

高表达 ANXA2 肝癌干细胞外泌体对肝癌细胞恶性生物学特性的调控作用

潘韵芝¹, 马 赛¹, 曹凯悦², 周素芳³, 赵爱琴³, 朱 莉¹, 朱传武¹

(1. 苏州大学附属传染病医院, 江苏 苏州 215000; 2. 天津第一中心医院, 天津 300100; 3. 苏州市高新区人民医院, 江苏 苏州 215000)

摘 要: [目的] 探讨肝癌干细胞来源外泌体中差异表达的蛋白质, 重点分析外泌体 ANXA2 分子对肝癌恶性生物学特性(自我更新、侵袭和转移能力)的影响。[方法] 采用无血清悬浮培养法和干细胞标志物流式分选术分离人肝癌干细胞; 分别采用干细胞球形成实验、体外侵袭转移能力鉴定分离所得肝癌干细胞; 采用蛋白质谱分析肝癌干细胞来源外泌体中的差异表达蛋白质; siRNA 靶向抑制 ANXA2 表达后, 分别进行肝癌细胞球形成实验、体外侵袭与迁移实验检测外泌体 ANXA2 对人肝癌细胞自我更新、侵袭、转移能力的影响; 收集肝癌患者和正常人血浆, 通过凝胶排阻层析联合 CD63 免疫磁珠分离纯化外泌体, Western blot 检测外泌体中 ANXA2 表达情况, 结合临床病理资料, 综合分析外泌体 ANXA2 的临床相关性。[结果] 成功分离得到肝癌干细胞 CD133⁺SK-Hep-1, 其具有典型的肿瘤干细胞生物学特性。与 CD133⁻SK-Hep-1 细胞外泌体相比, CD133⁺SK-Hep-1 肝癌干细胞来源外泌体中具有多种差异表达蛋白, 其中外泌体 ANXA2 表达明显上调。siRNA 靶向抑制肝癌干细胞 ANXA2 表达后, 其外泌体中 ANXA2 表达也下降。分别采用 PBS、siRNA 靶向抑制肝癌干细胞 ANXA2 后外泌体(Exo-LCSCs-siANXA2)、肿瘤干细胞来源外泌体(Exo-LCSCs)刺激肝癌细胞系 HepG2、SNU398, 其自我更新、侵袭和转移能力依次增强。Western blot 结果显示, 肝癌患者血浆外泌体 ANXA2 表达明显高于健康人血浆; 肝癌患者血浆外泌体 ANXA2 表达与患者年龄、性别无明显相关性, 而与肿瘤 TNM 分期和转移显著相关。[结论] 高表达 ANXA2 的肝癌干细胞的外泌体对肝癌细胞恶性生物学特性具有调控作用。

关键词: 肿瘤干细胞; 外泌体; ANXA2; 自我更新; 侵袭; 转移

中图分类号: R735.7 文献标识码: A 文章编号: 1004-0242(2019)04-0308-07

doi: 10.11735/j.issn.1004-0242.2019.04.A011

Exosomal ANXA2 of Cancer Stem Cell Regulates Biological Behavior of Liver Cancer

PAN Yun-zhi¹, MA Sai¹, CAO Kai-yue², ZHOU Su-fang³, ZHAO Ai-qin³, ZHU Li¹, ZHU Chuan-wu¹

(1. The Affiliated Infectious Hospital of Soochow University, Suzhou 215000, China; 2. Tianjin First Central Hospital, Tianjin 300100, China; 3. People's Hospital of Gaoxin District of Suzhou City, Suzhou 215000, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the expression of exosomal proteins in liver cancer stem cells(CSCs) and the effect of exosomal protein ANXA2 on biological behavior of liver cancer. [Methods] The serum-free suspension culture and flow cytometry sorting technology were used to isolate CSCs from liver cancer. Biological characteristics of liver CSCs were detected by sphere colony formation assay, invasion and migration assay in vitro. Protein mass spectrometry was used to analyze the differentially expressed proteins in CSCs-derived exosomes. After transfection with ANXA2 siRNA, the changes of biological behaviors of liver cancer were examined by sphere colony formation assay, invasion and migration assay. Exosomes were isolated from plasma of liver cancer patients and healthy subjects by gel exclusion chromatography combined with CD63 immunomagnetic beads method. Western blot was used to detect exosomal-ANXA2 expression, and the association of exosomal-ANXA2 expression with clinicopathological features of liver cancer was analyzed. [Results] Liver CSCs were successfully isolated by using the serum-free suspension culture and fluorescence-activated cell sorting. Functional studies revealed that CD133⁺SK-Hep-1 had cancer stem cell-like characteristics. Protein mass spectrometry analysis illustrated that the expression of exosomal-ANXA2 was significantly up-regulated in CD133⁺SK-Hep-1 cells. After inhibition of ANXA2 in CD133⁺SK-Hep-1 cells, the expression of exosomal-ANXA2 was down-regulated. The self-renewal, invasive and metastatic ability of liver cancer HepG2 and SNU398 cells were increased in PBS, exo-LCSCs-siANXA2 and exo-LCSCs groups. Western blot results showed that the expression of exosomal-ANXA2 in liver cancer patients was significantly higher than that in healthy subjects. No significant

