

Review article

## A Review of the Impact of Exosomal Non-Coding RNAs on the Development of Malignant Colorectal Tumors

Parham Mansouri<sup>1</sup>, Dariush Shanehbandi<sup>\*2</sup>

1. Immunology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

2. Cancer Immunology and Immunotherapy Research Center, Ardabil University of Medical Sciences. Ardabil, Iran

*\*Corresponding author.* Tel: +98413337144, Fax: +984133371440, E-mail: [shanebandid@tbzmed.ac.ir](mailto:shanebandid@tbzmed.ac.ir)

### Article info

#### Article history:

Received: Aug 5, 2025

Accepted: Sep 28, 2025

#### Keywords:

Exosome  
Non-coding RNAs  
Colorectal Cancer  
Biomarkers  
Tumor  
Microenvironment

### ABSTRACT

Colorectal cancer (CRC) remains one of the most prevalent gastrointestinal malignancies, posing significant challenges in diagnosis and treatment. Recent research has highlighted exosomes and their non-coding RNA (ncRNA) cargo as key players in tumor progression and novel diagnostic tools. Exosomes are extracellular vesicles (50-150 nm) secreted by normal and cancer cells that mediate intercellular communication. This comprehensive review examines the role of exosomal miRNAs, lncRNAs, and circRNAs in critical oncogenic processes including angiogenesis, metastasis, drug resistance, and immune modulation. Emerging evidence demonstrates that specific exosomal ncRNA contents may serve as sensitive and specific biomarkers for early detection, prognosis prediction, and monitoring of treatment response. However, challenges persist regarding standardization of exosome isolation methods and the need for expanded clinical validation. Advances in exosome research technologies hold promise for translating these findings into personalized medicine approaches. This review synthesizes current knowledge on the pathophysiological significance of exosomal ncRNAs in CRC and their clinical potential as diagnostic and therapeutic targets, while addressing existing limitations and future research directions in this rapidly evolving field.

How to cite this article: Mansouri P, Shanehbandi D. A Review of the Impact of Exosomal Non-Coding RNAs on the Development of Malignant Colorectal Tumors. J Ardabil Univ Med Sci. 2025;25(2):118-146.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-Non Commercial 4.0 International License.

## Extended Abstract

Colorectal cancer (CRC) is one of the most prevalent gastrointestinal malignancies and remains a major cause of cancer-related mortality worldwide. Despite improvements in screening programs and therapeutic approaches, the prognosis of patients with advanced CRC continues to be poor, largely due to tumor heterogeneity, metastatic potential, late-stage diagnosis, and the emergence of therapy resistance. Increasing evidence suggests that the tumor microenvironment plays a central role in driving malignant progression, as interactions between tumor cells and surrounding stromal, endothelial, and immune cells regulate processes such as angiogenesis, epithelial–mesenchymal transition, immune evasion, and metabolic adaptation. In this context, exosomes have emerged as key mediators of intercellular communication. These extracellular vesicles, typically 50–150 nm in size, are secreted by both normal and malignant cells and circulate in various body fluids, including blood, urine, saliva, and cerebrospinal fluid. Their lipid bilayer protects a wide array of biomolecules, including proteins, DNA, messenger RNAs, and particularly non-coding RNAs (ncRNAs), from degradation. Among these, microRNAs (miRNAs), long non-coding RNAs (lncRNAs), and circular RNAs (circRNAs) have received considerable attention for their regulatory functions in tumor biology and their potential as diagnostic and therapeutic tools in CRC.

miRNAs are short regulatory RNAs of 18–24 nucleotides that fine-tune gene expression at the post-transcriptional level. Exosomal miRNAs secreted by CRC cells influence angiogenesis, metastasis, and immune responses by transferring functional signals to recipient cells. For example, miR-21-5p and miR-25-3p enhance vascular permeability and angiogenesis by targeting VEGF and its downstream signaling pathways, while miR-9 and members of the miR-200 family promote fibroblast reprogramming into cancer-associated fibroblasts, thereby facilitating metastasis. Other miRNAs such as miR-1229 and miR-221-3p also modulate angiogenic pathways, while miR-208b and miR-92a-3p contribute to drug resistance by suppressing apoptosis and activating oncogenic signaling such as Wnt/ $\beta$ -

catenin. Clinically, altered levels of exosomal miRNAs in plasma or serum correlate with tumor burden, recurrence, and survival. MiR-193a, for example, is enriched in metastatic CRC and associated with poor prognosis, while reduced levels of miR-4772-3p predict recurrence and worse overall survival. These findings demonstrate that exosomal miRNAs not only contribute mechanistically to CRC progression but also serve as stable and accessible biomarkers for early detection, disease monitoring, and therapy evaluation.

lncRNAs, defined as transcripts longer than 200 nucleotides with little or no protein-coding capacity, also exert major regulatory functions in CRC when packaged into exosomes. Through mechanisms such as chromatin remodeling, transcriptional interference, or competitive sponging of miRNAs, exosomal lncRNAs reprogram recipient cells to acquire malignant phenotypes. For instance, lncRNA KCNQ1OT1 regulates PD-L1 ubiquitination through the miR-30a-5p/USP22 axis, enabling tumor cells to escape immune surveillance. Similarly, exosomal RPPH1 interacts with  $\beta$ -III tubulin to promote epithelial–mesenchymal transition and simultaneously induces macrophage polarization toward an M2 phenotype, thereby enhancing metastasis. In clinical studies, high serum or plasma levels of exosomal lncRNAs such as CRNDE-h, CCAT2, and RPPH1 have been linked to advanced disease stages, poor prognosis, and resistance to chemotherapy, whereas reduced levels of HOTTIP are associated with unfavorable outcomes. These lncRNAs are also detectable after surgery or during chemotherapy, suggesting their use as dynamic biomarkers to monitor therapeutic response.

Circular RNAs, once considered splicing byproducts, are now recognized as stable and functionally active ncRNAs that frequently accumulate in exosomes. Their covalently closed circular structure confers resistance to exonuclease degradation, allowing them to circulate in body fluids with high stability. In CRC, circRNAs participate in processes such as proliferation, invasion, metastasis, and drug resistance, often by acting as miRNA sponges or modulators of signaling cascades. Exosomal circFMN2 and circIFT80 have been shown to promote tumor progression through the circFMN2/miR-1182/hTERT and

circIFT80/miR-1236-3p/HOXB7 axes, respectively, thereby facilitating cell cycle progression and epithelial-mesenchymal transition. Conversely, circRNAs such as circ-0000338 contribute to resistance against 5-fluorouracil and oxaliplatin, transferring chemoresistance phenotypes between tumor cell populations. Clinical evidence highlights the diagnostic potential of exosomal circRNAs, as exemplified by hsa-circ-0004771, which is elevated up to 14-fold in CRC patients compared with healthy controls and demonstrates high sensitivity and specificity for disease detection. Such findings emphasize the potential of exo-circRNAs as robust liquid biopsy markers.

Mechanistically, exosomal ncRNAs regulate multiple hallmarks of CRC. In angiogenesis, they promote vascular remodeling by activating VEGF- and STAT3-mediated pathways. In immune modulation, they alter the function of tumor-infiltrating lymphocytes, natural killer cells, and macrophages. Exosomal circPACRGL, for instance, promotes neutrophil polarization through the miR-142-3p/miR-506-3p/TGF- $\beta$ 1 axis, while lncRNA SNHG10 suppresses NK cell activity. Similarly, RPPH1 drives M2 macrophage polarization and supports metastatic niche formation. Exosomal ncRNAs also contribute to metabolic reprogramming by enhancing glycolysis, lipid utilization, and hypoxia adaptation. Examples include miR-101-3p, which increases glycolysis by targeting HIPK3, and circ-133, which promotes metastatic potential under hypoxic conditions through the miR-133a/GEF-H1/RhoA axis. Drug resistance is another crucial area in which exosomal ncRNAs disseminate resistant phenotypes across heterogeneous tumor populations. lncRNA CCAL, delivered via cancer-associated fibroblast exosomes, activates  $\beta$ -catenin signaling and suppresses apoptosis, while miR-208b and miR-92a-3p modulate immune responses and survival pathways to reduce sensitivity to chemotherapy. Collectively, these mechanisms highlight the multifaceted role of exosomal ncRNAs in shaping the tumor microenvironment and promoting malignant progression.

From a translational perspective, exosomal ncRNAs hold immense promise as biomarkers for non-invasive diagnosis and prognosis. Their

presence in readily accessible body fluids, combined with their stability and tumor specificity, makes them attractive for clinical application. Panels of exosomal miRNAs and lncRNAs outperform conventional markers such as carcinoembryonic antigen (CEA) in sensitivity and specificity, and combining them with traditional assays enhances diagnostic accuracy. Moreover, exosomes are increasingly recognized as natural carriers for therapeutic delivery. Their biocompatibility, low immunogenicity, and ability to protect cargo molecules make them suitable vehicles for chemotherapeutics, nucleic acids, and proteins. Studies have shown that exosome-loaded doxorubicin or paclitaxel exerts stronger antitumor effects with reduced systemic toxicity, while engineered exosomes carrying miRNA mimics or siRNAs effectively silence oncogenic pathways. Exosome-mimetic nanocarriers are under development to optimize scalability and targeted delivery, and strategies such as surface modification or incorporation of targeting ligands further improve their therapeutic precision.

Despite these advances, several challenges must be overcome before exosomal ncRNAs can be integrated into clinical oncology. Isolation and characterization methods such as ultracentrifugation, precipitation, or size-exclusion chromatography are not standardized and often yield heterogeneous vesicle populations, limiting reproducibility. The small size and complex composition of exosomes complicate single-vesicle analysis, while the lack of universally accepted reference standards hampers cross-study comparisons. In addition, large-scale prospective clinical studies are still needed to validate candidate exosomal ncRNAs as reliable biomarkers across diverse populations. For therapeutic applications, ensuring large-scale production, safety, and consistent quality of engineered exosomes remains a critical hurdle.

In conclusion, exosomal ncRNAs—including miRNAs, lncRNAs, and circRNAs—play central roles in regulating the initiation and progression of colorectal cancer through their effects on angiogenesis, immune evasion, metabolic remodeling, and therapy resistance. Their remarkable stability and accessibility in body fluids position them as promising biomarkers for early detection, prognosis prediction, and

therapeutic monitoring. Furthermore, exosomes themselves represent innovative delivery platforms for anticancer drugs and genetic materials, offering novel avenues for personalized cancer therapy. Nevertheless, technical, biological, and clinical challenges continue to limit their routine application. Future efforts should focus on refining isolation technologies, standardizing analytical protocols, and integrating multi-omics approaches to

improve diagnostic accuracy. Advances in nanotechnology and bioengineering will further facilitate the design of therapeutic exosomes with improved targeting and safety profiles. With sustained interdisciplinary research, exosomal ncRNAs are poised to become powerful tools in precision oncology, potentially transforming the management of colorectal cancer and improving patient survival outcomes.

## مروری بر اثر RNAهای غیر کد کننده اگزوزومها بر توسعه تومورهای بدخیم روده

پرهام منصوری<sup>۱</sup>، داریوش شانه‌بندی<sup>۲\*</sup>

۱. مرکز تحقیقات ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

۲. مرکز تحقیقات ایمونولوژی سرطان و ایمونوتراپی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

\* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۴۱۳۳۳۷۱۴۴۰ فاکس: ۰۴۱۳۳۳۷۱۴۴۰ پست الکترونیک: shanebandid@tbzmed.ac.ir

### چکیده

سرطان کولورکتال (CRC) به عنوان یکی از شایع‌ترین سرطان‌های دستگاه گوارش، با چالش‌های مهمی در تشخیص و درمان مواجه است. در سال‌های اخیر، اگزوزوم‌ها و محتوای RNA غیر کد کننده (ncRNA) آن‌ها توجه محققان را به عنوان عوامل کلیدی در پیشرفت تومور و ابزارهای تشخیصی نوین جلب کرده‌اند. اگزوزوم‌ها، وزیکول‌های خارج سلولی با اندازه ۵۰-۱۵۰ نانومتر هستند که توسط سلول‌های نرمال و سرطانی ترشح شده و در انتقال سیگنال‌های بین سلولی نقش دارند. این مطالعه مروری به بررسی نقش miRNA، lncRNA و circRNAهای اگزوزومی در مکانیسم‌های سرطان‌زایی از جمله رگرایی، متاستاز، مقاومت دارویی و تعدیل سیستم ایمنی می‌پردازد. یافته‌ها نشان می‌دهند که محتوای ncRNAهای اگزوزومی می‌تواند به عنوان نشانگرهای زیستی حساس و اختصاصی برای تشخیص زودهنگام، پیش‌آگهی و پایش پاسخ به درمان مورد استفاده قرار گیرند. با این حال، چالش‌هایی مانند روش‌های استاندارد جداسازی اگزوزوم‌ها و نیاز به مطالعات بالینی گسترده‌تر هنوز وجود دارد. توسعه فناوری‌های نوین در این حوزه می‌تواند راه را برای کاربرد بالینی این یافته‌ها در پزشکی شخص‌محور هموار کند. این مقاله مروری بر اهمیت روزافزون ncRNAهای اگزوزومی در درک پاتوژنز CRC و پتانسیل بالینی آن‌ها به عنوان ابزارهای تشخیصی و درمانی تمرکز دارد.

**واژه‌های کلیدی:** اگزوزوم، RNAهای غیر کد کننده، سرطان کولورکتال، نشانگرهای زیستی، ریزمحیط تومور

پذیرش: ۱۴۰۴/۷/۶

دریافت: ۱۴۰۴/۵/۱۴

### مقدمه

[۱]. این سرطان با میزان بالای مرگ‌ومیر همراه است. اگرچه بهبود نرخ غربالگری موجب افزایش بقای بیماران در مراحل اولیه سرطان شده است، اما نرخ بقای ۵ ساله بیماران مبتلا به CRC پیشرفته به دلیل ناهمگونی تومور، پتانسیل متاستاتیک و یا تأخیر در تشخیص در برخی کشورها همچنان پایین است [۲]. بنابراین، بررسی پاتوژنز سرطان کولورکتال و شناسایی نشانگرهای مولکولی جدید از ارکان اصلی در

سرطان کولورکتال<sup>۱</sup> یکی از شایع‌ترین انواع سرطان‌های دستگاه گوارش و سومین سرطان شایع در سراسر جهان محسوب می‌شود. سالانه بیش از ۱/۱۴ میلیون مورد جدید از این بیماری تشخیص داده شده و ۵۷۶،۸۵۰ مرگ به آن نسبت داده می‌شود

<sup>۱</sup> Colorectal Cancer

غربالگری، تشخیص و درمان موفقیت آمیز این بیماری به شمار می‌روند. پیشرفت سرطان به توانایی سلول‌های توموری برای ایجاد یک ریزمحیط توموری<sup>۱</sup> حمایت‌کننده وابسته است [۳]. مطالعات نشان داده‌اند که ریزمحیط تومور در ایجاد حالت توقف رشد در تومور نقش دارد. در عین حال، تومورها برای غلبه بر فشار ضد توموری<sup>۲</sup>، با ریزمحیط طبیعی<sup>۳</sup> مقابله می‌کنند [۴]. در حالی که تومورها با ریزمحیط اطراف ارتباط تنگاتنگی دارند، سیگنال‌های بیوشیمیایی موجود در ریزمحیط بر رشد سلولی و تومورزایی تأثیر می‌گذارند [۵]. اجزای تشکیل‌دهنده ریزمحیط تومور در CRC شامل سلول‌های توموری کولورکتال، رگ‌های خونی، فیبروبلاست‌ها، سلول‌های ایمنی و التهابی، ماتریکس خارج سلولی و همچنین مولکول‌ها و مسیرهای سیگنالینگ متعددی است که بر پاسخ رگزایی تأثیر می‌گذارند [۶].

