

兔出血症病毒2型感染的肝组织外泌体提取方法比较

张怀^{1,2},李慧强^{1,2},李妍^{1,2},黄坚^{1,2}

(1.西南民族大学畜牧兽医学院,四川成都610041;2.动物医学四川省高等学校重点实验室,四川成都610041)

摘要:为了高效地分离得到兔出血症病毒2型感染后的肝组织外泌体,比较使用EDTA-2Na螯合法(EDTA-EX)、胶原酶解法(胶原酶-EX)和PEG-6000聚合物沉淀法(PEG-EX)结合差速离心法提取和富集外泌体的效果,并通过细胞表面标记的蛋白免疫印迹、纳米颗粒粒径分析和透射电镜技术对提取得到的外泌体样品进行表征鉴定。同时,通过实时荧光PCR、免疫荧光试验(IFA)及细胞感染试验确认外泌体中携带的病毒粒子数量及感染性。结果显示,PEG-6000聚合物沉淀法、EDTA-2Na螯合法和胶原酶解法均能提取和富集得到形态结构完整,浓度和纯度较高的外泌体。3种方法提取外泌体的所需时间分别为(331.6±7.96)min、(485.2±4.21)min和(390±7.68)min,样本中的外泌体总蛋白浓度分别为(7.61±1.09)μg/μL、(1.48±0.52)μg/μL和(0.55±0.18)μg/μL。实时荧光PCR的检测结果显示,PEG-EX、EDTA-EX和胶原酶-EX中的RHDV2病毒载量分别为 $1\times 10^{7.15}$ copies/mL、 $1\times 10^{7.11}$ copies/mL和 $1\times 10^{6.6}$ copies/mL。为了确认得到的外泌体仍具有感染性,将经CD63磁珠纯化得到的外泌体(pCD63-EX)接种RK13细胞,IFA检测可观察到细胞中RHDV2-VP60蛋白的特异性绿色荧光。相比纯化的RHDV2病毒粒子,pCD63-EX感染细胞后的病毒增殖活力要更高。结论:3种方法均能从兔肝组织中分离出携带RHDV2病毒粒子的外泌体。PEG-6000聚合物沉淀法对肝组织外泌体的提取效率更高(操作时间更短、富集率和质量更高),携带的病毒粒子数量也较多,而携带病毒的外泌体保有对宿主细胞的感染性,这也为后续病原学研究提供了方法学和物质基础。

关键词:外泌体;兔病毒性出血症2型;富集方法;纳米颗粒表征;感染性

中图分类号:S852.65;R392.33

文献标志码:A

文章编号:2095-4271(2025)03-0262-10

Comparison of extraction methods of exosomes from rabbit hemorrhagic virus type 2 infected liver tissue

ZHANG Huai^{1,2}, LI Huiqiang^{1,2}, LI Yan^{1,2}, HUANG Jian^{1,2}

(1. School of Animal and Veterinary Sciences, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China;

2. Sichuan Provincial Key Laboratory of Veterinary Medicine at Higher Educational Institutions, Chengdu 610041, China)

Abstract: To efficiently isolate exosomes from the liver tissue infected with RHDV2, the effects of three methods were compared: EDTA-2Na chelation (EDTA-EX), collagenase enzymatic digestion (Collagenase-EX), and PEG-6000 polymer precipitation (PEG-EX) combined with differential centrifugation for the extraction and enrichment of exosomes. The extracted exosome samples were characterized and identified by Western blotting of cell surface markers, dynamic light scattering (DLS), and transmission electron microscopy (TEM) imaging. Additionally, real-time fluorescence PCR, immunofluorescence assay (IFA), and cell infection experiments were conducted to confirm the quantity and infectivity of the virus particles carried by the exosomes. The results showed that all three methods could extract and enrich exosomes with intact morphology and structure, high concentration and purity. The time required for exosome extraction by the three methods was (331.6±7.96) min, (485.2±4.21) min, and (390±7.68) min, respectively, and the total protein concentration of exosomes in the samples was (7.61±1.09) μg/

收稿日期:2024-05-10

通信作者:黄坚(1984-),男,讲师,博士,研究方向:动物疾病防控、诊断及治疗,E-mail:huangjian@163.com。张怀和李慧强为共同一作

基金项目:四川省自然科学基金面上项目(2024NSFC0375);西南民族大学优秀学生培养项目(2023NYXXS117)

μL , $(1.48 \pm 0.52) \mu\text{g}/\mu\text{L}$, and $(0.55 \pm 0.18) \mu\text{g}/\mu\text{L}$, respectively. The real-time fluorescence PCR results indicated that the RHDV2 viral load in PEG-EX, EDTA-EX, and collagenase-EX was $1 \times 10^{7.15}$ copies/mL, $1 \times 10^{7.11}$ copies/mL, and $1 \times 10^{6.6}$ copies/mL, respectively. To confirm the infectivity of the obtained exosomes, exosomes purified by CD63 magnetic beads (pCD63-EX) were inoculated into RK13 cells, and IFA detection showed specific green fluorescence of RHDV2-VP60 protein in the cells. Compared with purified RHDV2 virus particles, the virus proliferation activity of pCD63-EX after infecting cells was higher. Conclusion: All three methods can isolate exosomes carrying RHDV2 virus particles from rabbit liver tissues; The PEG-6000 polymer precipitation method has a higher extraction efficiency for liver tissue exosomes (shorter operation time, higher enrichment rate and quality), and carries more virus particles; Moreover, the virus-carrying exosomes retain infectivity to host cells, which also provides a methodology and material basis for subsequent pathogenic studies.

Keywords: exosomes; Rabbit Hemorrhagic Disease Virus 2; enrichment method; nanoparticle characterization; infectivity

细胞外囊泡 (Extracellular vesicles, EVs) 是由细胞主动释放或被动脱落的膜包裹结构,其特征是具有脂质双层膜结构,可携带蛋白质、核酸和代谢物等生物分子,而外泌体 (Exosomes) 为细胞外囊泡中的亚类,是一种较小的脂质双层膜包被颗粒,直径通常在 $20 \sim 200 \text{ nm}$ ^[1]. 现有的研究表明, RNA 病毒 (如丙型肝炎病毒) 能够通过不同方式粘附或进入外泌体进行扩散,并具有感染性^[2]. 受感染细胞所产生的外泌体内不仅含有病毒成分,也包含其他宿主成分 (如蛋白质、miRNA 等),从而发挥多种生物学功能,包括介导细胞间信息传递、物质运载、病毒感染以及协助免疫逃逸等^[3-4]. 此外,外泌体还参与调控病毒性肝炎、脂肪肝、酒精性肝病和肝癌等多种肝病的病生理进程^[5].

