

doi: 10.3969/j.issn.1674-1242.2023.01.004

# 血清替代培养法使血清外泌体干扰最小化

王丹, 韩晓梅, 张超, 周越

(上海交通大学生物医学工程学院, 上海 200030)

**【摘要】** 外泌体是细胞之间及细胞和细胞外基质之间信号交流的途径之一。近年来, 对外泌体的研究呈现显著增长的趋势。在体外细胞培养系统中, 为保证细胞正常的生理状态, 血清是培养液中必须添加的成分。随之而来的问题是, 由于血清中含有大量外泌体, 其数量数倍于研究中需要进行针对性研究的特定外泌体, 从而对特定外泌体的定量和分析造成了干扰。为了去除培养液血清中的外泌体, 很多研究者采用差速离心法、密度梯度离心法等进行处理。该研究通过流式细胞分析对外泌体定量后发现, 加入 2% 血清的培养液在进行差速离心处理后, 外泌体数量减少了 30.6%; 而加入 5% 的血清培养液, 外泌体数量下降了 32.4%。由此可见, 差速离心处理对不同浓度血清的培养液结果类似, 只能去除约 30% 的血清外泌体, 留下约 70% 的血清外泌体, 仍然会对实验数据造成干扰。因此, 在人脐静脉内皮细胞体外培养系统中, 该研究探索了一种新型血清替代培养法, 即以无生物成分的血清替代物 XerumFree 替代培养液中的大部分血清, 经过对一系列配比进行探索发现, 当 XerumFree 与胎牛血清 FBS 体积比为 15:1 时, 细胞既可以正常生长, 又可以分泌外泌体, 而背景中外泌体干扰程度降低到 2%, 从而较好地解决了外源性外泌体形成的背景干扰问题, 为体外研究外泌体提供了明确的参考方案。

**【关键词】** 外泌体; 细胞培养; 差速离心; 血清**【中图分类号】** Q-31**【文献标志码】** A

文章编号: 1674-1242(2023)01-0042-08

## Serum Substitution Culture Method Minimizes the Interference of Serum Exosomes

WANG Dan, HAN Xiaomei, ZHANG Chao, ZHOU Yue

(School of Biomedical Engineering, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200030, China)

**【Abstract】** Exosomes are a unique pathway of cell-cell and cell-matrix communication media, which has aroused increasing research interest. In cell culture systems, to maintain normal physiological function of the cell, fetal bovine serum (FBS) is a nearly indispensable additive in the cell culture medium. The consequent problem is that the serum contains a large number of exosomes, several times more than the specific exosomes in the study that need to be targeted, which causes interference in the quantitation and analysis of specific exosomes. Therefore, many studies applied differential centrifugation or density gradient centrifugation to remove the serum exosomes from the culture medium. In this study, we analyzed the decrease percentage of the exosomes from medium with

收稿日期: 2022-12-15

基金项目: 上海市科委“科技创新行动计划”实验动物研究领域项目(16140901900)。

作者简介: 王丹(1991—), 女, 硕士研究生, 就职于康成生物公司。

通讯作者: 周越, E-mail: yzhou2009@sjtu.edu.cn。

the addition of different amount of FBS by fluorescence activated flow cytometry (FACS). We found that when cell culture medium was supplemented with 2% FBS, the amount of exosome dropped 30.6% after differential centrifugation. When supplemented with 5% FBS, the amount of exosome dropped 32.4%. Differential centrifugation brought no significant difference between the decreasing of the amount of the exosomes in media with different percentages of the FBS, suggesting that the maximum amount of the exosomes can be removed by differential centrifugation is around 30%, while there is still 70% interference remains. Therefore, human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) culture system was used to test the minimum FBS to maintain normal cell function and exosome secretion. A serum substitute XerumFree without any biological components was used to replace partial of the FBS. Our results showed that the ratio of 15 (XerumFree) to 1 (FBS) is the best condition to maintain normal cell function and exosome secretion while the interference of FBS was the minimum (less than 2%). The results from the study provide useful reference and a solid basis to exosome related research.

**【Key words】** Exosome; Cell Culture; Differential Centrifugation; Serum

## 0 引言

根据最新的研究进展,细胞在进行信息传递时,除了通过可溶性分子、细胞连接等途径,还可以通过分泌外泌体来影响其他相邻的细胞。外泌体(exosome)是直径为30~100nm的囊泡结构,由细胞内的多囊泡体向外与细胞膜融合分泌而成<sup>[1]</sup>,富含胆固醇和鞘磷脂。很多细胞都释放外泌体,包括内皮细胞<sup>[2]</sup>、肿瘤细胞<sup>[3]</sup>、网状细胞<sup>[4]</sup>、树突细胞<sup>[5]</sup>、肥大细胞<sup>[6]</sup>、B细胞<sup>[7]</sup>、T细胞<sup>[8]</sup>等。外泌体携带的mRNA可进入胞浆中被翻译成蛋白质。外泌体也可携带特定的miRNA,在进入靶细胞后调节其对应的靶mRNA水平<sup>[9]</sup>。外泌体还经常携带调节囊泡膜与受体细胞膜融合的Rab蛋白<sup>[10]</sup>、具有外泌体膜交换及融合作用的整合膜蛋白<sup>[11]</sup>、参与其运输的跨膜蛋白超家族蛋白<sup>[12]</sup>(CD9、CD63、CD81)、热休克蛋白家族<sup>[13]</sup>、细胞特异性蛋白<sup>[14]</sup>、多种代谢相关酶及泛素<sup>[15]</sup>等,参与并调控细胞的多种生命活动。

