

基于光学生物传感器检测外泌体的研究进展

吴润强^{1,2}, 卢春丽^{1,2}, 莫秋菊^{1,2}, 陈洁晶^{1,2}, 朱俊芳^{1,2*}

¹中国人民解放军联勤保障部队第九二四医院检验科, 广西 桂林

²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8日; 录用日期: 2021年3月22日; 发布日期: 2021年4月9日

摘要

外泌体是一种由大多数类型的细胞分泌到细胞外空间的膜性囊泡。它们存在于包括血液、尿液、血清和唾液在内的体液中, 在细胞间的通讯中起着至关重要的作用。外泌体包含各种生物标记物, 如核酸和蛋白质, 可以反映其母细胞的状态。因此, 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生物传感(主要是基于光学生物传感器)的最新研究进展。此外, 还分析了基于光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, 光学生物传感器, 肿瘤生物标志物

Research Progress in Detection of Exosomes Based on Optical Biosensor

Runqiang Wu^{1,2}, Chunli Lu^{1,2}, Qiuju Mo^{1,2}, Jiejing Chen^{1,2}, Junfang Zhu^{1,2*}

¹Department of Clinical Laboratory of Guilin No. 924 Hospital, Guilin Guangxi

²Guangxi Key Laboratory of Metabolic Diseases Research, Guilin Guangxi

Email: *1347355332@qq.com

Received: Mar. 8th, 2021; accepted: Mar. 22nd, 2021; published: Apr. 9th, 2021

Abstract

Exosomes are membranous vesicles secreted into the extracellular space by most types of cells. They exist in body fluids including blood, urine, serum and saliva, and play a vital role in the

*通讯作者。

文章引用: 吴润强, 卢春丽, 莫秋菊, 陈洁晶, 朱俊芳. 基于光学生物传感器检测外泌体的研究进展[J]. 生物医学, 2021, 11(2): 49-54. DOI: 10.12677/hjbm.2021.112007

communication between cells. Exosomes contain various biomarkers, such as nucleic acids and proteins, which can reflect the state of their parent cells. Therefore, tumor-derived exosomes are new biomarkers for early tumor diagnosis and prognosis evaluation. Here, we review the latest research progress in biosensing (mainly based on optical biosensors) for detecting tumor-derived exosomes. In addition, the challenges and opportunities of detecting tumor-derived exosomes based on optical biosensing technology are also analyzed.

Keywords

Exosome, Optical 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]。循环外泌体通过将特定的生物活性分子(脂质、蛋白质、核酸等)从供体细胞转移到受体细胞,参与多种病理生理过程[2]。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[3]。2016年,首个基于外泌体的肿瘤诊断产品在美国上市。虽然它们的临床应用仍处于起步阶段,但检测肿瘤来源的外泌体来诊断肿瘤,评估治疗反应和预后已引起人们的极大关注。

光学方法在测量生物靶标方面显示出卓越的准确性和稳定性。目前也有大量的研究通过光学检测技术对外泌体进行了分析。本文主要对光学生物传感(比色生物传感、荧光传感、表面等离子体共振传感和表面增强拉曼散射传感)检测外泌体进行概括性描述。

2. 比色生物传感

比色生物传感是以生成有色物质的显色反应为基础,通过肉眼观察或测量有色物质颜色的变化,产生“是/否”答案或半定量结果而无需额外的分析仪器。由于其灵敏、快速、方便、准确以及高选择性的特点,比色生物传感器已被广泛应用于床旁检测(Point-of-care testing, POCT)检测领域中。比色生物传感主要分为两类:基于纸质传感器和基于溶液传感器。

纸质传感器通常使用纸张作为基底,由于其使用简单方便和所需样本量小(一般少于 50 μl),有利于即时检测。侧流免疫层析检测技术(LFIA)是经典的纸质比色生物传感,被认为是最有前途的新技术之一[4]。通常情况,LFIA由样品垫、结合垫、包含测试和质控线的硝化纤维膜和吸收垫四个部件组成。样品溶液通过毛细管作用迁移至上述的四个部件。通过固定在检测线上的捕获元件靶向捕获外泌体,纳米颗粒标记的检测元件特异性结合外泌体形成“三明治”复合物,由于纳米颗粒在检测线上的积累而可以观察到颜色变化。Blanco-Lopez及其同事首次展示了一种比色 LFIA,用于检测人黑素瘤细胞系 Ma-Mel-86c 的外泌体[5]。首先,使用抗 CD9 和抗 CD81 的混合物作为捕获抗体,然后用金纳米颗粒标记的抗 CD63 作为检测抗体。该检测在 15 分钟内完成,检测限(LoD)为 8.54×10^5 外泌体/ μl 。此外,该研究小组将炭黑磁性纳米颗粒替换掉金纳米粒子,同样也获得优异的检测性能[6]。Lopez-Cobo及其同事还利用 LFIA 技术研究了外泌体膜蛋白表达情况,表明使用外泌体 MICA 和 CD9 作为检测靶标更为合理[7]。

