

外泌体在肿瘤诊疗中的研究进展

郭 静,徐桂英,黄 昊,杨星九,高 蓐

(北京协和医学院比较医学中心,中国医学科学院北京协和医学院实验动物研究所,北京 100021)

【摘要】 外泌体是具有磷脂双分子膜结构的纳米级囊泡,直径在 30 ~ 100 nm,广泛分布于血清、唾液、尿液等体液中。外泌体中包含多种蛋白质、核苷酸、甚至病毒等遗传物质,广泛参与细胞间物质交换和信息传递。最近研究发现,肿瘤细胞分泌的外泌体中 mRNA 和 miRNA 等遗传物质直接来自母体肿瘤细胞,此外外泌体携带的遗传物质可以直接作用于受体细胞,因此外泌体可能成为肿瘤诊断和治疗的新靶点。本文对外泌体作为肿瘤诊断的标志物以及外泌体对肿瘤治疗的作用作一综述。

【关键词】 外泌体;肿瘤;miRNA;诊断;治疗

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017) 02-0086-07

doi: 10. 3969. j. issn. 1671 - 7856. 2017. 02. 016

Research progress of exosomes in tumor diagnosis and treatment

GUO Jing, XUE Gui-ying, HUANG Hao, YANG Xing-jiu, GAO Ran

(Comparative Medicine Center, Peking Union College (PUMC) & Institute of Medical Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS), Beijing 100021, China)

【Abstract】 Exosomes have a size of 30 - 100 nm and membrane-bound nanovesicles, which is widely present in nearly all human body fluids, such as serum, saliva and urine, etc. Exosomes contain multiple proteins, nucleotides, and even viruses, and play an important role in the substance exchange and information transmission between cells. Recently, research found that genetic materials secreted from exosomes such as mRNA and miRNA were directly derived from their parent tumor cells, and they can directly effect on the receptor cells. Therefore, exosomes may become a new target for diagnosis and treatment of cancer. In this review, we described exosomes as a marker in early diagnosis of cancer, and its applications in cancer therapy.

【Key words】 Exosome; Cancer; miRNA; Diagnosis; Treatment

大多数细胞(包括正常细胞和病变细胞)都会向胞外和体液中释放具有双分子膜结构的纳米级囊泡。这些胞外囊泡按尺寸大小可分为三大类:外泌体(20 ~ 100 nm),微囊泡(100 ~ 1000 nm),凋亡小体(1 ~ 5 μ m)。凋亡小体是细胞在凋亡或受机械压力时为了排来自凋亡细胞的有毒成分而形成的泡状小体^[1];微囊泡直接由细胞质膜向胞外发芽

而形成^[2];外泌体是 Trams 等在 1980 年最先发现的^[3],外泌体在尺寸、组成和功能等方面与微囊泡和凋亡小体差异很大,外泌体直径在 30 ~ 100 nm,外泌体中含有多种蛋白质,其中四跨膜蛋白是目前发现最大的蛋白家族,包括 CD9 和 CD63 等。外泌体不是直接来源于质膜的发芽或脱落^[4],而是多泡体(multivesicular body, MVB)在细胞内吞过程中与

【基金项目】 中央级公益性科研院所基本科研业务费。

【作者简介】 郭静(1987 -),男,博士研究生,主要研究方向:外泌体与肿瘤, E-mail: guojing5730375@163.com。

【通讯作者】 高蓐(1980 -),女,副研究员,研究方向:比较医学, E-mail: gaoran26@hotmail.com。

细胞膜融合最终外排形成的囊泡^[5]。外泌体广泛存在于体液中,如血清、唾液、乳汁^[6]、脑脊液^[7]、尿液^[8]、和精液^[9]等体液中。外泌体在肿瘤微环境中含量尤其丰富,与肿瘤的发生发展、免疫逃逸、微环境建立密切相关^[10]。大量研究表明,肿瘤细胞来源的外泌体可以应用于肿瘤早期检测和治疗。本文对肿瘤细胞来源的外泌体在肿瘤早期检测和外泌体在肿瘤治疗方面的作用进行概述。

1 外泌体的组成、分泌、分离及功能

1.1 外泌体的组成

外泌体包含多种蛋白质、DNA、mRNA、miRNA,长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA),甚至病毒和朊病毒等遗传物质。不同细胞来源的外泌体拥有相同的一组蛋白或蛋白家族,这些蛋白可以作为外泌体的标记物,包括膜相关蛋白,如四跨膜蛋白 CD9、CD63、CD81 和 CD82;细胞质蛋白,如 Hsp 70 和 Hsp 90;细胞分选所需的运输蛋白,如 Alix 和 TSG101;膜运输和融合蛋白,如 Rab 家族 GTP 酶和膜联蛋白;而大部分外泌体包含热休克蛋白和主要组织相容性复合物 (MHC) I 类分子^[4,11]。外泌体也包含各种特异性蛋白,取决于供体细胞和具体功能,如 B 淋巴细胞和树突状细胞分泌的外泌体包含 MHC-I 类和 MHC-II 类蛋白^[12]。一些肿瘤细胞分泌的外泌体携带细胞粘附分子、金属蛋白酶和组织特异性蛋白,与肿瘤的发生发展密切相关^[13]。此外,脂类分析显示外泌体中还含有胆固醇和其他脂类^[4,14]。

