

胞外囊泡表面糖缀合物研究进展*

徐晓强 郭佳 关锋**

(江南大学糖化学与生物技术教育部重点实验室, 无锡 214122)

通讯作者简介

关锋, 男, 西北大学生命科学学院教授, 博士生导师. 先后师从于中国科学院院士李季伦教授和美国科学院院士 Sen-itiroh Hakomori 教授. 曾任江南大学生物工程学院教授, 糖化学与生物技术教育部重点实验室课题组长. 从事糖生物学研究已有 10 年时间, 研究方向集中在“基于组学技术的糖生物学功能”. 课题组已建立系统的糖组学和糖蛋白质组学研究方法, 综合基因芯片、凝集素芯片和质谱等技术挖掘乳腺癌和膀胱癌等多种癌症特征性表达的糖链和糖蛋白, 并阐释糖链的生物学功能及其调控的分子机制. 近年来主持国家自然科学基金 2 项、省自然科学基金 2 项; 获得陕西省百人计划(2017), 江苏省双创人才(2014), 江苏省“六大人才高峰”(2013)等称号. 在 *PNAS*, *The FASEB Journal*, *Journal of Proteome Research*, *Oncotarget*, *BBA-General Subjects*, *International Journal of Nanomedicine*, *Process Biochemistry* 等期刊发表 SCI 论文 30 多篇, 获得授权专利 2 项.

摘要 胞外囊泡(extracellular vesicles, EVs)是一类由细胞分泌到胞外的能够被受体细胞摄取的膜性囊泡小体, 直径在 20~1 000 nm. 近年来, 越来越多的研究者发现胞外囊泡在疾病诊断、预后评估以及药物递送等方面具有重要的生物学作用. 胞外囊泡可以直接参与细胞间信息的传递以及物质的运输, 其携带的核酸(mRNA, microRNA 和 lncRNA)和蛋白质可以影响受体细胞的生理状态. 大量研究表明, 胞外囊泡是被糖基化修饰的, 胞外囊泡表面覆盖了大量的聚糖以及糖结合蛋白, 而已知聚糖类物质在调控细胞黏附、细胞-细胞之间的信息传递、细胞和细胞外基质相互作用、免疫调节和肿瘤转移等方面发挥重要的作用. 本文综述了近年来细胞外囊泡表面糖缀合物修饰的前沿研究, 以期更好地理解聚糖在胞外囊泡的合成、释放以及运输过程及其生物学功能中的作用.

关键词 胞外囊泡, 外泌体, 糖缀合物, 疾病诊断

学科分类号 Q81

DOI: 10.16476/j.pibb.2017.0257

1 胞外囊泡

1.1 胞外囊泡的形成与分类

自 2013 年科学家詹姆斯 E. 罗斯曼等三人因揭示囊泡传输系统的奥秘而获得诺贝尔生理学或医学奖以来, 胞外囊泡(extracellular vesicles, EVs)的研究已经成为生命科学研究的热门领域. 胞外囊泡具有双层脂质结构(图 1), 广泛分布于血液、尿液、腹水和脑脊液等多种体液以及体外培养细胞的上清液中. 根据来源可以将胞外囊泡分为不同的亚群, 包括外泌体(exosomes)、微泡(microvesicles)和凋亡小体(apoptosis body)等^[1-3](表 1). 在晚期核内体(late endosome)中形成的由多泡体释放的囊泡被称为外

泌体; 而由细胞质膜通过出芽方式产生的囊泡则被称为微泡; 胞膜皱缩内陷分割包裹胞质、DNA 及细胞器形成的泡状小体则称为凋亡小体. 胞外囊泡的组成成分主要有核酸、蛋白质、脂质和糖类物质. 目前主流研究囊泡的数据库有胞外囊泡数据库(EVpedia)^[4]、外泌体数据库(ExoCarta)^[5], 这些数据库中收集了研究者在囊泡中鉴定到的核酸和蛋白质等信息, 挖掘这些数据库信息有助于阐明这些复杂的胞外细胞器的新功能.

* 国家自然科学基金资助项目(81672537).

