

非小细胞肺癌自适应放疗患者血浆外泌体微小RNA 差异表达谱和生物信息学分析

杨海华^{1,2}, 周苏娜², 王学全², 夏鑫航², 汤幸妮², 朱 远^{1,3}, 封 巍^{1,3}

(1. 浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053; 2. 温州医科大学附属浙江省台州医院, 浙江 台州 317000; 3. 中国科学院大学附属肿瘤医院(浙江省肿瘤医院), 中国科学院基础医学与肿瘤研究所, 浙江 杭州 310022)

摘要: [目的] 分析Ⅲ期非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)自适应放疗中不同放射敏感性患者的血浆外泌体微小RNA (microRNA, miRNA)差异表达谱,并应用生物信息学分析外泌体 miRNA 的作用。[方法] NSCLC 患者接受自适应放疗 20 次时的胸部增强 CT 进行肿瘤评估,划分为放射敏感组与放射抵抗组,从中筛选出 5 对进行下一步研究。通过 QIAseq 建库方法构建稳定的 miRNA 特异文库,并利用 Illumina 高通量测序技术检测 miRNA 差异表达谱。对差异 miRNA 靶基因进行生物信息学分析,分析其涉及的主要生物学功能及信号通路。[结果] 与放射敏感患者相比,放射抵抗患者血浆外泌体中共有 142 个 miRNA 异常表达,其中下调 42 个,上调 100 个。通过基因本体富集及京都基因与基因组百科全书的通路富集分析,上述差异表达 miRNA 的靶基因功能主要富集于 TGF- β 、Hedgehog、mTOR、p53 等信号通路,涉及 RNA 聚合酶、泛素样蛋白转移酶等多种细胞生化代谢途径,并参与细胞黏附、细胞周期、衰老等多种生物学过程。[结论] 不同放射敏感性 NSCLC 患者血浆外泌体 miRNA 表达谱发生了明显变化,可能通过 TGF- β 等信号通路在 NSCLC 放射敏感性调控中发挥重要作用。

关键词: 非小细胞肺癌; 自适应放疗; 血浆; 外泌体 miRNA; 生物信息学分析

中图分类号: R734.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2021)09-0728-07

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2021.09.B006

Differential Expression of Plasma Exosomal MicroRNA in Non-small Cell Lung Cancer Patients with Adaptive Radiotherapy and Its Bioinformatic Analysis

YANG Hai-hua^{1,2}, ZHOU Su-na², WANG Xue-quan², XIA Xin-hang², TANG Xing-ni², ZHU Yuan^{1,3}, FENG Wei^{1,3}

(1. Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China; 2. The Affiliated Taizhou Hospital, Wenzhou Medical University, Taizhou 317000, China; 3. The Cancer Hospital of the University of Chinese Academy of Sciences (Zhejiang Cancer Hospital), Institute of Basic Medicine and Cancer (IBMC), Chinese Academy of Sciences, Hangzhou 310022, China)

Abstract: [Objective] To analyze differential microRNA (miRNA) expression profile in plasma exosomes of stage III non-small cell lung cancer (NSCLC) patients with different radiosensitivity who received adaptive radiotherapy (ART), and bioinformatics analysis was applied to explore the role of miRNA. [Methods] The tumor regression was evaluated by enhanced chest CT at 20 fractions in stage III NSCLC patients who received ART. Patients were divided into radiation sensitive group and radiation resistance groups, and 5 pairs samples were selected for further research. A stable miRNA specific library was constructed by QIAseq library construction method. The differential miRNA expression profile was detected by Illumina high-throughput sequencing. Bioinformatic analysis was utilized to investigate the involved main biological functions and signal pathways of the differential miRNA-targeted-genes. [Results] Compared with radiation sensitive group, there were 142 significantly differentially expressed miRNAs in plasma exosomes of the radiation resistance group. Among them, 42 miRNAs were downregulated and 100 miRNAs were upregulated. By gene ontology (GO) enrichment and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway analysis, the targeted genes of differential expressed miRNA were mainly enriched in TGF- β , Hedgehog, mTOR, p53 and other signaling pathway. Moreover, they participated in various of cellular biochemical metabolic pathways including RNA polymerase, ubiquitin-like protein transferase, and so on, and different biological processes such as adhesion, cell cycle and senescence. [Conclusion] The remarkably differential miRNA expression profile is detected in plasma exosomes of NSCLC patients with different radiosensitivity, and might play a critical function in the radiosensitivity regulation of NSCLC through TGF- β signaling pathway and so on.

