

[DOI] 10.12016/j.issn.2096-1456.2022.09.001

· 专家论坛 ·

# 细胞外泌体的分离提取标准化及临床转化进展

叶青松<sup>1,2,3</sup>, 彭友俭<sup>3</sup>, 骆瑜<sup>1,3</sup>

1. 武汉大学人民医院再生医学中心, 湖北 武汉(430060); 2. 哈佛大学麻省总医院, 哈佛大学牙学院口腔颌面外科, 美国 波士顿(02114); 3. 武汉大学人民医院口腔医学中心, 湖北 武汉(430060)



**【通信作者简介】** 叶青松, 口腔医学博士, 医学科学博士, 教授, 主任医师, 研究员, 博士生导师, 博士后合作导师。先后于四川大学华西口腔医学院获口腔医学学士、硕士(正畸学方向)和博士(正畸学方向)学位、荷兰格罗宁根大学医学科学博士学位(干细胞与组织工程方向)。曾任澳大利亚詹姆斯库克大学教授、昆士兰大学终身教授、温州医科大学研究员、哈佛大学访问教授。现任武汉大学人民医院再生医学研究中心主任, 中国抗衰老促进会创新与应用分会副主席, 《Nano-Trans Med》(2021-) 主编。曾任《Bioactive Materials》专刊主编(2020-2021), 澳洲Begg正畸协会执委会常委(2010-), 世界牙科研究会FNQ区主席(2014-2016)以及首届亚太正畸与牙周论坛主席(2014)。在临床实践中倡导口腔循证医学, 参编人民卫生出版社出版的研究生教材《口腔循证医学》(第1版~第3版)。指导硕士、博士及博士后50余人。在产学研和医疗服务方面都建树颇丰, 先后入选英国

爱丁堡皇家外科学院院士、英国皇家医学会会士(遴选)、中组部国家特聘青年人才以及国际牙医师学院院士, 于2021年获得世界名人录 Albert-Nelson Marquis 终身成就奖。

**【摘要】** 外泌体是一类由活细胞分泌的具有磷脂双分子层结构的囊泡, 其内携带RNA、DNA、蛋白质、脂质等多种信号分子, 起到细胞间信号传递的作用, 从而调控生理病理过程。外泌体的提取技术包括差速离心技术、等密度梯度离心技术、尺寸排阻色谱技术、超滤技术、聚合物共沉淀技术、免疫亲和技术、微流控分离技术等, 这些提取技术各有优缺点, 目前国际上尚未统一外泌体的提取标准; 而且不同细胞来源及培养条件下的外泌体其特异性蛋白和遗传物质表达有所不同, 从而表现特征和功能也存在差异; 因此, 目前外泌体多用于临床前研究, 广泛应用于临床尚存在困难和挑战。本文总结了外泌体在现阶段研究领域中的进展, 归纳了不同细胞来源外泌体的特征和应用、优缺点以及面临的挑战, 以期帮助研究者更好地了解 and 掌握外泌体的性能; 同时建议需要完善外泌体提取和制备的标准化流程为外泌体的临床转化和应用提供参考。

**【关键词】** 外泌体; 外泌体分离技术; 细胞外泌体提取技术; 特异性; 标准化; 干细胞外泌体; 肿瘤细胞外泌体; 临床前研究; 组织再生; 靶向药物递送; 肿瘤耐药

**【中图分类号】** R78 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 2096-1456(2022)09-0609-11

**【引用著录格式】** 叶青松, 彭友俭, 骆瑜. 细胞外泌体的分离提取标准化及临床转化进展[J]. 口腔疾病防治, 2022, 30(9): 609-619. doi:10.12016/j.issn.2096-1456.2022.09.001.

**Advances in isolation and extraction standardization and clinical translation of exosomes** YE Qingsong<sup>1,2,3</sup>, PENG Youjian<sup>3</sup>, LUO Yu<sup>1,3</sup>. 1. Department of Regenerative Medicine, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China; 2. Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Massachusetts General Hospital and Harvard School of Dental Medicine, Boston 02114, USA; 3. Department of Stomatology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China



微信公众号

**【收稿日期】** 2021-12-28; **【修回日期】** 2022-03-24

**【基金项目】** 国家自然科学基金项目(81871503)

**【通信作者】** 叶青松, 教授, 博士, Email: qingsongye@whu.edu.cn, Tel: 86-15858242516

Corresponding author: YE Qingsong, Email: qingsongye@whu.edu.cn, Tel: 86-15858242516

**【Abstract】** Exosomes are phospholipid bilayer vesicles secreted by living cells that can carry a variety of signaling molecules, such as RNA, DNA, protein, and lipids. Exosomes play a role in the transmission of signaling molecules between cells, thus regulating many physiological and pathological processes. The methods of extracting exosomes include differential centrifugation, density gradient centrifugation, exclusion chromatography, ultrafiltration, coprecipitation, polymer immune affinity, microfluidic separation technology, etc. Each of these extraction technologies has advantages and disadvantages; however, there is no unified international standard. In addition, the expression of specific proteins and genetic material of exosomes from different cell sources are different; thus, their expression characteristics and functions are also distinctive. Based on this situation, research on exosomes is limited to preclinical studies, and difficulties and challenges still exist in clinical application. This paper summarizes the progress of research in the field of exosomes, to understand the characteristics, modification and application of exosomes from different cell sources, and to summarize their advantages and disadvantages as well as challenges, which can help researchers better understand and master the performance of exosomes. Furthermore, improvement of standard procedures in the extraction and manufacturing of exosomes is important, as it will provide a reference for researchers to carry out exosome-related translational clinical research.

**【Key words】** exosomes; exosomes isolation technique; extraction methods of exosomes; specificity; standardization; exosomes from stem cells; exosomes from tumor cells; preclinical studies; tissue regeneration; targeted drug delivery; tumor resistance

**J Prev Treat Stomatol Dis, 2022, 30(9): 609-619.**

**【Competing interests】** The authors declare no competing interests.

This study was supported by the grants from National Natural Science Foundation of China (No. 81871503).

在多细胞生物中,细胞间通讯是维持细胞功能和组织稳态所必需的。这种细胞间的沟通可通过细胞间的直接联系来实现,也可通过分泌介质来传递。其中细胞释放各种类型的囊泡,如外泌体、核内体、微囊泡等可携带DNA、RNA、蛋白质等物质,在细胞通讯中起到关键作用,外泌体为近年生命科学研究领域的热点<sup>[1]</sup>。外泌体是一类由细胞分泌的直径约30~150 nm,密度为1.13~1.19 g/mL的纳米级球形脂质双分子层囊泡<sup>[2]</sup>。虽然外泌体这一名词已得到普遍使用,但根据国际细胞外囊泡学会(International Society for Extracellular Vesicles, ISEV)2018年指南,由于外泌体分离存在困难,因此将普遍提取的外泌体学术词汇定义为“细胞外小泡(small extracellular vesicles, sEVs)”<sup>[3]</sup>。目前外泌体提取已存在的技术主要是基于体积和密度差异的原理,这些分离技术大多不能完全分离及纯化出外泌体。

