

· 综述 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2020.22.034

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20200930.1000.006.html\(2020-09-30\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20200930.1000.006.html(2020-09-30))

外泌体在结直肠癌早期诊疗中的研究进展*

廖伟¹, 杨红^{1△}, 周晶晶¹, 李生伟²

(1. 重庆市中医院普外科 400021; 2. 重庆医科大学附属第二医院肝胆外科 400010)

[摘要] 结直肠癌(CRC)由于其转移特性和对现有治疗的耐药性,是全球导致癌症死亡的第三大主要原因。外泌体是包含脂类、蛋白质、DNA 和 RNA 的纳米级细胞外囊泡,可通过细胞间信息传递参与肿瘤发生、肿瘤细胞侵袭及转移、耐药等。本文对外泌体在 CRC 发生、发展、预后,以及作为生物学标记物等方面的最新研究进展进行综述。

[关键词] 外泌体;结直肠肿瘤;细胞增殖;肿瘤浸润;抗药性,肿瘤;生物学标记

[中图法分类号] R735.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2020)22-3841-04

Research progress of exosomes in the early diagnosis and treatment of colorectal cancer*

LIAO Wei¹, YANG Hong^{1△}, ZHOU Jingjing¹, LI Shengwei²

(1. Department of General Surgery, Chongqing Traditional Chinese Medicine Hospital, Chongqing 400021, China; 2. Department of Hepatobiliary Surgery, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

[Abstract] Colorectal cancer (CRC) is the third leading cause of cancer mortality worldwide due to its metastatic characteristics and resistance to existing treatments. Exosomes are nano-scale extracellular vesicles containing lipids, proteins, DNA and RNA, which are involved in tumor genesis, tumor cell invasion and metastasis and drug resistance through intercellular information transmission. The latest research progress of exosomes in the occurrence, development and prognosis of CRC, and being biological markers were reviewed in this article.

[Key words] exosomes; colorectal neoplasms; cell proliferation; neoplasm invasiveness; drug resistance, neoplasm; biomarkers

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是最常见的消化道肿瘤之一,也是目前全世界第三大致死的恶性肿瘤,预计在 2030 年全球新发病例增长率会超过 60%^[1],所以 CRC 的诊治是一个具有世界范围意义的健康问题。据国外文献报道,CRC 在美国已成为癌症相关死亡第二大原因,每年估计有 5 万人死于 CRC^[2]。尽管近年来全世界范围内,针对 CRC 的早期筛查及治疗,包括靶向药物开发有了一定的进展,但仍有 50% 的患者死于疾病复发或远处转移^[3],且目前现有的筛查指标虽有助于降低病死率,但因 CRC 发病率不断上升,仍不能满足早期筛查的需求,考虑与患者依从性差、筛选指标敏感性及其特异性不足、治疗费用昂贵及具有侵入性等相关^[4]。近年来,CRC 发病逐年增加并有逐步年轻化趋势。国外相关数据表明,自 1994 年以来,50 岁以下人群 CRC 发病率以每年 2% 的速度增加,且其中一半以上的患者缺乏特异

性,既无遗传性综合征,也无家族性 CRC 病史^[5]。因此,寻找灵敏度及特异度更高、更经济可行的 CRC 早期筛查指标具有重要意义。

1 外泌体的形成与生物学基础

外泌体(exosome)是脂质双层膜包裹的小泡,其起源于胞内消化过程中的质膜。早期核内体形成,逐渐成熟为晚期核内体或多泡体(multivesicular bodies, MVBs)。MVBs 膜形成腔内小泡,称为外泌体。外泌体包含膜、mRNA、微 RNA(microRNA, miRNA)、蛋白质和 DNA 的特定区域,MVBs 与质膜融合,导致外泌体的释放^[6]。释放后的外泌体可进入血浆、脑脊液、尿液、母乳和渗出液等体液,以旁分泌或内分泌的方式参与细胞间通讯,控制细胞信息传递及调控,从而影响目标细胞的行为^[7-8]。外泌体含有其释放源细胞的所有信息,国外大量研究表明,外泌体内所含 miRNA 是其同源肿瘤源细胞实现功能,并

