

耿婷, 张晓红, 南琼. 外泌体检测 *KRAS* 突变在结直肠癌中的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(12): 122-126.  
Geng T, Zhang XH, Nan Q. Research progress on the detection of *KRAS* mutation in colorectal cancer by exosomes [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(12): 122-126.  
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019. 12. 019

# 外泌体检测 *KRAS* 突变在结直肠癌中的研究进展

耿 婷, 张晓红, 南 琼\*

(昆明医科大学第一附属医院消化内科和消化疾病研究所, 昆明 650000)

【摘要】 虽然内镜能早期诊断结直肠癌, 但因其存在有创、侵入等局限性, 世界范围内仍有大部分患者确诊时已经是晚期甚至伴有转移。西妥昔单抗等抗表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 单克隆抗体丰富了转移性结直肠癌的治疗, 然而其治疗效果与 *KRAS* 基因是否突变相关, 因此使用前检测 *KRAS* 基因是否突变十分有必要。对外泌体的大量研究使得我们思考能否通过外泌体检测来确定患者是否存在 *KRAS* 突变。本文重点对依靠外泌体检测 *KRAS* 突变指导结直肠癌患者使用 EGFR 单抗治疗的潜在可能性进行综述。

【关键词】 外泌体; *KRAS* 突变; 结直肠癌; 靶向药物; 检测

【中图分类号】 R-33      【文献标识码】 A      【文章编号】 1671-7856(2019) 12-0122-05

## Research progress on the detection of *KRAS* mutation in colorectal cancer by exosomes

GENG Ting, ZHANG Xiaohong, NAN Qiong\*

(Department of Gastroenterology and Institute of Digestive Diseases, First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650000, China)

【Abstract】 Although endoscopy can be used to diagnose colorectal cancer early, however, due to its invasiveness and other limitations, most patients have advanced or even metastatic status at the time of diagnosis. The anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) monoclonal antibody cetuximab enriches the treatment of metastatic colorectal cancer, and its therapeutic effect is related to mutation in the *KRAS* gene. Therefore, it is necessary to detect the *KRAS* gene before use of an anti-EGFR monoclonal antibody. Extensive research on exosomes has led us to consider whether exosomes can be used to determine *KRAS* mutation status. This review focuses on the feasibility of using exosomes to detect *KRAS* mutations to guide the use of anti-EGFR monoclonal antibodies in patients with colorectal cancer.

【Keywords】 exosome; *KRAS* mutation; colorectal cancer; targeted drug; detection

结直肠癌是世界范围内发病仅次于肺癌、和乳腺癌的最常见的癌症, 是第四常见的癌症死亡原因, 每年约有 70 万人死亡<sup>[1]</sup>。自 1988 年 Vogelstein 对正常组织-腺瘤-癌组织的发展过程进行详细解析<sup>[2]</sup>, 我们认识到大多数结直肠癌的发展是从腺瘤到腺癌的过程, 通常需要 7~10 年, 早期诊断并进行干预的患者往往预后较好。但结直肠癌是一种“沉默”性疾病, 许多人直到癌症转移后才会出现下消化道出血或腹痛等临床表现<sup>[3]</sup>, 因此早期诊断较困难。目前筛查早期结直肠癌的常用方法有粪便潜

【基金项目】 云南省应用基础研究 (2017FE468(-191))。

【作者简介】 耿婷 (1993—), 女, 在读硕士, 主要从事大肠癌早期诊治的研究。E-mail: Gengting94@163.com

【通信作者】 南琼 (1975—), 男, 博士, 副主任医师, 教授, 硕士生导师, 主要从事大肠癌早期诊治的研究。E-mail: nanqiong75@163.com

