· 论著 ·

冷沉淀中细胞外泌体表征的研究

唐颖怡　陈大伟　谭爱玲　李昕彤　刘宇健　钟慧斌

(广州血液中心 广州医科大学输血与血液病研究所 广州市血液安全重点实验室,广东 广州 510095)

摘要:目的　探索不同血型、性别和年龄阶段来源的冷沉淀中外泌体的种类和水平,对其特异性蛋白进行初步的表征。**方法**　利用聚合物沉淀法提取冷沉淀中的外泌体,通过外泌体粒径分析、透射电镜检测和 Western blot 法对外泌体进行鉴定。最后,利用 Luminex 对外泌体特异性蛋白 CD63、CD81、CD9、Cytochrome C、Syntenin-1 和 VLA-4 进行表征。**结果**　获得纯化的外泌体,镜下呈茶托型或一侧凹陷半球形的双层膜囊泡结构,其特异性表达 CD63 和 TSG101 蛋白,而内质网蛋白 Calnexin 表达为阴性。A 型,B 型,O 型和 AB 型外泌体粒径分别为(119. 6±47. 5) nm,(120. 5±47. 4) nm,(133. 3±54. 1) nm 和(103. 1±35. 3) nm。以外泌体特异性蛋白 CD63 为例,CD63 在女性和男性来源冷沉淀中的表达水平分别为(128. 22±63. 52) pg/mL 和(117. 39±40. 84) pg/mL;在 20~40 和 40~60 周岁两个年龄阶段的表达水平分别为(114. 20±37. 28) pg/mL 和(131. 41±64. 98) pg/mL;在 A 型、B 型、O 型和 AB 型四种血型中的表达水平分别为(109. 58±37. 79) pg/mL、(127. 45±44. 46) pg/mL、(131. 89±40. 59) pg/mL 和(122. 29±78. 68) pg/mL。CD63 在不同血型、性别和年龄阶段来源的冷沉淀中表达水平基本相当,差异无统计学意义(P 均>0. 05)。其余五种外泌体特异性蛋白在正常献血人群中的分布亦相当。**结论**　正常献血者来源的冷沉淀中外泌体特异性蛋白的表达水平与血型、性别和年龄阶段无关。

关键词:冷沉淀;外泌体;特异性蛋白;外泌体表征

中图分类号:R457. $1^{+}4$　R331. $3^{+}4$　　**文献标识码:**A　　**文章编号:**1004-549X(2026)6-0718-07

DOI:10. 13303/j. cjbt. issn. 1004-549x. 2026. 06. 003

Preliminary study on the characterization of exosomes in cryoprecipitate

TANG Yingyi, *CHEN Dawei*, *TAN Ailing*, *LI Xintong*, *LIU Yujian*, *ZHONG Huibin.*

Guangzhou Blood Center, *Institute of Blood Transfusion and Hematology of Guangzhou Medical University*, *The Key Medical Laboratory of Guangzhou*, *Guangzhou* 510095, *China.*

Joint first authors: *TANG Yingyi*, *CHEN Dawei*

Corresponding author: *ZHONG Huibin*, *Email*: 155391670@ *qq. com*

Abstract: Objective　To explore the types and levels of exosomes in cryoprecipitate from donors of different blood types, genders, and age groups, and to preliminarily characterize their specific proteins. **Methods**　Exosomes were extracted from cryoprecipitate using the polymer precipitation method. The exosomes were identified by particle size analysis, transmission electron microscopy, and Western blot. Finally, the specific proteins CD63, CD81, CD9, Cytochrome C, Syntenin-1, and VLA-4 of exosomes were characterized using Luminex. **Results**　The purified exosomes exhibited a double-membrane vesicle structure under microscopy, appearing saucer-shaped or as hemispheres with a concave side. They specifically expressed the CD63 and TSG101 proteins, while the endoplasmic reticulum protein Calnexin was not expressed. The particle sizes(nm) of exosomes from blood types A, B, O, and AB were 119. 6±47. 5, 120. 5±47. 4, 133. 3±54. 1 and 103. 1±35. 3, respectively. Taking the exosomal specific protein CD63 as an example, its expression levels(pg/mL) in cryoprecipitate from female and male donors were 128. 22±63. 52 and 117. 39±40. 84, respectively; the expression(pg/mL) levels in the 20-40 and 40−60 age groups were 114. 20±37. 28 and 131. 41±64. 98, respectively; and the expression levels(pg/mL) in the four blood types A, B, O, and AB were 109. 58±37. 79, 127. 45±44. 46, 131. 89±40. 59, and 122. 29±78. 68, respectively. The expression levels of CD63 in exosomes from different blood types, genders, and age groups were similar, with no statistically significant differences (all P>0. 05). The distribution of the other five exosomal-

