

· 中青年学者论坛 ·



王越 副教授、硕士生导师，现任海军军医大学（第二军医大学）基础医学院组织胚胎学教研室主任，海军军医大学（第二军医大学）转化医学研究中心干细胞与外泌体转化研究平台负责人，主要从事干细胞与外泌体领域的基础与转化医学研究工作。兼任中国解剖学会医学发育生物学分会青年委员会委员。近5年带领团队在干细胞的非编码RNA调控机制、外泌体临床转化研究方面取得了大量成果，发现了以非编码RNA miR-181、linc-RoR、snoRNA7A为代表的一系列干细胞自我更新调控分子，并阐明了这一系列分子的作用机制。证实了外泌体通过microRNA转移抑制肌成纤维细胞形成和瘢痕挛缩的机制及潜在临床价值。担任国家重点研发计划“干细胞及转化研究”重点专项子课题组长，承担国家级、上海市各类基金项目8项。获得6项国家发明专利授权。近5年作为第一作者、共同第一作者或共同通信作者在 *Dev Cell*、*Nat Commun* 等SCI收录期刊上发表论文14篇。入选上海市青年拔尖人才开发计划、上海市青年科技启明星计划、上海市卫生计生系统优秀青年医学人才培养计划、解放军总后勤部优秀青年科技人才扶持对象，获上海市五四青年奖章、中国青年解剖科学家奖，荣立三等功一次。

DOI:10.16781/j.0258-879x.2018.07.0697

转化医学研究领域的 super “STAR”：外泌体相关诊疗技术现状与前景

黎力¹，王越^{1,2*}

1. 海军军医大学（第二军医大学）基础医学院组织胚胎学教研室，上海 200433
2. 海军军医大学（第二军医大学）转化医学研究中心，上海 200433

[摘要] 近年来，外泌体在生物医药研究领域受到高度关注，尤其是在精准医学相关的诊断技术研发和临床转化中被寄予厚望，例如在疾病无创性诊断、肿瘤液态活检组织检查、精准药物研发和临床疗效监测等方面均有大量的外泌体相关研究报道。外泌体具有稳定（stable）、示踪（trackable）、活性（active）和实时（real-time）4个生物学特性，有望成为转化医学下一代“STAR”的关键因素。2014年以来，外泌体相关研究呈爆发式增长，已经有不少外泌体相关的新型诊疗专利技术或产品出现。本文简要概述外泌体的研究历史、生物学特性及诊疗技术的研发现状，并初步分析外泌体相关技术的转化研究发展趋势及前景。

[关键词] 外泌体；细胞间通讯；诊疗技术；转化医学；精准医学

[中图分类号] R 446.11；R 45 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2018)07-0697-07

Super “STAR” in translational medicine: current status and prospects of exosome-related diagnosis and treatment technologies

LI Li¹, WANG Yue^{1,2*}

1. Department of Histology and Embryology, College of Basic Medical Sciences, Navy Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China
2. Center of Translational Medicine, Navy Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China

[Abstract] Recently, exosome has gained great attention in the field of biomedical research, especially in precision medicine-related diagnostic technology and clinical transformation of therapeutic strategies. There have been a large number of exosome-related studies involving non-invasive diagnosis of diseases, liquid biopsy of tumor, development of precision drugs and observation of clinical efficacy. Exosomes possess four biological characteristics: stable, trackable, active and real-time.

[收稿日期] 2018-02-04 **[接受日期]** 2018-07-17

[基金项目] 上海市青年科技启明星计划(17QA1405400), 上海市卫生计生系统优秀青年医学人才培养计划(2017YQ028). Supported by Shanghai Rising Star Program for Young Scientists (17QA1405400) and Young Medical Talents Training Program of Health Department of Shanghai Municipal Government (2017YQ028).

[作者简介] 黎力, 硕士生. E-mail: 283773519@qq.com

*通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81870961, E-mail: wangyuesmmu@163.com

time, which make them the key factors for the next generation “STAR” of translational medicine. Since 2014 exosome-related studies began to show an explosive increase, and several exosome-associated patent technologies or products have appeared. This article summarizes the research history, biological characteristics and clinical exploration of exosomes, and analyzes the prospects of exosome-related technology.

