

# Tau 蛋白通过外泌体传递到细胞外空间的研究\*

张鹏<sup>1,2</sup>, 舒莉萍<sup>1,2</sup>, 周艳华<sup>1,2\*\*</sup>, 范安然<sup>1,2\*\*</sup>

(1. 贵州医科大学 细胞工程生物医药技术国家地方联合工程实验室, 组织工程与干细胞实验中心, 贵州省再生医学重点实验室, 贵阳 550004; 2. 中国医学科学院 成体干细胞转化研究重点实验室, 贵阳 550004)

**[摘要]** 目的: 验证 HEK293-Tau 细胞的外泌体中是否存在 Tau 蛋白、及 Tau 蛋白是否能够在细胞间通过外泌体传播。方法: 通过经典的超速离心结合超滤法分离 HEK293-Tau 细胞的外泌体, 通过透射电镜分析外泌体形态、采用 Western blot 鉴定外泌体特异性标记物 (HSP70、CD63 及 CD9) 及外泌体和细胞培养液中 Tau 蛋白表达。结果: 超速离心结合超滤法成功地分离了 HEK293-Tau 细胞的外泌体, 在透射电镜下观察到外泌体呈现典型的杯状形态, 分离的外泌体中检测到 HSP70、CD63 及 CD9 等外泌体特异性标记物的表达; 在外泌体及细胞培养液中能够检测到 Tau 蛋白的存在。结论: HEK293-Tau 细胞外泌体中存在 Tau 蛋白, 并且 Tau 蛋白可以通过外泌体传递到细胞外空间。

**[关键词]** Tau 蛋白; 外泌体; 阿尔茨海默综合征; HEK293-Tau 细胞; 神经退行性疾病; 超速离心法; 超滤法

**[中图分类号]** R741.02 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2019)06-0632-05

**DOI:** 10.19367/j.cnki.1000-2707.2019.06.003

## Study on the Delivery of Tau Protein to Extracellular Space of Cells via Exosomes

ZHANG Peng<sup>1,2</sup>, SHU Liping<sup>1,2</sup>, ZHOU Yanghua<sup>1,2</sup>, FAN Anran<sup>1,2</sup>

(1. National & Guizhou Joint Engineering Laboratory for Cell Engineering and Biomedicine Technique, Center for Tissue Engineering and Stem Cell Research, Guizhou Province Key Laboratory of Regenerative Medicine, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 2. Key Laboratory of Adult Stem Cell Translational Research, Chinese Academy of Medical Sciences, Guiyang 550004, Guizhou, China)

**[Abstract]** **Objective:** To examine whether Tau protein exists in exosomes isolated from supernatants derived from culture media with HEK293-Tau and whether the Tau protein can be delivered into extracellular space via exosomes. **Methods:** Exosomes were isolated using ultracentrifugation combined with ultrafiltration. The morphology of isolated exosomes were observed by a transmission electron microscopy. The marker of exosomes was further confirmed using Western blot. Tau protein in isolated exosomes and cell culture medium was also checked using Western blot. **Results:** Isolated exosomes showed typically cup-shaped morphology. In addition, the exosome marker HSP70, CD63 and CD9 and Tau protein are able to detect in exosomes and cell culture medium. **Conclusions:** Tau present in cell culture media might be delivered by exosomes derived from HEK293-Tau cells.

**[Key words]** Tau protein; exosomes; Alzheimer's disease; HEK293-Tau cell; neurodegenerative disease; ultracentrifugation; ultrafiltration

\*[基金项目] 国家自然科学基金项目(31660316); 中国医学科学院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助(2018PT31048); 贵州省应用基础研究计划重大专项“肿瘤转移复发耐药机制的研究及临床治疗新技术”[黔科合 J 重大(2015)2003]

\*\* 通信作者 E-mail: 275127171@qq.com; 36088035@qq.com

网络出版时间: 2019-06-22 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20190622.0723.003.html>

