

离子交换与吸附, 2023, 39(6): 558 ~ 569

ION EXCHANGE AND ADSORPTION

文章编号: 1001-5493(2023)06-0558-12

doi: 10.16026/j.cnki.ica.2023060558

外泌体在疾病诊断领域的研究及应用进展*

李晓敏** 郭子芳 贾轶静 唐毓婧 郭敏 邓莹楠 李可

中石化(北京)化工研究院有限公司, 中国石化医用卫生材料研究
与应用重点实验室, 北京 100013

摘要: 外泌体是细胞分泌的一种纳米级囊泡, 具有获取便捷、稳定性好、准确度高、浓度可控等优势, 在疾病早期诊断、进展监测以及预后评估中具有巨大的应用前景。本文主要介绍了外泌体在疾病诊断中的研究进展及临床应用现状, 并对其未来发展进行了展望。

关键词: 外泌体; 疾病诊断; 分离; 生物标志物

中图分类号: R446 文献标识码: A

Research and Application Progress of Exosomes in Disease Diagnosis

LI Xiaomin GUO Zifang JIA Yijing TANG Yujing GUO Min
DENG Yingnan LI Ke

*Sinopec Beijing Research Institute of Chemical Industry, Sinopec Key
Laboratory of Research and Application of Medical and Hygienic Materials,
Beijing 100013, China*

Abstract: Exosomes are nanoscale vesicles released by cells with the advantages of convenient acquisition, good stability, high accuracy, and controllable concentration, which have great application prospects in early diagnosis, progress monitoring, and prognosis evaluation of diseases. This article primarily provides an overview of the evolving research and current clinical applications of exosomes in disease diagnosis, while also offering insights into their future developments.

Keywords: Exosome; Disease diagnosis; Isolation; Biomarker.

* 收稿日期: 2023年10月15日

项目基金: 中国石化科技部项目 (223086)

作者简介: 李晓敏 (1992~), 女, 重庆人, 博士研究生. ** 通讯联系人: E-mail: lixm.bjhy@sinopec.com

1 前言

外泌体 (Exosome) 是一种大多数细胞都会主动释放的具有脂质双层膜结构的纳米级囊泡, 尺寸在 40~160nm^[1]。最初, 外泌体被认为是细胞排出的废物, 并未引起重视, 后来越来越多的研究认为, 外泌体富集了多种生物活性分子如核酸、蛋白质和脂质, 可以从供体细胞转移到受体细胞, 进行细胞内信息传递, 是细胞间通讯的重要参与者^[1,2]。2013年, 诺贝尔生理学或医学奖颁给了在细胞间囊泡 (外泌体等) 运输调控机制研究上做出突出贡献的三位科学家, 从而引发了外泌体研究热潮, 将外泌体的研究推向了新的高度。目前, 外泌体在肺癌、结直肠癌、乳腺癌、胰腺癌、心血管等疾病的诊断和治疗研究上都取得了不错的进展, 部分已推向临床应用, 具有广阔的应用市场^[3]。据报道, 外泌体市场呈指数级增长, 外泌体诊断的全球市场预计将从2021年的5710万美元增长到2026年的3.219亿美元, 外泌体治疗的市场预计将由2021年的3310万美元增长至1.692亿美元^[4]。

外泌体能够用于疾病诊断主要是富含多种生物活性分子, 即生物标志物, 可以反应其亲代细胞的生理及病理状态^[5]。主要优势有以下几点: (1) 获取便捷, 外泌体广泛存在于人体血液、尿液、唾液、粪便等易于获取的生物流体中, 便于取出进行体外检测, 无侵入性, 更无创安全; (2) 稳定性高, 由于脂质双层膜结构的存在, 外泌体的稳定性相对较高, 收集到的生物样本可在4℃储存几天, 在-20℃或者-80℃能够存放更长时间; (3) 准确性高, 分泌出的外泌体含有亲代细胞中整套的DNA信息, 作为生物标志物比其他无细胞成分的标志物更能准确反映其亲代细胞的生理及病理状态; (4) 浓度高且可控, 多数外泌体中相应生物标志物含量较其他成分更高, 并且可以通过预分离、浓缩等方式提高浓度, 进而可以提供更高的检测灵敏度^[2,3]。因此, 外泌体在疾病的早期诊断、进展监测、预后评估中具有巨大的潜在应用价值, 本文主要介绍在疾病诊断领域外泌体的研究进展及应用现状。

