

综述

DOI: 10.3969/j.issn.0253-9802.2023.09.003

表面等离子体共振技术在外泌体表征鉴定中的研究进展

龚柯 苏艳琼 陆昆婕 许凤娟 肖威 曹东林

【摘要】 外泌体是一种脂质双分子层膜性囊泡，广泛分布于外周血、唾液、尿液、腹水等多种液体中。外泌体中的多种肿瘤相关基因参与了肿瘤细胞与正常细胞之间的信息交流，以及肿瘤细胞增殖和转移的过程，在肿瘤的发展中起着重要作用，是肿瘤液体活检的潜在生物标志物。近年来，表面等离子体共振技术（SPR）因其灵敏度高、所需样品量少、检测时间短及背景干扰小等诸多优点，被认为在外泌体的表征鉴定中有巨大的应用潜力。该文主要介绍了SPR的基本原理及基于SPR的生物传感平台在外泌体表征鉴定中的应用前景。

【关键词】 外泌体；外泌体检测方法；表面等离子体共振

Research progress in surface plasmon resonance technology in exosome characterization and identification Gong Ke, Su Yanqiong, Lu Kunjie, Xu Fengjuan, Xiao Wei, Cao Donglin. Department of Laboratory Medicine, Guangdong Second Provincial General Hospital Affiliated to Jinan University, Guangzhou 510320, China

Corresponding author, Xiao Wei, E-mail: xkevent@foxmail.com; Cao Donglin, E-mail: caodl@126.com

【Abstract】 Exosomes are lipid bilayer membrane vesicles that are widely distributed in peripheral blood, saliva, urine, ascites and other fluids. A variety of tumor-related genes in exosomes are involved in the information exchange between cancer cells and normal cells, as well as the process of tumor cell proliferation and metastasis, play an important role in tumor development, and are potential biomarkers for tumor liquid biopsy. In recent years, surface plasmon resonance (SPR) is considered to have great application potential in the characterization of exosomes due to its high sensitivity, small sample size required for testing, short detection time and low background interference, etc. In this article, the basic principle of SPR and the application prospect of SPR-based biosensing platform in exosomes characterization were mainly illustrated.

【Key words】 Exosome; Exosome detection method; Surface plasmon resonance

外泌体是细胞内的多泡小体与细胞膜融合后释放到细胞外的膜性小泡，为细胞间信息交流的载体。2007年Valadi等首次发现外泌体同时含有mRNA和microRNA(miRNA)。它们可以通过外泌体在细胞间自由穿梭，并在新的位置发挥功能，如免疫调节、凝血功能、介导细胞间的物质传递及信息交流等^[1]。这表明外泌体在细胞间的通信交流方面起着至关重要的作用。人体的外周血、尿液、鼻腔灌洗液、唾液和母乳等都能检测到外泌体，其携带的核酸、蛋白质、脂质等生物活性分子，且与恶性肿瘤的发生、发展密切相关^[23]。研究表明，外泌体中的多种肿瘤相关基因参与了肿瘤细胞与正常细胞之间的信息交流，以及肿瘤细

胞增殖和转移的过程，在肿瘤的发展中起着重要作用，是诊断肿瘤的潜在生物标志物^[46]。

一、常用外泌体鉴定技术及其优缺点

目前外泌体的鉴定技术主要有电镜技术、免疫印迹技术、流式细胞术、纳米颗粒跟踪技术等^[7]。电镜技术分辨率高，但样品处理的过程较为复杂，以至于检测时间过长，因此不适用于快速检测大量的样品。免疫印迹技术简便且灵敏度高，但提取的外泌体浓度较低，所以对单个外泌体难以鉴定。纳米颗粒跟踪分析(NTA)技术分辨率高，但仪器较大，临床应用受限。流式细胞术灵敏度高，但检测时间较长，且操作过程复杂，需

基金项目：广东省基础与应用基础研究基金(2021A1515220067)

作者单位：510320 广州，暨南大学附属广东省第二人民医院检验医学部

通信作者：肖威，E-mail: xkevent@foxmail.com；曹东林，E-mail: caodl@126.com

要专业技术人员操作并分析结果^[89]。利用上述方法可以准确地鉴定外泌体，但是仍然存在明显的缺点（图1）。因此，临床需要一种操作简便、分析灵敏的高通量外泌体表征鉴定方法。表面等离子体共振技术（SPR）是一种实时测量、无标记的光学传感技术，通过检测和分析光学信号的变化而完成对外泌体的鉴定。基于SPR的生物传感平台已逐步成为生物传感器研究领域的热点，现常将SPR与其他技术相结合形成基于SPR的生物传

