

常见恶性脑肿瘤外泌体生物学标志物研究进展

武笑宇 朱靓怡 常青

【摘要】 细胞外囊泡可基于其起源或大小分为凋亡小体、微泡体和外泌体。外泌体是其中最小且最具特征的囊泡,由不同种类细胞分泌释放,包括神经细胞及其起源的肿瘤细胞,在神经系统中发挥重要功能。从血液和脑脊液中提取的外泌体是真核细胞用于交换蛋白质、mRNA 和微小 RNA 等生物学信息的载体,这些生物分子参与细胞信号转导、肿瘤细胞增殖迁移及血管生成。外泌体不仅是一种新的生物学标志物检测方法,更可提供潜在的分子治疗靶点,并且有望成为抗肿瘤药物传递的载体。本文重点介绍外泌体在胶质母细胞瘤和髓母细胞瘤中的研究现状,并对外泌体携带的生物分子在脑肿瘤中作为生物学标志物的作用机制及其在临床治疗中的应用前景进行探讨。

【关键词】 胶质母细胞瘤; 髓母细胞瘤; 外泌体; 生物标记; 肿瘤; 综述

Advances in research on exosome biomarkers in common malignant brain tumors

WU Xiao-yu, ZHU Liang-yi, CHANG Qing

Department of Pathology, School of Basic Medical Science, Peking University Health Science Center; Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China

WU Xiao-yu and ZHU Liang-yi contributed equally to the article

Corresponding author: CHANG Qing (Email: qingchang@bjmu.edu.cn)

【Abstract】 Extracellular vesicles (EVs) can be divided into apoptotic bodies, microvesicles and exosomes based on their origin and size. Exosomes are among the smallest and most characteristic vesicles that can be secreted by different types of cells, including nervous system cells and their originating tumor cells, which perform important functions in the nervous system. Exosomes extracted from blood and cerebrospinal fluid (CSF) are carriers of eukaryotic cells used to exchange biological information such as proteins, mRNA, and microRNA (miRNA). These biomolecules are involved in cell signaling, tumor cell proliferation and migration, and angiogenesis. Exosomes are not only a new biomarker detection method, but also provide potential molecular therapeutic targets, and are expected to become carriers of anti-cancer drug delivery. This review will focus on the current status of exosomes in glioblastoma and medulloblastoma, which is the most common in adults and children, and biomolecules carried by exosomes. The role of biomarkers in brain tumors and their application prospects in clinical treatment are discussed.

【Key words】 Glioblastoma; Medulloblastoma; Exosomes; Biomarkers, tumor; Review

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81972353) and the National Science Foundation of Beijing, China (No. 7192095).

Conflicts of interest: none declared

脑肿瘤是一种在诊断、治疗和监测复发方面都颇具挑战的肿瘤。胶质母细胞瘤是成人最常见的原发性恶性脑肿瘤^[1],具有高复发率、高病死率之特

点。针对胶质母细胞瘤复发的早期监控手段常局限于 MRI 或 CT 等影像学方法,但研究表明,影像学监测技术并不能真实地反映免疫靶向治疗后的免疫应答,头部 MRI 所见病灶对比增强和脑水肿可能被误诊为肿瘤进展,而利用外周血生物学标志物协助判断肿瘤复发并评价治疗反应显得尤为重要^[2]。外泌体(exosome)是由细胞分泌的一种直径在 30~150 nm 的细胞外囊泡(EVs),内含多种生物学信息,包括蛋白质、脂质、DNA、mRNA 和微小 RNA(miRNA)等,这些生物分子参与调控肿瘤细胞之间

doi:10.3969/j.issn.1672-6731.2019.11.006

基金项目:国家自然科学基金资助项目(项目编号:81972353);
北京市自然科学基金资助项目(项目编号:7192095)

作者单位:100191 北京大学医学部基础医学院病理学系 北京大学第三医院病理科

武笑宇与朱靓怡对本文有同等贡献

通讯作者:常青,Email:qingchang@bjmu.edu.cn

的信号转导、增殖、迁移和血管生成等多种生命活动。外泌体在细胞内质网合成并释放到细胞外环境,进入体液循环,因此在血浆、尿液、脑脊液中均可检测到^[3]。由于外泌体易透过血-脑屏障出入中枢神经系统,因此被认为是理想的中枢神经系统分子标志物载体^[4]。由胶质母细胞瘤或髓母细胞瘤等常见恶性脑肿瘤细胞分泌的外泌体通常可以携带生物学标志物进入脑脊液循环,通过脑脊液提取的外泌体可以避免血浆中来自其他脏器的干扰,纯度更高、特异性更强^[5]。本文将重点介绍外泌体在胶质母细胞瘤和髓母细胞瘤表达变化的研究现状,探讨外泌体携带的生物分子作为脑肿瘤生物学标志物的作用机制,以及其在临床诊断与治疗中的应用前景。

一、外泌体基本特性及分离鉴定方法

1. 肿瘤细胞来源的外泌体 虽然机体所有细胞均具有产生外泌体的功能,但肿瘤细胞来源的外泌体(TEX)明显不同于其他细胞来源的外泌体,具有极强的免疫抑制作用^[6],可向受体细胞传递细胞间信号或生物活性物质,从而改变这些细胞的生物学特性,参与肿瘤的发生与发展^[6-8]。由于外泌体的上述特性,肿瘤细胞来源的外泌体作为潜在的临床生物学标志物载体越来越受到研究者的关注。

2. 肿瘤细胞来源的外泌体的分离 从细胞培养上清液和患者血浆等生物液体样本中分离纯化外泌体是研究肿瘤细胞来源的外泌体的重要实验方法,包括超速差速离心、超滤、OptiPrep 密度梯度离心和免疫沉淀(IP)等方法。其中,以超速差速离心的应用最为广泛,可以分离获得大小相对均匀的微囊泡群,是目前公认的分纯化外泌体的“金标准”。然而,通过超速差速离心法纯化血浆外泌体的特异性较低,其密度梯度纯化过程中的差速离心步骤对后续结果的分析具有一定影响。而超滤法则可避免超速差速离心法的上述缺陷,现代超滤装置可以更快、更高产地分离外泌体。免疫沉淀法的优势在于特异性较高,但会在一定程度上改变外泌体的物理性状^[9]。因此,需针对不同的分离目的,选择不同的外泌体分离方法。

