

近红外荧光蛋白标记乳腺癌细胞外泌体的构建及鉴定

李泰明¹, 蓝文俊¹, 黄灿³, 张春², 刘晓玫²

1. 中国药科大学生命科学与技术学院, 南京 210009;
2. 中国科学院苏州生物医学工程技术研究所, 苏州市分子诊断和治疗技术重点实验室, 苏州 215163;
3. 上海大学生命科学学院, 上海 200436

摘要: 外泌体(Exosomes)是一种大小为 30~100 nm 的细胞外膜囊泡, 与细胞的生物学功能及细胞间的信号传递有着密切的关系, 尤其在癌症的诊断及治疗等领域发挥重要作用。为将外泌体更好地应用于乳腺癌肿瘤传递机制的研究, 本文首先通过分子克隆手段将近红外荧光蛋白 *iRFP682* 基因和外泌体标记蛋白 *CD63* 基因克隆到含腺相关病毒(Adeno-associated virus, AAV)末端倒置重复序列(Inverted repeat terminal, ITR)的质粒载体上, 构建融合表达近红外荧光蛋白和 *CD63* 蛋白的重组真核表达载体。然后再与辅助质粒共转染 AAV-293 细胞, 包装重组腺相关病毒、纯化测量滴度后用于感染乳腺癌细胞, 最后通过荧光筛选出稳定表达近红外荧光蛋白的乳腺癌细胞株。通过对乳腺癌稳定株的分离、纯化及鉴定, 最终得到一个新型生物标记物: *iRFP682* 标记的乳腺癌细胞来源的外泌体, 为后续研究外泌体在乳腺癌肿瘤微环境中的分布及信号传递提供保障。

关键词: 外泌体; *CD63*; 近红外荧光; 荧光分子标记; 乳腺癌

Establishment and identification of the near-infrared fluorescence labeled exosomes in breast cancer cell lines

Taiming Li¹, Wenjun Lan¹, Can Huang³, Chun Zhang², Xiaomei Liu²

1. School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China;
2. Suzhou Institute of Biomedical Engineering and Technology, Chinese Academy of Sciences, Suzhou 215163, China;
3. School of Life Science, Shanghai University, Shanghai 200436, China

Abstract: Exosomes, a population of extracellular membrane vesicles of 30-100 nm in diameter, play important roles in cell biological functions, intercellular signal transduction and especially in cancer diagnosis and therapy. To better apply exosomes in mechanistic study of breast cancer signal transduction, we constructed recombinant eukaryotic expression vector expressing the near-infrared fluorescence protein and *CD63* fusion protein through cloning *iRFP682* gene and exosomal marker protein *CD63* gene into plasmid containing the ITR of AAV. The constructed plasmids were co-transfected with helper plasmid in AAV-293 cell lines and were packaged into rAAV. After titer measurement, the recombinant plasmids were transfected into breast cancer cell lines. The cell lines that stably ex-

收稿日期: 2016-01-13; 修回日期: 2016-02-29

基金项目: 江苏省青年基金项目(编号: BK20140381), 苏州市医疗器械与新医药专项(编号: ZXY201432)和江苏高校优势学科建设工程项目资助
[Supported by Jiangsu Youth Fund (No. BK20140381), Suzhou Medical Equipment and New Medical Special Program (No. ZXY201432) and the Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions]

作者简介: 李泰明, 博士, 副教授, 研究方向: 活性肽、疫苗等基因工程药物的研究。E-mail: taimingli@163.com

通讯作者: 刘晓玫, 博士, 助理研究员, 研究方向: 基因治疗。E-mail: lxmddv@126.com

DOI: 10.16288/j.ycz.16-017

网络出版时间: 2016/4/5 14:44:18

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20160405.1444.002.html>

pressing near-infrared fluorescence protein were selected by fluorescence. Through isolation, purification and identification, we finally obtained a new biomarker: iRFP682 labeled exosomes secreted by breast cancer cell lines, which could be used in further studies of the distribution and signal transduction of exosomes in breast cancer microenvironment.

Keywords: exosomes; CD63; near-infrared fluorescent protein; fluorescent protein labeling; breast cancer

近年来随着社会压力的不断增大,癌症的发病率越来越高,已成为威胁人类生命健康的第二大杀手^[1],其中乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一^[2]。作为乳腺癌亚型之一的三阴性乳腺癌,以其转移能力强、预后极差且易复发的特点,成为乳腺癌领域研究的热点和难点^[3]。MDA-MB-231 细胞系是研究三阴性乳腺癌的最常用细胞系之一,将该细胞植入小鼠体内或注射小鼠皮下,极易使小鼠成瘤,并向其他部位转移^[4]。临床结果显示,癌细胞转移是乳腺癌患者死亡的主要原因^[5]。因此,寻找新型的生物标记物,用来探索乳腺癌早期转移的分子机制,对乳腺癌早期诊断治疗是非常重要的。研究表明癌症转移过程中,肿瘤细胞通过分泌纳米级别的膜外囊泡,调节多个不同细胞之间相互联系,从而改变肿瘤生存的微环境。这些从不同细胞分泌的介导免疫反应和传递信号的膜外囊泡被称为外泌体(Exosomes, EXOs)^[6]。

