

喉癌 Hep-2 细胞来源的 exosomes 提取方法的比较*

梁俊毅¹ 吉晓滨¹ 刘启才² 谢景华¹

[摘要] 目的:对分离提取喉癌 Hep-2 细胞来源的 exosomes 2 种方法进行对比,展现不同方法的优缺点,为选择分离提取包括喉癌 Hep-2 细胞在内的肿瘤细胞来源 exosomes 的方法提供参考。方法:大量培养喉癌 Hep-2 细胞,42℃ 热休克处理。收集 90 ml 培养上清液,先通过 3/0.8 μm 深层过滤小型滤芯对上清液进行预处理,去除直径较大的颗粒和杂质,再利用蔗糖密度梯度离心联合超滤离心法,将上清液浓缩提纯;收集培养上清液 4 ml,依次加入 Exosome Isolation Kit 内试剂,通过 exosomes 提取专用过滤柱,收集浓缩液。用高倍透射电子显微镜对 2 种方法所得的 exosomes 浓缩液分别鉴定,作出评价。结果:2 种方法均能成功地从喉癌 Hep-2 细胞培养上清液中分离提取出 exosomes。单个高倍视野下,蔗糖密度梯度离心联合超滤离心法提取 exosomes 分散性较好,但密度较低,背景见杂质较多;Exosome Isolation Kit 所提取 exosomes 排列紧密,密度较高,背景杂质较少。结论:2 种方法各具特点,均是较理想的 exosomes 分离提取方法。利用 Exosome Isolation Kit 分离提取 exosomes 具有样本量少、提取时间短、步骤简单、产物量大等优点,为喉癌 Hep-2 来源 exosomes 的分离提取提供了较好的选择。

[关键词] exosomes;蔗糖密度梯度离心;超滤离心;Exosome Isolation Kit

doi:10.13201/j.issn.1001-1781.2015.17.008

[中图分类号] R739.6 **[文献标志码]** A

Comparison of methods for isolating exosomes derived from laryngocarcinoma Hep-2 cells

LIANG Junyi¹ JI Xiaobin¹ LIU Qicai² XIE Jinghua¹

(¹Department of Otorhinolaryngology, Guangzhou Municipal First People's Hospital, Guangzhou, 510180, China; ²Experimental Medicine Research Center, Guangzhou Medical University) Corresponding author: JI Xiaobin, E-mail: chusebaba@163.com

Abstract Objective: To provide a reference about choosing the methods of isolating exosomes derived from tumor cells including laryngocarcinoma Hep-2 cells by comparing advantages and defects of two methods of isolation and extraction exosomes. **Method:** Previously, laryngocarcinoma Hep-2 cells were cultivated massively, then the cells were processed with hot shock in 42℃ for 1 h. Sucrose density gradient centrifugation ultrafiltration (method 1): cells culture supernatant 90 ml was gathered, the supernatant was clarified through a 3/0.8 μm small filter to remove impurities and fragments which in larger diameter. Then the filtering fluid was concentrated and purified through sucrose density gradient centrifugation and ultrafiltration, the concentrated fluid was obtained. Exosome Isolation Kit (method 2): cells culture supernatant 4 ml was gathered, the solutions of the kit were added into the supernatant in proper sequence, then filtered by the special column, the concentrated fluid was obtained. Both products are observed by high resolution transmission electron microscopy. **Result:** Both methods could isolate and extract exosomes feasibly. In single high power view of transmission electron microscopy, exosomes of method 1 disperse better, but lower density, and more impurity in background, exosomes of method 2 arrange closer, higher density, and less impurity. **Conclusion:** Exosome Isolation Kit require less supernatant, cost less time, process procedure briefly, harvest higher yield. It may become a new option of isolating exosomes derived from Laryngocarcinoma Hep-2 cells.

