

# TiO<sub>2</sub>微球的制备及应用用于外泌体的吸附

陈 竞<sup>1\*</sup>, 林建伟<sup>1\*</sup>, 何玉彬<sup>1</sup>, 马福新<sup>1</sup>, 宋泽良<sup>2</sup>, 韩志钟<sup>1#</sup>

<sup>1</sup>福建医科大学药学院, 福建 福州

<sup>2</sup>福建医科大学临床医学部, 福建 福州

Email: #zzhan@fjmu.edu.cn

收稿日期: 2021年6月16日; 录用日期: 2021年7月12日; 发布日期: 2021年7月19日

## 摘 要

外泌体具有多种生物学功能, 对疾病的治疗和诊断具有重要的意义, 而获得高纯度的外泌体对后续的研究至关重要。本实验采用溶剂热法, 以钛酸四异丙酯作为前驱物, EDTA作为包裹剂, 优化实验条件, 制备出粒径为1~3 μm、分散性良好、表面光滑的TiO<sub>2</sub>微球。利用TiO<sub>2</sub>微球表面Lewis酸位点实现对外泌体的特性吸附及纯化, 并采用扫描电镜(SEM)、透射电镜(TEM)进行表征观察。结果表明, TiO<sub>2</sub>微球能够高效地吸附外泌体, 使用10%氨水可以快速将外泌体从TiO<sub>2</sub>微球表面洗脱下来且不破坏外泌体的囊泡结构。

## 关键词

TiO<sub>2</sub>微球, 外泌体, 吸附

# Preparation and Application of TiO<sub>2</sub> Microspheres for Separation of Exosome

Jing Chen<sup>1\*</sup>, Jianwei Lin<sup>1\*</sup>, Yubin He<sup>1</sup>, Fuxin Ma<sup>1</sup>, Zeliang Song<sup>2</sup>, Zhizhong Han<sup>1#</sup>

<sup>1</sup>School of Pharmacy, Fujian Medical University, Fuzhou, Fuzhou Fujian

<sup>2</sup>School of Basic Medical Sciences, Fujian Medical University, Fuzhou Fujian

Email: #zzhan@fjmu.edu.cn

Received: Jun. 16<sup>th</sup>, 2021; accepted: Jul. 12<sup>th</sup>, 2021; published: Jul. 19<sup>th</sup>, 2021

## Abstract

Exosome has a variety of biological functions and is of great significance for the treatment and diagnosis of diseases. And it is very important to obtain high purity exosome for subsequent research. In this experiment, TiO<sub>2</sub> microspheres were prepared by hot solvent method with tetrai-

\*第一作者。

#通讯作者。

sopropyltitanate as precursor and EDTA as precipitant. Optimizing experimental conditions,  $\text{TiO}_2$  microspheres with particle size of 1~3  $\mu\text{m}$ , good dispersion and smooth surface were successfully prepared. Exosomes were adsorbed and purified by Lewis acid sites on the surface of  $\text{TiO}_2$  microspheres, and characterized by scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM). The results show that  $\text{TiO}_2$  microspheres could adsorb efficiently exosome. 10% ammonia could quickly elute exosome from the surface of  $\text{TiO}_2$  microspheres without destroying the vesicle structure of exocrine.

## Keywords

Titanium Dioxide Microspheres, Exosome, Adsorption

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)是一类内含核酸和蛋白质、直径约 40~100 nm 的微小囊泡[1], 多种细胞在正常及病理状态下均可特异性分泌外泌体。外泌体的内含物复杂[2] [3] [4], 包含一些核酸, 如 miRNA、非编码的 RNA 及 mRNA 等, 它们都可作为肿瘤诊断和检测的疾病标志物[5]。此外, 外泌体还可用于制备药物载体、联合抗癌药治疗癌症等。因此分离纯化外泌体以获得高纯度的外泌体对后续研究至关重要。目前分离外泌体方法主要有超速离心法、密度梯度离心法、超滤离心法、磁珠免疫法、沉淀法、试剂盒提取等方法, 但是这些分离方法存在一些缺点, 如超速离心法比较耗时, 密度梯度离心法步骤繁琐, 沉淀法会破坏外泌体活性, 试剂盒提取法特异性低[6] [7] [8] [9], 这些缺点限制外泌体的应用。因此需要研发一种耗时短、操作简单、特异性强、对外泌体破坏小的外泌体分离策略。

二氧化钛( $\text{TiO}_2$ )是一种应用广泛、无毒、稳定且抗腐蚀性能良好的材料, 具有独特的特性效应和优异性能。二氧化钛主要有金红石、锐钛矿和板钛矿三种晶型, 其中板钛矿型在自然界稀少, 结构不稳定, 没有工业价值。表面结构和微观形貌对二氧化钛的性能有重大影响, 目前科研人员制备的特殊形貌二氧化钛主要包括球状[10]、棒状[11]、纤维状[12]、片状[13]、花状[14]等。其中, 二氧化钛微球具有不易凝聚、比表面积大、扩展性能优良等优点, 备受研究者的青睐。

$\text{TiO}_2$  表面 Lewis 酸位点与磷酸根具有很强的结合力, 可以特异性结合具有完整生物膜的物质, 因此被广泛应用于富集具有生物膜结构的物质[15] [16]。利用  $\text{TiO}_2$  微球对外泌体进行分离, 效率明显优于传统的分离方法, 不仅样品处理时间短, 而且分离特异性强[17]。本论文成功合成分散性好、颗粒均匀、表面光滑的  $\text{TiO}_2$  微球用于外泌体的分离。采用溶剂热法在含聚四氟乙烯内胆的反应釜中合成  $\text{TiO}_2$  微球, 利用 EDTA 作为包覆剂减少  $\text{TiO}_2$  微球表面的粗糙度, 通过使用异丙醇作为反应溶剂减缓钛酸四异丙酯的水解速度, 以制备出颗粒均匀的  $\text{TiO}_2$  微球。利用制备的  $\text{TiO}_2$  微球对含杂质蛋白的外泌体进行分离。结果表明,  $\text{TiO}_2$  微球可以特异性的吸附外泌体, 将外泌体从杂质蛋白中分离出来。利用  $\text{TiO}_2$  微球分离外泌体的方法具有操作简单、特异性强、对外泌体破坏小等优点, 可以弥补传统分离方法的不足, 促进外泌体在医学检测领域中的应用。

