

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2019.03.007

· 基础研究 ·

前列腺癌 LNCaP-AI+F 细胞外泌体促进基质细胞 WPMY-1 功能活化

范维肖, 雷琳, 李蕊, 刁艳君, 常亮, 杨柳, 马越云, 郝晓柯(空军军医大学西京医院 检验科, 陕西 西安 710032)

[摘要] **目的:** 探讨前列腺癌外泌体对基质细胞 WPMY-1 迁移和侵袭能力的影响及其作用机制。**方法:** 超速离心法提取前列腺癌 LNCaP-AI+F 细胞上清中的外泌体, 电镜观察外泌体的典型形态结构, Zetaview 检测外泌体的粒径分布, Wb 鉴定外泌体标志蛋白及其他相关蛋白。将 WPMY-1 细胞与前列腺癌外泌体(40 $\mu\text{g/ml}$) 共孵育后, 激光共聚焦显微镜观察 WPMY-1 细胞对 PKH67 标记的外泌体的摄取情况, Transwell 实验检测 WPMY-1 细胞迁移和侵袭能力, qPCR 检测 IL-8、PDGFB 和 MMP9 等三种肿瘤相关成纤维细胞(cancer-associated fibroblast, CAF)分子表达水平, Wb 检测 EGFR 和 ERK1/2 蛋白磷酸化水平。**结果:** 电镜下可观察到典型茶托状外泌体结构, 外泌体粒径分布集中在 100 nm 左右, 其标志蛋白 CD63 和 ALIX 的表达证实了所提取颗粒为外泌体。此外, 外泌体还表达 EGFR、HER2 和 SRC 等三种与前列腺癌进展相关的蛋白。WPMY-1 细胞与外泌体共孵育后, 共聚焦显微镜下可看到该细胞摄取大量外泌体, 明显促进 WPMY-1 细胞的迁移和侵袭能力(均 $P < 0.01$); 与对照组比较, 外泌体(40 $\mu\text{g/ml}$) 处理后 WPMY-1 IL-8、PDGFB 及 MMP9 表达水平增高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 且外泌体促进了 WPMY-1 细胞 EGFR 和 ERK1/2 的磷酸化($P < 0.01$)。**结论:** 前列腺癌细胞可通过外泌体作用于基质细胞 WPMY-1, 使其高表达多种 CAF 相关分子, 促进 EGFR 和 ERK1/2 的磷酸化, 增强其迁移和侵袭能力。

[关键词] 前列腺癌; LNCaP-AI+F 细胞; 外泌体; 迁移; 侵袭; WPMY-1 细胞; 肿瘤相关成纤维细胞
[中图分类号] R73-36+1, R734.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2019)03-0293-06

Prostate cancer LNCaP-AI+F cell-derived exosomes promote activation of stromal cell WPMY-1

FAN Weixiao, LEI Lin, LI Rui, DIAO Yanjun, CHANG Liang, YANG Liu, MA Yueyun, HAO Xiaoke (Clinical Laboratory, Xijing Hospital Affiliated to Air Force Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of prostate cancer exosomes on the migration and invasion ability of stromal cells (WPMY-1), and to explore its mechanism. **Methods:** Exosomes in LNCaP-AI+F prostate cancer cell supernatant were isolated by ultracentrifugation and the typical structure of exosome was captured by electron microscope. The particle size distribution was analyzed by Zetaview, and Wb was used to identify the marker proteins and other proteins. After co-incubation of WPMY-1 cells and prostate cancer exosomes (40 $\mu\text{g/ml}$), laser confocal microscope was used to observe the uptake of PKH67-labeled exosomes by WPMY-1 cells; Transwell assay was used to detect the migration and invasion ability of WPMY-1 cells; qPCR was performed to detect the expression of three cancer-associated fibroblast (CAF)-related molecules (IL-8, PDGFB and MMP9) at mRNA level; and the phosphorylation of EGFR and ERK1/2 was analyzed by Wb. **Results:** Typical cup-shaped structure of exosomes was observed under electron microscope. The Zetaview results showed that the particle size distribution was concentrated at about 100 nm. The expression of exosome marker proteins CD63 and ALIX further verified that the isolated particles were exosomes. Besides, EGFR, HER2 and SRC, which were related to the progression of prostate cancer, were also enriched in exosomes. After co-incubation, confocal microscope imaging showed a number of PKH67 labeled exosomes in recipient WPMY-1 cells. Transwell experiments showed that exosomes could significantly enhance the migration and invasion ability of WPMY-1 cells (all $P < 0.01$). Compared with the control group, increased secretion of IL-8, PDGFB and MMP9 was observed after exosome treatment (40 $\mu\text{g/ml}$) ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Wb indicated that exosomes could promote the phosphorylation of EGFR and ERK1/2 of WPMY-1 cells ($P < 0.01$). **Conclusion:** Prostate cancer cell exosomes could act on the stromal cell WPMY-1 to highly express multiple CAF-related molecules, promote the phosphorylation of EGFR and ERK1/2 and enhance the migration and invasion ability of WPMY-1 cells.

