

• 综 述 •

外泌体提取方法及其 miRNA 在非小细胞肺癌中的应用*

吴 静 综述, 沈佐君[△] 审校

(安徽医科大学附属省立医院临床检验中心, 安徽合肥 230001)

摘 要: 作为癌症诊断有前景的生物学标志物, 外泌体在癌症的液体活检中受到很大关注。外泌体的生物学价值和临床应用价值凸显了开发有效提取和分离外泌体技术的重要性和必要性。外泌体 miRNA 越来越被认为是潜在的疾病非侵入性生物学标志物, 有越来越多的证据表明外泌体 miRNA 表达失调与非小细胞肺癌的发生和发展相关。该文对几种不同外泌体分离提取方法及其 miRNA 在非小细胞肺癌中的作用进行综述。

关键词: 外泌体; miRNA; 非小细胞肺癌; 提取方法

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2020.15.018 **中图法分类号:** R734.2

文章编号: 1673-4130(2020)15-1872-04 **文献标识码:** A

Exosome extraction method and application of miRNA in non-small cell lung cancer*

WU Jing, SHEN Zuojun[△]

(Clinical Laboratory Center, Anhui Provincial Hospital Affiliated to Anhui Medical University, Hefei, Anhui 230001, China)

Abstract: As a promising biomarker for cancer diagnosis, exosomes have received a lot of attention in liquid biopsy of cancer. The biological value and clinical application value of exosomes highlight the importance and necessity of developing effective techniques for extracting and isolating technology of exosomes. Exosomal miRNAs are increasingly recognized as potential non-invasive biomarkers for disease, and there is increasing evidence that misexpression of exosomal miRNAs is associated with the occurrence and development of non-small cell lung cancer. This review mainly introduces several different methods of exosome isolation and extraction and the role of miRNA in non-small cell lung cancer.

Key words: exosomes; miRNA; non-small cell lung cancer; extraction methods

细胞外囊泡是所有细胞主动分泌的纳米级囊泡, 活细胞释放不同类型的细胞外囊泡进入细胞外环境进行细胞间交流, 细胞外囊泡越来越多地被认为是希望的液体活检生物学标志物^[1]。根据相似囊泡的直径大小可将细胞外囊泡分为三类, 直径在 50~150 nm 的外泌体, 直径在 100~1 000 nm 的微囊泡、外粒体和微颗粒, 直径在 100~5 000 nm 的凋亡小体^[2]。目前主要认为, 外泌体产生的过程是细胞膜内陷形成内体, 再形成多泡体, 多泡体与质膜融合导致其管腔内囊泡释放到细胞外, 产生一种称为外泌体的 EV 亚型。

1 外泌体的生物学特性

在透射电镜下可以观察到外泌体呈茶托型或一侧凹陷的半球形, 由脂质双分子层包裹。外泌体是一种富含脂质的囊泡, 含有丰富蛋白质及 DNA 和 RNA 片段(mRNA、miRNA 和其他非编码 RNA), CD9、CD63、CD81、TSG101 和 HSP70 等可作为外泌体的

标志性蛋白, 可用于外泌体的提取和鉴定。有研究认为, miRNA 仅在其起源细胞的细胞内起作用^[3], ZHENG 等^[4]的研究表明, 在他们的测序研究中检测到的外泌体 miRNA 不仅可以作为潜在的生物诊断标志物, 还可以被鉴定为潜在的抗癌药物靶标。

外泌体的有效提取是进行实验研究的第一步, 本综述旨在全面概述外泌体的提取方法及外泌体 miRNA 在非小细胞肺癌(NSCLC)中的应用。目前已经开发了多种不同的分离和富集方法, 包括超速离心法、蔗糖密度梯度离心法、沉淀法、试剂盒法、尺寸排阻法(SEC)、超滤法、基于表面成分亲和力分离法、交流电动力学(ACE)分离法及微流控芯片法。

2 外泌体的提取纯化方法

2.1 基于密度的分离方法

2.1.1 超速离心法 超速离心法是最常用的外泌体

* 基金项目: 安徽省重点研究与开发计划项目(1704a0802153); 安徽省中央引导地方科技发展专项(201707d08050012、2018080402A009)。

[△] 通信作者, E-mail: shenzuojun@163.com。

本文引用格式: 吴静, 沈佐君. 外泌体提取方法及其 miRNA 在非小细胞肺癌中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(15): 1872-1875.

