

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.21.010

文章编号: 1005-8982(2017)21-0054-07

临床研究·论著

循环微粒对口腔癌进展的作用机制研究

祝华珺, 汤晶, 葛自力

(苏州大学附属第一医院 口腔科, 江苏 苏州 215006)

摘要:目的 比较正常人和口腔鳞状细胞癌患者循环微粒的含量,并探究循环微粒在口腔癌进展中的作用。**方法** 差速离心法收集正常人和口腔癌循环微粒。流式细胞术检测循环微粒的浓度;MTT法和EdU实验检测细胞增殖活性,划痕实验和Transwell实验分别检测细胞迁移和侵袭能力;裸鼠移植瘤模型检测循环微粒对肿瘤细胞体内成瘤的影响。**结果** 口腔癌患者循环微粒的含量比正常人的高,且循环微粒的浓度与口腔癌患者血液高凝状态密切相关。口腔癌患者来源的循环微粒促进口腔癌细胞增殖、迁移、侵袭和体内成瘤。**结论** 口腔癌患者来源的循环微粒促进口腔癌细胞增殖、迁移、侵袭和体内成瘤,在口腔癌的发生、发展中起重要作用。

关键词: 循环微囊泡;口腔癌;增殖;迁移;侵袭

中图分类号: R782

文献标识码: A

Role of CMPs in development of oral squamous cell carcinoma

Hua-jun Zhu, Jing Tang, Zi-li Ge

(The First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou, Jiangsu 215006, China)

Abstract: Objective To evaluate the role of circulating microparticles (CMPs) in the development of oral squamous cell carcinoma (OSCC). **Methods** CMPs were isolated by gradient centrifuge from healthy volunteers and OSCC patients. Cell proliferation was determined by MTT assay and EdU test. Migration and invasion activity were evaluated by wound healing assay and Transwell, respectively. Nude mouse models were utilized to evaluate tumorigenesis capacity of OSCC xenograft with or without CMPs. **Results** The concentration of CMPs was significantly higher in OSCC patients compared with healthy volunteers, and the increase of CMPs was closely associated with hyper-coagulation status. The ability of proliferation, migration, invasion and tumorigenesis of CAL27 cells were significantly enhanced by OSCC-derived CMPs. **Conclusions** OSCC-derived CMPs can increase proliferation, migration, invasion and tumorigenesis of CAL27 cells.

Keywords: circulating microparticles; oral squamous cell carcinoma; proliferation; migration; invasion

细胞源性微粒是细胞在激活、损伤或凋亡时经出芽方式释放的直径介于 100 ~ 1000 nm 的膜性囊泡^[1],其携带母体细胞特征性生物信息分子,可作为细胞间运输载体将该生物分子传递给其他细胞^[2-3]。微粒大量存在于机体的血液、尿液及唾液等体液之中,这些微粒统称为体液源性微粒^[4]。血液中含有的微粒被称为循环微粒(circulating microparticles, CMPs)^[5-6]。循环微粒在许多生理病理学过程中充当生物信息传递载体的作用^[7-9]。本研究的目的在于探

究循环微粒在口腔癌进展中的作用。

1 材料与方法

1.1 主要材料与设备

1.1.1 标本的制备 选取 2016 年 1 月 1 日 -2016 年 12 月 31 日就诊于苏州大学附属第一医院口腔科的口腔鳞状细胞癌患者 20 例。所有患者均在口腔外科门诊经局部组织切取活检术确诊为口腔鳞状细胞癌。本研究符合伦理要求,患者及家属均知情同意。

收稿日期:2017-04-27

[通信作者] 葛自力, E-mail: gezl@163.com; Tel:13451600531

用含抗凝剂的真空采血管收集口腔癌患者 5 ml 静脉血样品;并转移至离心管中,4℃条件下,2 500 r/min 离心 20 min,离心 2 次,取上清液,加入上清体积 3 倍的无菌 PBS 稀释血清;4℃条件下 32 000 r/min 离心 60 min,以 150 μ l 无菌 PBS 重悬沉淀,即获得口腔癌患者循环微粒。

1.1.2 材料和设备 DMEM 培养基、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)、双抗(青霉素+链霉素)及胰蛋白酶(购自美国 Hyclone 公司),基质胶(购自美国 BD 公司),MTT、DAPI 封片剂(购自武汉谷歌生物科技有限公司),Ki-67、CD31、CD41、CD144 及 CD45 一抗(购自美国 Sigma 公司),细胞培养耗材(购自无锡耐思生物科技有限公司),Transwell 小室(购自美国 Corning 公司),胸腺嘧啶核苷酸类似物 -EdU(5-乙炔基-2'脱氧尿嘧啶核苷)细胞增殖检测试剂盒(EdU 试剂盒)(购自广州锐博生物科技有限公司)。

