

细胞外囊泡检测分析方法研究进展

张维¹ 俞立² 陈扬^{3*}

(¹昆明医科大学第二附属医院, 昆明 650101; ²生物膜与膜生物工程国家重点实验室, 清华北大生命科学联合中心, 清华大学生命科学学院, 北京 100080; ³北京大学医学部精准医疗多组学研究中心, 北京大学医学部, 北京 100191)

摘要 细胞外囊泡是真核细胞和原核细胞共有的细胞间信号传递的重要媒介。细胞外囊泡可以传递蛋白质、脂质和核酸, 影响供体细胞和受体细胞的生理学、病理学功能。细胞外囊泡存在于多种体液中, 当前已在血液、尿液、唾液、母乳、羊水、脑脊液、胆汁等体液中鉴定到细胞外囊泡的存在。这些体液很多是临床检测的样本, 因此体液中含有的细胞外囊泡可能成为鉴定临床疾病的标志物, 这引起了科研人员的极大兴趣。该综述重点关注了不同体液样品中细胞外囊泡的功能, 并且针对临床样本和细胞外囊泡结构的特殊性, 综述了样品收集、储存、检测等标准流程研究, 为临床医生和科学家在细胞外囊泡研究中提供指引。

关键词 细胞外囊泡; 外泌体; 迁移体; 标志物; 检测方法

Research Progress in Extracellular Vesicles Detection and Analysis

ZHANG Wei¹, YU Li², CHEN Yang^{3*}

(¹The Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650101, China; ²State Key Laboratory of Membrane Biology, Tsinghua University-Peking University Joint Center for Life Sciences, School of Life Sciences, Tsinghua University, Beijing 100084, China; ³Center for Precision Medicine Multi-Omics Research, Peking University Health Science Center, Peking University, Beijing 100191, China)

Abstract Intercellular communication by dynamic extracellular vesicular compartment is a process conserved in both prokaryotes and eukaryotes. Compelling evidence supports the significance of extracellular vesicles that carry proteins, lipids or nucleic acid, in a broad range of physiological and pathological processes. Extracellular vesicles are identified in various body fluids, including blood, urine, saliva, breast milk, amniotic fluid, cerebrospinal fluid and bile, which make this compartment great candidates for biomarkers in disease diagnosis. Here in this review, we addressed the molecular contents and functions of extracellular vesicles in various body fluids. We also reviewed the standard methods for clinical sample collection, storage, handling and quality control for purification of extracellular vesicle to ensure the reliable sources for research.

Keywords extracellular vesicles; exosome; migrasome; biomarker; detection method

细胞间通讯方式包括细胞间直接接触、细胞外分泌和以细胞外囊泡为媒介的近距离或远距离信号传递。细胞外囊泡具有磷脂双分子层结构, 可以保

护其携带的内容物不被环境中的消化酶所破坏, 而细胞外囊泡表面具有特异性黏附分子, 可以引导其到达正确的受体细胞, 以上两个特点为细胞远距离

收稿日期: 2019-04-23 接受日期: 2019-07-16

国家自然科学基金重大研究计划培育计划(批准号: 91754108)、国家自然科学基金面上项目(批准号: 31671395)和科技部国家重点研发计划(批准号: 2018YFA0507102)资助的课题

*通讯作者。Tel: 13811813772, E-mail: chenyang1816185048@bjmu.edu.cn

Received: April 23, 2019 Accepted: July 16, 2019

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.91754108, 31671395), Ministry of Science and Technology of China (Grant No.2018YFA0507102)

*Corresponding author. Tel: +86-13811813772, E-mail: chenyang1816185048@bjmu.edu.cn

