

· 综 述 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2020.22.033

外泌体在口腔颌面部恶性肿瘤中作用的研究进展*

杨林瑞,李青,张凤河[△]

(山东大学齐鲁医学院口腔医学院·口腔医院口腔颌面外科/山东省口腔组织再生重点实验室/山东省口腔生物材料与组织再生工程实验室,济南 250012)

[摘要] 外泌体是由各种细胞释放用于细胞间通讯的异质性纳米小泡,可特异性地包装和运输各种蛋白质、脂质和核酸,并参与介导肿瘤细胞与肿瘤微环境之间的相互作用。因此,外泌体不仅可以作为肿瘤预后和诊断的标志物,还可以用作潜在的治疗靶点和药物递送载体。本文就外泌体的分子特性,其在口腔颌面部恶性肿瘤进展和转移中的作用,以及在肿瘤诊断和治疗中的应用作一综述,为临床治疗提供新的思路。

[关键词] 外泌体;口腔癌;唾液腺癌;肿瘤微环境

[中图分类号] R739.81 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2020)22-3835-06

Research progress on the role of exosomes in malignant tumors in oral and maxillofacial regions*

YANG Linrui, LI Qing, ZHANG Fenghe[△]

(Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School and Hospital of Stomatology, Cheeloo College of Medicine, Shandong University/Shandong Key Laboratory of Oral Tissue Regeneration/Shandong Engineering Laboratory for Dental Materials and Oral Tissue Regeneration, Jinan, Shandong 250012, China)

[Abstract] Exosomes are heterogeneous nanometer-sized vesicles released by many types of cells and used for intercellular communication. Exosomes can specifically package and transport various proteins, lipids and nucleic acids, thus can mediate the crosstalk between tumor cells and tumor microenvironment in malignant tumor development. Therefore, exosomes can not only be used as new prognostic and diagnostic biomarkers, but also can be used as potential therapeutic targets and drug delivery vehicles. This article reviewed the molecular characteristics of exosomes, their role in the progression and metastasis of oral and maxillofacial malignant tumors, and their applications in tumor diagnosis and treatment, in order to provide new ideas for clinical treatment.

[Key words] exosomes; oral cancer; salivary gland cancer; tumor microenvironment

口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)具有较高的发病率及病死率,5年生存率不到50%,且平均发病年龄逐年降低^[1]。另一类恶性肿瘤,唾液腺腺样囊性癌(salivary adenoid cystic carcinoma, SACC)具有生长缓慢,早期侵犯血管、神经,以及易发生转移等特点。恶性肿瘤的形成包括产生、进展和转移3个阶段。在肿瘤形成过程中,肿瘤细胞释放的细胞外信号作用于肿瘤微环境,促进肿瘤的发展。而微环境中的其他细胞,如基质细胞、内皮细胞和免疫细胞等,也可以通过影响肿瘤微环境的方式影响肿瘤细胞的生理活动^[2],而介导肿瘤细胞和肿瘤微环境之间双向串扰的主要载体就是外泌体。外泌体作为细胞外囊泡的一员,是一种来自内吞体的、直径30~100 nm的磷脂双分子层结构囊泡,在各种体液

中均可检测到外泌体的存在。人体内的绝大多数细胞均可产生外泌体,同一种细胞可产生成分各异的各种外泌体。外泌体不但参与许多生理过程,而且与多种疾病的发病机制有关。本文对外泌体的分子特性,在口腔颌面部恶性肿瘤进展和转移中的作用,以及在肿瘤诊断和治疗中的应用作一综述,为相应的临床治疗提供新的思路。

1 外泌体的生物学特性

1.1 外泌体的产生

外泌体的产生可概括为以下三步^[3]:(1)细胞质膜向内凹陷,并在高尔基复合体的加工下形成早期内体;(2)早期内体向内出芽并与核内体膜分离,形成成熟的晚期内体,并进一步加工为多囊泡体(multivesicular body, MVB);(3)基于不同的生化特性,一部

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81802709)。 作者简介:杨林瑞(1995—),在读硕士研究生,主要从事口腔颌面部恶性肿瘤研究。

[△] 通信作者, E-mail: zfengh@sdu.edu.cn.

