

· 综述 ·

DOI: 10.13865/j.cnki.cjbmb.2021.03.1508

不同体液来源外泌体分离鉴定方法评估

杨建^{1),2),3)}, 廖立^{1),2),3)}*, 田卫东^{1),2),3)}*⁽¹⁾口腔再生医学国家地方联合工程实验室, 成都 610041; ⁽²⁾口腔转化医学教育部工程研究中心, 成都 610041;⁽³⁾四川大学华西口腔医学院口腔疾病研究国家重点实验室, 成都 610041)

摘要 外泌体是细胞分泌的磷脂双分子层胞外囊泡, 作为载体在细胞间发挥着物质传递和信息交流的功能。外泌体存在于多种不同体液中, 在疾病诊断和药物载体方面具有良好的应用前景。由于外泌体纳米级别的大小和异质性, 以及体液复杂的组成, 使得体液来源外泌体的分离尤为困难。目前, 体液来源外泌体分离有6种常用方法: 超速离心法、沉淀法、分子筛色谱层析法、密度梯度离心法、膜超滤法和膜特异性吸附法。每种方法都有其独特的优点与不足, 单独使用均难以分离获得高质量的外泌体。不同体液来源外泌体分离方法的选择也存在差异。随着近年来微流控技术等一些新型方法的涌现与经典方法的不断改进, 促使外泌体分离技术得到完善, 有利于外泌体在临床与科研的相关应用研究。本篇综述对不同体液来源外泌体的提取鉴定方法作出比较及评估, 总结了不同体液来源外泌体提取方法的选择和差异, 为后续体液外泌体相关研究提供参考。

关键词 外泌体; 体液; 分离; 鉴定

中图分类号 Q2

Evaluation of Isolation and Identification Methods of Exosomes from Different Biofluids

YANG Jian^{1),2),3)}, LIAO Li^{1),2),3)}*, TIAN Wei-Dong^{1),2),3)}*

⁽¹⁾National Engineering Laboratory for Oral Regenerative Medicine, West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China; ⁽²⁾Engineering Research Center of Oral Translational Medicine, West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China; ⁽³⁾State Key Laboratory of Oral Diseases, West China School of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract Exosomes are phospholipid bilayer extracellular vesicles secreted by cells, and they act as carriers for material transfer and information exchange between cells. Exosomes exist in many different biofluids and have good application prospects in disease diagnosis and drug delivery. Due to the nano-scale size and heterogeneity of exosomes, as well as the complex composition of biofluids, the separation of exosomes from biofluids is particularly difficult. At present, there are six commonly used methods for isolating exosomes from biofluids: ultracentrifugation, precipitation, size exclusion chromatography, density gradient centrifugation, ultrafiltration and immuno-affinity membrane. Each method has its own advantages and disadvantages. It is difficult to separate and obtain high-quality exosomes when used alone. There are also differences in the selection of methods for separating exosomes from different biofluids. With the continuous emergence of some new technologies such as microfluidic technology and the continu-

收稿日期: 2020-09-15; 修回日期: 2020-12-09; 接受日期: 2020-12-20

国家重点研发计划 (No. 2017YFA0104800); 国家自然科学基金 (No. 81600912); 四川省重点研发项目 (No. 2020YFS0177, No. 2019YFS0311) 和中央高校基本科研业务费专项资金 (No. YJ201878) 资助

* 通讯作者 Tel: 028-85503499; E-mail: lliao@scu.edu.cn; Tel: 028-85503499; E-mail: drtwd@sina.com

Received: September 15, 2020; Revised: December 9, 2020; Accepted: December 20, 2020

Supported by the National Key R&D Program of China (No. 2017YFA0104800); National Natural Science Foundation of China (No. 81600912); Sichuan Provincial Key R&D Program (No. 2020YFS0177, No. 2019YFS0311) and Special Foundation for Basic Scientific Research Operating Expenses of Central Universities (No. YJ201878)

* Corresponding author Tel: 028-85503499; E-mail: lliao@scu.edu.cn; Tel: 028-85503499; E-mail: drtwd@sina.com

ous improvement of classical methods, the exosome separation technology is improved, which is beneficial to the application of exosomes in clinical and scientific research. This review compares and evaluates the isolation and identification methods of exosomes from different biofluid sources, summarizes the selection and differences of exosome isolation methods from different biofluid sources, and provides a reference for subsequent research on exosomes from biofluids.

Key words exosomes; biofluids; isolation methods; identification methods

外泌体(exosomes)是细胞分泌的脂质双层结构囊泡,包裹着来自于宿主细胞的核酸、蛋白质和脂质,如信使一般穿梭于各个细胞与组织之间,发挥着细胞与组织之间相互联系和相互交流的功能。几乎所有类型的细胞都能分泌外泌体,同时在机体多种体液中均发现有外泌体的存在,例如尿液、唾液、血液、精液以及乳液等^[1-6]。由于外泌体携带着宿主细胞特异的蛋白质和核酸,在肿瘤和其他疾病的诊断和预后等临床方面发挥重要作用^[7]。但由于外泌体的异质性以及其纳米级粒子大小,再加上如血液等体液复杂的理化性质,使得外泌体的分离提取变得尤为困难^[2,3]。从血液等其他体液中获得较高纯度和质量的外泌体是进行临床及科研应用的关键。本文对目前常用的 6 种体液来源外泌体的分离和鉴定方法进行对比评估,总结了不同体液的相关特点,以及不同体液来源外泌体提取方法的选择和差异。

