

技术与方法

一种细胞外囊泡的流式检测方案的探索与建立

郭春¹ 王佳佳¹ 李艳伟¹ 邢月婷¹ 宋兴辉¹ 黄莹莹¹ 叶小康^{2*}¹浙江大学医学院公共技术平台, 杭州 310000; ²浙江大学医学院基础医学系, 杭州 310000)

摘要 该研究旨在探索细胞外囊泡(extracellular vesicles, EVs)分析的标准化流程, 建立一种高效的EVs检测方法, 为EVs功能及临床转化研究提供技术支持。实验采用经典的超速离心法分离EVs, 借助已知直径的聚苯乙烯微球设定并优化流式检测EVs的参数, 联合应用散色光信号及荧光信号对EVs进行双参数分析鉴定, 最后通过电镜观察及蛋白质免疫印迹(Western blot, WB)对鉴定结果进行验证。结果显示, 参照纳米微球设定的条件可清楚地将100 nm颗粒信号与噪音信号分离, 且微球稀释的梯度和检测到的浓度之间呈线性相关, 可以对EVs进行定量分析; 荧光染色结果显示, EVs呈CFSE(5, 6-Carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester, 蛋白结合染料)及FM1-43(fixable analog of FM™ 1-43 membrane stain, 亲脂性染料)双阳性, 占比约3%; 电镜验证其形态及直径与预期相一致。该研究通过优化流式方案及双荧光参数分析鉴定探索了EVs流式检测的标准化流程, 建立了高效、准确的EVs流式检测方法。

关键词 细胞外囊泡; 流式细胞术; 荧光信号; 散射光信号; 分析鉴定

The Exploration and Establishment of a Method to Detect Extracellular Vesicles by Flow Cytometry

GUO Chun¹, WANG Jiajia¹, LI Yanwei¹, XING Yueting¹, SONG Xinghui¹, HUANG Yingying¹, YE Xiaokang^{2*}¹Core Facilities, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310000, China;²School of Basic Medical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310000, China)

Abstract This study was aimed to explore the standardized process for the analysis of EVs (extracellular vesicles) and establish a highly efficient detection method for EVs, which provided technical support for the function and clinical translational research of EVs. EVs were isolated by classic ultracentrifugation. The flow cytometric detection parameters were set up and optimized with the help of polystyrene microspheres of known diameter, and then the application of scattered light signal and fluorescence signal were combined to conduct dual-parameter analysis and identification of EVs. Finally the EVs were observed by electron microscope and WB (Western blot) to verify the identification results. The results of the flow cytometry experiment showed that the 100 nm particle signal could be clearly separated from the noise signal with reference to the conditions setted by the nanospheres. There was a good linear correlation between the gradient of the dilution of the microspheres and the detected concentra-

收稿日期: 2020-12-27 接受日期: 2021-01-12

浙江大学实验技术项目(批准号: SJS201913)资助的课题

*通讯作者。Tel: 13777853760, E-mail: yexk2015@zju.edu.cn

Received: December 27, 2020 Accepted: January 12, 2021

This work was supported by Research Project of Zhejiang University (Grant No.SJS201913)

*Corresponding author. Tel: +86-13777853760, E-mail: yexk2015@zju.edu.cn

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5486>

tion, which allowed quantitative analysis of EVs. The fluorescent staining results showed that EVs were double positive for CFSE (protein binding dye) and FM1-43 (lipophilic dye), accounting for about 3%. Its shape and diameter were verified by electron microscopy and consistent with those reported in the literature. The study explored the standardization process for flow cytometric detection method of EVs through optimized flow cytometric scheme and dual fluorescence parameter analysis and identification, and established an efficient and accurate EVs flow cytometric detection method.

Keywords extracellular vesicles; cytometry; fluorescence signal; scattered light signal; analysis and identification

细胞外囊泡(extracellular vesicles, EVs)是细胞自发或在一定条件下分泌的球状膜性囊泡,其实质上是一组纳米级颗粒,直径为40~1 000 nm,外泌体(exosome)、微囊泡(microvesicles, MVs)等均在其范畴^[1-2]。EVs内含蛋白、脂类、RNA及细胞因子等多种生物活性物质,在细胞间信号通讯及机体调控中发挥重要作用^[3-4]。此外,近年来,越来越多的研究发现,细胞外囊泡还在纤维化、自噬、免疫抑制及免疫激活等多方面发挥作用^[5-6],有望成为疾病诊断和预后循环生物标志物的重要载体。

