

外泌体蛋白相关肿瘤标志物研究进展

苏 航¹, 张 岱², 任伟宏²

(1. 河南中医药大学, 河南 郑州 450046;

2. 河南中医药大学第一附属医院, 河南 郑州 450000)

摘要:肿瘤早期诊断是其预防和治疗的关键,有效的肿瘤标志物是肿瘤早期诊断的重要手段之一。肿瘤细胞能够分泌外泌体(exosomes),其在电镜下呈杯状,直径 30~150 nm,被脂质双分子层包围,广泛存在于各种体液中。外泌体内容物包括蛋白质、短肽链、脂质、核苷酸等,其中外泌体蛋白可作为潜在的肿瘤诊断标志物。与活体组织样本检测相比,外泌体蛋白检测具有取样快速简便、检测成本低等优势,在肿瘤诊断中具有广阔的发展前景。全文就肿瘤外泌体差异蛋白变化及其在肿瘤诊断方面的研究进行综述。

关键词:外泌体蛋白;肿瘤标志物;早期诊断

中图分类号:R73 **文献标识码:**A **文章编号:**1671-170X(2021)06-0487-07

doi:10.11735/j.issn.1671-170X.2021.06.B013

Research Progress of Exosome Protein-related Tumor Markers

SU Hang¹, ZHANG Dai², REN Wei-hong²

(1. Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China;

2. The First Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China)

Abstract: Early diagnosis is the key issue for cancer prevention and treatment, and effective tumor markers are one of the important means leading to early diagnosis. Tumor cells can secrete exosomes, which are cup-shaped under electron microscope, with a diameter of 30~150 nm, surrounded by lipid bilayer, and widely exist in various body fluids. Exosomes include proteins, short peptide chains, lipids, nucleotides and other biological molecules. Exosomes can be used as potential tumor diagnostic markers. Compared with the detection of living tissue samples, detection of exosome proteins has the advantages of rapid sampling, low cost and so on, which has a promising prospect in tumor diagnosis. In this article the changes of tumor exosome differential proteins and their application in tumor diagnosis are reviewed.

Subject word: exosomal protein; tumor marker; early diagnosis

肿瘤早期诊断及治疗可显著提高患者生存率,多数肿瘤缺乏合适的诊断标志物,导致患者错过最佳治疗时间。因此,肿瘤诊断标志物的探索和应用具有重要意义^[1]。外泌体是一类具有膜结构的囊泡小体,直径 30~150nm,内含蛋白质、脂质、核酸等成分^[2],广泛分布于体液中^[3]。现已证明,部分外泌体蛋白在肿瘤患者体内异常表达,具有成为肿瘤诊断标志物的潜力。与常规肿瘤确诊方法相比,外泌体蛋白检测具有取样简便,检测成本低等优势,在肿瘤诊断生物标志物方面具有广阔的开发及应用前景。随着研究不

断深入,高特异性、敏感度的外泌体蛋白肿瘤标志物或将得到临床的广泛应用。本文就肿瘤外泌体差异蛋白变化及其在肿瘤诊断方面的研究进行综述。

1 外泌体简介

外泌体合成过程主要包括四部分:(1)内吞囊泡形成;(2)早期内体形成;(3)早期内体成熟形成多囊泡体(MVBs);(4)MVBs 与细胞膜融合,释放外泌体。外泌体由 Johnstone 于绵羊红细胞中发现并命名,早期被认为用于清除细胞多余成分^[4]。现阶段研究表明,外泌体的多种生物学功能具有广阔的临床应用前景。首先,外泌体中蛋白、核酸等成分可用于多种疾病(如恶性肿瘤、阿尔兹海默症等)的诊断;肿瘤来

基金项目:河南省高等学校重点科研项目计划(19zx009)

通信作者:任伟宏,主任,教授,主任技师,博士;河南中医药大学第一附属医院检验科,河南省郑州市金水区人民路 19 号(450000); E-mail:ren_weihong@163.com

收稿日期:2020-08-29;**修回日期:**2020-09-30

源外泌体可作用于 T 细胞等免疫细胞进而影响免疫调节^[5];其次,外泌体具有作为药物运输载体的潜能,其磷脂双分子层结构能够提供优良的保护性和稳定性,其传递靶向性可准确作用于靶细胞^[6];此外,外泌体还参与组织再生,可用于受损组织修复^[7];外泌体还参与包括血管生成,抗原呈递,炎症和细胞间信息交流等多种过程,同时能够参与多种疾病病程^[8]。现阶段外泌体的提取方法主要有超速离心,密度梯度离心,磁珠免疫,试剂盒提取,聚乙二醇沉淀等方法。不同的提取方法各具优劣,市面上各类产品的提取效果良莠不齐。目前仍没有绝对的方法或试剂盒能够从各类样品中分离出理想的外泌体。外泌体的检测方法主要包括电子显微镜、动态光散射技术及纳米微粒追踪分析技术等。每种检测方法同样各具优、缺点。针对外泌体中不同成分,可选用相应的方法进行分析。外泌体蛋白分析可采用蛋白质免疫印迹(Western blot, WB)、十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)等方法;外泌体基因水平分析可采用聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction, PCR)、基因测序等方法。

