

流式细胞术在小细胞外囊泡检测中的研究进展

王逍遙,馬素英,鄧昆

(重庆医科大学附属第三医院检验科,重庆 401120)

[摘要]小细胞外囊泡(small extracellular vesicles,sEV)是由细胞主动分泌、尺寸小于200 nm、具有脂质双分子膜结构的球状膜性微小囊泡的总称,sEV参与细胞间信号通讯,在生理状态维持及疾病进程中发挥重要作用,是近年来学界研究的热点。流式细胞术具有能直接对大量细胞等进行多参数、快速度、高分辨率分析的优势,但应用在检测比细胞小很多的sEV研究中还较少。本文综述了多个研究团队报道的将流式细胞术应用于检测sEV的方法,主要包括纳米流式细胞术直接检测sEV;通过sEV聚类、DNA扩增、微球等辅助常规流式细胞仪实现检测sEV;质谱流式细胞术辅助检测sEV等。以上方法显示出了流式细胞术应用于sEV检测的可能与优势,同时也面临着如荧光光谱重叠干扰、无法准确定量、依然不能突破尺寸限制等问题,限制了其大规模的研究应用。希望本综述能帮助学界更好地了解sEV流式细胞术的研究进展,进一步推动sEV的研究。

[关键词]流式细胞术;细胞外囊泡

[中图分类号]Q2-33

[文献标志码]A

[收稿日期]2022-06-22

Research progress of flow cytometry in detection of small extracellular vesicles

Wang Xiaoyao, Ma Suying, Deng Kun

(Department of Laboratory Medicine, The Third Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

[Abstract] Small extracellular vesicles (sEV) are spherical membranous vesicles with lipid bilayer membrane structure and size less than 200 nm, which are secreted by cells actively. sEV are involved in intercellular signal communication and play an important role in the maintenance of normal physiological state and the progression of disease. Flow cytometry has the advantage of being able to directly perform multi-parameter, fast and high-resolution analysis on a large number of cells, but few studies have been applied to detect sEV that are much smaller than cells. In this paper, we review the application of flow cytometry in the detection of sEV reported by several research teams, including the direct detection of sEV by nanoflow cytometry. By conventional flow cytometry assisted by sEV clustering, DNA amplification and microspheres. By mass spectrometry flow cytometry. These methods show the possibility and advantages of flow cytometry in the detection of sEV, but at the same time, they are also faced with problems such as overlapping interference of fluorescence spectrum, and inability to accurately quantify, and still unable to break through size limits, which limit its large-scale research and application. This review is expected to help the academic community better understand the research progress of sEV flow cytometry and further promote the research of sEV.

[Key words] flow cytometry; extracellular vesicle

过去10多年,越来越多的研究发现细胞外囊泡在机体生理病理中起着重要作用。细胞外囊泡参与许多重要疾病的发生发展,在疾病诊断和预后判断中有着广阔前景^[1]。

作者介绍:王逍遙,Email:1490804736@qq.com,

研究方向:流式细胞术检测细胞外囊泡。

通信作者:鄧昆,Email:drdengkun@icloud.com。

基金项目:国家自然科学基金面上资助项目(编号:82172365)。

优先出版:<https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20220831.0934.010.html>

(2022-08-31)

目前对于细胞外囊泡的大部分研究主要应用透射电子显微镜、扫描电子显微镜和原子力显微镜等显微技术,以及动态光散射技术、纳米颗粒跟踪技术、可调节电阻脉冲传感技术等对它的形态、粒径和浓度进行表征,但是这些技术存在样品制作繁琐、测量速度慢、测量结果数据单一等缺点^[2-4]。流式细胞术通过分析散射和多色荧光信号,对细胞进行快速多参数分析,在一次实验中可同时检测几种、十几种,甚至数十种同一细胞上的蛋白表达,有望成为细胞外囊泡检测、分离和表征的重要技术。

