

DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20210819

· 综述 ·

外泌体程序性死亡蛋白 1 在肺癌中的研究进展

胡家勋, 唐昊*

海军军医大学(第二军医大学)第二附属医院呼吸与危重症医学科, 上海 200003

[摘要] 近年来,以程序性死亡蛋白-1(PD-1)/程序性死亡蛋白配体-1(PD-L1)抑制剂为代表的免疫治疗对肺癌显示出明显疗效,但在不同的肺癌患者中PD-1/PD-L1抑制剂的疗效存在显著差异。研究发现外泌体PD-L1(ePD-L1)可以代替肺癌细胞PD-L1抑制T细胞活化,产生免疫抵抗,同时还能将PD-L1转移到次级细胞发挥免疫耐受作用,影响免疫治疗的效果。本文对外泌体及ePD-L1的分离与检测方法、ePD-L1的免疫抑制作用及ePD-L1在肺癌进展和免疫治疗中的作用机制进行综述。

[关键词] 外泌体; 程序性死亡蛋白-1; 程序性死亡蛋白配体-1; 肺肿瘤; 免疫疗法

[中图分类号] R 734.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2097-1338(2023)02-0238-07

Exosomal programmed death-1 in lung cancer: research progress

HU Jia-xun, TANG Hao*

Department of Respiratory and Critical Care Medicine, The Second Affiliated Hospital of Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200003, China

[Abstract] In recent years, immunotherapy represented by programmed death-1 (PD-1)/programmed death-ligand 1 (PD-L1) inhibitors has shown remarkable efficacy for lung cancer. However, there are significant differences in the efficacies of PD-1/PD-L1 inhibitors in different patients with lung cancer. Studies have found that exosomal PD-L1 (ePD-L1) can replace the PD-L1 from lung cancer cells to inhibit the activation of T cell and produce immune resistance. At the same time, it can transfer PD-L1 to secondary cells to play the role of immune tolerance and affect the efficacy of immunotherapy. This paper reviews the methods of separation and detection of exosomes and ePD-L1, the immunosuppressive effect of ePD-L1, and the mechanism of ePD-L1 in the progress of lung cancer and immunotherapy.

[Key words] exosomes; programmed death-1; programmed death-ligand 1; lung neoplasms; immunotherapy

[Acad J Naval Med Univ, 2023, 44(2): 238-244]

GLOBOCAN 2020 数据显示,肺癌的发病率仅次于乳腺癌,占总体癌症发病的 11.4%; 死亡率居首位,占总体癌症死亡的 18.0%^[1]。近年来,抗程序性死亡蛋白 1 (programmed death-1, PD-1) / 程序性死亡蛋白配体 1 (programmed death-ligand 1, PD-L1) 疗法在多种癌症中取得较理想的疗效。PD-1 主要来自活化 T 细胞,无法在静息 T 细胞上表达^[2], PD-L1 则是一种 I 型跨膜蛋白,通过与细胞上的负性共刺激分子 PD-1 结合抑制细胞的活化,进而保持免疫稳态。肿瘤细胞可过量表达 PD-L1,并通过结合 T 细胞表面的 PD-1 抑制它的激活,导致肿瘤细胞发生免疫逃逸^[3]。抗 PD-1/PD-L1 免疫检查点疗法可阻断两者之间的结合,

恢复 T 细胞活力。正常的生理条件下, T 细胞免疫稳态的维持与 PD-1/PD-L1 信号通路密切相关,可防止免疫系统过度激活引起组织损伤^[4]。PD-1/PD-L1 信号通路激活并不能直接引起组织细胞凋亡,而是使 T 细胞周期停在 G₁ 期^[5]。近期有研究检测 PD-1/PD-L1 信号通路发现,除了肿瘤细胞膜表面,PD-L1 同样存在于外泌体表面^[6]。表达 PD-L1 的外泌体可与 T 细胞相互作用并加重免疫抑制^[7-8]。目前,临床常规应用肿瘤组织标本 PD-L1 的免疫组织化学染色来选择符合免疫治疗条件的患者,但仍有部分 PD-L1 阳性的非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 患者不能从免疫治疗中获益,这可能与忽视了外泌体 PD-L1 (exosomal

[收稿日期] 2021-08-19 [接受日期] 2022-04-12

[基金项目] 国家自然科学基金(82070036)。Supported by National Natural Science Foundation of China (82070036).