اگزوزوم‌ها و زیکول‌های خارج سلولی با قطری در محدوده ۵۰ تا ۱۵۰ نانومتر هستند. این ساختارها از یک دولایه فسفولیپیدی تشکیل شده و توسط انواع سلول‌ها از جمله سلول‌های سرطانی به تمام مایعات بدن از جمله خون، پلاسما، ادرار، مایع مغزی-نخاعی و حتی مایع آمنیوتیک و بزاق ترشح می‌شوند. اگزوزوم‌ها حامل انواع مختلفی از مولکول‌ها شامل DNA، mRNA، RNAهای غیر کدکننده<sup>۴</sup> (ncRNA)، پروتئین‌ها و لیپیدها هستند. وزیکول‌های اگزوزومی نقش مهمی در ارتباطات بین سلولی، انتقال پیام‌های سلولی، پاسخ ایمنی، تکامل سرطان و متاستاز به اندام‌های خاص ایفا می‌کنند. انواع مختلفی از ncRNA اگزوزومی توسط سلول‌های سرطانی به محیط تومور ترشح می‌شوند، از جمله miRNA<sup>۵</sup>،

lncRNA<sup>۶</sup> و circRNA<sup>۷</sup> [۷، ۸]. هر دو نوع lncRNA و circRNA توانایی تعامل با miRNAها از طریق اثر اسفنجی<sup>۷</sup> را داشته و به عنوان رقباي RNAهای درون‌زاد<sup>۸</sup> (ceRNA) عمل می‌کنند. توالی‌های عنصر پاسخ miRNA<sup>۹</sup> (MRE) که در ceRNAها وجود دارند، امکان اتصال آنها به miRNAها را فراهم می‌کنند. این تعامل، نقش miRNAها به عنوان مهارکننده‌های ترجمه mRNA به پروتئین را مسدود می‌سازد. بدین ترتیب، ceRNAها می‌توانند مقدار پروتئین کد شده توسط یک ژن خاص را کنترل کرده یا تنظیم اپی ژنتیک بیان ژن را تغییر دهند. این تعامل بین miRNAها و ceRNAها به ویژه در تکامل سرطان اهمیت دارد، زیرا بسته به ماهیت ژن‌های مهارکننده تومور یا انکوژن بودن ژن‌های هدف miRNA، توانایی مهار یا تسهیل سرطان‌زایی را دارد (شکل-۱) [۷]. اگزوزوم‌های حاوی ncRNA نقش حیاتی در تنظیم توسعه CRC و مقاومت دارویی دارند و می‌توانند به عنوان نشانگرهای زیستی برای تشخیص CRC و پیش‌آگهی عمل کنند [۹].

<sup>۶</sup> Long-noncoding-RNA

<sup>۷</sup> Sponging Effect

<sup>۸</sup> Competitors of Endogenous RNAs

<sup>۹</sup> MicroRNA Response Element

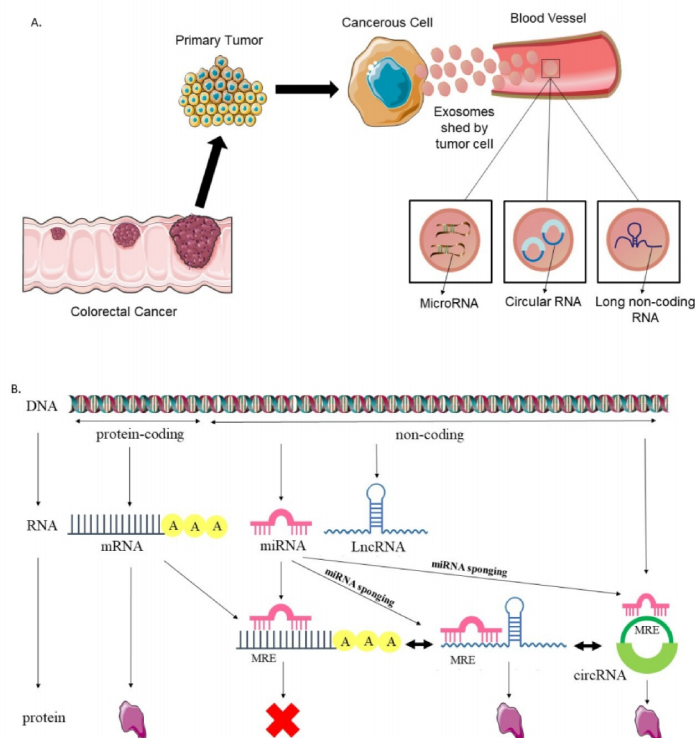
<sup>۱</sup> Tumor Microenvironment

<sup>۲</sup> Anti-tumor Pressure

<sup>۳</sup> Normal Microenvironment

<sup>۴</sup> Noncoding-RNA

<sup>۵</sup> MicroRNA



شکل ۱. (A) miRNA، lncRNA و circRNA موجود در اگزوزوم‌های مایعات بدن (بیوپسی‌های مایع) دارای نقش‌های بالقوه در تشخیص، پیش‌آگهی و پیش‌بینی پاسخ به درمان در CRC هستند. (B) مکانیسم اسفنج مولکولی به این صورت عمل می‌کند که mRNAهای تولیدشده از بخش‌های کدکننده پروتئین در ژنوم، به‌طور طبیعی به پروتئین ترجمه می‌شوند. در مقابل، miRNA، lncRNA و circRNA از DNA غیرکدکننده رونویسی می‌شوند. miRNA از طریق توالی‌های MRE قادر به اتصال به mRNAها هستند و می‌توانند از ترجمه آنها جلوگیری کنند. از آنجا که lncRNA و circRNA نیز حاوی توالی‌های MRE هستند، می‌توانند به miRNA متصل شده و آنها را به دام اندازند (اثر اسفنجی). در نتیجه اتصال رقابتی miRNA به lncRNA و circRNA به جای اتصال به mRNA هدف انجام می‌گیرد. این امر منجر به کاهش یا حذف اثر مهاري miRNA بر روی mRNA و ادامه روند ترجمه به پروتئین می‌شود [۷].

## اگزوزوم‌ها

وزیکول‌های خارج سلولی<sup>۱</sup> (EVs) گروهی ناهمگن از وزیکول‌های محدود به دولایه لیپیدی هستند که توسط انواع مختلف سلول‌ها ترشح می‌شوند [۱۰]. در سال‌های اخیر، مطالعات بسیاری درباره عملکرد EVها در سرطان انجام شده و آنها را بر اساس ریخت‌شناسی، محتوا و سلول‌های مبدأ دسته‌بندی کرده‌اند [۱۱]. اگزوزوم‌ها زیرمجموعه‌ای از EVها با قطری در محدوده ۵۰-۱۵۰ نانومتر هستند که نقش آنها در تنظیم ارتباط بین سلولی در حالت فیزیولوژیک طبیعی و بیماری‌ها شناخته شده است

<sup>1</sup> Extracellular Vesicles

[۱۲]. این وزیکول‌ها مولکول‌هایی مانند پروتئین‌ها، لیپیدها، DNA و انواع RNA، از جمله mRNA و ncRNA را حمل می‌کنند و تبادل محتوای عملکردی بین سلول‌ها را میانجی‌گری می‌کنند [۱۳، ۱۴]. مطالعات نشان داده‌اند که اگزوزوم‌ها در فرآیندهای فیزیولوژیک متعددی مانند ارتباطات عصبی، پاسخ ایمنی و ترمیم زخم نقش دارند، در حالی که در سرطان، متاستاز، فرار از سیستم ایمنی، مقاومت به درمان و رگزایی دخیل هستند [۱۵-۱۸]. جالب توجه اینکه، سلول‌های سرطانی از مکانیسم‌های مختلفی برای تنظیم مقدار و ترکیب اگزوزوم‌ها به منظور تسهیل پیشرفت سرطان استفاده می‌کنند. با این حال،

تنگاتنگی دارد. این مشاهدات نشان‌دهنده نقش مهم miRNAهای خارج سلولی در فعالیت‌های ارگانیزم و پتانسیل آنها به عنوان نشانگر تشخیصی بیماری است [۲۳].

miRNAهای اگزوزومی مشتق از تومور، از جمله ترکیبات زیست‌فعالی هستند که تنوع ریزمحیط تومور را افزایش می‌دهند و تغییرات در ریزمحیط توموری، رشد تومور را تقویت می‌کنند. اگزوزوم‌ها در طول تکوین تومور، می‌توانند miRNAها را حمل کنند تا ارتباط بین سلولی و انتقال پیام را بهبود بخشند و بر پاسخ ایمنی تأثیر بگذارند [۲۴]. به عنوان مثال، نشان داده شده است که miR-526b و miR-655 لنفانژیوژنز<sup>۳</sup> و رگزایی را در ریزمحیط توموری تقویت می‌کنند [۲۵]. همچنین miR-9 و miR-200s با تحریک تبدیل فیبروبلاست‌های طبیعی به فیبروبلاست‌های مرتبط با سرطان، متاستاز تومور را القا می‌کنند [۲۶]. نسبت miRNAها در اگزوزوم‌ها بسته به نوع سلول، بافت یا شرایط فیزیولوژیک متفاوت است و معمولاً برخی miRNAهای شاخص در اگزوزوم‌ها یافت می‌شوند [۲۷]. اگزوزوم‌ها به عنوان پوششی برای محافظت از miRNAها عمل می‌کنند و به آنها اجازه می‌دهند در محیط خارج سلولی محافظت شده و به طور مؤثر توسط سلول‌های هدف جذب شوند. اگزوزوم‌های مشتق شده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی<sup>۴</sup> (MSCs) می‌توانند اثرات مختلفی بر روی سلول‌های سرطانی بگذارند، مانند القای آپوپتوز، توقف چرخه سلولی، افزایش تکثیر و تمایز سلول‌های توموری، و حذف miRNAهای مهارکننده تومور [۲۸]. شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد برخی miRNAهای سرکوبگر مانند miR-23b و miR-192 ممکن است به طور انتخابی از سلول‌های توموری به محیط خارج سلولی منتقل شوند [۲۹]. با این حال، مطالعات مختلف نشان

ناهمگنی توجیه نشده اگزوزوم‌های ترشح‌شده و دشواری در استخراج و تکرارپذیری روش‌های استحصال EVها، یک چالش اساسی در درک پویایی این وزیکول‌ها، در شرایط آزمایشگاهی و به‌ویژه در سیستم‌های زیستی ایجاد کرده است [۱۹]. اگزوزوم‌ها با ایجاد نیچ‌های پیش‌متاستاتیک<sup>۱</sup>، فرار از نظارت ایمنی و ایجاد مقاومت به درمان، به پیشرفت سرطان کمک می‌کنند. برای دستیابی به این اثر، سلول‌های سرطانی از مکانیسم‌های مختلفی برای تنظیم مقدار و ترکیب اگزوزوم‌ها استفاده می‌کنند [۲۰].

### انواع ncRNAهای درون اگزوزوم‌ها

#### miRNA

miRNAها قطعات کوچک ncRNA با طول ۱۸ تا ۲۴ نوکلئوتید هستند که می‌توانند از طریق تنظیم پس از رونویسی بر بیان ژن تأثیر بگذارند. از زمان کشف اولیه آنها در کرم الگاس<sup>۲</sup> در اوایل دهه ۱۹۹۰، هزاران miRNA در انواع موجودات، از جلبک‌های تک‌سلولی تا انسان گزارش شده‌اند. مطالعات اخیر نشان می‌دهند که miRNAها حفاظت تکاملی بالایی در گونه‌های مختلف دارند و می‌توانند به عنوان عناصر تنظیمی سلولی و حیاتی عمل کنند [۲۱، ۲۲]. علاوه بر نقش تنظیمی درون سلولی، مطالعات نشان داده‌اند که miRNAها می‌توانند به شکل بسیار پایداری در نمونه‌های پلاسما و سرم خون حضور داشته باشند. همچنین، در سایر مایعات بدن مانند بزاق، ادرار، شیر و محیط کشت سلولی نیز miRNAهای پایدار شناسایی شده‌اند. این یافته‌ها حاکی از آن است که miRNAها می‌توانند در فضای خارج سلولی محفوظ بمانند. نکته مهم‌تر اینکه، مشابه miRNAهای درون سلولی، این miRNAهای خارج سلولی نیز در فرآیندهای فیزیولوژیک و پاتولوژیک نقش تنظیمی ایفا می‌کنند و حضور آنها در مایعات بدن با شرایط پاتولوژیک مختلف ارتباط

<sup>3</sup> Lymphangiogenesis

<sup>4</sup> Mesenchymal Stem Cells

<sup>1</sup> Premetastatic Niches

<sup>2</sup> *Caenorhabditis elegans*

داده‌اند که miRNAهایی که عمدتاً به محیط خارج سلولی ترشح می‌شوند، الزاماً همان‌هایی نیستند که در سلول‌های سرطانی یا طبیعی بیشترین سطح بیان را دارند. برای نمونه، miR-192-5p، miR-10a-5p و miR-191-5p در برخی سلول‌های توموری اولیه کولورکتال بیان می‌شوند و اگزوزوم‌های حاوی این miRNAها می‌توانند به‌عنوان نشانگر زیستی بالقوه برای CRC مورد استفاده قرار گیرند [۳۰، ۳۱]. بیشتر miRNAها در داخل سلول‌ها یافت می‌شوند که به آنها miRNAهای درون سلولی<sup>۱</sup> گفته می‌شود، در حالی که گروهی از miRNAها که می‌توانند به خارج از سلول‌ها آزاد شوند، معمولاً به عنوان miRNAهای برون سلولی<sup>۲</sup> یا miRNAهای گردش<sup>۳</sup> شناخته می‌شوند [۳۲]. اهمیت miRNAهای برون سلولی با فراوانی آنها در مایعات بیولوژیکی نشان داده می‌شود که می‌توانند با اتصال به ناقلین مختلف، به فرم گردش با پایداری بالا بسته‌بندی شوند. miRNAهای گردش خون می‌توانند به روش‌های مختلفی به خارج سلول منتقل شوند، از جمله با جمع‌آوری در اجسام آپوپتوزی<sup>۴</sup>؛ احاطه شدن در وزیکول‌های غشایی، از جمله اکتوزوم‌ها؛ اتصال با پروتئین‌های متصل شونده به RNA<sup>۵</sup> (Ago2 یا NPM1)؛ یا بسته‌بندی در اگزوزوم‌ها و وزیکول‌های چندحفرهای<sup>۶</sup> (MVB) [۳۳].

