

间充质干细胞小细胞外囊泡的分离纯化方法比较

李婷婷 刘燕

作者单位: 530021 南宁 广西医科大学附属肿瘤医院乳腺及骨软组织肿瘤内科

【摘要】目的 探讨在间充质干细胞上清液中分离纯化小细胞外囊泡的优化方法。**方法** 对比差速离心[differential (ultra)centrifugation, dUC]、聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)沉淀和QIAGEN试剂盒法3种标准细胞外囊泡分离程序,并基于标准程序分别进行超滤浓缩、0.22 μm 滤膜过滤或0.45 μm 滤膜过滤改良方案提取小细胞外囊泡,通过比较各分离方法的操作时长和简易程度,并分别用透射电镜、纳米颗粒跟踪分析技术(nanoparticle tracking analysis, NTA)和Western blot评估小细胞外囊泡的形态结构、粒径分布和标志蛋白表达情况,分析各分离方法提取的小细胞外囊泡质量和效率。采用CCK-8实验和Transwell迁移实验评估改良方法提取的小细胞外囊泡对乳腺癌细胞增殖和迁移能力的影响。**结果** dUC法、PEG沉淀法和QIAGEN试剂盒法3种分离方法均可分离出小细胞外囊泡,其中QIAGEN试剂盒法操作时长最短,平均为48 min,添加超滤浓缩步骤后延长至93 min($P<0.0001$)。PEG沉淀法的操作时间最长,平均为487 min,添加超滤浓缩步骤后延长至547 min($P<0.0001$)。dUC法平均操作时间为217 min,添加超滤浓缩步骤后延长至274 min($P<0.0001$)。各样本在透射电镜下均观察到典型的“茶托”样结构,粒径分布范围除QIAGEN试剂盒法在200 nm以上,其余均在30~200 nm之间,其中dUC+0.45 μm 滤膜过滤组一个视野中观察到的小细胞外囊泡典型结构最多且最完整。Western blot检测结果显示各方法提取的样本中均有阳性标志蛋白CD9、CD63、TSG101表达,不表达阴性标志物calnexin,但0.22 μm 滤膜过滤后,各方法的小细胞外囊泡标志蛋白条带均变浅。NTA结果显示,dUC+0.45 μm 滤膜过滤的小细胞外囊泡占比最高,达94.86%。不同方法提取的样本的粒径分布图显示,dUC法标准流程和dUC+0.45 μm 滤膜过滤组的NTA结果显示为单峰,曲线流畅。取dUC+0.45 μm 滤膜过滤的样本进行乳腺癌细胞表型实验,结果显示,细胞增殖和迁移能力均增强(均 $P<0.05$)。**结论** dUC法是一种有效的间充质干细胞小细胞外囊泡分离方法,在进行超速离心前对细胞上清液进行0.45 μm 滤膜过滤,可以提高小细胞外囊泡的质量。

【关键词】 肿瘤微环境;间充质干细胞;小细胞外囊泡;分离纯化

【中图分类号】 R737.9

【文献标识码】 A

【文章编号】 1674-5671(2024)04-0424-09

DOI: 10.3969/j.issn.1674-5671.2024.04.07

Comparison of the separation and purification methods of small extracellular vesicles in mesenchymal stem cells

LI Tingting, LIU Yan (Department of Breast and Bone Soft Tissue Oncology, Guangxi Medical University Cancer Hospital, Nanning 530021, China)

Corresponding author: LIU Yan, E-mail: liuyan@gxmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To explore the optimal method for separating and purifying small extracellular vesicles from the supernatant of mesenchymal stem cells. **Methods** Three standard extracellular vesicle separation procedures, including differential (ultra) centrifugation (dUC), polyethylene glycol (PEG) precipitation and QIAGEN kit method, were compared; small extracellular vesicles were extracted through ultrafiltration concentration and filtration with a 0.22 μm or 0.45 μm filter membrane, respectively, based on the standard procedure. The quality of the extracted extracellular vesicles and the efficiency of the separation methods were analyzed by comparing the operation duration and simplicity of the separation methods, and evaluating the morphological structure, particle size distribution and marker protein expression of small extracellular vesicles through transmission electron microscopy, nanoparticle tracking analysis technology (NTA) and Western blot, respectively. The CCK-8 assay and Transwell migration assay were used to evaluate the effects of small extracellular vesicles extracted by the modified methods on the proliferation and migration of breast cancer cells. **Results** Small extracellular vesicles

【基金项目】 广西自然科学基金区域高发疾病研究联合专项资助项目(2023GXNSFDA026041);国家自然科学基金项目(81960477)

【通信作者】 刘燕, E-mail: liuyan@gxmu.edu.cn

could be isolated by all these three methods, and the QIAGEN kit method has the shortest operation duration, 48 min on average, and up to 93 min after ultrafiltration concentration ($P<0.0001$). The PEG precipitation method had the longest operation duration, 487 min on average, and up to 547 minutes with additional ultrafiltration concentration step ($P<0.0001$). The average operation duration of the dUC method was 217 minutes; after the addition of the ultrafiltration concentration step, it was up to 274 minutes ($P<0.0001$). The typical "saucer" structure was observed in all samples under transmission electron microscopy, and the particle sizes of each sample ranged between 30 and 200 nm except for that in the QIAGEN kit method, which was above 200 nm. Among them, the dUC+0.45 μm filter membrane group had the largest number and the most complete small extracellular vesicles structures in one field of view. Western blot results showed that positive marker proteins CD9, CD63 and TSG101 were expressed in the samples extracted by different methods, but the negative marker calnexin was not expressed. However, after 0.22 μm filter membrane filtration, the bands of small extracellular vesicle marker proteins became shallow. The NTA results showed that the proportion of small extracellular vesicles filtered by dUC+0.45 μm filter membrane was the highest, reaching 94.86%. The particle size distribution maps of samples extracted by different methods showed that the NTA results of dUC standard and the dUC+0.45 μm filter membrane groups showed a unimodal and smooth curve. Samples filtered by dUC+0.45 μm filter membrane were selected for breast cancer cell phenotype experiment, and the results showed that cell proliferation and migration were enhanced (all $P<0.05$). **Conclusions** dUC is an effective method for separating small extracellular vesicles from mesenchymal stem cells. The quality of small extracellular vesicles can be improved by filtering the cell supernatant with 0.45 μm filter membrane before ultracentrifugation.

