

综 述

外泌体液体活检及其在肿瘤诊断治疗中的研究进展

朱皓峰综述,梅金红审校

【摘要】 近年来,外泌体液体活检在肿瘤诊断及治疗中的研究日益深入。外泌体因其来源丰富、获取便捷的优势和独特的生物学特性,使其在肿瘤的精准治疗方面显示出巨大的潜力。文章就外泌体的基本结构和功能、提取和鉴定方法及在肿瘤诊断和治疗中的研究进展进行综述。

【关键词】 外泌体;液体活检;肿瘤

【中图分类号】 R730.26

【文献标志码】 A

【文章编号】 1672-271X(2019)05-0512-05

【DOI】 10.3969/j.issn.1672-271X.2019.05.014

Advances in liquid biopsy of exosomes and its application in diagnosis and treatment of tumors

ZHU Hao-hao¹ reviewing, MEI Jin-hong² checking

(1. Department of Pathology, the 908th Hospital of the Joint Logistics Support Force, PLA, Nanchang 330002, Jiangxi, China; 2. Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330000, Jiangxi, China)

【Abstract】 In recent years, the study of exosome liquid biopsy in the diagnosis and treatment of tumors has been deepening. Exosomes have shown a great potential role in the precise treatment of tumors, due to their abundant sources, convenient access and unique biological characteristics. This article reviews the basic structure and function of exosomes, the methods of extraction and identification, and the research progress in the diagnosis and treatment of tumors.

【Key words】 exosome; liquid biopsy; tumor

0 引 言

与传统的医疗技术手段如组织活检相比,液体活检是以患者的血液、尿液、浆膜腔积液或其他液体成份为研究对象,以微创或无创方式获取样本在恶性肿瘤的研究中具有常规组织学方法无法比拟的优势。因此,近年来液体活检在肿瘤的早期诊断、术后疗效评估、预后判断等方面均显示了较广阔的应用前景。与循环肿瘤细胞(circulating tumor cell, CTC)在循环血液中的含量极其有限且细胞存

活期短以及循环肿瘤 DNA 的半衰期短、片段化强、易降解且只能检测核酸等局限性相比,外泌体因其携带丰富的生物信息分子在肿瘤的诊断及治疗中展现出巨大的潜力而备受关注并成为近年来的研究热点。本文就外泌体的基本结构和功能、提取和鉴定方法及在肿瘤诊断和治疗中的研究进展作一综述。

1 外泌体的基本概述

医学界对于外泌体的研究可追溯至 1985 年, Pan 等^[1]在研究绵羊网织红细胞成熟过程中在体外培养的绵羊红细胞上清中发现了一种呈囊膜样结构的小泡,并在 1987 年的研究中首次将其命名为 Exosome^[2];当时认为是红细胞成熟的“排泄物”而并未给予重视。随着对外泌体研究的不断深入,发现

基金项目:解放军联勤保障部队第九〇八医院苗子基金(2019NC019)

作者单位:330002 南昌,解放军联勤保障部队第九〇八医院病理科
(朱皓峰);330000 南昌,南昌大学第一附属医院病理科
(梅金红)

通信作者:梅金红, E-mail: 2572839187@qq.com

其含有细胞特异的蛋白、脂质及核酸,是一种生理/病理状态下细胞通过胞吐方式向外分泌的纳米级(直径约 40~100nm)蝶形膜性小泡^[3]。外泌体可由多种细胞如肿瘤细胞、神经细胞、淋巴细胞、造血细胞等分泌,不同细胞分泌的外泌体中所含的蛋白质、脂类和核酸也不同,并可在多种体液如血液、浆膜腔积液、尿液、脑脊液等中被检出。由于外泌体外有双层脂质膜结构使其具有相对稳定的化学特征,不易被机体内的各种酶类破坏降解。因此,对不同来源的外泌体携带的内容物检测并筛选出特异性的分子标志物,可成为疾病诊断治疗及预后评估的新方法。

