

- [15] 谢敬文,蓝文莉,严康峰,等. 献血人群 Mur 血型的筛查研究[J]. 临床输血与检验,2016,18(4):384-386.
 - [16] 刘达庄,朱自严,BYRNE P,等. 低频率抗体抗-Mur 引起的溶血性输血反应[J]. 中国输血杂志,2000,13(1):8-10.
 - [17] HEATHCOTE D,CARROLL T,WANG J J,et al. Novel antibody screening cells, MUT + Mur kodecytes, created by attaching peptides onto red blood cells [J]. Transfusion,2010,50(3):635-641.
 - [18] 严凤好,朱春燕,李雪群,等. 惠州地区无偿献血者 Mur 血型检索库的建立[J]. 中国输血杂志,2016,29(2):137-139.
 - [19] RICHARD M,ST-LAURENT J,PERREAULT J,et al. A new SEMA7A variant found in Native Americans with alloantibody [J]. Vox Sang,2011,100(3):322-326.
 - [20] KAWABATA K,UCHIKAWA M,OHTO H,et al. Anti-KANNO:a novel alloantibody against a red cell antigen of high frequency [J]. Transfus Med Rev,2014,28(1):23-28.
 - [21] JOHNSON S T. JMH blood group system:a review [J]. Immunohematology,2014,30(1):18-23.
 - [22] 孙爱农,魏双施,廖艳婷,等. 人源 Mur 血型抗体的鉴定和应用——附 1 例报告 [J]. 中国输血杂志,2016,29(12):1327-1330.
 - [23] 蓝欲晓,孙革. 低频率抗 Mur 抗体引起溶血性输血反应的调查研究[J]. 江西医学检验,2005,23(3):203-204.
 - [24] CHENG C K,LEE C K,LIN C K. Clinically significant red blood cell antibodies in chronically transfused patients:a survey of Chinese thalassemia major patients and literature review [J]. Transfusion,2012,52(10):2220-2224.
 - [25] MO Z,LI H,HUANG L,et al. Prevalence and specificity of RBC alloantibodies in the general hospitalised population in Guangxi [J]. Transfus Med,2015,25(5):313-319.
- (收稿日期:2019-01-14 修回日期:2019-05-27)

• 综 述 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2019.17.051

外泌体在肝癌发生发展中的研究新进展

向阳林¹,冯智浩²综述,龚建平^{2△}审核

1. 重庆两江新区人民医院外科,重庆 401147;2. 重庆医科大学附属第二医肝胆外科,重庆 400010

关键词:肝细胞癌; 外泌体; 微小 RNA

中图法分类号:R730.3

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2019)17-2575-04

肝细胞肝癌是全球第六大最常见的癌症,也是全球第四大癌症相关死亡原因。据统计肝癌在 2018 年全世界肝癌新发病例约 84.2 万人,死亡病例 78.2 万人。而中国是肝癌高发国家,中国肝癌死亡病例占了世界死亡病例的一半以上^[1]。由于早期肝癌患者并没有明显临床症状,肝癌的早期诊断十分困难。目前肝癌的筛查方法主要依靠影像学和肿瘤标志物,临床上常用方法是甲胎蛋白(AFP)结合计算机断层扫描(CT)或磁共振成像(MRI),必要时行病理学检查进行确诊^[2]。该筛查方法仍旧存在较大的不足,如早期肝癌 AFP 阳性率低,大约 30%肝癌患者 AFP 阴性,以及病理检查属于有创检查可能会出现胆漏、出血以及感染等并发症。手术完整切除肿瘤仍是肝癌患者的首选治疗方案,由于大部分患者前来就诊时已进展至中晚期肝癌,只有 15%~20%的患者有机会进行手术治疗^[2],而那些接受了手术治疗的患者复发率高达 70%^[3],因此临床需要更优秀的肝癌诊治手段。作为细胞外囊泡的主要类型,外泌体是直径 30~150 nm 的双层膜囊泡,含有核酸、蛋白质和脂质,介导细胞间通讯。近几年有大量研究表明,外泌体可以从多个方面影响肝癌的发生和进展,包括血管生成、化疗耐药、

