文章编号:1007 - 4252(2023)02 - 0002 - 080　　DOI:10.20027/j.gncq.2023.0011

外泌体生物传感器研究进展

李天晗[1,2],窦艳枝[1],李　铁[1,*]
(1. 中国科学院上海微系统与信息技术研究所,上海 200050;2. 中国科学院大学,北京 100049)

摘要:外泌体是由脂质双分子层膜结构组成的细胞外小体,属于细胞外囊泡的一个亚群,由正常细胞及癌细胞的多步内吞作用分泌到胞外,携带有蛋白质、脂类、核酸(DNA 和 RNA)、代谢产物等多种功能分子,促进细胞间的交流。肿瘤细胞、基质细胞、免疫细胞来源的外泌体,在肿瘤的发生发展、原发灶转移以及免疫逃逸等过程中具有重要作用。外泌体携带的内容物来自于源细胞,在癌细胞来源的外泌体和正常细胞来源的外泌体中,部分分子的含量有显著差异,可作为癌症早期诊断以及治疗监测的生物标志物。近年来利用生物传感器对癌症相关的外泌体进行传感检测受到了广泛关注。用于外泌体检测的生物传感器主要包括两大类:(1)电读出生物传感器;(2)光读出生物传感器。本文分析了针对疾病诊断的传统外泌体检测技术存在的缺陷,总结了不同类型生物传感器对癌症相关的外泌体中蛋白和核酸检测的研究进展,并对利用生物传感器构建外泌体检测方法所面临的挑战进行了讨论,对未来的发展方向提出了展望。

关键词:癌症;外泌体;蛋白;核酸;生物传感器
中图分类号:TP212.3　　**文献标志码**:A

Research progressof biosensors for detection of exosomes

LI Tian-han[1,2], Dou Yan-zhi[1], LI Tie[1,*]
(1. Shanghai Institute of Microsystem and Information Technology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200050, China;
2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Exosomes are extracellular vesicles composed of lipid bilayer membrane structures, which belong to a subgroup of extracellular vesicles. Exosomes are secreted extracellularly by multi-step endocytosis of normal cells and cancer cells. Exosomes carry a variety of functional molecules such as proteins, lipids, nucleic acids (DNA and RNA), metabolites, etc., and facilitate intercellular communication. Exosomes of tumor cell, stromal cell, and immune cell origin play an important role in tumor formation, metastasis of primary foci and immune escape. Exosome has been used as biomarkers for the early-stage detection of cancer and therapeutic monitoring because exosomes carry contents derived from source cells,

收稿日期:2023-02-17;　**修订日期**:2023-04-03
基金项目:基于硅纳米线的外泌体电学分析仪研制(No. ZDKYYQ20220002).
作者简介:李天晗, 男, 硕士研究生, 主要研究方向为生物传感器(E-mail:tianhan1998@mail.sim.ac.cn).
通信作者:李　铁, 男, 研究员, 主要研究方向为微纳传感(E-mail:tli@mail.sim.ac.cn).

and some molecules are significantly different in cancer cell-derived and normal cell-derived exosomes and can be used as biomarkers for early cancer diagnosis as well as for therapeutic monitoring. Biosensor-based cancer-associated exosome detection has been widely studied in recent years. The biosensors used for exosome detection include two major categories: (1) Biosensors based on electrical signals; (2) Biosensors based on optical signals. In this paper, the progress of traditional exosome detection techniques and their shortcomings in disease diagnosis were analyzed and different types of biosensors in detecting protein and nucleic acid in cancer-associated exosomes were summarized. Meanwhile, the challenge faced by biosensor-based exosome detection was discussed, and the prospect of the development of biosensor-based exosome detection in the future was forecasted.

Key words: Cancer; Exosome; Protein; Nucleic acid; Biosensor

0　引言

国际卫生组织报告显示:癌症已经成为人类健康的头号杀手,其中至少约 30% 的癌症引起的死亡是可以避免的[1-2]。通过癌症的早期诊断、癌症原位灶的扩散抑制,以及转移癌症及时治疗等措施可以有效降低死亡率。近年来,外泌体作为肿瘤标志物的潜力逐渐展现,癌源性外泌体与肿瘤的发生发展、原发灶转移以及免疫逃逸等过程密切相关。和正常细胞相比,癌细胞会释放更多的外泌体,一些癌症相关的生物标志物在癌源性外泌体中会过度表达。因此外泌体作为癌症早期诊断以及治疗监测的生物标志物,实现其有效分离与高灵敏检测,对于癌症的早期筛查、疗效评估、预后监测等方面都具有重要意义。

外泌体是一类由细胞释放的直径为 30-150nm 的天然微囊泡[3]。外泌体体内用于细胞组织间进行信号交流的生物分子,是细胞与细胞之间传递信息的重要载体。癌源性外泌体富含差异表达蛋白和核酸。传统的外泌体检测,包括蛋白质印迹法(Western blotting)、酶联免疫吸附试验(ELISA)和纳米颗粒跟踪分析(NTA)等。这些检测方法存在着分离捕获效率低、脂蛋白污染、凋亡小体或囊泡污染、操作时间长等问题,无法实现外泌体的有效分离及高灵敏检测。近几年基于生物传感技术的外泌体检测研究发展迅速,这些检测方法能够实现外泌体的分离、捕获、裂解,完成外泌体及核酸蛋白内容物的高灵敏、连续检测。

本文首先介绍了选择癌源性外泌体作为癌症检测的原因,接着列举了近几十年来传统的外泌体检测方法,之后总结了近几年来针对不同外泌体蛋白和核酸检测的生物传感器在新材料和新方法方面的研究进展,并对其在未来的研究发展方向进行了展望。

1　外泌体介绍

近年来,细胞外囊泡(extracellular vesicles, EVs)是一种可以促进细胞间相互识别反应的生物标志物。目前细胞外囊泡可以分为 3 种,分别是外泌体、微囊泡和凋亡小体。相比于微囊泡和凋亡小体,外泌体内容物具有更丰富的可检测靶标(核酸、蛋白等),是细胞与细胞、细胞与组织间信号传导的重要载体,是临床研究中最具潜力的新型癌症诊断标志物。

