

• 综述 •

外泌体蛋白质组学在肝癌发生发展和治疗研究中的应用进展

赵丽萍¹, 徐锋^{2,3}, 张亚莉¹, 徐平^{1,2,3}

1 贵州大学 医学院, 贵州 贵阳 550025

2 军事科学院军事医学研究院生命组学研究所 国家蛋白质科学中心 (北京) 北京蛋白质组研究中心 蛋白质组学国家重点实验室, 北京 102206

3 中国医学科学院蛋白质组学与新药研发技术创新单元, 北京 102206

赵丽萍, 徐锋, 张亚莉, 等. 外泌体蛋白质组学在肝癌发生发展和治疗研究中的应用进展. 生物工程学报, 2020, 36(10): 1992–2000.

Zhao LP, Xu F, Zhang YL, et al. Exosomal proteomics study in the tumorigenesis, development and treatment of hepatocellular carcinoma. Chin J Biotech, 2020, 36(10): 1992–2000.

摘要: 肝细胞癌 (Hepatocellular carcinoma, HCC) 是最常见的五大恶性肿瘤之一。据世界卫生组织 (World health organization, WHO) 最新统计, 肝癌发病率位居全球第八, 死亡率位居全球第三, 严重影响人们的生命健康。外泌体 (Exosomes) 是磷脂双分子层包被的细胞外囊泡, 携带来自母细胞的蛋白质、核酸等活性物质, 可实现细胞间的物质交换和信息交流, 参与协调体内的生理病理过程。近年来外泌体与肝癌相关性的研究引起了广泛关注, 大量研究表明外泌体蛋白在肝癌的发生发展、诊断治疗和预后方面发挥至关重要的作用。现就外泌体的组成与功能、外泌体蛋白在肝癌的作用进行简要综述。

关键词: 肝癌, 外泌体蛋白, 蛋白质组学, 分子标志物, 诊断, 治疗

Received: February 14, 2020; **Accepted:** March 27, 2020

Supported by: National Key Research and Development Project (No. 2017YFA0505100), National Natural Science Foundation of China (Nos. 31670834, 91839302), Research Unit of Proteomics & Research and Development of New Drug, Chinese Academy of Medical Sciences (No. 2019RU006).

Corresponding authors: Ping Xu. Tel: +86-10-61777113; E-mail: xupingghy@gmail.com

Yali Zhang. Tel: +86-851-88274012; E-mail: zhangyl20011002@aliyun.com

国家重点研发计划 (No. 2017YFA0505100), 国家自然科学基金 (Nos. 31670834, 91839302), 中国医学科学院蛋白质组学与新药研发技术创新单元 (No. 2019RU006) 资助。

Exosomal proteomics study in the tumorigenesis, development and treatment of hepatocellular carcinoma

Liping Zhao¹, Feng Xu^{2,3}, Yali Zhang¹, and Ping Xu^{1,2,3}

¹ School of Medicine, Guizhou University, Guiyang 550025, Guizhou, China

² State Key Laboratory of Proteomics, Beijing Proteome Research Center, National Center for Protein Sciences (Beijing), Beijing Institute of Lifeomics, Beijing 102206, China

³ Research Unit of Proteomics & Research and Development of New Drug, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 102206, China

Abstract: Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the five most common malignant tumors. According to the latest statistics of the World Health Organization (WHO), the incident and mortality rates of HCC ranks the eighth and third in the world, respectively, which severely affect people's health. Exosomes are extracellular vesicles with a bilayer of phospholipids, which carry active substances such as proteins and nucleic acids derived from their mother cells. These exosomes greatly facilitate the exchange of substances and information between cells, and coordinate physiological and pathological processes in the body. In recent years, a large number of studies have shown that exosomal proteins play important roles in the tumorigenesis, development, diagnosis and treatment of HCC. Here we review the composition and functions of exosomes and the role of exosomal proteins in HCC.

