

综述

外泌体在肿瘤转移及诊疗中的研究进展

李孟娇 王浩* 李庆伟*

(辽宁师范大学生命科学学院, 辽宁师范大学七鳃鳗研究中心, 大连 116081)

摘要 外泌体是直径为40~130 nm的纳米级囊泡结构, 其中包含大量的蛋白质、核酸和脂质等, 在细胞间物质信息传递过程中发挥重要的作用。与正常细胞相比, 肿瘤细胞释放更多的外泌体, 并且其中所包含的一系列蛋白质和核酸组分(包括miRNAs)在调节肿瘤微环境、促进肿瘤的转移侵袭过程中起到了关键的作用。该文重点介绍了由外泌体所介导的整合蛋白、表皮生长因子受体和miRNAs等分子在细胞间的转运对于肿瘤转移和侵袭的影响, 并展望了外泌体在肿瘤的诊断和治疗方面的应用前景。随着研究的深入, 通过外泌体建立有效的早期诊断体系和诊疗方案将为肿瘤的治疗提供新的思路和方法。

关键词 外泌体; 肿瘤; 转移; 诊断; 治疗

Progress of Exosomes in Tumor Metastasis and Diagnosis

Li Mengjiao, Wang Hao*, Li Qingwei*

(School of Life Science, Liaoning Normal University; Lamprey Research Center, Liaoning Normal University, Dalian 116081, China)

Abstract Exosomes are nano-scale membrane vesicles (40~130 nm in diameter) secreted by a variety of cells, which contain a large amount of proteins, nucleic acids, lipids and so on. It plays an important role in the process of intercellular communication. Compared with normal cells, cancer cells release more exosomes, which contain a series of proteins and nucleic acid components (including microRNAs) involved in the regulation of tumor micro-environment and promoting tumor invasion and metastasis. Here, we focus on the functions of integrin, EGFR, microRNAs and other molecular cargoes mediated by exosomes derived from cancer cells on cancer invasion and metastasis. Then we introduced the application perspective of exosomes in the diagnosis and treatment of cancer. The breakthrough in an emerging role of cancer cells-derived exosomes will promote development of novel approaches for effective early diagnosis and therapeutic strategies of cancer.

Keywords exosomes; cancer; metastasis; diagnosis; therapy

外泌体(exosomes)是一种由多种细胞所分泌的、直径为40~130 nm的亚细胞囊泡结构, 电子显微镜下呈球状或杯状^[1]。其源于细胞内的早期胞内体

(early endosome), 胞内体向内出芽形成多囊泡胞内体(multivesicular endosome, MVE), 后者与细胞膜融合从而将小囊泡释放到细胞外, 形成外泌体。一系

收稿日期: 2015-12-23 接受日期: 2016-04-01

辽宁师范大学青年科研项目(批准号: LS2014L011)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0411-85827065, E-mail: haow_6@hotmail.com; Tel: 0411-85827099, E-mail: liqw@263.net

Received: December 23, 2015 Accepted: April 1, 2016

This work was supported by Youth foundation of Liaoning Normal University (Grant No.LS2014L011)

*Corresponding authors. Tel: +86-411-85827065, E-mail: haow_6@hotmail.com; Tel: +86-411-85827099, E-mail: liqw@263.net

网络出版时间: 2016-05-31 13:48:20 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20160531.1348.006.html>

列对外泌体的组分分析表明, 外泌体中包含大量的蛋白质、核酸和脂质等, 其中一部分是外泌体所共有的普遍性组分, 而另一部分则是根据外泌体来源的不同而特有的组分。无论是哪种成分, 在外泌体介导的细胞间物质信息交流的过程中都起到了关键作用。例如, 抗原呈递细胞通过释放带有组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)分子以及特异性抗原的外泌体, 从而激活T淋巴细胞发挥免疫功能^[2]; 间充质细胞来源的外泌体则含有miR-301、miR-1et-7a与miR-22等免疫相关miRNA, 从而有效地抑制免疫炎症反应, 促进损伤细胞的修复^[3]。

肿瘤是目前仅次于心脑血管疾病而影响人类健康的另一大杀手, 局部的浸润和远距离的转移是恶性肿瘤最重要的特点, 并且这也是肿瘤致人死亡的主要原因。已有大量研究发现, 与正常细胞相比,

肿瘤细胞释放更多的外泌体来调节肿瘤微环境^[4], 避免免疫系统的杀伤, 增强肿瘤细胞的耐药性^[5]。近年来, 随着对外泌体功能研究的深入, 在肿瘤来源的外泌体中发现了一系列蛋白质和miRNAs, 这些成分在促进肿瘤的浸润和转移过程中起到了关键的作用(表1)。同时, 这一发现也为开发肿瘤诊断与治疗的新方法提供了重要的理论基础。

1 外泌体蛋白质促进肿瘤的转移

1.1 整合蛋白家族

根据Vesiclep数据库显示, 外泌体以及各种胞外囊泡中大约包含92 897种蛋白质, 而肿瘤细胞来源的外泌体中, 整合蛋白家族的种类最多。整合蛋白作为细胞与细胞外基质相互作用的纽带, 是肿瘤细胞实现细胞之间或细胞与胞外基质之间黏附的

