



康铁邦, 博士、教授、博士生导师, 国家杰出青年科学基金获得者。现任华南肿瘤学国家重点实验室副主任、PI, 中国细胞生物学学会肿瘤细胞生物学分会副会长, 中国抗癌协会肿瘤病因专业委员会副主任委员。2003年, 获德国Bielefeld大学生物化学博士学位。1998年至2008年, 一直在美国、德国从事细胞生物学、肿瘤学研究工作。2008年5月, 全职回国(中山大学“百人计划”引进人才)。已获得国家自然科学基金重点项目(3项)、“973”计划项目(2项)、国家重点研发计划(2项)。主要研究方向: 肿瘤细胞及其微环境的调控、相互作用与干预。以通讯作者身份在*Nature Cell Biol*、*Cell Res*、*J Clin Invest*、*Nat Commun*等国际主流杂志上发表论著40多篇。

## 细胞外囊泡与肿瘤

肖倍倍<sup>#</sup> 高瑛<sup>#</sup> 林雨洁 郑雪萍 陈宜林 康铁邦<sup>\*</sup>

(中山大学肿瘤防治中心, 华南肿瘤学国家重点实验室, 广州 510060)

**摘要** 细胞分泌的胞外囊泡(包括外泌体、微囊泡、凋亡小体、迁移体、retractosomes、R-EVs等)含有DNA、RNA、分泌性蛋白质、脂质、膜受体和其他类型的生物活性大分子。它在细胞的可塑性、细胞间交流和微环境重塑中起着关键作用。该文总结了细胞外囊泡的类型、形成、调节及其在肿瘤发生、转移、肿瘤免疫和靶向治疗中的作用和临床意义。

**关键词** 细胞外囊泡; 肿瘤; 细胞间交流

## Extracellular Vesicles and Cancers

XIAO Beibei<sup>#</sup>, GAO Ying<sup>#</sup>, LIN Yujie, ZHENG Xueping, CHEN Yilin, KANG Tiebang<sup>\*</sup>

(Sun Yat-sen University Cancer Center, State Key Laboratory of Oncology in South China, Guangzhou 510060, China)

**Abstract** EVs (extracellular vesicles) (including exosomes, microvesicles, apoptotic bodies, migrasomes, retractosomes, R-EVs, etc.) secreted by cells contain DNA, RNA, secreted proteins, lipids, membrane receptors and other types of bioactive macromolecules. It plays a key role in cell plasticity, intercellular communication and microenvironment modification. This review summarized the types, formation, regulation of extracellular vesicles and their roles and clinical significance in tumorigenesis, metastasis, tumor immunity and targeted therapy.

**Keywords** extracellular vesicles; cancers; intercellular communication

收稿日期: 2022-02-14 接受日期: 2022-03-15

中国博士后创新人才支持计划(批准号: BX2021394)和国家自然科学基金(批准号: 32100544)资助的课题

<sup>#</sup>共同第一作者

\*通讯作者。Tel: 020-87343183, E-mail: kangtb@sysucc.org.cn

Received: February 14, 2022 Accepted: March 15, 2022

This work was supported by the Chinese Postdoctoral Innovative Talent Support Program (Grant No. BX2021394) and the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 32100544)

<sup>#</sup>These authors contributed equally

\*Corresponding author. Tel: +86-20-87343183, E-mail: kangtb@sysucc.org.cn

从原核生物到真核生物, 所有的细胞都能释放各种类型的膜包被的囊泡, 称为细胞外囊泡(*extracellular vesicles*, EVs), 用于细胞-细胞和细胞-环境间交流。EVs最初被认为是细胞废物的载体<sup>[1]</sup>。然而, 随着研究的深入, 人们发现EVs能够装载各种货物, 包括核酸、脂质、蛋白质等, 在组织的生理调节和病理发展中充当信号运输工具。

通常来说, EVs由外泌体、微囊泡和凋亡小体组成。外泌体最初于绵羊网状细胞中发现, 并于1987年被JOHNSTONE<sup>[1]</sup>正式命名为“外泌体”<sup>[1-2]</sup>。外泌体是由内体膜内陷形成的腔内囊泡(*intraluminal vesicles*, ILVs), 随后通过内体膜与质膜融合分泌出细胞。20世纪90年代, ZITVOGEL和RAPOSO的团队<sup>[3-4]</sup>报道了由B淋巴细胞和树突状细胞分泌的外泌体能够提呈抗原, 这表明外泌体具有与免疫调节有关的潜在功能。近十年, VALADI和他的同事<sup>[5]</sup>发现, 外泌体同时含有mRNA和microRNA, 并且它们可以实现供体细胞到受体细胞间的功能性转移<sup>[5]</sup>。随后, 研究人员开始关注外泌体, 这迎来了外泌体研究的井喷时代。微囊泡是通过质膜向外出芽形成的囊泡。它们最初被认为是来自血小板的亚细胞器, 研究发现其主要在血液凝固中起作用<sup>[6-7]</sup>。近来研究人员发现, 它们参与了肿瘤细胞间致癌活性物质的转移<sup>[8]</sup>。凋亡小体是在细胞凋亡过程中释放的。它们主要是指由细胞膜起皱、内陷, 细胞质分裂、包裹形成的囊状体, 凋亡小体中含有DNA和细胞器。

近年来, 一些新的EVs亚型, 比如迁移体(*migrasomes*)、*retractosomes*和RAB22A诱导形成的EVs(RAB22A-regulated extracellular vesicles, R-EVs)被发现。清华大学俞立团队<sup>[9]</sup>在2015年首次发现并命名了*migrasome*这种新的细胞器, *migrasome*于迁移细胞在细胞尾部的收缩丝产生, 并逐渐脱离释放到细胞外环境。*Retractosomes*也是俞立团队最新发现的, 迁移细胞迁移时产生的收缩纤维断开后形成的细胞外囊泡(数据尚未正式发表)。R-EVs是我们团队新发现的一种细胞外囊泡, 由RAB22A诱导形成的非经典自噬和RAB22A阳性的早期内体在细胞内融合形成一个新的细胞器*Rafeesome*, 随后*Rafeesomes*与细胞膜融合释放R-EVs(数据尚未正式发表)。

在这篇综述中, 我们将讨论以上几类EVs的生物发生、货物和调控方式, 总结它们在肿瘤发生、微环境(*tumor-associated microenvironment*, TME)、

