

· 综述 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.33.020

外泌体作为浸润性乳腺癌诊断标志物的研究进展*

钟国斌, 韦薇, 周晓, 朱玲钰, 梅燕 综述, 刘剑仑[△] 审校

(广西医科大学附属肿瘤医院乳腺外科, 南宁 530021)

【摘要】 浸润性乳腺癌是指癌细胞已穿破乳腺导管或小叶腺泡的基底膜并侵入间质的一种恶性肿瘤, 是乳腺癌中最常见的类型。乳腺癌已居于女性癌症发病率首位, 且上升趋势、年轻化趋势明显, 成为我国常见的恶性肿瘤之一, 严重危害着广大女性的身心健康。目前, 乳腺癌诊断的金标准仍为病理诊断, 因此探寻一种可靠的乳腺癌生物标志物用于疾病早期诊断显得尤为重要。外泌体是由细胞主动分泌的囊泡小体, 近些年来备受国内外业界关注。本文针对外泌体作为浸润性乳腺癌诊断标志物的研究进展进行综述。

【关键词】 乳腺肿瘤; 生物标志物; 外泌体; 综述

【中图分类号】 R737.9

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-8348(2018)33-4278-04

浸润性乳腺癌是指癌细胞已穿破乳腺导管或小叶腺泡的基底膜并侵入间质的一种恶性肿瘤, 是乳腺癌中最常见的类型。乳腺癌目前诊断的金标准是病理检查, 其缺点是给患者带来创伤。外泌体是细胞主动分泌的、内含生物活性分子的囊泡小体, 其本质是脂质双分子层。由于外泌体的特性, 外泌体作为浸润性乳腺癌的早期诊断标志物具有巨大的潜力。

1 外泌体概念

外泌体最早是在体外培养的绵羊红细胞的上清液中被发现。1987 年 JOHNSTONE 等^[1] 对网织红细胞培养液分离纯化后得到了一种纳米级囊泡样物质, 并将其命名为外泌体(exosomes)。外泌体是细胞主动分泌的, 大小均一, 直径为 30~100 nm, 密度是 1.10~1.18 g/mL 的囊泡小体, 其本质是脂质双分子层^[2]。电镜下观察外泌体其形状呈杯状结构。外泌体可有树突细胞、血小板、淋巴细胞、内皮细胞、肥大细胞、间充质干细胞、成纤维细胞和肿瘤细胞等不同细胞种类脱落释放。在大多数体液中如外周血、唾液、尿液、脑脊液、关节液、精液、羊水、腹水等体液中可检测到外泌体。与同源组织器官类型的正常细胞和正常体液相比, 肿瘤细胞能分泌更多的外泌体, 癌性体液能包含更多的外泌体^[3-5]。

不同细胞来源的外泌体, 其内容物也有所不同, 但都富含生物活性分子, 如核酸、蛋白质、脂质。外泌体所携带的内容物作用于靶细胞, 使细胞间的通信得以进行, 最终实现调节靶细胞基因表达和细胞功能。研究表明, 外泌体能携带肿瘤遗传信息, 影响肿瘤微环境的形成, 促进肿瘤血管生成, 增强肿瘤细胞侵袭和转移能力, 介导肿瘤免疫抑制及参与肿瘤放化疗抵抗, 进而促进肿瘤的发生、发展^[6]。根据其生物学特征, 外泌体能在体液中被检测到, 检测液中外泌体

的水平及其所含的 miRNAs 和 DNA 可以反映肿瘤进展和治疗预后, 可作为一种新的癌症诊断标志物, 在疾病诊断和临床方面中有较好的应用前景。

迄今为止, 在 PubMed 网站上发现了超过 6 000 篇关于“exosome”的论文, 其中大部分是在近 5 年内发表。这表明学者对外泌体作为疾病的研究对象越来越感兴趣, 特别是在肿瘤领域中其更是成为了研究热点。美国 2018 年最新癌症统计报告中, 乳腺癌占女性新发癌症病例的 30%, 远超其他癌症所占比例^[7-8]。在中国国家癌症中心近日发布的我国癌症负担最新结果, 乳腺癌也居于女性癌症发病率首位。由于乳腺癌已成为我国常见的恶性肿瘤之一, 且上升趋势、年轻化趋势明显, 严重危害广大女性同胞身心健康, 除了加大乳腺癌的科普宣传, 寻找乳腺癌生物标志物用于疾病早期诊断显得迫在眉睫。

