

健康人血浆EVs与非EVs组分完整RNA的定量分布研究

甘馨怡 林欣仪* 肖旭煌 郭嘉慧 崔毅峙 王通*

(暨南大学, 生命科学技术学院, 天然生物活性分子与新药发现基础研究卓越中心,
生物活性分子与成药性优化全国重点实验室, 广州 510632)

摘要 该研究旨在利用优化后的二分式尺寸排阻色谱(dSEC)技术实现血浆中细胞外囊泡(EVs)与非EVs组分的高效、高纯度分离, 再利用二代测序技术系统绘制健康人血浆中EVs与非EVs组分的高完整RNA分布图谱, 揭示两类组分中高完整RNA的分布特征与规律。该研究采用dSEC法分离血浆EVs与非EVs组分, 依据MISEV2023指南, 结合纳米颗粒示踪分析、免疫印迹及透射电镜技术对分离组分进行系统表征; 通过下一代测序开展转录组分析, 以原始counts>10为标准进行RNA定量, 以测序覆盖率>95%为阈值筛选高完整RNA, 系统比较两类组分中RNA的组成、完整性及高完整RNA的分布差异。结果显示, dSEC法可高效分离获得高纯度血浆EVs, 其颗粒-蛋白比显著高于非EVs组分, 且分离所得EVs符合MISEV2023标准; EVs与非EVs组分中分别鉴定出31 284个和39 224个稳定定量RNA, 两类组分共有的稳定定量RNA为29 108个; 两组分均以长链非编码RNA(lncRNA)和编码蛋白RNA为主要RNA类型, 且约99%的该类长链RNA呈片段化形式存在, 在编码RNA、lncRNA、假基因及miRNA等主要RNA生物类型的高完整RNA数量分布上, 两组分无显著差异; 全长RNY4是唯一在EVs组分中高丰度稳定表达(TPM均值为2 019.55)且在非EVs组分中完全未被检出的RNA分子。综上所述, 该研究系统揭示了健康人血浆EVs与非EVs组分中高完整RNA的分布规律, 明确了两类组分的RNA组成及完整性特征, 同时发现了全长RNY4在血浆EVs中具有特异性的全长表达特征。该研究为深入理解血浆RNA在EVs与非EVs载体中的分布特征提供了新的实验数据, 也为EVs RNA的相关研究及液体活检检测体系的标准化奠定了基础。

关键词 血浆; 细胞外囊泡; RNA谱分析; 完整RNA

Quantitative Distribution of Intact RNA in EVs and Non-EVs Fractions from Healthy Human Plasma

GAN Xingyi, LIN Xinyi*, XIAO Xuhuang, GUO Jiahui, CUI Yizhi, WANG Tong*

(State Key Laboratory of Bioactive Molecules and Druggability Assessment, Guangdong Basic Research Center of Excellence for Natural Bioactive Molecules and Discovery of Innovative Drugs, College of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract This study aims to utilize the optimized dSEC (dichotomic size-exclusion chromatography) technique to achieve efficient, high-purity separation of plasma EVs (extracellular vesicles) and non-EVs components.

收稿日期: 2026-02-13

接受日期: 2026-04-23

广州市科技计划(批准号: 202102070001)和广东省基础与应用基础研究基金(面上项目)(批准号: 2023A1515011874、2025A1515012532、2025A1515010405)资助的课题

*通信作者。Tel: 020-85221997, E-mail: linxinyi@email.jnu.edu.cn; Tel: 020-85225960, E-mail: tongwang@email.jnu.edu.cn

Received: February 13, 2026 Accepted: April 23, 2026

This work was supported by the Science and Technology Project in Guangzhou (Grant No.202102070001) and the Guangdong Basic and Applied Basic Research Foundation (Grant No.2023A1515011874, 2025A1515012532, 2025A1515010405)

*Corresponding authors. Tel: +86-20-85221997, E-mail: linxinyi@email.jnu.edu.cn; Tel: +86-20-85225960, E-mail: tongwang@email.jnu.edu.cn

Plasma EVs and non-EVs components were isolated using the dSEC method. The isolated fractions were systematically characterized according to MISEV2023 guidelines, utilizing NTA (nanoparticle tracking analysis), Western blot, and TEM (transmission electron microscopy). Transcriptome analysis was conducted via NGS (next-generation sequencing). RNA quantification was defined by raw counts > 10, and high-integrity RNAs were screened using a sequencing coverage threshold > 95%. The composition, integrity, and distribution differences of high-integrity RNAs between the two fractions were systematically compared. The dSEC method efficiently isolated high-purity plasma EVs, which exhibited a significantly higher particle-to-protein ratio than the non-EVs fraction and met MISEV2023 standards. A total of 31 284 and 39 224 stably quantified RNAs were identified in the EVs and non-EVs fractions, respectively, with 29 108 RNAs common to both. LncRNAs (long non-coding RNAs) and protein-coding RNAs were the predominant RNA biotypes in both fractions; however, approximately 99% of these long RNAs existed in a fragmented form. No significant differences were observed between the two fractions regarding the abundance distribution of high-integrity RNAs across major biotypes, including coding RNAs, lncRNAs, pseudogenes, and miRNAs. Notably, full-length RNY4 was the only RNA molecule found to be stably expressed with high abundance in the EVs fraction (mean TPM was 2 019.55) while being completely undetected in the non-EVs fraction. This study systematically reveals the distribution patterns of high-integrity RNA in healthy human plasma EVs versus non-EVs components, clarifying their RNA composition and integrity profiles. Crucially, this study identified a specific full-length expression signature of RNY4 in plasma EVs. These findings provide novel experimental data for understanding RNA distribution across different plasma carriers and lay a foundation for standardizing EVs RNA research and liquid biopsy detection systems.