1986 年,在体外培养的绵羊红细胞上清液中首先发现并提取到了外泌体^[7]。1996 年,研究人员发现,在 EB 病毒(Epstein-barr virus, EBV)转化的人 B 细胞内有一些膜结构的小囊泡表面,存在主要组织相容性复合体(Major histocompatibility complex, MHC)II 类分子。该分子能激活 T 细胞,并与红细胞内外泌体的形成过程和排出途径相似^[8]。外泌体是活细胞分泌的来源于晚期核内体的膜性囊泡,直径约为 30~100 nm,密度为 1.13~1.21 g/m³,天然存在于包括血液、唾液和母乳等多种体液中^[9]。早期研究认为,外泌体只执行蛋白运输功能,通过特异靶定受体细胞,交换蛋白和脂类来引发下游信号事件^[10]。直到 2007 年,研究人员才发现外泌体也运输核酸,参与细胞间通讯,从而引起了更广泛的研究^[11]。

研究证明乳腺癌细胞分泌的外泌体中的 miRNA 可以由其他组织细胞吸收,这些细胞可以存在于原发性肿瘤微环境中,也可以存在于转移前或转移中

微环境^[12]。2014 年,Zhou 等^[13]证实由乳腺癌细胞分泌的外泌体所包含的 miRNA 会通过靶向作用紧密连接蛋白 ZO-1,摧毁血管内皮细胞障碍来促进乳腺癌细胞转移。2015 年,Hoshino 等^[14]研究表明,乳腺癌细胞中的外泌体除了通过 miRNA 参与癌症转移的过程,还参与肿瘤的器官特异性转移。他们通过把乳腺癌细胞的外泌体注入肺部细胞中,发现转移到肺部的乳腺癌细胞的外泌体能把另一类通常转移到骨头的肿瘤细胞重定向到肺部,从而证明了外泌体能促进肿瘤的器官特异性转移。这一发现进一步证实肿瘤细胞的转移特征并不是自主的,而是由外部因素影响的。这个外部因素主要是指携带肺部特异整合素的乳腺癌外泌体。同年,来自宾夕法尼亚大学的研究人员发表了关于外泌体从基质细胞转移到乳腺癌细胞从而调节其治疗耐受性通路的最新研究成果^[12]。该研究表明,基质细胞和乳腺癌细胞利用外泌体介导的抗病毒信号参与机体内一个错综复杂的作用,最终启动了化疗和放疗的耐受性。以上研究揭示了外泌体在乳腺癌肿瘤转移和肿瘤的器官特异性转移中的重大意义。结合外泌体携带细胞来源的核酸分子及功能蛋白能够通过生物屏障的特点,外泌体有望成为一种新型给药途径及基因治疗载体^[15],在乳腺癌及多种常见癌症的早期诊断中发挥重要作用。

本研究通过构建一种能够融合表达近红外荧光蛋白(Near-infrared fluorescent protein, iRFP)和外泌体标志性蛋白 CD63 的质粒载体,用此质粒包装的重组腺相关病毒(rAAV)和辅助定点整合的 rAAV 以一定比例共感染人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞,筛选获得能稳定表达近红外荧光的人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞系,最后分离提纯出近红外荧光蛋白 iRFP682 标记的外泌体进行鉴定。由于外泌体的独特功能及近红外荧光蛋白在体内体外示踪的优越性,本研究构建的基因工程化细胞株能够稳定分泌近红外标记

外泌体, 可用做乳腺癌肿瘤微环境体内体外研究的新生物标记物, 为进一步研究细胞间物质转移机制提供了有力工具, 同时也给未来的癌症治疗方案提供一定的参考。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌种和细胞株

pAAV-iRFP682-MCS、pDG 质粒、大肠杆菌 TG1、大肠杆菌 SURE2 均由中国科学院苏州生物医学工程技术研究所细胞分子生物学研究中心构建或保存。HEK293T、AAV-293 细胞和乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 细胞购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。

1.1.2 引物

根据 GenBank 中的 *CD63* 基因序列(NC_000012.12), 利用 Primer Premier 5.0 软件分析设计 *CD63* 基因的引物, 上游引物和下游引物分别含有 *Cla* I 和 *Xba* I 酶切位点。*CD63* 基因上游引物: 5'-ATCGATGCCACCATGGCGGTGGAA-3'; 下游引物: 5'-TCTAGACGATCCGCCACCGCCAGAGCCACCTCCGCCTGAACCCATCACCTCGTAGCCACTTC-3'; 病毒拷贝数测定时 qPCR 上游引物: 5'-TTCAAGCGATTCTCCTGCCT-3', 下游引物: 5'-ACGCCTGTAATCCCAGCAAT-3'。引物均由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 重组质粒的构建

按照标准的分子克隆方法构建 pAAV-CD63-Linker-iRFP682 重组质粒。MDA-MB-231 细胞贴壁培养在含 10%胎牛血清的 L-15 培养基中(美国 Thermo Fisher Scientific 公司), 置于 37℃的饱和湿度培养箱中。当细胞密度达到 80%以上时(不超过 1×10^7), PBS 清洗 2 遍, 用胰蛋白酶消化液(0.25% Trypsin, 0.02% EDTA)消化 3 min, 900 r/min 离心 5 min, 收集细胞沉淀。根据 RNA 提取分离试剂盒(北京天根生化科技有限公司)提取总 RNA, 再进行逆转录。反应体系: 10×RT Mix 2 μL, 1×Super pure dNTPs