近年来,有关外泌体的研究大量涌现,内容涉及生命科学研究的诸多方面。在心血管疾病(Cardiovascular Disease, CVD)方面,研究者发现,减少人心脏成纤维细胞对外泌体的摄取可以限制胶原蛋白和纤维化在心脏中的沉积<sup>[16]</sup>。另外,外泌体miRNA可以调节血管生成相关因子的表达,调节内皮细胞增殖和迁移,最终影响血管生成,并在CVD的发生、发展过程中发挥重要作用。例如,来自心肌梗死患者血清中的外泌体miRNA-143可以通过靶向胰岛素样生长因子1受体和增强一氧化氮的产生来促进心脏内皮细胞的血管生成<sup>[17]</sup>,外泌体miR-132在体外也可促进心肌梗死中血

管的生成<sup>[18]</sup>。除此之外,外泌体miRNA还可以为CVD的诊断提供帮助。例如,与CVD相关的外泌体miRNA(包括miR-192、miR-194、miR-34a)水平在急性心肌梗死和心力衰竭患者中上调<sup>[19]</sup>,有可能被用作诊断标志物。在免疫学中,肥大细胞在接受丙型肝炎病毒E2包膜糖蛋白的刺激后,会分泌大量含miR-490的外泌体以抑制肿瘤细胞的转移<sup>[20]</sup>。外泌体miR-934可以通过下调PTEN表达和激活PI3K/AKT信号通路来诱导M2巨噬细胞极化<sup>[21]</sup>。而M1巨噬细胞的外泌体可以通过下调肿瘤细胞的PD-L1水平来增强T淋巴细胞反应<sup>[22]</sup>。外泌体与肿瘤生长、转移和免疫调节有着密切的联系<sup>[23-24]</sup>。例如,外泌体miR-15b-3p可以通过靶向半胱天冬酶-3和半胱天冬酶-9来促进胃癌细胞的迁移和侵袭<sup>[25]</sup>。血清外泌体miR-1247-3p水平与肝癌患者的肺转移有关<sup>[26]</sup>。除此之外,有研究者认为可以通过检测外泌体中预测癌症的一些生物标志物来提高肿瘤早期诊断的特异性和敏感性。例如,乳腺癌细胞的外泌体中富含miR-1246和miR-21<sup>[27]</sup>,miR-638可用作结直肠癌的诊断标志物<sup>[28]</sup>。在癌症的预后中,外泌体miRNA-21被证明可以作为肝细胞癌的新型预后标志物和治疗靶点<sup>[29]</sup>。尿外泌体miRNA(miR-21、miR-451及miR-636)也被发现可以作为预测前列腺癌患者癌细胞转移和预后的无创标志物<sup>[30]</sup>。

细胞培养需要在培养液中加入血清,一般是胎牛血清(Fetal Bovine Serum, FBS)或小牛血清。血清本身富含外泌体,一般需要进行针对性研究的特定外泌体数量只占血清外泌体数量的1%,甚至更低。因此,在体外培养体系研究外泌体功能时,去除血清外泌体

干扰对实验数据的准确性至关重要。目前从大量的文献报道中可以发现,最常用的去除血清外泌体的方法是差速离心法,即通过逐步提高离心速度,在离心力为 10 000~20 000g 的条件下,去除一些质量较大的杂质。然后,进行超速离心,将离心力提高至 100 000~150 000g,延长离心时间,将囊泡与粒子分离出去。这种方法相对直接,但难以统一标准,很多研究中去除血清外泌体的效果良莠不齐,重复性差<sup>[31]</sup>。有报道称,相对较短时间(1 小时)的超速离心只能降低外泌体浓度的 50%左右,而相对较长时间(大于 6 小时)的超速离心能降低外泌体浓度的 80%左右,但会造成离心过度,有很多血清中的非外泌体成分也被去除,影响后期的细胞培养<sup>[32]</sup>。密度梯度离心法也有报道,此方法可将密度相对较低的外泌体和其他囊泡、粒子、蛋白加以区分,但是所需离心时间较长,一般为 16 小时。个别报道表明某些囊泡达到平衡密度甚至需要 62~90 小时<sup>[33]</sup>,如果时间不足,则除杂效果难以保证。无论是差速离心法还是密度梯度离心法,都有可能破坏囊泡膜,导致其内的 RNA 与蛋白泄漏,对细胞造成的影响不可预估。另外,凝胶过滤层析法也有应用,然而在去除外泌体时,一些与外泌体体积相近的成分也被同时清除<sup>[34]</sup>。此外,商品化的无外泌体血清也有报道。但有研究表明,某些商品化的“去除外泌体的血清”会显著降低细胞的增殖能力,整联蛋白相关的一系列蛋白的表达也相对降低<sup>[35]</sup>。

鉴于上述这些问题,本研究旨在给出一个既简单又相对容易统一的去除血清外泌体的最优方案,在把外界引入的外泌体干扰降到最低的同时,不影响研究对象的正常生长功能和外泌体分泌,以保证外泌体体外研究环境的精确性,提高实验结果的可靠性。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞培养

本研究所使用的人脐静脉内皮细胞(HUVECs)由上海交通大学杨国源教授课题组馈赠,培养条件为 37℃,5%CO<sub>2</sub>,细胞正常传代采用内皮细胞基础培养液(ECM, ScienCell, USA),添加 1%内皮细胞生长添加物、1%青霉素/链霉素、5%FBS。在外泌体实验中,采用 M200 低血清培养液(M200, LSGS kit, Thermo, USA),此培养液仅需添加 2%的 FBS,其

