

# Science子刊 | 基于单个胞外囊泡 EVs 的高通量液体活检技术，助力疾病诊断与动态检测

原创令页测序中国 2020-11-28 10:05

## 研究背景

细胞外囊泡 ( EVs ) 是一般小于 1000nm，由被脂质双分子层分隔的细胞中自然释放出来的颗粒。EVs 包括核内体来源的外泌体 ( 30-150nm ) 和质膜来源的微泡。EVs 包含蛋白质、DNA、mRNA 和非编码 RNA ( 如 miRNAs 和 lncRNA )。最新研究表明，**EVs 与肿瘤的起始、发展和转移高度相关，使其成为潜在的癌症检测生物标志物。**例如，癌细胞释放的外泌体 PD-L1 可以通过远程阻断 CD8+ T 细胞上的 PD-1 来促进肿瘤进展。因此，在免疫治疗期间监测外泌体 PD-L1 的表达水平是至关重要的。

作为一种液体活检方法，EVs 具有多种优势，如生物液的丰富性及保护蛋白质和核酸不被其脂质双层膜降解等。然而，由于过小的体积 ( 50-1000nm )，其内蛋白质和核酸的量化十分具有挑战性。近日，来自**上海复旦大学附属中山医院的研究团队开发的高通量纳米生物芯片集成系统液体活检系统 ( High-throughput Nano-bio Chip Integrated System for Liquid Biopsy, HNCIB )**。该技术是**首个能够从 EVs 表面和腔内同时检测和分析多种生物标志物的技术**，有望成为同时检测疾病特异性 EVs 表面蛋白和内部分子的新平台，提供更全面的 EVs 表型和疾病状态信息，提高疾病诊断、治疗动态监测及预后的敏感性、特异性和准确性。

## CANCER

# High-throughput single-EV liquid biopsy: Rapid, simultaneous, and multiplexed detection of nucleic acids, proteins, and their combinations

Jian Zhou<sup>1\*</sup>, Zuoren Wu<sup>2\*</sup>, Jie Hu<sup>1</sup>, Dawei Yang<sup>1</sup>, Xiaoyan Chen<sup>1</sup>, Qin Wang<sup>1</sup>, Jie Liu<sup>1</sup>, Maosen Dou<sup>1</sup>, Wenjun Peng<sup>1</sup>, Yuanyuan Wu<sup>1</sup>, Wenhao Wang<sup>2</sup>, Chenjian Xie<sup>2</sup>, Ming Wang<sup>2</sup>, Yuanlin Song<sup>1</sup>, Hengshan Zeng<sup>2†</sup>, Chunxue Bai<sup>1†</sup>

文章发表在 *Science advances* 上

## 研究内容与结果

### HNCIB 系统单 EV 分析的原理验证

电子显微镜图像和动态光散射 (DLS) 粒度分析证实了目前分离得到的 EVs 主要是外泌体。随后, 研究人员采用 HNCIB 系统对分离的 EVs 进行分析, TIRFM (全内反射荧光显微镜) 图像显示了单个 EV 的数量富集, 说明 HNCIB 系统对 EVs 具有较高的捕获效率。接着利用 HNCIB 系统, 在从人血浆中分离的 EVs 上检测到 CD9 和 CD63 这两种经典的 EV 标记, 而 ALB 和 APOB 这两种非 EV 标记物中的荧光信号极低。**这些结果证实了 HNCIB 系统成功且高效地捕获了 EVs, 以及在单 EV 水平上的高分辨率成像能**

### 验证 HNCIB 系统在 EVs 中的特异性、敏感性和蛋白定位检测

为了验证 HNCIB 系统能够特异、敏感地检测 EVs 上的特异性蛋白表达, 团队进行了多个对照实验:

CD63 和 PD-L1 抗体染色的 EVs 均显示高强度的荧光信号 (信号强度分别是 EV 同型对照的 9 倍和 7 倍), 说明 HNCIB 系统可以特异性检测 EVs 上的 CD63 和 PD-L1 蛋白。

