

# 电化学生物传感器检测外泌体的研究进展

朱俊芳, 薛雯, 唐立红, 陈洁晶, 陈燕\*

中国人民解放军联勤保障部队第九二四医院检验科/广西代谢性疾病研究重点实验室, 广西 桂林  
Email: \*1347355332@qq.com

收稿日期: 2021年3月6日; 录用日期: 2021年3月26日; 发布日期: 2021年4月2日

## 摘要

早期发现、早期诊断是改善肿瘤患者的预后、提高生存率最重要的手段。肿瘤衍生的外泌体是肿瘤早期诊断和预后评估的新型生物标志物。在这里, 我们回顾了用于检测肿瘤来源外泌体电化学生物传感器的最新研究进展。主要包括外泌体潜在标志物可用于生物传感器设计的指示性靶标, 生物识别元件和信号转换技术。此外, 还分析了电化学生物传感技术检测肿瘤来源外泌体所面临的挑战和机遇。

## 关键词

外泌体, 电化学生物传感器, 肿瘤生物标志物

# Research Progress of Electrochemical Biosensor for Detecting Exosomes

Junfang Zhu, Wen Xue, Lihong Tang, Jiejing Chen, Yan Chen\*

Department of Clinical Laboratory of Guilin No. 924 Hospital, Guangxi Key Laboratory of Metabolic Diseases Research, Guilin Guangxi  
Email: \*1347355332@qq.com

Received: Mar. 6<sup>th</sup>, 2021; accepted: Mar. 26<sup>th</sup>, 2021; published: Apr. 2<sup>nd</sup>, 2021

## Abstract

Early detection and diagnosis are the most important means to improve the prognosis and survival rate of tumor patients. Tumor-derived exosomes are new biomarkers for early tumor diagnosis and prognosis evaluation. Here, we review the latest research progress of electrochemical biosensors for detecting tumor-derived exosomes. It mainly includes potential exosomes markers that can be used as indicative targets for biosensor design, biometric identification elements and

\*通讯作者。

文章引用: 朱俊芳, 薛雯, 唐立红, 陈洁晶, 陈燕. 电化学生物传感器检测外泌体的研究进展[J]. 世界肿瘤研究, 2021, 11(2): 33-37. DOI: 10.12677/wjcr.2021.112005

signal conversion technology. In addition, the challenges and opportunities for the detection of tumor exocrine bodies by electrochemical biosensor technology were also analyzed.

## Keywords

Exosome, Electrochemical Biosensors, Tumor Biomarkers

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

外泌体(exosome)是由细胞内多泡小体通过细胞质膜融合向细胞外环境释放并进入循环系统的直径在 30~150 nm 之间的具有脂质双分子层的膜性囊泡[1]。最新研究证明,外泌体与肿瘤的发生、发展、转移以及免疫应答具有相关性,是一类具有广泛应用前景的新型生物标志物[2]。近年来,恶性肿瘤的发病率逐年上升,已成为全球性的公共健康挑战。在中国,过去五年癌症新增和死亡病例均居世界首位,肿瘤的防治形势极其严峻,研究新的肿瘤防治手段迫在眉睫[3]。传统的肿瘤诊断方法主要是基于内窥镜、计算机断层扫描、X 射线、正电子发射断层扫描、磁共振成像和组织活检,而这些方法存在灵敏度低、有创性、对人体有伤害等缺点[4]。而用于外泌体活性分析的电化学传感器具有信号读出速度快、传感元件价格低廉、超高检测灵敏度等优点。本文主要对电化学生物传感器检测外泌体进行概括性描述。

## 2. 生物传感:即时检测(Point-of-care testing, POCT)外泌体的趋势

虽然最近在外泌体领域的研究已受到广泛关注,但是仍然缺乏有效的定量方法用于外泌体检测。迫切需要开发快速且有效的方法鉴定和检测体液中的外泌体。近年来,为了实现高效灵敏的外泌体检测,即时检测(POCT),尤其是生物传感,已引起全球科学家和技术人员的高度关注[5] [6]。我们将回顾从靶标选择,生物识别策略和信号转换相关的外泌体检测生物传感(主要是电化学生物传感器)的最新研究进展。

## 3. 生物传感靶标选择

外泌体膜结构主要由①脂质双分子层(胆固醇、磷脂酰丝氨酸和神经酰胺)、②四次跨膜蛋白(CD9、CD63、CD81),③伴侣蛋白(热休克蛋白 Hsp60、Hsp70、Hsp90)和④膜锚定蛋白(Annexins、Rab 蛋白和 GTPases)等组成[7]。因此,利用其表面组成的差异可以简单和快速鉴定外泌体。外泌体表面上的四次跨膜蛋白(例如 CD9, CD63 和 CD81)或脂筏(例如胆固醇,磷脂酰丝氨酸和神经酰胺)通常用作总外泌体检测的靶标[8]。而肿瘤相关抗原如(EpCAM, HER2, MUC1 和 PSMA) [9]在肿瘤来源的外泌体表面上高度富集也成为检测肿瘤源性外泌体的主要靶标。

