



读书报告

.....张文雅.....

2017-04-28

**Plasma exosomes are enriched in Hsp70 and modulated by stress
and cortisol in rainbow trout**

Erin Faught^{1,2}, Lynsi Henrickson¹, Mathilakath M. Vijayan^{1,2,*}

目录

01 研究背景

02 材料方法

03 实验结果

04 结论分析



01

研究背景



研究背景

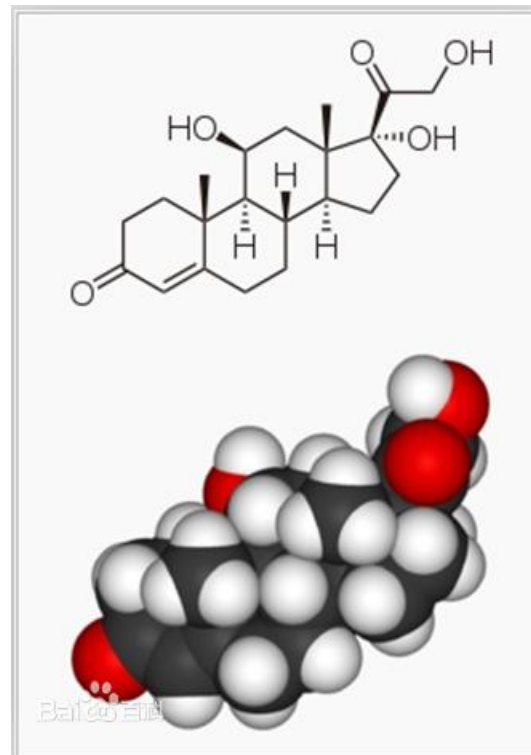
线粒体热激蛋白70又称热休克蛋白70是一种结构上高度保守的多肽，在细胞应激过程中的蛋白质内稳定中起关键作用。能够通过易化变性蛋白的修复，帮助新合成的多肽键的生理折叠与伸展，以及纠正多肽链的错误折叠等途径使细胞的功能和结构得到恢复，具有“分子伴侣”的功能。

最近的研究表明Hsp70也可能在鱼类细胞外释放，但分泌途径远不清楚。Hsp70缺乏从细胞经典出口所必需的前导序列，导致有一种意见，即其在外泌体中被从细胞向外输出。尽管在源自人血浆和哺乳动物细胞培养基的外泌体中已被证实但在较低的脊椎动物中缺乏这种研究。