分 MVB 转运到溶酶体后降解,另一部分 MVB 与细胞膜融合,以内出芽的方式进行分泌,即为外泌体。

1.2 外泌体的组成成分

1.2.1 蛋白质

外泌体中的蛋白质可大致分为两类:(1)绝大多数外泌体共有的、进化保守的蛋白质。这类蛋白质部分参与外泌体结构的形成,包括微管蛋白、信号转导蛋白、肌动蛋白结合蛋白、膜转运和融合相关蛋白 Rab 及各类运输蛋白等^[4]。此外,还有外泌体标志性的四跨膜蛋白超家族成员,如 CD9、CD63、CD81 和 CD82 等;另一些如热休克蛋白(heat shock protein, HSP)中的 HSP70 与 HSP90 可以促进抗原呈递,并与恶性肿瘤的淋巴转移及不良预后相关^[5];另还有各种代谢酶,如磷脂酶。(2)不同来源的外泌体中含有特异性蛋白质分子,外泌体也因此具有不同的病理及生理学功能。抗原呈递细胞(antigen presenting cell, APC)来源的外泌体中含有主要组织相容性复合物 II (MHC II)及共刺激分子 CD80、CD86。T 淋巴细胞分泌的外泌体具有特异性的标记蛋白 CD3、穿孔蛋白和颗粒酶。恶性肿瘤细胞产生的外泌体中可以检测到过度表达的蛋白质标志物。因此,其在恶性肿瘤诊断中具有重要的潜在应用价值。

1.2.2 脂质

外泌体含有丰富的脂质,如胆固醇、鞘磷脂、磷酸甘油酯等。外泌体中含有的脂质也可分为两类:一类是细胞质膜及其类似成分,用以维持脂质双分子层结构^[6];而另一类则具有细胞特异性,如某些脂质可以抑制一些关键肿瘤生存信号通路(如 Notch),引起细胞凋亡。脂质还可通过传递信号分子参与信号转导及细胞间通讯^[7]。

1.2.3 RNA

外泌体中含有各种 RNA,主要是 mRNA 和微 RNA(miRNA)。外泌体不仅保护 RNA 在体外不被酶降解,还能作为载体将 RNA 转运到靶细胞中,发挥特定的功能。

2 外泌体在口腔颌面部恶性肿瘤进展和转移中的作用

恶性肿瘤细胞可分泌多种外泌体,一方面调节肿瘤微环境,促进肿瘤的生长和扩散;另一方面还可以调节固有和特异性免疫反应,参与肿瘤的免疫逃逸。

2.1 外泌体促进肿瘤血管形成

在 OSCC 中,转化生长因子- β 受体 I (T β R I)和转化生长因子- β 受体 II (T β R II)是转化生长因子- β (TGF- β)信号通路的跨膜受体,而微 RNA(miR)-142-3p 是内源性 T β R I 抑制剂。肿瘤细胞释放含有 miR-142-3p 的外泌体,一方面诱导供体肿瘤细胞中 T β R I 的过度表达,另一方面增强受体上皮细胞中 T β R I 的活性,从而促进肿瘤细胞的生长和瘤体的血管形成^[8]。OSCC 患者的间质成纤维细胞产生的含有 T β R II 的外泌体还能转运到原本对 TGF- β 配体无反

应的 OSCC 角化细胞中,并使其获得对 TGF- β 的应答性^[9]。OSCC 中 Sonic Hedgehog (SHH)信号通路被异常激活后通过下游的 RhoA/Rho 激酶(RhoA/ROCK)信号通路同样可促进血管形成。其产物 Shh 蛋白水平与肿瘤微血管分布、TNM 分期、复发和转移率相关。XIAO 等^[10]发现,舌鳞癌细胞系 Cal27 产生的外泌体中 Shh 蛋白水平是细胞内的 5 倍。WANG 等^[11]还发现,来自 OSCC 的富含层粘连蛋白 332 的外泌体可促进肿瘤原发灶周围的淋巴管生成,有助于淋巴管生态位的形成和恶性肿瘤的转移扩散。