Keywords: hepatocellular carcinoma, exosomal proteins, proteomics, molecular markers, diagnosis, treatment

肝细胞癌 (Hepatocellular carcinoma, HCC) 是常见的五大恶性肿瘤之一, 具有起病隐袭、发生发展生物过程复杂的特点。约 85% 的肝癌患者就诊时已为中晚期, 其生存期仅有 3–6 个月, 5 年生存率仅为 10.1%^[1], 因此难以研究其发生、发展的分子机制, 并在诊断、治疗和预后判断中加以使用^[2]。

外泌体 (Exosomes) 是由各种活细胞分泌而来的直径在 30–200 nm 的微小囊泡。随着研究的深入, 外泌体在参与细胞间物质传递和信息交流方面的前景越来越广阔。已有的研究发现特异性外泌体蛋白可通过介导肝癌的相关信号通路, 加剧肝癌的发生、发展。这对研究肝癌的发生、发展、诊断和治疗具有一定的价值^[3]。本文综述外泌体的组成与功能以及外泌体蛋白在肝癌的作用和分子机制。

1 外泌体概述

1.1 外泌体的发现及其蛋白质成分

外泌体是澳大利亚科学家 Johnstone 在体外培养的成熟绵羊网织红细胞中发现的一种双层膜结构的小囊泡, 并将其命名为“exosome”^[4]。外泌

体可由包括肿瘤细胞在内的各种身体组成细胞 (血小板、红细胞、巨噬细胞、淋巴细胞、成纤维细胞、神经细胞间充质干细胞及肿瘤细胞间质细胞) 分泌, 分布在身体的血液、尿液、唾液、脑脊液、支气管肺泡液及乳汁等几乎所有的体液中。体外培养的细胞也不例外, 在其培养上清中也可检测到外泌体的存在^[5]。

外泌体分泌过程一般通过 3 种模式: 1) 向内出芽的内体膜逐渐演变为成熟的多泡体, 与质膜融合后释放出外泌体; 2) 通过直接从细胞膜出芽的方式, 立即释放外泌体; 3) 通过在细胞内质膜连接隔室中出芽而延迟释放^[6]。

ExoCarta (<http://www.exocarta.org/>) 是外泌体研究常用的数据库。目前 ExoCarta 共收录了 286 项研究的外泌体内容物, 包含 9 769 种蛋白质、1 116 种脂质、3 408 种信使 RNA 和 2 838 种 microRNA。外泌体蛋白质主要包括维持其他膜蛋白的运输和稳定的 4 次跨膜蛋白超家族、决定肿瘤转移器官倾向性的外泌体整合素^[7]、在信号传导和粘附中起重要作用的表面蛋白、增强内吞作

用的脂质锚定内膜蛋白、内周膜蛋白脚手架蛋白、外泌体酶、可溶性蛋白、热休克蛋白、跨膜转运蛋白、多囊泡体合成蛋白以及脂质相关蛋白等^[8]。外泌体的表面标记蛋白通常在囊泡形成过程中发挥重要功能,其丰度高于对应的细胞。如直接参与细胞外囊泡内容物分选的4次跨膜蛋白(CD9、CD63、CD81),内吞体分选转运体复合体相关蛋白TSG101以及在膜泡形成过程中参与质膜切割的ALIX蛋白等^[9]。

1.2 外泌体的生物学功能

外泌体具备特殊的囊泡结构以及表面富含的各种膜信号分子,通常被认为广泛参与细胞间的物质传递和信息交流,主要包括3种方式:1)外泌体表面的蛋白直接与靶细胞通过受体与配体的相互作用而进行交流;2)外泌体膜上蛋白被水解后,可溶性成分与靶细胞受体结合;3)外泌体被靶细胞内吞后,将内容物输送到靶细胞内来改变其生物学功能,参与细胞通讯^[10]。

外泌体的生物学功能主要体现在细胞间通讯、免疫反应、肿瘤调控等3个方面。在细胞间通讯方面,细胞分泌的外泌体具有降解转铁蛋白受体的功能,因此外泌体最初被认为会代替溶酶体参与细胞间交流^[11];外泌体在肿瘤与成纤维细胞、炎性细胞和内皮细胞等基质细胞之间的信息交流中也可充当有效的信使,促进炎性细胞募集、血管生成和细胞外基质降解^[12];外泌体的释放成为免疫细胞之间,肿瘤与免疫细胞之间通讯的一种模式,诱导与外泌体结合的受体细胞生物学功能发生改变^[13];外泌体作为肿瘤微环境中的重要载体,其携带的各种细胞因子、生长因子、粘附分子和细胞外基质蛋白介导肿瘤微环境中的细胞间通讯,这些分子为癌细胞的生存和生长提供了合适的环境^[14-15]。