兔出血症病毒 (Rabbit hemorrhagic disease virus, RHDV) 属于杯状病毒科,兔出血症病毒属 (Lagovirus) 的单股正链 RNA 病毒,可导致感染兔发生病毒性肝炎和急性死亡,并伴随出现肝脏水肿、淤血和坏死等主要病理变化,俗称兔瘟 (Rabbit hemorrhagic disease, RHD)^[6-7]. RHDV2 被认为是 RHDV 的新型变异株,其感染宿主范围更广泛,并且对不同年龄的兔均具有较高的易感性,该病毒自 2020 年 4 月在我国四川省金堂县暴发和流行以来,给区域内养兔业造成了巨大的经济损失^[8-9]. 目前,对 RHDV2 在体内感染和传播方式的研究仍十分匮乏,尤其是以肝脏为靶器官的 RHDV2 病毒粒子是否会借助外泌体实现体内的扩大感染尚未见报道. 为此,我们需要建立可高效提取兔肝脏外泌体的方法,以便开展后续的病原学研究.

目前对体液或体外培养细胞来源外泌体的提取

方法较为成熟,但对组织细胞来源外泌体的纯化和富集则缺乏条件统一的方法. 常用的外泌体分离方法包括超高速离心法、密度梯度离心法、尺寸排阻色谱法、亲和性富集法等^[10-11]. 由于组织样本中包含大量的血清外泌体和非外泌体成分 (如细胞碎片、蛋白质聚集体等),并且细胞源外泌体的释放率受细胞状态、生理条件或病理过程的影响,因此需要进行充分富集后才能获得足量的外泌体. 使用 EDTA-2 Na、胶原酶、DNA 酶及聚乙二醇 (PEG) 等制剂用于解离细胞、富集病毒或细胞外囊泡的方法已有报道^[11-13],但应用条件缺乏统一. 因此本研究拟通过对比不同方法提取外泌体的效率,并进行条件的重新组合优化,以此确定稳定提取兔肝组织外泌体的高效方法,并验证被 RHDV2 感染肝脏的外泌体是否具有感染性.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 组织样本和毒株信息

组织样本为 RHDV2 感染后病死兔的新鲜肝脏; RHDV2 毒株 SCNJ-2021 由西南民族大学畜牧兽医学院实验室鉴定保存.

1.1.2 主要试验材料和仪器

SDS-PAGE 快速凝胶试剂盒、BCA 蛋白浓度检测试剂盒购自武汉博士德生物; Protein A/G 免疫磁珠购自美国 Selleck 公司; VI 型胶原酶购自美国 Sigma-VETEC 公司; 磷钨酸、EDTA-2 Na、聚乙二醇 (PEG) 6000、考马斯亮蓝染液购自北京 Solarbio 公司; RNA 提取试剂盒、高保真 PCR 酶反转录酶购自宝生物工程 (大连) 有限公司; 磷酸盐缓冲液 (PBS)、DMEM/F-

12 培养基购自上海源培生物科技公司; anti-CD63、anti-TSG101、anti-ALIX、anti- β -tubulin 抗体购自武汉三鹰生物科技公司; anti-VP60 单克隆抗体为实验室自制保存; 山羊抗鼠 IgG-HRP、山羊抗兔 IgG-HRP 购买于美国 Abcam 公司; 硝酸纤维素膜(NC)购自美国密理博; RK13 细胞由本实验室保存; 纳米粒度颗粒跟踪分析仪、透射电子显微镜(JOEL, 日本电子); 所有荧光探针和引物均由生工生物工程(上海)有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 RT-PCR 检测

将提取的总 RNA 反转录为 cDNA, 用世界动物卫生组织(OIE)推荐的 RHDV2 特异性检测引物(表 1)和高保真 PCR 酶对病毒 cDNA 进行扩增检测。

表 1 RHDV2 OIE 引物序列

Table 1 RHDV2 OIE primer sequences

| 片段名称 | 引物序列(5'-3') | 片段大小(bp) |
|---------|----------------------|----------|
| RHDV2-F | CCTGTTACCATCACCATGCC | 481 |
| RHDV2-R | CAAGTTCARTGSCGTGTGCA | |

1.2.2 肝组织预处理

为减少血清来源外泌体的干扰, 新鲜采集 RHDV2 感染后的病死兔肝脏, 用预冷的 PBS 洗涤组织去除肝内血液, 并用无菌纱布吸干组织表面的水分, 然后放入无菌采样袋中置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

1.2.3 外泌体的分离方法

(1) EDTA-2 Na 螯合差速离心法

取适量的肝组织样品置于 5 mL EP 管中, 将组织剪碎后加入 3 mL 解离缓冲液(含 0.5% EDTA-2 Na 的 PBS 溶液, pH 7.2), 于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下螯合 30 min, 每间隔 5 min 轻摇混匀 1 次, 螯合结束后加入等体积的无血清 DMEM 培养液孵育 2 h^[13]。随后将悬液用 $70\text{ }\mu\text{m}$ 滤网过滤后于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $300\times\text{g}$ 离心 10 min 后收集上清液, 再于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $2\text{ }000\times\text{g}$ 离心 20 min 后继续收集上清液, 并进一步于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $10\text{ }000\times\text{g}$ 离心 70 min, 将最后收集的上清液经 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜过滤后转移至超高速离心杯中, 于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $120\text{ }000\times\text{g}$ 离心 90 min, 弃上清液后用 PBS 重悬浸洗沉淀, 再于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $120\text{ }000\times\text{g}$ 离心 90 min 后用预冷的 PBS 重悬沉淀, 即为 EDTA 制备的外泌体(EDTA-EX), 样品于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

(2) 胶原酶解法差速离心法

取适量组织样品置于 5 mL EP 管中, 将组织剪碎后转移至 6 孔细胞培养板中, 并加入 2 mL 消化液(含 2% 胶原酶 IV 和 DNase I), 在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 振荡培养箱中孵育 1 h 后用 $70\text{ }\mu\text{m}$ 滤网过滤得到悬液^[14]。将悬液于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $300\times\text{g}$ 离心 10 min 后收集上清液, 并于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $2\text{ }000\times\text{g}$ 离心 20 min, 收集上清液后继续于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $10\text{ }000\times\text{g}$ 离心 70 min, 将收集的上清液用 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜过滤后于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $120\text{ }000\times\text{g}$ 超速离心 90 min, 弃去上清液后用 PBS 重悬浸洗沉淀, 再以 $120\text{ }000\times\text{g}$ 超速离心 90 min, 用预冷的 PBS 重悬沉淀, 即为胶原酶制备的外泌体(胶原酶-EX), 样品于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