感平台用于鉴定外泌体^[10]。近年来，已有研究人员用基于SPR的生物传感器检测肿瘤细胞分泌的外泌体，如卵巢癌、白血病、肺癌等^[11-12]。SPR相比其他鉴定外泌体技术的优点在于：样品不需要进行提纯，低成本和较少的试剂使用，且样品无需进行标记就能实时检测^[13]。所以越来越多的研究人员开始利用SPR来建立一种高效、无创、新型检测方法来鉴定外泌体，从而将SPR应用于肿瘤的临床诊断中。



图1 常用外泌体鉴定技术及优缺点

二、基于纳米粒子增强的 SPR 传感平台检测外泌体

2018年Nie等^[14]将DNA四面体探针（DTP）修饰的Au薄膜与双金纳米粒子（AuNP）的催化生长相结合，开发了一种在复杂基质中检测miRNA的低污染、灵敏的SPR传感器。该传感器检测外泌体中的miRNA的结果与实时荧光定量PCR（RT-qPCR）的结果非常吻合，检测限仅为0.8 fm。这种方法使检测外泌体变得更加简便。2019年Wang等^[15]利用AuNP辅助信号放大的SPR技术检测外泌体，对捕获的DNA的Au薄膜进行功能化处理，实现了双纳米颗粒信号放大（图2）。这种直接测量外泌体的方法灵敏度高，检测限（LOD）为 $5 \times 10^6/L$ ，与商品化ELISA相比，LOD提高了 10^4 倍。2020年同课题组的Liao等^[16]利用基于适体识别和多巴胺功能化的金纳米颗粒（Au⁶⁴PDA NP）辅

助信号放大的SPR技术测定外泌体。该研究利用CD63适配子连接的Au⁶⁴PDA NP识别肝癌来源的外泌体并进行信号扩增，无需任何预处理即可在肝癌患者血清中特异性检测肝癌来源的外泌体。总之，无论是基于DNA杂交的检测方法还是使用了多巴胺功能化的AuNP方法来检测外泌体，灵敏度都比传统方法高，但检测过程复杂，仅限于实验室使用。

三、基于表面等离子体共振成像传感平台检测外泌体

2014年Zhu等利用表面等离子体共振成像（SPRi）结合抗体微阵列，定量检测肿瘤细胞培养基中的外泌体。该研究中将跨膜蛋白（例如CD9等）固定在镀金的传感器芯片上，无需纯化即可检测来自人肝癌细胞来源的外泌体。该方法不仅

