



陈扬博士, 北京大学医学部精准医疗多组学研究中心预聘制助理教授。主要从事膜性细胞结构和细胞器生物膜动态变化的研究, 重点研究细胞自噬的分子细胞生物学机制和新细胞器迁移体的分子细胞生物学基础以及生理功能。主要研究为细胞微丝骨架支撑自噬体膜曲度形成的分子机制, 以及自噬性溶酶体再生的分子机制和体外重构。针对新细胞器迁移体主要研究内容为特征性蛋白质标记物、疾病样品中迁移体的鉴定以及探索迁移体的生理功能、在疾病中的重要作用和迁移体在疾病发生、诊断中的意义。

<http://sbms.bjmu.edu.cn/jsdw/bssds/dsjs/201129.htm>

细胞外囊泡研究进展

陈扬*

(北京大学医学部精准医疗多组学研究中心, 北京 100191)

摘要 由细胞释放到细胞外环境中的来源于内体和细胞膜的多样化的膜性囊泡, 统称为细胞外囊泡。这些细胞外囊泡作为细胞间转运膜和可溶性蛋白、脂质、RNA的载体, 代表一种重要的细胞间通讯方式。虽然很多报道证明, 多种细胞释放细胞外囊泡, 并且具有一定的生理意义, 但是我们目前缺乏对细胞外囊泡分子机制的深入理解, 在细胞外囊泡研究的方法学以及人为调控细胞外囊泡的释放等方面也存在局限性, 因此使得我们对它们在体内的生理学功能和细胞外囊泡作为疾病靶标的转化医学的研究进程缓慢。在这篇综述中, 该文主要从细胞外囊泡的分类、分子细胞生物学研究、生理及病生理功能、细胞外囊泡的研究方法几个方面回顾当前细胞外囊泡领域的研究进展。

关键词 细胞外囊泡; 外泌体; 迁移体; 分离技术; 检测方法

Research Progress of Extracellular Vesicles

Chen Yang*

(Center for Precision Medicine Multi-Omics Research, Peking University Health Science Center, Peking University, Beijing 100191, China)

Abstract Cells release into the extracellular environment diverse types of membrane vesicles of endosomal and plasma membrane origin called extracellular vesicles (EV). These EV represent an important mode of intercellular communication by serving as vehicles for transfer between cells of membrane and cytosolic proteins, lipids, and RNA. Although over the past decades, many literatures report that extracellular vesicles have been released by a variety of cells, deficiencies in our knowledge of the molecular mechanisms for EV formation and lack of methods to interfere with the packaging of cargo or with vesicle release, still hamper the progress of developing EV as biomarkers for specific diseases. In this review, we focused on the definition, classification and characteriza-

科技部重点研发专项(批准号: 2018YFA0507102)和国家自然科学基金(批准号: 91754108、31671395)资助的课题

*通讯作者。Tel: 010-82805977, E-mail: chenyang1816185048@bjmu.edu.cn

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

*Corresponding author. Tel: +86-10-82805977, E-mail: chenyang1816185048@bjmu.edu.cn

网络出版时间: 2019-02-21 15:38:10

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20190221.1538.036.html>

tion of EV and on currently proposed mechanisms for their formation, targeting, and function. We would also talk about the separation and detection methodologies of EV.

Keywords extracellular vesicles; exosome; migrasome; separation technology; detection methodology

细胞间通讯是多细胞生物完成其正常生理功能的里程碑, 细胞间通讯可通过直接细胞间接触或通过细胞分泌的信号分子传递信息。在过去二十年, 第三种细胞间通讯方式被提出, 是通过细胞外囊泡来介导细胞间信号传递。虽然细胞凋亡时释放凋亡小体早就被报道, 但是健康的细胞从细胞膜释放囊泡是最近才被关注的。这些囊泡被统称为细胞外囊泡, 包括微泡(microvesicles)、ectosome、迁移体(migrasome)、凋亡小体(apoptotic body)和外泌体(exosome)。迁移体是2015年被发现和定义的一种细胞结构, 在迁移体发生过程中, 有很大部分时间是处于距离细胞较远, 但又与细胞相联系的状态, 发挥超出细胞外囊泡的功能。在迁移体完全脱离细胞胞体后, 呈囊泡结构的迁移体也可以归属为细胞外囊泡。我们可以观察到, 细胞外囊泡是在体内被释放的。后来, 具有外泌体特征的囊泡在多种体液, 包括精液、血液、尿、唾液、母乳、羊水、腹水、脑脊液、胆汁中被检测到, 使得科学家和医生对于细胞外囊泡的兴趣在过去的十年中呈指数增加, 他们鉴定了大量不同来源的细胞外囊泡的分子组成。当前对于这些细胞外囊泡的研究虽然火热, 但是都存在明显的缺陷。由于不同研究领域的研究组发现新的细胞外囊泡后, 他们根据这些囊泡的功能或者产生方式命名, 从而导致了囊泡命名的混乱和相互重合。当前研究过于重视鉴定不同来源和不同生理、病理条件下细胞外囊泡的分子组成, 以实现细胞外囊泡作为疾病分子标记物的转化研究, 而忽略了对细胞外囊泡的基础研究。例如, 细胞外囊泡结构的分类、发生的分子细胞生物学机制、转运和受体细胞接收的分子机制、检测方法等不同, 导致获得的大量数据质量参差不齐, 大量研究无法深入, 使得我们对细胞外囊泡在体内的生理学功能以及其作为疾病分子标志物的研究进展缓慢。本篇综述我们将对细胞外囊泡当前研究进展以及存在的问题进行综述。

1 细胞外囊泡的分类和命名

1.1 外泌体(exosome)