[作者简介] 胡家勋, 硕士。E-mail: hujiaxun1990@qq.com

*通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81885334, E-mail: tanghao_0921@126.com

PD-L1, ePD-L1) 有关。研究发现 ePD-L1 可以代替肺癌细胞 PD-L1 抑制 T 细胞活化, 产生免疫抵抗, 同时还能将 PD-L1 转移到次级细胞发挥免疫耐受作用, 影响免疫治疗的效果。本文就外泌体及 ePD-L1 的分离与检测方法、ePD-L1 的免疫抑制作用及 ePD-L1 在肺癌进展和免疫治疗中的作用机制进行综述。

1 外泌体与 ePD-L1 的分离和检测方法

外泌体来源于内涵体, 以多泡体形式与细胞质膜整合后形成腔内小泡, 随后释放到细胞外成为胞外囊泡, 半径为 20~50 nm, 浮力密度在蔗糖中为 $1.13 \times 10^3 \sim 1.19 \times 10^3$ g/L, 结构相对简单。生理条件下, 健康细胞、癌细胞和相关的基质细胞都会分泌外泌体^[9], 在血清和血浆^[10]、唾液^[11]、乳汁^[12]、脑脊液^[13] 等体液中都能检测到。外泌体富含胆固醇和鞘磷脂, 膜表面富集的 4 种主要跨膜蛋白 (CD63、CD81、CD9、CD82) 是外泌体的理想标志物^[14]。由于体液的复杂性, 外泌体分离与检测存在诸多困难, 现对外泌体及 ePD-L1 的分离和检测方法及其优缺点进行归纳。

1.1 外泌体的分离方法 近年来, 研究者根据外泌体的理化性质提出了多种分离提纯方法, 常见的有离心法、沉淀法、粒径分离法、免疫亲和法、基于适配体的磁分离法和微流控技术分离法等。离心法是通过物质在溶液中沉降系数的差异进行纯化的方法, 包括差速离心法和密度梯度离心法, 前者是最常用的外泌体分离方法, 但需配备昂贵的设备, 且外泌体的结构和功能易被破坏; 后者虽然分离纯度更高, 但操作复杂且易引入分离介质而导致污染。沉淀法是利用共沉淀和反向筛选的原理进行分离的方法, 包括聚合物沉淀法和有机溶剂沉淀法, 分离效率高, 但沉淀介质会干扰进一步纯化。粒径分离法是根据不同微粒的大小差异进行分离的方法, 包括超滤法和排阻色谱法, 操作简单、快速且廉价, 其中超滤法的外泌体回收率低且易破坏结构和功能, 而排阻色谱法只适用于小体积样本的提纯。免疫亲和法是利用抗体与外泌体已有的特异性表面蛋白结合进行分离的方法, 如磁分离法中修饰的免疫磁珠与抗体偶联可用于分离目标外泌体, 但昂贵的试剂不利于其在大体积样本中使用^[15]。基于适配体的磁分离法是在磁珠表面进行适配体修饰, 通过

结合表面蛋白实现外泌体捕获, 然后添加适配体互补序列实现外泌体释放, 但有限的适配体限制了该方法的普及。膜介导的外泌体分离技术也可提高磁分离法的效率。结合链霉亲和素修饰的氧化铁纳米颗粒的磁激活分选技术也可以从供体细胞的上清液中快速分离外泌体^[16]。ExoCounter 作为一种新的技术, 也可以通过特定的抗体功能化视盘捕获外泌体^[17]。与磁珠相比, 应用抗体偶联磁性纳米线的新方法可将捕获效率提高 3 倍^[18]。微流控技术囊括了材料、物理、化学、生物等微小流体技术, 将其与传统技术结合后开发出了捕获、过滤、磁分离、声学分离和电泳微流控技术等, 操作自动化, 但分离效率取决于装置所使用的技术原理, 稳定性和重复性较差。

1.2 外泌体的检测方法 基于外泌体独特的大小、表面特异性蛋白、脂质体谱和基因组谱, 近几十年来出现了多种定性和定量检测方法, 包括扫描电子显微镜、透射及原子力显微镜、ELISA、蛋白质印迹法、流式细胞术、动态光散射 (dynamic light scattering, DLS) 和纳米颗粒跟踪分析 (nanoparticle tracking analysis, NTA) 等。检测外泌体蛋白最常用的方法是蛋白质印迹法、ELISA 和质谱法; qPCR、微阵列和高通量测序技术也被成功用于外泌体核酸的测定。尽管这些技术功能强大, 但仍存在分析过程复杂、操作耗时和灵敏度低等缺陷。NTA 是一种分析跟踪粒子布朗运动能力的物理表征技术, 需要在测量囊泡浓度和大小之前使用校准珠进行设备校准。由于校准珠的尺寸无法控制, 检测外泌体的准确性较低。