他条件与上述内皮细胞正常培养条件一致。

### 1.2 外泌体提取

将细胞培养至形成单层时,换液继续培养 24 小时。吸取细胞上清液 1.5ml,室温下以 2 000g 的离心力离心 30 分钟,去除细胞碎片,将 1ml 上清液与 0.5ml 外泌体分离液(Thermo Fisher Scientific, USA)混匀,在 4℃温度下孵育过夜。以 10 000g 的离心力 4℃离心 1 小时,去上清液,沉淀加入外泌体重悬液,即可得到外泌体溶液。

### 1.3 透射电镜检测外泌体

使用 2.5%戊二醛固定 2 小时,吸取 15μl 的样品滴于带有支持膜的铜网上,放置 15 分钟。于烘灯下处理 5 分钟,将多余液体蒸发完全。用 1%磷酸钨染液负染 1 分钟后烘干,用透射电镜(JEM-ARM200F, JEOL, JPN)进行观察。

### 1.4 蛋白质印记

外泌体重悬液用 BCA 蛋白质浓度测定试剂盒(Merck Millipore, GER)定量,加载样缓冲液变性后,使用 SDS-PAGE 电泳(Bio-Rad, USA)进行分离。通过半干法转膜系统(Bio-Rad, USA)将蛋白转印于 PVDF 膜(Merck Millipore, GER)上,室温下封闭 90 分钟。使用 exosome-CD63 第一抗体(1:250, Thermo Fisher Scientific, USA)和辣根过氧化物酶(Horseradish peroxidase, HRP)标记的第二抗体(Jackson Immuno Research Laboratories, USA)检测,HRP 底物化学发光检测试剂盒(Merck Millipore, GER)显色,用 Tanon 1200+成像系统(Tanon, CHN)进行图像采集和定量分析。

### 1.5 外泌体的流式分析

配制 0.1% BSA-PBS 的分离缓冲液,用 0.2μm 滤器过滤。使用 exosome-CD63 分离检测磁珠(Thermo Fisher Scientific, USA)剧烈震荡 30 秒,得到均匀的重悬液。吸取 20μl CD63 磁珠悬液,加 200μl 分离缓冲液吹匀清洗,磁铁作用 1 分钟沉降磁珠,去上清。加入外泌体重悬液后,在 4℃温度下结合 18 小时。离心后再加入分离缓冲液清洗,磁铁作用 1 分钟沉降结合了磁珠的外泌体,清洗后用分离缓冲液重悬。

以不加抗体标记的外泌体磁珠样品作为阴性对照,将 CD63-PE 流式抗体(BD, USA)加入 CD63-磁珠标记的外泌体,室温下避光孵育 45~60 分钟。用

分离缓冲液吹匀清洗,用磁铁沉降磁珠。清洗重悬,得到样品,用BD Accuri™C6流式细胞仪进行检测,固定体积条件下比较阳性事件的个数。

## 2 结果与分析

### 2.1 胎牛血清中存在大量外泌体

直接从血清中提取外泌体后,使用透射电镜(Transmission Electron Microscope, TEM)对外泌体进行观察。使用重金属盐对铺展在载网上的样品进行染色后,无外泌体的凹陷处铺了一薄层重金属盐,但外泌体所在的凸出处没有染料沉积,从而出现负染效果,表现为明亮的球状囊泡,如图1(a)所示。由于牛和人的CD63高度同源,蛋白质印迹结果显示,蛋白样品经SDS-PAGE分离,可通过抗人CD63抗体检测到CD63表达,如图1(b)所示。由此证明,FBS中存在大量外泌体,势必对细胞外泌体的提纯与检测带来巨大干扰。

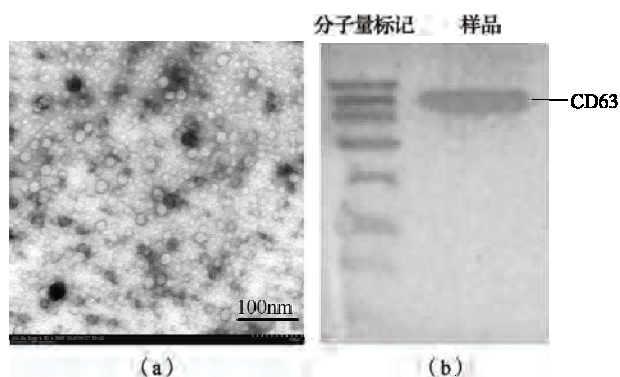


图1 血清外泌体的检测

Fig.1 Detection of exosomes in serum

(a) 胎牛血清中分离的外泌体 TEM 照片

(b) CD63 在外泌体上的表达

(a) TME image of exosomes isolated from FBS;

(b) Expression of CD63 on exosomes

### 2.2 不同血清浓度经差速离心处理后外泌体的定量分析

如图2(a)~(c)所示,内皮细胞基础培养液(ECM, ScienCell, USA)添加5%FBS, M200基础培养液(LSGS kit, Thermo, USA)添加2%FBS,采用差速离心法,在10 000g的离心力下高速离心预处理FBS,然后在100 000g的离心力和4℃温度下离心18小时(Beckman Coulter Optima L-100XP, USA),获得外泌体。TEM结果显示,普通培养液(ECM)在加

