

· 综 述 ·

外泌体的研究进展及其法医学意义

康圆博¹, 王思凡¹, 陈婷君², 郭亚东², 张长全²

1. 中南大学湘雅医学院, 湖南 长沙 410013; 2. 中南大学基础医学院法医学系, 湖南 长沙 410013

摘 要: 外泌体是一种由细胞分泌的微小膜性囊泡, 广泛存在于细胞外基质和多种体液中, 携带蛋白质、脂类、信使RNA(messenger RNA, mRNA)和微小RNA(microRNA, miRNA)等多种生物功能分子, 不仅在免疫学和肿瘤学领域发挥重要的生物学作用, 而且在法医学领域也具有潜在应用价值。本文对外泌体的发现、产生和降解机制, 生物学功能, 分离和鉴定方法进行综述, 总结其在法医学领域的研究和意义, 探讨其在体液识别、个体识别、死亡时间推断中的应用, 为外泌体在法医学中的实际应用提供思路。

关键词: 法医学; 外泌体; 个体识别; 死亡时间推断; 综述

中图分类号: DF795.1 文献标志码: A doi: 10.12116/j.issn.1004-5619.2021.410302

文章编号: 1004-5619(2022)06-0754-09



Research Progress of Exosomes and Their Forensic Significance

KANG Yuan-bo¹, WANG Si-fan¹, CHEN Ting-jun², GUO Ya-dong², ZHANG Chang-quan²

1. Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410013, China; 2. Department of Forensic Medicine, School of Basic Medical Sciences, Central South University, Changsha 410013, China

Abstract: Exosomes are membranous tiny vesicles secreted by cells, which are widely found in the extracellular matrix and various body fluids and carry a variety of biologically functional molecules such as proteins, lipids, messenger RNA (mRNA) and microRNA (miRNA). Exosomes not only play important biological roles in the field of immunology and oncology, but also have potential application value in the field of forensic medicine. This article reviews the discovery, production and degeneration mechanism, biological functions, isolation and identification methods of exosomes, summarizes the research on exosomes and their significance in the field of forensic science, and discusses their applications in body fluid identification, individual identification, postmortem interval estimation to provide ideas for the application of exosomes in forensic work.

Keywords: forensic medicine; exosomes; individual identification; estimation of postmortem interval; review

外泌体是一种具有单膜结构及外分泌特性的微小囊泡, 直径为30~200 nm, 其与细胞具有相同的拓扑结构, 富含来自原细胞的蛋白质、脂质、核酸和糖复合物^[1]。外泌体生物合成是蛋白质质量控制的一种机制, 其在细胞内产生后由内体膜出芽释放至细胞外。外泌体具有重构细胞外基质以及传递信号和分子到其他细胞的功能, 这种细胞间囊泡运输通路在生理和病理等方面发挥着重要作用, 包括发育、免疫、组织稳态、癌症和神经退行性疾病等^[2-3]。本文拟对外泌体的研究进展进行总结, 以期为进一步开展法医学领域外泌体的研究与应用提供参考。

1 概 述

1.1 外泌体的发现

外泌体是一种来源于内体的细胞膜囊泡^[1]。1967年, WOLF^[4]首次在血浆中观察到细胞外囊泡, 并将其命名为“血小板尘埃”。1983年, HARDING等^[5]和PAN等^[6]分别独立发现网织红细胞在成熟过程中可以释放直径小于50 nm的囊泡到细胞外空间。1987年, JOHNSTONE等^[7]将其命名为“外泌体”。1996年, RAPOSO等^[8]在B淋巴细胞中也发现了外泌体, 并发现其具有刺激T细胞增殖、参与抗原提呈和

作者简介: 康圆博(2000—), 男, 硕士研究生, 主要从事外泌体研究; E-mail: 1261619247@qq.com

通信作者: 张长全, 男, 博士, 讲师, 主要从事法医病理学和法医昆虫学研究; E-mail: zcq1105@163.com

引用格式: 康圆博, 王思凡, 陈婷君, 等. 外泌体的研究进展及其法医学意义[J]. 法医学杂志, 2022, 38(6): 754-762.

To cite: KANG Y B, WANG S F, CHEN T J, et al. Research progress of exosomes and their forensic significance[J]. Fayixue Zazhi, 2022, 38(6): 754-762.

抑制肿瘤生长等多种生物学活性。随后各种细胞来源的外泌体被逐渐发现,其生物学功能也被逐步阐述。

1.2 外泌体的产生和降解

外泌体可由多种类型的细胞释放,包括B淋巴细胞、T淋巴细胞、树突状细胞、肥大细胞、间充质干细胞、上皮细胞、星形胶质细胞、内皮细胞和几乎所有组织类型的肿瘤细胞^[9]。目前认为外泌体由晚期内体产生,而早期内体由细胞膜内陷形成^[3]。晚期内体通过膜内陷在多泡体中形成腔内囊泡^[10]。在此过程中,某些特定的蛋白质会被整合到膜中,而其他细胞质成分也被吞噬并封闭在腔内囊泡中。腔内囊泡在多泡体与质膜融合后释放到细胞外,释放出的囊泡被称为“外泌体”^[11-12]。在制备过程中,通过人工干燥产生的外泌体呈现特殊的双凹状或杯状,而其在液体环境中通过透射电子显微镜观察则呈现球形^[13]。

腔内囊泡的形成依赖于转运必需内体分选复合体(endosomal sorting complex required for transport, ESCRT),该复合体由4个独立的蛋白质ESCRT(ESCRT-0、ESCRT-I、ESCRT-II和ESCRT-III)组成,在多泡体形成、囊泡芽接和蛋白质分类等过程中发挥重要作用^[14-15]。但有研究^[16]发现,外泌体的形成还可能存在着另一种依赖于神经酰胺的生成途径,神经酰胺可以诱导局部质膜的横向分离和合并,其锥状结构还可能导致内体膜自发负性弯曲,从而促进外泌体的出芽。

