

生命奥秘

总 123 期 / 2020/3
LIFEOMICS



外泌体 (PART-11)

——细胞外泌体未来在肿瘤治疗领域的应用潜力

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-II）

——细胞外泌体未来在肿瘤治疗领域的应用潜力

| | |
|---|----|
| 前言 | 01 |
| 1. EV的分类、生物合成及内容物 | 05 |
| 1.1 外泌体的生物合成 | 06 |
| 1.2 sMV的生物合成 | 07 |
| 1.3 EV的分类及内容物的区别 | 07 |
| 2. 纯化EV的必要性 | 08 |
| 3. 肿瘤微环境里的外泌体 | 09 |
| 4. 外泌体与转移前微环境（pre-metastatic niche） | 14 |
| 4.1 外泌体对转移前微环境形成的作用 | 14 |
| 4.2 外泌体内容物对转移前微环境形成的作用 | 17 |
| 4.3 前哨淋巴结（sentinel lymph node）转移前微环境的发展 | 18 |
| 5. 与肿瘤有关的生理性外泌体 | 19 |
| 5.1 活性转移微环境的形成 | 19 |
| 5.2 冬眠肿瘤细胞 | 20 |
| 6. 外泌体的临床应用 | 21 |
| 7. 以EV作为治疗靶点 | 27 |
| 8. 总结 | 33 |

专题

外泌体（PART-II）

——细胞外泌体未来在肿瘤治疗领域的应用潜力

前言

肿瘤细胞的生长（growth）、侵入（invasion）和转移（metastasis）等过程，都依赖复杂的组织环境中细胞之间的双向交流（bidirectional cell-cell communication）。这种细胞之间的双向交流，主要指的就是肿瘤细胞和位于肿瘤微环境（tumour microenvironment, TME）里的间充质细胞（stromal cell）分泌的各种可溶性分子，不过这些细胞也能够释放各种囊泡，这些囊泡里也含有各种调控分子，可参与细胞之间的交流。这些囊泡结构就是细胞外膜泡结构（extracellular vesicle, EV），包括各种外泌体（exosome）和脱落微泡（shed microvesicle, sMV）。EV里含有多种分子，比如肿瘤蛋白（oncoprotein）和肿瘤多肽（oncopeptide），以及microRNA、mRNA、长链非编码RNA等各种RNA、DNA片段和各种脂质分子。这些分子会给肿瘤微环境带来各种复杂的表型改变。越来越多的证据表明，这些EV对于肿瘤转移前微环境的形成、转移等演进过程，都起到了非常重要的作用。我们已经明确，与非恶性细胞相比，肿瘤细胞能够分泌更多的EV，而且我们已经可以从人体的体液里分离得到这些囊泡了。因此，我们就可以利用人体的血液和尿液等体液标本，借助这些EV作为分子标志物，用于肿瘤的诊断、随访和预后判断等。接下来，我们将详细介绍这些EV的生理特点和功能，在肿瘤转移过程中起到的作用，以及在肿瘤诊断和治疗方面的应用潜力。

细胞与细胞之间，以及细胞与所处微环境之间的双向信息和物质交流，无论对于正常的细胞，还是病理细胞，都至关重要。我们过去认为，只有彼此有直接接触的细胞之间，或者能够分泌可溶性分子（比如细胞因子、生长因子和趋化因子等）的细胞之间，才能进行这种沟通。不过，近十年来，我们发现，EV也在细胞之间的沟通过程中起到了非常重要的作用。很多在体外培养的真核细胞都能释放EV，在人体的血液、尿液、胆汁液、乳汁、滑膜液、泪液、精液、腹水和支气管肺泡灌洗液（bronchoalveolar lavage fluid），甚至大便中都能找到。不仅细胞活化（比如血小板激活）时会释放EV，而且在细胞pH值改变、缺氧、受到辐照、损伤、补体蛋白暴露，以及应激时也都会释放。有意思的是，植物细胞、细菌、支原体、真菌和古细菌里的细胞液都能释放这些EV，说明这其实是一条在进化上非常保守的细胞间信号沟通机制。目前，我们主要发现了两种EV，分别是外泌体和sMV。细胞外泌体始于胞吞作用（endocytic），然后经由多泡小体（multivesicular body, MVB）这种晚期内体（late endosome）内向出芽作用，形成腔内小泡（intraluminal vesicle, ILV）。接着，这些MVB会转移至胞膜处，并与其融合，向胞外释放ILV，也就是我们现在所说的外泌体（图1a）。而sMV则是由胞膜直接出芽形成的（图1b）。这些EV都含有多种分子，比如蛋白质、RNA、DNA和脂质等（图1c-d）。这些分子在细胞之间的传递中起到了信息沟通的作用，而且不仅可以起到旁分泌（paracrine）的作用，还可以对全身发挥作用（图1e）。

这些EV也参与了很多正常的生理过程，比如血液凝固、天然免疫反应和获得性免疫反应，以及免疫调控、干细胞分化、组织再生和

血管形成、细胞自噬、胚胎植入及胎盘生理、精液调节、生殖和怀孕等。在正常的发育过程，比如神经系统和神经元的再生等过程中，这些EV也都参与了细胞之间的沟通工作。

EV除了能够参与正常的生理功能之外，还与很多病理过程有关，其中就包括神经变性疾病和肿瘤等。以肿瘤为例，EV就参与了与肿瘤演进有关的多种不同的病理过程，这些也都是肿瘤演进过程中的标志性过程（hallmarks of cancer），其中就包括了炎症反应过程（inflammatory response）、血管生成过程（angiogenesis）、淋巴生成过程（lymphogenesis）、细胞迁移过程（cell migration）、细胞增殖过程（cell proliferation）、免疫抑制过程（immune suppression）、侵入过程（invasion）、上皮-间质转分化过程（epithelial-to-mesenchymal transition, EMT）和肿瘤转移（metastasis）等。由于外泌体的形成过程与病毒的组装过程非常类似，因此，外泌体的形成会受到病毒的干扰，也就不足为奇了。鉴于EV与肿瘤的演进有如此密切的关系，因此，它们也可以作为一个理想的生物标志物（biomarker），用于肿瘤的诊治。

本文将介绍细胞外泌体和sMV这两种最主要的EV的生物合成过程和生理特点，详细介绍它们的内容物，比如癌蛋白、癌多肽、RNA、脂质、DNA等分子，并介绍它们在肿瘤微环境（TME）和转移前微环境（pre-metastatic niche）中的作用，同时还将重点介绍EV在肿瘤诊治工作中的应用。不过，血小板源性的膜泡结构（Platelet-derived vesicle），以及直径在50~2000nm的凋亡小体（apoptotic body）等其它膜泡结构不在本文讨论的范围之内。

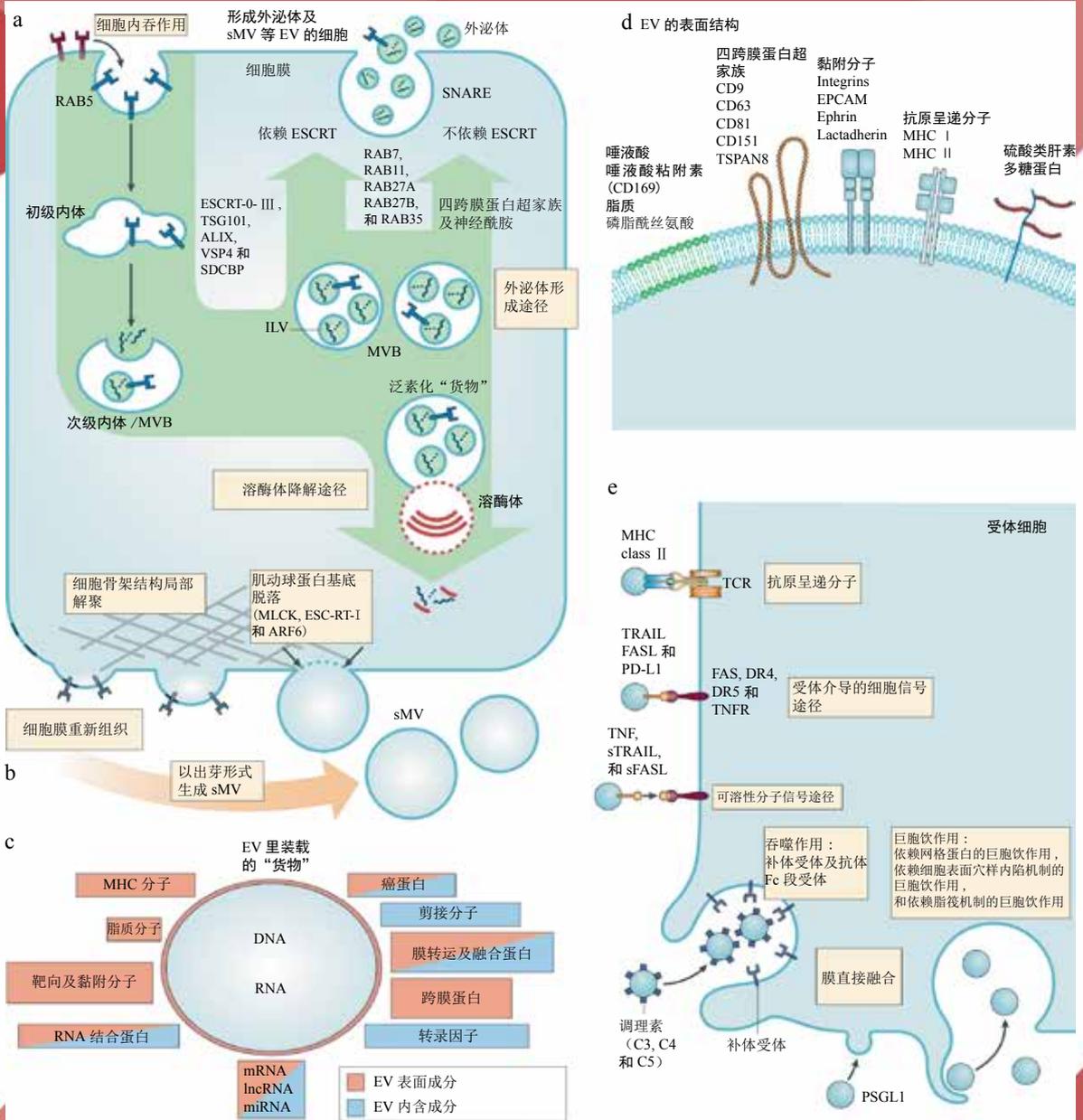


图1. EV的生物合成机制及内容物简介。a, 外泌体的生物合成及释放机制与多条细胞内信号通路有关。首先, 细胞通过主动的胞吞作用, 将细胞外的物质吞进细胞内, 并形成内体。次级内体(即MVB)向内出芽作用, 形成ILV。MVB向胞膜转移, 并与胞膜融合, 向胞外释放出管ILV, 即外泌体。外泌体生成途径可受依赖运输所需的内体分类复合体(endosomal sorting complex required for transport, ESCRT)的调控, 也可不受该途径的

控制。这两条通路是各自独立发挥作用的。MVB与胞膜的融合，以及外泌体的释放过程，受到多种RAB GTP酶，比如RAB7A、RAB11、RAB27A、RAB27B和RAB35等酶蛋白分子，以及可溶性的N-乙基马来酰亚胺敏感因子附着蛋白受体（soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor, SNARE）的调控。此外，MVB还能够与溶酶体融合，借此途径降解ILV。b, sMV的生物合成及释放。其中不仅包括了胞膜再组织（plasma membrane reorganization）和磷脂重分配（redistribution of phospholipid）等关键过程，还包括磷脂酰丝氨酸（phosphatidylserine）向胞膜外层的迁移、细胞骨架网络的解聚，以及细胞肌球蛋白的收缩（由MLCK、ESCRT-I及ARF6等分子激活）等过程。c, EV可以运送DNA及RNA等核酸分子，也可以运送蛋白质和脂质分子，包括癌蛋白、融合、剪接突变基因、转录因子和RNA结合蛋白等，这些“货物”都会对受体细胞产生影响。Exocarta2012和Vesiclepedia就是公开的数据库，收录了外泌体蛋白、RNA和脂质分子的数据，而且这些分子都经过了充分的注释。d, EV对受体细胞的特异性识别主要还是依靠受体结合途径，比如，磷脂酰丝氨酸等脂质、四跨膜蛋白超家族、整合素等黏附分子、信号受体、抗原呈递分子和膜转运分子等。e, EV能够经由不同的途径，进入受体细胞，这些途径包括胞吞作用、巨胞饮作用、内吞作用和膜融合作用等。发生在受体细胞表面的配体受体相互作用既能够引发一系列生物学反应，也能够发挥帮助EV与受体细胞特异性识别及结合的作用。ALIX（ALG-2-interacting protein X）：ALG2相互作用蛋白X；C3（complement C3）：补体C3；C4（complement component C4）：补体C4；C5（complement component C5）：补体C5；DR4（death receptor 4 also known as TNFRSF10A）：死亡受体4，又名TNFRSF10A；DR5（death receptor 5 also known as TNFRSF10B）：死亡受体5，又名TNFRSF10B；EPCAM（epithelial cell adhesion molecule）：上皮细胞黏附分子；FAS（apoptosis-mediating surface antigen）：凋亡介导表面抗原；FASL（FAS antigen ligand, also known as FASLG）：FAS抗原配体，又名FASLG；MHC（major histocompatibility complex）：主要组织相容性复合体；PD-L1（programmed cell death 1 ligand 1）：细胞程序死亡配体1；PSGL1（P-selectin glycoprotein ligand 1）：P-选择素糖蛋白配体1；SDCBP（syntenin 1）：内居蛋白1；sFASL（soluble FASL）：可溶性FASL；sTRAIL（soluble TRAIL）：可溶性TRAIL；TCR（T cell receptor）：T细胞受体；TNFR（TNF receptor）：TNF受体；TRAIL（TNF-related apoptosis-inducing ligand）：TNF相关凋亡诱导配体；TSG101（tumour susceptibility gene 101 protein）：肿瘤易感基因蛋白101；TSPAN8（tetraspanin 8）：四跨膜蛋白8；VPS4（vacuolar protein sorting-associated protein 4）：空泡蛋白分选相关蛋白4。

