

植物细胞外囊泡及其分析技术的进展

张雪萍 鲁雨晴 张月倩 李晓娟

(1. 北京林业大学生物科学与技术学院 林木育种与生态修复国家工程技术中心 林木花卉遗传育种教育部重点实验室, 北京 100083;

2. 北京林业大学树木发育与基因编辑研究院, 北京 100083)

摘要: 细胞外囊泡是细胞在生理和病理条件下通过胞吐作用释放的具有磷脂双分子层结构的纳米级囊泡。细胞外囊泡作为蛋白质、核酸、脂质和代谢物等物质的载体, 能够在细胞与细胞之间穿梭, 行使物质传递、信息交流的功能, 是细胞间通讯的重要媒介。近年来, 植物中细胞外囊泡的研究也不断深入, 其研究和分析技术也取得了很大进展。本文介绍了细胞外囊泡的组成, 综述了植物中细胞外囊泡的生物学功能, 分析了细胞外囊泡分离与富集方法的优缺点, 以及原位成像技术的应用, 最后对植物细胞外囊泡研究技术发展的重点进行了展望。

关键词: 细胞外囊泡; 功能; 分离方法; 原位检测

DOI:10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2022-1106

Advances in Plant Extracellular Vesicles and Analysis Techniques

ZHANG Xue-ping LU Yu-qing ZHANG Yue-qian LI Xiao-juan

(1. College of Biological Sciences and Technology, Beijing Forestry University, National Engineering Technology Center for Forest Breeding and Ecological Restoration, Key Laboratory of Forest and Flower Genetics and Breeding of the Ministry of Education, Beijing 100083; 2. Institute of Tree Development and Gene Editing, Beijing Forestry University, Beijing 100083)

Abstract: Extracellular vesicles (EVs) are nanoscale vesicles with a phospholipid bilayer structure released by cells through exocytosis under physiological and pathological conditions. EVs, as carriers of information such as proteins, nucleic acids, lipids, and metabolites, can shuttle between cells to play function of material transfer and information exchange, thus they are important for intercellular communication. In recent years, the research of EVs in plant has also been deepening, and there have been great progress in their research and analysis technologies. In this review, we briefly introduce the composition of extracellular vesicles. Then we summarize the current progress in the biological functions of EVs in plants. Furthermore, we analyze the advantages and disadvantages of EV isolation and enrichment methods, as well as the application of EVs in situ imaging technology. Finally, we prospect the potential technologies for the research of plant EVs.

Key words: extracellular vesicles; function; isolation method; in situ detection

细胞外囊泡 (extracellular vesicles, EVs) 是由细胞分泌的、具有膜结构的各种类型囊泡的统称^[1]。EVs 从细胞释放到周围环境中, 这一生物学过程在从细菌到植物和人类的整个进化过程中都是保守的^[1]。最初人们认为 EVs 的分泌是细胞清除不需要的物质分子的一种手段, 但进一步研究发现, EVs

可以作为信息载体, 参与细胞间通讯。EVs 能将信息从供体细胞运输到受体细胞, 被受体细胞识别后, 通过 EVs 表面分子或内吞途径将信息传递到细胞内, 进一步激活受体细胞内的信号转导^[2]。这些信息物质包括蛋白质、脂质、代谢物、糖、RNA (mRNA、miRNA、siRNA) 甚至 DNA 等^[3]。在临床医学中,

收稿日期: 2022-09-09

基金项目: 国家自然科学基金项目 (91954202, 31871349), 北京林业大学科技创新计划项目 (2019JQ03003)

作者简介: 张雪萍, 女, 硕士研究生, 研究方向: 植物细胞生物学; E-mail: zhangxp97@bjfu.edu.cn

通讯作者: 李晓娟, 女, 博士, 教授, 研究方向: 植物细胞生物学; E-mail: lixj@bjfu.edu.cn

EVs 可以用于治疗、预防疾病, 以及成为判断某些疾病的生物标志物^[4]。在植物中也有研究显示, EVs 可以作为植物和病原菌细胞之间信息交流的有效载体^[5], 或者参与植物对病原体的防御反应, 在调节植物免疫方面发挥着重要作用^[6]。

由于 EVs 的形态和内容物具有异质性的特性, 使得 EVs 难以用常规技术和方法分离和研究, 因此实现在单个囊泡水平上对 EVs 进行检测成为当前技术研究的热点问题。此外, EVs 的尺寸大小普遍低于光学衍射的极限, 传统的成像技术难以原位观察 EVs。由于近年来标记和成像技术的飞速发展, 原位成像技术也逐渐用于对 EVs 的活细胞原位检测。本文概述了 EVs 的组成和形成途径并对其在植物的主要功能的研究进展进行了总结。此外, 重点介绍了 EVs 的分离与富集技术, 以及 EVs 的原位成像技术及其在植物细胞研究中的应用, 并对 EVs 研究技术未来的发展作出了展望。

1 EVs 的分类与形成途径

1.1 EVs 的分类

EVs 是纳米级的含有磷脂双分子层结构的囊泡^[7], 几乎所有的细胞都可以分泌 EVs。已有研究显示 EVs 可以从各种体液, 如血浆、尿液、唾液、母乳和精液^[7], 或细胞培养基中分离得到 EVs^[3]。细胞释放大量异质性 EVs, 这些 EVs 主要通过其细胞内来源、特异性标记蛋白、生物物理特性和生物功能来区分^[8]。它们主要被分为 3 类: ①外泌体 (exosomes, Exs): 通常直径为 30–150 nm, 密度在 1.13–1.19 g/mL 之间, 来自细胞内的胞内体。②微囊泡 (microvesicles, MVs): 直径 100–1 000 nm, 由质膜向外释放 (出芽) 产生。③凋亡小体 (apoptotic vesicles, AVs): 直径 1 000–5 000 nm, 密度为 1.16–1.28 g/mL, 由凋亡细胞释放的小泡^[9]。