不同细胞来源的外泌体其内容物和功能具有特异性,研究发现不同细胞来源外泌体可根据其性能分别用于疾病的诊断、药物的传输以及免疫治疗和再生药物等。虽然外泌体的商业价值已得到广泛的关注,但其临床研究并不乐观,主要原因在于:①目前尚未研发出外泌体大规模生产纯化

的技术<sup>[4]</sup>;②目前国际上尚未制定出外泌体商品化临床生产准则<sup>[5]</sup>。因此,本文将综合分析已存在的外泌体分离技术,比较不同分离技术的优缺点,对目前提出的外泌体提取规范原则进行论述,并阐明不同细胞来源外泌体的功能及作用,阐述牙源性间充质干细胞来源外泌体的应用前景,为未来外泌体的提取及使用提供参考和建议。

## 1 外泌体的形成途径

所有细胞均可在生理或病理情况下释放外泌体,最开始外泌体被认为是细胞废弃物,后来通过研究逐渐发现外泌体中含有生物活性分子如蛋白质、脂质、mRNAs、miRNAs等,在机体生理和病理过程中扮演着重要角色。它的形成过程主要是由细胞膜内陷形成最初的核内体,胞内生物活性物质在早期核内体中积累,并在内吞分选机制下分选及运输所需的复合物和其他相关蛋白质形成晚期核内体,晚期核内体再次通过向内出芽形成多囊泡,最后多囊泡与细胞膜融合释放至胞外形成外泌体<sup>[2]</sup>。外泌体的产生机制主要通过以下途径:①Rab蛋白(小G蛋白)通过核内体和质膜调控外泌体的生物发生;Rab蛋白决定细胞器膜的特性,招募机械效应因子,并介导细胞器动力学。Os-

trowski 等<sup>[6]</sup>发现 Rab27a、Rab27b 参与了多囊泡的生物发生和定位,其中 Rab27a 通过调控质膜 PIP2 (水通道蛋白)动态来组装质膜微域,参与质膜囊泡出芽。Rab35 可定位于质膜,调节质膜 PIP2 水平,参与外泌体的发生。Rab11 则是通过钙诱导与多囊泡融合来影响外泌体的生物发生。②Ral/Arf6/PLD2/syntenin/Alix 轴(小 GTP 酶/二磷酸腺苷核糖基化因子 6/磷脂酶 D2/胞内衔接蛋白/凋亡连接基因-2-相互作用蛋白 X)调控外泌体的生物发生;Ral 蛋白可调控二磷酸腺苷核糖基化因子 6 (ADP-ribosylation factor6, Arf6)和磷脂酶 D2 (phospholipase D2, PLD2)的分泌,Arf6 和 PLD2 可使外泌体分泌 syntenin 和 Alix,帮助外泌体的膜形成<sup>[7]</sup>。③内吞体分选转运复合体(endosomal sorting complex required for transport, ESCRT)途径形成外泌体;ESCRT 可参与多囊泡的形成、核包裹、质膜修复,促进囊泡移动以及出芽。ESCRT 主要是催化膜分裂完成这一进程。因此,ESCRT 被大部分学者认为是外泌体的依赖途径,但是这一观点尚缺乏足够的数据支持。该途径始于合成素-合成聚糖的相互作用,早期核内体在内吞作用的控制下分选复合物以及相关蛋白,通过 Arf6 与细胞程序性死亡蛋白 1 配体 2(programmed cell death1 ligand 2, PDL2)作用进入胞质内形成晚期核内体,进而向腔内出芽形成腔内囊泡,多个腔内囊泡形成了多囊泡内体,这一过程中胞内的肝细胞生长因子相关酪氨酸激酶(hepatocyte growth factor associated tyrosine kinase, Hrs)可与肿瘤易感基因 101(tumor susceptibility gene 101, TSG101)作用降低胞内囊泡的数量,而泛素样蛋白 15 可抑制 TSG101 的泛素化,增加外泌体的释放<sup>[8]</sup>。④自噬参与外泌体的分泌;研究发现在癌症细胞中敲除自噬相关蛋白 5 (autophagy related gene 5, Atg5),外泌体的产生减少;相反,当 CRISPR/cas9 (可有效编辑有机体内部分基因的 CRISPR 基因组)介导敲除的 Atg5 神经元细胞,发现可以增加外泌体的释放<sup>[7]</sup>。

## 2 外泌体分离技术

单一的分离技术并不适用于各种来源的外泌体,因此研发多种不同分离技术对有效提取不同生理性能的外泌体尤为重要<sup>[9]</sup>。目前,已存在的外泌体分离技术包括差速离心技术、等密度梯度离心技术、尺寸排阻色谱技术、超滤技术、超速离心技术、聚合物共沉淀技术、免疫亲和技术、微流控

技术。不同分离技术的原理及优缺点见表 1。

### 2.1 基于密度的分离方法—差速离心技术、等密度梯度离心技术

2.1.1 差速离心技术 差速离心技术是目前分离外泌体使用最多的提取方法,其使用率高达 45.7%<sup>[10]</sup>。差速离心技术的原理是根据样品中胞外囊泡密度和尺寸大小的不同,在不同离心力作用下分离出外泌体。差速离心技术含量低,不需要繁杂的预处理,这一提取技术可广泛提取细胞上清、血清、唾液、尿液以及脑脊液等来源的外泌体样本。然而,差速离心技术可使具有相同质量、密度及大小的外泌体、微囊泡以及蛋白、脂质体等沉积在一起,难以获取完全纯化的外泌体。此外,由于差速离心技术需使用大的离心力,对外泌体的生物学结构会造成一定程度的损伤<sup>[11]</sup>。

2.1.2 等密度梯度离心技术 等密度梯度离心技术是根据细胞外成分的密度不同分离出外泌体,不同密度的蔗糖或碘克沙醇为密度梯度管中的介质成分,其使用率达 11.6%<sup>[10]</sup>。在离心力的作用下,样品中的外泌体、凋亡小体以及蛋白聚合物会固定在相同密度介质中从而分离外泌体,外泌体一般聚集在 1.10 ~ 1.18 g/mL 密度层<sup>[12]</sup>。虽然这种方法可以分离不同密度的胞外成分以及外泌体亚群,但对于不同大小、相同密度的胞外物质如微囊泡分离存在困难,动区密度梯度离心(moving-zone density-gradient centrifugation)是目前改良的一种分离技术,可在密度和大小二维方向上更进一步提纯外泌体。虽然该方法提取的外泌体纯度高,但其容纳的样本有限,设备贵,且需要高资质的技术人员<sup>[13]</sup>。

### 2.2 基于尺寸的分离方法—尺寸排阻色谱技术和超滤技术

2.2.1 尺寸排阻色谱技术 尺寸排阻色谱(size exclusion chromatography, SEC)技术是通过特定材料的孔隙微粒分离含有不同分子量的溶液,现使用的固相多孔材料主要有高分子右旋糖苷、琼脂糖、聚丙烯酰胺等<sup>[13]</sup>。尺寸排阻色谱技术最大的特点是可以保护外泌体的生物学结构和完整性不受破坏,其次该方法操作简单,节约时间,调整孔隙大小可以得到不同的胞外囊泡亚群<sup>[14]</sup>。近期 iZON 公司研发出基于尺寸排阻色谱技术的自动外泌体分离系统,可对外泌体进行高效、自动化提取<sup>[15]</sup>。尺寸排阻色谱技术也存在一些缺点,如分离的外泌体中含有与其粒径相似的蛋白质聚合物

