

·综述·

DOI: 10.16605/j.cnki.1007-7847.2018.05.012

外泌体形成分泌调控及其在肿瘤发生发展中的作用

翁新宪¹, 周 转¹, 张治宝^{1,2}, 廖朝亮¹, 杨力芳^{1*}

(1. 中南大学 肿瘤研究所, 中国湖南 长沙 410078; 2. 中南大学 湘雅医院, 中国湖南 长沙 410008)

摘要: 外泌体(exosome)是起源于细胞内体的双层膜小泡。作为细胞间重要的介质, 外泌体转运脂质、蛋白质、RNA 等物质, 从而发挥重要的生物学功能。外泌体的形成与分泌需要经过一个多因素、多阶段参与的精细调控过程。供体细胞分泌负载内含物的外泌体进入肿瘤微环境, 随后受体细胞以不同的作用方式摄取其中的内含物, 引起肿瘤的侵袭转移、免疫逃逸、治疗抵抗等。近年来, 外泌体已成为医学研究的热点之一。现就外泌体形成分泌调控及其在肿瘤发生发展中的作用进展予以综述。

关键词: 外泌体; 调控; 肿瘤演进; 肿瘤微环境; 治疗抵抗

中图分类号: Q28, R730.22

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2018)05-0422-09

Regulatory Mechanisms of Exosome Biogenesis and Secretion and Their Roles in Tumor Progression

WENG Xin-xian¹, ZHOU Zhuan¹, ZHANG Zhi-bao^{1,2}, LIAO Chao-liang¹,
YANG Li-fang^{1*}

(1. Cancer Research Institute, Central South University, Changsha 410078, Hunan, China; 2. Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, Hunan, China)

Abstract: Exosomes are bilayer membrane extracellular vesicles which derive from fusion of multivesicle bodies. As an indispensable mediator in cell-to-cell communications, exosomes have been demonstrated to play an important role in transporting a variety of biological components, including proteins, lipids and RNAs. The biogenesis and secretion of exosomes require a complicated and precise process of multi-factors and multi-stages. Exosomes secreted by donor cells into the tumor microenvironment can regulate tumor development in different ways. Meanwhile, receptor cells uptake the contents of exosomes in many ways, which can enhance the invasive migration, immune escape, and therapeutic resistance of cancer cells. Nowadays, exosomes are increasingly recognized as one of the hot spots in medical research. Herein, the regulatory mechanisms of exosome biogenesis and secretion and their roles in tumor progression are summarized.

Key words: exosome; regulation; tumor progression; tumor microenvironment; therapeutic resistance

(*Life Science Research*, 2018, 22(5): 422~430)

外泌体(exosome)是具有双层膜结构的胞外膜性囊泡, 直径范围 30~200 nm, 电镜下呈现杯托样结构^[1,2]。近年来的研究表明, 肿瘤微环境与肿瘤的发生发展密切相关。肿瘤细胞不仅可以通过细胞与细胞直接接触或释放可溶性细胞因子的方式发挥功能, 还可以通过分泌外泌体实现与肿

瘤微环境中其他细胞之间的联系, 介导多种生物学效应。外泌体载有特异性生物学物质, 其中脂质成分包含有鞘脂、胆固醇、神经酰胺以及花生四烯酸和前列腺素等信号分子; 常见的蛋白质包括膜转运和融合蛋白(GTP 酶, 膜联蛋白, flotillin)、四跨膜蛋白(CD9, CD63, CD81, CD82)、伴侣分子(Hsp70,

收稿日期: 2018-04-02; 修回日期: 2018-05-23

基金项目: 中南大学中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(2017zzts086)

作者简介: 翁新宪(1975-), 男, 湖南株洲人, 助理实验师, 主要从事鼻咽癌发病机制研究; * 通讯作者: 杨力芳(1969-), 男, 湖北黄石人, 博士, 中南大学研究员, 博士生导师, 主要从事肿瘤微环境研究, Tel: 0731-84805448, E-mail: yanglifang@csu.edu.cn。

Hsp90)、多囊内体合成蛋白(Alix, TSG101)、细胞骨架蛋白(Actin, Tubulin)和脂质相关蛋白质;此外,还涉及 DNA、mRNA、microRNA、中间代谢产物等。这些物质不仅能反映其来源细胞类型,更重要的是,还与其来源细胞的生理功能或病理改变密切相关。外泌体与受体细胞融合,传递信息分子,诱发相关的信号通路,执行多种重要的生物学功能^[3,4]。外泌体不仅具有细胞间物质转运和信息传递的生理功能,还具有促进肿瘤发生进展、免疫逃逸、血管生成、药物及放射抵抗等功能^[5]。本文着重探究外泌体的形成、分泌机制及其在肿瘤发生发展研究中的进展。

1 外泌体形成机制

1.1 外泌体的形成

目前,对外泌体形成的机制已有比较充分的认识。首先,胞膜通过内吞作用形成小囊泡即内吞室,内吞室相互融合形成早期内体(early endosome, EE)并进入内体循环。随后,早期内体进一步成熟,转化为晚期内体(late endosome, LE),此时,内体膜返褶逆出芽形成腔内囊泡(intraluminal vesicle, ILV)^[6,7]。富含 ILV 的内体称为多囊内体(multivesicular body, MVB)。含有 CD63、LAMP1、LAMP2 以及晚期内体标志的 MVB 与细胞质膜融合,释放其内 ILV 至胞外,形成外泌体^[8,9](图 1)。外泌体形成机制主要有内体运输分选复合物(endosomal sorting complex required for transport, ESCRT)依赖和 ESCRT 非依赖两种形式(图 2)。

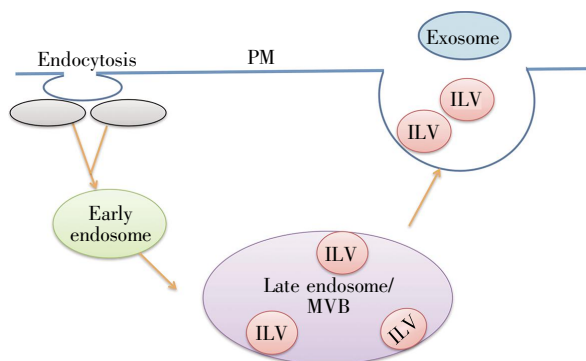


图 1 外泌体形成与分泌过程

PM: 细胞膜; ILV: 腔内囊泡; MVB: 多囊内体。

Fig.1 Exosome biogenesis and secretion

PM: Plasma membrane; ILV: Intraluminal vesicle; MVB: Multivesicular body.

