

生命奥秘

总 122 期 / 2020/1

LIFEOMICS



外泌体 (PART-1)

无奇不有

生命世界

解读生命

走进科学

目录 CONTENTS

专题：外泌体（PART-I）

前言	01
一、外泌体研究三十年回顾	02
二、肿瘤外泌体：一把影响抗癌治疗的双刃剑	08
1. 肿瘤外泌体的特点	09
2. 肿瘤外泌体对肿瘤侵入和转移的作用	10
3. 外泌体与细胞外基质（extracellular matrix, ECM）降解的关系	11
4. 外泌体在抗癌治疗中的潜力	12
5. 外泌体在肿瘤精准治疗方面的不足及限制	13
6. 总结及展望	15
三、外泌体15问	16
1. 外泌体的准确定义是什么？	16
2. 外泌体是怎么被发现的？	17
3. 外泌体研究因何而热？	18
4. 我们知道外泌体是如何形成的吗？	18
5. 如果一个细胞内囊泡不变成外泌体，那么它的命运将会怎样？	20
6. 不同细胞的差别：所有细胞都会分泌外泌体吗？	20
7. 外泌体如何进入受体细胞？	21
8. 外泌体传递了哪些信息，有哪些功能？	22
9. 外泌体如何影响受体细胞蛋白的表达和活力？	22
10. 外泌体能介导疾病发生发展吗？	23
11. 外泌体的成分由谁决定？	23
12. 怎么确定一个细胞外囊泡是否为外泌体？	24
13. 目前是不是还没有可靠的外泌体标志物？	24
14. 如果外泌体难以准确定性，如何分离和研究外泌体？	25
15. 外泌体研究领域最重要的问题是什么？	25

专题

外泌体 (PART-1)

前言

外泌体 (exosome) 是一种细胞外膜结构，由多泡内体 (multivesicular endosome, MVE) 经过胞吐作用 (exocytosis) 而生成，最早于1983年被发现。三十年来，我们逐渐认识到，外泌体具有多种生理功能，比如细胞间的交流 (intercellular communication) 等，同时与疾病的关系也非常密切。

外泌体研究 三十年回顾

本文将对整个外泌体三十年来的发现和研究进展进行一番综述，将重点介绍目前该领域最吸引人的几个发展方向。

1983年，Harding、Heuser和Stahl 等人在*JCB*杂志上发表了一篇文章，不到一周，Pan和Johnstone也在*Cell*杂志上发表了一篇文章。这两个研究小组在网织红细胞（reticulocyte）转铁蛋白受体（transferrin receptor）的研究中，均发现了一种大小约50 nM的物质，这是由成熟的网织红细胞分泌到细胞外的一种结构。几年之后，Rose Johnstone正式将这种结构命名为“外泌体（exosome）”，不过该名称已经在多年之前就已经出现了，但当时指的是源自其它生物液体（biological fluid）的膜碎片结构（membrane fragment），它还有一个类似的名称叫外切体复合物（exosome complex），但含义则完全不同。外切体复合物指的是参与RNA编辑过程的一种胞外结构。经过了三十年的发展，外泌体的重要性逐渐被人们所认识，该研究领域也出现了近乎爆炸式的发展，并诞生出各种学会，比如国际细胞外载体学会（International Society for Extracellular Vesicles）、美国外泌体及微体学会（The American Society for Exosomes and Microvesicles）等，同时拥有一份专门的刊物——《胞外膜结构杂志》（*Journal of Extracellular Vesicles*），召开了多次国际级会议，发表了一千多篇论文。

三十多年前，C.V. Harding正在美国华盛顿大学（Washington University in St. Louis）细胞生物学和生理学实验室开展他的博士研究工作——胞吞（endocytosis）研究。另一方面，Stahl等人研究的重点则是胞吞及循环（endocytosis and recycling）的受体介导信号通路，以及酸性胞内结构（acidic intracellular compartment）对配体（ligand）进入溶酶体（lysosomes）的促进作用。而Heuser的实验室则开发出了一种最新的电镜技术，并且在突触膜循环（synaptic membrane recycling）的可视化研究方面取得了巨大的进展。Harding确定的研究方向是转铁蛋白受体，所选择的研究对象是网织红细胞或成熟的红细胞，这主要是因为网织红细胞里有大量的转铁蛋白受体。他们三个实验室合作的结果就是，发现了转铁蛋白受体能够在网织红细胞的细胞膜（plasma membrane）和细胞内室（endocytic compartments）之间循环，而且还研究清楚这些酸性的结构对网织红细胞摄取铁的作用。就在同一年，Ciechanover、Dautry-Varsat和Klausner等人，也都发表了有关转铁蛋白受体循环通路的研究成果。再加上Alan Schwartz和Aaron Ciechanover的有益建议，所有这些研究，均有助于阐明网织红细胞转铁蛋白受体循环的具体机制。

当时，大家都认为，网织红细胞在继续发育成熟成为红细胞（erythrocytes）后，就会丧失生成血红蛋白的一整套作用，同时也会丧失转铁蛋白受体介导的铁转运作用。而且大部分人都认为，这可能是转铁蛋白受体被溶酶体降解，以及胞吞作用减弱所致。不过，有两项研究却有了不同的发现，这是使用结合了胶体金的转铁蛋白受体AuTf（colloidal gold-conjugated transferrin）所开展的研究，对转铁蛋白受体的转归进行了可视化的跟踪。研究人员发现，AuTf颗粒会被网织红细胞的转铁蛋白受体特异性地摄取（internalized）。不过，被酸性磷酸酶（acid phosphatase）或芳基硫酸酯酶（aryl sulfatase）染色之后，研究人员并没有在大鼠网织红细胞的溶酶体——内化小体（internal compartments）里发现金色颗粒。他们发现，网织红细胞里缺少这种珍贵的溶酶体。

让研究人员惊讶的是，这些内化的AuTf颗粒全都进入了多囊泡结构（multivesicular body），藏进这些结构内部，因此，他们将这些细胞器命名为多泡内体（multivesicular endosome, MVE）。研究人员后来又发现，这些MVE里含有被AuTf标记的小囊泡样结构，通过这些小囊泡结构的连续双层膜就可以很明显地看出，它们与胞膜融合过（图1左图）。这些AuTf标记的小囊泡样结构也有明显的排出胞外过程，即我们现在所说的外泌体（图1右图）。为了证明这些发现不是细胞固定所带来的假象，研究人员还对细胞进行了不固定的快速冷冻处理，然后用电镜进行了观察，还是得到了同样的结果（图1右图）。这些发现提示，在网织红细胞的成熟过程中，可能通过外泌体这一途径，失去了转铁蛋白受体。

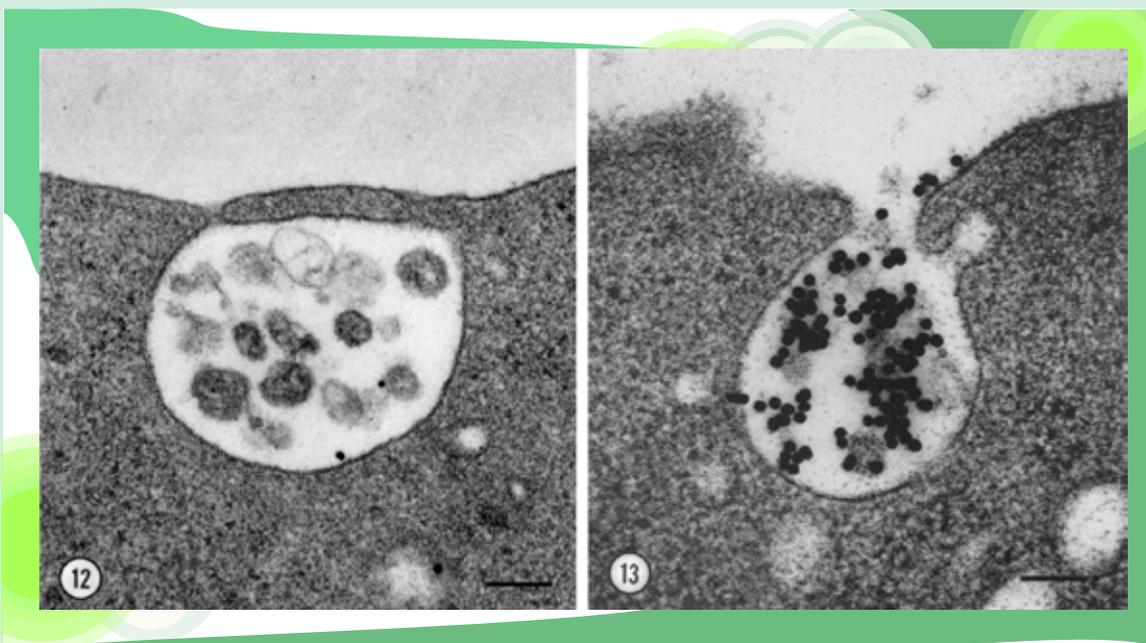


图1 经由多泡内体胞吐作用生成的外泌体含有转铁蛋白受体。左图是AuTf标记的网织红细胞固定之后的MVE图像，可见其中有少量的AuTf标记信号。MVE与胞膜明显融合，表明正在发生MVE胞吐作用。图中比例尺为100 nM。右图是AuTf标记的网织红细胞MVE胞吐图像。细胞未经固定，迅速冷冻、置换处理。图中比例尺为200 nM。

