

- 2002,47(18):1850-1856.
- [6] 覃丽英,许敏玲,陈少兰,等. 某镇教师幽门螺旋杆菌感染的流行病学调查[J]. 中国医药指南,2012,10(2):160-162.
- [7] Wichelhaus A, Brauchli L, Song Q, et al. Prevalence of Helicobacter pylori in the adolescent oral cavity dependence on orthodontic therapy, oral flora and hygiene[J]. Journal of Orofacial Orthopedics, 2011, 72(3): 187-195.
- [8] Jia CL, Jiang GS, Li CH, et al. Effect of dental plaque control on infection of helicobacter pylori in gastric mucosa[J]. J Periodont, 2009, 80(10): 1606-1609.
- [9] Muhsen K, Athamna A, Bialik A, et al. Presence of Helicobacter pylori in a Sibling is Associated with a Long-Term Increased Risk of H-pylori Infection in Israeli Arab Children[J]. Helicobacter, 2010, 15(2): 108-113.
- [10] Nam JH, Choi LJ, Cho SJ, et al. Helicobacter pylori infection and histological changes in siblings of young gastric cancer patients [J]. J Gastroen Hepatol, 2011, 26(7): 1157-1163.
- [11] Dattoli VCC, Veiga RV, Cunha S, et al. Seroprevalence and potential risk factors for helicobacter pylori infection in brazilian children[J]. Helicobacter, 2010, 15(4): 273-278.
- [12] Zou QHR, Li Q. Helicobacter pylori in the oral cavity and gastric mucosa: a meta-analysis[J]. J Oral Pathol, 2011, 40(4): 317-324.
- [13] Momtaz H, Souod N, Dabiri H, et al. Study of Helicobacter pylori genotype status in saliva, dental plaques, stool and gastric biopsy samples[J]. Gastroen, 2012, 18(17): 2105-2111.
- [14] Samra ZQ, Javaid U, Ghafoor S, et al. PCR assay targeting virulence genes of Helicobacter pylori isolated from drinking water and clinical samples in Lahore metropolitan[J]. Journal of Water and Health, 2011, 9(1): 208-216.
- [15] Brown LM, Thomas TL, Ma JL, et al. Helicobacter pylori infection in rural China; Exposure to domestic animals during childhood and adulthood[J]. Scand J Infect Dis, 2001, 33(9): 686-691.
- [16] Marshall BA, Howat PA, Wright. Oral fluid antibody detection in the diagnosis of Helicobacter pylori infection[J]. J Me Microb, 1999, 48(11): 1043-1046.
- [17] Kullavanijaya P, Thong-Ngam D, Hanvivatvong O, et al. Analysis of eight different methods for the detection of Helicobacter pylori infection in patients with dyspepsia[J]. J Gastroen Hepatol, 2004, 19(12): 1392-1396.
- [18] Ou ZY, Xiong LY, Li DY, et al. Evaluation of a new fluorescence quantitative PCR test for diagnosing Helicobacter pylori infection in children[J]. Bmc Gastroen, 2013, 13(2): 210-212.
- [19] Monno R, Giorgio F, Carmine P, et al. Helicobacter pylori clarithromycin resistance detected by Etest and TaqMan real-time polymerase chain reaction: a comparative study[J]. Apmis, 2012, 120(9): 712-717.
- [20] Song HY, Li Y. Can eradication rate of gastric Helicobacter pylori be improved by killing oral Helicobacter pylori[J]. J Gastroen, 2013, 19(39): 6645.
- [21] 金早蓉, 蓉宋斌, 李曙霞, 等. 口腔黏膜扁平苔藓患者口腔多部位幽门螺杆菌的检测及其意义[J]. 当代医学, 2010, 16(1): 1-3.
- [22] Pourshahidi S, Fakhri F, Ebrahimi H, et al. Lack of association between helicobacter pylori infection and oral lichen planus[J]. Asian Pac J Cancer P, 2012, 13(5): 1745-1747.
- [23] 徐捷, 黄炳新. 口腔幽门螺杆菌与复发性口腔溃疡的相关性研究[J]. 现代中西医结合杂志, 2009, 18(12): 1380-1381.
- [24] Victoria JMN, Kalapothakis E, Silva JDC, et al. Helicobacter pylori DNA in recurrent aphthous stomatitis[J]. J Oral Pathol, 2003, 32(4): 219-223.
- [25] 高静, 张丽, 靳松, 等. 慢性胃病患者口腔与胃内幽门螺杆菌基因型关系的研究[J]. 临床口腔医学杂志, 2010, 26(5): 266-269.
- [26] Suzuki N, Yoneda M, Naito T, et al. Detection of Helicobacter pylori DNA in the saliva of patients complaining of halitosis[J]. J Med Microb, 2008, 57(12): 1553-1559.
- [27] 傅长来, 唐光华, 蒋丹斌, 等. 胃幽门螺杆菌与口臭关系的临床研究[J]. 中国医药导刊, 2010, 9(12): 1527-1528.
- [28] Bouziane A, Ahid S, Abouqal R, et al. Effect of periodontal therapy on prevention of gastric Helicobacter pylori recurrence: a systematic review and meta-analysis[J]. J Clin Per, 2012, 39(12): 1166-1173.

