

双峰驼血浆外泌体分离提取及肝癌细胞 对外泌体摄取的实验研究

于雯^① 李子怡^① 牛雅如^① 贺星川^①

白浩宇^① 玉斯日古楞^{①②*}

① 内蒙古农业大学兽医学院 呼和浩特 010018; ② 农业农村部动物疾病临床诊疗技术重点实验室 呼和浩特 010018

摘要: 为进一步研究双峰驼 (*Camelus bactrianus*) 血浆来源的外泌体在肝癌细胞侵袭和转移中的调节作用, 本研究采用超速离心法分离双峰驼血浆外泌体, 并通过透射电镜观察其形态和超微结构。随后, 使用纳米粒子跟踪分析仪测定外泌体的粒径及分布。将荧光染料 PKH67 标记的外泌体与肝癌细胞 (MHCC-97H 和 Huh7 细胞) 共培养, 并应用扫描共聚焦显微镜 (LSCM) 观察肝癌细胞对双峰驼血浆来源外泌体的摄取情况。结果显示, 分离获得的双峰驼血浆外泌体均呈现杯状或圆形形态, 直径约为 100 nm; 纳米粒子跟踪分析的结果表明, 其颗粒大小的主峰分别为约 124.6 nm 和 117.9 nm, 总体尺寸分布范围从 50 nm 到 200 nm。在扫描共聚焦显微镜下观察, PKH67 标记的外泌体能够进入 MHCC-97H 和 Huh7 肝癌细胞内, 且主要分布于细胞膜及核周的细胞质中。本研究成功提取了双峰驼血浆外泌体, 并观察到肝癌细胞对外泌体的摄取现象, 表明肝癌细胞可能是双峰驼外泌体的靶细胞之一。

关键词: 双峰驼; 血浆; 外泌体; 肝癌细胞

中图分类号: Q955 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2025) 02-239-08

Isolation and Extraction of Plasma Exosomes From Bactrian Camels and Experimental Study on Exosome Uptake by Hepatocellular Carcinoma Cells

YU Wen^① LI Zi-Yi^① NIU Ya-Ru^① HE Xing-Chuan^①

BAI Hao-Yu^① YU Siriguleng^{①②*}

① College of Veterinary Medicine, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018;

② Key Laboratory of Clinical Diagnosis and Treatment of Animal Diseases, Ministry of Agriculture, Hohhot 010018, China

Abstract: [Objectives] This study aims to study the regulatory role of exosomes derived from Bactrian Camel *Camelus bactrianus* plasma in the invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma cells. **[Methods]**

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 32160821, 31860693), 内蒙古自治区自然科学基金项目 (No. 2023MS03021);

* 通讯作者, E-mail: srglyu@imau.edu.cn;

第一作者介绍 于雯, 女, 硕士研究生; 研究方向: 动物生理和病理研究; E-mail: 2219245084@qq.com.

收稿日期: 2024-05-21, 修回日期: 2024-11-21 DOI: 10.13859/j.cjz.202524113 CSTR: 32109.14.cjz.24113

In this study, the plasma exosomes of Bactrian Camels were separated by ultracentrifugation, the morphology and ultrastructure of the exosomes were observed by transmission electron microscopy, and the particle size and distribution of the exosomes were determined by nanoparticle tracking analyzer, the exosomes were co-cultured with hepatoma cells (MHCC-97H and Huh7 cells) after labeling with fluorescent dye PKH67, and the uptake of plasma-derived exosomes by hepatoma cells was observed by scanning confocal microscopy (LSCM). **[Results]** The obtained plasma exosomes of Bactrian Camels were all cup-shaped or round-shaped, with a diameter of about 100 nm (Fig. 1): the main peaks of particle size were about 124.6 nm and 117.9 nm, respectively, and the overall size distribution ranged from 50 nm to 200 nm (Fig. 2). Exosomes carrying PKH67 markers were observed to enter MHCC-97H and Huh7 cells under LSCM, and mainly distributed in the cytoplasm of cell membranes and perinucleus (Fig. 3). **[Conclusion]** In this study, exosomes derived from Bactrian Camel plasma were successfully extracted, and the uptake of exosomes by hepatoma cells was observed, suggesting that hepatocellular carcinoma cells may be one of the target cells of Bactrian exosomes.