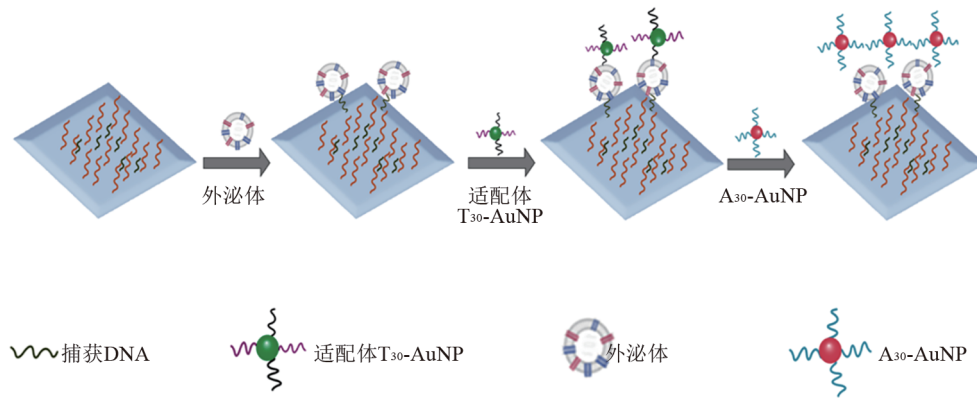


图2 AuNP辅助信号放大的SPR技术原理图

可监测外泌体水平的变化还能预测癌症患者的预后。2018年 Picciolini 等^[17]设计了一种 SPRi 传感器测定外泌体, 这种检测方法使用特定抗体, 能精准地分离并检测来自神经元和少突胶质细胞的外泌体。2020年 Fan 等^[18]提出了一种基于抗 CD63、抗表皮生长因子受体 (EGFR) 和抗上皮细胞黏附分子 (E_pCAM) 修饰的 SPRi 阵列的方法检测多重非小细胞肺癌 (NSCLC) 相关外泌体的多重表征, 在功能性 AuNP 的帮助下, 该方法 LOD 达到 $1.00 \times 10^{10}/L$ 的水平。2021年 Wu 等^[19]提出了一种利用金对银异质结构和 DNA 四面体框架 (DTF) 的 SPRi 传感器, 同时检测临床样品中的 NSCLC 相关外泌体的 miRNA, 借助 DNA 编程的 Au-on-Ag 异质结构和 DTF, 基于 SPRi 的生物传感器具有 2 fm~20 nm 的超宽检测范围, 1.68 fm 的超低检测限, 该方法不仅提高了捕获效率, 还提高了防污能力。2020年 Chen 等^[20]报道了一种基于水凝胶-金纳米粒子超分子球 (H-AuNP) 的无标记实时 SPRi 生物传感器 (图 3)。利用 AuNP 的局域表面等离子体共振和累积多层多孔水凝胶的信号放大效应增强了该平台的灵敏度。该生物传感器表现出 $1.00 \times 10^8 \sim 1.00 \times 10^{10}/L$ 的宽线性范围, 检测限低至 $1.00 \times 10^8/L$ 。上述结果均表明 SPR 是外泌体表征鉴定的有效工具。

四、基于 SPR 的等离子体显微镜传感平台检测外泌体

2018年 Yang 等^[21]提出了一种使用干涉等离子体显微镜 (SPRM) 以无标记方式对单个外泌体成像的光学方法。2020年该课题组利用基于功能化表面 SPR 生物传感器和先进的 SPRM, 在单粒子

水平上捕获和成像外泌体^[22]。SPRM 通过结合免疫传感和单粒子分析可以对外泌体进行物理和化学表征。研究者应用其分析人肺癌 A549 细胞系分泌的外泌体大小、浓度。由于 SPRM 具有单个成像及能多重分析的能力, 在临床应用中具有很大的价值, 但其检测过程比较复杂导致耗时较长, 故临床潜力相对较低。

五、基于纳米孔的 SPR 传感器平台检测外泌体

基于纳米孔的 SPR 传感器备受关注。2014年 Im 等报道了纳米等离子体外泌体 (nPLEX) 技术, 其用周期性纳米孔阵列传输 SPR 连续并分离、检测和高通量定量外泌体。nPLEX 将纳米孔芯片阵列与微型成像装置相结合, 形成了第一个具有高水平集成和多路复用能力的微流体平台。每次测量所需的样品体积仅为 $0.3 \mu L$, 却显示出很高的诊断准确性。这种方法不仅灵敏度高 (约 3 000 个外泌体), 更重要的是在检测不同蛋白标志物上具有更高的准确性。2019年 Lim 等^[23]提出放大等离子体外泌体 (APEX) 技术, 该方法利用局部光学沉积物和双层等离子体纳米结构的原位酶促转换来实现多路复用, 灵敏度高 (约 200 个外泌体), 并能够在外泌体中实现多种靶标共定位的检测。然而复杂且昂贵的纳米结构限制了纳米等离子体生物传感器的适用性。

六、总结与展望

相对于传统的外泌体鉴定技术, 基于 SPR 传感原理的外泌体鉴定技术具有以下优点: ①可以对外泌体进行多重分析, 以提高诊断的特异度; ②对单一的外泌体鉴定有着巨大的潜力; ③对靶