2 外泌体在疾病诊断领域的研究

外泌体上的多种生物活性分子可以用作疾病的生物标志物, 这些生物标志物主要分为两类, 一类是蛋白类标志物, 比如CD9、CD63、CD81、CEA (癌胚蛋白)、Her2 (人表皮生长因子受体-2)、EpCAM (上皮细胞粘附分子) 等; 一类是核酸类标志物, 比如miR-21、miR-141、miR-15a-5p、miR-10b等miRNA, mutated KRAS DNA等DNA, HOTTIP等lncDNA^[3]。它们在疾病和正常组织处细胞之间表达量不同, 甚至在不同的疾病中表达量也存在差异性分布, 这给疾病的准确检测提供了可能性。为了检测疾病是否存在、发展如何, 或者是否已治愈, 需要将患者生物样本中的外泌体提取出来, 并通过各种手段检测蛋白或核酸的表达情况, 与正常组织对比, 进而判断相应组织是否存在病症。

2.1 外泌体分离富集

外泌体提取主要是依靠分离富集方法来实现，传统的方法包括超速离心法、聚合物沉淀法、尺寸排阻层析等^[6]。评估外泌体分离富集效果主要从分离效率、分离纯度、耗时长短、操作难易、完整性等多个维度进行^[2,6]。超速离心法^[7]是最常用的外泌体分离富集方法，通过密度、尺寸大小以及沉降速度差异采用差速离心进行分离，是目前的“金标准”，该方法相对简单，稳定成熟，但耗时长、分离效率低，样品需求量大。聚合物沉淀法^[8,9]是使用高亲水性聚合物如聚乙二醇与外泌体膜周围的水分子竞争性结合，降低溶解度，最终实现外泌体分离，该方法操作简单，产率高，但纯度低，容易混有杂蛋白。尺寸排阻层析^[10]是根据样品的大小和凝胶孔径大小分离外泌体，在分离过程中，大分子较早被洗脱，小分子或颗粒直接扩散到孔隙中。该方法获得的外泌体纯度高，完整性和活性较好，缺点是放大困难，成本高。

目前，也发展了一些新的分离富集方法，如免疫捕获法、微流控法等。免疫捕获法^[11-13]通过磁性颗粒上修饰的抗体或适配体与外泌体表面特异蛋白结合，在外磁场作用下实现外泌体的快速分离，该方法操作简便，特异性高，但由于外泌体蛋白表达的异质性，导致该方法的捕获率较低，成本较高。微流控法^[14-16]是在前期分离方法的基础上，利用微流控技术对外泌体进行分离的方法，比如使用纳米孔膜、纳米阵列、微过滤器等器件结构直接对样品进行过滤分离。这种方法容易实现自动化，但缺乏方法验证和标准化，限制了其应用。上述方法在科学研究中已经广泛使用，但是基于成本和效率考虑，在规模放大和未来规模化生产上仍存在较多问题。

表1 外泌体分离富集方法				
方法		分离机制	优点	缺点
传统	超速离心法	利用外泌体和杂质颗粒在大小、密度上的差别进行分离	操作简单，方法成熟	耗时长，效率低
	聚合物沉淀法	利用亲水性聚合物和外泌体溶解度不同进行分离	操作简单，产率高	纯度低
	尺寸排阻层析	利用外泌体和杂质粒子的尺寸不同进行分离	完整性高	成本高
新型	免疫捕获法	基于抗原-抗体反应捕获外泌体进行分离	操作简单，完整性好，特异性高	成本高
	微流控法	基于微流控技术分离外泌体	易实现自动化	缺乏方法验证和标准化

2.2 外泌体蛋白检测

外泌体中膜蛋白和细胞质蛋白都可以检测，一些膜蛋白参与了癌症的发生与发展，因而可用作外泌体的分离富集靶点以及疾病的生物标志物。蛋白印迹分析 (Western Blot) 和酶联免疫吸附试验 (ELISA) 是检测外泌体蛋白的常规方法，这两种方法应用广泛，但也存在一些问题，比如程序复杂、灵敏度低^[3]。目前，针对具体需求，也开发了一些新型技术来检测外泌体蛋白，主要有比色法、荧光法、电化学法、表面等离子体共振法

(surface plasmon resonance, SPR)、表面拉曼散射法 (Surface enhanced Raman scattering, SERS)、单外泌体分析法等。

比色法是通过比较或测量发色物质的颜色变化来确定蛋白含量的方法^[17-19]。刘等人^[17]报道了一种纳米酶辅助免疫吸附测定,将2nm金颗粒固定到外泌体磷脂膜上,被固定在微孔板表面的抗体特异性捕获,金作为类过氧化物酶,可以催化3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)比色反应,通过紫外或微孔板分析仪得到的信号强度与目标外泌体膜蛋白的水平成正比。这种利用纳米酶催化TMB显色并辅助免疫吸附测定的方法可以实现从临床样本中快速分析多种外泌体蛋白,如CD63、CEA、Glypian-3 (GPC-3)、PD-L1和HER2。