1 外泌体的生物学特征及其功能

外泌体直径大小在 30~100 nm,由细胞膜内陷形成胞内多囊泡体(multivesicular bodies, MVBs),经过与内质网、高尔基体分泌的囊泡融合以及蛋白质分类机制后成熟。成熟的 MVBs 与细胞膜融合,将囊泡释放出胞外形成外泌体^[7]。外泌体膜上附着有四跨膜蛋白质、整合素和表面黏附蛋白等。其中包括跨膜蛋白质 tetraspanins (CD63、CD9、CD81)、脂筏结构蛋白 flotillin、肿瘤易感基因 101 蛋白(tumor susceptibility gene 101, TSG101)、ALG-2-互作蛋白 X (ALG-2-interacting protein X, Alix) 和热激蛋白 70 (heat shock 70 kD protein, HSP70)。这些蛋白质是目前用于鉴定外泌体的关键标记物。同时外泌体富含神经酰胺、胆固醇和鞘磷脂等多种不同的脂质^[8]。

异质性是外泌体的最显著的特点。由于细胞在内陷过程中的不均一性,以及胞内多囊泡体成熟过程中蛋白质分类机制(specific protein-sorting mechanism),导致外泌体在大小和所包含的内容物存在差异。异质性也使得外泌体在纯化和鉴定方面变得尤为困难。不同组织细胞分泌的外泌体所携带的内容

物存在一定差异;同一组织细胞在不同状态(健康或疾病,静息或运动等)时分泌的外泌体内容物也有较大差异^[9]。利用外泌体所携带物质差异及特点,外泌体正成为临床疾病诊断和药物载体的重要工具。

目前,疾病的诊断是外泌体临床应用的重要方面之一,其所携带特异 miRNA 或 miRNA 家族在肿瘤和其他疾病患者的诊断和预后方面发挥重要作用^[7, 10]。由于正常细胞与肿瘤细胞分泌的外泌体中原癌基因和肿瘤抑制基因 miRNA 表达水平的差异,使得外泌体在肿瘤早期诊断中发挥重要作用^[11-13]。目前,外泌体应用于诊断的疾病类型也越来越多,例如肿瘤、中枢神经疾病以及肝、肾和肺等多个器官性疾病^[14, 15]。药物载体是外泌体在临床应用的又一重要方面^[16-18]。相比常用的脂质体作为药物载体,外泌体作为药物载体有更好的载药能力,且不会引发免疫反应^[16-19]。外泌体作为化疗药物载体具有更好的靶向性,能够针对肿瘤位点进行靶向治疗^[20-22]。对于脑部疾病治疗而言,外泌体被证实能够跨越血脑屏障到达脑内传递蛋白质,利用这一功能可实现药物跨血脑屏障进行脑部相关治疗以及神经保护^[15, 23]。此外,也有研究将外泌体应用与组织修复再生和疾病的治疗。

2 体液来源的外泌体的分离方法

基于外泌体的不同性质,目前有 6 种常见提取方法:超速离心法、沉淀法、分子筛层析法、密度梯度离心法、膜超滤法、膜特异性吸附法(见 Fig. 1)。每种方法所利用的分离原理方法各有不同,每种方法也都存在不同的优缺点,很难仅通过单一的一种方法获得纯度较高的外泌体。

2.1 超速离心法

超速离心法(ultracentrifugation, UC)是利用溶液中不同物质的沉降系数不同,通过超速离心使得溶液中不同物质在相应离心转速时沉淀下来,从而获得外泌体的方法^[24]。首先,依次进行 400×g 和 2 000×g 的离心除去细胞和细胞碎片成分,弃去沉淀,上清进行 10 000×g 离心以去除大囊泡及凋亡小

体,最后进行 $100\ 000\times g$ 离心2 h 获得外泌体沉淀,沉淀经PBS重悬清洗后再次重复此步离心,最终获得外泌体沉淀^[25]。此方法是目前最为广泛使用的外泌体分离方法,超速离心能够较好的将外泌体与蛋白质和脂蛋白颗粒分离开,获得较纯的外泌体。

但是由于外泌体纳米级的粒子大小,需要超高速的离心才能使其沉淀,超速离心时强大的离心力会使得外泌体聚集成团难以重新分散,而且离心剪切力会导致外泌体膜的破损。除此之外超速离心法耗时长且对离心设备也有较高要求^[26-28]。

