

外泌体活体示踪的分子影像学研究进展

刘梦瑶 姜立新

摘 要 外泌体指从各种细胞质膜释放出的循环胞外囊泡,广泛存在于多种生物体液中,具有纳米尺寸和高度特异性。外泌体可运输蛋白质、脂质、DNA 和 RNA,参与细胞间通讯,具有多种生物学功能及广泛的临床应用。外泌体的活体示踪对于实时监测外泌体在体内外的生物学行为具有重要意义。目前常见外泌体活体示踪的分子影像学方法包括光学成像、磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)、放射性核素分子成像、光声成像(photoacoustic imaging, PA)以及多模态成像。这些成像方法的发展对于研究外泌体在临床诊断及治疗方面的作用具有重大意义,尤其是在肿瘤诊疗一体化中的作用。本文就外泌体活体示踪的分子影像学研究进展进行综述。

关键词 外泌体 活体示踪 分子影像学 肿瘤诊断 肿瘤治疗

中图分类号 R73 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2021.01.031

外泌体是一种由各种细胞分泌的直径为 30 ~ 150nm 的循环胞外囊泡,其生物发生机制较为复杂,通过“内吞-融合-胞吐”等一系列过程调节外泌体生成和组装,最终被释放至细胞外间隙或生物体液中。外泌体可携带多种膜蛋白、胞质蛋白、脂质、DNA 和 RNA 等,参与细胞间通讯,具有多种生物学功能及广泛的临床应用^[1]。然而由于外泌体的纳米尺寸和高度特异性,如何有效地对外泌体进行活体示踪,从而实时监测外泌体在体内外的生物学行为,是外泌体研究中十分重要的部分。

一、外泌体的生物发生

外泌体最早发现于 1985 年,由各种正常和肿瘤细胞从质膜释放出的直径为 30 ~ 150nm 的循环胞外囊泡,广泛存在于血液、尿液、唾液和母乳等多种生物体液中^[1,2]。外泌体的形成过程较为复杂,先由细胞外成分如蛋白质、脂类、代谢物、小分子等,通过内吞作用和质膜内陷,与细胞表面蛋白一起由外向内进入细胞形成早期分选核内体(early sorting endosomes, ESEs),并与内质网、高尔基体和线粒体预先形成的 ESEs 融合。之后 ESEs 发展成熟为晚期分选核内体(late sorting endosomes, LSEs),LSEs 膜向腔内出芽形成包含诸多外泌体的多泡体(multivesicular bodies, MVBs)。MVBs 除变成自噬小体及被溶酶体降解外,

还可通过细胞骨架和微管网络转运至质膜,通过胞吐作用释放腔内外泌体到细胞外环境中^[3]。此时的外泌体表面表达细胞膜蛋白,内部包裹细胞质内容物,即使同一细胞来源的外泌体,其大小及内容物种类和含量也有所不同。外源性外泌体则通过凹陷、网格蛋白陷窝、脂筏、大胞饮、吞噬作用、受体介导的内吞作用、直接结合、直接融合等方式进入受体细胞^[3]。这一复杂的重构过程导致外泌体携带多种膜蛋白(如磷脂酰肌醇蛋白聚糖-1 即 GPC1、四分子交联体超蛋白家族 CD47、CD63 等)、胞质蛋白、脂质、DNA、mRNA 和 miRNA,是人体内多功能的细胞间转运系统,影响细胞生物学的各个方面。

二、外泌体的生物医学应用

外泌体与免疫反应、病毒病理学、妊娠、心血管疾病、中枢神经系统疾病和癌症进展密切相关^[4,5]。由外泌体传递到受体细胞的蛋白质、代谢物和核酸改变细胞的生物反应,进而促进或抑制疾病。外泌体在调节细胞内信号通路方面的固有特性使其在许多疾病的治疗方面具有潜在应用,包括神经退行性疾病和癌症。外泌体具有良好的药代动力学特性、生物相容性和较少的不良反应。因此可在生物体内运输多种物质,包括小干扰 RNA(siRNA)、反义寡核苷酸、化疗药物和免疫调节剂等,并将其递送到靶细胞发挥治疗效应。Kamerkar 等^[6]利用间充质细胞的外泌体制备了包载 KrasG12D siRNA 的工程化外泌体,通过 CD47 对胰腺癌细胞的特异性靶向作用精准递送干扰 Kras 表达的 siRNA,最终显著抑制肿瘤生长和转移,提高小鼠的总体生存率。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(面上项目)(81771850);
上海交通大学医工交叉基金资助项目(YG2017MS19)

