

DOI:10.12405/j.issn.2097-1486.2025.02.008

细胞外囊泡分离研究进展

苏翕索, 刘定斌*

南开大学 化学学院 天津 300071

摘要: 细胞外囊泡(extracellular vesicle, EV)是由细胞释放的具有磷脂双层膜结构的囊状小泡,大小在 30~5 000 nm 之间。EV 携带母细胞的生物分子信息,通过运输关键的蛋白质、miRNA、mRNA 和 DNA 等生物分子,在细胞通信和表观遗传调控中发挥着重要作用。由于 EV 所处体液环境十分复杂,来源多样,且其理化性质存在较大的异质性,高效率、高纯度地分离和纯化 EV 对其下游的生物医学研究和临床应用至关重要。本篇综述将总结不同来源 EV 的分离分析研究进展,并深入剖析不同方法的优缺点,阐明其应用场景,为各种 EV 分离技术的应用和进一步开发提供有用信息。

关键词: 细胞外囊泡;分离富集;生物分析;医学应用

中图分类号: O652.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 2097-1486(2025)02-0208-18

Research progress in extracellular vesicle isolation methods

SU Xisuo, LIU Dingbin*

College of Chemistry, Nankai University, Tianjin 300071

Abstract: Extracellular vesicle (EV) is phospholipid bilayer membrane vesicle released by cells and its size ranges from 30 to 5 000 nm. EV carries the biomolecular information of the parental cells and plays an important role in cell communication and epigenetic regulation by transporting critical biological cargoes such as proteins, miRNA, mRNA and DNA. Due to the complexity of the body fluid environments in which EV is found, their diverse origins, and the great heterogeneity in their physical and chemical properties, efficiently and purely isolating and purifying EV is critical for downstream biomedical research and clinical applications. This review summarizes the research progress of isolating EV from different sources, analyze the advantages and disadvantages of different methods, clarify their application scenarios, and provide useful information for the application and further development of various EV separation technologies.

Keywords: extracellular vesicle; isolation and enrichment; bioanalysis; medical application

0 引言

细胞外囊泡(extracellular vesicle, EV)是一类由细胞释放到细胞外环境的微纳米级膜性囊泡,直径为 30~5 000 nm。几乎所有类型的细胞均能释放 EV,其分布广泛,在哺乳动物、植物和微生物细胞中均有发现。EV 携带着母细胞内的遗传物质和分子信息(如蛋白质、miRNA、mRNA 和 DNA 等),在细胞信息交流与传递之间发挥着重要作用。本篇综述拟系

统梳理和评估不同来源 EV 分离方法的研究进展,比较各类方法的效率和适用性,探讨其在实际应用中的优势和不足。

1 细胞外囊泡的基本概述

国际细胞外囊泡协会(ISEV)将细胞外囊泡(EV)定义为“从细胞中释放的颗粒,由脂质双层包裹,并且不能自行复制,即不包含功能性细胞核”^[1]。EV 按照其形成方式和来源可分为三类:外泌体

*通信作者

收稿日期:2024-12-28;修回日期:2025-02-07

(30~200 nm)、微囊泡(100~1 000 nm)和凋亡小体(100~5 000 nm)^[2]。外泌体主要由内吞途径产生,它们首先由细胞膜内陷形成早期内体,随后进一步成熟为多囊泡体(multivesicular body, MVB)。当多囊泡体与细胞膜融合后,小囊泡通过胞吐作用释放到细胞外环境中,从而形成外泌体^[3]。微囊泡和凋

亡小体是直接由细胞质膜向外出芽形成的囊泡,该过程不依赖于内吞途径(图1)。一般来说,根据不同的生物发生途径,为了避免误导性的术语,ISEV建议将<200 nm的EV称为小细胞外囊泡(small extracellular vesicle),而>200 nm的称为大细胞外囊泡(large extracellular vesicle)。

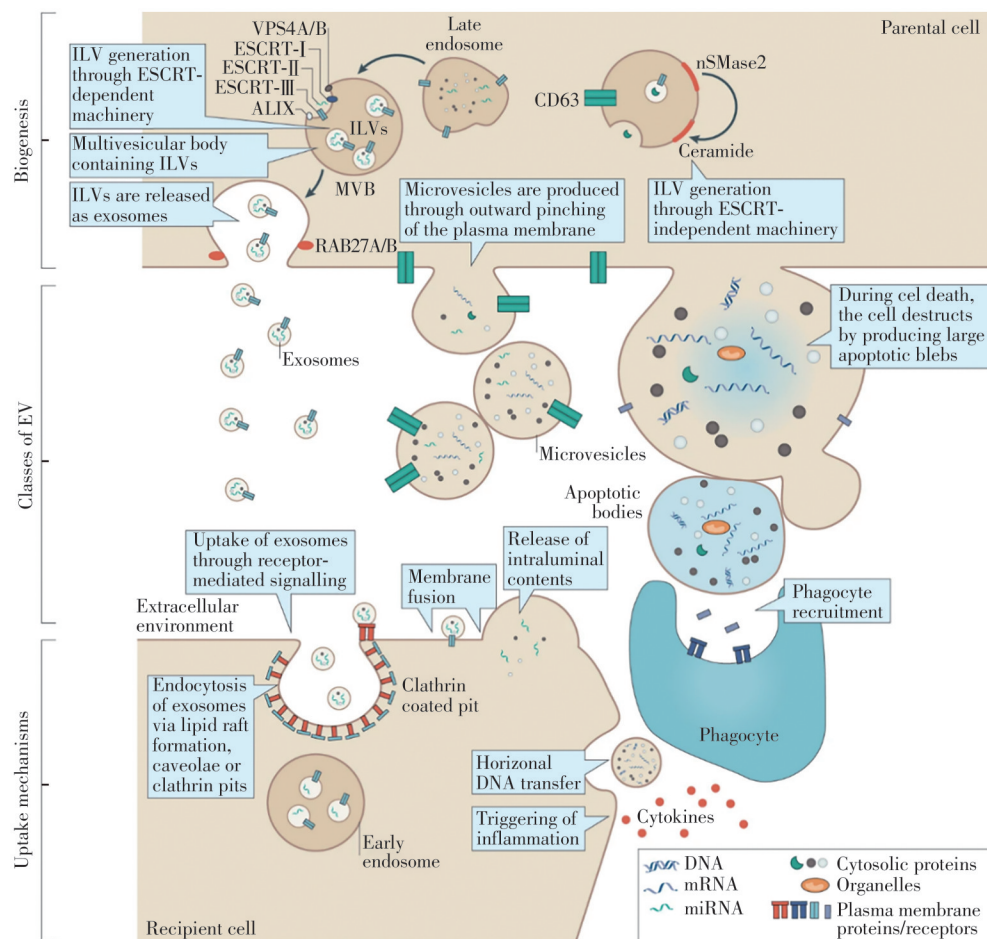


图1 EV的形成过程^[2]

Figure 1 Biogenesis of extracellular vesicle^[2]

EV的膜结构与细胞膜相似,含有磷脂双分子层和多种生物分子,包括蛋白质、脂质、核酸等,这些成分赋予了EV在细胞间通讯和信号传递中的独特功能,从而在多种生物学过程中发挥着重要作用^[4-5]。近年来,EV在细胞通讯、免疫调节^[6-7]、肿瘤转移以及神经退行性疾病中的功能引起了广泛关注^[4,8-11]。EV不仅是细胞间通讯的重要媒介,还在疾病诊断和治疗中展现出巨大的潜力^[12-14]。例如,EV可作为生物标志物,用于疾病早期检测和诊断^[15-16];此外,EV还可以作为药物递送载体^[17-18],将药物直接传递到目标细胞。因此,深入研究EV的生物学功能,对生物医学领域具有重要的意义^[19-21]。然而,要充分利用其

潜力,需要从复杂的生物样本中高效分离出EV。由于体液环境往往较为复杂^[21],且EV的理化性质具有很强的异质性,使得其分离过程面临诸多挑战。

目前,已有多种分离方法被开发和应用,包括超速离心法、超滤法、尺寸排阻色谱法、免疫捕获法、聚合物沉淀法及微流控技术等。每种方法都有其独特的原理、优点和局限性,适用于不同的研究需求和应用场景。本文将总结哺乳动物来源、植物来源和微生物来源的EV分离方法。

2 哺乳动物来源的EV分离方法

几乎所有哺乳动物细胞均会分泌EV,其分离

方法研究得最为广泛,包括超速离心法、超滤法、尺寸排阻色谱法、亲和捕获法、聚合物沉淀法和微流控技术等。

2.1 超速离心法

超速离心法是最早也是最常用的EV分离方法之一,适用于大部分的生物样本,包括细胞培养上清、血浆、尿液和脑脊液等,普适性强,无需专业的操作人员及昂贵的试剂,被称为EV分离的金标准方法。其原理是基于颗粒在高离心力场下的沉降速率差异,不同大小和密度的颗粒在离心力作用下会以不同的速度沉降,从而实现分离^[22]。超速离心法通常包括多个

离心步骤(图2),逐步去除较大和较小的颗粒,最终获得相对纯净的EV^[23]。然而,超速离心法也存在一定的局限性:(1)需要多步离心,耗时较长,操作过程繁琐,每步离心都会造成一定的样本损失,最终产量较低;(2)设备要求高,超速离心法产生的离心力可高达100 000 g可能会破坏EV的完整性,从而影响下游分析^[24]; (3)由于脂蛋白等颗粒大小和密度与EV接近^[25],因此超速离心法难以完全去除杂蛋白干扰,显著影响EV的分离纯度。此外,超速离心法受到离心力、离心时间、样本类型和体积以及离心温度等多种因素的影响,这些因素往往会影响EV的分离效果。

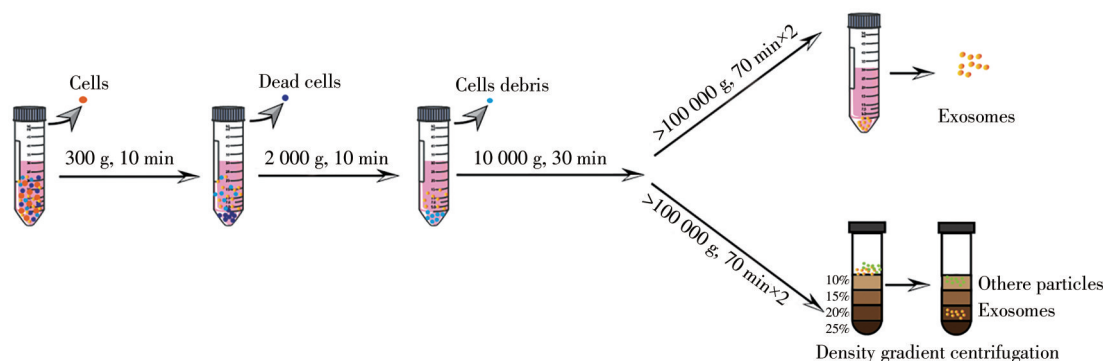


图2 差速离心法和密度梯度离心法示意图

密度梯度离心法是在差速离心法的基础上,通常将不同密度的生物相容性介质(如蔗糖或碘克沙醇)置入一个试管中,密度从下到上逐渐降低。不同密度的颗粒组分在一定的离心力作用下使密度小者上浮,密度大者下沉,最终不同密度的颗粒会停滞在相应等密度区。

Figure 2 Schematic illustration of differential centrifugation and density-gradient centrifugation

The density gradient centrifugation is based on the differential centrifugation. Usually, different-density biocompatible media (such as sucrose or iodixanol) are placed in a test tube, with the density gradually decreasing from bottom to top. Under the action of a certain centrifugal force, the particle components of different densities cause the denser ones to float upward and the less dense ones to sink downward. Eventually, different-density particles will stop at the corresponding isodensity zones.