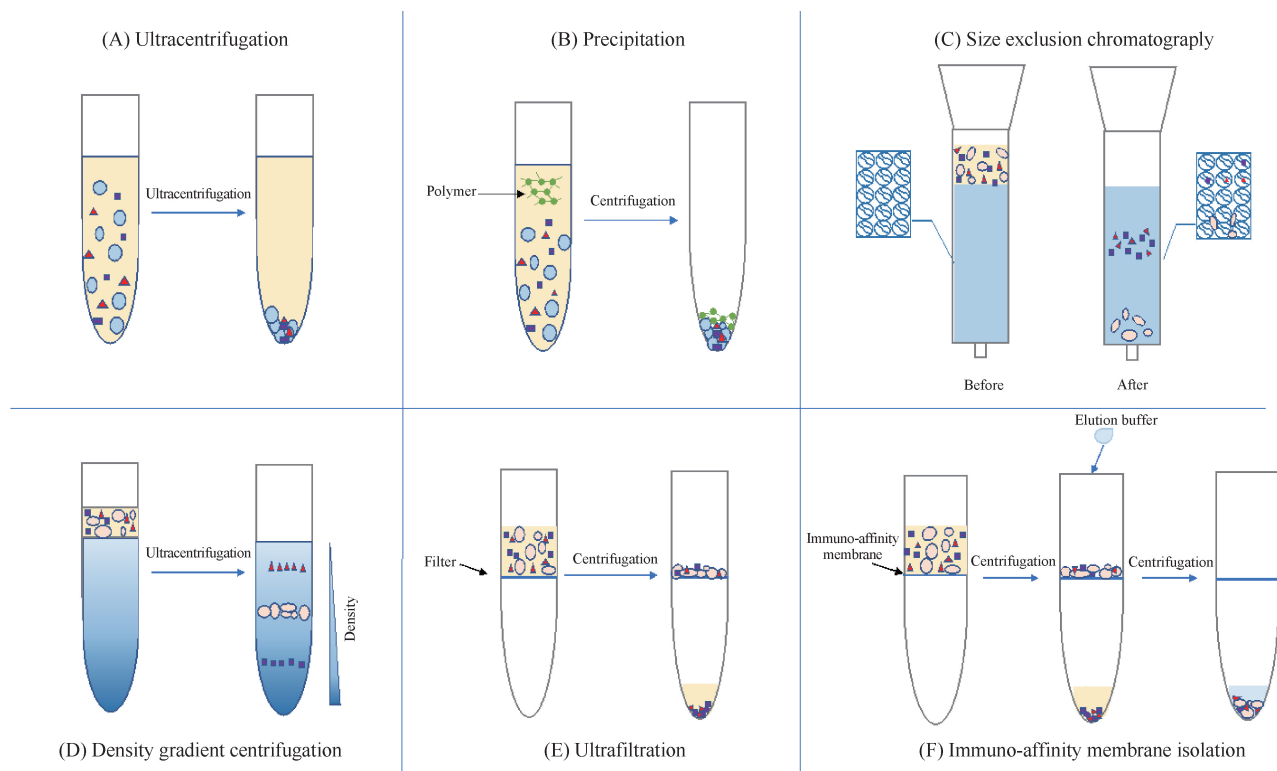


Fig.1 Different methods for exosome isolation Schematic diagram concisely shows six commonly used methods for exosome isolation. (A) Ultracentrifugation (B) Precipitation (C) Size exclusion chromatography (D) Density gradient centrifugation (E) Ultrafiltration (F) Immuno-affinity membrane isolation

2.2 沉淀法

沉淀法 (precipitation) 是利用聚合物,例如聚乙二醇 (polyethyleneglycol, PEG) 在溶液中相互交联形成网状结构,使外泌体在溶液中团聚析出,再通过离心的方式使其沉淀。相比超速离心法,沉淀法要更加简单、易于操作和省时,对外泌体相对温和,且市面上可以很容易购买到沉淀试剂盒^[28]。但是,沉淀法并不被推荐为首选。多篇文献通过沉淀法与超速离心、层析柱法等进行比较,得出结果均认为外泌体被聚合物沉淀的同时,一些大囊泡和蛋白质复合体也一同被聚合物沉淀下来,结果通常是所得到的产量表现较高,但纯度却很低,而且聚合物在产物中难以除去,在透射电镜下可看到点状交联剂背景。尤其从复杂成份的体液,例如血浆中提取外泌体时不建议使用沉淀法,血液中的脂蛋白颗粒和纤维蛋白原等会与外泌体共沉淀,对后续研究结果会有很大影响^[32-34]。

2.3 分子筛层析法

近年来分子筛层析法 (size exclusion chromatography, SEC) 受到越来越多的关注与应用。分子筛层析法是利用多孔介质对不同大小、体积和形状分子排阻能力的不同,使得分子在凝胶固相介质中流动的时间不同,较大的囊泡先被洗脱出来,较小的蛋白质等物质后被洗脱出来^[27]。层析所用的固相介质为凝胶颗粒,目前常用的凝胶材料有交联葡聚糖、琼脂糖和聚丙烯酰胺等,商品化的层析柱也有市售,例如 qEV (IZone)。2014年,由 Böing 团队^[35]提出利用层析分子筛法提取血浆外泌体,并证实此法能将血浆中外泌体与杂蛋白质进行有效分离。后续也有许多团队利用此法证实该法的有效性。有文献利用分子筛层析法与试剂盒沉淀法进行比较。结果均显示,分子筛层析法有更好的分离效果,但同时也指出此方法所提取的外泌体中仍然残留有高密度脂质颗粒,无法完全分离^[33, 36]。不同于超速离心,层析

法耗时短仅需 30 min 就可完成分离和收集,成本低且易于操作,同时避免了超速离心时离心力带给外泌体的损害,能收集到与血浆中状态相近的外泌体^[34]。

2.4 密度梯度离心法

密度梯度离心法(density gradient centrifugation, DGC)是利用不同浓度梯度的缓冲液形成不同密度的缓冲组分,通过离心将外泌体与其他杂蛋白质组分分离到相应悬浮密度组分中,从而实现外泌体的提取^[37]。外泌体的密度在 1.15~1.19 g/mL,蛋白质的密度在 1.35~1.41 g/mL^[8]。常用的梯度缓冲液是由蔗糖、碘海醇和碘克沙醇。常见的方法是使用浓度梯度在 5%~60%的碘克沙醇或者 20%~60%的蔗糖缓冲液,从溶液顶部加入样品进行离心。这种方法常被用于外泌体发生的相关研究中,借助此方法可以分离细胞中不同的细胞器,例如内质网、高尔基体和线粒体等。它能够较好的分离获得不同亚型的囊泡,同时能将外泌体与不同密度脂蛋白颗粒体分离获得较纯的外泌体,但此方法在实际操作和梯度缓冲液配制过程非常繁琐,离心耗时长。目前,市面上有试剂盒形式装配好梯度缓冲柱售卖。

2.5 超滤法

超滤法(ultrafiltration, UF)是利用外泌体分子大小的特点,使用特殊孔径的膜通过离心截留下外泌体而过滤掉蛋白质等小分子杂质的方法^[38]。但此方法存在不少问题,滤膜在截流囊泡的同时,相应体积大小的蛋白质复合体以及脂蛋白颗粒等也会不同程度的被截留。同时,随着膜截流量的增加会堵塞滤孔,导致纯度的降低。目前有利用此原理的试剂盒,通过 2 个连续的不同孔径大小(0.22 和 0.02 nm)滤膜过滤获得外泌体^[39]。有文献利用此方法试剂盒与分子筛层析法提取血浆外泌体进行比较,虽然膜超滤法试剂盒在产量上略有优势,但纯度上却差距甚远,从透射电镜下观察背景浑浊,提取效果远比分子筛层析法要差^[33, 39]。