分泌至细胞外间隙的囊泡通过膜蛋白与受体细胞特异性结合后,可以停留在质膜上或通过网格蛋白、形成胞膜窖、形成脂筏等机制而内吞进入细胞,形成早期内体^[17]。这部分囊泡可通过与多泡体膜融合释放囊泡内物质,从而影响细胞的生物活动^[17]。多泡体内的腔内囊泡可通过多泡体膜与溶酶体融合而降解,为受体细胞提供代谢所需物质^[18]。同时,细胞内存在阻止多泡体降解和允许其分泌的机制,使内源性外泌体释放^[19]。内吞的外源性外泌体是否又会被释放仍不清楚。多泡体的降解和分泌能力之间的平衡的调节机制还没有被揭示,但这一平衡的破坏无疑会影响细胞功能。分泌后进入血液的外泌体上存在大量抑制补体系统破坏的分子,使外泌体保持稳定^[20]。有研究^[21]表明,外源性外泌体在血液循环中主要被肝、脾和肾等器官捕获,被巨噬细胞吞噬摄取,抑制巨噬细胞的活性,使外泌体的半衰期明显延长。但目前仍缺少外泌体在体外稳定性的研究。

1.3 外泌体的功能

外泌体被认为是亲本细胞的缩影,所含的蛋白质、脂质、核酸成分高度依赖于亲本细胞的类型和状

况。外泌体富含具有多种功能的蛋白质,如参与细胞渗透、侵袭和融合事件的四跨膜蛋白(CD9、CD63、CD81、CD82),参与抗原结合和呈递的应激反应的热激蛋白(heat shock protein, HSP),参与释放的凋亡相关基因2-相互作用蛋白X(apoptosis-linked gene 2-interacting protein X, Alix)和肿瘤易感基因101(tumor susceptibility gene 101, TSG101),以及参与膜输送和融合的膜联蛋白、Rab蛋白^[22],另外还有参与炎症反应的氧化还原酶类^[23]。除了蛋白质外,外泌体还包含不同类型的RNA,如微小RNA(microRNA, miRNA)、信使RNA(messenger RNA, mRNA)、长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)、环状RNA(circular RNA, circRNA)、转运RNA(transfer RNA, tRNA)、核小RNA(small nuclear RNA, snRNA)等。miRNA可以在细胞之间进行单向转移,建立细胞间运输网络,引起受体细胞暂时或持久的表型变化^[24],其中let-7、miR-1、miR-15、miR-16、miR-155、miR-181和miR-375等参与血管生成、造血、胞吐、细胞代谢和肿瘤发生过程^[25-26]。mRNA可以转移到靶细胞中并翻译为蛋白质从而发挥功能。基因图谱分析^[25]结果显示,从外泌体分离的mRNA转录本与供体细胞不同,这表明在外泌体形成过程中,供体细胞中会发生mRNA的筛选。lncRNA和circRNA则可以影响包括肿瘤发生在内的多种生物学过程^[27-28]。除了蛋白质和核酸,外泌体还包含大量脂质,包括磷脂酰丝氨酸、磷脂酸、胆固醇、鞘磷脂和花生四烯酸等,都与其稳定性有关^[29]。

1.4 外泌体的分离方法

常用的外泌体分离方法包括离心法、沉淀法、粒径分离法、免疫亲和法与微流控技术等(表1),基于外泌体的不同特征,可以从条件细胞培养基或体液中将外泌体分离出来^[30]。

离心法是基于大小或密度分离物体的一种方法^[31],可将大小相同的囊泡从样本中分离出来。差速离心法可能对外泌体造成损害,并且由于转子数限制,每次处理的样本量有限,操作用时较长。密度梯度离心法是在差速离心法的基础上,利用分离介质使外泌体处于不同梯度层,然后从非膜性颗粒和蛋白质聚集体中分离外泌体,复杂的操作导致此方法分离效率降低^[32]。

沉淀法包括聚合物沉淀法和有机溶剂沉淀法。聚合物沉淀法利用多聚物的亲水性,可竞争性结合外泌体周围的水分子,使外泌体聚集,低速离心后即可沉淀,由于溶液中其他蛋白质分子也发生沉淀,因此此法获得的外泌体纯度和回收率低^[33]。有机溶剂沉

淀法可降低溶液中蛋白质的溶解度,继而发生沉淀,外泌体则被留在溶液中,由于有机溶剂受离子强度、温度和pH值的影响,所以要根据不同样本调整参数以提高纯度^[34]。

粒径分离法包括超滤法和排阻色谱法。超滤法利用过滤膜使大于一定分子量的颗粒被保留,小于该分子量的颗粒被过滤,过滤膜的堵塞可降低外泌体的回收率。排阻色谱法利用不同粒径的物质在通过多孔聚合物凝胶过程中的速度不同,对不同大小颗粒进行分离,其分离纯度高于离心法^[35],但此法耗时长,因此不适合大样本操作^[34]。

免疫亲和法利用外泌体生物标志物,包括 Alix、TSG101、flotillin1、HSP70 和 CD9 等^[30],可以实现外泌体特异性分离,其中最常用的是磁分离法,昂贵的试剂限制了该方法的应用^[34]。

此外,还有发挥了自动化优势的微流控技术^[36],微流控装置可在微米尺度内操纵流体,可最大程度地减少时间、设备和成本,但分离效率的高低取决于装置的原理,如基于免疫亲和的设备或微孔系统的外泌

体分离效率较低^[37]。

近年,MARTÍNEZ-GREENE 等^[38]报道了一种可以提高外泌体收集率和纯度的可重复并可扩展的分离技术,利用该方法可以在单个细胞类型内研究外泌体的亚型。一般而言,外泌体分离方法的选择取决于下游分析的需求,综合利用上述方法可有效提高分离效率和纯度。