## 4. 生物传感器的识别元件

生物识别元件的选择完全取决于识别元件和靶标之间的结合亲和力和效率。最经典的膜蛋白识别元件是抗原-抗体相互作用的“锁和钥匙”模型[10]。近年来,适配体已被用作抗体的替代物成为新的生物识别元件。与抗体相比,核酸适配体具有更稳定的化学性质、免疫原性低和易被各种基团灵活修饰等优点,被广泛应用于生物传感技术中靶标识别[11]。例如 Zhou, Q.等将 CD63 aptamer 包被在金电极上构建化学生物传感体系定量检测血清中的外泌[12],其灵敏度是抗 CD63 抗体检测试剂盒的 100 倍,且检测线性关系稳定。

此外,在蛋白质进化策略的帮助下,肽链也被用作特异性识别元件,其在结合亲和力,可扩展性,和成本效率方面提供良好的性能。例如, BK 和 CP05 的外泌体捕获可用于在生物传感器中有效地定量外泌体数量 [13] [14]。外泌体膜的特殊结构也提供了鉴定识别的机会。脂质是一种新的生物识别靶标,具有优异的效率,不受外泌体表面蛋白质含量的影响,并已用于许多生物传感器的开发。例如 Zheng, SY 等报道了一种脂质亲和策略,利用胆固醇探针快速插入到外泌体膜脂质双分子层中,最后通过磁性分离即可高效、快速富集到外泌体 [15]。Luo, Y 等人提出了一种适体-胆固醇介导的邻近连接测定法(AcmPLA)高效灵敏检测外泌体膜蛋白 [16]。

## 5. 生物传感器的信号转换器

信号转换器作为生物传感器的重要组成部分,它的作用是将生物识别元件获取的生物化学信息转换成容易进行测量的光信号或电信号。以下主要是对以电信号为转换器的电化学生物传感进行概括性描述。

基于电化学的生物传感因其信号读出速度快、传感元件价格低廉、超高检测灵敏度等优点得到了广泛的发展。电化学生物传感器可以将生物分子的识别转换为电信号,包括电流,电势和阻抗。随着集成电路技术的发展和新型电极的研发,电化学生物传感器正朝着小型化和便携性的方向逐步发展。目前,电化学生物传感可包含三种形式:常规电极、丝网印刷电极和微型芯片。

用于外泌体检测的常规电化学生物传感器主要使用玻碳电极和金电极。Boriachek 及其同事使用玻碳电极作为基底, CdSe 量子点(CdSeQDs)作为电化学信号标签 [17]。通过包被有 CD9 或 CD63 抗体的磁珠 (MB)来捕获来自乳腺癌、结肠癌细胞系和血清样品的外泌体, CdSeQDs 功能化的肿瘤特异性抗体用于识别外泌体形成双抗夹心免疫复合物。最后, CdSeQD 溶解在  $\text{HNO}_3$  中,  $\text{Cd}^{2+}$  阳极溶出伏安定量的峰值电流与肿瘤特异性外泌体的数量相关。这种方法实现了 100 个 exosome/ $\mu\text{l}$  的高灵敏检测,对于量化临床样本中的肿瘤特异性外泌体具有一定的应用前景。金电极具有快速电子响应和传递速率成为另一种常用的候选基底。Huang 等人,提出了一种免标记的电化学适体传感平台 [18],通过结合 hemin/G-quadruplex 系统和滚环扩增技术(RCA)高灵敏和特异检测胃癌细胞来源的外泌体,最低检测限为  $9.54 \times 10^2 \text{ mL}^{-1}$ 。Zhang 及其同事使用金/玻碳电极,开发了一种新型的电化学发光传感器,用于外泌体活性分析。该方法通过将适体修饰的二维  $\text{Ti}_3\text{C}_2$  MXenes 纳米片用作鲁米诺的纳米探针催化剂来增强化学发光(ECL)强度提高检测灵敏度 [19]。

