

外泌体在癌症诊治中的应用及其分离技术进展

任芳玲^{1,2}, 李 鹏¹, 王册明¹, 陈琴华^{1,3,4}

(1. 湖北医药学院附属东风医院, 湖北 十堰 442000; 2. 湖北医药学院药学院, 湖北 十堰 442000; 3. 武当特色中药研究湖北省重点实验室, 湖北 十堰 442000; 4. 深圳市宝安纯中医治疗医院, 广东 深圳 518102)

摘要:随着精准医学的发展,通过分子诊断来指导患者的个体化诊治已逐渐成为临床专家的共识。液体活检作为一种简单快捷、非侵入性、可重复性强的病理检测手段,在癌症的早期诊断、监测、预后及指导用药方面具有重要意义。外泌体作为液体活检中最具潜力的检测对象之一,被发现参与多种癌症的发生、发展、预后等过程,同时,外泌体也被认为是癌症治疗和药物运输的强有力工具。全文针对近年来外泌体在癌症诊治中的应用及其分离技术进展进行综述。

关键词:液体活检;外泌体;细胞外囊泡;药物输送

中图分类号:R73 **文献标识码:**A **文章编号:**1671-170X(2020)06-0475-06

doi:10.11735/j.issn.1671-170X.2020.06.B002

Application of Exosomes in Diagnosis and Treatment of Cancer and Progress in Exosome Isolation Techniques

REN Fang-ling^{1,2}, LI Peng¹, WANG Ce-ming¹, CHEN Qin-hua^{1,3,4}

(1. Affiliated Dongfeng Hospital, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, China;
2. College of pharmacy, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, China;
3. Hubei Key Laboratory of Wudang Local Chinese Medicine Research, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, China;
4. Shenzhen Baoan Authentic TCM Therapy Hospital, Shenzhen 518102, China)

Abstract: With the development of precision medicine, molecular diagnosis has been widely used to guide individual diagnosis and treatment of patients. Liquid biopsy as a simple, rapid, non-invasive and reproducible method, has great potential in the early diagnosis and prognosis of cancer. Exosomes present in various biofluid, are related to the occurrence, development and prognosis of various cancers, which become a promising candidate indicators for liquid biopsy. Also, exosomes are shown to be a powerful tool for drug delivery in cancer treatment. This review focuses on the roles of exosomes in the diagnosis and treatment of cancer and the recent progress of exosome isolation techniques.

Subject words: liquid biopsy; exosomes; extracellular vesicles; drug delivery

癌症是严重威胁人类健康的主要疾病,据美国癌症学会公布的“癌症统计数据 2018”显示,2018 年全球约有 1810 万例患者确诊为癌症,约有 960 万例患者因癌症死亡^[1],癌症已成为全世界的重大公共卫生问题。癌症早期诊断是癌症防治中的关键环节之一,根据国务院颁发的《中国防治慢性病中长期规划(2017—2025 年)》,到 2025 年我国癌症的早期诊

断率要达到 60%。近年来,液体活检因其简便快速、非侵入式、可重复性高等优点被广泛用于癌症的早期诊断^[2]。外泌体作为液体活检中具有独特生物学意义的一类检测对象,逐渐成为疾病诊断和治疗的新星。外泌体是内质膜在多囊泡胞内体成熟过程中向内萌芽形成的腔内囊泡^[3],直径约 40~200nm^[4]。外泌体包含丰富的信使 RNA(messenger RNA, mRNA)、微小 RNA(microRNA, miRNA)和蛋白质等^[5-6]。其确切的生物学功能目前尚不明确,早期假设认为外泌体是作为细胞垃圾袋来排出机体多余和/或不起作用的细胞成分的^[7],但 Lötvald 等^[8]在 2007 年表明,

基金项目:国家自然科学基金(81872509);湖北省卫生健康委员会面上项目(WJ2019M054);湖北医药学院研究生科技创新项目(YC2019027)