** 通讯联系人.

Tel: 0510-85918126, E-mail: fengguan@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2017-07-05, 接受日期: 2017-08-29

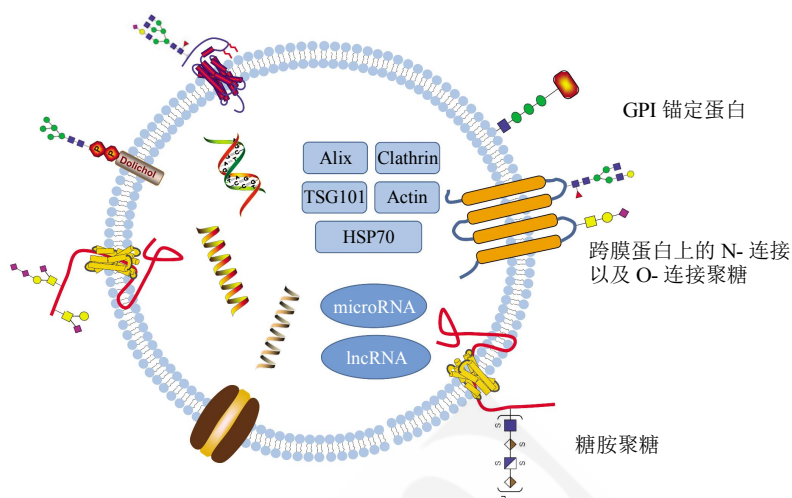


Fig. 1 Structure of extracellular vesicles

图 1 胞外囊泡结构图

Table 1 Classification of extracellular vesicles

表 1 胞外囊泡分类

	粒径	内含物	分子标记物	文献
外泌体	30~100 nm	信使 RNA、小 RNA、非编码 RNA; 胞质蛋白、膜蛋白	跨膜四蛋白家族	[1]
微泡	100 nm~1 μm	信使 RNA、小 RNA、非编码 RNA、胞浆蛋白	整合素、选择素、CD40 配体	[3]
凋亡小体	500~2 000 nm	核蛋白、细胞器	组蛋白 H3	[2]

1.2 囊泡的富集与鉴定

目前较为成熟的提取胞外囊泡的方法有密度梯度离心^[6]、超速离心^[7]、超滤^[8]、聚乙二醇沉淀^[9]和试剂盒提取^[10]等(表 2)。这些方法各有利弊,密度梯度离心法和差速离心法是目前运用最广泛的方法,但也存在很大的局限,例如前期准备工作繁杂、无法兼顾产量和纯度、需要准备大量的初始样品等。总体来讲,囊泡的纯化是一个繁琐耗时的过程,目前已知的分离纯化方法中尚没有一种策略能够完全实现囊泡的高纯度高回收率富集,如何尽量避免囊泡纯化过程中杂蛋白的污染也是研究的关键

Table 2 Methods used in extraction of extracellular vesicles

表 2 囊泡提取方法分类

提取方法	优缺点	文献
密度梯度离心	纯度高、操作复杂、费时、产量低	[6]
超速离心	操作相对复杂、费时、产量一般	[7]
超滤	成本低、纯度低、通量大、适合临床样本	[8]
聚乙二醇沉淀	产量高、操作简便、纯度低	[9]
试剂盒(SBI Thermo Qiagen 等)	操作简便、产量高、价格昂贵	[10]

因素。对于纯化得到的胞外囊泡我们可以通过多种方式鉴定,例如通过纳米颗粒追踪分析(nanoparticle tracking analysis, NTA)可以得到囊泡的粒径分布以及 zeta 电位信息^[11],透射电镜(transmission electron microscope, TEM)可以观察囊泡的形态及大小分布^[7],蛋白质免疫印迹可以鉴定特异性标志蛋白(如外泌体标志蛋白 CD63、CD9、Alix 等)^[12]。

2 糖基化修饰

2.1 糖基化修饰的生物学功能

糖基化修饰是最普遍的翻译后修饰^[13],哺乳动物中约有 80%以上的蛋白质都发生了糖基化修饰^[14]。糖缀合物主要包括糖蛋白(glycoproteins)、鞘糖脂(glycosphingolipids)和蛋白聚糖(proteoglycans),大多数糖缀合物位于细胞和细胞分泌的大分子表面,它们能够调控和介导多种细胞间和细胞与基质间的相互作用,在细胞黏附、信号传导、受体与配体互相识别等方面发挥着重要的作用。糖基化水平的改变和癌症等众多疾病紧密相关,因此特异性表达的糖链有望成为疾病诊断新的生物标志物。

2.2 糖基化修饰的分析鉴定方法及其在囊泡研究中的研究进展

理论上每 1 个单糖均可以 1 个 α 或 β 键与链中另 1 个单糖的 1 个或多个位点连接, 因此, 糖链比核酸和蛋白质更复杂. 尽管糖链的复杂性给研究囊泡表面糖缀合物带来了困难, 而近年来现代分析技术的发展突飞猛进, 其中包括凝集素印迹^[15]、凝集素芯片^[16]、亲和层析^[17]、生物质谱^[18]和液相色谱^[19]等, 也推动了糖组学以及糖蛋白质组学的研究进展. 凝集素(lectin)是一类能够与特异性糖链结合的糖蛋白, 通过使用结合不同糖链的多种凝集素可以完整地展现糖链表达谱图. 另外能够识别特定糖抗原表位的糖抗体(例如 anti-sialyl-Tn、anti-polysialic acid 等)^[20]也被广泛应用于免疫印迹、免疫组化以及流式分析等肿瘤的诊断中.