3. 外泌体的鉴定方法 目前主要通过囊泡颗粒大小和外泌体膜表面特定蛋白 TSG101、ALIX 或髓鞘蛋白脂质蛋白(PLP)表达水平的测定,了解其生物活性。最新研究表明,可将多种蛋白质联合作为外泌体标志物如 ALIX、TSG101、CD63、CD60、CD9

和 CD81^[10],然后采用质谱分析对外泌体的蛋白质组进行全面筛选,通过荧光显微镜和电子显微镜观察外泌体的大小和形态^[9]。

二、胶质母细胞瘤来源的外泌体相关生物学标志物研究现状

尽管胶质母细胞瘤患者手术切除病灶后辅助放射治疗和药物化疗,但中位生存期仍仅有 14 个月,复发不可避免^[11],因此术后须每 2 个月复查一次 MRI,以监控肿瘤进展^[12]。然而,通过 MRI 区分肿瘤是否真性进展,误诊率接近 20%^[13]。临床亟待一种更好的治疗反应评价体系与 MRI 相结合以判断肿瘤进展和复发情况,而外周血生物学标志物将有助于识别早期肿瘤复发。

1. 外泌体 DNA Garcia-Romero 等^[14]从胶质瘤患者外周血细胞外囊泡分离获得的 DNA 中成功检测到特定的序列变化,如异柠檬酸脱氢酶 1(IDH1) G395A;其后,Vaidya 等^[15]在肿瘤细胞来源的外泌体中发现高表达于胶质母细胞瘤干细胞的 NANOGP8 基因,该基因被认为是肿瘤细胞阳性率最高的潜在生物学标志物。胶质母细胞瘤来源的外泌体可携带肿瘤特征性蛋白标志物,主要包括表皮生长因子受体(EGFR)、EGFRv III 和 IDH1 R132H 等^[2,16]。但目前最受关注的胶质母细胞瘤来源的外泌体相关蛋白为热休克蛋白(HSP),该蛋白具有促进细胞外基质(ECM)降解的作用,其高表达与肿瘤细胞侵袭、迁移、预后不良及耐药性呈正相关^[17],同时可以通过刺激细胞增殖和抑制细胞死亡途径促进肿瘤生长^[18-19]。在治疗方面,研究显示,抑制热休克蛋白的表达可使胶质母细胞瘤细胞外基质和上皮间质转化(EMT)标志物表达下调,而肿瘤细胞对化疗药物和放射线照射的敏感性增加,据此推断,热休克蛋白抑制剂用于治疗胶质瘤可能具有一定的应用前景。Caruso Bavisotto 等^[20]认为,含有热休克蛋白的外泌体可用于胶质母细胞瘤的诊断、治疗和预后,并有望成为潜在的抗肿瘤疫苗或用于靶向肿瘤细胞的治疗载体。亦有研究发现,胶质母细胞瘤来源的异种移植瘤细胞外泌体 DN3 和 P65 蛋白及其 RNA 表达上调,而 P53 表达下调,提示上述蛋白质有可能成为监测胶质母细胞瘤患者药物化疗效果的生物学标志物^[21]。根据已经公布的研究结果,共有 14 种胶质母细胞瘤生成的细胞外囊泡蛋白(如 PSMD2、ACTR3、APP、ANXA1、CALR、CTSD、IGF2R、ECM1、GAPDH、IPO5、ITGB1、MVP、PSAP 和

PDCD6IP)与肿瘤细胞侵袭性呈显著正相关,而另一些蛋白质(如PDCD6IP和ACTR3)则与负责调控肿瘤细胞侵袭性的分子[例如肌动蛋白调控复合物Arp2/3和Wiskott-Aldrich综合征蛋白(WASP)等]相互作用,调控侵袭性伪足(invadopodia)的形成。由于侵袭性伪足是外泌体分泌的部位,高水平的PDCD6IP和ACTR3可以使肿瘤细胞产生更多的外泌体^[22]。Huang等^[23]发现,源于血清的外泌体RNA聚合酶1和转录释放因子(PTRF)高表达是肿瘤病理分级的危险因素($HR=5.840, P<0.001$),提示该细胞因子可能也是一种潜在的肿瘤生物学标志物和治疗靶点。此外,外泌体中呈高表达的组蛋白H2AX可以诱导胶质母细胞瘤细胞凋亡^[24]。上述研究提示,检测外泌体特定蛋白质的表达水平可以监测肿瘤细胞耐药情况,指导临床治疗。

2. 外泌体中非编码RNA (1) miRNA: 是一种短小的非编码RNA,发挥调节靶基因mRNA表达的功能,在不同类型组织和细胞中的表达变化具有较大差异^[25]。miRNA作为癌基因或抑癌基因,参与肿瘤发生发展的多个环节^[26-29]。肿瘤患者体内miRNA的表达谱与正常人群存在较大差异,目前已作为一种监测肿瘤发生发展的生物学标志物用于临床诊断或研究。与体液或血液循环中的miRNA相比,外泌体包含物不易被核酸酶和蛋白酶所降解,因此,从外周血或体液外泌体中分离获得的RNA(包括miRNA)丰度更高、更具肿瘤特异性^[30]。外泌体还可作为潜在的干预目标和抗肿瘤药物递送的稳定载体,在miRNA替代疗法中发挥重要作用。胶质母细胞瘤外泌体miRNA的表达谱与正常组织具有十分显著的差异,通过逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)观察发现,胶质母细胞瘤患者外周血miRNA-320、miRNA-574-3p和RNU6-1呈高表达,研究者认为这3种蛋白质可以联合应用,作为诊断胶质母细胞瘤的生物学标志物^[31-33]。此外,血清外泌体miRNA-301a表达变化也能够反映胶质母细胞瘤进展和病理变化,通过下调同源磷酸酶-张力蛋白(PTEN)表达,激活丝氨酸/苏氨酸激酶(AKT)和局部黏着斑激酶(FAK)信号转导通路,作为进展期胶质母细胞瘤的预后因子^[34]。另外,外泌体携带的miRNA-148a也可以通过靶向细胞黏附分子1(CADM1)激活信号传导和转录激活因子3(STAT3)信号转导通路,促进肿瘤细胞迁移^[35];源于胶质母细胞瘤外泌体表达上调的miRNA还有miRNA-21,