通信作者:陈琴华,副教授,博士;湖北医药学院附属东风医院门诊 10 楼,湖北省十堰市车城路(442000);E-mail: cqh77@163.com

收稿日期:2019-11-18; **修回日期:**2020-03-13

一些细胞利用外泌体来传递遗传物质,使蛋白质和 miRNA 相互调节基因的表达。这是外泌体研究领域的重大突破,使人们意识到外泌体可能与人体的生理病理状态有密切关系,甚至可能成为疾病治疗的新靶点。

1 外泌体与癌症诊断

肿瘤细胞来源的外泌体已被证实具有生物学意义:在肿瘤微环境中起着细胞间通讯的中介作用^[9]。外泌体与肿瘤发生发展过程密切相关,包括肿瘤细胞增殖^[10]、癌症转移^[11]及免疫调节^[12]等。与其他检测物不同,外泌体在许多方面具有独特优势。首先,外泌体携带的特异性表面蛋白可反映其来源细胞^[13]或靶细胞^[14],有利于对外泌体进行特异性分离;其次,外泌体在多种体液(如血液、尿液、唾液等)中稳定存在,易于取样分析;最后,外泌体具有母细胞相关疾病/肿瘤的特异性 RNA^[15]和蛋白质^[16],其包膜结构可保护其内部循环 RNA 免受 RNA 酶降解。因此,以外泌体为载体的生物标记物成为癌症在内的多种疾病的强有力的诊断工具^[17-18]。

Nigita 等^[19]利用非小细胞肺癌(NSCLC)样本 miRNA 测序数据来研究 RNA 编辑,并结合 26 组血浆外泌体样本进行分析,发现 miR-411-5p 的第五位编辑在 NSCLC 患者的癌组织以及血浆外泌体中显著失调,表明外泌体中的 miRNA 改变可能与肺癌生物学相关;Bai 等^[20]发现 miR-135b 通过外泌体递送至肿瘤细胞促进胃癌中血管的生成,其通过调控 FOXO1 来发挥作用,miR-135b 抑制 FOXO1 蛋白的表达并增强血管的生长。Tang 等^[21]发现卵巢癌患者腹水中存在大量含有可溶性钙粘附蛋白 E(sE-cad)的外泌体,它是血管生成的有力激活剂。sE-cad 阳性外泌体与血管内皮钙粘素(VE-cadherin)结合在内皮细胞表面,激活信号级联反应,最终生成 β -连环蛋白(β -catenin)和核转录因子(NF- κ B),从而刺激内皮细胞迁移,增强血管通透性,促进肿瘤细胞向转移前生态位归巢。

Dong 等^[22]开发了一种具有工程“慢光效应”的镀金 TiO₂ 大孔反蛋白石(MIO)结构,无需标记即可捕获分析癌症患者血浆中的外泌体。通过将这种技术与目前临床应用的肿瘤液体活检技术(western

blot)比较,证实该方法具有无创、省时、敏感性更高等优势,比 western blot 实现了更准确的定量检测,对癌症的初步筛查显示了更高的符合性。Min 等^[23]通过对外泌体 miRNA 进行分析,发现 let-7b-3p、miR-139-3p、miR-145-3p 和 miR-150-3p 可以很好地鉴别早期结直肠癌患者和对照组,与全血 miRNA 相比,外泌体来源 miRNA 在鉴别早期结直肠癌患者方面具有更显著的优势,优于无细胞血浆游离 miRNA。因此,可以看出外泌体(来源 miRNA)作为一种新兴的液体活检检测物,相比传统检测物具有独特优势,但随着外泌体相关研究的飞速发展,对这类纳米级别非细胞结构的操作还存在一定的技术困难,如何保证实验的严谨性、可重复性依旧是整个领域的重大问题。

