

· 综 述 ·

外泌体在膀胱癌中的研究前景

周万明 综述, 鲁雄兵 校审

(南昌大学第二附属医院泌尿外科, 江西南昌 330006)

摘要:外泌体(exosomes)是由细胞主动分泌、直径约为 40~100 nm 的脂质双分子层结构囊泡。外泌体通过直接膜融合、受体-配体间作用和内吞/吞噬作用 3 种方式将携带的信号从外泌体转移到受体细胞并发挥其广泛的生物学作用。膀胱癌是泌尿系统最常见的肿瘤之一,外泌体在膀胱癌的发生、生长和转移等过程具有调控作用,外泌体携带的许多分子都有成为膀胱癌诊断标志物的潜力。本综述旨在介绍外泌体的生物学特征以及外泌体在膀胱癌的诊断、治疗方面的研究前景。

关键词:外泌体;膀胱癌;诊断标志物;治疗;综述

中图分类号:R737

文献标志码:R

DOI:10.3969/j.issn.1009-8291.2019.09.020

外泌体是由细胞主动脱落释放的直径在 40~100 nm 的囊泡小体^[1],其膜由双层磷脂分子层构成。人体内多种细胞都可分泌外泌体,包括血小板、内皮细胞、肥大细胞、树突细胞、成纤维细胞、间充质干细胞和肿瘤细胞^[2]等,但不同的细胞分泌的外泌体亚型有区别。在大多数体液及细胞培养液中均可检测到外泌体。最新研究表明外泌体参与细胞间通讯,在肿瘤的发生发展以及转移上发挥了重要作用。

膀胱癌是指发生在膀胱黏膜上的恶性肿瘤,是我国泌尿系统最常见的癌症之一,也是西方最常见的八种癌症之一,其中移行细胞癌(占 90%)发病率仅次于前列腺癌。外泌体参与了膀胱癌的发生发展以及转移,携带的货物有助于疾病的诊断、分期以及预后的监测。

1 外泌体的生化特征

外泌体的主要分泌机制有两种:依赖高尔基体的连续分泌和诱导分泌。不同亚型的外泌体释放机制可能不同,携带的货物成份也不同^[3]。外泌体膜上及膜内富集了大量的蛋白,比如膜转运和膜融合蛋白(如 GTPases、Annexins 和 Flotillin)、多囊泡体合成所需的蛋白质(如肿瘤易感基因 101)、四跨膜蛋白(如 CD9、CD63、CD81)、凋亡连接基因 2 相互作用蛋白 X(apoptosis-linked gene2-interacting protein X, ALIX)、热休克蛋白(heat shock proteins, 如 HSP70、HSP90)^[2]等。外泌体内携带许多核酸分子,如 miRNA、非编码的 RNA 及 mRNA 等^[4]。另外也携带了来源细胞相似的细胞因子、生长因子等蛋白质。

收稿日期:2018-05-04

修回日期:2018-10-29

基金项目:江西省自然科学基金(No. 20142BAB205008);江西省自然科学基金(No. 20161BAB205258)

通信作者:鲁雄兵,主任医师,副教授,硕士研究生导师。

E-mail:luxiongbing@yahoo.com

作者简介:周万明(1991-),男(汉族),在读硕士研究生,主要从事膀胱癌方向研究。E-mail:mrzhouwm@163.com

外泌体的分离方法尚未统一,包括蔗糖梯度离心、差异超速离心、过滤离心、免疫亲和捕获技术、层析技术、微流控芯片技术以及 PEG 聚合物沉淀^[2]等,这些技术适当的组合可能效果会更好,目前也有较多基于以上原理的商业试剂盒。黄金标准方法是差异超速离心^[5]。蔗糖梯度离心法得到的外泌体纯度高,但前期准备耗时、提取过程非常耗时且产量少。外泌体短期储存(1~2 d 内)置于 4 °C 即可,长期保存则应放置于-80 °C^[6]。

外泌体的鉴定依赖于形态学观察和蛋白质组成分析。在电镜下观察外泌体的形态,可见杯状、或为扁平球囊体^[7],也可用纳米颗粒追踪(nanoparticle tracking analysis, NTA)对其直径大小进行测量;蛋白组成分析常用 Western blot 技术检测外泌体富集的蛋白质表达水平^[8],如常选择检测 CD63 和 CD81。

