

医学参考报

放射医学与防护专刊

Radiological Medicine and Protection

第四期 NO.04

执行主编简介



何宁宁 副研究员

博士，中国医学科学院放射医学研究所，主要从事干细胞及外泌体对于肿瘤辐射增敏和辐射损伤修复方面的研究。作为项目负责人先后承担国家自然科学基金青年基金项目和面上项目、天津市自然科学基金青年项目、协和青年教师项目。获得2017年度天津市“131”创新型人才培养工程第三层次人才。发表了一系列关于干细胞方面的科研论文，以第一作者在 *Biomaterials*、*Antioxid Redox Signal*、*Cell Death Dis*、*Stem Cell Research & Therapy* 等国际学术期刊发表SCI论文9篇，申请专利2项。

导读

低剂量率辐射诱导的TGF- β 3分泌联合小细胞外囊泡中的激活剂通过结合ALK1调节低剂量高放射敏感性

2版

作为辐射暴露检测标志物的尿液细胞外囊泡分离的优化方法

3版

细胞外囊泡在鼻咽癌进展和治疗抵抗中的作用

4版

小鼠间充质干细胞来源的外泌体miR-466f-3p在辐射诱导的肺损伤中通过c-MET抑制AKT/GSK3 β 通路逆转EMT过程

5版

肿瘤相关巨噬细胞来源的hsa_circ_0001610通过外泌体转运降低子宫内膜癌的放射敏感性

6版

工程化细胞外囊泡对辐射引发的胶质母细胞瘤免疫检查点抑制作用

7版

外泌体在放射损伤治疗中的作用

8版

辐照后垂死肿瘤细胞外泌体中的 MiR-26b-5p 通过促进肿瘤微环境增强食管鳞状细胞癌的转移

【据《Cancer Letters》2022年1月报道】题：辐照后垂死肿瘤细胞外泌体中的MiR-26b-5p通过促进肿瘤微环境增强食管鳞状细胞癌的转移[中国山东第一医科大学(山东省医学科学院)附属肿瘤医院 作者 Xiaoyang Yin 等]

放射治疗是治疗食管鳞状细胞癌(ESCC)的主要手段之一,是治疗食管癌的一种高效方法。然而,有文献表明,放疗可能适得其反地促进癌细胞的转移和侵袭。放射治疗按每天分批进行,平均总时间为5~7周,这使得肿瘤细胞在照射后的间隔进行恢复。垂死的肿瘤细胞与其他细胞的相互作用可能会影响肿瘤的命运。肿瘤微环境中的宿主细胞在影响肿瘤细胞转移行为中起着关键作用。肿瘤细胞在转移前原发肿瘤部位分泌的外泌体在其他部位预先形成的微环境,称为转移前生态位(PMN)。骨髓源性抑制细胞(MDSCs)是一种由未成熟的髓样细胞和髓样祖细胞组成的异质群体,能够产生PMN,同时MDSCs显著抑制免疫应答,MDSCs的出现频率与癌症患者的临床分期和癌症进展密切相关。然而,放射治疗和促进转移的微环境之间的联系机制还不清楚。在这项研究中,作者研究了辐射诱导死亡的肿瘤细胞是否增强了ESCC中促进转移的微环境的形成及增强MDSCs的机制。

由于MDSCs和巨噬细胞构成了PMN,作者使用4-硝基喹啉-1-氧化物(4NQO)诱导的原位肿瘤模型研究辐射对ESCC中MDSCs和巨噬细胞的影响(图1A)。作者以三种模式进行辐照:3Gy x 1f, 10Gy x 1f 和 3Gy x 3f。在照射4天后,三种照射模式下脾脏CD11b+Ly6c+髓系细胞水平平均显著上调,其中以3Gy x 3f的影响最为显著(图1B)。有证据表明,照射引起的肿瘤微环境变化也可促进转移,细胞外基质(ECM)重塑是PMN形成过程中的关键步骤。作者检测了F4/80, GR-1, FN, 赖氨酸氧化酶(LOX)和基质金属蛋白酶-9(MMP9)

等因子在远处器官的沉积情况,包括肺和肝脏。实验结果发现,在照射后,肺中的F4/80、GR-1和FN及肝脏中的GR-1显著上调(图1C)。这些数据表明,原发肿瘤部位被照射时,脾脏中MDSCs的增加,以及肺和肝脏中PMN成分的沉积。脾脏T淋巴细胞增殖实验显示,辐照小鼠的外泌体显著增强MDSCs的抑制功能(图1D)。

外泌体在原发肿瘤与微环境之间的信号传导中起着至关重要的作用,在照射后形成了促进转移的微环境。在RNA测序数据中作者观察到辐射后细胞外泌体中作者观察到辐射后细胞外泌体中调节辐射后的免疫过程中起着至

关重要的作用(图2A)。由于以上7个miRNAs在人和小鼠中具有相同的序列,作者验证了它们在放射前后荷瘤小鼠分离的外泌体中的表达水平。其中,mmu-miR-26a-5p和mmu-miR-1a-3p在辐照荷瘤小鼠的外泌体中均上调(图2B)。为了找到调控MDSC激活的miR-26b-5p的潜在靶点,作者使用miRNA靶点预测系统在人和小鼠中寻找miR-26b-5p的高靶基因。先前的研究已经证实了调节MDSC扩张和功能的通路,包括PI3K信号通路、JAK/STAT通路和TGF- β 通路。考虑到已报道的MDSC激活通路的关键分子,以及PI3K/AKT信号通路在辐照小鼠脾脏和骨髓

细胞中的富集,选择miR-26b-5p靶基因PTEN作为研究对象。作者发现在转染PTEN-siRNA和mmu-miR-26b-5p后都能抑制PTEN的表达并激活PTEN/AKT通路(图2C),在PTEN过表达的情况下,mmu-miR-26b-5p模拟物诱导的MDSCs扩增增强被PTEN过表达部分抵消(图2D)。因此,在本研究中作者发现照射致死的肿瘤细胞通过释放外泌体增强了PMN分子的沉积和MDSC的增强。miR-26b-5p在辐照死亡肿瘤细胞衍生的外泌体中表达上调,通过靶向PI3K/AKT信号通路,在调控MDSC诱导中发挥重要作用。

(孙毓筱 何宁宁 刘强编译)

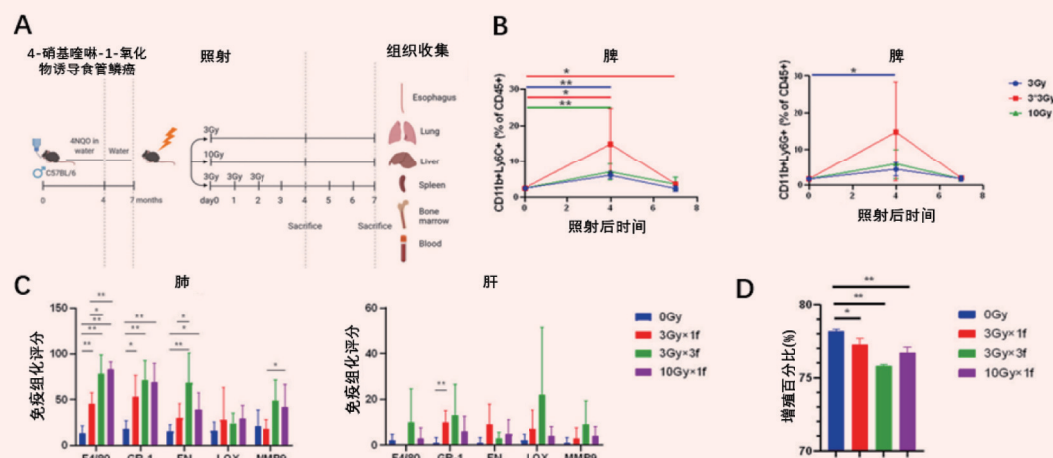


图1 局部照射增强ESCC小鼠模型系统性髓样细胞的增殖和功能

A. 4NQO诱导小鼠ESCC的示意图; B. 4NQO诱导C57BL/6小鼠ESCC,照射后第0、4、7天分析脾脏中骨髓细胞数量; C. 免疫组化染色和定量ESCC小鼠肺和肝切片中F4/80、GR-1、FN、LOX和MMP9; D. 来自放射荷瘤小鼠的外泌体增强了MDSCs的增殖和功能

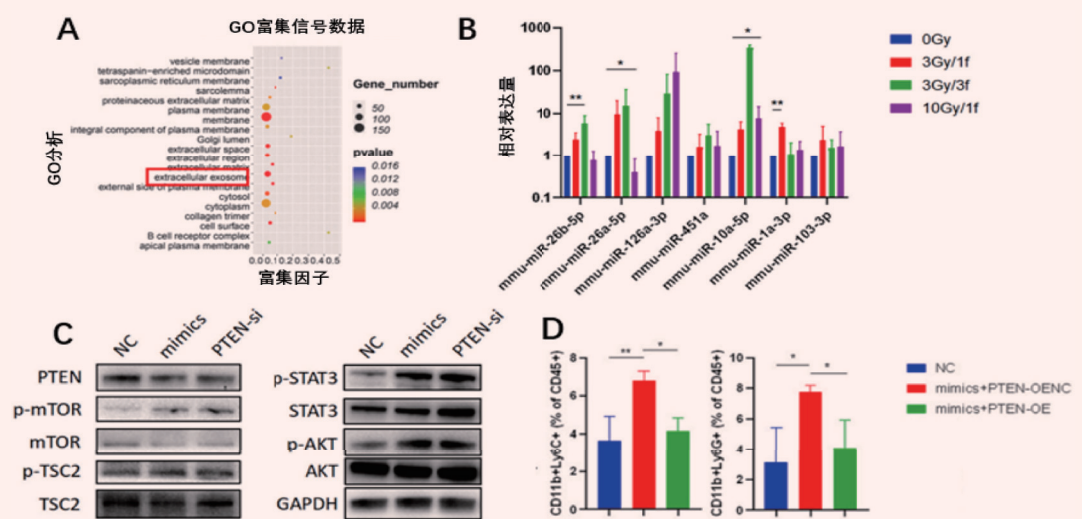


图2 辐射后死亡ESCC细胞来源的外泌体诱导MDSC激活由miRNA-26b-5p/PTEN/PI3K/AKT通路介导

A. 照射前和照射4天后荷瘤小鼠BM细胞中差异表达mRNA的GO分析; B. qRT-PCR检测了7个miRNAs在辐照前后荷瘤小鼠外泌体中的相对表达; C. 蛋白印迹法检测PTEN/AKT通路的关键分子; D. 流式细胞仪检测细胞MDSC比例

低剂量率辐射诱导的 TGF-β3 分泌联合小细胞外囊泡中的激活剂通过结合 ALK1 调节低剂量高放射敏感性

【据《International Journal of Molecular Sciences》2022年7月报道】题:低剂量率辐射诱导的 TGF-β3 分泌联合小细胞外囊泡中的激活剂通过结合 ALK1 调节低剂量高放射敏感性(挪威奥斯陆大学作者 Ingunn Hanson 等)

