

外泌体生成调控机制的研究进展

段海真 甘露 曹钰

四川大学华西医院急诊科,成都 610000

段海真现在遵义医科大学附属医院急诊科,贵州遵义 563003

通信作者:曹钰,Email:yuyuer@126.com

【摘要】 外泌体是细胞主动分泌的直径约40~160 nm的小囊泡,参与机体的多种病理生理过程,与疾病的发生发展密切相关;外泌体是一种新发现的可用于疾病诊断和预测预后的生物标志物载体,其潜在临床应用价值备受瞩目。然而,外泌体的生成、靶向性转运、分子调控机制等诸多方面目前仍不清楚。本文从外泌体生成环节入手,对目前已知的外泌体生成途径和重要的分子调控机制进行综述,以期通过抑制或者促进外泌体生成来治疗临床疾病。

【关键词】 外泌体; 细胞外囊泡; 生成

基金项目: 国家自然科学基金(82070421)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20210818-01209

Research progress on the molecular regulatory mechanism of exosome biogenesis

Duan Haizhen, Gan Lu, Cao Yu

Department of Emergency, West China Hospital of Sichuan University, Chengdu 610000, Sichuan, China

Duan Haizhen is working on the Department of Emergency, Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi 563003, Guizhou, China

Corresponding author: Cao Yu, Email: yuyuer@126.com

【Abstract】 Exosomes are small vesicles with a diameter of about 40–160 nm actively secreted by cells. They participate in a variety of pathophysiological processes and are closely related to the occurrence and development of diseases. As a newly carrier of intercellular communication and circulating biomarkers of disease diagnosis and prognosis, exosomes have attracted great attention for their potential clinical applications. However, many aspects such as exosome biogenesis, targeted transport, and mechanism of action are still unclear. This paper focuses on the exosome biogenesis, summarizes the exosome biogenesis pathways, and describes relevant molecular modulation mechanisms of importance. And this review provides a theoretical basis for disease treatment based on regulating exosome production.

【Key words】 Exosome; Extracellular vesicle; Biogenesis

Fund program: National Natural Science Foundation of China (82070421)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20210818-01209

细胞外囊泡(extracellular vesicle, EV)是由细胞释放的各种具有膜结构的囊泡的统称,基于其生成、大小和生物物理性质不同,可进一步分为凋亡小泡、微囊泡和外泌体^[1]。其中,外泌体具有特殊的生物发生机制,在细胞分选系统中以腔内囊泡(intraluminal vesicle, ILV)的形式产生,包被于多泡体(multivesicular body, MVB)中,当MVB与细胞膜融合时,其中的小囊泡被释放到细胞外,即为外泌体。该过程包括携带内容物的分选、胞内运输、细胞膜的锚定和融合、释放。外泌体携带多种物质,包括核酸、脂质和蛋白质等,在组织、细胞间进行信号交流,对维持正常细胞稳态具有重要作用。因此,探究外泌体生成的具体分子机制,开发相应的药物制剂,对疾病的防治具有重要意义。

1 外泌体的概念

外泌体是一种直径40~160 nm的具有脂质双分子层的小囊泡,密度1.1~1.2 g/mL,是EV的一种。早在1967年, Wolf^[2]首先在血浆中观察到细胞外小囊泡,并命名为“血小板灰尘”。Harding等^[3]和Pan等^[4]相继于1983年、1985年分别在大鼠及绵羊网织红细胞上清液中发现了细胞外小囊

泡。2005年,Johnstone^[5]因为“囊泡内容物向细胞外释放的过程与细胞膜内吞胞外分子的作用方向相反”,首次采用“exosome”(外泌体)来命名这些细胞外的小囊泡,意为向外的小体。1996年,Raposo等^[6]发现外泌体具有维持细胞外微环境稳态、抗原呈递、刺激T细胞增殖诱导机体免疫反应等作用。2007年,Valadi等^[7]发现外泌体中含有mRNA和微小RNA(microRNA, miRNA),具有调控细胞生物学作用的潜力,至此外泌体被广泛关注。

2 外泌体的生成过程

EV可分为凋亡小泡、微囊泡和外泌体。凋亡小泡属于脱落小体;微囊泡是质膜直接向外出芽产生的囊泡,直径约50~1 000 nm;而外泌体直径约40~160 nm,由细胞膜内吞形成内体,内体限制膜发生多处凹陷,向内出芽形成ILV,继而转变为具有动态亚细胞结构的MVB,与胞膜融合后,将颗粒状小囊泡释放至胞外,即为外泌体。外泌体独特而复杂的胞内形成过程,决定了其组成的复杂性及功能的多样性。