## 2. 实验部分

### 2.1. 主要试剂

达尔伯克必需基本培养基(不含酚红, 英国 Gibco 公司), 实验配液用蒸馏水(双蒸水, 上海亚荣生化

仪器厂), 醋酸双氧铀(AR, 湖北楚盛威化工有限公司), 乙二胺四乙酸(生工生物工程上海股份有限公司), 戊二醛(北京索莱宝科技有限公司), PBS 缓冲液(通用电气医疗集团生命科学部), 异丙醇(AR, 国药集团化学试剂有限公司), 乙醇(AR, 西陇科学股份有限公司), 钛酸四异丙酯(上海麦克林生化科技有限公司)

## 2.2. 仪器表征

采用 X-射线粉末衍射仪(MiniFlex600, 日本 Riguka 公司, 以 Cu 靶,  $K_{\alpha}$  射线进行扫描,  $\lambda = 0.15406$  nm, 扫描范围  $5^{\circ}\sim 80^{\circ}$ )研究煅烧前后  $\text{TiO}_2$  微球的构型及结晶度; 采用环境扫描电子显微镜(QUANTA 450, 美国 FEI 公司)表征  $\text{TiO}_2$  微球的表面形貌、尺寸; 采用红外光谱仪(Perkin Elmer Spectrum2000, PerkinElmer)表征  $\text{TiO}_2$  微球表面分子结构; 利用透射电子显微镜(Tecnai G2, 美国 FEI 公司)观察微球形貌和结构以及外泌体; 采用纳米粒度及 Zeta 电位分析仪(LitesizerTM 500, 安东帕上海商贸有限公司)表征微球和外泌体的粒径分布。

## 2.3. 实验方法

### 2.3.1. $\text{TiO}_2$ 微球的制备

根据采用不同浓度的钛酸四异丙酯作为前驱物合成  $\text{TiO}_2$  微球, 其中前驱物浓度为  $0.0720$  mol/L 时制备过程如下: 称取  $0.0220$  g EDTA 置于  $50$  mL 烧杯中, 放入磁力搅拌子, 加入  $32$  mL 异丙醇, 用封口膜裹住, 然后利用磁力搅拌器搅拌  $12$  h; 用移液枪吸取  $0.660$  mL 钛酸四异丙酯逐滴加入到烧杯中并继续用磁力搅拌器搅拌  $10$  min, 将反应物移入含聚四氟乙烯内衬的不锈钢反应釜内, 在  $200^{\circ}\text{C}$  条件下反应  $24$  h; 将产物用无水乙醇进行洗涤, 在  $60^{\circ}\text{C}$  条件下干燥  $8$  h, 然后在  $450^{\circ}\text{C}$  下煅烧  $2$  h。

### 2.3.2. 外泌体的离心分离

从人乳腺癌细胞(MDA-MB231)获得外泌体, 将处于对数生长期的乳腺癌细胞经过一系列预处理之后, 利用差速离心法进行处理, 即利用  $300\times g$  离心  $10$  min 以去除死细胞;  $2000\times g$  离心  $20$  min 以去除细胞碎片;  $11,000\times g$  离心  $45$  min 以去除大分子蛋白;  $100,000\times g$  离心  $70$  min 得到沉淀; 然后将所得沉淀重悬于 PBS 中, 以消除污染蛋白质。所有离心过程均在  $4^{\circ}\text{C}$  下进行, 获得的外泌体保存于  $-20^{\circ}\text{C}$  备用。

### 2.3.3. 利用 $\text{TiO}_2$ 微球对外泌体的吸脱附

取约  $2$   $\mu\text{g}$  外泌体, 利用不含酚红的 DMEM 培养液(英国, GIBCO)稀释到最终体积为  $50$   $\mu\text{L}$ 。将样品与  $2$  mg  $\text{TiO}_2$  微球混合, 在  $4^{\circ}\text{C}$  的温度下恒温孵育  $5$  min, 使样品有足够的附着力。简单离心后, 弃去上清液, 用 PBS 彻底冲洗沉淀三次, 以除去微球表面吸附的非特异性分子。利用透射电镜(TEM)观察  $\text{TiO}_2$  吸附外泌体的情况。

用碱性洗脱液对吸附在  $\text{TiO}_2$  微球表面的外泌体进行洗脱, 首先用  $10\%$   $\text{NH}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$  在  $4^{\circ}\text{C}$  温度下与表面吸附外泌体的  $\text{TiO}_2$  微球孵育  $10$  min, 用摇瓶进行洗脱。在  $10,000\times g$  离心  $3$  min 后, 用 PBS 溶液将上清液用微孔滤膜( $30$  kDa)进行过滤, 再用 PBS 溶液洗涤  $3$  次。

## 3. 结果与讨论

### 3.1. $\text{TiO}_2$ 微球合成原理

为避免因使用无机钛醇盐引入的杂质阴离子, 实验中使用钛酸四异丙酯作为前驱物, 采用异丙醇作为溶剂减缓前驱物的水解速度, 添加 EDTA 使微球表面更加光滑。溶剂热法反应完成之后使用乙醇进行清洗以除去溶液中残留的钛酸四异丙酯。充分干燥之后对  $\text{TiO}_2$  微球进行煅烧, 以提高  $\text{TiO}_2$  的结晶度及除去残留的有机物。

溶剂热法反应中  $\text{TiO}_2$  微球的形成过程如下(图 1):

1)  $\text{TiO}_2$  晶核的形成: 钛酸四异丙酯首先在异丙醇溶液中析出一批极细微的颗粒作为晶核中心, 晶核大小与钛酸四异丙酯浓度有关。随着反应温度和气压的不断上升, 钛酸四异丙酯水解程度逐渐增大, 晶核中心逐步长大, 形成  $\text{TiO}_2$  纳米颗粒并从溶液中析出。

2)  $\text{TiO}_2$  微球的形成: 随着越来越多的  $\text{TiO}_2$  纳米颗粒从溶液中析出, 原溶液水解平衡被打破, 反应速度加快, 溶液中  $\text{TiO}_2$  组分不断转为固相, 在 EDTA 的作用下有序排列生长, 最终变为  $\text{TiO}_2$  微球并沉淀下来。

