

不同来源外泌体保存方法的研究进展

卢姝言, 杨松, 任李梅, 王佳雯*, 赵大庆* (长春中医药大学, 长春 130117)

摘要: 外泌体是一类由各种类型的细胞分泌的直径为 30~100 nm 的细胞外囊泡。外泌体由脂质双分子层膜和膜相关蛋白组成, 并含有胞质成分, 如 mRNA、miRNA 和蛋白质。外泌体可以与靶细胞的膜结合或融合, 从而将表面蛋白和胞质成分输送到细胞中。外泌体通过将其生物活性物质转移到远处的细胞, 参与细胞间的通信, 并被认为是可以调节受体细胞中的基因和蛋白表达水平。细胞外泌体与许多应激条件, 如缺氧、衰老和癌基因激活等有关。目前外泌体可以通过差异离心、过滤加离心、免疫亲和或排除色谱、聚合物沉淀和微流体技术等方法从细胞培养基或体液中分离出来。但不同来源外泌体的保存条件尚未确定, 保存条件对外泌体的稳定性及后续实验研究十分重要。基于此, 本文就适宜外泌体保存条件的研究进展进行综述, 为后续研究提供参考。

关键词: 外泌体; 保存; 温度; pH; 蛋白质; RNA

中图分类号: R966 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2022)03-0410-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.03.022

引用本文: 卢姝言, 杨松, 任李梅, 等. 不同来源外泌体保存方法的研究进展[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(3): 410-416.

Research Progress on Preservation Methods of Exosomes from Different Sources

LU Shuyan, YANG Song, REN Limei, WANG Jiawen*, ZHAO Daqing* (Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China)

ABSTRACT: Exosomes are extracellular vesicles with a diameter of 30–100 nm secreted by various cell types. Exosomes are composed of lipid bilayer membranes and membrane-associated proteins, contain cytoplasmic components such as mRNA, miRNA, and proteins. Exosomes can bind to or fuse with the membrane of the target cell to transport surface proteins and cytoplasmic components into the cell. Exosomes participate in cell-to-cell communication by transferring their bioactive substances to distant cells and are thought to regulate gene and protein expression levels in recipient cells. Exosomes are involved in many stress conditions such as hypoxia, senescence and oncogene activation. Exosomes can be isolated from cell media or body fluids by differential centrifugation, filtration plus centrifugation, immunoaffinity or exclusion chromatography, polymer precipitation and microfluidic techniques. However, the preservation conditions of exosomes from different sources have not been determined, the stability of the preservation conditions and the subsequent experimental study of exosomes are very important. Based on this, this review summarized the research progress of suitable conditions for exosome preservation as follows to provide reference for the subsequent research.

KEYWORDS: exosome; preserve; temperature; pH; protein; RNA

细胞外囊泡(extracellular vesicles, EVs)包括外泌体(30~100 nm)、微囊泡(100~1 000 nm)和凋亡小体(50~500 nm), 是由 RNA、DNA、蛋白质和脂质等生物活性分子组成的球形双层磷脂膜颗粒^[1-2]。外泌体可以在受体细胞内释放具有功能活性的 mRNA 和 microRNA, 并通过重新翻译 mRNAs 等方式调节受体细胞的基因表达^[3]。外泌体还可以通过释放蛋白质刺激特定的信号通路从而对受体细胞产生一定影响^[4]。近些年, 外泌体的生物功能一直备受关注, 目前外泌体已知的生物功能包括调控受体细胞基因转录和翻译, 调节

细胞的代谢和增殖, 促进血管生成和伤口愈合, 参与中枢和外周免疫调节, 参与细胞凋亡与分化, 并在细胞迁移与转移性疾病中起到一定作用^[5]。外泌体与其他细胞衍生物一样, 在存储过程中保持其生物活性稳定是至关重要的一步, 不同的保存条件可能对外泌体的功能产生较大影响, 因此找到一种特殊的存储条件尤为重要, 但有关外泌体的存储方法等研究相对较少, 且部分现象的机制仍需要进一步实验证明。本文总结了目前有关外泌体的存储技术方法以及不同存储条件对外泌体的影响。

基金项目: 中央引导地方科技发展资金吉林省基础研究专项(202002054JC)

