

DOI: 10.13376/j.cbbls/2023114

文章编号: 1004-0374(2023)08-1043-09

外泌体源性环状RNA在肺癌病理进程及诊疗中的研究进展

丁庆凯^{1,2,3}, 唐旭东^{1,2,3*}

(1 广东医科大学生物化学与分子生物学研究所, 湛江 524023; 2 广东医科大学抗肿瘤活性物质研发协同创新中心, 湛江 524023; 3 广东医科大学医学技术学院, 东莞 523808)

摘要: 外泌体是具有细胞间信号传递生物学功能的一种脂质双分子层囊泡, 其内包含 RNA、DNA、蛋白质等生物分子, 近年来其在疾病发生发展、早期诊断和治疗等方面的作用被广泛研究。环状 RNA (circular RNA, circRNA) 是一类可以存在于外泌体中的单链闭合环状 RNA。越来越多的研究表明外泌体源性 circRNA 与肺癌的发生发展密切相关, 为了更好地了解外泌体源性 circRNA 在肺癌病理进程中的作用, 本文重点讲述了外泌体源性 circRNA 在肺癌增殖、侵袭与转移、免疫逃逸和耐药中的作用, 以及其在肺癌诊断、预后评估及治疗方面的研究进展。

关键词: 外泌体; circRNA; 肺癌; 病理进程; 诊疗

中图分类号: R734.2 文献标志码: A

Research progress of exosomal circRNAs in the pathological process and diagnosis and treatment of lung cancer

DING Qing-Kai^{1,2,3}, TANG Xu-Dong^{1,2,3*}

(1 Institute of Biochemistry and Molecular Biology, Guangdong Medical University, Zhanjiang 524023, China; 2 Collaborative Innovation Center for Antitumor Active Substance Research and Development, Guangdong Medical University, Zhanjiang 524023, China; 3 School of Medical Technology, Guangdong Medical University, Dongguan 523808, China)

Abstract: Exosomes are lipid bilayer vesicles that transmit intercellular signals and contain biological molecules such as RNAs, DNAs, and proteins. In recent years, extensive researches have focused on the role of exosomes in pathogenesis, early diagnosis, and treatment of diseases. Circular RNAs (circRNAs) are a class of single-stranded and closed circular RNA that can exist in exosomes. Exosomal circRNAs are shown to play a crucial role in the occurrence and development of lung cancer. In this review, we summarize the role of exosomal circRNAs in cell proliferation, invasion, metastasis, immune escape, and drug resistance, as well as recent progress in diagnosis, prognosis assessment and treatment of lung cancer.

Key words: exosome; circRNA; lung cancer; pathological process; diagnosis and treatment

肺癌是中国癌症相关死亡的主要原因^[1]。肺癌包括非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 和小细胞肺癌 (small cell lung cancer, SCLC), 其中 NSCLC 约占 80%。NSCLC 包括肺鳞癌 (lung squamous cell carcinoma, LSCC)、肺腺癌 (lung adenocarcinoma, LUAD)、大细胞肺癌 (large cell lung carcinoma, LCLC) 等。由于肺癌早期症状轻微, 很容易被忽视, 大多数患者确诊肺癌时已是晚期, 预后通常较差, 因此

探寻有效的肺癌早期诊断生物标志物是提高患者生存率的关键。

收稿日期: 2023-04-24; 修回日期: 2023-05-31

基金项目: 广东省普通高校特色创新类项目(自然科学)(2022KTSCX048); 广东省基础与应用基础研究基金自然科学基金项目(2023A1515010103)

*通信作者: E-mail: tangxudong2599@126.com, txd@gdmu.edu.cn; Tel: 0759-2388581

外泌体是具有脂质双分子层的囊泡,其稳定性强,可以保护内容物不被降解,起到信号传递的作用,其常见的内容物有微小RNA (microRNA, miRNA)、长链非编码RNA (long noncoding RNA, lncRNA)等^[2-4]。外泌体形成过程复杂,其形成过程可简单概括为:细胞膜内吞形成内体,内体膜凹陷形成具有腔内囊泡的多囊体,在内体分选复合物等蛋白质的作用下外泌体内容物被包装到腔内囊泡中,腔内囊泡向内出芽形成直径30~150 nm、膜表面具有TSG-101和CD9等特征性蛋白质的微囊泡,即外泌体^[5-6]。外泌体广泛分布于各种体液中,如血液、尿液、精液等一些较易获取的体液^[7-9]。几乎所有的细胞在正常或病理状态下都可以产生外泌体^[10],并且外泌体可以反映来源细胞的状态,因此外泌体及其内容物具有作为疾病诊断标志物的潜力。

环状RNA (circular RNA, circRNA)是由DNA结构中的外显子或内含子转录后反向剪接形成的调控性非编码RNA^[11-12]。根据序列起源, circRNA可以分为三类:外显子 circRNA、内含子 circRNA、外显子-内含子 circRNA^[13]。circRNA的成环机制还不完全清楚,目前主流观点认为主要有以下几种机制:依赖于剪接体的环化、RNA结合蛋白调控的环化以及反向互补配对的内含子促进的环化^[14-15]。circRNA最初被认为是错误剪接的无用产物,随着测序技术以及生物信息学的发展,越来越多的研究表明 circRNA参与正常生理活动,同时也在疾病的发生发展中发挥调控作用^[16]。circRNA可以富集并结合 miRNA 或者直接与 RNA 结合蛋白相互作用进而调控转录或基因表达,此外有研究表明部分 circRNA 具有编码蛋白质的功能^[17]。circRNA 可以被外泌体转运^[18],一些 circRNA 被证明主要存在于外泌体中^[19],且其相比于线性 RNA 没有 5' 帽子结构和 3' 多聚腺苷酸尾,结构更稳定,不会被 RNA 外切酶降解。因此,外泌体源性 circRNA 具有作为疾病早期诊断等生物标志物的潜力。近年已发现外泌体源性 circRNA 在肺癌病理进程及肺癌诊疗中具有重要作用,本文即对近年来此方面的研究进展进行阐述。

1 外泌体源性circRNA在肺癌病理进程中的作用

肺癌进展过程中存在复杂的信号交流网络,肺癌细胞之间、肺癌细胞与健康细胞之间均可以通过直接接触或分泌细胞因子传递信息,还可以通过分泌包装有 miRNA、circRNA 等内容物的外泌体进行

