

# 外泌体处理温度对其蛋白质组学分析的影响

吴梦鸽<sup>1,2</sup>, 楚占营<sup>2</sup>, 孟波<sup>2</sup>, 叶子弘<sup>1</sup>, 翟睿<sup>2</sup>

(1. 中国计量大学生命科学学院, 杭州 310018;

2. 中国计量科学研究院, 前沿计量科学中心, 国家市场监督管理总局技术创新中心(质谱), 北京 100029)

**摘要** 外泌体蛋白质组学分析在重大疾病生物标志物筛选、药物靶点发现及功能机制研究中具有重要价值。外泌体和蛋白质均被认为是极易受处理温度变化影响的研究对象, 然而以往研究通常将基于不同富集策略得到的外泌体蛋白质组学分析结果的差异直接归因于不同富集方法的富集选择性和富集效率的不同, 关于外泌体富集处理过程中温度的变化对外泌体蛋白质组学分析结果的影响尚未充分讨论。为探究样本处理温度对外泌体蛋白质组学分析结果的影响, 本文在 4, 25, 37, 45, 60 和 90 °C 6 种温度条件下分别处理外泌体样本 1 h, 随后系统分析了样本外泌体的形貌特征、颗粒粒径分布与浓度、特征蛋白质表征含量变化以及蛋白质组学数据。结果表明, 不同温度处理的外泌体在形貌和粒径上未表现出显著差异; 但随着温度升高, 外泌体颗粒的浓度显著下降。当温度超过 45 °C 时, 外泌体标志性蛋白 TSG101 的表征含量显著下降, 而外泌体特征膜蛋白 CD9 的表征含量则显著上升。定量蛋白质组学分析结果进一步表明, 在 4, 25 和 37 °C 下处理的外泌体样本的蛋白质组学数据具有较好的可比性, 而 45 °C 及以上温度处理的样本则表现出 48 种蛋白的显著差异。综上, 在进行外泌体蛋白质组学分析时, 应充分考虑温度变化对测量结果的潜在影响, 以确保数据的可靠性、重现性与可比性。

**关键词** 外泌体蛋白质组; 温度; 质谱

中图分类号 O657

文献标志码 A

doi: 10.7503/cjcu20250023

## Effect of Exosome Treatment Temperature on Proteomic Analysis of Exosomes

WU Mengge<sup>1,2</sup>, CHU Zhanying<sup>2</sup>, MENG Bo<sup>2</sup>, YE Zihong<sup>1</sup>, ZHAI Rui<sup>2\*</sup>

(1. Faculty of Life Sciences, China Jiliang University, Hanzhou 310018, China;

2. Technology Innovation Center of Mass Spectrometry for State Market Regulation, Center for Advanced Measurement Science, National Institute of Metrology, Beijing 100029, China)

**Abstract** Exosome proteomic analysis has important value in screening biomarkers for major diseases, discovering drug targets, and studying functional mechanisms. Exosome and protein are widely recognized as research objects that are highly susceptible to temperature changes. However, previous reports have often attributed the differences in exosome proteomic analysis results based on different enrichment strategies directly to the differences in enrichment selectivity and efficiency of different enrichment methods. There has not been sufficient research and discussion on the impact of temperature changes during the enrichment process of exosome on the results of exosome proteomic analysis. To investigate the effect of sample processing temperature on the results of exosome proteomics analysis, this study treated exosome samples at six temperature conditions of 4, 25, 37, 45, 60, and 90 °C for 1 h. Subsequently, the morphology characteristics, particle size distribution and concentration, changes in characteristic

收稿日期: 2025-01-20. 网络首发日期: 2025-02-28.

联系人简介: 翟睿, 女, 博士, 副研究员, 主要从事蛋白质组学与蛋白质计量方面的研究. E-mail: zhairui@nim.ac.cn

基金项目: 中国计量科学研究院基本科研业务费(批准号: AKYCX2211)和“万人计划”科技创新领军人才项目(批准号: WR2202)资助. Supported by the Fundamental Research Funds of the National Institute of Metrology(No. AKYCX2211) and the "Ten-Thousands Talents Program" Plan for Leading Talents of Science and Technology Innovation, China(No. WR2202).

protein characterization content, and proteomic data of the samples were systematically analyzed. The results showed that there were no significant differences in morphology and particle size among exosomes treated at different temperatures, But as the temperature increases, the concentration of exosome particles significantly decreases. When the temperature exceeds 45 °C, the characterization content of the exosome marker protein TSG101 significantly decreases, while conversely, the characterization content of the exosome characteristic membrane protein CD9 significantly increases. The results of quantitative proteomics analysis further indicate that the proteomic data of exosome samples treated at 4, 25 and 37 °C have good comparability, while samples treated at 45 °C and above show significant differences in 48 proteins. In summary, when conducting exosomal proteomic analysis, the potential impact of temperature changes on measurement results should be fully considered to ensure the reliability, reproducibility, and comparability of the data.

**Keywords** Exosome proteomic; Temperature; Mass spectrometry

外泌体(Exosome)是由多囊泡体和细胞膜融合形成的直径在50~200 nm范围内的细胞外囊泡<sup>[1]</sup>,其包含介导细胞间通讯的蛋白质、核酸(包括miRNA, inRNA和DNA)及脂质等<sup>[2]</sup>,存在于各种生物的体液中(如血液、尿液、唾液和母乳等)<sup>[3,4]</sup>.研究表明,外泌体内容物参与各种生命进程,包括血管再生、肿瘤转移、免疫逃逸及代谢等<sup>[5,6]</sup>生理或病理进程,因而外泌体被认为是一系列重大疾病最具潜力的标志物或治疗靶点<sup>[7]</sup>.

外泌体蛋白质组学分析的经典工作流程分为3部分:首先,从生物样本中富集分离出外泌体(如采用超速离心、亲和富集等方法);其次,进行外泌体裂解和蛋白质样品制备(将提取的外泌体超声裂解或热裂解后,采用胰蛋白酶将蛋白质消化成肽段);最后,进行液-质联用分析[使用UPLC或Nano LC串联高分辨质谱仪,在数据依赖/非依赖型扫描(DDA/DIA)模式下进行蛋白质组数据采集]<sup>[8]</sup>.外泌体通常被认为是对温度极敏感的囊泡<sup>[9,10]</sup>.已有研究表明,外泌体储存条件对外泌体完整性/表面标记有显著影响,推荐外泌体样本长期储存在-80 °C<sup>[11]</sup>;并且外泌体在4 °C下也能稳定保存几个小时到几天<sup>[11,12]</sup>,Kumeda等<sup>[13]</sup>发现,唾液外泌体在4 °C下保存20个月后依旧能够保持膜的完整性和蛋白质含量.