【Key words】 Tumor microenvironment; Mesenchymal stem cells; Small extracellular vesicles; Separation and purification

肿瘤微环境 (tumor microenvironment, TME) 中的间充质干细胞 (mesenchymal stem cell, MSC) 衍生的细胞外囊泡 (extracellular vesicles, EVs) 可能在 TME 中提供了一个重要的细胞间通讯途径^[1]。本团队在研究 TME 对乳腺癌进展的影响及其机制中观察到 MSC 可以调控乳腺癌进展, 并通过间接接触发挥作用^[2]。因此推测, MSC 可能通过向 TME 中分泌 EVs 而影响乳腺癌进展。

EVs 是由大多数真核细胞分泌到细胞外环境中, 并且具有脂质双层膜结构、不能自我复制 (即不含功能性细胞核) 的颗粒^[3]。其中小细胞外囊泡 (small extracellular vesicles, sEV) 又称外泌体 (exosomes, exo), 直径为 30~200 nm, 囊泡内包含其来源细胞的部分核酸、蛋白、脂质等多种生物活性分子^[4]。EVs 可通过向其他受体细胞输送其内容物, 直接或间接参与多种生理和病理过程^[5]。sEV 的双层膜结构具有天然稳定性, 在癌症的临床诊断方面优于传统的循环分子标志物 (如 cfDNA、miRNA) 和 CEA、CA125 等常见肿瘤标志物^[6-8]。相较于病理诊断金标准, sEV 具有非侵入性、即时性等优势^[9], 在临床诊断和预后监测中具有重要价值。此外, 基于 EVs 的低免疫原性、相对稳定性和膜穿透性等特性^[10], 目前已开发了许多装载特定药物或信号分子的工程化的 sEV^[11-13], 以实现药物的精准靶向递送。其中, 间充质干细胞分泌的小细胞外囊泡 (mesenchymal stem cell-secreted small extracellular vesicles, MSC-sEV) 应用最为广泛, 在整

形美容、癌症药物靶向治疗等领域均显示出极大的潜力^[14-15]。而随着 MSC-sEV 被广泛应用, sEV 产量和质量提升成为亟需解决的一大难题。

根据 2023 最新版细胞外囊泡指南, EVs 的分离方法主要包括差速离心法 [differential (ultra) centrifugation, dUC]、密度梯度/垫层、尺寸排阻色谱法、基于流体流动或电荷和分子识别的分离方法等^[16]。dUC 具有提取样本纯度高的优势, 是细胞上清中 sEV 分离纯化最常用的方法^[17], 一直以来也被认为是 sEV 提取的金标准^[18]。但是在实际操作过程中, dUC 法的操作复杂性和提取样本量的局限性成为 sEV 研究过程中的一大阻碍^[19]。聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 沉淀法是传统 sEV 分离方法中产量较高的一种方法, 但特异性较低, 往往会伴随杂蛋白或杂质沉淀^[20]。因此, 为了提高 MSC-sEV 分离质量和效率, 本研究在标准 dUC 法的超速离心步骤前和 PEG 沉淀步骤前添加超滤浓缩或滤膜过滤, 同时选用基于膜亲和原理的试剂盒 (QIAGEN exoEasy Maxi) 进行 sEV 分离纯化并鉴定, 分析各方案提取样品的质量和效率, 以期为后续的 MSC-sEV 研究提供更有效的分离方法。

1 材料与方法

1.1 细胞系及主要试剂

人脐带间充质干细胞 (human umbilical cord mesenchymal stem cell, hUC-MSC) 获赠于第二军医大学附属东方肝胆外科医院, 为冻存的第二代细胞 (P2)。乳

腺癌 MCF 7 细胞和 MDA-MB-231 细胞购于中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。MEM α 培养基、高糖 DMEM 培养基购于美国 Thermo Fisher Scientific 公司;胎牛血清(FBS)购于新西兰 NEWZERUM 公司;青霉素-链霉素混合溶液、胰蛋白酶-EDTA 溶液(0.25%)、CCK-8 试剂盒购于翌圣生物科技(上海)股份有限公司;1 \times PBS 缓冲液购于北京索莱宝科技有限公司;QIAGEN exoEasy Maxi 试剂盒购于德国 QIAGEN 公司;PEG 8000 购于生工生物工程(上海)股份有限公司;Anti-CD63(C-term)、Anti-CD9(Center)、Anti-TSG101 购于美国 ABGENT 公司;calnexin 购于美国 Cell Signaling Technology 公司;4% 多聚甲醛、结晶紫染色液购于上海碧云天生物技术股份有限公司。

1.2 细胞培养

MCF 7 和 MDA-MB-231 细胞均培养在 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 的高糖 DMEM 完全培养基(10%FBS+1% 青霉素-链霉素混合液)中。hUC-MSC 培养及条件培养基的获取:复苏冻存的 P2 代 hUC-MC, 接种至 10 cm 培养皿中,在 MEM α 完全培养基(10%FBS+1% 青霉素-链霉素混合液)中培养至 90%~95% 密度时,用胰酶消化 3~5 min,离心重悬细胞沉淀并均匀接种至 2 个 T175 培养瓶中,继续在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养。次日换液,待细胞状态稳定,生长密度达到 70% 时,换成 60 mL 无血清的 MEM α 培养基继续培养 48 h。收集上述方法培养的细胞条件培养基,用胰酶消化细胞并用 countstar 细胞计数仪进行细胞计数。低速冷冻离心机提前预冷至 4 $^{\circ}$ C,细胞条件培养基收集完成后立即以 1 528 r/min 离心 10 min,以去除悬浮细胞,随后收集上清液用于后续的 sEV 分离纯化。

