

外泌体在非小细胞肺癌诊断及治疗中的作用

朱 鹏 张志明 雍文兴 王功臣 呼永华 宋忠阳 吴亚娜 苏 欢 杜婷婷

摘 要 非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)是最常见的肺癌类型,约占肺癌比例的 85%,尽管 NSCLC 的病理生理学、诊断和预后等对本病的认识较强,但因其早期特异性诊断标志物的缺乏、对放化疗药物的耐药及转移扩散迅速等原因,现已成为全球病死率最高的恶性肿瘤之一。外泌体(exosomes)是由微环境中的各种细胞分泌的直径 30~100nm 的外囊泡,含有核酸、蛋白质等,能传递 microRNAs、脂类等多种生物活性分子,并通过调节肿瘤与宿主间的相互作用等途径在肺癌的诊断和治疗中有着较大的潜在价值。本文就外泌体在 NSCLC 诊断及治疗中的作用做一综述。

关键词 外泌体 非小细胞肺癌 生物学标志物 诊断 治疗

中图分类号 R73 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2021.11.006

肺癌是全球发生率和病死率最高的恶性肿瘤之一,而非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)发生率占据了肺癌的绝大多数^[1]。I 期 NSCLC 患者术后 5 年生存率可达 80% 以上,但由于早期特异性诊断标志物缺乏等原因,NSCLC 患者确诊之时往往已处于晚期,故 NSCLC 患者的 5 年生存率仅为 5% 左右^[2]。因而迫切需要发现敏感度、准确率更高的早期诊断及治疗方法以提高 NSCLC 患者的生存率。近年来,基因组学和蛋白质组学迅猛发展,人们对外泌体有了更深入的研究,外泌体携带的多种生物分子活性成分参与细胞的迁移、通信与生长、血管的新生等生理和病理学过程^[3]。因此,外泌体为 NSCLC 提供了新的研究途径,能够成为早期诊断和治疗的潜在生物学标志物^[4]。

一、外泌体概述

1. 外泌体的起源、结构、组成及分布:外泌体(exosomes)是由多种活性细胞分泌的具有脂质双层膜结构的纳米级囊泡,最早可追溯到 1983 年,是 Johnstone 等在研究网织红细胞成熟的过程中被发现并命名的^[5]。质膜循环途径中的膜腔或早期胞内体是其产生的起源,而后向内凹陷形成管腔内膜泡并发展成多泡小体,在细胞内分子马达的牵引下,多泡小体与

胞表面融合,最终被分泌出去,此被称之为“内吞-融合-外排”调控过程^[6]。外泌体形态规则,呈杯状或双凹蝶形,大小均匀,直径为 30~100nm。外泌体其内含大量的生物活性物质如:①蛋白质:由在外泌体中普遍存在的膜转运和融合相关蛋白(Alix、Rab 蛋白、TSG101、G 蛋白等)、细胞骨架成分蛋白、整合素和四跨膜蛋白(CD81、CD63、CD9 等)等固有蛋白及与细胞来源和组织类型相关的特异性蛋白两大类组成^[7];②核酸:包括长非编码 RNA(lncRNA)、各种 RNA 亚型、双链 DNA、微小 RNA(microRNA 或 miRNA)等^[8];③脂质:包括磷脂酰肌醇、磷脂酰乙醇胺、神经节苷脂、胆固醇、鞘磷脂、卵磷脂等^[9]。无论在生理或病理条件下,一些细胞均可以胞吐的方式将外泌体释放入各种体液之中,包括尿液、血液、唾液、支气管肺泡灌洗液、母乳、精液、羊水、脑脊液、腹腔积液、胆汁等,通常采用差速离心法可得到外泌体^[10]。

