

单颗粒外泌体指纹图谱分析技术研究进展

李婉祯¹, 李东浩^{2*}, 刘璐^{2*}

(1. 延边大学 长白山天然药物研究教育部重点实验室, 吉林 延吉 133000; 2. 延边大学 理学院 化学系, 吉林 延吉 133000)

摘要: 外泌体是细胞分泌的纳米级囊泡, 在细胞通讯和疾病进程中起重要作用。由于不同来源的外泌体存在显著异质性, 传统检测技术大多仅能获取外泌体群体平均特征信息, 无法建立外泌体功能与特定亚型的关联, 这一局限性严重制约了单颗粒水平外泌体的精准分析。现有检测技术针对外泌体的物理形态、膜表面分子及内容物分子等单一维度开展检测, 但存在准确度不足等问题。该文围绕外泌体结构特征与复杂分子组成, 系统阐述了基于流式细胞术、拉曼光谱、质谱技术等主流检测手段的单维度特征指纹图谱构建策略, 以及二维联用及多维度联用检测技术进展, 旨在通过多层次特征协同分析为疾病精准分型、药物靶点的挖掘等提供方法学参考。

关键词: 单颗粒; 外泌体; 分离分析; 指纹图谱

中图分类号: O657.3; O657.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(XXXX)XX-0001-10

Advances in Fingerprint Profiling Analysis Techniques for Single Exosomes

LI Wan-zhen¹, LI Dong-hao^{2*}, LIU Lu²

(1. Key Laboratory of Natural Medicines of the Changbai Mountain, Ministry of Education, Yanbian University, Yanji 133000, China; 2. Department of Chemistry, College of Science, Yanbian University, Yanji 133000, China)

Abstract: Exosomes are nanoscale vesicles that mediate intercellular communication and play a pivotal role in physiological and pathological processes. Given the substantial heterogeneity across diverse exosome origins, conventional detection technologies yield characteristics reflecting the population averages, but fail to establish functional links between specific exosome subtypes and their biological roles, thereby constraining the precise analysis of individual particles. Existing analytical techniques enable independently detecting the physical morphology, membrane surface molecules, and cargo as single dimensions but suffer from poor accuracy and provide incomplete information. This review delineates the strategies for constructing fingerprints derived from single dimensions using mainstream analytical techniques such as flow cytometry, Raman spectroscopy, and mass spectrometry, in combination with two-dimensional and multidimensional separation methods. The objective of the study is to provide methodological insights for precise disease stratification and drug target discovery through a collaborative analysis of exosomes with various structures and molecular compositions.

Key words: single particle; exosome; separation and analysis; fingerprint

外泌体是细胞分泌的纳米级囊泡^[1], 其形成历经早期核内体(EEs)、晚期核内体(Les)及多泡体(MVBs)的成熟过程, 最终通过与细胞膜融合释放至胞外^[2]。外泌体广泛存在于血液、尿液、唾液等体液中^[3], 通过膜融合、受体-配体相互作用或内吞作用等将内容物递送至靶细胞^[4], 参与调控细胞迁移、免疫反应及肿瘤发展等过程^[5]。鉴于其天然靶向性和生物相容性^[6], 外泌体被视为理想的药物递送载体及癌症诊断生物标志物^[7]。

收稿日期: 2026-05-20; **修回日期:** 2026-07-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(22304150, 22376177); 吉林省自然科学基金-青年科学基金项目B类(20260101055JJ)

* **通讯作者:** 李东浩, 博士, 教授, 研究方向: 样品前处理, E-mail: dhli@ybu.edu.cn;

刘璐, 博士, 副教授, 研究方向: 微纳尺度物质分离分析, E-mail: liulu@ybu.edu.cn

外泌体粒径主要分布在 30~150 nm, 呈典型杯状结构具有清晰的脂质双分子层膜 (图 1)^[8]。囊泡膜的杨氏模量等力学性质可通过原子力显微镜获取, 与粒径、浓度共同形成物理形态指纹。膜表面富集胆固醇、鞘磷脂及磷脂酰丝氨酸^[9] 并镶嵌 CD9、CD63、CD81 等四跨膜蛋白以及糖基化修饰分子^[10]。腔内负载核酸、蛋白质及代谢物 3 类核心分子, 这些内容物携带来源细胞的基因表达与功能状态信息^[11-12]。物理特性与分子组成的系统性差异使外泌体区别于微囊泡和凋亡小体, 也构成了多维指纹识别的结构基础。

