

唾液外泌体 miRNAs 在头颈部鳞状细胞癌中的研究进展

何锦怡¹ 杨柳²

[摘要] 唾液外泌体是指存在于唾液中的直径为 30~150 nm 的细胞外囊泡,在细胞之间的物质交换和信号转导方面发挥重要作用,能将其携带的脂质、蛋白质、核酸传递至受体细胞,调节受体细胞的生理、病理过程。miRNA 作为外泌体中重要的“货物”被转运至受体细胞,调控受体细胞信号通路,从而对疾病的进展起着调节的作用。随着近年来技术手段的发展,大量研究揭示了唾液外泌体 miRNA 在头颈鳞癌的发生发展中发挥重要作用以及唾液外泌体 miRNA 在头颈鳞癌的诊疗中的作用。本文综述了唾液外泌体 miRNA 在头颈鳞癌中的发生、治疗和预后,并讨论唾液外泌体 miRNA 作为生物标志物在头颈鳞癌诊断中的潜在前景和重要意义。

[关键词] 细胞外囊泡;唾液外泌体;生物标志物;头颈部鳞状细胞肿瘤

DOI:10.13201/j.issn.2096-7993.2024.03.016

[中图分类号] R739.91 **[文献标志码]** A

Advances in salivary exosomal miRNAs in head and neck squamous carcinoma

HE Jinyi¹ YANG Liu²

(¹West China School of Clinical Medicine, Sichuan University, Chengdu, 610041, China; ²Department of Otolaryngology Head & Neck Surgery, West China Hospital, Sichuan University)
Corresponding author: YANG Liu, E-mail: yangliuent@163.com

Abstract Salivary exosomes are extracellular vesicles of 30-150 nm in diameter that exist in saliva and play an important role in substance exchange and signal transduction between cells, delivering the lipids, proteins and nucleic acids they carry to the recipient cells and regulating the physiological and pathological processes of the recipient cells. miRNA, as an important "cargo" in exosomes, is transported to the recipient cells and regulates the signaling pathways of the recipient cells, thus playing a regulatory role in disease progression. The miRNAs are transported to the recipient cells and regulate the signaling pathways of the recipient cells, thus playing a regulatory role in the progression of diseases. With the development of technological tools this year, numerous studies have revealed the important role of salivary exosomal miRNAs in the development of head and neck squamous carcinoma and the role of salivary exosomal miRNAs in the diagnosis and treatment of head and neck squamous carcinoma. This paper reviews the occurrence, treatment and prognosis of salivary exosomal miRNA in head and neck squamous carcinoma, and discusses the potential prospects and importance of salivary exosomal miRNA as a biomarker in the diagnosis of head and neck squamous carcinoma.

Key words extracellular vesicles; salivary exosomes; biomarkers; head and neck squamous carcinoma

头颈部鳞状细胞癌(head and neck squamous carcinoma, HNSCC)是世界上第 6 大常见癌症。由于症状较晚,患者往往表现为局部晚期肿瘤、淋巴结和远处转移。尽管在过去的几年里建立了新的治疗方法,但复发率、死亡率仍然较高。肿瘤特异性标志物的缺乏强调了对 HNSCC 患者早期检测、疾病监测和治疗监测的新诊断工具的必要性。国际细胞外囊泡学会(international society of extracellular vesicles, ISEV)认为,外泌体是一种纳米级别的囊泡(直径为 30~100 nm),起源于内泌

体途径,通过胞吐作用分泌到细胞外。外泌体已经从大量体液中分离出来,如血液、尿液、唾液、母乳、脑脊液和腹膜液^[1]。外泌体被认为是癌细胞微环境最重要的指标,也是致癌细胞通讯的新媒介。近年来对外泌体介导的细胞信号转导的研究进展,为阐明肿瘤发展的分子机制做出了重要贡献,拓展了肿瘤生物学的研究前沿。

有研究表明,非编码 RNA(non-coding RNA, ncRNA)、信使 RNA(messenger RNA, mRNA)、蛋白质和 DNA 片段可以作为“货物”在细胞外囊泡(extracellular vesicle, EV)中被携带,在介导细胞间通信的信号传输中发挥重要作用,且可以作为新的 HNSCC 诊断生物标志物^[2]。其中,外泌体微

¹四川大学华西临床医学院(成都,610041)