肿瘤转移中的作用, 并讨论EVs对癌症治疗的作用。

## 1 EVs的生物生成、货物和调节

### 1.1 外泌体

外泌体的直径平均在30~150 nm, 起源于细胞内吞。细胞质膜内陷并夹断, 形成细胞内囊泡, 也被称为早期内体。内体膜逐渐内陷形成ILVs是早期内体到晚期内体[也被称为多泡体(*multivesicular bodies*, MVBs)]转变的标志。随后, MVBs运输至质膜并与之融合, 将ILVs释放到细胞外空间。因此, 从本质上讲, 被释放出质膜的ILVs被称为外泌体。

外泌体包含各种类型的货物。受供体细胞的类型和生理或病理状态的影响, EVs的内容物具有高度异质性<sup>[10]</sup>。外泌体含有各种类型的蛋白, 典型的标志蛋白是四次跨膜蛋白家族, 如CD9、CD63、CD81; 与MVB生物生成有关的内体相关蛋白, Alix和TSG101; 细胞质热休克蛋白, 如Hsp70和Hsp90<sup>[11]</sup>。RATAJCZAK等<sup>[12]</sup>首次报道了外泌体含有mRNAs, 并且能够将mRNA转移到受体细胞中。除了全长的mRNA, 外泌体还能通过RNA结合蛋白装载长链非编码RNA和小非编码RNA<sup>[13-14]</sup>。此外, 外泌体还含有DNA, 包括单链DNA、双链DNA、基因组DNA、线粒体DNA等。

在外泌体形成、货物分拣和运输这个庞大的网络的调控中心是运输所需的内体分拣复合物(*endosomal sorting complex required for transports*, ESCRTs), ESCRTs在酵母和哺乳动物的进化过程中均非常保守<sup>[15]</sup>。ESCRTs主要由四个复合物(ESCRT-0、ESCRT-I、ESCRT-II和ESCRT-III)组成, 分别与相关蛋白一起履行其职责。一般来说, ESCRT-0介导底物的识别和分拣, ESCRT-I和ESCRT-II指导装载货物后的膜出芽, 而ESCRT-III负责芽颈的断裂, 使其落入内体腔形成MVB<sup>[16]</sup>。毫无疑问, ESCRT在货物分拣和囊泡运输中起着至关重要的作用, 但研究也发现多种ESCRT非依赖途径(图1)<sup>[17]</sup>。例如, 有文献报道*tetraspanin*家族的蛋白可以调节ESCRT非依赖性内体分选。*Tetraspanin*家族的CD63, 特异地富集于外泌体表面, 并已被证明参与黑素细胞内的内体分选<sup>[18-19]</sup>。*Tetraspanin*家族其他成员蛋白CD81、CD82和CD9也直接参与外泌体的各种货物分选<sup>[20-21]</sup>。机制上, 这些蛋白和*tetraspanin*家族其他成员蛋白与不同的跨膜/细胞质蛋白形成簇和动态膜平台, 参于将

要出芽的微结构域的形成。还有证据表明,货物分拣到多泡内体(multivesicular bodies, MVEs)的过程依赖于神经酰胺;这项研究发现货物分拣到MVEs独立于ESCRT机制,而依赖于基于脂筏的微结构域。这些微结构域含有高浓度的鞘磷脂,其形成神经酰胺,后者通过诱导小的微结构域凝聚成大的微结构域,进而促进该结构域的出芽<sup>[22]</sup>。我们团队首次报道了RAB31标记和控制的ESCRT非依赖的外泌体途径,重新定义了RAB31-FLOTs负责腔内囊泡和外泌体形成的分子机器。RAB31被表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)磷酸化所激活,活化的RAB31和FLOTs蛋白形成脂筏依赖的微结构域,驱动EGFR进入MVEs形成ILVs;同时RAB31招募GAP蛋白(GTPase-activating proteins) TBC1D2B,失活RAB7,抑制MVEs和溶酶体的融合,从而促进ILVs分泌形成外泌体。这种EGFR被分泌到外泌体,在肿瘤细胞间传递EGFR的靶向药物的耐药性(图2)<sup>[23]</sup>。

## 1.2 微囊泡

微囊泡(micro-vesicles, MVs)的大小通常在50 nm~1 000 nm。MVs的产生依赖于细胞骨架的重新排列以及产生的囊泡与细胞质膜的脱离。与外泌体相比,MVs在其生物生成和释放的具体机制方

面的报道要少得多。研究表明,ARF6和RHOA分别在重排肌动蛋白细胞骨架和调节质膜衍生的微囊泡的脱落方面起作用<sup>[24-25]</sup>。其中,ARF6 GTP/GDP循环调控肿瘤细胞向周围环境释放含有蛋白酶的MVVs。ARF6-GTP依赖的磷脂酶D的激活促进细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)被招募到质膜,ERK磷酸化并激活肌球蛋白轻链激酶(myosin light chain kinase, MLCK),后者介导MLC的磷酸化从而造成MVVs的释放<sup>[25]</sup>。小GTP酶RHOA通过触发ROCK激活的Lim激酶-cofilin信号通路促进肿瘤细胞的MVVs生物生成;抑制该通路中不同蛋白质的活性可阻断肿瘤细胞的MVVs生成,以及防止细胞致癌转化和小鼠模型的肿瘤生长<sup>[24]</sup>。

## 1.3 凋亡小体

凋亡小体是细胞凋亡过程的产物,主要指胞膜皱缩内陷分割和包裹胞质形成的泡状小体。细胞凋亡是多基因严格控制的细胞自主的有序死亡,参与细胞凋亡的基因包括Bcl-2家族基因、caspase家族基因、癌基因*C-myc*、抑癌基因*P53*等。

