

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.04.002

· 基础研究 ·

外泌体来源的 miR-181a 促进胶质瘤的血管生成

欧阳一彬¹, 何青龙¹, 孙衍昶¹, 莫业和¹, 李渭亮² (1. 海南医学院第二附属医院 神经外科一区, 海南 海口 570311; 2. 海南医学院 基础医学与生命科学学院, 海南 海口 571199)

[摘要] **目的:** 探讨外泌体来源的 miR-181a 对胶质瘤血管生成和肿瘤进展的影响。**方法:** 选用 2017 年 8 月至 2019 年 12 月海南医学院第二附属医院手术切除的 83 例胶质瘤和 13 例瘤旁组织标本, 以及胶质瘤细胞 U87、A172、U251、LN229、U373 和小神经胶质细胞 HM, 用 qPCR 法检测瘤组织和细胞中 miR-181a 的表达水平。构建过表达或敲减 miR-181a 的 U373 细胞, 分离和鉴定外泌体; 用小管形成实验、鸡胚绒毛尿囊膜血管实验观察外泌体来源的 miR-181a 对 HUVEC 小管和血管生成的影响。构建裸鼠 U373 细胞移植瘤模型, 观察外泌体来源的 miR-181a 对血管生成及肿瘤生长的影响。**结果:** miR-181a 在胶质瘤肿瘤组织和细胞中的表达水平明显高于瘤旁组织和 HM 细胞 (均 $P < 0.01$)。外泌体来源的 miR-181a 可以明显促进 HUVEC 小管的形成和鸡胚尿绒毛尿囊膜的血管生成 (均 $P < 0.01$)。裸鼠胶质瘤细胞瘤体内实验发现, 回输大量外泌体来源 miR-181a 的小鼠移植瘤进展更快 ($P < 0.05$)、肿瘤组织中血管生成数量显著增加 ($P < 0.01$)。**结论:** miR-181a 在促进胶质瘤血管生成中发挥重要作用, 可能成为胶质瘤诊断及治疗的潜在靶点。

[关键词] 胶质瘤; U373 细胞; 外泌体; miR-181a; 血管生成

[中图分类号] R739.41; R730.254 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2021)04-0325-07

Exosome-derived miR-181a promotes angiogenesis of glioma

OUYANG Yibin¹, HE Qinglong¹, SUN Yanchang¹, MO Yehe¹, LI Weiliang² (1. First District of Neurosurgery, the Second Affiliated Hospital of Hainan Medical University, Haikou 570311, Hainan, China; 2. School of Basic Medicine and Life Sciences, Hainan Medical University, Haikou 571199, Hainan, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect of exosome-derived miR-181a on angiogenesis and tumor progression in gliomas. **Methods:** 83 cases of glioma tissues and 13 cases of peritumoral tissues resected in the Second Affiliated Hospital of Hainan Medical University from August 2017 to December 2019, glioma cells U87, A172, U251, LN229, U373 and microglial cell line HM, were selected to detect the expression of miR-181a in tumor tissues and cells by qPCR method. Glioma U373 cells with miR-181a overexpression or knockdown were constructed, and exosomes were isolated and identified. The effects of exosome-derived miR-181a on angiogenesis of HUVEC cells were investigated by tubule formation and chicken chorioallantoic membrane assay *in vitro*. Nude mice bearing U373 cell transplanted xenograft was constructed to observe the effect of exosome-derived miR-181a on angiogenesis and tumor growth *in vivo*. **Results:** The expression of miR-181a in glioma tissues and cells was significantly higher than that in normal tissues and normal glial HM cells (all $P < 0.01$). The exosome-derived miR-181a could significantly promote the tubule formation of HUVEC cells ($P < 0.01$) and the angiogenesis of chicken chorioallantoic membrane (all $P < 0.01$). *In vivo* experiments showed that the growth of xenografts was promoted ($P < 0.05$) and the amount of angiogenesis in the tumor tissues was increased in the nude mice after being transfused with exosome-derived miR-181a ($P < 0.01$). **Conclusion:** miR-181a plays an important role in promoting angiogenesis of gliomas and may be a potential target for diagnosis and treatment of gliomas.