癌源性外泌体在肿瘤的发生发展、原发灶转移以及免疫逃逸等过程中具有重要作用,可作为癌症早期诊断以及治疗监测的生物标志物[4,5],如图 1 所示。目前认为外泌体在调控肿瘤的发生发展、原发灶转移以及免疫逃逸等过程中的工作机制主要包括以下几种:(1)肿瘤来源的外泌体内有大量的特异性蛋白源于母细胞,可加速 T 细胞衰老死亡和阻止免疫作用;(2)肿瘤来源的外泌体内含有与肿瘤原发灶转移相关的生物分子,可使细胞间的动态生理状态发生改变并加速细胞表型转移;(3)肿瘤来源的外泌体可以促进大量生物活性分子与目标细胞膜发生融合反应,接着转移到受体细胞,对受体细胞的信号通路和蛋白表达进行调节作用;(4)肿瘤来源的外泌体内的某种蛋白酶可加速细胞分化和肿瘤的转移速度;(5)肿瘤来源的外泌体在生长因子或细胞因子的作用下激活成纤维细胞使其分化,进而影响肿瘤血管的再生过程。因此,肿瘤来源的外泌体通过加速 T 细胞凋亡、加速细胞表型转移、调节

信号通路和蛋白表达、增强肿瘤细胞侵袭性和调节细胞间生物环境等方法,促进了肿瘤的原发灶转移以及免疫逃逸。外泌体检测在肿瘤相关的癌症诊断、监测以及预防等方面都表现出了强大的优势,已成为肿瘤研究领域的热点。

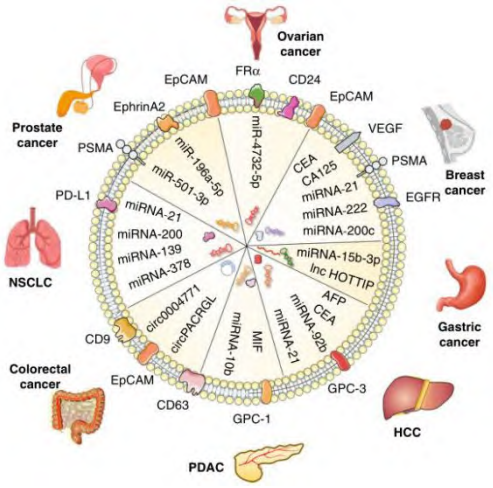

图 1 肿瘤来源的外泌体富含差异表达蛋白和核酸[4]

Fig. 1 Tumor-derived exosomes are rich in differentially expressed proteins and nucleic acids[4]

2 传统外泌体检测技术

近几十年来,蛋白质印迹法(Western blotting)、酶联免疫吸附试验(ELISA)和纳米颗粒跟踪分析(NTA)等各种方法已被应用于外泌体检测。蛋白质印迹法是应用分子生物学、生物化学和免疫遗传学中的常用实验方法,能对蛋白进行定性和半定量分析。它首先对生物样品进行凝胶电泳处理,接着利用特异性抗体的差异性对样品进行色差处理,最后通过对显色的位置和颜色的深浅进行分析,得到特定生物样品的实验结果[6,7]。酶联免疫吸附试验是一种常用的传统免疫分析技术,常用于对血浆或培养基中的小分子蛋白进行检测,具有较高的灵敏度且可进行定量分析[8,9]。纳米颗粒跟踪分析广泛用于表征外泌体的浓度和大小。然而,由于缺乏外泌体检测所需的标准化样品,NTA 无法区分多分散样本中存在的表型。透射电子显微镜(TEM)和原子力显微镜(AFM)可以用于研究外泌体的形态和大小分布,但显微镜方法不具备高通量或快速检测能力[10,11]。

这些常规方法通常都需要大量的外泌体样品、较长的分析时间和繁琐的技术步骤。最近的研究报道了几种基于微流控技术的外泌体分析检测方法。这些方法避免了传统方法的一些缺点。例如,它们可以在几个小时内分析少量样本中的疾病特异性外泌体,还可以实现自动化的多路复用,但仍操作较复杂、速度不够快、灵敏度不够高。

3 生物传感器检测外泌体

生物传感器具有检测快速、灵敏度高、成本低等优点,已广泛用于癌症相关的外泌体检测领域的研究。外泌体携带有许多癌症相关的生物标志物,可与抗体或适配体特异性结合,导致生物传感信号的改变进而实现外泌体的传感检测。近十几年来,用于外泌体分析检测的生物传感技术,有效提高了外泌体检测的准确性、灵敏度和速度,为癌症的早期诊断提供了技术支持。外泌体中含有大量的膜蛋白、细胞脂蛋白以及特异性表达的相关蛋白。例如,CD63 是一种在外泌体上高度富集的四跨膜蛋白,研究发现黑色素瘤患者血液中外泌体的 CD63 含量显著高于健康人,并且证明恶性肿瘤细胞分泌的外泌体上 CD63 含量比正常细胞高,说明外泌体膜上的 CD63 蛋白含量可作为癌症诊断的潜在生物标志物[12]。

3.1 电读出外泌体生物传感器

基于纳米材料的电读出外泌体生物传感器为外泌体的生物传感提供一个有前景的发展方向。纳米材料可以通过加速传递生物信号和放大识别生物信号来提高传感器的性能。目前几种纳米材料,包括金属有机框架材料、金属纳米材料、磁性纳米材料和 DNA 纳米材料,已被用于为电读出外泌体生物传感器产生增强信号。

电读出外泌体生物传感器具有灵敏度高、选择性好、反应快、易于小型化器件集成等优点,是生物传感器中最引人注目的一类,广泛应用于医疗、环境、食品等领域,但目前仍存在测试重复性低和样品基质效应等问题亟需解决。