可影响多种分子通路,如胰岛素样生长因子结合蛋白3(IGFBP3)、逆转录富含半胱氨酸蛋白(RECK)和基质金属蛋白酶组织抑制因子3(TIMP3),同样可以作为胶质母细胞瘤患者诊断与治疗的生物学标志物,尤其是基于脑脊液的miRNA-21检测具有较好的诊断和预后预测效果^[36-37]。Zeng等^[38]发现,自胶质母细胞瘤患者脑脊液中分离获得的外泌体miRNA-151a表达下调,与替莫唑胺化疗不敏感有关,提高其表达水平可增加替莫唑胺耐药患者的疗效,且与血清来源的外泌体miRNA-151a表达无差异。(2)长链非编码RNA:近年研究表明,长链非编码RNA(lncRNA)具有稳定的二级结构,可作为多种肿瘤的外周标志物。LncRNA含有200个及以上核苷酸,不编码任何蛋白质^[39],是DNA与特异性染色质重构活动之间的接口,可以从基因间区域转录,转移到不同的基因组位点,并以组织和细胞特异性方式调控癌基因或抑癌基因的表达。HOTAIR是胶质母细胞瘤特异性长链非编码RNA中的一种,Tan等^[40]采用实时荧光定量PCR法对43例胶质母细胞瘤患者血清HOTAIR表达变化进行观察,其结果显示,与对照者相比,胶质母细胞瘤患者血清HOTAIR表达水平明显高于低级别胶质瘤患者($P<0.0001$),受试者工作特征(ROC)曲线下面积(AUC)为0.913(95%CI:0.845~0.982, $P<0.0001$),检测灵敏度为86.1%、特异度为87.5%,提示呈高表达的HOTAIR与高级别脑肿瘤恶性程度呈正相关,可作为判断胶质母细胞瘤预后和临床诊断的生物学标志物。

三、髓母细胞瘤来源的外泌体生物学标志物研究现状

髓母细胞瘤是发生于小脑的常见儿童恶性肿瘤,具有发病早期即发生颅内转移的倾向^[41]。目前,针对髓母细胞瘤的治疗主要是手术切除联合放射治疗和药物化疗,但是脑脊髓放射治疗可给婴幼儿带来永久性认知功能障碍的风险。髓母细胞瘤的分子分型对于预测患儿预后和靶向治疗具有十分重要的临床意义^[42]。有研究发现,髓母细胞瘤细胞系外泌体中的RNA和DNA存在*c-Myc*基因扩增现象^[6,43],提示可通过监测体液循环中外泌体*c-Myc*基因扩增,预测髓母细胞瘤复发情况。人肝细胞核因子4 α (HNF4A)是核受体超家族(NRs)成员,在肝脏发育中发挥关键作用,其在肿瘤组织中的表达可能失调^[44];应用HNF4A抑制剂处理D283MED细胞后,其外泌体HNF4A表达水平升高、细胞增殖旺盛,

表明 HNF4A 可能具有抑制髓母细胞瘤细胞系增殖的作用^[42,45]。Steggmann-Olmedillas^[46]的研究显示,由富含肿瘤干细胞(TSCs)的肿瘤细胞群体分泌的囊泡中存在载铁蛋白(即血清转铁蛋白和血红素结合蛋白),铁耗竭导致细胞生长停滞在G₁期,进而细胞凋亡。针对髓母细胞瘤细胞系 DAOY 和 UW228 细胞行铁螯合剂治疗后,肿瘤细胞球和干细胞群数目同时减少,表明铁螯合剂可能在抗肿瘤治疗中具有潜在应用价值^[42,47]。

四、外泌体在脑肿瘤微环境中的作用

肿瘤微环境即肿瘤生存的细胞环境^[48],微环境的微小变化即可刺激肿瘤细胞发生恶性转化,参与肿瘤的发生、增殖和转移。在肿瘤组织中,细胞与细胞之间或细胞与微环境之间的交流,通过直接接触或分泌生物分子和囊泡进行远距离交流。除肿瘤细胞外,肿瘤微环境还包括周围血管、细胞外基质、其他非肿瘤细胞及信号分子^[49]。其中,非肿瘤细胞包括基质细胞、纤维母细胞、免疫细胞[如T淋巴细胞、B淋巴细胞、自然杀伤T细胞(NKT)],以及肿瘤相关巨噬细胞(TAMs)、周细胞或脂肪细胞;此外,还有许多神经系统所固有的组织特异性细胞,如星形胶质细胞、神经元和小胶质细胞等。由肿瘤细胞外泌体携带和释放的生物分子还包括蛋白质和 miRNA,能够改变肿瘤微环境中的基因表达,从而促进肿瘤进展^[50-51],这些蛋白质和 miRNA 可以诱导受体细胞表型修饰和细胞外基质重塑,导致肿瘤侵袭和迁移^[52]。