外泌体是一类纳米级膜性囊泡, 成功地对各类样品中分离并鉴定外泌体, 对不断揭示外泌体功能、对人类加深机体生理病理等过程至关重要。目前对分离外泌体的技术主要有离心法(最常见)、沉淀法、超滤法、免疫亲和法、微流控技术等; 基于外泌体的特征, 可对外泌体进行鉴定, 主要的鉴定技术是: 电子显微镜检测、粒径及浓度检测、Western blot 法、流式细胞术。因外泌体特有的结构和性能, 许多激动人心的外泌体分离技术仍在积极的探索中, 如电渗法、微流控、免疫亲和捕捉后洗脱。然而, 到目前为止, 尚未有一种技术可以实现大家公认的外泌体高纯度、高回收率富集。

根据外泌体数据库 Exocarta(<http://www.exocarta.org>) 最新的数据显示, 不同组织细胞所产生的外泌体中含有 9 769 种蛋白质, 3 408 种 RNA, 2 838 种 miRNA 及 1 116 种脂类物质。外泌体内含的蛋白

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81760481)。 作者简介: 钟国斌(1994—), 在读硕士, 主要从事乳腺癌的基础与临床研究。

[△] 通信作者, E-mail: 695547509@qq.com。

质主要包括两类:(1)在外泌体中普遍存在的蛋白,如热休克蛋白(HSP60、HSP70 及 HSP90)、4 次跨膜蛋白(CD9、CD63、CD81)、ALG-2 相互作用蛋白 X(Alix)、肿瘤易感基因 101 蛋白(TSG101);(2)蛋白则是与外泌体亲代来源细胞有关,如转化生长因子(TGF) β 1 和 MAGE3/6 特异存在卵巢肿瘤细胞外泌体中^[9]。表皮生长因子受体(EGFR)特异存在于非小细胞性肺癌中^[10-11]。各种蛋白分子为外泌体在抗原递呈和共刺激的过程中发挥作用奠定了基础。外泌体中的核酸来源于亲代细胞,包括双链和单链 DNAM,线粒体 DNA, RNA 如信使 RNA(mRNA)、微小 RNA(miRNA)、非编码 RNA(ncRNA),以及核糖体 RNA。外泌体富含二酰甘油、胆固醇、磷脂、鞘脂和磷脂酰丝氨酸等脂质,外泌体中的脂质成分的比例与其细胞来源有关,但目前对外泌体脂质的研究报道并不多。

2 精准医疗与液体活检

自美国原总统贝拉克·侯赛因·奥巴马(Barack Hussein Obama)于 2015 年 1 月提出“精准医疗计划”,这一计划迅速影响了全世界的医疗发展,且分子生物学和临床医学教授们对精准医学赋予了科学的解释。精准医疗(precision medicine)是以个体化医疗为基础、随着基因组测序技术快速进步及生物信息与大数据科学的交叉应用而发展起来的新型医学概念与医疗模式。其本质是通过基因组、蛋白质组等组学技术和医学前沿技术,对大样本人群与特定疾病类型进行生物标志物的分析与鉴定、验证与应用,从而精确找到疾病的原因和治疗的靶点,并对一种疾病的不同状态和过程进行精准分类,最终实现对疾病和特定患者进行个性化精准治疗的目的,以提高疾病诊治与预防的效益。