²四川大学华西医院耳鼻咽喉头颈外科

通信作者:杨柳, E-mail: yangliuent@163.com

RNA(microRNA, miRNA), 作为重要的生物标志物之一, 在诊断各种恶性肿瘤方面有巨大潜力, 此外还可以调节细胞增殖、肿瘤转移、细胞凋亡和免疫反应中的蛋白表达等生理过程。

血浆或血清中的外泌体 miRNAs 在口腔癌^[3]和喉癌^[4]中显示出潜在的疾病鉴别潜力。然而, 较少有将唾液来源的外泌体作为潜在的非侵入性液体生物标志物进行研究。与血浆比较, 唾液样本通常不用于临床诊断, 尽管唾液是一种理想的生物标志物检测诊断介质, 唾液采集方便、简单、无创、成本低。与血液不同, 唾液中的生物标志物被稀释后, 易于获取, 可以使用高灵敏度的扩增技术进行检测。这些特征使唾液成为发现生物标志物的理想生物液体^[5]。由于外泌体是通过胞吐作用分泌, 所以上呼吸道内衬的各种类型的细胞, 无论是健康的还是恶性的, 分泌的外泌体都可能直接进入唾液。口腔癌和口咽癌与唾液直接接触的部位或其附近区域使唾液外泌体成为检测这些癌症的有希望的血液替代介质^[6]。此外, 另有研究证明来自唾液的外泌体 miRNA 可以用来区分健康个体和头颈鳞癌患者^[7]。因此, 唾液可以作为一种合适的生物液体, 用于 HNSCC 的筛查、治疗和监测。本文就唾液外泌体 miRNA 在头颈鳞癌中的发展、进展和转移, 以及唾液外泌体 miRNA 作为生物标志物在头颈鳞癌诊断中的作用进行综述。

1 唾液外泌体分离

液体活检作为一种新兴的非侵入性检测方法, 通过检测存在于体液中的生物标志物, 来进一步检测疾病发生及发展的情况。由于外泌体在很大程度上与亲本细胞相似, 并在所有体液中自由循环, 因此外泌体有望成为非侵入性液体活检的组成部分。从细胞培养上清液和不同体液中分离和富集外泌体的方法不同, 通常体液或细胞培养上清液在 2 000 g 离心力下进行差异离心以清除死细胞, 然后在 10 000 g 离心力下清除细胞碎片和非外泌体囊泡, 如微泡(microvesicles, MVs)。然后, 含有外泌体的上清液通过 200 nm 过滤器, 将 200 nm 以上的较大颗粒(即死细胞、凋亡泡和来自小泡的细胞碎片)分离出来。研究时常使用的分离方法有: 100 000 g 超速离心; 等密度离心; 使用针对外泌体表面标记物的抗体进行的免疫亲和分离; 尺寸排阻色谱法; 超滤; 聚合物沉淀^[8]。目前唾液外泌体常用的提取方法有 2 种, 分别为金标准的超速离心法及 ExoQuick-TCTM(EQ)试剂盒提取法。

然而, 唾液外泌体的分离却是唾液诊断分析发展的主要障碍。与其他生物体液的数据比较, 不同的分离方法从唾液中分离出的外泌体的产量和含量存在不一致性, 这可能会影响唾液作为癌症诊断物质的实用性。由于放射治疗、唾液腺手术、心理

压力等原因, 口干症患者的唾液采样可能会受到阻碍; 唾液流量和成分进一步会受到压力、食物摄取、牙龈出血或饮酒和吸烟的影响^[9-10]; 甚至酒精和烟草也会引起气道上皮细胞 EVs 的 RNA 谱的变化^[11], 且烟草/酒精对口腔癌中 EVs 的影响也未得到明确的证明。因此, 还需要在唾液外泌体分离的开发和优化方面做更多努力, 期待这些改进可以跳过分离外泌体的步骤, 直接从唾液等生物液体中检测外泌体。

