

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.13.002

支原体污染增加人肿瘤细胞外泌体生成并改变其小 RNA 表达模式 *

胡晓鹏¹ 张 哲² 晏昱婧¹ 罗智勇¹ 吴亚群^{1△}

(1 华中科技大学同济医学院附属同济医院 湖北 武汉 430030; 2 郑州大学附属第一医院 河南 郑州 450052)

摘要 目的:研究支原体污染对肿瘤细胞外泌体生成的影响,探讨支原体导致的外泌体量和质的变化。**方法:**应用荧光显微镜及荧光共振能量转移观察支原体污染导致的胞内膜脂质向胞膜再分布及跨细胞传输变化,应用 western blotting 检测污染细胞上清中外泌体标记物 CD81 蛋白含量,应用芯片检测污染细胞上清外泌体中小 RNA 的表达变化模式。**结果:**支原体污染导致 Rab11 和胞膜脂质染料信号强度上升 2 倍以上,提示胞内膜脂质向胞膜再分布增强;支原体污染导致 DiO 和 DiI 双染细胞胞内膜泡的 FRET 指数上升 4 倍,提示膜脂质由支原体污染细胞向未污染细胞的跨细胞传输增强;污染细胞的上清中外泌体标志物 CD81 明显升高;污染导致外泌体内小 RNA 表达模式改变。**结论:**体外实验显示支原体污染可造成外泌体质和量的改变。

关键词:支原体;外泌体;小 RNA;细胞间通讯;脂质传输

中图分类号:R-33; R375; Q291; R730.231 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2018)13-2408-06

Mycoplasma Contamination Enhances Generation of Exosomes of Human Tumor Cells and Alters the Exosomal miRNA Expression Pattern*

HU Xiao-peng¹, ZHANG Zhe², YAN Yu-jing¹, LUO Zhi-yong¹, WU Ya-qun^{1△}

(1 Tongji Hospital affiliated to Tongji Medical college, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei, 430030, China;

2 The first Hospital affiliated to Zheng Zhou University, Zhengzhou, Henan, 450052, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of mycoplasma contamination on host cells exosome generation. To study the mycoplasma-induced alterations on exosome in quantity and quality aspects. **Methods:** Fluorescent microscopy and Fluorescent resonance energy transfer (FRET) were applied for observation of mycoplasma-induced redistribution of intracellular membrane lipid to plasma membrane and intercellular transportation. Western blotting was used to determine the exosomal biomarker CD81 levels in the supernatant of mycoplasma contaminated host cells. MicroRNA chip assay were used to analyze the changes of microRNA expression pattern. **Results:** Mycoplasma contamination increased fluorescence intensity of Rab 11 and DiI at peripheral cytoplasm region more than 2 folds, indicating enhanced redistribution of intracellular lipid to plasma membrane. Mycoplasma induced 4 folds increase in vesicular FRET index in DiO and DiI double-labeled cells, which indicates intercellular lipid transport is enhanced. And in mycoplasma infected cells supernatant the expression level of exosomal marker CD81 increased remarkably. In addition, exosomal miRNA of mycoplasma-contaminated cells differs from that of mycoplasma free cells. **Conclusion:** In vitro study demonstrates that mycoplasma contamination may change exosome generation in quantity and quality.

Key words: Mycoplasma; Exosome; MiRNA; Intercellular communication; Lipid transport**Chinese Library Classification(CLC):** R-33; R375; Q291; R730.231 **Document code:** A**Article ID:** 1673-6273(2018)13-2408-06

前言

支原体是一种广泛存在的微生物,是能在体外无生命培养基中生长的最小原核生物。在实验室中体外培养的肿瘤细胞经常人为或偶然性的污染了支原体,给细胞培养工作带来了灾难性的后果^[1-3]。支原体污染会导致培养的细胞多方面的细胞机能改变,极大的改变肿瘤细胞的增殖和迁移侵袭能力。通过促进内吞和抑制自噬降解途径上调细胞的酪氨酸激酶受体信号强度,从而促进增殖^[4-5];通过特定的蛋白片段或 WVLGE 多肽基序抑制宿主肿瘤细胞的 Rac1 活性,从而抑制细胞迁移侵袭能

力^[6];通过改变宿主细胞内 Rho 家族相关小 GTP 酶活性干扰细胞胞质分裂^[6]。已知肿瘤细胞的内膜系统动力学受到影响会改变外泌体分泌的质和量^[7,8],而外泌体是细胞间通讯和物质交流的主要载体^[9,10]。我们前期的研究着重于支原体对宿主肿瘤细胞的直接影响^[4-6],而本研究通过体外实验,分析支原体污染对培养的肿瘤细胞之间经外泌体途径的跨细胞间通讯的影响,并探讨其通过外泌体途径传输小 RNA 影响肿瘤微环境的机制。

