

外泌体分离技术研究进展

李帅^{†,a,b} 刘亚婷^{†,c} 仰大勇^{*,a}

(^a 天津大学 化工学院 合成生物学前沿科学中心 系统生物工程教育部重点实验室 天津 300350)

(^b 天津大学浙江研究院 宁波 315200)

(^c 苏州亿弗生物科技有限公司 苏州 215000)

摘要 外泌体是来源于母细胞的小细胞外囊泡,包裹有核酸、蛋白等内容物,能够动态实时地反映母细胞的生理病理状态,因此在药物递送、疾病诊断和治疗等生物医学领域有广泛的应用. 外泌体应用的第一步是分离和纯化,不管是从血液、唾液等体液还是细胞培养上清中获取外泌体,都需要对其进行分离纯化,以去除不需要的杂质. 基于外泌体的尺寸、密度、电荷、组成,已经开发出了诸多分离方法,比如超速离心、超滤、尺寸排阻色谱、聚合物沉淀、免疫亲和等,这些传统的分离方法已经非常成熟,尤其是超速离心,被誉为是外泌体分离的金标准,为广大研究者所接受. 然而这些方法在分离纯度、效率、处理量、操作便捷性等方面各有优缺点,因此将多种分离方法联用是一种新思路. 此外,随着化学、材料学、生物学、医学、工程学、机械学等学科的发展和交叉,越来越多新兴的技术被开发出来,比如微流控法、基于流体流动原理分离、热泳法、脂质识别分离、DNA 适配体亲合法等,在一定程度上提高了外泌体的分离效率和纯度. 在本综述中,详细总结了传统分离方法和新兴分离方法的最新进展,并对未来发展进行了展望,以期促进该领域的发展,推动外泌体技术的产业化.

关键词 外泌体; 外泌体分离; 细胞外囊泡; 微流控; DNA 适配体

Recent Progress on Exosome Separation

Li, Shuai^{†,a,b} Liu, Yating^{†,c} Yang, Dayong^{*,a}

(^a *Frontiers Science Center for Synthetic Biology, Key Laboratory of Systems Bioengineering (MOE), School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300350, China*)

(^b *Zhejiang Institute of Tianjin University, Ningbo 315200, China*)

(^c *Suzhou EVs Biotechnology Co., Ltd, Suzhou 215000, China*)

Abstract Exosomes are small extracellular vesicles derived from parent cells, carrying nucleic acids, proteins, and other biomolecules. Due to their ability to reflect the physiological and pathological states of parent cells in real time, exosomes have significant potential in biomedical applications, including drug delivery, disease diagnosis, and therapeutic interventions. A key step in their application is the efficient separation and purification of exosomes from biological fluids (such as blood, saliva) or cell culture supernatants, ensuring the removal of impurities. Numerous separation techniques, including ultracentrifugation, ultrafiltration, size exclusion chromatography, polymer precipitation, and immunoaffinity capture, have been developed based on the size, density, charge, and composition of exosomes. Although ultracentrifugation is widely regarded as the gold standard for exosome isolation, each method has its advantages and limitations in terms of purity, efficiency, processing capacity, complexity, and convenience. Recently, the combination of different separation methods has emerged as a promising strategy. Moreover, advances in interdisciplinary fields, such as chemistry, materials science, biology, medicine, engineering, and mechanics, have led to the development of innovative separation technologies, including microfluidics, fluid flow-based methods, thermophoresis, lipid-based recognition, and DNA aptamer-based affinity. These novel techniques have substantially improved the efficiency and purity of exosome isolation. In this review, we first offer a comprehensive overview of both traditional and emerging separation methods, the advantages and disadvantages of each method were discussed and summarized. We also illustrate the latest progress and representative work in the exosome separation field. Finally, we put forward our own insights on the future development, including balancing between purity and yield, isolation of specific subpopulations of exosomes, standardization and automation separation and exploration of new separation technologies. We believe that significant breakthroughs in exosome separation will be achieved in the near future, and will contribute to the development of the biomedical applications. We hope this review will be helpful in promoting the development of exosome separation field.

Keywords exosome; exosome separation; extracellular vesicles; microfluidics; DNA aptamer

* E-mail: dayongyang@fudan.edu.cn

† These authors contributed equally to this work.

Received December 20, 2024; published February 14, 2025.

Project supported by the China Postdoctoral Science Foundation (No. 2023M742595).

项目受中国博士后科学基金(No. 2023M742595)资助.

1 引言

外泌体是细胞释放的直径约 30~150 nm 的膜包裹的小囊泡^[1]. 它最早发现于体外细胞培养的上清液中, Johnstone 等^[2]将其命名为“exosome”. 外泌体属于细胞外囊泡(Extracellular vesicles, EVs)中的一个亚群, 国际囊泡协会(International Society for Extracellular Vesicles, ISEV)根据 EVs 生物发生、释放途径等方面的不同将 EVs 分为三类: 微囊泡(microvesicles)、外泌体和凋亡小体(apoptosis bodies)^[3]. 但由于没有明确的界限以及难以完全分离, 现有的大多数文献中所说的“外泌体”, 实际上指的是广泛的 EVs 群体, 而非 EVs 中特定的亚群, 如无特殊说明, 本文中的外泌体也指广义上的 EVs^[4]. 随着研究的不断深入, 研究人员发现几乎所有的细胞, 甚至包括细菌均可以产生外泌体, 外泌体不仅存在于细胞培养液中, 也存在于各种体液之中, 包括尿液、血液、乳液、脑脊液等. 外泌体参与细胞之间的信息传递, 它携带蛋白质、脂质、核酸等生物分子, 能够调节目标细胞的功能和状态, 在生理和病理过程中发挥重要作用, 为疾病诊断和治疗提供了新的思路^[5-7].

外泌体的大小和其携带的内容物能够准确地反映其来源细胞及生理状态, 给临床检测与诊断带来更精确的结果^[8-9]. 据统计, 目前外泌体相关的临床研究已经超过 470 项, 涉及疾病超过 200 种, 其中超过 80% 为诊断和辅助诊断相关的研究, 且临床实验逐年呈现快速增长的趋势^[10]. 外泌体在临床中的应用越来越广泛, 但其所处的生物环境复杂, 不同来源、甚至同一来源的外泌体在尺寸、形态、生化特性等方面都存在巨大的差异, 这给外泌体的分离纯化带来了巨大的困难^[11]. 近年来, 外泌体在基础医学与临床应用的研究不断深入, 相比于传统的外泌体提取方法, 研究者对准确完整、高纯度的分离外泌体提出了更高的技术要求^[12]. 而化学、生物学、材料学等科学的飞速发展也使得多种新兴外泌体提取技术不断涌现, 给外泌体研究带来了更广阔的应用前景. 在本文中, 我们总结了传统的外泌体分离方法和新兴的外泌体分离技术, 传统的外泌体分离方法包括超速离心法、超滤法、尺寸排阻色谱法、聚合物沉淀、免疫

亲和法等; 新兴的外泌体分离方法包括微流控法、DNA 适配体亲合法、基于流体流动的分离法、热泳法、脂质识别分离等. 通过对传统和新兴分离方法的总结和比较, 我们旨在促进本领域的进一步发展.

2 超速离心法

超速离心法(Ultracentrifugation)是一种基于物理性质的用于分离分散在溶液中的不同生物颗粒, 如细胞、细胞碎片、亚细胞器、蛋白质和核酸等广泛使用的技术, 通过使用超速离心机在极高转速下根据密度和大小分离目标产物^[13]. 原始溶液通常包含多组分混合物, 这些颗粒大小和密度差异使得其沉降速度也不同, 所以能够有效地将混合物中的不同成分分离开来. 颗粒在离心管中高速转动时, 其速度由离心力、阿基米德浮力和斯托克斯粘性阻力这三种力的平衡决定, 在转速和介质成分固定的离心条件下, 颗粒速度完全由颗粒的形态和密度决定: 当颗粒密度大于介质密度时, 颗粒沿着离心力的方向“向下”沉降, 颗粒密度小于介质密度则颗粒沿着与离心力相反的方向“向上”漂浮; 在密度相似的情况下, 尺寸较大的颗粒移动得更快.

Johnstone 等^[14]于 1992 年首次将超速离心法用于分离网状细胞组织培养基中的外泌体, 并将其误认为是受损细胞成分的回收处与细胞的垃圾站. 随着科学家的研究不断深入, 超速离心法在外泌体研究领域迅速发展, 其操作简单、重复性高的特点使其成为外泌体分离最常用的分离技术之一. 如图 1 所示, 超速离心的过程主要分为两个部分: 首先是进行一系列的中低速离心, 去除死细胞、细胞碎片和大尺寸的细胞外囊泡, 然后超速离心分离外泌体, 去除可能造成污染的蛋白质和其他杂质^[15]. 沉降系数(sedimentation coefficient, *S*)是衡量物质在离心力场中沉降速率的一个参数, 可以通过施加的离心力与离心时间计算得到. 外泌体 *S* 值较小, 常施加的离心力约为 100,000 至 200,000 g, 时间为 45 至 150 min.

