

Automated Extracellular Vesicles Extractor Based on Nanotechnology for High Throughput Sample Preparation and Phosphoproteomics Analysis

Yuchen Yang¹, Hao Zhang², Yuhan Cai², Yajie Ding², Guiyuan Zhang², Yufeng Liu², Jie Sun², Weiguo Andy Tao³, Yanhong Gu¹

¹Department of Oncology & Cancer Rehabilitation Center, The First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing, China

²State Key Laboratory of Bioelectronics, National Demonstration Center for Experimental Biomedical Engineering Education, Southeast University, Nanjing, China

³Department of Chemistry, Department of Biochemistry & Center for Cancer Research, Purdue University, West Lafayette, United States

Email address:

630782226@qq.com (Yuchen Yang), zhanghaohao@seu.edu.cn (Hao Zhang), yhcail@seu.edu.cn (Yuhan Cai), yajie_ding@seu.edu.cn (Yajie Ding), 230218260@seu.edu.cn (Guiyuan Zhang), 230208230@seu.edu.cn (Yufeng Liu), 230189808@seu.edu.cn (Jie Sun), taow@seu.edu.cn (Weiguo Andy Tao), guyhphd@163.com (Yanhong Gu)

To cite this article:

Yuchen Yang, Hao Zhang, Yuhan Cai, Yajie Ding, Guiyuan Zhang, Yufeng Liu, Jie Sun, Weiguo Andy Tao, Yanhong Gu. Automated Extracellular Vesicles Extractor Based on Nanotechnology for High Throughput Sample Preparation and Phosphoproteomics Analysis. *Science Discovery*. Vol. 10, No. 2, 2022, pp. 48-59. doi: 10.11648/j.sd.20221002.15

Received: March 17, 2022; Accepted: April 18, 2022; Published: April 22, 2022

Abstract: Extracellular vesicles (EVs) play important roles in the diagnosis and treatment of diseases because of its lavish bioinformatic molecular contents. However, how to separate plentiful of extracellular vesicles in a short time with high consistency is still a problem. Here, we'd like to introduce an automated extracellular vesicles capturing machine named EVenrich (Extracellular Vesicles Enrichment) that helps realize capturing EVs of biosamples in a high-throughput manner. Incorporating EVenrich with EVtraps-a kind of biological magnetic beads capturing extracellular vesicles specifically, we were able to isolate EVs from up to 48 urine samples in 60 min, with similar quality and quantity and superior stability to manual capture. In clinical urine EVs analysis, over 14000 peptide fragments and 2000 proteins were detected by automated capture, which was similar to manual capture and significantly superior to ultracentrifugation. We further collected urine samples from 21 patients with negative prostate biopsy results and 21 patients with confirmed prostate cancer. Every three samples were mixed into a group to make mixed samples of 7 control groups and 7 disease groups. After exosome extraction and exosome proteomics / phosphorylated proteomics analysis, we found 211 overexpressed proteins and 187 overexpressed phosphorylated peptides corresponding to 40 phosphorylated proteins as potential biomarkers for prostate cancer. In addition, qRT-PCR results showed that the ratio of miR-125b to miR-145 could well distinguish prostate cancer patients from non-prostate cancer patients, suggesting that it could be used as a potential marker of prostate cancer.

Keywords: Extracellular Vesicles, EVenrich, Phosphoproteomics, Prostate Cancer

一种基于纳米技术的自动细胞外囊泡提取器的探索与建立

杨雨晨¹, 张昊², 蔡雨含², 丁雅杰², 张贵元², 刘雨风², 孙杰², 陶纬国³, 顾艳宏¹

¹南京医科大学第一附属医院肿瘤科与癌症康复中心, 南京, 中国

²东南大学生物电子学国家重点实验室、国家生物医学工程实验教学示范中心, 南京, 中国

³普渡大学化学系、生物化学系与癌症研究中心, 西拉斐特, 美国

邮箱

630782226@qq.com (杨雨晨), zhanghaohao@seu.edu.cn (张昊), yhcail@seu.edu.cn (蔡雨含), yajie_ding@seu.edu.cn (丁雅杰), 230218260@seu.edu.cn (张贵元), 230208230@seu.edu.cn (刘雨凤), 230189808@seu.edu.cn (孙杰), taow@seu.edu.cn (陶纬国), guyhphd@163.com (顾艳宏)

摘要: 细胞外囊泡含有丰富的生物信息分子内容, 在疾病的诊断和治疗中发挥着重要作用。然而, 在短时间内分离出高浓度的细胞外囊泡仍然是一个难题。在这里, 我们介绍一种名为EVENrich (Extracellular Vesicles Enrichment) 的自动化细胞外囊泡提取器, 它能以高通量的方式提取生物样本的细胞外囊泡。将EVENrich与EVtrap (一种专门提取细胞外囊泡的生物磁珠) 结合, 我们能够在60分钟内从多达48个尿液样本中分离细胞外囊泡。在对临床尿液样本细胞外囊泡的分析中, 自动提取方法检测到14000多个肽段和2000多个蛋白质, 其质量和数量均与手动提取相似。我们还检测到对应于40种蛋白质的187种显著过表达的磷酸肽作为潜在的前列腺癌生物标志物。

关键词: 细胞外囊泡, EVenrich, 磷酸化蛋白质组学, 前列腺癌

1. 引言

细胞外囊泡 (Extracellular Vesicles, EVs) 是一种分泌性的膜囊泡, 包含直径在30-1000nm之间的功能性核酸和蛋白质。大多数研究表明, 在正常或异常的生理条件下, 不同的细胞可以分泌EVs[1]。由于其传递信号分子的能力, EVs被认为是细胞间通信的重要方式[2-3]。EVs通过运输核酸、蛋白质、脂质、氨基酸和代谢物等实现体内远距离的信号传导, 这对多器官功能协作和维持正常生理功能至关重要[4-5]。目前已证实许多生理过程都与EVs有关。Grizzle等人发现肿瘤来源的囊泡可以携带免疫抑制分子, 这些分子可以使T淋巴细胞或自然杀伤细胞失活, 或促进调节性T淋巴细胞或髓样细胞的分化, 从而抑制免疫反应[6]。Thomson等人提出, 未成熟树突状细胞可以通过结合并吞来自其他活化树突状细胞的外泌体而被激活为免疫活性细胞[7]。Yang等人注意到肿瘤细胞可以通过EVs胞吐抗肿瘤药物。基于此, 他们开发了可以靶向癌症化疗的生物相容性肿瘤细胞外泌体仿生多孔硅纳米颗粒, 从而实现了大块癌细胞和肿瘤干细胞的有效抑制[8]。因此, 监测EVs可帮助我们阐明许多尚不明确的生理过程, 包括肿瘤细胞如何逃逸免疫监视、细胞间如何协作、细胞如何对药物做出反应等等。阐明EVs的功能对生理学、肿瘤学、药学和许多其它学科都有重要意义。

目前几种常见的EVs分离方法包括超速离心法 (ultracentrifugation, UC)、密度梯度离心法、免疫亲和富集法、共沉淀法、超滤法、尺寸排阻色谱法等[9-10]。然而, 这些方法存在固有的缺点, 如膜完整性低、实验周期长、成本高、回收效率低和纯度低等, 限制了它们在快速、高效的EVs捕获和分析中的潜在应用。最近, 一些基于纳米技术的新方法走进人们的视野。借助于纳米颗粒, 如TiO₂微球[11]或对EVs具有特定亲和力的两亲磁珠[12], 研究人员实现了比UC更高的EVs捕获率, 使得自动流水线捕获和分析EVs的过程成为现实。

我们设计了一种用于捕获EVs的高通量自动化细胞外囊泡提取器 (EVENrich), 通过将样品与相应的缓冲液孵育 (大部分缓冲液是表面活性剂的混合物, 成分因样品而异) 以防止污染物 (尤其是一些杂蛋白) 与我们之前设计

的EVtrap珠结合[13]。在与磁珠共孵育后, 样本中的EVs可以被捕获到珠的表面。通过简单的磁捕获和漂洗, 我们可以得到纯的EVs样品。与手动采样方法相比, 自动方法获取的样品更加均匀, 质量也保持一致。此外, 自动化过程更加高效, 可以实现每次最大48批的高通量样本处理。提取到的纯EVs样品可直接用于生物学实验以及进一步的蛋白质组学和磷酸化蛋白质组学分析。