1 材料与方法

1.1 细胞培养与支原体污染检测

* 基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(81502373)

作者简介:胡晓鹏(1982-),博士,主治医师,主要研究方向:普通外科临床及肿瘤基础研究,E-mail: xiaopeng_hu@hust.edu.cn

△ 通讯作者:吴亚群,E-mail: wyqmd@126.com

(收稿日期:2018-03-20 接受日期:2018-04-16)

细胞系为 MCF-7 细胞, 购自 ATCC (Manassas, VA, USA), 培养基为 Eagle's Minimum Essential 培养基加入 0.01 mg/mL 人重组胰岛素和 10% 的胎牛血清(Hyclone)。支原体污染检测使用针对 16-23s 基因间隔区特异引物, 其序列为: 5'-GACTTCCAGACCCAAGGCAT-3'; 5'-GCACCAGGGAGCTGGTAAT-3'。已污染支原体的细胞取其上清, 将已污染的上清 800 rpm 低速离心后去碎片, 换液时加入未污染的传代后贴壁细胞(感染组), 对照组加入同法处理的新鲜无污染上清(对照组); 感染和对照组又分别平行设置加入 PlasmocinTM (In-vivoGen, France) 支原体清除试剂后清除支原体组。支原体感染浓度(multiplicity of infection, MOI) 的确定: 将已知模板经梯度稀释得到标准曲线, 绝对定量含支原体上清中的支原体基因组 DNA 拷贝数, 与细胞计数做比较使最终的 MOI 值约为 10:1^[4]。

1.2 荧光染色与荧光能量共振转移 (Fluorescence resonance energy transfer, FRET)

DiI 和 DiO 膜脂质染料均为终浓度 15 μM, 与 MCF-7 细胞在室温共孵育 15 分钟后用 PBS 清洗 3 次, 之后用于进行后续实验。荧光显微镜为 Olympus 共聚焦显微镜, 具备 100× /1.40 油镜头。FRET 采集三个通道的数据, 分别是 488 nm 激发 500 nm 采集, 488 nm 激发 585 nm 采集, 549 nm 激发 585 nm 采集。FRET 图像后期处理由 ImageJ 软件完成。

1.3 外泌体提取与检测

细胞上清中提取外泌体采用 Total Exosome Isolation Reagent (cat# 4478359, invitrogenTM) 试剂盒, 按照制造商说明步骤进行。检测采用 CD81 抗体 (sc-166028, Santa Cruz, CA, USA) Western blotting 半定量检测。

1.4 引物与 PCR 检测

引物经 Primer Premier5 和 Oligo 6 软件设计, 针对 Mycoplasma Arginini 的检测引物序列为 GCACCAGGGAGCTGGTAAT, CTTCATCGACTTCCAGACCC。扩增产物长 370 bp, 以 2% 琼脂糖凝胶电泳观察。

1.5 miRNA 芯片分析

所用芯片为 Agilent Human miRNA, Release 21.0 (8*60 K), 每组 2 个生物学重复, 共 4 个样品。样品总 RNA 利用 NanoDrop ND-2000 (Thermo Scientific) 定量并经 Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) 检测 RNA 完整性。RNA 质检合格后, 参照芯片标准流程进行样本的标记、芯片的杂交以及脱落。对差异 miRNA 靶基因进行 GO 分析, GO 包括三大板块, Biological Process, Cellular Component 和 Molecular Function, 所以有三类结果, 本研究中只取其 biological process。利用 KEGG 数据库对预测得到的靶基因进行 Pathway 分析, 并且用统计检验的方法计算每个 Pathway 条目中基因富集的显著性。层次聚类由 MEV.exe 软件完成。

1.6 统计分析

荧光显微镜信号强度的统计检验采用 student-t 检验, 条形图中结果表现为 mean± SD; miRNA 芯片层次聚类度量距离采用 Pearson correlation 距离, 聚类连接方式选择 complete clustering 方法, 由软件自动生成 HCL 树形图。GO 分析和 pathway 分析依据返回的 P 值排序展示了 P 值 <0.01 的前 20 项条目。