Batista 等^[16]利用质谱技术解析糖链结构, 发现在 T 淋巴细胞、皮肤癌以及结肠癌细胞分泌的胞外囊泡中高度富集了甘露糖、多聚乳糖胺, 以及 $\alpha 2, 6$ 连键的唾液酸型糖链. 利用基于生物质谱的糖组学研究技术, 发现半乳糖血症病人尿液中的囊泡表面糖基化修饰发生了由高甘露糖型向复合型的转变, 值得关注的是尿液中的糖蛋白整体上并没有发现这种糖型的转变, 由此可见胞外囊泡表面糖基化修饰在疾病诊断方面具有很高的研究价值^[21].

Saraswat 等^[22]对尿液中提取的外泌体进行了系统的糖组学以及糖蛋白质组学研究, 在尿液外泌体中鉴定到来自 51 个糖基化位点的 126 种 N-糖基化修饰的肽段, 其中超过 50% 的复合型 N-糖都是被岩藻糖修饰的, 而已有的文献报道岩藻糖基化修饰的改变与肿瘤的发展以及炎症反应密切相关, 因此尿液中的外泌体有望成为疾病检测的标志物. 由此可见, 尽管糖型的改变作为肿瘤等疾病检测的生物标志物还有着灵敏度和专一性等局限, 利用现代分析技术对胞外囊泡表面糖基化修饰的研究已经成为糖组学研究的热门.

3 囊泡表面糖缀合物在囊泡的运输、内化以及对肿瘤的调控作用

由于粒径与组成的特殊性, 胞外囊泡的物理特性相比细胞更接近固体纳米微粒, 在生理条件下比细胞展现更快速的物理运动, 而胞外囊泡表面的聚糖能够影响囊泡的物理特性. 例如肿瘤细胞分泌的囊泡由于带有大量末端唾液酸结构的糖链, 因此带有很强的负电荷, 电荷间的排斥与吸引影响着囊泡的分泌和内吞等^[4]. 本节总结归纳了凝集素、N-糖蛋白、O-糖蛋白、蛋白聚糖和鞘糖脂(图 2)对囊泡的运输、内化以及对肿瘤的调控作用.

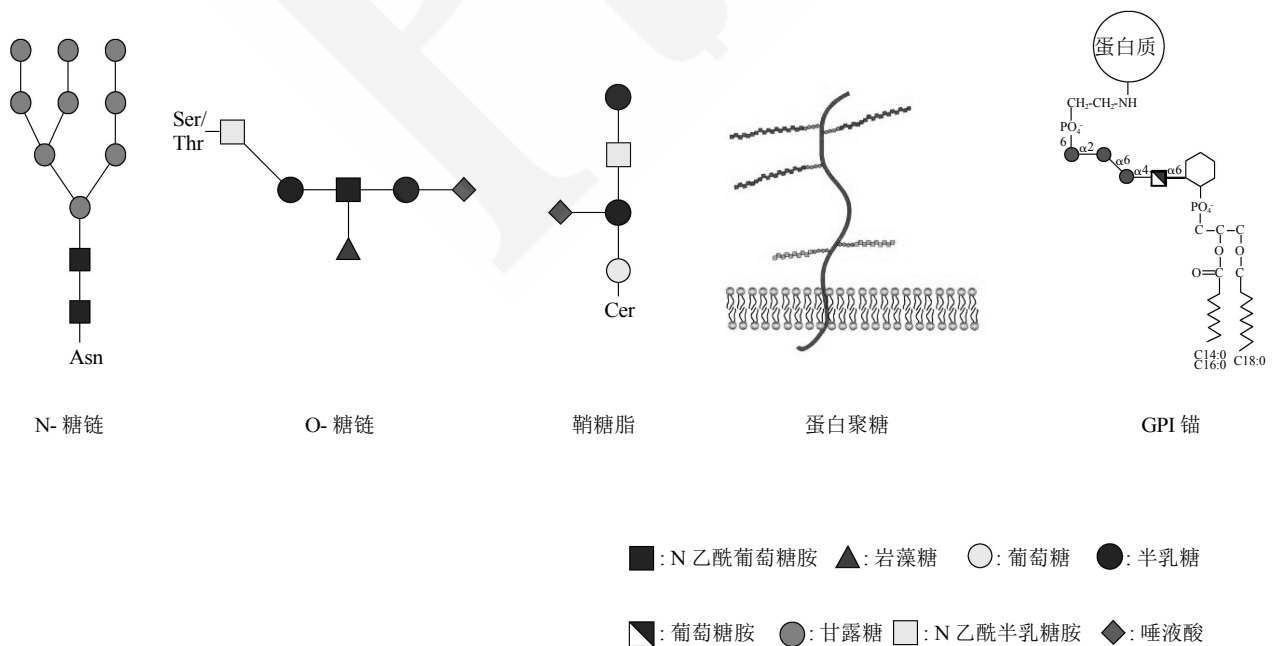


Fig. 2 Structures of different glycoconjugates

图 2 糖缀合物结构(改编自 Ajit Varki 等所著 *Essentials of Glycobiology*, 第二版)