在外泌体样品的分离过程中,研究人员倾向于在低温(通常是接近0 °C)条件下操作样本,以避免外泌体在处理过程中发生裂解,从而确保所得外泌体的完整性及其内含的蛋白质等生物活性分子的完整结构和生物活性<sup>[14,15]</sup>,如,基于金属离子亲和富集原理的磁珠通常在4 °C条件下进行富集操作<sup>[16-18]</sup>.然而,并非所有富集或前处理操作均适宜在低温环境下操作,如基于“抗原-抗体”免疫亲和原理的富集方法通常在37 °C或室温(约25 °C)下进行操作<sup>[19-21]</sup>,基于“核酸适配体-蛋白质”特异性亲和原理的富集方法通常在37 °C下进行<sup>[22-24]</sup>.热泳技术利用温度梯度的热泳力实现外泌体的分离,如Liu等<sup>[25]</sup>利用25~57 °C的梯度范围积累外泌体放大荧光信号用于检测肿瘤源性的外泌体.此外,基于温敏技术的富集磁珠通常需要变换温度以实现外泌体的富集和洗脱过程.如,Li等<sup>[26]</sup>开发的MB@CP-iPr温敏磁珠需在25 °C孵育5 min以实现外泌体的富集,在42 °C孵育20 min以实现外泌体的洗脱.尽管多数开发外泌体富集新方法的研究报道均明确声明其能实现较高的外泌体富集回收率,但在不同温度下操作处理后,是否会对所得外泌体蛋白质组学分析结果产生影响尚未见研究报道.

在外泌体蛋白样品的制备过程中,多采用基于超声破裂的方法破坏外泌体囊泡结构<sup>[27,28]</sup>,从而更高效地释放其中的蛋白质等内容物,但由于超声的热效应,不可避免地造成样本温度升高,甚至局部温度可能超过60 °C;一部分外泌体蛋白质提取试剂盒推荐采用热裂解的方法(100 °C处理5~10 min)处理外泌体样本,这一操作是否会对外泌体的蛋白质组学分析结果产生影响也无相关报道.

目前,已有多种不同富集分离策略用于分析外泌体蛋白质组学,多数研究将不同方法得到的外泌体蛋白质组学分析结果差异产生的原因直接概括为不同富集方法的富集选择性和富集效率的不同,然而关于富集分离过程中温度变化对外泌体蛋白质组学分析的影响尚未充分研究讨论.外泌体样品前处理度条件的变化是否会对外泌体蛋白质组学分析结果造成影响是一项非常值得研究探讨的科学问题.基于此,本文针对外泌体富集、破裂等处理过程中的温度变化对外泌体蛋白质组学分析结果的影响进

行了研究. 将样品分别置于4, 20, 37, 45, 60和90 °C环境中处理1 h后, 采用扫描电子显微镜、纳米颗粒追踪分析仪、电泳仪和液相色谱-质谱联用仪等仪器, 基于多种分析方法对其外泌体的形貌、粒径分布、特征蛋白质和蛋白质组学等进行了表征分析. 结果表明, 外泌体的形貌和粒径分布对处理温度的变化不敏感, 但外泌体的颗粒浓度会显著受到处理温度变化的影响. 随着处理温度的上升, 外泌体的颗粒浓度会显著下降. 此外, 外泌体的典型膜蛋白CD9和囊泡内特征蛋白质TSG101的表征含量随着外泌体处理温度的变化而呈现相反的变化趋势. 当处理温度高于45 °C时, TSG101会显著损失, 而CD9则显著升高. 蛋白质组学分析结果显示, 4, 20和37 °C条件下处理的外泌体样本鉴定到的蛋白质数目无明显差异, 且非标记定量蛋白质组学分析结果显示无显著差异的蛋白质. 在分析不同温度处理的外泌体蛋白质组学时发现, 当外泌体样本处理温度高于37 °C时, 鉴定到的外泌体蛋白质数目显著下降, 且外泌体蛋白质组学结果表现出显著差异(有48种外泌体蛋白质丰度显著下降). 此结果表明, 在不高于37 °C条件下富集得到的外泌体的蛋白质组学分析结果具有可比性, 在富集提取过程中, 外泌体样本可直接在室温下操作, 或无需进行特殊降温处理, 但如需温敏材料等特殊富集手段或使用超声破碎等样本处理手段时, 为避免热效应带来的蛋白质组学差异, 应进行适当的温度控制.

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

Hela细胞, 北京北纳生物公司; 胎牛血清(FBS)、RPMI1640基础培养基、青霉素-链霉素“双抗”溶液、EDTA胰蛋白酶、磷酸盐缓冲液(1×PBS)和无外泌体胎牛血清, 美国Gibco公司; BCA定量试剂盒和5×上样缓冲液>Loading buffer), 上海碧云天生物技术有限公司; GAPDH抗体、TSG101抗体、CD9抗体和山羊抗兔IgGHRP, 武汉Proteintech生物技术有限公司, 碳酸氢铵NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>(纯度≥99%)、二硫苏糖醇DTT(纯度≥99%)和碘乙酰胺IAA(纯度≥98%), 美国Sigma公司; 超滤离心管(30 kD), 美国Millipore公司; 测序级Trypsin, 美国Promega公司; 添加Tween-20的Tris缓冲溶液(TBST, 1×), 北京Solarbio科技有限公司.

Optima L-100XP型低温超速离心机, 美国贝克曼库尔特公司; PowerPac HC型高流电泳仪, 美国BIO-RAD公司; 恒温混匀仪, 德国Eppendorf公司; BPN-50CH型CO<sub>2</sub>培养箱, 上海一恒科学仪器有限公司; Micro21型高速冷冻离心机、Multiskan SkyHigh酶标仪和高分辨率质谱仪, 美国Thermo Fisher公司; JY92-IIN型超声破碎仪, 宁波新芝生物科技股份有限公司; HT-7700型透射电子显微镜, 日本Hitachi公司; PMX160型纳米颗粒跟踪分析仪, 德国PARTICLE METRIX公司.

### 1.2 实验过程

1.2.1 细胞培养与外泌体收集 将Hela细胞在含有10%胎牛血清(FBS)和1%青霉素和链霉素的RPMI 1640培养基中培养, 待密度达到80%后用PBS缓冲液清洗2遍, 然后与无外泌体胎牛血清的培养基在37 °C和5% CO<sub>2</sub>条件下共孵育48 h后, 收集细胞上层清液.

1.2.2 外泌体的分离和纯化 采用超速离心(UC)从Hela细胞上层清液中制备外泌体样本. 将收集的培养基按以下程序处理: (1) 以200 r/min离心处理10 min后收集上层清液; (2) 以2000 r/min离心10 min后收集上层清液; (3) 以10000 r/min离心30 min后收集上层清液, 随后用0.22 μm过滤器除去死细胞和细胞碎屑; (4) 将收集的上清液在110000 r/min和4 °C条件下超速离心70 min后, 除去上层清液, 所得沉淀重悬在PBS缓冲液中; (5) 再次在110000 r/min和4 °C条件下超速离心重复2次, 最后将所得沉淀重悬在PBS缓冲液中, 储存于-80 °C冰箱中.

1.2.3 不同温度处理外泌体 将所得外泌体等分(20 μL)在冷却的1.5 mL离心管中, 处理前储存于冰中, 然后用恒温混匀仪将等分的外泌体分别在4, 20, 37, 45, 60和90 °C下处理1 h.