Keywords plasma; EVs (extracellular vesicles); RNA profiling; intact RNA

细胞外囊泡 (extracellular vesicles, EVs) 是由细胞释放、由脂质双分子层包裹且不具备自主复制能力的纳米级颗粒^[1]。尽管既往研究常根据生物发生途径将其细分为外泌体 (exosomes)、微囊泡 (microvesicles) 等亚类, 或依据理化性质 (如粒径、密度) 将其划分为小/大 EVs 或轻/重 EVs, 但鉴于生物发生途径在实际操作中难以精确界定, 且特定理化性质的边界尚存争议, 多个国际国内专家共识均建议优先采用通用术语 EVs 以涵盖各类亚群^[1-2]。作为细胞间通讯的关键介质, EVs 继承了亲本细胞的蛋白质、脂质、核酸及代谢产物等生物活性分子, 不仅在生理与病理过程中发挥重要的调控作用, 更因其良好的生物溯源特性而成为极具潜力的研究热点^[3-9]。

近年来, 血浆来源的 EVs RNA 在液体活检领域展现出巨大的临床应用前景, 为疾病早期诊断、疗效评估及预后判断提供了潜在的非侵入性生物标志物^[10-12]。然而, EVs RNA 标志物的开发与临床转化仍面临关键挑战。常规分离方法如超速离心 (ultracentrifugation, UC)、尺寸排阻色谱 (size-exclusion chromatography, SEC) 等, 所获得的样本中常伴随高密度脂蛋白 (high-density lipoprotein, HDL) 等脂蛋白颗粒^[13] 以及其他非 EVs 来源 RNA 的污染, 严重影响 EVs RNA 特异

性鉴定及跨研究数据的可比性与可重复性^[14-15]。

同时, 血浆中 EVs RNA 普遍呈现高度片段化的特征^[16-17], 其完整性易受样本处理、储存及提取过程中 RNA 降解因素的影响, 进一步削弱了候选标志物在检测中的稳健性。当前研究多聚焦于总 RNA 的组成分析, 而忽略了 RNA 完整性对标志物可重复检出的关键作用。同时, 多数分离技术难以同步获取高纯度的 EVs 与非 EVs 组分, 限制了从系统层面阐明 RNA 在不同血浆载体间分布特征的能力。

针对上述问题, 本研究采用具备良好临床可及性的二分式尺寸排阻色谱 (dichotomic size-exclusion chromatography, dSEC) 方法, 实现对健康人血浆中 EVs 与非 EVs 组分的高效、同步分离^[18]。基于下一代测序技术, 我们以高完整 RNA (测序覆盖度 > 95%) 为分析对象, 系统绘制其在两类组分中的分布图谱, 旨在识别在 EVs 中特异性存在、完整性高的 RNA 分子, 为 EVs RNA 液体活检的标准化与临床转化提供新的实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 临床血浆样品 本研究经暨南大学附属第

一医院伦理委员会批准(批件号: KY-2025-093), 共采集6例健康志愿者外周血样本用于后续实验, 其中蛋白酶K保护实验结合免疫印迹分析实验的样本来源于志愿者4~6(Donor 4~6, 即D4、D5和D6), 其余实验样本均来源于志愿者1~3(Donor 1~3, 即D1、D2和D3), 本研究所涉及的所有志愿者均签署了知情同意书。

1.1.2 主要试剂 Bestarose CL-6B填料(货号: AG0044)购自博格隆(上海)生物技术有限公司; NuPAGE预制胶(10%、10孔)(货号: NP0315BOX)、TRIzol™试剂(货号: 15596018CN)、糖原(RNA级)(货号: R0551)、Pierce™ BCA蛋白定量试剂盒(货号: 23225)购自美国ThermoFisher Scientific公司; AMICON ULTRA 4ML 30K(货号: UFC803096)购自德国Merck Millipore公司; RQ1 RNase-Free DNase(货号: M6101)购自美国Promega公司; SMARTer Stranded Total RNA-Seq Kit v2-Pico Input Mammalian(货号: 634412)购自日本TaKaRa公司; 兔抗人Syntenin mAb(1:1 000稀释)(货号: ab133267)、兔抗人Albumin mAb(1:2 000稀释)(货号: ab207327)、兔抗人Integrin β 3 mAb(1:2 000稀释)(货号: 13166S)、辣根过氧化酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的兔/鼠二抗(1:2 000稀释)(货号: 7074S/7076S)购自美国Cell Signaling Technology公司; 脱脂奶粉(货号: 232100-100 g)、吐温-20(货号: 0777-100 mL)购自广州捷倍斯生物科技有限公司; 十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)(货号: P0013G)购自上海碧云天生物技术有限公司; 苯甲磺酰氟(phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF)(货号: P7626-25 g)购自美国Sigma-Aldrich公司; Econo-Pac®色谱柱(货号: 7321010)购自美国Bio-Rad公司。

1.2 方法

1.2.1 血浆预处理 采集的外周血样本于20 °C、2 500 ×g离心15 min, 收集上清液后再次于20 °C、17 000 ×g离心10 min, 取上清并经0.22 μ m滤膜过滤, 所得液体即为预处理后的血浆, 于-80 °C保存备用。

1.2.2 dSEC法分离健康人血浆EVs 参考GUO等^[18]建立的方法略作调整。简要步骤如下: 取27 mL Bestarose CL-6B填料装填于Econo-Pac®色谱柱, 静置过夜形成稳定柱床(约20 mL)。使用40 mL PBS平衡后, 上样1 mL预处理血浆。待样本完全进入柱床后, 首先加入8 mL PBS进行洗脱, 收集该部分洗脱液并

将其标记为E1(eluate 1), 即EVs富集组分; 随后再加入18 mL PBS继续洗脱, 收集洗脱液并将其标记为E2(eluate 2), 即非EVs组分。最后, 将E1与E2组分分别浓缩至终体积为250 μ L。

1.2.3 纳米颗粒示踪分析 采用NanoSight NS300仪器(Malvern Panalytical公司)分别检测E1与E2组分的颗粒浓度与粒径分布。检测参数设置为: 相机灵敏度12, 每次采样拍摄时长60 s, 每个样品随机选取3个视野进行拍摄, 分析时检测阈值设定为3。

1.2.4 透射电镜成像 取10 μ L待测样品滴加至碳支持膜包覆的铜网, 静置吸附1 min后用滤纸吸除残留液体。加入10 μ L 2%醋酸双氧铀负染1 min, 吸净染液后室温干燥。样品在80 kV加速电压下于透射电子显微镜下观察并拍照。

1.2.5 蛋白质定量 采用BCA法测定样品总蛋白浓度。简要流程为根据试剂盒说明绘制标准曲线, 测定样品在570 nm波长处的吸光度值, 据此计算各样本的蛋白质浓度。