2 外泌体的结构和功能

外泌体的形成主要经出芽、内陷、多泡体形成及分泌四个过程。早期由多泡体经膜内陷并包裹内容物,以“出芽”方式形成网格状蛋白囊泡,后期一部分进入溶酶体后被降解,一部分在与细胞膜融合的过程中被释放到胞外基质,即形成外泌体^[4]。研究显示,在外泌体中已发现数千种蛋白质、miRNA、RNA 以及脂类物质,其中某些特定类型的蛋白质如 CD9、CD63、CD81 及 TSG101 等恒定存在于各类外泌体中,可视为外泌体的生物标志蛋白用于外泌体的鉴定。而另一些外泌体蛋白因来源不同而各有差异,如热休克蛋白和 MHC 蛋白等^[5]。此外,外泌体中还含有鞘磷脂、神经节苷脂和其他脂类以及大量的核酸类物质,如 DNA、miRNA、mRNA 等^[6-7]。

外泌体被分泌出细胞外基质后,可通过体液运送至身体各部位,在此过程中若接触受体细胞,其表面携带的蛋白质和脂质可与受体细胞膜融合并将外泌体内的相应物质释放至受体细胞呈递抗原,调控机体的免疫功能,如调控肿瘤的发生发展、侵袭、转移及耐药,并通过释放内部信号分子进而调控受体细胞间的信息传递^[8]。由于外泌体表面覆盖的鞘磷脂膜使外泌体内容物能稳定的存在于体液中,这一特性可成为基于外泌体的液体活检作为临床研究及诊治恶性肿瘤的有利基石。

3 外泌体的提取及鉴定

外泌体的分离和提取方法很多,都是基于外泌体的一种或若干种理化性质来实现的。如根据密度不同,可通过超高速离心法将不同大小的囊泡及蛋白质聚集并分离。若结合蔗糖梯度离心法使用,

能让外泌体富集在密度范围在 1.13~1.19g/mL 的馏分中,从而提高产物纯度^[9]。根据大小不同,可使用适合外泌体分离的超滤膜将粒径不同的外泌体从体液中分离出来。由于大分子蛋白质和外泌体可能黏附并堵塞滤孔,因此该方法需考虑滤过膜的孔径范围,以免影响外泌体的提取率和纯度^[10]。根据分子量的不同,可使用色谱法让小分子物质进入凝胶孔被滞留,而大分子物质不能进入凝胶孔被洗脱出来,此法可分离到纯度较高的外泌体,但获取量少限制了其应用范围^[11]。此外,还有使用包被有单克隆抗体(如 CD63、CD81 和 CD9 等)的免疫磁珠法,通过与外泌体表面携带的特异性抗原相结合形成外泌体-免疫磁珠复合物,再用甘氨酸-Tris-HCL 溶液洗脱即可选择性分离外泌体。该方法提取的外泌体纯度和特异性高,但在酸性和低渗性溶液中可能会影响外泌体的形态及生物活性,且免疫磁珠价格昂贵,不利于普及。由于外泌体的研究要求提取方法简便快捷,近年来也出现多种用于分离提取的商品化试剂盒,如最常用的由 System Biosciences (SBI)公司研发的 Exoquick 试剂盒和 QIAGEN 公司的 ExoRNeasy 试剂盒,国内也有多家生物制剂公司已研发出科研用外泌体提取试剂盒。然而上述外泌体分离纯化方法都存在各自的局限性,2018 年发表在《转化医学杂志》的外泌体研究、转化和临床应用专家共识一文就指出,到目前为止,外泌体的分离方法尚无公认的“金标准”,无论采用何种方法,均不能将外泌体与其他细胞外囊泡(extracellular vesicles, EVs)亚群彻底分离。因此,在研究中建议对 EVs 进行必要的鉴定表征和功能学实验,并根据样本类型和下游的科学问题来选择合适的提取方法,可能有助于提高研究结果的可靠性^[12]。