高放射敏感性(HRS)是在大多数细胞系中观察到的对低剂量电离辐射表现出的较高敏感性。该研究团队之前证明 HRS 在低剂量率(LDR)照射细胞中会永久消失,其机制取决于转化生长因子 β3(TGF-β3)。该研究旨在阐明上述机制中 TGF-β3 活化和受体结合过程。通过 TGF-β3 的潜在受体抑制剂和激活剂,以及从 LDR 诱发细胞中获取的小细胞外囊泡(sEV)对 T-47D 细胞进行预处理,通过克隆形成实验评估放射敏感性。通过质谱法分析 LDR 诱发的细胞 sEV 的蛋白质内容物。该研究结果表明无论是否 LDR 诱发状态,sEV 中都含有 TGF-β3,但只有来自 LDR 诱发细胞的 sEV 可以去除受体细胞的 HRS。抑制基质金属蛋白酶

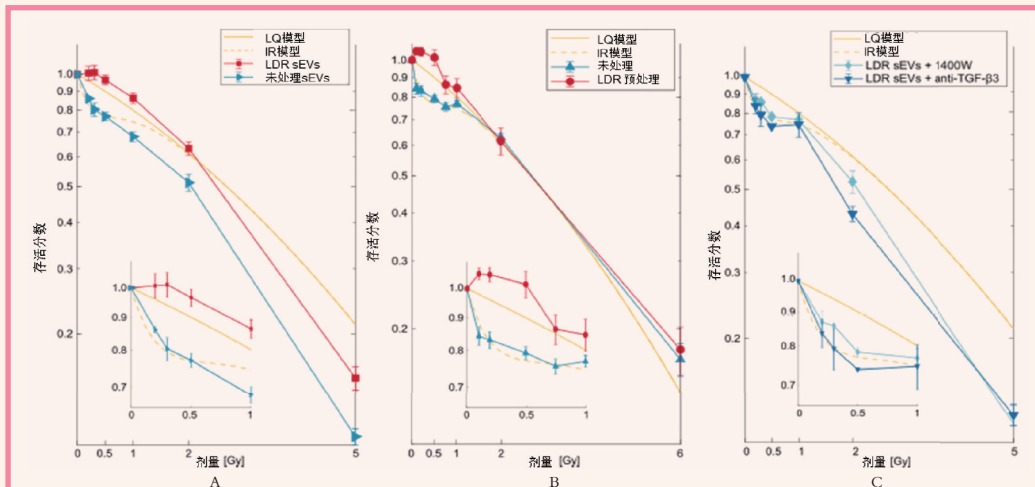


图1 小细胞外囊泡(sEV)预处理后 T-47D 细胞的存活曲线

A. 来自低剂量率(LDR)诱导的 T-47D 细胞的 sEV 进行预处理。(■)去除了高放射敏感性(HRS)对 T-47D 受体细胞中随后的激发辐射的反应,用未受照射对照细胞(▶)的 sEV 预处理对受体细胞的放射敏感性没有影响。B. 未处理的 T-47D 细胞(▲)对低剂量电离辐射(IR)的 HRS 反应。T-47D 细胞用 0.3Gy 剂量处理,伴有 0.3 Gy/h (●) HRS 丢失。C. 使用诱导一氧化氮合酶(iNOS)抑制剂 1400 W (◆)或 TGF-β3 中和抗体(▼)与来自 LDR 诱导细胞的 sEV 共同进行预处理,逆转了 sEV 在受体细胞中消除 HRS 反应的影响。LQ 模型和 IR 模型:线性-二次模型拟合和诱导修复模型拟合,用于未经处理的 T-47D 细胞。通过 3 次单独实验的误差加权的均值计算存活分数,每个实验有 5 个生物重复。误差线表示均值的标准误差(SEM)。通过相对暴露于预处理的对照细胞计算存活分数

(MMP)家族可防止 HRS 的去除,提示 LDR 诱发细胞中 TGF-β3 激活是 MMP 依赖的。该研究还通过证明 TGF-β3 与 activin 受体样激酶 1(ALK1)结合去除 HRS,这种作用独立于 ALK5 和 TGF-RII,证明了 TGF-β3 和

activin 受体样激酶 1(ALK1)之间的相互作用。该研究结果有助于更全面地了解 TGF-β3 介导的 HRS 去除背后的机制。

该研究为了证明 TGF-β3 的辐射保护作用是否通过 sEV 传递,从 LDR 诱发的 T-47D

细胞或未受照射的 T-47D 对照细胞中分离 sEV,并将其加入未受照射的 T-47D 细胞的培养液中,通过克隆形成实验分析受体细胞的放射敏感性。研究结果显示来自 LDR 诱发细胞的 sEV 改变了受体细胞的存活曲

线,与 HRS 去除后的效果一致,而来自对照细胞的 sEV 不能影响受体细胞的放射敏感性(图 1A)。该作用与直接 LDR 照射和转移 LDR 诱发细胞的培养液(受照射细胞条件培养基,ICCM)的作用类似(图 1B)。

接下来该研究为了进一步确认 HRS 的去除作用是通过转移依赖于 TGF-β3 的 sEV 发挥的,将 TGF-β3 中和抗体加入转移期间的 sEV,该过程延缓了受体细胞的 HRS 反应(图 1C)。

低剂量电离辐射在癌症放射治疗中受到关注,通过重复低剂量暴露诱导分次放疗。当用低于约 0.5 Gy 的剂量照射时,约 80% 的测试细胞系表现出对 X 线、γ 线、质子、碳离子的 HRS 反应。然而该研究团队以往发现 HRS 在低剂量率(LDR)照射细胞中永久消失。转化生长因子 β(TGF-β)家族是在哺乳动物组织中普遍表达的多效性蛋白质。该研究结果强调了 TGF-β3 在 T-47D 癌细胞的 HRS 去除机制中的重要作用,从而降低其放射敏感性。

(梁鑫 何宁宁 刘强 编译)

照射后胶质瘤细胞外泌体的 B7-H4 有助于增加分化的 Th1 细胞的 FoxP3 表达并促进肿瘤生长

【据《Redox Biology》2022年8月报道】题:照射后胶质瘤细胞外泌体的 B7-H4 有助于增加分化的 Th1 细胞的 FoxP3 表达并促进肿瘤生长(中国广州医科大学附属肿瘤医院作者 Yunhong Tian 等)。

胶质母细胞瘤(GBM)是最常见和最具侵袭性的原发性

脑肿瘤。虽然包括放疗在内的许多术后治疗策略已经被开发出来,仍不可避免肿瘤经过几年治疗后复发。共抑制分子 B7-H4 负调控 T 细胞免疫反应和促进免疫逃逸。外泌体介导细胞间通讯和启动肿瘤微环境(TME)中的免疫逃避。该研究通过采用碘二

醇密度梯度离心和流式细胞术检测外泌体 B7-H4,证明了 B7-H4 在照射后上调并加载到外泌体中,从而有助于免疫抑制和促进肿瘤生长。从机制上进一步证明照射通过增加 ATM-ALIX 相互作用促进外泌体的生物生成。该研究还发现 ATM 磷酸化的 STAT3 直

接与 B7-H4 启动子结合增加其表达。最后,辐射诱导的外泌体 B7-H4 的增加能够通过激活 STAT1 通路诱导 Th1 细胞分化过程中 FoxP3 的表达。在体内,外泌体 B7-H4 降低了 GBM 细胞的放射敏感性并减小了 GBM 小鼠模型的存活率。总体结果表明辐射增强的

外泌体 B7-H4 促进免疫抑制和肿瘤生长,因此确定了辐射和抗肿瘤免疫反应之间的直接联系。此外,该研究结果还提示放疗联合抗 B7-H4 治疗可改善局部肿瘤控制并确定外泌体 B7-H4 为潜在的肿瘤生物标志物。

下转第 8 版 ▶

医学参考报

放射医学与防护专刊

理事长兼总编辑: 巴德年
副理事长兼副总编辑: 曹雪涛等
理事会秘书长: 周赞

社长: 魏海明
副社长: 吕春雷
副社长: 周赞

社址: 北京市西城区红莲南路30号红莲大厦B0403
邮编: 100055
总机: 010-63265066
网址: www.yxckb.com

主编: 刘强
名誉主编: 柴之芳
副主编: (按姓氏笔画排序)
刘玉龙 刘青杰 刘晓冬 邵春林 周光明 梁莉
常务编委: (按姓氏笔画排序)
王治东 左雅慧 冉新泽 邢志伟 吕玉民 朱建国
刘澜涛 李蓉 李爽 李君利 何淑雅 张玉松
张照辉 拓飞 金顺子 周美娟 骆志平 徐畅
曹宝山 崔凤梅
编委: (按姓氏笔画排序)
王进 王优优 王佳楠 王春燕 王津哈 王墨培
卞华慧 尹再哲 申延男 朱久法 朱卫国 伍丽君
刘丽波 李丽 李洁清 杨文峰 杨苍珍 肖宇
肖莉 吴启庆 余长林 余祖胤 汪传高 张冰洁
张晓强 张惠生 陈大伟 周艳 赵骅 赵凤玲
施晓松 姚波 顾叶青 党旭红 徐孝华 高林峰
郭姗姗 谢萍 蒲汪旸 魏伟奇

企业编委: (按姓氏笔画排序)
石长旭 刘继国 李科 周杰 郑劲林 缪应江
名誉专家委员:
周湘艳 白光 施仲齐 王文学
专家委员会主任委员: 马力文
专家委员会副主任委员: 刘芬菊 杨志祥 姜恩海 郭国栋
专家委员会委员: (按姓氏笔画排序)
丁振华 吕慧敏 杨业鹏 陈英 尚兵 龚守良
粟永萍 董建
编辑部主任: 杜利清
编辑部副主任: 王彦
编辑: 何宁宁 宋会娟 张曼曼 顾叶青
学术发展部主任: 刘玉龙
学术发展部成员: 王津哈 纪凯华

作为辐射暴露检测标志物的尿液细胞外囊泡分离的优化方法

【据《Journal of Translation Medicine》2022年3月报道】题:作为辐射暴露检测标志物的尿液细胞外囊泡分离的优化方法(美国乔治城大学 作者 Charles P. Hinzman 等)

细胞外囊泡(EVs)由于其丰富的分子内容物,正在迅速成为一种液体活检的生物标志物。EVs是在正常的生理过程中,可以从所有组织类型的细胞中释放出来,可作为低丰度的生物标志物来源,用于广泛的病理生理学研究。

全身暴露在急性大剂量照射(>2 Gy)中,如果不及时诊断和治疗,电离辐射(IR)可能是致命的。暴露后24小时内可以发生血管内皮损伤,最常影响的是胃肠道和骨髓。在癌症治疗时,累积照射也会使患者发生正常组织毒性反应。IR的远期效应可能会延迟数月出现,会对大脑、心脏、肺和肾脏造成损伤甚至危及生命。当考虑用一种无创的方法来检测辐射损伤的生物标志物时,本研究作者及其团队研究了血浆、血清、尿液和唾液在其中的作用。尿液作为IR损伤生物标志物的来源,已被广泛研究。尿液EVs也有望作为肾脏疾病、泌尿系癌症、甚至神经系统疾病的生物标志物。然而,多数研究报告,从尿液