基金项目:广东省基础与应用基础研究基金项目(2025A1515010465);广州市市校(院)企联合资助专题(2025A03J3369, 2025A03J3451, 2025A03J3453);广州市医学重点学科(2025-2027 年)项目

并列第一作者简介:唐颖怡(1995-),女,主管护师,Email:709507719@ qq. com;陈大伟(1988-),男,副主任技师,Email:428dawei@ 163. com

通信作者:钟慧斌,Email:155391670@ qq. com

specific proteins was also comparable among the normal blood donors. **Conclusion** The expression levels of exosomal-specific proteins in cryoprecipitate from normal blood donors are not associated with blood type, gender, and age group.

Key words: cryoprecipitate; exosome; specific protein; exosome characterization

输血相关急性肺损伤(transfusion-related acute lung injury,TRALI),是指输入血液或血液制品后 6 h 内,出现以急性低氧血症和非心源性肺水肿为主要表现的临床综合征[1]。按发病原因,TRALI 可分为非抗体介导的 TRALI 和抗体介导的 TRALI。在 20%~28%的 TRALI 病例中,未检测到白细胞抗体,此类病例被描述为非抗体介导的 TRALI[2-3]。非抗体介导的 TRALI 有很多因素,包括供体血液制剂中细胞衍生物质积累和血液制剂“储存损伤”,如溶血磷脂酰胆碱、可溶性 CD40 配体、细胞因子、血小板细胞外囊泡(extracellular vesicles,EV)等[4]。以往的研究已经探索了从不同血液成分中包括血小板和红细胞分离的 EV 的作用[5],例如有研究发现血小板 EV 可以将鞘脂从血小板输送到内皮细胞,通过神经酰胺介导的内皮屏障功能障碍引发 TRALI[6]。临床报道,输注冷沉淀,一种来源于新鲜冰冻血浆并主要用于替代凝血Ⅷ因子和纤维蛋白原制剂的血液成分,也会导致 TRALI 的发生[7-8]。然而,冷沉淀尚未被探索作为可能促进 TRALI 发展的 EV 来源。

EV 是由细胞自然释放的细胞器结构,在细胞生理状态下、损伤/激活和凋亡期间都可以释放。根据大小、生物特性和形成过程的不同,EV 主要分为外泌体(exosome)、微囊泡和凋亡小体三大类,其中外泌体是研究最为广泛的一类[9]。本研究拟检测不同血型、性别和年龄阶段来源冷沉淀中外泌体的特异性蛋白表达情况,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 标本收集

随机抽取广州血液中心 2025 年 7 月至 8 月期间,检测合格的正常献血者,已签署《献血者知情同意及健康状况征询表》,同意血液中心按规定对血液标本进行科研相关检测及使用。按《全血及成分血质量要求》(GB18469-2012)标准采集 400 mL 全血制备的新鲜冰冻血浆 80 袋,速冻后采用水浴虹吸法制备成冷沉淀,并立即速冻储存在-30℃以下。抽样分组规则:1)男性 40 袋,女性 40 袋;2)A 型,B 型,O 型,AB 型各 20 袋;3)20~40 周岁 40 袋,41~60 周岁 40 袋。

1.2 试剂与仪器

醋酸双氧铀(02624-AB,SPI-Chem 公司);Total Exosome Isolation 试剂盒(4484450,Thermo Fisher Scientific 公司);人外泌体表征检测试剂盒(EPX060-15845-901,Invitrogen 公司);PBS 缓冲液(C14190500BT,Gibco 公司);Nanoparticles Tracking Analysis 纳米颗粒追踪分析仪(NTA,Zetaview-PMX120-Z 型号,Particle Metrix 公司);透射电子显微镜(HT7800 型号,HITACHI 公司);液相芯片分析系统(Luminex 200 型号,Thermo Fisher Scientific 公司);聚苯乙烯标准微球(粒径:100nm,货号:3100A,Thermo Fisher Scientific 公司);Calnexin Polyclonal antibody(10427-2-AP,Proteintech 公司);TSG101 Polyclonal antibody(28283-1-AP,Proteintech 公司);CD63 Polyclonal antibody(25682-1-AP,Proteintech 公司);Beta Actin Polyclonal antibody(20536-1-AP,Proteintech 公司);Omni-Easy™ 一步法 PAGE 凝胶快速制备试剂盒(PG213,雅酶公司);SuperSignal™ West Pico PLUS 化学发光底物(34577,Thermo Fisher Scientific 公司);凝胶成像仪(5200 型号,Tanon 公司)。

