
外泌体研究的三把钥匙：提纯、组成与功能 MDPI Proteomes

作者：writer 来源：科学网

本文原地址：<https://www.iikx.com/news/progress/41133.html>

本文仅供学习交流之用，版权归原作者所有，请勿用于商业用途！

外泌体研究的三把钥匙：提纯、组成与功能 MDPI Proteomes. 论文标题：Proteomics of Extracellular Vesicles: Recent Updates, Challenges and Limitations

论文链接：<https://www.mdpi.com/2227-7382/13/1/12>

期刊名：Proteomes

期刊主页：<https://www.mdpi.com/journal/proteomes>

细胞外囊泡（EVs）是细胞分泌的脂质双层囊泡，存在于所有体液中，在细胞间通讯、免疫系统调节、癌症进展和药物递送中发挥着关键作用。然而，EVs的分离纯化、蛋白质组分析以及功能解读仍面临诸多挑战。

Proteomes 发表的一篇综述，对EVs蛋白质组学领域进行了全景式梳理。本文将从这篇综述出发，系统了解EVs蛋白质组学的进展、挑战与未来方向。

一、EVs的分类与生物发生

EVs根据其生物发生方式、大小、内容和释放机制，分为三种亚型：

外泌体（50-150 nm）：通过内体膜的内向出芽形成，是多泡体（MVBs）中的腔内囊泡（ILVs）。MVBs转运至质膜后释放外泌体。外泌体的生物发生通过运输必需内体分选复合物（ESCRT）依赖或ESCRT非依赖途径进行。ESCRT依赖途径涉及ESCRT-0、I、II、III和Vsp4五个核心复合物；ESCRT非依赖途径则依赖四跨膜蛋白（如CD81）、脂筏结构域、flotillin-2和ARF-6等。