* 基金项目:重庆市科学技术委员会绩效激励引导专项课题(2018-cj-25)。 作者简介:廖伟(1983—),主治医师,硕士,主要从事胃肠及肝胆临床研究。

△ 通信作者, E-mail: haifen2357@126.com。

继发侵犯和远处转移的重要因素;此外,国内外部分研究已深入扩展到使用外泌体和 miRNA 作为检测癌症和疾病进展的生物标志物^[9]。与此同时,国内学者 WONG 等^[10]通过大样本数据分析,指出外泌体生物标志物对各类癌症具有良好的早期诊断能力,且与传统筛查指标相比更具有敏感性和特异性,可作为肿瘤诊断和判断预后的潜在生物标志物。由此可见,外泌体具有多种功能,有望成为肿瘤患者临床早期诊断和治疗的新指标。

2 外泌体在 CRC 中的作用

外泌体中含有大量的非编码 RNA 尤其是 miRNA,因其信息量大、灵敏度高且与同源细胞信息一致而成为近年的研究热点。通过对外泌体中 miRNA 的不断深入研究,发现外泌体在 CRC 的发病过程中具有重要意义。

2.1 肿瘤的发生与增殖

肿瘤的发生过程是一个极其复杂的细胞转化及增殖过程。在已知的研究中,通过细胞间信息传递,肿瘤分泌的外泌体对供体细胞产生影响,并支持肿瘤的分化和生长。ZHANG 等^[11]研究发现,CRC 细胞外泌体中 miR-200 明显升高,且后者可通过细胞间通讯传递至新的目标细胞完成癌细胞的增殖,此外过表达 p27/kip1 可有效抑制 miR-200 诱导细胞增殖。而在 HUANG 等^[12]的研究中发现,低氧 CRC 细胞来源的外泌体可促进内皮细胞的分化和增殖,其机制考虑与外泌体内富含的 Wnt4,可增加内皮细胞内 β 蛋白核移位相关;此外,敲除 RAB27 基因可减少 CRC 细胞外泌体分泌,从而抑制内皮细胞的增殖。由此可见,外泌体可以通过细胞间通路转移 CRC 细胞的成分影响增殖,从而促进肿瘤细胞的生长。

2.2 肿瘤的侵袭和转移

目前研究认为,肿瘤细胞扩散的主要机制是上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transformation, EMT),但这一过程十分复杂,由不同家族的转录调控因子通过不同的信号通路调控,可能与细胞间蛋白、细胞基质成分、参与细胞极性的元素、细胞骨架重塑和蛋白酶(包括基质金属蛋白酶)的表达变化有关^[13]。HU 等^[14]研究表明,肿瘤相关成纤维细胞(cancer-associated fibroblasts, CAFs)可直接将外泌体转移到 CRC 细胞中发挥作用,导致 CRC 细胞中 miR-92a-3p 水平显著升高,后者可激活 Wnt/ β -连环素(β -catenin)线粒体凋亡通路,促进细胞 EMT,从而导致肿瘤的转移。LI 等^[15]研究表明,CRC 患者的血浆外泌体中糖基磷脂酰肌醇-1(glypican 1, GPC1)阳性水平升高,但血浆 miR-96-5p 和 miR-149 水平却下降;此外,GPC1 激活的 EMT 增加了 HT29 和 HCT-116 结肠癌细胞的侵袭和迁移。相反,沉默 GPC1 表达并过表达 miR-96-5p 和 miR-149 可显著抑制 EMT 活性,降低 HT29 和 HCT-116 细胞的侵袭和迁移。除了 EMT 过程外,肿瘤相关的巨噬细胞也可促进癌症的发生和发展。

PENG 等^[16]研究发现,巨噬细胞虽然是抗肿瘤免疫的重要组成部分,但有可能从介导肿瘤消除的 M1 表型逆转为促进肿瘤进展的另一种 M2 表型。该研究还发现,经外泌体处理后的巨噬细胞可显著提高白细胞介素-4(IL-4)的表达,而后者正是 M2 型极化的强诱导剂。同样,LAN 等^[17]研究发现,M2 巨噬细胞调控的 CRC 细胞迁移和侵袭依赖于 M2 巨噬细胞来源的外泌体(MDE),后者中 miR-21-5p 和 miR-155-5p 呈高表达,miR-21-5p 和 miR-155-5p 通过 MDE 转移到 CRC 细胞并与 BRG1 编码序列结合,下调了 BRG1 的表达从而实现肿瘤细胞转移。