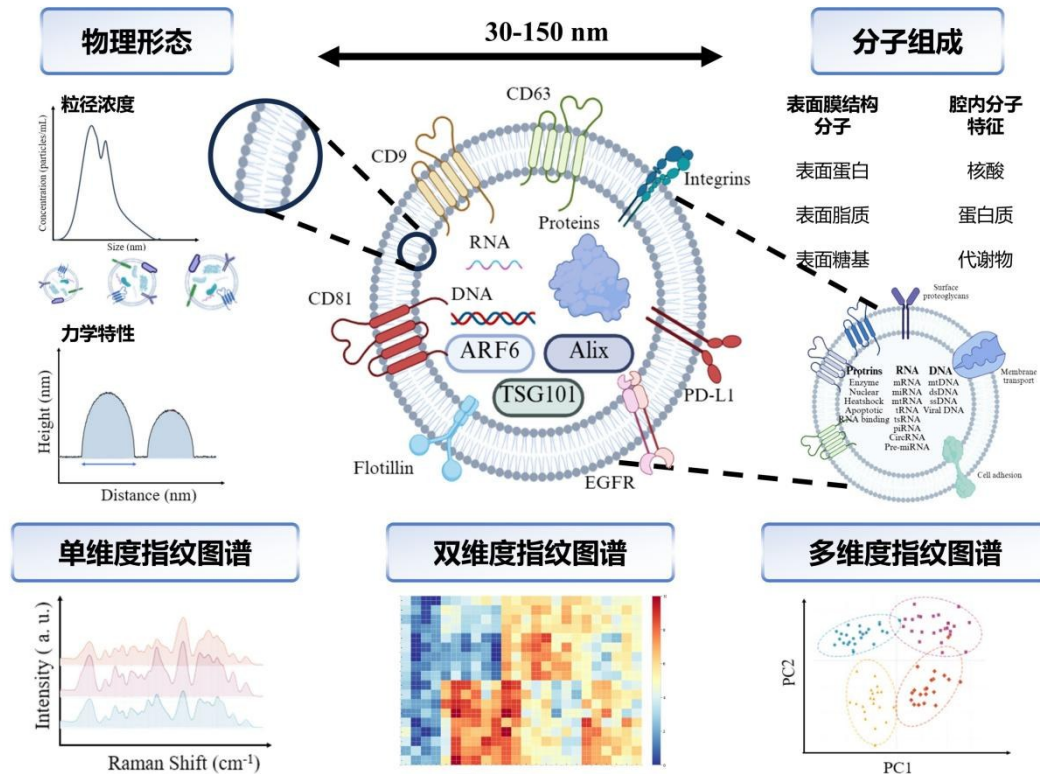


图 1 外泌体的结构特征与分子组成

Fig. 1 Structural characteristics and molecular compositions of the exosomes

外泌体的物理参数与分子表达具有显著的细胞来源依赖性, 且随生理或病理状态动态变化^[13]。传统群体分析虽揭示了外泌体 miRNA 与膜蛋白表达水平同肿瘤进展的关联^[14], 但平均化测量掩盖了亚群差异, 单一标志物检测亦易丢失关键分型信息^[15]。近期研究证实单个外泌体在膜蛋白拷贝数与核酸载荷方面存在不可忽视的个体差异^[16], 这种异质性恰恰是疾病精准分型的核心依据。因此将分析单元从群体均值转向个体囊泡, 在单颗粒水平同步捕获粒径、表面分子及内容物等多维特征, 成为突破现有瓶颈的关键路径^[17], 单颗粒外泌体指纹图谱技术通过整合多维度互补信息形成反映个体属性的综合指纹^[18], 有望显著提升癌症早期筛查的灵敏度与辅助诊断的特异性^[19-20]。

1 单颗粒外泌体单一维度特征指纹图谱

1.1 外泌体物理形态的指纹图谱

1.1.1 基于粒径与浓度的指纹图谱 纳米颗粒追踪分析 (NTA) 通过追踪布朗运动获取颗粒尺寸与浓度信息^[21] (图 2A)。但群体层面的统计平均会掩盖亚群差异且易受非外泌体成分干扰^[22]。可调式电阻脉冲传感 (TRPS) 基于库尔特计数原理实现单颗粒逐个计数, 粒径分辨率较高且不受折射率差异干扰^[23]。Cimorelli 等^[24] 以微流控电阻脉冲感测平台筛选最适稀释条件, 发现血浆等样品中颗粒在 75 nm~2 μ m 范围内呈幂律分布, 浓度跨越 5 个数量级, 多芯片数据与拟合曲线一致性良好 ($R^2 > 0.93$), 呈现了可重复的粒径浓度分布指纹 (图 2B)。高灵敏度流式细胞术 (HSFCM) 通过优化检测模块将检出限延伸至 100 nm 以下^[25]。Tian 等^[26] 进一步依靠侧向散射光实现了对直径低至 40 nm 单颗粒外泌体

的快速粒径分析,在结直肠癌患者血浆中,CD147阳性外泌体亚群较健康对照显著富集,ROC曲线下面积超过0.9,且术后显著回落,说明特定尺寸亚群的浓度变化与肿瘤负荷密切相关(图2C)。HSFCM的优势在于将粒径分析与荧光检测天然耦合,为后续多维联用奠定了技术接口。此外,靶型多腔电泳(CME)^[27]通过构建非均匀梯度电场结合梯度凝胶浓度,可实现外泌体高通量分离与制备,其连续进程使回收粒子数随处理体积线性增长,且富集过程不影响粒径分布偏移,并实现样品的纯化,为物理形态分析提供了高效前处理手段,也为后续基于粒径与荷质比的外泌体亚群分离提供了新技术。

1.1.2 基于表面形貌及力学特性的指纹图谱 原子力显微镜(AFM)可在近生理条件下获取单个外泌体的高度、直径、表面粗糙度及弹性模量等参数^[28]。LeClaire等^[29]利用该技术发现乳腺癌细胞来源囊泡的弹性模量随侵袭性增强而递减。患者血浆中,侵袭性乳腺癌来源囊泡较良性病变降低约47%($p < 0.001$),说明无标记纳米力学特征可作为正交判别指标,且形貌与力学特征的联合分析可区分乳腺癌良性病变与恶性肿瘤(图2D)。

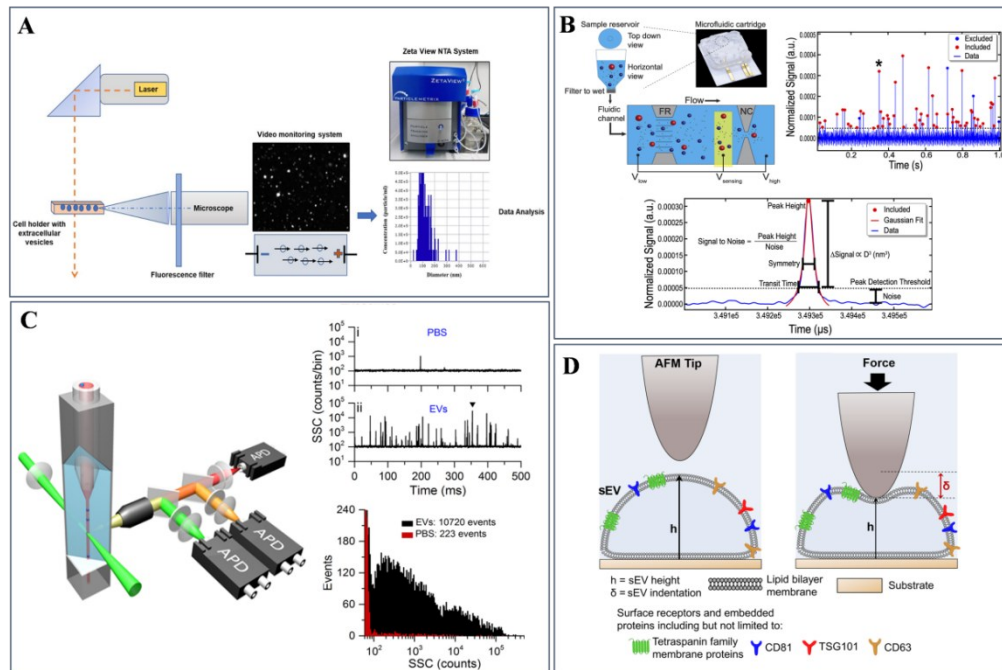


图2 纳米颗粒追踪分析 (A)^[21]、微流控电阻脉冲感测 (B)^[24]、高灵敏度流式细胞术 (C)^[26] 及原子力显微镜纳米压痕 (D)^[29] 检测单颗粒外泌体物理形态分析的原理示意图

Fig. 2 Nanoparticle tracking analysis (A)^[21], microfluidic resistive pulse sensing (B)^[24], high-sensitivity flow cytometry (C)^[26], and atomic force microscopy nanoindentation (D)^[29] for detecting the physical phenotypes of single exosomes