外泌体在免疫细胞(树突状细胞、T细胞、B细

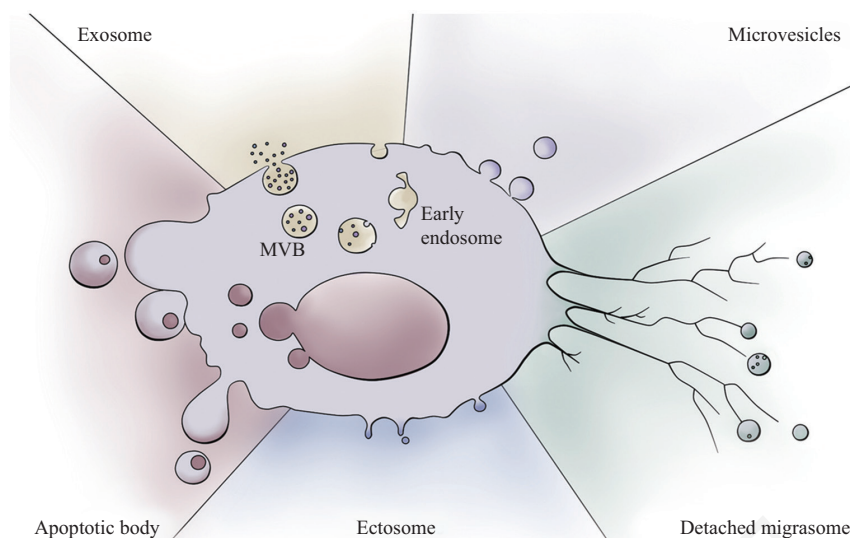
胞和巨噬细胞)或者肿瘤中的报道居多。外泌体是磷脂双分子层包围的细胞外囊泡, 直径为50~100 nm, 可以由静息细胞释放, 或诱导释放(图1)。外泌体释放是通过内吞体向内凹陷形成多泡体(multivesicular body, MVB), 再由多泡体与细胞膜融合而释放的。外泌体不仅可以横向传递mRNA和miRNA、致癌受体(oncogenetic receptor)和艾滋病病毒颗粒(HIV particle), 还具有抗原呈递、免疫激活和免疫抑制活性, 表达D63、CD81、CD9、LAMP1、TSG101等标志物。

1.2 迁移体(migrasome)

迁移体是2015年新报道的细胞器^[1]。在细胞定向迁移的过程中, 细胞尾部产生收缩丝。在收缩丝的末端或交叉部位产生直径为0.5~3.0 μm的单层膜囊泡结构称为迁移体。电子显微镜结果发现, 在大囊泡中, 有时包含了小的数量不等的直径在50~100 nm的囊泡, 这些小的囊泡的数量从10到300个不等。当细胞迁移离开后迁移体会继续留在原地, 直到破裂或被后来的细胞吞噬, 释放出供体细胞的内容物(图1和图2)。因此, 从迁移体发生的形态学分析可以发现, 迁移体在发生过程中有相当长时间与细胞相连接, 可能进行动态的信号沟通, 当迁移体完全脱离细胞成为细胞外囊泡后, 迁移体承载着细胞间进行物质传递的功能。迁移体的发生需要整合素、TSPAN家族等蛋白的参与^[2]。迁移体在斑马鱼早期胚胎发育中信号分子区域微环境的建立上具有重要作用。

1.3 微泡(microvesicles)

微泡是内皮细胞或者血小板产生的细胞外囊泡。首先, 微泡是由Cargaff等^[3]在1946年发现的, 认为是不含血小板但还具有产生凝血酶活性的血浆中有沉淀作用的因子。1967年, Volf等^[4]从新鲜血浆中通过超速离心分离出血小板的尘埃(platelet dust), 定义为微泡。微泡被认为是由血小板、红细胞或上皮细胞产生的, 具有促凝血功能。微泡是磷脂双分子层包围的膜结构, 直径为100~1 000 nm^[5]。微泡由细胞膜向外出芽生成(图1)。微泡的生成是受调控的。细胞表面受体被激活、细胞凋亡或细胞内钙离

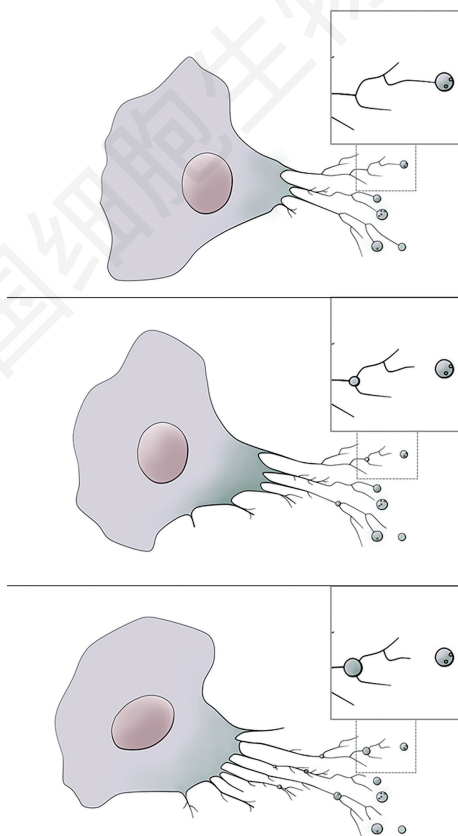


外泌体(exosome)释放是通过内吞体向内凹陷形成多泡体(MVB), 再由多泡体与细胞膜融合而完成的。迁移体(migrasome)是细胞迁移过程中收缩丝的末端或交叉部位产生的。微泡(microvesicles)由细胞膜向外芽生出的。凋亡小体(apoptotic body)是细胞凋亡过程中细胞起泡产生的。Ectosome是细胞延伸出伪足后, 伪足断裂形成的小囊泡。

Exosomes are endosome-derived vesicles and released upon fusion of multi-vesicular bodies with the plasma membrane. Migrasomes grow on the tips and intersections of retraction fibers during cell migration. Microvesicles are produced by outward budding and fission of the plasma membrane. Apoptotic bodies are released as blebs of cells undergoing apoptosis. Ectosome is vesicles shedding by activated neutrophils.

图1 不同细胞外囊泡的产生和释放

Fig.1 Biogenesis and release of extracellular vesicles



迁移体是在细胞定向迁移的过程中, 在细胞尾部的收缩丝的末端或交叉部位产生直径为0.5~3.0 μm 、内含数量不等的小囊泡的单层膜囊泡结构。Migrasomes, which are 0.5-3.0 μm in diameter and contain small vesicles of unknown origin, grow on the tips and intersections of retraction fibers.