1. EV的分类、生物合成及内容物

按照生物合成机制的不同，我们至少发现了两种EV，即细胞外泌体和sMV。sMV也经常被称作超微小泡（microvesicle）、核外颗粒体（ectosome）和微粒（microparticle）。为了便于讨论，本文将统一使用sMV。我们主要根据大小来区分细胞外泌体和sMV。外泌体的直径约为30~150 nm，而sMV的直径则在50~1300 nm。我们逐渐发现，这两种EV大小可能会有重叠。值得注意的是，某些EV的大小还会受储存条件的影响。例如，外泌体在反复冻融过程中大小基本不变，但是sMV在-80℃，以及反复冻融的储存条件下就会明显缩小。

越来越多的体外实验（细胞培养试验及体液标本试验）证据表明，外泌体还分成了很多不同的亚型。蛋白质及RNA谱系分析发现，不同亚型的外泌体里装载的“货物”也各有不同，不过我们目前还不太清楚它们在功能上有什么区别，还需要通过对更高纯度和更加明确的EV进行研究，来进一步认识它们。其它种类的EV，例如在血小板活化时释放的、直径在130~500 nm的血小板源性的微体（也被称作血小板尘platelet dust），毫无疑问就是在血液中含有最多的EV。

关键点：

》外泌体和sMV是两大类微小的、有脂质包被的EV，它们能够在细胞之间传递蛋白质和核酸等分子，改变受体细胞的表型。

》每一种EV都有独特的生物合成机制，而每一种EV又包括多种亚型，我们可以根据内含蛋白质和RNA的不同，来区分不同的亚型。

》外泌体参与了肿瘤细胞与细胞微环境之间的信号传递过程，有利于建立肿瘤转移前微环境，促进肿瘤的演进。

》循环外泌体（Circulating exosome）里含有肿瘤特异性分子，比如癌蛋白、mRNA、长链非编码RNA和DNA等的信号。这些分子都是新一代分子标志物，具有极高的临床价值，可用于液体活检，并改进肿瘤的临床诊治工作。

》急需制定标准化的EV分离操作规程。只有这样，才能对不同实验室得到的数据进行比较，促进EV的临床应用。

》外泌体还是一种非常有潜力的给药工具，也可用作抗癌疫苗，有望促进临床抗癌工作的改善。

1.1 外泌体的生物合成

外泌体与sMV不仅在内容物和大小方面有区别，形成机制也完全不同。外泌体生物合成的第一步就是胞膜内向出芽（inward budding），形成一个膜空泡结构，即初级内体；随后该初级内体再经历多轮变化，直至成熟，形成次级内体（图1a）。次级内体有限的膜成分再内向出芽，挤出多个ILV，这也就形成了MVB。这些含有多个ILV的MVB是溶酶体降解途径里的中间媒介，它们与溶酶体融合，就会在核酸酶、蛋白酶、脂酶，以及其它水解酶的作用下，使ILV的内容物降解。这种降解途径是由表面蛋白介导的，包括含有His结构域的肿瘤抑制因子蛋白酪氨酸磷酸酶（His domain-containing protein tyrosine phosphatase, HD-PTP，又名PTPN23）、HSP70 HSP90组织蛋白复合物、GTP酶RAS相关蛋白RAB7A、酶融合可溶性N-乙基马来酰亚胺敏感因子附着蛋白受体（SNARE）复合物，以及借助与VT11B、STX7和STX8之间的相互作用来介导囊泡转运的VAMP7蛋白等。

MVB还能够形成外泌体。这些MVB借助细胞内体循环系统（endosomal recycling

system）转运至胞膜处，并与胞膜融合，释放出里面的ILV，形成外泌体。ESCRT-0~III这4种依赖运输所需的内体分类复合体是促使外泌体形成的关键因素。这是一个可逆的蛋白质泛素化过程（reversible protein ubiquitylation）。除了这条依赖ESCRT复合体途径之外，还有不依赖它的外泌体形成途径，即依赖中性神经磷脂酶（neutral sphingomyelinase, N-SMase）形成神经酰胺（ceramide）的途径，以及需要ADP核糖基化因子6（ADP ribosylation factor 6, ARF6）和磷脂酶D2（phospholipase D2, PLD2）的途径。包括SDCBP等蛋白在内的选定蛋白（selected protein）也是一种潜在的调控因子，能够调节外泌体内容物。依赖ESCRT和不依赖ESCRT的MVB和外泌体的生物合成机制，会根据各自特定脂质的含量来决定。但是一个外泌体是否可以同时借助这两条不同的途径来生成？不同机制生成的外泌体是否能够共存于同一个细胞？这些问题还有待我们去解答。总而言之，EV的生物合成机制目前还没有被研究得特别透彻，更深层次的机理亟待更深入的研究来揭示。

1.2 sMV的生物合成

与外泌体的生物合成相比，我们对sMV的生物合成了解得更少。外泌体的生物合成依赖于MVB，但是sMV的生物合成却并非如此，也不需要胞吐作用的参与。sMV是细胞依赖ARF6和RHOA对肌球蛋白细胞骨架进行重排之后，直接以出芽的方式形成的。sMV和病毒的出芽机制类似，即利用ESCRT，直接从胞膜上“挤出”（图1b）。比如，ESCRT-I亚单位肿瘤易感基因101蛋白TSG101就与sMV向胞膜的运输有关，而且它还能在sMV释放后期（这一时期与sMV内的装载物分选有关），与ALG-2相互作用蛋白X（ALIX蛋白，又名PDCD6IP蛋白）及ARRDC1蛋白相互作用。ESCRT-III及ALIX也与Gag介导的HIV病毒出芽过程有关，同时也与细胞骨架的解离（cytokinetic abscission）有关。有

趣的是，P2X嘌呤受体7（P2X purinoceptor 7, P2X7）活化之后，激活的下游事件会促使sMV从神经胶质细胞和星形胶质细胞中释放，这也是神经炎性疾病（neuroinflammatory disease）里的关键事件。这一发现，以及后来发现的N-SMase能够调节少突胶质细胞（oligodendrocyte）的外泌体释放等证据表明，SMase家族里的不同成员，都是调节EV形成的关键因子，而这些酶因子的抑制剂就有望成为治疗神经炎性疾病的新药物。

尽管外泌体和sMV这两种不同EV的生物合成机制，及其各自膜结构的来源各有不同，但它们在被释放到细胞外之后，发挥了比较相似的功能。不过我们目前对这些EV的功能还不太了解，还需要进行更深入的研究，来认识这两种EV的功能差异。

1.3 EV的分类及内容物的区别

在EV的生物合成阶段，它们会装载不同的、具有各种生物活性的“货物”（图1c）。有意思的是，我们利用新一代高通量测序技术，对人结肠癌细胞SW480和SW620进行研究后发现，很多在细胞内无法检测到的miRNA，却可以在这些细胞释放的外泌体和sMV里发现。即在细胞里每100万个测序结果里不到5个的转录子（transcripts per million read, TPM），在外泌体和sMV里却“浓缩”成了超过1000 TPM。这一发现至关重要，也因此在全球掀起了使用深度测序技术，在肿瘤活检

组织中寻找RNA分子标志物的热潮。总体而言，我们对这些EV如何挑选内容物的机制，还一无所知。除此之外，在EV的生物合成过程中，能够代表各自来源细胞的不同的表面蛋白，也都被有选择地呈现在EV的表面了（图1d）。这其中就包括RNA结合蛋白、核糖核蛋白、信号受体和整合素等，而整合素对于识别受体细胞，和/或被受体细胞摄取（包括直接融合和胞吞等），以及在T细胞受体TCR主要组织相容物（MHC）和ICAM1等分子之间的相互作用中都具有重要的作用（图1e）。

2. 纯化EV的必要性

近十年来，我们越来越意识到分离、纯化EV，对于开展相关科学研究工作的重要性和必要性。其中最重要的是，高纯度的EV是帮助我们更深入认识EV基本生物化学特征（比如确定内含的生物活性物质）的关键，而且只有这样，才能进一步了解其生物合成机制和功能。而且，我们还需要鉴别EV表面蛋白，这不仅有助于我们开发相应的单克隆抗体（mAb），用来对这些EV进行更精细的鉴别（比如亚型鉴定），用来进行大规模的分选和纯化（可用于后续的EV疫苗生产），还可以用来致敏免疫细胞等。背景知识1详细介绍了目前比较常用的几种EV纯化方法，以及这些EV在诊断和治疗方面的应用。

背景知识1. EV纯化技术简介

尽管大量有关EV纯化技术的文献都已详细介绍了每一种技术各自的劣势，但是我们目前仍然缺乏一个标准的、堪称金标准的EV纯化流程。随着我们发现越来越多外泌体和sMV的亚型结构，纯化问题就变得更加复杂和突出了。各种常见的、快速的、一步式的EV“纯化”方法并不能解决“纯化产物”的混杂问题，比如最终的“纯化产物”中会包含各种亚型EV，以及各种生物大分子物质，例如蛋白质寡聚物、蛋白质RNA复合体（HDL、LDL和AGO2等）。现有EV纯化技术包括差速离心技术（differential centrifugation）、使用蔗糖、聚果糖、碘丙醇等物质的密度梯度离心技术（density gradient centrifugation, DGC）、高效液相色谱凝胶渗透层析技术（highperformance liquid chromatography gel permeation (size-exclusion) chromatography）、利用结合了能特异性识别GPA33、EPCAM、MHC II抗原CD45、CD63、CD81、CD9、CD1b、CD1d、CD14、CD24和HER2等分子的特异性mAb磁珠亲和层析

技术（affinity chromatography）、低离心力的膜超滤技术（membrane ultrafiltration devices using low centrifugal force）、微流体技术（microfluidic device），以及使用人工合成多聚体的沉淀技术（synthetic polymer-based precipitation reagent）等。研究人员通常都会根据实验目的，来选择不同的纯化方案。

如果是想开展精细的生物化学分析，比如对EV的内容物及表面蛋白进行鉴定，或者开展功能分析，就需要制定非常严格的分离方案。试验发现，在分离外泌体时，使用mAb磁珠亲和层析技术要比使用密度梯度离心技术更佳。

如果缺乏相应的mAb，我们还可以根据目标EV的表面热休克蛋白，以及硫酸肝素蛋白多糖（heparan sulfate proteoglycan），来人工合成相应的肽段，以进行特异性识别和分离。还有报道称，使用低重力多次离心膜超滤技术（low gravitational (g) force sequential centrifugal membrane ultrafiltration），以及差速离心结合密度梯度离心技术，也取得了不错的结果。

3. 肿瘤微环境里的外泌体

我们已经知道，不同细胞释放的EV的分子组成（**molecular composition**）有极大差异。而受体细胞在摄入了这些各不相同的外泌体（我们对sMV的功能还知之甚少，所以此处主要指外泌体）后会发生何种表型变化，则主要取决于外泌体里含有的各种蛋白质及RNA成分。有证据显示，这些内含成分主要参与了不同细胞与肿瘤微环境、肿瘤细胞与间充质细胞，以及肿瘤细胞之间的双向交流（表1）。

原位肿瘤细胞（**tumours in situ**）是一种非常常见的现象，我们也对此进行了长达半个世纪的不懈研究，我们尤其想知道，为什么这些细胞最终不一定会恶变呢？这些肿瘤细胞尽管也携带了致癌突变，但是当被植入发育中的胚胎等非恶性变的微环境（**nonmalignant microenvironment**）中时，却并不会形成肿瘤。这一现象说明，非恶性的微环境可能会限制非良性细胞的生长和进一步恶性变。这也引发了一个值得我们深思的问题，癌症究竟是一种分子层面的遗传或表观遗传学疾病，还是一个主要由肿瘤微环境决定的生态学疾病（**ecological disease**）？

近十年来，我们已经发现，肿瘤细胞释放的外泌体能够影响非肿瘤细胞，以形成一个有利于肿瘤生长和转移的肿瘤微环境（表1）。比如，肿瘤细胞释放的外泌体能够影响内皮细胞，促进血管生成，帮助肿瘤生长；还可以影

响血管的通透性，促进肿瘤的转移。肿瘤细胞释放的外泌体还能够促使成纤维细胞分化为促血管生成的成纤维细胞（**pro-angiogenic fibroblast**），以及促肿瘤形成的成纤维细胞（**pro-tumorigenic cancer-associated fibroblast**）。此外，肿瘤细胞释放的外泌体还能够抑制免疫细胞，帮助肿瘤逃避免疫监视，随着肿瘤的演进，最终让免疫细胞也改造出促肿瘤（**pro-tumorigenic phenotypes**）和促转移的表型（**pro-metastatic phenotypes**）。肿瘤细胞释放的外泌体之所以能够改变受体细胞的表型，主要依靠的就是内含的各种功能分子，比如MAPK及PI3K-AKT-mTOR信号通路的各种组分分子（表1）。肿瘤细胞释放的外泌体还可以将miRNA转移给受体细胞，抑制受体细胞内某些基因的表达。我们还发现，肿瘤细胞释放的外泌体内含的长链非编码RNA也具有重要的作用。综上所述，外泌体转移的各种分子也可以使非肿瘤细胞发生转化，以促进原发肿瘤细胞的生长，这一点小鼠动物模型也已证实。

多位科研人员已经发现，人肿瘤细胞释放的EV都能够将非恶性的细胞进行转化（**transform**）。比如，结直肠癌细胞释放的外泌体就能促使来源患者自身的间充质细胞发生转化；而前列腺癌细胞释放的EV，也能够促使来源患者自身的脂质干细胞发生转化；神