2 外泌体与癌症治疗

除了作为生物标志物诊断癌症之外,外泌体也可以作为疾病治疗和药物运输的工具^[24-25]。基于 RNA 的治疗药物通过递送小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA)沉默病理基因或通过外源 mRNA 递送至细胞来表达治疗性蛋白质,在治疗各种疾病方面具有巨大潜力。在 mRNA/siRNA 输送方面,传统载体如脂质体和纳米颗粒具有无传染性,材料来源广泛,易于大量制备等优点,有着病毒载体不可替代的优势^[26],但是它们输送效率较低、难以通过生物屏障到达病灶部位^[27],并且易引发免疫反应被机体快速清除掉^[28]。与传统载体不同的是,一方面,外泌体包含可增强内吞作用的跨膜蛋白和膜锚定蛋白,从而促进其内部携带物质的传递^[29-30];另一方面,外泌体也含有一些抑制吞噬作用的跨膜蛋白而不被循环系统快速清除,如外泌体蛋白 CD47^[31],它是一种广泛表达于细胞表面的整合素相关蛋白,可向巨噬细胞发出一种“不要吃我”的信号,保护细胞免受吞噬。

Yong 等^[32]开发了一种生物相容性肿瘤细胞-外泌体护套 PSiNPs,作为靶向癌症化学疗法的药物载体。当肿瘤细胞与载有阿霉素的 PSiNPs (DOX@PSiNPs)一起孵育时,肿瘤细胞便会分泌载有 DOX@PSiNPs 的外泌体(DOX @ E-PSiNPs),DOX @ E-PSiNPs 对大量的癌细胞和癌症干细胞具有杀伤作用,从而起到抗肿瘤作用。外泌体也具有很多传

统药物载体不具备的通过血脑屏障的能力^[33]。Yang等^[34]的一项研究表明,脑内皮细胞产生的外泌体可作为治疗脑肿瘤药物的载体。在斑马鱼原发性脑瘤模型中,装载抗癌药物的外泌体可通过血脑屏障发挥抗肿瘤作用,显著缩小肿瘤病灶大小并降低异种移植癌细胞的荧光强度和肿瘤生长标志物含量。Kamerkar等^[31]利用基因修饰的外泌体来特异性地传递 siRNA,阻止 KRAS 基因突变,从而使患有胰腺癌的小鼠病情得到缓解,提高小鼠的存活率,证实外泌体能够作为一种高效的 RNA 干扰(RNAi)载体发挥作用,运送特异性地靶向 KRAS 的 siRNA 和短发夹 RNA 分子,比脂质体更加高效,且没有明显的免疫反应。

3 外泌体分离技术进展

3.1 外泌体传统分离技术

为了促进外泌体在癌症诊断和治疗方面的应用,必须将外泌体从大量细胞碎片和其他干扰成分中特异性地分离出来。现有的传统商业技术主要利用外泌体的特殊性质(如密度、溶解性、表面蛋白、大小等)将它们分离。

超速离心法:超速离心法(ultracentrifugation, UC)是将外泌体从大小、质量不同的细胞外囊泡中分离出来的最常见技术之一^[35]。该方法通过一系列的离心步骤,使速度最终达到 200 000g,沉淀 120min,最终将外泌体从样品中分离出来。这项技术不需要特殊试剂,但所需设备相对昂贵(>10 万美元),耗时长(>4h),外泌体回收率低(通常<25%),且分离产物常与微泡碎片及可溶性蛋白共混,外泌体纯度较低^[36-37]。

密度梯度分离法:密度梯度分离法(density-gradient separation)是利用不同颗粒间的沉降系数不同,在一定离心力作用下,颗粒以一定速度沉降,在不同梯度上形成区带,从而将外泌体与大分子蛋白分离开来纯化外泌体的方法。密度梯度分离法可提高外泌体的纯度和回收率,但与常规超速离心法相比,该方法需要更长的时间(约 21h),且对实验人员有着更高的技术要求^[4,17]。

沉淀法:随着众多商用快速沉淀试剂盒(如 Exo-Quick TC)的问世,提供了更经济可行的(200~1000

美元)外泌体分离方法。这些试剂盒中的聚合物能够轻柔地沉淀外泌体,然后利用常规仪器如典型的台式微滤器,在较低的离心力下将外泌体分离。这种方法避免了设备成本和耗时长的问题^[38]。但是,这种方法常引起非外泌体来源的物质(如脂蛋白等)的共沉淀,这些污染物会严重影响目标外泌体中的生物标志物的下游检测和分析^[4]。