1.2 EVs 的形成途径

通过透射电镜、免疫电镜和生物化学手段, 对 EVs 的生物发生进行了深入的研究^[10–11], 研究显示 3 类 EVs 的形成途径不同。

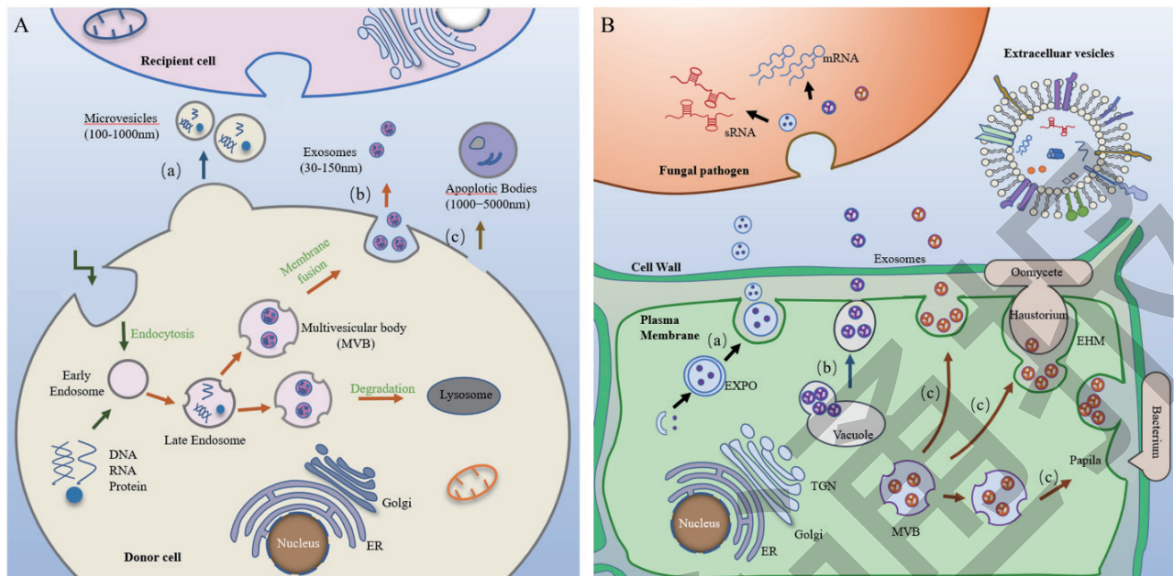
外泌体被报道有两条形成途径, 一是外泌体形成的“经典途径”, 二是外泌体直接形成途径^[12]。在“经典途径”中, 外泌体通过两次膜内陷产

生^[13–14], 具体过程如图 1 所示: 首先, 一些细胞外的物质, 如蛋白质、脂质、代谢物及离子, 与细胞膜上的蛋白分子一起通过细胞质膜向内凹陷形成早期内涵体 (early endosome, EE) 的小泡, 当早期内涵体趋于成熟后, 内体膜 (endosome membrane) 会进一步向内出芽可形成晚期内涵体 (late endosome, LE), 也被称为多泡体 (multivesicular body, MVB), 由于发生了两次的膜内陷, 腔内囊泡 (intraluminal vesicles, ILVs) 出现在这一过程中。随后包含有 ILVs 的 MVB 会运输到细胞膜并与膜融合, 并将 ILVs 释放到细胞外间隙中, 被释放的囊泡就是外泌体^[15]。此外, MVB 还能与细胞内的溶酶体融合, 导致囊泡内容物降解。然而, 到目前为止, MVB 如何被分选与细胞质膜融合产生外泌体或与溶酶体融合被降解, 其分选调控机制仍不明确。第二条途径是外泌体直接形成途径, 由细胞质膜直接释放外泌体^[12]。该途径形成的外泌体与经典途径释放的外泌体具有相似的直径和密度, 这类分泌途径常见于 T 细胞或红白血病 (erythroleukemia)^[12], 这种外泌体是否会在其他细胞或体液中释放, 目前尚不清楚。

微囊泡又称为微粒, 来源于细胞质膜释放 (出芽) 形成的大膜泡 (large membrane vesicles), 其直径大于 100 nm, 直接出芽脱落或者释放到细胞外^[12]。其与“直接形成途径”产生的外泌体的主要区别在于囊泡直径大小不同。微囊泡的分泌受到各种刺激物的调节, 这些刺激物会导致细胞内 Ca^{2+} 浓度升高、细胞发生死亡等。近年来, 有研究认为除了微囊泡外, 迁移体等细胞器也被认为是细胞外囊泡的一种^[16]。然而, 也有研究认为迁移体的生物释放过程与直径大小都与 EVs 有着本质不同^[17–18], 因而不属于 EVs。

凋亡小体或小泡是当细胞发生凋亡时释放出的囊泡。凋亡小体是 3 类 EVs 中体积最大且异质性最高的, 其密度为 1.16–1.28 g/mL, 与外泌体部分重叠, 其形态通常比其他两类 EVs 更不规则。与其他 EVs 一样, 凋亡小体可以参与传递 DNA 等信息物质^[19]。

与哺乳动物细胞不同的是, 植物细胞具有细胞壁, 过去人们认为这一结构可能会影响 EVs 的形成与释放。但近年来的研究发现, 植物也会产生 EVs。植物 EVs 与动物 EVs 有着相似的形态特征, 具有



A: 哺乳动物 EVs 生物发生途径。(a) 微囊泡途径: 由细胞质膜直接出芽脱落并释放到细胞外。(b) 外泌体途径: 细胞质膜向内凹陷后发生内存作用, 形成早期内涵体。早期内涵体将进一步向内凹陷形成晚期内涵体, 包被部分细胞质和某些物质 (如核酸、高尔基体和细胞核的蛋白质), 从而产生腔内囊泡 (ILV), 具有 ILV 的多泡体 (MVB) 会与细胞膜融合, 其内容物 (ILV) 可释放到细胞外环境中。释放的囊泡被称为外泌体。(c) 凋亡小体以凋亡细胞的小泡形式释放。这些 EVs 可以与细胞外基质相互作用, 并将其中的内容物输送到靶细胞。参照 Chen 等^[35] 修改。B: 植物 EVs 的生物发生途径。(a) EXPO 途径: EXPO 是一种球形双膜结构, 能与质膜融合并释放单层膜囊泡;(b) Vacuole 途径: 植物细胞中含有水解酶和防御成分的液泡可以与质膜融合, 并将防御物质释放到细胞外空间, 抑制病原体的增殖。(c) MVB 途径: 植物中的 MVB 可以与质膜融合, 然后将 EVs 释放到细胞外空间。参照 Cong 等^[33] 修改

A: The mammalian EVs biogenesis pathway. (a) Microvesicle pathway: Direct budding from the cytoplasmic membrane and release outside the cell. (b) Exosome pathway: Endocytosis occurs after the inward depression of the cytoplasmic membrane to form early endosomes. Early endosomes will be further recessed inward to form late endosomes, which coat part of the cytoplasm and certain substances (such as nucleic acids, proteins in the Golgi apparatus, and nucleus), resulting in intraluminal vesicles (ILVs). Multivesicular bodies (MVB) with ILVs fuse with cell membranes, and their contents (ILVs) can be released into the extracellular environment. The released vesicles are called exosomes. (c) Apoptotic bodies are released as vesicles of apoptotic cells. These EVs can interact with the extracellular matrix and transport its contents to target cells. Refer to Chen et al^[35]. B: The biogenesis pathway of plant EVs. (a) exocyst-positive organelle (EXPO) pathway: EXPO is a spherical double-membrane structure, which can fuse with plasma membrane to release monolayer vesicles; (b) Vacuole pathway: The vacuole containing hydrolases and defense components in plant cells can fuse with the plasma membrane and release the defense material into the extracellular space to inhibit pathogen proliferation. (c) MVB pathway: In plants, MVB can fuse with plasma membrane and release EVs into the extracellular space. Refer to Cong et al^[33]

图 1 胞外囊泡的产生和传递

Fig. 1 Formation and delivery of extracellular vesicle

脂双层结构, 其中含有与植物免疫和应激相关的蛋白质^[5]与 miRNA^[20]等生物大分子。目前研究认为, 植物 EVs 的发生有 3 种可能的途径: (1) MVB 途径; (2) Exocyst-positive organelle (EXPO) 途径; (3) 液泡 (vacuole) 途径^[21] (图 1-B)。1967 年, Halperin 等^[22]首次在胡萝卜悬浮细胞中观察到 MVB 可与质膜融合, 释放 EVs。近年来在植物叶片、根和种子黏液中也发现类似的现象^[5, 23-24]。高氏白粉病菌 (*Golovinomyces orontii*) 感染拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 叶片后会产生吸器 (haustorial), 在分离出的吸器外膜 (extrahaustorial membrane, EHM) 中可以观察到 MVB 的结构^[25]。进一步研究发现, 在

