

特约综述



肿瘤的发生发展与癌细胞所处的内外环境有着密切关系, 不仅涉及癌细胞自身的遗传信息改变或表观遗传调控, 更与肿瘤所在局部组织的结构、功能和代谢变化相关。肿瘤与其所处的微环境, 既相互依存, 相互促进, 又相互拮抗, 相互斗争, 是现代肿瘤生物学的一个关键、核心与本质问题。本实验室主要探讨临床条件下肿瘤微环境对于疾病进展的病理生理学影响和相应的分子细胞学机制, 同时关注外泌体等胞外囊泡在肿瘤形成、耐药、复发和转移等恶性行为演化过程中发挥的病理作用及其生化基础。通过解析肿瘤微环境不同细胞类型和活性组分在肿瘤发展各阶段的具体作用及深层机制, 我们希望为当前国际范围内个性化临床肿瘤学的蓬勃发展提供重要线索和科学导向。

<http://www.ihs.ac.cn/cPI.asp?id=121>

胞外囊泡与癌症

韩柳 孙宇*

(中国科学院上海生命科学研究院健康科学研究所, 中国科学院大学, 上海 200031)

摘要 哺乳动物细胞产生和释放大量的胞外囊泡(extracellular vesicles, EVs), 在细胞来源、形成途径、物质组成和生物功能等方面各有不同。EVs多数起源于内吞体或质膜, 包括外泌体(exosome)、微体(microvesicle)和凋亡小体(apoptotic body)。每一种EVs均可从正常或癌变细胞产生, 向邻近或远处细胞运输生物活性物质, 调控生理学或病理学相关的细胞行为, 包括肿瘤的发生和发展。因此, EVs实际上代表了一种十分重要的细胞间通讯的模式, 而肿瘤微环境中的EVs参与的一系列活动对于疾病的进展或演化尤为重要。该文重点讨论EVs对于癌症一系列标记性特征的生物学作用与意义。对EVs及其生物功能的深入了解, 将有助于拓展对癌症这一严重影响人类健康和长寿的顽疾的研究思路, 为将来的精准医学提供更有效的治疗靶标和更合理的干预策略。

关键词 胞外囊泡; 外泌体; 微体; 癌症; 微环境

Extracellular Vesicles and Cancer

Han Liu, Sun Yu*

(Institute of Health Sciences, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, University of Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract In mammalian animals, distinct cells can exchange information by transferring signals including not only single molecules but also extracellular vesicles (EVs), the latter often varying in the origin of cell, formation pathway, content composition and biological functions. Most EVs originate from endosome or plasma membrane, including exosomes, microvesicles and apoptotic bodies. Each EV can be secreted by normal or cancerous cells, transporting stuffs of biological activities, regulating physiology or pathophysiology including

*通讯作者。Tel: 021-54923302, E-mail: sunyu@sibs.ac.cn

*Corresponding author. Tel: +86-21-54923302, E-mail: sunyu@sibs.ac.cn

网络出版时间: 2016-04-18 16:57:26

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20160418.1657.004.html>

tumorigenesis. Here we review the recent evidence of functional roles of EVs by focusing on their implications in human cancer behaviors, including inducing tumorigenesis and tumor growth, generating therapy resistance, reprogramming energy metabolism, causing genomic instability, remodeling tumor microenvironment, promoting metastasis and evading immune surveillance. A deeper understanding of EVs and their contribution to human diseases particularly cancer progression can lead to new opportunities in clinical diagnosis and treatment of cancer in current worldwide settings of personalized medicine.

Keywords extracellular vesicle; exosome; microvesicle; cancer; microenvironment

1 前言

胞间通讯代表一种高度复杂的信号网络,影响着癌细胞的多种恶性潜能^[1]。一般情况下,这种网络涉及细胞中生物活性物质的直接分泌或细胞之间的相互作用。在过去近50年里,人们逐渐注意到胞间通讯实际可以由另外一种途径实现,即一些细胞脱落的囊泡(extracellular vesicles, EVs)随后被其他细胞整合性吸收。1969年,Anderson首次在软骨基质的钙化过程中发现EVs的存在。至今,越来越多的证据表明,细胞可以通过胞膜锚定和释放一些EVs以旁分泌或自分泌的方式来完成胞间通讯。实际上,多种生理和病理学过程均涉及这类囊泡,如实质中的EVs与炎症、自免疫疾病、心血管系统失调和代谢综合征相关^[2-3]。无论正常还是癌变细胞产生的EVs都在一些重要的生物学过程中发挥着活跃而关键的作用,从相邻细胞质膜表面的通讯,到远端细胞之间的DNA、RNA、蛋白和脂质等生命必需成分的水平转移^[4]。不同类型EVs的分子分型有助于确定正常和癌变细胞释放的EVs是否存在独特的分子标签以区别性调控细胞功能,而这种分类方法或许可以用于预后、诊断和定向的临床治疗^[5-6]。

根据性质、功能和生物来源,目前至少有三种主要类型的EVs:外泌体、微泡和凋亡小体。外泌体,最早于1987年由Johnstone等^[7]在绵羊的网织红细胞中发现并经高速离心提取。这种囊泡的直径在40~120 nm,从一种名为多胞体(multivesicular body, MVB)的内吞体小室分泌而来。MVB作为外泌体的来源,可经内吞或外泌途径形成。在这一过程中,质膜表面的内吞作用或高尔基体产生的囊泡与内吞体小室的有限膜体相融合,随后向内吞体的腔隙进行内出芽而形成新的囊泡。运输所需的内吞体分选复合物(endosomal sorting complex required for transport, ESCRT)与其他成分,比如脂类或四跨膜蛋白超家族成员tetraspanin,参与到内吞体相关的