1.3 sEV 的分离纯化

1.3.1 dUC 法提取 hUC-MSC 条件培养基中的 sEV

取上述预处理后的条件培养基 48 mL,4 $^{\circ}$ C 下以 4 830 r/min 离心 10 min。收集上清液,4 $^{\circ}$ C 下以 8 819 r/min 离心 30 min。收集上清液,转移至超离管,每管 8 mL,用 0.22 μ m 一次性无菌式针头过滤器过滤后的 1 \times PBS 溶液配平。4 $^{\circ}$ C 下以 29 600 r/min 离心 70 min,PBS 洗涤沉淀,继续超速离心 70 min,离心结束后加入 400 μ L PBS 重悬 sEV 沉淀并分装储存。

1.3.2 PEG 沉淀法提取 hUC-MSC 条件培养基中的 sEV 取 48 mL 条件培养基,4 $^{\circ}$ C 下以 4 830 r/min 离

心 10 min,收集上清液并按照 1:3 比例与 50% PEG 8000 溶液(称取 25 g PEG 8000 粉末,用灭菌 ddH₂O 定容至 50 mL,搅拌至溶液澄清)充分混匀,置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜。次日以同样条件离心 1 h,弃上清液,用 400 μ L 过滤后的 PBS 重悬 sEV 沉淀,移至 1.5 mL EP 管中,置于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱储存或直接进行后续鉴定。

1.3.3 QIAGEN exoEasy Maxi 试剂盒提取 hUC-MSC 条件培养基中的 sEV 取 48 mL 条件培养基,若是冻存样本可短暂于 37 $^{\circ}$ C 水浴解冻,后续流程均需在室温(15~25 $^{\circ}$ C)条件下进行。根据试剂盒说明书,用 0.8 μ m 滤膜过滤,将条件培养基分成 6 份,每管 8 mL 与 8 mL XBP 缓冲液 1:1 混合,轻轻翻转 5 次,混合液升至室温后转移至 exoEasy 旋转柱上,室温下以 1 972 r/min 离心 1 min。弃去流通液,将柱子放回原收集管。随后加 10 mL XWP 缓冲液至旋转柱内,以 6 236 r/min 离心 1 min。丢弃流通液及收集管,将柱子放入新的收集管中,并加入 400 μ L XE 缓冲液,静置孵育 1 min,1 972 r/min 离心 5 min,此时收集管中的流通液即为 sEV 样品。为充分洗脱柱子内残存的 sEV,将流通液重新加至柱子内,孵育 1 min 后继续以 6 236 r/min 离心 5 min,收集管内的流通液即为最终的 sEV 悬液,将其转移至 1.5 mL EP 管中储存或直接进行后续实验。

1.3.4 用 dUC 法、PEG 沉淀法和 QIAGEN 试剂盒法分别进行超滤浓缩或滤膜过滤处理 在 dUC 法、PEG 沉淀法和 QIAGEN 试剂盒法 3 种方法的不同环节中通过添加超滤浓缩、0.22 μ m 滤膜过滤或 0.45 μ m 滤膜过滤选取最优的 sEV 分离纯化方法。具体操作(图 1)如下:(1)dUC 法在进行超速离心前进行超滤浓缩/0.22 μ m 滤膜过滤/0.45 μ m 滤膜过滤;(2)PEG 沉淀法在加入 50% PEG 溶液前进行超滤浓缩/0.22 μ m 滤膜过滤/0.45 μ m 滤膜过滤;(3)QIAGEN 试剂盒法在 0.8 μ m 滤膜过滤后加 XBP 前进行超滤浓缩/0.22 μ m 滤膜过滤/0.45 μ m 滤膜过滤。其中,超滤浓缩步骤为用 50 kDa 的超滤管进行超滤浓缩,4 $^{\circ}$ C 下以 4 830 r/min 离心 10 min,逐次加入条件培养基并离心,直至 48 mL 的条件培养基被浓缩至 8 mL。

1.3.5 sEV 的储存 用透射电镜(transmission electron microscope,TEM)和纳米颗粒跟踪分析技术(nanoparticle tracking analysis,NTA)检测的样本储存于 4 $^{\circ}$ C 冰箱,提取 24 h 内完成 NTA 检测和 TEM 拍摄;用于 Western

blot检测的样本在蛋白裂解变性后储存在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱,1周内完成实验;将用于细胞实验的sEV样本储于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱以保证活性。

1.4 sEV鉴定

1.4.1 TEM观察sEV结构 sEV样品充分混匀后,用 $10\text{ }\mu\text{L}$ 移液器吸取样品,滴加至铜网正面,静置 $20\sim 25\text{ min}$ 使sEV样品沉淀至铜网表面,随后用滤纸小心接触液滴吸去多余液体,用 $10\text{ }\mu\text{L}$ 乙酸双氧铀进行负染,大约 30 s 后用滤纸吸去多余染料,再用 $10\text{ }\mu\text{L}$ 的 ddH_2O 洗涤, 10 s 后滤纸吸干多余液体,随后在TEM下拍摄 100 nm 比例尺下的sEV结构。

1.4.2 Western blot检测鉴定sEV标志蛋白表达情况 sEV样品用RIPA-PMSF裂解后,用BCA法进行蛋白定量,将不同方法提取的sEV样品蛋白浓度调至 $1\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{L}$,加入 $5\times$ 上样缓冲液,金属浴 $97\text{ }^{\circ}\text{C}$ 加热 5 min 。每孔蛋白上样量为 $15\text{ }\mu\text{L}$, 50 V 下电泳,待溴酚蓝指示剂条带压缩至约 3 mm 时,加大电压至 70 V ,样品进入分离胶后电压调至 120 V 。当目标条带位置跑至分离胶的中间位置时结束电泳,进行转膜和剪膜,在 5% 的脱脂牛奶中封闭 2 h , $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育一抗过夜,次日孵育二抗 2 h 后,进行曝光成像。

1.4.3 NTA检测sEV样本的粒径分布和粒子浓度 将sEV样品充分吹打混匀,取 $100\text{ }\mu\text{L}$ 至EP管中,加入 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜过滤后的PBS进行稀释,充分吹打混匀。打开NanoSight NS300,先用 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜过滤后的灭菌 ddH_2O 清洗检测模块,再用 1 mL 注射器吸取空气吹洗 3 次以去除模块内残留液体。用 1 mL 注射器吸取充分混匀后的sEV样品缓慢匀速注入检测模块。设置软件程序,调焦,使视野清晰,保证视野范围内颗粒呈现不规则布朗运动,且无大的亮泡,然后开始运行,检测完毕后导出数据并分析。