血试验、粪便免疫组化检测、全结肠镜检查等。前两者特异性较差,自发肠道出血可导致结果假阳性,另外癌早期出血较少,容易漏诊。而全结肠镜检查虽然在发现早期癌和癌前病变有高度敏感性,检查同时就可以切除早期病灶,但侵入性较高,易引起患者不适,还需要复杂的肠道准备,仅有少数国家直接采用结肠镜检查作为筛查手段<sup>[4]</sup>。而在未接受筛查的人群中,约有 60%~70% 的结直肠癌病例是在晚期确诊的<sup>[5]</sup>。晚期或转移性结直肠癌患者尚缺乏有效可靠的治疗手段。表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)靶向药物(如西妥昔单抗、帕尼单抗等)的出现丰富和发展了结直肠癌的治疗。但是 RAS 基因是否突变以及突变的类型对 EGFR 靶向药物的治疗效果有很大的影响,因此,使用 EGFR 靶向药物之前应该对 RAS 基因(主要是 KRAS 基因)进行突变检测<sup>[6]</sup>。目前 KRAS 突变试验已被亚洲临床指南认可<sup>[7]</sup>。近年来对外泌体的大量研究使得我们思考是否能通过其进行无创简便的方法来确定患者是否存在 KRAS 突变,从而更好的指导 EGFR 靶向治疗药物的临床使用。

# 1 EGFR 在结直肠癌中的作用

EGFR 也称为 ErbB-1 或 HER1,为大小为  $170 \times 10^3$  的单体糖蛋白,表达于大多数组织中,是一种属于细胞膜受体 ErbB 家族的跨膜酪氨酸激酶受体。EGFR 级联启动具有促进二聚化的配体结合受体,导致酪氨酸激酶残基自磷酸化,从而诱导许多细胞内信号转导途径(主要是通过 Ras/Raf/MEK/ERK/MAPK 和 PI3K/AKT/mTOR 这两条通路将信号从胞质传导到细胞核)的激活(图 1),导致多种转录因子的激活,在包括转移性结直肠癌在内的几种不同的人类癌症中发挥着调节增殖、分化、迁移、凋亡、血管生成和转移扩散的作用<sup>[8]</sup>。研究表明大约 60%~80% 的结直肠癌患者存在 EGFR 过表达<sup>[9-10]</sup>。

# 2 抗 EGFR 单抗

目前最常用来治疗晚期转移性结直肠癌的 EGFR 靶向药物主要是抗 EGFR 单克隆抗体<sup>[11]</sup>。以第一个于 2004 年被美国食品和药品监督管理局(FDA)批准用于治疗临床上对化疗耐受的晚期转移性结直肠癌的抗 EGFR 单克隆抗体-西妥昔单抗为例:西妥昔单抗经历了广泛的临床前期和临床评估,在许多细胞系的体外实验中证实了其抗肿瘤、

抗增殖和细胞毒性作用<sup>[12]</sup>。Cunningham 等<sup>[13]</sup>于 2004 年在新英格兰医学杂志上发表了著名的 BOND 临床试验的研究结果确立了西妥昔单抗在治疗化疗耐药的晚期结直肠癌二线的地位。西妥昔单抗通过与 EGFR 的结合(图 1)阻止细胞内配体介导的酪氨酸激酶磷酸化,导致下游信号通路的抑制,从而发挥其药理作用<sup>[14]</sup>。然而,抗 EGFR 单克隆抗体价格昂贵,且临床用药后发现在一些患者身上疗效并不十分理想,或是开始治疗有效,而在治疗过程中逐渐表现出耐药性。所以探索其耐药机制,寻求有效方法指导靶向药物的使用显得尤为重要。