3.1 N-糖蛋白

在蛋白质的 N-糖基化修饰中, N-聚糖与蛋白质的共有氨基酸序列 Asn-X-Ser/Thr 中的 Asn 天冬酰胺相连. N-聚糖主要分为以下几类: a. 只含甘露糖和 N-乙酰葡萄糖胺的高甘露糖型, b. 含有其他单糖如半乳糖组成的复合型 N-聚糖, c. 一条分支链只含甘露糖另一分支类似复合型糖链结构的杂合型 N-聚糖.

乳腺癌细胞分泌的胞外囊泡, 相比于乳腺上皮细胞高表达糖基化修饰的基质金属蛋白酶诱导物 (extracellular matrix metalloproteinase inducer, EMMPRIN)^[23], EMMPRIN 能够诱导细胞分泌基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP) 分解胞外基质, 对肿瘤细胞的侵袭能力有重要影响. 研究发现, 通过肽 N-糖苷酶 F (peptide-N-glycosidase F, PNGaseF) 去除 N-糖基化修饰和基因敲除等手段, 抑制 EMMPRIN 的正常表达可以抑制胞外囊泡介导的侵袭, 由此可见 EMMPRIN 的糖基化修饰与肿瘤细胞的表型相关.

最新研究发现, 胰腺癌细胞的外泌体通过高表达巨噬细胞移动抑制因子从而诱导肝脏促转移囊的形成, 为胰腺癌向肝脏的转移提供微环境并促使 Kupffer 细胞分泌 N-糖基化修饰的 TGF- β , 诱导肝星状细胞表达纤连蛋白 (fibronectin), 最终导致胰腺癌向肝脏的转移^[24].

腹膜转移是卵巢癌发生过程中肿瘤转移的最显著特征, 研究发现, 在发生腹膜转移的卵巢癌病人腹水的外泌体中, 发现了大量的糖基化修饰的 CD24 以及表皮细胞黏附分子 (epithelial cell adhesion molecule, EpCAM)^[25-26], 这些糖蛋白对诊断有重要的价值, 其中 CD24 是一个已经明确的肿瘤标志物, 不仅在卵巢癌, 在其他癌症的检测中也与不良的预后症状密切相关, 研究报道了 CD24 表达大量 α 2, 3/6 连接的唾液酸型糖链并且能够被凝集素 Siglec-5 和 P-selectin 识别^[27], 这些糖基化修饰是否与肿瘤相关还有待进一步研究.

综上所述, N-糖蛋白是目前研究最为广泛的一类糖蛋白, 胞外囊泡表面的 N-糖基化修饰对囊泡介导的肿瘤细胞的侵袭起重要作用.

3.2 O-糖蛋白

蛋白质的 O-糖基化修饰是 N-乙酰半乳糖胺残基连接在蛋白质丝氨酸或苏氨酸残基进行的修饰, 是 N-乙酰半乳糖胺残基连接在蛋白质丝氨酸或苏氨酸残基进行的修饰^[28], 通常被认为发生在细

胞核, 细胞质以及线粒体.

相比于 N-糖链的解析技术发展, 由于缺少专一性切除 O-糖链的酶, 针对胞外囊泡 O-糖基化修饰的研究较为少见. 最新的研究发现 O-糖基化修饰也能发生在细胞分泌的囊泡中, Chaiyawat 等^[29] 研究发现转移性越强的结肠癌细胞分泌的囊泡中携带更多的 O-GlcNAc 修饰糖蛋白. 未来随着针对 O-糖蛋白的解析技术的发展, 胞外囊泡表面的 O-糖基化修饰一定会被研究者所重视.

3.3 蛋白聚糖

蛋白聚糖属于杂多糖, 为不分支的长链聚合物, 由含己糖醛酸和己糖胺成分的重复单元构成, 在体内糖胺聚糖通常以蛋白聚糖的形式存在. 连接在多肽链上的糖链部分可多达上百个单糖残基. 几乎所有的哺乳动物细胞都合成蛋白聚糖, 常见的蛋白聚糖包括硫酸肝素、硫酸软骨素和聚透明质酸等, 它们通常分泌到胞外基质或者插入细胞膜, 通常起交联的作用而存在于细胞表面, 是胞外基质的重要组成部分.