3.1.1 金属有机框架材料

金属有机框架材料(Metal-Organic Frameworks, MOFs)通常是指过渡金属离子与有机配体通过自组装形成的具有周期性网络结构的晶体多孔材

料[13-15]。它具有高孔隙率、低密度、大的比表面积、孔道规则、孔径可调以及拓扑结构多样和可裁剪等优点。在电学生物传感中,MOFs 不仅为反应提供了更多的活性位点,还可以作为载体封装纳米颗粒,提高复合材料的催化活性。Li[16] 开发了一种基于 Zr 的金属有机框架(Zr-MOFs)的高灵敏度无标记电化学生物传感器,如图 2 所示,用于检测胶质母细胞瘤来源的外泌体。该传感器利用 Zr^{4+} 与外泌体外固有的磷酸基相互作用,亚甲基蓝包裹的 Zr-MOFs 可以在外泌体表面吸附。通过监测 MOFs 内的电活性分子,定量测定外泌体的浓度,检测限为 7.8×10^{6} particles/mL,检测范围为 $9.5\times10^{6}-1.9\times10^{10}$ particles/mL。该生物传感器可用于分析人血清中胶质母细胞瘤产生的外泌体,区分胶质母细胞瘤患者与健康人群。Gui[17] 开发了一种利用功能混合薄膜材料的全新双重信号、内在自校准的外泌体适配体生物传感器。该传感器通过在氧化铟锡(ITO)薄膜上组装黑磷纳米片(BPNSs)和二茂铁(Fc)掺杂合成的金属有机框架(ZIF-67),然后将亚甲基蓝(MB)标记的单链 DNA 适配体结合构建在 ITO 薄片上。合成的适配体/Fc/ZIF-67/ITO 平台具有 MB(标记在适配体上)和 Fc(掺杂在 ZIF-67 上)的双重氧化还原信号响应。当加入肿瘤来源的特异性外泌体时,通过氧化还原反应,作为参考电流的 Fc 的电流几乎没有变化,而 MB 的信号电流有规律地降低。在 PBS 中,通过监测 MB 和 Fc 的双重氧化还原信号反应,可以定量检测外泌体浓度,检测范围为 $1.3\times10^{2}-2.6\times10^{5}$ particle/mL,检测限为 100particles/mL。

3.1.2 金属纳米材料

金属纳米材料为基础的电化学生物传感器具有灵敏度高、特异性好、成本低、易于集成等优点,目前广泛应用于生物研究、生态环境、食品安全等领域[18]。金属纳米材料与电学传感器的结合通过放大生物识别信号来加强传感性能,为外泌体的检测提供了一个很好的思路。Zhou[19] 设计了一种微加工多通道芯片,用于外泌体的捕获和定量电化学分析。该芯片在 30 分钟内可从细胞培养上清或前列腺患者血清中分离出外泌体和微粒体,并进行电化学检测。与健康样本对照相比,来自前列腺癌(PCa)临床样本的血清来源的外泌体和微粒体的

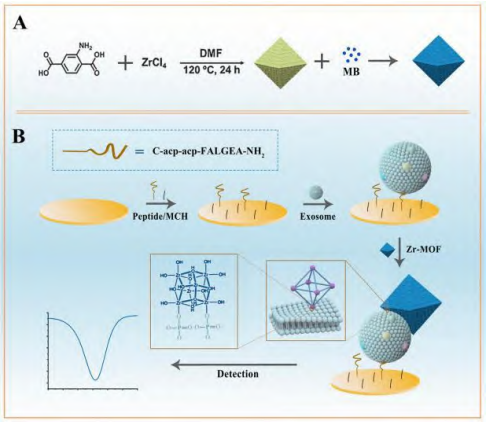

图 2　Zr 纳米探针制作过程和外泌体电化学生物传感器原理示意图[16]

Fig. 2 Schematic diagram of Zr nanoprobe fabrication process and exosome electrochemical biosensor principle[16]

EpCAM-和 PSMA-的囊泡的浓度显著增加,该生物传感器的检测限为 50particles/mL。Huang[20] 构建了一种无标记电化学适配体生物传感器。该传感器包含一个抗 CD63 抗体修饰的金电极和一个胃癌外泌体特异性适配体。胃癌外泌体特异性适配体与一个引物序列相连接,该引物序列与一个 G 四联体的环状扩增模板互补。靶外泌体的存在可以触发滚环核酸扩增并产生多个 G 四联体单位。这种类似于 DNA 酶的辣根过氧化物酶能够催化 H_2O_2 还原并产生电化学信号。该生物传感器对胃癌外泌体具有高特异性性和灵敏度,在 100μL 血浆样品中胃癌细胞外泌体的线性检测范围为 $4.8\times10^{3}-4.8\times10^{6}$ particles/mL,检测限为 9.54×10^{2} particles/mL。Jiang[21] 建立了一种基于铜封闭微凝胶的快速富集和检测细胞外囊泡的新方法。该方法利用铜封闭的微凝胶,捕获了大量携带复杂生物特征的特定蛋白标记的细胞外囊泡,以实现对目标细胞外囊泡的灵敏检测。通过靶向 CD63 和 HER2 等细胞外囊泡蛋白,这些微凝胶的检测限为 10^{4} particles/mL。与 ELISA 和 Western Blot 相比,该方法无需繁琐的样品制备,可直接在人血清和细胞培养基中检测细胞外囊泡。

3.1.3 磁性纳米材料

磁性纳米材料可以通过外加磁场实现对被测物的富集和分离。因此,磁性纳米材料与生物传感器的结合现被研究用于外泌体的检测。J. A. Shiddiky[22] 利用具有多功能特性的超顺磁性材料载金

氧化铁纳米立方体(AuNP-Fe_2O_3NC),实现了外泌体的直接分离和检测。该生物传感器以胎盘碱性磷酸酶(PLAP)为生物标记物快速、高灵敏、定量检测胎盘细胞分泌的外泌体,外泌体的线性动态范围为10^3 – 10^7 particles/mL,检出限为 10^3 particles/mL。Zhou[23]开发了一种适配体电化学生物传感用于外泌体跨膜蛋白 CD63 的检测,如图 3 所示。作者选择一个对 CD63 具有高亲和力的适配体,利用氧化还原标记的反义链屏蔽该适配体上的结合区域,形成一个双链结构,将其固定在金电极上。外泌体的存在会使得此 DNA 双链解旋分离,释放出反义链。导致电化学信号的变化。该传感器和微流控装置集成,检测时只需要少量样品。检测限为 10^6particles/mL。与传统的外泌体定量方法相比,该方法的优点包括:(1)检测结果易读出;(2)样品无需标记或清洗;(3)对外泌体检测比传统的免疫检测灵敏度更高。Wang[24]开发了一种基于超顺磁性氧化铁颗粒的化学发光免疫分析法,用于生物体液中外泌体的快速定量分析。抗 CD63 抗体偶联的超顺磁性氧化铁粒子与吖啶酯标记的抗 CD9 抗体形成了一个双抗体三明治体系。采用超离心法从胰腺肿瘤细胞系培养基中分离外泌体。该生物传感器的检测线性范围为 2.9×10^8–2.8×10^{11}particles/mL,检测限为 2.6×10^8particles/mL。Wei[25]开发了一种电场感应释放与测量(EFIRM)技术,制备出了结合生物分子释放和检测的电化学生物传感器,用于检测外泌体中的蛋白。该生物传感器通过电场作用破坏外泌体释放内容物,通过标记有 CD63 抗体的磁珠捕获和分离出血清或唾液中的外泌体中蛋白,并将其富集在电极上,完成对外泌体中蛋白的检测。