3 外泌体生成的调控机制

外泌体生成主要包括ILV的形成、MVB的转运(避免溶

酶体降解)及 MVB 与细胞膜的融合。外泌体生成过程主要涉及 Ras 超家族成员蛋白小 GTP 酶蛋白家族(Rab)、含 PDC 结构域的联合蛋白聚糖结合蛋白 1(syntenin 1)、肿瘤易感基因 101(tumor susceptibility gene 101, TSG101)、凋亡相关基因-2 相互作用蛋白 X (apoptosis-linked gene-2-interacting protein X, ALI X)、联合蛋白聚糖-1 (syndecan-1)、内吞体分选转运复合物(endosomal sorting complex required for transport, ESCRT)蛋白、磷脂、四分子交联体家族成员、神经酰胺、鞘磷脂酶和可溶性神经酰胺-马来酰亚胺敏感因子附着蛋白受体复合物蛋白(soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor, SNARE)等(图 1)^[8-9]。

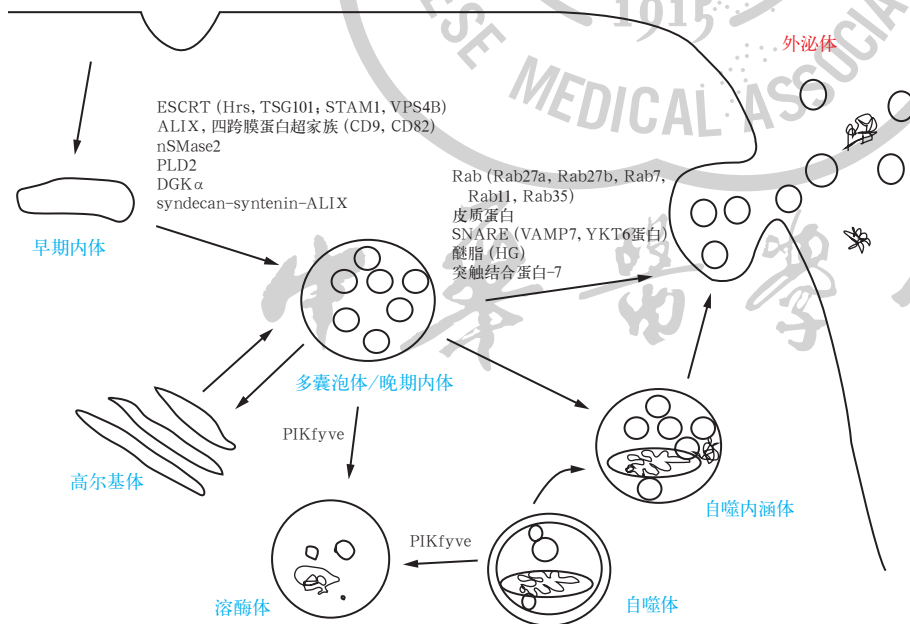
不同的细胞类型、培养条件和细胞的基因组稳态亦是调节外泌体生成的重要因素。肿瘤细胞比健康细胞释放的外泌体更多。在不同温度条件下,乳腺癌细胞生成的外泌体含量存在显著差异,温度增高时,乳腺癌细胞释放的外泌体明显增加^[10]。此外,对单细胞外泌体进行延时监测的研究结果表明,非癌细胞与癌细胞外泌体产生速率也存在显著差异;研究还表明,在低氧条件下,间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)生成的外泌体可以减轻心肌细胞凋亡,从而改善心肌缺血^[11-12]。昼夜节律改变可以调控外泌体的生成,使机体胰岛素敏感性受到影响^[13]。网织红细胞在分化过程中^[14],树突状细胞在细胞成熟过程中^[15],都会出现外泌体生成增加。

外泌体可根据大小分为不同的亚群,且大外泌体和小外泌体各有独特的 N-糖基化、蛋白质、脂质、DNA 和 RNA 图

谱及生物物理特性,因而分泌过程亦不相同^[16]。外泌体生成通常涉及 3 种途径,包括 ESCRT 依赖性外泌体生成途径、ESCRT 非依赖性外泌体生成途径和其他途径。

3.1 ESCRT 依赖性外泌体生成途径:外泌体可通过 ESCRT 依赖性途径生成。研究表明,外泌体的生物学发生首先是质膜内吞形成早期内体,继而早期内体逐渐成熟为晚期内体,内体膜向外出芽形成 ILV,最终演变成 MVB^[17]。ESCRT 蛋白复合物作为膜形成和断裂的驱动力,是 MVB 和 ILV 形成的重要调控物质^[18]。ESCRT 蛋白复合物包括 5 种不同的复合物,分别为 ESCRT-0、ESCRT- I、ESCRT- II、ESCRT- III 和 AAA 三磷酸腺苷酶相关的液泡分选蛋白 4(vacuolar protein sorting 4, VPS4)复合物。ESCRT 调控外泌体生成是一个多步骤过程,首先 ESCRT-0 和 ESCRT- I 亚单位蛋白将泛素化的跨膜分子聚集在 MVB 膜的微结构域上,并通过 ESCRT- II 募集 ESCRT- III 形成亚复合物,调控细胞膜微结构域的出芽和分裂。一项关于 ESCRT 组成分子的 RNA 干扰研究揭示了 ESCRT 关键组分在外泌体形成中的作用,发现 ESCRT 组分选择性失活影响了 MVB 和 ILV 形成,进而间接调控了外泌体的形成^[19]。在该研究中,7 个有关外泌体生成的 ESCRT 蛋白被发现。降低 ESCRT-0 的肝细胞生长因子调节的酪氨酸激酶底物 Hrs、TSG101 及 ESCRT- I 的蛋白信号转导接头分子 1(signal transducing adaptor molecule 1, STAM1),可使外泌体分泌减少;然而敲除 ESCRT- III 和相关蛋白染色质修饰蛋白 4C(chromatin modified protein 4C, CHMP4C)、VPS4B、囊泡运输相关蛋白 1(vesicle trafficking-associated protein 1, VTA1)、