## 1.4 迁移体

迁移体是一种新的被定义的细胞外囊泡,由俞立团队发现并命名(图3)<sup>[26]</sup>。需要说明的是,迁移体

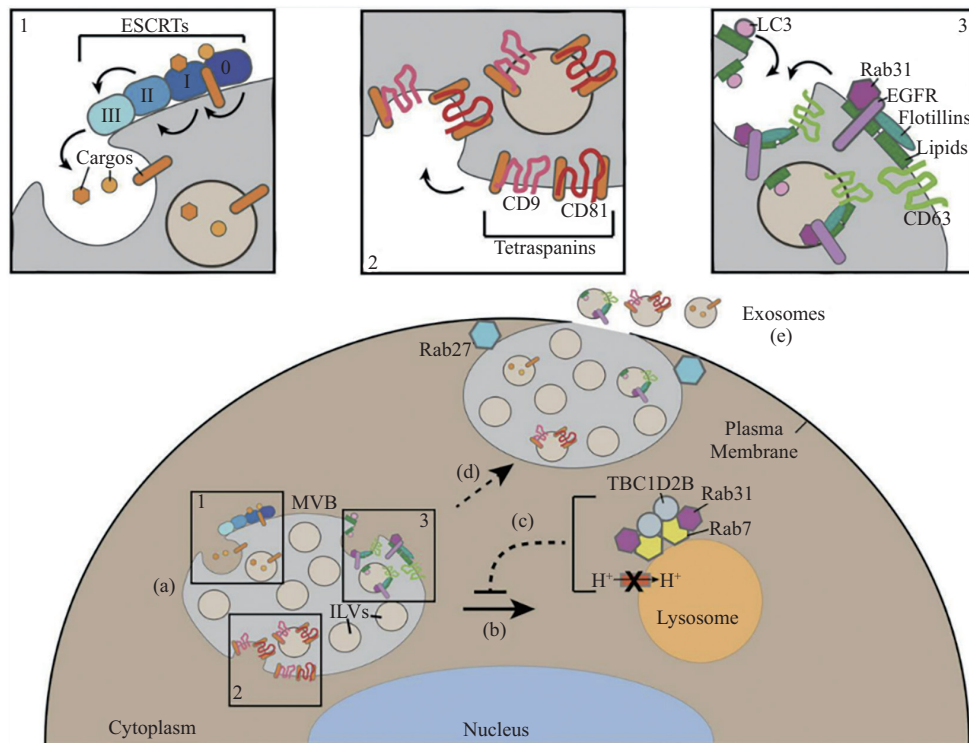


图1 外泌体的生物发生过程(图片来自参考文献[17])

Fig.1 Exosome biogenesis (image cited from reference [17])



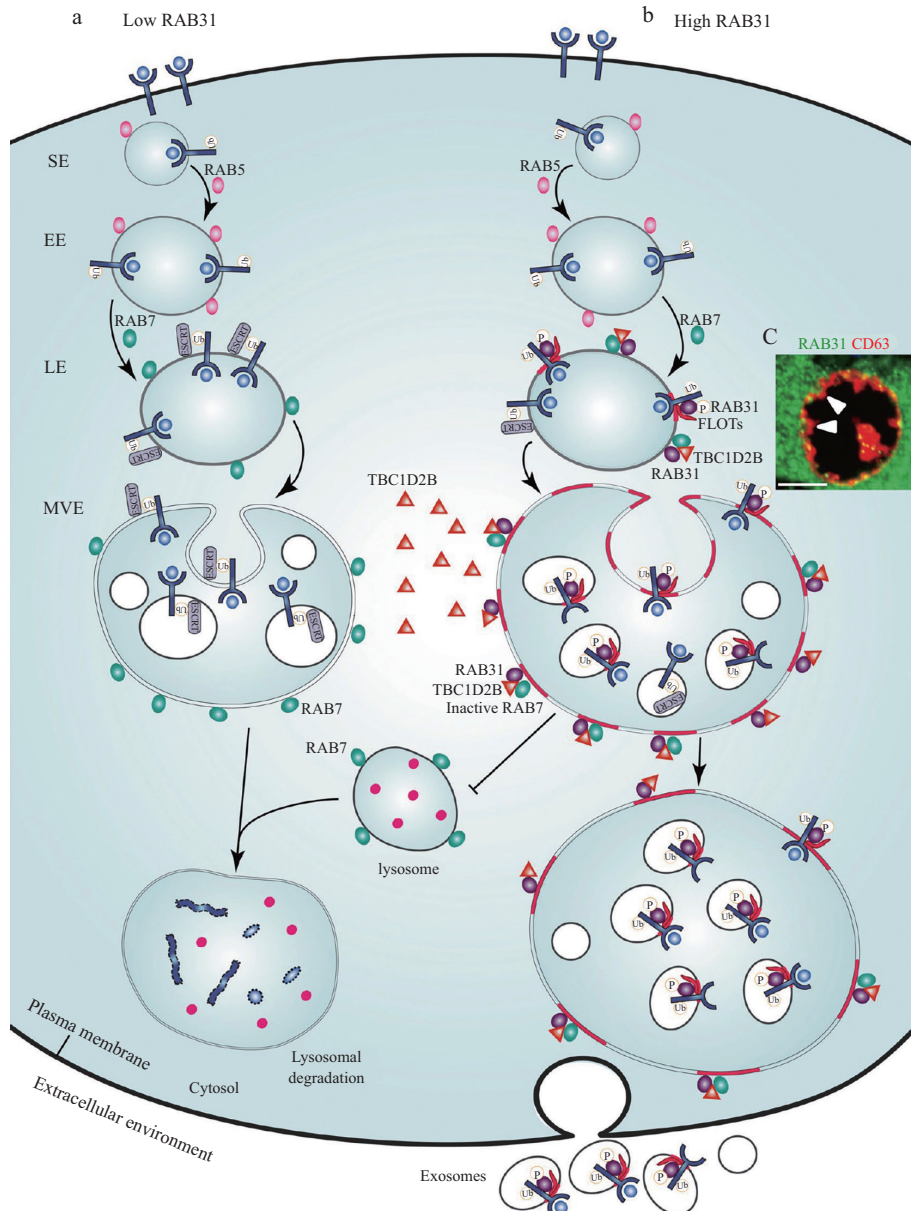


图2 RAB31在外泌体途径的作用模型(图片来自参考文献[23])

Fig.2 The proposed model for the functions of RAB31 in exosome pathway (image cited from reference [23])

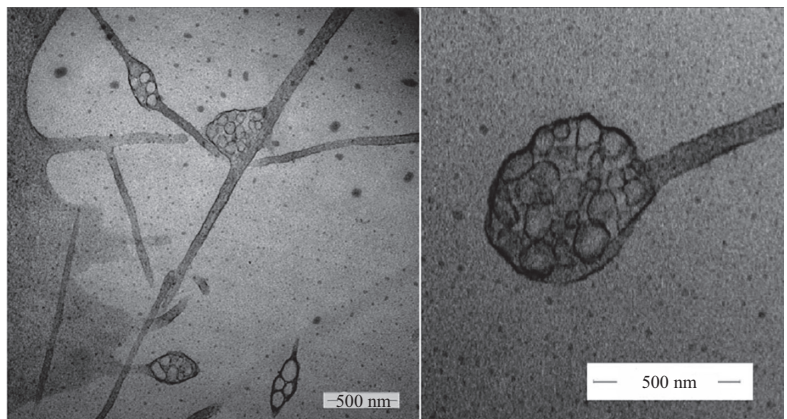


图3 电镜下观察到的石榴样结构——迁移体(图片来自参考文献[26])