除蛋白质和脂质体外,外泌体还包含大量的核苷酸,如 mRNA、microRNA、lncRNA 和 DNA 等。这些核苷酸能够通过靶细胞膜的融合被受体细胞吸收,控制受体细胞的蛋白表达或激活信号通路^[15]。目前,外泌体中大概有 1639 种 mRNA 被发现,这个数量还在逐年上升。虽然细胞分泌的外泌体中含有大量的 RNA,但是每一个外泌体中 RNA 分子的种类是唯一的或不含有 RNA 分子^[16]。研究发现,鼠源外泌体中的 RNA 被运送到人源细胞后,新的鼠蛋白会在受体细胞中发现,说明外泌体可以诱导受体细胞的转录过程^[15]。

miRNA 作为外泌体中重要的内含物,是生理和病理过程中重要的调控者。研究发现,肿瘤患者血清来源的外泌体中一些 miRNA 的表达明显上调,表明这些 miRNA 可以作为肿瘤早期诊断的标

志物^[17]。

1.2 外泌体的分泌调节和提取

如今人们对外泌体的起源和分泌的分子机制知之甚少,但外泌体的分泌被多种信号分子精确控制^[18]。通常,外泌体的分泌受多种因素的影响,如:神经酰胺的合成、钙信号、p53 基因、酸中毒、高温和外界应力等^[19-22]。外泌体的分泌主要受保守的细胞质蛋白家族控制,如 Rab 家族 GTP 酶,尤其是 Rab27a 和 Rab27b^[23]。

超速离心能够得到较高纯度的外泌体是目前公认的提取外泌体的有效方法^[24],但是其过程复杂且耗时较长。外泌体试剂盒在许多试验中证明了它的高效性,其操作简单方便无需超速离心,通过加入几种试剂就能够得到外泌体沉淀^[25]。2009 年,Logozzi M 等人设计了一种内部具有三明治结构的酶联反应吸附试验,应用管家蛋白 (CD63 和 Rab5b) 的表达与肿瘤细胞关联作为标记物,成功捕获并量化了血浆来源的外泌体^[26]。同时,发现相比较健康对照组肿瘤患者血浆中外泌体含量更高^[27]。

1.3 外泌体的功能

一直以来,外泌体被看做是细胞内运送“垃圾”的载体,允许细胞排出废物,如对细胞分化不利的分子和对细胞有损伤的药物分子^[28],但研究发现外泌体是免疫表达重要的调控者和抗原递呈者^[29],之后外泌体的功能被广泛研究。虽然外泌体在生理和病理方面作用的具体细节仍在研究,但其主要功能是通过自身膜蛋白与靶细胞识别并融合,进而参与细胞间信息和物质的传递,可以调节受体细胞的转录及表型^[4,30]。外泌体是天然的细胞间 RNA 传输的信使, Cossetti C 等^[31]构建了一种人源黑色素瘤细胞移植瘤稳定表达 EGFR 编码质粒的小鼠模型,发现 EGFR 编码的 RNA 被外泌体运送到血液,最终到达小鼠的精子中,说明外泌体可以将遗传信息运送到受体细胞。

2 外泌体在肿瘤诊断中的应用

大量研究发现,肿瘤细胞来源的外泌体中含有大量特异性 miRNA,且生化性能稳定易于保存,可以作为肿瘤早期诊断的标志物^[32]。Madhavan 等^[33]对胰腺癌患者血清来源的外泌体研究表明,83% 患者的外泌体中 miR-1246、miR-4644、miR-3976 和 miR-4306 表达水平明显上调,然而健康对照组则较少表达。Ogata-Kawata 等^[34]研究发现,结直肠癌患

者血清来源的外泌体中 let-7a、miR-1229、miR-1246、miR-150、miR-21、miR-223 和 miR-23a 的表达水平明显高于健康对照组。I 期结肠癌患者,miR-23a 和 miR-1246 的表达具有较高的敏感度,分别达到 95% 和 90%,手术后它们的表达水平明显下调。