Key words exosomes; sucrose density gradient centrifugation; ultrafiltration; Exosome Isolation Kit

在 exosomes 被 Johnstone 等^[1] 分离并命名的近 30 年间,由于其在肿瘤诊断及治疗方面的潜能,受到了广泛的关注,当 exosomes 的应用前景、研究

价值吸引人们的注意时,其分离提取方法却鲜有突破。人的尿液、血液、前列腺液、羊水、精液及恶性胸腹水等体液中均发现 exosomes,且肿瘤细胞自身也可产生^[2]。从成分复杂的生物液体中获得高产量、高浓度,并保留其生物学特性的 exosomes,关系到后续的研究及应用^[3]。不同来源的 exosomes,分离提取方法有所不同。目前,普遍认可多步差速离心法、免疫磁珠分选法、蔗糖密度梯度联

* 基金项目:广东省科技厅产业技术研究与开发资金计划项目(No:2012B031800340);广州市科技和信息化局社会发展应用基础研究专项(No:2013J4100024)

¹ 广州市第一人民医院耳鼻咽喉科(广州,510180)

² 广州医科大学实验医学研究中心

通信作者:吉晓滨, E-mail: chusebaba@163.com

合超速离心法及 Exosome Isolation Kit。Franzen 等^[4]利用多步差速离心法从膀胱癌 SW780 细胞中成功分离出 exosomes,但该方法耗时长,对细胞培养上清液没有进行很好的预处理,可能会导致细胞碎片、大小分布相类似的分子蛋白复合物一同被收集,使 exosomes 纯度下降,目前不作首选。Tauro 等^[5]在分离提取结肠癌细胞系 LIM1863 来源 exosomes 时,采用多步差速离心法、密度梯度离心法和免疫磁珠分选法并进行对比,发现免疫磁珠分选法对保留 exosomes 内的分子标记物及蛋白有显著优势,但只能分选出表面标记阳性的 exosomes,而没有被标记的 exosomes 则被遗漏。蔗糖密度梯度离心联合超滤离心法能得到均匀分散的 exosomes,目前使用最广泛。Webber 等^[6]采用蔗糖密度梯度离心联合超滤离心法从 Du145 细胞中提取 exosomes,但该方法亦存在样本量大、过程耗时长等缺点。随着 exosomes 研究的深入,以往的分选方法已然不适当当前高质量的科研要求,人们迫切希望能快捷、简便、高效地得到 exosomes。Exosomes Isolation Kit 是近年来新兴的提取方法,具有样本量少、产物浓度高、提取时间短等优点,有望成为提取 exosomes 的首选。本课题组分别用蔗糖密度梯度离心联合超滤离心法和 Exosome Isolation Kit 成功从喉癌细胞中分离提取出 exosomes,并对 2 种方法进行比较,期望为 exosomes 的提取提供有价值的参考。

1 材料与方法

1.1 材料及仪器

喉癌细胞 Hep-2 系购自中山大学实验动物中心细胞库,DMEM 培养液、胎牛血清购自美国 Hyclone 公司,双抗(青霉素-链霉素)购自吉诺生物技术有限公司,99.99%重水、分析纯蔗糖购自 Sigma 公司。3/0.8 μm 深层过滤小型滤芯购自德国 Sartorius 公司,100 kDa Amicon 超滤离心管购自美国 Millipore 公司,Beckman 超速离心机、水平转子 SW40 由中山大学中山医学院医学实验中心提供,HITACHI H-7650 透射电子显微镜、200 目福尔瓦膜铜网由广东省微生物研究所提供,Beckman 专用超速离心管(最大体积 12.5 ml)购自美国 Beckman 公司,0.22 μm 滤膜购自美国 Millipore 公司。P100 Exosome Isolation Kit 购自美国 101Bio 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养上清液的预处理 ①血清中 exosomes 去除:将胎牛血清加入到普通离心管中,4 $^{\circ}\text{C}$ 、10 000 $\times g$ 离心 30 min,取上清液,加到 Beckman 专用超速离心管中,并置于水平转子 SW40 中,4 $^{\circ}\text{C}$ 、100 000 $\times g$ 超速离心 1 h,取上清液,即为去除 exosomes 的胎牛血清。②培养上清液收集:

喉癌 Hep-2 细胞常规传代,接种至培养瓶,更换为含 DMEM 培养液、10%胎牛血清(已去除内在 exosomes)和 1%双抗的完全培养液,在恒温 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 细胞培养箱中连续孵育 48 h。待细胞铺满瓶壁 90%后,再将细胞培养瓶置于 42 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中热休克 1 h,取出再置于恒温 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 细胞培养箱复苏 4 h,收集 90 ml 细胞培养上清液。③细胞培养上清液预处理:抽取收集好的细胞培养上清液,缓慢注射到 3/0.8 μm 深层过滤小型滤芯中,收集滤过液。