(3) PGE-6000 沉降差速离心法

将适量组织样本置于 5 mL EP 管中, 将组织剪碎后加入无血清 DMEM 培养基混匀。用 $70\text{ }\mu\text{m}$ 滤器过滤后取悬液于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $300\times\text{g}$ 离心 10 min, 收集上清液于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $2\text{ }000\times\text{g}$ 离心 20 min 后, 继续于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $10\text{ }000\times\text{g}$ 离心 70 min, 然后收集上清液。配置 PEG-6000 缓冲液(向 400 mL 的 PBS 中加入 64 g PEG-6000 和 23.376 g NaCl, 于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴至溶解)后按体积比 1:1 加入上清液中, 于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 静置沉降 2 h^[15]。将 PEG-6000 沉降后的悬液置于超速离心管内以 $120\text{ }000\times\text{g}$ 离心 30 min 后用 PBS 重悬浸洗沉淀, 再以 $120\text{ }000\times\text{g}$ 离心 30 min 后用 PBS 重悬沉淀, 即得到 PGE-6000 制备的外泌体(PEG-EX), 样品于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2.4 免疫磁珠纯化

为了去除游离于外泌体外的病毒颗粒干扰^[16], 按照 protein A/G 免疫磁珠试剂盒说明方法, 利用偶联 CD63 抗体的免疫磁珠对外泌体提取液进一步纯化(pCD63-EX)。

1.2.5 SDS-PAGE 蛋白分析

向外泌体样品中加入裂解液后置于冰上裂解 10 min, 然后加入蛋白上样缓冲液并于 $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 加热 5 min 后, $12\text{ }000\text{ rpm}$ 离心 5 min 吸取上清液。用配置好的 10% 的十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)对蛋白样本进行电泳分析。用考马斯亮蓝 R250 对蛋白胶进行染色 1 h, 在摇床上洗涤(5% 氯化钾溶液)脱色后拍照保存。

1.2.6 蛋白免疫印迹(Western blot)鉴定外泌体标志物及病毒蛋白

用 anti-TSG101、anti-CD63、anti-Alix、anti- β -tubu-

lin 检测外泌体标记物,以及用 anti-VP60 检测外泌体中的病毒蛋白.样品处理方法同 1.2.5,将样品进行 SDS-PAGE 电泳后于 250 mA 条件下完成转膜(90 min),然后于 37 °C 恒温箱用 5% 脱脂奶对膜进行封闭 2 h.用稀释后的抗体于 4 °C 过夜孵膜后用 TBST 进行充分浸洗.之后用二抗于室温孵膜 2 h 后用 TBST 将膜清洗,最后用化学发光液进行显影拍照保存^[17].

1.2.7 颗粒粒度分析

用纳米粒度颗粒跟踪分析仪对外泌体的粒度分

布及颗粒总数进行表征,并记录结果.

1.2.8 透射电子显微镜观察形态

将样品进行负染后,使用透射电子显微镜(500 nm)对外泌体的形态进行观察,并拍照记录结果.

1.2.9 荧光定量检测

参考文献^[18]合成 RHDV2 RT-qPCR 特异性引物及探针,进行实时荧光定量 PCR,检测 RHDV2 VP60 核酸含量.序列如表 2 所示.

表 2 荧光定量 PCR 引物及探针序列

Table 2 Primers and probe sequences for PCR in real-time quantitation

| 片段名称 | 引物序列(5'-3') | 大小(bp) |
|-------------------|----------------------------------|--------|
| RHDV-Taq man -C-F | CGGTTTGCCGCCATTG | |
| RHDV-Taq man-C-R | CCAAAGCTCAAGCACGTTG | 78 |
| RHDV2-C-Probe | FAM-AACGCAAGTTCCCTGGAAGCAGTT-VIC | |

1.2.10 BCA 法测定蛋白浓度

通过 BCA 法测定提取得到外泌体的总蛋白量,根据试剂盒说明书配置 BCA 工作液,于 96 孔板中加入 200 μ L BCA 工作液和 20 μ L 蛋白标准品或外泌体样本,37 °C 摇床上避光孵育 30 min 后,使用酶标仪(562 nm 波长)检测吸光值,根据标准曲线计算待检样本中的蛋白含量.

1.2.11 病毒粒子纯化

用 0.01 mM PBS 将兔肝脏按 1:10 体积比进行匀浆制备成组织细胞悬液,4 °C,8 000 rpm 离心 40 min 后收取上清液,用 0.22 μ m 的滤器过滤上清,加入 PEG-6000 和 NaCl 至浓度分别为 6% 和 3%,并 4 °C 搅拌过夜.配置质量分数分别为 65%、55%、45%、35% 的蔗糖溶液,分别取 2 mL 依次加入超离管中,4 °C 静置过夜.将过夜搅拌后的病毒液在 4 °C 条件下 40 000 rpm 离心 60 min 后弃上清,再用适量的 PBS 重悬沉淀.将悬液加入蔗糖密度梯度离心管的最上层,于 4 °C 条件下 40 000 rpm 离心 2 h.取全病毒核酸所在的组分,用 PBS 透析后再用 100 kDa 的超滤管 4 °C,12 000 rpm 离心 30 min 进行浓缩.最后,使用偶联 CD63 的免疫磁珠对浓缩液进行处理,去除聚集沉淀的外泌体,即获得纯化的 RHDV2 病毒粒子.

1.2.12 间接免疫荧光(IFA)

将纯化的 RHDV2 和 pCD63-EX 与 RK13 细胞于 37 °C 共培养 2 h,PBS 漂洗 3 次后以 anti-VP60 抗体为

一抗,以羊抗兔 FITC-IgG 为二抗对粘附感染细胞的 RHDV2 病毒蛋白进行标记并观察记录荧光信号.