1.2.4 不同温度处理后外泌体的形貌与粒径表征 使用透射电子显微镜(TEM)对外泌体的形貌进行了表征. 取20 μL目标物, 滴到封口膜上, 将100目铜网放到液滴上, 让铜网上浸透外泌体, 沉淀1 min. 用滤纸吸取浮液, 然后滴加醋酸双氧铀到铜网上, 负染色30 min, 经日光灯干燥, 用透射电子显微镜

(电压 100 kV)进行检测成像。

采用纳米颗粒跟踪分析技术(NTA)对外泌体的粒径和颗粒浓度进行了表征。取 20  $\mu\text{L}$  不同温度处理后的外泌体,用纳米颗粒跟踪分析仪分析外泌体的粒径及浓度。

**1.2.5 蛋白浓度测量和免疫印迹分析** 采用BCA试剂盒测蛋白样品浓度,在样品蛋白中加入5 $\times$ 上样缓冲液,于95  $^{\circ}\text{C}$ 加热处理10 min;用12% SDS-PAGE电泳分离后将凝胶转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)微孔膜上,电压设置为19 V,45 min后用5%脱脂牛奶(2.5 g奶粉溶于50 g水)进行封闭。采用TBST冲洗后,将PVDF膜与不同的第一抗体(CD9, GAPDH和TSG101)在4  $^{\circ}\text{C}$ 下共孵育12 h,冲洗后再用第二抗体(IgGHRP)孵育150 min。最后,使用Amersham ImageQuant 800呈现印记。

**1.2.6 外泌体的裂解** 将外泌体悬浮在含有胰蛋白酶抑制剂的100 mmol/L尿素裂解液中,于冰上超声裂解15 min,离心后将上层清液转移至超滤离心管中。在14000 r/min条件下离心15 min,添加50 mmol/L碳酸氢铵溶液,重复此步骤3次。添加50  $\mu\text{L}$  DTT溶液(10 mmol/L溶于50 mmol/L  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ 溶液),于57  $^{\circ}\text{C}$ 反应1 h后,于14000 r/min条件下离心15 min;添加6.17  $\mu\text{L}$  IAA溶液(20 mmol/L溶于50 mmol/L  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ 溶液),避光反应1 h,于14000 r/min条件下离心15 min。向溶液中加入3  $\mu\text{g}$ 胰蛋白酶,在37  $^{\circ}\text{C}$ 下孵育16 h,真空离心浓缩后重新溶解,再脱盐处理进行nLC-hrMS/MS分析。

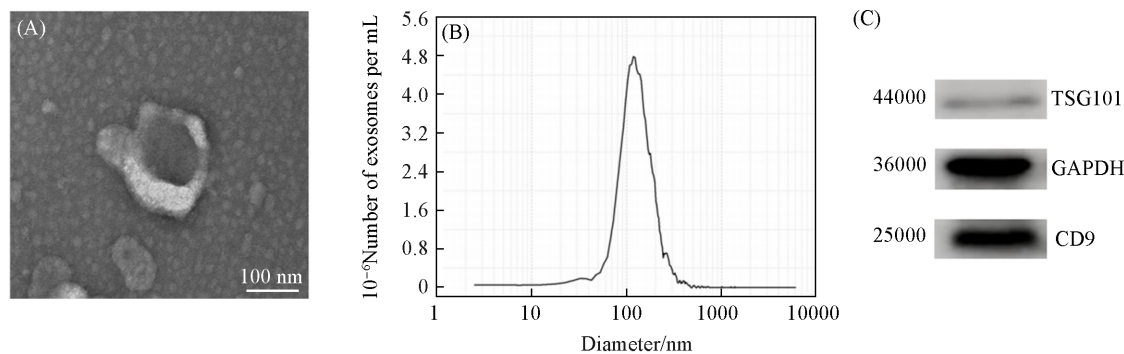
**1.2.7 数据处理和分析** 使用Thermo Fisher EASY-nLC 1200 串联Orbitrap Fusion<sup>TM</sup> Lumos<sup>TM</sup> Tribrid<sup>TM</sup>质谱仪进行外泌体蛋白质组分析。色谱柱为 $\text{C}_{18}$ 反相毛细管柱(15 cm, 75  $\mu\text{m}$  i. d.);流动相A:水(含0.1%甲酸),流动相B:乙腈/水(体积比80:20,含0.1%甲酸);洗脱梯度:0~8 min, 5%~8%B; 8~58 min, 8%~22%B; 58~70 min, 22%~32%B; 70~71 min, 32%~95%B; 71~78 min, 95%B;流速为300 nL/min。质谱数据采集使用DDA模式,一级质谱参数:喷雾电压2 kV,离子源温度320  $^{\circ}\text{C}$ ,扫描质荷比 $m/z$  350~1440,最大离子注入时间(MIT)50 ms。二级质谱参数:选取一级质谱信号最高的前25个离子进行二级质谱分析,碰撞能量30%,最大离子注入时间(MIT)35 ms。

使用MaxQuant软件(Version 2.0.6.0)对所得质谱数据进行搜库与组学定量分析,选择Uniprot-human swissport数据库,固定修饰设定为半胱氨酸脲甲基化,酶切方式为Trypsin/P,漏切位点设置为2,肽段最小长度为6个氨基酸残基,肽段的最大修饰设置为3,一级母离子质量容许误差设置为 $2 \times 10^{-5}$ ,二级碎片离子的质量容许误差设置为0.02 Da。Protein, PSM和Peptide的FDR均设置为1%,使用非标记定量方法对血清外泌体蛋白进行定量。使用Perseus平台进行蛋白质组分析,以 $P < 0.05$ 为临界值,采用 $t$ 检验评估蛋白质丰度是否具有统计学意义。使用UniProt的GO数据库(<http://www.ebi.ac.uk/GO/>)对蛋白质进行GO(基因本体)功能注释,使用KASS([http://www.genome.jp/kaas-bin/kaas\\_main](http://www.genome.jp/kaas-bin/kaas_main))对提交的蛋白质进行KEGG(用京都基因与基因组百科全书)通路分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 外泌体的鉴定