1.2 微粒粒径检测

1.2.1 动态光散射实验 将收集的微粒用 PBS 垂悬至合适的浓度,用 Nano-ZS ZEN 3600 型动态光散射(dynamic light scattering, DLS)仪分析微粒水合粒径。

1.2.2 微粒形态表征 取 10 μ l 微粒 PBS 垂悬液滴于碳支持膜铜网上,室温孵育 5 min,滤纸吸干铜网;将铜网置于 1%磷钨酸复染液中染色,3 min 后滤纸吸干液体,自然晾干铜网;将铜网置于 Hitachi HT7700 型透射电镜上观察、拍照,测量微粒粒径大小。

1.3 细胞增殖活性检测

1.3.1 细胞培养 口腔癌细胞系 CAL27 细胞(由中国典型培养物保藏中心提供)培养于含 10%FBS 的 DMEM 培养基中,隔天换液,每 3 天传代 1 次;细胞培养环境为 37℃、95%湿度、5%二氧化碳 CO₂ 浓度。

1.3.2 MTT 实验 收集对数期细胞,调整细胞悬液浓度加入 96 孔板:每孔加入 100 μ l,使细胞调密度 1 000~10 000 个/孔。细胞分为对照组和实验组,实验组细胞加入终浓度为 40 μ g/ml 的循环微粒。5% CO₂,37℃孵育 0~72 h,每孔加入 10 μ l MTT 溶液(5 mg/ml),继续培养 4 h。终止培养,小心吸去孔内培养液。每孔加入 100 μ l 二甲基亚砜,置摇床上低速振荡 10 min,使结晶物充分溶解。在酶联免疫检测仪 OD490 nm 处测量各孔的吸光值。

1.3.3 EdU 实验 细胞分为对照组和实验组,实验

组细胞加入终浓度为 40 μ g/ml 的循环微粒。用细胞培养基按 1 000:1 的比例稀释 EdU 溶液(试剂 A),制备适量 50 μ mol/L EdU 培养基;每孔加入 100 μ l 50 μ mol/L EdU 培养基孵育 2 h,弃培养基。PBS 清洗细胞 1、2 次,每次 5 min。每孔加入 50 μ l 细胞固定液(即含 4%多聚甲醛的 PBS)室温孵育 30 min,弃固定液;每孔加入 50 μ l 2 mg/ml 甘氨酸,脱色摇床孵育 5 min 后,弃甘氨酸溶液;每孔加入 100 μ l PBS,脱色摇床清洗 5 min,弃 PBS。每孔加入 100 μ l 的 Apollo 染色反应液,避光、室温、脱色摇床孵育 30 min 后,弃染色反应液;每孔每次加入 100 μ l 甲醇清洗 1、2 次,每次 5 min;PBS 清洗 1 次,每次 5 min。含有 DAPI 封片剂封片。

1.4 细胞迁移和侵袭能力检测

1.4.1 细胞划痕试验 将对数生长期的 CAL27 细胞接以 5×10^5 个/孔接种于 6 孔板中,培养 24 h 后,以 20 μ l 黄色无菌吸头沿培养孔的正中划一道划痕,PBS 轻轻冲洗并吸收游离细胞。实验组细胞加入终浓度为 40 μ g/ml 的循环微粒。

1.4.2 Transwell 实验 细胞分为对照组和实验组,实验组细胞加入终浓度为 40 μ g/ml 的循环微粒。将铺有基质胶 Transwell 小室置于 24 孔板上,在外室加入 500 μ l 含有 40 μ g/ml 的完全培养基,小室内加入 300 μ l 无血清培养基垂悬的 CAL27 细胞(1×10^6 个/ml)。培养 24 h 后,从培养箱中取出 Transwell 小室,PBS 清洗,用棉签擦去上层基质胶和细胞,95%乙醇固定 10 min,结晶紫染色 10 min,PBS 冲洗 3 次,显微镜下观察并拍照成像。

1.5 裸鼠移植瘤实验

将对数生长期的 CAL27 细胞以 PBS 重悬,使细胞密度为 1×10^7 个/ml。将 200 μ l 含有细胞的 PBS 悬液注射于裸鼠腹侧皮下(每组各 8 只),观察并测量和记录肿瘤大小。实验组老鼠,每 3 天经尾静脉注射 1 次循环微粒(50 μ g/次),连续注射次。肿瘤体积计算公式为:(长 \times 宽 \times 宽)/2。观察期结束后,处死裸鼠,取下肿瘤标本及肺组织,制成石蜡切片进行后续实验。

1.6 免疫组织化学染色

标本取材后切成小块组织,4%多聚甲醛固定标本、流水冲洗后,梯度酒精脱水、石蜡包埋及组织切片(4 μ m)。然后二甲苯脱蜡、梯度酒精入水、高压抗原修复、羊血清 37℃孵育切片 20 min,甩去血清,滴加 Ki-67 一抗(1:200),4℃孵育过夜。滴加相应辣