随着纳米材料的发展, 纳米技术逐渐被应用于外泌体的常规检测, 并涌现出许多基于光学、电化学和电学检测原理的新方法, 如荧光生物传感器、电化学生物传感器、比色生物传感器、表面等离子体共振生物传感器、表面增强拉曼光谱生物传感器等^[19-20]。下一代新型生物传感器和芯片的开发需要微流体等^[21]新方法, 这种检测方法具有高通量、高灵敏度、低试剂消耗和便携性等优点。基于微流体的外泌体检测方法包括荧光成像、比色测定、光学特效方法、磁检测等, 也适用于样品的预浓缩和制备。

1.3 ePD-L1 的检测方法 ELISA 是最常用的 ePD-L1 定量检测方法, 但当 ePD-L1 表达过低时

该方法无法区分健康人和患者;PCR技术在检测外泌体核酸方面具有优势,但检测的mRNA含量与PD-L1蛋白表达量之间无绝对一致性,所以仅采用PCR检测ePD-L1 mRNA存在一定缺陷。流式细胞术具有良好的可重复性,是目前较为准确的ePD-L1定量分析法。基于 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TiO}_2$ 分离和表面增强拉曼散射的免疫检测法可以在40 min内实现每微升临床血清样本中1个PD-L1⁺外泌体的检测极限^[22]。将新的适配体与热泳技术结合开发的HOLMES-ExoPD-L1检测法比PD-L1抗体具有更高的识别效率,显著提高了检测灵敏度^[23]。近期有研究报道使用Cu-TCPP 2D金属有机框架作为表面等离子共振传感界面增敏层,能够快速、灵敏检测ePD-L1^[24]。

总体来说,外泌体和ePD-L1的分离检测技术还处于起步阶段,存在诸多难题,如何高效分离和纯化外泌体并建立样本需求少、灵敏度高、重复性好的ePD-L1检测方法是研究的核心环节。

2 ePD-L1的免疫抑制作用

肿瘤细胞胞质内的氨基末端免疫受体酪氨酸抑制基序在PD-1结合肿瘤细胞PD-L1后发生磷酸化,活化后的蛋白酪氨酸磷酸酶2被招募到羧基末端免疫受体酪氨酸依赖性活化基序上,去磷酸化T细胞抗原受体复合物和 ζ 链关联蛋白激酶70(ζ -chain-associated protein kinase 70, ZAP70),抑制PI3K/Akt/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白下游信号通路,发挥抑制T细胞分化增殖的作用,导致T细胞失活,造成肿瘤细胞复发和转移。PD-L1主要表达于细胞膜,但深入研究发现PD-L1还可能存在于外泌体和细胞微泡表面,甚至部分以游离形式存在,非细胞膜上的PD-L1统称为可溶性PD-L1^[25]。ELISA检测发现可溶性PD-L1具有与肿瘤细胞表面PD-L1相同的膜拓扑结构^[26],故ePD-L1极有可能在调节上述信号通路中发挥作用^[27]。ePD-L1的全身免疫抑制作用主要分为2类:直接内源性ePD-L1和外泌体间接诱导的PD-L1。

2.1 直接内源性ePD-L1 多数研究认为,肿瘤细胞来源的外泌体内含有mRNA、miRNA和蛋白质,具有广泛的转移前生态位增强特点^[28-29]。位于外泌体表面的PD-L1同样与多种肿瘤的进展相关^[7,8,30-31]。肿瘤细胞的ePD-L1通过直接连接到T

细胞上的PD-1^[8]及驻留在PD-L1阴性的肿瘤细胞上^[30],在微环境中诱导T细胞功能障碍。研究证实,ePD-L1的表达水平与肿瘤转移^[8]、肿瘤体积、临床分期和淋巴结受累程度^[7,30-31]呈正相关,与术后生存时间呈负相关^[32],表明ePD-L1可在一定程度上促进肿瘤的生长和转移。

NSCLC细胞分泌的ePD-L1可诱导CD8⁺T细胞凋亡,CD8⁺T细胞的数量随着ePD-L1浓度的增高而减少^[33]。胃癌细胞分泌的ePD-L1可显著降低CD8⁺T细胞的Ki-67表达,而在PD-1抗体存在的条件下可恢复这种表达^[34]。体外实验中,ePD-L1可抑制由T细胞受体刺激激活的人外周和小鼠脾脏CD8⁺T细胞中颗粒酶B的表达^[8]。此外,ePD-L1能够降低CD8⁺T细胞产生 γ 干扰素、IL-2和TNF- α 的能力,减少CD4⁺和CD8⁺T细胞上CD69、CD25和PD-1等激活标志物的表达,抑制CD4⁺和CD8⁺T细胞向肿瘤迁移,诱导巨噬细胞M2极化促进肿瘤免疫逃逸,从而降低免疫反应对肿瘤细胞的杀伤效果^[33-38]。

