

外泌体分离和蛋白质组学分析的研究进展

靳莹¹, 张俊杰¹, 张毅欣¹, 袁悦², 韩珍珍¹

(1. 安徽医科大学基础医学院, 合肥 230032;

2. 安徽省儿童医院小儿骨科(安徽医科大学附属儿童医院), 合肥 230051)

摘要 外泌体是多泡体与细胞质膜融合时释放的细胞外囊泡, 含有蛋白质、脂质和核酸等。它以细胞外囊泡的形式运送货物, 参与多种癌症过程(如侵袭和转移), 被认为是液体活检的新兴靶标, 其在细胞通讯、信号传导和免疫应答中发挥着重要的作用。质谱法已成为蛋白质组学研究领域不可或缺的一部分, 外泌体的蛋白质组学分析是发现潜在癌症生物标志物的一种很有前途的方法。高分辨率分离、高效质谱分析和全蛋白质组数据库的最新进展都有助于患者样本中外泌体的成功分析。本文综合评述了外泌体的分离方法、蛋白质组学分析技术以及基于外泌体的蛋白质组学分析在临床疾病诊断的应用研究。最后, 对外泌体分离和蛋白质组学面临的挑战及在临床应用中的前景进行了展望。

关键词 外泌体; 蛋白质组学; 质谱; 生物标志物; 疾病诊断

中图分类号 O657

文献标志码 A

doi: 10.7503/cjcu20240305

Research Progress in Exosome Isolation and Proteomics Analysis

JIN Ying¹, ZHANG Junjie¹, ZHANG Yixin¹, YUAN Yue², HAN Zhenzhen^{1*}

(1. School of Basic Medical Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032, China;

2. Department of Pediatric Orthopedics, Anhui Children's Hospital

(Children's Hospital of Anhui Medical University), Hefei 230051, China)

Abstract Exosomes are extracellular vesicles released *via* the fusion of multivesicular bodies with the cell plasma membrane, containing proteins, lipids, nucleic acids, etc. They transport cargo in the form of extracellular vesicles and participate in various cancer processes such as invasion and metastasis. As emerging targets for liquid biopsy, exosomes play crucial roles in cell communication, signal transduction, and immune response. Mass spectrometry has become an indispensable part of the field of proteomics research, and the proteomic analysis of exosomes is a promising method for discovering potential cancer biomarkers. Recent advances in high-resolution separations, high-performance mass spectrometry and comprehensive proteome databases have all contributed to the successful analysis of exosomes from patient samples. Here, this article reviews the isolation methods of exosomes, proteomics analysis techniques, and the application research of proteomics analysis based on exosomes in clinical disease diagnosis. Finally, the challenges faced by exosome isolation and proteomics, as well as the prospects for their clinical applications, are discussed and outlooked.

Keywords Exosome; Proteomics; Mass spectrometry; Biomarker; Disease diagnosis

收稿日期: 2024-06-24. 网络首发日期: 2024-08-13.

联系人简介: 韩珍珍, 女, 博士, 副教授, 主要从事外泌体分离分析、免疫诊断治疗方面的研究. E-mail: hanzhenzhen@ahmu.edu.cn

基金项目: 安徽省高校自然科学基金项目(批准号: 2023AH050572)和安徽省转化医学研究院科研基金(批准号: 2023zhyx-C02)资助.

Supported by the University Natural Science Research Project of Anhui Province, China(No.2023AH050572) and the Research Fund of Anhui Institute of Translational Medicine, China(No.2023zhyx-C02).

外泌体是细胞分泌的直径为 30~150 nm 的细胞外囊泡 (Extracellular vesicle, EV), 几乎存在于所有体液中 (如血液、母乳、唾液、尿液和脑脊液等)^[1], 具有磷脂双分子层结构, 由蛋白质、脂质、DNA、RNA (如 mRNA, miRNA 和 ncRNA) 等组成^[2] (图 1). 外泌体在细胞通讯、免疫应答、肿瘤转移和血管生成等方面发挥着重要的作用, 并参与各种生理和病理过程^[3,4]. 研究表明, 肿瘤细胞分泌的外泌体会携带相关疾病的丰富信息, 其数量远高于正常细胞分泌的, 因此外泌体被认为是癌症早期诊断的潜在生物标志物^[5]. 此外, 由于外泌体具有良好的生物相容性、稳定性、利用度和货物装载能力, 越来越多的研究利用外泌体作为药物递送载体来治疗疾病^[6-8]. 因此, 外泌体在癌症和其它临床疾病的诊断和治疗方面均具有巨大的潜力^[9].

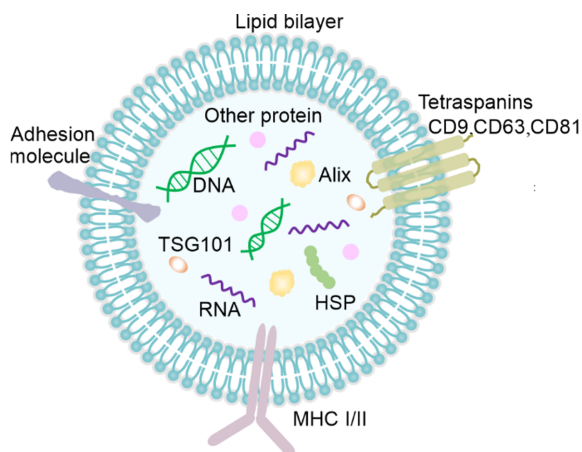


Fig. 1 Structure of exosomes

蛋白质是外泌体的重要组成成分, 也是疾病发展的主要功能分子. 因此, 更好地了解外泌体中的蛋白质组成对癌症的评估至关重要. 蛋白质组学是揭示蛋白质组成、结构和活性全貌的有效方法, 可以为疾病的分子机制提供新的见解, 并鉴定诊断预后的新生物标志物, 从而为更好的治疗提供治疗靶点. 质谱作为一种强大的分析工具, 已被用来揭示外泌体在癌症中的基本作用, 如调节肿瘤微环境、介导免疫逃逸和促进转移^[10]. 外泌体的蛋白质组学分析通过现代生物技术和高通量技术 (如质谱技术), 对外泌体中的蛋白质进行全面的鉴定和定量. 基于质谱的蛋白质组学可用于癌细胞来源外泌体的蛋白分析, 揭示重要的生物发生过程, 提高了对癌变和肿瘤进展的理解^[11]. ExoCarta^[12] 和 Vesiclepedia^[13] 数据库收录了成千上万种蛋白质. 然而, 制备不受来自生物流体或其它微囊泡的蛋白质污染的高纯度的外泌体仍然具有挑战性. 由于不同细胞机制产生的微囊泡与外泌体具有不同的功能和货物装载能力, 因此在蛋白质组学中获得高纯度的外泌体是非常必要的. 仪器、质谱碎裂技术和生物信息学等方面已有了广泛的发展, 但生物样品的特殊性、复杂性和不稳定性仍然是质谱分析面临的挑战. 然而, 在大多数情况下, 盐、洗涤剂、高度丰富或非蛋白质成分的含量、pH 值等影响着测量样品的质量^[14]. 另外, 外泌体的蛋白质组学分析面临着其它挑战, 包括样品中蛋白含量低和蛋白质的稀释度不同. 本文综合评述了外泌体的分离方法、外泌体的蛋白质样品处理方法、外泌体的蛋白质组学分析方法以及其在临床疾病诊断中的应用.

1 外泌体分离

质谱的高灵敏度既是优点也是缺点. 不纯的外泌体样品会阻碍质谱分析系统中的进样系统或传输路径, 导致不准确和不可重复的结果. 生物流体和细胞培养上层清液成分复杂, 含有的细胞碎片、多种膜囊泡亚群和游离蛋白等污染物可能显著影响外泌体生物标志物的测定. 此外, 外泌体含量较低时, 杂质的影响会增加, 从而产生较低的信噪比和较差的数据采集. 因此, 基于质谱的蛋白质组学分析外泌体组成必须考虑样品的纯度, 这对分析特异性至关重要. 研究者们探索了外泌体的不同理化性质, 开发了不同的外泌体分离策略, 包括离心法、聚合物沉淀法、基于尺寸的分选法、免疫亲和法和新兴的物理分离技术等.

1.1 离心法

1.1.1 超速离心法 超速离心法 (Ultracentrifugation, UC) 是外泌体分离最常用的方法. UC 是基于溶液中外泌体与其它成分沉降系数的差异, 通过施加强大的离心力, 从而沉淀并富集外泌体的技术. 1989 年, Johnstone 等^[15] 采用 UC 从细胞培养基中成功分离出外泌体. 2006 年, Théry 等^[16] 进一步优化了该方法, 通过逐步增加转速, 分别去除细胞、死细胞和细胞碎片等, 有效分离并富集了外泌体. 目前,

UC已成为应用最广泛的外泌体分离技术之一,至今仍被视为外泌体分离的“金标准”. UC通常进行多步骤离心(图2):首先,低速离心去除细胞、细胞碎片和较大的囊泡;其次,在离心力为10000 g时去除蛋白聚集体和其它密度较高的成分;最后,在离心力为100000~200000 g时超高速离心使较小的外泌体沉淀下来,并利用缓冲液重悬以获得纯化的外泌体^[17].

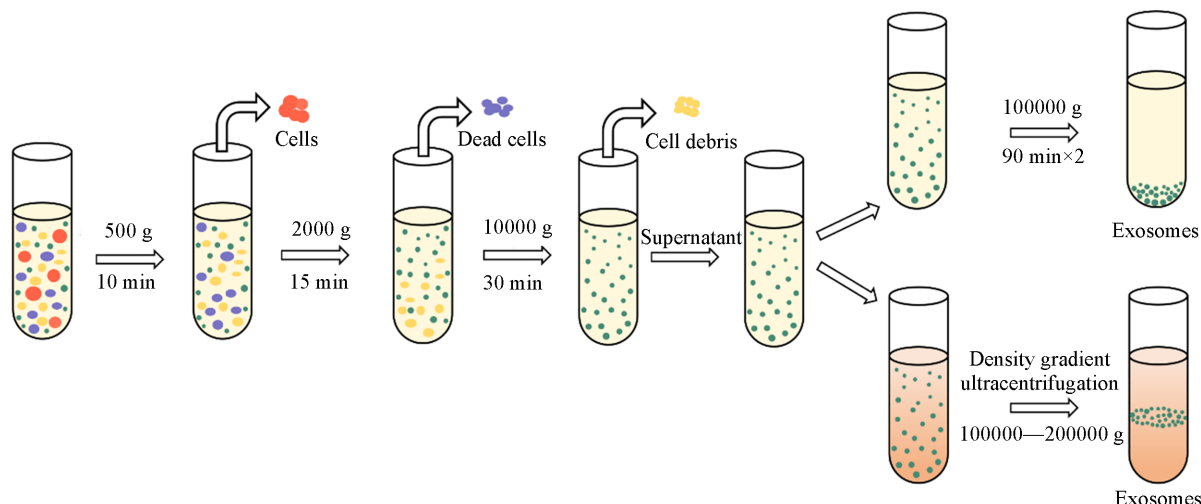


Fig. 2 Schematic representation of differential ultracentrifugation-based and density gradient ultracentrifugation-based exosome isolation

UC能够有效地将外泌体与其它成分分离,且所获外泌体的浓度较高,具有高效性和适用性广等特点,适用于处理大剂量的样品以及对多种来源的外泌体进行分离.目前,UC已被广泛应用于血浆、尿液、细胞培养上层清液等体液的外泌体分离.由于UC能够提供高纯度的外泌体,已被广泛用于外泌体的蛋白质组学分析^[18,19].然而,UC也存在回收率低、操作复杂、成本高、耗时长及长时间离心影响外泌体结构功能等缺点,且污染物蛋白聚集体和脂蛋白的存在严重影响了外泌体的定量和功能分析^[20,21].

1.1.2 密度梯度超速离心法 密度梯度超速离心(Density gradient ultracentrifugation, DGUC)是一种根据外泌体与杂质粒子之间的密度差异进行分离的方法(图2)^[22].首先,将不同密度的生物相容介质放于试管中,介质密度从底部到顶部逐渐降低;然后,将样品加入到密度梯度介质的顶部,在离心力为100000 g或120000 g下离心16 h;最终,外泌体、凋亡小体和蛋白聚集体会在与其相同密度的介质层中富集. DGUC常用的分离介质包括蔗糖和碘克沙醇等. DGUC具有分离的外泌体纯度高、活性高,适应范围广等优点. DGUC分离的外泌体回收率为10%~50%^[23].相较于UC,在沉降系数差别不大时, DGUC可有效去除样本中的污染物蛋白,从而获得高纯度的外泌体.它可使不同成分悬浮在特定位置形成区带,而不会形成沉淀,外泌体也不会被挤压变形,因此可高效保持外泌体的生物活性.但是, DGUC也存在操作复杂、成本高、耗时长、产量低及长时间离心影响外泌体结构功能等缺点,且该方法存在着脂蛋白污染,影响外泌体的定量和功能分析^[24,25].因此, DGUC不适合用于大量临床样本的蛋白质组学分析.

