

• 生物技术与方法 •

人脐血血浆外泌体提取方法的比较

叶俊杰^{1,2,3,4}, 孙晓东^{1,2,3,4}, 袁乐永^{1,5}, 冯胜蓝^{1,2,3,4}, 覃冰清^{1,2,3,4}, 许倩倩^{1,2,3,4}, 谢丽霞^{1,2,3,4}, 桑明^{1,2,3,4}

- 1 湖北医药学院 基础医学院, 湖北 十堰 442000
- 2 湖北医药学院 附属襄阳市第一人民医院转化医学中心, 湖北 襄阳 441000
- 3 湖北省帕金森病临床研究中心, 湖北 襄阳 441000
- 4 湖北医药学院 武当特色中药研究湖北省重点实验室, 湖北 十堰 442000
- 5 南方科技大学医院, 广东 深圳 518000

叶俊杰, 孙晓东, 袁乐永, 冯胜蓝, 覃冰清, 许倩倩, 谢丽霞, 桑明. 人脐血血浆外泌体提取方法的比较. 生物工程学报, 2022, 38(6): 2342-2351.

YE JJ, SUN XD, YUAN LY, FENG SL, QIN BQ, XU QQ, XIE LX, SANG M. Comparison of the extraction methods of plasma exosomes from human umbilical cord blood. Chin J Biotech, 2022, 38(6): 2342-2351.

摘要: 为探寻高效且稳定的提取人脐血血浆外泌体的方法, 利用超高速离心法、蔗糖垫密度梯度离心法、改良超速离心法和聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 沉淀法提取人脐血血浆外泌体, 并比较 4 种方法的优劣。利用透射电镜、动态光散射技术观察外泌体的形态、结构及大小; 聚氰基丙烯酸正丁酯 (bicinchoninic acid, BCA) 法测定外泌体蛋白总量; Western blotting 检测外泌体表面标志蛋白 CD63、HSP70 以及外泌体阴性蛋白 GM130 (高尔基标志蛋白) 的表达。结果表明, 与提取外泌体的“金标准”, 即超高速离心法相比, 蔗糖垫密度梯度离心法稳定性好, 获取的外泌体粒径较均一, 但操作较复杂, 耗时长; 改良超速离心法操作较简单, 纯度较高; PEG 沉淀法提取的外泌体蛋白量最高, 操作时间最短, 但杂质较多。结果表明, 4 种方法均能从人脐血血浆中获取外泌体, 但在操作时间、纯度、提取量等方面存在一定差异。因此, 应根据实验目的和具体要求选择合适的提取人脐血血浆外泌体的方法。

Received: December 12, 2021; **Accepted:** February 22, 2022

Supported by: Hubei Province Innovation Project of Science and Technology Cooperation with Foreign Countries, China (2019AHB068); The Experimental Animal Resources Development and Utilization Project of Hubei Province, China (2020DFE025); Hubei Provincial Key Laboratory of Wudang Traditional Chinese Medicine Research (Hubei University of Medicine) Open Project, China (WDCM2021011); The Innovative Team Project from the Institute of Medicine and Nursing at Hubei University of Medicine (2017YHKT02); Key Project of Medical and Health Science and Technology Plan of Xiangyang Science and Technology Bureau, China (2020YL26)

Corresponding author: SANG Ming. E-mail: smxd2000@126.com

基金项目: 湖北省对外科技合作项目 (2019AHB068); 湖北省实验动物资源开发及利用项目 (2020DFE025); 武当特色中药研究湖北省重点实验室 (湖北医药学院) 开放课题 (WDCM2021011); 湖北医药学院药护学院团队项目 (2017YHKT02); 襄阳市科技局医疗卫生领域科技计划重点项目 (2020YL26)

关键词：外泌体；超高速离心法；蔗糖垫密度梯度离心法；改良超速离心法；聚乙二醇沉淀法；脐血血浆

Comparison of the extraction methods of plasma exosomes from human umbilical cord blood

YE Junjie^{1,2,3,4}, SUN Xiaodong^{1,2,3,4}, YUAN Leyong^{1,5}, FENG Shenglan^{1,2,3,4},
QIN Bingqing^{1,2,3,4}, XU Qianqian^{1,2,3,4}, XIE Lixia^{1,2,3,4}, SANG Ming^{1,2,3,4}

1 Institute of Basic Medical Science, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, Hubei, China

2 Center for Translational Medicine, Xiangyang No.1 People's Hospital, Hubei University of Medicine, Xiangyang 441000, Hubei, China

3 Hubei Clinical Research Center of Parkinson's Disease, Xiangyang 441000, Hubei, China

4 Hubei Key Laboratory of Wudang Local Chinese Medicine Research, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, Hubei, China

