

综述

细胞外囊泡中miRNA的分泌机制

叶扬扬¹, 席金忠¹, 李菁^{2*}

(¹南京警察学院刑事科学技术学院, 南京 210023; ²南京大学生命科学学院, 南京大学生命科学高等研究院, 江苏省小核酸生物学和生物技术工程研究中心, 医药生物技术国家重点实验室, 南京 210023)

摘要: 细胞外囊泡(extracellular vesicles, EVs)是一类在生理和病理条件下所有细胞均可分泌的双层膜囊泡。EVs可以包裹很多供体细胞来源的分子物质(蛋白质、脂类、核酸和代谢产物等), 并将所携带的分子物质释放到受体细胞内, 从而调节受体细胞的生物学功能。在EVs携带的分子物质中, microRNA(miRNA)是被广泛研究的一类包含物。EVs中miRNA(EV-miRNAs)作为信号分子介导细胞间通讯, 调控受体细胞的基因表达, 在诸多生理和病理过程中发挥着重要的作用。由于EVs的miRNA表达谱与亲本细胞的miRNA表达谱不同, 表明EV-miRNAs并非随机释放而是选择性地被包装到EVs中。该综述主要对EVs生成、转运以及EVs中miRNA的分泌机制进行介绍, 这些机制包括RNA结合蛋白、miRNA序列特征、miRNA介导的沉默复合体、参与EVs生物生成的膜蛋白等。此外, 某些生理病理状态也影响EV-miRNAs分泌, 揭示了选择性分泌机制在疾病进程中的潜在作用。同时, 本综述讨论了EV-miRNAs作为生物标志物在疾病诊疗中的应用价值。

关键词: 细胞外囊泡; 选择性分泌; miRNA分泌机制; RNA结合蛋白; 表达调控

Mechanism of miRNA secretion into extracellular vesicles

YE Yangyang¹, XI Jinzhong¹, LI Jing^{2*}

(¹School of Criminal Science and Technology, Nanjing Police University, Nanjing 210023, China;

²Advanced Institute of Life Sciences, Jiangsu Engineering Research Centre for miRNA Biology and Biotechnology, State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, School of Life Sciences, Nanjing University, Nanjing 210023, China)

Abstract: Extracellular vesicles (EVs) are bilayer vesicles secreted by all cells under physiological and pathological conditions. EVs can encapsulate many molecular substances (proteins, lipids, nucleic acids, metabolites, etc.) from donor cells, and release the carried molecular substances into the recipient cells, thereby regulating the biological function of the recipient cells. Among the molecular substances carried by EVs, microRNA (miRNA) are a class of inclusions that have been widely studied. As signaling molecules, miRNA in EVs (EV-miRNAs) can mediate intercellular communication, regulate gene expression of receptor cells, and play an important role in many physiological and pathological processes. Since the miRNA expression profile of EVs is different from that of parent cells, EV-miRNAs are not released randomly but selectively packaged into EVs. This review mainly introduces the formation, transport of EVs and the mechanism of miRNA secretion into EVs. These mechanisms include RNA-binding proteins, miRNA sequence signatures, miRNA

收稿日期: 2023-08-13

基金项目: “十四五”江苏省重点学科“公安技术”项目(苏教研函[2022]2号); 国家自然科学基金项目(31972912, 82030026, 31771666)

第一作者: E-mail: yeyangyangnju@163.com

*通信作者: E-mail: jingli220@nju.edu.cn

induced silencing complexes, and membrane proteins involved in EVs biogenesis. In addition, certain physiological and pathological states also affect EV-miRNAs secretion, revealing the potential role of selective secretion mechanisms in disease. At the same time, this review discusses the application value of EV-miRNAs as biomarkers in disease diagnosis and treatment.

Key Words: extracellular vesicles; selective secretion; miRNA secretion mechanism; RNA-binding proteins; expression regulation

细胞外囊泡(extracellular vesicles, EVs)是一类在生理和病理条件下所有细胞均可分泌的双层膜囊泡。EVs的组成具有高度的异质性,主要由直径在50~150 nm的外泌体和直径在100~1 000 nm的微囊泡组成。外泌体和微囊泡的生成机制有很大差异。外泌体来源于核内体起源的多泡体(multivesicular bodies, MVBs),MVBs与质膜融合后向外释放形成外泌体;而微囊泡则是直接由质膜向外出芽产生的。EVs包裹着很多供体细胞来源的分子物质,包括蛋白质、脂类、核酸和代谢产物等。EVs被供体细胞分泌后可以到达受体细胞,并将携带的分子物质释放到受体细胞内,从而调节受体细胞的生物学功能。因此,EVs是介导细胞间通讯的媒介。

在EVs携带的分子物质中,microRNA(miRNA)是被广泛研究的一类包含物。EVs中miRNA(EV-miRNAs)作为信号分子介导细胞间交流,在生理和病理进程中发挥着重要的作用。研究发现,EV-miRNAs并非随机而是选择性地被包装到EVs中。不同亲本细胞来源的EV-miRNAs的丰度和表达水平存在显著差异,并且在不同生理或病理条件刺激下,EV-miRNAs的种类和表达水平也存在明显的差异。这些发现都提示miRNA的分泌是一个被高度调控的过程,不是被动的释放,而是存在主动分泌的机制,可以调节特定的miRNA分拣到EVs中。

EV-miRNAs可以作为信号分子,在介导受体细胞表达调控中发挥重要作用。而且,EV-miRNAs可以作为生物标志物和潜在的靶向因子应用于癌症的诊断和治疗。但目前对调控特异性miRNA装载进入EVs的机制仍知之甚少,现有研究尚不能覆盖所有EV-miRNAs的分泌机制。而且,对于在一些特定生理和病理条件下EVs的生物生成

以及miRNA的分泌机制也不能给出合理的解释。因此,本综述将主要阐述EVs生成、转运以及EVs中miRNA的分泌机制,这对于研究肿瘤发生发展的分子机制以及肿瘤的临床诊疗都具有十分重要的意义。