1.2.13 细胞感染试验

将 RK13 细胞接种 12 孔板进行扩大培养,待细胞融合生长至约 80%~90% 密度时,吸弃培养基并加入 4 °C PBS 浸洗 3 次,然后分别接种相同病毒拷贝数的 RHDV2 纯化病毒液或含毒外泌体(pCD63-EX),同时以健康兔肝提取的纯化外泌体作为阴性对照组.于 37 °C 培养箱孵育 2 h 后,收集处理后的细胞提取总 RNA 并反转录为 cDNA.利用 RT-qPCR 及 IFA 分别检测不同处理组细胞中 RHDV2 的核酸量和病毒蛋白荧光信号.同时是在接种后的第 12 h、24 h、36 h、48 h 和 60 h 分别取细胞上清,用 RT-qPCR 方法检测细胞中的病毒核酸含量.

1.2.14 统计学分析

采用 GraphPad Prism 7 软件对数据进行统计分析并制图,计量资料用均数 \pm 标准差表示,采用单因素方差分析. $P < 0.05$ 表示统计学差异显著(*), $P < 0.01$ 表示差异十分显著(**), $P < 0.001$ 表示差异极其显著(***) .

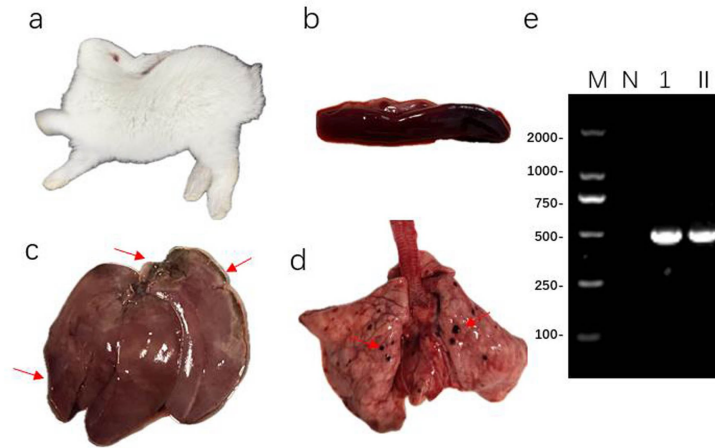
2 结果

2.1 RHDV2 感染死亡兔的大体剖检和病原检测

感染兔发生急性死亡,病死前出现精神沉郁,厌食和角弓反张等典型症状,肛门失禁可见血痢.对病

死兔进行病理剖检(图 1),多器官呈现明显的败血症表现(不同程度的出血和淤血),尤以肝脏、脾脏、脾脏的病变最为严重.肝脏肿胀淤血,体积增大,边缘钝圆呈土黄色;脾脏肿胀出血,脾尾边缘呈暗黑色,质地脆

弱;肺脏充血,表面有多个散在淤血斑;气管黏膜出血,管腔有泡沫样物质.同时,病死兔肝脏组织的 RHDV2 VP60 基因检测结果阳性(图 1e).



a.死亡兔出现角弓反张;b.脾脏瘀血,脾尾边缘呈现暗黑色;c.肝脏肿胀淤血,边缘土呈黄色;
d.肺脏充血,出现点状瘀血;e.RHDV2 VP60 基因扩增的电泳图

图 1 死亡兔的大体解剖及 RHDV2 VP60 基因 PCR 电泳结果

Fig.1 Gross anatomy of dead rabbits and PCR results of RHDV2 VP60 gene

注:M.DNA marker;N.空白对照;1.病死兔肝脏样本;II.阳性对照

2.2 不同方法结合差速离心提取外泌体

将相同质量(5 g)的肝脏组织样本分别使用 EDTA-2 Na 螯合法、胶原酶解法和 PEG-6000 沉降法进行处理后,再通过差速离心法对外泌体进行富集.结果表明,3 种方法提取的外泌体样本均可观察到淡黄色沉淀.其中,PEG-6000 处理组(PEG-EX)获得的沉淀最多,EDTA-2 Na 处理组(EDTA-EX)与胶原酶处理组(胶原酶-EX)的沉淀相对较少(图 2).BCA 法测定外泌体蛋白浓度的结果显示,PEG-EX、EDTA-EX 和胶原酶-EX 获得的外泌体总蛋白浓度分别为(7.61

± 1.09) $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、(1.48 ± 0.52) $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 和(0.55 ± 0.18) $\mu\text{g}/\mu\text{L}$,并且存在极显著差异($P < 0.001$)(图 3b).外泌体蛋白的 SDS-PAGE 电泳图显示(图 4),PEG-EX 与胶原酶-EX 的蛋白条带更为丰富,而 EDTA-EX 组的蛋白条带相对较少.对提取操作过程的总耗时进行比较,PEG-6000 聚合物沉积法、EDTA-2 Na 螯合法和胶原酶解法提取肝组织外泌体的所需时间分别为(331.6 ± 7.96) min、(485.2 ± 4.21) min 和(390 ± 7.68) min,三种提取方法的时长存在极显著差异($P < 0.001$)(图 3a).

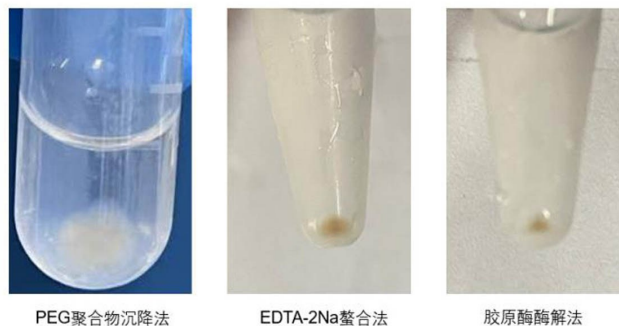


图 2 三种提取方法富集得到的外泌体沉淀

Fig.2 Exosome precipitation enriched by three different methods

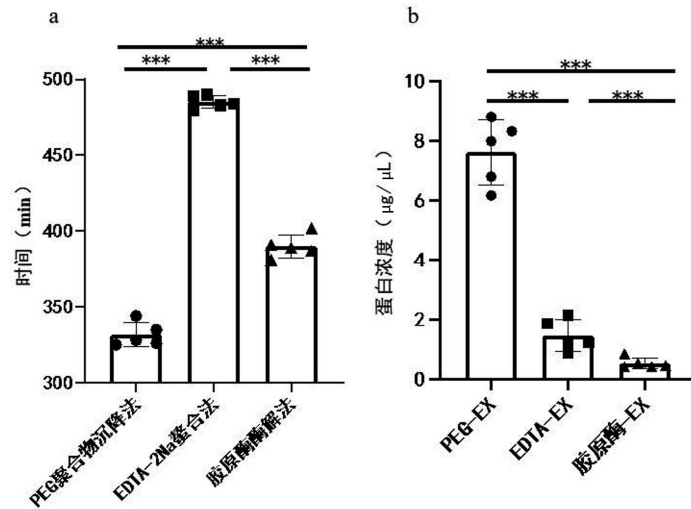


图 3 不同方法提取外泌体的时长 (a) 和外泌体的总蛋白浓度 (b)