硫酸肝素酶是一种内源性能够切割硫酸类肝素的糖苷酶, Thompson 等^[30] 研究发现硫酸肝素酶能够通过调控外泌体的组成和分泌从而促进肿瘤的形成. Christianson 等^[31] 研究发现, 细胞表面的硫酸肝素蛋白聚糖 (heparan sulfate proteoglycans, HSPGs) 是胞外囊泡内化的受体蛋白, 通过荧光染料 PKH67 标记胞外囊泡发现硫酸肝素在胶质母细胞瘤 U-87MG 细胞分泌的囊泡内化过程中发挥了重要的作用, 外源添加糖苷酶破坏细胞表面聚糖结构或者过表达糖苷酶抑制蛋白聚糖的合成可以显著抑制细胞对囊泡的内吞. 研究还发现囊泡内化能够激活受体细胞的 ERK 信号通路从而提高受体细胞迁移能力, 而去除受体细胞表面的蛋白聚糖能使信号通路的激活受到抑制. Purushothaman 等^[32] 以骨髓瘤细胞为研究模型进一步发现了外泌体表面的纤连蛋白是识别受体细胞表面 HSPGs 的配体.

糖基磷脂酰肌醇 (glycosylphosphatidylinositol, GPI) 也是一种常见的蛋白质翻译后修饰, 在真核生物中有广泛的表达. GPI 是一种结构复杂的糖脂类化合物, 蛋白质的 C 端以共价键形式与 GPI 相连, GPI 修饰的蛋白质可以通过 GPI 锚定在细胞膜的外侧, GPI 锚可以携带多种蛋白质并固定在细胞膜上. Zhang 等^[33] 在膀胱癌细胞 T24 中通过分子手段过表达 GPI 锚定白介素 2 (GPI-IL-2), 发现在 T24 细胞分泌的外泌体中也大量表达 GPI-IL-2 这一结

构并能够激活 T 细胞的抗肿瘤免疫应答。

肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSC)在肝细胞中占很少的比例, 通常起储存维生素 A 和维持血管张力的作用, 在肝脏发生损伤后 HSC 会改变自身的表型, 从而对损伤进行修复。Chen 等^[34]研究发现 HSC 来源的外泌体能够结合 HSC 细胞表面的整合素以及硫酸肝素蛋白聚糖从而向 HSC 细胞传递 miRNA 等物质。肝素是一类由葡萄糖胺、L-艾杜糖醛苷、N-乙酰葡萄糖胺和 D-葡萄糖醛酸交替组成的黏多糖硫酸脂, Franzen 等^[35]通过研究膀胱癌细胞摄入外泌体的特性, 发现外源添加肝素能够显著抑制细胞对外泌体的摄入。

总的来说, 蛋白聚糖作为细胞外基质的重要组成部分, 往往在细胞膜以及囊泡的表面都有表达, 因此在囊泡与受体细胞的接触识别过程中起到了重要的作用。

3.4 鞘糖脂

鞘糖脂是一类通过神经酰胺嵌入细胞膜的糖缀合物, 糖类通过其还原末端以糖苷键的形式与脂类结合形成鞘糖脂, 鞘糖脂是哺乳动物细胞膜上的必需组成成分之一, 参与细胞的多种生物学活动, 其生物学功能非常复杂, 在免疫应答、细胞发育、细胞识别及分化中都发挥重要的作用。

脂质是胞外囊泡的主要组成成分, 为囊泡内含物提供了相对稳定的环境, 它保护着囊泡内的核酸、蛋白质等物质不受细胞内外各种水解酶的影响, 同时, 脂质在囊泡发挥疾病治疗的过程中也起到关键的作用。Llorente 等^[36]用质谱技术定量比较了前列腺癌细胞 PC-3 以及其分泌的外泌体中脂质成分的差异, 发现相比于 PC-3 细胞, 其分泌的外泌体中富集了大量的鞘糖脂、鞘磷脂、磷脂酰丝氨酸以及胆固醇, 其中鞘糖脂 GM3 以及己糖神经酰胺 Hexcer 在囊泡中的含量相比于 PC-3 细胞有 4 倍的提升。Trajkovic 等^[37]发现抑制中性鞘磷脂酶的表达能够大幅减少细胞分泌外泌体。

近年来, 胞外囊泡尤其是外泌体中的鞘糖脂在治疗阿尔茨海默病方面的潜力越来越受到关注^[38], β 淀粉肽(amyloid- β peptide, A β)在大脑中的高表达与阿尔茨海默病的病发密切相关, Yuyama 等^[39]研究发现, 成神经细胞瘤来源的外泌体能够结合大脑中的 β 淀粉肽, 而外泌体表面的鞘糖脂在与 β 淀粉肽结合过程中起了重要作用, 外泌体诱导 β 淀粉肽的聚集, 并通过与 A β 的结合将它们清除,