作者单位:200233 上海交通大学附属第六人民医院

通讯作者:姜立新,主任医师,博士生导师,电子信箱:jinger_28@sina.com

除此之外,外泌体也可用于疾病诊断,基于外泌体表面蛋白的液体活检在癌症和其他疾病的诊断和预后上具有潜在的应用价值。如 GPC1 富集在肿瘤外泌体中,可用来诊断胰腺癌、乳腺癌和结肠癌等,循环外泌体的数量变化也可反映肿瘤的治疗效果^[7,8]。疾病的进展和治疗反应也可通过外泌体的多组分分析来确定。目前正在考虑将表面蛋白、脂质、DNA 和 miRNA 联合用于癌症诊断和预后评估,增强诊断的特异性和敏感度。

三、外泌体的活体成像方法

外泌体活体示踪是用示踪剂(如有机染料、荧光蛋白、造影剂、核素等)标记外泌体,用特定的影像学方法对动物体内外泌体进行追踪,从而观察外泌体在体内的生物学行为。目前常用的活体成像方法包括光学成像、磁共振成像、放射性核素分子成像、光声成像及多模态成像。

1. 光学成像:生物发光成像(bioluminescence imaging, BLI)和荧光成像(fluorescence imaging, FLI)是在可见光光谱(390~700nm)范围内检测外泌体的两种主要的光学成像方法^[9]。BLI是由自身合成的荧光素酶催化人为注射的荧光素底物而产生的化学发光成像方法,需要超敏感的 CCD 相机采集生物发光信号。FLI利用有机染料或荧光蛋白在外部光源的激励下发出信号而成像。与 BLI 比较,CCD 相机更容易检测到 FLI 信号,因此 BLI 和 FLI 都可用于外泌体的实时监测。

生物发光成像:生物发光成像可在活体条件下对同一动物体进行连续观察,其优点是活体实时、无放射性、成像范围广。荧光素酶催化荧光素的反应必须要在外源性荧光素及内源性氧气和 ATP 存在的条件下,才能在活细胞中进行。Luo 等^[10]在心肌细胞特异性 α MHC 增强子后加哺乳动物基因条件性表达载体质粒载体(LoxP-Stop-LoxP),建立了稳定表达 CD63-纳米荧光素酶(NanoLuc)报告基因的转基因小鼠模型,用于时空标记心肌来源的外泌体;并将转基因小鼠与他莫昔芬诱导的 Cre 小鼠(CreERT2-Rosa)杂交,获得他莫昔芬诱导表达 CD63-NanoLuc 报告基因的杂交小鼠模型;最后通过 BLI 成像研究了心肌细胞外泌体的特异性标记和组织分布情况,为后续的外泌体研究提供了有效工具。然而 BLI 成像往往需要构建复杂的转基因细胞株或动物模型,对检测仪器的精密度也有较高要求。

荧光成像:目前,外泌体荧光成像常以有机染料

和荧光蛋白两种方法标记外泌体(包括外泌体膜和内容物),以小动物(包括视窗模型动物和模式动物等)为研究对象,借助激光共聚焦显微镜和小动物活体荧光成像仪进行外泌体可视化研究^[11]。

有机染料标记技术主要用于研究外泌体的细胞摄取及体内分布。常用的有机染料主要包括 PKH 家族如 PKH26/67、Alexa 488/633、Cy3/5/7 和 Dil/Dio/DiR 等。Chen 等^[12]针对 HeLa 细胞外泌体中的两种 miRNA(mir-21 和 mir-31)分别制备了两种分子信标,即 Cy5 修饰的 MB21 和 Alexa Fluor 488 修饰的 MB31。然后将 CM-Dil 膜标记的外泌体与受体细胞孵育,通过单分子定位显微镜(single molecule localization microscopy, SMLM)实现了外泌体和 miRNA 的活细胞动态追踪,且成功观察到外泌体在受体细胞间丝状结构中的移动。然而,这类方法存在染料聚集、内(外)源性杂质混入等造成非特异性荧光信号混淆的缺点。

另一种标记方法是通过荧光蛋白标记外泌体,主要用于研究外泌体释放、吸收、内容物递送等过程。Lai 等^[13]通过插入棕榈酰化序列的荧光蛋白标记肿瘤细胞膜,研究其分泌的外泌体在体内的动态行为,并通过活细胞共聚焦显微镜发现细胞群之间的外泌体交换,通过多光子活体显微镜(multi-photon intravital microscopy, MP-IVM)技术完成了对肿瘤脊背视窗模型内外泌体在体可视化观察,此外还观察到外泌体内 RNA 被受体细胞摄取的动态过程。然而,由于荧光蛋白标记效率低、半衰期短,给后期在体成像带来了一定挑战。