细胞间信号转导。以往的许多研究已证实 circRNA 与肺癌发生发展密切相关,并且不同类型的 circRNA 在肺癌的病理进程中发挥不同的作用。

1.1 外泌体源性circRNA在肺癌增殖、侵袭和转移中的作用

由于基因突变等原因,肺癌细胞的生长不受调控,具有无限增殖的能力,大量消耗人体资源,并且增殖到一定程度后会发生侵袭和转移,最终可能导致患者治疗失败甚至死亡。上皮-间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 是上皮细胞获得间充质特性、细胞失去极性和细胞间连接的过程,参与细胞外基质重塑以及转移前生态位的形成,可以增强癌细胞进入循环系统的能力,与肺癌的转移与侵袭密切相关,它的一个典型特征是细胞中分化标志物表达量的改变,如 N-cadherin 和 Vimentin 表达上调^[20]。最近的研究显示外泌体源性 circRNA 在肺癌细胞增殖、侵袭和转移过程中发挥双向作用。

目前大多数研究发现外泌体源性 circRNA 促进肺癌细胞增殖、转移和侵袭。有研究发现 circSATB2 在肺癌患者血清外泌体中异常表达,外泌体源性 circSATB2 通过结合 miR-326 正向调节肌动蛋白结合蛋白 1 (Fascin actin-bundling protein 1, FSCN1) 的表达,进而促进 NSCLC 细胞的增殖以及正常支气管上皮细胞的异常增殖^[19]。伪足富集的非典型激酶 1 (pseudopodium enriched atypical kinase 1, PEAK1) 是一种非受体酪氨酸激酶^[21],可以促进肺癌侵袭与转移。研究发现,外泌体源性 circSATB2 可以通过结合 miR-330-5p,促进 PEAK1 的表达以及肺癌细胞的增殖、侵袭和转移^[22]。腺嘌呤第 6 位氮原子上的甲基化修饰 (N⁶-methyladenosine, m⁶A) 是真核生物最常见的 mRNA 修饰方式,在各种生理活动中发挥重要作用,其作用受外显子结构的调控^[23]。甲基转移酶样蛋白 3 (methyltransferase like 3, METTL3) 是 m⁶A 甲基化转移酶复合体的核心亚基,其可以通过溶质载体家族 7 成员 11 (solute carrier family 7 member 11, SLC7A11) mRNA 的 m⁶A 修饰促进 LUAD 细胞增殖并抑制铁死亡^[24]。将 NSCLC 细胞与类似细胞系分离的外泌体源性 circVMP1 共培养发现,NSCLC 细胞 EMT 标志蛋白 Vimentin 和 N-cadherin 表达量增加;深入研究发现, circVMP1 通过结合 miR-524-5p 增强 METTL3 和性别决定区 Y 框蛋白 2 (SRY-box transcription factor 2, SOX2) 的表达; SOX2 可以促进肺癌细胞的 EMT,同时 METTL3 可以增强 SOX2 的表达,促进 SOX2 mRNA 的 m⁶A 修饰,提高 SOX2

的稳定性,最终促进 NSCLC 细胞侵袭与转移^[25]。外泌体源性 circ_0007385 可能通过激活 miR-1253/FAM83A 信号通路促进 NSCLC 细胞增殖,增加 NSCLC 细胞干性^[26]。circ-MEMO1 被发现在 NSCLC 组织中表达量升高,其高表达往往预示着 NSCLC 患者预后较差;miRNA-101-3p 通过与 *KRAS* mRNA 的 3'-UTR 结合进而下调 *KRAS* 基因的表达,而外泌体源性 circ-MEMO1 则通过直接结合并负向调节 miRNA-101-3p,进而促进 *KRAS* 基因的表达以及 NSCLC 细胞的增殖、侵袭和转移,抑制 NSCLC 细胞的凋亡^[27]。有研究表明外泌体源性 circCD226 通过充当 miR-1224-3p 海绵促进 NSCLC 的增殖、侵袭和转移^[28]。CD133 是癌症干细胞的表面标志物,将过表达或敲低 circSHKBP1 的外泌体与肺癌细胞共培养,结果表明,外泌体源性 circSHKBP1 增加了 CD133 阳性细胞的百分比,提高了干性相关基因 *SOX2*、*ABCG2*、*NANOG* 和 *Oct4* 的 mRNA 和蛋白质水平,说明外泌体源性 circSHKBP1 可以增强 NSCLC 细胞干性,促进其增殖^[29]。肿瘤血管生成对肿瘤恶性增殖具有重要意义, circ_0006988 可以海绵化 miR-491-5p,导致有丝分裂原活化蛋白激酶激酶 3 (mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase kinase kinase 3, MAPKKK3) 过表达,当敲低或沉默 circ_0006988 时, NSCLC 血管生成减少,并且异种移植肿瘤的生长也受到了抑制^[30]。使用 circ_0014235 过表达载体以及空载体转染肺癌细胞,发现过表达的 circ_0014235 增强了肺癌细胞增殖、侵袭与转移的能力,这可能是通过调控 miR-520a-5p/CDK4 信号通路实现的,表明外泌体源性 circ_0014235 可以促进 NSCLC 细胞的增殖、侵袭与转移^[31]。ATP 结合盒 C 亚家族成员 1 (ATP binding cassette subfamily C member 1, ABCC1) 蛋白与肝癌、肺癌等肿瘤耐药性有关,并且已被证明能够促进 NSCLC 进展^[32-33]。外泌体源性 circ_PIP5K1A 可以富集并结合 miRNA-101,促使 *ABCC1* 基因表达,进而促进 NSCLC 的增殖、侵袭和转移;另外,敲低 circ_PIP5K1A 的外泌体可以抑制 NSCLC 细胞的增殖、侵袭和转移,这或许为 NSCLC 治疗提供了新的思路^[34]。

近年来有少数外泌体源性 circRNA 被证明具有抑制肺癌细胞增殖、侵袭和转移的能力。脂肪间充质干细胞外泌体携带的 circRNA_100395 可以通过下调 miR-141-3p 来增加拉特抑癌基因 2 (large tumor suppressor kinase 2, LATS2) 的表达,进而抑制 Hippo/

YAP 信号通路活性,最终抑制 NSCLC 细胞的增殖、侵袭和转移^[35]。circ-NDUFB2 同样具有抑制肺癌细胞增殖、侵袭和转移的能力,其可以作为支架形成 TRIM2/circNDUFB25/IGF2BPs 复合物,促进 IGF2BPs 蛋白的泛素化和降解,或者通过激活 RIG-I-MAVS 途径将免疫细胞富集到肿瘤微环境中,从而抑制 NSCLC 的生长^[36]。