MVE的这种明显的胞吐作用是一种全新的、非常有意思的发现。首先，这驳倒了之前大家普遍认为的，只有早期内生小室（**early endocytic compartment**）才会参与胞膜循环的观点。该研究发现，MVE这样的后期内生小室同样可以参与胞膜循环。如果真是这样，MVE的胞吐作用也是那些进入了细胞内吞系统（**endocytic system**）的内化分子（**internalized molecules**）的一种循环途径。后来，研究人员陆续发现了很多这样的分子，比如溶酶体LAMP-1分子向胞膜的转运，以及在2类组织相容性复合体（**class II major histocompatibility complex, MHC-II**）的抗原处理过程中，处理过的抗原从晚期溶酶体（**late endosomes/lysosomes**）向胞膜的转运等。在更基础的层面上，研究人员还首次想到，MVE的胞吐作用可能是细胞用来释放膜泡结构的一种机制，而不仅仅只是转铁蛋白受体循环的一种机制。目前，这方面的研究已经开展得非常深入了。

Harding 在1983年发表的文章中首次展示了MVE的外化过程（图1）。Pan和Johnstone也在同一年发现，羊网织红细胞也能释放这种大小相差不大、含有转铁蛋白受体的囊泡结构。不过Pan和Johnstone并没有直接看到这个过程，他们认为，这些囊泡结构是在胞膜上形成，并马上被排出的，这些结构后来也被称作外泌体（**ectosome**）或超微小泡（**microvesicle**）。这两篇同时发表的文章彼此互为补充，再加上这两个研究团队后面发表的一些文章（比如Harding在1984年发表的生化纯化外泌体的研究，以及Pan在1985年发表

的电镜研究证实了MVE的胞吐作用的确生成了外泌体等），更进一步完善了外泌体模型。所有这些研究为囊泡及受体排出通路模型的构建奠定了坚实的基础，但是其重要意义也是后来才被大家所认可的，起初大家只是认为这与网织红细胞和转铁蛋白受体有关。

研究人员发现，转铁蛋白受体排出的MVE—外泌体通路是一条全新的转铁蛋白受体循环途径。他们使用AuTf进行了试验，对细胞内的AuTf颗粒进行了定量、定位研究，弄清楚了转铁蛋白受体循环的动力学特性，并为网织红细胞内转铁蛋白受体转运机制提出了一种模型。该模型内包含两条循环途径，分别是快速循环途径（**fast recycling pathway**）和缓慢排出途径（**slower shedding pathway**）。在转铁蛋白受体通过胞吞作用进入细胞之后，首先会进入早期内生小管（**early endocytic tubules**），然后大部分会快速循环至细胞表面，并在细胞表面被胰蛋白酶消化掉（**trypsinization**）。不过，还有一部分转铁蛋白受体会经由第二条较慢的途径，转运至MVE，然后排出细胞，此时的转运速度就刚好与发育中的网织红细胞排出转铁蛋白受体的速度一致了。这一研究成果表明，外泌体的释放途径是网织红细胞排出转铁蛋白受体的主要途径，这也与Johnstone课题组的结论一致。后来，研究人员越来越清楚，细胞内的其它分子也是通过MVE—外泌体这一途径。Harding在1984年发表的论文中详细介绍了他们最初在JCB文章中提出的模型（图2），该成果也经受住了时间的考验。

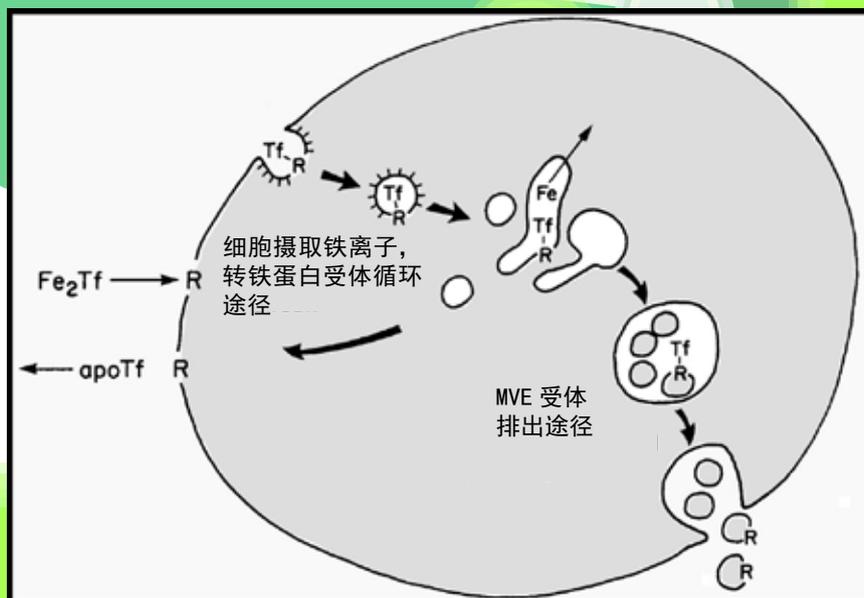


图2 网织红细胞内转铁蛋白循环模式图。网织红细胞内的转铁蛋白受体能够通过两条途径循环利用，或者被排出细胞外。(a) 结合了 Fe_2 离子的转铁蛋白与网织红细胞表面的受体结合，结合之后形成的复合物通过胞吞方式进入细胞。(b) 胞吞复合物脱去外膜之后，经过融合，形成了不同形状的、较小的、无外膜的管腔结构。(c) 在这些管腔的酸性环境中，转铁蛋白释放出铁离子，铁离子转移至胞质中。(d) 不含铁的转铁蛋白在酸性环境中继续与转铁蛋白受体结合，随后该复合物被转运至胞膜，然后解离。转铁蛋白受体也能够以MVE胞吐的方式被排出细胞外。该模型由Harding在1984年正式提出。 Fe_2Tf ：结合了 Fe_2 离子的转铁蛋白； $apoTf$ ：不含铁离子的转铁蛋白； $Tf-R$ ：转铁蛋白受体； R ：受体； Fe ：铁离子。

与此同时，在外泌体生物合成的细胞生理学方面，研究人员也取得了巨大进展。当时已经清楚，MVE在细胞内会有两种结局：与溶酶体融合后被降解，或者与胞膜融合后以外泌体的形式释放出细胞外。现在，我们对MVE的形成机制也有了一定的了解，比如知道了内质复合体转运通路（endosomal complex required for transport,ESCRT）都需要哪些组份，以及囊泡向内出芽（inward vesicle budding）的机制等。还有一些研究则关注以神经酰胺

（ceramide）和其它脂质为介导的、外泌体生物合成问题。MVB形成之后，Rab GTP酶（Rab GTPases）似乎被直接转运至胞膜，然后与其融合，并被选择性调控。我们现在已经知道，Rab GTP酶能够调控膜转运。Vidal和Stahl在1993年发现，外泌体上就富含Rab4和Rab5蛋白；Savina在2002年发现了Rab11蛋白与外泌体分泌的关系；Hsu和Ostrowski分别在2010年发现Rab27蛋白和Rab35蛋白是调节性GTP酶（regulatory GTPases）；Baletti

在2012年发现，ALIX和VPS4这两种ESCRT途径的组份都参与了外泌体分泌的过程，尤其与多配体蛋白聚糖（syndecans）的转运有关；Savina在2005年发现，细胞内钙离子浓度的变化是触发外泌体释放的关键，这说明，外泌体释放也是一个受到严格调控的过程。

外泌体与很多领域都有关，本文重点讨论其与免疫（immunology）及细胞之间信息交流（intercellular communication）的相互关系。1996年，在发现了外泌体十几年之后，Raposo等人又在B淋巴细胞里发现，富含MHC-II类分子的MVE（MHC-II-enriched MVEs, MIIC）能够与胞膜融合，释放含有MHC-II类分子的外泌体，这些外泌体能够使抗原呈递的作用，激活T细胞的免疫反应。不久之后，Zitvogel和Théry又分别在1998年、2001年和2002年发现，树突状细胞（dendritic cell）能够分泌外泌体，并且能够激活T细胞免疫反应。巨噬细胞（macrophage）也能生成外泌体。Ramachandra等人在2010年发现，感染了结核分枝杆菌（*Mycobacterium tuberculosis, Mtb*）的巨噬细胞分泌的外泌体，能够向T淋巴细胞呈递结核杆菌抗原——MHC II类分子复合物。而且这些外泌体像其它系统里的一样，它们的抗原呈递效果也是最好的。Segura等人在2005年发现，只有接受了成熟信号刺激的树突状细胞分泌的外泌体，才有直接激活天然T细胞的能力。而外泌体的这种T细胞免疫激活能力，也引起了众多的关注，大家都想了解外泌体对于免疫，尤其是肿瘤免疫的作用。

外泌体除了可以通过向T细胞的抗原呈递途径，参与人体的获得性免疫作用（adaptive immunity）之外，还可以携带某些分子，来刺激人体的先天免疫反应（innate immune response）。比如被结核分枝杆菌，或其它分支杆菌（mycobacteria）感

染的巨噬细胞，就能分泌含有微生物分子（microbial molecules）的外泌体，这些分子能刺激人体的先天免疫受体（innate immune receptor），对抗原呈递细胞及免疫系统的其它细胞进行调节。而且，结核分枝杆菌感染之后，或者炎性小体（inflammasome）活化之后，都能促进外泌体和胞膜来源的超微小泡（microvesicle）的产生。虽然，大多数外泌体研究都是以哺乳动物的细胞为研究材料，不过也有一些科研人员使用了包括病原微生物在内的非哺乳动物细胞作为试验材料，比如利什曼原虫（*Leishmania*）等。他们发现，这些非哺乳动物细胞同样能够分泌外泌体，而且病原微生物分泌的外泌体还能够对宿主的免疫防御反应进行调节。由此可见，外泌体其实是一个“大喇叭”，能够用很大的音量告诉机体，有病原体（尤其是胞内感染的病原体）正在侵入，让一个被感染的细胞影响更多的细胞，扩大机体的反应范围。不过，外泌体的这种作用也会使得病原体利用人体自身的反应，从而容易形成慢性感染。