Melo 等^[35]发现肿瘤细胞来源的外泌体中磷脂酰肌醇聚糖-1 (glypican-1, GPC1) 属于细胞表面蛋白多糖在外泌体中含量丰富,在患者血清和患癌小鼠体内成功分离出含 GPC1 的外泌体与健康对照组相比其含量有明显差异,利用蛋白多糖含量的高低,在胰腺癌中还成功区分了早期和晚期肿瘤,此外含 GPC1 的外泌体还携带特殊的 KRAS 突变基因,可以预测预后和辅助化疗效果。Zhou 等^[36]同样发现使用表面处理后的金属纳米颗粒可以特异性的识别外泌体,前列腺癌细胞分泌的外泌体表面蛋白能够被这些特异性的纳米颗粒识别,如上皮细胞粘附分子 (Epithelial cell adhesion molecule, EpCAM),也可以成为新的肿瘤诊断标记物。

3 肿瘤细胞分泌的外泌体在肿瘤发展和治疗中的作用

3.1 促进肿瘤细胞发展,侵袭和转移

肿瘤转移是大部分肿瘤治疗失败的主要原因。肿瘤转移是一种过程,这个过程允许肿瘤细胞侵袭某些特定的正常人类器官,形成新的转移灶。肿瘤细胞来源的外泌体能够提供自分泌、旁分泌、内分泌和其它能够促进肿瘤生长的信号,促进肿瘤的侵袭和转移^[37]。

Hong BS 等^[38]发现结直肠癌细胞来源的外泌体富含与细胞周期相关的 mRNAs,能够促进内皮细胞增殖,促进肿瘤生长和转移。研究发现,肝癌细胞来源的外泌体通过调节 β 活化激酶-1 及其相关信号通路的表达可以促进肝癌细胞的生长^[39]。除肿瘤细胞外,其它细胞(巨噬细胞、人骨髓间充质干细胞、肥大细胞)分泌的外泌体通过调控相应的信号通路,同样可以促进肿瘤细胞增殖^[40]。

胃肠道间质肿瘤细胞分泌的外泌体通过侵袭细胞间质,可以促进肿瘤细胞的形成^[41]。对于外泌体功能的研究发现,处理后的埃博拉病毒分泌的外泌体,能够提高鼻咽癌细胞系的迁移和侵袭,可能与上皮到间质细胞的转化有关 (epithelial-mesenchymal transition, EMT)^[42]。研究表明^[43],肿瘤细胞能够共享一些恶性特征,例如,KRAS 表达特异的结直肠癌细胞分离的外泌体包含一些肿瘤促

进蛋白,包括 KRAS、EGFR、SRC 家族激酶和整合蛋白,可以转移到受体细胞增强侵袭性,进而使受体细胞表达各种类型的 KRAS 基因。

转移前肿瘤细胞会控制局部微环境,使其最有利于迁移和移植,其控制范围甚至会在远端病灶区^[44],这个过程需要肿瘤基质间复杂的相互作用,包括各种细胞间通信^[37]。外泌体在肿瘤转移中扮演重要的角色,它们会排出肿瘤抑制相关的 miRNA,如 miR23b,使受体区获得转移特性,促进肿瘤细胞远端转移^[34]。黑色素瘤细胞分泌的外泌体能够为肿瘤转移创造微环境,增强黑色素瘤细胞的迁移能力^[45],此外,肿瘤细胞来源的外泌体能够诱导宿主免疫应答及其表型的转化,在前哨淋巴结中建立一个利于肿瘤的环境^[46]。虽然这些现象在不同的肿瘤模型中已经被发现,但是具体的可能机制仍然需要继续探索。

3.2 促进肿瘤的血管新生

肿瘤血管新生主要受缺氧诱导因子家族的调节,肿瘤细胞中供给和消耗氧量的不平衡,使肿瘤细胞处于低氧环境,特别是肿瘤晚期患者^[47],在低氧环境下肿瘤细胞会表现出更强的生长能力,肿瘤细胞在低氧环境下能够分泌更多外泌体,调节肿瘤微环境促进肿瘤血管新生和转移^[48]。缺氧环境能够促进肿瘤细胞分泌外泌体,主要受低氧诱导因子的控制。当乳腺癌细胞在低氧(1% 氧含量)和严重缺氧(0.1% 氧含量)时,外泌体的获得量分别提高 $32.3 \pm 4.8\%$ 和 $90.9 \pm 7.1\%$ ^[49]。