植物受到白粉病菌感染后, MVB 会与细胞质膜发生融合进行胞吐, 将防御化合物运输到质膜附近的感染位置并在此聚集。例如, 将小麦白粉病菌 (*Blumeria graminis* f. sp) 侵染到大麦叶片, 应用透射电镜 (transmission electron microscopy, TEM) 观察到 MVB 通过胞吐进入细胞的质膜与细胞壁之间^[26], 这一过程类似于哺乳动物的外泌体分泌^[7], 并且与真菌接触部位产生乳头状突起 (papillae)。由此可见, MVBs 和植物中的外泌体——类外泌体囊泡 (exosome-like vesicles)^[27], 是植物 EVs 形成过程的重要途径。Movahed 等^[28]应用 TEM 观察到在芜菁花叶病毒 (Turnip mosaic virus) 感染后的烟草

叶片中有 MVB 的增殖, MVB 会与质膜融合, 释放被包被的腔内囊泡 (ILV), 并在细胞外空间发现大量与膜结合的直径约为 60–150 nm 囊泡。基于这些研究结果, 研究人员进一步证明 MVB 和 PM 之间的融合, 会导致 ILV 从 MVB 释放到细胞外空间中^[28]。Regente 等^[29]以向日葵细胞外液为研究对象, 证实 Rab 蛋白参与了向日葵细胞 MVB 的分泌, 尽管已有证据表明, 在植物受到病原菌侵染期间能够分离和鉴定到 EVs^[30](图 1-B(c)), 但 MVB 靶向质膜释放 EVs 的机制在植物中尚不清楚^[31]。此外, Wang 等^[32]在拟南芥和烟草的悬浮细胞中发现一种特殊的细胞器 EXPO, 是类似于自噬体的球形双膜结构, 它们会与质膜融合, 向细胞外释放单层膜囊泡从而产生 EVs (图 1-B(a))。EXPO 途径不同于 MVB 途径, 是植物特有的非传统囊泡分泌形式^[33]。此外, 植物 EVs 的生物发生还有可能来自于液泡, Hatsugai 等^[34]研究发现在拟南芥受到番茄 *Pst DC3000* 病原菌侵染时, 其液泡膜会与质膜发生融合, 将液泡内的一些抗菌蛋白释放到细胞外, 以应对病原菌的侵害(图 1-B(b)), 为植物的防御策略提供了新的证据。

2 EVs 在植物细胞中的功能

大多数已有的 EVs 研究是在哺乳动物系统中进行的。EVs 参与哺乳动物的许多生理过程, 例如细胞成熟、适应性免疫反应和神经细胞通讯等^[1,7]。EVs 还介导一些病理过程, 如在炎性刺激下, 大脑内皮层细胞会响应这种刺激并将外泌体释放到血液中^[36]。相对于哺乳动物细胞, EVs 在植物中的研究发展得要缓慢得多, 人们对植物中 EVs 的了解仍处于初级阶段。当植物受到病原菌侵染时, 植物产生的 EVs 可以发挥免疫作用, 抵抗病原菌的伤害^[6]。EVs 还具有参与细胞间通讯的作用, 可以在植物细胞间运输蛋白质、脂质和 RNA 分子等^[37]。

2.1 EVs 参与植物免疫调节

2.1.1 EVs 参与植物与病原菌相互作用 有大量证据表明, EVs 能够参与植物与病原微生物的相互作用, 调节植物免疫^[6,38]。Rutter 等^[5]从拟南芥叶片的质外体中发现含有大小约为 50–300 nm 的囊泡状结构, 叶片在受到丁香假单胞菌 (*Pseudomonas syringae*) 感染后, EVs 的分泌数量增多。因此, 推

测 EVs 的形成可能是植物免疫应答的一个重要途径。Regente 等^[24]从向日葵的细胞外液中分离得到的 EVs, 是直径为 50–200 nm 的囊泡。这些 EVs 处理真菌孢子后, 通过透射电镜和蛋白质组学分析发现, 真菌孢子在生长发育、形态等方面出现异常, 甚至出现细胞死亡的情况, 显示 EVs 具有影响真菌生长的能力, 由此推测 EVs 能参与植物与病原菌之间相互作用。研究发现, 当大麦白粉病真菌 (*Blumeria graminis* f.sp.hordei, Bgh) 入侵大麦表皮组织时, 大麦会在侵入部位会形成含有抗真菌化学物质、酚类物质和活性氧等成分的乳头状突起, 该突起是防止病原菌侵染的防御结构^[39], 在 MVB 与 PM 融合时, 腔内囊泡作为外泌体释放, 发挥防御功能^[38]。此外, De Palma 等^[23]分析了植物根系释放到环境中的 EVs, 结果表明根系释放的 EVs 可以抑制真菌病原体的孢子生长。然而, EVs 是如何闯过植物细胞壁进入根系周围环境, 其机制尚不明确。

2.1.2 EVs 运输脂质参与免疫反应 植物可以产生脂质信号, 如鞘脂 (sphingolipids)、磷脂酸 (phosphatidic acid, PA) 等, 调节众多生理过程, 包括对生物胁迫的反应^[40–41]。Liu 等^[42]提取拟南芥莲座叶 EVs 后进行了脂质组学分析, 发现了 EVs 中鞘脂成分含量很高, 这些鞘脂主要由糖基肌醇磷酸神经酰胺 (glycosyl-inositol-phosphoceramides, GIPCs) 组成。GIPCs 可感知病原真菌, 在植物免疫中发挥重要作用。拟南芥 4 次跨膜蛋白 (tetraspanin 8, TET8) 与 EVs 分泌相关, 在 *tet8* 突变体中 EVs 分泌显著减少, GIPCs 的含量显著降低, 这表明 GIPC 可能在 EVs 的生物发生中发挥作用。在 flg22 处理下, *tet8* 突变体产生的 ROS 明显减少, 当添加外源 GIPC 时可使 EVs 分泌增多, flg22 处理产生 ROS 也增强。由此可见, EVs 中的脂质成分与植物抗病性紧密相关。

2.1.3 EVs 运输 sRNA 参与植物免疫 研究发现, 植物质外体 EVs 能够携带小的非编码 RNA, 如 microRNA (miRNA)、短干扰 RNA (siRNA) 和一类 10–17 nt 的微小 RNA^[43]。有趣的是, EVs 能够将 sRNA 从植物转移到病原体细胞中。Cai 等^[30]发现拟南芥被灰霉菌侵染后可以分泌含有 sRNA 的类外