目前,也有新的过滤方法,例如非对称流场流分离法(asymmetric flow field-flow fractionation, AF4)等,通过与膜带有角度的方向流动,在过滤的同时横向作用避免堆积堵塞滤孔,同时还能与多种检测方法结合,例如 260 nm 和 280 nm 波长紫外吸收光谱、多角度激光散射和动态光散射等,能同时进行外泌体的分选及鉴定^[33, 39]。目前,有文献利用非对称流场分离法与分子筛层析法对尿液来源外泌体进行分离鉴定比较,尽管非对称流场分离法能够提取出较

好纯度的外泌体,但其耗时长、上样体积小及产量低等缺点,限制后续的应用^[40]。

2.6 免疫亲和膜分离

免疫亲和膜分离(immuno-affinity membrane isolation)是利用经过特殊修饰后与磁珠或滤膜相连的抗体,特异性结合外泌体所携带的膜蛋白质,从而实现外泌体与杂质的分离^[27, 38]。近来有公司推出的利用膜亲和吸附的方法提取外泌体,例如 exoEasy。有文献使用 exoEasy 试剂盒对血浆外泌体进行提取^[6, 33, 36],同时与梯度差速离心法、分子筛层析法以及不同沉淀试剂盒方法进行比较,结果显示,exoEasy在提取纯度和效率均不理想,而且在透射电镜下观察有很厚蛋白质杂质污染,难以找到囊泡。

2.7 微流控技术

目前,广泛应用的 6 种外泌体分离方法,每种方法有其独特的优势与不足,且都难以分离获得较好纯度和较高质量的外泌体。近年来,随着不同学科领域技术的发展与交叉应用,新兴的外泌体分离技术不断涌现并逐渐成为当前外泌体分离研究的热点。基于微流控(microfluidic)的外泌体分离技术就是其中之一。微流控技术是指通过使用尺寸为数微米到数百微米的微管道处理或操纵微小流体,以实现体液中外泌体的分离。目前,此技术已广泛应用于生物医学研究、分子生物学和即时诊断等领域中^[41-43]。当前使用的微流体技术依照分离原理不同主要分为 3 类:基于大小的分离(size-based separation)、基于免疫亲和力的分离(immunoaffinity-based separation)和动态分离(dynamic separation)^[44]。相较于已介绍的 6 种分离方法,微流控技术具有分离外泌体速度快、分离样本纯度高、集成度高等独特优势。但同时该技术复杂的制作工艺以及微小的外泌体产量也限制了其应用的范围^[44]。

3 体液来源外泌体的鉴定评估

常用于鉴定评估外泌体的方法主要是从外泌体的理化性质进行鉴定,从外泌体的粒子大小、浓度、形态以及标记物携带情况进行分析鉴定。不同体液来源的外泌体在某种程度上会携带有组织细胞的特异标记物,对其来源的鉴定依据也有所不同。

3.1 物理性质的鉴定

对于外泌体粒子大小及浓度,目前常用以下 3 种方法进行分析鉴定:纳米颗粒跟踪分析(nanoparticle tracking analysis, NTA)、动态光散射(dynamic light scattering, DLS)和可调电阻脉冲传感(tunable

resistive pulse sensing, tRPS)。NTA 与 DLS 原理相似,利用颗粒在一定范围内做布朗运动,通过光照射颗粒,颗粒上形成散射光被显微采集器收集,从而获得颗粒的分散系数,并最终通过斯托克斯-爱因斯坦公式(the Stokes-Einstein equation)计算出颗粒的大小与浓度,它们的测量直径范围均在 10 ~ 1 000 nm 之间^[45]。不同之处在于,NTA 利用镭射激光且每次需要 0.5 ~ 1 mL 左右的样品体积,而 DLS 则直接使用散射光且仅需要 70 μ L 的样品体积。tRPS 技术简单的说,是外泌体颗粒在电势作用下穿过一层带有纳米孔径的非导电薄膜,在跨膜过程中形成短暂的电阻,电阻大小与颗粒大小成正相关。利用已知颗粒大小与电阻之间的标准曲线计算出样品颗粒的大小。

对于外泌体的形态,通常采用扫描电镜(scanning electron microscope, SEM)和透射电镜(transmission electron microscope, TEM)进行观察。二者的不同在于,SEM 是通过电子束与粒子表面撞击后产生散射光,散射光形成颗粒的形状图像。TEM 则是电子束穿过颗粒直接形成颗粒的形状,有膜的地方形成黑色阴影。通常外泌体在电镜下呈现出内陷的碗状。

3.2 生化性质鉴定

对外泌体生化方面的分析鉴定主要是对其所携带特异性蛋白质标记物的检测。通过特异性抗体与外泌体特征标记物蛋白质结合,检测特异蛋白质表达水平,并可对外泌体的亚类进行分型。目前,主要有蛋白质印迹法(Western blot)和纳米流式细胞术(nanoscale flow cytometry, Nano FACS)这两种方法^[46]。

蛋白质印迹法是最为常见的通过特异性抗原抗

体反应,了解某种特异性蛋白质在外泌体中的表达情况。常用于检测外泌体的抗体有 CD63、CD9、CD81、Alix 和 TSG101 等。不同来源的外泌体所携带表达的标记物不同,通常并不会同时表达所有的标记物,所以每次检测均需要检测多个不同的标记物。

纳米流式细胞术是基于流式细胞技术相同的方法,纳米大小的外泌体较难做为单一的囊泡颗粒进行检测,通常会有聚集在一起的囊泡影响检测。因此,设计将外泌体囊泡与珠子进行连接再进行流式分析^[46]。与传统流式分析相同,应用荧光的抗原抗体反应,对表达特异性蛋白质的外泌体进行分选。这种方法的最大优势在于,它可以避免所含杂质的影响,准确的筛选出表达相应蛋白质的外泌体,同时也能对囊泡的大小和浓度进行测定。