2. 材料和方法

2.1. 材料和试剂

EVtrap由Tymora分析运营有限公司购买。EVtrap捕获的EVs用三乙胺 (Millipore-Sigma) 洗脱, 并用磷钨酸 (国药集团化学试剂有限公司) 负染。此外, 实验中使用的纯净水由Milli-Q纯水系统制备 (电阻率>18.2 MΩ·cm)。tritonX-100 (上海 (中国) 生物工程有限公司)、磷酸盐缓冲盐水 (PBS, Gibco)、15%十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE, 上海 (中国) 雅酶生物医药科技有限公司)、PTS裂解液 (EVLiXIR) 和聚偏氟乙烯 (PVDF) 膜 (Millipore, Sigma) 用于EVs捕获和蛋白质印迹实验。Pierce™ BCA蛋白质分析试剂盒购自赛默飞公司。

2.2. 尿液样本的收集和预处理

所有临床尿样均经由江苏省人民医院 (中国南京) 批准获得, 所有样本均按照该医院的道德准则使用, 所有患者在采集样本前均表示知情同意。收集健康人和前列腺癌患者的第一次晨尿, 以3000g离心10分钟, 重复两次以去除大的细胞沉淀。上清液在-80℃下储存直至使用, 注意避免反复冻融。

2.3. EVs提取

首先将尿液样本和EVtrap在室温下混匀, 振荡孵育30分钟。磁捕获后, 用0.01% Triton X-100清洗一次, PBS清洗两次, 最后与三乙胺 (100 mM) 涡旋10分钟充分洗脱, 收集洗脱液冻干[12]。

图1A显示了自动EVs提取器 (EVENrich) 纯化和提取预处理的EVs样品的过程。第1列用于尿液样品与EVtrap

共孵育，第2列用0.1%Triton X-100洗涤两次，然后将EVtrap磁珠转移到3和4两列中并用PBS洗涤两次。最后，在最后两列中分别用三乙胺洗脱EVtrap两次。将最后两列的洗脱液混匀后，通过冷冻干燥分离，并在-80℃下储存。

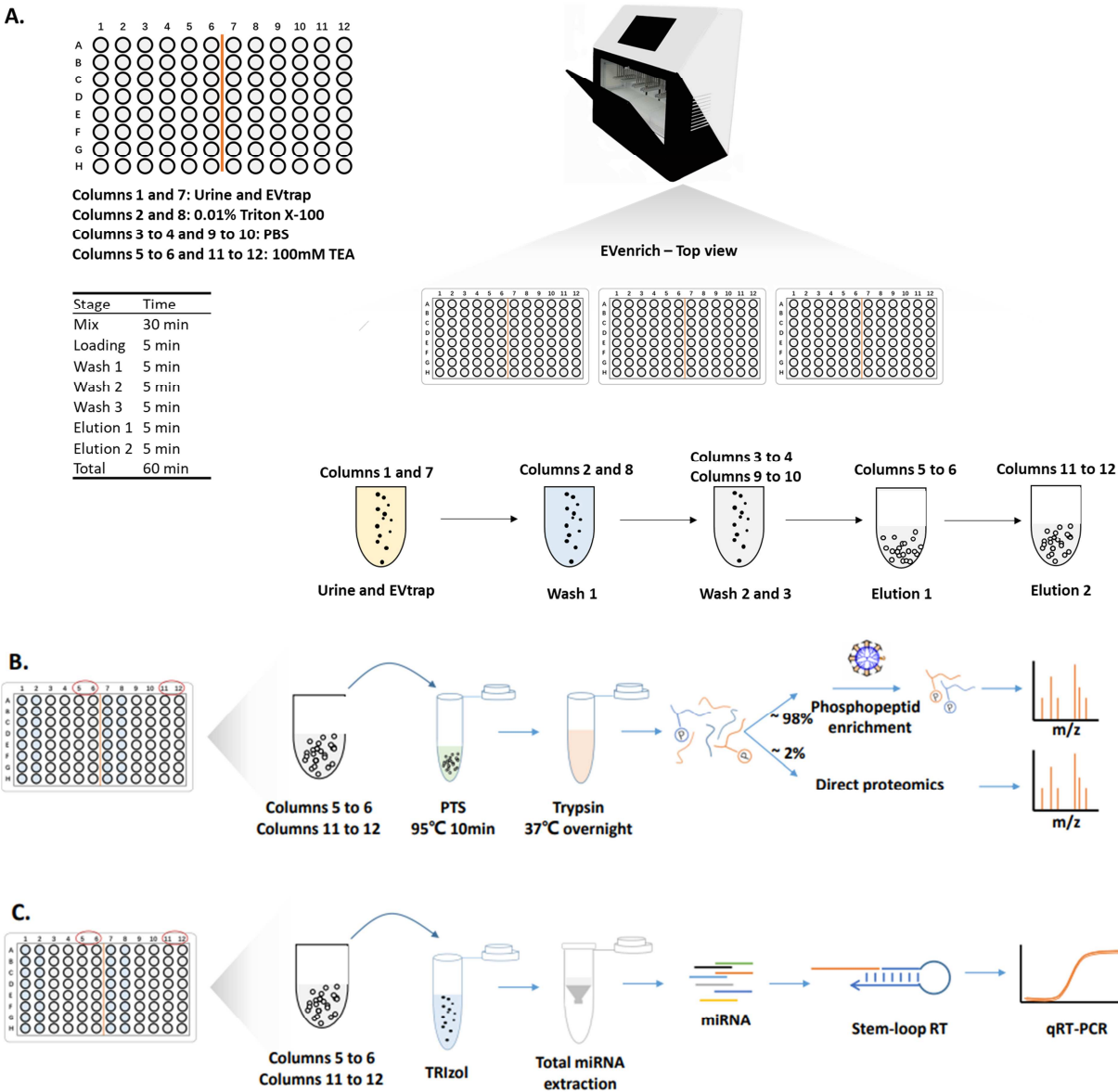


图1 A.自动化细胞外囊泡提取器样品制备工作流程图；B.外泌体蛋白质组学和磷酸化蛋白质组学全自动提取流程图；C.外泌体miRNA全自动提取流程图。

2.4. 透射电子显微镜（TEM）

将与5mL尿液对应的EVs样品分散在1mL PBS中以制备EVs-TEM溶液。将10μl EVs-TEM溶液滴入200目碳涂层铜网上。自然干燥后，样品在室温下与2%磷钨酸溶液（pH=7.0）孵育2-3分钟，进行阴性染色。最后，在加速电压为80 kV的HITACHI HT7700D电子显微镜下（Hitachi, Tokyo, Japan）成像。

2.5. 纳米粒径跟踪分析（NTA）

将从1 mL尿液样品中富集到的外泌体用200 μL 100 mM TEA洗脱两次，用PBS稀释至10 mL，以制备EVs-NTA溶液用于NTA分析。使用ZetaView（Particle Metrix,

Germany）测定手动操作和EVs提取器提取的EVs大小，用纯水稀释100 nm聚苯乙烯颗粒25万倍进行校准。在仪器设置中，最小亮度设置为20，灵敏度设置为70，快门设置为100。

2.6. 蛋白质印迹分析（WB）

用20μl LDS上样缓冲液裂解EVs样品，以获得蛋白质裂解物。在95℃下煮5分钟，然后将这些样品的等效体积加到15% SDS-PAGE（电压190 V，70min）上，并转移（电流275 mA，70 min）到PVDF膜（Millipore, Sigma）上。之后，在TBST中用1%的BSA封闭PVDF膜1小时，并在4℃冰箱中以1:2500v/v的电压与兔抗CD9（D3H4P; Cell Signaling Technology）孵育过夜。最后在TBST中与1%

BSA中的HRP二抗特异性结合，用增强化学发光成像仪（ImageQuant LAS500）扫描膜以实现免疫测定和定量。

2.7. 实时定量聚合酶链反应（qRT-PCR）

按照说明书使用miRNA纯化试剂盒（CWbiotech, China）提取EVs的miRNA。使用逆转录试剂盒将总RNA反转录成cDNA，使用miRNA通用SYBR Qpcr引物

（Vazyme, China）进行qRT-PCR（定量实时PCR）反应，进行3个重复。表1中提供了用于qRT-PCR的引物。

PCR反应采取20μL反应体系。包括10μL Mix，2μL上下游引物，2μL模板DNA，6 μL去离子水。PCR扩增条件如下：95°C预变性5 min，95°C变性30s，58°C退火30s，72°C延伸30s，循环35次，72°C延伸5min。PCR得到的产物用2%的琼脂糖凝胶进行验证。