目前，外泌体在细胞间的信息沟通方面具有哪些作用，是一个非常热门的研究领域。其中，有一个研究方向就是与外泌体有关的RNA（exosome-associated RNA），因为这些RNA有可能会影响“受体细胞”里RNA的表达，进而对“受体细胞”的蛋白质组和功能都造成影响。这些功能对免疫反应的条件，或者其它病理生理反应都非常重要。Valadi等人在2007年发现，小鼠和人的肥大细胞（mast cell）分泌的外泌体里都含有mRNA和microRNA，而且这些RNA都能够进入靶细胞，并且还具备生理活性。这个激动人心的发现开启了一个全新的研究领域。起初还有人对此持怀疑态度，他们认为，这些外泌体里的RNA分子可能只是偶然出现的，不过现在，我们已经确认，外泌体里的确实

载了RNA。Skog等人在2008年发现，肿瘤细胞分泌的外泌体里一样含有RNA，这些RNA也能够影响其它细胞，有助于肿瘤的演进。这些携带RNA的外泌体也能够影响机体的免疫系统，比如抗原呈递细胞与T细胞之间的相互作用等。有研究还发现，体外也能生成外泌体，而这就可以让我们制备“重组外泌体（recombinant exosome）”，在其中装载各种不同的“货物”，比如组织特异性的识别分子（recognition molecule）或归巢分子

（homing molecule）等。

除了继续研究细胞间的信息传递和调控等方面之外，我们也在临床应用上有所突破。比如，因为外泌体里含有某些特殊的蛋白或RNA分子，据此可以开发出在诊断方面的应用。再加上外泌体是细胞分泌出来，进入血液、尿液，或其它体液中的，因此就更加适合用于临床诊断了。除此之外，还可以利用装载有RNA分子的外泌体影响某些靶细胞，用于疾病的治疗，比如肿瘤、自身免疫病等。

一、

肿瘤外泌体：一把影响抗癌治疗的双刃剑

肿瘤细胞与普通正常细胞一样，也能够合成各种生物大分子，并将其向胞外运输。这些生物大分子会被包裹在直径约纳米级的脂质双分子层囊泡中，从肿瘤细胞中释放出来，进入人体的血液系统，或者肿瘤周围组织。Trams等人早在1981年，便通过电镜首次在两种肿瘤细胞里发现了这些直径约40 nm的结构。随后，Johnstone 等人通过免疫电镜（immunoelectron microscopy），也在网织红细胞的成熟过程中发现了细胞排出的、直径约30~100 nm的外泌体结构。在发现外泌体的最初那段时间里，大家都认为这是细胞排放废弃物的一种手段。直到后来，人们发现树突状细胞分泌的外泌体能够促进细胞毒性T淋巴细胞（cytotoxic T lymphocyte）的增殖，具有抑制肿瘤生长的作用，才改变了大家对外泌体的看法。

实际上，这些最初的研究不仅促进了外泌体在肿瘤研究中的应用，同时也扩大了外泌体在细胞生物学、生理学和药理学中的广泛应用。2013年，诺贝尔生理及医学奖就颁给了三位科学家，以表彰他们在细胞囊泡转运调控机制方面的贡献。其中，Randy SCHEKMAN 发现了一系列细胞囊泡必需的基因；James ROTHMAN 发现了参与细胞囊泡与靶标融合时的蛋白质元件；而Thomas SüDHOF则揭示了胞内如何指示囊泡形成，以及在何处、何时来释放这些囊泡这一机制。实际上，后来的研究也都发现，如果干扰了这些囊泡外泌体的运输和转运，就会对机体造成有害的影响，带来很多病理改变，比如造成免疫紊乱和肿瘤等疾病。最近发表的几篇综述也对外泌体在生理学、病理学、功能，以及在肿瘤转移和治疗中的作用进行了颇为深入的讲解和介绍。迄今为止，肿瘤相关的外泌体已经被证明广泛参与了肿瘤细胞与机体之间的物质交换和信号传递，在肿瘤的发生、发展、侵入和转移等过程中都起到了关键性的作用。更重要的是，这些外泌体还有望在精准医疗中，成为新兴的抗癌手段，用来治疗多种癌症。

本文将介绍肿瘤外泌体近年来的最新科研成果，及其在抗癌领域的潜力和可能遇到的困难。

1.

肿瘤外泌体的特点

肿瘤细胞会持续不断地向胞外环境分泌囊泡（**membrane vesicle**）。这些外泌体是一种“新型的”、细胞之间的沟通工具，也是构成有助于肿瘤细胞定位（**localization**）、增殖（**proliferation**）和存活（**survival**）的支持性微环境（**supportive microenvironment**）的重要组分。Trams等人首次使用“外泌体”

（**exosomes**）这个词来称呼这些由C-6神经胶质瘤细胞（**C-6 glioma cell**）或N-18神经母细胞瘤细胞（**N-18 neuroblastoma cell**）分泌的囊泡结构。现在，我们常常用外泌体来形容直径大约在30~150 nm左右的，以胞吞方式（**endocytic pathway**）形成的、细胞外的囊泡结构。肿瘤细胞释放的外泌体里含有很多特殊的分子，包括蛋白质、脂质、DNA、miRNA、mRNA和非编码RNA等，这些分子都是肿瘤细胞与周围环境沟通的重要信使。ExoCarta数据库里有286个研究都是关注外泌体的。这些研究一共在外泌体里发现了41,860种蛋白质、7,540种RNA和1,116种脂质。也有一些学者提出了一些分类方法，来帮助大家对这些外泌体及其内含的分子进行分类和管理。

除了肿瘤细胞之外，成体干细胞（**adult stem cell**）、间充质细胞（**stromal cell**）和肿瘤干细胞（**cancer stem cell**）等其它细胞也都能够以外泌体的方式在彼此之间，以及在细胞与周围微环境之间进行信息交流。越来越多的证据表明，这些肿瘤外泌体还能够在构成肿瘤微环境的不同细胞之间，协调彼此的相互作用，对肿瘤的演进和转移起到调节作用。这些研究让我们有了一个全新的视角——外泌体信号途径，这个视角可以帮助我们认识肿瘤细

胞之间是如何通过相互作用，来形成耐药性，以及导致肿瘤复发的。不过，这其中的具体机制还有待阐明。现有证据表明，细胞外囊泡结构（特别是外泌体）会在肿瘤细胞与其周围的肿瘤干细胞、成体干细胞和间充质细胞之间转移，这给肿瘤细胞生物学又增添了一份复杂性。

虽然，源自不同组织和细胞的外泌体在化学组成和生物学功能上各有不同，但是不同外泌体的形成过程都是差不多的。首先，胞膜内陷形成初级内体（**primary endosome**），然后内体与溶酶体（**lysosomes**）融合，在其内部形成囊泡，并在其中注入细胞组份。这些初级内体再转变成次级内体（**secondary endosome**），也被称作多囊泡结构（**multivesicular body**）。接下来，这些多囊泡结构与胞膜上的特定部位融合。然后经由GTP酶和Nsf偶联蛋白受体（**GTPase and Nsf coupling protein receptor**）调控的胞吐途径（**exocytosis**），分泌至胞外。在人体的血液、淋巴液、尿液、唾液、乳汁和腹水中都能检测到这些外泌体。

靶细胞摄取了这些外泌体之后，外泌体里的内容物就会通过多种途径，影响这些靶细胞的生理行为，引起表型改变。比如外泌体miRNA能够抑制靶细胞里相应mRNA的表达，因此影响靶细胞的功能。急性粒细胞白血病（**acute myeloid leukemia**）细胞释放的外泌体能影响骨髓间充质细胞的增殖和迁移，而多发性骨髓瘤（**multiple myeloma**）细胞释放的外泌体则会增强新生血管能力（**angiogenesis**）。

2.

肿瘤外泌体对肿瘤侵入和转移的作用

在肿瘤的最初阶段，一部分的肿瘤细胞会表现出侵袭性。肿瘤的侵袭过程贯穿绝大多数肿瘤整个生命周期。经过好几轮的分类和增殖，子代肿瘤细胞的生物学及遗传学改变正是通过外泌体途径进行传递，在整个肿瘤克隆里扩散这些突变信息的。肿瘤的转移是一个非常复杂的、多步骤的过程，包括了肿瘤细胞侵入血管、在血管里存活、在远隔器官定居和繁殖等。在肿瘤的转移过程中，有多种不同的分子和功能协调因子也会参与其中。现在已知，肿瘤外泌体能够影响肿瘤转移信号途径里的几乎每一个步骤，因此，肿瘤外泌体是一个很好的抗癌治疗靶点。Al-Nedawi等人就曾对EGFR基因发生了突变的神经胶质瘤细胞进行过研究，观察到这些细胞通过微泡结构（microvesicle），在细胞之间传递肿瘤受体EGFRvIII所造成的影响。结果发现，在接受了这些EGFRvIII分子的细胞里，抗凋亡基因（anti-apoptotic gene）大量表达，而且肿瘤细胞的非黏附生长能力（non-adherent growth）和侵袭能力都得到了加强。

同样，将KRAS等位基因发生了突变的Dko-1细胞的外泌体传递给KRAS等位基因没有发生突变的Dks-8细胞之后，也能够增强这些携带了野生型KRAS基因的非转化细胞（non-transformed cell）的3D生长能力。因为这些外泌体里含有很多促进肿瘤生长的蛋白质，比如kRAS、EGFR和SRC等激酶，以及多种整合素（integrin）分子。