5 Southern University of Science and Technology Hospital, Shenzhen 518000, Guangdong, China

Abstract: We compared ultracentrifugation, sucrose gradient centrifugation, improved ultracentrifugation, and polyethylene glycol (PEG) precipitation in the extraction of plasma exosomes from human umbilical cord blood, aiming at screening out a stable and efficient method. The morphology, structure, and size of exosomes were observed based on transmission electron microscopy and dynamic light scattering. Total protein content of exosomes was determined by bicinchoninic acid (BCA) assay, and the expression of exosome markers CD63 and HSP70 and exosome negative marker GM130 (Golgi marker) by Western blotting. Results showed that sucrose gradient centrifugation was more stable and yielded exosomes of uniform particle size compared with ultracentrifugation which had been considered as the “gold standard” for exosome extraction. However, sucrose gradient centrifugation had the limitations of complex operation and time-intensiveness. The improved ultracentrifugation featured ease of implementation and the extracted exosomes were of high purity. PEG precipitation extracted the most exosomes in a shorter timeframe, but the purity of the exosomes was low. In conclusion, all the four methods can separate exosomes from human umbilical cord blood plasma, but they are different in operation time, product purity, and product content. Therefore, the method for extracting plasma exosomes from human umbilical cord blood should be selected based on the experimental purpose and specific requirements.

Keywords: exosomes; ultracentrifugation; sucrose gradient centrifugation; improved ultracentrifugation; PEG precipitation; umbilical cord blood plasma

外泌体是一种包裹有大量蛋白质、脂质、各种 RNA 以及 DNA 等物质的胞外囊泡结构，直径

在 30–150 nm 左右，密度为 1.13–1.19 g/mL^[1-2]。外泌体由内体膜内陷产生^[3]，其存在于人体多

种体液中,例如血液、脑脊液、尿液、支气管肺泡灌洗液、乳汁等^[4],并通过自分泌、旁分泌的方式作用于临近细胞,或通过血液循环传递至远端细胞,介导细胞间的物质交换与信息交流^[1]。同时,外泌体可以参与体内多种生物学过程,在免疫调节^[5]、肿瘤细胞凋亡与迁徙^[5-7]、病毒感染与传播^[8]、炎症反应、神经修复等过程中发挥着关键作用^[9]。此外,由于外泌体为较小的脂质双分子层结构,可作为药物递送载体,提高药物吸收率^[10-11]。

脐带血在胎儿娩出后往往和脐带及胎盘一起被视为医疗废物,脐带血易于采集,对供体无伤害,且脐带血免疫细胞处于原始阶段,脐带血间充质干细胞具有免疫原性低、移植后免疫排斥反应发生率低等优点^[12]。因此,越来越多的研究人员开始对脐带血中的资源进行挖掘和利用。目前应用最多的依然是干细胞移植,可用来治疗多种血液系统疾病、免疫系统疾病和先天性代谢疾病等^[13-15],在帕金森病、肝病、软骨软化症、阿尔兹海默症、退行性关节炎、糖尿病等疾病领域也有涉及^[16]。在分离脐带血中单个核细胞的同时,脐带血血浆也是可利用的难得资源,其中包含蛋白、酶以及细胞分泌的活性分子等成分,也包括外泌体(exosomes)。从人脐血血浆中分离纯化出的外泌体(human umbilical cord blood plasma-derived exosomes, UCB-Exos)兼顾免疫原性低和纳米载体的特征,具有巨大的应用潜力^[17]。然而,目前关于UCB-Exos的分离提取尚无经过验证的确定方法。超高速离心法是最常用的方法^[18],也是外泌体提取的“金标准”,蔗糖垫密度梯度离心法、改良超速离心法和聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)沉淀法也是常用的外泌体提取方法^[19-20]。本研究比较了这4种方法提取的UCB-Exos的质量差异,为进一步研究UCB-Exos提供了支持。

1 材料与方法

1.1 材料

实验采集的3例健康产妇的脐带血均来自本院产科,经产妇及家属签订知情同意后收集。本实验经襄阳市第一人民医院医学伦理委员会审查批准后开展(审批号:XYYYE20210009)。

Pierce™ BCA 蛋白检测试剂盒(23227)购自 Thermo Scientific™ 公司; GM130 Polyclonal Antibody (11308-1-AP) 和 HSP70 Polyclonal Antibody (10995-1-AP) 购自武汉三鹰生物技术有限公司; CD63 Monoclonal Antibody (abs149061) 购自爱必信公司; HRP 标记的山羊抗小鼠(115-035-003)和山羊抗兔(111-035-003)的二抗购自 Jackson ImmunoResearch 公司; PEG6000 (25322-68-3) 购自 Sigma 公司; 10 kDa 离心过滤装置(UFC9010) 购自默克公司; 0.22 μm 滤膜(SLGP033RB) 购自 MILLEX GP 公司; 全自动凝胶成像仪(1708195) 购自 Bio-Rad 公司; 纳米粒径分析仪(Nano ZS90) 购自马尔文公司; 超速离心机(Optima XPN-100) 购自 Beckman 公司。

1.2 方法

1.2.1 临床脐带血血浆的分离

三名健康孕妇分娩后留取脐带全血,4℃、800×g 离心 10 min,分离出上层血浆,然后依次经过 4℃、3 000×g 离心 20 min 和 4℃、10 000×g 离心 20 min,去除血浆中细胞碎片及大分子杂质,每管 3 mL 分装,冻存于-80℃冰箱中备用。