2.2 外泌体在口腔颌面部恶性肿瘤细胞迁移与侵袭转移中的作用

在转移发生前,肿瘤周围的间质细胞和其他非恶性细胞[如肿瘤相关成纤维细胞(cancer-associated fibroblasts, CAFs)、内皮细胞和免疫细胞等],以及神经纤维和细胞外基质,共同提供了一个有助于肿瘤生长和扩散的微环境,这种微环境被称为转移前生态位。外泌体可以通过调节转移前生态位的形成,促进肿瘤的进展和转移。

上皮调节蛋白可增强 SACC 细胞的侵袭性和远处转移能力。YANG 等^[12]研究表明,从上皮调节蛋白基因过表达的腺样囊性癌细胞中分离出的富含上皮调节蛋白的外泌体,可以影响肿瘤微环境及肺转移前微环境,促进肿瘤细胞的肺转移。这类外泌体还能通过下调钙粘蛋白表达,诱导上皮细胞发生上皮-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)。上皮细胞间连接的溶解是 EMT 过程中最关键的步骤之一,腺样囊性癌细胞系 SACC-83 细胞的外泌体可以特异性地抑制几种紧密连接蛋白(如跨膜蛋白 Claudin-1、外周膜蛋白 ZO-1)和 β -连环蛋白表达,从而破坏紧密连接。这些外泌体还可以下调内皮细胞中的 ZO-1 和 Claudin-5 水平,促进 SACC 细胞的血行转移^[13]。

除此之外,高侵袭性舌鳞癌细胞的外泌体中的 miR-200c-3p 可以通过抑制受体细胞 CHD9 和 WRN 表达而诱导不具有侵袭性的肿瘤细胞产生侵袭潜能^[14]。SAKHA 等^[15]发现,具有高转移潜能的 OSCC 细胞外泌体中的 miR-1246 和 miR-342-3p 在转运至低转移潜能的癌细胞系后也显著增强了其细胞运动能力和侵袭能力;此外,低氧环境下 OSCC 细胞产生的外泌体可以将 miR-21 运送到正常氧含量的 OSCC 细胞中,并增强后者远处转移能力。

CAFs 在肿瘤微环境形成中起着重要作用。DING 等^[16]研究证实,长链非编码 RNA(LncRNA) FLJ22447 可通过作用于白细胞介素-33(IL-33)上调 α -平滑肌肌动蛋白、波形蛋白和 N-钙黏蛋白等表达,将正常成纤维细胞重编程为 CAFs,从而促进 OSCC 的发展。CAFs 还通过外泌体将 miR-382-5p 转运到 OSCC 细胞中,而 miR-382-5p 过表达与 OSCC 细胞的迁移和侵袭有关^[17]。OVERMILLER 等^[18]发现,

肿瘤微环境中的非恶性成纤维细胞可以内化恶性肿瘤细胞分泌的外泌体,并激活自身的细胞外调节蛋白激酶/丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶(ERK/Akt)信号通路进行增殖,miR-34a-5p 缺失的成纤维细胞产生的外泌体也可以通过激活 Akt 信号通路而促进 OSCC 进展^[19]。另一项研究表明,OSCC 细胞分泌的外泌体可以将健康人牙龈成纤维细胞转化为进行有氧糖酵解的成纤维细胞,从而为肿瘤细胞的迁移和侵袭提供能量^[20]。

刘小豪等^[21]发现,人牙周膜成纤维细胞在内化腺样囊性癌细胞系 SACC-83 细胞来源的外泌体后向致瘤表型转化,并分泌促炎细胞因子和神经生长因子(NGF)作用于肿瘤细胞中的神经营养受体酪氨酸激酶 1(neurotrophic receptor tyrosine kinase 1, NTRK1),激活 NGF-NTRK1 信号通路诱导肿瘤转移;此外,还可诱导 SACC-83 的 ERK 活化,激活丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)/ERK 信号通路,导致肿瘤细胞增殖能力的增强。

