

# 外泌体参与卵巢癌患者对化疗耐药的研究进展

沈夏梦, 吕卫国

浙江大学医学院附属妇产科医院, 浙江 杭州 310006

**[摘要]** 患者对化疗药物耐药是晚期卵巢癌患者治疗失败的主要原因之一。外泌体可能通过作为细胞排出化疗药物的途径、通过其携带耐药相关核酸、蛋白质等内容物及通过中和抗体类药物等方式促进卵巢癌患者对化疗药物耐药的发生和发展。本文阐述了外泌体与卵巢癌患者对化疗药物耐药的相关性、外泌体参与耐药的作用机制及其临床价值, 以为卵巢癌患者对化疗药物耐药机制研究、临床诊断和干预提供新的思路。



**[关键词]** 卵巢肿瘤/药物治疗; 药物耐受性; 外泌体; 综述

**[中图分类号]** R737.31 **[文献标志码]** A

## Research advances on the role of exosomes in chemotherapy resistance of ovarian cancer

SHEN Xiameng, LYU Weiguo (*Department of Gynecology, Women's Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310006, China*)

Corresponding author: LYU Weiguo, E-mail: lbwg@zju.edu.cn, <https://orcid.org/0000-0002-8570-7317>

**[Abstract]** Chemotherapy resistance is one of the biggest challenges in treatment of ovarian cancer. Mounting evidence shows that the exosomes shedding from tumor cells are considered to be involved in chemotherapy resistance of ovarian cancer by enhanced exosomal export of drugs, transferring RNAs or proteins and interfering with the bioactivity of therapeutic anti-tumor antibodies. In this review, we display the correlation between exosomes and chemotherapy resistance of ovarian cancer, the mechanism of exosomes involved in chemotherapy resistance of ovarian cancer, and discuss the potential clinical values of exosomes in chemotherapy resistance of ovarian cancer.

**[Key words]** Ovarian neoplasms/drug therapy; Drug tolerance; Exosomes; Review

收稿日期: 2018-09-30 接受日期: 2018-11-20

基金项目: 浙江省医药卫生科技计划(2017211914)

第一作者: 沈夏梦(1992—), 女, 硕士研究生, 主要从事妇科肿瘤临床和基础研究; E-mail: 21618360@zju.edu.cn; <https://orcid.org/0000-0002-5586-3925>

通信作者: 吕卫国(1965—), 男, 博士, 教授, 主任医师, 博士生导师, 主要从事妇科肿瘤临床和基础研究; E-mail: lbwg@zju.edu.cn; <https://orcid.org/0000-0002-8570-7317>

[J Zhejiang Univ (Med Sci), 2019,48(1):116-120.]

卵巢癌是病死率较高的妇科恶性肿瘤,美国国家健康统计中心2018年发布的数据显示,卵巢上皮癌患者五年总存活率仅为47%<sup>[1]</sup>。紫杉醇联合铂类化疗方案是晚期卵巢癌患者初次肿瘤细胞减灭术后的首选化疗方案<sup>[2]</sup>,尽管近期完全缓解率已经达到80%以上,但大部分患者会因复发而经历多次化疗,每次化疗后的无瘤生存期逐渐缩短,从对铂类敏感变成对铂类耐药,因此化疗药物耐药已成为晚期卵巢癌患者治疗失败而死亡的主要原因之一<sup>[3]</sup>。多年来,卵巢癌患者对化疗药物耐药相关机制的研究一直受到关注,但迄今尚不明确。外泌体最初在网织红细胞成熟过程研究中发现,是网织红细胞分泌的小囊泡<sup>[4]</sup>,起源于细胞内多囊泡体,经多囊泡体外膜与细胞膜融合后释放到细胞外基质中<sup>[5]</sup>。外泌体具有脂质双分子层膜结构,大小为30~150 nm,由多种不同类型的细胞释放,并可在血液、尿液、乳液、腹水、精液、卵泡液等多种体液中被提取。外泌体具有广泛的生物学活性,囊泡内携带有DNA、RNA及蛋白质等物质,具有细胞通信功能。近年研究发现,外泌体在肿瘤发生、发展中发挥重要作用,包括促进肿瘤增殖、侵袭转移、新生血管形成、免疫逃逸与抑制,以及肿瘤耐药等。本文综述了外泌体参与卵巢癌患者对化疗药物耐药的相关机制及其临床价值,以期为解决卵巢癌患者对化疗药物耐药这一难题提供新的思路。