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5166>

信号沟通的必要条件。细胞外囊泡包括外泌体、迁移体、微泡和凋亡小体。主要通过细胞外囊泡的形态结构、体积大小、发生方式以及特异性分子标记物来进行分类。细胞外囊泡存在于多种体液中,包括血液、尿液、唾液、母乳、羊水、脑脊液、滑膜液等,检测体液内的细胞外囊泡可指示疾病的进程,这是细胞外囊泡成为临床检测标志物的前提条件。细胞外囊泡中的miRNA和蛋白质是疾病诊断标志物的重要组成部分,也是当前研究最多的部分。miRNA是20~24个核苷酸组成的小RNA,在细胞内具有多个靶基因,一般通过抑制靶基因的表达而发挥功能。miRNA量的变化可能预示疾病的发生。例如,恶性神经胶质瘤的发生上调或下调多种miRNA,其中有几种miRNA的变化可从细胞外囊泡中检测出来^[1]。对病人脑脊液中细胞外囊泡中miRNA的分析可以为掌握神经胶质瘤的发展提供信息。针对细胞外囊泡的蛋白质标志物的研究进展相对缓慢,Glypican 1在胰腺癌细胞系产生的细胞外囊泡中富集,因此有潜力成为胰腺癌诊断的标志物^[2-3]。细胞外囊泡还具有指征帕金森病^[4]、慢性肾病和肾脏肿瘤^[5-6]、恶性胶质瘤^[7]等疾病的潜力。当前对细胞外囊泡的研究手段还很有限,尤其针对细胞外囊泡蛋白的研究,由于缺乏标准化流程和生物学机制验证,开发细胞外囊泡作为临床疾病标志物的研究进展缓慢。本篇综述总结不同体液来源的细胞外囊泡的功能,并且介绍了细胞外囊泡的纯化和检测方法,为临床医生和科研工作者提供参考。

1 细胞外囊泡的定义和分类

1.1 外泌体(exosome)

外泌体最早是在1981年由TRAMS等^[8]发现的,被定义为由细胞释放的具有5'-核苷酸酶活性的囊泡。之后,JOHNSTONE等和STAHL等^[9-10]发现,网织红细胞可分泌类似囊泡,由此定义外泌体是磷脂双分子层包裹的细胞外囊泡,直径为50~100 nm,可以由静息细胞释放,也可被诱导释放。外泌体是通过内体向内凹陷形成多泡体而产生,再由多泡体与细胞膜融合被释放到细胞外。外泌体可以介导细胞间传递mRNA和miRNA、致癌受体(oncogenetic receptor)和HIV颗粒。外泌体还具有抗原呈递、免疫激活和免疫抑制的活性。外泌体的特异性标志物为CD63、CD81、CD9、LAMP1、ALIX、TSG101等。

1.2 迁移体(migrasome)

迁移体是2015年由俞立课题组^[11]报道的新细胞器。在细胞定向迁移的过程中,细胞尾部产生收缩丝。在收缩丝的末端或交叉部位产生直径为1~3 μm的单层膜囊泡结构被称为迁移体。电子显微镜检查发现,在大囊泡中,有时包含了数量为10~300个、直径为50~100 nm的小囊泡。当细胞迁移离开后,迁移体会继续留在原地,直到破裂或被后来的细胞吞噬,释放出供体细胞的内容物,因此从迁移体发生的形态学分析可以发现,迁移体在发生过程中有相当长时间与细胞相连接,可能进行动态的信号沟通,迁移体完全脱离细胞成为细胞外囊泡后,承载细胞间进行物质传递的功能。迁移体的发生需要整合素、TSPAN(tetraspanin)家族等蛋白^[12]。迁移体在斑马鱼早期胚胎发育中信号分子区域微环境的建立上具有重要作用。目前鉴定迁移体表面蛋白有TSPAN4、Integrin等。

1.3 微泡(microvesicle)

1967年,PETER等^[13]从新鲜血浆中通过超速离心分离出血小板灰尘(platelet dust),将其定义为微泡。微泡由细胞膜向外出芽生成,是磷脂双分子层包围的膜结构,直径为100~1 000 nm。微泡是由血小板、红细胞或上皮细胞产生,具有促凝血功能。细胞在静息情况下释放微泡的频率较低,在细胞表面受体被激活、细胞凋亡或细胞内钙离子浓度增高时,微泡的产生会显著增加。

1.4 凋亡小体(apoptotic body)

凋亡小体是由KERR等^[14]在1972年提出的。之后,Robert Horvitz课题组^[15-16]在线虫细胞谱系发育中对凋亡小体的阐述是凋亡小体研究的里程碑。凋亡小体的直径1~5 μm,是细胞凋亡过程中产生的。凋亡小体可被DAPI、PI染色,说明凋亡小体中含有DNA。凋亡小体可水平传递DNA^[17],如致癌基因^[18],在被吞噬细胞摄入时呈递T细胞抗原决定簇,具有免疫抑制作用^[19]。

2 细胞外囊泡的功能

细胞外囊泡在人体中广泛存在,作为细胞间近距离或远距离沟通的媒介,发挥重要的生理和病理功能,细胞外囊泡又存在于多种体液中,是它们可以作为疾病标志物的基础,科学家和临床医生积极研究其在诊断方面的作用。第一个证明细胞外囊泡