[Key words] prostate cancer; LNCaP-AI+F cell; exosome; migration; invasion; WPMY-1 cell; cancer-associated fibroblast (CAF)

[Chin J Cancer Biother, 2019, 26(3): 293-298. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2019.03.007]

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No.81872347)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No.81872347)

[作者简介] 范维肖(1993-),男,硕士,主要从事前列腺癌外泌体相关的研究, E-mail: 1325899014@qq.com

[通信作者] 郝晓柯(HAO Xiaoke, corresponding author), 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事前列腺癌分子诊断及治疗方面的研究, E-mail: ha-oxkg@fmmu.edu.cn

前列腺癌是威胁全球男性健康的重大疾病之一。据美国癌症协会调查统计,2018年美国预计前列腺癌新发病164 690例,预计病死人数29 430例。中国的前列腺癌发病率随着生活方式的改变也在逐年增加^[1-2]。前列腺癌患者经过经典的去势治疗之后,许多会发展为转移去势抵抗性前列腺癌,引起骨转移的发生,是前列腺癌引起死亡的主要原因^[3-4]。因此,深入研究前列腺癌的转移机制对于寻找前列腺癌潜在的治疗靶点及预后影响因素具有重要的意义。基质成纤维细胞是一种广泛分布于体内具有高度异质性的梭形细胞^[5],基质细胞的功能包括维持细胞外基质(extracellular matrix, ECM)稳态、促进上皮分化、调控炎症发生以及参与损伤修复^[6-7],因此,肿瘤相关成纤维细胞(cancer-associated fibroblast, CAF)在疾病发展特别是恶性肿瘤的进展过程中扮演者重要的角色。越来越多的研究^[8-9]表明,肿瘤细胞来源的外泌体可以通过其内容物促进基质细胞活化并调控肿瘤的发生发展。外泌体是由多种细胞分泌的直径为30~100 nm的细胞外囊泡,来源于细胞内的多囊泡体,其与细胞膜融合后将其包裹的外泌体释放到细胞外^[10]。Tsg101、ALIX、CD9和CD63等多种蛋白选择性地富集于外泌体中,是常用于外泌体鉴定的标志蛋白^[11]。外泌体通过其所包含的蛋白质、RNA以及脂质等成分介导细胞与细胞之间的信号交流,特别是其蛋白成分可以激活受体细胞的多种信号通路,调控受体细胞的功能和状态^[12]。前列腺癌外泌体如何调控基质细胞的活化,目前研究尚少。本研究通过探究前列腺癌细胞LNCaP-AI+F来源的外泌体对基质细胞WPMY-1迁移、侵袭能力的影响及其作用机制,为前列腺癌转移微环境的形成提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株及主要试剂

LNCaP-AI+F细胞株由浙江大学医学院附属第二医院陶志华教授课题组馈赠,WPMY-1基质细胞购自中国科学院细胞库。RMPI1640培养基购自Hyclone公司,无酚红DMEM培养基购自吉诺生物公司,普通FBS和炭处理FBS购自BI公司,无外泌体血清购自上海逍鹏生物,Transwell小室及基质胶购自美国BD公司,DAPI染色液购自碧云天公司,罗丹明标记的鬼笔环肽购自Cytoskeleton公司,PKH67染色试剂购自Sigma公司,qPCR试剂盒购自TaKaRa生物,EGFR抗体购自Abcam公司,pEGFR、ERK1/2和pERK1/2抗体购自CST公司。

1.2 细胞培养

LNCaP-AI+F细胞用含10%炭处理血清的无酚红DMEM培养基培养在75 cm²的培养瓶中,待细胞汇合度至70%左右时更换为含10%无外泌体血清的无酚红DMEM培养基,继续培养48 h后收集细胞上清。WPMY-1用含15%普通胎牛血清的RMPI1640培养液培养。两种细胞均于37 °C、5%CO₂培养箱中培养。