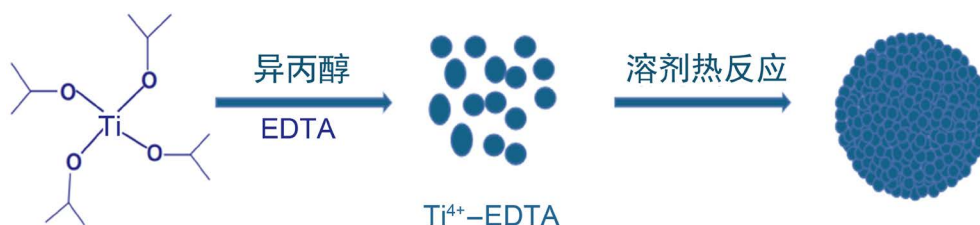


Figure 1. Formation process of  $\text{TiO}_2$  microspheres

图 1.  $\text{TiO}_2$  微球的形成过程

### 3.2. $\text{TiO}_2$ 微球的合成及条件优化

参考 Yu [18] 等人的做法制备  $\text{TiO}_2$  微球, 采用溶剂热法在  $200^\circ\text{C}$  条件下于含聚四氟乙烯内衬的不锈钢反应釜内反应制备  $\text{TiO}_2$  微球。利用环境扫描电子显微镜进行表征, 结果如图 2 所示。从图中可以看出制备的  $\text{TiO}_2$  微球存在粒径不均匀、形状不规则、表面粗糙、黏连团聚严重、球形颗粒占比低等问题。

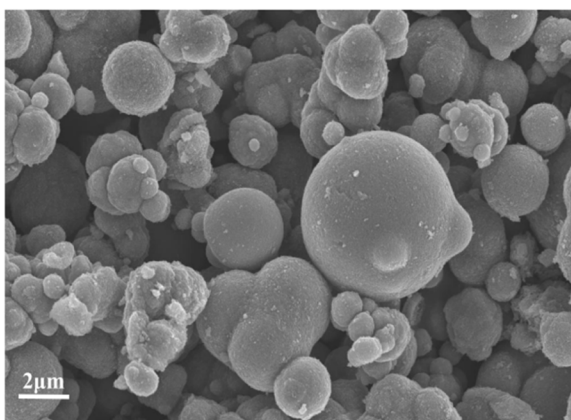


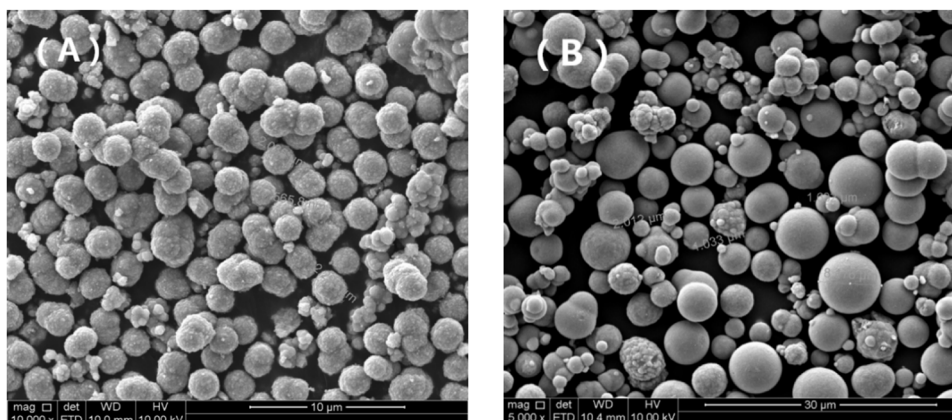
Figure 2. SEM image of  $\text{TiO}_2$  microspheres

图 2.  $\text{TiO}_2$  微球的 SEM 图

#### 3.2.1. 探究包裹剂 EDTA 对 $\text{TiO}_2$ 微球表面形貌的影响

在溶剂热反应过程中, 加入 EDTA 对  $\text{TiO}_2$  微球表面结构进行修饰。在  $\text{TiO}_2$  纳米颗粒形成之后, EDTA 被吸附在颗粒表面, 在 EDTA 的作用下纳米颗粒有序的在晶核表面堆积长大, 形成  $\text{TiO}_2$  微球。此外, 若控制 EDTA 浓度使其能完整包覆  $\text{TiO}_2$  微球, 则能在微球之间产生空间位阻作用, 避免颗粒聚集, 从而提高  $\text{TiO}_2$  微球的分散性和均匀性[19]。将未添加 EDTA 制备的  $\text{TiO}_2$  微球(图 3(A))与加入 EDTA 制备  $\text{TiO}_2$  微球(图 3(B))进行对比, 结果如图 3 所示。通过对比分析可知加入 EDTA 后, 制得的  $\text{TiO}_2$  微球表面更加光滑, 表面毛刺明显减少。

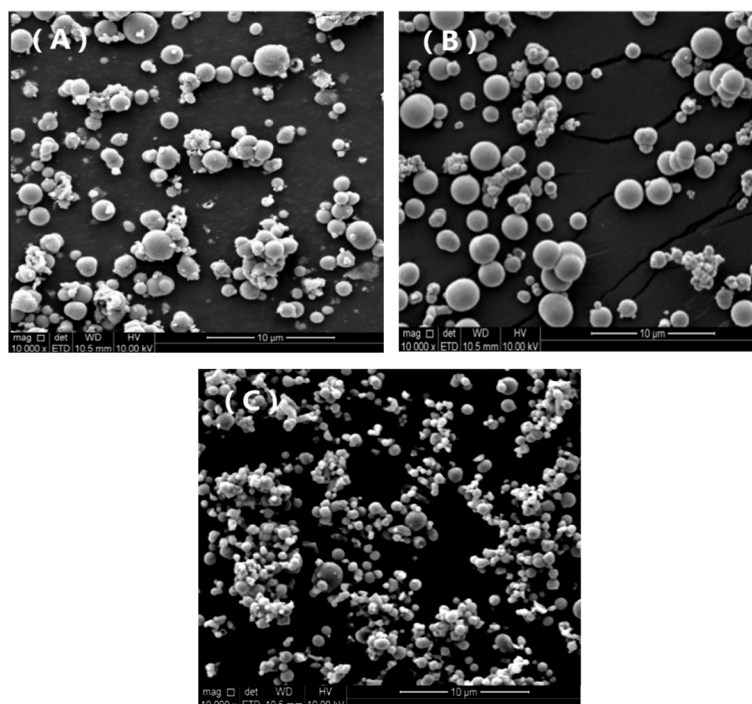




**Figure 3.** SEM images of TiO<sub>2</sub> microspheres, (A) Prepared without and (B) with EDTA  
**图 3.** TiO<sub>2</sub> 微球的 SEM 图, (A) 未添加 EDTA 和 (B) 添加 EDTA