## 1 外泌体参与卵巢癌患者对化疗药物耐药的发生

卵巢癌患者对化疗药物耐药相关研究发现,外泌体可以传递耐药表型。Zhang等<sup>[6]</sup>发现,与耐紫杉醇卵巢癌细胞株A2780/PTX来源的外泌体共培养后,A2780细胞对紫杉醇的耐药性提高5倍。Crow等<sup>[7]</sup>以卵巢癌细胞株A2780及耐卡铂细胞株C30、CP70为实验对象,分别提取上述三种细胞分泌的外泌体与A2780细胞共培养24 h,然后使用20  $\mu\text{mol/L}$ 卡铂作用48 h,发现与加入A2780自身来源的外泌体(或PBS)相比,加入C30、CP70细胞来源外泌体可使A2780存活率分别增加至2倍和1.5倍。除了同源细胞之间存在耐药表型传递外,耐卡铂卵巢癌细胞株亦能够将耐药表型传递给非同源卵巢癌细胞株。如80  $\mu\text{mol/L}$ 卡铂作用48 h后,OVCAR10细胞来源的外泌体与A2780共培养

可使其存活率增加至自身阴性对照组(或PBS)的1.7倍;50  $\mu\text{mol/L}$ 卡铂作用48 h后,C30与OVCAR10细胞来源的外泌体分别作用于A1847细胞均可使其存活率提高至1.7倍,分别作用于OVCAR5细胞均可使其存活率提高至2倍<sup>[7]</sup>。

除了耐药卵巢癌细胞能够通过外泌体影响敏感细胞的耐药性外,受药物影响后的卵巢癌细胞也能通过外泌体传递信号影响周围细胞对化疗药物的反应。Samuel等<sup>[8]</sup>使用顺铂分别作用于A2780和IGROV-1卵巢癌细胞株2 h后,提取细胞24 h内分泌的外泌体作用于未受药物刺激的卵巢癌细胞,可增强后者的侵袭和迁移能力及对铂类药物的适应能力。

外泌体的参与可促进卵巢癌耐药的发生发展过程,在卵巢癌耐药过程中,外泌体的内容物及分泌量亦发生改变。Safaei等<sup>[9]</sup>研究发现,耐药卵巢癌细胞株来源的外泌体内化疗药物含量较敏感细胞株明显增多;Zhang等<sup>[6]</sup>电镜下观察到,耐药卵巢癌细胞表面产生囊泡明显增多;Dorayappan等<sup>[10]</sup>发现耐药卵巢癌患者血清中外泌体含量明显增加,但大小无明显改变。然而,Lopes-Rodrigues等<sup>[11-12]</sup>观察两组肿瘤细胞(大细胞肺癌细胞H460及其耐药株RH460,慢性髓系白血病细胞K562及其耐药株K562Dox)发现,耐药肿瘤细胞分泌的囊泡增多,但其中外泌体比例减少。这一现象可能提示耐药肿瘤细胞能够选择性包裹相关囊泡内容物以促进自身耐药性及耐药性的传递,但该推论有待进一步验证。

综上所述,外泌体与卵巢癌患者对化疗药物耐药的发生密切相关,这为进一步深入研究卵巢癌患者对化疗药物耐药发生的机制提供了新的视角。

## 2 外泌体参与卵巢癌患者对化疗药物耐药发生的机制

卵巢癌患者对化疗药物耐药是由多种机制和途径参与的复杂过程。目前关于外泌体参与卵巢癌患者对化疗药物耐药的机制主要有以下几个方面:

### 2.1 细胞通过外泌体排出化疗药物

Safaei等<sup>[9]</sup>研究发现,2008/C13\*5.25耐顺铂卵巢癌细胞株来源外泌体内的顺铂含量是敏感细胞内的2.6倍,且外泌体内与顺铂转运相关蛋白,如

多药耐药相关蛋白(MRP2)、铜离子转出蛋白A(ATP7A)及铜离子转出蛋白B(ATP7B)表达也同样增加。因此,耐顺铂卵巢癌细胞可能通过外泌体途径外排化疗药物,导致肿瘤细胞对顺铂耐药。

## 2.2 外泌体通过携带耐药相关核酸、蛋白质等在细胞间传递耐药性

Zhang等<sup>[6]</sup>研究发现,耐紫杉醇卵巢癌细胞A2780来源的外泌体可以通过传递P-糖蛋白提高敏感细胞对紫杉醇和阿霉素的耐药性。P-糖蛋白是由耐药基因MDR1编码的一种ATP酶活性的跨膜泵,能够将大分子亲脂药物泵出,维持细胞内药物低浓度水平而导致其对药物的敏感性下降。该研究发现,P-糖蛋白不仅在耐药卵巢癌细胞内高表达,在其分泌的外泌体内亦高表达,且与敏感细胞共培养后发现,敏感细胞中P-糖蛋白表达增多,进入细胞核内的药物明显减少,从而导致细胞耐药性增加。

此外,卵巢癌微环境中基质细胞分泌的外泌体通过其内含的微小RNA(miRNA, miR)-21可导致卵巢癌细胞抵抗化疗药物。Au等<sup>[13]</sup>研究发现,miR-21可以通过基质细胞外泌体传递至卵巢癌细胞,与其中基因凋亡蛋白酶活化因子1(APAF1)编码的序列直接相连,下调APAF1的表达,从而抑制卵巢癌细胞凋亡并导致其耐药。

## 2.3 外泌体通过中和抗体类药物促进耐药形成

贝伐单抗是重组人单克隆抗体,通过与血管内皮生长因子特异性结合,阻断血管内皮生长因子,抑制肿瘤增生,因此被应用于卵巢癌治疗中。研究显示,乳腺癌中高表达人表皮生长因子受体-2(HER2)的外泌体可以逆转曲妥单抗对乳腺癌细胞的生长抑制作用<sup>[14]</sup>,这是否提示卵巢癌细胞外泌体内也存在血管生成因子受体而中和抗体类药物,目前尚无相关报道,需进一步研究和探讨。

## 3 外泌体在卵巢癌患者对化疗药物耐药中的临床应用

### 3.1 预测卵巢癌患者耐药

目前国际上卵巢癌现行的分型是基于组织类型的病理分型,但同一组织类型的卵巢癌样本存在分子表型差异,对化疗药物的敏感性也存在明显差异,因此无法进行个体化精准治疗。因此,找到与卵巢癌化疗疗效相关的分子分型特征,明确与化疗耐药相关的分子标志物十分必要。

肿瘤细胞在其发生和发展的过程中会不断释放肿瘤特异性外泌体至细胞外,而外泌体中的肿瘤源性DNA、RNA、蛋白质等因受到膜结构保护而具有更强的稳定性。随着提取和分析方法的不断进步,目前已有许多研究以外泌体中的蛋白质和核酸为分子标志物,从而实现个体化精准医疗。如循环外泌体中的瞬时受体电位通道蛋白5、谷胱甘肽S-转移酶P1、泛素羧基末端水解酶L1等有望作为非侵入性分子标志物来预测乳腺癌患者对化疗的反应<sup>[15-17]</sup>;血浆外泌体中的雄激素受体剪切变异体7(AR-V7)可以预测前列腺癌患者对激素治疗的反应性<sup>[18]</sup>;血清外泌体中P-糖蛋白的表达水平能够预测前列腺癌患者对多西他赛的反应性<sup>[19]</sup>。