经胶质瘤-星状细胞瘤细胞释放的外泌体里含有EGFR突变体EGFRvIII，这也能够促使缺乏EGFRvIII突变体的神经胶质瘤细胞发生转化；非恶性的小鼠成纤维细胞在植入免疫力低下的小鼠动物模型之后，如果再加上促肿瘤乳腺癌细胞（pro-tumorigenic breast cancer cell）的微环境，也能够小鼠体内形成肿瘤；良性的人乳腺癌细胞（nonmalignant human breast cell）在植入免疫力低下的小鼠动物模型之后，如果再加上乳腺癌细胞释放的外泌体，甚至是乳腺癌患者血液里分离得到的外泌体，也能够小鼠体内形成肿瘤。不过在体内是否真正能够发生这种细胞转化，目前还存在争议。

外泌体还能够将癌细胞里的致癌物转移给肿瘤微环境里的其他邻近细胞，比如突变的蛋白、融合基因mRNA（例如EML4-ALK）和致癌的长链非编码RNA等。比如，神经胶质瘤细胞释放的外泌体就可以将EGFR突变体EGFRvIII，及其致癌信号活性转移给其它惰性癌细胞（indolent cancer cell），促使它们恶变。除了那些标志性的促癌能力之外，外泌体还能转移miRNA分子，在细胞之间传递耐药性。实际上，肿瘤细胞还会根据外界环境的变化，随时调整和改变它们释放的外泌体里装载

的成分。比如在缺氧时，就促进血管生成；在有抗癌药存在时，就传递耐药性等。

越来越多的证据表明，肿瘤异质性并不限于肿瘤细胞。比如，间充质细胞也能够与肿瘤细胞共同演进（co-evolve）。这两种细胞彼此合作，共同促进肿瘤演进。在此过程中，间充质细胞释放的外泌体会持续向肿瘤细胞提供有功能的蛋白质和RNA，促进肿瘤生长、侵袭和转移（表1）。此外，间充质细胞释放的外泌体还能促进肿瘤的恶性变、成功转移，以及产生耐药性，而这对于肿瘤的预后具有决定作用。

值得注意的是，大量有关外泌体对于促进肿瘤微环境形成的作用研究，均使用小鼠动物模型，以及人肿瘤细胞释放的外泌体，来开展体外实验。重要的是，从肿瘤患者体内分离得到的外泌体都是有功能的。比如，从癌性腹水里分离得到的外泌体，以及从肿瘤患者血清里分离得到的外泌体都能够使良性的间充质细胞发生改变，促进肿瘤的演进。综上所述，肿瘤细胞与非肿瘤细胞之间的信号传递，是肿瘤生物学里的重要课题，这个课题也吸引了越来越多的关注。

表1 外泌体在肿瘤细胞间存在信息交流的证据一览表

| 外泌体释放细胞 | 受体细胞 | 外泌体内含功能物质 | 确定这些功能的方法 | 重要结论 |
|---|-----------------|--------------|---|---|
| 肿瘤细胞外泌体对非肿瘤细胞的影响 | | | | |
| 小鼠黑色素瘤B16F10细胞或人黑色素瘤A375细胞释放的外泌体里含有2型肿瘤抑制因子PEDF | 小鼠骨髓单核细胞 | PEDF | 在转移的黑色素瘤细胞里过表达PEDF, 以及抗PEDF抗体 | 肿瘤细胞释放的外泌体里含有2型肿瘤抑制因子PEDF, 这些肿瘤细胞的转移能力比较弱, 它们能够将天然杀伤细胞(NK细胞)和巨噬细胞募集到转移前微环境(pre-metastatic niche)里, 杀死那些转移过来的癌细胞。 |
| 小鼠黑色素瘤B16F10细胞 | 小鼠BMDC | MET | <i>Met</i> shRNA、 <i>Rab27a</i> shRNA以及MET抑制剂crizotinib | 含有MET的外泌体转移至小鼠BMDC, 然后进入血液循环系统, 最终进入小鼠的肺部, 并在肺部形成一个转移前微环境, 促进肿瘤细胞的转移。 |
| 小鼠PDAC细胞R6560B和PAN02及PDAC细胞BxPC-3 | 小鼠及人枯否细胞 | MIT | <i>MIF</i> shRNA | 含有MIF的外泌体转移至小鼠肝脏内, 促使肝脏内的枯否细胞释放TGF β 因子, 进而刺激肝脏星状细胞内纤连蛋白沉积。这些纤连蛋白会捕获循环系统里的BMDC细胞, 在肝脏内形成一个转移前微环境, 促进肿瘤向肝脏转移。 |
| 人前列腺癌细胞PC3 | 人原代成纤维细胞AG02262 | TGF β | 抗TGF β 抗体及TGF β -SMAD抑制剂SB431542 | 含有大量TGF β 的外泌体能激活成纤维细胞内SMAD3信号通路, 促进细胞内 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin)的表达, 最终使成纤维细胞分化为肌成纤维细胞(myofibroblast)。 |
| 人乳腺癌细胞MDA-MB-231及人胶质瘤细胞U87 | 小鼠成纤维细胞NIH3T3 | 谷氨酰胺转氨酶及纤连蛋白 | 谷氨酰胺转氨酶编码基因siRNA及纤连蛋白抑制剂RGD多肽 | 外泌体里含有的谷氨酰胺转氨酶及纤连蛋白能够激活促有丝分裂信号通路, 增强成纤维细胞不依赖于anchorage因子的生长活性。 |
| 人胃癌细胞SGC7901 | 小鼠枯否细胞及人肝脏星状细胞 | EGFR | <i>EGFR</i> siRNA | 这些含有EGFR分子的外泌体能够抑制枯否细胞内miR-26a和miR-26b分子的作用, 促进肝脏生长因子的表达, 这些肝脏生长因子就能够促进肝脏内表达MET分子的转移瘤细胞的生长。 |
| 人胶质瘤细胞U87 | 人HMVEC细胞 | DLL4 | DLL4过表达 | 外泌体将DLL4因子转移给内皮细胞, 会抑制内皮细胞内的 <i>HES1</i> 及 <i>HEY1</i> 等Notch信号通路靶基因的表达, 下调Notch信号通路的活性, 促使血管生成。 |

| | | | | |
|---|-------------------------------------|------------------------|--|--|
| 人原代胶质瘤细胞 | HMVEC | GLuc mRNA | GLuc mRNA过表达 | GLuc mRNA经由外泌体转移至HMVEC细胞之后，能够表达出GLuc蛋白，促进小管形成，但这些mRNA是否能够促进血管生成，还不确定。 |
| 乳腺癌细胞MDAMA-231-D3H2LN、BMD1a、BMD2a及BMD2b | 人HUVEC、周细胞及星形胶质细胞 | miR-181c | miR-181c转染及过表达 | 含有miR-181c分子的外泌体会下调内皮细胞内PDPK1分子的表达，使细胞内肌动蛋白定位出现异常，破坏血脑屏障，促进乳腺癌细胞的颅内转移。 |
| 肺腺癌细胞CL1-5 | HUVEC | miR-23a | 转染miR-23a抑制子 | 缺氧的肺癌细胞释放的外泌体里含有miR-23a分子，它们可以抑制内皮细胞内EGLN1、2分子的表达，促使细胞内HIF1 α 分子积聚，最终促使血管生成。这些miR-23a分子还能够抑制内皮细胞内紧密连接蛋白ZO-1的表达，增强血管的通透性，促进肿瘤细胞的跨血管转移。 |
| 人前列腺癌细胞Du145 | HUVEC | TGF β | TGF β 信号通路抑制剂SB431542及RAB27A基因下调 | 在体外试验中发现，外泌体里含有的TGF β 分子能使成纤维细胞转化成肌成纤维细胞，促进血管生成，在体内实验中也发现，这些外泌体能够加快肿瘤的生长。 |
| 人多发性骨髓瘤细胞RPMI8226、KMS-11及U266 | HUVEC | miR-135b | miR-135b抑制子转染 | 能够耐受缺氧的多发性骨髓瘤细胞释放的外泌体里含有miR-135b分子，它们可以增强内皮细胞在缺氧条件下形成小管的能力，这主要依赖HIF1 α 抑制剂信号通路的作用。 |
| 肿瘤细胞之间的相互作用 | | | | |
| 对舒尼替尼（Sunitinib）耐药的肾癌细胞7Su3rd | 对Sunitinib敏感的肾癌细胞786-O | 长链非编码RNA (lncRNA)-ARSR | 特异性抑制lncRNA-ARSR的核酸 | 对Sunitinib耐药的肾癌细胞7Su3rd释放的外泌体里含有lncRNA-ARSR，它被对Sunitinib敏感的肾癌细胞摄取之后，能够让受体细胞获得对Sunitinib的耐药性。lncRNA-ARSR能够与miR-34及miR-449结合，促进AXL及MET的表达。 |
| 人乳腺癌细胞MDA-MB-231及B16黑色素瘤细胞 | 人乳腺癌细胞T47D、MCF-7及小鼠MMTV-PyMT乳腺癌转移模型 | Cre重组酶mRNA | 过表达Cre重组酶mRNA | 乳腺癌细胞释放的外泌体里含有Cre重组酶mRNA，该RNA分子能够在恶性度较低的受体细胞里表达有活性的蛋白，进而增强受体细胞的运动能力和转移能力。但是具体是哪种蛋白的作用，现在还不清楚。 |

| | | | | |
|--|--|-------------------|--|---|
| 能表达EGFRvIII分子的人胶质瘤细胞U373vIII | 不能表达EGFRvIII分子的人胶质瘤细胞U373 | EGFRvIII | 能抑制受体细胞与外泌体相互作用的Annexin V, 以及不可逆的ERBB广泛抑制剂CI-1033 | 体外实验发现, 能表达EGFRvIII分子的人胶质瘤细胞释放的外泌体将EGFRvIII分子转移至不能表达EGFRvIII分子的人胶质瘤细胞中, 这促使受体细胞发生形态改变, 增强这些细胞独立于anchorage因子的生长能力。 |
| 人结肠癌细胞DKO-1, 该细胞只有KRAS等位基因发生了KRAS-G13D突变 | 人结肠癌细胞DKs-8 (该细胞KRAS等位基因为野生型), 及大鼠小肠上皮细胞RIE1 | KRAS突变基因 | 借助MRM质谱技术, 在DKs-8受体细胞中确定了KRAS-G13D突变肽段LVVVGAGDVGK | 体外实验发现, 含有KRAS ^{G13D} 突变基因的外泌体能够使DKs-8不依赖anchorage因子的生长能力增强。 |
| 非肿瘤细胞对肿瘤细胞的作用 | | | | |
| 人乳腺肿瘤相关成纤维细胞及人乳腺癌细胞MDA-MB-231 | 人乳腺癌细胞MDA-MB-231 | CD81 | CD81 shRNA | 以不依赖外泌体CD81分子的方式, 在PCP-WNT信号通路的作用下, 促进乳腺癌细胞的生长和运动。 |
| 原代人乳腺肿瘤相关成纤维细胞 | 人乳腺癌细胞MDA-MB-231 | 信号识别颗粒RNA——RN7SL1 | POL3抑制子及POL3特异性siRNA | 原代人乳腺肿瘤相关成纤维细胞释放的不含有蛋白质成分的外泌体里含有RN7SL1, 它能激活乳腺癌细胞DDX58信号通路, 增强乳腺癌细胞对化疗药物的耐药性, 提高乳腺癌细胞的生长能力。 |
| 小鼠原代皮肤成纤维细胞 | 人乳腺癌细胞MDA-MB-231 | ADAM10 | ADAM10抑制剂GI254023、ADAM17及ADAM10抑制剂GW280264, ADAM抑制剂TAPI-1、金属蛋白酶抑制剂BB94、ADAM10特异性shRNA及Timp基因敲除小鼠动物模型 | Timp基因敲除小鼠动物模型成纤维细胞 (该细胞不能表达金属蛋白酶抑制子1) 释放的外泌体能够提高乳腺癌细胞内ADAM10的表达水平, 提高乳腺癌细胞的运动能力。 |
| 人骨髓间质干细胞 (BM-MSc) | 人乳腺癌细胞BM2 | miR-23b | MARCKS基因siRNA, 过表达MARCKS基因及miR-23b | BM-MSc释放的外泌体里含有miR-23b, 它能抑制受体细胞内MARCKS基因的表达, 使受体细胞进入休眠状态。 |
| 小鼠原代星形胶质细胞 | 人乳腺癌细胞MDA-MB-231及小鼠乳腺癌细胞4T1 | miR-19a | 突变的miR-19a, PTEN shRNA及CCL2 shRNA | 小鼠原代星形胶质细胞释放的外泌体里含有miR-19a, 能够抑制脑转移乳腺癌细胞内PTEN基因的表达, 进一步增强肿瘤细胞的转移能力。 |

4. 外泌体与转移前微环境 (pre-metastatic niche)

我们对转移前微环境形成的认识得益于观察到原代肿瘤细胞能够分泌一些因子，这些因子会在肿瘤细胞转移之前，就先迁移到适于转移的位置，并对该位置进行改造，使其更加利于肿瘤的转移。非恶性组织天然具有抑制肿瘤生长的能力，但是转移前微环境却有所不同，它们已经被外泌体改造成具有某些原发灶的特点，比如血管的通透性增高、炎症反应、免疫抑制、血栓（coagulation）和间充质细胞活化等，成为一块适于转移瘤生长的“沃土”。

此外，还有大量肿瘤细胞分泌的因子也都与转移前微环境的形成有关，如VEGFA、PIGF、趋化因子S100-A8、S100-A9和G-CSF等肺癌原发肿瘤细胞分泌的可溶性因子都与肺癌转移前微环境的形成有关。因此，本文只讨论外泌体对转移前微环境的作用，而不讨论其它因子在这方面的影响。