上述研究结果表明,外泌体源性 circRNA 与肺癌的增殖、侵袭和转移密切相关,而且可在正常细胞癌变以及肺癌细胞增殖、侵袭和转移过程中通过调控癌症相关信号通路发挥两种截然相反的作用。此外,一种 circRNA 可能激活多条信号通路来促进肺癌细胞的增殖、侵袭和转移。但是,目前关于外泌体源性 circRNA 抑制肺癌细胞增殖、侵袭和转移的报道较少,还需要进一步的研究。

1.2 外泌体源性 circRNA 在肺癌免疫逃逸中的作用

免疫逃逸是肺癌病理进程中的重要组成部分,也是肺癌治疗失败的主要原因之一,研究表明外泌体源性 circRNA 在肺癌细胞的免疫逃逸过程中发挥重要作用。例如,一项研究将 NSCLC 细胞来源外泌体、NSCLC 细胞来源 circUSP7 敲低的外泌体以及正常人支气管上皮细胞来源外泌体与 CD8⁺T 细胞共同培养,结果发现,与正常人支气管上皮细胞来源外泌体相比, NSCLC 细胞来源外泌体显著抑制 CD8⁺T 细胞分泌 TNF- α 等细胞因子,而 NSCLC 细胞来源 circUSP7 敲低的外泌体明显减轻了这种抑制作用,表明外泌体源性 circUSP7 可以诱导 CD8⁺T 细胞耗竭,在肺癌免疫逃逸中发挥重要作用;RNA 免疫沉淀和双荧光素酶报告基因实验证实,外泌体源性 circUSP7 通过调控 miRNA-934/SHP2 信号通路来降低 CD8⁺T 细胞活性,改变肿瘤微环境,促进肿瘤细胞免疫逃逸^[11]。干扰素调节因子 4 (IRF4) 已被证明可以促进 CD8⁺T 细胞衰竭和限制记忆 T 细胞发育^[37], LUAD 细胞衍生的外泌体源性 circZNF451 可与脆性 X 相关蛋白 1 (fragile X-related protein-1, FXR1) 和三基序蛋白 56 (tripartite motif-containing 56, TRIM56) 相互作用,在巨噬细胞中形成 FXR1-circZNF451-TRIM56 复合物,其中 circZNF451 作为支架, TRIM56 通过泛素化修饰 RNA 结合蛋白 FXR1 以促进 FXR1 的降解和 ELF4-IRF4 途径的激活,最终重塑免疫抑制肿瘤微环境,促进肿瘤免疫逃逸^[38]。有研究发现,与正常人相比, LUAD 患者血清外泌体中 circRNA-002178 的表达显著升高,并且证实 circRNA-002178 可以促进 LUAD

细胞表面 PD-L1 的表达；此外，circRNA-002178 也可以通过外泌体被递送到 T 细胞内，随后其通过结合 miR-28-5p 促进 T 细胞表面 PD1 的表达，进而诱导 T 细胞衰竭^[39]。

综上，外泌体源性 circRNA 可能通过与 RNA 结合蛋白相互作用或结合 miRNA 进而激活下游信号通路，最终导致 CD8⁺ T 细胞衰竭或重塑肿瘤微环境，在肺癌免疫逃逸中发挥重要作用。这提示外泌体源性 circRNA、相关 RNA 结合蛋白以及下游信号通路是潜在的肺癌治疗靶点。

1.3 外泌体源性 circRNA 在肺癌耐药中的作用

表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂 (epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors, EGFR-TKIs) 早已被用于 EGFR 突变肺癌患者的治疗，并取得了一定的疗效^[40]。但近年研究发现外泌体源性 circRNA_102481 可以通过 miRNA-30a-5p/ROR1 信号通路促进 NSCLC 细胞对 EGFR-TKIs 的耐药性，并且 circRNA_102481 主要由 EGFR-TKIs 耐药肺癌细胞通过外泌体分泌^[41]。外泌体源性 circDNER 被发现在紫杉醇耐药的肺癌细胞中表达增强，通过 RNA 干扰技术减少 circDNER 表达，发现紫杉醇 IC₅₀ 值降低，推测可能的机制是：外泌体源性 circDNER 通过 miR-139-5p/ITGB8 信号通路增强了肺癌细胞对紫杉醇的耐药性，促进了肺癌的进展^[42]。Xie 等^[25] 通过建立小鼠异种移植物模型进行体内实验，研究外泌体源性 circRNA 对肺癌细胞耐药性的影响，结果表明肺癌细胞可以通过外泌体源性 circRNA 传播耐药性。

铁死亡是一种新型的铁依赖性细胞程序性死亡方式，同时伴有脂质过氧化物的积累和抗氧化系统的功能障碍^[43]，最近外泌体源性 circRNA 被发现与肿瘤细胞的铁死亡相关^[44]。例如，LUAD 患者的血浆外泌体源性 circRNA-101093 通过上调脂肪酸结合蛋白 3 (FABP3) 表达来降低花生四烯酸的含量从而减少脂质过氧化，抑制 LUAD 细胞铁死亡，降低铁死亡相关药物的疗效，因此阻断外泌体合成或释放可能有助于 LUAD 的治疗^[45]。

综上所述，外泌体源性 circRNA 参与了肺癌耐药，具有耐药表型的肺癌细胞可以通过外泌体源性 circRNA 向敏感肺癌细胞传播耐药性，可能的机制为外泌体源性 circRNA 通过激活特定信号通路调控耐药相关蛋白的表达介导肺癌细胞耐药，或通过抑制肺癌细胞的铁死亡来增加肺癌细胞对铁死亡药物的耐药性。深入研究外泌体源性 circRNA 介导肺癌

耐药的机制或许对发现新的肺癌治疗靶点具有重要意义。

2 外泌体源性 circRNA 在肺癌诊断、预后以及治疗中的价值

circRNA 是继 miRNA 和 lncRNA 之后新的非编码 RNA 研究热点，而外泌体已被证实可作为寻找 NSCLC 新的诊断和预后生物标志物的工具^[46]。近年来外泌体源性 circRNA 展现出了作为肺癌诊断、预后评估新型生物标志物的潜力。

2.1 外泌体源性 circRNA 在肺癌诊断、预后中的价值

Li 等^[47] 发现 SCLC 患者的血清外泌体源性 circFECR1 表达水平明显高于健康人，并且血清外泌体中低表达 circFECR1 的 SCLC 患者无进展生存率明显高于高表达 circFECR1 的患者，表明外泌体源性 circFECR1 有望用于 SCLC 的诊断、预后评估。