表1 当前外泌体分离技术原理及优缺点

Table 1 Principles and advantages and disadvantages of current exosome separation techniques

| Isolation technique                                                                                              | Principle                                                                                                                                                                                                | Advantages                                                                                                                                                                                                  | Disadvantages                                                                                                                                                                                                                   |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Sequential ultracentrifugation                                                                                   | Particles of different sizes and densities are separated by centrifugal force                                                                                                                            | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Low extraction cost</li> <li>• No contamination</li> <li>• Suitable for large volume of exosomes</li> </ul>                                                        | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Expensive equipment</li> <li>• Time consuming</li> <li>• Mechanical damage at high speed</li> </ul>                                                                                    |
| Gradient ultracentrifugation                                                                                     | According to the different density of particles, the particles of different density can be retained in the media of different density of gradient tube so as to separate                                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Different subgroups of exosomes can be separated</li> </ul>                                                                                                        | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Expensive equipment</li> <li>• Time consuming</li> <li>• Highly qualified laboratory personnel</li> </ul>                                                                              |
| Size-exclusion chromatography                                                                                    | Porous materials are added to the separation column and particles are discharged at different stages according to diameter                                                                               | <ul style="list-style-type: none"> <li>• High purity</li> <li>• Less time consuming</li> <li>• Preserve natural properties of exosomes</li> <li>• Suitable for large or small volume of exosomes</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Expensive equipment</li> </ul>                                                                                                                                                         |
| Ultrafiltration                                                                                                  | Ultrafiltration membranes intercept particles according to their size and molecular weight                                                                                                               | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Low extraction cost</li> <li>• Less time consuming</li> </ul>                                                                                                      | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Low purity</li> <li>• Membrane blockage leads to loss of exosomes</li> </ul>                                                                                                           |
| Polymer precipitation                                                                                            | Hydrophilic polymer co-precipitates with exosomes                                                                                                                                                        | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Easy accessibility</li> <li>• Ordinary centrifugal equipment</li> <li>• Suitable for large or small volume of exosomes</li> <li>• High efficiency</li> </ul>       | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Protein polymer or other extracellular vesicles contamination</li> <li>• Complex pre-cleaning procedures</li> <li>• Contaminants interfere with downstream analysis results</li> </ul> |
| Paramagnetic particle method<br>Chromatographic solid phase separation<br>Enzyme-linked immunosorbent separation | These three methods are all immunoaffinity separation techniques, which enable the antigen bind to the antibodies with specific markers in exosomes, so as to achieve the purpose of exosomes separation | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Suitable for separation of exosomes from specific sources</li> <li>• High purity</li> <li>• No contamination</li> <li>• Diagnose diseases</li> </ul>               | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Expensive reagents</li> <li>• Affected by pH and salt concentration</li> <li>• Only isolated exosomes with specific markers</li> </ul>                                                 |
| Immunoaffinity method<br>Mixed fractional and decimal dimensioning<br>No contact method                          | These three methods are all microfluidic separation techniques, which can separate exosomes based on the principles of immune affinity, particle diameter and particle size, and density                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• High efficiency in acquisition</li> <li>• Cost-effective</li> <li>• Easy to automate and integrate</li> </ul>                                                      | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Low sample volume</li> </ul>                                                                                                                                                           |

和脂质体。在2013年国际细胞外囊泡学会上,学者提议将超滤技术和尺寸排阻色谱技术结合,可提高外泌体的提取纯度<sup>[16]</sup>。

**2.2.2 超滤技术** 超滤技术使用超细纳米复合膜对含有不同截流分子量(molecular weight cut-off, MWCO)的生物样品进行分离,筛选出外泌体<sup>[17]</sup>。目前常用的有两种简易的超滤装置,第一种装置是串联配置微孔过滤器<sup>[18]</sup>;第二种装置是序列超滤过滤器<sup>[19-20]</sup>。超滤技术可显著缩短操作时间,不需要特殊的设备,可通过调整超滤膜孔径大小来寻找胞外囊泡的不同子集。然而,超滤膜易堵塞影响分离效率,传统方法可通过蛋白酶清洗超滤膜解决滤膜堵塞的问题,现阶段改进的切向流过滤技术是解决这一问题的理想方法。其次,与外

泌体大小相近的纳米粒子可以通过超滤膜是超滤技术的另一个缺陷,因此现在较为常规的使用是将超滤技术与其他技术相结合<sup>[21-22]</sup>。

### 2.3 基于聚合物共沉淀的分离方法—聚合物共沉淀试剂盒技术

聚合物共沉淀技术的原理是亲水性聚合物与样品中外泌体亲水键相互作用,在外泌体周围形成疏水微环境,从而形成沉淀提取出外泌体。现常用的外泌体试剂盒中使用的亲水性聚合物大多是聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)<sup>[23]</sup>。聚合物共沉淀技术简单易行,可用于大规模提取外泌体以及疾病的快速诊断<sup>[24]</sup>。然而,该技术使用的亲水性聚合物不仅可以使外泌体发生沉淀,还可使亲水性物质如核酸、脂蛋白或者一些病毒的沉

积。Patel等<sup>[25]</sup>研究发现,相比于其它方法提取的外泌体,通过聚合物共沉淀技术提取的外泌体更具有细胞毒性。目前,聚合物共沉淀技术使用了更具有疏水性的PEG聚合物和更具有亲水性的右旋糖苷聚合物形成双向系统(aqueous two-phase systems, ATPSs),对外泌体及其它分子进行双向分离,从而在一定程度上改善外泌体污染的问题<sup>[26]</sup>。

#### 2.4 基于免疫亲和的分离方法—磁珠技术、色谱固相分离技术、酶联免疫吸附分离技术

外泌体中含有丰富的特异性膜蛋白如四次跨膜蛋白CD9、上皮细胞黏附分子(epithelial cell adhesion molecule, EPCAM)、四次跨膜蛋白63(CD63)、小G蛋白(Rab5)、四次跨膜蛋白81(CD81)、凋亡连接基因-2-相互作用蛋白X(apoptosis linked gene 2 interacting protein X, ALIX)、磷脂结合蛋白(Annexin)等<sup>[27]</sup>。免疫亲和技术的原理则是通过识别外泌体的特异性蛋白质,从而实现外泌体的分离和富集。根据抗体底物载体的不同,免疫亲和分离技术可分为磁珠免疫分离、色谱固相分离、酶联免疫吸附分离等。在磁珠免疫分离法中,磁珠负载链霉亲和素,对生物素化的抗体如CD63、CD9和CD81具有捕获能力。虽然免疫亲和技术可提取高纯度的外泌体,但该技术缓冲液中的pH和盐浓度会影响外泌体的活性。此外,与抗体结合后的外泌体只适用于疾病的诊断,并不适用功能性研究<sup>[28]</sup>。因此,有学者提出适配体筛选技术,适配体是具有抗体功能的小DNA或RNA,可识别特异性蛋白质,从而与外泌体结合,进行生物样品中外泌体的分离,再通过改变适配体的三维结构,可对分离的外泌体进行纯化,保证外泌体的完整性<sup>[29]</sup>。

