生命奥秘

总 131 期 2020/12
LIFEOMICS

细胞外RNA

无奇不有
生命世界
阅读生命
走进科学

目录 CONTENTS

专题:细胞外RNA

前言 01

一、基于胞外RNA诊断疾病 02

二、寻找胞外核糖体的生物学家 08

三、生物外泌体或优于人工纳米颗粒 11

四、膳食RNA或可影响基因表达 16

五、关于膳食RNA的疑惑 19

六、揭开母乳中microRNA的奥秘 23

七、操纵机体的递送服务系统 27

八、干细胞胞外囊泡或能替代细胞疗法exRNA 31

九、植物囊泡启发作物保护新方法 37

十、细胞外RNA研究综述 40

本刊文章主要由国外网站文章编译而成，如有版权问题，请版权所有人与本刊联系。
凡本刊所载文章，版权归作者本人和本刊所有，如需转载，请注明作者及出处“生命奥秘”。
本刊提供的任何信息都不能作为医疗凭证和依据，仅供科研参考。

专题

细胞外RNA

前言

研究人员发现了RNA在医学中的新作用。以前人们认为RNA只存在于细胞内，现在发现它们可以在“细胞外囊泡”的保护下在全身“旅游”。目前科学家正在研究细胞外RNA在检测和治疗疾病方面的潜力。

一、基于胞外RNA诊断疾病

通过癌症筛查和疫苗接种，全球正在消除宫颈癌——女性最常见的癌症之一。

人体组织通常通过在细胞之间来回发送RNA信息而相互通信。因此，从理论上来说，科学家通过“窃听”血液、唾液、尿液和其它体液中携带的这些细胞外信使，应该能够截获

指示健康和疾病的信息。

事实却并非如此。加利福尼亚大学圣地亚哥分校（University of California, San Diego, UCSD）的围产学家Louise Laurent指出，刚开始进入这个领域的时候，大家都太天真了。

Laurent是越来越多的试图开发微创RNA检测技术以用于癌症、心脏病、神经退行性疾病和其它疾病的早期检测和临床管理的科学家之一。期间，细胞外RNA（extracellular RNA, exRNA）分子固定的多样性，以及运输它们的载体都给研究人员带来了巨大的挑战。Laurent表示，大家最开始应该都没有预测到exRNA的复杂性。Laurent的研究重点是使用exRNA预测妊娠并发症。

RNA谱数据库具有极大的异质性，因此从背景分子噪声中辨别临床上有用的生物标志物非常困难。此外，更有挑战性的是，用于在生物样品中收集、处理和分析exRNA的各种各样的技术都遇到了不同的难题。这些挑战让研究人员无法很好地比较不同实验室的结果——这恰恰是发现和验证exRNA生物标志物的必要步骤。

例如，其中挑战性比较大的一个技术是分离细胞外囊泡（extracellular vesicle, EV）的策略。囊泡通常为人类细胞大小的千分之一，表面有脂肪分子形成的被膜，以保护其内容物免受存在于大多数生物流体中的RNA降解酶的伤害。在一项开展了大约1700项囊泡相关实验的研究中，研究人员发现了1000多种独特的方案，这些方案都可从生物流体中提取EV。技术过程差别不大，例如都可以采用不同的转子来分离不同的成分。但正如该项研究的作者、比利时根特大学（Ghent University）研究EV的癌症生物学家An Hendrix指出的一样，更改一些参数确实会影响从样本中获得的囊泡的性质。

在过去的5年中，基于exRNA诊断方法的研究深入，大学和公司也正在涉足这一领域，以期找到可以应用于临床的技术。科学家在生物学和技术领域都取得了诸多进步，比如已经明确了RNA分子如何包裹进入囊泡或其它载体，以及这些分子衍生物在各种生理或病理条件下所起的作用。

得益于胞外RNA通讯联盟（Extracellular RNA Communication Consortium, ERCC）等项目，学界也正在开发新方法来改善exRNA检测的标准化和可重复性。ERCC由NIH于2013年发起，耗资1.6亿美元，为期10年，旨在启动基于exRNA的诊断和治疗方法的临床开发。

尽管基于胞外RNA的诊断方法在临床应用上困难重重——尤其是获得纯净囊泡的能力。一些依靠生物流体中exRNA印迹的“液体活检”测试已经投放市场，为面临诊断信息不明确的癌症患者提供了有用的信息。类似的诊断探针还可以用于各种疾病。

据分子遗传学家Danilo Tagle评价，该领域取得了长足发展。Danilo Tagle认为，这促使一些公司正在将其中一些方法商业化。他是NIH位于马里兰州贝塞斯达（Bethesda）的美国国家转化科学促进研究中心（s National Center for Advancing Translational Sciences）特殊计划的副主任，并正在协助协调ERCC。

在马萨诸塞州沃尔瑟姆的一个实验室，技术人员每月平均要处理数千瓶尿液。他们从每个样本中提取所有EV，然后分离出很多其中包含的RNA。

这是Exosome Diagnostics的所在地，它是Bio-Techne的子公司，也是世界上第一家提供基于EV的临床诊断分析的公司。这项名为ExoDx的测试是为年龄较大的男性开发的，这些男性血液中的前列腺特异性抗原（PSA）水平略有升高，需要采用ExoDx来帮助他们决定是否进行前列腺活检。

前列腺穿刺活检是将一根大约针头宽度的针头穿过直肠，并取出一小块组织。该手术常见的副作用包括疼痛、流血、感染和膀胱疾病等。但是如果不进行活检，可能很难发现哪些患者的肿瘤需要切除，而哪些只需要随访监测。目前的估计是，在PSA结果中等的男性中，不到四分之一的人患有侵略性癌症。

ExoDx的目的是通过量化尿液样本中EV中的三种特定RNA分子水平，帮助更多的男性不用接受浸润性活检以及随后的过度治疗。其中两个基因涉及编码调节蛋白——一个促进癌症，一个抑制肿瘤；而第三个RNA分子与一种促进合成某种参与前列腺癌发展的非蛋白质编码RNA的基因有关。通过评估这些基因的相对活性，该测试能够估算个体罹患侵略性前列腺癌的风险。

两项包括1000多名中度PSA水平男性的临床试验证明ExoDx具有较高的预测能力，可以预测哪位患有令人担忧的癌症，应考虑进行活检，而哪位患者只是良性疾病，可以合理地选择进行积极监控。

该公司的业务正扩展到其它临床领域。目前正在开展的第二项基于EV的尿液测试将能提早预测哪些肾脏移植接受者有排斥其供体器官的风险。该公司还在开发一种基于exRNA和循环肿瘤DNA的血液测试，以检测肺癌患者的基因突变。Exosome的联合创始人兼首席科学官Johan Skog表示，这不仅仅是诊断，这是一个平台。

许多其他分子诊断公司和学术研究团队也正在研究exRNA，以发现癌症的警告信号以及帮助进行风险分层。例如，位于加利福尼亚州森尼韦尔的Cepheid和位于新西兰但尼丁的Pacific Edge都提供尿液检测，可以检测5种蛋白质编码RNA的水平，以鉴定最早的膀胱癌和监测治疗后的复发征兆。该策略遵循Exosome尿液检查的逻辑——收集靠近恶性肿瘤源的体液，并检测来源于肿瘤的RNA。还有公司采用了相同的方法来测试脊髓液中与脑癌相关的RNA和唾液中与口腔癌相关的RNA。值得一提的是，肿瘤释放的RNA可以遍布全身。

大多数团队都在寻找血液中的这些系统性exRNA的足迹。而加利福尼亚大学洛杉矶分校（University of California, Los Angeles）的口腔生物学家David Wong已证明在唾液中也可以检测到exRNA。Wong与首尔三星医学中心（Samsung Medical Center）的临床合作者合作，检查了约2500位志愿者的唾液，并确定了由9种RNA（某些人类、某些细菌）组成的唾液特征，据此可以高度预测谁会患上胃癌——胃癌是韩国最常见的恶性肿瘤。

Johan Skog在马萨诸塞州沃尔瑟姆市Exosome实验室中处理样品。

多领域应用

无论选择哪种体液，exRNA可能仅构成诊断方程式的一部分。这就是Freenome在结直肠癌筛查领域采用多组学方法，试图捕获整个肿瘤生物学的原因。该公司正在分析血液样本中的蛋白质、DNA、表观遗传生物标志物和RNA以及其它循环疾病指标。

Freenome首席科学官Jimmy Lin指出，他们需要不同诊断方法的广度。要想揭露潜伏在分子阴影中的癌症，仅凭一种分析物是无法检测出所有信息的。该公司位于加利福尼亚州南旧金山。

Freenome的科学家在今年的一次会议上报告（请参阅go.nature.com/3ge6wjc），该公司的平台通过机器学习算法来筛选大量生物

学数据。该平台收集了90%以上的癌症病例，并且优于已批准的基于粪便的测试。基于粪便的测试是目前结肠癌筛查中唯一可替代结肠镜检查的方法。而由于结肠镜检查的不便和不适，许多人会回避常规结肠镜检查。

少数专注于exRNA的新兴公司正在开拓癌症诊断以外的领域，并且开始关注心脏和大脑疾病。例如，位于马萨诸塞州列克星敦的Dyrnamix正在开发exRNA诊断技术，以为心血管疾病患者提供个性化治疗。与此同时，位于纳蒂克（Natick）几公里外的Neurodex正通过从血液中捕获神经元衍生的外来体，并仔细分析其中的RNA和蛋白质，以期发现阿尔茨海默氏病的早期迹象。

Neurodex首席科学官Erez Eitan指出，一般来说，神经科学家对RNA不感兴趣。据他解释，与癌症不同，神经系统疾病的病理学是蛋白质水平的，而不是DNA或RNA水平的，因此研究人员对RNA在神经变性中的作用了解不多。

这部分解释了为什么大多数对阿尔茨海默氏病的实验性血液测试针对的是β-淀粉样蛋白片段，活化的tau或某些其它蛋白质的水平——这些蛋白质在大脑中的积累是阿尔茨海默氏病的标志。加利福尼亚州圣地亚哥的退伍军人事务应激和心理健康事务中心（Veterans Affairs Center of Excellence for Stress and Mental Health）的神经科学家Victoria Risbrough表示，这种策略类似于翻阅某人的垃圾箱来推测他们的生活。Risbrough建议，更好地理解疾病的发生和发展的方式可以了解它们的通讯——也就是exRNA所传达的信息。

Risbrough指出，RNA使你了解可能导致某种病理的原因。Risbrough目前正与UCSD神经病理学家Robert Rissman合作开发创伤性脑损伤的诊断方法。有了这些方法，你就不需要再去翻看“垃圾”，而是直接查看他们的“短信”。

脑疾病的广泛筛查测试仍然是最终目标。但据位于新泽西州蒙茅斯章克申的DiamiR联合创始人兼首席执行官Kira Sheinerman所说，大多数运用exRNA诊断的最初客户可能是进行研究性治疗的临床试验的制药公司。

例如，通过DiamiR测试，科学家可以检测大脑中富集的、与验证相关的微小RNA（microRNA）。Sheinerma等人已经表明，他们可以以84%的准确性预测那些没有认知障碍迹象的老年人是否会发展为阿尔茨海默氏病。Sheinerman表示，这类信息可以帮助药物开发人员和临床研究人员更好地识别出有症状的阿尔茨海默氏症患者。这些患者可能是正在接受临床评估的实验疗法的良好候选人。

波特兰俄勒冈健康与科学大学（Oregon Health and Science University）的神经学家Joseph Quinn认为，即使这些exRNA测试没有得到广泛使用，在产生这种疾病的新假设方面也有价值。Quinn与分子神经生物学家Julie Saugstad合作，发现了一系列对阿尔茨海默氏病具有诊断潜力的microRNA，这可能为将来的药物开发指明一定的生物学途径。但是，

Quinn提醒，这个过程的机制仍然没有被很好地理解。因此，与许多其他研究人员一样，他在exRNA诊断领域的努力仍处于探索阶段。

该探索的一部分涉及开发工具以完善分离EV的方法。尽管一些研究人员在未抽提出体液中囊泡的情况下，成功地对exRNA进行了分析，但这种大规模分析RNA的方法通常会漏掉一些与生物学相关的微小信号。因此，该领域正稳步地实现从对人类体液中所有RNA进行测序，到只对目标器官分泌的特定囊泡中的RNA进行测序的转变。波士顿麻省总医院（Massachusetts General Hospital）心脏电生理学家，Dyrnamix联合创始人Saumya Das指出，现在是时候靶向发出信号的位置了。

科学家通常通过在超速离心机中旋转样品来提取EV，然后根据分子成分之间的大小和密度的差异来获得目标囊泡。但是这种方法并不完美。荷兰乌得勒支大学（Utrecht University）免疫细胞生物学家Esther Nolte-’t Hoen认为，这种方法仍然存在一些缺陷——仅仅基于大小和密度，是无法获得100%纯度的EV的。

开发中的技术包括通过各种直径的细孔来过滤囊泡，或使用结合剂将目标囊泡从样品中提取出来。无论采用哪种方法，都需要使用经过验证的参考材料才能进行准确的校准。然而，直到最近这种标准参考材料才出现。