3.1.4 DNA 纳米材料

DNA 纳米材料是一种新型的生物材料,由于其良好的反应可控性和生物兼容性,DNA 纳米技术在生物传感器中得到了广泛的应用。Yang[26]利用酶催化底物产生的颜色变化来检测外泌体,开发了一种辣根过氧化物酶介导的,利用 pH 试纸进行外泌体定量检测的新方法。如图 4 所示,脲酶可以将尿素水解成氨水和二氧化碳,导致溶液的 pH 值升高,通过建立外泌体含量与溶液 pH 值变化之间的关系,可以直接利用低成本、广泛使用的商业化 pH 测试纸来定量分析外泌体,检测限低至 4.46×10^6particles/mL。除此以外,Liu[27]建立了一种靶向诱导触发重组酶聚合酶扩增(RPA)和转录介导扩增(TMA)比色法,用于高灵敏度和特异性检测鼻咽癌来源的外泌体。该生物传感器通过使用两个 PLA 探针来识别 TEXs 上的生物标志物,生成一个独特的替代 DNA 信号。随后,RPA 结合转录介导扩增(TMA)对该 DNA 信号进行两次同步扩增。RPA-TMA 反应的 RNA 产物与 TEX 上生物标志物的初始浓度成比例,利用基于金纳米颗粒(AuNP)的比色法定量检测。该生物传感器结合了邻近连接试验、重组酶聚合酶扩增、转录介导扩增和纳米金颗粒比色法,检测限低至 100particles/mL。Cao[28]建立了一种基于分子机器催化作用驱动信号放大的外泌体电化学生物传感器。外泌体通过免疫亲和反应被捕获在抗 CD63 免疫磁珠的表面并进行磁分离。随后,被含有 CD63 适配体的环状 DNA 链识别。磁分离后,此 DNA 可以启动级联介导的链置换反应(CTSDR)的分子催化机制。抗体和适配体的结合,确保了外泌体识别和富集的高特异性,而分子机器的高效催化作用大大提高了检测灵敏度。该生物传感器在培养基和 PBS 中的外泌体线性检测范围为 1×10^5–5×10^7particles/mL,检测限为 1.72×10^4particles/mL,在血清样本中具有较高的特异性,有潜力应用于临床疾病诊断,特别是肿瘤的早期检测和预后监测。Zhao[29]基于 3D DNA 和外切酶 III 开发了一种电化学外泌体生物传感器。该研究采用离心法

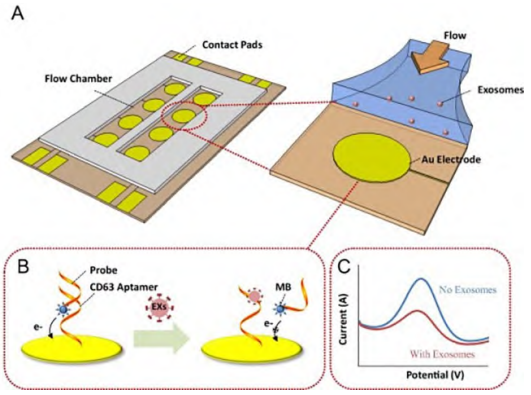

图 3 由玻璃表面的金电极阵列和 PDMS 层组成的基于适配体的外泌体检测示意图[23]

Fig. 3 Schematic diagram of the aptamer-based exosome detection consisting of a gold electrode array on a glass surface and a PDMS layer[23]

分离来自 MCF-7 细胞的外泌体,利用 CD63 适配体和 EpCAM 适配体检测 MCF-7 细胞分泌的外泌体。该生物传感器具有良好的选择性,检测限为 1.3×10^4 particles/mL。Dong[30]利用适配体识别激发多重 DNA 释放和环酶扩增的双信号扩增技术,开发了一种适配体电化学生物传感器,通过使用适配体-磁珠生物偶联物捕获来自 LNCaP 细胞的肿瘤外泌体,电活性 $Ru(NH_3)_6^{3+}$ 因其对 DNA 的静电吸引作用而发生变化。可以通过检测 $Ru(NH_3)_6^{3+}$ 峰值电流的下降来检测肿瘤外泌体。该生物传感器实现了对 LNCaP 细胞来源的肿瘤外泌体的灵敏检测。检测限低至 7×10^4 particles/mL。

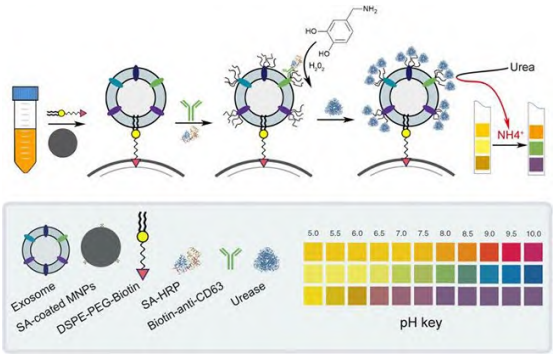

图 4　利用 pH 试纸进行外泌体定量检测的新方法[26]

Fig. 4 New method for quantitative detection of exosomes using pH dipstick[26]

3.2　光读出外泌体生物传感器

光读出外泌体生物传感器是在电学分析基础上发展起来的一种将光电材料与生物识别分析方法相结合的新型检测技术。在光照条件下,特异性识别探针与被测目标物之间的特定生物识别将导致相对应的电信号发生变化。目前像碳纳米材料、金属氧化物材料、量子点等纳米材料都被应用于光学外泌体生物传感器。