图2 新细胞器迁移体的发生和释放过程

Fig.2 Biogenesis and release of new cellular organelle migrasome

子浓度增高均可诱发微泡的产生。

1.4 凋亡小体(apoptotic body)

凋亡小体由Kerr等^[6]在1972年提出, Robert Horvitz团队^[7-8]研究线虫中细胞谱系发育中的细胞凋亡是又一个凋亡小体研究的里程碑。凋亡小体直径在1~5 μm ^[9], 是细胞凋亡过程中起泡产生的(图1)。凋亡小体可水平传递DNA^[10]、致癌基因^[11], 在被吞噬细胞摄入时呈递T细胞抗原决定簇, 具有免疫抑制作用^[12-14]。

1.5 Ectosome

在扫描电镜下观察, 发现中性粒细胞被fMLP激活, 并发生形态学改变, 延伸出伪足(pseudopodia), 伪足断裂形成小囊泡(图1)。另外, 激活的中性粒细胞表面形成70~300 nm小囊泡凸起, 最后以囊泡结构释放到细胞外, 以上两种小囊泡被定义为ectosome^[15-16]。因此, Ectosome是一类定义比较狭窄的细胞特异性的细胞外囊泡。

2 细胞外囊泡的分子细胞生物学研究

对细胞外囊泡的分子细胞生物学研究主要集中在细胞外囊泡的分子组成、形成机制、内容物的分选机制、细胞外囊泡的释放以及释放入细胞外环境的细胞外囊泡被摄取的机制这几个方面。不同种类的细胞外囊泡在以上方面均具有共同点和特异性, 这决定了它们的生物学功能也有各自的特异性。当前的研究绝大多数集中在外泌体的研究上, 而其他的细胞外囊泡的研究相对较少。

2.1 细胞外囊泡的分子组成

不同来源的细胞外囊泡的蛋白组成可以由蛋白免疫印记或蛋白组学实验来研究。不同细胞外囊泡的来源不同, 外泌体具有内吞体相关蛋白, 如Rab、SNAREs、Annexins和flotillin, 一些和多泡体产生有关的蛋白(如Alix、TSG101)^[17]。一些已知的会在细胞膜或细胞内吞体膜表面聚集形成微结构域的蛋白质也在细胞外囊泡表面富集, 包括Tetraspanins蛋白质家族的30多个蛋白^[18]。TSPAN家族蛋白如CD63、CD81、CD82、CD53或CD37最早在B细胞产生的外泌体上被鉴定^[19]。其他研究证明, 这些TSPAN家族蛋白也在其他来源的细胞外囊泡上富集^[20]。细胞外囊泡上也富集脂筏相关蛋白质, 如糖基化磷脂酰肌醇结合的蛋白和flotillin^[21-22]。与细胞膜比较, 外泌体还富集胆固醇、鞘磷脂和神经酰胺^[22-25]。

细胞外囊泡中含有mRNA和miRNA, 并且mRNA可以在受体细胞中被翻译成蛋白质^[26-27]。从体液中分离的细胞外囊泡中也含有RNA^[28-30]。免疫细胞释放的外泌体可以有选择性地富集miRNA, 并且富集的miRNA可以被传递到受体细胞中^[31-32]。有研究通过深度测序证明, 细胞外囊泡中还含有大量其他小非编码RNA、tRNA片段、Y RNA、小干扰RNA等^[33-34]。许多RNA都是相对于胞体富集的, 预示着RNA进入细胞外囊泡是有选择性的^[26-27, 34-35]。需要注意的是, 目前的许多研究并不能证明被分泌到细胞外的RNA是真正通过细胞外囊泡途径, 还是RNA-蛋白复合物恰巧与细胞外囊泡共纯化而被检测到的。这两者最大的区别在于RNA是包被在囊泡膜结构内还是暴露在囊泡膜结构外, 因此可以用对RNA酶抵抗的方法来检验。不同的RNA分离方法会造成巨大的偏差^[36], 再加上缺乏标准化的方法和统计学数据, 因此, 当前将RNA的数据整合在一起形成数据库还非常困难。

2.2 细胞外囊泡的形成和内容物选择

细胞外囊泡的形成方式主要分为三大类: 由内吞体形成多泡体, 再由多泡体与细胞膜融合释放外泌体的方式; 或者直接从细胞膜表面出芽生成, 即为微泡或Ectosome生成的方式; 或者通过细胞迁移产生的收缩丝上主动生成的囊泡结构, 即为迁移体生成的方式。针对外泌体发生的方式当前的研究较多。细胞内多泡体有两种发展途径: 多泡体与溶酶体融合, 降解内容物; 或者多泡体通过与细胞膜融合分泌外泌体。多泡体会倾向于哪条途径, 主要和多泡体膜上的胆固醇含量相关^[37]。富含胆固醇的多泡体最终会分泌外泌体, 而胆固醇含量少的多泡体会和溶酶体融合, 选择溶酶体降解途径。形成多泡体需要内容物(cargo)聚集在内吞体膜表面, 向里出芽形成囊泡结构, 并且夹断囊泡口缘, 形成内吞体腔内囊泡。多泡体产生的分子基础是ESCRT-0、-I、-II、-III等4个蛋白组成的复合体和辅助蛋白Alix和VPS4。ESCRT-0、-I、-II复合物在内吞体膜表面识别和捕获泛素化膜蛋白, ESCRT-III复合物负责膜出芽和囊泡口缘的剪切^[38-39]。对多泡体发生的分子机制的发现, 使我们猜想外泌体的发生是否也依赖同样的分子机制。然而, 外泌体的发生比我们想象的要复杂, 外泌体的发生又分为依赖ESCRT的途径和不依赖ESCRT的途径。一些细胞在ESCRT复合物敲除的情况下仍