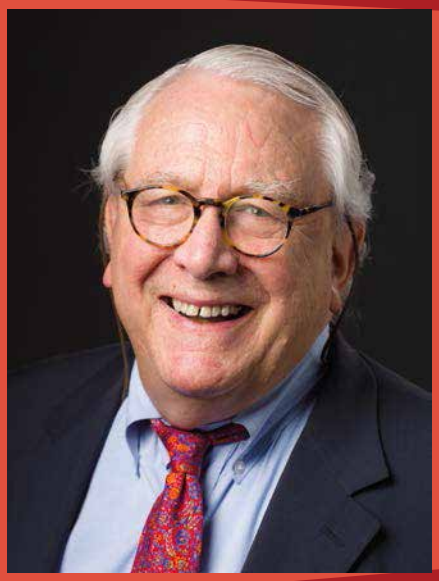
例如，去年，根特大学（Ghent University）的Hendrix等人开发了一种生物工程囊泡，可以将其掺入到生物流体中，然后进行实验跟踪，以帮助检查样品制备和分析方案的准确性。Hendrix指出，该领域一直在寻找这样的参考材料。Hendrix与全球数十个实验室分享了她的可追踪囊泡技术。她表示，每次在会议上介绍该技术之后，她都会收到多个请求。

Hendrix和其他人，包括Nolte-’t Hoen，都在积极地参与社区建设和数据报告计划，以确保对含RNA囊泡的研究，包括那些专注于疾病诊断的囊泡，能够得到正确的解释和重复。Nolte-’t Hoen指出，从科学上讲，这也许不是最令人兴奋的事情，但这是非常必要的。

目前NIH正通过其庞大的数百万美元的财团致力于寻找分离单个EV并分析其内容物的更好方法。如今，很少有基于exRNA的诊断测试能够达到这种水平的精确度——许多方法根本不富集囊泡。不过，对于许多临床应用而言，富集囊泡并非必须。

但是，Tagle指出，为了显示严谨性，你需要知道你的信息源来自何处，这样才能确保更可靠和可重复的结果。

二、生物外泌体或优于人工纳米颗粒



Philip W. Askenase是康涅狄格州纽黑文耶鲁大学医学院（Yale University School of Medicine）的免疫学家。

邮箱：philip.askenase@yale.edu

Philip W. Askenase指出，自然产生的外泌体是治疗的理想选择，而且优于人工纳米颗粒。

外泌体是一个轰动学界的生物学发现。这些微小的脂囊——细胞外囊泡中最小的一种——由所有动物的所有细胞产生并分泌。细菌也产生非常相似的纳米囊泡。

外泌体存在于所有的体液中，似乎参与了几乎所有的生物过程。外泌体的主要功能是进入细胞，或者在组织附近，或者在通过血液后系统地进入细胞传递它们所携带的遗传信息。特别需要指出的是，外泌体转运microRNA (miRNA)——长度大约为22个碱基的小核糖核酸聚合物。外泌体携带的细胞外miRNA可诱发受体细胞核内DNA的改变，细胞DNA的修饰会进而改变蛋白质的产生，从而改变细胞的功能。外泌体是一种未被预料到的通用纳米颗粒，它可以介导以前未被发现的生物过程，并改变细胞和整个生物体的分子和代谢途径。

这些万能的生命纳米颗粒可能具有重大的医学意义。它们可能会帮助研究人员更好地了解疾病的机制，引导研发新的诊断测试，或许最重要的是，成为新的药物递送方式。实现这一切的前提是，研究人员更深入地研究这些自然实体。

不幸的是，生物医学工程师把注意力放在了另一种不太有希望的途径上：开发模仿天然外泌体功能的人工纳米颗粒，用于药物和小核糖核酸的递送。自然产生的外泌体经过数十亿年的进化形成了最佳的工具，而工程纳米颗粒却有诸多缺点：外泌体可以穿过血脑屏障等自然组织屏障，在给药后药效可以持续4-5天，并且可以进入血液；人工纳米颗粒不能穿过这些屏障，而且会被探测外来物质的机制迅速消除。血液中的天然外泌体能避开生理清除机制，但工程纳米颗粒会被吸收和破坏。

外泌体膜由独特比例的脂质成分组成，这使它们具有高表面粘度和刚性。这种成分有助于它们在能杀死细胞的恶劣条件下存活。这些特性可能源于生物进化开始时，甚至在细菌发展之前，远古囊泡存活的有毒的原始海洋环境。

外泌体对恶劣环境（如胃酸和消化酶丰富的环境）具有显著的抵抗力，这意味着它们可以口服给药。与静脉注射、腹腔注射和皮下注射相比，口服给药对病人，尤其是儿童来说更容易接受，体验更舒适。口服给药在小鼠中也被证明是一种更好的给药方法。

外泌体的稳定性和弹性只是外泌体被选作局部和系统治疗中递送遗传和抗炎分子载体的部分理由。它们还可以有其它的用途。外泌体有很多优势：外泌体可以从健康个体中分离出来，然后通过一种名为抗原或抗体亲和层析的纯化方法得到富集以增强治疗效果；在某些情况下，外泌体还可以跨物种使用，而且无需担心免疫或遗传不相容，因为miRNA通常是普遍存在的；来自植物的外泌体甚至可能有一些医疗用途。而且由于外泌体不包含全长DNA，因此它们不太可能导致癌症。

与人工药物载体相比，外泌体在靶向方面也具有优势。一些外泌体可以在其表面与特定的抗原特异性抗体链结合。这使外泌体在这方面的优势无与伦比——能够特异性靶向表达特定表面抗原的受体细胞。研究人员可以通过简单手段使外泌体载带具有改变基因能力的miRNA——激活的外泌体可以通过孵育与选择的miRNA结合。因此，外泌体既可用于对抗病原体，又可促进多种疾病的基因治疗。

研究表明，外泌体可能对癌症、多发性硬化症、类风湿关节炎、中风、脊髓损伤、心肌梗死和肺纤维化等疾病有效。此外，研究人员已经开始使用外泌体治疗神经系统疾病，如阿尔茨海默病、帕金森氏病，甚至自闭症谱系障

碍。当然，在携带RNA的外泌体能够发挥其治疗潜力之前，还需要做更多的工作。一项重要的任务是确定外泌体表面分子的性质，使它们能够与靶向抗体结合，以及分子修饰，使它们也能与选定的治疗RNA结合。而人工纳米颗粒不具备这些能力。现在是研究人员开启一个新时代，开发自然外泌体囊泡载带RNA治疗可能性的时候了。

资讯 · 频道

www.LifeOmics.com

三、寻找胞外核糖体的生物学家

Juan Pablo Tosar分析了经过离心机处理的样本的细胞外RNA。

一个偶然的发现让Juan Pablo Tosar发现了细胞外的蛋白质制造机制——这一发现让科学家重新思考了其基本的假设。

如果Juan Pablo Tosar 不是那么健忘，他就不会无意中发现一项可能颠覆细胞生物学基本原理的发现。2016年，在获得博士学位两个月后，Tosar 在乌拉圭蒙得维的亚巴斯德研究

所（Pasteur Institute of Montevideo）的一个实验室里接受了处理乳腺癌细胞样本的任务。其目的是去除细胞和膜结合结构，以便研究人员能够只研究存在于细胞间液体中的分子。为了分离出不需要的成分，Tosar 必须在离心机中旋转样品。根据标准协议，他应该将离心机的可拆卸转子冷却到4℃，以保护样品不被降解。Tosar指出，正确的做法是前一天晚上把它放在冷库里。有时他会忘记，所以转子没有预冷。不过，他还是会继续进行实验，他当时想，应该差别不大，但是结果却差异巨大。

当Tosar 充分冷却转子时，分析结果显示出一个微小的峰，这表明细胞外空间存在大的RNA分子，理论上这里不应该有大的RNA分子。但当他忘记进行冷却步骤时，那个小峰就消失了。这种反常现象激起了他的好奇心。

Tosar 隐约觉得，这可能是一个重大的发现。RNA有很多种，最大的可以形成核糖体。核糖体是其它种类的RNA将遗传密码转化为蛋白质的必要装置，它们只在细胞内发挥作用，是生物学的一个基本原则。但是如果这些关键的蛋白质工厂也漂浮在细胞外空间里呢？来自Tosar 的意外的温度过高的离心机的数据表明了这种可能性。

试着去理解事物是如何运作的以及跳出既定框架去思考，这一直是Tosar 的天性。作为一个在乌拉圭长大的14岁男孩，他的业余爱好是开发电脑游戏，比如一种扑克游戏，玩家可以通过多拿几张牌来作弊。但是，有一天，他的父母把电脑拿去修理，而商店的人错误地删除了所有的数据。这段经历让Tosar 非常痛苦，他发誓再也不从事计算机科学，最终转向了生物学。

他的职业道路最终引导他进入蒙得维的亚巴斯德研究所（Pasteur Institute of Montevideo），在那里他遇到了他的导师，生物学家Alfonso Cayota。Cayota试图弄清楚RNA在细胞通讯中的作用。RNA最为人所知的作用是帮助细胞通过一种被称为翻译的过程，在细胞膜内将DNA转化为蛋白质。但是Cayota的研究小组正在研究的是存在于细胞膜外的细胞外RNA （exRNA）。越来越多的证据表明，细胞利用exRNA来影响彼此。

作为Cayota实验室的一名博士生，Tosar检查了他能找到的每一种exRNA。当时，许多研究人员都把注意力集中在被称为细胞外囊泡（extracellular vesicles, EV）的微小膜结构内的exRNA上。EV包括一种被称为外泌体的小类型，由细胞释放到细胞外空间。但Cayota和Tosar 采取了不同的方法。他们决定研究在这些结构之外发现的exRNA。2015年，他们和同事报告称，不同类型的exRNA独立于外泌体存在。这些组合包括转运RNA （tRNA）分子，它们对将蛋白质的氨基酸构建块运送到核糖体非常重要。研究人员的后续实验表明，tRNA可以在细胞和外泌体外保持稳定的构象。

就在此时，Tosar 从他忘记冷却的离心机中得到了奇怪的结果。他决心弄清楚是什么导致了这些问题。在乌拉圭，他发现很难获得一些必需品，比如某些试剂。于是他申请到了马萨诸塞州波士顿布列根和妇女医院（Brigham and Women’s Hospital）Pavel Ivanov实验室三个月的试用期，以推进这项研究工作。他说服身为儿科医生的妻子，在2019年春天带着蹒跚学步的孩子和三个月大的婴儿搬到了那里。在接下来的几个月里，Tosar 试图证实这些结构实际上是核糖体。

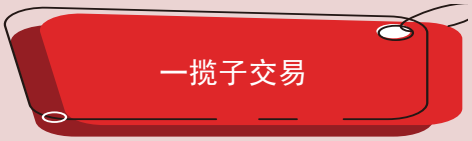
为了放大核糖体RNA的信号，Tosar 在样本中添加了一种名为核糖核酸酶抑制剂的化合物，它可以阻止自然产生的酶消化RNA。当他这样做时，核糖体RNA的小峰变得巨大。这表明，核糖体RNA存在于囊泡外的细胞外空间，尽管在身体的天然酶开始工作之前是短暂的。他的研究成果已于1月3日发表在bioRxiv预印

本服务器上，目前正考虑发表在杂志上。他还详细说明了这些细胞外核糖体在与携带能量的ATP分子混合时是如何被激活的——这表明它们有可能在细胞外产生蛋白质。

荷兰乌得勒支大学（Utrecht University）研究细胞外信号的Esther Nolte-＇t Hoen表示，这些数据发人深省。蛋白质转译发生在细胞外的可能性可能一直被忽视，因为细胞培养条件通常不允许核糖体保持稳定。

Tosar 认为，这种可能性的存在令人难以置信地兴奋。这项工作仍处于初步阶段，需要其他研究小组进行复制。但是，如果蛋白质是在细胞之间的空间合成的，这意味着细胞之间存在超乎生物学家想象的更多的交流方式。药物制造商可以利用这一现象，将蛋白质药物的基因模板直接传递到细胞外核糖体。有时Tosar觉得虽然伟大的发现好像是几十年前的事了，但当你看到这样的东西时，你还是会觉得有一个完整的世界等着你去探索。

Juan Pablo Tosar握着他在实验中忘记冷却的离心机转子。



随便拿起一本生物学教科书，你都能找到上世纪50年代发现DNA结构的记载，以及科学家是如何发现某种RNA作为该信息的副本的。多年来，人们一直认为所有这些遗传信息都是在细胞内部携带的。但几十年后，研究人员开始质疑这一简单的观点。

1983年，也就是Tosar 出生的前几年，业界发表了两篇论文，描述了细胞外小泡的存在。在其中一篇重要论文发表后不久，生物化学家Rose Johnstone创造了外泌体这个术语。然而，这些发现逐渐成为历史，直到1996年乌得勒支大学（Utrecht University）的研究人员发现免疫细胞大量产生外泌体时，这一领域才开始蓬勃发展。

但即便如此，一些科学家还是驳斥了这些囊泡含有RNA的说法。许多人只是拒绝接受活细胞会系统地释放遗传物质这一观点。在瑞典哥德堡大学（University of Gothenburg）研究外泌体的Jan Lotvall，还记得他在2007年报告外泌体可以运送RNA然后在细胞间穿梭时所面临的怀疑。他指出活细胞不仅会释放遗传物质，而且还会从其它细胞那里得到这些物质。这种细胞间的信号传递是一个人们难以接受的概念。生物学家知道神经通过电信号相互刺激，以触发远端细胞的激素等化学信使。但是，细胞之间共享核酸包裹的想法，提出了一个全新的细胞通讯领域。Lotvall表示，当他们发表这篇文章时，他失去了资助。资助者不愿意支持他提出的后续实验。而目前该论文已被引用超过5000次，成为该领域的一项开创性研究。