1 细胞外囊泡概述

1.1 细胞外囊泡的发现及特征

1983年,Pan等^[1]在绵羊网织红细胞中观察到细胞内充满了几乎均匀大小的囊泡结构,并发现红细胞成熟过程中可以通过小泡包裹的方式将代谢产物分泌到细胞外。1989年,Johnstone等^[2]将这种功能性囊泡定义为外泌体。但是,这类囊泡的生物学作用并未引起科学家的重视。随着研究的进展,研究者逐渐认识到,主要由外泌体、微囊泡和凋亡小体组成的EVs,不仅是运载细胞废弃物的载体,同时可以携带多种生物活性物质,介导细胞间的信息传递^[3]。随后陆续发现,网状细胞、树突状细胞、神经细胞、上皮细胞以及肿瘤细胞等都具有分泌EVs的能力。而且很多体液中都存在EVs,包括血液、尿液、唾液、母乳、羊水、腹水、脑脊液、胆汁和精液等。根据其粒径大小及形成方式主要将EVs分为外泌体以及微囊泡^[4]。EVs被磷脂双分子层膜包裹并含有蛋白质、脂类、核酸(DNA、mRNA和miRNA等)以及代谢物^[5]。各种类型的细胞产生的EVs中携带的脂质、蛋白质和核酸是不相同的,并且与细胞所处的生理或者病理过程密切相关^[6]。

1.2 细胞外囊泡的生成

EVs的脂双层膜来源于高尔基体或者细胞膜所形成的核内体。其中,微囊泡形成于细胞膜向外的“出芽”,而外泌体起始于细胞膜内吞作用形成的早期核内体,早期核内体进一步发展为晚期

核内体, 通过向内出芽形成管腔囊泡(intraluminal vesicles, ILVs), 包含多个ILVs的晚期核内体形成MVBs。一部分MVBs与自噬体或溶酶体融合降解, 另一部分MVBs与细胞膜融合, 从而将包裹的囊泡释放到细胞外基质中成为外泌体^[5]。

根据外泌体物质的聚集和膜的内陷过程, 可将外泌体的形成机制分为两种: 依赖内体分选复合物(endosomal sorting complex required for transport, ESCRT)和非依赖ESCRT两种^[6]。

1.2.1 依赖内体分选复合物(ESCRT-dependent)机制

ESCRT由四个复合物(ESCRT-0、ESCRT-I、ESCRT-II和ESCRT-III)和相关蛋白质组成^[7,8]。ESCRT-0识别蛋白质并招募到内体膜; ESCRT-0通过与ESCRT-I亚基肿瘤易感基因101(tumor susceptibility gene 101, Tsg101)的相互作用招募ESCRT-I; ESCRT-I招募ESCRT-II蛋白, 后者招募并激活ESCRT-III复合物; ESCRT-III组成蛋白可以形成寡聚体, 驱动ILVs的切割分离, 同时招募适配蛋白ALG-2 interacting protein X(Alix)来稳定ESCRT-III的组装, 并在空泡蛋白分选相关蛋白4(vacuolar protein sorting-associated protein 4, Vps4)等辅助蛋白的帮助下负责ESCRT复合物的解离和循环^[8]。Thery等^[9]在研究小鼠树突状细胞分泌的外泌体时, 发现了ESCRT的相关蛋白是Tsg101和Alix, 这一发现甚至早于ESCRT机制的发现。这两种蛋白质的发现也使外泌体中ESCRT成分的鉴定得到了进一步的证实和推广。ESCRT-0的重要亚基酪氨酸激酶底物(hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate, HRS)在外泌体分泌过程中有重要作用。研究发现, 一种非典型G蛋白偶联受体与HRS相互作用, 从而调节蛋白质选择性分泌至外泌体中^[10]。Yan等^[11]研究报道, 在培养的脂肪细胞中, 提高ESCRT-I组成蛋白Tsg101的表达量, 外泌体释放量增多。另外, ESCRT-III相关蛋白Vps4和Alix促进膜出芽、MVBs生成和囊泡的形成^[8,12]。

同时, 同线蛋白和多配体聚糖参与了依赖ESCRT的外泌体生物形成过程。研究发现, 沉默同线蛋白或多配体聚糖减少了Alix和CD63阳性外泌体的释放数量^[13]。

1.2.2 非依赖内体分选复合物(ESCRT-independent)机制

很多研究发现, 缺乏ESCRT关键成分的哺乳动物细胞仍可以形成MVBs。除了ESCRT机制外, 其他机制也参与ILVs以及外泌体的生物形成过程, 这些机制包括脂质、四聚体蛋白和热休克蛋白^[6]。例如, 蛋白脂质阳性的外泌体分泌不受HRS、Alix或Tsg101沉默以及Vps4表达的影响^[6]。在哺乳动物中, 同时沉默Tsg101、Vps22和Vps24基因时, MVBs仍然能形成, 但是表皮生长因子诱导的MVBs形成受损^[14]。中性鞘磷脂酶2(neutral sphingomyelinase 2, nSMase2)参与了ILVs向晚期核内体或MVBs的出芽, 抑制nSMase2活性会显著减少EVs的分泌^[15,16]。外泌体膜中另一种丰富的脂质是胆固醇, 也是MVBs膜的重要组成部分。Guix等^[17]发现, 由于在衰老的神经元中胆固醇累积, 使其比年轻的神经元分泌更多的EVs。Peruzzu等^[18]研究表明, 阻断胆固醇的转运, 会影响EVs的形成和释放。

另一方面, 四聚体蛋白是外泌体中高度富集的膜蛋白, 通过与其他跨膜蛋白、胞质蛋白和脂质相互作用, 形成富含四次跨膜结构域。外泌体的生物发生和蛋白负载涉及四聚体蛋白CD9、CD63和CD81等^[6]。Verta等^[19]报道, 外泌体中CD9、CD63和CD81共表达; Ai等^[20]研究发现, CD63是外泌体生物发生的表达依赖性调节因子, 抑制内吞作用促进CD63的外泌体分泌。人骨髓间充质干细胞分泌的外泌体中CD9、CD81表达量高, 在外泌体的合成中起关键作用^[21]。

1.3 细胞外囊泡的转运与分泌

外泌体的释放主要包括细胞内外泌体的转运、在膜上的锚定以及与质膜的融合。目前发现小鸟苷三磷酸酶(guanosine triphosphatases, GTPases)参与了MVBs向细胞膜的转运和EVs分泌^[22]。例如, RAB蛋白家族(RAB11、RAB27和RAB35等)^[23]以及Rho蛋白家族(RhoA、RAC1和CDC42等)^[24]。此外, 融合因子附着蛋白受体(soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors, SNAREs)家族也参与了MVBs与细胞膜的融合过程^[25]。