3.3 外泌体鉴定方法的评估

上述是目前最为常见的几种外泌体鉴定方法,不同鉴定方法存在其优点与不足。Table 1 对目前常见鉴定方法优缺点进行了比较总结。鉴定方法在不断的改进和完善,一些新的鉴定方法也被提出。近期有文献报道,使用非对称流场分离法结合,例如 260 nm 和 280 nm 波长紫外吸收光谱、多角度激光散射和动态光散射的组合方法^[40],可以同时对粒子大小和粒径分布进行较好的鉴定,避免了 NTA、DLS 的不足。但作者也提出此方法操作费时,不适用于大范围使用等缺点。纳米流式细胞术也是越来越多文献报道使用的鉴定方法,通过流式和多参数荧光等多种检测结合,可以准确无偏见的对单个囊泡进行粒子大小和蛋白质表达情况的检测,相比 NTA 和蛋白质印迹等方法更为准确,是目前较为可靠的外泌体鉴定方法^[40]。

Table 1 Compare different methods for identifying exosomes

| Method | Project identification | Advantages | Disadvantages |
|---------------------|---|---|---|
| NTA, DLS, tRPS | Size and concentration | Easy to operate, quick | Ensemble-average approaches, cannot distinguish aggravated proteins |
| Western blot | Expression of specific protein in exosomes | Widely use approach, distinguish specific proteins of exosomes | Ensemble-average approach, cannot distinguish dissociate proteins, time-consuming, require known antibodies |
| TEM, SEM | Morphology | Visualize the morphology of exosomes | Sample cannot retrieve |
| Nano-flow cytometry | Size and protein profiling of individual exosomes | Accurate, without prejudice, enable multiparameter analysis of single exosome | Special equipment, time-consuming |

Abbreviations: NTA = nanoparticle tracking analysis; DLS = dynamic light scattering; tRPS = tunable resistive pulse sensing; TEM = transmission electron microscope; SEM = scanning electron microscope

4 不同体液来源外泌体分离方法的评估与选择

4.1 分离方法评估与组合优化

目前,有多种外泌体提取方法,不同方法有其优点与不足。Table 2 对目前常见的体液来源外泌体提取方法进行比较。超速离心法仍是目前最为广泛使用的标准方法,但鉴于其耗时长、对外泌体有损伤等不足,正逐渐被其他方法替代。分子筛层析法是近年来在相关文献中使用频率越来越高的一种方法,其操作简单,产率和活性都比其他方法高,尤其在对血浆等复杂体液来源外泌体进行提取时,更多的会偏向于选择分子筛层析法^[48]。对于沉淀试剂盒,由于其大量的杂蛋白质共沉淀,且无法去除等缺点限制了它的使用^[33, 34, 49]。膜超滤法在目前对外泌体提取中,很少被单独使用,更多的是选择膜超滤法与其他方法进行组合使用^[40, 49]。密度梯度离心法能获得较高纯度的外泌体亚型,但鉴于其复杂的操作和耗时的离心,对于上样体积也有一定限制,所以对于日常实验室使用是非常受限的。对于外泌体的发生起源等需要对外泌体亚型进行研究时,常选用此法进行分离^[37]。最近,厦门大学颜晓梅教授团队^[33]报道了基于纳米流式细胞仪的分析策略,对常见的 6 种不同提取方法,以及对分离血浆外泌体的质量和效率进行评估,利用流式细胞仪进行 TritonX-100 破膜前后的粒子数目对比,去除和未去除外泌体的血清中纯化颗粒物数

目对比等策略评估,结论认为,超速离心法具有最好的分离质量和效率,分子筛层析法紧随其后,沉淀法、超滤及膜吸附等方法表现则不尽如人意。

目前有文献报道,通过不同的分离方法组合使用对体液来源外泌体进行分离,利用一种方法的优点弥补另一种方法的缺点与不足,表现出较好的分离效果。结合体液性状和各种分离方法的优缺点,选择合适的分离方法进行组合是关键。例如,对于血浆外泌体的提取,由于血浆样品体积小,成份复杂,含有大量清蛋白和脂蛋白难以去除。有文献报道,利用碘克沙醇密度梯度超速离心法和连接洗脱色谱层析法(bind-elute chromatography)结合的方法对血浆外泌体进行分离,密度梯度离心可以较好的获得较高纯度的外泌体组分,同时结合连接洗脱色谱层析能够进一步更好的去除组分中的可溶性蛋白质,从而能从血浆中获得高纯度的外泌体^[50]。也有先利用超速离心对血清外泌体进行分离后,再利用沉淀法对外泌体进行富集的方法报道^[31]。对于初始样品体积较大的体液例如尿液,有文献选择先用膜超滤对体积进行浓缩,同时去除大量的可溶性蛋白质杂质,再选择分子筛层析或超速离心对外泌体进行分离^[40, 49]。总之,在对体液来源外泌体提取时,方法的选择应该根据体液类型特点、样品体积、后续研究需求以及实验室条件等多方面因素进行抉择。同时,避免仅使用单一方法进行提取,采用不同方法的结合使用,优势互补是目前更为明智的选择。

Table 2 Comparison of the currently available methods for biofluid-EV isolation

| Method | Principle of isolation | Time | Purity | Advantages | Disadvantages |
|---|------------------------|---------------------|--------|--|--|
| Ultracentrifugation ^[27, 28, 32, 33] | Densit | 4-8 h | High | Current gold standard, established protocol | Time-consuming, specialized equipment, damage of exosomes, low yield and reproducibility |
| Ultrafiltration ^[30, 51] | Size and diameter | 2 h | Low | No limitations on sample volume, easy to operate | Loss of sample, low purity, filter blocking, deformation of exosomes |
| Density gradient centrifugation ^[37] | Density | 20 h | Medium | High purity, separate exosomes with contamination | Time-consuming, difficult to preparation of gradient volume, low yield |
| Size-exclusive chromatography ^[28, 34, 36, 40] | Size and diameter | 20-30 min | High | High yield and recovery, preserves vesicles integrity, low cost, user-friendly processing, quick | Co-isolation of lipoproteins and aggregate proteins |
| Precipitation with polymers ^[26, 30, 33] | Surface charge | 30 min or overnight | Medium | No specialized equipment, user-friendly processing, quick, preserves vesicles integrity | Low purity, mass contamination proteins and lipoproteins, retention of polymer |
| Membrane-based affinity isolation ^[36] | Epitope immunoaffinity | 20-30 min | Low | User-friendly, quick | Low purity, mass contamination proteins and lipoproteins, limitation subtype of exosomes |