在体内,肿瘤ePD-L1除了以旁分泌方式诱导肿瘤部位的免疫抑制活性^[8,33]外,还可以进入淋巴结或血液,通过全身循环在远处诱导免疫抑制^[39]。因此,除了肿瘤ePD-L1,来自患者血浆的ePD-L1也显示出对T细胞的调节作用^[33]。但由于肿瘤细胞ePD-L1和主要组织相容性复合体I类分子表达的稳定性高,其在抑制T细胞活化方面比血浆ePD-L1效果更强^[34]。通过对NSCLC患者自体CD8⁺T细胞与从患者外周血中分离的外泌体共培养发现,只有高表达PD-L1的外泌体能抑制IL-2和 γ 干扰素等促炎因子的产生^[33]。

总之,ePD-L1通过减少IL-2、 γ 干扰素和颗粒酶B的分泌调节T细胞的增殖能力和效应子功能来抑制T细胞功能,导致T细胞功能障碍。除了使低增殖和效应子功能丧失外,ePD-L1还可以诱导CD8⁺T细胞凋亡,并以剂量依赖性方式增强调节性T细胞的抑制活性^[40]。ePD-L1对其他T细胞抑制性受体如T细胞Ig域和黏蛋白域-3、细胞毒性T细胞抗原-4、淋巴细胞激活基因-3等的影响有待进一步研究^[41-42]。

2.2 外泌体间接诱导的PD-L1 外泌体还能通过间接机制诱导次级细胞表达PD-L1来调节免疫系统。通过标记各种肿瘤模型的外泌体发现,吞噬

细胞能够在肿瘤局部微环境中以摄取外泌体的方式, 在体外和体内将 ePD-L1 转移到其他细胞。而迁移到受体细胞表面的 PD-L1 同样保持与 T 细胞 PD-1 结合的能力。磷酸化信号转导及转录激活因子-3 是免疫抑制性 M2 巨噬细胞的一种转录因子, PD-L1 表达升高与信号转导及转录激活因子-3 磷酸化水平的升高有关; 而磷酸化 p70S6 激酶和 ERK1/2 水平在某些条件下升高, 说明 MAPK 和哺乳动物雷帕霉素靶蛋白信号通路参与了 PD-L1 的表达调控。肿瘤外泌体还能通过 Toll 样受体驱动次级细胞 PD-L1 的表达^[43-44]。总之, 巨噬细胞摄取外泌体、诱导次级细胞向原始肿瘤表型极化以 PD-L1 表达增加和免疫抑制为特征, 但 PD-L1 表达增加的确切机制有待进一步研究。

3 ePD-L1 在肺癌临床进展中的作用

研究发现, NSCLC 患者血清中 ePD-L1 表达水平与肿瘤大小、淋巴结转移、远处转移、TNM 分期呈正相关, 而可溶性 PD-L1 仅与肿瘤大小相关, 与其他临床病理特征无关^[45]。肿瘤细胞 ePD-L1 以免疫依赖性方式促进肿瘤生长。当存在 ePD-L1 时, 肿瘤相关淋巴结中的 T 细胞表达耗竭且脾脏较小; 敲除外泌体关键酶或 PD-L1 可促进 T 细胞的活化、增殖和杀伤潜力, 引入外源性 ePD-L1 又可再次逆转该效应^[35]。故 ePD-L1 参与诱导肿瘤细胞免疫逃逸, 促进肺癌进展。

4 ePD-L1 与肺癌免疫治疗的关系

随着 ePD-L1 功能的逐步揭示, 外泌体为肿瘤的诊断、治疗和预后提供了广阔的临床应用前景。来自美国加利福尼亚大学旧金山分校的 Poggio 等^[35]在 *Cell* 上刊文, 从外泌体角度充分、合理地解释了部分肿瘤患者接受抗 PD-1/PD-L1 治疗后失败的原因。该研究发现, ePD-L1 能通过抑制淋巴结中的 T 细胞活性系统性地降低抗肿瘤疗效, 对免疫疗法具有较强的抵抗作用; 阻断肿瘤细胞分泌带有 PD-L1 的外泌体后, 患者的生存期会因抗肿瘤免疫反应的提高而延长。

Chen 等^[8]研究发现, 帕博利珠单抗 (pembrolizumab) 治疗效果不佳的 NSCLC 患者治疗前有较高浓度的循环 ePD-L1。该研究还发现治疗前患者循环 γ 干扰素浓度也较高, 且能上调 ePD-L1, 总

