

间充质干细胞来源外泌体的分离及贮存方法研究进展

高雪^{1,2}, 慈小燕^{1,2*}, 张英驰^{2,3}, 闫凤英^{1,2}

1. 药物成药性评价与系统转化全国重点实验室, 天津 300301

2. 天津市细胞技术创新中心, 天津和创生物技术有限公司, 天津 300301

3. 中国医学科学院血液病医院(中国医学科学院血液学研究所)实验血液学国家重点实验室, 天津 300020

摘要: 间充质干细胞来源外泌体(MSCs-Exo)近年来成为替代间充质干细胞发挥治疗作用的研究热点, 良好的外泌体分离和贮存方法是保障获得的外泌体具有稳定的质量和可重复的关键, 也是临床转化的前提。外泌体具有多种分离方式, 包括国际金标准的超速离心法, 改良后的蔗糖密度梯度离心法、超滤法以及微流控技术等。贮存温度和贮存介质是影响外泌体生物学完整性的主要因素。结合当下MSCs-Exo的研究现状及其分离和贮存条件的研究进展进行综述, 以期临床转化研究提供参考。

关键词: 间充质干细胞; 外泌体; 分离方法; 贮存条件; 临床转化

中图分类号: R965.3 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2024)05-1146-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.05.025

Research progress on isolation and storage of exosomes from mesenchymal stem cells

GAO Xue^{1,2}, CI Xiaoyan^{1,2}, ZHANG Yingchi^{2,3}, YAN Fengying^{1,2}

1. State Key Laboratory of Drugability Evaluation and Systematic Translational Medicine, Tianjin 300301, China

2. Center of Tianjin Cell Technology Innovation, Tianjin Hechuang Biotechnology Co., Ltd., Tianjin 300301, China

3. State Key Laboratory of Experimental Hematology, Institute of Hematology and Blood Diseases Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Tianjin 300020, China

Abstract: Mesenchymal stem cell derived exosomes (MSCs-Exo) has become a research hotpot in the field of replace Mesenchymal Stem Cell (MSCs) on the therapeutic recently. A good method of exosome separation and storage is the key to ensure the stable quality and repeatability of the obtained exosomes, and is also the premise of clinical transformation. Exosomes have a variety of separation methods, including international gold standard ultrafiltration method, improved sucrose density gradient centrifugation method, ultrafiltration method and microfluidic technology. Storage temperature and storage medium are the main factors affecting the biological integrity of exosomes. This article reviews the current research status of MSCs-Exo and their isolation and storage conditions in order to provide reference for translational research.

Key words: mesenchymal stem cells; exosome; separation method; storage condition; clinical transformation

间充质干细胞(MSCs)是具有自我复制能力和多向分化潜能的成体干细胞, 可以从多种组织中获得^[1]。其具有较强的免疫调控和再生功能^[2], 在自身免疫性疾病、炎症性疾病和退行性疾病的治疗中具有不可替代的作用^[3]。MSCs虽然临床前研究较多, 但想要作为药品被批准上市仍面临如MSCs临

床药效稳定性等许多巨大挑战^[4]。随着研究的深入, 研究者们发现MSCs主要通过旁分泌发挥功能, 而外泌体是MSCs旁分泌的主要物质。

外泌体是一种具有双层脂质膜结构的直径在30~150 nm间的纳米级囊泡, 富含功能蛋白、脂质和核酸(mRNA及miRNA)等丰富的生物信号, 是进

收稿日期: 2024-01-14

基金项目: 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目(2019-I2M-5-020); 天津市科技计划项目: 细胞产品开发和临床应用的研究(22ZYJDSY00150); 天津市科技计划项目: 细胞制品的成药性及转化研究(23ZGCXQY00050)