2 唾液外泌体 miRNA 在 HNSCC 方面的研究现状

2.1 唾液外泌体 miRNA 的分离纯化

Gallo 等^[12]报道了唾液中的大部分 miRNA 集中在外泌体中, 并提出外泌体 miRNA 是发现生物标志物的第一步。外泌体可能是连接口腔健康与系统性疾病的关键中介。从口腔远端发展的肿瘤可以通过诱导唾液发生与癌症相关的特异性变化来改变唾液生物标志物谱, 从而反映出肿瘤的存在。然而, 检测外泌体核酸的准确性和可行性往往受到其低丰度的阻碍。为了量化外泌体核酸的表达水平, 已经使用了实时荧光定量 PCR(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)、微阵列数据分析(microarray data analysis)和下一代测序(next-generation sequencing, NGS)等技术, 但在实际操作中仍有诸多限制和不足。为了克服这些限制, 人们已探索出一些与传统方法比较, 具有高灵敏度和方便的外泌体核酸检测方法。如微滴式数字 PCR(droplet digital PCR)、分子信标检测(molecular beacons)、四面体 DNA 探针(tetrahedral DNA probe)、SPR 检测(surface plasmon resonance, SPR)、热泳检测(thermophoretic detection)、CRISPR/Cas-assisted 检测、直接可视化的单囊泡分析。但 Yu 等^[13]报道, 大多数新的检测方法虽然优于传统方法, 但仍然面临着不同外泌体亚群的低灵敏度和高异质性的挑战。虽然取得了革命性的进展, 但目前还未从细胞培养液和人体体液中分离高通量、高纯度和最小损伤的外泌体的标准化方法。

2.2 唾液外泌体 miRNA 与肿瘤微环境

肿瘤微环境是肿瘤细胞和基质细胞复杂而多样的组合, 其中各成分的比例和状态都会影响肿瘤细胞的迁移、增殖等生命活动。肿瘤相关的外泌体被释放到各种体液中, 在区分健康个体和癌症患者时显示出预测和(或)诊断的潜力^[14]。新兴的研究已经确定外泌体是介导分子交互作用的动态参与者, 驱动肿瘤的进展、侵袭和转移。外泌体中填充的生物活性分子, 被转移到受体细胞中发挥功能, 并能够通过加速肿瘤生长、转移、血管生成和耐药性的增强来改变受体细胞的生物特性。其中, 外泌体 miRNAs 已被证明为一种可以有效调节肿瘤微

环境的生物成分。

肿瘤微环境中的细胞相互作用现在被认为是肿瘤进展的关键因素。肿瘤微环境中,来自肿瘤细胞的外泌体将分子信号传递给周围的正常健康细胞。癌细胞相关的活化成纤维细胞(cancer associated fibroblasts, CAFs)几乎存在于所有实体肿瘤组织中,在肿瘤恶性进展中发挥重要作用,如上皮间充质转化和转移。HNSCC 来源的唾液外泌体 miR-196a 通过靶向 CDKN1B 和 ING5 在 HNSCC 肿瘤微环境中促进肿瘤发生,导致 CAFs 具有顺铂耐药性。肿瘤分泌的唾液外泌体可以通过转移 miR-125b 促进癌相关成纤维细胞的活化。此外, miR-34a-5p 的转移通过靶向 AXL 基因来抑制 AKT/GSK-3 β / β -catenin/Snail 通路从而抑制了口腔细胞的增殖和运动^[15]。在 CAFs 衍生外泌体中检测到 miR-382-5p 过表达,且被认为是 OSCC 细胞迁移和侵袭的原因^[16]。肿瘤细胞可以通过被释放的外泌体 miRNA 来诱导成纤维细胞样分化。在缺氧条件下,过表达的 miR-192/215 被 CAF 吸收,导致 Caveolin-1 (CAV1) 表达下调,从而抑制 TGF- β /SMAD 信号传导来调节 CAF 样分化^[17]。有研究发现,唾液来源的外泌体 miRNAs 被发现参与 RAS/MAPK、核因子- κ B 复合体(nuclear factor kappa B, NF- κ B)、Smad2/3 和干扰素- α 信号(interferon-alpha, IFN- α) 转导。例如,在 OSCC 中,由 CAL-27 来源的外泌体释放的 miR-21-5p 被 THP1 单核细胞吸收后,在激活 NF- κ B 炎症通路中发挥作用;同时其还可促进 OSCC 中的血管生成^[18]。miR-146a-5p 被发现可以抑制与白细胞介素-1 受体相关的激酶-1 的表达,并参与 NF- κ B 通路^[19]。此外,高度转移和侵袭性的口腔癌细胞可将唾液外泌体来源的 miRNA-1246 转运到亲本 OSCC 细胞上,并靶向结合 DENND2D 和 CHD9/WRN 来促进肿瘤细胞增殖、转移和侵袭^[20]。过表达的外泌体 miR-9 通过靶向 MDK 的促血管生成蛋白和调节 PDK/AKT 信号通路来阻碍鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, HPC)中血管的生成和转移^[21]。