研究背景

皮质醇(cortisol)是从肾上腺皮质中提取出的是对糖类代谢具有最强作用的肾上腺皮质激素，即属于糖皮质激素的一种。皮质醇有时用来专指基本的“应激激素”。

最近研究表明皮质醇是硬骨鱼中主要循环皮质类固醇，调节鱼类的靶组织Hsp70表达，从而将细胞应激反应与生物应激反应相关联。



皮质醇

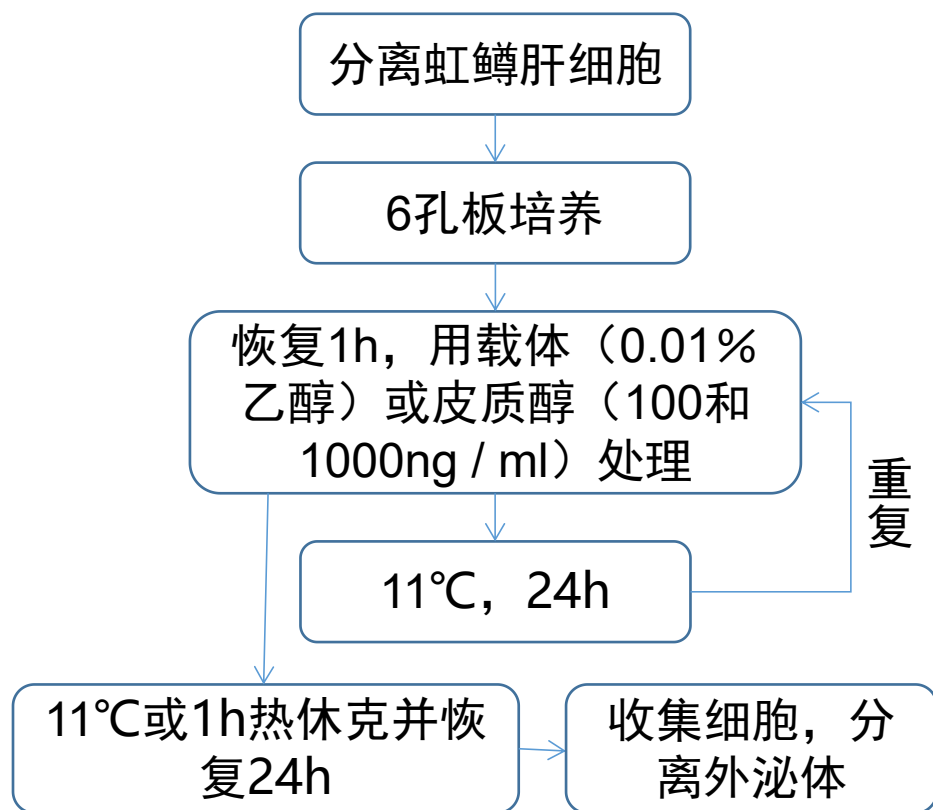


02

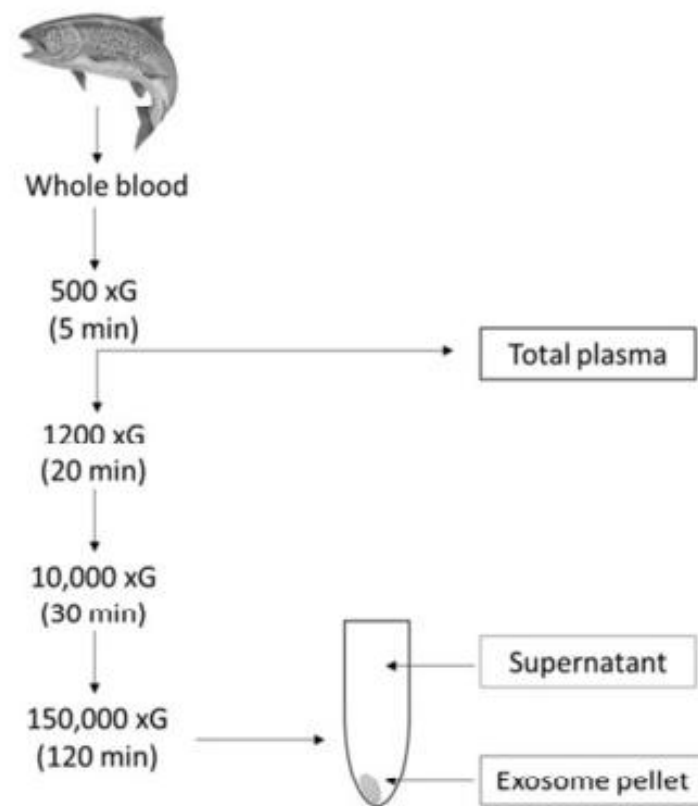
材料方法

材料方法

1、肝细胞研究