入5%FBS的情况下,从上清液中抽提的外泌体数量最多。离心处理后,ECM'外泌体量下降了约32.4%,如图2(d)~(f)所示。只含有2%血清的M200培养液的外泌体数量约为ECM的64.2%,此数据正好与减少的血清量(60%)对应。进行离心处理后, M200'外泌体数量比M200降低了约30.6%。可见,对于不同血清浓度的培养液,差速离心只能去除约30%的血清外泌体,明显不能达到去除外泌体背景的效果。而血清浓度从5%降低到2%(降低60%),抽提的外泌体数量则相应降低了64%左右。因此设想,如果使用血清培养替代物最大限度地减少血清用量,很可能会明显改善由血清造成的背景外泌体的干扰。

### 2.3 血清替代物 XerumFree 对细胞生长的影响

基于上文的结论,我们试图采用无生物成分的血清替代物 XerumFree (XerumFree, TNCBIO, NL)来代替FBS培养细胞。结果发现,完全采用 XerumFree 代替FBS进行培养,细胞会凋亡,无法正常生长。为了不改变细胞的正常生理功能,同时尽可能降低FBS所占比重,我们尝试采用无生物成分的血清替代物 XerumFree 加部分超速离心处理过的血清,以补充维持细胞正常生理功能所需营养不足的部分,同时保证血清加 XerumFree 的总量占培养液的5%不变。正常传代生长的HUVECs按 $10^6$ 个细胞/孔的密度接种于六孔板进行实验, XerumFree 与FBS的比例分别为0、1:3、1:1、3:1、1:1。结果表明,除了完全不加血清、只采用血清替代物的第五组,其他组的细胞皆可正常贴壁。经过第二天1/4旧培养液+3/4新鲜培养液的适应期,到第三天,前四组细胞均可大量增殖,如图3(a)所示。选取经过第一次适应期的第四组细胞(3:1),将 XerumFree 与FBS的比例分别调成7:1、15:1、1:1进行培养,结果显示,当比例为15:1时,细胞可正常生长。而在完全不使用血清的情况下,即使经过第一阶段的低血清适应期,细胞仍不能正常生存,如图3(b)所示。将中间组细胞(15:1)继续传代,将 XerumFree 与FBS的比例降低至31:1,此时细胞无法正常存活, FBS浓度无法继续降低。结果表明,在逐步适应低血清培养环境的情况下,细胞可在 XerumFree 与FBS的比例为15:1时正常贴壁、增殖。由于添加物总浓度为5%,故培养液中FBS的总比例降至3.125%。

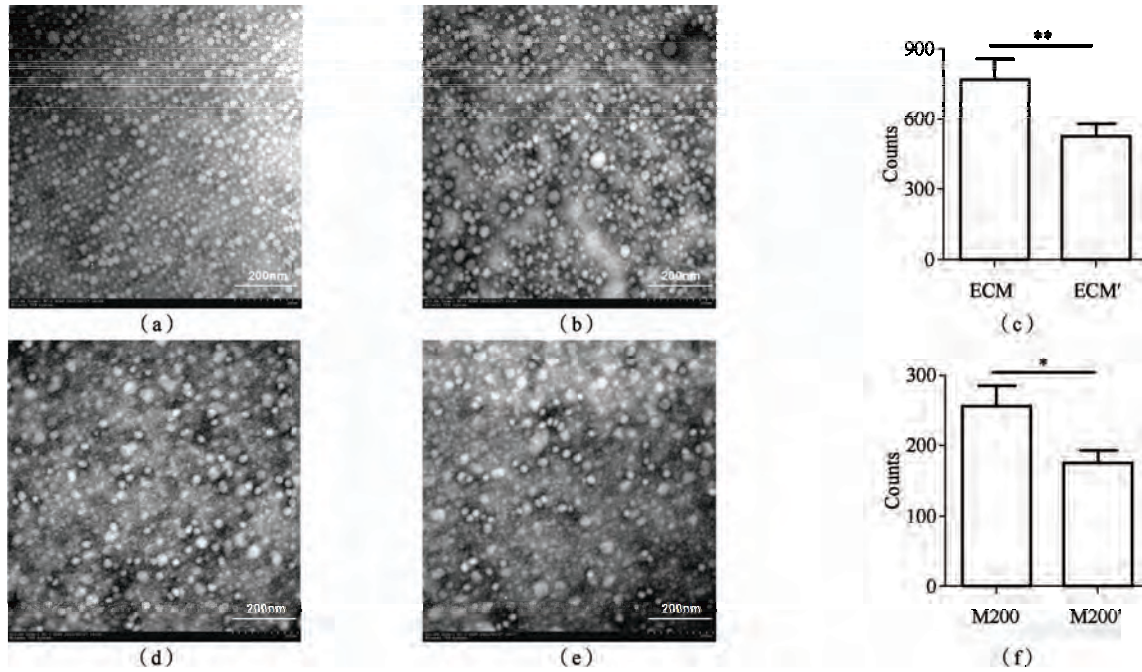


图 2 含有 2%和 5%血清的培养液经差速离心处理后分离的外泌体定量分析

**Fig.2 Quantitation of the exosomes isolated from cultured media with 2% and 5% serum treated with differential centrifugation**

(a) 从含 5%FBS 的 ECM 中分离出外泌体的 TEM 照片；(b) 从做超离心处理的含 5% FBS 的 ECM (ECM') 中分离出外泌体的 TEM 照片；(c) ECM 和 ECM'外泌体的数量分析；(d) 从含 2% FBS 的 M200 中分离出外泌体的 TEM 照片；(e) 从做超离心处理的含 2% FBS (M200') 中分离出外泌体的 TEM 照片；(f) M200 和 M200'外泌体的数量分析 (TEM 比例尺：200nm；\* $P<0.05$ )

