

外泌体在肿瘤体外诊断中的临床研究和应用前景

白跃宗

(上海思路迪生物医学科技有限公司, 上海 200120)

[摘要] 外泌体由于富含生物信息分子, 提供了潜在的生物标志物, 在肿瘤体外诊断中显示出良好的临床应用前景。阐述了外泌体的功能、在体外诊断中的优势及检测方法, 并深入探讨了外泌体在肺癌、肠癌、卵巢癌、胃癌、胰腺癌、膀胱癌、骨与软组织肉瘤等肿瘤体外诊断中的价值和临床获批情况, 展望了外泌体在体外诊断领域的发展趋势。

[关键词] 外泌体; 体外诊断; 癌症诊断; 临床研究

[中图分类号] R730.4

[文献标志码] A

[文章编号] 1001-5094 (2023) 06-0433-09

DOI: 10.20053/j.issn1001-5094.2023.06.005

Clinical Research and Prospective Application of Extracellular Vesicles in Tumor Diagnostics

BAI Yuezhong

(Shanghai 3D Medicine Co., Ltd., Shanghai 200120, China)

[Abstract] Due to the abundance of bioinformatic molecules in exosomes, they provide potential biomarkers and have shown good clinical application prospects in *in vitro* diagnostics of tumors. This paper provides a detailed introduction to the functions of extracellular vesicles, elaborates on their advantages in *in vitro* diagnostics, gives an overview of the detection methods of extracellular vesicles, and delves into the value and clinical approvals of extracellular vesicles in the diagnosis of lung cancer, colorectal cancer, ovarian cancer, gastric cancer, pancreatic cancer, bladder cancer, bone and soft tissue sarcoma, etc., with a prospect of the development trend of extracellular vesicles in the field of *in vitro* diagnostics.

[Key words] exosome; *in vitro* diagnostic; cancer diagnostic; clinical research

作为一种关键的细胞间通信工具, 外泌体因其富含的生物信息分子而受到广泛关注和研究。尤其在肿瘤液体活检领域, 外泌体展现出巨大的发展潜力和应用价值^[1]。目前, 关于外泌体在肿瘤诊断领域的研究成果较多, 为肿瘤的早期诊断和全程管理提供了新的视角和策略。然而, 外泌体研究领域仍有一些争议和待解决的问题, 如最佳的外泌体提取方法、精确定量以及外泌体在不同类型肿瘤中的作用机制等^[2]。本文深入探讨外泌体在肺癌、肠癌、卵巢癌 (ovarian cancer, OC)、胃癌 (gastric cancer, GC)、胰腺癌、膀胱癌 (bladder cancer, BC) 以及骨与软组织肉瘤 (bone and soft tissue sarcomas, BSTS) 等多种肿瘤诊断中的价值和临床批准的相关情况, 发现外泌体在肿瘤早期诊断、疾

病监测和治疗反应评估等方面的潜在价值, 并为外泌体在肿瘤液体活检领域的进一步发展提供参考。

1 外泌体的定义和功能

外泌体是一类直径 30~150 nm 的囊泡, 通过内质网、高尔基体等细胞器形成内质膜囊泡, 并融合至细胞膜释放到细胞外。外泌体可以依据其来源细胞、生物生成途径和功能特性等因素进行分类, 其中功能特性分类方式较为常见, 可进一步细分为外泌小体、微泡等^[3]。外泌体生理功能涉及细胞间通讯、物质转运和细胞功能调节等过程, 内含蛋白质、脂质、核酸 [如信使核糖核酸 (messenger ribonucleic acid, mRNA)、微小核糖核酸 (microRNA, miRNA)、长链非编码核糖核酸 (long non-coding RNA, lncRNA)] 等多种生物活性物质, 其成分特性可反映来源细胞生理及病理状态。外泌体表面表达的特异性标志物主要有 CD9、CD63 和 CD81 等^[4]。

外泌体在多种疾病的发生、发展中具有重要意

接受日期: 2023-05-16

*** 通信作者:** 白跃宗, 博士, 副总裁;

研究方向: 肿瘤的精准诊断;

Tel: 18611103631; **E-mail:** Baiyuezhong@icloud.com

义，其具有以下主要生物学功能：外泌体可携带病源性物质如蛋白质、核酸片段等，参与肿瘤细胞增殖、侵袭、转移和耐药性等病理过程；外泌体可作为细胞间信号传递载体，影响免疫调节、炎症反应和纤溶过程等，进一步影响疾病进程；外泌体中某些特定癌症相关的突变基因、mRNA、非编码RNA等特异性生物标志物可作为疾病诊断的潜在靶点，有助于实现早期、高灵敏度和高特异性的疾病诊断^[5]。

2 外泌体在体外诊断中的优势

体外诊断 (*in vitro* diagnostics, IVD) 是在人体外进行的医学检测，主要通过分析来自人体的生物样本 (如血液、尿液、唾液或组织样本) 以识别或评估特定的健康状况或疾病。在肿瘤诊断领域，体外诊断是一种有效的工具，可以通过检测和分析特定的生物标志物来发现、监测和评估癌症。

国家药品监督管理局 (National Medical Products Administration, NMPA) 定义体外诊断试剂为“直接或间接用于人体样本 (如血液、体液、组织等) 的检测、测定的医疗器械”，这主要包括用于人体疾病诊断或身体状况检测的试剂、试剂盒、校准品及质控品。美国食品和药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 将体外诊断产品定义为“在人体外使用的器械，其目的是用于在样本中寻找来自人体的微量物质或微生物”。这些产品可用于诊断疾病，也可用于预防、监控、筛查或预测疾病的进程或治疗。因此，无论在国内还是国际上，IVD 均被认为是一种重要的医疗检测手段，对于肿瘤的早期发现和管理起关键作用。