[Key words] gliomas; U373 cell; exosome; miR-181a; angiogenesis

[Chin J Cancer Biother, 2021, 28(4): 325-331. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2021.04.002]

胶质瘤是最常见的中枢神经系统原发性肿瘤, 占有中枢神经系统肿瘤的 30%, 占有恶性脑肿瘤的 80%^[1-2]。尽管手术技术和治疗策略在过去 20 年中取得了进步, 但胶质瘤患者的预后仍然很差, 累计 1 年生存率低于 30%^[3], 这种不良预后在很大程度上归因于胶质瘤异常血管生成、高侵袭性和化疗耐药性^[4]。肿瘤微血管密度 (microvessel density, MVD) 增

[基金项目] 海南省卫生健康行业科研项目 (No.19A200002)。Project supported by the Scientific Research Project of Health Industry in Hainan Province (No.19A200002)

[作者简介] 欧阳一彬 (1982-), 男, 学士, 副主任医师, 主要从事胶质瘤及颅脑损伤的研究, E-mail: w387683@163.com

[通信作者] 莫业和 (MO Yehe, corresponding author), 主任医师, 硕士生导师, 主要从事胶质瘤及颅脑损伤的研究, E-mail: moyeche2018@163.com

加已被确认为胶质瘤患者预后较差的一个标志^[5]。因此,更好地了解胶质瘤血管生成的分子机制有助于寻找胶质瘤新的治疗靶点,并最终改善预后。血管生成是指从原有的血管系统中形成新的血管,异常的血管生成是大多数实体瘤生长和转移所必需的。据报道^[6-8],miRNA介导了肿瘤的发生及其血管生成,而miRNA在人胶质瘤中的确切作用及其调控失调的原因仍不清楚。研究^[9-10]证实,miR-181a是一种在多种肿瘤中具有促血管生成和耐药的miRNA,然而其在胶质瘤中也具有促血管生成能力,其通过何种方式发挥功能目前未见报道。本研究通过检测miR-181a在胶质瘤组织中的表达水平,观察其对胶质瘤血管生成的影响并探讨其作用机制,以期对胶质瘤的临床诊断与治疗提供新的靶点。

1 材料与方法

1.1 组织标本、细胞系及主要试剂

收集2017年8月至2019年12月海南医学院第二附属医院肿瘤外科手术切除的83例胶质瘤组织及13例瘤旁组织标本,其中男性57例、女性39例,中位年龄63岁;病理类型为高级别48例、低级别35例。术前均告知并签署知情同意书。

胶质瘤细胞U87、A172、U251、LN229和U373购自美国模式培养物库,人小神经胶质细胞HM购自中科院上海细胞库,人脐静脉血管内皮细胞(HUVEC)购自武汉普诺赛生物科技有限公司。

ExoQuick-TC外泌体提取试剂盒购自上海善然生物科技有限公司,TRIzol试剂购自美国Invitgen公司,外泌体蛋白提取试剂盒购自美国EZBioscience公司,PRIME-SCRIPT™ RT Master Mix和SYBR® PrimeScript™ miRNA RT-PCR试剂盒购自日本TaKaRa公司,FastStart Essential DNA Green Master购自美国Roche公司,引物序列由通用生物有限公司合成,anti-CD63、anti-HSP70、anti-GM130抗体购自美国Abcam公司,辣根过氧化物酶(HRP)偶联的羊抗兔二抗购自杭州联科生物科技股份有限公司,Matrigel基质胶购自美国BD生物公司,鸡胚购自广东月琴育种有限公司(中国)。

1.2 细胞培养、转染与分组

将U373细胞建成稳定过表达或敲减miR-181a的细胞,将细胞以 1×10^5 个/孔的密度接种于6孔板中,在细胞贴壁过夜后,以DOI=5加入sh-miR-181a慢病毒或LV-miR-181a慢病毒,并加入6 μ g/ml的聚凝胺,培养24 h后更换为新鲜培养基。敲减miR-181a的细胞命名为sh-miR-181a,过表达miR-181a的细胞命名为

LV-miR-181a。

1.3 外泌体的分离和鉴定

将转染后U373细胞以 1×10^5 个/孔的密度接种于6孔板中,在细胞贴壁后,更换新鲜培养基继续培养48 h。之后取上清,严格按照ExoQuick-TC试剂盒说明书的方法提取外泌体。将获取的不同细胞来源的外泌体分别命名为sh-miR-181a-exo和LV-miR-181a-exo,在铜丝滤网上加入30 μ l所提取的外泌体,静置1 min后再加入30 μ l Salkowski's溶液(pH6.8)混匀,室温下静置5 min,在透射电镜下观察、拍照,并用纳米粒子跟踪分析法进行粒度分析并加以鉴定。

1.4 qPCR法检测胶质瘤组织和细胞中miR-181a的表达水平

用TRIzol试剂从胶质瘤组织及细胞中提取总RNA,对每个RNA样本进行定量,并进行逆转录。分别用PRIME-SCRIPT™ RT Master Mix和SYBR® PrimeScript™ miRNA RT-PCR试剂盒进行miRNA逆转录反应。根据制造商的方案,用FastStart Essential DNA Green Master进行qPCR测定miR-181a的表达水平。引物序列:miR-181a F为5'-AACATTCAACGCTGTCGGTG-3', R为5'-AGCCATAGGGTACAATCAACGG-3'; U6 F为5'-GCTTCGGCAGCACATATAC TAAAAT-3', R为5'-CGCTTCACGAATTTGCGTGT CAT-3'。反应条件:92 °C预变性1 min,93 °C变性5 s,60 °C复性30 s,72 °C延伸60 s,共36个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算目的基因mRNA的相对表达量。实验重复3次。