转移和免疫反应等^[3-5]。此外,外泌体内容物可被人作为干预,用于开发新型疗法。

1 外泌体的概念

外泌体在 1987 年被澳大利亚学者首次报道^[4],但是长久以来学者们都一直认为外泌体只是一种细胞的废弃物,并没有引起较多的重视,直到 2007 年有学者报道了外泌体富含各种各样的核酸^[5]。外泌体是一种细胞外囊泡,直径为 30~150 nm,大部分细胞都能够产生数量众多的外泌体,它们广泛分布于各种各样的体液中例如血浆、尿液、乳汁、唾液等,除此之外体外培养的细胞上清液中也可以找到大量外泌体。外泌体起源于早期胞内体,经过一系列复杂过程最终分泌出胞^[6]。外泌体表面膜分子成分决定外泌体作作用于临近或是远隔靶细胞。靶细胞将通过配体受体结合及胞吞作用摄入外泌体从而起到信息交流作用。外泌体保存着细胞特异性的脂质、酶与抗原以及各种各样的核酸如信使 RNA(mRNA)、微小 RNA(miRNA)、长非编码 RNA(LncRNA)、环状 RNA(circRNA)等。而外泌体具有脂质双层膜结构,可以保护核酸免受胞外 RNA 酶的降解,同时这也使得这些外泌体包含的核酸具有成为生物标志物的潜在可能^[7]。

△ 通信作者,E-mail:gongjianping11@126.com.

2 外泌体介导肝癌发生

肿瘤发生的实质是正常细胞向肿瘤细胞的转化。近期有研究表明,外泌体介导的细胞间信息交流与物质交换在肝癌发生、发展中起到了至关重要的作用^[7]。先前就有学者发现肝癌细胞来源的外泌体被癌旁脂肪细胞摄取,从而诱导脂肪细胞产生大量促炎性细胞因子以及激活核因子 κ B(NF- κ B)通路,从而强有力地促进肝癌细胞发生与进展^[8]。肝癌细胞可以通过分泌外泌体将促癌 RNA 与蛋白转移至正常肝细胞,激活正常肝细胞的 PI3K/AKT 与 MAPK 信号通路,通过分泌大量基质金属蛋白酶(MMP)-2、MMP-9 来使正常肝细胞向肝癌细胞转化^[9]。除此之外,MELO 等^[10]发现,肿瘤细胞来源的外泌体能不依赖完整细胞,通过外泌体双层脂质膜上的功能分子 CD43 募集相关的酶,从而促进前体微 RNA(pre-miRNA)剪切加工为成熟的 miRNA。且这些肿瘤来源的外泌体以二聚体的形式被正常上皮细胞摄取并形成肿瘤。ZHANG 等^[11]通过研究发现,脂肪细胞来源的外泌体包含去泛素化的 circRNA。这些脂肪来源的外泌体通过 circRNA 的传递显著下调了肝癌的 miR-34a 的表达,并进一步激活了 USP7/Cyclin A2 信号通路并促进肝癌的发生并减少其 DNA 损伤从而增强肿瘤细胞的生存能力。开发阻断这些机制的药物,就可能降低肝癌的发病率。