(收稿日期: 2014-04-29)

胞外体在微 RNA 转运过程中的作用

陈 胜, 王 伟, 王 亮 综述, 张 颖, 贾战生 审校

(解放军第四军医大学唐都医院感染病科, 陕西西安 710038)

关键词: 胞外体; 微 RNA; 综述

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.24.040

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)24-3392-03

胞外体来源于多种真核细胞的多泡体(MVBs)内部的小囊泡,在电镜下呈典型的杯状,由脂质双层膜包裹的扁平半球体,直径约 40~100 nm。MVBs 可能通过内出芽的方式形成小囊泡,而一些蛋白、脂质和核酸就分选进入这些小囊泡中,被释放到细胞间隙成为胞外体^[1]。胞外体的实质是细胞内产生的小囊泡,在形成过程中“不可避免”携带参与细胞生命过程的各种蛋白、脂质以及核酸。微 RNA(MicroRNA)是由 21~25

个核苷酸构成的非编码小分子 RNA,曾经被视为无功能的分子^[2]。近年来已经成为分子生物学领域的研究热点,参与了细胞内多种基因的表达调控^[3]。已经证实 microRNA 存在于胞外体中,胞外体如同“特洛伊木马”参与 microRNA 在细胞间的转运而影响靶细胞功能。

1 胞外体中的 microRNA

根据胞外体内容物数据库(Exocarta)的记录,目前已确定

有 764 种 microRNA 在胞外体中存在,这些 microRNA 来自于不同的组织和细胞,而且将会发现更多的 microRNA^[4]。与胞浆中的 microRNA 相比,胞外体中 microRNA 更加稳定,能够经受反复冻融以及经较长时间储存而不被 RNA 酶降解。Montecalvo 等^[5]对不同成熟程度树突细胞(DC)细胞来源的胞外体中 microRNA 进行分析,共检测了 139 种 microRNA,其中 5 种只存在于不成熟 DC 来源的胞外体中,58 种是成熟 DC 细胞独有的,说明处于不同成熟程度的 DC 细胞来源的胞外体含有不同的 microRNA 组成。此外该组研究人员在胞外体中没有发现一些细胞中存在的 microRNA,表明不是所有的 microRNA 都会进入胞外体;研究发现 T 细胞、B 细胞、DC 细胞来源的胞外体中 microRNA 的表达谱与其母细胞不同,说明 microRNA 进入胞外体存在分选过程,具体机制尚未完全阐明^[6]。

2 胞外体在细胞间的传递

microRNA 通过胞外体在细胞间的传递,可以归纳为以下步骤:(1) microRNA 被选择性地分选入 MVBs 内部的小囊泡中;(2) MVBs 与质膜融合,将其内部小囊泡分泌到细胞间质中;(3) 胞外体与靶细胞相互作用,主要有 3 种方式,即结合到细胞表面、与细胞质膜融合或通过笼形蛋白介导的内吞作用摄取;(4) 胞外体被摄入到细胞内后,可以反向与内体膜相融合或者通过 MVBs 与质膜融合释放^[7]。经过上述过程, microRNA 通过胞外体这样一架“特洛伊木马”实现了在细胞间的传递。