2 外泌体与肿瘤

外泌体最早被发现参与抗原呈递和免疫激活与抑制^[9]。肥大细胞通过释放的外泌体将其内的 mRNA、miRNA 转运到受体细胞,并在受体细胞内翻译出了蛋白质,因此证明外泌体具有转运物质的功能。外泌体的脂质双层膜降低了外泌体被蛋白酶及核糖核酸酶的降解,通过自分泌、旁分泌、内分泌等分泌途径从细胞膜上脱落下来,膜内携带蛋白质、核酸等信号分子,通过受体-配体相互作用、直接膜融合、内吞作用(或吞噬作用)3 种途径将信号从外泌体转移到受体细胞^[2],参与细胞间通讯、血管新生、免疫反应和肿瘤生长等生理和病理过程^[10]。外泌体参与了肿瘤微环境的组成,促进可溶性蛋白质、核酸、功能性跨膜蛋白、趋化因子受体、表皮生长因子受体等来介导的肿瘤发生、生长、肿瘤血管生长、肿瘤转移^[11]、肿瘤免疫逃逸^[9]、肿瘤微环境的形成^[12]等。

肿瘤细胞会释放外泌体,其携带的信号分子特征

可以反应肿瘤细胞表型,比如肿瘤特异性抗原蛋白和RNA,它们具有很大的潜能作为肿瘤诊断的标志物^[13]。THERY等^[9]的研究表明外泌体在B淋巴细胞和树突状细胞中具有免疫调节作用和抗肿瘤作用,同时肿瘤细胞可以通过分泌外泌体来排出抗肿瘤的药物而导致肿瘤的多重耐药性。CLAYTON等^[14]的研究发现膀胱癌、前列腺癌、直肠癌等癌细胞分泌的外泌体中含有CD39和CD73,它们可以减少腺苷的产生和阻止T细胞的活化来逃避免疫系统的监视。

外泌体与肿瘤息息相关,参与肿瘤的形成、转移、耐药、逃避免疫监视,同时也可以协助诊断与治疗等。

3 外泌体与膀胱癌的研究

3.1 膀胱癌来源的外泌体促进肿瘤生长和转移

SAMANT等^[15]发现前列腺癌、膀胱癌以及乳腺癌细胞分泌的外泌体含有转移生长因子 β (transforming growth factor β , TGF- β),作用于受体细胞成纤维细胞,可以减少肌成纤维细胞活化、促进肿瘤的血管再生和肿瘤生长。BERNARD等^[16]研究发现,膀胱癌细胞衍生的外泌体含有转移生长因子 β (transforming growth factor β , TGF- β),通过外泌体介导的TGF- β 转移和SMAD途径激活触发成纤维细胞分化成癌相关成纤维细胞(cancer-associated fibroblasts, CAF)。OSTENFELD等^[17]的研究显示膀胱癌细胞分泌的miRNA-23b可以使癌细胞获得转移

潜能。FRANZEN等^[18]证明膀胱癌细胞来源的外泌体可以在靶细胞内触发上皮间质转化,这一过程与表型的改变导致癌细胞的迁移、侵袭和转移。此外,体外实验已经证明,膀胱癌细胞产生的外泌体上调Bcl-2和Cyclin-D1抑制癌细胞凋亡,激活膀胱癌细胞中的Akt和ERK通路促进膀胱癌细胞的增殖^[19]。CARLA等^[20]证实膀胱癌患者尿液来源的外泌体中含有上皮生长因子样重复盘状结构I样域蛋白3[epidermal Growth Factor (EGF)-Like Repeats and Discoidin I-Like Domains 3, EDIL-3], EDIL-3可以促进膀胱癌细胞和内皮细胞的血管生成和迁移,当实验沉默EDIL-3后,其外泌体未能促进血管生成以及尿道上皮和内皮细胞迁移。此外,从高级别膀胱癌患者的尿中纯化的外泌体中EDIL-3比健康对照组的表达水平更高,因此EDIL-3/DeL1蛋白可能可以用于评估膀胱癌的分级。长链非编码RNA的表达与膀胱癌疾病进展相关,BERRONDO等^[21]通过富集膀胱癌患者尿液外泌体中的长链非编码RNA HOTAIR,证实HOTAIR在膀胱癌细胞系中的敲低减少了膀胱癌细胞体外迁移和侵袭力。重要的是,膀胱癌细胞系中HOTAIR表达的缺失会改变包括上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)基因的表达(如:SNAI1、ZEB1、ZO1、MMP1、LAMB3和LAMC2等),上皮-间质转化与癌症的形成密切相关。如图1示。