RAB家族是GTPases中最大的亚家族, 其存在

两种形式：当与GTP结合时蛋白质处于激活状态，当与GDP结合时蛋白质处于失活状态。鸟嘌呤核苷酸交换因子和GTPases激活蛋白可以通过与GTP/GDP结合调控该蛋白质的活性形式^[23]。目前认为RAB家族参与到EVs分泌的诸多环节，包括囊泡的出芽、转运、黏附、锚定和融合等，RAB GTPases作用于细胞内EVs分泌早期复杂的转运步骤，可以作为一个不同囊泡的标志物^[23]。RAB4、RAB5和RAB11修饰早期核内体，RAB7和RAB9是晚期核内体的标记，RAB27A/B与晚期核内体的形成相关^[26]。在三阴性乳腺癌中，敲除RAB5减少了外泌体的分泌^[27]。另外，Ostrowski等^[28]发现，沉默RAB5A、RAB9A、RAB2B、RAB27A和RAB27B能有效地减少外泌体的分泌，而沉默RAB11A或RAB7则不能减少外泌体分泌。但是，Baietti等^[13]发现，在乳腺癌细胞中，分泌含同线蛋白和Alix的外泌体则需要RAB7的参与。综上所述，MVBs的亚细胞定位依赖RAB家族与肌动蛋白和微管细胞骨架的相互作用，后者也受RAB蛋白及其效应物运动蛋白的调控，促进了囊泡沿着肌动蛋白和/或微管细胞骨架的运动。

Rho家族是另一类调节外泌体分泌的GTPases。Rho家族的20个成员可以分为经典家族成员和非典型家族成员两类。经典的Rho GTPases如RhoA、RAC1和CDC42，同RAB家族一样，也受鸟嘌呤核苷酸交换因子和GTPases激活蛋白相互作用的调控。非典型Rho家族成员包括无法水解的Rnd亚家族和RhoH亚家族。Rho GTPase的活性需要在不同的细胞位置进行精确的调节，以使细胞能够对不同的环境和刺激做出反应^[24]。Li等^[29]报道，在各种人类癌细胞中，RhoA是微囊泡释放所必需的，并能阻止细胞和小鼠肿瘤生长中的致癌转化。还有研究报道，CDC42是微囊泡生物发生过程中多个调控信号的关键节点，CDC42可以通过抑制细胞表面蛋白的内化间接促进微囊泡的产生^[30]。这揭示了肿瘤细胞微囊泡的产生及分泌的复杂调控机制，并提供了治疗癌症的策略。

在MVBs与质膜融合的过程中，SNAREs蛋白家族也发挥着重要的作用。SNAREs蛋白家族根据分布位置可以分为v-SNARE(在运输囊泡膜上)和t-SNARE(在靶细胞膜上)，SNAREs蛋白能够促进

MVBs与细胞器膜或细胞膜的融合^[25]。例如，Sun等^[31]报道，可以通过v-SNARE同源物促进外泌体分泌。另有研究发现，在不同的细胞类型中，SNAREs蛋白家族中突触小体相关蛋白、囊泡相关性膜蛋白7和8参与调节MVBs与质膜的融合^[32,33]。

1.4 细胞外囊泡的摄取和胞内命运

EVs被释放到细胞外基质中时，可以到达靶细胞，然后将其内含物释放到受体细胞中，以此来影响靶细胞的下游通路和表型，从而影响靶细胞的生理学和病理学环境。作为细胞间交流的重要媒介，EVs与靶细胞之间有多种交流方式，主要可以概括为三种：配体-受体结合、内吞以及膜融合^[6]。

第一种方式为配体-受体结合。EVs表面富集的蛋白质可以与靶细胞膜表面的受体特异性结合，激活下游信号通路。已知特异性结合的几种介质包括四聚体蛋白家族、整合素、脂类、凝集素、硫酸肝素蛋白聚糖和细胞外基质成分。但特异性靶向受体细胞的分子基础仍不清楚。Park等^[34]报道，整合素细胞黏附分子在调控外泌体归巢中发挥重要作用。还有研究报道，硫酸乙酰肝素蛋白多糖和糖蛋白之间的相互作用参与了靶细胞对EVs的摄取^[35]。

第二种方式为内吞。EVs可以通过内吞作用进入靶细胞，可分为依赖或者不依赖网格蛋白介导的内吞，包括大胞饮、吞噬以及通过小窝蛋白1(caveolin-1, Cav-1)、脂质筏介导的内吞^[6]。进入细胞的外泌体会再次形成MVBs，一部分EVs被溶酶体降解，也有可能被转运释放至邻近细胞中，还有一部分EVs会释放内容物到细胞质中。

第三种方式为膜融合。EVs可以通过与细胞膜融合将内部的物质释放至靶细胞内。EVs中的miRNA和mRNA通过膜融合释放到受体细胞中调节基因的表达。同时，EVs与受体细胞膜的直接融合也能促进跨膜蛋白和脂质交换^[6]。但是，EVs与这些不同成分融合的机制尚不清楚。

2 细胞外囊泡中的miRNA概述

MiRNA是一种长度为22个核苷酸左右的非编码小RNA，由内源基因编码^[36]。早期研究认为，miRNA主要在细胞内发挥作用，因为RNA酶无处

不在, 导致细胞外的RNA极易被降解。但是越来越多的研究表明, miRNA同样可以对远端的组织和器官起到调节作用。Chen等^[37]发现, 血清和血浆中稳定存在大量的miRNA, 这些miRNA可以抵抗不同的温度、pH、储存时间、反复冻融和RNA酶的降解, 这种miRNA被称为循环miRNA。通过在正常生理条件和不同疾病状态下鉴定血清miRNA的表达谱, 发现血清中的miRNA不仅来自循环血细胞, 也来自其他组织。大量的研究已经证明, 除了血清外, miRNA还存在于尿液、乳汁、唾液等体液中^[37,38]。细胞外miRNA的发现为miRNA远距离发挥调控作用提供了可能, 促使miRNA的研究从局限的细胞内扩展到整个生命体, 开辟了miRNA研究的新领域。

细胞外miRNA的来源主要有三种^[37]: (1)组织损伤或细胞凋亡导致细胞破裂使细胞内的miRNA被动释放; (2)细胞中高密度脂蛋白、Argonaute 2 (Ago2)等RNA结合蛋白(RNA binding proteins, RBPs)与miRNA结合, 被主动分泌出细胞; (3)供体细胞分泌的EVs包裹miRNA, 释放到细胞外基质中。EVs的包裹和与特定蛋白的结合可能是细胞外miRNA可以抵抗RNA酶降解的关键原因。