1.2.6 免疫印迹分析 取20 μ g蛋白质样品进行SDS-PAGE电泳(200 V恒压、40 min)。之后于20 V恒压条件下湿转至PVDF膜1 h。用5%脱脂牛奶室温封闭1 h, 随后加入相应一抗于4 °C孵育过夜。洗膜后加入HRP标记的二抗室温孵育1 h, 最后使用化学发光成像系统进行显影。

1.2.7 蛋白酶K保护实验结合免疫印迹分析 本研究利用蛋白酶K保护实验结合免疫印迹分析, 评估EVs膜的完整性, 实验条件参考VOOGT等^[19]的方法。具体为取等体积E1, 以终浓度为20 μ g/mL的蛋白酶K孵育(37 °C、5 min), 以终浓度为5 mmol/L的蛋白酶抑制剂PMSF终止酶解反应。采用免疫印迹分析方法检测EVs内的标志物Syntenin的表达水平。

1.2.8 血浆EVs RNA提取及基因组DNA的去除 使用TRIzol法提取EVs RNA。取100 μ L样品加入1 mL TRIzol™试剂, 涡旋混匀后室温静置5 min; 加入200 μ L氯仿和1.5 μ L糖原(20 mg/ μ L), 剧烈振荡后静置3 min; 4 °C、12 000 ×g离心15 min; 吸取600 μ L上清水相, 加入800 μ L异丙醇, -20 °C沉淀过夜; 4 °C、12 000 ×g离心10 min收集沉淀; 用1 mL预冷75%乙醇洗涤沉淀两次(4 °C、7 500 ×g离心5 min); 晾干沉淀后, 用8 μ L无RNase水重溶RNA。

为去除残留基因组DNA, 取上述RNA样品加入1 μ L DNase, 37 °C孵育30 min, 随后加入1 μ L终止液

并于65 °C孵育10 min以失活DNase。

1.2.9 cDNA文库的制备 取经DNase处理的RNA样品,按照SMARTer Stranded Total RNA-Seq Kit v2-Pico Input Mammalian试剂盒说明书,进行cDNA文库构建。构建好的文库在Illumina NovaSeq 6000平台上进行150 bp双端测序。

1.2.10 下一代测序数据分析 原始下机数据使用fastp软件进行质量控制,去除接头序列并过滤低质量读段(reads)。依据SMARTer Stranded Total RNA-Seq Kit v2建库试剂盒说明书,使用HISAT2软件将经过质控过滤后的干净读段(clean reads)比对至人类参考基因组hg38(下载自UCSC Genome Browser^[20])。基于GENCODE v45基因组注释文件,采用FeatureCounts软件统计比对至各基因外显子区域的reads数,获得原始表达计数。为提升分析可靠性,设定基因表达筛选阈值为原始counts>10,仅保留满足此条件的基因进行后续分析。

$$TPM = \frac{Ni/Li}{\sum(N1/L1 + N2/L2 + \dots + Nn/Ln)} \times 10^6$$

其中, N_i 为比对到第*i*个外显子的reads数, L_i 为第*i*个外显子的长度(碱基数), $\sum(N1/L1+N2/L2+\dots+Nn/Ln)$ 为所有(*n*个)外显子按长度标准化之后数值的和。TPM(transcripts per million)值经过基因长度与测序深度双重校正,可用于跨样本间的基因表达水平比较。

1.2.11 统计方法 本研究使用GraphPad Prism 10.20软件进行统计分析,以Anderson-Darling正态性检验进行,对于服从正态分布的两个独立样本,采用Student's *t*-test进行统计检验分析,对于不服从正态分布的样本,采用K-S(Kolmogorov-Smirnov) test分析。数据以平均值±标准误(mean±SEM)表示, $P<0.05$ 为具有显著统计学差异。

2 结果

2.1 dSEC成功分离血浆EVs和非EVs组分

为评估dSEC方法对血浆EVs的分离效果,本研究严格依据国际细胞外囊泡研究指南(minimal information for studies of extracellular vesicles, MISEV2023)^[4],对分离得到的E1(EVs富集组分)和E2(非EVs组分)进行了系统表征。结果表明,E1组分的颗粒数显著高于E2(图1A),而E2组分的总蛋白含量明显高于E1($P=0.001$)(图1B)。颗粒-蛋白比分析显示,E1和