作者简介: 卢姝言, 女, 硕士生 E-mail: 1187477595@qq.com *通信作者: 赵大庆, 男, 博士, 研究员, 博导 E-mail: zhaodaqing1963@163.com 王佳雯, 女, 博士, 副研究员, 硕导 E-mail: wangjiawen1229@163.com

1 不同的保存方法对外泌体形态的影响

不同来源的外泌体在 4℃短期存储并不会产生较大影响,并且不会受到反复冻融对脂质膜的破坏,但外泌体数量会随储存时间的延长而减少,长期储存还需将外泌体保存在较低温度条件下,但冷冻可能会引起外泌体的聚集,还可能形成多层膜结构,因此可适当添加保护剂以减少冷冻造成的损失,有研究表明,加入甘油保护剂与不加保护剂的外泌体回收率相差不大,但 DMSO 保护剂会使外泌体回收率降低较多^[6]。加入 10%DMSO 则可在一定程度上使保存的外泌体的大小和形状不会受到影响^[7]。在液氮中保存时,加入白蛋白保护剂会使外泌体数量保持稳定,但 1%DMSO 和 5%甘油会使外泌体发生降解^[8]。加入海藻糖保护剂的外泌体未发生聚集现象,形态也未受影响,而未加入保护剂的外泌体在冷冻干燥后会聚集^[9]。可见,保护剂可在一定程度上维持外泌体的形态及数量,但要选择合适的保护剂,同时也需控制好保护剂的浓度和用量。在外泌体冷冻保存时切忌反复冻融,以减少冻融过程带来的损失。

外泌体中的蛋白质在保存时会发生一定程度的降解,这可能也会影响其内容物的生物学功能。因此,在保存和提取过程中加入蛋白酶抑制剂可有效防止外泌体相关蛋白的降解,研究发现复融过程中充分的涡旋可以使外泌体中的蛋白质恢复到较为正常的水平,从而提高外泌体回收率,这可能是由于冷冻过程是外泌体形成聚集体,减少了蛋白浓度,但充分的涡旋可以破坏这种聚集使外泌体更趋近于独立状态从而使蛋白质更充分地释放出来。也有研究者提出假设是因外泌体可能被囚在蛋白网状物中形成沉淀,或冷冻后附着在塑料管的壁上,最终通过充分的涡旋释放相关蛋白,目前人们可以确定的是-80℃的保存条件可以使外泌体保持完整,并且-80℃比-20℃能更好地保存外泌体中的蛋白质^[10]。在保存中也需注意对外泌体脂质膜的保护,脂质膜的存在可以保护其中的蛋白不受蛋白酶的影响^[11]。

储存条件可能对外泌体的生物功能有显著影响,但不同的方法对生物活性的影响差异较大,冷冻等一些存储方式可能会对外泌体的脂质膜产生影响,但不会对其生物活性产生较大破坏,虽然在此过程中浓度或内容物含量会有所减少,但

如果需要长期保存,冷冻无疑是较好可行的方法,需注意冷冻过程中避免反复冻融,同时注意保存时间不宜过长。

1.1 不同的保存方法对不同体液来源外泌体形态的影响

不同体液来源的外泌体对保存温度的要求不尽相同,如人唾液中的外泌体可在 4℃条件下保持 20 个月形态不变^[11]。人乳汁中的外泌体在 4℃条件下保存时间越长含量越低,仅 4 周可降低 50% 左右^[6]。-80℃条件相对更适合外泌体的储存,人尿和精液中的外泌体在-80℃条件下储存,其形态、数量、物理特性等均未受影响^[10,12]。但小鼠支气管肺泡灌洗液中的外泌体,-80℃储存后直径有所增加,膜电位有所降低,同时出现了多层结构并发生聚集^[13]。

1.2 不同的保存方法对不同细胞来源外泌体形态的影响

对不同细胞来源的外泌体而言,温度越高、时间越长对外泌体的保存越不利。补体系统产生的外泌体数量随着保存时间的延长而逐渐减少,且保存温度越高数量减少越明显^[14]。人源细胞(HEK、293T、ECFC、MSC)产生的外泌体在 37℃保存 2 d 其粒径减小约 60%,在 4℃保存 25 d 其粒径减小约 70%^[15]。中性粒细胞产生的外泌体在 4℃条件下保存 1 周,其数量大量降低,但在-20~-80℃条件下保存 1 个月,其数量及大小基本没有改变^[8]。

