



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。现任中山大学肿瘤防治中心, 华南恶性肿瘤防治全国重点实验室副主任、PI, 中国细胞生物学学会肿瘤细胞生物学分会会长, 广东省政协委员。2003年, 获德国Bielefeld大学生物化学博士学位。1998—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。已主持国家自然科学基金重点项目3项、“973计划”课题、国家重点研发计划课题等。主要研究方向: 肿瘤细胞及其胞外囊泡的调控与干预。以通信作者在*Nat Cell Biol*、*Nat Cancer*、*Cell Res*(3篇)、*Sci Adv*、*J Clin Invest*、*Nat Commun*等国际主流杂志上发表论著50多篇。

细胞外囊泡发生的新途径在肿瘤演进中的作用 与临床意义

高瑛¹ 魏灯辉¹ 钟理² 廖丹¹ 郑雪萍¹ 林雨洁¹ 方冬梅¹ 康铁邦^{1*}

(¹华南恶性肿瘤防治全国重点实验室, 广东省恶性肿瘤临床医学研究中心, 中山大学肿瘤防治中心, 广州 510060;

²中山大学附属第七医院, 广东省消化系统恶性肿瘤防治研究重点实验室, 深圳 518107)

摘要 肿瘤细胞间或与间质细胞、免疫细胞之间的串扰在肿瘤的演进中至关重要。细胞外囊泡(EVs)是一种异质性的分泌信使, 携带生物活性分子, 在这种细胞-细胞通信中起关键作用, 可作为肿瘤治疗靶点、生物标志物或治疗工具。因此, 解析EVs的生物发生机制及其在肿瘤中的调控机制是当今的肿瘤科学前沿。该文综述康铁邦团队对EVs在肿瘤演进中的研究: (1) 骨肉瘤中融合蛋白以ESCRT方式分泌到外泌体, 重塑肿瘤微环境促进骨肉瘤肺转移; (2) 表皮生长因子受体(EGFR)以ESCRT非依赖的外泌体以及微囊泡分泌, 在细胞间传递其靶向耐药性; (3) 激活型干扰素基因刺激因子(STING)以新的EVs亚群R-EV形式分泌, 发挥抗肿瘤免疫作用。

关键词 细胞外囊泡; 肿瘤转移; 耐药; Rafeesome-R-EV; 干扰素刺激因子; 表皮生长因子受体

The Role and Clinical Significance of Novel Pathways in Extracellular Vesicle Biogenesis in Cancer Progression

GAO Ying¹, WEI Denghui¹, ZHONG Li², LIAO Dan¹, ZHENG Xueping¹, LIN Yujie¹, FANG Dongmei¹, KANG Tiebang^{1*}

(¹State Key Laboratory of Oncology in South China, Guangdong Provincial Clinical Research Center for Cancer,

Sun Yat-sen University Cancer Center, Guangzhou 510060, China; ²Guangdong Provincial Key Laboratory of Digestive Cancer Research, the Seventh Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Shenzhen 518107, China)

收稿日期: 2024-12-03

接受日期: 2025-01-13

国家重点研发计划(批准号: 2021YFA1300601)和国家自然科学基金(批准号: 82030090、82341015)资助的课题

*通信作者。Tel: 020-87343183, E-mail: kangtb@sysucc.org.cn

Received: December 3, 2024

Accepted: January 13, 2025

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (Grant No.2021YFA1300601) and the National Natural Science Foundation of China (Grant No.82030090, 82341015)

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

Abstract Intercellular crosstalk among tumor cells, mesenchymal cells and immune cells is crucial for cancer progression. EVs (extracellular vesicles), a heterogeneous secretory messenger that carries bioactive molecules, have been proved to be essential for such a cell-to-cell communication and have been used for tumor the therapeutic target, biomarker or therapeutic tool. Therefore, deciphering the mechanisms of EVs biogenesis and how they are regulated in cancers are the current forefront of oncology science. This review summarize the contributions from KANG Tiebang's lab for roles of EVs in cell-cell communication during cancer progressions, (1) a new fusion protein in osteosarcoma is secreted into exosomes by ESCRT to reshape tumor microenvironment and promote lung metastasis of osteosarcoma; (2) EGFR (epidermal growth factor receptor) is secreted by ESCRT-independent exosomes and microvesicles to transmit its targeted drug resistance among cancer cells; (3) activated STING (stimulator of interferon genes) is secreted by R-EV, a new type of EVs, to execute anti-tumor immunity.

Keywords extracellular vesicle; tumor metastasis; drug resistance; Rafeesome-R-EV; stimulator of interferon genes; epidermal growth factor receptor

细胞外囊泡(extracellular vesicles, EVs)是一种脂质双层膜结构,几乎所有类型的细胞都会在生理和病理过程中释放这种结构^[1]。最初, EVs被认为是正常细胞处理不需要的物质以维持正常组织平衡的一种机制,或者是癌细胞促进肿瘤进展的一种机制^[2-3]。现在, EVs在细胞间通信中的作用已得到充分证实, EVs货物被吸收后转移到受体细胞,或通过EVs表面蛋白与细胞受体的相互作用,促进细胞间通信^[4],该作用对维持正常生理功能非常重要^[5]。相反, EVs的异常也与包括肿瘤在内的许多疾病有关^[3,6]。

根据其生物发生和大小, EVs通常被分为三种亚型:外泌体(exosome)、微囊泡(microvesicles, MVs)和凋亡体(apoptotic bodies)。外泌体是小的(直径为50~150 nm) EVs,来自多泡内体中的腔内囊泡(intraluminal vesicles, ILVs)。当多泡内体与质膜融合时,这些腔内囊泡就会作为外泌体分泌出来^[7]。微囊泡直径为100~1 000 nm,由质膜向外出芽形成,直接释放到细胞外环境中^[8]。凋亡体一般被定义为凋亡细胞解体的产物,直径为1~5 μm ^[9]。由于大多数EVs分离技术并不能富集由不同机制产生的EVs,基于生物发生的亚型鉴定也较困难。因此,国际细胞外囊泡协会(ISEV)发表的《细胞外囊泡研究的最低信息》(minimum information for studies of extracellular vesicles, MISEV)里提到除非这种EVs群体被特别分离和表征,否则不鼓励使用基于生物发生的术语^[10]。通常使用过滤或差速超速离心等方法分离出假定的基于大小的EVs种群, MISEV2023建议用“小”和“大”等术语表示EVs种群;“小”通常是指直径<100 nm或<200 nm的EVs,即sEVs(small EVs);直径大于200 nm