### 3.2.2. 差速离心法处理 TiO<sub>2</sub> 微球

首先尝试利用离心方法分离不同粒径的 TiO<sub>2</sub> 微球, 溶剂热法反应之后, 将 TiO<sub>2</sub> 微球溶解于 EP 管中, 利用超声波震荡使其充分分散, 然后在 500 r/min 下离心 5 min, 沉淀进行充分干燥。剩余上清液用 1000 r/min 进行离心 5 min, 将不同转速得到的产品进行干燥, 并将离心处理后的 TiO<sub>2</sub> 微球进行 SEM 表征, 结果如图 4 所示。与未进行离心处理的微球(图 4(A))进行对比, 500 r/min 离心处理后的 TiO<sub>2</sub> 微球(图 4(B))平均粒径增大, 但仍存在许多小颗粒, 并且 TiO<sub>2</sub> 团聚物也会被沉淀下来。1000 r/min 离心处理的 TiO<sub>2</sub> 微球(图 4(C))粒径几乎都小于 1 μm。可以得出结论, 采用离心法不能完全去除小颗粒 TiO<sub>2</sub>, 且会把团聚物一起分离出来, 但是离心法可以在一定程度上将大粒径的 TiO<sub>2</sub> 微球筛选出来。

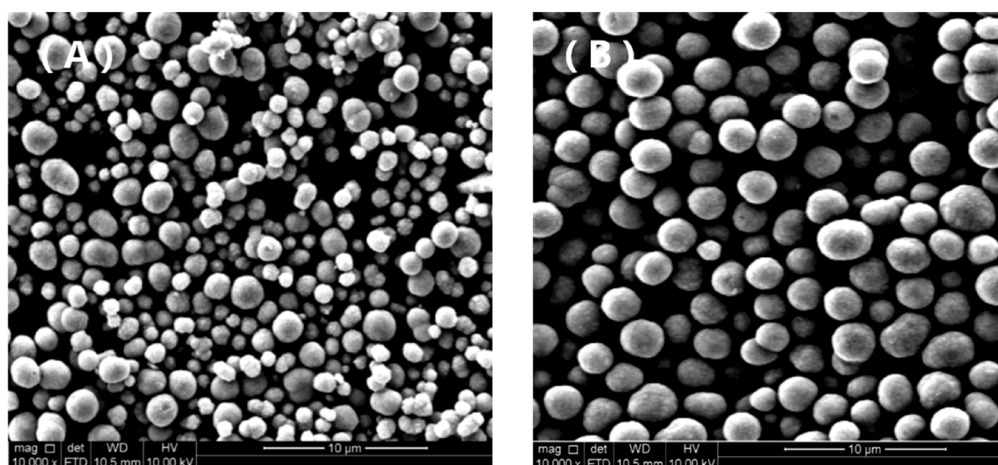


**Figure 4.** SEM images of TiO<sub>2</sub> microspheres. (A) Uncentrifuged; (B) 500 r/min centrifugal treatment; (C) 1000 r/min centrifugal treatment after 500 r/min centrifugal treatment

**图 4.** TiO<sub>2</sub> 微球 SEM 图。(A) 未离心; (B) 500 r/min 离心处理; (C) 500 r/min 离心之后的上清液 1000 r/min 离心

### 3.2.3. 微孔滤膜分离 TiO<sub>2</sub> 微球

离心处理不能完全除去纳米尺寸的颗粒,因此尝试采用 0.8 μm 的微孔滤膜对 TiO<sub>2</sub> 进行过滤。将 TiO<sub>2</sub> 微球溶解在 EP 管中,并通过超声波震荡使其充分分散,然后利用微孔滤膜对溶液进行抽滤,用乙醇清洗三次。对过滤前后的 TiO<sub>2</sub> 微球进行 SEM 表征,结果如图 5 所示。可以看到未过滤时 TiO<sub>2</sub> 微球(图 5(A))存在许多纳米级别的颗粒,而用微孔滤膜过滤之后(图 5(B))几乎无小于 800 nm 的颗粒。因此,利用微孔滤膜对 TiO<sub>2</sub> 微球进行处理可以有效除去纳米级别的 TiO<sub>2</sub> 颗粒。

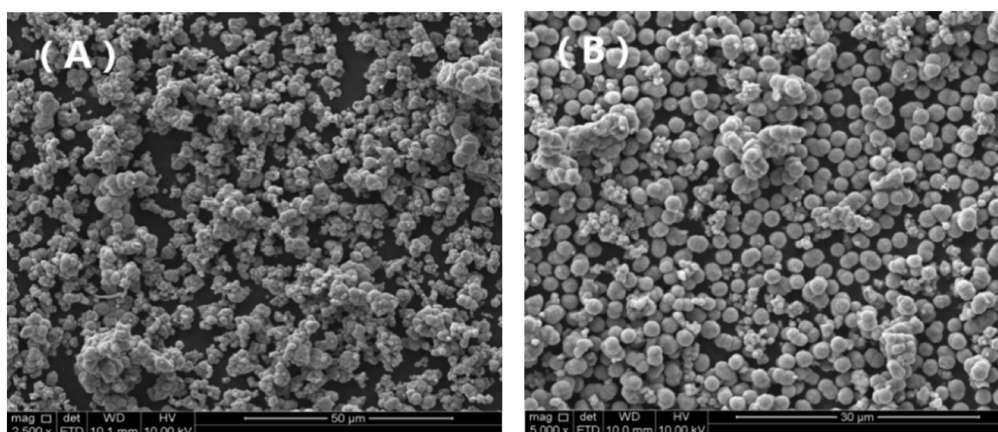


**Figure 5.** SEM images of TiO<sub>2</sub> microspheres, filtrated. (A) Without microporous membrane and (B) By 0.8 μm microporous membrane