1.3 外泌体分离与鉴定

外泌体分离严格按照THERY等^[13]的方法进行。取LNCaP-AI+F细胞上清,300×g离心10 min去除活细胞;2 000×g离心10 min去除死细胞;10 000×g离心30 min去除细胞碎片;超速离心机Type70Ti转子100 000×g离心70 min,而后1 ml PBS重悬沉淀并汇集至39 ml离心管中,再次100 000×g离心70 min,弃上清,100 μl无菌PBS重悬沉淀,即为外泌体。外泌体电镜观察:吸取20 μl外泌体样品滴于铜网,静置5 min;滤纸吸去铜网上的液体,滴加2%磷酸钨染液20 μl负染,室温静置5 min,滤纸吸去多余的液体,白炽灯下干燥10 min后透射电镜下观察拍照。Zetaview粒径分布由上海逍鹏公司测定,Wb鉴定见方法1.6。

1.4 外泌体摄取实验检测WPMY-1细胞摄取外泌体情况

将200 ml LNCaP-AI+F细胞上清超离所得100 μl外泌体与500 μl DiluentC混合,同时将4 μl PKH67试剂加入到500 μl DiluentC中,混匀两者并避光孵育6 min;而后用2 ml FBS终止过度染色并再次超速离心70 min,100 μl PBS重悬沉淀即为染色后的外泌体。以40 μg/ml的质量浓度将外泌体与WPMY-1细胞在共聚焦皿中共孵育24 h,吸去上清,PBS清洗1遍,加入1 ml 4%多聚甲醛避光固定10 min;吸去固定液,PBS清洗1遍;加入500 μl DAPI,避光染色6 min;吸去DAPI染色液,PBS清洗1遍;加入300 μl 鬼笔环肽避光染色30 min,吸去染色液,加入PBS清洗1遍;加入50 μl抗荧光淬灭液,共聚焦显微镜下观察拍照。

1.5 qPCR检测CAF相关分子表达的水平

对照组与LNCaP-AI+F外泌体(40 μg/ml)处理后的WPMY-1细胞以TRIzol法提取总RNA,测得RNA浓度并反转录为cDNA。将1.6 μl DNA和10 μl SYBER Green、10 μmol/L的上游和下游引物各0.8 μl及无酶水加入到荧光定量板中,每孔20 μl体系。设置程序:95 °C 30 s;95 °C 5 s、60 °C 30 s,40个循环;溶解曲线;以GAPDH为内参检测CAF相关分子的表达水平,记录每个反应的Ct值,以2^{-ΔΔCt}公式计算基因相对倍比关系。相关引物序列GAPDH-F:5'-CCTGCAC-CACCAACTGCTTA-3',GAPDH-R:5'-GGCCATC-

CACAGTCTTCTGG - 3'; IL-8-F: 5' - TTTTGCCAA GGAGTGCTAAAGA-3', IL-8-R: 5'-AACCTCTGCA CCCAGTTTTTC-3'; PDGFB-F: 5'-GATCCGCTCCTTT-GATGATCTC-3', PDGFB-R: 5' - GGTCATGTTTCAG-GTCCAACCTC-3'; MMP9-F: 5' - CAGTACCGAGAGA AAGCCTATT-3', MMP9-R: 5' - CAGGATGTCATAG-GTCACGTAG-3'.

1.6 Wb 检测 LNCaP-AI+F 细胞外泌体蛋白及外泌体处理后 WPMY-1 细胞中磷酸化蛋白的表达水平

外泌体蛋白鉴定: 收取 LNCaP-AI+F 细胞, 100 μ l 裂解液冰上裂解 30 min, 与超速离心所得 PBS 重悬外泌体以 BCA 法测定浓度, 并以 20 μ g 的总蛋白量上样进行 SDS-PAGE, PVDF 膜半干转印 8 min, 封闭液封闭 1 h, 分别与一抗摇床孵育 2 h 后 4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜。第 2 天回收一抗, TBS 洗膜 3 次并与荧光二抗孵育 1 h, 之后 TBS 洗膜 3 次荧光扫描仪下扫膜观察条带。

磷酸化蛋白表达检测: 收取 LNCaP-AI+F 外泌体处理后的 WPMY-1 细胞, 60 μ l 裂解液冰上裂解后 BCA 法测定蛋白浓度, 以 20 μ g 的总蛋白上样量进行 SDS-PAGE, 之后步骤与外泌体蛋白鉴定步骤相同。

