

## · 专家论坛 ·

## 外泌体:乳腺癌精确诊疗的新热点

盛媛 李恒宇

【摘要】 精准医学概念已被广泛认可,但如何实现更为精准的诊疗,仍有漫长的路要探索。继高通量测序、液态活组织检查、单细胞分析之后,外泌体已逐渐成为肿瘤研究的新热点。外泌体是循环囊泡的一种,也是细胞间通讯的重要介质之一,其本身具有稳定、可捕获、有生物活性、实时检测等特征。外泌体内携带的生物活性分子,参与肿瘤微环境中肿瘤细胞之间、肿瘤细胞与基质细胞之间的通讯,影响肿瘤发生、生长、侵袭和转移。本文通过分析外泌体在肿瘤早期发展、转移和耐药等过程中的作用,阐明其作为诊断标志物的优势与不足;通过分析其发挥生物学作用的方式以及与基因治疗经典传递方法相比较,来探讨其作为治疗载体的可行性。

【关键词】 外泌体; 乳腺肿瘤; 精准医学

【中图分类号】 R737.9 【文献标志码】 A

Exosome: new hotspot in precision diagnosis and treatment of breast cancer Sheng Yuan, Li Hengyu.

Department of Breast Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

Corresponding author: Sheng Yuan, Email: sheng528yuan@163.com

【Abstract】 The concept of precision medicine has been widely accepted, but there is a long way to go before accurate diagnosis and treatment are achieved. Following the high-throughput sequencing, liquid biopsy and single cell technology, exosome has gradually become a new focus of cancer research. Exosomes are cell-derived vesicles and important intercellular communication mediators. They are stable and biologically active, meanwhile they could be captured and detected in real time. The bioactive molecules, which exosomes carry, are involved in the communication among tumor cells, between tumor cells and stromal cells in the tumor microenvironment, affecting tumorigenesis, tumor growth, invasion and metastasis. In this paper, we analyzed the role of exosomes in early stage development, metastasis and drug resistance of tumor, clarified its advantages and disadvantages as a diagnostic marker, investigated its biological function and explored its potential as a biological therapy compared with classical gene therapy

【Key words】 Exosomes; Breast neoplasms; Precision medicine

近年来,精准医学的概念备受关注,但精确诊疗之路任重道远。早期乳腺癌诊疗较为规范,患者的生存率较高,但晚期乳腺癌的诊疗常常无法精准。例如:许多晚期肿瘤患者无法取到复发的组织标本进行免疫组织化学分析;还有患者在长期随访过程中不能精准监测;晚期肿瘤治疗能否有更优的治疗载体和靶标等。因此,精准医学目标的实现,需要新的技术或方法。近年来关于外泌体(exosome)的研究逐渐成为新热点,其在肿瘤治疗中的作用日益凸显。笔者在本文中回顾了外泌体研究的最新进展,

探讨外泌体在乳腺癌诊断和治疗中的重要作用以及应用前景。

### 一、外泌体生物学特性

外泌体是循环囊泡的一种,循环囊泡还包括微囊泡(microvesicle)、凋亡小体(apoptosis body)、自噬小体(autophagy body)等。凋亡小体与自噬小体是以出芽方式形成的,大小约 10~30 μm,表面有细胞膜蛋白或磷脂酰丝氨酸。微囊泡也是以出芽方式形成的,大小约 100~1000 nm,表面有细胞膜蛋白标记;外泌体为脂质囊泡,是细胞内多泡小体质膜融合形成,其直径 30~100 nm,表面有特定的标记物,如 Alix、肿瘤易感基因 101 (tumor susceptibility gene 101, TSG101)、CD63 等<sup>[1]</sup>。几乎各类细胞,包括肿瘤细胞,都可以释放外泌体。它们是膜性囊泡,作为