Fig.3 Pomegranate-like structures observed by transmission electron microscope—migrasomes (image cited from reference [26])

在最初发生时通过收缩丝与细胞连接,此时并不能定义其为细胞外囊泡的一个亚型。所以严格意义来讲,迁移体在与细胞脱离之后才属于一类细胞外囊泡。迁移体跟随迁移的细胞,生长在迁移细胞尾部收缩丝的尖端或交汇处<sup>[27]</sup>。当一个细胞迁移离开时,收缩纤维断裂,留下迁移体,继而破裂,将其内容物释放到微环境中。Tetraspanin家族蛋白TSPAN4是迁移体的标志蛋白,整合素与其特定的细胞外基质伴侣蛋白的正确配对是迁移体形成的一个决定因素<sup>[28-29]</sup>。俞立团队<sup>[30-31]</sup>后续发现了迁移体在介导线粒体质量控制过程和影响斑马鱼发育过程中器官形态发生方面的作用。线粒体在受损后通过避免与内向运动蛋白结合从而定位在细胞周边,随后被运送至迁移体进行处理,这个过程被称为mitocytosis。因此mitocytosis可以保护细胞免受线粒体应激源引起的线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential, MMP)和线粒体呼吸的损失,是迁移细胞中一个重要的线粒体质量控制过程<sup>[30]</sup>。迁移体在斑马鱼的胃发育过程中起信号细胞器的作用,信号分子如趋化因子在迁移体中富集,提供特定的生化信息以协调器官的形态发生<sup>[31]</sup>。此外,迁移体中富含mRNA和蛋白质,俞立团队已在体外证实这些货物在迁移体与受体细胞分离后可被受体细胞摄取并发挥功能,这表明迁移体在物理或病理条件下将成为细胞间交流的一个有吸引力的细胞器<sup>[26]</sup>。体内的研究以及迁移体更多生物学特征和功能需要进一步探索。

### 1.5 Retractableosomes

迁移细胞在迁移过程中产生收缩纤维和迁移体,在细胞迁移后,大量的收缩纤维从细胞中分离出来。俞立团队最近通过活细胞成像、扫描电镜和透射电镜观察到收缩纤维断开后会形成大量圆形的小细胞外囊泡,大小从50 nm到250 nm,远小于迁移体,他们将这此囊泡命名为“retractosomes”,以反映其收缩纤维和质膜的起源(数据尚未正式发表)。Retractosomes的生理功能仍有待研究。

### 1.6 R-EVs

R-EVs是我们团队最近发现并命名的一种新型的EVs(数据尚未正式发表),它是由RAB22A诱导的非经典自噬体和RAB22A阳性的早期内体在细胞内融合形成一个新的细胞器Rafeesome(RAB22A-regulated non-canonical autophagosome fusing with early endosome),随后Rafeesomes与细胞膜融合释放R-

EVs。其形成机制为:在内质网上RAB22A与PI4K2A结合,后者产生PI4P以招募Atg12-Atg5-Atg16L1复合物,并诱导LC3-II锚定在自噬前体膜上,形成RAB22A调控的非经典自噬体。随后,由RAB22A诱导的早期内体与该非经典自噬体融合,形成一个新的细胞器,即Rafeesome。由于RAB22A招募RAB7的GAP TBC1D2B抑制了Rafeesome与溶酶体融合,Rafeesome随之与质膜融合,释放ILVs到细胞外,即为R-EVs(数据尚未正式发表)。经鉴定,R-EVs的粒径大小为100~500 nm。R-EVs的货物理论上应该包括可以和LC3结合的蛋白,比如说,P62和激活状态的STING。

## 2 EVs与肿瘤

### 2.1 EVs与肿瘤发生

肿瘤发生是一个多阶段、渐进式的过程,在遗传突变的不断积累下,细胞发生癌变并越来越不受控制,逐渐侵入正常组织。有证据表明,癌细胞衍生的EVs参与了正常细胞向致瘤细胞的转化。例如,乳腺癌相关外泌体含有与RISC装载复合物(RISC-loading complex, RLC)相关的microRNAs,可将前体microRNAs(pre-miRNAs)加工成成熟的miRNAs;其被受体细胞摄取,以Dicer依赖的方式诱导非致瘤上皮细胞向肿瘤细胞的转变<sup>[32]</sup>。前列腺癌(prostate cancer, PC)细胞来源的外泌体诱导PC患者脂肪来源的干细胞(patient-derived adipose stem cells, PASCs)发生致瘤转化,与PC细胞来源的外泌体所携带的肿瘤抑制因子的下调和致癌因子的转运有关<sup>[33]</sup>。肿瘤的发生过程伴随着癌症的血管生成。据报道,EVs也参与了肿瘤血管生成的调节,并进一步促进了肿瘤的生长<sup>[34]</sup>。

### 2.2 EVs与肿瘤转移

在癌细胞扩散之前,原发肿瘤会重塑远处器官的微环境,以建立转移前生态位(pre-metastatic niche, PMN)。转移前生态位的构建最初从血管渗漏开始,继而进行基质和免疫细胞的重塑和招募,随后是诱导免疫抑制,并吸引循环肿瘤细胞至远隔器官。大量的肿瘤细胞分泌物质促进了转移前生态位的形成过程,其中包括肿瘤来源的EVs<sup>[35]</sup>。有证据表明,黑色素瘤源性外泌体可诱导转移前部位的血管渗漏<sup>[36]</sup>。FONG等<sup>[37]</sup>发现,癌细胞分泌的携带miR-122的囊泡被转移前生态位的细胞吸收,依赖葡萄糖代谢重编程导致



