

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.09.003

网络首发 http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20190301.1143.010.html(2019-03-04)

癌源外泌体的制备及其对胃癌细胞 STK15 表达的影响*

杨勇¹,陈霖^{2,3},杨宏新^{2Δ},李磊²,于建²,何源哈达²,杨晨⁴,徐伟⁵,高艳伟¹,高维实¹

(1. 内蒙古自治区人民医院肿瘤外科,呼和浩特 010017;2. 内蒙古医科大学基础医学院,呼和浩特 010059;

3. 湖北省宜昌市第一人民医院中医科 443000;4. 内蒙古医科大学临床医学院,呼和浩特 010059;

5. 内蒙古自治区人民医院中西医结合科,呼和浩特 010017)

[摘要] **目的** 探讨胃癌来源外泌体对胃癌细胞的增殖作用及其对丝氨酸/苏氨酸激酶 15(STK15)表达的影响。**方法** 采用超速梯度离心法从胃癌 MGC803 细胞培养上清液中提取外泌体,通过透射电镜技术对其超微结构进行鉴定,然后用不同浓度的外泌体(0.05、0.10、0.20、0.50 μg/μL)处理胃癌细胞,利用甲基偶氮唑蓝(MTT)法检测其对细胞增殖活性的影响。利用免疫细胞化学方法分析外泌体对胃癌细胞中心体扩增激酶 STK15 表达的影响。**结果** 胃癌 MGC803 细胞来源的外泌体具有特征性的盘状结构,由双层膜构成,直径为 50~130 nm。外泌体具有促进胃癌细胞增殖活性的作用($P<0.05$)。随着时间的延长增殖活性也增强,12 h 细胞增殖活性从 0.213 上升到 0.534($F=44.21, P=0.000$),24 h 细胞增殖活性从 0.251 上升到 0.998($F=66.06, P=0.000$),36 h 细胞增殖活性从 0.273 上升到 1.057($F=435.37, P=0.000$),48 h 细胞增殖活性从 0.342 上升到 1.414($F=195.30, P=0.000$),外泌体以剂量依赖性-时间依赖性促进胃癌细胞增殖,其可能通过负载抗原上调 STK15 表达来影响细胞增殖进程。**结论** 胃癌来源外泌体可能通过调节细胞 STK15 表达促进胃癌细胞增殖。

[关键词] 外泌体;胃肿瘤;丝氨酸/苏氨酸激酶 15;细胞增殖**[中图分类号]** R 73-3**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2019)09-1453-04

**Identification and isolation of exosomes derived from tumor and their effects
on STK15 expression on gastric cancer cells***

YANG Yong¹, CHEN Lin^{2,3}, YANG Hongxin^{2Δ}, LI Lei², YU Jian²,
HEYUAN Hada², YANG Chen⁴, XU Wei⁵, GAO Yanwei¹, GAO Weishi¹

(1. Department of Oncology, Inner Mongolia People's Hospital, Hohhot, Neimenggu 010017, China;

2. School of Basic Medicine, Inner Mongolia Medical University, Hohhot, Neimenggu

010059, China; 3. Department of Traditional Chinese Medicine, Yichang People's Hospital,

Yichang, Hubei 443000, China; 4. College of Clinical Medicine, Inner Mongolia Medical University,

Hohhot 010059, China; 5. Department of Combined Chinese and Western

Medicine, Inner Mongolia People's Hospital, Hohhot, Neimenggu 010017, China)

[Abstract] **Objective** To discuss the effect of exosomes on proliferation of gastric cancer cells and expression of serine/threonine kinase 15 (STK15). **Methods** Exosomes were extracted from the culture supernatant of MGC803 gastric cancer cells by ultracentrifugal gradient centrifugation, and their ultrastructure was identified by transmission electron microscopy. Gastric cancer cells were then treated with exosomes at different concentrations (0.05, 0.10, 0.20, 0.50 μg/μL). The effect of exosomes on the proliferation of gastric cancer cells was examined by MTT assay. Immunohistochemical method was used to test the expression of serine/threonine kinase 15 (STK15) in gastric cancer cells. **Results** The exosomes derived from gastric cancer MGC803 cells had a characteristic plate-like structure consisting of a bilayer membrane with the diameter of about 50–130 nm. Exosomes had the effect of promoting the proliferation activity of gastric cancer cells ($P<0.05$). The cell proliferation activity increased from 0.213 to 0.534 when treated 12 h ($F=44.21, P=0.000$), from 0.251 to 0.998 when treated 24 h ($F=66.06, P=0.000$), from 0.273 to 1.057 when treated 36 h ($F=$