研究表明,外泌体在免疫调节中的功能可能是抗原肽的转移和呈递所致^[16]。如成熟的树突状细胞分泌的外泌体有效参与机体的抗肿瘤免疫应

答、内皮炎症以及动脉粥样硬化等^[17];树突状细胞摄取小鼠肿瘤外泌体中的肿瘤抗原后,将其呈递给MHC-I分子,诱导CD8阳性T细胞发生依赖性抗肿瘤作用,介导T细胞的抗肿瘤免疫应答^[18];经肿瘤肽处理的树突状细胞分泌的外泌体,在体内引发特异性细胞毒性T淋巴细胞并以T细胞依赖性方式根除或抑制肿瘤的生长^[19];B淋巴细胞可以分泌呈递抗原的外泌体,激活免疫细胞,调节免疫反应^[20];巨噬细胞释放的微囊泡会被上皮细胞等非专职吞噬细胞吞噬,从而降低炎症反应^[21];单核细胞或巨噬细胞分泌的多囊泡体,携带具有生物活性的IL-1 β 和其他炎性因子,共同参与体液免疫^[22]。

外泌体携带的多种生物活性分子也参与调控肿瘤发生发展,且不同来源的细胞分泌外泌体的数目、大小、浓度、内容物各不相同,并随细胞状态的变化而变化,因此可被作为疾病发生、发展、诊断和治疗的依据^[23]。胰腺癌病人血清样本中外泌体蛋白GPC1显著高于正常人^[24],可作为胰腺癌的诊断标志;缺氧口腔鳞癌细胞(Oral squamous cell carcinoma cells, OSCC)来源的外泌体,在HIF1 α 和HIF2 α 的参与下加速OSCC细胞的侵袭和迁移^[25];恶性黑色素瘤患者外周血中外泌体浓度显著高于健康对照组,且分泌的外泌体分子被运至肝脏,解释了黑色素瘤患者发生肝转移的现象^[26];小细胞肺癌外泌体中细胞因子TGF- β 和IL-10与肺癌细胞的迁移能力密切相关^[27];肿瘤微环境中脂肪细胞或成纤维细胞分泌的外泌体将自身携带的分子转移至卵巢癌细胞,改变转移性卵巢癌细胞的恶性表型,成为治疗肿瘤细胞的另一种方式^[28]。肿瘤来源外泌体蛋白质的这些特性为肿瘤生物学研究及其在发生、发展、诊断、治疗和预后判断中的应用创造条件。

2 外泌体蛋白质在肝癌发生发展中的作用

越来越多的研究表明,体液中分离纯化的外

泌体蛋白可在肿瘤之间, 肿瘤与肿瘤微环境之间进行生物信息传递, 调节肝癌的发生发展, 并影响肿瘤的增殖、侵袭和转移。表 1 列出了在肝癌进展中发挥作用的外泌体蛋白。

2.1 外泌体蛋白质在肝癌增殖中的作用

外泌体中包含的蛋白质和核酸等活性物质通过细胞间交流的方式诱导肿瘤内部产生异质性, 促进血管生成, 最终导致肿瘤细胞的恶性增殖。Ye 等^[29]发现外泌体通过释放重要的细胞内物质参与免疫细胞和癌细胞之间的通信。肝细胞癌来源的外泌体膜携带的高迁移率族蛋白 B1 可促进 TIM-1⁺B 细胞扩张, 诱导 TNF- α 和 IFN- γ 因子分泌, 进一步抑制 CD8⁺T 细胞增殖。Alzahrani 等^[30]发现, 肝癌肿瘤干细胞分泌的外泌体蛋白中, 肝癌标志物 AFP 和 GGT、肝酶 (ALT、AST 和 ALP) 增加显著。这也为肝癌标志物 GST-P 的免疫染色结果所证实。这些结果对肝癌的增殖研究有潜在意义。Li 等^[31]以肝癌细胞系 SMMC-7721 和 SK-Hep1 为材料分离外泌体, 发现外泌体蛋白

LOXL4 可通过过氧化氢机制激活 FAK/Src 信号通路, 调节细胞基质粘连, 并在肿瘤增殖和迁移中扮演重要作用。人脐静脉内皮细胞可在外泌体表面蛋白整合素 $\alpha v\beta 5$ 的调控下特异地摄取人肝癌细胞株 HepG2 分泌的 I 型跨膜外泌体蛋白 VASN, 从而改变人脐静脉内皮细胞自身的状态, 促进细胞增殖^[32]。外泌体所携带的 Golgi 膜蛋白 1 也可通过激活 GSK-3 β /MMPs 信号通路, 诱导靶细胞的增殖、迁移和侵袭, 从而促进肝癌的发展^[33]。