目前常用的EVs分析方法为宏观分析与单颗粒分析两种。宏观分析如蛋白免疫印迹(Western blot, WB)主要是对EVs内的特定蛋白含量进行检测^[7-8],此法可以检测样品中某些蛋白质的存在,但不能确定EVs真实的数量,且样本量大、耗时、操作过程繁琐,仅可辅助EVs的鉴定。单颗粒分析法包括透射电子显微镜、纳米颗粒跟踪分析、流式分析等,其中透射电子显微镜和纳米颗粒跟踪分析仪可表征EVs形状、粒径、浓度等信息,但通量低,无法鉴定EVs内容物含量及成分^[9]。而流式技术能够实现高通量、单颗粒、多参数的高效分析,是目前最有潜力应用于临床的EVs分析技术^[10]。

然而,流式检测EVs依然面临诸多挑战^[11-12]。一是EVs存在于多种复杂的生物体液中,前期的分离纯化十分繁琐;二是传统流式因检测灵敏度的限制,较难实现200 nm以下颗粒的分析,且小颗粒具有非均质性、低折光率等特点,使其较难与背景噪音信号分开。以上这些极大地阻碍了EVs功能及临床转化研究,因此建立一种标准可行的流式检测分析方法十分必要。本研究从流式检测前的样本处理及检测参数设置两方面进行优化,并对EVs进行了双荧光染色分析鉴定,旨在建立一种具有普适性的、准确的、高效的EVs分析检测方法。

1 材料与方法

1.1 细胞株及主要试剂耗材

1.1.1 主要细胞株及试剂 RKO人结肠癌细胞系购自ATCC; eBioscience™ CFSE(5,6-carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester, No.65-0850-84)和FM™ 1-43FX(fixable analog of FM™ 1-43 membrane stain, No.F35355)购自Invitrogen公司;聚苯乙烯纳米微球(Photon Correlation Spectroscopy Control Mixed)购自Beckman coulter公司;胎牛血清和胰酶Trypsin-EDTA购自Gibco公司;高效裂解液RIPA buffer(high)购自杭州弗德生物科技有限公司。用于蛋白免疫印迹分析的抗体主要包括:CD63、TSG101(rabbit)一抗购自Proteintech公司;IRDye® 780RD Goat anti-Rabbit和IRDye® 680RD anti-Mouse荧光二抗购自美国LI-COR公司;Calnaxin(mouse)抗体购自Santa Cruz公司。

1.1.2 主要耗材 超速离心管购自Beckman Coulter公司;1.5 mL离心管、枪头购自Axygen公司。

1.2 主要仪器及设备

主要仪器设备包括:流式细胞分析仪(美国Beckman, Cytoflex LX);超速冷冻离心机(美国Beckman, Optima-L80XP);120 KV冷冻透射电子显微镜Tecnai(Thermo FEI);荧光倒置显微镜(ZEISS);纯水仪,用于制备电阻率18.2 MΩ超纯水(Milipore);Centrifuge 5424R小型冷冻离心机(Eppendorf);CO₂培养箱(Thermo);电泳仪(Bio-rad);红外激光双色图像分析系统(Odyssey CLx, LI-COR)。

1.3 细胞传代培养

RKO人结肠癌细胞培养于含10%胎牛血清(100 000 ×g去除外泌体)、1%双抗DMEM培养基中,然后放置于37 °C、5% CO₂的培养箱中培养。待细胞密度生长至铺满培养皿80%后再培养48 h,收集细胞培养上清。

1.4 细胞外囊泡提取

收集细胞上清,离心除去培养基中的细胞(300 ×g、4 °C离心5 min),取上清液转移至干净的离心管中,再次离心去除细胞碎片(1 600 ×g、4 °C离心10 min),取上清液于新的离心管中第三次离心(16 000 ×g、4 °C离心70 min),随后将上清液转移至干净的超速离心管中进一步离心,沉淀为直径较大的外囊泡,即微囊泡(microvesicles),用适量PBS重悬后备用。将上述步骤中最后收集的上清液于超速离心机(Optima-L80XP, Beckman)中100 000 ×g(SW32Ti转头)离心2 h,最后用100 μL PBS重悬沉淀。

1.5 细胞外囊泡的流式检测鉴定

1.5.1 流式细胞仪检测器设置及清洗 正常开启Cytotflex LX(5激光)流式细胞分析仪,启用405 nm激光器的侧向散射光检测通道VSSC(voilet side scatter),同时在软件上更改检测器配置。用超纯水(电阻率18.2 MΩ)对流式细胞仪进行高速清洗至少1 h以上。