1 小细胞外囊泡概述

细胞外囊泡(extracellular vesicles, EVs)是指细胞主动分泌的具有脂质双分子膜结构的球状膜性微囊泡的统称,已知绝大多数真核生物细胞都会分泌EVs^[5]。根据EVs的尺寸大小,可将其分为小细胞外囊泡(sEV,<200 nm),中/大细胞外囊泡(m/IEV,>200 nm)^[6]。根据生物特性和形成过程不同,EVs又可分为外泌体(exosome)、微囊泡(microvesicles,MV)、凋亡小体(apoptotic bodies)3大类^[7],其中外泌体是由多囊泡与细胞膜融合形成的直径为40~200 nm的EV^[8]。根据其尺寸大小,外泌体也属于sEV,本文将重点对sEV进行探讨。

sEV携带丰富的功能性生物分子,包括胆固醇、鞘磷脂、磷脂酰丝氨酸、神经节苷脂等脂类物质、多种蛋白质和核酸(DNA、mRNA、microRNA、lncRNA、circRNA)等^[9-10]。sEV介导重要的细胞间信号通讯,参与细胞凋亡、血管新生、血栓形成、炎症免疫反应等生理状态维持及疾病进展^[11]。sEV参与调节肿瘤发生、进展和转移等病理过程,成为癌症诊断中液体活检的新新兴目标^[12]。此外,sEV作为天然性转运载体,具有纳米级粒径及良好生物相容性,同时可以携带RNA、蛋白质及小分子药物。相比传统脂质体、微球等人工合成的药物载体,sEV是一种很有前景的靶向递药载体^[13]。虽然现在对sEV的研究十分火热,但是无论是应用于临床诊断还是治疗,学界对sEV的检测、分离和表征都没有统一的标准,目前研究报道中对sEV的检测表征方法有样品制作繁琐、测量速度慢、测量结果数据单一等多种不足,而流式细胞术是具有解决以上问题重要潜能的技术平台。

2 流式细胞术

流式细胞术(flow cytometry, FCM)是20世纪70年代初发展起来的一项新技术。它是单克隆抗体及免疫细胞化学技术、激光和电子计算机科学等高度发展及综合利用的高技术产物。流式细胞术以流式细胞仪为主要分析设备,对悬浮液体环境中的单个活细胞、生物颗粒或液体中的大分子物质进行多参数的、快速的定量分析和分选。通过分析散射和多色荧光信号,流式细胞术可测量细胞大小、内部颗粒的性状,可检测细胞表面和细胞浆抗原,细胞内DNA、RNA含量等,并且能够分类收集(分选)某一亚群细胞,分选纯度超过95%^[14-16]。流式细胞术有着分辨率高、分辨细胞数量大、参数多、准确性高、速度快等优点,现已广泛应用于肿瘤学、免疫学、血液学等临床工作和各类科学的研究中,并逐步成为医学临床检验领域中极具发展潜力的高技术平台^[17]。

流式细胞术具有高通量定量和多参数表征的优势,在EV定量和表征上有一定潜力^[18-19]。但是,常规的流式细胞

仪很难基于光散射检测直径小于200 nm的颗粒^[20],根据瑞利散射理论,对于尺寸远小于入射光波长的球形纳米粒子,散射光的强度以粒径的6次方下降,使得极小粒子的散射光强度迅速消失在背景噪声之下^[21]。

$$\sigma_{\text{scatt}} = \frac{2\pi^5 d^6 n_{\text{med}}^4}{3\lambda^4} \left| \frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right|^2$$

式中, σ_{scatt} 指散射截面, d 指粒子直径, λ 指入射光波长, m 指粒子($n_{\text{particle}} = n_{\text{rel}} + i n_{\text{im}}$)与介质(n_{med})的折射率之比。

常规流式细胞术的最小可检测粒径为270~600 nm,而sEV的尺寸小于200 nm,因此常规的流式细胞术不能直接用于分析sEV。为了解决这个问题,目前有多个研究团队从改变流式细胞仪器提高对sEV的敏感性和将sEV的总尺寸扩大到常规FCM的可检测尺寸限制以上^[19-22]2个策略方向进行研究。

