

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2020.03.005

· 基础研究 ·

## 涎腺腺样囊性癌来源外泌体促进成纤维细胞 PD-L1 表达

郑星<sup>1</sup>, 徐征丽<sup>2</sup> (1. 海军军医大学 第三附属医院 口腔科, 上海 201800, 2. 海军军医大学 第一附属医院 口腔科, 上海 200433)

**[摘要]** **目的:** 研究涎腺腺样囊性癌 (salivary adenoid cystic carcinoma, SACC) 来源的外泌体 (exosome, EXO) 对成纤维细胞 PD-L1 分子表达的影响。**方法:** 通过 EXO 分离试剂盒提取 SACC-83 细胞系来源的外泌体并以电镜鉴定其颗粒大小、密度和表型; 使用 PKH67 荧光标记后将 EXO 与成纤维细胞 HPLF 共孵育, 以共聚焦显微镜观察 EXO 可否被 HPLF 细胞摄取; 将 EXO 与 HPLF 细胞共孵育后, 全转录组测序检测筛查该细胞中差异表达基因, GO 分析结合 KEGG 富集分析阐明差异表达基因涉及的生物学功能和相关信号通路; 使用 qPCR、Western blotting 和流式细胞术检测肿瘤 EXO 对 HPLF 细胞中 PD-L1、LAG3 和 IDO1 在 mRNA 与蛋白水平表达的影响。**结果:** SACC-83 细胞源 EXO 特异性表达 CD63、CD81 和 TSG101 分子, 并可被 HPLF 细胞内吞摄取; EXO 处理 HPLF 细胞后, 细胞中 PD-L1 分子显著上调表达 (Fold change=10.19), 差异基因显著富集于 TNF、NF- $\kappa$ B、cGAS-String 等免疫反应信号通路; 体外实验证明 EXO 可以从 mRNA 和蛋白水平显著促进 HPLF 细胞中 PD-L1 的表达 ( $24.7 \pm 4.75$  vs  $1.03 \pm 0.11$ ,  $P < 0.05$ )。**结论:** 涎腺腺样囊性癌 SACC-83 细胞来源 EXO 可以促进 HPLF 细胞中免疫检查点配体 PD-L1 的表达。

**[关键词]** 涎腺腺样囊性癌; SACC-83 细胞; 肿瘤微环境; 癌症相关成纤维细胞; HPLF 细胞; 外泌体; PD-L1

**[中图分类号]** R730.3; R739.8 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2020)03-0242-07

## Exosomes from salivary adenoid cystic carcinoma promote the expression of PD-L1 in fibroblasts

ZHENG Xing<sup>1</sup>, XU Zhengli<sup>2</sup> (1. Department of Stomatology, the Third Affiliated Hospital of Naval Medical University, Shanghai 201800, China; 2. Departments of Stomatology, the First Affiliated Hospital of Naval Medical University, Shanghai 200433, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of salivary adenoid cystic carcinoma (SACC) derived exosomes on PD-L1 expression in fibroblasts. **Methods:** Exosomes of SACC-83 cell line were extracted by exosome isolation kit, and its particle size, density and phenotypes were identified by electron microscope. After being labeled with PKH67 fluorescence, exosomes were co-incubated with HPLF to observe whether the exosomes could be ingested by fibroblasts under confocal microscope. After co-incubation with the exosomes, the differentially expressed genes (DEGs) in HPLF cells were detected by whole transcriptome sequencing. GO analysis together with KEGG enrichment analysis was used to clarify the biological functions and related signaling pathways related with the DEGs. qPCR, Western blotting and Flow cytometry were used to detect the effect of tumor exosomes on the mRNA and protein expressions of PD-L1, LAG3 and IDO1 in HPLF fibroblasts. Results: SACC exosomes specifically expressed CD63, CD81 and TSG101 molecules, and could be ingested by fibroblasts. After the treatment of fibroblasts by exosomes, the expression of PD-L1 molecule was significantly up-regulated (Fold change=10.19), and the DEGs were significantly enriched in the immune response signaling pathways, such as TNF, NF- $\kappa$ B and cGAS-String pathway, etc. In vitro experiments showed that exosomes could significantly promote the expression of PD-L1 in HPLF cells at both mRNA and protein levels ( $24.7 \pm 4.75$  vs  $1.03 \pm 0.11$ ,  $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Exosomes of SACC can promote the expression of immunotherapy ligand PD-L1 in fibroblasts.