Subject words: non-small cell lung cancer; adaptive radiotherapy; plasma; exosomal miRNA; bioinformatic analysis

基金项目: 浙江省基础公益研究计划(LGF21H160027); 浙江省医药卫生科技计划项目(2020PY001, 2021PY038)

通信作者: 封巍, 副主任, 主任医师, 硕士研究生导师, 博士; 中国科学院大学附属肿瘤医院(浙江省肿瘤医院)放疗科, 浙江省杭州市拱墅区半山道路 1 号(310022); E-mail: fengwei@zjcc.org.cn

收稿日期: 2021-08-08; **修稿日期:** 2021-08-31

放射治疗是非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 的重要治疗策略, 放射治疗技术的提高和图像引导放疗 (image-guided radiotherapy, IGRT) 的引入提高了放射治疗的准确性和耐受性^[1]。自适应放疗 (adaptive radiotherapy, ART) 是建立在 IGRT 基础上的新型放疗技术, 在治疗过程中通过影像检测肿瘤及周围正常组织的解剖变化来调整优化放疗计划^[2]。我们前期的研究显示, 不可手术的Ⅲ期 NSCLC 患者常规给予 20 次 (fractions, F) 改野的自适应推量调强放疗 (intensity-modulated radiotherapy with simultaneous integrated boost, SIB-IMRT), 可以减少正常器官的放射剂量, 减少放射性肺炎、放射性食管炎的发生, 同时不降低对肿瘤的控制^[3]。因为不同患者肿瘤自身对放化疗的敏感性不同, 并非所有患者适合在 20 F 时进行 ART 改野, 因此亟须发掘高效、易操作且能动态监测的肿瘤相关标志物, 来预测筛选适合 ART 的敏感人群。

外泌体 (extracellular vesicles, EVs) 是由多种细胞包括分裂的肿瘤细胞分泌到人体体液中的具有高度异质性的膜结合磷脂囊泡, 富含微小 RNA (microRNA, miRNA), 稳定且大量存在于体液包括血液、尿液等中, 介导细胞之间的信息交流^[4]。miRNA 是一种单链非编码小分子 RNA, 通过调节下游基因表达参与 DNA 损伤反应、细胞周期和凋亡、缺氧肿瘤微环境、上皮间质转化、肿瘤干细胞和辐射诱导信号通路等多种生物学过程调控, 在调节肺癌细胞的放射敏感性方面发挥重要作用^[5-7]。

本文分别对 5 对接受 SIB-IMRT 的Ⅲ期不可切 NSCLC 放射敏感 (20 F ART 改野时肿瘤评估为部分缓解) 与疾病稳定的患者血浆外泌体中的 miRNA 进行检测, 筛选出不同放射敏感组间的外泌体 miRNA 差异表达谱, 并对差异表达 miRNA 的靶基因进行基因本体 (gene ontology, GO) 富集及京都基因与基因组百科全书的通路富集 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes pathway, KEGG pathway) 分析。旨在为筛选适合 ART 的敏感人群寻找潜在的生物标志物, 为研究 NSCLC 放射敏感性调控机制提供参考依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象

回顾性分析 2018 年 1 月至 2020 年 3 月温州医

科大学附属浙江省台州医院放疗科接受同步放化疗的不可手术的Ⅲ期 NSCLC 患者, 肿瘤分期根据 UICC 肺癌 TNM 系统的第 8 版确定临床特征信息。患者的血浆标本于第一次放疗前采集。血浆标本来自于温州医科大学附属浙江省台州医院放疗科的生物标本库, 所有生物样本均已获得患者及其家属授权并签署知情同意书。

1.2 治疗方法

患者接受 SIB-IMRT 同步紫杉醇联合卡铂周方案化疗^[3]。调强放疗采用 Varian 的 Eclipse 动态调强, 放疗 20 F 时重新进行胸部增强 CT 定位扫描, 根据肿瘤退缩情况重新勾画大体肿瘤靶区 (gross tumor volume, GTV) 及临床肿瘤靶区 (clinical target volume, CTV), 最终完成放疗总剂量。计划大体肿瘤靶区 (planning gross tumor volume, PGTV) 64~66 Gy/30 F, 2.16~2.20 Gy/F, 计划治疗靶区 (planning treatment volume, PTV) 53~54 Gy/30 F, 1.76~1.80 Gy/F。同步紫杉醇联合卡铂的周方案化疗: 紫杉醇 45mg/m², d₁+卡铂 AUC 2, d₁, 每周 1 次, 放疗期间同步完成 4~6 个周期。

1.3 肿瘤评估

根据放疗 20 F 时第二次胸部增强定位 CT 图像, 依据实体瘤 RECIST 1.1 进行肿瘤评估, 达到完全缓解 (complete remission, CR) 或部分缓解 (partial response, PR) 定义为放射敏感组; 评估为疾病稳定 (stable disease, SD) 或疾病进展 (progressive disease, PD) 定义为放射抵抗组。