的EVs即lEVs(large EVs)(由于许多分离方法产生的EVs群体具有重叠的尺寸分布,对于粒径大小值没有严格的定义)。所以外泌体属于sEV,但sEV群体包括外泌体和小尺寸微囊泡^[10]。由于这些术语仍具有局限性, ISEV建议对这些操作术语进行仔细和明确的定义。

最近,人们又发现了其他EVs亚型,比如迁移体(migrasomes)^[11]、Rafeesome-R-EV(RAB22A-induced extracellular vesicle)^[12]和线粒体囊(mitopher)^[13]等。从迁移细胞的回缩纤维中释放出来的迁移体是由富含TSPAN4和胆固醇的大型微域组装介导的,内含囊泡、脂质、小分子、核酸及其他细胞器成分^[14]。Rafeesome-R-EV是康铁邦和高瑛团队^[12]在2022年发现并报道的, RAB22A可以诱导形成一种新的类似于多囊泡体的亚细胞结构,被称为Rafeesome,它是由RAB22A调控形成的非经典自噬体,与RAB22A阳性的早期内体融合而成。携带货物的自噬体内层囊泡变成了Rafeesome的腔内囊泡。RAB22A可以诱导RAB7失活,从而抑制Rafeesome与溶酶体的融合,促进自噬体内层囊泡分泌到细胞外,被称为R-EV(RAB22A诱导的细胞外囊泡)。这是一种新的EVs亚群,直径大小为100~500 nm,介于外泌体和微囊泡之间。而线粒体囊是一种能够选择性地运输线粒体的EVs,用于线粒体的质量和数量控制,从而在发育和衰老等多种生理过程中发挥关键作用^[13]。

在肿瘤学领域,肿瘤衍生的EVs已成为癌症生物学和进展的重要参与者^[1]。这些由恶性细胞分泌的特异性EVs表现出区别于非肿瘤性EVs的独特特征。肿瘤衍生的EVs携带多种生物活性分子,包括蛋白

质、脂质和核酸,反映了其来源细胞的分子组成^[15]。这些货物可被选择性地富集,使EVs有别于它们的母细胞,成为肿瘤状态的“指纹”^[16]。EVs中的微小核糖核酸和长非编码核糖核酸尤其引人关注,它们可以调节受体细胞中的基因表达,促进肿瘤的发展^[17]。

肿瘤EVs的功能是多方面的,而且影响深远。在原发肿瘤部位,它们有助于建立和维持有利于肿瘤生成的微环境。例如,肿瘤外泌体可通过向内皮细胞输送促血管生成因子来促进血管生成,从而支持肿瘤生长和侵袭^[18]。肿瘤外泌体还能调节免疫反应,通常以有利于肿瘤存活的方式发挥作用。这包括抑制T细胞活性和促进调节性T细胞扩增,从而抑制抗肿瘤免疫^[19]。肿瘤EVs最显著的作用之一可能是参与转移,这些囊泡可通过体液到达远处,在那里参与准备转移前的龛位^[20]。通过改变潜在转移部位的微环境,肿瘤衍生的EVs创造了更有利于循环肿瘤细胞播种和生长的条件。这一过程涉及多种机制,包括诱导血管渗漏、重塑细胞外基质以及招募致癌免疫细胞^[21]。

肿瘤EVs的意义不仅在于其生物学功能,还在于其潜在的临床应用。由于肿瘤EVs可以从血液、尿液和唾液等各种体液中分离出来,因此为液体活检提供了一个很好的方法。肿瘤EVs可作为丰富的生物标记物来源,用于癌症诊断、预后判断和治疗监测。例如,特定的外泌体蛋白质和核酸已被确定为胰腺癌的潜在早期检测标记物^[22]。

本文将重点探讨中山大学肿瘤防治中心康铁邦教授团队关于EVs在肿瘤演进中的作用与临床意义方面的研究。下面围绕骨肉瘤中融合蛋白以ESCRT方式分泌到外泌体,重塑肿瘤微环境促进骨肉瘤肺转移;表皮生长因子受体分泌到细胞外的分子机制及其临床意义;Rafesosome-R-EV形成机制及在肿瘤中的作用这三个方面进行展开。

1 骨肉瘤中融合蛋白以ESCRT方式分泌到外泌体,重塑肿瘤微环境促进骨肉瘤肺转移

骨肉瘤是一种高频突变肿瘤,染色体重排和染色体断裂发生率高,染色体重排导致一些驱动基因的突变以及形成融合基因^[23]。目前已被广泛用于临床诊断、治疗的融合基因靶标如下:最著名的白血病Ph费城染色体 $BCR-ABL$ 、Ewing肉瘤中的 $EWSR1-FLII$ 、前列腺癌中的 $TMPRSS2-ERG$ 、非小细胞肺癌

中的 $EML4-ALK$ ^[24]。但是,目前骨肉瘤中尚无融合基因的诊疗靶标,融合基因是肿瘤特异性基因,因此,以肿瘤特异性融合基因作为治疗靶标有利于骨肉瘤的精准个体化治疗,具有十分重要的意义,有望突破骨肉瘤肺转移治疗的瓶颈。

康教授团队^[25]发现了一类新的外显子-内含子 exon-intron 融合基因(传统融合基因均为 exon-exon 型)。这类融合基因由RAB22A(exon 1和2)与多个不同的内含子或非编码区连接,并编码产生融合蛋白。研究发现,该类融合蛋白能够促进RhoA的活化,进而推动肿瘤(如骨肉瘤、乳腺癌、肺癌等)的转移。基于这一发现,团队开发了诊断性探针和治疗性多肽(已获2项专利授权),为肿瘤转移的诊疗提供了一个新的潜在靶标。该研究工作被同行专家以亮点评论发表于 *Signal Transduct Target Ther*^[26]。进一步发现:该类融合蛋白被溶酶体降解,索拉菲尼、瑞戈菲尼等已知的肿瘤靶向药物可通过诱导PINK1,促进该融合蛋白的降解。因此,这两个肿瘤靶向药物可老药新用:治疗该融合基因阳性的骨肉瘤肺转移患者^[27]。