### IncRNAها

با تکمیل پروژه ژنوم انسان و آغاز دوران پساژنوم، ncRNAها به اهداف محبوب عصر علوم زیستی تبدیل شده‌اند [۳۴]. در این میان، IncRNA به عنوان زیرمجموعه‌ای از ncRNAها شناخته می‌شوند که

طول رونوشت‌های آنها بین ۲۰۰ تا ۱۰۰۰۰۰ نوکلئوتید بوده، فاقد چارچوب خوانش باز کاملاً عملکردی هستند و به ندرت پپتیدهای کوتاه عملکردی را کد می‌کنند [۳۵]. مطالعات اخیر نشان داده‌اند که lncRNAs نقش مهمی در فرآیندهای فیزیوپاتولوژیک انسان از جمله تمایز بافتی، ایمنی و تولیدمثل ایفا کرده و در نتیجه طیفی از بیماری‌های انسانی مانند دیابت شیرین، بیماری پارکینسون و تومورها را موجب می‌شوند [۳۶]. شواهد فزاینده‌ای حاکی از آن است که lncRNAs می‌توانند در اگزوزوم‌ها کپسوله شده و از سلول‌های ترشح‌کننده به سلول‌های گیرنده منتقل شوند، بدین ترتیب پیشرفت CRC را تحت تأثیر قرار دهند [۳۷]. این lncRNAهای اگزوزومی می‌توانند از طریق گردش هومورال به سلول‌های گیرنده وارد شده و در چندین فنوتیپ پیشرفت تومور از جمله تکثیر بدخیم، متاستاز، مقاومت شیمیایی و پاسخ التهابی مشارکت کنند. علاوه بر این، به دلیل ویژگی‌های اختصاصی و حساسیت بالا، lncRNAهای مشتق از اگزوزوم که به ریزمحیط تومور آزاد می‌شوند، پتانسیل تبدیل شدن به نشانگرهای زیستی CRC را دارند [۳۸]. هنگامی که lncRNAها در اگزوزوم‌ها بسته‌بندی می‌شوند، از سلول‌های ترشح‌کننده به سلول‌های گیرنده منتقل شده و عملکرد بیولوژیکی خود را اعمال می‌کنند که این امر می‌تواند بر پیشرفت تومورها تأثیرگذار باشد. یکی از مکانیسم‌های اصلی lncRNAها پس از ورود به سلول‌های گیرنده، تنظیم بیان ژن‌های هدف miRNAها از طریق مهار آنها توسط مکانیسم اسفنجی می‌باشد (شکل ۱). مطالعات متعدد در CRC نشان داده‌اند که اگزوزوم‌های حاوی lncRNA پس از ورود به سلول‌های هدف، علاوه بر تنظیم بیان ژن‌های هدف miRNAها از طریق مکانیسم اسفنجی با اتصال به پروتئین‌ها بر سطح فسفوریلاسیون بر بیان آنها تأثیر می‌گذارند. در نتیجه، درک سیستماتیک نقش lncRNAهای اگزوزومی در سرطان می‌تواند

<sup>1</sup> Intracellular miRNAs

<sup>2</sup> Extracellular miRNAs

<sup>3</sup> Circulating miRNAs

<sup>4</sup> Apoptotic Bodies

<sup>5</sup> RNA-binding Proteins

<sup>6</sup> Multivesicular Bodies

به توسعه نشانگرهای تشخیصی و پیش‌آگهی دقیق‌تر و همچنین اهداف درمانی جدید برای تومورهای بدخیم منجر شود [۳۹].

### circRNA

circRNAها به عنوان یکی از اعضای متنوع خانواده ncRNA شناخته می‌شوند که نقطه عطف جدیدی در تحقیقات زیست‌شناسی سرطان محسوب می‌شوند [۴۰]. در ابتدا، این مولکول‌ها به عنوان محصولات جانبی رونویسی یا حاصل برش غیراستاندارد RNA در نظر گرفته می‌شدند [۴۱]. اما با پیشرفت فناوری‌های بیوانفورماتیک و توالی‌یابی RNA، فراوانی و تنوع circRNAها به اثبات رسید و الگوهای بیان اختصاصی آنها در شرایط پاتولوژیک شناسایی شد [۴۲]. شواهد نشان می‌دهد که بیان ناموزون برخی از circRNAها در شروع و پیشرفت سرطان نقش دارد. به‌ویژه، circRNAها نقش حیاتی در تکثیر، متاستاز و مقاومت به درمان سرطان ایفا می‌کنند [۴۳]. مطالعات مختلف بیان غیرطبیعی circRNAها را در CRC نشان داده‌اند. تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی در انسان حاکی از آن است که اکثر circRNAها در CRC به‌طور قابل‌توجهی کاهش (یا در برخی موارد افزایش) می‌یابند [۴۴]. داده‌های توالی‌یابی RNA نشان داده است که نسبت circRNAها به رونوشت‌های خطی مرتبط با آنها در مدل‌های CRC در مقایسه با بافت‌های طبیعی کولون کاهش یافته و این نسبت در رده‌های سلولی سرطانی مرتبط نیز به‌مراتب کمتر است. این کاهش، که بیانگر نقش بالقوه تومورسایر سور بسیاری از circRNAها است، به نظر مستقل از میزان بیان مطلق circRNAها یا تغییرات افزایش/کاهش رونوشت‌های خطی در بیماران سرطانی در مقایسه با نمونه‌های غیرسرطانی است [۴۵]. این یافته‌ها circRNAها را به عنوان نشانگرهای پیش‌آگهی امیدوارکننده و اهداف درمانی در درمان سرطان مطرح می‌کنند [۴۶]. تحقیقات اخیر نشان داده‌اند که

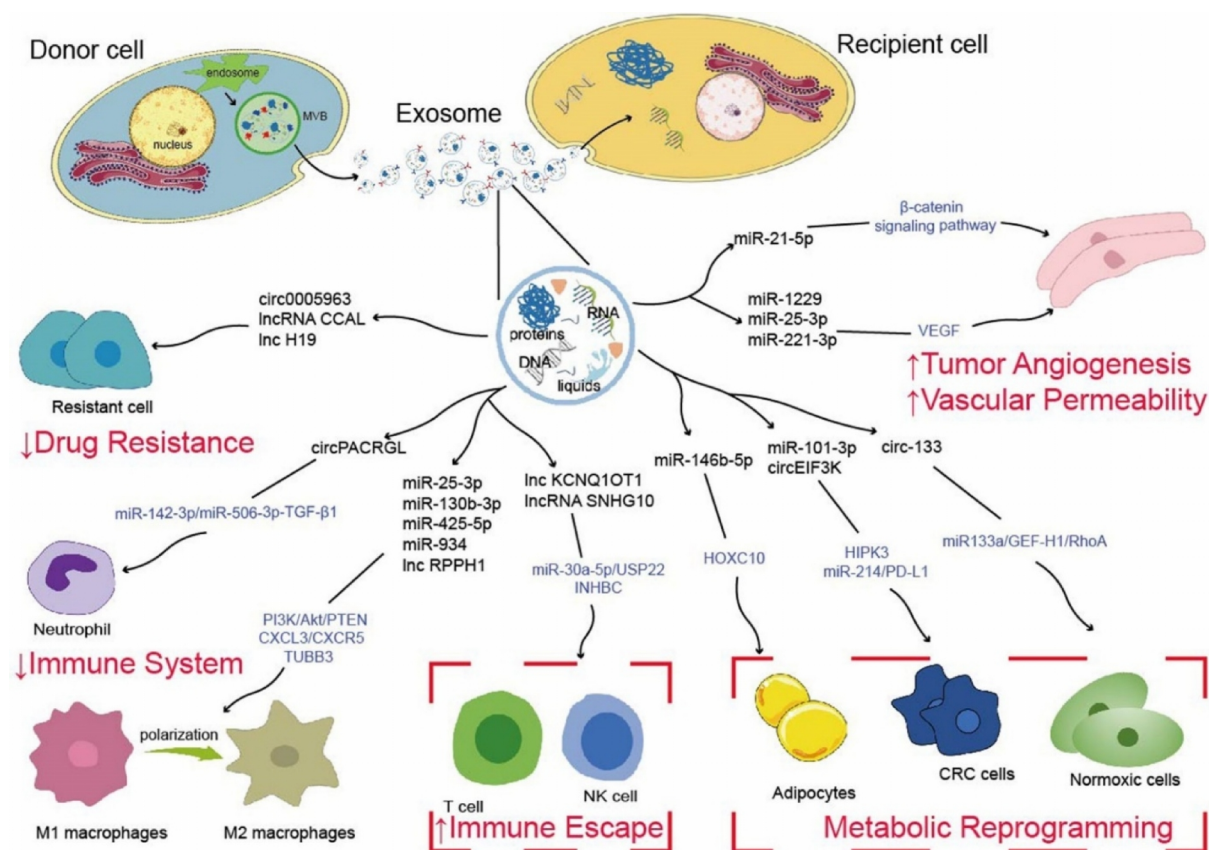
circRNAs به‌طور غنی در اگزوزوم‌ها تجمع می‌یابند که احتمالاً به دلیل ویژگی‌های محافظتی اگزوزوم‌ها یا ساختارهای توالی خاص و/یا پروتئین‌های همراه آنها است [۴۷]. به لطف غشای دولایه اگزوزوم‌ها، بار محموله آنها از تخریب یا پاکسازی محافظت می‌شود [۴۸]. اندازه نانومتری اگزوزوم‌ها نیز به افزایش زمان گردش و بهبود فعالیت‌های زیستی circRNAs کمک می‌کند [۴۹]. مطالعات پیشین نشان داده‌اند که exo-circRNAs ممکن است دارای مزایای تنظیمی مهمی باشند؛ از این رو استفاده ترکیبی از اگزوزوم‌ها و circRNAها می‌تواند پیامدهای بالینی بالقوه این مولکول‌ها را به عنوان نشانگرهای زیستی در تشخیص و پیش‌آگهی سرطان افزایش دهد. جالب توجه است که exo-circRNAs به‌ویژه در اگزوزوم‌های مشتق از تومورها، در مقایسه با circRNAها آزاد ترشح شده از سلول‌ها، فراوان و پایدار هستند. بر اساس گزارش‌های منتشر شده، سطح exo-circRNAs در اگزوزوم‌ها حداقل دو برابر بیشتر از سلول‌های مادر است. همچنین مشخص شد که نسبت circRNA به RNA خطی در اگزوزوم‌ها تقریباً شش برابر بیشتر از سلول‌هاست که نشان‌دهنده ترجیح تجمع circRNAها در اگزوزوم‌ها نسبت به RNAهای خطی است. در نتیجه، میزان بالای exo-circRNAs پایدار، طبقه جدیدی از RNAها را معرفی می‌کند که می‌تواند افراد سالم را از بیماران سرطانی متمایز کند و پتانسیل قابل‌توجهی به عنوان یک نشانگر زیستی گردش برای تشخیص سرطان دارد. با وجود پیشرفت‌های این حوزه، نقش exo-circRNAs در پیشرفت CRC هنوز به‌طور کامل روشن نشده است [۵۰].

## عملکردها و مکانیسم‌های ncRNA های مشتق از

## اگزوزوم در ریزمحیط تومور کولورکتال

وقوع و پیشرفت CRC نیاز به روش‌های پیچیده مختلفی دارد. متاستاز اغلب خطرناک‌ترین و اصلی‌ترین علت شکست درمان است که از طریق زنجیره‌ای پیچیده از رویدادها اتفاق می‌افتد. مطالعات فراوان نشان داده‌اند که ncRNA ها به طور قابل توجهی در اگزوزوم‌ها غنی شده‌اند که به ریزمحیط

تومور گسترش می‌یابند و در نهایت از طریق تغییر فرایندهایی مانند: رگ‌زایی، نفوذپذیری عروقی، ایمنی تومور، متابولیسم تومور، و مقاومت دارویی منجر به متاستاز تومور می‌شوند (شکل ۲). علاوه بر این، مقاومت دارویی ارتباط نزدیکی با ریزمحیط تومور دارد، ncRNA های اگزوزومی نقش‌های کلیدی در سازگاری سلول‌های تومور با ریزمحیط تومور و مقاومت دارویی ایفا می‌کنند [۵۱].



شکل ۲. ncRNA های اگزوزومی در (A) رگ‌زایی تومور، (B) نفوذپذیری عروقی، (C) ایمنی تومور، (D) متابولیسم تومور، (E) مقاومت دارویی در ریزمحیط توموری CRC نقش دارند [۵۱].

## نقش ncRNA های مشتق از اگزوزوم، در رگزایی و نفوذپذیری عروقی در تومورهای کولورکتال

یکی از ویژگی‌های متمایز سرطان، توانایی آن در تحریک رگزایی است. در عمل، با ادامه رشد تومور، ریزمحیط تومور نیازمند تأمین اکسیژن و مواد مغذی بیشتر می‌شود. در این فرآیند، ریزمحیط تومور با ارسال سیگنال به سلول‌های اندوتلیال، موجب افزایش بیان چندین فاکتور رگزایی برای تشکیل عروق خونی جدید می‌شود [۵۲]. به‌ویژه، فاکتور رشد اندوتلیال عروقی<sup>۱</sup> (VEGF) به‌عنوان یک فاکتور رگزایی قوی، نقش کلیدی در این فرآیند دارد [۵۳]. VEGF با اتصال به گیرنده‌های خود (VEGFR-1, -2, -3) که روی سلول‌های اندوتلیال عروقی بیان می‌شوند، تشکیل عروق را تنظیم می‌کند. برای توسعه داروهای ضد رگزایی نوآورانه، درک عمیق‌تر مسیرهای سلولی و مولکولی دخیل در رگزایی تومور ضروری است [۵۴]. بیان غیرطبیعی ncRNA های اگزوزومی از طریق تنظیم رگزایی، پیشرفت سرطان را تحت تأثیر قرار می‌دهد. هی<sup>۲</sup> و همکاران نشان دادند که miR-21-5p از سلول‌های CRC به سلول‌های اندوتلیال ورید نافی انسان<sup>۳</sup> (HUVECs) منتقل شده و با فعال‌سازی مسیر سیگنالینگ  $\beta$ -catenin، بیان هدف‌های پایین‌دست را افزایش داده و رگزایی و نفوذپذیری عروقی در CRC را تنظیم می‌کند [۵۵]. در مطالعه دیگری پیشنهاد شده است که افزایش قابل توجه miR-1229 اگزوزومی مشتق از سلول‌های CRC، بیان پروتئین HIPK را مهار کرده و مسیر VEGF را در HUVECs فعال می‌کند. علاوه بر این، مهارکننده miR-1229 اگزوزومی به‌طور قابل توجهی رشد تومور و رگزایی را در مدل پیوند زئوگرافت موش‌های نود<sup>۴</sup> مهار می‌کند [۵۶]. پژوهش زنگ<sup>۵</sup> و

همکاران نشان داد که miR-25-3p اگزوزومی مشتق از سلول‌های سرطانی، پیشرفت CRC را با تغییر بیان ZO-1، occludin و Claudin5 در سلول‌های اندوتلیال از طریق هدف قرار دادن KLF2 و KLF4 هدایت می‌کند [۵۷]. به‌طور مشابه، محور سیگنالینگ STAT3/VEGFR-2 توسط miR-221-3p اگزوزومی مشتق از سلول‌های CRC فعال شده که رگزایی سلول‌های اندوتلیال را تقویت می‌کند [۵۸]. در مطالعه‌ای شانگ<sup>۶</sup> و همکاران کشف کردند که miR-185-3p به‌صورت قابل توجهی در اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های سرطانی بیان می‌شود و افزایش بیان ژن هدف آن (FOXO1) می‌تواند افزایش پروتئین‌های مرتبط با رگزایی ناشی از miR-183-5p در سلول‌های HMEC-1 را معکوس کند [۵۹]. پژوهش چن<sup>۷</sup> و همکاران آشکار ساخت که miR-27b-3p اگزوزومی مشتق شده از سلول‌های سرطانی به سلول‌های اندوتلیال عروقی، بیان VE-Cad و p120 را کاهش داده، نفوذپذیری عروقی در شرایط *in vivo* را افزایش داده و در نهایت متاستاز CRC را تسریع می‌کند. این مطالعات نشان می‌دهند که ncRNA های اگزوزومی با تأثیر بر رگزایی و نفوذپذیری عروق، متاستاز تومورهای کولورکتال را تقویت می‌کنند [۶۰].