ALI X 则可以使外泌体分泌增多。但 ALI X 基因沉默可能只影响外泌体蛋白组成,不影响外泌体分泌。ESCRT-0 蛋白 Hrs 也被证明在外泌体分泌中发挥作用^[20]。Hrs 基因沉默主要导致 50~200 nm 的外泌体减少,而对 <50 nm 的外泌体分泌则无明显影响^[19]。研究表明, Hrs 缺失的树突状细胞分泌的外泌体较少^[21]。人胚胎肾细胞 HEK293 中 Hrs 缺失可减少外泌体中 Wnt 信号通路蛋白和内质网保守的膜转运蛋白 Evi 分泌^[22]。另外,敲除 Hrs 可减少头颈鳞状细胞癌细胞外泌体分泌。Syntenin 是一种多价可溶性蛋白质,因能够与 ALI X 结合,参与了 ESCRT 机制。Syntenin 与 ALI X 相互作用后不仅作用于外泌体搭载货物的分选,而且对 ILV 的形成也具有促进作用^[23]。乙酰肝素酶可以对顺癸烷 syndecan 的硫酸肝素侧链进行修剪,促使顺癸烷簇



注: ESCRT 为内吞体分选转运复合物, Hrs 为肝细胞生长因子调节的酪氨酸激酶底物, TSG101 为肿瘤易感基因 101, STAM1 为信号转导接头分子 1, VPS4B 为液泡分选蛋白 4B, ALI X 为凋亡相关基因-2 相互作用蛋白 X, nSMase2 为中性鞘磷脂酶 2, PLD2 为磷脂酶 D2, DGK α 为二酰基甘油激酶 α , syndecan-syntenin-ALI X 为联合蛋白聚糖-含 PDC 结构域的联合蛋白聚糖结合蛋白 1-ALI X 复合物, Rab 为小 GTP 酶蛋白家族, SNARE 为可溶性神经酰胺-马来酰亚胺敏感因子附着蛋白受体复合物蛋白, VAMP7 为囊泡相关膜蛋白 7, PIKfyve 为含 FYVE 指磷酸肌醇激酶

图 1 影响外泌体生成和释放的分子组成^[9]

聚集后绑定于 syntenin^[24];乙酰肝素酶也可以促进 CD63 的分选,提示 syntenin 与 CD63 在外泌体内容物的分选中相关。典型的 ESCRT 通路可以被 syntenin 和 ALI X 阻断,它们可桥接内容物分子和 ESCRT-III 亚单元 CHMP4(也称 VPS32)^[14]。研究表明,乳腺癌细胞 MCF-7 中部分囊泡分泌由 syndecan-syntenin-ALI X 调控^[25]。因此,通过调控 ESCRT 分子组成调节外泌体的生成是研发外泌体生成药物的重要领域。