2.3 肿瘤的耐药及预后

肿瘤的化疗耐药与肿瘤的预后密切相关,而化疗耐药在 CRC 患者中很常见,通常与肿瘤干细胞(cancer stem cells, CSCs)的存在有关,但其潜在机制仍有待阐明。一些研究将细胞成分(如 cld7)的去监管化与耐药联系起来^[18]。然而,越来越多的研究表明,外泌体在耐化疗药中也起着重要作用。HU 等^[19]研究发现,通过成纤维细胞外泌体中的 Wnts,可诱导大部分的 CRC 细胞去分化,从而获得与 CSCs 相同的表型及功能产生耐药。另一项研究也表明,从 CM 中分离的外泌体具有与肿瘤相关成纤维细胞(CAFs)相同的共性,如促进 CSCs 的分化、克隆性及肿瘤生长,而抑制外泌体的分泌可明显降低化疗耐药^[20]。西妥昔单抗广泛用于转移性结肠癌患者的化疗,但其耐药限制了临床疗效。ZHANG 等^[21]研究发现,西妥昔单抗耐药机制与外泌体中第 10 号染色体同源丢失性磷酸酶张力蛋白(PTEN)及磷酸化 Akt 相关,将 Caco-2 细胞暴露于 RKO 细胞来源的外泌体后,Caco-2 细胞中 PTEN 降低,苏氨酸蛋白激酶(Akt)磷酸化水平升高,而 Akt 抑制剂可以阻止 RKO 细胞外泌体诱导的 Caco-2 细胞耐药。

鉴于以上所述,靶向外泌体中的 miRNA 具有重要意义。LIU 等^[22]用 miR-128-3p 表达慢病毒转染耐草酸铂 CRC 细胞和正常人肠黏膜上皮细胞(FHC),结果表明 miR-128-3p 转染的 FHC 有效地将 miR-128-3p 包装为可分泌的外泌体,并介导 miR-128-3p 递送至耐奥沙利铂细胞,改善了 CRC 细胞体内外奥沙利铂的应答。此外,miR-128-3p 过表达上调了上皮型钙黏蛋白(E-cadherin)水平,并通过抑制耐药细胞中 Bmi1 的表达抑制了奥沙利铂诱导的 EMT,同时通过抑制药物转运体多药耐药蛋白 5(MRP5)的表达,减少奥沙利铂的外排。JIN 等^[23]通过耐药 CRC 细胞培养并分离外泌体,发现其中 miR-21-5p、miR-1246、miR-1229-5p、miR-135b、miR-425 和 miR-96-5p 表达明显上调,在临床样品分析中,通过与化疗敏感对照组相比,化疗耐受患者血清外泌体中 miR-21-5p、miR-1246、miR-1229-5p 和 miR-96-5p 的表达水平显著升高,靶向这些 miRNA 可能促进奥沙利铂和 5-氟尿嘧啶的化学敏感性,可能是改善 CRC 耐药的有前

景的策略。

3 外泌体作为 CRC 早期诊断的生物标志物

鉴于外泌体在 CRC 发生、发展过程中的作用,近年来外泌体中 miRNA 成为研究热点,特别是为早期筛查 CRC 而寻找生物标志物的研究呈指数级增长。研究表明,与直接从患者的血浆或血清样品中扩增 miRNA 相比,从肿瘤外泌体中分离出的 miRNA 更为稳定,因此可以作为更可靠的生物标志物^[24]。YAN 等^[25]通过微阵列分析测定血清外泌体 miR-6803-5p 水平,并通过实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 进行验证。采用 Kaplan-Meier 分析估计 CRC 患者的总生存率(OS)和无病生存率(DFS)。与健康对照组相比,CRC 患者血清外泌体 miR-6803-5p 水平显著升高,且血清外泌体 miR-6803-5p 水平升高的患者 OS 和 DFS 较低,提示外体 miR-6803-5p 是 CRC 患者潜在的诊断和预后标志物。ZHANG 等^[26]研究发现,CRC 中有 7 个 miRNA (miR-103a-3p、miR-18a-5p、miR-17-5p 等)明显过表达,在 CRC 组织中发现 miR-17-5p、miR-18a-5p 等显著上调;而 CRC 血浆外泌体中 miR-17-5p 和 miR-18a-5p 均显著升高,并以此为基础建立了外周血浆中 CRC 检测的 7-miRNA 信号系统。LI 等^[27]研究发现,在 CRC 患者肿瘤组织及血浆中,GPC1 阳性外泌体及 miR-96-5p 和 miR-149 的表达均明显低于肿瘤周围组织和健康对照组,手术治疗后 2 个月,所有检测指标水平均明显恢复;而过表达 miR-96-5p 和 miR-149 可显著降低 HT-29 和 HCT-116 细胞的细胞活力,增加细胞凋亡,抑制异种移植瘤 HT-29 和 HCT-116 细胞生长,所以 miR-96-5p 和 miR-149 表达降低可以作为 CRC 诊断的特异性标志物。HOSSEINI 等^[28]也证实了 miR-150、miR-21、miR-192 等外泌体 miRNA 对结肠癌的早期诊断具有特异性。

