.4.1 透射电镜 取蔗糖密度梯度离心产生的外切体上清直接送电镜室采用负染的方法,取10~20 μL 外切体悬液载样于铜网上,室温静置2 min,用滤纸从侧面吸干液体,滴加磷钨酸溶液约20 μL 于铜网上,室温负染2 min。滤纸吸干负染液,白炽灯下烘干约10 min,采用透射电子显微镜进行观察。

1.4.2 流式细胞术分析 取3例标本通过蔗糖密

度梯度离心产生的外切体上清,加入 4 μm 的胶珠 (latex beads) 5 μL 进行吸附, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下致于摇床上孵育过夜, 加入甘氨酸终止反应 30 min 并 staining buffer 洗涤 3 次后, 加入荧光标记的 CD24 抗体进行孵育 40 min, 洗涤 3 次后进行流式检测, 流式细胞术重复 3 次。另取胶珠与荧光标记的 CD24 抗体进行孵育 40 min, 洗涤 3 次后进行流式细胞术检测作为空白对照组。

1.4.3 激光共聚焦检测 取蔗糖密度梯度离心产生的外切体上清, 加入 4 μm 的胶珠 10 μL 进行吸附, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下致于摇床上孵育过夜, 加入甘氨酸终止反应 30 min 并 staining buffer 洗涤 3 次后, 加入荧光标记的 CD24 抗体进行孵育 40 min, 洗涤 3 次后进行激光共聚焦检测。

1.4.4 RNA 浓度测定 取蔗糖密度梯度离心产生的外切体上清, 采用 trizol 进行 RNA 提取, 将 trizol 法提取所得 RNA ($n = 8$) 致于紫外分光光度计上进行浓度测定。

2 结 果

2.2 流式细胞术

将经过 latex beads 和荧光标记的 CD24 抗体致于流式细胞仪上进行检测, 可见 CD24 的阳性率为 $(92.23 \pm 3.8)\%$ (图 1)。