Fig. 3 Extraction time (a) and total exosome protein concentration (b) by different methods

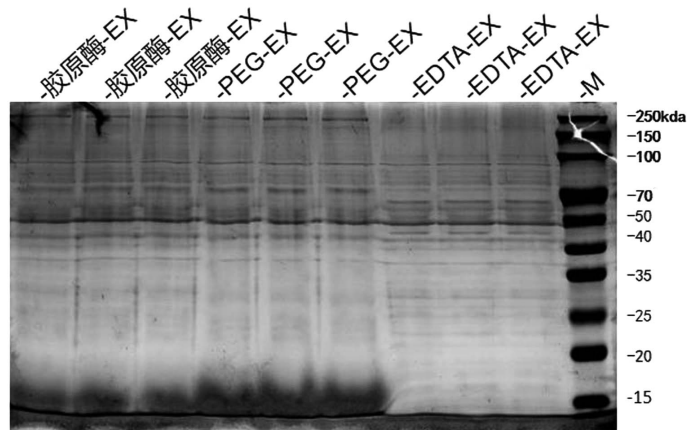


图 4 3 种方法得到的外泌体总蛋白 SDS-PAGE 图

Fig. 4 SDS-PAGE electrophoresis of total protein obtained from exosomes enriched by three different methods

2.3 不同方法分离外泌体的鉴定及表征

透射电镜下可以观察到多个圆形或椭圆形的囊泡(图 5a),总体形态呈中心凹陷,边缘凸起、明显的白色反光的囊膜结构,大小为 30~150 nm,形态、大小均符合典型外泌体的特征.其中,PEG-EX 与 EDTA-EX 在 500 nm 视野下较为聚集,而胶原酶-EX 在 500 nm 视野下数量相对稀少.蛋白免疫印迹结果显示(图 5c),3 种提取方法获得的外泌体都表达 CD63、TSG101 和 Alix 表面标记物蛋白,但不表达 β-tubulin 蛋白;而肝组织匀浆中高表达 β-tubulin 蛋白,低表达外泌体的表面标记蛋白.经动态光散射(DLS)技术分析(图 5b),外泌体的粒径分布呈单峰特征,主峰集中在 100 nm 区间,总体粒子质量评估均较好,符合标准外泌体粒径范围.

2.4 外泌体中 RHDV2 病毒的检测

为了排除在外泌体提取离心过程中共沉降下来的游离病毒颗粒的影响,通过偶联 CD63 抗体的免疫磁珠纯化外泌体后进行 RHDV2 病毒核酸检测.RT-qPCR 结果显示(图 6a),3 种方法提取感染兔肝的外泌体 RHDV2 VP60 基因均呈阳性,且病毒载量差异无统计学意义($P>0.05$).其中 PEG-EX 组的平均 Ct 值为 20.26,病毒载量为 $1 \times 10^{7.15}$ copies/mL; EDTA-EX 组的平均 Ct 值为 20.86,病毒载量为 $1 \times 10^{7.11}$ copies/mL;胶原酶-EX 组的平均 Ct 值为 22.66,病毒载量为 $1 \times 10^{6.6}$ copies/mL.为进一步验证所提取外泌体中是否含有 RHDV2 的病毒蛋白,Western blot 分析结果显示在预期大小位置(70 kDa)出现了目的蛋白条带(图 6c).

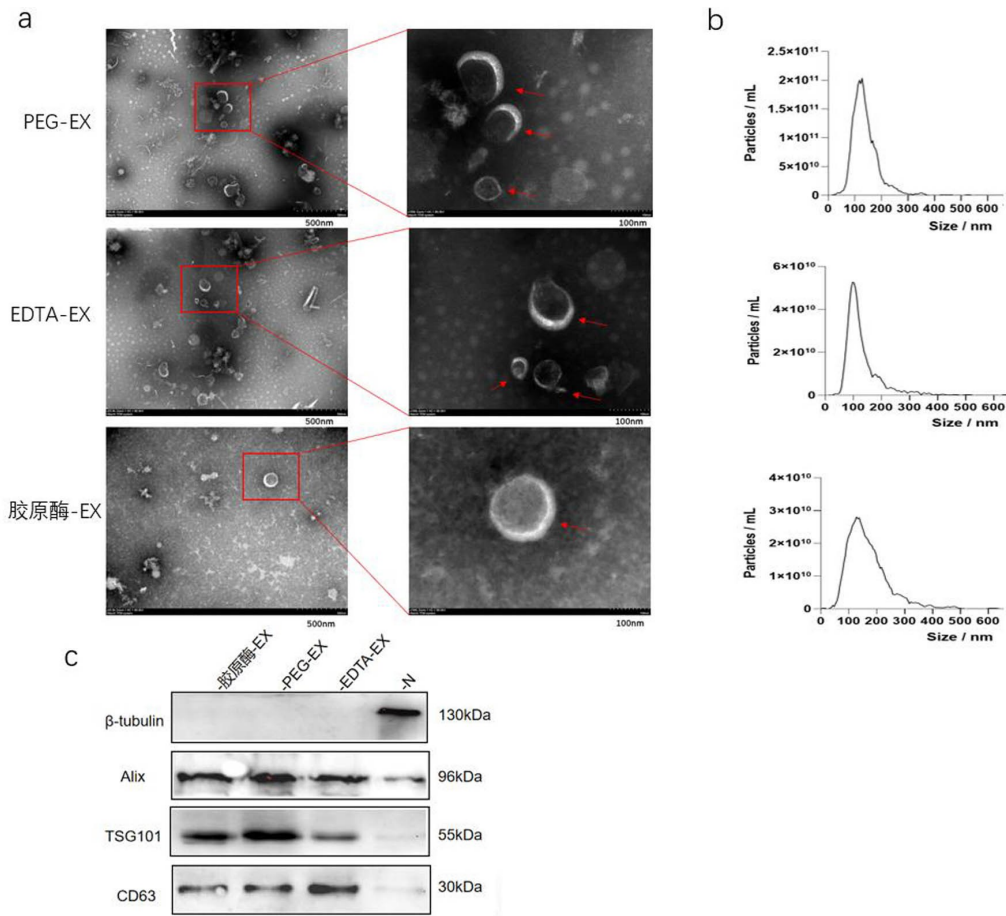
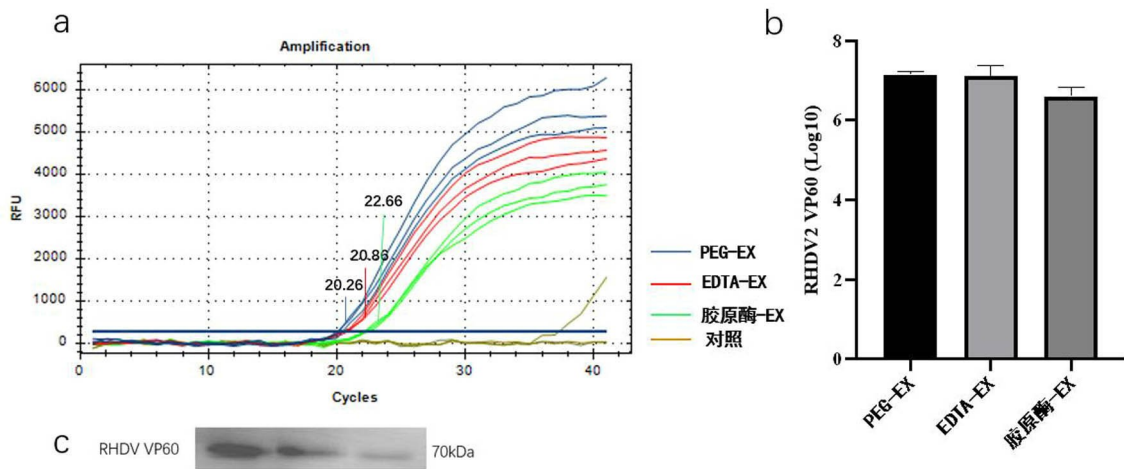