**[Key words]** salivary adenoid cystic carcinoma (SACC); SACC-83 cell; cancer-related fibroblast; HPLF cell; exosome; PD-L1

[Chin J Cancer Biother, 2020, 27(3): 242-247. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2020.03.005]

涎腺腺样囊性癌 (salivary adenoid cystic carcinoma, SACC) 是病死率非常高的上皮性肿瘤, 估计发病率为 0.5~2.5/10 万, 女性发病率略高于男性 (60% vs 40%)<sup>[1-2]</sup>。涎腺恶性肿瘤的恶性生物学表型临床表现特点是肿瘤局部侵袭性生长、易侵入脉管形成远处转移、广泛的神经周围浸润 (perineural invasion,

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目 (No.81602497)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No.81602497)

**[作者简介]** 郑星 (1989-), 男, 住院医师, 主要从事口腔肿瘤相关研究, E-mail:zx1443@126.com

**[通信作者]** 徐征丽 (1981-), 女, 博士, 主治医师。主要从事口腔肿瘤病理相关研究, E-mail:86732153@qq.com

PNI)和高转移率,其5、10和15年生存率分别为90%、80%、69%<sup>[3]</sup>。

外泌体(exosome, EXO)是一种直径为40~100 nm胞外囊泡,可以通过运输蛋白质和RNA等介导细胞间的通信<sup>[4]</sup>。大量的研究<sup>[5-12]</sup>表明,肿瘤微环境中EXO不仅参与了细胞迁移、血管新生和细胞增殖等肿瘤生物学过程,同时也通过细胞间通讯参与到肿瘤微环境形成过程,使肿瘤细胞周围逐步发生免疫监视钝化,形成适合肿瘤细胞生长、侵袭、转移的微环境。

肿瘤相关成纤维细胞(cancer-associated fibroblast, CAF)是微环境构成的重要成员<sup>[13]</sup>。研究<sup>[14-16]</sup>表明,CAF多分布于肿瘤侵袭前沿、肿瘤-间质界面或肿瘤间质中靠近肿瘤血管的部位,是肿瘤-宿主界面最主要的细胞,具有促进肿瘤生长、侵袭并诱导免疫抑制的功能。

关于SACC与CAFs之间如何通过EXO途径发生细胞间通信鲜有报道,本课题通过观察SACC来源的EXO引起正常成纤维细胞向CAF转变,可为进一步探求SACC嗜神经侵袭的机制提供分子生物学的实验依据。本研究提取并鉴定了SACC-83细胞株来源的EXO,并检测了成纤维细胞HPLF对该EXO的摄取作用;通过转录组测序阐明EXO对成纤维细胞的生物学作用;并在体外实验中证明EXO可以从mRNA和蛋白水平显著促进HPLF细胞中PD-L1的表达,阐明SACC通过EXO途径介导微环境免疫抑制的新途径。本课题的研究可能为探索涎腺腺样囊性癌的发病机制及临床诊断、治疗提供新的思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

人SACC细胞株SACC-83和成纤维细胞系HPLF分别购自上海晶康生物与上海子实生物公司,并经支原体检测与短串联重复序列标记技术鉴定。胎牛血清、DMEM培养基与青链霉素购自Gibco公司,EXO分离试剂盒购自ThermoFisher公司,荧光标记PKH67购自Sigma公司,TRIzol<sup>®</sup> modified Ultrapure RNA试剂盒购自北京康成生物工程公司,SuperScriptII逆转录酶与SYBR Green PCR Master Mix购自TaKaRa公司。

### 1.2 细胞培养与EXO分离和荧光标记

人SACC细胞株SACC-83和成纤维细胞株HPLF均使用含10%胎牛血清及1%青链霉素的高糖DMEM培养基(37℃、5% CO<sub>2</sub>)培养。采用ThermoFisher公司的细胞液EXO抽提试剂盒(#4478359)分离SACC-83细胞株EXO,使用ZetaView纳米颗粒跟踪分析仪检测EXO的大小和颗粒密度,通过Sigma公司的PKH67(cat. no. PKH67GL)按照说明书进行绿

色荧光标记。

### 1.3 SACC-83来源EXO的电镜鉴定

新鲜分离的EXO重悬在2%多聚甲醛中4℃过夜,然后固定在formvar碳包覆铜网上,利用2%戊二醛固定5 min,经无菌蒸馏水中清洗、干燥后,在JEOL JEM-1010透射电镜下进行观察。