泌体, 这些 EVs 在感染部位积累, 并被真菌细胞吸收, 从而将 sRNA 传递到病原体灰霉菌中, 转移的宿主 sRNA 可以诱导致病性相关基因沉默。在禾谷镰刀菌 (*Fusarium graminearum*) 侵染小麦时也观察到 RNA 从宿主到病原体的转运, 以诱导相应致病基因的沉默^[44]。病原体还将 sRNA 作为效应物转移到植物宿主细胞中, 以促进感染和植物防御^[45]。这些进展为植物免疫研究的发展提供了新的思路。

2.2 EVs参与植物细胞壁成分形成

植物细胞壁是位于植物细胞最外层的多层黏液结构, 主要由纤维素和果胶组成^[46], 还具有甲酯化、乙酰酯化等多种修饰。在正常生长状态下的云杉的次生木质部和韧皮部中, Chukhchin 等^[47]观察到球状 EVs。其直径大小在 65–145 nm 之间, 并且在其中检测到内切 -1,4- β - 葡聚糖酶的活性, 此类 EVs 被认为参与内切 -1,4- β - 葡聚糖酶的储存和运输。内切 -1,4- β - 葡聚糖酶可以催化水解具有 1,4- β - 葡聚糖主链的多聚糖, 如纤维素和木葡聚糖分子, 从而参与对细胞壁的修饰。木栓质 (suberin) 是一种含有多聚脂类和酚类的生物聚合物, 存在于保护组织中, 如种子外壳、根的外皮层和内皮层。De Bellis 等^[48]对拟南芥内皮层凯氏带缺失的突变体 *lotr2/exo70a1* 进行分析, 超微结构观察发现大量 EVs 在内皮层中特异性积累, 使用抑制囊泡转运的 brefeldin A (BFA) 处理, 可以抑制木栓质的积累, 这些结果表明 EVs 参与了植物细胞壁木栓质的沉积过程。

3 EVs 的分析技术及其应用

近年来, EVs 分离与鉴定方面的相关技术不断发展, 这为研究 EVs 的结构与功能提供了更多的便利。前沿电子显微成像技术的发展和高分辨成像技术的广泛应用, 为在原位对细胞内单个囊泡水平上检测异质性 EVs 及在纳米尺度上的研究提供了新方法^[49], 解决了不少备受争议的问题。

3.1 EVs分离纯化技术及其应用

不同种类 EVs 之间在大小、密度及蛋白质特性上有较大的差异^[50]。同时, 它们还存在于血液、体液等复杂的生物流体中。因此如何去除杂质成分的干扰, 是对 EVs 高效分离和富集技术研究的重点方向^[51]。为了进一步分离植物 EVs 的内容物并研究

其功能, 前人研究中已经建立了多种分离和富集方法, 包括基于密度离心技术、基于聚合物的沉淀、尺寸排阻色谱法、超滤法、微流控技术和免疫亲和捕获技术等。在这些技术中, 超速离心法和密度梯度离心相结合的方法^[52], 以及免疫亲和捕获技术通常被用于植物 EVs 的分离^[53], 以分离出纯度更高的 EVs。具体分离与富集技术的汇总见表 1。

3.1.1 基于密度离心技术 超速离心技术 (ultracentrifugation) 根据颗粒密度的不同将囊泡进行分离^[54], 是分离 EVs 的常用方法之一。细胞碎片在低离心力 ($300 \times g$) 下被清除, 而 EVs 在高离心力 ($100\,000 \times g$) 下会被沉淀和浓缩^[55]。Zhao 等^[69]利用超速离心法分离出椰汁中的 EVs, 发现其中有 microRNAs 的存在, 这些 microRNAs 可以作为食物成分被哺乳动物细胞吸收。Rutter 等^[5]利用真空渗透和超速离心法从拟南芥叶片组织的质外体洗涤液中分离得到 EVs。超速离心法是目前公认的分 EVs 的“金标准”方法, 有着操作简便, 可以批量处理样品的优势。同时, 通过这种方法分离出的 EVs 的纯度较高、污染较小, 但是它也有许多缺点, 例如离心设备昂贵、样品处理时间长、费力、获得 EVs 的产率低^[56]。另外, 离心速度过高有可能会影响 EVs 的完整性。

蔗糖密度梯度离心技术 (sucrose density gradient ultracentrifugation) 可以从培养细胞的培养液中分离纯化 EVs。在分离过程中, 密度不同的囊泡及生物分子以不同的速率沉积^[48]。Ju 等^[70]使用超速离心和蔗糖梯度法从葡萄汁中分离出葡萄外泌体样纳米粒子 (grape exosome-like nanoparticles, GELNs), 在 GELNs 中检测出大量直径在 50–300 nm 的膜结合囊泡。蔗糖密度梯度离心法能进一步提高分馏的密度, 产生的 EVs 纯度较高。然而, 它仍存在与超速离心相关的许多劣势, 如持续时间较长等。除了蔗糖梯度, 新的等渗梯度如碘克沙醇 (iodixanol) 梯度逐渐用于 EVs 研究, 该方法可以更好地保持囊泡的生物物理性质^[57]。

3.1.2 沉淀法 沉淀法 (coprecipitation) 利用超亲水聚合物聚乙二醇 (polyethylene glyco, PEG) 溶液中化合物溶解度会降低的原理, 将样品和聚合物溶液混合, 通过低速离心 ($1\,500 \times g$) 沉淀 EVs, 然

表 1 主要 EVs 的分离方法及优缺点

技术名称	原理	优点	缺点	参考文献
Approaches	Mechanism of enrichment	Advantages	Disadvantages	References
超速离心法	密度	“金标准”，操作简便，可以分离大量样品	持续时间长，设备昂贵，离心速度过高可能会影响 EVs 的完整性	[54–56]
蔗糖密度梯度离心	密度	分离纯度高，没有其他化学药品污染	持续时间长（>4 h），样本量大，需要超离心，回收率低	[48, 57]
沉淀法	表面电荷	操作简单、快速、成本低，对 EVs 损伤小	分离的外泌体纯度通常很低	[58–59]
尺寸排阻色谱法	大小和分子量	高效、操作简单且耗时短，提取外泌体得率与纯度高，能保持 EV 的完整性	费用高，需要专用设备，色谱柱使用次数与加样体积有限制，复杂性	[60–62]
超滤法	大小	程序简单，允许同时处理多个样本，省时，可较好地保持 EV 活性	无法滤除小于滤膜孔径的杂质，样品使用前需去除细胞等大的膜状结构	[63–64]
微流控技术	大小、密度和表面抗原亲和	小型化、集成化、高通量和耗时时间短	研究技术尚未标准化；成本高，设备昂贵	[35, 65–66]
免疫亲和捕获技术	表面抗原亲和	高纯度，高特异性	抗体制备存在限制，成本高	[53, 67–68]

后将 EVs 颗粒悬浮在 PBS 缓冲液中进行进一步分析，最后用 PEG 沉淀 EVs。Kalarikkal 等^[71]使用基于聚乙二醇 6000（PEG6000）的方法分离纯化出生姜（*Zingiber officinale*）可食用纳米颗粒（edible nanoparticles, ENP）。应用沉淀法的优点是操作简单、快速、成本低廉，并且在的生理 pH 范围内，对 EVs 损害小且对离子浓度的依赖性较弱^[58]。应用沉淀法分离 EVs 效率高，无需昂贵的设备，该方法与超速离心法相比降低了成本。但是，因为几乎所有的可溶性分子都会被沉淀，所以该方法分离的 EVs 纯度通常较低^[59]。

