

# 外泌体对肝细胞癌转移前生态位形成的影响

朱金霞<sup>1</sup>, 刘光伟<sup>2\*</sup>, 杨培伟<sup>2</sup>

1.河南中医药大学, 河南 郑州 450000

2.河南中医药大学第一附属医院 脾胃肝胆科, 河南 郑州 450000

**【摘要】** 肝细胞癌(HCC)有高发病率、高转移率、低生存率、治疗效果差等特点。转移前生态位是指远处器官发生必要的变化以创造适合肿瘤细胞定植的局部微环境。外泌体是具有多种生物学功能的细胞外囊泡,在转移前生态位的形成中起重要作用。本文总结了外泌体对转移前生态位的影响,包括在HCC转移前生态位中介导特异性器官转移、增加血管生成和血管通透性、促进基质细胞活化和细胞外基质重塑、诱导HCC免疫抑制和免疫监视、为HCC靶向治疗提供新依据等;指出了利用外泌体在HCC转移前生态位中的作用,筛选出能预测肿瘤转移、预后及治疗效果的生物标志物,对延缓HCC病情进展有潜在的临床意义。

**【关键词】** 外泌体; 肝细胞癌; 转移前生态位; 肿瘤微环境; 免疫调节

## The influence of exosomes on the formation of pre-transfer niche of hepatocellular carcinoma

Zhu Jinxia<sup>1</sup>, Liu Guangwei<sup>2</sup>, Yang Peiwei<sup>2</sup>

1.Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, Henan, China

2.Department of Hepatology and Spleen-Stomach, The First Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, Henan, China

**【Abstract】** The characteristics of hepatocellular carcinoma (HCC) is high incidence, high metastasis rate, low survival rate, and poor treatment effect. Pre-metastasis niche refers to the necessary changes in distant organs to create a local microenvironment suitable for tumor cell colonization. Exosomes are extracellular vesicles with multiple biological functions and play an important role in the formation of the pre-metastasis niche. This article summarizes the effects of exosomes on the pre-metastasis niche, including mediating specific organ metastasis in the pre-metastasis niche of HCC, increasing angiogenesis and vascular permeability, promoting stromal cell activation and extracellular matrix remodeling, and inducing HCC immunosuppression or immune surveillance, provide new basis for HCC targeted therapy, etc. It is pointed out that the use of exosomes in the pre-metastasis niche of HCC to screen out biomarkers that can predict tumor metastasis, prognosis and therapeutic effects has potential clinical significance for delaying the progression of HCC.

**【Key words】** Exosomes; Hepatocellular carcinoma; Pre-transfer niche; Tumor microenvironment; Immune regulation

原发性肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)发病率和死亡率呈逐年上升的趋势,2020年全球流行病学显示:HCC占全球癌症新发病例的4.69%,死亡率占8.34%<sup>[1]</sup>。肝细胞癌占其中的90%,大多确诊时已是中晚期,少数在早期发现时能接受手术治疗,且术后1~3年内发生了不同部位的复发转移<sup>[2]</sup>,严重影响患者的预后。因此,探索影响HCC转移的分子效应机制,开发临床预防HCC转移的新型生物标志物显得至关重要。

HCC转移是一个多步骤、复杂的过程,其中有HCC逃避宿主免疫应答和凋亡信号的参与,还有肿瘤微环境中细胞通讯的影响。关于肿瘤转移机制被广泛接受的则是“种子和土壤”假说<sup>[3]</sup>。具体是指癌细胞(种子)广泛扩散,但在特定的组织微环境(土壤)中生长,即在癌细胞接近目标部位之前,“土壤”已被定植。因此转移前生态位被提出,即原发部位肿瘤细胞通过传递信号分子,在转移前创造特定的环境转移细胞<sup>[4]</sup>。据此衍生出的新的外泌体概念:供体细胞分泌的外泌体是细胞间的重要载体,能搭建受体细胞和靶器官的转移表型。外泌体是细胞分泌的直径为30~150 nm的细胞外囊泡,广泛分布在血液、唾液、尿液以及其他体液中,它包括DNA、RNA、蛋白质、脂质等分子,是细胞间通讯

基金项目:国家自然科学基金资助项目(82003994),河南省特色骨干学科中医学学科建设项目(STG-ZYXKY-2020017)

\*通信作者:刘光伟, E-mail: Liuguangwei1975@163.com

的关键角色,进而介导信息传递<sup>[5]</sup>。外泌体生理上是一种普遍存在的、进化上保守的细胞间通讯机制,对维持正常生理功能至关重要。病理状态下,外泌体能促进肿瘤的增殖、迁移侵袭、免疫抑制、血管生成以及化学耐药性等。研究表明,外泌体的差异表达与HCC转移密切相关。本文主要从外泌体在HCC转移前生态位中介导特异性器官转移、增加血管生成和血管通透性、促进基质细胞活化和细胞外基质重塑、诱导HCC免疫抑制和免疫监视、为HCC靶向治疗提供新依据等方面详细阐述。

## 1 外泌体介导HCC转移前生态位的特异性器官转移

如果肿瘤细胞被认为是种子,转移前生态位为土壤,那么外泌体就相当于肥料,它能使贫瘠的土地肥沃并促进肿瘤细胞的定植。这一说法形象地为我们介绍了外泌体介导的特异性器官转移,即肿瘤细胞扩散到全身并定植在远处器官中,表现出优先定植并转移到特定器官<sup>[6]</sup>。