为了进一步解决超速离心法的局限性,研究者们进行了多方面的优化和技术改进。例如,根据不同类型的样本和目标EV的特性,调整离心力和离心时间。对于小型EV,适当降低离心力并缩短离心时间,以减少对EV的损害。在常规超速离心的基础上,引入密度梯度离心法^[26-27],从而可以根据EV与其他颗粒的密度差异进一步提高分离纯度。具体操作如下:通过在样本中加入密度梯度介质,从而根据EV和其他颗粒的密度差异进行更精确的分离。首先,将不同密度的生物相容性介质(如蔗糖或碘克沙醇)置入一个试管中,密度从下到上逐渐降低。随后,将样品添加到密度梯度培养基的顶部,进行超速离心。岩井(Iwai)等人^[26]通过碘克沙醇密度梯度离心法提取唾液中的EV,获得了纯度较高的EV。但与传统的超速离心法相同,该方法操作上依

然繁琐,且耗时较长,不适合大规模地处理样品。

2.2 超滤法

与传统的过滤方法类似,超滤法是一种根据颗粒大小进行膜过滤的分离方法。超滤使用具有不同截留分子量的纳米膜从临床样本或细胞培养基中分离EV。通过选择合适孔径的超滤膜,可以有效地将EV从较大的细胞碎片和较小的分子中分离出来^[28]。超滤法的基本原理是通过压力驱动样本溶液通过具有特定孔径的超滤膜,使得大于孔径的颗粒被截留,小于孔径的物质通过膜孔流出。因此,超滤膜的孔径是影响分离效果的关键因素。选择适合的膜孔径对分离不同大小的EV至关重要。如果膜孔径过大,可能无法有效截留EV;如果膜孔径过小,则可能导致较小的EV无法通过,影响回收率。此外,过滤压力、膜污染和堵塞以及样本溶液的黏度

等因素也对超滤法有重要的因素。如:过高的过滤压力可能导致膜污染或破裂,从而降低过滤效果;过低的压力则可能导致过滤速度慢,效率低。

与超速离心法相比,基于超滤的EV分离法步骤相对简单^[29],且显著缩短了处理时间,不需要特殊设备,操作条件温和,减少了对EV结构和功能的损伤。然而,超滤法也存在一些局限性,长时间使用可能导致滤膜堵塞,影响分离效率和产量^[30]。为了解决这一问题,引入了切向流技术。切向流过滤又称为交叉过滤,其中过滤的流体切向过滤表面(图3),由于膜处于平行的流动力下,通过不断地冲洗,可以一定程度上避免潜在的膜堵塞^[31]。而无法透过的截留物会再循环至进料区,参与循环,从而实现自动化^[32-33]。此外,还可以通过其他参数的控制和调整为超滤法提供一定的优化策略。例如,在过滤的过程中,通过控制过滤压力和流速,避免过高的压力导致膜损坏。优化流速和压力以提高分离效率,保持过滤的稳定性。使用长时间后,可以对膜进行再生和清洗,使用适当的清洗溶液(如水、盐溶液、酸性溶液或碱性溶液等)定期清洗膜可以避免污染的积累,以减少堵塞的出现,从而提高膜的使用寿命。

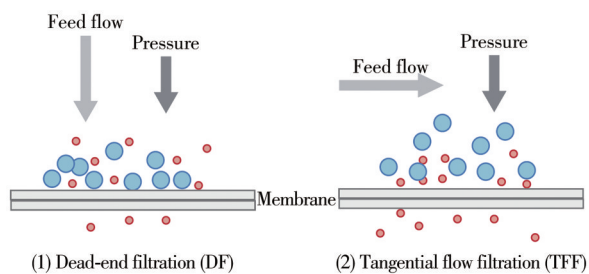


图3 死端过滤(1)与切向流过滤(2)的对比

Figure 3 Dead-end filtration (1) vs. Tangential flow filtration (2)

2.3 尺寸排阻色谱法

1955年,格兰特(Grant H. L)和科林(Colin R. R)发明了一种基于分子尺寸的分离技术,称为尺寸排除色谱法(size exclusion chromatography, SEC)^[34]。SEC是一种基于颗粒大小进行分离的色谱技术,其原理是通过多孔基质的色谱柱来区分不同尺寸的颗粒。当样本通过装填有多孔凝胶的色谱柱时,大颗粒由于无法进入凝胶孔隙,会沿最短路径快速通过色谱柱;而小颗粒则会进入凝胶孔隙,被延迟洗脱^[35]。最终,不同大小的颗粒按照洗脱时间被分离开来(图4)。

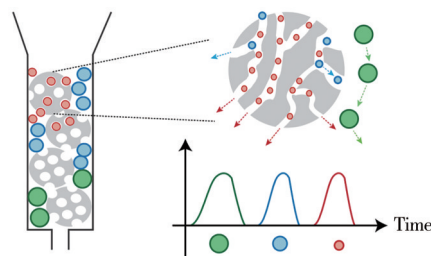


图4 尺寸排阻色谱法的分离原理图

Figure 4 Illustration of the principle of size exclusion chromatography

就EV的治疗应用和功能研究而言,SEC最吸引人的特征是它能够保存分离的EV的自然生物活性^[36]。与超速离心和超滤不同,SEC是通过被动重力流进行的,它不影响囊泡的结构和完整性。EV通过选择具有生理渗透压和黏度的洗脱缓冲液,可以进一步增强其自然状态,适用于后续的生物功能分析或临床应用。然而,由于其分离速度相对较慢,且需要高质量的色谱柱和色谱系统,因此SEC通常用于需要高纯度的EV的实验,而非高通量应用。为了提高SEC的分离效率和处理量,研究者们进行了多项技术改进。例如,开发了高流速的色谱柱和多柱串联系统,能够在较短时间内处理更多样本,提高分离效率。此外,结合自动化液相色谱系统,实现了高通量EV分离和分析,大大提高了实验效率和重复性,如商业化的产品qEV色谱柱^[37]。

2.4 亲和捕获法

亲和捕获法基于EV膜表面分子与分离介质界面配体的高亲和力和识别,如免疫捕获法通过抗原-抗体的特异性结合来分离EV^[38]。EV亲和捕获法最常选用的膜蛋白是CD63、CD81和CD9。该方法通常结合磁性微球,通过在微球表面偶联抗体,使得抗体能够捕获目标EV。免疫捕获法已被广泛应用于EV相关疾病标志物鉴定、组学分析和疾病诊断等领域^[39]。例如,利用免疫捕获法从血液中分离肿瘤来源的EV,并进行基因组和蛋白质组分析,发现了一些特异性分子标志物,有助于癌症的早期诊断和治疗^[40]。此外,在阿尔茨海默病研究中,免疫捕获法被用于分离脑脊液中的神经元EV,研究其在疾病机制中的作用。相对于其他分离方法,免疫捕获法最大的优点是其高特异性,利用抗体与EV表面标志物的特异性结合,显著提高了EV分离的纯度。免疫捕获法的操作相对简便,可在较短时间内完成分离过程。然而,该方法也存在一定局限性:(1)EV膜蛋白表达的异质性,使得分离效率较低;(2)捕获

效率依赖于抗体的质量和特异性,而高质量的特异性抗体成本较高,限制了其大规模应用。

为了提高EV分离富集的效率 and 通用性,本课题组报道了一种可逆的两性离子配位策略^[41],该策略基于EV膜上的磷脂酰胆碱(phosphatidylcholine, PC)与锚定在磁珠上的胆碱磷酸(choline phosphate, CP)之间的特异性相互作用(图5)。CP可最

大限度地减少其他生物污染物在磁珠上的非特异性吸附,此外,可通过改变环境温度来可逆地调节PC-CP的配位,从而将EV从磁珠上快速释放下来。该方法解决了传统免疫磁珠法的非特异性吸附以及高成本的问题,通过可逆的两性离子配位策略,实现了从不同生物样本中快速、高产和高纯度地分离EV。

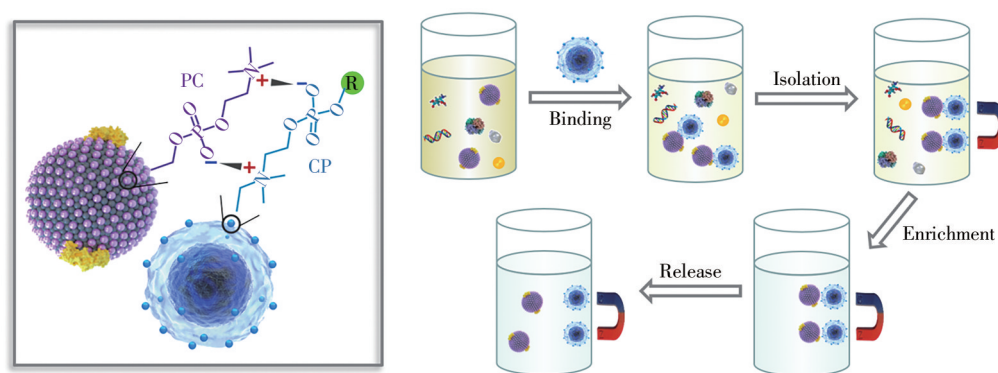


图5 通过CP-PC可逆配位对EV进行捕获和释放

Figure 5 Schematic diagram of capture and release of EV through CP-PC reversible coordination

2.5 聚合物沉淀法

聚合物沉淀法是一种通过添加聚合物使EV沉淀的分离方法,高度亲水的聚合物与EV周围的水分子相互作用,形成疏水的微环境,导致EV沉淀^[42],其中聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)为最常用的聚合物。由于该方法操作简便,富集效率高,因此备受青睐,已被制作成商用试剂盒,如ExoPrep、ExoQuick等。聚合物沉淀法不需要复杂的设备,适合大规模样本处理,已被广泛用于各类样本中EV的分离富集,如血液、细胞培养液、脑脊液和尿液等^[42]。聚合物沉淀法对于大分子的沉淀无选择性,因此复杂生物样本EV分离富集的沉淀物中会包含其他非囊泡成分(如蛋白质、脂质等),导致分离纯度较低。此外,PEG等聚合物的残留可能干扰后续的分析,因此在下游应用中需要特别注意。