1.2.2 用 2 种方法分别提取 Exosomes 蔗糖密度梯度离心联合超滤离心法:①将已经预处理的滤过液加入 100kDa Amicon 超滤离心管中,4 $^{\circ}\text{C}$ 、1 500 $\times g$ 离心 30 min,收集超滤离心管底部浓缩液,约 3.75 ml。②将 30 g/L 蔗糖/重水(3.75 ml)、浓缩液(3.75 ml)、PBS(5.00 ml)按 3:3:4 的比例依次加入 Beckman 专用超速离心管(需加满至管口水平,以防超速离心时超速离心管变形),置于 SW40 转子中,并配平转子,4 $^{\circ}\text{C}$ 、100 000 $\times g$ 超速离心 1 h,取出超速离心管,可见管内液体分为 3 层,用移液管取最底层液体,即为混有 exosomes 的蔗糖重水密度垫。③用 10 ml PBS 重悬,并加入到 100 kDa Amicon 超滤离心管中,4 $^{\circ}\text{C}$ 、1 500 $\times g$ 离心 30 min,得到 3.75 ml 浓缩液。④抽取浓缩液注射到 0.22 μm 滤膜里去杂质,收集滤液,即为 exosomes 原液,-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

Exosome Isolation Kit:①收集 4 ml 已经预处理的滤过液,4 $^{\circ}\text{C}$ 、2 000 $\times g$ 离心 10 min,去除细胞和细胞碎片。②将离心后的无细胞的滤过液转移到玻璃管 1,置于冰浴中备用。③取出 Exosome Isolation Kit 中溶液 A、B、C,于玻璃管 2 中按比例依次加入溶液 A 0.25 ml、溶液 B 0.25 ml、溶液 C 1 ml,振荡混匀 5~10 s,得到均质溶液。④将玻璃管 2 中的均质溶液加入到玻璃管 1 中,拧紧玻璃管 1 盖子,剧烈振荡 30 s,然后置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 中孵育 1 h。可见玻璃管 1 中溶液分 3 层,用枪头小心地吸出最上层的液体并弃掉。⑤将余下的液体转移到一无菌 EP 管中,然后 4 $^{\circ}\text{C}$ 、1 000 $\times g$ 离心 3 min,再出现新的 3 分层,吸出最上层液体并弃掉。然后用枪头垂直插入 EP 管底部,完全吸出最底部液体并弃掉,只剩中层绒毛状物质。然后重复第⑤步。⑥打开 EP 管盖,室温下干燥 5~10 min。⑦按所得的绒毛状物质体积的 2 倍加入 1 \times PBS,剧烈地用枪头吹打重悬绒毛状物质。⑧从 Exosome Isolation Kit 中取出一过滤柱,将悬液小心地转移到过滤柱中,并将过滤柱在 4 $^{\circ}\text{C}$ 、2 000 $\times g$ 离心 5 min,然后收集所有的滤过液。⑨滤过液即为分离得到的纯化的 exosomes,直接使用或置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 1 周、-80 $^{\circ}\text{C}$ 3 个月。浓缩后的 exosomes 会沉淀在底部,每次

使用前应吹打均匀。

1.2.3 喉癌 Hep-2 细胞 exosomes 的电镜形态鉴定 取 20 μ l exosomes 原液,滴于电镜专用铜网上,室温静置 1 min,用滤纸从侧面吸干液体,滴加 20 μ l pH 7.0 磷钨酸溶液于铜网上,室温静置负染 1 min,吸干磷钨酸,置于常温下风干 10 min,在透射电镜下观察照相。

2 结果

2.1 蔗糖密度梯度离心联合超滤离心法提取 exosomes 的结果

透射电子显微镜下见 exosomes 均呈椭圆或圆形,质膜完整,直径 20~100 nm(图 1a),内部为低电子密度物质填充的浅染区,外层为较深染的脂质双层膜(图 1b)。exosomes 自身可分裂(图 1b)或融合(图 1c)形成新的 exosomes,exosomes 分散性较好,但密度较低,背景杂质较多(图 1d)。