* 基金项目:内蒙古自然科学基金资助项目(2014MS0864);内蒙古肿瘤生物治疗协同创新项目(2016ZLXT008)。 作者简介:杨勇(1971—),主任医师,硕士,主要从事肿瘤临床治疗和基础研究。 Δ 通信作者, E-mail: hongxinydiy@sina.com。

435.37, $P=0.000$), from 0.342 to 1.414 when treated 48 h ($F=195.30, P=0.000$). Exosomes promoted the proliferation of MGC803 cells in a dose-dependent and time-dependent manner, which might affect the cell proliferation process by regulating the expression of STK15. **Conclusion** Exosomes can accelerate the proliferation of gastric cancer cells by regulating STK15 expression.

[Key words] exosomes; stomach neoplasms; serine/threonine kinase 15; cell proliferation

随着分子生物学和免疫学的发展,肿瘤的生物治疗成为国际研究的热点。近几年具有亚细胞结构的外泌体(exosomes)日益受到重视,有学者预言外泌体可能会成为未来疾病诊断和治疗的工具^[1]。外泌体源自细胞并通过胞吐方式分泌到细胞外,是具有膜性结构的小囊泡^[2],来源于不同细胞的外泌体所含成分也不同,目前已证实很多类型细胞都能释放外泌体,但外泌体负载的抗原物质存在很大差异,所以对不同来源的外泌体的深入研究对于肿瘤的个性化治疗显得非常重要^[3]。丝氨酸/苏氨酸激酶 15 (serine/threonine kinase 15, STK15) 是中心体扩增相关基因,与细胞有丝分裂相关,有学者把其作为中心体扩增的标记物。早期有学者认为外泌体有抗肿瘤作用,有人推测其可能会成为抗肿瘤疫苗^[4],但随研究的深入,有学者发现其负载肿瘤抗原具有促进肿瘤细胞增殖作用^[5-6],故本研究以胃癌 MGC-803 细胞为模型,从其培养上清液中制备胃癌细胞分泌的外泌体,然后通过体外实验证明外泌体对胃癌细胞的作用,以及对胃癌细胞产生效应的可能机制,为今后外泌体肿瘤疫苗研发提供理论依据,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 人低分化胃癌细胞株 MGC-803 为本实验室常规传代保存。RPMI 1640 培养基和胎牛血清购自美国 Gibco 公司,甲基偶氮唑蓝(MTT)购自美国 Sigma 公司,二辛可宁酸(BCA)法蛋白定量试剂盒购自北京百泰克生物技术有限公司,STK15 一抗购自美国 GeneTex 公司,链霉卵白素-过氧化物酶(S-P)检测试剂盒和二氨基联苯胺(DAB)显示试剂盒及多聚赖氨酸购自福建迈新试剂公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 胃癌 MGC-803 细胞液氮取出复苏后,置于含 10% 灭活胎牛血清、100 U/mL 双抗(青霉素和链霉素)的 RPMI 1640 培养液中,于 37 °C、5% CO₂、饱和湿度培养箱内培养,0.25% 胰酶消化液消化传代,平均 3~4 d 传代 1 次,所有实验均采用对数生长期的细胞。

1.2.2 外泌体的制备及蛋白定量 胃癌 MGC-803 细胞用 75 mL 培养瓶培养至对数生长期后,除去含血清培养基,用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 3 遍,随后加入不含血清的 RPMI 1640 培养基,培养 24 h 后收集上清制备外泌体。(1)收集的上清液 1 500 r/min 离心

10 min, 3 500 r/min 离心 10 min; (2) 采用 15 000 r/min 离心 30 min, 去除细胞及细胞碎片等物; (3) 50 000 r/min 离心 2 h, 用无菌 PBS 液稀释沉淀物、采用滤器除菌(0.22 μm)。首先采用 BCA 法用标准品测定得到蛋白标准曲线, 然后根据标准曲线测得外泌体蛋白水平。将沉淀物分装在小离心管中, 取出部分外泌体进行电镜检测, 其余小管 -80 °C 冰箱保存备用。