Tau 蛋白是一种微管相关蛋白,在微管聚集和稳定方面发挥重要的作用。正常状态下,Tau 蛋白自身几乎不表现出聚集的倾向,但是 Tau 蛋白聚集形成的双螺旋纤维以及神经纤维结节是一系列神经退行性疾病的主要特征,这些神经退行性疾病被称为 Tau 蛋白病,其中包括阿尔茨海默综合征(alzheimer disease, AD)和亨廷顿病额颞叶痴呆等<sup>[1]</sup>。虽然 Tau 蛋白的聚集是导致这些神经退行性疾病的原因,但是 Tau 蛋白在神经退行性疾病形成聚集物的机制以及 Tau 蛋白的病理学传播机制仍然存在争议<sup>[2-3]</sup>。外泌体是后期胞内体向内出芽形成多泡体、是一类纳米级别的生物膜封闭囊泡,随后在多泡体与细胞膜融合后被释放到胞外环境,这种起源过程赋予了外泌体具有与起源细胞类似的膜结构,它们富含胆固醇脂筏、鞘磷脂和神经酰胺<sup>[4-5]</sup>。研究认为外泌体不仅仅是一种消除了多余蛋白或分子的垃圾处理囊泡,还可能是促进胞间交流的重要信使,不仅在正常的生理学过程中发挥作用,它们还与许多疾病的病理学相关<sup>[6-8]</sup>,在中枢神经系统细胞之间的信息传递中也发挥重要作用<sup>[9]</sup>。最近一项研究发现,外泌体可能是 Tau 蛋白在细胞之间传递的方式<sup>[10]</sup>;研究发现在 AD 病人中,其外泌体的 Tau 蛋白水平显著升高<sup>[11]</sup>。因此本研究通过经典的超速离心结合超滤法分离获得 HEK293-Tau 细胞的外泌体,采用 Western blot 鉴定外泌体特异性标记物(HSP70、CD63 及 CD9)及外泌体和细胞培养液中 Tau 蛋白表达,报告如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料

DMEM-F12 基础培养基、细胞培养用血清(FBS)、磷酸盐缓冲液(PBS)、0.25% 胰消化酶、100×非必需氨基酸(NEAA)、L-谷氨酰胺、β-巯基乙醇和 100 000 U/L 青链霉素均购自 Gibco 公司,外泌体鉴定抗体和无外泌体血清购自 ABI 公司,蛋白预染 marker 购自 Biorad 公司,羊抗鼠 IgG 购自北京索莱宝科技有限公司,24 孔板、T25 培养瓶和 25 cm 培养板购自 Corning 公司产品,超速离心用离心管和 100 KD 超滤管购自 Millipore 公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** HEK293-Tau 细胞培养于 T75 的细胞培养瓶,并使用 DME-F12 完全培养基进行

培养。完全培养基组成包括 10% 胎牛血清、1% 非必需氨基酸、10 mmol/L β-巯基乙醇、1% 谷氨酰胺及 1% 青链霉素。每天观察细胞生长状态,3 d 换液 1 次,细胞生长融合度为 90% 时进行传代培养。

**1.2.2 外泌体分离** HEK293 细胞培养在 25 cm 的细胞培养皿中,每皿加完全培养基液 20 mL,收集前 48 h 换成无外泌体血清配制的培养基。48 h 后收集细胞上清液 200 mL(10 块细胞培养皿),3 462 r/min 离心 10 min 收集上清液,将上清液 6 924 r/min 继续离心 20 min 去除细胞;再取上清液 15 482 r/min 离心 60 min 去除细胞碎片。取上清液用 Millipore 100 KD 的超滤管浓缩至 10 mL,浓缩后 48 958 r/min 离心 90 min,取沉淀用 PBS 重悬,48 958 r/min 离心 90 min, PBS 重悬沉淀,0.22 μm 针头式过滤器过滤, -80 ℃ 保存。