2.3 外泌体在免疫调节中的作用

激活的免疫细胞可显著降低舌鳞癌细胞的增殖和侵袭能力,但恶性肿瘤仍可以通过外泌体引起的免疫抑制实现肿瘤免疫逃逸,并维持免疫抑制的微环境。如 OSCC 细胞来源外泌体中的 miR-29a-3p 可促进 M2 亚型巨噬细胞极化,加强 OSCC 细胞的增殖和侵袭能力^[22]。这些因癌细胞聚集并产生特异性变化的巨噬细胞被称为肿瘤相关巨噬细胞(tumor-associated macrophages, TAMs),它们能产生多种细胞因子和细胞外基质重塑分子,从而促进血管生成、肿瘤生长和转移。当发挥抗肿瘤作用的 M1 亚型巨噬细胞吞噬了 OSCC 细胞外泌体中的血小板凝血酶蛋白家族 1(thrombospondin 1, THBS1)后也可以转化为 TAMs,从而调节 OSCC 细胞的迁移。TAMs 一方面直接抑制效应 T 淋巴细胞增殖,一方面招募辅助性 T 淋巴细胞或调节性 T 淋巴细胞到肿瘤微环境中,从而抑制效应 T 淋巴细胞对肿瘤细胞的杀伤作用^[23]。外泌体还可调节 OSCC 患者的获得性免疫反应,这些外泌体含有免疫检查点分子,如程序性细胞死亡蛋白 1(programmed cell death protein 1, PD-1)、程序性死亡配体 1(programmed cell death 1 ligand 1, PD-L1)和细胞毒性 T 淋巴细胞相关蛋白 4(cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4, CTLA-4),这些分子不仅能诱导 T 淋巴细胞凋亡和抑制 T 淋巴细胞增殖,还有助于肿瘤细胞逃脱免疫监视^[24]。

3 外泌体在口腔颌面部恶性肿瘤诊断和治疗中的作用

目前,组织活检仍是口腔颌面部恶性肿瘤诊断的“金标准”。然而,组织活检存在有创、患者舒适度差、价格高昂、可能加速肿瘤进展甚至引起肿瘤转移等缺点。此外,由于大多数肿瘤具有异质性,即肿瘤内不同区域的基因表达程度和转移潜能存在差异。而活

检组织只反映单一位点短时间内快速、动态的改变,无法指示整个肿瘤的变化。因此,研究人员一直在寻找用于恶性肿瘤早期诊断的新方法。

3.1 唾液中外泌体在口腔颌面部恶性肿瘤诊断中的作用

液体活组织检查可以反映肿瘤进展阶段、治疗效果和转移风险等,是一种无创、实时的诊断工具。而唾液作为成分最复杂也最重要的体液之一,其浓度、组成变化均可反映个体的口腔健康变化,还因其易获得、采集过程无创、标本量充足等优点,是进行液体活组织检查的理想标本来源。

ZLOTOGORSKI-HURVITZ 等^[25]研究表明,口腔恶性肿瘤患者和健康人外泌体具有不同的形态和分子特征,如口腔恶性肿瘤患者唾液中外泌体通常比健康人的体积更大,聚集程度更高,且常见的标志物 CD63 水平明显升高,CD9 和 CD81 水平明显下降,这一发现符合 CD9 和 CD81 抑制恶性肿瘤转移的特点,也为检测高危患者恶变提供了一种早期诊断工具。LANGEVIN 等^[26]进行 miRNA 测序发现,miR-486-5p、miR-486-3p 和 miR-10b-5p 等在头颈部鳞癌患者中明显过度表达,可能参与了免疫抑制和细胞代谢重编程,提示唾液外泌体中 miRNA 作为生物标志物的潜力。miR-24-3p 可靶向作用于生物节律调节基因 1,维持 OSCC 细胞的增殖,并且在 OSCC 细胞分泌的外泌体中含量明显上升,因此也可以作为潜在的生物标志物^[27]。