第一作者: 高雪, 女, 助理研究员, 主要从事间充质干细胞研发。E-mail: gaoxue@tipr.com.cn

*通信作者: 慈小燕, 女, 副研究员, 主要从事间充质干细胞研发。E-mail: cixy@tipr.com.cn

行细胞间通讯,调控细胞行为的重要介质^[5]。间充质干细胞来源外泌体(MSCs-Exo)能够模拟并发挥MSCs的功能,可将其内容物释放至靶细胞,从而改变靶细胞内的信号传导及基因表达情况,有效促进组织再生,调节损伤部位的局部免疫反应^[6]。且MSCs-Exo易于提取和贮存,具有极低的免疫原性和良好的生物相容性,可高效穿透细胞质膜、血脑屏障等主要生物屏障,且使用时无栓塞、致瘤等风险^[7]。因此,MSCs-Exo在调节免疫反应,组织修复,癌症治疗以及作为天然药物载体等研究中扮演重要角色。尤其是靶向性和效应性更强的工程化MSCs-Exo,作为纳米级别的非细胞治疗手段,在临床治疗方面展现出了巨大的应用潜力和更高的成药性^[8]。以MSCs-Exo为检索关键词,在美国临床试验数据库(clinicaltrials.gov)中共检索出12项相关的临床项目,其中,试验方向主要集中于应用MSCs-Exo作为药物在阿尔茨海默病、肺部感染、急性呼吸窘迫综合征、新冠病毒感染、干眼症等疾病方面的治疗。

虽然目前利用外泌体治疗疾病的探索性研究较多,但由于外泌体具有较高的生物异质性,缺乏标准化的分离及贮存方法,不具备完善的质量检测方法和标准等缺陷,限制了MSCs-Exo的临床转化速度和质量。如何稳定、可重复且规模化地生产符合良好生产规范(GMP)的MSCs-Exo,是进行临床应用前必须解决的关键问题。其中,良好的外泌体分离和贮存方法是保障获得的外泌体具有稳定的质量和可重复的关键。本文就外泌体分离和贮存方法的相关进展进行归纳总结,并探讨了该研究领域存在的问题及未来的研究方向。

1 外泌体的分离

外泌体具有独特的理化性质,密度为 $1.13\sim 1.19\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$,由平均厚度小于 5 nm 的双层脂膜包裹,具有典型杯状形态,呈现为扁平球形^[9-10]。MSCs-Exo直径一般为 $30\sim 150\text{ nm}$,远小于MSCs($15\sim 25\text{ }\mu\text{m}$)。外泌体固有的异质性、细胞上清成分的复杂性以及纳米级污染物的存在使得MSCs-Exo的分离成为其产业化应用的巨大挑战。目前外泌体分离的主要方法有7种,包括超速离心法、蔗糖密度梯度离心法、超滤法、免疫亲和捕获法、聚合物沉淀法、尺寸排阻色谱以及微流控技术,本文将每种方法的原理和优缺点进行了整理归纳。

1.1 超速离心法

由Raposo等^[11]在1996年首次提出,原理是利

用细胞其他成份和外泌体的密度不同,在逐步增加转速,或低转速和高转速条件下交替进行离心,除去大的生物颗粒、凋亡小体、细胞碎片以及蛋白质,最终得到外泌体。超速离心法分离外泌体是国际上公认的金标准,也是目前最常用的外泌体分离和浓缩方法。然而超速离心法分离外泌体仍存在分离操作费时费力,仪器规格要求高等缺点^[12]。

1.2 蔗糖梯度密度离心法

为进一步除去存在的污染蛋白,提高外泌体得率,Gupta等^[13]利用在特定密度的物质将悬浮在类似密度的介质中的原理,提出利用2步超速离心法,即在一部超速离心去除细胞及细胞碎片的基础上,将与样品中不同成分的密度相似的蔗糖溶液($5\%\sim 90\%$)逐层放入离心管,然后高转速长时间的离心。利用蔗糖溶液密度($1.2\sim 1.8\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$)与外泌体的密度($1.15\sim 1.19\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$)相当,维持外泌体的完整性,除去高密度的污染蛋白。蔗糖梯度密度离心法得到的外泌体较为纯净,但也存在需要高转速的仪器以及无法分离与外泌体密度相似的细胞外囊泡等条件限制^[14]。