1.3 聚合物沉淀法提取外泌体

冷沉淀外泌体提取使用 Total Exosome Isolation 试剂盒,操作方法遵循说明书进行。具体操作步骤如下:冷沉淀在 37℃孵育解冻,然后置于冰上待用。解冻后的冷沉淀先进行低速离心预处理,室温条件下以 2 000 g 离心 20 min,以沉淀任何大的碎片或聚集体。将上清液进一步以 10 000 g 离心 20 min,以沉淀较大的细胞外囊泡,随后将离心得到的上清转移至新的离心管。按照 0.5 倍体积的配比加入 1×PBS 缓冲液,充分混匀后,加入 0.05 倍体积的蛋白酶 K。再充分混匀后,置于 37℃孵育 10 min。最后按照 0.2 倍体积的配比加入 Exosome Precipitation Reagent 试剂,该试剂可以与水分子形成聚合物,使难溶性的外泌体从血浆中析出。充分混匀后,4℃静置 30 min,室温条件下 10 000 g 离心 5 min,移除上清,得到的沉淀用 1×PBS 重悬即为外泌体,置于-80℃保存备用。

1.4 NTA 法检测外泌体粒径

利用去离子水清洗样本池后，NTA 仪器以聚苯乙烯标准微球进行校准，再利用 1×PBS 缓冲液清洗样本池。利用 1×PBS 缓冲液对样本进行稀释，然后上机检测。

1.5　外泌体透射电镜检测

将提取纯化的外泌体进行重悬，用移液枪吸取 20 μL 样本滴在方华膜铜网，放置 5～10 min，然后用滤纸吸去多余液体。将 2%醋酸双氧铀滴在支持膜铜网，放置 2 min，用滤纸吸去多余液体，室温干燥。透射电子显微镜下观察，采集图像分析。

1.6　外泌体蛋白免疫印迹（Western blot，WB）法检测

在提取纯化的外泌体中加入 RIPA 裂解液，混匀后置于冰上裂解 30 min，离心后取上层蛋白溶液，最后利用 BCA 法进行蛋白浓度检测。按照要求，配制 12.5% 的 SDS-PAGE 凝胶。待凝胶聚合后，将外泌体裂解液与 5×loading buffer 混匀后，95℃加热 5 min 后放于冰盒上待冷却至 4℃。将样本及蛋白 Maker 加入电泳胶孔内，在 80 V 电压条件下电泳 30 min 至溴酚蓝染料浓缩胶进入分离胶后，将电压调制 120 V 继续电泳 60 min。取 PVDF 膜在甲醇中活化 5 min，然后将膜与滤纸在缓冲液中平衡 15 min，与 SDS-PAGE 电泳完成后，取出凝胶夹层放入加有转移液的实验盘内。利用湿转的方式，在转膜槽 180 mA 条件下转膜 2 h。将转膜后的 PVDF 膜置于 5%脱脂奶粉的 TBST 孵育盒中，室温条件下摇动封闭 1 h。封闭完成后，将膜的蛋白面朝上置放于适当浓度的一抗稀释液中，4℃脱色摇床上摇动孵育过夜，室温下 TBST 摇动洗 3 次，每次 10 min。合适稀释倍数下，稀释相应的二抗，将 PVDF 膜在室温条件下孵育 1 h。TBST 摇动洗 3 次，每次 10 min。将 PVDF 膜置于凝胶成像仪中，加入 ECL 发光液进行化学发光反应，合适条件下进行曝光，采集图像分析。