收稿日期: 2018-03-14; 修回日期: 2018-04-02

基金项目: 苏州市感染性疾病临床医学中心项目(SZZX201508)

通信作者: 朱传武, E-mail: zhuchw@126.com

association between exosomal-ANXA2 expression and age,sex of patients was detected in 50 liver cancer patients. However,the levels of exosomal-ANXA2 were significantly correlated with tumor differentiation,TNM stage and depth of invasion. [Conclusion] The study indicates that exosomes of cancer stem cells with high expression of ANXA2 regulate biological characteristics of liver cancer.

Key words: cancer stem cell;exosomes;ANXA2;self-renewal capacity;invasion;migration ability

肝癌是常见的恶性肿瘤之一,其发病率和死亡率在各种恶性肿瘤中分别居第4位和第3位,严重威胁着人类健康^[1]。目前肝癌治疗以手术为主,并辅以放、化疗,但患者5年生存率仍很低,预后不理想,其中肿瘤的复发、侵袭和转移是治疗失败和患者死亡的主要原因^[2]。

近年来,研究发现肿瘤干细胞(cancer stem cells, CSCs)是肿瘤组织中一小部分具有自我更新能力并能产生异质性肿瘤的细胞,在肿瘤的侵袭转移过程中发挥着重要作用^[3,4]。肿瘤干细胞介导侵袭转移机制主要有两方面:首先,肿瘤干细胞高表达一系列干细胞标志物(Sox-2、Oct-4、Nanog、Snail等)可促进上皮间质转化(EMT)^[5];其次,肿瘤干细胞微环境的改变可促进肿瘤干细胞的自我更新、诱导血管生成、招募免疫细胞和基质细胞等,从而促进肿瘤的侵袭和转移^[6]。因此,针对肿瘤干细胞干性维持机制和微环境进行深入研究,寻找潜在的治疗靶点有望解决肝癌侵袭转移的难题。

外泌体是由多种类型细胞分泌的直径为30~100nm的小囊泡,富含蛋白质、mRNA、miRNA、DNA和脂质等生物活性分子。大量研究报道,外泌体可通过刺激血管生成、抑制免疫反应、改变细胞外基质成分等调控肿瘤微环境,促进肿瘤的侵袭和转移^[7-9]。有文献报道,与低转移性HCC细胞相比,高转移性HCC细胞来源的外泌体表现出更强促进肝癌转移的能力^[10]。肿瘤干细胞作为恶性肿瘤的种子细胞,具有较强的致瘤性、耐药性和侵袭转移能力^[11,12]。基于此,本文重点探讨肝癌干细胞来源外泌体中差异表达蛋白质,并进一步研究外泌体ANXA2分子对肝癌细胞恶性生物学特性的作用及其临床相关性。

1 材料与方法

1.1 细胞系和肿瘤干细胞的培养

HepG2、SNU398、LM3、Huh7、MHCC97L、SK-

Hep-1细胞系购于中国科学院细胞库。细胞系使用含10%FBS(Thermo Scientific,USA)、1%谷氨酰胺、1%青霉素-链霉素的RPMI-1640培养。无血清培养基(SFM)含DMFM/F12、20μl/ml B27 supplement(Life Technologies)、20ng/ml碱性成纤维细胞生长因子(bFGF,Gibco)、10ng/ml EGF(Gibco)和10ng/ml LIF(Gibco)。肝癌细胞系经无血清悬浮培养7d可形成紧实的细胞球体。肝癌干细胞是使用无血清悬浮培养肝癌细胞系后,通过流式细胞分选技术分离所得。

1.2 流式细胞分选技术分离肝癌干细胞

采用无血清悬浮培养肝癌细胞系,培养第7天时采用FITC Mouse Anti-Human CD133(BD Biosciences)以1:400的比例稀释抗体孵育细胞,然后PBS洗涤2次,采用流式细胞仪(BD Biosciences)分选CD133⁺和CD133⁻细胞。

