

外泌体在口腔癌中的研究进展

张艳^{1,2}, 兰霞斌^{1,2}, 陈超^{1,2}

(1. 中国科学院大学附属肿瘤医院(浙江省肿瘤医院), 中国科学院肿瘤与基础医学研究所, 浙江 杭州, 310022; 2. 浙江省头颈肿瘤转化医学研究重点实验室, 浙江 杭州 310022)

摘要:外泌体是携带脂质、蛋白质、核酸等生物信息分子的脂质双层膜囊性小泡, 介导细胞间之间的信息传递, 从而在调节免疫反应、肿瘤发生发展、肿瘤浸润转移等方面发挥重要作用。口腔癌是头颈部恶性肿瘤中较为常见的一种恶性肿瘤, 其发病率和死亡率逐年增高。全文综合阐述外泌体在口腔癌发生发展、浸润转移及免疫反应等过程中发挥的作用, 以期成为口腔癌的诊断和治疗提供新的思路。

关键词:口腔肿瘤; 口腔鳞状细胞癌; 外泌体; 诊断; 治疗; 预后

中图分类号: R739.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2020)06-0487-04

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2020.06.B004

Research Progress of Exosomes in Oral Cancer

ZHANG Yan^{1,2}, LAN Xia-bin^{1,2}, CHEN Chao^{1,2}

(1. Cancer Hospital of University of Chinese Academy of Sciences (Zhejiang Cancer Hospital), Institute of Cancer and Basic Medicine (IBMC), Chinese Academy of Sciences, Hangzhou 310022, China; 2. Key Laboratory of Head and Neck Cancer Translational Research of Zhejiang Province, Hangzhou 310022, China)

Abstract: Exosomes are lipid bilayer membrane vesicles carrying biological molecules, like lipid-derivatives, proteins, DNA or RNA. Exosomes take part in the crosstalk between cells, thus exerting great influence on immunoreaction regulation, tumorigenesis, tumor invasion and metastasis. Oral cancer is one of highest incidence among all head and neck cancers, with increasing incidence and mortality rates. This article reviews the roles of exosomes in pathogenesis, invasion, metastasis and immunoreaction of oral cancer, to provide information for diagnosis and treatment of oral cancer.

Subject words: oral cancer; OSCC; exosome; diagnosis; treatment; prognosis

口腔癌(oral cancer, OC)是发生在口腔及咽喉部位的恶性肿瘤, 根据第10版国际疾病分类(10th edition of the International Classification of Diseases, ICD-10), 口腔癌的范围包括: 唇、舌根、舌、牙龈、口底、腭部、扁桃体、口咽及口腔内其余部位。口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)是口腔癌中最常见的病理类型, 约占90%^[1,2]。近30年来, 口腔癌的发病率和死亡率在全世界范围内呈逐年上升趋势^[3]。根据全球疾病负担研究(Global Burden of Disease, GBD)报道, 2017年全世界口腔癌年龄标准化发病率为9.8/10万, 年龄标准化死亡

率为4.9/10万^[3]。口腔癌预后较差, 5年生存率仅50%左右^[4]。早期发现和治疗是改善口腔癌预后的关键, 因此, 口腔癌的诊断和治疗已成为近年来国内外研究的重点, 发现口腔癌早期诊断的标志物及口腔癌治疗的靶点是目前研究的焦点。

外泌体(exosome)是一种直径约为30~50nm、密度约为1.10~1.14g/ml的脂质双层膜囊性小泡, 在电子显微镜下观察呈杯状形态^[5]。人体内几乎所有类型的细胞都能产生外泌体, 如上皮细胞、树突状细胞、B细胞、T细胞、血小板、造血干细胞、肿瘤细胞等^[6]。外泌体内含有来自母体细胞的脂质、蛋白质、核酸, 来自不同组织的细胞产生的外泌体具有一定的组织特异性^[6]。外泌体介导母体细胞和受体细胞之间的信息传递, 通过质膜融合、表面受体介导的摄取、受体细胞内化等机制进入到受体细胞内进行

基金项目: 国家自然科学基金(81702645); 浙江省基础公益研究计划项目(LGJ18H160002)

