

# 肝肿瘤细胞分泌的微泡在肝癌中作用机制的研究进展

蔡修成<sup>1</sup>, 刘永刚<sup>1</sup>, 闫瑞娟<sup>1</sup>, 魏海梁<sup>1</sup>, 李京涛<sup>1\*</sup>, 闫曙光<sup>2</sup>, 常占杰<sup>1</sup>

1. 陕西中医药大学附属医院 肝病医院一病区, 陕西 咸阳 712000

2. 陕西中医药大学 第一临床医学院, 陕西 咸阳 712000

**【摘要】** 肝细胞癌是世界范围内最常见且恶性程度最高的肿瘤之一, 其发病机制尚未明确, 致病原因颇多。通常认为肿瘤的形成是种子和土壤的相互作用, 肝细胞癌中作为种子的肝肿瘤细胞受到土壤(肿瘤微环境)的不断刺激, 最终形成肝细胞癌。在这个形成的过程中, 肝肿瘤细胞内的介质如微泡(microvesicle, MV)参与细胞间信息与物质的传递, 促进上皮向间充质转化(epithelial mesenchymal transition, EMT), 推动肿瘤的侵袭与转移。本文综述了微泡与肿瘤微环境的密切关系, 为肝细胞癌的治疗提供新的思路。

**【关键词】** 肿瘤微环境; 微泡; 肝癌; 上皮间质转化

## Research progress on the mechanism of microvesicle secreted by liver tumor cells in liver cancer

Cai Xiucheng<sup>1</sup>, Liu Yonggang<sup>1</sup>, Yan Ruijuan<sup>1</sup>, Wei Hailiang<sup>1</sup>, Li Jingtao<sup>1\*</sup>, Yan Shuguang<sup>2</sup>, Chang Zhanjie<sup>1</sup>

1. Liver Disease Hospital Ward I, Affiliated Hospital of Shaanxi University of traditional Chinese medicine, Xianyang 712000, Shaanxi, China

2. The First Clinical Medical College of Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Xianyang 712000, Shaanxi, China

\*Corresponding author: Li Jingtao, E-mail: lijingtao555@163.com

**【Abstract】** Hepatocellular carcinoma is one of the most common and malignant tumors worldwide, and its pathogenesis is not yet clear, with many causes. It is generally believed that the formation of tumor is the interaction between seeds and soil. In hepatocellular carcinoma, the seeded liver tumor cells are constantly stimulated under the soil of tumor microenvironment, and eventually form hepatocellular carcinoma. During this formation process, mediators such as microvesicles within liver tumor cells participate in the transmission of information and substances between cells, promote epithelial mesenchymal transition (EMT), and promote tumor invasion and metastasis. This article reviews the close relationship between microvesicles and tumor microenvironment, which provides new ideas for the treatment of hepatocellular carcinoma.

**【Key words】** Tumor microenvironment; Microvesicle; Liver cancer; Epithelial mesenchymal transition

肝细胞癌死亡率很高, 占原发性肝癌引起死亡的70%~85%<sup>[1]</sup>。细胞外囊泡(extracellular vesicles, EV)有3种亚型, 分别是微泡、外泌体、凋亡小体, 其中微泡参与细胞间多种信息传递和物质交换, 包括蛋白质、RNA、DNA、脂质和代谢物等。肝肿瘤细胞分泌的微泡含有促进肿瘤发生、发展和转移的生物分子。因此, 了解微泡在肿瘤微环境中所发挥的作用, 能更好地为抗肝细胞癌提供新视角。

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(82174330); 陕西中医药大学学科创新团队建设项目(2019-YL05)

\*通信作者: 李京涛, E-mail: lijingtao555@163.com

## 1 微泡的概述

1.1 微泡的来源及包含成分 微泡是一种小的(100 nm~1 mm)、膜结合的囊泡, 从细胞的质膜萌发, 随后脱落到细胞外<sup>[2]</sup>。微泡由脂质双层组成, 是一种胞膜结合载体的复合物, 能运输多种物质, 包括蛋白质、脂类、代谢物和核酸。微泡来源于许多生物体液中, 包括尿液、血液、腹水和脑脊液, 以及部分体液如血清和血浆, 还有细胞培养液。微泡主要含有胞质和质膜相关蛋白<sup>[3]</sup>, 细胞骨架蛋白、热休克蛋白、整合素以及糖化和磷酸化蛋白也普遍存在于微泡中。