1.2.2 超高速离心法提取 UCB-Exos

取 3 mL 血浆,4℃、100 000×g 离心 30 min,将上清转移至新离心管中,再经 100 000×g 离心 90 min,以沉淀 UCB-Exos,然后将沉淀重悬于 5 mL 预冷的 PBS 中,100 000×g 超速离心 90 min 洗涤 UCB-Exos,用 200 μL 预冷的 PBS 重悬沉淀,即获得 UCB-Exos 悬液(图 1A)。

1.2.3 蔗糖垫密度梯度离心法提取 UCB-Exos

取 3 mL 血浆, 4 °C、10 000×g 离心 1 h, 转移上清至新离心管中, 经 100 000×g 超速离心 90 min, 弃去上清, 加入 1 mL 预冷的 PBS 重悬管底沉淀。用重水配制不同密度的蔗糖溶液, 向超离管中沿管壁依次缓慢加入 1 mL 不同密度的蔗糖溶液 (由下至上依次为: 2 mol/L, 1.3 mol/L, 1.16 mol/L, 0.8 mol/L, 0.5 mol/L, 0.25 mol/L), 将重悬的 1 mL UCB-Exos 悬液缓慢加至蔗糖溶液最上层, 在 4 °C、120 000×g 条件下超速离心 6 h, 轻轻取出超离管, 吸取从上至下第 4-9 层溶液, 使用 0.22 μm 滤膜进行过滤, 将滤液收集至 10 kDa 的截留管中, 经 4 °C、3 200×g 离心至截留液约 200 μL 后, 收集截留管滤网中的截留组分 (图 1B)。

1.2.4 改良超速离心法提取 UCB-Exos

取 3 mL 血浆加入超离管中, 4 °C、120 000×g 超速离心 3 h, 弃去上清, 所得沉淀为 UCB-Exos, 加入预冷的 PBS 洗涤 UCB-Exos (4 °C、120 000×g, 3 h 离心), 最后, 用 200 μL PBS 重悬沉淀 (图 1C)。

1.2.5 PEG 沉淀法提取 UCB-Exos

取 3 mL 血浆于离心管中, 4 °C、16 000×g 离心 20 min, 除去大分子物质及碎片, 取上清液, 并加入 1 mL 预冷的 PBS 溶液, 混匀, 按照 PEG6000: 上清=1: 4 的比例加入一定量的 PEG6000, 将混合物轻轻颠倒混匀, 置于 4 °C 冰箱中静置 60 min, 然后经 4 °C、10 000×g 离心 20 min 沉淀 UCB-Exos, 最后用 200 μL PBS 重悬沉淀的 UCB-Exos 颗粒 (图 1D)。

1.2.6 透射电镜 (transmission electron microscope, TEM) 观察 UCB-Exos 形态

取 UCB-Exos 悬液 20 μL 滴于电镜铜网上, 室温静置 3-5 min, 滴加 40 g/L 的磷钨酸溶液复染 5 min, 用干净滤纸从侧面慢慢吸走多余液体, 待铜网上样本干燥后, 置于电镜下观察,

由武汉迈斯普生物科技有限公司完成。

1.2.7 动态光散射技术 (dynamic light scattering, DLS) 检测 UCB-Exos 粒径大小

将 20 μL UCB-Exos 悬液加至 1 mL 预冷 PBS 中, 混匀, 转移至测量池内, 通过纳米颗粒示踪分析仪捕获并分析纳米颗粒物质在溶液中的布朗运动情况, 从而计算出纳米颗粒的粒径大小及浓度。

1.2.8 BCA 法检测 UCB-Exos 总蛋白浓度

向提取的 50 μL UCB-Exos 样本中加入 50 μL 蛋白裂解液, 置于冰上裂解 30 min, 期间每隔 10 min 混匀一次, 取新的 EP 管, 依次加入 10 μL PBS 和 10 μL UCB-Exos 裂解后样本 (即倍比稀释 1 倍)。根据 BCA 法测蛋白浓度试剂盒说明书配置 BCA 工作液, 于 96 孔板中加入 200 μL BCA 工作液和 20 μL UCB-Exos 稀释后样本或标准品, 37 °C 摇床上避光孵育 30 min, 通过酶标仪检测 562 nm 处吸光值, 根据标准曲线计算总蛋白浓度。

1.2.9 Western blotting 检测 UCB-Exos 标志蛋白

取 50 μL UCB-Exos 蛋白悬液, 加入 5× SDS 蛋白上样缓冲液, 100 °C 加热 10 min。随后进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE), 先 80 V 电泳后转为 120 V, 转膜时采用湿转 2.5 h, 随后 5% 的脱脂牛奶封闭 2 h, 用一抗稀释液配 CD63 (1: 1 000)、HSP70 (1: 5 000)、GM130 (1: 1 000), 4 °C 孵育过夜。次日, TBST 缓冲液洗 PVDF 膜 3 次, 每次 10 min, 加入 HRP 标记的二抗, 室温于摇床上孵育 2 h, 再次用 TBST 缓冲液洗 PVDF 膜 3 次, 每次 10 min。配制 ECL 发光试剂, 通过凝胶成像系统显影。

