

外泌体在乳腺癌耐药方面的研究进展

熊文婧, 解园, 靳语书, 张悦, 张清媛
(哈尔滨医科大学附属肿瘤医院, 黑龙江 哈尔滨 150081)

摘要: 外泌体是从正常细胞和肿瘤细胞中释放出来的膜源性小泡, 可介导细胞间的物质交换和信息交流。越来越多的研究表明, 外泌体在乳腺癌耐药过程中发挥重要作用, 并且可作为预测、监测疗效的候选标志物以及逆转耐药的潜在靶点或载体。全文对外泌体在乳腺癌耐药方面及其在乳腺癌诊疗中的临床应用研究进展进行总结。

关键词: 外泌体; 乳腺癌; 耐药

中图分类号: R737.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2022)07-0586-04

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2022.07.B010

Progress on Exosomes in Drug Resistance to Breast Cancer

XIONG Wen-jing, XIE Yuan, JIN Yu-shu, ZHANG Yue, ZHANG Qing-yuan

(Harbin Medical University Cancer Hospital, Harbin 150081, China)

Abstract: Exosomes are membrane-derived vesicles released from normal and tumor cells, which mediate material and information exchange between cells. More and more studies have shown that exosomes play an important role in the process of drug resistance of breast cancer, indicating that exosomes may be used as a candidate marker to predict and monitor the therapeutic efficacy, as well as potential targets or carriers to reverse drug resistance in patients with breast cancer. This review summarizes the advances in the study on exosomes in the drug resistance of breast cancer and its clinical application.

Subject words: exosomes; breast cancer; drug resistance

外泌体是由各种细胞分泌的膜源性小泡结构, 其直径约为 40~160 nm^[1], 在多种体液如血浆、血清、尿液、唾液等都可以检测到外泌体的存在。外泌体内富含蛋白质、脂质、编码或非编码 RNA 等生物信息物质, 在多种生理、病理过程中发挥着独特作用。在肿瘤方面, 肿瘤衍生的外泌体(tumor-derived exosomes, TDEs)参与调节肿瘤生长、侵袭、耐药、血管生成、免疫逃逸以及肿瘤微环境的重塑^[2]。

手术、化疗、放疗、内分泌治疗和靶向药物治疗是乳腺癌常规的治疗手段。免疫治疗药物也在部分患者中显示出良好疗效。然而, 耐药性的产生和预测反应生物标志物的缺乏使治疗效果仍然受限。进一步了解耐药的分子机制, 寻找可靠的标志物预测治疗后反应仍是临床需迫切解决的实际问题。本文将对外泌体介导乳腺癌治疗耐药的研究进展进行总结, 并探讨外泌体作为生物标志物及治疗载体的临床应用价值。

1 化疗药物耐药

随着个体化治疗的发展, 不同亚型乳腺癌的治疗策略各有不同, 药物种类繁多。阿霉素(adriamycin, ADM)、紫杉醇(paclitaxel, PTX)、多西他赛(docetaxel, DOC)、顺铂是乳腺癌治疗中常用的化疗药物。然而, 乳腺癌细胞可利用多种机制来逃避各种化疗药物引起的细胞凋亡, 主要包括药物的外流和失活^[3], 旁路或促存活通路的激活, 上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)等。此外, TDEs 可诱导敏感细胞“演变”, 导致肿瘤细胞间耐药表型的转移^[4]。

1.1 肿瘤源性外泌体对乳腺癌化疗耐药的影响

外泌体通过多种机制介导 ADM 耐药。第一种是药物直接外流。早在 2003 年, 研究人员观察到乳腺癌可将 ADM 以囊泡的形式排出到细胞外培养基, 并且癌细胞系中囊泡脱落速率与肿瘤细胞对 ADM 的抵抗呈正相关^[5]。第二种是外泌体通过转移药物代谢酶, 诱导 ADM 失活。Yang 等^[6]发现, ADM 耐药细胞分泌的外泌体中谷胱甘肽巯基转移酶呈现