3.1.3 尺寸排阻色谱法 尺寸排阻色谱法（size-exclusive chromatography, SEC）通过凝胶过滤基质或树脂过滤，区分大小不同的囊泡和其他生物分子^[59]。凝胶由含有不同尺寸分布孔隙的聚合物组成，当待分离样品进入凝胶时，小分子物质会进入到孔隙中，而大分子物质直接过滤下来。这使得不同大小的分子根据洗脱时间被区分开，因而该方法被广泛用于生物聚合物（蛋白质、多糖、蛋白聚糖等）的分离^[72]。蛋白质等小分子在色谱柱上停留的时间更长，EVs

比聚合物的孔隙大，在色谱柱上移动的速度更快^[60]。这种分离方法能从复杂的生物介质中纯化获得 EVs，并将 EVs 与可溶性蛋白质分离。此外，尺寸排阻色谱法是根据分子大小的不同将 EVs 分离纯化，这种方法基本不损害 EVs 的结构及功能^[61]。近年来，SEC 成为外泌体分离的常规方法之一，它有着效率高、操作简便和省时的优点，分离得到的 EVs 纯度更高^[62]。

3.1.4 超滤法 超滤法（ultrafiltration）利用各种不同直径小孔的膜过滤器，将不同大小的 EVs 分离开，从而收集特定尺寸的 EVs^[63]。目前市面上通常使用的过滤器孔径分别为 0.8、0.45、0.22 和 0.1 μm^[58]。超滤法的操作流程首先是通过孔径为 0.8 μm 和 0.45 μm 的过滤器，去除直径较大的颗粒，再依次通过孔径为 0.22 μm 和 0.1 μm 的过滤器，并将颗粒直径小于目标 EVs 的颗粒从滤液中分离出来^[64]。超滤法可以与超速离心法连续进行，也可以是凝胶过滤色谱中的一个附加步骤^[73]。利用超滤法操作比较简单，节省时间，能较好地保持 EVs 活性，但是小于滤膜孔径的杂质无法滤除。特别需要注意的是，样本需

要首先去除大的膜性结构,防止其过滤时分解为小囊泡,影响后续纯度与分析。

3.1.5 微流控技术 微流控技术 (microfluidics technology) 是近年来新兴的分离 EVs 的技术方法。微流控技术能够区分、捕获、富集和分离形状和尺寸非常相似的 EVs,样品只需流经一个含有纳米过滤器、纳米多孔膜或纳米阵列小型微流控装置^[10],通过大小、密度和表面抗原等物理特征来纯化 EVs^[35]。微流控技术可以将样品处理、分析、检测和其他过程集成到芯片中,从而实现小型化、集成化、高通量和低样品体积^[65-66]。基于这些优点,微流控技术逐渐成为高效分离 EVs 的有力工具。当样品被匀速注入时, EVs 会黏附到通道的内表面,然后通过免疫亲和、网筛等分离^[35]。这种分离方法速度快、可实现高效的 EVs 分离。就目前来说,微流控技术尚未标准化,对 EV 分离的研究也不够,但在未来的植物 EVs 高通量分析中非常有前景。

3.1.6 免疫亲和捕获技术 免疫亲和捕获技术 (immunoaffinity capture-based technique) 是目前用于分离纯化特定类别 EVs 的方法之一^[53]。这项技术根据不同类别的 EVs 表面带有不同蛋白质标记的特性,利用抗体捕获特定的 EVs 后,通过共价或高亲和力和相互作用与磁珠或其他分离基质结合,进而通过低速离心或磁性技术分离纯化 EVs^[67-68]。He 等^[74]利用免疫亲和捕获技术结合蔗糖密度梯度离心技术,使用带有 TET8 抗体的磁珠,将 TET8 衍生的 EVs 拉下,从而成功纯化出 TET8-positive EVs,并进一步研究发现拟南芥中的 sRNAs 在 TET8 衍生的 EVs 中富集。免疫亲和捕获技术是目前精确分离纯化植物中特定的 EVs 的理想方法,并且可与其他多种方法结合使用提高分离纯度。

3.2 原位成像技术在 EVs 研究中的应用

原位成像的技术旨在单个 EV 的水平上对其进行分类与检测^[75],传统光学显微镜的衍射极限虽接近 EVs 的大小,但是不能产生清晰的图像。利用电子显微镜 (electron microscopy, EM)、原子力显微镜 (atomic force microscopy, AFM)、拉曼镊子显微光谱 (raman tweezers microspectroscopy, RTM) 的方法,进一步提高成像分辨率,以观测到直径小于 200 nm

的囊泡,在亚细胞水平上观察植物细胞的超微结构,使得一些更为精细的囊泡转运过程得以发现。

3.2.1 基于电子显微技术 透射电子显微镜 (transmission electron microscopy, TEM)、扫描电子显微镜 (scanning electron microscopy, SEM) 和冷冻电子显微镜 (cryo-electron microscopy, cryo-EM) 技术的发展推动了对 EVs 的研究。TEM 可以在亚细胞水平上观察细胞内的超微形态结构^[76],如细胞器、内膜系统及大分子物质^[77]。An 等^[78]应用 TEM 首次观察到植物组织中质膜和细胞壁之间的囊泡状结构,其大小在 40–150 nm,与哺乳动物外泌体形态类似,植物外泌体也包含蛋白质、脂质、微小 RNA 等物质。这些结构发生在细胞壁沉积相关过程中,这使得人们开始关注植物中 EVs 的功能。Zeyen 等^[79]使用 TEM 发现在病原体侵染大麦过程中, MVB 在细胞中增殖,并被观察到与质膜发生融合,该融合大多发生在小乳头状突起处或附近位置,研究证明该突起是阻止病原体进入细胞的防御结构,由此证实了 EVs 在植物免疫中的作用。

SEM 主要用于观察样品表面形貌^[80]。SEM 与其他成像手段,如免疫金标记方法等结合使用,可对 EVs 表面结构进行研究^[81]。De Palma 等^[23]通过超速离心法将水培的番茄植株根系分泌物的溶液分离纯化,获得了圆形 EVs。应用 SEM 对其的表面形态进行了观察,统计分析显示根释放的 EVs 大小在 50–100 nm 范围内。

cryo-EM 被广泛用于解析蛋白结构,与其他 TEM 方法所需的长时间样品制备 (通常需要数小时) 相比,其不添加重金属或固定剂,也不需要脱水步骤^[82]。样品经玻璃化冷冻固定后,使 EVs 的天然结构得以保留,该方法可以成像 EVs 的结构^[9]。Ju 等^[70]使用差速离心和蔗糖梯度法分离出植物 EVs,并用 Cryo-EM 观察到, EVs 组分中存在大量直径为 50–300 nm 纳米级膜结合囊泡。Yuana 等^[83]使用 cryo-EM 观察细胞外囊泡,发现 EV 的形态呈现出经典的圆形。使用 cryo-EM 虽然能够实现高分辨率可视化,但是 cryo-EM 图像通常只包含少数 EV,提供 EV 的信息较少。cryo-EM 可以与使用带有免疫金标记抗体的功能化纳米颗粒联合使用,用于表征 EV