1.5 MSC-sEV处理乳腺癌细胞

取对数生长期的MCF 7和MDA-MB-231细胞并估计细胞数量,将浓度为 1 000 粒子/细胞的sEV样品以换液的方式加到MCF 7和MDA-MB-231细胞中,继续培养 24 h ,随后通过CCK-8实验及Transwell迁移实验评估细胞活力和迁移能力的变化。

1.6 CCK-8法检测乳腺癌细胞活力

消化用MSC-sEV处理后的MCF 7和MDA-MB-231细胞,制备细胞悬液,计数。在96孔板的每孔中接种

$100\text{ }\mu\text{L}$ 的细胞悬液,每孔细胞数为 1×10^4 个。将96孔培养板放入培养箱中培养 12 h ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $5\%\text{ CO}_2$)后,镜下观察细胞贴壁情况及密度,继续培养 24 h 。配置含 $10\%\text{ CCK-8}$ 的培养基,以换液的形式加入96孔板,放入培养箱中孵育 1 h ,然后用酶标仪测定 450 nm 处的光密度(optical density, OD)。细胞活力=(实验组OD值-空白组OD值)/(对照组OD值-空白组OD值)。

1.7 Transwell迁移实验检测乳腺癌细胞迁移能力

细胞消化后用无血清培养基重悬并计数。将细胞悬液稀释至所需浓度,每个Transwell小室接种 2×10^4 个细胞。向24孔板下室加入 $600\text{ }\mu\text{L}$ 的完全培养基($10\%\text{ FBS}$),培养 48 h 后用棉签轻轻擦去小室内膜上未迁移的细胞。PBS润洗 $1\sim 2$ 次后,用 4% 多聚甲醛固定 10 min 。吸弃 4% 多聚甲醛后,用PBS轻轻润洗 $1\sim 2$ 次,结晶紫染色 10 min 。染色后进行洗涤,镜下观察拍照。

1.8 统计学方法

采用GraphPad Prism 8.0、ImageJ软件进行数据处理和统计分析,计量资料以均数 \pm 标准差表示。独立样本 t 检验用于两组样本间的比较,多组样本采用单因素方差分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同sEV分离时间的操作时间和难易程度对比

在dUC法、PEG沉淀法和QIAGEN试剂盒法3种sEV分离标准程序的特定环节进行超滤浓缩或用 $0.22\text{ }\mu\text{m}/0.45\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜进行过滤,以确定可以提高hUC-MSC分泌的sEV质量的分离方法,sEV分离流程如图1所示。

在操作时间方面,3种方法的标准流程与 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜和 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜操作时间相近,故此不分开阐述。QIAGEN试剂盒法标准流程与 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜和 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜操作时间相近,为 $40\sim 53\text{ min}$,平均操作时长为 48 min ,添加超滤浓缩步骤后延长至 93 min ($P<0.0001$)。PEG沉淀法操作最简便,整体操作时间在3种方法中最长,为 $479\sim 492\text{ min}$,平均为 487 min ,添加超滤浓缩步骤后延长至 547 min ($P<0.0001$)。dUC法操作时长居于上述两种方法之间,平均为 217 min (范围: $209\sim 223\text{ min}$),添加超滤浓缩步骤后延长至 274 min ($P<0.0001$)。见图2。

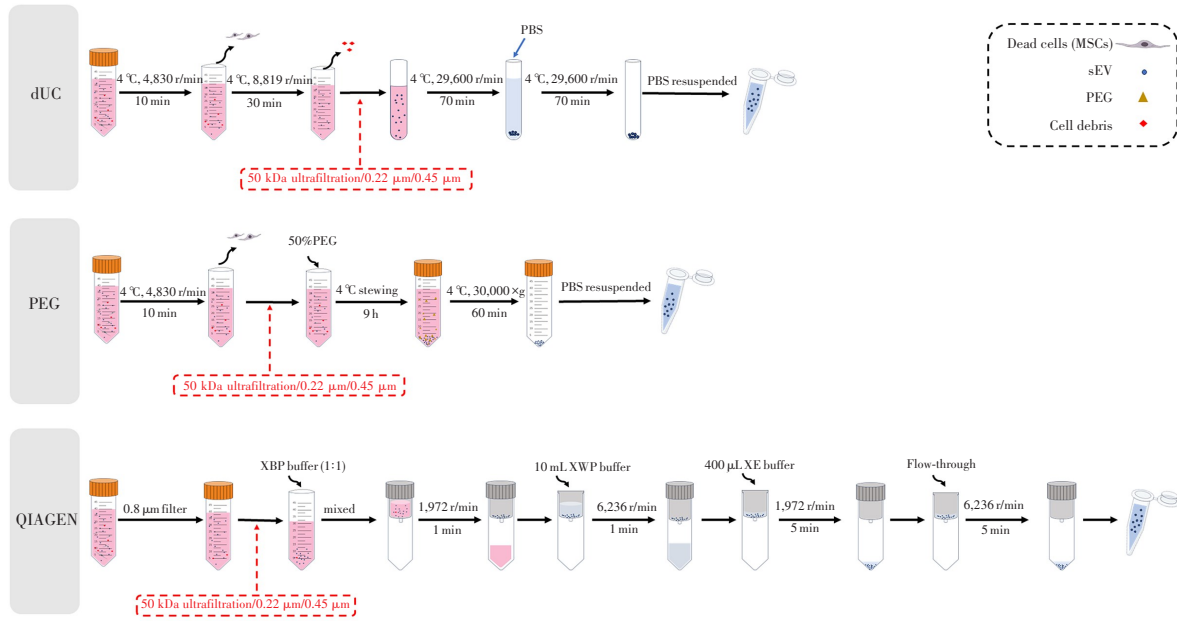
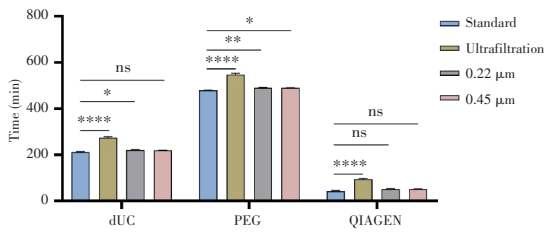