1.5.2 流式检测参数设定 将100 nm直径的聚苯乙烯微球进行梯度稀释后用Cytotflex LX进行检测,手动调节阈值及增益,使背景噪音信号(noise)与100 nm微球信号有较好的分离,此时即为EVs检测的最佳条件,并以同样的条件对ddH₂O和PBS进行检测,进一步确定背景噪音信号的设门位置。

1.5.3 标准工作曲线建立 分别将100 nm、200 nm、300 nm、500 nm四种聚苯乙烯微球进行梯度稀释,并于低速(low)条件下进样,每次采样时间为30 s,每个样品平行采样3次。根据稀释的梯度和测定的浓度建立一条颗粒浓度与稀释梯度之间的标准工作曲线。

1.5.4 Mixed微球溶液配制 选取处于线性范围内的梯度溶液,分别吸取适量的微球溶液进行等比例混合,制成Mixed聚苯乙烯微球。

1.6 EVs的CFSE和FM1-43双染

按步骤1.5.3,用PBS对EVs进行梯度稀释,使其浓度在线性检测范围内。CFSE贮存液3 μL(5 mmol/L)溶解于100 μL的HBSS溶液中,FM1-43贮存液(100 μg/mL)溶解于100 μL HBSS溶液中,将上述两种染液与100 μL EVs悬液充分混匀后于室温避光孵育30 min(CFSE染液终浓度100 mmol/L, FM1-43染液终浓度10 μg/mL)后于Cytotflex LX流式细胞仪上检测。

1.7 电镜观察验证

取1 μL EVs的PBS重悬液滴在有膜的铜网上,

滴液后静置数分钟,然后用滤纸从铜网边缘吸去多余的液体,滴上负染色液,染色1~2 min用滤纸吸去负染色液,再用蒸馏水滴在铜网上洗1~2次,用滤纸吸去水,待干后于120 KV冷冻透射电子显微镜下观察,观察其形态并初步确定其直径大小。

1.8 Western blot验证

用高效裂解液RIPA buffer裂解提取EVs(EVs和裂解液1:1混合),BCA法测定蛋白浓度后SDS-PAGE凝胶电泳(10%~15%)分离目的蛋白CD63、TSG101、Calnexin,并转移到PVDF膜上于Odyssey CLx红外激光双色图像分析仪器上成像。

2 结果

2.1 流式检测参数设置

用稀释后的100 nm聚苯乙烯微球溶液为标尺进行调试,结果如图1所示:调整VSSC-A检测通道的阈值(Threshold)及增益(Gain),当阈值调整至1 000左右,增益调至200左右(其他检测通道参数均为仪器默认值,无需调整)时,Noise和100 nm微球的散射光信号有较好的分离,可以清楚圈出100 nm微球群体,占比82.74%,噪音信号占比7.86%;分别设置ddH₂O和PBS对照,用相同的增益和阈值检测,结果绝大部分为噪音信号,占比分别为96.36%和98.64%。因此,当阈值和增益调节恰当时,Cytotflex流式细胞仪可以检测到直径在100 nm左右的颗粒。

此外,我们比较了传统的488 nm激光器前向散射光(FSC-A)信号检测和405 nm激光器侧向散色光(VSSC-A)信号检测的区别,结果显示,在同样的增益和阈值条件下,通过FSC信号无法将100 nm的微球与背景信号分开(图2),而在VSSC检测通道上两者的散射光信号有较好的区分。因此,Cytotflex上VSSC通道的光散射检测性能更灵敏,可进行小颗粒检测。

2.2 建立纳米微球的标准工作曲线

为了确定流式是否可以定量检测EVs,我们将不同直径(100 nm、200 nm、300 nm、500 nm)的微球做了梯度稀释,并于低速条件下进样,每次采样时间为30 s,每个样本采样三次,取三次的平均值以减少随机误差。然后依据稀释的梯度和测定的浓度建立一条颗粒浓度与稀释梯度之间的标准工作曲线。结果如图3所示:稀释的梯度和检测到的浓度(特定时间内检测的颗粒数换算获得)呈现为较好的线性相关,