1.4 血浆外泌体提取、鉴定及 miRNA 高通量测序

取出血液样本, 1 600 r/min, 4 ℃离心 10 min。离心后血液分为 3 层, 用移液器吸取上层的血浆至冻存管中。将血浆在 4 ℃条件下以 16 000 r/min 离心 10 min, 分装 500 μl/管, -80 ℃保存。采用 ExoRNeasy Midi 和 Maxi Kits 试剂盒依据试剂说明书提取血浆外泌体。透射电镜观察外泌体: 20 μl 外泌体悬液放置在 400 网铜网格上, 在室温下孵化 3 min, 然后滴加 pH=6.5 的 3% 磷钨酸继续孵化 5 min, 然后 37 ℃干燥 15 min, 并且对分离的外泌体采用纳米颗粒追踪分析 (nanoparticle tracking analysis, NTA) 技术进行质量鉴定。使用 The QIAseq miRNA Library Kit 的 QIAseq 建库方法构建稳定的 miRNA 特异文库, 并利用美国 Illumina 公司 HiSeq 2500 测序

平台进行高通量测序,获得原始图像数据。

1.5 miRNA 数据质控及差异表达分析

使用软件 Cutadapt(Version 2.7) 处理测序接头,使用软件 Perl5 (Version 26) 处理掉无单分子标签(unique molecular identifier,UMI)小于 12 bp 的读段(reads)。然后,软件 Bowtie(Version 1.2.2) 软件分别比对到 miRBase 数据库、piRNAbank 数据库、Rfam 数据库,并对比读段进行 miRNA 定量,得到每个样本对应 miRNA 的 UMI 计数,进行合并得到表达矩阵;使用每百万计数值(counts per million,CPM)对定量 UMI 计数进行标准化。CPM 使用 EdgeR 包计算,计算方法如下:

$$CPM_i=\frac{X_i}{N}\cdot10^6$$

i:样本对应第 *i* 个 miRNA;*N*:样本所有 miRNA UMI 计数的总和;*X_i*: 样本对应第 *i* 个 miRNA 的 UMI 计数值。

使用 EdgeR 包计算 CPM 后进行 Log2 处理,对于表达为 0 的 miRNA,EdgeR 包对其进行最小化处理。使用 R 包 EdgeR 对 UMI 计数矩阵,根据分组信息进行表达差异分析,按差异显著性标准(*P*<0.05)筛选检测结果,分析 miRNA 显著性差异表达谱。

1.6 外泌体 miRNA 靶基因 GO 功能富集及 KEGG pathway 分析

使用 miRTarBase 数据库对差异的 miRNA 进行靶基因预测注释。使用 R 包对差异的 miRNA 靶基因进行 GO 功能富集及 KEGG pathway 分析。通过 GO 富集分析发现与 miRNA 差异表达谱靶基因显著相关分子功能(molecular function,MF)、生物过程(biological process,BP) 和细胞组成(cellular component,CC)。通过 KEGG 分析发现与差异表达 miRNA 靶基因富集的分子信号通路。

1.7 统计学处理

采用 GraphPad Prism 软件(8.0 版)进行数据分析,临床病理参数变量采用统计描述,两组计量资料比较采用 *t* 检验,连续变量的组间差异采用非参数检验中曼-惠特尼秩和检验

(Mann-Whitney *U*), 分类变量的组间差异用卡方或 Fisher 精确检验。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 患者临床特征分析及自适应放疗评估

基于患者放疗 0 F 及放疗 20 F 时的 CT 图像进行肿瘤评估,划分为放射敏感组与放射抵抗组,并从中匹配性别、年龄、TNM 分期、病理类型、吸烟史及放疗前初始肿瘤体积均无显著性差异的放射敏感与放射抵抗患者 5 对,5 例放射敏感患者在放疗 20 F 时肿瘤评估达 CR,5 例放射抵抗患者在放疗 20 F 时肿瘤评估为 SD (Table 1)。患者放疗 0 F 及放疗 20 F 时的 CT 图像中(Figure 1),红色勾勒部分为肿瘤评估的靶病灶示例,靶病灶包括可评估的肺部病灶及纵隔淋巴结,放射敏感组的患者放疗 20 F 时肿瘤病灶均较放疗 0 F 时明显缩小,达到 PR,放射抵抗组的患者放疗 20 F 时的肿瘤病灶与放疗 0 F 时比无明显改变,评估为 SD。

2.2 血浆外泌体鉴定

经透射电子显微镜观察到外泌体形态 (Figure 2),外泌体具有膜边界的,呈杯口状结构,NTA 技术检测外泌体的粒径分布(Figure 3),粒径为(71.25±16.92) nm,

Table 1 Clinical characteristics of patients

Characteristic	Radiosensitive group (n=5)	Radioresistant group (n=5)	<i>P</i>
Age(years old)	63~72	60~74	0.80
Gender			>0.99
Male	5	5	
Female	0	0	
Pathological type			>0.99
Squamous cell carcinoma	3	4	
Adenocarcinoma	2	1	
TNM stage			>0.99
III B	5	4	
III C	0	1	
Smoking history			>0.99
Yes	4	5	
No	1	0	
20 F ART			>0.99
Yes	5	5	
No	0	0	
Initial tumor volume(cm ³)	19.82~407.81	46.61~238.53	0.83
Tumor evaluation			0.01
CR/PR	5	0	
SD/PD	0	5	