图1 sEV分离流程图

Fig.1 Flow chart of sEV separation



* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; **** $P < 0.0001$; ns $P > 0.05$

图2 不同sEV纯化方法的操作时间对比

Fig.2 Comparison of operation time of different sEV purification methods

2.2 不同方法分离纯化的sEV形态对比

在TEM下观察3种方法提取的sEV,如图3所示,3种方法提取的sEV都可以看到有典型的“茶托”样结构,直径在100 nm左右(范围:30~200 nm),其中QIAGEN试剂盒法提取的sEV平均粒径最大,粒径分布范围在200 nm以上,且视野中具有sEV典型结构的粒子数量最少;PEG沉淀法提取到的sEV背景较为杂乱;标准dUC法提取的样本中具有典型sEV结构的粒子较少。在添加超滤浓缩后,QIAGEN试剂盒法的视野中sEV的尺寸较前降低,大部分颗粒直径在50 nm左右,背景较为干净;dUC法和PEG沉淀法仅在量上有所减少,粒径大小改变不大。用0.22 μm滤膜过滤后,dUC法背景出现的碎片样物质较多;PEG沉淀法和QIAGEN试剂盒法中,用0.22 μm滤膜过滤的粒径

均小于标准和超滤。用0.45 μm滤膜过滤后,3种方法提取到的样本中结构均呈典型的sEV形态,结构完整,且sEV量也没有明显减少,其中dUC法在一个视野中观察到了更多的典型sEV结构。

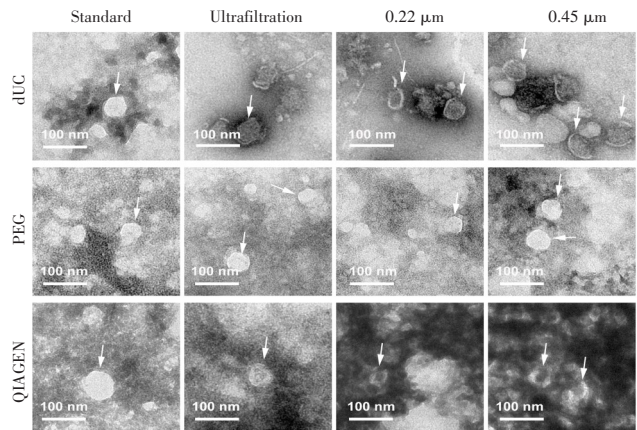


图3 透射电镜下的sEV形态

Fig.3 The morphology of sEV observed by transmission electron microscopy

2.3 不同方法提取的sEV标志蛋白的表达情况

Western blot检测结果(图4)显示,3种方法中标准程序分离的sEV均表达sEV阳性标志蛋白CD9、CD63和TSG101,不表达阴性标志物 calnexin。在添加0.22 μm滤膜过滤后,各组的sEV标志蛋白的条带均变浅,其中在试剂盒法中最为显著。

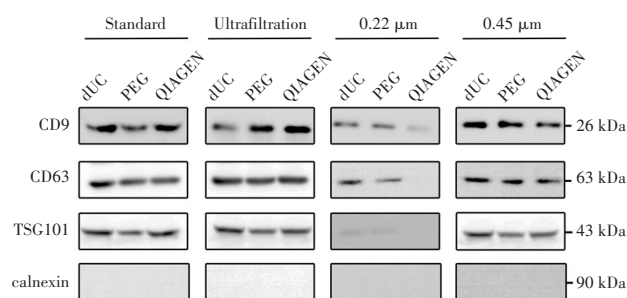


图4 Western blot检测sEV标志蛋白的表达情况

Fig.4 The protein expression of sEV markers detected by Western blot

2.4 不同方法分离纯化的sEV样本粒径分布和纯度对比

为了进一步分析收获的sEV样本的总体情况,采用NTA技术对sEV样本中的颗粒大小和纯度进行分析。分别计算0~30 nm、30~200 nm和200~1 000 nm的粒径范围内的总粒子数,随后计算sEV粒径范围(30~200 nm)内的粒子数占总粒子数的百分比,以估计sEV纯度,结果如表1所示。在所有分离方法中,QIAGEN试剂盒法

的标准程序提取到的样品粒子直径在278.2 nm处的粒子数量最多,即该样品中的峰粒径为278.2 nm,属于大EV范畴;其余方法提取的样品峰粒径均在30~200 nm范围内,说明提取到的主要是sEV。进一步对比不同方法提取的样品中的sEV浓度,结果显示,dUC+0.45 μm滤膜过滤的sEV占比最高,达94.86%。在其他两种dUC改良法中,dUC+超滤浓缩提取的sEV样品纯度最低,为65.97%;dUC+0.22 μm滤膜过滤提取到的样本sEV粒子数最低,为 2.03×10^9 。对比4种PEG方法,标准方法提取的样本中sEV纯度最高,为87.31%;PEG+超滤浓缩法纯度最低,为63.74%。在QIAGEN试剂盒的4种不同处理方法中,标准程序的sEV纯度最低,仅为14.96%,在试剂盒提取EV前对条件培养基分别进行超滤浓缩、0.22 μm滤膜过滤或0.45 μm滤膜过滤,结果显示sEV占比均有所提升,但是粒子数也都有所下降,其中0.45 μm滤膜过滤后,虽然sEV的粒子数下降为 1.35×10^9 ,但提取到的样品中sEV纯度最高,达82.82%。