1.2 外泌体膜表面分子特征的指纹图谱

1.2.1 基于膜表面蛋白的指纹图谱 针对传统 Western blot 分辨率低、灵敏度不足等难题, Liu 等^[30]基于外泌体膜表面蛋白 CD9 与胞质蛋白 TSG101、Alix 的分子量差异及低丰度特征,构建了靶型免疫印迹(CIB)装置,通过整合环形非均匀梯度电场与螺旋进样设计,实现了外泌体蛋白的同时分离、中心浓缩与免疫检测。未来可通过拓展 CD63、CD81 等膜表面标志物的高通量同步检测,构建外泌体膜表面蛋白多维指纹图谱,为外泌体亚群精准识别与疾病分子分型提供新策略。在超分辨成像领域中 Needham 等^[31]利用直接随机光学重建显微镜(dSTORM)对肿瘤外泌体单分子定位,发现四跨膜蛋白渗透化亚群中泛瓜氨酸化蛋白双阳性比例高达25%~30%,瓜氨酸化组蛋白H3不足10%,磷脂酰丝氨酸捕获亚型分布迥异,揭示表面蛋白装载具有亚型依赖性。Zhu 等^[32]进一步将表面等离子体共振成像(SPRi)与抗体微阵列结合,无需富集同时捕获并检测多种跨膜蛋白,建立基于多元表面标志物组合响应的指纹特征。Hu 等^[33]利用高灵敏度纳米流式检测技术(nFCM)在单颗粒水平分析多种四跨膜蛋白的共表达模式,发现基于CD147阳性外泌体浓度差异可区分结直肠癌患者与健康人群,AUC可达0.93。值得关注的是,nFCM获取的蛋白共表达模式本身就是一种指纹,各蛋白的不同组合比例反映了外泌体的生物发生路径,这种基于生物发生机制的蛋白指纹较单一标志物更能揭示亚群的功能属性。

从单分子定位、无标记捕获到单颗粒计数,外泌体表面蛋白分析正从单一标志物验证走向系统性指纹构建。Pan 等^[34]开发的 DNA 编码多轮循环检测策略(DETECT)克服荧光光谱重叠,逐轮检测 9 种膜蛋白,对 3 种癌症判别准确率达 100%,蛋白组合实现了 83.3%的多分类精度。多轮蛋白响应信号比单一标志物更能确定癌症表型,但是该技术目前仍面临多轮操作累积误差与检测周期较长的问题,未来若将 DNA 编码与微流控自动化联用,缩短每轮循环时间,有望推动蛋白指纹的临床转化。

1.2.2 基于膜脂质的指纹图谱 膜脂质是反映母细胞代谢状态的重要指标。Skotland 等^[35]通过定量脂质组学发现外泌体中膜脂质较母细胞富集 2~3 倍,非膜脂质如甘油三酯富集达 20 倍,为追溯亚细胞来源提供了定量依据。Smith 等^[36]利用激光光镊拉曼光谱捕获固定单囊泡,解析胆固醇与磷脂相关特征峰,经主成分分析构建单颗粒脂质指纹,揭示了不同细胞系外泌体的组分异质性。Stremersch 等^[37]采用表面增强拉曼散射(SERS)技术放大单个囊泡的膜脂质分子振动信号,结合偏最小二乘判别分析建立单颗粒指纹,判别精度达 95% 以上,实现了黑色素瘤与红细胞来源囊泡的溯源区分。由此可见,从群体丰度到单颗粒振动指纹,膜脂质分析正逐步走向亚细胞来源精准解析。

1.2.3 基于膜表面聚糖的指纹图谱 膜表面聚糖直接参与外泌体与靶细胞的识别相互作用^[38]。Zhang 等^[39]利用凝集素诱导聚集策略(MESSAGE)将外泌体表面聚糖信息转化为粒径变化信号,将不同凝集素孵育对应的粒径变化幅度组合成独特的表面聚糖指纹图谱,机器学习整合后准确率突破 0.95,表明多维度聚糖信号比单一标志物更能决定表型。该策略仅通过凝集素库与常规粒径分析即可构建高信息量的聚糖指纹,但粒径变化与聚糖密度间的定量关系尚不明确,需建立标准化的凝集素筛选流程与信号归一化方法,以提升指纹的可重复性。

1.3 外泌体内容物分子特征指纹图谱

1.3.1 基于腔内蛋白质的指纹图谱 在蛋白质组学分析中液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)通过裂解外泌体已实现数千种蛋白的深度覆盖^[40-41]。Espourteille 等^[42]对脑前额叶皮层间质液中分离脑源性外泌体进行无标记分析,结合加权基因共表达网络分析构建的蛋白指纹图谱可区分 Pick 病与对照样本, F1 值达 1.0。Dai 等^[43]结合超快外泌体分离系统(EXODUS)与基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)获取了食管鳞状细胞癌细胞系特异性蛋白指纹,其中 5555 m/z 峰和 2268 m/z 峰可区分肿瘤并判断分化程度, AUC 均为 1.0,进一步说明深度覆盖与快速指纹互补,可以拓展蛋白指纹在疾病分型与监测中的应用。

1.3.2 基于腔内代谢物的指纹图谱 代谢物分析可揭示疾病特有的代谢重编程现象^[44]。Lu 等^[45]采用分子印迹聚合物选择性富集,结合高分辨质谱鉴定出 314 个差异代谢物,并通过多元统计揭示了肝癌患者血浆外泌体中鞘氨醇等差异代谢物的特征表达。Baja 和 Sharma 将超滤分离的外泌体同时送入液相色谱串联质谱与核磁共振,在胰腺癌、肺癌及胶质瘤外泌体间实现了甘油磷脂及氨基酸等代谢差异的交叉验证^[46]。Zaripov 等^[47]利用纳米鞘流毛细管电泳质谱结合阳离子交换固相微萃取发现 L-肉碱含量升高四倍以上,并构建了乳腺癌外泌体的阳离子代谢指纹图谱(图 3)。

1.3.3 基于腔内核酸的指纹图谱 核酸分子检测依赖探针工程化与信号放大策略^[48],当前沿固相界面放大与膜融合递送两条路径展开。Na 等^[49]将发夹探针固定于三维金纳米结构, Jiang 等^[50]将 SERS 标签递送入外泌体(图 4),二者依据固相界面放大,分别通过酶促沉淀和热点组装实现单碱基甄别与胰腺癌判别。固相策略虽灵敏但需预先分离外泌体。膜融合策略可简化流程直接将探针递送至囊泡腔内原位检测。Ma 等^[51]将发夹探针封装于阴离子脂质体,靶 miRNA 触发链置换循环催化组装,检测下限优于其他脂质体 1~2 个数量级,联合饰脂质体封装催化发夹自组装探针,经膜融合检测 AUC 由 0.85 提升至 0.995。Han 等^[52]以胆固醇标记 DNA 双链修饰脂质体后,由 miR-155 触发循环恢复荧光,实现了腔内核酸原位检测。Chen 等^[53]在适配体功能化金纳米阵列上捕获肿瘤外泌体,脂质体递送 Cas13a,靶标激活产生自放大荧光,判别结直肠癌 miRNA-23a 的 AUC 达 1.000。通过探针的限域排布与级联放大策略的协同,可压缩检测下限并提高序列特异性,为外泌体核酸指纹刻画提供了多样化路径。