的肿瘤负荷与循环 ePD-L1 水平、循环 γ 干扰素水平呈正相关。免疫单药治疗后, ePD-L1 的水平变化可动态预测 γ 干扰素介导的免疫反应, 有利于辨别临床药物反应者与不反应者。表现出临床反应的患者使用帕博利珠单抗进行抗 PD-1 治疗后 3 周内 ePD-L1 水平显著增加, 而无临床反应者未见显著变化。由于 PD-1 抑制剂阻断了 PD-1 和 PD-L1 的相互作用, 故应将肿瘤细胞上 ePD-L1 的表达增加归因于产生 γ 干扰素的 CD8⁺ T 细胞重新激活导致, 而不是免疫抑制信号的作用, 这可能是治疗失败的原因之一^[46]。因此, ePD-L1 的上调可预测抗 PD-1 治疗较好的临床疗效。然而 Del Re 等^[47]纳入 8 例 NSCLC 患者, 使用抗 PD-1 药物纳武利尤单抗 (nivolumab) 或帕博利珠单抗治疗 8 周后发现, 血浆中 ePD-L1 明显降低的患者预后良好、明显升高的患者预后较差, 而预后趋于稳定的患者血浆中 PD-L1 无显著变化。还有研究发现, 黑色素瘤患者治疗期间循环 PD-L1 水平增加 >100 pg/mL 对疾病进展的阳性预测值达 91%^[36]; 治疗期间复发的头颈部肿瘤患者肿瘤外泌体/总外泌体比值、CD3⁻ ePD-L1 的数量较基线增加^[48]。

从机制上讲, 作为 PD-1/PD-L1 信号轴中的一个额外但不可替代的参与者, 循环水平的 ePD-L1 同样可以靶向 T 细胞, 导致 T 细胞凋亡和功能障碍及细胞因子产生减少, 促进肿瘤进展和抵抗免疫治疗^[33-34]。无论在基线还是在治疗期间, 高水平的 ePD-L1 都可能通过与抗体结合而持续暴露肿瘤 PD-L1, 从而拮抗免疫治疗。因 T 细胞过度耗竭和肿瘤浸润性淋巴细胞不足以通过治疗恢复, 高水平 ePD-L1 提示抗 PD-1 治疗失败的可能性较高^[35]。然而, 更有可能的是 ePD-L1 对免疫治疗具有耐药性, 尽管进行了积极的抗体治疗, 但仍会直接或间接地抑制 T 细胞的免疫功能。无论哪种方式, 治疗前循环 ePD-L1 水平最高的患者具有最大的肿瘤负荷、最严重的免疫抑制和最差的临床结果。因此, 为了获得有效的免疫检查点反应, 有必要进一步明确 ePD-L1 如何对免疫治疗产生不利影响, 以及外泌体耗竭是否是一种可行且必要的伴随治疗。这些研究结果相互矛盾, 可能是由于观察时间和样本量不同, 但也突出了在人血浆样本中区分肿瘤外泌体与非肿瘤外泌体的重要性, 需要进一步研究不同外泌体如何促进整体 PD-L1 表达增加和疾病进展。

5 小结和展望

免疫治疗打破了传统治疗格局,是以手术、放射、化学治疗为主的肺癌治疗方法的补充,但对抗PD-1/PD-L1治疗肺癌的研究仍需进一步完善。肿瘤细胞PD-L1是临床免疫治疗反应的预测因子之一^[49]。然而,使用肿瘤细胞PD-L1存在缺陷,如外伤性活检、小肿瘤缺失、肿瘤内PD-L1表达的异质性、动态观察的不可用及灵敏性有限等^[50]。研究证实肿瘤ePD-L1可以促进多种恶性肿瘤的生长和转移,主要通过以下3种机制赋予免疫抑制表型:直接内源性ePD-L1、间接诱导的PD-L1和ePD-L1介导的免疫检查点阻断。肺癌ePD-L1在PD-1/PD-L1信号轴上起着重要的调节作用,为癌症治疗带来了巨大障碍,其在肿瘤耐药中的作用机制值得继续探究。

NSCLC组织中的ePD-L1能够促进肿瘤生长和免疫逃逸,与肿瘤组织内的PD-L1功能一致,也与外周血循环中的ePD-L1含量相关^[22]。因此,循环中的ePD-L1可能成为一种无创且易于获得的生物标志物,并且比血浆和组织中的可溶性PD-L1更容易检测,也能够避免一般活检的时空差异性和肿瘤异质性带来的影响。

总的来说,ePD-L1,包括PD-L1蛋白、DNA和mRNA,都有可能成为可靠的免疫治疗生物标志物,是对肿瘤PD-L1和可溶性PD-L1的有效补充,其有利于识别可能受益于免疫治疗的患者并动态监测治疗反应^[51],可以用作肺癌患者对免疫检查点疗法是否有临床反应的预测指标。这有助于进一步了解肿瘤的免疫逃逸并提出相应的解决方案。尽管通过动态测量循环PD-L1的表达预测疾病的预后在部分患者中可行,但将ePD-L1作为免疫治疗功效的预测因素还需要进行更多的临床试验。

[参考文献]