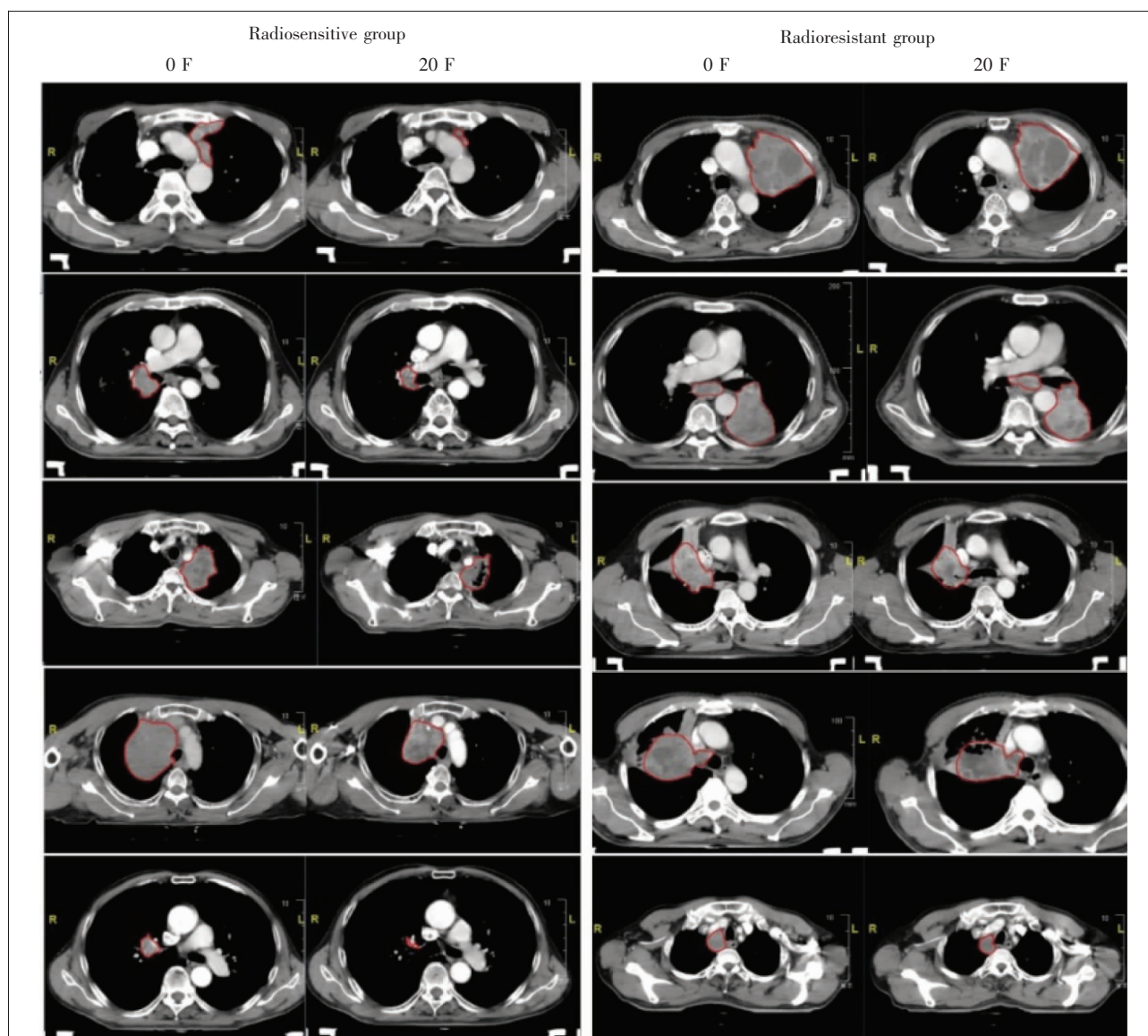


Figure 1 Schematic diagram of tumor evaluation of NSCLC patients

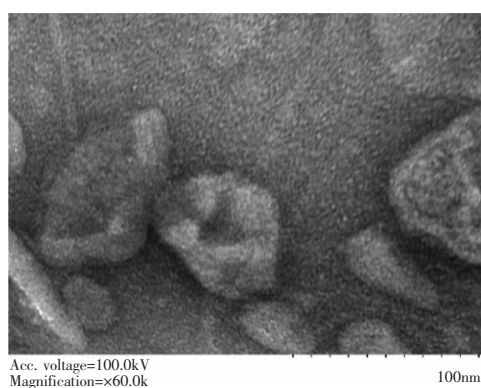


Figure 2 Morphology of exosomes under electron microscope (×1 000)