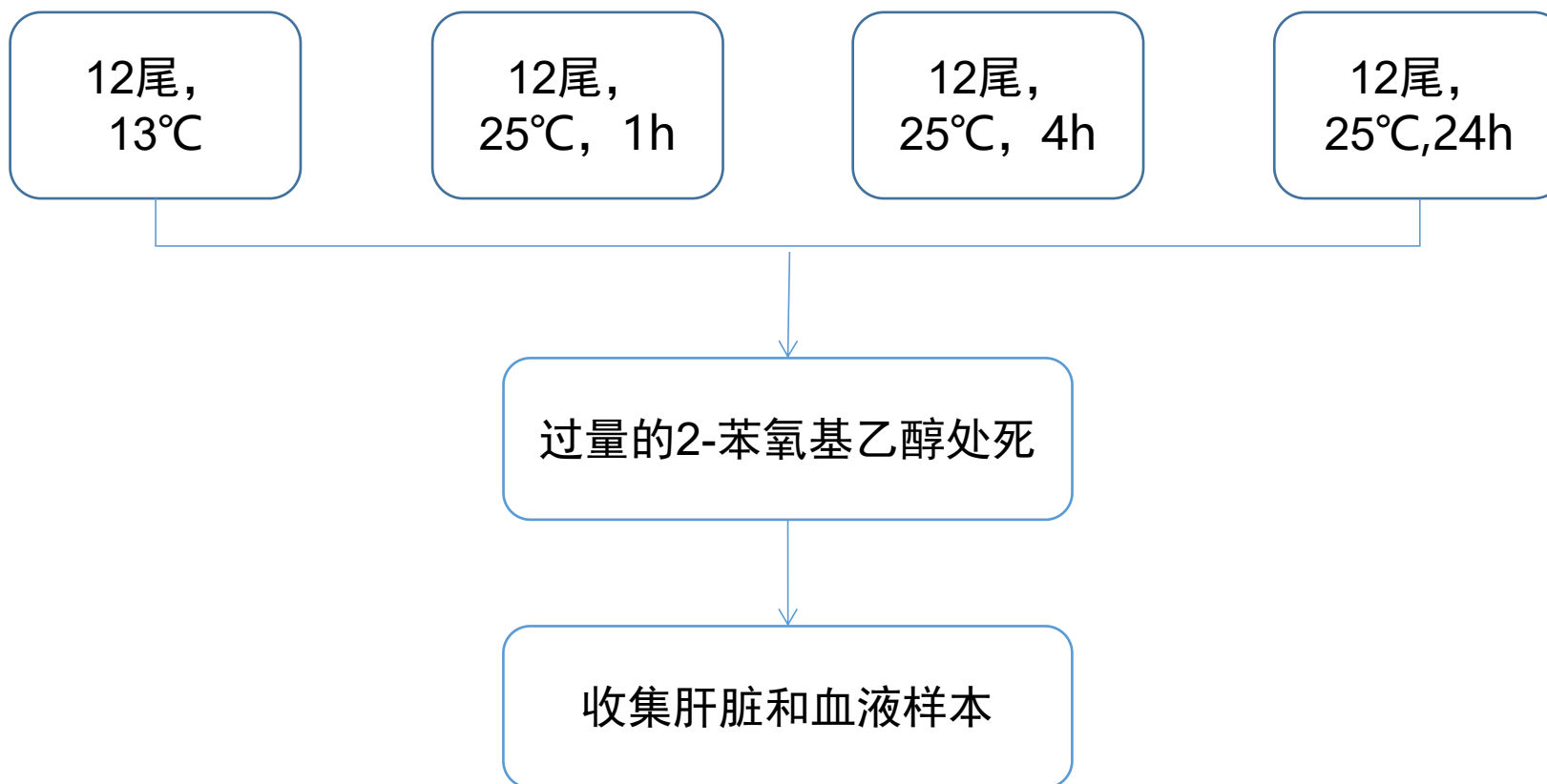


2、外泌体分离



材料方法

3、整体动物研究



材料方法

4、Hsp70酶联免疫吸附测定（ELISA）

用鲑鱼Hsp70重组蛋白包被孔，向其中加入预先培养样品或标准品；孵育过夜后，洗涤孔，并向每个孔中加入在5%脱脂乳中稀释的辣根过氧化物酶缀合的山羊抗兔二抗。孵育和洗涤1小时后，加入检测试剂（41mM TMB，200mM柠檬酸钾，pH4）。1小时后，用0.5M硫酸和8.5M乙酸混合物停止反应。使用多孔分光光度计在450nm读取孔。