这一生物起源过程中,促进MVB的形成^[8]。尽管降解型MVB随后跟溶酶体融合,导致MVB的内含物降解,分泌型MVB最后同质膜融合,向胞外空间释放外泌体。不同于外泌体的是,微泡则通过质膜向外出芽而形成,当芽体从细胞表面脱落时即释放微泡(100~1 000 nm)。最后一种情况,进行程序性死亡即凋亡的细胞可以脱落凋亡小体(800~5 000 nm),后者直接从质膜表面出芽而成^[9]。凋亡小体可能含有基因组DNA片段和组蛋白^[10]。

在肿瘤微环境中,基因组水平和表观遗传学水平高度不同的癌细胞群体同基质细胞相互作用,后者包括成纤维细胞、内皮细胞和浸润性免疫细胞。在肿瘤不断进展、胞间通讯逐渐扭曲的情况下,癌细胞会分泌EVs并影响癌症的所有标志性特征^[11]。由于微环境中的胞间通讯是相互的,从基质细胞产生的EVs可能会反向调控癌细胞的侵袭性和转移潜力。因此,准确理解正常细胞和癌细胞衍生的EVs之间的差异,包括其内含物的不同、表面特征、释放规律和其他的EVs生物学参数,对于癌症生物学和精准医学均有十分重要的意义。

2 EVs的分子组成

作为细胞释放的胞外囊泡, EVs中的内含物非常丰富。以外泌体为例,就很能说明问题。据国际数据资源库ExoCarta统计,截止到2016年3月30日,已有9 769种蛋白质、3 408种mRNA和2 838种miRNA在外泌体中相继被发现。

通过常规的蛋白分析方法如SDS-PAGE和基于多种蛋白质组学手段的研究,人们对于EVs的蛋白成分已经比较清楚。经过标准纯化步骤处理的EVs应当不含有污染物,包括与EVs没有直接关联的血清蛋白和胞内细胞器(如内质网和线粒体等)来源的物质。然而在有些情况下, EVs可能会带有内质网相关蛋白(如Rab GTPase、SNAREs、Annexins和

flotillin), 其中有的参与到MVB的生物发生过程中(如Alix和Tsg101)^[12]。

在质膜或内吞体中聚集为微型结构域的一些膜蛋白, 也会富集于EVs中。其中, 较为常见的是 tetraspanin, 该家族包括超过30个由4个跨膜结构域构成的蛋白质成员^[13]。其中的CD37、CD53、CD63、CD81和CD82首先于B细胞外泌体中发现, 这些分子可被富集至高于转铁蛋白受体100倍, 后者一般认为是质膜和早期内吞体的真正标志物^[14]。尽管富集蛋白tetraspanin的膜结构域与去污剂抵抗性脂蛋白筏有着明显不同, EVs中存在丰富的跟脂筏相关的蛋白, 包括糖基磷脂酰肌醇锚定蛋白和flotillin^[13,15]。相比于质膜, 不同细胞来源的外泌体有着高度集中的胆固醇、鞘磷脂和酸神经酰胺, 后者通过消耗卵磷脂和磷脂酰乙醇胺(脑磷脂)的方式产生^[16]。外泌体中的脂肪酸多为饱和或单不饱和脂肪酸, 与高浓度的胆固醇一起表现为在MVB形成过程中脂质的横向分离^[17]。

EVs所携带的生物成分中包括mRNA、miRNA和lncRNA, 而其中的mRNA可被受体细胞翻译成相应的蛋白质^[2]。从免疫细胞来源的具有外泌体特征的EVs可以选择性地将miRNA整合到受体细胞中^[18]。EVs中含有多种非编码RNA或其片段, 包括同蛋白编码区域重合的RNA转录本、重复序列、结构RNA、tRNA片段、拱形RNA、Y RNA和小干扰RNA^[19-21]。许多种从EVs分离到的RNA相比于来源细胞的RNA更为富集, 进一步证明RNA分子向EVs整合过程中具有一定的选择性^[20]。

最早报道EVs同细胞之间功能性互作的文献是有关prostate对于人类精细胞机动性的提升作用^[22]。过去几十年里, EVs的多种生物功能先后被发现, 但人们的共识是, EVs是机体组织内局部细胞之间或有一定空间距离的细胞之间的胞间通讯的重要载体。在本文中, 我们从多方面探讨EVs对于人类肿瘤的病理生理学影响。

3 促进肿瘤形成和生长

在肿瘤形成过程中, 不断积累的基因组和表观遗传学的突变可以组成性地激活原癌基因的表达并沉默抑癌基因。细胞的恶性转化同分泌到胞外的大量EVs有关, 后者可以促进特定癌基因在胞间转移, 如表皮生长因子受体vIII(epidermal growth

factor receptor vIII, EGFRvIII)^[23]。通过这种方式进行的癌基因表型“传递”在癌症进展过程中会影响微环境中的异质型的细胞。比如, 从癌细胞衍生的高表达野生型EGFR的外泌体可以通过向邻近的内皮细胞运送受体、激发血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和随后经由血管内皮生长因子R2(vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR2)的自分泌信号活化来诱导血管生成^[24]。同样地, 结直肠癌细胞中的组织因子(tissue factor, TF)直接将细胞的遗传状态, 如*K-ras*癌基因活化或*p53*抑癌基因功能失去性突变, 同它们的体内血管生成和生长能力相关联。有趣的是, 这种包涵TF的EVs可以调节血管生成并刺激体内的肿瘤生长, 尽管在体外条件下并不会促进癌细胞增殖^[25]。