表1 sEV粒子直径分布信息

Tab.1 sEV particles diameter distribution information

Purification methods	sEV particles diameter (nm)	0-30 nm particles	30-200 nm particles	200-1000 nm particles	Total particles	30-200 nm particles/Total particles
dUC						
Standard	90.2	0.00	3.76×10^9	5.38×10^8	4.30×10^9	87.44%
Ultrafiltration	163.9	0.00	2.52×10^9	1.30×10^9	3.82×10^9	65.97%
0.22 μm	101.4	1.07×10^2	2.03×10^9	4.35×10^8	2.47×10^9	82.52%
0.45 μm	53.1	1.93×10^7	5.90×10^9	3.00×10^8	6.22×10^9	94.86%
PEG						
Standard	94.2	0.00	4.06×10^{10}	5.90×10^9	4.65×10^{10}	87.31%
Ultrafiltration	143.3	0.00	4.94×10^9	2.80×10^9	7.74×10^9	63.74%
0.22 μm	132.4	0.00	1.11×10^{10}	3.54×10^9	1.46×10^{10}	76.03%
0.45 μm	144.5	0.00	1.19×10^{10}	4.05×10^9	1.60×10^{10}	74.38%
QIAGEN						
Standard	278.2	0.00	2.02×10^9	1.14×10^{10}	1.34×10^{10}	14.96%
Ultrafiltration	132.5	0.00	1.62×10^9	4.33×10^8	2.05×10^9	79.02%
0.22 μm	83.6	0.00	1.38×10^9	4.52×10^8	1.83×10^9	75.41%
0.45 μm	113.9	0.00	1.35×10^9	2.83×10^8	1.63×10^9	82.82%

将NTA结果可视化,通过各方法的单独粒径分布图(图5),以及对dUC法、PEG沉淀法和QIAGEN试剂盒法等3种方法的4种不同处理流程分别进行整合(图6),以更直观地对4种不同处理流程进行分析,结果显示,dUC法和PEG沉淀法提取的样本中粒子直径分布范围主要集中在30~200 nm,其中dUC法NTA结果显示为单峰,曲线流畅;而PEG沉淀法杂峰较多,在添加超滤浓缩、0.22 μm滤膜过滤或0.45 μm滤膜过滤

后杂峰数量较少,但粒子数也急剧下降。QIAGEN试剂盒法提取的样本中大囊泡较多,粒径分布范围主要集中在30~400 nm之间,在超滤浓缩、0.22 μm滤膜过滤或0.45 μm滤膜过滤后,粒径分布范围变为30~200 nm之间。

2.5 MSC-sEV促进乳腺癌细胞增殖和迁移能力

根据上述结果,本研究选取sEV在总粒子数中占比最高,即sEV纯度最高的dUC+0.45 μm滤膜过

滤方法,将该方法提取的sEV样本处理乳腺癌细胞,共培养24 h后,CCK-8实验结果(图7A)显示,用MSC-sEV处理后,MCF 7细胞($P<0.0001$)和MDA-MB-231细胞($P=0.030$)的细胞活性均增强,且MCF 7细胞活性增强更为明显;Transwell迁移实验结果(图

7B)显示, MSC-sEV处理后MCF 7细胞($P=0.004$)和MDA-MB-231细胞($P<0.001$)的迁移能力均增强。说明dUC+0.45 μm 滤膜过滤方法分离纯化的sEV在体外可以促进乳腺癌细胞增殖和迁移能力,表明提取的MSC-sEV具有活性,可以满足后续的实验需求。

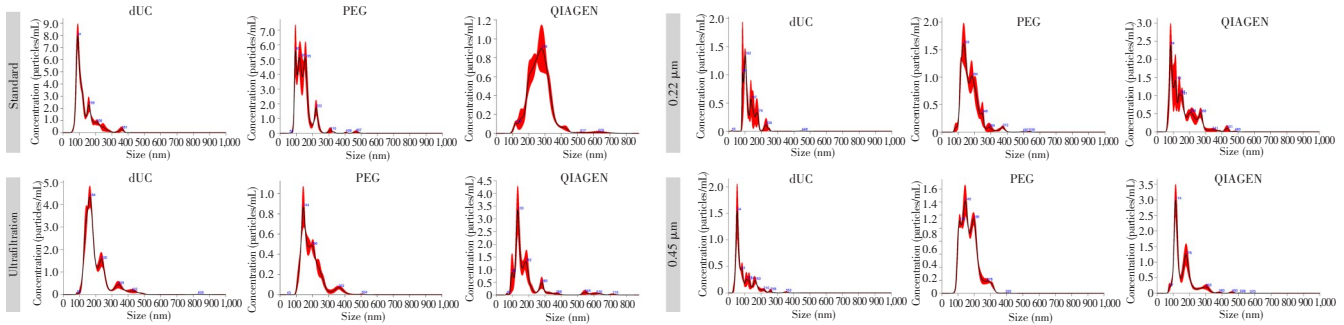


图5 各分离方法的sEV粒径分布图

Fig.5 Size distribution of sEV isolated by different methods

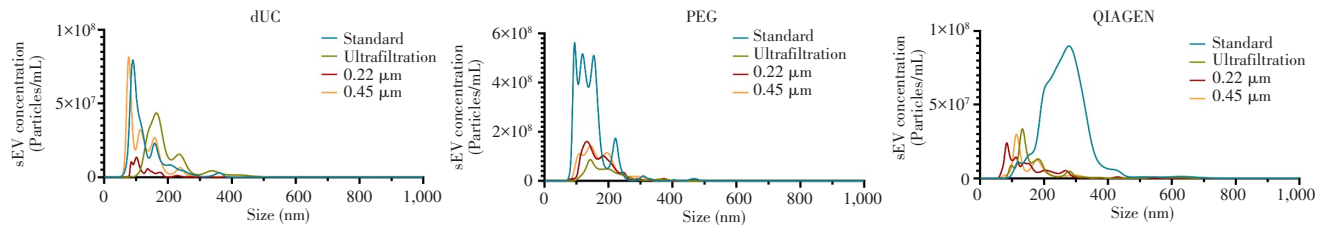
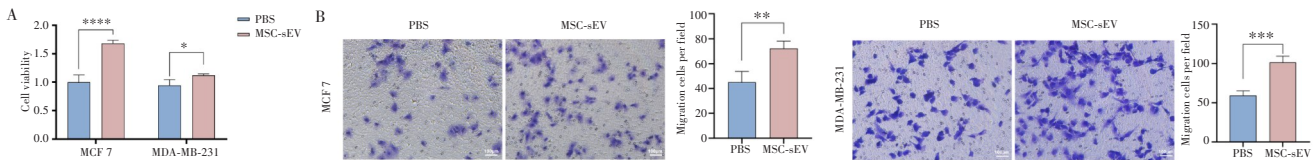