这些研究成果都表明，外泌体是一种非常重要的信号传递途径和遗传物质传递手段。Le等人通过对啮齿类动物肿瘤细胞和人异种移植模型的研究发现，高侵袭性的乳腺癌细胞

分泌的细胞外囊泡结构能够促进低转移能力的细胞的转移（包括向邻近组织和远隔组织的转移），并且可以促使这些低转移能力的细胞，以依赖miR-200的方式，在远隔组织处形成转移灶。这些研究成果都表明，乳腺癌细胞可以通过摄取外泌体的方式，增强转移能力。

我们已经非常清楚，接受了肿瘤转移的器官并不是一个被动的接受者，肿瘤生存的微环境才是决定肿瘤转移的关键。在转移之前，肿瘤细胞就能够通过外泌体来调控它靶向器官的微环境，以利于自身的转移和转移后的生长。肿瘤细胞向特定靶器官的转移过程，是一个高度依赖肿瘤外泌体里所包含的整合素（integrin）的表达的过程。外泌体通过进入受体细胞，激活Src磷酸化过程，提高S100的表达量，就可以打造出一个适合肿瘤转移的微环境，然后静待肿瘤细胞转移过来。Zhang等人发现，外泌体里携带的microRNA能够促使脑组织里PTEN的表达量下调，促使星形细胞瘤（astrocytoma）转移。

越来越多的证据表明，肿瘤外泌体对间质细胞、血管内皮细胞（vascular endothelial cell, VEC）和成纤维细胞（fibroblast）等细胞具有非常多的作用，能促进肿瘤的发生和发展。微环境血管通透性的改变，是预示肿瘤是否发生转移的一个重要标志。侵袭性很高的乳腺癌细胞分泌的外泌体里含有大量的miR-105分子，它们可以抑制血管内皮细胞表达ZO-1蛋白，改变血管的通透性，从而有利于肿瘤的转移，这是乳腺癌向肝脏转移的一条重要机制。胰腺癌细胞外泌体里含有整合素 $\beta 5$ 和 αv ，肝脏枯否细胞（kupffer cell）能特异性识别这些分子。枯否细胞吞噬了这些分子之后，外泌

体释放的巨噬细胞迁移抑制因子 (exosome-released macrophage migration inhibitory factor, MIF) 就会上调 TGF β 的表达, 促进肝脏里纤粘蛋白 (fibronectin) 的生成。这种纤维化的微环境能进一步招募巨噬细胞, 最终在肝脏转移之前, 形成一个有利于肿瘤转移的微环境。反过来, 抑制 MIF 的表达就能够减轻肝脏微环境的改变, 限制肿瘤细胞向肝脏转移。

2016年, Greening 等人发现, 恶性间皮瘤 (malignant mesothelioma) 细胞分泌的外泌体与血管重建有关, 具体机制是外泌体增强了血管内皮细胞和成纤维细胞的迁移。Cui 等人还发现, 肺腺癌细胞的外泌体能够以依赖 miR-210 的方式, 通过上调间质细胞里 Ephrin α 3 分子的表达, 促进肿瘤血管生

成。肿瘤外泌体里含有的 Rab3D、TGF- β 1 和 LMP1 等蛋白, 还能够促进上皮细胞-间充质细胞转换 (epithelial-mesenchymal transition, EMT), 增强肿瘤细胞的致癌性 (oncogenicity) 和侵袭能力。肿瘤外泌体除了能够促进内皮细胞的生长和间充质重构之外, 还能够直接调控远隔淋巴结的微环境, 为黑色素瘤 (melanoma) 的淋巴结转移和生长创造一个适合的环境。间充质细胞释放的外泌体也能够影响肿瘤细胞的行为。Luga 等人发现, CD81 分子阳性的成纤维细胞分泌的外泌体进入乳腺癌细胞之后, 其中含有的成纤维细胞 WNT-11 自分泌蛋白 (fibroblast WNT-11 autocrine protein) 能够激活 Wnt-PCP 信号通路, 促进肿瘤细胞的侵袭和转移。

3.

外泌体与细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 降解的关系

细胞外基质是一种能够抵御肿瘤转移的重要组织屏障。它的改变和重构都能够影响肿瘤细胞的侵袭速度。人前列腺癌细胞分泌的外泌体里含有多种 microRNA 分子, 比如 miR-100-5p、miR-21-5p 和 miR-139-5p, 这些分子都能够促进 MMP2、MMP9 和 MMP13 等基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP) 的表达。这些外泌体也都与细胞外基质的降

解, 以及生长因子的释放有关, 都能促进肿瘤的侵袭和转移。此外, 肿瘤外泌体还能够介导 MMP13 蛋白向受体细胞的转移, 这也会促进细胞外基质的降解和肿瘤的转移。McCready 等人就发现, 高侵袭性的腺癌细胞释放的外泌体里含有 Hsp90 蛋白, 该蛋白可以激活纤维蛋白酶原酶 (fibrinogenase), 促使细胞迁移。

4. 外泌体在抗癌治疗中的潜力

目前，我们治疗肿瘤的手段不外乎手术、化疗、放疗、免疫疗法和靶向疗法等，但是这些治疗手段的效果都不十分理想，不能解决肿瘤的复发和转移问题。鉴于肿瘤外泌体在肿瘤侵袭和转移过程中的重要作用，它们成为了一个新的抗癌治疗靶点，有望改善抗癌治疗的疗效和预后。

肿瘤外泌体与肿瘤的发病及相应微环境的形成都有密切的关系，而且肿瘤细胞分泌的外泌体的数量要比普通细胞多得多。因此，抑制这些肿瘤外泌体的形成和释放，降低循环系统里肿瘤外泌体的水平，可能会成为一种有效的抗癌治疗手段。

外泌体的形成和释放主要通过几条途径进行调节，比如：神经磷脂酶2（sphingomyelinase 2）有助于肿瘤外泌体的合成，静脉注入神经磷脂酶2的抑制剂GW4869，就可以有效抑制肿瘤小鼠分泌肿瘤外泌体，降低肿瘤的转移率。Chalmin等人发现，5-*N,N*-二甲基氨基氯化物（5-*N,N*-dimethylamiloride）能够阻塞H⁺/Na⁺离子通道和Na⁺/Ca²⁺离子通道，从而减少肿瘤外泌体的分泌，延缓肿瘤细胞的生长。不过，在PC3细胞实验中并没有得到同样的结果，这说明，这种抑制作用具有细胞特异性。某些保守的蛋白家族成员也与外泌体的分泌有关，比如Rab27a和Rab27b蛋白就是其中重要的调节因子。Bobbie等人通过RNA干扰试验发现，抑制Rab27a和Rab27b蛋白的表达，可以改变肿瘤的微环境，延缓肿瘤细胞的生长和转移。CD9因子阳性的细胞和MFGE8因子阳性的细胞在外泌体释放方面类似，这说明，外泌体的

释放是一个部分独立于Rab27a蛋白的过程。但是，并非所有的调控因子都能有效地干扰外泌体的释放。Mason等人发现，虽然整合素的表达能够促使肿瘤细胞向特定器官迁移，但是整合素 $\alpha v \beta 3$ 和 $\alpha v \beta 5$ 抑制剂西仑吉肽（cilengitide）治疗成胶质细胞瘤的3期临床试验结果还是让人比较困惑。最近的一项研究发现，血液滤过系统（hemofiltration system）能够捕获血液里的外泌体，起到减少循环系统里的外泌体的作用，这项机制可能起到抑制肿瘤细胞生长和转移的作用。

外泌体特有的脂质双分子层结构使它们不容易被降解，也不容易被RNA酶破坏。与传统的脂质小体（liposome）不同，外泌体的毒性较低，组织对它们的耐受性较高。而且，外泌体能够表达多种整合素，因此，可以靶向不同的器官。这些优势都引起了我们极大的兴趣，我们希望将外泌体打造成一种新型的体内载体，帮助将抗癌药物靶向运送到癌变组织里。外泌体可以运送DNA、miRNA、非编码RNA和蛋白质。比如，有研究人员开发了可运送阿霉素（adriamycin）或紫杉醇（paclitaxel）的外泌体，用于靶向抗癌治疗，试验结果发现，这种新药的毒性和免疫原性都非常小。与传统的阿霉素给药方式不同，外泌体给药方式具有更低的毒性和更高的药物利用度，最可贵的是降低了阿霉素的心脏毒性。之前的一项研究发现，let-7 miRNA分子能够抑制肿瘤细胞的PI3K信号通路。我们知道，治疗肺癌的吉非替尼（gefitinib）就是抑制了PI3K信号通路。如果联合使用这两种药物，就可以增强这两种药物治疗的敏感性。由于抗miR-135也能

够提高肺癌细胞对紫杉醇 (taxanes) 的敏感性, 我们推测, 利用外泌体将某些miRNA定向转移至肿瘤细胞内, 应该可以增强化疗的敏感性。既往的研究显示, 肺腺癌对紫杉醇和顺铂 (cisplatin) 的抵抗都是因为染色体上缺失了PTEN基因。因此, 如果利用外泌体将miR-181a定向转移至肺腺癌肿瘤细胞内, 可能会增强紫杉醇和顺铂的治疗敏感性。

使用外泌体给药的另外一大优势是它们的体积非常小, 能够轻易地透过各种生理屏障, 比如血脑屏障等。

自从Zitvogel等人在1998年报道外泌体与免疫反应有关之后, 已经有很多研究人员在进行相关的研究了。目前, 外泌体是抗癌疫苗开发领域里的一大热点。比如, 之前有人报道, 树突状细胞经肿瘤相关抗原刺激之后, 它所分泌的外泌体里会含有特定的肿瘤抗原。这些树突状细胞外泌体和肿瘤外泌体都会进入某些淋巴结里, 激活CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞, 引发抗癌免疫反应。到目前为止, 已经有好几个报