肿瘤的进展。来源于黑色素瘤的外泌体通过重塑前哨淋巴结微环境, 促进淋巴结转移<sup>[38]</sup>。我们团队<sup>[39]</sup>发现: 在骨肉瘤细胞中, Rab22a-NeoF1融合蛋白可结合PYK2蛋白激酶, 一起被分泌到外泌体中, 促进骨肉瘤肺转移, 其主要机制是: (1) 重塑肿瘤环境中的巨噬细胞, 促进PMN形成、活化巨噬细胞; (2) 也可以使该融合基因阴性的肿瘤细胞中Rho A活化。这就从细胞水平、动物模型, 很好地解释了为什么肿瘤组织融合基因阳性率只有10%左右, 但可以作为肿瘤患者的治疗靶标。特定的原发肿瘤细胞(种子)倾向于转移到特定的器官(土壤), 只有遇到适合生长的土壤, 种子才能成功转移, 即器官趋向性的种子与土壤学说。肿瘤来源的EVs已经显示出器官趋向性的特性。例如, 外泌体整合素 $\alpha6\beta4$ 和 $\alpha6\beta1$ 与肺转移有关, 而外泌体整合素 $\alpha v\beta5$ 与肝转移相关<sup>[40]</sup>。此外, 器官趋向性的EVs可以转移到特定的远处器官, 并被特定的基质细胞吸收, 诱导特定基质细胞的重编程。例如, 胰腺癌的外泌体倾向于被肝脏中的Kupffer细胞吸收, 而乳腺癌的外泌体则被成纤维细胞吸收<sup>[40]</sup>。除了基质细胞重塑, 骨髓来源的树突状细胞(bone marrow derived dendritic cells, BMDCs)的招募是PMN形成过程中的一个关键事件。研究表明, 胰腺导管腺癌(pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC)衍生的外泌体被Kupffer细胞吸收, 后者发生转化生长因子 $\beta$ 的分泌和纤连蛋白生成上调, 进而增强骨髓来源的巨噬细胞的招募<sup>[41]</sup>。随后, 循环中的BMDCs浸润到转移前器官, 构建促炎和免疫抑制的微环境<sup>[41]</sup>。

除了PMN的构建, 肿瘤源性EVs通过增加原发肿瘤细胞的转移潜力、重塑肿瘤相关微环境和促进血管生成来促进肿瘤转移。例如, 胶质瘤患者的肿瘤病灶中只有小部分胶质瘤细胞表达表皮生长因子受体突变体III(EGFRvIII)这种致癌蛋白(致癌性转化相关的最常见的突变体形式), 然而依赖于肿瘤细胞分泌的EVs, EGFRvIII可在胶质瘤细胞之间进行传递, 导致大多数细胞表现出转化表型<sup>[8]</sup>。EVs还能诱导肿瘤微环境细胞向有利于肿瘤生长的表型转变。有研究指出, 来自前列腺癌的外泌体TGF $\beta$ 1可以促进微环境中肌成纤维细胞的分化, 形成独特的肌成纤维细胞表型, 支持体外的血管生成, 加速体内肿瘤的生长<sup>[42]</sup>。肿瘤细胞来源的EVs能够诱导T细胞凋亡以逃避免疫监视, 进而进一步促进肿瘤转移<sup>[43]</sup>。研究表明, 慢性粒细胞白血病(chronic myeloid leukemia,

CML)细胞来源的外泌体通过IL-8介导的VCAM-1的激活诱导肿瘤血管生成<sup>[34]</sup>。综上, EVs从多个方面发挥促进肿瘤细胞生长和转移的作用。值得注意的是, 有证据表明, 从癌症患者身上分离出来的EVs在体外和体内均确实具有功能性<sup>[44]</sup>。因此, 进一步在体内体外研究EVs与肿瘤的关系具有重要意义, EVs被用于肿瘤的诊断与治疗具有极强的潜力。

### 2.3 EVs与肿瘤免疫

肿瘤细胞试图通过各种方式调节自身或重塑微环境以逃避和抑制免疫系统。作为一类细胞间交流信号, 研究表明, EVs可以同时表现出免疫激活和免疫抑制的特征(图4)<sup>[45]</sup>。EVs在免疫调节中的作用于1996年首次被报道, 研究发现B淋巴细胞能够分泌具有抗原呈递能力的囊泡<sup>[46]</sup>。此后, 大量的研究发现了EVs在T细胞激活中的作用。来源于树突状细胞的EVs装载主要组织相容性复合物(major histocompatibility complex, MHC)分子, 成为为T细胞进行抗原提呈的功能性囊泡。这是直接的抗原呈递过程, EVs也可通过与树突状细胞的相互作用发挥间接抗原提呈的作用。例如, 某些黏附分子, 如EVs中的ICAM1和整合素与树突状细胞结合以间接传递激活信号<sup>[47]</sup>。另外, 从成熟树突状细胞释放的EVs可以将MHC分子转移到静息的树突状细胞中, 实现抗原提呈<sup>[48]</sup>。肿瘤来源的EVs含有肿瘤特异性抗原(tumor specific antigen, TSA)和pMHC复合物, 可以传递给树突状细胞用于抗原呈递和肿瘤特异性T细胞的激活<sup>[49-50]</sup>。除TSA和pMHC外, 肿瘤EVs还可以通过增加IFN- $\gamma$ 的分泌和增强NK细胞的肿瘤细胞毒性活性而表现出抗肿瘤免疫功能<sup>[51]</sup>。此外, 我们最新的研究发现, R-EVs介导激活型STING的细胞间传递以激活抗肿瘤免疫(数据尚未正式发表)。

虽然肿瘤EVs有抗肿瘤免疫作用, 但也有大量的证据表明, 肿瘤细胞来源的EVs倾向于抑制抗肿瘤免疫反应。研究表明, 来源于肿瘤的EVs作为PD-L1的载体介导免疫抑制<sup>[52-53]</sup>。此外, 癌症EVs携带大量可调节免疫微环境的功能分子(蛋白质、mRNA、非编码RNA等)。例如, EVs携带肿瘤代谢关键酶ARG1, 含ARG1的EVs被输送到引流淋巴结, 被树突状细胞吸收并抑制抗原特异性T细胞增殖, 诱导T细胞功能紊乱和肿瘤增殖<sup>[54]</sup>。黑色素瘤来源外泌体释放的microRNAs通过减少T细胞受体(T cell receptor, TCR)信号传递以及细胞因子和颗粒酶B的

分泌下调T细胞反应<sup>[55]</sup>。还有一些研究指出,肿瘤来源的EVs通过促进T细胞凋亡、抑制T细胞中CD3- $\zeta$ 链的表达和阻止NK细胞和CD8 T细胞的细胞毒性来抑制免疫反应<sup>[56-57]</sup>。