1.3 超滤法

如前文所述,外泌体是具有纳米结构的一类细胞外囊泡,因此可以利用具有不同的截留相对分子质量(MWCO)的超细纳米过滤膜从细胞培养液中分离外泌体^[15]。通过调整MWCO的大小,实现提取高纯度、多亚群、结构完整的外泌体,并极大缩短外泌体的提取时间,且不需昂贵的大型设备以及经过培训的技术人员,为外泌体的功能研究和药物开发提供有利条件。但在超滤过程中存在样品堵塞滤膜的现象,导致样品损失、外泌体得率低,且滤膜具有不可重复使用的局限性^[16]。

1.4 免疫亲和捕获法

利用特定的外泌体标志物,通过抗原抗体相结合的方式分离特定来源的外泌体。外泌体的标记物如溶酶体相关膜蛋白-2B、跨膜蛋白、热休克蛋白、融合蛋白以及脂质相关蛋白已经被总结记录^[17-18],其中CD81、CD63、CD9以及annexin等跨膜蛋白已经被广泛应用于选择性分离外泌体^[19]。与传统超速离心法相比,免疫亲和捕获法具有效率高、时间短的优势。但在将外泌体与抗体分离的过程中,使用的洗脱液可能会影响收集外泌体的生物功能,只适用于微量样品分析。

1.5 聚合物共沉淀法

在溶液中加入溶剂改变某些成分的极性和溶

解度,使它们沉淀到溶液中^[20]。如聚乙二醇作为无毒不含水的高度亲水性聚合物,在提取外泌体的过程中与外泌体周围的水分子相互作用,产生疏水的微环境,使外泌体沉淀^[21]。目前用于外泌体分离的聚乙二醇相对分子质量在6 000~20 000,首先需将样品进行离心预处理,以去除细胞碎片、凋亡小体等颗粒较大的污染物,后将样品与聚乙二醇在4 ℃条件下过夜孵育,后在1 500×g条件下进行外泌体的收集^[22]。

聚合物共沉淀法收集的外泌体具有产量高、无需大型设备等优点,但由于聚合物除了沉淀外泌体,也可使小分子的蛋白质、核酸等污染物沉淀,因此存在非常高的污染机率,并影响外泌体的下游检测^[23]。

1.6 尺寸排阻色谱法

Lee等^[24]首次利用尺寸排阻色谱法分离来自骨髓MSCs培养液的外泌体。色谱柱的固定相由多孔颗粒组成,当液体样品流通时,可根据分子大小进行外泌体的聚集,流体力学半径小于固定相的颗粒在固定相停留时间较短,而不能进入固定相空隙较大的颗粒表现较长的停留时间,从而得到结构完整的外泌体颗粒。

相较于传统的高速离心和等密度梯度离心等收集外泌体的方法,尺寸排阻色谱法具有多重优点:(1)可进行微量分离,目前商业化的试剂盒允许最低样品分离体积达到500 μL;(2)收集外泌体的步骤简单,无需预处理步骤;收集时间短,可在15 min内完成;(3)调整固定相材料孔径可分离纯化多种外泌体亚群;(4)样品与固定相不发生相互作用,没有样品损失并保持较高的回收效率。但尺寸排阻色

谱法存在与外泌体的尺寸类似的蛋白质或微囊泡结构,存在蛋白质污染等问题,且通量不高。

1.7 微流控技术

随着不同学科技术的发展和交叉应用,用微流控技术分离外泌体应运而生,利用尺寸致密体的物理和生化特性对外泌体进行微尺度的分离,检测和分析^[25]。微流体技术一步完成外泌体的分离和鉴定,丰富了外泌体在临床研究中的疾病诊断前景^[26]。