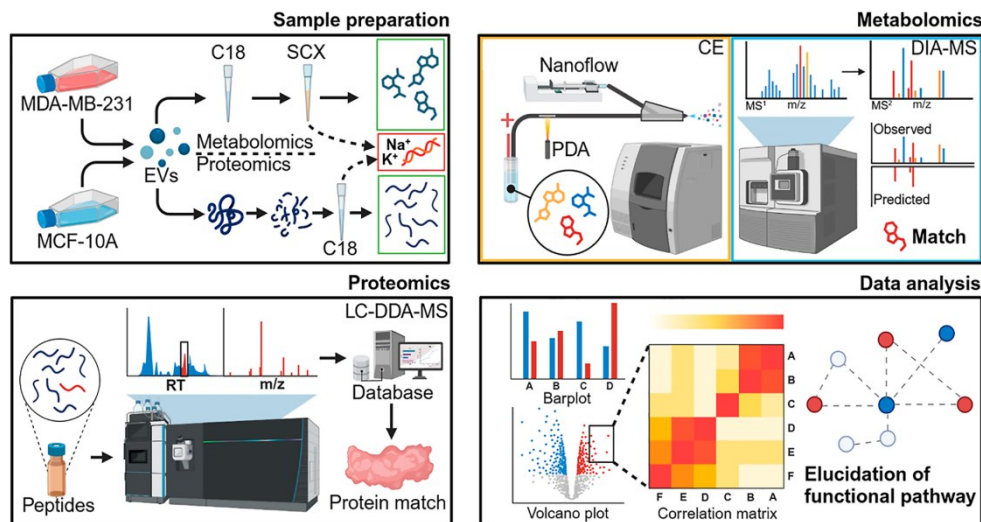


图3 纳米鞘流毛细管电泳-质谱联用与液相色谱-质谱联用整合技术用于单颗粒外泌体内容物分析的原理示意图^[47]

Fig. 3 Nanosheath-flow capillary electrophoresis - mass spectrometry integrated with liquid chromatography - mass spectrometry for analyzing the fingerprints of single exosomes^[47]

综上, 单颗粒外泌体的单维度指纹图谱分别从物理形态、膜表面分子和内容物分子等层面进行表征。形态分析可快速分选亚群, 但缺乏特异性且易受基质干扰。膜表面分子检测借助流式细胞术与成像技术能辅助疾病分型, 但存在通量受限和依赖荧光标记的问题。内容物分子检测通过蛋白代谢分析或核酸信号放大策略, 虽可获得深层信息但会破坏颗粒结构且操作繁琐。单一维度难以全面刻画外泌体异质性, 诊断准确性不足。因此, 单颗粒水平的外泌体分析需整合多维度信息, 构建联合指纹图谱, 将形态特征与分子特征相结合, 从而实现精准分型诊断。

2 单颗粒外泌体多维度特征指纹图谱

2.1 外泌体二维指纹图谱

外泌体二维指纹图谱基于其物理形态、分子特征或内容物分子等, 通过技术联用解析其异质性。一是以物理分离结合分子检测, 建立粒径与表面蛋白的对应关系, 从而克服群体平均化对亚群差异的掩盖。二是探究表面标志物与腔内内容物的功能联系, 突破单一维度的信息局限。该策略在降低分析复杂度的同时, 揭示维度间的内在关联, 为多维度联用提供技术验证与思路参照。

2.1.1 基于物理形态与表面蛋白的指纹图谱 Liu等^[54]将荧光纳米颗粒追踪分析(F-NTA)与尺寸排阻色谱(SEC)联用, 以粒径分布对应蛋白表达丰度, 发现HT29外泌体中EpCAM阳性亚群占比远高于HEK293来源样本, 由此验证粒径与荧光双通道可同步反映蛋白异质性。然而荧光标记策略存在抗体孵育繁琐及光漂白等问题^[55], Stollmann等^[56]基于数字全息显微术与支撑脂双层微流控阵列构建了无标记平台, 通过全息散射对比度反映囊泡尺寸, 捕获信号强度反映表面标志物组合, 经归一化后形成分子指纹, 但灵敏度受散射信号限制, 对小于100 nm外泌体的检测仍有挑战。Zhai等^[57]借助表面等离子体共振显微镜(SPRM)构建了一种名为单EV计数亚群蛋白分析技术(SPASEC)的平台(图5A), 以共振信号精确标定粒径, 并以10 nm为间隔系统划分亚群, 在骨肉瘤细胞系中联合膜蛋白分析

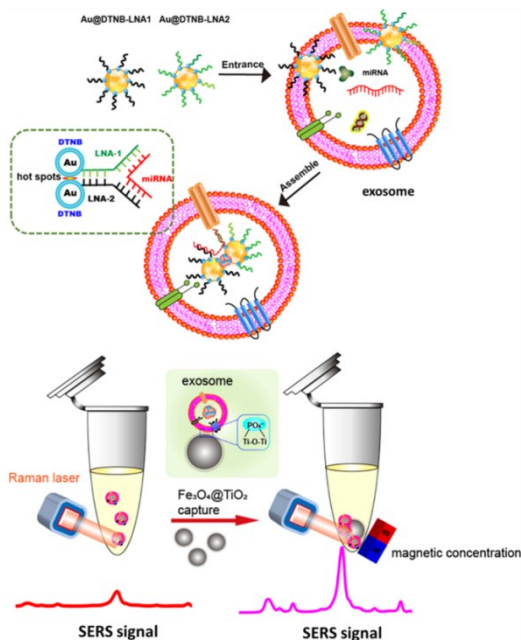


图4 靶标触发表面增强拉曼散射(SERS)联合磁性纳米颗粒富集技术的原理示意图^[50]

Fig. 4 Target-triggered surface-enhanced Raman scattering (SERS) integrated with magnetic nanoparticle enrichment^[50]

后, 分类准确率从原有水平提升至完全判别, 临床血浆样本中多亚群策略的判别准确率大幅提高。上述研究表明尺寸分辨率直接决定蛋白指纹的判别边界, 粒径维度的细化能够显著放大蛋白异质性信号。