1.3 肝癌干细胞外泌体蛋白质谱分析及验证

收集CD133⁺ SK-Hep-1肝癌干细胞、CD133⁻ SK-Hep-1细胞、HepG2细胞培养上清,送上海皓歌生物科技有限公司进行外泌体蛋白质谱表达差异分析。用超速离心法从细胞培养上清中提取外泌体,通过电镜形态观察、粒径分布范围、特异性表面蛋白CD63表达来鉴定提取所得外泌体的质量,Western blot检测CD133⁺ SK-Hep-1来源外泌体、CD133⁻ SK-Hep-1细胞来源外泌体中ANXA2表达。

1.4 蛋白质印迹

根据Subcellular Protein Fractionation Kit(Thermo Pierce)说明书操作步骤,提取相关细胞总蛋白。具体步骤为:将待提取的细胞用冰冷PBS洗3次;根据获取的细胞数量加入适量的细胞裂解液RAPI,冰上裂解30min;4℃、12 000rpm离心30min;取上清于-70℃保存备用。采用外泌体分离纯化试剂盒(QIAGEN)提取细胞上清或血浆外泌体,利用EXO-SOME外泌体RNA/蛋白提取试剂盒(Thermo)提取外泌体中蛋白质。

利用BCA protein Assay Kit(Thermo Pierce)测

定蛋白质浓度。具体操作为:将 BSA(Bovine Serum Albumin)标准品梯度稀释(0.0625~2mg/ml);取 25 μ l BSA 标准品,加入 200 μ l 稀释的 50:1 混合的 A+B 液;振荡混匀,37 $^{\circ}$ C 孵育 20min,用紫外分光光度计测 OD₅₇₀ 的吸收值,绘制蛋白定量的标准曲线;取待测蛋白样品,重复上述步骤,根据标准曲线算出相应蛋白浓度。

在蛋白样品提取、浓度测定后,分别制胶、上样、电泳、转膜、抗体孵育、曝光等步骤进行蛋白质印迹实验。其中所用到的一抗及稀释比例有:ANXA2 (Abcam,1:5000)、GAPDH (Cell Signaling Technology, 1:1000)、CD63 (Abcam,1:5000)。

1.5 siRNA 抑制

siRNA 购于上海吉玛基因。以 1×10^5 个/孔接种细胞于 6 孔板内,待其长至汇合度约 30% 时进行转染操作。在 EP 管中加入 250 μ l Opti-MEM 培养基中,再取 5 μ l Lipofectamine 2000 加入,摇匀室温孵育 5min。同时,将 2~4 μ g 质粒或 5 μ l siRNA(40nmol/L)加入另一份 250 μ l Opti-MEM 培养基中。将含有 siRNA 和 Lipofectamine 2000 的两管 Opti-MEM 混合,摇匀,室温孵育 20min。细胞用平衡至室温的 1 $\times$ PBS 洗 1 次,每孔加入 1ml Opti-MEM 培养基。将混合液加入 6 孔板中。37 $^{\circ}$ C 培养 6h 后更换为完全培养基,继续培养,48h 后收集细胞进行下一步实验。

1.6 体外自我更新能力的分析

取分选得到细胞或者 siRNA 抑制剂处理后的细胞,以 500 个/孔的密度接种于低粘附 24 孔板,用含 0.8% 甲基纤维素的无血清悬浮培养基培养,在 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 孵箱中培养,7d 后观察成球情况。

1.7 Transwell 实验检测外泌体对肝癌细胞侵袭、迁移能力的影响

细胞侵袭实验:Transwell 小室膜上铺基质胶;消化并稀释肝癌细胞悬液至 10 万/ml,向 Transwell 小室上室中接种细胞悬液 200 μ l;收集等量不同细胞来源的外泌体,向小室下室中加入等量的外泌体,放入 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 孵箱培养。48h 后割下小室膜,4% 多聚甲醛固定、DAPI 染色,置于倒置显微镜紫外激发光下拍照。

细胞迁移实验:消化并稀释肝癌细胞悬液至 10 万/ml,向 Transwell 小室上室中接种细胞悬液 200 μ l;收集等量不同细胞来源的外泌体,向小室下

室中加入等量的外泌体,放入 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 孵箱培养。48h 后割下小室膜,4% 多聚甲醛固定、DAPI 染色,置于倒置显微镜紫外激发光下拍照。

1.8 外泌体 ANXA2 分子临床相关性研究

从本校附属医院收集肝癌患者血浆样本 50 例、健康人血浆样本 10 例,使用凝胶排阻层析并 CD63 免疫磁珠分离提纯外泌体,Western blot 检测外泌体 ANXA2 表达情况,结合临床参数(年龄、性别、病理分级、分期、淋巴结转移和预后等),分析外泌体 ANXA2 表达与肝癌患者临床病理参数及预后的相关性。