材料方法

5、酶活性

为了评估由于热休克引起的细胞渗漏，通过连续分光光度法在室温下50mM咪唑缓冲酶试剂（pH 7.4）中在340nm处测量血浆中的细胞内酶（LDH和AspAT）的活性。。乙酰胆碱酯酶（AChE）活性作为外泌体释放的标记物。在室温下在415nm处测量30分钟。用于计算AChE活性的消光系数为 $13600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

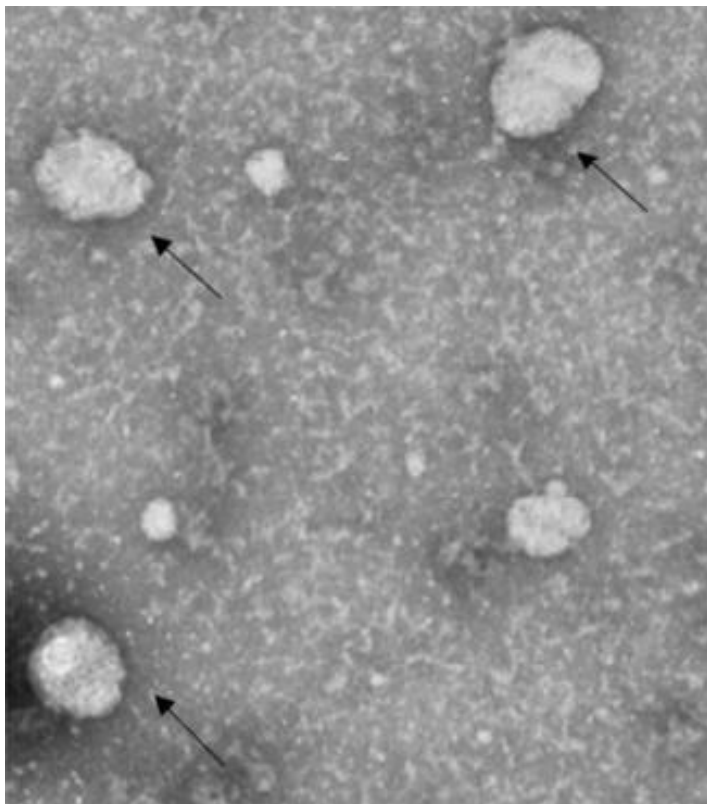
- 乳酸脱氢酶（LDH EC 1.1.1.27）：0.12mM NADH，反应开始于25mM丙酮酸钠。
- 天冬氨酸氨基转移酶（AspAT： EC 2.6.1.1）：7mM α -酮戊二酸，0.025mM吡哆醛5-磷酸，0.12mM NADH和8U / mL苹果酸脱氢酶;反应开始于40mM天冬氨酸。
- 乙酰胆碱酯酶（AChE： EC 3.1.1.7）。0.1mM 5,5-二硫代双 - （2-硝基苯甲酸）（DNTB / Ellman试剂）。用10mM乙酰硫胆碱开始反应。