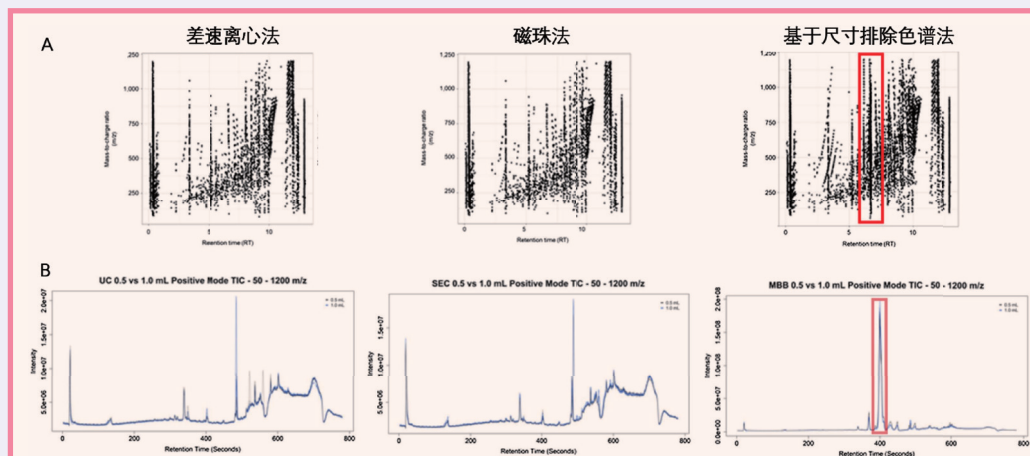


图1 EVs分离方法的质谱分析

A. 曼哈顿图,以质量电荷比(m/z, y轴)和保留时间(rt, x轴)显示每个特征。红色区域显示了在UC和SEC分离的EVs中没有检测到MBB样品的明显特征。B. UC、SEC和MBB分离的EVs样品的正电离子模式的总离子色谱图(TIC)。红色突出区域是在MBB样品中检测到的不同信号,而UC或SEC样品中没有检测到

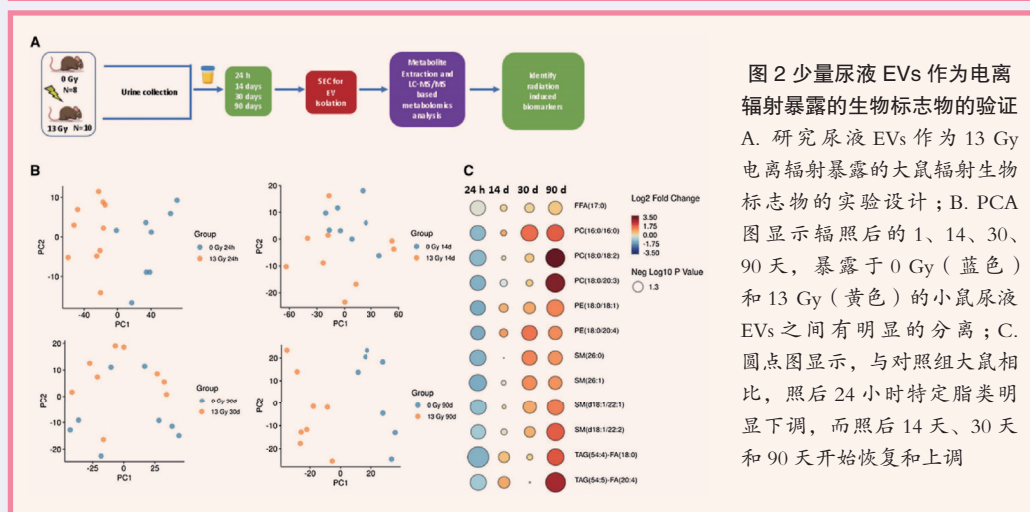


图2 少量尿液EVs作为电离辐射暴露的生物标志物的验证

A. 研究尿液EVs作为13 Gy电离辐射暴露的大鼠辐射生物标志物的实验设计; B. PCA图显示辐射后的1、14、30、90天,暴露于0 Gy(蓝色)和13 Gy(黄色)的小鼠尿液EVs之间有明显的分离; C. 圆点图显示,与对照组大鼠相比,照射24小时特定脂类明显下调,而照射14天、30天和90天开始恢复和上调

中分离EVs需要使用大量样本。目前,还没有研究小组探讨尿液EVs作为IR损伤生物标志物。

本研究的目的是比较、优化和验证从少量尿液中分离EVs的方法,重点是基于LC-

MS/MS的代谢组学和脂质组学的分析。比较了三种EVs的分离方法:差速离心法(UV)、磁

珠法(MBB)和基于尺寸排除色谱法(SEC)。EVs分离成功标准包括一定体积的得率和纯度,与LC-MS分析的兼容性,以及支持大批量样品的获得。对EVs中小分子进行富集和聚类分析后发现,SEC分离的尿液EVs在0.5 ml大鼠尿液中获得了最佳产量和高质量LC-MS数据(图1)。随后对WAG/RijCmcr大鼠进行腿外局部身体照射,并进行了更大队列样本的测试,该模型是唯一的在一次大剂量辐射暴露后可以观察到多个器官损伤(胃肠道、骨髓、肺、心脏、大脑和肾脏)的模型(图2)。最后,作者对接受胸部放射治疗(RT)患者的尿液样本进行初步研究,证明了EVs分离方法的临床效用。

该研究首次报道了从少量尿液中分离EVs的方法,首次报道了用质谱分析尿液EVs小分子和脂质含量,首次报道了尿液EVs作为辐射损伤生物标志物的有效性,并用于研究疾病的发生发展和患者对RT的反应。基于SEC的小体积尿液EVs分离方法可扩展到其他类型的生物分子分析,为此,该研究制定并提供了一套优化的标准操作程序(SOP),以方便其他实验室实施。

(李娜 何宁宁 刘强 编译)

缺氧细胞来源的细胞外囊泡通过 MiR-122-5p 加重放射治疗后直肠损伤

【据《Frontiers in Cell Developmental Biology》2022年4月报道】题:缺氧细胞来源的细胞外囊泡通过 MiR-122-5p 加重放射治疗后直肠损伤(中国上海市第一人民医院 作者 Yiqing Xu 等)

放射治疗(RT)是盆腔癌患者的主要治疗方式。然而,在接受放疗的盆腔癌患者中,超过一半会遭受辐射引起的副作用;其中,辐射引起的直肠损伤是一种常见的损伤。放射性直肠损伤的临床表现一般包括直肠疼痛、出血和腹泻。在内镜检查中经常可以观察到炎症、溃疡和出血。活组织检查通常显示毛细血管扩张、隐窝扭曲和纤维化。目前,很少有治疗放射性直肠损伤的策略,而抗氧化剂和抗炎药等药物可能会对疾病有所帮助。

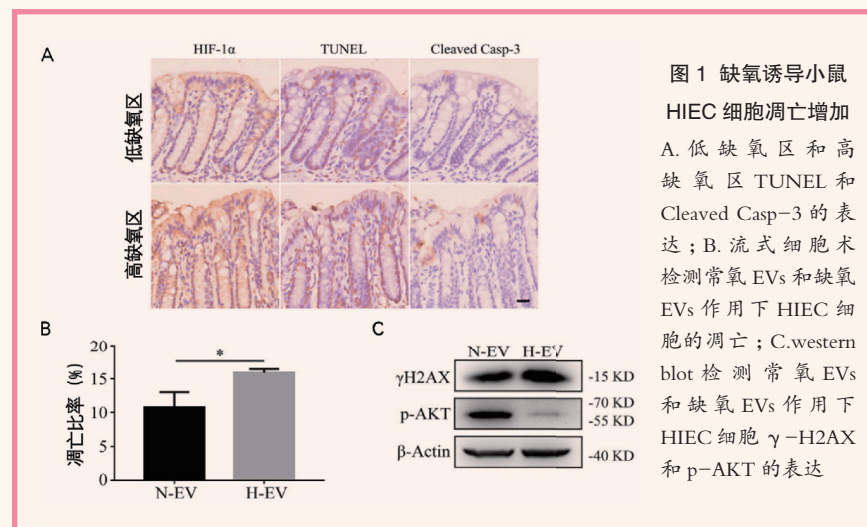


图1 缺氧诱导小鼠HIEC细胞凋亡增加
A. 低缺氧区和高缺氧区TUNEL和Cleaved Casp-3的表达; B. 流式细胞术检测常氧EVs和缺氧EVs作用下HIEC细胞的凋亡; C. Western blot检测常氧EVs和缺氧EVs作用下HIEC细胞γ-H2AX和p-AKT的表达

缺氧在放射性直肠损伤的发展中起着至关重要的作用。研究表明,缺氧参与辐射诱导的肺损伤,缺氧还通过产生血管生长因子(VEG)加速辐射诱导的晚期直肠损伤的发展。通过诱导缺氧诱导因子-1α(HIF-1α),缺氧导致VEGF和转化生长因子β通路的激活,从而导致炎症和纤维化。此外,临床研究报告了高压氧治疗放射性直肠损伤的有效性,表明靶向缺氧的治疗作用。然而,放射性直肠损伤的确切致病机制尚不清楚,缺氧对放射性直肠损伤的影响研究较少。

细胞外囊泡(EVs)起源于内体系统或质膜,是一组异质性的膜性颗粒,包括外泌体、微泡和凋亡小体。关于EVs作为生物标志物或细胞间信使的潜在作用,目前已有大量研究。在缺氧条件下,EVs的分泌及其含量和功能会发生变化。在慢性哮喘小鼠模型中,缺氧条件下培养的脐带间充质干细胞(hUC-MSC)衍生的外泌体可减弱过敏性气道炎症。心肌梗死后,EVs中miR-486-5p通过成纤维细胞MMP19-VEGFA信号通路增强心脏血管生成。这些发现表明EVs在正常组织损伤中尤其是在缺氧条件下发挥着重要作用。虽然EVs中含有蛋白质、脂质、DNA和mRNA等分子,但miRNAs由于其强大的生物学功能,是探索最多、研究最充分的内容物。因此,我们假设直肠缺氧部位可能通过EVs将miRNAs转移到直肠常氧部位,从而调节后者的生物活性。

在该研究中,作者观察到辐射后小鼠直肠高缺氧区细胞凋亡加剧,提示低氧可能促进组织损伤。缺氧诱导人肠上皮隐窝(HIEC)细胞的凋亡率增加,将缺氧HIEC细胞衍生的EVs添加到常氧HIEC细胞中,发现其可诱导细胞凋亡和γH2AX的高表达(图1)。通过miRNA微阵列分析,选择miR-122-5p进行进一步研究。与阴性对照相比,加入miR-122-5p抑制剂的缺氧EVs的HIEC细胞凋亡率降低,γH2AX表达降低,p-AKT表达升高。该研究为放射性直肠损伤的治疗提供了理论依据,未来有必要对miR-122-5p的具体机制进行研究。

(李娜 何宁宁 刘强 编译)

细胞外囊泡在鼻咽癌进展和治疗抵抗中的作用

【据《Cancers》2022年5月报道】题：细胞外囊泡在鼻咽癌进展和治疗抵抗中的作用（中国中南大学湘雅医院 作者 Yunhan Shan 等）

鼻咽癌（NPC）是一种上皮性恶性肿瘤，主要与人类疱疹病毒（EBV）感染有关。细胞外囊泡（EVs）起源于细胞的内体和质膜，参与细胞间通讯。研究表明，EVs在NPC的进展、转移和治疗抵抗中具有重要意义。放射治疗（RT）是NPC首选的治疗方法，通过电离辐射（IR）诱导癌细胞死亡。大多数肿瘤组织对IR的敏感性很高，但放射抗性仍然存在，在NPC中，放射抗性导致NPC局部复发和远端转移。本文总结了肿瘤衍生的细胞外囊泡（TDE）调节NPC的进展和TDE在NPC治疗抗性中的作用。