外泌体促进肿瘤血管新生,缓解肿瘤细胞的缺氧状态,然而在缺氧条件下形成的新血管是混乱的无序的,研究发现,使肿瘤血管系统正常化可以改善化疗效果和肿瘤放射敏感度^[50]。因此,抑制外泌体的分泌或转移,可能会抑制或正常化肿瘤血管新生。在临床中,抑制血管新生可以通过调控一些靶向分子基因,如贝伐单抗 (Bevacizumab, Avastin)。对于结直肠癌患者和晚期非小细胞肺癌患者,通过使用贝伐单抗使得化疗效果能够更加持久^[51]。美国食品和药品监督管理局已经批准,在转移性结直肠癌和晚期非小细胞肺癌的治疗中可以使用贝伐单抗,并且建议和鼓励阻断肿瘤细胞来源的外泌体对血管新生的促进作用,从而改善肿瘤治疗效果。

3.3 肿瘤免疫调节

肿瘤发展和转移的过程中,大多数肿瘤细胞受到免疫系统排斥。抑制免疫反应或免疫逃逸对于

肿瘤发展至关重要,在这个过程中外泌体充当重要的角色。大多数肿瘤患者存在免疫抑制和免疫缺陷,最近免疫疗法在肿瘤治疗中越来越受到重视,如恶性黑色素瘤,肾癌,肝癌甚至是非小细胞肺癌^[52]。外泌体的另外一个应用是作为肿瘤疫苗的开发,肿瘤细胞来源的外泌体通常包含一些肿瘤抗原可以使抗原递呈细胞(antigen presenting cells, APC)激活,包括树突状细胞^[53]。Escudier 等^[54]在 15 例转移性黑色素瘤患者,采用自体树突状细胞来源的外泌体进行治疗,结果显示外泌体没有二级毒性和最大耐受剂量,表明了外泌体的安全性。研究发现树突状细胞来源的外泌体能够显著增加 NK 细胞的循环数量,且在一半患者体内上调类分子相关蛋白 NKG2D 的表达,进而增强 NK 细胞的抗肿瘤活性^[55]。

另外一个类似的临床研究,在非小细胞肺癌患者的治疗中,应用自体树突状细胞(dendritic cells, DC)来源的外泌体可以运载黑色素瘤抗原基因(melanoma antigen gene, MAGE),这项临床研究表明,外泌体制得的疫苗具有可行性和有效性^[56]。Dai 等^[57]发现,腹水来源的外泌体结合粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF)或单独使用外泌体治疗 40 位结直肠癌患者,结果发现两种治疗方法都是安全且可行的,因为外泌体结合 GM-CSF 能够诱导 T 淋巴细胞免疫反应。同时研究表明,肿瘤细胞来源的外泌体能够促进免疫抑制^[58]。如 OVA(ovalbumin)表达的黑色素瘤细胞,包含所有的 OVA 蛋白,能够抑制 OVA 特异性的免疫反应^[59]。

肿瘤细胞来源的外泌体可以抑制多种淋巴细胞的免疫反应,也能够通过下调 NKG2D 基因的表达引起免疫逃逸^[55,60]。Clayton 研究发现,NKG2D 的下调是由于外泌体递送转化生长因子(transforming growth factor B1, TGFβ1)到 CD8⁺ T 细胞或 NK 细胞的结果,各种肿瘤细胞来源的外泌体携带有 NKG2D 配体,这些外泌体能够控制 NKG2D 在 NK 细胞和 CD8⁺ T 细胞的表达,因此会引起免疫逃逸^[61]。虽然很多研究表明,肿瘤细胞分泌的外泌体抑制特定抗原和非特异性抗肿瘤反应,但其同样能够激活免疫系统^[4,62]。

3.4 肿瘤化疗的增敏作用

外泌体可以增强肿瘤耐药,通过改变肿瘤局部 pH 值或信号通路,可以影响外泌体的分泌,进而提

高化疗药物的效果。由于肿瘤细胞来源的外泌体容易靶向肿瘤细胞,可用外泌体投放化疗药物、活性小分子和基因治疗剂^[63]。研究发现,表面修饰后的外泌体可靶向肿瘤细胞,同时可以运送阿霉素等药物^[64]。应用外泌体投放 microRNA 可以增强肿瘤对化疗药物的敏感度,研究发现,miR-15、miR-16、miR-342 和 anti-miR-221/22 均可增强肿瘤细胞对于他莫昔芬的敏感度;其中过表达 miR-15 和 miR-16 可以恢复表达 Bcl-2 抗凋亡基因^[65]。过表达 miR-342 可以增加他莫昔芬诱导的凋亡^[66]。吉非替尼的在肿瘤治疗时的靶标是 PI3K 通路,microRNA 家族的 Let-7 可抑制这个信号通路,进而增强肿瘤细胞对吉非替尼的敏感度^[67]。Anti-miR-135 可以增强肺癌异种移植瘤细胞对紫杉醇的敏感度^[68]。miR-34 在肺癌、前列腺癌和胰腺癌等肿瘤中表达较低,可以使用 miR-34 替代疗法,起到对常规化疗药物的增敏作用^[69]。