2.1 胞外体的起源和生成

MVBs 是源于内吞作用的多态性内体系统的一部分, MVBs 可能以向内出芽的形式形成内部小囊泡,细胞中的组分如脂质、蛋白、核酸被选择性地分选入这些囊泡中^[8]。MVBs 与不同的目标融合决定了其两种不同的命运:(1) 与溶酶体膜导致其组分被降解;(2) 与质膜相融合,其内部小囊泡通过胞吐作用进入细胞间隙,成为胞外体^[9]。多泡体内小囊泡的命运选择机制尚未弄清,目前认为有两种机制:(1) 转运必需内体分选复合物(ESCRT)依赖机制,这个机制主要由 5 个复合物组成(ESCRT-0, -I, -II, -III),目前认为这个机制主要负责促使 MVBs 内生形成小囊泡以及释放小囊泡进入溶酶体腔中^[10];(2) 转运必需内体分选复合物非依赖机制,这个机制中有神经酰胺的参与,神经酰胺在胞外体膜上表达丰富,目前认为神经酰胺在结构域的融合、受体聚集、囊泡形成、膜的融合和分解以及囊泡的运输过程中都发挥作用。

2.2 胞外体的分泌

胞外体分泌至细胞间隙不是一个随机的过程,而是一个高度协调、精细化的过程。目前认为胞外体的分泌是在微管蛋白、肌动蛋白以及相应分子的协调作用下通过 MVBs 的转运以及与质膜的融合而实现的^[11]。胞外体的分泌可以被机械的、化学的、生物的刺激所抑制, King 等^[12]在低氧条件下培养乳腺癌细胞,发现胞外体分泌明显增强;在黑色素瘤细胞中,较低的 pH 水平同样增加了胞外体的释放和摄取^[13]。

2.3 胞外体在细胞间的运输以及摄取

细胞间隙中的胞外体仍可以被细胞摄取,然后胞外体可以反向与内体膜融合,或者通过 MVBs 与质膜融合释放^[14]。胞外体的这种细胞间的释放与再摄取途径构成一种循环网络,使通过胞外体介导的,无需细胞间直接接触的跨膜物质转运成为现实^[15]。目前尚待解决的问题是分泌到细胞间隙中的胞外体在细胞间的运输是否是

“靶向”的,摄取胞外体细胞的特异性影响着胞外体中内容物功能的发挥。很多类型的细胞都可以摄取胞外体中的 microRNA 而实现对 mRNA 的转录后调控。胞外体从细胞中分泌后,胞外体膜上可能表达与来源细胞相似的配体以及抗原成分。胞外体被细胞所摄取可能是通过与摄取胞外体的细胞表面的受体和配体的激活而实现的。Christianson^[16]研究证实硫酸类肝素蛋白多糖在癌细胞来源的胞外体被靶细胞摄取过程中发挥关键作用。