除视窗模型动物外,模式动物也常用于研究外泌体动态活动,斑马鱼因其个体小、组织层薄、同源性高等特点,成为外泌体活体成像的良好对象。何文慧^[14]利用吡啶酮类荧光探针 MAA 在酸性条件下易与带负电的外泌体结合,实现了细胞中的外泌体成像,探针能以吞咽和皮肤吸收的方式进入斑马鱼体内,使其头、腹、尾部均显示绿色荧光。

2. 磁共振成像(MRI):MRI 因其空间分辨率高、无辐射等优点成为外泌体活体示踪的有效手段之一。外泌体须用 MRI 造影剂标记以达到成像目的,常用造影剂包括超小顺磁性氧化铁纳米颗粒(ultrasmall superparamagnetic iron oxides, USPIO)、钆剂和铁剂等。Busato 等^[15]通过创新性标记外泌体使其在 MRI 成像同时保持形态和生理特征。首先使用 4~6nm 的 USPIO 对脂肪干细胞进行标记(200g Fe/ml US-

PIO, 72h 孵育), 之后从脂肪干细胞中分离包含 USPIO 的外泌体, 最后实现外泌体的体内和体外 MRI 成像, 成像下限分别为 3g 和 5g 外泌体。Liu 等^[16]设计了一种由铁蛋白重链(FTH1)和內贴蛋白两部分组成的融合蛋白, 其中 FTH1 用作 MRI 造影剂; 之后用携带融合蛋白的慢病毒感染间充质干细胞, 并分离外泌体用于动物体内 MRI 成像。虽然 MRI 成像分辨率高, 但敏感度较低, 需大量外泌体才可成像, 在技术上存在着很大的挑战。Jung 等^[17]用 USPIO 和奥拉帕尼修饰低氧条件下的乳腺癌肿瘤外泌体, 并使用一种新型高敏感度纳米颗粒成像技术——磁粒子成像(magnetic particle imaging, MPI)在体内连续成像显示了外泌体的生物分布情况, 同时负载的奥拉帕尼能够增加细胞凋亡并减慢肿瘤生长。

3. 放射性核素分子成像: 近年来很多放射性核素分子探针被设计用于外泌体体内成像, 如¹²⁴I、¹³¹I、¹¹¹In-oxine、^{99m}Tc-HMPAO、^{99m}Tc-三巯基复合物等, 并通过单光子发射体层成像(single-photon emission computed tomography, SPECT)、正电子发射体层成像(positron emission tomography, PET)等观察外泌体的体内生物分布情况。Hwang 等^[18]用^{99m}Tc-HMPAO 标记巨噬细胞来源的外泌体, SPECT/CT 成像显示其在小鼠体内多分布于肝脏而脑内无摄取。Faruqu 等^[19]采用两种不同方法对黑素瘤细胞产生的外泌体(ExoB16)进行放射标记, 即腔内标记(¹¹¹In-tropolone)和膜外标记(¹¹¹In-DTPA-anhydride), 结果表明膜外标记的外泌体具有更好的放射标记效率和放射化学稳定性, SPECT/CT 成像显示膜外标记的 ExoB16 主要积聚在荷瘤小鼠的肝脏和脾脏, 而肿瘤部位较少。Shi 等^[20]创新性地使用 PET 无创监测铜-64 放射性标记聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)修饰的外泌体(⁶⁴Cu-PEG-Exo), PEG 修饰的外泌体在荷瘤小鼠肝内清除率较低而在肿瘤部位大量积累, 从而实现了外泌体成像和肿瘤摄取率定量检测。但该方法会造成辐射损伤, 不能清晰显示解剖学结构, 限制了其在生物体内的单独多次应用。

4. 光声成像(PA): PA 是近年来发展起来的一种新型结构和功能成像方式, 结合了光学成像和超声成像的优点, 具有高分辨率和高组织对比度, 突破了光学成像的深度限制, 可实现活体内 50mm 的深层组织成像。Piao 等^[21]利用金纳米颗粒(GN)标记绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)稳转的树突状细胞, 从稳定表达 CD63-RFP 融合蛋白的 4T1 细胞

系中分离纯化红色荧光蛋白(red fluorescent protein, RFP)标记的外泌体, 并通过激光共聚焦扫描显微镜观察树突状细胞吸收外泌体的全过程。此外还通过超声引导的光声成像敏感且纵向监测经外泌体刺激的树突状细胞向腋窝淋巴结转移的动态活动, 表明超声引导的 PA 是一种简单便捷的树突状细胞及其内外泌体的无创追踪成像方式。作为一种新兴技术, PA 的成像参数如扫描方式、脉冲重复频率等尚未形成规范化标准, 针对不同部位、器官的高分辨率实时光声成像仍有巨大挑战。

