

世界华人消化杂志®

**WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY**

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2016 年 2 月 18 日 第 24 卷 第 5 期 (Volume 24 Number 5)



5/2016

ISSN 1009-3079



9 771009 307056

《世界华人消化杂志》是一本高质量的同行评议, 开放获取和在线出版的学术刊物. 本刊被中国知网《中国期刊全文数据库》, 美国《化学文摘 (Chemical Abstracts, CA)》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘 (EMBASE/Excerpta Medica, EM)》和俄罗斯《文摘杂志 (Abstract Journal, AJ)》数据库收录.

目次

2016年2月18日 第24卷 第5期 (总第517期)

述评

- 657 胰十二指肠切除术中血管损伤的原因及防治措施
管小青, 郑向欣, 吴骥, 顾书成, 吴际生
- 664 肠道乳糖酶在小儿腹泻诊疗中的意义
邓艳玲, 舒兰, 刘又嘉, 谭周进

基础研究

- 670 人参皂苷Rg3联合索拉非尼对裸鼠肝癌移植瘤生长和血管生成的调控作用
郑侠, 高舒, 华海清, 杨爱珍, 秦叔逵
- 678 肠道碱性磷酸酶对结肠炎小鼠Muc2、Stat4及P-Stat4表达的影响
马娜, 赵美华, 李林静, 李展, 周力为, 冯百岁

临床研究

- 686 上皮细胞间质化预测胰腺癌预后的价值
马睿锐, 贡海兵, 龚健, 徐彬

文献综述

- 692 非酒精性脂肪肝机制及其与慢性应激相关性的研究进展
穆杰, 王庆国, 王雪茜, 程发峰, 李长香, 连雅君
- 699 原发性胆汁性肝硬化与天然免疫的研究进展
韦进香, 唐映梅
- 706 食物主要成分与动物肠道微生物组成及其代谢的关系
刘艺端, 余凯凡, 朱伟云
- 714 精准放射治疗技术在直肠癌的临床应用
赵文斌, 丘敏敏, 文碧秀
- 722 消化道癌脂类、氨基酸类及糖类代谢的分析及机制
杨方秀, 汪玉馨, 陆益红, 杨冬芝, 汤道权, 樊夏雷

研究快报

- 731 胶原纤维在小鼠酒精性肝损伤过程中的表达变化
姜雅坤, 李三强, 卢华杰, 尚付梅, 李倩倩, 侯松林, 白晓洁, 潘勇阳

- 737 肝癌细胞外泌体的分离与鉴定

陈加贵, 邓敬桓, 何敏

临床经验

- 744 腹腔镜治疗食管裂孔疝术后吞咽困难的比较

赵凯, 李朝霞, 陈震, 孙向宇

- 749 食管胃前壁吻合联合幽门成形在早期贲门癌术中的临床体会

聂蓬, 马海涛, 王吉红, 苏发德

- 754 幽门螺杆菌感染对血清及胃组织核组蛋白2/nesfatin-1表达的影响

张帅庆, 田宇彬, 孙桂荣, 丁雪丽, 宋文, 刘思良

- 759 阿帕替尼治疗晚期胃癌的临床疗效及预后

王博, 宋丽杰, 牛鹏云, 李晚露, 刘清存, 樊青霞

- 765 上消化道黏膜下肿瘤的诊治和随访

常琳琳, 张开光, 张明黎, 宋继中, 王业涛, 王巧民, 解丽, 吴正祥

- 775 非酒精性脂肪肝患者Hcy水平与C-IMT预测心血管病风险的相关性

王仁萍, 郭佳佳, 王伟, 刘洁, 张媛媛

- 782 肝脏Wilson病的临床病理特征

延永琴, 郑智勇, 曾德华, 刘庆宏, 朱育连, 郑巧灵, 曲利娟

- 790 失代偿期肝硬化患者SAAG、PA、PTA水平与肝功能分期及预后的关系

黄雪, 刘传苗, 赵守松, 赵久法, 高春明, 徐葵花

- 796 内镜治疗与药物治疗黏附血凝块的消化性溃疡出血的疗效对比

吴汉周, 袁海峰, 黄适, 雷力民, 赖远全

- 801 早期结直肠癌局部切除与根治性术后生存比较

曹益晟, 葛海燕

- 808 依据药物敏感试验根除幽门螺杆菌的临床疗效随访

韩丰, 冀子中, 金夏, 万里, 蔡陈效, 陈一鹏, 陈红亚, 陈敏芳, 杨宁敏

- 815 针灸治疗1330例单纯性肥胖病并发高脂血症的疗效

王鸣, 刘志成, 徐斌

病例报告

- 821 以间断发热伴发育迟缓为首表现的儿童克罗恩病1例报告及文献复习

张阳, 李伟华, 吕宜光

附录

I-V 《世界华人消化杂志》投稿须知

I 2016年国内国际会议预告

志谢

I-II 志谢《世界华人消化杂志》编委

消 息

- 705 《世界华人消化杂志》外文字符标准
721 《世界华人消化杂志》参考文献要求
743 《世界华人消化杂志》修回稿须知
753 《世界华人消化杂志》2011年开始不再收取审稿费
764 《世界华人消化杂志》消化护理学领域征稿启事
781 《世界华人消化杂志》栏目设置
789 《世界华人消化杂志》性质、刊登内容及目标
795 《世界华人消化杂志》正文要求

封面故事

《世界华人消化杂志》编委, 管小青, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 223800, 江苏省宿迁市宿城区黄河南路138号, 南京鼓楼医院集团宿迁市人民医院(徐州医科大学附属宿迁医院)普通外科. 江苏省重点学科带头人, 主攻胃肠外科疾病的诊治, 且颇有建树. 2006年以来, 获得江苏省科技厅自然科学基金课题、江苏省卫生厅资助课题、宿迁市科技局社会发展支撑课题共6项; 共在中华级、国家级及省级专业杂志上发表论文100余篇; 获得江苏省新技术引进奖一等奖1项、二等奖1项, 江苏省宿迁市人民政府科技进步奖一、二、三等奖12项, 江苏省有突出贡献中青年专家.