#### 2.5 基于微流控技术的分离方法—基于免疫亲和的微流体技术、基于尺寸的微流体技术、无接触式微流体技术

微流控是近年发展起来的以信号探测为基础的外泌体提取技术,可快速对外泌体进行分离,还可以通过实时监测外泌体,对早期未侵袭性疾病作出诊断。基于免疫亲和的微流体技术与免疫亲和技术相似,其在微流体芯片装置中装有特异性识别抗体,免疫亲和微流技术与免疫亲和技术一样只能获取外泌的特异性子集,且价格昂贵,难以维持外泌体的生物学结构。

基于尺寸的微流体技术结合了尺寸排阻色谱技术及免疫亲和技术的原理,其装置由多孔硅材料制成的纳米线组成,可阻止细胞碎片和凋亡小

体,同时装置中存在特异性的抗体,可有效分离40~100 nm的外泌体<sup>[30]</sup>。无接触式微流体包含弹性升力<sup>[31]</sup>、超声<sup>[32]</sup>及双向电泳<sup>[33]</sup>三种分离方式。弹性升力利用粘弹性介质流动所产生的升力可操控不同大小粒子的原理来分离肿瘤细胞、血细胞、细菌、飞沫或微球。2017年这一技术用于分离外泌体,其外泌体回收率超过80%,纯度超过90%<sup>[31]</sup>。超声微流体技术是利用超声波对不同粒子的辐射力分离外泌体,能够以无标记和无接触的方式从全血中直接分离外泌体,血细胞去除率超过99.999%<sup>[32]</sup>。双向电泳技术是一种比较简单的微流体技术,微通道的电泳可驱动样品中的外泌体通过微流体膜装置,并过滤其它细胞外囊泡,然而这种技术还需深入地探索其效率和可靠性,以及提取出的外泌体生物学性能<sup>[33]</sup>。

### 3 外泌体提取技术标准化进展

纵观目前已存在的外泌体提取技术,主要是基于体积和密度差异的原理来获取纯度较高的外泌体,这一技术主要体现在临床前基础研究中。外泌体的临床转化势必需要实现从科学实验到商业产品的转化,这一目标的实现主要需从细胞培养、外泌体提取和外泌体纯化三个方面进行思考和研究。搅拌式生物反应器技术、灌注培养技术和中空纤维灌注生物反应器技术可实现外泌体的大批量生产;合适的培养条件如生长因子、氧气浓度或其他刺激物影响的研究可探索出高产外泌体的方法。目前,流场流分离和多角度动态光散射是外泌体商业化生产和纯化常用的方法,可精确地测定粒径分布和颗粒在溶液中的浓度,分离出的微粒可以自动用标准馏分收集器收集。

另外,外泌体的临床转化也需其在同种异体环境中具有可重复性、可拓展性、稳定性和良好的临床监控性能。Melo等<sup>[34]</sup>通过免疫亲和分离技术从胰腺癌患者的血清中提取外泌体,发现外泌体可高表达蛋白多糖和磷脂酰肌醇聚糖1(glypican1, GPC1),GPC1阳性可区分胰腺癌患者及正常患者。然而,Lai等<sup>[35]</sup>学者则通过色谱固相分离技术提取外泌体,发现在胰腺癌患者的循环外泌体中,其中微小RNA miR-10b、miR-21、miR-30c和miR-181a的高表达以及miR-let7a的低表达更具有诊断价值。这两份科学研究的不同主要在于外泌体提取方式的差异。因此对于同一疾病统一的外泌体提取纯化标准尤为重要。

为使标准化胞外囊泡提取技术广泛应用于临床研究,2018年11月国际胞外囊泡协会在中国广州发起了以胞外囊泡为基础的临床研讨会。众多专家学者就4个关键主题进行了讨论:①胞外囊泡的标准化分离及提取技术;②胞外囊泡组学分析及生物标记物的探索;③胞外囊泡生物标记物在临床诊断的应用;④胞外囊泡在人类疾病中的治疗。就“胞外囊泡的标准化分离及提取技术”这一专题,学者们讨论了最前沿的外泌体快速分离技术如目前发展较快的芯片技术,另外多种分离技术结合的方式也可精确有效地提取外泌体。目前没有单一的方法可以用于所有样本类型和应用的分析。对于不同样本中外泌体的提取,参会学者们认为需要考虑但不限于以下因素:样品的来源、胞外囊泡的亚群、用于下游的分析;对于外泌体纯度的考量,定量方法的比值可以提高外泌体纯度测定,可作为外泌体的纯度指标,比如:蛋白质/颗

粒比、蛋白质/脂质比、RNA/颗粒比<sup>[36]</sup>。因此,虽然外泌体的提取技术趋于规范和标准,外泌体采集与分离标准的建立、鉴定标准的统一、产品制备过程标准化仍是未来需进一步明确和解决的问题。

#### 4 外泌体的研究及应用

外泌体几乎存在于人体内的所有细胞中,它们既有共性又有区别,不同细胞来源的外泌体其在生理病理过程的不同阶段具有不同的功能。间充质干细胞来源外泌体在非肿瘤环境下具有抗炎、抗氧化、免疫调节及促进组织器官修复等功能,免疫细胞来源的外泌体可促进体内免疫细胞的增殖,从而缓解炎症或肿瘤的侵袭,而肿瘤来源的外泌体可作用于微环境,形成一个有利于肿瘤发生的微环境<sup>[37]</sup>。因此,了解不同细胞来源外泌体的应用范围和功能对科学研究的进一步发展及临床转化具有重要的指导意义(表2)。

表2 不同细胞来源外泌体的功能及应用

Figure 2 Function and application of exosomes from different cell sources

| Source of exosomes    | Characteristic                                                                                                                                                                                  | Application                                                                                        |
|-----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Macrophagocyte        | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Regulate inflammation</li> <li>• Participate in tumor invasion</li> </ul>                                                                              | • Drug delivery carrier                                                                            |
| Dendritic cell        | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Regulate immune response</li> <li>• Mediate communication mechanism between dendritic cells and CD4<sup>+</sup>T cells</li> </ul>                      | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Immunotherapy</li> <li>• Drug delivery carrier</li> </ul> |
| Tumour cell           | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Regulate intercellular communication</li> <li>• Mediate tumor growth</li> <li>• Mediate immune response</li> <li>• Mediate tumor metastasis</li> </ul> | • Biomarkers for cancer diagnosis                                                                  |
| Mesenchymal stem cell | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Maintain organizational homeostasis</li> <li>• Immune regulation</li> </ul>                                                                            | • Treatment of various diseases                                                                    |
| Virus infected cell   | • As a vehicle for spreading disease                                                                                                                                                            |                                                                                                    |
| Other living cells    | • Regulate signal transduction                                                                                                                                                                  | • Treatment of various diseases                                                                    |