1.5 WB法检测胶质瘤细胞中CD63、HSP70和GM130蛋白的表达水平

用含1%苯甲基磺酰氟的RIPA裂解缓冲液裂解细胞,用外泌体蛋白提取试剂盒提取外泌体蛋白。蛋白质样品用BCA法进行定量,并在恒定电压下进行12% SDS-PAGE,转膜,5%牛血清白蛋白中封闭1 h后,分别加入anti-CD63(1:1 000)、anti-HSP70(1:5 000)、anti-GM130(1:1 000)一抗,4 °C孵育过夜。次日用TBST多次清洗膜后,在室温下加入HRP标记的羊抗兔二抗(1:20 000)孵育1 h,最后用FluorChem FC2 Imaging System进行曝光,用ImageJ软件分析蛋白条带的灰度值。实验重复3次。

1.6 小管形成实验检测miR-181a对HUVEC小管形成的影响

将200 μ l Matrigel基质胶加入24孔板中,37 °C静置30 min,每孔中加入 2×10^4 个HUVEC,待细胞贴壁后加入含有不同来源外泌体的培养基,在37 °C、5% CO₂中孵育20 h。在Axio Imager A1显微镜($\times 100$)

明场下观察并获取图片,用Image Pro Plus 6.0软件分析统计小管长度。

1.7 鸡胚绒毛尿囊膜血管实验检测miR-181a对血管生成的影响

实验用8 d龄的鸡胚购自北京妫川亚申养殖中心有限公司。在每个蛋壳上开一个直径为1 cm的窗口,去除气囊以显露绒毛尿囊膜。首先将直径0.5 cm的滤纸放在绒毛尿囊膜上,并在纸的中央加入100 μ l含有sh-miR-181a-exo或LV-miR-181a-exo的条件培养液,用无菌胶带封闭窗口后,在37 $^{\circ}$ C、相对湿度80%~90%的条件下孵育48 h,在固定液(甲醇:丙酮=1:1)中固定15 min,切取绒毛尿囊膜,用数码相机拍摄照片。以二、三级血管数为指标评价血管生成水平。

1.8 裸鼠U373细胞移植瘤模型的建立及观察

实验用4~5周龄雌性裸鼠购自海南医学院实验动物中心[实验动物合格证号:SYXK(琼)2017-0013;实验动物伦理审批号:20200416-03],饲养在SPF动物房。将 5×10^6 个U373细胞重悬在200 μ l生理盐水中,接种到裸鼠左侧胸部皮下。之后,每周通过尾静脉注射2次外泌体(20 μ g/只),对照组裸鼠通过尾静脉给予等量PBS,其后进行肿瘤体积监测。在接种肿瘤细胞25 d后处死裸鼠,剥离移植瘤并测量并计算体积。

1.9 免疫荧光染色法检测移植瘤组织中CD31蛋白的表达水平

将移植瘤组织切片在4%多聚甲醛中室温固定30 min后,组织切片用PBS冲洗(5 min $\times$ 3次)。然后,用5%牛血清白蛋白和0.5%Triton X-100在PBS中封闭1 h,加入anti-CD31一抗(1:1 500)在5%牛血清白蛋白中4 $^{\circ}$ C孵育过夜。次日,用PBS冲洗(5 min $\times$ 3次),组织切片在含有5%牛血清白蛋白和Dylight 488羊抗兔二抗(1:10 000)的PBS中避光室温孵育1 h。后用DAPI避光染色10 min,最后在荧光显微镜($\times 100$)下对组织切片进行观察、拍照,通过Image Pro Plus 6.0软件对阳性染色区域进行荧光强度分析。

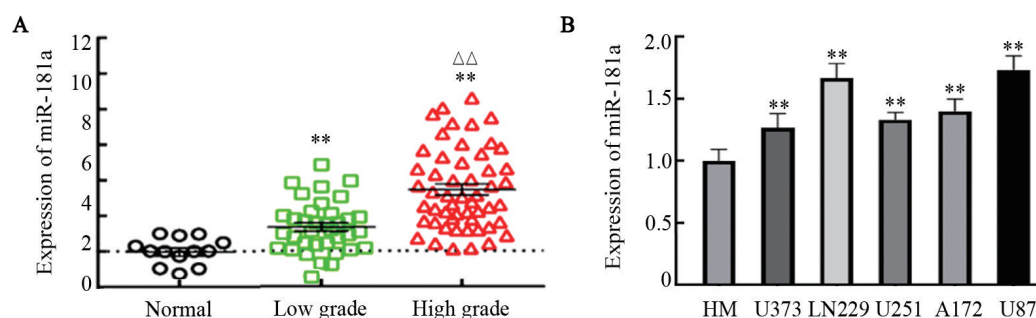
1.10 统计学处理

所有数据采用SPSS18.0软件进行统计学处理。呈正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用非配对 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-181a在胶质瘤组织和细胞中均高表达