2 结果

2.1 支原体污染干扰宿主细胞循环内吞体导致膜脂质向胞膜再分布增强

循环内吞体为逆向与细胞膜融合的内吞体^[11], 介导逆向与胞膜融合的小 GTP 酶蛋白为 Rab11^[12], 故 Rab11 与膜脂质的定位可以间接反映逆向运输即外泌的强度。通过荧光显微镜观察, 支原体污染使 DiI 染色细胞间空白区域游离脂质增多, 细胞膜表面 Rab11 和向胞膜再分布脂质信号增强, 间接反映外泌作用有增强的趋势, 见图 1。对照组为经抗生素 Plasmocin 处理清除支原体的细胞^[13]。

2.2 支原体污染促进宿主肿瘤细胞外泌体分泌

用两种不同激发波长的膜脂质染料 DiO 和 DiI 分别染色污染支原体的肿瘤细胞和清洁的肿瘤细胞, 将两者混合培养 24 小时。之后在 488 nm, 549 nm 分别激发, 用荧光能量共振转移(FRET) 的方法观察共染色细胞的数目及细胞内荧光共存状态。与对照组比较, 支原体污染增加膜脂质由污染细胞向未污染细胞的跨细胞流动, 增加培养物上清中外泌体的含量, 重复试验具有统计学意义, 见图 2。CD81 分子为外泌体的标志物^[14], 通过 western blotting 检测 CD81 显示污染支原体使上清中 C 外泌体分泌增加, 经 PCR 检测, 污染的支原体为精氨酸支原体, 见图 2。

2.3 支原体污染导致宿主肿瘤细胞外泌体传输小 RNA 成分的改变

收集污染支原体的细胞上清中外泌体, 提取其中的小 RNA, 行 miRNA 芯片分析。芯片数据经差异筛选及聚类分析显示外泌体小 RNA 表达谱发生了改变, 表达模式改变具有一定的重复性; GO 分析及 KEGG 分析显示支原体导致的小 RNA 表达改变与多种生物过程和信号通路相关, 均与肿瘤密切相关, 见图 3。

3 讨论

支原体广泛存在于实验动物及人体的各种定植部位^[15-17], 单个支原体细胞直径最小可小于 100 nm^[18], 因此可以存在于气溶胶以气态形式扩散污染^[19,20], 是实验室常见污染物, 故而体外培养的肿瘤细胞系中支原体污染情况较严重。支原体可以结合游离 actin 粘附于宿主细胞表面^[21], 之后支原体与宿主细胞膜直接融合或循内吞途径进入宿主细胞, 其内容物可致宿主细胞功能多种改变, 其中直接的影响包括对宿主细胞内吞后膜泡系统的影响, 干扰宿主细胞的内膜内吞系统功能^[22,23]。内吞体进入细胞后的去向有三大方面, 分别是 1) 早期循环内吞体重新与胞膜融合, 2) 晚期内吞体与溶酶体融合降解, 3) 晚期内吞体亦即多泡体(multivesicular bodies, MVBs) 与胞膜融合分泌外泌体^[24,25]。作者之前的研究显示, 支原体致内吞增强同时自噬泡的溶酶体降解途径受抑制, 间接提示晚期内吞体进入溶酶体途径降解受阻^[4,22]。MVBs 其细胞内去向有两大方面, 一方面进入溶酶体途径降解, 另一方面则与质膜融合从而释放外泌体至胞外^[26]。从理论上做合理的假设, 由于外泌体产生于内膜内吞膜泡系统, 直接来源于 MVBs^[27], 如果溶酶体降解途径受阻, 则堆积的 MVBs 有向另一方面排出的潜在趋势, 即增强外泌的趋势。