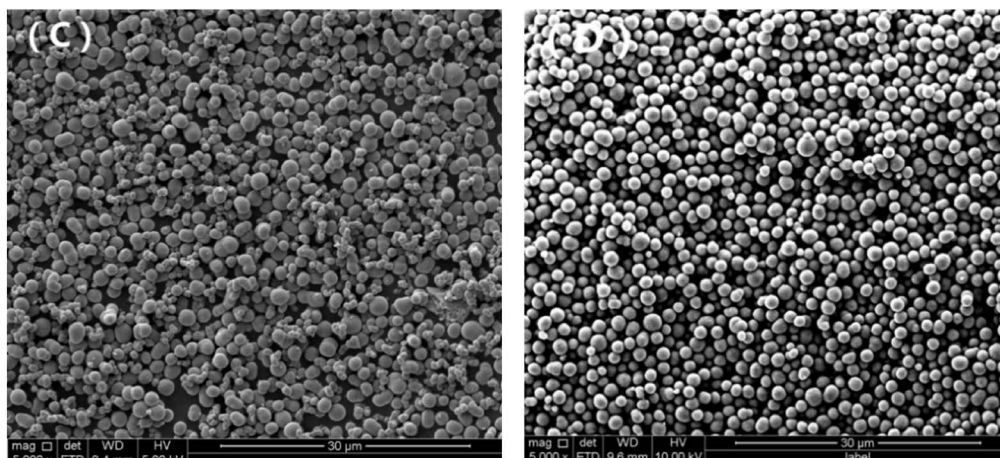
**图 5.** TiO<sub>2</sub> 微球 SEM 图。(A) 未用微孔滤膜过滤和(B) 0.8 μm 微孔滤膜过滤

### 3.2.4. 钛酸四异丙酯的用量对 TiO<sub>2</sub> 微球形貌的影响

为了研究溶剂热法反应中前驱物的浓度对 TiO<sub>2</sub> 微球形貌的影响,以初始用量 1.1 mL (3.8 mM)为对照组,分别增设 60% (2.3 mM)、80% (3.0 mM)、120% (4.6 mM)作为实验组。对制备的 TiO<sub>2</sub> 进行扫描表征,结果如图 6 所示。钛酸四异丙酯用量为 120% (4.6 mM)时(图 6(A)),TiO<sub>2</sub> 微球出现非常严重的硬团聚,颗粒形状非常不规则;用量为 100% (3.8 mM)时(图 6(B)),存在由多个 TiO<sub>2</sub> 微球构成硬团聚;用量为 80% (3.0 mM)时(图 6(C)),软团聚基本发生在两个或三个 TiO<sub>2</sub> 微球之间,可以看见许多未团聚 TiO<sub>2</sub> 微球,但有较多的微球呈不规则形状;用量为 60% (2.3 mM)时(图 6(D)),TiO<sub>2</sub> 微球几乎不发生团聚,且分散均匀,形状都呈圆形或椭圆形。







**Figure 6.** SEM images of  $\text{TiO}_2$  microspheres prepared by different dosage of tetraisopropyltitanate. (A) 4.6 mM; (B) 3.8 mM; (C) 3.0 mM; (D) 2.3 mM

**图 6.** 不同用量钛酸四异丙酯制备的  $\text{TiO}_2$  微球的 SEM 图。(A) 4.6 mM; (B) 3.8 mM; (C) 3.0 mM; (D) 2.3 mM

因此可以得出结论, 前驱物钛酸四异丙酯的用量在一定范围内时(2.3 mM~4.6 mM), 随着前驱物浓度增加,  $\text{TiO}_2$  微球硬团聚程度增加, 颗粒愈不规则, 当用量达 4.6 mM 时, 几乎无单颗粒的  $\text{TiO}_2$  微球,  $\text{TiO}_2$  微球都团聚在一起。因此本实验制备  $\text{TiO}_2$  微球采用钛酸四异丙酯的用量为 2.3 mM。

优化合成条件制备微球, 使用 2.3 mM 的钛酸四异丙酯作为前驱物, 0.0220 g EDTA 作为包裹剂, 使用微孔滤膜对  $\text{TiO}_2$  微球进行过滤, 用玛瑙磨对煅烧后的  $\text{TiO}_2$  微球进行研磨。如图 7(D)所示, 优化条件之后合成的  $\text{TiO}_2$  微球颗粒规则、分散性好、表面无毛刺、无团聚现象, 粒径较均匀, 约 0.8~3  $\mu\text{m}$  左右。

### 3.3. $\text{TiO}_2$ 微球的表征

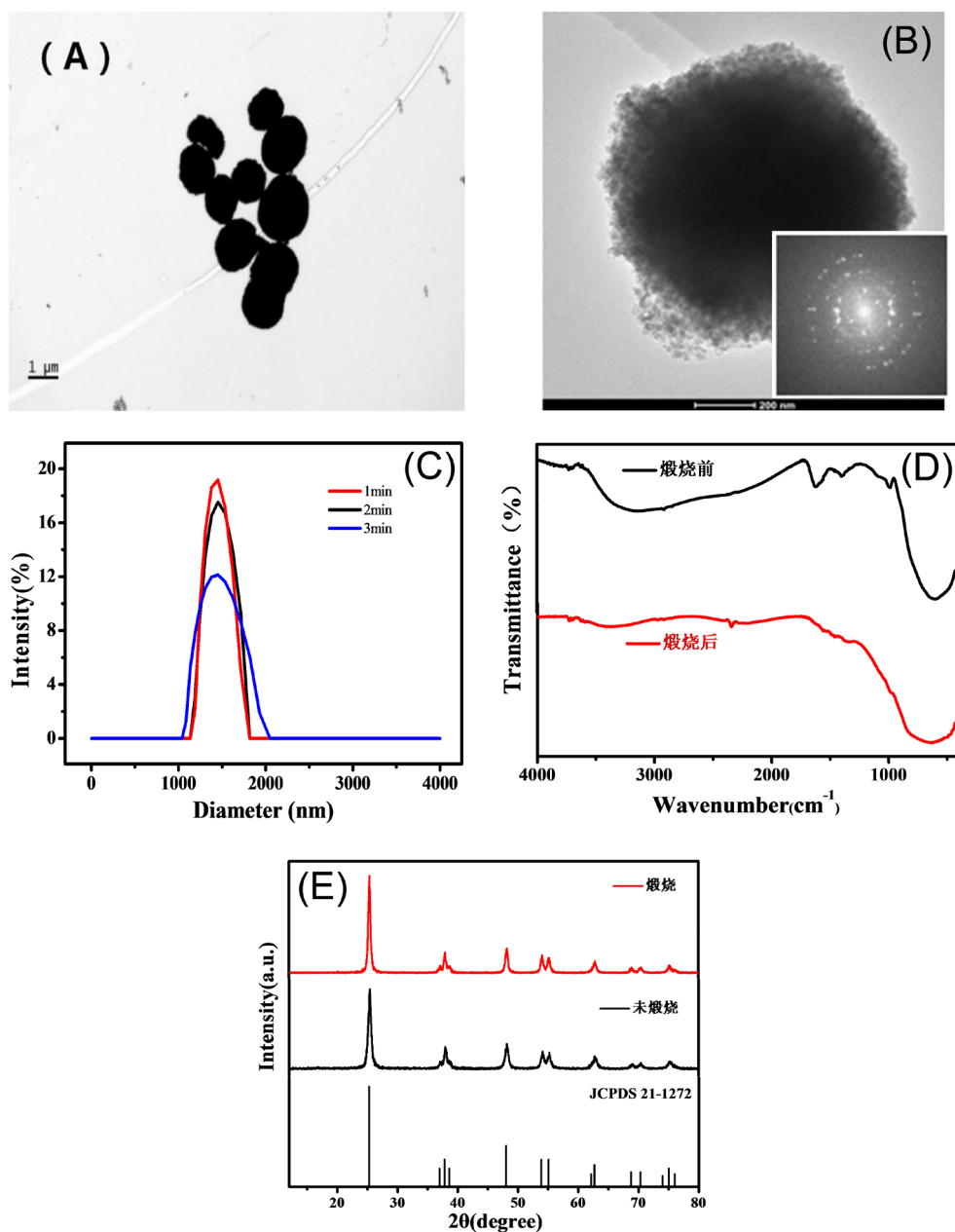
使用透射电子显微镜(TEM)对  $\text{TiO}_2$  微球进行表征, 观察  $\text{TiO}_2$  微球的亚显微结构, 结果如图 7 所示。从图 7(A)中可以看到制备的  $\text{TiO}_2$  微球粒径约为 0.8~1.6  $\mu\text{m}$  左右, 制备的二氧化钛球形度较佳。从图 7(B)中可以看出二氧化钛微球是由许多二氧化钛纳米颗粒堆积而成的。图 7(B)中 FFT 插图显示为衍射环, 也表明微球是有纳米颗粒堆积而成。