同时,该融合蛋白Rab22a-NeoF1可通过传统的转运必需内体分选复合物(endosomal sorting complex required for transport, ESCRT)途径,被分泌到外泌体,但并不通过经典的方式被包裹至外泌体中^[28]。Rab22a-NeoF1进入外泌体的过程中,热休克蛋白90(heat shock protein 90, HSP90)扮演了重要角色。HSP90是一类分子伴侣,通常帮助蛋白质正确折叠,并在非传统分泌途径中参与蛋白质的分选^[29]。Rab22a-NeoF1含有多个类似KFERQ的结构域,其中最为关键的是位于其序列中的RVLFLN^[42],这一区域能够被HSP90识别。具体来说,HSP90通过识别Rab22a-NeoF1上的KFERQ样序列,将Rab22a-NeoF1选择性地转运到外泌体。这一机制与自噬途径中的蛋白运输类似,但Rab22a-NeoF1通过与HSP90的结合被包裹至外泌体,而不是进入自噬体或溶酶体被降解。使用Ganetespib(HSP90抑制剂)处理细胞后,Rab22a-NeoF1在外泌体中的分泌量显著减少;Rab22a-NeoF1的RVLFLN^[42]突变体不能进入外泌体^[28]。

Rab22a-NeoF1通过其前10个氨基酸与PYK2相互作用,促进了PYK2的胞外分泌。Rab22a-NeoF1、PYK2均可被受体细胞(融合基因阴性肿瘤细胞)摄取,PYK2可激活RhoA,增强细胞的迁移、侵袭和

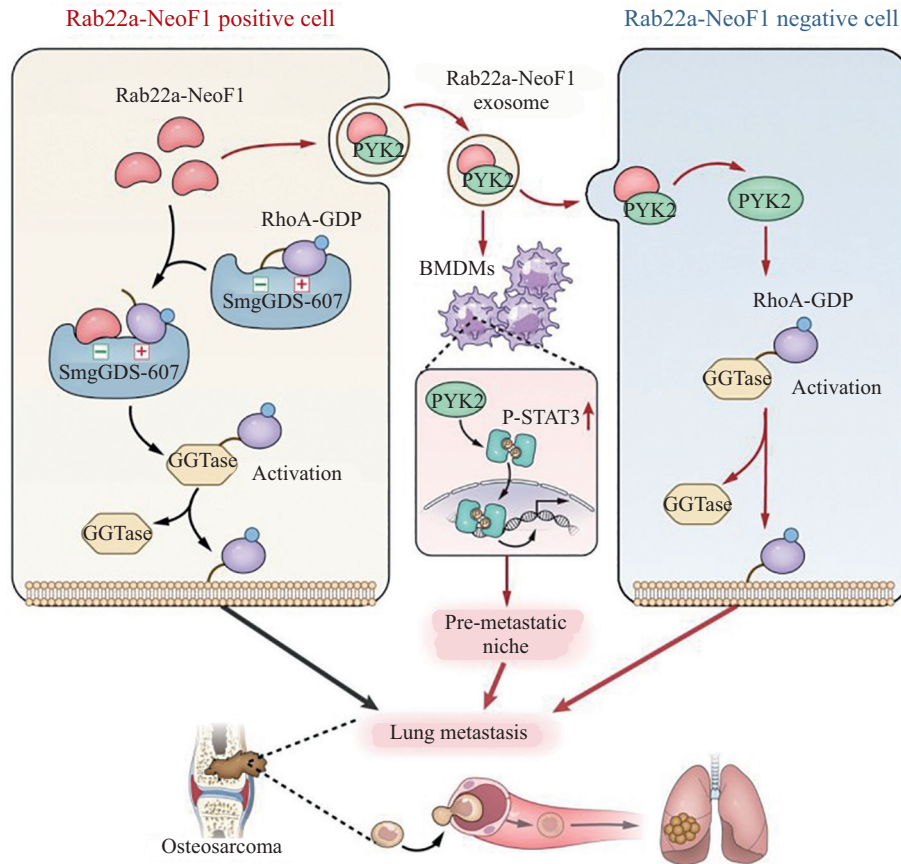


图1 外泌体源性的Rab22a-NeoF1融合蛋白重塑肿瘤免疫微环境及融合基因阴性细胞促进骨肉瘤肺转移
Fig.1 Exosome-derived Rab22a-NeoF1 fusion protein remodel tumor immune microenvironment and fusion gene-negative cells promote lung metastasis of osteosarcoma

肺转移能力。同时,外泌体源性的Rab22a-NeoF1、PYK2可进入血液循环,诱导肺部的CCL2、S100A8和S100A9等分子表达,促进骨髓来源巨噬细胞(bone marrow-derived macrophages, BMDMs)的招募并激活STAT3信号通路,诱导其向M2型肿瘤相关巨噬细胞极化,在肺部构建转移前微环境(pre-metastatic niche),从而促进肿瘤肺转移^[28]。

总之,Rab22a-NeoF1作为一种新型的融合蛋白促进骨肉瘤的肺转移,融合蛋白通过外泌体分泌为肿瘤的异质性传播提供了重要的见解,也很好诠释了为什么肿瘤组织中融合基因阳性率仅占10%,融合基因仍可作为肿瘤的有效治疗靶标(图1)。

2 表皮生长因子受体(EGFR)被分泌到细胞外的分子机制及其临床意义

在多泡内体形成腔内囊泡的经典机制是由ESCRT机制介导的,ESCRT途径由四个多蛋白复合物(ESCRT-0、-I、-II和-III)和相关蛋白组成,它们协

同作用,促进膜变形和裂解,从而形成腔内囊泡^[30]。这一过程始于ESCRT-0识别并聚集内体膜上的泛素化货物蛋白。然后,ESCRT-I和ESCRT-II诱导膜出芽,在VPS4进行ATP水解后,ESCRT-III亚基依次聚合,驱动膜变形和裂解,最终产生腔内囊泡^[31]。

除了经典的依赖ESCRT的机制外,研究者还发现了非经典的依赖ESCRT的途径。其中一种途径涉及ESCRT相关蛋白Alix(ALG-2-interacting protein X)。Alix可直接与ESCRT-III成分相互作用,在货物分拣和腔内囊泡形成中发挥作用,在病毒出芽和细胞分裂过程中也扮演重要角色^[32]。许多货物,包括目前已知的蛋白聚糖syndecan、四次跨膜蛋白CD63和Toll样受体转运伴侣UNC93B1等,都通过胞质尾部招募Syntenin-Alix-ESCRT-III通路来介导其腔内囊泡的形成。Alix与Syntenin结合后,再招募ESCRT-III和VPS4完成腔内囊泡的形成。另一种非典型的依赖于ESCRT的途径涉及HD-PTP(含His结构域的蛋白酪氨酸磷酸酶),它在某些情况下可在功能上取