qPCR法检测结果显示,miR-181a在胶质瘤组织中的表达水平显著高于瘤旁组织($P < 0.01$),其表达随肿瘤的进展程度而升高($P < 0.01$,图1A);miR-181a在多种胶质瘤细胞中的表达水平均显著高于HM细胞(均 $P < 0.01$,图1B)。



** $P < 0.01$ vs Normal or HM group; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs Low grade group

图1 miR-181a在胶质瘤组织(A)和细胞(B)中的表达

Fig.1 Expression of miR-181a in glioma tissues (A) and cells (B)

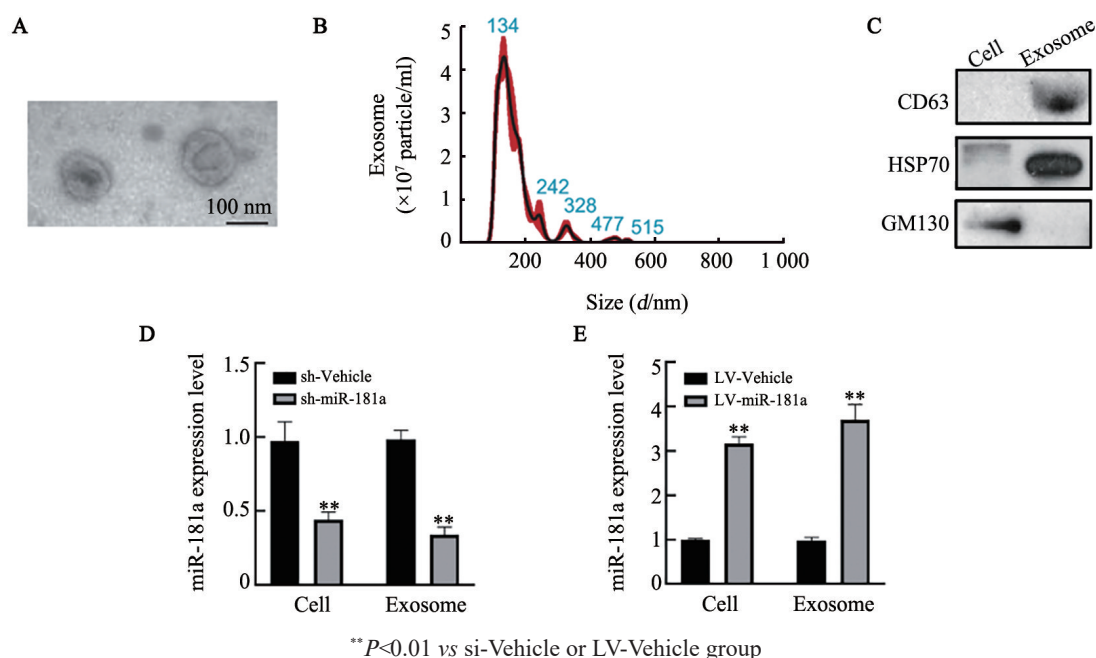
2.2 不同细胞来源的外泌体中miR-181a的含量

电镜下观测结果表明,所分离的外泌体大小在100 nm左右(图2A)。分析外泌体相关蛋白的表达(图2B),发现外泌体的特征蛋白CD63和HSP70表达水平均显著高于U373细胞(2.32 ± 0.13 vs 0.17 ± 0.03 , 5.21 ± 0.36 vs 0.61 ± 0.12 ,均 $P < 0.01$;图2C),而微囊泡标志蛋白GM130则主要存在于U373细胞内,外泌体中无表达(图2C)。qPCR检测结果表明,sh-miR-181a-exo组U373细胞及其外泌体中miR-181a的含量明显低于si-Vehicle组

细胞($P < 0.01$,图2D),而LV-miR-181a-exo组细胞及其外泌体中miR-181a的含量较LV-Vehicle组细胞显著升高($P < 0.01$,图2E)。