## 2.4 EVs与靶向治疗

我们团队最近发现,EGFR分泌到细胞外可以有两种方式。一种是RAB31介导的ESCRT非依赖性的外泌体,这种分泌出来的EGFR,如果具有其靶向药物的耐药性,其被受体细胞内吞后,受体细胞也可以获得该靶向药物的耐药性,也就是说,EGFR靶向药物的耐药性可以通过这种方式在肿瘤细胞间进行传递<sup>[23]</sup>。另一种是RAB22A介导的MVs(数据尚未正式发表)。根据以往报道,EGFR可被包裹入MVs中,随后被水平传递至周围细胞或远程运输至远端细胞,进而激活下游通路,改变相关基因的表达。但EGFR被包裹入MVs的具体过程尚不明确。细胞膜上的EGFR与配体结合后被内吞进入细胞,或被运送至溶酶体降解,或被包装入外泌体分泌出供体细胞,或经循环途径返回细胞膜继续执行任务。MVs由细胞膜直接出芽形成,经循环过程回到细胞膜表面的蛋白越多,其被包装进入MVs的可能性越大。因此,细胞内囊泡运输循环系统的发达程度将与细胞分泌MVs的能力呈正相关。RAB GTPases是细胞内囊泡运输和外泌体分泌的重要调控者,那么,它也有可能

参与调控MVs的形成。我们的研究成果表明,定位于内体的RAB22A通过以下方式:(1) 招募RAB7的GAP蛋白TBC1D2B降低RAB7-GTP水平,抑制RAB7活性,将EGFR截留在分选内体中而阻断其被运送至溶酶体降解;(2) 与PI4K2A互作,促进循环内体必需磷脂PI4P生成;(3) 与RAB11的GEF(Guanine-nucleotide exchange factor)即SH3BP5L互作,提高RAB11-GTP水平,提升RAB11活性,驱动早期内体向循环内体的转变,最终促进EGFR循环回细胞膜表面,并促进EGFR MVs生成。此外,RAB22A还可受EGFR调控,其第136位酪氨酸可被EGFR磷酸化,促进MVs生成。

作为包含功能性货物的细胞间交流的重要工具, EVs已经成为肿瘤治疗药物的潜在运输载体<sup>[58]</sup>。由于EVs的稳定性、生物相容性、低免疫原性和与目标细胞相互作用的天然能力、独特的器官趋向性和可透过血脑屏障的能力,使其与传统载体相比在作为药物递送载体时显示出诸多优势。有证据表明,前列腺癌细胞衍生的EVs可以装载紫杉醇,并通过内吞途径将紫杉醇转移到其母体细胞,并能够增加药物的细胞毒性<sup>[59]</sup>。然而, EVs快速制备和高效给药是其转化应用的挑战。ZHANG等<sup>[60]</sup>开发了一种工程化的中性粒细胞衍生的类外泌体,可以准确有效地靶向肿瘤组织。中性粒细胞衍生的类外泌体具有与

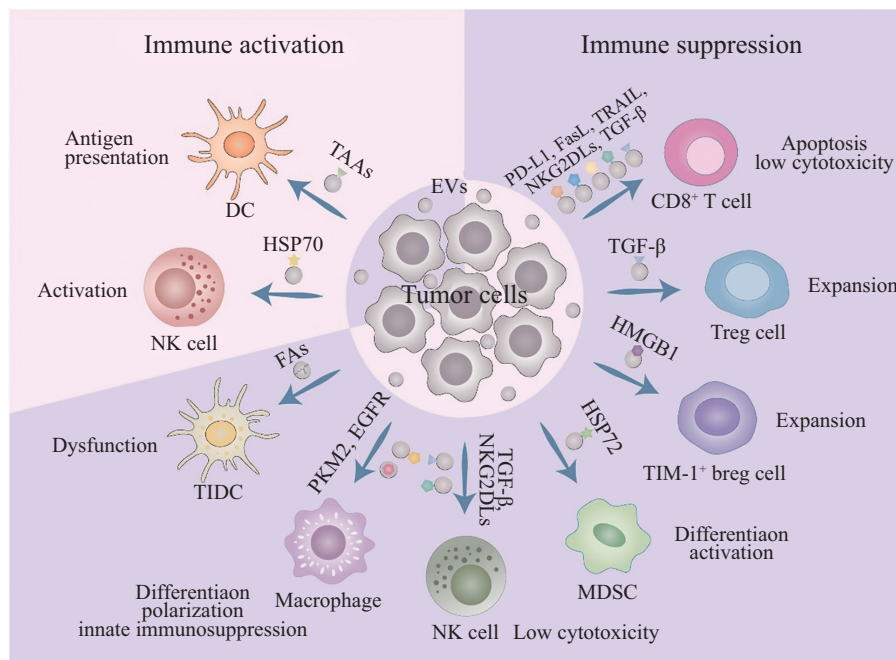


图4 肿瘤来源EVs在肿瘤免疫微环境中的作用(图片来自参考文献[45])

Fig.4 Roles of tumor-derived extracellular vesicles in the tumor immune microenvironment (image cited from reference [45])

天然外泌体相似的结构、生物组成和功能, 可以作为安全有效的药物递送平台用于肿瘤靶向治疗<sup>[60]</sup>。但尚需更多更深入的研究克服这些挑战。已有大量利用EVs进行肿瘤治疗的方法被设计并进行临床前试验评估, 少数已经进入II期临床试验阶段<sup>[61]</sup>。

### 3 前景与挑战

总的来说, 近些年来对EVs的生物特征、功能和临床应用方面的研究取得了重要进展。EVs在肿瘤细胞之间以及肿瘤细胞与微环境细胞间能够进行功能性转运与交流。肿瘤细胞会产生大量含各种生物活性分子的EVs, EVs携带特异的肿瘤信息释放至循环系统, 因此其有潜力替代肿瘤细胞本身成为肿瘤诊断、预后和预测的生物标志物。此外, EVs因其靶向能力、低免疫原性等优势具备很大的潜力成为临床药物的运输载体。然而, 对于EVs在临床中的应用, 目前仍有许多障碍需要克服。同一细胞或者不同细胞在不同生理或病理条件下都会产生不同的EV亚型, 对于这些EV亚型的准确分类问题, 以及阐明它们如何在肿瘤进展和肿瘤治疗中发挥多种作用是需要进一步探索的。肿瘤患者的体液样本成分复杂, 如何标准化分离、定量和分析体液样本中的EVs, 以及体液样本中不同EVs的含量、EVs中不同内容物的含量也是亟待解决的问题。对于EVs作为临床药物的运输载体, 如何快速制备和大规模生产EVs均需进一步探索和优化。此外, 利用动物模型研究EVs的生物合成、运输和与受体细胞的交流是另一个需要拓展和探究的领域。