## تنظیم ایمنی تومور کولورکتال توسط ncRNA های مشتق از اگزوزوم

سلول‌های ایمنی مرتبط با تومور بخشی از ریزمحیط تومور محسوب می‌شوند که نقش مهمی ایفا کرده و ممکن است اثرات تومورزایی یا ضد توموری داشته باشند [۶۱]. در مطالعه دان<sup>۸</sup> و همکاران نظریه ویرایش ایمنی سرطان<sup>۹</sup> را مطرح کردند که بر اساس نقش دوگانه ایمنی در تعامل پیچیده بین تومور و

<sup>5</sup> Zeng<sup>6</sup> Shang<sup>7</sup> Chen<sup>8</sup> Dunn<sup>9</sup> Cancer Immunoediting<sup>1</sup> Vascular Endothelial Growth Factor<sup>2</sup> He<sup>3</sup> Human Umbilical Vein Endothelial Cells<sup>4</sup> Nude Mouse Xenograft Model

میزبان استوار است. به طور خلاصه، سیستم ایمنی توانایی جلوگیری از تکوین و پیشرفت تومور را داشته و همزمان از بروز و توسعه آن ممانعت می‌کند [۶۲]. با این حال، برخی تومورهای اولیه می‌توانند از این حمله فرار کرده و به رشد خود در میزبان ادامه دهند، که احتمال متاستاز و عود را افزایش می‌دهد [۶۳]. تعاملات بین سلول‌های ایمنی و سلول‌های سرطانی، و همچنین ارتباط بین سلولی وابسته به اگزوزوم‌ها، در تنظیم ایمنی تومور حیاتی بوده و منجر به ایجاد محیط سرکوبگر ایمنی می‌شود که توسعه و پیشرفت سرطان را تسهیل می‌کند [۶۴]. مطالعات متعدد نشان می‌دهند که ncRNAهای اگزوزومی میانجی تعاملات پیچیده بین سلول‌های تومور و ایمنی بوده و موجب تغییر در بیان ژن‌های تنظیم کننده سرکوب ایمنی می‌شوند، که اهمیت عملکردی این RNAها در تعدیل ایمنی را تأیید می‌کند [۶۵]. مطالعه دیگری نشان داد که circPACRGL اگزوزومی مشتق از سلول‌های CRC، تمایز نوتروفیل‌های N1 به N2 را از طریق محور  $\text{miR-142-3p/miR-506-3p-TGF-}\beta 1$  تقویت می‌کند [۶۶]. علاوه بر این، سیستم ایمنی به طور طبیعی با ارتقای تکثیر و تمایز سلول‌های T سیتوتوکسیک در ریزمحیط تومور به آنتی‌ژن‌های خارجی پاسخ می‌دهد [۶۷]. در تحقیقاتی که Xian و همکارانش انجام دادند دریافتند که بیان بیش از حد lncRNA KCNQ1OT1 اگزوزومی ترشح شده توسط سلول‌های CRC، با تنظیم یوبیکوتیشن<sup>۱</sup> PD-L1<sup>۱</sup> از طریق  $\text{miR-30a-5p/USP22}$ ، بر سلول‌های T سیتوتوکسیک تأثیر گذاشته و منجر به فرار ایمنی می‌شود [۶۸]. به طور مشابه، ncRNAهای اگزوزومی می‌توانند به عنوان پلی بین سلول‌های تومور و سلول‌های NK عمل کرده و تبادل اطلاعات را تسهیل کنند. به عنوان مثال، lncRNA SNHG10 اگزوزومی مشتق از سلول‌های CRC با افزایش بیان

INHBC، عملکرد سلول‌های NK را مهار کرده و به فرار ایمنی کمک می‌کند [۶۹]. ماکروفاژها سلول‌های ایمنی ذاتی هستند که نقش‌های متنوعی در دفاع میزبان و هموستاز بافت در ریزمحیط تومور ایفا می‌کنند. همچنین مشخص شده است که اگزوزوم‌ها با تغییر مکان و عملکرد ماکروفاژهای مرتبط با تومور<sup>۲</sup> (TAMs) از طریق مکانیسم‌های مرتبط، بر جایگاه پیش‌متاستازی تأثیر گذاشته و متاستاز سرطان را تقویت می‌کنند [۷۰]. در مطالعه‌ای وانگ<sup>۳</sup> و همکاران دریافتند که با فعال شدن محور CXCL12/CXCR4، سلول‌های CRC، miRNAهای اگزوزومی ( $\text{miR-25-3p}$ ،  $\text{miR-130b-3p}$  و  $\text{miR-425-5p}$ ) تولید می‌کنند که توسط ماکروفاژها جذب شده و با فعال‌سازی مسیر سیگنالینگ PI3K/Akt، PTEN را هدف قرار می‌دهند که منجر به تبدیل فنوتیپی M2 می‌شود. نکته حائز اهمیت این است که ماکروفاژهای قطبی شده به M2 به نوبه خود VEGF ترشح می‌کنند که رگ‌زایی و متاستازهای کبدی CRC را تقویت می‌کند [۷۱]. همچنین ژائو<sup>۴</sup> و همکاران نشان دادند که قطبی شدن ماکروفاژهای M2 ناشی از  $\text{miR-934}$  اگزوزومی مشتق از تومور، از طریق فعال‌سازی محور CXCL13/CXCR5 متاستاز کبدی CRC را ارتقا می‌دهد [۷۲]. در همین حال، مطالعه دیگری دریافت که lnc-RPPH1 اگزوزومی مشتق از سلول‌های CRC با اتصال به TUBB3 و میانجی‌گری قطبی شدن ماکروفاژهای M2، متاستاز و تکثیر سلول‌های CRC را در شرایط *in vivo* افزایش می‌دهد. این مطالعات تأیید می‌کنند که ncRNAهای اگزوزومی می‌توانند با تأثیر بر فنوتیپ سلول‌های ایمنی، محیط ایمونولوژیک ریزمحیط تومور را تغییر دهند [۷۳].

<sup>۲</sup> Tumor-associated Macrophages<sup>۳</sup> Wang<sup>۴</sup> Zhao<sup>۱</sup> Ubiquitination

## بازبرنامه‌ریزی متابولیسم تومورهای کولورکتال توسط ncRNAهای مشتق از اگزوزوم

بازبرنامه‌ریزی متابولیسم انرژی نیز به‌عنوان یکی از ویژگی‌های شاخص سرطان شناخته می‌شود. گلیکولیز منبع اصلی متابولیسم انرژی در تومورها بوده و با افزایش ظرفیت تجزیه قندها، گلوکز را به لاکتات تبدیل می‌کند تا ATP تولید نماید. این فرآیند منجر به تشکیل ریزمحیط توموری اسیدی می‌شود که برای رشد سرطان مناسب‌تر است [۷۴]. در پژوهشی تائو<sup>۱</sup> و همکاران دریافتند که miR-101-3p اگزوزومی با هدف قرار دادن و کاهش بیان HIPK3 در سلول‌های CRC، پتانسیل غشای میتوکندری را کاهش داده و گونه‌های فعال اکسیژن<sup>۲</sup> (ROS) تولید می‌کند، در حالی که گلیکولیز هوازی را افزایش داده و پیشرفت تومور کولورکتال را تقویت می‌نماید [۷۵]. همچنین circ\_0005963 اگزوزومی مشتق از سلول‌های مقاوم به دارو به سلول‌های حساس به دارو منتقل شده و از طریق مسیر circ\_0005963/miR-122/PKM2 گلیکولیز را مهار می‌کند [۷۶]. علاوه بر این، اگزوزوم‌ها می‌توانند ارتباط بین سلول‌های سرطانی و آدیپوسیت‌ها را میانجی‌گری کنند که این امر انتقال مواد مغذی مانند لیپیدها را در ریزمحیط توموری تسهیل می‌نماید [۷۷]. اگزوزوم miR-146b-5p که توسط سلول‌های سرطانی آزاد می‌شود، باعث قهوه‌ای شدن<sup>۳</sup> بافت چربی سفید<sup>۴</sup> (WATs) و افزایش لیپولیز می‌گردد.

مطالعات بیشتر نشان داد که miR-146b-5p اگزوزومی با مهار افزایش بیان HOXC10، قهوه‌ای شدن WAT را افزایش داده، مصرف اکسیژن را کاهش داده و لیپولیز را تنظیم می‌کند [۷۸]. علاوه بر این، وضعیت تغذیه‌ای اکسیژن تأثیر قابل توجهی بر توانایی سرطان در استفاده از انرژی دارد و تفاوت در

ذخیره انرژی بین سلول‌های نورموکسیک و هیپوکسیک<sup>۵</sup>، پتانسیل‌های انتقال مختلفی را در ریز محیط تومور نشان می‌دهد. اگزوزوم circ-133 مشتق از سلول‌های هیپوکسیک به سلول‌های نورموکسیک منتقل شده و از طریق تأثیر بر محور miR-133a/GEF-H1/RhoA متاستاز CRC را تقویت می‌کند [۷۹]. در مطالعه‌ای یانگ<sup>۶</sup> و همکاران دریافتند که circEIF3K اگزوزومی مشتق از فیبروبلاست‌های مرتبط با سرطان<sup>۷</sup> (CAFs) به سلول‌های CRC منتقل شده و در ریزمحیط هیپوکسیک از طریق تنظیم محور miR-214/PD-L1 پیشرفت CRC را تسهیل می‌نماید. با توجه به این مطالعات، هدف قرار دادن محموله‌های اگزوزومی که متابولیسم انرژی را کنترل می‌کنند، می‌تواند روشی نوین و مؤثر برای درمان سرطان ارائه دهد [۸۰].

## تأثیر ncRNAهای مشتق از اگزوزوم بر مقاومت دارویی تومورهای کولورکتال

ncRNAهای اگزوزومی نه تنها در پیشرفت و متاستاز سرطان نقش دارند، بلکه در ایجاد مقاومت به درمان نیز مشارکت می‌کنند [۸۱]. به‌وضوح، یکی از چالش‌های درمان فرآیندهای توموری در طی شیمی‌پرتو درمانی، توسعه مقاومت دارویی است. اگزوزوم‌ها به عنوان واسطه‌های مهم ارتباط بین سلولی می‌توانند در انتشار افقی مقاومت دارویی در جمعیت‌های ناهمگن سلول‌های سرطانی نقش داشته باشند، که این امر ممکن است درمان مؤثر بسیاری از سرطان‌ها را غیرممکن سازد [۸۲]. MTX یک داروی ضد نئوپلاسم است که به‌طور گسترده به عنوان شیمی‌درمانی استاندارد در درمان بدخیمی‌های مختلف استفاده می‌شود [۸۳]. تحت درمان با MTX، کاهش بیان محور CDX2/HEPH توسط مهارکننده

<sup>۱</sup> Tao

<sup>۲</sup> Reactive Oxygen Species

<sup>۳</sup> Browning

<sup>۴</sup> White Adipose Tissue

<sup>۵</sup> Normoxic and Hypoxic Cells

<sup>۶</sup> Yang

<sup>۷</sup> Cancer-associated Fibroblasts

miR-24-3p از CAFها، مقاومت سلولهای سرطان روده بزرگ به MTX را تسریع می کند [۸۴]. مطالعات اخیر نشان داده اند که miR-208b ازگروزومی با هدف قرار دادن PDCD4 موجب گسترش سلولهای T تنظیمی<sup>۱</sup> (Tregs) می شود و افزایش بیان miR-208b ازگروزومی در سلولهای مقاوم به اگزالی پلاتین بیشترین میزان را داشت. این موضوع ممکن است با کاهش حساسیت شیمیایی مبتنی بر اگزالی پلاتین در CRC مرتبط باشد [۸۵]. بنابراین، miR-208b ازگروزومی می تواند به عنوان شاخص پاسخ به درمان با اگزالی پلاتین مورد استفاده قرار گیرد. CAFs با انتقال lncRNA CCAL ازگروزومی به سلولهای سرطانی، آپوپتوز را در سلولهای CRC مهار کرده، مسیر  $\beta$ -catenin را فعال می کنند و مقاومت به اگزالی پلاتین را هم در شرایط *in vitro* و هم *in vivo* افزایش می دهند [۸۶]. در پژوهشی Hon و همکاران دریافتند که 0000338 ازگروزومی می تواند مقاومت شیمیایی را از سلولهای مقاوم به FOLFOX به سلولهای حساس منتقل کند [۸۷]. علاوه بر این، بیماران CRC که تحت شیمی درمانی قرار می گیرند، معمولاً به داروی 5-FU مقاومت نشان می دهند [۸۸]. به طور مشابه، بیان نا به جای miR-139-5p در سلولهای CRC حساس به 5-FU باعث افزایش آپوپتوز شده است [۸۹]. بر اساس مطالعه هو<sup>۲</sup> و همکاران، سطح miR-92a-3p ازگروزومی در بیماران CRC مقاوم به 5-FU/L- OHP به طور قابل توجهی بیشتر از بیماران حساس به این داروها بود. تحقیقات بیشتر نشان داد که miR-92a-3p ازگروزومی مشتق از CAFs با انتقال به سلولهای CRC، مسیر  $\beta$ -catenin/Wnt را فعال کرده و با مهار مستقیم FBXW7 و MOAP1، آپوپتوز میتو کندریایی را سرکوب می کند که این امر بر رشد سرطان و مقاومت دارویی تأثیر می گذارد

<sup>۱</sup> Regulatory T Cells<sup>۲</sup> Hu

[۹۰]. علاوه بر این، رن<sup>۳</sup> و همکاران کشف کردند که lncRNA H19 ازگروزومی به عنوان اسفنج رقابتی اندوژن برای miR-141 عمل کرده و مسیر مرتبط با پروتئین Wnt/ $\beta$  را فعال می کند، در نتیجه مقاومت به اگزالی پلاتین را در سلولهای CRC افزایش می دهد. این نتایج نشان می دهند که miRNAهای ازگروزومی می توانند به عنوان نشانگرهای زیستی مفید برای توسعه متاستازها و مقاومت شیمیایی در CRC مورد استفاده قرار گیرند [۹۱].