1.2 ESCRT 依赖的形成机制

外泌体形成过程中 ESCRT 募集泛素化的蛋

白质到质膜上,促使 MVB 释放其内 ILV 至胞外。ESCRT 在外泌体形成过程中的功能最初是从蛋白质组学的研究中提出^[10]。ESCRT 包含 4 种复合体及相关辅助蛋白质,ESCRT-0 识别并募集大多数蛋白质,ESCRT-I 和 ESCRT-II 诱导出芽,ESCRT-III 促使囊泡分离,而辅助蛋白质(VTA1、ALIX、VPS4 等)尤其是 VPS4,则促使 ESCRT 之间发生不断分离和再结合的循环过程。这些物质在外泌体形成的过程中各显其能^[11]。

相关研究发现,ESCRT-0 的成员 Hrs (hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate)能识别被泛素标记的蛋白质,并与 ESCRT-0 的另一组分信号转导适配分子(signal transducing adaptor molecule, STAM)相互作用。抑制 Hrs 表达^[12-14],或者敲除 *STAM1*^[15],均能使外泌体的形成减少。此外,ESCRT-I 成员肿瘤易感基因 101 (tumor susceptibility gene 101, TSG101)的缺失也能使外泌体的形成量减少^[16]。人们在乳腺癌中发现,ESCRT-III 成员 CHMP4 的缺失会使外泌体的形成减少^[17]。这些研究充分说明了 ESCRT 在外泌体形成中的关键作用。

有研究报道,辅助蛋白质 ALIX 可促进内体出芽形成腔内囊泡从而增加外泌体的形成量^[17]。但在 HeLa-CIITA 细胞中,敲除 *ALIX* 能够增加 MHC class II 在胞质中的积累,对外泌体的形成没有影响^[15]。VPS4 参与腔内囊泡形成的最后一步,促使膜或 ESCRT-III 复合体的分离^[18]。在 HeLa-CIITA 细胞中抑制 VPS4B 的功能可使外泌体的形成增多^[15],然而,在乳腺癌细胞中同时沉默 VPS4A 和 VPS4B 之后 exosome 的形成增加,沉默 VPS4A、VPS4B 两者中任何一个,对 exosome 的形成没有太大影响^[17]。在 RPE1 细胞中同时抑制 VPS4A、VPS4B 能抑制 exosome 的分泌^[16]。这些研究提示以不同细胞为实验模型其外泌体生成存在异质性。

1.3 ESCRT 非依赖的形成机制

近年来,研究者发现除了经典的 ESCRT 依赖机制,细胞还可以通过 ESCRT 非依赖机制辅助生成 ILV 及 MVB,包括脂质、四跨膜蛋白家族分子或热休克蛋白(heat-shock protein, HSP)。Trajkovic 等^[19]首次证实了外泌体形成的 ESCRT 非依赖机制。他们在实验模型中敲降 ESCRT,发现含有脂质蛋白(proteolipid protein, PLP)的外泌体能正常形成。中性鞘磷脂酶(neutral sphingomyelinase, nS-Mase)水解鞘磷脂生成神经酰胺(ceramide),进一

步的研究发现抑制该酶的作用可减少神经酰胺的生成,进而降低 MVB 膜的内向生芽作用,减少外泌体的形成,提示神经酰胺以不依赖 ESCRT 的作用而形成外泌体。Kosakan 和 Chairoungdua 团队应用 nSMase 抑制剂 GW4869 作用于 HEK293 细胞可减少内含 PLP 外泌体的分泌,其过程不依赖于 ESCRT,而需要神经酰胺的合成^[20, 21]。胆固醇是 MVB 的一个重要组成成分^[22],同时也富含于外泌体外膜^[23]。在少突胶质细胞中,通过药物或基因诱导胆固醇在晚期 MVB 中累积,能促进包含 flotillin-2、ALIX、CD63 和胆固醇的外泌体分泌,这个过程依赖于 flotillin-2^[24]。磷脂酶 D2 (phospholipases D2, PLD2)能将磷脂酰胆碱水解成磷脂酸,研究报道外泌体的形成需要 PLD2 的参与^[25, 26]。

研究发现,四跨膜蛋白家族与外泌体内含物的分选有关。人们应用 nSMase 抑制剂 GW4869 作用肿瘤细胞系,观察到多种典型的外泌体蛋白质 (CD63、CD81 或 TSG101) 和 miRNA 的分泌减少^[12, 27]。在人黑色素瘤细胞中,CD63 能分选黑色素蛋白使其进入 ILV,这个过程既不依赖神经酰胺途径也不依赖 ESCRT 途径^[28]。TSPAN8^[29] 和 CD81^[30] 也可分选一系列配体等进入外泌体。在 HEK293 细胞中,过表达 CD9 或 CD82 能促进外泌体形成^[21]。

此外,分子伴侣 HSP70 可募集转铁蛋白受体 (transferrin receptor, TFR) 到外泌体中^[31],并结合胞浆蛋白 KFERQ,进一步将胞浆蛋白转运到 ILV^[32]。

以上信息提示,外泌体形成与 ESCRT 非依赖

机制的关系是生命科学的热点之一,随着研究的深入,ESCRT 非依赖机制辅助生成外泌体还需更多的实验来充分证实其功能效应。

2 外泌体的分泌调节

除了外泌体形成的调控机制外,外泌体分泌的调节也是一个重要的科学问题。研究发现,细胞内形成 MVBs 后,不同亚群的 MVBs 有不同的降解途径,分泌型 MVB 与细胞质膜融合释放外泌体;降解型 MVB 与溶酶体融合,导致 MVB 及其内含物降解^[8]。近年来,对外泌体分泌至胞外过程的研究逐渐增多,其主要依赖 Rab 家族^[33] 和 SNARE 家族的协助作用(图 2)。

2.1 Rab 家族与外泌体分泌

Rab 蛋白是存在于质膜和细胞器膜中的一类调节型的小分子,是鸟苷酸三磷酸酶(GTPase)结合蛋白 Ras 超家族中最大的亚家族,能调控囊泡转运的不同阶段,比如囊泡的出芽、囊泡和细胞内细胞器的运动、囊泡的衔接,从而促进膜的融合。Rab 蛋白作为胞内的运输蛋白质,在调控胞吞和胞吐过程中发挥重要作用^[34]。