1.2 聚合物沉淀法

聚合物沉淀法是一种利用聚合物(如聚乙二醇)与外泌体中疏水性蛋白或脂质分子相结合使外泌体沉淀,从而实现外泌体分离的方法[图3(A)].该方法通过简便操作即可获得大量外泌体,并保持外泌体的生物活性,同时通过选择合适的聚合物可以实现外泌体的特异性分离.目前,市面上分离外泌体的试剂盒大多采用此方法,如Wayen Exosome Isolation kit(华盈生物)、ExoQuick(System Biosciences)、Total Exosome Isolation kit(Thermo Fisher)等.相比于传统的UC和DGUC方法,聚合物沉淀法具有高效、操作简便、经济便利、使用范围广、处理样本量大和可扩展性强等优点,有着较高的临床诊断应用价值^[26].然而,聚合物沉淀法存在选择合适的聚合物较困难、试剂价格昂贵、后期处理复杂等缺点.另外,该方法分离的外泌体与污染物脂蛋白共沉淀,从而影响外泌体的定量和功能分析,因此不适合用

于基于质谱的蛋白质组学研究^[27].

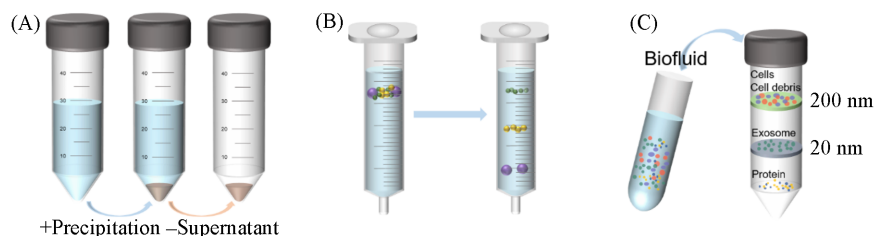


Fig. 3 Schematic representation of precipitation(A), size exclusion chromatography(B) and ultrafiltration(C) methods of exosome isolation

1.3 尺寸分离法

1.3.1 尺寸排阻色谱法 尺寸排阻色谱法(Size exclusion chromatography, SEC)是一种液相色谱技术,固定相由多孔聚合物组成,根据分子的大小实现外泌体分离的方法.在SEC中,小于固定相孔径的小分子物质(如蛋白、脂类等)被吸附,而大分子物质(如外泌体)留在间隙中[图3(B)].在缓冲溶液的作用下,较大粒径的外泌体流速快,先被洗脱出来,而小粒径物质后被洗脱出来. SEC分离外泌体的回收率可达40%~90%^[28],重现性高. SEC因其通过重力流被动分离样品中不同尺寸的颗粒,所以较好地保持了外泌体的结构完整性与生物活性^[29].此外,SEC还具有样本容量需求小、操作简单、耗时短、产率高和通量高等优点^[30,31],适用于大规模分析.目前,SEC已被广泛应用于分离、纯化和富集各种体液中的外泌体^[32]. SEC与液相色谱-串联质谱(Liquid chromatography tandem-mass spectrometry, LC-MS/MS)相结合已被广泛地应用于外泌体的高通量蛋白质组学分析^[33].然而,SEC分离外泌体也存在不足.与UC相比,SEC分离的外泌体易受到相似尺寸的脂蛋白和非外泌体颗粒的污染,纯度不高^[34]. SEC分离外泌体的产率和纯度取决于微球和柱的孔径大小.因此,将SEC与其它分离技术相结合可能有助于提高分离外泌体的纯度,并保持其生物物理和功能特性^[35].

1.3.2 超滤法 超滤法是在压力的作用下,使得溶剂和小于膜孔径的物质通过超滤膜过滤到膜的另一侧,而大于膜孔径的物质则被截留在超滤膜上,从而实现基于物质分子大小差异进行分离的目的[图3(C)].常用的超滤膜孔径为0.45和0.22 μm 等,可用于收集不同尺寸的外泌体^[36]. Yang等^[32]采用连续超滤法,使样本依次通过1 μm 和500000截留分子量的过滤器,有效去除了细胞碎片和凋亡小体以及游离蛋白等杂质,最后利用200 nm过滤器从滤液中收集外泌体.超滤法去除生物流体样品中高丰度蛋白质的能力使得其对质谱应用具有吸引力.超滤法具有简单、高效、省时、成本低,并且不影响外泌体的生物活性等优点.相比于UC和DGUC,超滤法具有更高的样品吞吐量.鉴于超滤法获得的外泌体纯度相对较高且几乎没有样本量的限制,因此很适用于外泌体的高通量蛋白质组学分析^[36,37].然而,该方法也存在一些缺点,如滤膜一侧的截留物不断堆积,导致过滤效率不断降低,而且与外泌体大小相近的物质也可能被截留,影响外泌体的纯度.此外,由于受到超滤膜的黏附、过滤时的剪切力等因素的影响,往往导致外泌体出现损失与形变.为此,切向流过滤法为这些问题提供了理想的解决方案.

1.3.3 切向流过滤法 切向流过滤法(Tangential flow filtration, TFF)在超滤法的基础上进行了改善,在过滤过程中,溶剂和污染产物通过滤膜孔到达另一侧,而由于流体方向与过滤方向垂直,流动过程中流体不断冲刷滤膜,实现了截留物的分离,反复过滤,从而有效减少了滤膜的堵塞.2018年, Busatto等^[38]比较了TFF和UC处理大量细胞培养上层清液的能力,发现TFF可以分离出外泌体,产量更高,批次间一致性更好,污染物更少.2021年,我们研究团队^[39]开发了一种基于尺寸筛选的微流控芯片,通过切向流过滤从人血浆中分离和纯化外泌体(图4).该微流控芯片由两片完全对称的具有蛇形通道的聚甲

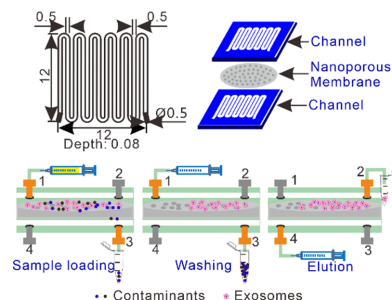


Fig. 4 Tangential flow filtration based microfluidic chip for efficient exosome purification^[39]

Copyright 2021, Elsevier.

基丙烯酸甲酯芯片和夹在芯片中间的纳米多孔聚碳酸酯蚀刻膜组成。通过反向洗脱收集,外泌体的回收率超过80%,且蛋白污染物的去除率超过97%。整个过程耗时短于3 h,极大地缩短了外泌体分离的时间,具有良好的临床应用前景。鉴于无标记分离的切向流过滤收集的外泌体可直接用于蛋白质组学分析^[40]。目前,TFF已被广泛应用于生物制药和食品工业。虽然TFF具有高效性和高处理量、可以保持外泌体的生物活性、减少滤膜堵塞等优点,但是也存在与超滤法相同的缺点,如滤膜对外泌体的黏附,无法去除与外泌体大小相近的杂质致使纯度低等。

1.4 免疫亲和法

免疫亲和法是一种基于外泌体表面特定抗原(如CD9, CD63, CD81和Rab5等)^[32]与特异性抗体之间的免疫亲和效应的分离方法。在免疫亲和法分离外泌体的过程中,通常使用包被有抗体的磁珠或微孔板等固相载体,使抗体与外泌体表面的特定抗原结合,形成抗原抗体复合物。随后,通过磁场或洗涤等步骤,将结合了外泌体的磁珠或微孔板从样品中分离出来,从而实现对外泌体的分离和纯化^[41-43]。免疫亲和法具有纯度高、特异性高、操作简便、外泌体形态保持完整等优点,有望从生物液体中选择性地分离出外泌体,甚至是外泌体的亚群。因此,在诊断方面的研究中,免疫亲和法有可能是特异性最强的方法。此外,市售的免疫亲和分离试剂盒,如外泌体分离试剂盒CD81/CD63(Miltenyi Biotec)和外泌体-人CD63分离试剂盒(Thermo Fisher)也已被开发出来并用于外泌体特定亚群的分离分析。

传统的免疫亲和法捕获外泌体具有简单、快速的优点。然而,受限于表面积,外泌体的捕获效率有待提高,而且常规实验室操作耗费试剂、抗体昂贵,不利于多样性和高通量检测。为了解决这一问题,纳米结构与微流控芯片的结合得到了发展。2019年,Zhang等^[44]开发了一种八通道的微流控芯片,基于酶联免疫吸附法用于血浆中低水平的肿瘤相关外泌体的检测(图5)。通过自组装构建三维多孔隙形纳米通道,以提供大量的反应位点并提高外泌体的生物传感效率。同时,可切换的微流控设计可以在单次添加外泌体样品时同时检测8种标记物。仅使用10 mL卵巢癌患者的血浆,即可在3 h内捕获卵巢癌患者的外泌体,捕获率达到了(75.4±3.2)%,远高于UC。通过该方法对7种生物标志物的评价实现了卵巢癌患者的早期诊断。总之,基于免疫亲和的分离方法通常可以获得较高的外泌体纯度,但也需要考虑相对较高的成本和抗体的非特异性结合。另外,亲和捕获外泌体方法在使用磁珠和配体偶联时存在潜在的批次效应,这可能导致蛋白质组学分析的可重复性较低。

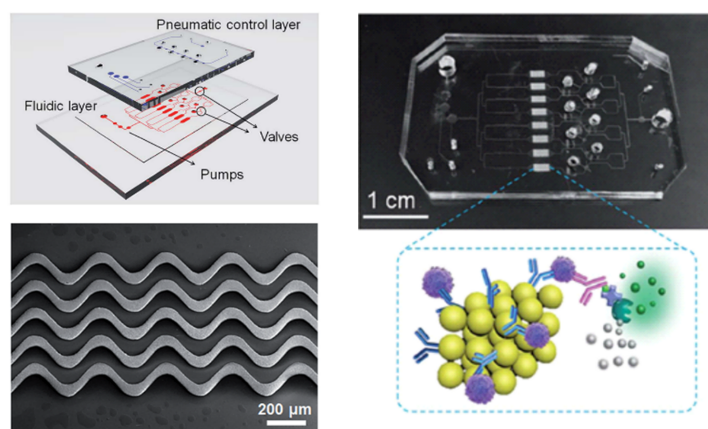


Fig. 5 ExoProfile chip consists of pneumatic and fluidic layer and 3D serpentine nanostructures for *in situ* immunophenotyping of exosomes^[44]

Copyright 2019, the Royal Society of Chemistry.

1.5 新兴的物理分离技术

1.5.1 黏弹性流体分选法 黏弹性流体分选法是一种简单的、无标记的新兴物理分离技术。黏弹性流体同时具有黏性和弹性,其应力与应变之间存在线性和非线性关系,不同粒径的物质在黏弹性介质中通过通道时,在弹性升力的作用下,以粒径依赖的形式发生迁移,从而实现对亚微米级颗粒的持续操

纵与分离^[45-47]. 黏弹性流体通常与微流控技术相结合用于外泌体的分离. 通过在微流控芯片中构建特定通道, 基于外泌体和其它组分(如蛋白质、细胞碎片等)粒径的不同, 受到的弹性升力也有所差异, 从而实现外泌体的分离. 2017年, Liu等^[45]设计了一种黏弹性微流控系统, 以无场、无标记和连续的方式分离外泌体[图6(A)]. 该方法通过在细胞培养基或纯血清中添加少量聚乙烯醇以控制外泌体的黏弹性, 结合微流控系统即可实现不同尺寸外泌体的高纯度分离(>90%)和回收率(>80%). 此外, 2019年, 他们还采用了黏弹性 λ -DNA和适体介导的方法同时实现了对单个外泌体进行大小选择分离和表面蛋白分析^[48].