#### 4.1 间充质干细胞来源外泌体的研究进展

##### 4.1.1 间充质干细胞来源外泌体修复损伤组织

间充质干细胞来源于中胚层的多种组织,包括骨髓、肝脏、脾脏、外周血、脂肪、胚胎和脐带血,具有自我更新和分化的能力。近年来间充质干细胞多用于组织再生、免疫调节、神经保护的研究,大量研究发现使用间充质干细胞研究时,只有小部分细胞可作用于损伤部位,因此,“细胞代替治疗”应运而生,其中,间充质干细胞旁分泌外泌体是当前研究的热点<sup>[38]</sup>。Haga等<sup>[39]</sup>将间充质干细胞来源外泌体作用于由D-半乳糖(D-Galactose)/肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )诱导的致

死性极强的肝损伤小鼠模型中,发现其中含有短非编码RNA Y-RNA-1,可缓解肝脏损伤,调节炎症反应,激活抗凋亡通路。Zhang等<sup>[40]</sup>研究发现预处理心脏干细胞来源外泌体,将其移植入心肌梗死的大鼠中,可发现其可降低心脏纤维化,增加毛细血管密度,恢复心脏的功能。Xiong等<sup>[41]</sup>研究表明,脂肪干细胞来源外泌体中含有细胞外烟酰胺磷酸核糖转移酶(nicotinamide phosphoribosyl transferase, NAMPT)可延缓衰老,这种物质可以内化入细胞中,从而增加NAD<sup>+</sup>的合成,当从年轻的小鼠中提取富含eNAMPT的胞外囊泡,并作用于年老小鼠中,发现可以衰老减缓,并增加了年老小鼠的生命

周期。

4.1.2 间充质干细胞来源外泌体是理想的药物载体 理想的药物载体应具有细胞靶向性、治疗有效性及免疫耐受性。现在常用的药物载体是脂质体,与较大的脂质体相比,较小的脂质体虽具有较长的体内循环时间,但其药物保留率和释放能力会减弱,为了减少脂质体在体内的清除率和毒性,经过改造后的脂质体免疫耐受性降低。因此,脂质体作为药物载体存在局限性,外泌体就具备理想载体的条件:低毒性、免疫耐受、可进入血脑屏障,并可直接作用于炎症或肿瘤组织。并且外泌体中具有功能性的生物成分可辅助靶向部位的治疗,树突状细胞来源外泌体膜蛋白(lysosome-associated membrane glycoprotein 2b, Lamp2b)与神经特异性RVG肽融合进行改建,作为药物静脉注射入有阿兹海默症的小鼠,发现可以靶向敲除 $\beta$ -分泌酶1( $\beta$ -site APP cleaving enzyme 1, BACE1),改善阿兹海默症相关症状<sup>[42]</sup>。

#### 4.2 肿瘤细胞来源外泌体的研究进展

4.2.1 肿瘤细胞来源外泌体可促进肿瘤的生长和转移 肿瘤细胞来源外泌体其功能与正常细胞来源外泌体有较大差异。肿瘤细胞来源外泌体可通过自分泌和旁分泌途径影响肿瘤的生长和转移,慢性髓系白血病细胞来源外泌体中含有转化生长因子- $\beta$ 1(transforming growth factor- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 1),可与白血病细胞中的TGF- $\beta$ 1受体结合,激活细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK)、蛋白激酶B(protein kinase B, AKT)和抗凋亡通路从而促进肿瘤的生长<sup>[43]</sup>。肿瘤细胞来源外泌体还可作用于基底细胞,从而形成促癌的微环境,基底细胞来源外泌体可作用于肿瘤细胞,促进肿瘤细胞的增殖和侵袭;乳腺癌来源外泌体可通过转化生长因子- $\alpha$ /丝/苏氨酸激酶受体(TGF- $\beta$ /SMAD)途径诱导脂肪干细胞向肿瘤相关肌成纤维细胞的转化<sup>[44]</sup>。

4.2.2 肿瘤细胞来源外泌体可引起肿瘤的耐药性 黑色素瘤和卵巢癌来源的外泌体可辅助细胞排出药物毒性,从而产生药物耐药性;含有miR-30a、miR-222和miR-100-5p的外泌体可以诱使药物敏感性细胞通过激活丝裂原激活的蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)或雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)对药物产生耐受;基底细胞来源外泌体也可使肿瘤细胞产生耐药性,巨噬细胞来源外泌体中含有miR

-365,激活胞苷脱氨酶,减少胰腺癌细胞对吉西他滨的耐药性<sup>[45]</sup>。

4.2.3 肿瘤细胞来源外泌体具有激活免疫或抑制免疫系统的功能 研究发现,肿瘤来源外泌体既有激活免疫系统的功能,又有抑制免疫系统的作用。免疫系统的激活通过外泌体的抗原呈递作用,免疫抑制则通过外泌体所携带的配体,蛋白质和miRNA抑制T细胞活性。肿瘤来源外泌体可将热休克蛋白70(heat shock protein 70, HSP70)、主要组织相容性复合体-I(major histocompatibility complex-I, MHC-I)传输至树突状细胞,诱导潜在的CD8<sup>+</sup>T细胞发挥抗癌作用<sup>[46]</sup>。外泌体中所携带的抗原和MHC为其作为抗癌疫苗的研发成为可能<sup>[47]</sup>。然而,肿瘤来源的外泌体可以表达TGF- $\beta$ 和自然杀伤细胞2族成员D(natural killer cell family 2 member D, NKG2),从而下调NK细胞和CD8<sup>+</sup>T细胞表面NKG2D的表达,降低其活性<sup>[48]</sup>。

#### 4.2.4 肿瘤细胞来源外泌体可作为生物标记物

外泌体来源于血液、尿液、唾液和脑脊液,它们可作为癌症诊断中理想的生物标记物。脑脊液外泌体中高表达的miR-21可作为恶性胶质瘤发展的标记物,并可以预估肿瘤的复发和转移<sup>[49]</sup>。然而,在不同的研究课题组中外泌体的提取方法不尽相同,研究缺乏一个共性的指标,这些问题会影响临床诊断和预后的准确性。

目前,IntelliScore公司研发了ExoDx Prostate试剂盒,通过从患者尿液中获取外泌体进行检测,并结合患者的家族史、种族、年龄、临床指标和前列腺癌特异性抗原(prostatic specific antigen, PSA),发现尿液中提取的外泌体具有高度的前列腺癌诊断灵敏性,这一试剂盒已在临床研究中得到广泛应用<sup>[50]</sup>。

#### 5 牙源性间充质干细胞来源外泌体的应用前景

相比于干细胞,外泌体具有低毒性、低免疫原性、易存储、安全性高、稳定性强、无需考虑细胞活性、可穿透血脑屏障等优势。近年来,外泌体治疗在再生医学、肿瘤学、药物运输、免疫治疗等领域取得了巨大的进步,大量的文献研究为其临床转化应用奠定了坚实的基础。目前已有外泌体相关研究进入临床试验阶段。截止2021年12月,世界范围内已有123项正在招募的临床研究,其中亚洲有27项研究,中国有20项研究(<https://clinicaltrials.gov>)(表3)。