1.2 微泡的生物学功能 微泡的传导可以使受体细胞转

化,从而促进疾病的进展,微泡信号可以促进细胞外基质和血管重塑,吸引促肿瘤的基质细胞,并诱导邻近细胞转化,促进成纤维细胞代谢及上皮细胞收缩;同时,会加快血管重构和激活免疫细胞炎症通路信号。此外,微泡在细胞间的交流和疾病进展中发挥着重要作用,可以通过细胞间的信号转导调节肝癌的增殖、侵袭和转移。一方面,微泡与肿瘤细胞通过调节 EMT 促进了肝癌的发生并维持肿瘤的微环境;另一方面,微泡也通过此途径为肿瘤细胞靶向治疗提供了可能。

## 2 微泡在肝癌发生发展中的作用

**2.1 微泡与肿瘤微环境的关系** 目前对肝细胞癌发生发展的机制尚无明确的认识,但通常认为与肝肿瘤细胞和肿瘤微环境相关<sup>[4]</sup>。其中,微泡在肝肿瘤细胞的产生、运输和肿瘤微环境的形成方面都发挥着重要的作用。肿瘤不仅包括不同种类的肿瘤细胞,还包括与肿瘤相关的成纤维细胞、免疫细胞(如单核/巨噬细胞、树突状细胞、中性粒细胞、自然杀伤细胞、T细胞和B细胞)、血管系统、分泌因子以及广泛的细胞外基质(extracellular matrix, ECM),统称为肿瘤微环境。肿瘤微环境是一个复杂的环境,主要特征是低氧、低 pH 和营养缺乏,在这种环境中,肿瘤细胞经常与肿瘤浸润性免疫细胞进行通讯,以支持肿瘤的发展<sup>[5]</sup>。肿瘤在恶劣和复杂的肿瘤微环境中发展,细胞间的通讯通过各种信号发生,这些信号的交流在肿瘤的进展和转移中起关键作用。肿瘤微环境中细胞间通讯的媒介包括细胞因子、趋化因子、生长因子、信号分子、间质细胞以及细胞外微泡<sup>[6]</sup>。

在这些细胞间的通讯中,肿瘤来源的微泡(tumor microvesicle, TMV)在肿瘤细胞和周围间质细胞之间传递包括核酸和蛋白质在内的各种分子,以促进肿瘤的生长、免疫逃避、化疗耐药性的产生,形成肿瘤进展的微环境<sup>[7-8]</sup>。其中,微泡调控着索拉非尼的耐药性。索拉非尼是一种小分子体外抗肿瘤生长的药物,通过靶向丝裂原激活蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)途径来减少癌细胞增殖,以及通过降低抗凋亡蛋白 Mcl-1 表达来诱导凋亡。然而,有研究报道,索拉非尼的治疗效果会因细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK)的再激活和 MAPK 信号通路的抑制而受到阻碍,肝癌细胞分泌的微泡通过抑制索拉非尼的凋亡和抗增殖作用,在体外诱导其亲代癌细胞产生对索拉非尼的耐药<sup>[9]</sup>。在分子水平上, HepG2 和 Huh7 衍生的微泡通过诱导细胞周期进展的关键调控因子叉头框蛋白 M1 (forkhead box M1, FOXM1) 的表达,从而激活 HGF/RAS 通路,继而影响索拉非尼的抗增殖作用。而 miR-25 可从肝癌细胞来源的微泡转移到索拉非尼治疗的受体癌细胞,逆转 p53 的表达,恢复 FOXM1 的表达,进而引起癌细胞的增殖。此外,索拉非尼治疗效果的抑制程度取决于该肿瘤的侵袭程度。侵袭性更强的 TMV 支持更强的肿瘤生长<sup>[9]</sup>。

微泡可通过激活成纤维细胞来加强肿瘤的运动性和抗凋亡,肿瘤成纤维细胞(cancer-associated fibroblast, CAF)是肿瘤微环境的主要成分,通过分泌肿瘤生长因子,从而促进肿瘤的发育和转移<sup>[10-11]</sup>。TMV 还会刺激成纤维细胞分泌微泡,从而形成恶性的循环,促进肿瘤的迁移和侵袭。此外, TMV 还可通过携带的分子调节肿瘤微环境的免疫反应,而肿瘤微环境应激在肿瘤免疫逃逸和肿瘤进展中起关键作用。例如,微环境酸中毒可以导致免疫逃逸机制的启动,通过这种机制,包括 T 细胞、自然杀伤细胞和树突状细胞在内的免疫细胞的抗肿瘤活性都受到肿瘤细胞的抑制,并促进免疫抑制细胞亚群的积累和激活(如骨髓来源的抑制细胞和调节性 T 细胞),从而有利于肿瘤的进展<sup>[12-13]</sup>。对来自正常和多发性骨髓瘤患者的骨髓瘤干细胞分泌的微泡进行比较,发现受到来自骨髓瘤干细胞的微泡刺激后,肿瘤细胞中的 MAPK 信号持续激活,肿瘤细胞的增殖和迁移能力也随之增强<sup>[14]</sup>。