### 1.4 共聚焦荧光显微镜观察HPLF细胞对EXO摄取

HPLF细胞与不同质量(0、25、50和75 μg)PKH67标记的EXO孵育不同的时间(0、3、6和9 h),细胞核用DAPI染色,然后在4%多聚甲醛中室温下固定10 min,最后在LSM510共聚焦显微镜下观察细胞摄取EXO的情况。

### 1.5 EXO处理后HPLF细胞的全转录组测序与数据分析

HPLF细胞经PBS或SACC-83来源EXO处理后抽提总RNA,通过BGISEQ-500平台构建cDNA文库测序,数据进行质控合格后,调用Bowtie程序与参考基因组比对,进行基因定量分析及基于基因表达水平的各项分析(主成分、相关性、差异基因筛选等),并对筛选出的样品间差异表达基因进行GO功能显著性富集分析、KEGG pathway显著性富集分析和聚类分析。

### 1.6 qPCR检测EXO处理后HPLF细胞中PD-L1 mRNA和LAG3 mRNA的表达水平

SACC-83来源的EXO处理HPLF细胞后,抽提细胞的总RNA,用SuperScriptII逆转录酶按说明书合成cDNA,在StepOnePlus<sup>™</sup>Real-time PCR仪上利用SYBR Green PCR Master mix运行qPCR,分析基因的mRNA表达水平。引物由Invitrogen公司合成,序列如下:人PD-L1, TGCCGACTACAAGCGAATTACTG、CTGCTTGTC-CAGATGACTTCGG;人LAG3, GCAGTGTACTTCACAGAGCTGTC、AAGCCAAAGGCTCCAGTCACCA;人IDO1, GCCTGATCTCATAGAGTCTGGC、TGCATCCCAGAACTAGACGTGC。

### 1.7 Western blotting检测EXO处理后HPLF细胞中相关蛋白的表达水平

HPLF细胞用含蛋白酶抑制剂的RIPA裂解液(50 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl, 1% Triton X-100, 1% 脱氧胆酸钠, 0.1% SDS)进行裂解,BCA方法定量,取15 μg蛋白行SDS-PAGE,转膜到PVDF膜上,在含0.1% Tween 20的5%脱脂奶粉中室温封闭至少2 h后,加一抗(CD63抗体、CD81抗体、TSG101抗体,均稀释1 000倍)4℃过夜,加二抗(HRP标记的羊抗兔抗体,稀释10万倍)室温孵育1 h,经Immobilon ECL Ultra Western HRP Substrate(EMD Millipore)试剂显色观察条带并进行半定量分析。

### 1.8 流式细胞术检测EXO处理后HPLF细胞PD-L1表达水平

SACC-83细胞来源的EXO处理HPLF细胞24 h后,用FITC标记的抗人PD-L1的抗体(Biolegend公司)染色HPLF细胞,然后用BD FACSCanton流式细胞仪检测细胞表面PD-L1的表达。