超速离心法并不能完全将外泌体与杂质分离, 产物中通常含有大量共沉淀的杂质, 包括蛋白质聚集体: 血清或细胞培养上清中的非外泌体蛋白(如脂蛋白、白蛋

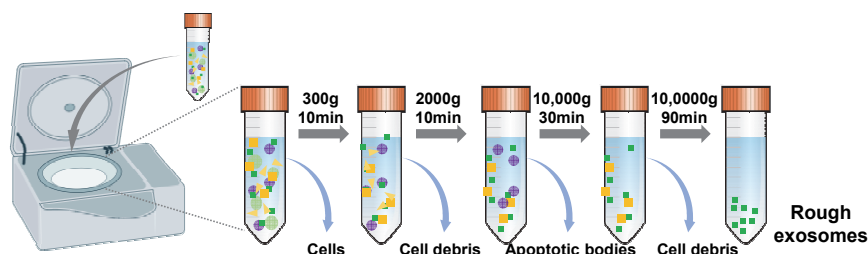


图 1 超速离心法分离外泌体. 首先中低速离心去除细胞和细胞碎片等大的颗粒, 然后通过高速离心分离得到外泌体沉淀

Figure 1 Ultracentrifugation-based exosome separation. Cells and cell debris removed through low-speed centrifugation and then exosome obtained through high-speed centrifugation

白)在高速离心过程中可能形成聚集体,与外泌体共沉淀;脂蛋白:高密度脂蛋白(HDL)和低密度脂蛋白(LDL)的密度与外泌体相近,难以通过离心完全分离;细胞碎片:细胞凋亡或裂解产生的微小膜碎片可能与外泌体共沉淀;其他细胞外囊泡:微囊泡和外泌体的密度范围重叠,导致难以完全分离.超速离心法获得的外泌体中,非外泌体蛋白的含量可能高达50%以上,这严重影响了后续的功能研究和临床应用,同时研究表明,调整离心速度、时间和温度,可以减少外泌体损伤和杂质共沉淀^[16-17].

为了进一步提高这种经典分离技术的外泌体分离效率,科学家们通过探索物质的不同物理性质,开发了各种类型的离心策略.密度梯度超速离心(Density Gradient Ultracentrifugation)是一种可以用来纯化外泌体的、使用密度梯度进行分离的替代技术,根据不同类型颗粒的特征密度将某些非囊泡型细胞外颗粒和蛋白质与外泌体分离以获得纯度更高的外泌体.密度梯度超速离心近年来在外泌体分离技术的选择中广受欢迎,约占目前使用的外泌体分离策略的10%^[12].常见的密度梯度层选择主要有蔗糖、碘克沙醇或碘己醇,将其与水溶液混合后装填至离心管,密度由底部到顶部逐渐降低的同时覆盖样品中颗粒密度的范围.样品的装填可以选择顶端(“自上而下法”),也可以装填至底端(“自下而上法”),最终随着超速离心的进程,样品颗粒无论是上浮或是下沉均会达到与其浮力密度相对应的密度分数层,从而达到分离的效果,外泌体一般聚集在1.10~1.18 g/mL密度层^[18-19].

相比于传统的超速离心法,密度梯度超速离心法能够获取到纯度更高的外泌体,其产物几乎不包含干扰蛋白.有研究表明,在植物中通过蔗糖梯度离心法提取出来的外泌体可以作为药物载体应用于临床试验^[20].但是相对应的,该操作并不适用于大规模的外泌体提取,操作步骤更为繁琐,离心时间也更长,甚至达到20 h之久;高渗的梯度介质也易导致亚细胞结构失水,进而影响外泌体的生物学活性.

3 超滤法

超滤(ultrafiltration)是一种基于膜分离技术的过滤方法.利用具有不同膜类型和孔径的多孔膜(或离心过滤器),可以在通过外加动力驱动液体流过膜的过程中,将大于膜孔径的颗粒截留在膜的一侧,而小分子颗粒和溶剂则透过膜来捕获特定尺寸的颗粒.超滤通常是大体积原料样品(如>100 mL细胞培养基或尿液)外泌体纯化的第一步,该操作将样品简单快速地浓缩为更易处理的小体积(通常为1~2 mL),然后进行进一步的纯化方案,如超速离心等^[21].超滤的动力主要来自电荷、低速离心和压力等因素,相比于其他方式,低速离心驱动的超滤能够保证外泌体膜的完整性,在维持外泌体活性方

面具有更明显的优势^[22].超滤使用的过滤膜通常由纤维素、聚醚砜或氯化盐制成,常见的膜截留分子量为10~100 kDa,用于分离大于30 nm的颗粒^[23].

对膜的需求使得超滤成为一种较为昂贵的外泌体提取方法,针对获取精准尺寸外泌体的多个连续步骤分离又使该方法的成本进一步增加^[24].更为重要的是在这种方法中,所有大于30 nm的颗粒,包括蛋白质和其他非外泌体囊泡均可以和目标外泌体共分离,在降低目标样品的质量和纯度的同时还会造成膜堵塞带来产量的降低和成本的进一步增加.

膜堵塞所造成的膜使用寿命的降低是超滤法提取外泌体中的一大难题.较为传统的解决方法是化学清洗,如蛋白酶清洗超滤膜去除蛋白质污染物,但这同时也带来了膜材料降解、膜孔径变化等一系列问题.Visan等^[25]将切向流过滤与超滤相结合,减轻了膜的污染,提高了过滤效率,并延长了膜的使用寿命.Liu等^[26]发展了负压振荡与超滤结合来分离外泌体的方法,实现外泌体的无堵塞和超快速纯化,作者将双耦合谐波振荡引入膜过滤配置中,以产生横波,抑制了外泌体等在滤膜上的沉积,从而提高外泌体处理速度、产量和纯度.

4 尺寸排阻色谱法

尺寸排阻色谱(Size-Exclusion Chromatography, SEC)根据物质的流体动力学半径来分离物质,是目前使用最广泛的基于尺寸的分离技术之一^[27a].早在发现外泌体之前,SEC就已经得到了很好的发展,并被广泛应用于蛋白质、聚合物和各种脂质体颗粒等大分子或大分子聚集体的高分辨率分离.选择含有不同孔径大小的凝胶颗粒作为固定相,在样品流通色谱柱时,尺寸越小,渗透到凝胶基质中的能力越强,在色谱柱中保留的时间越长,洗脱时间越长.由于外泌体尺寸较小,因此相对于细胞碎片和较大的囊泡而言,外泌体进入色谱柱中的更小孔道中,需要更长的时间才能洗脱下来;而相对于更小的蛋白而言,在孔道中的停留时间更久,通过收集合适时间的流出液,就能实现外泌体的特异性分离(图2)^[28-29].色谱柱中的固定相介质一般有多种选择,包括葡聚糖聚合物、琼脂糖、聚丙烯酰胺等.2014年SEC首次被应用于外泌体提取分离,Böing等^[30]通过琼脂糖凝胶CL-2B SEC从人血小板浓缩物的去血小板上清液中提取纯化出外泌体,相对于当时需要花费2~96 h的超速离心提取法,该方法仅需20多分钟就可以完成回收率为43%的外泌体分离工作,大大节省了分离时间.

目前市面上已推出多种商品化的外泌体纯化柱,包括GE Healthcare的EV Second纯化柱和Izon的qEV系列试剂盒等,专业填充的商业色谱柱使得这一原本就操作简单、流程简短的提取方法拥有了更高的重复性.同时,基于重力滴落的方式收集的外泌体,其生物学结构和完整性未遭到破坏,生物活性未受到影响.通过选择

具有生理渗透压和粘度的洗脱缓冲液(例如 PBS), 可以进一步增强外泌体的生物活性^[31].

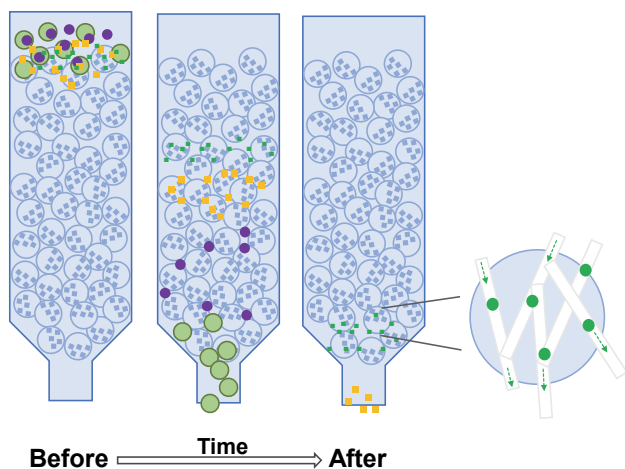


图 2 尺寸排阻色谱法分离外泌体. 大尺寸的颗粒在色谱柱中停留时间短, 小尺寸颗粒在色谱柱中停留时间长, 收集不同时间的流出液, 可以得到不同的组分

Figure 2 Size exclusion chromatography-based exosome separation. Larger particles have a shorter residence time in the chromatographic column, while smaller particles have a longer residence time. Collecting the effluent at different times can yield different components

最近的一项研究比较了多种外泌体分离技术并证明了 SEC 是从脑脊液和血浆中纯化外泌体的最佳方法^[32]. 然而, SEC 的应用范围较窄, 不适合大容量样本, 同时 SEC 制备的产物可能含有与目标外泌体尺寸重叠的污染物颗粒, 洗脱液也会稀释样本使最终产物浓度偏低. 针对 SEC 的优化改进研究也在不断深入, Guo 等^[33]设计出一种二分式 SEC 法, 该方法使用 Sepharose CL-6B 填料提高了 SEC 柱对外泌体的分离效能同时简化了分离流程, 使用两个大的洗脱步骤取代了多个洗脱步骤, 仅需 20 min 左右即可从血清/血浆等复杂液体中高效分离获得高纯度外泌体, 该方法在肿瘤和重大传染病的外泌体组学中的大规模队列研究也在推进中.