1.9 数据分析

采用 SPSS13.0 软件进行统计分析,计数资料的比较采用 χ^2 检验,计量资料的比较采用 t 检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

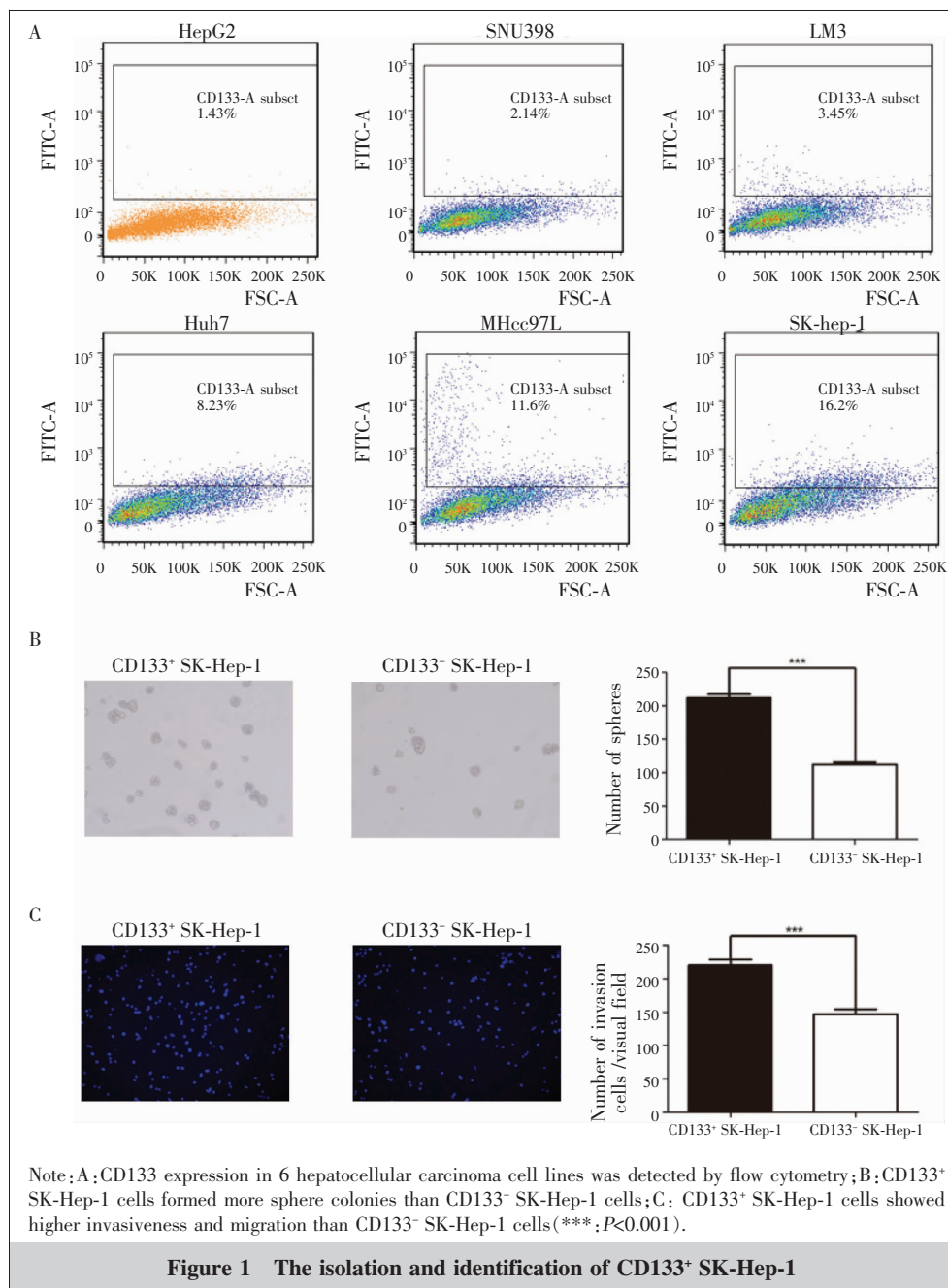
2 结 果

2.1 肝癌干细胞的分离、干性鉴定

采用无血清悬浮培养和表面标志物流式细胞分选术检测肝癌干细胞标志物 CD133 在 6 株肝癌细胞系 HepG2、SNU398、LM3、Huh7、MHCC97L、SK-Hep-1 中的表达情况,结果表明 SK-Hep-1 细胞系中 CD133 表达最高,为 16.2%(Figure 1A)。通过甲基纤维素成球实验检测 CD133⁺ SK-Hep-1、CD133⁻ SK-Hep-1 成球率高,结果显示 CD133⁺ SK-Hep-1 干细胞成球率显著高于 CD133⁻ SK-Hep-1 (Figure 1B)。Transwell 侵袭实验结果表明 CD133⁺ SK-Hep-1 细胞侵袭能力强于 CD133⁻ SK-Hep-1 (Figure 1C)。