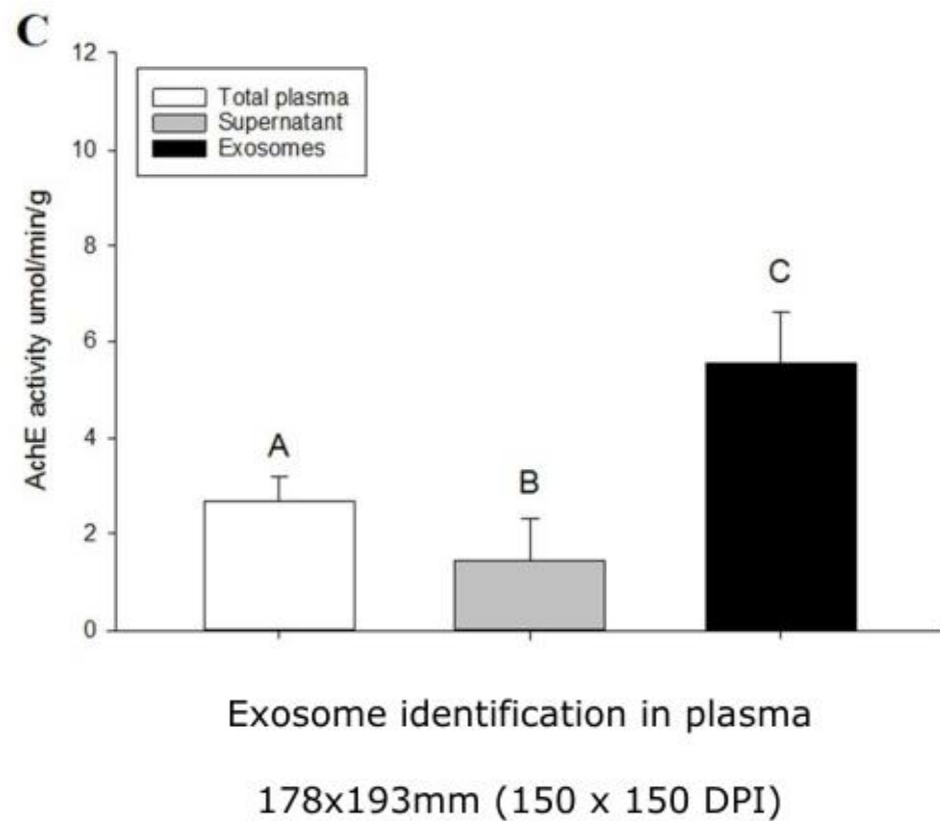
03

实验结果

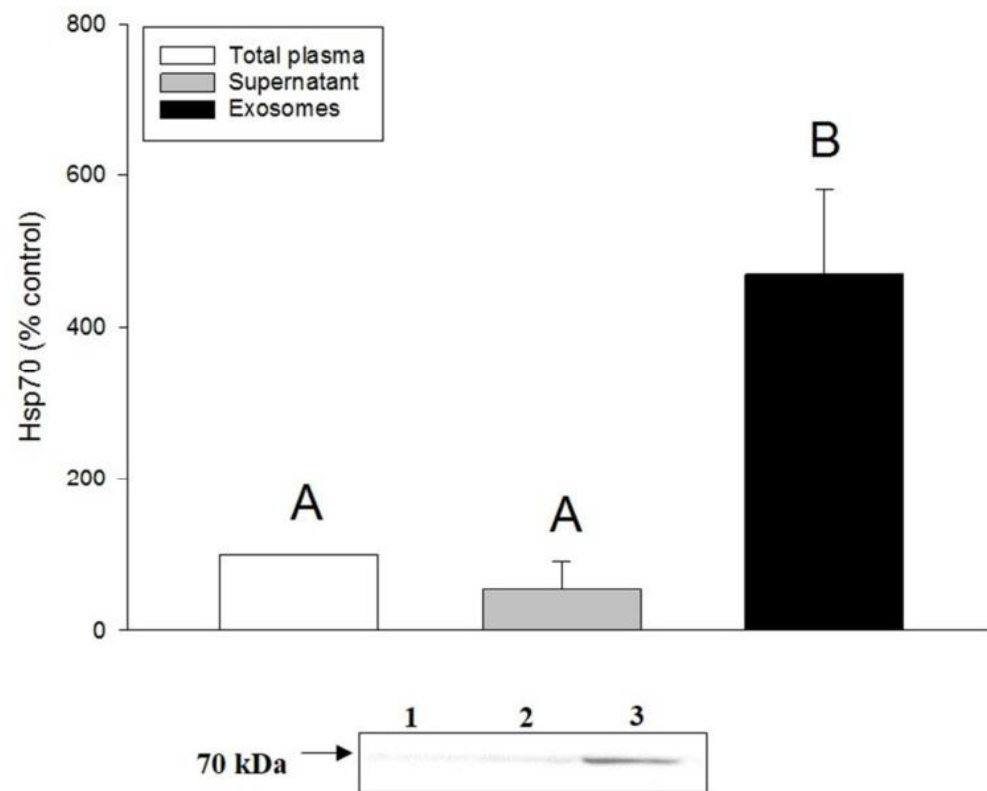
