



细胞外囊泡在肿瘤液体活检中的应用

李帅^{1,2}, 刘亚婷³, 仰大勇^{1,4*}

1. 天津大学化工学院, 合成生物学前沿科学中心, 系统生物工程教育部重点实验室, 天津 300350

2. 天津大学浙江研究院, 宁波 315200

3. 苏州亿弗生物科技有限公司, 苏州 215000

4. 复旦大学化学系, 上海 200433

* 联系人, E-mail: dayongyang@fudan.edu.cn

2024-11-19 收稿, 2025-01-17 修回, 2025-02-06 接受, 2025-02-20 网络版发表

中国博士后科学基金(2023M742595)资助

摘要 肿瘤液体活检是研究者和医生密切关注的一种新兴的无创检测技术, 通过采集血液、尿液、唾液等体液, 利用分子生物学、免疫学等手段对肿瘤标志物进行分析, 来确定受试者肿瘤发生概率或肿瘤发展状态, 具有灵敏性和便捷性的优点. 细胞外囊泡(EVs)是活细胞主动分泌的膜结构, 在细胞间传递信息的重要载体, 包含母细胞的生理病理信息, 能动态传递疾病发生的信号, EVs已成为肿瘤液体活检领域的一颗新星. EVs富含核酸(DNA、RNA)和蛋白, 不管组织活检还是液体活检, 核酸和蛋白都是重要的分析标志物. 得益于EVs分离和表征技术的发展, 研究者们开发了各种EVs核酸和蛋白分析技术并进行了临床试验, 近年来也不断有产品获批走向市场, 将科学研究转化为造福人类的生产力. 受到最新研究进展的鼓舞, 本文综述了EVs在肿瘤液体活检中的应用, 分别介绍了EVs DNA、EVs RNA、EVs蛋白在肿瘤液体活检中的应用和进展, 并且对EVs研究的挑战和未来发展方向提出了自己的见解, 期待为该领域的研究者提供一些帮助, 也期待更多EVs产品走向临床、走向市场.

关键词 肿瘤液体活检, 细胞外囊泡, 肿瘤标志物, 外泌体

细胞外囊泡(EVs)是细胞释放的, 携带母细胞生物特征, 不具有自我复制能力的膜结构^[1-3]. 受到科学技术和表征手段的限制, EVs在早期被认为是细胞代谢废物的“回收站”, 没有引起科学家的重视^[4,5]. 1983年, 科学家首次在体外培养细胞的上清中发现囊泡结构, 随后被命名为“外泌体”, 但是并没有点燃外泌体研究的热情^[6,7]; 随着研究的逐渐深入, EVs的重要性不断被挖掘出来, 1996年, 研究证明了EVs携带II类主要组织相容复合物(MHC II), 能够呈递抗原并引发T细胞免疫^[8]; 2007年研究证实了EVs在细胞之间传递遗传物质, 科学家意识到EVs或许是细胞间信息交流的重要媒介^[9]; 2008年, Skog等人^[10]发现EVs中含有大量的DNA和RNA, 他们敏锐地意识到EVs可以作为疾病检测的靶

标, 并成立了第一家EVs检测公司ExosomeDX; 2013年, 囊泡的运输调控机制获得了诺贝尔生理或医学奖, 从此, EVs成为科研界的新宠; 2015年, Kalluri等人^[11]验证了EVs与胰腺癌之间的关联, 展现了EVs在癌症早期检测领域的巨大潜力; 2016年, ExosomeDX公司推出了世界首款EVs癌症诊断产品ExoDxLung (ALK), 实现了非小细胞肺癌的灵敏检测. 随后, EVs用于癌症、神经退行性疾病的检测应用层出不穷^[12].

所有细胞都能释放EVs, 并且EVs遍布全身体液, 比如唾液、尿液、血液、乳汁、脑脊液等. 由于EVs来源、尺寸、功能的差异, EVs表现出高度异质性, 因此具有诸多不同的亚型. 根据生物发生途径的不同, EVs常常被分为凋亡小体、微囊泡、外泌体等, 分泌途径

引用格式: 李帅, 刘亚婷, 仰大勇. 细胞外囊泡在肿瘤液体活检中的应用. 科学通报

Li S, Liu Y, Yang D. Application of extracellular vesicles in tumor liquid biopsy (in Chinese). Chin Sci Bull, doi: [10.1360/TB-2024-1236](https://doi.org/10.1360/TB-2024-1236)

的不同,也导致了尺寸的差异(图1(a))^[13,14]. 凋亡小体是尺寸最大的EVs,是在细胞凋亡过程中,细胞裂解后又重新包装形成的,粒径通常在1000~5000 nm左右;微囊泡是指细胞膜出芽形成的中等囊泡,粒径在100~1000 nm左右;外泌体是尺寸最小的囊泡,在30~150 nm左右,科学界普遍认为外泌体的形成包括两次膜内陷过程,首先是细胞膜内陷,形成内吞小体,发育成早期内体后再一次内陷形成多囊泡体,多囊泡体破裂后释放出小囊泡,小囊泡躲避溶酶体降解,被释放到细胞外形成外泌体. 由于不同的囊泡之间会有尺寸的重叠,也不能完全通过尺寸判断囊泡的来源和类型,因此外泌体、微囊泡的精准区分是非常具有挑战性的. 为了避免产生误解,国际细胞外囊泡协会(ISEV)建议采用小囊泡和大囊泡来进行区分,尺寸在200 nm以下的为小囊泡,尺寸在200 nm以上的为大囊泡,应谨慎使用外泌体等能够表明生物来源途径的词语^[15].

DNA、RNA和蛋白是最常用的分析靶标,比如疫情、流感期间进行的核酸检测,就是通过qRT-PCR技术分析病毒的DNA或RNA,体检中的肿瘤标志物筛查,就是对甲胎蛋白、癌胚抗原、糖类抗原等广谱的癌症相关蛋白进行分析. 如图1(b)所示, EVs中同时富含DNA、RNA和蛋白,通过对其中单一组分或多组分联合分析,能够对肿瘤的确诊、转移、复发、预后情况有实时的了解^[16,17]. 纳米尺度的EVs在一定程度上起到了标志物的富集作用,比血浆检测的灵敏度更高,并且

EVs的膜还有能有效地防止RNA等标志物在血浆中被各种酶降解,进一步提升了EVs标志物检测的灵敏度^[18,19]. 本文将聚焦EVs在肿瘤液体活检中的应用,首先介绍了EVs分离和纯化技术,然后分别介绍了EVs DNA、EVs RNA、EVs蛋白和其他标志物在肿瘤液体活检中的应用和进展,最后对EVs研究的挑战和未来发展提出见解.

