

文章编号:1001-764X(2012)10-846-04

Exosomes(外体)在临床诊断和治疗中的应用*

朱伟,李雅红(江苏大学基础医学与医学技术学院,江苏镇江 212013)



作者简介:朱伟,研究员,博士,硕士研究生导师。现任江苏大学检验医学教学实验中心主任,主要从事血液学教学及干细胞和肿瘤基础与临床研究。主持承担国家自然科学基金及江苏省自然科学基金课题各 1 项,市、厅级课题 3 项,参与国家及省级科研课题 5 项;获教育部自然科学奖二等奖 1 项,江苏省科技进步三等奖 2 项,镇江市科技进步一等奖 1 项及江苏省卫生厅医学新技术引进奖二等奖 1 项。发表论文 30 余篇,第一作者 SCI 单篇最高影响因子 5.359,SCI 单篇最高引用 150 余次。参与高等教育出版社《临床基础检验学》、卫生部规划教材《临床检验基础》、《临床血液学检验》及《干细胞与肿瘤》等教材和专著编写共 10 本。

摘要:Exosomes(外体)是由细胞内多泡体(multive vesicles bodies, MVB)与胞膜融合后分泌到细胞外环境中的直径 40~100 nm 的膜性囊泡,它可由多种细胞分泌,作为一种载体在细胞间起到信息传递作用。外体存在于多种体液,包括血浆、尿液、恶性腹水、唾液、母乳及滑膜液等。外体含有能反映其来源细胞生理状态的多种蛋白质、microRNAs 及 mRNAs,为疾病诊断提供了丰富的生物学标志物。外体介导细胞间蛋白、microRNAs、mRNAs 及信号分子的转移为其用于临床治疗提供了应用前景。本文综述了外体的研究进展及其在疾病诊断、预后判断及治疗中的重要作用。

关键词:外体(exosomes);生物标志;诊断;基因治疗

中图分类号:R446;Q73

文献标志码:A

30 年前 Johnstone 和 Stahl 等从电镜中发现了 exosomes(外体),认为是由细胞释放的一种直径在 40~100 nm 的小囊泡(J Cell Bio, 1983, 97:329; J Cell Bio, 1985, 101:942)。近年来外体在肿瘤、感染、免疫及基因治疗等方面研究受到广泛关注。外体主要成分是细胞质,通过与细胞膜融合排至胞外,这种小囊泡主要包含其来源细胞的部分核酸、蛋白质、脂质成分^[1-2]。外体可以由多种细胞分泌,如造血细胞、间质细胞、内皮细胞和肿瘤细胞^[2]。已从多种体液中提取并纯化出外体,如:血、尿液、恶性腹水、羊水、唾液、支气管肺泡灌洗液、乳汁和滑液等^[3]。研究发现外体携带的核酸、蛋白质、脂质成分具有其来源细胞的特异性,可作为疾病诊断的生物学标志物^[4]。另外外体具有细胞间转移的功能,可作为生物载体用于基因治疗。本文对外体的生物学特性、分离纯化方法、诊断和治疗价值作一简要综述。

1 外体的生物学特性

细胞的旁分泌物质主要有两类,一类是可溶性的细胞因子,另一类是不可溶性膜性囊泡,主要包括微泡(microvesicles)、凋亡小体(apoptotic bodies)、核外粒体(ectosomes)和外体等,它们各有不同的生物

学特征和功能,其中外体是最主要的活性成分,在细胞信息传递中起着重要作用^[5-6]。它是一种由胞内多泡体(MVB)与胞膜融合后分泌到细胞外的膜性小囊泡,电镜下其外观是一种特征性的“碟形”小体。目前有关外体的命名经常混淆,有时与微泡混为一谈。外体的分离纯化方法及与其他细胞外囊泡的鉴别及功能是目前研究的重要方面。外体的特性主要有:(1)直径为 40~100 nm;(2)具有来源细胞的胞质和脂质胞膜成分;(3)密度为 1.13~1.19 g/mL;(4)可通过超速离心获得;(5)含有其来源细胞的特异性蛋白及外体相关蛋白质,如 CD9、CD81、CD63、Alix 等^[7]。蛋白质组学分析发现外体的蛋白质组成较为复杂,不同细胞来源的外体蛋白质组成亦有差异,故外体具有较复杂的生物学功能。细胞分泌的外体还含有能在细胞间进行转移的 RNA(mRNA 及 microRNAs),通过在细胞间水平转移方式激活靶细胞产生一系列生物学效应^[8],外体在细胞微环境中具有十分重要的作用。