表面的生化成分^[15]。

3.2.2 原子力显微技术 原子力显微镜可以用于 EVs 原位成像, 它有 3 种工作模式: 一是利用探针和样品表面的接触力的接触模式 (contact mode), 通过激光和传感器, 检测并记录由相互作用力引起的探针偏转, 反馈信号成像; 二是探针与样品表面一直不接触的非接触模式 (non-contact mode), 在这种模式下, 探针与样品间保持一定的距离进行扫描成像; 三是介于前两者之间的轻敲模式 (tapping mode), 此种模式在不损害样品的前提下, 又能达到接触模式的分辨率^[84]。利用 AFM 既可以准确表征 EVs 的形态又可以获得样品黏性、软硬等物理特性, 其横向分辨率为 1–3 nm, 垂直分辨率小于 0.1 nm^[85], 是研究 EVs 的绝佳工具。Sharma 等^[86] 利用 AFM 的技术, 使用机械探针测量了单个 EV 在其自然状态下的大小和结构。Chukhchin 等^[47] 利用 AFM 观察到了自然状态下云杉的球状外泌体, 单个外泌体具体的大小约为 100 nm。

3.2.3 拉曼镊子显微光谱 拉曼镊子显微光谱技术, 也被称为激光镊子拉曼光谱 (laser tweezer raman spectroscopy, LTRS), 可用于研究单个 EV 的表面特征, 同时检测 EV 内容物的化学成分, 包括蛋白质、脂质、核酸等^[75]。RTM 利用聚焦的激光束, 通过高数值孔径的物镜对介质中单个 (或极少数) 囊泡进行光学捕获, 并激发后续拉曼散射, 继而从捕获的生物分子中提供振动指纹^[82]。在几秒到几分钟的时间范围内即可提供样品化学成分的真實拉曼指纹, 无需对样品处理或外源标记, 并能提供更为准确的数据^[87–88]。因其可以对单个 EV 进行定性和定量生化表征^[89], 未来可以用于检测植物 EV 的化学成分及内部信息。

4 总结与展望

EVs 可以将生物大分子 (蛋白质、核酸、脂质和其他代谢物) 运输到特定的部位并发挥功能, 可以作为细胞间通讯的一种重要方式。目前关于植物 EVs 的生物学研究还处于初级阶段, 对它们的生物发生途径、释放及摄取机制以及信号转导的通路还有待进一步研究。近年来, 随着人们对植物 EVs 的研究日益深入, 这迫切要求我们对植物 EVs 的研究

加以标准化, 以明确植物 EVs 功能调控机制, 要解决这些问题就需要更先进的技术来探究 EVs 的特性。如使用高分辨率、高信噪比的超分辨显微镜 (super-resolution microscopy, SRM), 用于开展活细胞中 EVs 的动态研究^[90]。未来发展的方向之一可能是通过多种分离技术以及成像技术的结合使用, 并且可能会开发出适合于植物活体细胞 EVs 成像和跟踪的技术, 以真实反映动态调控机制。最后, EVs 原位成像的发展离不开与其他学科交叉合作, 在单细胞、单囊泡基础上开展动态水平研究, 并由此来深化对植物 EVs 生物发生途径、释放及摄取机制的研究, 为阐明植物 EVs 的生物学功能及调控机制的研究奠定坚实基础。

参考文献

- [1] van Niel G, D' Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018, 19 (4): 213–228.
- [2] Han CS, Yang JJ, Sun JC, et al. Extracellular vesicles in cardiovascular disease: biological functions and therapeutic implications [J]. *Pharmacol Ther*, 2022, 233: 108025.
- [3] Bahmani L, Ullah M. Different sourced extracellular vesicles and their potential applications in clinical treatments [J]. *Cells*, 2022, 11 (13): 1989.
- [4] Wu PP, Zhang B, Ocansey DKW, et al. Extracellular vesicles: a bright star of nanomedicine [J]. *Biomaterials*, 2021, 269: 120467.
- [5] Rutter BD, Innes RW. Extracellular vesicles isolated from the leaf apoplast carry stress-response proteins [J]. *Plant Physiol*, 2017, 173 (1): 728–741.
- [6] Rybak K, Robatzek S. Functions of extracellular vesicles in immunity and virulence [J]. *Plant Physiol*, 2019, 179 (4): 1236–1247.
- [7] Yáñez-Mó M, Siljander PRM, Andreu Z, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions [J]. *J Extracell Vesicles*, 2015, 4: 27066.
- [8] Zhang Y, Liu YF, Liu HY, et al. Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential [J]. *Cell Biosci*, 2019, 9: 19.
- [9] Thakur A, Ke XS, Chen YW, et al. The mini player with diverse functions: extracellular vesicles in cell biology, disease, and therapeutics [J]. *Protein Cell*, 2022, 13 (9): 631–654.
- [10] di BMA. Overview and update on extracellular vesicles: consider-

- ations on exosomes and their application in modern medicine [J]. *Biology*, 2022, 11 (6): 804.
- [11] Hua YQ, Chang XL, Fang LQ, et al. Subgroups of extracellular vesicles: can they be defined by "labels?" [J]. *DNA Cell Biol*, 2022, 41 (3): 249-256.
- [12] van der Pol E, Böing AN, Harrison P, et al. Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles [J]. *Pharmacol Rev*, 2012, 64 (3): 676-705.
- [13] Jadli AS, Ballasy N, Edalat P, et al. Inside (sight) of tiny communicator: exosome biogenesis, secretion, and uptake [J]. *Mol Cell Biochem*, 2020, 467 (1-2): 77-94.
- [14] Jiang K, Dong C, Yin Z, et al. The critical role of exosomes in tumor biology [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120: 6820-6832.
- [15] Shao HL, Im H, Castro CM, et al. New technologies for analysis of extracellular vesicles [J]. *Chem Rev*, 2018, 118 (4): 1917-1950.
- [16] 张维, 俞立, 陈扬. 细胞外囊泡检测分析方法研究进展 [J]. *中国细胞生物学学报*, 2020, 42 (1): 159-165.
- Zhang W, Yu L, Chen Y. Research progress in extracellular vesicles detection and analysis [J]. *Chin J Cell Biol*, 2020, 42 (1): 159-165.
- [17] Zhao XX, Lei YX, Zheng JJ, et al. Identification of markers for migrasome detection [J]. *Cell Discov*, 2019, 5: 27.
- [18] Thakur A, Parra DC, Motallebnejad P, et al. Exosomes: Small vesicles with big roles in cancer, vaccine development, and therapeutics [J]. *Bioact Mater*, 2021, 10: 281-294.
- [19] Rostyslav OB, Shkandina T. Patterns of apoptotic cell-derived macrophages discriminate glycosylation [J]. *J Biol Chem*, 2011, 287 (1): 496-503.
- [20] Xie WY, Melzig MF. The stability of medicinal plant microRNAs in the herb preparation process [J]. *Molecules*, 2018, 23 (4): 919.
- [21] Cui Y, Gao JY, He YL, et al. Plant extracellular vesicles [J]. *Protoplasma*, 2020, 257 (1): 3-12.
- [22] Halperin W, Jensen WA. Ultrastructural changes during growth and embryogenesis in carrot cell cultures [J]. *J Ultrastruct Res*, 1967, 18 (3-4): 428-443.
- [23] de Palma M, Ambrosone A, Leone A, et al. Plant roots release small extracellular vesicles with antifungal activity [J]. *Plants (Basel)*, 2020, 9 (12): 1777.
- [24] Regente M, Pinedo M, San Clemente H, et al. Plant extracellular vesicles are incorporated by a fungal pathogen and inhibit its growth [J]. *J Exp Bot*, 2017, 68 (20): 5485-5495.
- [25] Micali CO, Neumann U, Grunewald D, et al. Biogenesis of a specialized plant-fungal interface during host cell internalization of *Golovinomyces orontii* haustoria [J]. *Cell Microbiol*, 2011, 13 (2): 210-226.
- [26] Stotz HU, Brotherton D, Inal J. Communication is key: extracellular vesicles as mediators of infection and defence during host-microbe interactions in animals and plants [J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2022, 46 (1): fuab044.
- [27] Wang F, Shang YF, Fan BF, et al. *Arabidopsis* LIP5, a positive regulator of multivesicular body biogenesis, is a critical target of pathogen-responsive MAPK cascade in plant basal defense [J]. *PLoS Pathog*, 2014, 10 (7): e1004243.
- [28] Movahed N, Cabanillas DG, Wan J, et al. Turnip mosaic virus components are released into the extracellular space by vesicles in infected leaves [J]. *Plant Physiol*, 2019, 180 (3): 1375-1388.
- [29] Regente M, Corti Monzón G, de la Canal L. Phospholipids are present in extracellular fluids of imbibing sunflower seeds and are modulated by hormonal treatments [J]. *J Exp Bot*, 2008, 59 (3): 553-562.
- [30] Cai Q, Qiao LL, 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.
- [31] Fang Y, Wang ZW, Liu XL, et al. Biogenesis and biological functions of extracellular vesicles in cellular and organismal communication with microbes [J]. *Front Microbiol*, 2022, 13: 817844.
- [32] Wang J, Ding Y, Wang JQ, 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.
- [33] Cong MH, Tan SY, Li SM, 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.
- [34] 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.