**1.2.3 外泌体标志物鉴定及 Tau 蛋白检测** 采用 Western blot 方法,配制 10% 的分离胶 10 mL,分离胶凝好后配制 4 mL 浓缩胶。细胞裂解液以及上清的上样体积为 20 μL,将其分别于 2×上样缓冲液混匀后,置于 100 ℃ 水浴煮 10 min 即可上样;指示带泳至胶底部时停止电泳,4 ℃ 转膜过夜;转膜完成后,取出 PVDF 膜,用 5% 的脱脂牛奶室温封闭 1 h,加入相应一抗 4 ℃ 过夜;次日取出 PVDF 膜用双蒸水漂洗 3 次,10 min/次。然后加入二抗室温孵育 1 h,双蒸水漂洗 3 次,10 min/次;用 ECL 液室温避光孵育,暗室显影。

**1.2.4 外泌体测定** 采用 Sigma 公司的 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定,按照试剂盒说明进行操作,在第 1 孔添加标准品 20 μL,2~8 孔添加 1% SDS 20 μL。然后在第 2 孔添加蛋白标准品 20 μL,混匀后转移 20 μL 到第 3 孔进行倍比稀释,通过这种倍比稀释的方法将样品进行稀释逐孔、共 7 孔,第 7 孔混匀后取 20 μL 丢弃。每孔加入 BCA 工作液 200 μL,37 ℃ 孵育 30 min。根据吸光度值绘制标准曲线,再根据各个样本孔的吸光度值求得其实浓度。

## 2 结果

### 2.1 外泌体形态

收集 HEK293-Tau 细胞培养液,超速离心结合超滤离心法,分离外泌体,分离的外泌体稀释后在透射电镜下进行形态观察;外泌体生理状态下是球状结构,但是由于脱水的原因会造成中间内陷,使

内部折射变弱,电镜下外泌体会呈现杯状结构。所以本研究所分离获得的外泌体在电镜下呈典型的杯状结构(图1箭头所示)。

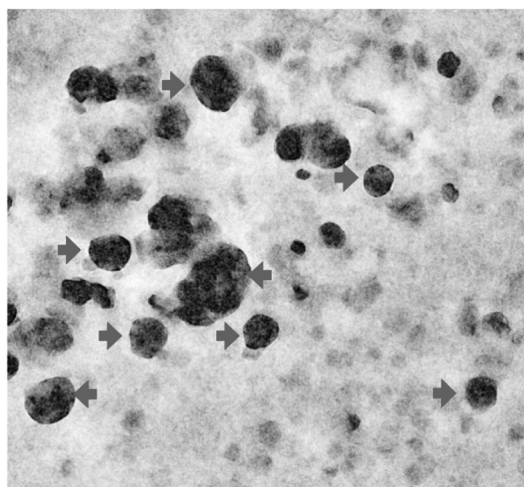
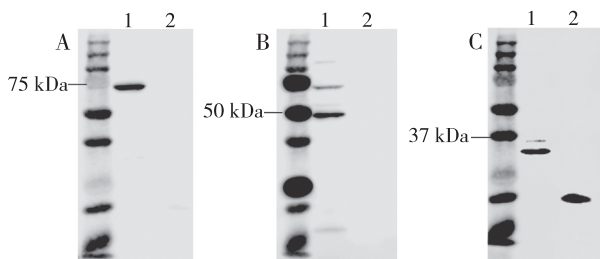


图1 透射电镜下外泌体形态

Fig.1 The morphology of isolated exosomes under transmission electron microscopy

## 2.2 外泌体表达特异性标记物

通过细胞裂解液获取外泌体总蛋白,然后使用 Western blot 方法,用外泌体中特异性高表达的蛋白标记物进行鉴定。结果显示,外泌体的特异性标记物 HSP70(图2A)、CD63(图2B)和 CD9(图2C)都呈现阳性,与电镜结果相结合,更进一步证明了所分离的外泌体的可靠性。



注:A 为 Hsp70、B 为 CD63、C 为 CD91,泳道1 为外泌体蛋白、2 为细胞总蛋白

图2 外泌体标志物鉴定(Western blot)

Fig.2 The expression of exosome markers on isolated exosomes

## 2.3 细胞裂解液、外泌体及细胞培养上清液中 Tau 蛋白表达

使用 Tau12 抗体对细胞培养上清液、细胞裂解液及外泌体进行 Western blot 分析,结果显示,在细胞培养上清液、细胞裂解液及外泌体中都可以检测到 Tau 蛋白表达(图3)。