在 LUAD 的诊断及预后评估中，血清外泌体源性 circRNA 可能是一种比血清 circRNA 和传统肿瘤标志物更加可靠的新型生物标志物，分析 LUAD 患者术前术后外泌体源性 circRNA 表达水平的差异，发现术后血清外泌体源性 circ_0001492、circ_0001439 和 circ_0000896 表达量显著下降，通过检测外泌体源性 circRNA 的表达量可能实现 LUAD 的早期诊断和预后评估；采用受试者工作特征曲线 (receiver operating characteristic curve, ROC) 分析外泌体源性 circRNA、血清 circRNA 以及传统肿瘤标志物对 LUAD 的诊断效能，发现外泌体源性 circ_0001439、circ_0001492 和 circ_0000896 的曲线下面积 (area under curve, AUC) 均 >0.75，诊断效能高于血清 circRNA 以及传统肿瘤标志物；更为重要的是，以上三种外泌体源性 circRNA 的组合比单一标志物具有更高的诊断敏感性和特异性，AUC 值为 0.805^[48]。通过 ROC 曲线分析发现，外泌体源性 circRAPGEF5 具有良好的诊断 LUAD 的能力 (临界值 = 11.8978, AUC = 0.847, 敏感性 = 64.90%, 特异性 = 95.60%); 而血清癌胚抗原 (carcinoembryonic antigen, CEA) 的 AUC 为 0.830, 敏感性为 94.40%, 特异性为 57.80%，诊断能力不如外泌体源性 circRAPGEF5^[49]。此外，与单独的血清外泌体源性 circRAPGEF5 和血清 CEA 相比，血清外泌体源性 circRAPGEF5 联合血清 CEA 诊断具有更好的诊断效能。He 等^[50] 发现，血浆外泌体源性 circRNA_0056616 与 LUAD 的淋巴结转移和远处转移密切相

关, 其诊断 LUAD 淋巴结转移的 AUC 值为 0.812, 敏感性和特异性都较高。

外泌体源性 circRNA 与 NSCLC 的早期诊断、预后、转移密切相关。外泌体源性 circRACGAP1 的高表达往往预示着 NSCLC 患者的总生存率较低, 提示外泌体源性 circRACGAP1 可能是 NSCLC 的诊断标志物^[51]。源自血清外泌体的 circPLK1 可能是 NSCLC 的潜在预后标志物, 其表达水平与 NSCLC 患者的预后密切相关, 高表达 circPLK1 的患者总生存期往往短于低表达的患者。采用 ROC 评估外泌体源性 circPLK1 对 NSCLC 的可预测性, AUC 值为 0.866, 对 NSCLC 的预测具有重要意义^[52]。外泌体源性 circ_0048856 对 NSCLC 具有较高的诊断价值, 其诊断 NSCLC 的 AUC 值为 0.943; 在最佳临界值为 1.800 时, 敏感性较高^[53]。有研究发现, 外泌体源性 circPTK2 和 circHIPK3 诊断 NSCLC 转移或分期具有较高的临床特异性和敏感性, 可作为 NSCLC 患者晚期转移的检测生物标志物; 此外, 外泌体源性 circPTK2 和 circHIPK3 可以促进单核细胞性髓源性抑制细胞 (M-MDSC) 极化为 M2 型巨噬细胞, 揭示了 circRNA 与肿瘤相关巨噬细胞 (TAM) 新的互作机制, 该通路可以促进肺癌的免疫抑制, 为肺癌的治疗提供了新的靶点^[54]。经统计学分析发现, 血清外泌体源性 circ_0069313 与 NSCLC 淋巴结转移、远处转移、肿瘤分期之间有较强的相关性 ($P \leq 0.001$); 随后使用 ROC 曲线进一步分析发现, 外泌体源性 circ_0069313 诊断 NSCLC 淋巴结转移、远处转移和分期的 AUC 值分别为 0.688、0.740、0.724, 与其他研究相比 ROC 值较低, 表明外泌体源性 circ_0069313 对诊断恶性 NSCLC 的价值有限, 这可能是由于外泌体源性 circRNA 在诊断疾病方面存在稳定性和一致性差的问题^[55]。

综上所述, 外泌体源性 circRNA 作为肺癌诊断以及预后评估的生物标志物具有较高的特异性与敏感性, 可能优于传统的肺癌诊断标志物, 几种外泌体源性 circRNA 联合诊断或外泌体源性 circRNA 与传统诊断标志物联合诊断的特异性和敏感性可能高于单一外泌体源性 circRNA 或者传统诊断标志物诊断的特异性和敏感性, 并且外泌体源性 circRNA 与肿瘤的分期以及患者的生存期可能具有较强的关联性。但是, 外泌体源性 circRNA 作为肺癌诊断以及预后评估标志物并不是完美的, 通过比对不同研究结果发现有些外泌体源性 circRNA 的诊断价值一般, 表明外泌体源性 circRNA 在肺癌诊断方面可能

存在一致性差的问题。

2.2 外泌体源性 circRNA 在肺癌治疗中的价值

外泌体具有低细胞毒性和低免疫原性, 可以用于向肺癌细胞递送治疗药物。例如, 间充质干细胞来源外泌体可以向 NSCLC 细胞递送 circ_100395, circ_100395 可以通过海绵吸附 miR-141-3p 调控 Hippo/YAP 信号通路来增加 LATS2 的表达从而抑制 NSCLC 的增殖、侵袭与转移^[35]。外泌体工程技术是生命科学领域新的研究热点, 有报道表明利用外泌体装载 circRNA 调节因子并传递至线粒体中, 可促进 M2 型巨噬细胞激活, 进而缓解脓毒症^[56]。以上研究表明, 外泌体源性 circRNA 及其调控因子在肺癌治疗方面可能具有十分广阔的前景。

circRNA 疫苗在新型冠状病毒疫情中受到了较多关注。研究人员通过使用具有编码蛋白质功能的 circRNA 研制出了较 mRNA 疫苗更稳定、效果更持久的新型疫苗, 但其免疫原性较强, 安全性备受争议^[57]。如果使用具有低免疫原性的外泌体装载具有翻译功能的 circRNA, 从而研制外泌体装载的 circRNA 疫苗, 可能更加安全可靠。

减少外泌体中 circRNA 的表达可能有利于肺癌的治疗。有研究表明, 从 circ_0000519 低表达的肺癌细胞中分离外泌体, 注射到小鼠异种移植 NSCLC 模型体内, 结果显示与对照组相比 circ_0000519 低表达的外泌体抑制 NSCLC 细胞的生长, 提示抑制某些外泌体源性 circRNA 的表达可能有益于肺癌的治疗, 为 NSCLC 提供了新的治疗方法^[58]。