从而减轻了病症。因此研究囊泡表面的鞘糖脂有望为治疗阿尔茨海默病提供新思路。

外泌体以及自然杀伤 T 细胞配体 α 半乳糖神经酰胺(α -galactosylceramide, α GC)也许能够为肿瘤免疫治疗提供新方法。Gehrmann 等^[40]发现, 装载了 α GC 的外泌体能够激活 NKT 细胞从而对肿瘤细胞起杀伤作用, 小鼠实验表明对黑色素瘤小鼠注射装载了 α GC 的外泌体能够显著提高小鼠生存期, 抑制肿瘤的生长。

Beloribi 等^[41]发现外泌体表面的脂质能够抑制胰腺癌细胞 SOJ-6 的 Notch 信号通路最终导致肿瘤细胞死亡。为了研究脂质在此过程中发挥的作用, 研究者构建了外泌体类似物 (synthetic exosome-like nanoparticles, SELN), 发现胆固醇和鞘磷脂在 SELN 中比例越高, 胰腺癌细胞的存活时间越短, 在共定位实验中还发现了 SELN 在内化过程中能够先后与胰腺癌细胞 SOJ-6 的鞘糖脂 GM1、Rab5A 以及早期核内体结合。

除此以外, 细胞外囊泡还表达有丰富的凝集素, 凝集素是指一种从各种植物、无脊椎动物和高等动物中提纯的糖蛋白, 不同来源的凝集素能够识别并结合不同糖型的糖缀合物, 例如半乳凝集素 (galectins) 是一类能够特异性结合 β 半乳糖结构的糖蛋白, 研究表明大鼠网状细胞分泌的囊泡中富集了大量的胞浆蛋白 galectin-5, galectin-5 能够调控大胞饮从而影响囊泡的内吞^[42]。糖蛋白质组学研究表明卵巢癌细胞分泌的外泌体中大量富集了 galectin-3 结合蛋白, 这类唾液酸糖蛋白有望成为新的外泌体标志蛋白^[19]。突触素 (synapsin) I 是一类凝集素类似物, 能够特异性结合甘露糖。Wang 等^[43]在共培养实验中发现 synapsin I 大量存在于神经胶质细胞分泌的囊泡中, 囊泡来源的 synapsin I 能够和甘露糖型糖链结合从而促进神经元的存活。Siglec (sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins) 是另一类能结合唾液酸的凝集素, 主要存在于免疫细胞的表面, 目前在哺乳动物细胞中共发现 14 种 Siglec。研究表明脾脏和淋巴结细胞来源的囊泡含有大量的 Siglec 1, 它能够促进炎症巨噬细胞对胞外囊泡的内吞。黏附分子 CD169 作为 Siglec 家族的一员能够促进肿瘤细胞分泌的带有唾液酸修饰外泌体的识别和内化^[44]。总的来说, 凝集素作为一类能够结合特定糖型的糖蛋白, 在囊泡与受体细胞的相互识别和内化过程中起着重要作用。

4 结论与展望

近年来, 细胞外囊泡在传递生物分子的作用机制以及作为疾病标志物应用方面的研究越来越受到研究者重视. 囊泡的糖基化修饰是一个新的研究热点, 差异化的糖缀合物也许能够为囊泡运输, 受体细胞识别内化的分子机制提供新的切入点, 例如内源性凝集素、硫酸肝素等糖缀合物参与囊泡被受体细胞内吞的过程以及某些特定糖蛋白在囊泡中的富集与分选. 胞外囊泡作为药物递送的潜在载体治疗肿瘤以及神经退行性疾病的应用前景正在被广泛地研究. 胞外囊泡作为一个新兴的热门研究领域, 目前在囊泡的富集纯化方面还存在很大的提升空间, 随着提取技术的不断改进, 相信未来随着研究的不断深入, 囊泡表面的糖基化修饰必将成为胞外囊泡研究的焦点.