表1 qRT-PCR使用的引物。

miR-21-5p-F	CGCGAGCTACATTGTCTGCTG
miR-21-5p-R	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACGAAACC
miR-125b-5p-R	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTCACA
miR-125b-5p-F	CGCGTCCCTGAGACCCTAAC
miR-145-5p-R	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACACAAAG
miR-145-5p-F	GCGCGTCAGTGCCTACAGAA
miR-221-5p-F	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTCAACA
miR-221-5p-R	GCGCGTAGCTTATCAGACTGA

2.8. 质谱检测（MS）

质谱样品制备方法：取5 mL尿液外泌体冻干样品，溶解于100μL裂解液中（12mM SDC，12mM SLS，10 mM TCEP，40mM CAA，50mM Tris（pH=8.5）），涡旋使其混合均匀后置于95°C水浴锅中煮10 min，待其冷却后轻微离心，加入450μL 50 mM TEAB，然后以酶与蛋白1: 100的质量比加入LysC蛋白酶，37°C 1000 rpm在恒温混匀仪上酶解，3 h后再以酶与蛋白1: 50的质量比加入胰酶，过夜酶解。酶解结束后，加入50 μL 10%的TFA溶液调节溶液pH至酸性，然后向体系中加入600 μL的乙酸乙酯，涡旋2 min，15000 g离心3 min，吸掉上层乙酸乙酯溶液，重复加入乙酸乙酯，涡旋，离心，去除溶液中的表面活性剂，最后冻干。

冻干后的样品采用Stage-Tip进行脱盐：往Stage-Tip柱子中加入200μL 80% ACN/0.1% TFA溶液，2000rpm离心使溶液全部通过柱子，再往柱子中加入200μL 0.1% TFA溶液，2000rpm离心使溶液全部通过柱子，用200 μL 0.1% TFA溶液重悬冻干的样品，涡旋混匀，然后加入Stage-Tip柱子，2000 rpm离心完全使蛋白质充分结合；加入200 μL 0.1% TFA溶液离心完全，洗去多余的盐，重复洗涤步骤一次；最后，用200μL 80% ACN和0.1% TFA混合溶液洗脱蛋白，重复一次洗脱，获得400 μL蛋白洗脱液。取出5%用作全蛋白分析，剩余95%使用PolyMAC磷酸化蛋白富集试剂盒（Tymora Analytical）进行磷酸化蛋白富集，用作磷酸化蛋白质分析。

将冻干的肽段和磷酸肽段重新溶解在10μL 0.1%甲酸（FA）中，分别将2μL和8μL冻干的肽段和磷酸肽段注入EASY-nLC 1200进行蛋白质组学和磷酸化蛋白质组学分析。流动相缓冲液由缓冲液A（超纯水中0.1%FA）和缓冲液B（乙腈中0.1%FA）组成。所有肽段均在25cm填充柱（360μm OD×150μm ID）上分离，该柱含有C18树脂（2.2μm，100A；Michrom Bioresources），流速为600nL/min，线性梯度为90min（B相：5%-35%）。所用设备为EASY-nLC 1200与Q Exactive HF-X质谱仪（Thermo Fisher Scientific）。

数据采集模式为DDA。Thermo Q-Exactive HF-X在top-20配置中设置为正模式。一级质谱的分辨率为60000，最大注入时间设置为30 ms。二级质谱的分辨率为30000，最大注入时间为50 ms。捕获宽度设置为1.6 m/z，标准化碰撞能量为28。

2.9. 质谱数据检索与分析

质谱检测到的外泌体数据使用PEAKS Studio X+软件（Bioinformatics Solutions Inc）进行分析，使用的数据库为2021年下载的Uniprot网站上的人源蛋白质数据库，数据库参数设置为：母离子质量窗口为15 ppm，子离子质量窗口为6 ppm，MS/MS tolerance设为0.6Da。多肽样本的搜索标准包括静态半胱氨酸烷基化（+57.0214Da）、甲硫氨酸氧化（+15.9949Da）和N端乙酰化（+42.011Da）。磷酸化多肽样本搜索还包含了丝氨酸、苏氨酸或酪氨酸磷酸化位点（+79.996Da）的可变修饰。设定为胰蛋白酶酶切漏切位点最多为2个，控制蛋白、多肽层次上的假阳性率（FDRs）不超过1%。

对于数据处理来说，在PEAKS Studio X+软件中选择ID-directed方法（使用确定的LC/MS特征来进行无标记定量，如通过保留时间对齐、矢量构建和运行之间的匹配等），通过ID transfer（运行之间的匹配）减少缺失的值。我们使用了无标记定量方法，并对PEAKS生成的数据采用Perseus软件处理，包括缺失值替换、归一化、KW检验和z-score归一化，对临床样本中检测出的蛋白质和磷酸化蛋白进行差异表达分析，并生成热图和火山图（ $P < 0.05$, $|\log_2 \text{Fold change}| > 1$ 为差异表达蛋白）。

2.10. 小规模临床样本研究

为了减少个体差异对实验结果的影响，我们对收集的临床样品进行了混样处理。取21名穿刺结果阴性和21名确诊前列腺癌的患者尿液样本，每三个样本混合为一组，制成7个对照组和7个疾病组混合物样本（表2）。

表2 临床样本信息表。

前列腺癌组				健康对照组		
样本编号	年龄	PSA (ng/ml)	Gleason 评分	样本编号	年龄	PSA (ng/ml)
1	67	14.76	4+3=7	1	68	6.16
	62	6	4+3=7		62	19
	63	7.1	4+4=8		69	6.79
	59	15.9	4+3=7		79	12.9
2	65	59.6	4+4=8	2	75	9.94
	59	33.4	4+4=8		71	4.85
	83	26.7	4+3=7		66	8.53
3	59	13.7	4+4=8	3	82	10.8
	75	21.8	4+4=8		65	5.59
	65	19.9	4+3=7		66	11
4	66	6.86	5+3=8	4	71	12.1
	79	39.5	4+3=7		70	12.5
	78	42.4	4+4=8		67	6.03
	53	6.93	4+3=7	5	65	5.05
5	68	5.64	4+4=8		62	23.4
	64	7.78	3+4=7		69	10.8
	71	15.4	3+4=7		70	9
6	86	51.3	4+4=8	6	62	6.85
	65	36.9	4+4=8		69	6.3
	78	12.3	3+4=7	7	66	12.4
7	83	6.384	3+4=7		54	12.12

3. 结果和讨论

3.1. EVs提取器优化

为了最大限度地提高EVs自动提取过程的效率，我们优化了几个参数，包括EVtrap的初始剂量、培养时间和清洗/洗脱速度（图2）。如图2A，对于每个混合尿液样本，EVs含量随着EVtrap的增加而增加。然而，当EVtrap的浓度高于20μl/ml时，CD9相对强度增加较慢，因此我们推荐的剂量为

20μl/ml。如图2B所示，在20分钟之前很难从样品中完全捕获EVs，而培养30分钟后CD9蛋白的相对强度不会发生显著变化。为确保样品质量，我们建议培养时间超过30分钟，但不超过60分钟。在洗涤步骤中，洗涤速度过快会导致蛋白质损失较大，而不完全洗涤可能会导致最终肽段产品中含有更多杂质，从而影响质谱的状态。通过反复测试，建议的清洗速度设置为100 mm/s（图2C）。最后，洗脱速度设置为650 mm/s的最大允许速度（图2D）。由于上述优化，我们在EVENrich的帮助下实现了高通量自动化EVs的捕获。