通信作者: 张悦, E-mail: zhangyue010@hotmail.com
收稿日期: 2022-01-09; 修回日期: 2022-04-05

高表达,将敏感细胞暴露于这些外泌体中可诱发耐药。第三种是外泌体介导功能蛋白或 miRNAs 的转移调节 P-gp(ABC 亚家族的一种跨膜转运蛋白质)的表达。研究发现,在化疗耐药 MCF-7/ADM 细胞外泌体中 UCH-L1 高表达,将此外泌体与敏感细胞共培养可导致 MAPK/ERK 信号通路活化上调 P-gp 表达,促进敏感细胞耐药。用 UCH-L1 抑制剂 LDN-57444 处理敏感 MCF-7 细胞,可预防 ADM 耐药^[7]。外泌体源性非编码 RNA 也可直接地促进 ADM 耐药。Wang 等^[8]发现,高表达 lncRNA-H19 的外泌体可促进乳腺癌对 ADM 耐药及耐药表型的传播。同样,多个 miRNA 在顺铂耐药 MDA-MB-231 细胞系的外泌体中呈现高表达,以 miRNA-423-5p 为例,可将顺铂耐药表型转移到敏感细胞。

外泌体也可通过不同机制介导其他化疗药物耐药。Kreger 等^[9]证明,高度侵袭性的 MDA-MB-231 乳腺癌细胞系诱导细胞分泌富含生存素(Survivin)的外泌体,这有利于人乳腺癌 SKBR3 细胞在 PTX 治疗下的存活。Guo 等^[10]发现,耐药乳腺癌细胞外泌体中富含 ANXA6 可以传递到敏感细胞通过诱导细胞自噬促进 PTX 耐药,而自噬抑制剂可逆转耐药。Schwarzenbach 等^[11]发现,耐药乳腺癌细胞释放的外泌体含有大量的 miRNAs,如 miRNA-23a、miRNA-222 以及 miRNA-452,可将 DOC 耐药表型传递到敏感细胞。

EMT 会导致细胞间紧密黏附性丧失,侵袭、迁移和抗凋亡能力增强,有助于肿瘤进展。Santos 等^[12]发现 ADM 和 PTX 耐药细胞中 miRNA-155 上调与 EMT 相关。将来自耐药细胞的外泌体与敏感细胞共同培养导致后者 miRNA-155 水平升高并诱导耐药。癌症干细胞(cancer stem cells,CSCs)不仅驱动肿瘤的发生和生长,而且介导肿瘤转移和治疗耐药^[13]。Yang 等^[14]发现,乳腺癌化疗后可激活 EZH2/STAT3 信号诱导外泌体源性 miRNA-378a3p 和 miRNA-378d 分泌,并通过靶向 DKK3(WNT 拮抗剂)和 NUMB(NOTCH 抑制因子)激活 WNT 和 NOTCH 干细胞通路,从而促进耐药;随后证明了化疗药物联合 EZH2 抑制剂可逆转耐药。这些结果表明,肿瘤源性外泌体可通过多种细胞、多种方式在乳腺癌化疗耐药性中发挥重要作用。

1.2 间质源性外泌体对乳腺癌化疗耐药的影响

各种细胞(内皮细胞、成纤维细胞、免疫细胞等)

和细胞外成分(细胞因子、生长因子、激素、细胞外基质等)组成了肿瘤微环境(tumor microenvironment,TME)^[15]。TME 缺氧、酸性环境、高氧化应激等特征促进外泌体的分泌及含量的调节^[16]。外泌体在 TME 中可作为信息载体,介导细胞间的通讯,利于耐药表型的转移。实验表明,间充质干细胞(mesenchymal stem cells,MSCs)可释放含有 miRNA-222/miRNA-223 的外泌体,诱导乳腺癌细胞处于静息状态并耐药^[17]。另有研究发现,基质细胞中的外泌体可转移到乳腺癌细胞中并激活 RIG-I 抗病毒信号,通过抗病毒/NOTCH3 通路诱导乳腺癌细胞耐药^[18]。