来自恶性肿瘤的外泌体可以诱导正常细胞发生转化。比如, 将乳腺癌患者血清中的外泌体和正常的上皮细胞一起注射入小鼠, 最终诱导小鼠形成肿瘤, 而正常人来源的外泌体则不具有这种能力^[26]。前列腺癌细胞分泌的外泌体含有癌蛋白、mRNA、miRNA, 这些外泌体诱导脂肪干细胞向癌细胞进行转化^[27]。来自多发性骨髓瘤的病人的骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BM-MSCs)的外泌体含有高水平的细胞因子和黏着分子, 可以促进多发性骨髓瘤生长并有助于癌细胞向基质细胞浸润^[28]。前列腺癌细胞的EVs可以增加LNCaP和RWPE细胞系的生长、抑制衰老; 来源于另外一个前列腺癌细胞系DU145的外泌体能够增加异种移植肿瘤的体积并提高前列腺特异性抗原(prostate specific antigen, PSA)的血清水平^[29]。因而, 恶性肿瘤产生的EVs具有诱导正常细胞癌变或转化的致病潜力。

4 造成癌细胞的治疗抵抗

癌症耐药性的发生发展可以导致90%的临床患者因病灶转移而面临治疗失败和死亡^[30]。癌细胞耐药可以分为两类: 先天性和获得性。前者由癌细胞自身原先存在的因素导致, 而后者同癌细胞在药物作用下的异质性发展包括基因和表观遗传水平的变化有关^[31]。从另外一个角度理解, 癌症作为一种恶性疾病, 在体内生理条件下实现连续的发生发展需要具备一定的前提能力, 其中非常重要的一个方面便是限制或规避细胞凋亡。近年研究发现, 微环境

中的EVs能够赋予周边癌细胞抗凋亡的潜力。比如,从高度侵袭性的MDA-MB-231乳腺癌细胞和U87胶质瘤细胞产生的EVs可以赋予正常成纤维细胞和上皮细胞一系列恶性特征,包括锚定非依赖性生长和有限营养条件下的生存^[32]。这种效果的产生需要EVs介导的蛋白交联酶-组织转谷氨酰胺酶(tissue transglutaminase, tTG)以及其在EVs表面的底物纤连蛋白的二聚体化。

近期发现,耐受紫杉醇的乳腺癌细胞系MCF-7/DOC能够通过分泌富含p糖蛋白(p-glycoprotein, P-gp)的外泌体使得原先对药物敏感的细胞系MCF-7/S获得对于紫杉醇的抵抗力,而这种通过外泌体运送P-gp的方式是导致癌细胞获得性耐药的一种新机制^[33]。癌细胞衍生的外泌体还可以通过药物外排的方式,在周边微环境中“传输”药物抗性。例如,对顺铂耐受的卵巢癌细胞释放的外泌体中除了含有顺铂,还有该药的运输蛋白MRP2(ATP binding cassette subfamily C member 2)、ATP7A(ATPase copper transporting alpha)和ATP7B(ATPase copper transporting beta),后者激活受体细胞中的相关信号通路,最终导致原先对药物敏感的癌细胞变得不再敏感^[34]。来源于乳腺癌细胞的外泌体含有HER2(erb-b2 receptor tyrosine kinase 2)等蛋白质,后者可以降低受体细胞对于Trastuzumab等药物的耐受,从而造成HER2信号通路相关的乳腺癌恶性进展^[35]。同非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)放射耐受相关的血清miR-208a经外泌体运输,可以靶向受体细胞中p21并抑制癌细胞的凋亡,最终降低其放疗敏感性并加速其增殖。因而,miR-208a将来可以作为肺癌治疗的一个新靶标^[36]。

基质细胞和癌细胞利用旁分泌和邻分泌信号来驱动化疗和放疗抗性。一旦发生异质性细胞交流, EVs中的外泌体即得以从基质细胞向乳腺癌细胞中传送。外泌体中的RNA,多是一些非编码性的转录本和转座元素,可以刺激模式识别受体(pattern recognition receptor, PRR)RIG(roundabout guidance receptor),以激活STAT(signal transducer and activator of transcription)依赖性信号^[37]。基质细胞能够通过这种方式活化乳腺癌细胞的Notch3通路,通过释放外泌体来协调其同后者之间的相互对话,从而促进那些能够抵抗治疗并加速肿瘤生长的癌细胞的增殖和扩展^[38]。因此,在肿瘤药物耐受性发生发展的过

程中,微环境中的癌细胞及其周边基质细胞均发挥着显著而深远的影响。

5 重编程能量代谢

在低氧条件下,葡萄糖运输、摄取和糖酵解通路中多种酶的活性均被上调。同时,细胞代谢过程中产生的各种酸性物质开始增多,导致一种偏酸性的肿瘤微环境^[39]。为了能够在这种低pH的条件下生存,癌细胞往往上调可以纠正它们内部pH的质子泵,使得其自身能够耐受于胞外pH的变化^[40]。肿瘤的酸性化可以增长对于EVs的分泌和吸收,因而加强肿瘤内部细胞间的通讯活动^[41]。通过促进HIF(hypoxia inducible factor)依赖性的RAB22A(member 22A of RAS oncogene family)的表达,低氧增加乳腺癌细胞表面EVs的脱落;而这些EVs随即在体外提高焦点黏连和细胞侵袭活性,体内增强静脉注射后的外渗频率,在乳腺脂肪垫移植癌细胞之后促进向肺部的自发转移^[42]。因而,在低氧和酸性微环境中癌细胞的代谢变化可以提高EVs介导的胞间通讯,导致进一步的癌症侵袭和疾病进展。