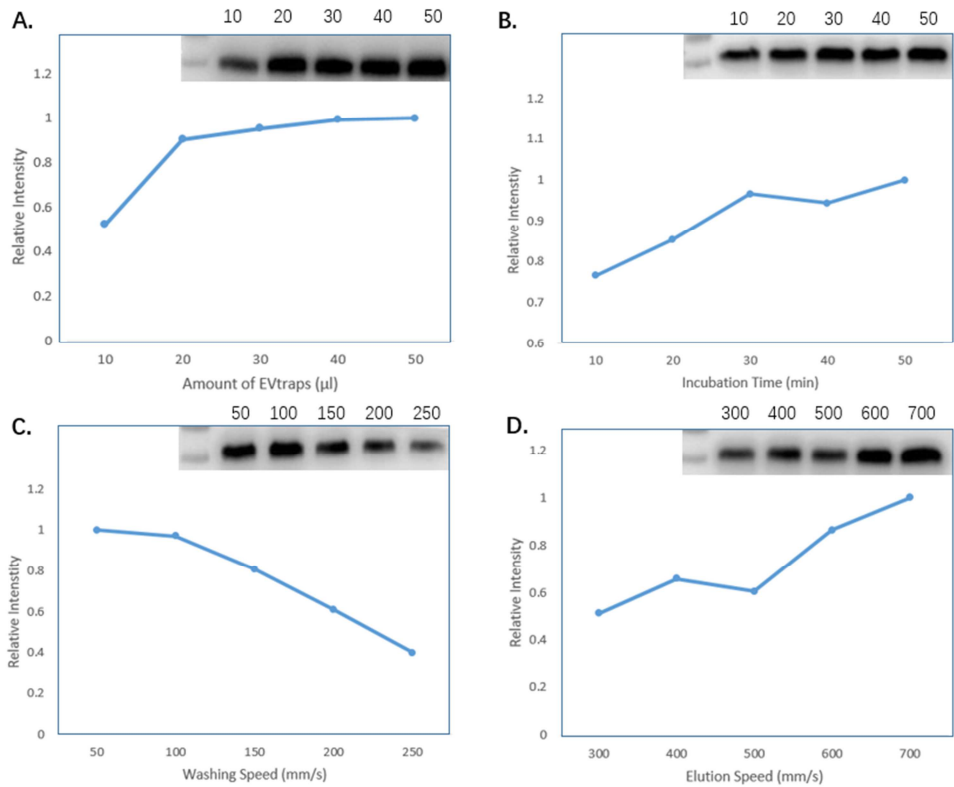


图2 自动提取器的优化：A.磁珠用量；B.培养时间；C.洗涤速度；D.洗脱速度。

3.2. EVs的提取和表征

为了比较三种提取方法（EVtrap手动提取、EVtrap自动提取和超速离心法），我们进行了几项试验。首先，根据TEM图像（图3A, B），自动捕获的EVs样品直径范围为50 nm至150 nm，呈均匀球形，几乎没有杂质，表现出典型的细胞外囊泡的特征[9]。图3C显示了通过手动、自动和超速离心法

采集的三个EVs样本的NTA结果。图3D使用Western blot检测来自三个样本的EVs生物标记物CD9。结果显示，自动组的强度相对高于超速离心组，但略低于手动组。此外，自动组CD9强度的组内变异性小于手动组。结果证明了自动捕获过程的高效性和稳定性。经过比较，自动化EVs捕获优于其他捕获方案，尤其是对于大规模的样本。

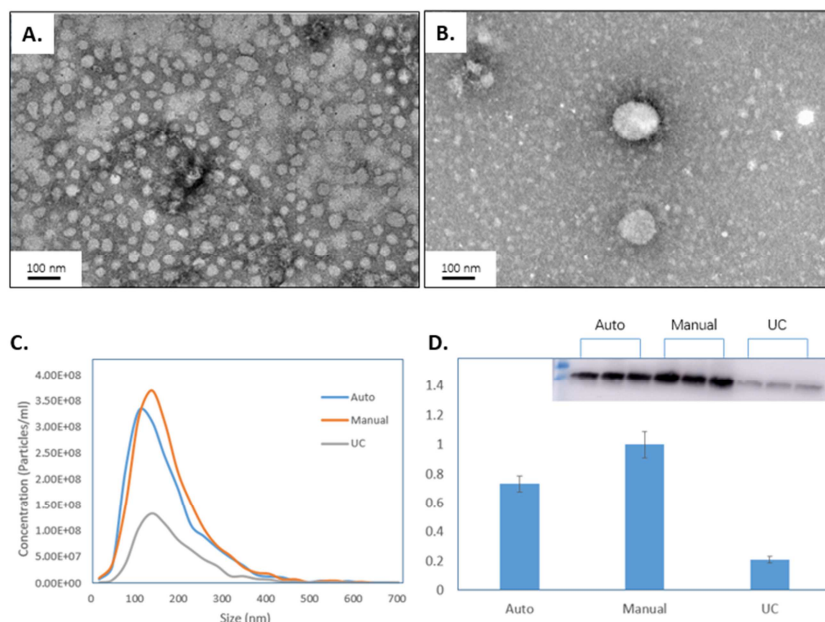


图3 EVs的表征：A/B.EVs的透射电子显微镜表征；C.NTA表征；D.三个提取过程的CD9蛋白含量。

3.3. 稳定性实验

我们收集了三名志愿者的正常尿液样本，每天两次，连续两天，以确认每个样本在EVENrich不同位置（随机选择）和不同时间的稳定性（图4A）。结果表明，通过手动和自动提取鉴定的EVs特异性蛋白质的信号强度远高于超速离心，而尿液中两种代表性污染蛋白质的信号强度则较低（图4B, C），这与我们之前公布的结果一致[12]。

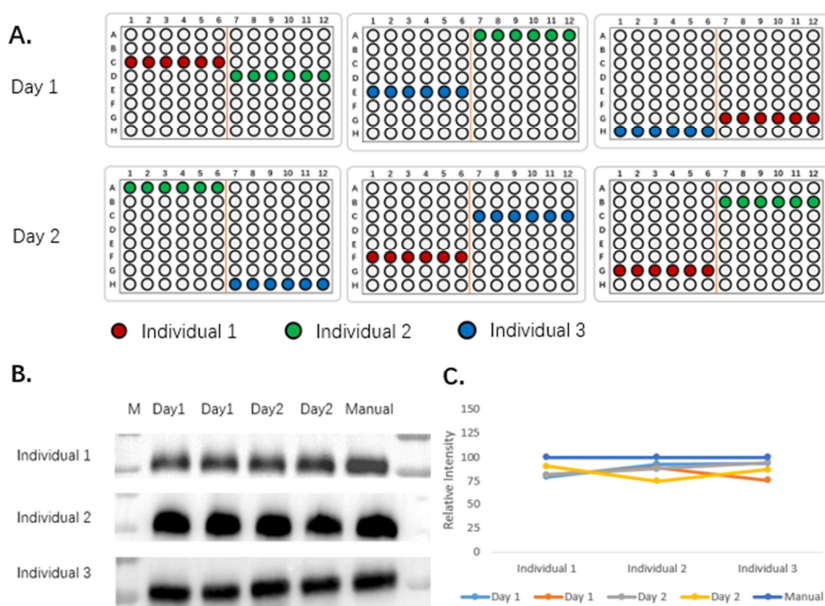


图4 自动提取的稳定性评估：A.两天内处理的样本的随机抽样位置示意图；B.尿液中随机提取的EVs的Western Blot实验结果；C.Western Blot半定量结果。

3.4. EVs的LC-MS/MS分析

由于Western Blot实验只能用于分析样本之间特定蛋白质含量的差异，我们进一步应用LC-MS/MS分析EVs的整个蛋白质组。如图5所示，我们在手动提取组中发现了平均14600个肽段，对应于平均2095个蛋白质，高于自动提取组（平均2074个）和超速离心组（平均1390个）。此外，我

们将鉴定出的蛋白质与ExoCarta [14]上公布的前100个外泌体蛋白质进行了比较。如图6所示，在手动和自动操作的样本中分别检测到89和90种蛋白质，而在超速离心样本中检测到了前100名相关蛋白中的87种。手动操作和自动操作的捕获效率均高于超速离心，表明了EVENrich的高效性。