[Key words] exosomes; cell communication; diagnosis and treatment technology; translational medicine; precision medicine

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2018, 39(7): 697-703]

外泌体是指细胞主动分泌到细胞外环境中的一类粒径在纳米级别的微小囊泡,具有完整的脂质双层膜结构和一定的内容物成分。外泌体可以被各种细胞分泌,并在各种生物体液中广泛地存在、分布和循环,能够运输和运送大量的蛋白质、脂质和核酸,具有重要的生理功能^[1-3]。近年来,外泌体在生物医药研究领域受到高度关注,尤其在精准医学相关的诊断技术研发和临床转化中被寄予厚望。外泌体作为疾病的生物标志物和递送药物、基因的载体,在疾病无创性诊断、肿瘤液态活检、精准药物研发和临床疗效监测等方面得到广泛研究^[4-7]。本文简要概述外泌体的研究历史、生物学功能及诊疗技术研发现状,并对外泌体相关技术的转化研究发展趋势及前景进行初步分析。

1 外泌体研究历史

早在20世纪50年代,科学家第一次借助透射电子显微镜技术把视野投入纳米尺度的生物体时,外泌体及与其相似的囊泡类物质就已经被发现,并被命名为细胞外囊泡(extracellular vesicle)^[8]。后来研究发现,细胞外囊泡其实是一个混杂的大家族,其成员均具有与质膜相同的拓扑结构双层膜。但是,细胞外囊泡表面的膜蛋白及内容物成分区别很大。目前细胞外囊泡的分类标准尚未完全统一,通常根据粒径、表面标志分子等大致分为外泌体、微囊泡及凋亡小体等类型。

科学家很早就发现细胞外囊泡可以被单核吞噬系统细胞摄取,但在很长一段时间内,这种摄取仅仅被认为是巨噬细胞清理残余物和抗原递呈细胞捕获循环抗原进行加工递呈的方式,因此针对细胞外囊泡其他生理功能的研究未受到过多重视,对细胞外囊泡家族成员间的区别也未有太多的认识。人们更多地吧外泌体的分泌简单类比于内体残余物的胞

吐作用,外泌体也被视为装载细胞废弃物的包裹,即细胞的“垃圾桶”。但自2007年起,大量证据表明外泌体并非只能进入巨噬细胞,而是可以进入各种类型的细胞;外泌体进入细胞后并非只能被溶酶体消化,而是可以将其内部分子释放入细胞质,发挥调节功能。这说明外泌体可以介导细胞间的功能性分子转移,并对受体细胞有靶向调控作用^[9-11]。在随后的十余年里,尤其是2013年诺贝尔生理学或医学奖授予囊泡运输调控机制的发现者之后,这一人体内跨细胞、跨系统的“物流”系统开始受到越来越多的重视。大量研究证实,外泌体或微囊泡可以通过细胞间的蛋白质、RNA、DNA等功能性大分子的转移机制调控微环境中的细胞功能,尤其是在肿瘤转移、免疫激活、组织再生等需要细胞间密切协作的生理病理过程中,外泌体介导的信息传递成为备受关注的机制,其在基础研究和临床转化医学领域的研究热度与日俱增^[12-13]。

外泌体独特的形成机制使其成为细胞外囊泡家族中的特殊一员。外泌体来源于一种被称为多泡内体的特殊内体结构。多泡内体的膜可以向内凹陷形成大量腔内小囊泡,在合适的条件下,内体的外膜与细胞质膜融合,将腔内小囊泡释放到细胞外环境,即为外泌体。外泌体中的内容物是由转运相关内体分选复合物(endosomal sorting complex required for transport, ESCRT)的多种蛋白协作摄取而来,与细胞质的一般性成分区别较大,可谓是精心挑选的分子信息,但是何种分子在何种条件下会被富集,其机制与规则目前尚不清楚。不仅如此,外泌体膜与其来源细胞的质膜成分也有很大区别。例如,外泌体上常常富集有来自ESCRT I的凋亡连接基因2相互作用蛋白X(apoptosis-linked gene 2-interacting protein X, ALIX)和肿瘤易感基因101(tumor susceptibility gene 101, TSG101)蛋白,涉及膜融合和转运的蛋白质如Rab GTPase等,以及一