2.2 Exosome Isolation Kit 提取 exosomes 的结果

exosomes 的形态基本与蔗糖密度梯度离心联合超滤离心法相同,多聚集成群(图 2a),其密度较高,背景杂质较少(图 2b),但聚集缠绕较多(图 2c),分散性较差(图 2d)。

3 讨论

关于 exosomes 的来源,Johnstone 等^[7]在电镜

下观察,在细胞内吞途径中,细胞内膜内陷,形成向内膨大的芽孢,基底部逐渐与细胞膜分离并融合,脱离后形成多胞体,其内含有多个小囊泡,小囊泡内包裹的主要是细胞质;当多胞体与细胞膜融合,其内的小囊泡即通过胞吐作用释放到细胞外,这种小囊泡即为 exosomes。在人体内,exosomes 具有清除细胞内多余蛋白质、介导免疫耐受、抗原提呈、介导细胞间的信息传递等多种功能,最为瞩目的是其在肿瘤免疫治疗方面的巨大潜能^[8]。余思等^[9]收集 BALB/c 小鼠未成熟树突状细胞与人胃癌细胞 SGC-7901 融合细胞培养上清液中的 exosomes 并作为瘤苗,注射至小鼠腹腔中,发现实验组小鼠脾细胞悬液的细胞毒性及该组小鼠存活时间明显增高,说明 exosomes 可诱导抗胃癌细胞的特异性免疫反应。张家模等^[10]通过 GPI 锚定蛋白将 IL-2 锚定于膀胱移行癌 T24 细胞来源的 exosomes 上,经树突状细胞负载后能有效诱导 CTL 细胞产生对靶细胞的杀伤效应。Wang 等^[11]分别从喉癌患者和声带息肉患者血清中提取 exosomes,发现喉癌组 exosomes 内 miRNA-21 和 HOTAIR 含量明显高于声带息肉组,并与喉癌的临床分期有密切关系,说明 exosomes 在临床诊断和预后评估具有重要价值。