道称, 抗癌疫苗在治疗肺癌领域取得了不错的成绩。比如, 有一项临床试验发现, TG4010能够延长3b期和4期非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 患者的存活时间。也有报道称, EGF疫苗可以有效治疗非小细胞肺癌。最近开展的一项2期临床试验也是治疗非小细胞肺癌的, 试验发现, 里面含有肿瘤相关抗原的树突状细胞分泌的外泌体, 能够延长NKp30低表达晚期肺癌患者的无进展存活时间。

肿瘤外泌体还能够促进肿瘤细胞的凋亡。肿瘤细胞能够通过外泌体将存活素 (survivin) 转移至肺癌细胞里, 通过抑制细胞生长的方式, 促进受体细胞凋亡。D53A存活素是一种显性失活突变蛋白 (dominant-negative mutant), 可促进肺腺癌细胞的凋亡。另外, 在植物细胞分泌的外泌体里, 含有的很多成分也都具有抗癌作用。比如, 姜黄素 (curcumin) 和雷公藤甲素 (triptolide) 联合治疗, 就能促进卵巢癌细胞的凋亡。

5. 外泌体在肿瘤精准治疗方面的不足及限制

目前, 外泌体还无法在临床抗癌治疗中进行应用, 因为还存在以下几点不足和限制:

- 1) 还缺少用于确认胞外载体 (extracellular vesicle) 的特定标志物;
- 2) 缺少分离、纯化肿瘤外泌体的标准;
- 3) 缺少获得同质性外泌体 (homogenous exosomes) 的有效技术手段;
- 4) 我们对外泌体内容物的调控机制, 以及外泌体的分泌调控机制都还缺乏认识。

有一些外泌体既能够促进肿瘤的转移, 也能促进肿瘤的生长和侵袭。比如, 多个研究都发现, 外泌体能够促使肿瘤细胞彻底转移。Hoshino等人发现了一种非传统的外泌体分泌现象, 这是一种由多泡内体 (multivesicular endosome, MVE) 分泌的外泌体, 在多个系统里都存在这种分泌机制, 而且在肿瘤细胞里, 这种分泌功能会进一步增强, 这增强了肿瘤的恶性行为。通过对肿瘤细胞的分析, 人们还发现了一种特化的侵袭肌动蛋白结构

(invasive actin structure)——侵袭性伪足 (invadopodia)。这是CD63及Rab27a分子阳性MVE特殊的、关键性的锚定及分泌位点。

在体外培养实验中,如果抑制了侵袭性伪足的形成,就可以降低外泌体的分泌量。纯化外泌体,或抑制外泌体的生物合成及分泌,都会影响侵袭性伪足的生命周期,包括侵袭性伪足的形成、稳定和吐出蛋白酶等步骤。因此,外泌体内容物也在肿瘤的侵袭、以及原位信号反馈中起到了关键性的作用。外泌体分泌也能够通过3D基质(3-dimensional matrix)途径来调控细胞侵袭过程。外泌体分泌与侵袭性伪足的形成之间,具有协同关系,这充分说明肿瘤外泌体分泌的调控机制也是一条重要的、与肿瘤侵袭相关的基础机制。

胰腺导管腺癌是一种高转移性的肿瘤,由于难以早期发现,预后通常都非常差。在小鼠动物实验中发现,该肿瘤分泌的外泌体能够诱导肝脏形成转移前微环境,从而增加肝脏内的转移灶数量。枯否细胞吞噬了这些外泌体之后,会分泌TGF β ,并上调肝脏星状细胞(stellate cell)内纤连蛋白的表达量,这种纤维化的微环境会招募更多的巨噬细胞。在1期胰腺导管腺癌患者肿瘤细胞分泌的外泌体里,就含有大量的巨噬细胞迁移抑制因子,这种病人的肝脏转移情况非常严重,远远高于非演进型胰腺癌的患者。研究发现,如果我们抑制了这些外泌体里巨噬细胞迁移抑制因子的表达,就可以抑制肝脏内形成转移前微环境(pre-metastatic niche),阻断肿瘤的转移。这说明,肿瘤外泌体里的巨噬细胞迁移抑制因子能够促使肝脏内形成转移前微环境,因此,它可以作为一个分子标志物,来预测胰腺导管腺癌患者是否会发生肝脏转移,并预测胰腺导管腺癌患者的预后。Leal等人发现,在肿瘤相关的血栓形成过程中,肿瘤外泌体和中性粒细胞

(neutrophils)能够互相协同,他们在动物实验中发现,载瘤小鼠的血栓形成速度要比对照组的正常小鼠快得多。

弄清外泌体与免疫抑制(immunosuppression)背后的复杂作用机制,对于解决肿瘤免疫逃避问题和开发新的抗癌手段都非常重要。肿瘤微环境里的树突状细胞和淋巴细胞都能够起到免疫调节的作用,然而,肿瘤外泌体还会通过死亡受体信号通路(death receptor pathway),诱导CD8⁺T细胞发生凋亡。此外,这些分子还能够对T淋巴细胞的增殖进行调控,抑制效应T细胞的增殖,导致T淋巴细胞失衡(T lymphocyte imbalance),从而起到抑制肿瘤微环境里的免疫功能的作用。

肿瘤外泌体作为一种细胞间的沟通工具,能够抑制受体细胞的免疫功能,也能够激发免疫受体与具有相似特点的癌细胞的受体细胞配体的分布。因此,它们可以通过封闭治疗性抗体的方式,或者耗竭疫苗刺激产生的、以及注射进人体内的免疫效应细胞的作用这种方式,起到减弱免疫抗癌治疗功效的作用。最近有研究表明,肿瘤外泌体还能够促进表皮生长因子受体向巨噬细胞的转移,起到抑制先天免疫作用,诱导免疫耐受的作用。

因此,与其它细胞产生的、用作运输(给药)载体的外泌体不同,肿瘤外泌体在抗癌治疗领域里是一把双刃剑。充分了解这些肿瘤外泌体的形成、分泌和网络功能等机制,是我们的当务之急。因为只有搞清楚了这些背景知识,才可能将其应用于临床抗癌治疗工作中。我们还需要开展更多的、更大规模的动物实验和临床实验,以明确这些肿瘤外泌体在抗癌治疗中的特点和安全性,不论我们是将其作为给药途径,还是作为治疗靶点。

6. 总结及展望

将来，我们还需要进一步弄清肿瘤外泌体在肿瘤发生和发展过程中的作用，了解它们的生物学特性和生化特性。只有当我们充分认清了肿瘤外泌体的特点、效果、功能、毒性和安

全性，我们才有可能将其应用于抗癌治疗工作当中，为精准抗癌医学提供新的、强有力的武器。

资讯 · 频道

www.LifeOmics.com



三、

外泌体15问

30多年前，科学家首次提出外泌体这个概念，此后外泌体被认为是与细胞间通讯以及疾病的发生、发展密切有关的细胞外囊泡，并且被作为开发新药的手段。然而，有关其生物学的基本问题仍未得到解决。本文将围绕15个问题，解释目前外泌体的定义、解答外泌体是什么、指出研究外泌体所面临的困难等外泌体生物学中的一些突出问题。

1. 外泌体的准确定义是什么？

这是一个非常好的问题。自30多年前出现对外泌体的最初描述以来，外泌体一词已被广泛用于各种形式的细胞外囊泡，这其实混淆了外泌体的定义，并且助长了针对该领域的怀疑主义。外泌体的最佳定义是多囊泡体（multivesicular body, MVB）内部的内吞隔室与质膜融合后从细胞释放出的细胞外囊泡。这一过程使胞内囊泡（intraluminal vesicles, ILV）释放到细胞外环境中，由此释放的囊泡

就是我们所知的外泌体（图1）。

细胞内也存在其它类型的微囊泡，包括凋亡小体和微泡，它们分别来源于经历凋亡和质膜脱落的细胞。虽然凋亡小体、微泡和外泌体大小大致相同（通常为40-100 nM），并且都包含胞质溶胶的“吞咽”作用，但它们是不同类型的囊泡，理解它们之间的差异是至关重要的，但这一点往往被忽视。

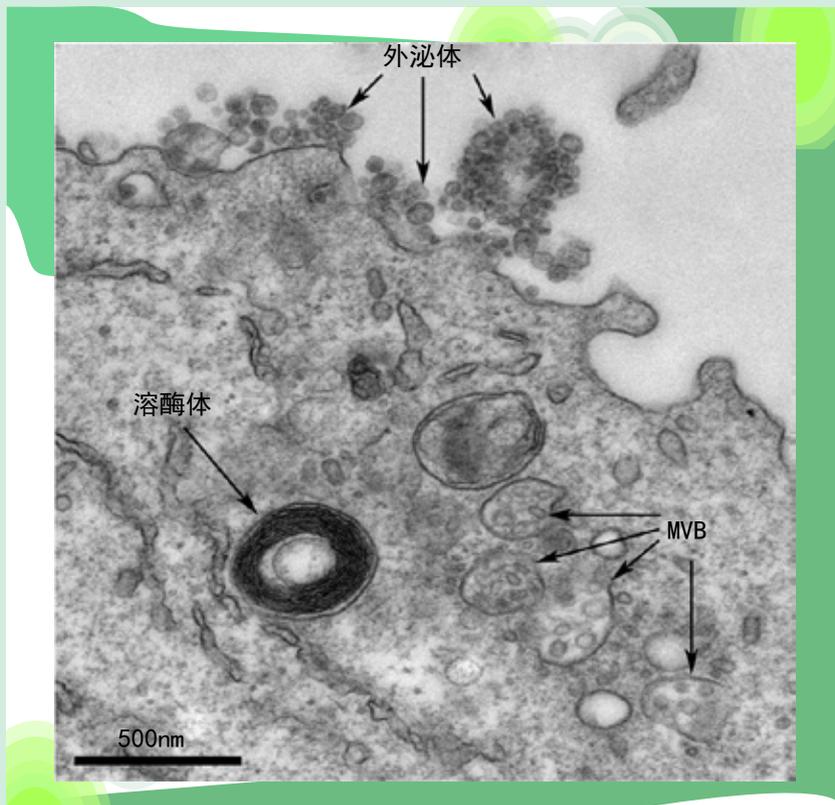


图1 外泌体起源于多泡体的胞内囊泡。图为Epstein-Barr病毒转化的B细胞的透射电子显微照片，从中可观察到在质膜上新排出的外泌体。如图所示，多泡体（MVB）可以将内容物递送至溶酶体进行降解，也可以与细胞表面融合以释放胞内囊泡，即外泌体。