**2.2 肿瘤细胞调控微泡生成的机制** 几乎所有的细胞都会分泌外囊泡,但与较小的囊泡相比,微泡能够携带更多的生物活性物质。当它们直接从质膜释放时,细胞表面受体和信号蛋白会停留在微泡的表面,它们主要通过细胞表面信号影响周围受体细胞的信号活动和行为。因此,与只能携带非常有限的生物活性成分的小型外囊泡相比,微泡在肿瘤微环境中发挥着更直接和关键的作用。微泡的产生和释放是一个复杂的动态过程,受多种细胞信号的调控。到目前为止,其潜在机制仍未被完全理解。目前已知的是,微泡的生物作用不需要通过内质网和高尔基体的运输来分泌蛋白质。有研究报道,Rho 家族小 G 蛋白 Cdc42 激活的 GTP 结合 Cdc42 与其下游效应子 Ras GTP 酶激活样蛋白 1 (recombinant IQ motif containing GTPase activating protein 1, IQGAP1) 的结合,是微泡脱落所必需的<sup>[15]</sup>。激活的 Cdc42 突变体,如快速循环的 Cdc42F28L 突变体,通过阻断表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)内化,帮助微泡释放,维持 EGF 信号。活化的 Cdc42 还通过抑制细胞表面蛋白的内化,间接促进微泡的生物生成。阻断这些信号通路可以有效减少微泡的释放,并显著抑制微泡促进的体内肿瘤血管生成。这些依赖 Cdc42 的调控机制是微泡脱落所特有的。这些发现为肿瘤细胞释放微泡的调节机制提供了新的见解,对新的治疗策略的设计具有潜在的影响。

**2.3 微泡对 EMT 的调控** 现今了解肿瘤转移的全貌仍有挑战,因此,探究肿瘤转移的机制在癌症治疗中至关重要。微泡可以很容易地从患者的血清中分离出来,并有可能作为诊断肿瘤转移的一种标志物<sup>[16]</sup>。在肿瘤的继发性扩张过程中,EMT 发挥着重要作用。

在转移初始阶段,癌细胞入侵肿瘤周围组织,然后进入血管内,参加血液循环。在这个阶段,细胞间和细胞与细胞基质的黏附丧失,促进了脱落的癌细胞转移到周围的基质中,然后进入到循环系统,形成循环肿瘤细胞(circulating

tumor cell, CTC)。随后它们逃离血液循环,最终到达转移的其他器官。EMT过程经常发生在转移中,静止的肿瘤干细胞可以在上皮钙黏素(E-cadherin)缺失的情况下扩散到移动的肿瘤干细胞中<sup>[17-18]</sup>。其分泌的微泡通过调节EMT促进肝癌转移,肝癌细胞产生的TMV能使受体细胞分泌基质金属蛋白酶,促进细胞外基质的降解<sup>[19]</sup>。此外,已知携带细胞外基质金属蛋白酶诱导物(EMMPRN或CD147)的循环T细胞分泌的微泡可以激活肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)中的纤维溶解能力,从而刺激细胞外基质的降解。与此同时,肝癌细胞分泌的TMV被证实可诱导上皮钙黏素表达减少和波形蛋白表达,这也是EMT的相关部分,并可促进肿瘤转移<sup>[20]</sup>。功能性miRNAs(如miR-103, miR-25-5P)通过TMV转移,增加血管通透性和肝癌肿瘤细胞的活动性,使细胞进入血液循环<sup>[21-22]</sup>。有报道,TMV和基质细胞发生作用,形成有利于转移的肿瘤微环境,并进行循环肿瘤的扩散<sup>[23]</sup>。另有研究表明,在血管周围的Ly6C-巨噬细胞中,观察到由TMV运送的载体,这有利于血管周围渗出的肿瘤细胞的生存,并进一步诱导了肝转移<sup>[24]</sup>。

**2.4 微泡在肝癌侵袭和转移中的作用** 肝癌细胞分泌的微泡与邻近的细胞相互作用,加速肿瘤的形成。在肿瘤微环境中,CAFs在接受肿瘤衍生的微泡后会被激活,同时进一步诱导和分泌基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)和微泡,这可能会促进肿瘤细胞的迁移。TMVs还可以转移miRNAs,以增强血管的通透性,使肿瘤细胞进入血液循环。