2. 外泌体的生物学特性:经研究证明,外泌体在各种细胞的生理和病理过程中起着重要的作用,作为细胞外微环境的重要成分之一,归结起来,外泌体的生物学功能如下^[11]:(1)细胞通讯与物质传递。首先,外泌体可参与细胞间信息传递及物质运输:外泌体不仅能够作为信号复合物通过受体介导直接刺激靶细胞,还可通过转运核酸、蛋白质、细胞器、膜受体等生物活性成分进入靶细胞内,从而影响靶细胞基因的转录和翻译并调节细胞信号通路,最终改变靶细胞的表型及功能状态。经研究发现,它在改变相邻细胞的生物学功能的同时还可对相距遥远细胞的功能产生重要影响。(2)促进血管与神经新生。外泌体可促进血管的生成进而促使伤口愈合,又可促进损伤神

基金项目:甘肃省中西医结合肿瘤临床医学研究项目(18JR2FA001)

作者单位:730000 兰州,甘肃中医药大学中医临床学院(朱鹏、宋忠阳、吴亚娜、苏欢、杜婷婷);730000 兰州,甘肃中医药大学附属医院肿瘤科(张志明、雍文兴、王功臣、呼永华)

通讯作者:张志明,主任医师,博士生导师,电子信箱:zhangzhimingys@163.com

经的修复。(3)促进肿瘤细胞生长。(4)参与免疫应答与免疫调节。(5)介导抗原递呈等。

二、外泌体在 NSCLC 早期诊断中的作用

外泌体与其他生物学标志物比较有着明显的优势,其生物活性物质 miRNA 和蛋白质因受双层脂质保护可长期稳定存在于血清、血浆或其他体液之中而免受蛋白酶或 RNA 酶的降解。同时,在癌症患者体液中外泌体更容易被分离和分析,因此外泌体可能替代 NSCLC 传统的诊断方法应用于临床,成为在临床诊断中较理想的生物学标志物。

1. 外泌体相关 miRNA 与 NSCLC 的诊断: miRNAs 是一类含有 20~25 个核苷酸的非编码小 RNA,可通过结合其靶 mRNAs 的 3' UTR 来调节靶基因转录水平上的基因表达,从而导致靶基因表达的改变。通过对正常肺组织和 NSCLC 肺组织对比发现, NSCLC 肺组织中 miRNAs 的表达量明显较高,目前 miRNAs 多被发现存在于 NSCLC 患者的外泌体中,参与 NSCLC 的形成及演化过程。因此,外泌体的 miRNA 具有成为 NSCLC 诊断标志物的潜质。Poroyko 等^[12]在 NSCLC 患者血清中发现 7 个外泌体 miRNA (hsa-miR-486-5p、hsa-miR-451a、hsa-miR-660-5p、hsa-miR-363-3p、hsa-miR-25-3p、hsa-miR-16-2-3p 及 hsa-miR-15b-5p) 的敏感度均 $\geq 83.33\%$, 特异性均 $\geq 87.50\%$, AUC 均 ≥ 0.88 , 且与健康志愿者的表达水平比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 说明血清外泌体 miRNAs 有成为早期诊断 NSCLC 的潜力。但化疗后 NSCLC 患者血清中无可用于鉴别与健康志愿者的特异性外泌体 miRNAs。

余昌敏等^[13]研究发现, NSCLC 患者血清中 3 个 miRNA (hsa-miR-451a、hsa-miR-331-5p 及 hsa-miR-363-3p) 可依靠 100% 的特异性和敏感度来鉴别出治疗前的 NSCLC 和小细胞肺癌 (small cell lung cancer, SCLC) 患者。说明这些血清外泌体中对于 NSCLC 诊断具有高敏感度的 miRNAs 同时还具有鉴别 SCLC 和 NSCLC 的能力, 有望在不久的将来成为 NSCLC 早期筛查诊断的生物学标志物。Jin 等^[14]研究发现, NSCLC 患者血浆外泌体中的 miR-24-3p、let-7b-5p 及 miR-486-5p 含量明显高于健康对照者但 let-7e-5p 水平较其降低。为进一步研究及证明外泌体 miRNAs 对 NSCLC 早期的诊断价值, Jin 等联合其他团队对 60 例尚未确诊的 NSCLC 患者血浆中 let-7e-5p、let-7b-5p、miR-486-