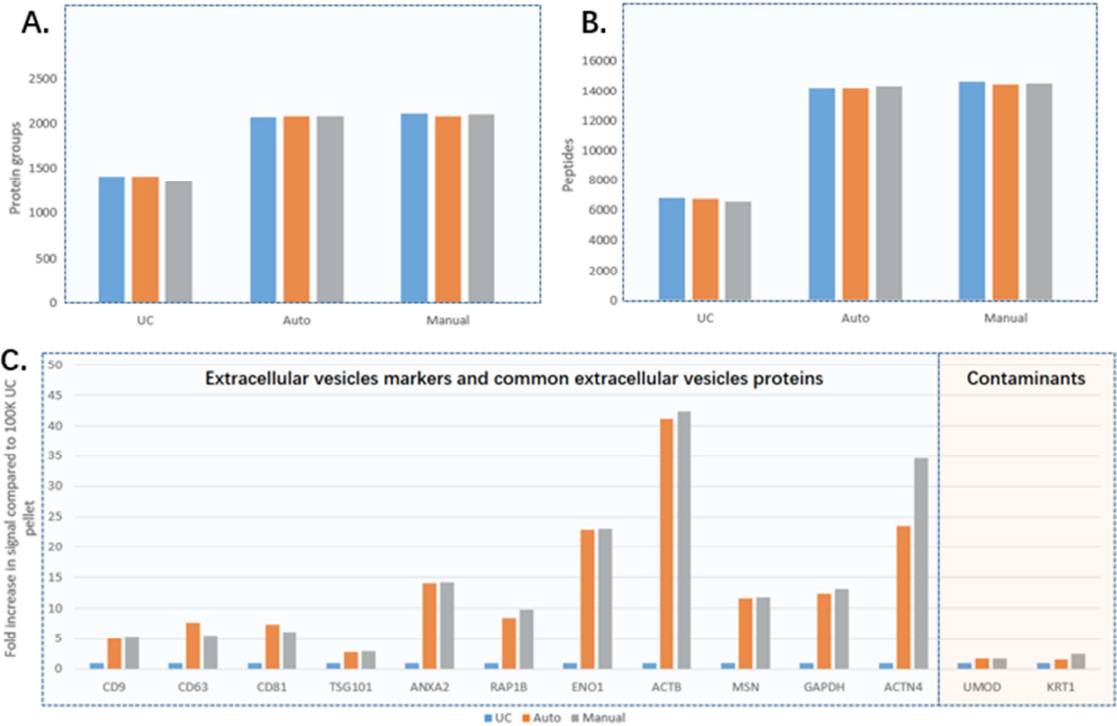


图5 A.比较不同方法提取的蛋白质含量；B.比较不同方法提取的肽含量；C.比较不同提取方法鉴定的EVs标记蛋白和污染物的信号强度。

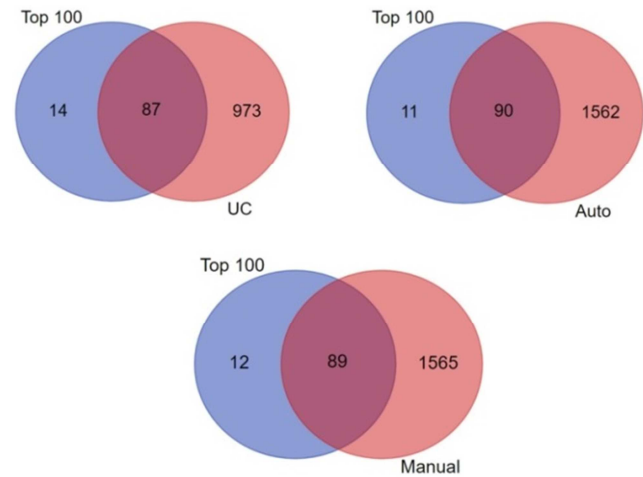


图6 不同捕获方法的外泌体蛋白质组学结果与ExoCarta数据库中TOP100蛋白质的重叠图。

3.5. EVs的qRT-PCR分析

为了评估不同提取过程中的miRNA差异，我们检测了其他研究中几种常见的miRNA（miR-21、miR-125b和miR-221）。miR-21已经引起了肿瘤学、干细胞生物学和

衰老等领域研究人员的关注，成为研究最多的miRNA之一[15]。miR-125b与细胞增殖和分化密切相关，并在各类癌症中都观察到miR-125b的下调[16]。MiR-221位于人类X染色体上，在各类癌症中上调。作为一种癌或抑癌miR，miR-221在肿瘤进展中起着重要作用[17]。

如图7所示，自动提取和手动提取的miRNA表达量基本相同，而自动提取的三种miRNA（miR-21、miR-125b、miR-221）表达量分别是超速离心的7、5、2倍。结果表明手动操作和自动操作的提取效率均高于超速离心，进一步证实了EVENrich的高效性。

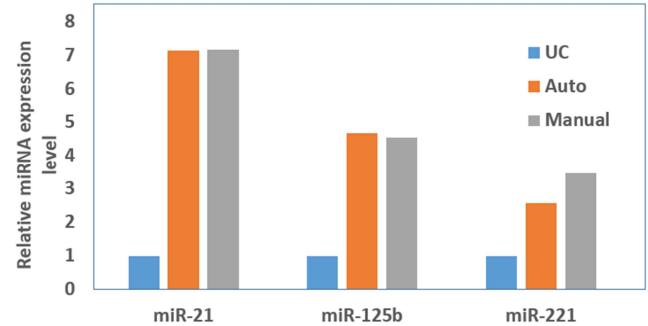


图7 比较三种不同方法提取的miRNA。

3.6. 前列腺癌尿液样本的LC-MS/MS分析

蛋白质磷酸化对癌症的发生、发展和耐药性至关重要。基于我们之前的研究，磷酸化蛋白可能作为乳腺癌的诊断和预后标志物[18]。在EVtrap和EVENrich的帮助下，我们可以快速有效地筛选尿液EVs中的磷酸化蛋白质生物标志物。在这里，我们选择占男性所有癌症近20%的前列腺癌[19]作为研究对象，开发基于尿液EVs的液体活检技术，用于前列腺癌的诊断。

为了在实践中应用我们的自动化EVs提取器，我们收集了21份前列腺癌尿样（Gleason评分高于6）和21份健康尿

样（表2）。每3个样本混合为一个样本组，得到14个样本组。如图8所示，所有样本组均使用EVENrich和EVtrap进行处理。之后对所有EVs样品进行胰蛋白酶预处理，然后去除洗涤剂并脱盐，以获得纯化的EVs肽段[20]。每个肽段样品的2%直接用于蛋白质组学分析。在LC-MS分析之前，用PolyMAC磷酸肽富集试剂盒进一步对剩余样品进行磷酸肽富集[21]。在EASY-nLC 1200上分析蛋白质组和磷酸化蛋白质组，并与Q Exactive HF-X质谱仪[22]进行联合检测。此外，将含有11种人工合成肽的索引保留时间标准加入每个样品中用作内部标准，以减少运行间的变化，并协助肽定量[23]。