1.5 外泌体的鉴定方法

在分离外泌体后,仍需要特异性指标来确定提取的成分是否为外泌体。国际细胞外囊泡协会提出,利用两种类型的蛋白质以确定提取的成分是否为外泌体,另外可以通过检测非外泌体结构蛋白成分来评估从生物液体中提取的外泌体纯度^[39]。一般从3个层面鉴定分离得到的外泌体:透射电子显微镜鉴定外泌体形态,纳米颗粒跟踪分析技术鉴定外泌体大小,蛋白质印迹法鉴定外泌体表面蛋白标志物。外泌体鉴定的检测内容主要包括外在特征(如形态和粒径检测)和内容物特征(如膜蛋白和脂筏)两类。常用方法的优缺点见表2。

表1 外泌体不同分离方法的优缺点

Tab. 1 Advantages and disadvantages of different methods for exosome isolation

方法	优点	缺点
离心法		
差速离心法 ^[34]	操作简单	操作用时较长,设备价格高昂,分离纯度低
密度梯度离心法	分离纯度高,理化性质保留 ^[34]	操作复杂,分离效率低 ^[32]
沉淀法		
聚合物沉淀法	操作简单 ^[34]	纯度和回收率低 ^[33]
有机溶剂沉淀法 ^[34]	廉价、操作简单、省时,理化性质保留	操作复杂
粒径分离法		
超滤法 ^[34]	设备廉价	过滤膜的堵塞会降低回收率
排阻色谱法	理化性质保留,避免外泌体聚集,分离纯度高于离心法 ^[35]	操作用时较长 ^[34]
免疫亲和法(磁分离法)	特异性高,分离效率高 ^[32]	反应试剂昂贵 ^[34]
微流控技术	省时,有高通量潜力 ^[32]	分离效率取决于装置原理 ^[36]

表2 外泌体不同鉴定方法的优缺点

Tab. 2 Advantages and disadvantages of different methods for exosome identification

方法	检测内容	优点	缺点
电子显微镜(扫描电子显微镜或透射电子显微镜)	形态	直接观察外泌体的形态结构,其中扫描电子显微镜可以观察表面结构;透射电子显微镜分辨率高,可成像直径<1 nm 物体 ^[40]	扫描电子显微镜的分辨率低;透射电子显微镜操作复杂,对样本的要求高,不适合大量样本的快速检测 ^[41]
流式细胞术	生物标志物	具有高通量、多通道分析能力,所需样本浓度低 ^[42]	检测下限为 400 nm,无法测量外泌体的粒径;由于基于光信号的检测,相对较低的精度和分辨率以及多分散性和低折射的特点限制其应用 ^[43]
酶联免疫吸附分析	标记蛋白	特异性强,检测速度快,可对标记蛋白进行定性定量分析,适合于高通量分析 ^[40]	操作复杂,耗时;重复性不佳,干扰因素多 ^[44]
蛋白质印迹法	标志蛋白	技术成熟,可对标志蛋白进行定性、定量分析 ^[44]	操作复杂,耗时;标志蛋白的检测取决于亲代细胞的类型,不适合检测生物液体中的外泌体标志蛋白 ^[39]

续表 2
Continued Tab. 2

方法	检测内容	优点	缺点
动态光散射技术 ^[42]	大小	测定下限低,适用于单分散体系的测定	不适合测量大尺寸的外泌体样本,对多分散样本不准确
纳米颗粒跟踪分析技术	大小和体积分数	省时,可以实时观察外泌体;分辨率高于流式细胞仪,测量的直径下限可达 30 nm ^[42,45]	操作复杂,很难从外泌体中分辨出被污染的蛋白质;摄像水平和检测阈值将影响外泌体的定量 ^[46]

2 外泌体的法医学意义

2.1 外泌体与法医物证学

外泌体存在于多种体液中,包括血液、汗液、尿液、唾液、精液、脑脊液和羊水等^[47-53]。鉴于外泌体包含 miRNA、蛋白质和脂质等多种成分,这些成分可以反映其细胞起源和生理状态,并可以作为供体细胞的特殊标志,因此外泌体具有识别体液的能力。外泌体及其载体可反映细胞的生物学过程以及机体的特征,因此也可用作不同个体的标识,具有潜在的法医学应用价值。

目前已知的外泌体标志包括 CD9、HSPA8、ALIX、HSP90AB1、ACTB、膜突蛋白(moesin,MSN)和 RAP1B^[54]。血清外泌体中除了以上蛋白分子标志外,还包括 miR-99a-5p、miR-128、miR-124-3p、miR-22-3p 和 miR-99b-5p 5 种常见的 miRNA^[47]。CD63、ALIX 和 HSP70 在汗液外泌体中高度富集^[52],但是并不具有特异性。2018 年 WU 等^[52]报道了 896 种能够将汗液外泌体与血液、尿液和唾液外泌体加以区分的蛋白质标志物。此外,一些蛋白质则是尿液外泌体所特有的,如水通道蛋白 1、铜绿菌素、尿调节蛋白、前列腺干细胞抗原等^[48],这将有利于法医学实践中对体液的识别。唾液中含有多种血源性分子和微生物,因此成为法医学鉴定工作中重要的痕迹物证资料。同时 BAHN 等^[49]研究表明,唾液外泌体中的 miRNA 表达谱可能和血液中 miRNA 表达谱相似。在脑脊液外泌体的相关研究中,YAGI 等^[51]利用二代测序技术分析了脑脊液和血清外泌体组分,发现脑脊液和血清之间的外泌体 miRNA 图谱不同。其中 miR-1911-5p 只在脑脊液外泌体中被检出,且 miR-34b-3p、miR-34c-3p、miR-204-3p 和 miR-449b-5p 在脑脊液外泌体中的含量显著高于血清外泌体。这些不同体液中外泌体成分的差异将有助于体液来源确定。