3 胞外体中 microRNA 作为疾病诊断标志物

细胞外的 microRNA 有多种存在形式,可以存在于胞外体、自噬小体以及高密度脂蛋白当中,或者与 Ago2 蛋白相联系构成 RNA 诱导沉默复合体^[17]。新近研究发现血浆或唾液中大多数的 microRNA 都存在于胞外体当中^[18]。一些 microRNA 的表达水平可以为了解疾病的病理过程和机体的调控机制提供参考,胞外体中 microRNA 有希望成为一些疾病和一些病理过程的标志物。Kuwabara^[19]研究发现胞外体中 miR-133 在罹患心肌损伤的患者标本中较健康人是升高的,揭示胞外体 microRNA 在心血管疾病的诊断价值。microRNA 是与肿瘤相关的多种基因的上游调控分子,通过调控细胞的增殖、凋亡等多种途径影响肿瘤的发生、发展。多种 microRNA 的异常表达已被证实可以作为肿瘤的诊断指标。肿瘤患者血浆中较健康人有更多的胞外体存在,表明肿瘤细胞较非肿瘤细胞分泌更多的胞外体^[20],所以检测肿瘤细胞产生的胞外体中 microRNA 较检测细胞中的 microRNA 更具准确性。Taylor 和 Gercel-Taylor^[21]将胞外体从肿瘤患者的外周血中分离出来,分析其中 microRNA 的表达谱,并与癌细胞浆中、良性疾病以及健康人的表达情况进行对比,认为可以利用卵巢癌细胞来源的胞外体中的 microRNA 表达特点作为卵巢癌的诊断标志物。在肝癌的形成过程中,一些胞外体转运的 microRNA 能够下调转化生长因子- β 通路,这项研究表明胞外体中的 microRNA 可能参与肝癌的局部扩散、肝内转移以及肝癌的多中心生长。胞外体 microRNA 的异常表达同样存在于肺腺癌、胶质母细胞瘤以及前列腺癌等多种肿瘤^[22]。但是一些研究结果显示,一些在胞外体中浓度很高的 microRNA,在胞外体来源的癌细胞中表达量很少或者不表达^[23],胞外体中 microRNA 能否作为疾病可靠的标志物仍需进一步探讨。目前胞外体分离技术方案分离效果不佳、特异性不高而且耗时长久,胞外体 microRNA 作为疾病标志物的研究亟需更快、效果更好的分离技术出现。

4 针对胞外体 microRNA 的治疗设想

凭借自身独特的在细胞间运送小分子物质的独特能力,胞外体有望在很多疾病的治疗中发挥作用。相应的,由于胞外体 microRNA 在多种疾病病理过程中的作用,针对胞外体 microRNA 的药物研发也在如火如荼地进行。Akao^[24]报道化学修饰的 microRNA (miR-143BPs) 在 miR-143BP 转染 THP-1 巨噬细胞分泌的胞外体中可以被检测。在实验动物静脉注射由 miR-143BP 转染的 THP-1 巨噬细胞后,在实验动物的血清、肿瘤组织、肾脏中 miR-143BP 的表达水平均升高,这项研究表明胞外体携带修饰过的 microRNA 能够准确到达特定的器官。Ohno^[25]认为修饰胞外体使其表面表达 GE11 肽(氨基酸序列 YHWYGYTPQNVD),静脉注射胞外体到小鼠体

内,特异性地运送 miR-let7a 至表达表皮生长因子受体(EGFR)的乳腺癌细胞,证明了胞外体是运送抗肿瘤 microRNA 至肿瘤组织的有效工具。关于胞外体 microRNA 有 2 点是明确的:(1)胞外体能够作为治疗靶点;(2)通过胞外体运输 microRNA 到靶细胞是可行的。尽管有很多大胆且有意义的尝试,胞外体 microRNA 用于治疗疾病还处于动物实验阶段,距离临床应用还有很长一段距离,当有很多问题需要解决:(1)外源性的胞外体进入人体后,会受到机体网状内皮系统的清除,需要对胞外体进行一些修饰以避免清除机制;(2)需要找到一条可靠且高效的方法将 microRNA 导入胞外体中;(3)不同细胞来源的胞外体的组成不一样,B 淋巴细胞、DC 细胞、肠上皮细胞多表达主要组织相容性复合体(MHC) II 分子;而来源于肿瘤细胞的胞外体主要表达生长因子及其受体^[26]。MHC II 有可能引发机体的免疫反应,因此选择合适的胞外体来源细胞也是胞外体 microRNA 的临床应用必须解决的问题。

5 展 望

胞外体被人类发现已经 30 余年,直至近年来人们才对胞外体的起源、组成、生理作用及其作用机制有了较深入的认识。细胞、胞外体与 microRNA 就像古希腊传说中城邦、木马与士兵间的关系。木马从哪里来? 运载哪些士兵? 士兵怎样装? 从这个城邦到另一个城邦怎样实现? 士兵怎样卸载而发挥作用? 想要让胞外体这架“特洛伊木马”为治疗疾病发挥积极的作用,这些问题都需要得到解决,对于胞外体的研究才刚刚开始,理由相信随着研究的进展,胞外体的生化特征、生物学功能以及作用机制将会更加明确。