基于不同分离原理,微流控方法分离外泌体的技术不断被优化。如基于免疫亲和捕获法分离外泌体的原理,Chen等^[27]首创一种利用CD63抗体快速分离外泌体的微流控免疫亲和装置,实现从10 μL的细胞培养液和血清中高效分离外泌体。基于在通道体积一定时,提高抗体固定表面积可获得更多的外泌体,Zhang等^[28]开发一种以氧化石墨烯/聚多巴胺纳米界面为特征的流体系统,结果表明,CD81微流体系统在外泌体收集的效率和纯度方面都较普通微流控系统更高。

1.8 小结

生物液体复杂的组分和目的不同的下游研究限制了外泌体分离方法的高度统一性^[29]。研究表明,与试剂盒提取相比,超速离心法提取的UC-MSCs外泌体纯度相对更高,满足实验需求^[30]。这也是目前获得较高纯度MSCs-Exo的相对普适方法。国际细胞外囊泡协会(ISEV)在2018年发布了《细胞外囊泡研究共识》,指出就外泌体分离而言,回收率和特异性是公认的2个基本要求^[31]。外泌体的分离方法比较见表1。

表1 外泌体的分离方法比较

Table 1 Comparison of exosome separation methods

收集方法	分离原理	优势	缺点
超速离心法	密度	高纯度,标准方法,国际金标准	时间长,样本体积大,需要超速离心机
蔗糖密度梯度离心法	密度	高纯度,得率高	时间长,样本体积大,需要超速离心机
超滤法	尺寸和相对分子质量	适用范围广,多种洗脱剂可用	时间长,需特殊设备
免疫亲和捕获法	抗原抗体特异性结合	高纯度,方便下游分析	只能收集到含有特定蛋白标记的外泌体
聚合物共沉淀法	表面电荷	高纯度,适用于各种体积样本	特异性差,可能含有污染性蛋白;成本高
尺寸排阻色谱法	尺寸	适用范围广	时间长,不适用于大样本体积
微流控技术	物理化学和生物化学性质	高纯度	低通量

2 外泌体的贮存

外泌体是有双层脂膜的囊泡结构,可保护内部生物分子的结构完整性和生物学活性。但提取后的外泌体的完整性和生物活性会受到贮存温度和

贮存介质的影响^[32]。

2.1 贮存温度

目前,外泌体最常用的储存方法为低温保存,但是不同低温条件对于外泌体的形态与物理性质

的改变、对多层囊泡的形成和聚集有不同影响,且反复冻融会导致外泌体表面分子的生物特性、含量和标志物组成发生变化^[33]。

由于外泌体表面静电斥力的存在,使其保持相对独立的状态,因此电位是评价外泌体稳定性的重要参数^[34]。细胞外基质中的扩散速率与分子粒径呈反比,外泌体发挥作用很可能与其粒径有关^[35]。新鲜制备的外泌体的电位在 $-34.8\sim-32.4$ mV,研究证明,外泌体从 -80 °C解冻后,电位降低到 $-16.5\sim-9.88$ mV,其粒径增加约30%,数量减少,表明 -80 °C的保存条件会引起外泌体的聚集, 4 °C的短期储存虽然免于外泌体反复冻融对脂质膜的破坏,也是短期维持蛋白质活性的最佳温度,但研究证明, 4 °C条件保存外泌体4 d后致使其粒径增加且312个蛋白质降解造成生物学功能损失^[36]。

2013年ISEV对外泌体的储存做出指南:建议将外泌体储存在装有磷酸盐缓冲溶液的硅化容器中并于 -80 °C保存^[37]。Qin等^[38]总结了 37 、 4 、 -20 、 -70 、 -80 °C 5种条件储存温度对外泌体的形态、粒径、颗粒数、内容物以及生物学功能五方面的影响,发现不同的贮存温度对外泌体的形态和内容物均有一定程度的破坏。且研究表明,长期贮存在磷酸盐缓冲溶液的外泌体回收率大幅度下降。因此在2018年更新的最新指南中,ISEV不再对外泌体的储存条件做出建议。