2.6 微流控技术

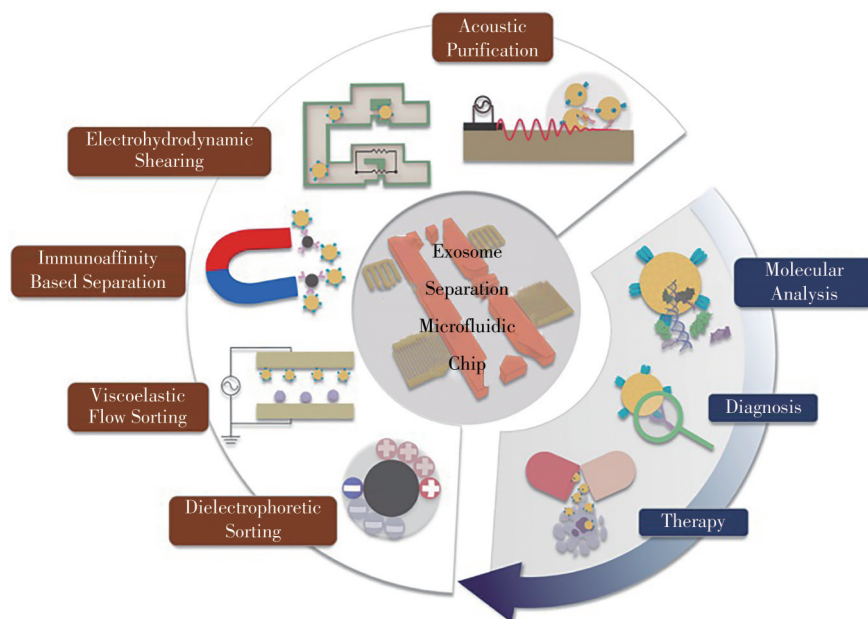
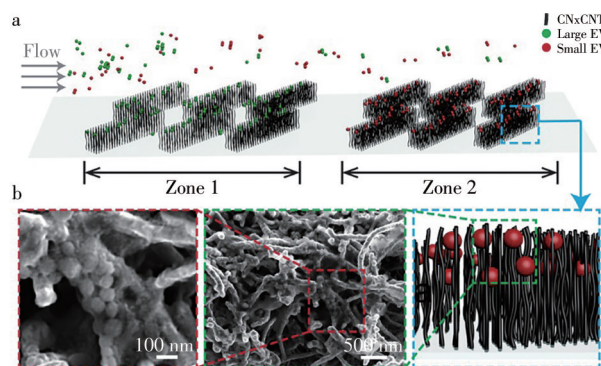
微流控平台由于具有样本体积小、自动化的优点,逐渐成为EV分离技术的新星。微流控技术是一种基于微小流体通道的EV分离方法,通过设计精密的微流控芯片实现对EV的高效分离和分析。该方法利用微米级通道中的流体动力学特性和物理化学性质差异,从而达到分离EV的目的。微流控技术可以通过物理筛分^[43]、声波^[44-46]、介电泳^[47-48]、磁捕获^[49-51]等不同手段实现EV的分离(图6)。库(Ku)等人^[52]利用声阱的自动微流控系统

富集了尿液的EV,并通过miRNA测序,发现生物标志物。雷泽利(Rezeli)等人^[53]建立了声波捕获平台,对血浆衍生的ECV蛋白进行了捕获,并与常规的差速离心法分离的ECV蛋白进行蛋白质组学分析,结果表明,通过两种方法捕获的蛋白质组成相似。

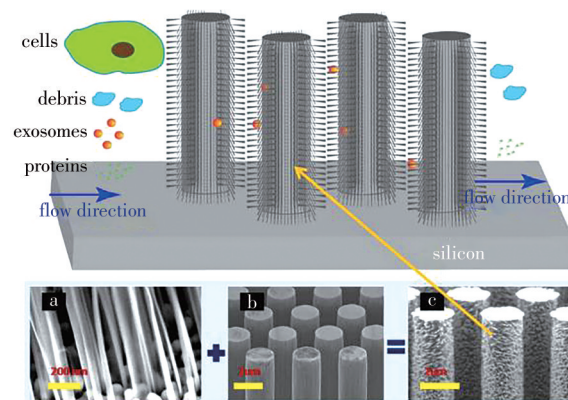
微流控技术具有极高的灵活性和可定制性,能够在微小尺度上进行高效分离,样本需求量低,所需样本量极少,适用于宝贵和稀有样本处理。且能够与下游分析技术无缝衔接,如实时成像、分子检测等。然而,微流控设备的开发和操作复杂度较高,需要精密的芯片和控制设备,并且需要针对不同类型样本和EV特性进行特定的芯片设计和优化,开发周期较长,目前多用于实验室研究,尚未广泛应用于大规模分离。

2.7 其他技术

除了上述常用的分离方法,一些新兴技术或对现有技术的改进也不断涌现。叶燕婷(Yin-Ting Yeh)等人^[54]基于SEC的原理,构建了一个由三维碳纳米管阵列组成的高通量平台(图7)。该平台可根据大小快速捕获和分离不同的EV,还能用于观察不同捕获的EV的细胞摄取。更重要的是,捕获过程无需任何标记,这种无标记捕获可在EV从宿主细胞中释放时保持其完整性,从而允许使用传统的方法进行全面的下游分析。

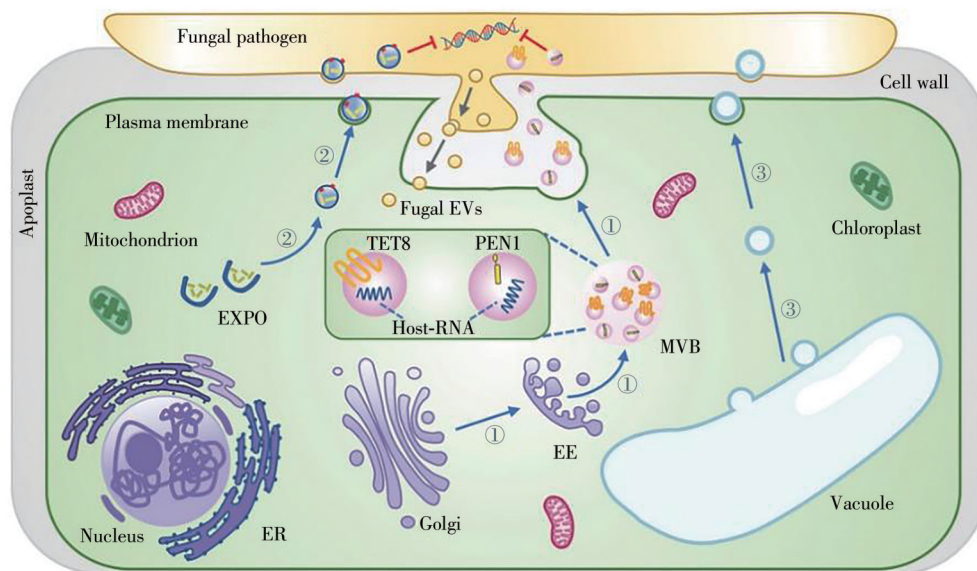
图6 基于微流控原理的分离技术及其临床应用^[49]Figure 6 Schematic illustration of microfluidic based separation and clinical applications of exosomes^[49]图7 通过三维碳纳米管阵列快速捕获EV^[54]Figure 7 Rapid capture of EVs by three-dimensional carbon nanotube arrays^[54]

王等人^[55]开发了一种由纤毛微柱组成的微流体装置,能够同时进行多尺度过滤。纤毛由多孔硅纳米线组成,这些纳米线使用电沉积银纳米颗粒催化剂化学蚀刻在微柱侧壁上。纳米线森林中的纳米线间距可以在30~200 nm的范围内进行调整,从而产生高密度的间隙位点,能够物理捕获类似外泌体的纳米颗粒(图8)。使用已知大小的脂质体作为模型囊泡,该课题组已经证明纤毛微柱优先捕获外泌体样脂质囊泡,同时允许较小的蛋白质和具有细胞碎片大小的较大纳米颗粒畅通无阻地通过。此外,可以通过将多孔硅纳米线溶解在PBS中来释放捕获的脂质囊泡,从而实现其完整和高度纯化的回收。这些新兴的技术通过进一步优化EV的分离过程,为未来的高通量分离和精准分析提供了新的方向。

图8 用于EV分离的纤毛微柱阵列示意图^[55]Figure 8 A schematic of the ciliated micropillar array for EV isolation^[55]

3 植物来源的EV分离方法

植物来源的细胞外囊泡(plant-derived extracellular vesicle, PDEV)是近年来植物学中备受关注的研究方向,与哺乳动物的EV相似,PDEV具有重要的生物学功能。PDEV的大小、形态及生物分子组成与哺乳动物的EV有相似之处,但也有其显著的特征。PDEV来源机制较为复杂^[56-57],目前已有一些模型用来解释PDEV的分泌机制,其分泌途径主要分为三种(图9):(1)通过胞吐作用分泌PDEV,类似于动物的外泌体和微囊泡,大小通常在30~1 000 nm之间^[58-59]; (2)外囊阳性细胞器与质膜融合产生的PDEV^[60-61],这是植物特有的非常规分泌途

图9 植物细胞外囊泡的生物发生和分泌过程^[56]Figure 9 Biogenesis and secretion of PDEV^[56]

径^[62]; (3)液泡途径产生的PDEV^[63],这一途径与多泡体通路之间可能存在一定联系^[64]。

PDEV的组成成分包括脂质、蛋白质、核酸(如miRNA、tRNA、mRNA)和次生代谢物等^[65-66]。PDEV的膜结构由磷脂双分子层构成,具有高度特异的蛋白质组成,如热激蛋白、溶酶体相关蛋白等。此外,其中也含有大量具有抗菌和抗病毒活性的物质^[67-69],如植物防御性小分子和酶类,表明它们在植物抗逆性和信号传导中的重要作用^[70]。由于PDEV的多样性和复杂性,分离纯化这些囊泡对于研究其功能具有重要价值。与哺乳动物EV相同,目前常用的PDEV分离方法有超速离心法、超滤法、聚合物沉淀法和尺寸排阻色谱法等,但大部分方法尚处于初步探索阶段,因此开发适合植物细胞的高效分离技术至关重要。

3.1 超速离心法

超速离心法是当前PDEV分离的常用方法之一,类似于哺乳动物细胞EV的分离。该方法依靠高速离心力将不同密度和大小的颗粒分离,是一种经典的EV分离方法,主要分为差速离心法和密度梯度离心法两种。

3.1.1 差速离心法

差速离心法是一种基于离心力逐步增加分离颗粒的技术。与哺乳动物EV不同,植物样本的前处理更为复杂,需要额外的裁剪枝叶^[67]、压榨并进行研磨及浸泡处理,去除花青素等色素小分子。然后再通过低速离心(300~500 g)去除细胞和较大的细

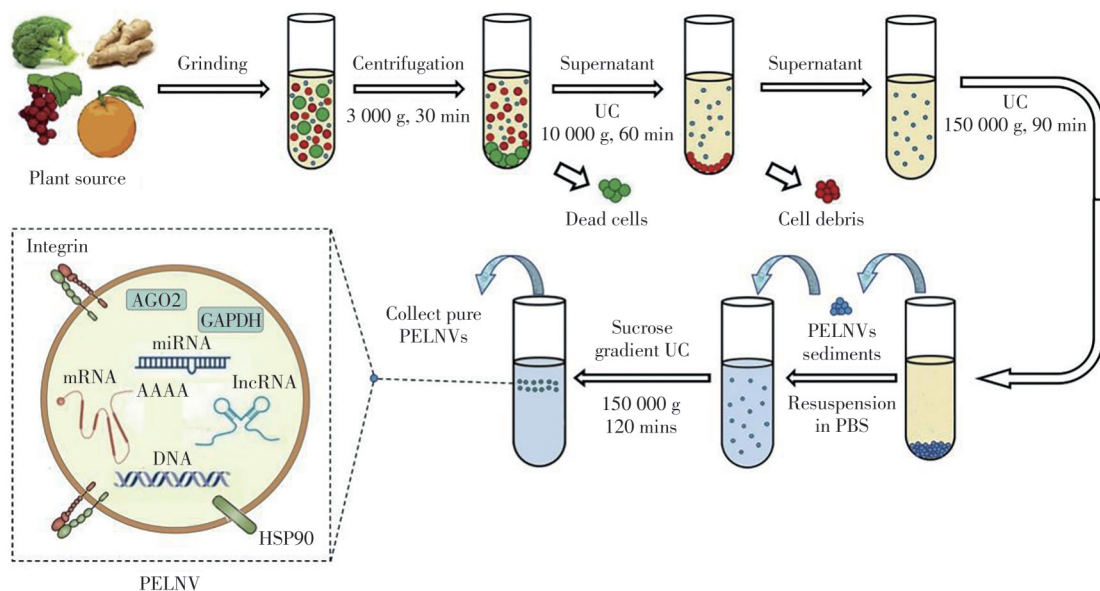
胞碎片,然后中速离心(2 000~3 000 g)去除更大的微粒。接着,高速离心(10 000~20 000 g)去除较大的胞器,如线粒体和叶绿体。最后,使用超高速离心(100 000 g)来沉淀PDEV。