外泌体作为一种创新的液体活检技术，在 IVD 中具有独特的优势。

首先，外泌体的小尺寸和多样性表面蛋白质使其能够在体内循环，并在远离来源细胞的位置释放其包含的生物分子 (如核酸、蛋白质等)。这些分子能够反映其母细胞的生理和病理状态，例如肿瘤细胞释放的外泌体中含有特定的肿瘤标志物。因此，外泌体作为一种无创检测方法，避免了传统组织活检等侵入性操作所带来的风险，例如采集尿液可分析泌尿系统疾病，采集脑脊液可分析中枢神经系统

疾病等^[6]。

其次，外泌体中装载的生物分子具有一定的稳定性，能够在体液中存活较长时间。外泌体有双层脂质膜，可以保护内部的生物分子不受外部环境的影响，同时也可以防止这些分子在血液循环中被降解或排泄。此外，有研究表明外泌体中的 RNA 和蛋白质等生物分子可能与外泌体膜上的一些蛋白质、糖基等形成稳定的复合物，也有助于保持这些分子的稳定性^[7]。

此外，外泌体在多种疾病中均具有显著的生物学作用，在相关疾病的早期诊断和预后评估方面具有较大应用潜力。例如，外泌体能够在细胞间传递信号分子、转移 RNA 和蛋白质等生物分子，从而影响受体细胞的生物学行为。在某些疾病中，外泌体可以通过这种方式传递异常的信号分子和突变的 RNA 和 DNA 等生物分子，从而导致疾病的发生和发展。此外，外泌体也参与多种疾病的炎症反应、免疫调节和血管生成等生物学过程^[8]。

3 外泌体检测方法

外泌体的分离方法较多，各具优缺点，其选择可基于不同方法的分离效率、灵敏度、特异性、操作复杂度、花费时间、经济成本以及适用性等多方面进行综合评估。

超速离心被广泛认为是外泌体分离的“金标准”^[9]。该方法依赖于外泌体与其他组分之间的大小和密度差异进行分离。然而，超速离心分离的外泌体的产量和纯度受到转子类型、离心时间和样品黏度等多种因素的影响^[10]。此外，重复的超速离心可能会降低外泌体的产量并对其质量产生负面影响。

基于尺寸的技术，如超滤和顺序过滤也被广泛应用于外泌体的分离。超滤通常作为初始步骤，用于将大量原始材料中的外泌体浓缩为小体积样本，并用于后续的纯化过程^[11]。顺序过滤通常包括 3 个步骤：过滤细胞和细胞残骸、去除游离蛋白并浓缩样本、使用具有特定孔径的滤膜对外泌体进行分选^[12]。

捕获技术与免疫亲和密切相关，常用于生产高纯度的外泌体。磁珠是一种可经过修饰以结合膜表面目标蛋白质的材料，在捕获技术中起核心作

用。外泌体表面含有多种膜蛋白，如 CD9、CD63、ALG-2 交互蛋白 X (ALG-2-interacting protein X, ALIX) 和上皮细胞黏附分子 (epithelial cell adhesion molecule, Ep-CAM)，可以利用抗体包被的磁珠进行富集。然而，基于磁珠的分离策略不适用于大规模的外泌体分离，高昂的成本和低产量限制了其进一步开发和应用^[13]。

沉淀技术主要依赖于使用聚合物来沉淀胞外囊泡，然后再进一步纯化处理。聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 是用于胞外囊泡分离最常用的聚合物，可有效提高外泌体富集度并增加其产量^[14]。然而有报道称这些方法会导致样品中各种污染物，例如非胞外囊泡蛋白的共沉淀^[15]。

微流控系统是分离外泌体与其他纳米级颗粒的理想工具，可实现高速和精确的分离过程。此外，微流控技术还是唯一一种可以连续分离的技术。目前广泛使用的微流控分离外泌体的设备基本都集成了上述多种技术，包括基于外泌体尺寸分离的技术、基于免疫亲和力分离的技术和微流控本身连续动态分离的技术^[16]。

理想的外泌体分离方法应该相对简单、快速、高效、廉价且可扩展，不应该损坏外泌体本身，也不需要太复杂的设备。事实上，不同的方法在效率、重复性和对功能结果的影响方面均有各自的优势和劣势。通过进一步优化分离方案和使用组合的分离技术，可能有助于克服这些劣势，并加速外泌体研究在基础和临床应用中的推进。

4 外泌体在肿瘤体外诊断中的研究进展

4.1 肺癌

肺癌是精准诊断和液体活检的研究热点，特别是如何通过外泌体这一无创检测来实现酪氨酸激酶抑制剂 (TKI) 治疗肺癌的疗效预测和耐药监测。有研究纳入了 52 例肺腺癌患者的样本，对肿瘤组织和恶性胸腔积液 (malignant pleural effusions, MPEs) 中的外泌体进行了突变状态的检测，结果显示利用外泌体进行基因检测的灵敏度为 100%，特异性为 96.55%，一致性为 98.08%；在接受表皮生长因子受体-酪氨酸激酶抑制剂 (EGFR-TKI) 治

疗的患者中，通过外泌体检测到 *EGFR* 突变的患者显示出 83% 的有效率和 100% 的疾病控制率，表明 MPEs 中的外泌体 DNA 可作为肺腺癌中 *EGFR* 检测的有效样本类型^[17]。