表1 不同来源外泌体中蛋白质和miRNAs在肿瘤侵袭转移中的作用

外泌体成分 Composition of exosomes	外泌体来源 Origin of exosomes	功能 Functions	参考文献 References
Integrin	Prostatic cancer Bladder cancer	Promote migration and invasion of cancer cells	[6-8]
EGFRvIII	Glioma cells Nonsmall-cell lung cancer Breast cancer	Promote progression and metastasis of cancer cells	[9-12]
KIT	Gastrointestinal stromal tumor	Increase tumor invasiveness	[13]
TGF- β	Gastric cancer	Promote angiogenesis and invasion of cancer cells	[14]
HIF-1 α	Nasopharyngeal carcinoma (NPC) (EBV-positive)	Promote migration and invasion of cancer cells	[15]
MET	Melanoma cells	Promote tumor growth and metastasis	[16]
Survivin	Breast cancer Lung cancer Prostatic cancer	Promote proliferation of cancer cells	[17-18]
LRG1	Nonsmall-cell lung cancer	Promote tumor angiogenesis	[19]
miR-21	Lung cancer Esophageal cancer Breast cancer	Promote migration and proliferation of cancer cells	[20-22]
miR-125b	Prostatic cancer	Induced tumor transformation	[23]
miR-92a	Leukemia cell (K562)	Promote the migration of vascular endothelial cells and the formation of the lumen.	[24]
miR-10b	Breast cancer	Promote migration and invasion of cancer cells	[25]
miR-9	Lung cancer Pancreatic cancer Melanoma	Promote migration of endothelial cells and tumor angiogenesis	[26]
miR-223	Breast cancer	Promote invasion of cancer cells	[27]

重要受体^[28]。研究发现,整合蛋白可以从两个方面参与肿瘤细胞的侵袭和转移。一方面,整合蛋白有助于肿瘤细胞黏附细胞外基质,使同质性黏附降低,异质性黏附增加^[29],从而为肿瘤细胞的侵袭提供牵引力。另一方面,整合蛋白可以激活受体细胞内下游的信号通路^[30]。例如,整合素蛋白 $\alpha v\beta 6$ -ERK2通路可调控金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)的表达,促进肠癌的侵袭和转移^[31]。为了阐明整合素蛋白与肿瘤浸润的关系, Bijnscorp等^[6]分别选取两种转移能力不同的前列腺癌细胞LNCaP和PC3(转移能力PC3大于LNCaP)与不具有转移能力的前列腺细胞prEC分别共培养,发现与PC3细胞共培养后, prEC细胞的侵袭转移能力发生了明显的增强。作者进一步对不同细胞来源的外泌体以及分泌蛋白质进行了蛋白质组分析,发现与LNCaP相比, PC3来源的外泌体中大约有57种蛋白质含量相对较高,其中整合素蛋白家族的ITGA3(integrin $\alpha 3$)和ITGB1(integrin $\beta 1$)对于受体细胞prEC侵袭转移能力的增强发挥了重要作用,说明由外泌体所介导的整合素蛋白的转运能促进受体细胞的侵袭和转移。Fedele等^[7]同样以前列腺癌细胞为实验材料,证明在前列腺癌细胞中整合蛋白 $\alpha v\beta 6$ 被主动地包装进入到外泌体中,并通过外泌体转移到 $\alpha v\beta 6$ 阴性受体细胞中,并最终定位在受体细胞表面。因此,外泌体通过介导整合蛋白在细胞间水平传播,以旁分泌的方式促进了 $\alpha v\beta 6$ 阴性前列腺癌细胞的迁移(图1)。此外,在前列腺癌对紫杉烷耐药的研究中, Kawakami等^[32]通过对前列腺癌紫杉烷耐药性患者外泌体进行蛋白质组学分析发现,整合蛋白 $\beta 4$ 和黏着斑蛋白(vinculin, VCL)含量相对较高,而将耐药细胞中编码这两种蛋白的基因沉默后,患者紫杉烷耐药性并不会发生改变,而前列腺癌细胞的侵袭和转移能力却得到了明显的抑制。这一发现进一步证明,由外泌体介导的整合蛋白细胞间转运能有效促进肿瘤细胞的侵袭和转移。

除了能有效地促进肿瘤细胞的转移外,最新研究发现,肿瘤细胞来源外泌体中的整合蛋白的不同类型还能够决定恶性肿瘤的靶向转移方向,即在原发性肿瘤转移之前,其释放的外泌体先转移至靶器官,改变肿瘤定植的“土壤”环境,从而为肿瘤的转移

做好准备。Hoshino等^[33]对不同来源的肿瘤外泌体中大约1 000种蛋白质进行了分析,最终将注意力集中在整合蛋白家族,发现不同肿瘤细胞来源的外泌体表面的整合蛋白不同,其中整合蛋白 $\alpha 6\beta 4$ 和 $\alpha 6\beta 1$ 在肺转移中发挥了关键作用,而整合蛋白 $\alpha v\beta 5$ 则在肝转移中起作用(图1)。携带整合蛋白的外泌体被吸收后,除了增强受体细胞的黏附作用外,还能激活其Src磷酸化并上调促炎基因*S100*的表达,从而促进肿瘤的转移。总之,由外泌体介导的整合蛋白在细胞间的运输与肿瘤细胞的侵袭和转移密切相关,这一发现为以整合蛋白为靶点的抗肿瘤药物研究提供了新的方向。