THP-1 细胞中产生的外泌体可在 4℃或-80℃条件下至少保存 1 个月,且外泌体数量不会产生较大差异^[16]。BEnd.3 细胞产生的外泌体在 4℃,-20℃,-80℃条件下保存 28 d 后外泌体体积均变小,4℃条件下外泌体数量减少较快,-20℃,-80℃条件下外泌体数量减少速度变缓^[17]。4℃储存 7 d 的红细胞产生的外泌体出现黑色点状物质,14 d 和 21 d 后黑色点状物质增多^[18]。

2 不同的保存方法对外泌体中蛋白质活性的影响

2.1 不同的保存方法对不同体液来源外泌体中蛋白质活性的影响

蛋白质在相对较低温度的环境中保存更为稳定。人尿液中的外泌体可在 4℃条件下保存 4 周,但不宜在-20℃条件储存,蛋白质会有较大损失;在-80℃条件下可保存≥2 年且蛋白质损失较小^[10,19]。人精液中的外泌体可在-80℃储存 30

年之久,其中有些蛋白如 CD63、CD9 含量没有显著变化,但某些特定的蛋白如乙酰胆碱,可能会因储存时间较长而降低活性^[12]。小鼠支气管肺泡灌洗液中的外泌体可检测到 1 140 个蛋白质,而储存在 4℃和-80℃的外泌体均有约 50%的蛋白质未发生变化,约有 23%的蛋白质被降解,在 4℃储存条件下,有 61 个有关 O-抗原生物合成、神经递质分泌、JNK 级联、染色体分离等生物过程的蛋白质含量降低,在-80℃储存条件下,有 31 个有关抗原呈递、糖异生、戊糖途径、维生素 D 代谢等生物过程的蛋白质含量降低^[13]。

2.2 不同的保存方法对不同细胞来源外泌体中蛋白质活性的影响

补充系统产生的外泌体其蛋白质可在 4℃、-70℃稳定保存 25 d^[14]。HEK293T 产生的外泌体其蛋白质随储存时间增长而减少,且蛋白质在-80℃条件下储存的降解率最低^[20]。bEnd.3 细胞中的外泌体在 4℃条件下存放 1 周蛋白质减少,-20℃条件下蛋白质也会减少但下降速度缓慢,-80℃条件下保存 28 d 蛋白质无明显减少^[17]。红细胞在 4℃保存 14 d 后促进了外泌体的分泌,CD63 和 CD81 蛋白表达显著增加,但储存 28 d 后 MRPS35 表达量显著降低^[18]。

3 不同的保存方法对外泌体中遗传物质的影响

3.1 不同的保存方法对不同体液来源外泌体遗传物质的影响

血清中的外泌体在 4℃保存 1 d 后其中的 miR-122、miR-145 等会发生降解^[21],2 d 后 DNA 含量会逐渐下降,在室温保存>1 d 时其 DNA 含量会急剧下降^[22]。血浆中的外泌体 RNA 在 4℃下 2 周内保持稳定,-80℃条件下至少可保存 2 个月,在-20℃条件下可以保存≥5 年,单个 miRNA 水平只有很小的变化,但反复冻融会使 RNA 含量减少^[23]。人乳汁在-80℃储存>24 h,其外泌体中 microRNA 会有显著降低^[6]。临床脑脊液中的外泌体冷冻干燥后放置室温保存 7 d,其总 RNA 稳定,但 miRNAs(miR-21, miR-24, miR-103, miR-125)经冻干后含量显著降低^[24]。

3.2 不同的保存方法对不同细胞来源外泌体遗传物质的影响

B16F0、SKBR3 细胞产生的外泌体在-80℃条件保存 2 个月其 RNA 依然稳定,但长时间保

存 RNA 会随着冷冻时间的延长而降解,保存 2 年会使 RNA 大量降解^[7]。bEnd.3 细胞产生的外泌体其 RNA 在 4℃条件下 1 周内保持稳定,-20℃和-80℃条件下 28 d 内保存稳定^[17]。

RNA 等遗传物质不稳定易分解,所以研究外泌体的 RNA 等物质需注意储存条件,多次循环冻融对 RNA 等遗传物质影响很大。其可在 4℃条件下短期保存,在冷冻条件下长期保存也需注意保存时间,不宜冷冻过长时间。冷冻干燥可能诱导外泌体解体,从而导致遗传物质严重降解^[24]。