- [35] Chen JC, Li PL, Zhang TY, et al. Review on strategies and technologies for exosome isolation and purification [J] . Front Bioeng Biotechnol, 2022, 9: 811971.
- [36] Ramirez SH, Andrews AM, Paul D, et al. Extracellular vesicles: mediators and biomarkers of pathology along CNS barriers [J] . Fluids Barriers CNS, 2018, 15 (1) : 19.
- [37] Urzì O, Gasparro R, Ganji NR, et al. Plant-RNA in extracellular vesicles: the secret of cross-kingdom communication [J] . Membranes, 2022, 12 (4) : 352.
- [38] Hansen LL, Nielsen ME. Plant exosomes: using an unconventional exit to prevent pathogen entry? [J] . J Exp Bot, 2017, 69 (1) : 59-68.
- [39] Thordal-Christensen H. Fresh insights into processes of nonhost resistance [J] . Curr Opin Plant Biol, 2003, 6 (4) : 351-357.
- [40] Shishova MF, Yemelyanov VV. Proteome and lipidome of plant cell membranes during development [J] . Russ J Plant Physiol, 2021, 68 (5) : 800-817.
- [41] Song JB, Huang RK, Guo MJ, et al. Lipids associated with plant-bacteria interaction identified using a metabolomics approach in an *Arabidopsis thaliana* model [J] . PeerJ, 2022, 10: e13293.
- [42] Liu NJ, Wang N, Bao JJ, et al. Lipidomic analysis reveals the importance of GIPCs in *Arabidopsis* leaf extracellular vesicles [J] . Mol Plant, 2020, 13 (10) : 1523-1532.
- [43] Baldrich P, Rutter BD, Karimi HZ, et al. Plant extracellular vesicles contain diverse small RNA species and are enriched in 10- to 17-nucleotide “tiny” RNAs [J] . Plant Cell, 2019, 31 (2) : 315-324.
- [44] Jiao J, Peng D. Wheat microRNA1023 suppresses invasion of *Fusarium graminearum* via targeting and silencing FGSG_03101 [J] . J Plant Interact, 2018, 13 (1) : 514-521.
- [45] Cai Q, He BY, Wang SM, et al. Message in a bubble: shuttling small RNAs and proteins between cells and interacting organisms using extracellular vesicles [J] . Annu Rev Plant Biol, 2021, 72: 497-524.
- [46] de Lorenzo G, Ferrari S, Giovannoni M, et al. Cell wall traits that influence plant development, immunity, and bioconversion [J] . Plant J, 2019, 97 (1) : 134-147.
- [47] Chukhchin DG, Bolotova K, Sinelnikov I, et al. Exosomes in the phloem and xylem of woody plants [J] . Planta, 2019, 251 (1) : 12.
- [48] de Bellis D, Kalmbach L, Marhavy P, et al. Extracellular vesicle-tubular structures associated with suberin deposition in plant cell walls [J] . Nat Commun, 2022, 13 (1) : 1489.
- [49] Panagopoulou MS, Wark AW, Birch DJS, et al. Phenotypic analysis of extracellular vesicles: a review on the applications of fluorescence [J] . J Extracell Vesicles, 2020, 9 (1) : 1710020.
- [50] Clos-Sansalvador M, Monguió-Tortajada M, Roura S, et al. Commonly used methods for extracellular vesicles’ enrichment: implications in downstream analyses and use [J] . Eur J Cell Biol, 2022, 101 (3) : 151227.
- [51] 刘春辰, 林慧娴, 郑磊. 细胞外囊泡检测技术及其临床应用进展 [J] . 检验医学, 2020, 35 (12) : 1207-1212.
- Liu CC, Lin HX, Zheng L. Research progress in extracellular vesicle detection technique and its clinical application [J] . Lab Med, 2020, 35 (12) : 1207-1212.
- [52] Jeppesen DK, Fenix AM, Franklin JL, et al. Reassessment of exosome composition [J] . Cell, 2019, 177 (2) : 428-445.e18.
- [53] Huang YF, Wang SM, 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.
- [54] 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.
- [55] Kontopoulou E, Strachan S, Reinhardt K, et al. Evaluation of dsDNA from extracellular vesicles (EVs) in pediatric AML diagnostics [J] . Ann Hematol, 2020, 99 (3) : 459-475.
- [56] Martins TS, Vaz M, Henriques AG. A review on comparative studies addressing exosome isolation methods from body fluids [J] . Anal Bioanal Chem, 2022: 2022 Jul 15.
- [57] Lischnig A, Bergqvist M, Ochiya T, et al. Quantitative proteomics identifies proteins enriched in large and small extracellular vesicles [J] . Mol Cell Proteomics, 2022, 21 (9) : 100273.
- [58] Konoshenko MY, Lekchnov EA, Vlassov AV, et al. Isolation of extracellular vesicles: general methodologies and latest trends [J] . Biomed Res Int, 2018, 2018: 8545347.
- [59] Monguió-Tortajada M, Morón-Font M, Gámez-Valero A, et al. Extracellular-vesicle isolation from different biological fluids by size-exclusion chromatography [J] . Curr Protoc Stem Cell Biol, 2019, 49 (1) : e82.
- [60] Monguió-Tortajada M, Gálvez-Montón C, Bayes-Genis A, et al.