1 EVs的分离

由于EVs尺寸小,种类多的特性,从成分复杂的体液或细胞培养上清液中快速精确地分离出特定EVs是目前亟需解决的难题,诸多研究者致力于开发新型高效的EVs分离新方法和新技术,现在常用的EVs分离方法包括基于尺寸的超速离心法、尺寸排阻色谱法、超滤法;基于疏水相互作用的聚合物沉淀法;基于抗原抗体亲和作用免疫亲和法;基于DNA适配体的亲和法,基于尺寸和免疫亲和的微流控法等^[20-23]. 超速离心法是目前EVs分离的金标准,通过给样品施加100000~200000 × g的离心力,使EVs沉淀,由于超速离心是根据样品的尺寸和密度进行分离,因此得到的沉淀中会有尺寸相当的脂蛋白等其他杂质,导致得到的EVs纯度不能保证;同时施加的超强离心力会破坏EVs的活性,影响后续的应用;此外超速离心机的使用限制了EVs的分离体积和分离便捷性^[24,25]. 聚合物沉淀法是利用聚乙二醇(PEG)等聚合物改变EVs在溶液中的溶解度,

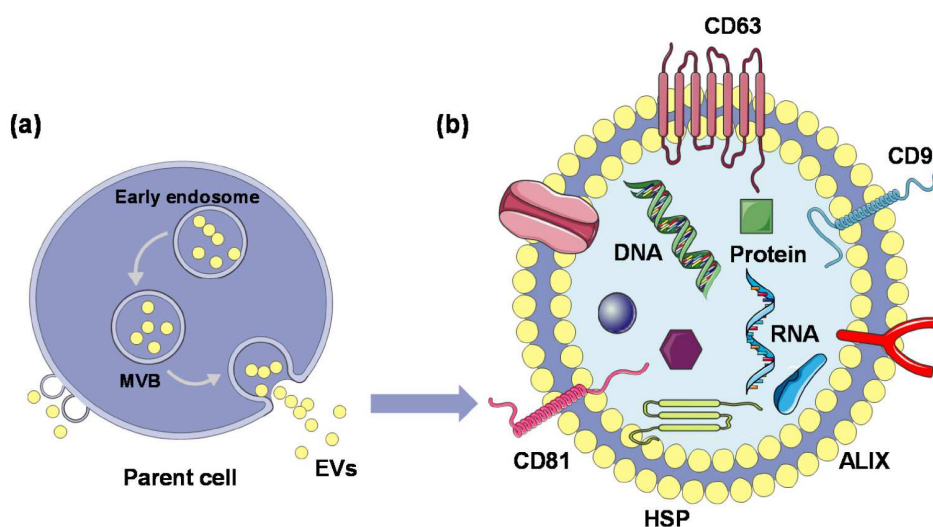


图1 (网络版彩色)EVs的生成和组成. (a) EVs的产生路径: 内体途径或出芽; (b) EVs表面和内部含有丰富的DNA、RNA和蛋白

Figure 1 (Color online) The synthesis pathway and content of EVs. (a) The generation pathway of EVs: endosomal pathway or budding pathway; (b) EVs contain various DNA, RNA, and proteins on the surface and in the lumen

从而将EVs和聚合物共同沉淀出来的一种技术, 由于其操作简便, 不需高速离心, 获得了研究者的青睐, 目前商用的EVs分离试剂盒中有很一部分是基于此原理开发的^[26]. 该方法应用广泛, 但是需要注意的是, 通过该方法得到的EVs混合有大量的蛋白和聚合物, 如果后续应用有影响的话, 应谨慎选择. 尺寸排阻色谱法(SEC)是根据不同粒径的样品在多孔载体中停留的时间不同进行分离的方法, 通过提前在色谱柱中装填具有一定孔径的填料, 尺寸大的颗粒由于不能进入填料的孔洞中而较早地被洗脱下来, 尺寸小的颗粒能够进入填料的孔洞中而被滞留, 因此需要更长的时间才能被洗脱下来, 通过收集不同时间的流出液, 就能收集不同尺寸的EVs^[27,28]. 该方法分离的EVs具有很好的尺寸特异性, 但是在洗脱的过程中, 样品会被稀释, 导致样品浓度过低, SEC通常与超滤、超速离心等其他手段共用来提高EVs样品的浓度和纯度. 超滤法是通过滤膜来实现不同尺寸的样品分离, 小分子物质和溶剂能够通过滤膜而被过滤掉, 大分子物质如EVs则会被截留在膜上, 超滤法具有简单高效的特点, 但是滤膜容易堵塞是阻碍其高通量连续过滤的重要问题^[29]. 微流控法是基于微流控芯片发展出来的分离方法, 微流控芯片具有特定尺寸的孔道, 能够分离特定尺寸的EVs, 实现了EVs自动化分离和检测, 但是由于微流控芯片的尺寸和成本限制, 该方法适合小样本EVs的分离^[30,31]. 免疫亲合法基于抗原抗体亲和作用实现EVs分离, 该方法可以分离带有特定蛋白的EVs, 比如利用CD9, CD63的抗体, 可以分离得到CD9, CD63阳性的EVs, 该方法分离得到的EVs纯度高, 特异性好, 重复性好, 操作相对简单, 有利于后续EVs的精准分析, 但是EVs和抗体的亲和力强, 将EVs从抗体上洗脱的过程需要用到洗脱剂, 可能会破

坏EVs的膜, 造成EVs生物活性的受损, 其次抗体的价格昂贵, 不适合大规模使用^[32,33]. DNA适配体亲和法是一种新兴的EVs分离方法, 其与免疫亲和法类似, 利用DNA适配体和特定蛋白的高亲和力进行分离, 同样具有特异性好、纯度高的优点, 此外, 相比于抗体, DNA适配体洗脱更容易, 对EVs的损伤更小, 价格更低, 有望替代免疫亲和法, 成为新一代的EVs分离方法^[34,35]. EVs的分离方法不止这些, 本文仅介绍了一部分常用的分离方法, 其他方法诸如脂质分离^[36,37]、热泳分离^[38]等也是非常具有前景的分离方法, 本文不做重点讲解. 表1总结了不同分离方法的优缺点.

2 EVs标志物在肿瘤液体活检中的应用

2.1 EVs DNA在肿瘤液体活检中的应用

遗传变异与肿瘤的发生发展有密切联系, 第二代基因测序(NGS)技术的发展促进了基因和肿瘤之间的关系的认识, 比如研究发现EGFR、HER2、KRAS、TP53、RET、EpCAM等基因突变的频率与肺癌、乳腺癌、胃癌、胰腺癌等呈正相关, 在肿瘤的确诊、用药指导和术后复发监测方面发挥了重要作用^[39,40]. EVs中含有大量的核糖核酸(RNA)和蛋白质, 已成为研究者的共识^[41]. 对于EVs中是否存在脱氧核糖核酸(DNA), 研究者们还没有达成共识, 但是一些研究表明EVs中存在线粒体DNA、单链DNA、双链DNA^[42-44]. Kalluri等人^[45]证实了血清来源的EVs中含有双链基因组DNA, 其长度大于10 kb, 并且在胰腺癌病人血清来源的EVs中发现了KRAS和TP53基因突变. 作者进一步通过检测EVs DNA的KRAS和TP53突变实现胰腺癌的早期诊断应用, 采集了48例胰腺癌患者的血清样本, 通过数字

表 1 不同EVs分离方法的优缺点比较

Table 1 Comparison of advantages and disadvantages of different separation methods of EVs

分离方法	效率	纯度	成本	优点	缺点
超速离心法	低	低	高	具有普适性 无需分离试剂	费时费力 设备要求高
聚合物沉淀法	高	低	低	操作方便 处理量大	杂质多
尺寸排阻色谱法	高	中等	高	分离纯度高 生物活性损伤小	样品被稀释
超滤法	中等	中等	中等	操作相对简便	滤膜易堵塞
微流控法	低	高	高	可自动化分离	难以放大
免疫亲和法	低	高	高	能分离特定亚型	洗脱困难
DNA适配体亲和法	低	高	高	能分离特定亚型、操作温和	难以放大

PCR技术分析了EVs中的DNA, 确定了KRAS^{G12D}突变占比39.6%, TP53^{R273H}突变占比4.2%, KRAS^{G12D}突变仅占114例健康人血清的EVs DNA的2.6%, 未发现TP53^{R273H}突变, 该研究展示了EVs DNA突变在癌症液体活检中的潜力^[46].