常用的外泌体鉴定方法有透射电镜或原子力显微镜直接对单个 EV 的形态和大小进行观察^[13];根据不同来源外泌体携带的各自母细胞的特异分子不同,还可以用流式细胞术、ELISA 法和 Western-blot 方法检测这些特异性蛋白抗原,相比形态学判断更加准确^[14-16];近年来,通过 PCR 扩增或高通量测序方法分析外泌体中的遗传物质和突变信息也成为应用广泛的鉴定和研究方法。此外,还有一些基于外泌体物理性质的纳米粒子追踪分析(nanoparticle tracking analysis, NTA)技术、基于微流控技术的 Exosearch 等鉴定分析技术应用于外泌体的科学研究^[17-18]。

4 基于外泌体的液体活检在肿瘤临床应用中的研究

鉴于传统的组织活检难以对肿瘤的发生发展进行实时动态的监测,因此,基于外泌体的液体活检技术由于来源可靠,标本形式丰富,且丰度较 CTC 更高给肿瘤的临床诊断和精准治疗带来更多契机。研究表明,肿瘤侵袭和转移的发生与肿瘤细胞与微环境间的信息交流密不可分,在这一进程中,外泌体承担着信号媒介的重要传递作用^[19]。机体内肿瘤细胞可通过外泌体将癌基因核酸或片段、蛋白质转移到靶细胞,进而调节肿瘤侵袭、转移、肿瘤营养血管生成及免疫应答。由于外泌体还具有携带功能性生物分子如 miRNA、DNA 和蛋白质的天然能力,这种特性使外泌体在药物传递和分子诊断中具有应用潜力。此外,外泌体可以附着在纳米颗粒上并用于高精度成像,因此开发利用外泌体作为药物运载工具的方法,有望使外泌体作为恶性肿瘤化疗给药的全新载体^[20]。

4.1 基于外泌体的研究在肺癌诊断和治疗中的应用 遗传学和基因组学的广泛研究表明,肺癌是一种复杂的遗传异质性疾病,晚期肺癌和术后复发转移的肺癌传统疗法对其治疗效果差。尽管已经确定了一些能够产生良好反应的分子靶点,但由于缺乏合适的药物载体,这些靶点不能被有效利用。此外,靶向治疗也面临包括肿瘤靶向性差、靶向效应差以及治疗过程中产生继发性耐药等诸多问题。由于外泌体具有携带功能性生物分子的自然能力,因此利用改进的外泌体载体药物输送系统,可将药物专门输送到肿瘤,将产生更好的治疗结果^[21,22]。在诊断及鉴别诊断方面,有研究证实肺癌细胞所释放的外泌体和正常肺组织释放的外泌体就存在较大差异^[23]。一项来自瑞典的研究通过 RT-qPCR 阵列分析方法证实,癌性胸腔积液与良性肺疾病所致的胸腔积液中外泌体 miRNAs 有显著差异,其中 miRNA-200 和编码脂质运载蛋白-2(LCN2) mRNA 可作为肺腺癌外泌体液体活检的潜在诊断标志物^[24]。还有一项针对复发性肺癌裸鼠模型的研究发现,与原发肿瘤相比,复发性肿瘤外泌体中的 miRNA-21 和 miRNA-155 明显上调,提示外泌体 miRNA 分子标记可能作为无创性诊断肺癌的生物标记物^[25]。此外,Clark 等^[25]通过采用三重 Silac 定量蛋白质组学方法分别检测了永生化正常支气管上皮细胞系和两个非小细胞肺癌(non small cell lung cancer, NSCLC)细胞系 A549 和 HCC827 中外泌体相

关蛋白,从上述细胞系中共提取到 721 个包括与信号转导相关的蛋白,如 EGFR、GRB2 和 SRC 外泌体蛋白在 NSCLC 外泌体中富集,并能积极调节受体细胞的增殖,提示外泌体由于其丰富的蛋白质载体作用可促进肺癌的进展,这可能对非小细胞肺癌患者生物标记物的开发具有潜在的临床意义。

