

· 指南与共识 ·

细胞外囊泡分离与检测技术专家共识

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

通信作者: 郑磊, Email: nfyyzhenglei@smu.edu.cn; 王前, Email: wangqian@smu.edu.cn

【摘要】 细胞外囊泡是细胞间传递信息的重要载体, 在人体病理生理过程中发挥着重要作用, 在液体活检领域也有巨大潜力。然而, 目前细胞外囊泡分离与检测技术多样, 各有优缺点。因此, 建立细胞外囊泡分离与检测技术专家共识, 对于推动 EV 的研究转化与临床应用具有重要价值。本共识由中国研究型医院学会细胞外囊泡研究与应用专业委员会和中华医学会检验医学分会分子诊断学组共同编写, 汇聚了来自检验医学、基础医学、临床医学、分析化学、生物学和材料科学等多个相关领域专家的观点和经验, 详细阐述了常用细胞外囊泡分离与检测技术及其不同应用场景, 并进一步指明了细胞外囊泡临床应用转化的关键技术要点。

【关键词】 细胞外囊泡; 分离技术; 检测技术; 专家共识

基金项目: 国家自然科学基金(82025024, 82230080); 国家重点研发计划(2021YFA1300604)

Expert Consensus on isolation and detection technology of extracellular vesicles

Chinese Society of Extracellular Vesicles, Chinese Research Hospital Association; Molecular Diagnostic Group, Chinese Society of Laboratory Medicine

Corresponding author: Zheng Lei, Email: nfyyzhenglei@smu.edu.cn; Wang Qian, Email: wangqian@smu.edu.cn

【Abstract】 Extracellular vesicle (EV) serves as a crucial mediator of intercellular information exchange, playing a pivotal role in human pathophysiological processes and offering immense potential in the realm of liquid biopsy. However, a diverse array of EV isolation and detection techniques exist, each possessing its own strengths and limitations. Hence, the establishment of an expert consensus on EV isolation and detection techniques holds significant value in advancing the translational and clinical application of EV research. This consensus, jointly authored by the Chinese Society of Extracellular Vesicles of the Chinese Research Hospital Association and the Molecular Diagnostics Group of the Chinese Society of Laboratory Medicine, combines the insights and experiences of experts spanning diverse related fields, encompassing laboratory medicine, basic medicine, clinical medicine, analytical chemistry, biology, and materials science, among others. It elaborates a comprehensive overview of commonly employed EV isolation and detection techniques, along with their applications in diverse scenarios. Furthermore, it identifies the key technological considerations for the clinical translation of EV applications.

【Key words】 Extracellular vesicle; Isolation techniques; Detection techniques; Expert consensus

Fund program: National Natural Science Foundation of China (82025024, 82230080); National Key R&D Program of China (2021YFA1300604)

DOI: 10.3760/cma.j.cn114452-20240528-00278

收稿日期 2024-05-28 本文编辑 唐栋

引用本文: 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, 2024, 47(8): 852-863. DOI: 10.3760/cma.j.cn114452-20240528-00278.



细胞外囊泡(extracellular vesicle, EV)是活细胞向细胞外释放的纳米级脂质双分子层囊泡。它主动分选了源自母体细胞的重要生物大分子,包括DNA、RNA、蛋白、脂质、糖类、代谢物质等。作为这些大分子的集合体,EV释放至胞外基质后,可通过血液循环到达远处器官与组织,然后被受体细胞所摄取并影响其生物学功能。因此EV广泛参与人体的生理病理过程,在疾病诊疗领域展现了巨大潜力。尤其在液体活检领域,EV作为标志物具有独特优势:(1)外周稳定性好:其双层脂质膜结构可保护内含物在外周循环中不易被降解;(2)诊断灵敏度高:在疾病早期阶段,病变细胞即可释放EV至血液体液,可反映早期病变过程;(3)组织特异性:分析特定细胞来源的EV亚群可以提供疾病组织定位线索,对直接取样困难的疾病,如中枢神经系统疾病,具有重要诊断价值。然而,现有EV分离与检测技术种类较多,且各有优缺点。为了更好地推动EV的临床应用和转化,本共识总结了当前EV分离和检测各类技术的优势和局限,并为具体应用场景提供了推荐意见。同时,这一共识的制定汇聚了多个相关领域专家的观点和经验,包括医学检验、基础医学、临床医学、分析化学、生物学和材料科学等,旨在为促进EV在检验医学领域的研究与应用提供更加全面客观的指导意见。

制定方案

一、共识发起机构与专家组成员

本共识由中国研究型医院学会细胞外囊泡研究与应用专业委员会(Chinese Society of Extracellular Vesicles, CSEV)和中华医学会检验医学分会分子诊断学组共同组成的专家组(以下简称专家组)牵头制订。2023年7月14日启动,成员间多次线上线下反复讨论形成初稿,之后召开3次专家组研讨会,最终针对推荐意见进行投票表决,于2024年4月10日完成定稿。本共识专家组成员均填写了利益声明表,不存在与本共识直接相关的利益冲突。

二、使用者与应用的目标人群

本共识适用于高校、科研院所、生物技术公司或体外诊断企业及不同医疗机构从事EV研究与转化应用的科技人员或医务工作者等,涵盖常用的EV分离与检测技术与方法,旨在为EV应用于临床检验的研究与转化提供参考。

三、基本框架构思与确定

专家组通过线下讨论的形式,初步拟定EV应用于临床检验所面临的核心问题,经多次讨论与修改,最终围绕四大问题进行,包括EV定义与命名、样本收集与前处理、EV分离技术、EV检测技术,并形成了9条推荐意见。

四、证据的检索

专家组根据最终选定的四大问题,根据EV中涉及的不同样本来源与不同的技术原理进行解构,通过Pubmed、Web of Science、中国知网、万方与维普等数据库,综合国内外研究进展进行证据选择。最终选择66篇文献作为该共识的依据。

五、证据的评价与分级

专家组根据文献依据,对每个推荐意见的必要性进行二次讨论,对于证据不充分的建议进行了删除。根据推荐分级办法,专家组对更新后的共识推荐进行投票表决,根据推荐意见分级最终形成完整的推荐意见(表1)。

表1 专家共识推荐意见分级表

推荐意见	证据级别	说明
强推荐	高质量证据	专家一致同意(支持意见>90%)
弱推荐	低质量证据	专家基本同意(支持意见60%~90%)
专家建议	证据不足	部分专家同意(支持意见<60%)

共识内容

一、EV的定义与命名

EV泛指由各类细胞释放的微小囊泡颗粒,其由脂质双分子层包裹,无法自我复制且不含功能性细胞核^[1]。建议使用通用术语“EV”指代各类囊泡亚群,或基于EV理化性质对所提取EV进行命名。如基于大小、密度等特征对EV亚型进行命名,包括“小EV”(smallEV, sEV)和“大”(largeEV, lEV),轻EV(lightEV)和重EV(heavyEV)等。然而,需要注意的是,当前对于EV特定的理化性质尚无明确界定。例如,sEV在不同文献中被广泛使用,但其上下限尺寸并未完全统一。同时,许多分离方法如差速超速离心法(differential ultracentrifugation, dUC)所产生的EV亚群尺寸分布存在重叠。因此,研究人员应意识到这些术语的局限性^[2]。

应避免使用定义模糊且具有误导性的术语。如与EV生成途径相关的术语,“exosome”和“ectosome”等,只应在有强有力证据支撑时谨慎使

用。尽管在某些情况下,药物或遗传干预可以抑制或刺激特定 EV 的生成或释放,大多数当前 EV 分离和表征技术无法区分由不同生成机制产生的 EV。除此之外,需要特别指出的,“小 EV”与 exosome 并非同义词:小 EV 群体泛指各类尺寸较小的 EV,是一个相对性的概念,可能包括了同样尺寸较小的 ectosome 和 exosome,但 ectosome 和 exosome 是根据其生物学来源定义的,因此两者并不等同。基于上述原因,当前大多数关于 exosome 和“ectosome/microvesicle”的文献实际上涉及了广泛的 EV 群体,而非经特定生物途径释放的 EV^[2]。此外,某些 EV 亚群可能不完全符合上述常见 EV 的定义,例如,细胞受挤压产生的颗粒严格来说并不是从细胞中释放,应被定义为类 EV 颗粒。