### lncRNA های مشتق از ازگروزوم بعنوان بیومارکر

#### برای تشخیص و پیش آگاهی CRC

بیماران مبتلا به آدنوکارسینوم کولورکتال و آدنوم درجه بالا، تعداد قابل توجهی ازگروزوم مشتق از پلاسما نسبت به شرکت کنندگان با ضایعات کم خطر (پولیپهای هیپرپلاستیک و آدنوم درجه پایین) یا افراد سالم گروه کنترل نشان داده اند. علاوه بر این، همبستگی معنی داری بین تعداد ازگروزومها و اندازه ضایعه، تعداد ضایعات و حجم کل ضایعات وجود داشت. این یافته ها یک روش غربالگری بالقوه برای تشخیص افراد پرخطر ارائه می دهند. محتوای ازگروزومها به عنوان یک نشانگر زیستی بالقوه برای CRC مورد مطالعه قرار گرفته است [۹۲]. در جدول ۱ تعدادی از ncRNA های مشتق از ازگروزوم که بعنوان بیومارکر برای تشخیص و پیش آگاهی CRC در تحقیقات مختلف شناسایی شده اند نوشته شده است.

<sup>۳</sup> Ren

جدول ۱. پتانسیل نشانگر زیستی تشخیصی ncRNAهای اگزوزومی در CRC.

| ncRNA                                                                                        | Class ncRNA | Source              | Status        | References |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|---------------------|---------------|------------|
| circLPAR1                                                                                    | circRNA     | Plasma              | Downregulated | [۱۲۴]      |
| Let-7a, miR-1229,<br>miR-1246,<br>miR-150, miR-21,<br>miR-223,<br>miR-23a                    | miRNA       | Serum               | Upregulated   | [۱۲۵]      |
| CCAT2                                                                                        | LncRNA      | Serum               | Upregulated   | [۱۰۲]      |
| RPPH1                                                                                        | LncRNA      | Plasma              | Upregulated   | [۷۳]       |
| HOTTIP                                                                                       | LncRNA      | Serum               | Downregulated | [۱۰۶]      |
| miR-92b                                                                                      | miRNA       | Plasma              | Downregulated | [۹۵]       |
| miR-6803-5p                                                                                  | miRNA       | Serum               | Upregulated   | [۱۲۶]      |
| miR-96-5p,<br>miR-149                                                                        | miRNA       | Plasma              | Downregulated | [۹۴]       |
| miR-125a,<br>miR-320c                                                                        | miRNA       | Plasma              | Upregulated   | [۹۶]       |
| miR-150-5p                                                                                   | miRNA       | Plasma              | Downregulated | [۱۲۶]      |
| miR-4461                                                                                     | miRNA       | BMSC                | Downregulated | [۱۲۷]      |
| miR-10A                                                                                      | miRNA       | Primary<br>CRC cell | Downregulated | [۱۲۸]      |
| miR-874                                                                                      | miRNA       | Serum               | Downregulated | [۱۲۹]      |
| miR-19a-3p,<br>miR-203-3p,<br>miR-221-3p,<br>let-7f-5p                                       | miRNA       | Serum               | Upregulated   | [۵۸]       |
| miR-377-3p,<br>miR-381-3p                                                                    | miRNA       | Serum               | Downregulated | [۱۳۰]      |
| LNCV6_116109,<br>LNCV6_98390,<br>LNCV6_38772,<br>LNCV_108266,<br>LNCV6_84003,<br>LNCV6_98602 | LncRNA      | Plasma              | Upregulated   | [۱۰۳]      |
| CRNDE-h                                                                                      | LncRNA      | Serum               | Upregulated   | [۱۰۴]      |
| GAS5                                                                                         | LncRNA      | Serum               | Downregulated | [۱۰۵]      |
| miR-17-5p                                                                                    | miRNA       | Serum               | Upregulated   | [۱۳۱]      |
| ADAMTS9-AS1                                                                                  | LncRNA      | Serum               | Downregulated | [۱۳۲]      |
| miR-4323,<br>miR-4284,<br>miR-1268a,<br>miR-1290,<br>miR-6766-3p,<br>miR-21-5p,<br>miR-1246  | miRNA       | Serum               | Upregulated   | [۱۳۳]      |
| miR-200c-3p                                                                                  | miRNA       | Serum               | Downregulated | [۱۳۴]      |
| miR-424-5p                                                                                   | miRNA       | Serum               | Upregulated   | [۱۳۵]      |

## miRNA های اگزوزومی بعنوان بیومارکر برای تشخیص و پیش آگاهی CRC

در مطالعه‌ای آستن‌فیلد<sup>۱</sup> و همکاران اختلال بیان هشت miRNA را در بافت CRC شناسایی کردند؛ به طوری که miR-16، miR-23b-3p، miR-27b-3p، miR-30b، miR-30c و miR-30a-3p کاهش بیان و miR-27a-3p و miR-222-3p افزایش بیان داشتند. با این حال، تمامی این miRNA در اگزوزوم‌های EpCAM+ پلاسمای بیماران CRC در مقایسه با افراد سالم افزایش بیان نشان دادند. سطح این اگزوزوم‌های حاوی miRNA ها پس از جراحی کاهش یافت که نشان‌دهنده منشأ توموری آن‌هاست [۹۳]. بافت تومور ممکن است از اگزوزوم‌ها برای دفع miRNA های مهارکننده تومور استفاده کند که این امر می‌تواند توضیحی برای اختلاف تنظیم بیان بین بافت CRC و اگزوزوم‌ها باشد (کاهش در بافت و افزایش در اگزوزوم). همچنین تومورها می‌توانند با بارگذاری اگزوزوم‌ها با miRNA های اُنکوژن (که در هر دو بافت و اگزوزوم افزایش بیان دارند)، محیط پیش‌متاستاتیک در مناطق دوردست ایجاد کنند [۲۹]. علاوه بر این، لی<sup>۲</sup> و همکاران کاهش بیان miR-96 و miR-149 را در بافت و پلاسمای بیماران CRC و همچنین در اگزوزوم‌های GPC1+ پلاسمای این بیماران در مقایسه با افراد سالم نشان دادند. سطح این miRNA ها دو ماه پس از جراحی به حالت عادی بازگشت. جالب این که افزایش بیان این miRNA ها به طور قابل توجهی آپوپتوز سلولی را افزایش داد، در حالی که تکثیر سلولی و بیان GPC1 را در رده‌های سلولی CRC، پلاسمای موش‌های حامل تومورهای ناشی از این رده‌های سلولی و تومورهای پیوندی کاهش داد [۹۴]. همچنین مشخص شده که miR-92 اگزوزومی در بیماران CRC در مقایسه با افراد مبتلا

به آدنوم کولورکتال و ضایعات غیرسرطانی<sup>۳</sup> (NC) به طور معناداری کاهش بیان دارد. سطح این miRNA در بیماران با نئوپلازی داخل اپیتلیال درجه بالا نسبت به بیماران با ضایعات NC به طور چشمگیری کمتر بود [۹۵]. از سوی دیگر، مطالعات نشان داده‌اند که miR-17، miR-18a، miR-18b، miR-181a، miR-125a و miR-320c اگزوزومی در پلاسمای بیماران CRC به طور قابل توجهی افزایش بیان دارند. miR-125a و miR320c به ویژه در مراحل اولیه CRC افزایش بیان نشان دادند. در تمایز بین بیماران CRC و افراد سالم، افزودن miR-125a به آنتی‌ژن کارسینوآمبریونیک<sup>۴</sup> (CEA) مدل پیش‌بینی‌کننده بهتری نسبت به CEA به تنهایی ارائه داد [۹۶، ۹۷]. در پژوهشی تنگ<sup>۵</sup> و همکاران سطح بالاتر miR-193a را در اگزوزوم‌های رده‌های سلولی CRC متاستاتیک و پلاسمای بیماران CRC با متاستاز کبدی شناسایی کردند. ارزیابی چرخه سلولی نشان داد که miR-193a موجب توقف چرخه سلولی در فاز G1 می‌شود. علاوه بر این، افزایش بیان آن تکثیر سلولی را از طریق هدف قرار دادن Caprin1 مهار کرد که با کاهش بیان mRNA و پروتئین Caprin1 همراه بود. در نتیجه، CCND2 و c-MYC نیز که در مسیر پایین‌دست Caprin1 قرار دارند، کاهش بیان نشان دادند. این نتایج در مطالعات in vivo نیز تأیید شد، به طوری که افزایش بیان miR-193a موجب افزایش قابل توجه بقای موش‌های حامل تومور CRC شد. در مورد مکانیسم ترشح این miRNA مهارکننده تومور به درون اگزوزوم‌ها، این فرآیند از طریق پروتئین اصلی وزیکول<sup>۶</sup> (MVP) صورت می‌گیرد، زیرا حذف MVP موجب تجمع این miRNA در سلول‌ها به جای اگزوزوم‌ها شد [۹۸]. مطالعه دیگری که توسط لیو<sup>۷</sup> و

<sup>3</sup> Non-cancerous

<sup>4</sup> Carcinoembryonic Antigen

<sup>5</sup> Teng

<sup>6</sup> Major Vault Protein

<sup>7</sup> Liu

<sup>1</sup> Ostensfeld

<sup>2</sup> Li

همکاران انجام شد، کاهش معنادار miR-4772-3p را در بیماران با CRC عودکننده نشان داد. کاهش بیان miR-4772 با خطر عود و مرگ مرتبط بود. miR-4772 به تنهایی حساسیت ۷۸٫۶٪ و ویژگی ۷۷٫۱٪ در تمایز بیماران عودکننده از غیرعودکننده داشت. علاوه بر این، miR-4772 پیش‌بینی کننده بهتری برای عود نسبت به محل تومور و متاستاز غدد لنفاوی بود [۹۹]. miR-6869 نیز در بافت CRC و اگزوزوم‌های سرم بیماران CRC کاهش بیان داشت. ارتباط معناداری بین TLR4 و این miR-6869 مشاهده شد. افزایش بیان miR-6869 تکثیر سلولی و انتقال هسته‌ای فسفریله‌شده NF-κB/p65 را مهار کرد، سیتوکین‌های التهابی IL-6 و TNF-α را کاهش داد و آپوپتوز را افزایش داد. بنابراین، نقش مهارکننده توموری miR-6869 از طریق تنظیم مسیر سیگنالینگ TLR4/NF-κB صورت می‌گیرد. علاوه بر این، نرخ بقای سه ساله در بیماران CRC با سطح پایین miR-6869 اگزوزومی سرم کمتر بود [۱۰۰].

### lncRNAهای اگزوزومی بعنوان بیومارکر برای

#### تشخیص و پیش‌آگاهی CRC

در مطالعه‌ای بارباگالو<sup>۱</sup> و همکاران نشان دادند که UCA1<sup>۲</sup> که یک نوع lncRNA است، در بافت‌های CRC افزایش بیان دارد، در حالی که در اگزوزوم‌های سرم بیماران CRC در مقایسه با افراد سالم کاهش می‌یابد. حساسیت و ویژگی سطوح UCA1 در تمایز بیماران CRC از افراد سالم به ترتیب ۱۰۰ و ۴۳ درصد بود. علاوه بر این، مشخص شد که UCA1 می‌تواند از طریق اتصال پروتئین CEPB<sup>۳</sup> به ناحیه اتصال بالادست آن تنظیم شود. همبستگی خطی معناداری بین CEPB و UCA1 در بافت‌های CRC مشاهده شد که نشان می‌دهد CEPB ممکن است یک فعال کننده رونویسی باشد. همچنین، افزایش بیان

UCA1 در سلول‌های CRC منجر به کاهش miR-135a، miR-143، miR-214 و miR-1271 و افزایش mRNAهای ANLN، BIRC5، IPO7، KIF2A و KIF23 شد. علاوه بر این، آزمایش‌ها نشان دادند که UCA1 می‌تواند به این miRNAها و mRNAها متصل شود و با جلوگیری از اتصال miRNAها به mRNAهای هدف از طریق تعامل با ناحیه 3'-UTRs آنها، پیشرفت CRC را تسهیل کند. تجزیه و تحلیل غنی‌سازی عملکردی<sup>۴</sup> نشان داد که UCA1 در مهاجرت سلولی نقش دارد. در مورد توزیع نامتقارن UCA1، این فرضیه مطرح است که سلول‌های توموری ترشح UCA1 را از طریق اگزوزوم‌ها محدود می‌کنند تا آن را برای عملکردهای تومورزایی خود حفظ کنند، که نشان می‌دهد UCA1 نقش مهمی در پیشرفت CRC دارد [۱۰۱]. مطالعات نشان داده‌اند که LNCV6\_98390، LNCV6\_116109، LNCV6\_38772، LNCV6\_108266، LNCV6\_84003، LNCV6\_98602 و CCAT2<sup>۵</sup> در بافت CRC، سطح سرم و اگزوزوم‌های بیماران CRC در مقایسه با افراد سالم به طور معناداری افزایش بیان دارند. سطوح تمام این lncRNAها به جز CCAT2 در هر مرحله از بیماری تغییرات قابل توجهی نشان دادند. در حالی که بیان بالاتر CCAT2 با تهاجم موضعی و متاستاز به غدد لنفاوی مرتبط بود، سطح سرمی آن پس از جراحی به طور قابل توجهی کاهش یافت. به طور کلی، این lncRNAها می‌توانند به عنوان نشانگرهای تشخیصی CRC مورد استفاده قرار گیرند [۱۰۲، ۱۰۳].

در پژوهشی Liang و همکاران نشان دادند که RPPH1<sup>۶</sup> در بافت‌های CRC و اگزوزوم‌های پلاسمای بیماران CRC به طور معناداری افزایش بیان دارد و

<sup>۴</sup> Functional Enrichment Analysis

<sup>۵</sup> Colon Cancer-associated Transcript 2

<sup>۶</sup> Ribonuclease P RNA Component H1 (RPPH1)

<sup>۱</sup> Barbagallo

<sup>۲</sup> Urothelial Carcinoma Associated

<sup>۳</sup> CCAAT/enhancer-binding Protein Beta

با مراحل پیشرفته بیماری، بقای کلی ضعیف و بقای بدون بیماری پایین مرتبط است. این یافته‌ها با این مشاهده توجیه می‌شود که RPPH1 متاستاز CRC را در شرایط آزمایشگاهی و مدل‌های حیوانی تقویت می‌کند. تعامل RPPH1 با  $\beta$ -III tubulin (TUBB3) از یوبیکوتینشن آن جلوگیری کرده و EMT را القا می‌کند. افزایش بیان RPPH1 در سلول‌های CRC منجر به افزایش Vimentin و N-cadherin و کاهش E-cadherin در سطح mRNA و پروتئین شد. علاوه بر این، RPPH1 با انتقال اگزوزوم‌های غنی از RPPH1 از سلول‌های CRC به ماکروفاژها، موجب قطبی‌شدن M2 ماکروفاژها<sup>۱</sup> شد که با فنوتیپ CD206high/HLA-DRlow، مورفولوژی کشیده سلولی، افزایش نشانگرهای M2 (مانند CCL17، CCL18، CXCL8، IL-10،  $\beta$ -TGF) و افزایش تعداد سلول‌های توموری در گردش همراه بود. ارزش تشخیصی RPPH1 در اگزوزوم‌های پلاسمای بیماران CRC بهتر از نشانگرهای CEA و CA199 بود و سطح آن پس از جراحی کاهش یافت [۷۳].