蛋白质组学分析发现外泌体中含有 Rab 家族蛋白^[10]。第一个报道与外泌体分泌相关的 Rab 蛋白是 Rab11,在白血病研究中发现,Rab11 能调控外泌体分泌^[35],过表达 Rab11 突变质粒,外泌体分泌减少^[36]。在中性粒细胞^[37] 和原代少突胶质细胞^[38] 中,人们发现抑制 Rab35 的表达能减少外泌

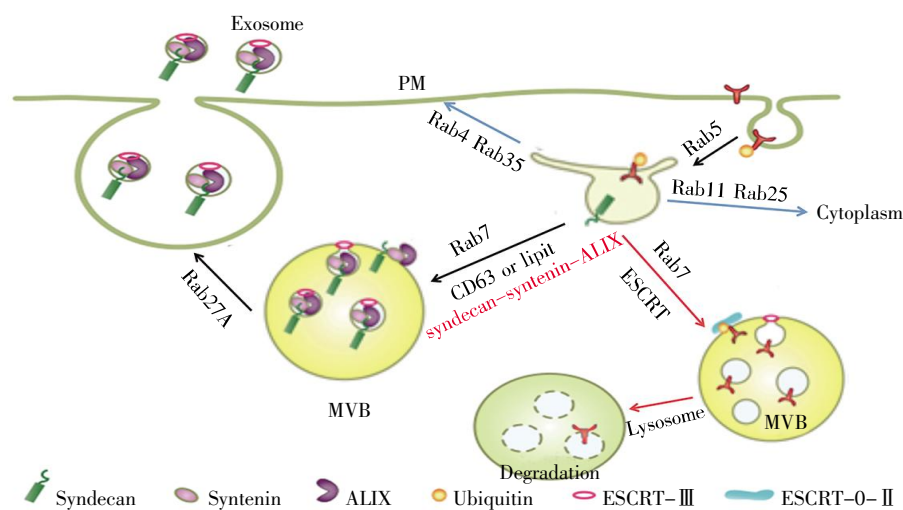


图 2 Rab 家族在外泌体形成分泌中的作用(改编自文献[33])

PM: 细胞膜; ESCRT: 内体运输分选复合物; MVB: 多囊内体; ALIX: 凋亡相关基因-2 相互作用蛋白 X。

Fig.2 Roles of Rab family in exosome biogenesis and secretion (Adapted from reference [33])

PM: Plasma membrane; ESCRT: Endosomal sorting complex required for transport; MVB: Multivesicular body; ALIX: Apoptosis-linked gene-2 interacting protein X.

体分泌。后续在人 RPE1 细胞中也证实外泌体分泌需要 Rab11 或 Rab35 的参与^[16]。在 HeLa 细胞中,沉默 Rab2B、Rab5A、Rab9A、Rab27A、Rab27B 均能减少外泌体分泌,其中 Rab27A 和 Rab27B 的缺失减少效应更明显,而 Rab11A 或 Rab7 的缺失对外泌体分泌无影响^[99]。但是在 MCF-7 细胞中,包含同线蛋白和 ALIX 的外泌体分泌却需要 Rab7 的参与^[17]。在黑色素瘤^[40]、乳腺癌^[41]中沉默 Rab27A,外泌体分泌减少。而在人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 中,Rab27A 的缺失并不会减少外泌体分泌,但是同时敲除 *Rab27A* 和 *Rab27B* 会减少外泌体分泌^[42]。大量研究证实 Rab 家族在外泌体膜融合过程中起重要作用,这为后续探索外泌体分泌的研究者们提供了思路。

2.2 SNARE 家族与外泌体分泌

可溶性 NSF 附着蛋白受体(soluble NSF-attachment protein receptor, SNARE)家族是外泌体分泌中另一个重要的调节分子,是由多种蛋白质组成的复合体。两个负载不同成分的细胞进行精准对接之后,SNARE 有助于脂质双分子层融合^[43]。在不同类型的细胞中,SNARE 蛋白 SNAP-23、VAMP-7 和 VAMP-8 参与钙离子调控的溶酶体分泌物与细胞膜的融合^[44-46]。在 HEK293 细胞中,SNARE 蛋白复合体中的 Ykt6 促进装载成形态素 WNT3A 的外泌体分泌^[13]。在果蝇 MVB 中,人们也检测到 Ykt6 蛋白的存在^[47]。研究报道,突触融合蛋白 1A (syntaxin 1A, STX1A)也能作用于外泌体分泌机制^[48]。由于 SNARE 介导细胞器膜融合的异质性,其作用还需在多个模型中验证。

2.3 其他

Hyenne 等^[49]在秀丽隐杆线虫和乳腺癌细胞中发现, Ral-1 (Ras-related GTPase)定位于 MVB 膜表面,与 MVB 的形成、MVB 和细胞膜的融合有关。该课题组还发现 Ral-1 的下游蛋白质——突触融合蛋白 5 (syntaxin 5, STX5)在 MVB 膜与细胞膜融合的过程中也同样发挥重要的作用,敲除 *STX5* 之后, MVB 外膜不再与细胞膜融合,使得 MVB 在细胞内累积,与此同时,该过程需要 RalA、RalB 的参与。Yang 等^[50]在 MCF-7 细胞中发现, Rab3D 能促进外泌体分泌。在 T 细胞中过表达甘油二酯激酶 α (diacylglycerol kinase α , DGK α)能抑制外泌体分泌,而遏阻 DGK α 的表达则能促进外泌体分泌^[51],提示 DGK α 是 MVB 形成的负调控因子。总之,细胞中可能还存在许多效应分子与外

泌体分泌调控有关,更深入探讨跨膜分泌、细胞外分泌等途径机制,将有助于对外泌体的全面认识。

3 受体细胞摄取外泌体的机制

外泌体形成分泌至胞外后被受体细胞摄取的过程也涉及到多种调节机制。外泌体表面分子与受体细胞质膜表面分子特异性结合介导了其受体细胞的融合。研究证明,连接蛋白如整合素蛋白、细胞黏附分子能调控外泌体与受体细胞膜融合。比如:树突状细胞膜上 LFA-1 分子可与外泌体表面的 ICAM-1 特异结合^[52],肿瘤细胞来源的外泌体表面表达的 TSPAN8 可与内皮细胞或前列腺癌细胞的 ICAM-1 结合^[52],受体细胞表面 CD169 可与外泌体中高水平配体 $\alpha 2, 3$ 连接的唾液酸结合^[53],肿瘤细胞产生的外泌体所表达的硫酸肝素糖蛋白可被受体细胞识别^[54],巨噬细胞膜上的半凝素-5 可识别红细胞来源的外泌体^[55]。此外,受体细胞内化外泌体同样需要众多分子参与。研究发现,受体细胞内化外泌体通过 dynamin、PI3-kinase 和 actin 聚合 3 种方式进行^[38, 56]。外泌体是细胞间重要的交流方式之一,在受体细胞摄取外泌体的机制研究中,除了通过分子间特异性结合介导的外泌体摄取外,更多其他作用方式还有待进一步的探索。