HCC肺转移后致死率高达70%以上<sup>[7]</sup>。肿瘤来源的外泌体能改变肿瘤细胞的运动方向,只靠肿瘤细胞自身则很难转移到特定器官。一项研究表明,特异性器官转移可以通过肿瘤来源的外泌体介导,进而显示出对第二靶点的亲和力,以及非随机的传播模式<sup>[8]</sup>。外泌体介导的特异性器官转移大体有以下几步:①未来的转移部位主动吸收外泌体;②外泌体重定向转移分布;③外泌体表面的整合素(integrins,ITGs)以组织特异性的方式与靶细胞融合,直接进行器官特异性定植,进而转移前生态位形成。具体来讲:定性及定量质谱分析和蛋白质印迹法结果表明ITG $\alpha$ 6存在于肺导向的外泌体中,而ITG $\beta$ 5存在于肝脏导向的外泌体中,提示外泌体ITGs的差异性表达是特异性器官转移的基础;进一步靶向ITG $\alpha$ 6、ITG $\beta$ 5分别降低了外泌体的摄取以及肝转移和肺转移。证明了外泌体ITGs与器官特异性常驻细胞融合后,通过激活Src磷酸化和促炎性S100基因表达建立转移前生态位来介导器官转移<sup>[8]</sup>。另外外泌体四跨膜蛋白和整合素链协同调节体内外靶细胞的选择进而介导转移前生态位的器官转移<sup>[9]</sup>。

另外,外泌体微小RNA(microRNA,micRNA)在器官特异性转移中发挥重要作用。研究表明,在肺转移中高转移性HCC细胞比低转移性HCC细胞有更强的将正常成纤维细胞转化为肿瘤相关成纤维细胞(cancer-associated fibroblasts,CAF)的能力。高转移性HCC细胞直接靶向 $\beta$ -1,4-半乳糖基转移酶III(B4GALT3)的外泌体miR-1247-3p,导致 $\beta$ -1-整合素-NF- $\kappa$ B信号传导的激活进而将正常成纤维细胞转化为CAF。活化的CAF通过分泌促炎细胞因子进一步促进HCC进展。临床数据已经证实高血清外泌体miR-1247-3p水平与HCC患者的肺转移相关<sup>[7]</sup>。综上所述,HCC外泌体介导的器官转移机制有以下两方面:①与特定常驻细胞融合促进黏附;②miRNA及其靶基因的失调激活炎症反应,进而为HCC转移提供有利的转移前生态位。

## 2 外泌体增加HCC转移前生态位的血管生成和血管通透性

转移前生态位可以促进血管生成并增加血管通透性,以促进转移。有研究报道,缺氧状态下肿瘤细胞释放的外泌体更容易加速血管生成,促进转移前生态位形成,进而增加肿瘤的恶性程度<sup>[10]</sup>。

2.1 缺氧诱导的外泌体高表达增加了HCC转移前生态位的血管生成 研究发现miR-182在HCC组织缺氧条件下被上调,并通过靶向Ras p21蛋白活化子1(Ras p21 protein activator 1,RASA1)促进HCC肿瘤血管生成<sup>[11]</sup>。此外,HCC细胞中缺氧诱导的miR-210可促进HCC细胞转移。而液泡膜蛋白1(vacuole membrane protein 1,VMP1)作为miR-210的直接和功能性下游靶标,与miR-210表达负相关。缺氧降低VMP1表达,而miR-210对VMP1的下调介导了缺氧诱导的HCC细胞转移<sup>[12]</sup>。更有研究表明:外泌体miR-210可以进入内皮细胞,直接抑制SMAD4同源物4重组蛋白(recombinant mothers against decapentaplegic homolog 4,SMAD4)和信号转导及转录激活蛋白6(signal transducer and activator of transcription 6,STAT6)的表达,促进HCC血管生成,从而促进转移前生态位的形成<sup>[13]</sup>。

2.2 外泌体通过靶向血管内皮细胞增加HCC转移前生态位的血管生成和血管通透性 HCC细胞可以通过释放外泌体中的内容物来调节血管内皮细胞(endothelial cell,ECs)的活性,进而增加血管通透性,以及加速血管生成,导致肿瘤的转移。Fang等<sup>[14]</sup>观察到miR-103在HCC细胞来源的外泌体中明显增加,并转移至ECs中导致内皮完整性的破坏、血管通透性的增加,为HCC转移前营造良好的环境最终促进HCC转移,其机制与miR-103抑制血管内皮钙黏蛋白(VE-Cadherin,VE-cad)、p120-连环蛋白(p120-catenin,p120)、闭锁小带蛋白1(zonula occludens protein 1,ZO-1)及miR-1290的表达有关。有6种HCC来源的外泌体表达上调,如:肾上腺素-B2/Delta-like 4配体(DLL4)、血管生成素-2(angiopoietin-2,ANGPT2)、circRNA-100338、miR-1290、Vasorin(VASN)蛋白等被证实与活跃的内皮依赖性血管生成有关,但具体机制并不完全相同:内皮祖细胞(endothelial progenitor cells,EPCs)与ECs关系密切,后者由EPCs进化而来。研究发现,高表达的肾上腺素-B2和DLL4可以通过外泌体传递到EPCs中,促进肿瘤血管生成。DLL4通过上调DLL4/Notch信号通路发挥作用,遗憾的是,肾上腺素-B2的促HCC血管生成的作用机制尚不清楚<sup>[15]</sup>;HCC分泌的外泌体表面检测到高水平的ANGPT2蛋白,随后转移到ECs中,通过上调蛋白激酶B(protein kinase,Akt)/内皮一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase,eNOS)以及激活AKT/ $\beta$ -catenin信号通路促进ECs的血管生成<sup>[16]</sup>;此外,相较于低转移性HCC细胞,外泌体circRNA-100338在高转移性HCC细胞中过度表达。临床证据表明外泌体circRNA-100338可能是HCC的潜在生物标志物。研究发