5 聚合物沉淀法

目前市场上大部分的商用外泌体分离试剂盒都是基于聚合物沉淀法所开发的, 例如 Invitrogen Total Exosome Isolation Kit (Life Technologies)、ExoSpin Exosome Purification Kit (Cell Guidance Systems)、ExoQuick Exosome Precipitation Solution (System Biosciences)等. 20 世纪 60 年代, 研究者们开始使用聚合物来沉淀和富集生物大分子, 随着对病毒生物学的认识加深和技术的发展, 聚合物沉淀法逐渐被引入到病毒的分离和纯化中; 基于外泌体与病毒大小特性相似, 近年来该技术已成为外泌体分离的常用策略之一. 聚合物沉淀法的原理是利用亲水聚合物与外泌体的亲水相互作用, 在外泌体周围形成疏水微环境, 降低外泌体的溶解度, 在 1500 g 的低速离心条件下沉降获得外泌体. 亲水聚合物聚乙二

醇(PEG)以其能够改变水溶性且无毒的特性成为绝大部分外泌体分离试剂盒的选择, 常被添加到样品中进行 4 °C 下 15 min 至 12 h 的孵育以助于后续的低速离心外泌体分离^[34]. 低速离心使该方法避免了复杂的设备与繁琐的操作步骤, 回收率高, 无论是大样本量还是小样本量均适用, 产量高. 有研究表明, 该方法的可扩展性高, 可用于高通量样品的制备.

然而, 该技术也带来一些共沉淀物杂质, 如免疫复合物、脂蛋白、病毒、核酸等, 同时在最终产物中的聚合物材料也无法去除, 不利于后续的研究. 一些报告表明, 与超速离心法相比, 使用 PEG 沉淀分离的样本中外泌体活力降低, 这表明共沉淀物质可能具有毒性或拮抗作用^[35].

在此基础上, 进一步通过混合两种聚合物或聚合物与盐溶液开发了双水相系统(Aqueous two-phase system, ATPS), 用于分离和隔离各种生物分子^[36]. Shin 等^[37]研究了一种利用聚乙二醇/葡聚糖双水相系统高效分离外泌体的方法, 该方法避免了传统聚合物沉淀法中长时间的孵育操作, 能在短时间内实现较高的外泌体回收率(约 70%), 显著提高外泌体的诊断适用性. Kim 等^[38]随后通过改进该分离步骤, 能够去除外泌体产物中约 95% 的杂蛋白, 实现了对外泌体更高效和高纯度的分离. 进一步的研究又证明了基于 ATPS 的分离能够从不同的污染物中纯化外泌体, 例如脂肪酸、酚红或植物化学物质, 稳定蛋白定量(BCA)等下游检测^[39].

除了最常见的降低外泌体溶解度沉淀法, 也存在多种其他分离沉淀方法, 例如基于电荷的沉淀, 由于外泌体带负电荷, 可以通过与带正电荷的分子(如鱼精蛋白、壳聚糖)相互作用而产生沉淀^[40-41].

6 免疫亲和法

免疫亲和法是一种基于抗体和配体的特异性结合, 从异质混合物中分离所需物质的分离纯化技术, 它是目前外泌体分离中特异性较高, 能够识别特定细胞来源的方法之一(图 3). 这种特异性结合的效率与生物亲和配对、洗脱条件、基质载体以及操作人员的熟练程度等都密切相关. 该方法所使用的抗体主要为单克隆抗体与多克隆抗体, 而抗原即目标蛋白的选择则更为复杂. 原则上所选用的目标蛋白应是外泌体膜表面的高丰度蛋白, 如四跨膜蛋白超家族(CD63、CD9、CD81 等)、膜联蛋白、上皮细胞黏附分子(EpCAM)等, 外泌体表面的常见成分或特定细胞来源外泌体的独特成分也是常见的选择, 如用于识别肿瘤来源外泌体的表皮生长因子受体(EGFR)、人表皮生长因子受体 2 (HER2)等, 目标蛋白的选择主要取决于研究的需要^[42]. 因此, 免疫亲和法并非一次性分离所有的外泌体, 而是根据所选标记特异性地分离外泌体亚型, 这导致在外泌体提取产物中, 总外泌体产量较低, 但是针对特定亚群的外泌体产量则相对较高.

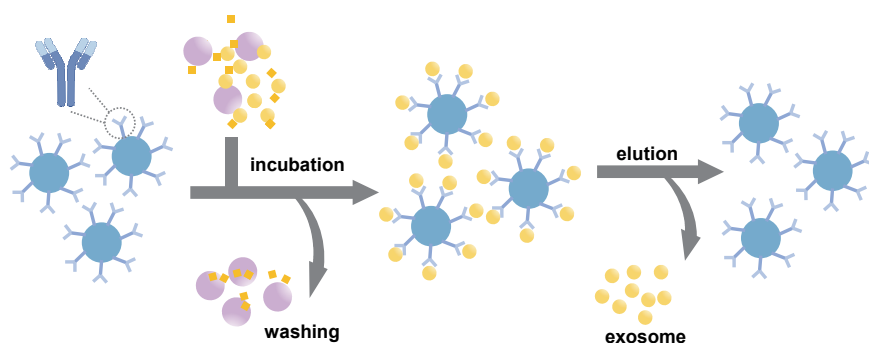


图3 免疫亲和法分离外泌体。将外泌体特异性抗体偶联到磁珠上,与含有外泌体的溶液混合后,外泌体与抗体结合,继而通过磁力分离,随后将外泌体从磁珠上洗脱

Figure 3 Immunoaffinity-based exosome separation. Coupling exosome-specific antibodies onto magnetic beads, mixing them with exosome solution, binding the exosomes to the antibodies, followed by magnetic separation, and subsequently washing the exosomes from the magnetic beads

在该方法中,靶蛋白抗体还需要固定在固相载体上面,载体的选择具有多样性,目前常用载体主要有磁珠、二氧化硅、树脂等,可分为磁珠免疫分离、色谱固相分离、酶联免疫吸附分离等。当样品通过载体或是与载体孵育时,目标外泌体被抗体捕获,经过合适的洗脱步骤后便可分离出外泌体。Yousif 等^[27b]优化了基于免疫亲和分离的特定外泌体或神经源性外泌体分离方案,以 1 μm 大小的功能化磁珠成功从血清中分离出 CD63⁺和 L1CAM⁺外泌体,该分离产物保持了原始大小、形态,生物活性未遭破坏,且在常规流式细胞术分析中能够被很好地识别。在此之前,免疫捕获测定中使用的磁珠的大小范围为 2~9 μm ,载体磁珠尺寸的缩小能够增大外泌体可附着表面积,从而提高分离效率,同时更易被常规流式细胞术所检测。免疫亲和法能够保证外泌体结构的完整性以及生物活性,但是抗体与载体成本高,且抗体结合时间长,同时洗脱条件相对更为苛刻,使得该方法不适宜于大规模应用。

免疫亲和法通常与其他方法如尺寸排阻色谱法等联用,提高外泌体提取纯度。在对血浆中的黑色素瘤来源的外泌体进行免疫捕获时,可以先通过微型尺寸排阻色谱获得形态完整且具有生物活性的外泌体,然后使用特异性黑色素瘤靶向抗体硫酸软骨素蛋白聚糖 4 (CSPG4)精确分离黑色素瘤来源的外泌体^[43]。

抗体也存在非特异性结合使得产物包含干扰杂质,而抗体的特异性结合也很难逆转,从而影响后续试验。可以选择可逆转结合分子避免这种情况。T 细胞免疫球蛋白和粘蛋白结构域蛋白 4 (Tim4 抗体)的特异性结合是 Ca^{2+} 依赖性的,它可以固定在磁珠上通过与特异性表达在外泌体表面的磷脂酰丝氨酸结合进行外泌体分离,并且在分离后可以通过添加 Ca^{2+} 螯合剂将外泌体从磁珠上解离下来^[35]。

7 微流控法

微流控法是一种基于颗粒物化学特性,使用微通道

(10~100 μm)进行微量分离分析的重要技术,该技术随着不断地发展能够将多种分析元件、传感器和其他组件集成到同一个芯片上,消除了传统方法中对设备齐全的实验室的需求(图 4)。该技术目前可以分为基于生物特性的微流控法与基于物理特性的微流控法两大类。前者的基本原理与免疫亲和捕获技术类似,主要依赖免疫亲和性和适配体的特异性,涉及抗体与固定在微流控芯片上的外泌体标记物的特异性结合。在外泌体分离免疫微流控装置中,应用最广泛的是含 CD63 抗体的 ExoChip,其他还包括含 CD9 抗体的金电极、含 CD81 抗体的氧化石墨烯/聚多巴胺纳米界面以及含 CD9 抗体的鱼骨槽^[44]。近 10 年来,微流控法以独特的优势在外泌体分离中的使用频率呈指数级增长^[45]。Liu 等^[46]提出了一种基于浸笔纳米光刻技术(Dip-Pen Nanolithography, DPN)生成的支撑脂膜微阵列的新型外泌体捕捉方法,这些阵列带有识别外泌体的特异性表面生物标记物的抗体,可实现外泌体的高度选择和高效捕获,同时研究表明捕获的外泌体核酸会保留在脂质阵列上,为下游分析提供了可能性。Lo 等^[47]开发了一种豆荚状的径向流微流控芯片装置,该微流控芯片宽度为 50 μm ,高度为 100 μm ,通道间距为相距 25~32 μm ,通道内部用链霉亲和素修饰。目标抗体用脱硫生物素标记,能够通过生物素-链霉亲和素相互作用被捕获,CD63 是外泌体表面的特征蛋白,该装置使用 CD63 抗体实现了外泌体的特异性捕获,进一步加入生物素,能够将捕获的外泌体置换下来,收集到的外泌体可以用于下游的表征和应用。作者通过实验证明了收集的外泌体能够被细胞摄取,不影响其后续应用。

免疫微流控系统中除去与免疫亲和法相似的生物问题外,还存在一系列物理问题影响外泌体的捕获,如由于微通道中极低的对流比,导致物质传递的限制,使得外泌体难以接触到固定在通道壁上的捕获试剂;当外泌体在液体中接近固体表面时,存在流体动力学阻力。高表面积/体积比有利于免疫亲和和相互作用,从而提高外泌体捕获率^[48]。