然能够产生外泌体。除ESCRT复合体外, TSPAN家族蛋白也被证明在外泌体的发生中起重要作用, 该方面的研究还需继续深入^[40]。

细胞内蛋白质如何被选择性富集到外泌体中当前也不十分清楚, 可能与外泌体表面蛋白HSC70、HSP90等有关, 这些蛋白可以特异性结合内容物并分选入外泌体^[41-42]。从细胞膜表面直接出芽生成的细胞外囊泡蛋白分选的机制就更加没有准确的定义。细胞质蛋白多聚加上其他细胞膜蛋白锚定, 可能会驱动蛋白进入细胞外囊泡^[43]。

RNA如何分选进入细胞外囊泡也不是十分清楚。一些报道证明, 存在在细胞外囊泡中的RNA具有特异的序列, 可能介导RNA分选进入细胞外囊泡^[43]。ESCRT-II可能通过结合RNA发挥分选的作用^[44]。还有文献报道, 多泡体是装载miRNA的RISC(RNA诱导的沉默复合物)富集点, 并且外泌体富集AGO2, 这些也可能是RNA分选进入外泌体的机制^[45]。

2.3 细胞外囊泡的释放

细胞如何释放细胞外囊泡, 例如外泌体的来源多泡体产生后如何运动到细胞边缘, 如何锚定到细胞膜上, 如何与细胞膜融合而释放外泌体等分子机制的研究还处在初级阶段。这些过程需要细胞骨架蛋白[如微丝、微管蛋白、动力蛋白(驱动蛋白, 肌球蛋白)、分子开关(小GTP酶)以及融合分子机器(SNARE和锚定蛋白)]的参与^[46]。研究表明, Rab11、Rab27和Rab35参与外泌体的释放, 缺失任何一个都会影响外泌体的释放^[47-49]。但是要注意的是, 选择性抑制其中一个小GTP酶只能部分影响这条通路, 说明外泌体的释放还有冗余的通路。关于多泡体与细胞膜融合的分分子器的研究也比较匮乏。SNARE蛋白是介导两个不同膜结构的磷脂双层融合的重要分子机器。SNAP-23、VAMP-7和VAMP-8是介导钙离子调控的分泌性溶酶体与细胞膜的融合的蛋白质^[50-52]。然而, SNARE也不是介导多泡体与细胞膜融合的必要条件。成熟红细胞分泌外泌体依赖VAMP7功能^[53], 然而, MDCK细胞又不依赖VAMP7^[54]。报道表明, 含有Wnt的外泌体的分泌依赖于R-SNARE Ykt6^[55]。

2.4 细胞外囊泡与受体细胞相互作用

细胞外囊泡在生理和病理过程中的功能依赖细胞外与受体细胞的相互作用释放携带的信息。B细胞产生的外泌体特异性结合树突状细胞^[56]。同

样地, 人小肠上皮细胞系释放的细胞外囊泡也偏好与树突状细胞结合而不是B或T淋巴细胞^[57]。由受体细胞特异性选择结合外泌体的原理主要是由受体细胞表面的黏附分子决定的, 如integrin。外泌体表面的TSPAN蛋白复合体的不同也会影响受体细胞对外泌体的选择, 可能通过调控与TSPAN复合体结合的黏附分子^[58]。其他成分如galactin-5、9, 也与巨噬细胞清除红细胞产生的外泌体有关^[59]。

在结合到受体细胞上后, 细胞外囊泡可能与受体细胞膜融合, 或通过细胞内吞进入受体细胞。当被内吞, EV可能进入溶酶体途径被降解。如果受体细胞吞噬能力差, 细胞外囊泡可受体细胞膜融合。检测到细胞外囊泡与细胞膜的融合受手段的限制, 并且该过程十分动态化。然而, 用亲脂染料标记的外泌体可以提供外泌体与细胞膜融合的直接证据, 该染料在融合发生时, 会被稀释, 可以解除自身荧光淬灭作用, 受体细胞内的荧光强度会增加^[32]。另外一些研究证明, 细胞外囊泡可以通过内吞或者吞噬作用进入细胞, 该过程依赖细胞骨架、PI3K和Dynamin-2^[59-61]。

3 细胞外囊泡的功能

细胞外囊泡在人体中广泛存在, 在生理和病理过程中起重要作用。细胞外囊泡又在多种体液中被鉴定, 这是它们可以作为疾病标志物的基础, 因此科学家和临床医生积极研究它们在诊断方面的作用。第一个证明细胞外囊泡与受体细胞相互作用的证据是前列腺小体(prostasomes)能够促进精子细胞的活度^[62]。在过去的几年中, 细胞外囊泡被证明具有非常广泛的生物学功能。EV可以作为重要的细胞间近距离或远距离沟通的媒介。上世纪80年代, 人们认为, 红细胞分泌外泌体的作用是丢弃不需要的分子^[63]。之后, 外泌体被证明是抗原呈递的媒介, 激活抗肿瘤免疫反应, 或诱导免疫耐受。这些特点激起免疫学家的兴趣, 研究它们在临床上的应用^[64-65]。肿瘤细胞或肿瘤微环境的其他细胞分泌外泌体, 通过促进血管新生、肿瘤细胞迁移或肿瘤转移来促进肿瘤的发展^[66-67]。肿瘤细胞产生的囊泡也含有免疫抑制分子, 可以抑制T淋巴细胞或者NK细胞, 或者促进调节性T细胞的分化来抑制免疫反应^[68]。上皮细胞或神经系统也具有产生细胞外囊泡的功能。小肠上皮细胞释放的细胞外囊泡与验证条件下的抗原呈递有关, 这些细胞外囊泡可以使上皮细胞的作用范围扩大^[69]。在呼吸道和支气