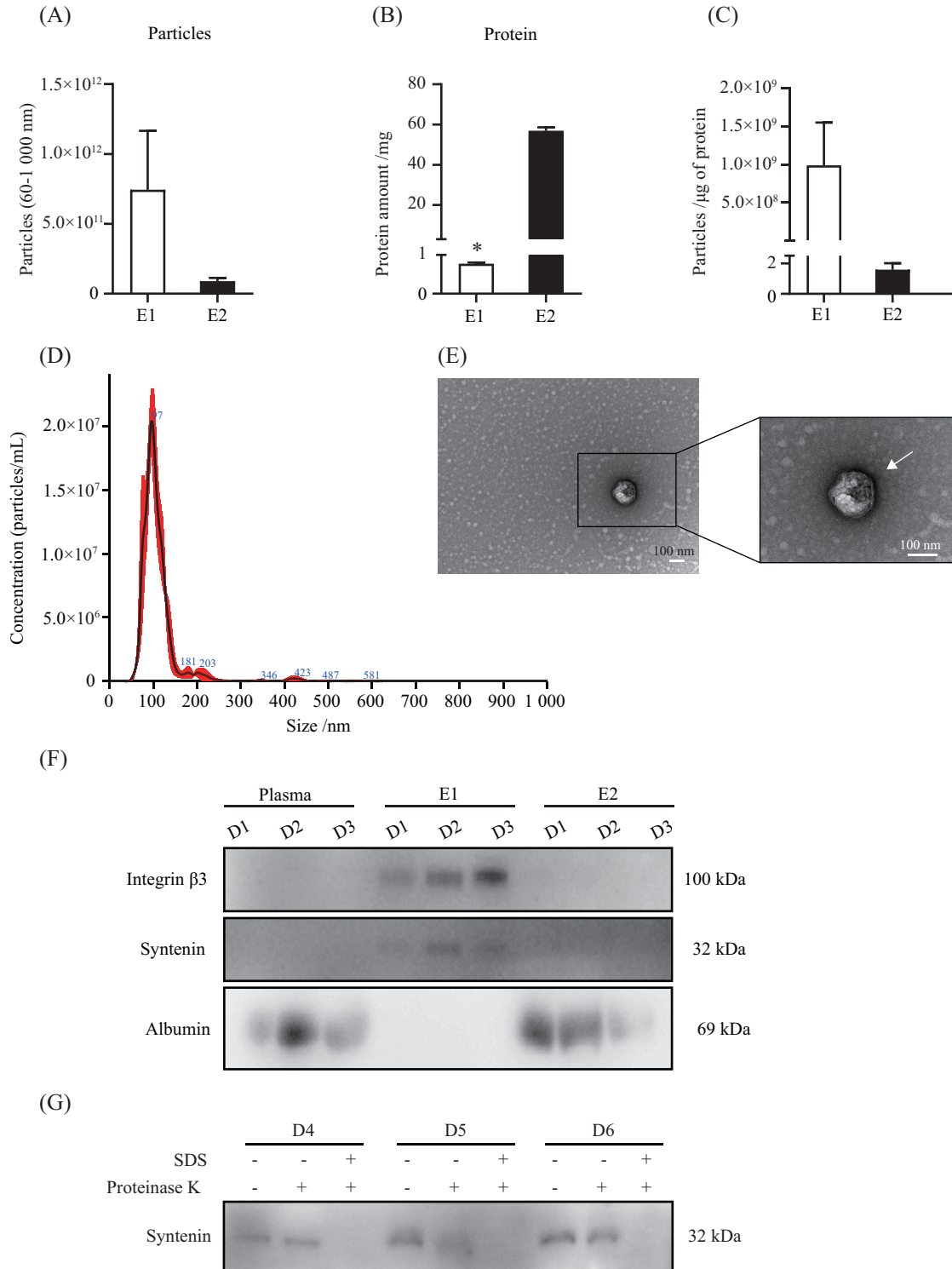
E2的颗粒-蛋白比分别为 $(9.86\pm 5.62)\times 10^8$ particles/ μg 和 $(1.58\pm 0.42)\times 10^6$ particles/ μg ,相差约两个数量级(图1C),表明E1组分含有高纯度的EVs。纳米颗粒跟踪分析进一步显示,E1中颗粒的粒径分布主峰位于97 nm,且绝大多数颗粒直径小于200 nm(图1D)。透射电镜结果确认E1组分中存在典型的杯状囊泡结构(图1E)。免疫印迹分析表明,EVs蛋白标志物Integrin $\beta 3$ 和Syntenin在E1中特异性富集,而血浆中高丰度蛋白Albumin则在原始血浆及E2组分中含量较高,在E1中几乎检测不到(图1F)。蛋白酶保护实验结果显示,阴性对照(E1未经蛋白酶K和SDS处理组)及阳性对照(E1经蛋白酶K和SDS处理组)均符合预期,即阴性对照中检测到Syntenin目的条带,而阳性对照中该条带消失。在此基础上,仅经蛋白酶K处理的E1组在三次生物学重复中均稳定检测到EVs内标志物Syntenin(图1G)。该结果表明,dSEC法分离得到的E1颗粒具有完整的膜结构,能够有效保护其内部蛋白免受蛋白酶K的降解。综上,通过多指标表征证实,本研究采用dSEC方法成功从健康人血浆中分离出高纯度的具高度完整膜结构EVs,且所得囊泡性质符合MISEV2023标准。

2.2 血浆EVs与非EVs组分的高质量转录组测序分析

为系统解析血浆EVs与非EVs组分的RNA组成,本研究对分离得到的E1与E2组分进行了下一代转录组测序。如表1所示,原始数据经质控后,各样本经过质控过滤后的干净读段的Q30百分比均高于92%,GC含量介于47.36%至49.21%之间(平均值为 $48.56\pm 0.76\%$),表明测序数据质量可靠。

序列比对分析显示,所有样本的平均比对效率为 $90.1\pm 2.7\%$ (范围84.8%~92.3%),其中唯一比对率平均为 $88.8\pm 2.6\%$ (范围83.9%~91.1%),表明绝大多数测序reads可准确定位至参考基因组(图2A)。多重比对率则维持在较低水平(平均 $1.11\pm 0.15\%$),进一步证明了比对结果的可靠性(图2A)。

基于FeatureCounts的定量分析表明,E1(EVs组分)与E2(非EVs组分)中分别定量得到54 933和54 272个RNA分子。我们将稳定表达的RNA定义为在3个生物学重复中均被检测到且counts>10的转录本。据此标准,我们在E1和E2组分中分别鉴定出31 284个和39 224个稳定表达的RNA(图2B和图2C)。进一步分析显示,两个组分中共有29 108个RNA为共同稳定表达(图



A、B: E1与E2组分的颗粒数(A)与蛋白质含量(B); C: 两组分的颗粒-蛋白比; D: E1组分的粒径分布与浓度; E: E1组分的典型透射电镜图像, 可见杯状囊泡结构; F: E1与E2组分中EVs标志蛋白(Integrin β3、Syntenin)及血浆蛋白污染物(Albumin)的免疫印迹分析结果, 每泳道上样量为20 µg; G: E1组分的蛋白酶K保护实验。数据以均值±标准误表示。*P<0.05, 与E2组比较。