#### 参考文献 (References)

- [1] JOHNSTONE R M, ADAM M, HAMMOND J R, et al. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes) [J]. *J Biol Chem*, 1987, 262(19): 9412-20.
- [2] PAN B T, JOHNSTONE R M. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes *in vitro*: selective externalization of the receptor [J]. *Cell*, 1983, 33(3): 967-78.
- [3] ZITVOGEL L, REGNAULT A, LOZIER A, et al. Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes [J]. *Nat Med*, 1998, 4(5): 594-600.
- [4] RAPOSO G, NIJMAN H W, STOOBVOGEL W, et al. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles [J]. *J Exp Med*, 1996, 183(3): 1161-72.
- [5] VALADI H, EKSTROM K, BOSSIOS A, et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells [J]. *Nat Cell Biol*, 2007, 9(6): 654-9.
- [6] SIMS P J, FAIONI E M, WIEDMER T, et al. Complement proteins C5b-9 cause release of membrane vesicles from the platelet surface that are enriched in the membrane receptor for coagulation factor Va and express prothrombinase activity [J]. *J Biol Chem*, 1988, 263(34): 18205-12.
- [7] WOLF P. The nature and significance of platelet products in human plasma [J]. *Br J Haematol*, 1967, 13(3): 269-88.
- [8] AL-NEDAWI K, MEEHAN B, MICALLEF J, et al. Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells [J]. *Nat Cell Biol*, 2008, 10(5): 619-24.
- [9] MA L, LI Y, PENG J, et al. Discovery of the migrasome, an organelle mediating release of cytoplasmic contents during cell migration [J]. *Cell Res*, 2015, 25(1): 24-38.
- [10] MINCIACCHI V, FREEMAN M, DI VIZIO D. Extracellular vesicles in cancer: exosomes, microvesicles and the emerging role of large oncosomes [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2015, 40: 41-51.
- [11] MASYUK A, MASYUK T, LARUSSO N. Exosomes in the pathogenesis, diagnostics and therapeutics of liver diseases [J]. *J Hepatol*, 2013, 59(3): 621-5.
- [12] RATAJCZAK J, MIEKUS K, KUCIA M, et al. Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery [J]. *Leukemia*, 2006, 20(5): 847-56.
- [13] WEI Z, BATAGOV A, SCHINELLI S, et al. Coding and noncoding landscape of extracellular RNA released by human glioma stem cells [J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 1145.
- [14] SHURTLEFF M, YAO J, QIN Y, et al. Broad role for YBX1 in defining the small noncoding RNA composition of exosomes [J]. *PNAS*, 2017, 114(43): E8987-E95.
- [15] WOLLERT T, HURLEY J. Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes [J]. *Nature*, 2010, 464(7290): 864-9.
- [16] HURLEY J, HANSON P. Membrane budding and scission by the ESCRT machinery: it's all in the neck [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010, 11(8): 556-66.
- [17] KENIFIC C, ZHANG H, LYDEN D. An exosome pathway without an ESCRT [J]. *Cell Res*, 2021, 31(2): 105-6.
- [18] VAN NIEL G, CHARRIN S, SIMOES S, et al. The tetraspanin CD63 regulates ESCRT-independent and -dependent endosomal sorting during melanogenesis [J]. *Dev Cell*, 2011, 21(4): 708-21.
- [19] THEOS A, TRUSCHEL S, TENZA D, et al. A luminal domain-dependent pathway for sorting to intraluminal vesicles of multivesicular endosomes involved in organelle morphogenesis [J]. *Dev Cell*, 2006, 10(3): 343-54.
- [20] BUSCHOW S, NOLTE-T HOEN E, VAN NIEL G, et al. MHC II in dendritic cells is targeted to lysosomes or T cell-induced exosomes via distinct multivesicular body pathways [J]. *Traffic*, 2009, 10(10): 1528-42.
- [21] CHAIROUNGDU A, SMITH D, POCHARD P, et al. Exosome release of  $\beta$ -catenin: a novel mechanism that antagonizes Wnt signaling [J]. *J Cell Biol*, 2010, 190(6): 1079-91.
- [22] TRAJKOVIC K, HSU C, CHIANTIA S, et al. Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes [J].