4 外泌体在肿瘤发生发展中的作用

4.1 外泌体影响肿瘤细胞增殖和转移

近年来,大量研究发现外泌体通过转运不同的内含物调控受体肿瘤细胞的增殖和转移。黑色素瘤相关研究发现,高侵袭性的黑色素瘤细胞通过外泌体分泌 MET 蛋白使骨髓祖细胞向表达 c-Kit、Tie2 和 Met 的表型转化,并促进了肿瘤转移前体的形成,从而增加黑色素瘤的转移^[57]。鼻咽癌相关研究发现, LMP1 阳性鼻咽癌细胞与阴性的细胞相比能够产生更多的外泌体,转运 HIF1 α 蛋白至受体细胞,从而将高侵袭性的特性转运到受体细胞,促进鼻咽癌的侵袭转移^[58]。KRAS 是重要的致癌蛋白^[59],近期研究发现,大肠癌细胞可以通过外泌体在细胞间转运 KRAS 蛋白,从而加速受体细胞增殖^[60]。外泌体外膜蛋白参与介导肿瘤细胞的转移倾向性。比如:乳腺癌细胞分泌的外泌体中富含整合素 $\alpha 6\beta 4$ 、 $\alpha 6\beta 1$ 和 $\alpha v\beta 5$,分别作用于基质细胞、肺巨噬细胞和肝脏库普弗细胞,可促进 Src 活化和促炎症 S100 基因表达,从而促进乳腺癌细胞的肺和肝脏的倾向性转移^[61]。

外泌体转运 RNA 促进肿瘤细胞的增殖和转移。乳腺癌细胞摄取星型角质细胞,分泌含有 PTEN-targeted-miRNAs 的外泌体,促使 PTEN 表达下降,继而引起 CCL2 分泌升高, CCL2 招募 IBA1 型骨髓细胞,后者能够促进转移肿瘤细胞增殖和抑制凋亡,最终促使乳腺癌细胞发生脑转移^[62]。研究证明外泌体不仅可以转运成熟的 miRNA 还可以促进 miRNA 成熟,乳腺癌细胞分泌的外泌体具有自主促进前体 miRNA 成熟的能力,刺激周围非致瘤性上皮细胞形成肿瘤^[63]。此外,外泌体也可转运 lncRNA,肝癌细胞通过外泌体分泌携带 lncTUC339 转运至受体细胞,促进周围受体细胞增殖、克隆形成等,进而促进肝癌的进展^[64]。HeLa 和 MCF-7 细胞分泌的外泌体富含 lncRNA (MALAT1、HOTHAI 和 GAS5),它们作用于受体细胞后,可以诱导其肿瘤表型^[65,66]。

外泌体转运代谢产物促进肿瘤细胞的增殖和转移。肿瘤成纤维细胞是大多数实体肿瘤微环境中主要的细胞成分,前列腺癌研究发现,病人组织来源的肿瘤相关成纤维细胞分泌的外泌体可以引起受体肿瘤细胞发生代谢重编程,抑制肿瘤细胞线粒体氧化磷酸化而促进糖酵解和谷氨酰胺依赖性还原羧化。进一步通过代谢组学分析发现,外泌体转运氨基酸、脂质、三羧酸循环中间代谢产物至受体肿瘤细胞,促进其在营养缺乏条件下的生长^[67-69]。这些研究明确了外泌体在肿瘤增殖、转移中的作用。不断发现新的外泌体转运内含物在肿瘤发生发展中的作用与分子机制,是目前肿瘤研究的热点领域之一。

4.2 外泌体参与免疫系统的调节

肿瘤细胞产生的外泌体具有影响免疫系统从而促进肿瘤演进的作用。肿瘤细胞产生的外泌体富含 CD95L、TRAIL 和 galectin9 等分子,这些分子被受体 T 细胞摄取后,导致 T 细胞发生凋亡^[70]。此外,肿瘤细胞来源的外泌体可影响抗原提呈细胞的功能,肿瘤细胞产生的外泌体富含 PGE2、TGF β 、HSP72 和 miRNA 等成分,被单核细胞摄取后,可以诱导其向骨髓来源的抑制性细胞(myeloid-derived suppressor cells, MDSCs)表型转化^[71]。肿瘤细胞来源的外泌体可以阻断树突细胞(dendritic cell, DC)的成熟,该效应是通过 TGF- β 途径实现的^[72]。肺癌的相关研究报道,巨噬细胞摄取肺癌细胞分泌的含有 miRNA 的外泌体,靶向结合 Toll 样受体 mRNA 并使其降解,从而减少 Toll 样受体的

表达,促进巨噬细胞分泌促炎症因子,最终导致肿瘤的全身转移^[53]。大肠癌细胞分泌的外泌体中含有诱导凋亡、坏死的 Fas 蛋白,可以诱导受体 T 细胞发生凋亡^[73]。研究还发现肿瘤细胞来源的外泌体转运 EGFR 至巨噬细胞,诱导巨噬细胞抑制表型,具体机制是 EGFR 激活 MEKK2,继而磷酸化 IRF3 抑制 IFN- γ 产生,最终使得巨噬细胞抗肿瘤免疫应答减弱^[74]。这些研究以外泌体为切入点,为深入探讨肿瘤免疫和逃逸机制开创了新的视角。