对细胞上层清液提取的外泌体进行了鉴定。透射电子显微镜(TEM)分析结果如图1(A)所示,提取



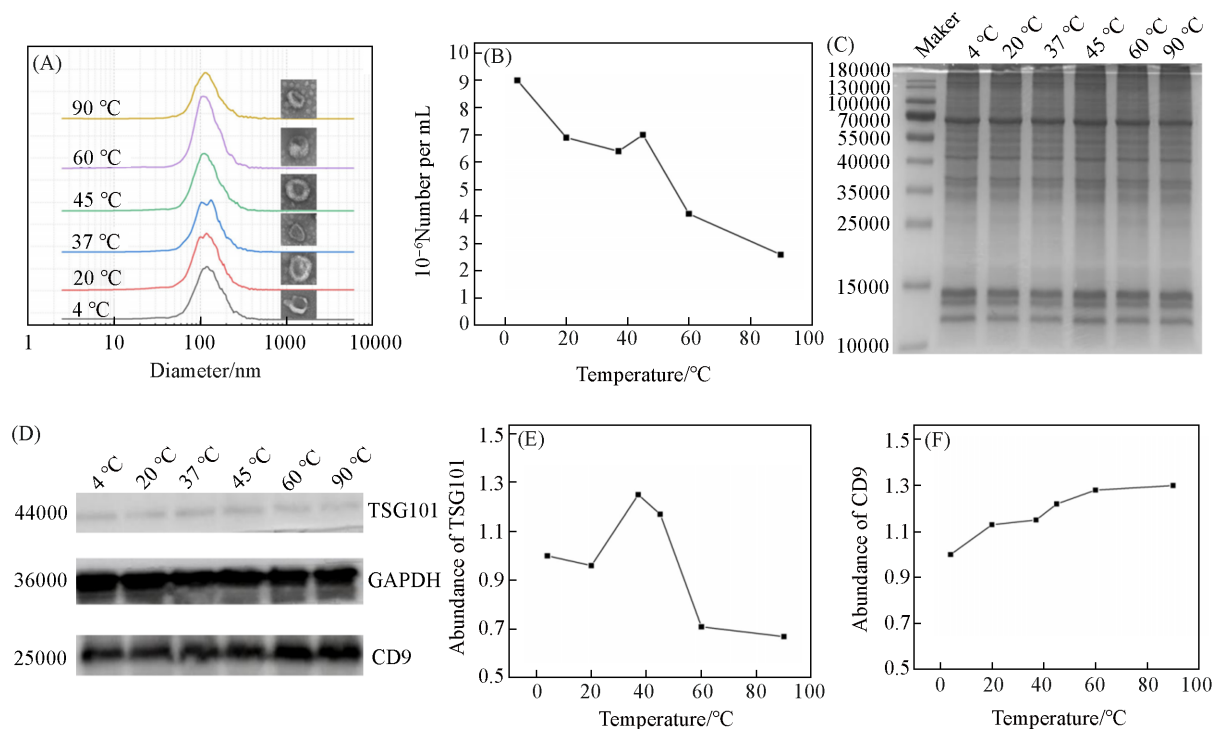
**Fig. 1 Identification of exosomes in model samples extracted from the culture supernatant of HeLa cells**

(A) Morphology of exosomes under transmission electron microscopy; (B) nanoparticle tracking analysis; (C) Western-blot analysis.

的外泌体呈现典型的“茶托状”结构且背景较为干净；纳米颗粒跟踪分析(NTA)结果如图1(B)所示，大多数囊泡的直径在60~200 nm之间；免疫印迹结果如图1(C)所示，利用超速离心得到的细胞外囊泡存在外泌体的标志性蛋白CD9和TSG101，表明已从细胞上层清液中提取到了外泌体。

## 2.2 外泌体形貌、粒径和标志性蛋白表达的变化

透射电子显微镜(TEM)照片显示了不同温度处理后外泌体的形态变化，如图2(A)所示，经不同温度处理后均可观察到典型的外泌体“茶托状”结构。进一步采用纳米颗粒跟踪分析(NTA)表征了不同温度处理条件下外泌体粒径和颗粒浓度的变化，如图2(A)所示，外泌体的平均粒径分别为164.1, 158.9, 152.4, 155.8, 152.7和158.8 nm(标准差为4.43, 在均值的10%以下)，符合外泌体的粒径范围且无明显变化，说明不同温度处理不会对外泌体粒径分布产生明显影响。对颗粒浓度的表征结果如图2(B)所示，随着温度的升高，颗粒浓度显著下降。4 °C时颗粒浓度最高，以20, 37和45 °C处理后颗粒浓度有约20%的下降；以更高的温度处理外泌体样本后，外泌体的颗粒浓度则显著下降，其中60 °C处理后下降49%，90 °C处理后下降74%。以上结果表明，在4 °C条件下，外泌体囊泡结构较为完整且颗粒浓度最高，随着处理温度的升高，外泌体的颗粒浓度总体呈逐渐下降趋势。



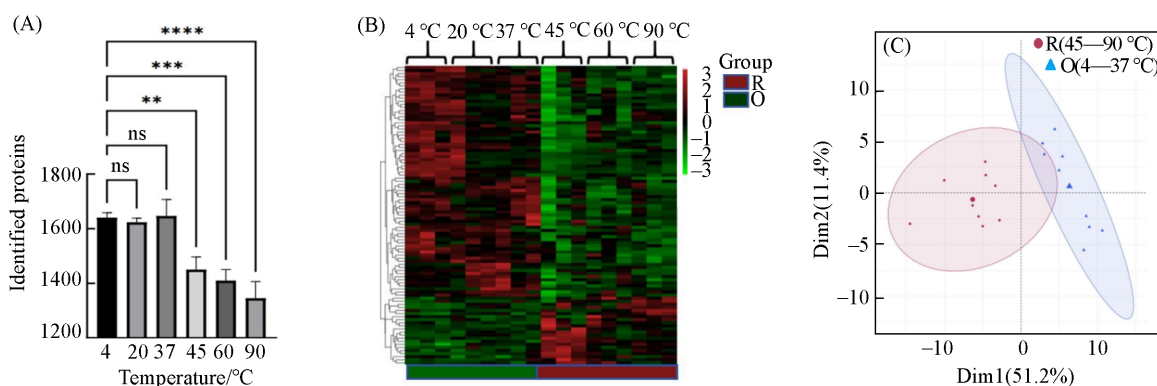
**Fig. 2** Changes in morphology, particle size, and protein expression of model exosomes after treatment at different temperatures

(A) Morphology and particle size of exosomes treated at different temperatures; (B) particle concentration analysis of exosomes; (C) expression levels of whole protein in exosomes treated at different temperatures; (D) expression levels of marker proteins in exosomes treated at different temperatures; (E) TSG101 abundance variation; (F) CD9 abundance variation.

为了评估不同温度处理对外泌体蛋白质的影响，首先通过聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)检测了不同温度处理后的外泌体全蛋白水平，结果如图2(C)所示，不同温度处理后的外泌体全蛋白在分子量分布水平上无明显差异。进一步通过Western-blot分析了外泌体标志蛋白质CD9和TSG101的丰度变化，结果如图2(D)所示。利用“Image J”软件对TSG101和CD9的灰度值进行了统计，结果如图2(E)和2(F)所示，标志性外泌体胞内蛋白TSG101在高于45 °C时会发生明显的损失，可能是由于样本处理温度的升高导致部分外泌体蛋白质发生了降解或变性；与之相反，外泌体膜蛋白CD9的丰度随样本处理温度的升高而升高，这可能是由于温度升高导致外泌体膜结构被破坏，进而促进了膜蛋白的充分释放。

### 2.3 不同温度处理对外泌体蛋白含量的影响

通过液相色谱串联质谱(LC-MS/MS)非标记定量技术对不同温度条件下处理的外泌体蛋白进行了蛋白质组学分析. 为了探讨温度对外泌体蛋白质丰度的影响, 对不同温度处理的外泌体蛋白进行了蛋白图谱分析, 使用MaxQuant定量软件与Swiss-port数据库进行搜索和比对, 结果如图3(A)所示. 在4, 20和37 °C条件下处理后共鉴定到的蛋白数量相近, 均能鉴定到1600多个蛋白质, 随着温度升高鉴定到的蛋白数量下降, 45, 60和90 °C条件下处理后蛋白质鉴定数量逐渐下降至1300种蛋白质(下降约17%), 说明外泌体样本处理温度的升高会影响蛋白质的质谱分析和定量结果.