荧光法是根据荧光谱线的阳性率和强度进行外泌体蛋白鉴定和含量测定。郑等人^[20]利用免疫磁珠捕获外泌体,然后结合可产生荧光信号的酶报告子,在定量液滴微流体系统中测定GPC-1⁺外泌体。也有通过荧光标记适配体来检测外泌体蛋白的方法,如何等人^[21]利用表面修饰适配体的磁珠(cy3标记)来检测外泌体CD63。此外,也可利用具有荧光猝灭能力的氧化石墨烯等材料来检测外泌体蛋白,当引入目标外泌体时,适配体优先结合目标外泌体,导致荧光分子从材料表面脱离,开启荧光信号。如,荧光标记肽Fam标记的适配体在被吸收到氧化石墨烯膜上时荧光被淬灭,而外泌体与适配体竞争性结合,荧光信号重新显示,检出限为 1.6×10^5 个颗粒/mL^[22]。

电化学法是通过检测电化学电势或电流来分析蛋白样本,具有灵敏度高、测量范围宽的优势。近年来,研究人员开发了电化学生物传感器,当外泌体与识别元件如抗体和适体特异性结合时,电化学信号的改变可以量化外泌体,如赵等人^[23]开发了一种电化学生物传感器可以准确检测PD-L1⁺外泌体。在此基础上,也发展了基于适配体的电化学生物传感器(DeMEA),如Jung等人^[24]开发了一种可拆卸的微流控装置,靶向EpCAM的适体被固定在预先镀有金纳米结构的电极表面,微流体涡流可以增加外泌体与传感表面的碰撞,进而能够量化不同阶段乳腺癌患者血浆样本中的外泌体。

SPR是光在金属膜/液面界面全反射产生的一种物理光学现象,当金属膜上相邻介质RI变化改变等离子体共振频率,导致消光谱发生偏移,从而检测到目标外泌体蛋白。Lee等人^[25]开发了一种基于周期性纳米孔阵列透射SPR的纳米等离子体外泌体(nPLEX)检测方法,在每个阵列中都有功能化抗体,nPLEX传感器显示出正比于目标外泌体蛋白水平的光谱位移或强度变化。又比如采用抗LRG1抗体偶联AuR探针,利用等离子效应(散射波长位移和散射强度改变),检测肺癌患者与健康人群尿外泌体中LRG1(富亮氨酸 $\alpha 2$ 糖蛋白1)的差异表达^[15]。

SERS方法类似,通过拉曼信号改变来分析外泌体蛋白含量变化^[13],如使用QSY21涂层的金纳米棒作为标记剂来定量检测乳腺癌血浆来源外泌体靶蛋白HER2和EpCAM^[26]。肖等人^[27]提出了可直接从血清样本中捕获和分析外泌体PD-L1的方法,使用抗PD-L1抗体修饰的Au@Ag@MBA进行外泌体PD-L1标记和SERS检测,该方法可在40min内定量4 μ L血清样品的外泌体PD-L1含量。

单外泌体分析。单个外泌体上蛋白可以提供更准确的肿瘤信息。由于尺寸缘故外泌体不能通过传统的流式细胞术鉴定,因此可通过与醛/硫酸盐乳胶微球结合,然后用荧光

抗体染色, 对其蛋白进行标记并表征。例如, 抗 GPC-1 抗体和 Alexa-488 标记的二抗被引入到外泌体连接的珠上, 阳性珠的百分比代表着 GPC-1⁺ 外泌体的百分比^[28]。纳米流式细胞术的发展也为外泌体蛋白分析提供了新的选择, 比如通过免疫荧光标记, 采用该方法可以测量单个外泌体上 CD9、CD63、CD81、CD235a、CD45、CD41a 和 CD144 的表达^[29]。

2.3 外泌体核酸检测

除蛋白外, 核酸也是外泌体中的常见物质, RNA 是其主要代表, 目前多种 RNA 已显示出作为癌症诊断和预后预测的特异性生物标志物潜力, 最常见的是各种 miRNA^[30]。由于核酸的表达量低, 检测的准确性和可行性就显得尤为重要。目前, 为了量化外泌体核酸的表达水平, 可采用实时定量逆转录技术 (real-time quantitative reverse transcription PCR, qRT-PCR)、DNA 微阵列 (microarray)、新一代高通测序 (next-generation sequencing, NGS)。qRT-PCR 灵敏度很高, 但只能用于检测已知序列的核酸。Microarray 可一次分析外泌体中数千个核酸, 但也存在灵敏度的问题。NGS 有利于高通量发现和定量未知外泌体 RNA 转录物, 但也需解决成本高、数据量大、复杂性高等问题^[31]。为了更好的检测外泌体核酸, 人们也在不断地开发新的技术, 比如液滴数字 PCR (droplet digital PCR, ddPCR)、分子信标 (Molecular beacons, MB)、局域化表面等离子体共振 (Localized surface plasmon resonance, LSPR) 等。