代Alix, HD-PTP与ESCRT-0和ESCRT-III成分相互作用, 并与货物分拣和腔内囊泡的形成有关^[31]。

有趣的是, 也有独立于ESCRT的腔内囊泡形成机制。第一个独立于ESCRT的腔内囊泡生物形成机制需要鞘脂神经酰胺, 这种锥形脂质可诱导膜自发弯曲, 促进腔内囊泡出芽。这一过程由中性鞘磷脂酶2(nSMase2)介导, 它从鞘磷脂中生成神经酰胺^[33]。神经酰胺依赖途径在携带特定货物(如少突胶质细胞中的蛋白脂蛋白)的外泌体形成过程中尤为重要^[34]。然而, 在这种不依赖ESCRT的腔内囊泡形成过程中, 需要哪些蛋白以及如何发挥作用仍是未知。

受体酪氨酸激酶(receptor tyrosine kinase, RTK)家族的EGFR, 经激活后被内吞, 然后经过内体运输, 并通过多泡内体与溶酶体的融合, 最后进入溶酶体降解, 这是由多种RAB GTPase和ESCRT机制介导的^[35-37]。ESCRT机制将泛素化的EGFR分选到腔内囊泡中进行溶酶体降解, 这被定义为多泡内体途径中膜蛋白溶酶体内分选的典型模式。事实上, EGFR经常在多种类型的癌症中积累和/或突变, 并存在于从癌细胞系和患者血清中提取的外泌体中^[38]。这一现象表明, EGFR向外泌体分泌的腔内囊泡分选机制可能在两个关键步骤(腔内囊泡形成和防止多泡内体降解)上不同于ESCRT机制。

康教授团队^[39]揭示了一种由RAB31调控的、不依赖于ESCRT的新型外泌体通路, 即RAB31-FLOTs依赖于脂筏微域的外泌体通路, 该通路控制着RTKs外泌体的分选, 大大推进了人们对外泌体生物发生的认识。脂筏微域是由鞘脂质、胆固醇和蛋白质组成的纳米级集合体, 可以稳定地凝聚在一起, 形成平台, 在信号转导、病毒感染和膜运输中发挥作用^[40]。支架蛋白FLOTs与鞘脂神经酰胺和胆固醇协调形成平台; 激活的RAB31不仅作为触发器驱动平台出芽到多泡内体中形成腔内囊泡, 而且还招募TBC1D2B使RAB7失活, 从而阻止多泡内体与溶酶体融合, 使腔内囊泡作为外泌体分泌。货物RTK可磷酸化RAB31, 使RAB31激活, 从而驱动这些RTK进入多泡内体平台, 形成腔内囊泡(外泌体)。

值得注意的是, 我们还发现脂筏微域中的神经酰胺和胆固醇不是ESCRT机制驱动的外泌体生物生成所必需的。因此, 重新定义了腔内囊泡(外泌体)的生物发生机制: RAB31-FLOTs机制依赖于脂筏微域, 而大型且受限的ESCRT机制则不受脂筏微域影响。

也就是说, RAB31-FLOTs和Syntenin-Alix-ESCRT-III机制是两条平行的外泌体通路, 它们负责不同的货物。Syntenin-Alix-ESCRT-III通路是syndecan/UNC93B1和CD9/CD81/CD63等四次跨膜蛋白分选进入外泌体的必要条件, 是一种组成型分泌; 而活跃的RAB31-FLOTs机制则由上游信号(如EGFR)强烈触发, 激活的RAB31-FLOTs机制可驱动四次跨膜蛋白CD9、CD81和CD63及其结合伙伴Syntenin-1绕过Alix-ESCRT-III途径分选到外泌体中。由于膜蛋白被分选到脂筏微域以形成在膜信号转导和运输中发挥作用的平台, 我们推测RAB31-FLOTs机制可能是将RTKs以外的膜蛋白分选到外泌体的共同驱动力。

根据这个新的发现, 我们可将腔内囊泡的形成机制分为三种途径: 经典ESCRT依赖性途径、非经典ESCRT依赖性途径和RAB31-FLOTs相关脂筏依赖性途径(图2)。外泌体领域国际著名学者、美国康奈尔大学LYDEN等^[41]对EGFR的外泌体新通路给予了高度的评价, 并同期发表了其亮点评论: 解决了领域内存在多年的“ESCRT非依赖的外泌体通路是什么及其如何发生?”这个科学问题。

另外, 康教授团队^[42]揭示了RAB22A通过增强EGFR循环、抑制EGFR降解, 促进包含EGFR的MVs释放。RAB22A招募RAB7A的GTPase激活蛋白(GAP)TBC1D2B使RAB7A失活, 从而阻止EGFR转运到晚期核内体和溶酶体。RAB22A还与RAB11A的鸟嘌呤核苷酸交换因子(guanine nucleotide-exchange factor, GEF) SH3BP5L结合, 激活早期核内体上的RAB11A。因此, EGFR被循环内体运输到细胞表面并包装成MVs。此外, EGFR可以使RAB22A的Tyr136位点磷酸化, 从而促进含有EGFR的MVs的形成。

货物分子在局部的浓度影响着其将以何种方式被分泌到细胞外。若货物分子在细胞膜富集, 则它们更可能以MVs的方式分泌到细胞外; 若在晚期内体富集, 则倾向于以外泌体的方式分泌到细胞外。货物分子在细胞内的运输途径也影响着其分泌方式。若货物分子经早期内体→分选内体→循环内体途径运输, 则更可能被包入MVs, 若经早期内体→晚期内体→多囊泡内体方向运输, 则更可能被分选入外泌体。这一过程受RAB22A和RAB31的调控^[39,42]。