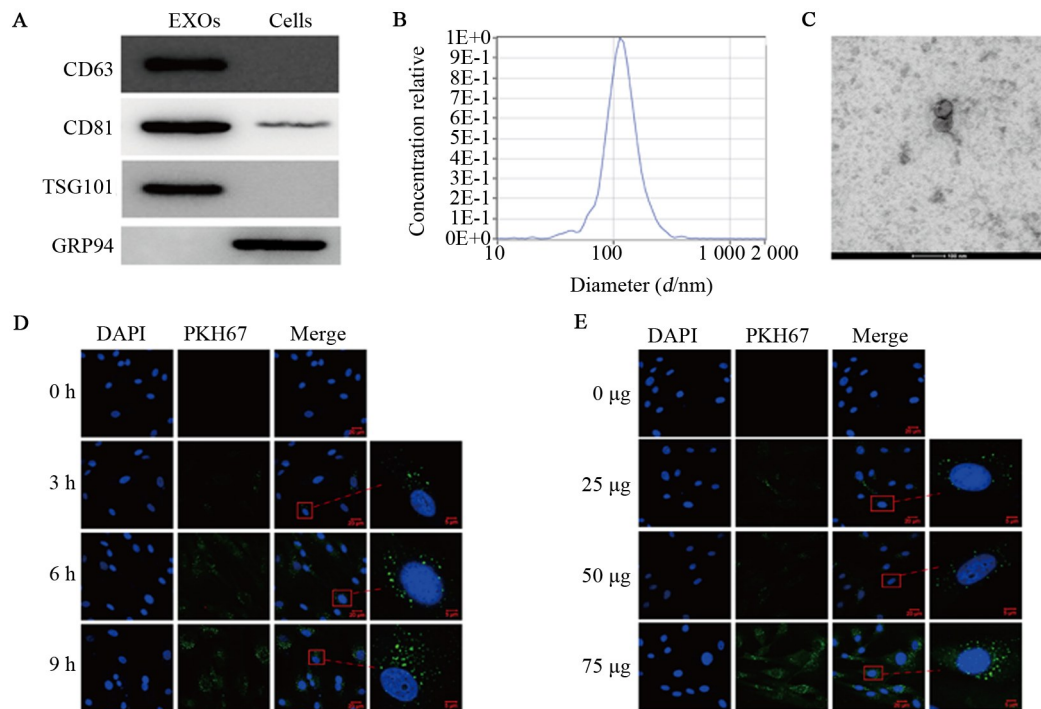
### 1.9 统计学处理

采用统计学软件为Graphpad Prism(v7.00版),所有实验至少重复3次,正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用t检验分析比较两组之间的差异, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 SACC-83来源的EXO能够被成纤维细胞HPLF内吞

使用试剂盒分离SACC-83细胞培养上清的EXO,Western blotting检测EXO表达特异性标志物,发现EXO表达CD63、CD81和TSG101,不表达GRP94(图1A)。纳米颗粒跟踪分析仪检测EXO的直径为100~150 nm(图1B,C),颗粒密度为 $8.2 \times 10^{10}/\text{ml}$ (透射电镜80 kV电压下观察并摄片记录)。荧光染料PKH67标记EXO后与HPLF细胞共孵育3、6和9 h,共聚焦显微镜( $\times 630$ )检测细胞绿色荧光量,结果表明EXO以时间依赖的形式被HPLF细胞内吞,随着时间的延长,HPLF细胞中的EXO也增多。如图1D所示,孵育9 h后,HPLF细胞中的荧光小体数量最多。同时,这些EXO进入HPLF细胞也与剂量有关,随着剂量的增加,HPLF细胞的EXO也增多,如图1E所示,当75  $\mu\text{g}$ 的EXO孵育HPLF细胞6 h后,HPLF细胞中的荧光小体数量最多。



A: Western blotting was used to the expression of EXO markers; B, C: The diameter of EXO was examined by electron microscopy( $\times 100\ 000$ ); D: The endocytosis of HPLF was detected at different time points after co-incubation of EXO and LPLF cells ( $\times 630$ ); E: The endocytosis of HPLF to EXOs of different concentrations was detected by confocal laser ( $\times 630$ )

图1 SACC-83细胞来源EXO与HPLF细胞内吞EXO能力的鉴定

Fig.1 Identification of SACC-83 cell derived exosomes and endocytosis of HPLF cells

### 2.2 SACC-83来源的EXO对成纤维细胞HPLF生物学功能和相关信号通路的影响

为了解SACC-83细胞来源的EXO对HPLF细胞的作用,实验对EXO处理后的细胞进行全转录组测序,测序结果表明,对照组和EXO处理组HPLF细胞共同表达的基因有16 655个,对照组有519个特异表达的基因,EXO处理组有474个特异表达的基因;两组间有943个基因的表达水平出现两倍以上差异

(图2,红色代表上调基因,蓝色代表下调基因)。对差异基因进行GO富集分析,发现细胞因子、细胞因子受体结合以及细胞因子介导的信号通路涉及的差异基因显著富集(图3A)。KEGG通路分析发现差异基因主要分布于7个通路,包括细胞过程、环境信息处理、遗传信息处理、人类疾病、代谢、有机系统和药物开发,其中涉及信号转导和免疫系统通路的差异基因最多(图3B);其中,与肿瘤免疫抑制与逃逸相关

的基因在肿瘤来源EXO处理的成纤维细胞HPLF中显著上调(表1),特异性活化负调控免疫检查点的配体分子PD-L1显著上调(Fold change=10.19),此外其他免疫抑制基因如LAG3(Fold change=6.564)、IDO1(Fold change=7.03)在EXO处理的HPLF细胞也显著上调。