2.3 唾液外泌体 miRNA 可作为 HNSCC 的生物标志物

为了研究唾液来源的外泌体的 miRNA 含量, Hofmann 等^[22] 对健康人群(healthy donors, HD) 和 HNSCC 患者进行 miRNA 分析和比较。健康人唾液中共检测到 170 个外泌体 miRNAs, 而 HNSCC 患者唾液中检测到 139 个外泌体 miRNAs。62 个 miRNAs 只存在于 HD 的唾液来源的外泌体中, 31 个存在于 HNSCC 患者的外泌体中, 108 个存在于 2 组间的重叠, 与 HD 比较, 大多数(86%) 重叠的唾液来源的外泌体 miRNAs 在

HNSCC 患者中水平较低。在 HNSCC 患者中, 有 8 个 miRNAs 的表达率显著降低, 其中 miR-203a-3p 的差异倍数最大, miR-133a-5p 的显著性最高。唾液 miR-9、miR-191 和 miR-13、miR-122-5p、miR-486-5p、miR-486-3p 和 miR-10b-5p 被发现可作为 HNSCC 的特异性生物标志物, 突出了外体 miRNA 作为非侵入性唾液生物标志物的潜在临床应用^[19]。此外, 在 HNSCC 患者的唾液样本中成功检测到 miR-196a 和 miR-196b 水平的升高; miR-196a 和 miR-196b 在靶基因和下游调控通路中均能诱导细胞特异性应答, 并对细胞增殖、迁移和侵袭具有独特的影响。因此, miR-196b 可用于早期诊断和疾病监测, 也可作为唾液中的非侵入性生物标志物^[23]。

有研究证明, 唾液外泌体 miR-31 可能 HNSCC 的生物标志物; 在所有临床阶段的口腔癌患者中, 无论肿瘤大小, 浓度均有明显升高; 在癌前病变和健康对照中无表达变化; 肿瘤切除后, 唾液中 miR-31 水平降低^[24]。唾液 miR-31 不仅可用于监测疾病, 还对癌症筛查有一定帮助。miR-31 上调也被认为是 HNSCC 复发或恶性转化的标志, 并被证明其可以在癌组织中调节干细胞转录因子 Nanog/OCT4/Sox^[25]。

唾液外泌体 miRNAs 在口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC) 的诊断和治疗过程中具有潜在的诊断作用。在最新研究中, 下调的 miR-30c-5p 有可能成为早期 OSCC 检测的新的非侵入性生物标志物, 具有与总体生存相关的临床意义^[26]。有研究列举了 19 种 miRNAs 作为 OSCC 的候选生物标志物, 其中有 5 种在 OSCC 中表达下降, 14 种表达上升^[27-28]。其中 miR-345 和 miR-31-5p 是持续上调的 OSCC 唾液生物标志物, miR-345、miR-31-5p 和 miR-424-3p 这 3 种 miRNA 可以较灵敏地区分癌症患者和对照组。此外, miR-345 过表达与口腔白斑中不典型增生水平的升高有关^[29]; miR-424 被发现在肿瘤细胞迁移和侵袭以及萌发血管生成中发挥作用^[28]。OSCC 细胞系可以选择性地包装和丢弃外泌体中 miR-142-3p, 从而激活 TGFBR1 途径, 促进内皮细胞血管生成并维持肿瘤细胞的恶性状态^[30]。与健康受试者比较, 口腔鳞癌患者唾液中 miR-125a、miR-21、miR-145、miR-200a、miR-93、miR-375 和 miR-184 等 miRNA 的不同表达已被证明是检测口腔鳞癌和潜在口腔恶性病变的关键理论基础之一^[31-32]。Zahr-an 等^[31] 的研究表明 miRNA-184 是唯一能区分 OSCC 和口腔潜在恶性疾病的 miRNA。此外, 在 OSCC 患者唾液中, miR-300、miR-27a-3p、miR-340-5p、miR-205-3p 及其对应靶基因的表达均下降, 被认为与 OSCC 的发生有关键性影响^[33]。近