3.5 肿瘤治疗中的应用

外泌体的主要功能就是递送各种生物分子,包括蛋白质、多肽配体、DNA 和 RNAs。当外泌体有计划或有选择性的包裹特殊生物活性分子时,可以用于投放抑癌分子或化疗药物。如人第 10 号染色体缺失的磷酸酶-张力蛋白同源的蛋白(phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten, PTEN,一种肿瘤抑制蛋白),被发现存在于鼠胚胎成纤维细胞和人胚胎肾脏细胞来源的外泌体中。PTEN 能够被受体细胞吞噬并抑制细胞增殖^[70]。在遗传工程中,外泌体可以运送自杀式 mRNA 或蛋白质,也可以运送前体药物在肿瘤组织中转化成 5-氟尿嘧啶(5-FU),能够诱导肿瘤细胞凋亡^[71]。还有学者发现,修饰后的外泌体能够有效的递送 let-7a miRNA 到乳腺癌细胞,使表皮生长因子表达^[72]。然而,所有的应用都仅处于实验阶段,外泌体在临床上的应用还需要进一步探索。

肿瘤细胞来源的外泌体含有肿瘤活化分子,这些分子可以引起宿主的免疫反应参与肿瘤治疗。因此,开发靶向性、功能性的外泌体对肿瘤治疗具有深远的意义。在 1989 年,Lentz MR 发现,使用血液提取法,降低血液中外泌体的含量,6/16 患者的肿瘤体积减少 50% 以上^[73]。Aethlon Medical 设计了一种血液过滤治疗方案,叫做自适应亲和平台技术系统(adaptive dialysis-like affinity platform technology, Aethlon ADAPT),这个系统能够捕获大

量的抗体和其他类似物质,如核酸适配体、蛋白配体和外泌体^[74]。除了血液净化,质子泵抑制剂(Proton pump inhibitors, PPIs)同样能够改善低 PH 值条件的肿瘤细胞,在活体内用 PPI 预处理能够减少肿瘤细胞来源的外泌体在血浆中的含量,因此 PPI 很有可能成为抑制肿瘤细胞分泌外泌体的有效方法^[75]。

4 问题与展望

一直以来,对外泌体的研究主要集中在肿瘤疫苗方面,但外泌体对肿瘤的具体作用及其调节机制尚不明确仍需深层次研究。大量研究表明,外泌体中 miRNA 在肿瘤的发生发展中具有极其重要的作用,其作为肿瘤早期诊断标志物已经得到广泛研究,但外泌体中 miRNA 表达谱尚不完善、对于特定肿瘤尚未找到特异性的单个或多个 miRNA,同时对于肿瘤细胞选择性包裹 miRNA 并释放外泌体以及受体细胞摄取的外泌体的作用机制目前缺乏有力的理论支撑。由于外泌体与受体细胞具有很好的特异性结合,使其成为理想的药物载体,蛋白质等大分子物质可以装载到外泌体内^[76]。研究人员已成功将转载药物的外泌体应用于临床治疗,然而外泌体如何影响肿瘤环境中远端细胞的增殖、生长知之甚少,需要不断探索。外泌体作为具有细胞间物质和信息传递功能的活性分子,学者们正在不断揭开其在肿瘤发生发展过程中的神秘面纱。

参考文献:

- [1] Wickman G, Julian L, Olson M. How apoptotic cells aid in the removal of their own cold dead bodies [J]. Cell Death Differ, 2012, 19(5): 735–742.
- [2] Heijnen HF, Schiel AE, Fijnheer R, *et al.* Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alphagranules [J]. Blood, 1999; 94 (11): 3791–3799.
- [3] Trams EG, Lauter CJ, Norman Salem J, *et al.* Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles [J]. Biochim Biophys Acta (BBA)-Biomembranes, 1981, 645(1): 63–70.
- [4] Thery C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses[J]. Nat Rev Immunol, 2009, 9 (8): 581–593.
- [5] Pan BT, Johnstone RM. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor [J]. Cell, 1983, 33(3): 967–978.
- [6] Lasser C, Alikhani VS, Ekstrom K, *et al.* Human saliva, plasma and breast milk exosomes contain RNA: uptake by macrophages [J]. J Transl Med, 2011, 9: 9.
- [7] Street JM, Barran PE, Mackay CL, *et al.* Identification and proteomic profiling of exosomes in human cerebrospinal fluid [J]. J Transl Med, 2012; 10: 5.
- [8] Pisitkun T, Shen RF and Knepper MA. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(36): 13368–13373.
- [9] Vojtech L, Woo S, Hughes S, *et al.* Exosomes in human semen carry a distinctive repertoire of small non-coding RNAs with potential regulatory functions [J]. Nucleic Acids Res, 2014; 42 (11): 7290–304.
- [10] Yu S, Cao H, Shen B, *et al.* Tumor-derived exosomes in cancer progression and treatment failure [J]. Oncotarget, 2015, 6 (35): 37151–37168.
- [11] Mathivanan S, Fahner CJ, Reid GE *et al.* ExoCarta 2012: database of exosomal proteins, RNA and lipids [J]. Nucleic Acids Res, 2012, 40(D1): D1241–D1244.
- [12] Denzer K, Kleijmeer MJ, Heijnen HF, *et al.* Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device [J]. J Cell Sci, 2000, 113 (19): 3365–3374.
- [13] Liang B, Peng P, Chen S, *et al.* Characterization and proteomic analysis of ovarian cancer-derived exosomes [J]. J Proteomics, 2013, 80: 171–182.
- [14] Yuyama K, Sun H, Mitsutake S, *et al.* Sphingolipid-modulated exosome secretion promotes clearance of amyloid- β by microglia [J]. J Biol Chem, 2012, 287(14): 10977–10989.
- [15] Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, *et al.* Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells [J]. Nat Cell Biol, 2007, 9 (6): 654–659.
- [16] Li M, Zeringer E, Barta T, *et al.* Analysis of the RNA content of the exosomes derived from blood serum and urine and its potential as biomarkers [J]. Philos Transact Royal Soc B: Biol Sci, 2014, 369(1652): 20130502.
- [17] Tanaka Y, Kamohara H, Kinoshita K, *et al.* Clinical impact of serum exosomal microRNA-21 as a clinical biomarker in human esophageal squamous cell carcinoma [J]. Cancer, 2013, 119 (6): 1159–1167.
- [18] Keller S, Sanderson MP, Stoeck A *et al.* Exosomes: from biogenesis and secretion to biological function [J]. Immunol Lett, 2006, 107(2): 102–108.
- [19] Park JE, Tan HS, Datta A, *et al.* Hypoxic tumor cell modulates its microenvironment to enhance angiogenic and metastatic potential by secretion of proteins and exosomes [J]. Mol Cell Proteomics, 2010, 9(6): 1085–1099.
- [20] Savina A, Furlan M, Vidal M, *et al.* Exosome release is regulated by a calcium-dependent mechanism in K562 cells [J]. J Biol Chem, 2003, 278(22): 20083–20090.
- [21] Lespagnol A, Duflaut D, Beekman C, *et al.* Exosome secretion,