与受体细胞相互作用发挥功能的证据是, 前列腺小体(prostasomes)能够促进精子细胞的活度^[20]。之后有研究发现, 红细胞分泌的外泌体作用是丢弃不需要的分子^[21]。外泌体是抗原呈递的媒介, 可激活抗肿瘤免疫反应, 或诱导免疫耐受, 这激起了免疫学家的兴趣。肿瘤细胞或肿瘤微环境的其他细胞分泌外泌体, 通过促进血管新生、肿瘤细胞迁移或肿瘤转移, 促进肿瘤的发展。肿瘤细胞产生的细胞外囊泡也含有免疫抑制分子, 可以抑制T淋巴细胞或者NK细胞, 或者促进调节性T细胞的分化来抑制免疫反应。上皮细胞或神经系统产生细胞外囊泡也具有重要的生理和病生理功能, 如抗原呈递、免疫调节、神经元的存活以及神经系统疾病的病原蛋白释放和传播。近期, 细胞外囊泡在肿瘤免疫方面具有突破性进展。研究表明, 外泌体PD-L1是肿瘤通过抑制T细胞激活而发展的重要调节因素。抑制外泌体PD-L1可以诱导长效抗肿瘤免疫。因此外泌体PD-L1可能成为PD-L1抗体抗药性的重要突破口^[22]。肿瘤来源的外泌体可拮抗抗病毒免疫, 是肿瘤病人免疫功能低下的重要机制^[23]。另外, B细胞产生的细胞外囊泡通过水解化疗处理的肿瘤细胞来源的ATP, 从而抑制CD8阳性的T细胞反应。因此, 减少B细胞产生的细胞外囊泡, 有可能提高化疗的抗肿瘤效果^[24]。新细胞器迁移体, 可以通过向细胞外释放细胞因子CXCL12, 调控斑马鱼胚胎发育过程中的器官形成^[25]。这些研究将细胞外囊泡的研究推向新的高度, 使得我们对外泌体的生理功能和病生理功能了解更加清晰。

3 体液中的细胞外囊泡

体液产生的细胞外囊泡具有不同的来源, 细胞外囊泡的膜结构保护了其携带的内容物不被体液中的酶所降解, 因此这些信息可以被运送到远程进行远程的信号沟通。我们将在下文总结细胞外囊泡在不同的体液中的生理学功能。

3.1 血液中的细胞外囊泡

第一个报道的血液中的细胞外囊泡是血小板灰尘^[13]。20世纪70年代, 在血清中发现直径约55 nm的囊泡^[26]。20世纪80年代的研究发现, 红细胞成熟过程中释放含有铁传递蛋白受体的细胞外囊泡^[27-28]。研究血液中的细胞外囊泡, 建议使用血浆, 因为细胞外囊泡可能会在血液凝固提取血清时产生, 造成分析的假象。然而, 由于血浆中存在有许多分子量较

大的蛋白影响细胞外囊泡的纯度, 从血清中提取的细胞外囊泡更具有可重复性。血液中的细胞外囊泡所含有的蛋白质和RNA以及细胞外囊泡的数量在不同的病理生理条件下非常不同。在特殊生理条件下, 如怀孕情况下, 血液循环中的细胞外囊泡的数量和内容物也表现出不同。血液中的细胞外囊泡在血管生物学、凝血、母胎信息传递、免疫、肿瘤发生和转移等方面都具有重要的功能。

3.2 尿液中的细胞外囊泡

尿液中存在膜成分是在1990年被提出的^[29]。当时认为, 这些膜成分来源于囊泡^[30]。2004年证实尿液中存在细胞外囊泡, 并且估计大概3%的尿总蛋白来源于细胞外囊泡^[31]。肾上皮细胞表达的CD24是尿液细胞外囊泡的标志物^[32]。对尿液中的细胞外囊泡内容物分析发现, 沿着肾上皮从肾小球足细胞至近曲小管、髓袢升支、远曲小管到集合管的细胞均可以释放细胞外囊泡。尿液中的细胞外囊泡不仅来源于肾, 也来源于输尿管、尿道、膀胱的移行上皮、前列腺上皮细胞。对尿液细胞外囊泡的含有的RNA分析表明, 大多数RNA是rRNA, 只有5%的总RNA对应编码蛋白。早先研究表明, 细胞通过释放细胞外囊泡到尿液中来清除衰老的蛋白质。由于通过细胞外囊泡的分泌需要非常多的能量, 细胞外囊泡在进化中被保留下来, 可能承载更重要的功能。细胞外囊泡可能介导了肾单位之间的细胞-细胞信号沟通。例如, AQP2(aquaporin-2)可以通过细胞外囊泡分泌, 因此细胞外囊泡可能介导了AQP2在细胞间的运输, 从而调控肾单元中水的通透性^[30-33]。其他的钠离子转运蛋白以及它们的调控因子也存在于尿液细胞外囊泡中^[34-37]。另外, 尿液细胞外囊泡中蛋白质, 如血管紧张素转换酶, 与肾小管腔的直接作用, 可调控肾素-血管紧张素系统, 调控体液平衡^[31,38]。尿液细胞外囊泡还可提供凝血因子, 减少血液损失, 阻止微生物通过泌尿器官上皮进入体内, 帮助宿主抵抗外界感染^[39]。