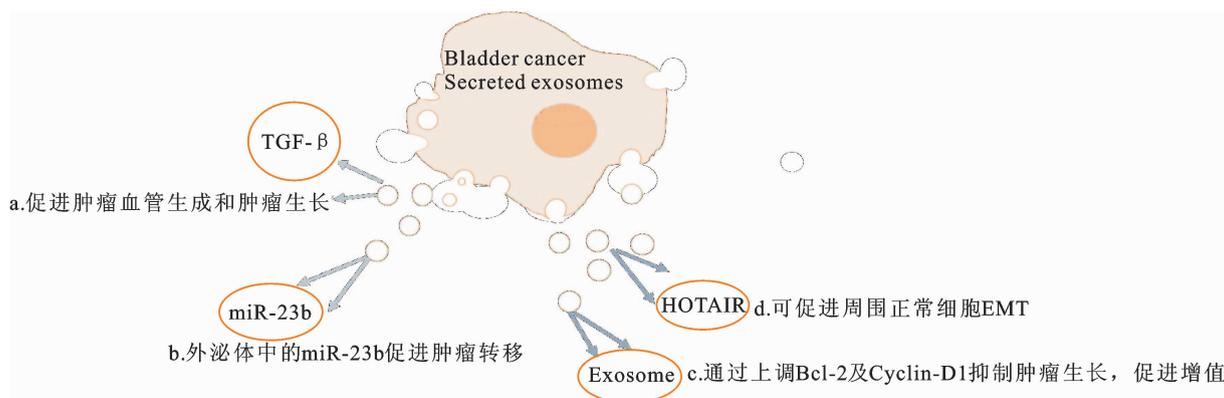


图1 膀胱癌细胞来源的外泌体促进肿瘤生长及转移

a:外泌体中含TGF- β 促进肿瘤血管生成和肿瘤生长^[15];b:外泌体中的miR-23b促进肿瘤转移^[17];c:癌细胞来源外泌体通过上调Bcl-2及Cyclin-D1抑制肿瘤生长,促进增值^[19];d:癌细胞系中长链非编码RNA HOTAIR表达的缺失或改变会改变包括上皮-间质转化(EMT)基因的表达^[21]。

3.2 外泌体具有成为膀胱癌诊断标志物的潜能 膀胱癌临床主要诊断和监测工具是尿细胞学检测和膀胱镜检查,但是尿细胞学检测敏感性欠佳,尤其是低度恶性肿瘤;膀胱镜检查是目前的“金标准”,属于侵入性检查。然而,据报道使用膀胱镜并不能全部检出乳头状肿瘤(Ta和T1)以及高度的CIS病变^[22]。因此临床上急需探寻一种非侵入性且特异性和敏感性

高的检查方法。

尿液来源的外泌体越来越多地被研究,因其有以下优点:可以通过非侵入性的方法从尿液中提取;尿路上皮细胞与尿液之间的接触为外泌体分泌到尿液中提供了充足的条件,并且不同部位的上皮细胞分泌的外泌体,其膜上的蛋白质和脂质分子组成及含量不同,可通过外泌体膜的特征来分离膀胱来源的外泌

体;外泌体是纳米级颗粒,不能透过肾脏的滤过膜,所以尿液相对于血液减少了其他系统的干扰。这些特征使得外泌体很有可能成为肾、膀胱、尿道和前列腺等泌尿系统疾病诊断的潜在标志物^[23]。

膀胱癌外泌体的蛋白质组学研究显示,从3例膀胱移行细胞癌患者尿液中分离的外泌体,其中CD36、CD44、CD73、滋养层糖蛋白(5T4)的表达与健康组有明显的差别。PEREZ等^[24]发现尿液来源外泌体中的RNA可以作为稳定的生物标志物,且人源性长寿保障基因2和黏液糖化蛋白酶1可以作为膀胱癌的诊断标志物。BAUMGART等^[25]发现尿