免疫亲和捕获法:免疫亲和捕获法(immunoaffinity capture)是利用外泌体表面特定蛋白(抗原)与标记抗体之间的特异性结合作用来进行分离的技术。该技术操作简便,特异性、敏感性高,耗时短,但其仅限于具有已知抗原的外泌体(如 CD63、CD9、膜联蛋白或 EpCAM 等)^[39],外泌体的异质性也会限制这种方法的有效性^[40]。此外,非特异性吸附还会导致分离产物中存在杂质和干扰蛋白,降低纯度^[38],pH 条件、试剂成本等也阻碍了该分离技术的大规模应用^[41]。

尺寸排阻色谱法:尺寸排阻色谱法(size exclusion chromatography, SEC)是基于外泌体尺寸大小的另一种常用分离技术^[42],如 qEV 试剂盒(<https://izon.com/exosome-isolation/>)^[17]。该技术根据分子和颗粒物的尺寸,利用多孔固定相对齐进行分类。样品中具有小流体动力半径的组分能够通过孔隙,后期被洗脱掉。而流体动力半径较大的组分(包括外泌体)无法进入孔隙从而被分离出来^[43]。由于该方法利用重力流来完成,所以细胞外囊泡结构基本上不被破坏,外泌体的生物活性也得以保留^[44],但是血液中蛋白质(主要是白蛋白)的污染仍然是 SEC 的主要问题^[37]。

由于体液和细胞培养基中存在大量非外泌体成分(如蛋白质、细胞碎片等),因此,外泌体的高纯度分离是进行蛋白质组学、基因组学和脂质组学分析的基础,也是生物标志物发现的先决条件。但由于其纳米级的尺寸、与其他颗粒粒径和密度上的重叠以及异质性,从生物体液中高效地分离外泌体仍然是一项重大挑战。

3.2 基于微流芯片的外泌体分离新技术

3.2.1 压力驱动外泌体分离芯片

Liu 等^[45]设计了外泌体分离芯片(exosome total isolation chip, ExoTIC),该方法基于外泌体尺寸大小,通过人工制备孔径约为 30nm 的纳米孔薄膜,使用简单的压力驱动过滤方法,将临床样品中的 30~

Table 1 Comparison of traditional exosome isolation techniques

Technique	Principle	Advantages	Disadvantages
Ultracentrifugation	When a heterogeneous mixture (suspension) is subjected to a centrifugal force-centrifugation, particulate constituents in the suspension will be sedimented according to their density, size, and shape ^[35]	Need no special reagents ^[36]	High equipment cost (>\$ 100K), long time consuming (>4h), low portability, low recovery (typically <25%), and damage integrity resulting in loss of protein and RNA ^[36-37]
Density-gradient separation	It is performed by loading the sample over a concentrated solution of the medium and applying ultracentrifugation to extract the exosomes from other particles based on their different flotation densities ^[4]	High recovery (typically <50%), high purity, low sample volume ^[4, 17]	Long time consuming (>20h), needs greater technical ability of the user ^[4, 17]
Precipitation	Salts or organic solvents can destroy the hydration layer on the surface of protein molecules and precipitate ^[4]	Easy to use, does not require specialized equipment, high portability ^[38]	Low purity, presence of a non-exosomal protein ^[4, 38]
Immunoaffinity capture	The exosome was separated from the sample by the highly specific binding between the specific surface protein (antigen) on the exosome membrane and the labeled antibody added outside ^[40]	Easy to use, high specificity, high sensitivity, high purity, and less time-consuming ^[37]	High reagent cost, limited to exosome with known antigens, heterogeneity of exosome hinders immune recognition ^[39-41]
Size exclusion chromatography, SEC	According to the size of particles, porous fixation is used to classify them. The components with small hydrodynamic radius can pass through the pores, while the components with large hydrodynamic radius can not enter the pores and be separated ^[43]	High purity, gravity flow protects the integrity and biological activity of exosome, high reproducibility ^[44]	Process is not scalable, low throughput, force result in the deformation and breaking up of exosome, biases the results of downstream analysis, contamination by blood protein ^[37]