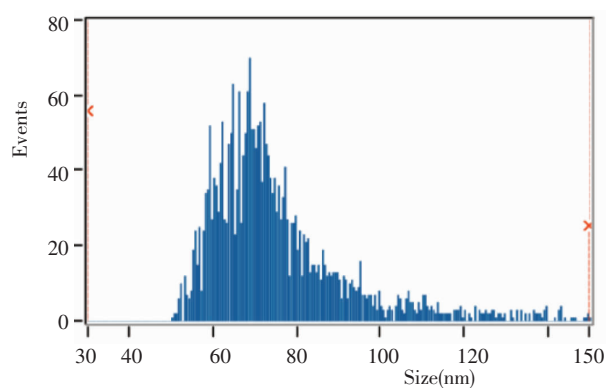


Figure 3 The analysis of exosomes nanometer size

提示成功分离到血浆外泌体。

2.3 外泌体 miRNA 差异表达谱分析

miRNA 差异表达谱发现,在不同放射敏感性Ⅲ期 NSCLC 患者血浆中,有 142 个有意义的差异表达的外泌体 miRNA ($P<0.05$)。在放射抵抗组的患者血浆中,42 个 miRNA 表达下调,100 个 miRNA 表达上调,如热点图和火山图所示(Figure 4)。差异表达倍数 25 倍以上的 miRNA 有 16 个 (Table 2), 2 个 miRNA 下调($\text{Log2FC}\geq 25, P<0.05$), 14 个 miRNA 上调($\text{Log2FC}\leq -2.5, P<0.05$)。

2.4 差异 miRNA 靶基因 GO 功能富集及 KEGG pathway 分析

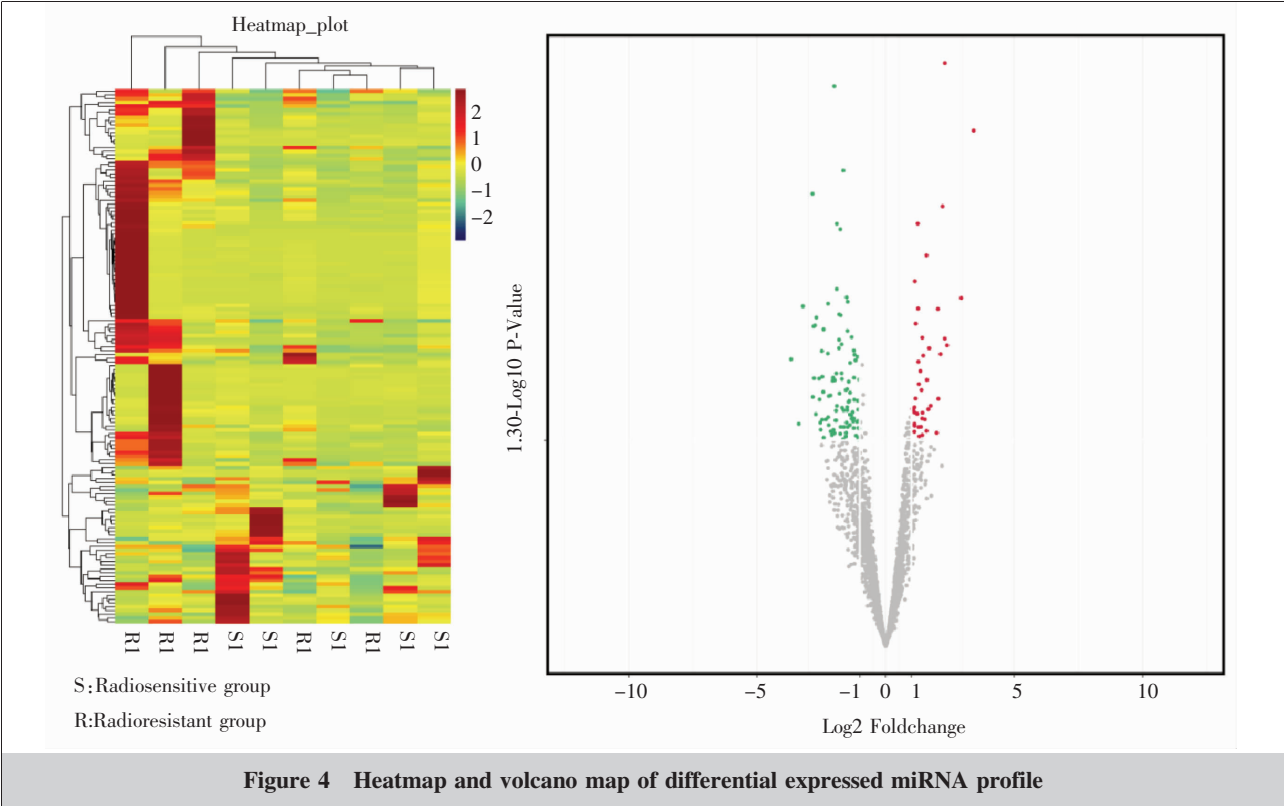
利用 R 语言对差异表达 miRNA 的靶基因进行 GO 分析,根据差异靶基因功能集合绘制,如图 5(Figure 5)所示,这些靶基因主要参与转录激活子活性、泛素连接酶复合物、细胞黏附链接、mRNA 代谢过程、细胞抗氧化应激等细胞生物学调控。如图 6(Figure 6)所示,差异表达 miRNA 的靶基因参与干细胞、细胞周期、衰老等调控,可能通过 TGF- β 信号通路、EMT 相关信号通路,包括 Hedgehog、mTOR、Hippo 信号途径等影响 NSCLC 的发生发展及放射敏感性的调控。