3.1.2 密度梯度离心法

密度梯度离心法通过在密度梯度介质(如蔗糖或碘克沙醇)中进行超高速离心,将PDEV与其他细胞碎片或亚细胞成分分离^[68]。由于PDEV的浮力密度不同于其他细胞器,密度梯度离心可以进一步提高分离纯度。这种方法尤其适合PDEV的纯化,因为植物细胞质复杂,存在大量的多糖和其他高分子杂质,密度梯度离心法能够有效区分这些杂质和EV(图10)。超速离心法的主要优点在于其相对成熟,能够分离大量样本,且实验设备易得。然而,它的缺点也较为明显。首先,植物细胞中存在大量的多糖、纤维素等物质,这些成分容易在离心过程中与EV混杂在一起,影响分离的纯度。其次,超高速离心可能会导致PDEV的形态发生变化或结构受损,影响后续功能研究。此外,离心法耗时较长,尤其是在处理大体积样本时,效率较低。

3.2 超滤法

超滤法是另一种常用的分离方法,通过不同孔径的滤膜将样本中的不同大小的颗粒进行分离。罗伯蒂斯(Robertis)等人^[71]用10 kDa的超滤管提取了蓝莓衍生的外泌体样纳米颗粒(blueberry-derived exosome-like nanoparticle, B-ELN),并研究了人稳定内皮细胞系(EA.hy926)对B-ELN的细胞摄取以

图10 基于超速离心法分离PDEV^[68]Figure 10 Separation of PDEV based on ultracentrifugation^[68]

及B-ELN调节炎症基因表达的能力。实验结果表明,EA.hy926细胞以剂量依赖性方式内化B-ELN;与对照相比,用B-ELN预处理可对抗TNF- α 诱导的活性氧生成和细胞活力丧失,并调节TNF- α 诱导的29个基因的差异表达。与超速离心法相比,超滤法的优势在于速度较快且操作步骤较为简单。尤其是在大体积样本的处理过程中,超滤法能够在短时间内完成样品的初步分离。此外,超滤法对PDEV的结构影响较小,能够较好地保持其形态和功能,适合下游的功能分析或活性研究。

然而,由于PDEV的尺寸和形态多样,部分囊泡可能在滤膜的孔隙中丢失或被卡住,从而影响回收率。此外,植物细胞的多糖和其他高分子物质可能导致滤膜堵塞,影响过滤效率。为了避免这种情况,通常结合其他技术(如离心或酶处理^[72])来优化超滤法的应用。

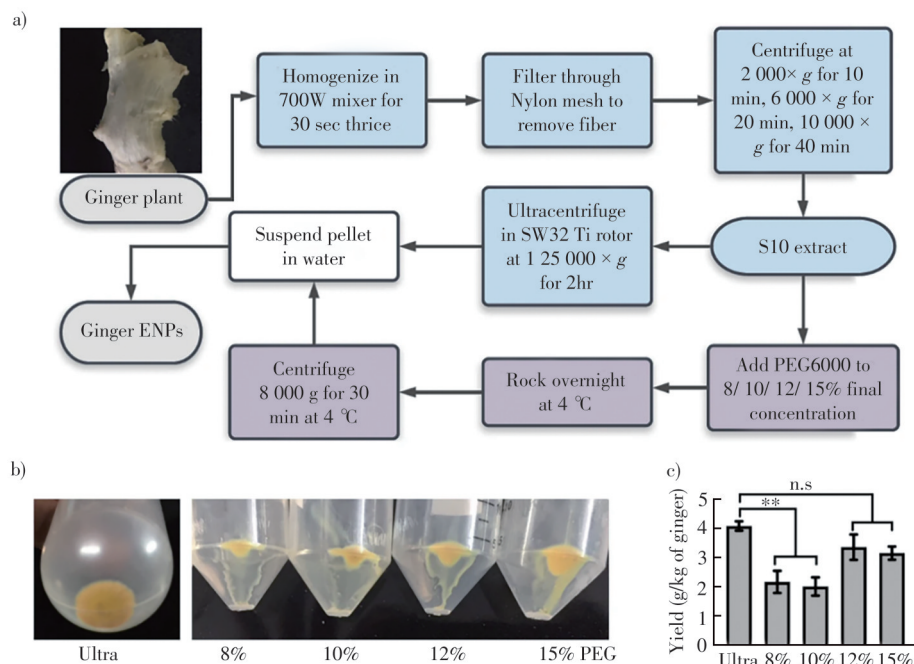
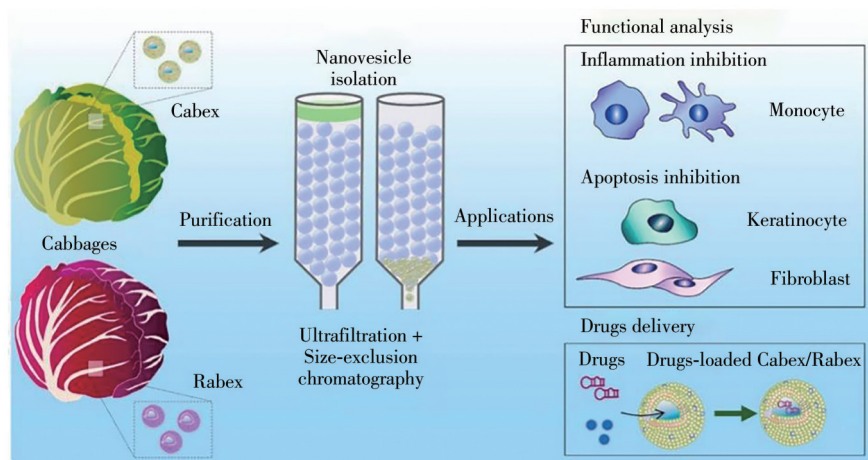
3.3 聚合物沉淀法

现有的聚合物沉淀法通常采用分子量为6 000~20 000 Da的聚乙二醇^[73]。卡拉里卡尔(Kalarikkal)等人^[74]开发了一种经济高效的基于聚乙二醇的方法,用于从姜根茎中分离EV。该方法使用不同的PEG 6 000浓度,可以回收60%至90%的EV(图11)。用PEG沉淀法提取的EV表现出与超滤法提取的EV几乎相同的尺寸、Zeta电位和生化组成(如蛋白质、脂质、miRNA和生物活性含量等)。此外,与ultra-EV类似,PEG-EV可被小鼠巨噬细胞有效吸

收,并保护细胞免受过氧化氢诱导的氧化应激。在此基础上,该课题组又进一步研究了pH对PEG沉淀法的影响。实验发现,在低pH条件(pH 4和5)下进行PEG沉淀时,生姜EV的回收率高出4—5倍^[75]。与在中性和碱性pH值下纯化的EV相比,低pH值纯化的生姜EV具有更高水平的总多酚含量。通过qRT-PCR,验证了在低pH值下纯化的生姜EV中存在能够预测靶向SARS-CoV-2的miRNA。刘建辉课题组用质量百分比8%的PEG 8 000提取了大蒜衍生的外泌体(garlic-derived exosome, GDE),研究发现GDE在脂多糖诱导的THP-1巨噬细胞中显示出极强的抗炎活性^[76],GDE的给药明显缓解了高脂饮食喂养小鼠肝脏中脂滴的积累和肝功能障碍。聚合物沉淀法虽然经济高效,但耗时仍较长,且在提取的过程中,脂蛋白和聚合物之间可能会发生沉淀,导致EV的纯度下降^[77]。

3.4 尺寸排阻色谱法

尺寸排阻色谱法是一种基于分子量大小进行分离的方法。尤(You)等人^[78]采用尺寸排阻色谱结合超滤的方法,成功从卷心菜和紫甘蓝中分离出外泌体样纳米囊泡(图12),并研究了分离的外泌体样纳米囊泡在哺乳动物细胞中的生理效应,包括增殖、炎症调节和细胞凋亡抑制等方面。实验结果显示,卷心菜和紫甘蓝来源的EV均促进细胞增殖,且显著抑制炎症和细胞凋亡,表明了植物来源的EV具有广泛的生物医学应用潜力。

图 11 基于 PEG6 000 沉淀法纯化生姜来源的 EV^[74]Figure 11 Purification of ginger derived EV using PEG6 000^[74]图 12 卷心菜来源的 EV 分离及其功能研究^[78]Figure 12 Schematic illustration of cabbage derived EV and its functional research^[78]

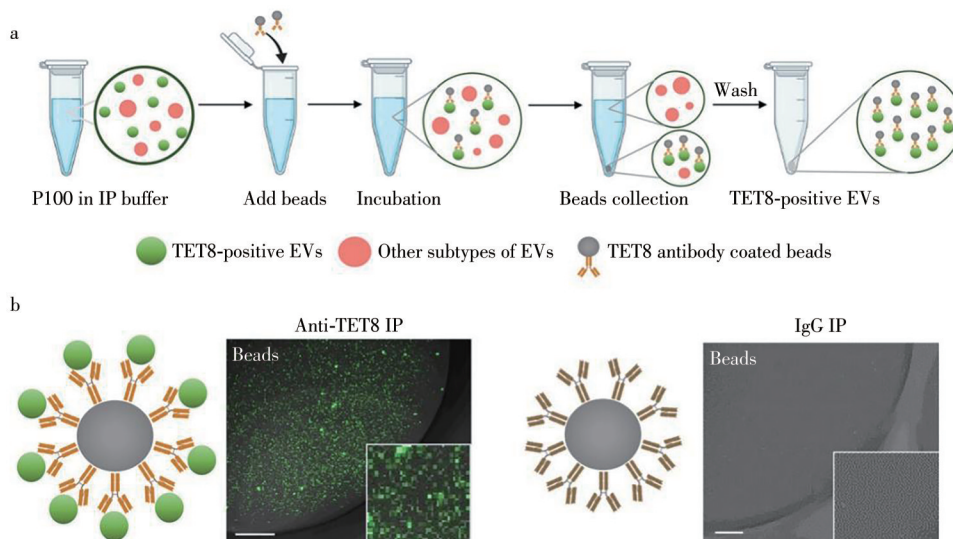
3.5 免疫捕获法

免疫捕获法依赖于使用特定的抗体来识别相应的 EV 膜蛋白质标志物,如哺乳动物 EV 表面的 CD9、CD63 等跨膜蛋白。迄今为止,对于植物细胞来源的 EV 而言,仍然缺乏特定的标志物,因此该方法的适用范围较小,普适性不高。目前为止,仅在拟南芥中发现了 EV 标志物,而其他植物的 EV 标志物仍在探索中。拟南芥的跨膜四蛋白样基因表达 TET8,该蛋白在结构上与哺乳动物的 CD63 相似^[56,79-81]。何(He)等人^[57]通过使用包被有靶向 TET8 的 EC2 囊外环结构域的抗体的磁珠,能够特异性捕获