1.2 表皮生长因子受体

在外泌体的蛋白质组分中除了整合蛋白外,表皮生长因子受体(epithelial growth factor receptor, EGFR)对于肿瘤的入侵和转移同样具有重要的作用。EGFR是一种广泛存在于人类各组织细胞膜上的多功能糖蛋白跨膜受体,受体与配体结合后,诱导受体发生二聚化,二聚体受体发生交联磷酸化,从而激发下一级信号转导。已有大量研究证明,EGFR的过表达是引起肿瘤细胞过度增殖的重要原因^[34]。EGFR突变体普遍存在于很多恶性肿瘤细胞表面,例如,胶质瘤细胞^[9-10]、非小细胞肺癌(non-small-cell carcinoma, NSCLC)^[11]、乳腺癌^[12]、前列腺癌和卵巢癌等。其中,EGFRvIII(the type III EGF deletion mutant receptor)是一种非配体依赖的可自身持续磷酸化的EGFR突变类型,其本身不能与配体结合,即可产生持续的激活信号,因此,EGFRvIII突变体能使细胞发生早期转移,导致细胞向恶性转化^[35]。研究发现,外泌体作为细胞间信息交换的载体,介导表皮生长因子EGFR、miR-520g等在细胞间传递,从而促进肿瘤细胞的生长、侵袭以及血管的生成等^[36]。Al-Nedawi等^[9]发现,该种EGFRvIII突变体在人类胶质瘤中的一部分细胞过度表达,而在外泌体这一载体的介导下,该突变体可从EGFRvIII阳性胶质瘤细胞运输到阴性细胞内,从而诱导受体细胞内Akt、MAPK(mitogen-activated protein kinase)等肿瘤转移相关信号通路的激活以及抗凋亡基因的过表达,促进肿瘤的恶化和转移(图1)。Skog等^[10]同样从胶质母细胞瘤患者血清中检测到含有EGFRvIII的外泌体,

证明该种外泌体能促进人神经胶质瘤细胞系的增殖。乳腺癌MDA-MB-231细胞分泌的外泌体也携带有EGFR, 该种外泌体被血管内皮细胞吸收后, 能够促进血管的新生, 从而促进癌细胞的转移^[37]。除了能够直接促进肿瘤细胞的侵袭和转移外, 携带EGFR的外泌体还可以通过诱导免疫抑制性细胞来促进肿瘤细胞的生长(图1)。黄邵洪等^[38]通过实验发现, 非小细胞肺癌来源的携带EGFR的外泌体被树突状细胞捕获后, 导致树突状细胞产生免疫耐受分子吲哚胺-2,3-双加氧酶(indoleamine 2,3-dioxygenase, IDO), 从而诱导辅助T细胞产生免疫耐受, 导致肿瘤免疫逃逸。

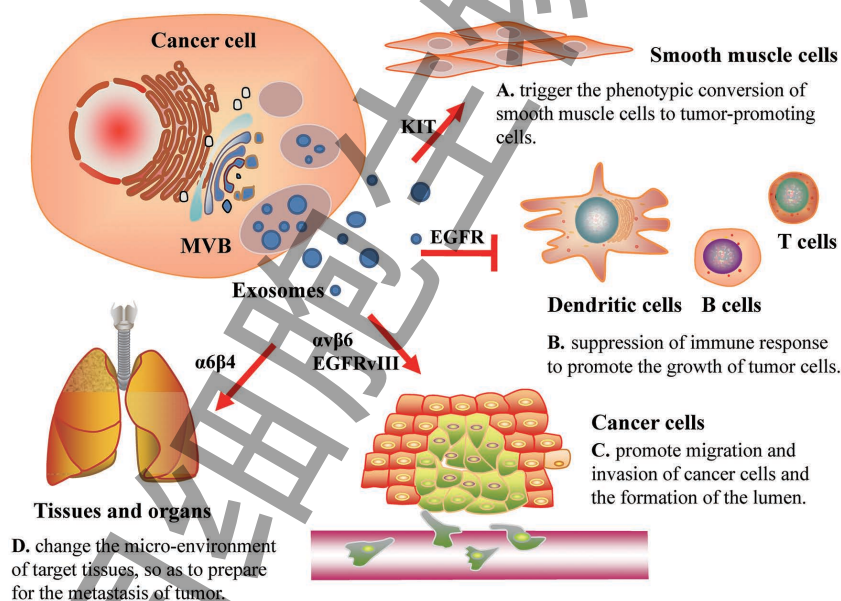
1.3 其他蛋白质

在肿瘤的发生过程中, 肿瘤细胞与周围基质细胞间的相互作用不断地变化。Atay等^[13]研究表明, 胃肠道间质瘤(gastrointestinal stromal tumors, GIST)

细胞所释放的外泌体包含致癌蛋白酪氨酸激酶(protein tyrosine kinase, KIT), 该外泌体被其周围平滑肌细胞吸收后, 使前体平滑肌细胞发生形态学改变, 并获得肿瘤相关表型, 包括增强与胞外基质蛋白的黏附、下游信号通路的激活以及多种基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)的释放, 从而增加胃肠道间质瘤的浸润性(图1)。