光读出外泌体生物传感器同样具备了灵敏度高和选择性好等优点,但是光读出传感器需要将光信号转化为电信号,增加了仪器设备的检测元件,导致集成复杂,成本较高。

3.2.1 碳纳米材料

碳纳米材料因其低廉的成本、优异的稳定性和良好的整体制备能力[31-33],在比色生物传感器的制备中受到广泛关注。一些碳纳米材料具有模拟天然酶活性的内在特性。Wang[34]开发了一种通过结合单链 DNA (ssDNA)的方式来增强石墨相氮化碳($G-C_3N_4$)纳米片内在过氧化物酶活性的比色传感器检测外泌体。当 CD63 蛋白的特异性适配体 ssDNA 与 $G-C_3N_4$ 混合反应时,促进了固有过氧化物酶的活性,产生深蓝色产物。加入超离心法分离的来自 MCF-7 细胞的外泌体后,由于外泌体其独有的特性,ssDNA 会立刻与外泌体发生反应,导致反应程度减弱,产物呈淡蓝色。该生物传感器的检测限为 1.4×10^9 particles/mL,检测时间为 30 min。可有效区分乳腺癌细胞系(MCF-7)和对照细胞系(MCF-10A)产生的外泌体跨膜蛋白 CD63 的差异化表达。此外,从乳腺癌患者和健康对照的血清样本中分离出的循环外泌体也发现了类似的趋势。Xia[35]开发了一种 DNA 整合适配体和单壁碳纳米管(s-SWCNTs)结合的比色生物传感器检测外泌体,如图 5 所示。跨膜蛋白 CD63 特异性核酸适配体吸附到 s-SWCNTs 表面,提高了 s-SWCNTs 的过氧化物酶活性,催化底物 TMB 时,溶液由无色变为蓝色。加入外泌体后,核酸适配体先与跨膜蛋白 CD63 结合,导致 s-SWCNTs 的过氧化物酶活性减弱,溶液颜色由深变浅。最佳条件下,外泌体的检测线性范围约为 $1.84\times10^9-2.21\times10^{10}$ particles/mL,检测限为 5.2×10^8 particles/mL。

3.2.2 金属氧化物材料

金属氧化物纳米颗粒在低密度和高密度的状态下,展现出的吸收波长特性会存在一定的差异性,从而导致其可见的颜色不同[36-38]。当外泌体上的靶标蛋白和适配体以更强的作用力特异性结合后,金属氧化物颗粒上的电荷数量会发生变化,进而导致颜色的变化。Chen[39]设计了一种 ZnO 纳米线涂层 3D 支架,构建了外泌体比色检测生物芯片。该芯片由独立 ZnO 纳米线阵列和三维聚二甲基硅氧烷(PDMS)支架组成。ZnO 纳米线阵列大的比表面积为外泌体捕获抗体的固定提供更多的结合位点,三维支架内相互连通的微孔诱导流体以混沌或涡流的形式流动,在高流速下,产生的尺寸类排斥效应增强了外泌体在生物芯片上的保留时间,在高流速下,这些协同作用显著提高了外泌体在生物芯片上的捕获能力。该生物传感器的检测线性范围为 $2.2\times10^8-2.4\times10^{10}$ particles/mL,检测限为 2.2×10^7 particles/mL。Zhang[40]开发了一种用于检测外泌体表面蛋白

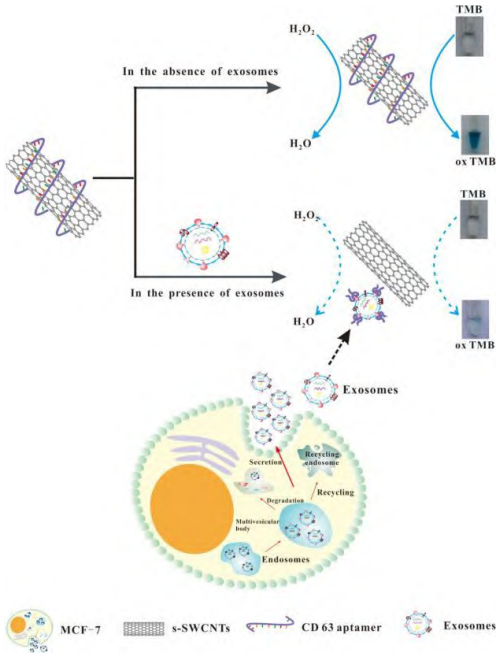

图 5 外泌体比色生物传感器检测外泌体的机制示意图[35]

Fig. 5 Schematic diagram of the mechanism of exosome detection by colorimetric biosensors[35]

的超灵敏生物传感器,如图 6 所示。该生物传感器利用了金纳米颗粒修饰的 Ti_3C_2 纳米探针,构建了电化学发光体系,对来自不同类型肿瘤细胞系(HeLa 细胞、OVCAR 细胞和 HepG2 细胞)的外泌体表面蛋白具有高度的选择性,能够准确、灵敏的检测来自人血清中的外泌体,线性范围为 10^5-10^8 particles/mL,检测限为 3×10^4 particles/mL,比传统 ELISA 方法的检出限低 1000 倍以上。Liu[41] 开发了一种基于多价界面和 $G-C_3N_4$ 涂层的液态金属纳米探针的外泌体生物传感器。抗体修饰的 PAMAM-Au 纳米颗粒(NPs)电极界面为高效捕获外泌体提供了一个多价识别平台,通过生物传感器实现外泌体及其表面蛋白的高灵敏度检测。该生物传感器检测 HeLa 细胞来源的外泌体,检测限为 3.1×10^3 particles/mL。Shen[42] 开发了一种用于检测乳腺肿瘤细胞外泌体的适配体生物传感器。采用巯基丙酸(MPA)改性 Eu^{3+} 掺杂的 CdS 纳米晶和 H_2O_2 分别作为发射体和共反应物,外泌体被 CD63 适配体识别并捕获。该生物传感器对乳腺癌肿瘤细胞(MCF7 细胞)来源外泌体的检测线性范围为 $3.4\times10^8-1.7\times10^{11}$ particles/mL,检测限为 7.41×10^4 particles/mL,已成功用于检测血清中的外泌体。

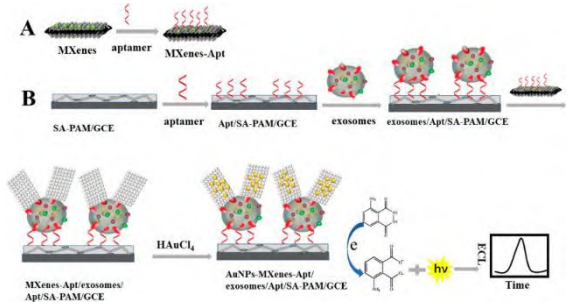

图 6 修饰 Ti_3C_2 纳米探针的金纳米颗粒原位形成的外泌体生物传感器原理[40]