由于外泌体脂质双层的性质可以保护 miRNA 免受体液中 RNA 酶的降解，因此外泌体 miRNA 已成为早期诊断和预后判断的无创生物标志物的理想来源。有研究发现，非小细胞肺癌 (NSCLC) 患者的外泌体 miR-21 表达水平较健康者更高，但是单一外泌体 miRNA 检测的特异性不佳，高水平的外泌体 miR-21 也在结直肠癌、乳腺癌和肝癌等其他癌症中被发现^[18]。因此，检测多个外泌体来源 miRNA 可能对 NSCLC 诊断更有价值。有研究显示，miR-21、miR-378、miR-139 和 miR-200 在 NSCLC 患者和健康受试者中表达有差异，这为早期 NSCLC 的诊断提供了更多可选的生物标志物^[19]。

随着肺癌进入免疫治疗时代，已有研究在评估肿瘤源性外泌体中程序性死亡-配体 1 (programmed death-ligand 1, PD-L1) 作为免疫检查点抑制剂 (immune checkpoint inhibitor, ICI) 治疗生物标志物的潜力。有研究者评估了 51 例癌症患者 (40 例为晚期 NSCLC) 肿瘤组织 PD-L1 (tPD-L1) 和血液 PD-L1 (bPD-L1) 之间的相关性，其中 bPD-L1 包括外泌体 PD-L1 mRNA、外泌体 PD-L1 蛋白表达和血浆中的可溶性 PD-L1 蛋白 (sPD-L1)；监测了这些标志物在 ICI 治疗过程中的变化，结果发现，tPD-L1 和 bPD-L1 之间存在正相关，PD-L1 mRNA 的倍数变化为 2.04 及以上和外泌体 PD-L1 蛋白表达的倍数变化为 1.86 及以上的患者有最佳的客观响应率 (ORR) 和总生存率 (OS)^[20]。另一项由 85 例 NSCLC 患者参与的研究发现，与 sPD-L1 不同，外泌体 PD-L1 与 NSCLC 的疾病进展、淋巴结状态、肿瘤大小、转移和分期有关，但外泌体 PD-L1 与肿瘤组织 PD-L1 的免疫组织化学 (IHC) 状态无关^[21]。Okuma 等^[22] 使用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 对 39 例 NSCLC 患者的研究发现，血浆 sPD-L1 水平低的患者中，59% 在免疫治疗后达到了部分或完全响应，而血浆 sPD-L1 水平高的患者中只有 25% 有响应；此外，基线血浆 sPD-L1 水平高的患者中有

75% 快速进展，而基线血浆 sPD-L1 水平低的患者中进展的只占 22%，提示血浆 sPD-L1 可能作为肺癌免疫治疗的新生物标志物。

4.2 卵巢癌

OC、宫颈癌 (CC) 和子宫内膜癌 (EC) 是 3 种最常见的妇科恶性肿瘤，其中 OC 的致死率最高。由于缺乏早期诊断工具，超过 70% 的 OC 患者初诊即晚期，5 年生存率约为 47%^[23]。一项有关 168 例 III~IV 期高级别浆液性卵巢癌 (HGSOC) 患者和 65 名健康受试者对照组的显示，在 HGSOC 患者中 miR-1246、miR-595 和 miR-2278 的表达显著增加，其中 miR-1246 具有最高的检测性能，其诊断灵敏度为 87%，特异性为 77%，准确度为 84%，ROC 曲线下面积 (AUC) 为 0.89^[24]。

外泌体蛋白在 OC 中的临床诊断潜力也有相关研究。一项研究分析了 40 例 III 期或 IV 期 OC 患者的血浆样本和 40 例健康受试者对照组的血浆样本中脂多糖结合蛋白 (LPB)、纤维蛋白原 γ 链 (FGG)、纤维蛋白原 α 链 (FGA) 和凝胶剪切蛋白 (GSN) 在诊断方面的作用，结果显示：在 OC 组中 FGA 和 GSN 水平显著升高，诊断 OC 的 AUC 分别为 0.845 9 (0.760 2~0.931 7, $P < 0.000 1$) 和 0.830 9 (0.734 3~0.927 4, $P < 0.000 1$)，而 FGG 和 LBP 水平显著下调，诊断 OC 的灵敏度为 0.744 7 (0.632 3~0.8571, $P < 0.0001$) 和 0.658 8 (0.538 1~0.779 4, $P < 0.001$)，提示 FGA 在 4 种候选蛋白中具有最高的诊断灵敏度^[25]。一项有关 70 例 OC 患者 (63 例 III~IV 期和 7 例 I~II 期) 和 30 例健康受试者对照组的显示，OC 患者的血浆样本外泌体中人类白细胞抗原 G (HLA-G) 水平增加了将近 7 倍 (平均为 $14.3 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)，而健康对照组为 $1.9 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[26]。

4.3 结直肠癌

研究发现，外泌体具有能够识别癌症个体和确定其组织来源的能力。该研究包含 497 个样本，其中包括 426 个人类样本 (肿瘤样本和正常组织对照样本分别为 275 个和 152 个) 和 71 个小鼠样本 (肿瘤样本和正常组织对照样本分别为 36 个和 35 个)，对所有样本中分离出的外泌体进行了蛋白质组分析，并将其分类为 Exo S (50~70 nm 的胞外囊泡)、Exo L (90

~120 nm 的胞外囊泡) 和 Exo 微粒 ($< 50 \text{ nm}$) 3 个亚组，结果表明，该研究分析能以 100% 的灵敏度和 92% 的特异性区分癌症患者和非癌症患者，并且能够将黑色素瘤、结直肠癌、胰腺癌和肺癌加以区分^[27]。