2.2 贮存介质

截至目前, -80 °C保存被公认是外泌体最佳的保存环境。在 -80 °C的低温保存中水冻结成为冰晶,可物理破坏外泌体的磷脂双分子层,同时导致溶解在剩余液相中的溶质浓度增加^[39]。含有低温冷冻剂的外泌体保存方法为玻璃化冷冻,通过低温冷冻剂的存在使溶液低于玻璃化转变温度,从而产生非晶基质,避免冰晶形成,从而减少对外泌体完整结构的损伤^[40]。且对比有无贮存介质的外泌体数量后发现,在没有贮存介质的条件下,低温贮存会损伤外泌体^[41]。低温冷冻剂的使用原则为低毒性以及不能造成非渗透性损伤,目前按照低温冷冻剂的作用方式不同,可分为2类:(1)渗透性低温冷冻剂,主要包括甘油、二甲基亚砷(DMSO)和丙二醇;(2)非渗透性低温冷冻剂主要为糖类(海藻糖)。

渗透性低温冷冻剂的研究中,甘油的存在与否对外泌体回收率影响不大,但DMSO的存在会提高外泌体的回收率^[42]。DMSO可提高细胞膜的通透性,在冷冻前将细胞内水分透出细胞外,减少胞内

水分形成冰晶对细胞的伤害。 10% 和 20% 的DMSO可保存样本中一定比例的外泌体使其大小和形态维持稳定^[43]。

海藻糖作为非渗透性低温冷冻剂的代表,是一种天然的非还原性双糖,具有稳定蛋白质、细胞膜和脂质体的生物保护作用^[44]。海藻糖作低温保护剂主要基于2个原理:(1)海藻糖在低温状态下转变成具有极高黏性的玻璃化状态,像茧一样将细胞膜的蛋白质分子固定;(2)海藻糖可以破坏水分子网络,防止细胞内水分子形成冰晶。保存温度相同的情况下,与不加海藻糖作为低温冷冻剂相比,海藻糖的存在保护外泌体形态完整,避免外泌体聚集。

2.3 小结

生物学结构完整的MSCs-Exo是发挥其生物学功能的基础。但在实际应用中,外泌体的贮存条件导致的外泌体数量、尺寸、电位、表面蛋白以及内容物等发生变化,成为限制MSCs-Exo临床转化的主要原因之一。外泌体质量控制标准的缺乏和分析技术的不一致限制了其储存研究的发展,导致经常会出现相互驳斥的结论,比如Sokolova等^[45]发现,纳米颗粒跟踪分析技术(NTA)和电镜分析表明,在 -20 °C条件下10次以内的冻融对外泌体的数量没有影响;而Jayachandran等^[46]报告通过流式细胞术检测后发现,单次冻融可使外泌体的数量降低 $10\%\sim 15\%$ 。Görgens等^[38]通过比较不同细胞来源的外泌体的储存方法,得出外泌体保存在含有人血清白蛋白和海藻糖的PBS缓冲液中,在 -80 °C中可进行短期或长期(2年)的保存。此外,外泌体作为纳米级囊泡,易于吸附在常规容器的内壁。为减少吸附所带来的样本损失,外泌体制剂应采用低吸附、对其关键质量属性无影响的材料和容器保存。

3 结语

近年来,MSCs-Exo成为了精准医疗和转化医学的研究热点。除本身对疾病治疗产生的积极影响外,MSCs-Exo还可作为药物载体发挥功能。与传统的药物递送系统相比,外泌体作为天然载体具有以下优势:(1)作为细胞产物,具有良好的生物相容性,免疫排斥反应小;(2)可通过工程化修饰提高有效药物浓度或搭载miRNA,实现精准靶向治疗;(3)体积小,且脂质膜上存在的信号传导分子和黏附分子等物质,有助于其跨越生理屏障,实现中枢神经系统疾病的治疗。