NPC中EVs的生物发生和分泌

NPC细胞中内体系统的多囊泡体（MVB）向内出芽形成腔内囊泡（ILV）。ILV与细胞膜融合进而作为外泌体释放到细胞外。研究发现EBV可以通过自身编码的潜伏膜蛋白1

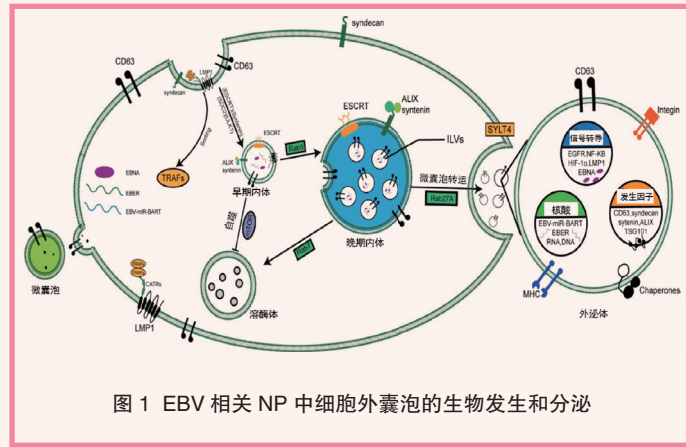


图1 EBV相关NP中细胞外囊泡的生物发生和分泌

（LMP1）避开溶酶体的降解，进而靶向内体并最终转移到EVs。在整个过程中LMP1可影响转运必需内体分选复合物（ESCRT）和多功能胞内衔接蛋白（syntenin）的表达，进而促进EV的分泌，同时LMP1通过NF- κ B信号上调整合素跨膜黏结蛋白syndecan-2（SDC2）以促进NPC细胞中EV的形成。在EV的分泌中EBV所携带病毒的RNA和miRNA，可以通过外泌体转移，这些小RNA和miRNA具有抗凋亡，调节免疫反应，以及促血管生成等功能（图1）。

肿瘤微环境衍生EVs在NPC中的作用

肿瘤微环境（TME）由癌细胞、基质细胞、免疫细胞和其他复杂成分组成。TME可以改变NPC细胞与周围基质细胞之间的细胞间通讯，促进肿瘤细胞的增殖、侵袭和转移。研究表明TME来源的EVs中负载的成纤维细胞生长因子19（FGF19）被NPC细胞摄取后，可通过依赖成纤维细胞生长因子受体4（FGFR4）的ERK信号通路促进上皮细胞-间充质转化（EMT），从而刺激NPC的进展。过表达miR-34c的MSC分泌的外泌体显著抑制NPC细胞的增殖，而miR-34c的敲低则显著提高了NPC细胞的活力。以上

结果表明NPC的TME分泌的EVs通过多种途径参与肿瘤的增殖和转移。

EVs在NPC放疗耐药中的作用

在NPC放疗中NPC分泌的含有LMP1的EVs可以通过激活的P38-MAPK信号通路介导癌细胞的辐射抗性并抑制细胞凋亡。在顺铂药物的化疗中内质网蛋白44（ERp44）可抑制细胞凋亡和细胞焦亡来降低药物敏感性，研究发现，顺铂药物的化疗中NPC细胞会产生含有ERp44的外泌体，这些外泌体可以转移到相邻细胞以增强癌细胞的耐药性。耐辐射及耐药细胞分泌的外泌体可促进鼻咽癌细胞的增殖、迁移和耐药性。

NPC来源的EV在诊断和治疗中的应用

NPC由于缺乏特异性的早期症状和特殊的发病部位，临床诊断的时大多处于晚期。EBV衣壳抗原免疫球蛋白A（VCA-IgA）抗体是已知的NPC生物标志物，但由于其阳性率低于70%，因此不是理想的标志物。随着技术发

展，有研究表明NPC患者中EVs衍生的miRNA与健康对照不同，miR-134-5p、miR-205-5p、miR-486-5p、miR-486-3p和miR-409-3p在NPC中失调。此外，由miR-134-5p、miR-205-5p和miR-409-3p组成的诊断模型在NPC的诊断和预后中表现出较高的准确性。另外NPC细胞分泌的载有病毒BART-miRNA的外泌体具有足够的稳定性，它还可以从肿瘤部位扩散到外周血，这为探索其作为新型肿瘤生物标志物提供了基础。阿司匹林显著抑制NPC细胞分泌LMP1，促进细胞和EV中miR-203的表达，而miR-203的高表达可降低肿瘤干性、放疗耐药等。这一结果表明阿司匹林在NPC中的潜在功能。

NPC的发生发展中，EVs通过与肿瘤细胞或TME的通讯促进肿瘤的恶性增殖、侵袭和治疗抵抗。NPC中具有EBV特征的EV，不仅可以评估肿瘤的恶性程度和进展，还可以为NPC的治疗提供适当的方法和监测手段。

（杨蒙蒙 何宁宁 刘强 编译）

外泌体在辐射诱发的旁观者效应中的作用

【据《Bioengineering》2022年5月报道】题：外泌体在辐射诱发的旁观者效应中的作用（伊朗德黑兰医科大学 作者 Safura Jokar 等）

放射治疗是癌症治疗的主要方法之一。辐射引起的对邻近未照射细胞的非靶向效应称为旁观者效应（RIBE），这些效应是细胞间通讯的结果。最近研究表明，电离辐射（IR）后细胞产生的外泌体，在细胞间通讯中起着至关重要的作用，并可能导致辐射抗性。

外泌体生物发生包括三个连续的步骤（图1），首先质膜在内吞形成早期内体，然后通过的成熟和额外的物质如核酸、受体、可溶性蛋白的加入成为多泡体（MVB），最后这些MVB与质膜融合并将该囊泡（外泌体）释放到细胞外空间。大量研究证实与其他细胞外囊泡相比，外泌体包含特定的分子成分，包括细胞碎片及具有独特生物学功能的蛋白质、核酸和脂质等。作为细胞间通讯的

关键介质，外泌体可以传递复杂的信号促进生理或病理条件下的细胞凋亡、存活、分裂、生长和分化。IR诱导的外泌体及其携带的分子受辐射类型、时间、剂量和细胞类型的影响。外泌体的释放是剂量依赖性的，与低剂量辐射相比，高剂量辐射在旁观者细胞中引起更多损伤。

RIBE可导致正常组织的生物损伤，这些组织细胞表现出基因突变、染色体损伤、微核和细胞凋亡，这是细胞间通讯的结果。旁观者效应的机制复杂，具体的分子机制尚不

清楚。细胞间通讯由受照细胞分泌的可溶性信号传递，如白介素、TNF- α 、TGF- β 、miRNA、ROS和一氧化氮。辐射细胞分泌的外泌体参与了RIBE，外泌体作为辐射诱导信号因子的载体，保护其免受细胞外酶的降解，并最终递送到远处的未照射细胞。有研究从照射后的小鼠骨髓中分离的外泌体静脉注射到未照射小鼠中（旁观者），旁观者小鼠活性氧ROS水平增加，抗氧化酶基因表达降低，并且旁观者小鼠的造血细胞数量减少和细胞凋亡增加，这种现

象与照射小鼠中观察到的效果相似，并且这些影响持续3个月。另外有研究发现小鼠胚胎成纤维细胞外泌体可增加未照射细胞的ROS水平，进而降低未照射细胞的克隆形成率，同时增加了未照射细胞中miR-34c水平。有人提出，受辐射或旁观者细胞释放的外泌体可能在受体细胞中导致两种相反的功能。一种是潜在的细胞保护功能，促进迁移和转移，增强DNA损伤修复和细胞存活。另一种是促进炎症、染色体损伤、表观遗传学改变和最终细胞死亡等细胞毒

性功能（图2）

最近的研究表明，外泌体介导的miRNA作为受辐射和未受辐射旁观者细胞之间的信使，在启动RIBE中具有重要作用。miR-21是DNA损伤反应相关miRNA，将照射后的角质形成细胞（HaCaT）与未照射的人成纤维细胞（WS1）共培养后发现旁观者WS1细胞中miR-21、ROS水平和p53结合蛋白1（53BP1）的核聚体（双链断裂的标志物）的表达显著增加。在2Gy照射后的人永生支气管上皮细胞（BEP2D）分泌的外泌体中miR1246增加，将照射后的外泌体与未照射细胞共孵育后观察到miR1246靶向的DNA Ligase4（LIG4）下调从而抑制细胞增殖和诱导DNA损伤。

外泌体作为传递介质在RIBE中具有非常重要的作用，应进一步探索外泌体释放和转运的分子机制，将为开发放射治疗的新方法提供更多思路。

（杨蒙蒙 何宁宁 刘强 编译）

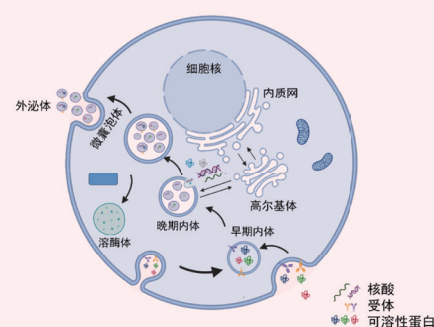


图1 外泌体的生物发生

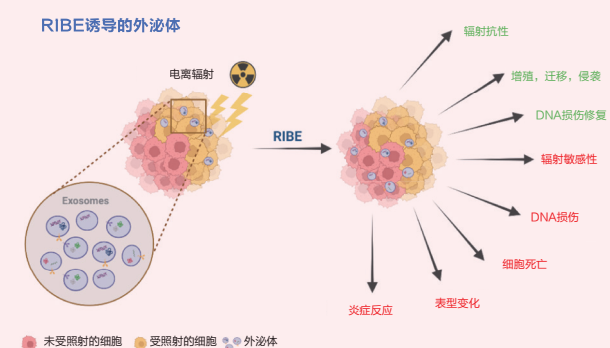


图2 未照射细胞中外泌体诱导的RIBE导致的两种相反的功能

小鼠间充质干细胞来源的外泌体 miR-466f-3p 在辐射诱导的肺损伤中通过 c-MET 抑制 AKT/GSK3 β 通路逆转 EMT 过程

【据《Journal of Experimental & Clinical Cancer Research》2022年4月报道】题：小鼠间充质干细胞来源的外泌体 miR-466f-3p 在辐射诱导的肺损伤中通过 c-MET 抑制 AKT/GSK3 β 通路逆转 EMT 过程（中国昆明医科大学第920医院 作者 Yi Li 等）

辐射诱导的肺纤维化是胸腔放疗的严重且危及生命的并发症，其限制了辐射剂量的增加，并严重影响患者的生存和生活质量。因此在临床上，对新疗法的需求十分紧迫。肺泡上皮细胞通过上皮-间质转化（EMT）在肺纤维化中起着至关重要的作用。来自间充质干细胞的外泌体具有修复和再生受损组织的有益特性，但潜在机制仍然不太清楚。