2.1.2 基于表面分子与内容物分子的指纹图谱 Wu等^[58]联用滚环扩增与膨胀显微术 (ExM) 建立了蛋白核酸双维度分析平台, 双阳性外泌体的腔内 miR-21 水平在健康人与癌症患者间呈无重叠分布, 说明表面蛋白靶向筛选为核酸检测提供了特异性入口。Lei等^[59]开发了一种名为双表面蛋白引导的肿瘤源性外泌体正交识别与原位 microRNA 分析技术 (SORTER), 采用双适配体构建正交条形码完成肿瘤来源外泌体的精确分选, 随后介导脂质体融合将检测元件递送至腔内, 同步完成表面分选与腔内 miRNA 信号放大。Xu等^[60]报道的数字双 CRISPR-Cas 驱动的单 EV 评估系统 (ddSEE system) 则采用另一种正交策略, 以抗体 DNA 偶联物将表面蛋白信息转化为 Cas12a 的核酸输入, 通过膜融合递送 Cas13a 检测腔内 miRNA, 检测灵敏度降至单拷贝级, 乳腺癌血浆中联合判别效能明显优于单标记方法, 实现了表面蛋白与腔内核酸在同一颗粒上的同时检测且互不干扰 (图 5B)。

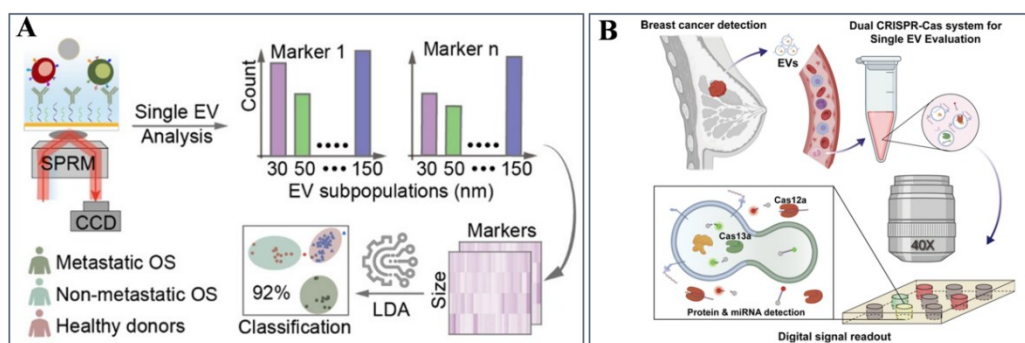


图5 单颗粒外泌体亚群蛋白分析技术 (A)^[57] 及数字双 CRISPR-Cas 外泌体评估技术 (B)^[60] 用于单颗粒外泌体双维度分析的原理示意图

Fig. 5 Subpopulation protein analysis by single extracellular vesicle (EV) counting (A)^[57] and digital dual CRISPR-Cas-powered single EV evaluation (B)^[60] for the two-dimensional fingerprint analysis of single EVs

2.2 外泌体多维度指纹图谱

二维联用虽然实现了两个维度的表征, 但外泌体的高度异质性需要更全面的信息覆盖才能满足精准诊断需求。多维度同步指纹图谱旨在单颗粒水平同时获取 3 个及以上的异质性参数, 通过光学干涉、流式分选、光谱解析及正交放大等方法学的技术联用, 构建更精细的亚群分辨指纹, 以克服单外泌体水平多靶标同时检测的灵敏度限制并提升疾病诊断的特异性与准确性。

2.2.1 基于粒径、膜表面蛋白与内容物的指纹图谱 Daaboul等^[61]基于单颗粒干涉反射成像传感 (SP-IRIS) 技术, 利用可见光干涉效应捕获单个外泌体, 建立了 50~200 nm 范围内信号强度与粒径的连续响应关系, 并借助多色荧光通道同步检测多种膜蛋白共表达 (图 6A)。在 HEK 293 细胞外泌体分析中, CD81 捕获密度为 6×10^4 NP/mm², 高于 CD63 和 CD9, 粒子计数与浓度线性相关系数大于 0.93。该方法实现单颗粒水平粒径与多达 4 种蛋白标志物的联合指纹提取, 还可进一步开展腔内蛋白检测以拓展表征深度, 且无需复杂纯化即可直接用于血浆等临床样本的高通量筛选。然而, 颗粒-基底间距敏感性引发的非特异性吸附及假阳性干扰, 是后续实验亟需克服的首要瓶颈。Troyer等^[62]将单颗粒干涉反射成像传感与单分子荧光原位杂交技术联用 (SPIRFISH), 发展了 SPIRFISH 新方法 (图 6B), 同步检测粒径、膜蛋白与腔内 RNA。对 HIV-1 感染样本的分析表明, 粒径大于 75 nm 且高表达的颗粒中超过 92% 可检出病毒基因组 RNA, 宿主囊泡几乎无此信号, 工程化外泌体约 14% 携带目标 mRNA。基于粒径、蛋白与核酸的三维联合指纹, 粒径实现尺寸区分, 蛋白反映表型特征, 核酸指示功能状态, 三者协同将外泌体分析从物理表征推进至功能解析。

2.2.2 基于粒径、膜脂质与膜表面蛋白的指纹图谱 von Lersner等^[63]基于高通量单囊泡流式细胞术, 利用环境敏感型脂溶性染料标记外泌体膜结构, 经降维聚类构建粒径-膜脂质-蛋白三维指纹, 首次揭示了 CD63 与 CD81 在不同粒径亚群的选择性分选规律。Rab27a 缺失导致小外泌体产量下降约 50%, CD63 过表达使阳性比例从 13% 升至 50%, 证实异质性受生物发生与货物分选的选择性调控。该策略说

明粒径信息可放大蛋白分选差异，为亚群精准解析提供定量框架。

2.2.3 基于粒径、膜脂质与代谢物的指纹图谱 Liu 等^[64]结合表面增强拉曼散射与机器学习，利用等离子体超表面电磁场增强效应捕获单个外泌体拉曼散射信号，结合机器学习提取特征光谱模式（图 6C），克服了群体平均效应从而揭示不同粒径亚群在脂质与代谢物组成上存在的差异，无标记策略避免了抗体孵育与荧光标记步骤，实现了高灵敏的单颗粒外泌体异质性解析。

2.2.4 基于膜脂质、蛋白质与核酸的指纹图谱 Penders 等^[65]以激光光镊无标记捕获单囊泡，通过拉曼光谱读取脂质、蛋白质与核酸生化信息，经偏最小二乘判别分析降维分类，揭示癌症来源囊泡脂质富集与核酸比例改变的分子特征构建多维生化指纹图谱，实现了癌症与非癌症囊泡的高灵敏区分，灵敏度与特异性均超 95%，并完成了乳腺细胞系囊泡亚型的精细鉴别与生物分子组成差异解析。