另外一项包含了健康受试者 (13 例)、腺瘤患者 (25 例) 和 I~IV 期的腺癌患者 (I 期 16 例、II 期 15 例、III 期 16 例、IV 期 15 例) 的研究通过对血清外泌体进行液相色谱-串联质谱分析，鉴定出了谷氨酸-半胱氨酸连接酶调节亚单位 (GCLM)、凯尔血型糖蛋白 (KEL)、载脂蛋白 F (APOF)、补体因子 B (CFB)、cGMP 特异性磷酸二酯酶 (cGMP) 和双功能嘌呤生物合成蛋白 (ATIC) 6 种蛋白质，在对其联合检测下能够将健康对照、腺瘤和腺癌者相互区分^[28]。

分析外泌体中的非编码 RNA 为结直肠癌的诊断和随访提供了一种简单的方法，其中包括 miRNA 和 lncRNA (含 circRNA)。有研究利用多阶段和纵向队列的血液样本进行外泌体内含物分析，鉴定出 EV-miR-320c 为转移性结直肠癌的生物标志物^[29]。对结直肠癌和对照样本进行高通量 RNA 测序分析显示，结直肠癌组 circLPAR1 的表达下调，circLPAR1 是从溶血磷脂酸受体 1 (LPAR1) 基因转录本的外显子 3 和 4 环化生成的 circRNA；结直肠癌患者血浆中外泌体 circLPAR1 的水平随着肿瘤分期上升而显著下降，但在肿瘤切除后又显著升高；这种 circRNA 可能构成结直肠癌诊断的特异性生物标志物^[30]。

4.4 胃癌

在 GC 患者血清中，某些外泌体蛋白、miRNA 和 lncRNA 的表达上调，提示外泌体可能是 GC 的潜在诊断标志物。一项研究纳入了 30 例受试者，其中包括 20 例 GC 患者 (I 期 10 例，II~IV 期 10 例) 和 10 例健康对照，与健康对照相比，20 例 GC 患者胃液来源的外泌体样本中 BarH-like 2 homeobox 蛋白 (BARHL2) 表现出高度甲基化；BARHL2 甲基化区分 GC 和非 GC 样本的 ROC 曲线下面积达到 0.92，检测灵敏度为 90%，特异性为 100%^[31]。这些结果表明，使用胃液分泌的外泌体 DNA 对

BARHL2 进行甲基化分析可用于临床 GC 的早期诊断。

血浆外泌体中的 lncRNA LINC00152 是 GC 的潜在生物标志物。研究发现，血浆和外泌体中 LINC00152 水平无差异，表明 LINC00152 可能稳定存在于血浆中，其能被成功检测出来，可能是因为得到了外泌体脂质双分子层的保护^[32]。研究显示，在 126 例 GC 患者中的血清外泌体 lncRNA HOTTIP 显著高于 120 名正常对照组，提示 HOTTIP 是 GC 的潜在新型诊断和预后生物标志物^[33]。

ICI 为 GC 治疗带来新的希望。然而，由于缺乏适当的生物标志物，GC 免疫疗法难以选择最佳获益人群，所以整体疗效仍然不尽人意。近期的一项研究采集了 112 例接受 ICI 相关治疗的 GC 患者的血浆，分为 3 个队列，并从 42 个关键候选蛋白中识别出 4 种血浆外泌体源性蛋白质（ARG1、CD3、PD-L1、PD-L2），然后将血浆外泌体源性蛋白质构建成一个 EV 评分指标；结果显示，该评分在基线时强有力地预测免疫治疗结果，并可动态监测疾病进展，EV 评分为 1 及以上的 GC 从 ICI 中获得了更多的治疗益处，而 EV 评分小于 1 的 GC 则可能从 ICI 联合人表皮生长因子受体 2（HER2）靶向治疗中获得更多益处^[34]。

4.5 胰腺癌

研究显示，与健康者相比，胰腺癌患者 glypican-1（GPC1）阳性外泌体的比例显著增加，早期胰腺癌患者血清中外泌体 GPC1 水平明显高于健康者，早期胰腺癌的诊断准确率和灵敏度均为 100%^[35]。少数研究则认为 GPC1 可能不是胰腺导管腺癌（PDAC）的理想诊断标志物。对健康者、慢性胰腺炎和 PDAC 患者外泌体中 GPC1 和 miRNA 的比较分析显示，外泌体 miRNA（miR-10b、miR-30c）的表现优于 GPC1，能够更好地区分健康者、慢性胰腺炎和 PDAC 患者^[36]。另一项研究表明，具有高 GPC1 表达的 PDAC 患者存在 GPC1 富集的循环外泌体（cirExos）；然而，cirExos 中的 GPC1 水平不能用于区分 PDAC 和良性胰腺疾病，GPC1 富集的 cirExos 在 PDAC 切除手术后下降，高 cirExos GPC1 水平与肿瘤具有较大相关性，表明 GPC1 可

能与肿瘤负荷有关，可能不是 PDAC 的生物标志物^[37]。尽管如此，更多的研究支持 GPC1 作为 PDAC 细胞来源的外泌体特异性标志物，提示 GPC1 在诊断或预后策略中的实用性值得进一步探讨。