1.7　外泌体特异性蛋白标志的表征

利用 ProcartaPlex™ Human Exosome Characterization Panel 6-Plex 检测试剂盒和 Luminex 200 检测平台对外泌体进行特异性蛋白（CD63、CD81、CD9、Cytochrome C、Syntenin-1 和 VLA-4）的表征。按照试剂盒的说明，在规划好的平底 96 孔板中加入混合均匀的 capture beads 50 μL，洗涤后弃上清。在每个孔中加入 25 μL 的 1×Universal Assay Buffer 以及等体积提纯的外泌体或者标准品，密封后室温震荡孵育 2 h。洗板后，加入 25 μL 生物素化检测抗体，密封后室温震荡孵育 30 min。洗板后，加入 50 μL 的 Streptavidin-PE，密封后室温震荡孵育 30 min。洗板后，加入 120 μL 的 Reading Buffer，密封后室温震荡孵育 5 min。移除密封后，置于 Luminex 200 仪上进行检测。在标准品的拟合中，采用五参数非线性回归的方式拟合标准曲线，将得到的荧光值（MFI，荧光强度中位值）换算为对应的浓度单位，即 pg/mL，计算出浓度值。

1.8　统计学分析

采用 GraphPad Prism 6.0 软件绘图，SPSS 27.0 软件进行统计学分析，计量资料正态分布以 $\bar{x}\pm s$ 表示，两组数据间比较采用 t 检验，若方差不齐则采用 Welch 修正的 t 检验；多组比较采用单因素方差分析，若方差齐性则采用 LSD 法，若方差不齐则采用 Tamhanes T2 法；以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　外泌体镜下观察

随机抽取 4 种血型的冷沉淀，分离纯化外泌体并进行透射电镜检测。镜下观察，外泌体呈现为茶托型或一侧凹陷半球形的双层膜囊泡结构，双层膜结构有较强的折光性（图 1）。

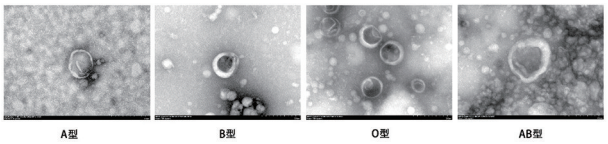


图 1　不同血型冷沉淀分离的外泌体透射电镜观察图

Figure 1　Transmission electron micrographs of exosomes isolated by cryoprecipitate from different blood types

2.2　外泌体粒径分析

随机抽取 4 种血型冷沉淀制备的外泌体进行粒径分析。A 型，B 型，O 型和 AB 型外泌体粒径（nm）分别为 119.6±47.5，120.5±47.4，133.3±54.1 和 103.1±35.3（图 2）。外泌体的直径范围约为 40～160 nm（平均约 100 nm），这说明本研究提取的冷沉淀外泌体粒径基本符合其大小范围。

2.3　外泌体 Western blot 鉴定

随机抽取四种血型冷沉淀制备的外泌体进行 WB 鉴定。外泌体特异性表达 CD63 和 TSG101 蛋白，而内质网蛋白 Calnexin 表达为阴性，符合外泌体的表达特征（图 3）。

2.4　冷沉淀中细胞外泌体表征的初步分析

2.4.1　不同性别来源冷沉淀中细胞外泌体的表征

随机提取 80 袋检验合格的新鲜冰冻血浆，制

备成冷沉淀后再提取其中的外泌体,并对外泌体特异性蛋白进行检测,其中 CD63,CD81,CD9,Cytochrome C,Syntenin-1 和 VLA-4 的总体分布分别为(122.80±53.67)pg/mL,(3 440.34±2 270.33)pg/mL,(5 746.21±6 781.45)pg/mL,(118.91±130.80),(1 487.50±1 347.63)和(70.72±69.12)pg/mL。将标本按照抽样分组规则,分为男性和女性各 40 人,对不同性别来源的冷沉淀中的特异性蛋白 CD63,CD81,CD9,Cytochrome C,Syntenin-1 和 VLA-4 进行表征,发现这些特异性蛋白的表达水平总体相当,差异无统计学意义(表 1)。

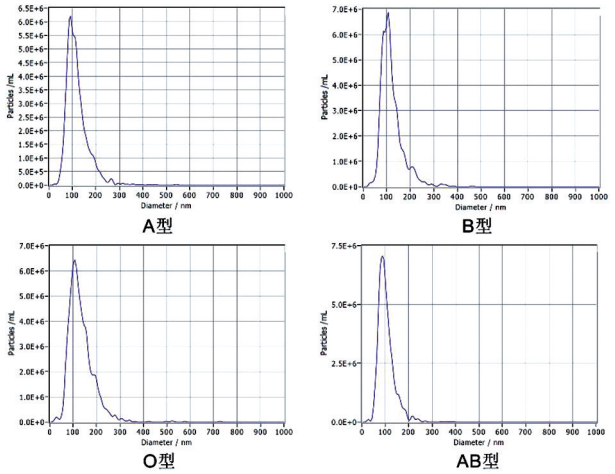
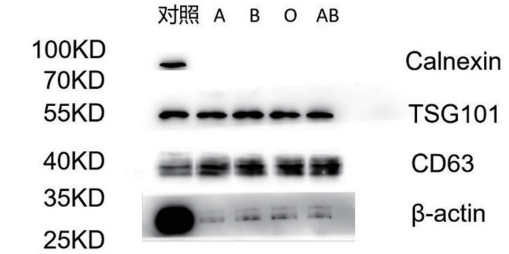