- including the DNA damage-induced p53-dependent secretory pathway, is severely compromised in TSAP6/Steap3-null mice [J]. *Cell Death Differ*, 2008, 15(11): 1723–1733.
- [22] Trajkovic K, Hsu C, Chiantia S, et al. Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes [J]. *Science*, 2008, 319(5867): 1244–1247.
- [23] Ostrowski M, Carmo NB, Krumeich S, et al. Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway [J]. *Nat Cell Biol*, 2010, 12(1): 19–30.
- [24] Thery C, Amigorena S, Raposo G, et al. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids [M]. *Curr Protoc Cell Biol*, 2006, Chapter 3: Unit 3.22.
- [25] Zlotogorski-Hurvitz A, Dayan D, Chaushu G, et al. Human saliva-derived exosomes: comparing methods of isolation [J]. *J Histochem Cytochem*, 2015, 63(3): 181–189.
- [26] Logozzi M, De Milito A, Lugini L, et al. High levels of exosomes expressing CD63 and caveolin-1 in plasma of melanoma patients [J]. *PLoS One*, 2009, 4(4): e5219.
- [27] Hong CS, Muller L, Boyiadzis M, et al. Isolation and characterization of CD34⁺ blast-derived exosomes in acute myeloid leukemia [J]. *PLoS One*, 2014, 9(8): e103310.
- [28] Morelli AE, Larregina AT, Shufesky WJ, et al. Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells [J]. *Blood*, 2004, 104(10): 3257–3266.
- [29] Thery C, Zitvogel L, Amigorena S. Exosomes: composition, biogenesis and function [J]. *Nat Rev Immunol*, 2002, 2(8): 569–579.
- [30] Hannafon BN, Ding WQ. Intercellular communication by exosome-derived microRNAs in cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(7): 14240–14269.
- [31] Cossetti C, Lugini L, Astrologo L, et al. Soma-to-germline transmission of RNA in mice xenografted with human tumour cells: possible transport by exosomes [J]. *PLoS One*, 2014; 9(7): e101629.
- [32] Kahlert C, Kalluri R. Exosomes in tumor microenvironment influence cancer progression and metastasis [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2013, 91(4): 431–437.
- [33] Madhavan B, Yue S, Galli U, et al. Combined evaluation of a panel of protein and miRNA serum-exosome biomarkers for pancreatic cancer diagnosis increases sensitivity and specificity [J]. *Int J Cancer*, 2015, 136(11): 2616–2627.
- [34] Ogata-Kawata H, Izumiya M, Kurioka D, et al. Circulating exosomal microRNAs as biomarkers of colon cancer [J]. *PLoS One*, 2014, 9(4): e92921.
- [35] Melo SA, Luecke LB, Kahlert C, et al. Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer [J]. *Nature*, 2015, 523(7559): 177–182.
- [36] Zhou YG, Mohamadi RM, Poudineh M, et al. Interrogating circulating microsomes and exosomes using metal nanoparticles [J]. *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*, 2016, 12(6): 727–32.
- [37] Nguyen DX, Bos PD, Massague J. Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization [J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9(4): 274–284.
- [38] Hong BS, Cho J-H, Kim H, et al. Colorectal cancer cell-derived microvesicles are enriched in cell cycle-related mRNAs that promote proliferation of endothelial cells [J]. *BMC Genomics*, 2009, 10(1): 556.
- [39] Kogure T, Lin WL, Yan IK, et al. Intercellular nanovesicle-mediated microRNA transfer: A mechanism of environmental modulation of hepatocellular cancer cell growth [J]. *Hepatology*, 2011, 54(4): 1237–1248.
- [40] Zhu W, Huang L, Li Y, et al. Exosomes derived from human bone marrow mesenchymal stem cells promote tumor growth in vivo [J]. *Cancer Lett*, 2012, 315(1): 28–37.
- [41] Atay S, Banskota S, Crow J, et al. Oncogenic KIT-containing exosomes increase gastrointestinal stromal tumor cell invasion [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(2): 711–716.
- [42] Aga M, Bentz GL, Raffa S, et al. Exosomal HIF1alpha supports invasive potential of nasopharyngeal carcinoma-associated LMP1-positive exosomes [J]. *Oncogene*, 2014, 33(37): 4613–4622.
- [43] Demory Beckler M, Higginbotham JN, Franklin JL, et al. Proteomic analysis of exosomes from mutant KRAS colon cancer cells identifies intercellular transfer of mutant KRAS [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2013, 12(2): 343–355.
- [44] Saleem SN, Abdel-Mageed AB. Tumor-derived exosomes in oncogenic reprogramming and cancer progression [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2015; 72(1): 1–10.
- [45] Hood JL, San RS, Wickline SA. Exosomes released by melanoma cells prepare sentinel lymph nodes for tumor metastasis [J]. *Cancer Res*, 2011, 71(11): 3792–3801.
- [46] Costa-Silva B, Aiello NM, Ocean AJ, et al. Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver [J]. *Nat Cell Biol*, 2015, 17(6): 816–26.
- [47] Harris AL. Hypoxia—a key regulatory factor in tumour growth [J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(1): 38–47.
- [48] Wang T, Gilkes DM, Takano N, et al. Hypoxia inducible factors and RAB22A mediate formation of microvesicles that stimulate breast cancer invasion and metastasis [J]. *Proc Nat Acad Sci*, 2014, 111(31): E3234–E3242.
- [49] Umez T, Tadokoro H, Azuma K, et al. Exosomal miR-135b shed from hypoxic multiple myeloma cells enhances angiogenesis by targeting factor-inhibiting HIF-1 [J]. *Blood*, 2014, 124(25): 3748–3757.
- [50] Poulsen HS, Urup T, Michaelsen SR, et al. The impact of bevacizumab treatment on survival and quality of life in newly diagnosed glioblastoma patients [J]. *Cancer Manag Res*, 2014, 6: 373–387.
- [51] Sandler A, Gray R, Perry MC, et al. Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer [J]. *N Engl J Med*, 2006, 355(24): 2542–2550.
- [52] Hoffmann TK, Dworacki G, Tsukihito T, et al. Spontaneous