外泌体中含有的蛋白质、脂质和 RNA 等多种生物活性分子可作为其亲本细胞的“指纹”^[55],在法医学个体识别工作中具有潜在的应用价值。外泌体已经被发现与许多非传染性疾病(如癌症、炎症、代谢紊乱、自身免疫、神经变性、慢性阻塞性肺疾病、成瘾等)

和传染性疾病(如由病毒、原生动物、真菌、蠕虫、节肢动物等感染引起的疾病)有关^[1],因此,可以利用这一生物标志物特性缩小嫌疑个体筛选范围。YANG 等^[53]于 2017 年利用液相色谱-质谱联合蛋白质组学分析技术和蛋白质印迹法分析了 12 份精液外泌体样本,发现精液外泌体蛋白质组成存在较高的个体差异,某些蛋白质只存在于特定的供者,这将为法医学个体识别提供帮助。通过检测尿液外泌体的内容物种类及含量,可以帮助临床诊断多种泌尿系统疾病,如前列腺癌患者尿液外泌体中包含 δ -连环蛋白和整合素 $\alpha 3$ 亚单位(integrin $\alpha 3$ subunit,ITGA3)蛋白^[56],IgA 肾病患者尿液外泌体中含有氨肽酶、血管蛋白前体、 α -抗胰蛋白酶和铜蓝蛋白^[57]。这些生物标志物的检出将有助于公安机关缩小对嫌疑对象的侦查范围。在唾液外泌体的研究中,MACHIDA 等^[58]招募了 15 名年轻健康的志愿者(年龄中位数为 21.0 岁)和 13 名老年人(年龄中位数为 66.0 岁),收集未接受任何刺激下的唾液,分离唾液外泌体,提取总 RNA,并利用实时定量 PCR 方法筛选,最终确定 miR-24-3p 可以作为候选衰老生物标志物。因此,唾液外泌体中 miR-24-3p 可用于评估受检者的年龄以及机体衰老程度,从而为确定嫌疑人年龄范围提供依据。

2.2 外泌体与法医病理学和法医临床学

如前所述,外泌体与人类多种疾病存在密切关联。在血清外泌体的研究中,董梦茹^[59]发现重度烧伤小鼠的血清外泌体 miRNA 成分与正常小鼠存在差异,烧伤后休克早期和晚期 miRNA 组分也有不同,因此,监测血清外泌体中的 miRNA 变化在伤情鉴定中具有潜在应用价值,并且可用于辅助鉴别死后焚尸与生前烧死。精液外泌体相关蛋白在男性生殖功能中起着关键作用,如谷胱甘肽过氧化物酶 5(glutathione peroxidase 5,GPX5)、醛糖还原酶和山梨醇脱氢酶与精子成熟和精子活力相关^[60],这些蛋白质的表达水平与男性不育和前列腺癌等疾病相关。PARCHEM 等^[50]探讨了羊水外泌体在双胎输血综合征中的诊断和预后潜力,发现羊水外泌体的严重缺乏与双胎输血综合征有关,且可能会导致胎膜修复力和完整性变

差,从而致胎儿死亡。由此可见,羊水外泌体可能携带反映妊娠和胎儿健康状况的重要信息,一定程度上有助于鉴定宫内胎儿死因。外泌体 miRNA 在心力衰竭的病理变化中发挥保护性作用,可为心脏性猝死的鉴定提供客观依据^[61]。

在死亡时间推断方面,2020年 HUANG 等^[62]利用透射电子显微镜、RNA 测序和蛋白质组学等技术研究发现,死亡时间和外泌体分离时间会影响大脑来源外泌体的种类和组成,并且不同死亡时间也会导致成熟 miRNA 和 miRNA 前体含量发生改变。随着死亡时间的延长,外泌体 miRNA 的多样性可能会有所降低。该团队同时发现,大脑来源的外泌体在死后 6 h 和 24 h 的相同蛋白质种类多于死后 2 h 和 24 h 的相同蛋白质种类,表明蛋白质种类随死亡时间发生变化。在死后 24 h 的样本中,外泌体中细胞质成分的富集程度更高,这可能与细胞分裂有关^[62]。总体而言,外泌体在死亡时间推断方面的研究较少,尚处于初步探索阶段。

2.3 外泌体与法医毒理学

在法医毒理学方面,目前已有研究发现金属中毒、蛇毒中毒、酒精中毒以及海洛因、甲基苯丙胺和 γ -羟基丁酸的使用均可导致外泌体发生变化。锰等金属毒物可以增加 *Rab27a* 基因的表达,从而促进外泌体的产生^[63]。OGAWA 等^[64]采用凝胶过滤法从白眉蝮蛇新鲜毒液中分离出了外泌体样囊泡,通过电子显微镜证实其大小和形态与典型外泌体相同,并发现囊泡内包含二肽基肽酶 IV、氨肽酶 A 和肌动蛋白等物质。SOUZA-IMBERG 等^[65]进一步通过电子显微镜下的形态学分析验证了南美响尾蛇毒液中小膜泡的起源,并利用蛋白质组学方法详细分析了囊泡的蛋白质组成。CHO 等^[66]发现酒精中毒患者和酒精暴露大鼠的外泌体成分较对照组增多,并且与氧化应激和内质网应激相关的外泌体蛋白质 CYP2E1 含量明显升高,从而造成肝损伤。此外,外泌体在毒品的影响下也会发生一定的改变,WANG 等^[67]发现海洛因可上调 98% 的与免疫调节和炎症反应相关的外泌体 miRNA,感染 HIV 的海洛因滥用人员与对照组相比,神经炎症相关的血浆 miRNA-146a、miRNA-126、miRNA-21 和 let-7a 水平显著增高。甲基苯丙胺作为一种高度成瘾的精神刺激药物,可以上调神经元内 α -突触核蛋白的表达,并通过外泌体将 α -突触核蛋白传递至星形胶质细胞^[68]。此外,外源性 γ -羟基丁酸能够在血液外泌体中检出,可与内源性 γ -羟基丁酸加以鉴别^[69]。因此,外泌体在确定是否中毒、确定中毒程度和推断中毒时间等方面具有潜在应用价值。