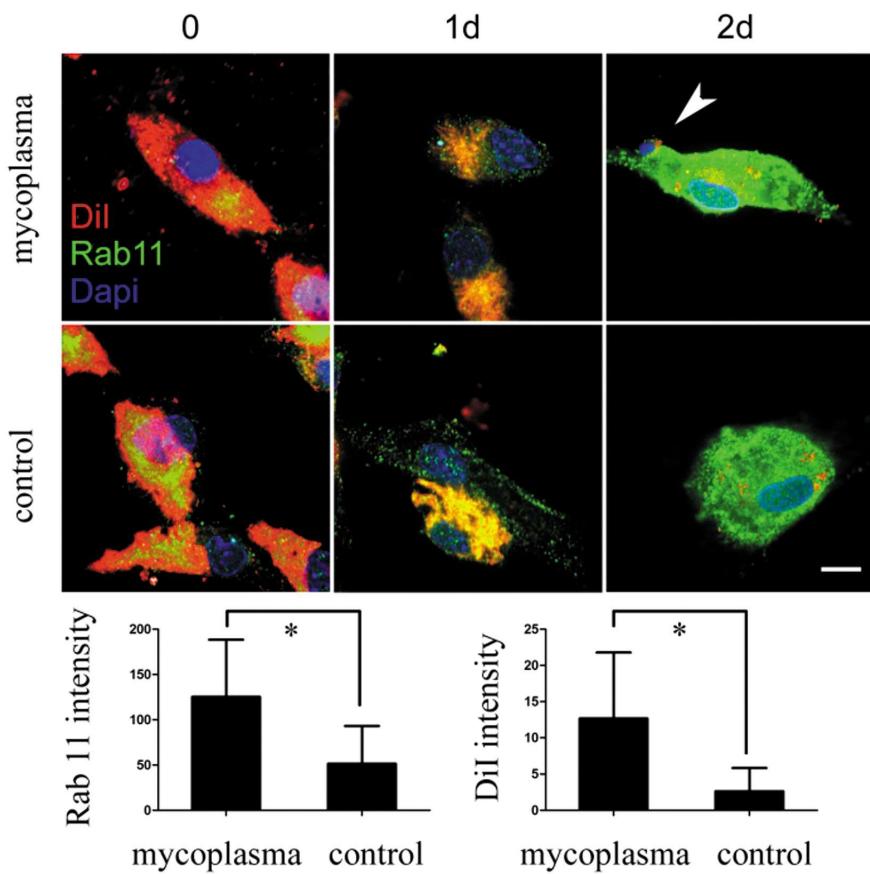


图 1 支原体污染宿主细胞增加膜脂质的外泌。control, 经抗生素清除支原体组; mycoplasma, 未用抗生素的支原体污染组; 红色 Dil 为膜脂质染料, 绿色 Rab 11 为循环内吞体膜泡标志物, 蓝色 Dapi 为核酸染料; 白色箭头指向胞外污染物及膜表面即将外泌的脂质, 细胞分别为脂质染色后立即拍摄, 第一天, 第二天拍摄; 右下短横线代表 5 μm 。下方为第二天(2d)胞膜 Rab 11 和 Dil 荧光强度, 共选取 9 个细胞相对应的膜周区域定量, t 检验, * 表示 $P < 0.05$ 。

Fig.1 Mycoplasma contamination enhances host cells exocytosis of membrane lipids. Control refers to elimination of mycoplasma by antibiotics, while mycoplasma refers to contamination; Dil (red) is membrane lipid dye, Rab11 (green) is recycling endosomal marker, Dapi (blue) is nuclear dye; white arrowhead point to extracellular contamination and the secreting membrane lipid, the photos were recorded immediately after administration of Dil, 24

and 48 hours later respectively; the bar represents 5 μm . Lower panel is the fluorescence intensities of Rab 11 and Dil respectively out of 9 cells corresponding region at day2 (2d), t-test, *, $P < 0.05$.

在以上假设基础上,本研究试图明确支原体感染对宿主肿瘤细胞内膜内吞膜泡系统的干扰是否有可能对外泌体的生成和分泌产生影响。在本研究中我们对支原体污染后外泌体的生成和分泌通过荧光显微镜进行观察,并对外泌体膜标志蛋白 CD81 通过 WB 半定量分析,对支原体污染后外泌体内容物的小 RNA 成分进行了芯片分析,在外泌体的量和质上进行了初步的探索分析。我们的结果提示支原体污染在表达量上增强了跨细胞脂质的流动,促进了外泌体的分泌;在其质变上,改变了外泌体内容物的小 RNA 表达谱成分。

如前所述,支原体促进肿瘤细胞外泌体分泌,其机制可能为支原体被内吞后干扰宿主肿瘤细胞内吞系统,抑制溶酶体途径的降解,从而促进上游生成的晚期内吞体与胞膜融合,释放外泌体至胞外。释放至胞外的外泌体被其他细胞接收后介导跨细胞的脂质流动,从而表现为跨细胞的膜脂质染料流动增强。另一方面外泌体分泌细胞受到支原体影响后,不仅外泌体的量会发生变化,其内容物也可能发生变化,这些内容物的变化进而又可导致接受细胞的生理功能变化,产生一系列连锁反应。

外泌体内容物有三大类,分别为核酸,蛋白和脂质^[28],外泌

体核酸主要成分有非编码 RNA, 依据片段长短可划分为长非编码 lncRNA 和短非编码 miRNA, 本研究中通过 miRNA 芯片展示了人乳腺肿瘤细胞系 MCF-7 受支原体污染后其外泌体的 miRNA 表达谱变化模式影响多个 microRNA 基因, 从一个侧面反映了支原体导致外泌体内容物的变化是大范围的。本研究仅展示了外泌体 miRNA 的变化,但是不排除同时还可能存在蛋白和膜脂质的成分变化。这些变化作用于外泌体的接受细胞,可以预见会产生广泛和巨大的病理生理效应,是一个值得研究的领域。