- Extracellular vesicle isolation methods: rising impact of size-exclusion chromatography [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2019, 76 (12) : 2369-2382.
- [61] Guan S, Yu HL, Yan GQ, et al. Characterization of urinary exosomes purified with size exclusion chromatography and ultracentrifugation [J]. *J Proteome Res*, 2020, 19 (6) : 2217-2225.
- [62] Otahal A, Kuten-Pella O, Kramer K, et al. Functional repertoire of EV-associated miRNA profiles after lipoprotein depletion via ultracentrifugation and size exclusion chromatography from autologous blood products [J]. *Sci Rep*, 2021, 11 (1) : 5823.
- [63] Tataruch-Weinert D, Musante L, Kretz O, et al. Urinary extracellular vesicles for RNA extraction: optimization of a protocol devoid of prokaryote contamination [J]. *J Extracell Vesicles*, 2016, 5: 30281.
- [64] Linxweiler J, Junker K. Extracellular vesicles in urological malignancies: an update [J]. *Nat Rev Urol*, 2020, 17 (1) : 11-27.
- [65] Liangsupree T, Multia E, Riekkola ML. Modern isolation and separation techniques for extracellular vesicles [J]. *J Chromatogr A*, 2021, 1636: 461773.
- [66] 刘娜, 杜盼盼, 杨扬, 等. 基于微流控技术的外泌体分离方法的研究进展 [J]. *生物技术通报*, 2019, 35 (1) : 207-213.
Liu N, Du PP, Yang Y, et al. Research progress on exosomes isolation methods based on microfluidics technology [J]. *Biotechnol Bull*, 2019, 35 (1) : 207-213.
- [67] 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, 2 (1) : 20360.
- [68] Sun JW, Chen Z, Tian KW, et al. Magnetic bead-based adsorption strategy for exosome isolation [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2022, 10: 942077.
- [69] Zhao ZH, Yu SR, Li M, et al. Isolation of exosome-like nanoparticles and analysis of microRNAs derived from coconut water based on small RNA high-throughput sequencing [J]. *J Agric Food Chem*, 2018, 66 (11) : 2749-2757.
- [70] Ju SW, Mu JY, Dokland T, et al. Grape exosome-like nanoparticles induce intestinal stem cells and protect mice from DSS-induced colitis [J]. *Mol Ther*, 2013, 21 (7) : 1345-1357.
- [71] Kalarikkal SP, Prasad D, Kasiappan R, et al. A cost-effective polyethylene glycol-based method for the isolation of functional edible nanoparticles from ginger rhizomes [J]. *Sci Rep*, 2020, 10 (1) : 4456.
- [72] 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.
- [73] Nordin JZ, Lee Y, Vader P, et al. Ultrafiltration with size-exclusion liquid chromatography for high yield isolation of extracellular vesicles preserving intact biophysical and functional properties [J]. *Nanomedicine*, 2015, 11 (4) : 879-883.
- [74] He BY, Cai Q, Qiao LL, et al. RNA-binding proteins contribute to small RNA loading in plant extracellular vesicles [J]. *Nat Plants*, 2021, 7 (3) : 342-352.
- [75] Bordanaba-Florit G, Royo F, Kruglik SG, et al. Using single-vesicle technologies to unravel the heterogeneity of extracellular vesicles [J]. *Nat Protoc*, 2021, 16 (7) : 3163-3185.
- [76] 李叶, 黄华平, 张新春, 等. 浅析透射电子显微镜在生物学科中的应用 [J]. *热带农业科学*, 2019, 39 (12) : 58-67.
Li Y, Huang HP, Zhang XC, et al. Current application of transmission electron microscope in biology [J]. *Chin J Trop Agric*, 2019, 39 (12) : 58-67.
- [77] Jong AY, Wu CH, Li JB, et al. Large-scale isolation and cytotoxicity of extracellular vesicles derived from activated human natural killer cells [J]. *J Extracell Vesicles*, 2017, 6 (1) : 1294368.
- [78] An QL, van Bel AJ, Hüekelhoven R. Do plant cells secrete exosomes derived from multivesicular bodies? [J]. *Plant Signal Behav*, 2007, 2 (1) : 4-7.
- [79] Zeyen RJ, Bushnel WR. Papilla response of barley epidermal cells caused by *Erysiphe graminis*: rate and method of deposition determined by microcinematography and transmission electron microscopy [J]. *Can J Bot*, 1979, 57 (8) : 898-913.
- [80] Sokolova V, Ludwig AK, Hornung S, et al. Characterisation of exosomes derived from human cells by nanoparticle tracking analysis and scanning electron microscopy [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2011, 87 (1) : 146-150.
- [81] Sharma S, Rasool HI, Palanisamy V, et al. Structural-mechanical characterization of nanoparticle exosomes in human saliva, using correlative AFM, FESEM, and force spectroscopy [J]. *ACS Nano*, 2010, 4 (4) : 1921-1926.

- [82] Tian Y, Ma L, Gong MF, et al. Protein profiling and sizing of extracellular vesicles from colorectal cancer patients via flow cytometry [J] . ACS Nano, 2018, 12 (1) : 671-680.
- [83] Yuana Y, Koning RI, Kuil ME, et al. Cryo-electron microscopy of extracellular vesicles in fresh plasma [J] . J Extracell Vesicles, 2013, 2 (1) : 21494.
- [84] Pi J, Cai J. Cell topography and its quantitative imaging by AFM [J] . Methods Mol Biol, 2019, 1886: 99-113.
- [85] Vorselen D, Piontek MC, Roos WH, et al. Mechanical characterization of liposomes and extracellular vesicles, a protocol [J] . Front Mol Biosci, 2020, 7: 139.
- [86] Sharma S, Gillespie BM, Palanisamy V, et al. Quantitative nanostructural and single-molecule force spectroscopy biomolecular analysis of human-saliva-derived exosomes [J] . Langmuir, 2011, 27 (23) : 14394-14400.
- [87] Kruglik SG, Royo F, Guigner JM, et al. Raman tweezers microscopy of circa 100 nm extracellular vesicles [J] . Nanoscale, 2019, 11 (4) : 1661-1679.
- [88] No JH, Nishu SD, Hong JK, et al. Raman-deuterium isotope probing and metagenomics reveal the drought tolerance of the soil microbiome and its promotion of plant growth [J] . mSystems, 2022, 7 (1) : e0124921.
- [89] Enciso-Martinez A, van der Pol E, Hau CM, et al. Label-free identification and chemical characterisation of single extracellular vesicles and lipoproteins by synchronous Rayleigh and Raman scattering [J] . J Extracell Vesicles, 2020, 9 (1) : 1730134.
- [90] Chen C, Zong SF, Wang ZY, et al. Visualization and intracellular dynamic tracking of exosomes and exosomal miRNAs using single molecule localization microscopy [J] . Nanoscale, 2018, 10 (11) : 5154-5162.

(责任编辑 朱琳峰)