分离提取 exosomes 的方法是另一个研究重

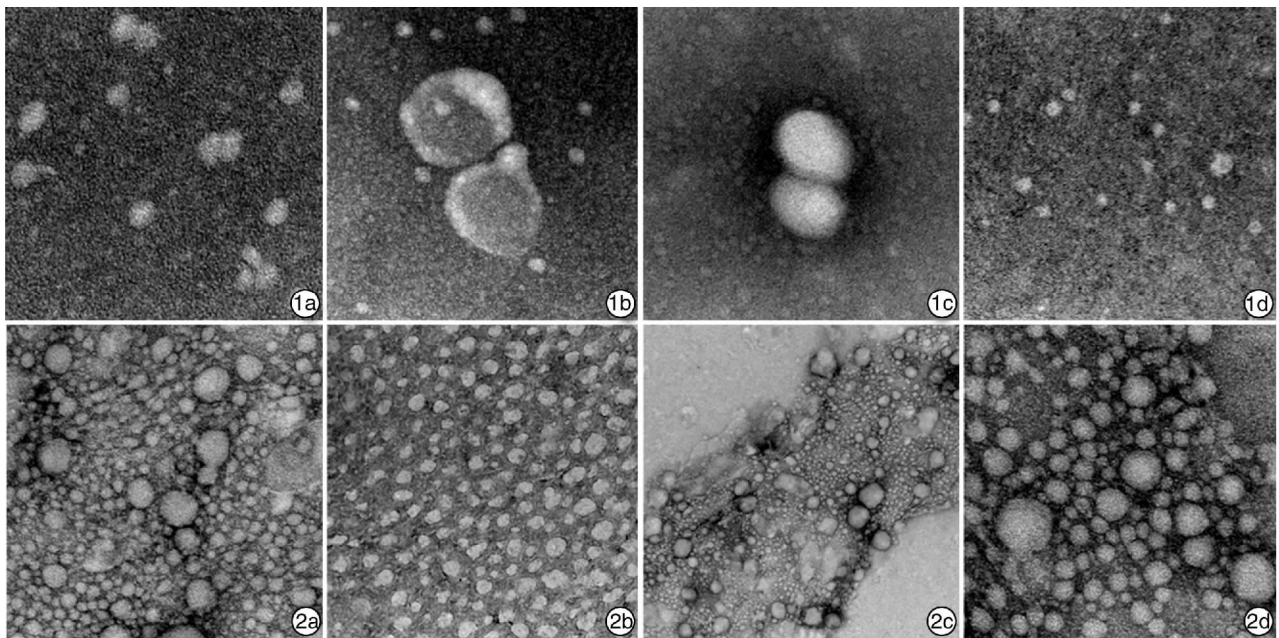


图 1 蔗糖密度梯度离心联合超滤离心法提取 exosomes 的结果 1a:exosomes 数量较少,或分散独立,或聚集成群,背景杂质较多 $\times 40\ 000$;1b:exosomes 大小不一,细胞质呈低电子密度,图中 exosomes 正在分裂出现胞吐,形成新的 exosomes $\times 90\ 000$;1c:exosomes 结构清晰,图中 2 个 exosomes 正在进行融合 $\times 100\ 000$;1d:exosomes 排列稀疏,密度较低,分散性良好 $\times 32\ 000$; **图 2 Exosome Isolation Kit 提取 exosomes 的结果** 2a: exosomes 排列紧密,分散性差 $\times 40\ 000$;2b: exosomes 密度极高,遍布视野,大小相仿,质膜轮廓完整,与背景形成清晰对比 $\times 29\ 000$;2c:exosomes 大小不一,密度极高,相互缠绕,分散性较差,背景透亮,杂质极少 $\times 37\ 000$;2d:exosomes 聚集缠绕,结构清晰,大小不一 $\times 42\ 000$ 。

点。对 exosomes 分离提取方法的评价,取决于其能否最大程度地减少终产物中的蛋白复合物、膜性大分子,保证 exosomes 的纯度;只有纯度高的 exosomes 才能确保后续研究的质量。由于 exosomes 的来源广泛,故其分离提取的方法也各有利弊。本研究分别采取蔗糖密度梯度离心联合超滤离心法及 Exosome Isolation Kit,从喉癌 Hep-2 细胞培养上清液中提取 exosomes,并借助透射电镜观察,对 2 种方法进行了评价。

蔗糖密度梯度离心法先进行多次不同速度的离心,将不同大小、密度的多种蛋白复合物、细胞及细胞碎片等杂质去除,然后加入到蔗糖重水密度垫中进行高速离心,得到纯化的 exosomes。该法需要多步离心,操作繁琐,耗时长,而且每次离心都需将样品转移到新的离心管中,使样品多次暴露于外界,增加了样品的污染率。Zhang 等^[12]在此基础上进行了改进,采用超滤离心联合蔗糖密度梯度离心,从人舌鳞状细胞癌细胞 Tca8113 的细胞培养上清液中分离提取 exosomes,用激光衍射仪测量其直径分布时发现 exosomes 的直径大多集中在 30~150 nm,几乎不存在大于 200 nm 的粒子;并发现 exosomes 总蛋白及目标蛋白含量明显增高,而 Western blot 结果显示该法能更好地保留包括 Alix 和 Hsp70 等表面标记物,证明该法能得到纯度更高的 exosomes。整个过程只需超速离心 1 次,摒弃了过去多次离心的繁琐,耗时更短,降低了样品的污染风险。

Exosome Isolation Kit 是新兴方法,通过特异性提取试剂利用免疫共沉积的原理,将 exosomes 从大分子蛋白复合物等杂质中分离出来。Taylor 等^[13]收集Ⅲ期卵巢癌患者的腹水,分别采用分子排阻色谱分析、免疫磁珠、超速离心及商品化试剂盒,从中分离出卵巢癌细胞来源的 exosomes,通过分析 4 种方法所得到的 exosomes 内 RNA 及蛋白发现,商品化试剂盒和分子排阻色谱分析所提取的 exosomes 能明显提高 RNA 的浓度,且 RNA 的 A_{260}/A_{280} 比值更高;另一方面,在 Western blot 的结果中,商品化试剂盒能获得更高的 exosomes 蛋白,且其纯度在各份样品中均居 4 种方法之首。证明了其在提取 exosomes 方面的可靠性。