癌症相关成纤维细胞(cancer-associated fibroblasts, CAFs)是多数实体瘤微环境的一种主要细胞组分,而患者体内条件下的CAF分泌的外泌体一旦被周边癌细胞摄取,能够相当显著地重编程其代谢机器。近期的一项研究表明,CAF衍生外泌体能够抑制线粒体氧化磷酸化,因而增强癌细胞的糖酵解和谷氨酰胺依赖性的还原羧化反应。而代谢组学数据证实,这种外泌体中具有完整的代谢产物,包括氨基酸、脂质、TCA循环中间物,这些物质均被癌细胞贪婪地利用于其自身的中心碳代谢并在营养缺乏和胁迫条件下造成肿瘤持续性生长^[43]。

6 提高基因组不稳定性

正常细胞在其周期循环过程中会严格地调节基因组的复制和修复,以维持细胞的遗传完整性。癌细胞基因组的不稳定性可能是被EVs所诱导,因为特定的反转录转座子RNA转录本,包括HERV(endogenous retrovirus group)、LINE1(retrotransposable element 1)和Alu元素,经常富集于肿瘤衍生EVs并可被转移至正常内皮细胞中^[44]。但是,这些EVs包装的反转录转座子是否被功能性地运输并插入到受体细胞中,至今并无定论。

在一些肿瘤中, 扩增性的染色质DNA是以一种名为“双微体”的染色体外环型片段形式而存在^[45]。这些片段缺乏着丝粒, 因而在有丝分裂中会彼此分开并在G₁期滞留在细胞质中, 随后有可能在微核中被细胞挤出胞外空间^[46]。一些文献曾报道, 癌细胞产生的EVs可以功能性地转移基因组DNA的片段, 并可以瞬时性地转化正常的上皮细胞^[47]。有趣的是, EVs运载的基因组DNA片段覆盖了整个宿主的基因组^[48]。如果是这样, EVs所介导的功能性DNA运输的机制应当比仅仅包涵双微体这一情况更加复杂。实际上, 突变型K-ras的直肠癌患者的血浆中曾发现具有类似的基因组中的癌基因转运活动, 尽管并不清楚这一现象是否被EVs所介导。

瞬时性转染的癌细胞所释放的EVs能够功能性地向受体细胞转运质粒DNA(plasmid DNA, pDNA)中的编码性报告分子, 而相应的mRNA分子在受体细胞中并不表达^[49]。因此, 这种pDNA的转移可能是由那些在基因组DNA片段中发现的相同的机制所调控。这同时表明, 对于EVs介导的pDNA和基因组DNA片段的具体机制的系统研究, 会促进我们对于经EVs中含有的DNA而发生的胞间通讯有关细节的更深层、更全面的理解。

7 重塑肿瘤微环境

在肿瘤发生发展的多步骤过程中, 基质细胞发挥着重要的作用。在很多实体瘤中, 主要的基质细胞是那些经过重编程并发生表型改变的成纤维细胞, 即上面提到过的CAFs。这种CAFs包括两种彼此迥异的细胞类型: 一种同普通成纤维细胞类似, 在微环境中为正常上皮细胞提供结构基础; 另一种是肌成纤维细胞, 通常参与到机体的伤口愈合及炎症反应中, 表达 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)。富含TGF- β (transforming growth factor-beta)的EVs可以驱动成纤维细胞分化为肌成纤维细胞, 并以 α -SMA的出现为其转化标志^[50]。

CAFs对于癌细胞的侵袭和转移可以造成多方面的影响。在肿瘤-基质相互作用中, CAFs产生的EVs能够通过Wnt-平面细胞极性(planar cell polarity, PCP)信号通路提高乳腺癌细胞的突起活性和机动性, 该过程涉及一组保守蛋白核心模块如Dvl1、Fzd6、Pk1和Vangl1^[51]。在乳腺癌小鼠模型中, 乳腺癌细胞和CAFs的共移植显著提高PCP信号和外泌体

组分CD81依赖性的转移活性, 并且乳腺癌细胞内部信号转导促进自分泌型分子Wnt11在CAFs衍生外泌体上的栓系。这些数据均表明, CAFs来源的外泌体能够调动Wnt-PCP信号活性, 导致乳腺癌细胞的高度侵袭行为^[52]。

基质细胞同乳腺癌细胞之间由EVs介导的相互对话对于癌细胞的化疗耐药性也非常重要。在基质成纤维细胞同耐药性乳腺癌细胞共培养时, 前者释放的EVs往往含有带5'三磷酸的反转录转座子RNA; 而跟非耐药性乳腺癌细胞共培养则不会有这种特征^[38]。这些反转录转座子RNA可以激活RIG-1(roundabout guidance receptor-1), 后者诱导干扰素相关的DNA损伤抗性标志基因如STAT1(signal transducer and activator of transcription 1)、ISG15(ISG15 ubiquitin-like modifier)、IFIT1(interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 1)、MX1(MX dynamin like GTPase 1)和OAS1(2'-5'-oligoadenylate synthetase 1)在治疗敏感性细胞中的上调。因此, 基质细胞能够通过生成和释放EVs的方式启用它们同癌细胞之间的信息流动来介导胁迫反应, 并使得耐药性癌细胞群体得以扩展。

8 促进癌细胞转移

癌细胞从原发位点经过局部迁移、侵袭、向血管和淋巴道内渗而进入循环系统之后, 就获得了向异位器官转移的可能。EVs可以通过散播自身携带的基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)直接促进胞外基质(extracellular matrix, ECM)的局部降解^[53-54]。不仅癌细胞衍生的EVs, CAFs释放的EVs也能刺激受体癌细胞的侵袭活性^[52]。此外, 被IL-4激活的巨噬细胞产生的外泌体, 可以将miR-233转移给共培养的乳腺癌细胞, 最终促进后者的浸润性^[55]。