现 circRNA-100338 刺激了人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) 的血管生成、血管内皮通透性增加以及增强了血管生成拟态 (vasculogenic mimicry, VM) 的形成能力, 为 HCC 提供了一个良好的转移前生态位, 也是外泌体增强 HCC 转移能力的一大证据<sup>[17]</sup>; 另一项研究发现, HCC 细胞分泌的外泌体中富含高水平的 VASN, 它通过硫酸乙酰肝素蛋白聚糖 (heparan sulfate proteoglycans, HSPG) 介导的内吞作用递送到 ECs 中, 促进 ECs 的迁移, 最终促进血管生成, 形成 HCC 良好的转移前生态位<sup>[18]</sup>。研究表明 miR-1290 从肿瘤细胞分泌到周围的微环境中, 并通过外泌体输送到内皮细胞中; 另外 miR-1290 下调 SMEK1 (suppressor of MEK1) 基因表达的同时增强了内皮细胞中血管内皮生长因子受体 2 (vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR2) 的磷酸化, 最终促进 HCC 血管生成形成良好的转移前生态位微环境而加剧 HCC 的进展<sup>[19]</sup>。另有研究证明, HCC 的外泌体可以下调单层内皮细胞中紧密连接蛋白的表达, 从而导致血管通透性增加, 并促进肺和骨转移<sup>[7]</sup>。

另外一项有趣的研究发现 HCC 细胞中表达的真核生物翻译起始因子 3 亚基 C (eukaryotic translation initiation factor 3 subunit C, EIF3C) 增加了外泌体的分泌, 进而促进 HCC 血管生成和肿瘤发生, 而不是直接刺激肿瘤细胞增殖和迁移, 这就为 HCC 转移前生态位的形成提供了良好的环境<sup>[20]</sup>。以上研究表明, 外泌体参与血管生成并增加血管通透性, 以促进 HCC 转移前生态位的形成。在 HCC 转移之前, 外泌体已为肿瘤细胞转移提供了良好的转移前生态位微环境。这是外泌体促进 HCC 转移的另一个重要证据。

### 3 外泌体促进 HCC 转移前生态位基质细胞活化和细胞外基质重塑

转移前生态位的基质环境由内皮细胞、成纤维细胞以及细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 构成。成纤维细胞不仅产生生长因子和炎症, 还表达纤连蛋白 (fibronectin, FN) 和基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP)。而内皮细胞会分泌 S100A8 和 S100A9 等促炎因子。肝癌转移前生态位的一个重要成分是肝星状细胞 (hepatic stellate cells, HSCs), 它在 HCC 微环境中促进 ECM 沉积并上调转化生长因子- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )、VEGF 和重组人白介素-1 $\alpha$  (recombinant human interleukin-1 $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ ) 的表达<sup>[21]</sup>。此外, HCC 中高表达的 miR-21 外泌体进入肝星状细胞后将其转化为 CAF, 研究发现这可能与同源磷酸酶-张力蛋白 (phosphatase and tensin homolog, PTEN) 的下调及丙酮酸脱氢酶激酶 1 (pyruvate dehydrogenase kinase 1, PDK1)/AKT 信号通路的上调有关; 进一步研究发现 CAF 可以分泌血管生成细胞因子, 如 TGF- $\beta$ 、MMP-2、MMP-9、碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF) 和 VEGF, 从而增强 ECs 的血管生成能力, 营造良好的转移

前生态位最终促进肿瘤进展<sup>[22]</sup>。

另有研究表明: 不同类型的骨髓来源树突状细胞 (bone marrow-derived dendritic cells, BMDC) 能促进转移前生态位中的基质重塑和纤连蛋白上调<sup>[23]</sup>。外泌体巨噬细胞迁移抑制因子 (macrophage migration inhibitory factor, MIF) 库普弗细胞释放 TGF- $\beta$ , 进而促进肝星状细胞中纤连蛋白的产生。纤连蛋白沉积后促进骨髓来源的巨噬细胞和中性粒细胞在肝脏中的滞留, 促进炎症环境的产生, 随后转移前生态位形成<sup>[24]</sup>。

综上所述, 我们可知外泌体与细胞外基质相互作用, 促进炎症环境的形成, 并且纤连蛋白的沉积会增加细胞外基质的黏附以促进转移前生态位中循环肿瘤细胞的定植。

### 4 外泌体在转移前生态位中诱导 HCC 免疫抑制

4.1 介导 PD-1/PD-L1 轴的免疫逃逸 免疫系统中程序性死亡蛋白 1 (programmed death protein 1, PD-1) 和程序性死亡配体 1 (programmed death ligand 1, PD-L1) 备受关注。正常情况下, T 细胞可以识别并攻击肿瘤细胞。然而, 当 PD-1 与 PD-L1 结合时, 它会提供抑制信号, 诱导 T 细胞凋亡并抑制 T 细胞活化和增殖。因此, 阻断 PD-1/PD-L1 通路可以增强 T 细胞的杀伤作用, 提高免疫反应。