# 3 KRAS 突变

虽然导致西妥昔单抗耐药性的原因有多种,但对耐药结直肠癌患者的肿瘤标本大规模分析结果显示,40%存在 KRAS 突变,且相较于其他的突变如 PIK3CA 突变(占 14.5%),BRAF 突变(占 4.7%),NRAS 突变(占 2.6%)等明显占有比例优势,更值得关注<sup>[15]</sup>。KRAS 作为 RAS 基因家族中的一员,是 Ras/Raf/MEK/ERK/MAPK 这条信号通路中主要的信号转导分子之一。所以 KRAS 突变可绕过 EGFR 直接激活下游信号,介导 Ras/Raf/MAPK 信号转导活化转录因子,使肿瘤细胞逃避西妥昔单抗的作用,从而形成对西妥昔单抗的原发性耐药。越来越多的研究也表明比起突变型的患者,KRAS 野生型的患者对西妥昔单抗的敏感性较高,疗效更显著<sup>[16-18]</sup>。同时西妥昔单抗治疗过程中 KRAS 的后续突变也会使患者对其反应性下降,影响治疗效果<sup>[19]</sup>。所以在使用西妥昔单抗前以及治疗过程中进行 KRAS 突变检测十分有必要。目前检测结直肠癌 KRAS 突变的方法主要是利用患者组织进行 DNA 提取,而组织标本主要来源于手术、结肠镜或穿刺活检,这些检查因其侵入性带来的伤害,并不是每个患者都能接受。

# 4 外泌体

## 4.1 外泌体概述

虽然目前来说组织活检仍是诊断肿瘤的金标准,但其对患者的创伤性大,在需要动态观察病情的患者身上无法重复进行。为了弥补这一不足,液体活检已发展成为一个非常活跃的研究领域。液体活检是指收集患者的外周血来检测患者血液的循环肿瘤细胞(circulating tumour cells, CTCs)、含有循环肿瘤 DNA(circulating tumour DNA, ctDNA)的癌症患者血液中的循环无细胞 DNA(circulating cell-

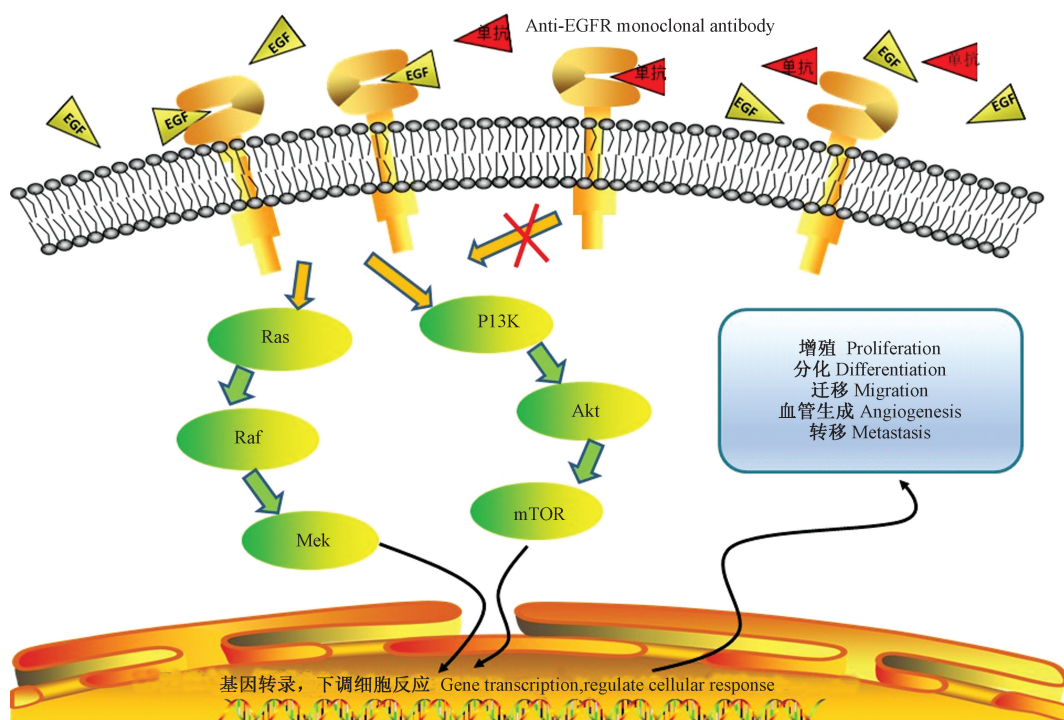


图1 EGFR 信号通路及抗 EGFR 单抗作用机制

Figure 1 EGFR signaling pathway and the mechanism of anti-EGFR monoclonal antibody