使用酶或纳米材料作为信号标签来产生颜色变化的溶液传感器对于大量样本的快速和简单的检测是极为有利的。基于溶液的生物传感通常利用金纳米颗粒(AuNPs)在分散-聚集状态变化时表现出颜色的改变这一特性。Tan 及其同事报道了一种生物传感平台,该平台利用 DNA 适配体与金纳米颗粒的络合,从而使 AuNPs 在高盐溶液中成分散状态(红色) [8]。当外泌体存在时,外泌体膜蛋白与相应的适配体发生特异性结合,金纳米颗粒聚集导致溶液的颜色发生改变(紫色)。通过酶标仪检测吸收光谱或肉眼观察肉眼分析外泌体膜蛋白。Zhang 和他的同事建立了一种称为邻近连接分析-重组聚合酶扩增-转录介导扩增(PLA-RPA-TMA)的检测方法,高灵敏度和特异性检测肿瘤来源的外泌体[9]。通过重组聚合酶扩增(RPA)和转录介导扩增(TMA)相结合进行了双重信号扩增,然后用基于金纳米颗粒的比色法对 RPA-TMA 反应的产物进行了定量检测。另一种广泛应用于基于溶液生物传感的信号标签为辣根过氧化物酶(HRP)。HRP 能够催化 H_2O_2 氧化 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)体系产生蓝色信号。He 等人,使用包被有抗 CD9 抗体的免疫磁珠捕获 HepG2 细胞分泌的外泌体[10]。随后,标记胆固醇的 DNA 链插入到外泌体膜上,其可促进连接着 HRP 的杂交链反应产生蓝色。该方法能够灵敏检测到每微升 2.2×10^3 个外泌体,比传统 ELISA 灵敏度高 100 倍。然而,HRP 需要复杂的制备、纯化过程和严格的储存环境。近年来,各种具有模拟天然酶活性的纳米酶因其成本低、易于批量制备和不受温度变化影响等优点,在生物传感器的构建中得到了广泛的应用。例如,Chen 等人通过整合具有优异水溶性的单壁碳纳米管(s-SWCNTs)和 CD63 适体来检测外泌体[11]。同样,石墨碳氮化纳米片(g-C₃N₄NSs)也被开发用于基于溶液的生物传感器[12],随着 CD63 阳性外泌体浓度的增加,传感器颜色由深蓝色变为浅蓝色。通过肉眼观察或通过 UV-可见光谱进行检测可以分析外泌体浓度。

3. 荧光生物传感

荧光生物传感因具有仪器设备简单、操作简便、灵敏度高和快速等优点,是生物医学研究的重要工具。荧光信号的产生通常取决于荧光纳米颗粒或荧光基团的使用。荧光生物传感器可以分成三种:基于纸质传感器、基于溶液传感器和基于微流控芯片传感器。

Chen 及其同事报道了使用金纳米棒(AuNRs)作为猝灭荧光纳米颗粒(上转换纳米粒子)的纸质传感器来检测源自肝细胞癌(HepG2)细胞的外泌体[13]。首先,将 CD63 适体序列设计成捕获探针(CP)和检测探针(DP)两个不同的片段。然后,将上转换纳米粒子和 CP 固定到高碘酸钠氧化的滤纸上以产生绿色荧光。当把 DP 修饰的 AuNRs 和外泌体滴加到滤纸上,外泌体表面的 CD63 蛋白可使 CP 与 DP 结合,缩短了 AuNRs 与 UCNTs 之间的距离,从而启动共振能量转移猝灭了绿色荧光。最后,通过读取纸质的荧光强度来量化外泌体浓度。