2.3 外泌体来源的miR-181a促进HUVEC小管形成

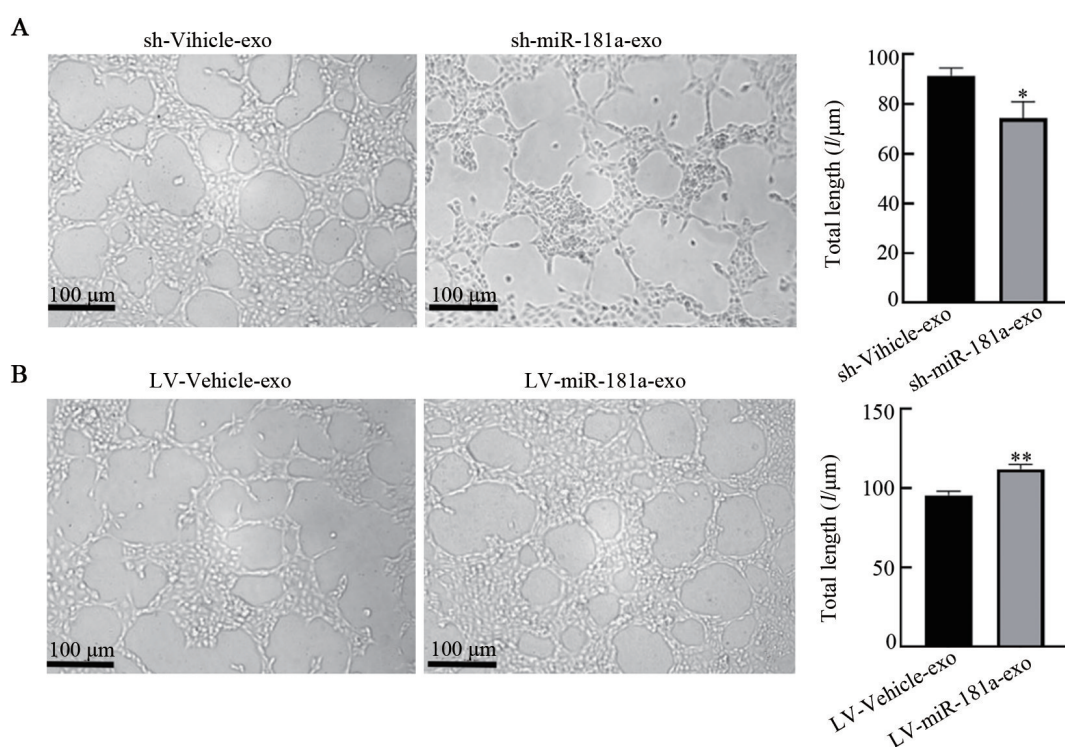
在体外培养的HUVEC中加入含有不同细胞来源的外泌体的培养基,培养一段时间后发现,sh-miR-181a-exo组HUVEC的小管形成能力低于sh-Vehicle-exo组($P < 0.05$;图3A);LV-miR-181a-exo组HUVEC的小管形成能力显著强于LV-Vehicle-exo组($P < 0.01$;图3B)。



A: Electron microscopic images of exosomes; B: Particle size analysis of exosomes; C: WB analysis showed that the exosome marker CD63 existed in the exosomes; D: miR-181a content detected by qPCR in miR-181a-knockdown cells and exosomes; E: miR-181a content detected by qPCR in miR-181a-overexpression cells and exosomes

图2 来自不同工程化细胞的外泌体中miR-181a的含量

Fig.2 miR-181a content in exosomes from various engineered cells



A: HUVECs cultured with sh-miR-181a-exo were subjected to tubule formation in matrigel and the tube number was evaluated using Image Pro Plus 6.0; B: HUVECs cultured with LV-miR-181a-exo were subjected to tubule formation in matrigel and the tube number was evaluated using Image Pro Plus 6.0

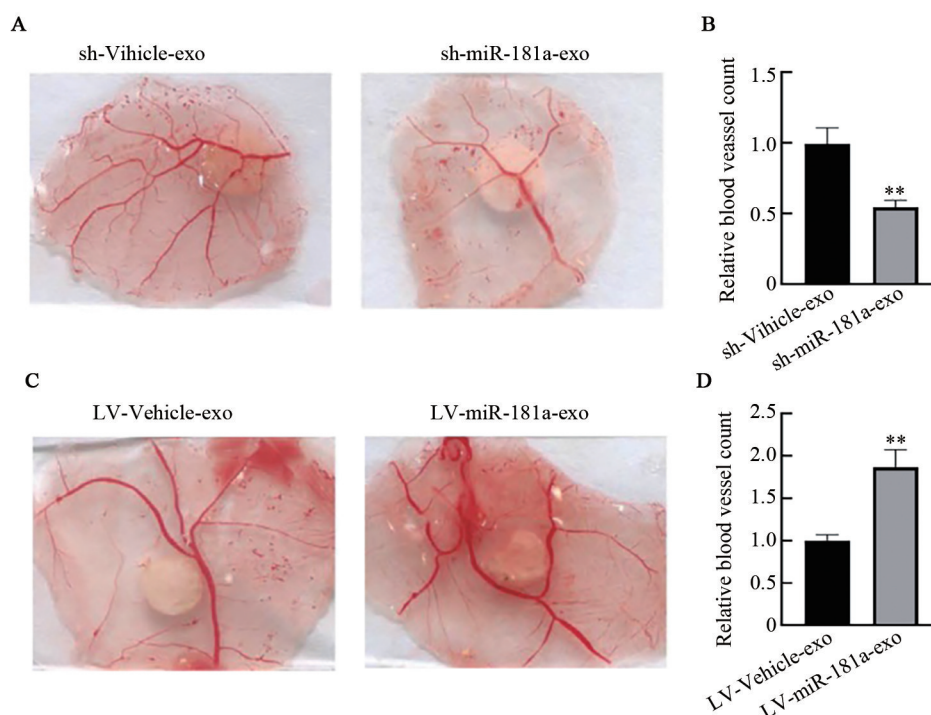
图3 外泌体来源的miR-181a促进HUVEC小管形成($\times 100$)