研究已证实肿瘤细胞分泌携带 PD-L1 的外泌体, 直接从肿瘤组织扩散至全身各部位, 全面打击和抑制人体免疫系统。外泌体中的 PD-L1 与肿瘤细胞表面的结构相同, 也可以与 T 细胞上的 PD-1 结合。体外实验表明, 与 PD-L1 结合的外泌体可以抑制 CD8<sup>+</sup> T 细胞的增殖; 体内实验表明, 携带 PD-L1 的外泌体促进了肿瘤生长并减少了脾脏和淋巴结中的 T 细胞数量, 即癌细胞将 PD-L1 转移到外泌体中, 外泌体 PD-L1 介导肿瘤细胞的免疫逃逸<sup>[25]</sup>, 因此外泌体 PD-L1 水平可以预测抗 PD-1 的临床治疗效果<sup>[26]</sup>。HCC 细胞分泌的外泌体增加了巨噬细胞上 PD-L1 的表达, 从而减少了 CD8<sup>+</sup> T 细胞和 IL-2 细胞的产生, 同时增加了 T 细胞凋亡<sup>[27]</sup>。因此, 当携带 PD-L1 的外泌体到达转移前微环境时, 此处免疫系统受到抑制, 促进转移前生态位的形成。此外, 外泌体除在转移前生态位介导 PD-1/PD-L1 轴的免疫逃逸外, 也会加剧 PD-1 治疗的耐药性; HCC 细胞衍生的外泌体 circUHRF1 通过降解 miR-449c-5p 上调自然杀伤细胞中的靶基因 T 细胞免疫球蛋白黏蛋白分子 3 (T cell immunoglobulin mucin molecule 3, TIM-3) 的表达, 从而促进 HCC 的免疫逃逸和对 PD-1 免疫治疗的耐药性。因此, circUHRF1 可能作为 HCC 患者的一个有希望的治疗靶点<sup>[28]</sup>。

4.2 直接介导 T 细胞的免疫逃逸 外泌体还可直接介导 T 细胞的免疫逃逸, CD4<sup>+</sup> T 细胞在抗体的产生和释放以及有免疫监视功能的 CD8<sup>+</sup> T 细胞的激活和扩增中发挥着重要作用。肿瘤细胞采用的典型免疫逃逸机制是抑制辅助性 T 细胞因子 1 (helper T cell, Th1) 反应并募集 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> 调节性 T 细胞 (regulatory T cells, Tregs)。Tregs 的激活是肿瘤

中最重要的免疫逃逸机制之一。

外泌体 14-3-3 在 HCC 中高表达,能促进 HCC 细胞的增殖和上皮间质转化。研究发现肿瘤浸润性 CD4<sup>+</sup> T 细胞中外泌体 14-3-3 的蛋白和 mRNA 水平显著增加,表明外泌体 14-3-3 可以从 HCC 细胞转移到 T 细胞,介导 T 细胞的免疫逃逸<sup>[29]</sup>。尽管外泌体可以从 HCC 细胞转移到 Tregs 中,但外泌体介导的 Treg 免疫逃逸可能机制是免疫细胞表面信号的传导<sup>[30]</sup>。肿瘤衍生的外泌体可以将 CD39、CD73 细胞传递到未激活的 Tregs 中,从而导致其激活以及转录组的改变<sup>[31]</sup>。此外,CD4<sup>+</sup> T 细胞与肿瘤外泌体的共孵育提高了关键免疫因子的水平,例如细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4 (cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4, CTLA-4)、TGF- $\beta$ 、IL-10 和环氧合酶-2 (cyclooxygenase-2, COX-2)。这些数据证实了暴露于外泌体的 Tregs 在促进 HCC 转移前生态位中肿瘤进展和免疫逃逸方面的作用<sup>[29-31]</sup>。另外发现婆罗双树样基因 4 (sal-like protein-4, SALL4) 介导的 HCC 外泌体 miR-146a-5p 的上调能驱动 HCC 中 M2 肿瘤相关巨噬细胞对 T 细胞的耗竭,并加速 HCC 进展<sup>[32]</sup>。HCC 衍生的外泌体膜上表达高迁移率族蛋白-1 (high mobility group box protein 1, HMGB1), HMGB1 与 Toll 样受体 2/4/9 (TLR-2/4/9) 和晚期糖基化终末产物 (advanced glycation end products, AGEs) 具有高亲和力从而导致肿瘤细胞存活、迁移侵袭。HMGB1 促进了人 I 型 T 细胞免疫球蛋白黏蛋白-1 (T cell immunoglobulin domain and mucin domain protein-1, Tim-1) 的产生,进而抑制 CD8<sup>+</sup> T 细胞活性,从而导致 HCC 中的免疫逃逸,进而转移前生态位的发育<sup>[33]</sup>。

**4.3 抑制免疫细胞募集** 肿瘤外泌体可募集抑制性免疫细胞。外泌体上调促炎因子的表达后,局部炎症微环境诱导肿瘤细胞产生趋化因子和细胞因子。这些因子与肿瘤细胞产生的外泌体协同作用,将肿瘤相关巨噬细胞 (tumor-associated macrophages, TAM)、肿瘤相关中性粒细胞 (tumor-associated neutrophils, TAN)、Tregs 和骨髓源性抑制细胞募集到远处的转移部位。这些免疫细胞可能会抑制抗肿瘤免疫反应<sup>[34]</sup>。造血干细胞和祖细胞也可以分化为 MDSC,从而促进转移前生态位内的免疫抑制。

## 5 外泌体在转移前生态位中诱导 HCC 免疫监视

与上述结论不同的是,“非转移性”外泌体与转移性肿瘤细胞产生的外泌体具有相反的作用,即介导 HCC 免疫监视功能以增强免疫功能。外泌体结合蛋白和遗传物质从一种细胞转移到另一种细胞体现出外泌体在 HCC 治疗中的可行性,如:miR-142 和 miR-223 可以通过外泌体从人类巨噬细胞转移到肝细胞,并抑制 HCC 的增殖和生长<sup>[35]</sup>。骨髓间充质干细胞与 HCC 细胞来源的外泌体结合后产生显著的抗肿瘤活性,并抑制 HCC 细胞的增殖。这些研究表明,HCC 细胞来源的外泌体可能是一种新型的抗肿瘤疗法。在 HCC 转移前生态位中,通过刺激外泌体及其内容物的分泌达到增强 HCC 细胞的免疫原性的目的。5-Aza-2'-脱氧胞