4.2 不同体液来源外泌体分离方法的选择

血液是外泌体含量最为丰富的体液来源,但由于血液的复杂组分和粘滞性的特点给外泌体的分离带来较多困难^[24]。血液中含有大量的蛋白质以及与外泌体大小相近的脂质颗粒,在外泌体分离过程中会与外泌体共分离,从而难以获得较纯的外泌体。试剂盒沉淀法并非首选直接用于血液来源外泌体的分离,交联剂只能粗略的将外泌体沉淀,同时伴随有大量的非外泌体杂蛋白质和脂质颗粒^[32-34]。分子筛层析法和超速离心法能够较好的将蛋白质与外泌体组分分离,提取纯度较其他方法要好,但分子筛层析法所提取的外泌体中仍残留有脂蛋白颗粒,超速离心所分离的外泌体在产量上表现不足^[33, 36]。在血液来源外泌体提取过程中,需要选择不同方法针对性去除蛋白质和脂蛋白颗粒,从而提高外泌体纯度。有文献利用沉淀法、密度梯度离心法和分子筛层析法的组合模式,利用各方法的优势分别去除脂蛋白颗粒和蛋白质组分,三步分离获得纯度和产量都较高的外泌体^[52]。血液中汇集了机体所有组织来源的外泌体类型,在进行疾病诊断时,通过对患者血液外泌体中某些疾病的特征性标记物的分析鉴定,并以此作为疾病诊断和预后的重要参考指标^[11-13]。

尿液作为除血液外的另一个常见疾病检测体液,由于尿液与泌尿系统直接联系,因此也被认为是泌尿相关肿瘤研究最为适合的体液对象^[1]。不同于血液,尿液样本体积较大,蛋白质含量相对较少。鉴于尿液样本特点,通常采用超滤浓缩的方式将尿液浓缩去除可溶性杂蛋白质,获得含外泌体浓缩液,再利用分子筛层析法或沉淀法等分离获得较纯的外泌体。肾是尿液的产生器官,多种肾细胞分泌的外泌体可直接进入尿液,因此,检测尿液来源外泌体能作为检测肾相关疾病的新手段。外泌体中所携带的蛋白质和 mRNA 也能作为肾以及泌尿系统疾病的标记物^[1, 53, 54]。

乳汁中含有丰富的酪蛋白胶粒、乳清蛋白和乳脂等成分,在外泌体提取过程中应考虑尽可能去除。利用低速离心可以去除乳液中的细胞和脂质获得乳清,再利用分子筛层析法分离获得较纯的外泌体。乳液来源的外泌体中含有某些 miRNAs,这些 miRNAs 具有免疫相关的功能,它们能够增强外周血来源的辅助性 T 细胞的免疫耐受性。同时乳汁来源外泌体能够促进产后的健康与生长^[5, 55-57]。

精液样本体积较小,蛋白质含量较多,外泌体含

量较少。通过超速离心或密度梯度离心的方法可以有有效的分离精液中的蛋白质和外泌体组分。精液来源的外泌体富含有其特异的标记物: microRNA let-7a、let-7b、miR-148a、miR-375 以及 miR-99a,且精液来源外泌体能够预测精子的成熟情况^[5, 55-57]。同时外泌体中 miRNA 能够促使免疫因子 IL-10 和 IL-13 的表达,在生殖器固有免疫中发挥重要作用^[58]。更重要的是,有研究表明,精液来源外泌体能够通过阻止 HIV 早期蛋白质的转录来抑制 HIV-1 感染^[59]。

5 问题与展望

鉴于外泌体作为信使携带物质与信息穿梭于各组织细胞间的独特生物学功能,利用外泌体发挥临床疾病诊断和载药治疗等多方面的应用研究将持续深入。随着对外泌体发生起源研究的不断深入,人们对外泌体也将会有更深入的理解和认识。但无论是对外泌体临床应用研究或者是其发生机制的研究,都迫切需要在提取和鉴定方法上的不断改进和完善。不同的分离鉴定方法各有其优势与不足,不同的体液理化性质各异,在对外泌体进行提取时应根据体液的特点进行分离方法的选择,可尝试使用几种不同方法组合的方式进行分离,以达到最佳分离效果。体液来源的外泌体作为检测指标,能够更快捷对某些疾病做出诊断和预后,对于临床具有很重要的应用意义。同时,外泌体作为天然的载体,对于药物呈递和疾病治疗具有与生俱来的优势,这也将成为外泌体目前和将来最为重要的应用前景。

参考文献 (References)

- [1] Merchant ML, Rood IM, Deegens JKJ, *et al.* Isolation and characterization of urinary extracellular vesicles; implications for biomarker discovery[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2017, **13**(12):731-749
- [2] Arraud N, Linares R, Tan S, *et al.* Extracellular vesicles from blood plasma: determination of their morphology, size, phenotype and concentration[J]. *J Thromb Haemost*, 2014, **12**(5):614-627
- [3] Iwai K, Yamamoto S, Yoshida M, *et al.* Isolation of extracellular vesicles in saliva using density gradient ultracentrifugation[J]. *Methods Mol Biol*, 2017, **1660**:343-350
- [4] Vojtech L, Woo S, Hughes S, *et al.* Exosomes in human semen carry a distinctive repertoire of small non-coding RNAs with potential regulatory functions[J]. *Nucleic Acids Res*, 2014, **42**(11):7290-7304
- [5] Blans K, Hansen MS, Sørensen LV, *et al.* Pellet-free isolation of human and bovine milk extracellular vesicles by size-exclusion chromatography[J]. *J Extracell Vesicles*, 2017, **6**(1):1294340
- [6] Camino JM, Lee H, Jin Y. Isolation and characterization of extracellular vesicles from Broncho-alveolar lavage fluid; a review and comparison of different methods[J]. *Respir Res*, 2019, **20**(1):240
- [7] Kalluri R, Lebleu VS. The biology function and biomedical applications of exosomes[J]. *Science*, 2020, **367**(6478):eaau6977
- [8] Shao H, Im H, Castro CM, *et al.* New technologies for analysis