ddPCR 是在 PCR 扩增前对样品进行微滴化处理, 每个单液滴中含有 1 个靶点基因, 并根据荧光幅度标记为阳性或阴性, 通过泊松分布估计目标核酸的浓度。研究表明, ddPCR 在分析尿液外泌体 miRNA 中具有更高的准确性和敏感性^[32]。Breakefield 等人^[33]使用 ddPCR 检测胶质母细胞瘤患者血清或脑脊液外泌体中的异柠檬酸脱氢酶 1 (IDH1) 转录物, 在外泌体中检测出来源患者的突变 IDH1 mRNA, 其含量高于健康对照组。同时也可以使用 ddPCR 量化肝细胞癌 (HCC) 患者血浆样本的 10 种 HCC 特异性 mRNA, 可通过计算评估其在 HCC 上的诊断价值^[34]。通过 ddPCR 也可以检测外体 miR-15a-5p, 可以区分子宫内膜癌患者和健康受试者^[35]。

MB 是一种用荧光标记具有“发夹”样结构的单链寡核苷酸, MB 可与靶序列自发杂交, 从而破坏发夹环结构并诱导荧光出现^[36]。Lee 等人^[37]发现癌症细胞和人血清外泌体上 miR-21 与分子信标杂交, 可产生高荧光信号。基于分子信标的生物传感器也可以从人尿液外泌体中检测 miR-375 和 miR-574-3p^[38], 从人血清外泌体中检测 miR-21、miR-375 和 miR-27a^[39]。

LSPR 也可用于外泌体核酸的检测。Sardar 等人^[40]开发了一种基于 LSPR 的生物传感器, 用于外泌体 miR-10b 的无标记和无损测量。丁等人^[41]也基于 LSPR, 使用 Au-Ag 异质结构和 DNA 四面体框架 (DTF) 同时检测临床样品中的多种非小细胞肺癌外泌体 miRNA。外泌体 miRNA 被固定在金阵列芯片上的各种 DTF 探针捕获。随后, 单链 DNA 功能化的银纳米立方体 (AgNC) 与捕获的 miRNA 杂交, 然后将单链 DNA 包裹的 Au 纳米颗粒组装在 AgNC 表面, 形成 Au-Ag 异质结构以实现 LSPR 响应。该方法实现了 2fM 到 20nM 的宽

检测范围以及1.68fM的超低检测限。

热电泳技术也可用于核酸检测。孙等人^[42]开发了一种热电泳传感器,用于原位检测外泌体miRNA,无需RNA提取或靶扩增。修饰的核酸适配体可与外泌体miRNA结合,诱导荧光的出现,热电泳积累后,荧光信号被放大,可在小体积血清样品中灵敏检测0.36fM miRNA,其中miR-375在乳腺癌早期(I、II期)检测中显示出85%的准确率。

DNA四面体是一种具有高度可控性的DNA纳米结构,也可用于外泌体核酸的检测。比如可以通过化学修饰和DNA自组装提供不同的扩增信号,定量检测人血清外泌体中miR-21,检测限可达 $45.4 \times 10^{-15} \text{M}$ ^[43]。

此外,基于全内反射荧光成像(total internal reflection fluorescence, TIRF)可实现外泌体单囊泡成像,李等人^[44]开发了一种使用无活性的分裂式DNA酶和荧光淬灭的底物共同包装至streptolysin O处理的纳米级外泌体中,产生靶向miRNA的催化裂解反应,放大荧光信号,用于直接观察和定量血清微量样品中外泌体单囊泡及其miR-21含量。最近,CRISPR/Cas基因编辑技术也为外泌体中蛋白和核酸的检测和定量提供了新的机会,如将核酸扩增和CRISPR/Cas整合,可以提高分析的特异性和灵敏性^[45,46]。

3 外泌体在疾病诊断领域的应用

随着外泌体研究的深入,为了满足科研机构 and 大型药企的研发及应用需求,基于外泌体分离富集技术的外泌体提取试剂盒及提取系统不断被研发出来,如国内恩泽康泰开发出了基于尺寸排阻色谱法的外泌体分离纯化专利产品—Exosupur试剂盒,具有95%的回收率和99.5%的杂蛋白去除效率,汇芯生物研发了全球首台用于外泌体分离纯化的非标记自动提纯系统—EXODUS®,运用负压振荡系统结合双耦和谐波振荡系统作用于纳米超滤芯片,将样本中游离核酸与蛋白等杂质通过纳米孔快速去除并截留外泌体,从而纯化富集外泌体。