Fig.3 Exosome-derived miR-181a promoted tubule formation of HUVEC($\times 100$)

2.4 外泌体来源的miR-181a促进鸡胚绒毛尿囊膜血管生成

鸡胚绒毛尿囊膜血管生成实验结果显示,sh-miR-

181a-exo组血管生成能力弱于sh-Vehicle-exo组($P<0.01$;图4A、4B);LV-miR-181a-exo组血管形成能力显著强于LV-Vehicle-exo组($P<0.01$;图4C、4D)。



** $P<0.01$ vs si-Vehicle-exo or LV-Vehicle-exo group

A and B: The chicken chorioallantoic membrane blood vessels stimulated by sh-miR-181a-exo and vector control;

C and D: The chicken chorioallantoic membrane blood vessels stimulated by LV-miR-181a-exo and vector control

图4 外泌体来源的miR-181a促进鸡胚绒毛尿囊膜血管生成

Fig.4 Exosome-derived miR-181a promoted angiogenesis in chorioallantoic membrane of chicken embryos

2.5 外泌体来源的miR-181a促进小鼠移植瘤的生长及血管生成

成功建立小鼠胶质瘤细胞移植瘤模型,通过尾静脉给予外泌体来源的miR-181a,监测肿瘤生长情况。结果发现,LV-miR-181a-exo组移植瘤体积较PBS组显著增大($P<0.05$;图5A、5B)。

免疫组化染色结果显示,LV-miR-181a-exo组瘤组织中CD31蛋白的表达水平显著高于PBS组($P<0.01$;图5C、5D),表明移植瘤组织中含有更多的新生血管。

3 讨论

胶质瘤是最常见的原发性脑肿瘤,也是人类最具侵袭性和致命性的恶性肿瘤之一^[11]。据报道^[12],血管生成与胶质瘤的生长、侵袭、转移和预后密切相关。因此,抑制血管生成过程可能成为预防肿瘤生长和转移的一种潜在的治疗方法。然而,调控胶质瘤血管生成的分子机制仍不清楚。本研究结果表明,胶质瘤细胞来源的外泌体中含有miR-181a,在体内外均可促进人胶质瘤的血管生成。