二、样本收集与前处理

(一) 细胞培养液

细胞培养液是体外培养细胞提取 EV 的主要样本来源,适用于各种细胞类型^[2]。这包括来自多细胞和单细胞生物的真核细胞,以及广泛的原核细胞,如革兰阳性和阴性细菌^[3-4]。细胞培养条件能直接或间接影响 EV 的产量、组成和功能^[5]。因此在真核细胞和原核细胞的培养过程中,尽量详细记录细胞培养的具体参数包括细胞系(如名称、传代数、接种量和提取 EV 时的细胞密度)、培养基成分(包括基础培养基、各种添加剂如血清、营养素、抗生素或抗真菌药物,以及其他可能的添加剂)和培养条件(如培养模式、温度和 pH 值)^[5-6]。值得注意的是,一些特定培养基,如胎牛或小牛血清,可能本身就含有 EV,这些 EV 可以被培养中的细胞吸收,并被重新包装成新的 EV。商用的无 EV 培养基需经过严格验证以确保其不含 EV^[7]。使用这些特制的无 EV 培养基和血清培养基可能会改变细胞产生 EV 的特性。此外,培养物中活细胞与垂死细胞的比例也是一个关键因素,因为它们可能释放不同亚型的 EV,且少数垂死细胞产生的 EV 数量可能超过健康细胞,这一比例会影响 EV 亚型和数量的分布^[8]。最后,微生物及其组份可能影响宿主细胞产生 EV 的多种特性,它们可被重新包装进培养物细胞的 EV 中,同时部分微生物也可释放 EV^[9]。

建议 1 细胞系培养条件对于提取 EV 的含量与分布具有重要影响,应详细记录相关培养条件,并对提取后的 EV 进行对应评估。对于向厂家购买的无 EV 培养基,应提供培养基处理方法以供评估(强推荐)。

(二) 血液体液标本

1. 血液:血液是人体体液样本中使用最多的样本类型。由于血液采集方便,且其中稳定存在的 EV 可反映机体的健康和疾病状态,因此血液样本中 EV 成为理想的液体活检标志物,受到本领域研究者的广泛关注^[10]。但血液中富含脂蛋白、红细胞碎片、非囊泡核酸以及其他与 EV 大小相似的生物颗粒,这使得血液源性 EV 的精准分析受到极大挑战。因此,血液 EV 分离和检测前,应参考国际细胞外囊泡学会(International Society for Extracellular Vesicles, ISEV)相关立场性文件和指南对血液样本进行严格的质量控制:(1)为了提高血液样本质量,最好在患者过夜禁食后进行采血;(2)采用含有柠檬酸钠或乙二胺四乙酸的采血管有助于抑制血小板释放 EV,从而保证血液样本 EV 分析的准确性;(3)样本收集与第一次离心之间的时间间隔应尽量缩短并保持一致,推荐在 20 °C 条件下 2 500×g 离心 15 min,收集细胞层上方 0.5 cm 以上的血浆层,同样条件第 2 次离心,以减少血小板和白细胞污染的风险,收集去血小板血浆,可新鲜使用,或在液氮中快速冷冻并在 -80 °C 条件下长期保持;(4)冻融次数,解冻温度和解冻时间应该有严格要求,推荐 37 °C 快速解冻,并尽量避免反复冻融;(5)通过标准化的血液采集和处理最大限度地减少溶血,应监测溶血情况,并报告红细胞计数和血红蛋白浓度的检测数据和仪器参数;(6)在条件允许情况下,应对血小板 EV 标志物(如 CD61 或 CD41)进行流式检测^[2, 11-15]。

2. 尿液:尿液 EV 分离和检测研究中,需要关注样本采集方式、保存条件及采集量^[16]。根据 ISEV 相关立场性文件和指南针对不同的研究方向和目的,尿液样本的采样方式会有不同,可以选择晨尿或随机尿^[2, 12, 16]。24 h 尿液样本收集有助于对尿液 EV 的准确定量,减少昼夜波动带来的误差。此外,也可根据疾病或检测标志物的不同,收集“首段尿”或“中段尿”。晨尿通常比随机尿更浓缩,可能导致晨尿中 EV 浓度更高。在许多前列腺癌的研究中,泌尿科医生在直肠指检后收集尿液样本或采集晨尿的首段尿,有望富集前列腺来源 EV。定时收集将有助于评估尿液在膀胱中的过渡时间,对于膀胱及其他疾病的研究所可能带来附加益处。

尿液样本采集后应在 0~4 °C 条件下保存,并在 8 h 内处理,以避免细菌生长、细胞裂解、RNA 和蛋白的降解以及沉积物的形成。在实际研究中,如不

能立即分离 EV 通常需要将尿液离心预处理后在 -70 °C 或更低的温度下冷冻保存, 离心可去除细胞、大的细胞碎片和尿调素, 避免这些杂质对后续 EV 分离造成影响。尿液 EV 分析所需的尿液量取决于 EV 分离方法产率和检测方法灵敏度, 但 10~30 ml 尿液已足够用于大多数分析研究, 如 RNA 测序和蛋白组学分析^[17]。

3. 脑脊液: 脑脊液是一种富含中枢神经系统疾病相关生物标志物的样本。根据 ISEV 相关立场性文件和指南^[2, 12, 18], 在脑脊液 EV 研究中必须考虑几个特异性因素:(1)某些蛋白质(如总 Tau 蛋白或磷酸化 Tau 蛋白)在腰椎区相对于大脑水平较低, 而其他蛋白质(如神经丝蛋白、淀粉样蛋白 b40)在腰椎区相对于大脑水平较高, 因此, 收集部位(例如腰椎、椎管、脑)可能影响脑脊液样本 EV 蛋白标志物分布;(2)血液中的蛋白质浓度是脑脊液的 200~400 倍, 脑脊液 EV 蛋白标志物研究容易受血液污染;(3)影响脑脊液生物标志物的因素还包括年龄、性别、种族和使用药物;(4)对于与昼夜节律相关的生物标志物, 脑脊液样本收集的时间很重要;(5)由于脑脊液样本采集方式具有侵入性、体积小且 EV 丰度低, 其研究需要高产量的分离方法和高灵敏的检测方法^[18-20]。

4. 唾液: 健康成年人每天唾液分泌量为 500~1 500 ml, 并随人体病理与生理状态而变化^[21]。唾液的非侵入性采样特性使其成为一种极具优势的生物样本, 尤其适用于口腔和牙周疾病研究。唾液样本收集及下游用量需求如下:采样时间应选在上午 8:00—10:00, 以尽可能减少昼夜节律对唾液成分的潜在影响。患者在唾液采集前 8 h 内应避免服用药物, 采集前至少 2 h 不能进食、饮用饮料(水除外)、咀嚼口香糖或进行刷牙等口腔清洁操作。若采样后立即检测, 唾液样本可在室温下短暂放置(30~90 min)。若采样后不能立即检测, 为保持样本的稳定性, 建议在采集后将样品即刻冷冻于 -20 °C 环境中;若冷冻条件受限, 样本可在 4 °C 下保存(不超过 6 h)。在 -80 °C 条件下, 唾液样本可以长期存放数年。采集的唾液样本经磷酸盐缓冲液处理后, 需通过 0.22 μm 过滤器以去除细菌和大分子物质, 以降低唾液中干扰成分。目前, 唾液采集方法尚无统一标准, 但从下唇被动引流非刺激性唾液入离心管已成为后续 EV 分析中最常用的唾液采集方法^[22-23]。

建议 2 血液体液样本中 EV 分析受到样本质

量影响较大, 包括受检者状态、采集方式、采集时间、采集后储存等。因此血液体液样本中 EV 研究需对各种影响因素进行详细记录, 并尽量遵循标准采集及处理流程, 以减少对 EV 分离和检测的影响(强推荐)。