细胞间通讯的重要介质,外泌体中的遗传物质通过直接作用或者形成 RNA-蛋白质复合体的方式介导细胞间通讯。宿主细胞或癌细胞分泌的外泌体,特别是其携带的生物活性分子,比如小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 和微小 RNA (microRNA, miRNA) 参与了肿瘤发生、生长、侵袭和转移。肿瘤微环境中的基质细胞和癌细胞之间通过外泌体进行通讯,在调节肿瘤发生、发展中发挥了重要作用(图1)<sup>[2]</sup>。因此,将精确诊疗的概念与外泌体相结合的研究近来备受关注。

## 二、外泌体作为肿瘤诊断的分子标志物

外泌体被认为是在特定条件下健康和疾病状态下重要的生物标志物<sup>[3]</sup>。目前证实肿瘤细胞外泌体来源的 miRNA、mRNA 及蛋白可以作为多种癌症的诊断指标,并在肿瘤早期、肿瘤转移、治疗抵抗等过程中作为诊断肿瘤进程的生物标志物<sup>[4]</sup>。

### 1. 外泌体与肿瘤早期诊断

研究发现肿瘤细胞和正常细胞分泌的外泌体有显著不同,进一步将肿瘤细胞分泌的外泌体加到正常细胞中,可以改变正常细胞的基因表达<sup>[5]</sup>。紧扣这一线索,将上述肿瘤细胞外泌体刺激过的细胞注入免疫缺陷小鼠体内可以形成肿瘤。那么,在肿瘤细胞系中得到的结论在临床研究中是不是也同样适用?研究者从8名正常人与11例乳腺癌患者的血液中收集外泌体,来自11例肿瘤患者的外泌体样本中有5例样本与正常细胞混合后植入小鼠体内诱发肿瘤形成;在对照的正常人群的外泌体荷瘤组中则没有肿瘤形成<sup>[5]</sup>。上述现象说明外泌体可能使得邻近癌细胞更具侵袭性。进一步检测两组外泌体中差异蛋白的变化,发现引起肿瘤发生的外泌体中的

Dicer、TRBP (TAR RNA binding protein)、AGO2 蛋白都只来源于乳腺癌细胞系,并同时伴有肿瘤抑制蛋白 PTEN 的降低<sup>[5]</sup>。这说明外泌体可能参与了肿瘤的发生,检测外泌体蛋白变化可能是诊断肿瘤的新思路。

Melo 等<sup>[6]</sup>发现血液循环中磷脂酰肌醇蛋白聚糖 (glypican-1, GPC1) 阳性的外泌体可以较 CA19-9 更特异的早期诊断胰腺导管腺癌(该研究为证明 GPC1 的有效性,也研究了乳腺癌,检测32例患者中有24例阳性)。并且在临床随访中观察到胰腺癌患者手术后外泌体的 GPC1 阳性率出现下降,特别是下降幅度大者,其预后更好。研究表明血清外泌体中的存活素及其剪接体表达量高的乳腺癌患者5年生存期显著高于对照组患者<sup>[7]</sup>。除血液以外,体液中也有外泌体,监测唾液外泌体中的 mRNA 和蛋白可以作为监测高危人群乳腺癌早期诊断的有效方法<sup>[7]</sup>。可见,利用外泌体可以检测和监控肿瘤,目前与循环肿瘤细胞 (circulating tumor cell, CTC) 相比,外泌体在循环中的含量更丰富也更容易富集。

### 2. 外泌体与肿瘤转移、治疗抵抗

研究者通过小鼠胰腺癌模型的肿瘤微环境,发现在癌症的极早期,含有巨噬细胞迁移抑制因子 (macrophage-inhibiting factor, MIF) 的外泌体进入肝脏,并被 Kupffer 细胞摄取,改变 Kupffer 细胞的基因表达和蛋白成分,引导转化生长因子  $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ , TGF- $\beta$ ) 生成增多,诱导肝纤维化的发生,从而为肿瘤播种和生长创造了一个良好的微环境<sup>[8]</sup>。除去外泌体中的 MIF 则可以阻止肝脏中建立纤维化的肿瘤支持环境。进一步研究发现 MIF 在晚期胰腺癌患者体内循环的外泌体中呈高表达,