通信作者: 陈超, 副主任医师, 博士; 中国科学院大学附属肿瘤医院头颈肿瘤外科, 浙江省杭州市拱墅区半山山东路1号(310022); E-mail: Lancet2000@msn.com

收稿日期: 2019-08-12; **修回日期:** 2019-11-15

调控^[7]。在免疫调节、细胞分化及凋亡、肿瘤细胞生长及转移、肿瘤细胞凋亡等方面发挥重要作用^[5]。肿瘤细胞产生携带自身基因及蛋白组学信息的外泌体,在肿瘤细胞之间及肿瘤细胞与正常细胞之间传递信息,促进肿瘤生长和转移^[8]。此外,也有研究表明外泌体具有促进肿瘤细胞凋亡、增强免疫反应等抑癌功能^[9-10]。随着外泌体研究领域的发展,外泌体在肿瘤发生发展中的机制日益明确,给肿瘤的诊断及治疗带来新的方向。

1 外泌体与口腔癌的关系

1.1 外泌体促进口腔癌进展

口腔癌细胞来源的外泌体作用于肿瘤细胞,促进肿瘤细胞的生长及转移。Sakha 等^[11]研究发现从高转移性人口腔癌细胞株分离得到的外泌体通过激活 ERK 和 AKT 信号通路促进肿瘤细胞生长,同时携带高表达的 miR-342-3p 和 miR-1246 进入低转移性癌细胞,促进受体细胞转移和浸润。Dickman 等^[12]通过抑制 OSCC 细胞外泌体转运相关蛋白 Rab27A 的功能,减少 miR-142-3p 向细胞外的转运,增加 OSCC 细胞内 miR-142-3p 的数量,抑制 TGFBR1 的表达,从而抑制肿瘤细胞的生长及转移,反之亦然。因此 Dickman 等^[12]推测外泌体通过其转运功能减少 OSCC 细胞内 miR-142-3p 的数量,从而促进肿瘤细胞的生长及转移。

外泌体由母体细胞产生并分泌到细胞外基质或体液中,从血浆、唾液、尿液等体液中均能分离得到外泌体。口腔癌细胞来源的外泌体通过血浆可以扩散至机体每个部位,作用于远处的组织细胞或血液里的免疫细胞。OSCC 患者血浆中外泌体含量显著增高,肿瘤源性的外泌体可作用于免疫细胞,促进肿瘤生长和转移^[13]。Momen-Heravi 等^[13]发现 OSCC 细胞来源的外泌体中含有大量的 miRNA-21。miRNA-21 激活 NF- κ B 信号通路,抑制细胞凋亡、失活抑癌基因、促进肿瘤生长和转移,属于致癌 miRNA。携带 miRNA-21 的 OSCC 外泌体通过血浆转运作用于单核细胞后,激活 NF- κ B 信号通路,增加促炎性细胞因子分泌(MCP1、PGE2 及 IL-6),促进基质金属蛋白酶(MMP9)表达,促进肿瘤转移,抑制肿瘤细胞凋亡^[13]。

除了肿瘤细胞,肿瘤间质细胞亦能产生外泌体,

作用于邻近的肿瘤细胞,促进肿瘤生长及转移。Li 等^[14]研究发现 OSCC 肿瘤相关成纤维细胞产生的外泌体内 miR-34a-5p 含量显著下降,进一步研究 miR-34a-5p 功能,发现 miR-34a-5p 抑制 AXL 受体酪氨酸激酶的功能,抑制促进上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT) 的 AKT/GSK-3 β / β -catenin 信号通路,从而抑制 OSCC 细胞的生长与转移。外泌体内 miR-34a-5p 含量的下降,使 OSCC 肿瘤相关成纤维细胞对 OSCC 生长和转移的抑制减弱,从而促进肿瘤进展。