成肌纤维的活化也是肿瘤发展必不可少的, 其中TGF- β 1(transforming growth factor- β 1)起到了关键的作用。Gu等^[14]发现, 由前列腺癌细胞所分泌的携带TGF- β 1外泌体, 进入受体细胞——成纤维细胞后, 触发TGF- β 1依赖的成纤维细胞分化, 促进血管的形成和肿瘤的生长。

此外, 由鼻咽癌(carcinoma of nasopharynx, NPC)细胞(EBV阳性)所分泌的外泌体含有HIF-1蛋白, 被鼻咽癌细胞(EBV阴性)摄取后, 促进了肿瘤细胞的转



A: 肿瘤来源的外泌体进入平滑肌细胞后, 外泌体携带的KIT分子诱导平滑肌细胞转化为促肿瘤细胞, 从而增加肿瘤细胞的浸润性; B: 肿瘤来源的携带EGFR的外泌体被树突状细胞捕获后, 导致后者产生免疫耐受分子, 从而诱导辅助T细胞产生免疫耐受, 导致肿瘤免疫逃逸; C: 与非恶性肿瘤细胞相比, 恶性肿瘤来源的外泌体中 α 6 β 4、EGFRvIII等蛋白含量相对较高, 被非恶性肿瘤细胞捕获后, 促进后者的侵袭和转移; D: 在原发性肿瘤转移之前, 其释放的携带整合蛋白 α 6 β 4的外泌体先转移至靶器官, 改变肿瘤定植的“土壤”环境, 从而为肿瘤的转移做好准备。

A: exosomes derived from cancer cells were captured by the smooth muscle cells, KIT associated with exosomes induced the phenotypic conversion of smooth muscle cells to tumor-promoting cells, which promoted tumor invasion; B: exosomes with EGFR derived from cancer cells were captured by dendritic cells and promoted the dendritic cells to express immune tolerance-related molecules, which then induced the immune tolerance of helper T cells, leading to cancer immune escape; C: compared with non-malignant cancer cells, the α 6 β 4 and EGFRvIII were relatively higher in exosomes derived from malignant cancer cells, which were captured by non-malignant cancer cells and promoted the metastasis and invasion of non-malignant cancer cells; D: prior to the metastasis of cancer cells, the exosomes with integrin α 6 β 4 first transferred to the recipient organ-specific cells, which changed the “soil” so as to prepare the pre-metastatic niche.

图1 肿瘤来源的外泌体在侵袭转移中的作用

Fig.1 The role of exosomes derived from cancer cells in metastasis and invasion

移和侵袭^[15]。由黑色素瘤细胞分泌的MET蛋白质在外泌体的介导下进入到骨髓干细胞后,促进了肿瘤细胞的生长和转移^[16]。由宫颈癌细胞分泌的携带生存素(survivin)的外泌体则能够有效地抑制由基因毒性应激诱导的细胞凋亡,促进细胞增殖^[17-18]。

2 外泌体miRNAs促进肿瘤的转移

miRNAs是一类由内源基因编码的长度为19~22个核苷酸的非编码单链RNA分子,参与基因表达的调控,在大多数类型肿瘤细胞中异常表达。有研究表明,外泌体能介导miRNAs在细胞间的转移和传递,保护其免遭RNase的降解。当携带特异miRNAs的外泌体被受体细胞摄取后,一方面,miRNAs在受体细胞内参与基因表达的调控^[39];另一方面,miRNAs可直接与某些蛋白质相互作用,从而干扰蛋白质的功能^[40]。

在众多已知的miRNAs中,miR-21由于其在多种恶性肿瘤(例如肝癌^[41]、卵巢癌^[42]、食管癌^[20]等)中表达上调,并且其表达水平与肿瘤的侵袭、转移能力密切相关,吸引了研究者的关注。Fabbri等^[21]发现,与HEK-293细胞系相比,肺癌细胞SK-MES所分泌的外泌体中miR-21的表达量明显偏高,并且当该外泌体被受体细胞摄取后,miR-21能作为配体与Toll样受体(Toll-like receptor, TLR)结合,诱导TLR介导的促转移炎症反应(TLR-mediated prometastatic inflammatory response),最终导致肿瘤的生长和转移。因此,由外泌体转运的miR-21作为TLR的旁分泌配体,是肿瘤微环境调控的关键因素。同样以肺癌细胞为实验材料,Liu等^[22]研究发现,携带miR-21的外泌体进入受体细胞后能导致STAT3(signal transducer and activator of transcription 3)的活化,从而上调受体细胞内血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的表达水平,促进细胞的恶化转移和血管的生成,这一发现为肺癌的治疗提供了新的视角。而在食管癌的研究中,Tanaka等^[20]成功从患者血清中分离纯化得到外泌体,发现与良性患者相比,恶性患者来源的外泌体中表达更多的miR-21,并且miR-21阳性外泌体能够诱导食管癌细胞的增殖,与肿瘤的进展和侵袭呈正相关。