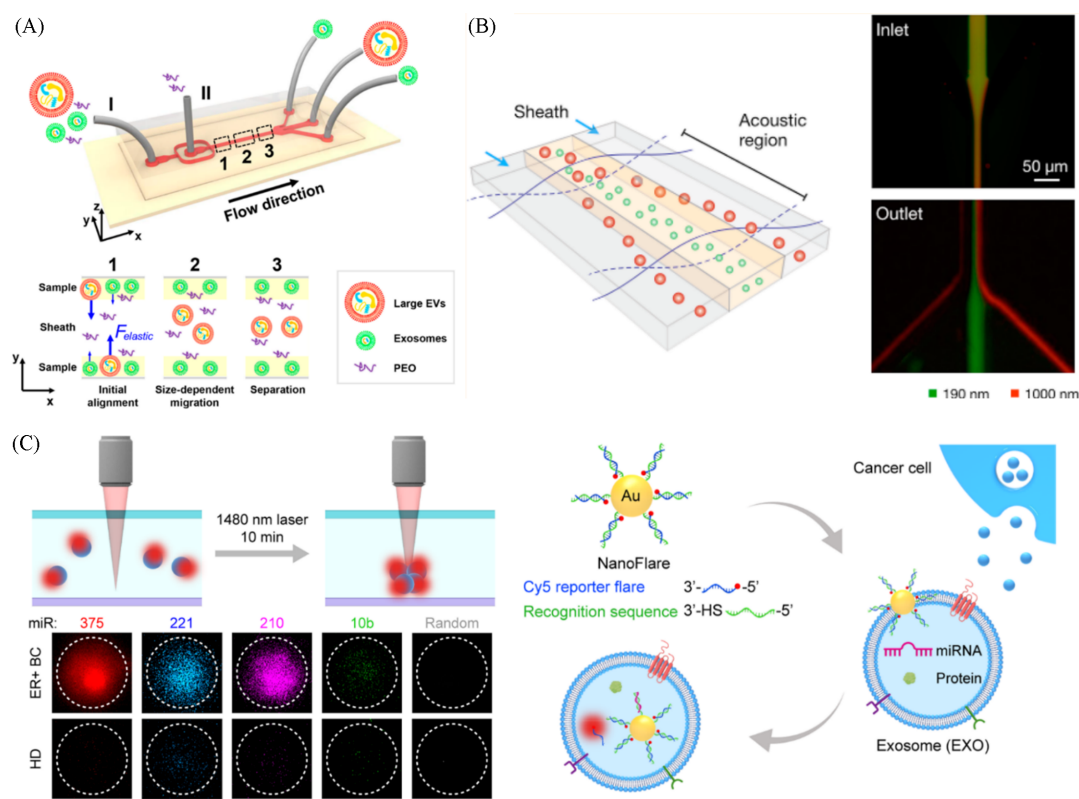


Fig. 6 Viscoelastic microfluidic system consisted of a high-aspect-ratio straight microchannel for size-based exosome isolation(A)^[45], the acoustic nanofilter system size-specifically separating microvesicles in a continuous and contact-free manner(B)^[49], the thermophoretic aptasensor implemented with nanoflares for *in situ* detection of exosomal miRNAs(C)^[53]

(A) Copyright 2017, American Chemical Society; (B) Copyright 2015, American Chemical Society; (C) Copyright 2020, American Chemical Society.

1.5.2 声流体技术 声流体技术是一种基于超声波在流体中产生的辐射力和声流效应, 通过与微流体系统结合可根据外泌体的大小、密度和可压缩性等物理特性, 施加不同的声力, 从而实现外泌体分离的技术. 2015年, Lee等^[49]开发了一种声学纳米过滤器系统, 用于从较大的细胞外微囊泡中分离外泌体, 外泌体的分离率超过90%[图6(B)]. 2017年, Wu等^[50]开发了一种使用多级声流体装置直接从全血中分离外泌体的方法. 该装置由两个模块组成, 其中一个细胞去除模块用于分离大量血液成分(如红细胞、白细胞和血小板), 另外一个分离模块用于分离外泌体. 当两个模块同时工作时, 实现了99.999%的血细胞去除率, 并成功地从细胞外囊泡混合物中分离出了外泌体. 2021年, Wang等^[51]使用了该声流体装置成功地从创伤性脑损伤的小鼠血浆样本中分离了外泌体, 并检测到创伤性脑损伤小鼠生物标志物水平的升高, 为创伤性脑损伤的诊断提供了新方法. 声流体技术由于其无标签、非接触式和生物相容性等优点, 现已被公认为一种有前途的细胞和生物颗粒分离和操作技术, 在生物医学研究领域具有广泛的应用前景.

1.5.3 热泳技术 热泳是一种基于不同温度梯度下粒子热扩散系数的差异,利用温度梯度产生的热泳力,使得不同大小和性质的粒子在温度梯度中受到不同的热扩散力,从而实现外泌体分离的方法. 2019年, Liu等^[52]开发了热泳适体传感器,用于富集与适体共轭的EV,利用适体结合的EV在积累时产生放大的荧光信号,其强度与EV靶表面蛋白的表达水平相关,实现了从极少量血清中检测肿瘤来源的EV. 该研究使用7个适体获得了232个血清样品中EV的表面蛋白质的谱图. 随后将线性判别分析算法用于6种癌症类型的自动癌症分类. 结果表明, EV的7个单独标记物的未加权总和和可用于区分前列腺癌和良性疾病,并监测根治性前列腺切除术后的生化复发. 2020年, Zhao等^[53]开发了一种基于纳米耀斑的热电泳传感器,用于外泌体miRNA的原位检测,而无需RNA提取或靶标扩增[图6(C)]. 纳米耀斑可以通过孵育进入外泌体,并在DNA探针与目标miRNA杂交时产生荧光信号. 然后,通过局部激光加热,负载纳米耀斑的外泌体被热反射富集,导致外泌体中仅由靶标miRNA引起的荧光增强. 该方法可以直接定量分析乳腺癌细胞系和乳腺癌患者血清样本的外泌体miRNA,其灵敏度与qRT-PCR相当. 尽管热泳技术拥有价格低廉、快速,且需要的血清体积小等优点,但其也面临低回收率和低纯度等难题.

微流控技术已经成为快速和低成本的外泌体分离替代方案. 将新兴的物理分离技术、免疫亲和法和微流控技术相结合,可以实现外泌体的自动化、高产量、高通量分离和制备,从而适用于蛋白质组学等下游分析.

2 外泌体的蛋白质组学分析

生物标志物可用于疾病诊断,反映治疗效果并可作为预后指标. 因此,需要进行可重复和准确地定量低浓度的蛋白质或肽生物标志物,并能从背景噪音中识别真实信号. 质谱具有高灵敏性和选择性,可以对多种蛋白质进行鉴定和定量. 基于质谱分析可以研究外泌体的蛋白质含量. 从生物流体中分离外泌体后,除了少量外泌体被用于常规表征之外,剩余足够数量的外泌体蛋白可用于蛋白质组学分析. 蛋白质组学已成为鉴定和验证复杂样品中潜在在外泌体生物标志物的重要工具. 外泌体的蛋白质组学分析仍处于早期阶段,图7总结了外泌体的蛋白质组学分析的经典工作流程图,并详细阐述了用于蛋白质组学分析的外泌体样品处理、蛋白质组学常用的分析方法.

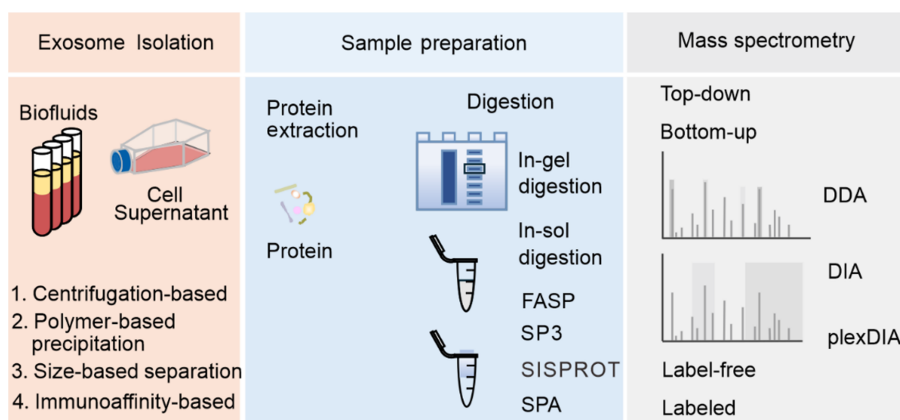


Fig. 7 Workflow for proteome profiling of exosomes

2.1 用于蛋白质组学分析的外泌体样品处理

质谱分析的样品制备对于肽段的鉴定产率至关重要,从而影响到整个实验的成功. 因此,在进行质谱分析前,需要对从生物体液中分离出的外泌体进行预处理,主要包括利用裂解液提取外泌体蛋白、分离提取蛋白以及对蛋白进行消化. 值得注意的是,提取的外泌体蛋白需经凝胶电泳分离,在质谱分析前进行凝胶消化;也可以在蛋白质提取后进行消化,使得生成的多肽在质谱分析之前通过液相色谱进行分离或直接进行质谱分析^[54]. 本文总结了6种蛋白质消化方法,包括胶内酶解、自由溶液

酶解、过滤辅助样品制备 (Filter-aided sample preparation, FASP)、单罐固相增强样品制备 (Single-pot, solid-phase-enhanced sample-preparation, SP3)、简单且集成的基于 Spintip 的蛋白质组学技术 (Spintip-based simple integrated proteomics technique, SISPROT) 和固相烷基化 (Solid-phase alkylation, SPA), 表 1 列出了这些常用的蛋白质消化方法的优势和局限性.

Table 1 Comparison between the properties of different proteome sample-handling approaches

Sample-handling approach	Beneficial feature	Limitation
In-gel digestion	Enzymatic digestion of proteins within the gel environment, enhancing protein recovery rates Simplify operational steps Robustness and efficient impurity removal capability	Time-consuming Introduce contamination from the gel, enzymes, or other reagents
In-solution processing methods, such as standard in-solution digestion	Applicable to virtually any sample Simple protocols that require minimal handling Generally, afford high recovery of protein input, making them adaptable to a wide range of sample quantities Easily adaptable to high-throughput regimes	Limited selection of reagents that can be used for protein extraction and solubilization In specific scenarios, processing volumes required for dilution can challenge downstream handling Diluted chaotropes in solution can hinder proteolysis Downstream removal of acid-labile detergents can result in material losses
FASP	Compatible with a wide range of lysis and protein solubilization components Effective processing of high input quantities of material Most protocols are simple and flexible for adaptation to different sample types	Processing can be time consuming and laborious When working with small input quantities, material losses can be substantial Reagent compatibility can be limited by consumables (e. g., filter compatibility)
SP3	Applicable to virtually any sample Compatible with a wide range of lysis and protein solubilization components Simple protocol that requires minimal handling Provides high recovery of protein input, making it adaptable to a wide range of sample quantities Rapid processing of large numbers of samples in parallel	Recovery of intact proteins from the paramagnetic beads can be challenging High concentrations of intact chromatin can reduce performance Bead clumping and aggregation can hinder adaptation to high-throughput automation
SISPROT	The preparation steps of proteomics samples are fully integrated Simple protocol that requires minimal handling Easily multiplexed on standard centrifuges with good reproducibility	It is not compatible with the rare cell proteomic reactor cell lysis buffer which contains 1% Triton Xs100 Costly consumables, high expenses
SPA	Simple protocol that requires minimal handling Provides improved efficiency, anti-interference ability, and recovery of low-input samples	Covalent binding of proteins hinders release of cysteine-containing peptides Low sequence coverage of proteins

胶内酶解首先通过凝胶电泳分离外泌体蛋白, 并从凝胶中切下染色的目标蛋白质区域的凝胶块; 然后, 经过一系列脱水和再水化步骤, 穿插着还原和烷基化反应后, 加入胰蛋白酶溶液进行过夜消化^[55]; 最后, 利用与质谱工具完全兼容的酸化乙腈溶液提取肽段. 凝胶电泳分为一维凝胶电泳和二维凝胶电泳. 目前常用的是简单而高效的一维凝胶电泳, 它可以根据蛋白质的分子量有效地去除最常见的污染物并对样品进行初步分级. 二维凝胶电泳的使用不太普遍, 它是根据等电点对外泌体蛋白进行分离^[56]. 总之, 胶内酶解是一种成熟的方法, 尽管存在耗时长和蛋白污染风险高等缺点, 但是由于其稳健性和高效去除杂质的能力, 仍然被广泛地应用.