1.7 Transwell 实验检测 WPMY-1 细胞迁移和侵袭能力

细胞迁移实验: LNCaP-AI+F 外泌体处理 WPMY-1 细胞 48 h 后胰酶消化, 并用无血清的 RMPI 1640 培养基重悬细胞, 细胞计数板计数细胞并调整密度至 3×10^5 个/ml, 吸取 200 μ l 加入 Transwell 小室中, 下室加入含 20% 血清的培养基 600 μ l, 培养 24 h 后取出小室吸去上层细胞液, 棉签擦去上层细胞, PBS 清洗 1 遍, 4% 多聚甲醛固定 10 min, 之后 PBS 再次清洗 1 遍后结晶紫染色液染色 8 min, PBS 淋洗 3 遍, 晾干后显微镜下观察拍照并计数细胞。

细胞侵袭实验: 基质胶与无血清 1640 按照 1:20 比例配制, 每孔 50 μ l 加入到 Transwell 上室中, 培养箱中放置 2 h 使其凝固, 而后胰酶消化外泌体处理的细胞, 以无血清 1640 重悬细胞, 细胞计数并调整密度至 3×10^5 个/ml, 吸取 200 μ l 加入 Transwell 上室中, 下室加入含 20% 血清的培养基 600 μ l, 培养 24 h 后取出小室吸去上层细胞液, 棉签擦去上层细胞, PBS 清洗 1 遍, 4% 多聚甲醛固定 10 min, 之后 PBS 再次清洗 1 遍后结晶紫染色液染色 8 min, PBS 淋洗, 晾干后显微镜下观察拍照并计数细胞。

1.8 统计学处理

采用 SPSS 22.0 统计学软件和 Graphpad prism 7.0 作图软件, 实验均重复 3 次。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 Student's-*t* 检验。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 外泌体鉴定及其相关蛋白表达

电镜下(图 1A)可观察到典型的茶托状外泌体结构; Zetaview 分布图(图 1B)显示, 外泌体的粒径分布集中在 100 nm 左右, 与电镜结果一致。细胞溶解产物与外泌体分别为 LNCaP-AI+F 细胞裂解与 LNCaP-AI+F 细胞来源的外泌体。Wb 检测结果(图 1C)显示, 与 LNCaP-AI+F 细胞相比, 提取的外泌体高表达标志蛋白 CD63 和 ALIX; 同时高表达 EGFR 和 HER2 蛋白, 也表达 SRC 蛋白, 这 3 种蛋白与前列腺癌进展有关。

2.2 WPMY-1 细胞大量摄取 LNCaP-AI+F 细胞来源的外泌体

将 PKH67 标记的 LNCaP-AI+F 外泌体(40 μ g/ml)与 WPMY-1 细胞共孵育 24 h 后, 共聚焦显微镜观察外泌体的摄取情况, 结果(图 2)显示, 与对照组相比, 实验组 WPMY-1 细胞质中出现大量绿色荧光标记的外泌体, 表明 WPMY-1 细胞可以大量摄取 LNCaP-AI+F 细胞来源的外泌体。

2.3 LNCaP-AI+F 外泌体提高 WPMY-1 细胞迁移和侵袭能力

Transwell 实验检测结果(图 3)显示, 与空白对照相比, LNCaP-AI+F 外泌体(40 μ g/ml)处理 48 h 后 WPMY-1 细胞的迁移能力和侵袭能力明显增强(均 $P < 0.01$)。

2.4 LNCaP-AI+F 外泌体促进 WPMY-1 细胞高表达 IL-8、PDGFB 和 MMP9

qPCR 检测结果(图 4)所示, 与对照组相比, IL-8、PDGFB 以及 MMP9 mRNA 在外泌体处理后表达水平平均明显升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