(三) 组织标本

实体组织释放的 EV 在揭示特定部位和细胞间相互作用方面具有重要价值。由于组织获取和保存方法的多样性、细胞与细胞外基质组成的复杂性, 以及物理特性的变异性, 组织源性 EV 研究面临着诸多复杂性和挑战。目前, 针对组织 EV 的研究主要采用两种方法, 并已成功应用于脑组织和肿瘤组织的研究中。第一种方法是在获取组织样本后进行体外培养, 努力维持接近原位环境的条件, 并从培养基中收集用于 EV 分离的样品^[24-25]。这种 EV 制品可能包含来自原始组织的 EV、培养过程中释放的 EV, 以及细胞死亡(如凋亡)过程中产生的 EV, 如凋亡小体^[26]。第二种方法是在组织切除后立即进行处理。这通常涉及将组织样本分割成小块(使用组织均质机、旋涡混合或切片技术), 随后采用酶处理来破坏细胞外基质^[27-28]。这种方法可能导致不同程度的细胞损伤, 从而产生某些非原生态的假性 EV。这些假性 EV 可能反映了细胞应激或损伤状态, 而非组织的生理状态。因此, 研究者在采用这些方法时需谨慎考虑这些潜在的限制和变异^[27]。

建议 3 对于组织体外培养提取 EV 方法, 应尽量保持培养条件接近原位条件, 还应考虑细胞死亡过程中所产生的 EV 对总 EV 制品质量的影响。组织直接提取 EV 方法应建立组织特异性的处理流程, 如针对组织细胞与细胞外间质分离方法(机械力或酶消化法)、特定 EV 分离或浓缩方法进行选择(弱推荐)。

三、细胞外囊泡分离技术

EV 的分离是指利用 EV 的理化性质与其他共分离污染物之间的差异, 实现将 EV 从样本中充分富集的操作。经多年的技术开发与革新, 研究者已开发出多种 EV 分离技术, 包括常用的技术如超速离心(ultracentrifugation, UC)、尺寸排阻层析(size exclusion chromatography, SEC)、亲和富集、共沉淀、场流分馏和切向流超滤等(表 2);近年来也出现了多种新兴技术, 如超声纳滤法、多肽探针法、脂质探针法、二分式 SEC 法(dichotomic size-exclusive chromatography, dSEC)等^[29-30]。

表 2 常用 EV 分离技术汇总表

分离方法	分离原理	优势	缺陷	推荐应用
超速离心法	EV 粒径和密度差异顺序沉降	金标准, 可处理体积较大样品, 价格低廉	回收率较低, 操作时间长	大体积及成分简单样品
尺寸排阻层析法	EV 粒径	操作简便, 可自动化, 分离效率较高	无法去除尺寸相似的可溶性污染蛋白	小体积生物体液样品
亲和富集法	特定抗体或其他亲和分子与 EV 特异性结合	实现特定 EV 亚型分离, 分离特异性高	成本较高, 需要抗体或特定亲和分子	分离表达特殊表面分子的 EV
共沉淀法	降低溶质可溶性从而沉淀析出 EV	操作简便, 技术门槛低	分离纯度低, 试剂可能破坏 EV 膜结构	小体积样品快速分离
场流分馏法	EV 粒径和形状	EV 损耗低, 分离分辨率高	仪器复杂, 技术门槛高, 样本分离时间长	高纯度高分辨率 EV 分离
切向流过滤法	液体切向流过滤杂质分子, 截留 EV	操作简便, 回收率高	同步处理多样品能力不足	大部分生物样品特别是大体积样品的快速分离
阴离子交换色谱法	填料上的可交换离子与 EV 等带电荷物质间的电荷作用力	操作简便, 分离效率高, 可自动化	无法去除带同样电荷的蛋白	大体积样品如细胞培养上清的 EV 分离, 要求样品中没有大量杂质蛋白

注:EV 为细胞外囊泡

(一) 常用细胞外囊泡分离技术

1. 超速离心法: UC 法是最早应用于 EV 分离的经典方法, 被视为 EV 提取的“金标准”, 其利用 EV 与其他杂质颗粒沉降系数的差异实现 EV 的分离^[29, 31-32]。UC 最常用的模式是差速离心, 即通过多步不同离心力/转速的离心操作将样品内包括 EV 在内的各种颗粒依序分离。其另一常用模式为密度梯度离心, 即使用蔗糖、重水和/或 OptiPrep(质量浓度为 60%、密度为 1.32 g/ml 的碘克砂醇溶液)等试剂制作密度梯度/缓冲垫, 从而实现 EV 及其亚类的精细分离^[33]。UC 法产物虽然具较高的纯度, 但是需要超速离心机等设备, 对操作人员的专业要求较高。当样本类型为血浆、血清等体液时, UC 法所分离的 EV 仍有较高丰度的脂蛋白和白蛋白等共分离污染物。分离较大体积样品时, 推荐使用 UC 作为分离方法。对于血浆和血清等复杂样品, 虽具有一定局限性, 但目前 UC 仍然作为分离“金标准”。为提高样品的分离纯度与产率, 应进行规范的样品前处理步骤, 选择合适的离心力、时间与缓冲液等参数。

2. 尺寸排阻层析法: SEC 又称凝胶过滤层析, 是根据固定相填料孔隙的大小与样品中颗粒的斯托克斯半径(即分子在溶液中的表观尺寸)间相对关系将不同粒径的颗粒分不同组份洗出的一种色谱学方法^[34]。当不同尺寸的颗粒流经 SEC 柱时, EV 等粒径大于填料孔隙的颗粒被排除在凝胶颗粒以外, 路径较短; 而蛋白质等小于孔隙的颗粒则进入其内部, 路径较长, 这使二者显示出不同的分配

系数, 进而可在不同保留时间被洗脱流出。SEC 法分离 EV 的过程较为温和, 可较大限度地保留 EV 的生物学活性。当使用不同填料和洗脱条件时, SEC 法 EV 分离过程常需收集约 10~30 个等体积洗脱液。但是, 其缺点是难以去除与 EV 粒径接近的共分离污染物, 例如低密度脂蛋白颗粒和 IgM 等。SEC 分离样品体积可调, 广泛适用于不同类型的 EV 样品。在使用 SEC 方法时, 应根据样品的性质选择分离柱、填充物类型, 收集合适组份的洗脱液进行下游应用。

3. 亲和富集法: 亲和富集法是使用与 EV 表面物质亲和力强的分子, 亲和并增加 EV 沉降系数和/或使用磁珠完成 EV 富集的方法。针对 EV 的物质组成, 现已开发出针对 EV 表面各种物质的分离技术, 其中应用最广泛的是免疫亲和捕获法。该法使用修饰有特定 EV 表面标志物蛋白(如 CD63、CD9 或 CD81 等)亲和分子的磁珠捕获具有这些标志物的特定 EV 亚群, 具有较好的特异性^[35]。但是, 该方法只能分离具有特定表面标志物的特定 EV 亚群, 不能达到总 EV 分离的目的。亲和富集法广泛应用于特定 EV 亚群的分离, 在不同的样品应用场景中应关注亲和分子如抗体、适配体、肽段的选择。

4. 共沉淀法: 共沉淀法通常使用聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)或蛋白质有机溶剂沉淀剂(protein organic solvent precipitation, PROSPR)等多聚物在样本溶液中形成网状结构并结合 EV, 通过低速离心获得 EV^[36]。该方法所需实验条件简易, 操作简便, EV 回收率高。但多聚物的多孔结构

可结合多种脂蛋白颗粒和蛋白质杂质,令其引入的多聚物或有机溶剂可能会对后续分析产生不利影响。共沉淀法可应用于大规模的样品分离,对实验设备要求较低,常用于 EV 的快速富集。目前共沉淀法常合并 UC、SEC 等方法提高 EV 纯度。