(2.5 mmol/L)2 μL, Oligo-(dT)15 2 μL, Quant Reverse Transcriptase 1 μL, 模板 RNA 1 μL, 加 RNase-Free 水至 20 μL。反应条件 37℃ 60 min。胶回收 cDNA, 以 cDNA 为模板, 利用设计的上下游引物扩增含限制性内切酶 *Cla* I 和 *Xba* I 位点的 *CD63* 基因, 胶回收产物, 与 pMD-18T 载体 16℃连接过夜, 转化 TG1 感受态菌, 挑单克隆菌于含 100 μg/mL 氨苄的 LB 培养基中, 在 37℃恒温摇床(200 r/min)上培养 16 h, 抽提质粒, 经 *Cla* I 和 *Xba* I 酶切鉴定后, 由上海生工生物工程技术有限公司测序比对。鉴定正确后, pMD-18T-CD63 经 *Cla* I 和 *Xba* I 双酶切, 胶回收 776bp 的片段; pAAV-iRFP682-MCS 质粒载体经 *Cla* I 和 *Xba* I 双酶切, 胶回收 5588 bp 片段; 质粒载体 pAAV-iRFP682-MSC(5588 bp)和 CD63-Linker(776 bp)目的基因片段用 DNA 连接试剂盒(日本 TaKaRa 公司)进行连接, 并转化到感受态 Sure-2 中, 挑取阳性克隆扩增, 提取并纯化质粒, 经酶切、PCR 和测序鉴定, 得到阳性重组质粒 pAAV-CD63-Linker-iRFP682。鉴定正确的质粒用 PEI 转染试剂转染 HEK 293T 细胞, 48 h 后在倒置荧光显微镜上检测 iRFP682 的表达。

1.2.2 重组腺相关病毒的包装、纯化及鉴定

AAV-293 细胞(来源于人胚肾细胞)贴壁培养在含 10%胎牛血清、链霉素(100 mg/mL)和青霉素(100 U/mL)的 DMEM 培养基中(美国 Thermo Fisher Scientific 公司), 置于 37℃、5%CO₂ 的饱和湿度培养箱中培养。用磷酸盐共沉淀法将 pAAV-CD63-Linker-iRFP682 质粒和 pDG 辅助质粒按摩尔比 1:1(N/P=20)共转染对数期 AAV-293 细胞, 包装 pAAV-CD63-Linker-iRFP682 重组腺相关病毒。共转染的 AAV-293 细胞在培养 72 h 后收集病毒。首先弃去培养基, 用细胞刮刮下细胞, 用冰冷的 PBS 清洗后收集合并细胞。反复冻融 3 次, 使细胞充分裂解, 释放病毒。病毒的浓缩纯化采用吴小兵等^[16]建立的“氯仿处理-PEG/NaCl 沉淀-氯仿抽提”纯化腺相关病毒载体的方法。荧光定量 PCR 测定 pAAV-CD63-Linker-iRFP682 重组病毒滴度。具体方法如下: pAAV-CD63-Linker-iRFP682 质粒按梯度稀释成具有 10⁹、10⁸、10⁷、10⁶ 个拷贝数的标准曲线溶液。纯化后的病毒样品预处理: 用 DNAase

(5 U/ μ L)和 RNAase(5 U/ μ L)37℃处理 30 min 后煮沸变性 10 min, 再加蛋白酶 K(1 mg/mL)56℃处理 30 min 后煮沸变性 10 min。反应体系: SybrGreen qPCR Master Mix(2 \times) 10 μ L, 上游引物(10 mol/L) 1 μ L, 下游引物(10 mol/L) 1 μ L, 病毒模板 1 μ L, 加 ddH₂O 至 20 μ L。扩增条件: 94℃ 5 min, 94℃ 10 s, 60℃ 30 s, 72℃ 30 s, 共 30 个循环。

1.2.3 重组腺相关病毒感染乳腺癌细胞

MDA-MB-231 乳腺癌细胞以每孔 10⁵ 个细胞密度接种于 24 孔板, 37℃培养 24 h 至完全贴壁。以重组腺相关病毒拷贝数/细胞个数为 5000 的比例感染上述贴壁的 MDA-MB-231 乳腺癌细胞, 对照组不感染。48 h 后在倒置荧光显微镜(德国卡尔蔡司光学有限公司)检测近红外荧光蛋白的表达。

1.2.4 稳定表达近红外荧光蛋白的乳腺癌细胞株的筛选

将感染细胞以 10 个细胞/孔密度接种至 96 孔板。培养 8 d 后, 将有荧光的细胞传代至 24 孔板中继续培养, 获得的细胞以第一次克隆所在 96 孔板的位置命名。待 24 孔中细胞密度达到 60%~70%时, 进行二次筛选, 以 1 个细胞/孔密度接种至 96 孔板中, 37℃培养 24 h。单克隆细胞完全贴壁后, 倒置荧光显微镜下观察细胞, 挑选出有单个近红外荧光标记的乳腺癌细胞的孔, 继续培养, 每天观察细胞荧光状态。待细胞密度达到 80%~90%时, 传代至 24 孔。

1.2.5 近红外荧光蛋白标记的乳腺癌细胞外泌体的提取

取稳定表达近红外荧光蛋白的乳腺癌细胞株, 用含 10%胎牛血清的 L-15 进行培养, 待细胞密度达到 70%~80%时, 将培养基更换为经超高速离心(120 000 \times g 16 h)的含 10%胎牛血清的 L-15 培养基。48 h 后收集培养上清液 60 mL, 按以下步骤提取外泌体: 2000 \times g, 15 min, 4℃; 5000 \times g, 15 min, 4℃; 12000 \times g, 30 min, 4℃; 0.22 μ L 滤器(Millipore)过滤分步离心后得到的上清液; 110 000 \times g, 120 min, 4℃; 弃上清, 1 \times PBS 洗沉淀; 120 000 \times g, 90 min, 4℃; 100 μ L 1 \times PBS 重悬, 加入蛋白酶抑制剂, -80℃保存。