4.3 外泌体参与肿瘤药物抵抗

肿瘤药物治疗特别是靶向个体化治疗是目前肿瘤治疗的新手段,而了解肿瘤药物抵抗则是提高治疗疗效的关键问题之一。近年来,随着外泌体研究进展,人们发现外泌体参与了肿瘤药物治疗抵抗。外泌体介导发生药物抵抗的机制主要分为 3 种(图 3):第一种是肿瘤细胞通过外泌体介导药物排出,从而降低胞内药物浓度,诱发药物抵抗。如:卵巢癌的药物抵抗研究发现,顺铂抵抗的卵巢癌细胞与敏感细胞相比,外泌体的分泌量提升 2.6 倍,并且富含顺铂,这提示顺铂抵抗的卵巢癌细胞利用外泌体向胞外排除药物^[75]。前列腺癌细胞对 docetaxel 的抵抗机制研究发现,外泌体通过转运多药抵抗蛋白(MDR-1)至敏感肿瘤细胞,而 MDR-1 分子可以将药物泵至胞外,从而发挥药物抵抗作用^[76,77]。除了抵抗细胞来源的外泌体,肿瘤微环境中间质干细胞分泌的外泌体也可作用于大肠癌细胞,通过 CaM-Ks/Raf/MEK/ERK 通路使外泌体高表达 MDR-1、肺抵抗蛋白(LRP),从而促进大肠癌细胞对化疗药物 5-fluorouracil 的抵抗^[78]。

第二种机制是肿瘤细胞可以通过外泌体分泌蛋白质,中和胞外的蛋白质抗体药物。乳腺癌细胞对 HER2 抗体 trastuzumab 抵抗的研究发现,抵抗的肿瘤细胞通过外泌体向胞外分泌 HER2, HER2 与抗体药物结合,减少抗体药物与肿瘤细胞作用的药物浓度,从而促进乳腺癌的药物抵抗^[79]。

第三种机制是细胞之间通过外泌体交流,赋予了敏感肿瘤细胞抗药特性。舒尼替尼抵抗是导致肾细胞癌治疗失败的重要原因,研究发现舒尼替尼抵抗的细胞产生的外泌体与敏感细胞相比表现出 lncARSR 高表达。进一步研究发现,外泌体可以将 lncARSR 传递至受体敏感肿瘤细胞,致使癌细胞产生舒尼替尼抵抗,具体机制是 lncARSR 被受体细胞摄取后,可以充当 miR-34/miR-449

的 ceRNA, 减弱 miR-34/miR-449 对 AXL 和 c-MET 的调控, 促进细胞 AXL 和 c-MET 的表达^[80]。肿瘤细胞休眠有助于其抵抗化疗药物的作用, 乳腺癌细胞诱导肿瘤相关成纤维细胞释放富含 miR-222/miR223 的外泌体, 促进乳腺癌细胞休眠, 并提升其药物抗性^[81]。

4.4 外泌体参与肿瘤的放射抵抗

电离辐射损伤细胞 DNA 是治疗肿瘤的有效方式之一^[83]。尽管放射治疗方法普遍使用, 但是放射抵抗一直限制着肿瘤的治疗效果。最新的研究发现, 外泌体促进细胞间信息交流, 参与肿瘤的放射抵抗。例如在肺癌研究中, 照射处理组肿瘤细胞与未照射组相比, 其产生的外泌体中 miR1246 含量更高。采用 miR1246 类似物或阻断剂处理表明, 细胞外 miR1246 增强肺癌细胞的增殖, 并产生放射抵抗; 进一步萤光素酶报告基因活性实验确定 miR1246 是通过抑制靶标 DR5 表达发挥作用^[84]。乳腺癌相关研究发现, 肿瘤间质细胞可以产生富含非编码 RNA 的外泌体, 其通过识别乳腺癌细胞膜表面模式识别受体 RIG-1 而激活受体细胞的 STAT1 抗病毒信号通路, 从而使乳腺癌细胞具有放射抵抗^[85]。头颈部肿瘤的研究中, 来源于照射处理细胞的外泌体增强受体细胞的放射抵抗, 这可能是由于受体细胞 DNA 双链断裂修复增强的存活效应^[78]。这些研究充分证明了外泌体介导的细胞间分子交流在肿瘤放疗抵抗中的重要性。

5 总结与展望

细胞分泌产生外泌体, 不仅是细胞排除物质

的一种方式, 更是肿瘤微环境中细胞之间交流的途径。本文阐述了外泌体形成与分泌调节的相关机制, 以及外泌体作为细胞间通讯的重要介质, 参与肿瘤微环境中多种细胞之间的生物信号传递及肿瘤发生和发展过程。

外泌体除了在肿瘤进展中发挥重要作用之外, 还可作为肿瘤诊断和治疗的潜在工具。通过液体活检技术^[86]在血浆、血清及腹水等人体体液中获取外泌体, 能反映其来源细胞的特征改变。Chen 等^[87]报道, 膀胱癌患者和非癌症患者尿液中分离出的外泌体有 24 个差异表达蛋白质, 其中外泌体来源的肿瘤相关钙信号转导因子 2 (tumor-associated calcium signal transducer 2, TACSTD2) 是一种在许多癌症中过表达的细胞表面糖蛋白, 可作为诊断膀胱癌的生物标志物, 膀胱癌患者分泌的外泌体中 TACSTD2 水平高于对照组病例。从不同体液中分离富集外泌体及其内含物, 有利于识别生物标志物的信号, 是一种非侵入性的肿瘤诊断手段。而且, 基于外泌体的靶向疗法和抑制外泌体分泌更是一种新型治疗策略, 抑制外泌体分泌可阻止致癌分子转运到肿瘤微环境, 进而减少血管生成和肿瘤转移。目前, 将外泌体设计为药物递送载体装载递送治疗性抗癌药物以及将树突细胞衍生的外泌体作为免疫疗法的疫苗等研究均已进入临床试验。

尽管已有研究阐述了与外泌体形成分泌相关的分子, 但由于该过程依赖于实验模型以及机体的特性, 同时需经历一个多阶段多层次的调控过程, 因而其具体机制仍未得到阐明。鉴于目前研

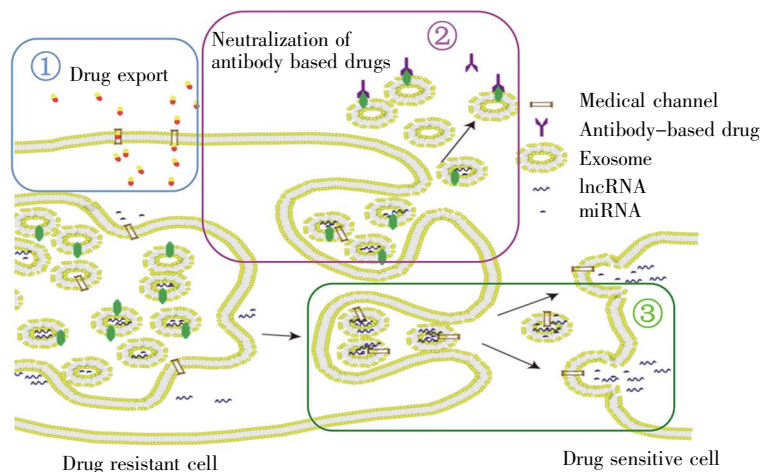


图 3 外泌体参与肿瘤药物抵抗的途径(改编自文献[82])