### 2.3 SACC-83来源的EXO上调HPLF细胞中PD-L1的表达

进一步从基因和蛋白水平验证全转录组测序的结果,qPCR结果(图3A)显示,SACC来源的EXO能够显著上调HPLF细胞中PD-L1、LAG3和IDO1的表达;Western blotting结果(图4B)证实PD-L1蛋白水平在升高,同样,流式细胞检测数据(图4C)也显示,EXO处理后HPLF细胞上PD-L1的表达升高。

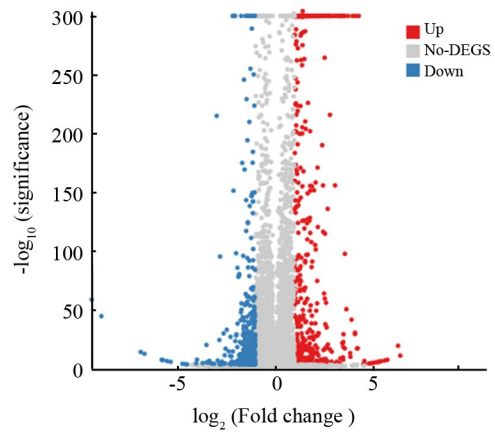


图2 SACC-83来源EXO处理后HPLF细胞的转录组测序火山图展示的差异基因

Fig.2 Differentially expressed genes in HPLF cells after the treatment of SACC-83 cell derived EXOs displayed by volcano map of transcriptome sequencing