2 内分泌治疗耐药

约 70%乳腺癌为激素受体阳性乳腺癌,内分泌治疗是其主要治疗手段,他莫昔芬(tamoxifen,TAM)是最早应用的内分泌药物,并明显改善该类患者预后。然而,约 30%晚期患者会产生内分泌治疗的原发性耐药,而几乎所有敏感患者会在治疗过程中发生获得性耐药,导致疾病进展。已有研究数据表明,外泌体可通过多种机制介导乳腺癌内分泌治疗耐药。Semina 等^[19]证实 MCF-7 细胞系中 TAM 耐药性可在细胞间发生水平传递。将敏感 MCF-7 细胞与耐药细胞外泌体共同培养 14 d,可导致敏感细胞对 TAM 耐药^[20]。外泌体源性非编码 RNA 在 TAM 耐药中也发挥作用。Liu 等^[21]发现 MCF-7/TAM 细胞外泌体中的 miRNA-9-5p 可以通过负向调控乳腺癌相关差异表达基因中的 ADIPOQ 促进 TAM 耐药。Zhao 等^[22]证明了在体内外泌体 miRNA-205 通过诱导 E2F1 转录因子的沉默促进 TAM 耐药和乳腺癌进展。但是,外泌体介导的内分泌治疗耐药的具体机制尚未完全明确,需要更多的研究深入探讨。

3 靶向药物耐药

曲妥珠单抗是首个获批治疗人表皮生长因子受体 2(human epidermal growth factor receptor 2,HER2)阳性乳腺癌的药物,提高了这类患者的总体生存率和无病生存率^[23]。然而,曲妥珠单抗耐药的出现成为 HER2 阳性乳腺癌治疗期间的主要障碍。其中,外泌体介导的曲妥珠单抗耐药是其重要原因之一。Martinez 等^[24]发现,曲妥珠单抗耐药与转化生长因子 β 1

(transforming growth factor $\beta 1$, TGF- $\beta 1$) 水平升高有关, 并且耐药细胞的外泌体可以促进敏感细胞中的 TGF- $\beta 1$ 表达上调及耐药。近期研究表明, 外泌体介导的 OIP5-AS1 细胞间转移, 通过 miRNA-381-3p/HMGB3 轴增强乳腺癌对曲妥珠单抗的耐药性^[25]。外泌体源性非编码 RNA 失调也可导致曲妥珠单抗耐药。Han 等^[26]发现, lncRNA AFAP1-AS1 在曲妥珠单抗耐药细胞中表达上调, 并可被包装到外泌体中转移到敏感细胞导致曲妥珠单抗耐药性的传播。同样, circHIPK3 (一种具有闭环结构的内源性非编码 RNA) 的过表达导致乳腺癌细胞曲妥珠单抗耐药, 并通过外泌体传递耐药表型^[27]。随着越来越多的深入研究, 为解决曲妥珠单抗耐药提供了治疗靶点及克服耐药的可能。

4 免疫治疗耐药

近年来, 新型抗癌免疫疗法成功开创了癌症治疗的新纪元。根据 IMpassion130 研究的结果, 抗细胞程序性死亡配体-1 (programmed death-1 ligand 1, PD-L1) 药物 (阿特珠单抗) 联合白蛋白紫杉醇于 2019 年 3 月 8 日获得美国 FDA 加速批准, 用于治疗不可切除的 PD-L1 表达的局部晚期或转移性三阴性乳腺癌患者^[28]。免疫治疗明显改善了患者预后, 但克服免疫逃逸及耐药成为了新的研究重点。外泌体在介导免疫逃逸及耐药方面也发挥了作用。Dou 等^[29]证明了 CAFs 来源的外泌体促进乳腺癌细胞 PD-L1 的表达, 进而诱导 T 细胞凋亡, 损害 NK 细胞功能, 从而促进免疫逃逸。研究发现, 外泌体中 miRNA-27a-3p 可通过 MAGI2/PTEN/PI3K 轴上调 PD-L1 促进免疫逃逸^[30]。在乳腺癌的 4T1 模型中, 外泌体中的 PD-L1 于 TME 中聚集, 通过抑制粒溶酶 B 的产生导致免疫治疗耐药^[31]。总之, 外泌体携带免疫抑制分子, 可以以多种方式介导免疫治疗耐药。