5. 场流分馏法:场流分馏法是利用所分析组份的流体动力学性质差异进行分离的技术,其中非对称流场-流动分馏 (asymmetric flow field-flow fractionation, AF4) 较为成熟。其原理是样本中不同尺寸的颗粒可在载液层流的作用下聚焦并向出口流动,在分子扩散力与垂直于载液方向上施加的外力场的共同作用下,在载液推动下依据牛顿层流特性以不同速度流向出口,据此,AF4 可获得不同大小的颗粒^[37]。该法对 EV 生物活性保留较好,但需要配备专业仪器。场流分馏法能够精准获取不同大小的 EV 群体,在研究 EV 尺寸及其功能时推荐使用。由于其分离原理的限制,在应用于复杂的生物样品时,需考虑密度、大小和 EV 相似的颗粒(脂蛋白等)污染问题。

6. 切向流过滤法:切向流过滤法通过使液体切向流经超滤膜表面,产生跨膜压力,将小颗粒和溶液推过滤膜,同时截留大颗粒,可有效降低样本内颗粒在滤膜上的堆积从而提高过滤效率^[38]。当作为独立分离技术使用时,切向流过滤法通常只能去除样本内粒径小于 EV 的杂质蛋白或颗粒。其操作简便,颗粒回收率高(可达 80%),是样品和/或粗提产物浓缩的理想手段,常与其他分离技术结合使用,从而获得纯度较高的 EV。切向流过滤法适用于大部分生物样品特别是大体积样品的快速分离,但同步处理多个样品的能力不足。

7. 阴离子交换色谱法:阴离子交换色谱法利用阴离子交换填料上的可交换离子与 EV 等带电荷物质间的电荷作用力不同,从而达到分离 EV 的目的。上样后,EV 因其带负电荷可与带正荷的阴离子交换填料结合,而它们的结合作用是可逆的,在改变 pH 值或者用离子浓度逐渐增加的缓冲液洗脱时,阴离子交换填料上结合的 EV 或其他物质可与洗脱液中的离子发生交换从而被洗脱到洗脱液中。由于不同物质的电荷不同,其与阴离子交换填料的结合能力也不同,所以被洗脱到洗脱液中的顺序也不同,可被不同离子浓度的洗脱液逐渐分离出来,从而可以利用阴离子交换法实现 EV 的提取及纯化^[39-40]。通过不同离子浓度缓冲液的梯度洗脱,还可在一定程度(表面基团的不同)上实现 EV 的纯化

及细分^[41]。阴离子交换色谱法适用于大量液体如细胞培养上清的处理,但要求样品中没有太多杂蛋白混杂,比如培养细胞需要用无血清无蛋白的培养基;另外终产品中会混杂部分和 EV 带同样电荷的蛋白,可以根据不同的下游应用场景进行综合评估。

建议 4 EV 目前仍然缺乏通用的特异性标志物,现有 EV 分离技术均不能在纯度、特异性、回收率、操作复杂度和经济性等方面取得完美的平衡。据此,研究者应明确临床或科学问题,可考虑以特定的、标准化的 EV 分离方法或方法组合作为基线,以评价所分离 EV 的科学或临床价值,从而有效推动 EV 领域研究成果的临床转化。在大规模的细胞上清、大体积的血液体液等生物样品的分离时推荐选择超速离心法、切向流过滤法和阴离子交换色谱法;小体积样品如泪液、唾液、脑脊液等样品推荐尺寸排阻法;研究特定 EV 亚群时推荐亲和富集法(强推荐)。

(二) 新兴 EV 分离方法

1. 超声纳滤法:超声纳滤法通过负压振荡结合双耦合超声振荡系统作用于纳米超滤芯片上,其可将样本中的游离核酸与蛋白等杂质通过纳米孔快速去除,同时 EV 可被截留,实现 EV 的富集和纯化,可有效提高分离纯化的处理速度和纯度,并保持 EV 的生物活性,可实现自动化 EV 分离,适合临床应用^[42]。该方法可分离不同尺寸的 EV 亚群,但目前没有实现特异标志物的 EV 亚群分离。超声纳滤法具备高效的纯化速度,在小体积、珍贵生物样品的分离上具备优势。

2. 多肽探针捕获法:多肽探针可通过其苯丙氨酸残基填充不对称拉伸双分子层产生的缺陷,经静电相互作用与富含磷脂酰丝氨酸 (phosphatidylserine, PS) 的弯曲膜结合^[43],探针偶联磁珠后,可实现多种样本类型的 EV 分离。多肽探针捕获法可分离较高纯度的 EV 群体,但由于 PS 在膜上分布不均一、数量差异大,导致其分离效率差异较大。

3. 脂质探针捕获法:脂质探针可插入 EV 的脂质双分子层,从而识别和捕获 EV^[44]。例如,在锆基有机金属骨架上修饰可切割脂质探针,组装成一种特殊的微载体,其通过脂质探针捕获 EV,再通过 DNA 酶切割脂质探针以释放 EV^[45]。基于脂质探针进行 EV 的捕获能够尽可能获取完整的 EV 群体,在肿瘤 EV 异质性分析、EV 核酸研究分析等方面具有

优势。

4. 二分式尺寸排阻层析法(dichotomic size exclusion chromatography, dSEC): dSEC 是一种改良的 SEC 法^[46]。其特点是可将复杂的 SEC 多组份分离合并操作简化为一步洗脱即可获得高纯度 EV, 其也可同时回收富 EV 组份和非 EV 组份。dSEC 提升了 SEC 法的分离纯度和操作便捷性, 目前在不同样品 EV 分离的应用较少, 仍需更多的研究支持。

建议 5 以上新兴 EV 分离方法在保留 EV 生物学活性、纯化速度、操作便捷性、样本体积要求等方面, 较常用 EV 分离方法具有一定优势。超声纳滤法在基于尺寸的 EV 亚群分离中优势显著, 适用于 EV 亚群组成分析, 但存在非膜性颗粒污染情况; 多肽探针捕获法和脂质探针法适用于 EV 总群的分离, 然而需注意其识别靶点具有脂膜亲和性, 可能存在脂质成分污染; dSEC 是简化改进的 SEC 技术, 其应用还需更多地探索与研究(专家意见)。

四、EV 检测技术

(一) EV 物理鉴定技术

1. 形貌、粒径、颗粒浓度的常规表征技术: 透射电子显微镜(transmission electron microscopy, TEM)、扫描电子显微镜(scanning electron microscopy, SEM) 和原子力显微镜 atomic force microscopy, AFM) 等是在单颗粒水平对 EV 形貌、粒径等物理形状进行表征的传统技术, 存在样本制备繁琐、分析速度慢、粒径分布缺乏统计代表性等缺点^[47-49]。冷冻透射电镜(cryogenic transmission electron microscopy, cryo-TEM) 可以保持 EV 膜结构的完整性, 在接近天然状态下对其进行分析, 但极其昂贵的仪器装备、严苛的技术要求等缺点使得 cryo-TEM 远不能满足 EV 的日常表征需求^[50]。

近年来, 动态光散射技术(dynamic light scattering, DLS)、纳米颗粒跟踪分析技术(nanoparticle tracking analysis, NTA) 和可调电阻脉冲传感技术(turnable resistive pulse sensing, TRPS) 等常被应用于 EV 粒径和颗粒浓度的快速测定^[47, 51-52]。其中 DLS 是一种非单颗粒的表征技术, 其局限性在于样本中的大粒径杂质颗粒或囊泡会湮没小粒径 EV 的信号, 导致测得的 EV 粒径与真实分布存在较大偏差^[51]。NTA 通过追踪颗粒的布朗运动轨迹, 结合 Stokes-Einstein 方程计算 EV 的水合粒径, 并同时根据视野中的颗粒数量计算颗粒浓度。由于 NTA 将纳米颗粒在三维空间的布朗运动投射到二维平面, 使得扩散路径小于真实值, 因此

其粒径测定结果偏大^[51]。TRPS 是一种利用纳米孔技术对溶液中纳米颗粒的粒径分布和浓度在单颗粒水平进行快速测定的技术, 其局限性在于 EV 的宽粒径分布可能导致纳米孔的堵塞并妨碍进一步测量^[52]。