4.2 基于外泌体的研究在前列腺癌诊断和治疗中的应用

前列腺癌是男性常见的恶性肿瘤之一,临床常用的如血清 PSA 水平、直肠指诊和组织病理学分级均无法区分惰性和侵袭性前列腺癌,从而无法对患者进行恰当的分层管理是前列腺癌临床治疗的一个主要挑战^[26]。一项来自美国的最新研究发现,研究者通过采用 NanoString 技术在大样本量侵袭性前列腺癌患者的血清外泌体中检测到高水平的 miRNA-1246,且 miRNA-1246 的表达与病理分级升高、阳性转移和预后不良显著相关,并验证了 miRNA-1246 作为外泌体 miRNA 标记物对预测/诊断侵袭性前列腺癌有重要的临床价值^[27]。此外,Neel 等^[28]在前列腺癌患者的尿液外泌体中检测到 AGR2 的剪接体 SV-G 和 SV-H 含量显著增加,ROC 曲线显示在鉴别前列腺癌与良性增生远优于 PSA。因此基于尿液外泌体的 AGR2 变异体 SV-G 和 SV-H 的无创检测将可能成为前列腺癌筛查的潜在标志物。在前列腺癌的治疗方面,Peak 等^[29]发现间充质样胎盘干细胞分泌的外泌体在正常前列腺细胞系中未观察到明显的生长抑制,却能选择性抑制侵袭性前列腺癌细胞的生长,将有望成为一种全新的肿瘤治疗方式。Lofozzi 等^[30]采用 NTA 技术和纳米流式细胞术,发现与良性前列腺增生相比,前列腺癌患者血浆外泌体中显示异常升高的 PSA 水平和 CD81 表达,且酸性微环境能诱导表达 PSA 和标记 CD81 的纳米囊泡释放增加,提示外泌体 PSA 水平及相关的肿瘤生物标志物水平可能作为前列腺癌筛查和早期诊断的一种新型无创临床工具。

4.3 基于外泌体的研究在血液系统肿瘤诊断和治疗中的应用

在非实体性肿瘤如血液系统肿瘤的外泌体研究也有好的发现。如慢性淋巴细胞性白血病中, Paggetti 等^[31]发现 CLL 细胞分泌的外泌体能被肿瘤微环境中存在的各种良性细胞(包括 ecs、髓细胞和 bm-mscs)主动吸收,通过调节周围微环境获得肿瘤相关成纤维细胞特征的基质细胞的多种功能,并传递功能性 miRNA 和蛋白质激活关键的信号通路后,通过活化 AKT 和 NF- κ B 等炎症因子促进肿瘤进展。在治疗方面,尽管部分 CLL 患者外泌体

呈现 CD20 阳性表达,但对利妥昔单抗治疗仍然没有反应,推测原因可能与利妥昔单抗与外泌体结合后降低了利妥昔单抗与 CLL 细胞结合的数量有关。

4.4 基于外泌体的研究在其他肿瘤诊断和治疗中的应用 与 Luminal A 型和 B 型相比,三阴性乳腺癌(即雌激素受体、孕激素受体和 HER2 均阴性)患者显示更差的预后,Eichelsner 等^[32]发现在血清外泌体中 miRNA-373 水平在三阴性乳腺癌及更具侵袭性的乳腺癌中显著增高,体外实验证实通过转染 mcf-7 细胞系过表达 miRNA-373,可下调雌激素受体蛋白从而抑制细胞凋亡。Tanaka 等^[33]发现在食管鳞癌患者的血清外泌体中 miRNA-21 水平显著高于非癌患者,且对紫杉醇耐药的患者 miRNA-21 水平显著高于敏感患者,化疗或手术后血清中 miRNA-21 水平显著下降,因此推测外泌体中 miRNA-21 可能作为评估食管鳞癌进展或治疗效果的有用生物标志物。此外,还有许多研究显示在结直肠癌、胃癌、恶性黑色素瘤等肿瘤中外泌体中的 miRNA 可以作为肿瘤早期诊断及预后判断的生物标志物^[34-38]。

5 结语与展望

外泌体作为精准医疗和个体化治疗的一个研究热点,有着来源丰富、获取便捷的优势,又因其独特的生物学特性,使外泌体在肿瘤的免疫治疗、化疗及基因治疗方面也显示出巨大的潜力,已成为临床肿瘤诊断和治疗中的新兴技术。尽管外泌体在临床应用上仍处于研究初期阶段,亦面临诸多问题和挑战,相信随着研究的不断深入,外泌体作为液体活检的重要形式,必定会在精准医疗中发挥重要作用。