提取方法^[5],首先,施加较低速度的离心力 300 g 以从细胞培养液中去细胞;然后,对上清液施加较大的离心力(10 000~20 000 g),去除大的细胞碎片和破碎的细胞器;最后,再次进行高速(100 000~150 000 g)离心从上清液中收集外泌体,所有离心在 4℃下进行^[6]。超速离心法获得的外泌体不被分离试剂污染,且分离数量多,处理样本小。尽管超速离心法是提取外泌体最广泛的“金标准”,但仍然有很多缺点,如所需的超高速离心仪器比较昂贵、样品量大、耗时长、电镜观察外泌体时仍存在蛋白质污染。

2.1.2 蔗糖密度梯度离心法 目前已发现,外泌体在蔗糖梯度为 1.15~1.19 g/mL 密度中漂浮^[7],所以根据这个特性,可以将样品与蔗糖梯度溶液一起超速离心,外泌体沉降到不同的密度区域就可以将其区分出来。蔗糖密度梯度离心法需要预先配好连续梯度浓度的蔗糖溶液,将蔗糖溶液铺于离心管底部,再将样本放于上部,4℃下 100 000 g 超速离心。蔗糖密度梯度离心法获得的外泌体纯度较高,但是前期准备复杂,耗时长,又不能完全将外泌体与蛋白质分离开。2013 年 10 月 ISEV 会议一些研究人员表示,通过蔗糖密度梯度离心法分离囊泡时,细胞囊泡的生物功能丧失。

2.2 沉淀法

2.2.1 聚乙二醇(PEG) PEG 是一种水溶性非离子化合物,具有极强的亲水性,可以与疏水的脂质双分子层结合,从而改变外泌体的溶解度而使外泌体沉淀。RIDER 等^[7]研究发现,PEG 水平会影响外泌体的产率,且从外泌体中获得的总蛋白和 RNA 在数量和质量上足以用于蛋白质组学和测序分析。沉淀法操作简单,不需要特殊设备,更经济,外泌体产量高,但是会沉淀一些非外泌体的疏水性物质而导致外泌体纯度不够。

2.2.2 试剂盒法 最近已经开发出基于聚合物共沉淀的试剂盒,如 ExoQuick、TEI 等,可用于提取多种体液中的外泌体。聚合物沉淀剂 ExoQuick 与样品 4℃共孵育 30 min,然后室温 1 500 g 离心 30 min,即可获得外泌体沉淀。与超速离心法比较,试剂盒法更简便、耗时短,且能获得更高的外泌体产量^[8]。试剂盒法获得外泌体沉淀含有的杂质较多,不同来源的样本需要使用不同的试剂盒来进行提取,且试剂盒价格较贵。

2.3 基于大小的分离方法

2.3.1 SEC SEC 主要根据外泌体的大小对外泌体进行分离和纯化。样品中大分子物质不能进入凝胶孔而被流动相快速洗脱出来,尺寸小于孔径的物质可进入多孔材料,需要较长时间被洗脱出来,即可通过

不同的洗脱时间分离外泌体。BÖING 等^[9]证明了琼脂糖凝胶可以从无血小板上清液中纯化出外泌体,通过这种方法,外泌体很容易从蛋白质和高密度脂蛋白中分离出来。HONG 等^[10]通过改编和使用 mini-SEC 方法能够有效分离出外泌体,与漫长而复杂的超速离心法不同,它可在 30 min 内完成外泌体分离。通过 SEC 分离得到的外泌体纯度较高,分离出结构上完整且功能活跃的囊泡是基于微型 SEC 分离的重要优势,但数量较少,而且需要特殊设备,故应用不广泛。

2.3.2 超滤法 超滤法是根据外泌体的大小使用相应孔径的滤膜,将样品中小分子物质过滤到膜的另一侧,而将大分子物质滞留在膜上来达到分离的目的。超滤法简单、省时、成本低。LIU 等^[11]改良了简单的超滤法,通过将不同孔径的膜(200、100、80、50、30 nm)串联在一起,实现了不同大小外泌体的快速分离,且捕获效率明显高于超速离心法。然而,过滤器很容易被囊泡和其他大分子物质堵塞,这种情况很容易导致膜压力过大而破碎。