获得高纯度的MSCs-Exo的提取方法和维持其生物学功能完整性的贮存条件,是行使其正常功能

的基础。由于外泌体、脂蛋白以及其他细胞外囊泡之间的物理化学和生物化学性质重叠,因此很难开发一种分离外泌体的技术应用于所有的研究,分离方法的选择与下游应用密切相关,但高回收率和高特异性是两个基本要求。此外,还需考虑操作的复杂程度、成本、生物活性及通量等问题。此外,研究者要根据自身产品特点和下游用途,选择适合的储存条件,其中贮存温度、贮存介质是影响外泌体储存稳定性的主要因素。目前关于外泌体的最佳保存条件仍在探索中,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 °C储存的外泌体未经冻融,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,生物活性也会随之快速降低,适用于短期储存;相比之下,-80 °C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,较适合长期储存,但在过程中切忌将外泌体反复冻融。

为了满足MSCs-Exo临床应用的需要,推动MSCs-Exo产业的进一步发展,需实现其GMP级标准化生产、分离和存储。此外,亟需具有公信力和科学性的外泌体的质量评价行业标准或共识来对外泌体的质量进行科学合理的评价。MSCs-Exo研究和转化的瓶颈问题,迫切需要不同领域的科学家、评审专家和工程师共同的探讨和努力。本文主要从外泌体分离和贮存两个方面出发,对目前国内外的相关研究结果和进展进行了综述,将不同方法的原理和优缺点进行了整理和总结,以期为后续研究提供参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Naji A, Eitoku M, Favier B, et al. Biological functions of mesenchymal stem cells and clinical implications [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2019, 76(17): 3323-3348.
- [2] Bacakova L, Zarubova J, Travnickova M, et al. Stem cells: their source, potency and use in regenerative therapies with focus on adipose-derived stem cells: A review [J]. *Biotechnol Adv*, 2018, 36(4): 1111-1126.
- [3] Fu X, Liu G, Halim A, et al. Mesenchymal stem cell migration and tissue repair [J]. *Cells*, 2019, doi: 10.3390/cells8080784.
- [4] Zhou T, Yuan Z, Weng J, et al. Challenges and advances in clinical applications of mesenchymal stromal cells [J]. *J Hematol Oncol*, 2021, doi: 10.1186/s13045-021-01037-x.
- [5] Babaei M, Rezaie J. Application of stem cell-derived exosomes in ischemic diseases: Opportunity and limitations [J]. *Biotechnol Biopro Engin*, 2021, doi: 10.1186/s12967-021-02863-w.
- [6] Muthu S, Bapat A, Jain R, et al. Exosomal therapy-a new frontier in regenerative medicine [J]. *Stem Cell Investig*, 2021, doi: 10.21037/sci-2020-037.
- [7] 王华. 间充质干细胞及其来源的胞外囊泡[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2023, 39(3): 354-363.
Wang H. Mesenchymal stem cells and mesenchymal stem cells derived extracellular vesicles [J]. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2023, 39(3): 354-363.
- [8] Keshtkar S, Azarpira N, Ghahremani M H. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: novel frontiers in regenerative medicine [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2018, doi: 10.1186/s13287-018-0791-7.
- [9] Skotland T, Hessvik N, Sandvig K, et al. Exosomal lipid composition and the role of ether lipids and phosphoinositides in exosome biology [J]. *J Lipid Res*, 2019, 60(1): 9-18.
- [10] Bellingham S, Guo B, Coleman B, et al. Exosomes: vehicles for the transfer of toxic proteins associated with neurodegenerative diseases? [J]. *Front Physiol*, 2012, doi: 10.3389/fphys.2012.00124.
- [11] Raposo G, Nijman H W, Stoorvogel W, et al. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles [J]. *J Exp Med*, 1996, 183(3): 1161-1172.
- [12] Langevin S, Kuhnell D, Orr-Asman M, et al. Balancing yield, purity and practicality: A modified differential ultracentrifugation protocol for efficient isolation of small extracellular vesicles from human serum [J]. *RNA Biol*, 2019, 16(1): 5-12.
- [13] Gupta S, Rawat S, Arora V, et al. An improvised one-step sucrose cushion ultracentrifugation method for exosome isolation from culture supernatants of mesenchymal stem cells [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2018, doi: 10.1186/s13287-018-0923-0.
- [14] Tran P, Wang T, Yin W, et al. Aspirin-loaded nanoexosomes as cancer therapeutics [J]. *Int J Pharm*, 2019, doi: 10.1016/j.ijpharm.2019.118786.
- [15] He L, Zhu D, Wang J, et al. A highly efficient method for isolating urinary exosomes [J]. *Int J Mol Med*, 2019, 43(1): 83-90.
- [16] Soda N, Rehm B, Sonar P, et al. Advanced liquid biopsy technologies for circulating biomarker detection [J]. *J Mater Chem B*, 2019, 7(43): 6670-6704.
- [17] Zhang Y, Liu Y, Liu H, et al. Exosomes: Biogenesis, biologic function and clinical potential [J]. *Cell Biosci*,