图6 整合的sEV的粒径分布图

Fig.6 Integration of sEV particle size distribution



A: CCK-8 assays detected the cell viability of breast cancer cells treated with MSC-sEV or equivalent PBS after 24 h; B: Transwell migration assay to examine the cell migration ability of breast cancer cells treated with MSC-sEV or equivalent PBS after 24 h. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$

图7 MSC-sEV处理后乳腺癌细胞活性和迁移能力的变化

Fig.7 Changes in activity and migration of breast cancer cells treated with MSC-sEV

3 讨论

近年来, MSC-sEV已成为癌症研究领域的一大热点,而sEV的分离纯化是研究开展的基础,为了提高sEV分离的产量和质量,目前已开发出多种新型sEV分离方法,例如3D切向流过滤、磁珠捕获法和各种基于沉淀亲和原理的试剂盒等^[21-23],但仍各有利弊。一些传统的分离方法如dUC和PEG沉淀法依然具有其特有的优势,其中dUC法具有分离纯度高、杂质少的优点,一直以来被广泛应用于EVs相关机制研究、载

药和液体活检等领域^[24-25]。PEG沉淀法尽管近年来已不再被大多数研究者认可,尤其是在需要分析EVs蛋白质谱等相关研究中,因为容易有杂蛋白干扰,但其产量高和易操作,许多基于该原理的试剂盒也逐渐问世^[26],且该方法在需要分析sEV中的特定微量分子时具有优势。

本研究通过对dUC法、PEG沉淀法和QIAGEN试剂盒法标准流程进行改良,对比各方法的操作时长和难易程度,结果发现用0.22 μm 或0.45 μm 滤膜过滤操作简便,不会明显延长操作时长。但是,超滤浓

缩步骤涉及多次离心,而且超滤膜的通过性能会随着离心次数的增加逐渐降低,导致离心时长增加。尽管超滤会明显增加操作时长,但处理大体积样本时可以通过将其浓缩为小体积样本,从而增加处理效率。

本研究还对提取的 MSC-sEV 进行鉴定,以评估 sEV 分离效果。3 种标准程序的 TEM 结果表明,dUC 法提取的样本中典型的 sEV 结构较少;PEG 沉淀法的背景较为杂乱,可能是提取到了大量杂蛋白或提取过程中存在杂质聚合物沉淀;QIAGEN 试剂盒法的粒径较大,不属于 sEV 范畴。为了提升 sEV 的提取质量,本研究通过添加超滤浓缩、0.22 μm 滤膜过滤或 0.45 μm 滤膜过滤对 dUC、PEG、和 QIAGEN 试剂盒法进行改良,发现超滤浓缩对 sEV 的结构影响不大,仅在 QIAGEN 试剂盒法中减少了 EVs 粒径,属于 sEV 范畴,可能是超滤膜的应用去除了部分大囊泡的干扰;0.22 μm 滤膜过滤也未能在 PEG 沉淀法和 QIAGEN 试剂盒法中得到更优的结果,在 dUC 法中反而发现碎片样物质的增多,可能是在通过滤膜时 sEV 被挤压变形甚至破损。而 0.45 μm 滤膜过滤则得到了较好的结果,尤其是在 dUC 法中,明显增加了典型 sEV 结构粒子的数量,既能一定程度上排除杂质干扰,还能最大程度地保留 sEV 并保证结构完整。Western blot 检测结果发现,各方案提取的样本均能表达 sEV 阳性标志蛋白,说明提取到的是 sEV,但在添加 0.22 μm 滤膜过滤后,条带明显变浅,可能是 0.22 μm 滤膜过滤导致了部分 sEV 的丢失。

根据 NTA 结果,本研究发现,在进行标准 dUC 法、PEG 沉淀法或 QIAGEN 试剂盒法提取 sEV 前,对条件培养基进行超滤浓缩会降低粒子浓度。而对 sEV 纯度的提高只在 QIAGEN 试剂盒法中有所体现,推测可能是在超滤浓缩后,48 mL 的上清液浓缩至 8 mL,使其可以在一个柱子中进行提取,减少了多个柱子操作带来的黏附损耗。dUC 法和 PEG 沉淀法并未经过膜,在离心管中的黏附性较小,因此添加超滤浓缩的操作后反而会使 sEV 部分丢失,导致最终呈现的结果是超滤浓缩降低了 dUC 法和 PEG 沉淀法标准程序提取的 sEV 纯度。而用 0.22 μm 滤膜过滤也降低了 3 种标准方法提取的样本中的粒子浓度。0.45 μm 滤膜过滤对粒子浓度的损耗较少,且能提高 sEV 纯度,是一种比较折中的方案,尤其在 dUC 方法中,其优势最为明显。

基于上述结果,本研究推荐在 dUC 法开始超速离心前用 0.45 μm 滤膜对 hUC-MSC 的条件培养基进行过滤,其得到的 sEV 样品质量可能更高。但是,在需要大量 sEV 进行实验且无需考虑杂蛋白干扰时,可选取操作最简便且无设备容量限制的 PEG 标准方法,尤其是在大体积样本的提取中该法更加适用。而在对 sEV 纯度有要求的实验中,则更推荐 dUC 法。操作时间最短的 QIAGEN 试剂盒法在本研究中并未显示出明显优势,但该结果并不能普及到其他细胞上清液或体液的 EVs 提取中。

本研究进一步将分离纯化得到的 MSC-sEV 样品与乳腺癌细胞共培养,发现其可促进细胞增殖和迁移,表明 MSC-sEV 具有生物活性,可以改变乳腺癌细胞的表型,进而影响乳腺癌进展。目前已有研究发现 MSC-sEV 在乳腺癌细胞中既有抗癌作用^[27]也有促癌作用^[28],而本研究中的 MSC-sEV 则主要表现为促癌作用,具体机制尚不清楚,未来还需通过更多的细胞实验和分子生物学实验等进一步挖掘。

综上所述,本研究通过对比 dUC 法、PEG 沉淀法和 QIAGEN 试剂盒法 3 种方法及对应改良方法的操作时长,并结合提取样本的 TEM、Western blot 和 NTA 鉴定结果,最终发现 dUC+0.45 μm 滤膜过滤法在本研究涉及的方案中表现最优,将该方案提取到的 sEV 样本进行生物学功能实验,发现其具有促进乳腺癌进展的作用,为未来进一步深入开展乳腺癌研究奠定了技术基础。