3 外泌体介导肝癌发展

最近有大量研究证实,肝癌通过外泌体重构肿瘤微环境以达到促进肝癌进展的作用^[6,12]。肿瘤微环境是近几年以来逐渐被各研究小组重视的一个概念,肿瘤微环境在肿瘤发生、发展中发挥着重要的作用。肿瘤微环境由肿瘤周围血管、多种多样的非肿瘤细胞、细胞外基质以及各种信号分子组成。肿瘤微环境对肿瘤有促进与抑制两重作用,而外泌体能介导肿瘤与肿瘤微环境间物质交流和信号传递。外泌体被肿瘤细胞释放,参与肿瘤微环境的形成与改造^[6,12,13]。近期有研究表明,肿瘤来源的外泌体可被肿瘤微环境中的成纤维细胞,巨噬细胞等细胞摄取,并使他们功能发生改变最终促进肿瘤进展与转移^[13]。LI 等^[14]学者的实验证明,肝癌来源的外泌体中包含大量 lncRNA TUC339,这些 lncRNA TUC339 随着外泌体被肿瘤微环境中的巨噬细胞摄取,减少了这些巨噬细胞促炎细胞因子的分泌,增加了抗炎细胞因子的分泌,以及使巨噬细胞发生表型转换,这些发生了表型转换的巨噬细胞能抑制机体对肿瘤免疫杀伤,促进了肿瘤的免疫逃逸,从而使肿瘤快速进展。此外 ZHOU 等^[15]也发现类似的结论,肝癌细胞通过外泌体将 miRNA-21 传递于肝星状细胞作用于抑癌基因 PTEN,从而激活 PDK1/AKT 信号通路使肝星状细胞活化为肿瘤相关成纤维细胞(CAFs),活化的 CAFs 进一步分泌促血

管生成相关细胞因子包括血管内皮生长因子(VEGF)、MMP2、MMP9 等,从而募集更血管生成,促进肝癌的进展。WANG 等^[8]通过试验发现,肝癌中肿瘤相关巨噬细胞来源的外泌体含有较低水平的 miR-125a/b,而 miR-125a/b 具有通过靶向 CD90 来抑制肝癌干细胞增殖的作用。YE 等^[16]学者发现,肝癌来源的外泌体具有高迁移率族蛋白 B1,位于肿瘤微环境的 B 淋巴细胞摄取这些 TEV 后表型转换为一种有别于经典调节型 B 细胞的表型,并分泌抗炎细胞因子 IL-10 以削弱 CD8⁺ 的 T 淋巴细胞的细胞毒性,从而协助肝癌细胞免疫逃逸。此外,LIU 等^[17]发现,内质网应激会促进肝癌细胞释放富含 miRNA-23a-3p 的外泌体,通过抑制 PTEN 通路和激活 AKT 通路来上调巨噬细胞中 PD-L1 的表达从而抑制 T 细胞从而介导免疫逃逸。这些机制在肝癌治疗中具有广阔的应用前景。

4 外泌体介导肝癌转移

最近有研究发现,已成功黏附的肝癌细胞转移灶能释放包含有 SMAD3 蛋白和其 mRNA 的外泌体,这些外泌体可被循环中未黏附的游离肝癌细胞摄取,并激活 SMAD3/ROS 信号通路,从而使它们的黏附分子的表达上调从而促进黏附以及转移灶的形成^[18]。学者最近发现,高转移性的肝癌细胞可以通过分泌含有 miRNA-1247-3P 的外泌体,作用于成纤维细胞,通过 β 1-integrin-NF- κ B 信号转导通路将成纤维细胞转化为 CAFs,而活化的 CAFs 通过分泌大量促炎细胞因子如 IL-6 及 IL-8 加重肝硬化的程度以及促进肝癌转移^[19]。WANG 等^[20]通过对比无转移性(HepG2)、低转移性(97L)及高转移性(LM3)的 3 种肝癌细胞株所衍生的外泌体,并对其包含的 circRNA 进行测序,从而发现了 circPTGR1 这一具有 3 种亚型的 circRNA,具有高转移潜能的肝癌细胞株能通过分泌含有 circPTGR1 的外泌体,外泌体被肝癌细胞摄取后, circPTGR1 与 MET 竞争靶向 miR-449a,从而赋予低转移以及无转移潜能的肝癌细胞株更强大的侵袭转移能力。同时该课题组发现肝癌患者 circPTGR1 高表达与预后不良相关。FANG 等^[21]研究发现,那些高转移性肝癌分泌的外泌体包含较多的 miR-21p,这些外泌体被上皮细胞摄取后下调了多种连接蛋白的表达,增加了血管通透性从而利于肝癌转移。除此之外这些外泌体降低了肝癌连环蛋白(P120)的表达从而提高了肝癌的转移性。有学者发现,在胰腺导管腺癌细胞中,肿瘤源的外泌体可招募骨髓源性的巨噬细胞分别形成肝转移前环境,促进肿瘤转移^[22]。但肝癌外泌体是否能促成肿瘤转移前微环境,有待进一步深入研究与探索。