在外泌体提取技术的基础上,全球近三分之一外泌体企业布局了外泌体诊断业务(另三分之二主要布局外泌体治疗业务)。然而截至2023年,也仅有几款外泌体疾病诊断产品面市,包括ExoDX Lung (ALK)、ExoDX Prostate (IntelliScore)、ExoDX Lung (T790M)以及MedOncAlyzer 170。其中,ExoDX Lung (ALK)是2016年Exosome Diagnostics(简称ExosomeDX)公司推出的第一款外泌体诊断产品,也是世界上第一个外泌体诊断产品,极具里程碑意义,该产品可以从血液样本中分离和分析外泌体RNA,可对非小细胞肺癌患者是否发生EML4-ALK突变进行筛查,灵敏度88%,特异性100%,能够帮助医生判断患者是否需要进行ALK抑制剂治疗。同年,ExosomeDX公司又推出了ExoDX Prostate (IntelliScore),即EPI,该产品可以通过检测尿液中外泌体中三个RNA(ERG、PCA3和SPDEF),并结合专有算法,对前列腺PSA在2~10ng/mL的患者是否可能发展为高级别前列腺癌进行评估。2017年,ExosomeDX推出了肿瘤广谱检测产品—MedOncAlyzer 170,该产品只需要患者0.5mL的血液或血浆样本来检测外泌体RNA和循环肿瘤DNA,就可完成170个基因、82000个突变类型的检测,敏感度高达99.9%。国内也有一些以外泌体诊

断为目标的公司,如思路迪、恩泽康泰,亿航生物、昱鼎生物、宝藤生物、晟燃生物、尧景基因、碳码科技等,多数是2015年后开始布局。其中思路迪研发的外泌体卵巢癌辅助诊断试剂盒(化学发光法)是我国首个进入注册临床试验的外泌体诊断产品,已于2022年2月获得国家药监局的优先审批。尽管临床应用价值已经在科研人员的研究中得到证明,但仍需要更多的临床样本、人群和试验来确认外泌体在疾病诊断中的作用,而大多数企业很难拿到足量的临床样本对外泌体诊断产品进行验证,这也是导致外泌体诊断应用发展较慢的主要原因。

4 结论与展望

外泌体获取便捷、稳定性好、准确度高、浓度可控、可用作多种疾病的早期诊断、进程监测以及预后评估的生物标志物,在疾病诊断领域的前景十分可观。通过传统和新型的外泌体分离富集技术介绍,外泌体蛋白及核酸类生物标志物检测方法的分析,以及应用现状总结,我们知道外泌体在疾病诊断领域主要还集中于科学研究,应用转化较少,仅有少量产品面市。在当前和未来,外泌体要实现更好的应用转化,仍需在以下三个方面继续努力,一是优化分离富集技术,提高外泌体产量,建立标准化流程;二是结合临床应用需求,提高外泌体分析敏感性和特异性;三是产学研医联合,通过更多的临床样本、人群和试验确认外泌体诊断产品的有效性。只有在上述环节取得高质量可信成果,外泌体才能真正应用于临床诊断,给患者带来福音。

参考文献

- [1] Kalluri Raghu, LeBleu Valerie S. The biology, function, and biomedical applications of exosomes[J]. Science, 2020, 367(6478): eaau6977.
- [2] Cheng Ke, Kalluri Raghu. Guidelines for clinical translation and commercialization of extracellular vesicles and exosomes based therapeutics[J]. Extracellular Vesicle, 2023, 2: 100029.
- [3] Yu Dan, Li Yixin, Wang Maoye, Gu Jianmei, Xu Wenrong, Cai Hui, Fang Xinjian, Zhang Xu. Exosomes as a new frontier of cancer liquid biopsy[J]. Molecular Cancer, 2022, 21(1): 56.
- [4] Exosome diagnostics and therapeutics: Global markets 2021-2026. 2021.
- [5] LeBleu Valerie S, Kalluri Raghu. Exosomes as a multicomponent biomarker platform in cancer[J]. Trends Cancer, 2020, 6(9): 767-774.
- [6] Li Pin, Kaslan Melisa, Lee Sze Han, Yao Justin, Gao Zhiqiang. Progress in exosome isolation techniques[J]. Theranostics, 2017, 7(3): 789-804.
- [7] Royo Felix, Théry Clotilde, FalcónPérez Juan M, Nieuwland Rienk, Witwer Kenneth W. Methods for separation and characterization of extracellular vesicles: results of a worldwide