4.1 外泌体对转移前微环境形成的作用

我们对转移前微环境形成机制的认识还不多。对转基因小鼠及肿瘤移植小鼠动物模型的研究发现，转移前微环境的形成是一个多步骤的过程，还有这个过程在不同种类的肿瘤之间，并没有太大的差别。转移前微环境的形成始于原发灶肿瘤将外泌体释放进入血液循环系统，通过这个途径，外泌体在身体的其它部位，找到了适合肿瘤生长的环境，这就是即将形成的转移前微环境。原发灶位置的流出血管可能会影响转移灶的形成，我们已经发现，外泌体对于转移灶的选择是有偏好的。比如，黑色素瘤或乳腺癌释放的外泌体就比较“喜欢”肺、肝、骨骼和大脑等组织，而结直肠癌细胞

释放的外泌体则比较偏好肝脏（图2、3）。虽然目前我们还不太清楚是否是外泌体的表面蛋白决定了这种偏好，但是，越来越多的证据表明，外泌体膜蛋白的组成成分，例如整合素等分子在其中起到了关键性的作用。有趣的是，对小鼠的系统性生物分布研究（systemic biodistribution studies）发现，某些人的肿瘤细胞释放的外泌体对于小鼠组织的偏好性，居然和人体内一模一样（图2）。此外，迄今为止的研究发现，大多数肿瘤细胞释放的外泌体都对骨髓组织（bone marrow）具有很强的偏好，这说明外泌体与骨髓来源细胞（bone marrow-derived cell, BMDC）之间的接触，

是肿瘤转移的最常见特点。

在转移前微环境的形成过程中，最关键的一个步骤就是血管的通透性升高，这是肿瘤细胞释放的外泌体，与影响转移灶位置间充质细胞的可溶性蛋白因子共同作用的结果。受体细胞的种类是由肿瘤类别决定的，而且为继发转移灶部位所特有。比如，胰腺癌细胞释放的外泌体就会被肝脏枯否细胞摄取，而乳腺癌细胞释放的外泌体则会被肺部的成纤维细胞或上皮细胞，以及大脑里的内皮细胞或者星形胶质细胞“捕获”。间充质细胞接触到这些外泌体之后，会发生重编程（reprogramming），激活信号通路，改变局部肿瘤微环境里趋化因子的状态，重构整个细胞外基质（extracellular

matrix, ECM），提高营养供给水平，促进新生血管生成和淋巴管生成。

在转移前微环境形成的初始阶段，大量肿瘤外泌体会经由血液循环系统进入骨髓组织，被BMDC细胞摄取，从而增强了这些细胞转移进入外周循环系统的能力。而继发灶位置已经发生了改变的微环境，则会吸引循环系统里的那些BMDC细胞，进入局部转移前微环境。这些BMDC细胞会在此处释放各种可溶性因子，形成局部的促炎症环境（proinflammatory milieu），以及促进肿瘤形成的免疫抑制环境。总体而言，这些事件累积起来，就形成了转移前微环境，促进了肿瘤的转移。

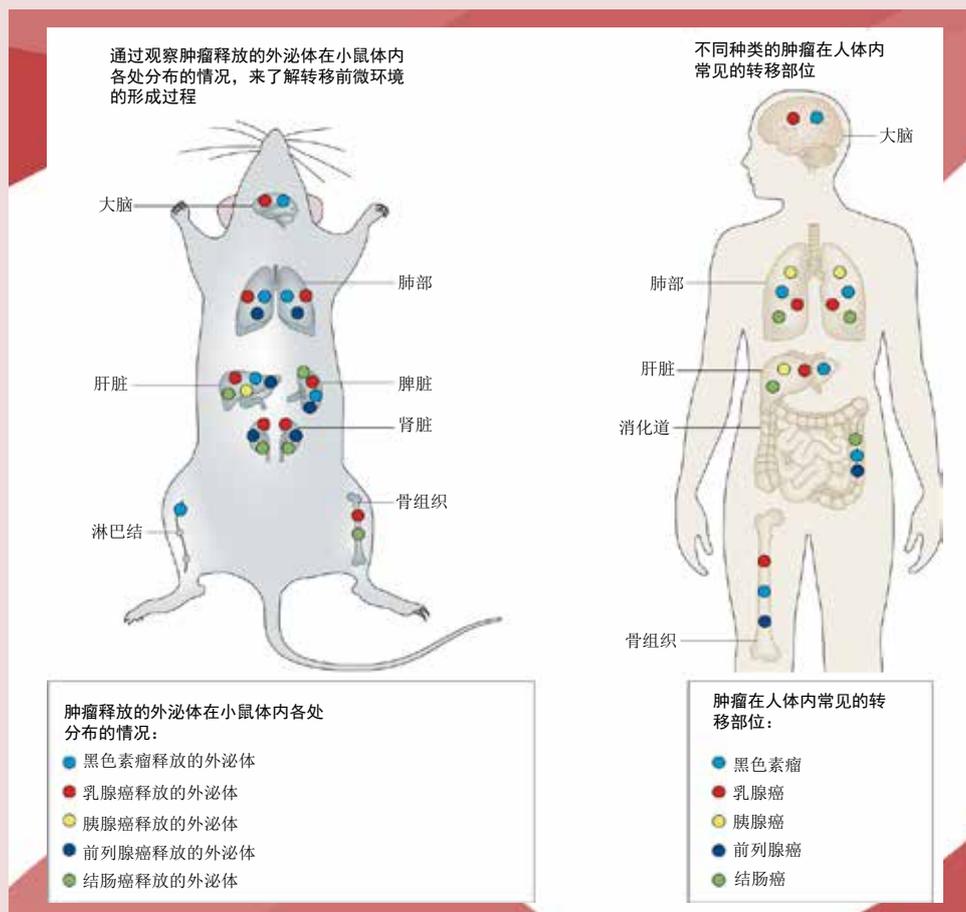


图2. 肿瘤释放的外泌体在小鼠体内各处的分布情况以及人体肿瘤在人体内常见的转移部位。左图展示的是黑色素瘤、乳腺癌、结肠癌、胰腺癌和前列腺癌等人体肿瘤释放的外泌体在小鼠体内各处的分布情况。右图展示的是这些人体肿瘤在人体内常见的转移部位。

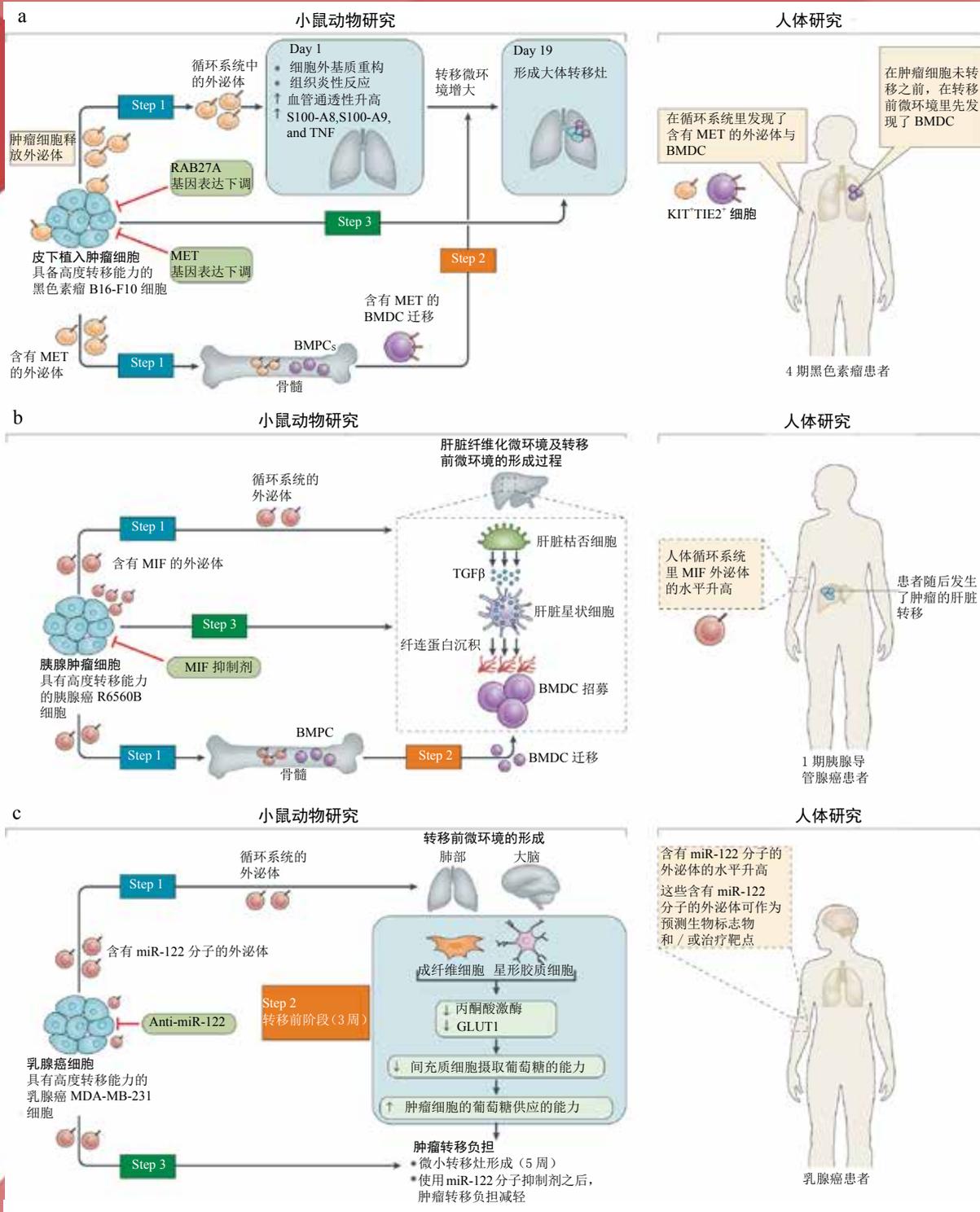


图3. 外泌体与转移前微环境的形成机制。我们目前对转移前微环境形成机制的认识和了解, 主要来自对肿瘤异体移植小鼠动物模型 (图3a) 和转基因小鼠动物模型 (图3a、3b、3c) 的研究。a, 高转移特性的B16-F10黑色素瘤

细胞释放的外泌体能够增强原发灶肿瘤的转移能力，主要作用机制是通过酪氨酸激酶受体MET，彻底改变骨髓前体细胞（bone marrow progenitor cells, BMPC）。黑色素瘤细胞释放的外泌体到达肺部，使肺部血管的通透性增高，因此细胞外基质重构发生紊乱，上调TNF等炎症因子，以及S100-A8、A9等趋化因子的表达。这些外泌体还会进入骨髓，通过转移MET到BMPC细胞的方式，对这些骨髓细胞进行改变。经过外泌体改造的MET⁺KIT⁺TIE2⁺ BMDC细胞进入肺部，从而促使转移前微环境的形成和扩张。肺部微环境的这种改变，会吸引循环系统里的肿瘤细胞，促使肺部转移进一步加重。如果将肿瘤细胞的MET基因或RAB27A（是一种RAS相关蛋白，对于外泌体的生物合成非常重要）基因的表达量下调，或者使用MET拮抗剂crizotinib，就会抑制外泌体介导的这种转移前微环境的形成作用。在4期黑色素瘤患者的血液里，能够检出含有MET的外泌体和MET⁺KIT⁺TIE2⁺ BMDC细胞。在黑色素瘤患者体内的转移前部位，也能发现这些BMDC细胞。b, R6560B原发性胰腺胆管腺癌细胞释放的外泌体能够在非肿瘤小鼠的肝脏内形成转移前微环境，并且促使移植瘤细胞发生肝脏转移。肝脏枯否细胞从循环系统中摄取到这些外泌体之后，会释放TGFβ因子，进而激活肝脏星状细胞，最终发生纤连蛋白沉积。这又会进一步招募BMDC细胞，加重肝脏的肿瘤转移负担。在这些外泌体里含有大量的巨噬细胞迁移抑制因子（MIF），如果抑制了这些因子的作用，就能抑制肝脏转移前微环境的形成，进而抑制肝脏肿瘤转移。值得注意的是，在后来发生了肝脏转移的1期原发性胰腺胆管腺癌患者的血液外泌体里，含有大量的巨噬细胞迁移抑制因子。而没有转移的原发性胰腺胆管腺癌患者的血液外泌体里，就没有这么高水平的巨噬细胞迁移抑制因子。这一发现表明，这些外泌体里的巨噬细胞迁移抑制因子对于原发性胰腺胆管腺癌肿瘤的肝脏转移至关重要。c, MDA-MB-231或MCFDCIS人乳腺癌细胞释放的外泌体里含有miR-122分子，这些外泌体进入脑部和肺部之后，会将这些miR-122分子分别转移给局部的星形胶质细胞和成纤维细胞。这些miR-122分子会抑制受体细胞内GLUT1酶蛋白的表达，导致间充质细胞对葡萄糖的摄取减弱，提高肿瘤细胞获取葡萄糖的机会，增加了这些部位发生肿瘤转移的负担。如果使用anti-miR-122，就可以逆转这个过程。在乳腺癌转移患者的血液里，也能检测到高水平的miR-122⁺外泌体。

4.2 外泌体内容物对转移前微环境形成的作用

转移前微环境的分子组成直接受到了外泌体内容物，例如酪氨酸激酶受体等信号因子蛋白、巨噬细胞迁移抑制因子（macrophage migration inhibitory factor, MIF）、RNA和

DNA等的影响。在一个小鼠黑色素瘤转移动物模型里，小鼠的黑色素瘤B16F10细胞能够转移至肺部，释放出含有酪氨酸激酶受体MET的外泌体（图3a）。BMDC细胞摄取了这些外泌