采用纳米粒度及 Zeta 电位分析仪对  $\text{TiO}_2$  微球的粒径分布进行表征, 图 7(C)为优化合成条件之后制备的  $\text{TiO}_2$  微球的粒径分布图。三条曲线分别表示同一溶液样品间隔一分钟测一次所得到的结果。从图中可以看出  $\text{TiO}_2$  微球粒径分布为 1.1~2.3  $\mu\text{m}$  左右, 多数  $\text{TiO}_2$  微球粒径为 1.5  $\mu\text{m}$  左右, 随着时间推移, 粒径分布峰位置不变, 但峰高变低, 峰型变宽, 这是由于微米颗粒在溶液中聚沉引起的。

在溶剂热法反应完成之后对  $\text{TiO}_2$  微球进行清洗、干燥之后取部分留样待测, 剩余  $\text{TiO}_2$  微球进行煅烧, 对煅烧前后的  $\text{TiO}_2$  微球进行表征, 结果如图 7(D)所示。从图中可知, 衍射角  $2\theta$  在 25.36°、37.94°、48.14°、54.02°、55.22°、62.72°分别对应  $\text{TiO}_2$  的(101)、(004)、(200)、(105)、(211)和(204)衍射面。将各衍射面对应的衍射峰与锐钛矿型  $\text{TiO}_2$  的标准 PDF 卡(JCPDS 21-1272)进行对比, 煅烧前后的  $\text{TiO}_2$  微球均为锐钛矿型。对比衍射角为 25.36°的衍射峰, 可以看到煅烧后的  $\text{TiO}_2$  微球衍射峰强度增大, 即煅烧后  $\text{TiO}_2$  微球的结晶度更高。

对煅烧前后的  $\text{TiO}_2$  微球进行红外光谱表征, 检查有无有机物残留、及分析合成的二氧化钛的晶型结构, 结果如图 7(E)所示。钛酸四异丙酯富含甲基, 然而 2960  $\text{cm}^{-1}$  与 2876  $\text{cm}^{-1}$  附近未出现吸收峰, 可确定  $\text{TiO}_2$  微球中没有钛酸四异丙酯残留; 700~400  $\text{cm}^{-1}$  宽峰为峰锐钛矿型二氧化钛的特征峰; 1300~1000  $\text{cm}^{-1}$  内无吸收峰, 说明无醇的 C-O 的伸缩振动, 即无乙醇或异丙醇残留; 1600  $\text{cm}^{-1}$  附近的吸收峰为 C=O

伸缩振动峰,  $3500\sim 2000\text{ cm}^{-1}$  宽而散的峰为氢键缔合的羧基的 O-H 的吸收振动峰,  $1400\text{ cm}^{-1}$  处的峰是 O-H 面内弯曲振动峰, 综合上述条件可知煅烧前  $\text{TiO}_2$  粉体中有 EDTA 残留。煅烧后  $1400\text{ cm}^{-1}$  处的吸收峰与  $1600\text{ cm}^{-1}$  附近的吸收峰消失,  $3500\sim 2000\text{ cm}^{-1}$  的吸收峰变窄, 推测为经过煅烧 EDTA 转化为  $\text{CO}_2$  而除去, 煅烧后的样品中  $3500\sim 3000\text{ cm}^{-1}$  的吸收振动峰为  $\text{TiO}_2$  微球表面的 O-H 所产生的。 $2345\text{ cm}^{-1}$  的峰是  $\text{CO}_2$  弱吸收峰, 产生的原因有两种, 第一种原因是测量时仪器样品光路和参与光路不平衡而导致的, 另一种是高温煅烧时 EDTA 分解产生  $\text{CO}_2$  吸附在  $\text{TiO}_2$  微球表面[20]。通过红外光谱表征图谱可知, 本次制备的二氧化钛为锐钛矿构型, 经过  $450^\circ\text{C}$  煅烧可以有效去除  $\text{TiO}_2$  粉末中残留的微量 EDTA。



**Figure 7.** (A, B) TEM images; (C) Dynamic light scattering; (D) XRD patterns; (E) Infrared spectra of  $\text{TiO}_2$  microspheres. The insert of B is the FFT image