2.2 外泌体蛋白质在肝癌的侵袭和转移中的作用

外泌体作为介导肝癌细胞间信息传递的重要媒介, 其独特的细胞间交流机制可能为肝癌的侵袭和转移提供良好的微环境。如肝癌细胞来源的外泌体可被癌旁脂肪细胞摄取, 激活 NF- κ B 信号通路的 AKT、STAT5 α 、GSK3 α/β 、p38 α 和 ERK1/2 等 5 种磷酸化激酶, 促进肝癌的侵袭^[34]。HCC 高转移潜能细胞系循环肿瘤细胞分泌的 CXCR4 受体可介导细胞外基质中 MMP-2/9 的分泌, 促进邻

表 1 外泌体蛋白在肝癌进展中的作用

Table 1 Functions of exosomal proteins in the progression of hepatocellular carcinoma

Cargos	Sources	Functions	Mechanisms	References
HMGB1	HepG2, Huh-7, Hep3B, LM3	Higher infiltration	Activate TLR-MAPK pathway	[29]
AFP, GGT	Cancer stem cells of HCC Livers	Induced epithelial mesenchymal transition	Not mention	[30]
OXL4	SK-Hep1, SUN-423	Promote migration and angiogenesis	Activate FAK/Src pathway	[31]
VASN	HepG2	Promote proliferation and Migration of recipient HUVECs	Not mention	[32]
Golgin1	Genetic modified MHCC97h	Accelerated cell proliferation and migration	GSK-3 β /MMPs signaling axis	[33]
IL-6, IL-8	HepG2	Promote cell migration and increase tube formation	NF- κ B signaling pathway	[34]
CXCR4, SDF-1 α	Mouse hepatocarcinoma Hca-F	Promote the migration and invasion	MMPs secretions to facilitate lymph node metastasis	[35]
ITG $\alpha v\beta 5$	BxPC-3-liver-tropic	Liver metastasis	Specifically bind to Kupffer cells	[36]
MET, caveolins, S100	HKCI-C3, HKCI-8	Enhance the migratory and invasive abilities of non-motile cell lines	PI3K-AKT-mTOR, RAS-RAF-MEK-ERK	[37]
Caveolin	HCC MHCC97L cells	HCC motility and malignant progression	Not mention	[38]
SMAD	HepG2	Detached HCC cells and facilitated their adhesion	SMAD3/ROS signaling	[39]

近或远距离的低转移潜能的细胞系发生侵袭和迁移^[35]。Hoshino 等^[36]通过外泌体蛋白质组学揭示了一种与肝转移相关的外泌体整合素 $\alpha v\beta 5$ 的可能表达模式,可帮助预测器官特异性转移。He 等^[37]发现外泌体蛋白 Met、小窝蛋白 (Caveolin)、S100 蛋白家族参与具有转移潜能的 MHCC97L、HKCI-8 肝癌细胞的转移过程。这些外泌体蛋白被转移至正常肝细胞株 MIHC,激活 PI3K/AKT 和 MAPK 信号通路,加快肝细胞分泌 MMP-2 和 MMP-9 两种基质金属蛋白酶,促进正常肝细胞转化为肝癌细胞。Zhang 等^[38]发现,在此过程中小窝蛋白 Caveolin 表达上调,促进肝癌细胞的运动和恶化。黏附的肝癌细胞释放出含有蛋白质 SMAD3 和 mRNA 的外泌体,靶向促进游离肝癌细胞的黏附过程,并在受体肝癌细胞中激活 SMAD3/ROS 信号通路,进而上调相关黏附分子的表达水平,促进黏附以及转移灶的形成^[39]。

3 外泌体蛋白质在肝癌诊治中的应用

外泌体分析在肝癌诊断、治疗、预后判断方面也具有广阔的应用前景。肿瘤患者的外泌体与健康对照相比不仅数目增加,而且在蛋白质组成上也发生显著变化。而肿瘤患者血液中包含的外泌体蛋白与肿瘤组织类似,有望作为新型液体活检样本来源。现有的 HCC 常规治疗的效果不理想,但特定的外泌体不仅可将所携带的药物输送到待杀伤的肿瘤细胞,直接杀伤肿瘤;而且可以利用特定的外泌体激活受试患者机体的免疫反应,为生物免疫治疗提供新靶点,共同达到抗肿瘤的目的。