در مطالعه‌ای که توسط لیو و همکاران انجام شد، CRNDE-h در رده‌های سلولی CRC و اگزوزوم‌های سرم بیماران CRC در مقایسه با افراد مبتلا به بیماری خوش خیم کولورکتال و افراد سالم افزایش بیان داشت. علاوه بر این، سطوح اگزوزومی CRNDE-h با متاستاز لنفاوی منطقه‌ای، متاستاز دور و بقای کلی پایین مرتبط بود. تجزیه و تحلیل پنج‌ساله بقای کلی نشان داد که سطح اگزوزومی CRNDE-h یک عامل پیش‌آگهی مستقل است. همچنین، ارزش پیش‌آگهی ترکیب سطوح اگزوزومی CRNDE-h و CEA مورد ارزیابی قرار گرفت که نشان داد بیماران با سطوح پایین هر دو نشانگر بیشترین بقا را داشتند، در حالی که بیماران با سطوح بالای هر دو نشانگر، کمترین بقا را نشان دادند. علاوه بر این، CRNDE-h در تمایز بیماران CRC از افراد مبتلا به بیماری

خوش خیم کولورکتال و افراد سالم با حساسیت ۷۰٫۳ درصد (در مقابل ۳۷٫۱۶ درصد برای CEA) و ویژگی ۹۴٫۴ درصد (در مقابل ۸۸٫۷۵ درصد برای CEA) عملکرد بهتری داشت. با این حال، ترکیب هر دو نشانگر برتر از استفاده جداگانه آن‌ها بود. بنابراین، توصیه می‌شود که سطوح اگزوزومی CRNDE-h و CEA برای تشخیص بهتر ترکیب شوند [۱۰۴]. علاوه بر این، کاهش بیان GAS5 که با افزایش miR-221 همراه بود، در بافت‌ها، سرم و اگزوزوم‌های بیماران CRC مشاهده شد. این سطوح با مرحله CRC متاستاز لنفاوی، میزان عود موضعی و میزان متاستاز دور ارتباط داشت و به عنوان یک عامل پیش‌آگهی مستقل برای CRC شناخته شد. هنگامی که GAS5 به صورت مصنوعی در رده‌های سلولی CRC افزایش بیان یافت، کاهش miR-221 و مهار تکثیر، مهاجرت و تهاجم سلولی مشاهده شد [۱۰۵]. از سوی دیگر، اومی<sup>۲</sup> و همکاران یک lncRNA دیگر به نام HOTTIP را شناسایی کردند که در بافت CRC و اگزوزوم‌های سرم بیماران CRC کاهش بیان داشت. تجزیه و تحلیل چندمتغیره نشان داد که HOTTIP یک عامل پیش‌آگهی مستقل برای بقای کلی است که به طور خاص با پیش‌آگهی ضعیف مرتبط می‌باشد. این مطالعات نشان می‌دهند که lncRNA می‌تواند به عنوان نشانگرهای تشخیصی و پیش‌آگهی در CRC مورد استفاده قرار گیرند [۱۰۶].

### circRNAهای اگزوزومی بعنوان بیومارکر برای

#### تشخیص و پیش‌آگاهی CRC

مطالعات نشان داده‌اند که hsa-circ-0005100 (circIFT80) و hsa\_circ\_0067835 (circFMN2) در رده سلولی CRC، نمونه‌های بافتی بیماران مبتلا به CRC، و همچنین اگزوزوم‌های استخراج‌شده از این بیماران به طور معنی‌داری افزایش بیان داشته‌اند. بیان بالاتر circFMN2 و circIFT80 با اندازه تومور،

<sup>2</sup> Oehme

<sup>1</sup> Macrophage M2 Polarization

مرحله بیماری و متاستاز دوردست ارتباط دارد. علاوه بر این، ناکداون *circFMN2* و *circIFT80* به صورت *in vivo* و *in vitro* منجر به مهار قابل توجه تکثیر سلولی شد؛ به طوری که سلول‌ها در فاز G0/G1 تجمع یافته و تعداد سلول‌ها در فاز G2/M کاهش یافت. با این حال، ناکداون *circFMN2* در رده سلولی طبیعی اپی‌تلیال روده بزرگ انسان تأثیری بر چرخه سلولی نداشت (نه مهار بیان آن باعث کاهش تکثیر شد و نه افزایش بیان آن باعث افزایش تکثیر گردید). این ویژگی، *circFMN2* را به عنوان یک هدف درمانی امیدبخش مطرح می‌کند، چرا که سلول‌های نرمال تحت تأثیر قرار نمی‌گیرند. از سوی دیگر، ناکداون *circIFT80* باعث افزایش آپوپتوز سلول‌های CRC شد، در حالی که ناکداون *circFMN2* تغییری در میزان آپوپتوز ایجاد نکرد. همچنین نشان داده شده که *circIFT80* فرآیند EMT را فعال می‌کند، به طوری که افزایش بیان *circIFT80* موجب افزایش چشمگیر تهاجم و مهاجرت سلول‌های CRC شده است. این تغییرات با کاهش بیان E-cadherin و افزایش بیان vimentin و N-cadherin همراه بود. بر اساس آزمایش‌های انجام شده، مکانیسم اثر *circFMN2* و *circIFT80* به تدریج از طریق محورهای *circIFT80/miR-1182/hTERT* و *circFMN2/miR-1236-3p/HOXB7* بیان می‌گیرد. بیان *hTERT* و *HOXB7* در نمونه‌های بافتی CRC به طور معنی‌داری بالاتر از بافت‌های نرمال بود. همچنین، یک رابطه معکوس میان سطح بیان *circRNA*‌ها و *mirRNA* های هدف آن‌ها در رده‌های سلولی و اگزوزوم‌های سرمی بیماران CRC مشاهده شد. علاوه بر این، ناکداون *circFMN2* و *circIFT80* به ترتیب باعث کاهش بیان *hTERT* و *HOXB7* شد، اما این اثر با مهار *microRNA* هدف هر کدام قابل برگشت بود. این نتایج نشان می‌دهند که *circRNA*های اگزوزومی *circIFT80* و *circFMN2* می‌توانند به عنوان

نشانه‌های پیش‌آگهی‌دهنده در CRC مطرح شوند [۱۰۷، ۱۰۸]. در مطالعه‌ای هون<sup>۱</sup> و همکاران نقش *hsa-circ-0000338* را در بیماران CRC مقاوم به درمان با 5-FU و اکسالی‌پلاتین (FOLFOX) مورد بررسی قرار دادند. یافته‌ها نشان داد که سطح اگزوزومی *hsa-circ-0000338* در سرم بیماران غیر پاسخگو<sup>۲</sup> به طور معنی‌داری بیش از دو برابر بیماران پاسخ‌دهنده بود. همچنین، ناکداون *hsa-circ-0000338* موجب افزایش زیست‌پذیری سلول‌های HCT116 در غلظت‌های بالای ۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از 5-FU شد. جالب توجه اینکه، آن‌ها بررسی کردند که آیا مقاومت دارویی قابل انتقال از سلول‌های مقاوم (HCT116-R) به سلول‌های والد (HCT116-P) است یا نه. نتایج نشان داد که اگزوزوم‌های HCT116-R به صورت انتخابی *hsa-circ-0000338* را به سلول‌های HCT116-P هم‌کشت منتقل کردند و این سلول‌ها در مقایسه با گروه کنترل، مقاومت بیشتری به دارو نشان دادند. بنابراین، *hsa\_circ\_0000338* اگزوزومی می‌تواند یک نشانگر پیش‌بینی‌کننده مقاومت دارویی در بیماران مبتلا به CRC باشد [۸۷]. در پژوهشی پان<sup>۳</sup> و همکاران نشان دادند که *hsa-circ-0004771* اگزوزومی در سرم بیماران CRC نسبت به بیماران مبتلا به بیماری‌های خوش‌خیم روده‌ای و افراد سالم به طور معنی‌داری افزایش یافته است. در واقع، سطح *hsa-circ-0004771* اگزوزومی در بیماران CRC حدود ۱۴ برابر بالاتر از افراد سالم بود. این سطح بیان با مرحله بیماری و متاستاز دوردست همبستگی داشت. حساسیت و ویژگی این بیومارکر برای تمایز بین بیماران CRC و افراد سالم به ترتیب ۸۰٫۹۱ و ۸۲٫۸۶ درصد گزارش شد. علاوه بر این، پس از عمل

<sup>۱</sup> Hon

<sup>۲</sup> Non-responders

<sup>۳</sup> Pan

مانند CD47، پپتیدهای iRGD و لیگندهای خاص مهندسی شده‌اند. تغییرات در گلیکوزیلاسیون سطحی و افزودن پاسخ‌دهنده‌های حساس به محیط اسیدی یا میدان مغناطیسی نیز موجب بهبود رسانش هدفمند اگزوزوم‌ها به بافت‌های سرطانی شده است. در مجموع، اگزوزوم‌ها ابزار امیدبخشی برای درمان هدفمند سرطان به‌ویژه از طریق تحویل مؤثر داروها، ژن‌ها و پروتئین‌ها محسوب می‌شوند [۱۱۹].

### محدودیت‌ها و چالش‌های استفاده از اگزوزوم‌ها

اولتراسانتریفیوژ به‌عنوان استاندارد طلایی برای جداسازی اگزوزوم‌ها شناخته می‌شود، اما روشی پرهزینه، زمان‌بر، نیازمند حجم بالایی از نمونه اولیه، تجهیزات گران‌قیمت و ناکارآمد برای آزمایش‌های با توان عملیاتی بالا است [۱۲۰، ۱۲۱]. با وجود کیت‌های تجاری موجود برای جداسازی اگزوزوم‌ها، این کیت‌ها استانداردسازی نشده‌اند و خلوص پایینی دارند. علاوه بر این، از بافرهایی استفاده می‌کنند که غشای اگزوزوم‌ها را هضم می‌کنند و این موضوع، تحلیل‌های کیفی و کمی را محدود می‌سازد. زیرا جمع‌آوری ذرات دست‌نخورده امکان‌پذیر نیست. همچنین، اولتراسانتریفیوژ ممکن است منجر به تشکیل توده‌های ذرات شود که بررسی تک‌تک وزیکول‌ها را با محدودیت مواجه می‌کند [۱۲۲]. از سوی دیگر، اندازه کوچک و ترکیب پیچیده اگزوزوم‌ها، ایجاد یک استاندارد طلایی برای کمی‌سازی را دشوار می‌سازد [۱۲۳].

### نتیجه‌گیری

مطالعات اخیر نشان می‌دهند که اگزوزوم‌ها و ncRNA مشتق از آنها نقش کلیدی در ایجاد و پیشرفت CRC ایفا می‌کنند. این مولکول‌ها با تنظیم رگزایی، متاستاز، مقاومت دارویی و تعدیل سیستم ایمنی، ریزمحیط تومور را برای رشد سرطان مساعد می‌سازند. اگزوزوم‌های حاوی miRNA، lncRNA و circRNA به‌عنوان نشانگرهای زیستی امیدوارکننده

جراحی و همچنین پس از درمان رده‌های سلولی CRC (HCT-116 و SW-480) با مهارکننده اگزوزوم GW4869، سطح hsa-circ-0004771 به‌طور قابل توجهی کاهش یافت. این نتایج نشان می‌دهند که سطوح اگزوزومی hsa-circ-0004771 منشأ توموری دارند و می‌توانند به‌عنوان نشانگر تشخیصی در CRC مورد استفاده قرار گیرند [۱۰۹].

### اگزوزوم‌ها به‌عنوان حامل‌های زیستی

اگزوزوم‌ها به‌عنوان حامل‌های زیستی، نقش بسیار مهمی در تحویل داروهای ضدسرطان ایفا می‌کنند. غشای دولایه لیپیدی آنها می‌تواند از مولکول‌های درمانی مانند داروهای شیمی‌درمانی، اسیدهای نوکلئیک و پروتئین‌ها محافظت کرده و آنها را به‌طور مؤثر و با آزادسازی تدریجی به بافت هدف منتقل کند [۱۱۰، ۱۱۱]. داروهایی مانند دوکسوروبیسین و پاکلیتاکسل که دارای سمیت بالا و زیست‌دسترسی پایین هستند، در صورت بارگذاری در اگزوزوم‌ها، اثر ضدسرطانی قوی‌تری داشته و عوارضی مانند سمیت قلبی را کاهش می‌دهند [۱۱۴-۱۱۲]. برای تحویل اسیدهای نوکلئیک مانند miRNA و siRNA نیز از اگزوزوم‌ها استفاده شده است. بارگذاری این مولکول‌ها می‌تواند از طریق افزایش بیان آنها در سلول‌های والد یا با روش‌های فیزیکی مانند الکتروپوریشن صورت گیرد [۱۱۶، ۱۱۵]. همچنین اگزوزوم‌های بیومیمتیک (شبیه‌سازی شده) و نانوذرات پوشیده شده با غشای اگزوزومی برای رساندن RNAها توسعه یافته‌اند [۱۱۷]. در زمینه تحویل پروتئین‌ها، اگزوزوم‌ها از طریق مهندسی ژنتیک یا بارگذاری مستقیم به کار رفته‌اند. به‌عنوان مثال، اگزوزوم‌های حامل پروتئین ضدآپوپتوزی survivin-T34A موجب القای مرگ سلولی در سرطان پانکراس شدند [۱۱۸]. همچنین اگزوزوم‌های مشتق‌شده از سلول‌های دندریک با بارگذاری آنتی‌ژن‌های توموری پاسخ ایمنی قوی ایجاد کردند. برای افزایش هدفمندی، اگزوزوم‌ها با مولکول‌هایی

برای تشخیص زودهنگام، پیش‌آگهی و پاسخ به درمان مطرح شده‌اند. با این حال، چالش‌هایی مانند روش‌های جداسازی پیچیده، نبود استانداردهای یکپارچه و نیاز به مطالعات بالینی گسترده، استفاده از آنها را در عمل محدود کرده است. توسعه فناوری‌های نوین در شناسایی و تحلیل اکزوزوم‌ها می‌تواند راه را برای کاربرد بالینی این مولکول‌ها هموار کند. در آینده، ترکیب نشانگرهای اکزوزومی با روش‌های تشخیصی موجود می‌تواند دقت و کارایی مدیریت CRC را بهبود بخشد و گامی مهم در جهت پزشکی شخص‌محور باشد.