220nm 尺寸范围内的外泌体富集纯化,并将游离的核酸、蛋白质、脂质等洗脱掉。该装置可在 3h 内将外泌体从 10 μ l~120ml 的样本中分离出来,具有操作简便、自动化、通量高等优势。研究人员通过从健康患者血浆中分离得到的外泌体进行分析发现,ExoTIC 法得到的外泌体产量约为 UC 法的 1000 倍,PEG 沉淀法的 3~4 倍。

3.2.2 三维纳米图形微流芯片

Zhang 等^[46]设计三维人字形纳米图形的微流芯片,用于检测血浆中低水平的肿瘤相关外泌体。这种纳米图案增加了表面积和探针密度,从而提高了外泌体结合的速率。使用该装置检测卵巢癌患者及其对照组的血浆外泌体,发现 CD24、上皮细胞粘附分子和叶酸受体 α 蛋白等的表达有差异,提示外泌体叶酸受体 α 蛋白可为卵巢癌早期检测的潜在生物标志物。

3.2.3 磁性微流芯片

Xu 等^[47]开发了一种两步微流平台(ExoPCD-chip),该平台将基于特异性磷脂酰丝氨酸-Tim4 蛋白识别的磁富集技术与芯片内新的信号转导策略相结合,实现了对低至 4.39 $\times 10^3$ 粒/ml 的 CD63 阳性外泌体的高灵敏度检测,从而将外泌体的分离和原位电化

学分析两个步骤集成在一个微流芯片上,能在 4h 内从 30 μ l 血液样本中分离出肿瘤来源的外泌体,并进行下游分析。

微流芯片具有精确流体控制、少量样品需求、快速反应等优势,在核酸分析、细胞分选以及药物筛选等方面应用广泛,已成为临床诊断及疾病筛查的有力工具。将微流芯片应用于外泌体提取是近年来的新技术趋势,其有望实现外泌体分离富集检测的集成技术,具有简单快速、低成本、无需标记等优势,但如何优化微流芯片达到外泌体富集和质量评估标准化,仍是目前有待解决的问题。

4 小 结

尽管外泌体作为国内外研究热门,被发现参与多种肿瘤的发生发展,还可作为疾病治疗和药物运输的工具,但其传统分离技术仍面临着回收率低、分离时间长、纯度低等许多问题。此外,近年来以外泌体为代表的细胞外囊泡展现出了多种功能性,但是加强对于这些囊泡结构自身的理解依然十分重要。现有的研究大多集中于多种外泌体亚型的混合,下一步重要的是综合比较不同亚型的外泌体,并且阐

明其生物功能性具体关联的外泌体亚群。所以,这一领域将持续寻找高效的外泌体分离技术,并且能够分选出不同亚型的外泌体的创新技术。

参考文献:

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018; GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6):394–424.
- [2] Rolfo C, Mack PC, Scagliotti GV, et al. Liquid biopsy for advanced non-small cell lung cancer (NSCLC): A statement paper from the IASLC [J]. *J Thorac Oncol*, 2018, 13(9):1248–1268.
- [3] van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018, 19(4):213–228.
- [4] Shao H, Im H, Castro CM, et al. New technologies for analysis of extracellular vesicles[J]. *Chem Rev*, 2018, 118(4):1917–1950.
- [5] Xu R, Rai A, Chen M, et al. Extracellular vesicles in cancer-implications for future improvements in cancer care[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2018, 15(10):617–638.
- [6] Pegtel D, Gould S. Exosomes [J]. *Annu Rev Biochem*, 2019, 88(1):487–514.
- [7] Kalluri R. The biology and function of exosomes in cancer [J]. *J Clin Invest*, 2016, 126(4):1208–1215.
- [8] Valadi H, Ekström K, Bossios A, et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells [J]. *Nat Cell Biol*, 2007, 9(6):654–659.
- [9] Tian X, Shen H, Li Z, et al. Tumor-derived exosomes, myeloid-derived suppressor cells, and tumor microenvironment[J]. *J Hematol Oncol*, 2019, 12(1):84.
- [10] Takasugi M, Okada R, Takahashi A, et al. Small extracellular vesicles secreted from senescent cells promote cancer cell proliferation through EphA2 [J]. *Nat Commun*, 2017, 8:15729.
- [11] Steinbichler TB, Dudás J, Riechelmann H, et al. The role of exosomes in cancer metastasis [J]. *Semin Cancer Biol*, 2017, 44:170–181.
- [12] Chen G, Huang AC, Zhang W, et al. Exosomal PD-L1 contributes to immunosuppression and is associated with anti-PD-1 response[J]. *Nature*, 2018, 560(7718):382–386.
- [13] Zhang X, Sai B, Wang F, et al. Hypoxic BMSC-derived exosomal miRNAs promote metastasis of lung cancer cells via STAT3-induced EMT[J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1):40.
- [14] Chavez-Muñoz C, Morse J, Kilani R, et al. Primary human keratinocytes externalize stratifin protein via exosomes[J]. *J Cell Biochem*, 2008, 104(6):2165–2173.
- [15] Zhang H, Zhu L, Bai M, et al. Exosomal circRNA derived from gastric tumor promotes white adipose browning by targeting the miR-133/PRDM16 pathway[J]. *Int J Cancer*, 2019, 144(10):2501–2515.
- [16] Melo SA, Luecke LB, Kahlert C, et al. Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer [J]. *Nature*, 2015, 523(7559):177–182.
- [17] Li P, Kaslan M, Lee SH, et al. Progress in exosome isolation techniques[J]. *Theranostics*, 2017, 7(3):789–804.
- [18] Wan M, Ning B, Spiegel S, et al. Tumor-derived exosomes (TDEs): How to avoid the sting in the tail [J]. *Med Res Rev*, 2020, 40(1):385–412.
- [19] Nigita G, Distefano R, Veneziano D, et al. Tissue and exosomal miRNA editing in non-small cell lung cancer[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1):10222.
- [20] Bai M, Li J, Yang H, et al. MiR-135b delivered by gastric tumor exosomes inhibits FOXO1 expression in endothelial cells and promotes angiogenesis [J]. *Mol Ther*, 2019, 27(10):1772–1783.
- [21] Tang MKS, Yue PYK, Ip PP, et al. Soluble E-cadherin promotes tumor angiogenesis and localizes to exosome surface[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1):2270.
- [22] Dong S, Wang Y, Liu Z, et al. Beehive-inspired macroporous SERS probe for cancer detection through capturing and analyzing exosomes in plasma[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2020, 12(4):5136–5146.
- [23] 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]. *J Extracell Vesicles*, 2019, 8(1):1643670.
- [24] Agrahari V, Agrahari V, Burnouf PA, et al. Extracellular microvesicles as new industrial therapeutic frontiers [J]. *Trends Biotechnol*, 2019, 37(7):707–729.
- [25] Qu M, Lin Q, Huang L, et al. Dopamine-loaded blood exosomes targeted to brain for better treatment of Parkinson's disease[J]. *J Control Release*, 2018, 287:156–166.
- [26] Baeza A, Vallet-Regí M. Smart mesoporous silica nanocarriers for antitumoral therapy [J]. *Curr Top Med Chem*, 2015, 15(22):2306–2315.
- [27] Liu J, Menghuan L, Luo Z, et al. Design of nanocarriers based on complex biological barriers in vivo for tumor therapy[J]. *Nano Today*, 2017, 15:56–90.