- [1] CAO W, CHEN H D, YU Y W, LI N, CHEN W Q. Changing profiles of cancer burden worldwide and in China: a secondary analysis of the global cancer statistics 2020[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2021, 134: 783-791.
- [2] NISHIMURA H, AGATA Y, KAWASAKI A, SATO M, IMAMURA S, MINATO N, et al. Developmentally regulated expression of the PD-1 protein on the surface of double-negative (CD4⁻CD8⁻) thymocytes[J]. *Int Immunol*, 1996, 8: 773-780.
- [3] FREEMAN G J, LONG A J, IWAI Y, BOURQUE K, CHERNOVA T, NISHIMURA H, et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation[J]. *J Exp Med*, 2000, 192: 1027-1034.
- [4] BARDHAN K, ANAGNOSTOU T, BOUSSIOTIS V A. The PD1: PD-L1/2 pathway from discovery to clinical implementation[J/OL]. *Front Immunol*, 2016, 7: 550. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00550.
- [5] PATSOUKIS N, BROWN J, PETKOVA V, LIU F, LI L Q, BOUSSIOTIS V A. Selective effects of PD-1 on Akt and Ras pathways regulate molecular components of the cell cycle and inhibit T cell proliferation[J/OL]. *Sci Signal*, 2012, 5: ra46. DOI: 10.1126/scisignal.2002796.
- [6] LIU C, ZENG X, AN Z J, YANG Y C, EISENBAUM M, GU X D, et al. Sensitive detection of exosomal proteins via a compact surface plasmon resonance biosensor for cancer diagnosis[J]. *ACS Sens*, 2018, 3: 1471-1479.
- [7] RICKLEFS F L, ALAYO Q, KRENZLIN H, MAHMOUD A B, SPERANZA M C, NAKASHIMA H, et al. Immune evasion mediated by PD-L1 on glioblastoma-derived extracellular vesicles[J/OL]. *Sci Adv*, 2018, 4: eaar2766. DOI: 10.1126/sciadv.aar2766.
- [8] CHEN G, HUANG A C, ZHANG W, ZHANG G, WU M, XU W, et al. Exosomal PD-L1 contributes to immunosuppression and is associated with anti-PD-1 response[J]. *Nature*, 2018, 560: 382-386.
- [9] RABINOWITS G, GERÇEL-TAYLOR C, DAY J M, TAYLOR D D, KLOECKER G H. Exosomal microRNA: a diagnostic marker for lung cancer[J]. *Clin Lung Cancer*, 2009, 10: 42-46.
- [10] KHAN S, JUTZY J M S, VALENZUELA M M A, TURAY D, ASPE J R, ASHOK A, et al. Plasma-derived exosomal survivin, a plausible biomarker for early detection of prostate cancer[J/OL]. *PLoS One*, 2012, 7: e46737. DOI: 10.1371/journal.pone.0046737.
- [11] LÄSSER C, ALIKHANI V S, EKSTRÖM K, ELDH M, PAREDES P T, BOSSIOS A, et al. Human saliva, plasma and breast milk exosomes contain RNA: uptake by macrophages[J/OL]. *J Transl Med*, 2011, 9: 9. DOI: 10.1186/1479-5876-9-9.
- [12] ADMYRE C, JOHANSSON S M, QAZI K R, FILÉN J J, LAHESMAA R, NORMAN M, et al. Exosomes with immune modulatory features are present in human breast milk[J]. *J Immunol*, 2007, 179: 1969-1978.
- [13] STREET J M, BARRAN P E, MACKAY C L, WEIDT S, BALMFORTH C, WALSH T S, et al. Identification and proteomic profiling of exosomes in human cerebrospinal fluid[J/OL]. *J Transl Med*, 2012, 10: 5. DOI: 10.1186/1479-5876-10-5.
- [14] KOWAL J, ARRAS G, COLOMBO M, JOUVE M,