本期责任人

编务 李香; 送审编辑 都珍珍, 闫晋利; 组版编辑 都珍珍; 英文编辑 王天奇; 责任编辑 于明茜; 形式规范审核编辑部主任 郭鹏; 最终清样审核总编辑 马连生

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

吴阶平 题写封面刊名

陈可冀 题写版权刊名

(旬刊)

创 刊 1993-01-15

改 刊 1998-01-25

出 版 2016-02-18

原刊名 新消化病学杂志

期刊名称

世界华人消化杂志

国际标准连续出版物号

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

主编

程英升, 教授, 200233, 上海市, 上海交通大学附属第六人民医院放射科

党双锁, 教授, 710004, 陕西省西安市, 西安交通大学医学院第二附属医院感染科

江学良, 教授, 250031, 山东省济南市, 中国人民解放军济南军区总医院消化科

刘连新, 教授, 150001, 黑龙江省哈尔滨市, 哈尔滨医科大学第一临床医学院普外科

刘占举, 教授, 200072, 上海市, 同济大学附属第十人民医院消化内科

吕宾, 教授, 310006, 浙江省杭州市, 浙江中医药大学附属医院(浙江省中医院)消化科

马大烈, 教授, 200433, 上海市, 中国人民解放军第二军医大学附属长海医院病理科

王俊平, 教授, 030001, 山西省太原市, 山西省人民医院消化科

王小众, 教授, 350001, 福建省福州市, 福建医科大学附属协和医院消化内科

姚登福, 教授, 226001, 江苏省南通市, 南通大学附属医院临床医学研究中心

张宗明, 教授, 100073, 北京市, 首都医科大学北京电力医院普外科

编辑部

郭鹏, 主任

《世界华人消化杂志》编辑部

100025, 北京市朝阳区东四环中路62号,

远洋国际中心D座903室

电话: 010-59080035

手机: 13901166126

传真: 010-85381893

E-mail: wcjd@wjgnet.com

http://www.wjgnet.com

出版

百世登出版集团有限公司

Baishideng Publishing Group Inc

8226 Regency Drive, Pleasanton,

CA 94588, USA

Fax: +1-925-223-8242

Telephone: +1-925-223-8243

E-mail: bpgoffice@wjgnet.com

http://www.wjgnet.com

制作

北京百世登生物医学科技有限公司

100025, 北京市朝阳区东四环中路62号, 远洋国际中心D座903室

电话: 010-85381892

传真: 010-85381893

《世界华人消化杂志》是一本高质量的同行评议, 开放获取和在线出版的学术刊物. 本刊被中国知网《中国期刊全文数据库》, 美国《化学文摘(Chemical Abstracts, CA)》, 荷兰《医学文摘/医学文摘(EMBASE/Excerpta Medica, EM)》和俄罗斯《文摘杂志(Abstract Journal, AJ)》数据库收录.

《世界华人消化杂志》正式开通了在线办公系统(<http://www.baishideng.com/wcjd/ch/index.aspx>), 所有办公流程一律可以在线进行, 包括投稿、审稿、编辑、审读, 以及作者、读者和编者之间的信息反馈交流.

特别声明

本刊刊出的所有文章不代表本刊编辑部和本刊编委会的观点, 除非特别声明. 本刊如有印装质量问题, 请向本刊编辑部调换.

定价

每期90.67元 全年36期3264.00元

© 2016年版权归百世登出版集团有限公司所有

Contents

Volume 24 Number 5 February 18, 2016

EDITORIAL

- 657 Reasons and preventive measures for vascular damage in pancreaticoduodenectomy

Guan XQ, Zheng XX, Wu J, Gu SC, Wu JS

- 664 Signification of intestinal lactase in diagnosis and treatment of infantile diarrhea

Deng YL, Shu L, Liu YJ, Tan ZJ

BASIC RESEARCH

- 670 Effect of ginsenoside Rg3 combined with sorafenib in inhibiting tumor growth and neovascularization in nude mice with *in situ* transplanted human hepatocellular carcinoma

Zheng X, Gao S, Hua HQ, Yang AZ, Qin SK

- 678 Effect of intestinal alkaline phosphatase on expression of Muc2, Stat4 and P-Stat4 in colitis in mice

Ma N, Zhao MH, Li LJ, Li Z, Zhou LW, Feng BS

CLINICAL RESEARCH

- 686 Relationship between epithelial to mesenchymal transition and prognosis in pancreatic cancer

Ma RR, Gong HB, Gong J, Xu B

REVIEW

- 692 Mechanisms of non-alcoholic fatty liver disease and its correlation with chronic stress

Mu J, Wang QG, Wang XQ, Cheng FF, Li CX, Lian YJ

- 699 Primary biliary cirrhosis and natural immunity

Wei JX, Tang YM

- 706 Impact of macronutrients on gut microbiota

Liu YD, Yu KF, Zhu WY

- 714 Clinical application of precise radiotherapy in rectal cancer

Zhao WB, Qiu MM, Wen BX

- 722 Metabolic analysis and mechanism of lipids, amino acids and carbohydrates in gastrointestinal cancer

Yang FX, Wang YX, Lu YH, Yang DZ, Tang DQ, Fan XL

RAPID COMMUNICATION

- 731 Changes of collagen fibers in development of alcoholic liver injury

Jiang YK, Li SQ, Lu HJ, Shang FM, Li QQ, Hou SL, Bai XJ, Pan YY

- 737 Isolation and identification of exosomes of hepatocellular carcinoma cells

Chen JG, Deng JH, He M

CLINICAL PRACTICE

- 744 Comparison of dysphagia incidence after laparoscopic Nissen and Toupet fundoplication for hiatal hernia repair

Zhao K, Li ZX, Chen Z, Sun XY

- 749 Esophagogastric anterior wall anastomosis combined with pyloroplasty after surgery for early cardia cancer

Nie P, Ma HT, Wang JH, Su FD

- 754 Impact of *Helicobacter pylori* infection on serum and gastric tissue nucleobindin 2/nesfatin-1 levels

Zhang SQ, Tian ZB, Sun GR, Ding XL, Song W, Liu SL

- 759 Clinical efficacy of Apatinib in treatment of advanced gastric cancer

Wang B, Song LJ, Niu PY, Li WL, Liu QC, Fan QX

- 765 Therapy and follow-up of upper gastrointestinal subepithelial lesions

Chang LL, Zhang KG, Zhang ML, Song JZ, Wang YT, Wang QM, Xie L, Wu ZX

- 775 Correlation between homocysteine level and carotid artery intima-media thickness in patients with nonalcoholic steatohepatitis

Wang RP, Guo JJ, Wang W, Liu J, Zhang YY

- 782 Clinicopathologic features of Wilson disease of the liver

Yan YQ, Zheng ZY, Zeng DH, Liu QH, Zhu YL, Zheng QL, Qu LJ

- 790 Relationship between levels of serum-ascites albumin gradient, serum prealbumin and prothrombin activity and grade of liver function and prognosis in patients with decompensated liver cirrhosis