Fig.3 Exosomes involved in cancer drug resistance (Adapted from reference [82])

究外泌体的作用机制均在体外实验体系中完成,且细胞培养上清抽取与定量外泌体的实验方法尚未得到一致的定论,因而对外泌体相关功能的研究只是模拟一个近乎体内的环境,况且个体差异性也会导致外泌体的功能呈现异质性。外泌体作为目前研究的热门领域,其形成与分泌机制还需更进一步的深入探索,可以预期的是如果体内实验体系应用于外泌体功能研究中,将更透彻地了解其在机体内发挥功能的形式,为肿瘤治疗提供更有利的理论依据。

参考文献(References):

- [1] Kilchert C, Wittmann S, Vasiljeva L. The regulation and functions of the nuclear RNA exosome complex[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2016, 17(4): 227–239.
- [2] Van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2018, 19(4): 213–228.
- [3] Gyorgy B, Szabo T G, Pasztoi M, *et al.* Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2011, 68(16): 2667–2688.
- [4] Mathivanan S, Ji H, Simpson R J. Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication[J]. *Journal of Proteomics*, 2010, 73(10): 1907–1920.
- [5] Kowal J, Tkach M, Thery C. Biogenesis and secretion of exosomes[J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 2014, 29: 116–125.
- [6] Ailawadi S, Wang X, Gu H, *et al.* Pathologic function and therapeutic potential of exosomes in cardiovascular disease[J]. *Biochimica et Biophysica Acta—Molecular Basis of Disease*, 2015, 1852(1): 1–11.
- [7] Farooqi A A, Desai N N, Qureshi M Z, *et al.* Exosome biogenesis, bioactivities and functions as new delivery systems of natural compounds[J]. *Biotechnology Advances*, 2018, 36(1): 328–334.
- [8] Jaiswal J K, Andrews N W, Simon S M. Membrane proximal lysosomes are the major vesicles responsible for calcium-dependent exocytosis in nonsecretory cells[J]. *Journal of Cell Biology*, 2002, 159(4): 625–635.
- [9] Kou X, Xu X, Chen C, *et al.* The Fas/Fap-1/Cav-1 complex regulates IL-1RA secretion in mesenchymal stem cells to accelerate wound healing[J]. *Science Translational Medicine*, 2018, 10(432): eaai8524.
- [10] Thery C, Boussac M, Veron P, *et al.* Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles[J]. *Journal of Immunology*, 2001, 166(12): 7309–7318.
- [11] Frydrychowicz M, Kolecka-Bednarczyk A, Madejczyk M, *et al.* Exosomes—structure, biogenesis and biological role in non-small-cell lung cancer[J]. *Scandinavian Journal of Immunology*, 2015, 81(1): 2–10.
- [12] Hoshino D, Kirkbride K C, Costello K, *et al.* Exosome secretion is enhanced by invadopodia and drives invasive behavior[J]. *Cell Reports*, 2013, 5(5): 1159–1168.
- [13] Gross J C, Chaudhary V, Bartscherer K, *et al.* Active Wnt proteins are secreted on exosomes[J]. *Nature Cell Biology*, 2012, 14(10): 1036–1045.
- [14] Tamai K, Tanaka N, Nakano T, *et al.* Exosome secretion of dendritic cells is regulated by Hrs, an ESCRT-0 protein[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2010, 399(3): 384–390.
- [15] Colombo M, Moita C, Van Niel G, *et al.* Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles[J]. *Journal of Cell Science*, 2013, 126(Pt 24): 5553–5565.
- [16] Abrami L, Brandi L, Moayeri M, *et al.* Hijacking multivesicular bodies enables long-term and exosome-mediated long-distance action of anthrax toxin[J]. *Cell Reports*, 2013, 5(4): 986–996.
- [17] Baietti M F, Zhang Z, Mortier E, *et al.* Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes[J]. *Nature Cell Biology*, 2012, 14(7): 677–685.
- [18] Hanson P I, Cashikar A. Multivesicular body morphogenesis[J]. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2012, 28: 337–362.
- [19] Trajkovic K, Hsu C, Chiantia S, *et al.* Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes[J]. *Science*, 2008, 319(5867): 1244–1247.
- [20] Kosaka N, Iguchi H, Yoshioka Y, *et al.* Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(23): 17442–17452.
- [21] Chairoungdua A, Smith D L, Pochard P, *et al.* Exosome release of beta-catenin: a novel mechanism that antagonizes Wnt signaling[J]. *Journal of Cell Biology*, 2010, 190(6): 1079–1091.
- [22] Hornick C A, Hamilton R L, Spaziani E, *et al.* Isolation and characterization of multivesicular bodies from rat hepatocytes: an organelle distinct from secretory vesicles of the Golgi apparatus[J]. *Journal of Cell Biology*, 1985, 100(5): 1558–1569.
- [23] Llorente A, Skotland T, Sylvanne T, *et al.* Molecular lipidomics of exosomes released by PC-3 prostate cancer cells[J]. *Biochimica et Biophysica Acta—Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2013, 1831(7): 1302–1309.
- [24] Strauss K, Goebel C, Runz H, *et al.* Exosome secretion ameliorates lysosomal storage of cholesterol in Niemann-Pick type C disease[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(34): 26279–26288.
- [25] Laulagnier K, Grand D, Dujardin A, *et al.* PLD2 is enriched on exosomes and its activity is correlated to the release of exosomes[J]. *FEBS Letters*, 2004, 572(1–3): 11–14.
- [26] Ghossoub R, Lembo F, Rubio A, *et al.* Syntenin-ALIX exosome biogenesis and budding into multivesicular bodies are controlled by ARF6 and PLD2[J]. *Nature Communications*, 2014, 5: 3477.
- [27] Dreux M, Garaigorta U, Boyd B, *et al.* Short-range exosomal transfer of viral RNA from infected cells to plasmacytoid dendritic cells triggers innate immunity[J]. *Cell Host Microbe*, 2012, 12(4): 558–570.