Pan 等发现网织红细胞正是通过释放小囊泡方式将转铁蛋白受体排至胞外而分化为成熟红细胞(Cell, 1983, 33:967)。外体可由大部分具有生物活性的细胞分泌,无论是造血细胞还是非造血细胞。

* 基金项目:江苏大学高级专业人才科研启动基金(11JGD0090)。

外体的生物学功能主要体现免疫调节和细胞间联络两个方面。外体可携带其来源细胞相关抗原成分,机体可能对这些抗原产生免疫反应。树突状细胞可分泌外体,它们与 T 细胞和 B 细胞作用产生免疫反应或调节免疫耐受,因此外体在免疫调节方面可能具有双向性,即刺激机体产生免疫反应或使机体产生免疫耐受^[9-10]。外体还参与细胞间联络,通过水平转移一些成分在不同细胞间起到信息传递的作用。活化的 CD8⁺T 细胞分泌的外体携带具有生物活性的 Fas 配体,体外与 B16 和 3LL 肿瘤细胞可通过 Fas/FasL 途径促进 MMP9 的表达而加速肿瘤转移^[11]。有证据表明,白血病细胞株 K562 分泌的外体可将 miR-92a 转移至内皮细胞,内皮细胞内相应的靶基因整联蛋白 $\alpha 5$ 表达明显下调^[12]。以上研究表明,外体在免疫系统和细胞间联络中起重要作用,且取决于外体携带有大量小分子物质的特性。

2 外体的分离及纯化

在进行外体生物学功能研究之前,外体的分离和纯化是必不可少的。确定分离出纯的囊泡成分是非外体而非其他污染物质是相当重要的,因为只有较纯的外体才能保证为下一步研究打下良好的基础。由于外体来源不同,不同的分离方法也各有利弊。现在用的外体的提取和纯化方法主要有超速离心、蔗糖密度梯度联合超速离心、免疫磁珠分选和商品化试剂盒(如 ExoQuick precipitation Kit)四种分离方法^[13-14]。Tauro 等^[15]用超速离心、蔗糖密度梯度联合超速离心、免疫磁珠分选三种不同的分离方法分离出结肠癌细胞系 LM1863 来源的外体,并对其进行了比较,发现免疫磁珠分选法是最有效的方法。当 Taylor 等^[14]对比各种分离方法时,发现 ExoQuick precipitation 试剂盒分离出的外体来源的 RNA 和蛋白质更纯。但不同的方法可能适应不同的应用需求,如:超速离心法、蔗糖密度梯度联合超速离心比较适用于标本量较大、外体浓度较高的标本;而免疫磁珠分选法和针对外体的试剂盒分离法却比较适合从标本量较少、外体浓度较低的标本中分离得到外体。超速离心法、蔗糖密度梯度联合超速离心的缺点在于分离出的外体不是特别纯,而免疫磁珠分选法虽然获得的外体比较纯,但可能只能分选出表面标记阳性的外体,从而遗漏一部分。ExoQuick precipitation 分离法分离外体存在的问题就是适合标本量较少的标本,对于大量的标本不大实用,且试剂盒成本太高。此外,还有采用

HPLC 分离方法,可根据外体的大小特征将其分离^[16]。我们已成功建立了蔗糖密度梯度联合超速离心分离人骨髓及脐带外体的方法^[17],并获批了专利(专利申请号:201010226049.0)。此法分离外体效率高,对量多的临床标本较合适。总之,研究者可根据实际需要选择最适合的外体分离方法。

3 外体的诊断价值

由于外体携有的蛋白质及 RNA 成分具有其来源细胞的特异性,其可作为特异的生物学标志用于肿瘤和一些非肿瘤疾病的诊断。前列腺癌时,尿液标本中外体表达 PSA、PSMA 和肿瘤相关标志 5T4,而正常尿液外体则不表达^[18]。Silva 等^[19]在结肠癌的研究中发现患者血浆中肿瘤来源外体明显增多,且癌胚抗原的表达含量很高,外体增多预示结肠癌预后差、生存率低。研究表明,外体中 microRNA 表达可作为疾病的诊断标志物,卵巢癌患者血浆外体高表达上皮细胞黏附分子(EpCAM),且与疾病进程相关^[20],卵巢癌患者血浆外体有 miR-21、miR-141、miR-200a、miR-200b、miR-200c、miR-203、miR-205、miR-214 特异性高表达,且与肿瘤组织表达水平一致,表明血浆外体可以替代肿瘤组织作为卵巢癌的诊断,而不需要活检的肿瘤组织。这一研究首先将外体中 microRNA 作为肿瘤诊断分子标志应用于良性和恶性肿瘤的鉴别诊断。血浆外体中 microRNA 检测也可作为肺癌的诊断标志,肺癌患者外体较健康对照组高表达 EpCAM,且血浆外体中有 12 种 microRNA 与肿瘤组织高表达一致^[21]。这些研究表明,血浆外体可作为非创伤性的检测标本用于肿瘤