1.2.10 统计学分析

采用 GraphPad Prism 7 进行数据统计分析,

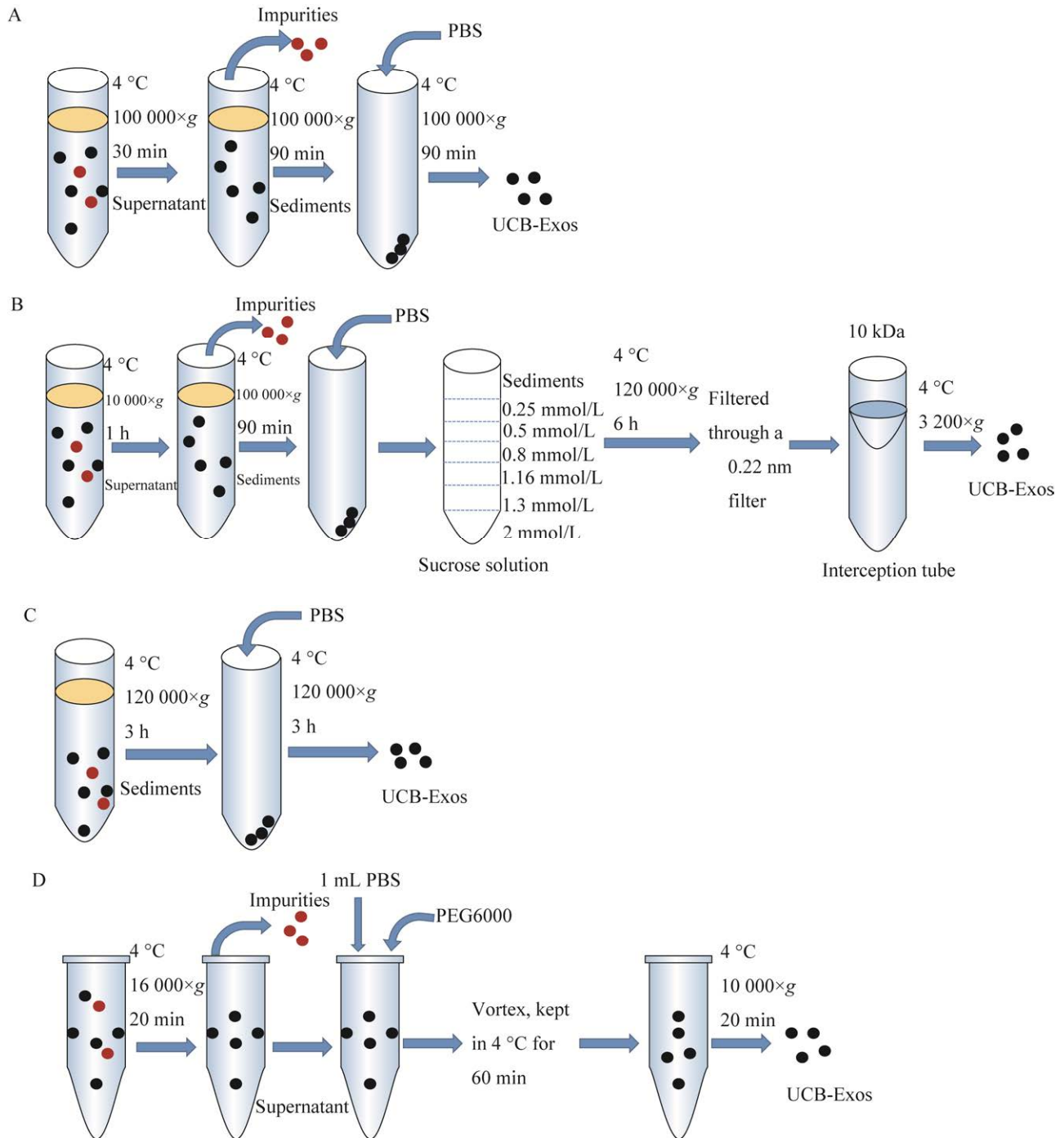


图 1 四种 UCB-Exos 提取方法流程示意图

Figure 1 Schematic diagrams of the methods for extracting UCB-Exos. (A) Ultracentrifugation. (B) Sucrose pad density gradient centrifugation. (C) Improved ultracentrifugation. (D) PEG precipitation.

符合正态分布的计量资料以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$)表示, 两组之间比较采用多样本 t 检验,

其他指标采用单因素方差分析。以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 UCB-Exos 提取操作时间

超高速离心法、蔗糖垫密度梯度离心法、改良超速离心法、PEG 沉淀法提取 UCB-Exos 所需操作时间分别为: (251.67±11.50) min、(560.67±13.43) min、(378.33±11.37) min、(136.67±9.61) min。结果表明, 蔗糖垫密度梯度离心法耗时最长, PEG 沉淀法相对耗时最短 (图 2)。

2.2 TEM 观察 UCB-Exos 形态

TEM 检测结果表明, 4 种方法提取的囊泡物质均可见脂质双分子层结构和典型杯状结构, 表明 4 种方法均成功提取出 UCB-Exos。相比之下, 超高速离心法提取的 UCB-Exos 相对较少, 而其他 3 种方法提取的外泌体量稍多, 其中, PEG 沉淀法提取的 UCB-Exos 最多, 但杂质蛋白也多 (图 3)。