2 具有诊断潜能的肿瘤外泌体蛋白

2.1 肺 癌

肺癌(lung cancer, LC)是全球恶性肿瘤致死的重要病因之一,组织活检可作为确诊依据,然而患者无法避免检查过程产生的生理痛感。近年来,液体活检作为 LC 常用诊断方法不断更新发展,广泛参与临床检查。现阶段,LC 常用标志物有 SCC、CA125、CyFRA21-1、CEA、NSE 等,其联合检查可用于检测大多数 LC 病理分型。此外,LC 标志物检测方法主要包括:放射免疫分析、酶联免疫吸附法、化学发光免疫法等^[9]。随着外泌体研究的不断发展,其中部分蛋白也被证明具有 LC 诊断标志物的潜力。相比于病理组织检查,外泌体蛋白检测痛苦小,诊断稳定性高,有望用于 LC 诊断。

近年来外泌体相关研究显示,LC 患者外泌体中的部分蛋白,如 CD91、 α -2-HS-糖蛋白(alpha2-HS-glycoprotein, AHSG)、MUC1 等水平相较健康个体有显著差异。CD91 是一种可于抗原呈递细胞上表达

的受体^[10]。Ueda 等^[11]发现非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)患者血清外泌体 CD91、CD317 水平显著高于健康个体,其中 CD91 检出能力高于癌胚抗原(carcino-embryonic antigen, CEA)。GPC1 是肝素结合生长因子的共受体,附着于细胞膜表面。有研究表明,NSCLC 患者血清外泌体膜蛋白 GPC1 水平高于健康对照^[12]。Niu 等^[13]对国内 125 例 NSCLC 患者及 46 名健康个体进行血清外泌体提取、蛋白组学分析,发现 NSCLC 患者 AHSG、细胞外基质蛋白 1(extracellular matrix1, ECM1)水平显著升高,AHSG 对 NSCLC 患者及早期 NSCLC 患者的诊断表现优于 ECM1。此外,相较于单一指标,AHSG、ECM1 和 CEA 联合检测能够提高诊断效能。Sandfeld-Paulsen 等^[14]研究表明,NSCLC 患者血浆 CD151、CD171 和四跨膜蛋白 8(tetraspanin 8, TSPAN8)水平显著高于健康对照,是 LC 患者与健康个体鉴别诊断的最优标志物(CD151: AUC=0.68, $P=0.0002$; CD171: AUC=0.60, $P=0.0002$; TSPAN8: AUC=0.60, $P=0.0002$)

部分蛋白在患者血浆中无明显差异表达,但外泌体水平差异显著。MUC1 是一种高糖基化蛋白,其在外泌体中的表达量比总细胞膜蛋白高 8.98 倍。NSCLC 患者血浆外泌体 MUC1 水平比健康个体高 1.5 倍。然而,NSCLC 患者和健康个体血浆 MUC1 水平没有显著差异^[15]。表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)也有类似的研究表现^[16]。

2.2 胃 癌

胃癌(gastric carcinoma, GC)是全球第五大常见癌症,致死率位列第三。现有肿瘤标志物检测简便,痛苦小,但特异性、敏感度较低,且单一指标无法独立诊断 GC,另外,目前仍未开发出诊断效果较好的 GC 肿瘤标志物^[1,17];放射组学诊断相关研究缺乏临床相关性的标准化评估^[18]。

近年来,GC 外泌体相关研究表明,与健康个体相比,GC 患者外泌体中的部分蛋白表达发生变化,有望成为 GC 肿瘤标志物并应用于临床诊断。外泌体中多种蛋白与 GC 相关,如 TRIM3 蛋白^[1]、CDH1^[19]、GKN1^[20]等。TRIM3 是三结构域蛋白家族(tripartite motif, TRIM)成员,可抑制 GC 细胞生长和转移。Fu 等^[1]通过检测 80 例 GC 患者血清外泌体及 80 名健康对照者血清外泌体,发现 TRIM3 在 GC 患者血清

外泌体中表达降低。CDH1 又称 E-钙黏蛋白(E-Cadherin), 是 GC 患者血清外泌体 miRNA-217 的直接作用靶标, Li 等^[21]发现 miRNA-217 过表达降低外泌体 CDH1 水平, 促进 GC 细胞增殖。

差异表达蛋白同样存在于 GC 患者组织来源外泌体中, 胃动蛋白 1(gastrotropin-1, GKN1)由 185 个氨基酸残基组成, 是胃特异性蛋白质。GKN1 具有肿瘤抑制功能, 其失活是 GC 发病的主要原因之一^[22]。Dokhaee 等^[20]通过对 27 例 GC 患者组织进行研究, 发现 GC 组织 GKN1 基因表达相较于健康对照者显著降低。