3.1 外泌体在肝癌诊断和预后判断中的应用

目前肝癌的诊断措施主要包括肝癌标志物和影像学诊断。甲胎蛋白 (Alpha fetoprotein, AFP) 是肝癌诊断首选标志物,再辅以超声、计算机断层扫描 (Computed tomography, CT)、磁共振成

像 (Magnetic resonance imaging, MRI) 等影像学诊断手段和肝穿刺合并针吸细胞学检查和酶学检查 (如碱性磷酸酶、 γ -谷氨酰转肽酶) 等,实现肝癌的诊治。不足之处在于影像学检查仪器昂贵、检验费用高,且仪器的辐射对人体伤害大;有创伤性的检查可能伴随各种并发症。即使使用最为普遍的 AFP,大约有 30% 的肝癌患者存在阴性检测结果,亟需其他灵敏度高、特异性好的临床检测指标,实现肝癌的精准早诊。血液外泌体来源的蛋白质因其干扰少,创伤性小、稳定性好、特异性强等优势,正越来越多的被用于肝癌患者的早筛早诊研究。

肝癌细胞和正常细胞分泌的外泌体蛋白差异显著,可用作肝癌诊断的肿瘤标志物。Arbelaiz 等^[40]在研究原发性硬化性胆管炎、胆管癌和肝细胞癌的血清外泌体蛋白质标志物时,发现肝细胞癌中显著表达的 LG3BP、PIGR,在肝癌诊断的 ROC 曲线线下面积分别为 0.904 和 0.837,高于同一批样本 AFP 值为 0.802 的 ROC 曲线线下面积。此外,外泌体蛋白中的 VNN1、CRP、FIBG、IGHA1、A1AG1 和 GGT1 也可作为区分肝内胆管癌和肝细胞癌的分子标志。Wang 等^[41]发现外泌体蛋白腺苷酸环化酶相关蛋白 1 (Cyclase-associated protein-1, CAP1) 在高转移潜能细胞系 MHCC97-H 中含量显著高于 MHCC97-L 细胞系,提示 CAP1 可区分不同转移潜能的肝癌细胞系,并在细胞迁移中起到关键作用。陈加贵^[42]使用改良后的超速离心法分离肝癌细胞 SMMC-7721 培养上清的外泌体,并经 LC-MS/MS 分析其中的蛋白质组成,发现肌球蛋白 9、视黄酸诱导的蛋白 3、整合素 β -1 和人多肽 N-乙酰氨基半乳糖转移酶 2 等膜蛋白显著富集。已知这 4 个膜蛋白参与乳腺癌、胃癌、肺癌等肿瘤的发生发展,其在肝癌中的早期诊断价值值得研究。Verma 等^[43]发现酒精性肝炎患者血清细胞外囊泡 (Extracellular vesicles, EV) 中

CD40L 水平显著高于健康人群,并在介导巨噬细胞活化和炎症方面起促进作用,提示 CD40L 可作为肝炎等的特征分子。此外,在人肝癌细胞外泌体中鉴定到的谷氨酰胺酶 2 和膜联蛋白 A2 等蛋白也与肝癌有关,具有潜在的肝癌肿瘤标志物价值^[44]。

3.2 外泌体蛋白质在肝癌治疗中的应用

目前肝癌的常规治疗方法有手术治疗、化疗、放射治疗、生物治疗和中医中药治疗。肝癌异质性强,个体化综合治疗具有较好的发展前景。常见的新型疗法有免疫治疗、分子靶向治疗和联合治疗。免疫治疗以 PD-1 抗体为主;分子靶向治疗主要以抗血管生成类小分子抑制剂为主,如多激酶抑制剂索拉非尼,多靶点抗血管生成药物瑞戈非尼、酪氨酸激酶 RTK 抑制剂乐伐替尼等,这些治疗手段均能在一定程度上延长肝癌患者的无疾病进展生存时间,为癌症患者带来福音。近年来,一些研究学者将外泌体作为包括肝癌在内的不同肿瘤的新型治疗手段,通过外泌体运载某些特定免疫相关内容物,实现肝癌新靶点的生物免疫治疗,并进一步激活机体对肿瘤的免疫,解决免疫逃逸问题,从而达到高效的抗肿瘤治疗之目的。研究肝癌治疗的外泌体蛋白见表 2。