free DNA, cfDNA)、循环无细胞 RNA(circulating cell-free RNA, cfRNA)以及循环细胞外囊泡(extracellular vesicles, EVs),如外泌体和肿瘤“教育”的血小板(tumour-educated platelets, TEPs)、蛋白质、代谢物等方法的总称<sup>[20]</sup>。最近,一项 meta 分析明确指出 cfDNA 十分有潜力作为判断 CRC 患者 *KRAS* 突变的生物标志物<sup>[21]</sup>。而外泌体可以反映原始细胞的状态、具有脂质双层结构保护,内容物不易降解、能稳定存在于在各种血液、尿液和细胞培养基等液体中<sup>[22]</sup>,更有可能将液体活检运用于临床实践中去。

外泌体是一种大小约 30~100 nm 的膜性小囊泡,由肥大细胞、树突状细胞等多种类型的细胞释放,存在于包括血液、尿液等多种体液中<sup>[23]</sup>。最早于上世纪 80 年代由 Johnstone 等人在培养羊的网织红细胞时发现<sup>[24]</sup>。随着研究的不断深入,学者们发现外泌体因其内部包裹的蛋白质、脂质、DNA、mRNA、microRNAs 等内容物,可作为细胞间信号传递的关键分子<sup>[25-30]</sup>。

#### 4.2 外泌体检测的发展

有研究报道,与正常细胞相比,肿瘤细胞分泌更多的外泌体<sup>[31]</sup>。目前的研究着力于验证血清外泌体是否可作为一种新颖的,有潜力的生物标志物来早期诊断癌症和明确癌症相关突变是否可以从患者血清外泌体中的 mRNA 扩增出来。2010 年有

研究指出,胃癌患者分泌的外泌体明显高于正常对照组,且在对照组和胃癌患者的外泌体中都能检测到如 *HER-2* 等标志物,但胃癌患者外泌体内这些标志物明显高表达<sup>[32]</sup>。2014 年有研究指出,鼻咽癌患者血浆中可连续检测到癌外泌体且血清外泌体浓度的升高与患者终末期淋巴结转移及预后不良密切相关<sup>[33]</sup>。2015 年有研究指出,外泌体可作为早期肺癌的潜在有效的生物标志物<sup>[34]</sup>。2016 年有研究指出,帕金森病患者尿液外泌体内的富含亮氨酸的重复激酶 2(LRRK2)可作为一种标志物,与疾病严重程度密切相关<sup>[35]</sup>。尤其是 2016 年 1 月 21 日,世界上第一个基于外泌体的癌症诊断产品在美国上市,外泌体作为诊断标志物的研究前进了一大步<sup>[36]</sup>。总之,对于外泌体作为诊断标志物的研究层出不穷,研究者们也正在不断地寻求更好的方法将其运用到临床实践中去。

#### 4.3 外泌体检测与 *KRAS* 突变

结直肠癌细胞 *KRAS* 突变后会释放更多的外泌体,且包含的蛋白质组成改变,这些外泌体携带的蛋白转移到周围的 *KRAS* 野生型细胞会明显刺激其生长<sup>[37]</sup>,这表明外泌体内容物中存在能提示结直肠癌细胞 *KRAS* 突变的成分。有研究显示 *KRAS* 突变率在结直肠癌患者肿瘤组织和相匹配的血清外泌体中分别为 57.6% 和 42.4%,没有显著统计学差异