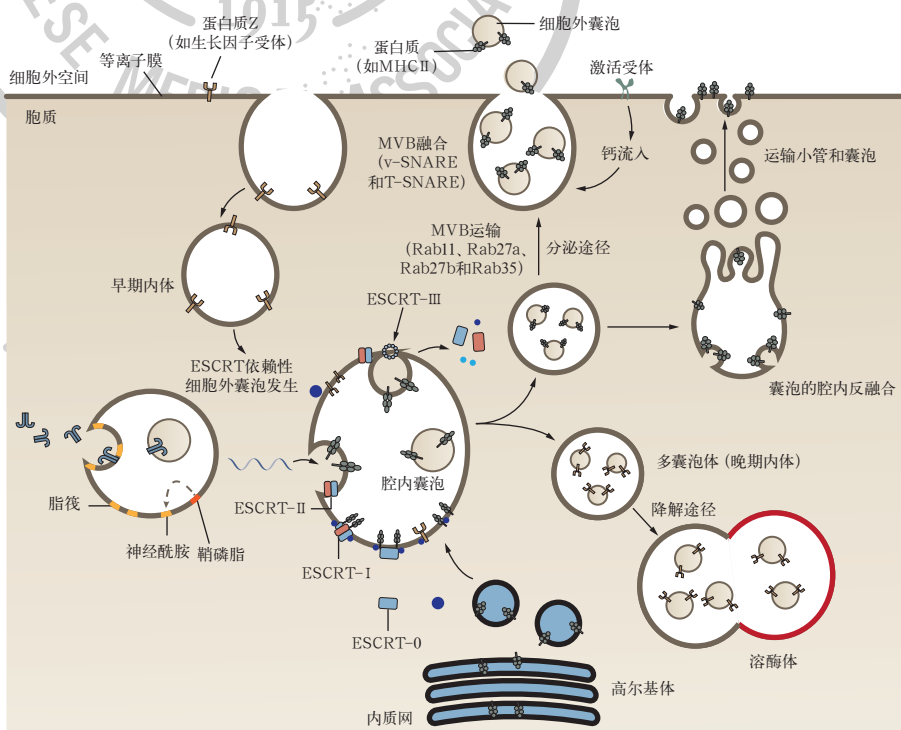
3.2 ESCRT 非依赖性外泌体生成途径:外泌体亦可以通过 ESCRT 非依赖性途径生成。研究表明,以负载 CD63 的 ILV 为特征的 MVB 仍然是在 4 种 ESCRT 复合物成分耗尽时形成的^[26]。第 1 个 ESCRT 非依赖性生成途径需要鞘磷脂酶将鞘磷脂水解为神经酰胺。神经酰胺代谢为磷酸化的鞘氨醇-1 (sphingosine-1),激活 G 蛋白耦联的磷酸化 sphingosine-1 受体,进而参与 ILV 内容物的分选和包裹。此外,跨膜四蛋白超家族蛋白质亦是 ESCRT 非依赖性途径的重要调节组分。研究表明,外泌体表面 CD63 参与黑色素细胞的内体分选,调节负载脂蛋白 E 的外泌体形成;在唐氏综合征患者成纤维细胞源性的外泌体形成过程中亦得以证实^[27]。同样,CD81、CD82 和 CD9 也直接参与外泌体各种内容物的分选包裹过程。这些蛋白与其他跨膜四蛋白、胞质蛋白一起形成蛋白簇,作用于细胞膜上出芽的微域^[28]。CD81 蛋白分子是锥体样结构,具有一个膜内腔,可以容纳胆固醇,并且可能为其他跨膜四蛋白所共有。研究表明,CD9 和 CD82 能促进 HEK293 细胞的外泌体释放增多,进而下调 β-连环蛋白表达,抑制 Wnt 信号通路,而 CD9 敲除小鼠的骨髓树突状细胞仍可分泌浮帆蛋白 flotillin-1^[29]。几个锥形的跨膜四蛋白富集在一个细胞膜微域诱导出芽。

ESCRT 依赖性机制和 ESCRT 非依赖性机制共同参与外泌体的生成^[30],其作用可能会因装载内容物和细胞源性不同而异(图 2)。MVB 形成后分泌出胞或者与溶酶体融合后被降解,这两种途径中均有 Ras 相关蛋白 Ras-GTP 酶参与调控。Rab7 可以通过 MVB 与溶酶体融合而使 MVB 降解,但 Rab5b、Rab9a、Rab27a、Rab27b 和 Rab35 等其他 Rab 蛋白则能够调控 MVB 运输及分泌^[31]。最终 MVB 与细胞质膜融合,释放包裹的小泡,该过程被 SNARE 介导,如囊泡相关膜蛋白(vesicle-associated membrane protein, VAMP)^[32]。

3.3 外泌体生成的其他调控机制:跨膜分子进入 EV 很大程度上依赖内容物的分选机制。研究表明,胞质蛋白与热休克蛋白 70

(heat shock protein 70, HSP70)、热休克蛋白 70 同源物(heat shock cognate 70, HSC70)等共同调控胞质蛋白分选进入 ILV 膜分子^[33],如糖基磷脂酰肌醇(glycosylphosphatidy-linositol, GPI)对脂质结构域与脂筏具有高亲和力,通过对膜的生物物理性质的影响直接参与 ILV 生成,进而将锚定的蛋白质包裹于外泌体中。一些泛素化修饰的胞质蛋白亦存在于 ILV 和外泌体内,但具体机制目前还不清楚。除蛋白质外,外泌体还携带核酸,包括 mRNA 和非编码 RNA,如 miRNA。目前, mRNA 被动和主动装载到外泌体的作用仍不清楚,但有证据表明多种机制参与特定核酸的分选过程,ESCRT- II 亦可作为 mRNA 绑定复合物^[34];富含四跨膜蛋白的微域也可将 mRNA 结合蛋白隔离在膜微域中^[35]。由于 miRNA 的序列不同,因此被分选进入外泌体的机制也不同。miRNA 诱导的沉默复合物(RNA-induced silencing complex, miRISC)及其主要成员阿尔戈诺特蛋白 2(argonaute 2, AGO2)介导 RNA 沉默过程^[36]。有研究表明,kiirsten ras 癌基因-丝裂素活化蛋白激酶(kiirsten ras oncogene-mitogen-activated protein kinase, KRAS-MEK)信号通路通过 AGO2 和 Y 盒结合蛋白 1(Y-box-binding protein 1, YBX1)调节外提 miRNA 负载^[37]。