基于溶液的荧光生物传感器通常依赖荧光纳米颗粒形成或荧光基团的释放。He 等人基于荧光铜纳米颗粒(CuNPs),开发了一种简单、经济有效的外泌体检测荧光生物传感器[14]。首先,胆固醇修饰的磁珠(MB)捕获外泌体。然后,适体修饰的氧化铜纳米颗粒(CuO NPs)特异性识别外泌体膜蛋白,最终形成了三明治复合物(MB-exosome-CuO NP)。通过将所得的三明治复合物溶解,从而将 CuO NP 转变为 Cu(II)离子(Cu²⁺)。最后,在聚胸腺嘧啶存在下,Cu²⁺被抗坏血酸钠还原为荧光 CuNPs,产生荧光信号。CuNPs 的荧光强度随 Cu²⁺浓度的增加而增加,且与外泌体的浓度成正比。基于溶液的荧光生物传感器的另外的策略是荧光基团的释放。张等人提出了一种适体受限的纳米探针,它与酶介导的信号放大互补,高灵敏地检测外泌体[15]。识别外泌体膜蛋白的单链荧光适体被氧化石墨烯(GO)淬灭,然后在外泌体的存在下释放并恢复荧光。同时,脱氧核糖核酸酶 I (DNase I)可以消化被释放的适体,使得外泌体进入新的检测周期以产生增强的荧光信号,提高检测灵敏度。

微流控芯片集高效、灵敏、特异、小巧、经济等优点于一身,目前已成为生命科学领域的研究热点。

Tian 等报道了一种通过锚定在外泌体表面核酸序列引发 DNA 自组装信号放大技术结合微流控芯片数字化检测外泌体的方法[16]。首先,使用 DNA 标记的膜亲和分子标记所有外泌体,并使用另一种 DNA 标记的抗体结合到外泌体表面上的靶蛋白。然后根据泊松分布原理将 DNA 锚定的外泌体分配到芯片微孔中,确保每个微孔中仅有一个或更少的外泌体,外泌体上的 DNA 信号通过等温核酸扩增进行放大。最后,通过计算阳性微孔数量,计算出外泌体浓度。Zheng 的团队将液滴微流控技术与 exosome 酶联免疫吸附测定(Exosome enzyme-linked immunosorbent assay, ExoELISA)结合,开发了一种 exosome 数字化检测的新方法[17],该体系在磁珠微载体上构建了基于 exosome 的双抗体夹心结构复合体,复合体上的 β -半乳糖苷酶(β -Galactosidase, β -Gal)可以水解微液滴中的荧光底物产生荧光,实现了单个 exosome 膜蛋白的数字化检测,并且成功用于乳腺癌的诊断。

4. 表面等离子体共振传感(SPR)

表面等离子体共振(Surface plasmon resonance, SPR)是一种高灵敏度、免标记的实时分析的光学检测方法,可通过监测其折射率的变化来检测金层表面上的分子相互作用。SPR 对金层表面结合事件的探测距离小于 200 nm,与外泌体大小相匹配。因此,基于 SPR 的生物传感器对外泌体的研究非常有吸引力。

目前已有研究者通过 Biacore 3000 SPR 仪检测从乳腺癌细胞培养基和健康对照组血浆样品中分离出的外泌体的六种表面蛋白(CD63, CD9, CD24, CD44, EpCAM 和 HER2) [18]。为了进一步提高 SPR 检测灵敏度,近年来研究者将纳米技术与 SPR 技术相结合构建了 SPR 纳米传感器或纳米等离子体生物传感器。例如,Im 等人开发了一种强度调制的纳米等离子体生物传感策略(nPLEX),用于高通量定量分析外泌体[19]。首先利用聚乙二醇和相应的抗体对传感芯片的金表面进行预先功能化。当传感芯片与外泌体结合后,利用纳米探针进行标记。最后通过 nPLEX 测量透射光谱位移,检测整合的抗体和特异性外泌体结合。此外,在 Im 的研究中还使用光谱仪和成像仪测量 SPR 信号,并显示出极好的一致性(相关系数 $R^2 > 98\%$)。这种传感技术与以前的方法相比具有更高的灵敏度,与小型光学器件集成时可实现便携式操作,并允许提取所捕获的外泌体进行下一步研究。