图 2 不同血型冷沉淀分离的外泌体粒径分布图

Figure 2 Exosome particle size distribution of cryoprecipitate separated from different blood types



注:对照为 HepG2 细胞裂解液(Calnexin/TSG101/CD63/β-actin)。

图 3 不同血型冷沉淀分离的外泌体 Western blot 鉴定图

Figure 3 Western blot identificationof exosomes isolated from cryoprecipitate of different blood types

表 1 不同性别来源冷沉淀中细胞外泌体中特异性蛋白的表征分析

Table 1 Characterization analysis of specific proteins in exosomes from cryoprecipitate of different genders

	性别		*t* 值	*P* 值
	女	男		
CD63	128.22±63.52	117.39±40.84	0.895	0.374
CD81	3 327.43±2 362.46	3 553.24±2 168.42	0.440	0.661
CD9	6 291.52±9 093.85	5 200.89±2 946.74	0.713	0.480
Cytochrome C	129.71±157.90	108.12±95.13	0.732	0.467
Syntenin-1	1 406.05±1 319.35	1 568.949±1 370.49	0.535	0.594
VLA-4	64.32±61.43	77.12±75.50	0.821	0.414

2.4.2 不同年龄阶段来源冷沉淀中细胞外泌体的表征

将标本按照抽样分组规则,随机取 20~40 周岁和 40~60 周岁年龄阶段冷沉淀各 40 袋,提取纯化其中的细胞外泌体,并对其特异性蛋白 CD63、CD81、CD9、Cytochrome C、Syntenin-1 和 VLA-4 进行表征,结果这些特异性蛋白在不同年龄阶段来源冷沉淀中表达水平均相当,差异无统计学意义(表 2)。

表 2 不同年龄阶段来源冷沉淀中细胞外泌体中特异性蛋白的表征分析

Table 2 Characterization analysis of specific proteins in exosomes from cryoprecipitate of different age groups

	年龄阶段		*t* 值	*P* 值
	20~40 周岁	40~60 周岁		
CD63	114.20±37.28	131.41±64.98	1.434	0.156
CD81	2 970.91±1 979.41	3 909.77±2 439.26	1.866	0.066
CD9	4 502.84±2 440.70	6 989.57±9 106.43	1.647	0.107
Cytochrome C	119.75±121.15	118.08±139.78	0.056	0.955
Syntenin-1	1 302.01±1 122.39	1 672.99±1 517.78	1.227	0.224
VLA-4	58.29±53.68	83.16±79.79	1.615	0.111

2.4.3 不同血型来源冷沉淀中细胞外泌体的表征

将标本按照抽样分组规则,随机抽取 A 型、B 型、O 型、AB 型冷沉淀各 20 袋,按照前述方法提取纯化细胞外泌体,并进行外泌体特异性蛋白分析。结果发现,特异性蛋白 CD63、CD81、CD9、Cytochrome C、Syntenin-1 和 VLA-4,在不同血型来源冷沉淀中的水平相当,差异无统计学意义(表 3)。

表 3 不同血型来源冷沉淀中细胞外泌体中特异性蛋白的表征分析

Table 3 Characterization and analysis of specific proteins in exosomes from cryoprecipitate of different blood types

	血型				*F* 值	*P* 值
	A	B	AB	O		
CD63	109.58±37.79	127.45±44.46	131.89±40.59	122.29±78.68	0.630	0.598
CD81	3 030.97±1 813.63	3 500.61±2 415.60	3 989.413±2 154.44	3 240.358±2 517.70	0.646	0.588
CD9	4 593.96±2 130.07	4 748.09±2 593.76	5 578.85±2 564.68	8 063.93±12 585.14	1.110	0.350
Cytochrome C	90.14±118.73	130.39±135.00	145.23±117.47	109.89±143.45	0.659	0.580
Syntenin-1	1 332.93±1 220.25	1 477.12±1 348.93	1 780.40±1 246.75	1 359.55±1 508.39	0.448	0.720
VLA-4	57.977±56.02	70.50±83.10	94.59±65.11	59.83±63.08	1.180	0.323