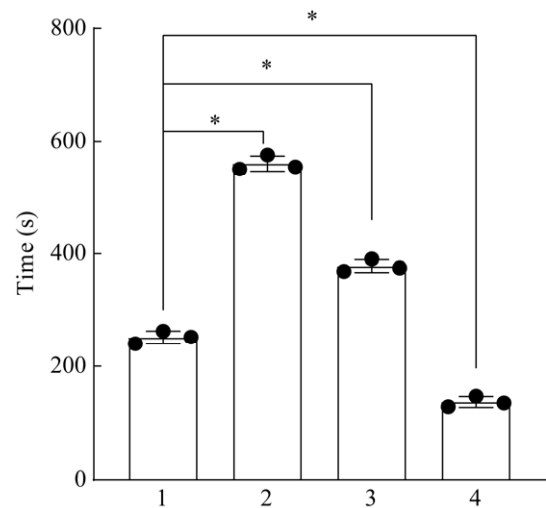


图 2 4 种方法提取 UCB-Exos 的操作时间

Figure 2 Operation time of the methods for extracting UCB-Exos. 1: ultracentrifugation; 2: sucrose pad density gradient centrifugation; 3: improved ultracentrifugation; 4: PEG precipitation. * $P < 0.001$.

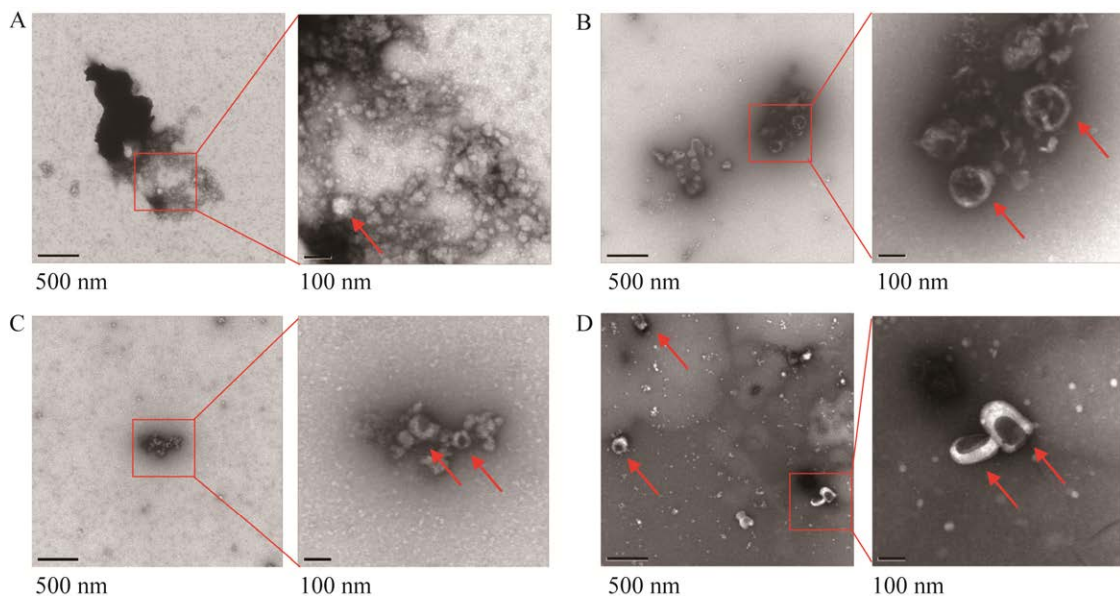


图 3 4 种方法提取的 UCB-Exos 电镜图

Figure 3 Electron microscopic images of UCB-Exos extracted with the four methods. (A) ultracentrifugation. (B) sucrose pad density gradient centrifugation. (C) improved ultracentrifugation. (D) PEG precipitation. Scale bar: 500 nm and 100 nm.

2.3 动态光散射技术检测 UCB-Exos 粒径大小

通过动态光散射检测 4 种方法提取的囊泡颗粒纳米粒径, 其中, 超高速离心法和蔗糖垫密度梯度离心法提取的囊泡结构纳米粒径大部分在 200 nm 以内, 粒径大小较标准, 而改良超速离心法和 PEG 沉淀法提取的囊泡结构纳米粒径稍偏大, 且 PEG 沉淀法可见约 20–30 nm 大小的囊泡颗粒, 表明 PEG 沉淀法提取的 UCB-Exos 中可能存在如脂蛋白的污染。动态光散射检测结果如图 4 所示。

2.4 BCA 法测 UCB-Exos 总蛋白浓度

超高速离心法、蔗糖垫密度梯度离心法、改良超速离心法、PEG 沉淀法提取的 UCB-Exos 总蛋白浓度分别为: $(0.48 \pm 0.03) \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、 $(0.70 \pm 0.06) \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、 $(0.85 \pm 0.06) \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、 $(3.17 \pm 0.49) \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。超高速离心法提取的 UCB-Exos 总蛋白浓度较低, 改良超速离心法、蔗糖垫密度梯度离心法获取的 UCB-Exos 总蛋白浓度高于超高速离心法, PEG 沉淀法提取的蛋白总浓度最高 (图 5)。