2.4 基于表面成分亲和力的分离法

2.4.1 蛋白质 外泌体表面含有丰富的蛋白质,所以基于其表面成分的亲和力特别适合于分离外泌体。CD63 是外泌体中发现的最丰富的蛋白质之一,因此,常用抗 CD63 免疫吸附外泌体。ZHAO 等^[12]通过使用抗 CD63 包裹的磁珠与血液样品不断混合,将外泌体捕获到磁珠上后,加缓冲液冲洗 5 min,然后引入 3 种不同荧光染料标记的抗体[抗 CD24、抗上皮细胞黏附分子(抗 EpCAM)、抗糖类抗原-125(抗 CA-125)],通过观察不同荧光强度可以量化卵巢癌中不同肿瘤标志物的表达水平。

2.4.2 膜磷脂 虽然大部分基于表面成分的亲和方法是基于外泌体表面的蛋白质,但是脂质双层也是一种很好的检测目标。XU 等^[13]利用外泌体膜上表达的磷脂酰丝氨酸(PS)可以被 PS 结合受体 Tim4 很好地结合,用 Tim4 固定化的磁珠与样品反应进行外泌体捕获,并且观察到洗脱的外泌体保持着完整的形态,与商业外泌体提取试剂盒相比,表现出更高的捕获率。CHEN 等^[14]利用外泌体将带负电荷的 PS 暴露在膜上的特点,使用带正电荷基团的离子交换树脂的磁珠与血浆样品反应,血浆中的外泌体就能与磁珠结合,通过这种方法分离的外泌体具有比超速离心法更高的回收率和更少的杂质蛋白。

2.5 ACE 分离法 ACE 微阵列产生的介电泳(DEP)分离力是通过施加交流电场产生的,纳米级的粒子和其他纳米级实体物质被吸引到圆形微电极边缘周围的 DEP 高场区域,细胞和大的实体物质被吸

引到 DEP 低场区域。IBSEN 等^[15]的 ACE 装置需要 30~50 μL 血浆样品就能够在 15 min 内将外泌体浓缩到微电极周围的高场区域。ACE 设备流程明显快于目前使用的方法,这个装置简化了外泌体提取和回收过程的能力,明显减少了加工步骤和消耗时间。CHEN 等^[16]构建了具有交叉电极的 DEP 芯片,能在 30 min 内从血浆样品中分离出外泌体。经过测试证明,DEP 芯片具有高捕获率和高回收率,需要的时间更短,并且不需要笨重和贵重的仪器。

2.6 微流控芯片法 微流控芯片法是新开发出来的用于快速高效分离样品中外泌体的方法。WOO 等^[17]使用 2 个纳米过滤器(Exodisc)集成的实验盘在 30 min 内实现了 20~600 nm 外泌体的全自动富集。使用纳米粒子跟踪分析定量检测证实了细胞培养上清液中外泌体的回收率大于 95%。与超速离心法相比,Exodisc 提供了高出 100 倍的 mRNA 水平,更省时,所需样本量更少。FANG 等^[18]开发了一种微流体芯片,将包裹了抗 CD63 的磁珠与血浆样品通入芯片,在第 1 个腔室中捕获到外泌体,通入一抗与磁珠-外泌体混合物结合,再通入荧光标记的二抗形成磁珠-外泌体-一抗-二抗混合物聚集在第 2 个腔室。微流控芯片法操作简单,捕获率高,特别适合于生物学研究。

外泌体作为癌症诊断的有前景的生物学标志物,其在癌症的液体活检中受到关注。外泌体的生物学价值和临床应用价值凸显了开发有效提取和分离外泌体技术的重要性和必要性。相信随着技术的不断进步和创新,外泌体提取将变得更加简便经济,纯度越来越高,完整性越来越好。

3 外泌体的应用

外泌体广泛存在于血液、唾液、尿液、母乳和腹水等体液中^[19],可以方便获得。与健康对照组比较,癌症患者外周血中具有更高水平的外泌体^[20],肺癌细胞分化的外泌体对于诊断肺癌有重要临床意义。肺癌是全球发病率和病死率最高的恶性肿瘤之一,其中 NSCLC 占有所有类型肺癌的 85% 以上,具有易转移、易复发、恶性程度高等特点,生存率较低。目前仍然缺乏精准的早期筛查方法,因此,有必要寻找灵敏度和特异度更高的早期检测的分子标志物。