肝细胞可通过旁分泌的形式向外分泌中性神经酰胺酶和鞘氨醇激酶 2 (Sphingosine kinase-2, SK2), 促进合成微环境中鞘氨醇-1-磷酸酯 (Sphingosine-1-phosphate, S1P), 进而诱导肝细胞增殖,促进损伤后的肝脏修复和再生^[45]。在肝癌

治疗中, Rao 等^[46]发现肝癌细胞 Hepa1-6 的外泌体中包含多种肿瘤特异性抗原,不仅可介导树突状细胞激活的 T 淋巴细胞中 IFN- γ 表达水平增加,降低肿瘤中白细胞介素 IL-10 和肿瘤生长因子 TGF- β 的表达,从而重组肿瘤微环境,增强肿瘤免疫反应;而且可提高 T 细胞中 IFN- γ 和 IL-2 的表达水平,引起强烈的肿瘤杀伤作用。因此外泌体也可用于肝癌的免疫治疗。如抗癌药物处理的肝癌细胞,可主动分泌 HSP60、HSP70 和 HSP90 等蛋白含量增加的外泌体,有效刺激 NK 细胞的细胞毒性和颗粒酶 B 的产生,上调活化性受体 CD94 的表达、下调 CD69、NKG2D 以及 NKP44 的表达,诱导肿瘤细胞凋亡,从而发挥抗肿瘤作用^[47]。类似的研究发现 HCC 细胞释放的外泌体通过上调巨噬细胞中 IL-6、IL-1 β 、IL-10 和 TNF- α 的表达,激活 STAT3 信号通路,进一步促进 PD-L1 蛋白表达,实现抗肿瘤的目的^[48]。

4 展望

外泌体蛋白在肝癌的发生、发展、诊断和治疗方面均具有重要的应用价值,亟待系统深入的基础研究。纯化外泌体的方法众多,包括最具代表性的超速离心法以及市售试剂盒方法等,但同一样品以不同分离方法提取的外泌体在数量和纯度上均存在较大差异,目前尚无统一的分离方法和评价标准。外泌体选择目的内容物并加以包裹的分子机制尚待研究。外泌体在肿瘤细胞或组织中增加的细胞和分子生物学机制尚待研究。在肝

表 2 外泌体蛋白用于肝癌治疗

Table 2 Exosomal proteins for the treatment of hepatocellular carcinoma

Cargos	Sources	Functions	Mechanisms	References
Neutral ceramidase, SK2	Hepatocytes of SK2-knockout mice	Promote cell proliferation and liver regeneration	Sphingolipid pathway	[45]
IFN- γ , IL-10, TGF- β	Hepa1-6	Inhibit tumor growth	Strong DC-mediated immune response	[46]
CD69, NKG2D	HepG2	Induce antitumor responses	HSP-specific NK cell responses	[47]
IL-6, IL-1 β , IL-10, TNF- α	HepG2, Bel-7402	Immunosuppression	STAT3 pathway	[48]

癌治疗中,靶细胞摄取外泌体蛋白,并传递给其他细胞的机制研究尚待深入,也亟需从离体细胞实验向整体动物模型转变。

致谢:左涛博士帮助指导和修改,特此感谢!