我们改进了蔗糖密度梯度离心联合超滤离心法:①100 kDa Amicon 超滤离心管代替了 500 kDa MWCO 中空纤维膜,大大缩短了超滤时间,提高回收的超滤液浓度,降低了超滤过程中蛋白的流失,②对样品进行预处理,收集细胞培养上清液前先将喉癌 Hep-2 细胞进行热休克;研究发现,热休克作用能增加肿瘤细胞分泌特异性蛋白及免疫分子的数量,间接使从细胞分离出来的 exosomes 所含的特异性蛋白及免疫分子浓度升高^[14]。另外,我们采

用了 Exosome Isolation Kit 进行 exosomes 的分离。实验结果经透射电镜鉴定和评价,发现:①2 种方法均能从喉癌 Hep-2 细胞培养上清液中成功提取 exosomes;②蔗糖密度梯度离心联合超滤离心法污染小,成本低,能有效去除因细胞凋亡而产生的核小体碎片及非特异性蛋白聚合物,获得较高纯度的 exosomes^[15];我们从电镜观察,exosomes 分散性较好,有利于后续对 exosomes 的修饰,但操作较繁琐,且所需样品量较大;③Exosome Isolation Kit 步骤简单,耗时短,所需样品量较少,电镜下可见 exosomes 数量较多,但多缠绕分布,且试剂盒价格昂贵,成本高,若需大量制备 exosomes 则不宜选择。另外,在提取过程中可能会有试剂残留在终产物里,在某些方面会对后续实验结果产生误差。若加入对照组证明 exosomes 内无试剂残留或试剂对后续反应体系无影响,则相当于增加了后续实验的操作步骤及耗时。根据我们的研究及相关文献报道,这 2 种方法各具特点,均是较理想的 exosomes 分离提取方法,可根据自身研究及实验特点,结合实际情况来选择。

参考文献

- [1] JOHNSTONE R M, ADAM M, HAMMOND J R, et al. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activitive with released vesicles (exosomes) [J]. *J Biol Chem*, 1987, 262:9412-9420.
- [2] KALANI A, TYAGI A, TYAGI N. Exosomes: mediators of neurodegeneration, neuroprotection and therapeutics [J]. *Mol Neurobiol*, 2014, 49:590-600.
- [3] LANE R E, KORBIE D, ANDERSON W, et al. Analysis of exosome purification methods using a model liposome system and tunable-resistive pulse sensing [J]. *Sci Rep*, 2015, 6:7639-7646.
- [4] FRANZEN C A, SIMMS P E, VAN HUIS A F, et al. Characterization of uptake and internalization of exosomes by bladder cancer cells [J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014:619-629.
- [5] TAURO B J, GREENING D W, MATHIAS R A, et al. Comparison of ultracentrifugation, density gradient separation, and immunoaffinity capture methods for isolating human colon cancer cell line LIM1863-derived exosomes [J]. *Methods*, 2012, 56:293-304.
- [6] WEBBER J, STONE T C, KATILIUS E, et al. Proteomics analysis of cancer exosomes using a novel modified aptamer-based array (SOMAScanTM) Platform [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2014, 13:1050-1064.
- [7] JOHNSTONE R M, MATHEW A, MASON A B, et al. Exosome formation during maturation of mammalian and avian reticulocytes: evidence that exosome release is a major route for externalization of obsolete membrane proteins [J]. *J Cell Physiol*, 1991, 147:27-36.