参考文献

- [1] Colombo M. Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles[J]. *J Cell Sci*, 2013, 28(2): 210-212.
- [2] Iorio MV, Croce CM. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review[J]. *Embo Mol Med*, 2012, 4(3): 143-159.
- [3] Sun J. MicroRNAs in hepatocellular carcinoma: regulation, function, and clinical implications[J]. *Sci World J*, 2013, 2013: 924206.
- [4] Mathivanan S. ExoCarta 2012: database of exosomal proteins, RNA and lipids[J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(12): 1241-1244.
- [5] Montecalvo A, Larregina A, Morelli E. Methods of analysis of dendritic cell-derived exosome-shuttle microRNA and its horizontal propagation between dendritic cells[J]. *Methods Mol Biol*, 2013, 24(1): 19-21.
- [6] Mittelbrunn M. Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells[J]. *Nat Commun*, 2011, 28(2): 282.
- [7] Pegtel DM. Functional delivery of viral miRNAs via exosomes[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(14): 6328-6333.
- [8] Hanson PI, Cashikar. Multivesicular body morphogenesis[J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2012, 28(3): 337-362.
- [9] Hannafon BN, Ding WQ. Intercellular Communication by Exosome-Derived microRNAs in Cancer[J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(24): 14240-14269.
- [10] Schmidt O, Teis D. The ESCRT machinery[J]. *Current Biology*, 2012, 22(4): R116-R120.
- [11] Rodriguez-Boulan E, Kreitzer G, Musch A. Organization of vesicular trafficking in epithelia[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, 6(3): 233-247.
- [12] King HW, Michael MZ, Gleadle JM. Hypoxic enhancement of exosome release by breast cancer cells[J]. *BMC Cancer*, 2012, 12(4): 421-423.
- [13] Parolini I. Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells[J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(49): 34211-34222.
- [14] Pant S, Hilton H, Burczynski ME. The multifaceted exosome: biogenesis, role in normal and aberrant cellular function, and frontiers for pharmacological and biomarker opportunities [J]. *Biochem Pharmacol*, 2012, 83(11): 1484-1494.
- [15] Chaput N. Thery, Exosomes: immune properties and potential clinical implementations[J]. *Semin Immunopathol*, 2011, 33(5): 419-440.
- [16] Christianson HC. Cancer cell exosomes depend on cell-surface heparan sulfate proteoglycans for their internalization and functional activity[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(43): 17380-17385.
- [17] Hessvik NP, Sandvig K, Llorente, exosomal miRNAs as biomarkers for prostate cancer[J]. *Front Genet*, 2013, 4(1): 36-38.
- [18] Gallo A. The majority of microRNAs detectable in serum and saliva is concentrated in exosomes[J]. *PLoS One*, 2012, 7(3): 30679.
- [19] Kuwabara Y. Increased microRNA-1 and microRNA-133a levels in serum of patients with cardiovascular disease indicate myocardial damage[J]. *Circ Cardiovasc Genet*, 2011, 4(4): 446-454.
- [20] Rabinowits G. Exosomal microRNA: a diagnostic marker for lung cancer[J]. *Clin Lung Cancer*, 2009, 10(1): 42-46.
- [21] Taylor DD, Gerceel-Taylor C. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer[J]. *Gynecol Oncol*, 2008, 110(1): 13-21.
- [22] Kogure T. Intercellular nanovesicle-mediated microRNA transfer: a mechanism of environmental modulation of hepatocellular cancer cell growth[J]. *Hepatology*, 2011, 54(12): 1237-1248.
- [23] Jaiswal R. Microparticle conferred microRNA profiles—implications in the transfer and dominance of cancer traits[J]. *Mol Cancer*, 2012, 11(1): 37-39.
- [24] Akao Y. Microvesicle-mediated RNA molecule delivery system using monocytes/macrophages[J]. *Mol Ther*, 2011, 19(2): 395-399.
- [25] Ohno S. Systemically injected exosomes targeted to EGFR deliver antitumor microRNA to breast cancer cells[J]. *Mol Ther*, 2013, 21(1): 185-191.
- [26] Simpson RJ, Jensen SS, Lim JW. Proteomic profiling of exosomes: current perspectives[J]. *Proteomics*, 2008, 8(19): 4083-4099.

(收稿日期: 2014-05-03)