该研究中，单剂量 8 Gy 辐照会使小鼠 II 型肺泡上皮（MLE12）细胞呈现出明显的形态变化，辐照后 48h 大多数细胞从典型的上皮转变为细长的间质状外观。WB 分析 EMT 相关标记，照射后发生 EMT 转化上皮标志物 E-Cadherin 明显减少，间充质标志物 Vimentin 的表达增强，而在照射前经间充质干细胞外泌体（mMSCs-Exos）预处理有效逆转了这一表型（图 1）。在胸部接受单剂量 14 Gy 的 RILI 小鼠模型中，照射前 2h 对治疗组小鼠静脉注射 mMSCs-Exos，病理分析显示 mMSCs-Exos 的给药明显减轻了辐射诱导的肺部损伤，缓解了肺泡隔增厚、间质性水肿和浸润的炎症细胞等病理现象。mMSCs-Exos 的加入减少了辐照后胶原蛋白的沉积，并显著抑制了促纤维化发展的 IL-1 β 和 IL-6 的分泌。最后免疫组化数据表明 mMSCs-Exos 明显增加肺内 E-Cadherin 的表达，并减少 Vimentin 的表达。

鉴于 miRNA 在外泌体中的重要作用，根据微阵列分析，mmu-miR-466f-3p（miR-466f-3p）在 mMSCs-Exos 中高度富集。在 mMSCs-Exos 中敲降 miR-466f-3p

显然削弱了其在 EMT 抑制中的作用，同时在 RILI 模型中抑制 miR-466f-3p 外泌体治疗的小鼠，病理性肺损伤更严重，胶原蛋白沉积更多，miR-466f-3p 抑制也导致更高的 IL-1 β 和 IL-6 水平。miR-466f-3p 依赖性 AKT/GSK3 β 途径对辐射诱导的 EMT 至关重要。MLE12 辐照后，AKT 和 GSK3 β 的磷酸化增加，SNAIL 表达也相应增加。在辐照前用 AKT 抑制剂预处理 MLE-12 细胞 2 小时，当 AKT 信号传导被阻断时，辐射诱导的 GSK-3 β 抑制被释放，这与 SNAIL 的下调有关。AKT 抑制剂还在辐照后下调 E-Cadherin 和 Vimentin 的蛋白质水平，有效地逆转了辐射诱导的 EMT。基于基因预测及 KEGG 通路分析，又进一步验证 c-MET 是否是 AKT 抑制的 miR-466f-3p 的关键目标。与 NC 对照组相比，miR-466f-3p 模拟物的转染显著减少了辐照 MLE-12 细胞中的 c-MET 蛋白，而 c-MET 在抑制 miR-466f-3p 抑制 MLE-12 细胞中的 c-MET 表达增加。通过 siRNA 敲降 c-MET 明显抑制了辐射诱导的 AKT 和 GSK3 β 磷酸化，从而逆转了辐照 MLE-12 细胞中的 EMT 表型。同时过表达 c-MET 减弱了用 mMSCs-Exos 治疗 MLE12 细胞的辐射诱导变化，包括 p-AKT、p-GSK3 β 、SNAIL 和 EMT 标志物 E-Cadherin 和 Vimentin，进一步确认了 c-MET 在 mMSCs-Exos 介导的 EMT 过程中的作用。

总之，本研究证明了 mMSCs-Exos 在体内和体外减轻了辐射引起的肺损伤。特别是，外泌体 miR-466f-3p 从 mMSC 转移到辐射损伤的 MLE12 并靶向 c-MET 下调 AKT/GSK3 β 信号通路，从而抑制辐射诱导的 EMT 发生（图 2）。这种对辐射诱导肺损伤中 mMSCs-Exos 的理解可能会进一步改善预防辐射损伤的方法。

（赵雯月 何宁宁 刘强 编译）

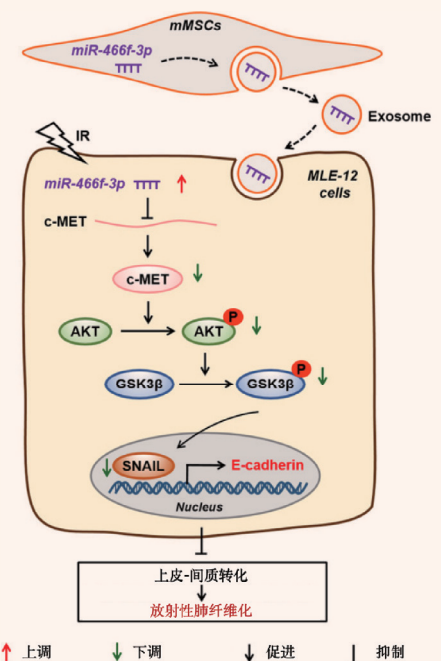


图 2 原理图说明 mMSCs 衍生的外泌体 miR-466f-3p 通过靶向 c-MET 抑制 AKT/GSK3 β 途径保护小鼠肺部免受辐射引起的损伤

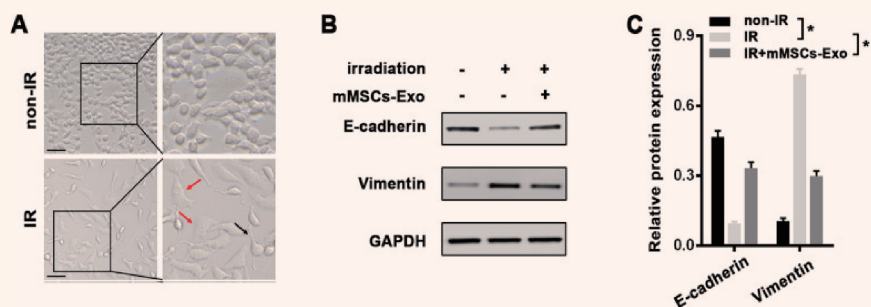


图 1 mMSCs-Exo 在 MLE-12 细胞中减弱辐射诱导的 EMT

A. 单剂量 8 Gy 辐照或非辐照后 48 小时细胞形态的代表性图像；B、C. 在非辐照细胞及有或无 mMSCs-Exo 的辐照细胞中 E-Cadherin、Vimentin 和蛋白定量

间充质干细胞来源的外泌体：辐射损伤中的生物功能及其治疗潜力

【据《cells》2021年1月报道】题：间充质干细胞来源的外泌体：辐射损伤中的生物功能及其治疗潜力（中国吉林大学白求恩第一医院 作者 Xiaoyu Pu 等）

放射损伤在接受放射治疗的癌症患者中很常见。在此背景下，辐射诱导的损伤可能是难治性的，因为受伤组织或器官的再生反应没有得到很好的刺激。间充质干细胞已成为治疗辐射损伤的理想候选者，来自间充质干细胞的外泌体对修复组织损伤有着有益的影响。MSC 来源的外泌体修复辐射损伤的机制尚未完全阐明，该研究将其生物学功能应用于辐射损伤模型中，旨在为辐射损伤治疗提供新的策略。

MSC 外泌体由脂质双层膜结构组成，直径从 40 nm 到 160 nm。MSC 外泌体至少含有 170 种不同的 miRNA 和 304 种蛋白质，以及无限数量的 DNA、mRNA 和代谢物。对比 MSC，MSC 外泌体的保存较持久，-80 $^{\circ}$ C 储存且不会影响其生物功能。MSC 外泌体的膜富含鞘蛋白、胆固醇、神经酰胺和脂质蛋白，使其能够通过生物屏障在体内传播。MSC 外泌体具有较低的免疫原性，因缺

乏 MHC 分子的表达阻止了宿主免疫细胞对其快速清除。输注 MSC 外泌体可以避免干细胞引发的相关风险。

MSC 外泌体通过免疫调节、血管生成、上皮恢复等多个方面发挥治疗作用。MSC 外泌体的免疫调节功能主要通过调节免疫细胞表型或改变其分泌特征。MSC 外泌体的蛋白质组学分析显示，MSC 外泌体包含参与血管生成的各种因素，如血小板衍生生长因子（PDGF）、成纤维细胞生长因子（FGF）、表皮生长因子（EGF）及与 NF- κ B 激活相关的

蛋白质。除了对免疫调节和血管生成的影响外，越来越多的证据表明 MSC 外泌体对上皮损伤的治疗作用，MSC 外泌体可通过其 miRNA 加速受伤组织中的上皮恢复并通过激活 PI3K/Akt 和 MAPK 来增加细胞增殖和存活率，同时抑制上皮-间质转化（EMT）限制病理性纤维化的发生，从而帮助上皮恢复。

MSC- 外泌体在修复辐射损伤中也发挥了积极的作用，几项研究表明，MSC 外泌体能够修复辐射诱导的造血系统损伤，但确切的机制尚不清楚。除了重塑造血系

统外，MSC 外泌体还能够保护皮肤、胃肠道、呼吸系统和其他系统免受辐射损伤（图 1）。目前的证据表明，MSC- 外泌体治疗有利于修复氧化应激诱导的损伤，MSC 外泌体还具有治疗辐射诱导损伤的潜力，部分原因是其强大的促血管生成物质，如 PDGF、FGF 和 EGF，诱导体内外皮增殖和分化以及体内新血管化。另一方面，外泌体靶向是由整合素和泛素复合物或其他相关分子成员根据其表达介导的。有实验研究表明，辐射有助于增加细胞表面 CD29/CD81 形成，从而增强了辐照细胞对外泌体的吸收。进一步说明了 MSC 外泌体在治疗辐射损伤方面的潜在用途。

MSC 外泌体显示出修复辐射损伤的潜力。目前的数据显示，MSC 来源的外泌体具有治疗潜力，因为它们具有抗炎作用，促进血管生成和促进上皮存活，这是重塑辐射损伤的关键生物过程。此外，MSC 外泌体的免疫调节作用可能会增强其组织修复功能。总体而言，MSC 外泌体在治疗辐射损伤方面有良好的前景，这可能会激发该领域的未来研究。

（赵雯月 何宁宁 刘强 编译）

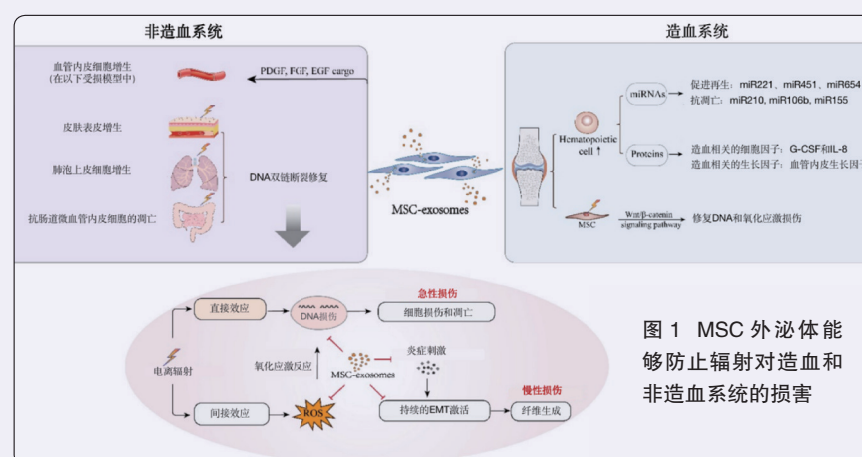


图 1 MSC 外泌体能够防止辐射对造血和非造血系统的损害

肿瘤相关巨噬细胞来源的 hsa_circ_0001610 通过外泌体转运降低子宫内膜癌的放射敏感性

【据《Cell Death and Disease》2021年8月报道】题:肿瘤相关巨噬细胞来源的 hsa_circ_0001610 通过外泌体转运降低子宫内膜癌的放射敏感性(中国郑州大学第一附属医院作者 Xiao Gu 等)