不同细胞来源的外泌体其内容物及功能不同,相同细胞不同培养基培养提取的外泌体也不相同,并且当细胞处于不同的条件及环境时,如细胞密度、细胞状态、低氧培养、炎症刺激、三维培养都会对外泌体造成极大的影响,因此,寻找一类合适的供体细胞是外泌体治疗技术成功的关键。目前牙源性间充质干细胞作为一类来源丰富、取材简单、不会对人体造成二次伤害、不涉及伦理问题

的新型间充质干细胞已经得到大量科学工作者的青睐。牙源性间充质干细胞由头颅神经嵴细胞发育而来,具有独特的组织特异性,其分泌的外泌体在神经再生性疾病、牙髓牙本质、皮肤再生、肿瘤治疗、骨损伤修复等方面均已取得较好的疗效。Li等<sup>[51]</sup>学者将牙髓干细胞来源外泌体通过鼠尾静脉注射于脑缺血再灌注损伤的大鼠中发现其可抑制高迁移率族蛋白 B1 (high mobility group box 1 pro-

表3 国内外部分外泌体相关临床试验招募项目 (<https://clinicaltrials.gov>)Table 3 Some exosome related clinical trial recruitment projects at home and abroad (<https://clinicaltrials.gov>)

| NCT.No      | Item                                                                                                                | Department                                                                   | Source of exosomes | Treatment of disease    |
|-------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|--------------------|-------------------------|
| NCT05035134 | 《Application of circulating exosomes in early diagnosis and prognosis evaluation after intracerebral hemorrhage》    | Tandu Hospital, Xi'an, China                                                 | Circulating blood  | Cerebral hemorrhage     |
| NCT04544215 | 《A clinical study of mesenchymal progenitor cell exosomes nebulizer for the treatment of pulmonary infection》       | Ruijin Hospital, Shanghai, China                                             | MSC                | Pulmonary infection     |
| NCT04182893 | 《Clinical study of ctDNA and exosome combined detection to identify benign and malignant pulmonary nodules (ctDNA)》 | Shanghai Chest Hospital, Shanghai, China                                     | Body fluid         | Pulmonary nodules       |
| NCT03108677 | 《Circulating exosome rna in lung metastases of primary high-grade osteosarcoma》                                     | Ruijin Hospital, Shanghai, China                                             | Circulating blood  | Osteosarcoma metastasis |
| NCT04213248 | 《Effect of UMSCs derived exosomes on dry eye in patients with cGVHD》                                                | Zhongshan Ophthalmic Center, Guangzhou, China                                | UMSCs              | Xerophthalmia           |
| NCT04894695 | 《Urine exosomes to identify biomarkers for LN》                                                                      | Shanghai Renmin's Hospital, Shanghai, China                                  | urine              | lupus nephritis         |
| NCT05058768 | 《Omics sequencing of exosomes in body fluids of patients with acute lung injury》                                    | Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, China              | Body fluid         | Acute lung Injury       |
| NCT04499794 | 《The study of exosome EML4 - ALK fusion in NSCLC clinical diagnosis and dynamic monitoring》                         | Cancer Hospital, Chinese Academy of Sciences, Beijing, China                 | Circulating blood  | NSCLC                   |
| NCT04227886 | 《Study on predictive biomarkers of neoadjuvant chemoradiotherapy for rectal cancer》                                 | Fudan University Cancer Center, Shanghai, China                              | Circulating blood  | Rectal Cancer           |
| NCT04427475 | 《Prediction of immunotherapeutic effect of advanced non-small cell lung cancer》                                     | Fudan University Cancer Center, Shanghai, China                              | Circulating blood  | NSCLC                   |
| NCT04388982 | 《the Safety and the efficacy evaluation of allogenic adipose MSC-exos in patients with Alzheimer's disease》         | Ruijin Hospital, Shanghai, China                                             | Adipose MSC        | Alzheimer's Disease     |
| NCT04636788 | 《Circulating extracellular exosomal small rna as potential biomarker for human pancreatic cancer》                   | Tongji Hospital, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, China | Circulating blood  | Pancreatic Cancer       |
| NCT04921774 | 《Research on patients with heart transplantation》                                                                   | Guangzhou Provincial Renmin's Hospital, Guangzhou, China                     | Circulating blood  | Heart Transplantation   |
| NCT01294072 | 《Study investigating the ability of plant exosomes to deliver curcumin to normal and colon cancer tissue》           | University of Louisville Hospital, United States                             | Plant              | Colon Cancer Tissue     |
| NCT04270006 | 《Evaluation of adipose derived stem cells exo.in treatment of periodontitis (exosomes)》                             | Beni-Suef University, Beni-Suef, Egypt                                       | Adipose MSC        | Periodontitis           |
| NCT03800121 | 《Study of exosomes in monitoring patients with sarcoma (EXOSARC)》                                                   | CHU de Besançon, Besançon, France                                            | Circulating blood  | Sarcoma                 |
| NCT03478410 | 《Role of exosomes derived from epicardial fat in atrial fibrillation》                                               | Sheba medical center, Ramat Gan, Israel                                      | Adipose MSC        | Atrial Fibrillation     |
| NCT03811600 | 《Exosomes implication in PD1 - PD - L1 activation in OSAS》                                                          | CHU d'Angers, Angers, France                                                 | Circulating blood  | OSAS                    |

MSC: mesenchymal stem cells; UMSCs: umbilicalcord mesenchymal stemcells; NSCLC: non-small cell lung cancer; OSAS: obstructive sleep apnea syndrome

tein, HMGB1)/Toll样受体4(Toll like receptor 4, TLR4)/髓样分化因子88(myeloid differentiation factor 88, MyD88)/核因子 $\kappa$ B(nuclear factor kappa-B, NF- $\kappa$ B)通路,达到抑制炎症的效果,并对脑缺血再灌注损伤提供神经保护。Ji等<sup>[52]</sup>学者发现牙髓干细胞来源外泌体可以抑制CD4<sup>+</sup>T细胞分化成Th17细胞,抑制IL-17和TNF- $\alpha$ 的分泌,但其可以促进CD4<sup>+</sup>T极化成Treg,增强了IL-17和TNF- $\alpha$ 的分泌;Zhang等<sup>[53]</sup>学者研究发现牙龈间充质干细胞来源外泌体可促进舌乳头的修复、味蕾再生和神经支配,为舌癌患者术后重建提供了可能。Zhang等<sup>[54]</sup>学者研究发现牙上皮细胞来源外泌体可被牙乳头细胞内吞,促进牙乳头细胞增殖和成牙分化,从而诱导牙髓的再生。Liu等<sup>[55]</sup>学者研究发现,制备牙周膜干细胞来源外泌体的水凝胶系统,通过局部注射可以有效恢复牙周炎局部的骨再生。目前尚未有研究报道牙源性间充质干细胞来源外泌体的副作用,也尚未有临床招募相关项目。

因此,牙源性间充质干细胞这些特性促使其具有作为提取外泌体供体细胞运用于未来临床转化研究中的巨大潜能,为未来各类疾病的治疗提供全新的治疗模式。

## 6 小 结

综上所述,不同细胞来源的外泌体已广泛应用于细胞生物学、细胞信号通路、再生医学、癌症生物学、免疫学、药物运输等研究领域,为临床转化提供了大量的理论依据。表1展示了近年来已存在的外泌体提取技术原理,并对比了每一项技术的优缺点;表2归纳了部分不同细胞来源外泌体的特征和作用;表3列举了部分国内外正在招募的外泌体治疗临床研究项目。外泌体作为一种新的治疗试剂,其功效已得到广泛的认可和肯定<sup>[56]</sup>,合适的外泌体来源选择和日益标准化的外泌体提取技术将有助于未来疾病治疗的进步。

**【Author contributions】** Ye QS, Peng YJ, Luo Y collected the references and wrote the article. Ye QS revised the article. All authors read and approved the final manuscript as submitted.