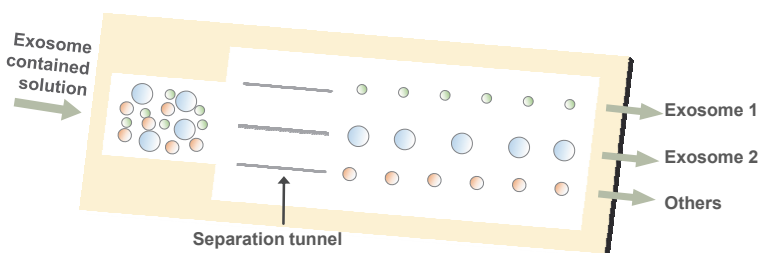


图4 微流控法分离外泌体. 含有外泌体的溶液加入到微流控装置后, 外泌体由于具有不同的物理和生化特性而被分离

Figure 4 Microfluidic chip-based exosome separation. After exosomes were added into a microfluidic device, exosomes were separated due to their different physical and biochemical properties

基于物理特性的微流控法主要通过外泌体大小、密度和电荷等物理特性来实现分离纯化, 这些微流控系统依赖于过滤和外部声、电、光等. Ramnauth 等^[49]开发了一种双过滤微流控装置, 能够在 50 min 之内从 50~100 μL 血浆中快速分离外泌体, 与 PEG 沉淀法分离得到的外泌体相比, 具有相似的尺寸和纯度; 然而, 从微流控装置中得到的外泌体能够更早地检测出 miRNA, 展示了该装置的临床应用潜力. Wang 等^[50]开发了一种声流控技术(声学与微流控技术结合)平台用于基于尺寸的唾液外泌体分离. 实验数据表明, 该平台能够稳定地从唾液样品中分离外泌体, 不受唾液粘度和收集方法的影响. 该方法所获得的唾液外泌体 miRNA 的平均产量较超速离心法高 15 倍, 利用这种高产率的外泌体分离平台, 可以在人乳头瘤病毒相关的口咽癌(HPV-OPC)患者唾液中分离的外泌体中检测到 HPV-16 DNA, 与 HPV-16 阳性的组织/活检一致性达到 80%. Shi 等^[51]研发了一种新型绝缘结构电介质泳动设备, 该设备基于一组硼硅酸盐微量移液管, 能够快速从条件培养基和生物体液(如血浆、血清和唾液)中分离外泌体. 该方法能够在相对低的($10 \text{ V}\cdot\text{cm}^{-1}$)直流电下, 20 min 内从 200 μL 的小样本体积中分离外泌体.

尽管微流控装置较为复杂且成本较高, 但相较于免疫亲和和捕获技术, 它在成本效益上更具优势, 同时消耗低、污染少、分析时间短、通量高、易于集成和自动化^[52-53].

8 DNA 适配体亲和法

DNA 适配体是一种通过指数富集配体的系统进化(SELEX)方法获得的短的单链 DNA 序列, 可选择性地

与目标物质(蛋白质、细胞、小分子、金属离子)结合^[54]. 理论上, SELEX 可以为几乎所有的靶标选择高亲和的适配体. 适配体可以称为“化学抗体”. 抗体是由 20 种氨基酸组成的免疫球蛋白, 核酸适配体仅由 4 种核苷酸组成, 虽然其与目标分子之间的序列模式和化学作用的多样性较差, 但在其他方面表现出其独特的优势, 如批次间差异小、易于针对不同应用进行放大和缩小、保质期长、免疫原性低或无免疫原性、生产成本低以及易于化学修饰以改善结合性能^[55]. 近年来, 适配体技术广泛用于外泌体分离(图 5). 研究发现一种基于 DNA 适配体的磁性分离策略能在 90 min 内快速捕获外泌体, 它的分离效率与超速离心接近; 该策略通过一种 DNA 结构转换来释放所捕获的外泌体, 能够保证目标产物的完整性和生物活性; 同时, 研究人员将该技术成功应用于临床乳腺癌患者血浆样本的外泌体提取中^[56].

Liu 等^[57]报道了一种 λ -DNA 和适配体介导的方法用于在单外泌体水平上分离和检测外泌体亚群. 双链 λ -DNA 分子的溶液具有很强的弹性效应, 可以在微通道内对颗粒进行流体动力聚焦或分选. 研究人员设计了一个由粘弹性样品流和牛顿鞘液组成的微流体共流系统, 同时将针对外泌体特异性蛋白的 DNA 适配体标记到外泌体表面, 在 30 min 内实现了外泌体(30~200 nm)、微囊泡(200~1000 nm)和凋亡小体(大于 1000 nm)的尺寸选择性分离, 同时保证了分离产物的完整性与生物活性. 这是第一种 DNA 介导的同时分拣和检测单个外泌体亚群的方法, 为在单个外泌体水平上评估外泌体的异质性提供了一个重要工具, 具有潜在的临床诊断价值.

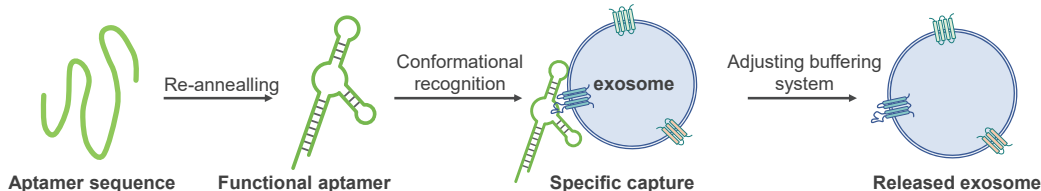


图5 DNA 适配体亲合法分离外泌体. DNA 适配体通过识别外泌体表面的特征蛋白, 实现外泌体的捕获, 通过改变缓冲体系等条件实现外泌体的释放

Figure 5 DNA aptamer-based exosome separation. DNA aptamers capture exosome by recognizing specific proteins on their surface, and release them by changing buffer systems

Tang 等^[58]设计出了一种基于 DNA 适配体的水凝胶, 实现了复杂生物培养基中外泌体的特异性和非破坏性分离. DNA 水凝胶由交联的超长单链 DNA (ssDNA) 形成, 通常通过物理或化学方法实现交联, 构建出三维空间网状结构. 研究人员在使用双滚环扩增(RCA)生成 ssDNA 的过程中, 设计出一种能特异性识别外泌体 CD63 的适配体模板(AptCD63)来生成多价适配体, 因此, ssDNA 产物对 CD63 阳性外泌体具有高亲和力, 进一步交联生成的 DNA 水凝胶能够实现对于外泌体的特异性捕获与高效富集. 酶解法和链置换法两种途径可以在保证外泌体结构与组成完整性的前提下将其从 DNA 水凝胶中释放出来. 实验结果表明每 50 μL DNA 水凝胶可分离 8×10^7 个外泌体, 作者还实现了外泌体分离检测的一体化, 对临床乳腺癌血清样本的检测精确度能够达到 100%.

DNA 适配体亲和法的探索目前还处于起步状态, 还没有大规模应用, 但它能够实现不同于传统外泌体分离方法的高特异性、高效性和高生物活性保留, 随着生物医学与材料学的不断发展, 未来一定能够带来更多突破.

9 基于流体流动的分选法

基于流体流动的分选法是指不依赖于“填料”或固定相载体, 将流体与外场联合作用于待分离物质, 根据一种或多种颗粒特性差异分离外泌体和其他颗粒, 主要为场流分离(field-flow fractionation, FFF)和自由流电泳(free-flow electrophoresis, FFE). 场流分离根据所施加外场类型的不同又可分为流场流分离(Flow Field-Flow Fractionation, FFFF 或 F4)、热场流分离(Thermal Field-Flow Fractionation, ThFFF)、电场流分离(Electrical Field-Flow Fractionation, ElFFF)等; 其中 F4 又包括对称流场流分离(Symmetric Flow Field-Flow Fractionation, SFFFF)和非对称流场流分离(Asymmetric Flow Field-Flow Fractionation, AsFFFF 或 AF4).

在外泌体研究中, 应用最广泛的流场分离技术是 AF4. AF4 是 Wahlund 和 Giddings 在 1987 年提出的一种分离技术, AF4 通道上层壁是非渗透性的透明玻璃材料, 可以直观反映出有色样品在通道中的分离过程, 下层为可渗透性多孔材料. 在通道内, 流动方向的垂直方向有一道横向流作为外加力场, 样品进入通道后在横向流的作用下与自身扩散力趋向平衡, 分布在液流抛物线剖面不同高度的位置, 最终在集聚壁上产生分布差异, 呈现指数浓度分布, 小尺寸颗粒分布层要高于大尺寸颗粒, 分布层越高的颗粒越早被洗脱, 该系统中颗粒产物的保留时间取决于其扩散通量.

AF4 分离范围广, 所需样品无需离心过滤等前处理, 在复杂生物样品分离分析领域受到欢迎. 它已用于从人间充质和神经干细胞培养物中分离外泌体, 以及用

于小鼠黑色素瘤细胞培养系中外泌体的大小分离和表征^[59]. 然而, AF4 目前在外泌体分离研究中并不是一种广泛使用的方法. Hu 等^[60]通过优化 AF4, 结合密度超速离心法从人血浆和血清中提取获得了高纯度、高完整性的外泌体, 减少了脂蛋白和其他非外泌体污染物的干扰; 后续的进一步蛋白组学分析得出了一系列全新的血浆外泌体标志物, 如 MYCT1、MPIG6B 和 TSPAN14 等, 表明了部分传统细胞来源外泌体标志物已不适用血浆外泌体检测.