2.2 透射电镜

通过蔗糖密度梯度离心获得的上清液负染后致于透射电镜下检测, 结果示微囊小体形态均一、

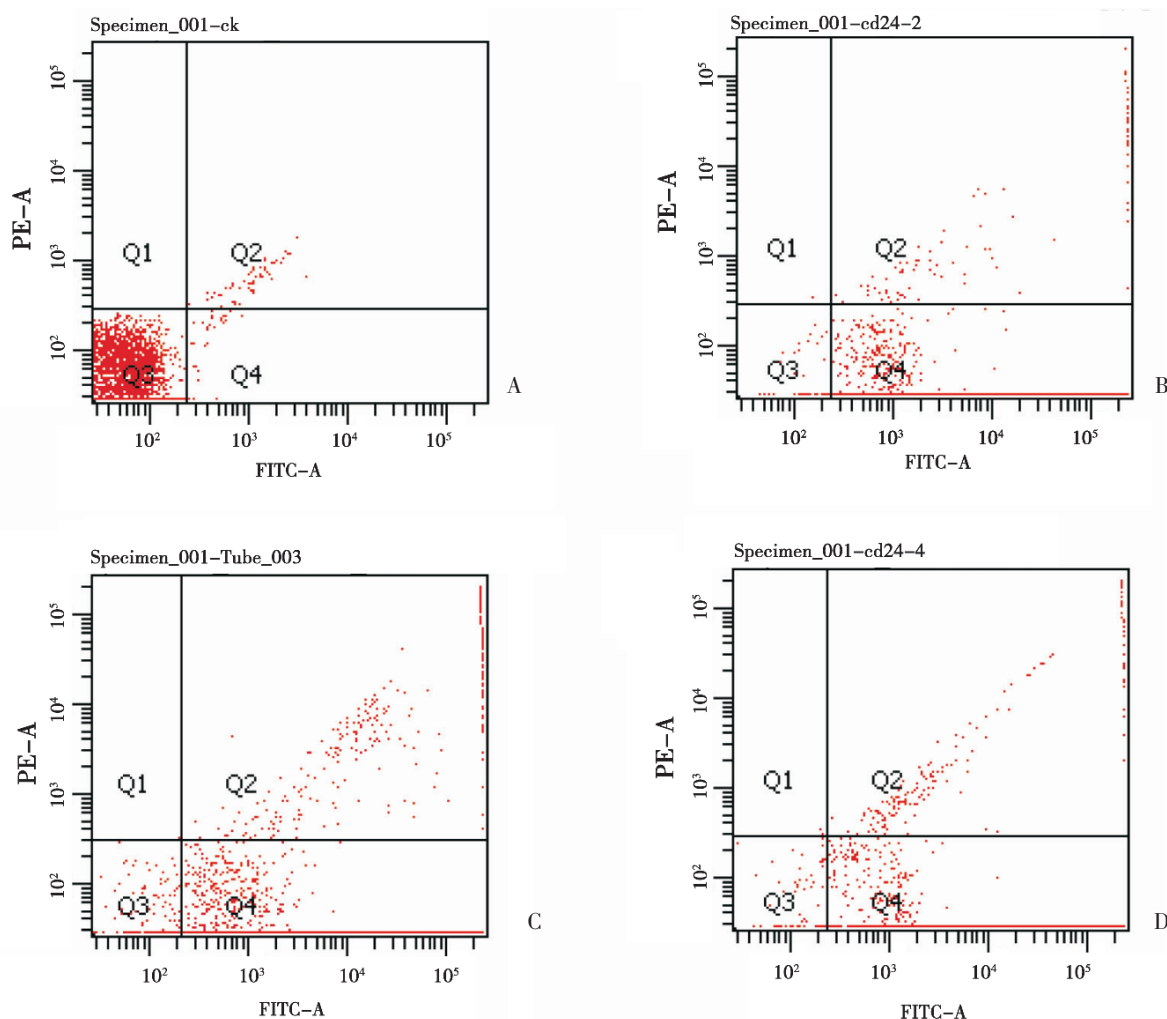


图 1 羊水内外切体流式细胞分析图

Fig.1 Fluorescence Activated Cell Sorter analysis of Amniotic fluid exosomes

A is the blank control group, B, C and D depend samples that came from three different gravidas. We can see that the positive signal of CD24 mainly concentrate in Q4, with the positive rate of $(92.23 \pm 3.8)\%$.

大小相近,直径范围40~100 nm,呈外切体典型的杯状结构,由脂质双层膜包裹的扁平球体,其外周及内含物均可见负染效应(图2)。

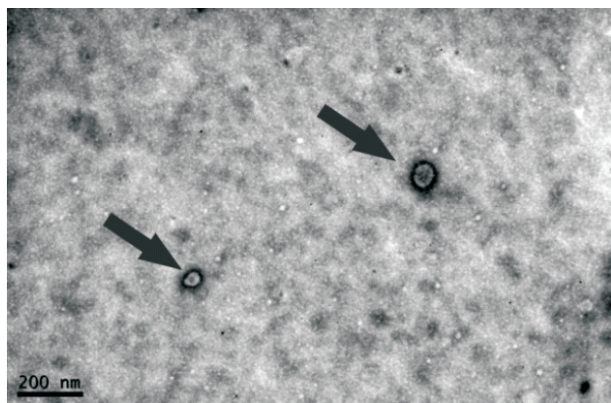


图2 羊水中外切体的透射电镜检测图

Fig.2 Amniotic fluid exosomes under TEM

A pure exosomal population was present with typical cup-shaped morphology, surrounded by a two-layer lipid membrane, and varying in size between 40~100 nm under TEM. Negative staining effect was manifested both surround and inside the exosomes.