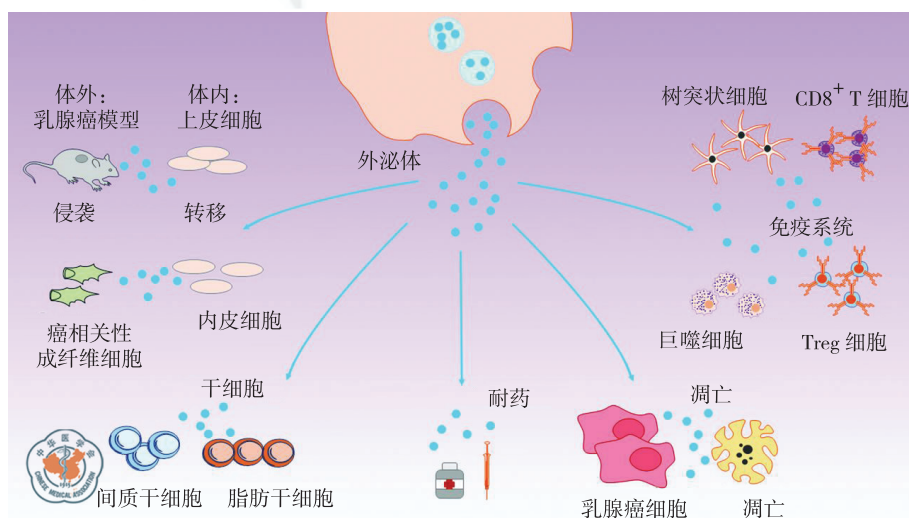


图1 外泌体在乳腺癌中的作用<sup>[2]</sup>

而有肝转移灶的患者中外泌体 MIF 水平更高,表明这一蛋白标志物或许可用来精确预测患者极早期的肝转移<sup>[8]</sup>。

O'Driscoll 等<sup>[9]</sup>发现外泌体和更大的囊泡(核外颗粒体 ectosomes)可以将 miRNA-200 从高转移性细胞转递到低转移性细胞,从而增加肿瘤细胞的转移潜力。在肿瘤微环境中基质细胞的外泌体也可对肿瘤的行为产生影响<sup>[10]</sup>。Shimoda 等<sup>[11]</sup>发现组织金属蛋白酶抑制剂(tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMPs)可以减少肿瘤基质细胞释放促肿瘤生长的外泌体,下调 TIMPs 后可诱导形成肿瘤相关成纤维细胞,这类细胞释放的外泌体可以提高乳腺癌细胞的运动性。Boelens 等<sup>[12]</sup>发现基质细胞的外泌体传递给乳腺癌细胞并通过旁分泌和近分泌信号来引起化疗和放射治疗抵抗。基质细胞通过与乳腺癌的交互作用,使乳腺癌的部分细胞形成耐药亚群,促进肿瘤生长及耐药<sup>[13]</sup>。

可见,来自肿瘤细胞的外泌体与正常细胞来源的外泌体有着本质上的区别,肿瘤细胞产生的外泌体以及肿瘤微环境中细胞外基质中的外泌体都可以对肿瘤生物学功能产生重要影响,但外泌体在体内功能的多效性、发挥作用的方式(例如单独或协同发挥作用)等,均有待进一步研究。

### 三、外泌体作为治疗载体

外泌体特有的膜成分有利于其从细胞外进入细胞内。外泌体膜富含胆固醇和磷脂酰丝氨酸,在外泌体膜上特异的蛋白质对于其进入细胞的能力以及生物学活性来说都至关重要。细胞摄取 miRNA 的可能机制之一是包被了 miRNA 的外泌体通过内吞或膜融合传递进入细胞<sup>[14]</sup>。外泌体也可以将 mRNA、miRNA 和蛋白质传递进入细胞,是肿瘤微环境中重要的信号通路介质。

#### 1. 调节靶细胞基因表达

外泌体穿过靶细胞膜传递遗传物质到靶细胞内发挥作用,也能调节细胞间的 mRNA 和 miRNA 的传递,使传递进入靶细胞的 RNA 也可进行翻译,从而改变靶体细胞的基因表达<sup>[15]</sup>。