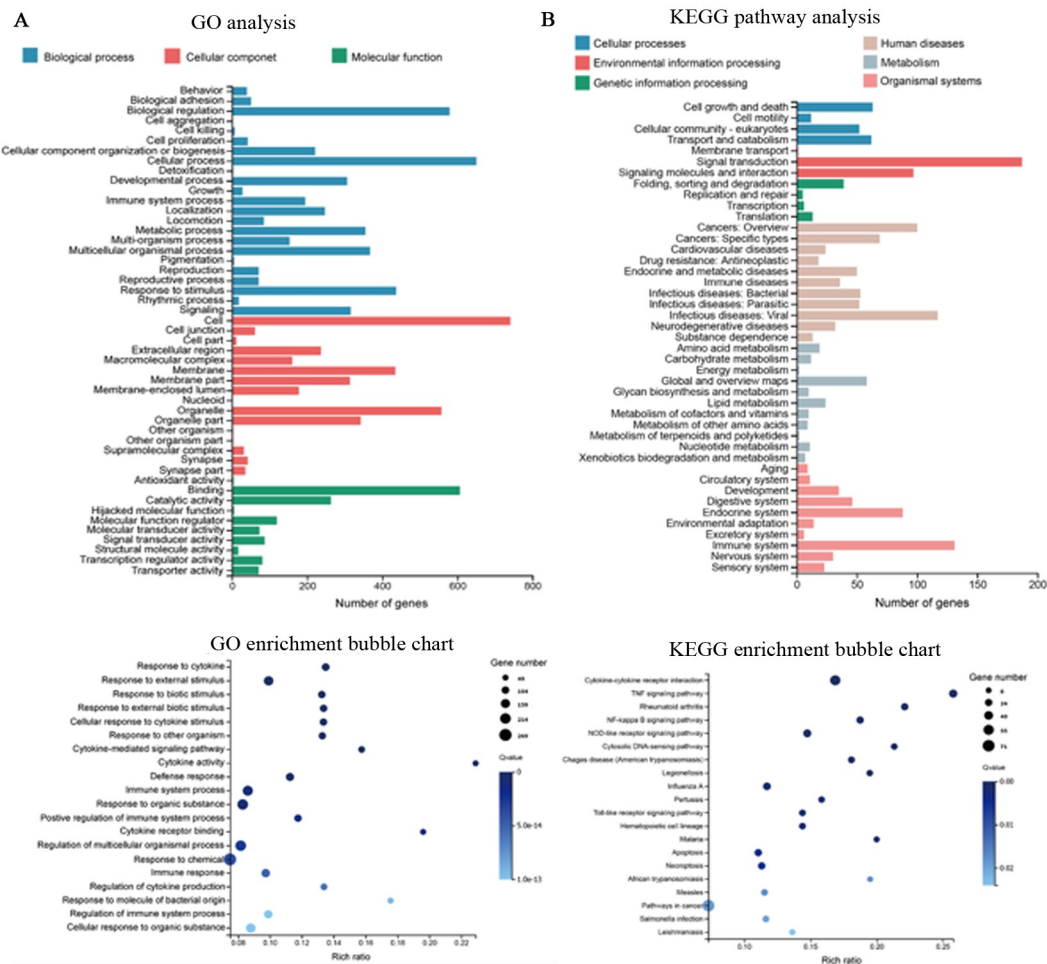


图3 SACC-83来源EXO处理后HPLF细胞的转录组测序和对差异基因GO富集分析(A)与KEGG pathway分析(B)  
Fig.3 GO enrichment analysis (A) and KEGG pathway analysis (B) of DEGs in HPLF cells treated with SACC-83 cell derived EXOs

### 3 讨论

SACC是一种罕见的恶性头颈部肿瘤,具有局部侵袭性生长、易侵入脉管形成远处转移、广泛的神经周围

浸润和高转移率等特点,然而,其恶性行为的生物机制仍不清楚。肿瘤微环境对肿瘤的生物行为影响巨大,不仅为肿瘤细胞的生长提供了必须的营养物质与生长因子,还为肿瘤细胞的免疫逃逸提供了“庇护所”。微

环境中的肿瘤细胞通过与其周围各种细胞的直接和间接作用,形成了独特的抑制性肿瘤微环境,最终促进了

肿瘤的恶性生物学表型,不仅逃避了免疫系统的攻击,也使临床治疗效果大打折扣。

表1 肿瘤来源EXO处理后HPLF细胞中表达水平上调的基因  
Tab.1 Up-regulated genes in HPLF cells after the treatment of tumor-derived EXOs

Up-regulation gene =	ID	Fold change	Up-regulation gene	ID	Fold change
ACOD1	730249	107.67	CACNA1I	8911	9.75
KLF14	136259	21.77	CXCL8	3576	9.68
CXCL11	6373	19.49	BIRC3	330	9.63
CCL3L3	414062	18.34	RORB	6096	9.30
RCSD1	92241	17.69	SELE	6401	9.23
RSAD2	91543	17.48	C3orf36	80111	9.15
CCL3L1	6349	17.20	CLDN14	23562	8.96
CCL3	6348	17.02	RSPO3	84870	8.54
NEURL3	93082	16.33	TNFSF13B	10673	8.48
PCDH17	27253	16.00	C11orf96	387763	8.42
CXCL10	3627	15.60	THEMIS2	9473	8.29
PAX5	5079	14.60	OR52K2	119774	7.67
OASL	8638	13.88	IFNB1	3456	7.47
AIM2	9447	13.33	SERPINB4	6318	7.42
LMO2	4005	13.13	ESM1	11082	7.19
TNFSF10	8743	12.08	TRAF1	7185	7.13
GCH1	2643	11.52	TNFAIP6	7130	7.05
PIK3AP1	118788	11.08	IDO1	3620	7.03
CSF2	1437	10.80	BATF2	116071	7.02
IL22RA1	58985	10.75	ADORA2A	135	7.00
IFIT2	3433	10.71	BTC	685	6.78
CMPK2	129607	10.64	ASPHD2	57168	6.76
ISG20	3669	10.42	LAG3	3902	6.56
HES7	84667	10.40	CEACAM1	634	6.49
CSF3	1440	10.31	TMEM171	134285	6.47
IL36G	56300	10.26	IL1RN	3557	6.43
PD-L1	29126	10.19	IL11	3589	6.40
SERPINA9	327657	10.15	BCL2A1	597	6.32
GBP4	115361	10.15	CYP2J2	1573	6.25
XIRP1	165904	9.87	PTGER2	5732	6.24