3　讨论

TRALI 是一种危及生命的输血不良反应,是输血导致死亡的主要原因之一[10]。细胞外囊泡(EV)是细胞间通讯的重要介质,具有转移蛋白质、核酸和脂质的能力,被认为是非抗体介导 TRALI 的一种重要因素[11]。血小板来源和血浆来源 EV 介导 TRALI 的发生机制一直是研究的热点,但临床研究亦发现,冷沉淀也是导致 TRALI 的一种重要因素[7-8]。本研究首次对 EV 的另一种重要来源,冷沉淀进行初步的表征研究。本研究发现,不同性别、血型和年龄阶段献血者的冷沉淀中,外泌体的特异性蛋白 CD63、CD81、CD9、Cytochrome C、Syntenin-1 和 VLA-4 表达水平相当,说明这些蛋白以及外泌体的表达水平在正常献血人群中的分布基本相同。

以往针对外泌体表征的研究,主要集中在 CD63、CD81 和 CD9 三种传统标志蛋白[12]。然而,有研究指出,这些四次穿膜蛋白是异质性的,在不同细胞类型中没有表现出普遍高丰度存在。另有研究发现,Syntenin-1 存在于各种细胞系以及不同分离方式分离的外泌体中,可以作为一种新的外泌体特异性蛋白[13]。有文献表明,来自不同程序细胞死亡通路的外泌体表现出显著的异质性,它们可以通过释放具有独特分子组合的外泌体(例如 Cytochrome C)来传递细胞间信号,从而影响受体细胞的炎症和凋亡[14]。有文献指出,EVs 的膜蛋白决定了其特定的细胞相互作用,VLA-4 广泛表达于先天免疫和适应性免疫反应细胞中,外泌体 VLA-4 的表达水平在一定程度上反映了机体的炎症状态[15-16]。本研究不仅对经典的外泌体特异性蛋白 CD63、CD81 和 CD9 进行了检测,还增加了对新型特异性蛋白 Syntenin-1 的分析。此外,本研究还对凋亡相关外泌体特异性蛋白(Cytochrome C),以及炎症相关外泌体特异性蛋白(VLA-4)进行了研究,丰富了冷沉淀来源外泌体的研究范围,提供了更多正常献血者血液制备的冷沉淀中外泌体的相关信息。本研究发现,不同性别、血型和年龄阶段献血者的冷沉淀中,外泌体的特异性蛋白 CD63、CD81、CD9、Cytochrome C、Syntenin-1 和 VLA-4 表达水平相当,说明这些蛋白以及外泌体的表达水平在正常献血人群中的分布基本相同。

有研究发现,不同性别健康受试者血浆中 EV 的大小和水平大致相似[17]。本研究亦发现,不同性别健康献血者来源冷沉淀所制备的外泌体,其特异性蛋白 CD63、CD81、CD9、Cytochrome C、Syntenin-1 和 VLA-4 表达水平相当,在不同性别中分布总体一致。但也有研究发现,激素和绝经对女性 EV 种类和水平有影响,55 周岁以上绝经后女性血浆中 CD105+EV 相关数量较低[17]。本研究中纳入的 40~60 周岁女性献血者中,均未达到 55 周岁以上,所以目前尚不能分析女性献血者绝经前后,其冷沉淀制备的外泌体水平及种类。

有研究表明,外泌体在生物衰老过程中扮演着重要作用。随着年龄增长,衰老细胞 EV 的分泌量会逐渐下降[18]。最近一项研究使用高分辨率流式细胞术通过检测不同年龄阶段人群血浆中的 EV 细胞表面标志物[19],发现其中 EV 标志物 CD81+和 CD9+的百分比随年龄增加而下降,而 CD63+EV 百分比没有明显变化。然而,我们对比 20~40 周岁和 40~60 周岁两个年龄阶段的冷沉淀中外泌体,发现外泌体特异性蛋白 CD81、CD9 和 CD63 的水平没有统计学差异,说明这两个年龄阶段正常献血者外泌体的分泌量相当。此外,我们也对比了不同年龄阶段冷沉淀分离的外泌体中 Cytochrome C、Syntenin-1 和 VLA-4 水平,也没有统计学差异。也有研究指出,衰老细胞分泌的 EV 总量可能变化不大,但是携带更多与衰老相关的成分,如 EphA2 和 DNA 等[20],这些成分会促进癌细胞增殖以及炎症。本研究下一步将继续深入研究冷沉淀中与衰老相关的成分,进一步探索不同年龄阶段献血者来源冷沉淀中外泌体的种类。