Cayota听说了Lotvall在细胞外遗传物质方面的发现，决定鼓励他的实验室成员，包括正在进行研究生学习的Tosar，也去寻找这方面的迹象。与此同时，其他科学家开始得到数据，暗示核糖体成分可能存在于细胞外。2009年，韩国浦项科技大学（Pohang University of Science and Technology）的一个研究小组在结肠直肠癌细胞周围的液体中发现了EV内核糖体亚基的迹象。次年，马萨诸塞州波士顿哈佛医学院（Harvard Medical School）的一个研究小组在人类尿囊中发现了核糖体成分。去年，研究人员发现了细胞外空间存在核糖体的间接证据。他们发现细胞外信使RNA（ex-mRNA）链，比预期的要长。科学家提醒，这“表明ex-mRNA片段受到核糖体的保护”，意味着它们与核糖体的物理联系可能使它们免受降解酶的影响。

Tosar对小泡外的细胞外核糖体的研究正是基于这项工作。值得注意的是，他的研究不仅发现了核糖体的碎片，还发现了完全完整的核糖体的证据。他的同行们指出，Tosar这个研究，让研究人员更加关注细胞外空间的遗传机制的潜在意义。在马里兰州巴尔的摩的约翰霍普金斯大学（Johns Hopkins University）研究exRNA，过去曾与Tosar合作的分子生物学家Kenneth Witwer认为这是一件大事，Tosar是他非常尊敬的思想家。

华盛顿西雅图太平洋西北研究所（Pacific Northwest Research Institute）的资深科学家Roger Alexander也注意到了Tosar 的工作。Alexander表示，Tosar在一个他认为非常重要，但在这个还没有得到足够关注的领域里打开了新局面。那里有很多有趣的生物学和临床潜力。

胞外核糖体从何而来？

Tosar 正在努力解决的一个大问题是，他样本中的核糖体物质从何而来。这些结构是否被活细胞有效地包装和转运出去？或者它们只是一个垂死的细胞的副产品，当细胞的膜破裂时，它们和细胞的其它内容物一起溢出到细胞外空间？Tosar指出，他们可能只是看到了细胞释放到细胞外空间的垃圾。

Witwer表示，核糖体相对较大的事实让他很难想象，如果不进行大EV操作，核糖体将如何从细胞中排出。因此，他认为，独立漂浮在细胞外空间的核糖体的主要来源可能是死亡细胞。事实上，早在2006年，科学家在对人类膀胱癌细胞系的实验中就报告了被破坏细胞的数量和细胞外核糖体RNA的数量之间的相关性。

核糖体并不能抵抗胞外降解酶的作用。所以它们在细胞外究竟具有什么生物学功能还不清楚。由于核糖核酸酶等酶的作用，游离在细胞外的exRNA通常会在“几秒钟内”消失。据Witwer解释，我们只能说，在细胞外空间，核糖核酸酶占优势。Tosar推测，当细胞死亡时，如果核糖体被释放到细胞外空间，它们可能是向免疫系统发出信号，告诉免疫系统出了问题。核糖体是一种异常大的复合物——30 nm宽，而其它常见的蛋白质，如白蛋白，大约4 nm宽。它们的尺寸可能使其更容易被免疫细胞发现，从而触发某种保护反应。

Witwer认为，exRNA信号也可以作为一种疾病的生物标记物，应用于临床。

为了确保包括细胞外核糖体在内的外核糖核酸（exRNA）能够存留足够长的时间以发挥作用，Witwer预测，从患者身上抽取血液的技术人员需要立即将样本与抑制剂混合，以阻断酶的作用。因此躲过降解的exRNA可以提供关于细胞信号传导或癌症等疾病中细胞死亡的信息。

尽管Tosar的数据表明他发现的细胞外核糖体有被激活的潜力，但他仍有很多工作要做来证明它们可以将信使RNA转化为蛋白质。证明细胞外的核糖体是否能做到这一点非常重要——如果它们能产生蛋白质，就可能在细胞间充当新的信号系统，甚至可以改变作为组织结构骨架的细胞基质。Tosar正在进行的实验之一是将核糖体分离出来，查看mRNA是否仍然装载在它们上面。

许多exRNA研究人员仍然记得自己早期受到的质疑，所以他们对Tosar等人的核糖体发现持开放的态度。Lotvall仍然记得他第一次报告外泌体结果时所面临的怀疑。Tosar表示，他应该对它们持有开放的态度，这肯定是可以被证明具有生物学重要性的东西。

Tosar知道，对于大多数生物学家来说，核糖体RNA漂浮在细胞之间的空间是令人不安的，因为它挑战了长期以来的观点，即细胞的所有机制都包含在细胞膜内。来自他的意外发现的非冷却转子实验的证据是初步的。但他希望人们能够考虑这样一种可能性，即像核糖体这样的机制可能并不局限于细胞内部，细胞外空间可能是细胞本身的延伸。如果exRNA不被限制，那么我们的思维也不应该被限制。

四、膳食RNA或可影响基因表达

Kenneth Witwer是位于马里兰州巴尔的摩的约翰·霍普金斯大学（ohns Hopkins University）的分子生物学家。邮箱：kwitwer1@jhmi.edu

Kenneth Witwer指出，食物中的RNA可能会对人体消化系统和更广泛的健康产生深远的影响。

19世纪中叶，德国哲学家Ludwig Feuerbach写了一篇关于食用化学物质对人体组成和功能影响的专著。在他的著作中，他断言食物甚至会影响认知，并因此创造了一个短语：“你就是你吃的东西”（You are what you eat）。他指出，给人们提供更好的食物，能够影响世界。

由此，营养学研究取得了实质性进展。人体如何从食物中提取分子结构单元和能量是众所周知的。但是食物仅仅是作为燃料，为人体提供营养素吗？2012年，一篇文章提出了一个新观点：饮食中可能存在与人体基因互动的成分。

该研究（Zhang, L. et al. *Cell Res*. 22, 107–126 (2012).）的作者报告，水稻中名为microRNA（miRNA）的短RNA积聚在人体组织中，并调节重要的肝酶。这种调节是如此有效，以至于令人惊讶的是，基于植物的饮食似乎可以显著提高小鼠体内循环胆固醇的水平。这篇论文和来自同一团队的、有关食用包含RNA的颗粒（包括细胞外囊泡（extracellular vesicle, EV））的其它报告引起了人们极大的兴趣。

但是，尽管科学家进行了大量复制和分析研究，但很少或根本没有观察到饮食RNA的系统吸收。一些研究者忠实地重复了最初的实验，但是在将接受了营养均衡的、基于大米饮食的小鼠与仅喂食大米的动物进行比较后，发现胆固醇的增加并不是miRNA转移的结果，而是针对营养不足的饥饿反应（对照组小鼠只食用大米，营养不足）。在今年对奶牛开展的一项研究中，研究人员发现，在出生后的24小时内，小牛可以吸收母乳中的抗体，蛋白质和脂质膜很容易转移到小牛的循环系统中，但RNA却没有。

但是，全身性转移并不是饮食中的RNA以营养素以外的方式影响健康的唯一途径。膳食RNA载体可以进入消化道的上皮细胞和免疫监视细胞。它们还可能与生活在肠道中的各种微生物群落相互作用。

科学家可以利用这种相互作用递送治疗性小RNA链以治疗特定的疾病。RNA从一种生物体向另一种生物体转移的早期证据来自以下发现：细菌经口服给予后，可以将治疗性RNA转移至移植到小鼠中的人类结直肠癌细胞。细菌无需自我复制即可发挥作用，因此细菌囊泡应该也能发挥此作用，可以成为更安全且高度可扩展的细菌替代品。而且细菌囊泡并不是唯一可能的递送载体。研究表明，将食用植物混合并分解，形成类似于囊泡的纳米颗粒，这些颗粒可以将RNA和小分子药物递送至上皮细胞。以食物为基础的RNA输送策略风险很低，因为没有证据表明膳食RNA有害。

这些植物“冰沙”产生的颗粒可能会影响肠道微生物组，RNA可能在其中起到重要作用。由于微生物组失衡现已成为癌症和神经退行性疾病等疾病中公认的因素，因此我们应该更深入地研究饮食中RNA和EV的影响。从理论上说，食品中的膳食RNA或工程RNA添加剂可以通过靶向必需的遗传元素来减轻或消除病原体，也可以用于微调肠道中微生物的平衡，因为不同的RNA分子在不同的肠道微生物群体中可以发挥不同的作用。

Feuerbach在其论文中指出，德国人的起义失败，是因为他们吃了太多土豆。他认为，富含这种饮食会带来政治变化。这种想法现在看来很古朴，因为通过食用microRNA改变一个人的政治行动非常牵强。

研究饮食RNA是否传递到消化道细胞和肠道微生物的方式非常多。这些研究必须包括适当的控制措施，以确定饮食中的细胞外RNA是否主要以分子构件的形式提供营养，或者是否将特定的RNA序列转移到了微生物或宿主肠道细胞中，从而调节其它核酸。

如果后者是正确的，那么研究人员将需要确定天然饮食RNA是否具有治疗效果，或者是否有必要引入天然或合成RNA的囊泡。同样，植物“冰沙”、未经加工的食物是否可以传递RNA，或者是否必须从这些来源中分离和浓缩类似于EV的颗粒？

最后，必须阐明受体细胞中RNA的递送机制和作用机制。确切了解RNA的吸收方式以及如何发挥调控作用，这样有助于利用和增强这些机制。尽管无法预测这些实验的结果，但这些发现可能会促成新的疗法：使用特定的食物和加工方法，治疗疾病或增强肠道健康。

因此 Feuerbach的想法可能在分子水平上是正确的。

五、关于膳食RNA的疑惑

科学家正致力于研究一个极端的观点，即来自食物的microRNA可以直接影响人类的基因表达。

直至2011年9月，Janos Zempleni的主攻方向都是研究哺乳动物机体如何利用化合物，如维生素，但最近在线新发表的研究论文却改变了他的研究方向。

内布拉斯加大学林肯分校（University of Nebraska–Lincoln）的分子营养学家Zempleni，与这个领域内的其他研究者一样，被发表在《细胞研究》（*Cell Research*）上的一项惊人的研究结果所震撼。该研究表明，食物可以提供营养物质以外的东西，即来自于摄取的植物信息可以控制哺乳动物基因的表达和沉默。在研究中，研究人员称，在小鼠、奶牛和人类的血液中发现了源自植物（如水稻）的非编码RNA分子的极短片段——microRNA（miRNA）。而在小鼠模型中，一种特殊的大米衍生的miRNA似乎到达了肝脏，在那里它直接抑制了一个基因的表达，而这个基因通常用来清除血液中“有害的”低密度脂蛋白胆固醇。在了解到这项研究后，Zempleni很想跟踪研究饮食成分可能转移的遗传物质，并进一步确定这种现象究竟有多广泛。

当约翰霍普金斯大学（Johns Hopkins University）医学院的分子生物学家Kenneth Witwer 读到这篇论文时，他马上意识到这项研究的潜在意义。他认为这很神奇，并且他也想研究这个方面。他记得当时觉得，也许这是一些进化上的保守方式，我们可以从食物中提取别的东西，而不仅仅是营养。他利用自己实验室的一些资源，并着手尝试通过自己的小型动物研究来验证这项结果。

但对《细胞研究》（*Cell Research*）的疑虑很快就开始浮现。不仅Witwer和其他一些研究者无法重复这些研究结果，而且研究的一些基本前提也受到质疑。科学家怀疑饮食衍生的miRNA能否以足够的水平进入动物宿主的循环系统，从而产生有意义的影响。后续工作也显示，“饮食衍生”的miRNA极有可能是污染的结果。

最初人们对大米衍生的miRNA可能对健康产生影响的兴奋逐渐减弱，包括Witwer在内的一些研究人员已经完全放弃了对它的研究。但另一些人则坚持认为，我们吃的东西可以直接影响基因表达。关键的是要更清楚地了解人类与食物的关系，以及人类如何从食物中获益。

在短暂而令人失望的寻找人体内西兰花特有的miRNA之后，Zempleni将注意力转向了牛奶中的miRNA。他表示之所以选择牛奶，是因为牛奶对婴儿营养的重要性，以及美国人对牛奶的大量消耗。

Zempleni想知道牛奶中的miRNA是否跨越了胃肠道。但他很快遇到了一个问题：miRNA分子本身在肠道中会被迅速降解。Zempleni表示，他们意识到，重要的其实不仅仅是miRNA，同样重要的还有这些miRNA被包装的外壳。这个外壳是一个被称为外泌体（exosome）的囊泡状容器。据Zempleni解释，为了使miRNA能够被生物利用并从肠道吸收，它们必须被封装在这些外泌体中。正如其他人所展示的那样，脆弱的miRNA需要在这些容器中得到保护，才能在细胞间转运。

外泌体解释了miRNA如何能在宿主的消化道中保持完整，下一个挑战是研究它们如何最终进入机体的不同部位。为了测试牛奶中的miRNA是否能跨越小鼠的肠道，Zempleni等人设计了一种用荧光复合物标记牛奶外泌体中的miRNA的方法，它可以在动物模型中示踪miRNA。Zempleni表示，这项技术证实这些microRNA如果被包裹在外泌体中，就会在各种组织（主要是大脑、肝脏和肠黏膜）中蓄积。

这项技术确定了miRNA不仅可以到达局部部位（肠壁），还可以到达远处的部位。然后，转向涉及含miRNA的外泌体如何影响宿主健康的问题，Zempleni进行了各种实验。在实验中，他给小鼠提供了缺乏游离miRNA和含miRNA的外泌体的饮食，并将这些小鼠与其它正常饮食的小鼠进行了比较。他发现了含miRNA的外泌体对小鼠的一系列的影响，这些影响包括缺乏游离miRNA饮食的小鼠的认知能力下降、生育能力下降和肌肉发育的变化。