2.5 LNCaP-AI+F 外泌体促进 WPMY-1 EGFR 信号通路活化

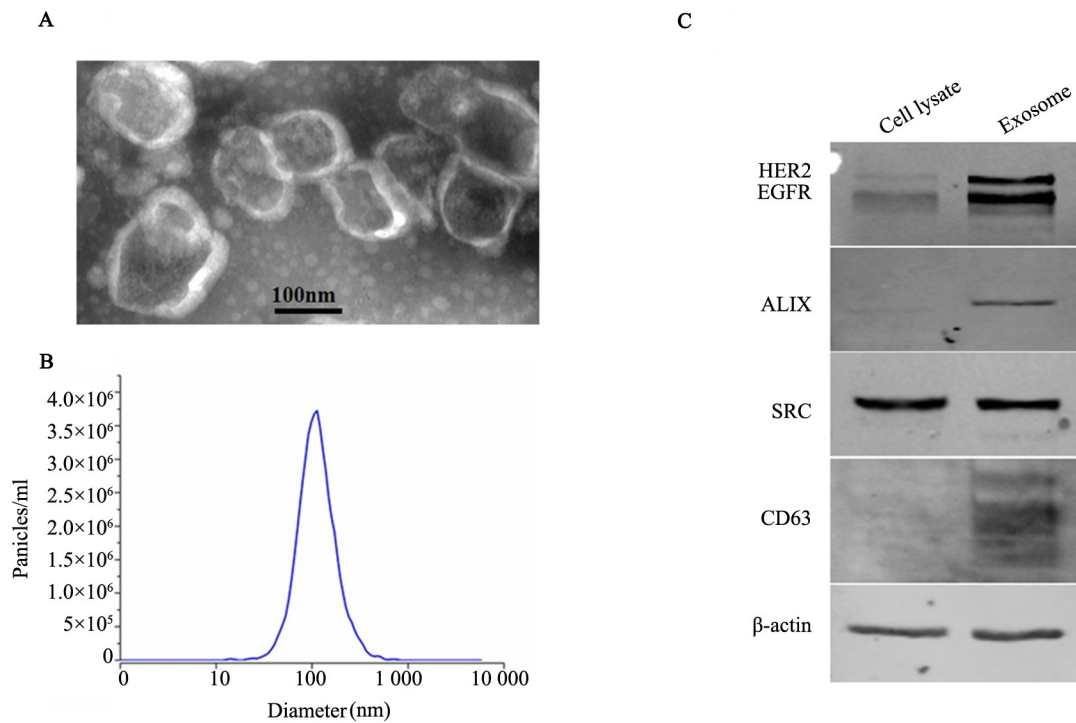
为了证明前列腺癌外泌体通过激活 EGFR 信号通路参与基质细胞 WPMY-1 的功能活化, 以 40 μ g/ml LNCaP-AI+F 外泌体作用 WPMY-1 细胞之后, Wb 检测结果(图 5)显示, 与 EGFR 和 ERK1/2 总蛋白相比, 外泌体处理后 pEGFR、pERK1/2 明显升高($P < 0.01$)。

3 讨论

肿瘤的发生和发展依赖于肿瘤细胞和肿瘤微环境中多种细胞之间动态的相互交流, 作为肿瘤微环境中重要的支持细胞, 基质细胞可以转化为肿瘤相关的成纤维细胞, 可以通过改变 ECM 的组分并促进 ECM 的转归, 促进肿瘤增殖、侵袭、血管新生以及远处转移的发生^[4]。外泌体携带了来自宿主细胞的

DNA、microRNA、mRNA、脂质以及蛋白质,可以通过与肿瘤基质之间的相互通讯,促进肿瘤转移的发生^[15]。接受了肿瘤细胞传递的信息后,基质细胞可以产生更多的诸如 SDF-1 α 、TGF- β 以及 S100A4 之类的炎症分子和生长因子,并高表达层黏连蛋白和基质金属蛋白酶^[16]。在前列腺癌的研究中,IRENE 等^[17]研究揭示了前列腺癌 LNCaP 和 PC3 细胞来源的外泌体包含多种蛋白,特别是 ITGA3 和 ITGB1,可以调控周围非恶性细胞的功能从而促进肿瘤进展;而 MCA-TEE 等^[18]研究证实,包含透明质酸酶 Hyal1 的前列腺癌细胞来源的外泌体可以通过激活 FAK 介导的整合素信号通路促进前列腺癌 WPMY-1 细胞的运动能力,而对其增殖能力并没有明显的影响。可见,以上

的研究都表明前列腺癌外泌体可以通过其内容物特别是蛋白成分使基质细胞分化为 CAF,调控转移微环境的形成,但这一作用可能与多种信号途径有关。前列腺癌中 EGFR 信号通路的活化与转移的发生密切相关,EGFR 及其下游 ERK1/2 信号通路的活化可以促进前列腺上皮细胞上皮间质转化的发生,从而获得肿瘤细胞的特征^[19],并且 EGFR-ERK 信号通路的激活可以促进前列腺癌成纤维细胞的表型转化,是前列腺癌进展中重要的异常活化的信号通路之一^[20-21],在前列腺癌的进展和转移发生过程中扮演着重要的角色。因此本研究旨在探究携带了宿主细胞信息的外泌体是否能够通过激活 EGFR-ERK1/2 的信号通路促进基质细胞 WPMY-1 的功能活化。