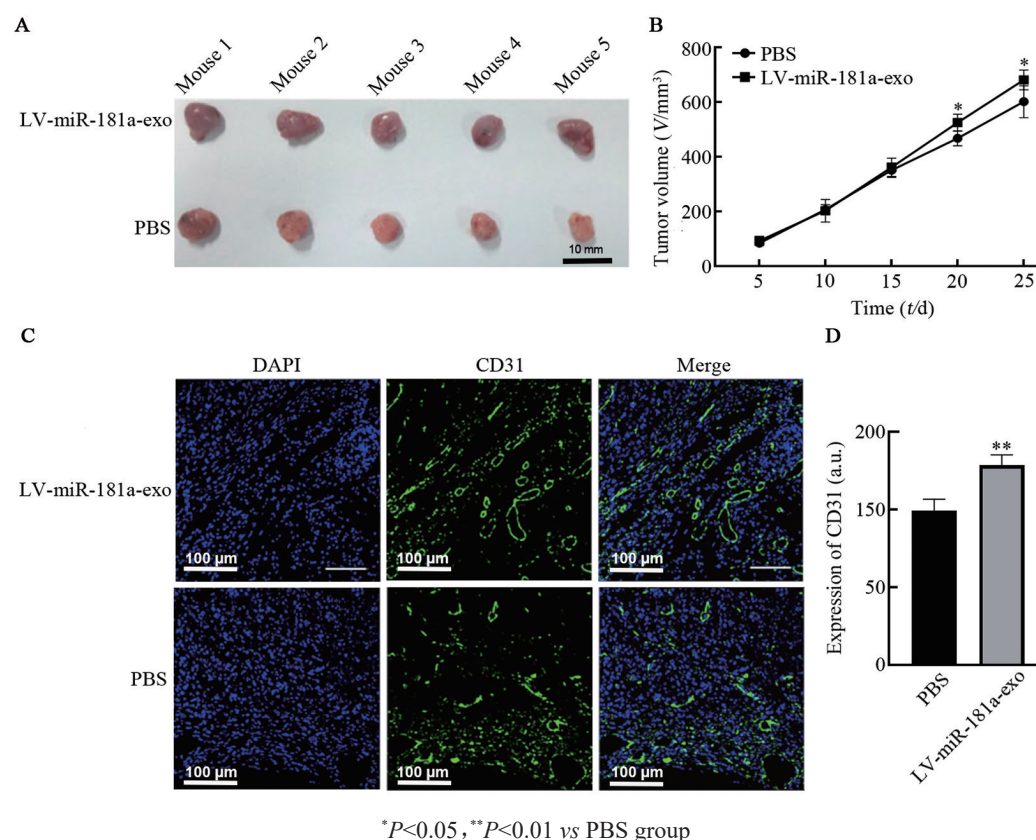
越来越多的证据^[13-14]表明,肿瘤释放的外泌体诱

导受体细胞发生改变,从而在肿瘤生长、转移和血管生成中发挥作用,而miRNA是外泌体发挥生物学功能过程中非常重要的一种介质。miR-181a作为一种癌基因,已被证实发生在卵巢癌、胃癌和乳腺癌等多种肿瘤的发生发展中起着不同的作用^[9, 15-16]。更重要的是,miR-181a可以通过增加VEGF表达和分泌来促进软骨肉瘤的生长^[9]。在结直肠癌的发展中,miR-181a可促进肿瘤生长和肝转移^[17-18]。在临床上,miR-181a的表达水平往往与接受EGFR靶向治疗的大肠癌患者的不良预后相关^[10]。这些研究表明,miR-181a对肿瘤细胞的增殖、侵袭和迁移具有促进作用。

血管生成包括内皮细胞增殖、迁移和排列等多个环节以形成毛细血管样结构。据报道^[19],抗血管生成疗法有望治疗包括胶质瘤在内的恶性肿瘤。虽然抗血管生成治疗的最初反应通常是显著的,但疗效往往是短暂的,随后是肿瘤恢复生长和进展^[20]。作为人脑胶质瘤一线治疗的一部分,贝伐珠单抗治疗的两项大型随机对照临床试验对延长患者生存期无显著作用^[21],这表明探索调控胶质瘤血管生成的分子机制十分迫切。本研究证实了外泌体来源的miR-181a

在体内外均可促进血管生成,这或许为胶质瘤的临床治疗提供了新的思路。推测抑制胶质瘤中外泌体的分泌,进而干扰 miR-181a 对肿瘤血管生成的影响,可能

会对胶质瘤的治疗产生益处,这一点将在后续研究中进行深入探索。



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs PBS group

A: Images of tumor samples from mice treated with exosomes derived from miR-181a over-expression cells; B: The tumor volume in the mice treated with exosomes derived from miR-181a over-expression cells; C and D: IHC analysis of the vascular density in tumors treated with exosomes derived from miR-181a over-expression cells was detected by staining CD31

图5 外泌体来源的 miR-181a 促进裸鼠胶质瘤细胞移植瘤的生长

Fig.5 Exosome-derived miR-181a promoted the growth of glioma cell transplanted xenografts in nude mice

综上所述,本研究结果显示 miR-181a 在胶质瘤组织中高表达,并且通过外泌体的运输增强了胶质瘤组织中的新生血管生成活性。这些发现可能为胶质瘤的治疗提供新的策略。

[参考文献]