3 检测sEV的各类流式细胞术

3.1 纳米流式检测技术表征sEV

厦门大学颜晓梅课题组开发了纳米流式检测技术(nano-flow cytometry, nFCM),实现了发光能力低于单分子荧光的单个纳米颗粒散射信号的直接检测,将EV、病毒、SiO₂纳米颗粒(silica nanoparticles, SiNPs)、纳米金的单颗粒检测下限分别推进到40 nm、27 nm、24 nm和7 nm^[23]。纳米流式的原理如图1所示,纳米颗粒悬浮液通过锥形石英毛细管(40 μm内径)被引入方孔鞘流比色皿的中心,高速鞘流通过流体动力学将样品流聚焦成非常细的流(约1.4 μm),该流穿过聚焦激光束的中心区域(直径约16 μm),在此被均匀照射。样品颗粒所发射的散射光和多色荧光信号经由高效能集光系统收集后由动作电位时程(action potential duration, APD)检测,实现多参数同时定量分析。可测定sEV的亲脂探针标记效率、表面唾液酸糖、核酸含量和特定蛋白的表达。结合免疫荧光标记,实现了结直肠癌的早期诊断($P<0.001$)和预后分析($P<0.05$)^[24]。nFCM具备散射光和荧光同时检测的性能,在流式细胞术检测尺寸上有了较大突破,但是仍然不能避免荧光光谱重叠造成的检测限制。

3.2 sEV的聚类辅助流式细胞术检测

3.2.1 pH介导的sEV聚类 南开大学刘定斌教授团队报道了一种pH介导的组装系统,该系统将单个纳米级尺寸的sEV转化为微米级簇,可以通过传统流式细胞术实现直接分析,突破了sEV分析的尺寸限制^[25]。该技术通过在sEV膜中安装pH响应型二酰基脂质共轭聚合物(diacyl lipid-conjugated polymers, DLPs; pKa=6.5)来控制sEV的表面润湿性。在低于pKa值(如pH=5.5)的弱酸性缓冲液中,安装的DLPs质子化导致sEV在水溶液中高度分散;当缓冲液变为中性(pH=7.4)时,sEV随着锚定的DLP去质子化而变得疏水,从而形成sEV组装簇(Exo-clusters),达到常规FCM的可检测尺寸

(图2)。然后用荧光染料(如藻红蛋白、PE)偶联的特异性抗体(Ab)对Exo-clusters进行免疫标记,用于在常规FCM上分析相应的sEV生物标志物。利用此技术策略,该团队发现MUC-1和PD-L1联合使用可以作为肝癌早期诊断的有效生物标志物,但仍然不能区分早期和晚期肝癌。

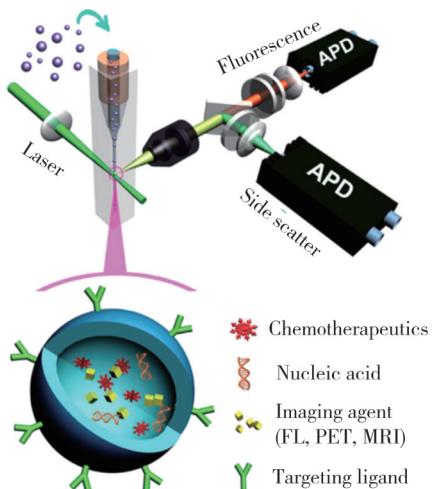


图1 纳米流式原理示意图

3.2.2 磷脂-聚合物-磷脂结合物诱导的sEV聚类 Yang HC等^[26]开发了一种使用流式细胞仪同时单步原位检测sEV表面蛋白和内部miRNA的方法,该方法利用磷脂-聚合物-磷脂结合物(1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-polyethylene glycol-1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, DSPE-PFG-DSPE)以诱导sEV聚类,从而增强检测信号用于纳米颗粒跟踪分析技术(nanoparticle tracking analysis, NTA)和流式细胞术分析。研究团队利用该技术分析了CD63和分子信标21在正常和癌症sEV中的多重生物标志物检测,发现该方法可以使用流式细胞仪检测和区分癌细胞衍生的sEV。

以上2个研究均是通过加入特定物质实现sEV的聚集,从而放大信号,操作简单便捷,并可用于常规流式细胞仪的检测,但每个聚类的sEV数量存在很大的不确定性,在流式分析时不能准确计算每一个信号包含的sEV数,很难实现对sEV的定量检测。