2.3 肝癌

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是肝癌最为常见的形式, HCC 发病隐匿、缺乏特定的早期诊断标志物, 多数患者病程已至晚期, 不适合手术治疗, 其生存时间往往仅为 6 个月^[23]。现阶段肝癌诊断方法主要包括: 血清学标志物检查(如甲胎蛋白 AFP 等)、影像学检查(磁共振成像、计算机断层扫描以及胸部 X 射线)、肝脏活组织检查等。血清 AFP 多用于肝癌筛查, 然而 AFP 多源性的特点导致其筛查敏感性、准确性较低。因而, 合适的肝癌诊断标志物具有较好的临床应用前景。

外泌体内容物作为 HCC 诊断标志物的相关研究大多集中于 RNA, 蛋白研究数量极少。Arbelaiz 等^[24]对 43 例胆管癌患者、30 例原发性硬化性胆管炎患者、29 例 HCC 患者和 32 名健康对照进行血清外泌体蛋白表达分析, 发现 HCC 患者血清外泌体中半乳凝素 3 结合蛋白(galectin-3-binding protein, G3BP)和多聚免疫球蛋白受体(polymeric immunoglobulin receptor, PIGR)显著高于健康对照, 这两种蛋白对 HCC 的预测效能优于 AFP。且 HCC 患者外泌体中 G3BP 显著高于其余三组, 可用于 HCC 与其他肝胆疾病的鉴别诊断。Sasaki 等^[25]研究表明 HCC 患者血清外泌体中铁调素(Hepcidin)mRNA 水平显著高于健康对照, 表明外泌体铁调素具有作为 HCC 风险诊断标志物的潜力。另有临床研究表明, HCC 患者血清外泌体 SMAD3 蛋白或其 mRNA 的水平升高可用于 HCC 进展及不良预后的预测^[26]。

2.4 卵巢癌

卵巢癌(ovarian cancer, OC)早期患者 5 年生存率约为 90%, 晚期患者则降至 20%, 早期诊断具有

重要临床意义^[27]。OC 早期无明显症状, 导致大多数患者确诊时病程已至晚期^[2], 为其早期诊断增加难度^[27]。因而高特异性、敏感度的 OC 早期诊断标志物具有重要的临床价值。部分 OC 标志物存在一定缺陷。CA125 是目前 OC 诊断常用标志物, 然而其敏感性和特异性较低^[28], 且某些特殊条件下, 可能造成假阳性结果^[29]。上皮细胞黏附分子(epithelial cellular adhesion molecule, EpCAM)是一种跨膜糖蛋白, 健康个体外泌体中 EpCAM 水平极低, 其水平与 OC 分期和严重程度相关, IV 期 OC 时其水平可达百倍以上。然而, 标记率较低^[30]、易被血清金属蛋白酶“切除”等缺陷为其临床应用带来困难。

部分外泌体蛋白具有作为 OC 标志物的潜力。CD24 属白细胞分化抗原, 其与 OC 预后有关, 大多数 CD24 阳性外泌体由肿瘤细胞分泌产生^[31]。Beáta 等^[32]证明 CD24 在浆液性 OC 中过度表达, 且与肿瘤分级有关, 但仅从少数 OC 患者血清中分离出 CD24 阳性外泌体, 外泌体 CD24 能否用于 OC 早期诊断仍需进一步研究。Li 等^[33]发现 OC 患者及 OC 裸鼠血清外泌体中存在较高浓度酪氨酸受体激酶 B(tyrosine kinase receptor B, TrkB)。Marta 等^[34]发现与良性肿瘤患者或健康对照相比, OC 患者血清外泌体蛋白水平增高, 且晚期患者外泌体蛋白水平明显高于早期患者, OC 患者血清外泌体中存在转移生长因子 $\beta 1$ (transforming growth factor-beta 1, TGF- $\beta 1$)与黑色素瘤相关抗原 MAGE3/6, 可用于 OC 患者与良性肿瘤患者、健康对照的鉴别诊断。

相比于单一标志物, 标志物组合检测有助于肿瘤分期和诊断能力的提高^[27]。

基于血液中三种外泌体蛋白标志物(CA125, EpCAM 和 CD24)的 OC 检测技术, 所需样本量较少, 具有一定诊断优势^[35]。

2.5 前列腺癌

前列腺癌(prostate cancer, PC)是造成男性癌症相关死亡的第二大病因^[36], 其诊断取样痛苦, 取样难度随病程发展增大。因此, 临床对于 PC 非侵入性诊断方法存在明显需求^[37]。前列腺特异性抗原(prostate specific antigen, PSA)是早期 PC 检查常用生物标志物^[38], 但其无法对 PC 与良性前列腺增生(benign prostatic hyperplasia, BPH)进行鉴别诊断^[39], 导致患者进行不必要的前列腺活检, 增加患者痛苦。