微囊泡（100-1000 nm）：通过质膜的外向出芽形成，独立于内体运输途径。小GTP酶（如ARF1和ARF6）在调节货物组装和分泌中起关键作用。

凋亡小体（1-5

μm）：由凋亡细胞解体产生，含有糖表位、组蛋白和DNA片段，参与免疫耐受和抗炎反应。

EVs存在于所有体液中，使样本采集相对容易，且可与疾病进展相关联。它们在干细胞扩增、炎

症以及神经系统疾病、肾脏疾病和多种癌症中发挥关键作用。

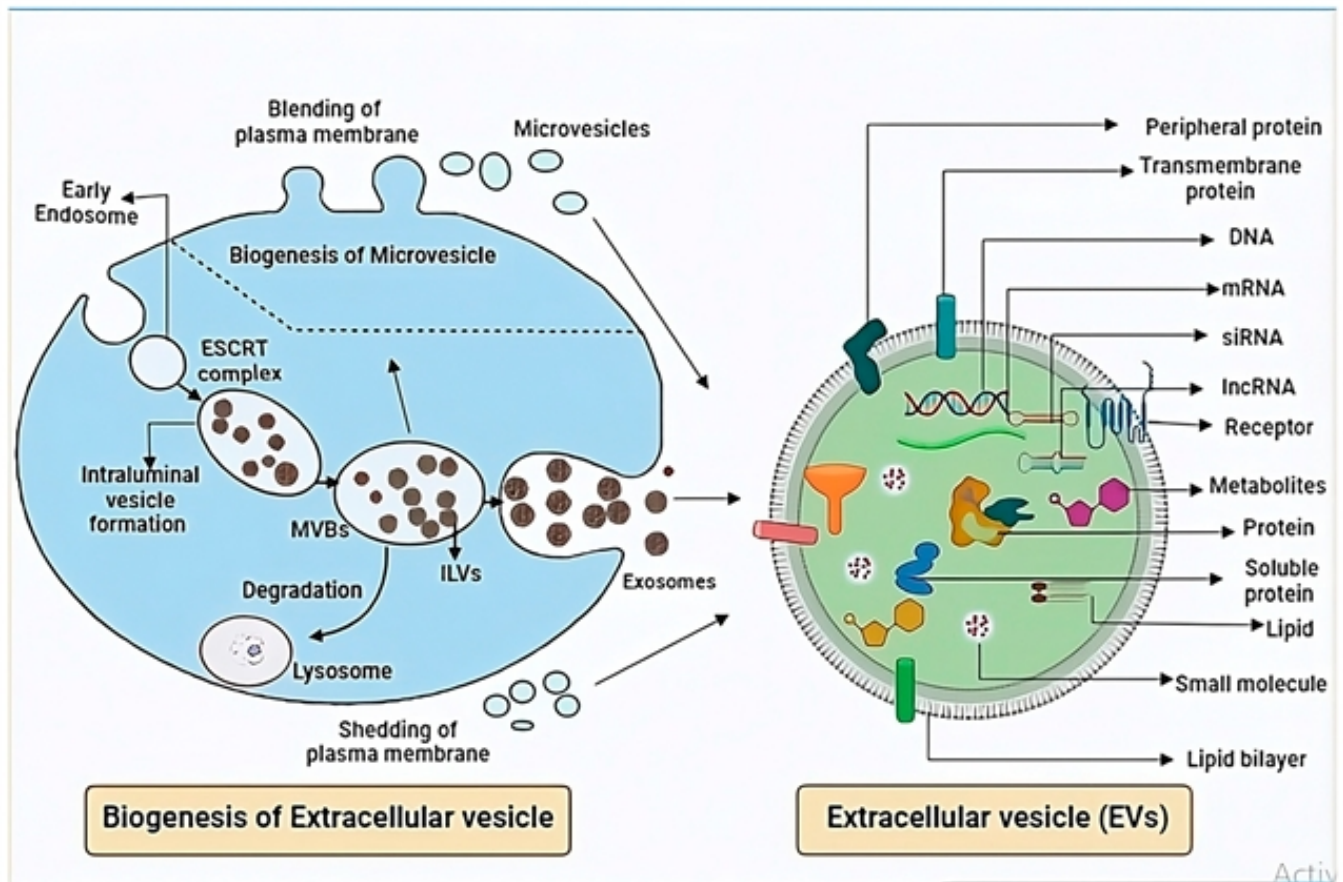


图1. 外泌体生物发生示意图

二、EVs的蛋白质组分

EVs表面和内部携带多种蛋白质。表面蛋白通过受体-配体相互作用介导EVs的靶向和摄取；内部蛋白则通过递送功能性酶、信号分子或转录因子直接调节细胞过程。

表面蛋白包括四跨膜蛋白（CD151、CD82、CD81、CD63、CD9等）、抗原呈递蛋白、细胞黏附蛋白、信号转导受体、整合素等。四跨膜蛋白在ESCRT非依赖的外泌体生物发生、货物选择、细胞靶向和摄取中发挥关键作用。

内部蛋白包括细胞骨架蛋白（微管蛋白、cofilin、肌动蛋白）、生长因子和细胞因子（TNF- α 、TGF- β 、TRAIL）、热休克蛋白以及参与MVB生物发生的蛋白。

不同细胞来源的EVs蛋白组成各异。例如，结直肠癌SW480细胞来源的外泌体富含RNA结合蛋白和膜蛋白；乳腺癌细胞来源的EVs中可鉴定出ST14、CLDN3、ITGA7等潜在生物标志物。

肿瘤来源的EVs可携带表面整合素促进转移，而免疫细胞来源的EVs可展示MHC分子调节免疫反应。

三、EVs分离方法的比较与挑战

EVs研究的首要挑战是分离纯化。综述系统比较了多种分离技术：

超速离心法：最广泛使用，通过差速离心分离。但耗时、需要大量处理，可能导致脂蛋白共沉淀。密度梯度超速离心可提高纯度，但更耗时且需大量样品。

尺寸排阻色谱（SEC）：基于分子大小分离，与超速离心联用可显著提高纯度。

超滤法：处理时间短、通量高，但存在膜破裂和EVs变形的风险。

聚合物沉淀法：操作简单、产量高，但纯度较低，盐浓度高可能干扰质谱分析。

免疫亲和法：基于抗原-抗体相互作用，特异性强、灵敏度高，但需要特定的表面蛋白标志物。

微流控技术：集成分离、检测和分析，适合小体积样品，但可能堵塞且难以处理大体积样品。

综述指出，目前没有任何方案能回收完全纯的EVs亚群。不同方法的纯度、产量和完整性差异显著，直接影响下游蛋白质组学数据的质量和可比性。

主要挑战包括：EVs的异质性影响单步分离效率和结果可重复性；血浆蛋白（白蛋白、脂蛋白等）常与EVs共分离，干扰蛋白质组分析；EVs中某些蛋白丰度较低，常规质谱难以检测；与转录组学不同，蛋白质无扩增技术，需要大量样本。

四、未来方向

为应对这些挑战，综述提出多项策略：多种分离技术联用（如超速离心+SEC+免疫亲和）以提高纯度和特定亚群分离；非对称流场流分离（AF4）减少尺寸异质性；蛋白质组分析从自下而上向自上而下转变，以检测蛋白质变体；建立标准化的EVs表征方案。