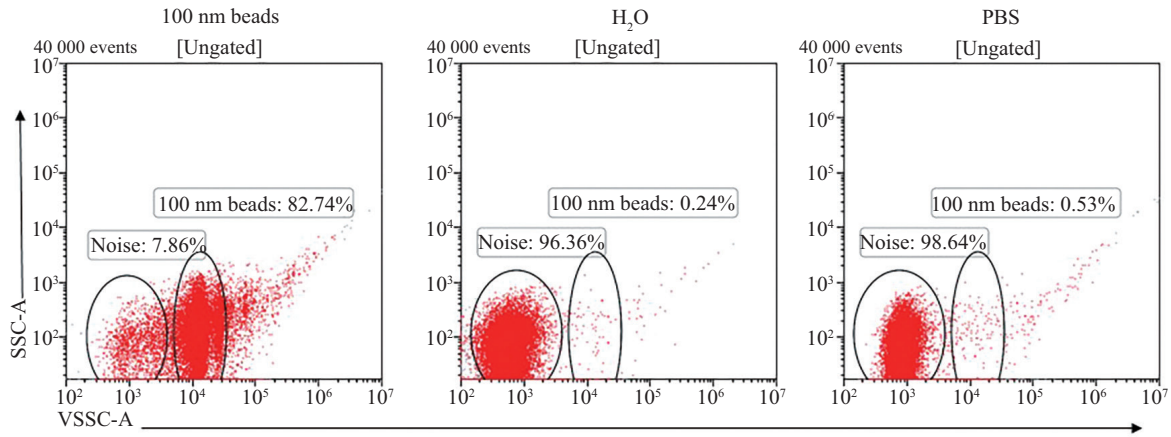


图1 EVs的流式检测参数设置

Fig.1 Parameter setting of flow cytometric detection for EVs

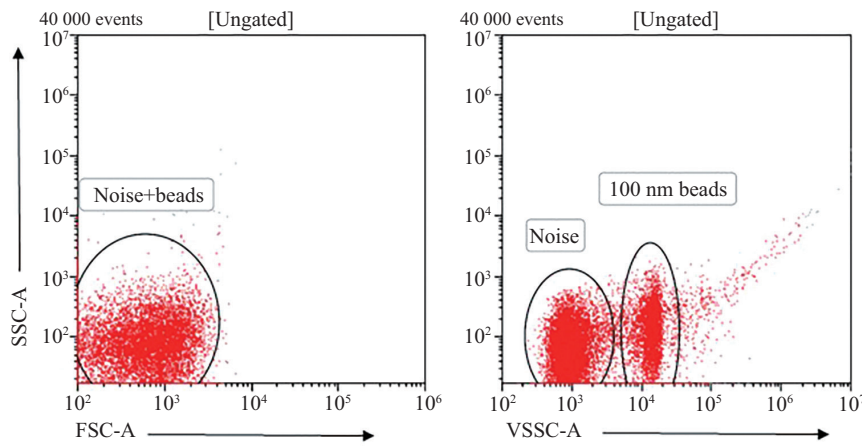


图2 前向散射光(FSC)信号与紫光侧向散射光(VSSC)信号的比较

Fig.2 Comparison of FSC (forward scattered light) signal and VSSC (violet side scattered) light signal

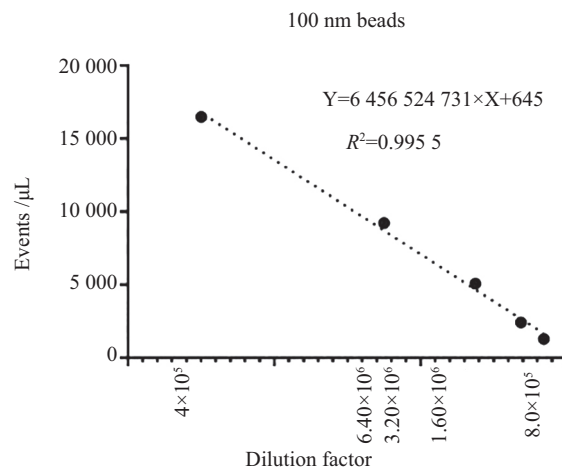


图3 聚苯乙烯微球的梯度稀释及线性范围检测

Fig.3 Gradient dilution and linear range detection of polystyrene microspheres

相关系数均在0.99以上(其他三种微球的检测结果图未展示)。因此,该条件下流式可以对EVs进行定量分析。

此外,为了可以同时分析不同直径EVs,我们分别吸取适量处于线性范围内的微球溶液进行等比例混合,制成Mixed聚苯乙烯微球,流式可以很清晰地

区分不同直径的纳米微球群体(图4)。

2.3 流式细胞法鉴定外囊泡

EVs的双层膜结构上富含蛋白及脂类,用亲脂性染料FM43-1和蛋白结合染料CFSE对提取的细胞外囊泡进行双染,结果如图5所示:首先参照已知直径的Mixed纳米微球及405 nm激光的侧向散射光