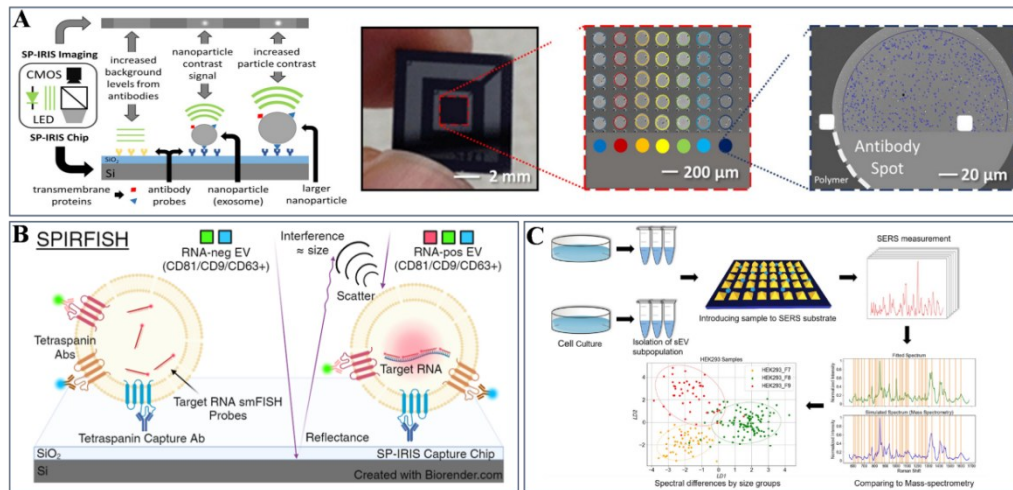


图6 单颗粒干涉反射成像传感技术 (A)^[61]、单颗粒干涉反射成像联合单分子荧光原位杂交技术 (B)^[62]、单囊泡表面增强拉曼光谱技术 (C)^[64] 用于单颗粒外泌体多维度分析的原理示意图

Fig. 6 Single-particle interferometric reflectance imaging sensor (A)^[61], single-particle interferometric reflectance imaging sensor combined with single-molecule fluorescence in situ hybridization (B)^[62], single-vesicle SERS (C)^[64] for multidimensional fingerprint analysis of single EVs

多维度指纹图谱通过整合光学干涉、流式分选及正交放大技术，于单颗粒水平同步捕获粒径、膜蛋白、脂质、代谢物及核酸特征，可显著提升亚群分辨率与诊断特异性。但是现有技术灵敏度与通量难以兼顾，操作复杂，正处于实验室验证阶段，临床转化仍需标准化与大规模样本验证。

3 总结与展望

单颗粒外泌体指纹图谱分析技术可在单囊泡水平精准捕获多维特征并解析异质性，为挖掘疾病特异性标志物提供新的技术路径。本文围绕物理形态、膜表面分子及内容物分子3个层面梳理了单维度表征策略，重点阐述了多维度联合指纹图谱的构建思路（如表1）。多维度联用整合物理特性与生化组成、表面表型与腔内功能，突破单一维度信息片面的瓶颈提升亚群分辨能力与诊断特异性，揭示单一技术难以发现的异质性规律与疾病标志物。单颗粒精准检测以高效分离为前提，当前分离技术仍是全流程的关键瓶颈，发展分离与多维度检测联用技术是未来的发展方向。此外，多维度数据深度挖掘亟需人工智能与深度学习算法辅助，可以通过特征提取与智能分型实现外泌体亚群精准识别。单颗粒分离分析联用技术与AI辅助的多维度指纹图谱深度融合，未来将在肿瘤早筛、液体活检及药物递送评价中发挥关键作用，为精准医学提供支撑。

表1 单颗粒外泌体指纹图谱分析技术
Table 1 Fingerprint analysis of single exosomes

Analytical dimension	Technology	Biofluid	Type of EVs	Analyte	Clinical application	Ref.
单维度	NTA	唾液	神经元外泌体	粒径	神经退行性疾病	[21]
	HSFCM	血浆	结直肠癌外泌体	膜蛋白CD147	结直肠癌	[26]
	AFM	血浆	乳腺癌外泌体	杨氏模量	乳腺癌	[29]
	dSTORM	细胞培养上清	前列腺癌细胞外泌体	瓜氨酸化蛋白	前列腺癌	[31]
	SPRi	细胞培养上清	B16细胞外泌体	CD9、CD63、EpCAM等	黑色素瘤	[32]
	DETECT	血清	血清外泌体	CD63、EpCAM、PD-L1等	胃癌	[34]
	MESSAGE	血清	血清外泌体	表面聚糖	结直肠癌	[39]
	LC-MS/MS	脑组织间液	脑源性外泌体	GFAP	神经退行性疾病	[42]
	EXODUS+MALDI-TOF MS	细胞培养上清	食管鳞状细胞癌外泌体	YBX1	食管鳞状细胞癌	[43]
	PS-MIPs+LC-MS	血浆	血浆外泌体	sphingosine	肝细胞癌	[45]
	CE-MS + LC-MS	细胞培养上清	乳腺癌细胞外泌体	L-carnitine	乳腺癌	[47]
	SERS+Fe ₃ O ₄ @TiO ₂	血清	胰腺导管腺癌血清外泌体	miRNA-10b	胰腺导管腺癌	[50]
	EValarm	血浆	淋巴瘤血浆外泌体	miR-155-5p	恶性淋巴瘤	[51]
双维度	CRISPR/Cas13a	血浆	结直肠癌血浆外泌体	miRNA-23a	结直肠癌	[53]
	F-NTA+SEC	细胞培养上清	结肠癌细胞外泌体	粒径及CD63、EpCAM等	结肠癌	[54]
	label-free optofluidic platform	细胞培养上清	卵巢细胞外泌体	粒径及CD9、CD63、CD81等	卵巢癌	[56]
	SPASEC	血浆	骨肉瘤血浆外泌体	粒径及CD63、BMP2等	骨肉瘤	[57]
	RCA-ExM	血浆	肺癌血浆外泌体	PD-L1、EpCAM及miR-21	肺癌	[58]
	SORTER	血浆	前列腺癌血浆外泌体	CD63、EpCAM及miR-21、miR-10b等	前列腺癌	[59]
	ddSEE system	血浆	乳腺癌血浆外泌体	PD-L1及miR-21	乳腺癌	[60]
多维度	SP-IRIS	脑脊液	脑脊液外泌体	粒径、CD9、CD63及腔内蛋白	神经退行性疾病	[61]
	SPIRFISH	细胞培养上清	PM1细胞外泌体	gp120/CD81及HIV genomic RNA	HIV感染	[62]
	SPARTA	细胞培养上清	乳腺癌细胞外泌体	Sphingomyelin、phenylalanine及guanine	乳腺癌	[65]

参考文献:

- [1] Du S, Guan Y C, Xie A H, Yan Z, Gao S J, Li W R, Rao L, Chen X J, Chen T K. *J. Nanobiotechnol.*, **2023**, 21: 231.
- [2] Arya S B, Collie S P, Parent C A. *Trends Cell Biol.*, **2024**, 34 (2): 90-108.
- [3] Tenchov R, Sasso J M, Wang X M, Liaw W S, Chen C A, Zhou Q A. *ACS Nano*, **2022**, 16 (11): 17802-17846.
- [4] Wu J, Zhou Y, Jiang Y, Xu W, Yan T, Ma S. *Anal. Chem.*, **2026**, 98 (14): 10217-10247.
- [5] Lyu C, Sun H F, Sun Z Q, Liu Y, Wang Q M. *Cell Death Dis.*, **2024**, 15 (2): 106.
- [6] Hyung S, Ko J, Heo Y J, Blum S M, Kim S T, Park S H, Park J O, Kang W K, Lim H Y, Klempner S J, Lee J. *Sci. Adv.*, **2023**, 9 (47): eadk1098.
- [7] Xiao Q, Tan M, Yan G, Peng L. *J. Nanobiotechnol.*, **2025**, 23 (1): 232.
- [8] Carney R P, Mizenko R R, Bozkurt B T, Lowe N, Henson T, Arizzi A, Wang A J, Tan C, George S C. *Nat. Nanotechnol.*, **2025**, 20 (1): 14-25.
- [9] Zhang Q, Jeppesen D K, Higginbotham J N, Franklin J L, Coffey R J. *Nat. Protoc.*, **2023**, 18 (5): 1462-1487.
- [10] Han C, Kang H, Yi J, Kang M S, Lee H, Kwon Y, Jung J, Lee J, Park J. *J. Extracell. Vesicles*, **2021**, 10 (3): e12047.
- [11] Wang J P, Xing K R, Zhang G Y, Li Z Y, University N, Ding X G, Leong D T. *ACS Nano*, **2025**, 19 (9): 8433-8461.
- [12] Li Y, Fu B, Wang M Y, Chen W Y, Fan J W, Li Y Y, Liu X J, Wang J, Zhang Z S, Lu H J, Zhang Y. *Nat. Commun.*, **2025**, 16: 2292.
- [13] Greening D W, Xu R, Rai A, Suwakulsiri W, Chen M S, Simpson R J. *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, **2025**, 22 (12): 924-952.
- [14] Zhang L, Zhang G, Lu Y Z, Gao J M, Qin Z, Xu S, Wang Z Y, Xu Y Y, Yang Y, Zhang J Y, Tang J N. *J. Cell. Mol. Med.*, **2023**, 27 (14): 1988-2003.
- [15] Dixon A C, Dawson T R, Di Vizio D, Weaver A M. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2023**, 24 (7): 454-476.
- [16] Zhang Y, Meng X T, Greening D W, Huang Y Y, Li B, Li Z G, Long G, Lötvall J, Lv L L, Poon I K H, Wang T, Law J X, Cai T X, Yang F Q, Yu L J, Zheng L, Yin H. *J. Extracell. Vesicles*, **2025**, 14 (12): e70209.

- [17] Zhang J, Wu J C, Wang G Z, He L X, Zheng Z W, Wu M H, Zhang Y Q. *ACS Nano*, **2023**, 17 (18): 17668–17698.
- [18] Tran H L, Zheng W S, Issadore D A, Im H, Cho Y K, Zhang Y Q, University S Y, Liu D B, University N, Liu Y, Li B, University S M, Liu F, Wong D T W, Sun J S, Qian K, He M, Wan M H, University S, Zeng Y, , Cheng K, Huang T J, University D, Chiu D T, Lee L P, University H, Zheng L, Godwin A K, Kalluri R, University R, Soper S A, , *Program B*, Hu T Y. *ACS Nano*, **2025**, 19 (31): 28021–28109.
- [19] Kumar M A, Baba S K, Sadida H Q, Al Marzooqi S, Jerobin J, Altemani F H, Algehaiy N, Alanazi M A, Abou-Samra A B, Kumar R, Al-Shabeeb Akil A S, Macha M A, Mir R, Bhat A A. *Signal Transduct. Target. Ther.*, **2024**, 9: 27.
- [20] Liu J J J, Liu D R, To S K Y, Wong A S T. *Mol. Cancer*, **2025**, 24: 166.
- [21] Spitzberg J D, Ferguson S, Yang K S, Peterson H M, Carlson J C T, Weissleder R. *Nat. Commun.*, **2023**, 14: 1239.
- [22] Ströhle G, Misra M, Li H. *Adv. Healthcare Mater.*, **2026**, 15 (7): e03002.
- [23] Sharma V, Nikolajeff F, Kumar S. *Transl. Neurodegener.*, **2023**, 12: 7.
- [24] Cimorelli M, Nieuwland R, Varga Z, van der Pol E. *PLoS One*, **2021**, 16 (4): e0249603.
- [25] Hu Y Y, Di H N, Lai H Y, Li Y R, Chen C, Tian Y, Yan X M. *J. Instrum. Anal.* (胡芸芸, 底浩楠, 赖辉燕, 李雨柔, 陈晨, 田野, 颜晓梅. 分析测试学报), **2022**, 41 (9): 1345–1354.
- [26] Tian Y, Ma L, Gong M F, Su G Q, Zhu S B, Zhang W Q, Wang S, Li Z B, Chen C X, Li L H, Wu L N, Yan X M. *ACS Nano*, **2018**, 12 (1): 671–680.
- [27] Xing Y H, Yang X L, Yang R L, Fatima Z, Xie P J, Liu F, Cai T P, Xu X, Zhou C L, Jia Z Y, Zhai X L, Piao X F, Liu H W, Hong S H, Zhang S N, Ren X S, Liu L, Li D H. *Anal. Chem.*, **2025**, 97 (1): 436–443.
- [28] Gazze S A, Thomas S J, Garcia-Parra J, James D W, Rees P, Marsh-Durban V, Corteling R, Gonzalez D, Conlan R S, Francis L W. *Nanoscale*, **2021**, 13 (12): 6129–6141.
- [29] LeClaire M, Wohlschlegel J A, Chang H, Wadehra M, Yu W B, Rao J Y, Elashoff D, Gimzewski J K, Sharma S. *ACS Appl. Nano Mater.*, **2021**, 4 (9): 9876–9885.
- [30] Liu F, Li W Z, Xing Y H, Kaw H Y, Yang X L, Xie P J, Cai T P, Zhang T, Yang R L, Xu X, Jia Z Y, Li D H, University Y, Liu L, University Y. *Anal. Chem.*, **2025**, 97 (28): 15472–15481.
- [31] Needham S R, Davis B M, Uysal-Onganer P, Rolfe D J, Hristova M, Kraev I, Inal J M, Lange S. *J. Biophotonics*, **2026**, 19 (3): e202500483.
- [32] Zhu L, Wang K, Cui J, Liu H, Bu X L, Ma H L, Wang W Z, Gong H, Lausted C, Hood L, Yang G, Hu Z Y. *Anal. Chem.*, **2014**, 86 (17): 8857–8864.
- [33] Hu Y, Wu Q, Chen J, Chen X, Di H, Yan X. *Proteomics*, **2025**: e70078.
- [34] Pan L, Yuan C Q, Ma X W, Wu D K, Dong Y H, Ye J, Pan S F, Yang D L, Wang P F. *Biosens. Bioelectron.*, **2026**, 291: 118055.
- [35] Skotland T, Ekroos K, Llorente A, Sandvig K. *J. Extracell. Vesicles*, **2025**, 14 (3): e70049.
- [36] Smith ZJ, Lee C, Rojalin T, Carney RP, Hazari S, Knudson A, Lam K, Saari H, Ibañez EL, Viitala T, Laaksonen T, Yliperttula M, Wachsmann-Hogiu S. *J. Extracell. Vesicles*, **2015**, 4: 28533.
- [37] Stremersch S, Marro M, Pinchasik B E, Baatsen P, Hendrix A, De Smedt S C, Loza-Alvarez P, Skirtach A G, Raemdonck K, Braeckmans K. *Small*, **2016**, 12 (24): 3292–3301.
- [38] Kuo J C, Paszek M J. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **2021**, 37: 257–283.
- [39] Zhang G H, Huang X D, Gong Y L, Ding Y, Wang H, Zhang H M, Wu L L, Su R, Yang C Y, Zhu Z. *J. Am. Chem. Soc.*, **2024**, 146 (42): 29053–29063.
- [40] Li N, Tang T T, Gu M L, Fu Y Q, Qian W W, Ma N N, Shen A R, Zhu T T, Huo R B, Zhang T, Xie J F, Zhang L, Liu B C, Lv L L. *Nat. Commun.*, **2025**, 16: 6960.
- [41] Bandu R, Oh J W, Kim K P. *Exp. Mol. Med.*, **2019**, 51 (3): 218.
- [42] Espourteille J, Barve A, Zufferey V, Leroux E, Perbet R, Bégard S, Caillierez R, Maurage C A, Toni N, Buée L, Colin M, Richetin K. *Alzheimers. Res. Ther.*, **2025**, 17: 223.
- [43] Dai X, Huang H, Liu F. *Anal. Chem.*, **2025**, 97 (19): 10180–10189.
- [44] Palviainen M, Laukkanen K, Tavukcuoglu Z, Velagapudi V, Kärkkäinen O, Hanhineva K, Auriola S, Ranki A, Siljander P. *Cancers*, **2020**, 12 (11): 3292.
- [45] Lu F, Cheng X H, Qi X L, Li D J, Hu L H. *Talanta*, **2025**, 282: 126940.
- [46] Bajaj N, Sharma D. *Nanoscale*, **2024**, 17 (1): 287–303.
- [47] Zaripov E A, Khraibah A, Kasyanchuk P, Radchanka A, Hüttmann N, Berezovski M V. *J. Proteome Res.*, **2025**, 24 (5): 2505–2516.
- [48] Morales-Sanfrutos J, Etxeberria-Ugartemendia J, Barroso-Gomila O, González E, Sendino M, Ximénez-Embún P, García F, Zarzuela E, Falcón-Pérez J M, Peinado H, Muñoz J. *Nat. Cell Biol.*, **2026**, 28 (3): 622–639.
- [49] Na H K, Wi J S, Son H Y, Ok J G, Huh Y M, Lee T G. *Biosens. Bioelectron.*, **2018**, 113: 39–45.
- [50] Jiang S Q, Li Q, Wang C W, Pang Y F, Sun Z W, Xiao R. *ACS Sens.*, **2021**, 6 (3): 852–862.