1.2.3 电镜鉴定外泌体结构 将 20 μL 外泌体悬液滴加在载样铜网上, 室温条件静置 1 min 后将铜网上多余液体用滤纸从侧面吸干, 在铜网上滴加 pH 值为 6.8 的磷钨酸溶液(3%) 30 μL, 1 min 后将磷钨酸用滤纸吸干, 室温静置 10 min 后在透射电镜下观察外泌体并照像。

1.2.4 胃癌细胞增殖活力检测 将对数生长期的 MGC-803 细胞用常规胰酶消化, PBS 洗涤后再制成单细胞悬液, 采用 96 孔板进行细胞培养, 每孔接种 100 μL 细胞悬液(1×10⁴ 个/mL), 培养 12 h 后, 分别加入终浓度为 0.05、0.10、0.20、0.50 μg/μL 的外泌体。实验设置实验对照组及空白对照组, 每组设 8 个复孔, 每孔终体积为 180 μL。培养 12、24、36、48 h 后, 每孔加入 MTT 溶液(5 g/L) 20 μL, 孵育 4 h 后吸弃上清, 然后加入 200 μL 二甲基亚砜(DMSO), 充分混匀。570 nm 波长条件下用酶标仪测定各孔平均吸光度值。

1.2.5 细胞增殖相关基因 STK15 表达变化 将包被多聚赖氨酸盖玻片置于 6 孔培养板中, 培养 12 h 待细胞贴壁后加入浓度为 0、0.20、0.50 μg/μL 的外泌体。培养 24 h 后将盖玻片取出放置于丙酮液中固定 15 min, 蒸馏水洗涤后, 滴加 3% 的过氧化氢 10 min, PBS 洗涤, 滴加血清封闭液 10 min, 滴加 STK15 一抗(1:100), 4 °C 冰箱过夜, PBS 代替一抗作为阴性对照。次日 PBS 洗涤, 滴加生物素标记的二抗工作液 10 min, PBS 洗涤, 滴加链霉素抗生物素蛋白过氧化酶 10 min, PBS 洗涤, 滴加 DAB 显色液 5 min, 自来水冲洗, 苏木精复染, 盐酸乙醇分化, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片, 在显微镜下观察染色结果。采用彩色图像分析系统测量阳性反应物的灰度值, 在 40 倍视野下每张片子随机测量 4 个视野取其平均值代表 STK15 染色强度。

1.3 统计学处理 数据采用 SPSS17.0 统计软件进行分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 实验重复 3 次。组间

比较采用方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 外泌体的制备和蛋白定量 胃癌 MGC-803 细胞按照上述方法经超速梯度离心后得到外泌体,经标准品测定得到标准曲线为 $Y = 0.6534X - 0.0058$,测得制备的外泌体浓度为 $13.39 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。

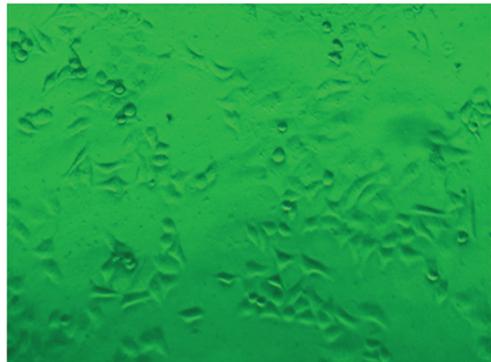


图 1 倒置显微镜下胃癌 MGC-803 细胞 ($\times 200$)

2.2 外泌体的形态学鉴定 光学显微镜下可以看到胃癌细胞呈现梭形、多角形(图 1),通过超速梯度离心法从胃癌 MGC-803 细胞上清液中得到外泌体,在透

射电镜下观察到外泌体呈现圆形或椭圆形小囊泡,具有特征性的盘状结构,有完整的包膜,内为低电子密度物质,直径为 $50 \sim 130 \text{ nm}$,见图 2。

2.3 外泌体对 MGC-803 细胞活力的影响 制备的外泌体与胃癌 MGC-803 细胞共培养,经 MTT 结果显示外泌体随着浓度从 $0.05, 0.10, 0.20, 0.50 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 升高, 570 nm 波长平均吸光度值升高,随着时间延长吸光度值亦升高,通过方差齐性检验和方差分析后证实各时间节点的组间增殖活性差异有统计学意义 ($P < 0.05$),外泌体以时间和剂量依赖性方式促进胃癌 MGC-803 细胞增殖,见表 1。