Huang X, Liu CM, Zhao SS, Zhao JF, Gao CM, Xu KH

- 796 Efficacy of endoscopic therapy vs drug therapy in peptic ulcer bleeding with an adherent blood clot

Wu HZ, Yuan HF, Huang S, Lei LM, Lai YQ

- 801 Survival after local excision or radical resection for early-stage colorectal cancer

Cao YS, Ge HY

- 808 Antimicrobial susceptibility testing for *Helicobacter pylori* treatment: A follow-up study on clinical effects

Han F, Ji ZZ, Jin X, Wan L, Cai CX, Chen YP, Chen HY, Chen MF, Yang NM

- 815 Efficacy of acupuncture for simple obesity complicated with hyperlipidaemia: Analysis of 1330 cases

Wang M, Liu ZC, Xu B

CASE REPORT

- 821 Intermittent fever and developmental retardation as initial manifestations in a pediatric Crohn's disease patient: A case report and literature review

Zhang Y, Li WH, Lv YG

Contents

World Chinese Journal of Digestology
Volume 24 Number 5 February 18, 2016

APPENDIX

I – V Instructions to authors
I Calendar of meetings and events in 2016

ACKNOWLEDGMENT

I – II Acknowledgments to reviewers for the *World Chinese Journal of Digestology*

COVER

Editorial Board Member of *World Chinese Journal of Digestology*, Xiao-Qing Guan, Chief Physician, Department of General Surgery, Suqian People's Hospital of Nanjing Drum-tower Hospital Group (Suqian Hospital Affiliated to Xuzhou Medical University), 138 Huanghe South Road, Suqian 223800, Jiangsu Province, China

Indexed/Abstracted by

Chinese Journal Full-text Database, Chemical Abstracts, EMBASE/Excerpta Medica, and Abstract Journals.

RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE

Assistant Editor: *Xiang Li* Review Editor: *Zhen-Zhen Du, Jin-Li Yan* Electronic Editor: *Zhen-Zhen Du*
English Language Editor: *Tian-Qi Wang* Editor-in-Charge: *Ming-Xi Yu* Proof Editor: *Peng Guo* Layout Reviewer: *Lian-Sheng Ma*

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

Founded on January 15, 1993

Renamed on January 25, 1998

Publication date February 18, 2016

NAME OF JOURNAL

World Chinese Journal of Digestology

ISSN

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

EDITOR-IN-CHIEF

Ying-Sheng Cheng, Professor, Department of Radiology, Sixth People's Hospital of Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200233, China

Shuang-Suo Dang, Professor, Department of Infectious Diseases, the Second Affiliated Hospital of Medical School of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, Shaanxi Province, China

Xue-Liang Jiang, Professor, Department of Gastroenterology, General Hospital of Jinan Military Command of Chinese PLA, Jinan 250031, Shandong Province, China

Lian-Xin Liu, Professor, Department of General Surgery, the First Clinical Medical College of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China

Zhan-Ju Liu, Professor, Department of Gastroenterology, Shanghai Tenth People's Hospital, Tongji University, Shanghai 200072, China

Bin Lv, Professor, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310006, Zhejiang Province, China

Da-Lie Ma, Professor, Department of Pathology, Changhai Hospital, the Second Military Medical University of Chinese PLA, Shanghai 200433, China

Jun-Ping Wang, Professor, Department of Gastroenterology, People's Hospital of Shanxi, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China

Xiao-Zhong Wang, Professor, Department of Gastroenterology, Union Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou 350001, Fujian Province, China

Deng-Fu Yao, Professor, Clinical Research Center, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China

Zong-Ming Zhang, Professor, Department of General Surgery, Beijing Electric Power Hospital, Capital Medical University, Beijing 100073, China

EDITORIAL OFFICE

Peng Guo, Director

World Chinese Journal of Digestology

Room 903, Building D, Ocean International Center, No. 62 Dongsihuan Zhonglu, Chaoyang District, Beijing 100025, China

Telephone: +86-10-59080035 13901166126

Fax: +86-10-85381893

E-mail: wjcd@wjgnet.com

<http://www.wjgnet.com>

PUBLISHER

Baishideng Publishing Group Inc
8226 Regency Drive, Pleasanton, CA 94588, USA

Fax: +1-925-223-8242

Telephone: +1-925-223-8243

E-mail: bpgoffice@wjgnet.com

<http://www.wjgnet.com>

PRODUCTION CENTER

Beijing Baishideng BioMed Scientific Co., Limited Room 903, Building D, Ocean International Center,

No. 62 Dongsihuan Zhonglu,

Chaoyang District, Beijing 100025, China

Telephone: +86-10-85381892

Fax: +86-10-85381893

PRINT SUBSCRIPTION

RMB 90.67 Yuan for each issue

RMB 3264 Yuan for one year

COPYRIGHT

© 2016 Baishideng Publishing Group Inc.

Articles published by this open access journal are distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-commercial License, which permits use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non commercial and is otherwise in compliance with the license.

SPECIAL STATEMENT

All articles published in journals owned by the Baishideng Publishing Group (BPG) represent the views and opinions of their authors, but not the views, opinions or policies of the BPG, except where otherwise explicitly indicated.

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

Full instructions are available online at www.wjgnet.com/1009-3079/tgxz.asp. If you do not have web access, please contact the editorial office.

肝癌细胞外泌体的分离与鉴定

陈加贵, 邓敬桓, 何敏

陈加贵, 邓敬桓, 何敏, 广西医科大学公共卫生学院 广西
壮族自治区南宁市 530021

何敏, 区域性高发肿瘤早期防治研究教育部重点实验室
广西壮族自治区南宁市 530021

陈加贵, 在读硕士, 主要从事肝癌血清标志物的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 81260445
广西自然科学基金青年基金资助项目,
No. 2015GXNSFBA139160
区域性高发肿瘤早期防治研究教育部重点实验室基金
资助项目, Nos. GK2013-13-A-01-02, GK2014-ZZ04,
GK2015-ZZ01

作者贡献分布: 此课题由邓敬桓与何敏设计; 细胞培养、外泌
体分离、鉴定由陈加贵与邓敬桓完成; 此文由陈加贵完成; 文
章修改和审阅由何敏完成。

通讯作者: 何敏, 教授, 530021, 广西壮族自治区南宁市双拥
路22号, 广西医科大学公共卫生学院. m_h_m868@sina.com
电话: 0771-5358146