在不同的生理病理条件下, EVs中的miRNA呈现出不同的表达水平, 说明这些miRNA并非细胞扔掉的“废物”, 而是选择性地被包装到EVs中, 并作为信号分子介导细胞间通讯。肿瘤微环境主要由肿瘤细胞、上皮细胞、血管内皮细胞、成纤维细胞、间充质干细胞、免疫细胞和多种炎症因子等组成^[39]。EV-miRNAs在肿瘤的发生、发展过程中发挥着重要的调节作用。癌细胞利用分泌miRNA来指示周围细胞, 从而促进癌细胞的进展。相对于癌细胞的这种“驯化”, 非肿瘤细胞通过分泌miRNA也影响癌症的发生和发展。这种分泌miRNA介导的肿瘤微环境中癌细胞与周围细胞的相互作用为肿瘤的发生发展提供了有利条件^[40]。

3 细胞外囊泡中的miRNA分泌机制

3.1 RNA结合蛋白对miRNA分泌的影响

蛋白质可以通过ESCRT的方式进入MVBs, RNA则不依赖于ESCRT。在外泌体出芽过程之前, miRNA就已被包裹到MVBs。而且, miRNA

有特定外泌体RNA序列(motif), 能够与RBPs结合并被主动加载到EVs中^[41]。目前已鉴定出多种RBPs^[42], 如表1所示。异质核糖核蛋白A2B1 (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2B1, hnRNPA2B1)通过潜在的GGAG/UGCA与miR-198和miR-601结合并装载到外泌体中, hnRNPA2B1与富含神经酰胺的膜区有亲和力^[43]。还有研究者报道, 突触蛋白结合胞质RNA相互作用蛋白 (synaptotagmin-binding cytoplasmic RNA-interaction protein, SYNCRIP)通过结合GGCU将miR-3470a和miR-194-2-3p装载到EVs中, SYNCRIP敲除会影响特定miRNA的分泌^[44]。McKenzie等^[45]研究报道, Ago2磷酸化水平调控EV-miRNAs的分泌, 并且还发现KRAS-MEK-ERK信号通路可以促进Ago2磷酸化, 从而调节let-7a、miR-100和miR-320的分泌。内皮祖细胞在高氧/再灌注处理后, Y-Box结合蛋白1 (Y-Box binding protein 1, YBX-1)调节miR-133分泌到内皮祖细胞的外泌体中^[46]。另外, Shurtleff等^[47]发现, YBX-1通过特定的RNA结合域选择性地miR-223包装到人胚胎肾细胞293T (human embryonic kidney 293T, HEK293T)细胞衍生的外泌体中。Lu等^[48]报道, 抑制MEX3 RNA结合家族成员C (MEX-3 RNA-binding family member C, MEX3C)的表达导致外泌体中miR-451a水平降低, 但未发现MEX3C与miR-451a之间存在互补序列。主要穹窿蛋白 (major vault protein, MVP)是一种核糖核蛋白, 可以将RNA从细胞核转运到细胞质。Teng等^[49]报道, 结肠癌细胞的MVP敲除导致细胞内miR-193a增加, 但外泌体中miR-193a水平降低。La蛋白是一种RNA结合蛋白, Temoche-Diaz等^[50]报道, La蛋白能调节miR-122的分泌。此外, 膜联蛋白A2 (annexin A2, ANXA2)参与了外泌体的内吞和膜转运过程^[51], 在将miRNA装载到EVs中起重要作用。Kosaka等^[52]研究表明, 人类前列腺癌细胞的EV-miRNAs (miR-16、miR-21、miR-24、miR-29a和miR-100)的表达与细胞中ANXA2的水平密切相关。Iavello等^[53]研究发现, Alix促进人类肝干细胞样细胞分泌富含miR-24、miR-31、miR-99b、miR-221、miR-16和miR-451的EVs。人抗原R (human antigen R, HuR)是研究最广泛的RBPs之一, 参与不同细胞的RNA转录后调控。据Chang

表1 RNA结合蛋白调控的miRNA分泌机制

RNA结合蛋白	机制	参考文献
hnRNPA2B1	通过GGAG/UGCA motifs结合miR-198和miR-601; 通过AGG/UAG motifs结合miR-17和miR-93	[43,55,56]
SYNCRIP	通过GGCU motif结合miR-3470a和miR-194-2-3p	[44]
Ago2	调节let-7a、miR-100、miR-223和miR-320a的分泌	[45]
YBX-1	调节miR-133和miR-223的分泌	[46,47]
MEX3C	调节miR-451a的分泌	[48]
MVP	调节miR-193a的分泌	[49]
La protein	调节miR-122的分泌	[50]
ANXA2	调节miR-16、miR-21、miR-24、miR-29a和miR-100分泌	[52]
Alix	调节miR-24、miR-31、miR-99b、miR-221、miR-16和miR-451的分泌	[53]
HuR	调节miR-126、miR-92a、miR-200b和miR-132的分泌	[54]

等^[54]报道, HuR可以调控miR-126、miR-92a、miR-200b和miR-132的分泌。总的来说, 这些报道的RBPs, 大多都是在特定的细胞中, 通过结合特定的motif, 调控一个或者几个miRNAs分泌至EVs中。

3.2 MiRNA序列特征对miRNA分泌的影响

MiRNA在质膜上的停留是由多种因素影响的, 其中特定的核苷酸序列特征和疏水性修饰是影响miRNA分泌的主要因素之一。Koppers-Lalic等^[57]发现, 在B淋巴细胞中, 3'末端腺苷的内源性miRNA主要存在于细胞内, 而3'末端尿苷的miRNA则在EVs中富集。这说明miRNA的3'末端或者部分序列包含关键的分选信号。除了膜结合序列之外, 还有另一种因素可以影响RNA分子对膜的亲和力: 疏水性修饰。有研究报道, 一些哺乳动物的miRNA可以被甲基化^[58], 从而影响其与MVBs膜脂质筏区域的结合。综上, 不同序列特征和修饰的miRNA除了影响与MVBs质膜的直接作用力, 可能还影响与特定RBPs的结合力, 进而调控miRNA分泌至EVs中。

3.3 MVBs限制膜脂质筏组分对miRNA分泌的影响

MVBs限制膜的脂质筏区域富含胆固醇、鞘磷脂、糖苷脂和磷脂酰胆碱以及饱和脂肪酸等, miRNA选择性进入ILVs是基于miRNA与MVBs膜外层脂质筏的相互作用力。MVBs膜蛋白参与了miRNA的分泌, 包括nSMase2^[59]、Cav-1^[56]和Vps4A^[60]。研究报道, nSMase2产生神经酰胺分