2. 流式细胞术(flow cytometry, FCM): FCM 是一种对悬液中的细胞或细胞大小的微粒进行快速定量分析或分选的技术^[53]。当其应用于 EV 分析时, 散射光可揭示 EV 的大小或颗粒度信息, 是表征 EV 粒径分布最直观的参数。然而目前仅有少数高端 FCM 可实现粒径 300~500 nm 的单个 EV 的散射光检测^[54]。

建议 6 EV 形貌的基本表征需求可选用 TEM、SEM 等, 对于需要保持 EV 膜结构完整性的研究, 表征 EV 更精细的天然结构, cryo-TEM 是一种选择。对于需要快速测定 EV 粒径和颗粒浓度的实验, NTA、TRPS 以及可实现单个 EV 的 FCM 是较为适合的选择。在实验设计中, 研究者应根据具体研究需求, 综合考虑不同技术的优缺点, 选择最适合的物理鉴定技术, 以确保获得准确、可靠的 EV 表征结果(弱推荐)。

(二) 细胞外囊泡蛋白检测技术

1. 蛋白常规表征技术: 蛋白质免疫印迹(western blotting, WB) 和酶联免疫吸附测定法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 是最常用的 EV 蛋白表征技术^[55-56]。然而, WB 存在所需 EV 用量大、操作繁琐、实验流程长等缺点^[55]。ELISA 由于使用了一对组合抗体, 提高了 EV 蛋白检测的特异性。不过, 这两种技术均只能对已知蛋白进行定性或定量表征^[56]。

质谱技术(mass spectrometry, MS) 可实现 EV 蛋白表达谱的检测, 被广泛运用于各种疾病诊断或预后标志物的鉴定与筛选。然而, 质谱检测灵敏度往往不如基于抗体的特异性表征技术, 需要使用 WB 或 ELISA 技术进一步验证鉴定蛋白。

2. FCM: 在 EV 研究中, FCM 通过荧光标记的抗体或荧光探针与 EV 表面的特定蛋白质结合, 使得 EV 能够被流式细胞仪检测和分析。这种方法可以定量分析不同类型 EV 的含量, 甚至能够分辨大小、表面标记和组成成分的差异。此外, FCM 结合流式分选技术, 还能够从复杂样本中分选和纯化特定亚群的 EV, 为后续的功能研究提供了支持^[53]。

建议 7 对于已知蛋白的定性或定量表征, 可选用 WB 或 ELISA 技术。对于未知蛋白的全面表

征,推荐使用 MS 对 EV 蛋白进行分析,随后使用 WB 或 ELISA 进一步验证。在需要多参数分析、亚群分析和分选的实验中,推荐使用 FCM。在选择蛋白检测技术时,应根据实验目的、样本特性和需求灵活运用不同技术,以获得准确、全面的 EV 蛋白信息(弱推荐)。

(三)EV 核酸检测技术

1. 高通量测序技术:高通量测序技术又称下一代测序(next generation sequencing, NGS),可以实现 EV 中所有核酸片段的高通量测序分析,适用于新型核酸序列的发现与核酸生物标志物的筛选^[57]。然而,大规模的测序数据往往需要复杂的数据分析流程,且测序结果受前期核酸制备方案的影响较大。

2. qPCR 及 RT-qPCR 技术:定量聚合酶链反应(quantitative-polymerase chain reaction, qPCR)及逆转录定量聚合酶链反应(reverse transcription-quantitative PCR, RT-qPCR)可分别检测 EV 中特定 DNA 或 RNA 的数量和表达水平,被广泛地应用于 EV 核酸标志物的检测^[58]。然而,这两种技术均在集权平均水平对核酸进行表征,无法揭示核酸在不同 EV 中的异质性分布。

3. 数字 PCR 技术:数字 PCR(digital PCR, dPCR)是利用微流控技术将核酸检测靶标随机分配到大量相互独立的反应单元中,可实现 EV DNA 及 RNA 的数字化分析^[59]。与传统的荧光定量 PCR 相比数字 PCR 技术具有抗干扰能力强、不依赖标准曲线和单分子绝对定量等优点,显著提高 EV 核酸检测的灵敏度。近年来,dPCR 技术被广泛地应用于稀有 EV 核酸标志物检测,有望进一步应用于早期临床诊断等研究^[60]。

建议 8 在分析 EV 核酸时,NGS 可用于新型核酸标志物的筛选。对于已知具体核酸序列的 EV 核酸标志物,建议使用 qPCR 或 RT-qPCR 进行验证。若检测标本量少或核酸标志物丰度极低,建议进一步使用 dPCR 对其进行检测(弱推荐)。

(四)单个 EV 分析技术

1. 单 EV 的 FCM:单 EV 的 FCM 突破了传统流式分析仪检测粒径的极限,将检测灵敏度提高至 40 nm。其在具备单 EV 分析能力的同时,实现了 EV 表面蛋白标志物的多参数检测,可加速 EV 特异性蛋白标志物的发现,并有望成为临床实验室单个 EV 分析的理想检测平台^[61]。此外,单 EV 的 FCM 还可应用于单 EV 核酸标志物分析,可揭示核酸标

志物在不同 EV 中的异质性分布^[62-63]。近年来,基于单 EV 的 FCM 对血浆中携带特定标志物阳性单 EV 的浓度测定被广泛应用于疾病的早期诊断与预后分析。

2. 单颗粒干涉反射成像技术(single particle interferometric reflectance imaging sensing, SP-IRIS):SP-IRIS 通过在基底修饰靶向 EV 表面蛋白的抗体来捕获 EV,利用基底和 EV 来源的两束反射光进行干涉成像^[64]。SP-IRIS 生物传感平台具备高效的光学增强原理,可实现对表达特定蛋白的 EV 的浓度测定及粒径分析^[65]。然而,当高浓度的 EV 位于显微镜的横向分辨率范围内时,多个囊泡可能合并成一个大颗粒,影响 EV 计数、大小和形态分析。

3. 液滴微流控技术:液滴微流控技术是基于两相不相容的原理,油相提供稳定的剪切力,将连续的水相反应体系分割成独立的液体反应单元,在表面活性剂的作用下稳定存在,形成离散的液滴,被广泛地应用于单分子或单颗粒数字化检测^[66]。近年来,基于液滴的微流控技术为特异膜蛋白阳性 EV 检测提供了新的单囊泡分析平台。并且,该技术利用微米级的液滴包裹纳米级的 EV 进行分析,将不受 EV 粒径不均一的影响,可以实现 EV 粒径全覆盖^[67]。

4. 超分辨率显微镜:超分辨率显微镜是近年来荧光成像引人瞩目的进展,可突破光学衍射极限(横向分辨率约为 200 nm, 轴向分辨率约为 500 nm)对生物分子和结构进行观察,从而在单 EV 分析领域显示了重要的应用前景。超分辨率显微成像可分为基于单分子定位的光激活定位显微技术/随机光学重建显微技术、基于受激辐射损耗技术以及基于结构光照明成像技术。此外,单分子定位技术还可以结合全内反射技术,改造成像信噪比、缩短成像时间。超分辨率显微镜可用于 EV 表征和功能研究,建议对样本的处理及标记进行优化,以减少非特异性数据,同时需考虑荧光分子标记对单分子定位的影响^[68]。

建议 9 针对特异蛋白标志物阳性的单 EV 分析,超敏流式细胞术、SP-IRIS、液滴微流控技术和超分辨率显微镜均适用;针对携带特异核酸标志物的单 EV 研究可选择超敏流式细胞术;液滴微流控技术可用于由于 EV 粒径过小或过大导致的超敏流式细胞术和 SP-IRIS 无法分析的 EV 亚群;超分辨率显微镜可用于 EV 亚群表征以及与细胞互作