对于 miRNA 芯片的生物学意义分析及与肿瘤的关系,作者进一步又进行了 GO 分析和 KEGG 通路分析。GO 和 KEGG 分析实质为在没有线索情况下的大数据分析,对于高通量的数据,为在毫无头绪的情况下试图从中找出下游生物学意义寻找突破口^[29]。GO 包括三大版块,生物学过程 (Biological Process), 细胞定位 (Cellular Component) 和分子功能 (Molecular Function), 所以有三类结果,本研究中重点关注了“生物学过程”这一方面。统计每个 GO 条目中所包括的靶基因个数,并统计计算每个条目中富集靶基因的显著性,得到相关性最大的

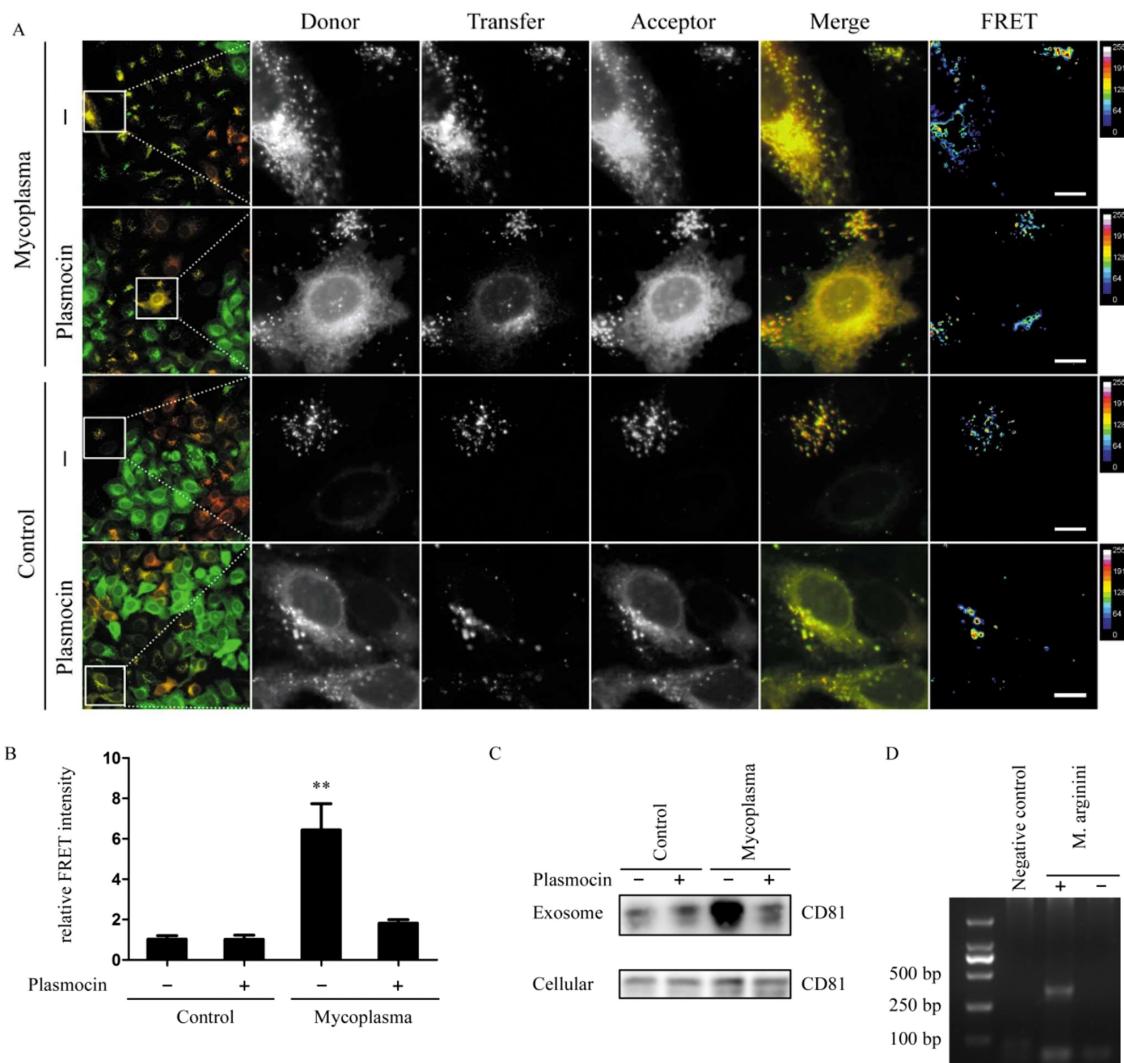


图 2 支原体污染通过增加外泌体分泌促进膜脂质的跨细胞传输。A 中 Plasmocin 为支原体清除抗生素, 绿色荧光(Donor)细胞为污染支原体细胞, 红色荧光(Acceptor)细胞为未污染细胞, 膜脂质传输方向主要为由绿色细胞至红色细胞, 即由污染细胞流向未污染细胞。针对双染色细胞, 分别在 Donor, Transfer 和 Acceptor 通道采集图像形成 FRET 指数和假色图, 图中横线代表 5 μm。与对照组比较, 双染色细胞内膜泡的 FRET 指数明显增高, 说明支原体感染后膜泡上共存的两种荧光脂质增多, 提示膜脂质跨细胞传输增强; B 为 A 图的统计结果, 统计 9 个细胞, ***, p<0.01; C 为相应细胞上清和细胞总蛋白 CD81 表达水平, 支原体污染的细胞其上清外泌体表面标志物 CD81 明显增加, 说明外泌体分泌增多; D 为 PCR 鉴定污染的支原体种类, 依据产物片段长度确定为精氨酸支原体污染。

Fig. 2 Mycoplasma contamination enhances intercellular membrane lipid transport via exosome secretion. In panel 'A', Plasmocin is antibiotics for elimination of mycoplasma, green fluorescent (Donor) cells were contaminated by mycoplasma while red fluorescent (Acceptor) cells were mycoplasma free. The membrane lipid dye were predominantly transmitted from green to red cells, namely from contaminated cells to uncontaminated cells. The region of interest was focused on