自由溶液酶解是蛋白质组最常用的样品制备技术, 通过使用氯仿、甲醇溶液以及三氯乙酸或丙酮进行沉淀, 可以从洗涤剂、盐甚至脂质成分中纯化蛋白质, 但其中一些可能会引入一些选择性修饰. 将沉淀在 MS 中性变性缓冲液中重悬后, 可以使用单管执行整个后续程序, 包括还原、烷基化和消化,

这大大减少了样品的损失^[57]。该特点在样本量很小的情况下尤为重要，并在外泌体研究中也很有见。然而，沉淀后的一些蛋白质可能很难再溶解，从而阻碍了酶消化的产率。另一个不利因素是最终样品的高复杂性，这是因为自由溶液酶解不提供预分级步骤，而该步骤可以为LC-MS/MS分析提供支持。分析前的肽段分离得越好，从而可以减少大量更易电离的分子对低丰度分子的掩蔽，使得蛋白质鉴定的产率就越高。

过滤辅助样品制备由Manza等^[58]开发，但由其他研究者们^[59]进行了改进和推广。FASP利用过滤装置将蛋白质与污染物分离。FASP是将提取的外泌体蛋白转移到分子量截留过滤装置中。经过简单的离心处理后，污染物通过超滤膜，而蛋白质则被保留在滤膜单元上，利用含尿素缓冲液洗涤捕获的蛋白质并进行烷基化处理。随后，将胰蛋白酶溶液加入到过滤器顶部并进行过夜消化，由此短时间内很容易通过离心回收获得的肽段。因此，FASP通过在过滤器上消化样品而无需额外的转移步骤，样本处理简单，样本损失最小，已成为许多研究外泌体的首选方法。

SP3是一种新兴的样本制备方法，它基于顺磁性微珠，利用亲水相互作用机制，有效交换或去除通常用于促进细胞或组织裂解、蛋白质溶解和酶消化(如去污剂、离液剂、盐、缓冲液、酸和溶剂)的多种组分^[60]。该方法旨在快速高效地处理蛋白质和多肽样本，显著提升蛋白质组学分析的灵敏度和准确性。SP3方法包括非选择性蛋白质结合和冲洗步骤，这些步骤通过使用亲水珠粒表面上乙醇驱动的溶剂化捕获以及在水条件下洗脱纯化的物质来实现。相比于其它方法，SP3以其与大量溶液添加剂的广泛兼容性、仅需30 min即可完成的简单高效流程，被成功应用于多种样品类型的处理。虽然SP3有着诸多优点，但是其也存在磁捕获损失的风险，尤其是在更高的蛋白质浓度和更疏水的蛋白质中表现出损失和更高的成本。为此，2022年，Johnston等^[61]提出使用溶剂沉淀SP3(SP4)作为SP3蛋白清理的替代方法，通过短暂离心而非磁力捕获乙腈诱导的蛋白聚集体，使用可选的低成本惰性玻璃珠来简化处理，实现了低溶解度和跨膜蛋白质的回收[图8(A)]。与SP3相比，SP4对低溶解度和跨膜蛋白质的回收率更高。该方法简化了步骤、降低了成本，为蛋白质组学研究提供了一种高效、经济的清理方法，同时保留了原有的速度和兼容性优势。

SISPROT是由Chen等^[62]开发的一种简单集成的基于Spintip的蛋白质组学技术，该技术结合了强阳离子交换珠和C18磁盘，并首次以离心为驱动力实现了样品制备步骤的完全集成[图8(B)]。SISPROT实现了样本制备的高通量、高灵敏性和高重复性，且样品损失可忽略不计。SISPROT技术具有强大的拓展性，将其与激光捕获显微切割(Laser capture microdissection, LCM)技术结合，形成了LCM-SISPROT技术^[63]。该技术能够以单细胞分辨率精确切割出肿瘤样本中的特定细胞类型，并进行高灵敏度的蛋白质组分析。通过LCM-SISPROT，从0.1 mm²，10 μm厚的结肠癌组织切片中鉴定出500多种蛋白质，并首次从结肠癌及其周围正常组织的4种细胞类型(包括癌细胞、肠细胞、淋巴细胞和平滑肌细胞)中获得了细胞类型的蛋白质组分析。2020年，为了进一步克服传统LCM技术的局限性，Huang等^[64]开发了基于免疫组织化学(Immunohistochemistry, IHC)的工作流程，用于组织样本的细胞类型解析蛋白质组分析。利用抗体标记细胞类型特异性标记物并通过IHC标记靶向细胞类型，显著提升了LCM的准确性和效率。同时，还优化了脱交联程序，并将其与SISPROT样品制备技术结合，形成了IHC-SISPROT新方法。该方法不仅保留了空间信息，而且显著提高了蛋白质的回收率。在肝细胞癌组织切片的应用中，IHC-SISPROT方法表现出色，能够高效鉴定数千种蛋白质，展现出高灵敏度和高重复性，为肿瘤异质性研究提供了强有力的技术支持。

基于固相的样品制备方法，通过非共价将蛋白质结合至微球上并进行集成处理，虽然减少了处理步骤并提高了回收率，但蛋白质与微球之间的弱相互作用导致了一定程度的样品损失。为了解决这一问题，通过共价化学将蛋白质固定于功能化材料上被视为一种更优的策略。然而，仅有少数几种方法实现了将蛋白质的N端或赖氨酸残基共价结合到微球上^[65]，而这些方法中存在的一个关键挑战是，对赖氨酸残基的修饰可能会降低胰蛋白酶的消化效率，进而可能影响到蛋白质组学的鉴定结果。鉴于蛋白质组学样品制备中常需半胱氨酸烷基化，且哺乳动物蛋白质广泛含有半胱氨酸残基，Li等^[66]创新性

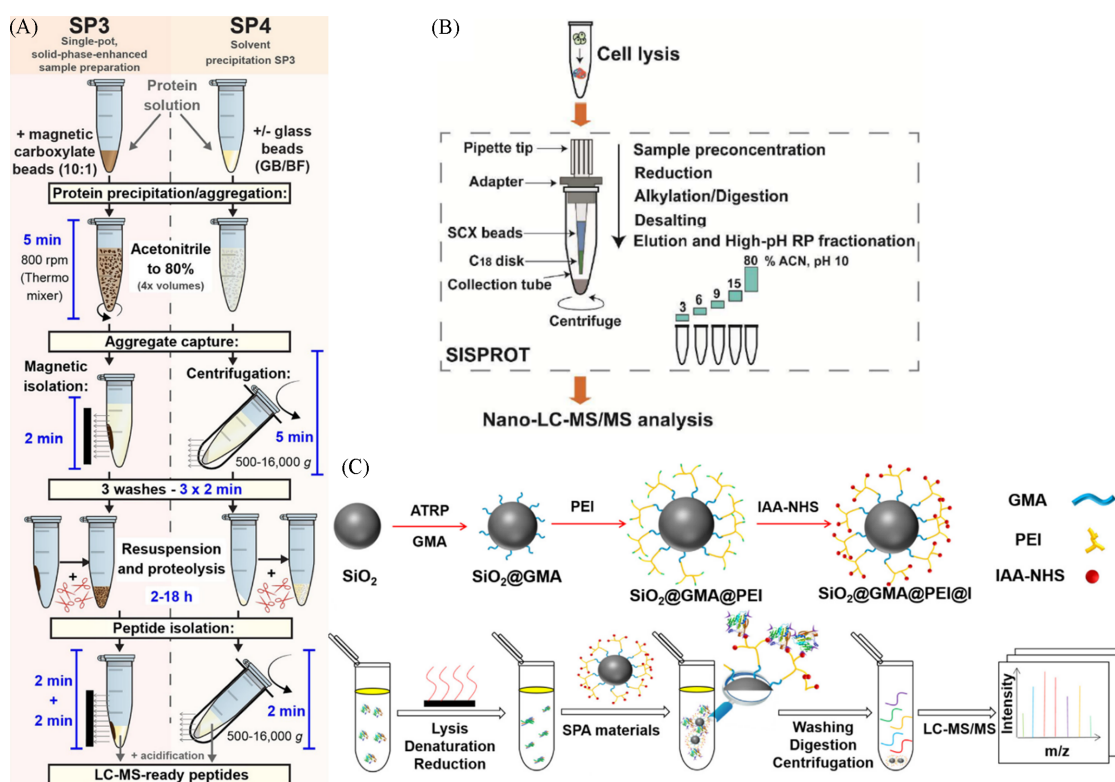


Fig. 8 Summary of the SP3 and SP4 workflows(A)^[61], schematic workflow of the simple and integrated SISPROT for deep proteome profiling(B)^[62], the principle and procedure of the SPA-based sample preparation workflow(C)^[66]

(A) Copyright 2022, Open Access; (B) Copyright 2016, American Chemical Society; (C) Copyright 2022, Elsevier.

地提出了一种新的固相烷基化(Solid-phase alkylation, SPA)策略[图8(C)]. 他们首次通过原子转移自由基聚合方法,在二氧化硅颗粒表面附着引发剂的存在下,使用催化剂前驱体,将甲基丙烯酸缩水甘油酯单体聚合,合成了单分散性聚合物颗粒. 再通过进一步的修饰,可巧妙地将蛋白质共价结合至单分散性聚合物上,随后通过甲醇和碳酸氢铵溶液的洗涤有效地去除了干扰物,并直接在颗粒上实现了蛋白质的水解. SPA样品制备方法在基于MS蛋白质组学研究中展现出巨大的应用潜力和广阔的发展前景,它不仅极大地简化了传统样品的处理流程,通过步骤的精简和优化显著提升了抗干扰能力和蛋白质回收率,同时提高了处理效率,为蛋白质的检测与分析提供了强有力的技术支撑.

总之,上述用于蛋白质组学分析的样品处理的策略均适合制备满足质谱分析要求的高质量的样品. 在实际选择时,应考虑样品的复杂性和大小以及要处理的污染物的类型.

2.2 外泌体的蛋白质组学分析方法

2.2.1 自下而上和自上而下方法

目前,最常见的蛋白质组学分析方法是基于自下而上的蛋白质组学方法,也称“鸟枪法蛋白质组学”^[67],利用蛋白酶(胰蛋白酶或胞内蛋白酶Lys-C)将蛋白质切割成肽段,用于蛋白质鉴定的序列分析^[68]. 首先,蛋白质被蛋白酶切割成肽段,利用液相色谱技术对肽段进行分离,然后,通过质谱仪对分离后的肽段进行质谱分析,最后,通过数据库检索实现蛋白质的鉴定. 胰蛋白酶是应用最广泛的酶,特异性地切割赖氨酸和精氨酸残基后的肽键时,会产生具有C-端碱基、N-端氨基、可能的内部组氨酸残基、在胰蛋白酶消化不完全时错误切割赖氨酸或精氨酸残基特征的肽段. 赖氨酸、精氨酸、组氨酸和N-端氨基都具有较高的碱性,使得其在溶液中接受质子而带正电荷. 因此,在电喷雾电离过程中,带正电荷的肽段会被进一步电离,从而形成多电荷的肽离子. 与单电荷离子相比,在较低的 m/z 范围内可以检测到多电荷肽离子,并且在解离过程中可以提供各种类型的片段离子. 尽管大多数外泌体的蛋白质组学分析均使用自下而上的蛋白质组学分析方法进行^[69],但是此方法难以

区分蛋白质异构体,无法阐明蛋白质中远端氨基酸翻译后修饰的化学计量学。

与自下而上的蛋白质组学技术相比,自上而下的方法能够通过质谱仪分析完整的蛋白质,而不需要对蛋白质进行水解消化^[68]。这使得它能够更完整地保留蛋白质的结构信息和翻译后修饰,从而更准确地揭示蛋白质的功能和相互作用^[70]。利用高分辨率质谱仪,可以获得完整蛋白质的精确质量,进一步裂解蛋白质以获得蛋白质的氨基酸序列信息。在自上而下的蛋白质组学分析方法中使用的碎片化方法包括碰撞诱导解离、高能碰撞解离、电子捕获解离、电子转移解离和紫外光解离^[71]。与自下而上的方法相比,自上而下方法可以揭示多种修饰的空间关系以及由于翻译后修饰、单核苷酸多态性或可变剪切导致的蛋白质序列变化,所有这些因素都促成了大量蛋白质形式的产生^[72]。蛋白质预分级以减少蛋白质复杂性的以及复杂软件用于分析复杂的碎片模式是自上而下分析的重要组成部分^[70]。2019年,Zhu等^[73]通过自上而下和自下而上的蛋白质组学分析,明确了外泌体指纹峰的蛋白质特征。2022年,Buck等^[74]采用自上而下的蛋白质组学分析方法鉴定了乳腺成纤维细胞外泌体中的蛋白质。