除了miR-21外,miR-125b^[23]、miR-92a^[24]、miR-

10b^[25]、miR-9^[26]、miR-223^[27]等对于肿瘤的侵袭和转移同样具有重要的作用。已知肿瘤的发展过程中,骨髓间充质干细胞常被招募到肿瘤部位,但其在肿瘤生长和疾病进展中的功能仍然未知。Abd Elmageed等^[23]发现,前列腺癌细胞可以诱导其周围脂肪细胞来源的干细胞募集并发生肿瘤性转化。而在这一过程中,肿瘤细胞来源的外泌体中miR-125b、miR-130b等致癌性miRNAs发挥了重要的作用。Umezumi等^[24]以白血病细胞K562为实验材料,发现其释放的含有miR-92a的外泌体不但能被人脐静脉内皮细胞吸收,还能增强血管内皮细胞的迁移和管腔的形成。为了进一步探究外泌体miRNAs与肿瘤转移间的关系,Singh等^[25]对乳腺癌来源的外泌体进行了分析,发现与非转移型乳腺癌相比,恶性乳腺癌细胞系MDA-MB-231所分泌的外泌体中miR-10b的表达量明显偏高,而当该种外泌体被非转移型乳腺癌细胞摄取后,miR-10b能抑制一系列靶基因[例如HOXD10(homeobox D10)和KLF4(Kruppel-like factor 4)]的表达,从而导致非转移型乳腺癌细胞侵袭转移能力的增强。

3 外泌体在肿瘤诊断与治疗中的应用前景

外泌体作为肿瘤细胞间信息交流的载体,其中所携带的一些特异性蛋白质以及核酸成分等为肿瘤的诊断和治疗提供了新的靶标。

3.1 外泌体在肿瘤诊断中的应用前景

在非小细胞肺癌的研究中,Rabinowits等^[43]发现,肺癌患者与未患病对照组之间的总体miRNAs水平存在显著差异,且患者循环系统中的外泌体与肿瘤细胞释放的外泌体之间,其miRNAs组分具有很强的相似性,表明循环系统中外泌体包含的miRNAs有望成为肺癌筛查的分子标志。此外,Li等^[19]发现,富亮氨酸 α -2糖蛋白1(leucine-rich α -2-glycoprotein 1, LRG1)在非小细胞肺癌患者尿液外泌体以及肺组织中表达水平均较高,说明外泌体中的LRG1可作为非小细胞肺癌的诊断标记物。

在前列腺癌的研究中,血液来源的游离外泌体中miRNA-375与miRNA-141是判断前列腺癌进展最明显的标志^[44]。最近,Işın等^[45]通过对前列腺癌患者与良性前列腺增生患者外泌体核酸成分进行比

较,发现LincRNA-P21水平差异显著,说明外泌体中LincRNA-P21有助于前列腺癌的诊断和预测。

通过对良性卵巢疾病患者与卵巢癌患者血液外泌体中miRNA分析比较,发现其中有8种miRNAs(miR-21、miR-141、miR-200a、miR-200b、miR-200c、miR-203、miR-205、miR-214)表达水平存在显著的差异,由于卵巢癌早期症状不明显而使患者错过最佳治疗期,因此这一发现可用于卵巢癌的早期诊断^[42]。而Li等^[46]通过对卵巢癌患者与正常女性血浆中外泌体蛋白质成分检测比较发现,claudin蛋白质在卵巢癌患者中高表达,表明claudin有望成为卵巢癌筛查的重要标志物。

胰腺导管腺癌(pancreatic ductal adenocarcinoma, PDACs)由于难以早期诊断,具有预后差、高转移的特点。Costa-Silva等^[47]发现,在发生PDACs肝转移的患者中,其肿瘤细胞来源的外泌体含有高水平的巨噬细胞迁移抑制因子(macrophage migration inhibitory factor, MIF),表明外泌体中MIF水平可能是胰腺癌发生肝转移的预后指标。此外,通过质谱分析及流式细胞术检测, Melo等^[48]发现,胰腺癌患者血液中外泌体(crExos)表面含有丰富的磷脂酰肌醇蛋白聚糖1(glypican 1, GPC1)。因此, GPC1(+)-crExos(携带GPC1的外泌体)可作为胰腺癌体外筛查和早期诊断的重要标志物。

3.2 外泌体在肿瘤治疗中的应用前景

外泌体还可以应用于肿瘤的免疫治疗,大量研究表明,肿瘤细胞所分泌的携带大量肿瘤特异性抗原的外泌体可诱导树突状细胞(dendritic cells, DCs)释放外泌体,这种外泌体负载肿瘤特异性抗原,如共刺激分子等,从而诱发抗肿瘤免疫反应^[49]。目前,这种肿瘤免疫治疗已经进入了临床试验, Mora等^[50]证明,部分非小细胞肺癌患者在应用了负载MAGE(melanoma antigens)的外泌体后,病情得到了稳定。对肝癌细胞来源外泌体的研究发现,携带热休克蛋白的外泌体可以提高肿瘤的免疫原性,并诱导自然杀伤细胞(NK细胞)的免疫应答,这一发现为研制高效的肝癌免疫疫苗提供了有价值的线索^[51]。