(a) TEM images of exosomes isolated from ECM containing 5%FBS; (b) TEM images of exosomes isolated from ultracentrifuged ECM containing 5% FBS (ECM'); (c) Quantitative analysis of exosomes isolated from ECM and ECM'; (d) TEM images of exosomes isolated from M200 containing 2% FBS;

(e) TEM images of exosomes isolated from ultracentrifuged M200 (M200') containing 2% FBS;

(f) Quantitative analysis of exosomes isolated from M200 and M200' (TEM image, scale : 200nm; \* $P<0.05$ )

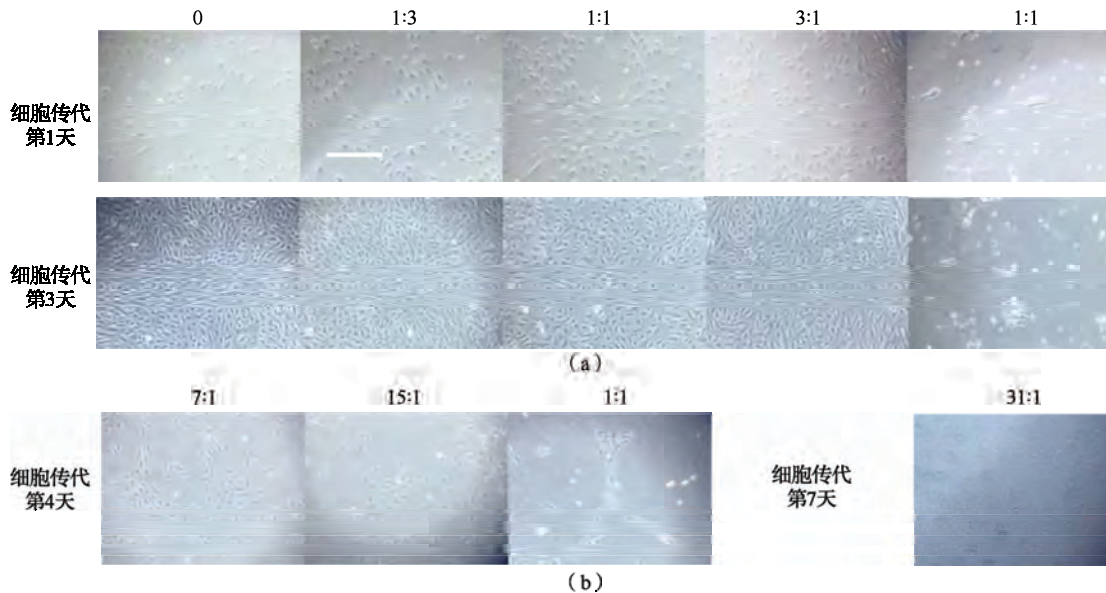


图 3 内皮细胞培养液 XerumFree/FBS 培养 HUVECs 的光镜观察

**Fig.3 HUVECs cultured by Endothelial Cell Medium with XerumFree/FBS under light microscopy**

(a) HUVECs 在含 5% XerumFree:FBS 的内皮细胞培养液中培养 3 天，浓度比分别为 0、1:3、1:1、3:1、1:1；

(b) 从 XerumFree:FBS 比例为 3:1 的培养液中继代培养 HUVECs，新的比例分别为 7:1、15:1、1:1 (比例尺：100µm)

(a) HUVECs were cultured in endothelial cell medium containing 5% XerumFree: FBS for 3 days with concentration ratios were:0, 1:3, 1:1, 3:1, 1:1;

(b) Subculture HUVECs from XerumFree: FBS culture medium with a ratio of 3:1, and the new ratios were:7:1, 15:1, 1 (Scale: 100µm)

## 2.4 血清替代物 XerumFree 的浓度差异对细胞外泌体分泌的影响

使用 CD63 磁珠标记外泌体,并用 CD63-PE 的流式抗体染色后,进行 FACS 实验。为确保统计的准确性,每次计数的总体积均为 80 $\mu$ l。XerumFree 与 FBS 的比例为 0、1:1、3:1、7:1、15:1、31:1。图 4 (a) 显示的是无细胞状态的空白组,即直接从培养液中提取外泌体检测。实验发现,随着 FBS 浓度的降低和 XerumFree 浓度的增加,外泌体数量呈降低趋势。加入细胞后 [见图 4 (b)],按照相同血清浓度梯度配制培养液培养细胞,对从上清液中抽提的外泌体进行

FACS 检测,也可看出相似的降低趋势,血清浓度始终与外泌体数量呈正相关关系。从细胞培养上清液中提取的外泌体显著多于空白培养液的对照组,表明在我们设定的培养条件下,细胞可正常分泌外泌体。当 FBS 占添加物的 1/8 左右时,细胞分泌的外泌体数量突然增加;而当 FBS 与 XerumFree 各占一半时,细胞分泌的外泌体数量与直接用 5% FBS 培养细胞得到的外泌体数量并无差别,因而外泌体提取量保持在一个稳定水平,如图 4 (c) 所示。当 XerumFree 与 FBS 的比例为 15:1 时,可在保持细胞分泌的情况下,将背景中的外泌体数量降至最少,如图 4 (c)、(d) 所示。