在应用层面，EVs可作为诊断和预后工具，也可用于药物递送（防止药物降解、实现靶向递送）。在再生医学领域，干细胞来源的EVs已显示出改善心脏损伤的潜力。

五、延伸阅读

如果您对EVs分离方法或特定蛋白的定量分析感兴趣，本期推荐的两篇文章也值得一读：

1. 血浆细胞外囊泡分离方法的系统比较：纯度评估与生物标志物发现

<https://www.mdpi.com/2227-7382/13/3/45>

本研究系统比较了ExoQuick、ExoSpin、Izon SEC、总外泌体分离试剂盒和Top14高丰度蛋白去除试剂盒五种血浆EVs分离方法。通过建立平行反应监测（PRM）靶向质谱纯度评分（监测50个肽段），发现尺寸排阻色谱（SEC）方法表现最佳：捕获了100种已知EV标志物蛋白中的62种（其他方法仅10-35种），检测到61种在血浆中无法检测的独特蛋白，纯度评分接近细胞来源EVs（0.9）。研究还发现某些传统认为的EV标志物部分以游离形式循环，为EVs标志物研究提供了新视角

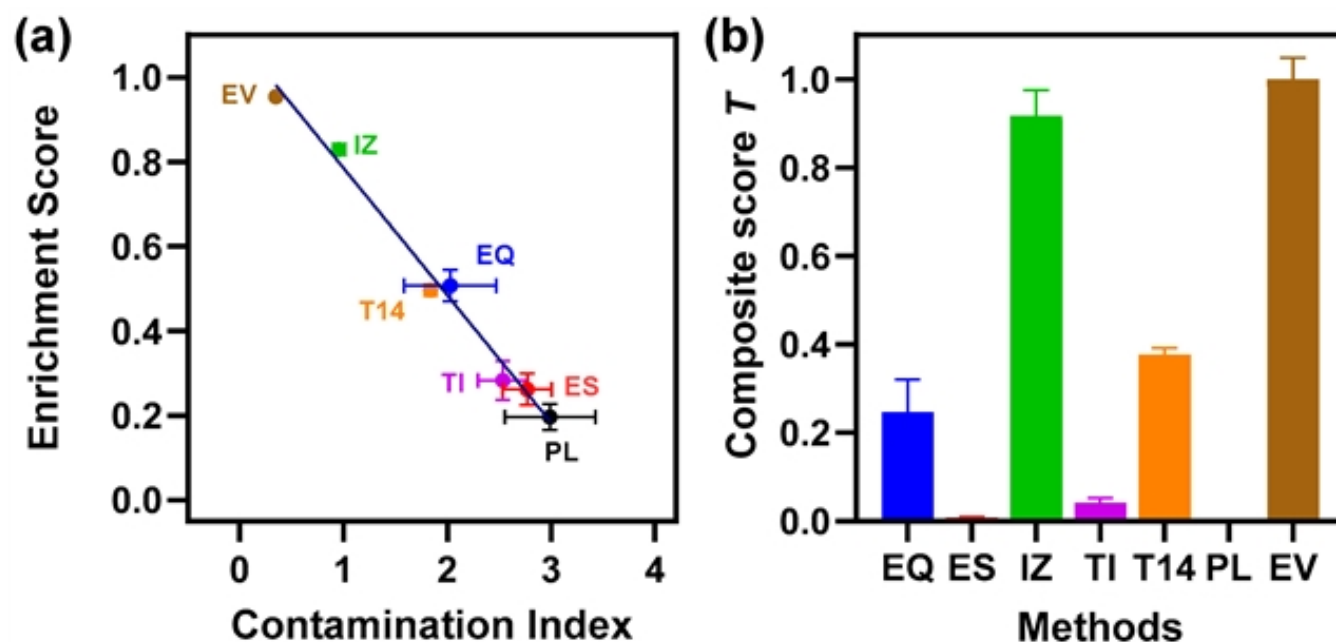


图7. EV富集评分与纯度综合评分柱状图

2. 细胞外囊泡相关补体膜攻击复合物蛋白的定量分析

<https://www.mdpi.com/2227-7382/12/3/21>

本研究使用多反应监测（MRM）质谱法，结合 ^{15}N 标记的QconCAT内标，定量分析了高度纯化的人血浆EVs中膜攻击复合物（MAC）形成蛋白（C5b、C6、C7、C8和C9）。通过三步纯化方案（差速离心+SEC+肝素亲和色谱），纯度较原始血浆提高约1200-1500倍。研究发现，20K-SEC-Hep EVs中MAC形成蛋白的摩尔比约为1:1:1:1:1，与已形成MAC的1:1:1:1:18不符，提示正常血浆EVs携带单个MAC蛋白但无预形成的MAC。这一发现对理解EVs与补体系统的相互作用具有重要意义。