4.6 膀胱癌

目前，诊断 BC 的金标准是膀胱镜检查和组织学评估，早期发现是 BC 诊断和监测的关键，因此无创且灵敏度高的生物标志物亟待开发。一项埃及的研究利用 ELISA 检测了 70 例 BC 患者（包括 T0~T3 阶段）与 12 例健康对照者的尿液和血清样本中肿瘤来源外泌体的水平；结果显示，与健康受试者相比，BC 患者外泌体水平在疾病的不同阶段均有所增加，随着肿瘤浸润程度增加（T0~T3 阶段），血清和尿液中肿瘤来源的外泌体水平也逐渐增加；血清样本外泌体水平检测相较尿液来源检测 BC 的特异性更高（100% vs 83.3%），而尿液样本外泌体水平检测 BC 的灵敏度更佳（92.% vs 82.4%）^[38]。另有研究表明，缺氧 BC 细胞可分泌丰富的 lncRNA UCA1 外泌体来重塑肿瘤微环境，并促进肿瘤的生长和进展，表明血清外泌体 lncRNA UCA1 可能是 BC 的潜在诊断生物标志物^[39]。

一些研究还探讨了外泌体非编码 RNA 在 BC 诊断中的联合应用。例如，基于 3 种血清外泌体 lncRNA（PCAT-1、UBC1 和 SNHG16）组合的诊断模型对于早期 BC 的判断具有高准确性，效能优于尿液细胞学检查的结果^[40]。患有淋巴结转移的 BC 患者预后极差。研究显示，外泌体可作为淋巴系统与 BC 之间的信息传递通道，并通过传递表观遗传信息和遗传信息重塑淋巴系统，淋巴结转移相关转录本 2（LNMAT2）的外泌体 lncRNA 在 BC 患者血清样本中显著升高；此外，与没有淋巴结转移的 BC 患者相比，淋巴结转移 BC 患者的血清外泌体中 LNMAT2 表达水平更高，且血清外泌体 LNMAT2 过表达与 BC 患者短期低生存率相关^[41]。

4.7 骨与软组织肉瘤

间叶组织起源的 BSTS 是一组异质性肿瘤，具有 100 多种组织学亚型，每种 BSTS 组织学亚型均具有特定的核酸或蛋白质特征，可实现肉瘤的分子诊断。尤文肉瘤（Ewing's sarcoma, ES）家族肿

瘤 (Ewing's sarcoma family of tumors, ESFT) 是一组原发性 BSTS, 大多数 ESFT 患者在确诊时已存在微转移病灶。ES 的诊断方法依赖于对肿瘤组织的侵入性切除, 目前临床实践中暂未见液体检测方法用于诊断 ES 和评估微小残留病灶。尤文肉瘤断点区域 1-友病毒白血病整合 1 (Ewing's sarcoma breakpoint region 1-friend leukemia integration 1, EWSR1-FLI1) 可在 ES 细胞中诱导组蛋白甲基转移酶 (enhancer of zeste homolog 2, EZH2) 的表达, EZH2 参与细胞多能性维护和致癌转化, 因此其表达可能与 ES 患者的不良预后相关; 在 ES 患者的血浆外泌体中可检测到 *EZH2* mRNA 表达, 而在健康受试者或其他肉瘤患者中未见^[42]。因此, 检测外泌体可以帮助诊断 ES 并在预测治疗反应和复发方面发挥潜在作用。此外, 通过免疫捕获方法检测 ES 患者的外泌体可以显著提高 *EWSR1-FLI1* 融合转录本的检测灵敏度, 避免患者肿瘤组织 DNA 测序带来的断点误差^[43]。

骨肉瘤 (osteosarcoma, OS) 是骨骼最常见的原发性肿瘤。10%~20% 的 OS 患者初诊即存在转移, 而肺部转移是导致 OS 患者死亡的主要原因; 然而大多数 OS 患者确诊时已有影像学难以检测的微转移病灶, 致 5 年生存率不到 20%^[44]。有研究显示, 70 例 OS 患者外泌体中 PD-L1 水平较健康对照者 (22 例) 更高, AUC 为 0.695 (95% CI: 0.577~0.814); 此外, 肺转移患者外泌体中 PD-L1 水平比未转移的患者更高, 推测 PD-L1 高表达与患者的不良预后相关, 其机制可能与 PD-L1 介导的免疫抑制有关^[45]。

横纹肌肉瘤 (rhabdomyosarcoma, RMS) 起源于具有肌源性分化的原始间叶细胞。RMS 有 2 种主要的组织学亚型: 肺泡型 RMS (alveolar rhabdomyosarcoma, ARMS) 和胚胎型 RMS (embryonal rhabdomyosarcoma, ERMS), 配对框基因-叉头框蛋白 O1 (paired box gene-forkhead box protein O1, PAX-FOXO1) 是 RMS 的特异性分子标志物。近期的一项研究发现, 62% 的转移性 RMS 患者初诊液体活检显示 *PAX-FOXO1* 基因表达也为阳性; 而所有局部进展的 ARMS 患者初诊液体活检显示 *PAX-FOXO1* 基因均为阴性, 表明从外泌体 RNA 中检测

到的 *PAX-FOXO1* 基因融合可能是 RMS 肿瘤特异性生物标志物, 可用于区分 RMS 是否发生转移^[46]。

5 外泌体相关肿瘤诊断标志物的临床获批情况

目前, 外泌体在肿瘤诊断的应用仍处于转化医学研究阶段, 获得监管部门批准和商业应用的产品较少。2016 年, Exosome Diagnostics 公司推出了全球首个外泌体癌症诊断产品 ExoDx Lung (ALK)。该方法敏感且准确, 可以检测出 NSCLC 患者中的 *EML4-ALK* 突变, 达到了 88% 的灵敏度和 100% 的特异性, 提供了比游离细胞 DNA (cell-free DNA, cfDNA) 更敏感的基因融合检测方法^[47]。