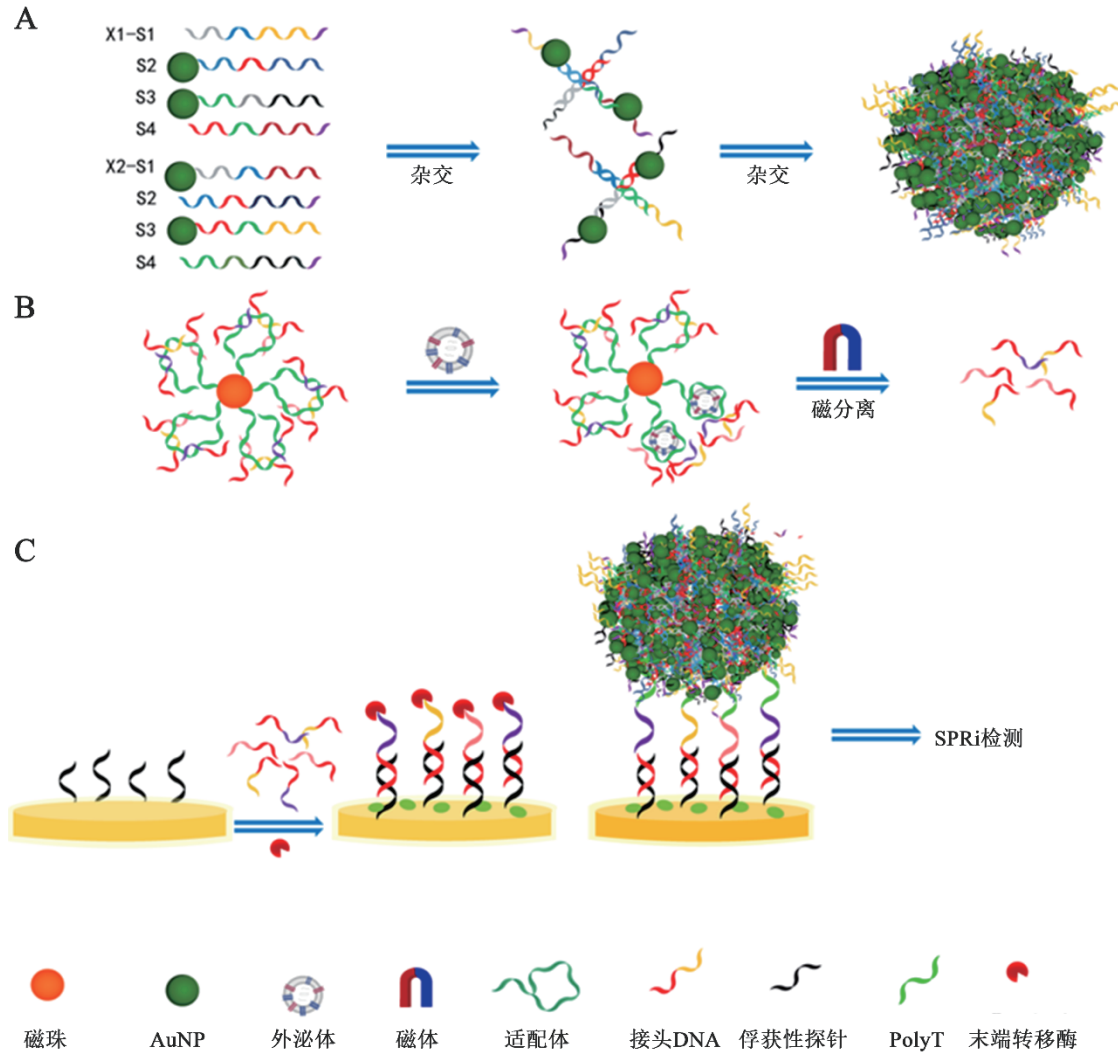


图3 H-AuNP的无标记实时SPRi生物传感器的原理图

标及生物标志物能更好地放大信号，从而提高诊断疾病的灵敏度。然而，基于SPR传感技术平台还存在一些应用挑战，难以满足外泌体的临床鉴定要求，主要包括如下几点：①SPR传感平台在复杂样品中的检测准确性是较低的，难以在复杂样品中排除非特异性吸附；②大多数基于SPR的平台仍处于概念验证水平，与其他检测方法（如ELISA）相比，它们的精确度是比较差的；③尽管有紧凑型的SPR传感平台，但是绝大多数的SPR传感平台仪器较大且昂贵，不利于便携式快速检测。综上所述，SPR是一种非常有价值的鉴定外泌体的分析技术，具有巨大的临床转化潜力，但基于SPR传感平台还存在一些不足，研究者需要从临床实际需求出发，开发便携式的SPR测量设备、提高其在复杂样本中的检测精准度，从而推动其临床应用，为基于外泌体的临床检验新

技术提供方法学支持。

参 考 文 献

- [1] Familtseva A, Jeremic N, Tyagi S C. Exosomes: cell-created drug delivery systems. *Mol Cell Biochem*, 2019, 459(1/2): 1-6.
- [2] Caby M P, Lankar D, Vincendeau-Scherrer C, et al. Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. *Int Immunol*, 2005, 17 (7): 879-887.
- [3] De M A. Human urine exosomes: another important member of the liquid biopsy family. *Methods Enzymol*, 2020, 645 : 195-208.
- [4] Kalluri R. The biology and function of exosomes in cancer. *J Clin Invest*, 2016, 126 (4): 1208-1215.
- [5] 王林, 易基群, 江高峰. 外泌体 lncRNA H19 在 miR-7/KLF4/VEGF 调控人肺癌细胞迁移和侵袭中的作用研究. *新医学*, 2021, 52 (10): 745-751.
- [6] 王成, 汪俊军. 细胞外囊泡 miRNA 作为肿瘤新型液体活检