Vagner等人^[47]更进一步地比较了不同尺寸的EVs中DNA的差异, 结果显示前列腺癌细胞和患者血浆分离出的大EVs中富含基因组DNA, 甚至包含长度大于200万碱基的长片段. 对于含有相同质量蛋白的大EVs和小EVs来说, 小EVs的数量更多, 但是大EVs中的DNA含量更多, 几乎所有的循环DNA都被包裹在大EVs中. 作者提取了PC3细胞和U87细胞中的DNA, 证实了大EVs中的DNA含量是小EVs中DNA含量的7倍, 从患者血浆中分离的EVs也表现出相同的趋势. 为了证明DNA包裹在EVs的内部而不是在离心过程中随EVs共沉淀, 在裂解EVs之前, 用DNA酶进行了消化, 结果显示, DNA酶消化前后, 大EVs和小EVs中DNA含量分别减少了35%和51%, 从而证明大部分DNA是包裹在EVs内部. 作者通过全基因组测序比较大EVs和供体细胞的基因组, 发现大EVs中的DNA跨越了所有染色体, 能够反映基因组的信息, 然后作者研究了体细胞拷贝数变异(SCNV)情况, 发现PC3细胞来源的大EVs的基因组与150名前腺癌患者的基因组图谱相似, 进一步分析发现, *MYC*、*KLF10*、*PTEN*、*PTK2*和*AKT1*五个基因变异导致肿瘤组织中mRNA表达水平与正常组织中的mRNA表达水平发生变化, 利用dPCR技术, 扩增出了肿瘤特异性*MYC*、*KLF10*、*PTK2*和*AKT1*基因, 大EVs中DNA的变异检测对于癌症的诊断、预后有很大帮助.

2.2 EVs RNA在肿瘤液体活检中的应用

在EVs标志物的研究中, RNA比DNA研究得更深入、更广泛. 常见的EVs RNA包括miRNA、信使RNA、环形RNA、长非编码RNA、嵌合RNA等, 有研究表明, 肿瘤细胞来源的EVs含有特定的RNA组合, 有助于癌症的发生和转移, 这为肿瘤的早期诊断、预后提供了重要参考^[48-51]. 不同来源样本的EVs的含量和组成也不尽相同, 有研究者研究了192例供体(包含健康供体、结直肠癌患者、前列腺癌患者、胰腺癌患者)的EVs RNA组成, 发现miRNA和piRNA是含量最丰富的RNA, 占比分别为40.4%和40.0%^[52]; 然而在另一项研究中, 研究者发现结直肠癌细胞EVs中tRNA为含

量最丰富的非编码RNA^[53]. 这些结果表明EVs中富含RNA且具有高度的异质性, 不同来源的EVs, 甚至不同的分离方法都有可能影响EVs RNA的组成和含量.

EVs中含量丰富的RNA吸引了研究者的研究热情, 尤其是在肿瘤液体活检领域. Min等人^[54]通过比较EVs来源的miRNA和血浆中总miRNA, 评估了EVs作为结肠癌早诊标志物的潜力. 通过对15例早期结肠癌患者和10例健康人的血浆EVs的分析, 作者筛选出了95条具有差异表达的miRNA, 更进一步选择miR-150-3p、miR-139-3p、miR-145-3p和let-7b-3p作为后续研究的miRNA组, 在134名受试者(包括58名结肠癌患者和76名健康人)中进行测试, 4条miRNA单独测试的曲线下面积(AUC)在0.680~0.792之间, miR-145-3p和let-7b-3p组合的AUC达到0.901, 三条miRNA的整体AUC达到0.927, 测试结果比血浆全miRNA更好. SOD2相关的组蛋白修饰和胃癌的进展有关, 长非编码RNA1(lncRNA-GC1)的靶基因就是SOD, 能够通过组蛋白乙酰转移酶WDR5和KAT2A促进SOD2的修饰, 是胃癌检测的潜在标志物. Guo等人^[55]证明了胃癌病人血清来源的EVs含有lncRNA-GC1, 通过比较lncRNA-GC1在健康人、早期胃癌患者和癌前病变患者中的差异, 并且与胃癌检测的传统标志物CEA、CA19-9和CA72-4进行了比较, 结果显示胃癌患者的血清EVs中lncRNA-GC1的表达水平和传统血清标志物表现一致, 均明显高于健康人, 更重要的是lncRNA-GC1的AUC值高于CEA、CA19-9和CA72-4, 表明lncRNA-GC1具有作为胃癌早期诊断标志物的潜力. 作者进一步评估lncRNA-GC1对胃癌早期检测的诊断价值, 发现I期或II期胃癌患者的血清EVs中lncRNA-GC1水平与健康人或慢性胃炎患者相比显著上调, 然而, I期或II期胃癌患者的CEA、CA19-9和CA72-4水平与健康人相当, 表明lncRNA-GC1在胃癌早期诊断的灵敏度和特异性更高. 虽然作者的研究表明了血清EVs中lncRNA-GC1具有作为胃癌早期诊断的标志物的潜力, 但是作者选取的样本都是经过病理分析确认的, 缺少前瞻性的临床研究, 也没有选取无症状人群进行测试, 因此lncRNA-GC1作为胃癌早诊标志物还需要进一步验证.

EVs中RNA的分析大多需要对EVs进行裂解, 提取内部的RNA, 该过程比较繁琐, 在RNA提取的过程中, 也容易造成RNA的降解和损失, 为了方便、更准确地检测EVs中的RNA, 研究者们开发了诸多原位检测方法^[56-58]. Zhao等人^[59]报道了一种基于纳米耀斑的热

泳传感器,用于EVs中miRNA的高灵敏度原位检测,并且不需要进行RNA提取和扩增。作者利用的纳米耀斑是含有金核的球形核酸,首先将miR-375的反义序列偶联到13 nm的金纳米颗粒表面,然后通过碱基互补配对连接荧光基团Cy5修饰的DNA链,由于Cy5和金纳米颗粒的邻近效应,Cy5的荧光被淬灭,当纳米耀斑进入到EVs内部,遇到miR-375时,miR-375与纳米耀斑结合,从而将带有Cy5荧光基团的DNA链置换下来,Cy5的荧光恢复,然后通过局部激光加热,负载纳米耀斑的EVs聚集,导致EVs中miRNA的荧光增强,该方法能够直接测量乳腺癌细胞系和乳腺癌患者血清样本的EVs miRNA,灵敏度与qRT-PCR相当,作者在29例临床样本(17例乳腺癌患者,12例健康人)中进行了测试,结果显示乳腺癌患者血清EVs中miR-375表达水平显著高于健康人,检测的灵敏度和特异性分别达到88%和83%,AUC值为0.94,该方法的检测限低至0.36 fM,仅需0.5 μ L的血清样本,大大减小了样本的用量,提高了检测的灵敏度。Tang等人^[60]开发了基于多价适配体的EVs分离和检测新方法,实现了分离检测的一体化(图2(a))。作者首先通过滚换扩增反应(RCA)生成含有重复适配体序列的DNA长链,该DNA长链含有CD63适配体,能特异性地

识别EVs表面的CD63蛋白,该DNA长链还能通过碱基互补配对连接分子信标和信号探针,当DNA长链遇到EVs时,通过识别EVs表面的CD63实现对EVs的捕获,同时分子信标从DNA长链脱落并进入EVs内部,当EVs内部存在特定miRNA(miR-21)时,将分子信标打开,恢复其荧光,此时加入另一条DNA长链,两条DNA长链互补结合,生成DNA水凝胶,从而通过低速离心即可将包裹EVs的DNA水凝胶分离出来,实现了EVs的富集,通过检测EVs的荧光信号,能够判断特定miRNA的表达水平,实现癌症的早期诊断,该方法测得miR-21的表达水平和qRT-PCR的结果相当(图2(b)),作者选了30例临床样本(15例乳腺癌患者,15例健康人)进行测试,检测的准确性和特异性均达到100%(图2(c)),表明该方法在乳腺癌的早诊早筛中具有很大潜力。