子, 这些分子主要分布在膜的脂质筏区域, 神经酰胺可以促进外泌体的分泌, 而抑制nSMase2表达后外泌体的释放减少^[59]。Kosaka等^[61]研究报道, 过表达nSMase2增加了外泌体中miR-16和miR-146a的表达水平, 但对细胞中miRNA水平没有影响。神经酰胺通过神经酰胺酶和鞘氨醇激酶代谢为鞘氨醇和鞘氨醇1-磷酸, MVBs限制膜中的鞘氨醇分子可能增加miRNA对膜的亲和力, 鞘氨醇1-磷酸通过质膜上的G蛋白偶联受体起作用, 进而调节外泌体分泌^[62]。Cav-1定位于质膜的小窝内, 在调节膜运输中发挥关键作用。Lee等^[63]报道, 在肺上皮细胞分泌的EVs中鉴定出Cav-1蛋白, 并强化了Cav-1在miRNA选择性转运到EVs中所起的重要作用。Lee等^[56]进一步研究报道, Cav-1与hnRNPA2B1协同作用, 促进EVs中miR-17和miR-93的分泌。Vps4A是正常内体运输和MVBs分选所必需的。过表达Vps4A的人肝癌细胞促进EVs中miR-27b-3p、miR-92a-3p、miR-193a-3、miR-320a和miR-132-3p的分泌; 降低HEK293T细胞Vps4A的表达水平抑制EVs中miR-92a和miR-150的分泌^[60,64]。表2总结了MVBs膜脂质筏区域的膜蛋白, 对特定miRNA分泌的影响。然而, 目前还需要更多的研究来揭示膜蛋白调控miRNA分泌的确切机制, 以及确定其对生理病理进程的调节作用。

3.4 MiRNA介导的沉默复合体对miRNA分泌的影响

MiRNA介导的沉默复合体(miRNA induced silencing complex, miRISC)和miRNA分泌之间的

表 2 膜蛋白调控的miRNA分泌机制

膜蛋白	机制	参考文献
nSMase2	调节miR-16和miR-146a的分泌	[61]
Caveolin-1	协同hnRNP家族调节miR-17和miR-93的分泌	[56]
Vps4A	调节肝癌细胞miR-27b-3p、miR-92a-3p、miR-193a-3p、miR-320a和miR-132-3p的分泌; 调节HEK293T细胞miR-92a和miR-15的分泌	[60,64]

关系, 促进了miRNA从细胞质加工小体向MVBs的双向再分配, 从而调节miRNA: mRNA生理上的稳态。这种双向再分配具体体现在: 第一, 由于miRISC主要成分与MVBs共定位, 阻断MVBs向溶酶体的转运可能导致miRISC的过度聚集, 而阻断MVBs的形成则导致miRISC的丢失; 第二, miRNA的靶mRNA水平变化可能会改变miRNA分泌进入EVs, 这主要是通过miRISC和MVBs之间的平衡来实现的^[65]。

研究发现, Ago2和miRNA的分泌之间可能存在关联。HEK293T细胞来源的EVs, 敲除Ago2可以减少分泌miRNA的类型或丰度, 如miR-451、miR-150和miR-142-3p^[66]。McKenzie等^[45]报道, Ago2磷酸化水平控制EV-miRNAs的分泌, 并且还发现KRAS-MEK-ERK信号通路可以促进Ago2磷酸化, 磷酸化的Ago2抑制miRNA与核内体的相互作用, 从而调节miRNA的分泌。与Ago2结合但未与靶标mRNA相互作用的miRNA易发生降解, 而与靶标mRNA相互作用的miRNA则受到保护^[67]。综上, mRNA以及MVBs的脂质筏区域都可以作为miRNA的“靶标”, miRNA与mRNA或MVBs的脂质筏区域结合稳态可以调控特定miRNA分泌至EVs中。

3.5 供体细胞生理病理条件对miRNA分泌的影响

3.5.1 稳定状态下EV-miRNAs选择性释放

癌细胞与正常细胞分泌的EVs的miRNA表达谱不同, 供体细胞生理病理条件的改变影响miRNA分泌进入EVs。例如, 在正常组织和肿瘤组织的EVs中miR-320家族广泛分布, miR-451在来源于正常细胞的EVs中高表达, 如人肥大细胞系^[66]。Balkom等^[68]发现, miR-30d、miR-30e、miR-92和miR-125a是内皮细胞中最丰富的miRNA, 但在其分泌的EVs中几乎不存在; miR-25、miR-27a、

miR-186和miR-4485是EVs中最丰富的miRNA, 但在内皮细胞内几乎不存在。MiR-214和miR-155在来自癌症患者的EVs中富集^[69,70]。胶质母细胞瘤(glioblastoma, GBM)患者血清EVs中miR-21水平高于健康人^[71,72], 良性肿瘤和卵巢癌分泌的EVs中miR-21和miR-141的水平也不同^[73]。来自乳腺癌细胞的EVs比正常细胞EVs中miR-21、miR-122、miR-451和miR-1246的含量更高^[74]。有趣的是, 尽管miR-21和miR-1246在乳腺癌患者的血浆EVs中高表达, 但由于它们在乳腺癌中有促癌作用, 这些促癌miRNA也在细胞内大量存在^[75]。综上所述, 这些现象都表明, 不同肿瘤细胞分泌的EV-miRNAs表达谱不同, 循环系统中miRNA表达特异性的改变可以用来评估肿瘤进展和转移的风险, EV-miRNAs在液体活检中可以作为潜在的跟踪疾病进程的分子诊断生物标志物, 以实现早期诊疗。

3.5.2 刺激状态下EV-miRNAs选择性释放

不同的生理或者病理刺激状态也可以改变EVs中miRNA的表达水平。例如, Ragusa等^[76]发现, 对西妥昔单抗治疗前后的结直肠癌细胞系分别提取外泌体, 大约90%细胞内的miRNA也存在于外泌体中。治疗后的结直肠癌细胞外泌体中存在具有潜在的肿瘤抑制特性的miRNA(如miR-142-5p、miR-150、miR-223和miR-433)。Kosgodage等^[77]发现, 大麻二酚(cannabidiol, CBD)与GBM的EVs释放之间存在联系。报道称, CBD是一种EVs分泌调节剂, 与化疗药替莫唑胺联用会影响GBM的EVs表达谱, CBD处理后的细胞释放的EVs含有较低水平的促癌miR-21和较高水平的抗癌miR-126。因此, CBD提高替莫唑胺对GBM的敏感性, 为大麻素治疗GBM提供了证据。Zhang等^[78]研究报道, 血细胞和培养的单核巨噬细胞在受到脂多糖、过氧化氢、晚期糖基化终产物和油酸/棕榈酸等各种刺