体之后，酪氨酸激酶受体会被激活，上调KIT和TIE2分子的表达，促进循环系统里含有酪氨酸激酶受体的BMDC细胞迁移到转移前微环境处。循环系统里的外泌体还能够促使肺部的血管通透性增高、ECM重构过程失控，以及炎症基因（比如S100-A8和S100-A9）表达上调等，进一步招募KIT⁺TIE2⁺ BMDC细胞，形成一个有利于肿瘤肺转移的转移前微环境。如果肿瘤细胞里缺少了*Met*基因，或者我们使用了MET抑制剂crizotinib，就能明显降低小鼠血液系统里KIT⁺TIE2⁺ BMDC细胞的水平，减少这种因为外泌体而发生的肿瘤转移现象。小鼠胰腺癌肝脏转移模型也发现，含有MIF的外泌体能够促使转移前微环境形成，主要机制是其诱导了肝脏枯否细胞表达，并分泌TGF β 因子。这些TGF β 因子会激活肝脏星状细胞，使细胞

内发生纤粘蛋白沉积，进而促进骨髓巨噬细胞（这些细胞具有促肿瘤作用）的招募，最终增加了肝脏转移的负担（图3b）。

外泌体里的miRNA也在转移前微环境的形成过程中起到了非常重要的作用。比如，小鼠乳腺癌大脑及肺转移动物模型研究发现，在乳腺癌细胞释放到循环系统里的外泌体里存在大量的miR-122，这些miRNA分子能够抑制大脑星形胶质细胞及肺部成纤维细胞等受体细胞里丙酮酸激酶（pyruvate kinase）的表达。丙酮酸激酶的下调抑制了葡萄糖转运蛋白1（glucose transporter type 1, GLUT1，又名SLC2A1）的表达，降低了大脑和肺部对葡萄糖的摄取，最终保证了肿瘤细胞的葡萄糖充足供应，促使转移瘤细胞“茁壮成长”（图3c）。

4.3 前哨淋巴结（sentinel lymph node）转移前微环境的发展

大部分小鼠转移瘤动物模型研究，主要关注的都是循环系统在其中的作用，比如在研究中使用尾静脉或后眼窝（retro-orbital）注入肿瘤细胞外泌体的试验方法。但是，肿瘤细胞除了经由血液循环系统转移之外，还可以经由淋巴系统转移。我们都知道，如果前哨淋巴结病检结果为阳性，那患者的预后通常都会比较差。黑色素瘤小鼠动物模型体内，原发灶肿瘤细胞释放的外泌体，在淋巴结里的含量远远超过了在血液或其它器官（比如骨、肺和肝脏等）里的水平。很多肿瘤会发生前哨淋巴结转移前微环境的改变。这可能也是肿瘤发生淋巴结转移的必需步骤。实际上，我们将黑色素瘤细胞释放的外泌体通过足垫注射到小鼠体内之

后，也会在淋巴结里形成一个转移前微环境。在这些淋巴结中，外泌体会上调一系列基因的表达，这些基因与细胞招募作用、ECM重构作用，以及血管生成作用都有关系，而且还会影响脱落肿瘤细胞在体内的分布。

在胰腺癌小鼠动物模型的足垫处注入高转移特性胰腺癌细胞释放的外泌体，就会在小鼠的腭窝淋巴结形成一个由转移性非常低的肿瘤细胞形成的转移灶。这可能是由于外泌体将miRNA转移给了间充质细胞，导致这些细胞里的粘连蛋白发生了改变，同时也影响了细胞里趋化因子配体和蛋白酶体的分泌，以及细胞周期蛋白和血管生成蛋白的表达。

5. 与肿瘤有关的生理性外泌体

能够促使肿瘤发生转移的转移前微环境的形成，可以不依赖肿瘤原发灶。比如，老化或感染等因素导致的组织微环境的改变，也能够促使肺部形成转移前微环境，加重肿瘤的肺部转移。由此可见，很多器官都能够不需要原发灶参与的情况下，帮助转移瘤细胞的生长。比如，将肿瘤细胞直接注入无瘤小鼠体内，就能成功地形成转移灶，这些发生了肿瘤转移的器官就是所谓的活性转移微环境，它们之所以不叫做转移前微环境，是因为在体内本来就没有原发灶。

5.1 活性转移微环境的形成

有一系列非常关键的证据能够表明，非肿瘤细胞释放的外泌体（即生理性外泌体）也参与了活性转移微环境的形成过程。在2015年发表的一项研究中，在小鼠乳腺癌转移模型体内，癌细胞在转移至小鼠大脑之后，没有再转移到其它部位，这些乳腺癌细胞是缺失了PTEN这一重要抑癌因子的。而这些乳腺癌细胞缺失了PTEN的原因就是，大脑星形胶质细

胞释放的外泌体里含有的miR-19a分子抑制了PTEN的表达。在这些脑部转移瘤细胞缺失了PTEN表达之后，会进一步分泌CCL2趋化因子，招募能够表达IBA1（又名AIF1）因子的骨髓细胞，这些骨髓细胞能促进脑部转移瘤细胞的增殖，同时减少它们的凋亡。这些不依赖原发灶的微环境就是活性转移微环境。

5.2 冬眠肿瘤细胞

由于致癌基因的致癌能力各不相同，受到很多因素的影响，二级器官（secondary organ）通常都不太适合脱落肿瘤细胞的生长，因此，转移前微环境就会模拟原发灶微环境里那些有利于肿瘤细胞生长的标志性特征。可是，成功转移到远隔器官的肿瘤细胞并不总是能够进入转移前微环境，或者活性转移微环境。那些没能获得适宜生长环境的转移肿瘤细胞，就会进入冬眠状态。

而能够调控冬眠状态的分泌因子（secreted factor）似乎是器官特异性的。此外，脱落肿瘤细胞在远隔部位遭遇的细胞外

基质成分，也是诱导细胞进入冬眠状态的因素之一，这些细胞外基质通常被称作“冬眠微环境（sleepy niche）”。越来越多的证据表明，生理性外泌体参与了转移肿瘤细胞冬眠的过程。比如，骨髓间质干细胞释放的外泌体就能通过转移miR-23b分子的方法，促使转移到骨髓处的乳腺癌细胞进入冬眠状态。这些miR-23b分子能抑制与细胞分裂及活动能力有关的富含丙氨酸的豆蔻酰化蛋白激酶C的作用底物（myristoylated alanine- rich C- kinase substrate, MARCKS）蛋白的表达。



资讯 · 频道

www.LifeOmics.com

6. 外泌体的临床应用

发现可靠的、可用于肿瘤早期诊断的生物标志物，是从事肿瘤诊断研究人员的终极目标。这些生物标志物应该能够明确肿瘤类别、可被早期发现，而且可使用非侵入式检查。尽管不断有报道称发现了新型生物标志物，但是迄今为止，获得FDA批准可用于临床检测工作的生物标志物并不多。为了帮助我们发现更好的生物标志物，学界制订了严格的科研操作指南，对样品数量、靶点特异性和敏感性等指标都做出了明确的规定。

与传统的实体瘤活检（一种诊断及判断预后的手段，需依赖经验作出判断）相比，液态活检更注重检测循环肿瘤细胞、肿瘤DNA分子和RNA分子。最近，凭借液态活检简单、非侵入式的取样优势，外泌体研究迅速登上舞台，并在精准医学和个体化医疗领域获得了人们的极大关注。液体活检的最大优势是能够在整个诊治的过程中，不断为临床医生提供信息。近十年来，循环外泌体已经成为了我们寻找肿瘤相关生物标志物（例如miRNA）的重要来源，涉及肝癌、肺癌、胃癌、结肠癌、胰腺癌、黑色素瘤、乳腺癌、卵巢癌和前列腺癌等各种临床常见肿瘤。除了miRNA之外，其它外泌体分子，例如癌基因mRNA（包括融合基因和剪接突变体）、DNA、脂质和长链非编码RNA等等分子也都获得了大量的关注（表2，背景知识2）。近20年来，学界开展了大量利用外泌体

开发疫苗的研究，人们希望将这些外泌体与树突状细胞免疫疗法结合起来，抑制肿瘤的生长（背景知识3）。

最近，有两项利用外泌体生物标志物早期发现胰腺癌的研究引起了广泛的关注和讨论。目前胰腺癌已经成为了美国第三大致死性肿瘤，而胰腺癌的早期诊断一直是个难题，缺少高特异性的、敏感分子标志物，鉴于此，这些研究潜力巨大。这两项研究都检测了外泌体里磷脂酰肌醇蛋白聚糖1（glypican 1, GPC1）的水平。GPC1分子是一种锚定在膜上的硫酸类肝素多糖蛋白（heparan sulfate proteoglycan），多种肿瘤，包括神经胶质瘤、乳腺癌、结直肠癌和胰腺癌等都会过表达这种分子。实际上，早就有报道称，外泌体GPC1分子及其调控的miRNA（miR-96-5p、miR-149）既可作为诊断结直肠癌的特异性生物标志物，也可作为治疗结直肠癌的靶标分子。

第一项研究将251名肿瘤患者的血样分成了检测组和验证组。根据GPC1的水平，研究人员可以明确区分晚期胰腺癌和良性胰腺疾病患者，准确率高达100%。另外一项研究虽然没有借助GPC1对12份样品进行胰腺癌的诊断，但是这些样品外泌体里含有的miRNA信号（高水平的miR-10b、miR-21、miR-30c和miR-181a，以及低水平的let-7a），也明确地

区分出了胰腺癌样品与非肿瘤样品。但是，这些miRNA信号与GPC1信号不同，在把胰腺癌样品从体内切除24小时之后，这些miRNA信号就变得与正常组织一样了。有趣的是，虽然这两项研究都利用蛋白质组学技术对GPC1分子进行了检测，但是第一项研究里使用的是抗体技术，而第二项研究里使用的却是液相色谱-串联质谱法（liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS），并结合了多重反应监测系统（multiple reaction monitoring, MRM）。因此，第二项研究能够对外泌体里的GPC1分子进行定量分析，主

要检测的是GPC1分子里含有的特异性肽段QIYGAK。显而易见，这两项研究的结果肯定会有差异，因为患者人群、样品数量和反应的特异性都不相同。不过，由于我们急需胰腺癌分子标志物，因此，在后续的研究工作中，还需要在方法学上进行统一。第二项研究发现了MRM的重要性，这种结合了液相色谱-串联质谱法的选择性反应检测系统，是一种新型的、快速的、敏感，且功能强大的技术，能够以很高的效率，对大量的临床样品进行高通量检测。

背景知识2. EV能为我们提供新型的、特异性的肿瘤分子标志物吗？

EV里含有一些核酸分子，例如癌基因、融合基因、抑癌基因等基因的mRNA转录产物，致癌基因的DNA片段，长链非编码RNA等，这些分子都有可能成为新型的、特异性的肿瘤分子标志物。

EV DNA片段

- 在多种不同的人类肿瘤细胞系细胞释放的外泌体里都发现了双链DNA核酸的片段。

- 肿瘤细胞释放的外泌体里的DNA数量比成纤维细胞释放的外泌体要多20倍。

- 在非小细胞肺癌细胞系细胞释放的外泌体里发现的DNA片段中，检出了EGFR突变。

- 在肿瘤细胞释放的外泌体所含有的DNA片段中，突变率比肿瘤细胞自身的DNA更高，这说明如果使用外泌体DNA做检测靶标，会更容易检出突变。

- 以荷瘤小鼠的血清DNA为模板，可以扩增出Myc癌基因。

- 在人胰腺癌患者的血清外泌体DNA中，可以检出KRAS突变基因及TP53突变基因。

EV mRNA片段

- 外泌体EGFR突变体III（EGFRvIII）mRNA分子转移到内皮细胞之后，能够促进肿瘤生长。

- 外泌体HRAS基因mRNA分子能够促使非恶变的内皮细胞和成纤维细胞发生恶性转化。

- 前列腺癌患者经轻度的前列腺按摩之后，在他们尿液里的外泌体中能发现前列腺癌mRNA分子标志物——前列腺癌抗原3（prostate cancer antigen 3, PCA3）非编码RNA及TMPRSS2-ERG mRNA。

- 在前列腺癌患者血液外泌体里，都能检出KRAS^{G12D}及KRAS^{G12V}这两种突变癌基因的mRNA。

- LIM1863人结肠癌细胞释放的脱落颗粒、含有糖蛋白A33的外泌体、含有上皮细胞黏附分子（epithelial cell adhesion molecule, EPCAM）的外泌体里含有的mRNA的水平都比正常组织细胞释放的外泌体更高。

- 同时检测外泌体RNA及血液DNA，能够提高非小细胞肺癌患者通过血液检测EGFR突变的灵敏度。

EV肿瘤新生抗原 (neoantigens)

● 对血清外泌体内核酸进行高分辨率的基因组及转录组测序，能够发现拷贝数变异 (copy number variation)、点突变 (point mutation)、插入突变 (insertion)、缺失突变 (deletion)、融合突变 (gene fusions) 和其它突变信号，这些都属于肿瘤新生抗原。

● LIM1863释放的EV里含有268种可变剪接突变体和33种融合基因，其中有很多在其它肿瘤里也发现过，比如，在原发性骨髓纤维瘤 (primary myelofibrosis) 中发现了SH3D19-LRBA分子，在原发性尿道透明细胞腺癌 (primary urethral clear-cell adenocarcinoma) 中发现了RIPK2-OSGIN2分子，在膀胱癌中发现了GOLT1A-KISS1分子。

EV长链非编码RNA的诊断潜力

● 外泌体长链非编码RNA在血清里能够稳定存在，也曾经有研究人员研究过外泌体里的细胞骨架调控RNA (cytoskeletal regulator RNA, CYTOR) 作为消化道肿瘤分子标志物的可能性。

● 宫颈癌患者与HPV病毒阳性或阴性的非宫颈癌志愿者相比，包括HOX反义转录RNA (HOX transcript antisense RNA, HOTAIR)、转移相关肺腺癌转录体1 (metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1, MALAT1) 和母系表达3 (maternally expressed 3, MEG3) 在内的外泌体长链非编码RNA的含量是不一样的。