根过氧化物酶标记的二抗约 50 μl 完全覆盖切片, 37℃ 孵育切片 20 min。PBS 缓冲液漂洗后, 滴加链霉亲和素 - 过氧化物酶, 37℃ 孵育切片 20 min。PBS 缓冲液漂洗后, 于光学显微镜下显色。苏木素复染细胞核后流水冲洗 15 min 后, 梯度酒精脱水, 切片晾干后行二甲苯透明及中性树胶封片过夜。

1.7 流式细胞术

向细胞或微粒垂悬液中加入 CD31、CD41、CD144 及 CD45 单克隆抗体 (1 : 100), 室温孵育 30 min; 离心去除多余抗体后以 PBS 垂悬细胞或微粒; 加入荧光标记二抗 (1 : 200), 37℃ 孵育 30 min, PBS 洗涤 5 min × 2 次; 以 400 μl PBS 重悬细胞或微粒, 流式细胞仪检测。

1.8 统计学方法

数据处理采用 GraphPad Prism 6.0 软件, 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组比较用 *t* 检验, 多组比较用单因素方差分析, 若方差齐, 则组间两两比较用 LSD-*t* 检验, 相关性分析采用 Spearman 法, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 循环微粒的鉴定结果

差速离心法收集口腔癌患者循环微粒, 垂悬于 PBS。透射电镜下, 分离所得的沉淀呈双层膜结构 (见图 1A), 大小范围为 100 ~ 1 000 nm, 其中 400 ~ 500 nm 的双层膜结构最多 (见图 1B)。流式细胞分析 (见图 1C) 和动态光散射结果 (见图 1D) 表明, 离心分离的沉淀粒径分布范围位于 100 ~ 1 000 nm, 符合微粒的粒径分布, 表明本研究分离所得的沉淀为循环微粒。

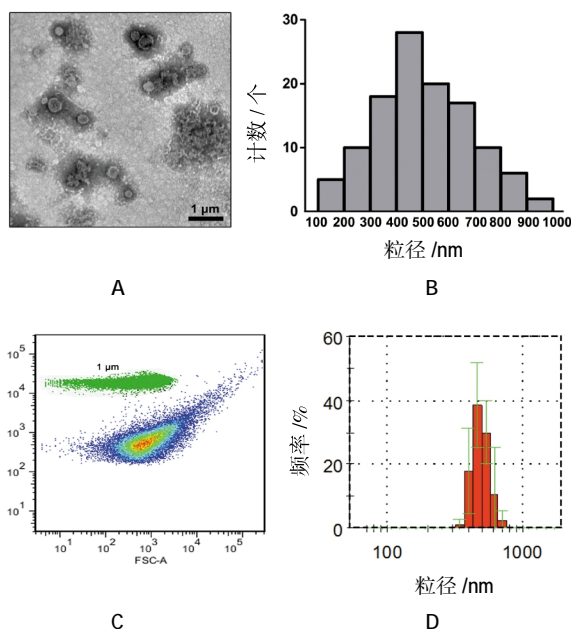
2.2 口腔癌患者循环微粒含量

分别收集正常人和口腔癌患者循环微粒, PBS

垂悬后以流式细胞仪计数。结果发现, 口腔癌患者循环微粒的浓度达到 (7808.33 ± 2905.51) 个 / μl, 正常人循环微粒浓度为 (2090.2 ± 714.05) 个 / μl (见图 2A)。口腔癌患者与正常人循环微粒浓度比较, 采用 *t* 检验, 差异有统计学意义 (*t* = 3.876, *P* = 0.004), 口腔癌患者患者微粒浓度高于正常人。循环微粒主要由血小板来源的微粒, 内皮细胞来源的微粒, 白细胞来源的微粒构成。随后进一步统计正常人和口腔癌患者循环微粒的成分差异。见图 2B 所示, 口腔癌患者和正常人循环微粒中各成分所占比例基本保持不变。