另外, PSA 检查存在假阳性结果等问题^[38]。

Kawakami 等^[39]证实 PC 患者血清外泌体 γ -谷氨酰转移酶(GGT)活性显著高于 BPH 患者,可用于 PC 诊断或 PC 与 BPH 的鉴别诊断。EphrinA2 是具有糖基-磷脂酰肌醇(glycosylphosphatidylinositol, GPI)脂质锚的膜结合蛋白, Li 等^[40]发现,与 BPH 组与健康对照组相比,PC 患者外泌体 ephrinA2 水平显著升高。其表达与 PC 患者的 TNM 分期和 Gleason 评分呈正相关。就 PC 患者和 BPH 患者鉴别诊断而言,外泌体 ephrinA2 的诊断效率优于全血清 ephrinA2 和血清 PSA。外泌体 ephrinA2 具有作为 PC 生物标志物的潜力,并为该疾病提供新的治疗靶点。Krishn 等^[37]证明,PC 患者血清外泌体 $\alpha v \beta 3$ 整合素水平高于健康对照,表明其可用于 PC 非侵入性诊断,同时, $\alpha v \beta 3$ 整合素可由外泌体转移到受体细胞,为进一步研究 $\alpha v \beta 3$ 整合素在 PC 发病机制中的作用以及开发潜在治疗靶点提供理论依据。

外泌体蛋白可存在于 PC 患者尿液中。Wang 等^[41]通过对 26 例 PC 患者及 16 例健康对照进行尿液外泌体提取,蛋白质免疫印记(Western Blot, WB)分析,发现 PC 患者尿液外泌体脂筏特征蛋白 flotillin-2、跨膜蛋白 256(transmembrane protein 256, TMEM256)、小 GTP 结合蛋白 Rab3B、LAMTOR1 水平均高于 HC。Overbye 等^[42]发现 V-type proton ATPase 16 kDa proteolipid subunit (VATL)富集于 PC 患者尿外泌体中。此外, Li 等^[43]的研究显示 PC 患者尿液中前列腺特异性膜抗原(prostate specific membrane antigen, PSMA)阳性外泌体浓度高于健康对照。

2.6 乳腺癌

乳腺癌(breast cancer, BC)诊断主要依靠影像学技术和组织病理学检查。影像学检查临床局限性主要表现在其存在肿瘤体积检查下限^[44];组织病理学检查则存在痛苦。鉴于外泌体蛋白的诊断优势,其有望用于 BC 早期诊断。

多数 BC 外泌体蛋白研究采用患者血清作为样本。Wang 等^[45]对 80 例 BC 患者、80 例乳腺良性疾病患者及 80 名健康对照血清外泌体进行检测,发现 BC 患者组四跨膜蛋白超家族成员 CD82 表达较高。Tamkovich 等^[46]证明解整合素样金属蛋白酶 10(ADAM10)在 BC 患者血清中高度表达; Lee 等^[47]表明 BC 患者外泌体

发育性内皮细胞基因-1(developmentally regulated endothelial locus 1, Del-1)明显高于健康对照,同时 Del-1 也是区分 BC 与良性乳腺肿瘤和非癌症疾病的潜在标志物^[48]。此外,相同标志物在 BC 不同时期可有不同表现。Khan 等^[49]发现外泌体 Survivin 及其剪接变体可用作早期 BC 诊断标志物,作为 Survivin 剪接变体之一, Survivin-2B 在 BC 早期正常表达,然而 BC 晚期(IV 期)阶段其在肿瘤和外泌体中表达降低甚至不表达。另外,部分细胞系来源外泌体蛋白同样存在异常表达。Hannafon 等^[50]分别研究了 MCF7 等 5 种 BC 细胞系及正常人乳腺细胞系 MCF10A,发现在五种 BC 细胞系外泌体中均能检测到 MTA1 蛋白,但在 MCF10A 细胞系的外泌体中未发现 MTA1 蛋白,表明 MTA1 具有作为 BC 标志物的潜力。

2.7 结直肠癌

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)早期无创诊断方法可提高早期检出率和患者生存率。

CRC 细胞系中外泌体蛋白也存在显著变化。Lee 等^[51]发现,结肠癌细胞系外泌体中四跨膜蛋白 1(tetraspanin 1, TSPAN1)、半乳糖凝集素-3 结合蛋白(lectin galactoside binding, soluble 3 binding protein, LGALS3BP)、中性氨基酸转运蛋白 B(solute carrier family 1 member 5, SLC1A5)三种蛋白水平显著高于结肠正常成纤维细胞外泌体,显示其作为 CRC 标志物的潜力。其中 TSPAN1 在结肠癌患者血清外泌体中水平升高,具有较高的敏感性^[51]。Xiao 等^[52]发现, CK19、TAG72 和 CA125 分别在 CRC 细胞系、5-FU 抗性 CRC 细胞系、高转移性 CRC 细胞系外泌体中高表达。Copine III(CPNE3)是钙依赖性膜结合蛋白, CRC 患者血浆外泌体中 CPNE3 水平高于健康个体^[53]。