3.3 DNA扩增辅助流式细胞术检测sEV

3.3.1 滚环扩增辅助放大sEV 滚环DNA扩增(rolling circle

DNA amplification, RCA)是一种等温信号扩增方法,其线性扩增倍数为 10^5 ^[27],指数化扩增能力大于 10^9 ^[28],产生的扩增产物连接在固相支持物(如玻片、微孔板等)表面的DNA引物或抗体上。清华大学李景洪教授团队开发了RCA辅助流式细胞术来同时分析表面蛋白和量化sEV^[29]。使用特异性抗CD63抗体偶联磁珠(MB-CD63、生物素-链霉亲和素相互作用构建)捕获sEV, EV与特异性识别适体的DNA引物结合后,通过RCA反应产生用于荧光探针杂交的重复DNA序列。最后,将传统的流式细胞仪引入表型sEV蛋白标记检测(图3)。通过对肺癌患者的血液样本进行定量分析,发现其在癌症早期临床诊断和预后方面有一定的潜力。该方法利用RCA放大信号,同时利用磁珠结合特异性sEV,可除去游离蛋白的干扰,但是每个磁珠结合的sEV数和RCA产物大小都将使结果分析有较大的差异。

3.3.2 构象可转换的DNA探针杂交放大sEV 美国加州大学钟文婉教授团队报道了通过DNA纳米结构的靶向启动(target-initiated engineering, TIE)实现单个EV的流式细胞术分析^[19]。该技术采用构象可转换的DNA探针与EV表面标记结合,从而通过杂交链式反应触发DNA纳米结构的工程化(hybridization chain reaction, HCR)。HCR产品不仅将单个EV的整体尺寸扩大到500 nm以上,还可与多个荧光团结合,放大位于EV表面有限区域的少数标记分子的信号,从而在传统流式细胞仪中实现单个EV的可视化,大大简化了同一EV上多个标记的测量(图4)。在sEV表面进行DNA扩增,从而放大检测信号,可实现常规流式细胞术对sEV的定量检测和单个sEV的参数分析,但临床样本成分复杂,对DNA扩增存在一定干扰,在临床应用上有一定难度。

3.3.3 基于适配体的DNA纳米组装体放大sEV Wan S等^[22]在sEV表面构建了一种基于适配体的DNA纳米组装体。这种原位组装方法基于DNA适体及其sEV表面标记之间的分子识别,以及由适体-嵌合触发器引发的DNA杂交链式反应。它进一步证明了对靶细胞衍生的sEV的选择性组装,而不是非靶细胞衍生的sEV。此实验表明DNA纳米结构可以成功地组装在纳米尺寸的细胞器上。这种方法可用于sEV修饰和功能化,从而达到将sEV尺寸放大的效果,然后能够更好地适用流式细胞仪的检测。

3.4 微球辅助流式细胞术检测sEV

3.4.1 基于聚苯乙烯微球放大sEV Yang KS等^[30]报道了一种通过流式细胞术检测到的基于聚苯乙烯(polystyrene, PS)