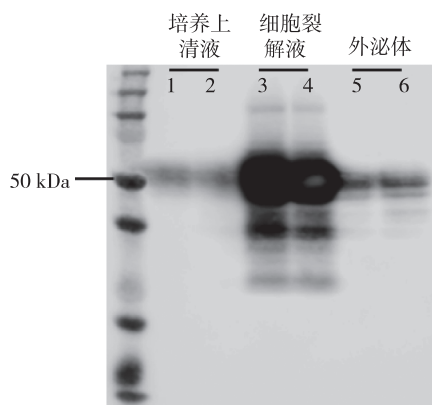


图3 细胞、外泌体及细胞培养液中 Tau 蛋白表达(Western blot)

Fig.3 Tau protein in isolated exosomes and supernatants derived culture media with HEK293-Tau cells

## 3 讨论

Tau 蛋白是一种微管相关蛋白,在微管聚集和稳定方面发挥重要的作用。正常状态下,Tau 蛋白自身几乎不展现出聚集的倾向。但是在 AD 中,Tau 蛋白会超磷酸化,导致其错误折叠以及聚集形成神经纤维结节(neurofibrilomatosis,NFT)<sup>[12]</sup>。NFT 沉积的出现是以一种独特的可预测的时空特异性方式发生。Braak 等<sup>[13]</sup>将 Tau 的传播分为 6 阶段,前两个阶段的主要特点是 Tau 先在旁嗅皮层然后在嗅皮层沉积,所以该阶段也别称为旁嗅皮层阶段。这一阶段,病人的绝大多数认知是正常的;在 III、IV 阶段,NFT 密集的出现于嗅皮层的前 alpha 区以及 CA1 区,海马下托区也开始出现 NFT;在 IV 阶段 CA4 区、杏仁区、屏状体、扣带、丘脑核都受到影响。由于 IV 阶段主要影响大脑的边缘系统,所以该阶段也叫边缘期;这一阶段病人开始表现出轻度认知障碍,但是仍可以进行日常工作;在第 V、VI 阶段,病原性的 Tau 几乎在海马区的所有区域出现,病人表现出大规模的神经元损失,也被称为岛旁区阶段<sup>[13]</sup>。在 AD 进程中,Tau 在大脑中的传播多数情况下可以用突触间传播解释,但是其侧向传播以及长距离传播仍不能解释,但 Tau 的这种传播方式如果是通过大脑的外泌体传播方式就可以解释。最近已经有研究开始探索 AD 中外泌体作用于错误折叠的 Tau 传播的可能性<sup>[3]</sup>。

外泌体是一类纳米级别的生物膜封闭囊泡,其存在于生物体液中,直径在 50 ~ 150 nm 之间<sup>[14]</sup>。

本研究获得的外泌体在电镜下直径绝大多数位于这个范围。外泌体通常可通过差速离心方法获得,但是各个实验室的获得方法又有所不同。本研究采用超速离心结合超滤的方法非常有效的分离获得了外泌体。外泌体生理状态下是球状结构,但是由于脱水的原因会造成中间内陷,使内部折射变弱,电镜呈现杯状结构<sup>[15]</sup>。本研究获得的外泌体具有典型的杯状结构。并且外泌体由于其起源于多泡体,所以腔内体的蛋白标记物被用来作为外泌体鉴定的标记,比如 CD81、CD9、CD63 和 TSG102 等<sup>[16]</sup>。本研究分离的外泌体经鉴定 HSP70、CD63 和 CD9 均呈现阳,进一步证明本研究获得的外泌体的可信度。