- of extracellular vesicles[J]. *Chem Rev*, 2018, **118**(4):1917-1950
- [9] Harada Y, Suzuki T, Fukushige T, *et al.* Generation of the heterogeneity of extracellular vesicles by membrane organization and sorting machineries[J]. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 2019, **1863**(4):681-691
- [10] Lebleu VS, Kalluri R. Exosomes as a multicomponent biomarker platform in cancer[J]. *Trends Cancer*, 2020, **6**(9):767-774
- [11] Sehrawat TS, Arab JP, Liu M, *et al.* Circulating extracellular vesicles carrying sphingolipid cargo for the diagnosis and dynamic risk profiling of alcoholic hepatitis[J]. *Hepatology*, 2021, **73**(2):571-585
- [12] Lapitz A, Arbelaz A, O'Rourke CJ, *et al.* Patients with cholangiocarcinoma present specific RNA profiles in serum and urine extracellular vesicles mirroring the tumor expression; novel liquid biopsy biomarkers for disease diagnosis[J]. *Cells*, 2020, **9**(3):721
- [13] de Miguel PD, Rodríguez MA, Ortigosa PA, *et al.* Extracellular vesicle-miRNAs as liquid biopsy biomarkers for disease identification and prognosis in metastatic colorectal cancer patients[J]. *Sci Rep*, 2020, **10**(1):3974
- [14] Osti D, Del Bene M, Rappa G, *et al.* Clinical significance of extracellular vesicles in plasma from glioblastoma patients[J]. *Clin Cancer Res*, 2019, **25**(1):266-276
- [15] Beard K, Meaney DF, Issadore D. Clinical applications of extracellular vesicles in the diagnosis and treatment of traumatic brain injury[J]. *J Neurotrauma*, 2020, **37**(19):2045-2056
- [16] Vader P, Mol EA, Pasterkamp G, *et al.* Extracellular vesicles for drug delivery[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2016, **106**(Pt A):148-156
- [17] Surman M, Drozd A, Stepien E, *et al.* Extracellular vesicles as drug delivery systems-methods of production and potential therapeutic applications[J]. *Curr Pharm Des*, 2019, **25**(2):132-154
- [18] Barile L, Vassalli G. Exosomes; Therapy delivery tools and biomarkers of diseases[J]. *Pharmacol Ther*, 2017, **174**:63-78
- [19] Lo SC, Reverberi D, Balbi C, *et al.* Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles as mediators of anti-inflammatory effects; endorsement of macrophage polarization[J]. *Stem Cells Transl Med*, 2017, **6**(3):1018-1028
- [20] Haney MJ, Zhao Y, Jin YS, *et al.* Macrophage-derived extracellular vesicles as drug delivery systems for triple negative breast cancer (TNBC) therapy[J]. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2020, **15**(3):487-500
- [21] Yong T, Wang D, Li X, *et al.* Extracellular vesicles for tumor targeting delivery based on five features principle[J]. *J Control Release*, 2020, **322**:555-565
- [22] Xue VW, Wong S, Song G, *et al.* Promising RNA-based cancer gene therapy using extracellular vesicles for drug delivery[J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2020, **20**(7):767-777
- [23] Morad G, Carman CV, Hagedorn EJ, *et al.* Tumor-derived extracellular vesicles breach the intact blood-brain barrier via transcytosis[J]. *ACS Nano*, 2019, **13**(12):13853-13865
- [24] Gardiner C, Vizio DD, Sahoo S, *et al.* Techniques used for the isolation and characterization of extracellular vesicles; results of a worldwide survey[J]. *J Extracell Vesicles*, 2016, **5**:32945
- [25] Momen-Heravi F. Isolation of extracellular vesicles by ultracentrifugation[J]. *Methods Mol Biol*, 2017, **1660**:25-32
- [26] Helwa I, Cai J, Drewry MD, *et al.* A comparative study of serum exosome isolation using differential ultracentrifugation and three commercial reagents[J]. *PLoS One*, 2017, **12**(1):e170628
- [27] Gurunathan S, Kang M, Jeyaraj M, *et al.* Review of the isolation, characterization, biological function, and multifarious therapeutic approaches of exosomes[J]. *Cells*, 2019, **8**(4):307
- [28] Mol EA, Goumans MJ, Doevendans PA, *et al.* Higher functionality of extracellular vesicles isolated using size-exclusion chromatography compared to ultracentrifugation[J]. *Nanomedicine*, 2017, **13**(6):2061-2065
- [29] Ding M, Wang C, Lu X, *et al.* Comparison of commercial exosome isolation kits for circulating exosomal microRNA profiling[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2018, **410**(16):3805-3814
- [30] Soares Martins T, Catita J, Martins Rosa I, *et al.* Exosome isolation from distinct biofluids using precipitation and column-based approaches[J]. *PLoS One*, 2018, **13**(6):e198820
- [31] Ryu KJ, Lee JY, Park C, *et al.* Isolation of small extracellular vesicles from human serum using a combination of ultracentrifugation with polymer-based precipitation[J]. *Ann Lab Med*, 2020, **40**(3):253-258
- [32] Helwa I, Cai J, Drewry MD, *et al.* A comparative study of serum exosome isolation using differential ultracentrifugation and three commercial reagents[J]. *PLoS One*, 2017, **12**(1):e170628
- [33] Tian Y, Gong M, Hu Y, *et al.* Quality and efficiency assessment of six extracellular vesicle isolation methods by nano-flow cytometry[J]. *J Extracell Vesicles*, 2019, **9**(1):1697028
- [34] Gamez-Valero A, Monguio-Tortajada M, Carreras-Planella L, *et al.* Size-Exclusion Chromatography-based isolation minimally alters Extracellular Vesicles' characteristics compared to precipitating agents[J]. *Sci Rep*, 2016, **6**:33641
- [35] Boing AN, van der Pol E, Grootemaat AE, *et al.* Single-step isolation of extracellular vesicles by size-exclusion chromatography[J]. *J Extracell Vesicles*, 2014, **3**
- [36] Stranska R, Gysbrechts L, Wouters J, *et al.* Comparison of membrane affinity-based method with size-exclusion chromatography for isolation of exosome-like vesicles from human plasma[J]. *J Transl Med*, 2018, **16**(1):1
- [37] Duong P, Chung A, Bouchareychas L, *et al.* Cushioned-density gradient ultracentrifugation (C-DGUC) improves the isolation efficiency of extracellular vesicles[J]. *PLoS One*, 2019, **14**(4):e0215324
- [38] Li P, Kaslan M, Lee SH, *et al.* Progress in exosome isolation techniques[J]. *Theranostics*, 2017, **7**(3):789-804
- [39] Andreu Z, Rivas E, Sanguino-Pascual A, *et al.* Comparative analysis of EV isolation procedures for miRNAs detection in serum samples[J]. *J Extracell Vesicles*, 2016, **5**:31655
- [40] Oeyen E, Van Mol K, Baggerman G, *et al.* Ultrafiltration and size exclusion chromatography combined with asymmetrical-flow field-flow fractionation for the isolation and characterisation of extracellular vesicles from urine[J]. *J Extracell Vesicles*, 2018, **7**(1):1490143
- [41] Bachurski D, Schuldner M, Nguyen PH, *et al.* Extracellular vesicle measurements with nanoparticle tracking analysis - An accuracy and repeatability comparison between NanoSight NS300 and ZetaView[J]. *J Extracell Vesicles*, 2019, **8**(1):1596016
- [42] Szatanek R, Baj-Krzyworzeka M, Zimoch J, *et al.* The methods of choice for extracellular vesicles (EVs) characterization[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, **18**(6):1153
- [43] Nolan JP, Duggan E. Analysis of individual extracellular vesicles by flow cytometry[J]. *Methods Mol Biol*, 2018, **1678**:79-92
- [44] Monguio-Tortajada M, Galvez-Monton C, Bayes-Genis A, *et al.* Extracellular vesicle isolation methods; rising impact of size-exclusion chromatography[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2019, **76**(12):2369-2382
- [45] Nordin JZ, Lee Y, Vader P, *et al.* Ultrafiltration with size-exclusion liquid chromatography for high yield isolation of extracellular vesicles preserving intact biophysical and functional properties[J]. *Nanomedicine*, 2015, **11**(4):879-883
- [46] Yang F, Yang X, Jiang H, *et al.* Dielectrophoretic separation of prostate cancer cells[J]. *Technol Cancer Res Treat*, 2013, **12**(1):61-70
- [47] Wang Z, Wu H, Fine D, *et al.* Ciliated micropillars for the microfluidic-based isolation of nanoscale lipid vesicles[J]. *Lab Chip*, 2013, **13**(15):2879-2882
- [48] Huang LR, Cox EC, Austin RH, *et al.* Continuous particle separation through deterministic lateral displacement[J]. *Science*, 2004, **304**(5673):987-990
- [49] Yang F, Liao X, Tian Y, *et al.* Exosome separation using microfluidic systems; size-based, immunoaffinity-based and dynamic methodologies[J]. *Biotechnol J*, 2017, **12**(4):doi:10.1002/biot.201600699