分析,还可实现单 EV 单分子水平的检测(弱推荐)。

五、展望

EV 是由活细胞释放的特殊脂质囊泡,含有多种生物分子,已成为现代医学研究的热点。这些微小囊泡作为细胞间物质传递和信息传导的载体,携带丰富的生物活性分子,已成为癌症、心血管疾病、感染等多种重大疾病的新型生物标志物,为发展新的临床检验技术提供了前所未有的机遇。然而,要将 EV 分离和检测技术应用于临床实验室,需要面对以下三大挑战。首先,临床标本成分复杂,需要构建临床适用的 EV 分离技术,从而更高效、便捷地从临床标本中提取 EV,为其下游分析打下基础。其次,EV 标志物的多样性和高度异质性,需要搭建高通量、高精度的 EV 检测平台,并利用人工智能技术提高 EV 检测技术的临床诊断效能。最后,不同实验室间检测结果的一致性差,需要建立规范化质量控制体系,以提高 EV 实验室检测结果的可重复性和跨实验室可比性。近年来,随着交叉医学领域的快速发展,物理学、化学和工程学逐渐应用于 EV 分离和检测技术的开发,EV 检测灵敏度、特异性、稳定性等性能不断提升,未来将开发出更多 EV 标志物和诊断方法应用于重大疾病的早期诊断、疗效监测和预后判断,更好地服务临床,造福患者。

执笔人 李博(南方医科大学南方医院检验医学科),张晔(南方医科大学南方医院检验医学科),王通(暨南大学生命科学技术学院/暨南大学附属第一医院检验科),吕林莉(东南大学附属中大医院肾脏科/肾脏病研究所),颜晓梅(厦门大学化学化工学院化学生物学系),汪泱(上海交通大学医学院附属第六人民医院骨科研究所),蔡志坚(浙江大学基础医学院),陈刚(口颌系统重建与再生全国重点实验室/武汉大学口腔医院口腔颌面外科),陈熹(南京大学生命科学学院),付清玲(中山大学附属第一医院耳鼻咽喉科),刘飞(哈佛医学院布莱根妇女医院医学系医学工程科),刘婷姣(上海市口腔医院/复旦大学附属口腔医院病理科),钱晖(江苏大学医学院医学检验系),徐文华(青岛大学再生医学与检验创新研究院/青岛大学医学部检验系),杨露(电子科技大学医学院基础医学系),尹航(清华大学药学院),张鹏(上海交通大学医学院分子医学研究院),赵可伟(广州中医药大学第三附属医院/中草药囊泡广东省工程研究中心),邹和群[香港中文大学(深圳)医学院],黄依瑶(南方医科大学南方医院检验医学科)、潘炜伦(南方医科大学南方医院检验医学科),刘春辰(南方医科大学南方医院检验医学科),欧子豪(南方医科大学南方医院检验医学科),郑磊(南方医科大学南方医院检验医学科),王前(南方医科大学珠江医院检验医学部/转化医学中心)

专家组成员(按姓氏拼音顺序排列) 蔡贞(南方医科大学南方医院检验医学科),蔡志坚(浙江大学基础医学院),曹颖平(福建医科大学附属协和医院检验科),唱凯(陆军军医大学西南医院检验科),陈凤花(华中科技大学同济医学院附属协和医院检验科),陈刚(口颌系统重建与再生全国重点实验室,武汉大学口腔医院口腔颌面外科),陈葳(西安交通大学第一附属医院检验科),陈熹(南京大学生命科学学院),程国锋(同济大学医学院传染病和疫苗研究所),程伟(重庆医科大学附属第一医院临床分子医学检测中心),杜鲁涛(山东大学齐鲁医院检验医学中心),段勇(昆明医科大学第一附属医院医学检验科、云南省医学检验临床研究中心),樊俊兵(南方医科大学基础医学院肿瘤研究所),符生苗(海南医科大学附属海南医院医学检验教研室),付清玲(中山大学附属第一医院耳鼻咽喉科),关明(复旦大学附属华山医院检验医学科),郭玮(复旦大学附属中山医院检验科),郝晓柯(西北大学医学院检验医学系),何帮顺(南京医科大学附属南京医院医学检验科),黄胜林(复旦大学附属肿瘤医院肿瘤研究所),姜艳芳(吉林大学第一医院基因诊断中心),金博(北京大学第一医院检验科),康春生(天津医科大学总医院、天津市神经病学研究所),李博(南方医科大学南方医院检验医学科),李娟(山东大学第二医院检验医学中心),李莉(上海交通大学医学院附属第一人民医院检验医学中心),李敏(上海交通大学医学院附属仁济医院检验科),李珣(厦门大学附属第一医院检验科),李永鑫(新疆生产建设兵团医院检验科),刘笔锋(华中科技大学生命科学与技术学院),刘必成(东南大学附属中大医院肾脏科),刘春辰(南方医科大学南方医院检验医学科),刘飞(哈佛医学院布莱根妇女医院医学系医学工程科),刘婷姣(复旦大学附属口腔医院病理科),刘子杰(云南省检验医学重点实验室),龙钢(复旦大学基础医学院病原生物学系),罗阳(重庆大学医学院智慧检验与分子医学中心),吕林莉(东南大学附属中大医院肾脏科/肾脏病研究所),马亮(中日友好医院检验科),欧子豪(南方医科大学南方医院检验医学科),潘炜伦(南方医科大学南方医院检验医学科),钱晖(江苏大学医学院医学检验系),宋兴勃(四川大学华西医院实验医学科),唐月汀(武汉大学中南医院医学检验科)、汪泱(上海交通大学医学院附属第六人民医院骨科研究所),王保龙(中国科学技术大学附属第一医院),王佳谊(上海市胸科医院检验科),王鹏飞(上海交通大学医学院附属仁济医院检验科),王前(南方医科大学珠江医院检验医学部/转化医学中心),王通(暨南大学生命科学技术学院/暨南大学附属第一医院检验科),王小中(南昌大学第二附属医院检验科),肖漓(解放军总医院第八医学中心呼吸与危重症医学部研究所),谢辉(中南大学湘雅医院骨科),熊思东(苏州大学生物医学研究院),徐建(南京医科大学第一附属医院检验学部),徐文华(青岛大学再生医学与检验创新研究院,青岛大学医学部检验系),许文荣(江苏大学医学院医学检验系),颜晓梅(厦门大学化学化工学院化学生物学系),杨福全(中

国科学院生物物理研究所蛋白质组学技术实验室),杨露(电子科技大学医学院基础医学系),尹海芳(天津医科大学医学技术学院),尹航(清华大学药学院),张华(贵州省人民医院检验科),张鹏(上海交通大学医学院分子医学研究院),张晔(南方医科大学南方医院检验医学科),赵可伟(广州中医药大学第三附属医院/中草药囊泡广东省工程研究中心),郑磊(南方医科大学南方医院检验医学科),邹和群[香港中文大学(深圳)医学院]