此外,LI 等^[28]发现低氧 OSCC 细胞来源的外泌体以低氧诱导因子依赖的方式增加 OSCC 细胞的迁移和侵袭能力;对常氧和低氧环境下 OSCC 细胞来源的外泌体 miRNA 测序结果显示,有 108 个 miRNA 存在差异表达,其中 miR-21 是缺氧条件下上调最显著的 miRNA。这一发现表明,低氧微环境可以刺激肿瘤细胞产生富含 miR-21 的外泌体,并将其输送到正常细胞以促进前转移行为^[28]。在蛋白质组学分析中,WINCK 等^[29]检测了 OSCC 患者和健康人群唾液外泌体中的 381 种蛋白质,发现有 8 种存在差异表达。此外,外泌体还与患者预后密切相关。WANG 等^[11]研究发现,出现淋巴转移的患者其唾液外泌体中往往高表达层黏连蛋白 332,而且手术前后血浆外泌体中 CD63 水平较低的 OSCC 患者往往具有较长的生存期^[30]。唾液中外泌体所含 PD-L1 水平升高不仅会增强免疫抑制,还与口腔恶性肿瘤的分期呈正相关^[24]。

3.2 外泌体在口腔颌面部恶性肿瘤治疗中的作用

对于恶性肿瘤,目前常用的治疗手段往往副作用大且费用昂贵。考虑到外泌体与肿瘤微环境的形成密切相关,抑制外泌体的合成、释放,以及降低其在肿瘤微环境中的水平可能成为治疗癌症的有效途径。

SENTO 等^[31]发现,肝素治疗可以抑制 OSCC 细胞摄取其他 OSCC 细胞分泌的外泌体,从而暂时性地

阻断外泌体的促肿瘤作用。此外,癌细胞对于外泌体的选择性分泌可能与癌细胞对抗癌药物的敏感性降低有关。对顺铂耐药的 OSCC 细胞系 H314 产生的外泌体中顺铂浓度较高,而细胞体中浓度较低,提示 H314 细胞可通过外泌体直接外排抗癌药物实现耐药,而用兰索拉唑抑制外泌体的分泌后 H314 细胞的存活率显著降低^[32]。在顺铂耐药的 OSCC 细胞释放的外泌体中高表达 miR-21,并且 miR-21 可通过外泌体转运,诱导其他 OSCC 细胞获得对顺铂的耐药性^[33]。此外,通过抑制外泌体中 miR-21-5p、转录激活因子 3 (STAT3) 和哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 的表达,使肿瘤细胞对顺铂再次增敏,显著降低肿瘤增殖^[34]。

外泌体中的多种 miRNA 都具有治疗作用。COL10A1 基因被发现在大多数正常组织中表达下调,而在多种恶性肿瘤(包括 OSCC)中表达上调。研究人员将转染了 miR-101-3p-Cy3 的原代人骨髓间充质干细胞产生的外泌体转运至受体 TCA8113 细胞系,发现其能抑制受体细胞 COL10A 的表达并显著降低侵袭、迁移和聚集能力^[35]。进一步的动物实验也表明,通过皮下注射人骨髓来源间充质干细胞(hBMSC)的 miR-101-3p 外显子,可有效减小肿瘤体积和重量,这也证实了 miR101-3p 在癌症调节中的功能。miR-138 可促进 CD8⁺ T 淋巴细胞的增殖和干扰素- γ (IFN- γ) 的产生,以增强其对 OSCC 细胞的杀伤作用,并能显著降低 CD8⁺ T 淋巴细胞的 PD-1 和 CTLA-4 的 mRNA 和蛋白含量。研究人员将慢病毒转染 miR-138 的 T 淋巴细胞产生的外泌体用于治疗 OSCC,结果显示,其对免疫功能正常的裸鼠体内 CAL27 细胞有抑制作用,但不能抑制 T 淋巴细胞缺乏裸鼠肿瘤的生长^[36]。

3.3 外泌体作为药物运输载体的潜力

外泌体作为药物运输的载体,具有以下优点^[37]: (1)自源性的外泌体不易引起有害的免疫反应;(2)磷脂双分子层保护其运载的“货物”不被酶降解,因此外泌体在体液中较稳定;(3)外泌体的转运效率高;(4)外泌体可以在整合素的介导下向靶器官迁移;(5)外泌体直径在 30~100 nm,可以通过增强渗透滞留效应较长时间存在于肿瘤微环境中;(6)外泌体体积小,可以很容易地通过包括血脑屏障在内的各种生物屏障。基于以上特点,越来越多的研究人员致力于设计开发基于外泌体的外源递送载体,用于将治疗药物或 DNA、mRNA、miRNAs 或其他类型的非编码 RNA 和蛋白质转移到靶细胞中。