1.2.6 近红外蛋白标记的乳腺癌细胞外泌体的鉴定

1.2.6.1 Western blot 检测外泌体标记蛋白 CD63

取稳定表达近红外荧光蛋白的乳腺癌细胞进行消化离心(200 \times g, 5 min), 用 PBS 清洗 2 遍之后, 收集细胞沉淀进行裂解。取裂解液上清用于 Western blot 检测的阳性对照。分离提纯后的外泌体作为实验样品, 分别煮沸 10 min 后进行 Western blot 检测。浓缩胶浓度 5%, 分离胶浓度 12%。抗体杂交时, 一抗为 CD63 单克隆抗体(上海药明康德新药开发有限公司), 二抗为 HRP-山羊抗兔抗体(苏州百奇生物科技有限公司)。

1.2.6.2 透射电镜观察外泌体形态特征

先进行样品处理, 选择标本的最佳浓度(1 mg/mL)放置到一个 300 目 Formvar 膜铜网中。红外灯下固定 30 min, 用滤纸小心吸掉未粘附在铜网的样品, 然后放置在 2.5%的戊二醛磷酸缓冲 15 min, 再用 1 \times PBS 和蒸馏水分别冲洗 2 遍后使用醋酸双氧铀进行负染, 上样观察。

1.2.6.3 SIM 观察外泌体荧光状态

将提纯的外泌体样品 10 μ L, 用 1 \times PBS 稀释到 200 μ L, 滴至共聚焦细胞培养皿上, 用结构光照明超分辨荧光显微镜(北京莱卡仪器有限公司)进行观察。

2 结果与分析

2.1 重组质粒 pAAV-CD63-Linker-iRFP682 的构建

将下游带有 Linker 的 CD63 基因目的片段插入到 pAAV-iRFP682-MCS 的多克隆位点, 得到重组表达质粒 pAAV-CD63-Linker-iRFP682(图 1A)。酶切位点分析重组的质粒经 *Cla*I 和 *Xba*I 双酶切获得 5588 bp(载体骨架片段)和 776 bp(目的基因片段)两个片段(图 1B)。酶切结果与酶切位点分析一致, 结合测序比对结果, 证明重组质粒构建正确。pAAV-CD63-Linker-iRFP682 用 PEI 转染试剂转染 MDA-MB-231 细胞后, 利用倒置荧光显微镜检测到近红外荧光蛋白的表达, 荧光信号多集中在细胞膜上, 胞内外均有发近红外荧光的囊泡结构(图 1C), 而未转染重组质粒的对照组 MDA-MB-231 细胞则未检测到荧光信号。结果表明 CD63-Linker-iRFP682 在细胞中能够正确表达, 也进一步表明重组表达载体构建正确。

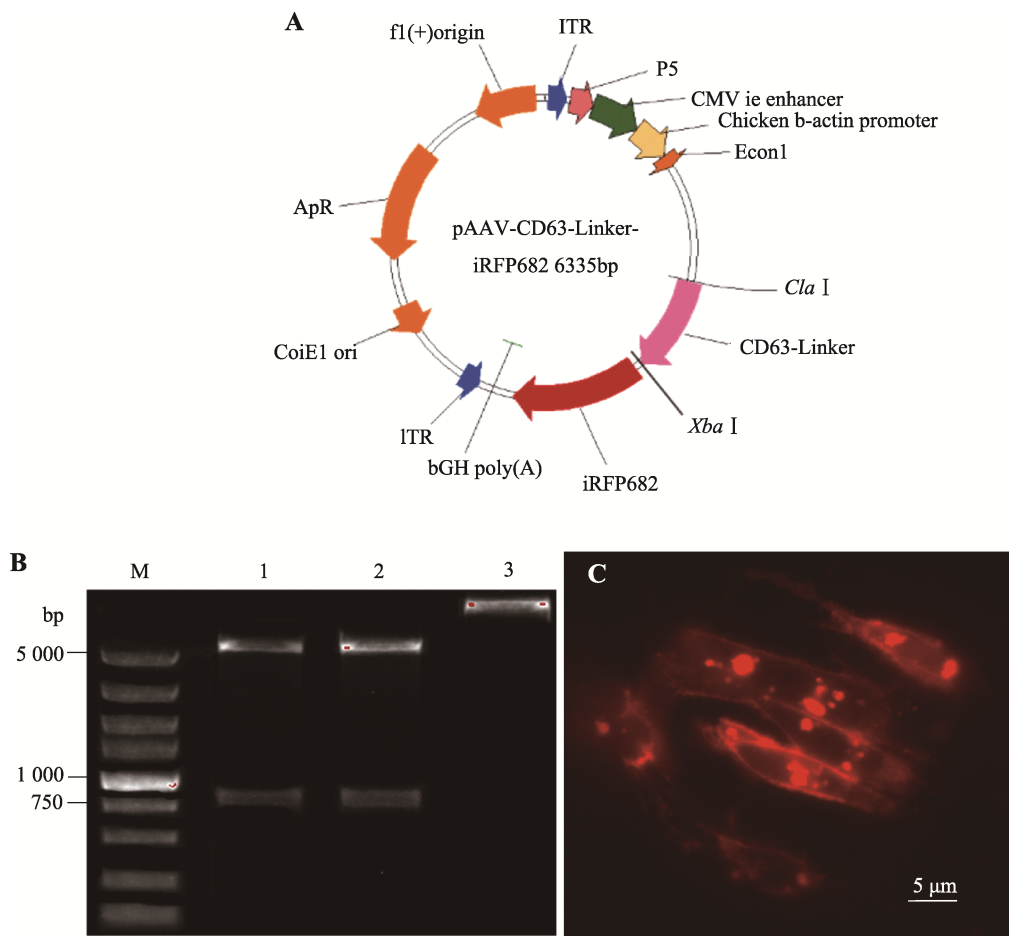


图 1 重组表达质粒的结构、鉴定和 iRFP682 蛋白表达

Fig. 1 Construction, expression and verification of pAAV-CD63-Linker-iRFP682 vector