激时,会主动选择性地将miRNA包装进微囊泡。而且在不同的刺激条件下,微囊泡中miRNA表达情况也不同,miR-26b和miR-222在过氧化氢刺激时分泌到EVs中减少,但在晚期糖基化终产物和油酸/棕榈酸刺激时则促进分泌到微囊泡中。综上所述,在不同的刺激状态下,不同细胞分泌的miRNA种类和表达水平也存在明显的差异,提示细胞会选择性地miRNA包装进EVs并主动分泌到细胞外,这种选择性包装使EV-miRNAs成为一种参与多种生物过程以及系统内稳态的分泌因子。

4 总结与展望

EVs在体液中能够稳定存在,可以携带多种生物活性物质,并选择性地将装载的货物递送至受体细胞,在细胞的信息交流中发挥十分重要的作用。近年来,EVs逐渐成为医学研究的热点,在多种疾病的预防、诊断、治疗、预后判断中具有良好的应用前景。EVs是细胞间传递生物信息的天然载体,具有较小的适应性免疫原性和毒性。此外,EVs还具有稳定性好、运输效率高、生物相容性强以及能穿过血脑屏障等独特优势。因此,EVs的这些特性适合于作为各种治疗剂(包括蛋白质、核酸药物、靶向药物、基因编辑药物等)的体内递送载体。EVs已成为一种新的无细胞治疗策略,用于治疗包括癌症在内的多种疾病。

供体细胞分泌的EVs包裹miRNA递送到受体细胞中,可以介导细胞间通讯、调控靶基因的表达和受体细胞的功能,在肿瘤、代谢、发育、神经、免疫以及心血管系统等生理和病理进程中发挥着重要的作用。大量研究表明,miRNA并非随机整合到EVs中,细胞可以选择性地miRNA装载到EVs。尽管我们概述了一些miRNA分泌相关的机制,但是这些机制的细节在很大程度上仍然是未知的,目前也没有更高效的检测手段来追踪每个细胞分泌miRNA的能力。而且,现有研究尚不能覆盖所有EV-miRNAs的分泌机制,一些具有重要生理病理功能的EV-miRNAs的分泌机制尚不清楚。

供体细胞来源的EV-miRNAs表达量的变化反映了肿瘤进展,并且能够在循环系统EVs中检测到miRNA,提示EV-miRNAs是癌细胞表型的调节因

子、再生医学中的细胞替代品,以及非侵入性分子诊断的来源。在肿瘤液体活检中,EV-miRNAs有望作为分子检测中一种新的无创性生物标志物,补充无细胞DNA和循环肿瘤细胞的治疗策略,具有良好的临床诊断、治疗与预后应用前景。其一,循环系统中EV-miRNAs表达量的改变可以用来评估肿瘤进展和转移的风险,以实现早期诊断。其二,通过修饰EVs膜递送治疗性miRNA等核酸药物,靶向到达肿瘤细胞,具有良好的抗肿瘤作用,为靶向治疗肿瘤提供了新的思路。其三,利用EV-miRNAs也可以进行药物的耐药性疗效判断和疾病的预后判断,可以衡量肿瘤临床治疗的效果。

在未来的研究中,对EV-miRNAs的量化过程需要制定一系列标准的步骤。此外,从转化的角度来看,需要评估肿瘤与EV-miRNAs之间的关系,并系统制定癌症诊断和预后的生物标志物。

参考文献

- [1] Pan BT, Johnstone RM. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes *in vitro*: selective externalization of the receptor. *Cell*, 1983, 33(3): 967-978
- [2] Johnstone RM, Bianchini A, Teng K. Reticulocyte maturation and exosome release: transferrin receptor containing exosomes shows multiple plasma membrane functions. *Blood*, 1989, 74(5): 1844-1851
- [3] Colombo M, Raposo G, Théry C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2014, 30(1): 255-289
- [4] Mathieu M, Martin-Jaular L, Lavieu G, et al. Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. *Nat Cell Biol*, 2019, 21(1): 9-17
- [5] Kalluri R, LeBleu VS. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science*, 2020, 367(640): 1-15
- [6] van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018, 19(4): 213-228
- [7] Juan T, Fürthauer M. Biogenesis and function of ESCRT-dependent extracellular vesicles. *Semin Cell Dev Biol*, 2018, 74: 66-77
- [8] Larios J, Mercier V, Roux A, et al. ALIX- and ESCRT-III-dependent sorting of tetraspanins to exosomes. *J Cell Biol*,