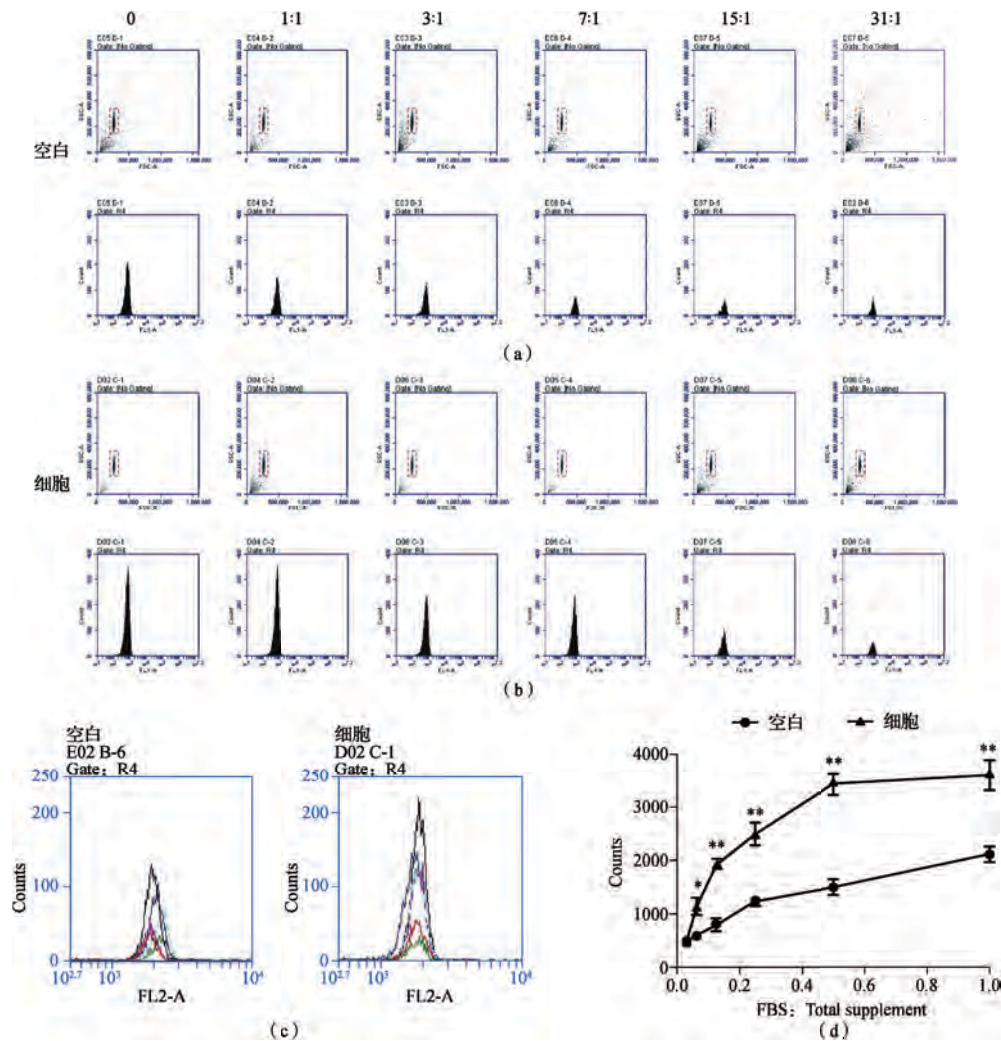


图 4 不同浓度 FBS 培养 HUVECs 上清液分离的外泌体分析

Fig.4 Analysis of exosomes isolated from supernatant of HUVECs cultured with different concentration of FBS

(a) 从含 5% XerumFree/FBS 的 ECM 中分离的 CD63-外泌体的流式分析,浓度比为 0、1:1、3:1、7:1、15:1、31:1;

(b) 从 HUVECs 上清液中分离的 CD63-外泌体的流式分析; (c)、(d) 阳性计数比较,  $n=3$ ,  $*P<0.05$

(a) Flow analysis of CD63-exosomes isolated from ECM containing 5% XerumFree/FBS with concentration ratios of 0, 1:1, 3:1, 7:1, 15:1, 31:1;

(b) Flow analysis of CD63-exosomes isolated from HUVECs supernatant; (c)、(d) Comparison of positive counts,  $n=3$ ,  $*P<0.05$

### 3 讨论

外泌体近年来被发现广泛存在于体液中，是一类特殊的携带多种蛋白、mRNA、miRNA，经由特定程序分泌的，有一定直径范围的微小膜泡结构，参与细胞间的信息传递与调控，涉及免疫应答、抗原提呈、细胞迁移、细胞分化、肿瘤侵袭等方方面面。

在外泌体的研究中，去除血清中的外泌体干扰这一步骤至关重要。FBS 中的外泌体会影响细胞表型。例如，未经处理的 FBS 及从中抽提的外泌体成分，都可以促进肺癌表皮细胞迁移，FBS 中的 RNA 也不被 RNase A 降解<sup>[36]</sup>，对细胞产生的效应甚至会覆盖实验组本身造成的影响。我们首先直接对培养液进行检测，发现从培养液中就可提取出大量外泌体，牛与人的外泌体表面标记蛋白序列同源度极高，分子量相近，使用蛋白印记法无法区分。因此，如果对 FBS 的外泌体不做处理，后续实验将难以进行。