2.3 EVs蛋白在肿瘤液体活检中的应用

在EVs的生成过程中,其表面和内腔中包裹大量来自母细胞的蛋白,能够反映母细胞的生理病理状态,因此EVs蛋白也是肿瘤液体活检的重要标志物^[61~64]。如图3所示,常见的EVs蛋白有跨膜蛋白(如CD9、CD63、CD81、CD82、CD37、CD151),整合素,Wnt/b-catenin

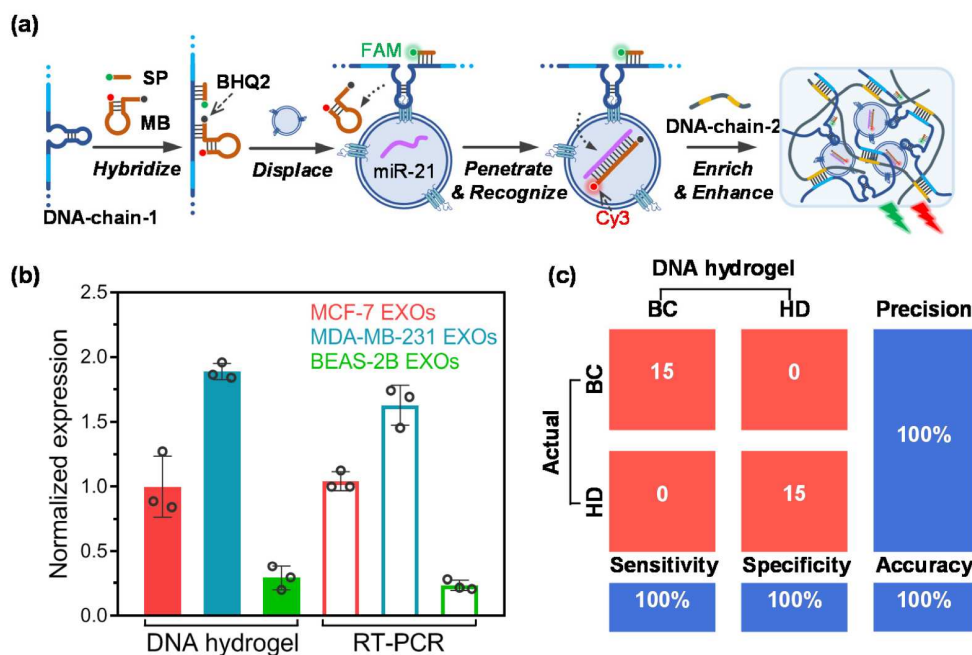


图2 (网络版彩色)基于多价适配体的EVs分离和检测新方法^[60]。(a) EVs分离和检测示意图;(b) DNA水凝胶分离EVs测试miR-21表达水平;(c) 临床样本检测

Figure 2 (Color online) Ploy-aptamers based EVs separation and detection method^[60]. (a) Scheme of EVs separation and detection. (b) Detection of miR-21 expression level by isolating EVs from DNA hydrogel. (c) Clinical sample testing

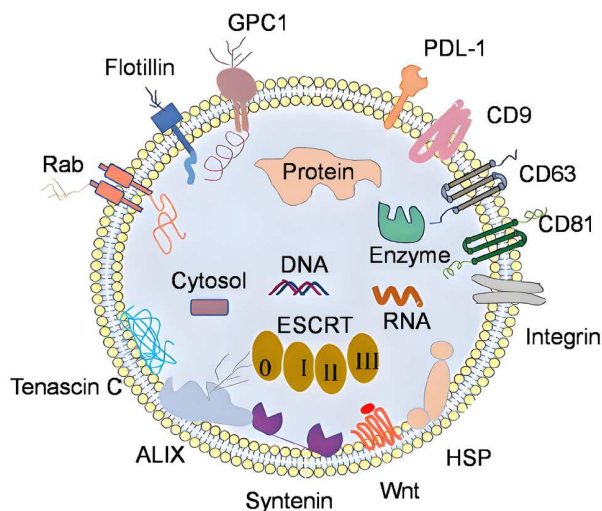


图3 (网络版彩色)EVs中常见的蛋白种类^[62]

Figure 3 (Color online) Common protein types in EVs^[62]

通路相关蛋白, 骨架蛋白(如ESCRT复合物、ALIX), 热休克蛋白(如HSP70), 功能蛋白(如PD-L1、GPC1), 正常细胞和病变细胞分泌的EVs中蛋白的种类和含量不尽相同, 通过比较其中的差异, 可以判断细胞的状态, 从而预测疾病发生的概率^[65].

早在2015年, Kalluri^[11]的研究发现与健康人相比, 胰腺癌病人血清样本分离的EVs中含有更多的磷脂酰肌醇蛋白聚糖1(GPC1), 该研究开启了EVs作为肿瘤液体活检的新纪元. 传统的蛋白质检测手段包括蛋白印迹(WB)和酶联免疫吸附测定(ELISA), 这些方法存在操作复杂和灵敏度低的问题, 诸如荧光检测、电化学检测等新的检测方法正在不断涌现^[66-68]. Li等人^[69]开发了荧光适配体传感器来测定EVs中肿瘤相关蛋白. 该方法整合了DNA适配体、聚集诱导发光(AIE)分子TPE-TAs和氧化石墨烯(GO), 三者分别充当识别元件、荧光元件和荧光淬灭元件. TPE-TAs分子可以吸附在DNA适配体表面, 形成TPE-TAs / DNA复合物, 并使TPE-TAs的荧光增强, 当没有肿瘤来源的EVs时, TPE-TAs / DNA复合物吸附在GO表面, 其荧光被淬灭, 当存在目标EVs时, 由于适配体和EVs表面蛋白的强亲和力, TPE-TAs / DNA复合物优先与EVs结合, TPE-TAs / DNA复合物从GO表面脱落的同时荧光恢复, 溶液中的荧光强度能够反应EVs表面蛋白的含量, 实现特定肿瘤的预测. 利用该技术, 作者收集了49例临床样本(包括6例健康人, 5例良性肿瘤患者, 38例恶性肿瘤患者), 分析了乳腺癌相关的三个蛋白, 表皮生长因子受体(EGFR)、

上皮细胞黏附分子(EpCAM)和人表皮生长因子受体2(HER2), 结果表现出97.37%的高灵敏度, 其中I期病例的检测灵敏度为92.31%, 该技术展现了在肿瘤液体活检中的巨大应用潜力.

EVs具有很强的异质性, 即使是同一个细胞分泌的EVs, 其内容物组成也大不相同, 因此, 如果单个外泌体的分析将能获得更精准的信息. Guo等人^[70]利用DNA纳米结构实现了那个EVs的分析(图4). 作者首先设计了一条包括DNA适配体序列和RCA引物序列的引发链, DNA适配体通过识别EVs表面的蛋白而锚定在EVs表面, 随后加入RCA反应的底物, EVs表面即可进行RCA反应, 生成长的单链DNA, 长单链DNA进行自组装生成DNA纳米花, 在该过程中加入链霉亲和素修饰的荧光基团, 得到带有荧光DNA纳米花修饰的EVs, 此时EVs的尺寸达到200~400 nm, 能够在光学显微镜下观察, 从而实现单个EVs的分析. 利用多条不同的引发链可以实现多个蛋白的同时标记, 作者利用该技术进行了乳腺癌患者血清EVs分析, 结果显示乳腺癌患者血清EVs中EGFR、HER2和CD44蛋白的表达量明显高于健康人, 展示了该方法在肿瘤检测中的潜力.