利益冲突 所有作者声明无利益冲突

参 考 文 献

- [1] 王前,郑磊.细胞外囊泡—基础研究与临床应用[M].北京:科学出版社,2019.
- [2] Welsh JA, Goberdhan D, 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. DOI: 10.1002/jev2.12404.
- [3] Liang X, Dai N, Sheng K, et al. Gut bacterial extracellular vesicles: important players in regulating intestinal microenvironment[J]. *Gut Microbes*, 2022, 14(1): 2134689. DOI: 10.1080/19490976.2022.2134689.
- [4] Park KS, Svennerholm K, Crescitelli R, et al. Synthetic bacterial vesicles combined with tumour extracellular vesicles as cancer immunotherapy[J]. *J Extracell Vesicles*, 2021, 10(9):e12120. DOI: 10.1002/jev2.12120.
- [5] 李青,李博,陈政升,等.团体标准《人多能干细胞来源的小细胞外囊泡》与《人间充质干细胞来源的小细胞外囊泡》解读[J].中国研究型医院,2023,10(3):47-50. DOI: 10.19450/j.cnki.jcrh.2023.03.010.
- [6] Jeppesen DK, Fenix AM, Franklin JL, et al. Reassessment of exosome composition[J]. *Cell*, 2019, 177(2):428-445.e18. DOI: 10.1016/j.cell.2019.02.029.
- [7] Lehrich BM, Liang Y, Fiandaca MS. Foetal bovine serum influence on in vitro extracellular vesicle analyses[J]. *J Extracell Vesicles*, 2021, 10(3): e12061. DOI: 10.1002/jev2.12061.
- [8] Shlomovitz I, Erlich Z, Arad G, et al. Proteomic analysis of necroptotic extracellular vesicles[J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(11):1059. DOI: 10.1038/s41419-021-04317-z.
- [9] Zhang S, Wear DJ, Lo S. Mycoplasmal infections alter gene expression in cultured human prostatic and cervical epithelial cells[J]. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2000, 27(1):43-50. DOI: 10.1111/j.1574-695X.2000.tb01410.x.
- [10] Zabel RR, Bär C, Ji J, et al. Enrichment and characterization of extracellular vesicles from ex vivo one-sided human placenta perfusion[J]. *Am J Reprod Immunol*, 2021, 86(2):e13377. DOI: 10.1111/aji.13377.
- [11] Lucien F, Gustafson D, Lenassi M, et al. MiBlood-EV: Minimal information to enhance the quality and reproducibility of blood extracellular vesicle research[J]. *J Extracell Vesicles*, 2023, 12(12): e12385. DOI: 10.1002/jev2.12385.
- [12] Théry C, Witwer KW, 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. DOI: 10.1080/20013078.2018.1535750.
- [13] Nieuwland R, Siljander PR. A beginner's guide to study extracellular vesicles in human blood plasma and serum [J]. *J Extracell Vesicles*, 2024, 13(1): e12400. DOI: 10.1002/jev2.12400.
- [14] Coumans F, Brisson AR, Buzas EI, et al. Methodological guidelines to study extracellular vesicles[J]. *Circ Res*, 2017, 120(10): 1632-1648. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.117.309417.
- [15] Palviainen M, Laukkonen K, Tavukcuoglu Z, et al. Cancer alters the metabolic fingerprint of extracellular vesicles [J]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12(11): 3292. DOI: 10.3390/cancers12113292.
- [16] Erdbrügger U, Blijdorp CJ, Bijnsdorp IV, et al. Urinary extracellular vesicles: A position paper by the urine task force of the international society for extracellular vesicles [J]. *J Extracell Vesicles*, 2021, 10(7): e12093. DOI: 10.1002/jev2.12093.
- [17] Merchant ML, Rood IM, Deegens J, et al. Isolation and characterization of urinary extracellular vesicles: implications for biomarker discovery[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2017, 13(12):731-749. DOI: 10.1038/nrneph.2017.148.
- [18] Sandau US, Magaña SM, Costa J, et al. Recommendations for reproducibility of cerebrospinal fluid extracellular vesicle studies[J]. *J Extracell Vesicles*, 2024, 13(1): e12397. DOI: 10.1002/jev2.12397.
- [19] Welton JL, Loveless S, Stone T, et al. Cerebrospinal fluid extracellular vesicle enrichment for protein biomarker discovery in neurological disease: multiple sclerosis[J]. *J Extracell Vesicles*, 2017, 6(1): 1369805. DOI: 10.1080/20013078.2017.1369805.
- [20] Kangas P, Nyman TA, Metsähonkala L, et al. Towards optimised extracellular vesicle proteomics from cerebrospinal fluid[J]. *Sci Rep*, 2023, 13(1): 9564. DOI: 10.1038/s41598-023-36706-z.
- [21] Chiappin S, Antonelli G, Gatti R, et al. Saliva specimen: a new laboratory tool for diagnostic and basic investigation [J]. *Clin Chim Acta*, 2007, 383(1-2):30-40. DOI: 10.1016/j.cca.2007.04.011.
- [22] Comfort N, Bloomquist TR, Shephard AP, et al. Isolation and characterization of extracellular vesicles in saliva of children with asthma[J]. *Extracell Vesicles Circ Nucl Acids*, 2021, 2:29-48. DOI: 10.20517/evcna.2020.09.
- [23] Sjoqvist S, Otake K. Saliva and saliva extracellular vesicles for biomarker candidate identification-assay development and pilot study in amyotrophic lateral sclerosis[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(6):5237. DOI: 10.3390/ijms24065237.
- [24] Van Ombergen A, Demertzis A, Tomilovskaya E, et al. The effect of spaceflight and microgravity on the human brain [J]. *J Neurol*, 2017, 264(Suppl 1): 18-22. DOI: 10.1007/s00415-017-8427-x.
- [25] Jingushi K, Uemura M, Ohnishi N, et al. Extracellular vesicles isolated from human renal cell carcinoma tissues disrupt vascular endothelial cell morphology via azurocidin[J]. *Int J Cancer*, 2018, 142(3): 607-617. DOI: 10.1002/ijc.31080.
- [26] Carrel A, Burrows MT. Cultivation of tissues in vitro and its technique[J]. *J Exp Med*, 1911, 13(3): 387-396. DOI: 10.1084/jem.13.3.387.