TET8 阳性的 EV(图 13)。使用该方法,能很容易地分离纯化植物中特定亚型的 EV。

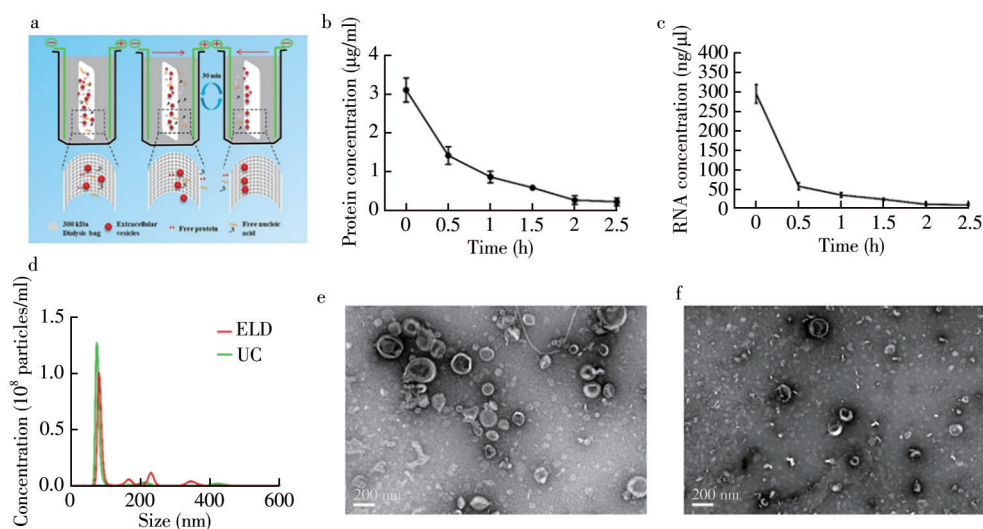
3.6 电场透析法

研究人员利用 PDEV 表面的天然负电荷,开发了电场透析的方法来提取植物中的 EV。如杨(Yang)等人^[82]提出了一种基于电泳和透析的高效分离 PDEV 的方法(命名为 ELD),该方法耗时较短,且不需要特殊的设备。该课题组使用 ELD,从柠檬汁中分离了柠檬衍生的细胞外囊泡(lemon-derived extracellular vesicle, LDEV)。在电场作用下, LDEV 外部的颗粒穿过膜(图 14)。每隔 30 min

图13 基于免疫捕获法捕获拟南芥中的EV^[57]Figure 13 Capture of EV in *Arabidopsis Thaliana* by immunocapture method^[57]

更换一次电泳缓冲液,并改变电泳的方向,以避免膜孔被LDEV堵塞。将柠檬汁装入透析袋中,不同电荷的杂质从透析袋中释放出来,而LDEV在电场力下留在透析袋中。通过ELD方法提取的LDEV通过纳米颗粒示踪技术和透射电子显微镜证实,分离的LDEV与金标准超速离心法的EV具

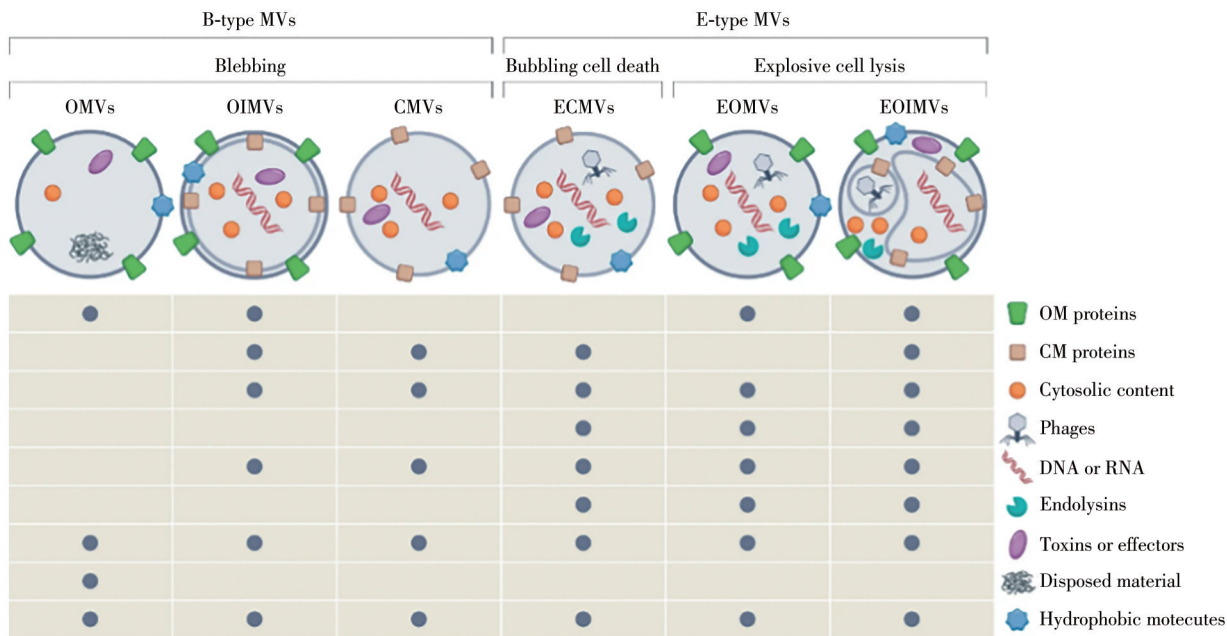
有相似的大小和数量完整的囊泡(图14)。次年,该课题组又采用ELD的方法提取了苦瓜衍生的细胞外囊泡^[83](bitter melon-derived extracellular vesicle, BMEV),并研究了BMEV在增强治疗效果和降低口腔鳞状细胞癌对5-FU的耐药性方面的潜力。

图14 基于电场透析法分离的LDEV及其表征^[82]Figure 14 Isolation and characterization of LDEV based on electric field dialysis^[82]

4 微生物来源的EV分离方法

微生物细胞外囊泡是由细菌、真菌等微生物释放到细胞外环境的小膜性囊泡^[84-85],通常直径在40~400 nm之间^[86]。微生物EV的形成机制较哺乳动物和植物复杂,具有不同结构和组成的细菌膜囊泡类型具有

不同的生物发生途径(图15)。细菌的细胞外囊泡(bacterial extracellular vesicle, BEV),如革兰氏阴性菌的外膜囊泡(outer membrane vesicle, OMV),形成途径有两条^[87],一是通过细胞膜向外突起并从细胞壁中脱落形成^[88]。二是通过爆炸性细胞裂解形成。革兰氏阳性菌虽然缺乏外膜,但也能通过肽聚糖细胞壁生成囊泡^[89]。

图 15 不同类型的细菌膜囊泡的生物发生途径^[86]Figure 15 Biogenetic pathways of different types of bacterial membrane vesicles^[86]

微生物 EV 的组成复杂,包含细胞膜成分、蛋白质、脂多糖、磷脂、核酸和其他次生代谢物^[90-92]。与哺乳动物 EV 不同的是,微生物 EV 中往往富含毒性蛋白^[93]、抗生素抗性基因和病原因子^[94],这些囊泡不仅在细胞通讯中起作用,还在微生物的致病性和环境适应性中发挥关键作用^[95-97]。随着对微生物 EV 研究的深入,分离这些囊泡成为理解其生物学功能的基础^[98]。然而,由于微生物 EV 的生物发生途径较为复杂,且容易受环境等外部因素的影响,因此其大小和成分通常变化较大^[99]。同时 BEV 的尺寸与细胞碎片、小分子代谢物高度相似,分离它们的技术难度较大。

4.1 超速离心法

超速离心法是目前最常用于分离微生物 EV 的技术,特别是在研究革兰氏阴性细菌和真菌 EV 方面。该方法依赖于强大的离心力,根据不同颗粒的大小和密度将它们从细胞培养物或环境样本中分离出来。前文所述,主要通过梯度离心,逐步提高离心力来分离 EV。Wang 等人^[100]通过超速离心法从基因改造的金黄色葡萄球菌中纯化了 EV。动物实验证明,基因工程改造表达的解毒溶细胞素金黄色葡萄球菌突变体的 EV,在小鼠中具有免疫原性,可引发溶细胞素中和抗体,并在致命败血症模型中保护动物。

与哺乳动物、植物 EV 相同,为了提高分离纯度,可结合密度梯度离心法,通过使用密度梯度介

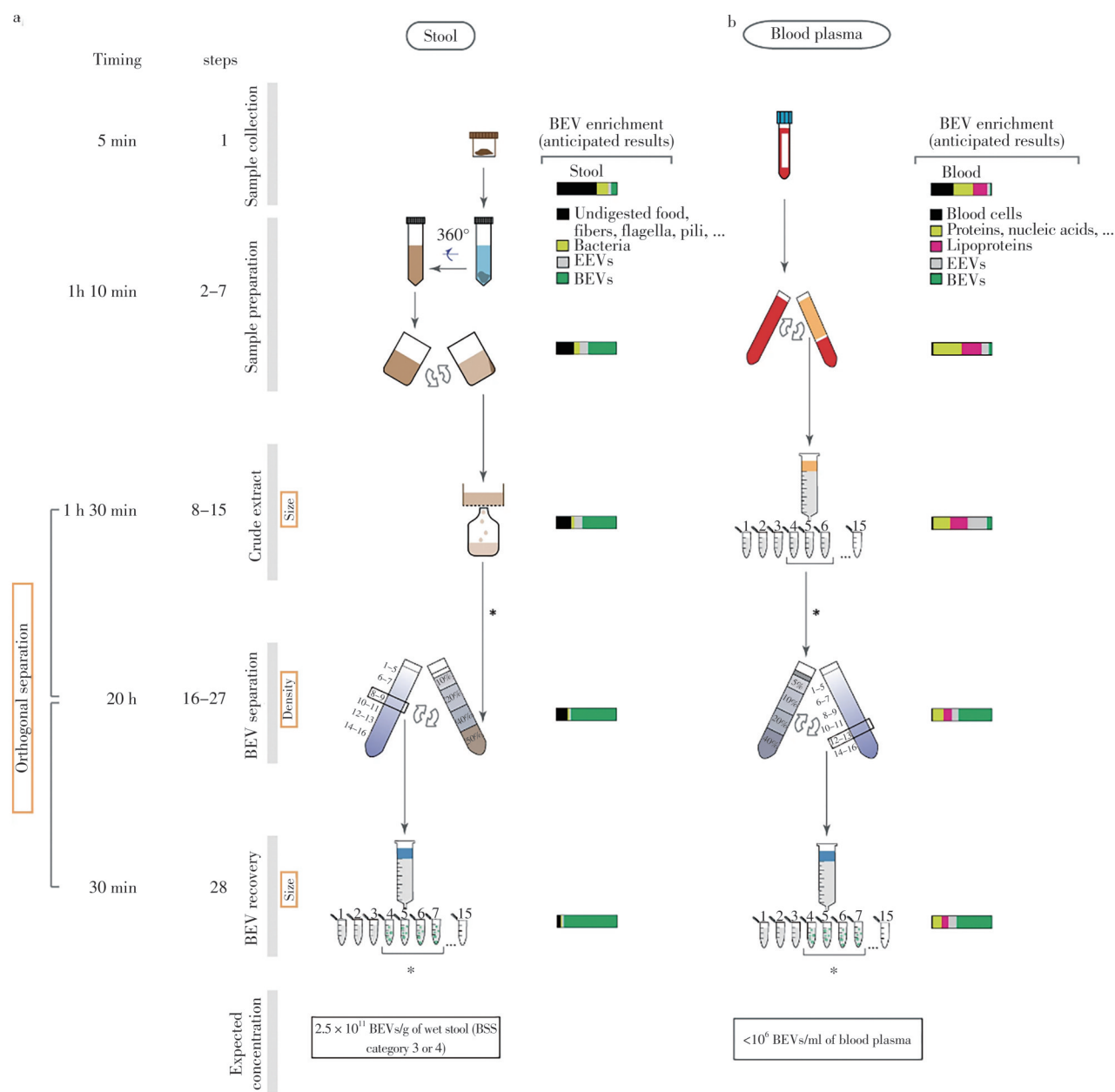
质,在超高速离心的作用下,按照 EV 的浮力密度进行进一步分离。微生物 EV 的密度通常介于 1.1~1.2 g/mL 之间,因此可以通过密度梯度有效区分 EV 和其他污染物。