- 分子指标的价值. 中华检验医学杂志, 2021, 44 (3): 250-254.
- [7] 王耀杰, 颜晰, 赵立波, 等. 外泌体分离和纯化方法研究进展. 中华检验医学杂志, 2021, 44 (2): 167-170.
- [8] Cizmar P, Yuana Y. Detection and characterization of extracellular vesicles by transmission and cryo-transmission electron microscopy. *Methods Mol Biol*, 2017, 1660: 221-232.
- [9] Drula R, Ott L F, Berindan-Neagoe I, et al. MicroRNAs from liquid biopsy derived extracellular vesicles: recent advances in detection and characterization methods. *Cancers (Basel)*, 2020, 12 (8): 2009.
- [10] Xie X, Liu J, Wang X. Design, synthesis and biological evaluation of (2', 5' and 3' 5'-linked) cGAMP analogs that activate stimulator of interferon genes (STING). *Molecules*, 2020, 25 (22): 5285.
- [11] Fathi F, Rahbarghazi R, Movassaghpour A A, et al. Detection of CD133-marked cancer stem cells by surface plasmon resonance: its application in leukemia patients. *Biochim Biophys Acta BBA Gen Subj*, 2019, 1863 (10): 1575-1582.
- [12] Ribaut C, Voisin V, Malachovská V, et al. Small biomolecule immunosensing with plasmonic optical fiber grating sensor. *Biosens Bioelectron*, 2016, 77: 315-322.
- [13] Xu L, Shoaie N, Jahanpeyma F, et al. Optical, electrochemical and electrical (nano) biosensors for detection of exosomes: a comprehensive overview. *Biosens Bioelectron*, 2020, 161: 112222.
- [14] Nie W, Wang Q, Zou L, et al. Low-fouling surface plasmon resonance sensor for highly sensitive detection of microRNA in a complex matrix based on the DNA tetrahedron. *Anal Chem*, 2018, 90 (21): 12584-12591.
- [15] Wang Q, Zou L, Yang X, et al. Direct quantification of cancerous exosomes via surface plasmon resonance with dual gold nanoparticle-assisted signal amplification. *Biosens Bioelectron*, 2019, 135: 129-136.
- [16] Liao G, Liu X, Yang X, et al. Surface plasmon resonance assay for exosomes based on aptamer recognition and polydopamine-functionalized gold nanoparticles for signal amplification. *Microchim Acta*, 2020, 187 (4): 1-9.
- [17] Picciolini S, Gualerzi A, Vanna R, et al. Detection and characterization of different brain-derived subpopulations of plasma exosomes by surface plasmon resonance imaging. *Anal Chem*, 2018, 90 (15): 8873-8880.
- [18] Fan Y, Duan X, Zhao M, et al. High-sensitive and multiplex biosensing assay of NSCLC-derived exosomes via different recognition sites based on SPRi array. *Biosens Bioelectron*, 2020, 154: 112066.
- [19] Wu W, Yu X, Wu J, et al. Surface plasmon resonance imaging-based biosensor for multiplex and ultrasensitive detection of NSCLC-associated exosomal miRNAs using DNA programmed heterostructure of Au-on-Ag. *Biosens Bioelectron*, 2021, 175: 112835.
- [20] Chen W, Li J, Wei X, et al. Surface plasmon resonance biosensor using hydrogel-AuNP supramolecular spheres for determination of prostate cancer-derived exosomes. *Microchim Acta*, 2020, 187 (11): 1-10.
- [21] Yang Y, Shen G, Wang H, et al. Interferometric plasmonic imaging and detection of single exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115 (41): 10275-10280.
- [22] Yang Y, Zhai C, Zeng Q, et al. Multifunctional detection of extracellular vesicles with surface plasmon resonance microscopy. *Anal Chem*, 2020, 92 (7): 4884-4890.
- [23] Lim C Z J, Zhang Y, Chen Y, et al. Subtyping of circulating exosome-bound amyloid β reflects brain plaque deposition. *Nat Commun*, 2019, 10: 1144.

(收稿日期: 2022-12-15)

(本文编辑: 林燕薇)