2.2 肝癌干细胞来源外泌体中差异表达蛋白质及其验证

收集 CD133⁺ SK-Hep-1 肝癌干细胞、CD133⁻ SK-Hep-1 细胞、HepG2 细胞上清送上海皓歌生物科技有限公司进行外泌体蛋白质谱表达差异分析。结果表明,ANXA2 在 CD133⁺ SK-Hep-1 肝癌干细胞外泌体中表达明显上调(Figure 2A)。利用 Western blot 检测 CD133⁺ SK-Hep-1 肝癌干细胞、CD133⁻ SK-Hep-1 细胞、CD133⁺ SK-Hep-1 来源外泌体、CD133⁻ SK-Hep-1 细胞来源外泌体中 ANXA2 表达,结果表明,CD133⁺ SK-Hep-1 肝癌干细胞及其外泌体内 ANXA2 的表达均高于 CD133⁻ SK-Hep-1 细胞。siR-



NA 靶向抑制肝癌干细胞 ANXA2 表达后,其外泌体 ANXA2 表达也下降(Figure 2B)。

2.3 肿瘤干细胞来源外泌体 ANXA2 分子对肝癌细胞恶性生物学特性的影响

选取恶性程度较低的肝癌细胞系:HepG2、SNU398 作为研究模型,分别采用 PBS、肿瘤干细胞来源外泌体(Exo-LCSCs)、siRNA 靶向抑制肝癌干细胞 ANXA2 后外泌体(Exo-LCSCs-siANXA2)刺激肝癌细胞系 HepG2、SNU398,观察其自我更新、侵袭和

转移能力的改变。结果可见,PBS、Exo-LCSCs-siANXA2、Exo-LCSCs 刺激后肝癌细胞自我更新、侵袭转移能力依次增强(Figure 3)。因此,肿瘤干细胞来源外泌体 ANXA2 分子在肝癌细胞恶性生物学特性中发挥关键作用。

2.4 肿瘤干细胞来源外泌体 ANXA2 分子临床相关性

肝癌患者血浆外泌体 ANXA2 表达明显高于健康人外泌体 ANXA2 的表达(Figure 4),临床病理参数相关性研究表明,肝癌患者外泌体 ANXA2 表达与患者年龄、性别无明显相关性,而与肿瘤 TNM 分期和转移显著相关(Table 1)。

3 讨论

肝癌是常见的恶性肿瘤之一,复发和转移是肝癌预后不佳的主要因素。肿瘤干细胞是指肿瘤内一群具有

自我更新能力与不定向分化潜能的细胞,具有自我更新、无限增殖、高致瘤性、抵抗放化疗等生物学特性。目前,肿瘤干细胞的分离主要通过三种途径:侧群细胞法、无血清悬浮培养和利用表面标志物来分选。研究表明在肝癌组织和肝癌细胞系中均存有肿瘤干细胞,CD133 是肝癌干细胞的标志物之一。本研究通过无血清悬浮培养和肝癌干细胞标志物 CD133 流式分选技术相结合成功分离人肝癌干细胞。体外功能实验也证明分离得到的细胞具有典型的肿瘤干