A : pAAV-CD63-Linker-iRFP682 的质粒图谱图。B : 酶切鉴定重组质粒。M : DNA marker ; 第 1,2 泳道 : 重组质粒用限制性内切酶 *Cla* I 和 *Xba* I 酶切结果 ; 第 3 泳道 : 重组质粒。C : 近红外标记的 MDA-MB-231 细胞的 SIM 结构光共聚焦荧光图。

2.2 重组病毒的包装、纯化及滴度测定

质粒共转染 AAV-293 细胞后，在细胞内包装含 pAAV-CD63-Linker-iRFP682 质粒和 pDG 辅助 *CD63-Linker-iRFP682* 基因的重组腺相关病毒。图 2

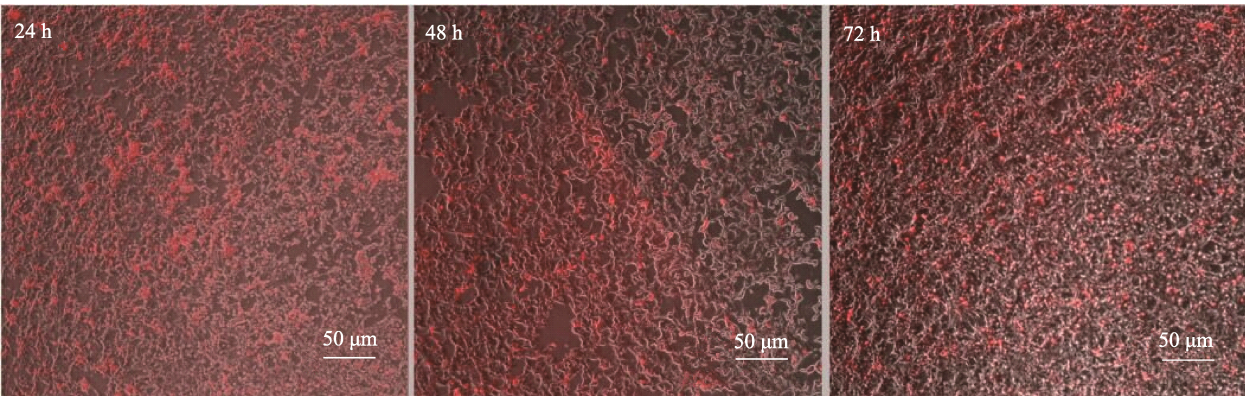


图 2 转染 AAV-293 细胞包装病毒荧光成像

Fig. 2 Fluorescent images of AAV-293 cells co-transfected with two AAV packaging plasmids

为质粒共转染 AAV-293 细胞后 24 h、48 h、72 h，在倒置荧光显微镜上观察到的荧光、白光、叠加图像。可以看出 24 h 时近红外蛋白已经表达，在 48 h 时近红外荧光蛋白的表达增多，72 h 时，收集细胞用于提纯病毒。

按氯仿提纯法纯化浓缩病毒后，得到 200 μL 病毒。病毒样品经过实时荧光定量 PCR 测定，软件分析 C_t 值读数(表 1)，并绘制标准曲线及溶解曲线(图 3)。

根据标准曲线计算病毒拷贝数为 $10^6/\mu\text{L}$ ，由于病毒处理时稀释 10 倍，所以待测病毒的实际拷贝数为 $10^{10}/\text{mL}$ 。溶解曲线的单的尖峰表明样品特性扩增良好，病毒纯化效果较好，病毒 DNA 较纯。

2.3 近红外荧光蛋白标记的乳腺癌细胞株的建立及其来源的外泌体的分离提纯

将重组病毒感染乳腺癌细胞后，通过筛选获得

表 1 q-PCR 测定质粒标准品及待测病毒的 C_t 值及分析
Table 1 C_t values of plasmid standards and virus measured by q-PCR

标准品及样品	C_t 值			C_t 值平均值	标准差(S.D.)	变异系数 CV(%)
1×10^9	14.38	14.33	14.52	14.41	0.10	0.68
1×10^8	17.76	17.45	17.67	17.63	0.16	0.90
1×10^7	20.46	20.51	20.49	20.49	0.03	0.12
1×10^6	23.45	23.39	23.48	23.44	0.05	0.20
病毒	18.55	18.44	18.42	18.47	0.07	0.38