**Fig. 3 Effect of different temperature treatments on the identified protein numbers and exosomal proteomics**

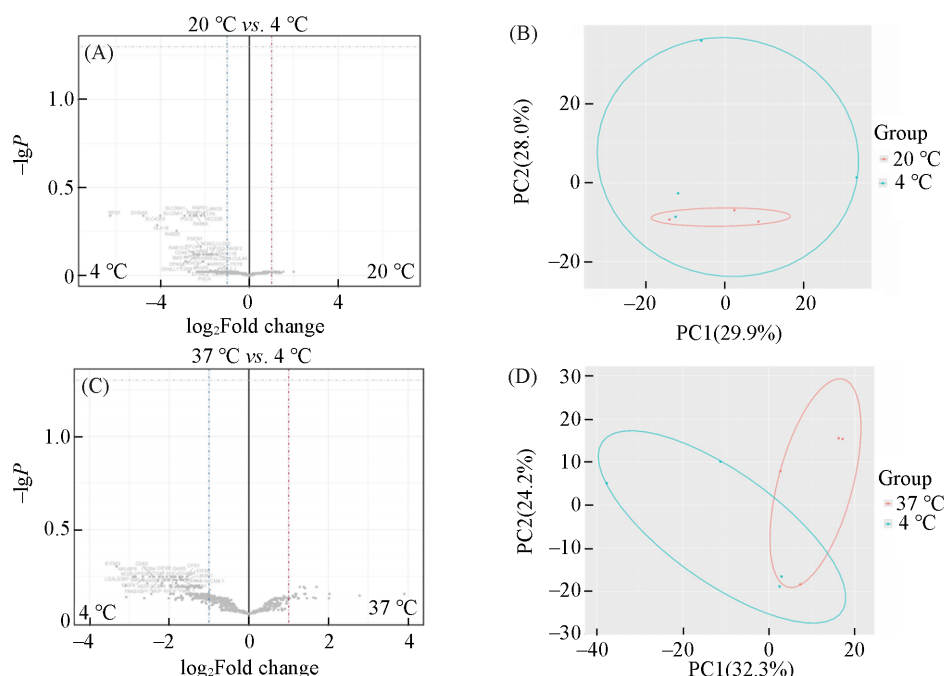
(A) Number of proteins identified after different temperature treatments; (B) identified protein profile (repeated 3 times at each temperature); (C) PCA of exosomes treated at different temperatures.

常规的外泌体富集操作一般在37 °C以下进行(如, 基于金属离子亲和富集原理的磁珠通常推荐在4 °C进行富集操作; 基于“抗原-抗体”、“核酸适配体-蛋白”亲和原理的富集方法通常在37 °C或室温下进行操作), 而一些温敏材料在富集的时候会使用较高的处理温度. 因此, 将37 °C以下划分为一组, 37 °C以上分为一组, 对外泌体蛋白质组学分析结果进行了聚类分析. 如图3(B)所示. 低温(4~37 °C)处理组和高温(45~90 °C)处理组外泌体的蛋白质丰度存在明显差异, 说明升高温度会对部分外泌体蛋白产生显著影响. 对低温处理组和高温处理组的外泌体蛋白质组数据进行了主成分(PCA)分析, 结果如图3(C)所示. 高温处理的外泌体蛋白与低温处理的外泌体蛋白离散明显, 主成分分析(PCA)进一步验证了升高温度对外泌体蛋白丰度的显著影响.

### 2.4 不同温度处理外泌体蛋白组定量分析结果

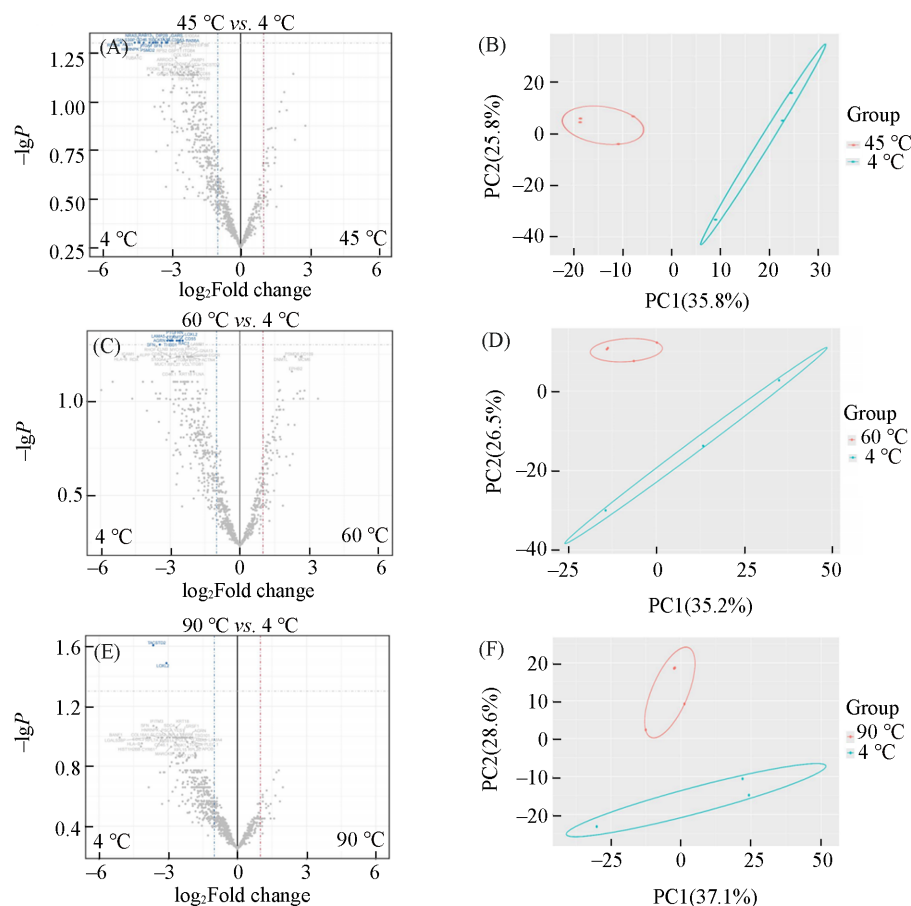
根据上述实验结果, 在低温组(4, 20和37 °C)和高温组(45, 60和90 °C)处理后得到的外泌体蛋白质组之间存在显著的丰度差异. 为了进一步验证低温处理组的外泌体蛋白组数据是否具有可比性, 将20和37 °C处理的外泌体分别与4 °C处理的外泌体的蛋白组进行非标记定量分析和比较. 选取各温度条件分别进行3次重复实验获得的样本数据, 通过*t*检验筛选具有统计学意义的受温度影响显著的外泌体差异蛋白质(差异倍数>2倍且 $P \leq 0.05$ ,  $P$ 值校正方法 Storey's  $q$ -value), 并绘制火山图. 如图4(A)和4(C)所示, 经比较, 在37 °C以下外泌体蛋白之间未观察到明显差异. 对20和37 °C处理的外泌体蛋白与4 °C处理的进行主成分分析, 如图4(B)和4(D)所示, 37和20 °C处理的外泌体与4 °C处理的外泌体在主成分分析中表现出较为接近的分布, 且离散性不明显, 表明低温条件下外泌体蛋白质组的变化较小, 未显著干扰蛋白质组的整体结构与特征.