- 2019, doi: 10.1186/s13578-019-0282-2.
- [18] Smolarz M, Pietrowska M, Matysiak N, et al. Proteome profiling of exosomes purified from a small amount of human serum: The problem of co-purified serum components [J]. *Proteomes*, 2019, doi: 10.1186/s13578-019-0282-2.
- [19] Liu C, Su C J T. Design strategies and application progress of therapeutic exosomes [J]. *Theranostics*, 2019, 9(4): 1015-1028.
- [20] Menon R, Dixon C L, Sheller-Miller S, et al. Quantitative proteomics by SWATH-MS of maternal plasma exosomes determine pathways associated with term and preterm birth [J]. *Endocrinology*, 2019, 160(3): 639-650.
- [21] García-Romero N, Madurga R, Rackov G, et al. Polyethylene glycol improves current methods for circulating extracellular vesicle-derived DNA isolation [J]. *J Transl Med*, 2019, doi: 10.1186/s12967-019-1825-3.
- [22] Dou Y, Kong P, Li C, et al. Smooth muscle SIRT1 reprograms endothelial cells to suppress angiogenesis after ischemia [J]. *Theranostics*, 2020, 10(3): 1197-1212.
- [23] Kimura T, Ferran B, Tsukahara Y, et al. Production of adeno-associated virus vectors for *in vitro* and *in vivo* applications [J]. *Sci Rep*, 2019, doi: 10.1038/s41598-019-49624-w.
- [24] Lee C, Mitsialis S A, Aslam M, et al. Exosomes mediate the cytoprotective action of mesenchymal stromal cells on hypoxia-induced pulmonary hypertension [J]. *Circulation*, 2012, 126(22): 2601-2611.
- [25] Gholizadeh S, Shehata Draz M, Zarghooni M, et al. Microfluidic approaches for isolation, detection, and characterization of extracellular vesicles: Current status and future direction [J]. *Biosens Bioelectron*, 2017, 91: 588-605.
- [26] Zhang P, Zhou X, He M, et al. Ultrasensitive detection of circulating exosomes with a 3D-nanopatterned microfluidic chip [J]. *Nat Biomed Eng*, 2019, 3(6): 438-451.
- [27] Chen C, Skog J, Hsu C, et al. Microfluidic isolation and transcriptome analysis of serum microvesicles [J]. *Lab Chip*, 2010, 10(4): 505-511.
- [28] Zhang P, He M, Zeng Y. Ultrasensitive microfluidic analysis of circulating exosomes using a nanostructured graphene oxide/polydopamine coating [J]. *Lab Chip*, 2016, 16(16): 3033-3042.
- [29] Chen B, Sung C, Chen C, et al. Advances in exosomes technology [J]. *Clin Chim Acta*, 2019, 493: 14-19.
- [30] 郭莹. 人脐带间充质干细胞来源外泌体提取方法的比较[J]. *中国组织工程研究*, 2018, 22(9): 1382-1388.
- Ying G. Comparison of exosome extracting methods from human umbilical cord mesenchymal stem cells [J]. *Chin J Tiss Eng Res*, 2018, 22(9): 1382-1388.
- [31] Théry C, Witwer K W, Aikawa E, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): A position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines [J]. *J Extracell Vesic*, 2018, 7(1): 1535750.