3 讨论

不可切除的局部晚期Ⅲ期 NSCLC 治疗主要选择为以铂类为基础同步放化疗,推荐的放射剂量为 60~70 Gy/30~35 F^[8]。RTOG0617 研究结果显示,标准放化疗组治疗后 2 年的局部失败率为 31%^[9],

Table 2 Significantly differentially expressed exosomal miRNAs

miRNA	Log2FC	P
hsa-miR-10396a-3p	-2.58	0.02
hsa-miR-2117	-2.56	0.03
hsa-miR-3124-5p	-3.21	0.01
hsa-miR-320a-5p	-2.69	0.01
hsa-miR-4514	-2.78	0.02
hsa-miR-4745-3p	-2.75	0.01
hsa-miR-4770	-3.37	0.04
hsa-miR-4797-3p	-2.72	0.03
hsa-miR-550b-3p	-3.68	0.02
hsa-miR-6070	-2.84	0.00
hsa-miR-621	-2.83	0.03
hsa-miR-6514-5p	-2.52	0.04
hsa-miR-8057	-2.53	0.04
hsa-miR-888-3p	-2.79	0.01
hsa-miR-3714	2.94	0.01
hsa-miR-4674	3.43	0.00



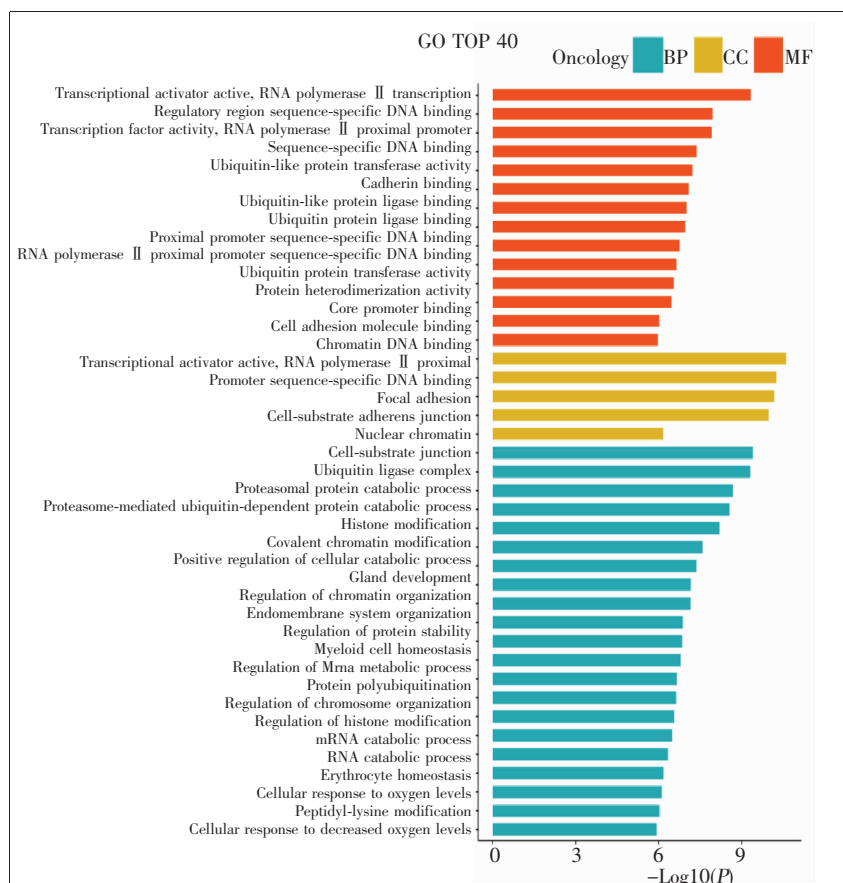


Figure 5 GO enrichment map of differential miRNA-targeted-genes

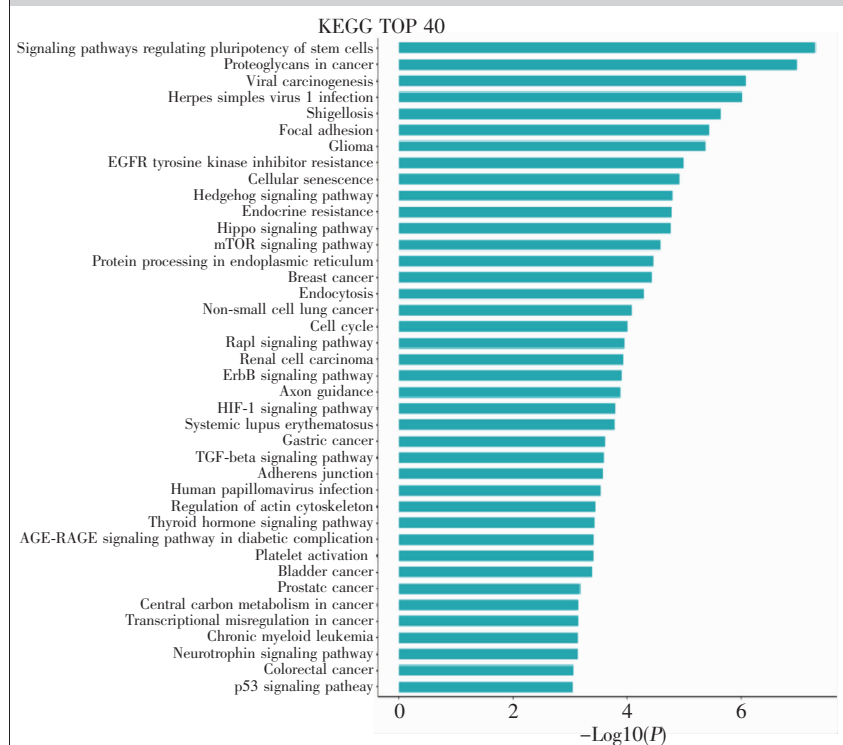


Figure 6 KEGG pathway enrichment of differential miRNA-targeted-genes

局部复发是影响 NSCLC 患者同步放化疗后生存预后的主要因素之一。提升肿瘤靶区治疗剂量能有效提高局部控制率和延长生存期^[10]。虽然靶区剂量的提高可增加局部控制率,但同时增加了周围正常组织的毒性。由于治疗过程中的解剖上变化,如肿瘤消退、肿瘤移位、胸腔积液和/或肺不张,可能导致实际的放射剂量覆盖偏离预定的放疗计划^[11]。放化疗过程中肿瘤消退会导致 GTV 缩小,如果不及时修正放疗计划,则会增加放射性肺炎的发生率^[12]。ART 是在治疗过程中针对肿瘤退缩及周围正常组织的解剖变化来调整优化放疗计划,从而避免对周围危及器官及残留肿瘤的高剂量照射^[13-14]。