在精准医学的大背景下,液体活检(liquid biopsy)作为一种便捷、微创、能够动态反映肿瘤基因谱全貌的方法在临床研究与实践中发挥着越来越重要的作用。用于液体活检相应的多种检测技术也发展迅速。液体活检与传统组织活检金标准相比,具有明显的优势:(1)对受检者的创伤小,对患者而言可接受性高。(2)液体活检可缩短癌症诊断时间,可以反映出肿瘤的基因组全貌^[12-13]。(3)与其他无创诊断手段相比,液体活检对癌细胞的诊断具有更高的灵敏度和特异度。(4)液体活检还具有实时检测、可重复性等优点。液体活检包括循环肿瘤细胞(circulation tumor cell, CTC)、循环肿瘤循环肿瘤 DNA(circulation tumor DNA, ctDNA)、外泌体和肿瘤血小板(tumor-educated platelets, TEPs),在癌症领域应用广泛,在诊断、治疗和预后等方面具有很好的应用前景。外泌体为何能在肿瘤领域中成为研究热点,是由以下特性决定的:(1)肿瘤细胞释放的具有生物活性的外泌体在体液中的水平高,可达 10^9 /mL,因此灵敏度较

高^[14]。(2)外泌体选择性携带其亲代细胞的生物活性物质,如 miRNA,这使外泌体更具有特异度^[15]。(3)外泌体体积较小,可穿透体内各种组织屏障,容易传送到各种体液中,为液体活检提供了重要的前提条件^[16]。(4)外泌体的脂质双膜结构对其内容物起到很好的保护作用,可防止内容物被血液中酶类物降解,同时在体外也能保存一段时间,具有一定的稳定性。MENG 等^[17]用 Taq Man miRNA、实时定量荧光聚合酶链反应和酶联免疫吸附试验等方法说明了 miR-373、miR-200a、miR-200b、miR-200c 这 4 种核酸对上皮卵巢癌有一定的诊断价值。ZHU 等^[18]证实了结直肠癌患者血清样品中的外泌体 miRNA-19a-3P、miRNA-21-5p 和 miRNA-425-5P 的水平显著升高。BRYANT 等^[19]运用实时聚合酶链反应分析发现前列腺癌患者血清外泌体中的 miR-107 和 miR-574-3p 的水平与正常人相比存在显著差异。MADHAVAN 等^[20]通过检测胰腺癌患者血清外泌体中 miRNAs 表达水平,结果显示 miR-1246、miR-4644、miR-3976 和 miR-4306 可能作为检测胰腺癌患者的诊断标志物。对肝癌患者血清和细胞上清液的外泌体中循环 RNA 进行分析,发现肝癌患者外泌体分泌的 miR-519d、miR-21、miR-221、miR-1228 与正常人相比差异均具有统计学意义,据此绘制的 ROC 曲线灵敏度高于甲胎蛋白,可以成为肝癌特异性的外泌体标志物^[21-22]。LI 等^[23]发现肿瘤患者外泌体所携带的环状 RNA(circRNAs)的表达谱与健康人存在差异,得出可以通过检测血清中 circRNAs 的表达水平以区分癌症患者和健康人。

3 外泌体在浸润性乳腺癌中的诊断价值

浸润性乳腺癌是指癌细胞已穿破乳腺导管或小叶腺泡的基底膜并侵入间质的一种恶性肿瘤。既往认为肿瘤的发生是源于具有自我更新能力的肿瘤干细胞,且这类细胞可以促进肿瘤的进一步发展^[24]。