- [27] Crescitelli R, Lässer C, Lötvall J. Isolation and characterization of extracellular vesicle subpopulations from tissues[J]. *Nat Protoc*, 2021, 16(3): 1548-1580. DOI: 10.1038/s41596-020-00466-1.
- [28] Huang Y, Driedonks T, Cheng L, et al. Brain tissue-derived extracellular vesicles in alzheimer's disease display altered key protein levels including cell Type-Specific markers[J]. *J Alzheimers Dis*, 2022, 90(3): 1057-1072. DOI: 10.3233/JAD-220322.
- [29] Shao H, Im H, Castro CM, et al. New technologies for analysis of extracellular vesicles[J]. *Chem Rev*, 2018, 118(4):1917-1950. DOI: 10.1021/acs.chemrev.7b00534.
- [30] Kurata A, Kiyohara S, Imai T, et al. Characterization of extracellular vesicles from *Lactiplantibacillus plantarum* [J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 13330. DOI: 10.1038/s41598-022-17629-7.
- [31] Marar C, Starich B, Wirtz D. Extracellular vesicles in immunomodulation and tumor progression[J]. *Nat Immunol*, 2021, 22(5): 560-570. DOI: 10.1038/s41590-021-00899-0.
- [32] Dong L, Zieren RC, Horie K, et al. Comprehensive evaluation of methods for small extracellular vesicles separation from human plasma, urine and cell culture medium[J]. *J Extracell Vesicles*, 2020, 10(2):e12044. DOI: 10.1002/jev2.12044.
- [33] Zhang Z, Yu K, You Y, et al. Comprehensive characterization of human brain-derived extracellular vesicles using multiple isolation methods: Implications for diagnostic and therapeutic applications[J]. *J Extracell Vesicles*, 2023, 12(8):e12358. DOI: 10.1002/jev2.12358.
- [34] Watson DC, Yung BC, Bergamaschi C, et al. Scalable, cGMP-compatible purification of extracellular vesicles carrying bioactive human heterodimeric IL-15/lactadherin complexes[J]. *J Extracell Vesicles*, 2018, 7(1): 1442088. DOI: 10.1080/20013078.2018.1442088.
- [35] Zhang P, Zhou X, He M, et al. Ultrasensitive detection of circulating exosomes with a 3D-nanopatterned microfluidic chip[J]. *Nat Biomed Eng*, 2019, 3(6):438-451. DOI: 10.1038/s41551-019-0356-9.
- [36] Zhang X, Borg E, Liaci AM, et al. A novel three step protocol to isolate extracellular vesicles from plasma or cell culture medium with both high yield and purity[J]. *J Extracell Vesicles*, 2020, 9(1): 1791450. DOI: 10.1080/20013078.2020.1791450.
- [37] Zhang H, Lyden D. Asymmetric-flow field-flow fractionation technology for exomere and small extracellular vesicle separation and characterization[J]. *Nat Protoc*, 2019, 14(4): 1027-1053. DOI: 10.1038/s41596-019-0126-x.
- [38] Visan KS, Lobb RJ, Ham S, et al. Comparative analysis of tangential flow filtration and ultracentrifugation, both combined with subsequent size exclusion chromatography, for the isolation of small extracellular vesicles[J]. *J Extracell Vesicles*, 2022, 11(9):e12266. DOI: 10.1002/jev2.12266.
- [39] Fang SB, Zhang HY, Wang C, et al. Small extracellular vesicles derived from human mesenchymal stromal cells prevent group 2 innate lymphoid cell-dominant allergic airway inflammation through delivery of miR-146a-5p[J]. *J Extracell Vesicles*, 2020, 9(1): 1723260. DOI: 10.1080/20013078.2020.1723260.
- [40] Kim DK, Nishida H, An SY, et al. Chromatographically isolated CD63+CD81+extracellular vesicles from mesenchymal stromal cells rescue cognitive impairments after TBI[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113(1): 170-175. DOI: 10.1073/pnas.1522297113.
- [41] Seo N, Nakamura J, Kaneda T, et al. Distinguishing functional exosomes and other extracellular vesicles as a nucleic acid cargo by the anion-exchange method[J]. *J Extracell Vesicles*, 2022, 11(3): e12205. DOI: 10.1002/jev2.12205.
- [42] Chen Y, Zhu Q, Cheng L, et al. Exosome detection via the ultrafast-isolation system: EXODUS[J]. *Nat Methods*, 2021, 18(2):212-218. DOI: 10.1038/s41592-020-01034-x.
- [43] Botha J, Handberg A, Simonsen JB. Lipid-based strategies used to identify extracellular vesicles in flow cytometry can be confounded by lipoproteins: Evaluations of annexin V, lactadherin, and detergent lysis[J]. *J Extracell Vesicles*, 2022, 11(4):e12200. DOI: 10.1002/jev2.12200.
- [44] Wan Y, Cheng G, Liu X, et al. Rapid magnetic isolation of extracellular vesicles via lipid-based nanoprobe[J]. *Nat Biomed Eng*, 2017, 1: 0058 [pii]. DOI: 10.1038/s41551-017-0058.
- [45] Pan WL, Feng JJ, Luo TT, et al. Rapid and efficient isolation platform for plasma extracellular vesicles: EV-FISHER[J]. *J Extracell Vesicles*, 2022, 11(11): e12281. DOI: 10.1002/jev2.12281.
- [46] Guo J, Wu C, Lin X, 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. DOI: 10.1002/jev2.12145.
- [47] Hoshino A, Kim HS, Bojmar L, et al. Extracellular Vesicle and Particle Biomarkers Define Multiple Human Cancers [J]. *Cell*, 2020, 182(4): 1044-1061.e18. DOI: 10.1016/j.cell.2020.07.009.
- [48] Dong X, Li M, Li Q, et al. Effects of cryopreservation on microparticles concentration, procoagulant function, size distribution, and morphology[J]. *Med Sci Monit*, 2019, 25: 6675-6690. DOI: 10.12659/MSM.917962.
- [49] Feng X, Iliuk A, Zhang X, et al. Supramolecular exosome array for efficient capture and in situ detection of protein biomarkers[J]. *Anal Chem*, 2023, 95(5): 2812-2821. DOI: 10.1021/acs.analchem.2c04190.
- [50] Zhang Z, Liu X, Yang X, et al. Identification of faecal extracellular vesicles as novel biomarkers for the non-invasive diagnosis and prognosis of colorectal cancer [J]. *J Extracell Vesicles*, 2023, 12(1): e12300. DOI: 10.1002/jev2.12300.
- [51] Li D, Zhang C, Gao Z, et al. Curcumin-loaded macrophage-derived exosomes effectively improve wound healing[J]. *Mol Pharm*, 2023, 20(9): 4453-4467. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.3c00062.
- [52] Fang Z, Liu K. Plant-derived extracellular vesicles as oral drug delivery carriers[J]. *J Control Release*, 2022, 350: 389-400. DOI: 10.1016/j.jconrel.2022.08.046.
- [53] Morales-Kastresana A, Jones JC. Flow cytometric analysis of extracellular vesicles[J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1545: 215-225. DOI: 10.1007/978-1-4939-6728-5_16.
- [54] Ou Z, Situ B, Huang X, et al. Single-particle analysis of circulating bacterial extracellular vesicles reveals their biogenesis, changes in blood and links to intestinal barrier

- [J]. *J Extracell Vesicles*, 2023, 12(12): e12395. DOI: 10.1002/jev2.12395.
- [55] Zhu L, Sun HT, Wang S, et al. Isolation and characterization of exosomes for cancer research[J]. *J Hematol Oncol*, 2020, 13(1): 152. DOI: 10.1186/s13045-020-00987-y.
- [56] Rai A, Fang H, Fatmous M, et al. A protocol for isolation, purification, characterization, and functional dissection of exosomes[J]. *Methods Mol Biol*, 2021, 2261:105-149. DOI: 10.1007/978-1-0716-1186-9_9.
- [57] Huang X, Yuan T, Tschanne M, et al. Characterization of human plasma-derived exosomal RNAs by deep sequencing[J]. *BMC Genomics*, 2013, 14: 319. DOI: 10.1186/1471-2164-14-319.
- [58] Li L, Huang L, Huang C, et al. The multiomics landscape of serum exosomes during the development of sepsis[J]. *J Adv Res*, 2022, 39: 203-223. DOI: 10.1016/j.jare.2021.11.005.
- [59] Chen WW, Balaj L, Liau LM, et al. BEAMing and Droplet Digital PCR Analysis of Mutant IDH1 mRNA in Glioma Patient Serum and Cerebrospinal Fluid Extracellular Vesicles[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2013, 2(7):e109. DOI: 10.1038/mtna.2013.28.
- [60] Liu C, Li B, Lin H, et al. Multiplexed analysis of small extracellular vesicle-derived mRNAs by droplet digital PCR and machine learning improves breast cancer diagnosis[J]. *Biosens Bioelectron*, 2021, 194:113615. DOI: 10.1016/j.bios.2021.113615.
- [61] Fathi M, Martinez-Paniagua M, Rezvan A, et al. Identifying signatures of EV secretion in metastatic breast cancer through functional single-cell profiling[J]. *iScience*, 2023, 26(4):106482. DOI: 10.1016/j.isci.2023.106482.
- [62] Liu H, Tian Y, Xue C, et al. Analysis of extracellular vesicle DNA at the single-vesicle level by nano-flow cytometry[J]. *J Extracell Vesicles*, 2022, 11(4):e12206. DOI: 10.1002/jev2.12206.
- [63] Huang G, Lin G, Zhu Y, et al. Emerging technologies for profiling extracellular vesicle heterogeneity[J]. *Lab Chip*, 2020, 20(14):2423-2437. DOI: 10.1039/d0lc00431f.
- [64] Silva AM, Lázaro-Ibáñez E, Gunnarsson A, et al. Quantification of protein cargo loading into engineered extracellular vesicles at single-vesicle and single-molecule resolution[J]. *J Extracell Vesicles*, 2021, 10(10):e12130. DOI: 10.1002/jev2.12130.
- [65] Gebara N, Scheel J, Skovronova R, et al. Single extracellular vesicle analysis in human amniotic fluid shows evidence of phenotype alterations in preeclampsia [J]. *J Extracell Vesicles*, 2022, 11(5): e12217. DOI: 10.1002/jev2.12217.
- [66] Liu C, Xu X, Li B, et al. Single-exosome-counting immunoassays for cancer diagnostics[J]. *Nano Lett*, 2018, 18(7):4226-4232. DOI: 10.1021/acs.nanolett.8b01184.
- [67] Tang Z, Lv F, Reynolds DE, et al. Highly parallel, wash-free, and ultrasensitive centrifugal droplet digital protein detection in sub-microliter blood[J]. *Lab Chip*, 2023, 23(12):2758-2765. DOI: 10.1039/d3lc00205e.
- [68] Bordanaba-Florit G, Royo F, Kruglik SG, et al. Using single-vesicle technologies to unravel the heterogeneity of extracellular vesicles[J]. *Nat Protoc*, 2021, 16(7): 3163-3185. DOI: 10.1038/s41596-021-00551-z.