2.4 外泌体与法医精神病学

外泌体在中枢神经系统的生理和病理中也发挥着重要作用,是神经元和胶质细胞以及其他器官和组织细胞之间局部和远距离沟通的“桥梁”^[70]。miRNA 主要通过外泌体在全身转运^[71]。2019年 GRUZDEV 等^[72]的研究结果显示,在精神分裂症患者的血液中存在特异性的 miRNA (miR-30e、miR-7、miR-195、miR-34a 和 miR-346),miR-144-5p 则在精神分裂症患者血浆外泌体中表达升高^[73],能够调控神经元存活、神经炎症、谷氨酸能系统成分和各种精神病相关基因的表达。GRUZDEV 等^[72]还认为外泌体可以提高 miRNA 检测的准确性,有助于更加深入理解精神疾病有关的分子生物学,最终获得对心理变化的生理解释,为精神病学诊断提供客观支持。RAISZADEH 等^[74]从精神分裂症患者汗液中鉴别出 185 种标志性蛋白质,发现汗液外泌体中的蛋白质与汗液中的蛋白质种类高度重叠(93.3%)。TSILIONI 等^[75]发现患有自闭症的儿童血清外泌体增多,并且自闭症儿童血清外泌体中含有的 mtDNA 7S 量同样增加($P=0.046$)。这意味着外泌体可能用于判定犯罪嫌疑人实施犯罪时的精神状态,或辅助鉴定个体的刑事责任能力和民事行为能力。

3 展 望

在过去的几十年中,大量研究主要集中于外泌体的生物学特性。外泌体来源于各种类型的细胞,存在于各种体液中,作为细胞间通信介质,在生理和病理过程中发挥着重要作用。目前仍缺乏不同体液来源的外泌体在体外稳定性的研究,尚不清楚环境中存在哪些影响外泌体半衰期的因素。外泌体包裹大量的蛋白质、脂质和 RNA,可向特定的受体细胞或组织发出信号,使外泌体成为多种疾病的诊断标志物和治疗工具。但与 RNA 或蛋白质不同,目前尚不清楚 DNA 片段是否会选择性地进入外泌体,也不清楚 DNA 在外泌体中的分布情况。至于外泌体 DNA 的生理作用,目前认为以外泌体为基础的 DNA 分泌可能有助于 DNA 质量控制、炎症调节,还可能成为肿瘤恶性程度、病毒感染或化疗耐药的有效标志^[3],以上这些方面都值得进一步研究。

外泌体能够在痕迹物证不够理想时提供更有价值的物证资料,也可提供除 DNA 谱以外的生物信息。作为新兴的遗传标志物,miRNA 具有检测微量物证样本和高度腐败样本的优势,但由于其片段短小导致难以从样本中检出,将来可通过分离体液外泌体富集 miRNA,建立更加高通量且准确的检测方法。同时,外泌体在法医学鉴定的应用上,如烧伤(烧死)鉴定、

精神病鉴定、死亡原因鉴定、个体识别等方面的研究仍处于初始阶段,需要进一步研究填补这一领域的空白。由于不同个体外泌体组成的差异性,建立外泌体蛋白质数据库也将为个体身份识别工作提供帮助。外泌体在法医学领域是一个很有应用前景的工具,有望为疑难刑事案件的解决提供新思路。

参考文献:

- [1] PEGTEL D M, GOULD S J. Exosomes[J]. *Annu Rev Biochem*, 2019, 88: 487-514. doi: 10.1146/annurev-biochem-013118-111902.
- [2] ANEL A, GALLEGU-LLEYDA A, DE MIGUEL D, et al. Role of exosomes in the regulation of T-cell mediated immune responses and in autoimmune disease[J]. *Cells*, 2019, 8(2): 154. doi: 10.3390/cells8020154.
- [3] KALLURI R, LEBLEU V S. The biology, function, and biomedical applications of exosomes[J]. *Science*, 2020, 367(6478): eaau6977. doi: 10.1126/science.aau6977.
- [4] WOLF P. The nature and significance of platelet products in human plasma[J]. *Br J Haematol*, 1967, 13(3): 269-288. doi: 10.1111/j.1365-2141.1967.tb08741.x.
- [5] HARDING C, HEUSER J, STAHL P. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes[J]. *J Cell Biol*, 1983, 97(2): 329-339. doi: 10.1083/jcb.97.2.329.
- [6] PAN B T, JOHNSTONE R M. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: Selective externalization of the receptor[J]. *Cell*, 1983, 33(3): 967-978. doi: 10.1016/0092-8674(83)90040-5.
- [7] JOHNSTONE R M, ADAM M, HAMMOND J R, et al. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes)[J]. *J Biol Chem*, 1987, 262(19): 9412-9420.
- [8] RAPOSO G, NIJMAN H W, STOORVOGEL W, et al. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles[J]. *J Exp Med*, 1996, 183(3): 1161-1172. doi: 10.1084/jem.183.3.1161.
- [9] CORRADO C, RAIMONDO S, CHIESI A, et al. Exosomes as intercellular signaling organelles involved in health and disease: Basic science and clinical applications[J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(3): 5338-5366. doi: 10.3390/ijms14035338.
- [10] MINCIACCHI V R, FREEMAN M R, DI VIZIO D. Extracellular vesicles in cancer: Exosomes, microvesicles and the emerging role of large oncosomes[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2015, 40: 41-51. doi: 10.1016/j.semcdb.2015.02.010.
- [11] SAHU R, KAUSHIK S, CLEMENT C C, et al. Microautophagy of cytosolic proteins by late endosomes[J]. *Dev Cell*, 2011, 20(1): 131-139. doi: 10.1016/j.devcel.2010.12.003.
- [12] RECORD M. Intercellular communication by exosomes in placenta: A possible role in cell fusion?[J]. *Placenta*, 2014, 35(5): 297-302. doi: 10.1016/j.placenta.2014.02.009.
- [13] YELLON D M, DAVIDSON S M. Exosomes: Nanoparticles involved in cardioprotection?[J]. *Circ Res*, 2014, 114(2): 325-332. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.113.300636.
- [14] HENNE W M, BUCHKOVICH N J, EMR S D. The ESCRT pathway[J]. *Dev Cell*, 2011, 21(1): 77-91. doi: 10.1016/j.devcel.2011.05.015.
- [15] HURLEY J H. ESCRTs are everywhere[J]. *EMBO J*, 2015, 34(19): 2398-2407. doi: 10.15252/embj.201592484.
- [16] CASTRO B M, PRIETO M, SILVA L C. Ceramide: A simple sphingolipid with unique biophysical properties[J]. *Prog Lipid Res*, 2014, 54: 53-67. doi: 10.1016/j.plipres.2014.01.004.
- [17] VAN NIEL G, D'ANGELO G, RAPOSO G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018, 19(4): 213-228. doi: 10.1038/nrm.2017.125.
- [18] ZHAO H, YANG L, BADDOUR J, et al. Tumor microenvironment derived exosomes pleiotropically modulate cancer cell metabolism[J]. *Elife*, 2016, 5: e10250. doi: 10.7554/elife.10250.
- [19] EITAN E, SUIRE C, ZHANG S, et al. Impact of lysosome status on extracellular vesicle content and release[J]. *Ageing Res Rev*, 2016, 32: 65-74. doi: 10.1016/j.arr.2016.05.001.
- [20] CLAYTON A, HARRIS C L, COURT J, et al. Antigen-presenting cell exosomes are protected from complement-mediated lysis by expression of CD55 and CD59[J]. *Eur J Immunol*, 2003, 33(2): 522-531. doi: 10.1002/immu.200310028.
- [21] IMAI T, TAKAHASHI Y, NISHIKAWA M, et al. Macrophage-dependent clearance of systemically administered B16BL6-derived exosomes from the blood circulation in mice[J]. *J Extracell Vesicles*, 2015, 4: 26238. doi: 10.3402/jev.v4.26238.
- [22] VLASSOV A V, MAGDALENO S, SETTERQUIST R, et al. Exosomes: Current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1820(7): 940-948. doi: 10.1016/j.bbagen.2012.03.017.
- [23] CASERTA S, GHEZZI P. Release of redox enzymes