AF4 分离环境温和, 摆脱了常规分离技术中机械力对外泌体生物活性的损伤. 将多重检测系统联用 AF4 技术对所分离外泌体进行表征评估, 检测结果表明, 横流条件和通道厚度对外泌体分级质量有显著影响, 样品在通道内的聚焦时间则影响较小. Wu 等^[61]优化了 AF4 技术和样品制备的参数, 包括错流梯度、聚焦时间、超滤条件、样品量和进样体积, 并成功用于人血浆中外泌体的分离和表征, 证明了 AF4 在从人血浆中的高密度脂蛋白(HDL)和低密度脂蛋白颗粒(LDL)中分离外泌体方面的巨大潜力, 提升产物纯度, 有高复现性. 同时研究表明通过减小通道尺寸, 可以在小型化通道中实现 AF4, 在不丧失分离能力的情况下加快分离速度^[62].

10 热泳法

热泳是一个常见的物理学现象, 指的是粒子在具有温度梯度的环境中, 会倾向于在低温区域聚集, 近年来被应用于外泌体的分离和富集. 热泳法具有无标记、操作简便和高灵敏度的特点, 特别适合处理复杂生物样本中的外泌体^[63]. Sun 等^[64]提出了热泳适配体传感器的概念, 具体来说是利用荧光基团修饰的适配体来修饰外泌体, 当适配体在外泌体表面聚集时, 会产生荧光放大的效果, 外泌体表面的目标蛋白含量越多, 荧光越强. 当用激光照射含有外泌体的溶液时, 外泌体会发生聚集, 相比于单个外泌体, 聚集之后能产生更多的信号, 提高外泌体检测的灵敏度. 作者在该工作中选择了七种识别外泌体表面蛋白的荧光适配体进行癌症检测和分类, 在 102 例患者的队列实验中, 检测的灵敏度达到 95%, 特异性达到 100%, 在不同癌症的确诊方面准备率达到 68%, 而该过程需要的血清体积小于 1 μL , 有助于癌症的早期筛查、分类和监测. 随后作者进行了改进, 实现了对外泌体内 miRNA 的原位检测^[65]. 利用热泳原理使外泌体聚集, 促进外泌体中 miRNA 的荧光放大, 该方法仅需 0.5 μL 的血清样本, 检测限低至 0.36 fmol/L, 检测的灵敏度和特异性分别高达 88% 和 83%, 具有很好的应用前景. 作者通过热泳法还实现了外泌体表面聚糖的检测, 能够对三阴性乳腺癌(TNBC)血浆外泌体中的聚糖实现快速、灵敏、特异性、低成本的分析, 在检测方面的准确度达到 91%, 治疗反应的纵向监测中准确率达到 96%^[66].

虽然热泳法分离外泌体具有无需抗体等标记、操作简便、易于实现自动化、灵敏度高等优点,但是其缺点也不容忽视,具体来说有以下四点: (1)热泳涉及到多种物理因素(如温度梯度、表面电荷、颗粒尺寸等),分离机制复杂,优化分离条件需要深入的理论研究和实验验证; (2)在分离过程中会损失部分外泌体,特别是尺寸较小或表面电荷较低的外泌体亚群; (3)无法完全去除与外泌体尺寸和表面性质相似的杂质(如脂蛋白或蛋白聚集体),影响分离纯度; (4)热泳法还处在外泌体分离应用的早期阶段,尚未形成标准化的操作流程和标准. 任何一项技术都是从不成熟走向成熟的,随着技术的不断优化和发展,热泳法有望成为外泌体分离的重要工具之一.

11 磷脂识别分离

外泌体的膜上除了含有特征蛋白外,磷脂是更为丰富的组分,特定的磷脂,如磷脂酰丝氨酸(PS)可以被特定的蛋白质或分子识别并结合,从而实现外泌体的特异性分离. Tim4 蛋白是常用的 PS 结合蛋白. Nakai 等^[67]开发了基于 Tim4 与 PS 特异性结合的外泌体分离方法,由于两者的结合是 Ca^{2+} 依赖的,因此加入 Ca^{2+} 螯合剂就能轻松释放捕获的外泌体,基于此原理制备的外泌体中含有的杂质较少,适用于后续的蛋白质谱检测,同时该技术还能开发 ELISA 试剂盒或流式检测试剂,具有广阔的应用前景.

此外也可利用合成多肽进行磷脂识别. Liu 等^[68-70]首先合成了磷脂识别探针 DSPE-PEG-Mal, 其中 DSPE 是一种含有疏水基团的多肽,能够通过疏水相互作用自发地嵌入到外泌体的磷脂膜中, Mal 能够通过点击化学反应共价连接到磁珠上, DSPE 和 Mal 通过 PEG 连接,利用该探针,实现了血清中外泌体的高效富集,分离纯度高于 80%; 随后他们对该技术进行了升级,首先将胆碱磷酸(CP)修饰到水凝胶微球上, CP 能够与外泌体膜上的磷脂酰胆碱(PC)配位结合,从而捕获样本中的外泌体,实现外泌体的高效分离,更重要的是 CP-PC 形成的配位键具有温度敏感性,当温度升高到 42 °C 时,配位键断裂,外泌体被释放下来,该过程较为温和,省去了传统的酸碱洗脱剂,能够更好地维持外泌体的生物活性,同时该方法整个过程仅需 0.5 h,与超速离心法、聚合物沉淀法等相比,大大缩短了外泌体的分离时间,却没有降低分离的效率和纯度,该技术有望实现规模化应用^[71].

基于磷脂识别的外泌体分离方法具有明显优势,比如特异性高:通过靶向外泌体膜上的特定磷脂,能够有效区分外泌体与其他细胞外囊泡或杂质;操作简便:无需复杂的设备(如超速离心机);适用性广:可用于多种生物样品(如血液、尿液、细胞培养上清)中的外泌体分离. 然而,该方法也存在一些挑战,比如磷脂表达的异质性:不同来源的外泌体可能具有不同的磷脂组成,影

响分离效率;分离过程中使用的结合蛋白或洗脱条件可能对外泌体的功能产生影响;目前尚无统一的标准化流程,不同实验室的结果可能存在差异等.

12 总结与展望

为了更直观地比较不同外泌体分离方法的差异,我们在表 1 中进行了总结,在后续的应用中,根据不同的要求选择不同的分离方法. 未来,外泌体分离技术必定朝着更高效、更精准、更自动化的方向发展,将面临着以下四个方面的挑战: (1)分离纯度与得率的平衡. 目前外泌体分离方法难以同时兼顾高纯度和高得率. 例如,免疫亲和法虽然可以获得较高纯度的外泌体,但得率较低,且可能对囊泡造成损伤;而聚合物沉淀法虽然操作简便、得率高,但杂质较多,影响后续分析. 未来需要开发新的分离技术和方法,例如将不同分离方法联用. (2)特定外泌体亚群的分离. 外泌体由于表面标志物、大小、内容物等存在差异,因此具有很强的异质性,对应的生物学功能也不完全相同. 但是目前仍然缺乏高效分离特定外泌体亚群的方法,限制了其后续应用. 未来需要开发基于特异性标志物的分离技术,例如利用抗体偶联的微球或 DNA 适配体,实现外泌体亚群的特异性捕获和分离. (3)标准化与自动化分离. 外泌体分离方法的多样性和操作步骤的复杂性导致实验结果难以重复. 建立标准化的分离流程和质控标准至关重要. 此外,自动化设备的开发将提高分离效率,减少人为误差,促进外泌体研究的临床转化. (4)新型分离技术的探索. 除了传统的分离方法,一些新兴技术也展现出巨大潜力. 例如,基于声波、电场、磁场的分离技术可以实现外泌体的无标记、无损分离;基于纳米材料的分离技术可以提高分离效率和特异性. 未来需要进一步探索这些新技术的原理和应用,开发更高效、更便捷的外泌体分离方法.

表 1 不同外泌体分离方法比较

Table 1 Comparison of different exosome separation methods

方法	纯度	得率	成本	分离时间
超速离心	低	中等	中等	长(4~6 h)
超滤	较低	较高	较高	短(1~2 h)
尺寸排阻色谱	较高	中等	较高	短(0.5~2 h)
聚合物沉淀	低	高	低	长(2~12 h)
免疫亲和	高	低	高	中等(2~4 h)
微流控	高	高	高	短(0.5~1 h)
DNA 适配体亲和	高	中等	高	中等(2~4 h)
基于流体流动	中等	中等	高	短(1~2 h)
热泳	高	中等	高	短(0.5~1 h)
磷脂识别分离	高	中等	高	中等(2~3 h)

要解决这些难题,我们首先要加强基础研究,深入研究外泌体的生物发生机制、表面标志物和异质性,为开发特异性分离方法提供理论依据;其次要开展多学科交叉研究:结合材料科学、微流控技术、纳米技术等领域的先进成果,开发新型外泌体分离平台;此外,还要

建立标准化体系: 制定外泌体分离、鉴定和表征的标准操作流程, 促进不同实验室之间的数据共享和比较; 最后推动产学研合作: 加强学术界与产业界的合作, 加速外泌体分离技术的转化应用, 开发具有临床应用价值的诊断试剂盒和治疗方案, 促进外泌体在疾病早期诊断、预后评估和治疗靶点发现等领域的应用, 推动精准医学的发展。

作者简介



李帅, 博士, 分别于 2018 年和 2023 年获得天津大学化工学院学士和博士学位, 目前在天津大学浙江研究院进行博士后研究, 主要从事外泌体分离方法和癌症早期诊断研究。



刘亚婷, 于 2021 年取得安徽工程大学学士学位, 2024 年取得沈阳医科大学硕士学位, 现为苏州亿弗生物科技有限公司研发工程师, 研究方向为外泌体分离技术和产品的研发。