同一个细胞是否会同时分泌外泌体和MVs以及是否释放等量的两种EVs是一个值得探讨的问

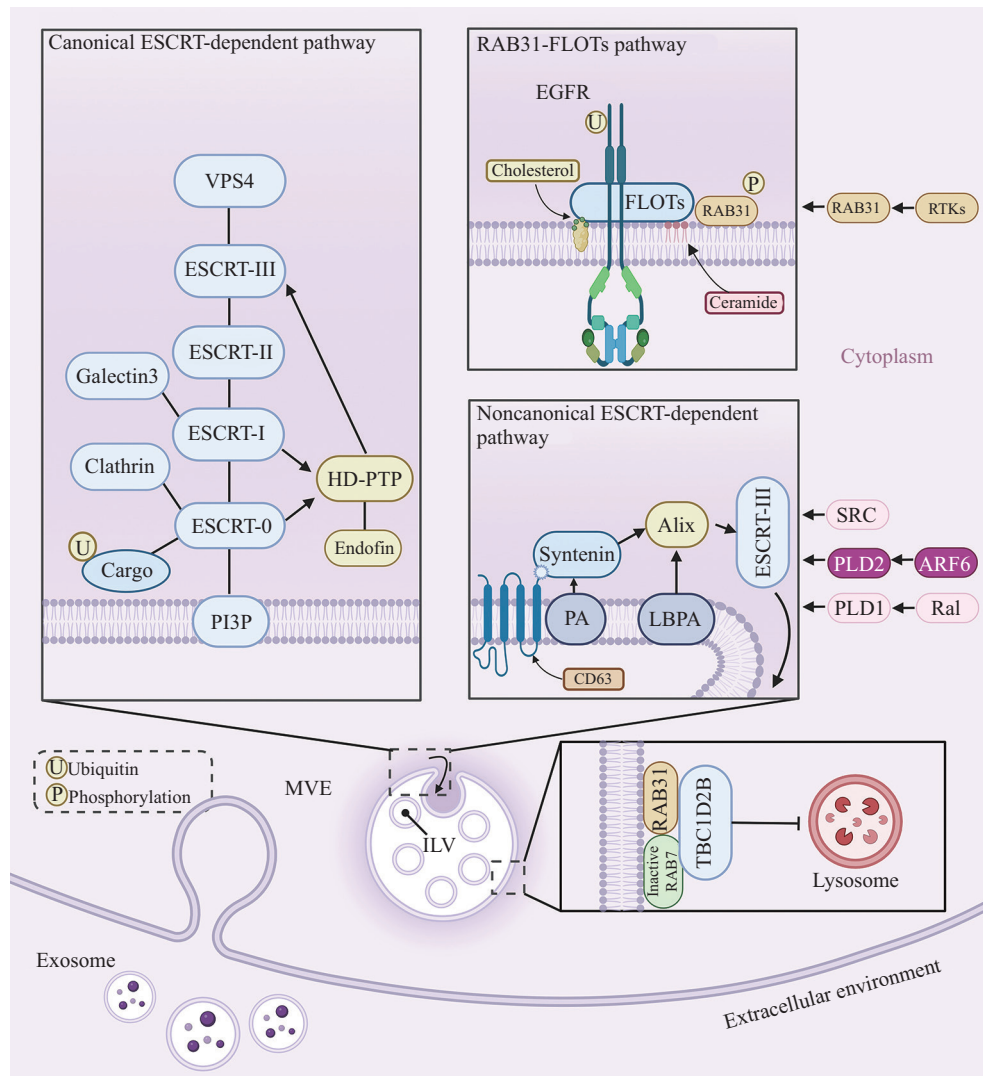


图2 腔内囊泡的形成受经典的ESCRT依赖途径、非经典的ESCRT依赖途径和RAB31-FLOTs途径调控(图片由Biorender创建)

Fig.2 ILV formation is regulated by classical ESCRT dependent pathway, non-classical ESCRT dependent pathway and RAB31-FLOTs pathway (figure created by Biorender)

题。我们证实RAB31过表达促进含EGFR外泌体释放,而RAB22A过表达促进包含EGFR的MVs释放;但在同一细胞系中,RAB22A蛋白表达量如果相对较高,RAB31的表达量就会相对较低^[39,42]。这暗示,同一细胞,若RAB22A过表达,则选择分泌MVs的方式进行信息交流;若RAB31过表达,则通过分泌外泌体的方式进行通讯传递。

康教授团队^[39,42]发现了两种EGFR的胞外分泌途径——外泌体和微囊泡,并证实了EGFR突变体能够促进这一过程,从而实现了肿瘤细胞间的EGFR信号传递。这一发现为临床中长期未能合理解释的现象提供了新的解释:在对EGFR靶向药物产生耐药的肿瘤组织中,并非所有肿瘤细胞都携带

EGFR突变。

3 Rafeesome-R-EV形成机制及在肿瘤中的作用

R-EV是康教授团队^[12]近年鉴定到的一种新的EVs类群。与外泌体的形成机制类似,R-EV是由具有MVB样结构的新型亚细胞结构Rafeesome(它是由RAB22A调控的非经典自噬和早期内体融合而成)与质膜融合释放内含的非经典自噬体产生的,大小在100~500 nm^[12]。该研究被同行高度评价,清华大学俞立教授^[43]在*Cell Res*发表了其亮点评论:这是首次报道了细胞外囊泡可来源于自噬体的内层膜,认为Rafeesome-R-EV是一种新的、可与MVB-exosome

并行的EVs生成路径,开拓了自噬体形成细胞外囊泡的新领域。

激活型干扰素刺激因子(stimulator of interferon genes, STING)通过进入非经典自噬体成为Rafeesome-R-EV的货物,被分泌到肿瘤微环境中发挥抗肿瘤效应,这个发现部分解释了为什么肿瘤患者对放化疗的敏感性不一样,也为利用活化型STING的抗肿瘤作用提供了新策略。目前正在开发在间充质干细胞中产生激活型STING的R-EV进行抗肿瘤研究^[44]。

Rafeesome内部包含非经典自噬体的内层囊泡,这是R-EV在细胞内的前体结构,因此,探究非经典自噬体的形成机制是了解Rafeesome的生物发生以及R-EV来源的重要前提。研究证实,RAB22A以不依赖FIP200、ULK1等自噬关键基因的方式在内质网中诱导非经典自噬体的形成,然而自噬体的膜来源尚未被阐明。为了解决这一关键问题,通过提取Rafeesome细胞器并进行质谱分析,鉴定到两个内质网膜蛋白TMEM33及RTN4在Rafeesome里显著富集,并且敲低二者均能降低RAB22A诱导的自噬水平,这初步验证了TMEM33及RTN4在Rafeesome生物发生过程中的调控作用。Reticulons是一类高度保守的在管状内质网上含量丰富的膜整合蛋白家族。研究表明,Reticulons亚家族成员RTN4是负责形成及维持管状内质网形态的关键蛋白^[45]。RTN4驱动膜弯曲的作用得益于其特有的C-端保守的同源结构域