4 不同的保存方法对外泌体生物活性的影响

4.1 不同的保存方法对不同体液来源外泌体生物活性的影响

小鼠支气管肺泡灌洗液中的外泌体在 4℃和-20℃条件下保存 1 d 后其抗菌效果会降低^[13]。人精液在-80℃储存 2 年,其中的外泌体仍具有抑制病毒的作用,但储存 30 年后抑制病毒作用完全丧失,可能由于长期冷冻使其中的某些成分发生了改变^[12]。

4.2 不同的保存方法对不同细胞来源外泌体生物活性的影响

HEK 293T 产生的外泌体在-80,-20,37,60℃条件下储存时,更易被细胞摄取,但细胞对 4℃储存的外泌体摄入效果较差,可能由于不同的温度或多次的循环冻融影响外泌体膜的某些性质,从而使外泌体更容易被细胞吸收^[20]。补体系统产生的外泌体在 4,-70℃保存 25 d 仍保持了激活补体的功能,且 4℃下活性略高于-70℃^[14]。B16BL6 细胞产生的外泌体在经冷冻干燥后仍然保持使细胞增殖的活性以及其装载功能和荧光素酶的活性,并且对其药动学影响不大^[9]。中性粒细胞产生的外泌体在 4℃条件下保存时,其抗菌能力在 1 d 后开始减弱,1 周后完全丧失,在-20℃条件下保存 28 d 后其抗菌功能几乎完全丧失,在-80℃条件下其抗菌功能可维持 28 d,但抗菌能力随时间延长而减弱,在液氮中保存也会出现抗菌能力下降的情况,保护剂也无法维持抗菌能力^[8]。bEnd.3 细胞产生的外泌体在 4℃条件下存放 3 d,细胞对其的摄入量明显减少,-20℃条件下存放 3 周细胞摄入量无明显变化,-80℃条件存放 2 周细胞摄入量减少。bEnd.3 细胞提取出的外泌体在 4,-20℃条件下保存的时间越长,体内脏器摄入越少,在-80℃条件下保存 28 d 内脏等器官可正常摄入,但保存 14 d

后大脑摄入减少^[17]。

5 酸碱度对不同来源外泌体保存的影响

有研究表明外泌体更适合在酸性条件下提取,而不适合碱性条件。在酸性条件下 HEK 293T 产生的外泌体其蛋白质浓度和核酸浓度均是中性条件下的 5 倍,而在碱性条件下外泌体蛋白质和核酸浓度极低^[25]。人尿液产生的外泌体在酸性条件分离有利于保持其稳定性和完整性,与碱性环境和中性环境相比,酸性环境中的外泌体总 RNA 含量较高,且蛋白降解较少^[26]。与中性条件相比,HEK 293T 产生的外泌体在酸性或碱性条件下更易被细胞摄入^[20]。酸性环境更有助于肿瘤细胞外泌体的释放和摄取,不论是正常条件还是病理条件,酸性微环境都有助于细胞对外泌体的摄入^[27]。

中性条件可以使外泌体的浓度及蛋白质等物质保持稳定,而酸性环境可以提高蛋白质和核酸等外泌体代表性成分的分离产率,也可以适当提高细胞对外泌体的摄入量,大多数研究结果表明碱性条件不利于外泌体蛋白质及核酸的分离和保存。

6 讨论

外泌体的磷脂双分子膜在一定程度上对外泌体内容物进行保护,防止其内部活性成分被降解或稀释,并且,外泌体膜上含有特定的蛋白质和脂质等物质,有助于外泌体与靶细胞融合,从而促进细胞间物质与信息的交流^[28-29],本文就适合外泌体保存条件的研究进展进行总结,见表 1。

外泌体的稳定性在很大程度上依赖于其双层膜结构,以保护其内容物在细胞外环境中不被降解和变性^[22,30]。来源不同的外泌体,由于其内容物和行使功能的部分区别,即使储存条件相同但最终也可能会对外泌体产生不同影响。不仅仅是储存条件可以产生差异,提取方法的不同也对其性质产生不同程度的影响。先提取出外泌体再冻存或先将样品冻存再从中提取外泌体,2 种不同的操作可能会产生不同的结果,若将样品先冷冻再提取外泌体,因样本中某些蛋白的存在可能会降低冷冻对外泌体聚集的影响^[13]。