2.8 白血病

白血病(leukemia)是起源于造血细胞的恶性肿瘤,目前,骨髓穿刺是其诊断必要的检查方式,其对患者造成痛感,难以用于白血病早期诊断,且取样易导致假阴性结果^[54]。流式细胞术无法检测在骨髓中存在的癌细胞。体液标志物检测痛苦小,患者易接受,诊断效能合适。可为白血病诊断提供更多选择。

外泌体蛋白的深入研究为其用于白血病诊断提供可能性。Raimondo 等^[55]在慢性粒细胞白血病来源的外泌体中发现了 TGF- β 1,其刺激白血病细胞增殖并激活形成抗凋亡表型,阻断 TGF- β 1 信号传导可

抑制白血病细胞的增殖,并阻止慢性粒细胞白血病细胞中抗凋亡表型的形成。此外,不同化疗阶段的急性髓系白血病患者其外泌体 TGF- β 1 水平存在差异^[56]。

Wojtuszkiewicz 等^[57]研究发现,急性髓系白血病来源外泌体中的凋亡相关分子 MCL-1、Bcl-2、Bax 和 Bcl-X 可用于其辅助诊断和复发、预后判断。急性髓系白血病生物标志物 NPM1、FLT3、CXCR4、MMP9 和 IGF-1R 也存在于其癌细胞分泌的外泌体中^[58]。此外,慢性淋巴细胞白血病患者血清外泌体 CD19 水平与疾病进展高度相关^[59]。

2.9 外泌体蛋白与其他肿瘤

外泌体蛋白也用于其他肿瘤诊断研究。Frampton 等^[60]发现 glypican-1 (GPC1)在胰腺癌患者血清外泌体中水平升高,其水平与胰腺癌存在关联性。Arbelaiz 等^[24]证明 aminopeptidase N (AMPN),pan-tetheinase (VNN1)在胆管癌患者血清外泌体中呈现高水平状态,具有成为胆管癌标志物的潜力。

外泌体蛋白与多种癌症存在相关性,其灵敏度与特异性也有所差别,作为潜在的肿瘤诊断标志物,外泌体蛋白具有一定优势和不足,临床应用仍有待进一步研究。

3 小 结

外泌体蛋白作为潜在肿瘤标记物,取样快速简便,检测成本低;外泌体蛋白可在肿瘤发生、发展过程中“实时”提供相关信息,稳定性和敏感性更高 (Table 1)。然而,其相关研究仍存在部分问题有待解决。第一,缺少标准化的外泌体提取方法,且现阶段外泌体提取方法难以消除杂蛋白影响,不利于外泌体蛋白研究发展。第二,外泌体蛋

白在肿瘤诊断方面特异性和灵敏度的相关研究数量较少,尤其是早期癌症诊断的相关研究数量极少,并且其诊断效能缺乏大量标本验证,不利于其后续的

Table 1 Potential exosomal protein biomarker and trend in certain cancer

Cancer type	Potential biomarker of exosomal protein	Trend	Source of exosome	Reference
LC	CD91	↑	Serum	[11]
	AHSG	↑	Serum	[13]
	GPC1	↑	Serum	[12]
	MUC1	↑	Plasma, cell line	[15]
GC	TRIM3	↓	Serum, cell line	[1]
	CDH1	↓	Serum, tissue	[19]
	GKN1	↓	Tissue	[20]
HCC	G3BP	↑	Serum	[24]
	PIGR	↑	Serum	[24]
	Hepcidin	↑	Serum, cell line	[25]
OC	SMAD3	↑	Peripheral blood	[26]
	CA125	↑	Cell lines	[28]
	EpCAM	↑	Cell lines	[35]
	CD24	↑	Serum	[32]
	MAGE3/6	↑	Serum	[34]
PC	TGF- β 1	↑	Serum	[34]
	TrkB	↑	Serum, cell line	[33]
	GGT	↑	Serum, cell line	[39]
	EphrinA2	↑	Serum	[40]
	α v β 3	↑	Serum	[37]
	TMEM256	↑	Urine	[41]
	LAMTOR1	↑	Urine	[41]
	Flotillin-2	↑	Urine	[41]
	Rab3B	↑	Urine	[41]
	VATL	↑	Urine	[42]
BC	PSMA	↑	Cell lines, urine	[43]
	Del-1	↑	Serum	[47]
	ADAM10	↑	Serum, cell lines	[46]
	CD82	↑	Serum	[45]
	Survivin-2B	↑ (Early stage), ↓ (Late stage)	Serum	[49]
CRC	MTA1	↑	Cell lines	[50]
	TSPAN1	↑	Cell line	[51]
	LGALS3BP	↑	Cell line	[51]
	SLC1A5	↑	Cell line	[51]
	CK19	↑	Cell lines	[52]
	TAG72	↑	Cell lines	[52]
	CA125	↑	Cell line	[52]
	CPNE3	↑	Serum	[53]
Leukemia	TGF- β 1	↑	Cell lines	[56]
Pancreatic ductal adenocarcinoma	GPC1	↑	Serum	[60]
Cholangiocarcinoma	AMPN,	↑	Serum, cell line	[24]
	VNN1	↑	Serum, cell line	[24]