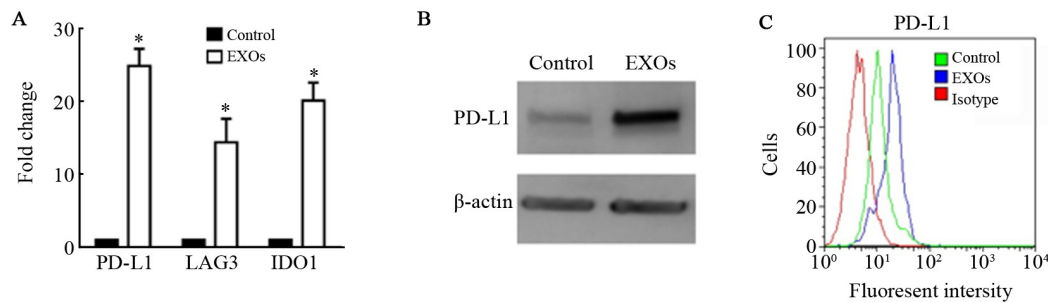


图4 SACC-83来源的EXO上调HPLF细胞中PD-L1表达的体实验证

Fig.4 *In vitro* verification of the up-regulation of PD-L1 expression in HPLF cells by SACC-83 cell derived exosomes

免疫检查点在肿瘤生长和转移的基质调节中的作用是一个活跃的研究领域,免疫检查点的表达对肿瘤微环境的影响巨大。尽管PD-L1已经被证明可以在成纤维细胞上表达,并影响了肿瘤的恶性生物学行为<sup>[17]</sup>。但PD-L1在CAF中被诱导表达的机制尚缺乏研究。本研究发现SACC细胞可以通过EXO途径促进PD-L1在CAF中的表达,这一发现为SACC的恶性生物学行为提供了一种解释,即SACC可以通

过EXOs促进微环境中PD-L1的表达,进一步加强微环境的免疫抑制,促进了T细胞的耐受和逃避宿主免疫。

研究中通过PKH67荧光标记的EXO与成纤维细胞HPLF共孵育,在荧光共聚焦显微镜下观察证实了SACC-83来源的EXO能够被成纤维细胞HPLF摄取。EXO作为细胞间物质交换的重要载体,具有脂质双层膜结构,其中包含DNA、RNA、蛋白质、脂质等多种生物活性成分。成纤维细胞HPLF摄取肿瘤来

源EXO后,包括PD-L1、LAG3等免疫检查点在内的多种基因表达显著上调<sup>[18-20]</sup>。随着肿瘤免疫研究的深入,证明了PD-L1是负向调节T细胞激活的关键蛋白,肿瘤微环境中PD-L1的高表达在肿瘤的进展和免疫逃逸中发挥重要作用。PD-L1作为配体有效抑制了T细胞对肿瘤细胞的杀伤。目前针对PD-L1靶点的抗体性药物Tecentrig(罗氏公司)、Imfinzi(阿斯利康公司)已经用于膀胱癌及晚期转移性肿瘤的治疗;针对PD-1的抗体性药物特瑞普利单抗(君实生物)、帕博丽珠单抗(默沙东)等用于治疗黑色素瘤、非小细胞性肺癌等肿瘤的治疗,并且取得了一定疗效。本研究证明了SACC-83来源的EXO促进了成纤维细胞中PD-L1、LAG3等的表达,将成为SACC促进肿瘤微环境中免疫逃逸的重要影响因素,如果能够针对此过程进行干预可通过多靶点激活抗肿瘤免疫应答,为SACC肿瘤患者提供新的治疗思路。

本研究发现SACC-83分泌的EXO能够被成纤维细胞HPLF内吞,全转录组测序技术结果表明,该EXO能够促进HPLF细胞炎症相关因子、趋化因子及相关受体的表达增高,特别地,涉及肿瘤免疫抑制及逃逸的重要分子(包括PD-L1、LAG3和IDO1等)都显著升高,同时又进一步在基因和蛋白水平进行了验证。本研究的结果将为研究EXO、肿瘤及CAF之间的联系提供了新的证据,从而揭示了SACC进展中的关键生物学事件和新的诊治靶点。