注：是为检测标准品及病毒样品 C_t 值重现性的复孔。

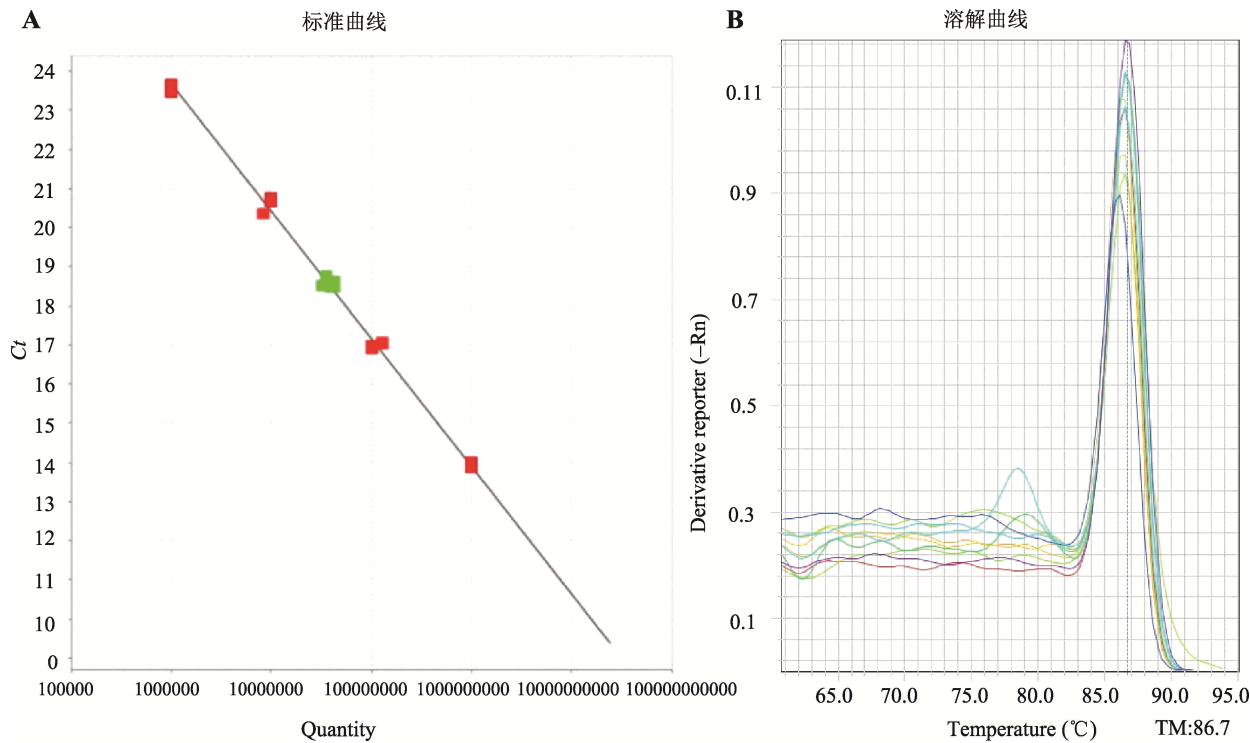


图 3 q-PCR 测定病毒的标准曲线和溶解曲线
Fig. 3 The standard curve and melt curve of plasmid standards and virus
A: q-PCR 测定病毒的标准曲。红色方块为标准品样品，绿色方块为病毒样品。B: q-PCR 测定病毒的溶解曲线。蓝色曲线代表病毒样品的溶解曲线，其他颜色曲线为标准品样品的溶解曲线，溶解温度为 86.7℃。

稳定表达近红外荧光蛋白的乳腺癌细胞株(图 4)。采用分步离心法从 60 mL 该细胞株的培养上清液中提取近红外荧光蛋白标记的外泌体 100 μ L。经 Nanodrop2000 微量紫外分光光度计测量(以 BSA 方法定量), 浓度为 1.0 mg/mL, -80°C 保存。

2.4 iRFP682 标记成功的 MDA-MB-231 细胞外泌体的鉴定

用兔抗人 CD63 单克隆抗体检测提纯后外泌体中标志性蛋白, 同时用稳定表达近红外荧光蛋白的乳腺癌细胞裂解液做阳性对照。结果显示在 30~55 kDa 条带之间存在 CD63 蛋白条带(图 5A)。TEM 高分辨透射电镜中发现 30~100 nm 大小的圆形囊泡, 均匀

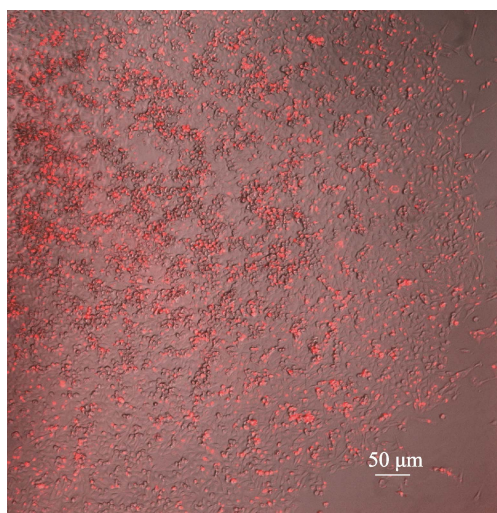


图 4 近红外荧光蛋白 iRFP682 标记的乳腺癌细胞株
Fig. 4 Near-infrared fluorescent protein iRFP682 labeled breast cancer cell line