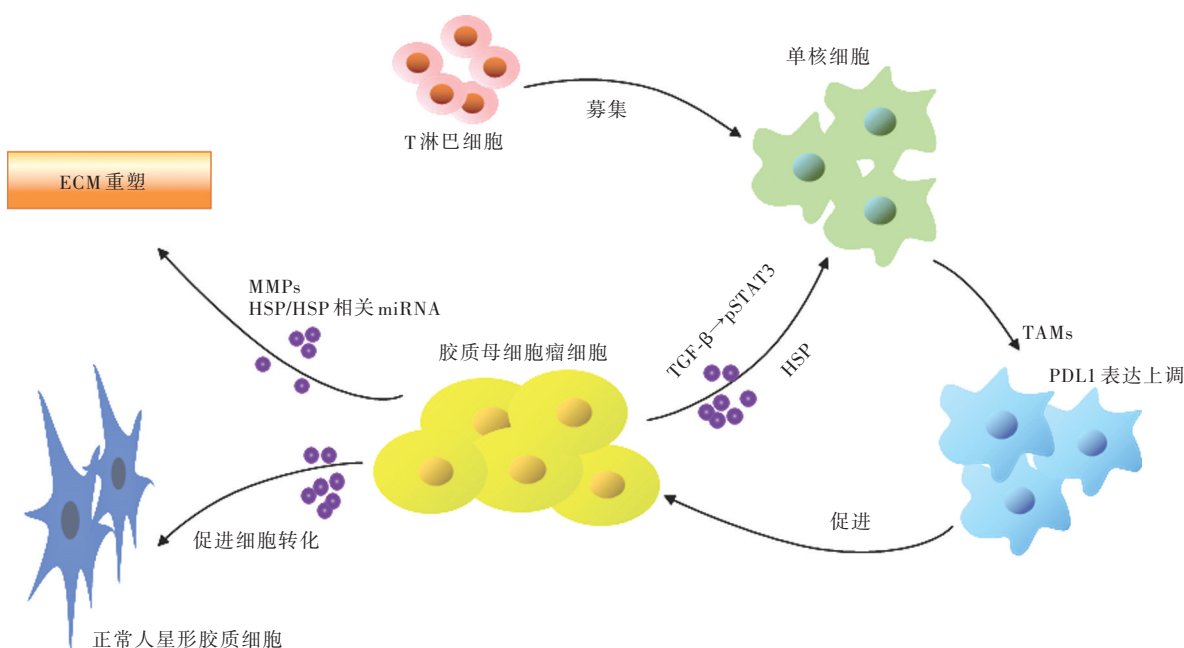
1. 外泌体与细胞外基质 胶质瘤形成和侵袭转移的主要生物学过程与细胞外基质重塑有关^[53]。细胞外基质是一种高度动态的结构,其重塑受融合素样金属蛋白酶与凝血酶(ADAMT)家族和基质金属蛋白酶(MMPs)的调节,后者有助于基底膜的降解并通过细胞内骨架重排细胞外基质降解、重塑,MMPs 表达变化与胶质瘤组织病理学分级相关^[54]。据研究显示,由胶质瘤细胞产生的囊泡含有 MMP-2 明胶酶、pro-MMP-9 和 TIMP,如 TIMP1 和 TIMP2,具有促进肿瘤生长相关血管生成的作用^[55]。Neviani 和 Fabbri^[51]发现,髓母细胞瘤 D283MED 肿瘤细胞团的增殖也与外泌体携带的 MMPs 相关。热休克蛋白的高表达也具有促进细胞外基质重塑的作用,并可增强胶质瘤细胞侵袭迁移的潜能^[20]。

2. 外泌体与星形胶质细胞 胶质母细胞瘤外泌体对肿瘤微环境中的胶质细胞具有特殊作用。星

形胶质细胞是正常血-脑屏障的组成部分,有研究显示,胶质母细胞瘤细胞通过细胞外囊泡促进星形胶质细胞的迁移,从而改变局部微环境,由胶质母细胞瘤衍生的细胞外囊泡内化,增强伪足的形成,促进细胞外基质重塑和血-脑屏障分解,从而有助于胶质母细胞瘤细胞的侵袭迁移^[56]。通过对蛋白质组学、生物信息学和靶向 RNA 的分析表明,经胶质母细胞瘤-细胞外囊泡处理的星形胶质细胞 MYC 表达水平显著升高、TP53 表达水平显著降低,而且证实,胶质母细胞瘤-细胞外囊泡通过调节肿瘤信号转导通路中的分子变化,促进星形胶质细胞在半固态基质中增生,此为肿瘤细胞恶性转化的标志^[57]。

3. 外泌体与巨噬细胞 在胶质母细胞瘤的炎症反应中,以巨噬细胞所占比例为最,约 20%,分为 M1 和 M2 两种表型。M1 型巨噬细胞具有吞噬、抗原表达和促炎症作用;而 M2 型则失去其促炎症和抗肿瘤作用的免疫功能,具有促进肿瘤侵袭和肿瘤内血管生长的特点^[58]。Graner 等^[59]的研究显示,浸润于胶质母细胞瘤中的单核细胞常与脑组织中的 T 细胞协同作用:T 细胞释放细胞因子和趋化因子,吸引肿瘤相关巨噬细胞至微环境,而巨噬细胞则分泌促细胞生长因子并诱发肿瘤,表明肿瘤外泌体对机体免疫系统具有调节或抑制双重作用。胶质母细胞瘤外泌体所分泌的特定细胞因子,包括 STAT3 信号转导通路成员和转化生长因子- β (TGF- β),这些细胞因子均是胶质母细胞瘤相关免疫抑制微环境的调节剂^[59]。有研究显示,经外泌体处理的单核细胞细胞程序性死亡蛋白配体 1(PDL1)表达水平升高与 STAT3 磷酸化增加相关^[60],而且 HSP60 也参与巨噬细胞的激活,从而导致巨噬细胞在异常条件下的过度增殖^[61](图 1)。

4. 外泌体与肿瘤血管生成 胶质母细胞瘤形成的肿瘤血管具有组织结构畸形,以及功能异常的特点^[62]。当脉管系统不能满足肿瘤细胞的不断增殖时,肿瘤组织内部即可出现缺氧和酸性区域,表现为组织水肿和广泛性缺氧坏死^[63],此时静息态血管因受到肿瘤微环境缺氧信号的刺激而增生,以满足肿瘤细胞增殖的需要。胶质母细胞瘤释放的细胞外囊泡内容物在细胞增殖过程中起诱导血管生成、增加血管通透性的作用,包括组织因子(TF)、血管内皮生长因子(VEGF)、IL-8 和 IL-6^[64]。含氧量是促进肿瘤细胞增殖的重要因素,在低氧环境中胶质母细胞瘤外泌体通过调节血管内皮细胞表型,促进多



TAMs, 肿瘤相关巨噬细胞; PDL1, 细胞程序性死亡蛋白配体 1; TGF-β, 转化生长因子-β; pSTAT3, 磷酸化信号传导与转录激活因子 3; HSP, 热休克蛋白; MMPs, 基质金属蛋白酶; miRNA, 微小 RNA; ECM, 细胞外基质

图 1 胶质母细胞瘤来源的外泌体在微环境中的作用: 由外泌体分泌的特定细胞因子包括 TGF-β 和 STAT3 信号转导通路成员, 这些细胞因子通过上调巨噬细胞 PDL1 表达、下调 T 淋巴细胞活化, 调节免疫应答。TAMs 可与脑组织 T 淋巴细胞协同作用: T 淋巴细胞释放细胞因子和趋化因子, 吸引 TAMs 进入微环境, 巨噬细胞分泌促细胞生长因子而诱发肿瘤; 外泌体既可促进周围的正常人星形胶质细胞发生细胞恶性转化, 也可通过 MMPs 和 HSP 促进细胞外基质重塑, 参与胶质母细胞瘤的侵袭迁移和耐药性

Figure 1 The role of exosomes released by glioblastoma in the microenvironment: exosomes derived from glioblastoma cells secrete specific cytokines, including TGF-β and members of the STAT3 pathway, which regulate the immune system by up-regulating PDL1 in macrophages and down-regulating the activation of T cells. TAMs also interact with T cells in the brain: brain T cells release cytokines and chemokines, attracting TAMs into the microenvironment, and TAMs provide growth-promoting factors to promote tumorigenesis. The exosomes secreted by glioblastoma can promote the malignant transformation of surrounding normal human astrocytes, and can also promote ECM remodeling through MMPs and HSP, and participate in the invasion, migration and drug resistance of glioblastoma.