近年来,基于丝网印刷电极的电化学生物传感器由于其比传统的基于玻碳/金电极的电化学生物传感器成本低,操作简单和设计灵活性强而备受研究者青睐。Jeong 及其同事将磁性富集,抗体识别和酶促扩增与丝网印刷电极相结合,进行高通量测量 [20]。他们还设计了一种便携式的八通道设备,用于筛查卵巢癌患者血浆样本中的 EV。Park 及其同事同样采用磁电化学方法检测 EV:对尿液中 T 细胞衍生的 CD3 阳性外泌体进行免疫磁富集并通过电化学检测来监测肾移植排斥反应 [21]。Doldán 及其同事使用抗 CD9 抗体功能化的丝网印刷电极直接检测稀释后血清样品中的外泌体 [22]。为了进一步提高直接检测外泌体的灵敏度, Tan 及其同事开发了一种纳米四面体(NTH)辅助的核酸适体传感平台,用于直接捕获和检测肝细胞外泌体 [23]。NTH 允许维持空间定向固定化并减少阻碍和显著提高生物分子识别。与传统的单链适体功能化的生物传感器相比,灵敏度提高了 100 倍,最低检测限为  $2.09 \times 10^4/\text{mL}$ 。

基于微型芯片的电化学生物传感器已经小型化以使用小样品体积来检测外泌体。Zhou 及其同事报道了一种基于核酸适体的电化学生物传感器用于定量检测外泌体 [24]。将 CD63 适体固定在微型芯片化的电极表面上,并将预先标记有亚甲蓝(MB)的探针链与适体链杂交。在存在外泌体的情况下,探针链被置换出去,导致电化学信号降低。该方法最低检测限为  $1 \times 10^6 \text{ particles/mL}$  比商业 ELISA 的 LOD 降低了 100 倍。类似的, Kelley 及其同事将适体固定在微型芯片化的电极表面上捕获外泌体,利用电氧化标记的金

属纳米颗粒(MNP)报告外泌体膜蛋白含量[25]。该方法的最小检测限(LOD)为 50 个外泌体/传感器, 比最近报道的方法具有更高的灵敏度(LOD = 500 个外泌体/传感器)。

## 6. 展望

电化学传感具有极其灵敏的生物分子检测特性, 因为在肿瘤早期阶段, 外泌体及其相关标记物的浓度非常低, 因此可以非常有效地进行检测。此外, 电化学方法操作简单, 所需的设备小和便携, 这对 POCT 检测特别有用。尽管这些研究取得了令人振奋的结果, 但在推广电化学生物传感器方面仍有两个重要的挑战需要解决: 传感器小型化和灵敏度提高。随着微流体和集成制造技术的进步, 可以获得更先进的电化学生物传感器。灵敏度可以通过几种方式提高, 例如, 高比表面积的纳米材料可以用来提高电极的导电性, 而其他信号放大方法, 如核酸放大和基于酶的催化反应, 也可以用来提高灵敏度。