喉非鳞状细胞癌恶性肿瘤的临床特点分析

谢华顺¹ 闫燕¹ 刘仲奇¹ 马芙蓉¹

[摘要] 目的:回顾性分析 15 例喉非鳞状细胞恶性肿瘤的临床特点,探讨该类疾病的诊断及治疗方法。方法:收集 15 例经病理确诊为喉非鳞状细胞恶性肿瘤患者的临床资料,分析其病理学、CT、治疗、随访结果等特点。结果:患者男女比例为 4:1;声门上型占 53.33%(8/15)。15 例患者中,1 例单纯行气管切开术缓解呼吸困难症状,放弃其他治疗;3 例明确诊断后行放疗或化疗;其余患者根据病情行不同方式的手术切除,术后辅助放疗和(或)化疗。随访结果提示,1、3、5 年生生存率分别为 79.4%、57.8%、27.5%,中位生存时间为 42 个月。结论:男性患者易罹患喉非鳞状细胞恶性肿瘤,其中以声门上型多见;其临床特点与喉鳞状细胞癌有差异,容易复发或转移;5 年生生存率不高,预后较差。

[关键词] 喉肿瘤;非鳞状细胞癌;治疗;预后

doi:10.13201/j.issn.1001-1781.2015.17.009

[中图分类号] R739.6 **[文献标志码]** A

Clinical profile analysis of laryngeal nonsquamous cell malignancies

XIE Huashun YAN Yan LIU Zhongqi MA Furong

(Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, the Third Hospital of Peking University, Beijing, 100191, China)

Corresponding author: YAN Yan, E-mail: wzyyer34@163.com

Abstract Objective: To observe clinical characteristics of 15 cases of laryngeal nonsquamous malignancies. **Method:** The clinical data of 15 patients with laryngeal nonsquamous malignancies were collected. Details about pathology, CT, treatment and follow-up results were carefully taken into account. **Result:** There were more male patients than females while the sex ratio was 4:1. Supraglottic malignancies accounting for 53.33% seemed to be the most common type. In all the 15 patients, 1 patient gave up other treatment except tracheotomy to relieve laryngeal obstruction. Three patients took radiotherapy and chemotherapy. The rest patients underwent surgical procedure after strict endoscopic, radiologic staging. Radiotherapy and (or) chemotherapy were chosen after operation. The follow-up results show that 1 year survival rate was 79.4% and the 3 year survival rate was 57.8%, 5 year survival rate was 27.5% which was not optimistic. **Conclusion:** Being a kind of rare type laryngeal nonsquamous malignancies have difference clinical characteristics with laryngeal squamous cell carcinoma. Laryngeal nonsquamous cell carcinoma have much lower 5 year survival rate and are easier to suffer recurrence and metastasis compared with laryngeal squamous cell carcinoma.

Key words laryngeal neoplasms; nonsquamous cell carcinoma; therapy; prognosis

¹ 北京大学第三医院耳鼻咽喉头颈外科(北京,100191)
通信作者:闫燕, E-mail: wzyyer34@163.com

[8] 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: 28-41.

[9] 余思, 邓建中, 李志澄, 等. 未成熟树突状细胞-胃癌细胞融合细胞来源的 exosome 诱导特异性抗肿瘤免疫[J]. *中华临床医师杂志(电子版)*, 2013, 7(2): 113-116.

[10] 张家模, 吴小候, 张翮, 等. 白细胞介素 2 锚定的 exosomes 的制备及其对膀胱癌细胞的诱导杀伤效应[J]. *中华肿瘤杂志*, 2011, 33(8): 564-569.

[11] WANG J, ZHOU Y, LU J, et al. Combined detection of serum exosomal miR-21 and HOTAIR as diagnostic and prognostic biomarkers for laryngeal squamous cell carcinoma[J]. *Med Oncol*, 2014, 31: 148-150.

[12] ZHANG Z Y, WANG C X, LI T, et al. Comparison of ultracentrifugation and density gradient separation methods for isolating Tca8113 human tongue cancer cell line-derived exosomes[J]. *Oncol Lett*, 2014, 8: 1701-1706.

[13] TAYLOR D D, ZACHARIAS W, GERCEL-TAYLOR C. Exosomes isolation for proteomic analyses and RNA profiling[J]. *Methods Mol Biol*, 2011, 728: 235-246.

[14] 董超, 刘迪, 冯业童, 等. 结直肠癌细胞外泌体的制备及其促单核细胞增殖作用[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2013, 39(3): 472-476.

[15] HOOD J L, SCOTT M J, WICKLINE S A. Maximizing exosome colloidal stability following electroporation[J]. *Anal Biochem*, 2014, 448: 41-49.

(收稿日期: 2015-06-07)