临床应用发展。第三,目前对于外泌体蛋白在肿瘤中的作用机制仍不明确。第四,缺乏通用扩增技术,造成外泌体蛋白分析对外泌体样本需求量较大,且处理过程复杂。因此,外泌体蛋白高通量快速检测方法的开发是临床应用的关键,纳米等离子体外泌体检测技术(nano-plasmonic exosome, nPLEX)的开发有助于解决此问题。第五,部分地区肿瘤患者标本较为缺乏,为其相关研究带来困难。就胃癌患者而言,由于胃癌早期无明显可察觉症状,加之肿瘤标志物、胃镜等相关检查不属于居民日常健康体检范畴,使得胃癌早期诊断颇具难度,其标本量也受到影响。第六,外泌体中存在部分具有标志物潜能的糖蛋白,由于缺乏寡糖特异性抗体及合适的检测分析工具,糖蛋白用于肿瘤诊断的进一步发展受到限制。外泌体亚型及其组成如何随疾病发展或恢复而变化,“特征性”外泌体能否特异性诊断疾病,评估疾病严重性等问题有待进一步研究。第七,后期临床应用时如何控制检测成本,提高检出率应加以考虑。随着外泌体蛋白相关研究不断取得新进展,上述问题将逐一解决,外泌体蛋白能够实现肿瘤诊断方面的应用。

参考文献:

- [1] Fu H, Yang H, Zhang X, et al. Exosomal TRIM3 is a novel marker and therapy target for gastric cancer[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37(1): 162.
- [2] Osaki M, Okada F. Exosomes and their role in cancer progression[J]. *Yonago Acta Med*, 2019, 62(2): 182-190.
- [3] Vidal M. Exosomes: Revisiting their role as “garbage bags”[J]. *Traffic*, 2019, 20(11): 815-828.
- [4] Johnstone RM, Adam M, Hammond JR, et al. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes)[J]. *J Biol Chem*, 1987, 262(19): 9412-9420.
- [5] G Kugeratski F, Kalluri R. Exosomes as mediators of immune regulation and immunotherapy in cancer [J]. *FEBS J*, 2020 Sep 10. [Ahead of print]
- [6] Wani TU, Mohi-Ud-din R, Mir RH, et al. Exosomes harnessed as nanocarriers for cancer therapy—current status and potential for future clinical applications [J]. *Curr Mol Med*, 2020 Sep 15. [Ahead of print]
- [7] Wu Z, Pu P, Su Z, et al. Schwann Cell-derived exosomes promote bone regeneration and repair by enhancing the biological activity of porous Ti6Al4V scaffolds[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 531(4): 559-565.
- [8] Gurunathan S, Kang MH, Jeyaraj M, et al. Review of the isolation, characterization, biological function, and multifarious therapeutic approaches of exosomes[J]. *Cells*, 2019, 8(4): 307.
- [9] 李会萍. 肺癌肿瘤标志物及其检测方法的研究进展[J]. *中国城乡企业卫生*, 2020, 35(8): 40-42.
- Li HP. Research progress on tumor markers and detection methods of lung cancer [J]. *Chinese Journal of Urban and Rural Enterprise Hygiene*, 2020, 35(8): 40-42.
- [10] Sedlacek AL, Younker TP, Zhou YJ, et al. CD91 on dendritic cells governs immunosurveillance of nascent, emerging tumors[J]. *JCI insight*, 2019, 4(7): e127239.
- [11] Ueda K, Ishikawa N, Tatsuguchi A, et al. Antibody-coupled monolithic silica microtips for highthroughput molecular profiling of circulating exosomes[J]. *Sci Rep*, 2014, 4: 6232.
- [12] 孟祥宽. 血清外泌体膜蛋白 GPC1 在非小细胞肺癌筛查及预后评估中的应用价值[D]. 长春: 吉林大学, 2016.
- Meng XK. The screening and prognostic value of exosomal GPC1 derived from serum in non-small cell lung cancer [D]. Changchun: Jilin University, 2016.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] Pan D, Chen J, Feng C, et al. Preferential localization of MUC1 glycoprotein in exosomes secreted by non-small cell lung carcinoma cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(2): 323.
- [16] Yamashita T, Kamada H, Kanasaki S, et al. Epidermal growth factor receptor localized to exosome membranes as a possible biomarker for lung cancer diagnosis [J]. *Pharmazie*, 2013, 68(12): 969-973.
- [17] Tong W, Ye F, He L, et al. Serum biomarker panels for diagnosis of gastric cancer[J]. *Onco Targets Ther*, 2016, 9: 2455-2463.
- [18] Jiang Y, Wang W, Chen C, et al. Radiomics signature on computed tomography imaging: association with lymph node metastasis in patients with gastric cancer [J]. *Front Oncol*, 2019, 9: 340.
- [19] Lo W, Zhu B, Sabesan A, et al. Associations of CDH1 germline variant location and cancer phenotype in families with hereditary diffuse gastric cancer (HDGC)[J]. *J Med Genet*, 2019, 56(6): 370-379.
- [20] Dokhaee F, Mazhari S, Galehdari M, et al. Evaluation of GKN1 and GKN2 gene expression as a biomarker of gastric cancer[J]. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*, 2018, 11 (Suppl 1): S140-S145.
- [21] Zou Z, Zhao L, Su S, et al. The plasma levels of 12 cytokines and growth factors in patients with gastric cancer [J]. *Medicine*, 2018, 97(19): e0413.
- [22] Yoon JH, Ham IH, Kim O, et al. Gastric 1 protein is a potential theragnostic target for gastric cancer [J]. *Gastric Cancer*, 2018, 21(6): 956-967.
- [23] Hollebecque A, Malka D, Fertet C, et al. Systemic treatment of advanced hepatocellular carcinoma: from disillusion to new horizons[J]. *Eur J Cancer*, 2015, 51(3): 327-339.
- [24] Arbelaiz A, Azkargorta M, Krawczyk M, et al. Serum extracellular vesicles contain protein biomarkers for primary sclerosing cholangitis and cholangiocarcinoma [J]. *Hepatology*, 2017, 66(4): 1125-1143.
- [25] Sasaki K, Kohgo Y, Ohtake T. Splicing variant of hepcidin mRNA[J]. *Vitam Horm*, 2019, 110: 131-141.
- [26] Fu Q, Zhang Q, Lou Y, et al. Primary tumor-derived exosomes facilitate metastasis by regulating adhesion of circu-