## 基金项目

本文由广西重点实验室建设项目(20-065-76); 桂林市研究与技术开发计划项目(20170117-1)提供资助。

## 参考文献

- [1] Tkach, M. and Théry, C. (2016) Communication by Extracellular Vesicles: Where We Are and Where We Need to Go. *Cell Actions*, **164**, 1226-1232. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.01.043>
- [2] 郑磊, 李博. 细胞外囊泡生物标志物研究现状与筛选策略[J]. 中华检验杂志, 2018, 41(11): 812-816.
- [3] 郑荣寿, 孙可欣, 张思维, 等. 2015 年中国恶性肿瘤流行情况分析[J]. 中华肿瘤杂志, 2019, 41(1): 19-28.
- [4] Park, S.M., Aalipour, A., Vermesh, O., et al. (2017) Towards Clinically Translatable *in Vivo* Nanodiagnosics. *Nature Reviews Materials*, **2**, Article No. 17014. <https://doi.org/10.1038/natrevmats.2017.14>
- [5] Lippa, P.B., Müller, C., Schlichtiger, A., et al. (2011) Point-of-Care Testing (POCT): Current Techniques and Future Perspectives. *Trends in Analytical Chemistry*, **30**, 887-898. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2011.01.019>
- [6] Kirsch, J., Siltanen, C., Zhou, Q., et al. (2013) Biosensor Technology: Recent Advances in Threat Agent Detection and Medicine. *Chemical Society Reviews*, **42**, 8733-8768. <https://doi.org/10.1039/c3cs60141b>
- [7] Azmi, A.S., Bao, B. and Sarkar, F.H. (2013) Exosomes in Cancer Development, Metastasis, and Drug Resistance: A Comprehensive Review. *Cancer and Metastasis Reviews*, **32**, 623-642. <https://doi.org/10.1007/s10555-013-9441-9>
- [8] Kalluri, R. and LeBleu, V.S. (2020) The Biology, Function, and Biomedical Applications of Exosomes. *Science*, **367**, eaau6977. <https://doi.org/10.1126/science.aau6977>
- [9] Simpson, R.J., Jensen, S.S. and Lim, J.W.E. (2008) Proteomic Profiling of Exosomes: Current Perspectives. *Proteomics*, **8**, 4083-4099. <https://doi.org/10.1002/pmic.200800109>
- [10] Notkins, A.L. (2004) Polyreactivity of Antibody Molecules. *Trends in Immunology*, **25**, 174-179. <https://doi.org/10.1016/j.it.2004.02.004>
- [11] Shangguan, D., Li, Y., Tang, Z., et al. (2006) Aptamers Evolved from Live Cells as Effective Molecular Probes for Cancer Study. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 11838-11843. <https://doi.org/10.1073/pnas.0602615103>
- [12] Zhou, Q., Rahimian, A., Son, K., et al. (2016) Development of an Aptasensor for Electrochemical Detection of Exosomes. *Methods*, **97**, 88-93. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2015.10.012>
- [13] Gori, A., Romanato, A., Greta, B., et al. (2020) Membrane-Binding Peptides for Extracellular Vesicles On-Chip Analysis. *Journal of Extracellular Vesicles*, **9**, 1751428. <https://doi.org/10.1080/20013078.2020.1751428>
- [14] Gao, X., Ran, N., Dong, X., et al. (2018) Anchor Peptide Captures, Targets, and Loads Exosomes of Diverse Origins for Diagnostics and Therapy. *Science Translational Medicine*, **10**, eaat0195. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aat0195>
- [15] Wan, Y., Cheng, G., Liu, X., et al. (2017) Rapid Magnetic Isolation of Extracellular Vesicles via Lipid-Based Nanoprobes. *Nature Biomedical Engineering*, **1**, Article No. 0058. <https://doi.org/10.1038/s41551-017-0058>
- [16] Zhao, X., Luo, C., Mei, Q., et al. (2020) Aptamer-Cholesterol-Mediated Proximity Ligation Assay for Accurate Identification of Exosomes. *Analytical Chemistry*, **92**, 5411-5418. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c00141>
- [17] Boriachek, K., Islam, M.N., Gopalan, V., et al. (2017) Quantum Dot-Based Sensitive Detection of Disease Specific

- Exosome in Serum. *Analyst*, **142**, 2211-2219. <https://doi.org/10.1039/C7AN00672A>
- [18] Huang, R., He, L., Xia, Y., *et al.* (2019) A Sensitive Aptasensor Based on a Hemin/G-Quadruplex-Assisted Signal Amplification Strategy for Electrochemical Detection of Gastric Cancer Exosomes. *Small*, **15**, e1900735. <https://doi.org/10.1002/sml.201900735>
- [19] Zhang, H., Wang, Z., Zhang, Q., *et al.* (2019) Ti<sub>3</sub>C<sub>2</sub> MXenes Nanosheets Catalyzed Highly Efficient Electrogenerated Chemiluminescence Biosensor for the Detection of Exosomes. *Biosensors and Bioelectronics*, **124-125**, 184-190. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.10.016>
- [20] Jeong, S., Park, J., Pathania, D., *et al.* (2016) Integrated Magneto-Electrochemical Sensor for Exosome Analysis. *ACS Nano*, **10**, 1802-1809. <https://doi.org/10.1021/acs.nano.5b07584>
- [21] Park, J., Lin, H.-Y., Assaker, J.P., *et al.* (2017) Integrated Kidney Exosome Analysis for the Detection of Kidney Transplant Rejection. *ACS Nano*, **11**, 11041-11046. <https://doi.org/10.1021/acs.nano.7b05083>
- [22] Doldán, X., Fagúndez, P., Cayota, A., *et al.* (2016) Electrochemical Sandwich Immunosensor for Determination of Exosomes Based on Surface Marker-Mediated Signal Amplification. *Analytical Chemistry*, **88**, 10466-10473. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b02421>
- [23] Wang, S., Zhang, L., Wan, S., *et al.* (2017) Aptasensor with Expanded Nucleotide Using DNA Nanotetrahedra for Electrochemical Detection of Cancerous Exosomes. *ACS Nano*, **11**, 3943-3949. <https://doi.org/10.1021/acs.nano.7b00373>
- [24] Zhou, Q., Rahimian, A., Son, K., *et al.* (2016) Development of an Aptasensor for Electrochemical Detection of Exosomes. *Methods*, **97**, 88-93. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2015.10.012>
- [25] Zhou, Y.-G., Mohamadi, R.M., Poudineh, M., *et al.* (2016) Interrogating Circulating Microsomes and Exosomes Using Metal Nanoparticles. *Small*, **12**, 727-732. <https://doi.org/10.1002/sml.201502365>