RHD(reticulon homology domain)。RHD由两个高度疏水的跨膜(transmembrane, TM)结构域组成,呈“楔子”状,跨膜序列短,在内质网外膜占据的空间比内膜大,导致外膜受到的张力更大,这也解释了Reticulons促进管状内质网膜弯曲,维持管状膜的高曲度的机制^[45]。SHIBATA等^[46]发现Reticulons还可以通过RHD在膜上形成稳定的寡聚物,寡聚化的形成可能有利于Reticulons在内质网膜上持续形成外膜张力从而维持膜弯曲的特性。因此提出猜想:RTN4参与非经典自噬体的形成是否与其寡聚化特性相关?通过一系列生化及成像分析,研究团队最新研究阐明了Rafeesome-R-EV通路的发生机制:RAB22A通过与TMEM33结合,促进RTN4寡聚形成RTN4富集的微域,大量RTN4寡聚物在膜上产生强烈的张力导致内质网膜过度弯曲;随后RTN4携带TMEM33及RAB22A从内质网膜上出芽产生RTN4单层膜小泡,RTN4小泡通过ATG9A的运输发生同型融合形成早期隔离膜,并招募ATG12-ATG5-ATG16L1复合物促进LC3脂化,致使其锚定于内、外膜上参与隔离膜的延伸闭合,最终形成双层膜的RTN4非经典自噬体(图3)。最后RTN4非经典自噬体与RAB22A早期内体融合形成Rafeesome,从而被Rafeesome分泌到细胞外成为R-EV。重要的是,通过免疫亲和法分离TMEM33标记的R-EV和CD63标记的外泌体,发现了二者所包含的货物蛋白具有特异性,进一步证明了R-EV是一种独立于传统外泌体的新型EVs类群,

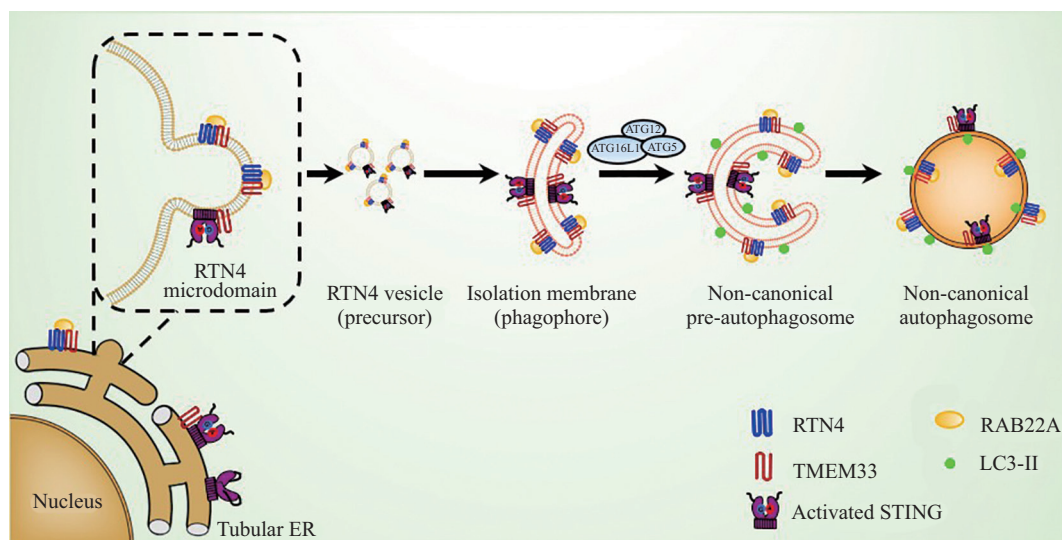


图3 TMEM33/RTN4介导管状内质网出芽促进Rafeesome-R-EV的形成

Fig.3 TMEM33/RTN4 mediates tubular endoplasmic reticulum bud scission to promote the formation of Rafeesome-R-EV

且TMEM33可作为R-EV的标志物,用于特异性分离及鉴定R-EV。

我们揭示了Rafeesome在调控肿瘤免疫微环境中的重要功能:天然免疫的明星分子STING可作为Rafeesome-R-EV分泌途径的底物被Rafeesome包裹分泌到微环境中,进而被免疫细胞摄取并分泌干扰素 β (interferon- β , IFN β)等细胞因子,从而在肿瘤微环境中杀伤肿瘤细胞^[12]。在过去的十多年里,大量的研究表明STING通路在抵抗各种外来刺激包括病毒感染、自身免疫、神经退行性疾病和肿瘤进程从而启动免疫反应中发挥关键作用。STING是一种内质网锚定蛋白,传统研究发现STING在细胞受到外来的DNA或病毒刺激时从内质网通过囊泡转运系统——COP-II小泡被运输到高尔基体,随后招募TBK1激酶,通过级联反应最终诱导IFN β 的产生^[47-49]。然而,STING通路在肿瘤的发生发展中是一把“双刃剑”,其免疫激活可发挥抗肿瘤作用,而过度的免疫激活却成为促进肿瘤进展的“利器”。研究发现,STING的慢性激活会诱导持续的炎症反应,从而提供了一个促癌的环境。具有染色体不稳定性肿瘤细胞通过刺激STING持续激活非经典NF- κ B信号,从而促进肿瘤细胞转移^[50-51]。有文献报道STING转运到高尔基体后,激活的STING可作为离子通道,诱导高尔基体氢离子外流,从而招募NLRP3炎症小体,激活NF- κ B通路^[52]。因此,如何在启动STING正常的免疫激活效应下避免STING经高尔基体的促炎作用是成功开发以STING为靶点的免疫疗法的重要因素。

通常来说,STING的免疫应答主要在细胞内发生,而我们首次报道STING可通过Rafeesome-R-EV路径在细胞外发挥免疫活性。那么,STING是如何规避高尔基体的转运而选择作为分泌底物被Rafeesome捕获的呢?因为RTN4非经典自噬体起源于内质网,前期研究发现,TMEM33可通过结合激活型STING抑制其经由COP-II小泡的高尔基体转运途径,同时RTN4寡聚微域的出芽为STING在内质网的输出打开了新的“出口”。因此,STING作为货物蛋白通过内质网-RTN4非经典自噬体-Rafeesome-R-EV的转运路径调控细胞外的免疫微环境。有趣的是,我们最近研究表明在非经典自噬体上也存在磷酸化TBK1,但此时STING不能结合NLRP3,这表明STING被转运至非经典自噬体后仍可以激活细胞内的下游信号,同时阻滞NF- κ B炎症通路的激活。因此,

Rafeesome-R-EV介导的STING转运是STING免疫激活的新途径,通过这个机制,STING激活剂和化疗药物可以更好地发挥抗肿瘤效应。通过研究STING在不同癌种中的转运方式,并分析其规律,可以了解STING在不同癌种中的免疫激活机制,有助于具有靶向性的STING激动剂的开发,通过在不同肿瘤中选择性地增强STING在细胞内或细胞外的信号而达到肿瘤治疗的效果。