[参考文献]

- [1] Pan BT, Teng K, Wu C, *et al.* Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes[J]. *J Cell Biol*, 1985, 101(3): 942-948.
- [2] 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.
- [3] Denzer K, Kleijmeer MJ, Heijnen HF, *et al.* Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device[J]. *J Cell Sci*, 2000, 113(19): 3365-3374.
- [4] Farooqi AA, Desain NN, Qureshi MZ, *et al.* Exosome biogenesis, bioactivities and functions as new delivery systems of natural compounds[J]. *Biotechnology Adv*, 2018, 36(1): 328-334.
- [5] Schey KL, Luther JM, Rose KL. Proteomics characterization of exosome cargo[J]. *Methods*, 2015, 87(1): 75-82.
- [6] Skotland T, Sandvig K, Llorente A. Lipids in exosomes: Current Knowledge and the way forward [J]. *Prog Lipid Res*, 2017, 66: 30-41.
- [7] Jiang L, Vader P, Schiffelers RM. Extracellular vesicles for nucleic acid delivery: progress and prospects for safe RNA-based gene therapy [J]. *Gene Ther*, 2017, 24(3): 157-166.
- [8] Li SP, Lin ZX, Jiang XY, *et al.* Exosomal cargo-loading and synthetic exosome-mimics as potential therapeutic tools [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2018, 39(4): 542-551.
- [9] Crossland RE, Norden J, Bibby LA, *et al.* Evaluation of optimal extracellular vesicle small RNA isolation and qRT-PCR normalization for serum and urine [J]. *J Immunol Methods*, 2016, 4(29): 39-49.
- [10] Peterson MF, Otoc N, Sethi JK, *et al.* Integrated systems for exosome investigation [J]. *Methods*, 2015, 87: 31-45.
- [11] Chen TS, Arslan F, Yin Y, *et al.* Enabling a robust scalable manufacturing process for therapeutic exosomes through oncogenic immortalization of human ESC-derived MSCs [J]. *J Transl Med*, 2011, 9(1): 47.
- [12] 中国抗癌协会肿瘤标志专业委员会外泌体技术专家委员会. 外泌体研究、转化和临床应用专家共识 [J]. *转化医学杂志*, 2018, 7(6): 321-325.
- [13] Jung MK, Mun JY. Sample preparation and imaging of exosomes by transmission electron microscopy [J]. *J Vis Exp*, 2018, 3(131): 12-14.
- [14] Munich S, Sobo-vujanovic A, Buchser WJ, *et al.* Dendritic cell exosomes directly kill tumor cells and activate natural killer cells via TNF superfamily ligands [J]. *Oncoimmunology*, 2012, 1(7): 1074-1083.
- [15] Toda Y, Takata K, Nakagawa Y, *et al.* Effective internalization of U251-MG-secreted exosomes into cancer cells and characterization of their lipid components [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 456(3): 768-773.
- [16] Khan G, Ahmed W. Isolation and characterization of exosomes released by EBV-immortalized cells [J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1532: 147-158.
- [17] Dragovic RA, Gardiner C, Brooks AS, *et al.* Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis [J]. *Nanomedicine*, 2011, 7(6): 780-788.
- [18] Zhao Z, Yang Y, Zeng Y, *et al.* A microfluidic exosome chip for multiplexed exosome detection towards blood-based ovarian cancer diagnosis [J]. *Lab Chip*, 2016, 16(3): 489-496.
- [19] Kholia S, Raghino A, Garnieri P, *et al.* Extracellular vesicles as new players in angiogenesis [J]. *Vascular Pharmacol*, 2016, 86: 64-70.
- [20] Srivastava A, Amreddy N, Razaq M, *et al.* Exosomes as Theranostics for Lung Cancer [J]. *Adv Cancer Res*, 2018, 139: 1-33.
- [21] De Jong WH, Borm PJ. Drug delivery and nanoparticles: Application

