

细胞释放的微粒的检测方法研究进展

杨荟圆 路 明 张迎媚

摘 要 微粒(MPs)是由活化或凋亡的血液细胞、血管内皮细胞、肿瘤细胞释放的直径 $0.1 \sim 1.0 \mu\text{m}$ 的小囊泡,具有广泛的生物学活性,与多种疾病的发生、发展密切相关。由于MPs极小,常规检测方法的敏感度和分辨率常常是不够的,使得MPs的检测受到很大限制。本文简单介绍了目前一些常用的MPs的检测方法,包括定性和定量检测方法,分析了各个方法的优势和不足,为微粒检测分析时方法的选择提供参考,但MPs的临床检测尚有待MPs检测方法的进一步标准化。

关键词 微粒 检测方法 定性分析 定量分析

中图分类号 R331

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2019.12.007

微粒(MPs)是各种血液细胞、血管内皮细胞、肿瘤细胞受刺激活化或凋亡而释放到血液循环中的直径 $0.1 \sim 1.0 \mu\text{m}$ 的小泡状膜颗粒^[1]。当细胞活化或凋亡时,细胞膜脂质双层不对称性丧失,引起一系列的生物学变化,使细胞膜脱落形成MPs^[2]。MPs不仅仅是简单的细胞脱落物,它携带有其来源细胞的一些基本物质,主要包括脂类和蛋白质,也包含mRNA、microRNA,但没有细胞核结构。各种细胞来源的MPs表面均携带有其母体细胞的特异表面抗原。MPs表面还有磷脂酰丝氨酸(PS)暴露,这一点与细胞不同。

MPs具有广泛的生物学活性,其生物学特性在很大程度上取决于其蛋白质和脂质组成,而蛋白质组成又取决于其来源的细胞和导致其产生的刺激因素^[3]。例如,来自内皮细胞的MPs(EMPs)含有大量的代谢酶、参与细胞外渗的蛋白质和细胞骨架相关的蛋白质;血小板释放的MPs(PMPs)表面则富集整合素、p-选择素等蛋白,而活化中性粒细胞来源的MPs中整合素Mac-1浓度较高^[4]。MPs也可以作为细胞与细胞之间传递信号的媒介。MPs在炎症、免疫、与癌症相关的静脉血栓栓塞(VTE)和血管等疾病的发生、发展中发挥着重要作用,对于这些疾病,检测MPs性质及水平有助于监测病情、指导治疗及判断疗效^[5,6]。但是,由于MPs极小,常规检测方法的敏感度和

和分辨率常常不够,使得MPs的检测受到很大限制。

本文介绍了许多检测MPs的方法,用来确定的MPs直径、数量、形态学、细胞来源和生物学活性。这些分析MPs的方法各有其优势和不足,微粒检测方法的标准化在技术方面还面临极大挑战。本文从定性和定量分析两方面对MPs一些常用的检测方法做一简单介绍。

一、定性分析方法

1. 透射电子显微镜法(TEM):TEM利用电子获得样本的二维图像,它的特点是具有极高的分辨率(接近 0.1 nm),可以用来评估MPs的直径、膜的形态和组成^[7]。使用胶体金标记的抗体可以获得关于MPs抗原成分的信息^[8]。

该方法需要通过超离心技术使样品中的MPs浓缩,因此不能对原样本中MPs的数量进行定量分析^[9];不能直接检测血浆中的MPs,因为它需要对样品进行固定和脱水,而这一操作过程对MPs的直径和形态有着直接的影响^[10]。该方法样本制备过程非常耗时,而且镜下检测也需要几个小时。因此本方法主要用于对MPs的直接观察或对其他检测进行验证。

2. 激光扫描共聚焦显微镜技术(LSCM):LSCM是荧光显微镜的一个现代变体,在激光扫描共聚焦显微镜中,使用激光做光源,与荧光显微镜比较,提高了图像的分辨率;计算机代替了人眼或者照相机进行观察、摄像,得到的图像是数字化的,提高了图像的清晰度;光电倍增管的应用,提高了检测的敏感度。LSCM检测前,先超速离心分离得到MPs,用PS的特异结合蛋白Annexin V固定MPs以阻止其布朗运动,然后用荧光素偶联的抗体对MPs表面特异抗原进行标记^[11]。此方法检测结果取决于针对目标抗原的抗

基金项目:黑龙江省自然科学基金资助项目(H2017032);哈尔滨医科大学研究生科研和实践创新基金资助项目(YJSSJCX2018-24HYD)