图 5 3 种方法提取的外泌体透射电镜图 (a)、粒径浓度分布图 (b) 及蛋白免疫印迹图 (c)

Fig. 5 Transmission electron microscopy (a), particle size concentration distribution (b) and western blot results (c) of exosomes enriched by three methods

注:PEG-EX: PEG-6000 法提取的外泌体;EDTA-EX,EDTA-2 Na 法提取的外泌体;胶原酶-EX:胶原酶法提取的外泌体; N:肝脏组织匀浆



a:扩增曲线;b:病毒载量差异分析;c:VP60 蛋白表达水平

图 6 三种方法提取的外泌体中 RHDV2 核酸含量及结构蛋白 VP60 的表达水平

Fig. 6 RHDV2 nucleic acid and VP60 protein expression level in exosomes by three different methods

2.5 含病毒外泌体的感染性验证

2.5.1 RT-qPCR 检测 RHDV2 核酸载量

将 PEG-6000 聚合沉淀法提取的病死兔肝脏外泌体样本通过 CD63 磁珠分离纯化,得到纯化的外泌体 (pCD63-EX). 以相同病毒含量 (10⁵ copies/mL) 的 RHDV2 纯化病毒液和 pCD63-EX 分别接种 RK13 细胞,孵育 2 h 后进行 RT-qPCR 检测 (图 7), 其中 pCD63-EX 组的病毒吸附量显著高于纯化的 RHDV2 病毒液组 (P<0.01).

2.5.2 IFA 标记 RHDV2 VP60 蛋白表达定位

以相同病毒含量的 RHDV2 纯化病粒子和 pCD63-EX 分别接种 RK13 细胞,于 37 °C 培养箱放置 2 h 后,使用 anti-VP60 抗体标记病毒蛋白,结果显示 (图 8), pCD63-EX 和纯化的 RHDV2 病毒液感染组细胞均可观

察到特异性绿色荧光,荧光主要分布在细胞浆.

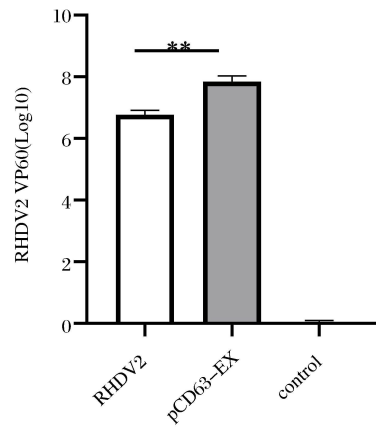


图 7 纯化 RHDV2 病毒液和含毒 pCD63-EX 感染 RK13 细胞后病毒核酸载量

Fig.7 Viral load of RHDV2 particle and pCD63-EX infected RK13 cells

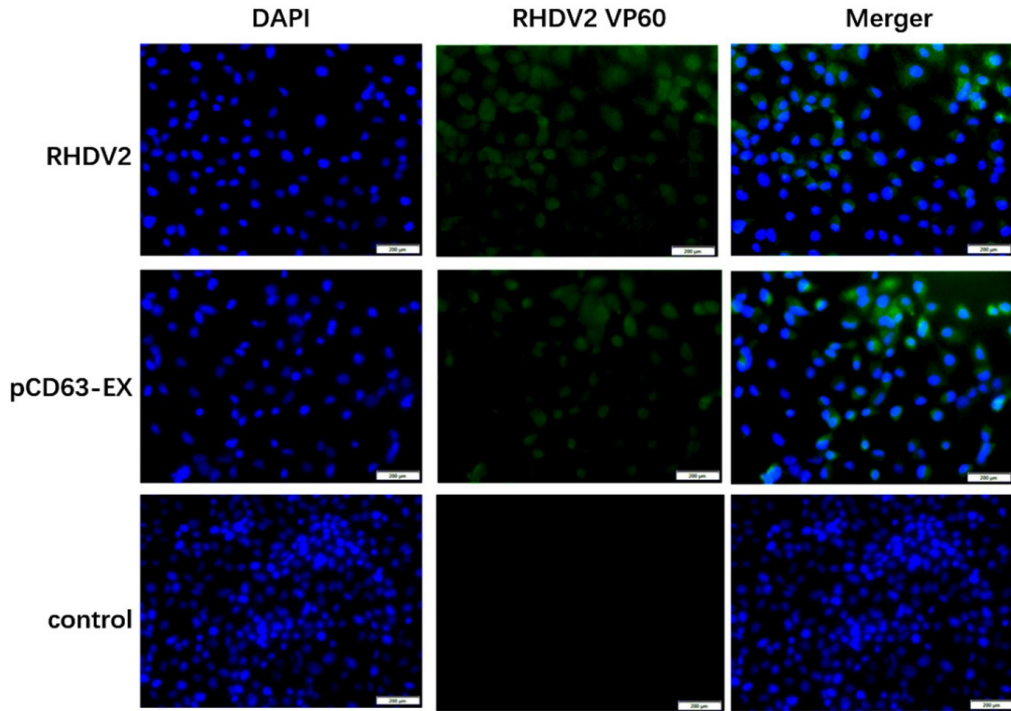


图 8 纯化 RHDV2 病毒液和含毒 pCD63-EX 感染 RK13 细胞后的 VP60 蛋白表达定位 (比例尺:200 μm)