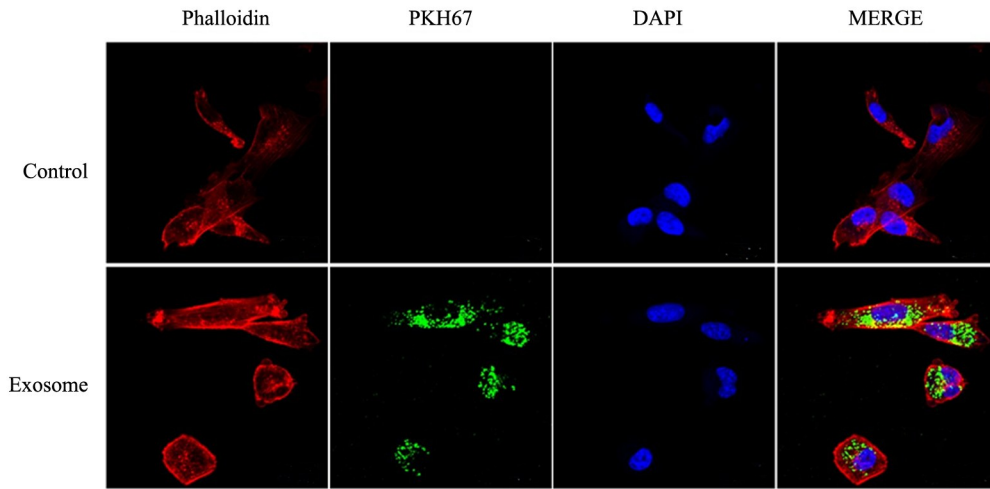
A: Electron microscopy of exosomes ($\times 100\ 000$); B: Zetaview image for particle size distribution
C: Identification of exosome proteins

图1 外泌体的分离鉴定及其相关蛋白表达水平

Fig.1 Isolation and characterization of exosomes and the expression of related proteins

本研究采用了经典的超速离心法,成功分离了前列腺癌细胞 LNCaP-AI+F 的外泌体,并且还鉴定出前列腺癌 LNCaP-AI+F 细胞来源的外泌体高表达 EGFR 与 HER2 蛋白,也表达 SRC 蛋白,表明这 3 种蛋白在前列腺癌进展中发挥至关重要的作用,与以前的研究^[22-23]相一致;本研究通过外泌体作用于基质细胞的功能研究,发现基质细胞可以大量摄取前列腺癌 LNCaP-AI+F 细胞来源的外泌体,并可以促进基质细胞的迁移和侵袭能力增强;此外,外泌体可以促进

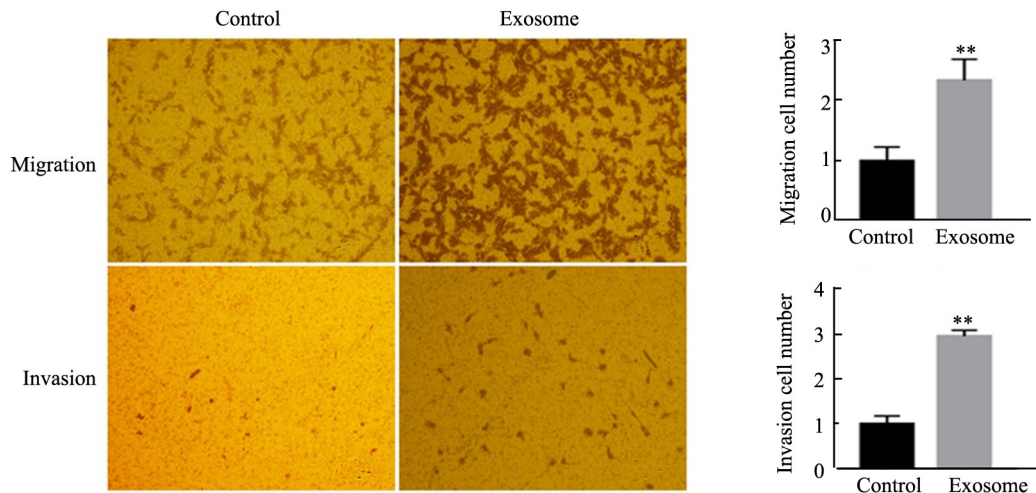
基质细胞包括 IL-8、PDGFB 以及 MMP9 多种 CAF 相关分子 mRNA 表达水平增高,IL-8 和 PDGFB 都是重要的促肿瘤血管生成因子,而 MMP9 是一种基质金属蛋白酶,可以选择性地降解基底膜的 IV 型胶原蛋白和层黏连蛋白,促进细胞外基质重塑^[24]。细胞信号内通路方面,外泌体可以促进基质细胞 EGFR 及其下游分子 ERK1/2 的磷酸化水平增高,激活 EGFR-ERK 信号通路。