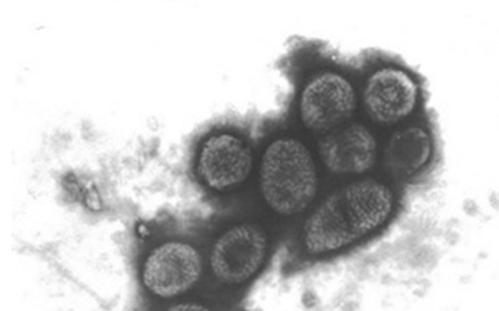
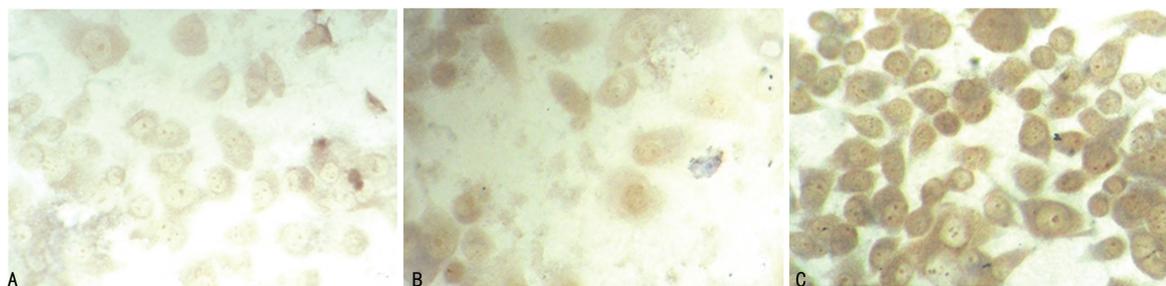


图 2 透射电镜下的外泌体 ($\times 15000$)

表 1 不同浓度外泌体对胃癌细胞吸光度影响

组别	12 h	24 h	36 h	48 h
$0 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 外泌体组	0.213 ± 0.023^b	0.251 ± 0.043^b	0.273 ± 0.039^b	0.342 ± 0.032^b
$0.05 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 外泌体组	0.297 ± 0.031^{ab}	0.323 ± 0.032^b	0.412 ± 0.023^{ab}	0.732 ± 0.054^{ab}
$0.10 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 外泌体组	0.298 ± 0.032^{ab}	0.372 ± 0.037^{ab}	0.462 ± 0.021^{ab}	0.865 ± 0.043^{ab}
$0.20 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 外泌体组	0.347 ± 0.043^{ab}	0.451 ± 0.075^{ab}	0.498 ± 0.017^{ab}	1.032 ± 0.062^{ab}
$0.50 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 外泌体组	0.534 ± 0.023^a	0.998 ± 0.102^a	1.057 ± 0.019^a	1.414 ± 0.048^a

^a: $P < 0.05$,与 $0 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 外泌体组比较; ^b: $P < 0.05$,与 $0.50 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 外泌体组比较



A: $0 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 外泌体组; B: $0.20 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 外泌体组; C: $0.50 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 外泌体组

图 3 MGC-803 细胞 $0, 0.20, 0.50 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 外泌体组中 STK15 基因表达 ($\times 400$)

2.4 免疫组织化学检测结果 免疫组织化学染色结果显示,STK15 蛋白阳性反应物主要定位于细胞核,部分细胞质也有表达,阳性产物呈棕黄色颗粒, $0.50 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 外泌体的 STK5 表达高于 $0.20 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 外泌体组, $0.20 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 外泌体组 STK15 表达高于 MGC803 细胞组,各组间表达强度差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。 $0, 0.20, 0.50 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 外泌体组中 STK15 基因

表达,见图 3。

3 讨论

外泌体作为一种膜性小泡,最初是用来描述由网织红细胞分泌的小囊泡,直径为 $30 \sim 100 \text{ nm}$,呈现扁球体状,外膜为磷脂双分子层,在囊泡表面负载丰富的膜性分子,这些膜性分子与其功能和来源相关^[7]。目前认为外泌体是由细胞膜内陷形成早期内体,早期