与此同时,部分研究指出外泌体中的特异性蛋白也可作为 CRC 早期诊断的生物学标志。SUN 等^[29]研究发现,外泌体 Copine III (CPNE3)在 CRC 组织中表达增加,免疫组织化学法检测 CRC 组织中 CPNE3 表达与 ELISA 法检测血清外泌体 CPNE3 表达呈正相关($r=0.645, P<0.001$),且外泌体 CPNE3 检测对 CRC 的灵敏度为 67.5%,特异度为 84.4%。进一步研究显示外泌体 CPNE3 水平较低的 CRC 患者 DFS 明显较高,故外泌体 CPNE3 对 CRC 的诊断和预后具有潜在的意义。此外,结肠癌相关转录因子 2 (CCAT2)在多种癌症中起着重要作用。然而,循环表达 CCAT2 在 CRC 中的临床意义尚不清楚,基于此 WANG 等^[30]通过对比研究发现,CRC 肿瘤组织中 CCAT2 表达水平明显高于癌旁非肿瘤组织($P<0.05$),CRC 患者血清 CCAT2 表达水平明显高于健康人($P<0.05$),术后标本 CCAT2 水平明显低于术前标本($P=0.01$)。但也发现一个有趣的现象,CRC 外泌体中 CCAT2 表达上调($P<0.001$),血清和外泌体中 CCAT2 水平无明显差异,表明循环 CCAT2 可

能受外泌体的保护,可以作为 CRC 的一个新的潜在预测因子。

由此可见,外泌体作为 CRC 早期诊断的生物标志物已被越来越多的研究者所关注,众多研究结果也表明通过对外泌体的分析,可提高 CRC 早期筛选的特异性和敏感性。

4 小 结

现有的研究已证明外泌体在 CRC 诊断及预后中具有重要意义,并成为近年的研究热点。然而,目前国内外对外泌体的研究尚处于探索阶段,存在许多不足及挑战:(1)CRC 外泌体中相关生物学标志物的筛选存在盲目性和差异性,表现在不同研究者的结果中有着不同的生物学标志物,这些生物学标志物缺乏共性及特异性,需进一步通过大样本数据反复筛选、验证;(2)CRC 外泌体在肿瘤的增殖、与宿主免疫系统的相互作用、血管生成和治疗反应等方面的作用机制也尚未完全阐明,给研究带来一定的难度。但随着学界对外泌体在 CRC 中的机制的研究不断深入,相信在不久的将来可从分子层面对 CRC 的早期诊断、治疗及预后开创一个新的研究领域。

参考文献

- [1] ARNOLD M, SIERRA M S, LAVERSANNE M, et al. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality[J]. Gut, 2017, 66(4): 683-691.
- [2] LIANG P S, DOMINITZ J A. Colorectal Cancer Screening: is colonoscopy the best option? [J]. Med Clin North Am, 2019, 103(1): 111-123.
- [3] TOIYAMA Y, OKUGAWA Y, FLESHMAN J, et al. MicroRNAs as potential liquid biopsy biomarkers in colorectal Cancer: a systematic review[J]. Biochim Biophys Acta Rev Cancer, 2018, 1870(2): 274-282.
- [4] WALSH J M E, TERDIMAN J P. Colorectal cancer screening: clinical applications[J]. JAMA, 2003, 289(10): 1297-1302.
- [5] MAURI G, SARTORE-BIANCHI A, RUSSO A G, et al. Early-onset colorectal cancer in young individuals[J]. Mol Oncol, 2019, 13(2): 109-131.
- [6] KOUREMBANAS S. Exosomes: vehicles of intercellular signaling, biomarkers, and vectors of cell therapy[J]. Annu Rev Physiol, 2015, 77: 13-27.
- [7] LUDWIG A K, GIEBEL B. Exosomes: small vesicles participating in intercellular communication[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2012, 44(1): 11-15.
- [8] KAHLERT C, KALLURI R. Exosomes in tumor microenvironment influence cancer progression and