有人在成纤维肉瘤模型的研究中发现, 覆盖有纤连蛋白(fibronectin, FN)-整联蛋白 α 5 β 1复合物的EVs的持续分泌, 无论在体外和体内均能直接提高前锋细胞的迁移活性^[56]。以该模型开展的研究表明, FN-整联蛋白覆盖的EVs能结合到胶原蛋白纤丝和细胞整联蛋白上、协助整联蛋白聚集并形成强的黏附状态。此外, 不同癌型产生的EVs具有不同的整联蛋白表达模式, 而这些模式可以决定器官特异性转移的发生发展。比如, 包涵 α 6 β 4和 α 6 β 1的EVs同肺转移相关, 而 α v β 5在EVs上的表达则关系到肝转

移^[57]。靶向 $\alpha 6\beta 4$ 和 $\alpha v\beta 5$ 可以降低受体细胞对外泌体的吸收以及相应的肺转移或肝转移效率。特别地, 宿主细胞对于外泌体的摄取能够激活Src磷酸化和前炎症因子*SI100*基因的表达, 而外泌体上整联蛋白的组成类型或许可在临床中用于预测器官依赖型癌细胞转移的概率^[57]。

癌细胞释放的EVs可以改变周边和远处非癌细胞的生理状态, 间接造成癌细胞的扩散和生长(如激发血管通透性或调整异位器官转移前位点的局部环境)^[58-59]。例如, 癌细胞能够通过分泌含有高水平miR-122的EVs, 抑制转移前位点非癌细胞的葡萄糖吸收, 从而增加远端器官微龕(niche)处的可获取能量的供给; 癌细胞释放的EVs通过特定microRNA重编程转移前微环境中细胞糖类代谢, 最终可以促进疾病发展^[60]。因而, 在形成转移前微环境的过程中, EVs发挥着相对隐匿但非常关键的作用。高度侵袭性的黑色素瘤细胞释放的EVs能通过将骨髓前体细胞重塑至前血管样细胞状态而提高原发癌的恶性程度^[61]。含有巨噬细胞迁移抑制因子(migration inhibitory factor, MIF)的胰腺癌细胞产生的EVs诱导肝脏Kupffer细胞分泌TGF- β , 导致肝脏星形细胞活化和胞外基质重塑。这种微环境的重编程显著促进骨髓衍生巨噬细胞的大量浸润, 为胰腺癌细胞向肝脏转移提供了有利的微龕^[59]。

9 诱导血管生成

在实体瘤连续生长的条件下, 距离血管最远的那些细胞往往处于营养缺陷, 低氧胁迫或完全坏死的状态中。新生血管的生成通常可以归因于微环境多种细胞分泌的前血管生成因子如VEGF(vascular endothelial growth factor), 后者可以刺激临近的内皮细胞并从骨髓中招募肥大细胞和巨噬细胞^[62]。然而, 这一过程中经常会有EVs参与。文中已经提到过, 癌细胞释放的那些含EGFRvIII的EVs可以诱导内皮细胞自分泌VEGF所导致的VEGFR活化以及随后的新生血管生成^[24]。从高度恶性多形性成胶质细胞瘤(glioblastoma multiforme, GBM)患者的血浆中分离到的EVs蛋白和/或mRNA具有可以反映这些肿瘤相关的低氧状态和侵袭特征的分泌标记; 而低氧条件下GBM细胞释放的EVs能够激活周边内皮细胞使其分泌那些激发周细胞中PI3K/Akt信号通路并加速新生血管生成和肿瘤生长相关外泌因子的合成^[63]。

癌细胞主要通过调节血管生成、代谢重塑、侵袭和转移的HIF信号活动, 最终适应低氧环境。在爱泼斯坦-巴尔病毒(Epstein-Barr virus, EBV)感染后的鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)细胞中曾发现过有关EVs介导的HIF-1 α 表达的新型机制。EBV的主要癌蛋白LMP1(PDZ and LIM domain 7)同tetraspanin蛋白CD63向EVs中的运送有关, 通过提高在感染后的类成淋巴细胞系(lymphoblastoid cell line, LCLs)中内吞体-外泌体通路的运输来限制下游NF- κ B1(nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1)的活化^[64]。通过NPC细胞衍生的EVs, LMP1可以被定向输送到基质细胞中^[65]。此外, 这些LMP1阳性的EVs包涵HIF-1 α , 并活跃地将其运送到LMP1阴性细胞中, 导致其上皮-间质转换(epithelial-mesenchymal transition, EMT)^[66]。这些研究结果证实, 人类肿瘤病毒不仅能够将EVs用于胞间通讯, 而多种活性转录因子也能通过EVs转运到临近细胞从而控制基质细胞中靶基因的表达、最终改变肿瘤微环境。

10 逃逸免疫监控

在体内, 虽然免疫系统在肿瘤发生的早期通过识别、监控和清除癌变细胞来限制疾病发展, 但这些防御机制大多逐渐被关闭, 如癌细胞中包括PD-L1在内的T细胞抑制性信号, 往往促进免疫检查点的形成^[67]。除此之外, 一些免疫逃脱性行为的替代机制, 往往涉及癌细胞活跃释放的免疫抑制性EVs。比如, 有人发现, EVs是能够协助抑制对肿瘤免疫反应的调节子^[68-69]。特别地, 从人类黑色素瘤或结直肠癌细胞衍生的EVs约束单核细胞向树突细胞(dendritic cells, DCs)的分化并诱导一种分泌TGF- β 的MDSC(myeloid-derived suppressor cell)亚群^[70]。研究表明, 肿瘤衍生的EVs含有Fas配体, 后者可以诱导活化的抗肿瘤细胞毒T淋巴细胞(cytotoxic T lymphocytes, CTLs)的凋亡并降低自然杀伤(natural killer, NK)细胞的毒性^[68-69]。

11 结论与展望

EVs就像是宇宙中穿梭在各星球之间的飞船, 它携带着自己星球的信息, 飞向目的星球, 传达信息, 发挥作用。作为现实世界里有机体胞间通讯的一种载体, EVs不仅在细胞培养条件下检测得到, 更