血浆外泌体特征



虹鳟血浆中的外泌体直径平均为 $54\pm 4\text{nm}$ 。



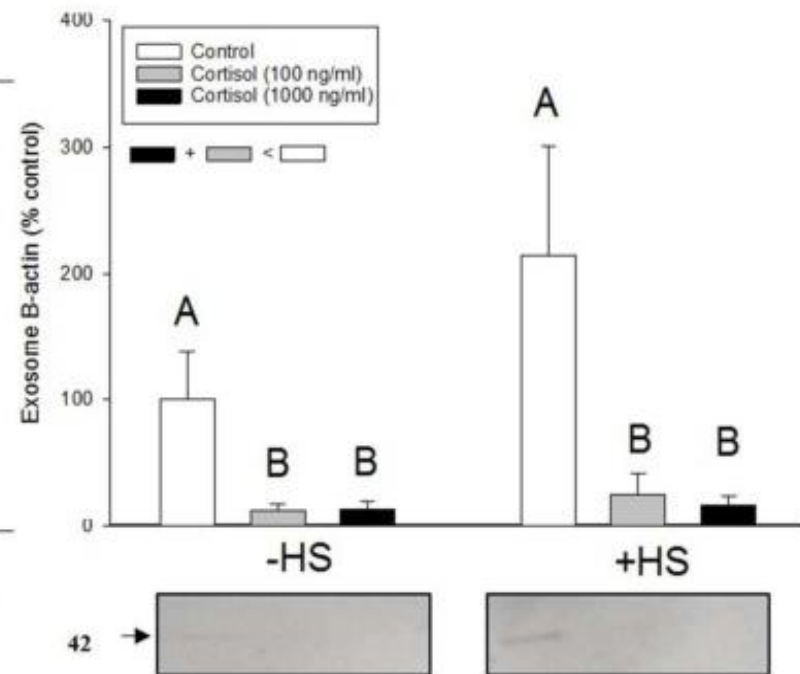