## References

- 1- Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2021;71(3):209-49.
- 2- Filip S, Vymetalkova V, Petera J, Vodickova L, Kubecek O, John S, et al. Distant metastasis in colorectal cancer patients—do we have new predicting clinicopathological and molecular biomarkers? A comprehensive review. *Int J Mol Sci*. 2020;21(15):5255.
- 3- Hui L, Chen Y. Tumor microenvironment: Sanctuary of the devil. *Cancer Lett*. 2015; 368(1): 7–13.
- 4- Bakhshandeh S, Werner C, Fratzl P, Cipitria A. Microenvironment-mediated cancer dormancy: Insights from metastability theory. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2022; 119(1): e2111046118.
- 5- Del Prete A, Schioppa T, Tiberio L, Stabile H, Sozzani S. Leukocyte trafficking in tumor microenvironment. *Curr Opin Pharmacol*. 2017;35:12-19.
- 6- Weis SM, Cheresch DA. Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets. *Nat Med*. 2011;17:1359-1370.
- 7- Mezher M, Abdallah S, Ashekian O, Al Shoukari A, Choubassy H, Kurdi A, et al. Insights on the biomarker potential of exosomal non-coding RNAs in colorectal cancer: An in silico characterization of related exosomal lncRNA/circRNA–miRNA–target axis. *Cells*. 2023;12(7):1081.
- 8- Karami Fath M, Azami J, Jaafari N, Akbari Oryani M, Jafari N, Karim poor A, et al. Exosome application in treatment and diagnosis of B-cell disorders: leukemias, multiple sclerosis, and arthritis rheumatoid. *Cell Mol Biol Lett*. 2022;27:74.
- 9- Wu Q, Liu W, Wang J, Zhu L, Wang Z, Peng Y. Exosomal noncoding RNAs in colorectal cancer. *Cancer Lett*. 2021;493:123-134.
- 10- Doyle LM, Wang MZ. Overview of extracellular vesicles, their origin, composition, purpose, and methods for exosome isolation and analysis. *Cells*. 2019;8:727.
- 11- Rezaie J, Ahmadi M, Ravanbakhsh R, Mojarad B, Mahbubfam S, Shaban SA, et al. Tumor-derived extracellular vesicles: The metastatic organotropism drivers. *Life Sci*. 2021;278:120216.
- 12- Crescitelli R, Lässer C, Lötvall J. Isolation and characterization of extracellular vesicle subpopulations from tissues. *Nat Protoc*. 2021;16:1548-1580.
- 13- Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO, et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*. 2007;9:654-659.
- 14- Babaei S, Fadaee M, Abbasi-Kenarsari H, Shanehbandi D & Kazemi T. Exosome-based immunotherapy as an innovative therapeutic approach in melanoma. *Cell Commun Signal*. 2024;22:527.
- 15- Zhang B, Wang M, Gong A, Zhang X, Wu X, Zhu Y, et al. HucMSC-exosome mediated-Wnt4 signaling is required for cutaneous wound healing. *Stem Cells*. 2020;38:1485-1497.
- 16- Osaki M, Okada F. Exosomes and their role in cancer progression. *Yamato J Med*. 2019;1(1):1-5.
- 17- Aslan C, Maralbashi S, Kahroba H, Asadi M, Soltani-Zangbar MS, Javadian M, et al. Docosahexaenoic acid (DHA) inhibits pro-angiogenic effects of breast cancer cells via down-regulating cellular and exosomal expression of angiogenic genes and microRNAs. *Life Sci*. 2020;260:118094.
- 18- Safaei S, Fadaee M, Farzam OR, Yari A, Poursaei E, Aslan C, et al. Exploring the dynamic interplay between exosomes and the immune tumor microenvironment: implications for breast cancer progression and therapeutic strategies. *Breast Cancer Res*. 2024;26:57.
- 19- Han QF, Li WJ, Hu KS, Gao J, Zhai WL, Yang JH, et al. Exosome biogenesis: machinery, regulation, and therapeutic implications in cancer. *Mol Cancer*. 2022;21:207.
- 20- Marar C, Starich B, Wirtz D. Extracellular vesicles in immunomodulation and tumor progression. *Nat Immunol*. 2021;22:560-570.
- 21- Pasquinelli A. MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship. *Nat Rev Genet*. 2012;13:271-282.

- 22- Peláez N, Carthew RW. Biological robustness and the role of microRNAs: a network perspective. In: Collier HA, editor. *MicroRNAs in Development*. San Diego: Academic Press; 2012. p. 145-162.
- 23- Zhao C, Sun X, Li L. Biogenesis and function of extracellular miRNAs. *ExRNA*. 2019;1:38.
- 24- Tan S, Xia L, Yi P, Han Y, Tang L, Pan Q, et al. Exosomal miRNAs in tumor microenvironment. *J Exp Clin Cancer Res*. 2020;39:67.
- 25- Hunter S, Nault B, Ugwuagbo KC, Maiti S, Majumder M. Mir526b and Mir655 promote tumour associated angiogenesis and lymphangiogenesis in breast cancer. *Cancers*. 2019;11:938.
- 26- Baroni S, Romero-Cordoba S, Plantamura I, Dugo M, D'Ippolito E, Cataldo A, et al. Exosome-mediated delivery of miR-9 induces cancer-associated fibroblast-like properties in human breast fibroblasts. *Cell Death Dis*. 2016;7:e2312.
- 27- Vautrot V, Chanteloup G, Elmallah M, Cordonnier M, Aubin F, Garrido C, et al. Exosomal miRNA: Small molecules, big impact in colorectal cancer. *J Oncol*. 2019;2019:8585276.
- 28- Dilsiz N. Role of exosomes and exosomal microRNAs in cancer. *Future Sci OA*. 2020;6:FSO465.
- 29- Ostensfeld MS, Jeppesen DK, Laurberg JR, Boysen AT, Bramsen JB, Primdal-Bengtson B, et al. Cellular disposal of miR23b by RAB27-dependent exosome release is linked to acquisition of metastatic properties. *Cancer Res*. 2014;74:575–586.
- 30- Wang Q, Huang Z, Ni S, Xiao X, Xu Q, Wang L, et al. Plasma miR-601 and miR-760 are novel biomarkers for the early detection of colorectal cancer. *PLoS One*. 2012;7:e44398.
- 31- Xi Y, Formentini A, Ju J. Prognostic values of microRNAs in colorectal cancer. *Biomarker Insights*. 2006;1:113–121.
- 32- Sohel MH. Extracellular/circulating microRNAs: Release mechanisms, functions and challenges. *Achiev Life Sci*. 2016;10(2):175–186.
- 33- Bakhsh T, Alhazmi S, Alburae NA, Farsi A, Alzahrani F, Choudhry H, et al. Exosomal miRNAs as a promising source of biomarkers in colorectal cancer progression. *Int J Mol Sci*. 2022;23(9):4855.
- 34- Wang Y, Nie H, He X, Liao Z, Zhou Y, Zhou J, et al. The emerging role of super enhancer-derived noncoding RNAs in human cancer. *Theranostics*. 2020;10(24):11049–11062.
- 35- Dempsey JL, Cui JY. Long non-coding RNAs: A novel paradigm for toxicology. *Toxicol Sci*. 2017;155(1):3–21.
- 36- Fan C, Tang Y, Wang J, Xiong F, Guo C, Wang Y, et al. Role of long non-coding RNAs in glucose metabolism in cancer. *Mol Cancer*. 2017;16:130.
- 37- Galamb O, Barták BK, Kalmár A, Nagy ZB, Szigeti KA, Tulassay Z, et al. Diagnostic and prognostic potential of tissue and circulating long non-coding RNAs in colorectal tumors. *World J Gastroenterol*. 2019;25(34):5026–5048.
- 38- Cheshomi H, Matin MM. Exosomes and their importance in metastasis, diagnosis, and therapy of colorectal cancer. *J Cell Biochem*. 2019;120(2):2671–2686.
- 39- Sun R, He XY, Mei C, Ou CL. Role of exosomal long non-coding RNAs in colorectal cancer. *World J Gastrointest Oncol*. 2021;13(8):867–878.
- 40- Zhu LP, He YJ, Hou JC, Chen X, Zhou SY, Yang SJ, et al. The role of circRNAs in cancers. *Biosci Rep*. 2018;38(6):BSR20170750.
- 41- Santer L, Bär C, Thum T. Circular RNAs: A novel class of functional RNA molecules with a therapeutic perspective. *Mol Ther*. 2019;27(8):1350–1367.
- 42- Cheng D, Wang J, Dong Z, Li X. Cancer-related circular RNA: diverse biological functions. *Cancer Cell Int*. 2021;21:11.
- 43- Su M, Xiao Y, Ma J, Tang Y, Tian B, Zhang Y, et al. Circular RNAs in cancer: emerging functions in hallmarks, stemness, resistance and roles as potential biomarkers. *Mol Cancer*. 2019;18:90.
- 44- Wang P, He X. Current research on circular RNAs associated with colorectal cancer. *Scand J Gastroenterol*. 2017;52(11):1203–1210.
- 45- Artemaki PI, Scorilas A, Kontos CK. Circular RNAs: a new piece in the colorectal cancer puzzle. *Cancers (Basel)*. 2020;12(9):2464.
- 46- Wang M, Yu F, Li P, Wang K. Emerging function and clinical significance of exosomal circRNAs in cancer. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2020;21:367–383.

- 47- Shi X, Wang B, Feng X, Xu Y, Lu K, Sun M, et al. circRNAs and exosomes: a mysterious frontier for human cancer. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2020;19:1005–1021.
- 48- Zarà M, Amadio P, Campodonico J, Sandrini L, Barbieri SS. Exosomes in cardiovascular diseases. *Diagnostics (Basel)*. 2020;10(11):1943.
- 49- Geng X, Lin X, Zhang Y, Li Q, Guo Y, Fang C, et al. Exosomal circular RNA sorting mechanisms and their function in promoting or inhibiting cancer. *Oncol Lett*. 2020;20:296.
- 50- Li Y, Zheng Q, Bao C, Li S, Guo W, Zhao J, et al. Circular RNA is enriched and stable in exosomes: a promising biomarker for cancer diagnosis. *Cell Res*. 2015;25:981–984.
- 51- Chen X, Jia M, Ji J, Zhao Z, Zhao Y. Exosome-derived non-coding RNAs in the tumor microenvironment of colorectal cancer: possible functions, mechanisms and clinical applications. *Front Oncol*. 2022;12:887532.
- 52- Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell*. 2011;146(6):873–887.
- 53- Tanaka S, Tatsuguchi A, Futagami S, Gudis K, Wada K, Seo T, et al. Monocyte chemoattractant protein 1 and macrophage cyclooxygenase 2 expression in colonic adenoma. *Gut*. 2005;54:1761–1766.
- 54- da Costa VR, Araldi RP, Vigerelli H, D'Amelio F, Mendes TB, Gonzaga V, et al. Exosomes in the tumor microenvironment: from biology to clinical applications. *Cells*. 2021;10(10):2617.
- 55- He Q, Ye A, Ye W, Liao X, Qin G, Xu Y, et al. Cancer-secreted exosomal miR-21-5p induces angiogenesis and vascular permeability by targeting KRIT1. *Cell Death Dis*. 2021;12:576.
- 56- Hu HY, Yu CH, Zhang HH, Zhang SZ, Yu WY, Yang Y, et al. Exosomal miR-1229 derived from colorectal cancer cells promotes angiogenesis by targeting HIPK2. *Int J Biol Macromol*. 2019;133:771–780.
- 57- Zeng Z, Li Y, Pan Y, Lan X, Song F, Sun J, et al. Cancer-derived exosomal miR-25-3p promotes pre-metastatic niche formation by inducing vascular permeability and angiogenesis. *Nat Commun*. 2018;9:5395.
- 58- Dokhanchi M, Pakravan K, Zareian S, Hussen BM, Farid M, Razmara E, et al. Colorectal cancer cell-derived extracellular vesicles transfer miR-221-3p to promote endothelial cell angiogenesis via targeting suppressor of cytokine signaling 3. *Life Sci*. 2021;277:119937.
- 59- Shang A, Wang X, Gu C, Liu W, Sun J, Zeng B, et al. Exosomal miR-183-5p promotes angiogenesis in colorectal cancer by regulation of FOXO1. *Aging (Albany NY)*. 2021;13:25099–25116.
- 60- Dou R, Liu K, Yang C, Zheng J, Shi D, Lin X, et al. EMT-cancer cells-derived exosomal miR-27b-3p promotes circulating tumour cells-mediated metastasis by modulating vascular permeability in colorectal cancer. *Clin Transl Med*. 2022;12:e595.
- 61- Lei X, Lei Y, Li JK, Du WX, Li RG, Yang J, et al. Immune cells within the tumor microenvironment: biological functions and roles in cancer immunotherapy. *Cancer Lett*. 2020;476:1–13.
- 62- Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:329–360.
- 63- Mittal D, Gubin MM, Schreiber RD, Smyth MJ. New insights into cancer immunoediting and its three component phases — elimination, equilibrium and escape. *Curr Opin Immunol*. 2014;27:16–25.
- 64- Wellenstein MD, de Visser KE. Cancer-cell-intrinsic mechanisms shaping the tumor immune landscape. *Immunity*. 2018;48(3):399–416.
- 65- Deyell M, Garris CS, Laughney AM. Cancer metastasis as a non-healing wound. *Br J Cancer*. 2021;124(9):1491–1502.
- 66- Shang A, Gu C, Wang W, Sun J, Zeng B, Chen C, et al. Exosomal circPACRGL promotes progression of colorectal cancer via the miR-142-3p/miR-506-3p-TGF- $\beta$ 1 axis. *Mol Cancer*. 2020;19(1):117.
- 67- Liu J, Peng X, Yang S, Meng X, Zhang P, Zhao Y, et al. Extracellular vesicle PD-L1 in reshaping tumor immune microenvironment: biological function and potential therapy strategies. *Cell Commun Signal*. 2022;20(1):14.

- 68- Xian D, Niu L, Zeng J, Wang L. LncRNA KCNQ1OT1 secreted by tumor cell-derived exosomes mediates immune escape in colorectal cancer by regulating PD-L1 ubiquitination via miR-30a-5p/USP22. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:653808.
- 69- Huang Y, Luo Y, Ou W, Zhang X, Li J, Chen H, et al. Exosomal lncRNA SNHG10 derived from colorectal cancer cells suppresses natural killer cell cytotoxicity by upregulating INHBC. *Cancer Cell Int.* 2021;21:528.
- 70- Doak GR, Schwertfeger KL, Wood DK. Distant relations: macrophage functions in the metastatic niche. *Trends Cancer.* 2018;4(6):445–459.
- 71- Wang D, Wang X, Si M, Yang J, Sun S, Wu H, et al. Exosome-encapsulated miRNAs contribute to CXCL12/CXCR4-induced liver metastasis of colorectal cancer by enhancing M2 polarization of macrophages. *Cancer Lett.* 2020;470:36–48.
- 72- Zhao S, Mi Y, Guan B, Li J, Wang H, Chen X, et al. Tumor-derived exosomal miR-934 induces macrophage M2 polarization to promote liver metastasis of colorectal cancer. *J Hematol Oncol.* 2020;13:156.
- 73- Liang ZX, Liu HS, Wang FW, Zhang Y, Chen H, Li J, et al. LncRNA RPPH1 promotes colorectal cancer metastasis by interacting with TUBB3 and by promoting exosomes-mediated macrophage M2 polarization. *Cell Death Dis.* 2019;10:829.
- 74- Pavlova NN, Thompson CB. The emerging hallmarks of cancer metabolism. *Cell Metab.* 2016;23(1):27–47.
- 75- Tao L, Xu C, Shen W, Tan J, Li L, Fan M, et al. HIPK3 inhibition by exosomal hsa-miR-101-3p is related to metabolic reprogramming in colorectal cancer. *Front Oncol.* 2022;11:758336.
- 76- Wang X, Zhang H, Yang H, Bai M, Ning T, Deng T, et al. Exosome-delivered circRNA promotes glycolysis to induce chemoresistance through the miR-122–PKM2 axis in colorectal cancer. *Mol Oncol.* 2020;14(3):539–555.
- 77- Lazar I, Clement E, Dauvillier S, Milhas D, Ducoux-Petit M, LeGonidec S, et al. Adipocyte exosomes promote melanoma aggressiveness through fatty acid oxidation: a novel mechanism linking obesity and cancer. *Cancer Res.* 2016;76(14):4051–4057.
- 78- Di W, Zhang W, Zhu B, Li X, Tang Q, Zhou Y. Colorectal cancer prompted adipose tissue browning and cancer cachexia through transferring exosomal miR-146b-5p. *J Cell Physiol.* 2020;235(10):7341–7355.
- 79- Yang H, Zhang H, Yang Y, Wang X, Deng T, Liu R, et al. Hypoxia induced exosomal circRNA promotes metastasis of colorectal cancer via targeting GEF-H1/RhoA axis. *Theranostics.* 2020;10(18):8211–8226.
- 80- Yang K, Zhang J, Bao C. Exosomal circEIF3K from cancer-associated fibroblast promotes colorectal cancer (CRC) progression via miR-214/PD-L1 axis. *BMC Cancer.* 2021;21:933.
- 81- Seebacher NA, Krchniakova M, Stacy AE, Skoda J, Jansson PJ. Tumour microenvironment stress promotes the development of drug resistance. *Antioxidants (Basel).* 2021;10(11):1801.
- 82- Yun BD, Choi YJ, Son SW, Cipolla GA, Berti FCB, Malheiros D, et al. Oncogenic role of exosomal circular and long noncoding RNAs in gastrointestinal cancers. *Int J Mol Sci.* 2022;23(2):930.
- 83- Shakeran Z, Varshosaz J, Keyhanfar M, Mohammad-Beigi H, Rahimi K, Sutherland DS. Co-delivery of STAT3 siRNA and methotrexate in breast cancer cells. *Drug Deliv.* 2022;29(1):723–733.
- 84- Zhang HW, Shi Y, Liu JB, Wang HM, Wang PY, Wu ZJ, et al. Cancer-associated fibroblast-derived exosomal microRNA-24-3p enhances colon cancer cell resistance to MTX by down-regulating CDX2/HEPH axis. *J Cell Mol Med.* 2021;25(6):3236–3247.
- 85- Ning T, Li J, He Y, Zhang H, Wang X, Deng T, et al. Exosomal miR-208b related with oxaliplatin resistance promotes Treg expansion in colorectal cancer. *Mol Ther.* 2021;29(9):2723–2736.
- 86- Deng X, Ruan H, Zhang X, Xu X, Zhu Y, Peng H, et al. Long noncoding RNA CCAL transferred from fibroblasts by exosomes promotes chemoresistance of colorectal cancer cells. *Int J Cancer.* 2020;146(6):1700–1716. doi:10.1002/ijc.32608.
- 87- Hon KW, Ab-Mutalib NS, Abdullah NMA, Jamal R, Abu N, et al. Extracellular vesicle-derived circular RNAs confers chemoresistance in colorectal cancer. *Sci Rep.* 2019;9:16497.