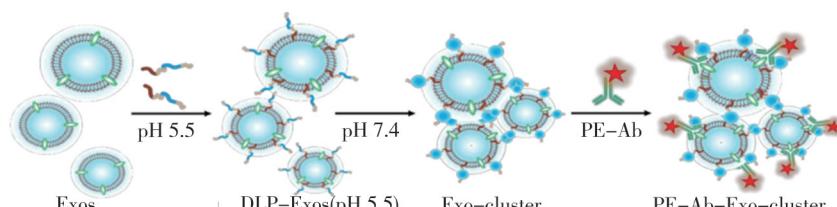


图2 pH介导的sEV组装成胞外簇用于流式细胞仪分析

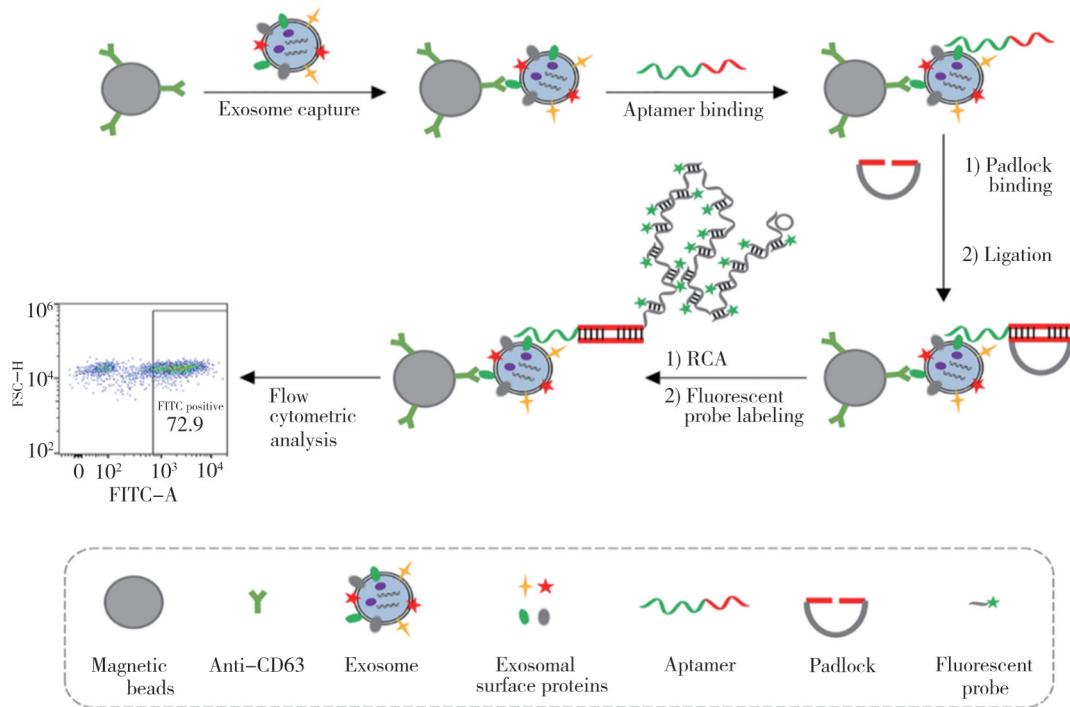
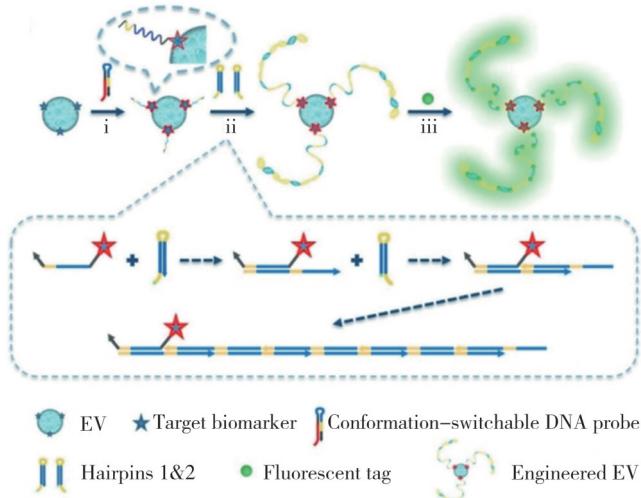


图3 用于分析外泌体表面蛋白的RCA辅助流式细胞术方法的示意图



注:靶向启动DNA纳米工程的原理示意图(i指目标识别后探针构象变化;ii指DNA杂交联;iii指荧光标记)

图4 靶向启动DNA纳米结构工程的单个EV流式细胞术示意图

微球的sEV测定。它将使用微球的sEV捕获与流式细胞术的sEV蛋白分析相结合。该测定快速(48个样品<4 h)、稳健且与用于高通量sEV分析的传统流式细胞仪兼容。首先使用NHS-PEG4-生物素对分离的sEV进行生物素化,然后在捕获5 μm链霉亲和素包被的PS微球。然后用一抗和Alexa Fluor 488二抗对珠结合的sEV进行染色,以进行流式细胞术测量(图5)。