此外,由于肿瘤来源的外泌体在肿瘤的侵袭和转移过程中扮演了重要的角色,因此从体内循环系统中特异性地去除肿瘤外泌体已成为抑制肿瘤细胞

转移的新思路。Aethlon Medical为此专门设计了一种血液透析方法,称为适应性类透析平台技术(Aethlon ADAPT™),通过使用抗体以及亲和试剂实现肿瘤外泌体特异性的去除^[52]。由于外泌体由机体自身合成分泌,不会产生任何免疫排斥反应,并且能靶向定位到特定的组织,因此,在肿瘤的靶向治疗方面外泌体具有广泛的应用前景^[53]。然而,将外泌体普及应用于肿瘤的临床诊断与治疗还需要进一步深入研究外泌体在肿瘤发生与转移中的复杂作用。

4 外泌体在肿瘤研究中常用的技术手段

近年来,越来越多的证据表明,外泌体对于生物学以及医学研究具有重要的价值,而由于外泌体的体积与结构方面的因素,其分离纯化还存在很大的困难,目前比较常用的分离方法有差速离心法、密度梯度离心法、超滤离心法、免疫磁珠法、多聚物沉降法等。其中,差速离心法作为经典方法虽然操作简单,但分离纯度不高,并且经过多次离心对外泌体的理化性质会造成一定的影响。而免疫磁珠法、多聚物沉降法等新方法分离外泌体的产量和纯度都得到了很大程度的提高,是目前比较高效的制备外泌体的方法。

其次,此前对于肿瘤外泌体的功能研究主要在体外水平上进行,将分离纯化得到的肿瘤来源的外泌体与受体细胞共孵育,检测受体细胞的迁移、浸润以及增殖能力的变化情况。为了更准确地揭示外泌体在肿瘤转移中的生理功能,已有一系列研究深入到体内水平,例如,最近Zomer等^[54]利用携带loxP位点、Dsred与GFP荧光蛋白的转基因小鼠以及可以表达Cre重组酶的乳腺癌细胞制作了报告系统。将该肿瘤细胞植入小鼠体内后,肿瘤细胞分泌携带Cre重组酶编码mRNA的外泌体,并被靶细胞吸收。靶细胞进而翻译并表达Cre酶用于切割loxP位点之间的序列,loxP位点之间的Dsred片段的去除导致靶细胞loxP位点以外GFP蛋白的绿色荧光能被检测到。因而通过活体成像技术实时观察注射到小鼠体内的乳腺癌细胞系荧光标记的变化,能够在体内条件下实时观测到靶细胞对外泌体的摄取以及外泌体对靶细胞状态的影响。他们利用这一系统证实了在体内高转移性的MDA-MB-231细胞释放的外泌体能够被

组织远端的低转移性T47D细胞摄取,且导致受体细胞的迁移能力显著增强。

5 总结与展望

总之,肿瘤细胞来源的外泌体通过在细胞间转运一系列蛋白质和miRNAs组分,在促进肿瘤的侵袭和转移中发挥了重要的作用。外泌体研究的深入丰富了我们对肿瘤细胞间的相互作用及其内在机制的理解,为研究肿瘤的诊断和治疗新方法提供了理论基础。利用外泌体为靶标建立系统的肿瘤早期诊断方法并开发新的抗肿瘤药物与疫苗等,将有效推动肿瘤医学事业的发展。

参考文献 (References)