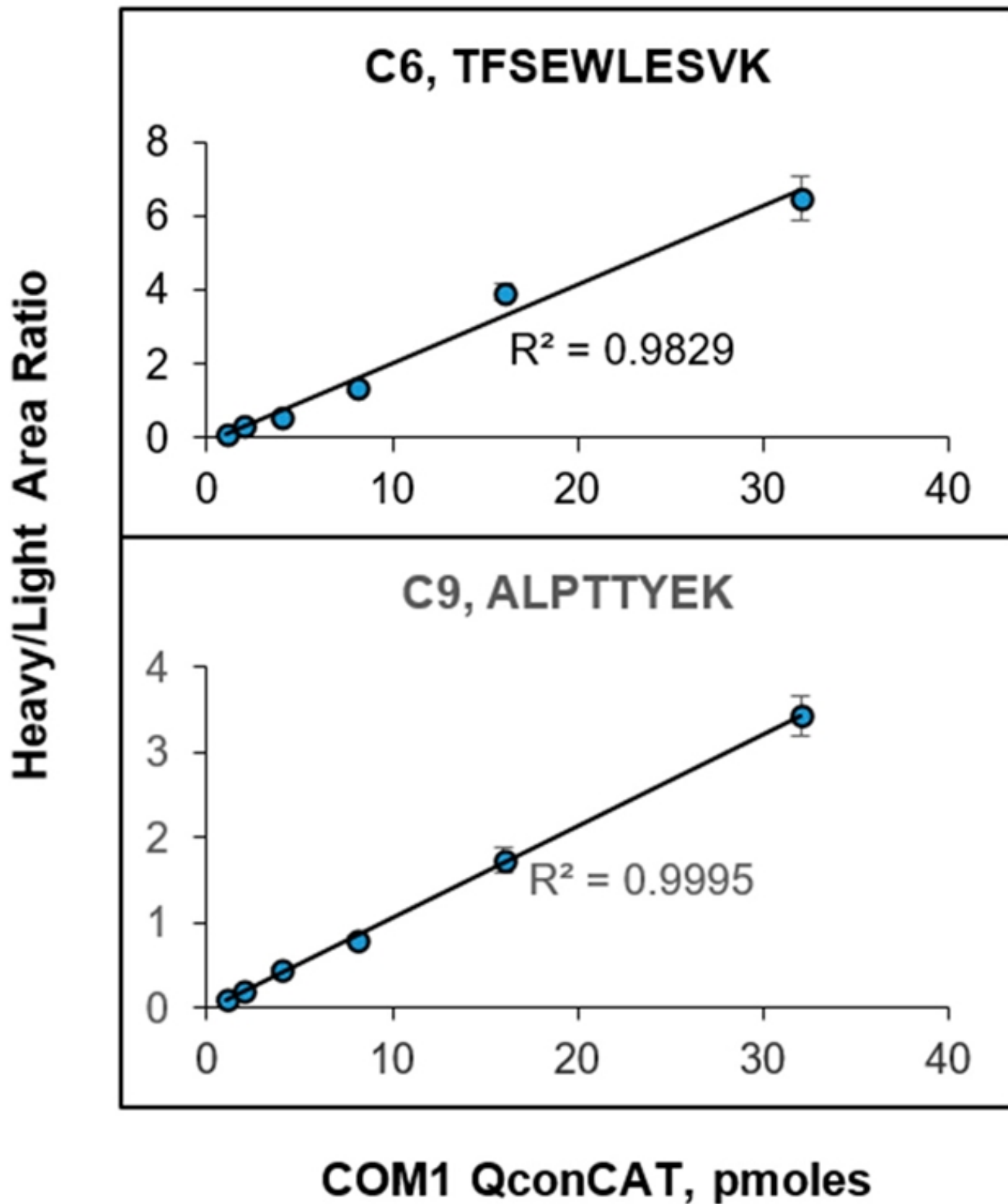


图 1. 添加不同浓度 COM1 QconCAT 的 20K-SEC-Hep EV 的响应曲线

Proteomes 期刊介绍

主编：Jens R. Coorsen, Institute for Globally Distributed Open Research and Education (IGDORE),

Canada; Matthew P. Padula, The University of Technology Sydney, Australia

期刊专注于蛋白质组分析的各个方面，特别关注蛋白质组在蛋白质形式（proteoforms）、功能性生物学单元以及标准氨基酸序列水平上的表征和定量。目前已被Scopus、ESCI (Web of Science)、PubMed等数据库收录。

2025 Impact Factor: 4.3

2025 CiteScore: 6.4

Time to First Decision: 27.9 Days

Acceptance to Publication: 5.5 Days

来源：Proteomes

更多 科学进展 请访问 <https://www.iikx.com/news/progress/>

本文版权归原作者所有，请勿用于商业用途，[爱科学iikx.com](https://www.iikx.com)转发