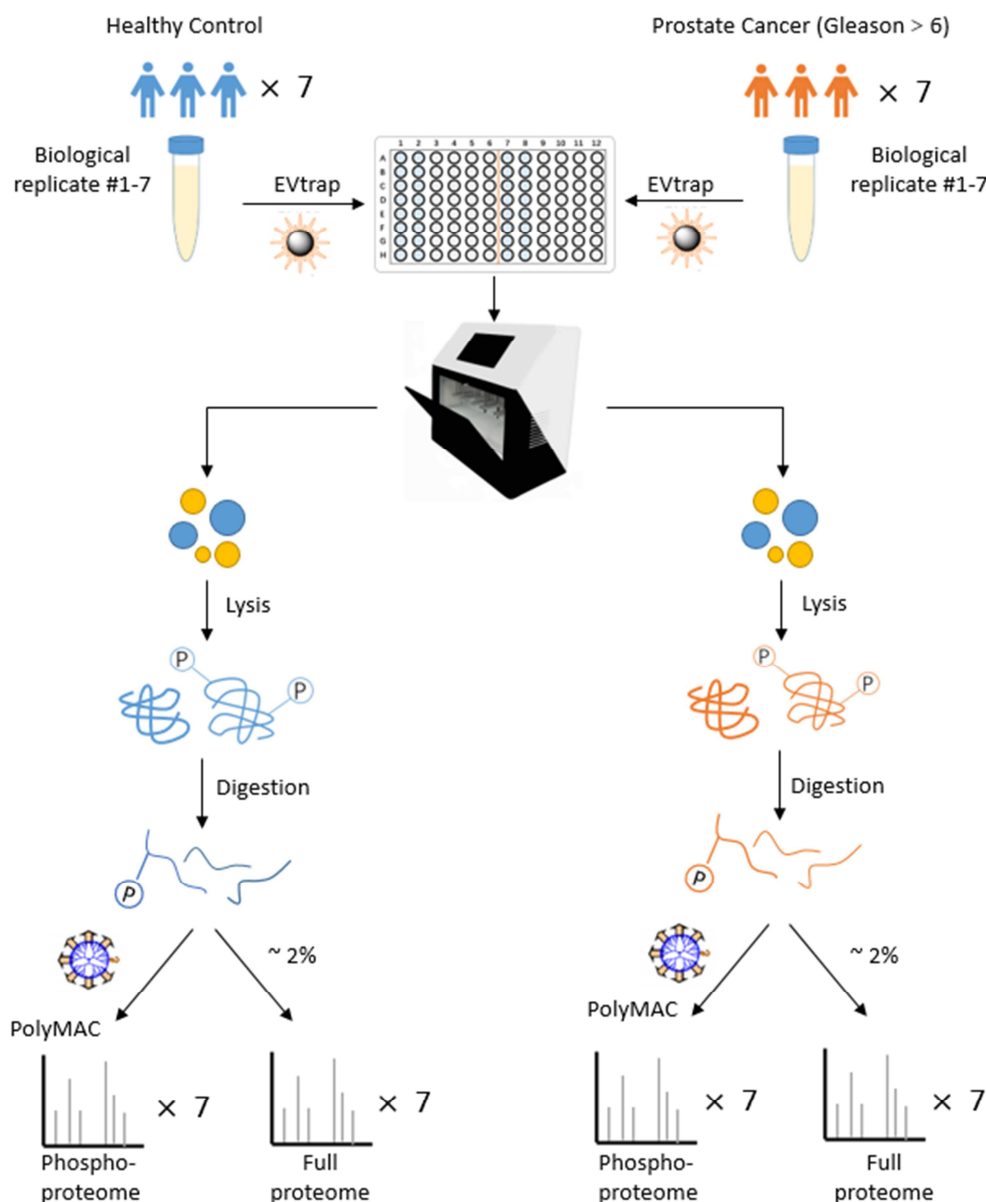


图8 对健康对照组和前列腺癌患者的尿液样本进行EVs蛋白质组学和磷酸化蛋白质组学分析的工作流程图。

与对照组相比，前列腺癌组鉴定出211个过表达蛋白质和对应于40个蛋白质的187个过表达磷酸肽（图9）。在上调蛋白中，至少有14种蛋白之前被报道与前列腺癌相关：PLAU、SPP1、MCAM、CDH11、GDF15、IGSF8、CRISP3、LGALS3、FGFR1、HYAL1和ENG。

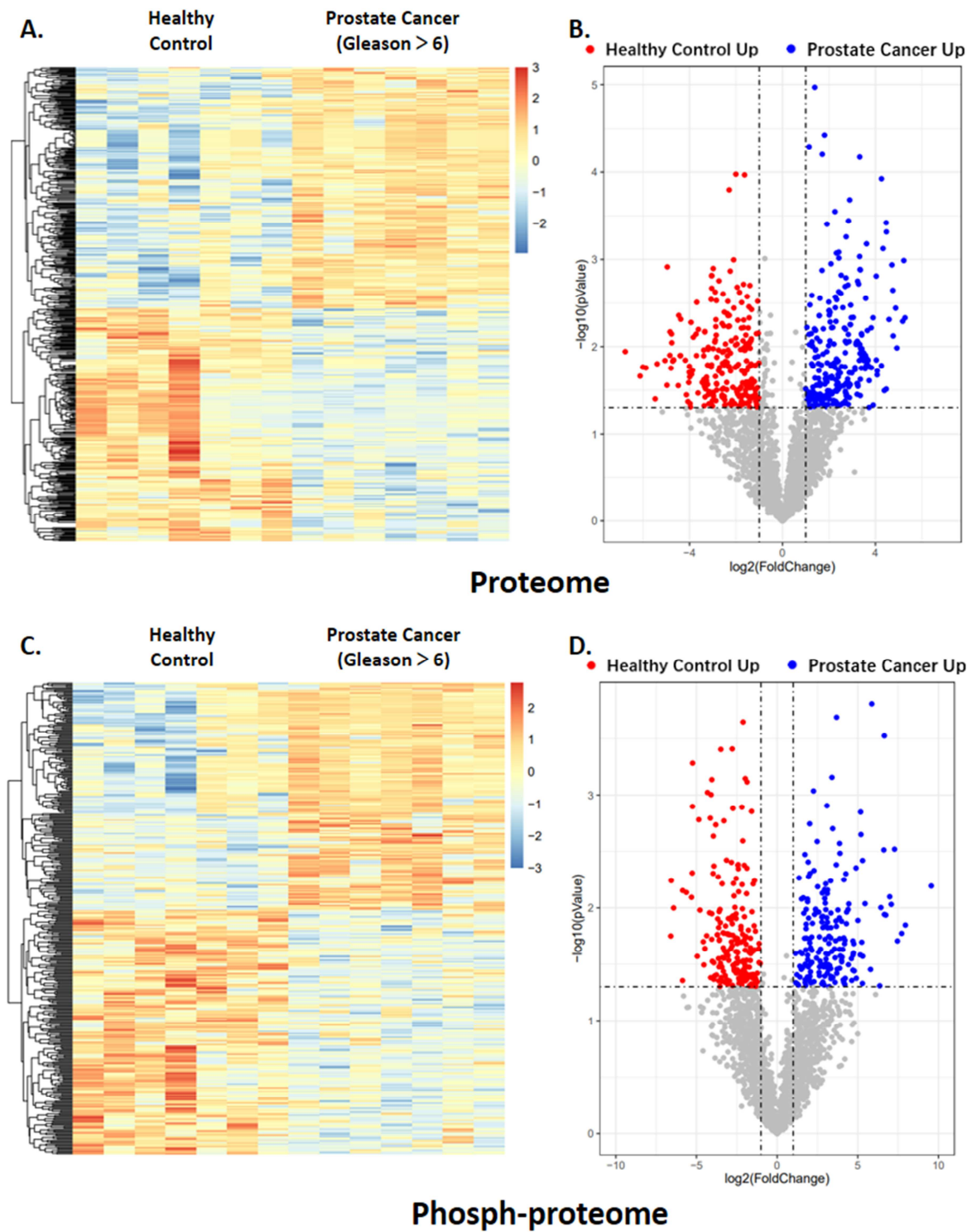


图9 前列腺癌患者和健康对照组尿液EVs的定量蛋白质组学和磷酸化蛋白质组学: A.差异表达的蛋白质的热图;B.表达上调的蛋白质的火山图; C.差异表达的磷酸肽的热图;D.表达上调的磷酸肽的火山图。

通过分析这些高表达的蛋白质和磷酸肽,我们发现了三种潜在的蛋白质生物标记物和一种磷酸肽生物标记物(图10)。既往研究表明, SPP1蛋白参与了前列腺癌的复发和转移[24]。此外, SPP1是转移性去势抵抗前列腺癌潜在的生物标记物和治疗靶点[25]。在我们的研究中,我们发现前列腺癌患者的SPP1表达显著上调(图10A)。更有趣的是,前列腺癌组308和310位点的SPP1磷酸化显著高于

对照组(图10D)。我们推测这两个磷酸化位点与前列腺癌的发生和发展密切相关。同时,我们观察到GDF15蛋白在前列腺癌患者的尿液EVs中高表达(图10B),这也与先前的研究一致,即GDF15可以通过激活ERK1/ERK2信号通路促进AR阳性前列腺癌细胞的增殖[26]。此外,我们发现EFNA1蛋白在前列腺癌组高表达(图10C),它通常

在恶性黑色素瘤细胞和前列腺癌细胞中过度表达[27]。图 11显示了其它潜在标志物的箱线图。

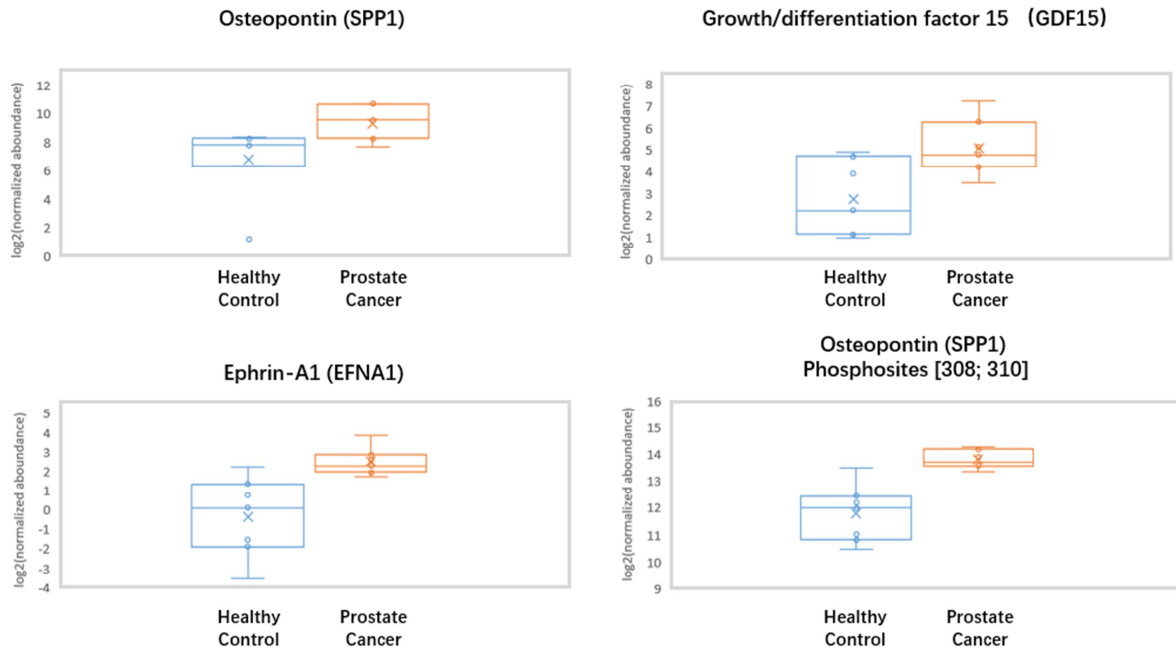


图10 前列腺癌尿液外泌体中的潜在标志物 ($P < 0.05$)。A-C.蛋白标记物；D.磷酸化蛋白标记物。所有值均为LC-MS测定的蛋白质或磷酸化位点标准化丰度水平的log₂转换。