种细胞生长因子(例如 CXCL1、IL-6、IL-8 等)的分泌,同时,刺激血管周细胞磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)/AKT 信号转导通路的激活和迁移^[35]。另外,由细胞外囊泡分泌的 VEGF 和其他细胞生长因子也可促进血-脑屏障的改变^[65]。因此,通过抑制外泌体的分泌,影响胶质母细胞瘤组织中的血管生成,可能是未来控制其侵袭、迁移的策略之一。

五、外泌体在脑肿瘤治疗中的应用前景

1. 外泌体作为抗肿瘤靶向药物载体 近年来,针对脑肿瘤的新药不断问世,但由于其在体内的不稳定性和血-脑屏障的限制,疗效不尽人意。因此,研发能够透过血-脑屏障,直接使药物靶向作用于原发肿瘤的新型给药系统将有效提高抗肿瘤药物的效能。外泌体是人体分泌的细胞外囊泡,具有稳定性高、生物相容性好、免疫源性低,可以透过血-脑屏障等特性,是药物靶向投递的最佳载体^[66]。通过室

温孵育和超声波处理将紫杉醇组装于胶质瘤细胞系 U-87 来源的外泌体中,可见载有紫杉醇的外泌体对 U-87 细胞的毒性即显著增加^[67]。除了传统化疗药物,天然药物和 RNA 等也有望通过外泌体用于治疗乳腺癌、胰腺癌、肺癌、前列腺癌以及胶质母细胞瘤^[68]。外泌体 miRNA-34a 能够特异性负向调控胶质母细胞瘤 *n-Myc* 基因的表达,鉴于人骨髓间充质干细胞(hBMSCs)可迁移至肿瘤部位的特性,利用人骨髓间充质干细胞来源的外泌体将过表达的外源性 miRNA-34a 递送至肿瘤细胞,使 *n-Myc* 基因沉默,提高胶质母细胞瘤细胞对替莫唑胺的化疗敏感性,达到抑制肿瘤细胞生长的目的^[69]。有研究显示,药物敏感性肿瘤细胞来源的外泌体可逆转耐药肿瘤细胞的耐药性^[24]。因此,外泌体除能够靶向传递抗肿瘤药物、促进其吸收等功能外,还可在逆转肿瘤细胞耐药性方面发挥作用,此为脑肿瘤的治疗提供

了新策略^[70-71]。

2. 外泌体作为免疫疗法的介入靶点 随着细胞程序性死亡蛋白 1(PD1)、嵌合抗原受体 T 细胞(CAR-T)等研究的不断深入,免疫疗法逐渐成为脑肿瘤研究所关注的重要课题。胶质瘤发生发展的主要原因即是其免疫逃避。Domenis 等^[72]针对胶质瘤干细胞外泌体对不同外周免疫细胞群的免疫调节特性进行观察,发现经胶质瘤干细胞外泌体处理的外周血单核细胞具有抑制 T 淋巴细胞活化、增殖和辅助性 T 细胞 1(Th1)细胞因子产生的能力,同时不影响细胞活力或抑制 T 淋巴细胞功能。该作者认为,胶质瘤外泌体主要通过作用于单核细胞,抑制 T 淋巴细胞的免疫应答,外泌体在选择性靶向治疗胶质瘤时对免疫细胞产生效应,从而减缓或阻止肿瘤进展。另外,胶质母细胞瘤来源的外泌体还具有将免疫调节分子转移到免疫细胞的作用,形成相应的肿瘤免疫微环境^[73]。

综上所述,外泌体具有传递信号分子、调节细胞及周围微环境的作用,在未来的临床应用中,不仅可以作为监测肿瘤复发、预测患者预后的生物学标志物,还有望成为携带靶向药物的载体。