参 考 文 献

- [1] Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *The Journal of Cell Biology*, 2013, **200**(4): 373–383
- [2] Hauser P, Wang S, Didenko V V. Apoptotic bodies: selective detection in extracellular vesicles. *Methods in Molecular Biology*, 2017, **1554**: 193–200
- [3] S E L A, Mager I, Breakefield X O, *et al.* Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2013, **12**(5): 347–357
- [4] Kim D K, Kang B, Kim O Y, *et al.* EVpedia: an integrated database of high-throughput data for systemic analyses of extracellular vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles*, 2013, **2**: 20384
- [5] Simpson R J, Kalra H, Mathivanan S. ExoCarta as a resource for exosomal research. *Journal of Extracellular Vesicles*, 2012, **1**: 18374
- [6] Escola J M, Kleijmeer M J, Stoorvogel W, *et al.* Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 1998, **273**(32): 20121–20127
- [7] Thery C, Amigorena S, Raposo G, *et al.* Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Current Protocols in Cell Biology*, 2006, **Chapter 3**: Unit 3.22
- [8] Cheruvanky A, Zhou H, Pisitkun T, *et al.* Rapid isolation of urinary exosomal biomarkers using a nanomembrane ultrafiltration concentrator. *American Journal of Physiology Renal Physiology*, 2007, **292**(5): F1657–1661
- [9] Weng Y, Sui Z, Shan Y, *et al.* Effective isolation of exosomes with polyethylene glycol from cell culture supernatant for in-depth proteome profiling. *The Analyst*, 2016, **141**(15): 4640–4646
- [10] Enderle D, Spiel A, Coticchia C M, *et al.* Characterization of RNA from exosomes and other extracellular vesicles isolated by a novel spin column-based method. *PLoS One*, 2015, **10**(8): e0136133
- [11] Sokolova V, Ludwig A K, Hornung S, *et al.* Characterisation of exosomes derived from human cells by nanoparticle tracking analysis and scanning electron microscopy. *Colloids and Surfaces B, Biointerfaces*, 2011, **87**(1): 146–150
- [12] Andreu Z, Yanez-Mo M. Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function. *Frontiers in Immunology*, 2014, **5**: 442
- [13] Ohtsubo K, Marth J D. Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. *Cell*, 2006, **126**(5): 855–867
- [14] Apweiler R. On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1999, **1473**(1): 4–8
- [15] Machado E, Kandzia S, Carilho R, *et al.* N-Glycosylation of total cellular glycoproteins from the human ovarian carcinoma SKOV3 cell line and of recombinantly expressed human erythropoietin. *Glycobiology*, 2011, **21**(3): 376–386
- [16] Batista B S, Eng W S, Pilobello K T, *et al.* Identification of a conserved glycan signature for microvesicles. *Journal of Proteome Research*, 2011, **10**(10): 4624–4633
- [17] Ahn Y H, Kim J Y, Yoo J S. Quantitative mass spectrometric analysis of glycoproteins combined with enrichment methods. *Mass Spectrometry Reviews*, 2015, **34**(2): 148–165
- [18] Thaysen-Andersen M, Packer N H, Schulz B L. Maturing glycoproteomics technologies provide unique structural insights into the N-glycoproteome and its regulation in health and disease. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, 2016, **15**(6): 1773–1790
- [19] Escrevente C, Grammel N, Kandzia S, *et al.* Sialoglycoproteins and N-glycans from secreted exosomes of ovarian carcinoma cells. *PLoS One*, 2013, **8**(10): e78631
- [20] Stowell S R, Ju T, Cummings R D. Protein glycosylation in cancer. *Annual Review of Pathology*, 2015, **10**: 473–510
- [21] Staubach S, Schadewaldt P, Wendel U, *et al.* Differential glycomics of epithelial membrane glycoproteins from urinary exosomes reveals shifts toward complex-type N-glycosylation in classical galactosemia. *Journal of Proteome Research*, 2012, **11**(2): 906–916
- [22] Saraswat M, Joenvaara S, Musante L, *et al.* N-linked (N) glycoproteomics of urinary exosomes. [Corrected]. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, 2015, **14**(2): 263–276
- [23] Menck K, Scharf C, Bleckmann A, *et al.* Tumor-derived microvesicles mediate human breast cancer invasion through differentially glycosylated EMMPRIN. *Journal of Molecular Cell Biology*, 2015, **7**(2): 143–153
- [24] Costa-Silva B, Aiello N M, Ocean A J, *et al.* Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver. *Nature Cell Biology*, 2015, **17**(6): 816–826
- [25] Im H, Shao H, Park Y I, *et al.* Label-free detection and molecular profiling of exosomes with a nano-plasmonic sensor. *Nature Biotechnology*, 2014, **32**(5): 490–495
- [26] Runz S, Keller S, Rupp C, *et al.* Malignant ascites-derived exosomes of ovarian carcinoma patients contain CD24 and