- [50] Onódi Z, Pelyhe C, Terézia Nagy C, *et al.* Isolation of high-purity extracellular vesicles by the combination of iodixanol density gradient ultracentrifugation and bind-elute chromatography from blood plasma[J]. *Front Physiol*, 2018, **9**:1479
- [51] Konoshenko MY, Lekhnov EA, Vlassov AV, *et al.* Isolation of extracellular vesicles: general methodologies and latest trends [J]. *Biomed Res Int*, 2018, **2018**: 8545347
- [52] Zhang X, Borg EGF, 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
- [53] De Palma G, Sallustio F, Schena FP. Clinical application of human urinary extracellular vesicles in kidney and urologic diseases [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, **17**(7):1043
- [54] Wachalska M, Koppers-Lalic D, van Eijndhoven M, *et al.* Protein complexes in urine interfere with extracellular vesicle biomarker studies[J]. *J Circ Biomark*, 2016, **5**:4
- [55] Admyre C, Johansson SM, Qazi KR, *et al.* Exosomes with immune modulatory features are present in human breast milk[J]. *J Immunol*, 2007, **179**(3):1969-1978
- [56] Foster BP, Balassa T, Benen TD, *et al.* Extracellular vesicles in blood, milk and body fluids of the female and male urogenital tract and with special regard to reproduction[J]. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2016, **53**(6):379-395
- [57] Chen T, Xie MY, Sun JJ, *et al.* Porcine milk-derived exosomes promote proliferation of intestinal epithelial cells[J]. *Sci Rep*, 2016, **6**:33862
- [58] Welch JL, Madison MN, Margolick JB, *et al.* Effect of prolonged freezing of semen on exosome recovery and biologic activity[J]. *Sci Rep*, 2017, **7**:45034
- [59] Welch JL, Kaddour H, Schlievert PM, *et al.* Semen exosomes promote transcriptional silencing of HIV-1 by disrupting NF- κ B/Sp1/Tat circuitry[J]. *J Virol*, 2018, **92**(21):e00731-18