收稿日期: 2015-12-15
修回日期: 2016-01-05
接受日期: 2016-01-11
在线出版日期: 2016-02-18

Isolation and identification of exosomes of hepatocellular carcinoma cells

Jia-Gui Chen, Jing-Huan Deng, Min He

Jia-Gui Chen, Jing-Huan Deng, Min He, Public Health
School of Guangxi Medical University, Nanning 530021,
Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Min He, Key Laboratory of High-Incidence-Tumor
Prevention & Treatment (Guangxi Medical University),
Ministry of Education, Nanning 530021, Guangxi Zhuang
Autonomous Region, China

Supported by: National Natural Science Foundation of
China, No. 81260445; Guangxi Natural Youth Science

Foundation, No. 2015GXNSFBA139160; the Fund of
Key Laboratory of High-Incidence-Tumor Prevention &
Treatment, Nos. GK2013-13-A-01-02, GK2014-ZZ04 and
GK2015-ZZ01

Correspondence to: Min He, Professor, Public Health
School of Guangxi Medical University, 22 Shuangyong
Road, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous
Region, China. m_h_m868@sina.com

Received: 2015-12-15
Revised: 2016-01-05
Accepted: 2016-01-11
Published online: 2016-02-18

Abstract

AIM: To seek a new method for isolating and
purifying exosomes from the supernatants
of cultured human hepatocellular carcinoma
cells.

METHODS: Human hepatocellular carcinoma
cells SMMC-7721 were cultured to adapt to
continuous serum-free culture, and the culture
supernatants were collected. Exosomes derived
from SMMC-7721 were isolated and purified from
the supernatants by improved ultracentrifugation.
Transmission electron microscopy (TEM) was
used to observe the morphology of isolated
exosomes. Particle size of exosomes was detected
with Nanosight technology. Western blot analysis
was used to examine CD63, CD9, and Alix
exosomal protein expression and SDS-PAGE was
used for exosomal protein analysis.

RESULTS: The isolated exosomes were
round or oval in shape under TEM. The
peak diameter of exosomes was 122 nm, and
particles with a diameter between 30-150
nm accounted for 72.16%. The expression of

背景资料

外泌体的分离和
纯化是开展外泌
体功能研究的前
提条件, 但目前
尚未有一种方法
能同时保证提取
外泌体的含量、
纯度、生物活性。
特别是肿瘤细胞,
由于其培养方式
的特殊性, 增加
了外泌体分离和
纯化的难度, 阻
碍了相关研究的
发展。

同行评议者

刘树业, 主任技
师, 天津市第三中
心医院医学检验
中心

■ 研发前沿

外泌体能携带多种蛋白质、RNA、microRNA和DNA片段, 参与疾病的发生发展, 引起诸多研究者的兴趣。如何提取到量多、纯度高且具有活性的外泌体是亟待研究解决的问题。

Alix, CD63 and CD9 could be detected in the supernatants of cultured cells and isolated exosomes. SDS-PAGE showed that the abundant macromolecular structure proteins were significantly less in exosomes than in SMMC-7721 cells.

CONCLUSION: Continuous adaptation to serum-free culture combined with improved ultracentrifugation can be used to isolate and purify exosomes efficiently. This is helpful for further study of exosome markers of hepatocellular carcinoma cells.

© 2016 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Hepatocellular carcinoma cells; Exosome; Isolation; Identification

Chen JG, Deng JH, He M. Isolation and identification of exosomes of hepatocellular carcinoma cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2016; 24(5): 737-743 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/24/737.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v24.i5.737>

摘要

目的: 针对目前尚缺理想的肿瘤细胞提取方案, 探寻分离纯化肝癌细胞培养液中外泌体的新方法。

方法: 连续适应无血清培养肝癌SMMC-7721细胞, 收集细胞上清液, 采用改良超速离心法分离、纯化培养上清液中肝癌细胞外泌体; 透射电镜观察其形态, Nanosight技术分析粒径; Western blot分析其特异蛋白Alix、CD63、CD9的表达并利用SDS-PAGE电泳分析肝癌细胞和外泌体的蛋白谱。

结果: 透射电镜观察到的肝癌细胞外泌体, 外形呈圆形或椭圆形; Nanosight技术分析颗粒直径峰值为122 nm, 直径30-150 nm之间颗粒占72.16%; Western blot证实在细胞培养上清液和外泌体提取液中均能检测到Alix、CD63、CD9的蛋白表达; SDS-PAGE电泳清晰显示外泌体中高丰度大分子结构蛋白明显少于肝癌细胞。

结论: 利用连续适应无血清细胞培养结合改良超速离心法能提取高纯度的外泌体, 为肝癌细胞外泌体标志物研究奠定基础。

© 2016年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 肝癌细胞; 外泌体; 分离; 鉴定

核心提示: 连续适应无血清细胞培养结合改良超速离心法是一种全新的外泌体提取方案。本研究选取肝癌细胞, 通过多种技术, 多角度展示该方法的提取效果, 并利用SDS-PAGE电泳清晰显示蕴含的蛋白, 为肝癌细胞外泌体标志物的研究奠定基础。

陈加贵, 邓敬恒, 何敏. 肝癌细胞外泌体的分离与鉴定. *世界华人消化杂志* 2016; 24(5): 737-743 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/24/737.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v24.i5.737>

0 引言

外泌体(exosomes)是由细胞内多泡体(multivesicular body, MVB)与细胞膜融合后释放到细胞外隙或生物学体液中的膜性囊泡, 含有蛋白质、RNA、microRNA和DNA片段等多种成分, 参与人体许多重要的生理或病理过程, 在细胞通讯、细胞迁移、血管新生、免疫反应和肿瘤细胞生长等方面起了重要的作用, 影响疾病的发生发展^[1]。因此, 外泌体的生物学研究受到普遍关注, 而寻找到与其相适应的提取方法是展开相关研究的前提。目前离心法是最常用和有效的提取方法, 但由于外泌体是纳米级的囊泡结构, 其提取的纯度和生物活性易受到离心力、离心时间等外因的影响^[2], 故如何保证提取外泌体的纯度和生物活性, 是摆在诸多研究者面前亟待解决的问题, 本研究利用肝癌SMMC-7721细胞探讨适合肝癌细胞外泌体提取的新方案。