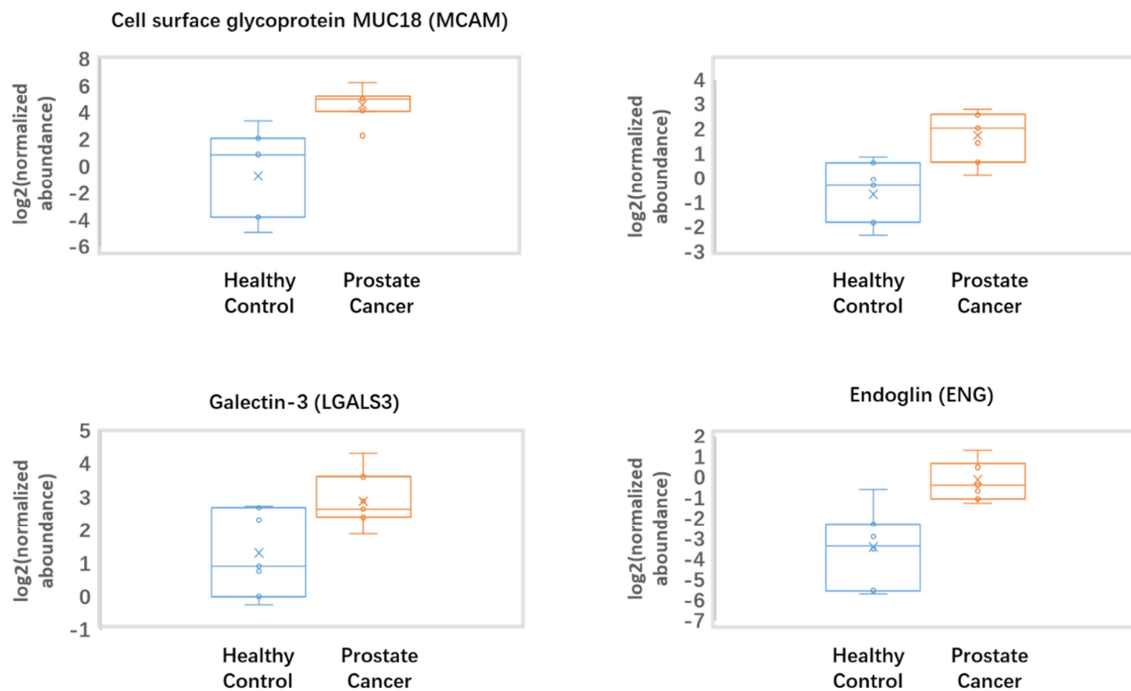


图11 前列腺癌尿液外泌体中其他潜在蛋白标志物。

3.7. 前列腺癌尿液样本的qRT-PCR分析

MicroRNAs (miRNAs)是一类小的、非编码的单链RNA。近年来的研究表明，miRNAs的异常表达与包括前列腺癌在内的各种癌症的发生、侵袭、转移和预后密切相关。有研究表明，miR-145与前列腺癌的侵袭和转移有关[28-30]。如上所述，miR-125b与细胞增殖和分化密切相关，

并且在各种类型的癌症中下调[16]。我们分析了不同尿液样本中的miR-125b和miR-145表达。如图12所示，所有样本组均使用EVENrich和EVtrap进行处理。考虑到EVs没有稳定的内部参数，我们参考了EXO106中的分析方法，以消除内部参数的差异[31]。结果如图13所示，通过比较miR-125b/miR-145的结果，我们发现miR-125b与miR-145的比值可以帮助我们区分潜在的前列腺癌患者。

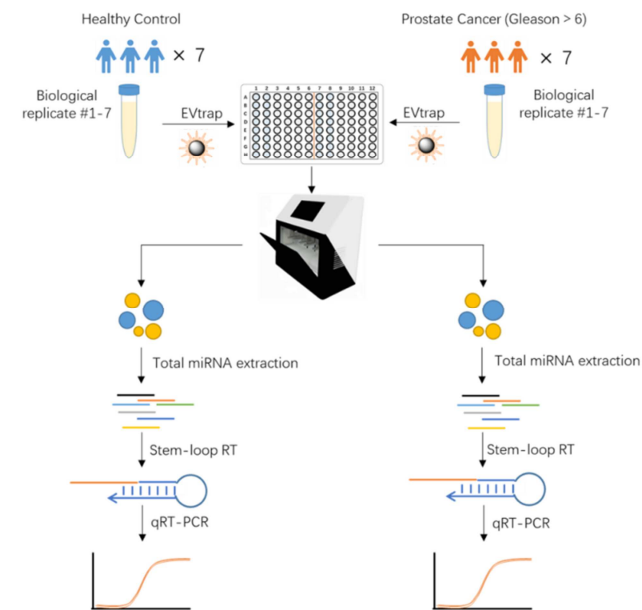


图12 健康对照组和前列腺癌组尿液样本的EVs miRNA检测工作流程图。

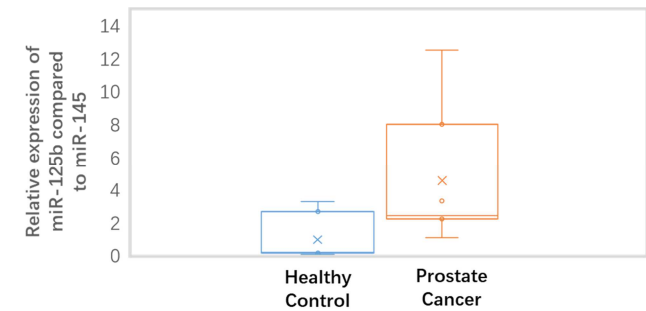


图13 健康对照组和前列腺癌组尿液外泌体中miR-125b/miR-145结果的比较图。

4. 结论

为了开发一种高通量且可重复的EVs提取方法，我们设计了一种自动化EVs提取装置，能够分离和提取大批量EVs样品。通过对EVENrich提取的EVs的特性、纯度和蛋白质组学的测定，证明EVENrich可以快速处理大规模临床样本，实现高质量、高数量的EVs分离。通过对21例前列腺癌和21例对照尿液样本中的EVs进行无标记蛋白质组学分析，我们鉴定了211个显著过表达的蛋白质和187个显著过表达的磷酸肽（对应于40个蛋白质），包括前列腺癌的几种独特生物标记物如SPP1、GDF15、EFNA1等，我们还筛选出了2种前列腺癌miRNA生物标记物——miR-125b和miR-145。综上所述，EVENrich可以在短时间内实现对大量样本的EVs提取，并将手动操作造成的误差降至最低，适用于大规模基于EVs的临床样本检测。

我们设计的自动化细胞外囊泡提取器的优点在于它可以实现高通量、高效且稳定的外泌体提取，为外泌体液体活检和转化医学领域提供高质量的上游外泌体；缺点在于它目前尚未实现大样本的规模化提取，这在一定程度上限制了其在外泌体治疗领域的应用。未来的研究有望进一步扩大提取规模并实现一体化的核酸/蛋白质提取和检测，

并在我们探索的潜在标志物的基础上进行大样本的验证研究，最终开发出基于尿液外泌体的高效、准确的前列腺癌液体活检技术。

利益冲突

作者声明本论文的发表不存在利益冲突。

致谢

本项目部分资金来源于国家重点研究开发项目（编号2017YFA0700404）。

参考文献

[1] Raposo, G.; Stoorvogel, W., Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol* 2013, 200 (4), 373-83.

[2] 张思盼,刘志红.细胞外囊泡：一类新的细胞间信使[J].肾脏病与透析肾移植杂志, 2017, 26(03): 257-262.

[3] Meldolesi, J., Exosomes and Ectosomes in Intercellular Communication. *Curr Biol* 2018, 28 (8), R435-R444.