3.4.2 基于多重微球放大sEV Koliha N等^[31]开发了一种新的基于多重微球的平台,在一个样本中研究多达39种不同的表面标记。捕获抗体微球与荧光标记检测抗体的组合允

许分析携带2种抗体识别的表面标记sEV。这种新方法可以轻松筛选sEV群体的表面标记,通过组合不同的捕获和检测抗体,可以获得有关相对表达水平和潜在囊泡亚群的更多信息,同时通过传统流式细胞术达到分析多个标记物的效果。

3.5 质谱流式技术检测sEV

随着更深入的科学的研究,流式细胞分析技术和方法得到迅速发展,科学家们研发出了质谱流式细胞术^[32]。质谱流式细胞术采用金属元素标记物(抗体)标记或识别细胞表面和内部的信号分子,应用流式细胞术分离单个细胞,通过对单

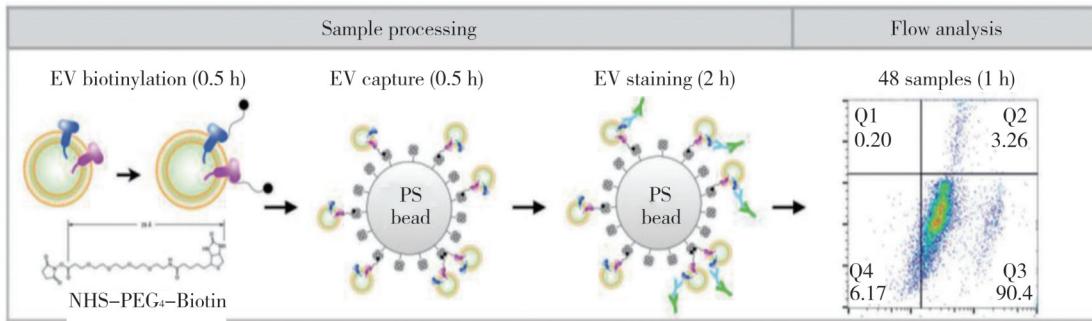


图 5 通过流式细胞术检测的基于 PS 珠子的 sEV 测定

个细胞原子能量谱的信号分析,实验对细胞表面或内部信号的检测^[33]。其优势在于使用金属标签,信号通道间不会有相互干扰,可同时完成上百个独立信号的检测。

广州医科大学王金恒团队发现,质谱流式与高度多变量细胞表型相结合能够高通量鉴定 sEV 的体内表达^[34]。用金属标记 sEV,记录受体细胞对 sEV 的摄入,并结合质谱流式免疫分型能力,分析不同免疫细胞对 sEV 的摄入差异。在此基础上该团队优化了基于 sEV 的药物递送的给药方法,验证了这些 sEV 在乳腺癌小鼠模型中的抗癌功效。利用金属标记,避免了常规流式细胞仪荧光重叠的干扰,可实现 sEV 多个参数的同时分析检测。

4 总结与展望

sEV 参与细胞通讯、抗原呈递、血管新生、肿瘤的迁移和生长等众多生理、病理过程,在疾病诊断、预后和治疗中显示很大的应用前景,也是目前生命科学研究中最热的前沿领域之一。但是,目前 sEV 仍有许多功能尚不明确,其检测方法也有待统一。流式细胞术可对悬液中的单个细胞或微米级颗粒进行快速、多参数定量分析,实现流式细胞术对 sEV 的表征和定量,将极大地推动 sEV 的基础研究和相关生物医学应用的发展。传统流式细胞仪检测样本多样性,临床应用广泛。目前有许多研究人员致力于如何在传统流式细胞仪上实现对 sEV 的检测,研究报道了多种方式可放大 sEV 辅助传统流式细胞术检测,但仍然存在以下问题:① sEV 聚类和微球结合 sEV 放大的方式,都不能准确计算每一个流式细胞仪检测的信号包含多少个 sEV,在 sEV 的定量检测上存在不确定性;② 基于 DNA 扩增放大 sEV 的方式,在临床应用中存在困难,临床样本成分复杂,对 DNA 扩增存在一定干扰。虽然 nFCM 已经可以用于单个 sEV 的分析,但是 nFCM 在 sEV 的分析应用中才刚刚起步,仍然存在一些不足:① nFCM 对单个 sEV 的多种蛋白同时联合检测还有待进一步研究;② nFCM 可突破尺寸大小,但是仍不能避免荧光光谱重叠所造成的检测参数限制。质谱流式细胞仪利用金属元素标记,可避免荧光光谱重叠的干扰,但仍不能突破尺寸限制直接检测 sEV,目前将质谱流式细胞术运用于检测 sEV 的研究非常少。理