类特有的四跨膜蛋白超家族成员如 CD63、CD9、CD81 和 CD82 等^[14-15], 这些膜蛋白可能自身寡聚化或参与其他膜蛋白如整合素、免疫球蛋白超家族受体与金属蛋白酶的相互作用, 也可与特定的脂质如胆固醇和神经节苷脂等相互作用; 这些膜蛋白也常被作为外泌体区别于其他细胞外囊泡的特征性标志物。

2 外泌体的生物学特性和“STAR”潜质

随着近年研究的深入, 特别是精准医学理念的提出, 外泌体在转化医学领域备受关注。外泌体具有稳定 (stable)、示踪 (trackable)、活性 (active) 和实时 (real-time) 4 个生物学特性, 有望成为转化医学下一代“STAR”的关键因素。

2.1 稳定 外泌体是一种稳定的细胞外循环囊泡, 具有完整的脂质双分子层, 可以很大程度上抵抗外来化学、物理因素的破坏, 特别是生物体液中常见的蛋白、核酸酶的降解, 这一特性显著优于其他可能作为生物学标志物的体液循环分子, 尤其是游离核酸类标志物。实验数据表明, 离体的生物体液, 如血液或尿液中的外泌体可以在常温下稳定存在数天之久, 冷藏条件下可保存 2~3 周, 大大降低了样品保存、运输的难度; 而且外泌体粒径小, 不易形成内部微冰晶, 可以耐受一定次数的反复冻融^[16]。优良的稳定性是外泌体成为诊断标志物、生物治疗药物的首要前提条件。

2.2 示踪 外泌体表面的蛋白标志物有显著的细胞来源特异性, 例如胰腺癌细胞来源外泌体富含膜蛋白磷脂酰肌醇蛋白聚糖 1 (glypican 1, GPC-1)^[6] 等。虽然不同器官来源外泌体的膜蛋白特性尚未完全阐明, 但其对于生物标志物的研究仍然具有极大的吸引力。例如某些肿瘤标志物往往缺乏组织来源特异性, 特别是核酸类标志物, 而通过外泌体表面特异性标志物的富集有望获取特定组织来源的外泌体, 有助于确定肿瘤原发灶的位置。同时, 除了外泌体“从哪里来”, 近年研究还发现了决定外泌体“到哪里去”的示踪机制, 即外泌体表面的整合素分子类型决定其细胞靶向性^[17]。这也进一步提升了其在肿瘤转移预测、干细胞治疗等转化医学领域中的潜在研究价值。

2.3 活性 外泌体究竟是“垃圾桶”还是“鸡毛信”? 答案已经越来越倾向于后者。外泌体有望作

为体内活细胞特有的一种“活性”机制而被监测和利用。目前研究较多的其他肿瘤液态活组织检查标志物, 如循环肿瘤 DNA (circulating tumor DNA, ctDNA)、循环微 RNA (microRNA, miRNA)、肿瘤标志物蛋白等, 都有可能来源于坏死或凋亡的肿瘤细胞^[18-21], 而外泌体理论上只能由活细胞主动分泌, 因此外泌体可能更有希望反映现存肿瘤细胞数量和活性水平, 这无疑对于肿瘤患者预后及治疗后反应监测具有特殊的价值。不仅如此, “活性”的外泌体可能意味着它在生理病理过程中具有一定的调控价值, 可能通过模拟或阻断其活性而干预疾病进程, 这也为外泌体靶向治疗带来新的希望^[22]。

2.4 实时 迄今为止, 在转化医学领域, 生物标志物的时效性还是一个较少被考量的指标。而在精准医学时代, 一个随着疾病进程敏感应答并及时变化的诊断指标, 无疑对于监测疾病治疗效果、病情转归有更大的临床意义。研究提示, ctDNA、循环 miRNA 等循环核酸标志物、多数蛋白类标志物来源于细胞的崩解物, 在体液中的清除时间可能依赖于巨噬细胞和循环酶类的活性, 发生有临床意义的改变往往需要十几个小时乃至数天^[23-24]; 而外泌体作为细胞间信息传递的天然机制, 其信号发送、接收和消减的速率理论上应与体液性生理调节 (例如激素) 的时效性吻合, 即以小时、分钟甚至秒为单位来计算^[25-26]。这意味着随着检测技术的不断进步, 如果可以实现对外泌体水平和标志分子的快速灵敏监测, 就有可能实时监控体内的循环体液乃至组织微环境的分子水平改变, 如实时监控心肌活力、神经活性、肝脏功能、肿瘤负荷等。要实现这种实时监控, 首先需要对外泌体作为细胞间信息传递载体的精准解读, 其次需要监控技术的全面进步和检测仪器的集成小型化。