- Zamanian M, Fraser LM, Agbedanu PN, Harischandra H, Moorhead AR, Day TA, *et al.* Release of small RNA-containing exosome-like vesicles from the human filarial parasite *Brugia malayi*. *PLoS Negl Trop Dis* 2015; 9(9): e0004069.
- Robbins PD, Morelli AE. Regulation of immune responses by extracellular vesicles. *Nat Rev Immunol* 2014; 14(3): 195-208.
- 冯影, 卢士红, 王昕, 崔俊杰, 李雪, 杜文静, 等. 人骨髓来源间充质干细胞分泌外泌体特性研究. *中国实验血液学杂志* (Feng Ying, Lu Shihong, Wang Xin, Cui Junjie, Li Xue, Du Wenjing, *et al.* Biological characteristics of exosomes selected by human bone marrow mesenchymal stem cells. *Journal of Experimental Hematology*) 2014; 22(3): 595-9.
- Kahlert C, Kalluri R. Exosomes in tumor microenvironment influence cancer progression and metastasis. *J Mol Med (Berl)* 2013; 91(4): 431-7.
- 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.
- Bijnsdorp IV, Geldof AA, Lavaei M, Piersma SR, van Moorselaar RJ, Jimenez CR. Exosomal ITGA3 interferes with non-cancerous prostate cell functions and is increased in urine exosomes of metastatic prostate cancer patients. *J Extracell Vesicles* 2013; doi: 10.3402/jev.v2i0.22097.
- Fedele C, Singh A, Zerlanko BJ, Iozzo RV, Languino LR. The alphavbeta6 integrin is transferred intercellularly via exosomes. *J Biol Chem* 2015; 290(8): 4545-51.
- Welton JL, Khanna S, Giles PJ, Brennan P, Brewis IA, Staffurth J, *et al.* Proteomics analysis of bladder cancer exosomes. *Mol Cell Proteomics* 2010; 9(6): 1324-38.
- 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): 619-24.
- Skog J, Würdinger T, van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Sena-Esteves M, *et al.* Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol* 2008; 10(12): 1470-6.
- Yamashita T, Kamada H, Kanasaki S, Maeda Y, Nagano K, Abe Y, *et al.* Epidermal growth factor receptor localized to exosome membranes as a possible biomarker for lung cancer diagnosis. *Pharmazie* 2013; 68(12): 969-73.
- 杨永滨, 黄建霞, 宋文姬, 刘海杰, 许苗苗, 薛娟. Her2/Neu和EGFRvIII与乳腺癌发生及浸润的相关性研究. *医学研究与教育* (Yang Yongbin, Huang Jianxia, Song Yawen, Liu Haijie, Xu Miaomiao, Xue Juan. Study on the relationship between the expression of Her2/Neu and EGFRvIII and the pathogenesis of the occurring and the invasion in the breast carcinoma. *Medical Research and Education*) 2012; 29(1): 21-4.
- Atay S, Banskota S, Crow J, Sethi G, Rink L, Godwin AK. Oncogenic KIT-containing exosomes increase gastrointestinal stromal tumor cell invasion. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014; 111(2): 711-6.
- Gu J, Qian H, Shen L, Zhang X, Zhu W, Huang L, *et al.* Gastric cancer exosomes trigger differentiation of umbilical cord derived mesenchymal stem cells to carcinoma-associated fibroblasts through TGF-beta/Smad pathway. *PLoS One* 2012; 7(12): e52465.
- Aga M, Bentz GL, Raffa S, Torrisi MR, Kondo S, Wakisaka N, *et al.* Exosomal HIF1alpha supports invasive potential of nasopharyngeal carcinoma-associated LMP1-positive exosomes. *Oncogene* 2014; 33(37): 4613-22.
- Peinado H, Alečković 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.
- Khan S, Bennis HF, Wall NR. The emerging role of exosomes in survivin secretion. *Histol Histopathol* 2015; 30(1): 43-50.
- Valenzuela MM, Ferguson Bennis HR, Gonda A, Diaz Osterman CJ, Hibma A, Khan S, *et al.* Exosomes secreted from human cancer cell lines contain inhibitors of apoptosis (IAP). *Cancer Microenviron* 2015; 8(2): 65-73.
- Li Y, Zhang Y, Qiu F, Qiu Z. Proteomic identification of exosomal LRG1: A potential urinary biomarker for detecting NSCL. *Electrophoresis* 2011; 32(15): 1976-83.
- Tanaka Y, Kamohara H, Kinoshita K, Kurashige J, Ishimoto T, Iwatsuki M, *et al.* Clinical impact of serum exosomal microRNA-21 as a clinical biomarker in human esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* 2013; 119(6): 1159-67.
- Fabbri M, Paone A, Calore F, Galli R, Gaudio E, Santhanam R, *et al.* MicroRNAs bind to Toll-like receptors to induce prometastatic inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109(31): E2110-6.
- Liu Y, Luo F, Wang B, Li H, Xu Y, Liu X, *et al.* STAT3-regulated exosomal miR-21 promotes angiogenesis and is involved in neoplastic processes of transformed human bronchial epithelial cells. *Cancer Lett* 2016; 370(1): 125-35.
- 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.
- Umezumi T, Ohyashiki K, Kuroda M, Ohyashiki JH. Leukemia cell to endothelial cell communication via exosomal miRNAs. *Oncogene* 2013; 32(22): 2747-55.