利益冲突 无

参 考 文 献

- [1] Clarke J, Penas C, Pastori C, Komotar RJ, Bregy A, Shah AH, Wahlestedt C, Ayad NG. Epigenetic pathways and glioblastoma treatment[J]. *Epigenetics*, 2013, 8:785-795.
- [2] Brandes AA, Tosoni A, Spagnoli F, Frezza G, Leonardi M, Calucci F, Franceschi E. Disease progression or pseudoprogression after concomitant radiochemotherapy treatment: pitfalls in neurooncology[J]. *Neuro Oncol*, 2008, 10: 361-367.
- [3] Giusti I, Di Francesco M, Dolo V. Extracellular vesicles in glioblastoma: role in biological processes and in therapeutic applications[J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2017, 17:221-235.
- [4] Hessvik NP, Llorente A. Current knowledge on exosome biogenesis and release[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2018, 75:193-208.
- [5] Xu R, Greening DW, Zhu HJ, Takahashi N, Simpson RJ. Extracellular vesicle isolation and characterization: toward clinical application[J]. *J Clin Invest*, 2016, 126:1152-1162.
- [6] D'Asti E, Garnier D, Lee TH, Montermini L, Meehan B, Rak J. Oncogenic extracellular vesicles in brain tumor progression[J]. *Front Physiol*, 2012, 3:294.
- [7] Whiteside TL. Immune modulation of T-cell and NK (natural killer) cell activities by TEXs (tumour-derived exosomes)[J]. *Biochem Soc Trans*, 2013, 41:245-251.
- [8] Peinado H, Aleckovic M, Lavotshkin S, Matei I, Costa-Silva B, Moreno-Bueno G, Hergueta-Redondo M, Williams C, Garcia-Santos G, Ghajar C, Nitoro-Hoshino A, Hoffman C, Badal K, Garcia BA, Callahan MK, Yuan J, Martins VR, Skog J, Kaplan RN, Brady MS, Wolchok JD, Chapman PB, Kang Y, Bromberg J, Lyden D. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET[J]. *Nat Med*, 2012, 18:883-891.
- [9] Greening DW, Xu R, Ji H, Tauro BJ, Simpson RJ. A protocol for exosome isolation and characterization: evaluation of ultracentrifugation, density - gradient separation, and immunoaffinity capture methods[J]. *Methods Mol Biol*, 2015, 1295:179-209.
- [10] Li X, Corbett AL, Taatizadeh E, Tasnim N, Little JP, Garnis C, Daugaard M, Guns E, Hoorfar M, Li IT. Challenges and opportunities in exosome research: perspectives from biology, engineering, and cancer therapy[J]. *APL Bioeng*, 2019, 3: ID011503.
- [11] Szopa W, Burley TA, Kramer-Marek G, Kaspera W. Diagnostic and therapeutic biomarkers in glioblastoma: current status and future perspectives[J]. *Biomed Res Int*, 2017:ID8013575.
- [12] Brandes AA, Tosoni A, Spagnoli F, Frezza G, Leonardi M, Calucci F, Franceschi E. Disease progression or pseudoprogression after concomitant radiochemotherapy treatment: pitfalls in neurooncology[J]. *Neuro Oncol*, 2008, 10: 361-367.
- [13] Stuplich M, Hadizadeh DR, Kuchelmeister K, Scorzin J, Filss C, Langen KJ, Schäfer N, Mack F, Schüller H, Simon M, Glas M, Pietsch T, Urbach H, Herrlinger U. Late and prolonged pseudoprogression in glioblastoma after treatment with lomustine and temozolomide[J]. *J Clin Oncol*, 2012, 30:E180-183.
- [14] Garcia-Romero N, Carrion-Navarro J, Esteban-Rubio S, Lázaro-Ibáñez E, Peris-Celda M, Alonso MM, Guzmán-De-Villoria J, Fernández-Carballal C, de Mendivil AO, García-Duque S, Escobedo-Lucea C, Prat-Acín R, Belda-Iniesta C, Ayuso-Sacido A. DNA sequences within glioma-derived extracellular vesicles can cross the intact blood-brain barrier and be detected in peripheral blood of patients[J]. *Oncotarget*, 2017, 8:1416-1428.
- [15] Vaidya M, Bacchus M, Sugaya K. Differential sequences of exosomal NANOG DNA as a potential diagnostic cancer marker[J]. *PLoS One*, 2018, 13:E0197782.
- [16] Choi D, Montermini L, Kim DK, Meehan B, Roth FP, Rak J. The impact of oncogenic EGFRv III on the proteome of extracellular vesicles released from glioblastoma cells[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2018, 17:1948-1964.
- [17] Strik HM, Weller M, Frank B, Hermisson M, Deininger MH, Dichgans J, Meyermann R. Heat shock protein expression in human gliomas[J]. *Anticancer Res*, 2000, 20:4457-4462.
- [18] Shen G, Liang S, Xu Z, Zhou L, Xiao S, Xia X, Li R, Liao Y, You C, Wei Y. Downregulated expression of HSP27 in human low-grade glioma tissues discovered by a quantitative proteomic analysis[J]. *Proteome Sci*, 2010, 8:17.
- [19] Khalil AA, Kabapy NF, Deraz SF, Smith C. Heat shock proteins in oncology: diagnostic biomarkers or therapeutic targets[J]? *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1816:89-104.
- [20] Caruso Bavisotto C, Graziano F, Rappa F, Marino Gammazza A, Logozzi M, Fais S, Maugeri R, Bucchieri F, Conway de Macario E, Macario AJL, Cappello F, Iacopino DG, Campanella C. Exosomal chaperones and miRNAs in gliomagenesis: state-of-art and theranostics perspectives[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19:E2626.
- [21] Yang JK, Song J, Huo HR, Zhao YL, Zhang GY, Zhao ZM, Sun GZ, Jiao BH. DNM3, p65 and p53 from exosomes represent potential clinical diagnosis markers for glioblastoma multiforme[J]. *Ther Adv Med Oncol*, 2017, 9:741-754.
- [22] Mallawaaratchy DM, Hallal S, Russell B, Ly L, Ebrahimkhani S, Wei H, Christopherson RI, Buckland ME, Kaufman KL. Comprehensive proteome profiling of glioblastoma-derived extracellular vesicles identifies markers for more aggressive