- and micro-RNAs in extracellular vesicles, during infection and inflammation[J]. *Free Radic Biol Med*, 2021, 169:248-257. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2021.04.010.
- [24] MITTELBRUNN M, GUTIÉRREZ-VÁZQUEZ C, VILLARROYA-BELTRI C, et al. Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells[J]. *Nat Commun*, 2011, 2:282. doi:10.1038/ncomms1285.
- [25] VALADI H, EKSTRÖM K, BOSSIOS A, et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and micro-RNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells[J]. *Nat Cell Biol*, 2007, 9(6):654-659. doi:10.1038/ncb1596.
- [26] HUANG Z, XU A. Adipose extracellular vesicles in intercellular and inter-organ crosstalk in metabolic health and diseases[J]. *Front Immunol*, 2021, 12:608680. doi:10.3389/fimmu.2021.608680.
- [27] FAN T, SUN N, HE J. Exosome-derived lncRNAs in lung cancer[J]. *Front Oncol*, 2020, 10:1728. doi:10.3389/fonc.2020.01728.
- [28] HEWSON C, CAPRARO D, BURDACH J, et al. Extracellular vesicle associated long non-coding RNAs functionally enhance cell viability[J]. *Non Coding RNA Res*, 2016, 1(1):3-11. doi:10.1016/j.ncrna.2016.06.001.
- [29] ZHANG Y, LIU Y, LIU H, et al. Exosomes: Biogenesis, biologic function and clinical potential[J]. *Cell Biosci*, 2019, 9:19. doi:10.1186/s13578-019-0282-2.
- [30] AYALA-MAR S, DONOSO-QUEZADA J, GALLO-VILLANUEVA R C, et al. Recent advances and challenges in the recovery and purification of cellular exosomes[J]. *Electrophoresis*, 2019, 40(23/24):3036-3049. doi:10.1002/elps.201800526.
- [31] LIVSHITS M A, KHOMYAKOVA E, EVTUSHENKO E G, et al. Isolation of exosomes by differential centrifugation: Theoretical analysis of a commonly used protocol[J]. *Sci Rep*, 2015, 5:17319. doi:10.1038/srep17319.
- [32] LI P, KASLAN M, LEE S H, et al. Progress in exosome isolation techniques[J]. *Theranostics*, 2017, 7(3):789-804. doi:10.7150/thno.18133.
- [33] DEREGIBUS M C, FIGLIOLINI F, D'ANTICO S, et al. Charge-based precipitation of extracellular vesicles[J]. *Int J Mol Med*, 2016, 38(5):1359-1366. doi:10.3892/ijmm.2016.2759.
- [34] 王耀杰, 颜晰, 赵立波, 等. 外泌体分离和纯化方法研究进展[J]. *中华检验医学杂志*, 2021, 44(2):167-170. doi:10.3760/cma.j.cn114452-20200525-00497.
- WANG Y J, YAN X, ZHAO L B, et al. Advances in methods for isolation and purification of exosomes[J]. *Zhonghua Jianyan Yixue Zazhi*, 2021, 44(2):167-170.
- [35] GUAN S, YU H, YAN G, et al. Characterization of urinary exosomes purified with size exclusion chromatography and ultracentrifugation[J]. *J Proteome Res*, 2020, 19(6):2217-2225. doi:10.1021/acs.jproteome.9b00693.
- [36] XU H, LIAO C, ZUO P, et al. Magnetic-based microfluidic device for on-chip isolation and detection of tumor-derived exosomes[J]. *Anal Chem*, 2018, 90(22):13451-13458. doi:10.1021/acs.analchem.8b03272.
- [37] KANWAR S S, DUNLAY C J, SIMEONE D M, et al. Microfluidic device (ExoChip) for on-chip isolation, quantification and characterization of circulating exosomes[J]. *Lab Chip*, 2014, 14(11):1891-1900. doi:10.1039/c4lc00136b.
- [38] MARTÍNEZ-GREENE J A, HERNÁNDEZ-ORTEGA K, QUIROZ-BAEZ R, et al. Quantitative proteomic analysis of extracellular vesicle subgroups isolated by an optimized method combining polymer-based precipitation and size exclusion chromatography[J]. *J Extracell Vesicles*, 2021, 10(6):e12087. doi:10.1002/jev.2.12087.
- [39] 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 Vesicles*, 2018, 7(1):1535750. doi:10.1080/20013078.2018.153575.
- [40] SHAO H, IM H, CASTRO C M, et al. New technologies for analysis of extracellular vesicles[J]. *Chem Rev*, 2018, 118(4):1917-1950. doi:10.1021/acs.chemrev.7b00534.
- [41] WU Y, DENG W, KLINKE D J 2ND. Exosomes: Improved methods to characterize their morphology, RNA content, and surface protein biomarkers[J]. *Analyst*, 2015, 140(19):6631-6642. doi:10.1039/c5an00688k.
- [42] XU R, GREENING D W, ZHU H J, et al. Extracellular vesicle isolation and characterization: Toward clinical application[J]. *J Clin Invest*, 2016, 126(4):1152-1162. doi:10.1172/JCI81129.
- [43] POSPICHALOVA V, SVOBODA J, DAVE Z, et al. Simplified protocol for flow cytometry analysis of fluorescently labeled exosomes and microvesicles using dedicated flow cytometer[J]. *J Extracell Vesicles*, 2015, 4:25530. doi:10.3402/jev.v4.25530.
- [44] 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 Nanomedicine, 2020, 15: 6917-6934. doi:10.2147/IJN.S264498.
- [45] SZATANEK R, BAJ-KRZYWORZEKA M, ZIMOCH J, et al. The methods of choice for extracellular vesicles (EVs) characterization[J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(6):1153. doi:10.3390/ijms18061153.
- [46] MAAS S L N, DE VRIJ J, VAN DER VLIST E J, et al. Possibilities and limitations of current technologies for quantification of biological extracellular vesicles and synthetic mimics[J]. J Control Release, 2015, 200:87-96. doi:10.1016/j.jconrel.2014.12.041.
- [47] HUANG X, YUAN T, TSCHANNEN M, et al. Characterization of human plasma-derived exosomal RNAs by deep sequencing[J]. BMC Genomics, 2013, 14:319. doi:10.1186/1471-2164-14-319.
- [48] GONZALES P A, PISITKUN T, HOFFERT J D, et al. Large-scale proteomics and phosphoproteomics of urinary exosomes[J]. J Am Soc Nephrol, 2009, 20(2):363-379. doi:10.1681/ASN.2008040406.
- [49] BAHN J H, ZHANG Q, LI F, et al. The landscape of microRNA, Piwi-interacting RNA, and circular RNA in human saliva[J]. Clin Chem, 2015, 61(1):221-230. doi:10.1373/clinchem.2014.230433.
- [50] PARCHEM J, PAPANNA R, YANG S, et al. 89: Exploring the diagnostic and prognostic potential of amniotic fluid exosomes in twin-twin transfusion syndrome (TTTS)[J]. Am J Obstet Gynecol, 2017, 216(S1):S63-S64. doi:10.1016/j.ajog.2016.11.977.
- [51] YAGI Y, OHKUBO T, KAWAJI H, et al. Next-generation sequencing-based small RNA profiling of cerebrospinal fluid exosomes[J]. Neurosci Lett, 2017, 636:48-57. doi:10.1016/j.neulet.2016.10.042.
- [52] WU C X, LIU Z F. Proteomic profiling of sweat exosome suggests its involvement in skin immunity[J]. J Investig Dermatol, 2018, 138(1):89-97. doi:10.1016/j.jid.2017.05.040.
- [53] YANG C, GUO W B, ZHANG W S, et al. Comprehensive proteomics analysis of exosomes derived from human seminal plasma[J]. Andrology, 2017, 5(5):1007-1015. doi:10.1111/andr.12412.
- [54] HOSHINO A, KIM H S, BOJMAR L, et al. Extracellular vesicle and particle biomarkers define multiple human cancers[J]. Cell, 2020, 182(4):1044-1061. e18. doi:10.1016/j.cell.2020.07.009.
- [55] DUTTA S, KUMAR S, HYETT J, et al. Molecular targets of aspirin and prevention of preeclampsia and their potential association with circulating extracellular vesicles during pregnancy[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(18):4370. doi:10.3390/ijms20184370.
- [56] LU Q, ZHANG J, ALLISON R, et al. Identification of extracellular delta-catenin accumulation for prostate cancer detection[J]. Prostate, 2009, 69(4):411-418. doi:10.1002/pros.20902.
- [57] MOON P G, LEE J E, YOU S, et al. Proteomic analysis of urinary exosomes from patients of early IgA nephropathy and thin basement membrane nephropathy[J]. Proteomics, 2011, 11(12):2459-2475. doi:10.1002/pmic.201000443.
- [58] MACHIDA T, TOMOFUJI T, EKUNI D, et al. MicroRNAs in salivary exosome as potential biomarkers of aging[J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(9):21294-21309. doi:10.3390/ijms160921294.
- [59] 董梦茹. 重度烧伤休克期大鼠血清外泌体的提取鉴定及miRNA表达谱分析[D]. 广州:南方医科大学, 2020.
- DONG M R. Extraction and identification of serum exosomes and analysis of miRNA expression profiles in severe burns rats during shock stage[D]. Guangzhou: Southern Medical University, 2020.
- [60] SAMANTA L, PARIDA R, DIAS T R, et al. The enigmatic seminal plasma: A proteomics insight from ejaculation to fertilization[J]. Reprod Biol Endocrinol, 2018, 16(1):41. doi:10.1186/s12958-018-0358-6.
- [61] 马晓楠, 路陆, 黄琰潼, 等. 外泌体 microRNA 在心血管疾病中的研究进展及其法医学应用前景[J]. 法医学杂志, 2022, 38(2):258-262. doi:10.12116/j.issn.1004-5619.2020.400911.
- MA X N, LU L, HUANG Y T, et al. Research progress of exosomal microRNA in cardiovascular disease and its forensic application prospects[J]. Fayixue Zazhi, 2022, 38(2):258-262.
- [62] HUANG Y, CHENG L, TURCHINOVICH A, et al. Influence of species and processing parameters on recovery and content of brain tissue-derived extracellular vesicles[J]. J Extracell Vesicles, 2020, 9(1):1785746. doi:10.1080/20013078.2020.1785746.
- [63] HARISCHANDRA D S, GHASIAS S, ROKAD D, et al. Environmental neurotoxicant manganese regulates exosome-mediated extracellular miRNAs in cell culture model of Parkinson's disease: Relevance to α -synuclein misfolding in metal neurotoxicity[J]. Neurotoxicology, 2018, 64:267-277. doi:10.1016/j.neuro.2017.04.007.
- [64] OGAWA Y, KANAI-AZUMA M, AKIMOTO Y, et al. Exosome-like vesicles in *Gloydius blomhoffii* venom[J]. Toxicon, 2008, 51(6):984-993. doi:10.1016/j.toxicon.2008.02.003.
- [65] SOUZA-IMBERG A, CARNEIRO S M, GIANNOTTI K C, et al. Origin and characterization of small membranous vesicles present in the venom of *Crotalus durissus terrificus*[J]. Toxicon, 2017, 136:27-33. doi:10.1016/j.toxicon.2017.06.013.
- [66] CHO Y E, MEZEY E, HARDWICK J P, et al. Increased ethanol-inducible cytochrome P450-2E1 and