#### [参考文献]

- [1] ELLINGTON C L, GOODMAN M, KONO S A, et al. Adenoid cystic carcinoma of the head and neck: Incidence and survival trends based on 1973-2007 surveillance, epidemiology, and end results data[J]. *Cancer*, 2012, 118(18): 4444-4451. DOI:10.1002/cncr.27408.
- [2] VENTEICHER A S, WALCOTT B P, SHETH S A, et al. Clinical features of brain metastasis from salivary gland tumors[J]. *J Clin Neurosci*, 2013, 20(11): 1533-1537. DOI:10.1016/j.jocn.2012.11.024.
- [3] HO A S, KANNAN K, ROY D M, et al. The mutational landscape of adenoid cystic carcinoma[J]. *Nat Genet*, 2013, 45(7): 791-798. DOI: 10.1038/ng.2643.
- [4] CHE Y, GENG B, XU Y, et al. Helicobacter pylori-induced exosomal MET educates tumour-associated macrophages to promote gastric cancer progression[J]. *J Cell Mol Med*, 2018, 22(11): 5708-5719. DOI:10.1111/jcmm.13847.
- [5] CIARDIELLO C, CAVALLINI L, SPINELLI C, et al. Focus on extracellular vesicles: new frontiers of cell-to-cell communication in cancer[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(2): 175-187. DOI: 10.3390/ijms17020175.
- [6] PEINADO H, LAVOTSHKIN S, LYDEN D. The secreted factors responsible for pre-metastatic niche formation: old sayings and new thoughts[J]. *Semin Cancer Biol*, 2011, 21(2): 139-146. DOI:10.1016/j.semcancer.2011.01.002.
- [7] RATAJCZAK J, WYSOCZYNSKI M, HAYEK F, et al. Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication[J]. *Leukemia*, 2006, 20(9): 1487-1495. DOI:10.1038/sj.leu.2404296.
- [8] VAN DER POL E, BOING A N, HARRISON P, et al. Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles[J]. *Pharmacol Rev*, 2012, 64(3): 676-705. DOI:10.1124/pr.112.005983.
- [9] BECKER A, THAKUR BK, WEISS JM, et al. Extracellular vesicles in cancer: cell-to-cell mediators of metastasis[J]. *Cancer Cell*, 2016, 30(6): 836-848. DOI:10.1016/j.ccell.2016.10.009.
- [10] ZHANG H, DENG T, LIU R, et al. Exosome-delivered EGFR regulates liver microenvironment to promote gastric cancer liver metastasis[J]. *Nat Commun*, 2017, 8(15016): 1: 11. DOI: 10.1038/ncomms15016.
- [11] 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.
- [12] LENER T, GIMONA M, AIGNER L, et al. Applying extracellular vesicles based therapeutics in clinical trials-an ISEV position paper [J]. *J Extracell Vesicles*, 2015, 4(30087): 1-31. DOI: 10.3402/jev.v4.30087.
- [13] RICHARDS K E, ZELENIAK A E, FISHEL M L, et al. Cancer-associated fibroblast exosomes regulate survival and proliferation of pancreatic cancer cells[J]. *Oncogene*, 2017, 36(13): 1770-1778. DOI:10.1038/onc.2016.353.
- [14] FONG MY, ZHOU W, LIU L, et al. Breast-cancer-secreted miR-122 reprograms glucose metabolism in premetastatic niche to promote metastasis[J]. *Nat Cell Biol*, 2015, 17(2): 183-194. DOI: 10.1038/ncb3094.
- [15] ANDREU Z, YANEZ-MO M. Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function[J]. *Front Immunol*, 2014, 5(442): 1-12. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00442.
- [16] FONG MY, ZHOU W, LIU L, et al. Breast-cancer-secreted miR-122 reprograms glucose metabolism in premetastatic niche to promote metastasis[J]. *Nat Cell Biol*, 2015, 17: 183-194. DOI: 10.1038/ncb3094.
- [17] KYTHREOTOU A, SIDDIQUE A, MAURI F A, et al. PD-L1[J]. *J Clin Pathol*, 2018, 71(3): 189-194. DOI:10.1136/jclinpath-2017-204853.
- [18] WANG J, SANMAMED M F, DATAR I, et al. Fibrinogen-like protein 1 is a major immune inhibitory ligand of LAG-3[J]. *Cell*, 2019, 176(1/2): 334-347 e312. DOI:10.1016/j.cell.2018.11.010.
- [19] LINO A C, DANG V D, LAMPROPOULOU V, et al. LAG-3 inhibitory receptor expression identifies immunosuppressive natural regulatory plasma cells[J]. *Immunity*, 2018, 49(1): 120-133 e129. DOI: 10.1016/j.immuni.2018.06.007.
- [20] ZHAI L, LADOMERSKY E, LENZEN A, et al. IDO1 in cancer: a Gemini of immune checkpoints[J]. *Cell Mol Immunol*, 2018, 15(5): 447-457. DOI:10.1038/cmi.2017.143.

[收稿日期] 2019-12-28

[修回日期] 2020-02-22

[本文编辑] 韩丹