- [28] Salvati A, Pitek AS, Monopoli MP, et al. Transferrin-functionalized nanoparticles lose their targeting capabilities when a biomolecule corona adsorbs on the surface[J]. *Nat nanotechnol*, 2013, 8(2):137–143.
- [29] Zhao C, Busch DJ, Vershel CP, et al. Multifunctional transmembrane protein ligands for cell-specific targeting of plasma membrane-derived vesicles [J]. *Small*, 2016, 12(28):3837–3848.
- [30] Gudbergsson JM, Jønsson K, Simonsen JB, et al. Systematic review of targeted extracellular vesicles for drug delivery-Considerations on methodological and biological heterogeneity[J]. *J Control Release*, 2019, 306:108–120.
- [31] Kamerkar S, LeBleu VS, Sugimoto H, et al. Exosomes facilitate therapeutic targeting of oncogenic KRAS in pancreatic cancer[J]. *Nature*, 2017, 546(7659):498–503.
- [32] Yong T, Zhang X, Bie N, et al. Tumor exosome-based nanoparticles are efficient drug carriers for chemotherapy [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1):3838.
- [33] Morad G, Carman CV, Hagedorn EJ, et al. Tumor-derived extracellular vesicles breach the intact blood-brain barrier via transcytosis[J]. *ACS Nano*, 2019, 13(12):13853–13865.
- [34] Yang T, Martin P, Fogarty B, et al. Exosome delivered anticancer drugs across the blood-brain barrier for brain cancer therapy in *Danio rerio*[J]. *Pharm Res*, 2015, 32(6):2003–2014.
- [35] Farooqi AA, Desai NN, Qureshi MZ, et al. Exosome biogenesis, bioactivities and functions as new delivery systems of natural compounds [J]. *Biotechnol Adv*, 2018, 36(1):328–334.
- [36] Lane RE, Korbie D, Anderson W, et al. Analysis of exosome purification methods using a model liposome system and tunable-resistive pulse sensing[J]. *Sci Rep*, 2015, 5:7639.
- [37] Yang XX, Sun C, Wang L, et al. New insight into isolation, identification techniques and medical applications of exosomes[J]. *J Control Release*, 2019, 308:119–129.
- [38] van der Pol E, Böing AN, Gool EL, et al. Recent developments in the nomenclature, presence, isolation, detection and clinical impact of extracellular vesicles [J]. *J Thromb Haemost*, 2016, 14(1):48–56.
- [39] Zhang H, Freitas D, Kim HS, et al. Identification of distinct nanoparticles and subsets of extracellular vesicles by asymmetric flow field-flow fractionation [J]. *Nat Cell Biol*, 2018, 20(3):332–343.
- [40] Willms E, Johansson HJ, Mäger I, et al. Cells release subpopulations of exosomes with distinct molecular and biological properties[J]. *Sci Rep*, 2016, 6:22519.
- [41] Boriachek K, Islam MN, Möller A, et al. Biological functions and current advances in isolation and detection strategies for exosome nanovesicles[J]. *Small*, 2018, 14(6):1702153.
- [42] Quintana JF, Makepeace BL, Babayan SA, et al. Extracellular onchocerca-derived small RNAs in host nodules and blood[J]. *Parasit Vectors*, 2015, 8:58.
- [43] Feng Y, Huang W, Wani M, et al. Ischemic preconditioning potentiates the protective effect of stem cells through secretion of exosomes by targeting Mecp2 via miR-22 [J]. *PLoS One*, 2014, 9(2):e88685.
- [44] Lane RE, Korbie D, Trau M, et al. Optimizing size exclusion chromatography for extracellular vesicle enrichment and proteomic analysis from clinically relevant samples[J]. *Proteomics*, 2019, 19(8):e1800156.
- [45] Liu F, Vermesh O, Mani V, et al. The exosome total isolation chip[J]. *ACS Nano*, 2017, 11(11):10712–10723.
- [46] Zhang P, Zhou X, He M, et al. Ultrasensitive detection of circulating exosomes with a 3D-nanopatterned microfluidic chip[J]. *Nat Biomed Eng*, 2019, 3(6):438–451.
- [47] Xu H, Liao C, Zuo P, et al. Magnetic-based microfluidic device for on-chip isolation and detection of tumor-derived exosomes[J]. *Anal Chem*, 2018, 90(22):13451–13458.