**图 7.**  $\text{TiO}_2$  微球的(A、B)TEM 图; (C) 动态光散射图; (D) XRD 图; (E) 红外光谱图。B 中的插图为傅里叶变换图

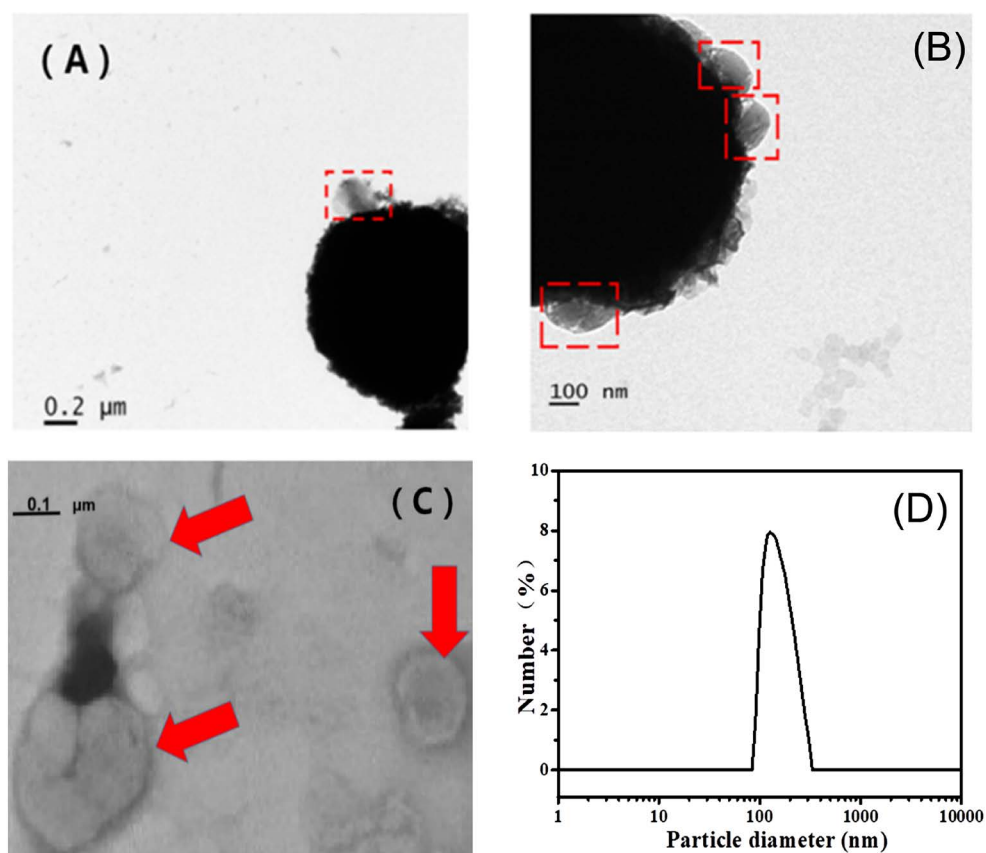


### 3.4. TiO<sub>2</sub> 微球吸附和洗脱外泌体

一些金属氧化物可以可逆地与磷酸盐基团结合，具有较高的特异性[17]。而在外泌体囊泡膜上，磷脂的亲水性磷头暴露在脂质双层的外表面。TiO<sub>2</sub> 表面 Ti<sup>3+</sup> 具有悬挂键，可以与磷酸根形成化学键合。利用这一特性，TiO<sub>2</sub> 可有效捕获外泌体，并进行富集。

碱性溶剂(pH 10~12)通常被用来破坏磷酸基团和 TiO<sub>2</sub> 之间的结合作用[21]。在碱性溶液中，TiO<sub>2</sub> 微球表面带负电，与磷酸根带相同电荷，产生电荷互斥，外泌体从 TiO<sub>2</sub> 微球表面脱落，但溶液 pH 过高时，会导致膜上的通道蛋白、转运蛋白以及信号通路蛋白等组分失去正常功能，使外泌体膜失去选择性透过功能，发生不可逆破坏。因此实验采用 10% NH<sub>3</sub>·H<sub>2</sub>O 洗脱吸附在 TiO<sub>2</sub> 微球表面的外泌体。

利用 TiO<sub>2</sub> 微球对外泌体进行分离，经过一系列前处理之后，利用透射电镜观察在 80 kV 下 TiO<sub>2</sub> 微球对外泌体吸附情况，表征结果如图 8 所示。从图 8(A)和图 8(B)中可以看出外泌体成功的被吸附在 TiO<sub>2</sub> 微球的表面，透射电镜下被吸附的外泌体呈球形或扁球状，膜状结构明显。然后使用 10% NH<sub>3</sub>·H<sub>2</sub>O 作为洗脱液洗脱外泌体，溶液进行一系列前处理后进行透射电镜表征(图 8(C))，可以观察到粒径约 80~100 nm、呈球形或扁球形、单分散的外泌体，且膜结构完整。采用纳米粒度及 Zeta 电位分析仪(Litesizer<sup>TM</sup> 500)对外泌体的粒径分布进行表征，结果图 8(D)所示，外泌体粒径分布约为 80~280 nm 左右。



**Figure 8.** TEM image of (A, B) Exosome adsorbed on the surface of TiO<sub>2</sub> and (C) Single exosome; (D) DLS of exosome  
**图 8.** (A、B)外泌体吸附在 TiO<sub>2</sub> 表面和(C)单独外泌体的 TEM 图；(D) 外泌体的动态光散射图

## 4. 总结

本文构建一种基于 TiO<sub>2</sub> 微球纯化外泌体的方法。利用溶剂热法制备 TiO<sub>2</sub> 微球，以 EDTA 作为包裹

剂, 并通过离心、过滤等方法筛选微球粒径, 最后通过煅烧除去残留的有机物, 提高微球结晶度, 制得粒径均匀、分散性好、表面光滑的  $\text{TiO}_2$  微球。通过差速离心的方法从人乳腺癌细胞(MDA-MB231 细胞)分离出含杂蛋白的外泌体, 利用二氧化钛与磷酸基团的亲和作用将  $\text{TiO}_2$  微球与外泌体共同孵育, 使外泌体与杂蛋白分离开来, 最后利用 10%  $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  将外泌体从  $\text{TiO}_2$  微球表面洗脱下来, 达到纯化外泌体的目的。该方法分离外泌体具有特异性强、操作简单、成本低、快速高效等优点, 进一步促进外泌体在医学检测领域中的应用。