2.2.2 数据依赖采集模式和数据非依赖采集模式 自下而上蛋白质组学有两种类型的数据采集模式:数据依赖采集(Data-dependent acquisition, DDA)和数据非依赖采集(Data-independent acquisition, DIA)。DDA是LC-MS/MS分析最常用的数据采集方法,即在MS扫描中选择具有最高丰度信号的固定数量的前体离子,并在采集步骤中将其碎片化以生成每个母离子的MS/MS光谱。根据MS1中含量最高的母离子、绝对信号强度和母离子的电荷来选择用于裂解的母离子。通过将片段光谱与蛋白质序列数据库进行匹配来鉴定肽^[75]。DDA可以识别数千种蛋白质,但是在某些情况下可能会丢失次要内容。这个问题主要是由其数据依赖型扫描模式的特性所致。DDA是随机选择丰度最高的肽段,可能忽略丰度较低的肽段^[76]。DDA通常采用动态排除技术来获取丰度较低的离子的MS/MS光谱,其中离子的 m/z 值在其MS/MS被获取后,会在排除列表中存储一定的时间^[77]。大多数外泌体的蛋白质组学分析均使用DDA进行^[78]。

即使采用动态排除技术,如果在全MS扫描谱中,没有将低丰度蛋白质选择出来作为MS/MS分析的后续候选前体离子,那么在DDA中通常就会被忽略。为了克服DDA对低丰度离子偏见的缺点,引入了DIA。DIA是一种无标记的定量方法,省略了前体离子筛选和选择步骤,而是将所有洗脱的肽段碎片化,以收集全面的MS2光谱。MS2扫描的隔离窗口是预先确定的。隔离窗内的所有前体离子无论其强度如何均被扫描。然后对光谱库进行数据搜索,以识别和绘制感兴趣的肽段^[79]。利用Spectronaut软件进行数据库搜索,DIA最近被应用于肝细胞癌血清来源的外泌体蛋白生物标志物^[80],或使用OpenSWATH进行数据库搜索,通过分析结直肠癌细胞系的EV来筛选结直肠癌^[81]。2020年,Yang等^[82]提出了一种基于深度学习的方法,用于生成DIA分析的计算谱库,可以突破DDA对肽段/蛋白质检测的限制,并增强对人血清样本的DIA分析效果[图9(A)]。此外,2021年,还提出了GproDIA,一个用于从DIA数据中对完整糖肽进行蛋白质组范围表征的框架,通过在酵母和人血清样品的DIA数据上对N-糖肽分析方法进行基准测试,证明使用GproDIA的DIA在识别能力和数据完整性以及准确性方面均优于DDA的糖蛋白组学方法^[83]。

通过化学标记或同时分析多个多肽的策略可提高基于MS的蛋白质分析的通量。化学标记通常与DDA策略联合使用,但其深度受限于每次运行中MS2水平上可分析的前体数量。为了克服这一限制,研究人员采用了非等压同位素质量标签对样品进行多路复用分析。2022年,Derks等^[84]将这两种策略巧妙地结合,开发了plexDIA技术,用于同时对肽和样品进行多路分析。通过使用三重非等压质量标签,plexDIA能够实现纳克级样品中3倍以上的蛋白质比例的定量。在实验中,利用1h的活性梯度,plexDIA技术在每个标记的三重集样品中成功定量了约8000种蛋白质,这不仅提高了数据的完整性,还显著地减少了样品间的缺失数据。在单个人体细胞的应用中,plexDIA技术能够在每个细胞中定量约1000种蛋白质,并在plexDIA数据集中实现了98%的数据完整性,而这一过程每个细胞仅需约5min的活性色谱分析。这些研究结果不仅展示了plexDIA技术在提高灵敏度且定量蛋白质分析通量方面的巨大潜力,还构建了一个通用的框架,为未来蛋白质组学研究的深入探索提供了有力支持。

个样品,多种标记技术结合使用为多通路分析提供了新的思路.2019年,Stepath等^[96]对无标记、SILAC和TMT技术进行了系统比较,研究结直肠癌细胞系中EGFR信号抑制的早期适应性[图9(B)].虽然iTRAQ和TMT有着多通路、高置信度且在定量复杂样品中的低丰度蛋白质时具有高灵敏度等特点^[97],但是也存在成本高、操作复杂、标记效率低、分析的动态范围相对有限等缺点^[98,99].已知iTRAQ的定量动态范围小于无标记定量法,导致鉴定的蛋白质数量减少^[100].在基于iTRAQ的相对定量和无标记定量方法的对比研究中,iTRAQ有可能忽略许多具有微小变化的外泌体蛋白,这些蛋白却可能足以区分临床患者和对照组.化学标记研究是发现生物标志物和临床研究的首选方法,并可利用其它技术进行生物标志物的验证.

SILAC技术通过在细胞培养基中添加带有同位素的必需氨基酸(通常是赖氨酸和精氨酸),使细胞在生长过程中将这些氨基酸内化并用于蛋白质合成.经过多次传代培养,细胞内新合成的蛋白质会被同位素标记,而对照组则使用正常的氨基酸培养.利用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离和质谱仪分析,比较一级质谱图中同位素型肽段的面积大小从而进行相对定量.同时,二级谱图对肽段进行测序从而实现蛋白质的鉴定.由于存在几种不同的标记策略,SILAC分析具有多路复用的特点,可以同时多达5个样品进行蛋白质组学定量分析^[90].SILAC技术已被应用于疾病机制的研究和人类样本的生物标志物鉴定.2016年,Clark等^[101]利用SILAC技术分析了两种非小细胞肺癌外泌体与正常支气管上皮细胞系外泌体的蛋白水平.2021年,Kugeratski等^[102]将SILAC技术与高分辨质谱分析相结合,定量蛋白质组学鉴定了外泌体的核心蛋白质组,其中,鉴定的Syntenin-1是含量最高的蛋白质,被认为是一种通用的生物标志物.SILAC因其操作简单、定量准确和可重复性高等突出优点,被广泛应用于蛋白质组学分析,可用于研究蛋白质翻译后修饰的动态变化等^[103].虽然SILAC有着诸多优点,但是基于同位素标记的定量方法几乎都受限于步骤繁杂、耗材昂贵而无法进行高通量样本处理,且不同的标记技术往往有着不同的标记效率,从而造成蛋白质消化的差异^[90].外泌体的非标记和标记的定量蛋白质组学技术各有优势,同时也具有相应的局限性(表2),在实际选择时,应进行综合考虑.

Table 2 Comparison between the label-free and labeled quantitative proteomics techniques

Type	Name	Labeling level	Beneficial feature	Limitation
Metabolic labeling	SILAC	Cells, organisms	Efficient labeling, one label for(tryptic) peptide, semiautomatic data analysis Applicable to cells but can be expanded to tissues or model organisms using internal standards (e.g., super-SILAC)	High costs, especially when applied to whole organisms Super-SILAC experiments have reduced quantitative proteome coverage Requires metabolically active cells to introduce labels
		15N labeling	Cells, organisms	Efficient labeling Applicable to cells and model organisms
Chemical labeling (<i>in vitro</i>)-isobaric labeling	iTRAQ	Peptide	Efficient labeling enhanced signal intensity in MS and MS/MS, high multiplexing capability, simple data analysis Applicable to any sample(cells, animal or human tissue) Commercially available	Expensive Does not allow <i>in vivo</i> labeling Quantitative precision dependent on the reproducibility of sample preparation
	TMT	Peptide	Efficient labeling enhanced signal intensity in MS and MS/MS, high multiplexing capability, simple data analysis Applicable to any sample(cells, animal or human tissue)	Expensive Requires fragmentation with HCD or ETD Does not allow <i>in vivo</i> labeling Quantitative precision dependent on the reproducibility of sample preparation

Continued

Type	Name	Labeling level	Beneficial feature	Limitation
Enzymatic labeling (<i>in vitro</i>)	¹⁸ O labeling	Peptide	Low costs, simple in handling Applicable to any sample (cells, animal or human tissue)	Incomplete labeling complicates data analysis Limited multiplexing capability (up to 2-plex) Not suitable for <i>in vivo</i> labeling Overlapping isotopic peaks Varied labeling efficiencies
Label-free	Spectral counting	NA	Low costs, simple in handling Broad applicability	Less accurate than the labeling methods More time needed for MS analysis
	Chromatographic peak area	NA	Low costs, simple in handling Broad applicability	Less accurate than the labeling methods More time needed for MS analysis

3 外泌体的蛋白质组学分析在临床疾病诊断中的应用

近年来,癌症的早期诊断一直是医学诊断的目标,早期诊断可提供治愈疾病的最佳机会.生物标志物在早期疾病诊断中发挥着重要作用.其中,蛋白质生物标志物是癌症液体活检中最早使用的靶标之一.外泌体是由细胞释放的小囊泡,能够携带蛋白质、RNA和DNA等生物分子,在细胞通讯中发挥重要的作用.在癌症患者体内,外泌体的分泌量常常显著增加,并且其内容物与癌症的发生、发展和转移密切相关.因此,外泌体是液体活检的新兴靶标,作为生物标志物在疾病的诊断方面具有巨大的潜力.外泌体蛋白质组学的分析对于发现潜在的蛋白生物标志物用于早期诊断、疾病进展、预后和治疗反应具有潜在的临床应用价值^[104].

肿瘤来源的外泌体蛋白在癌症发展中具有重要的功能和预后价值.质谱分析主要用于鉴定来自癌症患者和健康受试者的血液外泌体中的不同蛋白质.对胰腺导管腺癌外泌体表面蛋白的研究揭示了多种特定的生物标志物候选物(CLDN4, EPCAM, CD151, LGALS3BP, HIST2H2BE和HIST2H2BF)^[105].糖蛋白-1(Glypican-1, GPC1)是研究最多的来自胰腺癌和结肠癌的外泌体表面标志物之一^[106].GPC1⁺外泌体的水平能够区分健康受试者、良性胰腺疾病患者以及早期和晚期胰腺癌患者,其与肿瘤负荷和患者术后生存率相关,因此能够检测胰腺癌^[106].研究表明,GPC1⁺外泌体与血清CA19-9联合使用可作为胰腺癌的诊断标志物^[105].

事实上,越来越多的外泌体生物标志物已经被报道用于许多癌症类型的鉴定和分型.2020年,Hoshino等^[107]利用LC-MS/MS技术,通过蛋白质组学分析497个样本中的囊泡和颗粒,鉴定到通用的13种新的蛋白生物标志物,从而大大地扩展了囊泡和颗粒的蛋白生物标志物的范围,并且这些蛋白生物标志物可以对未知原发肿瘤进行分类,可以作为癌症检测和癌症类型鉴定的可靠生物标志物.2021年,我们研究团队^[108]将蛋白质组学与基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱法相结合鉴定出了7种潜在的骨肉瘤肺转移外泌体蛋白生物标志物,并应用于骨肉瘤肺转移的早期诊断.2022年,Wang等^[109]通过蛋白质组学分析外泌体,发现了196个差异蛋白候选生物标志物以及许多与胃癌相关的重要细胞成分和功能[图10(A)].2023年,Wang等^[110]基于不同孔径纳米阵列结构分离不同的EV亚群,通过蛋白质组学分析鉴定出EV的潜在蛋白生物标志物,可用于前列腺癌的诊断[图10(B)].2024年,Yuyama等^[111]通过EV蛋白质组学分析,揭示了组织蛋白酶B可作为阿尔茨海默症的生物标志物.以上研究表明,外泌体的蛋白质可以作为可靠的癌症检测生物标志物,并用于诊断癌症类型.