- cations and hazards [J]. *Int J Nanomedicine*, 2008, 3 (2) : 133-149.
- [22] 沈凯凯, 吕镔烽. 外泌体在非小细胞肺癌中的研究进展[J]. *东南国防医药*, 2018, 20(4):399-403.
- [23] Rolfo C, Castiglia M, Hong D, *et al.* Liquid biopsies in lung cancer: The new ambrosia of researchers [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1846 (2):539-546.
- [24] Hydbring P, De Petris L, Zhang Y, *et al.* Exosomal RNA-profiling of pleural effusions identifies adenocarcinoma patients through elevated miR-200 and LCN2 expression [J]. *Lung Cancer*, 2018, 124:45-52.
- [25] Munagala R, Aqil F, Gupta RC. Exosomal miRNAs as biomarkers of recurrent lung cancer [J]. *Tumor Biol*, 2016, 37 (8) : 10703-10734.
- [26] Clark DJ, Fondrie WE, Yang A, *et al.* Triple SILAC quantitative proteomic analysis reveals differential abundance of cell signaling proteins between normal and lung cancer-derived exosomes [J]. *J Proteomics*, 2016, 133:161-169.
- [27] Bhagirath D, Yang TL, Bucay N, *et al.* MicroRNA-1246 is an exosomal biomarker for aggressive prostate cancer [J]. *Cancer Res*, 2018, 78(7):1833-1844.
- [28] Neeb A, Hefele S, Bormann S, *et al.* Splice variant transcripts of the anterior gradient 2 gene as a marker of prostate cancer [J]. *Oncotarget*, 2014, 5 (18):8681-8689.
- [29] Peak TC, Praharaj PP, Panigrahi GK, *et al.* Exosomes secreted by placental stem cells selectively inhibit growth of aggressive prostate cancer cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 499(4):1004-1010.
- [30] Logozzi M, Angelini DF, Iessi E, *et al.* Increased PSA expression on prostate cancer exosomes in in vitro condition and in cancer patients [J]. *Cancer Lett*, 2017, 403:318-329.
- [31] Paggetti J, Haderk F, Seiffert M, *et al.* Exosomes released by chronic lymphocytic leukemia cells induce the transition of stromal cells into cancer-associated fibroblasts [J]. *Blood*, 2015, 126 (9): 1106 - 1117.
- [32] Eichelsner C, Stückrath I, Müller V, *et al.* Increased serum levels of circulating exosomal miRNA-373 in receptor-negative breast cancer patients [J]. *Oncotarget*, 2014, 5(20):9650-9663.
- [33] Tanaka Y, Kamohara H, Kinoshita K, *et al.* Clinical impact of serum exosomal microRNA-21 as a clinical biomarker in human esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Cancer*, 2013, 119 (6):1159-1167.
- [34] Santasusagna S, Moreno I, Navarro A, *et al.* Proteomic analysis of liquid biopsy from tumor-draining vein indicates that high expression of exosomal ECM1 is associated with relapse in stage I-III colon cancer [J]. *Transl Oncol*, 2018, 11 (3):715-721.
- [35] Wozniak M, Peczek L, Czernek L, *et al.* Analysis of the miRNA Profiles of Melanoma Exosomes Derived Under Normoxic and Hypoxic Culture Conditions [J]. *Anticancer Res*, 2017, 37(12): 6779-6789.
- [36] Deng G, Qu J, Zhang Y, *et al.* Gastric cancer-derived exosomes promote peritoneal metastasis by destroying the mesothelial barrier [J]. *FEBS Lett*, 2017, 591 (14):2167-2179.
- [37] 于娟, 张立平, 孙宁, 等. 外泌体与自身免疫病的研究进展 [J]. *医学研究生学报*, 2018, 31(9):972-976.
- [38] 张 扬, 范小乐, 陈和平, 等. 外泌体在胃癌中的研究进展 [J]. *医学研究生学报*, 2017, 30(10):1096-1099.

(收稿日期:2019-03-18; 修回日期:2019-04-17)

(责任编辑:刘玉巧; 英文编辑:朱一超)