在机体的体液中含有丰富。EVs携带着多种具有病理生理学意义的生物标记,包括但不限于癌基因、突变的抑癌基因、低氧相关分子、血管生成因子、免疫调节蛋白、胆固醇、鞘磷脂、酸神经酰胺、非编码RNA以及各种细胞代谢中间物和/或产物。近年来, EVs研究领域的迅速发展,已经吸引了大量的科学家和临床工作者,尤其那些在癌症生物学方面的学者更是希望能深入探索、发现和验证EVs的一些已知和未知的功能。但是,有关EVs的术语、标准化分离和亚型成分的定义尚有待确认、建立和完善。特别地,准确、高效而标准化的纯化方法对于临床背景下以EVs为生物标记物、疫苗和药物递送手段的研发,逐渐成为医学界和药学界探讨的热点。通过澄清和解决这些科学问题或技术屏障,我们期待着有关EVs的生物医学研究能够提供更丰富、更准确的信息,为将来精准医学的发展带来一系列有益的科学线索、提供重要的理论导向。

参考文献 (References)

- Rak J. Extracellular vesicles-biomarkers and effectors of the cellular interactome in cancer. *Front Pharmacol* 2013; 4: 21.
- Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol* 2013; 200(4): 373-83.
- Barteneva NS, Fasler-Kan E, Bernimoulin M, Stern JN, Ponomarev ED, Duckett L, *et al.* Circulating microparticles: Square the circle. *BMC Cell Biol* 2013; 14: 23.
- EL Andaloussi S, Mager I, Breakefield XO, Wood MJ. Extracellular vesicles: Biology and emerging therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov* 2013; 12(5): 347-57.
- Jia S, Zocco D, Samuels ML, Chou MF, Chammas R, Skog J, *et al.* Emerging technologies in extracellular vesicle-based molecular diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn* 2014; 14(3): 307-21.
- Melo SA, Luecke LB, Kahlert C, Fernandez AF, Gammon ST, Kaye J, *et al.* Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer. *Nature* 2015; 523(7559): 177-82.
- Johnstone RM, Adam M, Hammond JR, Orr L, Turbide C. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J Biol Chem* 1987; 262(19): 9412-20.
- Lo Cicero A, Stahl PD, Raposo G. Extracellular vesicles shuffling intercellular messages: For good or for bad. *Curr Opin Cell Biol* 2015; 35: 69-77.
- Budnik V, Ruiz-Canada C, Wendler F. Extracellular vesicles round off communication in the nervous system. *Nat Rev Neurosci* 2016; 17(3): 160-72.
- Kanada M, Bachmann MH, Contag CH. Signaling by extracellular vesicles advances cancer hallmarks. *Trends in Cancer* 2016; 2(2): 84-94.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144(5): 646-74.
- van Niel G, Porto-Carreiro I, Simoes S, Raposo G. Exosomes: A common pathway for a specialized function. *J Biochem* 2006; 140(1): 13-21.
- Hemler ME. Targeting of tetraspanin proteins--potential benefits and strategies. *Nat Rev Drug Discov* 2008; 7(9): 747-58.
- Escola JM, Kleijmeer MJ, Stoorvogel W, Griffith JM, Yoshie O, Geuze HJ. Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes. *J Biol Chem* 1998; 273(32): 20121-7.
- Wubbolts R, Leckie RS, Veenhuizen PT, Schwarzmann G, Mobius W, Hoernschemeyer J, *et al.* Proteomic and biochemical analyses of human B cell-derived exosomes. Potential implications for their function and multivesicular body formation. *J Biol Chem* 2003; 278(13): 10963-72.
- Phuyal S, Hessvik NP, Skotland T, Sandvig K, Llorente A. Regulation of exosome release by glycosphingolipids and flotillins. *FEBS J* 2014; 281(9): 2214-27.
- Hirsova P, Ibrahim SH, Krishnan A, Verma VK, Bronk SF, Werneburg NW, *et al.* Lipid-induced signaling causes release of inflammatory extracellular vesicles from hepatocytes. *Gastroenterology* 2016; 150(4): 956-67.
- Montecalvo A, Larregina AT, Shufesky WJ, Stolz DB, Sullivan ML, Karlsson JM, *et al.* Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes. *Blood* 2012; 119(3): 756-66.
- Bellingham SA, Coleman BM, Hill AF. Small RNA deep sequencing reveals a distinct miRNA signature released in exosomes from prion-infected neuronal cells. *Nucleic Acids Res* 2012; 40(21): 10937-49.
- Nolte-t Hoen EN, Buermans HP, Waasdorp M, Stoorvogel W, Wauben MH, 't Hoen PA. Deep sequencing of RNA from immune cell-derived vesicles uncovers the selective incorporation of small non-coding RNA biotypes with potential regulatory functions. *Nucleic Acids Res* 2012; 40(18): 9272-85.
- Sharma U, Conine CC, Shea JM, Boskovic A, Derr AG, Bing XY, *et al.* Biogenesis and function of tRNA fragments during sperm maturation and fertilization in mammals. *Science* 2016; 351(6271): 391-6.
- Stegmayr B, Ronquist G. Promotive effect on human sperm progressive motility by prostasomes. *Urol Res* 1982; 10(5): 253-7.
- Al-Nedawi K, Meehan B, Micallef J, Lhotak V, May L, Guha A, *et al.* Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nat Cell Biol* 2008; 10(5): 619-U24.
- Al-Nedawi K, Meehan B, Kerbel RS, Allison AC, Rak J. Endothelial expression of autocrine VEGF upon the uptake of tumor-derived microvesicles containing oncogenic EGFR. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106(10): 3794-9.
- Yu JL, May L, Lhotak V, Shahrzad S, Shirasawa S, Weitz JI, *et al.* Oncogenic events regulate tissue factor expression in colorectal cancer cells: Implications for tumor progression and angiogenesis. *Blood* 2005; 105(4): 1734-41.
- Thomas LM, Salter RD. Activation of macrophages by P2X7-induced microvesicles from myeloid cells is mediated by