作者单位:150001 哈尔滨医科大学附属第一医院血液内科(杨荟圆、张迎媚);150008 哈尔滨,黑龙江省妇幼保健院(路明)

通讯作者:张迎媚,副研究员,硕士生导师,电子信箱:zhangyingmei1111@126.com

体的特异性和亲和力,以及 MPs 表面抗原的密度。LSCM 技术还能够获得 MPs 的直径、形态和结构信息^[12]。该方法的不足是耗时长(每个样品需要分析几个小时),而且不能对血浆中的 MPs 直接进行检测。

3. 原子力显微镜检测(AFM):AFM 是一种可以用来研究固体材料表面结构的分析仪器。它通过检测待测样品表面和一个微力敏感元件之间的极微弱的原子间相互作用力来研究待测样本的表面结构及性质。将一对对微力极端敏感的微悬臂一端固定,另一端的微小针尖接近样品,这时针尖将与样品表面相互作用,作用力将使得微悬臂发生形变或运动状态发生变化。扫描样品时,利用传感器检测这些变化,就可以获得作用力分布信息,从而以纳米级分辨率获得待测样品表面形貌结构信息及表面粗糙度信息。AFM 可以检测单个 MP,形成检测样品的三维图像^[13]。

该方法要求测量前将 MPs 从血浆或其他样品中分离出来、浓缩,并使之紧密结合固定到载体平面上,这会影响 MPs 的形态和数量,也无法测得 MP 的直径。云母是一种绝缘矿物,涂于载体平面表面,特异抗体再涂于云母表面,与 MPs 样本孵育后,携带相应抗原的 MPs 即可紧密结合到载体平面上。该方法的优点是能提供真正的检测样品的三维表面图;可以直接在液体环境中检测 MPs,使 MPs 维持在生理状态。尽管 AFM 允许检测 MPs 并确定其表型,但不能获得关于 MPs 功能特性的信息;成像范围太小;耗时费力(检测一个样本约需 2h)。

二、定量分析方法

1. 光学显微镜技术:光学显微镜的最高分辨率为 200nm,比普通显微镜高 50 倍,可以看到检测样品的亚显微结构,特别适合用来观察微小的颗粒。光学显微镜结合图像分析软件可以对 MPs 进行定量分析,但很费时(分析 10000 个 MPs 需要几个小时),并且这种方法不能提供关于 MPs 的细胞起源、抗原成分等方面的信息。

2. 荧光显微镜技术:是将荧光与显微镜技术相结合的一种检测技术,也是一种很有前途的 MPs 检测技术。其利用荧光素标记的抗体检测微粒表面特异的抗原,从而对微粒的特定属性进行定量分析。这种方法同样耗时较长(每个样本平均检测时间约为 1h),并且不能测量 MPs 的直径。随着光学成像技术的不断进步,荧光显微镜是一种很有前景的 MPs 检测技术,例如借助 FITC - annexin V 标记 PS,荧光显微镜可以动态观察 MPs 自细胞膜脱落、形成的过

程^[14]。但是,由于纳米级 MPs 的快速布朗运动的存在,限制了该技术敏感度的提高^[11]。

3. 流式细胞术:流式细胞术是最常用的鉴定 MPs、并对其进行定量分析的方法^[15]。该方法检测 MP 获得两部分参数:散射光强度和荧光强度(荧光偶联于抗体上并进一步结合到特异的目标抗原上)。前向角散射光(FSC)强度反映细胞/MPs 的直径,而侧向角散射光(SSC)强度提供待测细胞/MPs 内颗粒结构复杂程度的信息^[11]。使用已知大小的荧光素标记的标准微球,通过比较 MPs 与标准微球的 FSC 强度,可以确定 MPs 群^[16]。使用已知浓度的荧光素标记的标准微球,将其添加到特定体积的 MPs 样品中,通过计算检测到的 MPs 与标准微球的数量比,可以确定样品中 MPs 的浓度^[17]。用针对细胞特异抗原的荧光标记的抗体对 MPs 进行染色,可以评估 MPs 的细胞来源。此外,使用荧光素标记的 Annexin V,可以验证 MPs 的磷脂分布特性,即 MPs 表面有 PS 的暴露^[18]。