的分子诊断。外体在非肿瘤性疾病的研究中也得到广泛的关注和应用。Michael 等^[2]从干燥综合征患者和健康人的唾液中提取出的外体携带有其 microRNA 标志物,对疾病的诊断有重要意义。外体在肝脏和肾脏疾病的诊断中也受到关注,研究发现有肝损伤的兔和鼠尿液标本中含有外体。作者对 28 种外体来源蛋白质进行分析,发现在一些模型中 Cd26、Cd81、Slc3A1 和 Cd10 的表达有差异,可被选为肝脏疾病诊断的标志物^[22]。尿液中的外体也可能携带肾功能障碍和结构性损伤的蛋白质标志,在顺铂诱导的大鼠急性肾损伤模型中,尿液外体胎球蛋白-A 的含量明显升高,可作为急性肾损伤的诊断标志物^[23]。急性肾损伤患者尿液外体中含有活化转录因子-3,而健康对照尿液中没有,表明尿液外体检测可作为

急性肾损伤的诊断指标^[24]。以上研究表明外体在疾病诊断领域得到广泛关注,并取得了部分研究成果。相信有关外体的诊断性研究能够更好地发展,为疾病诊断做出更多贡献。

4 外体的治疗应用前景

肿瘤或损伤时外体作为非细胞运载载体具有优良的运输能力,可调节机体免疫能力,因此外体在疾病治疗中的作用也受到很大的关注。肿瘤生长过程中可将外体释放到微环境中,肿瘤分泌的外体具有多向免疫抑制功能,可以保护和支撑肿瘤使其可以顺利逃避机体抗肿瘤免疫反应,且外体在抗肿瘤免疫反应的三个阶段中每个阶段都发挥其不可低估的作用^[25]。我们先前分离纯化得到人骨髓间质干细胞(hBM-MSc)的外体,发现hBM-MSc的外体可以活化肿瘤细胞MAPK通路,促进肿瘤细胞VEGF自分泌,增强肿瘤血管形成,促进肿瘤细胞的生长^[26],为肿瘤的微环境发生学说及靶向治疗提供实验依据。肿瘤外体的分泌还可以影响肿瘤对抗癌药物的敏感性,影响肿瘤治疗进展。在针对HER2⁺的乳腺癌治疗中,HER2⁺外体的分泌会使肿瘤对抗癌药物敏感性降低,影响靶向HER2的抗癌治疗^[27]。但也有研究发现肿瘤外体在机体抗肿瘤免疫反应中起重要作用,利用此特性研究出可以加强抗肿瘤免疫反应的外体疫苗^[28]。在非肿瘤领域,外体的免疫抑制特性使得其在疾病治疗方面的研究也有很多报道。树突细胞来源的外体的应用使得关节炎的治疗取得新的进步^[29]。作为纳米级别的微粒,依据其可以携带核酸的特性,利用其携带一些治疗性药物的研究得以实现。Alvarez等^[30]证实,用电穿孔技术将外源siRNA导入内源性外体(靶向神经元、小胶质细胞、少突神经胶质细胞)来治疗鼠阿尔茨海默病,发现其可特异性敲除靶向基因。这种纳米级的生物学材料可作为基因载体在肿瘤及损伤性疾病的基因治疗中有着重要的应用前景。

干细胞来源的外体对损伤组织具有修复作用。间质干细胞来源的外体治疗急、慢性肾损伤有很好的疗效^[31-32]。Bruno等^[32]研究发现hBM-MSc可分泌一种直径80~100 nm大小的非可溶性微泡,对急性肾损伤具有修复作用。这些从MSC培养上清中分离出来的微泡在体外能够促进肾小管上皮细胞的增殖及抗凋亡,将其标记PKH26后注射到急性肾损伤动物模型体内,可发现微泡在6 h内即在肾损伤部位发生了聚集。Timmers等^[33]首次报道人胚胎干