内体的界膜向内凹陷出芽形成许多小泡,称之为多泡体(multivesicular bodies, MVB),当 MVB 膜与细胞膜融合后,再形成小泡被释放至细胞外空间,这种小泡被称之为外泌体。外泌体的膜也是由磷脂双分子层组成,由于脂类分子可以进行不间断运动,这样外泌体可与具有膜性结构的物质不断融合来交换物质,蕴含的生物信息逐渐被接触的细胞所容纳。目前人们知道,细胞之间的信息传递过程非常复杂,许多细节需要诠释,谁来扮演细胞之间的“信使”是目前这个领域亟待需要解决的难题。外泌体小泡表面负载活性物质很多^[8],肿瘤细胞源的外泌体,负载信息更多^[2],作用更为复杂^[9-10]。甚至有学者认为,不同类型肿瘤细胞共表达的肿瘤共同抗原可能就存在于外泌体囊泡上,外泌体可能以自分泌和旁分泌形式影响癌细胞和正常细胞之间的信息传递^[11]。通过外泌体载体传递抗原给抗原呈递细胞(如树突状细胞),介导 CD4⁺ T 细胞免疫反应来治疗同基因源性和异基因源性肿瘤显示巨大潜力。

有效、安全、稳定和实用是肿瘤理想的治疗性疫苗应该具备的基本特征。从目前研究结果看肿瘤源外泌体具有膜的结构特征,大小只有 100 nm 左右,甚至更小,负载了肿瘤细胞的特征分子,具有纳米疫苗的特征,可以作为一种新型的亚细胞疫苗,当然其免疫原性、安全性、免疫反应性、耐受性等需要在实验中进一步验证。肿瘤源外泌体疫苗,由于其负载肿瘤相关抗原多,与细胞膜有特殊的可融合性,在细胞间的信息传递过程中发挥巨大作用,而作为肿瘤疫苗与其他肿瘤肽疫苗、核酸疫苗相比,从理论上可激发的免疫反应更强烈,甚至在上述疫苗无效的情况下也可能诱导明显的免疫应答。早期有研究报道当接种 L1210 细胞分泌的外泌体,移植性肿瘤细胞的生长可部分被抑制;抗肿瘤的 T 细胞免疫应答反应可被来自热休克淋巴瘤细胞的外泌体诱导^[12]。王东关等^[13]发现,树突状淋巴细胞可被肿瘤源外泌体活化成为特异性的细胞毒性 T 细胞(CTL),来杀伤肿瘤细胞。随着现代生物科学的发展,人们采用 CRISPR/Cas9 技术对肿瘤细胞的基因编辑工作更为简单,而外泌体作为细胞分泌的小泡,应该负载基因编辑后肿瘤细胞的特殊抗原,所以外泌体作为免疫调控和肿瘤治疗的工具或药物载体显示巨大潜力^[1,14-15]。本研究采用超速离心法制备的肿瘤细胞外泌体,经电泳证实具有外泌体的特征。将制备外泌体作用于胃癌 MGC803 细胞,发现其可促进胃癌细胞生长,而且随外泌体浓度增加对胃癌细胞的增殖作用也增强,同时随着时间延长胃癌细胞增殖活性也越强,肿瘤源外泌体对胃癌细胞的生长作用具有时间和浓度依赖性。研究结果提示外泌体负载重要肿瘤抗原,由其传递给抗原呈递细胞产生

的免疫效应可能非常强烈。

STK15 基因编码一类丝/苏氨酸蛋白激酶,是中心体扩增相关激酶,其定位于中心体,位于染色体周围,是细胞增殖过程的关键基因^[16],在细胞周期的 G₁/S 期开始出现。中心体作为细胞主要微管组织中心,在细胞有丝分裂期可形成两极纺锤体,STK15 不仅参与中心体的复制、分离和成熟,而且还参与纺锤体两极的组装与稳定性维持。当细胞周期结束后 STK15 迅速通过泛素化降解途径降解,STK15 的精确适时表达在细胞有丝分裂中起重要作用。当正常细胞 STK15 表达不容易检测到,但细胞癌变后 STK15 高表达,结果导致多级纺锤丝形成,染色体不均等分离,遗传物质不稳定,出现肿瘤恶性特征。有研究结果证实 STK15 可以转化 NTKT3 细胞,使免疫缺陷裸鼠体内形成肿瘤,STK15 是细胞增殖过程的重要标志。本研究发现胃癌 MGC803 细胞 STK15 有少量表达,加入 0.20 μg/μL 和 0.50 μg/μL 浓度的外泌体后,其表达水平逐渐增高($P < 0.05$),而细胞增殖活性也逐步提高($P < 0.05$),胃癌源外泌体携带抗原成分可使胃癌细胞的 STK15 基因过表达,从而加速肿瘤细胞增殖分裂。研究也提示制备的外泌体充当了“信使”,通过膜分子的相互作用将中心体复制相关蛋白传递给胃癌细胞,导致胃癌细胞增殖加速。