3.3 唾液中的细胞外囊泡

唾液中的细胞外囊泡含有蛋白质、RNA, 可以被口腔角蛋白细胞、巨噬细胞吞噬。体外培养的唾液腺上皮细胞可以释放细胞外囊泡, 上皮细胞标志物和粒细胞标志物CD66b也在唾液中的细胞外囊泡上被检测到^[40-41], 表明唾液产生的细胞外囊泡主要是上皮细胞和粒细胞来源。从正常人群唾液中分离

的细胞外囊泡含有凝血因子,因此唾液中的细胞外囊泡可以诱导凝血^[41],人和动物在舔舐流血的伤口时,唾液中的细胞外囊泡可能对于凝血和伤口愈合有作用。

3.4 脑脊液中的细胞外囊泡

脑脊液承载血液和脑之间营养物质转运,保护脑组织的和维持脑循环的重要作用。脑脊液还有去除毒素和其他代谢副产物的作用。研究证实了脑脊液中存在细胞外囊泡,并携带重要的信号分子,因此脑脊液中的细胞外囊泡的研究倍受关注。外泌体可以通过外泌体表面蛋白(如PrP^C)来中和 β -淀粉样蛋白活性,降低 β -淀粉样蛋白的聚集^[42]。然而,脑脊液中细胞外囊泡的功能的研究现在还少之又少。

3.5 滑膜液中的细胞外囊泡

滑膜液是关节腔、腱鞘分泌的起润滑作用的液体,其中含有细胞外囊泡^[43]。滑膜液中细胞外囊泡的研究主要集中在自身免疫性疾病,如风湿性关节炎^[44]。滑膜液中的细胞外囊泡含有IgG和IgM免疫复合物,同时含有整合素可以介导细胞与表面的黏附。滑膜液中的细胞外囊泡代表非细胞间直接接触的新的远程输送自身抗原的模式。

3.6 羊水水中的细胞外囊泡

2007年,科研人员在小鼠和人的羊水中发现细胞外囊泡^[32]。羊水水中的细胞外囊泡可能同时来源于母体和胎儿。胎儿的肾释放表达AQP2、CD24和Annexin-I的细胞外囊泡进入胎尿,而胎尿是羊水的主要组成部分。羊水中的一部分细胞外囊泡表达Annexin-I、HSP70,但是不表达CD24,可能来源于母体^[32]。羊水水中的细胞外囊泡可能调节免疫反应,从而保证胎儿的存活。

3.7 母乳中的细胞外囊泡

母乳是一个非常复杂的体液,富含免疫组分,影响着婴儿免疫系统的发育。人母乳中含有细胞外囊泡^[45],但是细胞外囊泡的来源还不确定。母乳中的细胞外囊泡可能来源于乳腺上皮细胞,或者来源于身体其他组织,通过血液循环进入母乳。有意思的是,在哺乳期前6个月,免疫相关的miRNA(miR-181a和miR-17)在母乳中的细胞外囊泡中高表达。深度测序技术鉴定发现,母乳细胞外囊泡中含有许多miRNA与免疫功能相关,表明这样的细胞外囊泡通过母乳由母体传递给婴儿,可能对于婴儿的免疫系统发育起重要的作用^[46]。

4 临床样品的细胞外囊泡研究的标准化流程

高纯度的细胞外囊泡是准确鉴定细胞外囊泡内容物、研究细胞外囊泡功能的前提。当前,越来越多的研究用纯化的细胞外囊泡进行细胞和小鼠实验来研究细胞外囊泡的功能。细胞外囊泡纯化和鉴定技术有限,因此许多研究中认为是细胞外囊泡本身的功能,事实上是由在细胞外囊泡纯化过程中非细胞外囊泡的污染引起的,例如蛋白聚集体、病毒等与细胞外囊泡具有类似大小或者密度的结构。另外,标准化流程和技术推广不够,导致多方发表的细胞外囊泡的组学数据无法整合分析。以上问题亟须改进和提升,尤其在临床相关的样品采集、处理和分析技术方面。我们以临床样品中的血液为例,总结临床样品采集、前处理、存储、细胞外囊泡的分离、鉴定、分析等几个方面的技术细节,期待为临床医生在细胞外囊泡的研究提供可靠的准则。