- cytochrome P450 isoforms in exosomes of alcohol-exposed rodents and patients with alcoholism through oxidative and endoplasmic reticulum stress[J]. *Hepatology Commun*, 2017, 1(7): 675-690. doi: 10.1002/hep4.1066.
- [67] WANG X, SUN L, ZHOU Y, et al. Heroin abuse and/or HIV infection dysregulate plasma exosomal miRNAs[J]. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2020, 15(3): 400-408. doi: 10.1007/s11481-019-09892-9.
- [68] 孟运乐. 甲基苯丙胺促使 α -突触核蛋白传递至星形胶质细胞的相关病理损伤机制研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2020.
- MENG Y L. Mechanism of pathological damage in astrocytes after alpha-synuclein transferred to astrocytes promoted by METH[D]. Guangzhou: Southern Medical University, 2020.
- [69] 郜崢翔, 罗奇志, 张亮, 等. 大鼠血液外泌体中外源性 γ -羟基丁酸的检测[J]. *法医学杂志*, 2022, 38(2): 212-216. doi: 10.12116/j.issn.1004-5619.2021.410116.
- GAO Z X, LUO Q Z, ZHANG L, et al. Detection of exogenous γ -hydroxybutyric acid in rat blood exosomes[J]. *Fayixue Zazhi*, 2022, 38(2): 212-216.
- [70] JANAS A M, SAPÓN K, JANAS T, et al. Exosomes and other extracellular vesicles in neural cells and neurodegenerative diseases[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1858(6): 1139-1151. doi: 10.1016/j.bbame.2016.02.011.
- [71] TIAN F, SHEN Y, CHEN Z, et al. No significant difference between plasma miRNAs and plasma-derived exosomal miRNAs from healthy people[J]. *Biomed Res Int*, 2017, 2017: 1304816. doi: 10.1155/2017/1304816.
- [72] GRUZDEV S K, YAKOVLEV A A, DRUZHKOVA T A, et al. The missing link: How exosomes and miRNAs can help in bridging psychiatry and molecular biology in the context of depression, bipolar disorder and schizophrenia[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2019, 39(6): 729-750. doi: 10.1007/s10571-019-00684-6.
- [73] LIU J, SU B. Integrated analysis supports *ATXN1* as a schizophrenia risk gene[J]. *Schizophr Res*, 2018, 195: 298-305. doi: 10.1016/j.schres.2017.10.010.
- [74] RAISZADEH M M, ROSS M M, RUSSO P S, et al. Proteomic analysis of eccrine sweat: Implications for the discovery of schizophrenia biomarker proteins[J]. *J Proteome Res*, 2012, 11(4): 2127-2139. doi: 10.1021/pr2007957.
- [75] TSILIONI I, THEOHARIDES T C. Extracellular vesicles are increased in the serum of children with autism spectrum disorder, contain mitochondrial DNA, and stimulate human microglia to secrete IL-1 β [J]. *J Neuroinflammation*, 2018, 15(1): 239. doi: 10.1186/s12974-018-1275-5.

(收稿日期: 2021-02-28)

(本文编辑: 张建华)