基于质谱的外泌体表征不仅有助于蛋白质生物标志物的鉴定,而且有助于发现人类血浆外泌体中的磷酸化蛋白.蛋白质磷酸化是控制蛋白质功能的一种常见细胞调节机制,评估外泌体中的磷酸化蛋白具有重要意义^[112].2017年,Chen等^[113]分离和分析人血浆EV中的磷酸化蛋白,通过少量血浆样本即可分离出大约10000个独特的磷酸肽,使用无标记定量磷酸化蛋白质组学分析,发现乳腺癌患者血浆EV中的144种磷酸化蛋白显著高于健康对照组,其中,一些磷酸化蛋白在个体患者中得到了进一步验

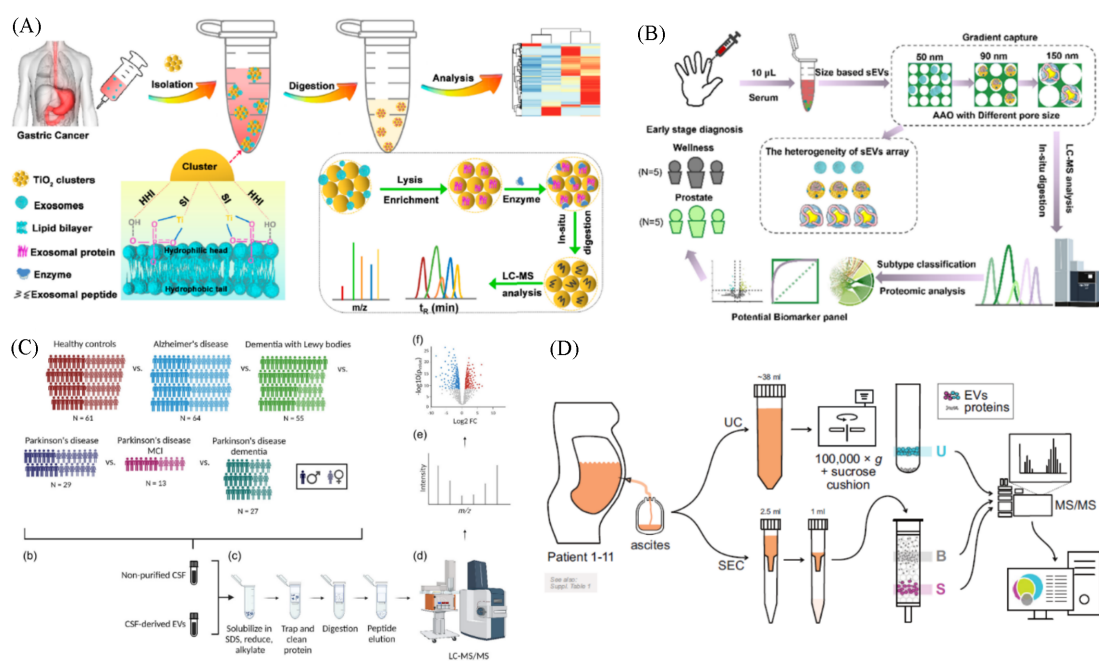


Fig. 10 All-in-one strategy for downstream molecular profiling of tumor-derived exosomes(A)^[109], nanoarray enabled size-dependent isolation and proteomics profiling of small EV subpopulations(B)^[110], proteomic comparison between non-purified cerebrospinal fluid and cerebrospinal fluid-derived EVs(C)^[123], processing and isolation of samples from patient ascites and the MS analysis(D)^[125]

(A) Copyright 2022, American Chemical Society; (B) Copyright 2023, American Chemical Society; (C) Copyright 2023, Open Access; (D) Copyright 2024, Open Access.

证。2020年, Aguilar等^[114]开发了一种从少量人血浆中分离EV中磷酸化蛋白和糖蛋白的方法,能够鉴定出近10000种独特的磷酸肽和1500种独特的N-糖肽,这些潜在的标志物可以区分疾病和健康状态。这些研究表明,外泌体中磷酸化蛋白的检测可能有助于癌症的筛查和监测。因此,外泌体的蛋白质组学分析在临床疾病诊断、筛查和监测方面具有重要的研究意义(表3^[80,81,105,107,108,110,111,113,115-119])。

Table 3 Proteomic analysis of tumor-derived exosomes for clinical disease diagnosis

Disease	Sample	Type of MS	Potential finding	Ref.
Pancreatic ductal adenocarcinoma	Plasma	LC-MS/MS	CLDN4, EPCAM, CD151, LGALS3BP, HIST2H2BE and HIST2H2BF	[105]
Multiple cancers	Tissue explants, plasma, and other bodily fluids	LC-MS/MS, DDA	ACTB, MSN and RAP1B	[107]
Osteosarcoma	Plasma	LC-MS/MS, MALDI-TOF MS	IGLV2-23, IGLV4-3, IGLV1-51, IGKV3-15, IGHV4-4, IGLV4-60, HBA1	[108]
Prostate cancer	Serum	LC-MS/MS	Vinculin, ECM, Rac, VASP	[110]
Alzheimer	Cerebrospinal fluid, plasma	Orbitrap, LC-MS	Cathepsin B	[111]
Breast cancer	Plasma	LC-MS/MS, label-free	144 Phosphoproteins	[113]
Colorectal cancer	Serum	DIA, TMT	Fibrinogen α chain, phosphorylated fibronectin 1, haptoglobin	[81]
Hepatocellular carcinoma	Serum	DDA, DIA	Von Willebrand factor, LGALS3BP, TGFB1, SERPINC1, HPX, HP, HBA1, FGA, FGG, FGB	[80]
Lung cancer	Serum	UPLC-MS/MS, Q-exactive	Lipopolysaccharide-binding proteins	[115]
Liver cancer	Serum	LC-MS, LTQ-orbitrap XL	Thrombospondin-1, fibulin-1, fibrinogen gamma chain	[116]
Oral squamous cell carcinoma	Serum	LC-MS, Q-exactive, orbitrap	PF4V1, CXCL7, F13A1, ApoA1	[117]
Epithelial ovarian cancer	Plasma	LC-MS/MS, TMT	Fibrinogen alpha chain, fibrinogen alpha chain	[118]
Prostate cancer	Serum	LC-MS/MS	Filamin A	[119]

除了作为检测的生物标志物外,外泌体还可以用于癌症患者疾病进展和治疗反应的监测^[120]。2018年,Chen等^[121]研究表明外泌体可以预测患者对抗PD-1治疗的反应。2019年,García-Silva等^[122]已经鉴定了从淋巴结切除术获得的晚期黑色素瘤患者淋巴引流液中纯化的EV。蛋白质组学分析结果表明,血清来源的外泌体富含类似黑色素瘤进展的蛋白质。此外,研究发现BRAFV600E突变可以在淋巴引流源性EV中检测到,并且其检测与患者复发风险相关。2023年,Hirschberg等^[123]通过蛋白质组学分析阿尔茨海默病、患有轻度认知障碍的帕金森病的未纯化的脑脊液和脑脊液衍生的EV,从未纯化的脑脊液中鉴定到39个候选生物标记物,从脑脊液衍生的EV中鉴定到37个候选生物标记物,经过对这些蛋白生物标志物的进一步探索和验证,结果表明,它们可用于进一步区分痴呆症,并为更多疾病特异性药物治疗的研究提供新途径[图10(C)]。2023年,Zhang等^[124]分析PD-1在单个肿瘤来源EV上的局部成像预测免疫治疗反应的效果。2024年,Vyhlídalová Kotrbová等^[125]利用腹水EV的蛋白质组学分析描述肿瘤微环境并预测卵巢癌患者的生存,为更好地了解EV在肿瘤促进和预防中的作用以及改进EV诊断开辟了新途径[图10(D)]。

4 总结与展望

几乎所有类型的细胞均可分泌外泌体。无论是诊断还是预后,外泌体已成为鉴定新的癌症生物标志物的理想靶标。生物标志物的鉴定可以进一步促进对癌症生物学的理解,以及外泌体在诊断和治疗方面的应用。最近,来自生物体液的外泌体的蛋白质组学分析越来越多地用于揭示新的蛋白质特征,以用于无创或微创癌症诊断和预后,并为更好的癌症治疗提供治疗靶点。高质量的外泌体是基于MS的蛋白质组学进行有效分析的先决条件。本文比较了最常用的外泌体分离方法,并讨论了它们的原理、优点和局限性。所有外泌体分离方法的实用性均取决于它们对人类临床样品的适用性。然后,总结了基于质谱的蛋白质组学分析方法以及外泌体蛋白质组学在临床疾病诊断中的应用。

然而,对于目前基于质谱的外泌体蛋白质组学分析,最大的挑战仍然是缺乏高效的、可靠的、可重复的和高通量的外泌体分离方法,导致样品质量的可重复性低,并可能导致误导性的结果。UC或UC和其它分离方法的结合通常可用于制备高纯度的外泌体,但这些方法耗时且难以保持大量临床样本的蛋白质组学分析的高可重复性。此外,它们需要大量的生物流体才能获得足够的外泌体进行全面的蛋白质组学分析。因此,在不牺牲纯度或产率的前提下,提高外泌体分离和纯化的通量和可重复性,有益于从更大的患者样本队列中开发外泌体的生物标志物。另外,低通量UC方法可用于在小队列中初步发现外泌体蛋白生物标志物,然后使用高重复性、高通量的方法(如SEC、亲和免疫和微流控分离)在大型临床队列中对候选蛋白生物标志物进行蛋白质组学验证。外泌体分离的自动化和标准化与先进的基于质谱的蛋白质组学相结合,可能为快速、可重复的外泌体定量蛋白质组学分析铺平道路,为这一重要的研究领域带来新的动力。在蛋白质组学领域,新的基于质谱的技术仍在开发中,将为我们寻找外泌体的蛋白质组学生物标志物提供新的选择。此外,随着大量基于外泌体的生物标志物逐渐被揭示,应该及时和严格地进行大型队列临床试验的后续验证,以加速它们在临床中的应用。

参 考 文 献

- [1] Li Q., Zhang Z., Wang F., Wang X., Zhan S., Yang X., Xu C., Liu D., *Sci. Adv.*, **2023**, 9(15), eadf4568
- [2] Kalluri R., McAndrews K. M., *Cell*, **2023**, 186(8), 1610—1626
- [3] Li Z., Liu C., Cheng Y., Li Y., Deng J., Bai L., Qin L., Mei H., Zeng M., Tian F., Zhang S., Sun J., *Sci. Adv.*, **2023**, 9(16), eade2819
- [4] Ding L., Liu X., Zhang Z., Liu L. E., He S., Wu Y., Effah C. Y., Yang R., Zhang A., Chen W., Yarmamat M., Qu L., Yang X., Wu Y., *Lab Chip*, **2023**, 23(6), 1694—1702
- [5] Zhang L., Yin W., Tong Y., Zhang Y., Xu Y., Liu S. Y., Dai Z., Zou X., *Anal. Chem.*, **2022**, 94(31), 10991—10999
- [6] Wang X., Xiang Z., Liu Y., Huang C., Pei Y., Wang X., Zhi H., Wong W. H. S., Wei H., Ng I. O. L., Lee P. P. W., Chan G. C. F., Lau Y. L., Tu W., *Sci. Transl. Med.*, **2020**, 12(563), eaaz3426
- [7] Zhang K., Cheng K., *Nat. Rev. Bioeng.*, **2023**, 12, 1—2
- [8] Zhang M., Hu S., Liu L., Dang P., Liu Y., Sun Z., Qiao B., Wang C., *Signal Transduct. Target. Ther.*, **2023**, 8(1), 124