[4] Thery, C.; Zitvogel, L.; Amigorena, S., Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat REV Immunol* 2002, 2 (8), 569-79.

[5] 张赵一淳, 郭静, 邱新毓, 冯剑颖.细胞外囊泡的生物学功能及其临床应用[J].实用口腔医学杂志, 2022, 38(01): 121-126.

[6] Zhang, H. G.; Grizzle, W. E., Exosomes and cancer: a newly described pathway of immune suppression. *Clin Cancer Res* 2011, 17 (5), 959-64.

[7] Morelli, A. E.; Larregina, A. T.; Shufesky, W. J.; Sullivan, M. L.; Stolz, D. B.; Papworth, G. D.; Zahorchak, A. F.; Logar, A. J.; Wang, Z.; Watkins, S. C.; Falo, L. D., Jr.; Thomson, A. W., Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells. *Blood* 2004, 104 (10), 3257-66.

[8] Yong, T.; Zhang, X.; Bie, N.; Zhang, H.; Zhang, X.; Li, F.; Hakeem, A.; Hu, J.; Gan, L.; Santos, H. A.; Yang, X., Tumor exosome-based nanoparticles are efficient drug carriers for chemotherapy. *Nature Communications* 2019, 10 (1).

[9] Li, P.; Kaslan, M.; Lee, S. H.; Yao, J.; Gao, Z., Progress in Exosome Isolation Techniques. *Theranostics* 2017, 7 (3), 789-804.

[10] Momen-Heravi, F.; Balaj, L.; Alian, S.; Mantel, P. Y.; Halleck, A. E.; Trachtenberg, A. J.; Soria, C. E.; Oquin, S.; Bonebreak, C. M.; Saracoglu, E.; Skog, J.; Kuo, W. P., Current methods for the isolation of extracellular vesicles. *Biol Chem* 2013, 394 (10), 1253-62.

[11] Gao, F.; Jiao, F.; Xia, C.; Zhao, Y.; Ying, W.; Xie, Y.; Guan, X.; Tao, M.; Zhang, Y.; Qin, W.; Qian, X., A novel strategy for facile serum exosome isolation based on specific interactions between phospholipid bilayers and TiO2. *Chem Sci* 2019, 10 (6), 1579-1588.

- [12] Wu, X.; Li, L.; Iliuk, A.; Tao, W. A., Highly Efficient Phosphoproteome Capture and Analysis from Urinary Extracellular Vesicles. *J Proteome Res* 2018, 17 (9), 3308-3316.
- [13] Iliuk, A.; Wu, X.; Li, L.; Sun, J.; Hadisurya, M.; Boris, R. S.; Tao, W. A., Plasma-Derived Extracellular Vesicle Phosphoproteomics through Chemical Affinity Purification. *J Proteome Res* 2020, 19 (7), 2563-2574.
- [14] 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., ExoCarta: A Web-Based Compendium of Exosomal Cargo. *J Mol Biol* 2016, 428 (4), 688-692.
- [15] KrichEVssky, A. M.; Gabriely, G., miR-21: a small multi-faceted RNA. *J Cell Mol Med* 2009, 13 (1), 39-53.
- [16] Huang, L.; Luo, J.; Cai, Q.; Pan, Q.; Zeng, H.; Guo, Z.; Dong, W.; Huang, J.; Lin, T., MicroRNA-125b suppresses the dEVsvelopment of bladder cancer by targeting E2F3. *Int J Cancer* 2011, 128 (8), 1758-69.
- [17] Di Martino, M. T.; Rossi, M.; Caracciolo, D.; Gulla, A.; Tagliaferri, P.; Tassone, P., Mir-221/222 are promising targets for innovative anticancer therapy. *Expert Opin Ther Targets* 2016, 20 (9), 1099-108.
- [18] Chen, I. H.; Xue, L.; Hsu, C. C.; Paez, J. S. P.; Pan, L.; Andaluz, H.; Wendt, M. K.; Iliuk, A. B.; Zhu, J. K.; Tao, W. A., Phosphoproteins in extracellular vesicles as candidate markers for breast cancer. *P Natl Acad Sci USA* 2017, 114 (12), 3175-3180.
- [19] Siegel, R. L.; Miller, K. D.; Jemal, A., Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin* 2019, 69 (1), 7-34.
- [20] Masuda, T.; Tomita, M.; Ishihama, Y., Phase transfer surfactant-aided trypsin digestion for membrane proteome analysis. *J Proteome Res* 2008, 7 (2), 731-40.
- [21] Iliuk, A. B.; Martin, V. A.; Alicie, B. M.; Geahlen, R. L.; Tao, W. A., In-depth analyses of kinase-dependent tyrosine phosphoproteomes based on metal ion-functionalized soluble nanopolymers. *Mol Cell Proteomics* 2010, 9 (10), 2162-72.
- [22] Kelstrup, C. D.; Bekker-Jensen, D. B.; Arrey, T. N.; Hoglebe, A.; Harder, A.; Olsen, J. V., Performance EVsaluation of the Q Exactive HF-X for Shotgun Proteomics. *J Proteome Res* 2018, 17 (1), 727-738.
- [23] Collins, B. C.; Hunter, C. L.; Liu, Y.; Schilling, B.; Rosenberger, G.; Bader, S. L.; Chan, D. W.; Gibson, B. W.; Gingras, A. C.; Held, J. M.; Hirayama-Kurogi, M.; Hou, G.; Krisp, C.; Larsen, B.; Lin, L.; Liu, S.; Molloy, M. P.; Moritz, R. L.; Ohtsuki, S.; Schlapbach, R.; SelEVssek, N.; Thomas, S. N.; Tzeng, S. C.; Zhang, H.; Aebersold, R., Multi-laboratory assessment of reproducibility, qualitative and quantitative performance of SWATH-mass spectrometry. *Nat Commun* 2017, 8 (1), 291.
- [24] Ding, Z.; Wu, C. J.; Chu, G. C.; Xiao, Y.; Ho, D.; Zhang, J.; Perry, S. R.; Labrot, E. S.; Wu, X.; Lis, R.; Hoshida, Y.; Hiller, D.; Hu, B.; Jiang, S.; Zheng, H.; Stegh, A. H.; Scott, K. L.; Signoretti, S.; Bardeesy, N.; Wang, Y. A.; Hill, D. E.; Golub, T. R.; Stampfer, M. J.; Wong, W. H.; Loda, M.; Mucci, L.; Chin, L.; DePinho, R. A., SMAD4-dependent barrier constrains prostate cancer growth and metastatic progression. *Nature* 2011, 470 (7333), 269-73.
- [25] Pang, X.; Xie, R.; Zhang, Z.; Liu, Q.; Wu, S.; Cui, Y., Identification of SPP1 as an Extracellular Matrix Signature for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *Front Oncol* 2019, 9, 924.
- [26] Vanhara, P.; Hampl, A.; Kozubik, A.; Soucek, K., Growth/differentiation factor-15: prostate cancer suppressor or promoter? *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2012, 15 (4), 320-8.
- [27] Potla, L.; Boghaert, E. R.; Armellino, D.; Frost, P.; Damle, N. K., Reduced expression of EphrinA1 (EFNA1) inhibits three-dimensional growth of HT29 colon carcinoma cells. *Cancer Lett* 2002, 175 (2), 187-95.
- [28] Xu, W.; Chang, J.; Du, X.; Hou, J., Long non-coding RNA PCAT-1 contributes to tumorigenesis by regulating FSCN1 via miR-145-5p in prostate cancer. *Biomed Pharmacother* 2017, 95, 1112-1118.
- [29] Chiyomaru, T.; Tatarano, S.; Kawakami, K.; Enokida, H.; Yoshino, H.; Nohata, N.; Fuse, M.; Seki, N.; Nakagawa, M., SWAP70, actin-binding protein, function as an oncogene targeting tumor-suppressive miR-145 in prostate cancer. *Prostate* 2011, 71 (14), 1559-67.
- [30] Guo, W.; Ren, D.; Chen, X.; Tu, X.; Huang, S.; Wang, M.; Song, L.; Zou, X.; Peng, X., HEF1 promotes epithelial mesenchymal transition and bone invasion in prostate cancer under the regulation of microRNA-145. *J Cell Biochem* 2013, 114 (7), 1606-15.
- [31] Donovan, M. J.; Noerholm, M.; Bentink, S.; Belzer, S.; Skog, J.; O'Neill, V.; Cochran, J. S.; Brown, G. A., A molecular signature of PCA3 and ERG exosomal RNA from non-DRE urine is predictive of initial prostate biopsy result. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2015, 18 (4), 370-5.