- Science, 2008, 319(5867): 1244-7.
- [23] WEI D, ZHAN W, GAO Y, et al. RAB31 marks and controls an ESCRT-independent exosome pathway [J]. *Cell Res*, 2021, 31(2): 157-77.
- [24] LI B, ANTONYAK M, ZHANG J, et al. RhoA triggers a specific signaling pathway that generates transforming microvesicles in cancer cells [J]. *Oncogene*, 2012, 31(45): 4740-9.
- [25] MURALIDHARAN-CHARI V, CLANCY J, PLOU C, et al. ARF6-regulated shedding of tumor cell-derived plasma membrane microvesicles [J]. *Curr Biol*, 2009, 19(22): 1875-85.
- [26] YU S, YU L. Migrasome biogenesis and functions [J]. *FEBS J*, 2021, doi: 10.1111/febs.16183.
- [27] DA ROCHA-AZEVEDO B, SCHMID S. Migrasomes: a new organelle of migrating cells [J]. *Cell Res*, 2015, 25(1): 1-2.
- [28] HUANG Y, ZUCKER B, ZHANG S, et al. Migrasome formation is mediated by assembly of micron-scale tetraspanin macrodomains [J]. *Nat Cell Biol*, 2019, 21(8): 991-1002.
- [29] WU D, XU Y, DING T, et al. Pairing of integrins with ECM proteins determines migrasome formation [J]. *Cell Res*, 2017, 27(11): 1397-400.
- [30] JIAO H, JIANG D, HU X, et al. Mitocytosis, a migrasome-mediated mitochondrial quality-control process [J]. *Cell*, 2021, 184(11): 2896-910, e13.
- [31] JIANG D, JIANG Z, LU D, et al. Migrasomes provide regional cues for organ morphogenesis during zebrafish gastrulation [J]. *Nat Cell Biol*, 2019, 21(8): 966-77.
- [32] MELO S A, SUGIMOTO H, O'CONNELL J T, et al. Cancer exosomes perform cell-independent microRNA biogenesis and promote tumorigenesis [J]. *Cancer Cell*, 2014, 26(5): 707-21.
- [33] ABD ELMAGEED Z Y, YANG Y, THOMAS R, et al. Neoplastic reprogramming of patient-derived adipose stem cells by prostate cancer cell-associated exosomes [J]. *Stem Cells*, 2014, 32(4): 983-97.
- [34] MINEO M, GARFIELD S H, TAVERNA S, et al. Exosomes released by K562 chronic myeloid leukemia cells promote angiogenesis in a Src-dependent fashion [J]. *Angiogenesis*, 2012, 15(1): 33-45.
- [35] PEINADO H, ZHANG H, MATEI I R, et al. Pre-metastatic niches: organ-specific homes for metastases [J]. *Nat Rev Cancer*, 2017, 17(5): 302-17.
- [36] PEINADO H, ALEČKOVIĆ M, LAVOTSHKIN S, et al. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET [J]. *Nat Med*, 2012, 18(6): 883-91.
- [37] FONG M Y, ZHOU W, LIU L, et al. Breast-cancer-secreted miR-122 reprograms glucose metabolism in premetastatic niche to promote metastasis [J]. *Nat Cell Biol*, 2015, 17(2): 183-94.
- [38] HOOD J L, SAN R S, WICKLINE S A. Exosomes released by melanoma cells prepare sentinel lymph nodes for tumor metastasis [J]. *Cancer Res*, 2011, 71(11): 3792-801.
- [39] ZHONG L, LIAO D, LI J, et al. Rab22a-Neof1 fusion protein promotes osteosarcoma lung metastasis through its secretion into exosomes [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6(1): 59.
- [40] HOSHINO A, COSTA-SILVA B, SHEN T L, et al. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis [J]. *Nature*, 2015, 527(7578): 329-35.
- [41] COSTA-SILVA B, AIELLO N M, OCEAN A J, et al. Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver [J]. *Nat Cell Biol*, 2015, 17(6): 816-26.
- [42] WEBBER J P, SPARY L K, SANDERS A J, et al. Differentiation of tumour-promoting stromal myofibroblasts by cancer exosomes [J]. *Oncogene*, 2015, 34(3): 290-302.
- [43] KIM J W, WIECKOWSKI E, TAYLOR D D, et al. Fas ligand-positive membranous vesicles isolated from sera of patients with oral cancer induce apoptosis of activated T lymphocytes [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(3): 1010-20.
- [44] YOKOI A, YOSHIOKA Y, YAMAMOTO Y, et al. Malignant extracellular vesicles carrying MMP1 mRNA facilitate peritoneal dissemination in ovarian cancer [J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 14470.
- [45] HOU P, CHEN H. Extracellular vesicles in the tumor immune microenvironment [J]. *Cancer Lett*, 2021, 516: 48-56.
- [46] RAPOSO G, NIJMAN H, STOORVOGEL W, et al. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles [J]. *J Exp Med*, 1996, 183(3): 1161-72.
- [47] CLAYTON A, TURKES A, DEWITT S, et al. Adhesion and signaling by B cell-derived exosomes: the role of integrins [J]. *Faseb J*, 2004, 18(9): 977-9.
- [48] OBREGON C, ROTHEN-RUTISHAUSER B, GITAH S K, et al. Exovesicles from human activated dendritic cells fuse with resting dendritic cells, allowing them to present alloantigens [J]. *Am J Pathol*, 2006, 169(6): 2127-36.
- [49] ZHANG H, TANG K, ZHANG Y, et al. Cell-free tumor microparticle vaccines stimulate dendritic cells via cGAS/STING signaling [J]. *Cancer Immunol Res*, 2015, 3(2): 196-205.
- [50] WOLFERS J, LOZIER A, RAPOSO G, et al. Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming [J]. *Nat Med*, 2001, 7(3): 297-303.
- [51] DABLER-PLENKER J, REINERS K S, VAN DEN BOORN J G, et al. RIG-I activation induces the release of extracellular vesicles with antitumor activity [J]. *Oncoimmunology*, 2016, 5(10): e1219827.
- [52] RICKLEFS F L, ALAYO Q, KRENZLIN H, et al. Immune evasion mediated by PD-L1 on glioblastoma-derived extracellular vesicles [J]. *Sci Adv*, 2018, 4(3): eaar2766.
- [53] CHEN G, HUANG A C, ZHANG W, et al. Exosomal PD-L1 contributes to immunosuppression and is associated with anti-PD-1 response [J]. *Nature*, 2018, 560(7718): 382-6.
- [54] CZYSTOWSKA-KUZMICZ M, SOSNOWSKA A, NOWIS D, et al. Small extracellular vesicles containing arginase-1 suppress T-cell responses and promote tumor growth in ovarian carcinoma [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 3000.
- [55] VIGNARD V, LABBÉ M, MAREC N, et al. MicroRNAs in tumor exosomes drive immune escape in melanoma [J]. *Cancer Immunol Res*, 2020, 8(2): 255-67.
- [56] TAYLOR D D, GERÇEL-TAYLOR C, LYONS K S, et al. T-cell apoptosis and suppression of T-cell receptor/CD3-zeta by Fas ligand-containing membrane vesicles shed from ovarian tumors [J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9(14): 5113-9.
- [57] HUBER V, FAIS S, IERO M, et al. Human colorectal cancer cells induce T-cell death through release of proapoptotic microvesicles: role in immune escape [J]. *Gastroenterology*, 2005, 128(7): 1796-804.
- [58] MIZRAK A, BOLUKBASI M F, OZDENER G B, et al. Geneti-

- cally engineered microvesicles carrying suicide mRNA/protein inhibit schwannoma tumor growth [J]. *Mol Ther*, 2013, 21(1): 101-8.
- [59] SAARI H, LÁZARO-IBÁÑEZ E, VIITALA T, et al. Microvesicle- and exosome-mediated drug delivery enhances the cytotoxicity of Paclitaxel in autologous prostate cancer cells [J]. *J Control Release*, 2015, 220(Pt B): 727-37.
- [60] ZHANG J, JI C, ZHANG H, et al. Engineered neutrophil-derived exosome-like vesicles for targeted cancer therapy [J]. *Sci Adv*, 2022, 8(2): eabj8207.
- [61] GYÖRGY B, HUNG M E, BREAKEFIELD X O, et al. Therapeutic applications of extracellular vesicles: clinical promise and open questions [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2015, 55: 439-64.