信号VSSC设门圈出EVs的可能的区域A,然后对A门内的颗粒进行荧光参数分析,在FM43-1和CFSE双参数散点图上设门圈出FM43-1和CFSE双阳性群体即为EVs,占比约为1.33%;同时我们尝试了另一种分析策略,先圈出CFSE或者FM1-43单阳的群体,再从单阳群体中找另一参数也为阳性的群体,结果

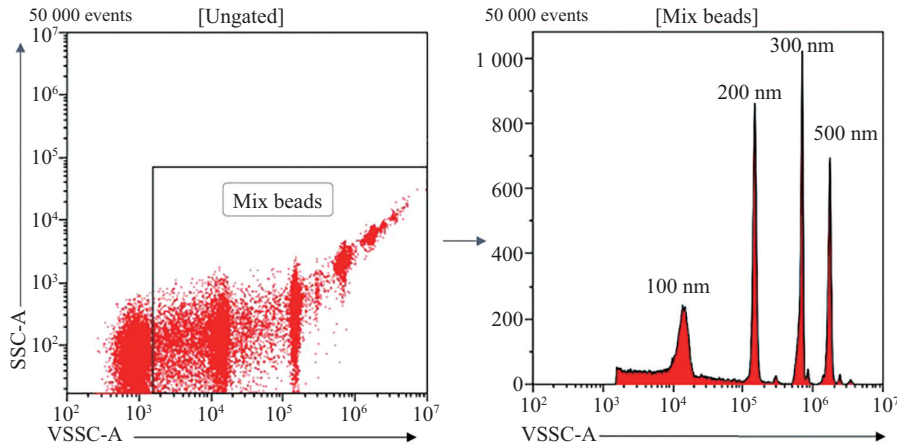
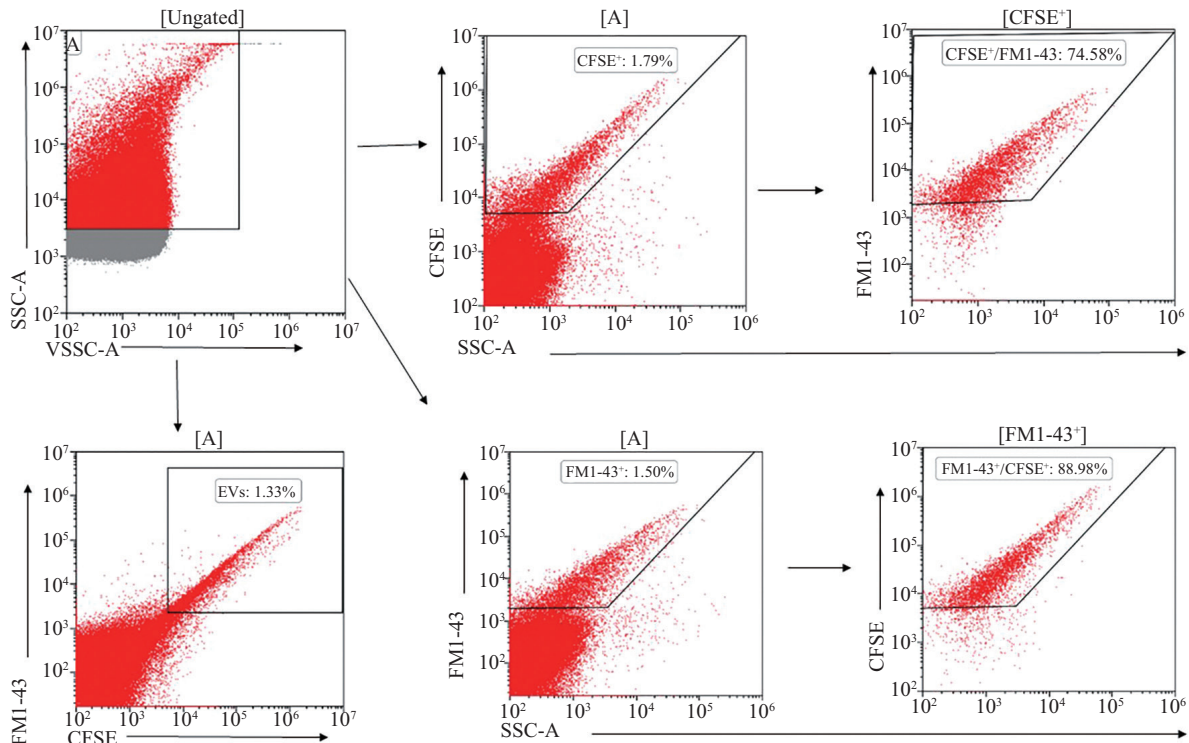