( $P=0.063$ ),血清外泌体可用于结直肠癌患者的快速非侵入性基因分型检测。该研究还指出与 cfDNA 相比,外泌体携带的基因片段更加丰富且稳定性更好<sup>[38]</sup>。国内也有研究指出外泌体 DNA 突变检测较组织学检测灵敏度为 90.6%,一致性为 81.1%。且外泌体检测反映的是患者的整体状况,并不局限于原发灶的突变,有效避免了肿瘤异质性对检查结果的影响<sup>[39]</sup>。通过对结直肠患者外泌体 DNA 突变频率的连续监测也发现突变频率与西妥昔单抗的疗效具有相关性,即当西妥昔单抗治疗效果好时,患者 *KRAS* 突变频率较低,而当患者对西妥昔单抗逐渐出现耐药时,基因突变的频率则出现明显的升高趋势<sup>[19]</sup>。这进一步说明了外泌体中 *KRAS* 突变情况与西妥昔单抗耐药性有很好的一致性。

#### 4.4 外泌体的分离纯化

目前外泌体的提取分离方法主要有超速离心法、顺序滤过法、尺寸排阻色谱法、磁珠特异性捕获法、聚合物沉淀法等。

超速离心一般和蔗糖密度梯度离心或蔗糖衬垫组合起来分离低丰度外泌体,操作简便,可以获得高纯度的外泌体,是分离外泌体的金标准。但重复离心可能对外泌体的囊泡造成损害从而降低其质量,可溶性蛋白与外泌体形成团块也会导致外泌体污染<sup>[40]</sup>。顺序过滤法是利用不同空隙的超滤膜对样品中不同大小的分子进行分离,此方法简单高效,但外泌体可能会堵塞滤孔,导致膜的寿命缩短,分离效率较低<sup>[41]</sup>。尺寸排阻色谱法也是利用大小来分离外泌体,可以极大保留外泌体的完整性和生物活性,与差速离心法结合可获得高度纯化的外泌体<sup>[42]</sup>。外泌体表面有特异性标记物,磁珠特异性捕获的方法是利用抗体与标记物的特异性结合,将抗体固定在磁珠表面可以实现对外泌体的特异性富集,此法特异性强,但价格昂贵<sup>[43]</sup>。聚合物沉淀法是使用不同体积的含有沉淀物的溶液和生物体液混合,对来自样品的外泌体进行沉淀,目前这类方法市场上已经有比较成熟的试剂盒如 ExoQuick<sup>TM</sup>,但使用聚合物沉淀溶液会产生非外泌体组分的共沉淀,难以洗脱的沉淀剂会影响实验的进行<sup>[44]</sup>。这些方法各有利弊,研究者多根据自己需求和经济水平加以选择,也可以多种方法联合运用。最近,Zhang 等<sup>[45]</sup>还提出了他们研究的微流体装置能检测出微升存在的外泌体并证实了外泌体是卵巢癌的潜在生物标志物。

## 5 结语

综上所述,为了使晚期结直肠癌患者能得到更

为精准的治疗,在使用抗 *EGFR* 单抗治疗时检测 *KRAS* 突变十分有必要。而外泌体在肿瘤检测中表现出了强大的发展潜力,且在结直肠癌中检测 *KRAS* 突变时外泌体检测除了与组织检测体现出较好的一致性外,还具有非侵入、可重复、能在治疗过程中检测 *KRAS* 的变化情况等优点。外泌体的分离纯化方法也在不断完善中。因此外泌体有望成为临床上检测结直肠癌 *KRAS* 突变的新手段。