5p4 及 miR-23a-3p 等外泌体的差异性表达进行检测, 最终鉴别出 43 例 NSCLC 患者, 因此, 外泌体相关 miRNA 这种无创且高敏感度的诊断方法可提高 NSCLC 的早期诊断率。此外, Su 等^[15]查阅文献发现, 利用 qPCR 技术和 miRNA 测序检测 42 例健康志愿者及 41 例 I 期 NSCLC 患者血浆外泌体中的 Ct 值及其 miRNA, 以筛选诊断 NSCLC 的特异性 miRNA, 结果发现 miR-361b-5p、miR-181b-5p、miR-320b 及 miR-10b-5p 这 4 种 miRNA 具有鉴别 NSCLC、肺鳞癌及肺腺癌患者的能力, 说明外泌体中的 miRNA 在肺癌的诊断及鉴别诊断中发挥着重大作用, 并为寻找诊断早期 NSCLC 的生物学标志物提供理论依据, 进而可能会代替组织活检成为诊断 NSCLC 的非侵入性分子标志物。

美国 Exosome Diagnostics 公司于 2016 年初研发的基于血浆外泌体的间变性淋巴瘤激酶 (anaplastic lymphoma kinase, ALK) 试剂盒已被相关机构批准用于临床, 这是世界上第 1 个以血浆为样本分析外泌体 RNA 的临床检测^[16]。它可以实时、准确地检测 NSCLC 患者 EML4-ALK 融合基因突变的情况, 该项检测也被证明具有高达 100% 的诊断特异性和 88% 的诊断敏感度。

2. 外泌体相关蛋白质与 NSCLC 的诊断: 据研究报告, 外泌体中除 miRNA 外的特异性蛋白质也可以作为诊断筛查 NSCLC 的生物学标志物并可促进 NSCLC 的发生、发展, 是早期诊断 NSCLC 的有效途径。有研究者对 NSCLC 患者和健康志愿者血清 ELISA 检测时发现, ECM1 及 AH-SG 外泌体蛋白在 NSCLC 患者与健康志愿者间的表达比较, 差异有统计学意义, 特异性为 56.6%, 敏感度为 75.0%, AUC 为 0.656 (95% CI: 0.528~0.785)^[17]。他们还将 ECM1 和 AH-SG 联合进行检测发现, NSCLC 及早期 NSCLC 患者, 特异性为 54.3%, 敏感度为 87.5%, AUC 为 0.739 (95% CI: 0.621~0.858), 这显著提高了 NSCLC 患者诊断的敏感度。另有报道称, NSCLC 患者血浆外泌体中高表达的 EGFR、CD91 及 CD317 等蛋白均可作为 NSCLC 早期诊断的生物学标志物且多个外泌体蛋白标志物联合检测对 NSCLC 诊断更具优势^[18]。

近年来, 基于质谱的高通量蛋白质组学的研究使得对 NSCLC 外泌体蛋白质的筛选方法提升到了新的高度, 这为我们提供了更多具有生物学标志物价值的分子。Clark 等^[19]运用稳定同位素标记氨基酸的方

法检测并分析了 NSCLC 患者和健康对照者支气管上皮细胞外泌体之间的 721 种生物蛋白的差异性表达,筛选出了溶质载体家族 3 成员 2、细胞外基质金属蛋白酶诱导因子、溶酶体膜糖蛋白 2 及癌胚抗原相关黏附分子 6 等多种对 NSCLC 诊断筛查具有高特异性和敏感度的蛋白标志物,若将其开发并应用于 NSCLC 患者液体活检的外泌体蛋白诊断芯片,较单一的生物学标志物将具有更高的开发和诊断价值。Sandfeld - Paulsen 等^[20]研究了 127 例健康对照者和 336 例肺癌患者血浆外泌体中 49 种蛋白表达情况后发现,CD151、CD171 及 TSPAN8 不仅能作为区分肺癌组织与正常组织鉴别诊断的生物学标志物,同时对于区分各种肺癌组织的亚型也具有较高的价值。进一步研究发现,这 3 种蛋白联合应用时诊断 NSCLC 的 AUC 可达 0.74。目前对诊断筛查 NSCLC 外泌体蛋白虽有了一定的成就和较多的研究报道,但已筛选出的蛋白生物学标志物尚需开展进一步的临床验证,相信随着蛋白质组学研究的不断深入,用于诊断 NSCLC 外泌体蛋白的标志物将会被不断被发现。