Key words: Bactrian Camel; Plasma; Exosomes; Liver cancer cells

原发性肝癌 (hepatic cell carcinoma, HCC) 是常见的恶性肿瘤之一, 具有高死亡率和易复发的特点。外泌体通过改变肿瘤微环境, 介导产生具有生物活性的 miRNA, 从而在肝癌的发展过程中影响肿瘤的生长、侵袭和转移 (Zaborowski et al. 2015)。双峰驼 (*Camelus bactrianus*) 主要分布在中国的新疆、甘肃和内蒙古, 适应了独特的生活习性和极端的生存条件。研究表明, 双峰驼乳源外泌体对肝癌细胞 HepaRG 具有选择性的抗增殖作用, 而对正常肝细胞 ThLE-2 则没有明显的细胞毒性 (El-kattawy et al. 2021)。这一发现提示双峰驼外泌体在癌症治疗与预防中的潜在应用价值。然而, 由于乳汁成分复杂, 其中一些小分子与外泌体大小相似, 可能导致分离后的外泌体浓度降低。因此, 本研究选择双峰驼的另一种体液——血浆, 作为外泌体的提取来源。

研究发现, 原发性肝癌 (HCC) 患者与正常志愿者的血浆外泌体存在显著差异, 显示其作为肝癌潜在诊断标志物的可能性 (夏泽宇 2021)。此外, 有研究指出, 血浆外泌体 circ-0051443 能够抑制肝癌的进程, 成为潜在的治疗靶点 (Chen et al. 2020)。另外, 双峰驼血浆外泌体能够有效递送 siRNA 到目标细胞, 为靶向肝癌治疗提供了新的可能 (Wahlgren et

al. 2012)。

外泌体是一种细胞外囊泡 (Kalluri et al. 2020), 最早于 1983 年在绵羊 (*Ovis aries*) 网织红细胞中被发现 (Johnstone et al. 1987)。其形态呈典型的杯状, 直径约为 40~160 nm, 外膜由两层平均厚度小于 5 nm 的脂质双层包裹, 密度为 1.13~1.19 kg/L (van Dommelen et al. 2012)。越来越多的研究表明, 细胞可以通过多种内吞途径 (如依赖网格蛋白、小窝蛋白或脂筏的内吞) 以及直接与细胞膜融合的方式摄取外泌体, 从而释放其内容物以调节靶细胞的生物学功能 (冯唐等 2024)。本研究采用基于质量密度的超速离心技术分离双峰驼血浆中的外泌体, 并使用纳米粒子跟踪分析仪检测外泌体的粒径分布。同时, 利用透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM) 观察外泌体的形态, 采用共聚焦显微镜研究肝癌细胞对双峰驼外泌体的摄取情况, 为后续研究其在肝癌细胞侵袭与转移中的调节作用奠定基础。

1 材料与方法

从内蒙古乌兰察布市卓资山镇十八台乡采集 10 峰健康双峰驼个体的血液, 并分离其血浆, 备用。所选个体均为 8 至 9 岁的母驼。

肝癌细胞 MHCC-97H 和 Huh7 分别购自中国科学院细胞库和 ATCC 公司, luc 标记的人肝癌细胞 HEP3B-luc 购自上海钰博生物科技有限公司。

1.1 超速离心法分离双峰驼外泌体

本实验采用超速离心法进行外泌体的分离, 该方法依据样品中外泌体、蛋白质、细胞等物质的沉降速率差异, 通过逐步提高离心力实现分离。大量研究已证明, 经过优化的超速离心方法可以有效从细胞培养液、血清及其他体液中提取外泌体 (Raposo et al. 2013), 被认为是外泌体分离的“金标准” (Coughlan et al. 2020)。本实验使用超速离心机 (XE-90:90k RPM, Beckman, 美国) 处理经等密度 PBS 稀释的血液样品。首先, 以 300 g 离心 10 min, 分离活细胞; 之后, 将上清液转移到新的试管中, 以 2 000 g 离心 10 min, 沉淀死细胞; 接着取上清液, 以 12 000 g 离心 30 min, 清除细胞碎片; 最后, 收集上清, 以 12 000 g 离心 70 min, 获得外泌体沉淀。将沉淀重悬于预冷的 PBS (2.5 ml) 中, 即可获得外泌体, 并储存在 -80 °C 备用。根据制造商的说明, 使用 BCA 蛋白检测试剂盒 (上海木辰生物科技有限公司) 检测分离得到外泌体的浓度。