Fig. 6 Principle of the biosensor for exosomes detection based on in Situ formation of gold nanoparticles decorated Ti_3C_2 MXenes nanoprobes[40]

3.2.3 量子点

量子点作为一种纳米级别的低维半导体电化学发光材料,三个维度上的尺寸都小于其对应半导体材料的激子玻尔半径的两倍[43-45]。对于量子点这种发光材料,其发射出的光的频率和颜色取决于其尺寸。通过在材料两端施加固定的电场和光强,可以得到理想中的光的颜色和频率。Dai[46] 利用新兴材料黑磷量子点(BPQDs)和 MXenes 作为信号放大器,制备了 ECL 和光热双模式生物传感器,用于测定 MCF-7 细胞来源的外泌体。其中 MXenes 具有较大的比表面积和优异的电导率,作为载体增加了 $Ru(dcbpy)_3^{2+}$ 和 BPQDs 的固定量,进一步增强了信号。该生物传感器的检测限为 3.7×10^4 particles/mL,线性范围为 $1.1\times10^5-1.1\times10^{10}$ particles/mL。Boriachek[47] 利用 CdSe 量子点作为信号放大探针构建了外泌体检测的电化学生物传感器。该传感器用四跨膜蛋白抗体修饰的磁性纳米颗粒捕获大量外泌体后,分别使用 CdSe 量子点功能化的生物素化 HER-2 和 FAM134B 抗体对乳腺癌和结肠癌相关的外泌体进行捕获,用硝酸溶解捕获外泌体的 CdSe 量子点产生 Cd^{2+} 离子,通过阳极溶出伏安法检测 Cd^{2+} 离子来间接实现外泌体的定量检测。利用该生物传感器成功检测了从结直肠癌患者采集的 9 份血清样本,检测限为 10^5 particles/mL,线性范围为 10^5-10^{10} particles/mL,证明了其临床适用性。Pang[48] 构建了

一种基于 TiO_2 纳米丝(NSs)@MoS_2 量子点(QDs)的自驱动外泌体 RNA 生物传感器。通过捕获探针与 HOTTIP 的有效杂交,该生物传感器已成功应用于定量 HOTTIP 检测。成功捕获的 HOTTIP 导致连续输出功率下降,用于定量 HOTTIP 超灵敏检测,HOTTIP 浓度的对数从 5fg/mL 到 50000ng/mL,检测限低至 5fg/mL,为定量检测肿瘤标志物提供了新的方向。

3.2.4 侧流免疫层析法

侧流免疫层析法(Lateral Flow Immunochromato-graphy Assay,LFIA)是一种基于抗原、抗体免疫技术的传统即时检测技术[49-51]。LFIA 的试纸条起初是由纳米金颗粒制备,用去人绒毛膜促性腺激素的检测,即用于检测是否怀孕,但当时由于其结果判定需要人工操作,所以导致了其低灵敏度和高假阴性率的问题。随着图像处理和信息采集相关技术的发展和仪器的出现,LFIA 技术得到了大幅度的发展,其检测性能也得到了大幅度提高,不仅可以进行定性检测,还可以实现目标物的半定量检测。Oliveira-Rodríguez[52]开发了用于检测外泌体的 LFIA 平台,作者选择抗 CD9 和抗 CD81 的混合抗体作为捕获抗体,选择胶体金标记的抗 CD63 作为检测抗体,成功开发了一种用于检测外泌体的新型 LFIA。该生物传感器可在 15 min 内完成对外泌体的检测,检出限为 8.54×10^5 particles/mL。

4　总结与展望

目前,外泌体生物传感器的研究取得了很大的进展,多种纳米材料和技术已被用于构建外泌体生物传感器的检测信号,例如金属-有机框架、碳纳米管、磁性纳米颗粒、金属纳米颗粒、量子点、聚吡咯纳米管和 DNA 纳米材料,如表 1 所示。

生物传感器通过固定的敏感生物材料与分析物特异性结合,发生复杂的生物化学特性改变,然后由换能器转换为电信号。这种信号的强弱或频率的变化与敏感元件所结合的分析物相关,从而实现对待测物进行的分析测定。外泌体生物传感器具有特异、敏感、快速、便携以及操作简便等优点,是现在的研究的热点之一。但是外泌体生物传感器仍然面临很多挑战:(1)目前由于外泌体的异质性、纳米级尺寸以及体液复杂的理化性质,外泌体分离捕获效率不高,对外泌体及其内容物的核酸、蛋白精准成分分析难度大、时间长、灵敏度不够,缺乏可以对外泌体及其内容物的高效分离-捕获-检测的全面分析能力,针对不同的外泌体内容物的传感机理仍然需要更多的深入研究;(2)目前分离外泌体所使用的常规方案包括密度梯度离心法、分子排阻法、超滤离心法、免疫磁珠法等,这些方法在设备、试剂成本、操作复杂度、对外泌体损害程度、分离纯度等方面还存在不同程度的缺陷。外泌体具有复杂的生物分泌路径,异质性以及分离纯化方式的限制,其研究仍然需要进一步探索。

随着国内外研究人员对生物传感器技术研究的不断深入,我们相信外泌体生物传感器会体现出更大的实用价值,将在恶性肿瘤引发的癌症诊断中发挥更重要的作用。

表 1　不同生物传感器的反应原理及其检测限

Table1Reaction principle and detection limit of different biosensors

材料种类 Types of materials	方法 Method	检测外泌体癌源 Cancer Source	检测限 LOD	参考文献 Refs.
金属有机框架材料 Metal organic frame materials	Zr^{4+} 与外泌体外固有的磷酸基相互作用 Zr^{4+} interacts with exocrine inherent phosphate groups in vitro	胶质母细胞瘤 Glioblastoma	7.8×10^6 particles/mL	16
	双重氧化还原信号响应 Double redox signal response	乳腺癌 Breast Cancer	100particles/mL	17
金属纳米材料 Metal materials	增强过氧化物酶活性 Enhancing peroxidase activity	胃癌 Stomach Cancer	9.54×10^2 particles/mL	20