5 外泌体在肝癌治疗中的前景

曾经有学者利用外泌体包含大量肿瘤相关相关

抗原 (TAAs) 的特性来研制新型免疫疗法, RAO 等^[23]发现肝癌细胞来源的外泌体在体内体外都引起了比细胞裂解物更强的免疫反应, 他们进一步利用肿瘤来源的外泌体激活的树突状细胞治疗患有肝癌的小鼠, 该疗法显著改善了肝癌的肿瘤微环境: T 淋巴细胞数量和 γ -干扰素的水平上升, IL-10 与肿瘤生长因子 β 水平降低, 最终该疗法显著抑制了小鼠的肝癌, 延长了小鼠的生存期。但最近有研究得出了较为有争议的结论: 发现胰腺导管癌细胞就可以通过外泌体呈递大量 TAAs 来中和针对肿瘤的自身抗体, 从而逃避补体介导的细胞毒性^[24]。这也提示阻止包含 TAAs 的外泌体的形成或分泌可能有助于增强免疫疗法的疗效。之前也有学者发现, 人干肝细胞来源的外泌体包含多种抑癌蛋白质与 mRNA, 他们使用这些外泌体治疗小鼠肝癌取得了一定成果^[25]。此外有学者关注了肝星状细胞与肝癌细胞之间的细胞间交流, 他们还改造了肝星状细胞源的外泌体使其包含 miR-335-5p, 并进一步证实这些外泌体可以被小鼠肝癌细胞摄取并引起多种 mRNA 表达量的下调, 使肝癌侵袭性降低, 肝癌细胞再生减少和凋亡增加, 最终成功使小鼠的肝癌缩小及小鼠的生存期延长, 从而开辟出一种新型的肝癌新治疗策略^[26]。ORTIZ 等^[27]研究发现, 黑色素瘤来源的外泌体可以下调 I 型干扰素 (IFN) 受体和 IFN 诱导型胆固醇 25-羟化酶的表达从而改造转移前微生态来促进其转移。该研究小组还发现, 经典降压药物利血平能够通过破坏脂质膜的融合过程来抑制健康细胞对肿瘤分泌的外泌体的摄取。在动物实验中, 手术前后使用利血平处理后的小鼠生存期较只进行手术的小鼠生存期大幅延长, 其肺转移也几乎被彻底避免。另外有学者发现经典抗菌药物磺胺是内皮素受体 A 的阻断剂, 通过阻断内皮素受体 A 可以抑制肿瘤细胞分泌外泌体, 通过解除外泌体促进肿瘤细胞进展转移的作用, 极大程度上消除了实验动物中发生的肺转移, 显著延长了实验动物的存活时间^[28]。这些研究提出了抑制健康细胞摄取肿瘤来源的外泌体来阻止肿瘤进展转移的新思路。

上述研究均表明, 外泌体作为一种独特的载体, 在肝癌发生、进展、转移过程中发挥了极其重要的作用。这为肝癌诊断与治疗新方法的开发提供了新的思路。

6 小 结

肝癌在全球范围内仍然在严重威胁着人类的生命健康, 如何延长晚期肝癌的生存期仍然是世界难题。临床常用的体液样本如血浆、尿液都分布着大量外泌体, 此外有研究提示肿瘤患者血浆中的外泌体数量更多。值得注意的是, 虽然有近几年外泌体的研究越发火热, 但基本上都取材于细胞培养液中的外泌体进行研究, 直接在患者体液中提取外泌体进行的较

少, 以及大部分外泌体及其信号通路研究目前都只处于早期阶段, 很多研究还仅限于细胞实验, 其研究结果有待在动物模型中进一步验证。相信随着外泌体相关研究的深入, 临床上运用外泌体治疗肝癌只是时间问题。