想的可以用于 sEV 检测的流式细胞术应具备如下特点:① 突破尺寸限制,能直接根据散射光分析出 sEV 的尺寸和内部颗粒特性;② 应用金属标签标记,避免荧光光谱重叠所造成的检测限制;③ 通过对特异性信号的分析,能同时获得 sEV 的表面抗原、细胞浆抗原、细胞内 DNA、RNA 等多个参数的结果。期望在不久的将来能开发出成熟的可用于 sEV 定量检测、多表型分析及分选的流式细胞术来推动细胞外囊泡的研究。

参 考 文 献

- [1] van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2018, 19(4) : 213-228.
- [2] Hoshino A, Costa-Silva B, Shen TL, et al. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis[J]. Nature, 2015, 527(7578) : 329-335.
- [3] Kamerkar S, LeBleu VS, Sugimoto H, et al. Exosomes facilitate therapeutic targeting of oncogenic KRAS in pancreatic cancer[J]. Nature, 2017, 546(7659) : 498-503.
- [4] Théry C, Amigorena S, Raposo G, et al. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids[J]. Curr Protoc Cell Biol, 2006, 30(1) : cb0322s30.
- [5] Johnstone RM, Adam M, Hammond JR, et al. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes)[J]. J Biol Chem, 1987, 262(19) : 9412-9420.
- [6] Théry C, Witwer KW, 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.
- [7] Shao HL, Im H, Castro CM, et al. New technologies for analysis of extracellular vesicles[J]. Chem Rev, 2018, 118(4) : 1917-1950.
- [8] Gurunathan S, Kang MH, Jeyaraj M, et al. Review of the isolation, characterization, biological function, and multifarious therapeutic ap-