图4 PCS control 混合微球配制

Fig.4 Preparation of PCS control mixed microspheres



[A]: 根据聚苯乙烯微球直径圈定的可能为EVs的颗粒; [CFSE⁺]: CFSE染色结果为阳性的颗粒群体; [FM1-43⁺]: FM1-43染色结果为阳性的颗粒群体。

[A]: practices gated according to the diameter of polystyrene microspheres; [CFSE⁺]: CFSE positive population; [FM1-43⁺]: FM1-43 positive population.

图5 双荧光染料标记鉴定EVs

Fig.5 The identification of EVs by double labeling with fluorescence dyes

显示: 两种分析方法最后的双阳性群体的百分比一致, 但是CFSE或者FM1-43单阳的百分比都高于双阳性群体占比, 这说明流式单染法鉴定EVs可能会出现结果高于真实值。

2.4 电镜观察鉴定

超速离心提取的EVs在冷冻电镜下观察的结果如图6所示: 在电镜下EVs具有明显的膜结构, 外观呈茶托形或表面一侧凹陷的半球形, 直径在100~500 nm

不等, 与预期结果一致。

2.5 Western blot检测EVs的典型标记蛋白

选取EVs特异性的四跨膜蛋白分子CD63、肿瘤易感因子TSG101及细胞内质网膜蛋白Calnexin进行蛋白免疫印迹(WB)分析, 结果如图7所示: CD63及TSG101在EVs中均能检测到特异性条带, 而作为细胞内质网标志蛋白的Calnexin在EVs中也有少量表达, 这提示EVs样本存在其他蛋白污染, 纯度有待提高。