### 3 微泡在肝肿瘤中的诊断作用及潜在的治疗前景

微泡可作为肝癌诊断和预后的指标。从肝癌患者获得的微泡中,M2型丙酮酸激酶(M2 pyruvate kinase, PKM2)水平显著高于从健康供者获得的水平,并与肝癌的发生呈正相关。研究人员报道,在肝癌患者尤其是早期复发患者的血清中发现了表达丰富的微泡中Hepar1<sup>+</sup><sup>[25]</sup>。

这可能进一步用于预测肝癌的预后。一项研究评估了肿瘤相关微粒对肝癌检测的诊断价值,显示Annexin V<sup>+</sup>、上皮细胞黏附分子<sup>+</sup>(epithelial cell adhesion molecule, EpCAM<sup>+</sup>)、CD147<sup>+</sup>、taMPS均在肝癌中升高<sup>[25]</sup>。此外,EV尤其是微泡参与了肿瘤微环境的调节,并已被用于肿瘤治疗的药物输送。微泡可以运载基因编辑工具CRIPR/Cas9<sup>[26]</sup>,从Cas9稳定转导的肝癌细胞系HepG2和上皮细胞系HEK293中提取的Cas9来源的微泡被sgRNA质粒包裹,这些微泡进一步发挥协同作用,来自上皮细胞系的微泡联合索拉非尼的体外抗肿瘤效果优于来自肝癌细胞系的微泡联合索拉非尼<sup>[27]</sup>。微泡在体外和体内都能有效地传递Cas9和sgRNA。当与常规化疗药物索拉非尼联合使用时,可诱导肝癌HepG2细胞的细胞毒性作用,从而作为肝癌治疗的一种有效方法。

### 4 总结与展望

微泡是肿瘤微环境中细胞间通讯的一个组成部分,通过传递生物活性分子,加强了细胞间的交流通讯<sup>[26,28]</sup>。微泡作为肝癌治疗中诊断和预后的有前途的生物标志物,有望将来在临床上将抗击肝癌的阵线前移,除此之外,由于微泡本身在促进肿瘤中的作用,微泡还可以是潜在的治疗靶点<sup>[29]</sup>。微泡可以作为运输抗肿瘤药物的载体,进行更为精确地靶向传递药物的抗肿瘤作用。

近年来,在了解EV的生物学、功能和生物医学应用方面取得了重大进展,大多数研究重心都放在了外泌体上,尽管在EV中已经开发出了外泌体的标志物、肿瘤疫苗和药物载体的途径,但对微泡相关研究较少,需要进一步研究来完全解决外囊泡亚型的准确分类,开发新型抗癌疗法。另外,微泡的产生和释放是一个复杂的动态过程,受多种细胞信号的调控。同时,微泡携带多种miRNA,一种miRNA可以调控多个靶基因,不同种miRNA也可以调控同一个靶基因。因此,这种复杂的网络调控需要进一步探索。

### 参考文献

- [1] NIO K, YAMASHITA T, KANEKO S. The evolving concept of liver cancer stem cells[J]. *Mol Cancer*, 2017, 16(1):4.
- [2] WENDLER F, FAVICCHIO R, SIMON T, et al. Extracellular vesicles swarm the cancer microenvironment: from tumor-stroma communication to drug intervention [J]. *Oncogene*, 2017, 36(7):877-884.
- [3] DOYLE LM, WANG M. Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis[J]. *Cells*, 2019, 8(7):727.
- [4] 朱金霞, 刘光伟, 杨培伟. 外泌体对肝细胞癌转移前生态位形成的影响[J/CD]. *消化肿瘤杂志(电子版)*, 2022, 14(4):378-383, 389.
- [5] SCHWARTZ L, SEYFRIED T, ALFAROUK K, et al. Out of Warburg effect: an effective cancer treatment targeting the tumor specific metabolism and dysregulated pH [J]. *Semin Cancer Biol*, 2017, 43: 134-138.
- [6] ANDERSON NM, SIMON MC. The tumor microenvironment[J]. *Curr Biol*, 2020, 30: R921-R925.
- [7] BIAN X, XIAO Y, WU T, et al. Microvesicles and chemokines in tumor microenvironment: mediators of intercellular communications in tumor progression[J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1):50.
- [8] RACKOV G, GARCIA RN, ESTEBAN RS, et al., Vesicle-mediated control of cell function: the role of extracellular matrix and microenvironment[J]. *Front Physiol*, 2018, 9:651.
- [9] JAFFAR AD, HE C, XU H, et al. Microvesicles mediate sorafenib resistance in liver cancer cells through attenuating p53