- phospholipids and is partially dependent on TLR4. *J Immunol* 2010; 185(6): 3740-9.
- 27 Abd Elmageed ZY, Yang Y, Thomas R, Ranjan M, Mondal D, Moroz K, *et al.* Neoplastic reprogramming of patient-derived adipose stem cells by prostate cancer cell-associated exosomes. *Stem Cells* 2014; 32(4): 983-97.
- 28 Roccaro AM, Sacco A, Maiso P, Azab AK, Tai YT, Reagan M, *et al.* BM mesenchymal stromal cell-derived exosomes facilitate multiple myeloma progression. *J Clin Invest* 2013; 123(4): 1542-55.
- 29 Hosseini-Beheshti E, Choi W, Weiswald LB, Kharmate G, Ghaffari M, Roshan-Moniri M, *et al.* Exosomes confer pro-survival signals to alter the phenotype of prostate cells in their surrounding environment. *Oncotarget* 2016; doi: 10.18632/oncotarget.7052.
- 30 Longley DB, Johnston PG. Molecular mechanisms of drug resistance. *J Pathol* 2005; 205(2): 275-92.
- 31 Holohan C, van Schaeybroeck S, Longley DB, Johnston PG. Cancer drug resistance: An evolving paradigm. *Nat Rev Cancer* 2013; 13(10): 714-26.
- 32 Antonyak MA, Li B, Boroughs LK, Johnson JL, Druso JE, Bryant KL, *et al.* Cancer cell-derived microvesicles induce transformation by transferring tissue transglutaminase and fibronectin to recipient cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108(12): 4852-7.
- 33 Lv MM, Zhu XY, Chen WX, Zhong SL, Hu Q, Ma TF, *et al.* Exosomes mediate drug resistance transfer in MCF-7 breast cancer cells and a probable mechanism is delivery of P-glycoprotein. *Tumour Biol* 2014; 35(11): 10773-9.
- 34 Safaei R, Larson BJ, Cheng TC, Gibson MA, Otani S, Naerdemann W, *et al.* Abnormal lysosomal trafficking and enhanced exosomal export of cisplatin in drug-resistant human ovarian carcinoma cells. *Mol Cancer Ther* 2005; 4(10): 1595-604.
- 35 Ciravolo V, Huber V, Ghedini GC, Venturelli E, Bianchi F, Campiglio M, *et al.* Potential role of HER2-overexpressing exosomes in countering trastuzumab-based therapy. *J Cell Physiol* 2012; 227(2): 658-67.
- 36 Tang Y, Cui Y, Li Z, Jiao Z, Zhang Y, He Y, *et al.* Radiation-induced miR-208a increases the proliferation and radioresistance by targeting p21 in human lung cancer cells. *J Exp Clin Cancer Res* 2016; 35(1): 7.
- 37 Thery C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol* 2009; 9(8): 581-93.
- 38 Boelens MC, Wu TJ, Nabet BY, Xu B, Qiu Y, Yoon T, *et al.* Exosome transfer from stromal to breast cancer cells regulates therapy resistance pathways. *Cell* 2014; 159(3): 499-513.
- 39 Pavlova NN, Thompson CB. The emerging hallmarks of cancer metabolism. *Cell Metab* 2016; 23(1): 27-47.
- 40 Ghaffari P, Mardinoglu A, Nielsen J. Cancer metabolism: A modeling perspective. *Front Physiol* 2015; 6: 382.
- 41 Parolini I, Federici C, Raggi C, Lugini L, Palleschi S, de Milito A, *et al.* Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells. *J Biol Chem* 2009; 284(49): 34211-22.
- 42 Wang T, Gilkes DM, Takano N, Xiang LS, Luo WB, Bishop CJ, *et al.* Hypoxia-inducible factors and RAB22A mediate formation of microvesicles that stimulate breast cancer invasion and metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014; 111(31): E3234-42.
- 43 Zhao H, Yang L, Baddour J, Achreja A, Bernard V, Moss T, *et al.* Tumor microenvironment derived exosomes pleiotropically modulate cancer cell metabolism. *Elife* 2016; doi: 10.7554/eLife.10250.
- 44 Balaj L, Lessard R, Dai LX, Cho YJ, Pomeroy SL, Breakefield XO, *et al.* Tumour microvesicles contain retrotransposon elements and amplified oncogene sequences. *Nat Commun* 2011; doi: 10.1038/ncomms1180.
- 45 Jin Y, Liu Z, Cao W, Ma XY, Fan YH, Yu Y, *et al.* Novel functional MAR elements of double minute chromosomes in human ovarian cells capable of enhancing gene expression. *PLoS One* 2012; 7(2): e30419.
- 46 Shimizu N. Extrachromosomal double minutes and chromosomal homogeneously staining regions as probes for chromosome research. *Cytogenet Genome Res* 2009; 124(3/4): 312-26.
- 47 Lee TH, Chennakrishnaiah S, Audemard E, Montermini L, Meehan B, Rak J. Oncogenic ras-driven cancer cell vesiculation leads to emission of double-stranded DNA capable of interacting with target cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2014; 451(2): 295-301.
- 48 Kahlert C, Melo SA, Protopopov A, Tang JB, Seth S, Koch M, *et al.* Identification of double-stranded genomic DNA spanning all chromosomes with mutated KRAS and p53 DNA in the serum exosomes of patients with pancreatic cancer. *J Biol Chem* 2014; 289(7): 3869-75.
- 49 Kanada M, Bachmann MH, Hardy JW, Frimansson DO, Bronsart L, Wang A, *et al.* Differential fates of biomolecules delivered to target cells via extracellular vesicles. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015; 112(12): E1433-42.
- 50 Webber JP, Spary LK, Sanders AJ, Chowdhury R, Jiang WG, Steadman R, *et al.* Differentiation of tumour-promoting stromal myofibroblasts by cancer exosomes. *Oncogene* 2015; 34(3): 290-302.
- 51 Gray RS, Roszko I, Solnica-Krezel L. Planar cell polarity: Coordinating morphogenetic cell behaviors with embryonic polarity. *Dev Cell* 2011; 21(1): 120-33.
- 52 Luga V, Zhang L, Vitoria-Petit AM, Ogunjimi AA, Inanlou MR, Chiu E, *et al.* Exosomes mediate stromal mobilization of autocrine Wnt-PCP signaling in breast cancer cell migration. *Cell* 2012; 151(7): 1542-56.
- 53 Yue SJ, Mu W, Erb U, Zoller M. The tetraspanins CD151 and Tspan8 are essential exosome components for the crosstalk between cancer initiating cells and their surrounding. *Oncotarget* 2015; 6(4): 2366-84.
- 54 Clancy JW, Sedgwick A, Rosse C, Muralidharan-Chari V, Raposo G, Method M, *et al.* Regulated delivery of molecular cargo to invasive tumour-derived microvesicles. *Nat Commun* 2015; 6: 6919.
- 55 Yang M, Chen J, Su F, Yu B, Su F, Lin L, *et al.* Microvesicles secreted by macrophages shuttle invasion-potentiating microRNAs into breast cancer cells. *Mol Cancer* 2011; 10: 117.
- 56 Sung BH, Ketova T, Hoshino D, Zijlstra A, Weaver AM. Directional cell movement through tissues is controlled by exosome secretion. *Nat Commun* 2015; 6: 7164.
- 57 Hoshino A, Costa-Silva B, Shen TL, Rodrigues G, Hashimoto