放疗抵抗是子宫内膜癌(EC)治疗的临床障碍,并且会导致肿瘤复发。肿瘤微环境在肿瘤发生发展中起到至关重要的作用。肿瘤相关巨噬细胞(TAMs)是肿瘤微环境中最丰富的免疫细胞。有研究表明 TAMs 通过分泌外泌体调控癌细胞发展,外泌体中富含包括 circRNAs 在内的多种非编码 RNA,作为细胞间载体发挥物质转运功能,前人研究发现在 EC 患者血清外泌体(EXOs)中异常表达的 209 个 circRNAs,暗示外泌体中的 circRNAs 可能在子宫内膜癌的癌症进展中发挥潜在作用。本研究中,研究者发现子宫内膜癌患者样本中肿瘤相关巨噬细胞(TAMs)主要呈现 M2 样表型。体外研究表明,与 M2 极化的巨噬细胞共培养会通过释放外泌体显著下调子宫内膜癌细胞的放射敏感性。Hsa-circ-0001610 在 M2 极化巨噬细胞来源的外泌体中表达丰富,并且敲降 hsa-circ-0001610 会消除 EXOs 对 EC 细胞的放射敏感性的抑制(图 1)。接下来的机制研究表

明 hsa-circ-0001610 作为 miR-139-5p 的竞争性内源 RNA 发挥作用,因此上调 cyclin B1 的表达, cyclin B1 在许多类型癌症中都可以通过调控细胞周

期,作为重要的辐射抗性推动剂。Hsa-circ-0001610 过表达会降低 EC 细胞的放射敏感性,该作用可被过表达 miR-139-5p 所逆转。体内研究表明,

EXOs 对放疗后裸鼠移植瘤生长的促进作用在过表达 hsa-circ-0001610 后被进一步加强(图 2)。综上, TAM 来源的外泌体可将 hsa-circ-0001610 转运至 EC 细胞中,并且在 EC 细胞中过表达 hsa-circ-0001610 通过吸附 miR-139-5p 释放

cyclin B1 的表达,进而降低 EC 细胞的放射敏感性。本研究确定了 TAM 来源的外泌体对子宫内膜癌细胞放射敏感性的影响并且探究了发挥功能的外泌体来源 circRNA,对临床上提高 EC 患者放射敏感性提供了新的靶点。

(蔡慧 何宁宁 刘强 编译)

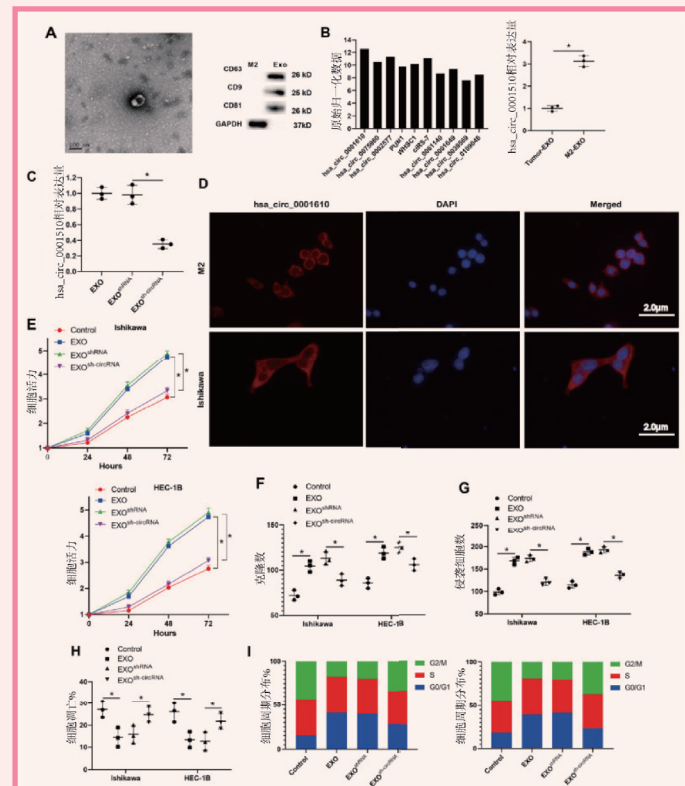


图 1 外泌体中 hsa-circ-0001610 介导 M2 极化的巨噬细胞来源外泌体对 EC 细胞放射敏感性的减弱

A. 外泌体电镜图; B. circRNA 微阵列分析 M2 极化巨噬细胞来源外泌体中 10 个候选 circRNAs 表达谱(左);在 EC 细胞来源外泌体和 M2 极化巨噬细胞来源外泌体中 qPCR 验证 hsa-circ-0001610 表达水平(右); C. qPCR 验证外泌体中敲降 hsa-circ-0001610 的效果; D. hsa-circ_0001610 的细胞定位; E-I. 与正常外泌体/敲降 hsa-circ-0001610 外泌体共培养后给予 EC 细胞 4Gy 照射,检测 E 细胞活力; F. 增殖能力; G. 侵袭能力; H. 凋亡和 I 细胞周期

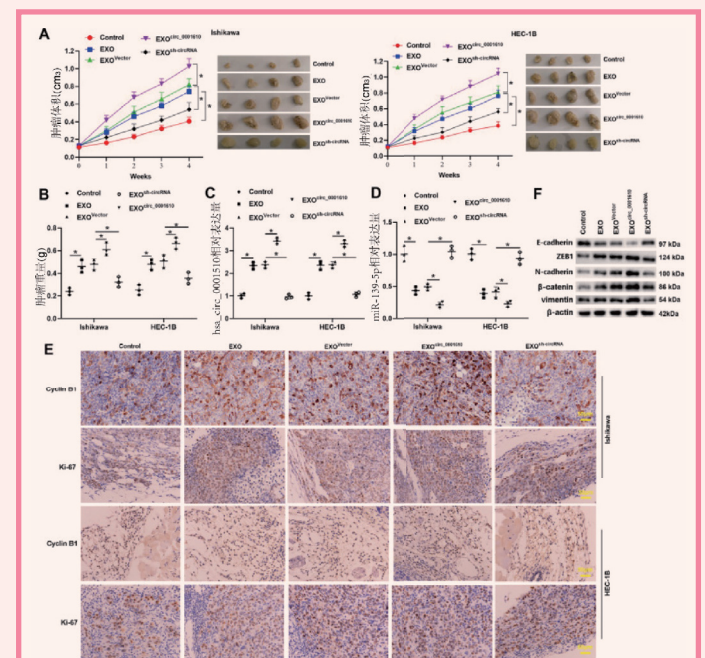


图 2 外泌体 hsa-circ-0001610 在体内减弱 EC 细胞的放射敏感性

EC 细胞皮下注射至裸鼠建立裸鼠移植瘤模型。肿瘤体积达到 100mm³ 时进行辐照。分组:对照组,照射+外泌体组(EXO 组),照射+过表达 hsa_circ_0001610 外泌体组(EXO circ_0001610 组)照射+对照外泌体组(EXOvector 组),照射+敲降 hsa_circ_0001610 外泌体组(EXOsh-circRNA 组)。A. 局部照射后每周进行瘤体检测。B. 瘤重检测。肿瘤中(C) hsa_circ_0001610 和(D) miR-139-5p 表达水平。E. cyclin B1 和 ki-67 免疫组化染色代表图片。F. E-cadherin, AEB1, N-cadherin, β -catenin 和 vimentin 的蛋白水平

苦瓜衍生的胞外囊泡样纳米囊泡通过减缓 DNA 损伤和线粒体功能障碍保护心肌细胞免受辐射损伤

【据《Frontiers in Cardiovascular Medicine》2022年4月报道】题:苦瓜衍生的胞外囊泡样纳米囊泡通过减缓 DNA 损伤和线粒体功能障碍保护心肌细胞免受辐射损伤(中国徐州医科大学 作者 Wen-Wen Cui 等)

总生存期的延长推动人们愈发关注癌症治疗相关不良反应,而胸部放疗患者发生放射性心脏病(RIHD)的风险较高。电离辐射产生过量的活性氧(ROS)蓄积,导致氧化应激,表观遗传改变,线粒体功能障碍和心脏细胞/组织中的端粒侵蚀。这些效应进一步共同引发心脏内皮功能障碍,炎症和纤维化。急性 RIHD 患者症状明显,易于诊断并及时接受药物治疗,而慢性 RIHD 在发病初期无症状,难以发现,因此需要采取无损伤的预防方案。辐射防护剂包括化学合成药物,天然和植物药物。其中天然化合物费用低、易获取、毒性小,但也具有分子量高、溶解度低、难以跨越物理屏障等缺点,但植物源型细胞外囊泡(EVs)克服了这些缺点,是一种新型的治疗药物。

苦瓜及其提取物具有抗氧化活性。研究者探索

了苦瓜来源的 EV 样纳米囊泡(MCELNs)对 RIHD 的治疗效果。使用密度梯度离心法成功分离出与 EVs 形状、大小和标志物相似的 MCELNs。共聚焦成像显示大鼠心肌细胞 H9C2 细胞摄取 PKH67 标记的 MCELNs 的时间依赖性。体外实验证实 MCELNs 能促进 H9C2 细胞在电离辐射(16 Gy, X 线)后能促进细胞增殖,抑制细胞凋亡并且缓解 DNA 损伤。此外,照射后 H9C2 细胞中升高的线粒体 ROS 被 MCELNs 清除,通过重新平衡线粒体膜电位保护线粒体功能。此外,在 MCELNs 处理的照射后 H9C2 细胞中随着 p-AKT/AKT 和 p-ERK/ERK 比值增加,ROS 相关蛋白的磷酸化得以恢复。最后,腹膜内给药 MCELNs 可减轻胸部放射小鼠模型的心肌损伤和纤维化(图 1)。研究数据展示了 MCELNs 对 RIHD 的潜在保护作用,促进了辐射相关毒性的预防机制的发展。然而 MCELNs 对除了心肌细胞外的其他类型心脏细胞的影响仍待探究,并且 MCELNs 内发挥功能的具体分子(例如蛋白质, miRNAs 等)仍需要进一步研究。

(蔡慧 何宁宁 刘强 编译)