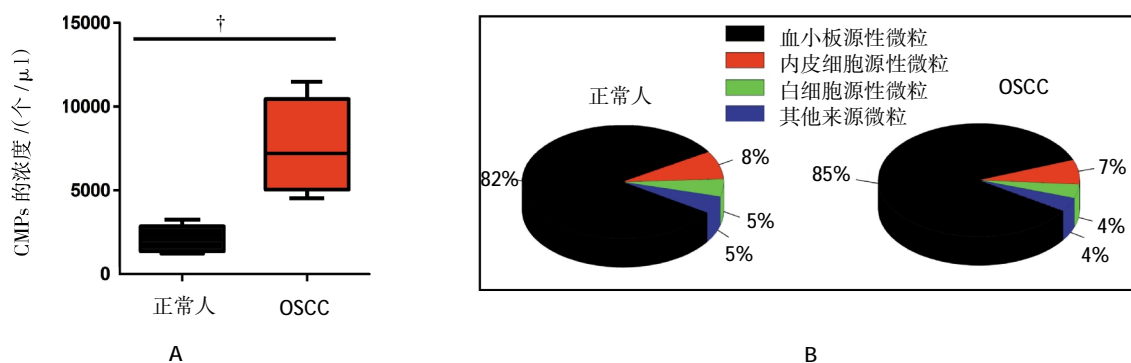
2.3 循环微粒浓度与口腔癌血液高凝状态的关系

恶性肿瘤患者血液普遍存在高凝状态, 而静脉血栓形成是恶性肿瘤患者的主要死因和并发症之一。



A: CMPs 电镜图; B: CMPs 电镜下粒径分布; C: 流式细胞术分析 CMPs 粒径大小; D: DLS 测量 CMPs 水合粒径

图 1 口腔癌患者循环微粒的分离与鉴定



A: 正常人和口腔癌患者 CMPs 的浓度比较; B: 正常人和口腔癌患者 CMPs 成分分析。† 与正常人比较, *P* < 0.01

图 2 口腔癌患者与正常人循环微粒比较

本研究检测正常人口腔癌患者的纤维蛋白值(fibrinogen, FIB)、凝血酶原时间(prothrombin time, PT)和部分凝血酶时间(activated partial thromboplastin time, APTT), 结果发现, 口腔癌患者 FIB (4.00 ± 1.19)g/L、PT (8.71 ± 2.49)s 和 APTT (19.27 ± 2.86)s 与正常人 FIB (2.94 ± 1.43)g/L、PT (10.57 ± 2.50)s 和 APTT (25.27 ± 4.46)s 比较, 采用 *t* 检验, 差异有统计学意义(FIB: $t=2.297, P=0.028$; PT: $t=2.239, P=0.033$; APTT: $t=4.475, P=0.001$), 口腔癌患者 FIB 高于正常人, 口腔癌患者 PT 和 APTT 低于正常人(见图 3A)。将口腔癌患者循环微粒浓度和口腔癌患者 FIB、PT 和 APTT 进行相关性分析, 结果发现, 循环微粒浓度与 FIB 呈正相关($P < 0.0001$), 与 PT ($P < 0.0001$) 和 APTT ($P < 0.0038$) 呈负相关(见图 3B), 证明循环微粒可能与口腔癌血液高凝状态有关。

2.4 口腔癌患者微粒对肿瘤细胞增殖的影响

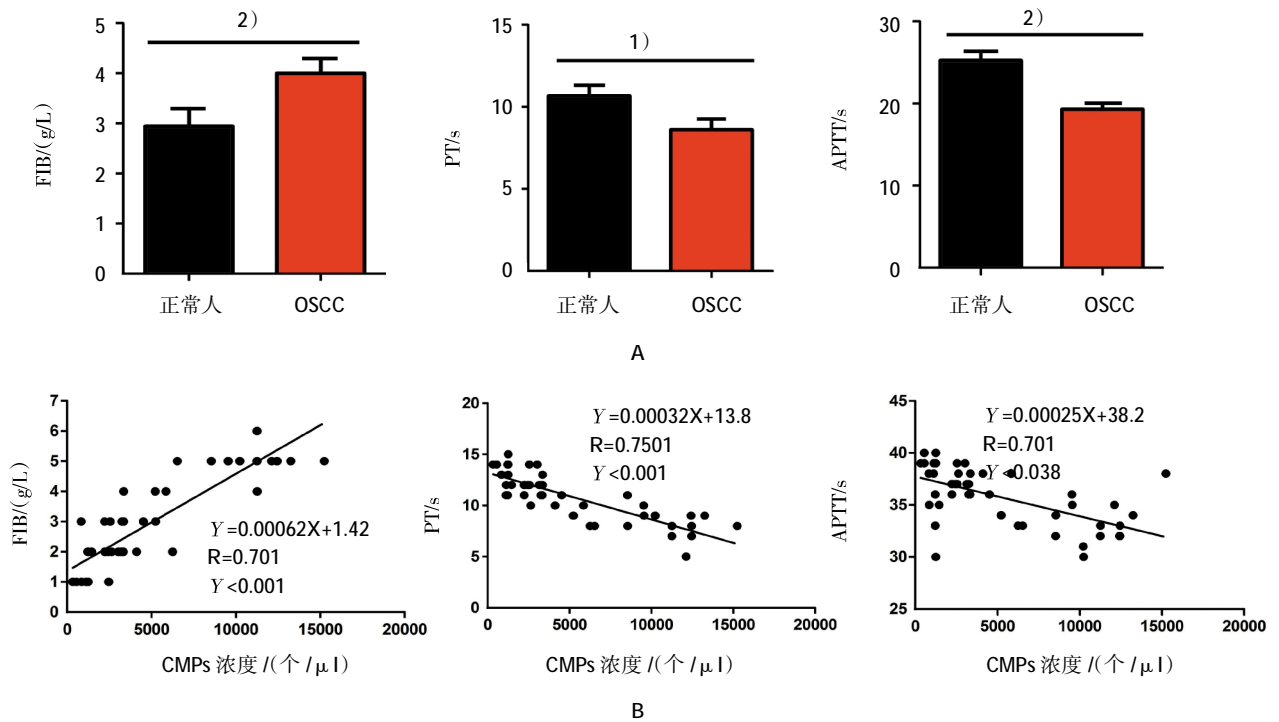
MTT 实验证实, 口腔癌循环微粒促进 CAL27 细胞增殖, 且具有浓度依赖性(见图 4A)。EdU 实验证实口腔癌患者来源的循环微粒明显提高口腔癌细胞的增殖活性(见图 4B, 增殖细胞标记为绿色)。