2.5 Western blotting 检测 CD63、HSP70 和 GM130 蛋白表达量

Western blotting 结果显示, 4 种方法提取的 UCB-Exos 均表达外泌体表面标志蛋白 CD63、HSP70, 不表达高尔基体相关蛋白 GM130, 结果符合外泌体化学特征^[21]。从蛋白 marker 的表达量来看, 超高速离心法提取的 UCB-Exos 量较少, PEG 沉淀法提取的量较多, 此外, 不同供体来源的脐血血浆中 UCB-Exos 量有所差异, 蔗糖垫密度梯度离心法相对较稳定 (图 6)。

3 讨论

UCB-Exos 具有低免疫性的特点, 有用于临床治疗的优势。目前, 已有研究证实: UCB-Exos 可抑制肝星状细胞的激活, 缓解纤维化^[17]; 促

进成纤维细胞增殖, 加快伤口愈合^[22]; 增强内皮细胞增殖和迁移^[23]等。此外, 对 UCB-Exos 和外周血血浆来源外泌体 (peripheral blood plasma exosomes, PB-Exos) 进行蛋白质谱检测发现, UCB-Exos 中含有更丰富的蛋白质 (UCB-Exos:

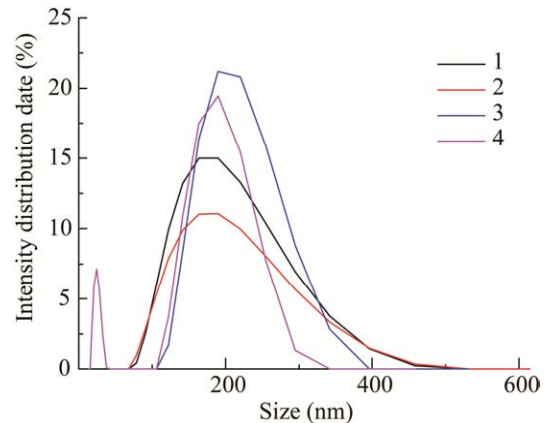


图 4 动态光散射技术检测 UCB-Exos 粒径大小
Figure 4 Particle size of UCB-Exos (DLS). 1: ultracentrifugation; 2: sucrose pad density gradient centrifugation; 3: improved ultracentrifugation; 4: PEG precipitation.

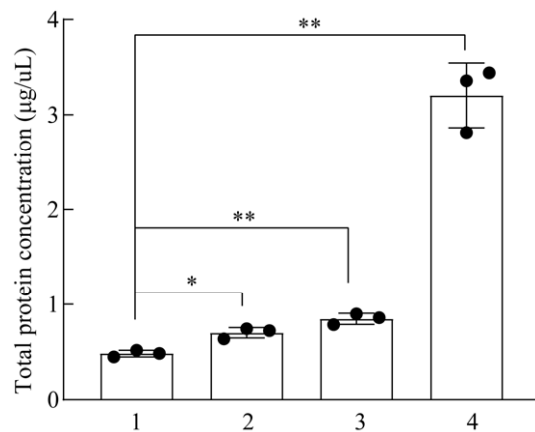


图 5 BCA 法检测不同方法提取的 UCB-Exos 总蛋白浓度

Figure 5 Total protein concentration of UCB-Exos (BCA assay). 1: ultracentrifugation; 2: sucrose pad density gradient centrifugation; 3: improved ultracentrifugation; 4: PEG precipitation. * $P < 0.005$, ** $P < 0.001$.

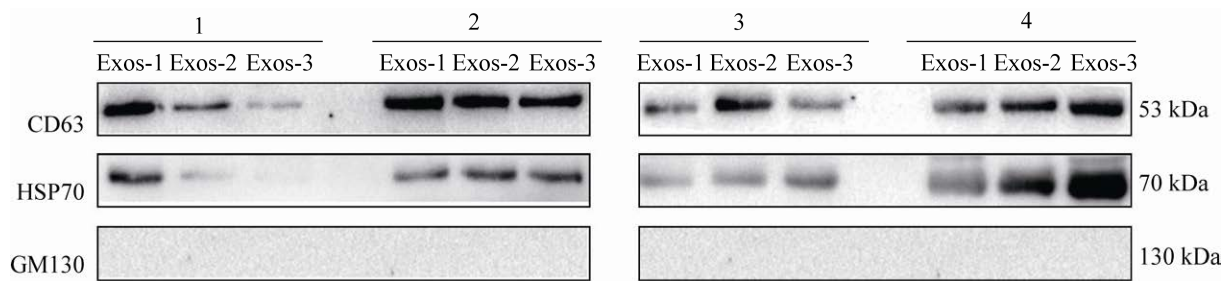


图6 Western blotting 检测不同方法提取的 UCB-Exos 相关蛋白的表达水平 Exos-1、Exos-2、Exos-3 表示 3 个不同供体来源脐带血血浆中提取分离出的外泌体

Figure 6 Expression of proteins related to the separated UCB-Exos by Western blotting. 1: ultracentrifugation; 2: sucrose pad density gradient centrifugation; 3: improved ultracentrifugation; 4: PEG precipitation. Exos-1, Exos-2, Exos-3: exosomes extracted and isolated from three plasma of umbilical cord blood samples.