EVs表面蛋白和miRNA的同步检测可以用来提高肿瘤检测的准确率和可靠性. Cho等人^[71]开发了一种EVs蛋白和miRNA同时原位检测技术, 实现了前列腺癌的特异性检测. 作者首先用特异性抗体修饰的磁珠捕获前列腺癌细胞来源的EVs, 然后用分子信标检测EVs内部的miRNA, 用荧光抗体检测EVs表面的蛋白, 实现了EVs表面蛋白和miRNA的同步原位检测作简单、省时省力. 作者用CD63抗体进行EVs捕获, 选择了前列腺癌细胞和非前列腺癌细胞EVs中的两种miRNA(miR-21、miR-574-3p)和一种蛋白(EpCAM)进行测试, 结果显示前列腺癌细胞与非前列腺癌细胞EVs中的标志物含量具有显著差异性, 证明了该技术的可靠性.

2.4 其他EVs标志物肿瘤液体活检中的应用

除了DNA、RNA和蛋白以外, 聚糖在EVs表面普遍存在, 其通常与蛋白质或脂质以糖基化形式形成糖蛋白或糖脂, 广泛参与生理病理过程^[72-74]. 异常糖基化通常与癌症的发生和发展有关, Guan等人^[75]研究发现, EVs上唾液酸路易斯寡糖X(sLeX)糖基化修饰能够增强血管的渗透, 诱导血管新生, 从而促进肿瘤发展, 表明聚糖具有作为肿瘤标志物的潜力. Tkac等人^[72]研究了不同睾丸癌细胞系及顺铂耐药细胞系的聚糖表达

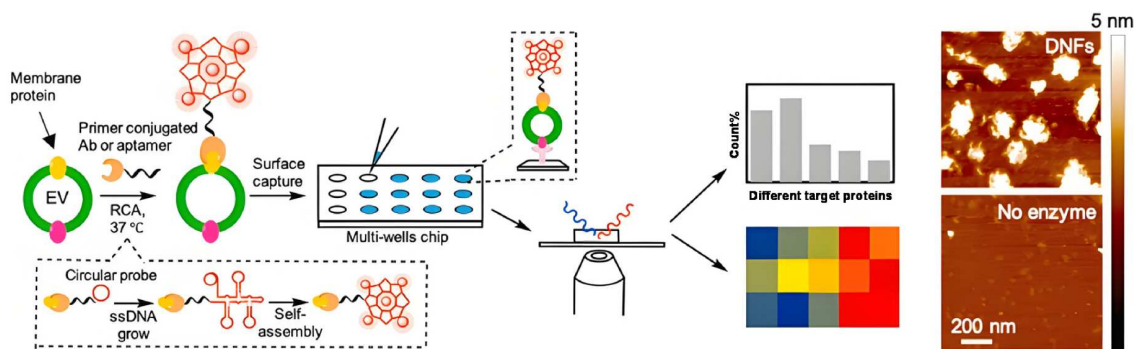


图4 (网络版彩色)基于RCA的单EVs分析^[70]

Figure 4 (Color online) Single EVs analysis by RCA technology^[70]

差异, 睾丸癌(TC)是年轻男性的常见癌症, 通常使用顺铂进行治疗, 但是通常有4%左右的患者对顺铂无响应, 甚至有致命风险. 人绒毛膜促性腺激素(hCG)被用作TC治疗效果的监测, 而其糖基化与生理病理状态有关. 基于此, 作者采用酶联凝集素测定(ELLA)的分析形式, 提出了基于17种凝集素的hCG特异性聚糖分析的测定法, 结果显示, 双花扁豆(DBA)凝集素可以区分顺铂敏感和耐顺铂细胞系, 进而证明了能通过检测hCG的糖基化水平来判断睾丸癌患者的顺铂耐药性. EVs聚糖与蛋白质和核酸等其他标志物共研究, 或许能开启EVs研究的新方向和新热潮.

3 总结与展望

为了更清楚地了解EVs DNA、EVs RNA、EVs蛋白与不同肿瘤的关系, 我们对部分研究进行了总结(表2). 组织活检、病理检测依然是目前肿瘤确诊的金标准, 但是液体活检凭借其无创性、取样方便、连续动态分析、灵敏准确而逐渐走上肿瘤早诊早筛的舞台, 更易被患者所接受, 有望取代组织活检, 成为肿瘤确诊的金标准^[82~84]. 循环肿瘤细胞(CTC)、循环肿瘤DNA(ctDNA)、细胞外囊泡(EVs)被成为液体活检的“三驾马车”, 其中EVs在生理病理过程中发挥的重要作用和作为肿瘤液体活检标志物的潜力不断被发掘和重视, 正成为液体活检的新星^[85,86]. 在学术研究方面, 2013年囊泡运输调控机制获诺贝尔生理学或医学奖, EVs的研究掀起了一股持续的热潮, 促进了EVs领域的发展, 2024年miRNA在基因调控中的作用获诺贝尔生理学或医学奖, EVs miRNA的研究必将登上一个新的台阶, 推动EVs基础研究和临床应用的发展. 迄今为止, 公开的EVs相关临床试验接近500例, 其中诊断相关占比超过

80%, 说明研究者对EVs的诊断抱有更大期望^[87]. 在商业化应用方面, 2016年, 美国Exosome Diagnostics公司推出了EVs检测肺癌和前列腺癌的产品, 走在行业前列; 国内企业奋起直追, 2024年思路迪诊断获批了国内第一款EVs检测产品, 也是全球第一款EVs卵巢癌检测产品, 这意味着EVs用于肿瘤的早期诊断获得了国家的认可, 给我国的EVs相关企业注入了一剂“强心针”; 热景生物基于自主开发的糖链EVs捕获技术, 实现了EVs中miRNA的分析, 其中肝癌、胃癌、胰腺癌检测产品已通过注册检验. 除了在液体活检领域的应用, EVs在药物递送、疾病治疗、再生医学、医美、生发等领域也有广泛的应用, 可以说是“小囊泡, 大作为”, EVs研究领域的百花齐放, 有利于建立疾病监测和治疗的新业态^[88].

虽然EVs大有可为, 但是前行的道路困难重重, 要想实现EVs在临床中的大规模应用, 必须解决以下几个问题: (1) 分离问题, 目前EVs的分离手段层出不穷, 但是没有任何一种手段能够高效分离特定细胞产生的EVs或者EVs亚群, 而不引入其他杂质, 如果只从结果考虑, 能够产生满足我们需求的EVs即可, 可以降低对分离的要求, 但是如果想要研究EVs的作用机制和途径, 就必须对EVs的组成和来源有清晰的了解. (2) 大规模生产和制备问题, 目前EVs的获取途径主要是通过细胞培养, 对培养液进行分离得到, 对贴壁细胞来说, 受制于培养环境的表面积, 限制了EVs产生细胞的数量, 细胞三维培养在一定程度上可以解决这个难题, 但是目前细胞三维培养的技术还未成熟, 缺乏安全可靠的三维培养基质, 难以模拟体内环境限制了该技术的发展; 此外植物是天然存在的, 且来源广泛, 开发植物来源的EVs或许是一条可选择的路径^[89,90]. 天然EVs的应用存在一些限制, 工程化EVs的高效开发和制备具有