到目前为止，去除血清外泌体的方法有差速离心法、密度梯度离心法、凝胶过滤层析法、免疫捕获法、场流分级法<sup>[37]</sup>等，其中差速离心法是最常用的一种。我们首先参照文献报道，使用传统的差速离心法来处理血清，在 100 000g 的离心力下，超速离心 1 小时、6 小时、18 小时后，去除外泌体的效果并不理想。因此，我们减少了细胞培养液的血清用量。M200 是一种只需要加入较少血清的培养液，培养效果与传统的 ECM 一致。我们将添加 2% 血清的 M200 和传统的添加 5% 血清的 ECM 进行了比较，结果发现，使用差速离心法处理后，两者都可以显著降低血清外泌体总量约 30%，结果远没有达到令人满意的水平。然而，血清水平确实直接影响了引入实验体系的外泌体总量。这提示我们，直接从减少血清加入量入手，将引入培养液的外源性外泌体数量降至最低水平，这一思路是可行的。

目前，国外有几种商品化去除外泌体的血清，由于卫生检疫等因素，我国尚未进口。因此，本研究采用的无生物成分的 XerumFree 是目前最可行的选择。利用 HUVECs 培养体系，我们试验了血清替换培养的可行性，并确定了最佳替换比例。结果表明，随着 FBS 浓度的降低，无论是培养液组还是上清液组，收集的外泌体数量都呈下降趋势。从细胞培养上清液中提取的外泌体显著多于空白培养液的对照组，表明在我们设定的培养条件下，细胞可正常分泌外泌体。因此，

当 XerumFree 与 FBS 的比例为 15:1 时，可在保持细胞分泌的情况下，将背景中的外泌体数量降至最少。由此可见，内皮细胞基础培养液 ECM，补充 0.32% FBS 和 4.68% XerumFree，即可达到减少背景干扰，同时不影响实验结果的目的，这是最佳方案。

我们通过血清替代物与血清搭配，提高了外泌体实验结果的可靠性与可重复性，为体外培养系统中外泌体的研究提供了有价值的参考数据和方便合理的解决方案。

#### 参考文献

- LOTVALLI J, VALADI H. Cell to Cell Signalling Via Exosomes through esRNA[J]. *Cell Adhesion & Migration*, 2007, 1:156-8.
- BANG C, THUM T. Exosomes: New Players in Cell-cell Communication[J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2012, 44:2060-4.
- IERO M, VALENTI R, HUBER V, *et al.* Tumour-released Exosomes and Their Implications in Cancer Immunity[J]. *Cell Death and Differentiation*, 2008, 15:80-8.
- GRIFFITHS R E, KUPZIG S, COGAN N, *et al.* The Ins and Outs of Human Reticulocyte Maturation: Autophagy and the Endosome/Exosome Pathway[J]. *Autophagy*, 2012, 8:1150-1.
- LIU Q, ROJAS-CANALES D M, DIVITO S J, *et al.* Donor Dendritic Cell-derived Exosomes Promote Allograft-targeting Immune Response[J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2016, 126:2805-20.
- CHEN B, LI M Y, GUO Y, *et al.* Mast Cell-derived Exosomes at the Stimulated Acupoints Activating the Neuro-immuno Regulation[J]. *Chinese Journal of Integrative Medicine*, 2017, 23(11): 878-880.
- SHENODA B B, AJIT S K. Modulation of Immune Responses by Exosomes Derived from Antigen-Presenting Cells[J]. *Clinical Medicine Insights Pathology*, 2016, 9:1-8.
- VENTIMIGLIA L N, ALONSO M A. Biogenesis and Function of T Cell-Derived Exosomes[J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2016, 4:84.
- VALADI H, EKSTROM K, BOSSIOS A, *et al.* Exosome-mediated Transfer of mRNAs and MicroRNAs is a Novel Mechanism of Genetic Exchange between Cells[J]. *Nature Cell Biology*, 2007, 9:654-9.
- OSTROWSKI M, Carmo N B, KRUMEICH S, *et al.* Rab27a and Rab27b Control Different Steps of the Exosome Secretion Pathway[J]. *Nature Cell Biology*, 2010, 12:19-30; sup pp 1-13.
- SCHEY K L, LUTHER J M, ROSE K L. Proteomics characterization of exosome cargo[J]. *Methods (San Diego, Calif)*, 2015, 87:75-82.
- STICKNEY Z, LOSACCO J, McDEVITT S, *et al.* Development of