Control group: Unstained exosome; Exosome group: Exosomes stained with PKH67
Phalloidin: Cytoskeleton stained with ghostpen cyclic peptide; PKH67: Fluorescent labeled exosomes; DAPI: Nucleus

图2 激光共聚焦实验检测 WPMY-1 细胞摄取 LNCaP-AI+F 外泌体情况(×80)

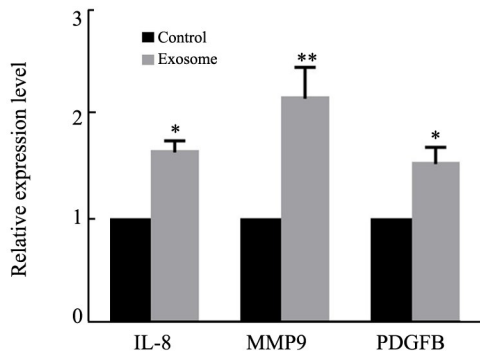
Fig.2 Detection of LNCaP-AI+F exosome uptake by WPMY-1 cells under laser confocal scanning(×80)



** $P < 0.01$ vs Control group

图3 Transwell 实验检测外泌体处理后 WPMY-1 细胞迁移和侵袭能力(×40)

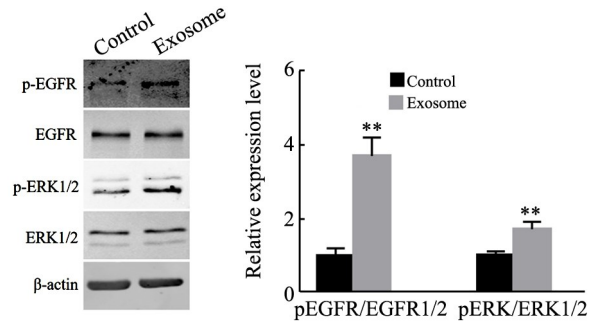
Fig.3 Transwell experiments to detect the migration and invasion ability of WPMY-1 cells co-cultured with exosomes(×40)



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Control group

图4 外泌体处理后对 IL-8、PDGFB 和 MMP9 mRNA 表达水平的影响

Fig.4 Effect of exosome treatment on the expression of IL-8, PDGFB and MMP9 mRNA in WPMY-1 cells



** $P < 0.01$ vs Control group

图5 外泌体处理对 EGFR 及 ERK1/2 磷酸化水平的影响
Fig.5 Effect of exosome treatment on the phosphorylation of pEGFR and ERK1/2 in WPMY-1 cells

综上所述,本研究证明前列腺癌细胞 LNCaP-AI+F 细胞来源的外泌体可以增强基质细胞 WPMY-1 迁移和侵袭能力,激活 EGFR-ERK1/2 信号通路并高表达多种 CAF 相关分子。但外泌体中引起基质细胞功能改变的具体分子机制及其相关信号通路的相互关系仍需进一步探讨和深入研究。

(致谢 诚挚感谢浙江大学医学院第二附属医院陶志华教授对本课题的大力支持和帮助!)

[参考文献]