5. 表面增强拉曼散射(SERS)传感

表面增强拉曼散射(Surface-enhanced Raman scattering, SERS)生物传感由于其具有显著增强分析信号(单分子水平的灵敏度)的潜力而被用于 POCT 领域。与比色、荧光或 SPR 相比,这种类型的生物传感器可以在复杂的生物环境中识别独特的光谱信号。

SERS 生物传感器已应用于实验室和临床样品的外泌体浓度检测。例如,Zong 等提出了一种基于表面增强拉曼散射(SERS)的检测方法,利用表面增强拉曼散射(SERS)纳米探针和磁性纳米棒检测肿瘤来源的外泌体[20]。当存在靶外泌体,磁性纳米棒和 SERS 纳米探针可以通过形成夹心型免疫复合物。该免疫复合物可以通过磁场的存在而沉淀,因此可以在沉淀物中检测到 SERS 信号。用于生物传感器中的 SERS 纳米探针对生物传感器的性能至关重要。有研究者提出可以通过控制等离子体纳米颗粒的表面化学、尺寸和结构以及拉曼报告的表面密度,提高检测灵敏度和特异性。Kwizera 等将涂有 QSY21 拉曼报告基因的金纳米棒用作标记标签加载到涂有金纳米颗粒的玻璃基板上,用便携式拉曼光谱仪(TSI ProRaman 光谱仪)检测外泌体[21]。该方法的检测极限为 2×10^6 外泌体/mL,并在 2 小时内单个设备上分析 80 多个纯化的样品。为了提高肿瘤诊断的特异性,同时检测多种外泌体标记物是非常有必要的。Wang 等人展示了使用多重外泌体表型分析仪芯片(EPAC)检测血浆外泌体来监测患者治疗反应的可行性[22]。EPAC 结合了纳米混合增强微芯片和多重表面增强拉曼散射(SERS)纳米标签系统,无需富集外泌体即可直接进行外泌体表型鉴定。最后通过分析多重 SERS 纳米标签的特征峰强度即可同时对外泌体多种靶标蛋白进行检测。鉴于 EPAC 的强度功能,该方法在指导个性化癌症医学方面具有巨大潜力。

6. 展望

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，基于光学生物传感器检测外泌体具有以下优点，实时性：被广泛应用于 POCT 领域，可以即时检测；敏感性：可以测到每微升 2.2×10^3 个外泌体，比传统 ELISA 灵敏度高 100 倍；高效性：可快速和简单的完成大量样本的检测；特异性：可在单个设备上分析多个纯化样品，提高了肿瘤诊断的特异性。因此，基于光学的生物传感器有望成为传统技术的替代检测方案。我们相信在不久的将来，灵敏、准确、方便、高效和集成的外泌体检测生物传感器将在全球健康领域中发挥越来越重要的作用。