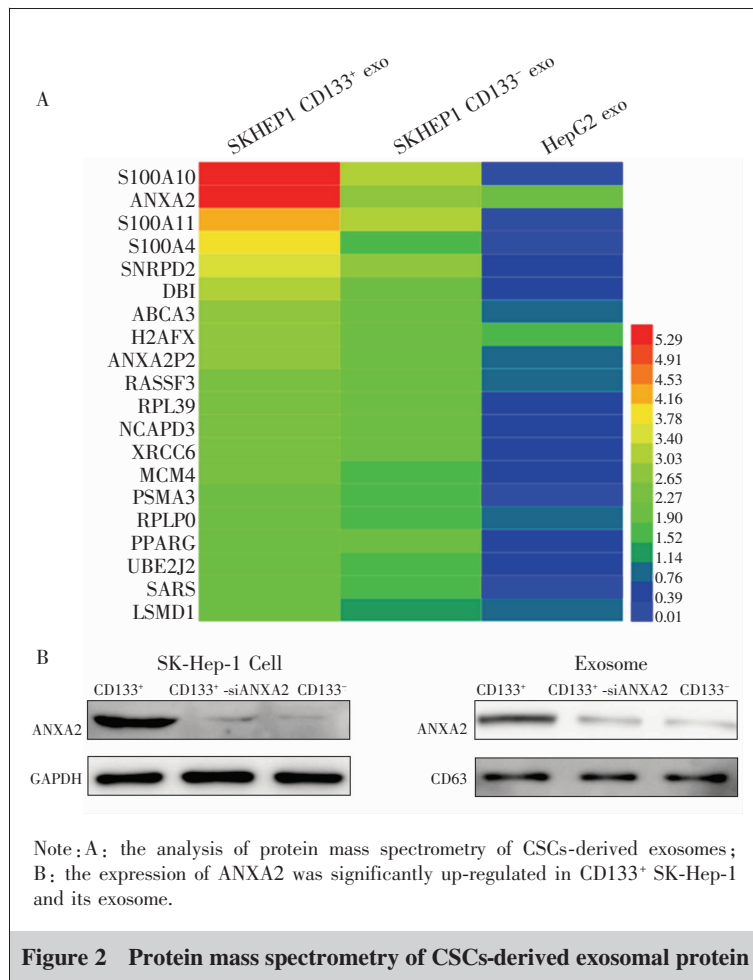


Figure 2 Protein mass spectrometry of CSCs-derived exosomal protein

Table 1 Relationship between exosomal-ANXA2 expression and clinicopathological parameters in 50 liver cancer patients

Characteristics	N	ANXA2 expression		χ^2	P
		Negative	Positive		
Age groups(years)					
<60	28	10	18	1.878	0.146
≥60	22	4	18		
Gender					
Male	25	8	17	0.397	0.377
Female	25	6	19		
Differentiation					
PD	14	5	9	1.371	0.504
MD	28	8	20		
WD	8	1	7		
TNM stage					
I + II	24	11	13	7.281	0.007
III + IV	26	3	23		
Depth of invasion					
T ₁ +T ₂	21	10	11	12.349	0.009
T ₃ +T ₄	29	4	25		

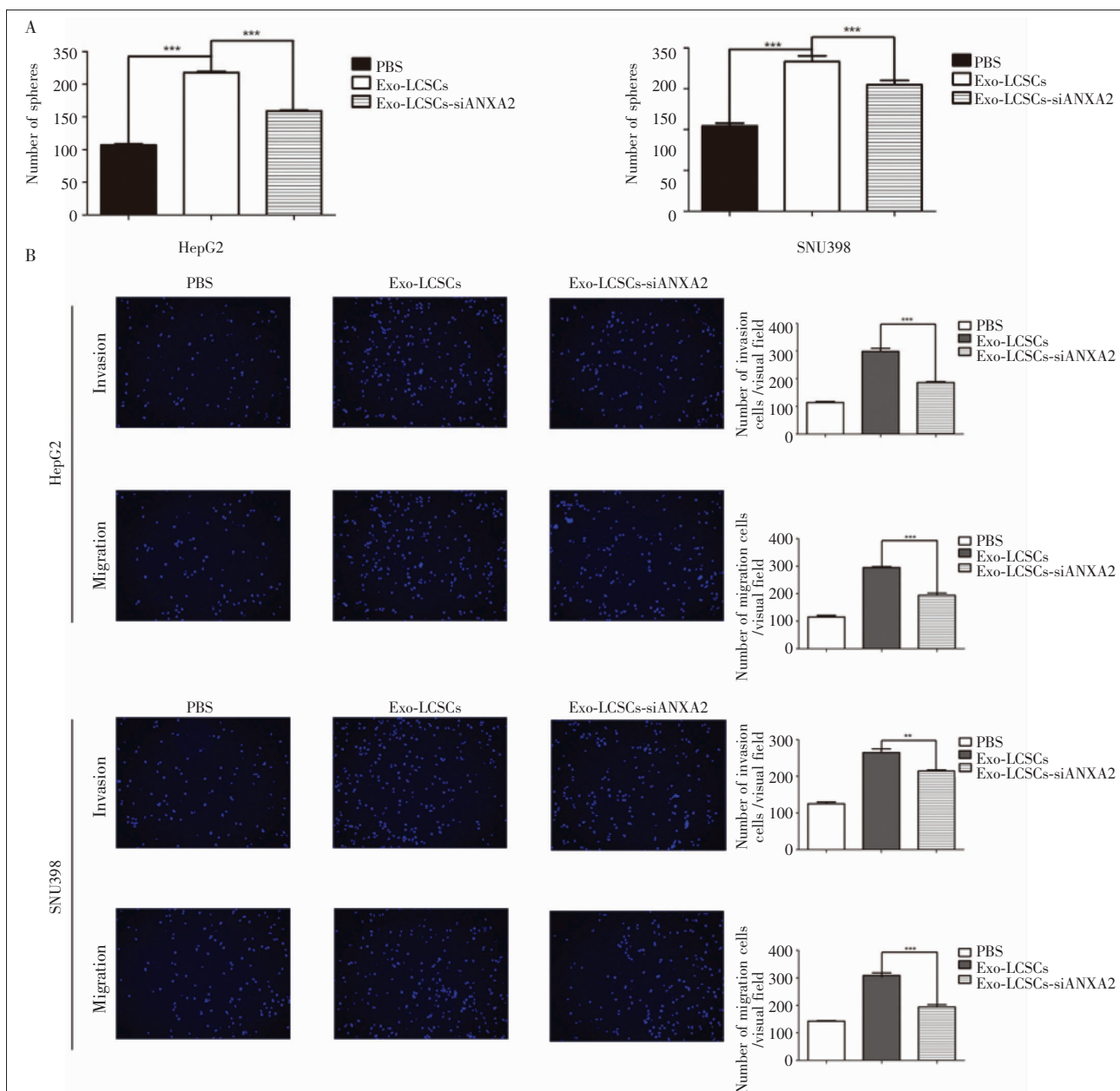
Note: PD; poorly differentiated; MD; moderately differentiated; WD; well differentiated.