总体来说,外泌体的生物发生过程是复杂的,因内容物和细胞类型的不同而不同,并可能受到胞内外信号、病理刺激的影响,细胞稳态的改变亦可导致外泌体组成的变化。同时,不同的分选机制调控不同的外泌体组分或同一组分的包裹^[27]。因此,几种机制可同时或相继作用于形成的 MVB^[38],在 MVB 不同成熟阶段调节内容物的包裹。细胞内存在不同



注: MHC II 为主要组织相容性复合物 II, MVB 为多囊泡体, ESCRT 为内吞体分选转运复合物, miRNA 为微小 RNA, SNARE 为可溶性神经酰胺-马来酰亚胺敏感因子附着蛋白受体复合物蛋白, Rab 为小 GTP 酶蛋白家族

图 2 外泌体生成的 ESCRT 依赖性和非依赖性途径^[30]

MVB 亚群,亦是外泌体异质性产生的重要分子生物学基础。

4 调控外泌体生成的抑制剂及其临床应用前景

外泌体参与机体的多种病理生理过程,与疾病的发生发展密切相关。因此,外源性补充或药物诱导调控外泌体生成成为治疗疾病的潜在策略。但由于外泌体生成、释放过程的复杂性及高度异质性,通过单一药物来调控外泌体生成仍具有挑战性,因而设计抑制外泌体主要亚群生成和释放的药物较为可行。目前影响外泌体生成的药物主要包括调控外泌体体内运输过程的钙蛋白酶、马努霉素 A、Rho 相关蛋白激酶(Rho-related protein kinase, ROCK)抑制剂 Y27632 及作用于脂质代谢的泛硫乙胺、神经丝酶抑制剂 GW4869 等。

钙蛋白酶在细胞中普遍表达,其被激活后与蛋白质底物结合,参与细胞凋亡、增殖、迁移、肿瘤侵袭和癌症进展等多种病理生理过程。Fox 等^[39]发现,用钙蛋白酶预处理血小板能减少 70% 的外泌体生成。此外, Yano 等^[40]发现,钙蛋白酶可以显著抑制血小板活化早期外泌体的生成,并呈剂量依赖性。Datta 等^[41]发现了马努霉素 A 对 ESCRT 依赖性外泌体生成的特异性抑制作用。马努霉素 A 可以使前列腺癌细胞外泌体产生减少 50%~60%;当马努霉素 A 与 GW4869 联合使用时,抑制效果则更明显。Zhou 等^[42]研究发现,马努霉素 A 可能通过拮抗表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)的激活而抑制肾小管的修复。ROCK 是丝氨酸-苏氨酸激酶家族成员,通过作用于细胞骨架来参与调节细胞的形状和运动,参与外泌体的释放过程。Y27632 是 ROCK1 和 ROCK2 的一种常用竞争性抑制剂。Tramontano 等^[43]发现, 2.5 μmol/L Y27632 可明显降低人冠状动脉内皮细胞释放的 CD105⁺ 和 CD31⁺ 外泌体生成。此外, Kim 等^[44]发现, Y27632 可抑制异氟烷激活的内皮细胞 Rho 激酶,从而促进外泌体的生成。

脂质代谢调控药物主要有泛硫乙胺、丙咪嗪、GW4869。泛硫乙胺是一种泛酸衍生物,在脂质代谢和降低总胆固醇水平中起重要作用。Kavian 等^[45]发现,在多发硬化化的体外模型中加入 50 mol/L 或 100 mol/L 泛硫乙胺后,内皮细胞释放的外泌体呈剂量依赖性减少;随后,该结果在体内模型中得到验证,并且,干预泛硫乙胺可显著减缓多发硬化化模型小鼠的血管纤维化,原因可能与循环中 CD144⁺ 内皮细胞源性微囊泡的数量显著减少有关^[45]。丙咪嗪是一种三环类抗抑郁药,因其对酸性鞘磷脂酶的抑制活性也在外泌体生成的调控中备受关注。酸性鞘磷脂酶可催化鞘磷脂水解为神经酰胺,这一过程参与外泌体的形成。Deng 等^[46]发现,用丙咪嗪处理的成骨细胞释放外泌体显著减少; Kosgodage 等^[47]发现丙咪嗪干预后前列腺癌细胞株生成的外泌体减少了 77%。GW4869 是一种可渗透细胞的对称二氢咪唑并酰胺化合物,是一种有效的、特异的、非竞争性的膜中性鞘磷脂酶抑制剂。神经丝酶是一种普遍存在的酶,通过膜脂鞘磷脂水解产生生物活性神经酰胺。Lyu 等^[48]发现,用 40 mol/L GW4869 处理与新生大鼠心脏成纤维细胞共培养的心肌细胞时,心脏成纤维细胞源性外泌体的作用被显著抑制。此外,还有研究证