最近,有研究发现外泌体参与了 Tau 的病理学过程<sup>[17]</sup>,来源于小胶质细胞的外泌体中的 Tau 参与大脑中 Tau 的病理学传播,使用 GW4869 清除小胶质细胞和抑制外泌体的合成能够限制 Tau 在病人大脑中的传播<sup>[18]</sup>。该研究认为小胶质细胞能够吞噬含有 Tau 蛋白病变的神经元,随后将 Tau 释放到外泌体中来传递病变神经元,小胶质细胞来源的外泌体可以将 Tau 从嗅皮层(Tau 病理学的最早位点之一)传播到齿状回区域(Tau 晚期影响的区域,但是也在早期受到影响),封闭 nSMase2 抑制外泌体生物合成后可显著减少 Tau 的传播<sup>[18]</sup>。研究还发现外泌体中含有 AD 的典型生物标记 Tau 和 A $\beta$ <sup>[19]</sup>。本研究也发现外泌体中确实存在 Tau 蛋白,说明了外泌体在 Tau 蛋白的传播中可能发挥作用,在后期胞内体内陷形成多泡体的时候,在细胞中表达的 Tau 蛋白会随之被分选到多泡体的腔内体中,当多泡体与细胞膜融合后释放外泌体,此时 tau 蛋白会随之被释放到胞外空间。释放的外泌体可以与相邻以及不相邻的细胞膜融合,并将其包含的外泌体再释放到受体细胞中,从而造成 Tau 蛋白在不同细胞之间的传播。

此外,外泌体中的蛋白质的分选机制仍不清楚,但是似乎是被特异性分选的,因为它们与其亲本细胞的组成不同<sup>[20]</sup>,并且外泌体中装载的分子还会根据亲本细胞的状态而改变<sup>[21]</sup>。关于外泌体中的蛋白分子分选机制有 3 种途径被提出。第 1 种是利用胞浆体系,比如 ALIX 和 ESCRT 蛋白以及 LBPA<sup>[22-23]</sup>,ESCRT 途径可以募集 ILV 中单泛素化的蛋白进行胞内溶酶体降解;第 2 种途径是以富含鞘磷脂的细胞膜结构为基础,将细胞膜镶嵌蛋白进行分离以及将脂膜上的 flotilins 和 Tetraspanins 蛋

白及其结合蛋白共同分离到 ILV 中<sup>[24-25]</sup>;第 3 种途径是由凝集素等因子在胞内体腔内发起的装载,这一途径主要是招募糖基化蛋白到外泌体中。但是 Tau 蛋白具体是通过什么方式被分选到外泌体中去的,其机制仍然不清楚,这也是下一步外泌体在 Tau 蛋白传播中需要进一步研究的内容。

综上,神经元可能在外泌体中分泌 Tau 的病原性形式,这种装载有病原性蛋白的外泌体可以被神经元摄取。这些证据表明包含 Tau 的外泌体在神经元之间相互传递 Tau,可能是大脑中 Tau 传播的一个重要组成途径。本研究通过经典的超速离心结合超滤法成功分离获得外泌体,并验证了 HEK293-Tau 细胞的外泌体中存在 Tau 蛋白,但 Tau 蛋白是否能够在细胞间通过外泌体传播,有待进一步研究。

## 4 参考文献

- [1] AYERS J I, GIASSEN B I, BORCHELT D R. Prion-like spreading in tauopathies [J]. *Biol Psychiatry*, 2018, 83 (4): 337-346.
- [2] JELLINGER K A. Neuropathological staging of Alzheimer-related lesions: the challenge of establishing relations to age [J]. *Neurobiol Aging*, 1997, 18 (4): 369-375.
- [3] WANG Y, BALAJI V, KANIYAPPAN S, et al. The release and trans-synaptic transmission of Tau via exosomes [J]. *Mol Neurodegener*, 2017, 12 (1): 5.
- [4] DE GASSART A, GEMINARD C, FEVRIER B, et al. Lipid raft-associated protein sorting in exosomes [J]. *Blood*, 2003, 102 (13): 4336-4344.
- [5] WUBBOLTS R, LECKIE R S, VEENHUIZEN P T, et al. Proteomic and biochemical analyses of human B cell-derived exosomes. potential implications for their function and multivesicular body formation [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278 (13): 10963-10972.
- [6] VALADI H, EKSTROM K, BOSSIOS A, et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells [J]. *Nat Cell Biol*, 2007, 9 (6): 654-659.
- [7] FEVRIER B, VILETTE D, ARCHER F, et al. Cells release prions in association with exosomes [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101 (26): 9683-9688.
- [8] HAO S, YE Z, LI F, et al. Epigenetic transfer of metastatic activity by uptake of highly metastatic B16 melanoma cell-released exosomes [J]. *Exp Oncol*, 2006, 28 (2): 126-131.