细胞生物学特性;较强的自我更新能力、侵袭和转移能力。

多项研究证实外泌体可携带蛋白质、mRNA、miRNA、DNA 和脂质等生物活性分子,参与肝癌的发生、发展,是肝癌潜在的分子标志物和治疗新手段。Sugimachi 等^[13]研究发现 miR-718 在肝移植复发后显著表达,同时 miR-718 的表达水平与肝癌的侵袭转移密切相关,其上调与预后较差有关。此外,血浆外泌体中的多种小分子 RNA 也可被认为是肝癌潜在的诊断标志物,如 miR-21、miR-221、miR-1228 等^[14-16]。近几年,在开发基于外泌体,针对肝癌的新型治疗手段也取得巨大进展^[17-19]。肿瘤来源外泌体对肿瘤免疫治疗具有激活作用,如外泌体可将肿瘤特异性抗原、癌胚抗原等转移到树突状细胞,诱导 CD8⁺T 细胞介导的免疫反应。有研究表明,肿瘤起源的外泌体可通过促进细胞因子(IL-12、IFN- β 等)表达而产生抗肿瘤活性,抑制肝癌细胞增殖^[20]。

本研究中,我们进行了 CD133⁺ SK-Hep-1 肝癌干细胞、CD133⁻ SK-Hep-1 细胞来源外泌体内蛋白质谱表达差异的分析。表达谱结果表明,与 CD133⁻ SK-Hep-1 细胞来源外泌体相比,CD133⁺ SK-Hep-1 肝癌干细胞外泌体中具有多种差异表达蛋白质,其中 ANXA2 差异表达最为显著(529倍)。采用 Western blot 技术验证表达谱结果。体外功能研究表明肿瘤干细胞来源外泌体 ANXA2 分子对肝癌细胞恶性生物学特性具有调控作用:促进肝癌的自我更新、侵袭和转移。临床病理参数相关性研究表明,肝癌患者血浆外泌体 ANXA2 表达明显高于健康人的表达,肝癌患者外泌体 ANXA2 表达与患者年龄、性别无明显相关性,而与肿瘤 TNM 分期和转移显著相关。

综上所述,肿瘤干细胞来源外泌体在肝癌的自我更新、侵袭、转移等恶性生物学特性中发挥关键作用。以肝癌干细胞来源外泌体 ANXA2 分子为聚焦点,通过细胞表型实验、临床问题相关性研究等方面证



Note: A: CSCs-derived exosomal ANXA2 promote self-renewal ability; B: the invasive and metastatic ability of HepG2 and SNU398 were increased by exosomal ANXA2.