4.1 样品收集

样品采集的质量是在后期分析中引入不确定性的主要因素。因为血液中,尤其血小板,在样品收集和处理时非常容易被激活并释放细胞外囊泡,因此在分析前应当避免血小板被激活。血浆是细胞外囊泡研究的较好来源。在收集血清时凝血会引起细胞外囊泡的释放,影响对血液中原有的细胞外囊泡的分析。收集血浆需要抗凝剂,抗凝剂的使用一般采用EDTA、氟化钠/草酸钾或柠檬酸盐。目前,柠檬酸盐(终浓度为0.109 mol/L)是最常用的抗凝剂,被International Society on Thrombosis and Haemostasis推荐。EDTA对于后期针对细胞外囊泡的RNA分析是最好的选择,而抗凝剂肝素则会影响到后续PCR反应。因此,选择抗凝剂需要同时考虑在体外抑制细胞外囊泡的释放和后续的分析需要。收集步骤分两步。(1)在室温下收集血液到塑料收集管中。将收集管装满,来保证合适的血液与抗凝剂比例。在运输过程中将收集管垂直放置。(2)收集血浆。血液收集和后续的离心收集血浆步骤最好在几小时之内完成。抗凝剂处理的血液先离心去处红细胞,淋巴细胞和血小板。血小板的去除是至关重要的,因为在冻融过程中血小板的激活会释放细胞外囊泡。因为单次离心可能会残留很多血小板,因此需要二次离心。用2次连续的2 500 \times g、15 min离心步骤,收集血浆到干净的离心管中,将无血小板的血浆进行下

面的分析。

4.2 样品储存

细胞外囊泡在血浆中是比较稳定的, 然而冻融可能会对细胞外囊泡造成影响。冻存需要在液氮中进行, 并且在 -80°C 保存, 37°C 复苏, 避免多次冻融。

4.3 细胞外囊泡的分离纯化

细胞外囊泡具有不同的生物物理或生物化学性质, 包括大小、密度、形状、电荷、表面抗原, 可作为分离细胞外囊泡的基础。不同的分离方法影响细胞外囊泡的纯度和浓度, 不同的方法也可以互相结合, 取其优势。有效分离纯化方法是后期细胞外囊泡的分析是否准确的决定性因素。在分离操作后, 要在细胞外囊泡的大小、完整性、形态、回收率、浓度、纯度、活性这些方面对分离方法进行评估。

4.3.1 差速离心 差速离心是基于大小和密度分离细胞外囊泡的方法, 通过循序渐进提高离心力分别沉淀细胞($<600 \times g$)、细胞碎片($<1\ 500 \times g$)、大体积细胞外囊泡($10\ 000\sim 20\ 000 \times g$)和小体积细胞外囊泡($100\ 000\sim 200\ 000 \times g$)。对于具有黏度的样品, 例如血浆, 要先将样品稀释2倍, 再进行差速离心。差速离心方法有其缺陷: (1)不能达到绝对分离细胞外囊泡的目的。细胞外囊泡的沉降率也取决于其形状、密度; (2)可能会造成细胞外囊泡的团聚或者破坏, 这样会共同沉淀一些蛋白聚集体或者病毒; (3)回收率在2%~80%, 使得实验组间的比较困难; (4)耗费时间并且低通量, 不适用于临床。

4.3.2 密度梯度离心 该方法基于细胞外囊泡的大小和密度对细胞外囊泡进行分离。蔗糖或碘克沙醇是最常用的介质。相对于蔗糖, 碘克沙醇具有等渗、惰性、无毒和黏度低的优势。等渗表示该介质的渗透压与细胞外囊泡相同。另外, 不同的密度层的渗透压相同, 因此在离心过程中样品处于不同层的时候不会出现体积的变化。密度梯度离心的回收率在10%~50%, 有效减少蛋白或其他颗粒的污染, 但是依然因为耗时长、通量低而不适合临床应用。