the double labeled cells, images were recorded at Donor, Transfer and Acceptor channels respectively to generate the FRET index and the pseudocolor image. The white bar represents 5 μm. Compared to the control groups, double labeled cells possess higher FRET indices, which demonstrates that colocalization of the two lipid dyes increased after mycoplasma infection, implying increased membrane lipid transport between non-contacted cells; Panel 'B' is the statistical result of panel 'A' from 9 independent cells, ***, p<0.01; In panel 'C', western blotting was used to determine the exosome marker CD81 expression levels in supernatant and cells. The result reveals that CD81 increased significantly with mycoplasma contamination, indicating increased exosome secretion. In panel 'D', according to the length of the PCR product, the contamination is probably mycoplasma arginini.

生物学过程并依据其 P 值排序。结合其生物学意义, 可以发现均与肿瘤密切相关。另外, 利用 KEGG 数据库对预测得到的靶基因进行通路分析, 并且用统计检验的方法计算每个通路中基因富集的显著性。小的 P 值表示基因在该通路中出现了富集。通路分析对实验结果有提示的作用, 通过对靶基因的通路分析, 我们可以得到富集靶基因的通路。本研究中 GO 分析和

KEGG 通路分析得到的首位相关过程分别是 WNT 信号通路和 mTOR 信号通路, 分别与肿瘤增殖和抑制肿瘤相关, 可见受支原体影响的外泌体 miRNA 其下游靶基因与肿瘤密切相关。

体外实验揭示的这种支原体感染诱导的外泌体内容物变化是否能在体内水平成立尚不得而知。但是体内水平的外泌体研究已有相当的证据表明外泌体变化与肿瘤转移有关^[30-32], 肿