- survey performed by the ISEV rigor and standardization subcommittee[J]. *Cells*, 2020, 9(9): 1955.
- [8] Weng Yejing, Sui Zhigang, Shan Yichu, Hu Yechen, Chen Yuanbo, Zhang Lihua, Zhang Yukui. Effective isolation of exosomes with polyethylene glycol from cell culture supernatant for in-depth proteome profiling[J]. *Analyst*, 2016, 141(15): 4640-4646.
- [9] Rider Mark A, Hurwitz Stephanie N, Meckes David G. ExtraPEG: a polyethylene glycol-based method for enrichment of extracellular vesicles[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6(1): 23978.
- [10] Taylor Douglas D, Shah Sahil. Methods of isolating extracellular vesicles impact downstream analyses of their cargoes[J]. *Methods*, 2015, 87: 3-10.
- [11] Poellmann Michael J, Nair Ashita, Bu Jiyeon, Kim Jack K H, Kimple Randall J, Hong Seungpyo. Immunoavidity-based capture of tumor exosomes using poly (amidoamine) dendrimer surfaces[J]. *Nano Letters*, 2020, 20(8): 5686-5692.
- [12] Cheng Jia, Zhu Nanhong, Zhang Yujia, Yu Yue, Kang Ke, Yi Qiangying, Wu Yao. Hedgehog-inspired immunomagnetic beads for high-efficient capture and release of exosomes[J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2022, 10(21): 4059-4069.
- [13] Dong Shilian, Wang Yuhui, Liu Zhengqi, Zhang Wuwen, Yi Kezhen, Zhang Xingang, Zhang Xiaolei, Jiang Changzhong, Yang Shikuan, Wang Fubing, Xiao Xiangheng. Beehive-inspired macroporous SERS probe for cancer detection through capturing and analyzing exosomes in plasma[J]. *ACS applied Materials & Interfaces*, 2020, 12(4): 5136-5146.
- [14] Kanwar Shailender Singh, Dunlay Christopher James, Simeone Diane M, Negrath Sunitha. Microfluidic device (ExoChip) for on-chip isolation, quantification and characterization of circulating exosomes[J]. *Lab on a Chip*, 2014, 14(11): 1891-1900.
- [15] Yang Qinsi, Cheng Liming, Hu Liang, Lou Doudou, Zhang Ting, Li Jiaoyuan, Zhu Qingfu, Liu Fei. An integrative microfluidic device for isolation and ultrasensitive detection of lung cancer-specific exosomes from patient urine[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2020, 163: 112290.
- [16] Meng Yingchao, Zhang Yanan, Bühler Marcel, Wang Shuchen, Asghari Mohammad, Stürchler Alessandra, Mateescu Bogdan, Weiss Tobias, Stavrakis Stavros, deMello Andrew J. Direct isolation of small extracellular vesicles from human blood using viscoelastic microfluidics[J]. *Science Advances*, 2023, 9(40): eadi5296.
- [17] Di Huixia, Mi Ze, Sun Yan, Liu Xuehui, Liu Xinzhuo, Li Ang, Jiang Ying, Gao Hongmei, Rong Pengfei, Liu Dingbin. Nanozyme-assisted sensitive profiling of exosomal proteins for rapid cancer diagnosis[J]. *Theranostics*, 2020, 10(20): 9303-9314.
- [18] Chen Junge, Xu Youchun, Lu Ying, Xing Wanli. Isolation and visible detection of tumor-