4, -20, -80 °C 这 3 个温度分别是保存蛋白质、DNA、RNA 相对稳定的常用保存条件。外泌体有磷脂双层膜保护,内含 RNA、DNA、蛋白质和脂质等生物活性分子,所以其保存条件一直是研究者们关注的重点,除了常用的保存方法外,也有

研究人员在保存过程中采用冷冻干燥或添加保护剂等新方法,试图找寻外泌体保存的最佳条件。

为更好地保存和长途运输,有研究人员采用冷冻干燥技术对外泌体进行冷冻干燥保存,冷冻干燥是通过在真空中升华和解吸来除去冷冻样品中的水分。有研究表明,冻结速度和初始冻干温度主要决定了冻干和冻害程度以及冻干的形态,在冻干过程中,添加一定浓度胆固醇和少量带负电荷的脂质可以减少内容物的泄露,也能防止囊泡的聚集及融合^[31]。在组织运输中也常用冷冻干燥的方法,其不改变各种组织的总蛋白质活性,包括酶活性、免疫活性和磷酸化等,也不影响冻干组织中的某些 RNA^[3]。

在冻干或低温保存过程中也可以添加保护剂,其中海藻糖较为常用,海藻糖是 2 个单位的葡萄糖组成的非还原性双糖,被食品和药品工业广泛用作蛋白质稳定剂和冷冻保护剂,具有稳定蛋白质、细胞膜和脂质体的能力,并且能在储存过程中保持外泌体的分散性、功能性、稳定性和完整性^[32]。在无海藻糖保护的情况下,外泌体在冷冻干燥过程中会因各种压力而引起聚集,可能会脂质双层膜被冰晶破坏,在脱水过程中发生囊泡融合,或在复水过程中发生相变。而在冷冻干燥过程中加入海藻糖,则可以在一定程度上防止冷冻干燥过程中外泌体聚集,保护外泌体的颗粒特性^[9]。不同的碳水化合物(葡萄糖、乳糖或海藻糖)或者多元醇(甘露醇或甘油)也可用作冷冻过程中抑制脂质体融合或降解的低温保护剂,防止冷冻干燥复水过程在分子水平上影响脂质膜的重组,从而影响药物释放和药理学性能。低浓度的甘油和碳水化合物的结合,有利于在冷冻干燥过程中保持均匀性。并且碳水化合物浓度越高,效果越好,而葡萄糖、乳糖或海藻糖这 3 种糖没有显著差异,少量的甘油可改善乳糖和海藻糖的保护性能,而甘露醇和葡萄糖不适合同时使用^[33]。

有研究表明冷冻保护剂的浓度越高,冷冻速度越快,纳米颗粒的再分散性越好,快速冷冻会形成较小冰晶,会有更好的分散性,但保护剂浓度过低不利于获得良好的再分散效果。总之,在整个冷冻速率和防冻剂浓度范围内,冷冻速率越快,保护剂浓度越高,总体上效果越好,较慢的冻结速率会导致纳米颗粒聚集^[34]。所以冷冻时不仅需要注意温度,也需要注意冷冻速度及其他条件。

表1 不同来源外泌体保存方法及研究内容

Tab. 1 Preservation methods and research contents of exosomes from different sources