1.2 外泌体抑制口腔癌进展

口腔癌细胞来源的外泌体作用于免疫细胞后,激活免疫反应,抑制肿瘤进展。Wang 等^[15]发现口腔癌细胞来源外泌体作用于 NK 细胞后,促进其细胞增殖、释放穿孔素和颗粒酶 M、增强细胞毒性。进一步研究发现,口腔癌细胞来源外泌体富含 NAP1,作用于 NK 细胞后使其胞浆内 NAP1 含量增高,NAP1 是 IRF-3 的激活因子,促进 IRF-3 的表达及磷酸化,从而促进 IFN 和 CXCL 基因表达,增强 NK 细胞的细胞毒性功能。

间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)产生的外泌体具有抑制肿瘤生长及转移的功能。口腔癌细胞中 miR-101-3p 表达下降,其下游靶基因 COL10A1 表达上升,而人骨髓间充质干细胞(human bone marrow mesenchymal stem cell, hBMSC)产生富含 miR-101-3p 的外泌体,作用于口腔癌细胞后降低 COL10A1 表达,抑制肿瘤细胞生长、浸润及转移^[16]。经血源性间充质干细胞(menstrual mesenchymal stem cell, MenSC)产生的外泌体在体外诱导上皮细胞凋亡,并且降低内皮细胞内 VEGF 的浓度,抑制脉管形成。因此推测, MenSC 在机体内抑制 OSCC 生长,同时抑制肿瘤组织内血管形成^[17]。

2 外泌体与口腔癌前病变的关系

口腔癌前病变主要有口腔白斑、口腔红斑、口腔黏膜下纤维化等。口腔白斑是最常见的一种癌前病变,据报道 16%~62% 的 OSCC 来源于口腔白斑恶变^[18]。口腔白斑和口腔癌来源的外泌体促进口腔白斑恶变^[19]。Li 等^[19]从人口腔白斑和口腔癌组织中分别分离出 MSC,提取其外泌体,发现口腔白斑 MSC 外泌体与

口腔癌 MSC 外泌体一样,能够在体外促进口腔增生细胞及癌细胞增殖、转移及浸润。相较于正常口腔黏膜组织 MSC 分泌的外泌体,口腔白斑和口腔癌来源外泌体内 miR-8485 含量异常增高,进一步研究发现 miR-8485 能在体外促进口腔癌细胞增殖、转移及浸润。因此,Li 等^[19]认为口腔白斑 MSC 来源外泌体及其内富含的 miR-8485 促进口腔癌前病变和口腔癌的发生发展。

目前已有多项研究表明,MSC 源性外泌体抑制口腔癌生长和转移,在口腔癌前病变相关的研究中,亦发现 MSC 外泌体抑制口腔癌前病变的进展。Wang 等^[20]使用富含 miR-185 的 MSC 外泌体作用于颊黏膜癌前病变模型,发现 MSC 外泌体显著减轻癌前病变中的炎症反应及异型增生,细胞增生标志分子 PCNA 和血管增生标志分子 CD31 显著减少,细胞凋亡相关分子 caspase-3 和 caspase-9 表达增加,从而抑制口腔癌的发生。

3 外泌体与口腔癌的诊断

外泌体存在于人体血浆、唾液、尿液等体液中,标本获取便捷且无创,自身携带丰富的肿瘤信息且不易受外界干扰,是良好的诊断工具。Zlotogorski-Hurvitz 等^[21]采集口腔癌患者和健康人群的唾液,通过纳米粒子跟踪分析唾液源性外泌体,发现口腔癌患者唾液内外泌体浓度高于健康人群,且外泌体个体平均体积也大于健康人群。通过 ELISA 和 WB 方法检测发现,相较于健康人群,口腔癌患者唾液源性外泌体低表达 CD81 和 CD9 分子,同时高表达 CD63 分子。Sharma 等^[22]通过原子力显微镜分析口腔癌患者和健康人群唾液中外泌体的情况,相较于健康人群,口腔癌患者的唾液外泌体数量更多,形态不规则,个体体积更大,相互之间聚集性更明显。从分子层面分析,口腔癌患者外泌体表面的 CD63 分子密度高于健康人群,与 Zlotogorski-Hurvitz 等的研究结果一致。Han 等^[23]通过差异蛋白组学方法分析人舌鳞状细胞癌细胞和人正常黏膜细胞产生的外泌体之间的差异,发现两组外泌体中差异表达量在 2 倍及以上的蛋白差异点有 16 个,癌细胞源性外泌体上调表达的蛋白质有 12 个,下调表达的有 4 个。根据目前的研究结果推测,外泌体浓度、形态、表面分