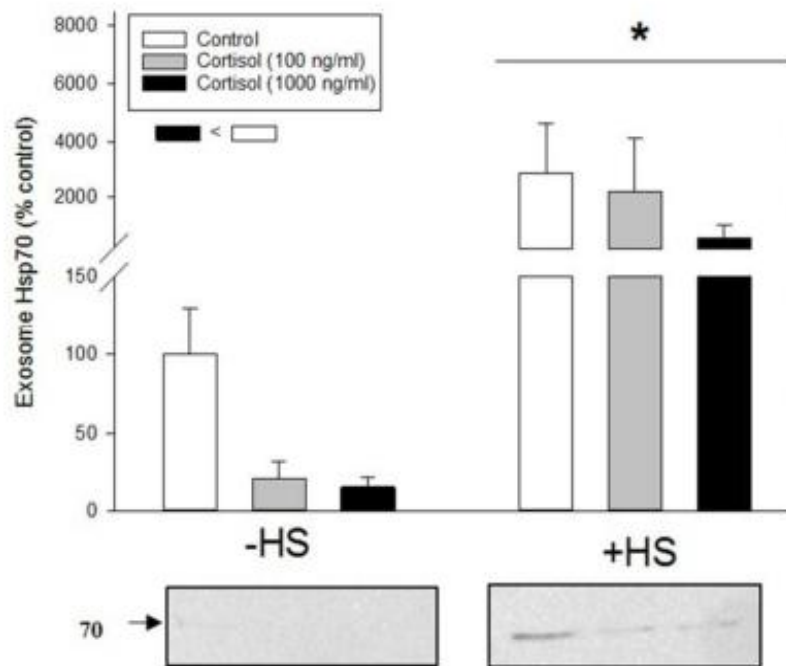
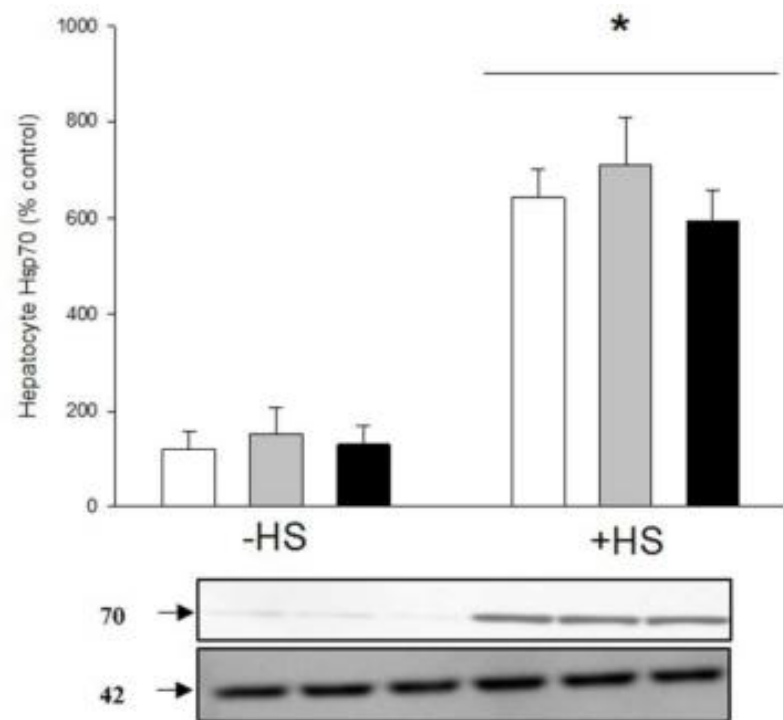
Hsp70在血浆外泌体中的表达