- Exosome Surface Display Technology in Living Human Cells[J]. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2016, 472:53-9.
- [13] LANCASTER G I, FEBBRAIO M A. Exosome-dependent Trafficking of HSP70: a Novel Secretory Pathway for Cellular Stress Proteins[J]. **The Journal of Biological Chemistry**, 2005, 280:23349-55.
- [14] GONZALEZ-BEGNE M, LU B, HAN X, *et al.* Proteomic Analysis of Human Parotid Gland Exosomes by Multidimensional Protein Identification Technology (MudPIT) [J]. **Journal of Proteome Research**, 2009, 8:1304-14.
- [15] BUSCHOW S I, LIEFHEDBER J M, WUBBOLTS R, *et al.* Exosomes Contain Ubiquitinated Proteins[J]. **Blood Cells, Molecules & Diseases**, 2005, 35:398-403.
- [16] KUO H, HSIEH C, WANG S, *et al.* Simvastatin Attenuates Cardiac Fibrosis Via Regulation of Cardiomyocyte Derived Exosome Secretion[J]. **Journal of Clinical Medicine**, 2019, 8: E794.
- [17] GENG T, SONG Z Y, XING J X, *et al.* Exosome Derived from Coronary Serum of Patients with Myocardial Infarction Promotes Angiogenesis Through the miRNA-143/IGF-IR Pathway[J]. **Int J Nanomedicine**, 2020, 15: 2647-2658.
- [18] MA T, CHEN Y, CHEN Y, *et al.* MicroRNA-132, Delivered by Mesenchymal Stem Cell-derived Exosomes, Promote Angiogenesis in Myocardial Infarction[J]. **Stem Cells International**, 2018, 3290372.
- [19] MATSUMOTO S, SAKATA Y, SUNA S, *et al.* Circulating p53-responsive MicroRNAs are Predictive Indicators of Heart Failure After Acute Myocardial Infarction[J]. **Circ Res**, 2013, 113(3): 322-326.
- [20] XIONG L, ZHEN S, YU Q, *et al.* HCV-E2 Inhibits Hepatocellular Carcinoma Metastasis by Stimulating Mast Cells to Secrete Exosomal Shuttle MicroRNAs[J]. **Oncol Lett**, 2017, 14: 2141-6.
- [21] ZHAO S, MI Y, GUAN B, *et al.* Tumor-derived Exosomal miR-934 induces Macrophage M2 Polarization to Promote Liver Metastasis Of Colorectal Cancer[J]. **J Hematol Oncol**, 2020, 13(1):156.
- [22] LI Z, SUO B, LONG G, *et al.* Exosomal miRNA-16-5p Derived From M1 Macrophages Enhances T Cell-Dependent Immune Response by Regulating PD-L1 in Gastric Cancer[J]. **Front Cell Dev Biol**, 2020, 8:572689.
- [23] POGGIO M, HU T, PAI -C-C, *et al.* Suppression of Exosomal PD-L1 induces Systemic Anti-Tumor Immunity and Memory[J]. **Cell**, 2019, 177(2):414.
- [24] SANDERSON R D, BANDARI S K, VLODAYSKY I. Proteases and glycosidases on the Surface Of Exosomes: Newly Discovered Mechanisms for Extracellular Remodeling[J]. **Matrix Biol**, 2019, 75-76, 160-169.
- [25] WEI S, PENG L, YANG J, *et al.* Exosomal Transfer of miR-15b-3p Enhances Tumorigenesis and Malignant Transformation through the DYNLT1/Caspase-3/Caspase-9 Signaling Pathway in Gastric Cancer[J]. **J Exp Clin Cancer Res**, 2020, 39:32.
- [26] FANG T, LV H, LV G, *et al.* Tumor-derived Exosomal miR-1247-3p induces Cancer-Associated Fibroblast Activation to Foster Lung Metastasis of Liver Cancer[J]. **Nat Commun**, 2018, 9(1): 191.
- [27] HANNAFON B N, TRIGOSO Y D, CALLOWAY C L, *et al.* Plasma Exosome microRNAs are Indicative of Breast Cancer[J]. **Breast Cancer Res**, 2016, 18(1):90.
- [28] YAN S, DANG G, ZHANG X, *et al.* Downregulation of Circulating Exosomal miR-638 Predicts Poor Prognosis in Colon Cancer Patients[J]. **Oncotarget**, 2017, 8(42): 72220-72226.
- [29] LEE Y R, KIM G, TAK W Y, *et al.* Circulating Exosomal Noncoding RNAs as Prognostic Biomarkers in Human Hepatocellular Carcinoma[J]. **Int J Cancer**, 2019, 144(6): 1444-1452.
- [30] SHIN S, PARK Y H, JUNG S H, *et al.* Urinary Exosome microRNA Signatures as a Noninvasive Prognostic Biomarker for Prostate Cancer[J]. **NPJ Genom Med**, 2021, 6(1): 45.
- [31] TAYLOR D D, SHAH S. Methods of Isolating Extracellular Vesicles Impact Down-Stream Analyses of Their Cargoes[J]. **Methods** (San Diego, Calif), 2015, 87:3-10.
- [32] EITAN E, ZHANG S, WITWER K W, *et al.* Extracellular Vesicle-Depleted Fetal Bovine and Human Sera Have Reduced Capacity to Support Cell Growth[J]. **Journal of Extracellular Vesicles**, 2015, 4:26373.
- [33] PALMA J, YADDANAPUDI S C, PIGATI L, *et al.* MicroRNAs are Exported from Malignant Cells in Customized Particles[J]. **Nucleic Acids Research**, 2012, 40(18): 9125-9138.
- [34] TAYLOR D D, ZACHARIAS W, GERCEL-TAYLOR C. Exosome Isolation for Proteomic Analyses and RNA Profiling[J]. **Methods in Molecular Biology** (Clifton, NJ), 2011, 728:235-246.
- [35] ANGELINI F, IONTA V, ROSSI F, *et al.* Foetal Bovine Serum-Derived Exosomes Affect Yield and Phenotype of Human Cardiac Progenitor Cell Culture[J]. **BiolImpacts**, 2016, 6:15-24.
- [36] EITAN E, ZHANG S, WITWER K W, *et al.* Extracellular Vesicle-Depleted Fetal Bovine and Human Sera Have Reduced Capacity to Support Cell Growth[J]. **Journal of Extracellular Vesicles**, 2015, 4: 26373.
- [37] WITWER K W, BUZAS E I, BEMIS L T, *et al.* Standardization of Sample Collection, Isolation and Analysis Methods in Extracellular Vesicle Research[J]. **Journal of Extracellular Vesicles**, 2013, 2: 20360.
- [38] SHELKE G V, LASSER C, GHO Y S, *et al.* Importance of Exosome Depletion Protocols to Eliminate Functional and RNA-containing Extracellular Vesicles from Fetal Bovine Serum[J]. **Journal of Extracellular Vesicles**, 2014, 3: 24783.