此外, 抑制外泌体源性 circRNA 下游致癌基因的表达也许是治疗肺癌的一种新选择。SHP2 已被证明与肺癌细胞的增殖、侵袭、转移有关^[59], 而外泌体源性 circUSP7 通过调控 miRNA-934/SHP2 信号通路来促进肿瘤免疫逃逸^[11]。研究发现, SHP2 抑制剂可以通过抑制 RAS/ERK 信号通路减少 M2 型巨噬细胞的数量, 促进 B 细胞和 T 细胞的浸润, 但只使用 SHP2 抑制剂会导致 NF- κ B 依赖性细胞表面趋化因子受体 2 (CXCR2) 配体的产生进而增加粒细胞髓源性抑制细胞 (G-MDSC) 的数量, 导致 T 细胞功能受到抑制; 而 SHP2 抑制剂和细胞表面趋化因子受体 2 抑制剂联合使用可以阻断 G-MDSC 的迁移, 诱导效应 T 细胞产生高细胞毒活性, 提高 NSCLC 模型的生存率^[60]。外泌体源性 circZNF451 可以通过结合 FXR1 或 TRIM56 激活 ELF4-IRF4 信号通路诱导 LUAD 抗 PD1 耐药, 敲除巨噬细胞中的 ELF4 后发现可以降低该耐药性, 为增强 LUAD 的

免疫治疗效果提供了一种新的策略^[38]。

总之，外泌体源性 circRNA 在治疗肺癌方面展现出了较大的应用潜力，但目前关于外泌体源性 circRNA 应用于肺癌治疗的临床研究较少，大部分只是发现了一些潜在的治疗靶标或提出了新的思路，因此未来有必要进行外泌体源性 circRNA 相关临床研究，从而验证外泌体源性 circRNA 治疗肺癌的潜力。

3 问题与展望

外泌体是细胞间信息传递的载体，circRNA 作为其重要内容物之一，通过多种途径参与肺癌的发生发展。外泌体源性 circRNA 在肺癌的病理进程中发挥重要作用，参与肺癌的增殖、侵袭、转移、免疫逃逸和耐药(图1)。circRNA主要富集在外泌体中，其自身环状结构的稳定性以及外泌体的保护使得外泌体源性 circRNA 很难被降解，而且外泌体源性 circRNA 的种类和表达量变化可以反映肺癌患者健康状况，因此外泌体源性 circRNA 在肺癌的诊断、

预后评估、病程监测等方面具有巨大应用潜力。

尽管相关研究已取得一定进展，但以下问题仍需继续探索。(1) 外泌体提取的质量直接影响后续外泌体源性 circRNA 的研究，是制约外泌体相关研究进展的重要因素。超速离心技术被认为是外泌体分离的“金标准”，但存在工作量大、耗时长、外泌体产量少等缺点。近年来涌现出许多新的外泌体分离方法，如基于铁磁流体力学的分离方法、基于静电吸附的分离方法、切向流过滤技术等，这些新技术通常具有产量高、杂质少等优点，但同样具有不足之处，因此寻找优良的外泌体分离方法助力外泌体源性 circRNA 研究成为亟待解决的问题^[61-63]。(2) 外泌体具有低毒性和低免疫原性，是一种良好的药物载体，但如何确保外泌体的靶向性是开发外泌体疗法面临的一大难题。较早的研究发现通过检测肿瘤外泌体表面整合素的表达可以预测肿瘤转移的器官^[64]，而2023年 Grigoryeva 等^[65]的研究证实，乳腺癌细胞来源表面高表达整合素 $\beta 4$ 的外泌体与乳腺癌细胞肺转移密切相关，并且在转移前生态位