侵袭性肿瘤的一个重要特征是染色体不稳定(chromosomal instability, CIN),它与肿瘤预后不良和化疗耐药息息相关^[53]。CIN的主要后果是产生微核——一种大小为主核的1/20~1/5的小核,由于其异常的核孔功能和低水平的层黏连蛋白B1(lamin B1),以及肿瘤细胞中较高水平的ROS,使其核膜更容易破裂^[54]。有研究表明,60%的微核在间期由于微核膜崩溃而经历不可逆的区隔化损失,微核的崩溃使其包裹的DNA暴露于细胞质中,催化染色体重排和表观遗传改变,这些改变促进了肿瘤异质性和治疗抗性^[55]。

最近有研究表明,线粒体转录因子A(transcription factor A, mitochondrial, TFAM)——一种结合线粒体DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)的蛋白质,能够结合泄漏到细胞质中的mtDNA并与LC3相互作用,从而将mtDNA带到自噬体中降解,从而抑制细胞炎症的发生^[56]。有趣的是,我们在肿瘤细胞的Rafeesome质谱结果中发现了许多DNA结合蛋白,而肿瘤细胞大多存在染色体不稳定现象从而产生许多胞质DNA,胞质DNA或许可以被这些DNA结合蛋白招募到Rafeesome中。一方面,可以使胞质DNA不再游离暴露于细胞质中,避免其被cGAS识别导致STING慢性激活引起炎症,这或许能够抑制肿瘤的生长与转移;另一方面,通过Rafeesome-R-EV分泌到细胞外的DNA或许可以作为新型的肿瘤标志物,我们正在开展这方面的研究工作。

肿瘤细胞中的胞质DNA大多源于微核膜崩溃导致的染色体碎裂,而最近的一项研究表明,p62与人类癌细胞系中的染色体碎裂增加呈正相关^[54,57],我们在之前的研究中发现癌细胞中p62也可以作为Rafeesome-R-EV的一个货物被分泌到细胞外,从而使细胞内p62的水平降低,这也许可以减少肿瘤细胞中因染色体的碎裂而产生的胞质DNA,从而抑制肿瘤的转移。

4 总结

本文主要讨论了几种细胞外囊泡发生的新途径在肿瘤演进中的作用与临床意义, 包括: (1) 融合蛋白 Rab22a-NeoF1 以依赖于 ESCRT, 但并不通过经典的方式被包裹至外泌体中, 而是通过 Rab22a-NeoF1 与 HSP90 的结合被包裹至外泌体进而分泌, 促进骨肉瘤肺转移; (2) EGFR 以 RAB31-FLOTs 相关脂筏依赖性途径 (ESCRT 非依赖) 的外泌体和微囊泡两种形式进行分泌, 促进靶向药物产生耐药; (3) 新型亚细胞结构 Rafeosome-R-EV 可以分泌激活型 STING 发挥抗肿瘤效应, 进而增强肿瘤患者对放化疗的敏感性。这些研究揭示了 EVs 在肿瘤转移、耐药性传播及肿瘤免疫调节中的重要作用, 为肿瘤治疗提供了新思路。

恶性肿瘤是我国重大疾病, 多发且致死率高。肿瘤有一个重要的特征就是肿瘤异质性, 肿瘤由细胞亚群 (亚克隆) 组成, 染色体的不稳定性及其表型可塑性使其具有异质性。一方面, 肿瘤细胞通过分泌 EVs, 将蛋白质、核酸等物质分泌出去, 在细胞间互相传递、吸收, 从而使异质性的肿瘤细胞同质化, 这可能是同类分期的肿瘤患者可以同质化治疗的重要原因。因此, 解析肿瘤演进过程中 EVs 的分泌机制可以为肿瘤的综合治疗提供新思路。另一方面, EVs 也可作为载体, 用于杀灭肿瘤细胞。EVs 的这些特性使其成为肿瘤学研究的前沿领域, 发展新的 EVs 分离鉴定方法、解析 EVs 形成机制与调控通路等, 将助力揭示肿瘤演进的规律, 为肿瘤的诊断、治疗提供新的策略。

参考文献 (References)

- [1] KALLURI R, LEBLEU V S. The biology, function, and biomedical applications of exosomes [J]. *Science*, 2020, 367(6478): eaau6977.
- [2] PAN B T, TENG K, WU C, et al. Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes [J]. *J Cell Biol*, 1985, 101(3): 942-8.
- [3] OSTENFELD M S, JEPPESEN D K, LAURBERG J R, et al. Cellular disposal of miR23b by RAB27-dependent exosome release is linked to acquisition of metastatic properties [J]. *Cancer Res*, 2014, 74(20): 5758-71.
- [4] VAN NIEL G, CARTER D R F, CLAYTON A, et al. Challenges and directions in studying cell-cell communication by extracellular vesicles [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2022, 23(5): 369-82.
- [5] ROEFS M T, SLUIJTER J P G, VADER P. Extracellular vesicle-associated proteins in tissue repair [J]. *Trends Cell Biol*, 2020, 30(12): 990-1013.
- [6] BUZAS E I, GYORGY B, NAGY G, et al. Emerging role of extracellular vesicles in inflammatory diseases [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2014, 10(6): 356-64.
- [7] VAN NIEL G, D'ANGELO G, RAPOSO G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018, 19(4): 213-28.
- [8] TRICARICO C, CLANCY J, D'SOUZA-SCHOREY C. Biology and biogenesis of shed microvesicles [J]. *Small GTPases*, 2017, 8(4): 220-32.
- [9] CARUSO S, POON I K H. Apoptotic cell-derived extracellular vesicles: more than just debris [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 1486.
- [10] WELSH J A, GOBERDHAN D C I, O'DRISCOLL L, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): from basic to advanced approaches [J]. *J Extracell Vesicles*, 2024, 13(2): e12404.
- [11] 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.
- [12] GAO Y, ZHENG X, CHANG B, et al. Intercellular transfer of activated STING triggered by RAB22A-mediated non-canonical autophagy promotes antitumor immunity [J]. *Cell Res*, 2022, 32(12): 1086-104.
- [13] LIU P, SHI J, SHENG D, et al. Mitophogenesis, a form of mitochondria-specific ectocytosis, regulates sperm mitochondrial quantity and fertility [J]. *Nat Cell Biol*, 2023, 25(11): 1625-36.
- [14] ZHU M, ZOU Q, HUANG R, et al. Lateral transfer of mRNA and protein by migrasomes modifies the recipient cells [J]. *Cell Res*, 2021, 31(2): 237-40.
- [15] PEGTEL D M, GOULD S J. Exosomes [J]. *Annu Rev Biochem*, 2019, 88: 487-514.
- [16] ZHANG H, FREITAS D, KIM H S, et al. Identification of distinct nanoparticles and subsets of extracellular vesicles by asymmetric flow field-flow fractionation [J]. *Nat Cell Biol*, 2018, 20(3): 332-43.
- [17] 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.
- [18] RASHID A. Auer rods in dysplastic granulocyte [J]. *Blood*, 2014, 124(7): 998.
- [19] WHITESIDE T L. Exosomes and tumor-mediated immune suppression [J]. *J Clin Invest*, 2016, 126(4): 1216-23.
- [20] 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.
- [21] 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.
- [22] MELO S A, LUECKE L B, KAHLERT C, et al. Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer [J]. *Nature*, 2015, 523(7559): 177-82.
- [23] BEIRD H C, BIELACK S S, FLANAGAN A M, et al. Osteosarcoma [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2022, 8(1): 77.
- [24] MERTENS F, JOHANSSON B, FIORETOS T, et al. The emerging complexity of gene fusions in cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2015, 15(6): 371-81.
- [25] LIAO D, ZHONG L, YIN J, et al. Chromosomal translocation-