- derived exosomes from plasma[J]. *Analytical Chemistry*, 2018, 90(24): 14207-14215.
- [19] Zhen Chen, Cheng Shibo, Cao Pan, Qiu Quanfa, Chen Yan, XuYu, Xie Min, Huang Weihua. Detection of exosomes by ZnO nanowires coated three-dimensional scaffold chip device[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2018, 122: 211-216.
- [20] Liu Chunchen, Xu Xiaonan, Li Bo, Situ Bo, Pan Weilun, Hu Yu, An Taixue, Yao Shuhuai, Zheng Lei. Single-exosome-counting immunoassays for cancer diagnostics[J]. *Nano Letters*, 2018, 18(7): 4226-4232.
- [21] Yu Xiaocheng, He Lei, Pentok Myima, Yang Haowen, Yang Yale, Li Zhiyang, He Nongyue, Deng Yan, Li Song, Liu Tonghua, Chen Xiangyu, Luo Huiwen. An aptamer-based new method for competitive fluorescence detection of exosomes[J]. *Nanoscale*, 2019, 11(33): 15589-15595.
- [22] Jin Dan, Yang Fan, Zhang Yulin, Liu Li, Zhou Yujuan, Wang Fubing, Zhang Guojun. ExoAPP: exosome-oriented, aptamer nanoprobe-enabled surface proteins profiling and detection[J]. *Analytical Chemistry*, 2018, 90(24): 14402-14411.
- [23] Cao Ya, Wang Ying, Yu Xiaomeng, Jiang Xihui, Li Gang, Zhao Jing. Identification of programmed death ligand-1 positive exosomes in breast cancer based on DNA amplification-responsive metal-organic frameworks[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2020, 166: 112452.
- [24] Kashefi-Kheyraadi Leila, Kim Junmoo, Chakravarty Sudesna, Park Sunyoung, Gwak Hogeong, Kim Seung-Il, Mohammadniaei Mohsen, Lee Min-Ho, Hyun Kyung-A, Jung Hyo-Il. Detachable microfluidic device implemented with electrochemical aptasensor (DeMEA) for sequential analysis of cancerous exosomes[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2020, 169: 112622.
- [25] Im Hyungsoon, Shao Huilin, Park Yong Il, Peterson Vanessa M, Castro Cesar M, Weissleder Ralph, Lee Hakho. Label-free detection and molecular profiling of exosomes with a nano-plasmonic sensor[J]. *Nature Biotechnology*, 2014, 32(5): 490-495.
- [26] Kwizera Elyahb Allie, O'Connor Ryan, Vinduska Vojtech, Williams Melody, Butch Elizabeth R, Snyder Scott E, Chen Xiang, Huang Xiaohua. Molecular detection and analysis of exosomes using surface-enhanced raman scattering gold nanorods and a miniaturized device[J]. *Theranostics*, 2018, 8(10): 2722-2738.
- [27] Pang Yuanfeng, Shi Jinmaio, Yang Xingsheng, Wang Chongwen, Sun Zhiwei, Xiao Rui. Personalized detection of circling exosomal PD-L1 based on $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TiO}_2$ isolation and SERS immunoassay[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2020, 148: 111800.
- [28] Melo Sonia A, Luecke Linda B, Kahlert Christoph, Fernandez Agustin F, Gammon Seth T, Kaye Judith, LeBleu Valerie S, Mittendorf Elizabeth A, Weitz Juergen, Rahbari Nuh,

- Reissfelder Christoph, Pilarsky Christian, Fraga Mario F, Piwnica-Worms David, Kalluri Raghu. Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer[J]. *Nature*, 2015, 523(7559).
- [29] Liu Haisheng, Yuan Wenli, Pang Qisheng, Xue Chengfeng, Yan Xiaomei. Single-particle analysis of tear fluid reveals abundant presence of tissue factor-exposing extracellular vesicles with strong coagulation activity[J]. *Talanta*, 2022, 239: 123089.
- [30] Wang Shuhong, Lin Yusheng, Zhang Yishi, Qiu Xiaofu, Pan Yunlong, Yeung Sai-Ching Jim, Zhang Hao. Complex RNA world in small extracellular vesicles for liquid biopsy in cancer management[J]. *Extracellular Vesicle*, 2022, 1: 100015.
- [31] Gandham Srujan, Su Xianyi, Wood Jacqueline, Nocera Angela, Alli Sarath Chandra, Milane Lara, Zimmerman Alan, Amiji Mansoor, Ivanov Alexander. Technologies and standardization in research on extracellular vesicles[J]. *Trends in Biotechnology*, 2020, 38 (10): 1066-1098.
- [32] Wang Cong, Ding Qiang, Plant Pamela, Basheer Mayada, Yang Chuance, Tawedrous Eriny, Krizova Adriana, Boulos Carl, Farag Mina, Cheng Yufeng, Yousef George M. Droplet digital PCR improves urinary exosomal miRNA detection compared to real-time PCR[J]. *Clinical Biochemistry*, 2019, 67: 54-59.
- [33] Chen Walter W, Balaj Leonora, Liau Linda M, Samuels Michael L, Kotsopoulos Steve K, Maguire Casey A, Loguidice Lori, Soto Horacio, Garrett Matthew, Zhu Lin Dan, Sivaraman Sarada, Chen Clark, Wong Eric T, Carter Bob S, Hochberg Fred H, Breakefield Xandra O, Skog Johan. BEAMing and droplet digital PCR analysis of mutant IDH1 mRNA in glioma patient serum and cerebrospinal fluid extracellular vesicles[J]. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, 2013, 2(7): e109.
- [34] Sun Na, Lee Yi-Te, Zhang Ryan Y., Kao Rueihung, Teng Pai-Chi, Yang Yingying, Yang Peng, Wang Jasmine J., Smalley Matthew, Chen Pin-Jung, Kim Minhyung, Chou Shih-Jie, Bao Lirong, Wang Jing, Zhang Xinyue, Qi Dongping, Palomique Juvelyn, Nissen Nicolas, Han Steven-Huy B., Sadeghi Saeed, Finn Richard S., Saab Sammy, Busuttil Ronald W., Markovic Daniela, Elashoff David, Yu Hsiao-hua, Li Huiying, Heaney Anthony P., Posadas Edwin, You Sungyong, Yang Ju Dong, Pei Renjun, Agopian Vatche G., Tseng Hsian-Rong, Zhu Yazhen. Purification of HCC-specific extracellular vesicles on nanosubstrates for early HCC detection by digital scoring[J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 4489.
- [35] Zhou Lanyun, Wang Wei, Wang Fenfen, Yang Siqi, Hu Jiaqi, Lu Bingjian, Pan Zimin, Ma Yu, Zheng Mengyue, Zhou Liyuan, Lei Shufeng, Song Penghong, Liu Pengyuan, Lu Weiguo, Lu Yan. Plasma-derived exosomal miR-15a-5p as a promising diagnostic biomarker for early detection of endometrial carcinoma[J]. *Molecular Cancer*, 2021, 20