2.5 口腔癌患者微粒促进肿瘤细胞迁移和侵袭

随后分别用划痕实验和 Transwell 小室实验检

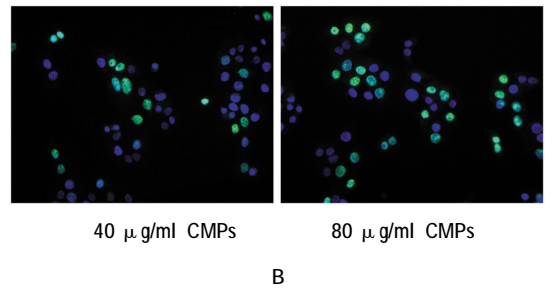
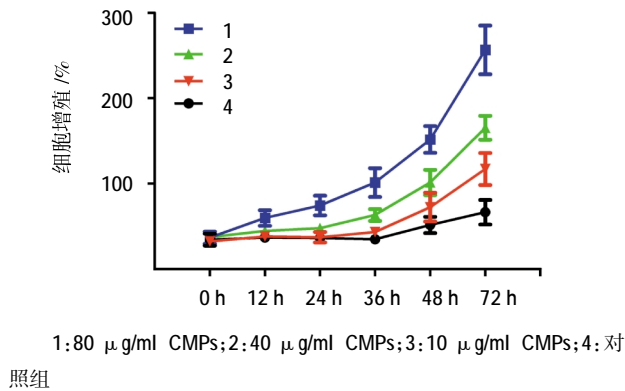
测口腔癌患者循环微粒对口腔癌细胞迁移和侵袭能力的影响。见图 5 所示, 刮除细胞 24 h 后, 各组细胞均向划痕区域迁移; 循环微粒浓处理组[$10 \mu\text{g/ml}$, (275.21 ± 124.12)个; $20 \mu\text{g/ml}$, (352.25 ± 164.27)个; $80 \mu\text{g/ml}$, (467.54 ± 175.65)个]与对照组迁移至划痕区细胞的数目(175.78 ± 89.35)个比较, 采用 *t* 检验, 差异有统计学意义($10 \mu\text{g/ml}$, $t=3.24, P=0.031$; $20 \mu\text{g/ml}$, $t=2.68, P=0.000$; $80 \mu\text{g/ml}$, $t=4.24, P=0.000$), 循环微粒处理组迁移至划痕区细胞的数目多于对照组。且随着循环微粒浓度的升高, 迁移至划痕区细胞的数目逐渐提高, 证明口腔癌循环微粒可提高口腔癌细胞迁移能力。

Transwell 小室实验结果证实, 循环微粒浓处理组[$10 \mu\text{g/ml}$, (19.84 ± 4.36)个; $20 \mu\text{g/ml}$, (25.58 ± 5.54)个; $80 \mu\text{g/ml}$, (32.24 ± 652)个]与对照组突破基质胶的细胞数目(15.21 ± 3.34)个比较, 采用 *t* 检验, 差异有统计学意义($10 \mu\text{g/ml}$, $t=3.27, P=0.032$; $40 \mu\text{g/ml}$, $t=3.54, P=0.000$; $80 \mu\text{g/ml}$, $t=2.28, P=0.000$), 循环微粒处理组突破基质胶的细胞数目多于对照组(见图 6)。且随着循环微粒浓度的升高, 突破基质胶的细胞数目逐渐增加, 表明口腔癌循环微粒可提高口腔癌细胞侵袭能力。