- [9] AGNATI L F, GUIDOLIN D, GUESCINI M, et al. Understanding wiring and volume transmission [J]. *Brain Res Rev*, 2010, 64 (1): 137 – 159.
- [10] MEDINA M, AVILA J. The role of extracellular Tau in the spreading of neurofibrillary pathology [J]. *Front Cell Neurosci*, 2014, 8:113.
- [11] FIANDACA M S, KAPOGIANNIS D, MAPSTONE M, et al. Identification of preclinical Alzheimer's disease by a profile of pathogenic proteins in neurally derived blood exosomes; a case-control study [J]. *Alzheimers Dement*, 2015, 11 (6): 600 – 607.
- [12] WANG Y, MANDELKOW E. Tau in physiology and pathology [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2016, 17 (1): 5 – 21.
- [13] BRAAK H, BRAAK E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes [J]. *Acta Neuropathol*, 1991, 82 (4): 239 – 259.
- [14] HARTMANN A, MUTH C, DABROWSKI O, et al. Exosomes and the prion protein: more than one truth [J]. *Front Neurosci*, 2017, 11:194.
- [15] THERY C, AMIGORENA S, RAPOSO G, et al. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids [J]. *Curr Protoc Cell Biol*, 2006, 3 (3): 22.
- [16] HARASZTI R A, DIDIOT M C, SAPP E, et al. High-resolution proteomic and lipidomic analysis of exosomes and microvesicles from different cell sources [J]. *J Extracell Vesicles*, 2016, 5: 32570.
- [17] TARDIVEL M, BEGARD S, BOUSSET L, et al. Tunneling nanotube (TNT)-mediated neuron-to neuron transfer of pathological Tau protein assemblies [J]. *Acta Neuropathol Commun*, 2016, 4 (1): 117.
- [18] ASAI H, IKEZU S, TSUNODA S, et al. Depletion of microglia and inhibition of exosome synthesis halt tau propagation [J]. *Nat Neurosci*, 2015, 18 (11): 1584 – 1593.
- [19] SAMAN S, LEE N C, INOYO I, et al. Proteins recruited to exosomes by tau overexpression implicate novel cellular mechanisms linking tau secretion with Alzheimer's disease [J]. *J Alzheimers Dis*, 2014, 40 (Suppl 1): 47 – 70.
- [20] MUNICH S, SOBO-VUJANOVIC A, BUCHSER W J, et al. Dendritic cell exosomes directly kill tumor cells and activate natural killer cells via TNF superfamily ligands [J]. *Oncoimmunology*, 2012, 1 (7): 1074 – 1083.
- [21] DE JONG O G, VERHAAR M C, CHEN Y, et al. Cellular stress conditions are reflected in the protein and RNA content of endothelial cell-derived exosomes [J]. *J Extracell Vesicles*, 2012, 1(1): 1 – 12.
- [22] TRAJKOVIC K, HSU C, CHIANTIA S, et al. Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes [J]. *Science*, 2008, 319 (5867): 1244 – 1247.
- [23] VAN NIEL G, CHARRIN S, SIMOES S, et al. The tetraspanin CD63 regulates ESCRT-independent and -dependent endosomal sorting during melanogenesis [J]. *Dev Cell*, 2011, 21 (4): 708 – 721.
- [24] CARAYON K, CHAOUI K, RONZIER E, et al. Proteolipidic composition of exosomes changes during reticulocyte maturation [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286 (39): 34426 – 34439.
- [25] PEREZ-HERNANDEZ D, GUTIERREZ-VAZQUEZ C, JORGE I, et al. The intracellular interactome of tetraspanin-enriched microdomains reveals their function as sorting machineries toward exosomes [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288 (17): 11649 – 11661.

(2019-03-12 收稿, 2019-05-29 修回)

中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 张启芳