分布在铜网上(图 5B)。SIM 结构光照明超分辨荧光显微镜结果发现提纯后的外泌体发出强烈的近红外荧光信号(图 5C)。

3 讨论

外泌体广泛存在并分布于各种体液中, 通过携带和传递重要的信号分子形成了一种全新的细胞间信息传递系统, 进而影响细胞的生理状态, 同时还与多种疾病的发生与进程密切相关。2013 年, James E. Rothman, Randy W. Schekman 和 Thomas C. Südhof 因为发现细胞囊泡运输的调节机制而荣获了诺贝尔生理学或医学奖。作为人体内一类重要囊泡, 外泌体成为科学家们研究的热点领域。目前已经证实, 真核细胞释放到外界环境中与母细胞相关的外泌体, 是拥有特殊功能的细胞缩小版^[17]。外泌体可以携带蛋白, 运送 RNA, 经过“内吞-融合-外排”等一系列过程调控细胞间物质和信息转导^[18]。细胞在正常和病理条件下都能分泌外泌体, 并且包含在外泌体里的蛋白质和核酸能够说明相关的生理病理状况。近年来外泌体已经作为一种重要的生物标志物, 被广泛应用于相关疾病初期的临床诊断。其中, 由于外泌体易从体液(如血液和乳汁)中分离^[19], 利用人体外周血液检测以识别癌细胞的标记蛋白或核酸已成为一场新的癌症诊断革命^[20]。目前已有诊断公司宣布从少量血液样本中检测到携带癌症特有的“指纹”的外泌体, 有望用非侵入手段取代现有昂贵的微创活检手术。然而, 外泌体参与癌症肿瘤转移的具体机制研究仍然是一个挑战。

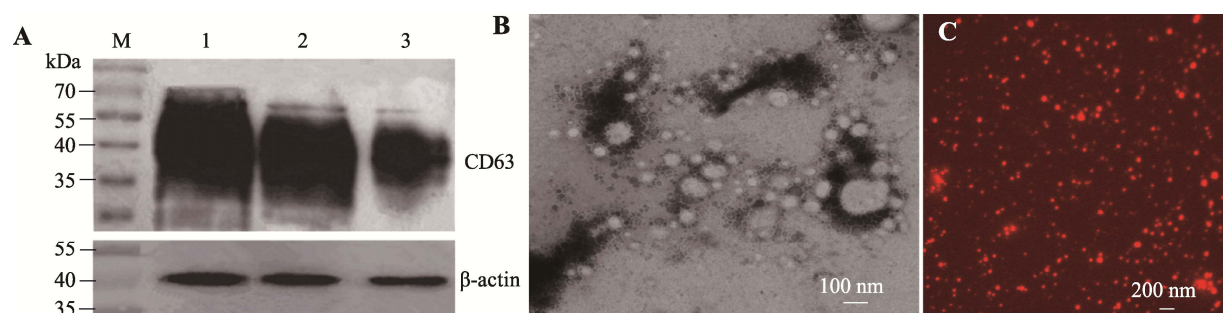


图 5 iRFP682 标记成功的 MDA-MB-231 细胞外泌体的鉴定

Fig. 5 Identification of exosomes isolated from iRFP682 labeled MDA-MB-231 cells

A: 蛋白印迹检测 CD63 蛋白。M: 蛋白 Marker; 泳道 1: 近红外荧光标记的 MDA-MB-231 细胞裂解液; 泳道 2 和 3: 从近红外荧光标记的 MDA-MB-231 细胞中提取的外泌体, 上样量分别为 10 μ g 和 5 μ g。B: 提取纯化后的外泌体的透射电镜图。C: 提取纯化后的外泌体的结构光共聚焦荧光图。

近红外荧光蛋白是绿色荧光蛋白同源的一类荧光蛋白,可利用自身特殊的结构催化形成生色团,且具备许多优良的特点:(1)易于检测,灵敏度高,荧光性质稳定。荧光蛋白生色团的成熟不需要添加底物或其他辅助因子,仅在激发光激发下就能发出荧光,单细胞标记清晰,荧光显微镜下很容易观察到;(2)荧光蛋白基因编码序列短,易构建载体;(3)细胞毒性小,可直接标记活细胞或活体组织^[21]; (4)相比于 GFP,它的激发光和发射光波长更长,位于近红光区(650~900 nm),在动物组织中光吸收和光散射较低,有较高的穿透性^[22],更适宜于动物活体组织的深层成像,是活体成像更为理想的荧光标记分子^[23]。本研究使用的近红外荧光蛋白 iRFP682 的激发光和发射光波长分别为 663 nm 和 682 nm,是单体荧光蛋白分子,其发光性质较为稳定,较长的光谱特点使其在活体动物组织成像的应用中更具潜力。

本研究基于外泌体的特殊来源和功能,对 MDA-MB-231 乳腺癌细胞来源的外泌体进行了近红外蛋白标记的改造,使其成为一种很好的用于研究乳腺癌肿瘤转移机制的生物标记物。本文通过构建能够融合表达 CD63 外泌体标记蛋白和 iRFP682 近红外荧光蛋白的重组腺相关病毒载体,利用其在 AAV 重组蛋白为重组酶的作用下定点整合于人类细胞基因组的特性^[24],筛选出能稳定表达近红外荧光蛋白的乳腺癌细胞株并进行外泌体的提取分离及鉴定。从 SIM 成像的结果可以证明,提取的外泌体都能够发近红外荧光。后续工作将会用稳定表达近红外荧光蛋白的乳腺癌细胞株建立乳腺癌动物模型。由于近红外荧光蛋白在体内体外示踪的优越性,以及外泌体在乳腺癌形成和转移过程中的信号传递起着极其重要的作用,近红外荧光蛋白标记的外泌体将会成为一种很好的示踪标记物,为乳腺癌的早期诊断治疗提供有力支持。

参考文献(References):