子、蛋白组学等各方面的信息均有可能成为口腔癌早期诊断的重要因素。

4 外泌体与口腔癌的预后

外泌体与肿瘤的发生发展密切相关,其携带的信息可反映肿瘤的进展和预后。Rodriguez Zorrilla 等^[24]通过对 10 例局部晚期口腔癌手术患者进行随访研究,发现在术后 1 周,CD63 阳性的血浆外泌体显著减少,推测患者血浆中的 CD63 阳性外泌体主要由 OSCC 细胞产生。Rodriguez Zorrilla 等^[24]探查血浆外泌体浓度与预后的关系,发现不论是术前还是术后,血浆 CD63 阳性(或 CAV-1 阳性)外泌体浓度较低者总生存时间较长。Ono 等^[25]发现转移到淋巴结的 OSCC 细胞分泌富含热休克蛋白 HSP90 的外泌体,使用 siRNA 敲除 HSP90 α 和 HSP90 β 后转移性 OSCC 细胞的增殖能力显著下降,同时结合临床信息,发现肿瘤组织内 HSP90 蛋白表达升高的患者预后较差。由此,Ono 等^[25]推测外泌体中 HSP90 的表达有可能成为 OSCC 预后的一个重要因素,同时也是其治疗的一个重要靶点。

5 外泌体与口腔癌的治疗

手术联合放化疗综合治疗是目前口腔癌治疗的主要方式,但总体效果不甚理想,5 年生存率仅为 50%,因此目前亟需寻找新的治疗方式。外泌体与肿瘤的生长、转移及浸润密切相关,是极具潜力的治疗靶点。Fujiwara 等^[26]等发现 OSCC 细胞在 EGF 的作用下产生更多富含 EGFR 的外泌体,口腔上皮细胞内噬富含 EGFR 的外泌体后出现上皮间质转化特征,从而促进肿瘤细胞转移,而抗 EGFR 抗体——西妥昔单抗(cetuximab)能够抑制外泌体的内噬和其上皮间质转化作用,从而抑制 OSCC 细胞转移。

6 小 结

外泌体介导细胞间通信,调控肿瘤细胞机能,调节机体免疫反应,在口腔癌发生发展中发挥重要作用。随着外泌体研究的不断深入,外泌体将在口腔癌的诊断和治疗方面发挥重要作用。从血浆或唾液中

获取的外泌体可以作为口腔癌早期诊断的标志物。外泌体可作为药物治疗的靶点或药物载体,用于治疗口腔癌或癌前病变。对外泌体的深入研究及临床应用有望在口腔癌的诊断和治疗领域带来突破性的进展,改善口腔癌的预后。

参考文献:

- [1] Li J. Clinicopathological parameters as prognostic role in oral cancer [J]. *China Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 2008, 6(1): 17–21. [李江. 口腔癌的临床病理特征与预后[J]. *中国口腔颌面外科杂志*, 2008, 6(1): 17–21.]
- [2] Zhang J, Gao F, Yang AK, et al. Epidemiologic characteristics of oral cancer: single-center analysis of 4097 patients from the Sun Yat-sen University Cancer Center [J]. *Chin J Cancer*, 2016, 35: 24.
- [3] Global Burden of Disease Cancer Collaboration, Fitzmaurice C, Abate D, Abbasi N, et al. Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-Years for 29 Cancer Groups, 1990 to 2017: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study [J]. *JAMA Oncol*, 2019 Sep 27. [Epub ahead of print]
- [4] Zhang SK, Zheng R, Chen Q, et al. Oral cancer incidence and mortality in China, 2011 [J]. *Chin J Cancer Res*, 2015, 27(1): 44–51.
- [5] Kalra H, Drummen GP, Mathivanan S. Focus on Extracellular Vesicles: Introducing the Next Small Big Thing [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(2): 170.
- [6] Mathivanan S, Lim JW, Tauro BJ, et al. Proteomics analysis of A33 immunoaffinity-purified exosomes released from the human colon tumor cell line LIM1215 reveals a tissue-specific protein signature [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2010, 9(2): 197–208.
- [7] Mathivanan S, Ji H, Simpson RJ. Exosomes: Extracellular organelles important in intercellular communication [J]. *J Proteomics*, 2010, 73(10): 1907–1920.
- [8] Whiteside TL. Tumor-derived exosomes and their role in cancer progression [J]. *Adv Clin Chem*, 2016, 74: 103–141.
- [9] Ristorcelli E, Beraud E, Verrando P, et al. Human tumor nanoparticles induce apoptosis of pancreatic cancer cells [J]. *FASEB J*, 2008, 22(9): 3358–2369.
- [10] Zhang Y, Luo CL, He BC, et al. Exosomes derived from IL-12-anchored renal cancer cells increase induction of specific antitumor response in vitro: A novel vaccine for renal cell carcinoma [J]. *Int J Oncol*, 2010, 36(1): 133–140.
- [11] 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.
- [12] Dickman CT, 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.
- [13] Momen-Heravi F, Bala S. Extracellular vesicles in oral squamous carcinoma carry oncogenic miRNA profile and reprogram monocytes via NF- κ B pathway [J]. *Oncotarget*, 2018, 9(78): 34838–34854.
- [14] Li YY, Tao YW, 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.
- [15] Wang Y, Qin X, Zhu X, et al. Oral cancer-derived exosomal NAPI enhances cytotoxicity of natural killer cells via the IRF-3 pathway [J]. *Oral Oncol*, 2018, 76: 34–41.
- [16] Xie C, Du LY, Guo F, 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.
- [17] Rosenberger L, Ezquer M, Lillo-Vera F, et al. Stem cell exosomes inhibit angiogenesis and tumor growth of oral squamous cell carcinoma [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 663.
- [18] Zhu XH, Fu J, Chen QM, et al. Micro RNAs and oral premalignant lesions [J]. *International Journal of Stomatology*, 2012, 39(3): 394–396, 400. [朱晓寒, 付纪, 陈谦明, 等. 微小RNA与口腔癌前病变 [J]. *国际口腔医学杂志*, 2012, 39(3): 394–396, 400.]
- [19] Li W, Han Y, Zhao Z, et al. Oral mucosal mesenchymal stem cell \ominus derived exosomes: A potential therapeutic target in oral premalignant lesions [J]. *Int J Oncol*, 2019, 54(5): 1567–1578.
- [20] Wang L, Yin P, Wang J, et al. Delivery of mesenchymal stem cells-derived extracellular vesicles with enriched miR-185 inhibits progression of OPMD [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2019, 47(1): 2481–2491.
- [21] Zlotogorski-Hurvitz A, Dayan D, Chaushu GJ, et al. Morphological and molecular features of oral fluid-derived exosomes: oral cancer patients versus healthy individuals [J]. *Cancer Res Clin Oncol*, 2016, 142(1): 101–110.
- [22] Sharma S, Gillespie BM, Palanisamy V, et al. Quantitative nanostructural and single-molecule force spectroscopy biomolecular analysis of human-saliva-derived exosomes [J]. *Langmuir*, 2011, 27(23): 14394–14400.
- [23] Han XS, Zhang ZY, Huang Y, et al. Differential proteomics research on exosomes derived from tongue squamous cell carcinoma cells and normal mucosa cells [J]. *West China Journal of Stomatology*, 2014, (3): 283–287. [韩新生, 张卓远, 黄怡, 等. 舌鳞状细胞癌细胞与正常黏膜细胞微泡的差异蛋白组学研究 [J]. *华西口腔医学杂志*, 2014, (3): 283–287.]
- [24] Rodríguez 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): pii: E429.
- [25] 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.
- [26] Fujiwara T, Eguchi T, Sogawa C, et al. Carcinogenic epithelial-mesenchymal transition initiated by oral cancer exosomes is inhibited by anti-EGFR antibody cetuximab [J]. *Oral Oncol*, 2018, 86: 251–257.