- disease[J]. *J Neurooncol*, 2017, 131:233-244.
- [23] Huang K, Fang C, Yi K, Liu X, Qi H, Tan Y, Zhou J, Li Y, Liu M, Zhang Y, Yang J, Zhang J, Li M, Kang C. The role of PTRF/Cavin1 as a biomarker in both glioma and serum exosomes[J]. *Theranostics*, 2018, 8:1540-1557.
- [24] Nie JH, Li H, Wu ML, Lin XM, Xiong L, Liu J. Differential exosomal proteomic patterns and their influence in resveratrol sensitivities of glioblastoma cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20: E191.
- [25] Ameres SL, Zamore PD. Diversifying microRNA sequence and function[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013, 14:475-488.
- [26] Li L, Li C, Wang S, Wang Z, Jiang J, Wang W, Li X, Chen J, Liu K, Li C, Zhu G. Exosomes derived from hypoxic oral squamous cell carcinoma cells deliver miR-21 to normoxic cells to elicit a prometastatic phenotype[J]. *Cancer Res*, 2016, 76: 1770-1780.
- [27] Markopoulos GS, Roupakia E, Tokamani M, Chavdola E, HatziaPOSTOLOU M, Polytarchou C, Marcu KB, Papavassiliou AG, Sandaltzopoulos R, Kolettas E. A step-by-step microRNA guide to cancer development and metastasis[J]. *Cell Oncol (Dordr)*, 2017, 40:303-339.
- [28] Taucher V, Mange H, Haybaeck J. Non-coding RNAs in pancreatic cancer: challenges and opportunities for clinical application[J]. *Cell Oncol (Dordr)*, 2016, 39:295-318.
- [29] Ferraro A. Altered primary chromatin structures and their implications in cancer development[J]. *Cell Oncol (Dordr)*, 2016, 39:195-210.
- [30] Xiao G, Cheng CC, Chiang YS, Cheng WT, Liu IH, Wu SC. Exosomal miR-10a derived from amniotic fluid stem cells preserves ovarian follicles after chemotherapy[J]. *Sci Rep*, 2016, 6:23120.
- [31] Dong L, Li Y, Han C, Wang X, She L, Zhang H. miRNA microarray reveals specific expression in the peripheral blood of glioblastoma patients[J]. *Int J Oncol*, 2014, 45:746-756.
- [32] Manterola L, Guruceaga E, Gállego Pérez-Larraya J, González-Huarriz M, Jauregui P, Tejada S, Diez-Valle R, Segura V, Samprón N, Barrena C, Ruiz I, Agirre A, Ayuso A, Rodríguez J, González A, Xipell E, Matheu A, López de Munain A, Tuñón T, Zazpe I, García-Foncillas J, Paris S, Delattre JY, Alonso MM. A small noncoding RNA signature found in exosomes of GBM patient serum as a diagnostic tool[J]. *Neuro Oncol*, 2014, 16: 520-527.
- [33] Yerukala Sathipati S, Huang HL, Ho SY. Estimating survival time of patients with glioblastoma multiforme and characterization of the identified microRNA signatures[J]. *BMC Genomics*, 2016, 17:1022.
- [34] Lan F, Qing Q, Pan Q, Hu M, Yu H, Yue X. Serum exosomal miR-301a as a potential diagnostic and prognostic biomarker for human glioma[J]. *Cell Oncol (Dordr)*, 2017, 41:25-33.
- [35] Cai Q, Zhu A, Gong L. Exosomes of glioma cells deliver miR-148a to promote proliferation and metastasis of glioblastoma via targeting CADM1[J]. *Bull Cancer*, 2018, 105:643-651.
- [36] Akers JC, Ramakrishnan V, Kim R, Phillips S, Kaimal V, Mao Y, Hua W, Yang I, Fu CC, Nolan J, Nakano I, Yang Y, Beaulieu M, Carter BS, Chen CC. miRNA contents of cerebrospinal fluid extracellular vesicles in glioblastoma patients[J]. *J Neurooncol*, 2015, 123:205-216.
- [37] Qu K, Lin T, Pang Q, Liu T, Wang Z, Tai M, Meng F, Zhang J, Wan Y, Mao P, Dong X, Liu C, Niu W, Dong S. Extracellular miRNA-21 as a novel biomarker in glioma: evidence from Meta-analysis, clinical validation and experimental investigations[J]. *Oncotarget*, 2016, 7:33994-34010.
- [38] Zeng A, Wei Z, Yan W, Yin J, Huang X, Zhou X, Li R, Shen F, Wu W, Wang X, You Y. Exosomal transfer of miR-151a enhances chemosensitivity to temozolomide in drug-resistant glioblastoma[J]. *Cancer Lett*, 2018, 436:10-21.
- [39] Pastori C, Kapranov P, Penas C, Peschansky V, Volmar CH, Sarkaria JN, Bregy A, Komotar R, St Laurent G, Ayad NG, Wahlestedt C. The Bromodomain protein BRD4 controls HOTAIR, a long noncoding RNA essential for glioblastoma proliferation[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112:8326-8331.
- [40] Tan SK, Pastori C, Penas C, Komotar RJ, Ivan ME, Wahlestedt C, Ayad NG. Serum long noncoding RNA HOTAIR as a novel diagnostic and prognostic biomarker in glioblastoma multiforme[J]. *Mol Cancer*, 2018, 17:74.
- [41] Coluccia D, Figueredo C, Isik S, Smith C, Rutka JT. Medulloblastoma: tumor biology and relevance to treatment and prognosis paradigm[J]. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 2016, 16:43.
- [42] Ciregia F, Urbani A, Palmisano G. Extracellular vesicles in brain tumors and neurodegenerative diseases[J]. *Front Mol Neurosci*, 2017, 10:276.
- [43] Balaj L, Lessard R, Dai L, Cho YJ, Pomeroy SL, Breakefield XO, Skog J. Tumour microvesicles contain retrotransposon elements and amplified oncogene sequences[J]. *Nat Commun*, 2011, 2:180.
- [44] Lazarevich NL, Shavochkina DA, Fleishman DI, Kustova IF, Morozova OV, Chuchuev ES, Patyutko YI. Deregulation of hepatocyte nuclear factor 4 (HNF4) as a marker of epithelial tumors progression[J]. *Exp Oncol*, 2010, 32:167-171.
- [45] Ung TH, Madsen HJ, Hellwinkel JE, Lencioni AM, Graner MW. Exosome proteomics reveals transcriptional regulator proteins with potential to mediate downstream pathways[J]. *Cancer Sci*, 2014, 105:1384-1392.
- [46] Steegmann-Olmédillas JL. The role of iron in tumour cell proliferation[J]. *Clin Transl Oncol*, 2011, 13:71-76.
- [47] Bisaro B, Mandili G, Poli A, Piolatto A, Papa V, Novelli F, Cenacchi G, Forni M, Zanini C. Proteomic analysis of extracellular vesicles from medullospheres reveals a role for iron in the cancer progression of medulloblastoma[J]. *Mol Cell Ther*, 2015, 3:8.
- [48] Balkwill FR, Capasso M, Hagemann T. The tumor microenvironment at a glance[J]. *J Cell Sci*, 2012, 125:5591-5596.
- [49] Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis[J]. *Nat Med*, 2013, 19:1423-1437.
- [50] Squadrito ML, Baer C, Burdet F, Maderna C, Gilfillan GD, Lyle R, Ibberson M, De Palma M. Endogenous RNAs modulate microRNA sorting to exosomes and transfer to acceptor cells[J]. *Cell Rep*, 2014, 8:1432-1446.
- [51] Neviani P, Fabbri M. Exosomal microRNAs in the tumor microenvironment[J]. *Front Med (Lausanne)*, 2015, 2:47.
- [52] Schiera G, Di Liegro CM, Di Liegro I. Molecular determinants of malignant brain cancers: from intracellular alterations to invasion mediated by extracellular vesicles[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18:E2774.
- [53] Iser IC, Pereira MB, Lenz G, Wink MR. The epithelial-to-mesenchymal transition-like process in glioblastoma: an updated systematic review and in silico investigation[J]. *Med Res Rev*, 2017, 37:271-313.
- [54] Rajesh Y, Biswas A, Mandal M. Glioma progression through the prism of heat shock protein mediated extracellular matrix remodeling and epithelial to mesenchymal transition[J]. *Exp Cell Res*, 2017, 359:299-311.
- [55] Giusti I, Delle Monache S, Di Francesco M, Sanità P, Ascenzo S, Gravina GL, Festuccia C, Dolo V. From glioblastoma to endothelial cells through extracellular vesicles: messages for