- lating tumor cells via SMAD3 in liver cancer [J]. *Oncogene*, 2018, 37(47):6105–6118.
- [27] Zhang P, Zhou X, Zeng Y. Multiplexed immunophenotyping of circulating exosomes on nano-engineered ExoProfile chip towards early diagnosis of cancer [J]. *Chem Sci*, 2019, 10(21):5495–5504.
- [28] Li X, Wang X. The emerging roles and therapeutic potential of exosomes in epithelial ovarian cancer [J]. *Mol Cancer*, 2017, 16(1):92.
- [29] Nolen BM, Lokshin AE. Biomarker testing for ovarian cancer: clinical utility of multiplex assays [J]. *Mol Diagn Ther*, 2013, 17(3):139–146.
- [30] Zhang W, Peng P, Kuang Y, et al. Characterization of exosomes derived from ovarian cancer cells and normal ovarian epithelial cells by nanoparticle tracking analysis [J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(3):4213–4221.
- [31] Im H, Shao H, Park YI, et al. Label-free detection and molecular profiling of exosomes with a nano-plasmonic sensor [J]. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(5):490–495.
- [32] Soltesz B, Lukacs J, Szilagyi E, et al. Expression of CD24 in plasma, exosome and ovarian tissue samples of serous ovarian cancer patients [J]. *J Biotechnol*, 2019, 298:16–20.
- [33] Li W, Lu Y, Yu X, et al. Detection of exosomal tyrosine receptor kinase B as a potential biomarker in ovarian cancer [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(4):6361–6369.
- [34] Szajnik M, Derbis M, Lach M, et al. Exosomes in plasma of patients with ovarian carcinoma: potential biomarkers of tumor progression and response to therapy [J]. *Gynecol Obstet (Sunnyvale)*, 2013, Suppl 4:3.
- [35] Zhao Z, Yang Y, Zeng Y, et al. A microfluidic ExoSearch chip for multiplexed exosome detection towards blood-based ovarian cancer diagnosis [J]. *Lab Chip*, 2016, 16(3):489–496.
- [36] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(1):7–30.
- [37] Krishn SR, Singh A, Bowler N, et al. Prostate cancer sheds the α 5 β 3 integrin in vivo through exosomes [J]. *Matrix Biol*, 2019, 77:41–57.
- [38] Filella X, Foj L. Prostate cancer detection and prognosis: from prostate specific antigen (PSA) to exosomal biomarkers [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(11):1784.
- [39] Kawakami K, Fujita Y, Matsuda Y, et al. Gamma-glutamyltransferase activity in exosomes as a potential marker for prostate cancer [J]. *BMC Cancer*, 2017, 17(1):316.
- [40] Li S, Zhao Y, Chen W, et al. Exosomal ephrinA2 derived from serum as a potential biomarker for prostate cancer [J]. *J Cancer*, 2018, 9(15):2659–2665.
- [41] Wang L, Skotland T, Berge V, et al. Exosomal proteins as prostate cancer biomarkers in urine: from mass spectrometry discovery to immunoassay-based validation [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2017, 98:80–85.
- [42] Overbye A, Skotland T, Koehler CJ, et al. Identification of prostate cancer biomarkers in urinary exosomes [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(30):30357–30376.
- [43] Wu LY, Fang ZT, Lin JK, et al. Complementary iTRAQ proteomic and transcriptomic analyses of leaves in tea plant (*Camellia sinensis* L.) with different maturity and regulatory network of flavonoid biosynthesis [J]. *J Proteome Res*, 2019, 18(1):252–264.