Zempleni现在正在着手解决这样一个问题，即这些健康影响是由饮食中的miRNA赋予的，还是由其它东西赋予的，比如是整个外泌体还是外泌体中除了miRNA之外的某个成分。Zempleni等人正在研究一组经改造后的小鼠，这种小鼠乳汁中缺乏miRNA。初步未发表的结果显示，它们的后代（其饮食只由母亲的乳汁组成）中有许多健康和发育问题。如果此结果得到证实，将明确地表示饮食来源的miRNA是健康的主要参与者，至少，其在生命早期的母乳中是这样。

Zempleni认为miRNA和外泌体在乳汁中的生物利用度比在植物中高。他推测，这可能有进化的基础。他认为，自然界可能因为婴儿需要营养而使它们具有生物可利用性。Zempleni还在研究其它动物来源的食物，作为正在进行的研究的一部分，比如是否能够示踪饮食中的鸡蛋外泌体如何将miRNA囊泡运送到小鼠组织中。

直观感觉

Zempleni的一些动物模型工作是基于外泌体与肠道微生物群（由宿主饮食所赋予并参与宿主健康效应的微生物群）相互作用的观点。这引导了一种假设，即肠道微生物群可能介导乳汁外泌体和哺乳动物宿主之间的细胞间通信。

Witwer预测该领域的大部分进展将在未来几年内发生。Witwer表示，可以将重点从循环和动物组织转移到肠道。他认为，研究饮食来源的外泌体与肠道上皮细胞或特定肠道微生物的相互作用具有广阔的前景。

肠道也一直是研究人员研究膳食植物除营养之外健康效应的核心焦点。肯塔基州路易斯维尔大学（University of Louisville）的免疫学家Huang-Ge Zhang正在研究葡萄柚、胡萝卜等植物食品和蘑菇等菌类食品是如何影响特定细胞的问题。他研究了相当于外泌体的植物，这些实体被称为外泌体样纳米颗粒，它们是保护性囊泡，里面有与外泌体类似的重要的运输物质，如蛋白质、脂质和RNA。2018年，Zhang报道了生姜外泌体样纳米颗粒如何在肠道中稳定，以及它们如何调控肠道细菌的合成。

据Zhang介绍，当外泌体样纳米颗粒进入哺乳动物体内时，可以以显著的特异性进入肠道不同的细胞。例如，他已经证明，来自葡萄的外泌体样纳米颗粒被肠道干细胞吸收，来自葡萄、生姜、胡萝卜和葡萄柚的纳米颗粒以肠道相关巨噬细胞为靶点。

Huang-Ge Zhang已经证实来源于葡萄的纳米颗粒可以传递治疗性RNA。

Zhang的观点是，这些外泌体样纳米颗粒中的miRNA可能在早期被不正确地分选出来，影响宿主的健康。Zhang表示，由于外泌体样纳米颗粒由许多蛋白质、脂质、RNA和多糖组成，它们可能同时调控很多通路。一个纳米颗粒携带的多种因子可以被同一个细胞吸收。因此，我们可以看到多个分子在调节多种途径。

Zhang希望，通过了解哪些宿主细胞（肠道和其它部位）优先摄取哪些不同的植物外泌体样纳米颗粒，研究人员可以组装新的纳米颗粒，作为药物递送载体，用于体内非常特定的细胞类型。2008年前后，他放弃了自己对牛奶外泌体的研究，他认为，与动物来源的外泌体相比，植物纳米颗粒有几个明显的优势。比如外泌体样纳米颗粒避免了潜在的牛源病原体转移，不仅更安全，而且用途也更广泛。希望针对特定细胞类型的药物开发人员可以探索源自数千种不同类型植物的外泌体样纳米颗粒，因为每种植物在宿主中都有自己的靶标。此外，Zhang表示，纯化牛奶外泌体非常具有挑战性，而且大量外泌体的生产成本比植物纳米颗粒昂贵的多。

同样在内布拉斯加-林肯大学（University of Nebraska–Lincoln）的分子生物学家Jiujiu Yu对植物源性囊泡的治疗潜力也产生了兴趣，因为它们可以大量地从各种植物食品中提取。她尤其想了解囊泡如何影响代谢性炎症和肥胖。Yu的实验室开发了一个细胞培养系统，以筛选源于生姜或蘑菇的膳食外泌体样纳米颗粒，以了解它们如何影响涉及代谢性疾病炎症进程相关的细胞。

Yu专注于确定外泌体样纳米颗粒中负责抗炎作用的部分。她尚未发表的最新研究表明，只有在极少数情况下，RNA组分对于囊泡的抗炎作用才是必需的。她想探索的是，对于给定的食物，外泌体样纳米颗粒的任何部分都对健康产生影响的可能性。Yu表示，人们试图关注miRNA，因为它是一种新的组分。虽然蛋白质和脂质没有那么令人兴奋，但应该尝试研究囊泡的所有成分，而不仅仅是关注一些吸引眼球的东西。

Yu认为，在从植物中提取的外泌体样纳米颗粒投入人体治疗之前，还有很多东西需要学习。她所在的实验室发现，从不同的杂货店购买的生姜含有不同的外泌体样纳米颗粒，这些纳米颗粒产生的结果也不同。这些囊泡有的有很强的抗炎作用，有的很轻微，有的甚至促进炎症。她表示，因为存在不一致性，所以如果想仅仅使用这些膳食囊泡来进行治疗的话，需要非常谨慎，她很希望能确定活性分子。

与此同时，Zempleni注意到了牛奶外泌体的应用前景。他表示，如果用牛奶外泌体装载癌症药物，可以将它们传递到癌症患者的肿瘤部位，即使药物本身的生物利用率不高或不是很稳定。这是最近的一个大事件。事实上，马萨诸塞州波士顿的PureTech Health公司与制药巨头罗氏（Roche）合作，已经在致力于推进利用牛奶外泌体进行药物输送的技术。

我们的最终目标是获悉食物与我们对话的语言，并查明miRNA是否可以改变人体的基因表达。

六、揭开母乳中microRNA的奥秘

母乳中的MicroRNA可能在调节婴儿发育方面发挥作用。

在母乳中发现microRNA十年后，科学家仍在努力研究它们为何存在以及它们如何影响健康。

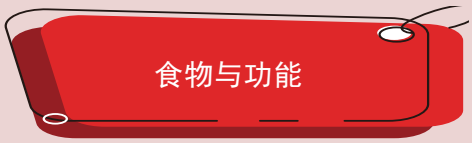
母乳是食物中的奇迹，其包含了营养物质以及具有其它对婴儿健康有益的作用。源源不断的研究表明，母乳喂养与降低婴儿感染、肥胖、糖尿病和呼吸道疾病的风险有关。

科学家正致力于研究母乳究竟是如何提供这些保护作用的。宾夕法尼亚州立大学医学院（Pennsylvania State University of Medicine）儿科医生Steven Hicks表示，研究人员对母乳中所含的脂肪和维生素等营养成分的量以及婴儿健康的影响已经有了很好的把握。但母乳是众多生物活性分子的复杂混合体，齐全部成分的作用尚不清楚。

Hicks表示，他们关于母乳以及母乳如何提供健康益处的知识正在不断积累。每当他们认为已经弄清楚的时候，就会有科学家又发现一个他们不知道的母乳中的新分子，或者是之前没有意识到其重要性的分子。

其中一个这样的分子是microRNA（miRNA），它是由22个核苷酸组成的短小且脆弱的RNA链，在被称为外泌体（exsome）的保护性细胞外囊泡内发现。miRNA曾经被视为基因垃圾而被忽视，现在作为调节基因表达的重要角色而受到关注。通过附着在参与蛋白质合成的信使RNA（messenger RNA，mRNA）的匹配链上，miRNA可以有效地沉默和启动mRNA，调节蛋白质的合成。

直到2010年，人们才在母乳中发现了miRNA。研究人员推测，这些分子在调节婴儿发育的关键方面，如免疫功能发挥一定的作用。如果得到证实，那么我们便可以将miRNA添加到婴儿配方奶粉中，通过这种方式喂养的婴儿就不会失去miRNA对健康的益处。但在这之前，研究人员必须回答有关这些分子的基本问题，包括miRNA是否能在肠道中保持活性。



加州大学（University of California）戴维斯分校的生物化学家Bo Lönnerdal花了几十年研究母乳中的生物活性成分。当Lönnerdal得知研究人员在母乳中发现了miRNA时，他记得他当时很好奇这些分子在母乳中的作用。他回忆到，母乳中出现这些看似随机的RNA片段，一定是有原因的。

为了解释它们存在的意义，研究人员提出了两种理论。第一种理论被称为“营养假说”，即miRNA只是便利的营养包，很像血清白蛋白（母乳的主要蛋白质之一），在肠道中被分解。第二种被称为“功能性假说”，认为miRNA具有调节作用，会影响婴儿的基因表达。

确定miRNA是否不仅仅是分子型婴儿食品的方法之一，是确定它是否在消化过程中被分解，或者它是否能够存活下来并影响肠壁及以外的细胞。2017年，Lönnerdal等人通过将母乳中含有miRNA的外泌体暴露在模拟婴儿肠道的酸性条件下，并观察囊泡的变化来探索这

个问题。

Lönnerdal表示，miRNA活性维持得非常好，外泌体保护了原本脆弱的miRNA不被降解。研究小组还发现，当外泌体与人体细胞共培养时，miRNA进入细胞核，这些分子可以影响基因表达。

并非所有人都认同miRNA可以在胃中的酸性条件下维持活性的结论。瑞士苏黎世联邦理工学院（Federal Institute of Technology Zurich，ETH Zurich）的研究人员发现，miRNA在小鼠的消化器官或血液中没有表现出生物相关的水平。但有人认为，miRNA可能在非常低的水平下具有活性，进一步的研究支持了miRNA可以抵抗酸性环境的观点。为了彻底解决这个问题，包括Hicks在内的研究人员正在设计母乳喂养婴儿的临床研究。一项检测婴儿粪便中完整miRNA的研究也已经在进行中。

撇开miRNA是否能保持活性的问题不谈，到目前为止，科学家主要是在识别母乳中常见的miRNA，然后研究它们可能影响哪些生物学过程。第一部分比较简单：可以从母乳样品中分离出miRNA。Hicks表示，在那之后，这是一个有点像猜谜的游戏。

据Hicks解释，一旦研究人员读取了一条22个碱基对左右的miRNA链，他们就可以将其与一个互补的mRNA进行匹配。该mRNA可能编码参与关键生物过程（例如免疫功能或代谢）的蛋白质。

Hicks表示，问题是mRNA比miRNA大得多。因此，一个miRNA可能会匹配20 - 50个mRNA。科学家正在使用软件算法来缩小他们的结果范围，剔除那些偏离一个或两个碱基对的不完美的匹配，或者搜索文献以找到以前报道的特定miRNA和mRNA之间的匹配。

根据2019年的一份综述，到目前为止，已经在母乳中发现了1400多个miRNA。几项研究已经将母乳中存在的主要miRNA与免疫反应的调节建立了联系。

有一篇文章报道称，miRNA-148a在母乳中丰量表达。这种特定的miRNA已被证明可以抑制肿瘤细胞中参与增殖基因的活性，这使作者推测miRNA-148a对婴儿抵抗癌症有保护作用。论文作者之一，耶路撒冷Hadassah医学中心（Hadassah Medical Center）的Regina Golan-Gerstl现在正在研究是否含有miRNA的外泌体可以越过肠道，通过血液到达其它器官。利用荧光标记，她的团队在小鼠的肝脏和大脑中检测到了外泌体，这表明miRNA可以到达身体其它部位的细胞，并可能调节这些部位的基因表达。另一项研究也已经表明，牛奶中的miRNA可以到达小鼠的肝脏和大脑。

Hicks的团队发现，足月分娩的母亲的乳汁中发现的miRNA链与早产儿母亲的乳汁中的miRNA链有所不同。研究人员表明，早产母亲的乳汁中含有更丰富的miRNA，这些miRNA靶向的是参与代谢的mRNA。Hicks认为，这表明母亲乳汁中的miRNA组成发生了变化，以帮助婴儿更快地成长，赶上正常成长的婴儿。研究表明，早产儿母亲的乳汁中还含有较多的

蛋白质和脂肪等常量营养素。

Hicks表示，这些发现可能会对早产婴儿的健康产生影响。早产儿的母亲有时不能进行母乳喂养，因为她们的身体还没有开始产生乳汁。在重症监护室的早产儿经常被给予母乳库中捐赠的母乳。母乳库存有足月母乳和早产儿母乳，但目前捐赠的母乳并没有标记这种区别。Hicks建议改变这种做法，让医生可以考虑给早产儿喂养早产母亲捐赠的母乳，以使这些婴儿的发育情况有所改善。

是否可以将miRNA加入婴儿配方奶粉？

建立miRNA与婴儿健康之间的直接联系可能会带来伦理挑战。传统的临床试验通常包括一个对照组，这意味着一些婴儿将接受含miRNA的母乳，而另一些则不会。虽然科学家并不确定miRNA是否能改善婴儿的健康状况，但Lönnerdal表示，很难想象伦理学小组会批准一项从婴儿队列中去除潜在有益分子的试验。

作为替代，研究人员可能仅限于观察性研究。2月，Hicks的团队在密歇根州弗里蒙特市的一项由非营利性Gerber基金会（Gerber Foundation）资助的临床研究中注册了第185对母婴。该研究最终将纳入超过200对参与者。该试验于2018年开始，测量12个月内母乳、婴儿唾液和婴儿粪便中发现的miRNA水平。此试验还跟踪婴儿的健康状况，特别是他们是否会出现食物过敏、湿疹或哮喘。