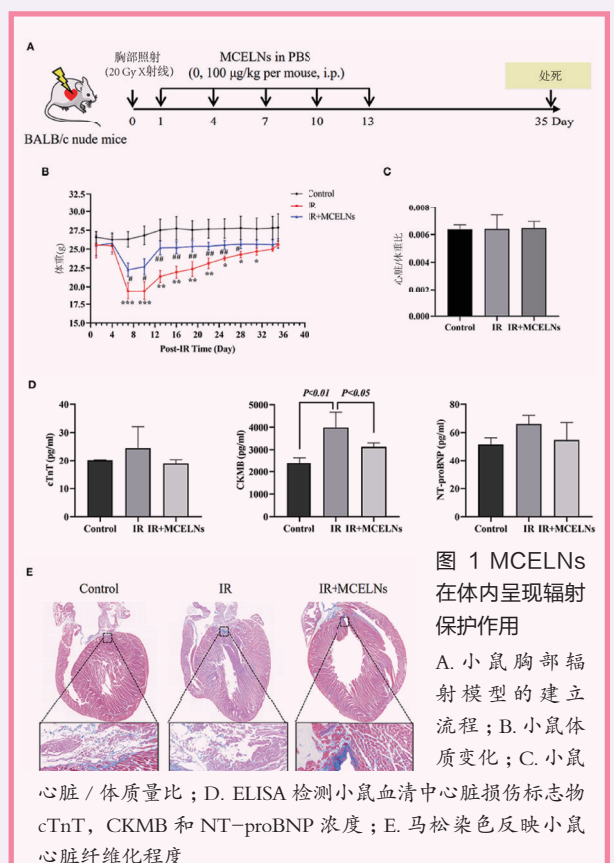


图 1 MCELNs 在体内呈现辐射保护作用

A. 小鼠胸部辐射模型的建立流程; B. 小鼠体质变化; C. 小鼠心脏/体质量比; D. ELISA 检测小鼠血清中心脏损伤标志物 cTnT, CKMB 和 NT-proBNP 浓度; E. 马松染色反映小鼠心脏纤维化程度

工程化细胞外囊泡对辐射引发的胶质母细胞瘤免疫检查点抑制作用

【据《American Chemical Society》2022年2月报道】题:工程化细胞外囊泡对辐射引发的胶质母细胞瘤免疫检查点抑制作用(美国哈佛医学院马萨诸塞州总医院神经肿瘤科 & 中国南京医科大学 作者 Tian Tian 等)

缺乏安全有效的血脑屏障递送和复杂的免疫抑制微环境是胶质母细胞瘤(GBM)治疗的两个主要障碍。细胞外囊泡(EV)已被用作GBM的治疗性递送载体,但疗效有限。该研究假设EV递送到GBM可以通过(i)用脑肿瘤靶向环状RGDyK肽(RGD-EV)修饰EV表面和(ii)使用脉冲辐射来增强积累。此外,该研究在EV上装载针对程序性细胞死亡配体-1(PD-L1)的小干扰RNA(siRNA),用于免疫检查点阻断。该研究结果表明基于EV的策略显著提高了RGD-EV对小鼠GBM的靶向效率,而加载的siRNA逆转了肿瘤细胞上辐射刺激的PD-L1表达,并招募了肿瘤相关骨髓细胞,提供了协同效应。联合治疗显著提高了CD8⁺T细胞的细胞毒性,阻止了肿瘤的生长,延长小鼠的存活期。该研究选择的用于EV分离的细胞来源和所提出的功能化策略适用于大规模生产,为GBM免疫检查点治疗提供了一种基于EV的治疗策略,可以转化为临床应用。

该研究从来自人胎儿大脑腹侧间脑区域的神经祖细胞(ReN)中分离出EV,证明EV表达经典的标志物Alix和TSG101(图1A)。使用化学修饰方法将脑肿瘤靶向配体c(RGDyK)肽偶联到EV表面上(图1B)。纳米颗粒跟踪分析(NTA)和透射电子显微镜(TEM)显示,RGD-EV的物理参数与非功能化EV相似,大多数粒径范围为100~250nm,其形态无显著差异(图1C、1D)。

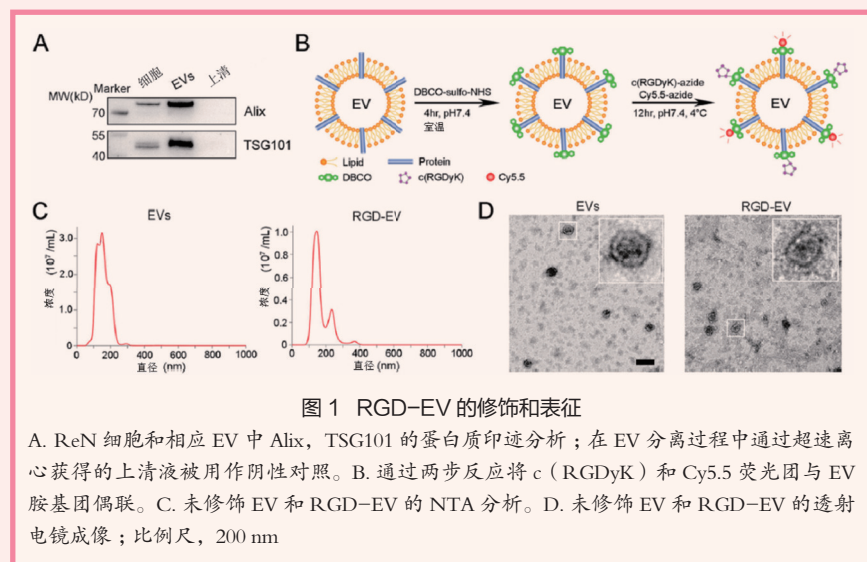


图1 RGD-EV的修饰和表征

A. ReN细胞和相应EV中Alix, TSG101的蛋白质印迹分析;在EV分离过程中通过超速离心获得的上清液被用作阴性对照。B.通过两步反应将c(RGDyK)和Cy5.5荧光团与EV胺基团偶联。C.未修饰EV和RGD-EV的NTA分析。D.未修饰EV和RGD-EV的透射电镜成像;比例尺,200 nm

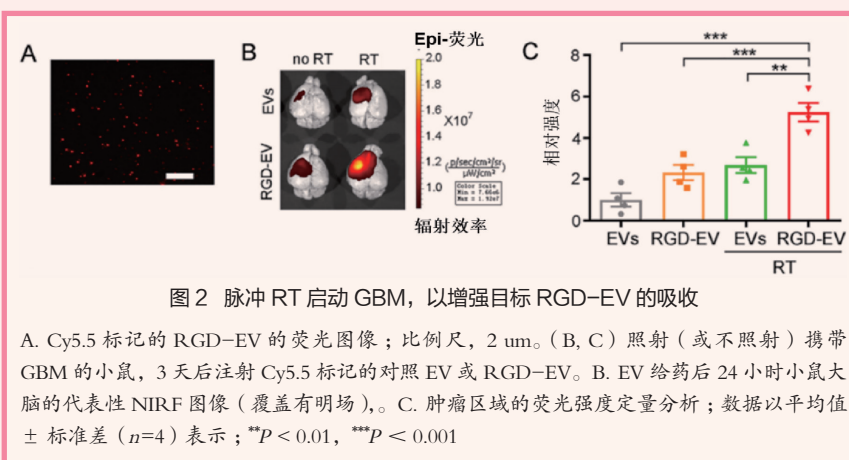


图2 脉冲RT启动GBM,以增强目标RGD-EV的吸收

A. Cy5.5标记的RGD-EV的荧光图像;比例尺,2 μm。(B, C)照射(或不照射)携带GBM的小鼠,3天后注射Cy5.5标记的对照EV或RGD-EV。B. EV给药后24小时小鼠大脑的代表性NIRS图像(覆盖有明场)。C.肿瘤区域的荧光强度定量分析;数据以平均值±标准差(n=4)表示; **P<0.01, ***P<0.001

为了评估RGD-EV的靶向能力及脉冲辐射是否可以增强其在GBM中的摄取,该研究使用了一种同源小鼠模型,通过在左纹状体中移植稳定表达萤火虫荧光素酶(Fluc)和绿色荧光蛋白(GL261-Fluc-GFP)的GL261细胞。小鼠成瘤后,将小鼠随机分为接受5 Gy的脉冲RT组及对照组。3天后,小鼠静脉注射PBS或100 μg Cy5.5标记的非靶向对照EV或RGD-EV。然后取出大脑组织,在给予EV后24 h通过近红外荧光(NIRS)成像分析。研究结果显示接受RT的小鼠在大脑中显示出显著增强的Cy5.5信号,这表明脉冲RT增强了大脑对EV和RGD-EV的摄取(图2A-C)。特别是,RGD-EV与RT联合显示出脑肿瘤的最大摄取量,其产生的Cy5.5信号高出单独的EV 5.24倍(图2C)。

该研究还证明RT治疗上调GBM和肿瘤相关骨髓细胞(TAMCs)中的PD-L1。为了抑制辐射诱导的PD-L1表达,该研究采用RGD-EV作为载体将PD-L1的siRNA(siPDL1)递送至GBM。在给药后48 h解剖GBM组织并用流式细胞术分析。结果显示RGD-EV:siPDL1显著降低了肿瘤细胞和TAMCs中PD-L1的水平,而RGD-EV:siCtrl或ser-EV:siPDL1组没有显示出显著的统计学差异。该研究结果表明,RGD-EV:siPDL1下调RT启动的GBM和TAMCs中的PD-L1表达,这种抑制在很大程度上取决于RGD-EV的靶向递送。

放疗仍然是针对GBM的最重要的非手术治疗方式。短脉冲放射治疗可以启动GBM,以增强纳米颗粒以肿瘤相关巨噬细胞(TAM)依赖性方式的靶向递送。此外,RT有可能改变免疫微环境,并使免疫原性较差的肿瘤对免疫检查点阻滞敏感。该研究结果表明,短脉冲辐射显著提高了RGD-EV对脑肿瘤及其微环境的靶向效率,有效减弱了辐射诱导的PD-L1在TAMCs和肿瘤细胞上的表达。

(梁鑫 何宁宁 刘强 编译)

成骨细胞衍生的外泌体可缓解辐射诱导的造血损伤

【据《Front Bioeng Biotechnol》2022年4月报道】题:成骨细胞衍生的外泌体可缓解辐射诱导的造血损伤(中国河北师范大学 作者 Jianqi Xue 等)

过量的辐射照射会对机体造成各种损害,包括造血系统、胃肠道、肾脏、皮肤和肺。鉴于骨髓是对辐射最敏感的组织之一,辐射暴露会导致骨髓衰竭,表现为造血干细胞(HSCs)减少,自我更新和分化受损。由于存活的造血干细胞可以自我补充并分化为所有造血系的血细胞,因此逆转造血干细胞损伤对辐射后的临床治疗很有意义。

造血干细胞(HSCs)居住在专门的微环境中,这些微环境可以调节造血干细胞在平衡状态下或损伤压力后的命运。在这些专门的微环境中,由间质基质细胞、成骨细胞和其他细胞组成的细胞与造血干细胞交流,并通过细胞间的直接接触或分泌可溶性因子来调整造血干细胞的自我更新和分化。外泌体是一种膜衍生的囊泡,直径30~150 nm不等,被认为是细胞间交流的另一种机制,可以通过转移其货物改变邻近细胞或远处细胞的功能,这些货物包括蛋白质、脂质和核酸,如mRNA和非编码小调控miRNAs。最近,来自间充质干细胞的外泌体被牵涉到辐射损伤后的造血再生中。提出的机制是它们能够增加抗凋亡基因的表达,下调促凋亡基因,并通过穿梭血管内皮生长因子(VEGF)、胰岛素生长因子-1和碱性成纤维细胞生长因子刺激促血管生成作用。来自造血微环境中其他细胞来源的外

泌体是否能促进造血再生还不清楚。

成骨细胞是形成骨的细胞,分泌钙质并合成骨基质。成骨细胞覆盖在骨内表面,在钙化骨和骨髓细胞之间形成一个界面。据报道,成骨细胞提供造血干细胞静止、长期维持和BM保留所需的信号。Visnjic等人表明,切除骨髓组织会导致骨髓细胞的丧失,骨髓中造血干细胞和祖细胞的数量减少,以及髓外造血的增加。成骨细胞是体内造血干细胞的一个调节成分,它通过Notch的激活影响造血干细胞的功能。然而,成骨细胞衍生的外泌体(OB-exosomes)在造血干细胞自我更新和再生中的作用仍不清楚。