3 外泌体相关诊断技术研发现状

近年来, 外泌体在疾病无创性诊断领域的研究成为关注焦点。随着国家对精准医学研究的大力扶持, 科研机构、医院, 以及仪器、试剂前沿技术厂商的大力发展、合作, 促使外泌体相关诊断技术的研发更加深入。短短几年, 外泌体的临床诊断技术得到了蓬勃发展, 从肿瘤到感染, 从神经到肝脏, 各个系统各类疾病均有外泌体诊断技术的研究实例或标书申请。有些学者难免担心, 外泌体诊断

真的有这么大的前景吗?如前文所述,外泌体以其自身的稳定、示踪、活性和实时等诸多特点,必将在临床诊断上发挥重要作用。但是要真正成为未来的核心诊断技术,无疑需要经得起临床实践的检验。从目前的研究报道来看,主流的外泌体临床诊断策略分为两大类:外泌体内核酸类标志物和蛋白类标志物。

3.1 核酸类标志物 外泌体内的核酸类标志物已经被证实在很多疾病中具有很好的诊断价值。作为天然的载体系统,外泌体可将信使 RNA (messenger RNA, mRNA)、miRNA、长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA)、DNA 等从供体细胞转运到受体细胞,从而调节指定的靶基因表达。如 miR-133a 已被证明是心肌梗死的诊断生物标志物^[7], miR-200c 和 miR-141 则与乳腺癌中的肿瘤转移相关^[27]。

从已报道文献中的技术方法来看,外泌体内核酸类标志物可行的临床检测技术可能与当前其他体液分子检测技术类似,即通过 RNA 高通量测序整体检测或实时荧光定量聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 技术检测特定分子标志物^[28-29]。这方面技术面临的最大问题是体液中游离核酸的干扰,因此必须先经过超速离心或特殊富集方法获取纯化的外泌体后进行检测,这无疑会增加检测的时间成本和仪器耗材成本。目前大量试剂厂商致力于开发新型的外泌体分离试剂盒,以在不需超速离心机的常规条件下快速分离外泌体,提高外泌体临床诊断技术应用的可行性。如德国 Qiagen 公司的外泌体提取试剂盒主要是根据膜亲和吸附原理抽提外泌体,而美国 SBI 公司的外泌体提取试剂盒则主要采用聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 沉淀法分离纯化外泌体。但是,在体液诊断过程中需要重视外泌体的异质性问题,因为超速离心方案和绝大多数目前的分离试剂盒均根据囊泡的粒径或 CD63、CD9 等表面分子区分外泌体,而体液中的外泌体来源广泛,直接抽提全部外泌体进行分子检测可能会造成较高的背景噪声,也可能对结果造成一定干扰。解决这一问题可能需要对正常人血清外泌体的基线水平进行更系统的分析,而目前更主流的研究趋势是选取合适的外泌体表面标志分子,通过磁珠分选等策略实现对特定目标器官或目标细胞来源的外泌体的精准分离^[30],但这种方案的灵敏性和特异

性均有待进一步证实。

3.2 蛋白类标志物 外泌体蛋白质具有优于传统血清学标志物的独特优势。首先,与直接在血液中检测到的蛋白质相比,外泌体蛋白质具有更高的灵敏性。如核转录因子 X 盒结合蛋白 1 (nuclear transcription factor X box binding 1, NFX1) 和 cGMP 依赖性蛋白激酶 1 (cGMP-dependent protein kinase 1, PKG1) 仅能在血浆外泌体中检测出^[2]。其次,外泌体蛋白质比分泌蛋白质具有更高的特异性。GPC1 被证明能够特异性富集肿瘤细胞来源的外泌体,并且在区分非肿瘤受试者和胰腺癌患者方面显示出比糖类抗原 19-9 (carbohydrate antigen 19-9, CA19-9) 或无血清 GPC1 更高的特异性^[10]。第三,外泌体蛋白质高度稳定。脂质双分子层可保护外泌体蛋白质免受外部蛋白酶和其他酶的影响,从冷冻 5 年的外泌体样品中可分离出磷酸化蛋白^[2]。