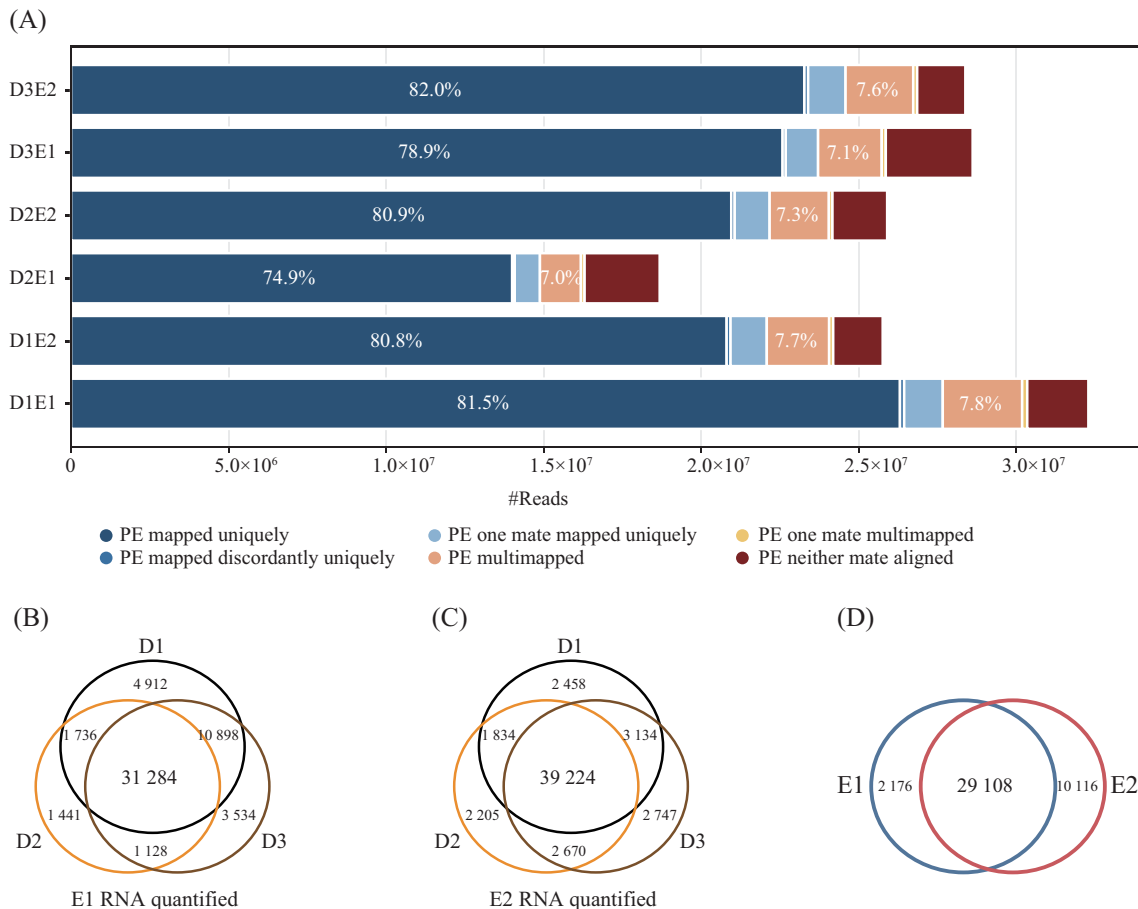
A,B: particle counts (A) and protein amount (B) of E1 and E2 fractions; C: particle-to-protein ratio of the two fractions; D: particle concentration and size distribution of the E1 fraction; E: representative transmission electron microscopy image of the E1 fraction, showing cup-shaped vesicular structures; F: Western blot analysis of EVs markers (Integrin β3, Syntenin) and plasma protein contaminant (Albumin) in E1 and E2 fractions. Protein was loaded at 20 µg per lane; G: proteinase K protection assay on the E1 fractions. Data are presented as mean±SEM. *P<0.05 compared with E2 group.

图1 血浆EVs组分(E1)与非EVs组分(E2)的系统表征

Fig.1 Systematic characterization of plasma EVs (E1) and non-EVs (E2) fractions

表 1 NGS测序数据信息汇总表
Table 1 Overview of NGS metrics

组分 Fraction	样本 Sample	经过质控过滤后的干净读段 Clean reads	准确率为99.9%的碱基占比/% Q30 /%	鸟嘌呤胞嘧啶碱基占比/% GC /%
E1	D1 (Donor 1)	6.458×10^7	92.63	47.87
	D2 (Donor 2)	3.736×10^7	92.81	49.21
	D3 (Donor 3)	5.723×10^7	93.09	47.36
E2	D1 (Donor 1)	5.152×10^7	93.07	48.86
	D2 (Donor 2)	5.180×10^7	93.36	48.88
	D3 (Donor 3)	5.677×10^7	93.73	49.16



A: E1与E2样本的测序数据比对统计, 包括总比对率、唯一比对率与多重比对率; B、C: 分别在E1(B)和E2(C)组分中, 基于原始counts>10的阈值, 在3个生物学重复中均被稳定定量检测到的RNA数目韦恩图; D: E1与E2两组分间共同稳定表达的RNA交集韦恩图。

A: alignment statistics of sequencing data for E1 and E2 samples, including overall alignment rate, unique mapping rate, and multi-mapping rate; B,C: Venn diagrams showing the number of RNAs consistently quantified (raw counts>10 in all three biological replicates) in the E1 (B) and E2 (C) fractions, respectively; D: Venn diagram illustrating the overlap of consistently quantified RNAs common to both E1 and E2 fractions.