- 2020, 219(3): 1-27
- [9] Thery C, Boussac M, Veron P, et al. Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *J Immunol*, 2001, 166(12): 7309-7318
- [10] Lee YJ, Shin KJ, Jang HJ, et al. GPR143 controls ESCRT-dependent exosome biogenesis and promotes cancer metastasis. *Dev Cell*, 2023, 58(4): 320-334
- [11] Yan C, Tian X, Li J, et al. A high-fat diet attenuates AMPK α 1 in adipocytes to induce exosome shedding and nonalcoholic fatty liver development *in vivo*. *Diabetes*, 2021, 70(2): 577-588
- [12] Alonso YAM, Migliano SM, Teis D. ESCRT-III and Vps4: a dynamic multipurpose tool for membrane budding and scission. *FEBS J*, 2016, 283(18): 3288-3302
- [13] Baietti MF, Zhang Z, Mortier E, et al. Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nat Cell Biol*, 2012, 14(7): 677-685
- [14] Stuffers S, Sem Wegner C, Stenmark H, et al. Multivesicular endosome biogenesis in the absence of ESCRTs. *Traffic*, 2009, 10(7): 925-937
- [15] Zhu C, Bilousova T, Focht S, et al. Pharmacological inhibition of nSMase2 reduces brain exosome release and α -synuclein pathology in a Parkinson's disease model. *Mol Brain*, 2021, 14(70): 1-8
- [16] Choezom D, Gross JC. Neutral sphingomyelinase 2 controls exosome secretion by counteracting V-ATPase-mediated endosome acidification. *J Cell Sci*, 2022, 135(5): jcs259324
- [17] Guix FX, Capitán AM, Casadomé-Perales Á, et al. Increased exosome secretion in neurons aging *in vitro* by NPC1-mediated endosomal cholesterol buildup. *Life Sci Alliance*, 2021, 4(8): 1-18
- [18] Peruzzi D, Boussadia Z, Fratini F, et al. Inhibition of cholesterol transport impairs Cav-1 trafficking and small extracellular vesicles secretion, promoting amphisome formation in melanoma cells. *Traffic*, 2023, 24(2): 76-94
- [19] Verta R, Saccu G, Tanzi A, et al. Phenotypic and functional characterization of aqueous humor derived extracellular vesicles. *Exp Eye Res*, 2023, 228: 1-10
- [20] Ai Y, Guo C, Garcia-Contreras M, et al. Syntenin and CD63 promote exosome biogenesis from the plasma membrane by blocking cargo endocytosis. *bioRxiv*, 2023, 5(26): 1-34
- [21] Liu Y, Zeng L, Wang W, et al. Human bone marrow mesenchymal stem cell exosome-derived miR-335-5p promotes osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells to alleviate periodontitis by down-regulating DKK1. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 2023, 43(3): 420-427
- [22] Xu M, Ji J, Jin D, et al. The biogenesis and secretion of exosomes and multivesicular bodies (MVBs): intercellular shuttles and implications in human diseases. *Genes Dis*, 2023, 10(5): 1894-1907
- [23] Stenmark H. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, 10(8): 513-525
- [24] Lawson CD, Ridley AJ. Rho GTPase signaling complexes in cell migration and invasion. *J Cell Biol*, 2018, 217(2): 447-457
- [25] Liu C, Liu D, Wang S, et al. Identification of the SNARE complex that mediates the fusion of multivesicular bodies with the plasma membrane in exosome secretion. *J Extracell Vesicle*, 2023, 12(9): 1-22
- [26] Huotari J, Helenius A. Endosome maturation. *EMBO J*, 2011, 30(17): 3481-3500
- [27] Qiao L, Dong C, Zhang J, et al. The expression of Rab5 and its effect on invasion, migration and exosome secretion in triple negative breast cancer. *Korean J Physiol Pharmacol*, 2023, 27(2): 157-165
- [28] Ostrowski M, Carmo NB, Krumeich S, et al. Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nat Cell Biol*, 2010, 12(1): 19-30
- [29] Li B, Antonyak MA, Zhang J, et al. RhoA triggers a specific signaling pathway that generates transforming microvesicles in cancer cells. *Oncogene*, 2012, 31(45): 4740-4749
- [30] Wang J, Zhuang X, Greene KS, et al. Cdc42 functions as a regulatory node for tumour-derived microvesicle biogenesis. *J Extracell Vesicle*, 2021, 10(3): 1-17
- [31] Sun C, Wang P, Dong W, et al. LncRNA PVT1 promotes exosome secretion through YKT6, RAB7, and VAMP3 in pancreatic cancer. *Aging*, 2020, 12(11): 10427-10440
- [32] Long Y, Cheng Y, Yang J, et al. Abeta-induced presynaptic release of UBC9 through extracellular vesicles involves SNAP23. *Neurosci Lett*, 2022, 785: 1-7
- [33] Colombo F, Casella G, Podini P, et al. Polarized cells display asymmetric release of extracellular vesicles. *Traffic*, 2021, 22(4): 98-110
- [34] Park EJ, Shimaoka M. Integrin-mediated exosomal homing to organs. *Methods Mol Biol*, 2023, 2668: 145-158
- [35] Melo SA, Luecke LB, Kahlert C, et al. Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer. *Nature*, 2015, 523(7559): 177-182
- [36] Catalanotto C, Cogoni C, Zardo G. MicroRNA in control of gene expression: an overview of nuclear functions. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(1712): 1-17
- [37] Chen X, Liang H, Zhang J, et al. Secreted microRNAs: a new form of intercellular communication. *Trends Cell Biol*, 2012, 22(3): 125-132