随后, 将高温组处理的外泌体分别与4 °C处理的外泌体蛋白质组进行非标记定量分析和比较. 如图5(A), 5(C)和5(E)所示, 高温组处理的外泌体样本有部分蛋白质发生显著含量变化, 通过*t*检验筛选出了差异蛋白, 发现45 °C处理后有15个具有统计学意义的蛋白质发生显著损失, 60 °C处理后有9个蛋白质显著损失, 90 °C处理后有2个蛋白显著损失. 对高温处理的外泌体蛋白与4 °C处理的外泌体进行了主成分分析. 如图5(B), 5(D)和5(F)所示, 高温组处理后的外泌体样本相比于4 °C处理的外泌体



**Fig. 4** Differences in exosome proteomics after treated at low temperatures

(A) Volcanic map comparing 20 °C and 4 °C; (B) principal component analysis comparing 20 °C and 4 °C; (C) volcanic map comparing 37 °C and 4 °C; (D) principal component analysis comparing 37 °C and 4 °C (repeated 3 times at each temperature).



**Fig. 5** Differences in exosomal proteomics after treated at high temperatures

(A) Volcanic map comparing 45 °C and 4 °C; (B) principal component analysis comparing 45 °C and 4 °C; (C) volcanic map comparing 60 °C and 4 °C; (D) principal component analysis comparing 60 °C and 4 °C; (E) volcanic map comparing 90 °C and 4 °C; (F) principal component analysis comparing 90 °C and 4 °C (repeated 3 times at each temperature).

样本,主成分分析显示其表现为明显的离散性,表明高温条件显著影响了部分外泌体蛋白质的组成及后续的组学分析.导致此现象的主要原因可以归纳为温度对蛋白质及外泌体结构稳定性的显著影响.当温度超过45 °C时,受分子热运动的影响,维持蛋白质构象的非共价键(如氢键、疏水相互作用等)会遭到破坏,一方面促进疏水相互作用的增强,促使原本埋藏在内部的疏水基团暴露,引发蛋白质聚集或不可逆变性;另一方面,温度升高使多肽链的热动能增强,导致链段展开,增加构象熵,破坏天然结构的稳定性.

综上所述,在37 °C以下的低温(包括4, 20和37 °C)处理组中,外泌体蛋白质组无明显差异,且各组数据在可比性方面较好,表明低温至常温范围内外泌体的蛋白质组相对稳定,蛋白质组学数据能够保持较一致的特征,适合用于进一步的组学分析.然而,在高于37 °C的温度(45, 60和90 °C)处理下,外泌体蛋白质组的差异显著增加,外泌体蛋白质的降解或变性可能会导致蛋白质组成的重大改变,会干扰后续的蛋白质组学分析.高温处理不仅可能导致蛋白质的热变性和降解,还可能引发蛋白质聚集、氧化等化学变化,可能导致数据产生偏差,从而影响结果的准确性和可靠性.外泌体样本在高温处理下,其蛋白质组数据会因蛋白质的物理化学变化而发生显著偏移.因此,如使用过高温处理样本,在进行不同处理方法的蛋白质组学数据比较时,应充分考虑由此效应引发的数据偏差.

## 2.5 温度影响的差异蛋白的功能与机制分析

为进一步分析温度升高对哪些外泌体蛋白质产生了影响,将45 °C以上处理组与37 °C以下处理组的蛋白质组学数据分别归类并进行了比较分析.结果表明,较高温处理会对蛋白质的分析产生影响[图6(A)和6(B)],经过比较分析发现,共有48个蛋白丰度显著下降.对排名前10的最显著的10个差异蛋白(SFN, RPS2, RPL14, HNRNPK, RPL6, LAMA5, ITGB1, CD55, RPL7和AKR1C3)进行了GO和KEGG富集分析,结果如图6(C)和6(D)所示.GO富集分析显示,上述差异蛋白主要参与以下生物学过程:焦点黏附、细胞-底物连接、细胞质翻译、胞质核糖体和核糖体大亚基生物发生,这些过程与细胞黏附、信号传导和蛋白合成等基本生物学功能密切相关.KEGG富集分析进一步揭示,这些差异蛋白与多个重要的信号通路密切相关,包括核糖体通路、冠状病毒病-Covid-19通路、ECM-受体相互作用