NSCLC 患者对放化疗的敏感性存在差异性,同样的治疗剂量和治疗模式,肿瘤发生缩小的时间点及程度不同。我们前期回顾性分析了 2017 年 11 月至 2019 年 3 月不可手术的 III 期 NSCLC 患者 64 例接受自适应推量调强放疗,在完成 42~44 Gy/20 F 放疗时 GTV 体积变化从+10.9%到-91.4%不等,GTV 体积缩小量的中位数为-38.2%^[3]。目前临床无法预测适合在放疗 20 F 时进行肿瘤靶区勾画调整的敏感人群,对所有患者在放疗 20 F 时进行再次胸部增强 CT 影像定位,缺乏人群的个体化选择,不利于优化资源分配。因此,需要寻找高效、易操作、易监测的标志物去筛选适合 ART 的放射敏感人群。EVs 稳定且大量存在于体液包括血液、尿液等中,基于外泌体的液体活检被认可为一种高效的疾病相关循环检测指标^[4,15]。肿瘤细胞来源的 EVs 充当细胞间信息或者生物分子传递的信使,且外泌体的分泌受到放疗等其他干预因素的动态影响^[16]。miRNA 是一种单链非编

码小分子 RNA, 容易在肿瘤组织和循环体液中检测到, 通过调节下游基因表达在多种生物学过程及治疗中发挥重要作用^[17]。EVs 中富含 miRNA, 如 EVs 通过在肿瘤相关成纤维细胞与结直肠癌细胞之间传递 miR-93-5p, 减少放疗损伤, 增加放疗抵抗性^[18]。乏氧的高级别胶质母细胞瘤细胞特异性分泌的 miR-301a 可以通过 EVs 转运到非乏氧细胞中, 从而增强常氧细胞的放疗抵抗能力^[19]。

本研究对接受自适应推量调强放疗的Ⅲ期不可手术 NSCLC 患者放疗 20 F 时进行肿瘤评估, 纳入 5 对放射敏感和放射抵抗患者, 对血浆进行外泌体提取鉴定及 miRNA 高通量测序, 并通过生物信息学统计分析发现, 放射抵抗组中 42 个表达显著性下调的 miRNA 及 100 个显著性上调的 miRNA。后续对差异 miRNA 的靶基因进行分析, GO 功能富集及 KEGG pathway 分析提示相关靶基因分别涉及 RNA 聚合酶、泛素样蛋白转移酶等多种细胞生化代谢途径, 并参与细胞黏附、周期、衰老等多种生物学过程, 通过 TGF- β 信号通路、Hedgehog 信号通路、mTOR 信号通路和 p53 信号通路等调控 NSCLC 的发生发展和放射敏感性。