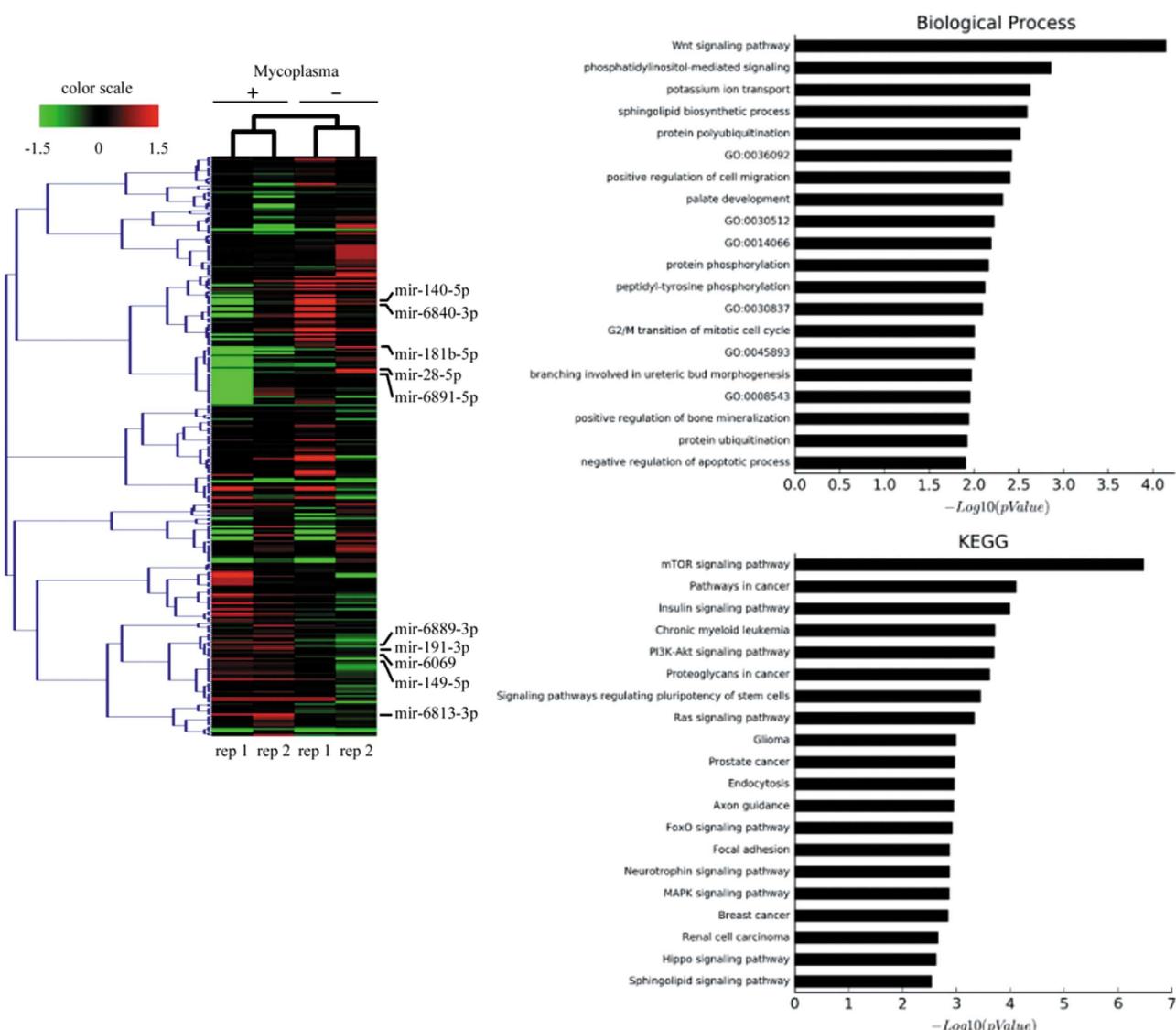


图3 小 RNA 芯片聚类分析和 GO 分析以及 KEGG 通路分析。miRNA 芯片分层聚类分析显示支原体污染与否导致肿瘤细胞小 RNA 表达模式在样品上汇聚为两类，分别对应污染与未污染组(每组两个生物学重复，'rep 1' 和 'rep 2')；GO 分析和 KEGG 通路分析罗列了相关性最强的前 20 种生物过程和信号通路，其中 p 值最小的两者分别是 WNT 和 mTOR 信号通路。

Fig.3 The clustering analysis, gene ontology (GO) analysis and KEGG pathway analysis based on a miRNA chip assay. Hierarchical clustering of miRNA chip data shows that mycoplasma contamination causes the microRNA expression of host tumor cells converged to two clusters corresponding to mycoplasma positive and mycoplasma free samples (each group with two repeats, 'rep 1' and 'rep 2'); The top 20 associated biological processes and signaling pathways are listed based on the GO and KEGG pathway analysis, among them the WNT and mTOR signaling pathway are the ones bearing the lowest P values.