管肺泡灌洗液中的细胞外囊泡可以提高哮喘病人气管上皮细胞促炎性细胞因子的释放^[70-71]。目前的研究证明了膜结合形态发生素与细胞外的关系, 包括Wnt、Notch受体DII4^[55,72-74]。通过Wnt信号, 成纤维细胞产生的外泌体可以促进乳腺癌细胞动态发展。同样地, 在果蝇中, Wnt相关的EV可能与Wnt的在组织中的梯度形成有关。在神经系统中, 神经元、少突神经胶质细胞、小神经胶质细胞分泌细胞外囊泡, 并且可以互相作为受体细胞^[75-77]。细胞外囊泡被证明参与神经突触生长和神经元存活^[78]。在中枢神经系统中, 一些病原蛋白参与中枢神经系统疾病, 如朊蛋白^[79]、beta-淀粉样肽段^[26]、超氧化物歧化酶^[80]或者alpha-突触核蛋白(α -synuclein)^[81]的释放与细胞外囊泡有关。这些分泌型囊泡被认为通过与受体细胞作用而传播致病源。 α -synuclein在血浆核脑脊液中被检测出, 说明细胞外囊泡可能具有作为疾病的标志物的潜力^[82-83]。最近, 将鉴定细胞外囊泡作为肿瘤标志物与其分子细胞生物学机制结合的研究逐渐增多。例如, 外泌体表面GPC-1(Glypican-1)蛋白可以作为胰腺癌早期诊断标志物, 研究发现, 含有GPC-1的外泌体携带有KRAS突变^[84]。同一个研究组人工制造了正常成纤维细胞产生的外泌体, 使其含有针对胰腺癌致癌突变基因KrasG12D, 比起脂质体, 人工制造的外泌体由于含有CD47而更有效地被受体细胞吞噬, 从而针对治疗胰腺癌具有更高的效率, 因此外泌体可以由于其表面蛋白所具有的优势, 通过生物工程方法被改造成为疾病治疗工具^[85]。另外, 外泌体表面不同的整合素组合形式决定了外泌体受体细胞的特异性, 从而决定癌症组织转移的特异性^[86]。脂肪组织产生的外泌体中富含多种miRNA, 可以调节远端组织的基因表达水平, 从而调节远端组织或细胞的代谢^[87]。

4 细胞外囊泡的研究方法

细胞外囊泡的研究给转化医疗领域的发展带来了重要的希望。更加准确和标准的纯化方法对于细胞外囊泡作为疾病标志物、疫苗或药物输送媒介在临床中应用是必须的。这里, 我们从样品收集、检测和分析几方面总结最近的从方法学出发对细胞外囊泡研究需要注意的地方以及相关建议。

4.1 样品收集

对于细胞外囊泡分析前的样品收集所带来的

细胞外囊泡的性质变化, 现在受到了越来越多的关注。这些在之前的文献中鲜有报道。机械力, 例如涡旋混匀, 或者样品储存方法以及是否冻融, 都对细胞外囊泡的性质起重大的改变。因此, 在日常研究过程中分析细胞外囊泡前, 从体液样品或者从体外培养的细胞样品收集到样品分析都需要一套标准的流程, 主要包括: (1)抗凝剂种类; (2)离心速度; (3)存储温度; (4)冻融次数; (5)样品收集到分析的时间; (6)分析方法等。样品处理的标准化流程的确定需要非常细致的实验数据来保证, 样品收集的标准化是后期样品分析, 以及多方分析数据成功整合的必要条件。

4.2 分离技术的难点和分析方法的标准化

对于外泌体的分离为大家所接受的方法, 是超速离心或密度梯度离心^[88]。然而, 针对区分不同的细胞外囊泡的标准的分析方法是缺乏的。离心的速度从18 000 $\times g$ 到100 000 $\times g$ 不等, 然而不同的离心速度和离心时间对于膜性囊泡的沉降和破坏程度并没有标准的结论。另外, 在生物体液中或者细胞培养基中, 之前讨论的几种细胞外囊泡在尺寸上都有重合。亲和纯化的方法分离可能会获得纯度较高的囊泡, 但是由于细胞外囊泡表面蛋白质重合度比较高, 因此该分离方法也会混有其他囊泡。流式分析也是常用的一种方法, 流式能够检测200 nm直径以上的囊泡, 因此, 外泌体或其他小的细胞外囊泡就不在流式分析和检测范围之内了。

除了膜性囊泡, 生物体液中还存在许多其他类型的粒子, 如脂蛋白、病毒, 或者可能形成聚集物或复合物的分子。这些复合物或者粒子会与细胞外囊泡共同沉淀, 因此, 它们是细胞外囊泡纯化过程中的重要污染物。细胞外囊泡还可能被内质网来源的微粒体(microsome)或者坏死细胞释放的囊泡所污染, 因此细胞内囊泡结构的蛋白也要在检测中被排除。

综上, 多种方法结合的分离方法可能是当前能够获得较纯的细胞外囊泡的方法, 然而该方法需要样品量大、得率低、通量低, 仅适用于实验室研究而不适合临床检测应用。

4.3 细胞外囊泡的形态学检测

细胞外囊泡的形态学检测的金标准是透射电镜。透射电镜制样中的脱水和固定可能会改变囊泡的形态。为人们所熟知的外泌体——cup-shaped结构, 就可能是透射电镜制样的假象^[88]。冷冻电镜是更好的选择, 能够更好地保存囊泡的膜结构。当前

透射电镜是能够同时研究细胞外囊泡的大小和结构的方法,也是大家普遍接受的方法。其他方法还包含流式细胞仪分析和原子粒显微镜分析。

5 展望

当前的研究数据表明,在体内确实存在一种前期没有被足够重视的、复杂并且高度动态的细胞外膜性囊泡结构。由于不同的细胞、不同的组织、不同的生理条件,该膜性囊泡的组成成分非常不同。该细胞外囊泡的可塑性可以使得细胞或身体适应变化的环境。它们存在的保守性说明它们具有重要的生物学功能。目前,我们对该细胞外膜结构的了解还远远不够。这些囊泡被释放到细胞外环境中,如血浆或细胞培养基中,不是立刻被周围细胞所吞噬,正是它们实现远程信号交流的特点。研究并理解这些囊泡结构会挑战当前对于细胞间信号沟通的传统观念,也会为转化医学领域,如诊断和治疗方面,开创新的契机。

参考文献 (References)