- 88- Xu F, Ye ML, Zhang YP, Li WJ, Li MT, Wang HZ, et al. MicroRNA-375-3p enhances chemosensitivity to 5-fluorouracil by targeting thymidylate synthase in colorectal cancer. *Cancer Sci*. 2020;111(5):1528–1541.
- 89- Liu H, Yin Y, Hu Y, Feng Y, Bian Z, Yao S, et al. miR-139-5p sensitizes colorectal cancer cells to 5-fluorouracil by targeting NOTCH1. *Pathol Res Pract*. 2016;212(7):643-649.
- 90- Hu JL, Wang W, Lan XL, Zeng ZC, Liang YS, Yan YR, et al. CAFs secreted exosomes promote metastasis and chemotherapy resistance by enhancing cell stemness and epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer. *Mol Cancer*. 2019;18(1):91.
- 91- Ren J, Ding L, Zhang D, Shi G, Xu Q, Shen S, et al. Carcinoma-associated fibroblasts promote the stemness and chemoresistance of colorectal cancer by transferring exosomal lncRNA H19. *Theranostics*. 2018;8(14):3932–3948.
- 92- Kobayashi M, Kawachi H, Hurtado C, Wielandt AM, Ponce A, Karelovic S, et al. A pilot trial to quantify plasma exosomes in colorectal cancer screening from the international collaborative study between Chile and Japan. *Digestion*. 2019;99(2):116–124.
- 93- Ostensfeld MS, Jensen SG, Jeppesen DK, Christensen LL, Thorsen SB, Stenvang J, et al. miRNA profiling of circulating EpCAM+ extracellular vesicles: promising biomarkers of colorectal cancer. *J Extracell Vesicles*. 2016;5:31488.
- 94- Li J, Chen Y, Guo X, Zhou L, Jia Z, Peng Z, et al. GPC1 exosome and its regulatory miRNAs are specific markers for the detection and target therapy of colorectal cancer. *J Cell Mol Med*. 2017;21(12):2963–2973.
- 95- Li M, Chen L, Liu S, Yu Y, Guo Q, Li P, et al. Loss of circulating exosomal miR-92b is a novel biomarker of colorectal cancer at early stage. *Int J Mol Sci*. 2019;20(21):5450.
- 96- Wang J, Yan F, Zhao Q, Zhan F, Wang R, Wang L, et al. Circulating exosomal miR-125a-3p as a novel biomarker for early-stage colon cancer. *Sci Rep*. 2017;7:4150.
- 97- Zhang H, Zhu M, Shan X, Zhou X, Wang T, Zhang J, et al. A panel of seven-miRNA signature in plasma as potential biomarker for colorectal cancer diagnosis. *Gene*. 2019;698:125–133.
- 98- Teng Y, Ren Y, Hu X, Zhang X, Li J, Wang H, et al. MVP-mediated exosomal sorting of miR-193a promotes colon cancer progression. *Nat Commun*. 2017;8:14448.
- 99- Liu C, Eng C, Shen J, Lu Y, Takata Y, Mehdizadeh A, et al. Serum exosomal miR-4772-3p is a predictor of tumor recurrence in stage II and III colon cancer. *Oncotarget*. 2017;8:12841–12852.
- 100- Yan S, Liu G, Jin C, Wang Z, Duan Q, Xu J, et al. MicroRNA-6869-5p acts as a tumor suppressor via targeting TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway in colorectal cancer. *J Cell Physiol*. 2018;233:9620–9631.
- 101- Barbagallo C, Brex D, Caponnetto A, Di Pietro C, Purrello M, Ragusa M, et al. LncRNA UCA1, Upregulated in CRC Biopsies and Downregulated in Serum Exosomes, Controls mRNA Expression by RNA-RNA Interactions. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2018;12:684–695.
- 102- Wang L, Duan W, Yan S, Xie Y, Wang C. Circulating long non-coding RNA colon cancer-associated transcript 2 protected by exosome as a potential biomarker for colorectal cancer. *Biomed Pharmacother*. 2019;118:108758.
- 103- Hu D, Zhan Y, Zhu K, Bai M, Han J, Si Y, et al. Plasma exosomal long non-coding RNAs serve as biomarkers for early detection of colorectal cancer. *Cell Physiol Biochem*. 2019;51(6):2704–2715.
- 104- Liu T, Zhang X, Gao S, Jing F, Yang Y, Du L, et al. Exosomal long noncoding RNA CRNDE-h as a novel serum-based biomarker for diagnosis and prognosis of colorectal cancer. *Oncotarget*. 2016;7(51): 85551–85563.
- 105- Liu L, Meng T, Yang XH, Sayim P, Lei C, Jin B et al. Prognostic and predictive value of long non-coding RNA GAS5 and microRNA-221 in colorectal cancer and their effects on colorectal cancer cell proliferation, migration and invasion. *Cancer Biomark*. 2018;22:23–32.
- 106- Oehme F, Krahel S, Gyroffy B, Muessle B, Rao V, Greif H, et al. Low level of exosomal long non-coding RNA HOTTIP is a prognostic biomarker in colorectal cancer. *RNA Biol*. 2019;16(10):1339–1345.
- 107- Li Y, Li C, Xu R, Wang Y, Li D, Zhang B, et al. A novel circFMN2 promotes tumor proliferation in CRC by regulating the miR-1182/hTERT signaling pathways. *Clin Sci (Lond)*. 2019;133(24):2463–2479.

- 108- Liu N, Jiang F, Chen Z. A preliminary study on the pathogenesis of colorectal cancer by constructing a hsa-circRNA-0067835-miRNA-mRNA regulatory network. *Onco Targets Ther.* 2021;14:4645–4658.
- 109- Pan B, Qin J, Liu X, He B, Wang X, Pan Y, et al. Identification of serum exosomal hsa-circ-0004771 as a novel diagnostic biomarker of colorectal cancer. *Front Genet.* 2019;10:1096.
- 110- Zhao X, Wu D, Ma X, Wang J, Hou W, Zhang W, et al. Exosomes as drug carriers for cancer therapy and challenges regarding exosome uptake. *Biomed Pharmacother.* 2020;131:110237.
- 111- Lahouty M, Fadaee M, Shانهbandi D & Kazemi T. Exosome-driven nano-immunotherapy: revolutionizing colorectal cancer treatment. *Mol Biol Rep.* 2025;52:83.
- 112- Jang SC, Kim OY, Yoon CM, Choi DS, Roh TY, Park J, et al. Bioinspired exosome-mimetic nanovesicles for targeted delivery of chemotherapeutics to malignant tumors. *ACS Nano.* 2013;7(9):7698–7710.
- 113- Wei H, Chen J, Wang S, Fu F, Zhu X, Wu C, et al. A nanodrug consisting of doxorubicin and exosome derived from mesenchymal stem cells for osteosarcoma treatment in vitro. *Int J Nanomed.* 2019;14:8603–8610.
- 114- Salarpour S, Forootanfar H, Pournamdari M, Ahmadi-Zeidabadi M, Esmaeeli M & Pardakhty A. Paclitaxel incorporated exosomes derived from glioblastoma cells: comparative study of two loading techniques. *DARU J Pharm Sci.* 2019;27:533–539.
- 115- Kim G, Kim M, Lee Y, Byun JW, Hwang DW, Lee M. Systemic delivery of microRNA-21 antisense oligonucleotides to the brain using T7-peptide decorated exosomes. *J Control Release.* 2020;317:273–284.
- 116- Yang Z, Xie J, Zhu J, Kang C, Chiang C, Wang X, et al. Functional exosome-mimic for delivery of siRNA to cancer: in vitro and in vivo evaluation. *J Control Release.* 2017;261:112–123.
- 117- Lu M, Zhao X, Xing H, Xun Z, Zhu S, Lang L, et al. Comparison of exosome-mimicking liposomes with conventional liposomes for intracellular delivery of siRNA. *Int J Pharm.* 2018;550(1-2):100–110.
- 118- Aspe JR, Diaz Osterman CJ, Jutzy JMS, Deshields S, Whang S, Wall NR. Enhancement of Gemcitabine sensitivity in pancreatic adenocarcinoma by novel exosome-mediated delivery of the Survivin-T34A mutant. *J Extracell Vesicles.* 2014;3:23244.
- 119- Kim H, Jang H, Cho H, Choi J, Hwang KY, Choi Y, et al. Recent advances in exosome-based drug delivery for cancer therapy. *Cancers.* 2021;13(17):4435.
- 120- Uratani R, Toiyama Y, Kitajima T, Kawamura M, Hiro J, Kobayashi M, et al. Diagnostic potential of cell-free and exosomal microRNAs in the identification of patients with high-risk colorectal adenomas. *PLoS One.* 2016;11(10):e0160722.
- 121- Baassiri A, Nassar F, Mukherji D, Shamseddine A, Nasr R, et al. Exosomal non coding RNA in liquid biopsies as a promising biomarker for colorectal cancer. *Int J Mol Sci.* 2020;21(4):1398.
- 122- Minciacci VR, Zijlstra A, Rubin MA & Vizio DD. Extracellular vesicles for liquid biopsy in prostate cancer: where are we and where are we headed? *Prostate Cancer Prostat Dis.* 2017;20(3):251–258.
- 123- Maas SLN, de Vrij J, van der Vlist EJ, Geragousian B, van Bloois L, Mastrobattista E, et al. Possibilities and limitations of current technologies for quantification of biological extracellular vesicles and synthetic mimics. *J Control Release.* 2015;200:87–96.
- 124- Zheng R, Zhang K, Tan S, Li Y, Li X, Wang Y, et al. Exosomal circLPAR1 functions in colorectal cancer diagnosis and tumorigenesis through suppressing BRD4 via METTL3-eIF3h interaction. *Mol Cancer.* 2022;21:49.
- 125- Ogata-Kawata H, Izumiya M, Kurioka D, Honma Y, Yamada Y, Furuta K, et al. Circulating exosomal microRNAs as biomarkers of colon cancer. *PLoS One.* 2014;9(4):e92921.
- 126- Yan S, Jiang Y, Liang C, Cheng M, Jin C, Duan Q, et al. Exosomal miR-6803-5p as potential diagnostic and prognostic marker in colorectal cancer. *J Cell Biochem.* 2018;119(2):1562–1570.
- 127- Chen HL, Li JJ, Jiang F, Shi WJ, Chang GY, et al. MicroRNA-4461 derived from bone marrow mesenchymal stem cell exosomes inhibits tumorigenesis by downregulating COPB2 expression in colorectal cancer. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2020;84(2):338–346.

- 128- Wang J, Liu Y, Li Y, Zheng X, Gan J, Wan Z, *et al.* Exosomal miR-10a derived from colorectal cancer cells suppresses migration of human lung fibroblasts, and expression of IL-6, IL-8 and IL-1 $\beta$ . *Mol Med Rep.* 2020; 22(6): 5087–5095.
- 129- Zhang N, Zhang PP, Huang JJ, Wang ZY, Zhang ZH, Yuan JZ, *et al.* Reduced serum exosomal miR-874 expression predicts poor prognosis in colorectal cancer. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2020;24(1):664–672.
- 130- Wang L, Song X, Yu M, Niu L, Zhao Y, Tang Y, *et al.* Serum exosomal miR-377-3p and miR-381-3p as diagnostic biomarkers in colorectal cancer. *Future Oncol.* 2022;18(7):793–805.
- 131- Zhang Y, Wang S, Lai Q, Fang Y, Wu C, Liu Y, *et al.* Cancer-associated fibroblasts-derived exosomal miR-17-5p promotes colorectal cancer aggressive phenotype by initiating a RUNX3/MYC/TGF- $\beta$ 1 positive feedback loop. *Cancer Lett.* 2020;491:22–35.
- 132- Li N, Li J, Mi Q, Xie Y, Li P, Wang L, *et al.* Long non-coding RNA ADAMTS9-AS1 suppresses colorectal cancer by inhibiting the Wnt/ $\beta$ -catenin signalling pathway and is a potential diagnostic biomarker. *J Cell Mol Med.* 2020;24(19):11314–27.
- 133- Handa T, Kuroha M, Nagai H, Shimoyama Y, Naito T, Moroi R, *et al.* Liquid biopsy for colorectal adenoma: is the exosomal miRNA derived from organoid a potential diagnostic biomarker? *Clin Transl Gastroenterol.* 2021;12(5):e00356.
- 134- Jiang Y, Ji X, Liu K, Zhang G, Wang C, Xu X, *et al.* Exosomal miR-200c-3p negatively regulates the migration and invasion of lipopolysaccharide (LPS)-stimulated colorectal cancer (CRC). *BMC Mol Cell Biol.* 2020;21:48.
- 135- Dai W, Zhou J, Wang H, Zhang M, Yang X, Song W, *et al.* miR-424-5p promotes the proliferation and metastasis of colorectal cancer by directly targeting SCN4B. *Pathol Res Pract.* 2019;215(11):152731.