- [1] Wu XG, Peng SB, Huang Q. Transcriptional regulation of breast cancer resistance protein. *Hereditas (Beijing)*, 2012, 34(12): 1529–1536.
吴新刚, 彭姝彬, 黄谦. 乳腺癌耐药蛋白基因的转录调控机制. *遗传*, 2012, 34(12): 1529–1536.
- [2] Yuan Y, Zhu ZY, Lai ZC, Zhang WX. Progress on breast cancer metastasis suppressor 1 (BRMS1). *Hereditas(Beijing)*, 2006, 28(9): 1141–1148.
袁圆, 朱作言, 赖志春, 张文霞. 乳腺癌转移抑制因子 BRMS1 研究进展. *遗传*, 2006, 28(9): 1141–1148.
- [3] Mahamodhossen YA, Liu W, Zhou RR. Triple-negative breast cancer: new perspectives for novel therapies. *Med Oncol*, 2013, 30(6): 653–659.
- [4] Alderton GK. Diagnosis: fishing for exosomes. *Nat Rev Cancer*, 2015, 15(8): 453–454.
- [5] Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61(2): 69–90.
- [6] Ludwig AK, Giebel B. Exosomes: small vesicles participating in intercellular communication. *Int J Biochem Cell Biol*, 2012, 44(1): 11–15.
- [7] Record M, Subra C, Silvente-Poirot S, Poirot M. Exosomes as intercellular signalosomes and pharmacological effectors. *Biochem Pharmacol*, 2011, 81(10): 1171–1182.
- [8] Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W, Liejendekker R, Harding CV, Melief CJ, Geuze HJ. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med*, 1996, 183(3): 1161–1172.
- [9] Johnstone RM, Adam M, Hammond JR, Orr L, Turbide C. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J Biol Chem*, 1987, 262(19): 9412–9420.
- [10] Conde-Vancells J, Rodriguez-Suarez E, Embade N, Gil D, Matthiesen R, Valle M, Elortza F, Lu SC, Mato JM, Falcon-Perez JM. Characterization and comprehensive proteome profiling of exosomes secreted by hepatocytes. *J Proteome Res*, 2008, 7(12): 5157–5166.
- [11] Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*, 2007, 9(6): 654–659.
- [12] Boelens MC, Wu TJ, Nabat BY, Xu BH, Qiu Y, Yoon T, Azzam DJ, Twyman-Saint Victor C, Wiemann BZ, Ishwaran H, Ter Brugge PJ, Jonkers J, Slingerland J, Minn AJ. Exosome transfer from stromal to breast cancer cells regulates therapy resistance pathways. *Cell*, 2014, 159(3): 499–513.
- [13] Zhou WY, Fong MY, Min YF, Somlo G, Liu L, Palomares MR, Yu Y, Chow A, O'Connor STF, Chin AR, Yen Y, Wang YF, Marcusson EG, Chu PG, Wu J, Wu XW, Li AX, Li Z, Gao HL, Ren XB, Boldin MP, Lin PC, Wang SE. Can-

- cer-secreted miR-105 destroys vascular endothelial barriers to promote metastasis. *Cancer Cell*, 2014, 25(4): 501–515.
- [14] Rak J. Organ-seeking vesicles. *Nature*, 2015, 527(1038): 312–313.
- [15] Bysell H, Månsson R, Hansson P, Malmsten M. Microgels and microcapsules in peptide and protein drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 2011, 63(13): 1172–1185.
- [16] Wu XB, Dong XY, Wu ZJ, Qu JG, Hou YD. A novel method for purification of recombinant adeno-associated virus vectors on a large scale. *Chin Sci Bull*, 2000, 45(19): 2071–2075.
- 吴小兵, 董小岩, 伍志坚, 屈建国, 侯云德. 一种快速高效分离和纯化重组腺病毒伴随病毒载体的方法. *科学通报*, 2000, 45(19): 2071–2075.
- [17] Milane L, Singh A, Mattheolabakis G, Suresh M, Amiji MM. Exosome mediated communication within the tumor microenvironment. *J Control Release*, 2015, 219: 278–294.
- [18] Logozzi M, De Milito A, Lugini L, Borghi M, Calabrò L, Spada M, Perdicchio M, Marino ML, Federici C, Iessi E, Brambilla D, Venturi G, Lozupone F, Santinami M, Huber V, Maio M, Rivoltini L, Fais S. High levels of exosomes expressing CD63 and caveolin-1 in plasma of melanoma patients. *PLoS One*, 2009, 4(4): e5219.
- [19] Taylor DD, Gercel-Taylor C. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 2008, 110(1): 13–21.
- [20] Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Brian KC, Allen A, Lin DW, Urban N, Drescher CW, Knudsen BS, Stirewalt DL, Gentleman R, Vessella RL, Nelson PS, Martin DB, Tewari M. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(30): 10513–10518.
- [21] Piatkevich KD, Subach FV, Verkhusha VV. Far-red light photoactivatable near-infrared fluorescent proteins engineered from a bacterial phytochrome. *Nat Commun*, 2013, 4(19): 2153–2159.
- [22] Tian T, Chang J, Zhang X, Jiang CY, Zhang YH, Liu XM, Zhang C. In vivo imaging of near-infrared fluorescent protein in skeletal muscle of mice mediated by recombinant Adeno-Associated Virus. *China Biotechnol*, 2014, 34(10): 67–72.
- 田婷, 昌剑, 张欣, 姜琛昱, 张运海, 刘晓玫, 张春. 重组腺相关病毒小鼠骨骼肌中近红外荧光蛋白表达及活体成像. *中国生物工程杂志*, 2014, 34(10): 67–72.
- [23] Lecoq J, Schnitzer MJ. An infrared fluorescent protein for deeper imaging. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(8): 715–716.
- [24] Hüser D, Weger S, Heilbronn R. Packaging of Human Chromosome 19-Specific Adeno-Associated Virus (AAV) Integration sites in AAV virions during AAV wild-type and recombinant AAV vector production. *J Virol*, 2003, 77(8): 4881–4887.

(责任编辑: 孙玉洁)