- [9] Das S., Lyon C. J., Hu T., *ACS Nano*, **2024**, *18*(14), 9784—9797
- [10] Novikova S. E., Soloveva N. A., Farafonova T. E., Tikhonova O. V., Liao P. C., Zgoda V. G., *Molecules*, **2021**, *26*(20), 6145
- [11] Lane R. E., Korbie D., Hill M. M., Trau M., *Clin. Transl. Med.*, **2018**, *7*(1), 14
- [12] Keerthikumar S., Chisanga D., Ariyaratne D., Al Saffar H., Anand S., Zhao K., Samuel M., Pathan M., Jois M., Chilamkurti N., Gangoda L., Mathivanan S., *J. Mol. Biol.*, **2016**, *428*(4), 688—692
- [13] Pathan M., Fonseka P., Chitti S. V., Kang T., Sanwlan R., Van Deun J., Hendrix A., Mathivanan S., *Nucleic Acids Res.*, **2019**, *47*(D1), D516—D519
- [14] Abramowicz A., Widlak P., Pietrowska M., *Mol. Biosyst.*, **2016**, *12*(5), 1407—1419
- [15] Johnstone R. M., Bianchini A., Teng K., *Blood*, **1989**, *74*(5), 1844—1851
- [16] Théry C., Clayton A., Amigorena S., Raposo G., *Curr. Protoc. Cell Biol.*, **2006**, Chapter 3, Unit 3.22
- [17] Yan H., Li Y., Cheng S., Zeng Y., *Anal. Chem.*, **2021**, *93*(11), 4739—4774
- [18] Principe S., Jones E. E., Kim Y., Sinha A., Nyalwidhe J. O., Brooks J., Semmes O. J., Troyer D. A., Lance R. S., Kislinger T., Drake R. R., *Proteomics*, **2013**, *13*(10/11), 1667—1671
- [19] Principe S., Kim Y., Fontana S., Ignatchenko V., Nyalwidhe J. O., Lance R. S., Troyer D. A., Alessandro R., Semmes O. J., Kislinger T., Drake R. R., Medin J. A., *J. Proteome Res.*, **2012**, *11*(4), 2386—2396
- [20] Chia B. S., Low Y. P., Wang Q., Li P., Gao Z., *TrAC-Trend. Anal. Chem.*, **2017**, *86*, 93—106
- [21] Li P., Kaslan M., Lee S. H., Yao J., Gao Z., *Theranostics*, **2017**, *7*(3), 789—804
- [22] Crescitelli R., Lasser C., Jang S. C., Cvjetkovic A., Malmhall C., Karimi N., Hoog J. L., Johansson I., Fuchs J., Thorsell A., Ghos Y. S., Olofsson Bagge R., Lotvall J., *J. Extracell. Vesicles*, **2020**, *9*(1), 1722433
- [23] Sódar B. W., Kittel Á., Pálóczy K., Vukman K. V., Osteikoetxea X., Szabó-Taylor K., Németh A., Sperlúgh B., Baranyai T., Giricz Z., Wiener Z., Turiák L., Drahos L., Pállinger É., Vékey K., Ferdinandy P., Falus A., Buzás E. I., *Sci. Rep.*, **2016**, *6*(1), 24316
- [24] Bard M. P., Hegmans J. P., Hemmes A., Luider T. M., Willemsen R., Severijnen L. A., van Meerbeeck J. P., Burgers S. A., Hoogsteden H. C., Lambrecht B. N., *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **2004**, *31*(1), 114—121
- [25] Keller S., Ridinger J., Rupp A. K., Janssen J. W., Altevogt P., *J. Transl. Med.*, **2011**, *9*, 86
- [26] Tauro B. J., Greening D. W., Mathias R. A., Ji H., Mathivanan S., Scott A. M., Simpson R. J., *Methods*, **2012**, *56*(2), 293—304
- [27] Patel G. K., Khan M. A., Zubair H., Srivastava S. K., Khushman M., Singh S., Singh A. P., *Sci. Rep.*, **2019**, *9*(1), 5335
- [28] Welton J. L., Webber J. P., Botos L. A., Jones M., Clayton A., *J. Extracell. Vesicles*, **2015**, *4*, 27269
- [29] Taylor D. D., Shah S., *Methods*, **2015**, *87*, 3—10
- [30] Stranska R., Gysbrechts L., Wouters J., Vermeersch P., Bloch K., Dierickx D., Andrei G., Snoeck R., *J. Transl. Med.*, **2018**, *16*(1), 1
- [31] Karimi N., Cvjetkovic A., Jang S. C., Crescitelli R., Hosseinpour Feizi M. A., Nieuwland R., Lotvall J., Lasser C., *Cell. Mol. Life Sci.*, **2018**, *75*(15), 2873—2886
- [32] Yang D., Zhang W., Zhang H., Zhang F., Chen L., Ma L., Larcher L. M., Chen S., Liu N., Zhao Q., Tran P. H. L., Chen C., Veedu R. N., Wang T., *Theranostics*, **2020**, *10*(8), 3684—3707
- [33] Lane R. E., Korbie D., Trau M., Hill M. M., *Proteomics*, **2019**, *19*(8), e1800156
- [34] Takov K., Yellon D. M., Davidson S. M., *J. Extracell. Vesicles*, **2019**, *8*(1), 1560809
- [35] Nordin J. Z., Lee Y., Vader P., Mager I., Johansson H. J., Heusermann W., Wiklander O. P., Hallbrink M., Seow Y., Bultema J. J., Gilthorpe J., Davies T., Fairchild P. J., Gabrielsson S., Meisner-Kober N. C., Lehtio J., Smith C. I., Wood M. J., El Andaloussi S., *Nanomedicine*, **2015**, *11*(4), 879—883
- [36] Lobb R. J., Becker M., Wen S. W., Wong C. S., Wiegman A. P., Leimgruber A., Moller A., *J. Extracell. Vesicles*, **2015**, *4*, 27031
- [37] Thompson A. G., Gray E., Mager I., Fischer R., Thezenas M. L., Charles P. D., Talbot K., El Andaloussi S., Kessler B. M., Wood M., Turner M. R., *Proteomics*, **2018**, *18*(24), e1800257
- [38] Busatto S., Vilanilam G., Ticer T., Lin W. L., Dickson D. W., Shapiro S., Bergese P., Wolfram J., *Cells*, **2018**, *7*(12), 273
- [39] Han Z., Peng C., Yi J., Zhang D., Xiang X., Peng X., Su B., Liu B., Shen Y., Qiao L., *Sens. Actuators B: Chem.*, **2021**, *333*, 129563
- [40] Hua X., Zhu Q., Liu Y., Zhou S., Huang P., Li Q., Liu S., *Anal. Chim. Acta*, **2023**, *1258*, 341160
- [41] Bu J., Nair A., Iida M., Jeong W. J., Poellmann M. J., Mudd K., Kubiatowicz L. J., Liu E. W., Wheeler D. L., Hong S., *Nano Lett.*, **2020**, *20*(7), 4901—4909
- [42] Contreras-Naranjo J. C., Wu H. J., Ugaz V. M., *Lab Chip*, **2017**, *17*(21), 3558—3577
- [43] Zhang K., Yue Y., Wu S., Liu W., Shi J., Zhang Z., *ACS Sens.*, **2019**, *4*(5), 1245—1251
- [44] Zhang P., Zhou X., Zeng Y., *Chem. Sci.*, **2019**, *10*(21), 5495—5504
- [45] Liu C., Guo J., Tian F., Yang N., Yan F., Ding Y., Wei J., Hu G., Nie G., Sun J., *ACS Nano*, **2017**, *11*(7), 6968—6976
- [46] Kang K., Lee S. S., Hyun K., Lee S. J., Kim J. M., *Nat. Commun.*, **2013**, *4*, 2567
- [47] Liu C., Ding B., Xue C., Tian Y., Hu G., Sun J., *Anal. Chem.*, **2019**, *91*(24), 12547—12553
- [48] Liu C., Zhao J., Tian F., Chang J., Zhang W., Sun J., *J. Am. Chem. Soc.*, **2019**, *141*(9), 3817—3821
- [49] Lee K., Shao H., Weissleder R., Lee H., *ACS Nano*, **2015**, *9*(3), 2321—2327
- [50] Wu M., Ouyang Y., Wang Z., Zhang R., Huang P. H., Chen C., Li H., Li P., Quinn D., Dao M., Suresh S., Sadovsky Y., Huang T.

- J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2017**, *114*(40), 10584—10589
- [51] Wang Z., Wang H., Becker R., Rufo J., Yang S., Mace B. E., Wu M., Zou J., Laskowitz D. T., Huang T. J., *Microsyst. Nanoeng.*, **2021**, *7*, 20
- [52] Liu C., Zhao J., Tian F., Cai L., Zhang W., Feng Q., Chang J., Wan F., Yang Y., Dai B., Cong Y., Ding B., Sun J., Tan W., *Nat. Biomed. Eng.*, **2019**, *3*(3), 183—193
- [53] Zhao J., Liu C., Li Y., Ma Y., Deng J., Li L., Sun J., *J. Am. Chem. Soc.*, **2020**, *142*(11), 4996—5001
- [54] Mallia A., Gianazza E., Zoanni B., Brioschi M., Barbieri S. S., Banfi C., *Diagnostics*, **2020**, *10*(10), 843
- [55] Kim H., Kim D. W., Cho J. Y., *Proteome Sci.*, **2019**, *17*, 5
- [56] Fontana S., Saieva L., Taverna S., Alessandro R., *Proteomics*, **2013**, *13*(10/11), 1581—1594
- [57] Ludwig K. R., Schroll M. M., Hummon A. B., *J. Proteome Res.*, **2018**, *17*(7), 2480—2490
- [58] Manza L. L., Stamer S. L., Ham A. J., Codreanu S. G., Liebler D. C., *Proteomics*, **2005**, *5*(7), 1742—1745
- [59] Wisniewski J. R., Zougman A., Nagaraj N., Mann M., *Nat. Methods*, **2009**, *6*(5), 359—362
- [60] Hughes C. S., Moggridge S., Muller T., Sorensen P. H., Morin G. B., Krijgsveld J., *Nat. Protoc.*, **2019**, *14*(1), 68—85
- [61] Johnston H. E., Yadav K., Kirkpatrick J. M., Biggs G. S., Oxley D., Kramer H. B., Samant R. S., *Anal. Chem.*, **2022**, *94*(29), 10320—10328
- [62] Chen W., Wang S., Adhikari S., Deng Z., Wang L., Chen L., Ke M., Yang P., Tian R., *Anal. Chem.*, **2016**, *88*(9), 4864—4871
- [63] Xu R., Tang J., Deng Q., He W., Sun X., Xia L., Cheng Z., He L., You S., Hu J., Fu Y., Zhu J., Chen Y., Gao W., He A., Guo Z., Lin L., Li H., Hu C., Tian R., *Anal. Chem.*, **2018**, *90*(9), 5879—5886
- [64] Huang P., Kong Q., Gao W., Chu B., Li H., Mao Y., Cai Z., Xu R., Tian R., *Anal. Chim. Acta*, **2020**, *1127*, 140—148
- [65] Shah P., Zhang B., Choi C., Yang S., Zhou J., Harlan R., Tian Y., Zhang Z., Chan D. W., Zhang H., *Anal. Biochem.*, **2015**, *469*, 27—33
- [66] Li Y., Yuan H., Cheng M., Zhu X., Yang K., Zhang W., Sui Z., Zhang C., Zhang L., Zhang Y., *Sci. Bull.*, **2022**, *67*(16), 1628—1631
- [67] Mathew B., Mansuri M. S., Williams K. R., Nairn A. C., *Brain Sci.*, **2021**, *11*(2), 258
- [68] Wallen H., *Nat. Rev. Methods Primers*, **2024**, *4*(1), 39
- [69] Doyle L., Wang M., *Cells*, **2019**, *8*(7), 727
- [70] Jalaludin I., Lubman D. M., Kim J., *Mass Spectrom. Rev.*, **2023**, *42*(2), 844—872
- [71] Toby T. K., Fornelli L., Kelleher N. L., *Annu. Rev. Anal. Chem.*, **2016**, *9*(1), 499—519
- [72] Aebersold R., Agar J. N., Amster I. J., Baker M. S., Bertozzi C. R., Boja E. S., Costello C. E., Cravatt B. F., Fenselau C., Garcia B. A., Ge Y., Gunawardena J., Hendrickson R. C., Hergenrother P. J., Huber C. G., Ivanov A. R., Jensen O. N., Jewett M. C., Kelleher N. L., Kiessling L. L., Krogan N. J., Larsen M. R., Loo J. A., Ogorzalek Loo R. R., Lundberg E., MacCoss M. J., Mallick P., Mootha V. K., Mrksich M., Muir T. W., Patrie S. M., Pesavento J. J., Pitteri S. J., Rodriguez H., Saghatelian A., Sandoval W., Schlüter H., Sechi S., Slavoff S. A., Smith L. M., Snyder M. P., Thomas P. M., Uhlén M., Van Eyk J. E., Vidal M., Walt D. R., White F. M., Williams E. R., Wohlschläger T., Wysocki V. H., Yates N. A., Young N. L., Zhang B., *Nat. Chem. Biol.*, **2018**, *14*(3), 206—214
- [73] Zhu Y., Pick H., Gasilova N., Li X., Lin T. E., Laeubli H. P., Zippelius A., Ho P. C., Girault H. H., *Chem*, **2019**, *5*(5), 1318—1336
- [74] Buck K. M., Roberts D. S., Aballo T. J., Inman D. R., Jin S., Ponik S., Brown K. A., Ge Y., *Anal. Chem.*, **2022**, *94*(20), 7164—7168
- [75] Brahmadhi A., Chuang Y. K., Wang S. Y., Kao C. C., Tsai I. L., *J. Food Drug Anal.*, **2022**, *30*(2), 202—222
- [76] Guan S., Taylor P. P., Han Z., Moran M. F., Ma B., *J. Proteome Res.*, **2020**, *19*(8), 3230—3237
- [77] Zhang Z., *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2012**, *23*(8), 1400—1407
- [78] Bian Y., Zheng R., Bayer F. P., Wong C., Chang Y. C., Meng C., Zolg D. P., Reinecke M., Zecha J., Wiechmann S., Heinzlmeir S., Scherr J., Hemmer B., Baynham M., Gingras A. C., Boychenko O., Kuster B., *Nat. Commun.*, **2020**, *11*(1), 157
- [79] Wu A. Y., Ueda K., Lai C. P., *Proteomics*, **2019**, *19*(1/2), e1800162
- [80] Zhao L., Shi J., Chang L., Wang Y., Liu S., Li Y., Zhang T., Zuo T., Fu B., Wang G., Ruan Y., Zhang Y., Xu P., *ACS Omega*, **2021**, *6*(1), 827—835
- [81] Zheng X., Xu K., Zhou B., Chen T., Huang Y., Li Q., Wen F., Ge W., Wang J., Yu S., Sun L., Zhu L., Liu W., Gao H., Yue L., Cai X., Zhang Q., Ruan G., Zhu T., Wu Z., Zhu Y., Shao Y., Guo T., Zheng S., *J. Extracell. Vesicles*, **2020**, *9*(1), 1750202
- [82] Yang Y., Liu X., Shen C., Lin Y., Yang P., Qiao L., *Nat. Commun.*, **2020**, *11*(1), 146
- [83] Yang Y., Yan G., Kong S., Wu M., Yang P., Cao W., Qiao L., *Nat. Commun.*, **2021**, *12*(1), 6073
- [84] Derks J., Leduc A., Wallmann G., Huffman R. G., Willetts M., Khan S., Specht H., Ralser M., Demichev V., Slavov N., *Nat. Biotechnol.*, **2022**, *41*(1), 50—59
- [85] Patel V. J., Thalassinou K., Slade S. E., Connolly J. B., Crombie A., Colin Murrell J., Scrivens J. H., *J. Proteome Res.*, **2009**, *8*(7), 3752—3759
- [86] Neilson K. A., Ali N. A., Muralidharan S., Mirzaei M., Mariani M., Assadourian G., Lee A., van Sluyter S. C., Haynes P. A., *Proteomics*, **2011**, *11*(4), 535—553
- [87] Lobo M. D., Moreno F. B., Souza G. H., Verde S. M., Moreira R. A., Monteiro-Moreira A. C., *Front. Oncol.*, **2017**, *7*, 14
- [88] Lee J., McKinney K. Q., Pavlopoulos A. J., Niu M., Kang J. W., Oh J. W., Kim K. P., Hwang S., *Mol. Cells*, **2018**, *41*(3), 179—187