目前,外泌体中的蛋白质和核酸作为卵巢癌患者对化疗反应的标志物研究仍较少。Yin等<sup>[20]</sup>研究发现,膜联蛋白A3作为钙离子依赖性磷脂结合蛋白家族成员,可以减少细胞对铂类的摄取及铂类在细胞中的积聚,其表达量在顺铂耐药卵巢癌患者血清中明显增加,且在电镜下观察到膜联蛋白A3位于外泌体中,提示膜联蛋白A3可以作为卵巢癌患者对铂类耐药的标志蛋白。

除了外泌体内蛋白外,外泌体内miRNA也可作为肿瘤分子标志物,但目前尚未发现可用于预测卵巢癌患者对化疗药物耐药的外泌体miRNA。Meng等<sup>[21]</sup>发现卵巢癌患者血清外泌体中miR-373、miR-200a、miR-200b、miR-200c的表达水平高于健康者,其中miR-373、miR-200b和miR-200c三者联合检测可以作为预测预后的独立因素,但其是否能够用于判断卵巢癌患者对化疗的反应仍需进一步研究和探讨。

## 3.2 通过外泌体改善卵巢癌患者对化疗药物耐药

### 3.2.1 消除循环肿瘤外泌体

可能通过以下两种途径得以实现。第一、抑制外泌体的生成与释放以及细胞对外泌体的摄取,如抑制Rab家族、神经酰胺、氢离子/钠离子和钠离子/钙离子泵等。研究发现,dynasore、阿米洛利、肝素阻断囊泡产生或抑制摄取可以增强肿瘤细胞对紫杉醇的敏感性,但仍需进一步进行体内验证<sup>[8,10]</sup>。第二、体外血液过滤。Marleau等<sup>[22]</sup>报道了一种血液净化装置Hemopurifier,可以捕获外泌体相关抗原,去除肿瘤相关外泌体,从而对晚期肿瘤的治疗有一定作用。尽管体外血液过滤可以减少药物不良反应,但其

对非肿瘤源性外泌体的清除及卵巢癌患者生存期的延长等方面仍存在争议。

**3.2.2 以外泌体为载体运输药物** 与传统的细胞治疗及化疗药物相比,以外泌体为载体运输药物的优点主要有:①毒性小,生物相容性好,不容易引起免疫排斥反应;②可被细胞主动摄取;③稳定性较好,可提高药物的生物利用率。siRNA、miRNA及化疗药物等多种成分可以通过电穿孔、转染、共孵育等方法装载入外泌体,提示以外泌体为载体运输一种或多种药物可能是潜在的卵巢癌治疗方法。如Agrawal等<sup>[23]</sup>研究发现牛奶来源的外泌体包裹紫杉醇作为口服制剂可以提高药效,减少不良反应,从而改善紫杉醇的水溶性和稳定性。Aqil等<sup>[24]</sup>发现,浆果花色苷能提高铂类对卵巢癌细胞的杀伤作用,将浆果花色苷包裹入外泌体能提高其稳定性和生物相容性。此外,Alvarez-Erviti等<sup>[25]</sup>通过给小鼠注射包裹有基因 $\beta$ 位淀粉样前体裂解酶-1(BACE1)siRNA的外泌体后,成功下调阿尔茨海默病致病基因BACE1,从而降低小鼠脑中 $\beta$ -淀粉样蛋白水平,但该方法在卵巢癌耐药中尚无相关报道,通过外泌体包裹siRNA下调卵巢癌相关耐药基因表达可能也是一个潜在的治疗方法。

#### 4 结 语

外泌体在卵巢癌化疗药物耐药中发挥了重要作用,可能通过作为细胞排出化疗药物的途径、通过其携带耐药相关核酸、蛋白等内容物以及通过中和抗体类药物等方式促进卵巢癌化疗耐药的发生和发展。但是,现有的关于外泌体在卵巢癌患者对化疗药物耐药的研究还存在一些不足,如:外泌体参与卵巢癌患者对化疗药物耐药的相关作用机制尚未完全阐明;临床应用研究少、内容不够深入、可靠性欠佳。这些研究上的缺陷和不足在一定程度上是由外泌体分离技术导致的。目前采用的外泌体分离技术存在提取率低、纯度不高、非肿瘤单一来源、时间及经济成本高等问题,使得外泌体难以真正应用于液体活检或肿瘤治疗。这些问题目前已引起许多科学家的关注,并已有一些学者开始着力于改善外泌体分离技术的研究。如Reátegui等<sup>[26]</sup>开发了一种新型微流体装置EVHB-Chip以捕获肿瘤来源细胞外囊泡,从而获取肿瘤特异性的遗传和分子信息,为从体液中提取的外