#### 参考文献:

- [1] Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012 [J]. Int J Cancer, 2015, 136(5): E359-E386.
- [2] Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development [J]. N Engl J Med, 1988, 319(9): 525-532.
- [3] Bardhan K, Liu K. Epigenetics and colorectal cancer pathogenesis [J]. Cancers (Basel), 2013, 5(2): 676-713.
- [4] 李聪. 结直肠癌筛查现状 [J]. 广东医学, 2016, 37(22): 3328-3330.
- [5] Maida M, Macaluso FS, Ianiro G, et al. Screening of colorectal cancer: present and future [J]. Expert Rev Anticancer Ther, 2017, 17(12): 1131-1146.
- [6] Sorich MJ, Wiese MD, Rowland A, et al. Extended RAS mutations and anti-EGFR monoclonal antibody survival benefit in metastatic colorectal cancer: a meta-analysis of randomized, controlled trials [J]. Ann Oncol, 2015, 26(1): 13-21.
- [7] Taniguchi H, Yamazaki K, Yoshino T, et al. Japanese society of medical oncology clinical guidelines: RAS (KRAS/NRAS) mutation testing in colorectal cancer patients [J]. Cancer Sci, 2015, 106(3): 324-327.
- [8] Koustaas E, Karamouzis MV, Mihailidou C, et al. Co-targeting of EGFR and autophagy signaling is an emerging treatment strategy in metastatic colorectal cancer [J]. Cancer Lett, 2017, 396: 94-102.
- [9] Nicholson RI, Gee JM, Harper ME. EGFR and cancer prognosis [J]. Eur J Cancer, 2001, 37(14): S9-15.
- [10] Goldstein NS, Armin M. Epidermal growth factor receptor immunohistochemical reactivity in patients with American Joint Committee on Cancer Stage IV colon adenocarcinoma: implications for a standardized scoring system [J]. Cancer, 2001, 92(5): 1331-1346.
- [11] Wykosky J, Fenton T, Furnari F, et al. Therapeutic targeting of epidermal growth factor receptor in human cancer: successes and limitations [J]. Chin J Cancer, 2011, 30(1): 5-12.
- [12] Herbst RS. Review of epidermal growth factor receptor biology [J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2004, 59(2): 21-26.
- [13] Cunningham D, Humblet Y, Siena S, et al. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer [J]. N Engl J Med, 2004,