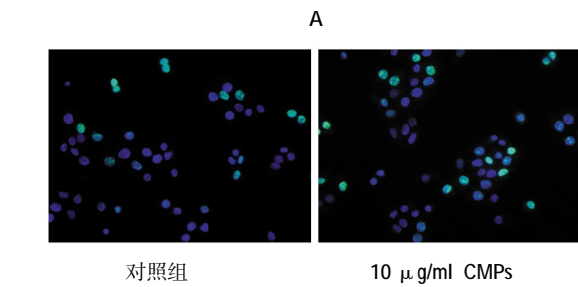
A: 口腔癌患者和正常人 FIB、PT 和 APTT; B: 循环微粒浓度与 FIB、PT 和 APTT 相关性分析。1) 与正常人比较, $P < 0.05$; 2) 与正常人比较, $P < 0.01$

图 3 口腔癌患者循环微粒浓度与口腔癌血液高凝状态的关系



A: MTT 法检测不同浓度 CMPs 对口腔癌细胞增殖活性的影响; B: EdU 法检测不同浓度 CMPs 对口腔癌细胞增殖活性的影响

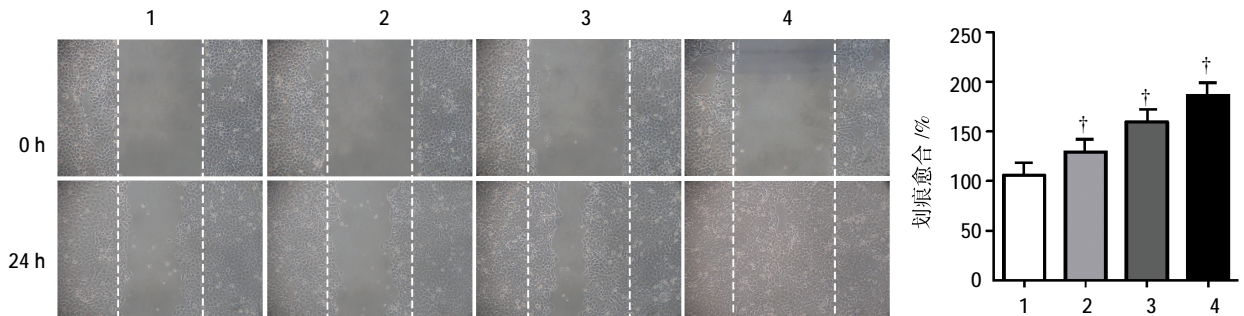
图 4 口腔癌循环微粒促进口腔癌细胞增殖



2.6 口腔癌患者微粒对肿瘤细胞体内成瘤能力的影响

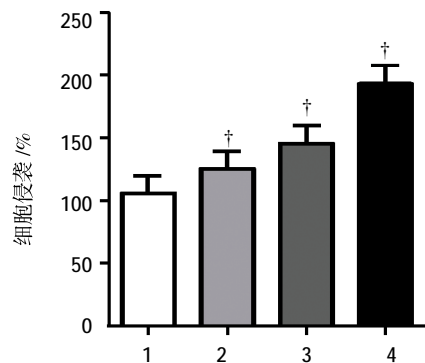
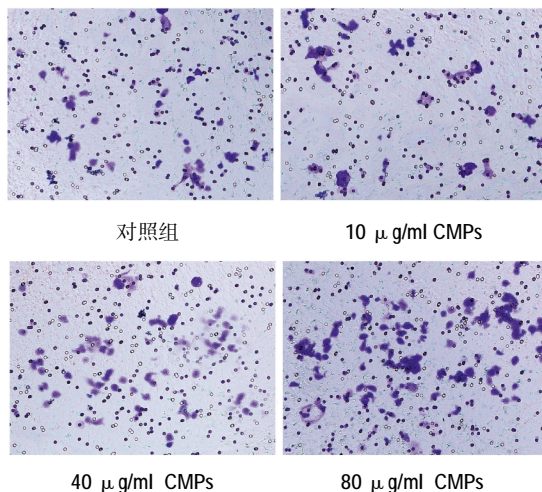
循环微粒处理组(1 282.85 ± 427.36)mm³ 与对照

组裸鼠背部肿瘤体积(333.03 ± 160.9)mm³ 比较, 差异有统计学意义($t=4.172, P=0.000$), 循环微粒处理组裸鼠体积大于对照组(见图 7A、B)。观察期结束后, 安乐死所有动物, 收获肿瘤标本。循环微粒处理组与对照组裸鼠背部肿瘤质量比较, 差异有统计学意义($t=3.372, P=0.000$), 循环微粒处理组裸鼠质量(0.51 ± 0.17)g 大于对照组(0.29 ± 0.06)g(见图 7C)。将肿瘤组织制成组织切片, 免疫组织化学检测后发现, 循环微粒处理后的肿瘤组织内 Ki-67(增殖细胞标志物)表达水平高于对照组(见图 7D)。