4.3.3 尺寸排阻色谱法(size exclusion chromatography) 尺寸排阻色谱法是使用柱料, 基于细胞外囊泡尺寸分离的方法, 大多数的细胞外囊泡会在可溶性物质流出前流出。分离样品的尺寸取决于柱料基质的选择, 例如Sephrose 2B的柱子孔径为60 nm。该方法可以去除99%的可溶性血浆蛋白和95%的高密度脂蛋白, 也不会造成细胞外囊泡的团聚, 保证了细胞外

囊泡的完整性。但是具有同样尺寸的其他非细胞外囊泡成分会造成污染, 例如病毒、大蛋白质复合物。该方法可达到40%~90%的细胞外囊泡回收率, 速度快并且价格便宜, 使其可以在临床上应用。缺陷是会大量稀释样品, 不能够获得浓度高的样品。

4.3.4 滤膜分离 滤膜可以使细胞外囊泡与可溶性成分分开。样品通过滤膜需要加压, 或者施加离心力, 外力施加可能会导致细胞外囊泡的变形, 因此体积比滤膜孔径大的细胞外囊泡也可能会在外力的作用下通过滤膜, 导致引入污染。滤膜分离在实验时间上比较适合临床应用, 而且处理的样品体积也比较大, 回收率也较高, 因此可以用于临床上浓缩和分离细胞外囊泡。

4.3.5 亲和纯化 大多数亲和纯化方法均使用结合在一个固定表面, 例如柱子(Beads)或者芯片等的单克隆抗体, 来捕获具有特异性表面蛋白的细胞外囊泡。亲和纯化可以根据表面蛋白的不同, 将细胞外囊泡细致分类。虽然亲和纯化反应耗时长, 有时需要几个小时, 但是可以高通量操作, 因此可作临床应用。

5 细胞外囊泡的检测方法

在分离纯化细胞外囊泡操作后, 对其内容物进行测序或蛋白质谱分析之前, 需要对细胞外囊泡的形态、纯度等进行检测。这是保证后期分析数据可靠性的必要条件。

5.1 电子显微镜检测

电子显微镜检测是细胞外囊泡形态学检测的金标准。透射电镜分辨率达1~3 nm, 扫描电镜分辨率为5 nm。观察电镜样品时, 可以测量细胞外囊泡的直径。免疫金标记的方法可以用于标记细胞外囊泡表面的蛋白。冷冻电镜可以观察细胞外囊泡的双层膜结构, 以便区分细胞外囊泡和其他非囊泡结构。电子显微镜可以揭示纯化的单个细胞外囊泡或者组织中的凋亡小体的结构^[13-14,47]。

5.2 流式细胞术检测

流式细胞术是分析细胞外囊泡的重要方法。流式分析是根据细胞外囊泡的大小或所携带的荧光信号对粒子进行分选的。细胞外囊泡的大小主要通过其散射光来分析, 细胞外囊泡所携带的荧光主要是通过激光激发下细胞外囊泡的发射光来分析。细胞外囊泡散射光的强度弱, 有时低于背景噪音。细胞外囊泡可以被带荧光的抗体所标记, 从而在流式分

析中被检测,然而单个细胞外囊泡由于体积小,表面可被标记的蛋白丰度低,因此荧光强度低于大多数流式细胞仪的分辨率。因此流式分析需要在很多背景噪音下分辨细胞外囊泡的信号。

5.3 纳米颗粒跟踪分析技术(nanoparticle tracking analysis)

纳米颗粒跟踪分析技术可以分析悬浮的微管粒子的尺寸和浓度,针对生物体液,该分析方法在细胞外囊泡的尺寸分辨率上优于流式。然而该方法不能够区分囊泡结构或非细胞外囊泡的其他结构。

6 结语

细胞外囊泡存在于多种体液中,携带特征性标志物,发挥广泛的功用,因此科学家和医生对于细胞外囊泡领域的兴趣在过去的10年里呈指数增长。细胞外囊泡的研究对新的诊断和医疗转化方面有很大的潜力,然而至今还未有显著性的突破。如上所述,我们对细胞外囊泡发生的分子机制、内容物的分选等方面的理解还处于初级阶段,同时对于收集临床样本的细胞外囊泡的标准化操作和检测技术掌握得还不成熟,以上两点制约了细胞外囊泡成为临床可用的诊断、治疗工具的研发。针对细胞外囊泡的精确分子机制的解析、分离纯化技术的革新和针对细胞外囊泡的多组学分析是未来细胞外囊泡研究的方向。标准化的操作流程的建立,使得多中心获得的多组学数据具备联合分析的可能,同时也是研究细胞外囊泡在临床应用的必要条件。我们期待,本篇综述可以为细胞外囊泡领域的科研工作者和临床医生提供技术上的规范和引导。