然而近年来研究发现,外泌体在乳腺癌的发生过程中也起了重要的作用。LIU 等^[25]发现,乳腺癌细胞分泌的外泌体(Exo-BCa)可以选择性减少穿膜蛋白的表达,抑制 NK 细胞的活性及阻碍 JAK-3 和 cyclin D3 的表达,从而抑制细胞的增值。DUTTA 等^[26]证实,Exo-BCa 能够与正常乳腺上皮细胞相互作用且产生活性氧,进而诱导磷酸化 P53、细胞自噬、DNA 损伤应答,使正常的乳腺细胞增殖。CHO 等^[27]发现 Exo-BCa 使脂肪组织中的间充质干细胞通过 Smad 通路转变为肌成纤维细胞。后者可以参与肿瘤血管的重建,是肿瘤细胞转移的重要因素之一。外泌体中 miR-210 进入血管内皮细胞,作用于靶基因络氨酸蛋白激酶 A3,可活化内皮细胞诱导血管生成因子,进而促进血管生成^[28]。Exo-BCa 中半乳糖凝集素 3 和膜表面脂质筏微型域粘斑处的膜联蛋白结合,固定在其细胞表面,实现后续的传播和黏附^[29]。黏附不仅是在各种

病理条件下相当重要,在肿瘤生物体中也极为重要。在乳腺癌细胞中,细胞脱离与外泌体的显著释放有关,外泌体聚集在细胞表面,介导细胞与细胞外基质蛋白的黏附^[30]。胎牛血清中的甲胎蛋白 A 已被证实为细胞黏附的重要线索^[31]。甲胎蛋白 A 通过募集外泌体介导癌细胞黏附,这些外泌体也参与了转移位点的制备,调节细胞生长和活力。许多研究发现外泌体可以改变靶细胞的转录,并有助于致癌转化和肿瘤形成^[32-33]。例如,乳腺癌细胞分泌的外泌体(MDA-MB-231)能够将正常的人类乳腺上皮细胞(MCF-10)转化为癌细胞。在细胞培养和小鼠模型中,这些癌外泌体包含的 miRNAs 改变了受体细胞的转录组,并诱导了沉默复合物、负载复合蛋白、加工前 miRNA、TAR RNA 结合蛋白 2 和 Argonaute-2 进入成熟的 miRNAs,且在局部发挥促进肿瘤形成和增殖作用,还可以影响远处的细胞^[34]。

循环外泌体包裹的 miRNAs 是乳腺癌早期理想的生物标志物,外泌体 miRNAs 的表达模式也与肿瘤的恶性程度和预后有关^[35]。ZHOU 等^[36]通过对乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 和正常乳腺上皮细胞 MCF 10A 外泌体中所有的小 RNAs 进行高通量测序和对比,发现 MDA-MB-231 外泌体中的 miR-105 表达水平明显升高。外泌体 miR-939 在基底样肿瘤亚型中高度表达,与三阴性乳腺癌预后差有关^[37]。外泌体 miR-101 浓度降低与乳腺癌淋巴结阳性有关,三阴性或雌激素受体、孕激素受体阴性乳腺癌患者的 miR-373 水平显著上调。而且 KHAN 等^[38]收集了 40 例乳腺癌患者血液样本进行外泌体及其内容物的检测,发现外泌体源性的 survivin-2B 在疾病早期高表达。乳腺癌细胞产生的外泌体可以检测到过表达的蛋白标志物,如肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体、Fas 配体和 TGF 等肿瘤抗原抑制蛋白^[39]。KHAN 等^[40]研究表明 survivin 及其剪切变异体在乳腺癌组织中差异性表达,在乳腺癌细胞凋亡中有不同的作用。他们认为是乳腺癌细胞释放了外泌体中的 survivin。进一步研究发现,乳腺癌患者血清中 survivin-2b 的表达分析可以作为乳腺癌早期诊断和预后的标志物^[38]。

4 展 望

综上所述,外泌体可能参与了乳腺癌的发生、发展,检测外泌体及其内容物可能是诊断乳腺癌的新思路。外泌体作为浸润性乳腺癌诊断标志物是有前景的,对于乳腺癌的早期诊断具有重要作用。然而,截至目前,外泌体在浸润性乳腺癌发生、发展的各种机制尚未完全清楚,外泌体的富集效率仍比较低。目前对外泌体的研究的样本例数仍比较少,想应用外泌体在浸润性乳腺癌作为诊断标志物仍需要进一步的深入研究。