Hicks表示，他的小组正在寻找母乳中能抵抗消化的高水平的特定miRNA链及其对婴儿的保护作用之间的联系。该小组的研究结果可能是找出影响婴儿健康的miRNA的第一步。Hicks认为，确认miRNA的作用机制需要更多的基础科学。

Hicks表示，如果证据显示miRNA是有益的，最后一步就是将这些分子添加到婴儿配方奶粉中。但鉴于配方奶粉行业的消费者是婴儿，将添加剂引入产品中会很困难。事实上，两种在十多年前首次显示出对婴儿健康有益处的成分（包括改善肠道健康）：人乳低聚糖2′-岩藻基乳糖（oligosaccharides 2′-fucosyl- lactose）和乳糖-N-新四糖（lacto-N-neotetraose），美国在2016年、欧洲在2017才被允许添加到配方奶粉中。

Lönnerdal推测，因为miRNA等分子起源于癌症研究（miRNA失调与某些类型的癌症有关），它们将更难获得许可。如果谷歌搜索microRNA（很多父母会这样做），搜索结果都是癌症、癌症、癌症。Lönnerdal表示，虽然配方奶粉行业在学术会议上对miRNA研究表示出了一些兴趣，但这些分子的市场吸引力可能会影响推进其研究的决定。

Golan-Gerstl认为，如果配方奶粉公司真的决定添加miRNA，这些分子可以从动物中分离出来。她的研究小组表明，在人类母乳中发现的大约90 %的miRNA也存在于牛和山羊的乳汁中。她认为，鉴于许多人喜欢标榜天然的产品，动物源性分子可能比人工合成的更容易被公众接受，也更有机会获得批准。

Golan-Gerstl表示，将miRNA放入配方奶粉中并不一定是该领域的唯一重点。揭开母乳miRNA对健康的益处，本身就可能是有价值的信息。母乳还可能为我们带来更多惊喜。

七、操纵机体的递送服务系统

研究人员利用天然的细胞外囊泡网络系统来传递治疗疾病的RNA。

2008年，当Lydia Alvarez-Erviti在英国牛津大学（University of Oxford）开展博士后研究时，目标是开发神经退行性疾病的基因疗法。她已经确定了靶向目标—α-突触核蛋白（α-synuclein）这种积累在帕金森病患者大脑中的蛋白质，并设计了一种小干扰RNA

（short interfering RNA, siRNA）来降低小鼠体内α-突触核蛋白的水平。但她需要一种将siRNA递送至大脑的方法，这种方法必须保护RNA，使其穿过血液循环和大脑之间的屏障，并且足够安全，可以反复使用。幸运的是，一位同事已经开始研究一种能满足上述要求的工具：机体自发产生的纳米大小的囊泡，被称为外泌体（exosome）。

外泌体是30-100 nm宽的脂质球体，全身细胞通过它来转运小分子，如microRNA（miRNA）。北卡罗来纳大学教堂山分校（University of North Carolina）的生物工程学家Juliane Nguyen表示，经过优化，每个微小包裹体都能在体内游走，而不会过度激活免疫系统，是“理想的药物载体。”

大约十年前，现任职于西班牙拉里奥哈生物医学研究中心（Center for Biomedical Research）的Alvarez-Erviti等人在帕金森病的小鼠模型中证明了外泌体作为药物载体的潜力。目前，大量在动物实验上的成果，以及在人身上的早期研究，都已经证明了外泌体产品的精准性和安全性。

将外泌体从其它类型的细胞外囊泡（extracellular vesicle, EV）中分离出来的成本很高，而且它们天然会携带各种不同的、未知的组分。在安全性和标准化方面，这些复杂性使基于外泌体疗法的性能介于细胞疗法和小分子药物治疗之间。但这些挑战并没有阻止Alvarez-Errviti的团队和其他研究小组、公司致力于标准化和扩大EV在人类身上的应用。Alvarez-Errviti声称，研究外泌体需要很大的勇气。

对于RNA和小分子药物来说，能否进入细胞是达成目标的主要瓶颈。因为机体具有相应措施，包括细胞膜和RNA降解酶等来防止外来物质进入细胞。

生物技术专家想出了各种变通办法。例如，合成性纳米粒子载体或空载病毒经常被用来保护药物不被降解，并促进其进入细胞。其中最受欢迎的载体是脂质体（liposome），它是由脂质分子组成的球体，直径通常为100-200 nm，可与细胞膜融合以输送其货物。但在高剂量下，脂质体可能会损伤细胞，而且脂质体和病毒载体在重复给药后会引发免疫反应。这些缺点使许多研究者考虑将外泌体作为载体，这是一种机体本身具备的RNA运输服务系统。

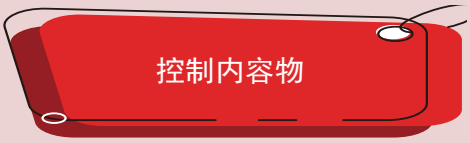
外泌体被认为比人工囊泡更安全，因为它们在体内循环系统中本来就存在。研究人员发现，实验室中给予细胞外泌体，并不会造成细胞死亡，反复注射到小鼠体内也不会引发炎症。Alvarez-Errviti从未成熟的免疫细胞中获取外泌体，因为这些细胞的囊泡表面没有免疫激活分子。来自中胚层干细胞的外泌体也很受欢迎，因为干细胞往往能逃避免疫监测。

像大多数纳米粒子药物载体一样，外泌体主要在肝、肺和脾脏中积累，但它们同时对其来源组织也表现出亲和性。位于罗利的北卡罗来纳州立大学（North Carolina State University）的生物工程师Ke Cheng发现，当将从纤维肉瘤细胞中采集的外泌体注射给患有肿瘤的小鼠时，外泌体会进入肿瘤。

这种归巢特性意味着外泌体可以将更多的药物输送到需要的地方，从而降低副作用。Cheng的团队报告称，将一种名为多柔比星的脂质体化疗药物加载到癌细胞外泌体中，可以增加到达肿瘤的药物量。用外泌体包裹的多柔比星治疗也比单独使用多柔比星更大程度地缩小了肿瘤。

一些非癌细胞的囊泡也具有归巢能力。据雅典乔治亚大学（University of Georgia）的干细胞生物学家、临近生物技术公司Aruna Bio的联合创始人Steven Stice介绍，一种来源于名为AB126的人类神经元干细胞系的外泌体可以穿过血脑屏障，在受伤部位归巢。而一些研究人员正在对外泌体进行加工设计，以增加其在某些组织中的含量。例如，Alvarez-Errviti的团队通过基因工程使细胞产生表面载有狂犬病病毒蛋白的外泌体，并使囊泡在大脑中含有该蛋白受体的地方积聚。

将囊泡靶向到所需组织的多肽也可以与外泌体表面蛋白进行化学连接，或者嵌入到囊泡膜中（这种方法可以加快它们在临床上的制备速度）。例如，Cheng的团队使用一种商业化的磷脂试剂将一种心肌细胞归巢肽包裹在外泌体膜中。这增加了外泌体在诱导性大鼠心脏病发作时在心脏中的累积。



当Alvarez-Errviti开始研究外泌体时，她已经拥有了一个可以运输外泌体的治疗分子。但EV天然充满了蛋白质、RNA和脂质。虽然它们的生物活性在很大程度上还未知，但有些似乎本身就具有治疗作用。

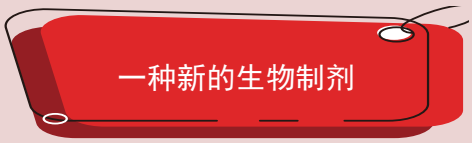
研究人员正在致力于确定外泌体内的治疗活性分子，并将其用于新的治疗。Cheng的团队已经发现了一种名为miRNA-21-5p的人类外泌体，它可以降低小鼠心脏病发作后的心肌细胞死亡速度，改善血管生长和促进组织修复。该团队的长期目标是生成具有高水平miRNA和心肌细胞归巢肽的外泌体。Cheng称这些外泌体为超级外泌体，可在患者心脏病发作后立即通过血液给予。

采用EV装载治疗性药物的一种方法是用电流或化学物质破坏囊泡膜，使药物进入；另一种是对囊泡形成细胞进行基因加工，在囊泡形成之前制造RNA或蛋白质药物。然而，并不能保证每一个加工后的细胞都会将所需的货物装入其囊泡中。加州大学欧文分校（University of California）的生物医学和材料科学家Young Kwon表示，细胞自身决定内吞什么物质。

Nguyen的团队正在研究细胞是如何做出这些决定的，以找到增加外泌体装载人工药物的方法。研究人员已经确定了天然外泌体RNA中常见的编码，这些编码可能在包装分子的过程中发挥作用。而Nguyen也已经发现，将其中一些分子编码复制到其它RNA上，可以将它们在外泌体中的装载量提高100倍。她计划利用该技术将阻断血管形成和癌症扩散的miRNA装载进乳腺癌外泌体。

另一种控制外泌体内容物的途径是通过对细胞进行物理或化学操作来完成。Kwon的团队用化学方法“哄骗”细胞分离自身的膜结合部分——小囊泡（bleb）。与天然存在的EV相

比，这些细胞的小囊泡的大小和内容物的一致性更高。细胞制造的任何RNA都应该随机分布到小囊泡中。这样的细胞产生的小囊泡是自身形成的囊泡的十倍，并且是在几个小时，而不是几天内形成。



EV要变成商业化产品是很有挑战性的，虽然EV有如此多的优点，但它们必须来自活细胞。大多数公司都在使用一些特征明确的细胞系来生产其所有的外泌体。干细胞是一个理所当然的选择，因为它们可以长期培养，而且不会产生免疫反应。瑞典哥德堡大学（University of Gothenburg）研究外泌体的Jan Lötvall表示，当细胞以悬浮状态而非在平板表面生长时，会产生最多的外泌体。但干细胞必须附着在某种东西上才能生长，所以一些公司使用悬浮在介质中的球形微载体，这种方法可以使外泌体的产量增加20倍。

企业还需要改进从细胞生长培养基中大规模纯化EV的方法，这比科研实验室的规模要大得多。Lötvall表示，像这样的制造问题是可以克服的，但这将使用EV提供治疗变成一种昂贵的选项。目前也还没有明确的审批路径。Cheng表示，FDA尚未发布关于如何测试这些囊泡的安全性和有效性的指导意见。目前，研究人员和公司将逐批对它们进行测试，根据他们正在开发的每一批药物使用不同的检测方法。

创造人工外泌体可以克服这些困难。但研究人员仍然需要弄清楚外泌体是如何产生的，以及为什么它们能如此有效地进入细胞，并逃避免疫侦查。只有在他们回答了这些基本问题之后，这种新的给药模式才能为临床服务做好准备。

八、干细胞胞外囊泡或能替代细胞疗法exRNA

奥地利萨尔茨堡的帕拉塞尔苏斯医科大学（Paracelsus Medical University）的研究人员正在制备细胞外囊泡。

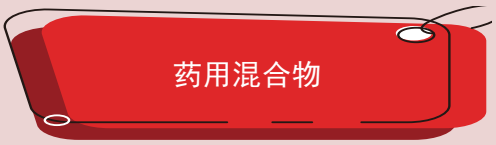
干细胞分泌的囊泡可能为临床医生提供一种更安全、更简单的细胞疗法替代方法，但研究人员还在努力开发研究和制备这些微小颗粒的最佳方法。

起初，一切似乎都很简单。干细胞以其能够发育为多种其它细胞类型而闻名。为此，研究人员花了数十年探索“成年干细胞移植，在患病或受损器官中形成健康的新组织”这一理论。

但是到21世纪初，研究人员开始意识到，干细胞生物学比最初认为的更加复杂。密歇根州底特律市亨利福特医疗集团（Henry Ford Health System）的神经科学家Michael Chopp是最早探索成体干细胞——最著名的是名为间充质干细胞（mesenchymal stem）或间充质基质细胞（mesenchymal stromal cells，MSC）的干细胞——能否减轻脊髓损伤、中风和其它神经系统损伤。Chopp指出，他们仔细研究到底发生了什么，发现细胞实际上并没有产生新组织，替代组织。相反，他和一些研究人员提出一种新理论，这些细胞通过分泌因子来修复组织。

如今，证据强烈指向外泌体——一类通常被称为细胞外囊泡的微小膜泡，通常从细胞释放，并携带着包括RNA、蛋白质和脂质的生物分子——可能是干细胞实现组织修复的主要手段。奥地利帕拉塞尔苏斯医科大学（Paracelsus Medical University）的GMP（good manufacturing practice，良好生产规范）负责人Mario Gimona 表示，他们很快发现可以用源自MSC的囊泡来实现MSC的作用。

因此，许多细胞疗法研究人员已经改变了方向，开始探索外泌体是否可以提供相同的临床益处，而不会产生与注入活细胞相关的潜在风险，例如免疫排斥或肿瘤形成。早期数据暗示，外泌体具有缓解心血管、神经和免疫疾病的潜力。但是，外泌体研究人员也意识到，对这些小囊泡如何以及为何起作用的机制了解还非常不足。



外泌体最早是在20世纪80年代后期被发现的，随后研究人员提出了外泌体在细胞之间进行交流的特性。但是直到2010年，新加坡A * STAR分子与细胞生物学研究所（A*STAR Institute of Molecular and Cell Biology）的细胞生物学家Sai-Kiang Lim才将MSC介导的组织修复作用归因于外泌体。