分类来源	实验物质	提取方法	提取物质	储存温度/ (储存 pH)	储存时间	研究形态/蛋白/ 核酸/生物活性	冻融次数及影响	来源文献
不同体液								
人乳汁	人乳汁	超离	外泌体	4, -80 °C	过夜、2, 4 周	221 个 microRNAs	—	[6]
人尿液	人尿液	超离	外泌体	4, -20, -80 °C	1 h、1 周、7 个月	Pr: NHE3, TSG101, X(Alix), AQP2, NSE, MDH, 胆酸蛋白等	—	[10]
人唾液	人唾液	超离	外泌体	4 °C	20 个月	Pr: DPPIV, Alixi 等	1 个冻融循环对蛋白质影响不大	[11]
精液	精液	试剂盒	EVs	-80 °C	2, 30 年	Pr: AchE, CD63, CD9, 蛋白组成等、RNA、生物活性	—	[12]
小鼠支气管肺泡灌洗液	外泌体	超离	外泌体	4, -80 °C	4 d	1 140 个 Pr, Pr 对比、生物活性	—	[13]
补充体系	外泌体	超离	EVs	37, 4 °C、-20, -70 °C	25 d	生物活性	—	[14]
人尿液	人尿液	—	蛋白质	4, -20, -40, -70 °C	4 周、2 年	白蛋白、转铁蛋白、IgG、a1-微球蛋白、B2-微球蛋白等	—	[19]
血清	外泌体	试剂盒	外泌体	4 °C	24 h	miR-39、miR-122、miR-92a、miR-145	—	[21]
血清	血清	试剂盒	EVs	4 °C、室温	1 d~1 周(4 °C)、6 h~2 d(室温)	DNA	0~5 个冻融循环, 在<3 个冻融循环时,DNA 基本保持稳定, 超过 2 个冻融循环会使 DNA 含量极具下降	[22]
血浆	血浆	试剂盒沉淀	外泌体	4, -20, -80 °C	2 周(4 °C)/2 周、3 年、5 年(-20 °C)/2 个月(-80 °C)	总 RNA、miR-16、miR-24、miR-451、miR-181a	1~2 个冻融循环, 2 个冻融循环后外泌体含量减少	[23]
临床脑脊液	EVs	超离	EVs	冷冻干燥、-80 °C	7 d	总 RNA、miR-21、miR-24、miR-103、miR-125	1~3 个冻融循环, 2 个冻融循环后外泌体减少, 3 个冻融循环后外泌体显著减少	[24]
尿液	尿液	超离	外泌体	-80 °C/pH 4、pH 5、pH 6、pH 7、pH 8	30 min	Pr: TSG101, Alix 等、总 RNA	—	[26]
不同细胞								
B16F0、SKBR3	外泌体	超离	外泌体	-80 °C	9 d、2 个月、2 年	形态、总 RNA	—	[7]
中性粒细胞	EVs	沉淀法, 梯度离心	EVs	20, 4, -20, -80 °C、液氮(速冻)	1 d、1 周、28 d	生物活性	—	[8]
B16BL6 细胞	外泌体	超离	外泌体	冷冻干燥、-80 °C	1~4 周	生物活性	—	[9]
人源细胞(HEK、293T、ECFC、MSC)	外泌体	超离	外泌体	37, 4, -80 °C	2~25 d	形态	多次冻融循环不影响外泌体大小	[15]
THP-1 细胞	EVs	超离	EVs	4, -80 °C	1 个月	形态	—	[16]
bEnd.3 细胞	EVs	超离	EVs	4, -20, -80 °C	3, 5, 7, 14, 28 d	形态、Pr: 总 Pr, CD63、总 RNA、生物活性	1~5 次冻融使外泌体数量减少	[17]
红细胞	红细胞	超离	外泌体	4 °C (红细胞)、-80 °C(外泌体)	7, 14, 21, 28 d	形态、Pr: MRPS35、CD81、CD63	—	[18]
HEK293 细胞	外泌体	聚乙二醇沉淀	外泌体	37, 60, 4, -20, -80 °C/pH 4、pH 10	—	Pr: X(Alix), Hsp70, TSG101 等、生物活性	1~5 个冻融循环, 冻融循环会使外泌体产生聚集现象	[20]
HEK293 细胞	外泌体	试剂盒	外泌体	pH 4、pH 11、pH 7	30 min	Pr: Hsp70, CD62, CD9 等	—	[25]
肿瘤细胞	—	—	外泌体	酸性环境	—	生物活性	—	[27]

注: Pr 表示蛋白质。

Note: Pr stood for protein.