表 2 不同EVs标志物与肿瘤的关系

Table 2 The relationship between EVs biomarker and tumor

标志物	靶标	癌种	参考文献
EVs DNA	EGFR, T790M	肺腺癌	[76]
	KRAS	胰腺癌	[77]
	KRAS, TP53	胰腺癌	[46]
	体细胞拷贝数变异	前列腺癌	[47]
EVs RNA	miR-150-3p, miR-139-3p miR-145-3p, let-7b-3p	前列腺癌	[54]
	lncRNA-GC1	胃癌	[55]
	miR-375	乳腺癌	[59]
	miR-21	乳腺癌	[60]
	miR-620	肺癌	[78]
	miR-4661-5p	肝癌	[79]
	miR-92b	结直肠癌	[80]
	GPC1	胰腺癌	[11]
EVs蛋白	EGFR, EpCAM, HER2	乳腺癌	[69]
	EGFR, HER2, CD44	乳腺癌	[70]
	EpCAM, miR-21, miR-574-3p	前列腺癌	[71]
	Wnt4	结直肠癌	[81]

广阔的应用前景^[91]。(3) 标准化问题, 国际细胞外囊泡协会和中国细胞外囊泡协会等相关团体已经制定了相关指南和团体标准, 对EVs的命名、获取、分离、表征、报告等做出了详细的建议 and 操作规范, 但是如何保证EVs的批次间稳定性、EVs的绝对定量、EVs的产

率、EVs的质量控制等仍然没有达成共识, 这就导致EVs的研究者各自为政, 在基础研究领域大放异彩, 但是临床转化却举步维艰。我们期待这些问题被早日攻克, 将EVs研究和应用带上一个新台阶, 造福人类, 造福社会。

参考文献

1 Nieuwland R, Siljander P R. A beginner's guide to study extracellular vesicles in human blood plasma and serum. *J Extracell Vesicle*, 2024, 13: e12400

2 Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol*, 2013, 200: 373–383

3 van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018, 19: 213–228

4 Tkach M, Théry C. Communication by extracellular vesicles: where we are and where we need to go. *Cell*, 2016, 164: 1226–1232

5 Yáñez - Mó M, Siljander P R, Andreu Z, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicle*, 2015, 4: 27066

6 Pan B T, Johnstone R M. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes *in vitro*: selective externalization of the receptor. *Cell*, 1983, 33: 967–978

7 Johnstone R M, Adam M, Hammond J R, et al. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J Biol Chem*, 1987, 262: 9412–9420

8 Raposo G, Nijman H W, Stoorvogel W, et al. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med*, 1996, 183: 1161–1172

9 Valadi H, Ekström K, Bossios A, et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*, 2007, 9: 654–659

10 Skog J, Würlinger T, van Rijn S, et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol*, 2008, 10: 1470–1476

11 Melo S A, Luecke L B, Kahlert C, et al. Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer. *Nature*, 2015, 523: 177–182

12 Yu D, Li Y, Wang M, et al. Exosomes as a new frontier of cancer liquid biopsy. *Mol Cancer*, 2022, 21: 56

13 Kalluri R, LeBleu V S. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science*, 2020, 367: eaau6977

- 14 Huang L, Wang D, Gu N, et al. Extracellular vesicles and their application in the diagnosis and treatment of diseases (in Chinese). *Chin Sci Bull*, 2019, 64: 2025–2036 [黄琳, 王殿冰, 顾宁, 等. 细胞外囊泡及其在疾病诊疗中的应用. *科学通报*, 2019, 64: 2025–2036]
- 15 Welsh J A, Goberdhan D C I, O'Driscoll L, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): from basic to advanced approaches. *J Extracell Vesicle*, 2024, 13: e12404
- 16 Hoshino A, Kim H S, Bojmar L, et al. Extracellular vesicle and particle biomarkers define multiple human cancers. *Cell*, 2020, 182: 1044–1061.e18
- 17 Kim J H, Kim E, Lee M Y. Exosomes as diagnostic biomarkers in cancer. *Mol Cell Toxicol*, 2018, 14: 113–122
- 18 Jeppesen D K, Zhang Q, Franklin J L, et al. Extracellular vesicles and nanoparticles: emerging complexities. *Trends Cell Biol*, 2023, 33: 667–681
- 19 Rahimian S, Najafi H, Afzali B, et al. Extracellular vesicles and exosomes: novel insights and perspectives on lung cancer from early detection to targeted treatment. *Biomedicine*, 2024, 12: 123
- 20 Chen J, Li P, Zhang T, et al. Review on strategies and technologies for exosome isolation and purification. *Front Bioeng Biotechnol*, 2022, 9: 811971
- 21 Yang D, Zhang W, Zhang H, et al. Progress, opportunity, and perspective on exosome isolation-efforts for efficient exosome-based theranostics. *Theranostics*, 2020, 10: 3684–3707
- 22 Xu R, Greening D W, Zhu H J, et al. Extracellular vesicle isolation and characterization: toward clinical application. *J Clin Invest*, 2016, 126: 1152–1162
- 23 Jia Y, Yu L, Ma T, et al. Small extracellular vesicles isolation and separation: current techniques, pending questions and clinical applications. *Theranostics*, 2022, 12: 6548–6575
- 24 Vidal M, Mangeat P, Hoekstra D. Aggregation reroutes molecules from a recycling to a vesicle-mediated secretion pathway during reticulocyte maturation. *J Cell Sci*, 1997, 110: 1867–1877
- 25 Lischinig A, Bergqvist M, Ochiya T, et al. Quantitative proteomics identifies proteins enriched in large and small extracellular vesicles. *Mol Cell Proteomics*, 2022, 21: 100273
- 26 Rider M A, Hurwitz S N, Meckes Jr. D G. ExtraPEG: a polyethylene glycol-based method for enrichment of extracellular vesicles. *Sci Rep*, 2016, 6: 23978
- 27 Böing A N, van der Pol E, Grootemaat A E, et al. Single-step isolation of extracellular vesicles by size-exclusion chromatography. *J Extracell Vesicle*, 2014, 3: 23430
- 28 Karimi N, Cvjetkovic A, Jang S C, et al. Detailed analysis of the plasma extracellular vesicle proteome after separation from lipoproteins. *Cell Mol Life Sci*, 2018, 75: 2873–2886
- 29 Nordin J Z, Lee Y, Vader P, et al. Ultrafiltration with size-exclusion liquid chromatography for high yield isolation of extracellular vesicles preserving intact biophysical and functional properties. *Nanomed-Nanotechnol Biol Med*, 2015, 11: 879–883
- 30 Liu C, Guo J, Tian F, et al. Field-free isolation of exosomes from extracellular vesicles by microfluidic viscoelastic flows. *ACS Nano*, 2017, 11: 6968–6976
- 31 Kanwar S S, Dunlay C J, Simeone D M, et al. Microfluidic device (ExoChip) for on-chip isolation, quantification and characterization of circulating exosomes. *Lab Chip*, 2014, 14: 1891–1900
- 32 Li B, Pan W, Liu C, et al. Homogenous magneto-fluorescent nanosensor for tumor-derived exosome isolation and analysis. *ACS Sens*, 2020, 5: 2052–2060
- 33 Joy A P, Ayre D C, Chute I C, et al. Proteome profiling of extracellular vesicles captured with the affinity peptide Vn96: comparison of Laemmli and TRIzol® protein-extraction methods. *J Extracell Vesicle*, 2018, 7: 1438727
- 34 Zhang K, Yue Y, Wu S, et al. Rapid capture and nondestructive release of extracellular vesicles using aptamer-based magnetic isolation. *ACS Sens*, 2019, 4: 1245–1251
- 35 Deng J, Liu C, Sun J. DNA-based nanomaterials for analysis of extracellular vesicles. *Adv Mater*, 2024, 36: 2303092
- 36 Wan Y, Cheng G, Liu X, et al. Rapid magnetic isolation of extracellular vesicles via lipid-based nanoprobe. *Nat Biomed Eng*, 2017, 1: 0058
- 37 Wan Y, Maurer M, Zheng S Y. Affinity-based enrichment of extracellular vesicles with lipid nanoprobe. *Methods Mol Biol*, 2022, 2349: 185–197
- 38 Liu C, Zhao J, Tian F, et al. Low-cost thermophoretic profiling of extracellular-vesicle surface proteins for the early detection and classification of cancers. *Nat Biomed Eng*, 2019, 3: 183–193
- 39 Zhong Y, Xu F, Wu J, et al. Application of next generation sequencing in laboratory medicine. *Ann Lab Med*, 2021, 41: 25–43
- 40 Kamps R, Brandão R, Bosch B, et al. Next-generation sequencing in oncology: genetic diagnosis, risk prediction and cancer classification. *Int J Mol Sci*, 2017, 18: 308
- 41 Liu M, Wen Z, Zhang T, et al. The role of exosomal molecular cargo in exosome biogenesis and disease diagnosis. *Front Immunol*, 2024, 15: 1417758
- 42 Guescini M, Guidolin D, Vallorani L, et al. C2C12 myoblasts release micro-vesicles containing mtDNA and proteins involved in signal transduction. *Exp Cell Res*, 2010, 316: 1977–1984