1 材料和方法

1.1 材料 肝癌细胞SMMC-7721(广州吉妮欧生物科技有限公司)。RPMI-1640基础培养基、胎牛血清(FBS)(美国Gibco); 磷酸盐缓冲液(PBS)(武汉博士德生物工程公司); UltraCULTURE无血清培养基(瑞士LONZA); BCA蛋白浓度测定试剂盒、RIPA裂解液(碧云天生物技术有限公司); 超滤管及0.22 μm滤器(美国Millipore); 兔抗人Alix、CD9、CD63单克隆抗体, 荧光标记羊抗兔二抗IgG(H+L)(美国SBI公司); 371细胞培养箱、酶标检测仪(美国Thermo公司); Beckman XL-100K超高速离心机(美国Beckman Coulter),

ODYSSEY双色红外成像系统(美国LICOR公司), Nanosight NS300纳米颗粒跟踪分析仪(英国马尔文仪器有限公司), 透射电子显微镜(日本日立集团), 全自动凝胶成像仪(美国Bio-Rad公司), 尼康Ti-s倒置荧光显微镜(日本尼康集团)。

1.2 方法

1.2.1 连续适应无血清培养肝癌SMMC-7721细胞: 将肝癌细胞用含10%FBS的RPMI-1640完全培养基, 置于37℃、50 mL/L CO₂中培养, 48 h换液1次, 待细胞融合度达到80%时, 去培养液, 用20 mL 0.01 mol/L PBS冲洗3次, 加入0.5 mL 0.25%胰蛋白酶, 置于37℃培养箱消化2 min。当镜下发现细胞质回缩、细胞间隙增大后, 加2-3 mL完全培养液终止消化, 1000 r/min、离心5 min, 去上清。配制7.5%FBS的混合培养液(10%FBS的RPMI-1640完全培养基: 无血清培养基 = 3:1), 取0.5-1.0 mL重悬细胞后, 接种于无菌培养瓶内, 加4 mL 7.5%FBS混合培养基继续培养。待细胞生长状态良好后, 传代2-3次。同上操作, 依次转5.0%、2.5%、1.0%FBS混合培养基培养。最后用20 mL 0.01 mol/L PBS冲洗至少3次, 转完全无FBS培养基培养48 h, 收集细胞培养上清液, -80℃保存备用。

1.2.2 改良超速离心法分离纯化外泌体: 将收集的肝癌细胞培养上清200 mL分装于4个50 mL离心管, 4℃ 3000 g离心15 min去除细胞和细胞碎片; 第1次110000 g离心70 min, 去上清留5 mL管底液, 重悬并轻轻吹打管底液体; 第2次110000 g离心70 min, 离心后可见管底淡黄色沉淀, 去上清剩1 mL管底液, 用PBS重悬并补足至离心管规定体积; 第3次110000 g离心70 min, 小心去上清, 将收集到的外泌体转移到1.5 mL的Eppendorf管中, -80℃冰箱中保存备用。

1.2.3 外泌体的形态学分析: 用PBS重悬提取的外泌体, 取悬液20 μL滴于孔径2 nm的载样铜网上, 室温静置2 min, 用滤纸从滤网侧边吸干液体, 用3%磷钨酸溶液30 μL在室温下负染5 min, 滤纸吸干负染液, 室温晾干, 透射电镜观察拍照。

1.2.4 Nanosight检测外泌体粒径: 将收集的外泌体用PBS稀释至颗粒浓度为10⁶/mL, 用1 mL

注射器注入纳米颗粒跟踪分析仪进行分析, 并保存分析数据。

1.2.5 Western blot检测外泌体特异标志蛋白: 收集肝癌细胞、外泌体提取液、提取前和后细胞培养上清, 加入RIPA裂解液裂解, 采用BCA法测定蛋白浓度。分别取30 μg蛋白行SDS-PAGE电泳。蛋白分离后将其转移至硝酸纤维素膜上, 室温下用含5%脱脂牛奶封闭液封闭处理1 h。经1×TBST缓冲液洗脱后, 分别加入一抗(Alix、CD63和CD9单克隆抗体), 于4℃条件下反应过夜。经再次洗脱后, 室温下避光加入荧光标记的二抗反应1 h。再用1×TBST缓冲液洗膜, 在ODYSSEY双色红外成像系统中扫描显像。

1.2.6 SDS-PAGE电泳凝胶成像分析蛋白: 根据BCA蛋白定量结果, 取裂解后外泌体及细胞裂解蛋白各30 μg, 加入5 μL 5×上样缓冲液, 95℃加热5 min, 上样。SDS-PAGE凝胶电泳, 5%浓缩胶恒压80 V 30 min, 10%分离胶恒压100 V, 60 min。电泳结束后, 0.25%考马斯亮蓝染液染色1 h, 脱色液脱色2 h, 使用全自动凝胶成像仪进行拍照。

2 结果

2.1 细胞的培养状况 经连续适应无血清细胞培养法培养肝癌SMMC-7721细胞48 h, 倒置荧光显微镜观察肝癌细胞生长状况良好(图1)。镜下可见细胞贴壁生长, 外形呈花瓣状, 胞膜完整, 排列规则, 分布密集。

2.2 外泌体的形态学分析 透射电镜观察, 结果显示肝癌SMMC-7721细胞外泌体大小不一, 外形呈圆形或椭圆形, 直径100 nm左右, 可见明显的膜性结构, 有单个分布, 也聚集成群, 背景较为清晰, 污染物少(图2)。

2.3 Nanosight检测外泌体粒径 所提外泌体沉淀经PBS稀释10000倍方达到上机检测浓度(10⁶/mL), 说明提取的颗粒数多。检测报告中MODE曲线线性流畅, 表明所含杂质少, 粒径峰值122 nm与理论外泌体大小值相符(图3A); 颗粒散点图提示外泌体直径大小较为集中, 大部分介于30-150 nm间(图3B); 颗粒直径区间累计百分比数据显示: 0-30 nm、30-150 nm和>150 nm的颗粒数占总粒数的百分比分别为: 1.10%、72.16%和26.74%(表1)。再次证实大部

■ 相关报道

以往研究认为外泌体只是细胞排泄的“废物”, 但随着研究的不断深入, 实验者发现外泌体能携带许多重要的蛋白质、RNA、microRNA和DNA片段, 且具有一定的生物活性, Mario等利用体外实验揭示了外泌体中的RNA、microRNA介导细胞间的通讯过程, 进一步证实外泌体在机体的生理病理活动中发挥着重要的作用。

■ 创新盘点

外泌体的分离和纯化一直是该研究领域中的热点和难点,特别是肿瘤细胞外泌体的提取,但目前相关文献报道多集中在分离技术上的讨论,未兼顾前期细胞培养过程的研究.本研究将细胞培养与分离技术同时优化,并运用多种技术包括最先进纳米检测技术,对优化后的提取效果进行更科学的检验和评价.