参考文献 (References)

- [1] 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): 654-9.
- [2] MELO S A, LUECKE L B, KAHLERT C, et al. Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer [J]. *Nature*, 2015, 523(7559): 177-82.
- [3] LU H, NIU F, LIU F, et al. Elevated glypican-1 expression is associated with an unfavorable prognosis in pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. *Cancer Med*, 2017, 6(6): 1181-91.
- [4] YUAN L, LI J Y. Exosomes in Parkinson's disease: current perspectives and future challenges [J]. *ACS Chem Neurosci*, 2019, 10(2): 964-72.
- [5] KHURANA R, RANCHES G, SCHAFFERER S, et al. Identification of urinary exosomal noncoding RNAs as novel biomarkers in chronic kidney disease [J]. *RNA*, 2017, 23(2): 142-52.
- [6] KRAUSE M, SAMOYLENKO A, VAINIO S J. Exosomes as renal inductive signals in health and disease, and their application as diagnostic markers and therapeutic agents [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2015, 3: 65.
- [7] MALLAWARATCHY D M, HALLAL S, RUSSELL B, et al. Comprehensive proteome profiling of glioblastoma-derived extracellular vesicles identifies markers for more aggressive disease [J]. *J Neurooncol*, 2017, 131(2): 233-44.
- [8] TRAMS E G, LAUTER C J, SALEM N, JR., et al. Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1981, 645(1): 63-70.
- [9] PAN B T, TENG K, WU C, et al. Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes [J]. *J Cell Biol*, 1985, 101(3): 942-8.
- [10] HARDING C, HEUSER J, STAHL P. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes [J]. *J Cell Biol*, 1983, 97(2): 329-39.
- [11] MA L, LI Y, PENG J, et al. Discovery of the migrasome, an organelle mediating release of cytoplasmic contents during cell migration [J]. *Cell Res*, 2015, 25(1): 24-38.
- [12] WU D, XU Y, DING T, et al. Pairing of integrins with ECM proteins determines migrasome formation [J]. *Cell Res*, 2017, 27(11): 1397-400.
- [13] WOLF P. The nature and significance of platelet products in human plasma [J]. *Br J Haematol*, 1967, 13(3): 269-88.
- [14] KERR J F, WYLLIE A H, CURRIE A R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics [J]. *Br J Cancer*, 1972, 26(4): 239-57.
- [15] FIXSEN W, STERNBERG P, ELLIS H, et al. Genes that affect cell fates during the development of *Caenorhabditis elegans* [J]. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 1985, 50: 99-104.
- [16] SULSTON J E, HORVITZ H R. Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans* [J]. *Dev Biol*, 1977, 56(1): 110-56.
- [17] HOLMGREN L, SZELES A, RAJNAVOLGYI E, et al. Horizontal transfer of DNA by the uptake of apoptotic bodies [J]. *Blood*, 1999, 93(11): 3956-63.
- [18] BERGSMEDH A, SZELES A, HENRIKSSON M, et al. Horizontal transfer of oncogenes by uptake of apoptotic bodies [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(11): 6407-11.
- [19] SAVILL J, DRANSFIELD I, GREGORY C, et al. A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses [J]. *Nat Rev Immunol*, 2002, 2(12): 965-75.
- [20] STEGMAYR B, RONQUIST G. Promotive effect on human sperm progressive motility by prostasomes [J]. *Urol Res*, 1982, 10(5): 253-7.
- [21] HARDING C V, HEUSER J E, STAHL P D. Exosomes: looking back three decades and into the future [J]. *J Cell Biol*, 2013, 200(4): 367-71.
- [22] POGGIO M, HU T, PAI C C, et al. Suppression of exosomal PD-L1 induces systemic anti-tumor immunity and memory [J]. *Cell*, 2019, 177(2): 414-27, e13.
- [23] GAO L, WANG L, DAI T, et al. Tumor-derived exosomes antagonize innate antiviral immunity [J]. *Nat Immunol*, 2018, 19(3): 233-45.