流式细胞术的一个主要优点是可以采用荧光素双标甚至多标法测定 MPs 的起源。流式细胞术的另一个优势是每秒可以分析成千上万个 MPs^[19]。流式细胞术不需要检测前从待测样本中分离 MPs,因此能很好地保留 MPs 的形态学特征,并防止 MPs 数量的丢失。然而,流式细胞术也有一些局限性:它没有提供细胞形态学方面的详细信息;受仪器分辨率的限制,绝大多数流式细胞仪不能检测 0.1 ~ 0.4 μ m 直径的 MPs;小的 MPs 聚集成团,会被记为一个 MPs;实验重复性差;检测结果受仪器的类型、设置、数据分析者的能力以及样品的制备和储存方法等影响较大^[20];虽然使用表面抗原特异抗体可以检测 MPs 起源,但当 MPs 表面抗原的量少,同时伴有抗原抗体的结合能力相对弱时,特异性荧光强度较低,MPs 可能不能被检出。

4. 基于阻抗的流式细胞术:该技术的工作原理也是目前普遍使用的血细胞分析仪的工作原理,又称库尔特原理。无论是血细胞还是 MPs,都是电的不良导体。将待测样本用电解液稀释,悬浮于电解质溶液中的颗粒被抽吸而通过两侧置有两枚电极的小孔的周边。当控制通过该小孔电流时,小孔周边会产生一个电感应区,随着每个颗粒通过该电感应区,颗粒会置换出电感应区内等体积的导电液体,瞬间增加了该电感应区的电阻。这种电阻的变化经过一个放大器会产生一种成比例的电脉冲,仪器能够对电脉冲进行精

确的测量。这种脉冲的强度与产生它的颗粒的大小呈正比,因此就可以在几秒钟内对液体中的颗粒进行识别和计数。该技术的检出下限为 300nm,因此直径 <300nm 的 MPs 不能检出。该方法不能提供 MPs 的形态、细胞来源、功能等方面信息。

5. 免疫印迹法 (Western blot 法): MPs 用裂解液裂解后,用聚丙烯酰胺凝胶电泳法分离蛋白质,然后将凝胶上的蛋白质转移到固相载体硝基纤维素膜或聚偏氟乙烯膜上,用针对特定抗原的一抗标记,再用针对一抗的带有标志物的二抗孵育,最后标志物显色,结合特定图像分析软件,即可定量 MPs 中特定抗原的表达量^[21,22]。

Western blot 法分析需要大量 MPs,这限制了该方法应用于血浆 MPs 的检测;另外,该法允许研究 MPs 的蛋白表达,但不能提供关于 MPs 直径和数量的信息。

6. 酶联免疫吸附试验 (ELISA): ELISA 是利用抗原抗体特异结合特性对样本中特异蛋白进行定量分析的一种简便易行的检测方法。该方法重复性好,可用来定量分析 MPs 表面的抗原,也可以通过定量 MPs 表面携带的 PS 的量间接地定量 MPs 的数量^[23]。包被于 96 孔板上的 Annexin V 或针对 MPs 表面特异抗原的抗体 (捕获抗体),与血浆中 MPs 特异性结合后,用针对 MPs 表面特异抗原、与荧光素偶联的抗体 (检测抗体) 检测被捕获 MPs 的表面抗原的表达量;用与荧光素偶联的 Annexin V 代替检测抗体,可以检测出 MPs 表面 PS 的总量,从而间接测定 MPs 的数量。

ELISA 检测 MPs 的优点为可以同时检测很多样本,是一种高通量检测方法;没有 MPs 直径限制;能定量评估 MPs 数量。该方法也有一些缺点:仅能检测可溶性抗原;不能提供 MPs 直径的信息;存在 Annexin V 非特异性结合,使该方法的应用受到限制^[24]。另外,该方法需要使用新鲜的血浆,因为冻融会引起 MPs 表面 PS 的数量增加。

7. 用于定量 MPs 表面特定生物活性分子的功能实验:本法是基于 MPs 的某些特定生物学功能对 MPs 特性特征进行定量分析。例如,PS 具有促凝血活性,而 MPs 表面暴露有 PS,因此,采用 MPs 促凝活性/促凝血酶生成活性检测实验,就可以间接测定 MPs 数量^[2,25]。再如,MP - TF 活性检测实验通过测定 MP - TF 依赖的凝血因子 Xa 的生成量,可以确定 MPs 表面携带的活性 TF 的量^[26,27]。由于 MPs 表面携带的、有特定生物学活性、适合分析的分子种类很少,此类