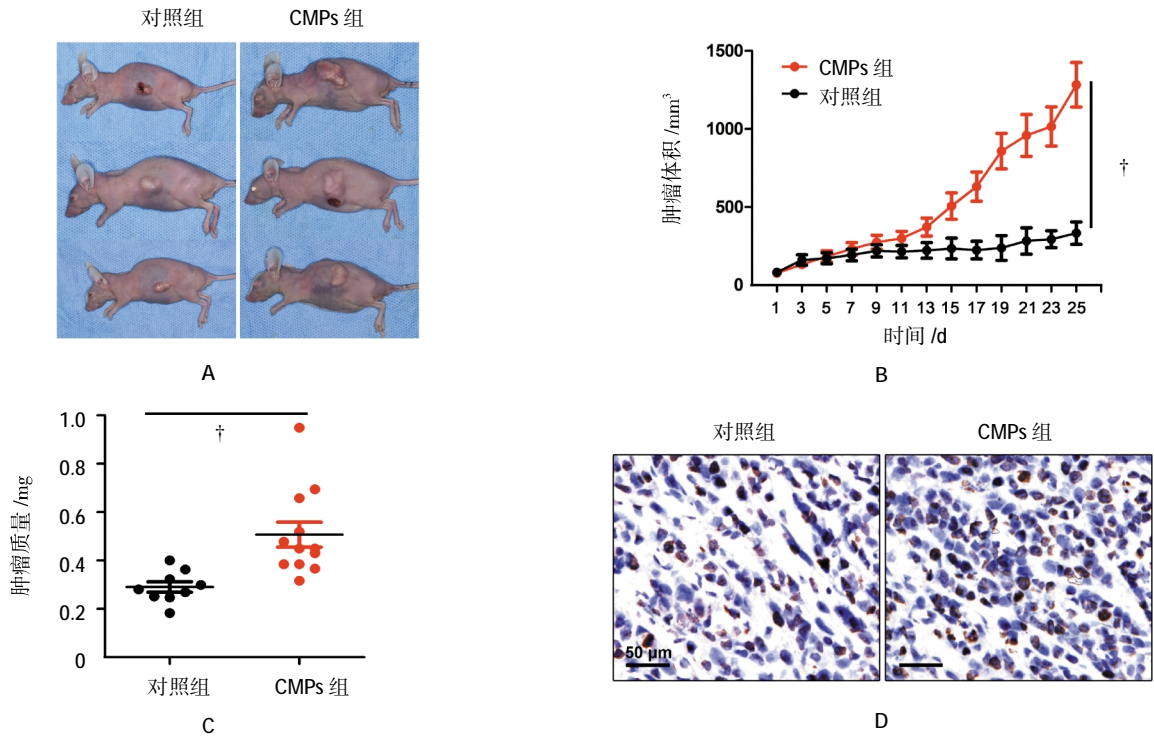
1: 对照组; 2: 10 μg/ml CMPs; 3: 40 μg/ml CMPs; 4: 80 μg/ml CMPs。† 与对照组比较, $P < 0.05$

图 5 口腔癌循环微粒促进口腔癌细胞迁移



1: 对照组; 2: 10 μg/ml CMPs; 3: 40 μg/ml CMPs; 4: 80 μg/ml CMPs。† 与对照组比较, $P < 0.05$

图 6 口腔癌循环微粒促进口腔癌细胞侵袭



A: 对照组和 CMPs 组裸鼠图像; B: 对照组和 CMPs 组裸鼠肿瘤生长曲线; C: 对照组和 CMPs 组裸鼠肿瘤质量; D: 对照组和 CMPs 组裸鼠肿瘤 Ki-67 染色。† 与对照组比较, $P < 0.01$

图 7 口腔癌循环微粒对体内成瘤能力的影响及 ki-67 表达水平

3 讨论

根据中国国家癌症中心发布的《2015 年中国癌症统计》显示,仅 2015 年中国就有 429.2 万新发肿瘤病例和 281.4 万癌症死亡病例,相当于平均每天有 1.2 万人罹患肿瘤、7 500 人死于癌症^[9]。该研究报告还指出,在中国,癌症的发病率和死亡率还在不断攀升,癌症已经成为疾病死因之首,是非常重要的公共健康问题。研究肿瘤发生、发展的机制对于寻找更好的治疗方法具有重要的现实意义。口腔癌是人类常见的肿瘤之一,居世界常见癌症第 6 位^[11-12]。目前,口腔癌患者 5 年生存率为 50%~60%,口腔癌的治疗仍然存在极大的挑战^[13-16]。许多患者就诊时已处于晚期,导致治疗效果较差,因此发展更可靠的早期诊断方法对于预防口腔癌具有重要意义^[17]。