- MORATH J P, PRIMDAL-BENGTSON B, et al. Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes[J/OL]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113: E968-E977. DOI: 10.1073/pnas.1521230113.
- [15] ZHAO Z, YANG Y, ZENG Y, HE M. A microfluidic ExoSearch chip for multiplexed exosome detection towards blood-based ovarian cancer diagnosis[J]. *Lab Chip*, 2016, 16: 489-496.
- [16] ZHANG W, YU Z L, WU M, REN J G, XIA H F, SA G L, et al. Magnetic and folate functionalization enables rapid isolation and enhanced tumor-targeting of cell-derived microvesicles[J]. *ACS Nano*, 2017, 11: 277-290.
- [17] KABE Y, SUEMATSU M, SAKAMOTO S, HIRAI M, KOIKE I, HISHIKI T, et al. Development of a highly sensitive device for counting the number of disease-specific exosomes in human sera[J]. *Clin Chem*, 2018, 64: 1463-1473.
- [18] LIM J, CHOI M, LEE H, KIM Y H, HAN J Y, LEE E S, et al. Direct isolation and characterization of circulating exosomes from biological samples using magnetic nanowires[J/OL]. *J Nanobiotechnology*, 2019, 17: 1. DOI: 10.1186/s12951-018-0433-3.
- [19] CHIA B S, LOW Y P, WANG Q, LI P, GAO Z Q. Advances in exosome quantification techniques[J]. *Trac Trends Anal Chem*, 2017, 86: 93-106.
- [20] KO J, CARPENTER E, ISSADORE D. Detection and isolation of circulating exosomes and microvesicles for cancer monitoring and diagnostics using micro-/nano-based devices[J]. *Analyst*, 2016, 141: 450-460.
- [21] LIN S J, YU Z X, CHEN D, WANG Z G, MIAO J M, LI Q C, et al. Progress in microfluidics-based exosome separation and detection technologies for diagnostic applications[J/OL]. *Small*, 2020, 16: e1903916. DOI: 10.1002/sml.201903916.
- [22] PANG Y F, SHI J, YANG X S, WANG C W, SUN Z W, XIAO R. Personalized detection of circling exosomal PD-L1 based on Fe₃O₄@TiO₂ isolation and SERS immunoassay[J/OL]. *Biosens Bioelectron*, 2020, 148: 111800. DOI: 10.1016/j.bios.2019.111800.
- [23] HUANG M J, YANG J J, WANG T, SONG J, XIA J L, WU L L, et al. Homogeneous, low-volume, efficient, and sensitive quantitation of circulating exosomal PD-L1 for cancer diagnosis and immunotherapy response prediction[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2020, 59: 4800-4805.
- [24] WANG Y D, MAO Z H, CHEN Q, KOH K, HU X J, CHEN H X. Rapid and sensitive detection of PD-L1 exosomes using Cu-TCPP 2D MOF as a SPR sensitizer[J/OL]. *Biosens Bioelectron*, 2022, 201: 113954. DOI: 10.1016/j.bios.2021.113954.
- [25] MORRISSEY S M, YAN J. Exosomal PD-L1: roles in tumor progression and immunotherapy[J]. *Trends Cancer*, 2020, 6: 550-558.
- [26] YU D D, WU Y, SHEN H Y, LV M M, CHEN W X, ZHANG X H, et al. Exosomes in development, metastasis and drug resistance of breast cancer[J]. *Cancer Sci*, 2015, 106: 959-964.
- [27] KOWANETZ M, ZOU W, GETTINGER S N, KOEPPEN H, KOCKX M, SCHMID P, et al. Differential regulation of PD-L1 expression by immune and tumor cells in NSCLC and the response to treatment with atezolizumab (anti-PD-L1)[J/OL]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115: E10119-E10126. DOI: 10.1073/pnas.1802166115.
- [28] CHIN A R, WANG S E. Cancer tills the premetastatic field: mechanistic basis and clinical implications[J]. *Clin Cancer Res*, 2016, 22: 3725-3733.
- [29] LUDWIG N, WHITESIDE T L. Potential roles of tumor-derived exosomes in angiogenesis[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2018, 22: 409-417.
- [30] YANG Y, LI C W, CHAN L C, WEI Y K, HSU J M, XIA W Y, et al. Exosomal PD-L1 harbors active defense function to suppress T cell killing of breast cancer cells and promote tumor growth[J]. *Cell Res*, 2018, 28: 862-864.
- [31] THEODORAKI M N, YERNENI S S, HOFFMANN T K, GOODING W E, WHITESIDE T L. Clinical significance of PD-L1⁺ exosomes in plasma of head and neck cancer patients[J]. *Clin Cancer Res*, 2018, 24: 896-905.
- [32] LUX A, KAHLERT C, GRÜTZMANN R, PILARSKY C. C-Met and PD-L1 on circulating exosomes as diagnostic and prognostic markers for pancreatic cancer[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20: 3305. DOI: 10.3390/ijms20133305.
- [33] KIM D H, KIM H, CHOI Y J, KIM S Y, LEE J E, SUNG K J, et al. Exosomal PD-L1 promotes tumor growth through immune escape in non-small cell lung cancer[J]. *Exp Mol Med*, 2019, 51: 1-13.
- [34] FAN Y B, CHE X F, QU J L, HOU K Z, WEN T, LI Z, et al. Exosomal PD-L1 retains immunosuppressive activity and is associated with gastric cancer prognosis[J]. *Ann Surg Oncol*, 2019, 26: 3745-3755.
- [35] POGGIO M, HU T Y, PAI C C, CHU B, BELAIR C D, CHANG A, et al. Suppression of exosomal PD-L1 induces systemic anti-tumor immunity and memory[J/OL]. *Cell*, 2019, 177: 414-427.e13. DOI: 10.1016/j.cell.2019.02.016.
- [36] CORDONNIER M, NARDIN C, CHANTELOUP G, DERANGERE V, ALGROS M P, ARNOULD L, et al. Tracking the evolution of circulating exosomal PD-L1 to monitor melanoma patients[J/OL]. *J Extracell Vesicles*, 2020, 9: 1710899. DOI: 10.1080/20013078.2019.1710899.
- [37] RAZZO B M, LUDWIG N, HONG C S, SHARMA P,