1.2 外泌体鉴定

双峰驼血浆来源外泌体的鉴定主要包括形态学特征、超微结构、外泌体大小及分布。首先, 采用透射电子显微镜 (Talos L120C, 赛默飞, 美国) 观察外泌体的形态 (Lee et al. 2017)。将从血浆中分离得到的外泌体溶液 50 μ l 加入到 10 ml PBS 中, 4 °C 120 000 g 离心 70 min; 将沉淀用 50 μ l PBS 重悬, 并通过电子显微镜观察外泌体的形态和大小。纳米粒子追踪分析法 (nanoparticle tracking analysis, NTA) 是一种基于光学粒子追踪的技术, 可以同时表征外泌体大小和粒度分布。其原理是利用激光束照射外泌体, 粒子散射产生的光被电荷耦合器件 (charge coupled device, CCD) 相机记录, 分析每个粒子的运动速度, 并通过 Stokes-Einstein

方程计算颗粒的大小 (Filipe et al. 2010, Dragovic et al. 2011)。取 100 μ l 外泌体样品使用纳米粒子追踪分析仪 (ZetaView PMX 110, Particle Metrix, 德国) 评估外泌体的大小及其分布。

1.3 细胞培养

取冻存的肝癌细胞 MHCC-97H 和 Huh7, 放置于 37 °C 水浴锅 (HH-2, 常州智博瑞, 中国) 中快速复苏, 将复苏后的细胞悬液转移至含有培养基 (10% 的胎牛血清和 1% 的青-链霉素双抗的 DMEM 培养基) 的 15 ml 离心管中, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃去上清, 加入完全培养基 (DMEM、10% 胎牛血清 FBS 和 1% 青链霉素双抗) 重悬细胞, 然后将其转移至细胞培养瓶中, 在 37 °C 5% CO₂ 条件下培养。待细胞生长到 80% ~ 90% 时, 进行传代操作。在生物安全柜 (BSC-1000IIB2, 上海苏净实业有限公司, 中国) 内, 吸弃细胞培养上清液, 并用无菌 1 \times PBS 洗涤细胞。然后, 加入 1 ml 胰酶 (25200-072, Gibco, 美国) 进行消化, 确保胰酶与细胞充分接触。当观察到细胞间隙增大, 且细胞出现脱落迹象时, 加入新鲜培养液以终止消化。吹打细胞使其完全脱落, 然后将细胞悬液在 1 000 r/min 下离心 5 min, 弃去上清液。加入新鲜培养液并轻轻吹打, 按 1 : 2 比例 (即从一个培养容器中将细胞转移到新容器中的比例) 传代至新培养瓶中, 最后补充培养液并 37 °C 5% CO₂ 继续培养。

1.4 外泌体标记

用 PKH67 染色试剂盒 (MINI67-1KT, Sigma, 美国) 标记双峰驼血浆外泌体。PKH67 是具有绿色荧光的荧光细胞连接染料。取出双峰驼血浆外泌体, 放冰融化。向无菌 EP 管中加入稀释液 C (Diluent C, 用于常规细胞膜标记) 至总体积到达 500 μ l, 在另一无菌 EP 管中, 加入 500 μ l 稀释液 C 和 4 μ l PKH67, 随后, 两管混合, 孵育 5 min。加入 1% 牛血清白蛋白 (BSA) 至 20 ml 终止染色 1 min, 120 000 g 离心 60 min, 弃上清, 用无菌 PBS 溶解沉淀,

即获得 PKH67 标记的双峰驼血浆外泌体,命名为 PKH67-Exo。

1.5 肝癌细胞与 PKH67 标记外泌体(PKH67-Exo) 共培养及荧光标记和观察

将培养好的肝癌细胞 MHCC-97H 和 Huh7 制成细胞悬液并计数,以每孔 0.5×10^5 细胞的数量接种在 24 孔板上,静置培养过夜。吸弃细胞培养上清,用无 FBS 培养基润洗细胞,随后加入不含外泌体的 FBS 培养基。将 PKH67 标记外泌体 (PKH67-Exo) 按终浓度 20 mg/L 加入细胞培养孔中,混匀后 37 °C 5% CO₂ 共孵育 12 h。完成孵育后,弃去培养基,用 PBS 润洗细胞。