苷 (5-Aza-2'-deoxycytidine, 5-Aza-CdR) 能改善抗肿瘤免疫反应,发现用 5-Aza-CdR 治疗后 HCC 细胞产生的外泌体中热休克蛋白 70 (heat shock protein 70, HSP70)、人类白细胞抗原-I (human leukocyte antigen-I, HLA-I) 和肿瘤/睾丸抗原 1 蛋白 (cancer/testis antigen 1) 的水平增加,为基于外泌体的抗 HCC 免疫疗法提供了证据支持<sup>[36]</sup>。组蛋白去乙酰化酶抑制剂 MS-275 能显著改变 HCC HepG2 和 Hep3B 细胞外泌体中免疫分子的含量及类别,改善 HCC 抗肿瘤免疫微环境<sup>[37]</sup>。此外,研究发现抗癌药物还可以促进 HepG2 细胞产生和释放更多携带 HSPs 的外泌体;这些外泌体可以增强特异性自然杀伤细胞 (natural killer cell, NK) 的活性,具有更高的抗肿瘤免疫反应。而脂肪来源的间充质干细胞源外泌体促进了大鼠的 NK 和 T 细胞抗肿瘤反应,从而抑制 HCC 早期转移前生态位的形成<sup>[38]</sup>。

综上所述,外泌体通过多种机制影响转移前生态位中的免疫反应。外泌体具有异质性,在转移前生态位中,外泌体对免疫的影响分为正面和负面两个方面。一方面起积极作用(促进免疫监视);另一方面起负面影响(导致免疫抑制),外泌体不仅通过 PD-1/PD-L1 轴或直接影响 T 细胞功能介导免疫逃逸,而且促进抑制性免疫细胞的募集,从而损害免疫细胞功能。

## 6 外泌体在转移前生态位中为 HCC 靶向治疗提供新依据

HCC 来源的外泌体可增强索拉非尼耐药性,并且来源于高侵袭性 HCC 细胞的外泌体比源自低侵袭性 HCC 细胞的外泌体有更强的耐药性。从两种侵袭性 HCC 细胞系中分离的外泌体能够通过激活 HGF/c-Met/Akt 信号通路和抑制索拉非尼诱导的细胞凋亡、增加与索拉非尼耐药相关的蛋白质水平来促进索拉非尼耐药<sup>[39]</sup>。这些结果表明 HCC 来源的外泌体是 HCC 细胞介导的索拉非尼耐药的重要介质。因此靶向 HCC 外泌体可能有助于提高 HCC 的治疗效果。

靶向治疗是在细胞和分子水平上对已确定的致癌部位进行治疗。靶向药物进入体内后,会与致癌部位特异性结合,使肿瘤细胞死亡而不影响正常组织细胞,因此分子靶向治疗剂也被称为“生物导弹”。虽然靶向治疗优势明显,但其效果却是有限的。个体间的差异需要在 HCC 发展的早期寻找强有力的靶点,是突破靶向治疗瓶颈的关键点。HCC 外泌体在细胞间传递信息等以促进转移前生态位的形成。因此,精准靶向治疗阻断外泌体向受体细胞传递可能是预防转移的有效策略。以下途径可用于靶向治疗抑制转移前生态位的形成,例如:阻断促炎因子的产生、阻止血管生成和血管渗透、重新激活抗肿瘤免疫反应等。这些能为未来开发出预防和控制 HCC 转移的靶向药物提供依据。

## 7 对临床的指导意义

**7.1 外泌体在 HCC 临床诊断及预后中的指导意义** 传统的组织活检是侵入性的,不能用于 HCC 的早期诊断。多年来,研究人员一直在寻找非侵入性检测工具。目前,随着外泌

体研究的深入,液体活检已被考虑用于肿瘤的早期诊断<sup>[40]</sup>。外泌体携带的不同类型分子在 HCC 进展中发挥不同的生物活性。外泌体从 HCC 肿瘤细胞中释放入体液,通过其脂质双层维持自身蛋白质和核酸的稳定表达,因此外泌体的数量以及自身稳定性能为 HCC 诊断及治疗提供依据。研究发现 HCC 患者外泌体中 miR-18a、miR-221、miR-222 和 miR-224 的水平低于单纯 HBV 患者,表明这 3 种 miRNA 可作为检测 HCC 的新型血清标志物<sup>[41]</sup>。另一项研究报道,miR-30d、miR-140 和 miR-29b 对 HCC 患者的生存期有显著影响,因此这些外泌体 miRNA 可作为 HCC 的预后生物标志物,并可指导晚期 HCC 的治疗<sup>[42]</sup>。为了证明 HCC 中外泌体非编码 RNA (ncRNA) 的作用, Lee 等<sup>[43]</sup>进行了一系列实验,表明 ncRNA(miRNA-21 和 lncRNA-ATB)影响 HCC 的 TNM 分期和预后。又有证据表明血清外泌体 ncRNA ENSG00000258332.1、LINC00635 联合甲胎蛋白(alpha-fetoprotein, AFP)可能是 HCC 诊断和预后的有价值的检测方法<sup>[44]</sup>。其他研究也表明外泌体 lncRNA 可作为 HCC 的预后因素,与正常患者相比, lncRNA (LINC00161) 在 HCC 患者中显著上调,具有良好的稳定性和特异性<sup>[45]</sup>。除了 lncRNA, circRNA (circPTGR1) 被发现与 HCC 患者的临床分期和预后相关<sup>[46]</sup>。以上证据皆表明外泌体在预测肿瘤转移、预后方面有独特优势。因此,临床中运用外泌体特异性诊断以及判断预后是未来治疗 HCC 的一大方向。