- metastasis[J]. *J Mol Med (Berl)*, 2013, 91(4):431-437.
- [9] GRANER M W, SCHNELL S, OLIN M R. Tumor-derived exosomes, microRNAs, and cancer immune suppression[J]. *Semin Immunopathol*, 2018, 40(5):505-515.
- [10] WONG C H, CHEN Y C. Clinical significance of exosomes as potential biomarkers in cancer [J]. *World J Clin Cases*, 2019, 7(2):171-190.
- [11] ZHANG Z, XING T, CHEN Y. Exosome-mediated miR-200b promotes colorectal cancer proliferation upon TGF- β 1 exposure [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 106:1135-1143.
- [12] HUANG Z, FENG Y. Exosomes derived from hypoxic colorectal cancer cells promote angiogenesis through wnt4-induced β -catenin signaling in endothelial cells[J]. *Oncol Res*, 2017, 25(5):651-661.
- [13] CAO H, XU E, LIU H, et al. Epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer metastasis: a system review [J]. *Pathol Res Pract*, 2015, 211(8):557-569.
- [14] HU J L, WANG W, LAN X L, et al. CAFs secreted exosomes promote metastasis and chemotherapy resistance by enhancing cell stemness and epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer[J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1):91.
- [15] LI J, LI B, REN C, et al. The clinical significance of circulating GPC1 positive exosomes and its regulatory miRNAs in colon cancer patients[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(60):101189-101202.
- [16] PENG B, HU J, ZHANG H, et al. Exosomes from CT26 cells promote tumor progression by subverting macrophage from M1 to M2 mediated partially by interleukin-4[J]. *Biomedica*, 2014, 30(3):1-7.
- [17] LAN J, SUN L, XU F, et al. M2 macrophage-derived exosomes promote cell migration and invasion in colon cancer[J]. *Cancer Res*, 2019, 79(1):146-158.
- [18] PHILIP R, HEILER S, MU W, et al. Claudin-7 promotes the epithelial-mesenchymal transition in human colorectal cancer [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(4):2046-2063.
- [19] HU Y B, YAN C, MU L, et al. Exosomal Wnt-induced dedifferentiation of colorectal cancer cells contributes to chemotherapy resistance [J]. *Oncogene*, 2019, 38(11):1951-1965.
- [20] HU Y, YAN C, MU L, et al. Fibroblast-derived exosomes contribute to chemoresistance through priming cancer stem cells in colorectal cancer[J]. *PLoS One*, 2015, 10(5):e0125625.
- [21] ZHANG S, ZHANG Y, QU J, et al. Exosomes promote cetuximab resistance via the PTEN/Akt pathway in colon cancer cells [J]. *Braz J Med Biol Res*, 2017, 51(1):e6472.
- [22] LIU T, ZHANG X, DU L, et al. Exosome-transmitted miR-128-3p increase chemosensitivity of oxaliplatin-resistant colorectal cancer [J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1):43.
- [23] JIN G, LIU Y, ZHANG J, et al. A panel of serum exosomal microRNAs as predictive markers for chemoresistance in advanced colorectal cancer[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2019, 84(2):315-325.
- [24] KÖBERLE V, PLELI T, SCHMITHALS C, et al. Differential stability of cell-free circulating microRNAs: implications for their utilization as biomarkers[J]. *PLoS One*, 2013, 8(9):e75184.
- [25] YAN S, JIANG Y, LIANG C, et al. Exosomal miR-6803-5p as potential diagnostic and prognostic marker in colorectal cancer [J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(5):4113-4119.
- [26] ZHANG H, ZHU M, SHAN X, et al. A panel of seven-miRNA signature in plasma as potential biomarker for colorectal cancer diagnosis [J]. *Gene*, 2019, 687:246-254.
- [27] LI J, CHEN Y, GUO X, et al. GPC1 exosome and its regulatory miRNAs are specific markers for the detection and target therapy of colorectal cancer [J]. *J Cell Mol Med*, 2017, 21(5):838-847.
- [28] 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.
- [29] SUN B, LI Y, ZHOU Y, et al. Circulating exosomal CPNE3 as a diagnostic and prognostic biomarker for colorectal cancer [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(2):1416-1425.
- [30] WANG L, DUAN W, YAN S, et al. Circulating long non-coding RNA colon cancer-associated transcript 2 protected by exosome as a potential biomarker for colorectal cancer [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 113:108758.