- [28] Van Niel G, Charrin S, Simoes S, *et al.* The tetraspanin CD63 regulates ESCRT-independent and -dependent endosomal sorting during melanogenesis[J]. *Developmental Cell*, 2011, 21(4): 708–721.
- [29] Nazarenko I, Rana S, Baumann A, *et al.* Cell surface tetraspanin Tspan8 contributes to molecular pathways of exosome-induced endothelial cell activation[J]. *Cancer Research*, 2010, 70(4): 1668–1678.
- [30] Perez-Hernandez D, Gutierrez-Vazquez C, Jorge I, *et al.* The intracellular interactome of tetraspanin-enriched microdomains reveals their function as sorting machineries toward exosomes[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288(17): 11649–11661.
- [31] Geminard C, De Gassart A, Blanc L, *et al.* Degradation of AP2 during reticulocyte maturation enhances binding of hsc70 and Alix to a common site on TFR for sorting into exosomes[J]. *Traffic*, 2004, 5(3): 181–193.
- [32] Sahu R, Kaushik S, Clement C C, *et al.* Microautophagy of cytosolic proteins by late endosomes[J]. *Developmental Cell*, 2011, 20(1): 131–139.
- [33] Hurley J H, Odorizzi G. Get on the exosome bus with ALIX[J]. *Nature Cell Biology*, 2012, 14(7): 654–655.
- [34] Stenmark H. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2009, 10(8): 513–525.
- [35] Savina A, Fader C M, Damiani M T, *et al.* Rab11 promotes docking and fusion of multivesicular bodies in a calcium-dependent manner[J]. *Traffic*, 2005, 6(2): 131–143.
- [36] Savina A, Vidal M, Colombo M I. The exosome pathway in K562 cells is regulated by Rab11[J]. *Journal of Cell Science*, 2002, 115 (Pt 12): 2505–2515.
- [37] Hsu C, Morohashi Y, Yoshimura S, *et al.* Regulation of exosome secretion by Rab35 and its GTPase-activating proteins TBC1-D10A-C[J]. *Journal of Cell Biology*, 2010, 189(2): 223–232.
- [38] Fruhbeis C, Frohlich D, Kuo W P, *et al.* Neurotransmitter-triggered transfer of exosomes mediates oligodendrocyte-neuron communication[J]. *PLoS Biology*, 2013, 11(7): e1001604.
- [39] Ostrowski M, Carmo N B, Krumeich S, *et al.* Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway[J]. *Nature Cell Biology*, 2010, 12(1): 19–30; sup pp 11–13.
- [40] Peinado H, Aleckovic M, Lavotshkin S, *et al.* Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET[J]. *Nature Medicine*, 2012, 18(6): 883–891.
- [41] Bobrie A, Krumeich S, Reyat F, *et al.* Rab27a supports exosome-dependent and -independent mechanisms that modify the tumor microenvironment and can promote tumor progression[J]. *Cancer Research*, 2012, 72(19): 4920–4930.
- [42] Zheng Y, Campbell E C, Lucocq J, *et al.* Monitoring the Rab27 associated exosome pathway using nanoparticle tracking analysis[J]. *Experimental Cell Research*, 2013, 319(12): 1706–1713.
- [43] Zylbersztejn K, Galli T. Vesicular traffic in cell navigation[J]. *FEBS Journal*, 2011, 278(23): 4497–4505.
- [44] Rao S K, Huynh C, Proux-Gillardeaux V, *et al.* Identification of SNAREs involved in synaptotagmin VII-regulated lysosomal exocytosis[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(19): 20471–20479.
- [45] Tiwari N, Wang C C, Brochetta C, *et al.* VAMP-8 segregates mast cell-preformed mediator exocytosis from cytokine trafficking pathways[J]. *Blood*, 2008, 111(7): 3665–3674.
- [46] Puri N, Roche P A. Mast cells possess distinct secretory granule subsets whose exocytosis is regulated by different SNARE isoforms[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 2008, 105(7): 2580–2585.
- [47] Meiringer C T, Auffarth K, Hou H, *et al.* Depalmitoylation of Ykt6 prevents its entry into the multivesicular body pathway[J]. *Traffic*, 2008, 9(9): 1510–1521.
- [48] Koles K, Nunnari J, Korkut C, *et al.* Mechanism of evenness interrupted (Evi)-exosome release at synaptic boutons[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(20): 16820–16834.
- [49] Hyenne V, Apaydin A, Rodriguez D, *et al.* RAL-1 controls multivesicular body biogenesis and exosome secretion[J]. *Journal of Cell Biology*, 2015, 211(1): 27–37.
- [50] Yang J, Liu W, Lu X, *et al.* High expression of small GTPase Rab3D promotes cancer progression and metastasis[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(13): 11125–11138.
- [51] Alonso R, Mazzeo C, Merida I, *et al.* A new role of diacylglycerol kinase alpha on the secretion of lethal exosomes bearing Fas ligand during activation-induced cell death of T lymphocytes[J]. *Biochimie*, 2007, 89(2): 213–221.
- [52] Segura E, Nicco C, Lombard B, *et al.* ICAM-1 on exosomes from mature dendritic cells is critical for efficient naive T-cell priming[J]. *Blood*, 2005, 106(1): 216–223.
- [53] Saunderson S C, Dunn A C, Crocker P R, *et al.* CD169 mediates the capture of exosomes in spleen and lymph node[J]. *Blood*, 2014, 123(2): 208–216.
- [54] Rana S, Yue S, Stadel D, *et al.* Toward tailored exosomes: the exosomal tetraspanin web contributes to target cell selection[J]. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 2012, 44(9): 1574–1584.
- [55] Barres C, Blanc L, Bette-Bobillo P, *et al.* Galectin-5 is bound onto the surface of rat reticulocyte exosomes and modulates vesicle uptake by macrophages[J]. *Blood*, 2010, 115(3): 696–705.
- [56] Lin H K, Lin H H, Chiou Y W, *et al.* Caveolin-1 down-regulation is required for Wnt5a-Frizzled 2 signalling in Ha-Ras (V12)-induced cell transformation[J]. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2018, 22(5): 2631–2643.
- [57] Peinado H, Aleckovic M, Lavotshkin S, *et al.* Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET[J]. *Nature Medicine*, 2012, 18(6): 883–891.
- [58] Aga M, Bentz G L, Raffa S, *et al.* Exosomal HIF1alpha supports invasive potential of nasopharyngeal carcinoma-associated LMP1-positive exosomes[J]. *Oncogene*, 2014, 33(37): 4613–4622.
- [59] Kranenburg O. The KRAS oncogene: past, present, and future[J]. *Biochimica et Biophysica Acta- Reviews on Cancer*, 2005, 1756 (2): 81–82.