使用 4%多聚甲醛固定细胞,去除多聚甲醛后,用含 0.1% TritonX-100 的 PBS 处理细胞 5 min,再用 PBS 洗爬片 3 次,最后使用含蓝色荧光 DNA 染料 4', 6-二脒基-2-苯基吡啶 (DAPI) 的封片剂进行封片,使用激光共聚焦显微镜 (XH8240RCD402, Leica, 德国) 在 358 nm 的激光波长下观察细胞与 PKH67 标记外泌体 (PKH67-Exo) 的共培养情况并拍照。

1.6 CCK8 检测细胞增殖活性

使用 Lipofectamine™ 2000 转染试剂 (11668019, Invitrogen, 美国) 将外泌体转染至 HEP3B-luc 细胞 (luc 标记的人肝癌细胞),无血清培养 6 h。随后,更换为完全培养基,并在 24 h 后检测转染效率。转染效率通过转染面

积计算,即荧光蛋白面积与细胞总面积之比。具体操作方法如下:转染效率通过 Image J 软件,先将图片设置成黑灰色,然后设置增强对比度,使图片亮度明显增强,接着设置阈值,依次点击 analyze、measure,直接算出面积,以便进行后续实验。细胞分组如下:HEP3B-luc 细胞阴性对照组、外泌体组 (HEP3B-luc 细胞与外泌体)、外泌体和 inhibitor 组 (HEP3B-luc 细胞、外泌体、inhibitor)。转染后的细胞浓度调整至 5×10^7 个/L,并按照上述分组分别接种于 96 孔培养板中,每孔 100 μl 细胞悬液于 96 孔培养板中。在培养 24 h、48 h、72 h 时,通过显微镜观察细胞状态并拍照。然后每孔加入 10 μl 的 CCK8(使用浓度为体积比 10%,C0037,碧云天,中国),在 37 °C 5% CO₂ 培养箱中避光孵育 2 h。用酶标仪[美谷分子仪器 (上海) 有限公司]检测细胞在 450 nm 波长下的吸光度 (A) 值。

数据处理采用 GraphPad Prism 7.0 软件,所有数据以均值 ± 标准差表示,两组间比较采用 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 透射电子显微镜鉴定外泌体的形态

使用透射电子显微镜观察显示,从双峰驼血浆中分离的外泌体均呈现杯状或圆形的形态,直径约为 100 nm (图 1)。

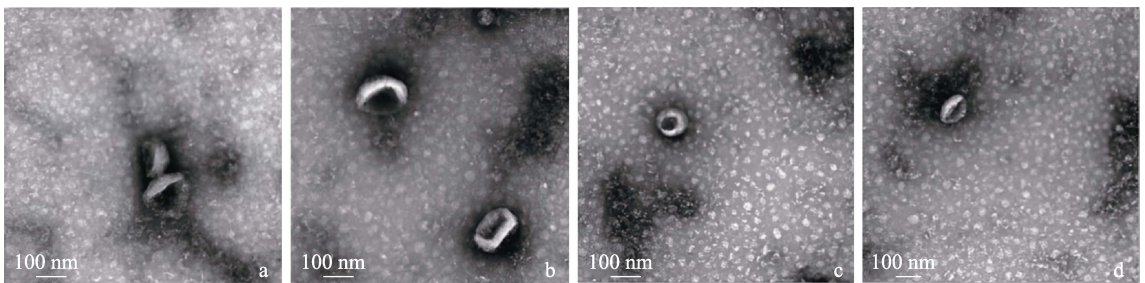


图 1 使用透射电子显微镜观察双峰驼外泌体的形态

Fig. 1 Transmission electron microscopy was used to observe the morphology of *Camelus bactrianus* exosomes

a ~ d 分别为 67000X-1 ~ D67000X-4 号双峰驼血浆。

a - d are plasma samples from *Camelus bactrianus* numbered 67000X-1 - D67000X-4, respectively.