#### 2. 进行 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)

RNAi 是指由双链 RNA 诱发的、同源 mRNA 高效特异性降解的细胞生物学现象,如转导了表达 siRNA 慢病毒载体的肝细胞能分泌外泌体并能介导受体细胞的 RNAi 反应<sup>[16]</sup>。

#### 3. 调节肿瘤微环境

外泌体参与肿瘤微环境的调节,如巨噬细胞能

分泌外泌体,其能在微环境中将 miRNA 转运至邻近的肿瘤细胞发挥作用。外泌体通过抑制免疫细胞包括树突状细胞(dendritic cells, DCs)、自然杀伤(natural killer, NK)细胞、CD4<sup>+</sup>和 CD8<sup>+</sup>T 细胞等引发抗肿瘤反应,及诱导免疫抑制或调节细胞群[骨髓来源的抑制性细胞(myeloid-derived suppressor cells, MDSCs)、调节性 T 淋巴细胞 Tregs 和调节性 B 淋巴细胞, Bregs]介导的免疫抑制。此外,几种免疫细胞(DCs, CD4<sup>+</sup>和 CD8<sup>+</sup>Tregs)分泌的外泌体也参与了免疫抑制等过程<sup>[17]</sup>。

### 四、外泌体与基因治疗经典传递方法相比的优势

纳米材料(例如脂质体、金纳米粒子和外泌体)的应用使得非病毒 RNA 传递载体的研究越来越深入。目前有临床试验(如 NCT00689065)用聚乙二醇传递 siRNA 来治疗实体肿瘤。与病毒、脂质体等经典的传递介质相比,外泌体有诸多优势<sup>[18]</sup>。

#### 1. 外泌体具有较小的免疫源性

外泌体能将携带的遗传物质直接传递进入细胞,无需溶酶体逃逸,外膜的惰性又能避免其在细胞外环境中被清除。外泌体有良好的耐受性,广泛地分布于体液中,如血液、尿液、肺泡灌洗液、乳汁、羊水、关节液、胸水、腹水等。相对于其他纳米传递载体,外泌体的另一个优势是不会造成治疗性物质在肝脏的累积<sup>[19]</sup>。研究证实外泌体肿瘤抑制性 miRNA 治疗不会出现严重的不良反应<sup>[20-21]</sup>。由此可见,外泌体是天然的转运体,与脂质体相比,其毒性作用和免疫反应更小,而且适于重复多次的 RNAi 治疗。

#### 2. 外泌体具有归巢靶组织的能力

作为药物传递载体,外泌体另一重要的属性是归巢靶组织的能力。黑色素瘤外泌体归巢前哨淋巴结表明外泌体确有内在的归巢能力,外泌体能靶向作用于特定来源的细胞类型<sup>[22]</sup>。外泌体能顺应细胞膜的改变,增强细胞类型的特异靶向性,而这种归巢能力适用于靶向治疗。

#### 3. 外泌体具有穿过生物屏障的能力

Alvarez-Erviti 等<sup>[20]</sup>研究发现外泌体有能力穿过血脑屏障,机制可能是其在细胞之间通过多囊泡体进行传递,从而使外泌体能穿过具有多层结构的血脑屏障<sup>[23]</sup>。

### 五、结语

综上所述,外泌体作为诊断标志物具有稳定、可捕获、有生物活性、检测实时等优点。但外泌体应用于临床也存在一些问题,比如特异性、来源是否明



确、富集效率、检测方法、提取便捷性、能否批量测定等。除 miRNAs 以外,外泌体中 mRNA、蛋白质等都将作为新的研究热点。在精准治疗方面需要进一步了解外泌体在肿瘤全程的作用机制,作为治疗载体可能出现的不良反应并确保治疗过程的安全。