3.1 外泌体 miRNA 在 NSCLC 中的作用 miRNA 被定义为一种小非编码 RNA,在基因表达的转录后调控中起关键作用。miRNA 越来越被认为是潜在的疾病非侵入性生物学诊断标志物,有越来越多的证据表明,miRNA 表达失调与 NSCLC 的发生和发展相关^[21-22]。RODRÍGUEZ 等^[23]的实验数据表明,与非肿瘤患者血浆外泌体中检测到的 miRNA 比较,在 NSCLC 患者的血浆外泌体中检测到更多具有高表达

的 miRNA。ZHOU 等^[24]通过系统搜索 PubMed、Web of Science 和 Embase 进行研究,强调外泌体衍生的 miRNA 可以用作 NSCLC 患者的潜在诊断和治疗生物学标志物。

3.2 外泌体 miRNA 在 NSCLC 中的诊断 外泌体 miRNA 可能成为筛选、诊断、检测癌症的有效生物标志物。GIALLOMBARDO 等^[25]通过聚合酶链反应检测 8 种 miRNA(miR-30b、miR-30c、miR-103、miR-122、miR-195、miR-203、miR-221 和 miR-222)与 NSCLC 相关,并且推断从这些上调或下调的 miRNA 中能发现 NSCLC 的外泌体生物学标志物。MUNAGALA 等^[26]研究发现,miR-21 和 miR-155 在复发肺癌中的表达明显增高,表明外泌体 miRNA 在区分复发性肺癌和原发性肺癌中起重要作用。JIN 等^[27]通过分离 NSCLC 患者血浆中肿瘤来源的外泌体,与健康个体来源的外泌体进行 miRNA 测序,并对其诊断准确性进行验证发现,腺癌特异性的 miR-181-5p、miR-30a-3p、miR-30e-3p 和 miR-361-5p 及鳞状细胞癌特异性的 miR-10b-5p、miR-15b-5p 和 miR-320b 可用于早期 NSCLC 的诊断,是非侵入性生物学标志物的有效候选者。

外泌体作为一种生物载体,分布广泛,可用于无创性诊断,包含蛋白质、核酸等生物信号,可在细胞之间传递生物信息和物质交换。外泌体囊泡结构稳定,可有效保护 miRNA 免受 RNase 降解,使外泌体内的 miRNA 更稳定、丰度更高。外泌体在肺癌治疗过程中会逐步提高其诊断的精确性和准确性,能够尽早发现肺癌,并及时进行治疗,提高患者的生存率。

4 外泌体提取面临的挑战及展望

近十年来,人们越来越认识到外泌体的重要作用。尽管人们对这一领域的兴趣日益浓厚,但是如何提高外泌体的产量和纯度是目前面临的一大挑战。虽然国内外学者尝试不同的分离纯化方法,取得了一定进展,但成本和效率仍然是限制外泌体研究和应用的关键。因此,建立可靠的外泌体提取方法,有助于外泌体在临床上的应用。本文主要介绍了几种不同外泌体的分离提取方法及其在 NSCLC 中的作用。随着医疗技术的发展和不断创新,外泌体还有很多需要探索的地方,相信外泌体在肺癌的诊断和治疗应用上将会有更广阔的前景。

参考文献

- [1] SHAO H, IM H, CASTRO C M, et al. New technologies for analysis of extracellular vesicles[J]. Chem Rev, 2018, 118(4): 1917-1950.
- [2] MATHIEU M, MARTIN-JAULAR L, LAVIEU G, et al. Specificities of secretion and uptake of exosomes and oth-