- proaches of exosomes[J]. Cells, 2019, 8(4):307.
- [9] Tkach M, Théry C. Communication by extracellular vesicles: where we are and where we need to go[J]. Cell, 2016, 164(6):1226–1232.
- [10] Jeppesen DK, Fenix AM, Franklin JL, et al. Reassessment of exosome composition[J]. Cell, 2019, 177(2):428–445.e18.
- [11] Sahoo S, Losordo DW. Exosomes and cardiac repair after myocardial infarction[J]. Circ Res, 2014, 114(2):333–344.
- [12] Thompson AG, Gray E, Heman-Ackah SM, et al. Extracellular vesicles in neurodegenerative disease—pathogenesis to biomarkers[J]. Nat Rev Neurol, 2016, 12(6):346–357.
- [13] 吕慧中,赵晨晨,朱 链,等.外泌体靶向递药在肿瘤治疗中的进展[J].中国生物工程杂志,2021,41(5):79–86.
- Lü HZ, Zhao CC, Zhu L, et al. Progress of using exosome for drug targeted delivery in tumor therapy[J]. China Biotechnol, 2021, 41 (5) : 79–86.
- [14] Nunez R. Flow cytometry: principles and instrumentation[J]. Curr Issues Mol Biol, 2001;3(2):39–45.
- [15] 王 师,张孟源,童能胜,等.流式细胞术在临床检验中的应用[J].检验医学与临床,2017,14(6):897–898,902.
- Wang S, Zhang MY, Tong NS, et al. Application of flow cytometry in clinical examination[J]. Lab Med Clin, 2017, 14(6):897–898,902.
- [16] 盛慧明,孙寒晓.流式细胞术的发展与展望[J].中华检验医学杂志,2018,41(1):20–23.
- Sheng HM, Sun HX. The advancement and perspective of flow cytometry [J]. Chin J Lab Med, 2018, 41(1):20–23.
- [17] 吴晓娜,蒋红兵.流式细胞术的工作原理及其临床应用[J].中国医疗设备,2011,26(3):91–93.
- Wu XN, Jiang HB. Working principle and clinical application of flow cytometry[J]. China Med Devices, 2011, 26(3):91–93.
- [18] Ricklefs FL, Maire CL, Reimer R, et al. Imaging flow cytometry facilitates multiparametric characterization of extracellular vesicles in malignant brain tumours[J]. J Extracell Vesicles, 2019, 8(1):1588555.
- [19] Shen W, Guo KZ, Adkins GB, et al. A single extracellular vesicle (EV) flow cytometry approach to reveal EV heterogeneity[J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2018, 57(48):15675–15680.
- [20] van der Pol E, Coumans FAW, Grootemaat AE, et al. Particle size distribution of exosomes and microvesicles determined by transmission electron microscopy, flow cytometry, nanoparticle tracking analysis, and resistive pulse sensing[J]. J Thromb Haemost, 2014, 12(7):1182–1192.
- [21] Brown RGW. Absorption and scattering of light by small particles [M]. Wiley, 1983.
- [22] Wan S, Zhang LQ, Wang S, et al. Molecular recognition-based DNA nanoassemblies on the surfaces of nanosized exosomes[J]. J Am Chem Soc, 2017, 139(15):5289–5292.
- [23] Zhu SB, Ma L, Wang S, et al. Light-scattering detection below the level of single fluorescent molecules for high-resolution characterization of functional nanoparticles[J]. ACS Nano, 2014, 8 (10) : 10998–11006.
- [24] Tian Y, Ma L, Gong MF, et al. Protein profiling and sizing of extracellular vesicles from colorectal cancer patients via flow cytometry[J]. ACS Nano, 2018, 12(1):671–680.
- [25] Liu XZ, Zong ZY, Xing MD, et al. pH-mediated clustering of exosomes: breaking through the size limit of exosome analysis in conventional flow cytometry[J]. Nano Lett, 2021, 21(20):8817–8823.
- [26] Yang HC, Rhee WJ. Single step *in situ* detection of surface protein and microRNA in clustered extracellular vesicles using flow cytometry[J]. J Clin Med, 2021, 10(2):319.
- [27] Gusev Y, Sparkowski J, Raghunathan A, et al. Rolling circle amplification: a new approach to increase sensitivity for immunohistochemistry and flow cytometry[J]. Am J Pathol, 2001, 159(1):63–69.
- [28] Lizardi PM, Huang XH, Zhu ZR, et al. Mutation detection and single-molecule counting using isothermal rolling-circle amplification [J]. Nat Genet, 1998, 19(3):225–232.
- [29] Gao XY, Teng XC, Dai YC, et al. Rolling circle amplification-assisted flow cytometry approach for simultaneous profiling of exosomal surface proteins[J]. ACS Sens, 2021, 6(10):3611–3620.
- [30] Yang KS, Lin HY, Curley C, et al. Bead-based extracellular vesicle analysis using flow cytometry[J]. Adv Biosyst, 2020, 4 (12) : e2000203.
- [31] Koliha N, Wienczek Y, Heider U, et al. A novel multiplex bead-based platform highlights the diversity of extracellular vesicles[J]. J Extracell Vesicles, 2016, 5(1):29975.
- [32] Behbehani GK, Bendall SC, Clutter MR, et al. Single-cell mass cytometry adapted to measurements of the cell cycle[J]. Cytometry A, 2012, 81(7):552–566.
- [33] Bendall SC, Nolan GP. From single cells to deep phenotypes in cancer[J]. Nat Biotechnol, 2012, 30(7):639–647.
- [34] Wang JH, Tu CG, Zhang H, et al. Loading of metal isotope-containing intercalators for mass cytometry-based high-throughput quantitation of exosome uptake at the single-cell level[J]. Biomaterials, 2020, 255:120152.

(责任编辑:唐秋姗)