Hsp70 enrichment in the exosome fraction of plasma

133x112mm (150 x 150 DPI)

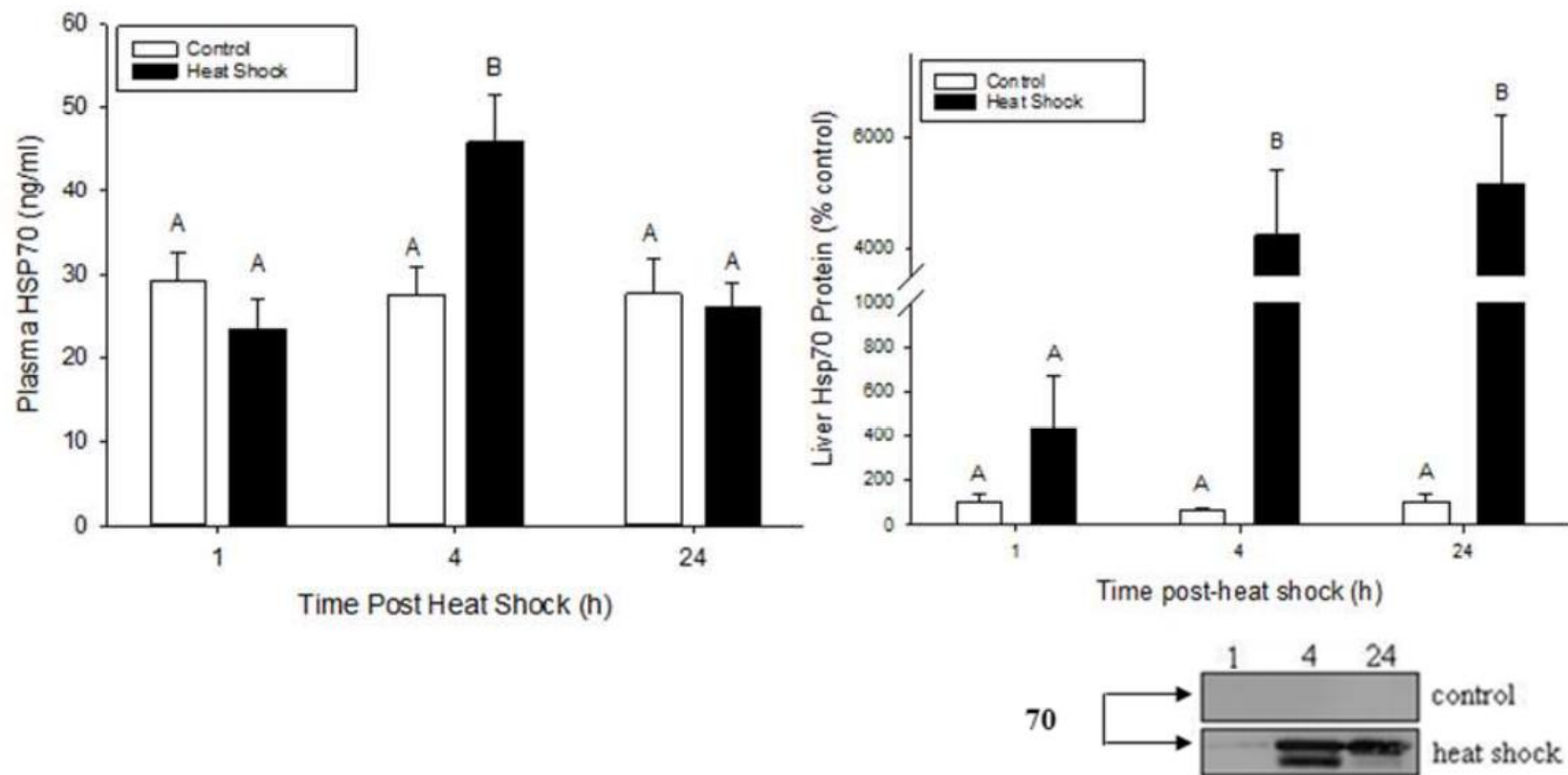
肝细胞外泌体释放



整体动物研究

Time post-stress (h)	Treatment	Protein (mg/ml)	AsAT (U/g)	LDH (U/g)	Cortisol (ng/ml)
1	Control	23.34 ± 2.16	0.34 ± 0.03	1.95 ± 0.21	27.9 ± 5.4
	Heat Shock	20.82 ± 0.80	0.36 ± 0.02	2.17 ± 0.23	26.6 ± 3.1
4	Control	19.79 ± 4.38	0.26 ± 0.03	2.34 ± 0.36	14.0 ± 2.5#
	Heat Shock	22.45 ± 0.23	0.33 ± 0.03	2.35 ± 0.19	29.5 ± 4.2*
24	Control	19.95 ± 2.02	0.26 ± 0.01	1.92 ± 0.21	17.0 ± 1.9
	Heat Shock	23.81 ± 1.02	0.36 ± 0.04	2.11 ± 0.14	24.2 ± 4.2

整体动物研究



Plasma and Liver Hsp70

338x190mm (96 x 96 DPI)



04

结论分析

结论分析

1. 虹鳟血浆（体内）和肝细胞的培养基（体外）中均鉴定了外泌体的存在。
2. 外泌体富集应激蛋白Hsp70。
3. 急性应激（体内和体外热休克）以及应激激素皮质醇的处理具有调节外泌体丰度或其Hsp70含量的潜力。
4. Hsp70阳性的外泌体可能在应激过程中扮演细胞间通讯信号的重要角色。

结论分析

- 皮质醇和热刺激调节外泌体含量还是Hsp含量？
- 血浆中外泌体的来源是什么？



- Hsp70或 β -肌动蛋白能否是外泌体分选合适候选者？



欢迎大家批评指正！

THANK YOU FOR YOUR ATTENTION