2. 外泌体是怎么被发现的？

50年前，科学家首次发现细胞外膜质囊泡的存在，但最初它们被认为是质膜脱落释放的废物。直到1983年，在针对网织红细胞成熟红细胞过程中转铁蛋白缺失的研究中，科学家才确立了外泌体的研究。这些研究通过内吞系统跟踪转铁蛋白-金结合物，发现MVB中产生的ILV可以通过与质膜融合释放到细胞外空

间。在1987年“外泌体”一词才正式出现。

然而，即便如此，这些细胞外囊泡在很大程度上被忽视，被遗忘，或者再次被视为细胞废物处理的一种手段。直到最近十年，科学界对外泌体的兴趣激增，相关文献也增长了近十倍（2006年外泌体相关发表物为115篇，2015年为1010件）。

3. 外泌体研究因何而热？

外泌体的大热至少有三个原因。首先，它们被认为可以充当细胞间通信和细胞之间大分子传递的手段。其次，在过去十年中，外泌体被发现是蛋白质、脂质、mRNA、miRNA和DNA的扩散工具，并被视为几种疾病发展的促成因素。第三，它们被认为是药物的有用载体，因为它们由细胞膜而不是合成聚合物组成，因此宿主可以更好地耐受它们。事实上，一些最早的外泌体研究表明，它们可以携带被

T淋巴细胞识别的MHC-肽复合物，并且这种外泌体的分泌可以促进小鼠体内的抗肿瘤免疫应答。目前研究人员正在抗癌临床试验中研究外泌体疗法。最近的报道指出，载带紫杉醇的外泌体可用于治疗小鼠癌症，其剂量比常规治疗低50倍，并且外泌体不会引起免疫反应。

然而，尽管有20年的研究，外泌体生物学的基础知识还处于起步阶段，我们对其在正常细胞生理学中所起的作用还知之甚少。

4. 我们知道外泌体是如何形成的吗？

是也不是。我们知道它们是ILV合成的。但首先，并非所有的ILV都会形成外泌体，其次，它们在内体中产生的机制尚不完全清楚。大多数常规的膜出芽过程使膜从细胞器变形进入细胞质，但在ILV形成中，膜芽远离细胞质并进入内体。这种非传统的萌芽过程不仅限于ILV的产生，还发生在包膜病毒从胞质溶胶出芽期间和胞质分裂期间，并且它需要专门的分子机器。

ILV（外泌体）可以通过至少两种机制在内体限制膜上产生，其中一种机制依赖于ESCRT机制（endosomal sorting complexes required for transport，内吞体分选转运复合体），而另一种是ESCRT非依赖性的（图2）。

ESCRT分子机器由一组细胞溶质蛋白复

合物组成，这些复合物通过已被标记（通常在细胞质结构域上具有泛素蛋白）的膜蛋白募集到内体中。泛素蛋白标签被ESCRT-0识别，ESCRT-0因此被募集到内体膜上，并将泛素化负荷传递给ESCRT-I。ESCRT-I的一个组分Tsg101也能识别泛素化。募集ESCRT分子机器的作用是将泛素化负荷蛋白聚集到内体上，并诱导内体膜凹陷形成ILV。

但是，在没有ESCRT的情况下，ILV仍然可以形成，因此必然存在合成ILV的其它方式，尽管相关机制不太清楚。这些ESCRT非依赖性ILV的产生前提是ILV上富含四跨膜蛋白CD63-a，但其功能尚不清楚——但是确定需要神经酰胺之类的具有弯曲特性的脂质的参与。

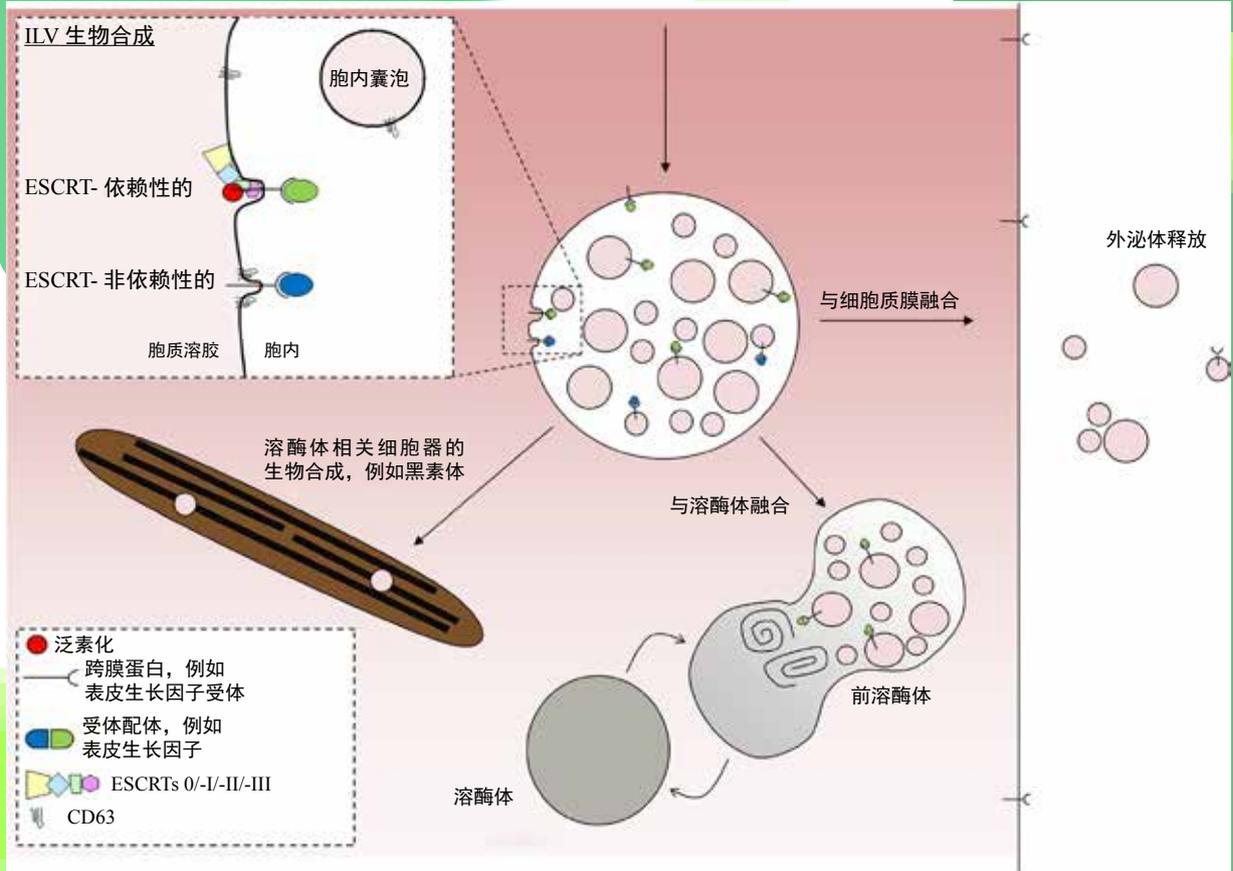


图2 ILV通过内体膜的内陷产生，并存在三种可能的命运。内体膜通过ESCRT依赖性或非依赖性机制内陷形成胞内囊泡（ILV）。成熟的内体在其胞内积累ILV，并存在三种不同的命运：它们可能包含有助于特定溶酶体相关细胞器合成的内容物（例如黑素体、Weibel-Palade体和嗜天青颗粒）；它们可能与溶酶体融合；或者它们可能与质膜融合，其中释放的ILV现在被称为“外泌体”；Escrts：内吞体分选转运复合体。

5.

如果一个细胞内囊泡不变成外泌体，那么它的命运将会怎样？

ILV的命运是由它们所处的MVB的命运引导的。令人困惑的是，除了不同类型的ILV之外，还存在不同类型的MVB，并且这些内体的命运的调节非常有趣。MVB具有几种潜在的命运（图2）：可以与溶酶体融合（其中内容物被降解和再循环）；与质膜融合（ILV作为外泌体释放）；或者促进生成特定细胞器，例如黑素体（位于黑素细胞）、Weibel-Palade体

（位于内皮细胞）、嗜天青颗粒（位于嗜中性粒细胞）和分泌颗粒（位于肥大细胞）。MVB上的胆固醇水平似乎在调节它们的命运中起作用，富含胆固醇的MVB倾向于与质膜融合，并以外泌体的形式释放到胞外，而胆固醇含量较低的MVB更倾向于与溶酶体融合。

因此，调节外泌体释放和ILV命运之间平衡的因素是动态的。

6.