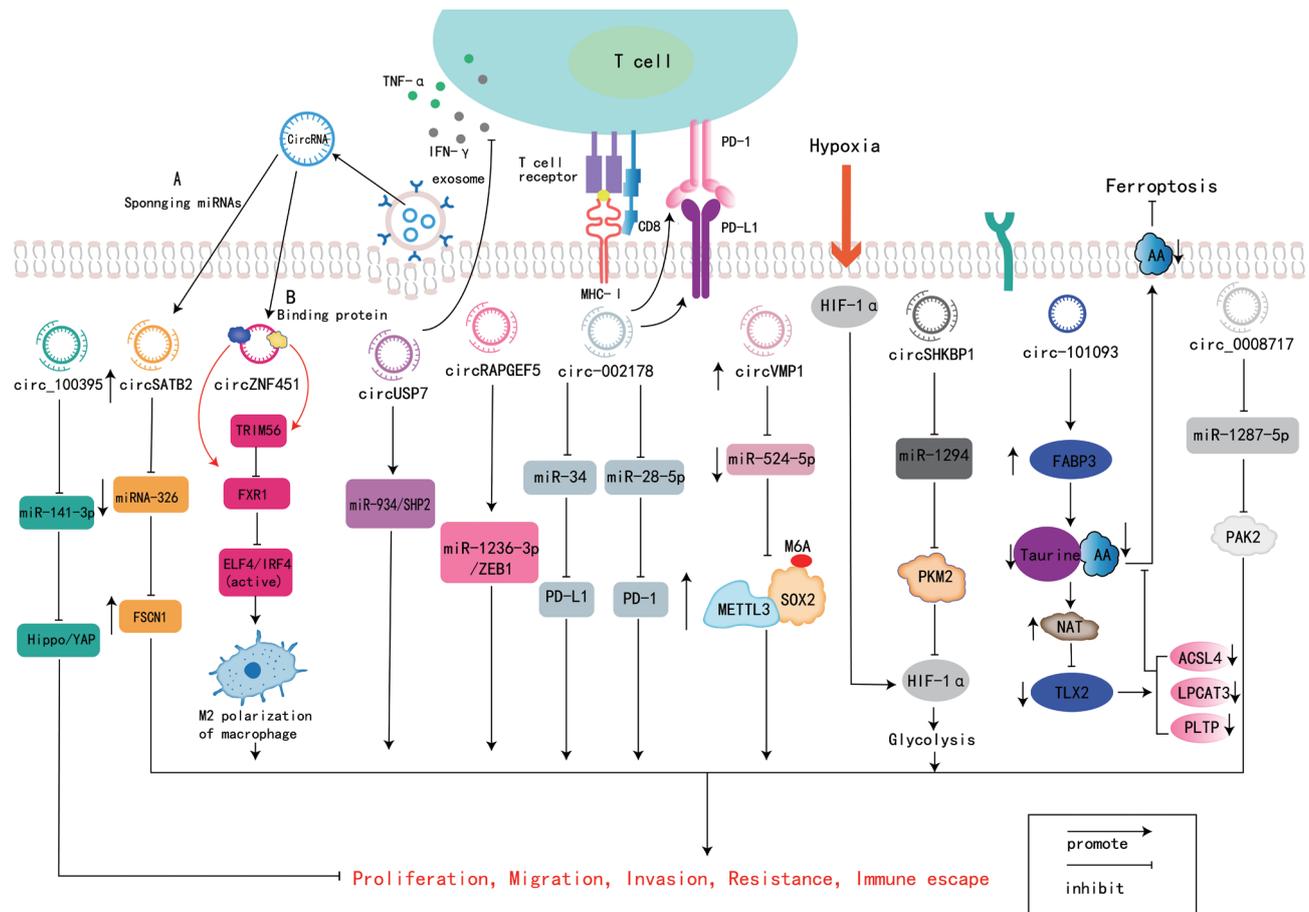


图1 外泌体源性circRNA在肺癌病理进程中的作用

的形成方面发挥重要作用。此外,近年来具有编码功能的 circRNA 相关肿瘤疫苗的可行性得到了证实^[66]。因此,通过修饰外泌体表面的整合素同时装载抑制性的 circRNA 或药物来靶向治疗肺癌以及研发外泌体源性 circRNA 疫苗成为可能,这或许为今后外泌体源性 circRNA 应用于肺癌的治疗提供了研究方向。(3) 外泌体源性 circRNA 作为一种新的调控性非编码 RNA, 与其他非编码 RNA 互作的机制还有待于进一步研究。目前的研究大多只针对一种外泌体源性 circRNA 调控一种 miRNA, 但外泌体源性 circRNA 与 lncRNA、piwi 相互作用小 RNA (piRNA) 等非编码 RNA 是否存在相互作用, 以及外泌体源性 circRNA 调控的 miRNA 是否会影响其他非编码 RNA, 均未有详细报道。(4) 有研究报道外泌体源性 circRNA 是比 circRNA 以及传统肿瘤标志物更加优良的生物标志物, 多种外泌体源性 circRNA 联合诊断肺癌比单一标志物具有更高的特异性和敏感性^[48]。另有研究显示, 多种不同水平的生物标志物联合诊断具有比单一生物标志物更高的特异性和敏感性^[67]。今后或许可以通过整合外泌体源性 circRNA 与其他水平(基因组学、转录组学、蛋白质组学等)的检测, 提高外泌体源性 circRNA 在肺癌诊断、预后方面的准确性。(5) 外泌体源性 circRNA 作为肺癌诊断以及预后标志物的研究处于起步阶段, 目前仍没有标准化的特异性外泌体源性 circRNA。此外, 外泌体源性 circRNA 应用于肺癌临床诊疗仍存在许多问题与挑战: 工程化外泌体已成为近年来的研究热点, 目前已有使用外泌体装载 circRNA 调控因子缓解脓毒症^[56]的报道, 利用外泌体工程技术针对 circRNA 及其调控因子进行肺癌的治疗具备了理论上的可行性, 除修饰外泌体表面整合素外, 如何确保 circRNA 的靶向性是一大难题; 由于外泌体源性 circRNA 在体液中的丰度较低, 加之目前没有完美的外泌体提取方法, 外泌体源性 circRNA 在临床上的应用可能会受到阻碍; 此外, 由于 circRNA 参与多种重要的生理和病理过程, 外泌体源性 circRNA 疗法是否具有潜在的副作用还不得而知。(6) 随着测序技术以及生物信息学的发展, 未来也许可以通过绘制不同患者体内的外泌体源性 circRNA 表达谱来制定个性化治疗方案, 从而促进精准医学的发展。

[参 考 文 献]

- [1] Xia C, Dong X, Li H, et al. Cancer statistics in China and United States, 2022: profiles, trends, and determinants. *Chin Med J (Engl)*, 2022, 135: 584-90
- [2] Mo Y, Leung LL, Mak CSL, et al. Tumor-secreted exosomal miR-141 activates tumor-stroma interactions and controls premetastatic niche formation in ovarian cancer metastasis. *Mol Cancer*, 2023, 22: 4
- [3] Ban J, Liu F, Zhang Q, et al. Macrophage-derived exosomal lncRNA MSTRG.91634.7 inhibits fibroblasts activation by targeting PINK1 in silica-induced lung fibrosis. *Toxicol Lett*, 2023, 372: 36-44
- [4] Chen C, Liu Y, Liu L, et al. Exosomal circTUBGCP4 promotes vascular endothelial cell tipping and colorectal cancer metastasis by activating Akt signaling pathway. *J Exp Clin Cancer Res*, 2023, 42: 46
- [5] Ghossoub R, Chéry M, Audebert S, et al. Tetraspanin-6 negatively regulates exosome production. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2020, 117: 5913-22
- [6] Lu Q, Qin H, Tan H, et al. Senescence osteoblast-derived exosome-mediated miR-139-5p regulates endothelial cell functions. *Biomed Res Int*, 2021, 2021: 5576023
- [7] Jakubec M, Maple-Grødem J, Akbari S, et al. Plasma-derived exosome-like vesicles are enriched in lysophospholipids and pass the blood-brain barrier. *PLoS One*, 2020, 15: e0232442
- [8] Kohaar I, Chen Y, Banerjee S, et al. A urine exosome gene expression panel distinguishes between indolent and aggressive prostate cancers at biopsy. *J Urol*, 2021, 205: 420-5
- [9] Bai R, Latifi Z, Kusama K, et al. Induction of immune-related gene expression by seminal exosomes in the porcine endometrium. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 495: 1094-101
- [10] Song Z, Mao J, Barrero RA, et al. Development of a CD63 aptamer for efficient cancer immunochemistry and immunoaffinity-based exosome isolation. *Molecules*, 2020, 25: 5585
- [11] Chen SW, Zhu SQ, Pei X, et al. Cancer cell-derived exosomal circUSP7 induces CD8⁺ T cell dysfunction and anti-PD1 resistance by regulating the miR-934/SHP2 axis in NSCLC. *Mol Cancer*, 2021, 20: 144
- [12] Hossain MT, Zhang J, Reza MS, et al. Reconstruction of full-length circRNA sequences using chimeric alignment information. *Int J Mol Sci*, 2022, 23: 6776
- [13] Wang C, Liu WR, Tan S, et al. Characterization of distinct circular RNA signatures in solid tumors. *Mol Cancer*, 2022, 21: 63
- [14] Knupp D, Cooper DA, Saito Y, et al. NOVA2 regulates neural circRNA biogenesis. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49: 6849-62
- [15] Qi Y, Han W, Chen D, et al. Engineering circular RNA regulators to specifically promote circular RNA production. *Theranostics*, 2021, 11: 7322-36
- [16] Ai K, Yi L, Wang Y, et al. CircRNA_33702 promotes renal fibrosis by targeting the miR-29b-3p/WNT1-inducibile signaling pathway protein 1 pathway. *J Pharmacol Exp Ther*, 2023, 384: 61-71
- [17] Deng Y, Zeng X, Lv Y, et al. Cdy12-60aa encoded by