2.2 纳米粒子追踪分析法检测双峰驼血浆外泌体的大小及分布

纳米粒子追踪分析法分析表明，双峰驼血浆中外泌体颗粒大小的主峰分别约为 124.6 nm 和 117.9 nm，峰面积占比 95.5%，粒径大小 50~200 nm，平均约为 136.4 nm（图 2）。所有结果表明，用超速离心法已成功提取了双峰驼血浆外泌体。

2.3 肝癌细胞对双峰驼血浆来源外泌体的摄取

激光共聚焦显微镜观察显示，PKH67 标记

外泌体（PKH67-Exo）出现在 MHCC-97H 细胞和 Huh7 细胞的细胞膜上并进入细胞内部，主要分布于核周的胞质中，呈绿色点状荧光（图 3）。由此可见，双峰驼血浆来源的外泌体可以进入 MHCC-97H 和 Huh7 肝癌细胞。

2.4 外泌体对细胞增殖活力的影响

与 HEP3B-luc 细胞阴性对照组相比，24 h 时，外泌体组（HEP3B-luc 细胞与外泌体）HEP3B-luc 细胞增殖能力显著降低（ $t = 2.870$ ， $df = 10$ ， $P < 0.05$ ），48 h、72 h 时，外泌体组

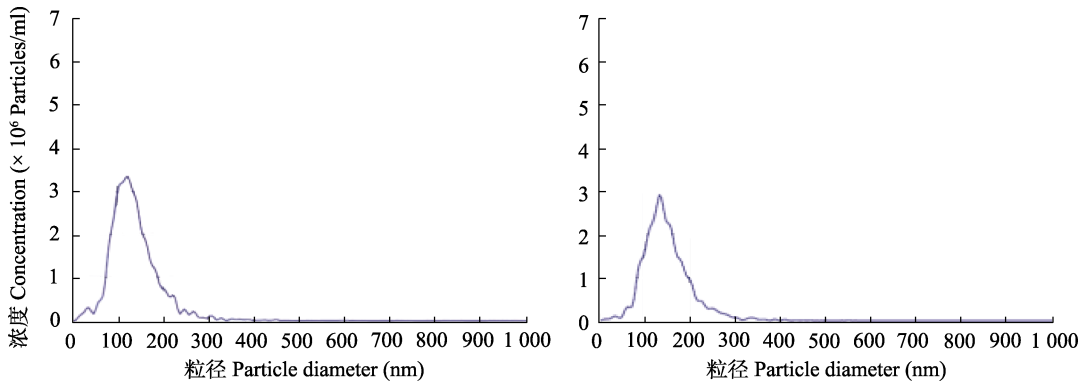


图 2 2 号双峰驼血浆外泌体粒径与浓度分布的纳米粒子跟踪分析

Fig. 2 Nanoparticle tracking analysis of the size and distribution of plasma exosomes from 2 *Camelus bactrianus*

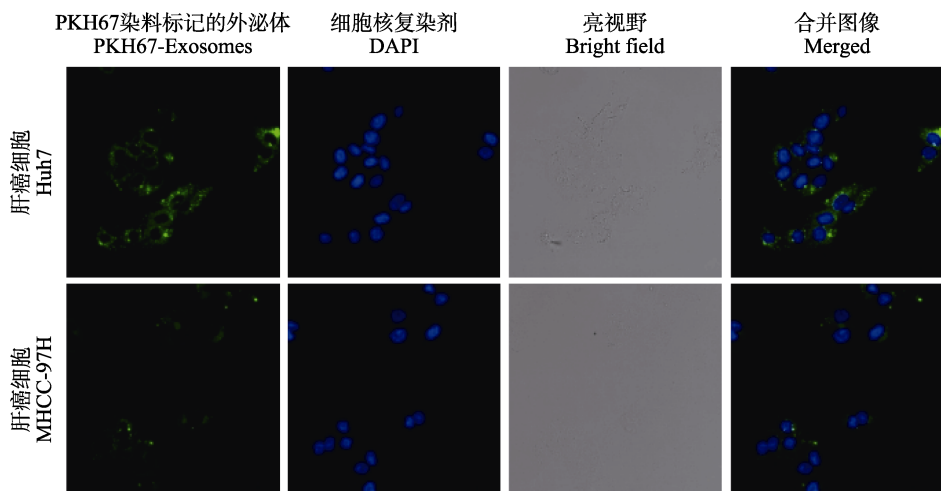


图 3 Huh7 细胞和 MHCC97H 细胞与 PKH67 标记的双峰驼外泌体共孵育结果（400 ×）

Fig. 3 Results of co-incubation of Huh7 cells and MHCC97H cells with PKH67-labeled *Camelus bactrianus* exosomes