外泌体表面或内部的蛋白类标志物可以采用流式细胞术及酶联免疫吸附测定 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 等成熟的临床检验技术进行检测。流式细胞术检测方案理论上具有较好的应用前景,因为该方案理论上不需要对样品中的外泌体进行分离,大大缩减了检测时间和费用。由于外泌体及微囊泡的粒径远远小于目前常规流式细胞仪的检测下限,文献中较为常见的方案是采用抗体偶联微球结合外泌体,再采用常规流式细胞术进行检测。例如,2016 年美国德州大学安德森癌症中心 Kalluri 教授课题组报道,采用抗体偶联微球检测 GPC1 阳性外泌体可诊断胰腺癌^[6]。在临床检测中应用这种方案具有一定的预富集效果和定量分析能力,对于提高外泌体的检出率具有很好的价值。但是这种方案不能根据粒径确定检测到的颗粒是否为外泌体,也不能实现单一外泌体分析而解决异质性问题。目前只有少数种类的微颗粒流式细胞仪可以直接进行外泌体或微囊泡的检测,其检测下限可达到 50 nm,因此可以直接确定单一外泌体的粒径和表面分子标志物,这可能是外泌体临床检测富有前景的技术方案之一,值得关注。

3.3 外泌体诊断的转化前景 总体而言,目前基于外泌体的临床诊断产品还较为少见。在转化进程上比较前沿的案例是美国麻省总医院 Skog 教授创建、ExosomeDx 公司研发的产品 ExoDx Lung (ALK)。该产品可以通过血清外泌体检测棘皮

动物微管相关蛋白样 4 (echinoderm microtubule-associated protein-like 4, EML4) 一间变性淋巴瘤激酶 (anaplastic lymphoma kinase, ALK) 融合基因 (EML4-ALK) 的 5 种不同突变, 从而预测非小细胞肺癌对 ALK 抑制剂的敏感性。该产品于 2016 年 1 月发布, 成为美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 批准上市的第一个外泌体诊断试剂盒。值得一提的是, 这一案例并未采用具有特殊技术壁垒的方案, 可复制性良好, 为外泌体诊断研究的转化前景带来希望^[31-32]。

4 外泌体相关治疗技术研究现状

外泌体研究领域还涵盖了另一大类的热门技术: 疾病的靶向治疗, 特别是干细胞治疗和基因靶向治疗技术。这两种技术均是曾被寄予厚望的下一代治疗技术, 但是由于自身局限性, 其转化进程缓慢。外泌体相关研究为这两类技术的转化带来新的希望。

4.1 干细胞治疗 干细胞治疗技术是现代医学发展的核心领域之一, 其最大瓶颈问题就是干细胞的临床安全性和治疗制剂的标准化质控。尤其是国家现行政策规定干细胞制剂的申报需要依照药品标准, 这与活性细胞产品自身存在的动态性和不确定性相悖, 导致干细胞治疗技术的临床转化困难。外泌体的研究为解决这一问题带来希望。研究证实, 部分干细胞治疗的效应可以不依赖移植细胞的存活, 而仅依靠其旁分泌效应就可以实现, 其中一部分效应可能与干细胞来源的外泌体有关^[33-34]。外泌体作为治疗制剂具有极大的天然优势: (1) 相对的稳定性, 可以实现冻干保存和非冷链运输; (2) 并非活性细胞, 移植后无成瘤的风险; (3) 成分相对恒定, 便于实现标准化质控。干细胞来源的外泌体有望替代部分类型的活性移植干细胞, 从而实现更为安全可控的治疗形式。当然, 干细胞来源外泌体的有效性和机制还有待更多研究结果的佐证, 这一问题已经受到广泛关注^[35-37]。