● LIM1863结肠癌细胞释放的外泌体里含有大量的长链非编码RNA、核仁小RNA宿主基因5 (small nucleolar RNA host gene 5, SNHG5)、ZNFX1反义RNA (ZNFX1 antisense RNA 1, ZFAS1)、印记母系表达转录子H19 (imprinted maternally expressed transcript H19) 和小整合膜蛋白37 (small integral membrane protein 37, SMIM37) 等，这些分子的表达都有上调。

● KRTAP5-4和MAGEA3这两种mRNA以及乳腺癌抗雌激素药物耐药基因 (breast cancer anti-oestrogen resistance 4, BCAR4) 长链非编码RNA这三种分子组合起来，有望成为诊治结肠癌分子标志物。

表2 外泌体内容物作为肿瘤标志物的临床前研究

| 外泌体内容物 | 肿瘤 | 患者人群 | 外泌体来源 (分离方法) | 检测方法 | 研究结果 |
|---|------|--------------------|-----------------|-------|--|
| <i>DNA</i> | | | | | |
| KRAS ^{G12V} 、 KRAS ^{G12D} 、 KRAS ^{G12R} 、 KRAS ^{G12C} 、 KRAS ^{G12S} 、 KRAS ^{G12A} 、 KRAS ^{G13D} DNA | PDAC | 39名PDAC患者及82名健康对照者 | 血浆 (超速离心) | ddPCR | 使用外泌体里的突变KRAS DNA预测PDAC的效果，要比使用游离突变KRAS DNA更好。 |

| | | | | | |
|--|-------|---|---------------------------------|---|---|
| KRAS^{G12D}、 TP53^{R273H} DNA | 胰腺癌 | 48名PDAC患者、7名胰腺导管内乳头状黏液性肿瘤患者、9名慢性胰腺炎患者、12名其它胰腺疾病患者和114名健康对照者 | 血清（超速离心） | ddPCR | 使用循环外泌体DNA，分别在39.6%和4.2%的PDAC患者中发现了 KRAS^{G12D} 和 TP53^{R273H} DNA。只在2.6%的健康对照者中检出了突变 KRAS ，而 TP53^{R273H} 在健康对照者中的检出率为0。 |
| 活化的EGFR突变体及 EGFR^{T790M} DNA | NSCLC | 56名参与了TIGER-X研究的患者，50名血清中 EGFR^{T790M} ctDNA水平低的患者，21名M0或M1a期的胸内疾病患者 | 血浆 (<i>ExoLution Plus</i>) | EXO100新一代外泌体RNA、DNA测序技术，BEAMing ctDNA检测技术 | 与单独的ctDNA分析相比，ctDNA结合外泌体RNA-DNA分析，能够提高活化的 EGFR 突变体及 EGFR^{T790M} DNA检测的敏感性。 |
| RNA | | | | | |
| AR-V7 mRNA | CRPC | 26名接受阿比特龙（Abiraterone）治疗的CRPC患者，10名接受恩杂鲁胺（enzalutamide）治疗的CRPC患者 | 血浆 (<i>exoRNeasy kit</i>) | ddPCR | AR-V7 mRNA能够预测前列腺癌患者是否会对激素疗法产生抵抗，外泌体里含有AR-V7 mRNA的患者的总体存活时间只有3个月，而外泌体里不含有AR-V7 mRNA的患者的总体存活时间长达20个月。 |
| 多种RNA | 前列腺癌 | 148名高分级前列腺癌患者与371名低分级前列腺癌患者 | 尿液 (EXOPRO尿液浓缩试剂盒) | RT-PCR | 与PSA水平、年龄、种族和家族史等临床常规评估指标相比，如果在此基础上再加上尿液外泌体基因表达谱这一指标，就能更好地区分前列腺癌患者的分级程度。这两种方法的AUC分别为0.63和0.73。 |
| 新生物抗原转录体、融合基因 | 胰胆管癌 | 3名胰胆管癌患者 | 血浆及胸腔积液（超速离心） | 新一代测序技术 | 对各种肿瘤相关核酸分子标志物进行检测，包括基因拷贝数变异、点突变、插入图表、缺失突变、基因融合突变及其它突变信号。 |
| CRNDE-h（一种长链非编码RNA） | CRC | 80名结肠镜检查结果正常的志愿者、80名增生性息肉患者、80名肠易激综合症患者、80名腺癌患者和148名CRC患者 | 血清 (<i>ExoQuick</i>) | RT-PCR | CRNDE-h能很好地区分CRC患者和其它健康及良性疾病患者，敏感性为70.3%、特异性为94.4%、AUC为0.89，明显优于癌胚抗原（carcinoembryonic antigen, CEA）。 |
| 多种miRNA | 肺癌 | 50名肺腺癌患者、30名肺肉芽肿患者和25名健康吸烟者 | 血浆 (<i>ExoQuick</i>) | RT-PCR | 多种miRNA分子能够明显区分肺腺癌患者和肺肉芽肿患者，AUC为0.76，敏感性为96%，特异性为60%。 |

| 蛋白质 | | | | | |
|--|------|--|----------|--------------|--|
| GPC1 | PDAC | 190名PDAC患者，100名健康志愿者 | 血清（超速离心） | 荧光活化细胞分选技术 | 含有GPC1分子的外泌体能够区分良性胰腺疾病和健康人群，以及早期和晚期PDAC患者，特异性和敏感性均为100%。 |
| MIF | PDAC | 12名肝转移的PDAC患者、10名未进展的PDAC患者、15名健康对照者、18名诊断时即已发生肝脏转移的PDAC患者 | 血浆（超速离心） | ELISA | 血液外泌体中MIF水平升高能够预测1期PDAC患者是否会发生肝脏转移， $p < 0.01$ 。 |
| 脂质 | | | | | |
| 磷脂酰丝氨酸18:1/18:1、乳糖基酰基鞘氨醇d18:1/16:0、磷脂酰丝氨酸18:0-18:2 | 前列腺癌 | 15名前列腺癌患者及13名健康对照者 | 尿液（超速离心） | 质谱定量脂质组学分析技术 | 将多种脂质指标结合起来，能够鉴别前列腺癌患者与健康者，AUC为0.989，敏感性为93%、特异性为100%。 |

AR-V7 (androgen receptor splice variant 7) : 雄激素受体剪接突变体7; AUC (area under the curve) : 曲线下面积; CRC (colorectal cancer) : 结直肠癌; CRNDE-h (colorectal neoplasia differentially expressed variant h) : 结直肠癌差异表达变异体h; CRPC (castration-resistant prostate cancer) : 去势治疗无效的前列腺癌; ctDNA (circulating tumour DNA) : 循环肿瘤DNA; ddPCR (digital droplet PCR) : 微滴式数字PCR; ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) : 酶联免疫吸附实验; GPC1 (glypican 1) : 磷脂酰肌醇蛋白聚糖1; MIF (macrophage migration inhibitory factor) : 巨噬细胞迁移抑制因子; NSCLC(non-small-cell lung cancer): 非小细胞肺癌; PDAC (pancreatic ductal adenocarcinoma) : 胰腺胆管腺癌; PSA (prostate-specific antigen) : 前列腺特异性抗原; RT-PCR (reverse transcription PCR) : 逆转录PCR。

背景知识3. EV疫苗

a. 以树突状细胞释放的外泌体为疫苗

临床前研究：树突状细胞（Dendritic cells, DC）释放的外泌体名为Dex，它携带结合了抗原肽段及CD86等共刺激分子的主要组织相容性复合体分子。因此，在小鼠肿瘤动物模型研究中发现，Dex能够更好地刺激抗肿瘤免疫反应。用结合有肿瘤肽段的树突状细胞刺激小鼠之后，在治疗60天时，仅有20%的小鼠为无瘤状态，而用Dex治疗的小鼠，在治疗60天时，有60%的小鼠为肿瘤完全消退状态（complete tumour regression）。

1期临床试验：评价治疗安全性和可行性。针对黑色素瘤转移患者，或晚期非小细胞肺癌患者，使用结合了肿瘤抗原的自体Dex（即第一代Dex）开展的1期临床试验，证实了该药物的安全性。尽管这种Dex不能刺激CD8⁺ T细胞反应，但是它们携带了天然杀伤细胞受体D分子（NKG2D又名KLRK1）的配体，可以激活NKG2D依赖性的天然杀伤细胞（NKG2D-dependent NK cell）。

2期临床试验：第二代自体Dex的免疫刺激能力更强，能够激活CD8⁺ T细胞。有一项2期临床试验，招募了22名无法手术的非小细胞肺癌患者，使用第二代自体Dex进行治疗，并评价其疗效。实验结果显示，平均进展期为2.2个月，平均总体生存时间为15个月。7名患者（32%）的稳定期超过了4个月。试验的主要终点（无进展存活时间）未能达成。

b. 以肿瘤细胞释放的外泌体为疫苗

临床前体外实验发现，人黑色素瘤细胞释放的外泌体富集了HSPA1A蛋白及全长的肿瘤抗原之

后，能以依赖树突状细胞的方式，激活肿瘤特异性的CD8⁺ T细胞。该临床前研究还显示，小鼠肿瘤细胞释放的外泌体能促使CD8⁺ T细胞交叉致敏（cross-priming），并排斥肿瘤细胞。

c. 以腹水中分离的外泌体为疫苗

临床前研究：体外实验发现，从黑色素瘤患者腹水（ascites）中收集的外泌体（称为Aex）里含有能够被T细胞识别的黑色素瘤相关抗原（melanoma-associated antigen recognized by T cells, MART-1），该肿瘤抗原能致敏单核细胞来源的树突状细胞，诱导MART-1特异性的、HLA-A2限制性的CD8⁺ T细胞反应。在9名黑色素瘤患者中，有7名患者体内的淋巴细胞在体外反应中与这些结合了Aex的树突状细胞共培养之后，增殖出了肿瘤特异性的细胞毒性T淋巴细胞。

1期临床试验：评价治疗的安全性和可行性。结直肠癌患者接受了为期4周的1期临床试验，给予皮下注射Aex，或皮下注射Aex联合粒-巨噬细胞集落刺激因子（granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF）治疗。结果发现，这两种治疗方案都是安全的，患者耐受性也很好。不过，只有接受了Aex联合粒-巨噬细胞集落刺激因子治疗的患者体内出现了肿瘤特异性的细胞毒性T淋巴细胞反应。

d. 外泌体的给药途径

以树突状细胞释放的外泌体为疫苗，通常的给药方式是每周皮下注射一次。用生物膜包被的自体肿瘤细胞植入患者的腹腔之后，会缓慢释放外泌体，激活抗肿瘤免疫反应。

7. 以EV作为治疗靶点

由于EV里含有大量有功能的分子，比如RNA和蛋白质等，因此它们吸引了大量的关注，我们希望能够利用这些EV运送治疗药物，比如miRNA、mRNA、蛋白质、多肽及其它药物。我们可以使用主动或被动的方法，将这些药物装入EV里。最常用的被动装载方式就是将药物（例如curcumin、acridine orange、doxorubicin和paclitaxel）与EV混合在一起，而主动方法就是利用电穿孔（electroporation）等方式，将药物（例如针对KRAS^{G12D}基因的小干扰RNA）“塞入”EV里。当然，也可以用最直接的方法，即直接用药物处理细胞，使细胞释放的EV里含有药物。另外，还可以利用基因工程的方法，让细胞大量表达药物（蛋白或RNA等），从而获得含有药物的EV。

我们还可以对细胞进行改造，使其释放的EV上含有特定的受体细胞表面识别分子，打造出特异性的靶向EV。有一项离体试验发现，使用结合了转铁蛋白（transferrin）的多重超顺磁性nm粒子（multiple superparamagnetic nanoparticle），通过

磁性分离方法（magnetic separation），成功地从小鼠血液里分离出了能表达转铁蛋白受体的外泌体，然后用被动方式，将阿霉素（doxorubicin）装入这些外泌体里，接着在磁场作用下，将这些装载了抗癌药的外泌体，定向输送到肝癌小鼠的肿瘤组织处，获得了很好的抑癌效果。现在也有人在研究使用其他非人体来源的EV，比如牛奶、植物来源的EV。有一项1期临床研究使用的就是植物来源的EV，以评估口服这种装载了姜黄素（curcumin）的EV能否治疗结肠癌。

EV之所以在药物运输方面具有优势，主要还是因为生物相容性高、免疫原性低，并具备靶向特点等特性。不过也存在一些困难和限制，需要进一步解决。比如，哪些细胞是生产EV的最佳“工厂”；在装载药物的过程中，如何确保EV的稳定；如何调配、大规模生产、储存这些EV药物等。也有一些关于EV药物的综述，读者如有兴趣，可以参阅。想获得更多、更详细的EV药物介绍，及相关的临床试验，可查看表3。