1 011 种, PB-Exos: 555 种), 其中有 53 种蛋白质为 UCB-Exos 独有, 这些蛋白质在调节细胞外基质生成、转运体活性和 GTP 酶活性中均起着重要作用^[17]。因此, 若将产科丢弃的脐带血收集保存, 采用高效稳定的方法提取 UCB-Exos, 可为许多疾病的治疗提供有价值的资源。

目前, 随着对外泌体的研究不断深入, 外泌体的提取方法不断改进, 也有很多提取试剂盒的开发应用^[24], 但超高速离心法仍然是外泌体提取的“金标准”^[25]。电镜结果显示, 这 4 种方法均能得到圆形或椭圆形的脂质双分子层结构, 符合外泌体的结构特征^[21], 证明这些方法均能够成功提取到 UCB-Exos。从提取过程的耗时量和操作过程的便利性角度比较, 超高速离心法、蔗糖垫密度梯度离心法、改良超速离心法对仪器设备要求较高, 操作较复杂, 而 PEG 沉淀法不需要特殊仪器设备, 操作亦较简单; 与超高速离心法 ((251.67±11.50) min) 相比, 蔗糖垫密度梯度离心法更耗时 ((560.67±13.43) min), 而 PEG 沉淀法相对省时 ((136.67±9.61) min)。从 4 种提取方法获取的外泌体纯度方面比较, 超

高速离心法和蔗糖垫密度梯度离心法提取的 UCB-Exos, 纳米粒径在 70–220 nm 之间, Z-Ave 分别为 (136.35±22.22) nm、(149.9±4.50) nm; 改良超速离心法和 PEG 沉淀法提取的 UCB-Exos, 纳米粒径在 110–220 nm 之间, Z-Ave 分别为 (171.8±20.05) nm、(175.83±13.28) nm, 说明蔗糖垫密度梯度离心法提取的 UCB-Exos 均一性最好。从 4 种方法所获取的 UCB-Exos 蛋白总量方面比较, 超高速离心法提取的 UCB-Exos 最少, 总蛋白浓度为 (0.48±0.03) μg/μL; 蔗糖垫密度梯度离心法提取的 UCB-Exos 总蛋白浓度为(0.70±0.06) μg/μL; 改良超速离心法提取的 UCB-Exos 总蛋白浓度为 (0.85±0.06) μg/μL, PEG 沉淀法提取的 UCB-Exos 蛋白总量为 (3.17±0.49) μg/μL (表 1), 标志蛋白 Marker 的表达量是一致的趋势 (图 6), 说明 PEG 沉淀法提取的 UCB-Exos 蛋白总量最高。此外, 从 CD63 和 HSP70 表达量上分析, 我们发现蔗糖垫密度梯度离心法获取的外泌体标志 marker 表达较稳定, 个体差异比较小, 另外 3 种方法获取的 UCB-Exos 在 CD63 和 HSP70 的表达量上都存在个体差异 (图 6)。

表 1 不同方法提取的 UCB-Exos 质量差异

Table 1 Quality of UCB-Exos extracted with different methods

Items	Ultracentrifugation	Sucrose pad density gradient centrifugation	Improved ultracentrifugation	PEG precipitation
Equipment	Ultracentrifuge	Ultracentrifuge	Ultracentrifuge	Centrifuge
Operating time (min)	251.67±11.50	560.67±13.43	378.33±11.37	136.67±9.61
Purity	Pure	Pure	Pure	More impurity proteins
Z-Ave (nm)	136.35±22.22	149.9±4.50	171.8±20.05	175.83±13.28
Total protein Concentration (μg/μL)	0.48±0.03	0.70±0.06	0.85±0.06	3.17±0.49
Repeatability	Instability	Stability	Stability	Relatively stable

综上所述, 对于 UCB-Exos 的提取, 应结合实验室仪器设备条件、实验对 UCB-Exos 量、纯度的要求, 选择合适的提取方法。在仪器设备允许的情况下, 蔗糖垫密度梯度离心法不仅保证了 UCB-Exos 的质量, 且稳定性较好, 但该方法操作复杂, 需要富有经验的实验人员才能保证提取质量, 如果能针对蔗糖垫密度梯度离心法开发出操作简便的提取试剂盒可在提高提取效率的同时, 保证 UCB-Exos 的提取质量。