5. 多模态成像: 多模态成像结合不同成像方法的特点, 如荧光成像(包括近红外荧光成像, 即 near-infrared fluorescence, NIRF)、电子计算机断层扫描(computed tomography, CT)、MRI、PA 等, 经图像融合获得更多的成像细节, 提高成像敏感度, 其在外泌体成像中应用广泛。Tayyaba 等^[22]利用 HepG2 癌细胞原位生物合成银和氧化铁纳米团簇(nanoclusters, NCs), 如银 NCs 可作为荧光探针, Fe₃O₄ NCs 可用作 CT 和 MRI 造影剂, 自组装的 NCs 很容易加载到外泌体上, 有望用于生物体内外泌体多模态成像。Abello 等^[23]用钆剂和近红外染料标记间充质基质细胞的外泌体, 通过 MRI/NIRF 成像获得其在注入骨肉瘤小鼠体内 24~48h 后的生物分布情况。Piao 等^[24]构建稳定表达 CD63-RFP 融合蛋白的三阴性乳腺癌(triple negative breast cancer, TNBC)细胞系, 分离其产生的外泌体, 通过 FLI/PA 成像观察体外条件下和原位 TNBC 模型中外泌体转移到巨噬细胞和肿瘤细胞的动态过程。Shaikh 等^[25]在肿瘤组织中原位生物合成银和氧化铁 NCs, 并分离含 NCs 的肿瘤外泌体, 特异且敏感地经 CT/FLI/MRI 多模态成像实现肿瘤外泌体的活体示踪。

四、展 望

针对外泌体纳米尺寸及高度特异性的特点, 研发的示踪剂可实现多种分子影像学方法下外泌体的活体示踪, 有利于实时监测外泌体在体内的生物学行为, 对于研究外泌体发挥生物学功能和临床作用的基础机制具有重要意义, 尤其是研究肿瘤外泌体在肿瘤的发生、发展、早期诊断、液体活检、靶向载药及疗效评估上有着重要价值。然而目前尚缺乏多层次、多模态的外泌体成像示踪剂, 例如适用于外泌体超声成像的示踪剂尚未出现, 这些示踪剂的研发始终是研究难点, 同样也是研究热点。因此未来开发一种用于肿瘤外泌体超声成像的靶向示踪剂具有巨大潜能, 它有望

简单便捷无辐射地实时监测活体内肿瘤外泌体的动态变化过程,提高早期诊断的敏感度和特异性,同时可以通过监测循环肿瘤外泌体的分布及数量动态评估肿瘤手术治疗、化疗、放疗以及高强度聚焦超声治疗(HIFU)后的疗效。相信随着外泌体活体示踪分子影像学研究的进一步发展,可以为外泌体的生物医学应用研究提供更好的方法,促进疾病尤其是肿瘤诊疗一体化平台的构建。

参考文献

- Meldolesi J. Exosomes and ectosomes in intercellular communication [J]. *Curr Biol*, 2018, 28(8): 435–444
- Pegtel DM, Gould SJ. Exosomes[J]. *Annu Rev Biochem*, 2019, 88: 487–514
- Kalluri R, LeBleu VS. The biology, function, and biomedical applications of exosomes[J]. *Science*, 2020, 367: 6478
- Jansen F, Li Q. Exosomes as diagnostic biomarkers in cardiovascular diseases[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2017, 998: 61–70
- Fitts CA, Ji N, Li Y, *et al.* Exploiting exosomes in cancer liquid biopsies and drug delivery [J]. *Adv Health Mater*, 2019, 8(6): 1801268
- Kamrkar S, LeBleu VS, Sugimoto H, *et al.* Exosomes facilitate therapeutic targeting of oncogenic KRAS in pancreatic cancer[J]. *Nature*, 2017, 546(7659): 498–503
- Li J, Li B, Ren C, *et al.* The clinical significance of circulating GPC1 positive exosomes and its regulative miRNAs in colon cancer patients[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(60): 101189–101202
- 温开凤, 武威杰, 李学军. 外泌体与胰腺癌的发生、发展、诊断和治疗[J]. *基础医学与临床*, 2019, 39(9): 1351–1355
- Chuo ST, Chien JC, Lai CP. Imaging extracellular vesicles: current and emerging methods[J]. *J Biomed Sci*, 2018, 25(1): 91
- Luo W, Dai Y, Chen Z, *et al.* Spatial and temporal tracking of cardiac exosomes in mouse using a nano-luciferase-CD63 fusion protein [J]. *Commun Biol*, 2020, 3(1): 114
- 王凯凯, 魏余辉, 张萍, 等. 细胞外囊泡成像方法最新研究进展[J]. *南方医科大学学报*, 2020, 40(2): 279–286
- Chen C, Zong S, Wang Z, *et al.* Visualization and intracellular dynamic tracking of exosomes and exosomal miRNAs using single molecule localization microscopy [J]. *Nanoscale*, 2018, 10(11): 5154–5162
- Lai CP, Kim EY, Badr CE, *et al.* Visualization and tracking of tumour extracellular vesicle delivery and RNA translation using multi-