实, GW4869 抑制外泌体的生成在肿瘤生长调控中起重要作用^[49-50]。Cao 等^[51]研究发现, GW4869 可降低卵巢癌细胞对顺铂的耐药性,因而 GW4869 与顺铂联合应用在耐药患者中具有一定的治疗潜力。另外, GW4869 在免疫调节、脓毒症治疗中的作用也逐渐被发现^[52-53]。因此,根据外泌体生成调控机制探索更好的调控外泌体生成药物,具有广阔的临床应用前景。

5 展望

外泌体是细胞间进行物质运输和信息交流的重要工具,与生物体的生命活动息息相关。研究已经证实外泌体是多种疾病发生进展的重要信号基础。尽管对于外泌体生物学功能还有很多的未解之谜,但随着外泌体研究工作的深入开展及研究手段的不断更新,外泌体的特性将会进一步被揭示。因此,深入了解外泌体的形成机制并基于此进行调控干预,将是未来研究的重要方向。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Kalluri R, LeBleu VS. The biology, function, and biomedical applications of exosomes [J]. *Science*, 2020, 367 (6478): eaau6977. DOI: 10.1126/science.aau6977.
- [2] Wolf P. The nature and significance of platelet products in human plasma [J]. *Br J Haematol*, 1967, 13 (3): 269-288. DOI: 10.1111/j.1365-2141.1967.tb08741.x.
- [3] Harding C, Heuser J, Stahl P. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes [J]. *J Cell Biol*, 1983, 97 (2): 329-339. DOI: 10.1083/jcb.97.2.329.
- [4] Pan BT, Teng K, Wu C, et al. Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes [J]. *J Cell Biol*, 1985, 101 (3): 942-948. DOI: 10.1083/jcb.101.3.942.
- [5] Johnstone RM. Revisiting the road to the discovery of exosomes [J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2005, 34 (3): 214-219. DOI: 10.1016/j.bcmd.2005.03.002.
- [6] Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W, et al. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles [J]. *J Exp Med*, 1996, 183 (3): 1161-1172. DOI: 10.1084/jem.183.3.1161.
- [7] Valadi H, Ekström K, Bossios A, et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells [J]. *Nat Cell Biol*, 2007, 9 (6): 654-659. DOI: 10.1038/ncb1596.
- [8] Mathieu M, Martin-Jaulat L, Lavieu G, et al. Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication [J]. *Nat Cell Biol*, 2019, 21 (1): 9-17. DOI: 10.1038/s41556-018-0250-9.
- [9] Hessvik NP, Llorente A. Current knowledge on exosome biogenesis and release [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2018, 75 (2): 193-208. DOI: 10.1007/s00018-017-2595-9.
- [10] Otsuka K, Yamamoto Y, Ochiya T. Uncovering temperature-dependent extracellular vesicle secretion in breast cancer [J]. *J Extracell Vesicles*, 2020, 10 (2): e12049. DOI: 10.1002/jev2.12049.
- [11] Zhu LP, Tian T, Wang JY, et al. Hypoxia-elicited mesenchymal stem cell-derived exosomes facilitates cardiac repair through miR-125b-mediated prevention of cell death in myocardial infarction [J]. *Theranostics*, 2018, 8 (22): 6163-6177. DOI: 10.7150/thno.28021.
- [12] 赵志晨, 王晶, 何婧瑜, 等. 致敏性 CD4⁺ T 细胞来源的外泌体介导心肌梗死后心肌重构的机制研究 [J]. *中华危重病急救医学*, 2021, 33 (11): 1332-1336. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20210709-01038.
- [13] Khalyfa A, Gaddameedhi S, Crooks E, et al. Circulating exosomal miRNAs signal circadian misalignment to peripheral metabolic tissues [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21 (17): 6396. DOI:

- 10.3390/ijms21176396.
- [14] Carayon K, Chaoui K, Ronzier E, et al. Proteolipidic composition of exosomes changes during reticulocyte maturation [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286 (39): 34426–34439. DOI: 10.1074/jbc.M111.257444.
- [15] Segura E, Amigorena S, Théry C. Mature dendritic cells secrete exosomes with strong ability to induce antigen-specific effector immune responses [J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2005, 35 (2): 89–93. DOI: 10.1016/j.bcmd.2005.05.003.
- [16] Zhang HY, Freitas D, Kim HS, 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. DOI: 10.1038/s41556-018-0040-4.
- [17] Théry C, Zitvogel L, Amigorena S. Exosomes: composition, biogenesis and function [J]. *Nat Rev Immunol*, 2002, 2 (8): 569–579. DOI: 10.1038/nri855.
- [18] Hurley JH. ESCRT complexes and the biogenesis of multivesicular bodies [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2008, 20 (1): 4–11. DOI: 10.1016/jceb.2007.12.002.
- [19] Colombo M, Moita C, van Niel G, et al. Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles [J]. *J Cell Sci*, 2013, 126 (Pt 24): 5553–5565. DOI: 10.1242/jcs.128868.
- [20] Hoshino D, Kirkbride KC, Costello K, et al. Exosome secretion is enhanced by invadopodia and drives invasive behavior [J]. *Cell Rep*, 2013, 5 (5): 1159–1168. DOI: 10.1016/j.celrep.2013.10.050.
- [21] Tamai K, Tanaka N, Nakano T, et al. Exosome secretion of dendritic cells is regulated by Hrs, an ESCRT-0 protein [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 399 (3): 384–390. DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.07.083.
- [22] Gross JC, Chaudhary V, Bartscherer K, et al. Active Wnt proteins are secreted on exosomes [J]. *Nat Cell Biol*, 2012, 14 (10): 1036–1045. DOI: 10.1038/ncb2574.
- [23] Baietti MF, Zhang Z, Mortier E, et al. Syndecan-syntenin-ALI X regulates the biogenesis of exosomes [J]. *Nat Cell Biol*, 2012, 14 (7): 677–685. DOI: 10.1038/ncb2502.
- [24] Roucourt B, Meeussen S, Bao J, et al. Heparanase activates the syndecan-syntenin-ALI X exosome pathway [J]. *Cell Res*, 2015, 25 (4): 412–428. DOI: 10.1038/cr.2015.29.
- [25] Friand V, David G, Zimmermann P. Syntenin and syndecan in the biogenesis of exosomes [J]. *Biol Cell*, 2015, 107 (10): 331–341. DOI: 10.1111/boc.201500010.
- [26] Stuffers S, Sem Wegner C, Stenmark H, et al. Multivesicular endosome biogenesis in the absence of ESCRTs [J]. *Traffic*, 2009, 10 (7): 925–937. DOI: 10.1111/j.1600-0854.2009.00920.x.
- [27] van Niel G, Charrin S, Simoes S, et al. The tetraspanin CD63 regulates ESCRT-independent and -dependent endosomal sorting during melanogenesis [J]. *Dev Cell*, 2011, 21 (4): 708–721. DOI: 10.1016/j.devcel.2011.08.019.
- [28] Charrin S, Jouannet S, Bouchez C, et al. Tetraspanins at a glance [J]. *J Cell Sci*, 2014, 127 (Pt 17): 3641–3648. DOI: 10.1242/jcs.154906.
- [29] Chairouduua A, Smith DL, Pochard P, et al. Exosome release of β -catenin: a novel mechanism that antagonizes Wnt signaling [J]. *J Cell Biol*, 2010, 190 (6): 1079–1091. DOI: 10.1083/jcb.201002049.
- [30] Dreyer F, Baur A. Biogenesis and functions of exosomes and extracellular vesicles [J]. *Methods Mol Biol*, 2016, 1448: 201–216. DOI: 10.1007/978-1-4939-3753-0_15.
- [31] Ostrowski M, Carmo NB, Krumeich S, et al. Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway [J]. *Nat Cell Biol*, 2010, 12 (1): 19–30; sup pp 1–13. DOI: 10.1038/ncb2000.
- [32] Fader CM, Sánchez DG, Mestre MB, et al. TI-VAMP/VAMP7 and VAMP3/cellubrevin: two v-SNARE proteins involved in specific steps of the autophagy/multivesicular body pathways [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1793 (12): 1901–1916. DOI: 10.1016/j.bbamer.2009.09.011.
- [33] Géminard C, De Gassart A, Blanc L, et al. Degradation of AP2 during reticulocyte maturation enhances binding of hsc70 and Alix to a common site on TFR for sorting into exosomes [J]. *Traffic*, 2004, 5 (3): 181–193. DOI: 10.1111/j.1600-0854.2004.0167.x.
- [34] Irion U, St Johnston D. bicoid RNA localization requires specific binding of an endosomal sorting complex [J]. *Nature*, 2007, 445 (7127): 554–558. DOI: 10.1038/nature05503.
- [35] Perez-Hernandez D, Gutiérrez-Vázquez C, Jorge I, et al. The intracellular interactome of tetraspanin-enriched microdomains reveals their function as sorting machineries toward exosomes [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288 (17): 11649–11661. DOI: 10.1074/jbc.M112.445304.