- Ma L, Li Y, Peng J, Wu D, Zhao X, Cui Y, *et al.* Discovery of the migrasome, an organelle mediating release of cytoplasmic contents during cell migration. *Cell Res* 2015; 25(1): 24-38.
- Wu D, Xu Y, Ding T, Zu Y, Yang C, Yu L. Pairing of integrins with ECM proteins determines migrasome formation. *Cell Res* 2017; 27(11): 1397-400.
- Chargaff E, West R. The biological significance of the thromboplastic protein of blood. *J Biol Chem* 1946; 166(1): 189-97.
- Wolf P. The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematol* 1967; 13(3): 269-88.
- Thery C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol* 2009; 9(8): 581-93.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26(4): 239-57.
- Sulston JE, Horvitz HR. Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 1977; 56(1): 110-56.
- Fixsen W, Sternberg P, Ellis H, Horvitz R. Genes that affect cell fates during the development of *Caenorhabditis elegans*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1985; 50: 99-104.
- Hristov M, Erl W, Linder S, Weber PC. Apoptotic bodies from endothelial cells enhance the number and initiate the differentiation of human endothelial progenitor cells *in vitro*. *Blood* 2004; 104(9): 2761-6.
- Holmgren L, Szeles A, Rajnavolgyi E, Folkman J, Klein G, Ernberg I, *et al.* Horizontal transfer of DNA by the uptake of apoptotic bodies. *Blood* 1999; 93(11): 3956-63.
- Bergsmedh A, Szeles A, Henriksson M, Bratt A, Folkman MJ, Spetz AL, *et al.* Horizontal transfer of oncogenes by uptake of apoptotic bodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(11): 6407-11.
- Bellone M, Iezzi G, Rovere P, Galati G, Ronchetti A, Protti MP, *et al.* Processing of engulfed apoptotic bodies yields T cell epitopes. *J Immunol* 1997; 159(11): 5391-9.
- Cocca BA, Cline AM, Radic MZ. Blebs and apoptotic bodies are B cell autoantigens. *J Immunol* 2002; 169(1): 159-66.
- Savill J, Dransfield I, Gregory C, Haslett C. A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nat Rev Immunol* 2002; 2(12): 965-75.
- Hess C, Sadallah S, Hefti A, Landmann R, Schifferli JA. Ectosomes released by human neutrophils are specialized functional units. *J Immunol* 1999; 163(8): 4564-73.
- Stein JM, Luzio JP. Ectocytosis caused by sublytic autologous complement attack on human neutrophils. The sorting of endogenous plasma-membrane proteins and lipids into shed vesicles. *Biochem J* 1991; 274(Pt 2): 381-6.
- van Niel G, Porto-Carreiro I, Simoes S, Raposo G. Exosomes: a common pathway for a specialized function. *J Biochem* 2006; 140(1): 13-21.
- Hemler ME. Tetraspanin proteins mediate cellular penetration, invasion, and fusion events and define a novel type of membrane microdomain. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2003; 19: 397-422.
- Escola JM, Kleijmeer MJ, Stoorvogel W, Griffith JM, Yoshie O, Geuze HJ. Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes. *J Biol Chem* 1998; 273(32): 20121-7.
- Zoller M. Tetraspanins: push and pull in suppressing and promoting metastasis. *Nat Rev Cancer* 2009; 9(1): 40-55.
- Thery C, Regnault A, Garin J, Wolfers J, Zitvogel L, Ricciardi-Castagnoli P, *et al.* Molecular characterization of dendritic cell-derived exosomes. Selective accumulation of the heat shock protein hsc73. *J Cell Biol* 1999; 147(3): 599-610.
- Wubbolts R, Leckie RS, Veenhuizen PT, Schwarzmann G, Mobius W, Hoernschemeyer J, *et al.* Proteomic and biochemical analyses of human B cell-derived exosomes. Potential implications for their function and multivesicular body formation. *J Biol Chem* 2003; 278(13): 10963-72.
- Laulagnier K, Motta C, Hamdi S, Roy S, Fauvel F, Pageaux JF, *et al.* Mast cell- and dendritic cell-derived exosomes display a specific lipid composition and an unusual membrane organization. *Biochem J* 2004; 380(Pt 1): 161-71.
- Subra C, Laulagnier K, Perret B, Record M. Exosome lipidomics unravels lipid sorting at the level of multivesicular bodies. *Biochimie* 2007; 89(2): 205-12.
- Brouwers JF, Aalberts M, Jansen JW, van Niel G, Wauben MH, Stout TA, *et al.* Distinct lipid compositions of two types of human prostasomes. *Proteomics* 2013; 13(10/11): 1660-6.
- Ratajczak J, Wysoczynski M, Hayek F, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak MZ. Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication. *Leukemia* 2006; 20(9): 1487-95.
- Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 2007; 9(6): 654-9.