仰大勇, 博士, 复旦大学“瑞清”特聘讲席教授, 天津大学兼职教授。国家杰出青年科学基金、国家优秀青年科学基金获得者, 入选海外高层次人才计划。研究方向为核酸化学与功能材料, 在 Chem. Rev.、Acc. Chem. Res.、PNAS、J. Am. Chem. Soc.、Angew. Chem.、Nat. Commun.、Sci. Adv.、Nat. Protoc. 和 Adv. Mater. 等杂志发表学术论文 150 余篇。

References

- [1] Kimiz-Gebologlu, I.; Oncel, S. S. *J. Control. Release* **2022**, *347*, 533.
- [2] Johnstone, R. M.; Adam, M.; Hammond, J. R.; Orr, L.; Turbide, C. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 9412.
- [3] Kalluri, R.; LeBleu, V. S. *Science* **2020**, *367*, eaau6977.
- [4] Welsh, J. A.; Goberdhan, D. C. I.; O'Driscoll, L.; Buzas, E. I.; Blenkiron, C.; Bussolati, B.; Cai, H.; Di Vizio, D.; Driedonks, T. A. P.; Erdbrügger, U.; Falcon-Perez, J. M.; Fu, Q. L.; Hill, A. F.; Lenassi,

- M.; Lim, S. K.; Mahoney, M. G.; Mohanty, S.; Möller, A.; Nieuwland, R.; Ochiya, T.; Sahoo, S.; Torrecilhas, A. C.; Zheng, L.; Zijlstra, A.; Abuelreich, S.; Bagabas, R.; Bergese, P.; Bridges, E. M.; Bruciale, M.; Burger, D.; Carney, R. P.; Cocucci, E.; Crescitelli, R.; Hanser, E.; Harris, A. L.; Haughey, N. J.; Hendrix, A.; Ivanov, A. R.; Jovanovic-Talisman, T.; Kruh-Garcia, N. A.; Ku'ulei-Lyn Faustino, V.; Kyburz, D.; Lässer, C.; Lennon, K. M.; Lötvall, J.; Maddox, A. L.; Martens-Uzunova, E. S.; Mizenko, R. R.; Newman, L. A.; Ridolfi, A.; Rohde, E.; Rojalin, T.; Rowland, A.; Saftics, A.; Sandau, U. S.; Saugstad, J. A.; Shekari, F.; Swift, S.; Ter-Ovanesyan, D.; Tosar, J. P.; Useckaite, Z.; Valle, F.; Varga, Z.; van der Pol, E.; van Herwijnen, M. J. C.; Wauben, M. H. M.; Wehman, A. M.; Williams, S.; Zendrini, A.; Zimmerman, A. J.; Théry, C.; Witwer, K. W. *J. Extracell. Vesicles* **2024**, *13*, e12404.
- [5] Rahimian, S.; Najafi, H.; Afzali, B.; Doroudian, M. *Biomedicines* **2024**, *12*, 123.
- [6] Hoshino, A.; Kim, H. S.; Bojmar, L.; Gyan, K. E.; Cioffi, M.; Hernandez, J.; Zambirinis, C. P.; Rodrigues, G.; Molina, H.; Heissel, S.; Mark, M. T.; Steiner, L.; Benito-Martin, A.; Lucotti, S.; Di Giannatale, A.; Offer, K.; Nakajima, M.; Williams, C.; Nogue, L.; Vatter, F. A. P.; Hashimoto, A.; Davies, A. E.; Freitas, D.; Kenific, C. M.; Arrarso, Y.; Buehring, W.; Lauritzen, P.; Ogita, Y.; Sugiura, K.; Takahashi, N.; Aleckovic, M.; Bailey, K. A.; Jolissant, J. S.; Wang, H.; Harris, A.; Schaeffer, L. M.; Garcia-Santos, G.; Posner, Z.; Balachandran, V. P.; Khakoo, Y.; Raju, G. P.; Scherz, A. C.; Sagi, I.; Scherz-Shouval, R.; Yarden, Y.; Oren, M.; Malladi, M.; Petriccione, M.; De Braganca, K. C.; Donzelli, M.; Fischer, C.; Vitolano, S.; Wright, G. P.; Ganshaw, L.; Marrano, M.; Ahmed, A.; DeStefano, J.; Danzer, E.; Roehrl, M. H. A.; Lacayo, N. J.; Vincent, T. C.; Weiser, M. R.; Brady, M. S.; Meyers, P. A.; Wexler, L. H.; Ambati, S. R.; Chou, A. J.; Slotkin, E. K.; Modak, S.; Roberts, S. S.; Basu, E. M.; Diolaiti, D.; Krantz, B. A.; Cardoso, F.; Simpson, A. L.; Berger, M.; Rudin, C. M.; Simeone, D. M.; Jain, M.; Ghajar, C. M.; Batra, S. K.; Stanger, B. Z.; Bui, J.; Brown, K. A.; Rajasekhar, V. K.; Healey, J. H.; de Sousa, M.; Kramer, K.; Sheth, S.; Baisch, J.; Pascual, V.; Heaton, T. E.; La Quaglia, M. P.; Pisapia, D. J.; Schwartz, R.; Zhang, H.; Liu, Y.; Shukla, A.; Blavier, L.; DeClerck, Y. A.; LaBarge, M.; Bissell, M. J.; Caffrey, T. C.; Grandgenett, P. M.; Hollingsworth, M. A.; Bromberg, J.; Costa-Silva, B.; Peinado, H.; Kang, Y.; Garcia, B. A.; O'Reilly, E. M.; Kelsen, D.; Trippett, T. M.; Jones, D. R.; Matei, I. R.; Jarnagin, W. R.; Lyden, D. *Cell* **2020**, *182*, 1044.
- [7] Yu, D.; Li, Y.; Wang, M.; Gu, J.; Xu, W.; Cai, H.; Fang, X.; Zhang, X. *Mol. Cancer* **2022**, *21*, 56.
- [8] Yang, Q.; Wang, R.; Wu, K.; Li, D. *Chin. J. Chem.* **2023**, *41*, 2269.
- [9] Shi, J.; Sun, Y.; Fan, W.; Ren, W.; Liu, C. *Chin. J. Chem.* **2023**, *41*, 2151.
- [10] Mizenko, R. R.; Feaver, M.; Bozkurt, B. T.; Lowe, N.; Nguyen, B.; Huang, K.-W.; Wang, A.; Carney, R. P. *J. Extracell. Vesicles* **2024**, *13*, e12510.
- [11] Rasihashemi, S. Z.; Sahrai, H.; Rezazadeh-Gavani, E.; Yazdani, Y.; Khalaji, A.; Lotfinejad, P. *Med. Oncol.* **2022**, *39*, 183.
- [12] Yang, D.; Zhang, W.; Zhang, H.; Zhang, F.; Chen, L.; Ma, L.; Larcher, L. M.; Chen, S.; Liu, N.; Zhao, Q.; Tran, P. H. L.; Chen, C.; Veedu, R. N.; Wang, T. *Theranostics* **2020**, *10*, 3684.
- [13] Livshits, M. A.; Khomyakova, E.; Evtushenko, E. G.; Lazarev, V. N.; Kulemin, N. A.; Semina, S. E.; Generozov, E. V.; Govorun, V. M. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 17319.
- [14] Johnstone, R. M. *Biochem. Cell Biol.* **1992**, *70*, 179.
- [15] Jeppesen, D. K.; Hvam, M. L.; Primdahl-Bengtson, B.; Boysen, A. T.; Whitehead, B.; Dyrskjot, L.; Orntoft, T. F.; Howard, K. A.; Ostentfeld, M. S. *J. Extracell. Vesicles* **2014**, *3*, 25011.
- [16] Wan, Z.; Gu, J.; Balaji, U.; Bojmar, L.; Molina, H.; Heissel, S.; Pagano, A. E.; Peralta, C.; Shaashua, L.; Ismailgeci, D.; Narozniak, H. K.; Song, Y.; Jarnagin, W. R.; Kelsen, D. P.; Bromberg, J.; Pascual, V.; Zhang, H. *J. Extracell. Bio.* **2024**, *3*, e167.
- [17] Thery, C.; Witwer, K. W.; Aikawa, E.; Jose Alcaraz, M.; Anderson, J. D.; Andriantsitohaina, R.; Antoniou, A.; Arab, T.; Archer, F.; Atkin-Smith, G. K.; Ayre, D. C.; Bach, J.-M.; Bachurski, D.; Baharvand, H.; Balaj, L.; Baldacchino, S.; Bauer, N. N.; Baxter, A. A.; Bebawy, M.; Beckham, C.; Zavec, A. B.; Benmoussa, A.; Berardi, A. C.; Bergese, P.; Bielska, E.; Blenkiron, C.; Bobis-Wozowicz, S.; Boilard, E.; Boireau, W.; Bongiovanni, A.; Borras, F. E.; Bosch, S.; Boulanger, C. M.; Breakefield, X.; Breglio, A. M.; Brennan, M. A.; Brigstock, D. R.; Brisson, A.; Broekman, M. L. D.; Bromberg, J. F.; Bryl-Gorecka, P.; Buch, S.; Buck, A. H.; Burger, D.; Busatto, S.;