**7.2 外泌体在 HCC 临床治疗中的指导意义** HCC 对普通化疗并不敏感。miR-122 可促进 HCC 肿瘤细胞对化疗药物的敏感性,即外泌体可作为 miRNAs 的生物载体<sup>[47]</sup>。另有研究表明外泌体作为纳米载体有应用的可行性,例如外泌体的低免疫原性、高生物相容性、低毒性等<sup>[48-49]</sup>。同时,间充质干细胞可以分泌大量的外泌体。研究发现,将 miRNA-122 转染到由 MSCs 形成的脂肪来源的间充质干细胞中,能产生含有 miRNA-122 的外泌体,从而改善 miR-122 靶基因的表达,并提高 HCC 细胞对化疗的敏感性<sup>[50]</sup>。令人振奋的是 HCC 细胞中的外泌体 miR-335-5,能抑制肿瘤的生长和转移,为 HCC 的治疗提供了新的策略<sup>[51]</sup>。Takahashiet 等<sup>[52]</sup>人发现,在介导化疗应激反应的过程中, RNA 干扰(RNA interference, RNAi)介导的细胞外囊泡中的 linc-VLDLR 敲低可以阻止 HCC 进展,从而提高 HCC 的治疗效果。这些发现在一定程度上为 HCC 患者提供了新的治疗方法。

## 8 小结

外泌体在 HCC 转移前生态位的进展中有多重作用。外泌体不仅可以导致 HCC 细胞外基质重塑、介导器官特异性转移、促进血管生成增加血管通透性、双向调节免疫功能。并且外泌体可作为 HCC 液体诊断的工具预测肿瘤转移、预后及治疗效果;精准靶向治疗阻断外泌体向受体细胞传递是预防转移的又一策略,或外泌体作为靶向药物的载体精准到达肿瘤部位杀死肿瘤。然而,外泌体的功能、

机制及贡献率有待进一步研究。①外泌体的组成成分复杂多样,那这些成分具体起什么作用?不同成分之间是否存在相互作用?②使用外泌体作为生物标志物判断肿瘤转移的可信度及有效性如何?③手术切除原发肿瘤后,外泌体对转移前生态位的作用是否终止?④外泌体和转移前生态位的理论基础如何具体应用于临床治疗?因此,进一步探索外泌体参与 HCC 转移前生态位形成中的具体分子机制,为治疗提供靶点,更要在预测肿瘤转移、预后方面发挥作用,更好地改善患者病情。

## 参考文献

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries [J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249.
- [2] KULIK L, HEIMBACH JK, ZALIEF F, et al. Therapies for patients with hepatocellular carcinoma awaiting liver transplantation: A systematic review and meta-analysis [J]. Hepatology, 2018, 67(1): 381-400.
- [3] FIDLER IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited [J]. Nat Rev Cancer, 2003, 3(6): 453-458.
- [4] Attaran S, Bissell MJ. The role of tumor microenvironment and exosomes in dormancy and relapse [J]. Semin Cancer Biol, 2022, 78: 35-44.
- [5] WORTZEL I, DROR S, KENIFIC CM, et al. Exosome-Mediated Metastasis: Communication from a Distance [J]. Dev Cell, 2019, 49(3): 347-360.
- [6] ALDERTON GK. Metastasis. Exosomes drive premetastatic niche formation [J]. Nat Rev Cancer, 2012, 12(7): 447.
- [7] FANG T, LV H, LV G, et al. Tumor-derived exosomal miR-1247-3p induces cancer-associated fibroblast activation to foster lung metastasis of liver cancer [J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 191.
- [8] HOSHINO A, COSTA-SILVA B, SHEN TL, et al. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis [J]. Nature, 2015, 527(7578): 329-335.
- [9] RANA S, YUE S, STADEL D, et al. Toward tailored exosomes: the exosomal tetraspanin web contributes to target cell selection [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2012, 44(9): 1574-1584.
- [10] MAO Y, WANG Y, DONG L, et al. Hypoxic exosomes facilitate angiogenesis and metastasis in esophageal squamous cell carcinoma through altering the phenotype and transcriptome of endothelial cells [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2019, 38(1): 389.
- [11] DU C, WENG X, HU W, et al. Hypoxia-inducible MiR-182 promotes angiogenesis by targeting RASA1 in hepatocellular carcinoma [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2015, 34(1): 67.
- [12] YING Q, LIANG L, GUO W, et al. Hypoxia-inducible microRNA-210 augments the metastatic potential of tumor cells