plexed reporters[J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 7029

- 何文慧. 一种吡啶酮类荧光探针的合成及其在体内外成像中的应用[D]. 福建: 福建医科大学, 2018
- Busato A, Bonafede R, Bontempi P, *et al.* Labeling and magnetic resonance imaging of exosomes isolated from adipose stem cells: Exosome Labeling and MRI[M]. *Current Protocols in Cell Biology*, John Wiley and Sons, 2017
- Liu T, Zhu Y, Zhao R, *et al.* Visualization of exosomes from mesenchymal stem cells in vivo by magnetic resonance imaging[J]. *Magn Reson Imaging*, 2020, 68: 75–82
- Jung KO, Jo H, Yu JH, *et al.* Development and MPI tracking of novel hypoxia-targeted theranostic exosomes[J]. *Biomaterials*, 2018, 177: 139–148
- Hwang DW, Choi H, Jang SC, *et al.* Noninvasive imaging of radiolabeled exosome-mimetic nanovesicle using (99m)Tc-HMPAO[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 15636
- Faruqu FN, Wang JT, Xu L, *et al.* Membrane radiolabelling of exosomes for comparative biodistribution analysis in immunocompetent and immunodeficient mice – a novel and universal approach [J]. *Theranostics*, 2019, 9(6): 1666–1682
- Shi S, Li T, Wen X, *et al.* Copper-64 labeled PEGylated exosomes for in vivo positron emission tomography and enhanced tumor retention [J]. *Bioconjugate Chem*, 2019, 30(10): 2675–2683
- Piao YJ, Kim HS, Moon WK. Noninvasive photoacoustic imaging of dendritic cell stimulated with tumor cell-derived exosome [J]. *Mol Imaging Biol*, 2019, 9: 1238–1249
- Tayyaba, Rehman FU, Shaikh S, *et al.* In situ self-assembled Ag-Fe₃O₄ nanoclusters in exosomes for cancer diagnosis [J]. *J Mater Chem B*, 2020, 8(14): 2845–2855
- Abello J, Nguyen TDT, Marasini R, *et al.* Biodistribution of gadolinium- and near infrared-labeled human umbilical cord mesenchymal stromal cell-derived exosomes in tumor bearing mice[J]. *Theranostics*, 2019, 9(8): 2325–2345
- Piao YJ, Kim HS, Hwang EH, *et al.* Breast cancer cell-derived exosomes and macrophage polarization are associated with lymph node metastasis[J]. *Oncotarget*, 2018, 9(7): 7398–7410
- Shaikh S, Rehman FU, Du T, *et al.* Real-time multimodal bioimaging of cancer cells and exosomes through biosynthesized iridium and iron nanoclusters[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2018, 10(31): 26056–26063

(收稿日期: 2020-06-30)

(修回日期: 2020-07-11)

(接第155页)

- Tabata M, Kadomatsu T, Fukuhara S, *et al.* Angiopoietin-like protein 2 promotes chronic adipose tissue inflammation and obesity-related systemic insulin resistance[J]. *Cell Metab*, 2009, 10(3): 178–188
- Kilicarslan M, de Weijer BA, Simonytė Sjödin K, *et al.* RBP4 increases lipolysis in human adipocytes and is associated with increased lipolysis and hepatic insulin resistance in obese women[J]. *FASEB J*, 2020, 34(5): 6099–6110

- Liu Y, Zhong Y, Chen H, *et al.* Retinol-binding protein-dependent cholesterol uptake regulates macrophage foam cell formation and promotes atherosclerosis[J]. *Circulation*, 2017, 135(14): 1339–1354
- Yang Q, Graham TE, Mody N, *et al.* Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes[J]. *Nature*, 2005, 436(7049): 356–362

(收稿日期: 2020-06-22)

(修回日期: 2020-07-05)