参考文献

[1] JOHNSTONE RM, ADAM M, HAMMOND JR, 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.
- [2] BOYIADZIS M, WHITESIDE T L. Information transfer by exosomes: a new frontier in hematologic malignancies [J]. *Blood Rev*, 2015, 29(5): 281-290.
- [3] HOSSEINI M, KHATAMIANFAR S, HASSANIAN S M, et al. Exosome-encapsulated microRNAs as potential circulating biomarkers in colon cancer [J]. *Curr Pharm Des*, 2017, 23(11): 1705-1709.
- [4] MADISON M N, ROLLER R J, OKEOMA C M. Human semen contains exosomes with potent anti-HIV-1 activity [J]. *Retrovirology*, 2014, 11(1): 102.
- [5] WANG D, SUN W. Urinary extracellular microvesicles: isolation methods and prospects for urinary proteome [J]. *Proteomics*, 2014, 14(16): 1922-1932.
- [6] FREDIANI J N, FABBRI M. Essential role of miRNAs in orchestrating the biology of the tumor microenvironment [J]. *Mol Cancer*, 2016, 15(1): 42.
- [7] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2018 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(1): 7-30.
- [8] VARGHESE F, WONG J. Breast cancer in the elderly [J]. *Surg Clin North Am*, 2018, 98(4): 819-833.
- [9] SZAJNIK M, DERBIS M, LACH M, et al. Exosomes in plasma of patients with ovarian carcinoma: potential biomarkers of tumor progression and response to therapy [J]. *Gynecol Obstet (Sunnyvale)*, 2013, Suppl 4: 3.
- [10] HUANG S H, LI Y, ZHANG J, et al. Epidermal growth factor receptor-containing exosomes induce tumor-specific regulatory T cells [J]. *Cancer Invest*, 2013, 31(5): 330-335.
- [11] PARK J O, CHOI D Y, CHOI D S, et al. Identification and characterization of proteins isolated from microvesicles derived from human lung cancer pleural effusions [J]. *Proteomics*, 2013, 13(14): 2125-2134.
- [12] LARREA E, SOLE C, MANTEROLA L, et al. New concepts in cancer biomarkers: circulating miRNAs in liquid biopsies [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(5): E627.
- [13] WAN J C M, MASSIE C, GARCIA-CORBACHO J, et al. Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA [J]. *Nat Rev Cancer*, 2017, 17(4): 223-238.
- [14] HE M, ZENG Y. Microfluidic exosome analysis toward liquid biopsy for cancer [J]. *J Lab Autom*, 2016, 21(4): 599-608.
- [15] KOSAKA N, TAKESHITA F, YOSHIOKA Y, et al. Exosomal tumor-suppressive microRNAs as novel cancer therapy: "exocure" is another choice for cancer treatment [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2013, 65(3): 376-382.
- [16] BOUKOURIS S, MATHIVANAN S. Exosomes in bodily fluids are a highly stable resource of disease biomarkers [J]. *Proteomics Clin Appl*, 2015, 9(3/4, SD): 358-367.
- [17] MENG X D, MUELLER V, MILDE-LANGOSCH K A, et al. Diagnostic and prognostic relevance of circulating