4.2 基因靶向治疗 基因靶向治疗技术也一度被认为是更有前景的治疗研究策略之一, 能否找到转移效率高、安全性好、靶向性强的基因载体是基因靶向治疗技术研究的瓶颈。相比目前在人体安全性上受到较大质疑的各类病毒载体, 纳米材料载体临床可行性较好。但由于生物体治疗反应的复杂性,

全人工合成纳米载体的临床应用还有待于针对体内安全性和生物靶向性进行的不断优化, 特别是更多基因治疗靶点的疗效确定和机制研究。而外泌体作为天然的生物纳米载体, 其生物安全性明确, 疗效的确定性也有实验依据, 特别是外泌体具有促进 RNA 内容物细胞间转移的特性, 并且可以在体外进行大批量瞬时转染和功能性 RNA 修饰, 有望成为 RNA 类药物的有效载体^[38]。外泌体的体内靶向性机制研究发现, 不同亚型的整合素分子可以决定外泌体的器官靶向性^[17], 这为基于外泌体的器官靶向治疗提供了思路。因此, 外泌体的靶向治疗效应研究具有巨大的转化研究潜力。这一方案能否走向临床应用, 主要可预见的瓶颈在于外泌体的异质性导致的批次间不稳定性, 以及外泌体成分复杂性导致的质控标准难以统一^[39]。可以设想, 在严格细胞培养的条件下建立标准化模式生产外泌体制剂并进行严格质控, 有望将其直接或经过 RNA 修饰后作为治疗载体, 进行临床转化应用, 这将是基因靶向治疗特别是 RNA 类药物应用研究的福音。

5 展望

外泌体在生物医药研究领域受到高度关注, 在疾病无创性诊断、肿瘤液态活组织检查、精准药物研发和临床疗效监测等方面均有大量的外泌体相关研究报告, 尤其是在疾病的无创性诊断技术和治疗策略的临床转化领域的应用令人期待, 能否真正实现成批次的转化成果并推动精准医学的发展, 还有待时间的考验。外泌体自身的“STAR”特质已经决定了其未来不应该是转瞬即逝的流星。作为生物体内天然的纳米成分, 外泌体的研究更大程度上受限于纳米技术的进步, 尤其是生物纳米材料、纳米光学、微流体技术、单分子定量研究技术等学科交叉领域的发展。如果能尽快解决单一外泌体水平的分子检测难题, 特别是建立具有临床检测可行性的单一外泌体检测方案, 充分解决外泌体异质性问题, 将大大推动外泌体的转化研究进程。

[参考文献]

- [1] EL ANDALOUSSI S, MÄGER I, BREAKEFIELD X O, WOOD M J. Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2013, 12: 347-357.
- [2] COLOMBO M, RAPOSO G, THÉRY C. Biogenesis,

- secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles[J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2014, 30: 255-289.
- [3] FÉVRIER B, RAPOSO G. Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2004, 16: 415-421.
- [4] LU M, YUAN S, LI S, LI L, LIU M, WAN S. The exosome-derived biomarker in atherosclerosis and its clinical application[J/OL]. *J Cardiovasc Transl Res*, 2018 May 25. doi: 10.1007/s12265-018-9796-y. [Epub ahead of print].
- [5] MASAOUTIS C, MIHAILIDOU C, TSOUROUFLIS G, THEOCHARIS S. Exosomes in lung cancer diagnosis and treatment. From the translating research into future clinical practice[J]. *Biochimie*, 2018, 151: 27-36.
- [6] MELO S A, LUECKE L B, KAHLERT C, FERNANDEZ A F, GAMMON S T, KAYE J, et al. Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer[J]. *Nature*, 2015, 523: 177-182.
- [7] CHENG C, WANG Q, YOU W, CHEN M, XIA J. MiRNAs as biomarkers of myocardial infarction: a meta-analysis[J/OL]. *PLoS One*, 2014, 9: e88566. doi: 10.1371/journal.pone.0088566.
- [8] RAMIREZ S H, ANDREWS A M, PAUL D, PACTHER J S. Extracellular vesicles: mediators and biomarkers of pathology along CNS barriers[J]. *Fluids Barriers CNS*, 2018, 15: 19. doi: 10.1186/s12987-018-0104-7.
- [9] KOUREMBANAS S. Exosomes: vehicles of intercellular signaling, biomarkers, and vectors of cell therapy[J]. *Annu Rev Physiol*, 2015, 77: 13-27.
- [10] WILLMS E, JOHANSSON H J, MÄGER I, LEE Y, BLOMBERG K E, SADIK M, et al. Cells release subpopulations of exosomes with distinct molecular and biological properties[J/OL]. *Sci Rep*, 2016, 6: 22519. doi: 10.1038/srep22519.
- [11] PEGTEL D M, COSMOPOULOS K, THORLEY-LAWSON D A, VAN EIJNDHOVEN M A, HOPMANS E S, LINDENBERG J L, et al. Functional delivery of viral miRNAs via exosomes[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 6328-6333.
- [12] COCUCCI E, MELDOLESI J. Ectosomes and exosomes: shedding the confusion between extracellular vesicles[J]. *Trends Cell Biol*, 2015, 25: 364-372.
- [13] BUZAS E I, GYÖRGY B, NAGY G, FALUS A, GAY S. Emerging role of extracellular vesicles in inflammatory diseases[J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2014, 10: 356-364.
- [14] COLOMBO M, MOITA C, VAN NIEL G, KOWAL J, VIGNERON J, BENAROCHE P, et al. Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles[J]. *J Cell Sci*, 2013, 126(Pt 24): 5553-5565.
- [15] RINK J, GHIGO E, KALAIIDZIDIS Y, ZERIAL M. Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes[J]. *Cell*, 2005, 122: 735-749.
- [16] JEYARAM A, JAY S M. Preservation and storage stability of extracellular vesicles for therapeutic applications[J/OL]. *AAPS J*, 2017, 20: 1. doi: 10.1208/s12248-017-0160-y.
- [17] HOSHINO A, COSTA-SILVA B, SHEN T L, RODRIGUES G, HASHIMOTO A, TESIC MARK M, et al. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis[J]. *Nature*, 2015, 527: 329-335.
- [18] LEE Y, PARK S, KIM W S, LEE J C, JANG S J, CHOI J, et al. Correlation between progression-free survival, tumor burden, and circulating tumor DNA in the initial diagnosis of advanced-stage EGFR-mutated non-small cell lung cancer[J/OL]. *Thorac Cancer*, 2018 Jul 10. doi: 10.1111/1759-7714.12793. [Epub ahead of print].
- [19] ZHANG J, HAN X, GAO C, XING Y, QI Z, LIU R, et al. 5-Hydroxymethylome in circulating cell-free DNA as a potential biomarker for non-small-cell lung cancer[J/OL]. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2018 Jul 12. pii: S1672-0229(18)30139-6. doi: 10.1016/j.gpb.2018.06.002. [Epub ahead of print].
- [20] ENDZELIŃŠ E, BERGER A, MELNE V, BAJOSANTOS C, SOBOŁEVSKA K, ĀBOLS A, et al. Detection of circulating miRNAs: comparative analysis of extracellular vesicle-incorporated miRNAs and cell-free miRNAs in whole plasma of prostate cancer patients[J/OL]. *BMC Cancer*, 2017, 17: 730. doi: 10.1186/s12885-017-3737-z.
- [21] OLBROMSKI M, PODHORSKA-OKOŁÓW M, DZIĘGIEL P. Role of the SOX18 protein in neoplastic processes[J]. *Oncol Lett*, 2018, 16: 1383-1389.
- [22] LIMONI S K, MOGHADAM M F, MOAZZENI S M, GOMARI H, SALIMI F. Engineered exosomes for targeted transfer of siRNA to HER2 positive breast cancer cells[J/OL]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2018 Jun 28. doi: 10.1007/s12010-018-2813-4. [Epub ahead of print].
- [23] 王建军,陈德,谢萍芳,潘艺,谭云洪,汤立军. 鸟结核分枝杆菌感染巨噬细胞后的外泌体刺激巨噬细胞产生的细胞因子及其蛋白质表达改变[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2013, 29: 123-126.
- [24] KELLER S, SANDERSON M P, STOECK A, ALTEVOGT P. Exosomes: from biogenesis and secretion to biological function[J]. *Immunol Lett*, 2006, 107: 102-108.
- [25] KIBRIA G, RAMOS E K, WAN Y, GIUS D R, LIU H. Exosomes as a drug delivery system in cancer therapy: potential and challenges[J/OL]. *Mol Pharm*, 2018 May 30. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.8b00277. [Epub ahead of print].
- [26] MROWCZYNSKI O D, ZACHARIA B E, CONNOR J