- [44] Grimm LJ, Shelby RA, Knippa EE, et al. Patient perceptions of breast cancer risk in imaging-detected low-risk scenarios and thresholds for desired intervention; a multi-institution survey [J]. *J Am Coll Radiol*, 2018, 15(6):911–919.
- [45] Wang X, Zhong W, Bu J, et al. Exosomal protein CD82 as a diagnostic biomarker for precision medicine for breast cancer [J]. *Mol Carcinog*, 2019, 58(5):674–685.
- [46] Tamkovich SN, Yunusova NV, Tugutova E, et al. Protease cargo in circulating exosomes of breast cancer and ovarian cancer patients [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2019, 20(1):255–262.
- [47] Lee SJ, Lee J, Chae YS, et al. Abstract 2781: exosomal Del-1 as a potent diagnostic marker for breast cancer: a prospective cohort study [J]. 2017, 77(13 Suppl):2781.
- [48] Moon PG, Lee JE, Cho YE, et al. Identification of developmental endothelial locus-1 on circulating extracellular vesicles as a novel biomarker for early breast cancer detection [J]. *Clin Cancer Res*, 2016, 22(7):1757–1766.
- [49] Khan S, Bennit HF, Turay D, et al. Early diagnostic value of survivin and its alternative splice variants in breast cancer [J]. *BMC Cancer*, 2014, 14:176.
- [50] Hannafon BN, Gin AL, Xu YF, et al. Metastasis-associated protein 1 (MTA1) is transferred by exosomes and contributes to the regulation of hypoxia and estrogen signaling in breast cancer cells [J]. *Cell Commun Signal*, 2019, 17(1):13.
- [51] Lee CH, Im EJ, Moon PG, et al. Discovery of a diagnostic biomarker for colon cancer through proteomic profiling of small extracellular vesicles [J]. *BMC Cancer*, 2018, 18(1):1058.
- [52] Xiao Y, Li Y, Yuan Y, et al. The potential of exosomes derived from colorectal cancer as a biomarker [J]. *Clin Chim Acta*, 2019, 490:186–193.
- [53] Sun B, Li Y, Zhou Y, et al. Circulating exosomal CPNE3 as a diagnostic and prognostic biomarker for colorectal cancer [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(2):1416–1425.
- [54] Hornick NI, Huan J, Doron B, et al. Serum exosome microRNA as a minimally-invasive early biomarker of AML [J]. *Sci Rep*, 2015, 5:11295.
- [55] Raimondo S, Saieva L, Corrado C, et al. Chronic myeloid leukemia-derived exosomes promote tumor growth through an autocrine mechanism [J]. *Cell Commun Signal*, 2015, 13:8.
- [56] Hong CS, Muller L, Whiteside TL, et al. Plasma exosomes as markers of therapeutic response in patients with acute myeloid leukemia [J]. *Front Immunol*, 2014, 5:160.
- [57] Wojtuszkiewicz A, Schuurhuis GJ, Kessler FL, et al. Exosomes secreted by apoptosis-resistant acute myeloid leukemia (AML) blasts harbor regulatory network proteins potentially involved in antagonism of apoptosis [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2016, 15(4):1281–1298.
- [58] Huan J, Hornick NI, Shurtleff MJ, et al. RNA trafficking by acute myelogenous leukemia exosomes [J]. *Cancer Res*, 2013, 73(2):918–929.
- [59] Caivano A, Laurenzana I, De Luca L, et al. High serum levels of extracellular vesicles expressing malignancy-related markers are released in patients with various types of hematological neoplastic disorders [J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(12):9739–9752.
- [60] Frampton AE, Prado MM, Lopez-Jimenez E, et al. Glypican-1 is enriched in circulating-exosomes in pancreatic cancer and correlates with tumor burden [J]. *Oncotarget*, 2018, 9(27):19006–19013.