参 考 文 献

- [1] WENG Z, ZHANG B, WU C, et al. Therapeutic roles of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles in cancer [J]. *J Hematol Oncol*, 2021, 14(1): 136.
- [2] LUO T, LIU Q, TAN A, et al. Mesenchymal Stem Cell-Secreted Exosome Promotes Chemoresistance in Breast Cancer via Enhancing miR-21-5p-Mediated S100A6 Expression [J]. *Mol Ther Oncolytics*, 2020, 19: 283-293.
- [3] THÉRY C, WITWER K W, AIKAWA E, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines [J]. *J Extracell Vesicles*, 2018, 7(1): 1535750.
- [4] PEIXOTO F C, ZANETTE D L, CARDOSO T M, et al. Leishmania braziliensis exosomes activate human macrophages to produce proinflammatory mediators [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1256425.
- [5] SAHOO S, LOSORDO D W. Exosomes and cardiac repair after myocardial infarction [J]. *Circ Res*, 2014, 114(2): 333-344.

- [6] BRACHT J W P, MAYO-DE-LAS-CASAS C, BERENQUER J, et al. The Present and Future of Liquid Biopsies in Non-Small Cell Lung Cancer: Combining Four Biosources for Diagnosis, Prognosis, Prediction, and Disease Monitoring[J]. *Curr Oncol Rep*, 2018, 20(9): 70.
- [7] VADLA G P, DAGHAT B, PATTERSON N, et al. Combining plasma extracellular vesicle Let-7b-5p, miR-184 and circulating miR-22-3p levels for NSCLC diagnosis and drug resistance prediction [J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 6693.
- [8] LIU J, PENG X, YANG Y, et al. The value of hsa_circ_0058514 in plasma extracellular vesicles for breast cancer [J]. *Front Oncol*, 2022, 12: 995196.
- [9] SRINIVAS A N, SURESH D, KAUR S, et al. The promise of small particles: extracellular vesicles as biomarkers in liver pathology [J]. *J Physiol*, 2023, 601(22): 4953-4971.
- [10] JIN S, WANG Y, WU X, et al. Young Exosome Bio-Nanoparticles Restore Aging-Impaired Tendon Stem/Progenitor Cell Function and Reparative Capacity [J]. *Adv Mater*, 2023, 35(18): e2211602.
- [11] FAN L, LIU C, CHEN X, et al. Exosomes-Loaded Electroconductive Hydrogel Synergistically Promotes Tissue Repair after Spinal Cord Injury via Immunoregulation and Enhancement of Myelinated Axon Growth [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2022, 9(13): e2105586.
- [12] HUANG L, RONG Y, TANG X, et al. Engineered exosomes as an in situ DC-primed vaccine to boost antitumor immunity in breast cancer [J]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1): 45.
- [13] WU T, LIU Y, CAO Y, et al. Engineering Macrophage Exosome Disguised Biodegradable Nanoplatform for Enhanced Sonodynamic Therapy of Glioblastoma [J]. *Adv Mater*, 2022, 34(15): e2110364.
- [14] BIAN D, WU Y, SONG G, et al. The application of mesenchymal stromal cells (MSCs) and their derivative exosome in skin wound healing: a comprehensive review [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2022, 13(1): 24.
- [15] LI X, WU F. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles transfer miR-598 to inhibit the growth and metastasis of non-small-cell lung cancer by targeting THBS2 [J]. *Cell Death Discov*, 2023, 9(1): 3.
- [16] 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.
- [17] DE PEDRO M Á, LÓPEZ E, GONZÁLEZ-NUÑO F M, et al. Menstrual blood-derived mesenchymal stromal cells: impact of preconditioning on the cargo of extracellular vesicles as potential therapeutics [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2023, 14(1): 187.
- [18] 姜舒, 刘洪玉, 禹洋, 等. 外泌体药物递送研究进展 [J]. *中国医药生物技术*, 2024, 19(2): 97-103.
- [19] LOBB R J, BECKER M, WEN S W, et al. Optimized exosome isolation protocol for cell culture supernatant and human plasma [J]. *J Extracell Vesicles*, 2015, 4: 27031.
- [20] 龚春梅, 徐远飞, 周继昌. 外泌体分离与鉴定方法的研究进展 [J]. *生命科学*, 2018, 30(3): 319-326.
- [21] HARASZTI R A, MILLER R, STOPPATO M, et al. Exosomes Produced from 3D Cultures of MSCs by Tangential Flow Filtration Show Higher Yield and Improved Activity [J]. *Mol Ther*, 2018, 26(12): 2838-2847.
- [22] ZHENG B, PENG M, GONG J, et al. Circulating exosomal microRNA-4497 as a potential biomarker for metastasis and prognosis in non-small-cell lung cancer [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2023, 248(16): 1403-1413.
- [23] ZHAO L, WANG H, FU J, et al. Microfluidic-based exosome isolation and highly sensitive aptamer exosome membrane protein detection for lung cancer diagnosis [J]. *Biosens Bioelectron*, 2022, 214: 114487.
- [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.
- [25] KIMIZ-GEBOLOGLU I, ONCEL S S. Exosomes: Large-scale production, isolation, drug loading efficiency, and biodistribution and uptake [J]. *J Control Release*, 2022, 347: 533-543.
- [26] PATEL G K, KHAN M A, ZUBAIR H, et al. Comparative analysis of exosome isolation methods using culture supernatant for optimum yield, purity and downstream applications [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 5335.
- [27] DU L, TAO X, SHEN X. Human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived exosomes inhibit migration and invasion of breast cancer cells via miR-21-5p/ZNF367 pathway [J]. *Breast Cancer*, 2021, 28(4): 829-837.
- [28] WANG Y, WANG P, ZHAO L, et al. miR-224-5p Carried by Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells-Derived Exosomes Regulates Autophagy in Breast Cancer Cells via HOXA5 [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 679185.

[收稿 2024-05-07] [编辑 罗惠予]

本文引用格式李婷婷, 刘燕. 间充质干细胞小细胞外囊泡的分离纯化方法比较 [J]. *中国癌症防治杂志*, 2024, 16(4): 424-432.