3. 其余外泌体相关内容物与 NSCLC 的诊断:外泌体中除 miRNA、蛋白质以外的其他分子如环状 RNA(circRNA)、长链非编码 RNA(lncRNAs)也有望成为诊断 NSCLC 的生物学标志物。Li 等^[21]研究发现,NSCLC 细胞和组织中 circRNA_0000735 的表达量均明显升高,且其表达与淋巴结浸润及 TNM 分期有关。进一步研究发现,circRNA_0000735 可显著提高 NSCLC 细胞的增殖、迁移及侵袭能力,又可明显抑制癌细胞的凋亡。其机制可能为 circRNA_0000735 与 miR-1179/1182 结合,从而发挥了生物学功能。另有一项研究显示,SNHG6 作为 19 个 LPro LncRs 中的其中一个,在 NSCLC 患者血浆中的表达呈异常状态,故可能作为 NSCLC 中肺腺癌的非侵入性检测的一个生物学标志物^[22]。

三、外泌体在 NSCLC 治疗中的作用

近年来,外泌体所介导的治疗肺癌的新方式备受青睐和关注。研究表明,外泌体及其相关成分对 NSCLC 的治疗有着较高的应用价值及较好的发展前景。

1. 外泌体所介导的肿瘤疫苗的开发:肿瘤疫苗是近年来研究的热点之一,它是一种活性生物前体。当 NSCLC 细胞相关抗原刺激抗原递呈细胞时,树突状细胞等抗原递呈细胞则会产生大量携带有特异性癌抗原的外泌体,随着外泌体迁移到附近区域淋巴结便

可激活产生强大抗肿瘤免疫反应的 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 的淋巴细胞^[23]。有临床研究证明,表皮生长因子疫苗对 NSCLC 的治疗具有较好的疗效^[24]。另外也有临床试验证实,治疗性疫苗(belagenpumatucel-L)对于 NSCLC 晚期患者来说可适当延长其生存期^[25]。因此对于 NSCLC 的治疗,外泌体所介导的肿瘤疫苗可提供新的思路。

2. 外泌体可抑制原癌基因表达:研究发现,NSCLC 相关原癌基因的表达可被外泌体有效抑制,从而对 NSCLC 的治疗发挥作用。有研究报道,RNA 干扰技术(RNA interference, RNAi)的使用能使 IGF-1R、AKT1、NUPR1、WT1 等肺癌相关原癌基因保持沉默,并可加速 NSCLC 相关 miRNA 的降解^[26,27]。因此,通过外泌体抑制 NSCLC 相关致癌基因的表达也将为 NSCLC 的预防和治疗提供新的思路。

3. 降低 NSCLC 细胞外泌体及其内容物的含量:因 NSCLC 细胞分泌的外泌体及其内容物在肺癌的发生、转移和演进中发挥着重要作用,因此减少外泌体及其内容物的含量或抑制 NSCLC 细胞对外泌体的分泌也可成为治疗的新靶点。研究表明,NSCLC 细胞分泌的外泌体能进一步分泌生存素,其可有效促进 NSCLC 细胞生长并抑制 NSCLC 细胞凋亡,生存素基因负性突变体(survivin-D53A)的使用可抑制 NSCLC 细胞分泌的外泌体分泌生存素,间接抑制了 NSCLC 细胞的生长、促进了其凋亡,有望成为潜在的基因治疗药物。Li 等^[28]研究发现,中性鞘磷脂酶 2(neutral sphingomyelinase 2, nSMase2) EPI64 能有效抑制小鼠体内肺癌细胞相关外泌体的分泌,故 EPI64 可作为 NSCLC 治疗的靶点。