此外,本研究还首次对不同血型来源冷沉淀中的细胞外泌体进行分析。结果发现,四种血型来源冷沉淀中的外泌体,其特异性蛋白 CD63、CD81、CD9、Cytochrome C、Syntenin-1 和 VLA-4 表达水平基本相当,说明正常献血者中外泌体的表达与血型无关。

研究还发现,多种因素会影响血液中的 EV 种类,包括采血方法、溶血、血清/血浆选择、抗凝剂、冷冻/解冻循环、储存时间/温度,以及 EV 分离方法等[9]。本研究利用全血分离的新鲜冰冻血浆制备而成的冷沉淀,采用聚合物沉淀法将血浆的水分子束缚住,从而迫使难溶性的外泌体从血浆中析出。该方案可能会损失一部分的外泌体,这是本研究的局限性之一。下一步,本研究将采用不同的 EV 分离方法,如差速离心、超滤、尺寸排阻色谱等

技术进行 EV 分离,进一步对比不同分离方法对冷沉淀中外泌体水平和纯度的影响。

综上,本研究提取并鉴定了新鲜冰冻血浆制备的冷沉淀中的外泌体,并对冷沉淀来源外泌体的特异性蛋白进行了初步表征,发现不同血型、不同性别以及不同年龄阶段献血血液来源的冷沉淀中外泌体特异性蛋白 CD63、CD81、CD9、Cytochrome C、Syntenin-1 和 VLA-4 表达水平基本相同,为进一步深入研究冷沉淀来源外泌体的功能打下了基础,也为进一步研究外泌体介导的输血不良反应奠定了基础。

利益冲突说明/Conflict of Interests

所有作者均声明不存在利益冲突。

伦理批准及知情同意/Ethics Approval and Donor/Patient Consent

本研究已通过广州血液中心伦理委员会审批(批准号:广州血液中心伦[2024]第 024 号);本研究纳入的献血者均已签署知情同意书。

作者贡献/Authors' Contribution

唐颖怡、陈大伟:实验实施和论文撰写;谭爱玲:样本收集和数据收集;李昕彤:数据分析;刘宇健:论文校对;钟慧斌:实验设计和论文审核。

[参考文献]

[1] SEMPLE J W, REBETZ J, KAPUR R. Transfusion-associated circulatory overload and transfusion-related acute lung injury[J]. Blood, 2019, 133(17): 1840-1853.

[2] FUNK M B, GUENAY S, LOHMANN A, et al. Benefit of transfusion-related acute lung injury risk-minimization measures--German haemovigilance data (2006-2010)[J]. Vox Sang, 2012,102(4):317-323.

[3] ANDREU G, BOUDJEDIR K, MULLER J Y, et al. Analysis of transfusion-related acute lung injury and possible transfusion-related acute lung injury reported to the French hemovigilance network from 2007 to 2013[J]. Transfus Med Rev, 2018,32(1):16-27.

[4] MCVEY M J, KAPUR R, CSERTI-GAZDEWICH C, et al. Transfusion-related acute lung injury in the perioperative patient[J]. Anesthesiology, 2019,131(3):693-715.

[5] KUEBLER W M, WILLIAM N, POST M, et al. Extracellular vesicles: effectors of transfusion-related acute lung injury[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2023,325(3):L327-L341.

[6] MCVEY M J, WEIDENFELD S, MAISHAN M, et al. Platelet extracellular vesicles mediate transfusion-related acute lung injury by imbalancing the sphingolipid rheostat[J]. Blood, 2021,137(5):690-701.

[7] THALJI L, THUM D, WEISTER T J, et al. Incidence and epidemiology of perioperative transfusion-related pulmonary complications in pediatric noncardiac surgical patients: a single-center, 5-year experience[J]. Anesth Analg, 2018,127(5):1180-1188.