表3. EV在肿瘤治疗中的应用

| 治疗药物 | 肿瘤 | EV来源 | 受体细胞 | 药物装载技术 | 重要发现 |
|-------|------|--|--|---|--|
| 小分子药物 | | | | | |
| 紫杉醇 | 前列腺癌 | LNCaP及PC3前列腺癌细胞 | LNCaP及PC3前列腺癌细胞 | 共孵育 | 体外实验发现, 装载了紫杉醇的EV能够增强药物对同种前列腺癌细胞的细胞毒性作用。 |
| | 肺癌 | 小鼠RAW 264.7巨噬细胞 | 小鼠Lewis 3LL-M27肺鳞癌细胞、野生型细胞或耐药MDCK细胞、C57Bl/6肺转移小鼠(静脉注射) | 共孵育、电穿孔、超声波 | 体外实验发现, 装载了紫杉醇的EV能够增强药物对小鼠3LL-M27肺鳞癌细胞、野生型细胞和耐药MDCK细胞的细胞毒性作用; 活体实验发现, 装载了紫杉醇的EV能够缩小肿瘤体积。 |
| | 肺癌 | 小鼠RAW 264.7巨噬细胞、C57Bl/6小鼠分离得到的原代骨髓来源巨噬细胞 | 小鼠3LL-M27肺癌细胞(体外实验用)、荷肿瘤细胞小鼠(静脉注射) | 人工改造的杂交外泌体, 含有融合了PEG的表面AA分子(AA-PEG), 通过超声波处理, 给这些外泌体里装入紫杉醇。 | 体外实验发现, 含有紫杉醇和AA的外泌体以极高的效率被肺癌细胞摄取; 体内实验发现, 这些外泌体对转移瘤的生长具有极强的抑制作用。 |
| | 胰腺癌 | 鼠SR4987 MSC细胞 | 人CFPAC-1胰腺癌细胞 | 共孵育 | 体外实验发现, 含有紫杉醇的外泌体能够抑制肿瘤细胞的生长 |
| 阿霉素 | 肺癌 | 人H1299及YRC9肺癌细胞 | 人H1299及A549肺癌细胞、MRC9原代肺成纤维细胞、HCASM平滑肌细胞 | 结合了pH连接子阿霉素的纳米金颗粒与肺癌细胞来源的外泌体(nanodox)共孵育, 使阿霉素进入外泌体, 形成纳米微脂囊(nanosome)。 | 体外实验发现, 这些nanosome的细胞毒性作用要强于nanodox; Nanosome能够选择性抑制肿瘤细胞的生长, 对非肿瘤细胞则没有这么强的抑制作用。 |
| | 肝癌 | 小鼠血清中被SMNC标记的外泌体 | 小鼠H22肝癌细胞(体外实验)和体内有H22肝癌细胞的小鼠(静脉注射) | 共孵育 | 体外实验发现, 装载了阿霉素的SMNC对小鼠H22肝癌细胞具有细胞毒性作用, 并能在磁场引导下, 特异性进入肿瘤部位, 抑制小鼠体内的肿瘤生长。 |

| | | | | | |
|--------------|---------|------------------------------------|--|----------------------|---|
| 阿霉素 | 乳腺癌、卵巢癌 | 人MDA-MB-231乳腺癌细胞、小鼠STOSE卵巢癌细胞 | MDA-MB-231乳腺癌细胞（体外实验）和小鼠STOSE卵巢癌细胞注射小鼠（静脉注射） | 电穿孔 | 体外实验发现，装载了阿霉素的外泌体对肿瘤细胞具有细胞毒性作用；体内实验发现，与单纯使用阿霉素相比，使用这些装载了阿霉素的外泌体，能够明显缩小肿瘤体积，并减少心脏毒性。 |
| 阿霉素 | 结肠癌 | 人U937淋巴瘤细胞、小鼠RAW 264.7巨噬细胞来源的外泌体 | HUVEC细胞（体外实验）及静脉注射了CT26细胞的小鼠 | 共孵育 | 体外实验中，内皮细胞表面的黏附分子对于这些装载了阿霉素颗粒的定向输送至关重要；体内实验发现，这些颗粒能诱导内皮细胞死亡，抑制肿瘤生长。 |
| | 乳腺癌 | 表达有CRGDKGPDC特异性肽段和LAMP2融合蛋白的imDC细胞 | α v整合素阳性的人MDA-MB-231细胞及MCF-7乳腺癌细胞、B16F10、HepG2肿瘤细胞、静脉注射了MDA-MB-231细胞的BALB/c裸鼠 | 电穿孔 | 体外实验发现，表面表达有LAMP2的、装载了阿霉素的外泌体能够抑制肿瘤细胞的生长；与单独使用阿霉素，以及使用不表达LAMP2但装载有阿霉素的外泌体相比，抑制肿瘤细胞生长的作用也更强，因其能特异性识别 α v整合素阳性的人乳腺癌细胞。 |
| 紫杉醇与阿霉素 | 脑癌 | bEND.3脑内皮细胞 | 人脑神经胶质瘤——星状细胞瘤U-87MG细胞斑马鱼异种移植模型。 | 共孵育 | 与单纯使用紫杉醇与阿霉素相比，外泌体能够跨过血脑屏障，将药物输送到脑癌细胞处，明显抑制VEGF的表达 |
| 阿霉素与姜黄素等抗炎药物 | 乳腺癌与结肠癌 | 柚子与小鼠EL4T淋巴瘤细胞、小鼠及人外周血粒细胞 | 小鼠4T1及4TO7乳腺癌细胞、小鼠NMuMG乳腺上皮细胞、CT26细胞、HUVEC细胞、小鼠静脉注射CT26及4T1细胞。 | 超声波与包被了炎症相关受体的IGNV融合 | 体内实验发现，这些IGNV能有效到达炎症部位，抑制乳腺癌及结肠癌细胞的生长。 |
| 醉茄素A与紫杉醇 | 肺癌、乳腺癌 | 牛乳 | 非恶性的Beas-2B支气管上皮细胞、MDA-MB-231及T47D乳腺癌细胞、A549及H1299肺癌细胞、A549细胞小鼠注射或口服动物模型。 | 共孵育 | 体内及体外实验发现，与单纯用药物治疗相比，含有醉茄素A与紫杉醇的外泌体对肿瘤细胞具有更大的细胞毒性作用，能够更好地抑制体内肿瘤的生长。 |

| | | | | | |
|---|--------------|---------------------------------|--|--------------------|--|
| 姜黄素 | 结肠癌 | 装载有姜黄素的植物外泌体样纳米颗粒 | NA | NA | 1期临床试验主要观察了使用植物外泌体补充姜黄素,作为一种膳食补充方法的可行性。 |
| 氨甲蝶呤 | 肺癌 | MTX-ATMP | NA | NA | 2期临床试验检测了使用MTX-ATMP治疗恶性胸腔积液的疗效。 |
| | 胃癌、结肠直肠癌、卵巢癌 | 含有氨甲蝶呤的同种红细胞来源的微粒 | NA | NA | 该临床研究观察了往腹腔灌注含有氨甲蝶呤的同种红细胞来源的微粒,同时联合系统疗法,治疗恶性腹水。 |
| 顺铂 | 肺癌 | 装载了化疗药物的肿瘤细胞 | 耐药的鼠H22肝癌细胞、人MCF-7乳腺癌细胞、人A549肺癌细胞、肺癌患者 | 共孵育 | 含有顺铂药物的肿瘤细胞来源的微粒能逆转肿瘤的耐药情况,促使肿瘤细胞死亡。 |
| 吡啶橙 | 黑色素瘤 | 人血巨噬细胞 | Me30966黑色素瘤细胞) | 共孵育 | 与单纯使用吡啶橙相比,使用含有吡啶橙的巨噬细胞来源的外泌体,能够更好地杀死黑色素瘤细胞。 |
| <i>siRNA</i> | | | | | |
| <i>KRAS</i> ^{G12D} siRNA或shRNA编码质粒 | 胰腺癌 | 人BJ成纤维细胞、CD47敲除小鼠耳成纤维细胞、小鼠间充质细胞 | MIA PaCa-2、PANC-1、BxPC-3、T3M4胰腺癌细胞、PANC-1或KPC689细胞小鼠注射模型、KPC(<i>Pdx1</i> ^{Cre/+} ; <i>LSL-Kras</i> ^{G12D/+} ; <i>LSLTrp53</i> ^{R172H/+})小鼠、KTC (<i>Ptfla</i> ^{cre/+} ; <i>LSLKras</i> ^{G12D/+} ; <i>Tgfb2</i> ^{lox/lox})小鼠 | siRNA或shRNA编码质粒电穿孔 | 表达CD47分子的外泌体在体内能躲避巨噬细胞的清除,与不含CD47分子或不含突变 <i>KRAS</i> siRNA或shRNA的外泌体相比,含有CD47和突变 <i>KRAS</i> siRNA的外泌体能缩小胰腺癌小鼠体内肿瘤的体积。 |
| VEGF siRNA | 脑癌 | bEND.3脑内皮细胞 | 人脑神经胶质瘤星状细胞瘤U-87MG细胞斑马鱼异种移植模型 | 脂质体转染 | 外泌体能够跨过血脑屏障,将VEGF siRNA运送到脑癌细胞处,抑制肿瘤细胞的生长。 |

| miRNA | | | | | |
|-----------------------------------|-------|--|--|---|---|
| miR-122 | 肝癌 | 人AMSC细胞 | 人HepG2肝癌细胞及人HepG2肝癌细胞小鼠注入模型 | 供体细胞转染 | 与不含miR-122的外泌体相比, 含有miR-122的外泌体能诱导肝癌细胞死亡, 抑制小鼠体内的肿瘤生长。 |
| let-7 | 乳腺癌 | 表达GE11肽段(能够靶向EGFR)的人HCC70、HCC1954和MCF-7乳腺癌细胞 | HCC70细胞, 表达EGFR的乳腺癌细胞 Rag2 ^{-/-} 小鼠移植模型 | 供体细胞转染 | 体内试验发现, 与不含let-7和GE11的外泌体相比, 含有GE11的外泌体特异性的靶向能表达EGFR的肿瘤组织, 抑制肿瘤的生长。 |
| Anti-miRNA | | | | | |
| anti-miR-9 | 恶性胶质瘤 | 人MSC细胞 | 人U87、T98G恶性胶质瘤细胞、BT145、BT164神经胶质瘤细胞 | 供体细胞转染 | 与不含anti-miR-9的外泌体相比, 含有anti-miR-9的外泌体能逆转恶性胶质瘤细胞对替莫唑胺的耐药性。 |
| mRNA | | | | | |
| 胞嘧啶脱氨酶-尿嘧啶磷酸核糖基转移酶融合(CD-UPRT)mRNA | 神经鞘瘤 | HEK293T细胞 | HEI-193细胞小鼠原位注射神经鞘瘤模型 | 供体细胞转染 | 含有CD-UPRT融合mRNA的外泌体能增加肿瘤细胞对5-氟胞嘧啶的敏感性, 诱导神经鞘瘤细胞死亡, 并抑制体内肿瘤的生长。 |
| 蛋白质 | | | | | |
| T34A突变生存蛋白(显性阴性突变) | 胰腺癌 | YUSAC-2黑色素瘤细胞 | MIA PaCa-2胰腺癌细胞 | 诱导黑色素瘤细胞表达T34A突变生存蛋白, 然后收集细胞释放的, 含有这些突变蛋白的外泌体 | 含有T34A突变生存蛋白的外泌体能增加肿瘤细胞对吉西他滨药物的敏感性, 诱导胰腺癌细胞死亡。 |
| hMUC1 | 结肠癌 | BALB/c小鼠来源的BMDC细胞, 表达MUC1的BALB/c小鼠细胞 | 供体细胞转染 | 胞嘧啶脱氨酶-尿嘧啶磷酸核糖基转移酶融合(CD-UPRT)mRNA | 含有hMUC1的外泌体能促进IFN γ 释放, 激活脾细胞, 同时抑制肿瘤细胞生长。 |

蛋白质

| | | | | | |
|-------|-----|----------------|---|--------|---------------------------------------|
| TRAIL | 骨髓瘤 | 人K562慢性髓性白血病细胞 | SUDHL、INT12、KMS11多发性骨髓瘤细胞，注射了SUDHL和INT12细胞的小鼠 | 供体细胞转染 | 含有TRAIL的外泌体促使骨髓瘤细胞凋亡的效力更强，能抑制体内肿瘤的生长。 |
|-------|-----|----------------|---|--------|---------------------------------------|

AA, aminoethyl anisamide: 氨基乙基茴香酰胺; AMSC, adipose mesenchymal stem cell: 脂肪间充质干细胞;

AO, acridine orange: 吖啶橙; BMDC, bone marrow-derived cell: 骨髓来源细胞; EV, extracellular vesicle: EV;

GNV, grapefruit derived nanovesicles: 柚子来源的纳米囊泡; hMUC1, human mucin 1: 人粘蛋白1; HUVEC, human umbilical vein endothelial cell: 人脐静脉内皮细胞; imDC, immature mouse dendritic cell: 不成熟的小鼠树突状细胞; LAMP2, lysosome-associated membrane glycoprotein: 溶酶体相关膜糖蛋白; miRNA, microRNA: 微小RNA; MSC, mesenchymal stem cell: 间充质干细胞; MTX-ATMP, methotrexate-loaded autologous tumour-derived microparticle: 装有甲氨蝶呤的同种肿瘤细胞释放的微粒; NA, not applicable: 不适用; PEG, polyethylene glycol: 聚乙二醇; RGD, Arg-Gly-Asp: 精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸; shRNA, short hairpin RNA: 短发夹RNA; siRNA, small interfering RNA: 小干扰RNA; SMNC, superparamagnetic nanoparticle: 超顺磁性nm粒子; TRAIL, TNF-related apoptosis-inducing ligand: TNF相关凋亡诱导配体。

8. 总结

随着对EV认识的不加深，我们发现很多生理过程中都有这些小东西的身影，因此，这个研究领域也变得越来越火热。各种重要的分子会借助这些结构在肿瘤细胞与微环境之间进行双向传递，这也是目前的一个研究热点，包括EV在转移前微环境建立过程中的作用等等。血液中的EV里含有不同的生物活性分子，它们都有潜力成为肿瘤分子标志物，可用于肿瘤的诊治和预后判断。不过机遇总是伴随着挑战，比如现在就缺乏EV的分离、定量和鉴定标准化流程。在EV定量的准确性方面，我们已经有了很大的提高，尽管这些结构在80°C或者冻融的时候，体积会有明显的缩小。不过我们还急需一套从血液中提取EV的标准化流程。这套流程对于不同实验室之间临床数据的交流至关重要，同时也有助于研究人员在临床试验时使用EV进行定量。还有一个尚未解决的问题就是，如何确定EV及其内容物，比如蛋白质的水平、EV的数量，以及两者之间的比值，或者使用单抗芯片得出的表面分子分析数据。因此，还需要进一步开展研究，了解肿瘤细胞释放的EV全貌，开发特异性针对这些EV表面分子，尤其是可用于肿瘤分期的表面分子的单抗。