Fig.8 Expression and localization of viral protein in RK13 cells infected with purified RHDV2venom and pCD63-EX (200 μm)

2.5.3 纯化 RHDV2 病毒液和含毒 pCD63-EX 感染 RK13 细胞后的增殖动态

将相同病毒含量的 RHDV2 纯化病毒粒子和 pCD63-EX 分别接种 RK13 细胞,于接种后的第 12 h、24 h、36 h、48 h、60 h 和 72 h 分别吸取细胞上清,对

RHDV2 病毒载量进行检测分析.结果显示,含病毒 pCD63-EX 可以感染 RK13 细胞并进行持续增殖,在感染后的第 48 小时达到增殖高峰并随之出现下降,与纯化的 RHDV2 病毒液感染组存在显著差异 (P<0.001) (图 9).

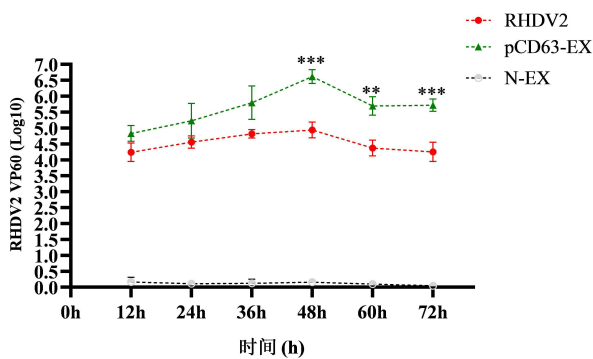


图9 纯化的RHDV2病毒粒子、带毒外泌体(pCD63-EX)及病毒阴性外泌体(N-EX)分别接种RK13细胞的病毒增殖动态

Fig. 9 Virus proliferation dynamic in RK13 cells inoculated with purified RHDV2 virions, virus-carrying exosomes (pCD63-EX) and virus-negative exosomes (N-EX)

3 讨论

外泌体在病毒感染和传播中作用受到了越来越多学者们的关注,对其功能开展研究的前提是获得高质量的外泌体.目前,仍缺少从组织细胞中提取外泌体的标准化方法,尤其因组织细胞多样性以及外泌体来源的复杂性问题,想要稳定获得高质量的外泌体仍然存在挑战.根据外泌体的理化性质,如粒径大小、形态、密度及亲疏水性等特性,需要采用不同的方法或者组合方式对外泌体进行分离和纯化.主流的外泌体纯化方法有聚合物沉淀、尺寸排阻色谱、免疫磁珠富集和蔗糖密度梯度离心等^[19-20],之后结合使用差速离心过程进行富集.因此如何提高第一阶段的纯度效率是获得高质量外泌体的关键.本研究分离组织中外泌体主要策略是通过解离试剂,把组织细胞间的粘着性降低,使得细胞与细胞间互相分离,以分泌更多的外泌体,再通过差速离心去除细胞碎片及较大的胞外囊泡,最后通过超速离心来富集外泌体.

本研究对比了3种提取组织细胞外泌体的方法,从提取时间、提取外泌体样品的总蛋白量、形态、粒子浓度、粒径分布等方面进行横向比较,明确了方法的可行性和差异性.EDTA-2 Na是一种金属螯合剂,可以螯合钙离子、镁离子等阳离子,破坏细胞的紧密连接,易细胞发生分离^[21].在4℃条件可以仍可稳定发挥作用,确保样品的完整性,并且成本可控,但相应增加了外泌体的提取时间.胶原酶可以消化细胞间基质并降解天然胶原蛋白,有利于将细胞从粘性组织中解

离,但在本研究中用胶原酶解法分离得到外泌体浓度相对较低,这与相对高的环境温度(37℃)导致外泌体囊膜结构的稳定性下降有关^[12].尤其在整体外泌体提取过程中需要经过多次离心操作和耗时延长,更容易加剧外泌体的不稳定性.相对而言,PEG-6000可以吸附到50~500nm的生物活性颗粒,利用其可沉降特性通过短时高速离心可以更快分离得到外泌体,这也在一项从Hela细胞培养液中分离外泌体的试验中得到验证^[22],并且PEG-6000沉淀后富集得到的外泌体量要远高于单纯超速离心的方法^[15].我们的实验结果同样表明,PEG-6000聚合沉淀法分离出的外泌体在体积上更加充足,总蛋白量最高,提取耗时相对较短,但仍需要根据分离对象选择适当的提取方法.

为了验证提取的外泌体中负载病毒粒子,我们通过偶联CD63的磁珠对外泌体做进一步的纯化,以此排除囊外游离病毒粒子或其他细胞成分碎屑的影响.此外,为了证实含病毒外泌体的感染性,我们需要做体外细胞感染实验.目前有多项研究证实了这一发现,如Vora等^[23]从感染登革病毒(DENV2)的细胞培养液中分离出了含病毒的外泌体,并且病毒RNA、E蛋白和基因组都较为完整,仍具有感染蚊子和其他哺乳动物细胞的能力.寨卡病毒(ZIKV)利用外泌体为媒介在神经元细胞间进行传播,在感染组织中提取的得到的外泌体同样含有ZIKV的RNA和E蛋白,且保有高度感染性^[24].相似的结果在日本脑炎病毒(JEV)^[25]和兰加特病毒(LGTV)的相关研究中也得到了确认^[26-27].因此本研究以PEG-6000聚合沉淀法得到外泌体(PEG-EX)为对象,确认了RHDV2 RNA的载量,以及体外对兔源RK13细胞的感染性,并且观察到了病毒进入宿主细胞以及在细胞内复制的情况.相比之下,负载RHDV2的外泌体所具有的感染性比单纯RHDV2的更强和持久,推测这与病毒粒子借助外泌体囊膜结构更快与宿主细胞发生相互作用以及推动病毒进入细胞和复制有关.总之,外泌体作为细胞间物质交换和信息交流的媒介,在病毒与宿主细胞相互作用中起着重要作用,而对外泌体提取方法的优化无疑为病原学的深入研究提供了基础技术保障.