- [60] Demory Beckler M, Higginbotham J N, Franklin J L, *et al.* Proteomic analysis of exosomes from mutant KRAS colon cancer cells identifies intercellular transfer of mutant KRAS[J]. *Molecular Cellular Proteomics*, 2013, 12(2): 343–355.
- [61] Hoshino A, Costa-Silva B, Shen T L, *et al.* Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis[J]. *Nature*, 2015, 527(7578): 329–335.
- [62] Zhang L, Zhang S, Yao J, *et al.* Microenvironment-induced PTEN loss by exosomal microRNA primes brain metastasis outgrowth[J]. *Nature*, 2015, 527(7576): 100–104.
- [63] 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): 707–721.
- [64] Kogure T, Yan I K, Lin W L, *et al.* Extracellular vesicle-mediated transfer of a novel long noncoding RNA TUC339: a mechanism of intercellular signaling in human hepatocellular cancer[J]. *Genes & Cancer*, 2013, 4(7–8): 261–272.
- [65] Gezer U, Ozgur E, Cetinkaya M, *et al.* Long non-coding RNAs with low expression levels in cells are enriched in secreted exosomes[J]. *Cell Biology International*, 2014, 38(9): 1076–1079.
- [66] Nabet B Y, Qiu Y, Shabason J E, *et al.* Exosome RNA unshielding couples stromal activation to pattern recognition receptor signaling in cancer[J]. *Cell*, 2017, 170(2): 352–366.e13.
- [67] Pocsfalvi G, Stanly C, Vilasi A, *et al.* Mass spectrometry of extracellular vesicles[J]. *Mass Spectrometry Reviews*, 2016, 35(1): 3–21.
- [68] Zhao H, Yang L, Baddour J, *et al.* Tumor microenvironment derived exosomes pleiotropically modulate cancer cell metabolism[J]. *Elife*, 2016, 5: e10250.
- [69] Bianco N R, Kim S H, Ruffner M A, *et al.* Therapeutic effect of exosomes from indoleamine 2, 3-dioxygenase-positive dendritic cells in collagen-induced arthritis and delayed-type hypersensitivity disease models[J]. *Arthritis Rheumatology*, 2009, 60(2): 380–389.
- [70] Klibi J, Niki T, Riedel A, *et al.* Blood diffusion and Th1-suppressive effects of galectin-9-containing exosomes released by Epstein-Barr virus-infected nasopharyngeal carcinoma cells[J]. *Blood*, 2009, 113(9): 1957–1966.
- [71] Chalmin F, Ladoire S, Mignot G, *et al.* Membrane-associated Hsp72 from tumor-derived exosomes mediates STAT3-dependent immunosuppressive function of mouse and human myeloid-derived suppressor cells[J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2010, 120(2): 457–471.
- [72] Yu S, Liu C, Su K, *et al.* Tumor exosomes inhibit differentiation of bone marrow dendritic cells[J]. *Journal of Immunology*, 2007, 178(11): 6867–6875.
- [73] Abusamra A J, Zhong Z, Zheng X, *et al.* Tumor exosomes expressing Fas ligand mediate CD8+ T-cell apoptosis[J]. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 2005, 35(2): 169–173.
- [74] Gao L, Wang L, Dai T, *et al.* Tumor-derived exosomes antagonize innate antiviral immunity[J]. *Nature Immunology*, 2018, 19(3): 233–245.
- [75] Safaei R, Larson B J, Cheng T C, *et al.* Abnormal lysosomal trafficking and enhanced exosomal export of cisplatin in drug-resistant human ovarian carcinoma cells[J]. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2005, 4(10): 1595–1604.
- [76] Kharaziha P, Chioureas D, Rutishauser D, *et al.* Molecular profiling of prostate cancer derived exosomes may reveal a predictive signature for response to docetaxel[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(25): 21740–21754.
- [77] Corcoran C, Rani S, O’Brien K, *et al.* Docetaxel-resistance in prostate cancer: evaluating associated phenotypic changes and potential for resistance transfer via exosomes[J]. *PLoS One*, 2012, 7(12): e50999.
- [78] Mutschelknaus L, Peters C, Winkler K, *et al.* Exosomes derived from squamous head and neck cancer promote cell survival after ionizing radiation[J]. *PLoS One*, 2016, 11(3): e0152213.
- [79] Ciravolo V, Huber V, Ghedini G C, *et al.* Potential role of HER2-overexpressing exosomes in countering trastuzumab-based therapy[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2012, 227(2): 658–657.
- [80] Qu L, Ding J, Chen C, *et al.* Exosome-transmitted IncARSR promotes sunitinib resistance in renal cancer by acting as a competing endogenous RNA[J]. *Cancer Cell*, 2016, 29(5): 653–668.
- [81] Bliss S A, Sinha G, Sandiford O A, *et al.* Mesenchymal stem cell-derived exosomes stimulate cycling quiescence and early breast cancer dormancy in bone marrow[J]. *Cancer Research*, 2016, 76(19): 5832–5844.
- [82] Giallombardo M, Taverna S, Alessandro R, *et al.* Exosome-mediated drug resistance in cancer: the near future is here[J]. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 2016, 8(5): 320–322.
- [83] Petrelli F, De Stefani A, Raspagliesi F, *et al.* Radiotherapy with concurrent cisplatin-based doublet or weekly cisplatin for cervical cancer: a systematic review and meta-analysis[J]. *Gynecologic Oncology*, 2014, 134(1): 166–171.
- [84] Yuan D, Xu J, Wang J, *et al.* Extracellular miR-1246 promotes lung cancer cell proliferation and enhances radioresistance by directly targeting DR5[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(22): 32707–32722.
- [85] Boelens M C, Wu T J, Nabet B Y, *et al.* Exosome transfer from stromal to breast cancer cells regulates therapy resistance pathways[J]. *Cell*, 2014, 159(3): 499–513.
- [86] 陈淑敏, 何姝仪, 刘怡, 等. 循环肿瘤 DNA 检测技术的研究进展[J]. *生命科学研究*(Chen Shu-min, He Shu-yi, Liu Yi, *et al.* Progresses on detection technology of circulating tumor DNA[J]. *Life Science Research*), 2017, 21(4): 365–369.
- [87] Chen C L, Lai Y F, Tang P, *et al.* Comparative and targeted proteomic analyses of urinary microparticles from bladder cancer and hernia patients[J]. *Journal of Proteome Research*, 2012, 11(12): 5611–5629.