细胞株(HuES9 hESC或H1 hESC)来源的MSC培养上清液(MSC-CM)经25倍浓缩后在猪心肌缺血再灌注损伤模型中能缩小心肌梗死面积,有效地保护心脏功能。将MSC-CM按直径大小分级过滤后通过静脉或冠状动脉分别注入小鼠心肌缺血再灌注模型体内,发现仅分子量大于100万和直径在50~100 nm的大复合物对小鼠心肌缺血再灌注损伤有修复和保护作用,该复合物就是MSC分泌的外体^[34]。Lim等^[35]将胚胎干细胞株来源MSC-外体治疗AMI作为干细胞治疗的一种新方法,并申请了美国专利(pub. No.: US2011/0003008A1, Pub. Date: Jan. 6, 2011)。这些研究表明,MSC可通过旁分泌外体在细胞间进行信息传递进而通过某种机制对受损组织进行修复,这一旁分泌机制为基于MSC的非细胞治疗奠定了重要基础。

鉴于外体的诊断和治疗价值,对它的研究正在进一步的深入。有关外体的相关研究及应用可参考外体的相关网站,如:<http://www.exocarta.org/>、<http://www.exosome.com/>和<http://www.exosomedx.com/>,这有助于我们更好地去关注和了解外体。目前存在的主要问题是建立快速、经济、高效的分离纯化外体的方法,克服现有提纯方法存在的缺点,这是外体应用于临床诊断和治疗的关键。

5 参考文献

- [1] Singh PP, Smith VL, Karakousis PC, *et al.* Exosomes isolated from mycobacteria-infected mice or cultured macrophages can recruit and activate immune cells *in vitro* and *in vivo*[J]. *J Immunol*, 2012, 189(2):777-785.
- [2] Michael A, Bajracharya SD, Yuen PS, *et al.* Exosomes from human saliva as a source of microRNA biomarkers[J]. *Oral Dis*, 2010, 16(1):34-38.
- [3] Simpson RJ, Lim JW, Moritz RL, *et al.* Exosomes: proteomic insights and diagnostic potential[J]. *Expert Rev Proteomics*, 2009, 6(3):267-283.
- [4] Filipazzi P, Bürdek M, Villa A, *et al.* Recent advances on the role of tumor exosomes in immunosuppression and disease progression [J]. *Semin Cancer Biol*, 2012, 22(4):342-349.
- [5] Simons M, Raposo G. Exosomes-vesicular carriers for intercellular communication[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2009, 21(4):575-581.
- [6] Février B, Raposo G. Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2004, 16(4):415-421.
- [7] Olver C, Vidal M. Proteomic analysis of secreted exosomes[J]. *Subcell Biochem*, 2007, 43:99-131.
- [8] Chen TS, Lai RC, Lee MM, *et al.* Mesenchymal stem cell secretes microparticles enriched in pre-microRNAs[J]. *Nucleic Acids Res*,