5 外泌体在乳腺癌中的临床应用

一方面, 外泌体具有携带信息丰富、结构相对稳定、且存在于大多生物液体中的特性, 使其有望成为诊断、鉴别诊断和评估疗效的生物标志物^[32]。Hannafon 等^[33]利用 microRNA 测序技术发现, 外泌体中 miRNA-1246 和 miRNA-21 在乳腺癌患者血浆中显

著性升高, 且与乳腺癌不良预后密切相关, 提示血浆外泌体中 miRNA-1246 和 miRNA-21 是潜在的预测指标, 用于乳腺癌的早期筛查和预后评估。Liu 等^[34]综合生物信息学分析和实验结果表明, 血浆中外泌体来源的 hsa-miRNA-21-5p 可作为乳腺癌诊断的生物标志物。然而, 外泌体样本的收集、处理和分离的标准化方法尚未建立, 且外泌体在肿瘤细胞与正常细胞中常混合存在, 使得外泌体在临床诊疗方面的研究仍面临较大挑战。

另一方面, 外泌体为乳腺癌的治疗提供了新思路。因外泌体纳米级尺寸、免疫相容性、低毒性和相对稳定等优点使外泌体成为具有优势的治疗载体。许多非编码 RNA、多肽或化疗药物可以通过不同方法装载到来自不同细胞的外泌体中。目前, 研究人员设计出以巨噬细胞来源的外泌体为药物递送平台, 运输铂纳米粒子, 靶向用于乳腺癌和肺转移肿瘤细胞, 同时激活细胞凋亡和抑制细胞增殖, 抑制乳腺癌的转移, 从而达到治疗目的^[35]。Yang 等^[36]发现来自 CAR-T 细胞的外泌体可通过分泌穿孔素和颗粒酶 B 有效地靶向用于间皮素阳性的三阴性乳腺癌细胞, 研究数据展示了良好的杀伤效率和安全性。Milano 等^[37]的研究结果显示, 在大鼠模型中, 间充质祖细胞来源的外泌体包载的 ADM/曲妥珠单抗能够显著性改善其心脏毒性, 并增强对乳腺癌细胞的细胞毒作用。此外, 研究人员发现, 以外泌体形式分泌的 PD-1 可以保护三阴性乳腺癌中 PD-L1 诱导的抗肿瘤免疫功能障碍, 增强效应 T 细胞对肿瘤细胞的细胞毒活性^[38]。因此, 有必要开展更多有关于外泌体的来源、合成和生物学功能研究, 来推动其临床转化应用。

外泌体具有捕捉癌症复杂动态变化的独特潜力, 外泌体及其内容物可作为诊断和监测乳腺癌患者治疗效果的候选生物标志物, 以及逆转耐药的潜在靶点或载体, 在未来肿瘤临床诊疗方面占据重要地位。

参考文献:

- [1] Kalluri R, Lebleu VS. The biology, function, and biomedical applications of exosomes[J]. Science, 2020, 367(6478): eaau6977.
- [2] Wan M, Ning B, Spiegel S, et al. Tumor-derived exosomes (TDEs): how to avoid the sting in the tail [J]. Med Res Rev, 2020, 40(1): 385-412.
- [3] Dallavalle S, Dobrić V, Lazzarato L, et al. Improvement of conventional anti-cancer drugs as new tools against multidrug resistant tumors [J]. Drug Resist Updat, 2020,