4.2 联合分离法

其他的分离方法如超滤、沉淀法、体积排阻色谱等,如前文所述,此处不再赘述。每种不同的分离方法有其自身的优缺点,因此越来越多的科学家们采取了多种手段进行联合分离。如塔肯斯(Tulkens)等人^[101]结合超滤、尺寸排阻色谱和密度梯度离心三种方法对人血浆和粪便中的 BEV 进行分离。该分离程序如下所示(图 16),首先通过超滤制备粗提取物,从而充分去除细胞碎片、纤维、菌毛和鞭毛等。然后将粗提取物与高密度碘克沙醇溶液混合,并叠加低密度碘克沙醇溶液,形成密度梯度。自下而上的密度梯度离心允许进一步分离 BEV 与粗提取物中存在的其他生物成分,如一些低分子量的蛋白质和纤维等。最后通过 SEC 从提取物中分离和回收 BEV,同时去除残留的碘克沙醇,避免干扰生化表征。该分离程序是无标记的,可保持 BEV 的完整性,并通过使用自动化处理器确保了实验的可重复性。

4.3 其他方法

类似于沉淀法,大江健三郎(Oishi)等人^[102]通过硫酸铵沉淀法^[103]制备了牙龈卟啉单胞菌囊泡。首先将硫酸铵以 40% 饱和浓度添加到培养上清液中,并搅拌 5 h。然后将混合物以 25 000 g 离心 20 min,

图 16 BEV 的分离程序^[101]Figure 16 Illustrative overview of the BEV separation protocol^[101]

将沉淀悬浮在 50 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.2) 中, 并进行透析。透析后, 将悬浮液以 40 000 g 离心 30 min, 得到的沉淀即为 BEV。然后再将盐浓度升高至质量百分比为 75% 饱和, 以富集非 BEV 的相关蛋白^[104]。韦 (Wei) 等人^[105] 提出了一种基于广谱抗菌 ϵ -聚-L-赖氨酸 (ϵ -PL) 的分离策略, 以相对较低的离心速度 (10 000 g) 沉淀 BEV (图 17)。与标准的超速离心策略相比, 该方法可以廉价且快速地从大量培养基中富集 BEV。通过调节介质的 pH 值和离子强度来回收沉淀的 BEV, 然后进行超滤以去除 ϵ -PL。实验结果表明, ϵ -PL 沉淀的 BEV 形态、大小

和蛋白质组成与通过超速离心纯化的 BEV 相当。此外, ϵ -PL 沉淀的 BEV 保留了良好的生物活性。

5 总结展望

EV 作为生物体间重要的细胞通讯工具, 其结构、组成及功能在不同生物体中表现出多样性。哺乳动物、植物和微生物的 EV 不仅在形态上有所差异, 而且在分离方法上也需要根据其来源、生理条件以及应用场景进行调整和优化。不同种类生物的 EV 分离面临不同的挑战, 适用的分离技术在效率、纯度和分离规模上各有优缺点。

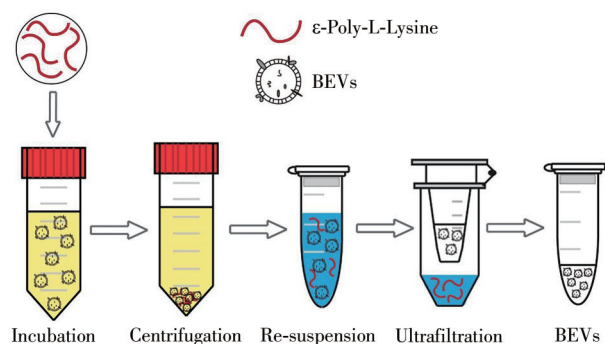


图 17 基于 ϵ -PL 的方法从细菌培养基中分离 BEV^[105]

Figure 17 Schematic of the BEV isolation from the bacterial culture medium using the ϵ -PL-based method^[105]

本文对不同来源的 EV 分离方法进行了介绍,如超速离心、超滤、尺寸排阻色谱、免疫捕获以及微流控技术等。这些方法各有优势和劣势,但共同为 EV 研究提供了丰富的选择。目前,还没有“一刀切”的独立方法能够达到简单快速、高纯度且高通量和高收率地分离 EV,仍然需要多种不同的方法联合使用。目前,超速离心依然是不同生物样品分离 EV 的首选方法。近年来,基于电场和声场的新兴分离技术在 EV 研究领域中也备受关注。未来的研究不仅需提高现有技术的效率和纯度,还需要开发全新的分离手段,以应对不同生物体系下 EV 分离的复杂需求。此外,随着 EV 在疾病诊断和治疗中的应用潜力被逐步发掘,分离富集技术的改进也将为精准医学和个性化治疗带来新的机遇。综上,开发高效的 EV 分离方法对于推动 EV 领域的发展具有重要意义,值得进一步深入探索。

参考文献:

- [1] WELSH J A, GOBERDHAN D C I, O'DRISCOLL L, *et al.* Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): From basic to advanced approaches[J]. *J Extracell Vesicles*, 2024, 13(2): e12404. DOI: 10.1002/jev2.12404.
- [2] CHENG L, HILL A F. Therapeutically harnessing extracellular vesicles[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2022, 21(5): 379-399. DOI: 10.1038/s41573-022-00410-w.
- [3] KALLURI R, LEBLEU V S. The biology, function, and biomedical applications of exosomes[J]. *Science*, 2020, 367(6478): eaau6977. DOI: 10.1126/science.aau6977.
- [4] VAGNER T, CHIN A, MARISCAL J, *et al.* Protein Composition Reflects Extracellular Vesicle Heterogeneity[J]. *Proteomics*, 2019, 19(8): e1800167. DOI: 10.1002/pmic.201800167.
- [5] ZABOROWSKI M P, BALAJ L, BREAKFIELD X O, *et al.* Extracellular Vesicles: Composition, Biological Relevance, and Methods of Study[J]. *Bioscience*, 2015, 65(8): 783-797. DOI: 10.1093/biosci/biv084.
- [6] XIA Y, ZHANG J, LIU G, *et al.* Immunogenicity of Extracellular Vesicles[J]. *Adv Mater*, 2024, 36(33): e2403199. DOI: 10.1002/adma.202403199.
- [7] KALLURI R. The biology and function of extracellular vesicles in immune response and immunity[J]. *Immunity*, 2024, 57(8): 1752-1768. DOI: 10.1016/j.immuni.2024.07.009.
- [8] BECKER A, THAKUR B K, WEISS J M, *et al.* Extracellular Vesicles in Cancer: Cell-to-Cell Mediators of Metastasis[J]. *Cancer Cell*, 2016, 30(6): 836-848. DOI: 10.1016/j.ccell.2016.10.009.
- [9] JEPPESEN D K, FENIX A M, FRANKLIN J L, *et al.* Reassessment of Exosome Composition[J]. *Cell*, 2019, 177(2): 428-445. DOI: 10.1016/j.cell.2019.02.029.
- [10] KALLURI R, MCANDREWS K M. The role of extracellular vesicles in cancer[J]. *Cell*, 2023, 186(8): 1610-1626. DOI: 10.1016/j.cell.2023.03.010.
- [11] LI P, KASLAN M, LEE S H, *et al.* Progress in Exosome Isolation Techniques[J]. *Theranostics*, 2017, 7(3): 789-804. DOI: 10.7150/thno.18133.
- [12] LI H, LIU Y, LIN Y, *et al.* Cardiac repair using regenerating neonatal heart tissue-derived extracellular vesicles[J]. *Nature Communications*, 2025, 16(1): 1292. DOI: 10.1038/s41467-025-56384-x.
- [13] BIRCH L A. Engineering extracellular vesicles for therapeutic delivery in ischaemic stroke[J]. *Nature Reviews Cardiology*, 2025, 22(4): 219. DOI: 10.1038/s41569-025-01122-5.
- [14] HAN X, SAENGOW C, JU L, *et al.* Exosome-coated oxygen nanobubble-laden hydrogel augments intracellular delivery of exosomes for enhanced wound healing[J]. *Nature Communications*, 2024, 15(1): 3435. DOI: 10.1038/s41467-024-47696-5.
- [15] YÁÑEZ-MÓ M, SILJANDER P R, ANDREU Z, *et al.* Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions[J]. *J Extracell Vesicles*, 2015, 4: 27066. DOI: 10.3402/jev.v4.27066.
- [16] S E L A, MÄGER I, BREAKFIELD X O, *et al.* Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2013, 12(5): 347-357. DOI: 10.1038/nrd3978.
- [17] TRAN P H L, WANG T, YIN W, *et al.* Development of a nanoamorphous exosomal delivery system as an effective biological platform for improved encapsula-