- EpCAM. *Gynecologic Oncology*, 2007, **107**(3): 563–571
- [27] Kristiansen G, Machado E, Bretz N, *et al.* Molecular and clinical dissection of CD24 antibody specificity by a comprehensive comparative analysis. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 2010, **90**(7): 1102–1116
- [28] Jensen P H, Kolarich D, Packer N H. Mucin-type O-glycosylation—putting the pieces together. *The FEBS Journal*, 2010, **277**(1): 81–94
- [29] Chaiyawat P, Weeraphan C, Netsirisawan P, *et al.* Elevated O-glcNAcylation of extracellular vesicle proteins derived from metastatic colorectal cancer cells. *Cancer Genomics Proteomics*, 2016, **13**(5): 387–398
- [30] Thompson C A, Purushothaman A, Ramani V C, *et al.* Heparanase regulates secretion, composition, and function of tumor cell-derived exosomes. *The Journal of Biological Chemistry*, 2013, **288** (14): 10093–10099
- [31] Christianson H C, Svensson K J, Van Kuppevelt T H, *et al.* Cancer cell exosomes depend on cell-surface heparan sulfate proteoglycans for their internalization and functional activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, **110**(43): 17380–17385
- [32] Purushothaman A, Bandari S K, Liu J, *et al.* Fibronectin on the surface of myeloma cell-derived exosomes mediates exosome-cell interactions. *The Journal of Biological Chemistry*, 2016, **291** (4): 1652–1663
- [33] Zhang J, Zhang Y. Glycosyl-phosphatidylinositol-anchored interleukin-2 expressed on tumor-derived exosomes induces antitumor immune response *in vitro*. *Tumori*, 2010, **96**(3): 452–459
- [34] Chen L, Brigstock D R. Integrins and heparan sulfate proteoglycans on hepatic stellate cells (HSC) are novel receptors for HSC-derived exosomes. *FEBS Letters*, 2016, **590**(23): 4263–4274
- [35] Franzen C A, Simms P E, Van Huis A F, *et al.* Characterization of uptake and internalization of exosomes by bladder cancer cells. *BioMed Research International*, 2014, **2014**: 619829
- [36] Llorente A, Skotland T, Sylvanne T, *et al.* Molecular lipidomics of exosomes released by PC-3 prostate cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2013, **1831**(7): 1302–1309
- [37] Trajkovic K, Hsu C, Chiantia S, *et al.* Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science*, 2008, **319**(5867): 1244–1247
- [38] Dinkins M B, Wang G, Bieberich E. Sphingolipid-enriched extracellular vesicles and Alzheimer's disease: a decade of research. *J Alzheimers Dis*, 2017, **60**(3): 757–768
- [39] Yuyama K, Sun H, Sakai S, *et al.* Decreased amyloid-beta pathologies by intracerebral loading of glycosphingolipid-enriched exosomes in Alzheimer model mice. *The Journal of Biological Chemistry*, 2014, **289**(35): 24488–24498
- [40] Gehrman U, Hiltbrunner S, Georgoudaki A M, *et al.* Synergistic induction of adaptive antitumor immunity by codelivery of antigen with alpha-galactosylceramide on exosomes. *Cancer Research*, 2013, **73**(13): 3865–3876
- [41] Beloribi S, Ristorcelli E, Breuzard G, *et al.* Exosomal lipids impact notch signaling and induce death of human pancreatic tumoral SOJ-6 cells. *PloS One*, 2012, **7**(10): e47480
- [42] Barres C, Blanc L, Bette-Bobillo P, *et al.* Galectin-5 is bound onto the surface of rat reticulocyte exosomes and modulates vesicle uptake by macrophages. *Blood*, 2010, **115**(3): 696–705
- [43] Wang S, Cesca F, Loers G, *et al.* Synapsin I is an oligomannose-carrying glycoprotein, acts as an oligomannose-binding lectin, and promotes neurite outgrowth and neuronal survival when released via glia-derived exosomes. *The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience*, 2011, **31**(20): 7275–7290
- [44] Saunderson S C, Dunn A C, Crocker P R, *et al.* CD169 mediates the capture of exosomes in spleen and lymph node. *Blood*, 2014, **123**(2): 208–216

Research Progress of Glycoconjugates on Extracellular Vesicles*

XU Xiao-Qiang, GUO Jia, GUAN Feng**

(Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry & Biotechnology Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract Extracellular vesicles (EVs) are a kind of membrane-bound particles with diameters ranging from 20 to 1 000 nm which can be uptaken by recipient cells. More and more research have focused on biological functions of EVs in disease diagnose, prognosis and drug delivery. It has been proved that EVs participate in cell-cell communication and material transfer directly. Nucleic acids (mRNA, microRNA and lncRNA) and proteins contained in EVs have significant influences on the behaviors of target cells. The surface of EVs is covered by glycoconjugates such as proteoglycans, glycosphingolipids and glycoproteins. And these glycoconjugates are directly associated with cell-cell adhesion, cell-cell communication, cell-matrix interactions, immune modulation, metastasis formation and others. This review summarizes the recent research progress of glycoconjugates on Evs, and is helpful to extensively understand the effects of glycosylation in the process of EVs' biosynthesis, release and transport and EVs' biological functions.

Key words extracellular vesicles, exosomes, glycoconjugates, disease diagnose

DOI: 10.16476/j.pibb.2017.0257

* This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation China (81672537).

**Corresponding author.

Tel: 86-510-85918126, E-mail: fengguan@jiangnan.edu.cn

Received: July 5, 2017 Accepted: August 29, 2017