- [32] Zhang Y, Bi J, Huang J, et al. Exosome: A review of its classification, isolation techniques, storage, diagnostic and targeted therapy applications [J]. *Int J Nanomed*, 2020, 15: 6917-6934.
- [33] Qin B, Zhang Q, Hu X, et al. How does temperature play a role in the storage of extracellular vesicles? [J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(11): 7663-7680.
- [34] Ruzicka-Ayoush M, Nowicka A, Kowalczyk A, et al. Exosomes derived from lung cancer cells: Isolation, characterization, and stability studies [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2023, doi: 10.1016/j.ejps.2022.106369.
- [35] Wu Y, Deng W, Klinke D J T A. Exosomes: improved methods to characterize their morphology, RNA content, and surface protein biomarkers [J]. *Analyst*, 2015, 140(19): 6631-6642.
- [36] Maroto R, Zhao Y, Jamaluddin M, et al. Effects of storage temperature on airway exosome integrity for diagnostic and functional analyses [J]. *J Extracell Vesic*, 2017, 6(1): 1359478.
- [37] Witwer K W, Buzás E I, Bemis L T, et al. Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research [J]. *J Extracell Vesicles*, 2013, doi: 10.3402/jev.v2i0.20360.
- [38] Görgens A, Corso G, Hagey D, et al. Identification of storage conditions stabilizing extracellular vesicles preparations [J]. *J Extracell Vesic*, 2022, 11(6): e12238.
- [39] 杜凯丽, 孙晓东, 唐晓华, 等. 两种试剂盒提取法对血浆外泌体质量的影响 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2020, 36(4): 330-336.
- Du K L, Sun X D, Tang X H, et al. Effects of storage temperature and time on quality of plasma exosomes extracted by ExoQuick and Umibio kits [J]. *Chin J Cell Mol Immunol*, 2020, 36(4): 330-336.
- [40] Levy D, Jeyaram A, Born L, et al. Impact of storage conditions and duration on function of native and cargo-loaded mesenchymal stromal cell extracellular vesicles [J]. *Cytherapy*, 2023, 25(5): 502-509.
- [41] Charoenviriyakul C, Takahashi Y, Nishikawa M, et al. Preservation of exosomes at room temperature using lyophilization [J]. *Int J Pharm*, 2018, 553: 1-7.
- [42] 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.
- [43] Wu Y, Deng W, Klink D J, 2nd. Exosomes: improved methods to characterize their morphology, RNA content, and surface protein biomarkers [J]. *Analyst*, 2015, 140 (19): 6631-6642.
- [44] Hu Y, Liu X, Liu F, et al. Trehalose in biomedical cryopreservation-properties, mechanisms, delivery methods, applications, benefits, and problems [J]. *ACS Biomater Sci Eng*, 2023, 9(3): 1190-1204.
- [45] Sokolova V, Ludwig A, 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.
- [46] Jayachandran M, Miller V, Heit J, et al. Methodology for isolation, identification and characterization of microvesicles in peripheral blood [J]. *J Immunol Methods*, 2012, 375: 207-214.

[责任编辑 李红珠]