小分子 RNA,如小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA),在过去的几十年里已经被大量用于基因治疗。裸露的 siRNA 在体循环中不稳定,容易降解,细胞来源和血浆来源的外泌体都能有效地将 siRNA 运送到单核血细胞中,从而导致基因敲除。外泌体运载的小核 RNA (small nuclear RNA, snRNA) 还

可以减少丙型肝炎病毒 (HCV) 对肝细胞的感染^[38]。除此之外,LI 等^[39]发现,被运送到肝星状细胞外泌体中的 miR-124 可以导致结缔组织生长因子表达减少,从而有效减轻了肝纤维化。此外,其他药物如天然化合物、合成纳米颗粒和小的化疗分子,也可通过外泌体进行运输。抗炎剂姜黄素被装载到外泌体中表现出更大的溶解度和代谢稳定性等,并且可以通过血脑屏障运送到大脑中,保护小鼠免受脂多糖诱导的脑部炎症^[40]。

4 小 结

此前已有许多研究证实,人的唾液中含有大量的外泌体,其组成成分及内容物会因人的生理或病理状态而存在差异。由于唾液外泌体的成分与血浆高度相似,且采集过程具有无创性,唾液来源的外泌体可以作为一种用于诊断不同口腔疾病及全身疾病的液体检查方式^[41]。然而,该方法应用于临床仍然有待进一步研究。

目前,从口腔颌面部恶性肿瘤患者的血浆或唾液中分离纯化外泌体的方法很多,如超速离心法、聚合物沉淀法等,但这些技术都缺乏高效率和敏感性。并且,由于唾液中黏蛋白含量高,其沉降速度较慢,外泌体回收率较低^[42]。此外,考虑到口腔复杂的解剖结构,并且在恶性肿瘤早期,唾液中肿瘤来源的外泌体水平可能相对较低,再加上唾液流速在不同情况下和个体间均存在差异,目前亟待进一步开发外泌体分离、鉴定和分析技术,以达到快速分离、分类及定量分析外泌体成分与内容物的目的^[43]。

尽管存在以上问题,外泌体仍有望作为肿瘤诊断和预后的生物标志物,以及口腔颌面部恶性肿瘤精确治疗的新靶点,外泌体的分离提纯及开发基于外泌体的新的药物载体方面仍需进一步研究。

参考文献

- [1] YAKOB M, FUENTES L, WANG M B, et al. Salivary biomarkers for detection of oral squamous cell carcinoma - current state and recent advances [J]. *Curr Oral Health Rep*, 2014, 1 (2): 133-141.
- [2] AZMI A S, BAO B, SARKAR F H. Exosomes in cancer development, metastasis, and drug resistance; a comprehensive review [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2013, 32(3/4): 623-642.
- [3] HESSVIK N P, LLORENTE A. Current knowledge on exosome biogenesis and release [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2018, 75(2): 193-208.
- [4] BURGIO S, NOORI L, MARINO GAMMAZZA A, et al. Extracellular vesicles-based drug delivery systems: a new challenge and the exemplum of malignant pleural mesothelioma [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21