外泌体最近已经成为癌症和其他疾病中潜在有希望的诊断和预后生物标志物^[17]。本研究提示肿瘤源的外泌体或经基因修饰后的外泌体可能在肿瘤免疫治疗方面具有更大的生机。有研究表明,在免疫应答下调或诱导免疫耐受过程中外泌体也在发挥作用,如外泌体通过诱导免疫耐受促进了肿瘤细胞的生长^[18],这给肿瘤治疗提出新的挑战,需要深入研究。

参考文献

- [1] KURYWCHAK P, KALLURI R. An evolving function of DNA-containing exosomes in chemotherapy-induced immune response[J]. *Cell Res*, 2017, 27(6): 722-723.
- [2] MILANE L, SINGH A, MATTHEOLABAKIS G, et al. Exosome mediated communication within the tumor microenvironment[J]. *J Control Release*, 2015, 219(2): 278-294.
- [3] PARK J, CHOI Y. Exosome identification for personalized diagnosis and therapy[J]. *Biomed Eng Lett*, 2014, 4(3): 258-268.
- [4] HAO S, MOYANA T, XIANG J. Cancer immunotherapy by exosome-based vaccines [J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2007, 22(5): 692-703.
- [5] HONG B S, CHO J H, KIM H, et al. Colorectal cancer cell-derived microvesicles are enriched in cell cycle-related mRNAs that promote proliferation of endothelial cells [J]. *BMC Genomics*, 2009, 10(1): 556. (下转第 1461 页)

- [14] 冯日露,麻静. 糖尿病胃轻瘫的发病机制、诊断和治疗研究进展[J]. 上海交通大学学报(医学版),2016,36(5):761-766.
- [15] 殷茵. 不同次序电针足三里、中脘调节小鼠胃运动的效应特征及其自主神经机制[D]. 南京:南京中医药大学,2017.
- [16] 孟醒,齐淑兰. 针灸治疗消化性溃疡病的选穴规律研究[J]. 中国针灸,2016,36(4):437-441.
- [17] 孙晓芬,程卫东,段永强. 脾虚大鼠血清及胃组织中胃肠激素 SS、GAS 和 CCK 的变化及中药干预研究[J]. 时珍国医国药,2014,25(3):756-758.
- [18] 朱建森,成志锋,李雨泽,等. Ghrelin, CGRP, NT 对胃肠作用的研究进展[J]. 现代生物医学进展,2014,14(16):3191-3193.
- [19] YAN C H, LUO X U, GAO S L, et al. Effect of ghrelin in septal nucleus on gastric motility of diabetic gastroparesis rats and its potential mechanism regulated by hypothalamic arcuate nucleus[J]. Chin J Pathophysiol, 2014, 30(3):486-493.
- [20] 高海霞. 海马-下丘脑弓状核 Ghrelin 神经通路构成及对胃运动的影响研究[D]. 青岛:青岛大学,2012.
- [21] ANDREWS Z B, LIU Z W, WALLINGFORD N, et al. UCP2 mediates ghrelin's action on NPY/AgRP neurons by lowering free radicals. [J]. Nature, 2008, 454(7206):846-851.
- [22] XU L, QU Z, GUO F, et al. Effects of ghrelin on gastric distention sensitive neurons in the arcuate nucleus of hypothalamus and gastric motility in diabetic rats[J]. Peptides, 2013, 48(5):137-146.
- [23] KHAZALI H, MAHMOUDI F. The anti-obesity effect of D-Lys3- GHRP-6 peptide, GHSR receptor antagonist in rats[J]. Int J Endocrinol Metab, 2013, 14(5):484-491.
- [24] 杨成广,袁青领,于嵩,等. ghrelin/ghrelin 受体途径参与大鼠小肠动力的外周作用[J]. 中华实验外科杂志,2012,29(3):446-448.
- [25] 薛亚楠,曲怡,王建波,等. 针刺“足三里”穴对脾气虚模型大鼠下丘脑及小肠组织 CCK、CCK-AR 表达的影响[J]. 针灸临床杂志,2017,33(1):46-49.
- [26] KIM Y J, SCHROEDER M, LIANG N C, et al. Effects of early postnatal environment on hypothalamic gene expression in OLETF rats[J]. PLoS one, 2017, 12(6):e0178428.
- [27] 陈洁. 中枢注射 CCK 对大鼠摄食行为以及相关神经元功能的影响[D]. 杭州:浙江大学,2007.
- [28] NAKAMURA H, ISHIGAMI T, KAWASE Y, et al. Effects of acupuncture stimulation on blood glucose concentration in the otsuka long-evans tokushima fatty (OLETF) rat, an animal model for type-2 diabetes mellitus[J]. Med Sci Monit Basic Res, 2014, 20(5):70-75.
- [29] 魏立民,任路平,李海英. 八肽胆囊收缩素对肥胖大鼠血脂、胰岛素抵抗及腹内脂肪的影响[J]. 中国现代医学杂志,2015,25(26):33-36.
- [30] 马国光,郭鸿,李斌. 脑肠肽 ghrelin 在胃肠功能中的研究进展[J]. 肠外与肠内营养,2011,18(6):377-379.
- [31] 孙晓宇,郭汝涛,张洪涛. 胃肠激素与肥胖关系的研究进展[J]. 现代生物医学进展,2015,15(14):2786-2789.
- [32] 林亚平,万全荃,彭艳. 电针对糖尿病胃轻瘫大鼠胃窦促生长素 mRNA、生长激素促分泌素受体 mRNA 表达的影响[J]. 针刺研究,2015,40(4):290-295.