也有研究表明外泌体在储存过程中的损失可能与储存容器的管壁吸附有关,使用特殊的储存管或者普通的封闭储存管可减少损失^[35]。

总而言之,目前关于外泌体的最佳保存条件仍在探索中,外泌体的保存可能受外泌体来源物质的影响较大,且没有绝对统一的保存方法,但总体保存结果趋势大致相同,在 4℃条件下外泌体未经冻融,在形态上不会受到破坏,但外泌体数量及其中包裹的蛋白质、核酸等物质会随着保存时间的延长而减少,且减少速度较快,外泌体的生物活性也会随之降低,建议 4℃短期储存,不宜储存时间过长。相比之下,-80℃条件下储存的外泌体虽然在形态上可能受到冷冻影响,但其包含的蛋白质、核酸等物质会较为稳定,且生物活性也会相对稳定一些,-80℃较适合长期储存,但需要注意分装保存,在冷冻过程中切忌将外泌体反复冻融。也可以在冷冻过程中加入冷冻保护剂,如海藻糖、白蛋白等,需要注意的是保护剂的种类和用量,如使用不当可能会造成外泌体损失。也可使用冷冻干燥技术对外泌体进行保存。尽管冷冻使外泌体保持相对稳定,但外泌体中的少数物质还会有损失,若对实验物质有特殊要求,建议使用新鲜外泌体进行研究。此外,保存外泌体也需注意酸碱度的调节,外泌体在中性溶液中相对稳定,在酸性溶液中更易被提取和摄入。关于外泌体的保存尚无确切定论,还需更深入的研究,本文就适合外泌体保存条件的研究进展进行综述,为后续研究提供参考。

REFERENCES

- [1] STANLY C, FIUME I, CAPASSO G, et al. Isolation of exosome-like vesicles from plants by ultracentrifugation on sucrose/deuterium oxide (D₂O) density cushions[J]. *Methods Mol Biol*, 2016(1459): 259-269.
- [2] TANCINI B, BURATTA S, SAGINI K, et al. Insight into the role of extracellular vesicles in lysosomal storage disorders[J]. *Genes (Basel)*, 2019, 10(7): E510. Doi: 10.3390/genes10070510.
- [3] WU Y H, WU M, ZHANG Y C, et al. Lyophilization is suitable for storage and shipment of fresh tissue samples without altering RNA and protein levels stored at room temperature[J]. *Amino Acids*, 2012, 43(3): 1383-1388.
- [4] MATHIEU M, MARTIN-JAULAR L, LAVIEU G, et al. Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication[J]. *Nat Cell Biol*, 2019, 21(1): 9-17.
- [5] CUI G N, LIU X P, HU J R, et al. Research progress on the characteristics of stem cell exosomes[J]. *Pharm Today(今日药*

学), 2020, 30(2): 106-109, 115.

- [6] LEIFERMAN A, SHU J, UPADHYAYA B, et al. Storage of extracellular vesicles in human milk, and MicroRNA profiles in human milk exosomes and infant formulas[J]. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2019, 69(2): 235-238.
- [7] WU Y T, DENG W T, KLINKE D J 2nd. Exosomes: improved methods to characterize their morphology, RNA content, and surface protein biomarkers[J]. *Analyst*, 2015, 140(19): 6631-6642.
- [8] LŐRINCZ Á M, TIMÁR C I, MAROSVÁRI K A, et al. Effect of storage on physical and functional properties of extracellular vesicles derived from neutrophilic granulocytes[J]. *J Extracell Vesicles*, 2014(3): 25465. Doi: 10.3402/jev.v3.25465.
- [9] CHAROENVIRIYAKUL C, TAKAHASHI Y, NISHIKAWA M, et al. Preservation of exosomes at room temperature using lyophilization[J]. *Int J Pharm*, 2018, 553(1/2): 1-7.
- [10] ZHOU H, YUEN P S, PISITKUN T, et al. Collection, storage, preservation, and normalization of human urinary exosomes for biomarker discovery[J]. *Kidney Int*, 2006, 69(8): 1471-1476.
- [11] KUMEDA N, OGAWA Y, AKIMOTO Y, et al. Characterization of membrane integrity and morphological stability of human salivary exosomes[J]. *Biol Pharm Bull*, 2017, 40(8): 1183-1191.
- [12] WELCH J L, MADISON M N, MARGOLICK J B, et al. Effect of prolonged freezing of semen on exosome recovery and biologic activity[J]. *Sci Rep*, 2017(7): 45034. Doi: 10.1038/srep45034.
- [13] MAROTO R, ZHAO Y X, JAMALUDDIN M, et al. Effects of storage temperature on airway exosome integrity for diagnostic and functional analyses[J]. *J Extracell Vesicles*, 2017, 6(1): 1359478.
- [14] PARK S J, JEON H, YOO S M, et al. The effect of storage temperature on the biological activity of extracellular vesicles for the complement system[J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2018, 54(6): 423-429.
- [15] SOKOLOVA V, LUDWIG A K, HORNUNG S, et al. Characterisation of exosomes derived from human cells by nanoparticle tracking analysis and scanning electron microscopy[J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2011, 87(1): 146-150.
- [16] DEVILLE S, BERCKMANS P, VAN HOOFF R, et al. Comparison of extracellular vesicle isolation and storage methods using high-sensitivity flow cytometry[J]. *PLoS One*, 2021, 16(2): e0245835. Doi: 10.1371/journal.pone.0245835.
- [17] WU J Y, LI Y J, HU X B, et al. Preservation of small extracellular vesicles for functional analysis and therapeutic applications: A comparative evaluation of storage conditions[J]. *Drug Deliv*, 2021, 28(1): 162-170.
- [18] DUAN L S, LIU Y, LI Z Z, et al. The effect of different storage times on the oxygen-carrying capacity of the exosomes of red blood cells[J]. *Adv Clin Exp Med*, 2021, 30(4): 387-394.
- [19] KLASSEN I S, REICHERT L J, DE KAT ANGELINO C M, et al. Quantitative determination of low and high molecular