- (15):5432.
- [5] ONO K, EGUCHI T, SOGAWA C, et al. HSP-enriched properties of extracellular vesicles involve survival of metastatic oral cancer cells [J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(9):7350-7362.
- [6] ZOCCO D, FERRUZZI P, CAPPELLO F, et al. Extracellular vesicles as shuttles of tumor biomarkers and anti-tumor drugs [J]. *Front Oncol*, 2014, 4:267.
- [7] THÉRY C, AMIGORENA S, RAPOSO G, et al. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids [J]. *Curr Protoc Cell Biol*, 2006(Suppl 30):3. 22. 1-3. 22. 29.
- [8] DICKMAN C T D, LAWSON J, JABALEE J, et al. Selective extracellular vesicle exclusion of miR-142-3p by oral cancer cells promotes both internal and extracellular malignant phenotypes [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(9):15252-15266.
- [9] LANGUINO L R, SINGH A, PRISCO M, et al. Exosome-mediated transfer from the tumor microenvironment increases TGF β signaling in squamous cell carcinoma [J]. *Am J Transl Res*, 2016, 8(5):2432-2437.
- [10] XIAO H T, FENG Y Y, TAO Y Q, et al. Microvesicles releasing by oral cancer cells enhance endothelial cell angiogenesis via Shh/RhoA signaling pathway [J]. *Cancer Biol Ther*, 2017, 18(10):783-791.
- [11] WANG S H, LIOU G G, LIU S H, et al. Laminin γ 2-enriched extracellular vesicles of oral squamous cell carcinoma cells enhance in vitro lymphangiogenesis via integrin α 3-dependent uptake by lymphatic endothelial cells [J]. *Int J Cancer*, 2019, 144(11):2795-2810.
- [12] YANG W W, YANG L Q, ZHAO F, et al. Epi-regulin promotes lung metastasis of salivary adenoid cystic carcinoma [J]. *Theranostics*, 2017, 7(15):3700-3714.
- [13] HOU J, WANG F, LIU X, et al. Tumor-derived exosomes enhance invasion and metastasis of salivary adenoid cystic carcinoma cells [J]. *J Oral Pathol Med*, 2018, 47(2):144-151.
- [14] KAWAKUBO -YASUKOCHI T, MORIOKA M, HAZEKAWA M, et al. miR-200c-3p spreads invasive capacity in human oral squamous cell carcinoma microenvironment [J]. *Mol Carcinog*, 2018, 57(2):295-302.
- [15] SAKHA S, MURAMATSU T, UEDA K, et al. Exosomal microRNA miR-1246 induces cell motility and invasion through the regulation of DENND2D in oral squamous cell carcinoma [J]. *Sci Rep*, 2016, 6:38750.
- [16] DING L, REN J, ZHANG D Y, et al. A novel stromal lncRNA signature reprograms fibroblasts to promote the growth of oral squamous cell carcinoma via lncRNA-CAF/interleukin-33 [J]. *Carcinogenesis*, 2018, 39(3):397-406.
- [17] SUN L P, XU K, CUI J, et al. Cancer-associated fibroblast-derived exosomal miR-382-5p promotes the migration and invasion of oral squamous cell carcinoma [J]. *Oncol Rep*, 2019, 42(4):1319-1328.
- [18] OVERMILLER A M, PIERLUISSI J A, WERMUTH P J, et al. Desmoglein 2 modulates extracellular vesicle release from squamous cell carcinoma keratinocytes [J]. *FASEB J*, 2017, 31(8):3412-3424.
- [19] LI Y Y, TAO Y W, GAO S, et al. Cancer-associated fibroblasts contribute to oral cancer cells proliferation and metastasis via exosome-mediated paracrine miR-34a-5p [J]. *EBioMedicine*, 2018, 36:209-220.
- [20] JIANG E, XU Z, WANG M, et al. Tumoral microvesicle-activated glycometabolic reprogramming in fibroblasts promotes the progression of oral squamous cell carcinoma [J]. *FASEB J*, 2019, 33(4):5690-5703.
- [21] 刘小豪, 王方圆, 侯晋, 等. SACC-83 来源的外泌体促进腺样囊性癌细胞的增殖 [J]. *南方医科大学学报*, 2018, 38(8):1008-1013.
- [22] CAI J, QIAO B, GAO N, et al. Oral squamous cell carcinoma-derived exosomes promote M2 subtype macrophage polarization mediated by exosome-enclosed miR-29a-3p [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2019, 316(5):C731-740.
- [23] XIAO M, ZHANG J J, CHEN W, et al. M1-like tumor-associated macrophages activated by exosome-transferred THBS1 promote malignant migration in oral squamous cell carcinoma [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37(1):143.
- [24] THEODORAKI M N, YERNENI S S, HOFFMANN T K, et al. Clinical significance of PD-L1⁺ exosomes in plasma of head and neck cancer patients [J]. *Clin Cancer Res*, 2018, 24(4):896-905.
- [25] ZLOTOGORSKI-HURVITZ A, DAYAN D, CHAUSHU G, et al. Morphological and molecular features of oral fluid-derived exosomes: oral cancer patients versus healthy individuals [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2016, 142(1):101-110.