2.3 激光共聚焦

将经过 latex beads 和荧光标记的 CD24 抗体致于荧光显微镜下,在荧光显微镜下找到荧光染色的 latex beads,再将玻片转至共聚焦显微镜下进行检测,由于外切体首先结合到 latex beads 表面,再与荧光标记的 CD24 结合,故于 latex beads 表面可见到荧光带(图3)。

2.4 RNA 浓度测定

将 trizol 法提取的 RNA ($n=8$) 经紫外分光光度计测得的 RNA 浓度分别为 28.67、30.02、37.57、21.08、49.41、24.57、24.24、26.77 ng/ μ L, 平均浓度为 30.29 ng/ μ L。

3 讨论

胎儿先天性泌尿系疾病是由各种病因引起胎儿肾脏的病理生理改变,造成胎儿肾脏的急性或慢性损伤,与胎儿出生后肾脏的病理改变或死亡率密切相关^[6],目前对于胎儿泌尿系疾病的诊断、肾功能监测及预后分析尚未见一个真正有效的生物指标。随着近年来对外切体研究的不断深入,人们逐渐发现外切体中含有丰富的生物学信息,它

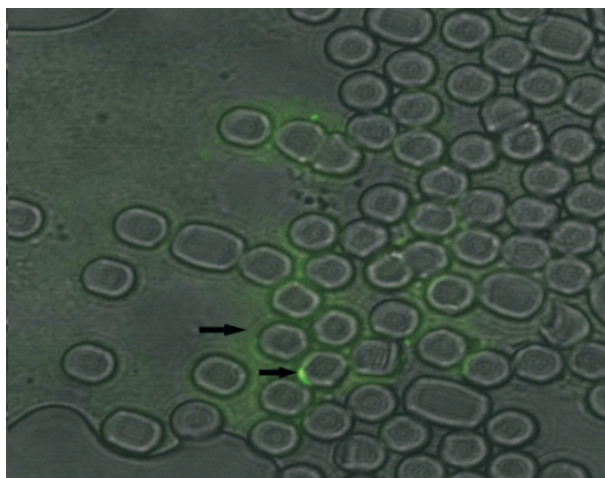


图3 羊水标本的激光共聚焦检测图

Fig.3 Amniotic fluid exosomes under CLSM

Because exosomes will combine to the surface of latex beads before the FITC Mouse Anti-Human CD24 combine to the exosomes, we can see fluorescent light surrounding the latex beads under CLSM.

可以通过在细胞之间传递生物活性物质,如蛋白质、RNA等,从而改变细胞的遗传学信息或者激活细胞信号传导通路,改变细胞的生物活动;也有人利用它携带的生物学信息,如 miRNAs 及蛋白质等作为生物指标,来对疾病进行诊断和预后预测^[7-8]。人们已经在多种人体组织细胞及体液中提取到了外切体,特别是在羊水中发现了外切体,为胎儿肾脏疾病的研究提供一个新的途径。在我们的实验中,采用了多步离心法从羊水中分离出外切体,并通过透射电镜、流式细胞术及激光共聚焦等对其进行了鉴定,结果证明了羊水中确实存在外切体,可为进一步有关研究提供基础材料。

对于从体液中提取外切体的方法,主要是经过多步离心法去除细胞和细胞碎片再通过蔗糖密度梯度超速离心进行纯化,但步骤不尽相同,对于标本如何采集、保存和提取的方法尚不统一,有人报导利用超滤膜可以快速对外切体进行分离,但其有效性尚需要进一步验证^[9]。Zhou 等^[10]通过对人尿液的研究,发现与新鲜收集尿液相比,保存在 -80°C 的尿液其外切体基本能够完全恢复。不管保存于 -20°C 或 -80°C 的尿液,融化后进行剧烈震荡能够提高尿液外切体的恢复,即使标本已保存7个月。他们的实验还证明了长时间保存于 -80°C 并不会导致标本中外切体相关蛋白的丢失,第一天新鲜和第二天早上尿液中外切体相关蛋白的差异

非常小,提示外切体中的蛋白在尿路中降解很少。本次实验收集到的羊水均保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 中,目的是为了最大程度的减少外切体和其内含物的降解,所有标本融化后在进行离心之前均进行剧烈震荡 2 min,以利于最大限度的恢复羊水中外切体,实验结果也证明该方法确实可行。