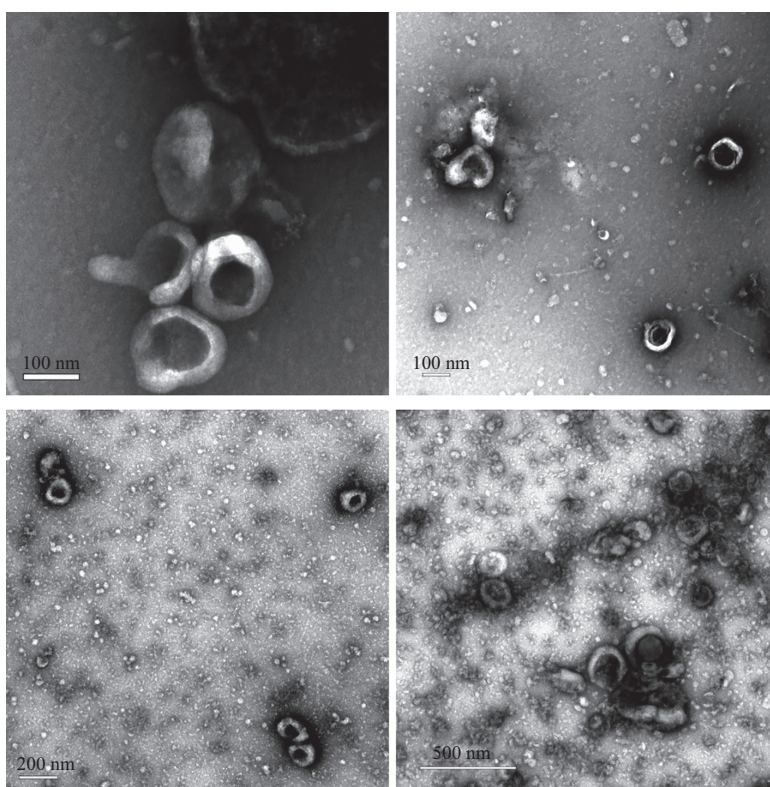


图6 EVs形态及直径的电镜观察

Fig.6 Morphology and diameter observation of EVs by electron microscope

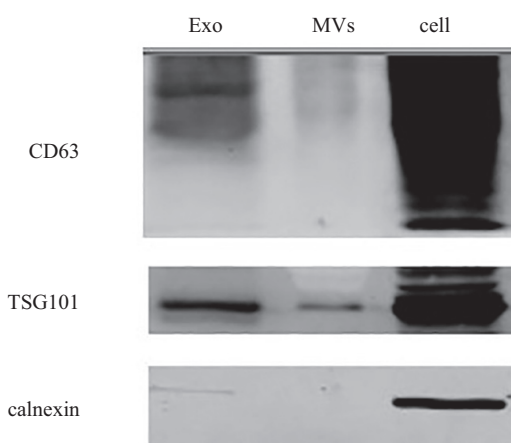


图7 WB鉴定EVs特异性蛋白表达

Fig.7 Characterization of EVs specific protein expression by Western blot

3 讨论

近年来无论在学术还是临床研究领域, 研究人员都尝试用各种方法揭示EVs潜在的疾病诊断和治疗功能, 因此EVs的检测分析尤为重要。高通量、单颗粒、多参数的流式技术可对悬浮颗粒进行物理特征和生物特性双重分析, 在EVs检测中极具优势。

但是, 因EVs亚微米直径, EVs的流式检测依然存在瓶颈。一方面, 大部分EVs直径位于流式检测的临界线或下限, 加之其非均质性、低折光率等特性使其很难与背景噪音信号分开^[13], 且EVs的纯度也会直接干扰其流式检测结果; 另一方面, 样本浓度、阈值、增益等参数的设定对EVs检测都有不可忽略的影响, 尤其是样本浓度过高引发的群检测效应(*swarm effects*)会直接干扰仪器对EVs真实浓度的判断^[14]。因此, 为了获得可靠且可重复的实验结果, 建立EVs分析鉴定的标准化流程十分必要。

本研究就以上问题进行了以下探索。首先从仪器设备入手, 最大限度地利用好流式细胞仪的检测性能。传统流式分析用488 nm激光器的前向散射光通道(FSC)来检测EVs颗粒的散射光信号强度, 检测灵敏度较低, 本研究通过更改检测器配置启用仪器上配备的Voilet405激光侧向散射光通道(VSSC)作为触发通道, 其检测灵敏度明显增高。此外, 仪器的清洁度会直接影响检测灵敏度, 故使用之前需对仪器进行彻底清洁。

EVs的检测参数设定至关重要。为了让检测规范化和标准化, 本研究利用已知直径的聚苯乙烯微球做标准参照, 调节阈值及增益, 直至可以将100 nm微球与背景噪音信号清楚区分, 将此时的检测参数设为EVs的标准检测条件, 后期的检测都将在此方案上进行微调。此外, 为了克服样本浓度过高引发的群检测效应(*swarm effects*), 我们对已知的直径聚苯乙烯微球做了系列梯度稀释, 建立了一条颗粒浓度与稀释梯度之间的标准工作曲线。标准曲线的建立一方面可以帮助快速选定线性范围内的稀释梯度, 对样本进行合理的稀释, 有效降低群检测效应的影响; 另一方面可以检测仪器的状态, 确定其能否对目标颗粒进行准确定量分析。

然而, 仅依据颗粒的散射光信号对EVs进行鉴定还不够准确, 因为聚苯乙烯微球和EVs的折光率(*refractive index, RI*)不完全一致, 故依据聚苯乙烯微球散射光信号推断出的EVs直径与其真实值会有差

异, 针对这一问题, 我们进一步对提取的EVs样本进行了荧光染色分析。EVs双层膜上富含具有交换以及融合作用的膜联蛋白及脂类^[15], 因此, 本研究选用了蛋白结合染料CFSE和亲脂性染料FM1-43对EVs进行双荧光染色标记, 这两种染料的最佳激发光波长均为488 nm, 但最大发射光不同, 故可以同时检测, 双阳性群体即可鉴定为EVs。在依据散射光信号初步确定EVs区域的基础上, 再联合荧光信号对EVs进行双参数分析鉴定, 可以有效排除其他相似直径颗粒和蛋白聚集体的干扰。同时我们比较了不同分析策略对结果的影响: 先圈出CFSE或者FM1-43单阳的群体, 再从单阳群体中找另一参数也为阳性的群体, 结果两种分析方法最后的双阳性群体的百分比一致, 但是CFSE或者FM1-43单阳的群体其百分比都高于双阳性群体占比, 这说明流式单染法鉴定EVs可能会出现结果高于真实值的情况。