- [24] ZHANG F, LI R, YANG Y, et al. Specific decrease in B-cell-derived extracellular vesicles enhances post-chemotherapeutic CD8⁺ T cell responses [J]. *Immunity*, 2019, 50(3): 738-50, e7.
- [25] JIANG D, JIANG Z, LU D, et al. Migrasomes provide regional cues for organ morphogenesis during zebrafish gastrulation. *Nat Cell Biol*, 2019, 21(8): 966-77.
- [26] BENZ E W, JR., MOSES H L. Small, virus-like particles detected in bovine sera by electron microscopy [J]. *J Natl Cancer Inst*, 1974, 52(6): 1931-4.
- [27] HARDING C, HEUSER J, STAHL P. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes [J]. *J Cell Biol*, 1983, 97(2): 329-39.
- [28] PAN B T, JOHNSTONE R M. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes *in vitro*: selective externalization of the receptor [J]. *Cell*, 1983, 33(3): 967-78.
- [29] SATO S, ZHU XL, SLY WS. Carbonic anhydrase isozymes IV and II in urinary membranes from carbonic anhydrase II-deficient patients [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87(16): 6073-6.
- [30] KANNO K, SASAKI S, HIRATA Y, et al. Urinary excretion of aquaporin-2 in patients with diabetes insipidus [J]. *N Engl J Med*, 1995, 332(23): 1540-5.
- [31] PISITKUN T, SHEN R F, KNEPPER M A. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(36): 13368-73.
- [32] 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): 1095-102.
- [33] KAMSTEEG E J, HENDRIKS G, BOONE M, et al. Short-chain ubiquitination mediates the regulated endocytosis of the aquaporin-2 water channel [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(48): 18344-9.
- [34] HOSSEINI-BEHESHTI E, PHAM S, ADOMAT H, et al. Exosomes as biomarker enriched microvesicles: characterization of exosomal proteins derived from a panel of prostate cell lines with distinct AR phenotypes [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2012, 11(10): 863-85.
- [35] MCKEE J A, KUMAR S, ECELBARGER C A, et al. Detection of Na⁺ transporter proteins in urine [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2000, 11(11): 2128-32.
- [36] ESTEVA-FONT C, WANG X, ARS E, et al. Are sodium transporters in urinary exosomes reliable markers of tubular sodium reabsorption in hypertensive patients? [J]. *Nephron Physiol*, 2010, 114(3): p25-34.
- [37] OLIVIERI O, CHIECCHI L, PIZZOLO F, et al. Urinary prosta-sin in normotensive individuals: correlation with the aldosterone to renin ratio and urinary sodium [J]. *Hypertens Res*, 2013, 36(6): 528-33.
- [38] GONZALES P A, PISITKUN T, HOFFERT J D, et al. Large-scale proteomics and phosphoproteomics of urinary exosomes [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2009, 20(2): 363-79.
- [39] KLEINJAN A, BOING A N, STURK A, et al. Microparticles in vascular disorders: how tissue factor-exposing vesicles contribute to pathology and physiology [J]. *Thromb Res*, 2012, 130 Suppl 1: S71-3.
- [40] GONZALEZ-BEGNE M, LU B, HAN X, et al. Proteomic analysis of human parotid gland exosomes by multidimensional protein identification technology (MudPIT) [J]. *J Proteome Res*, 2009, 8(3): 1304-14.
- [41] BERCKMANS R J, STURK A, VAN TIENEN L M, et al. Cell-derived vesicles exposing coagulant tissue factor in saliva [J]. *Blood*, 2011, 117(11): 3172-80.
- [42] AN K, KLYUBIN I, KIM Y, et al. Exosomes neutralize synaptic-plasticity-disrupting activity of Abeta assemblies *in vivo* [J]. *Mol Brain*, 2013, 6: 47.
- [43] GYORGY B, SZABO T G, TURIK L, et al. Improved flow cytometric assessment reveals distinct microvesicle (cell-derived microparticle) signatures in joint diseases [J]. *PLoS One*, 2012, 7(11): e49726.
- [44] SKRINER K, ADOLPH K, JUNGBLUT P R, et al. Association of citrullinated proteins with synovial exosomes [J]. *Arthritis Rheum*, 2006, 54(12): 3809-14.
- [45] LASSER C, ALIKHANI V S, EKSTROM K, et al. Human saliva, plasma and breast milk exosomes contain RNA: uptake by macrophages [J]. *J Transl Med*, 2011, 9: 9.
- [46] ZHOU Q, LI M, WANG X, et al. Immune-related microRNAs are abundant in breast milk exosomes [J]. *Int J Biol Sci*, 2012, 8(1): 118-23.
- [47] ZHAO X, LEI Y, ZHENG J, et al. Identification of markers for migrasome detection [J]. *Cell Discov*, 2019, 5: 27.