- 28 Hunter MP, Ismail N, Zhang X, Aguda BD, Lee EJ, Yu L, *et al.* Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PLoS One* 2008; 3(11): e3694.
- 29 Rabinowitz G, Gercel-Taylor C, Day JM, Taylor DD, Kloecker GH. Exosomal microRNA: a diagnostic marker for lung cancer. *Clin Lung Cancer* 2009; 10(1): 42-6.
- 30 Michael A, Bajracharya SD, Yuen PS, Zhou H, Star RA, Illei GG, *et al.* Exosomes from human saliva as a source of microRNA biomarkers. *Oral Dis* 2010; 16(1): 34-8.
- 31 Mittelbrunn M, Gutierrez-Vazquez C, Villarroya-Beltri C, Gonzalez S, Sanchez-Cabo F, Gonzalez MA, *et al.* Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nat Commun* 2011; 2: 282.
- 32 Montecalvo A, Larregina AT, Shufesky WJ, Stolz DB, Sullivan ML, Karlsson JM, *et al.* Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes. *Blood* 2012; 119(3): 756-66.
- 33 Bellingham SA, Coleman BM, Hill AF. Small RNA deep sequencing reveals a distinct miRNA signature released in exosomes from prion-infected neuronal cells. *Nucleic Acids Res* 2012; 40(21): 10937-49.
- 34 Nolte-’t Hoen EN, Buermans HP, Waasdorp M, Stoorvogel W, Wauben MH, t Hoen PA. Deep sequencing of RNA from immune cell-derived vesicles uncovers the selective incorporation of small non-coding RNA biotypes with potential regulatory functions. *Nucleic Acids Res* 2012; 40(18): 9272-85.
- 35 Skog J, Wurdinger T, van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Sena-Esteves M, *et al.* Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol* 2008; 10(18): 1470-6.
- 36 Eldh M, Lotvall J, Malmhall C, Ekstrom K. Importance of RNA isolation methods for analysis of exosomal RNA: evaluation of different methods. *Mol Immunol* 2012; 50(12): 278-86.
- 37 Mobius W, Ohno-Iwashita Y, van Donselaar EG, Oorschot VM, Shimada Y, Fujimoto T, *et al.* Immunoelectron microscopic localization of cholesterol using biotinylated and non-cytolytic perfringolysin O. *J Histochem Cytochem* 2002; 50(1): 43-55.
- 38 Raiborg C, Stenmark H. The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. *Nature* 2009; 458(7237): 445-52.
- 39 Hurley JH. The ESCRT complexes. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2010; 45: 463-87.
- 40 Simons M, Raposo G. Exosomes: vesicular carriers for intercellular communication. *Curr Opin Cell Biol* 2009; 21(4): 575-81.
- 41 Thery C, Boussac M, Veron P, Ricciardi-Castagnoli P, Raposo G, Garin J, *et al.* Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *J Immunol* 2001; 166(12): 7309-18.
- 42 Geminard C, De Gassart A, Blanc L, Vidal M. Degradation of AP2 during reticulocyte maturation enhances binding of hsc70 and Alix to a common site on TFR for sorting into exosomes. *Traffic* 2004; 5(3): 181-93.
- 43 Shen B, Fang Y, Wu N, Gould SJ. Biogenesis of the posterior pole is mediated by the exosome/microvesicle protein-sorting pathway. *J Biol Chem* 2011; 286(51): 44162-76.
- 44 Irion U, St Johnston D. bicoid RNA localization requires specific binding of an endosomal sorting complex. *Nature* 2007; 445(7127): 554-8.
- 45 Gibbins DJ, Ciaudo C, Erhardt M, Voinnet O. Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity. *Nat Cell Biol* 2009; 11(9): 1143-9.
- 46 Cai H, Reinisch K, Ferro-Novick S. Coats, tethers, Rabs, and SNAREs work together to mediate the intracellular destination of a transport vesicle. *Dev Cell* 2007; 12(5): 671-82.
- 47 Savina A, Vidal M, Colombo MI. The exosome pathway in K562 cells is regulated by Rab11. *J Cell Sci* 2002; 115(Pt 12): 2505-15.
- 48 Ostrowski M, Carmo NB, Krumeich S, Fanget I, Raposo G, Savina A, *et al.* Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nat Cell Biol* 2010; 12(1): 19-30; sup pp 1-13.
- 49 Hsu C, Morohashi Y, Yoshimura S, Manrique-Hoyos N, Jung S, Lauterbach MA, *et al.* Regulation of exosome secretion by Rab35 and its GTPase-activating proteins TBC1D10A-C. *J Cell Biol* 2010; 189(2): 223-32.
- 50 Rao SK, Huynh C, Proux-Gillardeaux V, Galli T, Andrews NW. Identification of SNAREs involved in synaptotagmin VII-regulated lysosomal exocytosis. *J Biol Chem* 2004; 279(19): 20471-9.
- 51 Tiwari N, Wang CC, Brochetta C, Ke G, Vita F, Qi Z, *et al.* VAMP-8 segregates mast cell-preformed mediator exocytosis from cytokine trafficking pathways. *Blood* 2008; 111(7): 3665-74.
- 52 Puri N, Roche PA. Mast cells possess distinct secretory granule subsets whose exocytosis is regulated by different SNARE isoforms. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(7): 2580-5.
- 53 Fader CM, Sanchez DG, Mestre MB, Colombo MI. TI-VAMP/VAMP7 and VAMP3/cellubrevin: two v-SNARE proteins involved in specific steps of the autophagy/multivesicular body pathways. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1793(12): 1901-16.
- 54 Proux-Gillardeaux V, Raposo G, Irinopoulou T, Galli T. Expression of the Longin domain of TI-VAMP impairs lysosomal secretion and epithelial cell migration. *Biol Cell* 2007; 99(5): 261-71.
- 55 Gross JC, Chaudhary V, Bartscherer K, Boutros M. Active Wnt proteins are secreted on exosomes. *Nat Cell Biol* 2012; 14(10): 1036-45.
- 56 Denzer K, van Eijk M, Kleijmeer MJ, Jakobson E, de Groot C, Geuze HJ. Follicular dendritic cells carry MHC class II-expressing microvesicles at their surface. *J Immunol* 2000; 165(3): 1259-65.
- 57 Mallegol J, Van Niel G, Lebreton C, Lepelletier Y, Candalf C, Dugave C, *et al.* T84-intestinal epithelial exosomes bear MHC class II/peptide complexes potentiating antigen presentation by dendritic cells. *Gastroenterology* 2007; 132(5): 1866-76.
- 58 Rana S, Yue S, Stadel D, Zoller M. Toward tailored exosomes: the exosomal tetraspanin web contributes to target cell selection. *Int J Biochem Cell Biol* 2012; 44(9): 1574-84.
- 59 Barres C, Blanc L, Bette-Bobillo P, Andre S, Mamoun R, Gabius HJ, *et al.* Galectin-5 is bound onto the surface of rat reticulocyte exosomes and modulates vesicle uptake by macrophages. *Blood* 2010; 115(3): 696-705.
- 60 Morelli AE. The immune regulatory effect of apoptotic cells and exosomes on dendritic cells: its impact on transplantation. *Am J Transplant* 2006; 6(2): 254-61.