材料种类 Types of materials	方法 Method	检测外泌体癌源 Cancer Source	检测限 LOD	参考文献 Refs.
磁性纳米材料 Magnetic nanomaterials	载金氧化铁纳米立方体的超顺磁性材料 Superparamagnetic materials containing gold iron oxide nanocubes	胎盘细胞 Placental Cells	10^3 particles/mL	22
DNA 纳米材料 DNA nanomaterials	酶催化底物产生颜色 Enzymes catalyze substrates to produce colors	乳腺癌 Breast Cancer	4.46×10^6 particles/mL	26
	重组酶聚合酶扩增和转录介导扩增 Recombinant enzyme polymerase amplification and transcription-mediated amplification	鼻咽癌 Nasopharyngeal Cancer	100particles/mL	27
碳纳米材料 Carbon nanomaterials	增强石墨相氮化碳内在过氧化物酶活性 Enhancing the intrinsic peroxidase activity of carbon nitride in graphite phase	乳腺癌 Breast Cancer	1.4×10^9 particles/mL	34
	增强过氧化物酶活性 Enhancing peroxidase activity	乳腺癌 Breast Cancer	5.2×10^8 particles/mL	35
金属氧化物材料 Metal oxide materials	G-C_3N_4涂层的液态金属纳米探针 Liquid metal nanoprobes coated with G-C_3N_4	宫颈癌 Cervical Cancer	3.1×10^3 particles/mL	41
	巯基丙酸改性 Eu^{3+}掺杂 CdS 纳米晶 Mercaptopropionic acid modified Eu^{3+} doped CdS nanocrystals	乳腺癌 Breast cancer	7.41×10^4 particles/mL	42
量子点 Quantum dots	黑磷量子点放大信号 Black phosphorus quantum dots amplify signals	乳腺癌 Breast cancer	3.7×10^4 particles/mL	46
	捕获探针与 HOTTIP 的有效杂交 Efficient hybridization of capture probes with HOTTIP	胃癌 Stomach Cancer	5fg/mL	48
侧流免疫层析法 Lateral flow immunochromatography	以四聚氰胺为靶点 Targeting tetramethylamine	黑色素瘤 Melanoma	8.54×10^5 particles/mL	52

参考文献：

[1] M. Zhou. Mortality, morbidity, and risk factors in China and its provinces, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017 [J]. The Lancet, 2019, 10204(394): 1145-1158.

[2] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424.

[3] M. P. Caby, D. Lankar, C. Vincendeau-Scherrer, et al. Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma [J]. Int Immuno, 2005, 17(7): 879-887.

[4] D. Yu. Exosomes as a new frontier of cancer liquid biopsy [J]. Mol Cancer, 2022, 21(1): 56.

[5] M. Shen. Progress in exosome associated tumor markers and their detection methods [J]. Mol Biomed, 2020, 1(1): 3.

[6] H. Zhou. Collection, storage, preservation, and normalization of human urinary exosomes for biomarker discovery [J]. Kidney Int, 2006, 69(8): 1471-1476.

[7] M. Mishra, S. Tiwari, and A. V. Gomes. Protein purification and analysis: next generation Western blotting techniques [J]. Expert Rev Proteomics, 2017, 14(11): 1037-1053.

[8]P. Peng. Emerging ELISA derived technologies for in vitro diagnostics [J]. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2006, 69(8): 1471-1476., vol. 152, 2022.

[9]M. K. K. Rao, K. Kapila, and R. M. Gupta. Enzyme Linked Immunosorbent Assays Revisited [J]. Medical Journal Armed Forces India, 1997, 53(1): 45-51.

[10]R. Deng, K. Zhang, and J. Li. Isothermal Amplification for MicroRNA Detection: From the Test Tube to the Cell [J]. Acc Chem Res, 2017, 50(4): 1059-1068.

[11]M. I. Ramirez. Technical challenges of working with extracellular vesicles [J]. Nanoscale, 2018, 10(3): 881-906.

[12]M. Logozzi. High levels of exosomes expressing CD63 and caveolin-1 in plasma of melanoma patients [J]. PLoS One, 2009, 4(4): e5219.

[13]Li J, Sculley J, Zhou H. Metal-Organic Frameworks for Separation [J]. Chem Rev, 2012, 112: 869-932.

[14]Furukawa H, Cordova KE, O'Keeffe M, et al. The Chemistry and Applications of Metal-Organic Frameworks [J]. Science, 2013, 341: 1230444-1230450.

[15]Yang J, Trickett CA, Alahmadi SB, et al. Calcium L-Lactate Frameworks as Naturally Degradable Carriers for Pesticides [J]. J Am Chem Soc, 2017, 139: 8118-8121.

[16]Z. Sun. An Electrochemical Biosensor Designed by Using Zr-Based Metal-Organic Frameworks for the Detection of Glioblastoma-Derived Exosomes with Practical Application [J]. Anal Chem, 2020, 92(5): 3819-3826.

[17]Y. Sun, H. Jin, X. Jiang, et al. Assembly of Black Phosphorus Nanosheets and MOF to Form Functional Hybrid Thin-Film for Precise Protein Capture, Dual-Signal and Intrinsic Self-Calibration Sensing of Specific Cancer-Derived Exosomes [J]. Analytical Chemistry, 2020, 92(3): 2866-2875.

[18]Liu HY, Weng LY, Yang C, et al. A review on nanomaterial-based electrochemical sensors for H_2O_2, H_2S and NO inside cells or released by cell [J]. Microchim Acta, 2017, 184: 1-17.

[19]Y. G. Zhou. Interrogating Circulating Microsomes and Exosomes Using Metal Nanoparticles [J]. Small, 2016, 12(6): 727-732.

[20]R. Huang. A Sensitive Aptasensor Based on a Hemin/G-Quadruplex-Assisted Signal Amplification Strategy for Electrochemical Detection of Gastric Cancer Exosomes [J]. Small, 2019, 15(19): e1900735.

[21]Q. Jiang, Y. Liu, L. Wang, et al. Rapid Enrichment and Detection of Extracellular Vesicles Enabled by CuS-Enclosed Microgels [J]. Anal Chem, 2019, 91(24): 15951-15958.

[22]K. Boriachek. Avoiding Pre-Isolation Step in Exosome Analysis: Direct Isolation and Sensitive Detection of Exosomes Using Gold-Loaded Nanoporous Ferric Oxide Nanozymes [J]. Anal Chem, 2019, 91(6): 3827-3834.

[23]Q. Zhou, A. Rahimian, K. Son, et al. Development of an aptasensor for electrochemical detection of exosomes [J]. Methods, 2016, 97: 88-93.