参考文献

- [1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018; GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424.
- [2] 张磊, 陈亚进. 2018 年《欧洲肝脏研究学会临床实践指南: 肝细胞癌管理》解读 [J]. 中国实用外科杂志, 2018, 38(9): 1021-1026.
- [3] LEE W C, LEE C F, CHENG C H, et al. Outcomes of liver resection for hepatocellular carcinoma in liver transplantation era [J]. Eur J Surg Oncol, 2015, 41(9): 1144-1152.
- [4] JOHNSTONE R M, ADAM M, HAMMOND J R, et al. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes) [J]. J Biol Chem, 1987, 262(19): 9412-9420.
- [5] VALADI H, EKSTRÖM 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.
- [6] MATHIEU M, MARTIN-JAULAR L, LAVIEU G, et al. Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication [J]. Nat Cell Biol, 2019, 21(1): 9-17.
- [7] XU R, RAI A, CHEN M, et al. Extracellular vesicles in cancer - implications for future improvements in cancer care [J]. Nat Rev Clin Oncol, 2018, 15(10): 617-638.
- [8] WANG S, XU M, LI X, et al. Exosomes released by hepatocarcinoma cells endow adipocytes with tumor-promoting properties [J]. J Hematol Oncol, 2018, 11(1): 82.
- [9] HE M, QIN H, POON T C, et al. Hepatocellular carcinoma-derived exosomes promote motility of immortalized hepatocyte through transfer of oncogenic proteins and RNAs [J]. Carcinogenesis, 2015, 36(9): 1008-1018.
- [10] MELO S A, SUGIMOTO H, O'CONNELL J T, et al. Cancer exosomes perform cell-independent microRNA biogenesis and promote tumorigenesis [J]. Cancer Cell, 2014, 26(5): 707-721.
- [11] ZHANG H, DENG T, GE S, et al. Exosome circRNA secreted from adipocytes promotes the growth of hepatocellular carcinoma by targeting deubiquitination-related USP7 [J]. Oncogene, 2018, 38: 2844-2859.
- [12] PAN J H, ZHOU H, ZHAO X X, et al. Role of exosomes and exosomal microRNAs in hepatocellular carcinoma: Potential in diagnosis and antitumour treatments (Review) [J]. Int J Mol Med, 2018, 41(4): 1809-1816.