液来源的肌层浸润性膀胱癌外泌体与非肌层浸润性膀胱癌外泌体中miRNA表达有差异,有助于鉴别诊断,但是仍然没有单独的一个指标可用于临床^[26]。未来有望发现更可靠的指标尽早用于临床。

3.3 外泌体可用于膀胱癌的治疗 无论如今的多学科治疗如何努力,膀胱癌的高复发率仍是目前治疗最大的障碍,外泌体介导的信号转导在癌症进展中的重要作用使得外泌体成为潜在的新型治疗靶点,其重点集中于抑制肿瘤细胞通讯网络的关键组分。外泌体有望在膀胱癌患者的治疗中发挥重要作用,有助于早期诊断和监测,也可提供准确的预测标志物。如图2所示。

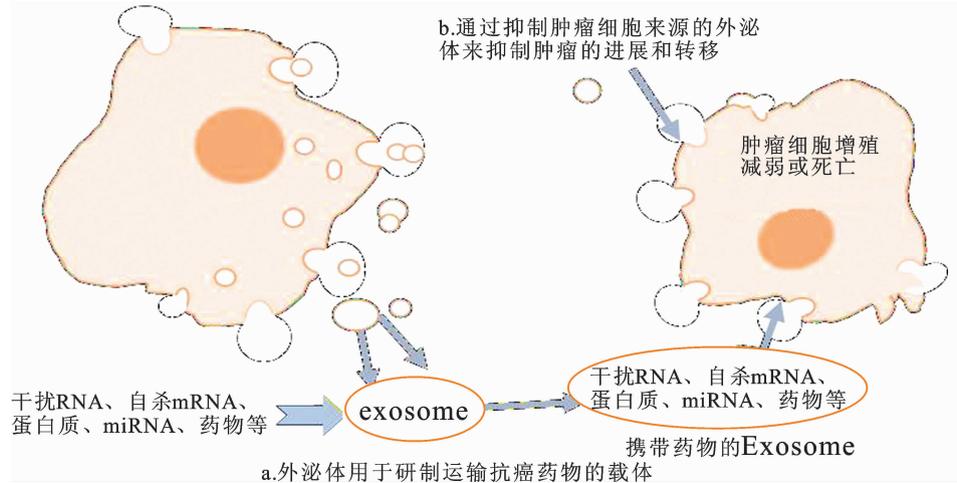


图2 两种利用外泌体治疗膀胱癌的潜在策略

a:外泌体用于研制运输抗癌药物的载体,利用肿瘤来源的外泌体携带抑制肿瘤细胞增殖或转移的药物靶向输送至肿瘤细胞发挥抗肿瘤作用;b:通过抑制肿瘤细胞来源的外泌体来抑制肿瘤的进展和转移^[27];抑制外泌体合成或释放,利用抗原抗体反应特异性去除循环中的肿瘤外泌体,阻断肿瘤外泌体与细胞的识别。

3.3.1 外泌体用于研制运输抗癌药物的载体 外泌体的脂质双分子层膜可以保护膜内核酸及蛋白质不被降解,同时膜上具有识别分子,外泌体可以很好地成为靶向运输药物的载体。它可精准运输干扰RNA、自杀mRNA、蛋白质、miRNA、药物等。尽管外泌体具有巨大的治疗潜力,但是该领域仍需要新的体内模型和强大的成像系统来追踪单个细胞外泌体的合成、释放、运输和发挥作用的途径。

3.3.2 通过抑制肿瘤细胞来源的外泌体来抑制肿瘤的进展和转移 外泌体参与了肿瘤微环境的构成、肿瘤细胞间信号转导。诱导或干扰外泌体的信号转导作用即可抑制肿瘤的发生与发展,目前有几种潜在策略^[27]:①通过干涉参与外泌体形成的途径组分(如ESCRT,神经酰胺)或释放(如Rab27、ARF6、RhoA)而抑制外泌体的生物发生或释放;②通过体外血液滤过从循环中去除外泌体;③通过阻断参与外泌体结合或内化的外泌体配体(如四跨膜蛋白)或细胞表面受体(如HSPG)来抑制受体细胞对外泌体的摄取。YANG等^[28]的研究提示抑制膀胱癌来源的外泌体