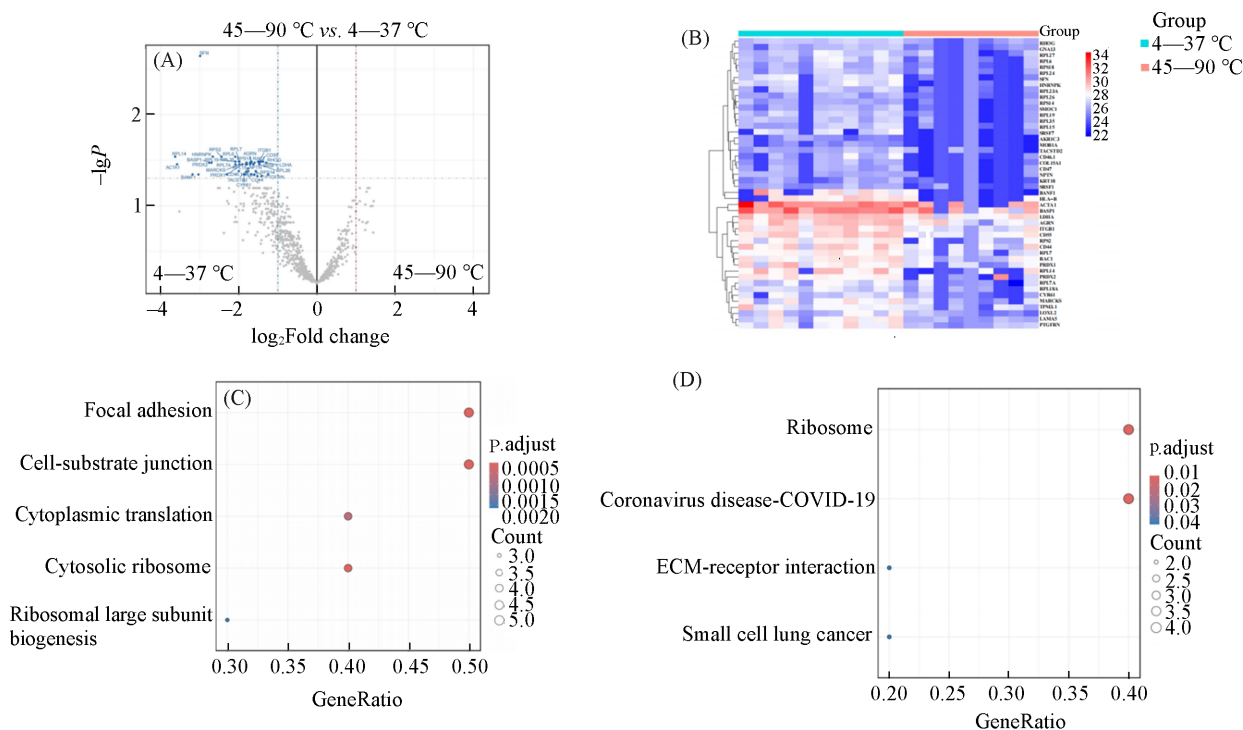


Fig. 6 Analysis of differential proteins

(A) Differential protein volcano map; (B) differential protein heatmap; (C) GO enrichment analysis of differential proteins; (D) KEGG enrichment analysis of differential proteins.

和小细胞肺癌通路, 这些通路的变化可能提示高温处理对细胞的应激反应以及外泌体生物学功能的潜在影响. 这表明较高温度处理可显著改变外泌体蛋白质的丰度, 并可能通过影响焦点黏附、细胞黏附以及核糖体功能等重要生物学过程, 进而影响外泌体在细胞间信息传递中的作用. 因此, 在研究上述外泌体蛋白的功能和通路时, 要对温度进行控制, 避免影响实验结果.

温度变化可能通过不同的机制影响蛋白质组分析结果: (1) 高温会破坏蛋白质的三维结构, 导致疏水核心暴露, 引发不可逆的聚集或者降解, 如 LAMA5 蛋白依赖稳定的 $\beta$ 折叠和结构域相互作用维持功能, 高温可能破坏结构域的稳定性, 导致功能丧失并加速蛋白酶体或溶酶体途径的降解<sup>[29-32]</sup>; (2) 高温会激活水解酶加速蛋白的水解, 如 RPS2/RPL14 在应激条件下通过泛素-蛋白酶体降解, 高温会通过激活 E3 泛素连接酶促进泛素化标记<sup>[33,34]</sup>; (3) 高温会诱导活性氧的生成, 导致蛋白质氧化破坏其功能, 如 SFN 作为信号适配蛋白, 其磷酸化结合位点可能因氧化损伤失去与其它蛋白(p53)相互作用的能力<sup>[35-37]</sup>; (4) 高温引起的蛋白质变性会抑制 HSP70 和 HSP90 等分子伴侣的辅助折叠功能, 导致错误折叠的蛋白被定向清除, 如核糖体蛋白 RPL6/RPL7 的折叠依赖 HSP70, 高温会干扰此过程<sup>[29,38-40]</sup>. 综上所述, 高温可能通过多种物理或生化途径(如变性、氧化损伤和水解酶激活)导致目标蛋白的降解. 这些结果有助于解析高温对外泌体蛋白稳定性的影响, 为优化外泌体处理流程提供理论依据.

### 3 结 论

外泌体蛋白质组学的研究不仅有助于深入了解细胞间信号传递的机制, 还为疾病的早期诊断和治疗提供了潜在的生物标志物和治疗靶点. 本研究以 Hela 细胞分泌的外泌体为研究对象, 探讨了温度处理对外泌体蛋白质组学分析的影响, 为外泌体的采集和处理过程中的温度控制策略提供了参考. 结果表明, 外泌体的形貌和粒径分布对处理温度的变化不敏感, 但随着处理温度的上升, 外泌体的颗粒浓度会显著下降. 在 4, 20 和 37 °C 条件下处理的外泌体样本鉴定到的蛋白数目无明显差异, 且非标记蛋白质组学定量分析结果未显示明显差异; 而当外泌体样本的处理温度达到 45 °C 及以上时, 蛋白质鉴定数下降约 17%, 根据 *t* 检验结果, 有 48 种外泌体蛋白质呈现显著损失. 上述实验结果表明, 当处理温度不超过 37 °C 时, 外泌体蛋白质组学分析结果具有较好的可比性, 但如需在高温下处理外泌体样本, 其蛋白质组数据会因蛋白质的物理化学变化而发生显著偏移, 因此, 在进行不同处理方法的蛋白质组学数据比较时, 应充分考虑由此效应引发的数据偏差.

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Shao H. L., Im H., Castro C. M., Breakefield X., Weissleder R., Lee H. H., *Chem. Rev.*, **2018**, *118*(4), 1917—1950
- [ 2 ] Valadi H., Ekström K., Bossios A., Sjöstrand M., Lee J. J., Lötvall J. O., *Nat. Cell Biol.*, **2007**, *9*(6), 654—659
- [ 3 ] Simpson R. J., Lim J. W. E., Moritz R. L., Mathivanan S., *Expert Rev. Proteomics*, **2009**, *6*(3), 267—283
- [ 4 ] Martins T. S., Vaz M., Henriques A. G., *Anal. Bioanal. Chem.*, **2023**, *415*(7), 1239—1263
- [ 5 ] Hamzah R., Alghazali K., Biris A., Griffin R. J., *ACS Appl. Nano Mater.*, **2022**, *5*(9), 12265—12275
- [ 6 ] Yao J. L., Huang K., Zhu D. S., Chen T., Jiang Y. F., Zhang J. Y., Mi L. J., Xuan H., Hu S. Q., Li J. L., Zhou Y. F., Cheng K., *ACS Nano*, **2021**, *15*(7), 11099—11111
- [ 7 ] Nguyen C. M., Sallam M., Islam M. S., Clack K., Soda N., Nguyen N. T., Shiddiky M. J. A., *ACS Sensors*, **2023**, *8*(7), 2493—2513
- [ 8 ] Jin Y., Zhang J. J., Zhang Y. X., Yuan Y., Han Z. Z., *Chem. J. Chinese Universities*, **2024**, *45*(11), 20240305(靳莹, 张俊杰, 张毅欣, 袁悦, 韩珍珠. 高等学校化学学报. **2024**, *45*(11), 20240305)
- [ 9 ] Cheng Y. R., Zeng Q. Y., Han Q., Xia W. L., *Protein Cell*, **2019**, *10*(4), 295—299
- [ 10 ] Maroto R., Zhao Y. X., Jamaluddin M., Popov V. L., Wang H. W., Kalubowilage M., Zhang Y. Q., Luisi J., Sun H., Culbertson C. T., Bossmann S. H., Motamedi M., Brasier A. R., *J. Extracell. Vesicles*, **2017**, *6*(1), 1359478
- [ 11 ] Welsh J. A., Goberdhan D. C. I., O'Driscoll L., Buzas E. I., Blenkinsop C., Bussolati B., Cai H. J., Di Vizio D., Driedonks T. A. P., Erdbrügger U., Falcon-Perez J. M., Fu Q. L., Hill A. F., Lenassi M., Lim S. K., Mahoney M. G., Mohanty S., Möller A., Nieuwland R., Ochiya T., Sahoo S., Torrecilhas A. C., Zheng L., Zijlstra A., Abuelreich S., Bagabas R., Bergese P., Bridges E. M., Brucale M., Burger D., Carney R. P., Cocucci E., Colombo F., Crescitelli R., Hanser E., Harris A. L., Haughey N. J., Hendrix A., Ivanov A. R., Jovanovic-Talisman T., Kruh-Garcia N. A., Faustino V. K. L., Kyburz D., Lässer C., Lennon K. M., Lötvall J., Maddox A. L., Martens-Uzunova E. S., Mizenko R. R., Newman L. A., Ridolfi A., Rohde E., Rojalin T., Rowland A., Saftics A., Sandau U. S., Saugstad J. A., Shekari F., Swift S., Ter-Ovanesyan D., Tosar J. P., Useckaite Z., Valle F., Varga Z., van der Pol E., van Herwijnen M. J. C., Wauben