图2 血浆EVs与非EVs组分的RNA测序与定量分析

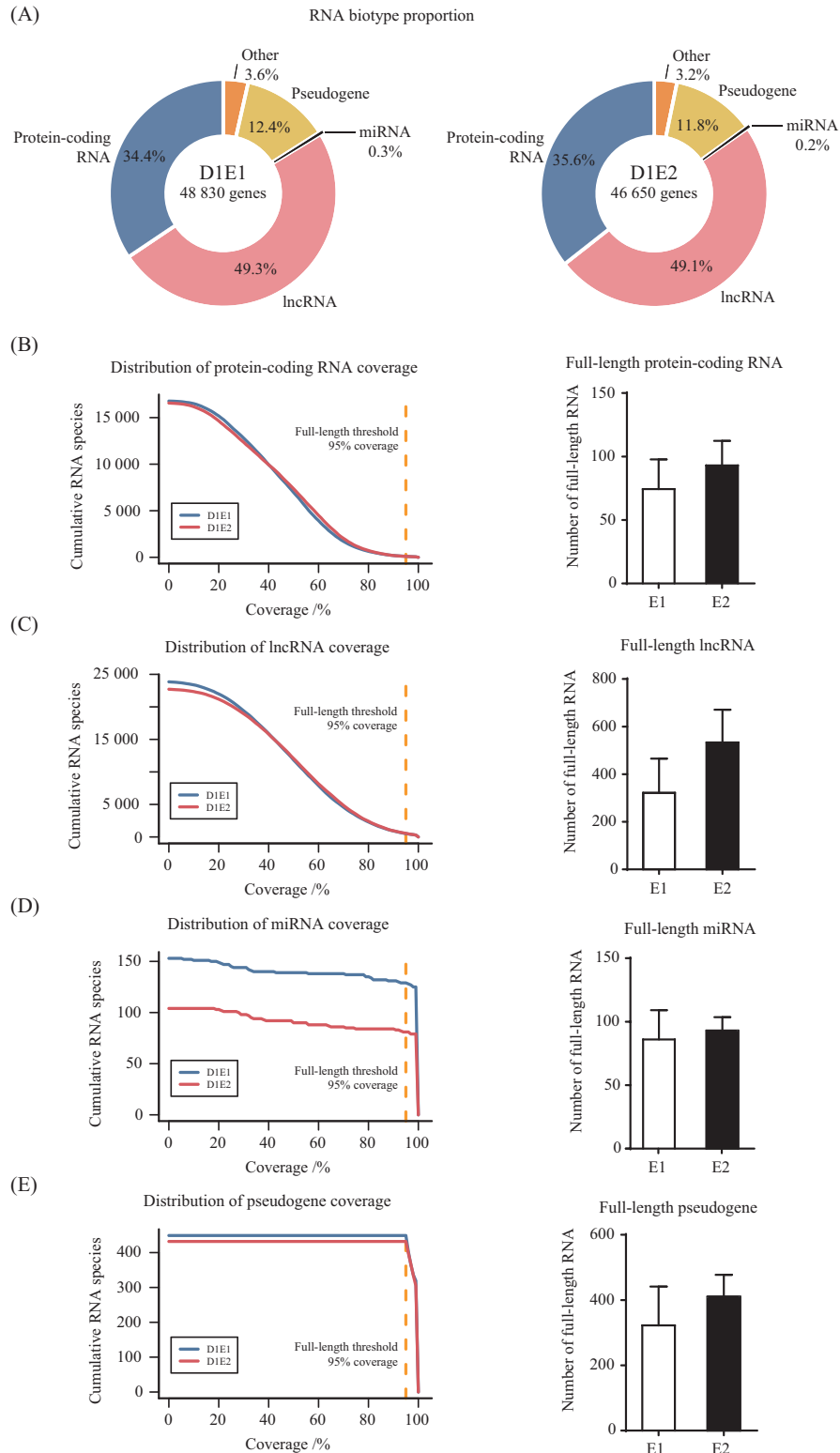
Fig.2 RNA sequencing and quantification analysis of plasma EVs and non-EVs fractions

2D), 这些转录本构成了后续分析的基础数据集。

2.3 人血浆EVs和非EVs组分内均存在大量高度片段化的RNA

本研究对鉴定出的RNA按其生物类型进行分

类, 主要包括编码蛋白RNA、长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)、微小RNA(microRNA, miRNA)、假基因及其他RNA。对代表性样本(如 Donor 1)的分析显示, EVs(E1)与非EVs(E2)组分的



A: 志愿者1(Donor 1)的E1与E2样本中, 各类RNA转录本的相对比例。“其他RNA”类别包含核糖体RNA、小核仁RNA等; B-E: E1与E2中, 编码蛋白RNA(B), 长链非编码RNA(C), 微小RNA(D)和假基因(E)的测序覆盖度分布, 右侧柱状图展示相应类别中高完整RNA(覆盖度>95%)的数量。数据以均值±标准误表示。测序覆盖度定义为目标转录本被测序reads覆盖的核苷酸比例。

A: relative proportions of different RNA biotypes in E1 and E2 fractions from a representative donor (Donor 1). The “Other RNA” category includes, but is not limited to, rRNA and snRNA; B-E: sequencing coverage distributions for protein-coding RNAs (B), lncRNAs (C), miRNAs (D), and pseudogenes (E) in E1 and E2 fractions. Bar plots (right) show the corresponding counts of full-length transcripts (coverage>95%) for each RNA type. Data are presented as mean±SEM. Sequencing coverage is defined as the proportion of nucleotides in a transcript covered by at least one sequencing read.

图3 血浆EVs与非EVs组分中RNA的类型分布与完整性分析

Fig.3 RNA biotype distribution and integrity analysis in plasma EVs and non-EVs fractions

RNA类别组成比例相近,均以lncRNA(E1: 49.3%; E2: 49.1%)和编码蛋白RNA(E1: 34.4%; E2: 35.8%)为主,假基因占比次之,miRNA占比最少(图3A)。为评估RNA的完整性,我们以测序覆盖度>95%作为阈值来定义高完整RNA^[21]。结果显示,无论是EVs还是非EVs组分,绝大多数编码蛋白RNA和lncRNA的测序覆盖度均低于95%,表明它们主要以片段化形式存在(图3B和图3C)。具体而言,EVs组分中全长编码蛋白RNA和lncRNA的数量分别为(74.33±23.39)个和(321.7±143.9)个;非EVs组分中则分别为(93.00±19.35)个和(533.3±137.4)个。相比之下,miRNA和假基因在两组分中均主要呈现为全长形式(图3D和图3E)。统计分析表明,EVs与非EVs组分在各RNA生物类型的高完整RNA数量上均无显著差异。

2.4 RNY4被检出为唯一以全长形式在血浆EVs特异性稳定存在的RNA

为筛选具有高特异性与完整性的血浆EVs RNA,我们设立了严格标准,候选RNA需在全部3个EVs生物学重复中稳定检测到(原始counts>10),且测序覆盖度均大于95%(定义为高完整RNA),同时所有非EVs组分中完全未被检出(覆盖度为0)。分析结果显示,仅有Ro60相关Y4(Ro60-associated Y4, RNY4) RNA完全满足上述严格条件。该RNA在EVs组分中呈现高丰度表达,其TPM均值高达2 019.55。

3 讨论

EVs的分离是开展其科学研究与临床应用的基础,现有主流的EVs分离方法主要包括UC、SEC和亲和富集法等^[2]。其中,UC法是EVs分离的“金标准”,其依据沉降系数和密度的差异实现EVs与杂质的分离。该方法可处理大体积样本,且产物纯度较高,但存在耗时长、EVs回收率低、需依赖大型专用设备及专业操作人员等局限。传统的SEC法基于粒径差异分离EVs,过程温和、回收率高且易于放大,但难以去除粒径相近的污染物,且需分离并合并数十个洗脱组分,操作繁琐。亲和富集法虽特异性强,但仅适用于特定亚型EVs且成本较高。鉴于常规方法在操作标准化与临床可及性方面存在局限^[22],本团队开发的dSEC法在保留SEC温和分离优势的基础上,通过优化层析柱填料与洗脱体系,实现单次上样和同步获取EVs与非EVs组分,兼具高纯度与高回收率^[18]。该方法为临床EVs液体活检提供了标准化前处理方