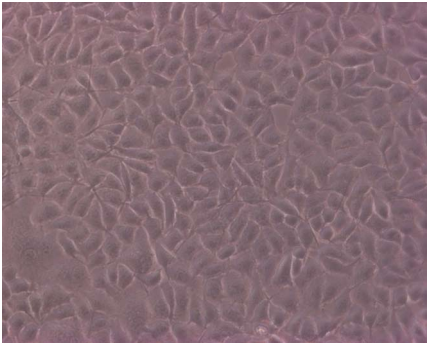


图 1 SMMC-7721细胞形态学观察(× 20).

表 1 Nanosight检测粒径区间累计百分比

粒径(nm)	浓度(10 ⁶ /mL)	该粒径颗粒数累计百分比(%)
10	0.000	0.000
30	6.179	1.101
50	17.111	4.150
70	31.612	9.783
90	72.361	22.677
110	91.801	39.035
130	99.994	56.853
150	92.070	73.259
170	51.725	82.476
190	34.581	88.638
210	18.654	91.962
230	9.630	94.145
250	8.485	95.657
270	6.314	96.778
290	5.359	97.733
310	2.385	98.158
330	1.543	98.233
350	1.263	98.458
370	1.431	98.713
390	1.207	98.928
410	1.094	99.123
430	0.813	99.268
450	0.707	99.394
470	0.645	99.509
490	0.617	99.619
510	0.572	99.721
530	0.533	99.816
550	0.471	99.900
570	0.370	99.966
590	0.179	99.998
610	0.011	100.000
630	0.000	100.000
650	0.000	100.000
670	0.000	100.000
690	0.000	100.000

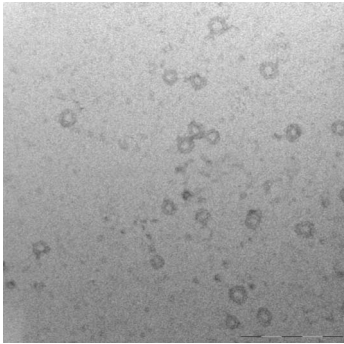


图 2 SMMC-7721外泌体形态学观察(× 200000).

分提取物的粒径分布在30-150 nm, 偏离范围的小部分可能与颗粒间黏着有关.

2.4 Western blot检测外泌体特异标志蛋白 以肝癌细胞为参照, Western blot检测外泌体特异性标志蛋白, 结果显示提取前的培养上清液及外泌体提取液均表达Alix、CD63、CD9蛋白, 而提取后的培养液上清未显示3种外泌体特异性标志蛋白(图4). 提示改良超速离心法分离到较为完全肝癌细胞外泌体.

2.5 SDS-PAGE电泳分析蛋白谱 SDS-PAGE电泳分析肝癌细胞及其外泌体蛋白谱(图5), 电泳显示两者蛋白条带清晰, 提示蛋白上样量合适, 所提外泌体未受细胞培养液中的杂蛋白干扰, 纯化效果佳. 从显示的蛋白谱看, 外泌体蛋白谱中高丰度大分子结构蛋白明显少于肝癌细胞, 提示外泌体可能有利于小分子标志物研究.

3 讨论

外泌体是由细胞内多泡体与胞浆膜融合后, 释放到胞外的一种脂质双分子层结构的囊泡, 直径介于30-150 nm, 存在于人体大多数体液中如血液、尿液、唾液等^[3]. 最初其被认为是细胞向外排放的“垃圾”^[4], 此后发现该囊泡可携带多种蛋白质、RNA、microRNA和DNA片段, 具有功能活性^[5-7]. 有报道其内含RNA可进入细胞质后被翻译成蛋白质, microRNA则可定向调节mRNA的功能. 由此可见, 外泌体通过释放内容物影响受体细胞和远端细胞的生长状况, 介导疾病的发生和发展.

尽管外泌体的研究取得了很大的进展, 但就总体而言还处于研究的初始阶段, 其中

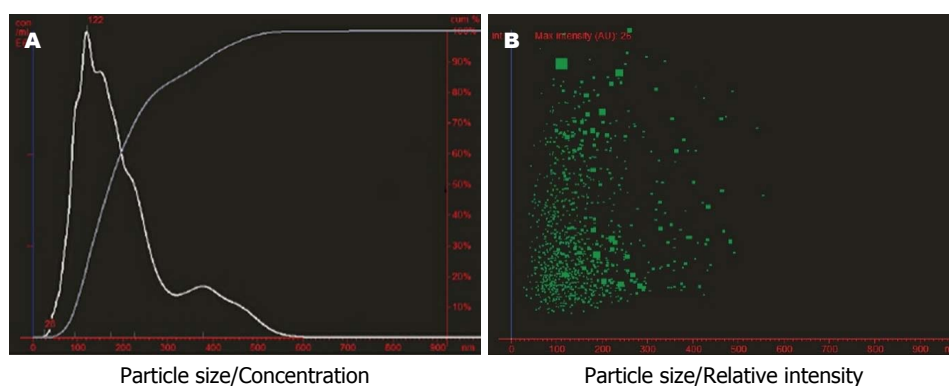


图 3 SMMC-7721外泌体Nanosight检测分析. A: MODE曲线图; B: 颗粒分布图.

应用要点

虽然传统离心法步骤繁琐,但仍然是外泌体提取最常用的方法,也是学术界所公认纯化外泌体的最佳手段.本研究通过优化传统离心法,获得良好的提取效果,有利于该方法更好地被推广和使用.