最初，Lim感到惊讶。她原本认为，关键在于蛋白质或小分子，所以发现这些奇怪囊泡的作用后，她开始广泛阅读相关文献。Lim指出，外泌体发现了我们，而不是我们发现了外泌体。这一发现是有道理的：外泌体中往往充满非编码（不翻译成蛋白质）的RNA分子，它们可以显著调节基因的表达。位于加利福尼亚洛杉矶的西达赛奈医学中心（Cedars-Sinai Medical Center）的心脏病专家EduardoMarbán表示，任何给定类型的细胞外囊泡都可能包含3万多种不同的非编码RNA。这种有效负载以及外泌体中包含的多种蛋白质和其它生物分子，使这些微小的液滴成为调节细胞生物学的强大引擎。

Marbán团队在2014年证明，通过阻止心

脏干细胞释放外泌体，可以消除该细胞对受伤的小鼠心脏的治疗作用。大约在同一时间，外泌体首次展示了临床效益。德国杜伊斯堡埃森大学（University of Duisburg-Essen）的移植医生Dietrich Beelen对使用MSC治疗重度移植物抗宿主病（graft-versus-host disease, GVHD）的患者感兴趣。当移植的骨髓触发针对宿主组织的破坏性免疫反应时，就会发生这种疾病，最终可能导致器官衰竭和死亡。一些研究表明，MSC可能会消除这种免疫反应，但是Beelen担心这些细胞的临床效果并不稳定。因此，他与干细胞生物学家同事Bernd Giebel合作，为患者服用MSC衍生的外泌体。结果是惊人的：患者的炎症得到了极大的缓解，她的生活质量得到了极大改善，一直持续到她最终死于可能的类固醇相关并发症。Giebel表示，她的病情稳定了4个多月。

这种治疗是经批准的、基于同情的一次性用药。在随后几年中，对外泌体的临床测试非常少。但是临床前数据始终表明使用基于外泌体的治疗方法不仅可以治疗GVHD，而且还可以治疗许多疾病。

德克萨斯A&M大学（Texas A&M University）研究再生医学的Ashok Shetty发现，MSC衍生的外泌体可以减轻啮齿动物长时间癫痫发作的危害。根据Shetty的报告，外泌体经鼻腔递送时，会在6个小时内渗入动物的整个前脑。他们发现，外泌体可以挽救认知功能，还可以预防大脑产生异常的神经。而且，就像在GVHD中一样，外泌体似乎也能够调节炎症。

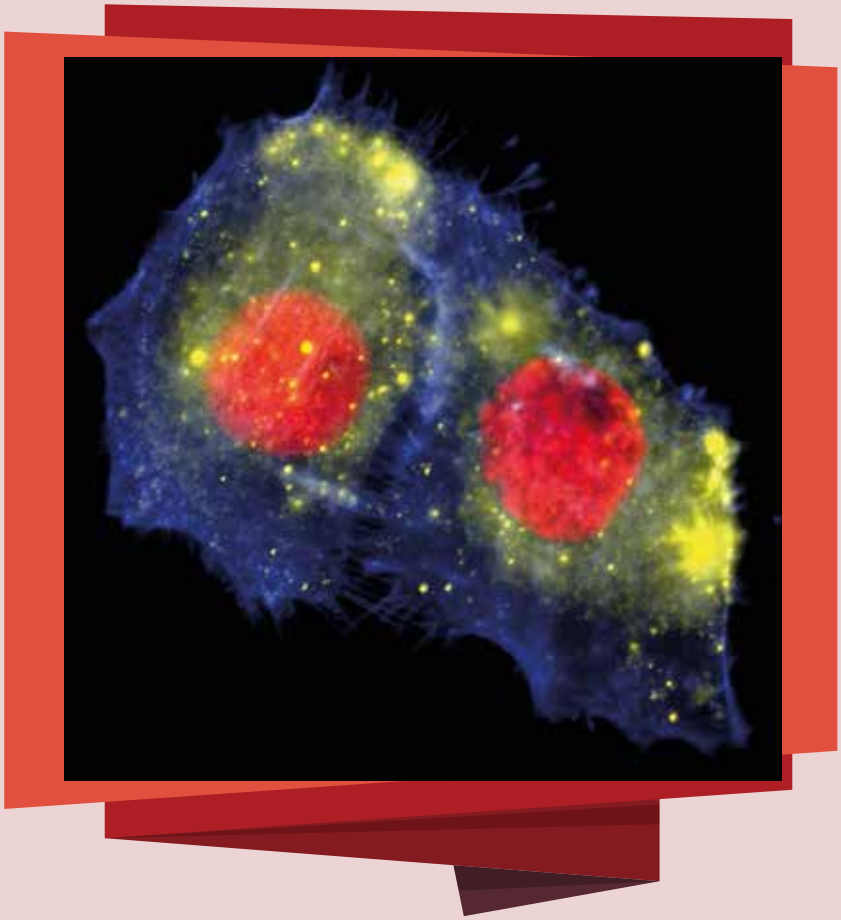
在对中风和脑外伤的调查中，Chopp等人发现，在动物模型上，外泌体治疗能促进神经组织的再生和重塑。他指出，你会发现整个中枢神经系统都发生了这种恢复迹象。我们实际上可以恢复神经、运动和认知功能。同样，Marbán小组测试了心脏干细胞及其外泌体，以治疗患有杜氏肌营养不良症的人，从而预防心脏疾病，因为心脏疾病是该疾病患者死亡的主要原因。干细胞和外泌体治疗不仅可以保护心脏功能，而且还可以促进被治疗小鼠体内的肌肉修复。 Marbán表示，接受治疗的动物，腿部的骨骼肌更有力、更强健，这似乎支持了干细胞的临床益处归因于外泌体这一理论。”

外泌体可能不仅能够实现干细胞的治疗益处，而且不会有干细胞的诸多副作用。外泌体不能自我复制或形成肿瘤。此外，它们足够小，可以被过滤以产生供患者使用的无菌材料，并且足够稳定，可以长期保存在冰箱中。当前数据还表明该囊泡是非常安全的。Lim指出，他们可以使用10或20倍的治疗剂量而不会出现不良反应。他指的是提供临床益处所需的外泌体数量。

尽管我们已经知道来自MSC的外泌体具有许多治疗益处，但这些作用背后的机制仍然不明确。外泌体似乎会影响免疫系统的多个组成部分，但要了解它们是如何做到这一点的，研究人员必须仔细梳理其内部的生物分子。到目前为止，研究人员大部分的关注点都集中在microRNA（本身不编码蛋白质，但可以调节其它基因产生的蛋白质水平的RNA短链）上。对外泌体中发现的物质进行生物信息学分析可以帮助鉴定作用于疾病相关细胞途径的微小RNA链。例如，Marbán发现一种特殊的microRNA——miR-181b，来自心脏干细胞外泌体的许多治疗作用都与这一RNA相关。

一些研究人员正在寻求操纵MSC衍生的外泌体的方法，使其不仅携带天然存在的microRNA，而且还能携带合成RNA药物。休斯顿德克萨斯大学MD安德森癌症中心（University of Texas MD Anderson Cancer Center）的癌症生物学家Raghu Kalluri广泛研究了外泌体在驱动和阻止肿瘤进展和扩散方面的自然作用。现在，他正在重新利用这些囊

泡，以提供能够选择性关闭驱动癌症生长基因的工程RNA分子。Kalluri 指出，他们有一只患有胰腺肿瘤的小鼠，那些肿瘤积累了大量的外泌体，他们正在考虑能不能通过外泌体递送药物。Kalluri等人选择了一种治疗性RNA分子，该分子可以使称为KRAS的基因失活，KRAS是胰腺癌的著名驱动因子。Kalluri表示效果非常惊人——治疗组小鼠的肿瘤缩小了，寿命明显延长了。他的团队现在正在计划对神经胶质瘤（另一种难以治疗的肿瘤）采取类似的策略。



癌症细胞中的胞外囊泡（黄色）。

分子分类成问题

相比于外泌体中其它生物分子，microRNA对治疗作用的贡献到底有多大存在一些争议。 Marbán已发现，去除外泌体中的RNA会在很大程度上消除外泌体的治疗效果，但他指出，microRNA只是这些颗粒中我们知之甚少的RNA分子的一部分，而非microRNA分子可能具有一些尚待阐明的临床益处。他表示，外泌体里有很多东西，他们甚至都不知道如何分类。最初的证据表明蛋白质在治疗性外泌体中可能具有比RNA更强的生物学活性，Lim对以microRNA为中心的外泌体功能模型提出质疑。她仔细地分析了各种MSC外泌体的分子库存，得出结论——RNA分子量太少，不足以产生效果——大多数microRNA在每个外泌体中仅存在约一个拷贝。由于外泌体还包含许多酶，这些酶仅需几个分子就可以极大地加速生物学过程，因此她认为这些酶可能比microRNA发挥更快，更直接的治疗作用。

Giebel也接受以蛋白质为导向的观点。他指出了一些因素，这些因素可能会挑战单个microRNA与外泌体治疗效果的联系。例如，敲除MSC中microRNA基因的操作也可能会破坏这些干细胞的功能，并扰乱其外泌体输出，这一影响远比外泌体中缺乏某个RNA要大得多。但是Giebel也不赞成完全否认RNA的贡献。他认为，真相很可能就在二者中间。RNA、蛋白子和其它分子各自发挥了部分作用。

信号与噪音

外泌体的高度异质性进一步增加了阐明这些治疗机制的难度。“外泌体”一词是指细胞外囊泡的高度特异性子集，它是由特定的细胞途径产生的，直径大约在30-150 nm之间。而这对于现在正在临床前测试的制剂而言可能是一个误导性的名称，因为外泌体制剂通常包含各种非外泌体的囊泡。Gimona表示，没有人敢说，他们能分离出100%纯净的外泌体。

制剂之间的进一步差异会以多种方式出现。几项研究已经确定，不同类型的干细胞（成熟细胞），会产生细胞特异性、内容物不同的囊泡。一些研究人员正在寻找治疗方法。例如，Shetty的实验室发现了证据，证明神经干细胞的囊泡比MSC的囊泡更能促进有效的神经元修复。但是，即使是相同细胞类型的不同培养物，也会产生具有不同功能特性的囊泡。Lim提醒，使用相同的MSC，在不同的实验室中进行培养，产生的囊泡也会有所不同。对于来自年龄、性别和其它生物学因素不同的供体的MSC，这些差异变得更加明显。

国际细胞外囊泡学会（International Society for Extracellular Vesicles）等组织正在开发最佳实践，以生产和表征用于临床研究的外泌体制剂。关键目标是确保囊泡分离物

不含有害污染物，并具有一致的功能特性。帕拉塞尔苏斯医科大学的细胞疗法研究人员Eva Rohde指出，如果要治疗某种适应症，就必须列出哪些因素是有效的。他们正在寻找预测性分析。囊泡制剂可以表现出多种作用方式，情况可能会很复杂。例如，Giebel指出，研究外泌体治疗GVHD的研究将需要验证其免疫抑制活性和促进受损组织修复的能力。但是，出于同样的原因，他认为清除这些障碍应该足以进行临床测试，即使其作用机理尚不清楚。Giebel表示，如果它具有与干细胞相当的活性，并且能在不伤害患者的情况下减轻其症状，那他觉得可以进行临床推广。

生产适用于临床测试的外泌体均匀制剂所需的过程很昂贵。目前只有少数学术中心能够进行人体试验。Gimona和Rohde在其机构的临床级制造工厂内工作，以优化从中型到大规模生产的即用型MSC外泌体。Kalluri的团队已经从MD安德森（MD Anderson）和慈善团体获得了足够的资金，以支持开展胰腺癌外泌体治疗的1期临床试验的启动，该试验于今年3月开始招募患者。不过现在大多数临床开发都在工业的支持下进行。例如，位于加利福尼亚州比佛利山庄的Capricor Therapeutics公司正准备着手进行一项基于Marbán的外泌体治疗肌肉营养不良症的临床试验。

不幸的是，一些声名狼藉的商业诊所正在利用其炒作赚钱，号称使用那些出处可疑的外泌体制剂可以治疗各种疾病。Chopp表示，这些外泌体工厂正在萌芽。据他指出，外泌体比干细胞更容易生产和处理，成本更低，且相比于细胞疗法，具有更少的直接安全隐患。这使得它们成为寻求轻松获利的不道德医生的目标。临床前研究取得的令人兴奋的进展的消息为市场营销提供了现成的广告。Lim指出，他甚至看到，在其他人的小册子中引用了他的一些论文。这些不受管制的诊所的广告往往远超出实际可用临床前数据，有时甚至会宣传一些离谱的治疗效果。实际上，一位新泽西州的临床医生和佛罗里达州Miramar的外泌体生产商Kimera Labs于2020年4月就因声称其提供的外泌体可以预防或治疗COVID-19而被美国FDA警告违规，该声明之后被公司官网删除。

与任何疗法一样，质量不佳的外泌体可能会造成直接威胁。2019年12月，FDA发出了关于不受监管的外泌体诊所的公共安全警告。该警告是基于内布拉斯加州的患者在接受治疗后出现败血症的报道。尽管正确准备的外泌体具有出色的安全性记录，但是仍需要在仔细的临床监督下，进行大量测试才能确定其任何长期风险。例如，Giebel指出，外泌体提供的免疫耐受力可以阻止炎症并促进组织愈合，因此理论上也可以推动早期肿瘤的快速生长。他认为细胞外囊泡将是许多疾病的理想治疗剂。但是，如果滥用，可能会透支该领域未来多年的发展。”