- by targeting vacuole membrane protein 1 in hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatology*, 2011, 54(6): 2064–2075.
- [13] LIN XJ, FANG JH, YANG XJ, et al. Hepatocellular Carcinoma Cell-Secreted Exosomal MicroRNA-210 Promotes Angiogenesis In Vitro and In Vivo [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2018, 11: 243–252.
- [14] FANG JH, ZHANG ZJ, SHANG LR, et al. Hepatoma cell-secreted exosomal microRNA-103 increases vascular permeability and promotes metastasis by targeting junction proteins [J]. *Hepatology*, 2018, 68(4): 1459–1475.
- [15] JAMSHIDI-PARSIAN A, GRIFFIN RJ, KORE RA, et al. Tumor-endothelial cell interaction in an experimental model of human hepatocellular carcinoma [J]. *Exp Cell Res*, 2018, 372(1): 16–24.
- [16] XIE JY, WEI JX, LV LH, et al. Angiopoietin-2 induces angiogenesis via exosomes in human hepatocellular carcinoma [J]. *Cell Commun Signal*, 2020, 18(1): 46.
- [17] HUANG XY, HUANG ZL, HUANG J, et al. Exosomal circRNA-100338 promotes hepatocellular carcinoma metastasis via enhancing invasiveness and angiogenesis [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2020, 39(1): 20.
- [18] HUANG A, DONG J, LI S, et al. Exosomal transfer of vasorin expressed in hepatocellular carcinoma cells promotes migration of human umbilical vein endothelial cells [J]. *Int J Biol Sci*, 2015, 11(8): 961–969.
- [19] WANG Q, WANG G, NIU L, et al. Exosomal MiR-1290 Promotes Angiogenesis of Hepatocellular Carcinoma via Targeting SMEK1 [J]. *J Oncol*, 2021, 2021: 6617700.
- [20] LEE HY, CHEN CK, HO CM, et al. EIF3C-enhanced exosome secretion promotes angiogenesis and tumorigenesis of human hepatocellular carcinoma [J]. *Oncotarget*, 2018, 9(17): 13193–13205.
- [21] MIKURIYA Y, TASHIRO H, KURODA S, et al. Fatty liver creates a pro-metastatic microenvironment for hepatocellular carcinoma through activation of hepatic stellate cells [J]. *Int J Cancer*, 2015, 136(4): E3–13.
- [22] ZHOU Y, REN H, DAI B, et al. Hepatocellular carcinoma-derived exosomal miRNA-21 contributes to tumor progression by converting hepatocyte stellate cells to cancer-associated fibroblasts [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37(1): 324.
- [23] HIRATSUKA S, WATANABE A, ABURATANI H, et al. Tumour-mediated upregulation of chemoattractants and recruitment of myeloid cells predetermines lung metastasis [J]. *Nat Cell Biol*, 2006, 8(12): 1369–1375.
- [24] COSTA-SILVA B, AIELLO NM, OCEAN AJ, et al. Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver [J]. *Nat Cell Biol*, 2015, 17(6): 816–826.
- [25] CHEN G, HUANG AC, ZHANG W, et al. Exosomal PD-L1 contributes to immunosuppression and is associated with anti-PD-1 response [J]. *Nature*, 2018, 560(7718): 382–386.
- [26] MONYPENNY J, MILEWICZ H, FLORES-BORJA F, et al. ALIX Regulates Tumor-Mediated Immunosuppression by Controlling EGFR Activity and PD-L1 Presentation [J]. *Cell Rep*, 2018, 24(3): 630–641.
- [27] LIU J, FAN L, YU H, et al. Endoplasmic Reticulum Stress Causes Liver Cancer Cells to Release Exosomal miR-23a-3p and Up-regulate Programmed Death Ligand 1 Expression in Macrophages [J]. *Hepatology*, 2019, 70(1): 241–258.
- [28] ZHANG PF, GAO C, HUANG XY, et al. Cancer cell-derived exosomal circUHRF1 induces natural killer cell exhaustion and may cause resistance to anti-PD1 therapy in hepatocellular carcinoma [J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 110.
- [29] WANG X, SHEN H, ZHANGYUAN G, et al. 14-3-3 $\zeta$  delivered by hepatocellular carcinoma-derived exosomes impaired anti-tumor function of tumor-infiltrating T lymphocytes [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(2): 159.
- [30] MULLER L, SIMMS P, HONG CS, et al. Human tumor-derived exosomes (TEX) regulate Treg functions via cell surface signaling rather than uptake mechanisms [J]. *Oncoimmunology*, 2017, 6(8): e1261243.
- [31] MULLER L, MITSUHASHI M, SIMMS P, et al. Tumor-derived exosomes regulate expression of immune function-related genes in human T cell subsets [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 20254.
- [32] YIN C, HAN Q, XU D, et al. SALL4-mediated upregulation of exosomal miR-146a-5p drives T-cell exhaustion by M2 tumor-associated macrophages in HCC [J]. *Oncoimmunology*, 2019, 8(7): 1601479.
- [33] YE L, ZHANG Q, CHENG Y, et al. Tumor-derived exosomal HMGB1 fosters hepatocellular carcinoma immune evasion by promoting TIM-1 + regulatory B cell expansion [J]. *J Immunother Cancer*, 2018, 6(1): 145.
- [34] GAO Y, BADO I, WANG H, et al. Metastasis Organotropism: Redefining the Congenial Soil [J]. *Dev Cell*, 2019, 49(3): 375–391.
- [35] AUCHER A, RUDNICKA D, DAVIS DM. MicroRNAs transfer from human macrophages to hepato-carcinoma cells and inhibit proliferation [J]. *J Immunol*, 2013, 191(12): 6250–6260.
- [36] XIAO WH, SANREN GW, ZHU JH, et al. Effect of 5-aza-2'-deoxycytidine on immune-associated proteins in exosomes from hepatoma [J]. *World J Gastroenterol*, 2010, 16(19): 2371–2377.
- [37] 李秋文, 肖文华, 萨仁高娃, 等. 组蛋白去乙酰化酶抑制剂 MS-275 显著改变肝癌 HepG2 细胞中 exosome 的免疫相关分子种类和含量 [J]. *中华肝脏病杂志*, 2012(3): 231–235.
- [38] KO SF, YIP HK, ZHEN YY, et al. Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cell Exosomes Suppress Hepatocellular Carcinoma Growth in a Rat Model: Apparent Diffusion Coefficient, Natural Killer T-Cell Responses, and Histopathological Features [J]. *Stem Cells Int*, 2015, 2015: 853506.
- [39] CHEN W, WU J, SHI H, et al. Hepatic stellate cell coculture (下接 389 页)