- A, Tesic Mark M, *et al.* Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature* 2015; 527(7578): 329-35.
- 58 Peinado H, Aleckovic M, Lavotshkin S, Matei I, Costa-Silva B, Moreno-Bueno G, *et al.* Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat Med* 2012; 18(6): 883-91.
- 59 Costa-Silva B, Aiello NM, Ocean AJ, Singh S, Zhang H, Thakur BK, *et al.* Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver. *Nat Cell Biol* 2015; 17(6): 816-26.
- 60 Fong MY, Zhou W, Liu L, Alontaga AY, Chandra M, Ashby J, *et al.* Breast-cancer-secreted miR-122 reprograms glucose metabolism in premetastatic niche to promote metastasis. *Nat Cell Biol* 2015; 17(2): 183-94.
- 61 Lesnik J, Antes T, Kim J, Griner E, Pedro L, Reproducibility Project: Cancer B, *et al.* Registered report: Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Elife* 2016; doi: 10.7554/eLife.07383.
- 62 Hu K, Babapoor-Farrokhran S, Rodrigues M, Deshpande M, Puchner B, Kashiwabuchi F, *et al.* Hypoxia-inducible factor 1 upregulation of both VEGF and ANGPTL4 is required to promote the angiogenic phenotype in uveal melanoma. *Oncotarget* 2016; 7(7): 7816-28.
- 63 Kucharzewska P, Christianson HC, Welch JE, Svensson KJ, Fredlund E, Ringner M, *et al.* Exosomes reflect the hypoxic status of glioma cells and mediate hypoxia-dependent activation of vascular cells during tumor development. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110(18): 7312-7.
- 64 Verweij FJ, van Eijndhoven MA, Hopmans ES, Vendrig T, Wurdinger T, Cahir-McFarland E, *et al.* LMP1 association with CD63 in endosomes and secretion via exosomes limits constitutive NF-kappa B activation. *EMBO J* 2011; 30(11): 2115-29.
- 65 Meckes DG, Shair KHY, Marquitz AR, Kung CP, Edwards RH, Raab-Traub N. Human tumor virus utilizes exosomes for intercellular communication. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(47): 20370-5.
- 66 Aga M, Bentz GL, Raffa S, Torrisi MR, Kondo S, Wakisaka N, *et al.* Exosomal HIF1 alpha supports invasive potential of nasopharyngeal carcinoma-associated LMP1-positive exosomes. *Oncogene* 2014; 33(37): 4613-22.
- 67 Koyama S, Akbay EA, Li YY, Herter-Sprue GS, Buczkowski KA, Richards WG, *et al.* Adaptive resistance to therapeutic PD-1 blockade is associated with upregulation of alternative immune checkpoints. *Nat Commun* 2016; doi: 10.1038/ncomms10501.
- 68 Wieckowski EU, Visus C, Szajnik M, Szczepanski MJ, Storkus WJ, Whiteside TL. Tumor-derived microvesicles promote regulatory T cell expansion and induce apoptosis in tumor-reactive activated CD8⁺ T lymphocytes. *J Immunol* 2009; 183(6): 3720-30.
- 69 Zhang HG, Grizzle WE. Exosomes and cancer: A newly described pathway of immune suppression. *Clin Cancer Res* 2011; 17(5): 959-64.
- 70 Valenti R, Huber V, Filipazzi P, Pilla L, Sovena G, Villa A, *et al.* Human tumor-released microvesicles promote the differentiation of myeloid cells with transforming growth factor-beta-mediated suppressive activity on T lymphocytes. *Cancer Res* 2006; 66(18): 9290-8.