- 351(4): 337–345.
- [14] Herbst RS, Shin DM. Monoclonal antibodies to target epidermal growth factor receptor-positive tumors: a new paradigm for cancer therapy [J]. *Cancer*, 2002, 94(5): 1593–1611.
- [15] De RW, Claes B, Bernasconi D, et al. Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis [J]. *Lancet Oncol*, 2010, 11(8): 753–762.
- [16] Loupakis F, Ruzzo A, Cremolini C, et al. KRAS codon 61, 146 and BRAF mutations predict resistance to cetuximab plus irinotecan in KRAS codon 12 and 13 wild-type metastatic colorectal cancer [J]. *Br J Cancer*, 2009, 101(4): 715–721.
- [17] Katsios C, Ziogas DE, Roukos DH. Colorectal cancer: cetuximab, KRAS, BRAF, PIK3CA mutations and beyond [J]. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 2010, 4(5): 525–529.
- [18] Kim ST, Ahn TJ, Lee E, et al. Exploratory biomarker analysis for treatment response in KRAS wild type metastatic colorectal cancer patients who received cetuximab plus irinotecan [J]. *BMC Cancer*, 2015, 15: 747.
- [19] 崔琰. 结直肠癌患者血清外泌体 DNA 与 RNA 中基因突变的研究 [D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院; 2017.
- [20] Heitzer E, Haque IS, Roberts CES, et al. Current and future perspectives of liquid biopsies in genomics-driven oncology [J]. *Nat Rev Genet*, 2019, 20(2): 71–88.
- [21] Xie W, Xie L, Song X. The diagnostic accuracy of circulating free DNA for the detection of KRAS mutation status in colorectal cancer: A meta-analysis [J]. *Cancer Med*, 2019, 8(3): 1218–1231.
- [22] Fu M, Gu J, Jiang P, et al. Exosomes in gastric cancer: roles, mechanisms, and applications [J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 41.
- [23] H Rashed M, Bayraktar E, K Helal G, et al. Exosomes: from garbage bins to promising therapeutic targets [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(3): 538.
- [24] Johnstone RM, Adam M, Hammond JR, et al. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes) [J]. *J Biol Chem*, 1987, 262(19): 9412–9420.
- [25] Choi DS, Kim DK, Kim YK, et al. Proteomics, transcriptomics and lipidomics of exosomes and ectosomes [J]. *Proteomics*, 2013, 13(10–11): 1554–1571.
- [26] Martins VR, Dias MS, Hainaut P. Tumor-cell-derived microvesicles as carriers of molecular information in cancer [J]. *Curr Opin Oncol*, 2013, 25(1): 66–75.
- [27] Peinado H, Lavotshkin S, Lyden D. The secreted factors responsible for pre-metastatic niche formation: old sayings and new thoughts [J]. *Semin Cancer Biol*, 2011, 21(2): 139–146.
- [28] Tetta C, Ghigo E, Silengo L, et al. Extracellular vesicles as an emerging mechanism of cell-to-cell communication [J]. *Endocrine*, 2013, 44(1): 11–19.
- [29] Valadi H, Ekström K, Bossios A, et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells [J]. *Nat Cell Biol*, 2007, 9(6): 654–659.
- [30] Zöller M. Pancreatic cancer diagnosis by free and exosomal miRNA [J]. *World J Gastrointest Pathophysiol*, 2013, 4(4): 74–90.
- [31] Logozzi M, De Milito A, Lugini L, et al. High levels of exosomes expressing CD63 and caveolin-1 in plasma of melanoma patients [J]. *PLoS One*, 2009, 4(4): e5219.
- [32] Baran J, Baj-Krzyworzeka M, Weglarczyk K, et al. Circulating tumour-derived microvesicles in plasma of gastric cancer patients [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2010, 59(6): 841–850.
- [33] Ye SB, Li ZL, Luo DH, et al. Tumor-derived exosomes promote tumor progression and T-cell dysfunction through the regulation of enriched exosomal microRNAs in human nasopharyngeal carcinoma [J]. *Oncotarget*, 2014, 5(14): 5439–5452.
- [34] Frydrychowicz M, Kolecka-Bednarczyk A, Madejczyk M, et al. Exosomes — structure, biogenesis and biological role in non-small-cell lung cancer [J]. *Scand J Immunol*, 2015, 81(1): 2–10.
- [35] Fraser KB, Moehle MS, Alcalay RN, et al. Urinary LRRK2 phosphorylation predicts parkinsonian phenotypes in G2019S LRRK2 carriers [J]. *Neurology*, 2016, 86(11): 994–999.
- [36] Sheridan C. Exosome cancer diagnostic reaches market [J]. *Nat Biotechnol*, 2016, 34(4): 359–360.
- [37] Demory Beckler M, Higginbotham JN, Franklin JL, et al. Proteomic analysis of exosomes from mutant KRAS colon cancer cells identifies intercellular transfer of mutant KRAS [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2013, 12(2): 343–355.
- [38] Hao YX, Li YM, Ye M, et al. KRAS and BRAF mutations in serum exosomes from patients with colorectal cancer in a Chinese population [J]. *Oncol Lett*, 2017, 13(5): 3608–3616.
- [39] 崔琰, 靳杨, 谭招丽等. 结直肠癌患者血清外泌体代替肿瘤组织检测 K-Ras 基因突变的研究 [J]. *临床肿瘤学杂志*, 2017, 22(5): 395–399.
- [40] Momen-Heravi F. Isolation of extracellular vesicles by ultracentrifugation [J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1660: 25–32.
- [41] Heinemann ML, Vykoukal J. Sequential filtration: a gentle method for the isolation of functional extracellular vesicles [J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1660: 33–41.
- [42] Lobb R, Möller A. Size exclusion chromatography: a simple and reliable method for exosome purification [J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1660: 105–110.
- [43] Pedersen KW, Kierulf B, Neurauter A. Specific and generic isolation of extracellular vesicles with magnetic beads [J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1660: 65–87.
- [44] Brown PN, Yin H. Polymer-based purification of extracellular vesicles [J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1660: 91–103.
- [45] Zhang P, Zhou X, He M, et al. Ultrasensitive detection of circulating exosomes with a 3D-nanopatterned microfluidic chip [J]. *Nat Biomed Eng*, 2019, 3(6): 438–451.