- [48] 高梓茗,徐惠绵.胃癌精准外科治疗的研究新进展[J].中华医学信息导报,2021,36(1):7-8.
- [49] 季加孚,季鑫,步召德.从规范化到精准化:胃癌手术治疗的发展[J].中华外科杂志,2016,54(3):164-168.
- [50] 张恒,桑江勇,刘凤林.对精准医疗背景下胃癌微创治疗专业化的认识[J].中华胃肠外科杂志,2017,20(8):847-851.
- [51] 吉王明,张涛,程宇,等.加速康复外科理念在胃癌根治性切除术中的应用[J/CD].中华损伤与修复杂志(电子版),2020,15(6):434-440.
- [52] LIU XX, PAN HF, JIANG ZW, et al. "Fast-track" and "Minimally Invasive" Surgery for Gastric Cancer[J]. Chin Med J (Engl), 2016, 129(19):2294-2300.
- [53] GAMBARDELLA V, CERVANTES A. Precision medicine in the adjuvant treatment of gastric cancer[J]. Lancet Oncol, 2018, 19(5):583-584.
- [54] KUBOKI Y, YAMASHITA S, NIWA T, et al. Comprehensive analyses using next-generation sequencing and immunohistochemistry enable precise treatment in advanced gastric cancer[J]. Ann Oncol, 2016, 27(1):127-133.
- [55] GAMBARDELLA V, FLEITAS T, CERVANTES A. Understanding mechanisms of primary resistance to checkpoint inhibitors will lead to precision immunotherapy of advanced gastric cancer[J]. Ann Oncol, 2019, 30(3):351-352.
- [56] YUAN L, XU ZY, RUAN SM, et al. Long non-coding RNAs towards precision medicine in gastric cancer: early diagnosis, treatment, and drug resistance[J]. Mol Cancer, 2020, 19(1):96.
- [57] ICHIKAWA H, NAGAHASHI M, SHIMADA Y, et al. Actionable gene-based classification toward precision medicine in gastric cancer[J]. Genome Med, 2017, 9(1):93.
- [58] WANG Y, ZHANG L, YANG Y, et al. Progress of Gastric Cancer Surgery in the era of Precision Medicine[J]. Int J Biol Sci, 2021, 17(4):1041-1049.
- [59] HUANG W, ZHAN D, LI Y, et al. Proteomics provides individualized options of precision medicine for patients with gastric cancer[J]. Sci China Life Sci, 2021, 64(8):1199-1211.
- [60] OOKI A, YAMAGUCHI K. The beginning of the era of precision medicine for gastric cancer with fibroblast growth factor receptor 2 aberration[J]. Gastric Cancer, 2021, 24(6):1169-1183.
- [61] TIAN Y, LI Q, PAN Y. Prospective study of the effect of ERAS on postoperative recovery and complications in patients with gastric cancer[J]. Cancer Biol Med, 2021, 19(8):1274-1281.
- [62] 龚彩凤,孙永琨,解亦斌.胃癌的分子诊断与精准免疫治疗[J].中华医学杂志,2021,101(34):2649-2652.
- [63] 季加孚,李子禹,沈琳,等.重视多学科团队在胃癌规范化治疗中的作用[J].中国实用外科杂志,2014,34(7):592-594.

(上接 383 页)

- enables sorafenib resistance in Huh7 cells through HGF/c-Met/Akt and Jak2/Stat3 pathways[J]. Biomed Res Int, 2014, 2014:764981.
- [40] GULEI D, PETRUT B, TIGU AB, et al. Exosomes at a glance - common nominators for cancer hallmarks and novel diagnosis tools[J]. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2018, 53(5):564-577.
- [41] SOHN W, KIM J, KANG SH, et al. Serum exosomal microRNAs as novel biomarkers for hepatocellular carcinoma[J]. Exp Mol Med, 2015, 47(9):e184.
- [42] Yu LX, Zhang BL, Yang Y, et al. Exosomal microRNAs as potential biomarkers for cancer cell migration and prognosis in hepatocellular carcinoma patient-derived cell models[J]. Oncol Rep, 2019, 41(1):257-269.
- [43] LEE YR, KIM G, TAK WY, et al. Circulating exosomal noncoding RNAs as prognostic biomarkers in human hepatocellular carcinoma[J]. Int J Cancer, 2019, 144(6):1444-1452.
- [44] XU H, CHEN Y, DONG X, et al. Serum Exosomal Long Noncoding RNAs ENSG00000258332.1 and LINC00635 for the Diagnosis and Prognosis of Hepatocellular Carcinoma[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2018, 27(6):710-716.
- [45] SUN L, SU Y, LIU X, et al. Serum and exosome long non coding RNAs as potential biomarkers for hepatocellular carcinoma[J]. J Cancer, 2018, 9(15):2631-2639.
- [46] WANG G, LIU W, ZOU Y, et al. Three isoforms of exosomal circPTGR1 promote hepatocellular carcinoma metastasis via the miR449a-MET pathway[J]. EBioMedicine, 2019, 40:432-445.
- [47] RODRÍGUEZ DA, VADER P. Extracellular Vesicle -Based Hybrid Systems for Advanced Drug Delivery[J]. Pharmaceutics, 2022, 14(2):267.
- [48] SYN NL, WANG L, CHOW EK, et al. Exosomes in Cancer Nanomedicine and Immunotherapy: Prospects and Challenges[J]. Trends Biotechnol, 2017, 35(7):665-676.
- [49] HA D, YANG N, NADITHE V. Exosomes as therapeutic drug carriers and delivery vehicles across biological membranes: current perspectives and future challenges[J]. Acta Pharm Sin B, 2016, 6(4):287-296.
- [50] LOU G, SONG X, YANG F, et al. Exosomes derived from miR-122-modified adipose tissue-derived MSCs increase chemosensitivity of hepatocellular carcinoma[J]. J Hematol Oncol, 2015, 8:122.
- [51] WANG F, LI L, PIONTEK K, et al. Exosome miR-335 as a novel therapeutic strategy in hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 2018, 67(3):940-954.
- [52] Takahashi K, Yan IK, Wood J, et al. Involvement of extracellular vesicle long noncoding RNA (linc-VLDLR) in tumor cell responses to chemotherapy[J]. Mol Cancer Res, 2014, 12(10):1377-1387.