- 43 Balaj L, Lessard R, Dai L, et al. Tumour microvesicles contain retrotransposon elements and amplified oncogene sequences. *Nat Commun*, 2011, 2: 180
- 44 Jeppesen D K, Fenix A M, Franklin J L, et al. Reassessment of exosome composition. *Cell*, 2019, 177: 428–445.e18
- 45 Kahlert C, Melo S A, Protopopov A, et al. Identification of double-stranded genomic DNA spanning all chromosomes with mutated KRAS and p53 DNA in the serum exosomes of patients with pancreatic cancer. *J Biol Chem*, 2014, 289: 3869–3875
- 46 Yang S, Che S P Y, Kurywchak P, et al. Detection of mutant KRAS and TP53 DNA in circulating exosomes from healthy individuals and patients with pancreatic cancer. *Cancer Biol Ther*, 2017, 18: 158–165
- 47 Vagner T, Spinelli C, Minciocchi V R, et al. Large extracellular vesicles carry most of the tumour DNA circulating in prostate cancer patient plasma. *J Extracell Vesicle*, 2018, 7: 1505403
- 48 Zhou R, Chen K K, Zhang J, et al. The decade of exosomal long RNA species: An emerging cancer antagonist. *Mol Cancer*, 2018, 17: 75
- 49 Wang S, Lin Y, Zhang Y, et al. Complex RNA world in small extracellular vesicles for liquid biopsy in cancer management. *Extracell Vesicle*, 2022, 1: 100015
- 50 Ke X, Xiong X, Lin Y, et al. Chimeric RNA and exosomes-based liquid biopsy. *Methods Mol Biol*, 2020, 2079: 211–218
- 51 Chu Y L, Li H, Ng P L A, et al. The potential of circulating exosomal RNA biomarkers in cancer. *Expert Rev Mol Diagnostics*, 2020, 20: 665–678
- 52 Yuan T, Huang X, Woodcock M, et al. Plasma extracellular RNA profiles in healthy and cancer patients. *Sci Rep*, 2016, 6: 19413
- 53 Guo S, Chen J, Chen F, et al. Exosomes derived from *Fusobacterium nucleatum*-infected colorectal cancer cells facilitate tumour metastasis by selectively carrying miR-1246/92b-3p/27a-3p and CXCL16. *Gut*, 2021, 70: 1507–1519
- 54 Min L, Zhu S, Chen L, et al. Evaluation of circulating small extracellular vesicles derived miRNAs as biomarkers of early colon cancer: a comparison with plasma total miRNAs. *J Extracell Vesicle*, 2019, 8: 1643670
- 55 Guo X, Lv X, Ru Y, et al. Circulating exosomal gastric cancer-associated long noncoding RNA1 as a biomarker for early detection and monitoring progression of gastric cancer. *JAMA Surg*, 2020, 155: 572–579
- 56 Li Y, Deng J, Han Z, et al. Molecular identification of tumor-derived extracellular vesicles using thermophoresis-mediated DNA computation. *J Am Chem Soc*, 2021, 143: 1290–1295
- 57 Lee J H, Kim J A, Jeong S, et al. Simultaneous and multiplexed detection of exosome microRNAs using molecular beacons. *Biosens Bioelectron*, 2016, 86: 202–210
- 58 Sun Z, Wu Y, Gao F, et al. *In situ* detection of exosomal RNAs for cancer diagnosis. *Acta BioMater*, 2023, 155: 80–98
- 59 Zhao J, Liu C, Li Y, et al. Thermophoretic detection of exosomal microRNAs by nanoflakes. *J Am Chem Soc*, 2020, 142: 4996–5001
- 60 Tang J, Jia X, Li Q, et al. A DNA-based hydrogel for exosome separation and biomedical applications. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2023, 120: e2303822120
- 61 Li Y, Zhang Y, Qiu F, et al. Proteomic identification of exosomal LRG1: a potential urinary biomarker for detecting NSCLC. *ELECTROPHORESIS*, 2011, 32: 1976–1983
- 62 Huang D, Chen J, Hu D, et al. Advances in biological function and clinical application of small extracellular vesicle membrane proteins. *Front Oncol*, 2021, 11: 675940
- 63 Huang D, Rao D, Xi X, et al. Application of extracellular vesicles proteins in cancer diagnosis. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 10: 1007360
- 64 Deng F, Miller J. A review on protein markers of exosome from different bio-resources and the antibodies used for characterization. *J HistoTech*, 2019, 42: 226–239
- 65 Hánělová K, Raudenská M, Masářík M, et al. Protein cargo in extracellular vesicles as the key mediator in the progression of cancer. *Cell Commun Signal*, 2024, 22: 25
- 66 Liu C, Xu X, Li B, et al. Single-exosome-counting immunoassays for cancer diagnostics. *Nano Lett*, 2018, 18: 4226–4232
- 67 Wei P, Wu F, Kang B, et al. Plasma extracellular vesicles detected by single molecule array technology as a liquid biopsy for colorectal cancer. *J Extracell Vesicle*, 2020, 9: 1809765
- 68 Liu C, Zeng X, An Z, et al. Sensitive detection of exosomal proteins via a compact surface plasmon resonance biosensor for cancer diagnosis. *ACS Sens*, 2018, 3: 1471–1479
- 69 Li B, Liu C, Pan W, et al. Facile fluorescent aptasensor using aggregation-induced emission luminogens for exosomal proteins profiling towards liquid biopsy. *Biosens Bioelectron*, 2020, 168: 112520
- 70 Guo K, Li Z, Win A, et al. Calibration-free analysis of surface proteins on single extracellular vesicles enabled by DNA nanostructure. *Biosens Bioelectron*, 2021, 192: 113502
- 71 Cho S, Yang H C, Rhee W J. Simultaneous multiplexed detection of exosomal microRNAs and surface proteins for prostate cancer diagnosis. *Biosens Bioelectron*, 2019, 146: 111749
- 72 Vrablova V, Kosutova N, Blsakova A, et al. Glycosylation in extracellular vesicles: isolation, characterization, composition, analysis and clinical applications. *Biotechnol Adv*, 2023, 67: 108196