- angiogenesis[J]. *Tumour Biol*, 2016, 37:12743-12753.
- [56] Oushy S, Hellwinkel JE, Wang M, Nguyen GJ, Gunaydin D, Harland TA, Anchordoquy TJ, Graner MW. Glioblastoma multiforme-derived extracellular vesicles drive normal astrocytes towards a tumour-enhancing phenotype[J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2018, 373(1737).
- [57] Hallal S, Mallawaarachy DM, Wei H, Ebrahimkhani S, Stringer BW, Day BW, Boyd AW, Guillemin GJ, Buckland ME, Kaufman KL. Extracellular vesicles released by glioblastoma cells stimulate normal astrocytes to acquire a tumor: supportive phenotype via p53 and MYC signaling pathways [J]. *Mol Neurobiol*, 2019, 56:4566-4581.
- [58] Wu A, Wei J, Kong LY, Wang Y, Priebe W, Qiao W, Sawaya R, Heimberger AB. Glioma cancer stem cells induce immunosuppressive macrophages/microglia[J]. *Neuro Oncol*, 2010, 12:1113-1125.
- [59] Graner MW, Alzate O, Dechkovskaia AM, Keene JD, Sampson JH, Mitchell DA, Bigner DD. Proteomic and immunologic analyses of brain tumor exosomes[J]. *FASEB J*, 2009, 23:1541-1557.
- [60] Horlad H, Ma C, Yano H, Pan C, Ohnishi K, Fujiwara Y, Endo S, Kikukawa Y, Okuno Y, Matsuoka M, Takeya M, Komohara Y. An IL-27/Stat3 axis induces expression of programmed cell death 1 ligands (PD - L1/2) on infiltrating macrophages in lymphoma[J]. *Cancer Sci*, 2016, 107:1696-1704.
- [61] Stefano L, Racchetti G, Bianco F, Passini N, Gupta RS, Panina Bordignon P, Meldolesi J. The surface - exposed chaperone, Hsp60, is an agonist of the microglial TREM2 receptor [J]. *J Neurochem*, 2009, 110:284-294.
- [62] Carmeliet P, Jain RK. Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2011, 10:417-427.
- [63] Jain RK, di Tomaso E, Duda DG, Loeffler JS, Sorensen AG, Batchelor TT. Angiogenesis in brain tumours [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2007, 8:610-622.
- [64] Svensson KJ, Belting M. Role of extracellular membrane vesicles in intercellular communication of the tumour microenvironment[J]. *Biochem Soc Trans*, 2013, 41:273-276.
- [65] Kucharzewska P, Christianson HC, Welch JE, Svensson KJ, Fredlund E, Ringnér M, Mörgelin M, Bourseau - Guilmain E, Bengzon J, Belting M. Exosomes reflect the hypoxic status of glioma cells and mediate hypoxia - dependent activation of vascular cells during tumor development [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110:7312-7317.
- [66] Xitong D, Xiaorong Z. Targeted therapeutic delivery using engineered exosomes and its applications in cardiovascular diseases[J]. *Gene*, 2016, 575:377-384.
- [67] Salarpour S, Foroofanfar H, Pournamdari M, Ahmadi-Zeidabadi M, Esmaeeli M, Pardakhty A. Paclitaxel incorporated exosomes derived from glioblastoma cells: comparative study of two loading techniques[J]. *Daru*, 2019.[Epub ahead of print].
- [68] Pullan JE, Confeld MI, Osborn JK, Kim J, Sarkar K, Mallik S. Exosomes as drug carriers for cancer therapy [J]. *Mol Pharm*, 2019, 16:1789-1798.
- [69] Wang B, Wu ZH, Lou PY, Chai C, Han SY, Ning JF, Li M. Human bone marrow - derived mesenchymal stem cell - secreted exosomes overexpressing microRNA - 34a ameliorate glioblastoma development via down - regulating MYCN [J]. *Cell Oncol (Dordr)*, 2019.[Epub ahead of print].
- [70] Li F, Li H, Jin X, Zhang Y, Kang X, Zhang Z, Xu M, Qian Z, Ma Z, Gao X, Zhao L, Wu S, Sun H. Adipose - specific knockdown of Sirt1 results in obesity and insulin resistance by promoting exosomes release [J]. *Cell Cycle*, 2019, 18:2067 - 2082.
- [71] Maacha S, Bhat AA, Jimenez L, Raza A, Haris M, Uddin S, Grivel JC. Extracellular vesicles - mediated intercellular communication: roles in the tumor microenvironment and anti-cancer drug resistance[J]. *Mol Cancer*, 2019, 18:55.
- [72] Domenis R, Cesselli D, Toffoletto B, Bourkoulas E, Caponnetto F, Manini I, Beltrami AP, Ius T, Skrap M, Di Loreto C, Gri G. Systemic T cells immunosuppression of glioma stem cell - derived exosomes is mediated by monocytic myeloid - derived suppressor cells[J]. *PLoS One*, 2017, 12:E0169932.
- [73] Abels ER, Broekman MLD, Breakefield XO, Maas SLN. Glioma EVs contribute to immune privilege in the brain [J]. *Trends Cancer*, 2019, 5:393-396.

(收稿日期:2019-10-20)

欢迎订阅 2020 年《中国现代神经疾病杂志》

《中国现代神经疾病杂志》为国家卫生健康委员会主管、中国医师协会主办的神经病学类专业期刊。办刊宗旨为:理论与实践相结合、普及与提高相结合,充分反映我国神经内外科临床科研工作重大进展,促进国内外学术交流。所设栏目包括述评、专论、论著、临床病理报告、应用神经解剖学、神经影像学、循证神经病学、流行病学调查研究、基础研究、临床研究、综述、临床医学图像、病例报告、临床病理(例)讨论、新技术新方法等。

《中国现代神经疾病杂志》为北京大学图书馆《中文核心期刊要目总览》2017年版(即第8版)核心期刊和国家科技部中国科技论文统计源期刊,国内外公开发行人。中国标准连续出版物号:ISSN 1672-6731, CN 12-1363/R。国际大16开型,彩色插图,48页,月刊,每月25日出版。每期定价15元,全年12册共计180元。2020年仍由邮政局发行,邮发代号:6-182。请向全国各地邮政局订阅,亦可直接向编辑部订阅(免邮寄费)。

编辑部地址:天津市津南区吉兆路6号天津市环湖医院A座二楼西区,邮政编码:300350。

联系电话:(022)59065611,59065612;传真:(022)59065631。网址:www.xdjb.org(中文),www.cjcn.org(英文)。