- [89] Xu L., Gimple R. C., Lau W. B., Lau B., Fei F., Shen Q., Liao X., Li Y., Wang W., He Y., Feng M., Bu H., Wang W., Zhou S., *Mass Spectrom. Rev.*, **2020**, *39*(5/6), 745—762
- [90] Lindemann C., Thomanek N., Hundt F., Lerari T., Meyer H. E., Wolters D., Marcus K., *Biol. Chem.*, **2017**, *398*(5/6), 687—699
- [91] Wang S., Chen G., Lin X., Xing X., Cai Z., Liu X., Liu J., *Oncol. Lett.*, **2017**, *14*(6), 8122—8131
- [92] Sun H., Wang C., Hu B., Gao X., Zou T., Luo Q., Chen M., Fu Y., Sheng Y., Zhang K., Zheng Y., Ren X., Yan S., Geng Y., Yang L., Dong Q., Qin L., *Signal Transduct. Target. Ther.*, **2021**, *6*(1), 187
- [93] Clark D. J., Fondrie W. E., Liao Z., Hanson P. I., Fulton A., Mao L., Yang A. J., *Anal. Chem.*, **2015**, *87*(20), 10462—10469
- [94] Huang Y., Liu Y., Huang Q., Sun S., Ji Z., Huang L., Li Z., Huang X., Deng W., Li T., *Front. Immunol.*, **2022**, *13*, 800902
- [95] Dephoure N., Gygi S. P., *Sci. Signal.*, **2012**, *5*(217), rs2
- [96] Stepath M., Zülch B., Maghnoji A., Schork K., Turewicz M., Eisenacher M., Hahn S., Sitek B., Bracht T., *J. Proteome Res.*, **2019**, *19*(2), 926—937
- [97] Simpson K. L., Whetton A. D., Dive C., *J. Chromatogr. B*, **2009**, *877*(13), 1240—1249
- [98] Li H., Han J., Pan J., Liu T., Parker C. E., Borchers C. H., *J. Mass Spectrom.*, **2017**, *52*(5), 319—341
- [99] DeSouza L. V., Romaschin A. D., Colgan T. J., Michael Siu K. W., *Anal. Chem.*, **2009**, *81*(9), 3462—3470
- [100] Rauniyar N., Yates J. R., *J. Proteome Res.*, **2014**, *13*(12), 5293—5309
- [101] Clark D. J., Fondrie W. E., Yang A., Mao L., *J. Proteomics*, **2016**, *133*, 161—169
- [102] Kugeratski F. G., Hodge K., Lilla S., McAndrews K. M., Zhou X., Hwang R. F., Zanivan S., Kalluri R., *Nat. Cell Biol.*, **2021**, *23*(6), 631—641
- [103] Chen X., Wei S., Ji Y., Guo X., Yang F., *Proteomics*, **2015**, *15*(18), 3175—3192
- [104] Sehey K. L., Luther J. M., Rose K. L., *Methods*, **2015**, *87*, 75—82
- [105] Castillo J., Bernard V., San Lucas F. A., Allenson K., Capello M., Kim D. U., Gascoyne P., Mulu F. C., Stephens B. M., Huang J., Wang H., Momin A. A., Jacamo R. O., Katz M., Wolff R., Javle M., Varadhachary G., Wistuba II, Hanash S., Maitra A., Alvarez H., *Ann. Oncol.*, **2018**, *29*(1), 223—229
- [106] Melo S. A., Luecke L. B., Kahlert C., Fernandez A. F., Gammon S. T., Kaye J., LeBleu V. S., Mittendorf E. A., Weitz J., Rahbari N., Reissfelder C., Pilarsky C., Fraga M. F., Piwnica-Worms D., Kalluri R., *Nature*, **2015**, *523*(7559), 177—182
- [107] Hoshino A., Kim H. S., Bojmar L., Gyan K. E., Cioffi M., Hernandez J., Zambirinis C. P., Rodrigues G., Molina H., Heissel S., Mark M. T., Steiner L., Benito-Martin A., Lucotti S., di Giannatale A., Offer K., Nakajima M., Williams C., Nogues L., Pelissier Vatter F. A., Hashimoto A., Davies A. E., Freitas D., Kenific C. M., Ararso Y., Buehring W., Lauritzen P., Ogitani Y., Sugiura K., Takahashi N., Aleckovic M., Bailey K. A., Jolissant J. S., Wang H., Harris A., Schaeffer L. M., Garcia-Santos G., Posner Z., Balachandran V. P., Khakoo Y., Raju G. P., Scherz A., Sagi I., Scherz-Shouval R., Yarden Y., Oren M., Malladi M., Petriccione M., de Braganca K. C., Donzelli M., Fischer C., Vitolano S., Wright G. P., Ganshaw L., Marrano M., Ahmed A., DeStefano J., Danzer E., Roehrl M. H. A., Lacayo N. J., Vincent T. C., Weiser M. R., Brady M. S., Meyers P. A., Wexler L. H., Ambati S. R., Chou A. J., Slotkin E. K., Modak S., Roberts S. S., Basu E. M., Diolaiti D., Krantz B. A., Cardoso F., Simpson A. L., Berger M., Rudin C. M., Simeone D. M., Jain M., Ghajar C. M., Batra S. K., Stanger B. Z., Bui J., Brown K. A., Rajasekhar V. K., Healey J. H., de Sousa M., Kramer K., Sheth S., Baisch J., Pascual V., Heaton T. E., La Quaglia M. P., Pisapia D. J., Schwartz R., Zhang H., Liu Y., Shukla A., Blavier L., DeClerck Y. A., LaBarge M., Bissell M. J., Caffrey T. C., Grandgenett P. M., Hollingsworth M. A., Bromberg J., Costa-Silva B., Peinado H., Kang Y., Garcia B. A., O'Reilly E. M., Kelsen D., Trippett T. M., Jones D. R., Matei I. R., Jarnagin W. R., Lyden D., *Cell*, **2020**, *182*(4), 1044—1061
- [108] Han Z., Peng C., Yi J., Wang Y., Liu Q., Yang Y., Long S., Qiao L., Shen Y., *iScience*, **2021**, *24*(8), 102906
- [109] Wang S., He Y., Lu J., Wang Y., Wu X., Yan G., Fang X., Liu B., *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2022**, *14*(32), 36341—36352
- [110] Wang S., He Y., Tian T., Lu J., Lu Y., Huang X., Zou Y., Zhang L., Fang X., Liu B., *Anal. Chem.*, **2023**, *95*(41), 15276—15285
- [111] Yuyama K., Sun H., Fujii R., Hemmi I., Ueda K., Igeta Y., *Brain*, **2024**, *147*(2), 627—636
- [112] Hunter T., *Cell*, **2000**, *100*, 113—127
- [113] Chen I. H., Xue L., Hsu C. C., Paez J. S., Pan L., Andaluz H., Wendt M. K., Iliuk A. B., Zhu J. K., Tao W. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2017**, *114*(12), 3175—3180
- [114] Andaluz Aguilar H., Iliuk A. B., Chen I. H., Tao W. A., *Nat. Protoc.*, **2020**, *15*(1), 161—180
- [115] Wang N., Song X., Liu L., Niu L., Wang X., Song X., Xie L., *Cancer Sci.*, **2018**, *109*(5), 1701—1709
- [116] Uzzaman A., Zhang X., Qiao Z., Zhan H., Sohail A., Wahid A., Shang Z., Guan X., Cao C. X., Xiao H., *Biochimie*, **2020**, *177*, 132—141
- [117] Li C., Zhou Y., Liu J., Su X., Qin H., Huang S., Huang X., Zhou N., *Cancer Epidem. Biomar.*, **2019**, *28*(10), 1668—1681
- [118] Zhang W., Ou X., Wu X., *Int. J. Oncol.*, **2019**, *54*, 1719—1733
- [119] Panigrahi G. K., Prahara P. P., Kittaka H., Mridha A. R., Black O. M., Singh R., Mercer R., van Bokhoven A., Torkko K. C., Agarwal C., Agarwal R., Abd Elmageed Z. Y., Yadav H., Mishra S. K., Deep G., *Cancer Med.*, **2019**, *8*(3), 1110—1123
- [120] Wang X., Tian L., Lu J., Ng I. O. L., *Oncogenesis*, **2022**, *11*(1), 54
- [121] Chen G., Huang A. C., Zhang W., Zhang G., Wu M., Xu W., Yu Z., Yang J., Wang B., Sun H., Xia H., Man Q., Zhong W., Antelo L. F., Wu B., Xiong X., Liu X., Guan L., Li T., Liu S., Yang R., Lu Y., Dong L., McGettigan S., Somasundaram R., Radhakrishnan

- R., Mills G., Lu Y., Kim J., Chen Y. H., Dong H., Zhao Y., Karakousis G. C., Mitchell T. C., Schuchter L. M., Herlyn M., Wherry E. J., Xu X., Guo W., *Nature*, **2018**, 560(7718), 382—386
- [122] Garcia-Silva S., Benito-Martin A., Sanchez-Redondo S., Hernandez-Barranco A., Ximenez-Embun P., Nogues L., Mazariegos M. S., Brinkmann K., Amor Lopez A., Meyer L., Rodriguez C., Garcia-Martin C., Boskovic J., Leton R., Montero C., Robledo M., Santambrogio L., Sue Brady M., Szumera-Cieckiewicz A., Kalinowska I., Skog J., Noerholm M., Munoz J., Ortiz-Romero P. L., Ruano Y., Rodriguez-Peralto J. L., Rutkowski P., Peinado H., *J. Exp. Med.*, **2019**, 216(5), 1061—1070
- [123] Hirschberg Y., Valle-Tamayo N., Dols-Icardo O., Engelborghs S., Buelens B., Vandenbroucke R. E., Vermeiren Y., Boonen K., Mertens I., *J. Extracell. Vesicles*, **2023**, 12(12), e12383
- [124] Zhang J., Guan M., Lv M., Liu Y., Zhang H., Zhang Z., Zhang K., *ACS Nano*, **2023**, 17(20), 20120—20134
- [125] Vyhřídálová Kotrbová A., Gömöryová K., Mikulová A., Plešingerová H., Sladeček S., Kravec M., Hrachovinová Š., Potěšil D., Dunsmore G., Blériot C., Bied M., Kotouček J., Bednaříková M., Hausnerová J., Minář L., Crha I., Felsinger M., Zdráhal Z., Ginhoux F., Weinberger V., Bryja V., Pospíchalová V., *J. Extracell. Vesicles*, **2024**, 13(3), e12420

(Ed.: Y, K, S)