- [36] Gibbins DJ, Ciaudo C, Erhardt M, et al. Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity [J]. *Nat Cell Biol*, 2009, 11 (9): 1143–1149. DOI: 10.1038/ncb1929.
- [37] McKenzie AJ, Hoshino D, Hong NH, et al. KRAS-MEK signaling controls Ago2 sorting into exosomes [J]. *Cell Rep*, 2016, 15 (5): 978–987. DOI: 10.1016/j.celrep.2016.03.085.
- [38] Edgar JR, Eden ER, Futter CE. Hrs- and CD63-dependent competing mechanisms make different sized endosomal intraluminal vesicles [J]. *Traffic*, 2014, 15 (2): 197–211. DOI: 10.1111/tra.12139.
- [39] Fox JE, Taylor RG, Taffarel M, et al. Evidence that activation of platelet calpain is induced as a consequence of binding of adhesive ligand to the integrin, glycoprotein IIb/IIIa [J]. *J Cell Biol*, 1993, 120 (6): 1501–1507. DOI: 10.1083/jcb.120.6.1501.
- [40] Yano Y, Shiba E, Kambayashi J, et al. The effects of calpeptin (a calpain specific inhibitor) on agonist induced microparticle formation from the platelet plasma membrane [J]. *Thromb Res*, 1993, 71 (5): 385–396. DOI: 10.1016/0049-3848(93)90163-i.
- [41] Datta A, Kim HY, Lal M, et al. Manumycin A suppresses exosome biogenesis and secretion via targeted inhibition of Ras/Raf/ERK1/2 signaling and hnRNP H1 in castration-resistant prostate cancer cells [J]. *Cancer Lett*, 2017, 408: 73–81. DOI: 10.1016/j.canlet.2017.08.020.
- [42] Zhou XJ, Zhang W, Yao QS, et al. Exosome production and its regulation of EGFR during wound healing in renal tubular cells [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2017, 312 (6): F963–F970. DOI: 10.1152/ajprenal.00078.2017.
- [43] Tramontano AF, O'Leary J, Black AD, et al. Statin decreases endothelial microparticle release from human coronary artery endothelial cells: implication for the Rho-kinase pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 320 (1): 34–38. DOI: 10.1016/j.bbrc.2004.05.127.
- [44] Kim MH, Ham A, Kim KY, et al. The volatile anesthetic isoflurane increases endothelial adenosine generation via microparticle ecto-5'-nucleotidase (CD73) release [J]. *PLoS One*, 2014, 9 (6): e99950. DOI: 10.1371/journal.pone.0099950.
- [45] Kaviani N, Marut W, Servetaz A, et al. Pantethine prevents murine systemic sclerosis through the inhibition of microparticle shedding [J]. *Arthritis Rheumatol*, 2015, 67 (7): 1881–1890. DOI: 10.1002/art.39121.
- [46] Deng LL, Peng Y, Jiang YH, et al. Imipramine protects against bone loss by inhibition of osteoblast-derived microvesicles [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18 (5): 1013. DOI: 10.3390/ijms18051013.
- [47] Kosgodage US, Trindade RP, Thompson PR, et al. Chloramidine/bisindolylmaleimide-I-mediated inhibition of exosome and microvesicle release and enhanced efficacy of cancer chemotherapy [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18 (5): 1007. DOI: 10.3390/ijms18051007.
- [48] Lyu LM, Wang H, Li B, et al. A critical role of cardiac fibroblast-derived exosomes in activating renin-angiotensin system in cardiomyocytes [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2015, 89 (Pt B): 268–279. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2015.10.022.
- [49] Richards KE, Zeleniak AE, Fishel ML, et al. Cancer-associated fibroblast exosomes regulate survival and proliferation of pancreatic cancer cells [J]. *Oncogene*, 2017, 36 (13): 1770–1778. DOI: 10.1038/ncr.2016.353.
- [50] Matsumoto A, Takahashi Y, Nishikawa M, et al. Accelerated growth of B16BL6 tumor in mice through efficient uptake of their own exosomes by B16BL6 cells [J]. *Cancer Sci*, 2017, 108 (9): 1803–1810. DOI: 10.1111/cas.13310.
- [51] Cao YL, Zhuang T, Xing BH, et al. Exosomal DNMT1 mediates cisplatin resistance in ovarian cancer [J]. *Cell Biochem Funct*, 2017, 35 (6): 296–303. DOI: 10.1002/cbf.3276.
- [52] Gon Y, Maruoka S, Inoue T, et al. Selective release of miRNAs via extracellular vesicles is associated with house-dust mite allergen-induced airway inflammation [J]. *Clin Exp Allergy*, 2017, 47 (12): 1586–1598. DOI: 10.1111/cea.13016.
- [53] 蒲倩, 修光辉, 孙洁, 等. 间充质干细胞外泌体在脓毒症多器官功能障碍中作用的研究进展 [J]. *中华危重病急救医学*, 2021, 33 (6): 757–760. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20200908-00620.