## 参考文献

- [1] Kalluri R, LeBleu VS. The biology, function, and biomedical applications of exosomes[J]. *Science*, 2020, 367(6478): 6977. doi: 10.1126/science.aau6977.
- [2] Zhang Y, Bi JY, Huang JY, et al. Exosome: a review of its classification, isolation techniques, storage, diagnostic and targeted therapy applications[J]. *Int J Nanomedicine*, 2020, 22(15): 6917-6934. doi: 10.2147/IJN.S264498.
- [3] Thery C, Witwer KW, 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. doi: 10.1080/20013078.2018.1535750.
- [4] Zhang L, Yu DH. Exosomes in cancer development, metastasis, and immunity[J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2019, 1871(2): 455-468. doi: 10.1016/j.bbcan.2019.04.004.
- [5] Willms E, Cabañas C, Mäger I, et al. Extracellular vesicle heterogeneity: subpopulations, isolation techniques, and diverse functions in cancer progression[J]. *Front Immunol*, 2018, 30(9): 738. doi: 10.3389/fimmu.2018.00738.
- [6] Ostrowski M, Carmo NB, Krumeich S, et al. Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway[J]. *Nat Cell Biol*, 2010, 12(1): 19-30. doi: 10.1038/ncb2000.
- [7] Pegtel DM, Gould SJ. Exosomes[J]. *Annu Rev Biochem*, 2019, 20(88): 487-514. doi: 10.1146/annurev-biochem-013118-111902.
- [8] Patel GK, Khan MA, 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. doi: 10.1038/s41598-019-41800-2.
- [9] Konoshenko MY, Lekhnov EA, Vlassov AV, et al. Isolation of extracellular vesicles: general methodologies and latest trends[J]. *Biomed Res Int*, 2018, 30: 8545347. doi: 10.1155/2018/8545347.
- [10] Yang DB, Zhang WH, Zhang HY, et al. Progress, opportunity, and perspective on exosome isolation - efforts for efficient exosome-based theranostics[J]. *Theranostics*, 2020, 10(8): 3684-3707. doi: 10.7150/thno.41580.
- [11] Chia BS, Low YP, Wang Q, et al. Advances in exosome quantification techniques[J]. *Trend Anal Chem*, 2017, 86(4): 93-106. doi: 10.1016/j.trac.2016.10.012.
- [12] Tran PHL, Wang T, Yin W, et al. Aspirin-loaded nanoexosomes as cancer therapeutics[J]. *Int J Pharm*, 2019, 15(572): 118786. doi: 10.1016/j.ijpharm.2019.118786.
- [13] Chen BY, Sung CW, Chen C, et al. Advances in exosomes technology[J]. *Clin Chim Acta*, 2019, 13(493): 14-19. doi: 10.1016/j.cca.2019.02.021.
- [14] Taylor DD, Shah S. Methods of isolating extracellular vesicles impact down-stream analyses of their cargoes[J]. *Methods*, 2015, 1(87): 3-10. doi: 10.1016/j.ymeth.2015.02.019.
- [15] Ma CY, Jiang F, Ma YF, 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.
- [16] Witwer KW, Buzás EI, Bemis LT, et al. Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research[J]. *J Extracell Vesicles*, 2013, 5(27): 2. doi: 10.3402/jev.v2i0.20360.
- [17] He LQ, Zhu D, Wang JP, et al. A highly efficient method for isolating urinary exosomes[J]. *Int J Mol Med*, 2019, 43(1): 83-90. doi: 10.3892/ijmm.2019.4310.