的分泌和释放,可能为膀胱癌的治疗提供新的策略。在敲低Rab27 siRNA的膀胱癌细胞,引起肿瘤抑制剂miR-23b在外泌体中表达降低,在细胞内表达增加,减弱细胞侵袭性,该效应被miR-23b抑制逆转。MARLEAU等^[29]的研究显示在人表皮生长因子受体2(HER-2)过表达的乳腺癌患者中,使用抗HER-2抗体从循环中去除表达HER-2的外泌体可以改善乳腺癌的治疗结果。FRANZEN等^[30]的研究证实了在SW780膀胱癌细胞通过硫酸乙酰肝素蛋白多糖(HSPGs)受体介导内吞膀胱癌来源的外泌体,用肝素可部分抑制内吞作用的发生。HSPGs介导的这种摄取途径似乎对外泌体的功能很重要,用肝素竞争性抑制靶细胞对外泌体的摄取,显著抑制外泌体诱导的靶细胞迁移^[31]。以上三项研究证明利用几种潜在策略干扰外泌体来治疗癌症是可行的。

4 展望

越来越多的研究显示外泌体在生理及病理过程中扮演着非常重要的角色。希望未来能够统一外泌

体分离与表征的方法,有望从血液或尿液来源的外泌体中找到膀胱癌的诊断标志物和监测预后的指标。肿瘤细胞释放和分泌外泌体的机制以及影响膀胱癌发生与发展的机制还需进一步阐明,从而找到精准的抑制外泌体在膀胱癌发生发展中的促进作用,却不影响正常细胞功能的治疗方法。

参考文献:

- [1] VAN NIEL G, D'ANGELO G, RAPOSO G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018, 19(4): 213-228.
- [2] HE C, ZHENG S, LUO Y, et al. Exosome theranostics; Biology and translational medicine[J]. *Theranostics*, 2018, 8(1): 237-255.
- [3] COLOMBO M, MOITA C, VAN NIEL G, et al. Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles[J]. *Journal of Cell Science*, 2013, 126(24): 5553-5565.
- [4] VLASSOV A V, MAGDALENO S, SETTERQUIST R, et al. Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials[J]. *Biochimica et biophysica acta*, 2012, 1820(7): 940-948.
- [5] AL-NEDAWI K, READ J. Analysis of extracellular vesicles in the tumor microenvironment[J]. *Methods Mol Biol*, 2016, 1458: 195-202.
- [6] MAROTO R, ZHAO Y, JAMALUDDIN M, et al. Effects of storage temperature on airway exosome integrity for diagnostic and functional analyses [J]. *J Extracell Vesicles*, 2017, 6(1): 1359478.
- [7] COUMANS F A W, BRISSON A R, BUZAS E I, et al. Methodological guidelines to study extracellular vesicles[J]. *Circ Res*, 2017, 120(10): 1632-1648.
- [8] ZHANG W, NI M, SU Y, et al. MicroRNAs in Serum exosomes as potential biomarkers in clear-cell renal cell carcinoma[J]. *Eur Urol Focus*, 2018, 4(3): 412-419.
- [9] THERY C, OSTROWSKI M, SEGURA E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses[J]. *Nat Rev Immunol*, 2009, 9(8): 581-593.
- [10] SIMONS M, RAPOSO G. Exosomes-vesicular carriers for intercellular communication[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2009, 21(4): 575-581.
- [11] RANA S, MALINOWSKA K, ZÖLLER M. Exosomal tumor microRNA modulates premetastatic organ cells [J]. *Neoplasia*, 2013, 15(3): 281-231.
- [12] MURALIDHARAN-CHARI V, CLANCY J W, SEDGWICK A, et al. Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression[J]. *J Cell Sci*, 2010, 123(Pt 10): 1603-1611.
- [13] ZHANG X, YUAN X, SHI H, et al. Exosomes in cancer: small particle, big player[J]. *J Hematol Oncol*, 2015, 8(1): 83.
- [14] CLAYTON A, AL-TAEI S, WEBBER J, et al. Cancer exosomes express CD39 and CD73, which suppress T cells through adenosine production[J]. *J Immunol*, 2011, 187(2): 676-683.
- [15] SAMANT R, GU J, QIAN H, et al. Gastric cancer exosomes trigger differentiation of umbilical cord derived mesenchymal stem cells to carcinoma-associated fibroblasts through TGF- β /Smad pathway[J]. *PLoS ONE*, 2012, 7(12): e52465.
- [16] RINGUETTE GOULET C, BERNARD G, TREMBLAY S, et al. Exosomes induce fibroblast differentiation into cancer-associated fibroblasts through TGF- β Signaling[J]. *Molecular cancer research*; MCR, 2018, 16(7): 1196-204.
- [17] OSTENFELD M S, JEPPESEN D K, LAURBERG J R, et al. Cellular disposal of mir23b by RAB27-dependent exosome release is linked to acquisition of metastatic properties[J]. *Cancer Res*, 2014, 74(20): 5758-5771.
- [18] FRANZEN C A, BLACKWELL R H, TODOROVIC V, et al. Urothelial cells undergo epithelial-to-mesenchymal transition after exposure to muscle invasive bladder cancer exosomes[J]. *Oncogenesis*, 2015, 4(8): e163.
- [19] YANG L, WU X, WANG D, et al. Bladder cancer cell-derived exosomes inhibit tumor cell apoptosis and induce cell proliferation in vitro[J]. *Mol Med Rep*, 2013, 8(4): 1272-1278.
- [20] BECKHAM C J, OLSEN J, YIN P N, et al. Bladder cancer exosomes contain EDIL-3/Dell and facilitate cancer progression[J]. *J Urol*, 2014, 192(2): 583-592.
- [21] BERRONDO C, FLAX J, KUCHEROV V, et al. Expression of the long non-coding rna hotair correlates with disease progression in bladder cancer and is contained in bladder cancer patient urinary exosomes[J]. *PLoS One*, 2016, 11(1): e0147236
- [22] GROSSMAN H B, GOMELLA L, FRADET Y, et al. A phase III, multicenter comparison of hexaminolevulinate fluorescence cystoscopy and white light cystoscopy for the detection of superficial papillary lesions in patients with bladder cancer[J]. *J Urol*, 2007, 178(1): 62-67.
- [23] WELTON JL, KHANNA S, GILES PJ, et al. Proteomics analysis of bladder cancer exosomes[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2010, 9(6): 1324-1338.
- [24] PEREZ A, LOIZAGA A, ARCEO R, et al. A pilot study on the potential of rna-associated to urinary vesicles as a suitable non-invasive source for diagnostic purposes in bladder cancer [J]. *Cancers (Basel)*, 2014, 6(1): 179-192.
- [25] BAUMGART S, HOLTERS S, OHLMANN C H, et al. Exosomes of invasive urothelial carcinoma cells are characterized by a specific miRNA expression signature [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(35): 58278-58291.
- [26] STREET J M, YUEN P S T, STAR R A. Bioactive exosomes: Possibilities for diagnosis and management of bladder cancer[J]. *J Urol*, 2014, 192(2): 297-298.
- [27] VADER P, BREAKFIELD X O, WOOD M J. Extracellular vesicles: emerging targets for cancer therapy[J]. *Trends Mol Med*, 2014, 20(7): 385-393.
- [28] YANG L, WU X H, WANG D, et al. Bladder cancer cell-derived exosomes inhibit tumor cell apoptosis and induce cell proliferation in vitro[J]. *Mol Med Rep*, 2013, 8(4): 1272-1278.
- [29] MARLEAU A M, CHEN C-S, JOYCE J A, et al. Exosome removal as a therapeutic adjuvant in cancer [J]. *J Transl Med*, 2012, 10(1): 134.
- [30] FRANZEN C A, SIMMS P E, VAN HUIS A F, et al. Characterization of uptake and internalization of exosomes by bladder cancer cells[J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014(3): 619829.
- [31] CHRISTIANSON H C, SVENSSON K J, VAN KUPPEVELT T H, et al. Cancer cell exosomes depend on cell-surface heparan sulfate proteoglycans for their internalization and functional activity [J]. *Proceed Nat Acad Sci USA*, 2013, 110(43): 17380-17385.

(编辑 何宏灵)