- [51] Ma J Y, Wang X, Cai Y H, Wang G C, Lu M Z, Feng K Z, Zhao Y, Wu X, Zhang X P, Wu H A, Yu W, Ma M, Ge Z, Zhang Y. *Adv. Sci.*, **2026**, 13 (10): e19758.
- [52] Han J X, Liu X R, Yan Y, Ge J W, Zhao H, Wang C, Song G H, Zhu L, Yang Y L. *Biosens. Bioelectron.*, **2025**, 288: 117763.
- [53] Chen M Z, Choi H K, Goldston L L, Hou Y N, Jiang C P, Lee K B. *ACS Nano*, **2025**, 19 (35): 31438–31456.
- [54] Liu Y T, El-Helou A J, Söderström B, Ruan J F, Zhu Y. *Sens. Diagn.*, **2026**, 5 (3): 348–357.
- [55] Chen W Q, Zhang Y, Di K L, Liu C, Xia Y Y, Ding S J, Shen H, Li Z Y. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, **2022**, 10: 945858.
- [56] Stollmann A, Garcia-Guirado J, Hong J S, Im H, Lee H, Arroyo J O, Quidant R. *Nat. Commun.*, **2023**: rs.3.rs-3309306.
- [57] Zhai C H, Xu J Y, Yang Y T, Xie F, Cao L, Wang K, Zhou Y, Ding X M, Yin J Y, Ding X T, Hu H Y, Yu H. *Anal. Chem.*, **2024**, 96 (23): 9486–9492.
- [58] Wu J C, Dou Q H, Mao M, Wan X, Wu M H, Hu T Y, Zhang Y Q. *Nat. Commun.*, **2025**, 16: 7498.
- [59] Lei Y M, Fei X C, Ding Y, Zhang J H, Zhang G H, Dong L, Song J, Zhuo Y, Xue W, Zhang P, Yang C Y. *Sci. Adv.*, **2023**, 9 (40): eadi1556.
- [60] Xu X, Zhang Y Y, Liu J J, Wei S J, Li N, Yao X T, Wang M X, Su X H, Jing G S, Xu J Q, Liu Y, Lu Y, Cheng J, Xu Y C. *ACS Nano*, **2025**, 19 (1): 1271–1285.
- [61] Daaboul G G, Gagni P, Benussi L, Bettotti P, Ciani M, Cretich M, Freedman D S, Ghidoni R, Ozkumur A Y, Piotto C, Prosperi D, Santini B, Ünlü M S, Chiari M. *Sci. Rep.*, **2016**, 6: 37246.
- [62] Troyer Z, Gololobova O, Koppula A, Liao Z H, Horns F, Elowitz M B, Tosar J P, Batish M, Witwer K W. *ACS Nano*, **2024**, 18 (39): 26568–26584.
- [63] von Lersner A K, Fernandes F, Ozawa P M M, Jackson M, Masureel M, Ho H, Lima S M, Vagner T, Sung B H, Wehbe M, Franze K, Pua H, Wilson J T, Irish J M, Weaver A M, Di Vizio D, Zijlstra A. *ACS Nano*, **2024**, 18 (15): 10464–10484.
- [64] Liu Z R, Ng M, Srivastava S, Li T Y, Liu J, Phu T A, Mateescu B, Wang Y T, Tsai C F, Liu T, Raffai R L, Xie Y H. *PLoS One*, **2024**, 19 (6): e0305418.
- [65] Penders J, Nagelkerke A, Cunnane E M, Pedersen S V, Pence I J, Coombes R C, Stevens M M. *ACS Nano*, **2021**, 15 (11): 18192–18205.

(责任编辑: 盛文彦)