- 25 Singh R, Pochampally R, Watabe K, Lu Z, Mo YY. Exosome-mediated transfer of miR-10b promotes cell invasion in breast cancer. *Mol Cancer* 2014; 13: 256.
- 26 Zhuang G, Wu X, Jiang Z, Kasman I, Yao J, Guan Y, *et al.* Tumour-secreted miR-9 promotes endothelial cell migration and angiogenesis by activating the JAK-STAT pathway. *EMBO J* 2012; 31(17): 3513-23.
- 27 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.
- 28 Yano H, Mazaki Y, Kurokawa K, Hanks SK, Matsuda M, Sabe H. Roles played by a subset of integrin signaling molecules in cadherin-based cell-cell adhesion. *J Cell Biol* 2004; 166(2): 283-95.
- 29 李娜, 张贺龙. 整合素家族与肿瘤骨转移相关性研究进展. 现代肿瘤医学(Li Na, Zhang Helong. Advances of research on relationship between integrins and neoplasms with bone metastasis. *Journal of Modern Oncology*) 2011; 19(3): 579-81.
- 30 Desgrosellier JS, Cheresh DA. Integrins in cancer: Biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer* 2010; 10(1): 9-22.
- 31 杨广运, 徐克森, 张朝阳, 王金申, 王加勇, 刘炎锋, 等. 整合素 $\alpha\beta6$ -ERK2 直接通路调控 MMP-9 分泌与结肠癌转移关系的实验研究. 中华普通外科杂志(Yang Guangyun, Xu Kesen, Zhang Chaoyang, Wang Jinshen, Wang Jiayong, Liu Yanfeng, *et al.* Integrin $\alpha\beta6$ - ERK2 binding pathway mediates both MMP-9 secretion and metastasis of colon cancer cells. *Chinese Journal of General Surgery*) 2007; 22(6): 443-5.
- 32 Kawakami K, Fujita Y, Kato T, Mizutani K, Kameyama K, Tsumoto H, *et al.* Integrin beta4 and vinculin contained in exosomes are potential markers for progression of prostate cancer associated with taxane-resistance. *Int J Oncol* 2015; 47(1): 384-90.
- 33 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.
- 34 吴健虹, 谢秋玲, 陈小佳, 洪岸. 表皮生长因子受体 EGFR 及其信号转导. 生命科学(Wu Jianhong, Xie Qiuling, Chen Xiaojia, Hong An. Epidermal growth factor receptor (EGFR) and its signal transduction. *Chinese Bulletin of Life Sciences*) 2006; 18(2): 116-22.
- 35 刘敏, 郭晓娟, 张红霞, 郭佑民, 王鹏, 段小艺. 表皮生长因子受体及 III 型突变体在食管癌的表达及意义. 中国癌症杂志(Liu Min, Guo Xiaojuan, Zhang Hongxia, Guo Youmin, Wang Peng, Duan Xiaoyi. Expression and significance of epidermal growth factor receptor and its variant III in human esophageal carcinoma. *China Oncology*) 2009; 19(10): 729-34.
- 36 D'Asti E, Garnier D, Lee TH, Montermini L, Meehan B, Rak J. Oncogenic extracellular vesicles in brain tumor progression. *Front Physiol* 2012; 3: 294.
- 37 谢莹珊, 沈宜, 隆霜, 范维柯, 姜蓉, 陈黎. 乳腺癌 MDA-MB-231 细胞源 exosomes 对血管内皮细胞 EGFR 表达的影响. 重庆医学(Xie Yingshan, Shen Yi, Long Shuang, Fan Weike, Jiang Rong, Chen Li. Effect of exosomes derived from breast cancer cell line MDA-MB-231 on EGFR expression in HUVECs. *Chongqing Medicine*) 2012; 41(26): 2694-7.
- 38 黄邵洪, 覃杰, 李响, 安军, 张军航, 荣健. 含表皮生长因子受体的外泌体诱导肿瘤特异性调节 T 细胞. 中国药理学通报(Huang Shaohong, Qin Jie, Li Yun, An Jun, Zhang Junhang, Rong Jian. Epidermal growth factor receptor-containing exosomes induce tumor-specific regulatory T cells. *Chinese Pharmacological Bulletin*) 2014; 30(8): 1090-5.
- 39 Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 2007; 9(6): 654-9.
- 40 Eiring AM, Harb JG, Neviani P, Garton C, Oaks JJ, Spizzo R, *et al.* miR-328 functions as an RNA decoy to modulate hnRNP E2 regulation of mRNA translation in leukemic blasts. *Cell* 2010; 140(5): 652-65.
- 41 Wang H, Hou L, Li A, Duan Y, Gao H, Song X. Expression of serum exosomal microRNA-21 in human hepatocellular carcinoma. *Biomed Res Int* 2014; 2014: 864894.
- 42 Taylor DD, Gercel-Taylor C. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2008; 110(1): 13-21.
- 43 Rabinowits G, Gercel-Taylor C, Day JM, Taylor DD, Kloecker GH. Exosomal microRNA: A diagnostic marker for lung cancer. *Clin Lung Cancer* 2009; 10(1): 42-6.
- 44 Brase JC, Johannes M, Schlomm T, Fälth M, Haese A, Steuber T, *et al.* Circulating miRNAs are correlated with tumor progression in prostate cancer. *Int J Cancer* 2011; 128(3): 608-16.
- 45 Işın M, Uysal E, Özgür E, Köseoğlu H, Şanlı Ö, Yücel ÖB, *et al.* Exosomal lncRNA-p21 levels may help to distinguish prostate cancer from benign disease. *Front Genet* 2015; 6: 168.
- 46 Li J, Sherman-Baust CA, Tsai-Turton M, Bristow RE, Roden RB, Morin PJ. Claudin-containing exosomes in the peripheral circulation of women with ovarian cancer. *BMC Cancer* 2009; 9: 244.
- 47 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.
- 48 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.
- 49 张敏, 张晨光, 丁卫. 外泌体及其在肿瘤诊疗中的意义. 生理科学进展(Zhang Min, Zhang Chenguang, Ding Wei. Exosome in cancer diagnosis and treatment. *Progress in Physiological Sciences*) 2014; 45(5): 372-8.
- 50 Morse MA, Garst J, Osada T, Khan S, Hobeika A, Clay TM, *et al.* A phase I study of dextran exosome immunotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer. *J Transl Med* 2005; 3(1): 9.
- 51 Lv LH, Wan YL, Lin Y, Zhang W, Yang M, Li GL, *et al.* Anti-cancer drugs cause release of exosomes with heat shock proteins from human hepatocellular carcinoma cells that elicit effective natural killer cell antitumor responses *in vitro*. *J Biol Chem* 2012; 287(19): 15874-85.
- 52 Marleau AM, Chen CS, Joyce JA, Tullis RH. Exosome removal as a therapeutic adjuvant in cancer. *J Transl Med* 2012; 10: 134.
- 53 Tickner JA, Urquhart AJ, Stephenson SA, Richard DJ, O'Byrne KJ. Functions and therapeutic roles of exosomes in cancer. *Front Oncol* 2014; 4: 127.
- 54 Zomer A, Maynard C, Verweij FJ, Kamermans A, Schäfer R, Beerling E, *et al.* *In vivo* imaging reveals extracellular vesicle-mediated phenocopying of metastatic behavior. *Cell* 2015; 161(5): 1046-57.