4 结论

本研究通过对比提取外泌体方法的效率,确定了

PEG-6000 聚合沉淀差离心法最适用于兔肝脏组织外泌体的提取. 以此方法富集得到外泌体保留了 RHDV2 病毒粒子对靶细胞的感染性和在细胞内的增殖能力, 为病原学的进一步研究提供了方法学基础.

参考文献

- [1] VAN NIEL G, D'ANGELO G, RAPOSO G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2018, 19(4): 213-228.
- [2] WU Q Y, GLITSCHER M, TONNEMACHER S, et al. Presence of intact hepatitis B virions in exosomes[J]. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 2023, 15(1): 237-259.
- [3] MUÑOZ-HERNÁNDEZ R, ROJAS Á, GATO S, et al. Extracellular vesicles as biomarkers in liver disease[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(24): 16217.
- [4] SZABO G, MOMEN-HERAVI F. Extracellular vesicles in liver disease and potential as biomarkers and therapeutic targets[J]. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2017, 14(8): 455-466.
- [5] SUNG S, KIM J, JUNG Y. Liver-derived exosomes and their implications in liver pathobiology[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(12): 3715.
- [6] MEYERS G, WIRBLICH C, THIEL H J. Genomic and subgenomic RNAs of rabbit hemorrhagic disease virus are both protein-linked and packaged into particles[J]. *Virology*, 1991, 184(2): 677-686.
- [7] MAHAR J E, HALL B R N, PEACOCK C D, et al. Rabbit hemorrhagic disease virus 2(rhdv2; gi. 2) is replacing endemic strains of RHDV in the Australian landscape within 18 months of its arrival[J]. *Journal of Virology*, 2017, 92(2): 1374-17.
- [8] 谭永贵, 缪秋红, 吴巧梅, 等. 新型兔出血症病毒研究进展[J]. *中国动物传染病学报*, 2016, 24(1): 80-86.
- [9] 程蓓蓓, 钟秀平. 新型兔出血症病毒与经典病毒的差异[J]. *中国动物检疫*, 2021, 38(4): 90-94.
- [10] VARGA Z, YUANA Y A, GROOTE MAAT A E, et al. Towards traceable size determination of extracellular vesicles[J]. *Journal of Extracellular Vesicles*, 2014, 3(1): 23298.
- [11] 王立志, 刘路宽, 刘晶. 外泌体分离与纯化技术研究进展[J]. *化学通报*, 2021, 84(10): 8.
- [12] 唐凤. 大鼠肝再生期间肝组织外泌体的分离鉴定及蛋白质组研究[D]. 长沙: 湖南师范大学, 2020.
- [13] 陈杰. 基于新的富集方法从人肝癌组织中提取小细胞外囊泡[D]. 赣南: 赣南医学院, 2022.
- [14] 赵晨. 脂肪干细胞来源外泌体对膝关节关节炎的疗效及作用机制的研究[D]. 苏州: 苏州大学, 2020.
- [15] RIDER M A, HURWITZ S N, MECKES D G. ExtraPEG: A polyethylene glycol-based method for enrichment of extracellular vesicles[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 23978.
- [16] 张亮, 王帅帅, 陈忍霞, 等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒感染的 MARC-145 细胞中外泌体的分离与鉴定[J]. *畜牧兽医学报*, 2017, 48(7): 1300-1305.
- [17] 叶俊杰, 孙晓东, 袁乐永, 等. 人脐血血浆外泌体提取方法的比较[J]. *生物工程学报*, 2022, 38(6): 2342-2351.
- [18] 王冠莹, 陈萌萌, 仇汝龙, 等. 兔出血症病毒 1、2 型双重 TaqMan 探针荧光定量 PCR 检测方法的建立和应用[J]. *江苏农业科学*, 2023, 51(18): 40-44.
- [19] VELLA L J, SCICLUNA B J, CHENG L, et al. A rigorous method to enrich for exosomes from brain tissue[J]. *Journal of Extracellular Vesicles*, 2017, 6(1): 1348885.
- [20] LI P, KASLAN M, LEE S H, et al. Progress in exosome isolation techniques[J]. *Theranostics*, 2017, 7(3): 789-804.
- [21] KRAVCHENKO L, PETRENKO A, SHANINA I, et al. A simple non-enzymatic method for the isolation of high yields of functional rat hepatocytes[J]. *Cell Biology International*, 2002, 26(11): 1003-1006.
- [22] KONOSHENKO M Y, LEKCHNOV E A, VLASSOV A V, et al. Isolation of extracellular vesicles: General methodologies and latest trends[J]. *BioMed Research International*, 2018, 2018: 8545347.
- [23] VORA A, ZHOU W S, LONDONO-RENTERIA B, et al. Arthropod EVs mediate dengue virus transmission through interaction with a tetraspanin domain containing glycoprotein Tsp29Fb[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(28): 6604-6613.
- [24] VAN DEN POL A N, MAO G C, YANG Y, et al. Zika virus targeting in the developing brain[J]. *The Journal of Neuroscience*, 2017, 37(8): 2161-2175.
- [25] GOSWAMI S, BANERJEE A, KUMARI B, et al. Differential expression and significance of circulating microRNAs in cerebrospinal fluid of acute encephalitis patients infected with Japanese encephalitis virus[J]. *Molecular Neurobiology*, 2017, 54(2): 1541-1551.
- [26] ZHOU W S, WOODSON M, NEUPANE B, et al. Exosomes serve as novel modes of tick-borne flavivirus transmission from arthropod to human cells and facilitates dissemination of viral RNA and proteins to the vertebrate neuronal cells[J]. *PLoS Pathogens*, 2018, 14(1): e1006764.
- [27] REGMI P, KHANAL S, NEELAKANTA G, et al. Tick-borne flavivirus inhibits sphingomyelinase (IsSMase), a venomous spider ortholog to increase sphingomyelin lipid levels for its survival in *Ixodes scapularis* ticks[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2020, 10: 244.

(责任编辑: 和力新, 殷锋, 付强, 张阳, 肖丽; 英文编辑: 周序林, 郑玉才)