- [38] Verweij FJ, Bebelman MP, Jimenez CR, et al. Quantifying exosome secretion from single cells reveals a modulatory role for GPCR signaling. *J Cell Biol*, 2018, 217(3): 1129-1142
- [39] de Visser KE, Joyce JA. The evolving tumor microenvironment: from cancer initiation to metastatic outgrowth. *Cancer Cell*, 2023, 41(3): 374-403
- [40] Naito Y, Yoshioka Y, Yamamoto Y, et al. How cancer cells dictate their microenvironment: present roles of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci*, 2017, 74(4): 697-713
- [41] Garcia-Martin R, Wang G, Brandão BB, et al. MicroRNA sequence codes for small extracellular vesicle release and cellular retention. *Nature*, 2022, 601(7893): 446-451
- [42] Groot M, Lee H. Sorting mechanisms for micrornas into extracellular vesicles and their associated diseases. *Cells*, 2020, 9(4): 1-16
- [43] Villarroya-Beltri C, Gutiérrez-Vázquez C, Sánchez-Cabo F, et al. Sumoylated hnRNP A2/B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nat Commun*, 2013, 4(2980): 1-10
- [44] Santangelo L, Giurato G, Cicchini C, et al. The RNA-binding protein SYNCRIP is a component of the hepatocyte exosomal machinery controlling microRNA sorting. *Cell Rep*, 2016, 17(3): 799-808
- [45] McKenzie AJ, Hoshino D, Hong NH, et al. KRAS-MEK signaling controls Ago2 sorting into exosomes. *Cell Rep*, 2016, 15(5): 978-987
- [46] Lin F, Zeng Z, Song Y, et al. YBX-1 mediated sorting of miR-133 into hypoxia/reoxygenation-induced EPC-derived exosomes to increase fibroblast angiogenesis and MEndoT. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(263): 1-13
- [47] Shurtleff MJ, Temoche-Diaz MM, Karfilis KV RS, et al. Y-box protein 1 is required to sort microRNAs into exosomes in cells and in a cell-free reaction. *Elife*, 2016, 5: 1-23
- [48] Lu P, Li H, Li N, et al. MEX3C interacts with adaptor-related protein complex 2 and involves in miR-451a exosomal sorting. *PLoS One*, 2017, 10(1037): 1-25
- [49] Teng Y, Ren Y, Hu X, et al. MVP-mediated exosomal sorting of miR-193a promotes colon cancer progression. *Nat Commun*, 2017, 8(14448): 1-16
- [50] Temoche-Diaz MM, Shurtleff MJ, Nottingham RM, et al. Distinct mechanisms of microRNA sorting into cancer cell-derived extracellular vesicle subtypes. *Elife*, 2019, 8: 1-34
- [51] Hagiwara K, Katsuda T, Gailhouse L, et al. Commitment of Annexin A2 in recruitment of microRNAs into extracellular vesicles. *FEBS Lett*, 2015, 589(24 Pt B): 4071-4078
- [52] Kosaka N, Iguchi H, Yoshioka Y, et al. Competitive interactions of cancer cells and normal cells via secretory MicroRNAs. *J Biol Chem*, 2012, 287(2): 1397-1405
- [53] Iavello A, Frech VSL, Gai C, et al. Role of Alix in miRNA packaging during extracellular vesicle biogenesis. *Int J Mol Med*, 2016, 37(4): 958-966
- [54] Chang SH, Hla T. Post-transcriptional gene regulation by HuR and microRNAs in angiogenesis. *Curr Opin Hematol*, 2014, 21(3): 235-240
- [55] Wu B, Su S, Patil DP, et al. Molecular basis for the specific and multivariant recognitions of RNA substrates by human hnRNP A2/B1. *Nat Commun*, 2018, 9(420): 1-12
- [56] Lee H, Li C, Zhang Y, et al. Caveolin-1 selectively regulates microRNA sorting into microvesicles after noxious stimuli. *J Exp Med*, 2019, 216(9): 2202-2220
- [57] Koppers-Lalic D, Hackenberg M, Bijnisdorp IV, et al. Nontemplated nucleotide additions distinguish the small RNA composition in cells from exosomes. *Cell Rep*, 2014, 8(6): 1649-1658
- [58] Yuan S, Tang H, Xing J, et al. Methylation by NSun2 represses the levels and function of microRNA 125b. *Mol Cell Biol*, 2014, 34(19): 3630-3641
- [59] Pavlic A, Poelman H, Wasilewski G, et al. Inhibition of neutral sphingomyelinase 2 by novel small molecule inhibitors results in decreased release of extracellular vesicles by vascular smooth muscle cells and attenuated calcification. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(3): 1-12
- [60] Wei JX, Lv LH, Wan YL, et al. Vps4A functions as a tumor suppressor by regulating the secretion and uptake of exosomal microRNAs in human hepatoma cells. *Hepatology*, 2015, 61(4): 1284-1294
- [61] Kosaka N, Iguchi H, Yoshioka Y, et al. Secretory mechanisms and intercellular transfer of micrornas in living cells. *J Biol Chem*, 2010, 285(23): 17442-17452
- [62] Czubowicz K, Jęsko H, Wencel P, et al. The role of ceramide and sphingosine-1-phosphate in Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Mol Neurobiol*, 2019, 56(8): 5436-5455
- [63] Lee H, Groot M, Pinilla-Vera M, et al. Identification of miRNA-rich vesicles in bronchoalveolar lavage fluid: insights into the function and heterogeneity of extracellular vesicles. *J Control Release*, 2019, 294: 43-52
- [64] Jackson CE, Scruggs BS, Schaffer JE, et al. Effects of inhibiting VPS4 support a general role for ESCRTs in extracellular vesicle biogenesis. *Biophys J*, 2017, 113(6): 1342-1352
- [65] Squadrito ML, Baer C, Burdet F, et al. Endogenous RNAs modulate microRNA sorting to exosomes and transfer to acceptor cells. *Cell Rep*, 2014, 8(5): 1432-1446
- [66] Guduric-Fuchs J, O'Connor A, Camp B, et al. Selective

- extracellular vesicle-mediated export of an overlapping set of microRNAs from multiple cell types. *BMC Genomics*, 2012, 13(357): 1-14
- [67] Meijer HA, Smith EM, Bushell M. Regulation of miRNA strand selection: follow the leader? *Biochem Soc Trans*, 2014, 42(4): 1135-1140
- [68] van Balkom BW, Eisele AS, Pegtel DM, et al. Quantitative and qualitative analysis of small RNAs in human endothelial cells and exosomes provides insights into localized RNA processing, degradation and sorting. *J Extracell Vesicles*, 2015, 4(26760): 1-14
- [69] Yamaoka B, Nagasaki-Maeoka E, Uekusa S, et al. Exosomal miR-214-3p as a potential novel biomarker for rhabdoid tumor of the kidney. *Pediatr Surg Int*, 2021, 37(12): 1783-1790
- [70] Bao Z, Zhang N, Niu W, et al. Exosomal miR-155-5p derived from glioma stem-like cells promotes mesenchymal transition via targeting ACOT12. *Cell Death Dis*, 2022, 13(725): 1-14
- [71] Zottel A, Šamec N, Kump A, et al. Analysis of miR-9-5p, miR-124-3p, miR-21-5p, miR-138-5p, and miR-1-3p in glioblastoma cell lines and extracellular vesicles. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(8491): 1-22
- [72] Beylerli O, Gareev I, Sufianov A, et al. The role of microRNA in the pathogenesis of glial brain tumors. *Non-coding RNA Res*, 2022, 7(2): 71-76
- [73] Horie K, Nanashima N, Yokoyama Y, et al. Exosomal MicroRNA as biomarkers for diagnosing or monitoring the progression of ovarian clear cell carcinoma: a pilot study. *Molecules*, 2022, 27(3953): 1-11
- [74] Hannafon BN, Trigoso YD, Calloway CL, et al. Plasma exosome microRNAs are indicative of breast cancer. *Breast Cancer Res*, 2016, 18(90): 1-14
- [75] Wang M, Wang Y, Tian X, et al. Diagnostic and predictive value of liquid biopsy-derived exosome miR-21 for breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Expert Rev Mol Diagn*, 2023, 23(4): 315-324
- [76] Ragusa M, Statello L, Maugeri M, et al. Highly skewed distribution of miRNAs and proteins between colorectal cancer cells and their exosomes following Cetuximab treatment: biomolecular, genetic and translational implications. *Oncoscience*, 2014, 1(2): 132-157
- [77] Kosgodage US, Uysal-Onganer P, MacLatchy A, et al. Cannabidiol affects extracellular vesicle release, miR21 and miR126, and reduces prohibitin protein in glioblastoma multiforme cells. *Transl Oncol*, 2019, 12(3): 513-522
- [78] Zhang Y, Liu D, Chen X, et al. Secreted monocytic miR-150 enhances targeted endothelial cell migration. *Mol Cell*, 2010, 39(1): 133-144