期有研究表明,miRNA-512-3p 和 miRNA-412-3p 在 OSCC 患者的唾液外泌体中高表达,对 OSCC 诊断具有良好的鉴别能力,可作为潜在的候选生物标志物。He 等^[7]发现来自唾液腺外泌体的 miR-24-3p 可以作为 OSCC 的潜在生物标志物,且过量表达的 miR-24-3p 可以作用于 period1 (PER1) 基因以促进肿瘤细胞的增殖。

唾液 miR-139-5p 也被证明是治疗和评估 OSCC 复发的有价值的生物标志物;与健康受试者比较,OSCC 患者唾液样本中其表达下调,术后 OSCC 患者唾液中其表达增加^[34]。miR-125b 在 OSCC 中下调,miR-125b 高表达与更好的预后相关^[35]。此外,唾液外泌体 miRNAs 也可用于评估口腔癌前病变向 OSCC 进展风险的潜力;唾液外泌体 miRNAs,尤其是在癌症中作为肿瘤抑制因子发挥作用并在口腔低级别发育不良患者中发现上调的 miRNA,可能是阻碍疾病恶性转化的物质,如:口腔鳞癌患者唾液中表达升高的 miR-708、miR-10b、miR-19a、miR-30e、miR-26a 和 miR-660,表达降低的 miR-99、miR-15a、miR-197、miR-145 和 miR-150,被认为是口腔恶性肿瘤转化为口腔低级别发育不良的生物标志物^[36]。Momen-Heravi 等^[37]报道了 OSCC 患者、OSCC 缓解期患者、口腔扁平苔藓患者唾液中细胞外 miRNA 的表达差异,与健康受试者比较,OSCC 患者唾液中 miRNA-27b 显著上调;在检测 OSCC 方面,miRNA-27b 比其他检测的 miRNA 具有更高的敏感性和特异性。

与健康对照组比较,HPC 患者唾液中的 miRNA (如 miR-3714、miR-650 和 miR-575) 有显著改变,这强调了使用唾液 miRNA 可以作为诊断 HPC 的生物标志物;且使用在 HPC 中显著表达水平差异的 6 种唾液外泌体 miRNA (miR-30b-3p、miR-1202、miR-1321、miR-3612、miR-4478 和 miR-4730) 去检测 HPC,灵敏度可达 95.45%,特异性为 80.00%^[38]。另外一项新的研究证明,HPC 患者中,miR-24-3p、miR-891a、miR-106a-5p、miR-20a-5p 和 miR-1908 存在差异性表达,其通过下调 MARK1 通路对 HPC 细胞的增殖分化产生影响^[39]。BART1 miRNAs 负性调节 LMP1 的表达,可能会促进 HPC 细胞的增殖和扩散^[40]。试验证明,miR-767-5p、miR-105-5p 在口咽鳞状细胞癌 (oropharyngeal squamous cell carcinoma, OPSCC) 中富集度最高,可以用来预测 OPSCC 的转移复发^[41]。在外泌体中,甲状腺乳头状癌 (papillary thyroid carcinoma, PTC) 细胞过表达 miR-146b 和 miR-222,导致了 TPC-1 和 NTHY 细胞的负性增长,有可能被开发为检测 PTC 复发的生物标志物^[42]。外泌体 miR-21、miR-127 与喉鳞状细胞癌 (laryngeal squamous cell carcinoma, LSCC) 临床

参数显著相关,是 LSCC 患者有前途的预测工具^[43]。最近的一项研究提示,血清衍生的外泌体促进 CD8 T 细胞过度表达 PD-1,将影响下咽癌的预后,但对于唾液外泌体的是否具有相关作用更待进一步研究^[44]。

2.4 唾液外泌体 miRNA 与 HNSCC 的 HPV 感染状态相关

在大多数入乳突瘤病毒 (human papilloma virus, HPV) 阳性癌症患者的体液和肿瘤组织中检测到的 miRNA 表达存在差异,如 miR-34a、miR-143/145、miR-125^[3]。这些存在差异的 miRNA 和其他抗癌 miRNA 将成为针对 HPV 相关癌症的 miRNA 治疗的候选者^[2]。Chai 等^[5]已证明唾液中 HPV-16 DNA 可以表明 HNSCC 患者中的 HPV 状态,并且有诊断的潜在作用。此外,也有研究证明外泌体 miRNA 的表达依赖于 HPV 的状态:miR-205-5p 在 HPV (+) 外泌体和 miR-1972 在 HPV (-) 外泌体中均呈现特异性表达,并可作为潜在的 HPV 相关生物标志物^[45]。miR-100-5p 与 HPV 阴性口咽鳞癌相关;miR-9 家族,可以区分与 HNSCC 相关的 HPV 阳性和阴性状态^[41]。