- apoptosis of circulating T lymphocytes in patients with head and neck cancer and its clinical importance [J]. *Clin Cancer Res*, 2002, 8(8): 2553–2562.
- [53] Andre F, Schartz NE, Movassagh M, et al. Malignant effusions and immunogenic tumour derived exosomes [J]. *Lancet*, 2002, 360(9329): 295–305.
- [54] Escudier B, Dorval T, Chaput N, et al. Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous dendritic cell (DC) derived-exosomes: results of the first phase I clinical trial [J]. *J Transl Med*, 2005, 3(1): 10.
- [55] Viaud S, Terme M, Flament C, et al. Dendritic cell-derived exosomes promote natural killer cell activation and proliferation; a role for NKG2D ligands and IL-15 [J]. *PLoS One*, 2009, 4(3): e4942.
- [56] Morse MA, Garst J, Osada T, et al. A phase I study of dexosome immunotherapy in patients with advanced nonsmall cell lung cancer [J]. *J Transl Med*, 2005, 3(1): 9.
- [57] Dai S, Wei D, Wu Z, et al. Phase I clinical trial of autologous ascites-derived exosomes combined with GM-CSF for colorectal cancer [J]. *Mol Ther*, 2008, 16(4): 782–790.
- [58] Filipazzi P, Burdek M, Villa A, et al. Recent advances on the role of tumor exosomes in immunosuppression and disease progression [J]. *Semin Cancer Biol (Elsevier)*, 2012, 22(4): 342–349.
- [59] Yang C, Kim SH, Bianco NR, et al. Tumor-derived exosomes confer antigen-specific immunosuppression in a murine delayed-type hypersensitivity model [J]. *PLoS One*, 2011, 6(8): e22517.
- [60] Clayton A, Tabi Z. Exosomes and the MICA-NKG2D system in cancer [J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2005, 34(3): 206–213.
- [61] Clayton A, Mitchell JP, Court J, et al. Human tumor-derived exosomes down-modulate NKG2D expression [J]. *J Immunol*, 2008, 180(11): 7249–7258.
- [62] Gastpar R, Gehrmann M, Bausero MA, et al. Heat shock protein 70 surface-positive tumor exosomes stimulate migratory and cytolytic activity of natural killer cells [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(12): 5238–5247.
- [63] 张敏, 张晨光, 丁卫. 外泌体及其在肿瘤诊断中的意义 [J]. *生理科学进展*, 2014, 45(5): 372–378.
- [64] Tian Y, Li S, Song J, et al. A doxorubicin delivery platform using engineered natural membrane vesicle exosomes for targeted tumor therapy [J]. *Biomaterials*, 2014, 35(7): 2383–2390.
- [65] Jeon HM, Sohn YW, Oh SY, et al. Id4 imparts chemoresistance and cancer stemness to glioma cells by derepressing mir-9-mediated suppression of Sox2 [J]. *Cancer Res*, 2011, 71(9): 3410–3421.
- [66] Cittelly DM, Das PM, Salvo VA, et al. Oncogenic Her2 delta 16 suppresses mir-15a /6 and deregulates Bcl-2 to promote endocrine resistance of breast tumors [J]. *Carcinogenesis*, 2010, 31(12): 2049–2057.
- [67] Sebio A, Pare L, Paez D, et al. The Lcs6 polymorphism in the binding site of let-7 microRNA to the KRAS 3'-untranslated region: its role in the efficacy of anti-EGFR-based therapy in metastatic colorectal cancer patients [J]. *Pharmacogenet Genomics*, 2013, 23(3): 142–147.
- [68] Holleman A, Chung I, Olsen R R, et al. miR-135a contributes to paclitaxel resistance in tumor cells both in vitro and in vivo [J]. *Oncogene*, 2011, 30(43): 4386–4398.
- [69] Han S Y, Zhao M B, Zhuang G B, et al. Marsdenia tenacissima extract restored gefitinib sensitivity in resistant non-small cell lung cancer cells [J]. *Lung Cancer*, 2012, 75(1): 30–37.
- [70] Putz U, Howitt J, Doan A, et al. The tumor suppressor PTEN is exported in exosomes and has phosphatase activity in recipient cells [J]. *Sci Signaling*, 2012, 5(243): ra70.
- [71] Mizrak A, Bolukbasi MF, Ozdener GB, et al. Genetically engineered microvesicles carrying suicide mRNA/protein inhibit schwannoma tumor growth [J]. *Mol Ther*, 2013, 21(1): 101–108.
- [72] Ohno S, Takanashi M, Sudo K, et al. Systemically injected exosomes targeted to EGFR deliver antitumor microRNA to breast cancer cells [J]. *Mol Ther*, 2013, 21(1): 185–191.
- [73] Lentz MR. Continuous whole blood UltraPheresis procedure in patients with metastatic cancer [J]. *J Biol Response Mod*, 1989, 8(5): 511–527.
- [74] Marleau AM, Chen C-S, Joyce JA et al. Exosome removal as a therapeutic adjuvant in cancer [J]. *J Transl Med*, 2012, 10(1): 134.
- [75] Federici C, Petrucci F, Caimi S, et al. Exosome release and low pH belong to a framework of resistance of human melanoma cells to cisplatin [J]. *PLoS One*, 2014, 9(2): e88193.
- [76] Lai RC, Yeo RW, Tan KH, et al. Exosomes for drug delivery - a novel application for the mesenchymal stem cell [J]. *Biotechnol Adv*, 2013, 31(5): 543–551.

[修回日期]2016-07-25