- 50:100682.
- [4] Wang X, Pei X, Guo G, et al. Exosome - mediated transfer of long noncoding RNA H19 induces doxorubicin resistance in breast cancer[J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(10): 6896–6904.
- [5] Shedden K, Xie XT, Chandaroy P, et al. Expulsion of small molecules in vesicles shed by cancer cells: association with gene expression and chemosensitivity profiles[J]. *Cancer Res*, 2003, 63(15):4331–4337.
- [6] Yang SJ, Wang DD, Li J, et al. Predictive role of GSTP1-containing exosomes in chemotherapy-resistant breast cancer[J]. *Gene*, 2017, 623:5–14.
- [7] Ning K, Wang T, Sun X, et al. UCH-L1-containing exosomes mediate chemotherapeutic resistance transfer in breast cancer[J]. *J Surg Oncol*, 2017, 115(8):932–940.
- [8] Wang B, Zhang Y, Ye M, et al. Cisplatin-resistant MDA-MB-231 cell-derived exosomes increase the resistance of recipient cells in an exosomal miR-423-5p-dependent manner[J]. *Curr Drug Metab*, 2019, 20(10):804–814.
- [9] Kreger BT, Johansen ER, Cerione RA, et al. The enrichment of survivin in exosomes from breast cancer cells treated with paclitaxel promotes cell survival and chemoresistance[J]. *Cancers (Basel)*, 2016, 8(12):111.
- [10] Guo Z, Guo A, Zhou C. Breast cancer stem cell-derived ANXA6-containing exosomes sustain paclitaxel resistance and cancer aggressiveness in breast cancer [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9:718721.
- [11] Schwarzenbach H, Gahan PB. MicroRNA shuttle from cell-to-cell by exosomes and its impact in cancer[J]. *Non-coding RNA*, 2019, 5(1):28.
- [12] Santos JC, Da Silva Lima N, Sarian LO, et al. Exosome-mediated breast cancer chemoresistance via miR-155 transfer[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1):1–11.
- [13] Bai X, Ni J, Beretov J, et al. Cancer stem cell in breast cancer therapeutic resistance[J]. *Cancer Treat Rev*, 2018, 69:152–163.
- [14] Yang Q, Zhao S, Shi Z, et al. Chemotherapy-elicited exosomal miR-378a-3p and miR-378d promote breast cancer stemness and chemoresistance via the activation of EZH2/STAT3 signaling[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2021, 40(1):120.
- [15] Wu T, Dai Y. Tumor microenvironment and therapeutic response[J]. *Cancer Lett*, 2017, 387:61–68.
- [16] Lin T, Zhang Q, Yuan A, et al. Synergy of tumor microenvironment remodeling and autophagy inhibition to sensitize radiation for bladder cancer treatment [J]. *Theranostics*, 2020, 10(17):7683–7696.
- [17] Bliss SA, Sinha G, Sandiford OA, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes stimulate cycling quiescence and early breast cancer dormancy in bone marrow[J]. *Cancer Res*, 2016, 76(19):5832–5844.
- [18] Boelens MC, Wu TJ, Nabat BY, et al. Exosome transfer from stromal to breast cancer cells regulates therapy resistance pathways[J]. *Cell*, 2014, 159(3):499–513.
- [19] Semina S, Scherbakov A, Kovalev S, et al. Horizontal transfer of tamoxifen resistance in MCF-7 cell derivatives: proteome study[J]. *Cancer Invest*, 2017, 35(8):506–518.
- [20] Semina SE, Scherbakov AM, Vnukova AA, et al. Exosome-mediated transfer of cancer cell resistance to antiestrogen drugs[J]. *Molecules*, 2018, 23(4):829.
- [21] Liu J, Zhu S, Tang W, et al. Exosomes from tamoxifen-resistant breast cancer cells transmit drug resistance partly by delivering miR-9-5p [J]. *Cancer Cell Int*, 2021, 21(1):1–15.