- weight proteins in human urine: Influence of temperature and storage time[J]. Clin Chem, 1999, 45(3): 430-432.
- [20] CHENG Y R, ZENG Q Y, HAN Q, et al. Effect of pH, temperature and freezing-thawing on quantity changes and cellular uptake of exosomes[J]. Protein Cell, 2019, 10(4): 295-299.
- [21] AISO T, TAKIGAMI S, YAMAKI A, et al. Degradation of serum microRNAs during transient storage of serum samples at 4 °C[J]. Ann Clin Biochem, 2018, 55(1): 178-180.
- [22] JIN Y, CHEN K Y, WANG Z Y, et al. DNA in serum extracellular vesicles is stable under different storage conditions[J]. BMC Cancer, 2016, 16(1): 753. Doi: 10.1186/s12885-016-2783-2.
- [23] GE Q Y, ZHOU Y X, LU J F, et al. miRNA in plasma exosome is stable under different storage conditions[J]. Molecules, 2014, 19(2): 1568-1575.
- [24] AKERS J C, RAMAKRISHNAN V, YANG I, et al. Optimizing preservation of extracellular vesicular miRNAs derived from clinical cerebrospinal fluid[J]. Cancer Biomark, 2016, 17(2): 125-132.
- [25] BAN J J, LEE M, IM W, et al. Low pH increases the yield of exosome isolation[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 461(1): 76-79.
- [26] ZHAO Y, CHEN K Y, LI H N, et al. Effect of pH on the isolation of urinary exosome[J]. Int Urol Nephrol, 2017, 49(1): 165-169.
- [27] PAROLINI I, FEDERICI C, RAGGI C, et al. Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells[J]. J Biol Chem, 2009, 284(49): 34211-34222.
- [28] BIAN Y P, LIU J H. Research progress on lipid-derived exosomes and obesity-induced metabolic inflammation[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2021, 38(8): 1008-1011.
- [29] LIU S L, ZHOU Y L, ZHOU L L, et al. Research progress on exosomes as siRNA delivery carriers[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2021, 38(7): 880-886.
- [30] TAYLOR D D, GERCEL-TAYLOR C. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer[J]. Gynecol Oncol, 2008, 110(1): 13-21.
- [31] CHEN C J, HAN D D, CAI C F, et al. An overview of liposome lyophilization and its future potential[J]. J Control Release, 2010, 142(3): 299-311.
- [32] BOSCH S, DE BEAUREPAIRE L, ALLARD M, et al. Trehalose prevents aggregation of exosomes and cryodamage[J]. Sci Rep, 2016(6): 36162. Doi: 10.1038/srep36162.
- [33] STARK B, PABST G, PRASSL R. Long-term stability of sterically stabilized liposomes by freezing and freeze-drying: Effects of cryoprotectants on structure[J]. Eur J Pharm Sci, 2010, 41(3/4): 546-555.
- [34] LEE M K, KIM M Y, KIM S, et al. Cryoprotectants for freeze drying of drug nano-suspensions: Effect of freezing rate[J]. J Pharm Sci, 2009, 98(12): 4808-4817.
- [35] EVTUSHENKO E G, BAGROV D V, LAZAREV V N, et al. Adsorption of extracellular vesicles onto the tube walls during storage in solution[J]. PLoS One, 2020, 15(12): e0243738. Doi: 10.1371/journal.pone.0243738.

收稿日期: 2021-01-27

(本文责编: 沈倩)