HEP3B-luc 细胞增殖能力均极显著降低 (48 h: $t = 8.077$, $df = 10$, $P < 0.0001$; 72 h: $t = 12.40$, $df = 10$, $P < 0.0001$); 同一时间点, 与对照组相比, 外泌体和 inhibitor 组 (HEP3B-luc 细胞、外泌体、inhibitor) HEP3B-luc 细胞增殖能力无显著差异 (图 4)。

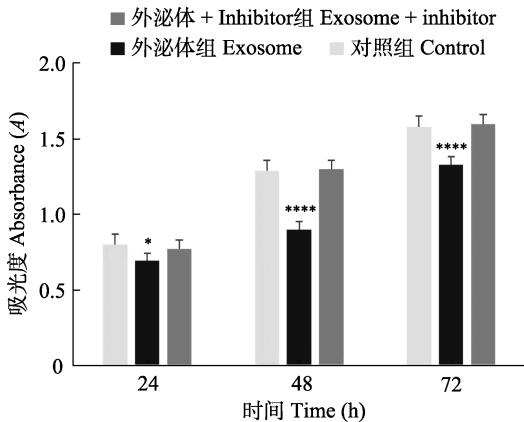


图 4 外泌体对各组细胞增殖活力的影响

Fig. 4 Effect of exosomes on cell proliferation and vigor in each group

与对照组相比, * $P < 0.05$, **** $P < 0.0001$ 。误差线表示标准差。

Compared to the control group, * $P < 0.05$, **** $P < 0.0001$. Error bar indicates standard deviation.

3 讨论

外泌体于 1983 年首次被发现 (Johnstone et al. 1987), 但当时有关这方面的研究较为缺乏。近年来, 随着研究的深入, 人们逐渐认识到了外泌体的生理特性, 它不仅可以通过介导细胞间通讯, 而且对机体生理病理过程有重要影响 (权素玉等 2018)。外泌体在肝癌的演化与进程中发挥重要作用, 不同类型细胞间通过外泌体实现的交叉联系有效地促进了致癌信号在细胞间传递与叠加, 从而加剧了癌变进程 (Zhang et al. 2015)。同时, 不同细胞来源的外泌体组分之间也存在异质性。由此推测, 外泌体可能参与形成和维持肝癌侵袭能力的异质性 (魏思佳等 2023)。原发性肝癌在我国乃至全球的发

病率与死亡率均呈逐年攀升之势, 是我国致死率极高的癌症之一 (Qi et al. 2023)。双峰驼在荒漠地区是独具经济价值和社会价值的特色物种资源, 在抗肿瘤 (Yang et al. 2019, Shi et al. 2021) 领域, 驼乳更是展现出了其独特的食疗保健与辅助治疗功效。更有研究表明, 血浆外泌体能抑制肝癌进程 (Chen et al. 2020), 因此我们推测来自双峰驼体液中的外泌体在癌症治疗和预防方面有很大的潜力。本研究从双峰驼血浆中分离提取外泌体, 成功建立了双峰驼血浆来源外泌体的分离方法, 并用 PKH67 标记双峰驼外泌体后检测到其可被 MHCC-97H 和 Huh7 细胞摄取, 为后续研究奠定了实验基础。

外泌体的组成及其在体液中的分布十分复杂。尽管其他细胞外囊泡亚群与外泌体在性质上具有相似之处, 但在生理功能上存在着显著差异 (Batista et al. 2011, Choi et al. 2019), 此外, 不同体液中不同组分之间的外泌体含量也存在很大程度的差别。因此, 为了保证外泌体的浓度和质量, 我们需要选用高效的分离提取方法来去除背景混杂对提取结果的影响, 提高外泌体生物学作用方面的研究, 优化外泌体临床检测技术, 保证治疗载体技术的准确性和可靠性。超速离心是目前最常用的外泌体分离方法之一, 其具有以下优点: 成熟的分离技术、较高的提取量、便捷的操作方法以及广泛的应用。然而, 超速离心仍存在一些弊端: 在离心过程中花费时间太长、离心机设备价格昂贵以及特异性较差。延长离心时间可以增加外泌体数量, 但如果时间超过 4 h 时, 则会导致外泌体的损伤甚至降解。超速离心还可能会因为离心过程中外泌体与可溶性蛋白共沉淀, 影响后续下游分析 (张越等 2023)。外泌体的鉴定主要采用透射电镜观察和纳米粒子追踪分析法, 可以直接观察外泌体形态、测量其粒径大小及分布。目前透射电子显微镜的分辨力可达 0.2 nm (Wu et al. 2015), 它能直接观察结构和形态, 鉴别不同大小的外泌体。本研究通过透