- [22] Zhao Y, Jin LJ, Zhang XY. Exosomal miRNA-205 promotes breast cancer chemoresistance and tumorigenesis through E2F1[J]. *Aging*, 2021, 13(14):18498–18514.
- [23] Cameron D, Piccart-Gebhart MJ, Gelber RD, et al. 11 years' follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive early breast cancer: final analysis of the herceptin Adjuvant (HERA) trial[J]. *Lancet*, 2017, 389(10075):1195–1205.
- [24] Martinez VG, O'Neill S, Salimu J, et al. Resistance to HER2-targeted anti-cancer drugs is associated with immune evasion in cancer cells and their derived extracellular vesicles[J]. *Oncoimmunology*, 2017, 6(12):e1362530.
- [25] Yu Q, Li Y, Peng S, et al. Exosomal-mediated transfer of OIP5-AS1 enhanced cell chemoresistance to trastuzumab in breast cancer via up-regulating HMGB3 by sponging miR-381-3p[J]. *Open Med*, 2021, 16(1):512–525.
- [26] Han M, Gu Y, Lu P, et al. Exosome-mediated lncRNA AFAP1-AS1 promotes trastuzumab resistance through binding with AUF1 and activating ERBB2 translation[J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1):1–18.
- [27] Zhang H, Yan C, Wang Y. Exosome-mediated transfer of circHIPK3 promotes trastuzumab chemoresistance in breast cancer[J]. *J Drug Target*, 2021, 29(9):1004–1015.
- [28] Schmid P, Adams S, Rugo HS, et al. Atezolizumab and nab-paclitaxel in advanced triple-negative breast cancer [J]. *N Engl J Med*, 2018, 379(22):2108–2121.
- [29] Dou D, Ren X, Han M, et al. Cancer-associated fibroblasts-derived exosomes suppress immune cell function in breast cancer via the miR-92/PD-L1 pathway[J]. *Front Immunol*, 2020, 11:2026.
- [30] Yao X, Tu Y, Xu Y, et al. Endoplasmic reticulum stress - induced exosomal miR-27a-3p promotes immune escape in breast cancer via regulating PD-L1 expression in macrophages[J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(17):9560–9573.
- [31] Wang H, Yao H, Li C, et al. HIP1R targets PD-L1 to lysosomal degradation to alter T cell-mediated cytotoxicity[J]. *Nat Chem Biol*, 2019, 15(1):42–50.
- [32] Nazri HM, Imran M, Fischer R, et al. Characterization of exosomes in peritoneal fluid of endometriosis patients[J]. *Fertil Steril*, 2020, 113(2):364–373, e2.
- [33] Hannafon BN, Trigos YD, Calloway CL, et al. Plasma exosome microRNAs are indicative of breast cancer[J]. *Breast Cancer Res*, 2016, 18(1):1–14.
- [34] Liu M, Mo F, Song X, et al. Exosomal hsa-miR-21-5p is a biomarker for breast cancer diagnosis[J]. *PeerJ*, 2021, 9:e12147.
- [35] Xiong F, Ling X, Chen X, et al. Pursuing specific chemotherapy of orthotopic breast cancer with lung metastasis from docking nanoparticles driven by bioinspired exosomes[J]. *Nano Lett*, 2019, 19(5):3256–3266.
- [36] Yang P, Cao X, Cai H, et al. The exosomes derived from CAR-T cell efficiently target mesothelin and reduce triple-negative breast cancer growth[J]. *Cell Immunol*, 2021, 360:104262.
- [37] Milano G, Biemmi V, Lazzarini E, et al. Intravenous administration of cardiac progenitor cell-derived exosomes protects against doxorubicin/trastuzumab-induced cardiac toxicity[J]. *Cardiovasc Res*, 2020, 116(2):383–392.
- [38] Qiu Y, Yang Y, Yang R, et al. Activated T cell-derived exosomal PD-1 attenuates PD-L1-induced immune dysfunction in triple-negative breast cancer [J]. *Oncogene*, 2021, 40(31):4992–5001.