- Buschmann, D.; Bussolati, B.; Buzas, E. I.; Byrd, J. B.; Camussi, G.; Carter, D. R. F.; Caruso, S.; Chamley, L. W.; Chang, Y.-T.; Chen, C.; Chen, S.; Cheng, L.; Chin, A. R.; Clayton, A.; Clerici, S. P.; Cocks, A.; Cocucci, E.; Coffey, R. J.; Cordeiro-da-Silva, A.; Couch, Y.; Coumans, F. A. W.; Coyle, B.; Crescitelli, R.; Criado, M. F.; D'Souza-Schorey, C.; Das, S.; Chaudhuri, A. D.; de Candia, P.; De Santana Junior, E. F.; De Wever, O.; del Portillo, H. A.; Demaret, T.; Deville, S.; Devitt, A.; Dhondt, B.; Di Vizio, D.; Dieterich, L. C.; Dolo, V.; Dominguez Rubio, A. P.; Dominici, M.; Dourado, M. R.; Driedonks, T. A. P.; Duarte, F. V.; Duncan, H. M.; Eichenberger, R. M.; Ekstrom, K.; Andaloussi, S. E. L.; Elie-Caille, C.; Erdbrugger, U.; Falcon-Perez, J. M.; Fatima, F.; Fish, J. E.; Flores-Bellver, M.; Forsnits, A.; Frelet-Barrand, A.; Fricke, F.; Fuhrmann, G.; Gabriellson, S.; Gamez-Valero, A.; Gardiner, C.; Gaertner, K.; Gaudin, R.; Gho, Y. S.; Giebel, B.; Gilbert, C.; Gimona, M.; Giusti, I.; Goberdhan, D. C. I.; Goergens, A.; Gorski, S. M.; Greening, D. W.; Gross, J. C.; Gualerzi, A.; Gupta, G. N.; Gustafson, D.; Handberg, A.; Haraszti, R. A.; Harrison, P.; Hegyesi, H.; Hendrix, A.; Hill, A. F.; Hochberg, F. H.; Hoffmann, K. F.; Holder, B.; Holthofer, H.; Hosseinkhani, B.; Hu, G.; Huang, Y.; Huber, V.; Hunt, S.; Ibrahim, A. G.-E.; Ikezu, T.; Inal, J. M.; Isin, M.; Ivanova, A.; Jackson, H. K.; Jacobsen, S.; Jay, S. M.; Jayachandran, M.; Jenster, G.; Jiang, L.; Johnson, S. M.; Jones, J. C.; Jong, A.; Jovanovic-Talisman, T.; Jung, S.; Kalluri, R.; Kano, S.-i.; Kaur, S.; Kawamura, Y.; Keller, E. T.; Khamari, D.; Khomyakova, E.; Khvorova, A.; Kierulff, P.; Kim, K. P.; Kislinger, T.; Klingeborn, M.; Klinke, D. J.; II, Kornek, M.; Kosanovic, M. M.; Kovacs, A. F.; Kraemer-Albers, E.-M.; Krasemann, S.; Krause, M.; Kurochkin, I. V.; Kusuma, G. D.; Kuypers, S.; Laitinen, S.; Langevin, S. M.; Languino, L. R.; Lannigan, J.; Lasser, C.; Laurent, L. C.; Lavieu, G.; Lazaro-Ibanez, E.; Le Lay, S.; Lee, M.-S.; Lee, Y. X. F.; Lemos, D. S.; Lenassi, M.; Leszczynska, A.; Li, I. T. S.; Liao, K.; Libregts, S. F.; Ligeti, E.; Lim, R.; Lim, S. K.; Line, A.; Linneemannstoens, K.; Llorente, A.; Lombard, C. A.; Lorenzowicz, M. J.; Lorincz, A. M.; Lotvall, J.; Lovett, J.; Lowry, M. C.; Loyer, X.; Lu, Q.; Lukomska, B.; Lunavat, T. R.; Maas, S. L. N.; Malhi, H.; Marcilla, A.; Mariani, J.; Mariscal, J.; Martens-Uzunova, E. S.; Martin-Jaular, L.; Martinez, M. C.; Martins, V. R.; Mathieu, M.; Mathivanan, S.; Maugeri, M.; McGinnis, L. K.; McVey, M. J.; Meckes, D. G.; Jr.; Meehan, K. L.; Mertens, I.; Minciacci, V. R.; Moller, A.; Jorgensen, M. M.; Morales-Kastresana, A.; Morhayim, J.; Mullier, F.; Muraca, M.; Musante, L.; Mussack, V.; Muth, D. C.; Myburgh, K. H.; Najrana, T.; Nawaz, M.; Nazarenko, I.; Nejsun, P.; Neri, C.; Neri, T.; Nieuwland, R.; Nimrichter, L.; Nolan, J. P.; Nolte-t Hoen, E. N. M.; Noren Hooten, N.; O'Driscoll, L.; O'Grady, T.; O'Loughlin, A.; Ochiya, T.; Olivier, M.; Ortiz, A.; Ortiz, L. C.; Osteikoetxea, X.; Ostegaard, O.; Ostrowski, M.; Park, J.; Pegtel, D. M.; Peinado, H.; Perut, F.; Pfaffl, M. W.; Phinney, D. G.; Pieters, B. C. H.; Pink, R. C.; Pisetsky, D. S.; von Strandmann, E. P.; Polakovicova, I.; Poon, I. K. H.; Powell, B. H.; Prada, I.; Pulliam, L.; Quesenberry, P.; Radeghieri, A.; Raffai, R. L.; Raimondo, S.; Rak, J.; Ramirez, M. I.; Raposo, G.; Rayyan, M. S.; Regev-Rudzi, N.; Riclefs, F. L.; Robbins, P. D.; Roberts, D. D.; Rodrigues, S. C.; Rohde, E.; Rome, S.; Rouschop, K. M. A.; Rugghetti, A.; Russell, A. E.; Saa, P.; Sahoo, S.; Salas-Huenuleo, E.; Sanchez, C.; Saugstad, J. A.; Saul, M. J.; Schiffelers, R. M.; Schneider, R.; Schoyen, T. H.; Scott, A.; Shahaj, E.; Sharma, S.; Shatnyeva, O.; Shekari, F.; Shelke, G. V.; Shetty, A. K.; Shiba, K.; Siljander, P. R. M.; Silva, A. M.; Skowronek, A.; Snyder, O. L.; II, Soares, R. P.; Sodar, B. W.; Soekmadji, C.; Sotillo, J.; Stahl, P. D.; Stoorvogel, W.; Stott, S. L.; Strasser, E. F.; Swift, S.; Tahara, H.; Tewari, M.; Timms, K.; Tiwari, S.; Tixeira, R.; Tkach, M.; Toh, W. S.; Tomasini, R.; Torrecillas, A. C.; Pablo Tosar, J.; Toxavidis, V.; Urbanelli, L.; Vader, P.; van Balkom, B. W. M.; van der Grein, S. G.; Van Deun, J.; van Herwijnen, M. J. C.; Van Keuren-Jensen, K.; van Niel, G.; van Royen, M. E.; van Wijnen, A. J.; Helena Vasconcelos, M.; Vechetti, I. J.; Jr.; Veit, T. D.; Vella, L. J.; Velot, E.; Verweij, F. J.; Vestad, B.; Vinas, J. L.; Visnovitz, T.; Vukman, K. V.; Wahlgren, J.; Watson, D. C.; Wau-ben, M. H. M.; Weaver, A.; Webber, J. P.; Weber, V.; Wehman, A. M.; Weiss, D. J.; Welsh, J. A.; Wendt, S.; Wheelock, A. M.; Wiener, Z.; Witte, L.; Wolfram, J.; Xagorari, A.; Xander, P.; Xu, J.; Yan, X.; Yanez-Mo, M.; Yin, H.; Yuana, Y.; Zappulli, V.; Zarubova, J.; Zekas, V.; Zhang, J.-y.; Zhao, Z.; Zheng, L.; Zheutlin, A. R.; Zickler, A. M.; Zimmermann, P.; Zivkovic, A. M.; Zocco, D.; Zuba-Surma, E. K. *J. Extracell. Vesicles* **2018**, 7, 1535750.
- [18] Tran, P. H. L.; Wang, T.; Yin, W.; Tran, T. T. D.; Nguyen, T. N. G.; Lee, B. J.; Duan, W. *Int. J. Pharm.* **2019**, 572, 118786.
- [19] Onodi, Z.; Pelyhe, C.; Nagy, C. T.; Brenner, G. B.; Almasi, L.; Kittel, A.; Mancek-Keber, M.; Ferdinandy, P.; Buzas, E. I.; Giricz, Z. *Front. Physiol.* **2018**, 9, 1479.
- [20] Seo, K.; Yoo, J. H.; Kim, J.; Min, S. J.; Heo, D. N.; Kwon, I. K.; Moon, H. J. *Nanoscale* **2023**, 15, 5798.
- [21] Musumeci, T.; Leonardi, A.; Bonaccorso, A.; Pignatello, R.; Puglisi, G. *Pharm. Nanotechnol.* **2018**, 6, 48.
- [22] Lu, Y.; Eguchi, T.; Sogawa, C.; Taha, E. A.; Tran, M. T.; Nara, T.; Wei, P.; Fukuoka, S.; Miyawaki, T.; Okamoto, K. *Cells* **2021**, 10, 1328.
- [23] Lane, R. E.; Korbie, D.; Trau, M.; Hill, M. M. *Methods Mol. Biol.* **2017**, 1660, 111.
- [24] Lucchetti, D.; Fattorossi, A.; Sgambato, A. *Biotechnol. J.* **2019**, 14, e1700716.
- [25] Visan, K. S.; Lobb, R. J.; Ham, S.; Lima, L. G.; Palma, C.; Edna, C. P. Z.; Wu, L. Y.; Gowda, H.; Datta, K. K.; Hartel, G.; Salomon, C.; Möller, A. *J. Extracell. Vesicles* **2022**, 11, e12266.
- [26] Chen, Y.; Zhu, Q.; Cheng, L.; Wang, Y.; Li, M.; Yang, Q.; Hu, L.; Lou, D.; Li, J.; Dong, X.; Lee, L. P.; Liu, F. *Nat. Methods* **2021**, 18, 212.
- [27] (a) Sidhom, K.; Obi, P. O.; Saleem, A. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, 21, 6466. (b) Yousif, G.; Qadri, S.; Parray, A.; Akthar, N.; Shuaib, A.; Haik, Y. *Neuromolecular Med.* **2022**, 24, 339.
- [28] D'Atri, V.; Imiolek, M.; Quinn, C.; Finny, A.; Lauber, M.; Fekete, S.; Guillaume, D. *J. Chromatogr. A* **2024**, 1722, 464862.
- [29] Chen, J.; Li, P.; Zhang, T.; Xu, Z.; Huang, X.; Wang, R.; Du, L. *Front. Bioeng. Biotech.* **2021**, 9, 811971.
- [30] Böing, A. N.; van der Pol, E.; Grootemaat, A. E.; Coumans, F. A.; Sturk, A.; Nieuwland, R. *J. Extracell. Vesicles* **2014**, 3, 23430.
- [31] An, M.; Wu, J.; Zhu, J.; Lubman, D. M. *J. Proteome Res.* **2018**, 17, 3599.
- [32] Ter-Ovanesyan, D.; Norman, M.; Lazarovits, R.; Trieu, W.; Lee, J. H.; Church, G. M.; Walt, D. R. *Elife* **2021**, 10, 70725.
- [33] Guo, J.; Wu, C.; Lin, X.; Zhou, J.; Zhang, J.; Zheng, W.; Wang, T.; Cui, Y. *J. Extracell. Vesicles* **2021**, 10, e12145.
- [34] Coumans, F. A. W.; Brissin, A. R.; Buzas, E. I.; Dignat-George, F.; Drees, E. E. E.; El-Andaloussi, S.; Emanuel, C.; Gasecka, A.; Hendrix, A.; Hill, A. F.; Lacroix, R.; Lee, Y.; van Leeuwen, T. G.; Mackman, N.; Mäger, I.; Nolan, J. P.; van der Pol, E.; Pegtel, D. M.; Sahoo, S.; Siljander, P. R. M.; Sturk, G.; de Wever, O.; Nieuwland, R. *Circ. Res.* **2017**, 120, 1632.
- [35] Jia, Y.; Yu, L.; Ma, T.; Xu, W.; Qian, H.; Sun, Y.; Shi, H. *Theranostics* **2022**, 12, 6548.
- [36] Liangsupree, T.; Multia, E.; Riekkola, M. L. *J. Chromatogr. A* **2021**, 1636, 461773.
- [37] Shin, H.; Han, C.; Labuz, J. M.; Kim, J.; Kim, J.; Cho, S.; Gho, Y. S.; Takayama, S.; Park, J. *Sci. Rep.* **2015**, 5, 13103.
- [38] Kim, J.; Shin, H.; Kim, J.; Kim, J.; Park, J. *PLoS One* **2015**, 10, e0129760.
- [39] Kırbaş, O. K.; Bozkurt, B. T.; Asutay, A. B.; Mat, B.; Ozdemir, B.; Öztürkoglu, D.; Ölmez, H.; İşlek, Z.; Şahin, F.; Taşlı, P. N. *Sci. Rep.* **2019**, 9, 19159.
- [40] Ansari, F. J.; Tafti, H. A.; Amanzadeh, A.; Rabbani, S.; Shokrgozar, M. A.; Heidari, R.; Behrooz, J.; Eyni, H.; Uversky, V. N.; Ghanbari, H. *Biochem. Biophys. Rep.* **2024**, 38, 101668.
- [41] Cao, L.; Zhou, Y.; Lin, S.; Yang, C.; Guan, Z.; Li, X.; Yang, S.; Gao, T.; Zhao, J.; Fan, N.; Song, Y.; Li, D.; Li, X.; Li, Z.; Guan, F.; Tan, Z. *J. Extracell. Vesicles* **2024**, 13, e12499.
- [42] Zhang, Y.; Bi, J.; Huang, J.; Tang, Y.; Du, S.; Li, P. *Int. J. Nanomed.* **2020**, 15, 6917.
- [43] Sharma, P.; Ludwig, S.; Muller, L.; Hong, C. S.; Kirkwood, J. M.; Ferrone, S.; Whiteside, T. L. *J. Extracell. Vesicles* **2018**, 7, 1435138.
- [44] Altıntaş, Ö.; Saylan, Y. *Anal. Chem.* **2023**, 95, 16029.
- [45] Theel, E. K.; Schwaminger, S. P. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, 23, 9004.
- [46] Liu, H. Y.; Kumar, R.; Zhong, C.; Gorji, S.; Paniushkina, L.; Masood, R.; Wittel, U. A.; Fuchs, H.; Nazarenko, I.; Hirtz, M. *Adv. Mater.* **2021**, 33, e2008493.
- [47] Lo, T.-W.; Zhu, Z.; Purcell, E.; Watza, D.; Wang, J.; Kang, Y.-T.; Jolly, S.; Nagrath, D.; Nagrath, S. *Lab Chip* **2020**, 20, 1762.
- [48] Zhang, P.; Zhou, X.; He, M.; Shang, Y.; Tetlow, A. L.; Godwin, A. K.; Zeng, Y. *Nat. Biomed. Eng.* **2019**, 3, 438.
- [49] Ramnauth, N.; Neubarth, E.; Makler-Disatham, A.; Sher, M.; Soini, S.; Merk, V.; Asghar, W. *Sensors* **2023**, 23, 8292.
- [50] Wang, Z.; Li, F.; Rufo, J.; Chen, C.; Yang, S.; Li, L.; Zhang, J.; Cheng, J.; Kim, Y.; Wu, M.; Abemayor, E.; Tu, M.; Chia, D.; Spruce, R.; Batis, N.; Mehanna, H.; Wong, D. T. W.; Huang, T. J. *J. Mol.*