Figure 3 The influence of CSCs-derived exosomal ANXA2 on biological characteristics of liver cancer

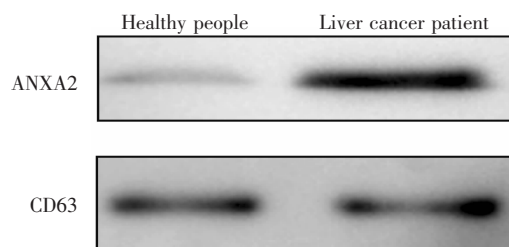


Figure 4 The expression of exosomal ANXA2 in liver cancer

实分泌体 ANXA2 可促进肝癌细胞自我更新、侵袭和转移。因此,探寻普通肿瘤细胞和肿瘤干细胞来源分泌体内容物的差异,深入研究其调控的分子机制,必将为肝癌诊断、治疗手段提供新依据和新思路。

参考文献:

- [1] Chen W,Zheng R,Baade PD,et al. Cancer statistics in China,2015[J]. CA Cancer J Clin,2016,66(2):115-132.
- [2] Xie H,Liao N,Lan F,et al. 3D-cultured adipose tissue-derived stem cells inhibit liver cancer cell migration and invasion through suppressing epithelial-mesenchymal transition[J]. Int J Mol Med,2018,41(3):1385-1396.
- [3] Yamashita T,Wang XW. Cancer stem cells in the development of liver cancer[J]. J Clin Invest,2013,123(5):1911-1918.
- [4] Xiao Y,Lin M,Jiang X,et al. The recent advances on liver cancer stem cells:biomarkers,separation,and therapy [J]. Anal Cell Pathol (Amst),2017,2017:5108653.
- [5] Matsumoto T,Yokoi A,Hashimura M,et al. TGF-beta-mediated LEFTY/Akt/GSK-3beta/Snail axis modulates epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell properties in ovarian clear cell carcinomas[J]. Mol Carcinog,2018,57(8):957-967.
- [6] Ping YF,Zhang X,Bian XW. Cancer stem cells and their vascular niche;do they benefit from each other?[J]. Cancer Lett,2016,380(2):561-567.
- [7] Whiteside TL. Tumor-derived exosomes and their role in cancer progression[J]. Adv Clin Chem,2016,74:103-141.
- [8] Santangelo L,Battistelli C,Montaldo C,et al. Functional roles and therapeutic applications of exosomes in hepatocellular carcinoma[J]. Biomed Res Int,2017,2017:2931813.
- [9] Grange C,Tapparo M,Collino F,et al. Microvesicles released from human renal cancer stem cells stimulate angiogenesis and formation of lung premetastatic niche [J]. Cancer Res,2011,71(15):5346-5356.
- [10] Fang T,Lv H,Lv G,et al. Tumor-derived exosomal miR-1247-3p induces cancer-associated fibroblast activation to foster lung metastasis of liver cancer[J]. Nat Commun,2018,9(1):191.
- [11] Chen Y,Meng L,Shang H,et al. beta2 spectrin-mediated differentiation repressed the properties of liver cancer stem cells through beta-catenin[J]. Cell Death Dis,2018,9(4):424.
- [12] Pan Y,Shu X,Sun L,et al. miR196a5p modulates gastric cancer stem cell characteristics by targeting Smad4[J]. Int J Oncol,2017,50(6):1965-1976.
- [13] Sugimachi K,Matsumura T,Hirata H,et al. Identification of a bona fide microRNA biomarker in serum exosomes that predicts hepatocellular carcinoma recurrence after liver transplantation[J]. Br J Cancer,2015,112(3):532-538.
- [14] Sohn W,Kim J,Kang SH,et al. Serum exosomal microRNAs as novel biomarkers for hepatocellular carcinoma[J]. Exp Mol Med,2015,47:e184.
- [15] Li Y,Xiang GM,Liu LL,et al. Assessment of endogenous reference gene suitability for serum exosomal microRNA expression analysis in liver carcinoma resection studies[J]. Mol Med Rep,2015,12(4):4683-4691.
- [16] Fornari F,Ferracin M,Treter D,et al. Circulating microRNAs, miR-939,miR-595,miR-519d and miR-494,Identify Cirrhotic Patients with HCC[J]. PLoS One,2015,10:e0141448.
- [17] Wang Y,Zhang C,Zhang P,et al. Serum exosomal microRNAs combined with alpha-fetoprotein as diagnostic markers of hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Med,2018. [Epub ahead of print]
- [18] Borrelli DA,Yankson K,Shukla N,et al. Extracellular vesicle therapeutics for liver disease[J]. J Control Release,2018,273(11):86-98.
- [19] Fu X,Liu M,Qu S,et al. Exosomal microRNA-32-5p induces multidrug resistance in hepatocellular carcinoma via the PI3K/Akt pathway[J]. J Exp Clin Cancer Res,2018,37(1):52.
- [20] Ma B,Jiang H,Jia J,et al. Murine bone marrow stromal cells pulsed with homologous tumor-derived exosomes inhibit proliferation of liver cancer cells[J]. Clin Transl Oncol,2012,14(3):764-773.