不同细胞的差别：所有细胞都会分泌外泌体吗？

鉴于并非所有细胞都有内膜系统，所以不是所有的细胞都会分泌外泌体。但是大多数哺乳动物细胞都含有内膜系统，并在MVB中产生ILV，尽管我们对大多数细胞类型中的外泌体释放知之甚少。

一些细胞——例如免疫系统的B细胞、树突细胞和肥大细胞——似乎都在组成性地释放外泌体，但事实上，我们对外泌体的大部分了解都来自免疫细胞。除了组成性释放外泌体之外，还可以通过细胞相互作用刺激这些细胞分泌外泌体。例如，专门用于激活T淋巴细胞的

鼠树突细胞在与抗原特异性CD4⁺ T淋巴细胞相互作用后，外泌体的分泌水平增加。事实上，淋巴细胞相互作用通常伴有外泌体释放：人T细胞（包括来自血液的原代T细胞、T细胞克隆和Jurkat细胞株）在其抗原受体激活后都会释放外泌体；B细胞在与抗原特异性CD4⁺ T细胞结合后，外泌体的释放水平会增加。

其它细胞类型可以在钙离子载体或其它刺激因子的作用下，增加外泌体的分泌水平，但非免疫细胞中外泌体分泌的程度在很大程度上是未知的。

7.

外泌体如何进入受体细胞？

我们其实知道得并不明确。将膜蛋白或内容物转移到受体细胞的外泌体可以被受体细胞完全吞噬，或外泌体膜直接与宿主质膜融合（图3），或者外泌体可能不需要被细胞吸收以引发生理反应：例如，滤泡树突状细胞携带的细胞表面外泌体上有MHC-肽复合物和其它细胞本身不表达的蛋白质，能够激活与其相互作用的免疫细胞。

对于细胞间传递，多篇文章描述了细胞外囊泡的吞噬作用和胞吞作用的各种机制，这些机制取决于囊泡大小，而囊泡大小又取决于囊泡携带的负荷。为了将物质释放到受体细

胞，外泌体必须与宿主细胞融合，然后可通过与质膜的直接融合或被宿主细胞内吞后在内吞细胞器内被融合。外泌体与内吞细胞器融合的过程我们知道得并不完全，虽然它似乎需要非传统的脂质LBPA和蛋白质Alix的参与（炭疽毒素致死因子利用这一过程从内体逃逸到细胞质）。

外泌体是否与靶细胞融合或通过与细胞表面蛋白的相互作用而发挥功能，是另一个基因细胞生物学问题。当然如果我们要了解外泌体的功能，就需要解决这个问题。

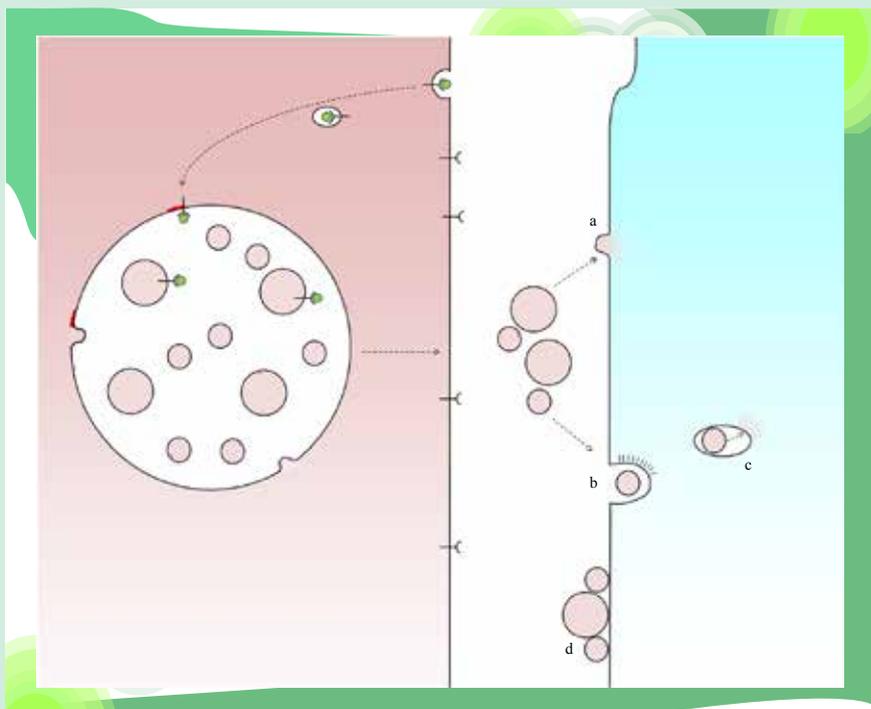


图3 受体细胞对外泌体的摄取。MVB与细胞膜融合，然后释放ILV到胞外，即外泌体。外泌体为了引发受体细胞的响应，可以与质膜融合（a）或通过胞吞作用（b）被完全吸收，然后外泌体必须被递送至胞质溶胶（c）。或者，外泌体可附着于受体细胞表面以引发信号反应（d）。

8. 外泌体传递了哪些信息，有哪些功能？

科学家指出了外泌体的多种功能，研究最充分的是其在免疫功能中的作用。早期实验显示，从B淋巴细胞中分离出来的、携带II类MHC分子的外泌体在体外能激活T淋巴细胞，这表明它们与母体B细胞一样，能与T淋巴细胞相互作用。同一个团队在之后的研究中发现，来自树突状细胞的外泌体可以促进小鼠免疫应答，可能会促进小鼠的抗肿瘤免疫反应，这激发了学界研究外泌体是否可用于肿瘤治疗

的兴趣。

或者，与滤泡树突状细胞一样，在既不表达II类MHC，也不分泌外泌体的细胞类型的表面上也能发现外泌体相关的II类MHC，这表明外泌体能从一种细胞类型递送到另一种细胞类型。

然而，外泌体可能具有除免疫应答之外的作用，因为几种非免疫细胞也能分泌外泌体。

9. 外泌体如何影响受体细胞蛋白的表达和活力？

外泌体不仅转运蛋白质和脂质，也转运mRNA和miRNA到受体细胞，并且这些RNA已经在体外实验中被证实在受体细胞中具有功能效应。例如，来自小鼠的外泌体可以被转移进人类细胞，其携带的mRNA可以被翻译成小鼠蛋白。类似地，可以调节特定mRNA组（以及蛋白质水平）的miRNA双链RNA片段在受体细胞中起作用。外泌体的作用方式一直是癌症生物学家特别感兴趣的焦点。例如，相对于

来自非致瘤性乳腺细胞系的外泌体，来自乳腺癌细胞系的外泌体所包含的miRNA水平更高，而且正常细胞暴露于源自乳腺癌细胞系的外泌体后，细胞存活和增殖会增加，同时伴随着一些肿瘤抑制蛋白表达的下调。与对照组相比，一些癌症患者的血清中的外泌体水平升高。然而，究竟这些胞外囊泡是外泌体，还是其它形式的细胞外囊泡，或是二者的混合物，截止发稿时尚不清楚。

10.

外泌体能介导疾病发生发展吗？

它能。既然外泌体是细胞间通信的手段，那么它通信的内容就包括“不良”交流或传播。与癌症情况下的miRNA一样，外泌体已被证明含有许多疾病相关分子——例如神经退行性相关肽，如A β （在阿尔茨海默病中）、tau（在众多神经退行性疾病中）、朊病毒（在传染性海绵状脑病中）、 α -突触核蛋白（在突触核蛋白病中，包括帕金森病）和超氧化物歧化酶1（在肌萎缩侧索硬化中）。因此，外泌体被认为是神经退行性蛋白质扩散的传播者。

在神经退行性疾病相关蛋白中，只有一些是完整的膜蛋白，即插入到脂质双分子层，而非插入胞质的蛋白质。膜蛋白质更易被分选到ILV（外泌体）中，诸如泛素化之类的标签会调节它们在ILV（外泌体）中的最终位置。到目前为止，科学家已经确定了A β 和PrP^c在ILV中的存在，但尚未证实其它膜蛋白，例如

α -突触核蛋白和tau是否也存在于ILV中。

然而，我们还不知道细胞溶质蛋白分选到ILV/外泌体中的机制。研究指出，内体上的膜相关组分或许参与了胞质蛋白分选到ILV的过程。miRNA等细胞质因子在外泌体中的水平比胞质中高，这表明外泌体摄取分子存在分选机制，这就是为何某些miRNA在外泌体中富集，而其它miRNA则不在其中富集。

目前，我们对疾病相关因子在细胞之间传播的途径仍然知之甚少，外泌体可能只是其中一种传播途径。外显子蛋白（如Alix）与阿尔茨海默氏症老年斑之间的关联间接证明外泌体介导了疾病相关因子在细胞间的传播。开发调节外泌体释放和传播的手段可能有助于对抗其中一些疾病，但在此之前需要建立更多的基础生物学证据。

11.

外泌体的成分由谁决定？

外泌体包括在其形成期间被分选到其内部的任何物质。膜蛋白通常在泛素化时被分选到外泌体中，泛素化标签作为募集ESCRT机制的底物，随后产生ESCRT依赖性ILV。

我们对细胞溶质因子分选到外泌体的机制目前仍了解甚少。例如，外泌体中的miRNA比胞质中的水平高很多，这表明miRNA并不是随机地被摄入到外泌体中，但是为什么外泌体

中miRNA的水平远高于其它结构中的miRNA尚不明确。目前有一些关于miRNA分选假设，例如可能包括通过类泛素化异质核糖核蛋白或miRNA诱导的沉默复合物（miRISC）进行分选。

由于难以将外泌体与其它细胞外囊泡分离，因此文献中所指的“外泌体”富含的一些物质可能实际上来自其它囊泡，而非外泌体。

虽然有许多研究人员能严格区分外泌体和细胞外囊泡，但遗憾的是，并非所有研究人员都能做到这一点。此外，正如之前所说，我们可能

可以在外泌体形成过程中发现胞质蛋白，因为外泌体腔由胞质溶胶构成。

12.