[24]Y. Wang. Rapid and Quantitative Analysis of Exosomes by a Chemiluminescence Immunoassay Using Superparamagnetic Iron Oxide Particles [J]. Journal of Biomedical Nanotechnology, 2019.

[25]F. Wei, J. Yang, and D. T. Wong. Detection of exosomal biomarker by electric field-induced release and measurement (EFIRM) [J]. Biosens Bioelectron, 2013, 44: 115-121.

[26]Y. Yang, C. Li, H. Shi, et al. A pH-responsive bioassay for paper-based diagnosis of exosomes via mussel-inspired surface chemistry [J]. Talanta, 2019, 192: 325-330.

[27]W. Liu, J. Li, Y. Wu, et al. Target-induced proximity ligation triggers recombinase polymerase amplification and transcription-mediated amplification to detect tumor-derived exosomes in nasopharyngeal carcinoma with high sensitivity [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2018, 102: 204-210.

[28]Y. Cao, L. Li, B. Han, et al. A catalytic molecule machine-driven biosensing method for amplified electrochemical detection of exosomes [J]. Biosens Bioelectron, 2019, 141: 111397.

[29]L. Zhao, R. Sun, P. He, et al. Ultrasensitive Detection of Exosomes by Target-Triggered Three-Dimensional DNA Walking Machine and Exonuclease III-Assisted Electrochemical Ratiometric Biosensing [J]. Anal Chem, 2019, 91(22): 14773-14779.

[30]H. Dong, H. Chen, J. Jiang, et al. Highly Sensitive Electrochemical Detection of Tumor Exosomes Based on Aptamer Recognition-Induced Multi-DNA Release and Cyclic Enzymatic Amplification [J]. Analytical Chemistry, 2018, 90(7): 4507-4513.

[31]Malode, S. J. Biomass-derived carbon nanomaterials for sensor applications [J]. J Pharm Biomed Anal, 2022, 222: 115102.

[32]Hwang, H. S. Carbon Nanomaterials as Versatile Plat-

forms for Biosensing Applications [J]. Micromachines, 2022, 11(9).

[33] Mazzaglia, A.; Piperno, A. Carbon Nanomaterials for Therapy, Diagnosis and Biosensing [J]. Nanomaterials, , 2022,12: 1597.

[34] Y. M. Wang. Enhancement of the Intrinsic Peroxidase-Like Activity of Graphitic Carbon Nitride Nanosheets by ssDNAs and Its Application for Detection of Exosomes [J]. Anal Chem, 2017, 89(22): 12327-12333.

[35] Y. Xia. A visible and colorimetric aptasensor based on DNA-capped single-walled carbon nanotubes for detection of exosomes [J]. Biosens Bioelectron, 2017, 92: 8-15.

[36] Liu, B., J. Liu. Sensors and biosensors based on metal oxide nanomaterials [J]. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2019, 121..

[37] Serban I, Enesca A. Metal Oxides-Based Semiconductors for Biosensors Applications [J]. Front. Chem, 2020, 8: 354.

[38] J. M. George, A. Antony, B. Mathew. Metal oxide nanoparticles in electrochemical sensing and biosensing: a review [J]. Mikrochim Acta, 2018, 185: 358.

[39] Z. Chen. Detection of exosomes by ZnO nanowires coated three-dimensional scaffold chip device [J]. Biosens Bioelectron, 2018, 122: 211-216.

[40] H. Zhang, Z. Wang, F. Wang, et al. In Situ Formation of Gold Nanoparticles Decorated Ti_3C_2 MXenes Nanoprobe for Highly Sensitive Electrogenerated Chemiluminescence Detection of Exosomes and Their Surface Proteins [J]. Anal Chem, 2020, 92(7): 5546-5553.

[41] Y. Zhang, F. Wang, H. Zhang, et al. Multivalency Interface and g-C3N4 Coated Liquid Metal Nanoprobe Signal Amplification for Sensitive Electrogenerated Chemiluminescence Detection of Exosomes and Their Surface Proteins [J]. Anal Chem, 2019, 91(18): 12100-12107.

[42] B. Qiao. An electrochemiluminescent aptasensor for amplified detection of exosomes from breast tumor cells (MCF-7 cells) based on G-quadruplex/hemin DNAzymes [J]. Analyst, 2019, 144(11): 3668-3675.

[43] S. Hong, C. Lee. The Current Status and Future Outlook of Quantum Dot-Based Biosensors for Plant Virus Detection [J]. Plant Pathol J, 2018, 34: 85-92.

[44] Iannazzo, D., Espro, C., Celesti, C., et al. Smart Biosensors for Cancer Diagnosis Based on Graphene Quantum Dots [J]. Cancers, 2021, 13: 3194.

[45] Q. Zhang, X. Zhang, F. Ma, et al. Advances in quantum dot-based biosensors for DNA-modifying enzymes assay [J]. Coordination Chemistry Reviews, 2022, 469.

[46] D. Fang, D. Zhao, S. Zhang, et al. Black phosphorus quantum dots functionalized MXenes as the enhanced dual-mode probe for exosomes sensing [J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2020, 305.

[47] K. Boriachek, M. N. Islam, V. Gopalan, et al. Quantum dot-based sensitive detection of disease specific exosome in serum [J]. The Analyst, 2017, 142(12): 2211-2219.

[48] X. Pang. Visible Light-Driven Self-Powered Device Based on a Straddling Nano-Heterojunction and Bio-Application for the Quantitation of Exosomal RNA [J]. ACS Nano, 2019, 13(2): 1817-1827.

[49] Wang, B., Moyano, A., Duque, J. M., et al. Nanozyme-Based Lateral Flow Immunoassay (LFIA) for Extracellular Vesicle Detection [J]. Biosensors, 2022, 12: 490.

[50] Mirica A-C, Stan D, Chelcea I-C, et al. Latest Trends in Lateral Flow Immunoassay (LFIA) Detection Labels and Conjugation Process [J]. Front. Bioeng. Biotechnol, 2022, 10: 922772.

[51] Bever CS, Adams CA, Hnasko RM, et al. Lateral flow immunoassay (LFIA) for the detection of lethal amatoxins from mushrooms [J]. PLoS ONE, 2020, 15(4): e0231781.

[52] M. Oliveira-Rodriguez, S Lopez-Cobo, HT. Reyburn, et al. Development of a rapid lateral flow immunoassay test for detection of exosomes previously enriched from cell culture medium and body fluids [J]. J Extracell Vesicles, 2016, 5: 31803.