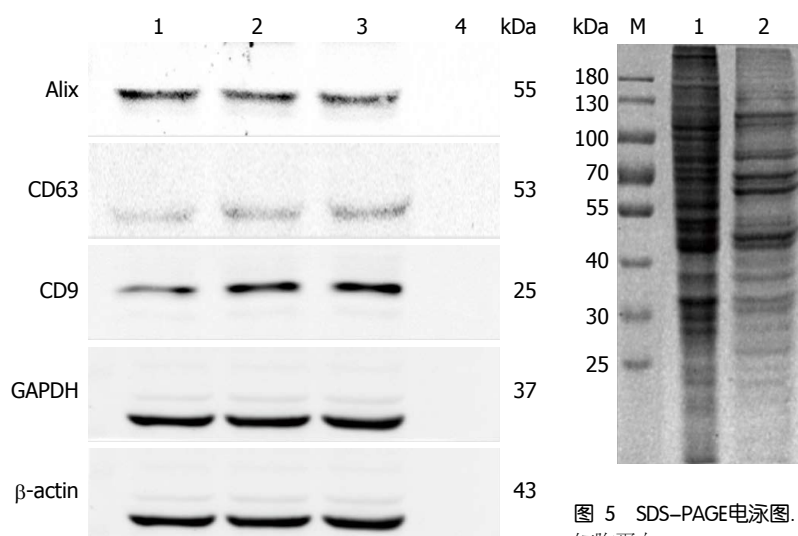


图 4 Western blot检测外泌体标志蛋白Alix、CD63、CD9的表达. 1: SMMC-7721细胞; 2: 提取前细胞培养上清液; 3: 外泌体提取液; 4: 提取后细胞培养上清液.

图 5 SDS-PAGE电泳图. M: 蛋白质Marker; 1: SMMC-7721细胞蛋白; 2: SMMC-7721外泌体蛋白.

一个需要迫切解决的便是寻找到一种能在含量、纯度及生物活性方面均较为理想的细胞外泌体提取方法. 目前认为细胞外泌体的提取效果常受细胞的培养和提取方法两方面因素的影响. 首先关于细胞培养, 由于细胞生长的状况会直接影响外泌体分泌的质量, 所以培养好细胞是提取的前提条件, 而一些细胞如肿瘤细胞具有较强的嗜血性, 需要加入一定量的血清(如小牛血清)才能存活生长, 但血清中会含有一定量的外泌体, 研究者常常会采取两种方式去除干扰. 一种是经血清常规培养后, 用PBS清洗3次直接转无血清培养(普通饥饿法), 另外一种是通过离心去除血清中外泌体. 这两种方法均不尽人意. 前者培养的细胞生长状况很差, 后者会出现血清外泌体去除不完全的现象, 如离心力和离心时间把

握不好, 势必影响到培养的效果. 其次关于外泌体提取的方法, 目前主要有离心法、过滤离心法、密度梯度离心法、免疫磁珠法、色谱法和新兴试剂法等. 但这些方法各有利弊, 均不能同时满足在含量、纯度和生物活性上的研究需求^[8,9].

基于此现状, 本研究选取具有较强嗜血性的肝癌SMMC-7721细胞, 采用连续适应无血清细胞培养法进行培养, 使细胞在血清梯度递减的过程中逐渐降低对血清的依赖, 最后适应无血清培养. 用倒置荧光显微镜观察到该细胞在无血清中培养48 h, 生长状况仍良好(普通饥饿法一般不会超过48 h). 这说明新的培养方法能有效延长细胞在无血清培养基中的存活时间. 收集到的细胞培养上清, 用改良超速离心法提取外泌体, 该离心法只需设置两次离心力, 其中第2个离心力需要进行3次(也可酌情增加离心次数), 分别起浓缩、分离、纯化作用. 较传统多步离心法, 操作更简便. 透射电

■名词解释

Nanosight检测技术: 纳米颗粒分析技术是一种高分辨率, 实时动态跟踪纳米颗粒检测技术, 他不但能测得颗粒的真实浓度, 还可以精准分析出微观样品体系中纳米级颗粒物的真实情况, 如颗粒粒型, 数量变化, 种类, 分散性好坏等, 是目前较为先进的纳米级颗粒检测技术;

外泌体: 是由细胞内的多泡小体与细胞膜融合后以外分泌的形式释放到细胞外的一种囊泡, 直径介于30-150 nm, 他与微泡组成细胞外囊泡。

镜观察提取物, 发现背景杂质少, 颗粒外观符合外泌体典型特征。用目前较为先进的纳米技术对所提颗粒进行分析, 结果显示: 颗粒数量多、纯度高, 粒径集中, 且大部分颗粒直径介于30-150 nm, 与外泌体直径理论值相符, 少部分颗粒超出该范围, 可能是由于彼此黏着造成粒径增大。根据已有报道^[10], 跨膜蛋白CD63、CD9在所有的外泌体中均呈现阳性, Alix在上皮源性细胞外泌体中高表达, 因此这3个蛋白可作为肝癌细胞外泌体存在的标志物。本研究利用Western blot验证外泌体这3个标志蛋白, 结果显示提取前肝癌细胞培养液上清和提取液均表达这3种标志蛋白, 而提取后的培养液上清液呈阴性。这说明所获得的提取物为肝癌SMMC-7721细胞释放的外泌体, 且提取较为完全。

通过SDS-PAGE电泳分析蛋白谱, 发现肝癌SMMC-7721细胞外泌体内富含不同分子量的蛋白, 大分子结构蛋白明显少于肝癌细胞裂解液, 凝胶图上清晰显示出分子量介于25-180 kDa之间的蛋白条带, 因此, 外泌体蛋白可能更有利于小分子量标志物的研究。由于外泌体体积较小, 相对于细胞而言, 更易于流动, 所携带的蛋白分子不但参与泡体的形成, 而且介导诸多重要的生物学功能^[11-15]。Park等^[16]实验证实肿瘤细胞在缺氧微环境中可以分泌外泌体, 其携带的跨膜蛋白和Alix蛋白有促血管形成作用, 为肿瘤转移提供条件。因此, 通过对肝癌细胞外泌体内含蛋白的研究, 有利于揭示肝癌发生发展的机制。

总之, 连续适应无血清细胞培养结合改良超速离心法是一种简单、有效的肝癌细胞外泌体提取方案。外泌体作为一种新型的分子实体, 蕴含丰富的生物信息, 对于肝癌的诊断、治疗和预后判断具有重要的研究价值和广阔的应用前景。

4 参考文献

- 1 张敏, 张晨光, 丁卫. 外泌体及其在肿瘤诊疗中的意义. 生理科学进展 2014; 45: 372-378
- 2 Zhu L, Qu XH, Sun YL, Qian YM, Zhao XH. Novel method for extracting exosomes of hepatocellular carcinoma cells. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 6651-6657 [PMID: 24914390 DOI: 10.3748/wjg.v20.i21.6651]
- 3 杨子楠, 魏继武. 外泌体在肿瘤发展中的研究进展. 肿瘤 2011; 31: 565-569
- 4 余乐成, 何长伦, 陈成伟. 外泌体在肝病发病机制、