- and enhancing FOXM1 expression [J]. *Life Sci*, 2021, 271 (15):119149.
- [10] DAS M, LAW S. Role of tumor microenvironment in cancer stem cell chemoresistance and recurrence [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2018, 103: 115–124.
- [11] LIU C, LIU L, CHEN X, et al. LSD1 stimulates cancer – associated fibroblasts to drive Notch3 –Dependent self –renewal of liver cancer stem –like cells [J]. *Cancer Res*, 2018, 78 (4) : 938–949.
- [12] HUBER V, CAMISASCHI C, BERZI A, et al. Cancer acidity: an ultimate frontier of tumor immune escape and a novel target of immunomodulation [J]. *Semin Cancer Biol*, 2017, 43: 74–89.
- [13] PILLAI SR, DAMAGHI M, MARUNAKA Y, et al. Causes, consequences, and therapy of tumors acidosis [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2019, 38:205–222.
- [14] DABBAH M, ATTAR –SCHNEIDER O, TARTAKOVER MS, et al. Microvesicles derived from normal and multiple myeloma bone marrow mesenchymal stem cells differentially modulate myeloma cells’ phenotype and translation initiation [J]. *Carcinogenesis*, 2017, 38 (7):708–716.
- [15] WANG J, ZHUANG X, GREENE KS, et al. Cdc42 functions as a regulatory node for tumour –derived microvesicle biogenesis [J]. *Extracell Vesicles*, 2021, 10(3): e12051.
- [16] STEINBICHLER TB, SAVIC D, DUDAS J, et al. Cancer stem cells and their unique role in metastatic spread [J]. *Semin Cancer Biol*, 2020, 60:148–156.
- [17] WANG H, LU Z, ZHAO X. Tumorigenesis, diagnosis, and therapeutic potential of exosomes in liver cancer [J]. *Hematol Oncol*, 2019, 12 (1):133.
- [18] QU Z, FENG J, PAN H, et al. Exosomes derived from HCC cells with different invasion characteristics mediated EMT through TGF –beta/Smad signaling pathway [J]. *Oncol Targets Ther*, 2019, 12:6897–6905.
- [19] DEVHARE PB, RAY RB. Extracellular vesicles: novel mediator for cell to cell communications in liver pathogenesis [J]. *Mol Asp*, 2018, *Med* 60:115–122.
- [20] CHEN L, GUO P, HE Y, et al. HCC –derived exosomes elicit HCC progression and recurrence by epithelial –mesenchymal transition through MAPK/ERK signalling pathway [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9 (5):513.
- [21] FANG J, ZHANG Z, SHANG L, 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.
- [22] LIU H, CHEN W, ZHI X, et al. Tumor –derived exosomes promote tumor self – seeding in hepatocellular carcinoma by transferring miRNA –25 –5p to enhance cell motility [J]. *Oncogene*, 2018, 37(36):4964–4978.
- [23] JUNG T, CASTELLANA D, KLINGBEIL P, et al. CD44v6 dependence of premetastatic niche preparation by exosomes [J]. *Neoplasia*, 2009, 11(10):1093–1105.
- [24] PFEILER S, THAKUR M, GRUNAUER P, et al. CD36 – triggered cell invasion and persistent tissue colonization by tumor microvesicles during metastasis [J]. *FASEB J*, 2019, 33 (2):1860–1872.
- [25] ABBATE V, MARCANTONI M, GIULIANTE F, et al. HepPar1 –Positive Circulating Microparticles Are Increased in Subjects with Hepatocellular Carcinoma and Predict Early Recurrence after Liver Resection [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18 (5):1043.
- [26] HE C, JAFFAR AD, XU H, et al. Epithelial cell –derived microvesicles: A safe delivery platform of CRISPR/Cas9 conferring synergistic anti –tumor effect with sorafenib [J]. *Exp Cell Res*, 2020, 392(2):112040.
- [27] ROSSATTI P, ZIEGLER L, SCHREGLE R, et al. Cdc42 couples T cell receptor endocytosis to GRAF1 –mediated tubular invaginations of the plasma membrane [J]. *Cells*, 2019, 8(11): 1388.
- [28] ISHIGURO K, YAN I, LEWIS –TUFFIN L, et al. Targeting liver cancer stem cells using engineered biological nanoparticles for the treatment of hepatocellular cancer [J]. *Hepatol Commun*, 2020, 4(2):298–313.
- [29] MOR’AN L, CUBERO FJ. Extracellular vesicles in liver disease and beyond [J]. *World J Gastroenterol*, 2018, 24 (40):4519 – 4526.