九、植物囊泡启发作物保护新方法

灰霉病会危害草莓等水果。

研究提示，植物和真菌通过细胞外囊泡交换RNA，这为科学家开发保护作物的方法提供了新的灵感。

过去，细胞外RNA（exRNA）以及将这种遗传信息从一个细胞传到另一个细胞的微小球形结构——外泌体的研究通常聚焦于哺乳动物。但是，早在20世纪60年代，科学家就发现植物细胞也能产生囊泡，这些囊泡将货物运出细胞膜。只不过几十年来，这些植物学观察基本上被遗忘了。

加州大学里弗赛德分校（University of California, Riverside）的植物生物学家Hailing Jin试图复兴这一领域，弄清植物如何发送细胞信息。她发现有证据表明，植物这样做部分是为了阻止真菌感染。基于这个发现，她现在正在设计基于exRNA的杀菌剂。

她的团队对番茄科植物进行了基因编辑，使其释放能沉默灰霉菌（Botrytis cinerea1）基因的exRNA。灰霉菌会引起灰霉病，每年摧毁数百万种水果、蔬菜和花卉植物。Jin指出，改造后的植物更健康。当用真菌溶液喷洒这些植物时，工程化植物的叶子仍保持绿色和充满活力，而正常对应组的叶子则会出斑点状，这意味着，这些叶子将会变黑并且最终死亡。

早在2013年，她的小组便发现了证据，表明外泌体促进了植物与真菌之间的“相互交流”。研究人员认为，灰葡萄孢菌（*B.cinerea*）会释放小RNA，从而使拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）中的免疫基因沉默。布卢明顿市印第安纳大学（Indiana University）的生物学家Roger Innes表示，Jin在2013年发表的那篇论文是真正的里程碑。它为植物科学开辟了全新的方向。

自那以后，Jin的实验室又证明，拟南芥细胞会释放出细胞外小泡，将RNA输送到灰葡萄孢菌中，而这种RNA能抑制那些在真菌感染植物过程中发挥重要作用的基因。在预印本服务器bioRxiv上发表的一篇论文中，生物学家报告指出，工程化拟南芥并使其释放exRNA，可以抵抗某种病原细菌。Innes提醒，虽然这些结果还未经同行评审，但“确实令人震惊”，细菌没有经典的RNA干扰途径——因此必须将其整合到一些导致细菌基因沉默的新颖途径中。

Jin表示，尽管一些科学家继续通过exRNA对蔬菜和水果进行基因改造，以抗击破坏性真菌和细菌，但漫长而昂贵的基因改造食品监管程序让她的团队选择了一种不同的方法。他们团队正在设计包含沉默RNA的抗真菌农作物喷雾剂。

其他科学家从在植物中见到的exRNA交流汲取了灵感，用于开发人类疗法。肯塔基州路易斯维尔大学医学院（University of Louisville School of Medicine）的一名免疫学家Huang-Ge Zhang正在尝试通过提取和重新利用水果和蔬菜的细胞成分来模仿植物中发现的RNA穿梭小泡。他已经发现，葡萄柚汁中含有脂质（构成细胞和外泌体膜大部分的分子），这些脂质可以组装成小壳，他将这种小壳称为“外泌体样纳米载体”。Zhang的团队给这些纳米载体加载了抗癌药物，并将其递送给患有肿瘤的小鼠。结果发现接受这种疗法的小鼠平均存活了42.5天，而用空纳米载体或单独使用化学治疗剂治疗的小鼠则存活了20-30天。Zhang表示，用这种方法封装药物的优点之一是，其来源的食品无毒且便宜。

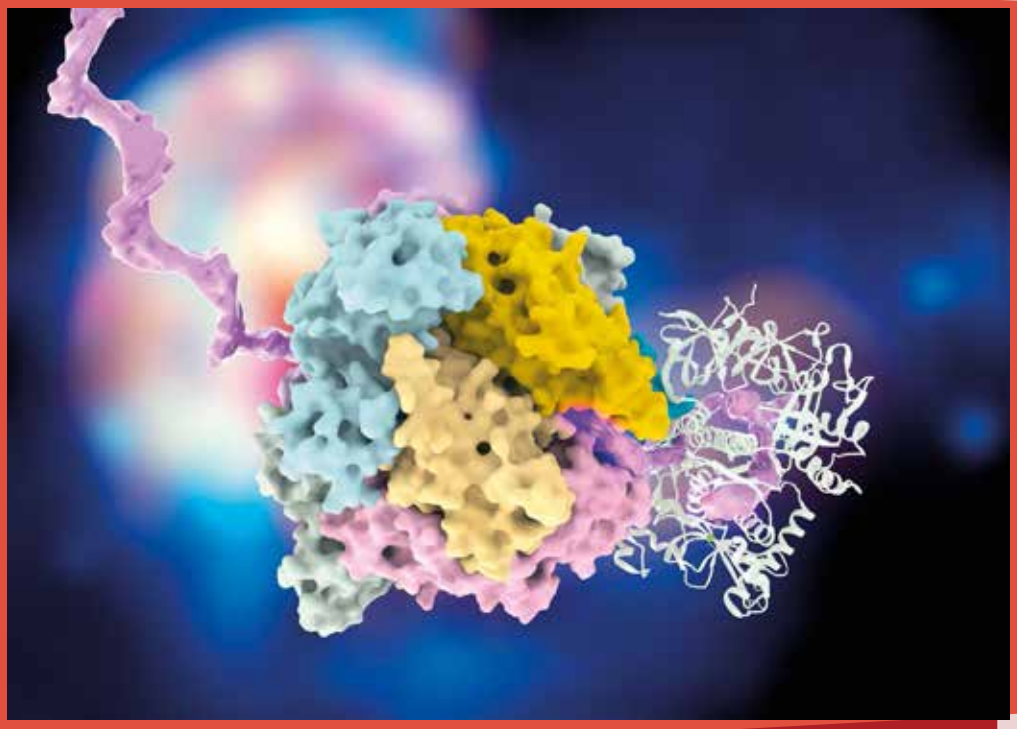
Zhang已经从NIH处获得了超过100万美元的资助。他目前正在与路易斯维尔的詹姆斯·格雷厄姆·布朗癌症中心（James Graham Brown Cancer Center）的研究人员合作进行

一项临床试验，以测试使用植物来源的载体递送姜黄素（香料姜黄的一种成分）来治疗结直肠癌的效果。Zhang还在探索来源于生姜的载体是否可以装载基于RNA的疗法。他的项目吸引了一些商业投资。其他小组也在研究是否可以将植物来源的纳米囊泡用于癌症治疗。

但是，一些科学家表示，不能将Zhang的药物递送结构称为外泌体样。他们指出，即使该结构与外泌体的尺寸大致相同，并且是由脂质分子构建的，但这并不意味着二者的行为方式相同。巴黎居里研究所（Curie Institute）研究外泌体生物学的Clotilde Théry表示，外泌体的特殊之处不仅在于它们的大小。除外泌体外，许多细胞外囊泡或颗粒的大小是相近的。但它们不一定表现得像外泌体。例如，尚不清楚纳米载体是否能够以和某些外泌体相同的方式将有效载荷传输至细胞。人类的免疫系统可能会阻止植物衍生的纳米载体，使它们无用。

Innes团队正在寻找更多证据，证明外泌体确实参与RNA信号传导。在显微镜下，可以在植物细胞附近看到圆形横截面，但是Innes希望确认这些形状是外泌体球体，而不仅仅是圆柱管。为此，他的小组正在创建植物细胞的超薄切片，并使用电子显微镜捕获每个切片的图像。然后，他们可以以数字方式重建假定为外泌体的微小结构的3D形状。他确定植物确实会发出RNA信号，但他想明确显示出传递这种遗传信息的结构形式。虽然Innes等人知道它有效，但目前最大的问题是：它们怎么发挥作用。

十、细胞外RNA研究综述



外泌体复合物的分子模型

细胞外RNA的研究要点。

1. 免疫RNA促进心脏病的发生

从免疫细胞中分离出来的RNA小片段可能会让人们患上心血管疾病。肥大细胞（在骨髓中产生的免疫细胞）被认为能加剧血管炎症和血管肿胀，它也是心血管疾病发生的信号，但这些细胞是如何启动这种炎症的，一直没有得到很好的解释。最近，德国吉森尤斯图斯李比希大学（Justus Liebig University）的研究人员牵头的一项研究表明，肥大细胞释放的RNA片段会引起细胞变化并引发炎症。

Silvia Fischer等人在体外从小鼠骨髓中提取出肥大细胞。然后，他们用化学物质处理肥大细胞，使细胞释放出名为“外泌体”（exosomes）的含RNA的颗粒物。这是一种在体内天然发生的释放反应。当研究小组将充满RNA的囊泡加入血管内皮细胞的培养基时，细胞表达了更多的被称为细胞因子的炎症蛋白。引入的含有RNA的囊泡浓度越高，细胞表达的细胞因子就越多。

结果表明，来自肥大细胞的细胞外RNA引发了炎症，使血管健康退化。循环RNA分子也可能参与了与高血压、动脉硬化和动脉瘤等疾病相关的血管壁变化。以上疾病中血管壁都会向外膨胀。该团队正在继续研究细胞外RNA如何与血管相互作用，并希望找出肥大细胞的RNA是否能促进可能影响疾病进程的细胞信号。（*FASEB J*. 33, 5457–5467 (2019)）

2. 焦虑症的生物标记物

创伤后应激障碍（posttraumatic stress disorder, PTSD）的生物标记物被公认是难以发现的。华盛顿州西雅图系统生物学研究所（Institute for Systems Biology）的Kai Wang等人正在改变这种现状。他们表示，在经历过战争并患有PTSD的老兵血液中循环的一些RNA片段水平与没有PTSD的人的水平不同，这一发现有望引领PTSD血液诊断。

研究人员招募了22名曾在伊拉克或阿富汗服役的男性退伍军人，以及同等数量的未患PTSD的人。他们从每个受试者身上抽取了血液样本，并提取了血液中的血浆部分，然后对血浆中发现的细胞外RNA进行了测序。与对照组相比，PTSD患者血液中循环的几种RNA分子的浓度不同寻常（有些比对照组高，有些较低）。这些RNA参与中枢神经系统发育、炎症和大脑神经递质系统的控制。该团队在另外10名PTSD退伍军人的验证组中也发现了类似的循环RNA特征。

作者希望在一个包括男性和女性在内的

更大的实验组中验证他们提出的PTSD的生物标志物。如果这些生物标志物测试被证明是全面可靠的，精神病学家也可以采用其作为监测治疗效果的工具。（*J. Clin. Med*. 8, 963 (2019)）

3. 发现早期阿尔茨海默氏症

血液中的RNA片段可以使医生检测到早期阶段的阿尔茨海默氏症，而此时治疗可能更加有效。

许多人在得知自己患有阿尔茨海默氏症之前，都会经历多年的认知能力下降。其它早期检测疾病的方法，如脑成像和脑脊液分析，都过于昂贵或是有创检查，均无法用于广泛的筛查计划。西班牙巴塞罗那自治大学（Autonomous University）的José Rodríguez-Álvarez等人开发的实验性测试则依赖于血液样本。该测试检测循环RNA的片段，这些片段控制参与形成突触（即脑细胞之间的关键连接）的蛋白质。

当研究人员对100多个认知能力变异较大的人进行血液测试时，他们发现有三种RNA分子在轻度认知障碍（mild cognitive impairment, MCI）和早期阿尔茨海默氏症的人中的水平较高，但在认知功能健康的人中水平较低。在患有MCI后来发展成阿尔茨海默氏症的人的血液中，这三种RNA的含量比没有发展成阿尔茨海默氏症的人高。

研究人员正计划对血液测试进行大规模试验，以验证他们的发现。如果这些RNA分子被证明是一个可靠的认知障碍指标，那么该测试可以形成全人口筛查方案的基础，因为它可以简单地在实验室或医生办公室进行操作。临床医生也可以使用该测试来预测哪类人群最有可能发展为阿尔茨海默氏症。（*Alzheimers Res. Ther.* 11, 46 (2019)）

4. RNA促进肾脏再生

一些干细胞释放含有RNA片段的微小颗粒，帮助受损肾脏再生。意大利都灵大学（University of Torino）的Giovanni Camuss等人报告称，用RNA分子富集这些粒子，即所谓的细胞外囊泡（extracular vesicle, EV），可引起比未加工的囊泡更有力的肾脏再生。这种富集可以使药物开发使用较少EV，可能使药物的风险和成本最小化。

该团队在一组急性肾损伤的小鼠模型上测试了其方法。一些小鼠接受了来源于间充质干细胞的天然EV治疗（间充质干细胞是一种已知能使受伤组织再生的细胞类型），其它小鼠则接受了经过电刺激处理后打开孔隙的干细胞的EV。后者的EV将更多的RNA分子包装在里面。研究人员采用仔细筛选的RNA分子来富集这些囊泡，以帮助肾小管中的细胞更快地生长。

事实证明，低剂量的电刺激RNA的囊泡比类似剂量的天然囊泡能更有效地改善小鼠的肾脏功能。接受这种剂量的改良囊泡的小鼠肾脏损伤较轻，而且其肾脏能更有效地过滤血液中的毒素（接受高剂量电处理EV的小鼠与给予高剂量未处理EV的小鼠结果并无显著不同）。

该研究表明，通过包装更多的RNA分子，可以使囊泡具有更强的治疗活性，这一策略有望促进肾脏损伤患者的低剂量再生药物的开发。（*Int. J. Mol. Sci*. 20, 2381 (2019)）

5. 预测多发性骨髓瘤的病程

多发性骨髓瘤是一种通常影响60岁以上人群的骨髓癌，其进展情况因人而异，差异很大。澳大利亚墨尔本莫纳什大学（Monash University）的Andrew Spencer等人报告称，血液中各种RNA分子的水平揭示了该病个体病例差异的关键特征，这种方法可以让医生更准确地跟踪患者的病情进展，并评估其预后。