案,具有推动疾病早期诊断等临床转化的应用潜力。

本研究基于dSEC技术实现了健康人血浆中EVs与非EVs组分的温和高效、高纯度分离,首次以高完整RNA(测序覆盖度>95%)为核心分析维度,系统绘制了两类组分中完整RNA的分布图谱,并鉴定出了全长RNY4为潜在的血浆EVs特异性RNA。该研究结果从RNA完整性视角深化了对血浆EVs载体功能的理解,为EVs RNA液体活检的标准化提供了新的实验依据与理论支撑。

关于EVs的生物学功能,经典观点将其定义为细胞的“垃圾桶”(garbage can),认为EVs的核心作用是介导细胞内待降解生物分子的外排,其内部包裹的物质多为细胞代谢产生的无功能碎片,并无特异性的生物学功能指向^[23]。本研究对血浆EVs与非EVs组分的RNA完整性分析结果,从RNA分子层面为该经典认知提供了直接的实验佐证。本研究发现,两类组分中占比最高的lncRNA和编码蛋白RNA,其测序覆盖度绝大多数低于95%,普遍以片段化形式存在;即使是在EVs特异性富集的RNA分子中,绝大部分也为核酸碎片,仅有少量转录本保持完整。这一现象表明,血浆EVs确实承载了大量细胞外排的RNA降解产物,从物质组成的角度印证了EVs作为细胞“垃圾处理载体”的经典属性。其他团队利用SEC^[24]和密度梯度离心^[25]法联合RNA-seq也报道了与本研究结相一致的发现,即mRNA和lncRNA在EVs组分为占比最高的RNA类型。同时,EVs RNA的片段化现象与他人的研究具有可比性。GUO等^[6]分析了血浆EVs的转录组,结果显示仅有9.1%的mRNA和1.8%的lncRNA测序覆盖度在90%~100%;BATAGOV等^[26]针对胶质母细胞瘤来源外泌体的分析表明,约68.5%的mRNA为片段化转录本,并富集于3'非翻译区,提示这类片段化mRNA可能在受体细胞中主要发挥翻译调控等非经典功能,而非直接参与蛋白质合成。

随着领域的进步,20余年的研究对上述经典认知进行了重要修正与拓展,越来越多的证据表明,EVs并非单纯的降解载体,而是细胞间通讯的重要媒介,其能够选择性地包裹具有生物学功能的核酸、蛋白质等分子,通过囊泡运输将这些功能分子传递至受体细胞,进而调控受体细胞的生理活动,参与微环境的稳态维持与病理过程的发生发展^[22,27]。本研究的结果同样为这一现代理论提供了关键的实验支持,即在高度片段化的RNA背景下,仍有约1%的转

录本呈现>95%的测序覆盖度, 这些近全长的RNA包括编码蛋白RNA、lncRNA、miRNA及假基因等多种功能类别。本研究的上述结果与PADILLA等^[28]的研究相互印证, 该研究利用纳米孔长读长测序技术分析了K562细胞EVs中的转录本, 发现约10.58%的转录本为覆盖度>95%的全长RNA。本研究的上述结果表明, 血浆EVs能够将保持完整的RNA分子运输至胞外, 为EVs通过功能性核酸介导细胞间通讯提供分子基础; 即EVs在物质运输方面具有双重属性, 既可承担细胞降解产物的外排功能, 也可执行功能性分子的定向运输功能。

在血浆EVs RNA兼具片段化为主、少量完整存在的双重特征背景下, 本研究通过严格的筛选标准(EVs中稳定检出、覆盖度>95%、非EVs中完全未检出), 鉴定出全长RNY4为唯一满足条件的血浆EVs特异性RNA分子, 该分子也展现出潜在的EVs检测内参潜力。RNY4是一种长度约96 nt、结构保守的小非编码Y-RNA, 已有研究发现, 其片段形式游离于血浆, 而全长形式则稳定存在于EVs内^[29-30]。从内参基因的应用潜力来看, VAGO等^[31]曾将RNY4提议为尿液EVs研究的候选内参基因。而本研究则将其应用场景拓展至血浆EVs, 且在3例健康志愿者的生物学重复中, RNY4均呈现高丰度(TPM均值达2 019.55)、高稳定性的表达特征, 证明该分子的EVs特异性并非局限于某一种体液类型, 而是具有跨体液的普适性, 为多体液EVs研究的标准化内参选择提供了统一候选分子。

当然, 本研究仍存在一定的局限性, 研究仅纳入3例健康志愿者的血浆样本, 样本量相对较小, 尚未在更大规模的健康人群及疾病队列中验证全长RNY4的表达稳定性与诊断效能。未来可进一步扩大健康人群样本量, 并在肿瘤、炎症性疾病等不同疾病队列中, 探究全长RNY4作为EVs内参基因的适用性。

综上所述, 本研究从RNA完整性的视角, 验证了EVs“生物垃圾桶-细胞通讯媒介”的双重生物学属性, 既为经典认知与现代研究提供了统一的实验佐证, 又在该背景下鉴定出了全长RNY4这一兼具高特异性、高稳定性的血浆EVs RNA, 提示RNY4可能为血浆EVs特异性RNA, 但是尚需扩大样本验证。同时, 本研究建立的dSEC分离结合高完整RNA筛选的技术策略, 为EVs RNA在检验医学领域的标准化研究提供了新思路。

参考文献 (References)