- 5 诊断和治疗中的作用. 肝脏 2014; 19: 211-214
- 6 刘长红, 武明花, 李桂源. 肿瘤细胞来源的外泌体与恶性肿瘤的进展及化疗. 中国生物化学与分子生物学报 2014; 30: 526-532
- 7 Lim JW, Mathias RA, Kapp EA, Layton MJ, Faux MC, Burgess AW, Ji H, Simpson RJ. Restoration of full-length APC protein in SW480 colon cancer cells induces exosome-mediated secretion of DKK-4. *Electrophoresis* 2012; 33: 1873-1880 [PMID: 22740476 DOI: 10.1002/elps.201100687]
- 8 Shin SJ, Smith JA, Reznicek GA, Pan S, Chen R, Brentnall TA, Wiche G, Kelly KA. Unexpected gain of function for the scaffolding protein plectin due to mislocalization in pancreatic cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110: 19414-19419 [PMID: 24218614 DOI: 10.1073/pnas.1309720110]
- 9 卢婉, 杨人强, 王伶. 外泌体的研究进展. 生命的化学 2013; 33: 438-443
- 10 刘艳华, 王小中. 外泌体在疾病诊疗中的研究进展. 实验与检验医学 2014; 32: 267-271
- 11 Théry C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol* 2006; Chapter 3: Unit 3.22 [PMID: 18228490 DOI: 10.1002/0471143030.cb0322s30]
- 12 Hoshino A, Costa-Silva B, Shen TL, Rodrigues G, Hashimoto A, Tesic Mark M, Molina H, Kohsaka S, Di Giannatale A, Ceder S, Singh S, Williams C, Soplop N, Uryu K, Pharmed L, King T, Bojmar L, Davies AE, Ararso Y, Zhang T, Zhang H, Hernandez J, Weiss JM, Dumont-Cole VD, Kramer K, Wexler LH, Narendran A, Schwartz GK, Healey JH, Sandstrom P, Jørgen Labori K, Kure EH, Grandgenett PM, Hollingsworth MA, de Sousa M, Kaur S, Jain M, Mallya K, Batra SK, Jarnagin WR, Brady MS, Fodstad O, Muller V, Pantel K, Minn AJ, Bissell MJ, Garcia BA, Kang Y, Rajasekhar VK, Ghajar CM, Matei I, Peinado H, Bromberg J, Lyden D. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature* 2015; 527: 329-335 [PMID: 26524530 DOI: 10.1038/nature15756]
- 13 Fontana S, Saieva L, Taverna S, Alessandro R. Contribution of proteomics to understanding the role of tumor-derived exosomes in cancer progression: state of the art and new perspectives. *Proteomics* 2013; 13: 1581-1594 [PMID: 23401131 DOI: 10.1002/pmic.201200398]
- 14 Umez T, Ohyashiki K, Kuroda M, Ohyashiki JH. Leukemia cell to endothelial cell communication via exosomal miRNAs. *Oncogene* 2013; 32: 2747-2755 [PMID: 22797057 DOI: 10.1038/nc.2012.295]
- 15 Casazza A, Di Conza G, Wenes M, Finisguerra V, Deschoemaeker S, Mazzone M. Tumor stroma: a complexity dictated by the hypoxic tumor microenvironment. *Oncogene* 2014; 33: 1743-1754 [PMID: 23604130 DOI: 10.1038/nc.2013.121]
- 16 吴永兵, 徐建军. 四跨膜蛋白超家族与肿瘤侵袭和转

移. 南昌大学学报(医学版) 2013; 53: 89-93

- 16 Park JE, Tan HS, Datta A, Lai RC, Zhang H, Meng W, Lim SK, Sze SK. Hypoxic tumor cell modulates its microenvironment to enhance angiogenic and

metastatic potential by secretion of proteins and exosomes. *Mol Cell Proteomics* 2010; 9: 1085-1099 [PMID: 20124223 DOI: 10.1074/mcp.M900381-MCP200]

同行评价

本文研究思路清晰, 研究方法在前人研究的基础上有一定的创新性.

编辑: 郭鹏 电编: 都珍珍



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2016年版权归百世登出版集团有限公司所有

•消息•

《世界华人消化杂志》修回稿须知

本刊讯 为了保证作者来稿及时发表, 同时保护作者与《世界华人消化杂志》的合法权益, 本刊对修回稿要求如下.

1 修回稿信件

来稿包括所有作者签名的作者投稿函. 内容包括: (1)保证无重复发表或一稿多投; (2)是否有经济利益或其他关系造成的利益冲突; (3)所有作者均审读过该文并同意发表, 所有作者均符合作者条件, 所有作者均同意该文代表其真实研究成果, 保证文责自负; (4)列出通讯作者的姓名、地址、电话、传真和电子邮件; 通讯作者应负责与其他作者联系, 修改并最终审核核稿; (5)列出作者贡献分布; (6)来稿应附有作者工作单位的推荐信, 保证无泄密, 如果是几个单位合作的论文, 则需要提供所有参与单位的推荐信; (7)愿将印刷版和电子版版权转让给本刊编辑部.

2 稿件修改

来稿经同行专家审查后, 认为内容需要修改、补充或删除时, 本刊编辑部将把原稿连同审稿意见、编辑意见发给作者修改, 而作者必须于15天内将单位介绍信、作者复核要点承诺书、版权转让信等书面材料电子版发回编辑部, 同时将修改后的电子稿件上传至在线办公系统; 逾期发回的, 作重新投稿处理.

3 版权

本论文发表后作者享有非专有权, 文责由作者自负. 作者可在本单位或本人著作集中汇编出版以及用于宣讲和交流, 但应注明发表于《世界华人消化杂志》××年; 卷(期); 起止页码. 如有国内外其他单位和个人复制、翻译出版等商业活动, 须征得《世界华人消化杂志》编辑部书面同意, 其编辑版权属本刊所有. 编辑部可将文章在《中国学术期刊光盘版》等媒体上长期发布; 作者允许该文章被美国《化学文摘》、《荷兰医学文摘库/医学文摘》、俄罗斯《文摘杂志》国外相关文摘与检索系统收录.



Published by **Baishideng Publishing Group Inc**
8226 Regency Drive, Pleasanton,
CA 94588, USA
Fax: +1-925-223-8242
Telephone: +1-925-223-8243
E-mail: bpgoffice@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>



ISSN 1009-3079