REFERENCES

- [1] Jiang Y, Sun AH, Zhao Y, et al. Proteomics identifies new therapeutic targets of early-stage hepatocellular carcinoma. *Nature*, 2019, 567(7747): 257–261.
- [2] Tsuchiya N, Sawada Y, Endo I, et al. Biomarkers for the early diagnosis of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(37): 10573–10583.
- [3] Wang HB, Lu ZM, Zhao XX. Tumorigenesis, diagnosis, and therapeutic potential of exosomes in liver cancer. *J Hematol Oncol*, 2019, 12(1): 133.
- [4] Johnstone RM, Adam M, Hammond JR, et al. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J Biol Chem*, 1987, 262(19): 9412–9420.
- [5] Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol*, 2013, 200(4): 373–383.
- [6] Pegtel DM, Gould SJ. Exosomes. *Annu Rev Biochem*, 2019, 88(1): 487–514.
- [7] Colombo M, Raposo G, Théry C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2014, 30(1): 255–289.
- [8] Li LM, Liu H, Liu XH, et al. Clinical significance of exosomal miRNAs and proteins in three human cancers with high mortality in China. *Oncol Lett*, 2019, 17(1): 11–22.
- [9] Escola JM, Kleijmeer MJ, Stoorvogel W, et al. Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes. *J Biol Chem*, 1998, 273(32): 20121–20127.
- [10] Urbanelli L, Magini A, Buratta S, et al. Signaling pathways in exosomes biogenesis, secretion and fate. *Genes (Basel)*, 2013, 4(2): 152–170.
- [11] Théry C, Zitvogel L, Amigorena S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol*, 2002, 2(8): 569–579.
- [12] Guo L, Guo N. Exosomes: Potent regulators of tumor malignancy and potential bio-tools in clinical application. *Crit Rev Oncol/Hematol*, 2015, 95(3): 346–358.
- [13] Théry C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol*, 2009, 9(8): 581–593.
- [14] Qu Z, Jiang CP, Wu JH, et al. Exosomes as potent regulators of HCC malignancy and potential bio-tools in clinical application. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(10): 17088–17095.
- [15] Takahashi K, Yan IK, Kogure T, et al. Extracellular vesicle-mediated transfer of long non-coding RNA ROR modulates chemosensitivity in human hepatocellular cancer. *FEBS Open Bio*, 2014, 4: 458–467.
- [16] Kalluri R, LeBleu VS. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science*, 2020, 367(6478): eaau6977.
- [17] Gao W, Liu HB, Yuan J, et al. Exosomes derived from mature dendritic cells increase endothelial inflammation and atherosclerosis via membrane TNF- α mediated NF- κ B pathway. *J Cell Mol Med*, 2016, 20(12): 2318–2327.
- [18] Wolfers J, Lozier A, Raposo G, et al. Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nat Med*, 2001, 7(3): 297–303.
- [19] Zitvogel L, Regnault A, Lozier A, et al. Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell derived exosomes. *Nat Med*, 1998, 4(5): 594–600.
- [20] Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W, et al. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med*, 1996, 183(3): 1161–1172.
- [21] Han CZ, Juncadella IJ, Kinchen JM, et al. Macrophages redirect phagocytosis by non-professional phagocytes and influence