- M. H. M., Wehman A. M., Williams S., Zendrini A., Zimmerman A. J., Théry C., Witwer K. W., *J. Extracell. Vesicles*, **2024**, *13*(2), e12404
- [12] Sivanantham A., Jin Y., *Life-Basel*, **2022**, *12*(5), 697
- [13] Kumeda N., Ogawa Y., Akimoto Y., Kawakami H., Tsujimoto M., Yanoshita R., *Biol. Pharm. Bull.*, **2017**, *40*(8), 1183—1191
- [14] Théry C., Amigorena S., Raposo G., Clayton A., *Curr. Protoc. Cell Biol.*, **2006**, Chapter 3, Unit 3.22
- [15] Wubbolts R., Leckie R. S., Veenhuizen P. T. M., Schwarzmann G., Möbius W., Hoernschemeyer J., Slot J. W., Geuze H. G., Stoorvogel W., *J. Biol. Chem.*, **2003**, *278*(13), 10963—10972
- [16] Back S. J., Kim W., Kim D. Y., Kim S. J., Hwang S. R., Jung G. B., *Anal. Biochem.*, **2023**, *673*, 115161
- [17] Gao F. Y., Jiao F. L., Xia C. S., Zhao Y., Ying W. T., Xie Y. P., Guan X. Y., Tao M., Zhang Y. J., Qin W. J., Qian X. H., *Chem. Sci.*, **2019**, *10*(6), 1579—1588
- [18] Geng H. C., Wu G. Y., Li C. Y., Song J., Chen P., Cai Q. Y., *New J. Chem.*, **2021**, *45*(26), 11719—11726
- [19] Huang Z. R., Chang Y. X., Hao K., Tan Y. F., Ding L., Wang L. K., Wang Z., Pan Z. Y., Gao H., Wu J. H., Zhu Y. B., Gao Q., Bi Y. J., Yang R. F., *Imeta*, **2023**, *2*(2), e100
- [20] Liu S. Y., Chen X., Bao L. L., Liu T., Yuan P. Y., Yang X. S., Qiu X. Y., Gooding J. J., Bai Y. K., Xiao J. J., Pu F. X., Jin Y., *Nat. Biomed. Eng.*, **2020**, *4*(11), 1063—1075
- [21] Khanum S., Roberts J. M., Heathcott R. W., Bagley S., Wilson T., Gupta S. K., Kirk M. R., Heiser A., Janssen P. H., Wedlock D. N., *Front. Microbiol.*, **2022**, *13*, 918111
- [22] Yu J. J., Wei Y., Cui Z. P., Tian J., Cai H. B., Zhang W. A., *ACS Macro Lett.*, **2024**, *13*(2), 195—200
- [23] Zhang K. X., Yue Y. L., Wu S. X., Liu W., Shi J. J., Zhang Z. Z., *ACS Sensors*, **2019**, *4*(5), 1245—1251
- [24] Huang D. Q., Yu J. J., Tian J., Cai H. B., Zhang W. A., *Macromol. Rapid Commun.*, **2025**, 2400819
- [25] Liu C., Zhao J. X., Tian F., Cai L. L., Zhang W., Feng Q., Chang J. Q., Wang F. N., Yang Y. J., Dai B., Cong Y. L., Ding B. Q., Sun J. S., Tan W. H., *Nat. Biomed. Eng.*, **2019**, *3*(3), 183—193
- [26] Li Q., Zhang Z. W., Wang F. C., Wang X., Zhan S. S., Yang X. Q., Xu C., Liu D. B., *Sci. Adv.*, **2023**, *9*(15), eadf4568
- [27] Subedi P., Schneider M., Philipp J., Azimzadeh O., Metzger F., Moertl S., Atkinson M. J., Tapio S., *Anal. Biochem.*, **2019**, *584*, 113390
- [28] Kugeratski F. G., Hodge K., Lilla S., McAndrews K. M., Zhou X. N., Hwang R. F., Zanivan S., Kalluri R., *Nat. Cell Biol.*, **2021**, *23*(6), 631—641
- [29] Hartl F. U., Bracher A., Hayer-Hartl M., *Nature*, **2011**, *475*(7356), 324—332
- [30] Hu J. P., Song S. S., Yu M. T., Yu Y. H., Ju Z. Y., Wang Y. F., Cao X. Y., *J. Mol. Model.*, **2024**, *30*(5), 134
- [31] Yao W. J., Zhao Z. H., Zhang J. M., Kong B. H., Sun F. D., Liu Q., Cao C. A., *Meat Sci.*, **2024**, *217*, 109595
- [32] Yurchenco P. D., *C. S. H. Perspect. Biol.*, **2011**, *3*(2), a004911
- [33] Shao C., Shen L., Qiu C., Wang Y., Qian Y., Chen J., Quyang Z., Zhang P., Guan X., Xie J., Liu G., Peng C., *Plant Biol.*, **2021**, *23*(5), 806—818
- [34] Chen L., Zhong H. Y., Kuang J. F., Li J. G., Lu W. J., Chen, J. Y., *Planta*, **2011**, *234*(2), 377—390
- [35] Sies H., Berndt C., Jones D. P., *Annu. Rev. Biochem.*, **2017**, *86*(1), 715—748
- [36] Kultz D., *Annu. Rev. Physiol.*, **2005**, *67*, 225—257
- [37] Mi W. N., Wang C. Y., Luo G., Li J. H., Zhang Y. Z., Jiang M. M., Zhang C. C., Liu N. N., Jiang X. X., Yang G., Zhang L. L., Zhang G., Zang Y. J., Fu Y., *Cell Death Discov.*, **2021**, *7*(1), 375
- [38] Koplín A., Preissler S., Ilina Y., Koch M., Scior A., Erhardt, M., Deuerling E., *J. Cell Biol.*, **2010**, *189*(1), 57—68
- [39] Kramer G., Boehringer D., Ban N., Bukau B., *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **2009**, *16*(6), 589—597
- [40] Jahan K., Nie H. T., Yan X. W., *Fish Shellfish Immunol.*, **2023**, *134*, 108607

(Ed.: L, V, K)