- circCDYL2 accelerates cardiomyocyte death by blocking APAF1 ubiquitination in rats. *Exp Mol Med*, 2023, 55: 860-9
- [18] Wang W, Sun H, Ma X, et al. Circ_0002476 regulates cell growth, invasion, and mtDNA damage in non-small cell lung cancer by targeting miR-1182/TFAM axis. *Thorac Cancer*, 2022, 13: 2867-78
- [19] Zhang N, Nan A, Chen L, et al. Circular RNA circSATB2 promotes progression of non-small cell lung cancer cells. *Mol Cancer*, 2020, 19: 101
- [20] Kim BN, Ahn DH, Kang N, et al. TGF- β induced EMT and stemness characteristics are associated with epigenetic regulation in lung cancer. *Sci Rep*, 2020, 10: 10597
- [21] Geng Q, Li Z, Li X, et al. LncRNA NORAD, sponging miR-363-3p, promotes invasion and EMT by upregulating PEAK1 and activating the ERK signaling pathway in NSCLC cells. *J Bioenerg Biomembr*, 2021, 53: 321-32
- [22] Zhu J, Wang F, Weng Y, et al. Exosome-delivered circSATB2 targets the miR-330-5p/PEAK1 axis to regulate proliferation, migration and invasion of lung cancer cells. *Thorac Cancer*, 2022, 13: 3007-17
- [23] He PC, Wei J, Dou X, et al. Exon architecture controls mRNA m⁶A suppression and gene expression. *Science*, 2023, 379: 677-82
- [24] Xu Y, Lv D, Yan C, et al. METTL3 promotes lung adenocarcinoma tumor growth and inhibits ferroptosis by stabilizing SLC7A11 m⁶A modification. *Cancer Cell Int*, 2022, 22: 11
- [25] Xie H, Yao J, Wang Y, et al. Exosome-transmitted circVMP1 facilitates the progression and cisplatin resistance of non-small cell lung cancer by targeting miR-524-5p-METTL3/SOX2 axis. *Drug Deliv*, 2022, 29: 1257-71
- [26] Ning Z, Tian Y, Li Y, et al. Exosomal circ_0007385 enhances non-small cell lung cancer cell proliferation and stemness via regulating miR-1253/FAM83A axis. *Anticancer Drugs*, 2022, 33: 61-74
- [27] Ding C, Xi G, Wang G, et al. Exosomal circ-MEMO1 promotes the progression and aerobic glycolysis of non-small cell lung cancer through targeting miR-101-3p/KRAS axis. *Front Genet*, 2020, 11: 962
- [28] Peng L, Cao Y, Hu C. Identification of exosomal circRNA CD226 as a potent driver of nonsmall cell lung cancer through miR-1224-3p/high mobility group AT-hook 2 axis. *Anticancer Drugs*, 2022, 33: 1126-38
- [29] Chen W, Tang D, Lin J, et al. Exosomal circSHKBP1 participates in non-small cell lung cancer progression through PKM2-mediated glycolysis. *Mol Ther Oncolytics*, 2022, 24: 470-85
- [30] Yang C, Shi J, Wang J, et al. Circ_0006988 promotes the proliferation, metastasis and angiogenesis of non-small cell lung cancer cells by modulating miR-491-5p/MAP3K3 axis. *Cell Cycle*, 2021, 20: 1334-46
- [31] Xu X, Tao R, Sun L, et al. Exosome-transferred hsa_circ_0014235 promotes DDP chemoresistance and deteriorates the development of non-small cell lung cancer by mediating the miR-520a-5p/CDK4 pathway. *Cancer Cell Int*, 2020, 20: 552
- [32] Chang YS, Su CW, Chen SC, et al. Upregulation of USP22 and ABCC1 during sorafenib treatment of hepatocellular carcinoma contribute to development of resistance. *Cells*, 2022, 11: 634
- [33] Chu D, Li P, Li Y, et al. Identification of circ_0058357 as a regulator in non-small cell lung cancer cells resistant to cisplatin by miR-361-3p/ABCC1 axis. *Thorac Cancer*, 2021, 12: 2894-906
- [34] Shao N, Song L, Sun X. Exosomal circ_PIP5K1A regulates the progression of non-small cell lung cancer and cisplatin sensitivity by miR-101/ABCC1 axis. *Mol Cell Biochem*, 2021, 476: 2253-67
- [35] Zhang C, Cao J, Lv W, et al. CircRNA_100395 carried by exosomes from adipose-derived mesenchymal stem cells inhibits the malignant transformation of non-small cell lung carcinoma through the miR-141-3p-LATS2 axis. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 663147
- [36] Li B, Zhu L, Lu C, et al. CircNDUFB2 inhibits non-small cell lung cancer progression via destabilizing IGF2BPs and activating anti-tumor immunity. *Nat Commun*, 2021, 12: 295
- [37] Man K, Gabriel SS, Liao Y, et al. Transcription factor IRF4 promotes CD8⁺ T cell exhaustion and limits the development of memory-like T cells during chronic infection. *Immunity*, 2017, 47: 1129-41
- [38] Gao J, Ao YQ, Zhang LX, et al. Exosomal circZNF451 restrains anti-PD1 treatment in lung adenocarcinoma via polarizing macrophages by complexing with TRIM56 and FXR1. *J Exp Clin Cancer Res*, 2022, 41: 295
- [39] Wang J, Zhao X, Wang Y, et al. CircRNA-002178 act as a ceRNA to promote PDL1/PD1 expression in lung adenocarcinoma. *Cell Death Dis*, 2020, 11: 32
- [40] Pan Z, Wang K, Wang X, et al. Cholesterol promotes EGFR-TKIs resistance in NSCLC by inducing EGFR/Src/Erk/SP1 signaling-mediated ERR α re-expression. *Mol Cancer*, 2022, 21: 77
- [41] Yang B, Teng F, Chang L, et al. Tumor-derived exosomal circRNA_102481 contributes to EGFR-TKIs resistance via the miR-30a-5p/ROR1 axis in non-small cell lung cancer. *Aging (Albany NY)*, 2021, 13: 13264-86
- [42] Li J, Zhu T, Weng Y, et al. Exosomal circDNER enhances paclitaxel resistance and tumorigenicity of lung cancer via targeting miR-139-5p/ITGB8. *Thorac Cancer*, 2022, 13: 1381-90
- [43] Wang D, Liang W, Huo D, et al. SPY1 inhibits neuronal ferroptosis in amyotrophic lateral sclerosis by reducing lipid peroxidation through regulation of GCH1 and TFR1. *Cell Death Differ*, 2023, 30: 369-82
- [44] Chen J, Li X, Liu H, et al. Bone marrow stromal cell-derived exosomal circular RNA improves diabetic foot ulcer wound healing by activating the nuclear factor erythroid 2-related factor 2 pathway and inhibiting ferroptosis. *Diabet Med*, 2023, 40: e15031
- [45] Zhang X, Xu Y, Ma L, et al. Essential roles of exosome and circRNA_101093 on ferroptosis desensitization in lung adenocarcinoma. *Cancer Commun (Lond)*, 2022, 42:

- 287-313
- [46] Duréndez-Sáez E, Calabuig-Fariñas S, Torres-Martínez S, et al. Analysis of exosomal cargo provides accurate clinical, histologic and mutational information in non-small cell lung cancer. *Cancers (Basel)*, 2022, 14: 3216
- [47] Li L, Li W, Chen N, et al. FLI1 exonic circular RNAs as a novel oncogenic driver to promote tumor metastasis in small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*, 2019, 25: 1302-17
- [48] Kang Y, You J, Gan Y, et al. Serum and serum exosomal circRNAs hsa_circ_0001492, hsa_circ_0001439, and hsa_circ_0000896 as diagnostic biomarkers for lung adenocarcinoma. *Front Oncol*, 2022, 12: 912246
- [49] Zhou H, Huang X, Yang X, et al. CircRAPGEF5 promotes the proliferation and metastasis of lung adenocarcinoma through the miR-1236-3p/ZEB1 axis and serves as a potential biomarker. *Int J Biol Sci*, 2022, 18: 2116-31
- [50] He F, Zhong X, Lin Z, et al. Plasma exo-hsa_circRNA_0056616: a potential biomarker for lymph node metastasis in lung adenocarcinoma. *J Cancer*, 2020, 11: 4037-46
- [51] Xiong H, Liu B, Liu XY, et al. Circ_rac GTPase-activating protein 1 facilitates stemness and metastasis of non-small cell lung cancer via polypyrimidine tract-binding protein 1 recruitment to promote sirtuin-3-mediated replication timing regulatory factor 1 deacetylation. *Lab Invest*, 2023, 103: 100010
- [52] Li C, Wang G, Ma X, et al. Upregulation of exosomal circPLK1 promotes the development of non-small cell lung cancer through the miR-1294/ high mobility group protein A1 axis. *Bioengineered*, 2022, 13: 4185-200
- [53] He Y, Liu Y, Cha N, et al. Exosomal circ_0048856 derived from non-small cell lung cancer contributes to aggressive cancer progression through downregulation of miR-1287-5p. *Pathol Res Pract*, 2022, 232: 153659
- [54] Katopodi T, Petanidis S, Domvri K, et al. Kras-driven intratumoral heterogeneity triggers infiltration of M2 polarized macrophages via the circHIPK3/PTK2 immunosuppressive circuit. *Sci Rep*, 2021, 11: 15455
- [55] Chen Y, Lou C, Ma X, et al. Serum exosomal hsa_circ_0069313 has a potential to diagnose more aggressive non-small cell lung cancer. *Clin Biochem*, 2022, 102: 56-64
- [56] Fan L, Yao L, Li Z, et al. Exosome-based mitochondrial delivery of circRNA mSCAR alleviates sepsis by orchestrating macrophage activation. *Adv Sci (Weinh)*, 2023, 10: e2205692
- [57] Qu L, Yi Z, Shen Y, et al. Circular RNA vaccines against SARS-CoV-2 and emerging variants. *Cell*, 2022, 185: 1728-44
- [58] Wang R, Liu H, Dong M, et al. Exosomal hsa_circ_0000519 modulates the NSCLC cell growth and metastasis via miR-1258/RHOV axis. *Open Med (Wars)*, 2022, 17: 826-40
- [59] Wang LN, Zhang ZT, Wang L, et al. TGF- β 1/SH2B3 axis regulates anoikis resistance and EMT of lung cancer cells by modulating JAK2/STAT3 and SHP2/Grb2 signaling pathways. *Cell Death Dis*, 2022, 13: 472
- [60] Tang KH, Li S, Khodadadi-Jamayran A, et al. Combined inhibition of SHP2 and CXCR1/2 promotes antitumor T-cell response in NSCLC. *Cancer Discov*, 2022, 12: 47-61
- [61] Liu Y, Zhao W, Cheng R, et al. Label-free ferrohydrodynamic separation of exosome-like nanoparticles. *Lab Chip*, 2020, 20: 3187-201
- [62] Chen W, Xie Y, Chang Y, et al. A portable device for simple exosome separation from biological samples. *Micromachines (Basel)*, 2021, 12: 1182
- [63] Kim JY, Rhim WK, Yoo YI, et al. Defined MSC exosome with high yield and purity to improve regenerative activity. *J Tissue Eng*, 2021, 12: 20417314211008626
- [64] Hoshino A, Costa-Silva B, Shen TL, et al. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature*, 2015, 527: 329-35
- [65] Grigoryeva ES, Tashireva LA, Savelieva OE, et al. The association of integrins β 3, β 4, and α V β 5 on exosomes, CTCs and tumor cells with localization of distant metastasis in breast cancer patients. *Int J Mol Sci*, 2023, 24: 2929
- [66] Li H, Peng K, Yang K, et al. Circular RNA cancer vaccines drive immunity in hard-to-treat malignancies. *Theranostics*, 2022, 12: 6422-36
- [67] Gulati S, Martinez P, Joshi T, et al. Systematic evaluation of the prognostic impact and intratumour heterogeneity of clear cell renal cell carcinoma biomarkers. *Eur Urol*, 2014, 66: 936-48