该研究中揭示了成骨细胞外泌体对辐射诱导的造血干细胞损伤在体外和体内的保护作用,静脉注射成骨细胞衍生的外泌体能显著促进白细胞、淋巴细胞、单核细胞和造血干细胞在辐照后的恢复(图1),成骨细胞衍生的外泌体减轻对造血干细胞和祖细胞的照射损伤。同时,成骨细胞衍生的外泌体抑制照射诱导的FDC-P1细胞凋亡。通过对成骨细胞衍生的外泌体衍生的miRNA进行测序并在体外验证,发现miR-21通过靶向PDCD4参与造血干细胞保护。该研究揭示了一个新的机制,即成骨细胞外泌体通过转移miR-21下调PDCD4的表达来介导造血干细胞的保护,这对辐射引起的骨髓衰竭提供了一个潜在的治疗策略。

(李科君 何宁宁 刘强 编译)

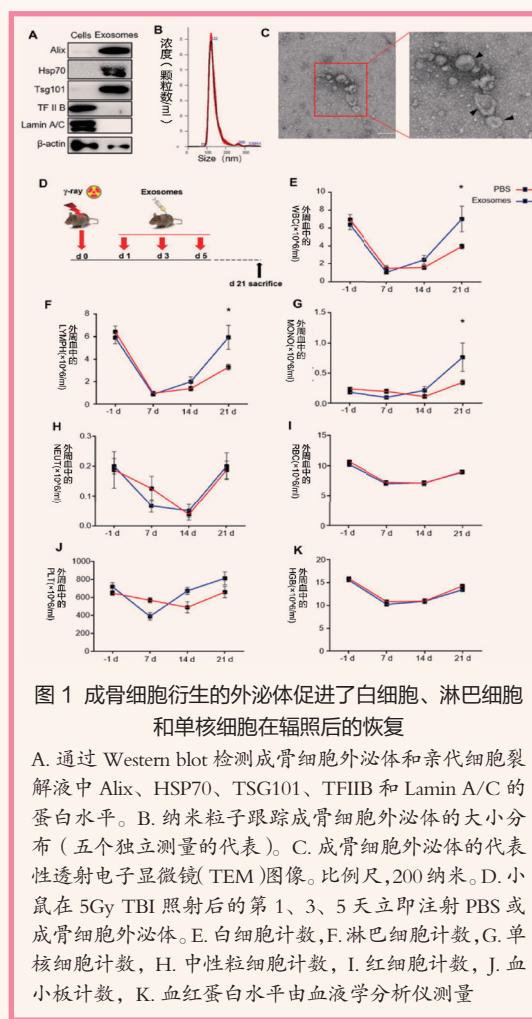


图1 成骨细胞衍生的外泌体促进了白细胞、淋巴细胞和单核细胞在辐照后的恢复

A.通过Western blot检测成骨细胞外泌体和亲代细胞裂解液中Alix、HSP70、TSG101、TFIIIB和Lamin A/C的蛋白水平。B.纳米粒子跟踪成骨细胞外泌体的大小分布(五个独立测量的代表)。C.成骨细胞外泌体的代表性透射电镜(TEM)图像。比例尺,200纳米。D.小鼠在5Gy TBI照射后的第1、3、5天立即注射PBS或成骨细胞外泌体。E.白细胞计数,F.淋巴细胞计数,G.单核细胞计数,H.中性粒细胞计数,I.红细胞计数,J.血小板计数,K.血红蛋白水平由血液学分析仪测量

外泌体在放射损伤治疗中的作用

【据《Burns & Trauma》2022年1月报道】题：外泌体在放射损伤治疗中的作用（中国南昌大学第一附属医院 作者 Shijie Dai 等）

放射治疗是癌症治疗的主要方式，它可有效控制肿瘤发展，改善肿瘤患者预后。但放射治疗也会导致多种副作用，如辐射诱发的皮肤纤维化、肺损伤、骨质流失等，此外在未辐照的组织中，辐射依然可以诱发旁观者效应（RIBE），表现出与辐射暴露相似的现象，诱发多器官及组织的损伤。

外泌体（exosome）是细胞分泌的一种直径为30~100 nm的膜性生物纳米囊泡，它携带多种具有生物活性的物质（脂质、蛋白质和核酸），参与细胞间通讯和细胞信号转导。外泌体作为内源性囊泡，进入人体不会引起免疫反应，不与体内补体结合及不被巨噬细胞清除，在体内循环的半衰期较长，因此外泌体在治疗中具有极大的潜力。在放射损伤中，辐射可增强细胞对外泌体的摄取，这些外泌体在放射损伤中起到重要作用。

辐射对外泌体生物合成的影响

外泌体起源于质膜的陷，经历早期分选内体（ESE）、

晚期分选内体（LSE），最后形成多个腔内囊泡（ILVs）的多泡体（MVBs）。MVBs与质膜融合，将ILVs作为外泌体释放出来（图1）。辐射会影响外泌体的产生和分泌。辐射诱导的外泌体产生如图1所示，辐射后由p53及抑癌激活通路6（TSAP6）蛋白调控，促进外泌体的产生，同时辐射后通过激活Wnt信号增强外泌体的分泌。辐射增加细胞对外泌体的摄取，释放到细胞外环境的外泌体与细胞双层膜表面的黏附分子结合后被内化，而外泌体内携带的分子释放到细胞中，执行调节功能。研究表明，细胞对外泌体的摄取以辐射剂量依赖性方式增强，辐射后受体细胞上的四跨膜蛋白复合物CD29/CD81的形成增加，从而促进细胞与外泌体的结合，促进细胞对外泌体的摄取（图1）。

外泌体在放射性皮肤损伤中的作用

众所周知间充质干细胞（MSCs）促进皮肤再生。研究表明，MSCs促进皮肤再生部分是通过MSCs分泌的外泌体（MSCs-exosome）的旁分泌发挥作用，这种修复是由MSCs-exosome中的miRNA起作用，例如miR-126在糖尿病大鼠模型中通过

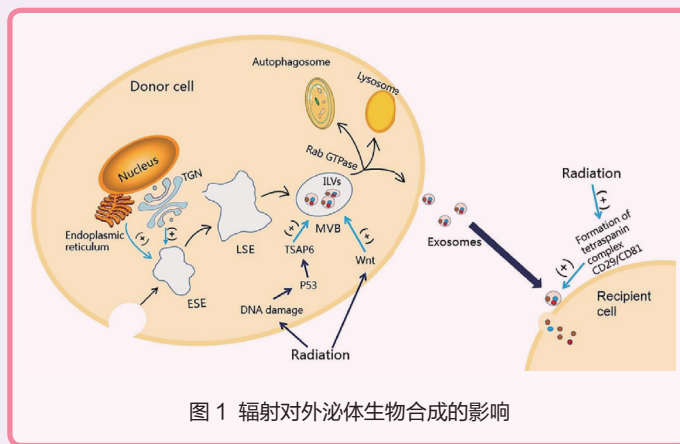


图1 辐射对外泌体生物合成的影响

激活PI3K-Akt和MAPK通路促进皮肤修复。此外MSCs-exosome还发挥免疫调节功能，在干扰素- γ （IFN- γ ）和肿瘤坏死因子- α （TNF- α ）存在的情况下，MSCs产生的外泌体，可诱导巨噬细胞从M1转变为M2型。MSCs-exosome还可抑制上皮-间质转化（EMT），从而保持上皮的完整性并抑制组织纤维化。血浆来源的外泌体可调节辐射后成纤维细胞的细胞增殖和铁死亡来促进辐射伤口的愈合。综上所述，外泌体可以促进皮肤细胞增殖和上皮再生，参与受损皮肤的免疫调节，从而加速伤口愈合，延缓皮肤衰老。

外泌体在放射性肺损伤中的作用

辐射诱发的肺损伤（RILI）是胸部肿瘤放疗中常见的并

起的肺损伤。

外泌体在放射性骨损伤中的作用

骨髓对辐射高度敏感，是放射治疗的主要损伤部位。辐射可直接影响骨髓间充质干细胞（BM-MSCs）和造血干细胞（HSCs）的分化潜能，导致骨髓中细胞数量减少和骨髓组成的变化，这不仅会导致免疫系统受损，还会削弱骨骼结构质量。有研究表明外泌体可通过激活PI3K/Akt信号通路促进人骨髓间充质干细胞（HBM-MSC）成骨分化。BM-MSCs衍生的外泌体可以减少照射后大鼠的骨丢失，减轻辐射损伤，促进照射后BM-MSCs的DNA修复。外泌体通过增加抗氧化相关蛋白（如过氧化氢酶、超氧化物歧化酶1（SOD1）和SOD2）的表达来缓解辐射诱导的氧化应激。在辐射诱导的骨损伤中，外泌体可以恢复BM-MSCs的分化潜能，缓解氧化应激，加速DNA修复，从而促进成骨分化和骨修复。

综上所述，在放射损伤中外泌体可以刺激细胞增殖和再生，缓解细胞氧化应激损伤，调节炎症反应。这为外泌体在放射损伤的治疗中提供了新的见解。

（杨蒙蒙 何宁宁 刘强 编译）

◀ 上接第2版

该研究为了证明辐照GBM细胞外泌体对T细胞的作用，用来自照射的GBM细胞外泌体处理T细胞。促炎细胞因子IFN- γ 和TNF- α 的水平下降，抗炎细胞因子IL-1ra的水平升高。此外，可以观察到上述效应呈现辐射剂量依赖性。检查外泌体处理后T细胞亚群的相对比例显示IFN- γ +IL-4+Th1细胞的比例下降，CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Tregs细胞增多。蛋白质印迹分析显示，与对照组相比，用辐照的GBM细胞外泌体处理的T细胞Treg和Th1转录因子T-bet水平显著减少，FoxP3水平显著增加。总之，上述结果表明来自辐照GBM细胞的外泌体抑制肿瘤浸润T细胞的体外抗肿瘤潜能。

放疗是GBM最重要的治疗方式。GBM的肿瘤微环境促进肿瘤生成并发展为辐射抵抗。该研究表明辐照的GBM细胞在体外和体内抑制T细胞的抗肿瘤免疫反应。在机制上，辐照通过增加ATM与ALIX的相互作用促进外泌体的产生，并通过ATM磷酸化STAT3诱导外泌体B7-H4表达。反过来，外泌体B7-H4通过使STAT1通路失活诱导FoxP3在Th1细胞分化中的表达。

（梁鑫 何宁宁 刘强 编译）

放射医学与防护专刊长期合作伙伴



北昂医疗是一家从事高端体外诊断精密仪器、生物试剂研发、制造、营销一体化的全产业链高科技企业，成立于2004年，具有自主软硬件双内核科技，已经可实现IVD高端产品的进口替代，在研产品已具备进口高端产品的升级实力。经过17年发展，北昂已经成为IVD“显微医学图像专家”，在IVD领域提供生殖、遗传、细胞、病理、生化、免疫、分子和微生物精密分析仪器、诊断试剂（芯片）和服务。



周杰

上海交通大学EMBA；资深医疗营销与产品应用和市场布局经理人，在显微医学图像诊断应用、生殖遗传智能检测布局、职业放射卫生产品解决方案等领域超过20年运营落地经历；行业领域内研发生产营销服务全产业链运作实战专家。