检测方法数量十分有限。

功能实验的优点是操作简单,可以同时分析很多样本,检测的是样本中全部 MPs 的功能,不受 MPs 直径和来源的限制。该方法的不足是它们不能评估样本中 MPs 的直径及数量。

到目前为止,流式细胞术与功能实验在 MPs 检测方面获得的数据不多,但两种方法测定的结果一致性差。考虑到流式细胞术不能检测直径 <400nm 的 MPs,而血浆中直径 <200nm 的 MPs 在凝血过程中的作用不可忽视,那么从功能实验和流式细胞术中得到的结果不一致是可以理解的。

三、MPs 检测方法的选择

从上述介绍可以看出,每种检测方法有其各自独特的用途、优势和不足,充分了解每种检测技术是选择适合的检测方法的前提。针对不同的研究目的,结合不同的实验室实际条件,可以选择不同的检测方法,来获得研究者所需要的信息。比如,很多实验常常需要同时获得关于 MPs 数量与来源方面的信息。经上面分析可知,流式细胞术、ELISA 都是可以选择的能同时获得这两方面信息的方法。例如 Sarlon - Bartoli 等^[16]在分析白细胞来源 MPs 的血浆水平与颈动脉高度狭窄患者的不稳定斑块的相关性的研究中用高敏感度流式细胞仪测定血浆中不同 MPs 的细胞来源及数量。有研究者使用 ELISA 法对脑梗死慢性期患者血浆中的血小板来源 MPs 的水平进行了定量分析。还有一种技术,该技术的原理是将 ELISA 与定量 MPs 表面 PS 的功能实验两种检测方法结合起来,也能达到同时获得这两方面信息的目的。Dela-branche 等即使用了这一技术对血浆中不同细胞来源的 MPs 在感染性休克引发的 DIC 中的数量变化情况进行了动态监测。另外,还可以将定性分析与定量分析方法联合应用,利用每种分析方法的优势,来弥补另一分析方法的不足。比如研究者采用透射电镜和流式细胞术技术对急性呼吸窘迫综合征大鼠血浆中不同细胞来源的微粒进行了定性、定量分析。再如 Hughes 等将正常人血小板置于肝素诱发的血小板减少症患者血浆中,并加入肝素激活血小板,然后联合使用电子显微镜、共聚焦显微镜和流式细胞术等技术,对血小板释放微粒情况进行定性、定量分析。

四、展 望

人血浆中循环 MPs 的发现具有重大意义,深入研究 MPs 的机制,可为临床许多疾病包括心血管疾病、凝血相关疾病以及一些恶性疾病的诊断、病情评

估、疗效判定提供依据。近年来,关于 MPs 的分析方法多种多样,但都存在一定的局限性,由于缺乏标准化的检测方法,MPs 研究需要进一步发展,用重复性好的方法测量 MPs 仍然是一个挑战。目前流式细胞术似乎是研究 MPs 的最佳技术,因为它具有多参数分析的可能性,它不仅提供定量信息,而且提供定性信息,尽管有许多限制,它仍然是检测和分析 MVs 最常用的技术。随着技术的进步,硬件设施分辨率的逐渐提高,方法学的进一步完善和发展,MPs 的检测方法将会越来越标准化,这将会有效促进 MPs 在生理和病理情况下发挥作用的研究,也会进一步促进 MPs 在临床疾病的诊断和治疗中的应用。