(收稿日期:2018-09-12 修回日期:2019-01-26)

(上接第 1456 页)

- [6] TAVERNA S, FLUGY A, SAIEVA L, et al. Role of exosomes released by chronic myelogenous leukemia cells in angiogenesis[J]. Int J Cancer, 2012, 130(9):2033-2043.
- [7] YAN Y M, FU G Z, YE Y F, et al. Exosomes participate in the carcinogenesis and the malignant behavior of gastric cancer[J]. Scand J Gastroenterol, 2017, 52(5):499-504.
- [8] 骆阳,孟民杰,刁志宏. Liquid biopsies in cancer[J/CD]. 转化医学电子杂志,2017,4(9):48-54.
- [9] ZHANG H G, GRIZZLE W E. Exosomes: a novel pathway of local and distant intercellular communication that facilitates the growth and metastasis of neoplastic lesions[J]. Am J Pathol, 2014, 184(1):28-41.
- [10] WHITESIDE T L. Tumor-derived exosomes and their role in cancer progression[J]. Adv Clin Chem, 2016, 74(1):103-141.
- [11] SUNG B H, WEAVER A M. Exosome secretion promotes chemotaxis of cancer cells[J]. Cell Adh Migr, 2017, 11(2):187-195.
- [12] 卜宁,孙秉中,李奇灵,等. Exosomes 对 L1210 肿瘤细胞攻击的免疫保护作用研究[J]. 临床血液学杂志,2006(6):358-361.
- [13] 王东关,孙善珍,王振光,等. 肿瘤 exosome 诱导的细胞毒性 T 细胞的特异性杀伤作用[J]. 山东大学学报(医学版),2006,44(2):213-216.
- [14] GREENING D W, GOPAL S K, XU R, et al. Exosomes and their roles in immune regulation and cancer[J]. Semin Cell Dev Biol, 2015, 40(1):72-81.
- [15] MAHMOODZADEH HOSSEINI H, HALABIAN R, AMIN M, et al. Exosome-based drug delivery system for cancer therapy: from past to present[J]. Cancer Biol Med, 2015, 12(3):150-162.
- [16] AL-HAZMI N, ALHAZZAZI T, WILLIAMS G, et al. DNA replication licensing factor MCM2, geminin, and Ki67 define proliferative state and are linked with survival in oral squamous cell carcinoma[J]. Eur J Oral Sci, 2018, 126(3):186-196.
- [17] VALENTINO A, RECLUSA P, SIRERA R, et al. Exosomal microRNAs in liquid biopsies: future biomarkers for prostate cancer[J]. Clin Transl Oncol, 2017, 19(6):651-657.
- [18] 朱磊,李响,刘朋飞. Exosomes 在肿瘤免疫方面的研究进展[J]. 中国生物制品学杂志,2010,23(4):441-444.

(收稿日期:2018-07-28 修回日期:2018-12-08)