此外, ExoDx Prostate IntelliScore (EPI) 也已通过 FDA 认证。该方法检测外泌体中 ETS 相关基因 (ETS-related gene, *ERG*)、前列腺癌基因 3 (prostate cancer gene 3, *PCA3*) 和 SAM 锐角域含有 ETS 转录因子 (SAM pointed domain containing ETS transcription factor, SPDEF) 的 RNA, 并提供外泌体诊断前列腺智能评分 (ExoDx prostate intelliscore, EPI), 用来预测前列腺特异抗原 (prostate specific antigen, PSA) 水平为 $2\sim 10\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的患者是否有可能发展为高级别前列腺癌。根据 ExoDx 的数据显示, 在前瞻性研究中该方法达到了 93% 的灵敏度, 并且当 EPI 阈值为 15.6 时可以帮助临床避免 26% 不必要的穿刺活检。有 3 个独立的前瞻性和多中心临床试验表明, EPI 的表现优于标准方案, 可用于协助早期诊断前列腺癌并避免不必要的前列腺活检^[48]。

2022 年 2 月, 中国 NMPA 授予了上海思路迪生物医学科技有限公司开发的创新产品外泌体卵巢癌辅助诊断试剂盒 (化学发光法) 以优先审批, 同意理由是该产品属于“临床急需, 且在我国尚无同品种产品获准注册的医疗器械”^[49]。

6 结语与展望

近年来, 外泌体技术的研究取得了突破性进展。首先, 在外泌体的分离与纯化方法上, 传统的超速离心法繁琐且效率低下, 新兴的磁性纳米颗粒捕获技术可有效地从生物样本中捕获和分离外泌体, 大大提高了分离纯度和效率。此外, 微流控芯片技

术也为外泌体的高通量分析提供了有力支持,使得从单个外泌体中获得的生物信息更加丰富和精确。其次,在外泌体的检测方法上,科研人员正开展多种新型生物传感器的研究,如表面增强拉曼光谱(SERS)传感器、免疫磁珠检测技术和荧光技术等。这些技术提高了检测灵敏度和特异性,为外泌体的定量分析和生物标志物检测奠定了基础^[50]。然而,尽管这一领域的研究潜力巨大,截至2023年6月,FDA批准的基于外泌体技术的体外诊断产品数量依然非常有限。这一现象的原因有多个方面:首先,外泌体诊断技术仍处于早期发展阶段,许多理论和实践问题尚未完全解决,包括外泌体的分离、纯化和检测技术,以及确保其稳定性和可靠性的问题。其次,外泌体的生物安全性和有效性尚需进行大量

的临床试验验证,这需要大量的时间和资金投入。此外,当前的监管环境也对外泌体产品的市场推广构成挑战,中美监管当局的审批过程严谨,且对新兴技术往往持保守态度。

总的来说,外泌体在肿瘤体外诊断的应用前景广阔,但目前进展较慢,主要由于技术难题、临床试验的长期性以及监管环境的挑战。然而,随着转化医学和临床研究的深入进行,跨学科、产学研之间的紧密合作将为技术创新和应用提供有力保障,外泌体技术在体外诊断领域的应用将得到更快地推进。期待更多基于外泌体的诊断产品通过监管的批准,为肿瘤的临床诊断、治疗及预防提供更加精准和高效的解决方案。

[参考文献]

- [1] Wang X, Xia J, Yang L, *et al.* Recent progress in exosome research: isolation, characterization and clinical applications[J]. *Cancer Gene Ther*, 2023. DOI: 10.1038/s41417-023-00617-y.
- [2] Zhu L, Sun H T, Wang S, *et al.* Isolation and characterization of exosomes for cancer research[J]. *J Hematol Oncol*, 2020, 13(1): 152. DOI: 10.1186/s13045-020-00987-y.
- [3] Kalluri R, LeBleu V S. The biology, function, and biomedical applications of exosomes[J]. *Science*, 2020, 367(6478): eaau6977. DOI: 10.1126/science.aau6977.
- [4] Labani-Motlagh A, Naseri S, Wenthe J, *et al.* Systemic immunity upon local oncolytic virotherapy armed with immunostimulatory genes may be supported by tumor-derived exosomes[J]. *Mol Ther Oncolytics*, 2021, 20: 508–518. DOI: 10.1016/j.omto.2021.02.007.
- [5] Zhang L, Yu D. Exosomes in cancer development, metastasis, and immunity[J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2019, 1871(2): 455–468.
- [6] Yu D, Li Y, Wang M, *et al.* Exosomes as a new frontier of cancer liquid biopsy[J]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1): 56. DOI: 10.1186/s12943-022-01509-9.
- [7] Yu W, Hurlley J, Roberts D, *et al.* Exosome-based liquid biopsies in cancer: opportunities and challenges[J]. *Ann Oncol*, 2021, 32(4): 466–477.
- [8] Hoshino A, Costa-Silva B, Shen T L, *et al.* Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis[J]. *Nature*, 2015, 527(7578): 329–335.
- [9] Iwai K, Minamisawa T, Suga K, *et al.* Isolation of human salivary extracellular vesicles by iodixanol density gradient ultracentrifugation and their characterizations[J]. *J Extracell Vesicles*, 2016, 5: 30829. DOI: 10.3402/jev.v5.30829.
- [10] Jeppesen D K, Hvam M L, Primdahl-Bengtson B, *et al.* Comparative analysis of discrete exosome fractions obtained by differential centrifugation[J]. *J Extracell Vesicles*, 2014, 3: 25011. DOI: 10.3402/jev.v3.25011.
- [11] Haraszi R A, Miller R, Stoppato M, *et al.* Exosomes produced from 3D cultures of MSCs by tangential flow filtration show higher yield and improved activity[J]. *Mol Ther*, 2018, 26(12): 2838–2847.
- [12] Xu R, Greening D W, Zhu H J, *et al.* Extracellular vesicle isolation and characterization: toward clinical application[J]. *J Clin Invest*, 2016, 126(4): 1152–1162.
- [13] Greening D W, Xu R, Ji H, *et al.* A protocol for exosome isolation and characterization: evaluation of ultracentrifugation, density-gradient separation, and immunoaffinity capture methods[J]. *Methods Mol Biol*, 2015, 1295: 179–209. DOI: 10.1007/978-1-4939-2550-6_15.
- [14] Weng Y, Sui Z, Shan Y, *et al.* Effective isolation of exosomes with polyethylene glycol from cell culture supernatant for in-depth proteome profiling[J]. *Analyst*, 2016, 141(15): 4640–4646.