- FABIAN K P, FECEK R J, et al. Tumor-derived exosomes promote carcinogenesis of murine oral squamous cell carcinoma[J]. *Carcinogenesis*, 2020, 41: 625-633.
- [38] LIU C R, YU S H, ZINN K, WANG J H, ZHANG L M, JIA Y J, et al. Murine mammary carcinoma exosomes promote tumor growth by suppression of NK cell function[J]. *J Immunol*, 2006, 176: 1375-1385.
- [39] WORTZEL I, DROR S, KENIFIC C M, LYDEN D. Exosome-mediated metastasis: communication from a distance[J]. *Dev Cell*, 2019, 49: 347-360.
- [40] XIA A L, ZHANG Y, XU J, YIN T L, LU X J. T cell dysfunction in cancer immunity and immunotherapy[J/OL]. *Front Immunol*, 2019, 10: 1719. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01719.
- [41] ANDREWS L P, YANO H, VIGNALI D A A. Inhibitory receptors and ligands beyond PD-1, PD-L1 and CTLA-4: breakthroughs or backups[J]. *Nat Immunol*, 2019, 20: 1425-1434.
- [42] WOLF Y, ANDERSON A C, KUCHROO V K. TIM3 comes of age as an inhibitory receptor[J]. *Nat Rev Immunol*, 2020, 20: 173-185.
- [43] HADERK F, SCHULZ R, ISKAR M, CID L L, WORST T, WILLMUND K V, et al. Tumor-derived exosomes modulate PD-L1 expression in monocytes[J/OL]. *Sci Immunol*, 2017, 2: eaah5509. DOI: 10.1126/sciimmunol.aah5509.
- [44] LIU J T, FAN L L, YU H Q, ZHANG J, HE Y, FENG D C, et al. Endoplasmic reticulum stress causes liver cancer cells to release exosomal miR-23a-3p and up-regulate programmed death ligand 1 expression in macrophages[J]. *Hepatology*, 2019, 70: 241-258.
- [45] LI C L, LI C W, ZHI C C, LIANG W J, WANG X, CHEN X, et al. Clinical significance of PD-L1 expression in serum-derived exosomes in NSCLC patients[J/OL]. *J Transl Med*, 2019, 17: 355. DOI: 10.1186/s12967-019-2101-2.
- [46] TAUBE J M, ANDERS R A, YOUNG G D, XU H Y, SHARMA R, MCMILLER T L, et al. Colocalization of inflammatory response with B7-h1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape[J/OL]. *Sci Transl Med*, 2012, 4: 127ra37. DOI: 10.1126/scitranslmed.3003689.
- [47] DEL RE M, MARCONCINI R, PASQUINI G, ROFI E, VIVALDI C, BLOISE F, et al. *PD-L1* mRNA expression in plasma-derived exosomes is associated with response to anti-PD-1 antibodies in melanoma and NSCLC[J]. *Br J Cancer*, 2018, 118: 820-824.
- [48] THEODORAKI M N, YERNENI S, GOODING W E, OHR J, CLUMP D A, BAUMAN J E, et al. Circulating exosomes measure responses to therapy in head and neck cancer patients treated with cetuximab, ipilimumab, and IMRT[J/OL]. *Oncoimmunology*, 2019, 8: 1593805. DOI: 10.1080/2162402X.2019.1593805.
- [49] LI H J, XU Y Y, WAN B, SONG Y, ZHAN P, HU Y B, et al. The clinicopathological and prognostic significance of PD-L1 expression assessed by immunohistochemistry in lung cancer: a meta-analysis of 50 studies with 11, 383 patients[J]. *Transl Lung Cancer Res*, 2019, 8: 429-449.
- [50] STOVGAARD E S, DYHL-POLK A, ROSLIND A, BALSLEV E, NIELSEN D. PD-L1 expression in breast cancer: expression in subtypes and prognostic significance: a systematic review[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2019, 174: 571-584.
- [51] DAASSI D, MAHONEY K M, FREEMAN G J. The importance of exosomal PDL1 in tumour immune evasion[J]. *Nat Rev Immunol*, 2020, 20: 209-215.

[本文编辑] 魏莎莎, 商素芳