4. 外泌体可增强 NSCLC 患者对化疗药物的敏感度:也有一些研究证实外泌体可增强 NSCLC 患者对化疗药物的敏感度,如 Aqil 等^[29]研究发现,装载于外泌体中的植物萃取物雷公藤红素能有效抑制肺癌细胞的增殖,同时可增强 NSCLC 患者对化疗药物的敏感度并减少毒性不良反应。

四、展 望

随着人们对外泌体不断地探索和研究发现,其在 NSCLC 的诊疗等方面有着巨大的前景和临床应用价值,相信不久的将来便会广泛地应用于临床,以达到延长 NSCLC 患者生存时间和改善 NSCLC 患者生存率的目的。然而,如何寻找外泌体的靶基因、如何标记、提取、分离和纯化外泌体以及如何提高外泌体对 NSCLC 诊断和治疗的特异性及敏感度等诸多问题仍

需广大研究者不断探究和解决。综上所述,外泌体对 NSCLC 的诊断和治疗拥有广阔的前景,相信更多的外泌体研究成果能更有效、更精准地应用于临床,以造福更多的 NSCLC 患者。

参考文献

- Zhang N, Nan A, Chen L, *et al.* Circular RNA circSATB2 promotes progression of non - small cell lung cancer cells[J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 101 - 116
- Shan X, Zhang H, Zhang L, *et al.* Identification of four plasma mi - cro RNA s as potential biomarkers in the diagnosis of male lung squamous cell carcinoma patients in China[J]. *Cancer Med*, 2018, 7(6): 2370 - 2381
- 冷远秀, 陈芳, 罗清. 非小细胞肺癌外泌体研究进展[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2019, 26(6): 437 - 442
- Li C, Lv Y, Shao C, *et al.* Tumor - derived exosomal lncRNA GAS5 as a biomarker for early - stage non - small - cell lung cancer diagnosis[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(11): 20721 - 20727
- Peng XX, Yu R, Wu X, *et al.* Correlation of plasma exosomal microRNAs with the efficacy of immunotherapy in EGFR/ALK wild - type advanced non - small cell lung cancer[J]. *J Immunother Cancer*, 2020, 8(1): 376 - 383
- Jiang L, Gu Y, Du Y, *et al.* Exosomal: diagnostic biomarkers and therapeutic delivery vehicles for cancer[J]. *Mol Pharmaceut*, 2019, 16(8): 3333 - 3349
- Batrakova EV, Kim MS. Using exosomes, naturally - equipped nanocarriers, for drug delivery[J]. *J Contr Rel*, 2015, 21(9): 396 - 405
- 余灵祥. 外泌体 miRNA 作为潜在生物标记物在肝癌病人复发与转移方面的研究[D]. 北京: 中国人民解放军医学院, 2019
- Frydrychowicz M, Kolecka - Bednarczyk A, Madejczyk M, *et al.* Exosomes - structure, biogenesis and biological role in non - small - cell lung cancer[J]. *Scandinavian Journal of Immunology*, 2015, 81(1): 2 - 10
- Okuma Y, Morikawa K, Tanaka H, *et al.* Prospective exosome - focused translational research for afatinib study of non - small cell lung cancer patients expressing EGFR (EXTRA study)[J]. *Thorax Cancer*, 2019, 10(2): 395 - 400
- Lin Y, Lu Y, Li X. Biological characteristics of exosomes and genetically engineered exosomes for the targeted delivery of therapeutic agents[J]. *J Drug Target*, 2020, 28(2): 129 - 141
- Poroyko V, Mirzapoiazova T, Nam A, *et al.* Exosomal miRNAs species in the blood of small cell and non - small cell lung cancer patients[J]. *Oncotarget*, 2018, 9(28): 19793 - 19806
- 余昌敏, 张丹, 闵明, 等. 外泌体 miRNA 作为癌症早期诊断标志物的研究进展[J]. *中国免疫学杂志*, 2020, 36(22): 2786 - 2790