如果要将EV应用于临床，还需要解决一个问题，即我们完全不知道在血液EV中，有

多少是来源于肿瘤细胞的，是1%、0.1%，还是0.01%。我们可以通过对肿瘤突变DNA、mRNA、RNA的种类、融合基因转录产物进行定量分析来了解这方面的信息，但是具体的可行性有多大，现在还不清楚。因此，以我们现有的技术手段，能否在任意一份血样中检测到肿瘤细胞释放的EV，还有待明确。我们对于不同EV的组成和功能上的差别，以及它们各自的半衰期，也都不清楚。只有先回答了这些问题，才知道需要富集多少EV，收集多少生物标志物，才可用于肿瘤的诊断。不过与蛋白质标志物不同，RNA标志物是可以扩增的，因此更有潜力成为肿瘤诊断标志物。在肿瘤细胞释放的EV中能够发现一些肿瘤细胞特有的RNA和DNA分子，这也是很好的分子标志物。由于存在被血小板释放的微粒结构（即血小板尘）“污染”的可能性，任何肿瘤EV分子标志物，或治疗靶点，在进行评估时，都需要设置一组血小板进行对照。

除了上述实际应用层面的考量之外，我们之前提到的，EV对于肿瘤微环境和转移前微环境的作用也将彻底改变整个肿瘤生物学，以及肿瘤治疗工作。未来的肿瘤治疗策略也许会是，在对已有的肿瘤细胞进行杀灭的同时，阻止肿瘤细胞释放EV，并被受体细胞摄取。

背景知识4. 可用于肿瘤诊断的血液中的EV

人体血液中的EV也可以用作诊断肿瘤的分子标志物。多项研究已经发现，肿瘤患者血液里的外泌体和未患该肿瘤的人血液里的外泌体截然不同。使用抗CD63抗体、抗窖蛋白1（caveolin 1）抗体的ELISA试验，或纳米颗粒跟踪分析方法（nanoparticle-tracking analysis）都可以发现这种区别。但是，也有研究称，血液中的EV不具备这种鉴别能力。之所以会出现这两种截然相反的观点，可能是因为在样品收集的方法上有所区别。而EV的数量与蛋白质浓度之间的比值是一个非常好的指标，能够解决不同实验室在收集EV时出现的倚倚问题。还有一个更关键的问题就是，人体血液中的

血小板产物对我们收集EV的影响问题。血小板释放的EV是人体血液EV的主要组成部分，而这些EV的水平会受到年龄、应激压力、感染和患病等多种因素的影响。这与收集EV的免疫方法也有关系。比如，血小板也表达CD63，如果使用抗CD63抗体，就会带来干扰。而且，血液中脂蛋白颗粒、蛋白复合体、其它相似大小的微粒结构的数量都远远超过了EV。因此，单单依靠血液中的外泌体数量这一个指标，是否就能清楚区分肿瘤和其它炎症疾病，是否能够明确肿瘤的类型，现在还不清楚。为了解决这些问题，有科研人员开始在EV中寻找特异性更高的分子标志物（背景知识2），而不再仅仅依赖血液中的外泌体水平这一指标。

名词解释：

腠窝淋巴结（Popliteal lymph node）：是位于膝关节后部的深部淋巴结组织，毗邻腠静脉和浅表静脉，通常体积较小，属于下肢淋巴系统。

Active metastatic niches：活性转移微环境，位于远隔器官的微环境，有利于肿瘤转移，但是其存在不受原发灶的影响。

沉睡微环境（Sleepy niches）：内部肿瘤细胞处于“冬眠”状态的一种特殊微环境，它能够延缓肿瘤的进展。

多重反应监测系统（multiple reaction monitoring, MRM）：是一种用于蛋白质组学研究的靶向质谱技术（targeted mass spectrometry），能够对特定的目标蛋白质进行精确的定量分析，也可以用于对特定的反应进行监测。

外泌体（exosome）：是一种非常重要的EV，直径约为30~150 nm，各种细胞内吞之后，与MVB融合，由细胞释放而产生。

脱落微泡（shed microvesicle, sMV）：是一种非常重要的EV，直径约为50~1300 nm，由细胞直接以出芽形式生成，又名“超微小泡和核外颗粒体”。

肿瘤微环境（Tumour microenvironment, TME）：围绕在肿瘤周围的微环境，主要包括非恶性变的淋巴细胞、髓细胞、成纤维细胞、血管周围细胞（pericyte）、内皮细胞、淋巴管和细胞外基质（又名间质）。这些细胞与肿瘤细胞之间的相互作用对于肿瘤的生长和转移具有至关

重要的作用。

转移前微环境 (Pre- metastatic niche)：由原发灶肿瘤细胞释放的多种因子，在远隔部位诱导形成的微环境，有利于转移瘤细胞的定居、生存和生长。

原文检索：

Xu, Rong , et al. "Extracellular vesicles in cancer — implications for future improvements in cancer care." *Nature Reviews Clinical Oncology* (2018).

Eason/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：

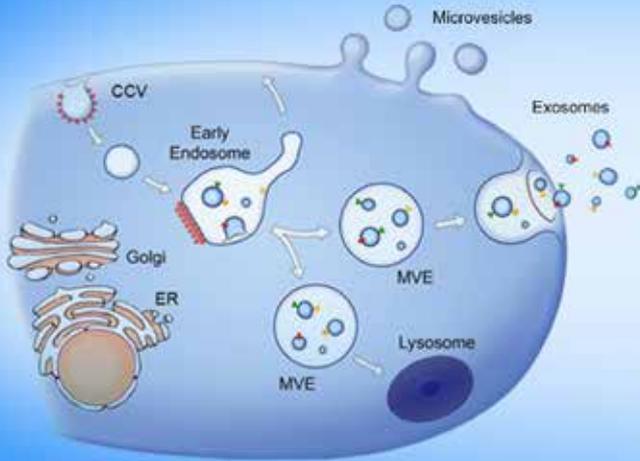
独立完成《生命奥秘》专题的策划：对基因组学、蛋白组学、生物信息学和细胞生物学等学科的发展以及生物医学领域相关技术（例如基因诊断技术、干细胞和克隆技术、生物芯片技术等）的应用进行翻译及深入评述。

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：

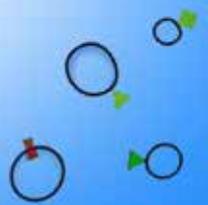
- 1.具备基因组学、蛋白组学、生物信息学、细胞生物学等生命科学学科背景；
- 2.具备良好的生命科学前沿触觉；
- 3.具备较高的外文文献翻译、编译水平；
- 4.具备较强的选题策划、资料搜集、组织能力，以及专业稿件撰写能力；
- 5.具有高级职称；或者拥有（正在攻读）该领域的最高学位。

有意者请将个人简历发送至 editor@lifeomics.com



外泌体 解决方案

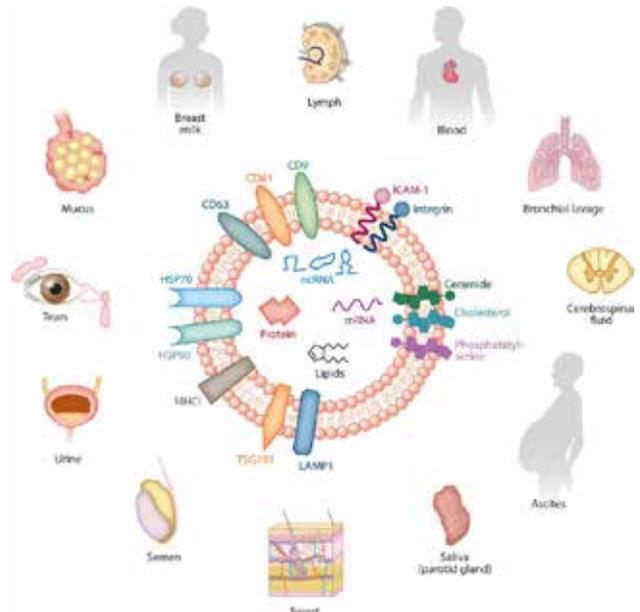
• 标题图片来源于DOI: 10.1083/jcb.201211138
活动时间: 2020年2月17日- 4月17日



■ 什么是外泌体 (Exosome)

外泌体 (Exosome) 是由细胞分泌而来的微小囊泡，直径约为 30-150 nm，天然存在于血液、尿液、唾液、母乳和细胞培养基等生物体液中，几乎所有类型的细胞都可以产生并释放外泌体。

GeneCopoeia可以提供外泌体相关标记慢病毒和 miRNA表达检测阵列，外泌体稳转细胞株构建服务。



• 来源: DOI:10.1146/annurev-physiol-021115-104929.

■ 外泌体相关标记慢病毒

GeneCopoeia提供携带不同标记的外泌体标志物CD9, CD63和CD81的预制慢病毒。可用于示踪外泌体的形成、分泌、靶向和运输机制。

另外, GeneCopoeia还提供可用于动物活体实验研究的外泌体预制慢病毒。

| 外泌体相关基因 | 启动子 | 标记 | 报告基因 | 筛选标记 | 描述 |
|---------|------|------|----------|-------------|--|
| CD9 | | N/A | N/A | | |
| CD63 | EF1a | Flag | tdTomato | Puromycin | >10 ⁸ TU/ml, 可直接用于转导实验, 100 μl (25 μl x 4管) |
| CD81 | CMV | Halo | mCherry | Blasticidin | |
| | | Avi | Gluc | | |

■ 外泌体相关miRNA表达检测阵列

GeneCopoeia通过对发表文献的全面检索，精心筛选miRNA与外泌体之间的密切关系，提供用于分析与外泌体相关的miRNA表达的miProfile™ exosome miRNA qPCR阵列。该阵列可用于特定类型的外泌体相关的miRNAs或整体外泌体相关的miRNAs的表达谱分析，包括来源于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。

产品优势

- ◆ **经文献筛选：**从大量外泌体相关研究的文献中筛选得到的与外泌体相关性较高的miRNAs
- ◆ **灵敏度高：**可检测低至20 pg的Total RNA（或者低至10 pg的small RNA）
- ◆ **特异性好：**能够区分单核苷酸错配的miRNAs。每套引物都经过了实验验证，以便进行特定的扩增
- ◆ **重复性高：**阵列间具有高重复性（R2>0.99）
- ◆ **已验证的miRNA引物：**每条miRNA特异验证引物均使用专利算法设计并经过实验验证

| 货号 | 产品名称 | 种属 | miRNAs个数 | 平板数 |
|-------|---|-------|----------|---------------------|
| QM044 | miProfile™ Human exosome miRNA qPCR array | Human | 706 | 8 x 96-well plates |
| QM045 | miProfile™ Human exosome miRNA qPCR array | Human | 658 | 2 x 384-well plates |
| QM046 | miProfile™ Human MSC exosome miRNA qPCR array | Human | 190 | 2 x 96-well plates |
| QM047 | miProfile™ Human blood exosome miRNA qPCR array | Human | 262 | 3 x 96-well plates |
| QM048 | miProfile™ Human urine exosome miRNA qPCR array | Human | 54 | 1 x 96-well plates |
| QM049 | miProfile™ Human milk exosome miRNA qPCR array | Human | 32 | 1 x 96-well plates |
| QM050 | miProfile™ Human Cancer exosome miRNA qPCR array | Human | 264 | 3 x 96-well plates |
| QM051 | miProfile™ Human lung cancer exosome miRNA qPCR array | Human | 48 | 1 x 96-well plates |
| QM052 | miProfile™ Human leukemia exosome miRNA qPCR array | Human | 40 | 1 x 96-well plates |
| QM053 | miProfile™ Human hepatocellular cancer exosome miRNA qPCR array | Human | 37 | 1 x 96-well plates |
| QM054 | miProfile™ Human colorectal cancer exosome miRNA qPCR array | Human | 51 | 1 x 96-well plates |
| QM055 | miProfile™ Human lymphoma exosome miRNA qPCR array | Human | 35 | 1 x 96-well plates |
| QM056 | miProfile™ Human squamous cell carcinoma exosome miRNA qPCR array | Human | 49 | 1 x 96-well plates |
| QM057 | miProfile™ Human ovarian cancer exosome miRNA qPCR array | Human | 30 | 1 x 96-well plates |
| QM058 | miProfile™ Human bladder cancer exosome miRNA qPCR array | Human | 27 | 1 x 96-well plates |
| QM059 | miProfile™ Human prostate cancer exosome miRNA qPCR array | Human | 34 | 1 x 96-well plates |
| QM060 | miProfile™ Human breast cancer exosome miRNA qPCR array | Human | 36 | 1 x 96-well plates |
| QM061 | miProfile™ Human renal cancer exosome miRNA qPCR array | Human | 22 | 1 x 96-well plates |
| QM062 | miProfile™ Human stomach cancer exosome miRNA qPCR array | Human | 32 | 1 x 96-well plates |
| QM063 | miProfile™ Human pancreatic cancer exosome miRNA qPCR array | Human | 29 | 1 x 96-well plates |

■ 相关文章

GeneCopoeia检索和产品涉及到的已发表文献见链接：

<http://www.igenebio.com/product/exosome-solutions/exosome-related-publications/>



扫一扫，关注官方微信

A group of people are performing a human pyramid against a cloudy sky. The pyramid consists of four people standing on the ground, two people standing on their shoulders, and one person standing on the shoulders of the two people in the middle. The people are wearing dark jackets and light-colored pants. The sky is filled with soft, white clouds, and a bright sun is visible in the upper left corner, creating a lens flare effect. The overall scene conveys a sense of teamwork and achievement.

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