- [15] Soares Martins T, Catita J, Martins Rosa I, *et al.* Exosome isolation from distinct biofluids using precipitation and column-based approaches[J]. *PLoS One*, 2018, 13(6): e0198820. DOI: 10.1371/journal.pone.0198820.
- [16] Salafi T, Zeming K K, Zhang Y. Advancements in microfluidics for nanoparticle separation[J]. *Lab Chip*, 2016, 17(1): 11–33.
- [17] Qu X, Li Q, Yang J, *et al.* Double-stranded DNA in exosomes of malignant pleural effusions as a novel DNA source for *EGFR* mutation detection in lung adenocarcinoma[J]. *Front Oncol*, 2019, 9: 931. DOI: 10.3389/fonc.2021.732743.
- [18] Ma D, Huang C, Zheng J, *et al.* Quantitative detection of exosomal microRNA extracted from human blood based on surface-enhanced Raman scattering[J]. *Biosens Bioelectron*, 2018, 101: 167–173. DOI: 10.1016/j.bios.2017.08.062.
- [19] Wu W, Yu X, Wu J, *et al.* Surface plasmon resonance imaging-based biosensor for multiplex and ultrasensitive detection of NSCLC-associated exosomal miRNAs using DNA programmed heterostructure of Au-on-Ag[J]. *Biosens Bioelectron*, 2021, 175: 112835. DOI: 10.1016/j.bios.2020.112835.
- [20] Yang Q, Chen M, Gu J, *et al.* Novel biomarkers of dynamic blood PD-L1 expression for immune checkpoint inhibitors in advanced non-small-cell lung cancer patients[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 665133. DOI: 10.3389/fimmu.2021.665133.
- [21] Del Re M, Marconcini R, Pasquini G, *et al.* PD-L1 mRNA expression in plasma-derived exosomes is associated with response to anti-PD-1 antibodies in melanoma and NSCLC[J]. *Br J Cancer*, 2018, 118(6): 820–824.
- [22] Okuma Y, Wakui H, Utsumi H, *et al.* Soluble programmed cell death ligand 1 as a novel biomarker for nivolumab therapy for non-small-cell lung cancer[J]. *Clin Lung Cancer*, 2018, 19(5): 410–417.e1. DOI: 10.1016/j.clcc.2018.04.014.
- [23] Siegel R L, Miller K D, Fuchs H E, *et al.* Cancer statistics, 2022[J]. *CA Cancer J Clin*, 2022, 72(1): 7–33.
- [24] Todeschini P, Salviato E, Paracchini L, *et al.* Circulating miRNA landscape identifies miR-1246 as promising diagnostic biomarker in high-grade serous ovarian carcinoma: a validation across two independent cohorts[J]. *Cancer Lett*, 2017, 388: 320–327. DOI: 10.1016/j.canlet.2016.12.017.
- [25] Zhang W, Ou X, Wu X. Proteomics profiling of plasma exosomes in epithelial ovarian cancer: a potential role in the coagulation cascade, diagnosis and prognosis[J]. *Int J Oncol*, 2019, 54(5): 1719–1733.
- [26] Schwich E, Rebmann V, Horn P A, *et al.* Vesicular-bound HLA-G as a predictive marker for disease progression in epithelial ovarian cancer[J]. *Cancers*, 2019, 11(8): 1106. DOI: 10.3390/cancers11081106.
- [27] Hoshino A, Kim H S, Bojmar L, *et al.* Extracellular vesicle and particle biomarkers define multiple human cancers[J]. *Cell*, 2020, 182(4): 1044–1061.
- [28] Chang L C, Hsu Y C, Chiu H M, *et al.* Exploration of the proteomic landscape of small extracellular vesicles in serum as biomarkers for early detection of colorectal neoplasia[J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 732743. DOI: 10.3389/fonc.2021.732743.
- [29] Yang C K, Hsu H C, Liu Y H, *et al.* EV-miRome-wide profiling uncovers miR-320c for detecting metastatic colorectal cancer and monitoring the therapeutic response[J]. *Cell Oncol*, 2022, 45(4): 621–638.
- [30] Zheng R, Zhang K, Tan S, *et al.* Exosomal circLPAR1 functions in colorectal cancer diagnosis and tumorigenesis through suppressing BRD4 via METTL3-eIF3h interaction[J]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1): 49. DOI: 10.1186/s12943-021-01471-y.
- [31] Yamamoto H, Watanabe Y, Oikawa R, *et al.* BARHL2 methylation using gastric wash DNA or gastric juice exosomal DNA is a useful marker for early detection of gastric cancer in an *H. pylori*-independent manner[J]. *Clin Transl Gastroenterol*, 2016, 7(7): e184. DOI: 10.1038/ctg.2016.40.
- [32] Li Q, Shao Y, Zhang X, *et al.* Plasma long noncoding RNA protected by exosomes as a potential stable biomarker for gastric cancer[J]. *Tumor Biol*, 2015, 36(3): 2007–2012.
- [33] Zhao R, Zhang Y, Zhang X, *et al.* Exosomal long noncoding RNA HOTTIP as potential novel diagnostic and prognostic biomarker test for gastric cancer[J]. *Mol Cancer*, 2018, 17(1): 68. DOI: 10.1186/s12943-018-0817-x.
- [34] Zhang C, Chong X, Jiang F, *et al.* Plasma extracellular vesicle derived protein profile predicting and monitoring immunotherapeutic outcomes of gastric cancer[J]. *J Extracell Vesicles*, 2022, 11(4): e12209. DOI: 10.1002/jev2.12209.
- [35] Melo S A, Luecke L B, Kahlert C, *et al.* Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer[J]. *Nature*, 2015,