射电镜直接观察到从双峰驼血浆中分离的外泌体均呈现典型的杯状或圆形形态，直径约为 100 nm。经软件测量分析，膜结构完整，轮廓清晰，中空囊泡状，视野所见背景清晰，内膜中央可见外泌体是质地均匀发黑的圆形空腔，与前人文献报道的外泌体大小形态高度一致 (Mahmoud et al. 2016)。

MHCC-97H 和 Huh7 细胞由于其取材方便以及易于分离培养的优点，作为肝癌摄取实验研究中常用的经典肝癌细胞。双峰驼的许多细胞具有释放外泌体的能力，外泌体释放后广泛存在于血浆、淋巴液、尿液、唾液、乳汁、羊水以及腹水等多种生理性或者病理性体液中 (Srivastava et al. 2021)。外泌体可介导蛋白、可溶性因子、RNA 和 miRNA 等生物活性物质在细胞间传递。而现阶段对于外泌体的研究多集中在生物起源和功能方面。不同来源的外泌体与目标细胞间存在特异性相互作用，被细胞摄取的方式也不尽相同。细胞通过多种内吞方式摄取外泌体，包括依赖网格蛋白的内吞作用、不依赖网格蛋白的内吞作用 (Costa verdadera et al. 2017)、小窝蛋白调节的内吞作用和依赖小窝蛋白/脂质筏途径的内化作用等 (Colombo et al. 2014)。由于外泌体的尺寸，内吞作用和融合是两个最可能的外泌体摄取机制，例如，Morelli 等 (2004) 的研究指出，外泌体进入树突状细胞的方式为内吞，Feng 等 (2010) 的研究表明，吞噬细胞通过吞噬这种特殊的内吞方式摄取外泌体，黑色素瘤通过融合的方式使外泌体内化进入细胞 (Tian et al. 2010)。本研究中外泌体示踪结果显示，在 MHCC-97H 细胞和 Huh7 细胞培养体系中加入用荧光染料 PKH67 标记的双峰驼血浆外泌体，在激光共聚焦显微镜下可见两种细胞的细胞膜上出现 PKH67-Exo 并进入细胞内部，主要分布于核周的胞质中，呈绿色点状荧光。说明 MHCC-97H 和 Huh7 细胞可成功摄取双峰驼血浆来源外泌体，推测肝癌细胞可能为双峰驼外泌体的靶细胞之一。

参 考 文 献

- Batista B S, Eng W S, Pilobello K T, et al. 2011. Identification of a conserved glycan signature for microvesicles. *Journal of Proteome Research*, 10(10): 4624–4633.
- Chen W, Quan Y Y, Fan S Y, et al. 2020. Exosome-transmitted circular RNA hsa_circ_0051443 suppresses hepatocellular carcinoma progression. *Cancer Letters*, 475: 119–128.
- Choi D, Spinelli C, Montermini L, et al. 2019. Oncogenic regulation of extracellular vesicle proteome and heterogeneity. *Proteomics*, 19(1/2): e1800169.
- Colombo M, Raposo G, Théry C. 2014. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 30: 255–289.
- Costa Verdera H, Gitz-Francois J J, Schiffelers R M, et al. 2017. Cellular uptake of extracellular vesicles is mediated by clathrin-independent endocytosis and macropinocytosis. *Journal of Controlled Release*, 266: 100–108.
- Coughlan C, Bruce K D, Burgy O, et al. 2020. Exosome isolation by ultracentrifugation and precipitation and techniques for downstream analyses. *Current Protocols in Cell Biology*, 88(1):e110.
- Dragovic R A, Gardiner C, Brooks A S, et al. 2011. Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 7(6): 780–788.
- El-Kattawy A M, Algezawy O, Alfaifi M Y, et al. 2021. Therapeutic potential of camel milk exosomes against HepaRG cells with potent apoptotic, anti-inflammatory, and anti-angiogenesis effects for colostrum exosomes. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 143: 112220.
- Feng D, Zhao W L, Ye Y Y, et al. 2010. Cellular internalization of exosomes occurs through phagocytosis. *Traffic*, 11(5): 675–687.
- Filipe V, Hawe A, Jiskoot W. 2010. Critical evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates. *Pharmaceutical Research*, 27(5): 796–810.
- Johnstone R M, Adam M, Hammond J R, et al. 1987. Vesicle

- formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *Journal of Biological Chemistry*, 262(19): 9412–9420.
- Kalluri R, LeBleu V S. 2020. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science*, 367(6478): eaau6977.
- Lee Y S, Kim S Y, Ko E, et al. 2017. Exosomes derived from palmitic acid-treated hepatocytes induce fibrotic activation of hepatic stellate cells. *Scientific Reports*, 7(1): 3710.
- Mahmoud M H, Badr G, El Shinnawy N A. 2016. Camel whey protein improves lymphocyte function and protects against diabetes in the offspring of diabetic mouse dams. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 29(4): 632–646.
- Morelli A E, Larregina A T, Shufesky W J, et al. 2004. Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells. *Blood*, 104(10): 3257–3266.
- Qi J L, Li M L, Wang L J, et al. 2023. National and subnational trends in cancer burden in China, 2005–20: an analysis of national mortality surveillance data. *The Lancet Public Health*, 8(12): e943–e955.
- Raposo G, Stoorvogel W. 2013. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *Journal of Cell Biology*, 200(4): 373–383.
- Shi Z Y, Gao Y, Feng L F, et al. 2021. TR35 exerts anti-tumor effects by modulating mitogen-activated protein kinase and STAT3 signaling in lung cancer cells. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9: 723346.
- Srivastava A, Rathore S, Munshi A, et al. 2021. Extracellular vesicles in oncology: from immune suppression to immunotherapy. *The AAPS Journal*, 23(2): 30.
- Tian T, Wang Y Y, Wang H T, et al. 2010. Visualizing of the cellular uptake and intracellular trafficking of exosomes by live-cell microscopy. *Journal of Cellular Biochemistry*, 111(2): 488–496.
- van Dommelen S M, Vader P, Lakhil S, et al. 2012. Microvesicles and exosomes: opportunities for cell-derived membrane vesicles in drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 161(2): 635–644.
- Wahlgren J, De L Karlson T, Brissler M, et al. 2012. Plasma exosomes can deliver exogenous short interfering RNA to monocytes and lymphocytes. *Nucleic Acids Research*, 40(17): e130.
- Wu Y T, Deng W T, Klinke D J 2nd. 2015. Exosomes: improved methods to characterize their morphology, RNA content, and surface protein biomarkers. *Analyst*, 140(19): 6631–6642.
- Yang J, Dou Z H, Peng X, et al. 2019. Transcriptomics and proteomics analyses of anti-cancer mechanisms of TR35-An active fraction from Xinjiang Bactrian camel milk in esophageal carcinoma cell. *Clinical Nutrition*, 38(5): 2349–2359.
- Zaborowski M P, Balaj L, Breakefield X O, et al. 2015. Extracellular vesicles: composition, biological relevance, and methods of study. *Bioscience*, 65(8): 783–797.
- Zhang Y, Wang X F. 2015. A niche role for cancer exosomes in metastasis. *Nature Cell Biology*, 17(6): 709–711.
- 冯唐, 杨欣蕊, 王琦为, 等. 2024. 肝癌外泌体在肿瘤微环境细胞间通讯中的作用. *四川大学学报: 医学版*, 55(1): 6–12.
- 权素玉, 南雪梅, 蒋林树, 等. 2018. 动物外泌体的生物学功能研究进展. *动物营养学报*, 30(12): 4786–4791.
- 魏思佳, 柳诗雅, 马亮亮, 等. 2023. 高转移潜能细胞外泌体对肝癌细胞迁移侵袭影响及其机制. *中华肿瘤防治杂志*, 30(13): 782–792.
- 夏泽宇. 2021. 肝癌患者血浆外泌体蛋白质组学与肝癌诊断标志物的研究. 桂林: 桂林医学院硕士学位论文.
- 张越, 李爱英, 潘琢, 等. 2023. 外泌体分离与提取技术研究进展——生物分离工程科技前沿知识引入. *广东化工*, 50(9): 219–222.