研究人员观察了24名已经复发或对治疗抵抗的多发性骨髓瘤患者对28天化疗周期的反应。他们在一个月里多次采集每个参与者的血液样本，并对每个样本的基因信息进行测序，包括细胞外RNA。

事实证明，一开始*CRBN*循环RNA水平较高的参与者具有比正常人更快的疾病进展风险。在本月晚些时候，血液中*IKZF1* RNA分子水平增加的人相比于该分子水平较低的人对治疗的反应更好，且生存率更高。一开始*CRBN* RNA水平低，后来*IKZF1* RNA水平高的人，疗效最好。

该团队计划对更大的多发性骨髓瘤患者群体进行测试，以证明这些循环RNA是否能在更广泛的人群中作为有效的生物标志物。如果可行，它作为用于监测每个病例，并精确预测疾病进程的血液测试的目标，将更接近临床现实。（*Leukemia* 33, 2022–2033 (2019)）

6. 提高效率的分子“骨架”

细胞外RNA在纠正心脏病、癌症和脑损伤等情况下的异常细胞过程中显示出前景。然而，一些高剂量的循环RNA可能存在毒性，这是已经结束的一些临床试验的阻碍所在。渥太华大学（University of Ottawa）的Derrick Gibbings等人已经研究出一种方法，将RNA分子打包成“骨架”结构，以确保更多的分子能影响靶器官。这大大减少了治疗所需的RNA数量，可以降低健康风险。

该团队在细胞核内制作了RNA的治疗序列。利用酶将这些序列整合到被称为“骨架”的RNA附加片段中。这种复合骨架随后出现在细胞产生的囊泡中。研究人员将这些囊泡注入小鼠体内，之后结果显示它们广泛分布于肾脏、肝脏、肠道和肺等器官。

重要的是，定制小泡中的RNA分子有很高的比例积累在靶器官中，而没有被周围的细胞破坏。相比之下，使用脂质纳米颗粒（一种更成熟的递送技术）或使用缺乏骨架的囊泡递送RNA时，到达靶器官的分子要少得多。定制的囊泡可能效果最好，因为RNA的包装方式很有效。

研究人员表示他们的概念验证研究证明了骨架方法的进一步发展，验证了它是否在临床试验中对安全药物的输送是实用的。

原文检索：

Elie Dolgin. (2020) Could tracking RNA in body fluids reveal disease? *Nature,* 582: S2-S4.

Philip W. Askenase. (2020) Artificial nanoparticles are not as good as the real thing. *Nature*, 582: S5.

Roxanne Khamsi. (2020) The biologist on the hunt for extracellular ribosomes. *Nature*, 582: S6-S8.

Kenneth Witwer. (2020) Dietary RNA is ripe for investigation. *Nature*, 582: S9.

Kristina Campbell. (2020) The doubts about dietary RNA. *Nature*, 582: S10-S11.

Tien Nguyen. (2020) Unravelling the mysteries of microRNA in breast milk. *Nature*, 582: S12-S13.

Amanda Keener. (2020) Hacking the body’s delivery service. *Nature*, 582: S14-S15.

Michael Eisenstein. (2020) Inside the stem-cell pharmaceutical factory. *Nature*, 582: S16-S18.

张洁/编

Roxanne Khamsi. (2020) Plant vesicles inspire methods to protect crops. *Nature*, 582: S19.

Elizabeth Svoboda. (2020) Highlights from extracellular RNA studies. *Nature*, 582: S20-S21.

张洁、郭庭玥/编译

特约编辑招聘启事

为了及时收集生命科学最新资讯、提高《生命奥秘》办刊质量，现面向从事生命科学或对这学科有浓厚兴趣的科研人员、学生诚聘特约编辑（兼职）。

职位职责：

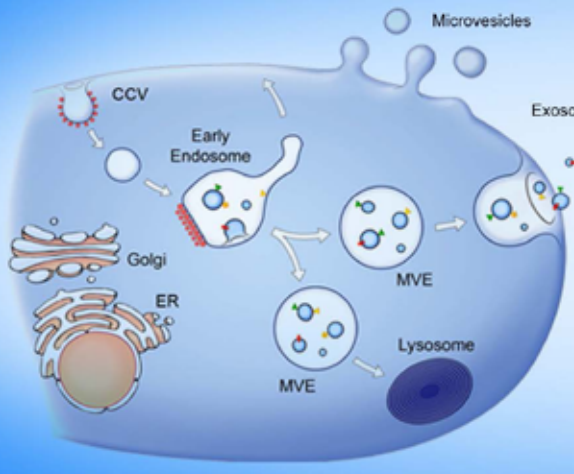
独立完成《生命奥秘》专题的策划：对基因组学、蛋白组学、生物信息学和细胞生物学等学科的发展以及生物医学领域相关技术（例如基因诊断技术、干细胞和克隆技术、生物芯片技术等）的应用进行翻译及深入评述。

选题要求内容新颖、评述精辟、注重时效和深入浅出。尤其欢迎以自身系统研究为基础的高水平译述与评论，结合所从事的科研工作提出自己的见解、今后设想或前瞻性展望。

要求：

1.具备基因组学、蛋白组学、生物信息学、细胞生物学等生命科学学科背景；
2.具备良好的生命科学前沿触觉；
3.具备较高的外文文献翻译、编译水平；
4.具备较强的选题策划、资料搜集、组织能力，以及专业稿件撰写能力；
5.具有高级职称；或者拥有（正在攻读）该领域的最高学位。

有意者请将个人简历发送至 editor@lifeomics.com



外泌体解决方案

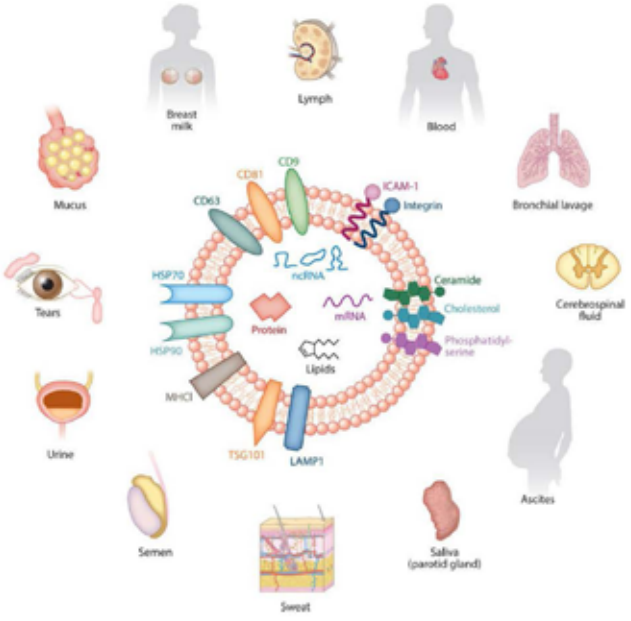
扫码查看产品详情

● 标题图片来源于DOI: 10.1083/jcb.201211138

■ 什么是外泌体（Exosome）

外泌体（Exosome）是由细胞分泌而来的微小囊泡，直径约为 30-150 nm，天然存在于血液、尿液、唾液、母乳和细胞培养基等生物体液中，几乎所有类型的细胞都可以产生并释放外泌体。

GeneCopoeia可以提供外泌体相关标记慢病毒和miRNA表达检测阵列，外泌体稳转细胞株构建服务。



● 来源：DOI:10.1146/annurev-physiol-021115-104929.

■ 外泌体相关标记慢病毒

GeneCopoeia提供携带不同标记（tdTomato, mCherry-Flag, Flag-Gluc）的外泌体标志物CD9, CD63和CD81的预制慢病毒，可用于示踪外泌体的形成、分泌、靶向和运输机制[1,2,3]。另外，GeneCopoeia还提供可用于动物活体实验研究的外泌体预制慢病毒。

外泌体相关基因	启动子	标记	筛选标记	描述
CD9 CD63 CD81	EF1a CMV	tdTomato Flag-mCherry Flag-Gluc Halo Avi copGFP-Flag	Puromycin Blasticidin	>10^8 TU/ml，可直接用于转导实验，100 µl（25 µl x 4管）

■ 参考文献

【1】Current Perspectives on In Vivo Noninvasive Tracking of Extracellular Vesicles with Molecular Imaging. BioMed Research International. 2017. 9158319, 11 pages.

【2】Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosome uptake and retrograde transport can occur at peripheral nerve endings, Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology. 2019. 47:1, 2918-2929.

【3】Cancer-associated fibroblast exosomes regulate survival and proliferation of pancreatic cancer cells. Oncogene. 2017. 36(13): 1770–1778.

■ 外泌体相关miRNA表达检测阵列

GeneCopoeia通过对发表文献的全面检索，精心筛选miRNA与外泌体之间的密切关系，提供用于分析与外泌体相关的miRNA表达的miprofile™ exosome miRNA qPCR阵列。miProfile™外泌体miRNA阵列可以帮助研究人员分析不同样本(尿液[4,5]、血液[6,7]或牛奶)和各种癌症（如肺癌[8,9]、结直肠癌[10]、乳腺癌[11]、前列腺癌[12]等）的外源体中miRNA的差异表达，从而了解miRNA在不同细胞间相互通讯中的作用。

产品优势

- **经文献筛选：**从大量外泌体相关研究的文献中筛选得到的与外泌体相关性较高的miRNAs
- **灵敏度高：**可检测低至20 pg的Total RNA（或者低至10 pg的small RNA）
- **特异性好：**能够区分单核苷酸错配的miRNAs。每套引物都经过了实验验证，以便进行特定的扩增
- **重复性高：**阵列间具有高重复性（R2>0.99）
- **已验证的miRNA引物：**每条miRNA特异验证引物均使用专利算法设计并经过实验确证

货号	产品名称	种属	miRNAs个数	平板数
QM044	miProfile™ Human exosome miRNA qPCR array	Human	706	8 x 96-well plates
QM045	miProfile™ Human exosome miRNA qPCR array	Human	658	2 x 384-well plates
QM046	miProfile™ Human MSC exosome miRNA qPCR array	Human	190	2 x 96-well plates
QM047	miProfile™ Human blood exosome miRNA qPCR array	Human	262	3 x 96-well plates
QM048	miProfile™ Human urine exosome miRNA qPCR array	Human	54	1 x 96-well plates
QM049	miProfile™ Human milk exosome miRNA qPCR array	Human	32	1 x 96-well plates
QM050	miProfile™ Human Cancer exosome miRNA qPCR array	Human	264	3 x 96-well plates
QM051	miProfile™ Human lung cancer exosome miRNA qPCR array	Human	48	1 x 96-well plates
QM052	miProfile™ Human leukemia exosome miRNA qPCR array	Human	40	1 x 96-well plates
QM053	miProfile™ Human hepatocellular cancer exosome miRNA qPCR array	Human	37	1 x 96-well plates
QM054	miProfile™ Human colorectal cancer exosome miRNA qPCR array	Human	51	1 x 96-well plates
QM055	miProfile™ Human lymphoma exosome miRNA qPCR array	Human	35	1 x 96-well plates
QM056	miProfile™ Human squamous cell carcinomaexosome miRNA qPCR array	Human	49	1 x 96-well plates
QM057	miProfile™ Human ovarian cancer exosome miRNA qPCR array	Human	30	1 x 96-well plates
QM058	miProfile™ Human bladder cancer exosome miRNA qPCR array	Human	27	1 x 96-well plates
QM059	miProfile™ Human prostate cancer exosome miRNA qPCR array	Human	34	1 x 96-well plates
QM060	miProfile™ Human breast cancer exosome miRNA qPCR array	Human	36	1 x 96-well plates
QM061	miProfile™ Human renal cancer exosome miRNA qPCR array	Human	22	1 x 96-well plates
QM062	miProfile™ Human stomach cancer exosome miRNA qPCR array	Human	32	1 x 96-well plates
QM063	miProfile™ Human pancreatic cancer exosome miRNA qPCR array	Human	29	1 x 96-well plates

■ 参考文献

【4】Identification of cell-free microRNAs in the urine of patients with prostate cancer. Urol Oncol. 2015. 33(1):16.e17-16.e22.

【5】MicroRNA-29c in urinary exosome/microvesicle as a biomarker of renal fibrosis. Am J Physiol Renal Physiol. 2013. 305(8):F1220-7.

【6】Protocol for serum exosomal miRNAs analysis in prostate cancer patients treated with radiotherapy. J Transl Med. 2018. 16(1):223.

【7】Exosome-Derived miR-130a Activates Angiogenesis in Gastric Cancer by Targeting C-MYB in Vascular Endothelial Cells. Mol Ther. 2018. 3;26(10):2466-2475.

【8】Tissue and exosomal miRNA editing in Non-Small Cell Lung Cancer. Sci Rep. 2018. 8(1):10222.

【9】Hypoxic BMSC-derived exosomal miRNAs promote metastasis of lung cancer cells via STAT3-induced EMT. Mol Cancer. 2019. 18(1):40.

【10】Downregulation of exosome-encapsulated miR-548c-5p is associated with poor prognosis in colorectal cancer. J Cell Biochem. 2018. Pages 1457-1463.

【11】Simultaneous and multiplexed detection of exosome microRNAs using molecular beacon. Biosens Bioelectron. 2016. 86:202-210.

【12】Protocol for serum exosomal miRNAs analysis in prostate cancer patients treated with radiotherapy. J Transl Med. 2018. 16(1):223.

合办专题专刊
网站广告合作
邮件群发推广
请致电(020)32051255

www.LifeOmics.com