- inflammation. *Nature*, 2016, 539(7630): 570–574.
- [22] Qu Y, Franchi L, Nunez G, et al. Nonclassical IL-1 β secretion stimulated by P2X7 receptors is dependent on inflammasome activation and correlated with exosome release in murine macrophages. *J Immunol*, 2007, 179(3): 1913–1925.
- [23] Tkach M, Théry C. Communication by extracellular vesicles: where we are and where we need to go. *Cell*, 2016, 164(6): 1226–1232.
- [24] Melo SA, Luecke LB, Kahlert C, et al. Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer. *Nature*, 2015, 523(7559): 177–182.
- [25] Li L, Li C, Wang SX, et al. Exosomes derived from hypoxic oral squamous cell carcinoma cells deliver *miR-21* to normoxic cells to elicit a prometastatic phenotype. *Cancer Res*, 2016, 76(7): 1770–1780.
- [26] Eldh M, Olofsson BR, Lässer C, et al. MicroRNA in exosomes isolated directly from the liver circulation in patients with metastatic uveal melanoma. *BMC Cancer*, 2014, 14(1): 962.
- [27] Wang YZ, Yi J, Chen XG, et al. The regulation of cancer cell migration by lung cancer cell-derived exosomes through TGF- β and IL-10. *Oncol Lett*, 2016, 11(2): 1527–1530.
- [28] Au Yeung CL, Co NN, Tsuruga T, et al. Exosomal transfer of stroma-derived *miR21* confers paclitaxel resistance in ovarian cancer cells through targeting APAF1. *Nat Commun*, 2016, 7: 11150.
- [29] Ye LS, Zhang Q, Cheng YS, et al. Tumor-derived exosomal HMGB1 fosters hepatocellular carcinoma immune evasion by promoting TIM-1⁺ regulatory B cell expansion. *J Immunother Cancer*, 2018, 6(1): 145.
- [30] Alzahrani FA, El-Magd MA, Abdelfattah-Hassan A, et al. Potential effect of exosomes derived from cancer stem cells and MSCs on progression of DEN-induced HCC in rats. *Stem Cells Int*, 2018, 2018: 8058979.
- [31] Li RK, Wang YH, Zhang XX, et al. Exosome-mediated secretion of LOXL4 promotes hepatocellular carcinoma cell invasion and metastasis. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 18.
- [32] Huang AX, Dong J, Li SH, et al. Exosomal transfer of vasorin expressed in hepatocellular carcinoma cells promotes migration of human umbilical vein endothelial cells. *Int J Biol Sci*, 2015, 11(8): 961–969.
- [33] Gai XC, Tang BF, Liu FM, et al. mTOR/*miR-145*-regulated exosomal GOLM1 promotes hepatocellular carcinoma through augmented GSK-3 β /MMPs. *J Genet Genomics*, 2019, 46(5): 235–245.
- [34] Wang SH, Xu MQ, Li XX, et al. Exosomes released by hepatocarcinoma cells endow adipocytes with tumor-promoting properties. *J Hematol Oncol*, 2018, 11(1): 82.
- [35] Li M, Lu Y, Xu YC, et al. Horizontal transfer of exosomal CXCR4 promotes murine hepatocarcinoma cell migration, invasion and lymphangiogenesis. *Gene*, 2018, 676: 101–109.
- [36] Hoshino A, Costa-Silva B, Shen TL, et al. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature*, 2015, 527(7578): 329–335.
- [37] He M, Qin H, Poon TCW, et al. Hepatocellular carcinoma-derived exosomes promote motility of immortalized hepatocyte through transfer of oncogenic proteins and RNAs. *Carcinogenesis*, 2015, 36(9): 1008–1018.
- [38] Zhang J, Lu SH, Zhou Y, et al. Motile hepatocellular carcinoma cells preferentially secrete sugar metabolism regulatory proteins via exosomes. *Proteomics*, 2017, 17(13/14), DOI: 10.1002/pmic.201700103.
- [39] Fu QH, Zhang Q, Lou Y, et al. Primary tumor-derived exosomes facilitate metastasis by regulating adhesion of circulating tumor cells via SMAD3 in liver cancer. *Oncogene*, 2018, 37(47): 6105–6118.
- [40] Arbelaiz A, Azkargorta M, Krawczyk M, et al. Serum extracellular vesicles contain protein biomarkers for primary sclerosing cholangitis and cholangiocarcinoma. *Hepatology*, 2017, 66(4): 1125–1143.

- [41] Wang S, Chen G, Lin X, et al. Role of exosomes in hepatocellular carcinoma cell mobility alteration. *Oncol Lett*, 2017, 14(6): 8122–8131.
- [42] Chen JG. Identification exosomes of hepatoma cell and proteomics detection[D]. Nanning: Guangxi Medical University. 2016 (in Chinese).
陈加贵. 肝癌细胞外泌体的鉴定及蛋白质组学研究[D]. 南宁: 广西医科大学, 2016.
- [43] Verma VK, Li HY, Wang RS, et al. Alcohol stimulates macrophage activation through caspase-dependent hepatocyte derived release of CD40L containing extracellular vesicles. *J Hepatol*, 2016, 64(3): 651–660.
- [44] Zhu L, Qu XH, Sun YL, et al. Novel method for extracting exosomes of hepatocellular carcinoma cells. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(21): 6651–6657.
- [45] Nojima H, Freeman CM, Schuster RM, et al. Hepatocyte exosomes mediate liver repair and regeneration via sphingosine-1-phosphate. *J Hepatol*, 2016, 64(1): 60–68.
- [46] Rao Q, Zuo BF, Lu Z, et al. Tumor-derived exosomes elicit tumor suppression in murine hepatocellular carcinoma models and humans *in vitro*. *Hepatology*, 2016, 64(2): 456–472.
- [47] Lv LH, Wan YL, Lin Y, et al. Anticancer drugs cause release of exosomes with heat shock proteins from human hepatocellular carcinoma cells that elicit effective natural killer cell antitumor responses *in vitro*. *J Biol Chem*, 2012, 287(19): 15874–15885.
- [48] Cheng L, Liu JT, Liu QQ, et al. Exosomes from melatonin treated hepatocellular carcinoma cells alter the immunosuppression status through STAT3 pathway in macrophages. *Int J Biol Sci*, 2017, 13(6): 723–734.

(本文责编 陈宏宇)