2.5 唾液外泌体 miRNA 与顺铂耐药性

基于顺铂 (cisplatin) 的化疗是晚期 HNSCC 治疗的一个重要环节。但是长期使用这种药物会导致耐药性,这是治疗 HNSCC 患者最具挑战性的问题之一^[46]。头颈部肿瘤细胞暴露于某些化疗药物,如顺铂、阿霉素 (adriamycin) 和活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 相关药品,可导致 EVs 中致癌成分失衡,降低化疗药物的抗增殖和抗转移效应。同时,肿瘤来源的 miRNA 可以赋予受体细胞顺铂抗性表型。据报道,在 OSCC 中,miR-125b 可抑制肿瘤细胞的生长,增加人体活性氧种类和顺铂敏感性;可采用降低 miR-125b-prxl2a-nrf2 轴的方法来降低氧化应激,从而增加顺铂耐药性^[30]。高耐药性的 OSCC 细胞通过外泌体包裹 miRNA-21 并转运至靶基因 PTEN 和 PDCD4 发生作用,可增强自身的耐药性并减少 DNA 损伤^[30,47]。Liu 等^[47]揭示,具有顺铂耐药性的 OSCC 细胞可以通过靶向基因 PTEN 和 PDCD4 的外泌体转移 miR-21,从而赋予亲本 OSCC 细胞顺铂耐药性。

3 展望

随着对外泌体介导的肿瘤产物从远端肿瘤传递到唾液的认识逐渐加深,唾液外泌体作为潜在生物标志物的效用也随之扩大,“唾液-外泌体”成为了当前研究的热门话题。但是目前关于唾液外泌体 miRNA 在 HNSCC 疾病进展的研究尚处于起步阶段,一方面,因为唾液外泌体的提取工艺复杂,浓度低,含量少;另一方面,唾液外泌体中 miRNA 参与 HNSCC 发生、发展的途径多种多样,使现阶段