- R. Exosomes and their implications in central nervous system tumor biology[J/OL]. *Prog Neurobiol*, 2018 Jul 9. pii: S0301-0082(17)30092-8. doi: 10.1016/j.pneurobio.2018.06.006. [Epub ahead of print].
- [27] ZHANG G, ZHANG W, LI B, STRINGER-REASOR E, CHU C, SUN L, et al. MicroRNA-200c and microRNA-141 are regulated by a FOXP3-KAT2B axis and associated with tumor metastasis in breast cancer[J/OL]. *Breast Cancer Res*, 2017, 19: 73. doi: 10.1186/s13058-017-0858-x.
- [28] DUIJVESZ D, LUIDER T, BANGMA C H, JENSTER G. Exosomes as biomarker treasure chests for prostate cancer[J]. *Eur Urol*, 2011, 59: 823-831.
- [29] MIRANDA K C, BOND D T, MCKEE M, SKOG J, PĂUNESCU T G, DA SILVA N, et al. Nucleic acids within urinary exosomes/microvesicles are potential biomarkers for renal disease[J]. *Kidney Int*, 2010, 78: 191-199.
- [30] PEDERSEN K W, KIERULF B, NEURAUTER A. Specific and generic isolation of extracellular vesicles with magnetic beads[J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1660: 65-87.
- [31] ZHANG M, WANG Q, DING Y, WANG G, CHU Y, HE X, et al. Brief report: CUX1-ALK, a novel alk rearrangement that responds to crizotinib in non-small-cell lung cancer[J]. *J Thorac Oncol*, 2018 Jul 13. pii: S1556-0864(18)30785-8. doi: 10.1016/j.jtho.2018.07.008. [Epub ahead of print].
- [32] ZHANG L, LI Y, ZHANG S, GAO C, NIE K, JI Y. Primary resistance to crizotinib treatment in a non-small cell lung cancer patient with an EML4-ALK rearrangement: a case report[J]. *Cancer Biol Med*, 2018, 15: 178-181.
- [33] SAHOO S, KLYCHKO E, THORNE T, MISENER S, SCHULTZ K M, MILLAY M, et al. Exosomes from human CD34⁺ stem cells mediate their proangiogenic paracrine activity[J]. *Circ Res*, 2011, 109: 724-728.
- [34] LI T, YAN Y, WANG B, QIAN H, ZHANG X, SHEN L, et al. Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells alleviate liver fibrosis[J]. *Stem Cells Dev*, 2013, 22: 845-854.
- [35] KHAN M, NICKOLOFF E, ABRAMOVA T, JOHNSON J, VERMA S K, KRISHNAMURTHY P, et al. Embryonic stem cell-derived exosomes promote endogenous repair mechanisms and enhance cardiac function following myocardial infarction[J]. *Circ Res*, 2015, 117: 52-64.
- [36] ZHANG W, BAI X, ZHAO B, LI Y, ZHANG Y, LI Z, et al. Cell-free therapy based on adipose tissue stem cell-derived exosomes promotes wound healing via the PI3K/Akt signaling pathway[J/OL]. *Exp Cell Res*, 2018 Jun 28. pii: S0014-4827(18)30375-6. doi: 10.1016/j.yexcr.2018.06.035. [Epub ahead of print].
- [37] HARRELL C R, SIMOVIC MARKOVIC B, FELLABAUM C, ARSENIJEVIC A, DJONOV V, ARSENIJEVIC N, et al. Therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived exosomes in the treatment of eye diseases[J/OL]. *Adv Exp Med Biol*, 2018 May 18. doi: 10.1007/5584_2018_219. [Epub ahead of print].
- [38] ALVAREZ-ERVITI L, SEOW Y, YIN H, BETTS C, LAKHAL S, WOOD M J. Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes[J]. *Nat Biotechnol*, 2011, 29: 341-345.
- [39] KALLURI R. The biology and function of exosomes in cancer[J]. *J Clin Invest*, 2016, 126: 1208-1215.

[本文编辑] 孙岩