非 EV 标志物 ALB 和 APOB 抗体染色的 EVs 信号相对较低，而 CD9 或 CD63 抗体染色的 EVs 显示高荧光信号（至少是 ALB 或 APOB 染色 EV 的 10 倍）。

对 CD63-GFP（绿色荧光蛋白）表达的 EVs 信号进行一系列稀释，评估 HNCIB 系统的敏感性。即使稀释倍数为 1:1000 时，也能检测到信号，**说明 HNCIB 系统具有较高的灵敏度，能够检测 CD63-GFP 表达的 EVs 的变化。**

研究人员进一步利用 HNCIB 系统证实了 CD63 和 PD-L1 在部分 EV 粒子上共存，并利用 Sobel 边缘检测算法计算出表达这两种蛋白的 EV 亚群在整个 EVs 群体中的比例。

### **同时检测体外 EVs 上 PD-L1 mRNA 和蛋白的表达**

为了验证该技术在体外检测 EVs 上 PD-L1 mRNA 和蛋白表达的变化，研究人员在 A549 细胞中过表达 PD-L1，并利用 HNCIB 系统分析从过表达的细胞中分离得到的 EVs 中的 PD-L1 mRNA 和蛋白。结果表明，PD-L1-A549 细胞 EVs 中 PD-L1 mRNA 和蛋白的表达明显高于载体-A549 细胞。这与 RT-qPCR 和 Western blotting 分析结果一致，**证实了 HNCIB 系统能够同时检测腔内 RNA 和表面膜蛋白。**

### **临床应用**

接着，研究人员招募了 34 名 LUAD（肺腺癌）患者和 35 名健康捐赠者，并使用 HNCIB 系统对肺癌患者血浆中的 EVs 进行检测。既往研究表明，外泌体中 miR-21 可作为肺癌检测的 miRNA 生物标志物，研究发现，与既往研究结果一致，**LUAD 患者 EVs 的 PD-L1 mRNA 及蛋白表达水平均明显高于健康供体 EVs PD-L1 mRNA 及蛋白表达水平。**

值得注意的是，虽然健康供体组和 LUAD 患者组的三个标志物均有统计学差异，但 PD-L1 蛋白在两组间的分离较 PD-L1 mRNA 和 miR-21 的差异更为明显。对于相同的疾病，不同的生物标志物的特异性是不同的，单一的生物标志物可能并不总是足以进行正确的诊断及预后。**同时检测多个生物标志物，将大大提高诊断及预后的准确性。**

## 小结

**该研究开发的 HNCIB 系统使用高通量纳米生物芯片进行高效、定向 EVs 捕获，并使用全内反射荧光显微镜（TIRFM）进行快速、高分辨率检测。**其开发的深度算法可以实现自动化分析，获得关于 mRNA/miRNA 和膜蛋白分布的半定量到定量信息，以及多种蛋白的分配和比例信息。该技术允许快速的单 EV 分析（总分析时间约为 6 小时），并且只需要非常小的样本量即可（约 90 $\mu$ l 血浆）。据悉，**该技术是首个能够从 EVs 表面和腔内同时检测和分析多种生物标志物的技术。**以肺癌为例，该研究证明了 HNCIB 系统能够同时检测 LUAD 患者和健康供体 EVs 的 PD-L1 蛋白和 mRNA/miRNA 表达，可见 HNCIB 系统能够可靠地评估来自临床样本 EVs 中的 miRNA、mRNA 和蛋白表达水平。该技术有望成为能够同时检测疾病特异性 EVs 表面蛋白和内部分子的新平台，有助于提高检测的准确性，提供更全面的 EVs 表型和疾病状态信息，进一步提高疾病诊断、治疗动态监测及预后的敏感性、特异性和准确性。

参考文献：

Zhou J, Wu Z, Hu J, et al. High-throughput single-EV liquid biopsy: Rapid, simultaneous, and multiplexed detection of nucleic acids, proteins, and their combinations. *Sci Adv.* 2020;6(47):eabc1204.