- derived aberrant Rab22a drives metastasis of osteosarcoma [J]. *Nat Cell Biol*, 2020, 22(7): 868-81.
- [26] XIE K, ZHANG X, TAO Y. Rab22a-NeoF1: a promising target for osteosarcoma patients with lung metastasis [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, 5(1): 161.
- [27] ZENG C, ZHONG L, LIU W, et al. Targeting the lysosomal degradation of Rab22a-NeoF1 fusion protein for osteosarcoma lung metastasis [J]. *Adv Sci*, 2023, 10(5): e2205483.
- [28] 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.
- [29] SCHOPF F H, BIEBL M M, BUCHNER J. The HSP90 chaperone machinery [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2017, 18(6): 345-60.
- [30] HURLEY J H. ESCRTs are everywhere [J]. *EMBO J*, 2015, 34(19): 2398-407.
- [31] SCHONEBERG J, LEE I H, IWASA J H, et al. Reverse-topology membrane scission by the ESCRT proteins [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2017, 18(1): 5-17.
- [32] BAIETTI M F, ZHANG Z, MORTIER E, et al. Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes [J]. *Nat Cell Biol*, 2012, 14(7): 677-85.
- [33] 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.
- [34] YUYAMA K, SUN H, MITSUTAKE S, et al. Sphingolipid-modulated exosome secretion promotes clearance of amyloid-beta by microglia [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(14): 10977-89.
- [35] TEBBUTT N, PEDERSEN M W, JOHNS T G. Targeting the ERBB family in cancer: couples therapy [J]. *Nat Rev Cancer*, 2013, 13(9): 663-73.
- [36] DOBROWOLSKI R, DE ROBERTIS E M. Endocytic control of growth factor signalling: multivesicular bodies as signalling organelles [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2011, 13(1): 53-60.
- [37] JEAN S, KIGER A A. Coordination between RAB GTPase and phosphoinositide regulation and functions [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012, 13(7): 463-70.
- [38] ZHANG H, DENG T, LIU R, et al. Exosome-delivered EGFR regulates liver microenvironment to promote gastric cancer liver metastasis [J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 15016.
- [39] 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.
- [40] SIMONS K, GERL M J. Revitalizing membrane rafts: new tools and insights [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010, 11(10): 688-99.
- [41] KENIFIC C M, ZHANG H, LYDEN D. An exosome pathway without an ESCRT [J]. *Cell Res*, 2021, 31(2): 105-6.
- [42] LIN Y, WEI D, HE X, et al. RAB22A sorts epithelial growth factor receptor (EGFR) from early endosomes to recycling endosomes for microvesicles release [J]. *J Extracell Vesicles*, 2024, 13(7): e12494.
- [43] YU L. A new route for EV biogenesis [J]. *Cell Res*, 2023, 33(2): 87-8.
- [44] QIAN L, ZHANG Z, ZHANG R, et al. Activated STING-containing R-EVs from iPSC-derived MSCs promote antitumor immunity [J]. *Cancer Lett*, 2024, 597: 217081.
- [45] VOELTZ G K, PRINZ W A, SHIBATA Y, et al. A class of membrane proteins shaping the tubular endoplasmic reticulum [J]. *Cell*, 2006, 124(3): 573-86.
- [46] SHIBATA Y, VOSS C, RIST J M, et al. The reticulon and DP1/Yop1p proteins form immobile oligomers in the tubular endoplasmic reticulum [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(27): 18892-904.
- [47] ISHIKAWA H, MA Z, BARBER G N. STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity [J]. *Nature*, 2009, 461(7265): 788-92.
- [48] GUI X, YANG H, LI T, et al. Autophagy induction via STING trafficking is a primordial function of the cGAS pathway [J]. *Nature*, 2019, 567(7747): 262-6.
- [49] DOBBS N, BURNAEVSKIY N, CHEN D, et al. STING activation by translocation from the ER is associated with infection and autoinflammatory disease [J]. *Cell Host Microbe*, 2015, 18(2): 157-68.
- [50] BAKHOUM S F, NGO B, LAUGHNEY A M, et al. Chromosomal instability drives metastasis through a cytosolic DNA response [J]. *Nature*, 2018, 553(7689): 467-72.
- [51] LI J, HUBISZ M J, EARLIE E M, et al. Non-cell-autonomous cancer progression from chromosomal instability [J]. *Nature*, 2023, 620(7976): 1080-8.
- [52] LIU B, CARLSON R J, PIRES I S, et al. Human STING is a proton channel [J]. *Science*, 2023, 381(6657): 508-14.
- [53] DREWS R M, HERNANDO B, TARABICHI M, et al. A pan-cancer compendium of chromosomal instability [J]. *Nature*, 2022, 606(7916): 976-83.
- [54] LIU S, KWON M, MANNINO M, et al. Nuclear envelope assembly defects link mitotic errors to chromothripsis [J]. *Nature*, 2018, 561(7724): 551-5.
- [55] HATCH E M, FISCHER A H, DEERINCK T J, et al. Catastrophic nuclear envelope collapse in cancer cell micronuclei [J]. *Cell*, 2013, 154(1): 47-60.
- [56] LIU H, ZHEN C, XIE J, et al. TFAM is an autophagy receptor that limits inflammation by binding to cytoplasmic mitochondrial DNA [J]. *Nat Cell Biol*, 2024, 26(6): 878-91.
- [57] MARTIN S, SCORZONI S, CORDONE S, et al. A p62-dependent rheostat dictates micronuclei catastrophe and chromosome rearrangements [J]. *Science*, 2024, 385(6712): ead7446.