最后, 我们分别从单颗粒分析和宏观分析两方面对流式检测的结果进行验证。在冷冻透射电镜下EVs呈茶托形或表面一侧凹陷的半球形, 直径在100~500 nm, 与预期结果一致。而WB的检测结果与其他文献报道的有出入^[15], LOBB等^[7]对超离提取的外泌体进行WB分析发现, 外泌体特异性表达TSG101和CD63, 且Calnexin作为细胞内质网标记蛋白仅在细胞中有表达。而本研究结果显示, TSG101和CD63这两个公认的EVs特异性指标在细胞中也有很高的表达, 我们猜测这可能并非是TSG101和CD63特异性条带, 而是其他的杂质蛋白条带, 这可能与EVs提取的方法有关, 提示分离的EVs样本纯度不高, 存在其他杂质蛋白污染, 但具体原因需进一步验证。因此, 仅根据WB结果对EVs进行定量或者定性分析可能并不准确。

综上所述, 本研究对流式方案的优化及双参数联合分析的方法可快速对EVs进行鉴定分析, 促进了流式检测流程标准化, 为进一步的EVs功能研究及临床应用奠定了基础。

参考文献 (References)

- [1] WIKLANDER O P B, BRENAN M Á, LÖTVALL J, et al. Advances in therapeutic applications of extracellular vesicles [J]. *Sci Transl Med*, 2019, 11(492): eaav8521.
- [2] RAPOSA G, STORVOGE W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles and friends [J]. *J Cell Biol*, 2013, 200(4): 373-83.
- [3] SHAO H, IM H, CASTRO C M, et al. New technologies for

- analysis of extracellular vesicles [J]. *Chem Rev*, 2018, 118(4): 1917-50.
- [4] KOSAKA N, YOSHIOKA Y, TAKESHITA F, et al. Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(23): 17442-52.
- [5] YANG Y, LI Y Y, CHEN X, et al. Exosomal transfer of miR-30a between cardiomyocytes regulates autophagy after hypoxia [J]. *J Mol Med*, 2016, 94(6): 711-24.
- [6] ROBBINS P D, MOTRLLI A E. Regulation of immune responses by extracellular vesicles [J]. *Nat Rev Immunol*, 2014, 14(3): 195-208.
- [7] LOBB R J, BECKER M, SHU W W, et al. Optimized exosome isolation protocol for cell culture supernatant and human plasma [J]. *J Extracellular Vesicles*, 2015, 4: 27031.
- [8] 边素艳, 刘宏斌. 细胞外囊泡的分离及鉴定方法[J]. *新医学杂志* (BIAN S Y, LIU H B. Solation and identification methods of extracellular vesicles [J]. *J New Medicine*), 2019, 9(50): 658-62.
- [9] AN T X, ZHENG L. Progress and analysis methods of clinical application of extracellular vesicles [J]. *J South Med Univ*, 2017, 37(11): 1559-62.
- [10] HIGGINBOTHAN J N, ZHANG Q, JEPPESEN D K, et al. Identification and characterization of EGF receptor in individual exosomes by fluorescence-activated vesicle sorting [J]. *J Extracellular Vesicles*, 2016, 5: 29254.
- [11] KORMELINK T G, ARKESTEIJIN G J A, NAUWELAERS F A, et al. Prerequisites for the analysis and sorting of extracellular vesicle subpopulations by high-resolution flow cytometry [J]. *Cytometry A*, 2016, 89(2): 135-47.
- [12] WISGRILL L, LAMM C, HARTMANN J, et al. Blood microvesicles secretion is influenced by storage time, temperature and anticoagulants [J]. *Cytometry*, 2016, doi: 10.1002/cyto.a.22892.
- [13] BRITTAİN G C, CHEN Y Q, MARTINEZ E, et al. A Novel semiconductor-based flow cytometer with enhanced light-scatter sensitivity for the analysis of biological nanoparticles [J]. *Sci Rep*, 2019, doi:10.1038/s41598-019-52366-4.
- [14] VAN DER POL E, VAN GEMERT M J C, STURK A, et al. Single vs. swarm detection of microparticles and exosomes by flow cytometry [J]. *J Thromb Haemost*, 2012, 10(5): 919-30.
- [15] POSPICHALOVA V, SVOBODA J, DAVE Z, et al. Simplified protocol for flow cytometry analysis of fluorescently labeled exosomes and microvesicles using dedicated flow cytometer [J]. *J Extracellular Vesicles*, 2015, doi: 10.3402/jev.v4.25530.