REFERENCES

- [1] Wang WS, Luo J, Wang ST. Recent progress in isolation and detection of extracellular vesicles for cancer diagnostics. *Adv Healthc Mater*, 2018, 7(20): e1800484.
- [2] Jeppesen DK, Fenix AM, Franklin JL, et al. Reassessment of exosome composition. *Cell*, 2019, 177(2): 428-445.e18.
- [3] Harada Y, Ohkawa Y, Maeda K, et al. Extracellular vesicles and glycosylation. *Adv Exp Med Biol*, 2021, 1325: 137-149.
- [4] Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol*, 2013, 200(4): 373-383.
- [5] Greening DW, Gopal SK, Xu R, et al. Exosomes and their roles in immune regulation and cancer. *Semin Cell Dev Biol*, 2015, 40: 72-81.
- [6] 赵丽萍, 徐锋, 张亚莉, 等. 外泌体蛋白质组学在肝癌发生发展和治疗研究中的应用进展. *生物工程学报*, 2020, 36(10): 1992-2000.
Zhao LP, Xu F, Zhang YL, et al. Exosomal proteomics study in the tumorigenesis, development and treatment of hepatocellular carcinoma. *Chin J Biotech*, 2020, 36(10): 1992-2000 (in Chinese).
- [7] 孔令旗, 王红梅, 李生伟, 等. 外泌体在肝癌诊断与治疗中的研究进展. *湖北医药学院学报*, 2021, 40(3): 317-321.
Kong LQ, Wang HM, Li SW, et al. Research progress of exosome in the diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. *J Hubei Univ Med*, 2021, 40(3): 317-321 (in Chinese).
- [8] 朱依凡, 于少雄, 仇华吉, 等. 外泌体: 病毒与宿主博弈的另一“角斗场”. *生物工程学报*, 2020, 36(9): 1732-1740.
Zhu YF, Yu SX, Qiu HJ, et al. Exosomes: another arena for the game between viruses and hosts. *Chin J Biotech*, 2020, 36(9): 1732-1740 (in Chinese).
- [9] Li KL, Huang HY, Ren H, et al. Role of exosomes in the pathogenesis of inflammation in Parkinson's disease. *Neural Regen Res*, 2022, 17(9): 1898-1906.
- [10] Yang XH, Xie BB, Peng HB, et al. Eradicating intracellular MRSA via targeted delivery of lysostaphin and vancomycin with mannose-modified exosomes. *J Control Release*, 2021, 329: 454-467.
- [11] Kim S, Lee SA, Yoon H, et al. Exosome-based delivery of super-repressor IκBα ameliorates kidney ischemia-reperfusion injury. *Kidney Int*, 2021, 100(3): 570-584.
- [12] Wang M, Yang Y, Yang DM, et al. The immunomodulatory activity of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells *in vitro*. *Immunology*, 2009, 126(2): 220-232.
- [13] 杨大志, 易伟宏. 人脐带间充质干细胞多向分化能力的研究和应用进展. *湖北医药学院学报*, 2015, 34(3): 313-318.
Yang DZ, Yi WH. Advances in multidirectional differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells. *J Hubei Univ Med*, 2015, 34(3): 313-318 (in Chinese).

- Chinese).
- [14] Chung HJ, Chung WH, Lee JH, et al. Expression of neurotrophic factors in injured spinal cord after transplantation of human-umbilical cord blood stem cells in rats. *J Vet Sci*, 2016, 17(1): 97-102.
- [15] Li HP, Yuan F, Du YM, et al. Umbilical cord blood stem cells transplantation in a patient with severe progressive supranuclear palsy: a case report. *J Med Case Rep*, 2021, 15(1): 574.
- [16] 李芳兰. 脐带血干细胞的基础与临床应用进展. *中国组织工程研究与临床康复*, 2008, 12(43): 8553-8556.
- Li FL. Basic research and clinical application of umbilical cord blood stem cells. *J Clin Rehabilitative Tissue Eng Res*, 2008, 12(43): 8553-8556 (in Chinese).
- [17] Huang YJ, Cao J, Lee CY, et al. Umbilical cord blood plasma-derived exosomes as a novel therapy to reverse liver fibrosis. *Stem Cell Res Ther*, 2021, 12(1): 568.
- [18] Zarovni N, Corrado A, Guazzi P, et al. Integrated isolation and quantitative analysis of exosome shuttled proteins and nucleic acids using immunocapture approaches. *Methods*, 2015, 87: 46-58.
- [19] 刘世明, 刘少军, 石鉴. 一种人脐带血来源的外泌体及其制备方法和用途: 中国, CN111808809A. 2020-10-23.
- Liu SM, Liu SJ, Shi J. The method of exosomes derived from human umbilical cord blood and the uses: China, CN111808809A. 2020-10-23.
- [20] Zhong XQ, Yan Q, Chen ZG, et al. Umbilical cord blood-derived exosomes from very preterm infants with bronchopulmonary dysplasia impaired endothelial angiogenesis: roles of exosomal microRNAs. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 637248.
- [21] Shen K, Jia YH, Wang XJ, et al. Exosomes from adipose-derived stem cells alleviate the inflammation and oxidative stress via regulating Nrf2/HO-1 axis in macrophages. *Free Radic Biol Med*, 2021, 165: 54-66.
- [22] Hu Y, Rao SS, Wang ZX, et al. Exosomes from human umbilical cord blood accelerate cutaneous wound healing through miR-21-3p-mediated promotion of angiogenesis and fibroblast function. *Theranostics*, 2018, 8(1): 169-184.
- [23] Jia LY, Zhou XY, Huang XJ, et al. Maternal and umbilical cord serum-derived exosomes enhance endothelial cell proliferation and migration. *FASEB J*, 2018, 32(8): 4534-4543.
- [24] 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. *细胞与分子免疫学杂志*, 2020, 36(4): 330-336.
- Du KL, Sun XD, Tang XH, et al. Effects of storage temperature and time on quality of plasma exosomes extracted by ExoQuick™ and Umibio kits. *Chin J Cell Mol Immunol*, 2020, 36(4): 330-336 (in Chinese).
- [25] Li P, Kaslan M, Lee SH, et al. Progress in exosome isolation techniques. *Theranostics*, 2017, 7(3): 789-804.

(本文责编 陈宏宇)