- tion of hydrophobic drugs [J]. *Int J Pharm*, 2019, 566: 697-707. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2019.06.028.
- [18] CHEN Y, DOUANNE N, WU T, *et al.* Leveraging nature's nanocarriers: Translating insights from extracellular vesicles to biomimetic synthetic vesicles for biomedical applications [J]. *Science Advances*, 2025, 11(9): eads5249. DOI: 10.1126/sciadv.ads5249.
- [19] SHEN Q, HUANG Z, YAO J, *et al.* Extracellular vesicles-mediated interaction within intestinal microenvironment in inflammatory bowel disease [J]. *J Adv Res*, 2022, 37: 221-233. DOI: 10.1016/j.jare.2021.07.002.
- [20] DING J Y, CHEN M J, WU L F, *et al.* Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles in skin wound healing: roles, opportunities and challenges [J]. *Mil Med Res*, 2023, 10(1): 36. DOI: 10.1186/s40779-023-00472-w.
- [21] FU X, SONG J, YAN W, *et al.* The biological function of tumor-derived extracellular vesicles on metabolism [J]. *Cell Commun Signal*, 2023, 21(1): 150. DOI: 10.1186/s12964-023-01111-6.
- [22] SHU S, YANG Y, ALLEN C L, *et al.* Purity and yield of melanoma exosomes are dependent on isolation method [J]. *J Extracell Vesicles*, 2020, 9(1): 1692401. DOI: 10.1080/20013078.2019.1692401.
- [23] ZHANG M, JIN K, GAO L, *et al.* Methods and Technologies for Exosome Isolation and Characterization [J]. *Small Methods*, 2018, 2(9): 1800021. DOI: 10.1002/smt.201800021.
- [24] DOYLE L M, WANG M Z. Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis [J]. *Cells*, 2019, 8(7): 727. DOI: 10.3390/cells8070727.
- [25] SIMONSEN J B. What Are We Looking At? Extracellular Vesicles, Lipoproteins, or Both? [J]. *Circ Res*, 2017, 121(8): 920-922. DOI: 10.1161/circresaha.117.311767.
- [26] IWAI K, YAMAMOTO S, YOSHIDA M, *et al.* Isolation of Extracellular Vesicles in Saliva Using Density Gradient Ultracentrifugation [J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1660: 343-350. DOI: 10.1007/978-1-4939-7253-1_27.
- [27] IWAI K, MINAMISAWA T, SUGA K, *et al.* Isolation of human salivary extracellular vesicles by iodixanol density gradient ultracentrifugation and their characterizations [J]. *J Extracell Vesicles*, 2016, 5: 30829. DOI: 10.3402/jev.v5.30829.
- [28] HE L, ZHU D, WANG J, *et al.* A highly efficient method for isolating urinary exosomes [J]. *Int J Mol Med*, 2019, 43(1): 83-90. DOI: 10.3892/ijmm.2018.3944.
- [29] MERCHANT M L, POWELL D W, WILKEY D W, *et al.* Microfiltration isolation of human urinary exosomes for characterization by MS [J]. *Proteomics Clinical Applications*, 2010, 4(1): 84-96. DOI: 10.1002/prca.200800093.
- [30] KONOSHENKO M Y, LEKCHNOV E A, VLASSOV A V, *et al.* Isolation of Extracellular Vesicles: General Methodologies and Latest Trends [J]. *Biomed Res Int*, 2018, 2018: 8545347. DOI: 10.1155/2018/8545347.
- [31] MUSUMECI T, LEONARDI A, BONACCORSO A, *et al.* Tangential Flow Filtration Technique: An Overview on Nanomedicine Applications [J]. *Pharm Nanotechnol*, 2018, 6(1): 48-60. DOI: 10.2174/2211738506666180306160921.
- [32] ZENG X, YI X, CHEN L, *et al.* Characterization and bioassays of extracellular vesicles extracted by tangential flow filtration [J]. *Regen Med*, 2022, 17(3): 141-154. DOI: 10.2217/rme-2021-0038.
- [33] LEBRETON B, BROWN A, VAN REIS R. Application of high-performance tangential flow filtration (HPTFF) to the purification of a human pharmaceutical antibody fragment expressed in *Escherichia coli* [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2008, 100(5): 964-974. DOI: 10.1002/bit.21842.
- [34] LATHE G H, RUTHVEN C R. The separation of substances on the basis of their molecular weights, using columns of starch and water [J]. *Biochem J*, 1955, 60(4): 665-674.
- [35] MONDAL S K, WHITESIDE T L. Immunoaffinity-Based Isolation of Melanoma Cell-Derived and T Cell-Derived Exosomes from Plasma of Melanoma Patients [J]. *Methods Mol Biol*, 2021, 2265: 305-321. DOI: 10.1007/978-1-0716-1205-7_23.
- [36] GÁMEZ-VALERO A, MONGUIÓ-TORTAJADA M, CARRERAS-PLANELLA L, *et al.* Size-Exclusion Chromatography-based isolation minimally alters Extracellular Vesicles' characteristics compared to precipitating agents [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 33641. DOI: 10.1038/srep33641.
- [37] MA C, JIANG F, MA Y, *et al.* Isolation and Detection Technologies of Extracellular Vesicles and Application on Cancer Diagnostic [J]. *Dose Response*, 2019, 17(4): 1559325819891004. DOI: 10.1177/1559325819891004.
- [38] KASTELOWITZ N, YIN H. Exosomes and mi-

- crovesicles: identification and targeting by particle size and lipid chemical probes[J]. *Chembiochem*, 2014, 15(7): 923-928. DOI: 10.1002/cbic.201400043.
- [39] RUPP A K, RUPP C, KELLER S, *et al.* Loss of Ep-CAM expression in breast cancer derived serum exosomes: role of proteolytic cleavage[J]. *Gynecol Oncol*, 2011, 122(2): 437-446. DOI: 10.1016/j.ygyno.2011.04.035.
- [40] HUANG T, DENG C X. Current Progresses of Exosomes as Cancer Diagnostic and Prognostic Biomarkers[J]. *Int J Biol Sci*, 2019, 15(1): 1-11. DOI: 10.7150/ijbs.27796.
- [41] LI Q, ZHANG Z, WANG F, *et al.* Reversible zwitterionic coordination enables rapid, high-yield, and high-purity isolation of extracellular vesicles from biofluids[J]. *Science Advances*, 2023, 9(15): ead4568. DOI: 10.1126/sciadv.adf4568.
- [42] SOARES MARTINS T, CATITA J, MARTINS ROSA I, *et al.* Exosome isolation from distinct biofluids using precipitation and column-based approaches[J]. *PLoS One*, 2018, 13(6): e0198820. DOI: 10.1371/journal.pone.0198820.
- [43] SANTANA S M, ANTONYAK M A, CERIONE R A, *et al.* Microfluidic isolation of cancer-cell-derived microvesicles from heterogeneous extracellular shed vesicle populations[J]. *Biomed Microdevices*, 2014, 16(6): 869-877. DOI: 10.1007/s10544-014-9891-z.
- [44] NAQUIN T D, CANNING A J, GU Y, *et al.* Acoustic separation and concentration of exosomes for nucleotide detection: ASCENDx[J]. *Sci Adv*, 2024, 10(10): eadm8597. DOI: 10.1126/sciadv.adm8597.
- [45] WU M, OUYANG Y, WANG Z, *et al.* Isolation of exosomes from whole blood by integrating acoustics and microfluidics[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, 114(40): 10584-10589. DOI: 10.1073/pnas.1709210114.
- [46] LEE K, SHAO H, WEISSLEDER R, *et al.* Acoustic purification of extracellular microvesicles[J]. *ACS Nano*, 2015, 9(3): 2321-2327. DOI: 10.1021/nn506538f.
- [47] 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. DOI: 10.1021/acs.nano.7b00549.
- [48] SHI L, KUHNELL D, BORRA V J, *et al.* Rapid and label-free isolation of small extracellular vesicles from biofluids utilizing a novel insulator based dielectrophoretic device[J]. *Lab Chip*, 2019, 19(21): 3726-3734. DOI: 10.1039/c9lc00902g.
- [49] KUMAR K, KIM E, ALHAMMADI M, *et al.* Recent advances in microfluidic approaches for the isolation and detection of exosomes[J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2023, 159: 116912. DOI: 10.1016/j.trac.2022.116912.
- [50] 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. DOI: 10.1021/acs.analchem.8b03272.
- [51] SHAO H, CHUNG J, LEE K, *et al.* Chip-based analysis of exosomal mRNA mediating drug resistance in glioblastoma[J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 6999. DOI: 10.1038/ncomms7999.
- [52] KU A, RAVIN, YANG M, *et al.* A urinary extracellular vesicle microRNA biomarker discovery pipeline; from automated extracellular vesicle enrichment by acoustic trapping to microRNA sequencing[J]. *PLOS ONE*, 2019, 14(5): e0217507. DOI: 10.1371/journal.pone.0217507.
- [53] REZELI M, GIDLÖF O, EVANDER M, *et al.* Comparative Proteomic Analysis of Extracellular Vesicles Isolated by Acoustic Trapping or Differential Centrifugation[J]. *Analytical Chemistry*, 2016, 88(17): 8577-8586. DOI: 10.1021/acs.analchem.6b01694.
- [54] YEH Y T, ZHOU Y, ZOU D, *et al.* Rapid Size-Based Isolation of Extracellular Vesicles by Three-Dimensional Carbon Nanotube Arrays[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2020, 12(11): 13134-13139. DOI: 10.1021/acsami.9b20990.
- [55] WANG Z, WU H J, FINE D, *et al.* Ciliated micropillars for the microfluidic-based isolation of nanoscale lipid vesicles[J]. *Lab Chip*, 2013, 13(15): 2879-2882. DOI: 10.1039/c3lc41343h.
- [56] FENG J, XIU Q, HUANG Y, *et al.* Plant-Derived Vesicle-Like Nanoparticles as Promising Biotherapeutic Tools: Present and Future[J]. *Adv Mater*, 2023, 35(24): e2207826. DOI: 10.1002/adma.202207826.
- [57] HE B, CAI Q, QIAO L, *et al.* RNA-binding proteins contribute to small RNA loading in plant extracellular vesicles[J]. *Nat Plants*, 2021, 7(3): 342-352. DOI: 10.1038/s41477-021-00863-8.
- [58] JIN Z, NA J, LIN X, *et al.* Plant-derived exosome-like nanovesicles: A novel nanotool for disease therapy[J]. *Heliyon*, 2024, 10(9): e30630. DOI: 10.1016/j.heliyon.2024.e30630.
- [59] SALL I M, FLAVIU T A. Plant and mammalian-derived extracellular vesicles: a new therapeutic ap-