- (1): 57.
- [36] Rhee Won Jong, Jeong Seunga. Extracellular vesicle miRNA detection using molecular beacons[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2017, 1660: 287-294.
- [37] Lee Ji Hye, Kim Jeong Ah, Kwon Min Hee, Kang Ji Yoon, Rhee Won Jong. In situ single step detection of exosome microRNA using molecular beacon[J]. *Biomaterials*, 2015, 54: 116-125.
- [38] Lee Jinhee, Kwon Min Hee, Kim Jeong Ah, Rhee Won Jong. Detection of exosome miRNAs using molecular beacons for diagnosing prostate cancer[J]. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 2018, 46(sup3): 52-63.
- [39] Lee Ji Hye, Kim Jeong Ah, Jeong Seunga, Rhee Won Jong. Simultaneous and multiplexed detection of exosome microRNAs using molecular beacons[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2016, 86: 202-210.
- [40] Joshi Gayatri K, Deitz-McElyea Samantha, Liyanage Thakshila, Lawrence Katie, Mali Sonali, Sardar Rajesh, Korc Murray. Label-free nanoplasmonic-based short noncoding RNA sensing at attomolar concentrations allows for quantitative and highly specific assay of microRNA-10b in biological fluids and circulating exosomes[J]. *ACS Nano*, 2015, 9 (11): 11075-11089.
- [41] Wu Wenwen, Yu Xiaolin, Wu Jiangling, Wu Tao, Fan Yunpeng, Chen Wenqin, Zhao Min, Wu Haiping, Li Xinmin, Ding Shijia. Surface plasmon resonance imaging-based biosensor for multiplex and ultrasensitive detection of NSCLC-associated exosomal miRNAs using DNA programmed heterostructure of Au-on-Ag[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2020, 175: 112835.
- [42] Zhao Junxiang, Liu Chao, Li Yike, Ma Yao, Deng Jinqi, Li Lele, Sun Jiashu. Thermophoretic detection of exosomal microRNAs by nanoflares[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2020, 142(11): 4996-5001.
- [43] Chen Xiaohui, Jia Mei, Liu Lianhua, Qiu Xiaopei, Zhang Hong, Yu Xingle, Gu Wei, Qing Guangchao, Li Qingmei, Hu Xiaolin, Wang Ruixuan, Zhao Xianxian, Zhang Liangliang, Wang Xianfeng, Durkan Colm, Wang Nan, Wang Guixue, Luo Yang. High-fidelity determination and tracing of small extracellular vesicle cargoes[J]. *Small*, 2020, 16(40): e2002800.
- [44] He Dinggeng, Wang Huizhen, Ho See-Lok, Chan Hei-Nga, Hai Luo, He Xiaoxiao, Wang Kemin, Li Hung-Wing. Total internal reflection-based single-vesicle in situ quantitative and stoichiometric analysis of tumor-derived exosomal microRNAs for diagnosis and treatment monitoring[J]. *Theranostics*, 2019, 9(15): 4494-4507.
- [45] Feng Wei, Newbigging Ashley M, Tao Jeffrey, Cao Yiren, Peng Hanyong, Le Connie, Wu

- Jinjun, Pang Bo, Li Juan, Tyrrell D Lorne, Zhang Hongquan, Le X Chris. CRISPR technology incorporating amplification strategies: molecular assays for nucleic acids, proteins, and small molecules[J]. Chemical Science, 2021, 12(13): 4683-4698.
- [46] Li Huilan, Xing Shan, Xu Jianhua, He Yi, Lai Yanzhen, Wang Yu, Zhang Ge, Guo Songhe, Deng Min, Zeng Musheng, Liu Wanli. Aptamer-based CRISPR/Cas12a assay for the ultrasensitive detection of extracellular vesicle proteins[J]. Talanta, 2021, 221: 121670.

(责任编辑 张楠)