- 73 Wu L, Gao C. Comprehensive overview the role of glycosylation of extracellular vesicles in cancers. *ACS Omega*, 2023, 8: 47380–47392
- 74 Janković M, Janković T. Extracellular vesicles and glycans. *Biochem Med (Online)*, 2024, 34: 210–224
- 75 Feng H, Liang L, Deng W, et al. Sialyl Lewis X decorated integrin $\alpha 3$ on small extracellular vesicles promotes metastasis of bladder cancer via enhancing vascular permeability. *Angiogenesis*, 2024, 27: 883–901
- 76 Kim I A, Hur J Y, Kim H J, et al. Liquid biopsy using extracellular vesicle-derived DNA in lung adenocarcinoma. *J Pathol Transl Med*, 2020, 54: 453–461
- 77 Allenson K, Castillo J, San Lucas F A, et al. High prevalence of mutantKRAS in circulating exosome-derived DNA from early-stage pancreatic cancer patients. *Ann Oncol*, 2017, 28: 741–747
- 78 Tang Y, Zhang Z, Song X, et al. Tumor-derived exosomal miR-620 as a diagnostic biomarker in non-small-cell lung cancer. *J Oncol*, 2020, 2020: 1–9
- 79 Cho H J, Baek G O, Seo C W, et al. Exosomal microRNA-4661-5p-based serum panel as a potential diagnostic biomarker for early-stage hepatocellular carcinoma. *Cancer Med*, 2020, 9: 5459–5472
- 80 Min L, Chen L, Liu S, et al. Loss of circulating exosomal miR-92b is a novel biomarker of colorectal cancer at early stage. *Int J Med Sci*, 2019, 16: 1231–1237
- 81 Huang Z, Yang M, Li Y, et al. Exosomes derived from hypoxic colorectal cancer cells transfer Wnt4 to normoxic cells to elicit a prometastatic phenotype. *Int J Biol Sci*, 2018, 14: 2094–2102
- 82 Connal S, Cameron J M, Sala A, et al. Liquid biopsies: the future of cancer early detection. *J Transl Med*, 2023, 21: 118
- 83 Siravegna G, Marsoni S, Siena S, et al. Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nat Rev Clin Oncol*, 2017, 14: 531–548
- 84 De Rubis G, Rajeev Krishnan S, Bebawy M. Liquid biopsies in cancer diagnosis, monitoring, and prognosis. *Trends Pharmacol Sci*, 2019, 40: 172–186
- 85 Zhang W, Xia W, Lv Z, et al. Liquid biopsy for cancer: circulating tumor cells, circulating free DNA or exosomes? *Cell Physiol Biochem*, 2017, 41: 755–768
- 86 Heitzer E, Haque I S, Roberts C E S, et al. Current and future perspectives of liquid biopsies in genomics-driven oncology. *Nat Rev Genet*, 2019, 20: 71–88
- 87 Mizenko R R, Feaver M, Bozkurt B T, et al. A critical systematic review of extracellular vesicle clinical trials. *J Extracell Vesicle*, 2024, 13: e12510
- 88 Perez Hurtado E C, Henao Agudelo J S, Foganholi da Silva R A, et al. The role of extracellular vesicles in cancer. *Curr Top Membr*, 2024, 94: 247–285
- 89 Wei C, Zhang M, Cheng J, et al. Plant-derived exosome-like nanoparticles – from Laboratory to factory, a landscape of application, challenges and prospects. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2024, 1–19
- 90 Yan G, Xiao Q, Zhao J, et al. Brucea javanica derived exosome-like nanovesicles deliver miRNAs for cancer therapy. *J Control Release*, 2024, 367: 425–440
- 91 Huang C, Li L, Huang Y, et al. Advances in targeted modification of extracellular vesicles (in Chinese). *Chin Sci Bull*, 2023, 68: 4532–4543 [黄春满, 李丽薇, 黄勇彬, 等. 外泌体靶向修饰的研究进展. 科学通报, 2023, 68: 4532–4543]

Summary for “细胞外囊泡在肿瘤液体活检中的应用”

Application of extracellular vesicles in tumor liquid biopsy

Shuai Li^{1,2}, Yating Liu³ & Dayong Yang^{1,4*}

¹ Frontiers Science Center for Synthetic Biology, Key Laboratory of Systems Bioengineering (MOE), School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300350, China

² Zhejiang Institute of Tianjin University, Ningbo 315200, China

³ Suzhou EVs Biotechnology Co., Ltd, Suzhou 215000, China

⁴ Department of Chemistry, Fudan University, Shanghai 200433, China

* Corresponding author, E-mail: dayongyang@fudan.edu.cn

Extracellular vesicles (EVs) are released by living cells and play important roles in transporting information between cells. EVs contain physiological and pathological information of the parent cell and can dynamically transmit disease signals. According to different biological pathways, EVs are often classified into apoptotic bodies, microvesicles, exosomes, etc. Due to the size overlap between different vesicles and the inability to determine their origin based on size, accurate differentiation between exosomes and microvesicles is highly challenging. To avoid misunderstandings, the International Society for Extracellular Vesicles (ISEV) recommends using small and large vesicles to distinguish them from each other.

EVs have become a new star in the field of tumor liquid biopsy, due to the high variability of biomarkers available. However, the rapid and accurate separation of specific EVs from complex body fluids or cell culture supernatants is an urgent problem. Many researchers are committed to developing new and efficient methods and technologies for EV separation, including size-based ultracentrifugation, size exclusion chromatography, and ultrafiltration; polymer precipitation method based on hydrophobic interactions; immunoaffinity method based on antigen-antibody affinity; affinity methods based on DNA aptamers, microfluidic methods based on size and immune affinity; and so on. With the development of EV isolation and characterization methods, researchers have developed various EV nucleic acid and protein analysis techniques and conducted clinical trials. In recent years, several products have been commercialized, transforming scientific research into productivity.

DNA, RNA, and proteins are the most commonly used targets for analysis, such as nucleic acid testing during epidemics and influenza, which uses qRT-PCR technology to analyze virus DNA or RNA and tumor marker screening during physical examinations, which analyzes broad-spectrum cancer-related proteins such as alpha fetoprotein (AFP), carcinoembryonic antigen (CEA), and carbohydrate antigens (CA). EVs are rich in DNA, RNA, and proteins. By analyzing a single component or a combination of multiple components, real-time detection of tumor occurrence, metastasis, and prognosis can be achieved. Nanoscale EVs have played a role in enriching biomarkers, with higher sensitivity than plasma detection. Moreover, the membrane of EVs can effectively prevent RNA and other biomarkers from being degraded by various enzymes present in plasma, further enhancing the sensitivity of EV biomarker detection. Encouraged by the latest research progress, we review the application of EVs in tumor liquid biopsy, introducing the application and progress of EV DNA, RNA, protein, and other biomarkers.

Although EVs have great potential, the road ahead is full of difficulties. To achieve large-scale application of EVs in clinical practice, the following problems must be solved. The first is the separation problem. Currently, there are several methods for separating EVs, but none can efficiently separate EVs or even EV subgroups produced by specific cells without introducing impurities. The second is large-scale production. Currently, the main way to obtain EVs is through the separation of cell culture and culture medium. For adherent cells, the surface area of the culture environment limits the number of EVs produced. The third is standardization. ISEV and the Chinese Society for Extracellular Vesicles (CSEV) have developed guidelines and group standards for the naming, acquisition, isolation, characterization, and reporting of EVs. However, there is still no consensus on how to ensure inter-batch stability, absolute quantification, yield, and quality control of EVs, which makes clinical translation difficult. We look forward to these issues being resolved as soon as possible, taking EV research and application to a new level, and thereby benefiting humanity.

tumor liquid biopsy, extracellular vesicles, tumor markers, exosome

doi: [10.1360/TB-2024-1236](https://doi.org/10.1360/TB-2024-1236)