参考文献

- Mooberry MJ, Key NS. Microparticle analysis in disorders of hemostasis and thrombosis[J]. *Cytometry A*, 2016,89(2):111-122
- Vallier L, Cointe S, Lacroix R, *et al.* Microparticles and fibrinolysis[J]. *Semin Thromb Hemost*, 2017,43(2):129-134
- Buzas EI, Gyorgy B, Nagy G, *et al.* Emerging role of extracellular vesicles in inflammatory diseases[J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2014,10(6):356-364
- Alexandru N, Badila E, Weiss E, *et al.* Vascular complications in diabetes; microparticles and microparticle associated microRNAs as active players[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016,472(1):1-10
- 袁玉娟, 穆叶赛·尼加提. 急性冠脉综合征发生与外周血红细胞源微粒致血栓活性的关系研究[J]. *医学研究杂志*, 2016,45(6):55-58
- 尼菲拉·甫拉提, 袁玉娟, 穆叶赛·尼加提. 急性冠脉综合征患者红细胞微粒水平与冠脉病变严重程度的关系[J]. *医学研究杂志*, 2018,47(3):20-23
- Vajen T, Mause SF, Koenen RR. Microvesicles from platelets; novel drivers of vascular inflammation[J]. *Thromb Haemost*, 2015,114(2):228-236
- Nielsen T, Kristensen AF, Pedersen S, *et al.* Investigation of procoagulant activity in extracellular vesicles isolated by differential ultracentrifugation[J]. *J Extracell Vesicles*, 2018,7(1):1454777
- Ponomareva AA, Nevzorova TA, Mordakhanova ER, *et al.* Intracellular origin and ultrastructure of platelet-derived microparticles[J]. *J Thromb Haemost*, 2017,15(8):1655-1667
- Montoro - Garcia S, Shantsila E, Hernandez - Romero D, *et al.* Small - size platelet microparticles trigger platelet and monocyte functionality and modulate thrombogenesis via P - selectin[J]. *Br J Haematol*, 2014,166(4):571-580
- Briens A, Gauberti M, Parcq J, *et al.* Nano - zymography using laser - scanning confocal microscopy unmasks proteolytic activity of cell - derived microparticles[J]. *Theranostics*, 2016,6(5):610-626
- Hisada Y, Auriemma AC, Alexander W, *et al.* Detection of tissue factor - positive extracellular vesicles by laser scanning confocal microscopy[J]. *Thromb Res*, 2017,150:65-72
- Burnouf T, Goubran HA, Chou ML, *et al.* Platelet microparticles: detection and assessment of their paradoxical functional roles in disease and regenerative medicine[J]. *Blood Rev*, 2014,28(4):155-166
- Nguyen DB, Ly TB, Wesseling MC, *et al.* Characterization of microvesicles released from human red blood cells[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016,38(3):1085-1099
- Van der Pol E, Coumans F, Varga Z, *et al.* Innovation in detection of microparticles and exosomes[J]. *J Thromb Haemost*, 2013,11(Suppl 1):36-45
- Sarlon - Bartoli G, Bennis Y, Lacroix R, *et al.* Plasmatic level of leukocyte - derived microparticles is associated with unstable plaque in asymptomatic patients with high - grade carotid stenosis[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2013,62(16):1436-1441
- Dinkla S, Brock R, Joosten I, *et al.* Gateway to understanding microparticles: standardized isolation and identification of plasma membrane - derived vesicles[J]. *Nanomedicine (Lond)*, 2013,8(10):1657-1668
- Shantsila E, Montoro - Garcia S, Gallego P, *et al.* Circulating microparticles: challenges and perspectives of flow cytometric assessment[J]. *Thromb Haemost*, 2014,111(6):1009-1014
- SBurger D, Schock S, Thompson CS, *et al.* Microparticles: biomarkers and beyond[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2013,124(7):423-441
- Piccin A, Van Schilfgaarde M, Smith O. The importance of studying red blood cells microparticles[J]. *Blood Transfus*, 2015,13(2):172-173
- Kang CC, Yamauchi KA, Vlassakis J, *et al.* Single cell - resolution western blotting[J]. *Nat Protoc*, 2016,11(8):1508-1530
- Libregts S, Arksteijn G, Nemeth A, *et al.* Flow cytometric analysis of extracellular vesicle subsets in plasma; impact of swarm by particles of non - interest[J]. *J Thromb Haemost*, 2018,16(7):1423-1436
- Iba T, Ogura H. Role of extracellular vesicles in the development of sepsis - induced coagulopathy[J]. *J Intensive Care*, 2018,6:68
- Nomura S, Shimizu M. Clinical significance of procoagulant microparticles[J]. *J Intensive Care*, 2015,3(1):2
- Delabranche X, Quenot JP, Lavigne T, *et al.* Early detection of disseminated intravascular coagulation during septic shock: a multicenter prospective study[J]. *Crit Care Med*, 2016,44(10):e930-e939
- Mooberry MJ, Bradford R, Hobl EL, *et al.* Procoagulant microparticles promote coagulation in a factor XI - dependent manner in human endotoxemia[J]. *J Thromb Haemost*, 2016,14(5):1031-1042
- Baker JV, Huppler HK, Bradford RL, *et al.* Circulating levels of tissue factor microparticle procoagulant activity are reduced with antiretroviral therapy and are associated with persistent inflammation and coagulation activation among HIV - positive patients[J]. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2013,63(3):367-371

(收稿日期:2019-03-04)

(修回日期:2019-04-11)