- 61 Tian T, Wang Y, Wang H, Zhu Z, Xiao Z. Visualizing of the cellular uptake and intracellular trafficking of exosomes by live-cell microscopy. *J Cell Biochem* 2010; 111(2): 488-96.
- 62 Stegmayr B, Ronquist G. Promotive effect on human sperm progressive motility by prostasomes. *Urol Res* 1982; 10(5): 253-7.
- 63 Harding CV, Heuser JE, Stahl PD. Exosomes: looking back three decades and into the future. *J Cell Biol* 2013; 200(4): 367-71.
- 64 Bobrie A, Colombo M, Raposo G, Thery C. Exosome secretion: molecular mechanisms and roles in immune responses. *Traffic* 2011; 12(12): 1659-68.
- 65 Chaput N, Thery C. Exosomes: immune properties and potential clinical implementations. *Semin Immunopathol* 2011; 33(5): 419-40.
- 66 Rak J. Microparticles in cancer. *Semin Thromb Hemost* 2010; 36: 888-906.
- 67 Hood JL, San RS, Wickline SA. Exosomes released by melanoma cells prepare sentinel lymph nodes for tumor metastasis. *Cancer Res* 2011; 71(11): 3792-801.
- 68 Zhang HG, Grizzle WE. Exosomes and cancer: a newly described pathway of immune suppression. *Clin Cancer Res* 2011; 17(5): 959-64.
- 69 van Niel G, Charrin S, Simoes S, Romao M, Rochin L, Saftig P, *et al.* The tetraspanin CD63 regulates ESCRT-independent and -dependent endosomal sorting during melanogenesis. *Dev Cell* 2011; 21(4): 708-21.
- 70 Prado N, Marazuela EG, Segura E, Fernandez-Garcia H, Vilalba M, Thery C, *et al.* Exosomes from bronchoalveolar fluid of tolerized mice prevent allergic reaction. *J Immunol* 2008; 181(2): 1519-25.
- 71 Qazi KR, Torregrosa Paredes P, Dahlberg B, Grunewald J, Eklund A, Gabrielson S. Proinflammatory exosomes in bronchoalveolar lavage fluid of patients with sarcoidosis. *Thorax* 2010; 65(11): 1016-24.
- 72 Luga V, Zhang L, Vitoria-Petit AM, Ogunjimi AA, Inanlou MR, Chiu E, *et al.* Exosomes mediate stromal mobilization of autocrine Wnt-PCP signaling in breast cancer cell migration. *Cell* 2012; 151(7): 1542-56.
- 73 Beckett K, Monier S, Palmer L, Alexandre C, Green H, Bonneil E, *et al.* Drosophila S2 cells secrete wingless on exosome-like vesicles but the wingless gradient forms independently of exosomes. *Traffic* 2013; 14(1): 82-96.
- 74 Sheldon H, Heikamp E, Turley H, Dragovic R, Thomas P, Oon CE, *et al.* New mechanism for Notch signaling to endothelium at a distance by Delta-like 4 incorporation into exosomes. *Blood* 2010; 116(13): 2385-94.
- 75 Faure J, Lachenal G, Court M, Hirrlinger J, Chatellard-Causse C, Blot B, *et al.* Exosomes are released by cultured cortical neurones. *Mol Cell Neurosci* 2006; 31(4): 642-8.
- 76 Kramer-Albers EM, Bretz N, Tenzer S, Winterstein C, Mobius W, Berger H, *et al.* Oligodendrocytes secrete exosomes containing major myelin and stress-protective proteins: Trophic support for axons? *Proteomics Clin Appl* 2007; 1(11): 1446-61.
- 77 Lachenal G, Pernet-Gallay K, Chivet M, Hemming FJ, Belly A, Bodon G, *et al.* Release of exosomes from differentiated neurons and its regulation by synaptic glutamatergic activity. *Mol Cell Neurosci* 2011; 46(2): 409-18.
- 78 Wang S, Cesca F, Loers G, Schweizer M, Buck F, Benfenati F, *et al.* Synapsin I is an oligomannose-carrying glycoprotein, acts as an oligomannose-binding lectin, and promotes neurite outgrowth and neuronal survival when released via glia-derived exosomes. *J Neurosci* 2011; 31(20): 7275-90.
- 79 Fevrier B, Vilette D, Archer F, Loew D, Faigle W, Vidal M, *et al.* Cells release prions in association with exosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(26): 9683-8.
- 80 Gomes C, Keller S, Altevogt P, Costa J. Evidence for secretion of Cu,Zn superoxide dismutase via exosomes from a cell model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett* 2007; 428(1): 43-6.
- 81 Emmanouilidou E, Melachroinou K, Roumeliotis T, Garbis SD, Ntzouni M, Margaritis LH, *et al.* Cell-produced alpha-synuclein is secreted in a calcium-dependent manner by exosomes and impacts neuronal survival. *J Neurosci* 2010; 30(20): 6838-51.
- 82 Alvarez-Llamas G, de la Cuesta F, Barderas ME, Darde V, Padial LR, Vivanco F. Recent advances in atherosclerosis-based proteomics: new biomarkers and a future perspective. *Expert Rev Proteomics* 2008; 5(5): 679-91.
- 83 Al-Nedawi K, Meehan B, Rak J. Microvesicles: messengers and mediators of tumor progression. *Cell Cycle* 2009; 8(13): 2014-8.
- 84 Melo SA, Luecke LB, Kahlert C, Fernandez AF, Gammon ST, Kaye J, *et al.* Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer. *Nature* 2015; 523(7559): 177-82.
- 85 Kamberkar S, LeBleu VS, Sugimoto H, Yang S, Ruivo CF, Melo SA, *et al.* Exosomes facilitate therapeutic targeting of oncogenic KRAS in pancreatic cancer. *Nature* 2017; 546: 498-503.
- 86 Hoshino A, Costa-Silva B, Shen TL, Rodrigues G, Hashimoto A, Tesic Mark M, *et al.* Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature* 2015; 527(7578): 329-35.
- 87 Thomou T, Mori MA, Dreyfuss JM, Konishi M, Sakaguchi M, Wolfrum C, *et al.* Adipose-derived circulating miRNAs regulate gene expression in other tissues. *Nature* 2017; 542(7642): 450-5.
- 88 Thery C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol* 2006; doi: 10.1002/0471143030.cb0322s30.