- 2010, 38(1):215-224.
- [9] Johansson SM, Admyre C, Scheynius A, *et al.* Different types of in vitro generated human monocyte-derived dendritic cells release exosomes with distinct phenotypes [J]. *Immunology*, 2008, 123(4): 491-499.
- [10] Théry C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses [J]. *Nat Rev Immunol*, 2009, 9(8): 581-593.
- [11] Cai Z, Yang F, Yu L, *et al.* Activated T cell exosomes promote tumor invasion via Fas signaling pathway [J]. *J Immunol*, 2012, 188(12):5954-5961.
- [12] Umezū T, Ohyashiki K, Kuroda M, *et al.* Leukemia cell to endothelial cell communication via exosomal miRNAs [J]. *Oncogene*, 2012. doi: 10.1038/onc.2012.295.
- [13] 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, Chapter 3:Unit 3.22.
- [14] Taylor DD, Zacharias W, Gercel-Taylor C. Exosome isolation for proteomic analyses and RNA profiling [J]. *Methods Mol Biol*, 2011, 728:235-246.
- [15] Tauro BJ, Greening DW, Mathias RA, *et al.* Comparison of ultracentrifugation, density gradient separation, and immunoaffinity capture methods for isolating human colon cancer cell line LIM1863-derived exosomes [J]. *Methods*, 2012, 56(2):293-304.
- [16] Lai RC, Chen TS, Lim SK. Mesenchymal stem cell exosome: a novel stem cell-based therapy for cardiovascular disease [J]. *Regen Med*, 2011, 6(4):481-492.
- [17] 朱伟, 黄玲, 许晓蒙, 等. 人骨髓间质干细胞来源外体的分离鉴定及生物学特性 [J]. *临床检验杂志*, 2010, 28(5):347-349.
- [18] Mitchell PJ, Welton J, Staffurth J, *et al.* Can urinary exosomes act as treatment response markers in prostate cancer? [J]. *J Transl Med*, 2009, 7: 4.
- [19] Silva J, Garcia V, Rodriguez M, *et al.* Analysis of exosome release and its prognostic value in human colorectal cancer [J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2012, 51(4):409-418.
- [20] Taylor DD, Gercel-Taylor C. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer [J]. *Gynecol Oncol*, 2008, 110(1):13-21.
- [21] Rabinowits G, Gercel-Taylor C, Day JM, *et al.* Exosomal microRNA: a diagnostic marker for lung cancer [J]. *Clin Lung Cancer*, 2009, 10(1):42-46.
- [22] Conde-Vancells J, Rodriguez-Suarez E, Gonzalez E, *et al.* Candidate biomarkers in exosome-like vesicles purified from rat and mouse urine samples [J]. *Proteomics Clin Appl*, 2010, 4(4):416-425.
- [23] Zhou H, Pisitkun T, Aponte A, *et al.* Exosomal Fetuin-A identified by proteomics: a novel urinary biomarker for detecting acute kidney injury [J]. *Kidney Int*, 2006, 70(10): 1847-1857.
- [24] Taub PR, Borden KC, Fard A, *et al.* Role of biomarkers in the diagnosis and prognosis of acute kidney injury in patients with cardio-renal syndrome [J]. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, 2012, 10(5): 657-667.
- [25] Taylor DD, Gercel-Taylor C. Exosomes/microvesicles: mediators of cancer-associated immunosuppressive microenvironments [J]. *Semin Immunopathol*, 2011, 33(5):441-454.
- [26] Zhu W, Huang L, Li Y, *et al.* Exosomes derived from human bone marrow mesenchymal stem cells promote tumor growth *in vivo* [J]. *Cancer Lett*, 2012, 315(1):28-37.
- [27] Ciravolo V, Huber V, Ghedini GC, *et al.* Potential role of HER2-overexpressing exosomes in countering trastuzumab-based therapy [J]. *J Cell Physiol*, 2012, 227(2):658-667.
- [28] Xie Y, Bai O, Zhang H, *et al.* Membrane-bound HSP70-engineered myeloma cell-derived exosomes stimulate more efficient CD8 (+) CTL- and NK-mediated antitumor immunity than exosomes released from heat-shocked tumor cells expressing cytoplasmic HSP70 [J]. *J Cell Mol Med*, 2010, 14(11):2655-2666.
- [29] Bianco NR, Kim SH, Ruffner MA, *et al.* Therapeutic effect of exosomes from indoleamine 2,3-dioxygenase-positive dendritic cells in collagen-induced arthritis and delayed-type hypersensitivity disease models [J]. *Arthritis Rheum*, 2009, 60(2):380-389.
- [30] Alvarez-Erviti L, Seow Y, Yin H, *et al.* Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes [J]. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(4):341-345.
- [31] Gatti S, Bruno S, Deregibus MC, *et al.* Microvesicles derived from human adult mesenchymal stem cells protect against ischemia-reperfusion-induced acute and chronic kidney injury [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2011, 26(5):1474-1483.
- [32] Bruno S, Grange C, Collino F, *et al.* Microvesicles derived from mesenchymal stem cells enhance survival in a lethal model of acute kidney injury [J]. *PLoS One*, 2012, 7(3):e33115.
- [33] Timmers L, Lim SK, Arslan F, *et al.* Reduction of myocardial infarct size by human mesenchymal stem cell conditioned medium [J]. *Stem Cell Res*, 2007, 1(2):129-137.
- [34] Lai RC, Arslan F, Lee MM, *et al.* Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. *Stem Cell Res*, 2010, 4(3):214-222.
- [35] Lai RC, Chen TS, Lim SK. Mesenchymal stem cell exosome: a novel stem cell-based therapy for cardiovascular disease [J]. *Regen Med*, 2011, 6(4):481-492.

(收稿日期:2012-08-31)

(本文编辑:许晓蒙,陈维忠)