[8] KUMAR R, SEDKY M J, VARGHESE S J, et al. Transfusion related acute lung injury (TRALI): a single institution experience of 15 years[J]. Indian J Hematol Blood Transfus, 2016,32(3):320-327.

[9] THÉRY C, WITWER K W, AIKAWA E, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines[J]. J Extracell Vesicles, 2018,7(1):1535750.

[10] FANG X, MO C, ZHENG L, et al. Transfusion-related acute lung injury: from mechanistic insights to therapeutic strategies[J]. Adv Sci (Weinh), 2025,12(11):e2413364.

[11] KUEBLER W M, WILLIAM N, POST M, et al. Extracellular vesicles: effectors of transfusion-related acute lung injury[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2023,325(3):L327-L341.

[12] KOWAL J, ARRAS G, COLOMBO M, et al. Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016,113(8):E968-E977.

[13] KUGERATSKI F G, HODGE K, LILLA S, et al. Quantitative proteomics identifies the core proteome of exosomes with syntenin-1 as the highest abundant protein and a putative universal biomarker[J]. Nat Cell Biol, 2021,23(6):631-641.

[14] XIONG M, CHEN Z, TIAN J, et al. Exosomes derived from programmed cell death: mechanism and biological significance[J]. Cell Commun Signal, 2024,22(1):156.

[15] CAO J Y, WANG B, TANG T T, et al. Exosomal miR-125b-5p deriving from mesenchymal stem cells promotes tubular repair by suppression of p53 in ischemic acute kidney injury[J]. Theranostics, 2021,11(11):5248-5266.

[16] RICE G P A, HARTUNG H P, CALABRESI P A. Anti-alpha4 integrin therapy for multiple sclerosis: mechanisms and rationale[J]. Neurology, 2005,64(8):1336-1342.

(下转第 733 页)

cryoprecipitate for 5 days at refrigerated temperatures:A systematic review and meta-analysis[J]. Transfus Med, 2025, 35(5):415-423.
[39] CRISPIN P, HICKS S, COUPLAND L A, et al. Cryoprecipitate as an alternative to platelet transfusion in thrombocytopenia[J]. e J Haem, 2022, 3(1):80-85.
[40] HO D, CHAN E, CAMPBELL D, et al. Targeted cryoprecipitate transfusion in severe traumatic haemorrhage [J]. Injury, 2020, 51(9):1949-1955.
[41] WINTER K M, WEBB R G, MAZUR E, et al. Extending the post-thaw shelf-life of cryoprecipitate when stored at refrigerated temperatures[J]. Vox Sang, 2024, 119(12):1257-1267.
[42] SAXENA S, ODONO V, FRANCIS R B, et al. Can storage of thawed cryoprecipitate be extended to more than six hours? [J]. Am J Clin Pathol, 1990, 94(2): 203-206.
[43] WAGNER S J, HAPIP C A, ABEL L. Bacterial safety of extended room temperature storage of thawed cryoprecipitate[J]. Transfusion, 2019, 59(11):3549-3550.
[44] KETTER P M, KAMUCHEKA R, ARULANANDAM B, et al. Platelet enhancement of bacterial growth during room temperature storage:mitigation through refrigeration [J]. Transfusion, 2019, 59(S2):1479-1489.
[45] RAMIREZ-ARCOS S, JENKINS C, SHEFFIELD W P. Bacteria can proliferate in thawed cryoprecipitate stored at room temperature for longer than 4 h[J]. Vox Sang, 2017, 112(5):477-479.

(2026-03-17 收稿,05-26 修回,05-28 接收)
本文编辑:李弘武

(上接第 723 页)

[17] ENJETI A K, ARIYARAJAH A, D′CRUS A, et al. Circulating microvesicle number, function and small RNA content vary with age, gender, smoking status, lipid and hormone profiles[J]. Thromb Res, 2017,156:65-72.
[18] EITAN E, GREEN J, BODOGAI M, et al. Age-related changes in plasma extracellular vesicle characteristics and internalization by leukocytes[J]. Sci Rep, 2017,7 (1):1342.
[19] ZHANG X, HUBAL M J, KRAUS V B. Immune cell extracellular vesicles and their mitochondrial content decline with ageing[J]. Immun Ageing, 2020,17:1.
[20] TAKASUGI M. Emerging roles of extracellular vesicles in cellular senescence and aging[J]. Aging cell, 2018, 17(2):e12734.

(2026-05-19 收稿,05-28 修回,06-09 接收)
本文编辑:李弘武