- [13] HUI L, CHEN Y. Tumor microenvironment: Sanctuary of the devil[J]. *Cancer Lett*, 2015, 368(1): 7-13.
- [14] LI X, LEI Y, WU M, et al. Regulation of Macrophage Activation and Polarization by HCC-Derived Exosomal lncRNA TUC339[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(10): 102958.
- [15] ZHOU Y, REN H, DAI B, et al. Hepatocellular carcinoma-derived exosomal miRNA-21 contributes to tumor progression by converting hepatocyte stellate cells to cancer-associated fibroblasts[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37(1): 324.
- [16] YE L, ZHANG Q, CHENG Y, et al. Tumor-derived exosomal HMGB1 fosters hepatocellular carcinoma immune evasion by promoting TIM-1 + regulatory B cell expansion[J]. *J Immunother Cancer*, 2018, 6(1): 145.
- [17] LIU J, FAN L, YU H, et al. Endoplasmic reticulum stress promotes liver cancer cells to release exosomal miR-23a-3p and up-regulate PD-L1 expression in macrophages[J]. *Hepatology*, 2019, 70(1): 241-258.
- [18] FU Q, ZHANG Q, LOU Y, et al. Primary tumor-derived exosomes facilitate metastasis by regulating adhesion of circulating tumor cells via SMAD3 in liver cancer[J]. *Oncogene*, 2018, 37(47): 6105-6118.
- [19] FANG T, LV H, LV G, et al. Tumor-derived exosomal miR-1247-3p induces cancer-associated fibroblast activation to foster lung metastasis of liver cancer[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 191.
- [20] WANG G, LIU W, ZOU Y, et al. Three isoforms of exosomal circPTGR1 promote hepatocellular carcinoma metastasis via the miR449a-MET pathway[J]. *EBioMedicine*, 2019, 40: 432-445.
- [21] FANG J H, ZHANG Z J, SHANG L R, et al. Hepatoma cell-secreted exosomal microRNA-103 increases vascular permeability and promotes metastasis by targeting junction proteins[J]. *Hepatology*, 2018, 68(4): 1459-1475.
- [22] COSTA-SILVA B, AIELLO N M, OCEAN A J, et al. Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver[J]. *Nat Cell Biol*, 2015, 17(6): 816-826.
- [23] RAO Q, ZUO B, LU Z, et al. Tumor-derived exosomes elicit tumor suppression in murine hepatocellular carcinoma models and humans in vitro[J]. *Hepatology*, 2016, 64(2): 456-472.
- [24] CAPELLO M, VYKOUKAL J V, KATAYAMA H, et al. Exosomes harbor B cell targets in pancreatic adenocarcinoma and exert decoy function against complement-mediated cytotoxicity[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 254.
- [25] FONSATO V, COLLINO F, HERRERA M B, et al. Human liver stem cell-derived microvesicles inhibit hepatoma growth in SCID mice by delivering antitumor microRNAs[J]. *Stem Cells*, 2012, 30(9): 1985-1998.
- [26] CHENG Q, SHI X, HAN M, et al. Reprogramming Exosomes as Nanoscale Controllers of Cellular Immunity[J]. *J Am Chem Soc*, 2018, 140(48): 16413-16417.
- [27] ORTIZ A, GUI J, ZAHEDI F, et al. An Interferon-Driven Oxysterol-Based Defense against Tumor-Derived Extracellular Vesicles[J]. *Cancer Cell*, 2019, 35(1): 33-45.
- [28] IM E J, LEE C H, MOON P G, et al. Sulfisoxazole inhibits the secretion of small extracellular vesicles by targeting the endothelin receptor A[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 1387.

(收稿日期: 2019-02-14 修回日期: 2019-05-13)

(上接第 2496 页)

- [4] 杨旭辉, 莫国柱, 梁嘉颖, 等. 抗苗勒氏激素、年龄、窦卵泡、雌二醇和促卵泡刺激素预测卵巢反应及 IVF 结局的临床研究[J]. *广东药学院学报*, 2016, 32(5): 647-653.
- [5] 柯嘉敏, 夏薇, 苏宁, 等. 卵巢反应性指标的临床研究进展[J]. *国际生殖健康/计划生育杂志*, 2018, 37(1): 62-65.
- [6] WEENEN C, LAVEN J S, VON BERGH A R, et al. Anti-Müllerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment[J]. *Mol Hum Reprod*, 2004, 10(2): 77-83.
- [7] 谭嘉琦, 陈晓莉, 李予, 等. 抗苗勒管激素预测卵巢反应性的价值研究[J]. *实用妇产科杂志*, 2015, 31(8): 583-587.
- [8] NELSON S M, XIEIN B M, ARCE J C. Comparison of anti Müllerian hormone levels and antral follicle count as predictor of ovarian response to controlled ovarian stimulation in good-prognosis patients at individual fertility clinics in two multicenter trials[J]. *Fertil Steril*, 2015, 103: 923-930.
- [9] LA MARCA A, SUNKARA S K. Individualization of controlled ovarian stimulation in IVF using ovarian reserve, e markers: from theory to practice[J]. *Hum Reprod update*, 2014, 20: 124.
- [10] 刘寒艳, 靳秀云, 刘见桥, 等. 增加启动剂量对年龄相关的卵巢反应性以及临床结局的影响[J]. *广东医学*, 2017, 38(2): 291-295.
- [11] 杨硕, 何艺磊, 梁靓, 等. 促性腺激素释放激素激动剂联合低剂量人绒毛膜促性腺激素扳机在高反应患者体外受精治疗中的应用[J]. *中华生殖与避孕杂志*, 2018, 38(3): 181-185.

(收稿日期: 2019-02-16 修回日期: 2019-05-13)