## 致 谢

感谢陈敬华教授和夏垚坤博士对外泌体相关实验提供的帮助。

## 基金项目

本项目研究由国家自然科学基金项目(51602053), 福建医科大学大学生创新创业训练资助项目(C20142)资助。

## 参考文献

- [1] Hessvik, N.P. and Llorente, A. (2018) Current Knowledge on Exosome Biogenesis and Release. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **75**, 193-208. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2595-9>
- [2] Subra, C., Grand, D., Laulagnier, K., Stella, A., Lambeau, G., Paillasse, M., *et al.* (2010) Exosomes Account for Vesicle-Mediated Transcellular Transport of Activatable Phospholipases and Prostaglandins. *Journal of Lipid Research*, **51**, 2105-2120. <https://doi.org/10.1194/jlr.M003657>
- [3] Subra, C., Laulagnier, K., Perret, B. and Record, M. (2007) Exosome Lipidomics Unravels Lipid Sorting at the Level of Multivesicular Bodies. *Biochimie*, **89**, 205-212. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2006.10.014>
- [4] Batista, B.S., Eng, W.S., Pilobello, K.T., Hendricks-Muñoz, K.D. and Mahal, L.K. (2011) Identification of a Conserved Glycan Signature for Microvesicles. *Journal of Proteome Research*, **10**, 4624-4633. <https://doi.org/10.1021/pr200434y>
- [5] Sun, D., Zhuang, X., Zhang, S., Deng, Z.-B., Grizzle, W., Miller, D., *et al.* (2013) Exosomes Are Endogenous Nanoparticles That Can Deliver Biological Information between Cells. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **65**, 342-347. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.07.002>
- [6] Lobb, R.J., Becker, M., Wen, S., Wong, C.S.F., Wiegmanns, A.P., Leimgruber, A., *et al.* (2015) Optimized Exosome Isolation Protocol for Cell Culture Supernatant and Human Plasma. *Journal of Extracellular Vesicles*, **4**, Article No. 27031. <https://doi.org/10.3402/jev.v4.27031>
- [7] 胡国文, 李青, 牛鑫, 胡斌, 刘鹏, 沈晓黎, 等. 旋转超滤: 一种提取细胞外泌体的新方法[J]. 第二军医大学学报, 2014(35): 598-602.
- [8] Zhang, X., Yuan, X., Shi, H., Wu, L., Qian, H. and Xu, W. (2015) Exosomes in Cancer: Small Particle, Big Player. *Journal of Hematology & Oncology*, **8**, Article No. 83. <https://doi.org/10.1186/s13045-015-0181-x>
- [9] Chen, L., Chen, R. and Brigstock, D. (2014) MicroRNA Profiling of Circulating Exosomes during Experimental Liver Fibrosis: 430. *Hepatology*, **60**, Article No. 412A.
- [10] An, H.R., Hong, Y.C., Kim, H., Huh, J.Y., Park, E.C., Park, S.Y., *et al.* (2018) Studies on Mass Production and Highly Solar Light Photocatalytic Properties of Gray Hydrogenated- $\text{TiO}_2$  Sphere Photocatalysts. *Journal of Hazardous Materials*, **358**, 222-233. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.06.055>
- [11] Nguyen-Le, M.T. and Lee, B.K. (2017) Effective Photodegradation of Dyes Using *In-Situ* N-Ti<sup>3+</sup> Co-Doped Porous Titanate- $\text{TiO}_2$  Rod-Like Heterojunctions. *Catalysis Today*, **297**, 228-236. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2017.03.036>
- [12] 万婷婷. 二氧化钛复合纳米纤维的制备及其在染料敏化太阳能电池的应用研究[D]: [硕士学位论文]. 北京: 北京化工大学, 2018.
- [13] Zhang, X., Zuo, G., Lu, X., Tang, C., Cao, S. and Yu, M. (2017) Anatase  $\text{TiO}_2$  Sheet-Assisted Synthesis of Ti<sup>3+</sup> Self-Doped Mixed Phase  $\text{TiO}_2$  Sheet with Superior Visible-light Photocatalytic Performance: Roles of Anatase  $\text{TiO}_2$  Sheet. *Journal of Colloid and Interface Science*, **490**, 774-782. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2016.12.010>
- [14] 魏秋实. 二氧化钛的表面改性和复合改性及其在水处理中的应用研究[D]: [硕士学位论文]. 广州: 华南理工大学, 2018.

- 
- [15] Thingholm, T.E. and Larsen, M.R. (2016) Phospho-Proteomics. In: von Stechow, L., Ed., *Phospho-Proteomics*, Vol. 1355, Springer, New York, 135-146. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3049-4\\_9](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3049-4_9)
- [16] Leitner, A. (2010) Phosphopeptide Enrichment Using Metal Oxide Affinity Chromatography. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **29**, 177-185. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2009.08.007>
- [17] Gao, F., Jiao, F., Xia, C., Zhao, Y., Ying, W., Xie, Y., *et al.* (2019) A novel Strategy for Facile Serum Exosome Isolation Based on Specific Interactions between Phospholipid Bilayers and TiO<sub>2</sub>. *Chemical Science*, **10**, 1579-1588. <https://doi.org/10.1039/C8SC04197K>
- [18] Yu, X., Shang, L., Wang, D., An, L., Li, Z., Liu, J., *et al.* (2018) Plasmon-Resonance-Enhanced Visible-Light Photocatalytic Activity of Ag Quantum Dots/TiO<sub>2</sub> Microspheres for Methyl Orange Degradation. *Solid State Sciences*, **80**, 1-5. <https://doi.org/10.1016/j.solidstatesciences.2018.03.014>
- [19] 刘波, 岳林海, 李国华, 宋旭春, 陈卫祥, 徐铸德. 纳米二氧化钛粉体表面的吸附特征及其对粉体分散性的影响[J]. 浙江大学学报(理学版), 2004, 31(1): 79-83.
- [20] 景晓辉, 卑圣金, 蔡再生, 石健, 丁欣宇. 锐钛矿型 TiO<sub>2</sub> 的制备与光催化性能研究[J]. 针织工业, 2008(10): 61-65.
- [21] Thingholm, T.E., Jørgensen, T.J.D., Jensen, O.N. and Larsen, M.R. (2006) Highly Selective Enrichment of Phosphorylated Peptides Using Titanium Dioxide. *Nature Protocols*, **1**, 1929-1935. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.185>