细胞源性微粒可以从细胞培养条件培养基中分离,也可以从正常人和患者体液中分离。几乎所有的真核细胞都能产生微粒,而每种细胞产生的微粒也不尽相同,因为微粒的形成与母细胞受到的刺激密切相关^[18-19]。根据微粒母细胞的类别,微粒可分为内皮细胞源性微粒、血小板源性微粒、单核细胞源性微粒、红细胞源性微粒及肿瘤细胞源性微粒等。体外培养

的细胞可以产生微粒,而正常人和患有不同疾病的患者体液(包括血液、尿液、腹水和脑脊液等)中也存在大量的微粒。研究证实,多种体液中均含有较高浓度的微粒,例如正常人循环血中微粒的浓度较低,而在多种病理情况下微粒的含量还将升高,提示循环微粒在肿瘤的发生、发展过程中可能发挥着重要作用。本研究发现,口腔癌患者循环微粒的含量比正常人升高,且循环微粒的浓度与口腔癌患者血液高凝状态密切相关。更重要的是,笔者发现口腔癌患者来源的循环微粒促进口腔癌细胞增殖、迁移、侵袭和体内成瘤。该结果证明,循环微粒可能在口腔癌的发生、发展中起重要作用。本研究有助于更好的认识口腔癌的发病机制,以寻找更好的治疗方法。此外,口腔癌患者血液中升高的循环微粒还可作为口腔癌诊断的依据。

参 考 文 献:

- [1] MAUSE S F, WEBER C. Microparticles: protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange [J]. *Circ Res*, 2010, 107(9): 1047-1057.
- [2] KANADA M, BACHMANN M H, HARDY J W, et al. Differential fates of biomolecules delivered to target cells via extracellular vesicles [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(12): 1433-1442.

- [3] PHINNEY D G, GIUSEPPE M D, NJAH J, et al. Mesenchymal stem cells use extracellular vesicles to outsource mitophagy and shuttle micrnas[J]. *Nat Commun*, 2015(6): 8472.
- [4] MRVAR-BRECKO A, SUSTAR V, JANSA V, et al. Isolated microvesicles from peripheral blood and body fluids as observed by scanning electron microscope[J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2010, 44(4): 307-312.
- [5] PICCIN A, MURPHY W G, SMITH O P. Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications [J]. *Blood Rev*, 2007, 21(3): 157-171.
- [6] OROZCO A F, LEWIS D E. Flow cytometric analysis of circulating microparticles in plasma[J]. *Cytometry A*, 2010, 77(6): 502-514.
- [7] NILSSON R J, BALAJ L, HULLEMAN E, et al. Blood platelets contain tumor-derived rna biomarkers[J]. *Blood*, 2011, 118(13): 3680-3683.
- [8] BEREZIN A, ZULLI A, KERRIGAN S, et al. Predictive role of circulating endothelial-derived microparticles in cardiovascular diseases[J]. *Clin Biochem*, 2015, 48(9): 562-568.
- [9] AMABILE N, HEISS C, REAL W M, et al. Circulating endothelial microparticle levels predict hemodynamic severity of pulmonary hypertension[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2008, 177(11): 1268-1275.
- [10] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115-132.
- [11] 周可, 马洪, 段晓峰. DNMT1 基因在口腔鳞状细胞癌中的表达及意义[J]. *实用口腔医学杂志*, 2016, 32(4): 584-586.
- [12] 韩晟, 陈衍, 谢诚, 等. 576 例口腔癌患者的流行病危险因素研究[J]. *实用口腔医学杂志*, 2012, 28(1): 74-78.
- [13] 王维, 池宇峰, 刘洁如, 等. 口腔癌患者术后生存质量的影响因素分析[J]. *武汉大学学报(医学版)*, 2013, 34(4): 585-587.
- [14] 王治平, 艾伟健, 郑俊发, 等. 围手术期高血压对口腔癌患者手术治疗的影响[J]. *广东医学*, 2009, 30(3): 384-385.
- [15] 梁煜程, 陈纯柳, 徐彬妮. 改良口腔护理法联合漱口液漱口在口腔癌术后患者中的应用[J]. *广东医学*, 2016, 37(s2): 264-365.
- [16] 陈群, 郭世莉. 健康教育在口腔癌患者中的作用[J]. *重庆医学*, 2013, 42(17): 2048-2049.
- [17] 雷志敏, 张敏, 赵怡芳. 口腔鳞癌患者血清 HGF、VEGF 和 uPA 的检测及意义[J]. *武汉大学学报(医学版)*, 2008, 29(4): 513-515.
- [18] GYORGY B, HUNG M E, BREAKEFIELD X O, et al. Therapeutic applications of extracellular vesicles: clinical promise and open questions[J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2015, 55(1): 439-464.
- [19] CLOTILDE TH?RY, MATIAS OSTROWSKI1, ELODIE SEGU-RA. Membrane vesicles as conveyors of immune responses[J]. *Nat Rev Immunol*, 2009, 9(8): 581-593.