怎么确定一个细胞外囊泡是否为外泌体？

这是一个有趣的问题，答案很复杂。最容易的是，细胞内区室可以根据特定的生物标记物来鉴定，例如，高尔基体、细胞核或线粒体都携带其它细胞器上未发现或水平很低的蛋白质。

相同的是ILV和外泌体都是中间体的中间区室。MVB不是静态的，而是经历连续成熟的细胞器，在此过程中它们获得并失去蛋白质。因此，它永远不会有外泌体的独特标记，因为ILV /外泌体膜上的任何负荷必须首先位于内体的限制性膜上，并且内部发现的任何物质必须首先来自胞质溶胶。负荷可能集中在ILV /外泌体上，但也可能存在于其它细胞的区室内。CD63可被认为是外泌体的标记。ILV和外泌体都富含几种这样的四跨膜蛋白，并

且本文原作者团队已经证明CD63是ESCRT非依赖性ILV形成所必需的。Alix似乎也集中在ILV /外泌体中，Tsg101同样如此。Tsg101是ESCRT-I的一个组分，已在许多研究中被用作外泌体的标记，尽管在不形成外泌体的ILV中也存在Tsg101。虽然Tsg101参与ESCRT依赖性ILV的形成，如前所述，它与其它ESCRT组分一起，在ILV与内体膜脱离之前与内体膜解离，以使其参与到进一步的事件。确切地说，ESCRT-I组分从膜上“脱落”的时间未知，但通常认为它是在ILV形成之前发生的，因此Tsg101应该也存在于胞质中，并参与随后的ILV形成。有些Tsg101可能被“吞入”到ILV腔中，但水平应该低到可以忽略。

13.

目前是不是还没有可靠的外泌体标志物？

目前可能还没有一个可靠的外泌体标志物。生物化学定义外泌体的最佳方法可能是通过标记物的组合，包括四跨膜蛋白、Alix和其它标记物，同时排除常驻质膜蛋白。尽管ILV /外泌体本质上含有一些质膜蛋白，而质膜也含有一些ILV /外泌体蛋白，但外泌体蛋白质的相对水平和/或富集，应可以作为区别于其它微泡的标志。来自B细胞的II类MHC分子和其

它细胞类型特异性抗原也可以帮助区分外泌体与其它形式的细胞外囊泡。常见的外泌体负荷包括四跨膜蛋白（CD63、CD81和CD9）、抗原呈递分子（MHC I和MHC II），以及其它（Alix, flotillin-1）。<http://www.exocarta.org>这个在线数据库，包含了来自已经发表和未发表的研究中指出的外泌体内包含的蛋白质、脂质和RNA。

14.

如果外泌体难以准确定性，如何分离和研究外泌体？

外泌体很少能够通过常规方法成像，因为它们太小而不能通过荧光显微镜解析，并且它们的释放可能是罕见的事件。虽然一些研究已经通过各种电子显微镜技术对细胞培养物中发生的外泌体释放进行了成像，但更常见的做法是，从细胞上清液或动物体液中收集外泌体。传统上，外泌体是通过培养基的差速离心而分离出来的，首先以递增的离心速度弃去较大的污染物，然后以非常高的速度（ $\sim 100,000 \times g$ ）沉淀细胞外囊泡、蛋白质聚

集体等物质。因此，得到的外泌体只是外泌体富集物而不是纯化物。研究人员通常通过生物化学、质谱或电子显微镜来分析分离得到的外泌体富集物。用电子显微镜观察分离得到的各层沉淀，可以对外泌体进行免疫标记，问题是分离的外泌体无法提供与标记细胞切片相同的内部对照。值得注意的是，外泌体的表征很少受到关注，尽管学界正在努力用限定细胞外囊泡组的指南和标准来弥补这个漏洞。

15.

外泌体研究领域最重要的问题是什么？

毫无疑问，最重要的一个问题是实际理解这些结构的生物学意义。由于对其基本生理功能知之甚少，我们似乎很难理解外泌体是如何与许多不同疾病状态的发病机理相关联的。虽然关于外泌体生成、命运和正常功能的基本问题仍然存在，但最终，为了了解外泌体，必须

先了解ILV，这一事实往往被忽视。同时，更为重要的是关于外泌体的出版物应该仔细和明确地说明用于区分它们与其它细胞外囊泡的标准，以避免引起混淆，并鼓励同行对出版物中的结果提出质疑。

原文检索：

Clifford V. Harding, John E. Heuser, and Philip D. Stahl. (2013) Exosomes: Looking back three decades and into the future. *J. Cell Biol.* Vol, 200(4): 367–371.

Wei SUN, Ju-dong LUO, Hua JIANG, Dayue Darre & DUAN. (2018) Tumor exosomes: a double-edged sword in cancer therapy. *Acta Pharmacologica Sinica*, 39: 534–541.

James R. Edgar. (2016) Q&A: What are exosomes, exactly? *BMC Biology*, 14: 46–53.

Eason、张洁/编译

特约编辑招聘启事

为了及时收集生命科学最新资讯、提高《生命奥秘》办刊质量，现面向从事生命科学或对这学科有浓厚兴趣的科研人员、学生诚聘特约编辑（兼职）。

职位职责：

独立完成《生命奥秘》专题的策划：对基因组学、蛋白组学、生物信息学和细胞生物学等学科的发展以及生物医学领域相关技术（例如基因诊断技术、干细胞和克隆技术、生物芯片技术等）的应用进行翻译及深入评述。

选题要求内容新颖、评述精辟、注重时效和深入浅出。尤其欢迎以自身系统研究为基础的高水平译述与评论，结合所从事的科研工作提出自己的见解、今后设想或前瞻性展望。

要求：

- 1.具备基因组学、蛋白组学、生物信息学、细胞生物学等生命科学学科背景；
- 2.具备良好的生命科学前沿触觉；
- 3.具备较高的外文文献翻译、编译水平；
- 4.具备较强的选题策划、资料搜集、组织能力，以及专业稿件撰写能力；
- 5.具有高级职称；或者拥有（正在攻读）该领域的最高学位。

有意者请将个人简历发送至 editor@lifeomics.com

qPCR检测阵列 (Arrays)

qPCR 检测阵列的服务对象

人鼠全基因组 miRNA 研究

疾病 (癌症) 研究

信号通路研究

芯片和测序结果、
基因功能确证

- **验证引物:** 每对引物均使用专利算法设计并进行过实验验证;
- **性能优越:** 严谨的质量监控保证产品的高品质、特异性好及灵敏性高 (最低可检测 4 个 mRNA 分子);
- **覆盖范围广:** 目录产品包含通路分析、癌症和其他研究热点, 定制产品可根据客户要求选择设置。

类别	产品名称	描述	配套产品
基因表达量检测阵列	ExProfile™ Pathway qPCR arrays	61 种信号通路相关基因表达差异定量检测阵列	基因验证引物
	ExProfile™ Cancer Gene qPCR arrays	21 种不同癌症 (肿瘤) 相关基因表达差异定量检测阵列	
	ExProfile™ Disease and gene group qPCR arrays	17 种疾病 (或特殊的基因功能群体) 相关基因表达差异定量检测阵列	
miRNA 表达量检测阵列	miProfile™ miRNAome miRNA qPCR arrays	高通量人类、小鼠 miRNA 全基因组 miRNA 表达差异定量检测阵列	All-in-One™ miRNA 验证引物 All-in-One™ miRNA qPCR Kit
	miProfile™ Cancer qPCR arrays	27 种不同癌症 (肿瘤) 相关 miRNA 表达差异定量检测阵列	BlazeTaq™ SYBR Green qPCR mix 2.0 SureScript™ First-Strand cDNA Synthesis Kit
	miProfile™ Disease and Focus-Group miRNA qPCR arrays	11 种疾病 (或特殊的基因功能群体) 相关 miRNA 表达差异定量检测阵列	All-in-One™ First-Strand cDNA Synthesis Kit
外泌体 miRNA 表达量检测阵列	miProfile™ Exosome miRNA qPCR arrays	来源于 MSC、血液、尿液、乳汁、癌症、肺癌、白血病、肝癌、结直肠癌、鳞状细胞癌、卵巢癌、膀胱癌、前列腺癌、乳腺癌、肾癌、胰腺癌等 16 种组织的外泌体	All-in-One™ miRNA qRT-PCR Detection Kit 2.0 RNAzol® RT RNA Isolation Reagent
表达量检测阵列定制服务	Custom-made Gene or miRNA qPCR arrays	96 和 384 孔板供选择, 客户定制 array 阵列和 qPCR array 检测服务	

客户发表文章

- ◆ Reciprocal androgen receptor/interleukin-6 crosstalk drives oesophageal carcinoma progression and contributes to patient prognosis. 2016. *The Journal of pathology*, IF 6.235. Gene qPCR Array.
- ◆ Dysregulation of the miR-194-CUL4B negative feedback loop drives tumorigenesis in non-small-cell lung carcinoma. 2016. *Molecular Oncology*, IF 5.264. miRNA qPCR Array.



A group of people are performing a human pyramid against a cloudy sky with a bright sun. The pyramid consists of four people standing on the ground, two on each shoulder, and one person standing on the shoulders of the two in the middle. The text is overlaid on the center of the image.

合办专题专刊
网站广告合作
邮件群发推广

请致电 (020) 32051255



www.LifeOmics.com