- exosomal miR-373, miR-200a, miR-200b and miR-200c in patients with epithelial ovarian cancer [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(13):16923-16935.
- [18] ZHU M, HUANG Z, ZHU D, et al. A panel of microRNA signature in serum for colorectal cancer diagnosis [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(10):17081-17091.
- [19] BRYANT R J, PAWLOWSKI T, CATTO J W, et al. Changes in circulating microRNA levels associated with prostate cancer [J]. *Br J Cancer*, 2012, 106(4):768-774.
- [20] 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.
- [21] FORNARI F, FERRACIN M, TRERE D, et al. Circulating microRNAs, miR-939, miR-595, miR-519d and miR-494, identify cirrhotic patients with HCC [J]. *PLoS One*, 2015, 10(10):e0141448.
- [22] LI Y, ZHANG L, LIU F, et al. Identification of endogenous controls for analyzing serum exosomal miRNA in patients with hepatitis B or hepatocellular carcinoma [J]. *Dis Markers*, 2015:893594.
- [23] LI Y, ZHENG Q P, BAO C Y, et al. Circular RNA is enriched and stable in exosomes: a promising biomarker for cancer diagnosis [J]. *Cell Res*, 2015, 25(8):981-984.
- [24] AL-HAJJ M. Cancer stem cells and oncology therapeutics [J]. *Curr Opin Oncol*, 2007, 19(1):61-64.
- [25] LIU C, YU S, ZINN K, et al. Murine mammary carcinoma exosomes promote tumor growth by suppression of NK cell function [J]. *J Immunol*, 2006, 176(3):1375-1385.
- [26] DUTTA S, WARSHALL C, BANDYOPADHYAY C, et al. Interactions between exosomes from breast cancer cells and primary mammary epithelial cells leads to Generation of reactive oxygen species which induce DNA damage response, stabilization of p53 and autophagy in epithelial cells [J]. *PLoS One*, 2014, 9(5):e97580.
- [27] CHO J A, PARK H, LIM E H, et al. Exosomes from breast cancer cells can convert adipose tissue-derived mesenchymal stem cells into myofibroblast-like cells [J]. *Int J Oncol*, 2012, 40(1):130-138.
- [28] KOSAKA N, IGUCHI H, HAGIWARA K, et al. Neutral sphingomyelinase 2 (nSMase2)-dependent exosomal transfer of angiogenic microRNAs regulate cancer cell metastasis [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(15):10849-10859.
- [29] OCHIENG J, PRATAP S, KHATUA AK, et al. Anchor-age-independent growth of breast carcinoma cells is mediated by serum exosomes [J]. *Exp Cell Res*, 2009, 315(11):1875-1888.
- [30] JUNG T, CASTELLANA D, KLINGBEIL P, et al. CD44v6 dependence of premetastatic niche preparation by exosomes [J]. *Neoplasia*, 2009, 11(10):1093-1105.
- [31] YU J L, MAY L, LHOTAK V, et al. Oncogenic events regulate tissue factor expression in colorectal cancer cells: implications for tumor progression and angiogenesis [J]. *Blood*, 2005, 105(4):1734-1741.
- [32] ANTONYAK MA, LI B, BOROUGHS LK, et al. Holowka DA and cerione RA [C]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011:4852-4857.
- [33] 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.
- [34] JIA Y, CHEN Y, WANG Q, et al. Exosome: emerging biomarker in breast cancer [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(25):41717-41733.
- [35] TETTA C, GHIGO E, SILENGO L, et al. Extracellular vesicles as an emerging mechanism of cell-to-cell communication [J]. *Endocrine*, 2013, 44(1):11-19.
- [36] ZHOU W, FONG M Y, MIN Y, et al. Cancer-secreted miR-105 destroys vascular endothelial barriers to promote metastasis [J]. *Cancer Cell*, 2014, 25(4):501-515.
- [37] DI MODICA M, REGONDI V, SANDRI M, et al. Breast cancer-secreted miR-939 downregulates VE-cadherin and destroys the barrier function of endothelial monolayers [J]. *Cancer Lett*, 2017(384):94-100.
- [38] KHAN S, BENNETT H F, TURAY D, et al. Early diagnostic value of survivin and its alternative splice variants in breast cancer [J]. *BMC Cancer*, 2014(14):176.
- [39] KAHLERT C, KALLURI R. Exosomes in tumor micro-environment influence cancer progression and metastasis [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2013, 91(4):431-437.
- [40] KHAN S, JUTZY JM, ASPE JR, et al. Survivin is released from cancer cells via exosomes [J]. *Apoptosis*, 2011, 16(1):1-12.