- er extracellular vesicles for cell-to-cell communication[J]. *Nat Cell Biol*, 2019, 21(1): 9-17.
- [3] KOSAKA N, YOSHIOKA Y, FUJITA Y, et al. Versatile roles of extracellular vesicles in cancer[J]. *J Clin Invest*, 2016, 126(4): 1163-1172.
- [4] ZHENG M, HOU L, MA Y, et al. Exosomal let-7d-3p and miR-30d-5p as diagnostic biomarkers for non-invasive screening of cervical cancer and its precursors[J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 76-79.
- [5] GARDINER C, VIZIO D D, 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(1): 32945-32948.
- [6] YANG X X, SUN C, WANG L, et al. New insight into isolation, identification techniques and medical applications of exosomes[J]. *J Control Release*, 2019, 308(28): 119-129.
- [7] RIDER M A, HURWITZ S N, MECKES JR D G. ExtraPEG: a polyethylene glycol-based method for enrichment of extracellular vesicles[J]. *Sci Rep*, 2016, 12(6): 23978-23979.
- [8] 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.
- [9] BÖING A N, VAN DER POL E, GROOTEMAAT A E, et al. Single-step isolation of extracellular vesicles by size-exclusion chromatography[J]. *J Extracell Vesicles*, 2014, 3(1): 23430-23436.
- [10] HONG C S, FUNK S, MULLER L, et al. Isolation of biologically active and morphologically intact exosomes from plasma of patients with cancer[J]. *J Extracell Vesicles*, 2016, 5(1): 29289-29292.
- [11] LIU F, VERMESH O, MANI V, et al. The exosome total isolation chip[J]. *ACS Nano*, 2017, 11(11): 10712-10723.
- [12] ZHAO Z, YANG Y, ZENG Y, et al. A microfluidic exosearch chip for multiplexed exosome detection towards blood-based ovarian cancer diagnosis[J]. *Lab Chip*, 2016, 16(3): 489-496.
- [13] XU H, LIAO C, ZUO P, et al. Magnetic-based microfluidic device for on-chip isolation and detection of tumor-derived exosomes[J]. *Anal Chem*, 2018, 90(22): 13451-13458.
- [14] CHEN J, XU Y, LU Y, et al. Isolation and visible detection of tumor-derived exosomes from plasma[J]. *Anal Chem*, 2018, 90(24): 14207-14215.
- [15] IBSEN S D, WRIGHT J, LEWIS J M, et al. Rapid isolation and detection of exosomes and associated biomarkers from plasma[J]. *ACS Nano*, 2017, 11(7): 6641-6651.
- [16] CHEN J, XU Y, WANG X, et al. Rapid and efficient isolation and detection of extracellular vesicles from plasma for lung cancer diagnosis[J]. *Lab Chip*, 2019, 19(3): 432-443.
- [17] WOO H K, SUNKARA V, PARK J, et al. Exodisc for rapid, size-selective, and efficient isolation and analysis of nanoscale extracellular vesicles from biological samples [J]. *ACS Nano*, 2017, 11(2): 1360-1370.
- [18] FANG S, TIAN H, LI X, et al. Clinical application of a microfluidic chip for immunocapture and quantification of circulating exosomes to assist breast cancer diagnosis and molecular classification [J]. *PLoS One*, 2017, 12(4): e0175050.
- [19] BEACH A, ZHANG H G, RATAJCZAK M Z, et al. Exosomes: an overview of biogenesis, composition and role in ovarian cancer[J]. *J Ovarian Res*, 2014, 7(1): 14-19.
- [20] ELDH M, BAGGE R O, LÄSSER C, et al. MicroRNA in exosomes isolated directly from the liver circulation in patients with metastatic uveal melanoma[J]. *BMC Cancer*, 2014, 14(1): 962-966.
- [21] VANNI I, ALAMA A, GROSSI F, et al. Exosomes: a new horizon in lung cancer[J]. *Drug Discov Today*, 2017, 22(6): 927-936.
- [22] FORTUNATO O, GASPARINI P, BOERI M, et al. Exo-miRNAs as a new tool for liquid biopsy in lung cancer [J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(6): 888.
- [23] RODRÍGUEZ M, SILVA J, LÓPEZ-ALFONSO A, et al. Different exosome cargo from plasma/bronchoalveolar lavage in non-small-cell lung cancer[J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2014, 53(9): 713-724.
- [24] ZHOU Q, HUANG S X, ZHANG F, et al. MicroRNAs: a novel potential biomarker for diagnosis and therapy in patients with non-small cell lung cancer [J]. *Cell Prolif*, 2017, 50(6): 12394-12399.
- [25] GIALLOMBARDO M, BORRÁS J C, CASTIGLIA M, et al. Exosomal miRNA analysis in Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) patients' plasma through qpcr: a feasible liquid biopsy tool [J]. *J Vis Exp*, 2016, 27(111): 53900-53906.
- [26] MUNAGALA R, AQIL F, GUPTA R C. Exosomal miRNAs as biomarkers of recurrent lung cancer[J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(8): 10703-10714.
- [27] JIN X, CHEN Y, CHEN H, et al. Evaluation of tumor-derived exosomal miRNA as potential diagnostic biomarkers for early-stage non-small cell lung cancer using next-generation sequencing[J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(17): 5311-5319.