- 523(7559): 177-182.
- [36] Lai X, Wang M, McElyea S D, *et al.* A microRNA signature in circulating exosomes is superior to exosomal glypican-1 levels for diagnosing pancreatic cancer[J]. *Cancer Lett*, 2017, 393: 86-93. DOI: 10.1016/j.canlet.2017.02.019.
- [37] Frampton A E, Prado M M, López-Jiménez 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.
- [38] Elsharkawi F, Elsabah M, Shabayek M, *et al.* Urine and serum exosomes as novel biomarkers in detection of bladder cancer[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2019, 20(7): 2219-2224.
- [39] Xue M, Chen W, Xiang A, *et al.* Hypoxic exosomes facilitate bladder tumor growth and development through transferring long non-coding RNA-UCA1[J]. *Mol Cancer*, 2017, 16(1): 143. DOI: 10.1186/s12943-017-0714-8.
- [40] Zhang S, Du L, Wang L, *et al.* Evaluation of serum exosomal lncRNA-based biomarker panel for diagnosis and recurrence prediction of bladder cancer[J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(2): 1396-1405.
- [41] Chen C, Luo Y, He W, *et al.* Exosomal long noncoding RNA LNMAT2 promotes lymphatic metastasis in bladder cancer[J]. *J Clin Invest*, 2020, 130(1): 404-421.
- [42] Villasante A, Marturano-Kruik A, Ambati S R, *et al.* Recapitulating the size and cargo of tumor exosomes in a tissue-engineered model[J]. *Theranostics*, 2016, 6(8): 1119-1130.
- [43] Allegretti M, Casini B, Mandoj C, *et al.* Precision diagnostics of Ewing's sarcoma by liquid biopsy: circulating *EWS-FLII* fusion transcripts[J]. *Ther Adv Med Oncol*, 2018, 10: 1758835918774337. DOI: 10.1177/1758835918774337.
- [44] Bacci G, Longhi A, Fagioli F, *et al.* Adjuvant and neoadjuvant chemotherapy for osteosarcoma of the extremities: 27 year experience at Rizzoli institute, Italy[J]. *Eur J Cancer*, 2005, 41(18): 2836-2845.
- [45] Wang J, Zhang H, Sun X, *et al.* Exosomal PD-L1 and N-cadherin predict pulmonary metastasis progression for osteosarcoma patients[J]. *J Nanobiotechnology*, 2020, 18(1): 151. DOI: 10.1186/s12951-020-00710-6.
- [46] Stegmaier S, Sparber-Sauer M, Aakcha-Rudel E, *et al.* Fusion transcripts as liquid biopsy markers in alveolar rhabdomyosarcoma and synovial sarcoma: a report of the Cooperative Weichteilsarkom Studiengruppe (CWS)[J]. *Pediatr Blood Cancer*, 2022, 69(9): e29652. DOI: 10.1002/pbc.29652.
- [47] Castellanos-Rizaldos E, Zhang X, Tadigotla V R, *et al.* Exosome-based detection of activating and resistance *EGFR* mutations from plasma of non-small cell lung cancer patients[J]. *Oncotarget*, 2019, 10(30): 2911-2920.
- [48] McKiernan J, Donovan M J, O'Neill V, *et al.* A novel urine exosome gene expression assay to predict high-grade prostate cancer at initial biopsy[J]. *JAMA Oncol*, 2016, 2(7): 882. DOI: 10.1001/jamaoncol.2016.0097.
- [49] 国家药品监督管理局医疗器械技术审评中心. 医疗器械优先审批申请审核结果公示(2022年第1号)[EB/OL]. (2022-02-07)[2023-04-28]. <https://www.cmde.org.cn/xwdt/zxyw/20220207093200254.html>.
- [50] Yang D, Zhang W, Zhang H, *et al.* Progress, opportunity, and perspective on exosome isolation - efforts for efficient exosome-based theranostics[J]. *Theranostics*, 2020, 10(8): 3684-3707.



【专家介绍】白跃宗：北京大学医学院肿瘤学博士，清华大学经管学院工商管理硕士；思路迪副总裁，战略医学和市场负责人；肿瘤分子诊断产品专家，设计、开发和商业运营了超过 20 个分子检测产品；肿瘤临床转化医学研究专家，主导和参与的相关研究成果已发表 20 余篇 SCI 文章，总影响因子超过 100；医疗行业资深从业者，产品、医学、市场营销等多元团队综合管理者。