泌体并非特异肿瘤来源这一难题提供了解决思路及方法;Kojima等<sup>[27]</sup>设计了一套EXOtic装置,通过改造外泌体来源细胞中的基因表达,增强外泌体分泌、特异性的mRNA包装以及mRNA递送,无须浓缩外泌体便可更高效地获得外泌体,从而参与肿瘤治疗;Zhang等<sup>[28]</sup>利用不对称流场分离法将外泌体分成90~120 nm Exo-L(large exosome vesicle)和60~80 nm Exo-S(small exosome vesicle)两种亚型,并发现存在丰富的Exomere( $\approx 35$  nm),通过这些外泌体亚型的认识,今后对外泌体功能的研究将更为细致和准确。

综上所述,外泌体分离技术的进步和相关研究的开展为耐药卵巢癌患者的治疗开启了一扇新的大门,外泌体不仅有望应用于卵巢癌患者对化疗药物耐药的预测,而且可能成为卵巢癌治疗的新靶点和新载体,从而改善卵巢癌患者的预后。

#### 参考文献

- [1] TORRE L A, TRABERT B, DESANTIS C E, et al. Ovarian cancer statistics, 2018 [J]. **CA Cancer J Clin**, 2018, 68(4):284-296.
- [2] LENGYEL E. Ovarian cancer development and metastasis [J]. **Am J Pathol**, 2010, 177(3):1053-1064.
- [3] RAJA F A, COUNSELL N, COLOMBO N, et al. Platinum versus platinum-combination chemotherapy in platinum-sensitive recurrent ovarian cancer: a meta-analysis using individual patient data [J]. **Ann Oncol**, 2013, 24(12):3028-3034.
- [4] PAN B T, JOHNSTONE R M. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes *in vitro*: selective externalization of the receptor [J]. **Cell**, 1983, 33(3):967-978.
- [5] FÉVRIER B, RAPOSO G. Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages [J]. **Curr Opin Cell Biol**, 2004, 16(4):415-421.
- [6] ZHANG F F, ZHU Y F, ZHAO Q N, et al. Microvesicles mediate transfer of P-glycoprotein to paclitaxel-sensitive A2780 human ovarian cancer cells, conferring paclitaxel-resistance [J]. **Eur J Pharmacol**, 2014, 738:83-90.
- [7] CROW J, ATAY S, BANSKOTA S, et al. Exosomes as mediators of platinum resistance in ovarian cancer [J]. **Oncotarget**, 2017, 8(7):11917-11936.
- [8] SAMUEL P, MULCAHY L A, FURLONG F, et al. Cisplatin induces the release of extracellular vesicles from ovarian cancer cells that can induce invasiveness and drug resistance in bystander cells [J]. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, 2018, 373(1737):pii:

- 20170065.
- [9] SAFAEI R, LARSON B J, CHENG T C, et al. Abnormal lysosomal trafficking and enhanced exosomal export of cisplatin in drug-resistant human ovarian carcinoma cells [J]. **Mol Cancer Ther**, 2005, 4(10): 1595-1604.
- [10] DORAYAPPAN K D P, WANNER R, WALLBILICH J J, et al. Hypoxia-induced exosomes contribute to a more aggressive and chemoresistant ovarian cancer phenotype: a novel mechanism linking STAT3/Rab proteins [J]. **Oncogene**, 2018, 37(28): 3806-3821.
- [11] LOPES-RODRIGUES V, DI L A, SOUSA D, et al. Multidrug resistant tumour cells shed more microvesicle-like EVs and less exosomes than their drug-sensitive counterpart cells [J]. **Biochim Biophys Acta**, 2016, 1860(3):618-627.
- [12] LOPES-RODRIGUES V, DI L A, SOUSA D, et al. Data supporting the shedding of larger extracellular vesicles by multidrug resistant tumour cells [J]. **Data Brief**, 2016, 6:1023-1027.
- [13] AU Y C L, CO N N, TSURUGA T, et al. Exosomal transfer of stroma-derived miR21 confers paclitaxel resistance in ovarian cancer cells through targeting APAF1 [J]. **Nat Commun**, 2016, 7:11150.
- [14] CIRAVOLO V, HUBER V, GHEDINI G C, et al. Potential role of HER2-overexpressing exosomes in countering trastuzumab-based therapy [J]. **J Cell Physiol**, 2012, 227(2):658-667.
- [15] WANG T, NING K, LU T X, et al. Increasing circulating exosomes-carrying TRPC5 predicts chemoresistance in metastatic breast cancer patients [J]. **Cancer Sci**, 2017, 108(3):448-454.
- [16] YANG S J, WANG D D, LI J, et al. Predictive role of GSTP1-containing exosomes in chemotherapy-resistant breast cancer [J]. **Gene**, 2017, 623:5-14.
- [17] 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.
- [18] DEL R M, BIASCO E, CRUCITTA S, et al. The detection of androgen receptor splice variant 7 in plasma-derived exosomal RNA strongly predicts resistance to hormonal therapy in metastatic prostate cancer patients [J]. **Eur Urol**, 2017, 71(4):680-687.
- [19] KATO T, MIZUTANI K, KAMEYAMA K, et al. Serum exosomal P-glycoprotein is a potential marker to diagnose docetaxel resistance and select a taxoid for patients with prostate cancer [J/OL]. **Urol Oncol**, 2015, 33(9):385.e15-20.
- [20] YIN J, YAN X, YAO X, et al. Secretion of annexin A3 from ovarian cancer cells and its association with platinum resistance in ovarian cancer patients [J]. **J Cell Mol Med**, 2012, 16(2):337-348.
- [21] MENG X, MÜLLER V, MILDE-LANGOSCH K, et al. Diagnostic and prognostic relevance of circulating exosomal miR-373, miR-200a, miR-200b and miR-200c in patients with epithelial ovarian cancer [J]. **Oncotarget**, 2016, 7(13):16923-16935.
- [22] MARLEAU A M, CHEN C S, JOYCE J A, et al. Exosome removal as a therapeutic adjuvant in cancer [J]. **J Transl Med**, 2012, 10:134.
- [23] AGRAWAL A K, AQIL F, JEYABALAN J, et al. Milk-derived exosomes for oral delivery of paclitaxel [J]. **Nanomedicine**, 2017, 13(5):1627-1636.
- [24] AQIL F, JEYABALAN J, AGRAWAL A K, et al. Exosomal delivery of berry anthocyanidins for the management of ovarian cancer [J]. **Food Funct**, 2017, 8(11):4100-4107.
- [25] ALVAREZ-ERVITI L, SEOW Y, YIN H, et al. Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes [J]. **Nat Biotechnol**, 2011, 29(4):341-345.
- [26] REÁTEGUI E, VAN DER VOS K E, LAI C P, et al. Engineered nanointerfaces for microfluidic isolation and molecular profiling of tumor-specific extracellular vesicles [J]. **Nat Commun**, 2018, 9(1):175.
- [27] KOJIMA R, BOJAR D, RIZZI G, et al. Designer exosomes produced by implanted cells intracerebrally deliver therapeutic cargo for Parkinson's disease treatment [J]. **Nat Commun**, 2018, 9(1):1305.
- [28] ZHANG H, FREITAS D, KIM H S, et al. Identification of distinct nanoparticles and subsets of extracellular vesicles by asymmetric flow field-flow fractionation [J]. **Nat Cell Biol**, 2018, 20(3):332-343.

[本文编辑 余方沈敏]