血浆外泌体 miRNA 是自适应放疗的 NSCLC 患者放射敏感性的潜在标志物。我们将在后续研究中扩大样本验证血浆外泌体 miRNA 差异表达谱, 构建相应的放射敏感性预测模型, 实现对适合 ART 的敏感人群的筛选, 同时基于 GO 功能富集及 KEGG pathway 分析结果对差异 miRNA 进行深入的功能学及机制研究, 以期将来实现放射增敏靶点的开发及临床应用。

参考文献:

- [1] Gaj-Levra N, Borghetti P, Bruni A, et al. Current radiotherapy techniques in NSCLC: challenges and potential solutions [J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2020, 20(5): 387–402.
- [2] Yan D, Vicini F, Wong J, et al. Adaptive radiation therapy [J]. *Phys Med Biol*, 1997, 42(1): 123–132.
- [3] Meng Y, Luo W, Xu H, et al. Adaptive intensity-modulated radiotherapy with simultaneous integrated boost for stage III non-small cell lung cancer: is a routine adaptation beneficial? [J]. *Radiother Oncol*, 2021, 158: 118–124.
- [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] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281–297.
- [6] Sun Y, Hawkins PG, Bi N, et al. Serum microRNA signature predicts response to high-dose radiation therapy in locally advanced non-small cell lung cancer [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2018, 100(1): 107–114.
- [7] Long L, Zhang X, Bai J, et al. Tissue-specific and exosomal miRNAs in lung cancer radiotherapy: from regulatory mechanisms to clinical implications [J]. *Cancer Manag Res*, 2019, 11: 4413–4424.
- [8] Yoon SM, Shaikh T, Hallman M. Therapeutic management options for stage III non-small cell lung cancer [J]. *World J Clin Oncol*, 2017, 8(1): 1–20.
- [9] Bradley JD, Paulus R, Komaki R, et al. Standard-dose versus high-dose conformal radiotherapy with concurrent and consolidation carboplatin plus paclitaxel with or without cetuximab for patients with stage III A or III B non-small-cell lung cancer (RTOG 0617): a randomised, two-by-two factorial phase 3 study [J]. *Lancet Oncol*, 2015, 16(2): 187–199.
- [10] Machtay M, Bae K, Movsas B, et al. Higher biologically effective dose of radiotherapy is associated with improved outcomes for locally advanced non-small cell lung carcinoma treated with chemoradiation: an analysis of the radiation therapy oncology group [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2012, 82(1): 425–434.
- [11] Weiss E, Fatyga M, Wu Y, et al. Dose escalation for locally advanced lung cancer using adaptive radiation therapy with simultaneous integrated volume-adapted boost [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2013, 86(3): 414–419.
- [12] Berkovic P, Paelinck L, Lievens Y, et al. Adaptive radiotherapy for locally advanced non-small cell lung cancer, can we predict when and for whom? [J]. *Acta Oncol*, 2015, 54(9): 1438–1444.
- [13] Moller DS, Holt MI, Alber M, et al. Adaptive radiotherapy for advanced lung cancer ensures target coverage and decreases lung dose [J]. *Radiother Oncol*, 2016, 121(1): 32–38.
- [14] Ramella S, Fiore M, Silipigni S, et al. Local control and toxicity of adaptive radiotherapy using weekly CT imaging: results from the LARTIA trial in stage III NSCLC [J]. *J Thorac Oncol*, 2017, 12(7): 1122–1130.
- [15] Spilak A, Brachner A, Kegler U, et al. Implications and pitfalls for cancer diagnostics exploiting extracellular vesicles [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2021, 175: 113819.
- [16] Jabbari N, Karimipour M, Khaksar M, et al. Tumor-derived extracellular vesicles: insights into bystander effects of exosomes after irradiation [J]. *Lasers Med Sci*, 2020, 35(3): 531–545.
- [17] Korpela E, Vesprini D, Liu SK. MicroRNA in radiotherapy: miRage or miRador? [J]. *Br J Cancer*, 2015, 112(5): 777–782.
- [18] Chen X, Liu J, Zhang Q, et al. Exosome-mediated transfer of miR-93-5p from cancer-associated fibroblasts confer radioresistance in colorectal cancer cells by downregulating FOXA1 and upregulating TGF β 3 [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2020, 39(1): 65.
- [19] Yue X, Lan F, Xia T. Hypoxic glioma cell-secreted exosomal miR-301a activates Wnt/ β -catenin signaling and promotes radiation resistance by targeting TCEAL7 [J]. *Mol Ther*, 2019, 27(11): 1939–1949.