- [1] WELSH J A, GOBERDHAN D C I, O'DRISCOLL L, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): from basic to advanced approaches [J]. *J Extracell Vesicles*, 2024, 13(2): e12404.
- [2] 中国研究型医院学会细胞外囊泡研究与应用专业委员会, 中华医学会检验医学分会分子诊断学组. 细胞外囊泡分离与检测技术专家共识[J]. *中华检验医学杂志(Chinese Society of Extracellular Vesicles, Chinese Research Hospital Association; Molecular Diagnostic Group, Chinese Society of Laboratory Medicine. Expert consensus on isolation and detection technology of extracellular vesicles [J]. Chin J Lab Med)*, 2024, 47(8): 852-63.
- [3] VAN NIEL G, CARTER D R F, CLAYTON A, et al. Challenges and directions in studying cell-cell communication by extracellular vesicles [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2022, 23(5): 369-82.
- [4] THÉRY C, WITWER K W, AIKAWA E, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines [J]. *J Extracell Vesicles*, 2018, 7(1): 1535750.
- [5] KALLURI R, MCANDREWS K M. The role of extracellular vesicles in cancer [J]. *Cell*, 2023, 186(8): 1610-26.
- [6] MATHIEU M, MARTIN-JAULAR L, LAVIEU G, et al. Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication [J]. *Nat Cell Biol*, 2019, 21(1): 9-17.
- [7] O'BRIEN K, BREYNE K, UGHETTO S, et al. RNA delivery by extracellular vesicles in mammalian cells and its applications [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21(10): 585-606.
- [8] VAN DER POL E, BÖING A N, GOOL E L, et al. Recent developments in the nomenclature, presence, isolation, detection and clinical impact of extracellular vesicles [J]. *J Thromb Haemost*, 2016, 14(1): 48-56.
- [9] VALADI H, EKSTRÖM 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.
- [10] HAN Y, DROBISCH P, KRÜGER A, et al. Plasma extracellular vesicle messenger RNA profiling identifies prognostic EV signature for non-invasive risk stratification for survival prediction of patients with pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. *J Hematol Oncol*, 2023, 16(1): 7.
- [11] PHAM L H P, CHANG C, TUCHEZ K, et al. Assessing Alzheimer's disease via plasma extracellular vesicle-derived mRNA [J]. *Alzheimers Dement*, 2024, 16(3): e70006.
- [12] SKOG J, WURDINGER T, VAN RIJN S, et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and protein that promote tumor growth and provide diagnostic biomarkers [J]. *Nat Cell Biol*, 2008, 10(12): 1470-6.
- [13] VICKERS K C, PALMISANO B T, SHOUCRI B M, et al. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins [J]. *Nat Cell Biol*, 2011, 13(4): 423-33.
- [14] BUSCHMANN D, KIRCHNER B, HERMANN S, et al. Evaluation of serum extracellular vesicle isolation methods for profiling miRNAs by next-generation sequencing [J]. *J Extracell Vesicles*,

- 2018, 7(1): 1481321.
- [15] SRINIVASAN S, YERI A, CHEAH P S, et al. Small RNA sequencing across diverse biofluids identifies optimal methods for exRNA isolation [J]. *Cell*, 2019, 177(2): 446-62, e16.
- [16] GUO W, HUAI Q L, LIU T J, et al. Plasma extracellular vesicle long RNA profiling identifies a diagnostic signature for stage I lung adenocarcinoma [J]. *Transl Lung Cancer Res*, 2022, 11(4): 572-57.
- [17] MATEESCU B, KOWAL E J K, VAN BALKOM B W M, et al. Obstacles and opportunities in the functional analysis of extracellular vesicle RNA-an ISEV position paper [J]. *J Extracell Vesicles*, 2017, 6(1): 1286095.
- [18] GUO J H, WU C H, LIN X Y, et al. Establishment of a simplified dichotomic size-exclusion chromatography for isolating extracellular vesicles toward clinical applications [J]. *J Extracell Vesicles*, 2021, 10(11): e12145.
- [19] DE VOOGT W S, FRUNT R, LEANDRO R M, et al. EV-Elute: a universal platform for the enrichment of functional surface marker-defined extracellular vesicle subpopulations [J]. *J Extracell Vesicles*, 2024, 13(12): e70017.
- [20] CASPER J, SPEIR M L, RANEY B J, et al. The UCSC Genome Browser database: 2026 update [J]. *Nucleic Acids Res*, 2025, 54(D1): D1331-5.
- [21] ROBERTS A, PIMENTEL H, TRAPNELL C, et al. Identification of novel transcripts in annotated genomes using RNA-Seq [J]. *Bioinformatics*, 2011, 27(17): 2325-9.
- [22] ZHANG L M, MA W C, GAN X Y, et al. Adequate enrichment of extracellular vesicles in laboratory medicine [J]. *IMed*, 2023, 1(3): e20220003.
- [23] RAPOSO G, STOOORVOGEL W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends [J]. *J Cell Biol*, 2013, 200(4): 373-83.
- [24] KIM H J, RAMES M J, GONCALVES F, et al. Selective enrichment of plasma cell-free messenger RNA in cancer-associated extracellular vesicles [J]. *Commun Biol*, 2023, 6(1): 885.
- [25] SAVELYEVA A V, KULIGINA E V, BARIAKIN D N, et al. Variety of RNAs in peripheral blood cells, plasma, and plasma fractions [J]. *Biomed Res Int*, 2017, 2017: 7404912.
- [26] BATAGOV A O, KUROCHKIN I V. Exosomes secreted by human cells transport largely mRNA fragments that are enriched in the 3'-untranslated regions [J]. *Biol Direct*, 2013, 8: 12.
- [27] ZHANG J, LU S H, ZHOU Y, et al. Motile hepatocellular carcinoma cells preferentially secrete sugar metabolism regulatory proteins via exosomes [J]. *Proteomics*, 2017, doi: 10.1002/pmic.201700103.
- [28] PADILLA J C A, BARUTCU S, MALET L, et al. Profiling the polyadenylated transcriptome of extracellular vesicles with long-read nanopore sequencing [J]. *BMC Genomics*, 2023, 24(1): 564.
- [29] DRIEDONKS T A P, MOL S, DE BRUIN S, et al. Y-RNA subtype ratios in plasma extracellular vesicles are cell type-specific and are candidate biomarkers for inflammatory diseases [J]. *J Extracell Vesicles*, 2020, 9(1): 1764213.
- [30] LOVISA F, DI BATTISTA P, GAFFO E, et al. *RNY4* in circulating exosomes of patients with pediatric anaplastic large cell lymphoma: an active player [J]? *Front Oncol*, 2020, 10: 238.
- [31] VAGO R, RADANO G, ZOCCO D, et al. Urine stabilization and normalization strategies favor unbiased analysis of urinary EV content [J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 17663.