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*, **164**, 1226-1232. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.01.043>
- [2] Mass, S.L., Breakefield, X.O. and Weaver, A.M. (2017) Extracellular Vesicles: Unique Intercellular Delivery Vehicles. *Trends in Cell Biology*, **27**, 172-188. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.11.003>
- [3] 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.
- [4] Gordon, J. and Michel, G. (2008) Analytical Sensitivity Limits for Lateral Flow Immunoassays. *Clinical Chemistry*, **54**, 1250-1251. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2007.102491>
- [5] Oliveira-Rodríguez, M., López-Cobo, S., Reyburn, H.T., et al. (2016) Development of a Rapid Lateral Flow Immunoassay Test for Detection of Exosomes Previously Enriched from Cell Culture Medium and Body Fluids. *Journal of Extracellular Vesicles*, **5**, 31803. <https://doi.org/10.3402/jev.v5.31803>
- [6] Oliveira-Rodríguez, M., Serrano-Pertierra, E., García, A.C., et al. (2017) Point-of-Care Detection of Extracellular Vesicles: Sensitivity Optimization and Multiple-Target Detection. *Biosensors and Bioelectronics*, **87**, 38-45. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.08.001>
- [7] López-Cobo, S., Campos-Silva, C., Moyano, A., et al. (2018) Immunoassays for Scarce Tumor-Antigens in Exosomes: Detection of the Human NKG2D-Ligand, MICA, in Tetraspanin-Containing Nanovesicles from Melanoma. *Journal of Nanobiotechnology*, **16**, Article No. 47. <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0372-z>
- [8] Jiang, Y., Shi, M.L., Liu, Y., et al. (2017) Aptamer/AuNP Biosensor for Colorimetric Profiling of Exosomal Proteins. *Angewandte Chemie International Edition*, **56**, 11916-11920. <https://doi.org/10.1002/anie.201703807>
- [9] Liu, W.L., Li, J.P., Wu, Y.X., et al. (2018) Target-Induced Proximity Ligation Triggers Recombinase Polymerase Amplification and Transcription-Mediated Amplification to Detect Tumor Derived Exosomes in Nasopharyngeal Carcinoma with High Sensitivity. *Biosensors and Bioelectronics*, **102**, 204-210. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.11.033>
- [10] He, F., Liu, H., Guo, X.G., et al. (2017) Direct Exosome Quantification via Bivalent-Cholesterol-Labeled DNA Anchor for Signal Amplification. *Analytical Chemistry*, **89**, 12968-12975. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b03919>
- [11] Xia, Y.K., Liu, M.M., Wang, L.L., et al. (2017) A Visible and Colorimetric Aptasensor Based on DNA-Capped Single-Walled Carbon Nanotubes for Detection of Exosomes. *Biosensors and Bioelectronics*, **92**, 8-15. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.01.063>
- [12] Wang, Y.M., Liu, J.W., Adkins, G.B., et al. (2017) Enhancement of the Intrinsic Peroxidase-Like Activity of Graphitic Carbon Nitride Nanosheets by ssDNAs and Its Application for Detection of Exosomes. *Analytical Chemistry*, **89**, 12327-12333. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b03335>
- [13] Chen, X.S., Lan, J.M., Liu, Y.X., et al. (2018) A Paper-Supported Aptasensor Based on Upconversion Luminescence Resonance Energy Transfer for the Accessible Determination of Exosomes. *Biosensors and Bioelectronics*, **102**, 582-588. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.12.012>
- [14] He, F., Wang, J., Yin, B.C. and Ye, B.C. (2018) Quantification of Exosome Based on a Copper-Mediated Signal Amplification Strategy. *Analytical Chemistry*, **90**, 8072-8079. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b01187>
- [15] Jin, D., Yang, F., Zhang, Y.L., et al. (2018) ExoAPP: Exosome-Oriented, Aptamer Nanoprobe-Enabled Surface Proteins Profiling and Detection. *Analytical Chemistry*, **90**, 14402-14411. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b03959>
- [16] Tian, Q.C., He, C.J., Liu, G.W., et al. (2018) Nanoparticle Counting by Microscopic Digital Detection: Selective

- Quantitative Analysis of Exosomes via Surface-Anchored Nucleic Acid Amplification. *Analytical Chemistry*, **90**, 6556-6562. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b00189>
- [17] Liu, C.C., Xu, X.N., Li, B., *et al.* (2018) Single-Exosome-Counting Immunoassays for Cancer Diagnostics. *Nano Letters*, **18**, 4226-4232. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.8b01184>
- [18] Rupert, D.L.M., Shelke, G.V., Emilsson, G., *et al.* (2016) Dual-Wavelength Surface Plasmon Resonance for Determining the Size and Concentration of Sub-Populations of Extracellular Vesicles. *Analytical Chemistry*, **88**, 9980-9988. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b01860>
- [19] Im H., Shao, H.L., Park, Y., *et al.* (2014) Label-Free Detection and Molecular Profiling of Exosomes with a Nano-Plasmonic Sensor. *Nature Biotechnology*, **32**, 490-495. <https://doi.org/10.1038/nbt.2886>
- [20] Zong, S.F., Wang, L., Chen, C., Lu, J., *et al.* (2016) Facile Detection of Tumor-Derived Exosomes Using Magnetic Nanobeads and SERS Nanoprobes. *Analytical Methods*, **8**, 5001. <https://doi.org/10.1039/C6AY00406G>
- [21] Kwizera, E.A., O'Connor, R., Vinduska, V., *et al.* (2018) Molecular Detection and Analysis of Exosomes Using Surface-Enhanced Raman Scattering Gold Nanorods and a Miniaturized Device. *Theranostics*, **8**, 2722-2738. <https://doi.org/10.7150/thno.21358>
- [22] Wang, J., Wuethrich, A., Sina, A.A.L., *et al.* (2020) Tracking Extracellular Vesicle Phenotypic Changes Enables Treatment Monitoring in Melanoma. *Science Advances*, **6**, eaax3223. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aax3223>