- proach for the future [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2023, 11: 1215650. DOI: 10.3389/fbioe.2023.1215650.
- [60] DING Y, WANG J, CHUN LAI J H, *et al.* Exo70E2 is essential for exocyst subunit recruitment and EXPO formation in both plants and animals [J]. *Mol Biol Cell*, 2014, 25 (3): 412-426. DOI: 10.1091/mbc.E13-10-0586.
- [61] WANG J, DING Y, WANG J, *et al.* EXPO, an exocyst-positive organelle distinct from multivesicular endosomes and autophagosomes, mediates cytosol to cell wall exocytosis in Arabidopsis and tobacco cells [J]. *Plant Cell*, 2010, 22 (12): 4009-4030. DOI: 10.1105/tpc.110.080697.
- [62] CONG M, TAN S, LI S, *et al.* Technology insight: Plant-derived vesicles-How far from the clinical biotherapeutics and therapeutic drug carriers? [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2022, 182: 114108. DOI: 10.1016/j.addr.2021.114108.
- [63] HATSUGAI N, IWASAKI S, TAMURA K, *et al.* A novel membrane fusion-mediated plant immunity against bacterial pathogens [J]. *Genes Dev*, 2009, 23 (21): 2496-2506. DOI: 10.1101/gad.1825209.
- [64] CUI Y, CAO W, HE Y, *et al.* A whole-cell electron tomography model of vacuole biogenesis in Arabidopsis root cells [J]. *Nat Plants*, 2019, 5 (1): 95-105. DOI: 10.1038/s41477-018-0328-1.
- [65] CAO M, DIAO N, CAI X, *et al.* Plant exosome nanovesicles (PENs): green delivery platforms [J]. *Mater Horiz*, 2023, 10 (10): 3879-3894. DOI: 10.1039/d3mh01030a.
- [66] SIKORSKA N, ZUBER H, GOBERT A, *et al.* RNA degradation by the plant RNA exosome involves both phosphorolytic and hydrolytic activities [J]. *Nat Commun*, 2017, 8 (1): 2162. DOI: 10.1038/s41467-017-02066-2.
- [67] CHEN A, HE B, JIN H. Isolation of Extracellular Vesicles from Arabidopsis [J]. *Curr Protoc*, 2022, 2 (1): e352. DOI: 10.1002/cpz1.352.
- [68] DAD H A, GU T W, ZHU A Q, *et al.* Plant Exosome-like Nanovesicles: Emerging Therapeutics and Drug Delivery Nanoplatforms [J]. *Mol Ther*, 2021, 29 (1): 13-31. DOI: 10.1016/j.ymthe.2020.11.030.
- [69] WANG B, ZHUANG X, DENG Z B, *et al.* Targeted Drug Delivery to Intestinal Macrophages by Bioactive Nanovesicles Released from Grapefruit [J]. *Molecular Therapy*, 2014, 22 (3): 522-534. DOI: 10.1038/mt.2013.190.
- [70] YANG L Y, LI C Q, ZHANG Y L, *et al.* Emerging Drug Delivery Vectors: Engineering of Plant-Derived Nanovesicles and Their Applications in Biomedicine [J]. *Int J Nanomedicine*, 2024, 19: 2591-2610. DOI: 10.2147/ijn.S454794.
- [71] DE ROBERTIS M, SARRA A, D'ORIA V, *et al.* Blueberry-Derived Exosome-Like Nanoparticles Counter the Response to TNF- α -Induced Change on Gene Expression in EA. hy926 Cells [J]. *Biomolecules*, 2020, 10 (5): 742. DOI: 10.3390/biom10050742.
- [72] ZHAO Q, LIU G, LIU F, *et al.* An enzyme-based system for extraction of small extracellular vesicles from plants [J]. *Scientific Reports*, 2023, 13 (1): 13931. DOI: 10.1038/s41598-023-41224-z.
- [73] GARCÍA-ROMERO N, MADURGA R, RACKOV G, *et al.* Polyethylene glycol improves current methods for circulating extracellular vesicle-derived DNA isolation [J]. *J Transl Med*, 2019, 17 (1): 75. DOI: 10.1186/s12967-019-1825-3.
- [74] KALARIKKAL S P, PRASAD D, KASIAPPAN R, *et al.* A cost-effective polyethylene glycol-based method for the isolation of functional edible nanoparticles from ginger rhizomes [J]. *Scientific Reports*, 2020, 10 (1): 4456. DOI: 10.1038/s41598-020-61358-8.
- [75] SURESH A P, KALARIKKAL S P, PULLAREDDY B, *et al.* Low pH-Based Method to Increase the Yield of Plant-Derived Nanoparticles from Fresh Ginger Rhizomes [J]. *ACS Omega*, 2021, 6 (27): 17635-17641. DOI: 10.1021/acsomega.1c02162.
- [76] LIU J, LI W, BIAN Y, *et al.* Garlic-derived exosomes regulate PFKFB3 expression to relieve liver dysfunction in high-fat diet-fed mice via macrophage-hepatocyte crosstalk [J]. *Phytomedicine*, 2023, 112: 154679. DOI: 10.1016/j.phymed.2023.154679.
- [77] MARTÍNEZ-GREENE J A, HERNÁNDEZ-ORTEGA K, QUIROZ-BAEZ R, *et al.* Quantitative proteomic analysis of extracellular vesicle subgroups isolated by an optimized method combining polymer-based precipitation and size exclusion chromatography [J]. *J Extracell Vesicles*, 2021, 10 (6): e12087. DOI: 10.1002/jev2.12087.
- [78] YOU J Y, KANG S J, RHEE W J. Isolation of cabbage exosome-like nanovesicles and investigation of their biological activities in human cells [J]. *Bioact Mater*, 2021, 6 (12): 4321-4332. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2021.04.023.
- [79] FENG J, XIU Q, HUANG Y, *et al.* Plant-Derived Vesicle-Like Nanoparticles as Promising Biotherapeutic Tools: Present and Future [J]. *Advanced Materi-*

- als*, 2023, 35(24): 2207826. DOI: 10.1002/adma.202207826.
- [80] HUANG Y, WANG S, CAI Q, *et al.* Effective methods for isolation and purification of extracellular vesicles from plants[J]. *J Integr Plant Biol*, 2021, 63(12): 2020-2030. DOI: 10.1111/jipb.13181.
- [81] CAI Q, QIAO L, WANG M, *et al.* Plants send small RNAs in extracellular vesicles to fungal pathogen to silence virulence genes[J]. *Science*, 2018, 360(6393): 1126-1129. DOI: 10.1126/science.aar4142.
- [82] YANG M, LIU X, LUO Q, *et al.* An efficient method to isolate lemon derived extracellular vesicles for gastric cancer therapy [J]. *J Nanobiotechnology*, 2020, 18(1): 100. DOI: 10.1186/s12951-020-00656-9.
- [83] YANG M, LUO Q, CHEN X, *et al.* Bitter melon derived extracellular vesicles enhance the therapeutic effects and reduce the drug resistance of 5-fluorouracil on oral squamous cell carcinoma [J]. *J Nanobiotechnology*, 2021, 19(1): 259. DOI: 10.1186/s12951-021-00995-1.
- [84] WEN M, WANG J, OU Z, *et al.* Bacterial extracellular vesicles: A position paper by the microbial vesicles task force of the Chinese society for extracellular vesicles[J]. *Interdisciplinary Medicine*, 2023, 1(3): e20230017. DOI: 10.1002/INMD.20230017.
- [85] SOLER N, MARGUET E, VERBAVATZ J M, *et al.* Virus-like vesicles and extracellular DNA produced by hyperthermophilic archaea of the order Thermococcales [J]. *Res Microbiol*, 2008, 159(5): 390-399. DOI: 10.1016/j.resmic.2008.04.015.
- [86] TOYOFUKU M, SCHILD S, KAPARAKIS-LIASKOS M, *et al.* Composition and functions of bacterial membrane vesicles[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2023, 21(7): 415-430. DOI: 10.1038/s41579-023-00875-5.
- [87] TOYOFUKU M, NOMURA N, EBERL L. Types and origins of bacterial membrane vesicles[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2019, 17(1): 13-24. DOI: 10.1038/s41579-018-0112-2.
- [88] GUERRERO-MANDUJANO A, HERNÁNDEZ-CORTEZ C, IBARRA J A, *et al.* The outer membrane vesicles: Secretion system type zero[J]. *Traffic*, 2017, 18(7): 425-432. DOI: 10.1111/tra.12488.
- [89] BROWN L, WOLF J M, PRADOS-ROSALES R, *et al.* Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2015, 13(10): 620-630. DOI: 10.1038/nrmicro3480.
- [90] TURNBULL L, TOYOFUKU M, HYNEN A L, *et al.* Explosive cell lysis as a mechanism for the biogenesis of bacterial membrane vesicles and biofilms[J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 11220. DOI: 10.1038/ncomms11220.
- [91] LEE E Y, CHOI D S, KIM K P, *et al.* Proteomics in gram-negative bacterial outer membrane vesicles[J]. *Mass Spectrometry Reviews*, 2008, 27(6): 535-555. DOI: 10.1002/mas.20175.
- [92] KIM J H, LEE J, PARK J, *et al.* Gram-negative and Gram-positive bacterial extracellular vesicles [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2015, 40: 97-104. DOI: 10.1016/j.semedb.2015.02.006.
- [93] ZHAO G, JONES MELISSA K. Role of Bacterial Extracellular Vesicles in Manipulating Infection[J]. *Infection and Immunity*, 2023, 91(5): e0043922. DOI: 10.1128/iai.00439-22.
- [94] BERLEMAN J, AUER M. The role of bacterial outer membrane vesicles for intra- and interspecies delivery[J]. *Environ Microbiol*, 2013, 15(2): 347-354. DOI: 10.1111/1462-2920.12048.
- [95] KOEPPEN K, HAMPTON T H, JAREK M, *et al.* A Novel Mechanism of Host-Pathogen Interaction through sRNA in Bacterial Outer Membrane Vesicles[J]. *PLoS Pathog*, 2016, 12(6): e1005672. DOI: 10.1371/journal.ppat.1005672.
- [96] SJÖSTRÖM A E, SANDBLAD L, UHLIN B E, *et al.* Membrane vesicle-mediated release of bacterial RNA [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 15329. DOI: 10.1038/srep15329.
- [97] BONNINGTON K E, KUEHN M J. Protein selection and export via outer membrane vesicles[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1843(8): 1612-1619. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2013.12.011.
- [98] ZHENG X, GONG T, LUO W, *et al.* *Fusobacterium nucleatum* extracellular vesicles are enriched in colorectal cancer and facilitate bacterial adhesion [J]. *Science Advances*, 2024, 10(38): eado0016. DOI: 10.1126/sciadv.ado0016.
- [99] GURUNATHAN S, KIM J H. Bacterial extracellular vesicles: Emerging nanoplateforms for biomedical applications[J]. *Microb Pathog*, 2023, 183: 106308. DOI: 10.1016/j.micpath.2023.106308.
- [100] WANG X, THOMPSON C D, WEIDENMAIER C, *et al.* Release of *Staphylococcus aureus* extracellular vesicles and their application as a vaccine platform [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 1379. DOI: 10.1038/s41467-018-03847-z.
- [101] TULKENS J, DE WEVER O, HENDRIX A. Ana-

- lyzing bacterial extracellular vesicles in human body fluids by orthogonal biophysical separation and biochemical characterization[J]. *Nature Protocols*, 2020, 15(1): 40-67. DOI: 10.1038/s41596-019-0236-5.
- [102] OISHI S, MIYASHITA M, KISO A, *et al.* Cellular locations of proteinases and association with vesicles in *Porphyromonas gingivalis*[J]. *Eur J Med Res*, 2010, 15(9): 397-402. DOI: 10.1186/2047-783x-15-9-397.
- [103] BAUMAN S J, KUEHN M J. Purification of outer membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa* and their activation of an IL-8 response[J]. *Microbes and Infection*, 2006, 8(9): 2400-2408. DOI: 10.1016/j.micinf.2006.05.001.
- [104] KLIMENTOVÁ J, STULÍK J. Methods of isolation and purification of outer membrane vesicles from gram-negative bacteria[J]. *Microbiological Research*, 2015, 170: 1-9. DOI: 10.1016/j.micres.2014.09.006.
- [105] WEI S, JIAO D, XING W. A rapid method for isolation of bacterial extracellular vesicles from culture media using epsilon-poly-L-lysine that enables immunological function research[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 930510. DOI: 10.3389/fimmu.2022.930510.



刘定斌,男,教授,博士,博士生导师,国家杰出青年科学基金获得者。近年来,已在生物医学检测和临床诊断领域发表论文110余篇,总影响因子>1 000,论文他引7 000余次,H指数43。近五年作为通讯作者在*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, *Sci. Adv.*, *Nat. Commun.*, *J. Am. Chem. Soc.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*等国际知名刊物上发表论文40多篇,多篇论文被选为期刊封面、Hot Paper及ESI高被引论文。申请中国专利12件,已授权9件,并实现7件专利的成果转化;主持科技部国家重点研发计划课题1项、国家自然科学基金杰出青年基金项目1项和面上项目5项(已结题3项)、军委后勤重点项目1项及多项横向课题。Email: liudb@nankai.edu.cn

(责任编辑:张伟杰)