- 10.3892/ijmm.2018.3944.
- [18] Dehghani M, Lucas K, Flax J, et al. Tangential flow microfluidics for the capture and release of nanoparticles and extracellular vesicles on conventional and ultrathin membranes[J]. *Adv Mater Technol*, 2019, 4(11): 1900539. doi: 10.1002/admt.201900539.
- [19] Popović M, de Marco A. Canonical and selective approaches in exosome purification and their implications for diagnostic accuracy [J]. *Transl Cancer Res*, 2017, 2(7): S209 - S225. doi: 10.21037/ter.2017.08.44.
- [20] Doyle LM, Wang MZ. 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.
- [21] Peterson MF, Otoc N, Sethi JK, et al. Integrated systems for exosome investigation[J]. *Methods*, 2015, 1(87): 31-45. doi: 10.1016/j.ymeth.2015.04.015.
- [22] 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.
- [23] 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.
- [24] Merdalimova A, Chernyshev V, Nozdriukhin D, et al. Identification and analysis of exosomes by surface-enhanced raman spectroscopy[J]. *Appl Sci*, 2019, 9(6): 1135. doi: 10.3390/app9061135.
- [25] Patel GK, Khan MA, 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. doi: 10.1038/s41598-019-41800-2.
- [26] Kırbaş OK, Bozkurt BT, Asutay AB, et al. Optimized isolation of extracellular vesicles from various organic sources using aqueous two-phase system[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 19159. doi: 10.1038/s41598-019-55477-0.
- [27] Brzozowski JS, Jankowski H, Bond DR, et al. Lipidomic profiling of extracellular vesicles derived from prostate and prostate cancer cell lines[J]. *Lipids Health Dis*, 2018, 17(1): 211. doi: 10.1186/s12944-018-0854-x.
- [28] Liu CY, Su CQ. Design strategies and application progress of therapeutic exosomes[J]. *Theranostics*, 2019, 9(4): 1015 - 1028. doi: 10.7150/thno.30853.
- [29] Wang T, Chen CY, Larcher LM, et al. Three decades of nucleic acid aptamer technologies: lessons learned, progress and opportunities on aptamer development[J]. *Biotechnol Adv*, 2019, 37(1): 28-50. doi: 10.1016/j.biotechadv.2018.11.001.
- [30] Pang BR, Zhu Y, Ni J, et al. Extracellular vesicles: the next generation of biomarkers for liquid biopsy-based prostate cancer diagnosis[J]. *Theranostics*, 2020, 10(5): 2309 - 2326. doi: 10.7150/thno.39486.
- [31] Yuan D, Zhao QB, Yan S, et al. Recent progress of particle migration in viscoelastic fluids[J]. *Lab Chip*, 2018, 18(4): 551-567. doi: 10.1039/c7lc01076a.
- [32] 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.
- [33] Sergio AM, Roberto C. Gallo-Villanueva, et al. Dielectrophoretic manipulation of exosomes in a multi-section microfluidic device [J]. *Mater Today: Proc*, 2019, 13(1): 332-340. doi: 10.1016/j.matpr.2019.03.162.
- [34] Melo SA, Luecke LB, Kahlert C, et al. Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer[J]. *Nature*, 2015, 523(7559): 177-182. doi: 10.1038/nature14581.
- [35] Lai XY, Wang M, McElyea SD, et al. A microRNA signature in circulating exosomes is superior to exosomal glypican-1 levels for diagnosing pancreatic cancer[J]. *Cancer Lett*, 2017, 393: 86-93. doi: 10.1016/j.canlet.2017.02.019.
- [36] Théry C, Witwer KW, 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. doi: 10.1080/20013078.2018.1535750.
- [37] Li MY, Li SS, Du CY, et al. Exosomes from different cells: characteristics, modifications, and therapeutic applications[J]. *Eur J Med Chem*, 2020, 1(207): 112784. doi: 10.1016/j.ejmech.2020.112784.
- [38] Cheng L, Zhang K, Wu SY, et al. Focus on mesenchymal stem cell-derived exosomes: opportunities and challenges in cell-free therapy[J]. *Stem Cells Int*, 2017, 20(17): 6305295. doi: 10.1155/2017/6305295.
- [39] Haga H, Yan IK, Takahashi K, et al. Extracellular vesicles from bone marrow-derived mesenchymal stem cells improve survival from lethal hepatic failure in mice[J]. *Stem Cells Transl Med*, 2017, 6(4): 1262-1272. doi: 10.1002/sctm.16-0226.
- [40] Zhang ZW, Yang JJ, Yan WY, et al. Pretreatment of cardiac stem cells with exosomes derived from mesenchymal stem cells enhances myocardial repair[J]. *J Am Heart Assoc*, 2016, 5(1): e002856. doi: 10.1161/JAHA.115.002856.
- [41] Xiong MC, Zhang Q, Hu WJ, et al. Exosomes from adipose-derived stem cells: the emerging roles and applications in tissue regeneration of plastic and cosmetic surgery[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 10(8): 574223. doi: 10.3389/fcell.2020.574223.
- [42] Mu LM, Ju RJ, Liu R, et al. Dual-functional drug liposomes in treatment of resistant cancers[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2017, 1(115): 46-56. doi: 10.1016/j.addr.2017.04.006.
- [43] Raimondo S, Saieva L, Corrado C, et al. Chronic myeloid leukemia-derived exosomes promote tumor growth through an autocrine mechanism[J]. *Cell Commun Signal*, 2015, 3(3): 138. doi: 10.1186/s12964-015-0086-x.
- [44] Yang Y, Li CW, Chan LC, et al. Exosomal PD-L1 harbors active defense function to suppress T cell killing of breast cancer cells and promote tumor growth[J]. *Cell Res*, 2018, 28(8): 862-864. doi: 10.1038/s41422-018-0060-4.
- [45] Binenbaum Y, Fridman E, Yaari Z, et al. Transfer of miRNA in macrophage-derived exosomes induces drug resistance in pancreatic adenocarcinoma[J]. *Cancer Res*, 2018, 78(18): 5287 - 5299.

- doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-0124.
- [46] Zhang L, Yu D. Exosomes in cancer development, metastasis, and immunity[J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2019, 1871(2): 455-468. doi: 10.1016/j.bbcan.2019.04.004.
- [47] Muhsin-Sharafaldine MR, Saunderson SC, Dunn AC, et al. Procoagulant and immunogenic properties of melanoma exosomes, microvesicles and apoptotic vesicles[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(35): 56279-56294. doi: 10.18632/oncotarget.10783.
- [48] Ludwig S, Floros T, Theodoraki MN, et al. Suppression of lymphocyte functions by plasma exosomes correlates with disease activity in patients with head and neck cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(16): 4843-4854. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-2819.
- [49] Takuma G, Mikihiro F, Hiroaki K, et al. An elevated expression of serum exosomal microRNA - 191, - 21, - 451a of pancreatic neoplasm is considered to be efficient diagnostic marker[J]. *BMC Cancer*, 2018, 18(1): 116. doi: 10.1186/s12885-018-4006-5.
- [50] McKiernan J, Donovan MJ, O'Neill V, et al. A novel urine exosome gene expression assay to predict high-grade prostate cancer at initial biopsy[J]. *JAMA Oncol*, 2016, 2(7): 882 - 889. doi: 10.1001/jamaoncol.2016.0097.
- [51] Li S, Luo LH, He Y, et al. Dental pulp stem cell-derived exosomes alleviate cerebral ischaemia-reperfusion injury through suppressing inflammatory response[J]. *Cell Prolif*, 2021, 54(8): e13093. doi: 10.1111/cpr.13093.
- [52] Ji LJ, Bao LL, Gu ZF, et al. Comparison of immunomodulatory properties of exosomes derived from bone marrow mesenchymal stem cells and dental pulp stem cells[J]. *Immunol Res*, 2019, 67(45): 432-442. doi: 10.1007/s12026-019-09088-6.
- [53] Zhang Y, Shi S, Xu Q, et al. SIS-ECM laden with GMSC-derived exosomes promote taste bud regeneration[J]. *J Dent Res*, 2019, 98(2): 225-233. doi: 10.1177/0022034518804531.
- [54] Zhang SC, Yang Y, Jia SX, et al. Exosome-like vesicles derived from Hertwig's epithelial root sheath cells promote the regeneration of dentin - pulp tissue[J]. *Theranostics*, 2020, 10(13): 5914-5931. doi: 10.7150/thno.43156.
- [55] Liu L, Guo SJ, Shi WW, et al. Bone marrow mesenchymal stem cell-derived small extracellular vesicles promote periodontal regeneration[J]. *Tissue Eng Part A*, 2021, 27(13): 962-976. doi: 10.1089/ten.TEA.2020.0141.
- [56] Aheget H, Tristán-Manzano M, Mazini L, et al. Exosome: a new player in translational nanomedicine[J]. *J Clin Med*, 2020, 9(8): 2380. doi: 10.3390/jcm9082380.

(编辑 张琳,曾曙光)



官网

## · 短讯 ·

## 《口腔疾病防治》被瑞士 HINARI 数据库收录

近期编辑部获悉《口腔疾病防治》被瑞士《健康网络首创研究获取》(Health Internetwork Access to Research Initiative, HINARI) 数据库收录。

这是继《口腔疾病防治》被美国《乌利希期刊指南》(Ulrichsweb)、WHO 西太平洋地区医学索引(The Western Pacific Region Index Medicus, WPRIM)、波兰《哥白尼索引》(Index Copernicus, IC)、瑞典《开放获取期刊指南》(Directory of Open Access Journals, DOAJ)、荷兰 Scopus 数据库等多个国际重要数据库收录后的又一国际重要数据库入选,这表明由南方医科大学口腔医院主办的《口腔疾病防治》的国际影响力得到进一步提升。

在此,本刊编辑部向长期关心、支持杂志发展的各级领导、全体编委、审稿专家、广大作者、读者致以衷心的感谢!

《口腔疾病防治》编辑部