Kelle 等^[11]在新生儿尿液和妊娠妇女羊水中均发现了 CD24 阳性的外切体,进一步通过免疫组织化学检测,发现 CD24 阳性的外切体来源于肾单位的各个部位,包括:集合管、肾小管、Henle loop、足细胞和系膜细胞,这些发现提示人类尿液中含有 CD24 的外切体来源于肾脏。在他们的实验中,让 CD24^{-/-}的雌老鼠与野生型的雄老鼠交配,从而在 CD24^{-/-}的母体产生 CD24^{+/+}的后代,通过分析发现其羊水外的外切体为 CD24⁺,提示羊水外的外切体来源于胎儿。在我们的实验中,同样证实了羊水的外切体含有 CD24。提示肾脏在胚胎发育过程中就已经开始分泌外切体,持续至出生后并且保留有种族特性,CD24 可做为胎儿肾脏来源外切体的一个标记。

通过外切体在细胞之间穿梭的 RNA 叫做外切体穿梭 RNA(esRNA),外切体通过与接收细胞的融合将携带的 RNA 在细胞之间传输,传输的 RNA 具有生物功能,mRNA 可以在接收细胞内发挥功能并翻译出新的蛋白质^[4]。尿外切体里 mRNA 的鉴定可以为一些遗传性疾病,如常染色体显性多囊肾病 (autosomal dominant polycystic kidney disease,ADPKD)等的研究提供一个无创的诊断技术^[12]。已有研究表明,尿液外切体中 miRNAs 的表达谱与多种肾脏慢性疾病相关,并与肾功能变化有密切的关系^[13-14]。在我们的实验中,通过对羊水外的外切体纯化后进行 RNA 提取,并测得其 RNA 浓度平均值为 30.29 ng/ μL ,提示进一步可利用外切体中包含的 RNA 进行分析研究,有望进一步寻找到胎儿肾脏疾病产前诊断和监测评价胎儿肾功能的生物指标。

参考文献:

- [1] Johnstone R M, Adam M, Hammond J R, et al. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes)[J]. *J Biol Chem*, 1987, 262(19): 9412-9420.
- [2] Palanisamy V, Sharma S, Deshpande A, et al. Nanostructural and transcriptomic analyses of human saliva derived exosomes[J]. *PLoS One*, 2010, 5(1): e8577.
- [3] Simpson RJ, Jensen SS, Lim JW. Proteomic profiling of exosomes: current perspectives[J]. *Proteomics*, 2008, 8(19): 4083-4099.
- [4] Lotvall J, Valadi H. Cell to cell signalling via exosomes through esRNA[J]. *Cell Adh Migr*, 2007, 1(3): 156-158.
- [5] Camussi G, Derigibus M C, Bruno S, et al. Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication[J]. *Kidney Int*, 2010, 78(9): 838-848.
- [6] Nwoko R, Plecas D, Garovic VD. Acute kidney injury in the pregnant patient[J]. *Clin Nephrol*, 2012, 78(6): 478-486.
- [7] Keller S, Ridinger J, Rupp A K, et al. Body fluid derived exosomes as a novel template for clinical diagnostics[J]. *J Transl Med*, 2011, 9(1): 86-92.
- [8] Michael A, Bajracharya S D, Yuen P S, et al. Exosomes from human saliva as a source of microRNA biomarkers[J]. *Oral Dis*, 2010, 16(1): 34-38.
- [9] Cheruvanky A, Zhou H, Pisitkun T, et al. Rapid isolation of urinary exosomal biomarkers using a nanomembrane ultrafiltration concentrator [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2007, 292(5): F1657-F1661.
- [10] Zhou H, Yuen P S, Pisitkun T, et al. Collection, storage, preservation, and normalization of human urinary exosomes for biomarker discovery [J]. *Kidney Int*, 2006, 69(8): 1471-1476.
- [11] Keller S, Rupp C, Stoeck A, et al. CD24 is a marker of exosomes secreted into urine and amniotic fluid [J]. *Kidney Int*, 2007, 72(9): 1095-1102.
- [12] Hogan MC, Manganelli L, Woollard JR, et al. Characterization of PKD protein-positive exosome-like vesicles[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2009, 20(2): 278-288.
- [13] Akkina S, Becker BN. MicroRNAs in kidney function and disease[J]. *Transl Res*, 2011, 157(4): 236-240.
- [14] Lorenzen JM, Haller H, Thum T. MicroRNAs as mediators and therapeutic targets in chronic kidney disease[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2011, 7(5): 286-294.

(编辑 孙慧兰)