- [1] MEENA R K, DODDAMANI R S, GARG K, et al. Invasive medial temporal pilocytic glioma[J]. Neurol India, 2020, 68(3): 713-715. DOI:10.4103/0028-3886.289010.
- [2] FURNARI F B, FENTON T, BACHOO R M, et al. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment[J]. Genes Dev, 2007, 21(21): 2683-2710. DOI:10.1101/gad.1596707.
- [3] 国丽茹, 王淑彬, 桑梅香, 等. MAGE-A1 和 MAGE-A3 在脑胶质瘤组织中的表达及其临床意义[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2019, 26(4): 402-408. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2019.04.006.
- [4] CHEN R Q, LIU F, QIU X Y, et al. The prognostic and therapeutic value of PD-L1 in glioma[J/OL]. Front Pharmacol, 2018, 9: 1503[2020-09-06]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6333638/>. DOI: 10.3389/fphar.2018.01503.
- [5] LONG S R, LI M D, OU S W, et al. The effect of marital status on glioma patient survival: analysis of 617 cases: a SEER-based study [J/OL]. Medicine, 2018, 97(52): e13900[2020-09-06]. <https://journals.lww.com/md-journal/Fulltext/2018/12280/>. DOI: 10.1097/MD. 0000000013900.
- [6] ROY S, SEN C K. miRNA in wound inflammation and angiogenesis [J/OL]. Microcirculation, 2012, 19(3): 224-232[2020-09-06]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3399420/>. DOI: 10.1111/j.1549-8719.2011.00156.x.
- [7] GENG T, SONG Z Y, XING J X, et al. Exosome derived from coronary serum of patients with myocardial infarction promotes angiogenesis through the miRNA-143/IGF-1R pathway[J/OL]. Int J Nanomedicine, 2020, 15: 2647-2658[2020-09-06]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7183550/>. DOI: 10.2147/IJN. S242908.
- [8] AMERIZADEH F, KHAZAEI M, MAFTOUH M, et al. miRNA targeting angiogenesis as a potential therapeutic approach in the treatment of colorectal cancers[J]. Curr Pharm Des, 2018, 24(39): 4668-4674. DOI:10.2174/1381612825666190110161843.
- [9] PANOUTSOPOULOU K, AVGERIS M, MAGKOU P, et al. miR-

- 181a overexpression predicts the poor treatment response and early-progression of serous ovarian cancer patients[J]. *Int J Cancer*, 2020, 147(12): 3560-3573. DOI:10.1002/ijc.33182.
- [10] PICHLER M, WINTER E, RESS A L, et al. miR-181a is associated with poor clinical outcome in patients with colorectal cancer treated with EGFR inhibitor[J]. *J Clin Pathol*, 2014, 67(3): 198-203. DOI: 10.1136/jclinpath-2013-201904.
- [11] LIU J Y, ZHANG X B, YAN X L, et al. Significance of TERT and ATRX mutations in glioma[J/OL]. *Oncol Lett*, 2019, 17(1): 95-102 [2020-09-06]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6313213/>. DOI:10.3892/ol.2018.9634.
- [12] MIAO C W, ZHAO W, YUAN S H, et al. A novel molecular agent for glioma angiogenesis imaging[J]. *Nucl Med Commun*, 2017, 38(11): 919-926. DOI:10.1097/MNM.0000000000000735.
- [13] ZHANG Y, BI J Y, HUANG J Y, et al. Exosome: a review of its classification, isolation techniques, storage, diagnostic and targeted therapy applications[J/OL]. *Int J Nanomedicine*, 2020, 15: 6917-6934[2020-09-06]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7519827/>. DOI:10.2147/IJN.S264498.
- [14] WANG J, CHEN D, HO E A. Challenges in the development and establishment of exosome-based drug delivery systems[J]. *J Control Release*, 2021, 329: 894-906. DOI:10.1016/j.jconrel.2020.10.020.
- [15] YANG C, TABATABAEI S N, RUAN X, et al. The dual regulatory role of miR-181a in breast cancer[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 44(3): 843-856. DOI:10.1159/000485351.
- [16] GE S H, ZHANG H Y, DENG T, et al. MiR-181a, a new regulator of TGF- β signaling, can promote cell migration and proliferation in gastric cancer[J]. *Invest New Drugs*, 2019, 37(5): 923-934. DOI: 10.1007/s10637-018-0695-5.
- [17] JIAO X Y, ZHAO L, MA M T, et al. MiR-181a enhances drug sensitivity in mitoxantone-resistant breast cancer cells by targeting breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2)[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2013, 139(3): 717-730. DOI:10.1007/s10549-013-2607-x.
- [18] ZHANG X W, LI X, TAN F B, et al. STAT1 inhibits miR-181a expression to suppress colorectal cancer cell proliferation through PTEN/Akt[J]. *J Cell Biochem*, 2017, 118(10): 3435-3443. DOI: 10.1002/jcb.26000.
- [19] ZENG Y, YAO X, LIU X, et al. Anti-angiogenesis triggers exosomes release from endothelial cells to promote tumor vasculogenesis[J]. *J Extracell Vesicles*, 2019, 8(1): 1629865. DOI: 10.1080/20013078.2019.1629865.
- [20] JANG J P, HAN J M, JUNG H J, et al. Anti-angiogenesis effects induced by octaminomycins A and B against HUVECs[J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2018, 28(8): 1332-1338. DOI: 10.4014/jmb.1806.06046.
- [21] ARBAB A S. Activation of alternative pathways of angiogenesis and involvement of stem cells following anti-angiogenesis treatment in glioma[J/OL]. *Histol Histopathol*, 2012, 27(5): 549-557 [2020-09-06]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3306128/>. DOI:10.14670/HH-27.549.

[收稿日期] 2020-11-07

[修回日期] 2021-02-28

[本文编辑] 党瑞山