- [1] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115-132. DOI: 10.3322/caac.21338 .
- [2] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2018[J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(1): 7-30. DOI: 10.3322/caac.21442.
- [3] HUSSAIN M, TANGEN C M, BERRY D L, et al. Intermittent versus continuous androgen deprivation in prostate cancer[J]. *N Engl J Med*, 2013, 368(14): 1314-1325. DOI: 10.1056/NEJMoa1212299.
- [4] SAAD F, GLEASON D M, MURRAY R, et al. Long-term efficacy of zoledronic acid for the prevention of skeletal complications in patients with metastatic hormone-refractory prostate cancer[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2004, 96(11): 879-882. DOI: 10.1093/jnci/djh141.
- [5] TARIN D, CROFT, C B. Ultrastructural features of wound healing in mouse skin[J]. *J Anat*, 1969, 105(Pt 1): 189-190.
- [6] TOMASEK J J, GABBIANI G, HINZ B, et al. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002, 3(5): 349-363. DOI: 10.1038/nrm809 .
- [7] PARSONAGE G, FILER A D, HAWORTH O, et al. A stromal address code defined by fibroblasts[J]. *Trends Immunol*, 2005, 26(3): 150-156. DOI: 10.1016/j.it.2004.11.014.
- [8] WEBBER J, STEADMAN R, MASON M D, et al. Cancer exosomes trigger fibroblast to myofibroblast differentiation[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(23): 9621-9630. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1722.
- [9] RINGUETTE GOULET C, BERNARD G, TREMBLAY S, et al. Exosomes induce fibroblast differentiation into cancer-associated fibroblasts through TGFbeta signaling[J]. *Mol Cancer Res*, 2018, 16(7): 1196-1204. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-17-0784.
- [10] THERY C, ZITVOGEL L, AMIGORENA S. Exosomes: composition, biogenesis and function[J]. *Nat Rev Immunol*, 2002, 2(8): 569-579. DOI: 10.1038/nri855.
- [11] BOBRIE A, COLOMBO M, KRUMEICH S, et al. Diverse subpopulations of vesicles secreted by different intracellular mechanisms are present in exosome preparations obtained by differential ultracentrifugation[J]. *J Extracell Vesicles*, 2016, 230 (112): 18397-18402. DOI: 10.3402/jev.v1i0.18397.
- [12] QUAIL D F, JOYCE J A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis[J]. *Nat Med*, 2013, 19(11): 1423-1437. DOI: 10.1038/nm.3394 .
- [13] THERY C, AMIGORENA S, RAPOSO G, et al. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids[J]. *Curr Protoc Cell Biol*, 2006, 3(3): 322-327. DOI: 10.1002/0471143030.cb0322s30.
- [14] KALLURI R, ZEISBERG M. Fibroblasts in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6(5): 392-401. DOI: 10.1038/nrc1877.
- [15] AZMI A S, BAO B, SARKAR F H. Exosomes in cancer development, metastasis, and drug resistance: a comprehensive review[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2013, 32(3/4): 623-642. DOI: 10.1007/s10555-013-9441-9.
- [16] YAMAMURA Y, ASAI N, ENOMOTO A, et al. Akt-Girdin signaling in cancer-associated fibroblasts contributes to tumor progression [J]. *Cancer Res*, 2015, 75(5): 813-823. DOI: 10.1158/0008-5472.can-14-1317.
- [17] BIJNSDORP I V, GELDOF A A, LAVAEI M, et al. Exosomal ITGA3 interferes with non-cancerous prostate cell functions and is increased in urine exosomes of metastatic prostate cancer patients[J]. *J Extracell Vesicles*, 2013, 23(2):374-377. DOI: 10.3402/jev.v2i0.22097.
- [18] MCATEE C O, BOOTH C, ELOWSKY C, et al. Prostate tumor cell exosomes containing hyaluronidase Hyal1 stimulate prostate stromal cell motility by engagement of FAK-mediated integrin signaling[J/OL]. *Matrix Biol*, 2018, pii: S0945-053X(17)30464-X[2018-11-09].<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0945053X1730464X>. DOI: 10.1016/j.matbio.2018.05.002.
- [19] MULHOLLAND D J, KOBAYASHI N, RUSCETTI M, et al. Pten loss and RAS/MAPK activation cooperate to promote EMT and metastasis initiated from prostate cancer stem/progenitor cells[J]. *Cancer Res*, 2012, 72(7): 1878-1889. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-3132.
- [20] RODRIGUEZ-NIEVES J A, PATALANO S C, ALMANZA D, et al. CXCL12/CXCR4 axis activation mediates prostate myofibroblast phenocconversion through non-canonical EGFR/MEK/ERK signaling[J/OL]. *PLoS One*, 2016, 11(7): e0159490[2018-11-19].<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27434301>. DOI: 10.1371/journal.pone.0159490.
- [21] STEWART J R, O'BRIAN C A. Protein kinase C-alpha mediates epidermal growth factor receptor transactivation in human prostate cancer cells[J]. *Mol Cancer Ther*, 2005, 4(5): 726-732. DOI: 10.1158/1535-7163.mct-05-0013.
- [22] DAY K C, LORENZATTI H G, KOZMINSKY M, et al. HER2 and EGFR overexpression support metastatic progression of prostate cancer to bone[J]. *Cancer Res*, 2017, 77(1): 74-85. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-16-1656.
- [23] DERITA R M, ZERLANKO B, SINGH A, et al. c-Src, insulin-like growth factor-I receptor, G-protein-coupled receptor kinases and focal adhesion kinase are enriched into prostate cancer cell exosomes [J]. *J Cell Biochem*, 2017, 118(1): 66-73. DOI: 10.1002/jcb.25611.
- [24] SHIGA K, HARA M, NAGASAKI T, et al. Cancer-associated fibroblasts: their characteristics and their roles in tumor growth[J]. *Cancers (Basel)*, 2015, 7 (4): 2443-2458. DOI: 10.3390/cancers7040902.

[收稿日期] 2018-12-06

[修回日期] 2019-02-01

[本文编辑] 王映红