段的研究还十分局限。未来如能充分认识唾液外泌体 miRNA 在头颈鳞癌中的作用,将有助于从疾病的发生来源来理解疾病,以寻找更多的 HNSCC 有效的唾液外泌体 miRNA 标志物,有望提高 HNSCC 的整体诊疗水平。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] EL Andaloussi S, Mäger I, Breakefield XO, et al. Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2013, 12(5): 347-357.
- [2] Sadri Nahand J, Moghoofei M, Salmaninejad A, et al. Pathogenic role of exosomes and microRNAs in HPV-mediated inflammation and cervical cancer: A review [J]. *Int J Cancer*, 2020, 146(2): 305-320.
- [3] He T, Guo X, Li X, et al. Plasma-Derived Exosomal microRNA-130a Serves as a Noninvasive Biomarker for Diagnosis and Prognosis of Oral Squamous Cell Carcinoma[J]. *J Oncol*, 2021, 2021: 5547911.
- [4] Zhao Q, Zheng X, Guo H, et al. Serum Exosomal miR-941 as a promising Oncogenic Biomarker for Laryngeal Squamous Cell Carcinoma [J]. *J Cancer*, 2020, 11(18): 5329-5344.
- [5] Chai RC, Lim Y, Frazer IH, et al. A pilot study to compare the detection of HPV-16 biomarkers in salivary oral rinses with tumour p16 (INK4a) expression in head and neck squamous cell carcinoma patients [J]. *BMC Cancer*, 2016, 16: 178.
- [6] Nair S, Tang KD, Kenny L, et al. Salivary exosomes as potential biomarkers in cancer [J]. *Oral Oncol*, 2018, 84: 31-40.
- [7] He L, Ping F, Fan Z, et al. Salivary exosomal miR-24-3p serves as a potential detective biomarker for oral squamous cell carcinoma screening [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 121: 109553.
- [8] Zlotogorski-Hurvitz A, Dayan D, Chaushu G, et al. Human saliva-derived exosomes: comparing methods of isolation [J]. *J Histochem Cytochem*, 2015, 63(3): 181-189.
- [9] Pedersen A, Sørensen CE, Proctor GB, et al. Salivary secretion in health and disease [J]. *J Oral Rehabil*, 2018, 45(9): 730-746.
- [10] Batista T, Chaiben CL, Penteadó C, et al. Salivary proteome characterization of alcohol and tobacco dependents [J]. *Drug Alcohol Depend*, 2019, 204: 107510.
- [11] Corsello T, Kudlicki AS, Garofalo RP, et al. Cigarette Smoke Condensate Exposure Changes RNA Content of Extracellular Vesicles Released from Small Airway Epithelial Cells [J]. *Cells*, 2019, 8(12): 1652.
- [12] Gallo A, Tandon M, Alevizos I, et al. The majority of microRNAs detectable in serum and saliva is concentrated in exosomes [J]. *PLoS One*, 2012, 7(3): e30679.
- [13] Yu D, Li Y, Wang M, et al. Exosomes as a new frontier of cancer liquid biopsy [J]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1): 56.
- [14] Silva J, Garcia V, Rodriguez M, et al. Analysis of exosome release and its prognostic value in human colorectal cancer [J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2012, 51(4): 409-418.
- [15] Li YY, Tao YW, Gao S, et al. Cancer-associated fibroblasts contribute to oral cancer cells proliferation and metastasis via exosome-mediated paracrine miR-34a-5p [J]. *EBioMedicine*, 2018, 36: 209-220.
- [16] Sun LP, Xu K, Cui J, et al. Cancer associated fibroblast derived exosomal miR-382-5p promotes the migration and invasion of oral squamous cell carcinoma [J]. *Oncol Rep*, 2019, 42(4): 1319-1328.
- [17] Zhu G, Cao B, Liang X, et al. Small extracellular vesicles containing miR-192/215 mediate hypoxia-induced cancer-associated fibroblast development in head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Cancer Lett*, 2021, 506: 11-22.
- [18] Momen-Heravi F, Bala S. Extracellular vesicles in oral squamous carcinoma carry oncogenic miRNA profile and reprogram monocytes via NF- κ B pathway [J]. *Oncotarget*, 2018, 9(78): 34838-34854.
- [19] Salazar-Ruales C, Arguello JV, López-Cortés A, et al. Salivary MicroRNAs for Early Detection of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: A Case-Control Study in the High Altitude Mestizo Ecuadorian Population [J]. *Biomed Res Int*, 2018, 2018: 9792730.
- [20] Guo L, Guo N. Exosomes: Potent regulators of tumor malignancy and potential bio-tools in clinical application [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2015, 95(3): 346-358.
- [21] Lu J, Liu QH, Wang F, et al. Exosomal miR-9 inhibits angiogenesis by targeting MDK and regulating PDK/AKT pathway in nasopharyngeal carcinoma [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37(1): 147.
- [22] Hofmann L, Medyany V, Ezić J, et al. Cargo and Functional Profile of Saliva-Derived Exosomes Reveal Biomarkers Specific for Head and Neck Cancer [J]. *Front Med (Lausanne)*, 2022, 9: 904295.
- [23] Álvarez-Teijeiro S, Menéndez ST, Villaronga MÁ, et al. Dysregulation of Mir-196b in Head and Neck Cancers Leads to Pleiotropic Effects in the Tumor Cells and Surrounding Stromal Fibroblasts [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 17785.
- [24] Liu CJ, Lin SC, Yang CC, et al. Exploiting salivary miR-31 as a clinical biomarker of oral squamous cell carcinoma [J]. *Head Neck*, 2012, 34(2): 219-224.
- [25] Lu WC, Liu CJ, Tu HF, et al. miR-31 targets ARID1A and enhances the oncogenicity and stemness of head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(35): 57254-57267.
- [26] Mehterov N, Vladimirov B, Sacconi A, et al. Salivary miR-30c-5p as Potential Biomarker for Detection of