- [26] LANGEVIN S, KUHNELL D, PARRY T, et al. Comprehensive microRNA-sequencing of exosomes derived from head and neck carcinoma cells in vitro reveals common secretion profiles and potential utility as salivary biomarkers[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(47): 82459-82474.
- [27] HE L, PING F, FAN Z N, et al. Salivary exosomal miR-24-3p serves as a potential detective biomarker for oral squamous cell carcinoma screening[J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 121: 109553.
- [28] LI L, LI C, WANG S, et al. 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(7): 1770-1780.
- [29] WINCK F V, PRADO RIBEIRO A C, RAMOS DOMINGUES R, et al. Insights into immune responses in oral cancer through proteomic analysis of saliva and salivary extracellular vesicles[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 16305.
- [30] RODRIGUEZ ZORRILLA S, PÉREZ-SAYANS M, FAIS S, et al. A pilot clinical study on the prognostic relevance of plasmatic exosomes levels in oral squamous cell carcinoma patients [J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(3): 429.
- [31] SENTO S, SASABE E, YAMAMOTO T. Application of a persistent heparin treatment inhibits the malignant potential of oral squamous carcinoma cells induced by tumor cell-derived exosomes[J]. *PLoS One*, 2016, 11(2): 1-20.
- [32] KHOO X H, PATERSON I C, GOH B H, et al. Cisplatin-resistance in oral squamous cell carcinoma; regulation by tumor cell-derived extracellular vesicles[J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(8): 1166.
- [33] LIU T, CHEN G, SUN D W, et al. Exosomes containing miR-21 transfer the characteristic of cisplatin resistance by targeting PTEN and PD-CD4 in oral squamous cell carcinoma[J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2017, 49(9): 808-816.
- [34] CHEN J H, WU A, BAMODU O A, et al. Ovatodiolide suppresses oral cancer malignancy by down-regulating exosomal miR-21/STAT3/ β -catenin cargo and preventing oncogenic transformation of normal gingival fibroblasts[J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 12(1): 56.
- [35] XIE C, DU L Y, GUO F Y, et al. Exosomes derived from microRNA-101-3p-overexpressing human bone marrow mesenchymal stem cells suppress oral cancer cell proliferation, invasion, and migration[J]. *Mol Cell Biochem*, 2019, 458(1/2): 11-26.
- [36] LI L, LU S, LIANG X, et al. $\gamma\delta$ TDEs: an efficient delivery system for miR-138 with anti-tumoral and immunostimulatory roles on oral squamous cell carcinoma[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2019, 14: 101-113.
- [37] DAS C K, JENA B C, BANERJEE I, et al. Exosome as a novel shuttle for delivery of therapeutics across biological barriers[J]. *Mol Pharm*, 2019, 16(1): 24-40.
- [38] DE VHARE P B, SASAKI R, SHRIVASTAVA S, et al. Exosome-mediated intercellular communication between hepatitis C virus-infected hepatocytes and hepatic stellate cells[J]. *J Virol*, 2017, 91(6): e02225-16.
- [39] LI P, KASLAN M, LEE S H, et al. Progress in exosome isolation techniques[J]. *Theranostics*, 2017, 7(3): 789-804.
- [40] KALANI A, CHATURVEDI P. Curcumin-primed and curcumin-loaded exosomes; potential neural therapy[J]. *Neural Regen Res*, 2017, 12(2): 205-206.
- [41] HAN Y, JIA L, ZHENG Y F, et al. Salivary exosomes; emerging roles in systemic disease[J]. *Int J Biol Sci*, 2018, 14(6): 633-643.
- [42] MOMEN-HERAVI F, BALAJ L, ALIAN S, et al. Impact of biofluid viscosity on size and sedimentation efficiency of the isolated microvesicles[J]. *Front Physiol*, 2012, 3: 162.
- [43] RAMIREZ M, AMORIM M G, GADELHA C, et al. Technical challenges of working with extracellular vesicles[J]. *Nanoscale*, 2018, 10(3): 881-906.