- Jin X, Chen Y, Chen H, *et al.* Evaluation of tumor - derived exoso - mal miRNA as potential diagnostic biomarkers for early - stage non - small cell lung cancer using next - generation sequencing[J]. *ClinCancer Res*, 2017, 23(17): 5311 - 5319
- Su CY, Li JJ, Liu Y, *et al.* Progress of exosomes as biomarkers of lung cancer diagnosis and prognosis[J]. *Lin Chuang Jian Yan Za Zhi*, 2019, 37(12): 881 - 884
- 马骏, 吴斌, 张国中, 等. 外泌体在非小细胞肺癌早期诊疗中的研究进展[J]. *中国胸心血管外科临床杂志*, 2019, 25(7): 1 - 5
- Niu L, Song X, Wang N, *et al.* Tumor - derived exosomal proteins as diagnostic biomarkers in non - small cell lung cancer[J]. *Cancer Sci*, 2019, 110(1): 433 - 442
- Alipoor SD, Mortaz E, Varahram M, *et al.* The potential biomarkers and immunological effects of tumor - derived exosomes in lung cancer[J]. *Front Immunol*, 2018, 18(9): 819 - 830
- 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]. *Journal of Proteomics*, 2016, 133: 161 - 169
- Sandfeld - Paulsen B, Jakobsen KR, Bæk R, *et al.* Exosomal proteins as diagnostic biomarkers in lung cancer[J]. *J Thorac Oncol*, 2016, 11(10): 1701 - 1710
- Li W, Jiang W, Liu T, *et al.* Enhanced expression of circ_0000735 forecasts clinical severity in NSCLC and promotes cell progression via sponging mi R - 1179 and miR - 1182 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 510(3): 467 - 471
- Salavaty A, Rezvani Z, Najafi A. Survival analysis and functional annotation of long non - coding RNAs in lung adenocarcinoma[J]. *J Cell Andmol Med*, 2019, 23(8): 5600 - 5617
- Amiri A, Pourhanifeh MH, Mirzaei HR, *et al.* Exosomes and Lung cancer: roles in pathophysiology, diagnosis and therapeutic applications[J]. *Curr Med Chem*, 2020, 21(23): 9264 - 9281
- Ramos TC, Rodriguez PC, Vinageras EN, *et al.* CIMAvax EGF (EGF - P64K) vaccine for the treatment of non - small - cell lung cancer[J]. *Exp Rev Vaccines*, 2015, 14(10): 1303 - 1311
- Giaccone G, Bazhenova LA, Nemunaitis J, *et al.* A phase III study of belagenpumatucel - L, an allogeneic tumour cell vaccine, as maintenance therapy for non - small cell lung cancer[J]. *Eur J Cancer*, 2015, 51(16): 2321 - 2329
- Liu S, Zhan Y, Luo J, *et al.* Roles of exosomes in the carcinogenesis and clinical therapy of non - small cell lung cancer[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 111: 338 - 346
- 张琳琳, 凌虹. 外泌体作为小干扰 RNA 递送载体的研究进展[J]. *国际免疫学杂志*, 2020, 43(5): 542 - 546
- Li W, Hu Y, Jiang T, *et al.* Rab27A regulates exosome secretion from lung adenocarcinoma cells A549: involvement of EPI64 [J]. *APMIS*, 2015, 122(11): 1080 - 1087
- Aqil F, Kausar H, Agrawal A, *et al.* Exosomal formulation enhances therapeutic response of celestrol against lung cancer[J]. *Exp Mol Pathol*, 2016, 101(1): 12 - 21

(收稿日期: 2021 - 02 - 06)

(修回日期: 2021 - 06 - 22)