- Diagn.* **2020**, *22*, 50.
- [51] Shi, L.; Kuhnell, D.; Borra, V. J.; Langevin, S. M.; Nakamura, T.; Esfandiari, L. *Lab Chip* **2019**, *19*, 3726.
- [52] Le, M. N.; Fan, Z. H. *Biomed. Mater.* **2021**, *16*, 022005.
- [53] Ozcelik, A.; Cevik, O. *Biocell* **2023**, *47*, 959.
- [54] Saito, S. *Anal. Sci.* **2021**, *37*, 17.
- [55] Tan, W.; Donovan, M. J.; Jiang, J. *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 2842.
- [56] Zhang, K. X.; Yue, Y. L.; Wu, S. X.; Liu, W.; Shi, J. J.; Zhang, Z. Z. *ACS Sens.* **2019**, *4*, 1245.
- [57] Liu, C.; Zhao, J.; Tian, F.; Chang, J.; Zhang, W.; Sun, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 3817.
- [58] Tang, J.; Jia, X.; Li, Q.; Cui, Z.; Liang, A.; Ke, B.; Yang, D.; Yao, C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2023**, *120*, e2303822120.
- [59] Oeyen, E.; Van Mol, K.; Baggerman, G.; Willems, H.; Boonen, K.; Rolfo, C.; Pauwels, P.; Jacobs, A.; Schildermans, K.; Cho, W. C.; Mertens, I. *J. Extracell. Vesicles* **2018**, *7*, 1490143.
- [60] Hu, L.; Zheng, X.; Zhou, M.; Wang, J.; Tong, L.; Dong, M.; Xu, T.; Li, Z. *J. Extracell. Vesicles* **2024**, *13*, e12470.
- [61] Wu, B.; Chen, X.; Wang, J.; Qing, X.; Wang, Z.; Ding, X.; Xie, Z.; Niu, L.; Guo, X.; Cai, T.; Guo, X.; Yang, F. *Anal. Chim. Acta* **2020**, *1127*, 234.
- [62] Oh, S.; Kang, D.; Ahn, S. M.; Simpson, R. J.; Lee, B. H.; Moon, M. H. *J. Sep. Sci.* **2007**, *30*, 1082.
- [63] Liu, C.; Tian, F.; Deng, J.; Sun, J. *Acta Chim. Sinica* **2022**, *80*, 679 (in Chinese). (刘超, 田飞, 邓瑾琦, 孙佳姝, 化学学报, **2022**, *80*, 679.)
- [64] Liu, C.; Zhao, J. X.; Tian, F.; Cai, L. L.; Zhang, W.; Feng, Q.; Chang, J. Q.; Wan, F. N.; Yang, Y. J.; Dai, B.; Cong, Y. L.; Ding, B. Q.; Sun, J. S.; Tan, W. H. *Nat. Biomed. Eng.* **2019**, *3*, 183.
- [65] Zhao, J.; Liu, C.; Li, Y.; Ma, Y.; Deng, J.; Li, L.; Sun, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 4996.
- [66] Li, Y.; Zhang, S.; Liu, C.; Deng, J.; Tian, F.; Feng, Q.; Qin, L.; Bai, L.; Fu, T.; Zhang, L.; Wang, Y.; Sun, J. *Nat. Commun.* **2024**, *15*, 2292.
- [67] Nakai, W.; Yoshida, T.; Diez, D.; Miyatake, Y.; Nishibu, T.; Imawaka, N.; Naruse, K.; Sadamura, Y.; Hanayama, R. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 33935.
- [68] Li, Q.; Plao, X. K.; Wang, F. C.; Li, X. J.; Yang, J.; Liu, Y.; Shi, L. Q.; Liu, D. B. *Anal. Chem.* **2019**, *91*, 13633.
- [69] Zhang, P.; Dong, B.; Zeng, E.; Wang, F.; Jiang, Y.; Li, D.; Liu, D. *Anal. Chem.* **2018**, *90*, 11273.
- [70] Di, H.; Zeng, E.; Zhang, P.; Liu, X.; Zhang, C.; Yang, J.; Liu, D. *Anal. Chem.* **2019**, *91*, 12752.
- [71] Li, Q.; Zhang, Z. W.; Wang, F. C.; Wang, X.; Zhan, S. S.; Yang, X. Q.; Xu, C.; Liu, D. B. *Sci. Adv.* **2023**, *9*, eadf4568.

(Cheng, B.)