- Oral Squamous Cell Carcinoma [J]. *Biomedicines*, 2021,9(9):1079.
- [27] Scholtz B, Horváth J, Tar I, et al. Salivary miR-31-5p, miR-345-3p, and miR-424-3p Are Reliable Biomarkers in Patients with Oral Squamous Cell Carcinoma [J]. *Pathogens*, 2022, 11(2):229.
- [28] Peng HY, Jiang SS, Hsiao JR, et al. IL-8 induces miR-424-5p expression and modulates SOCS2/STAT5 signaling pathway in oral squamous cell carcinoma [J]. *Mol Oncol*, 2016, 10(6):895-909.
- [29] Zhou X, Ren Y, Liu A, et al. STAT3 inhibitor WP1066 attenuates miRNA-21 to suppress human oral squamous cell carcinoma growth in vitro and in vivo [J]. *Oncol Rep*, 2014, 31(5):2173-2180.
- [30] Harmati M, Tarnai Z, Decsi G, et al. Stressors alter intercellular communication and exosome profile of nasopharyngeal carcinoma cells [J]. *J Oral Pathol Med*, 2017, 46(4):259-266.
- [31] Zahran F, Ghalwash D, Shaker O, et al. Salivary microRNAs in oral cancer [J]. *Oral Dis*, 2015, 21(6):739-747.
- [32] Maheswari T, Venugopal A, Sureshbabu NM, et al. Salivary micro RNA as a potential biomarker in oral potentially malignant disorders: A systematic review [J]. *Ci Ji Yi Xue Za Zhi*, 2018, 30(2):55-60.
- [33] Muhammad jawad khan AZ, Ghulam rabia SAA, Shanza sahar SB, et al. Role of salivary miRNAs and their target genes in oral cancer patients as a potential diagnostic tool [G]. *Proceedings of the Annual Meeting of the American Association for Cancer Research*, 2020:80.
- [34] Duz MB, Karatas OF, Guzel E, et al. Identification of miR-139-5p as a saliva biomarker for tongue squamous cell carcinoma: a pilot study [J]. *Cell Oncol (Dordr)*, 2016, 39(2):187-193.
- [35] Gu Y, Tang S, Wang Z, et al. Identification of key miRNAs and targeted genes involved in the progression of oral squamous cell carcinoma [J]. *J Dent Sci*, 2022, 17(2):666-676.
- [36] Yang Y, Li YX, Yang X, et al. Progress risk assessment of oral premalignant lesions with saliva miRNA analysis [J]. *BMC Cancer*, 2013, 13:129.
- [37] Momen-Heravi F, Trachtenberg AJ, Kuo WP, et al. Genomewide Study of Salivary MicroRNAs for Detection of Oral Cancer [J]. *J Dent Res*, 2014, 93(7 Suppl):86S-93S.
- [38] Wu L, Zheng K, Yan C, et al. Genome-wide study of salivary microRNAs as potential noninvasive biomarkers for detection of nasopharyngeal carcinoma [J]. *BMC Cancer*, 2019, 19(1):843.
- [39] 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.
- [40] Lin Z, Swan K, Zhang X, et al. Secreted Oral Epithelial Cell Membrane Vesicles Induce Epstein-Barr Virus Reactivation in Latently Infected B Cells [J]. *J Virol*, 2016, 90(7):3469-3479.
- [41] Peacock B, Rigby A, Bradford J, et al. Extracellular vesicle microRNA cargo is correlated with HPV status in oropharyngeal carcinoma [J]. *J Oral Pathol Med*, 2018, 47(10):954-963.
- [42] Lee JC, Zhao JT, Gundara J, et al. Papillary thyroid cancer-derived exosomes contain miRNA-146b and miRNA-222 [J]. *J Surg Res*, 2015, 196(1):39-48.
- [43] Wang J, Zhou Y, Lu J, et al. Combined detection of serum exosomal miR-21 and HOTAIR as diagnostic and prognostic biomarkers for laryngeal squamous cell carcinoma [J]. *Med Oncol*, 2014, 31(9):148.
- [44] Gao Q, Liu HT, Xu YQ, et al. Serum-derived exosomes promote CD8⁺ T cells to overexpress PD-1, affecting the prognosis of hypopharyngeal carcinoma [J]. *Cancer Cell Int*, 2021, 21(1):584.
- [45] Ludwig S, Sharma P, Wise P, et al. mRNA and miRNA Profiles of Exosomes from Cultured Tumor Cells Reveal Biomarkers Specific for HPV16-Positive and HPV16-Negative Head and Neck Cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(22):8570.
- [46] Brunner TF, Probst FA, Troeltzsch M, et al. Primary cold atmospheric plasma combined with low dose cisplatin as a possible adjuvant combination therapy for HNSCC cells-an in-vitro study [J]. *Head Face Med*, 2022, 18(1):21.
- [47] Liu T, Chen G, Sun D, et al. Exosomes containing miR-21 transfer the characteristic of cisplatin resistance by targeting PTEN and PDCD4 in oral squamous cell carcinoma [J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2017, 49(9):808-816.

(收稿日期:2022-11-23)