### 参 考 文 献

- [1] Lau CS, Wong DT. Breast cancer exosome-like microvesicles and salivary gland cells interplay alters salivary gland cell-derived exosome-like microvesicles in vitro [J]. PLoS One, 2012, 7(3):e33037.
- [2] Lowry MC, Gallagher WM, O'Driscoll L. The role of exosomes in breast cancer [J]. Clin Chem, 2015, 61(12):1457-1465.
- [3] Kourembanas S. Exosomes: vehicles of intercellular signaling, biomarkers, and vectors of cell therapy[J]. Annu Rev Physiol, 2015, 77:13-27.
- [4] Ewaisha R, Gawryletz CD, Anderson KS. Crucial considerations for pipelines to validate circulating biomarkers for breast cancer [J]. Expert Rev Proteomics, 2016, 13(2):201-211.
- [5] Melo SA, Sugimoto H, O'Connell JT, et al. Cancer exosomes perform cell-independent microRNA biogenesis and promote tumorigenesis [J]. Cancer Cell, 2014, 26(5):707-721.
- [6] 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.
- [7] Yu DD, Wu Y, Shen HY, et al. Exosomes in development, metastasis and drug resistance of breast cancer[J]. Cancer Sci, 2015, 106(8):959-964.
- [8] Zhang Y, Wang XF. A niche role for cancer exosomes in metastasis [J]. Nat Cell Biol, 2015, 17(6):709-711.
- [9] O'Driscoll L. Expanding on exosomes and ectosomes in cancer[J]. N Engl J Med, 2015, 372(24):2359-2362.
- [10] Zhang L, Zhang S, Yao J, et al. Microenvironment-induced PTEN loss by exosomal microRNA primes brain metastasis outgrowth[J]. Nature, 2015, 527(7576):100-104.
- [11] Shimoda M, Principe S, Jackson HW, et al. Loss of the Timp gene family is sufficient for the acquisition of the CAF-like cell state[J]. Nat Cell Biol, 2014, 16(9):889-901.
- [12] Boelens MC, Wu TJ, Nabet BY, et al. Exosome transfer from stromal to breast cancer cells regulates therapy resistance pathways[J]. Cell, 2014, 159(3):499-513.
- [13] Yu S, Wei Y, Xu Y, et al. Extracellular vesicles in breast cancer drug resistance and their clinical application[J]. Tumour Biol, 2016, 37(3):2849-2861.
- [14] Montecalvo A, Larregina AT, Shufesky WJ, et al. Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes[J]. Blood, 2012, 119(3):756-766.
- [15] Yeo RW, Lai RC, Zhang B, et al. Mesenchymal stem cell: an efficient mass producer of exosomes for drug delivery[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2013, 65(3):336-341.
- [16] Pan Q, Ramakrishnaiah V, Henry S, et al. Hepatic cell-to-cell transmission of small silencing RNA can extend the therapeutic reach of RNA interference (RNAi) [J]. Gut, 2012, 61(9):1330-1339.
- [17] Liu Y, Gu Y, Cao X. The exosomes in tumor immunity [J]. Oncoimmunology, 2015, 4(9):e1027472.
- [18] van den Boorn JG, Schlee M, Coch C, et al. SiRNA delivery with exosome nanoparticles[J]. Nat Biotechnol, 2011, 29(4):325-326.
- [19] Zhuang X, Xiang X, Grizzle W, et al. Treatment of brain inflammatory diseases by delivering exosome encapsulated anti-inflammatory drugs from the nasal region to the brain [J]. Mol Ther, 2011, 19(10):1769-1779.
- [20] Alvarez-Erviti L, Seow Y, Yin H, et al. Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes [J]. Nat Biotechnol, 2011, 29(4):341-345.
- [21] Kosaka N, Iguchi H, Yoshioka Y, et al. Competitive interactions of cancer cells and normal cells via secretory microRNAs [J]. J Biol Chem, 2012, 287(2):1397-1405.
- [22] 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.
- [23] El Andaloussi S, Lakhil S, Mäger I, et al. Exosomes for targeted siRNA delivery across biological barriers [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2013, 65(3):391-397.

(收稿日期:2016-01-15)

(本文编辑:刘军兰)

盛媛,李恒宇.外泌体:乳腺癌精确诊疗的新热点[J/CD].中华乳腺病杂志:电子版,2016,10(3):133-136.