瘤原发灶的外泌体可以促进远处转移灶的形成并且诱导转移器官的肿瘤定植微环境形成^[9, 33, 34]；例如，乳腺癌中外泌体 miR-105 下调了粘连蛋白 ZO-1，使血管通透性增加、肺脑转移增加^[35]。

综上所述，本研究经体外实验显示支原体污染可影响外泌体的质和量，如这种外泌体将小 RNA 传输至接受细胞，则可能改变接受细胞的生理功能和病理状态；本论文提出的这种机制提示肿瘤原发灶部位支原体的感染对远隔部位的转移灶可能通过外泌体途径产生影响，为进一步体内实验和临床观察提供一种思路与线索。

参考文献(References)

- [1] Uphoff CC and Drexler HG. Detection of Mycoplasma contamination

in cell cultures[J]. Curr Protoc Mol Biol, 2014, 106: 28. 4: 21-14

- [2] Callaway E. Contamination hits cell work[J]. Nature, 2014, 511(7511): 518
- [3] Gedye C, Cardwell T, Dimopoulos N, et al. Mycoplasma Infection Alters Cancer Stem Cell Properties in Vitro [J]. Stem Cell Rev, 2016, 12(1): 156-161
- [4] Hu X, Yu J, Zhou X, et al. Synergism between upregulation of Rab7 and inhibition of autophagic degradation caused by mycoplasma facilitates intracellular mycoplasma infection[J]. Mol Med Rep, 2014, 9(3): 793-800
- [5] Hu X, Yu J, Zhou X, et al. A small GTPase-like protein fragment of Mycoplasma promotes tumor cell migration and proliferation in vitro via interaction with Rac1 and Stat3 [J]. Mol Med Rep, 2014, 9(1):

173-179

- [6] Zhang Z, Luo Z, Min W, et al. An anti-cancer WxxxE-containing azurin polypeptide inhibits Rac1-dependent STAT3 and ERK/GSK-3 β signaling in breast cancer cells [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(26): 43091-43103
- [7] Bebelman MP, Smit MJ, Pegtel DM, et al. Biogenesis and function of extracellular vesicles in cancer[J]. *Pharmacol Ther*, 2018[Epub ahead of print]
- [8] Papandreou ME, Tavernarakis N. Autophagy and the endo/exosomal pathways in health and disease [J]. *Biotechnol J*, 2017, 12 (1)[Epub ahead of print]
- [9] Maia J, Caja S, Strano Moraes MC, et al. Exosome-Based Cell-Cell Communication in the Tumor Microenvironment [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2018, 6: 18
- [10] Hou J, Jiang W, Zhu L, et al. Circular RNAs and exosomes in cancer: a mysterious connection [J]. *Clin Transl Oncol*, 2018 [Epub ahead of print]
- [11] Cendrowski J, Maminska A, Miaczynska M. Endocytic regulation of cytokine receptor signaling [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2016, 32: 63-73
- [12] Savina A, Fader CM, Damiani MT, et al. Rab11 promotes docking and fusion of multivesicular bodies in a calcium-dependent manner [J]. *Traffic*, 2005, 6(2): 131-143
- [13] Uphoff CC, Denkmann SA, Drexler HG. Treatment of mycoplasma contamination in cell cultures with Plasmocin [J]. *J Biomed Biotechnol*, 2012, 2012: 267678
- [14] van der Merwe Y, Steketee MB. Extracellular Vesicles: Biomarkers, Therapeutics, and Vehicles in the Visual System[J]. *Curr Ophthalmol Rep*, 2017, 5(4): 276-282
- [15] Horner PJ, Martin DH. Mycoplasma genitalium Infection in Men[J]. *J Infect Dis*, 2017, 216(suppl_2): S396-S405
- [16] le Roux MC, Hoosen AA. Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction for the Diagnosis of Mycoplasma genitalium Infection in South African Men With and Without Symptoms of Urethritis[J]. *Sex Transm Dis*, 2017, 44(1): 17-20
- [17] Tanaka H. Correlation between Radiological and Pathological Findings in Patients with Mycoplasma pneumoniae Pneumonia [J]. *Front Microbiol*, 2016, 7: 695
- [18] Paulaitis ME, Agarwal K, Nana-Sinkam SP. Dynamic Scaling of Exosome Sizes[J]. *Langmuir*, 2018
- [19] Kanci A, Wawegama NK, Marenda MS, et al. Reproduction of respiratory mycoplasmosis in calves by exposure to an aerosolised culture of *Mycoplasma bovis*[J]. *Vet Microbiol*, 2017, 210: 167-173
- [20] Landman WJ, Feberwee A, van Eck JH. The effect of the air sampling method on the recovery of *Mycoplasma gallisepticum* from experimentally produced aerosols[J]. *Vet Q*, 2013, 33(2): 54-59
- [21] Raymond BBA, Madhkoor R, Schleicher I, et al. Extracellular Actin Is a Receptor for *Mycoplasma hyopneumoniae* [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2018, 8: 54
- [22] Johnson C, Kannan TR, Baseman JB. Cellular vacuoles induced by *Mycoplasma pneumoniae* CARDs toxin originate from Rab9-associated compartments[J]. *PLoS One*, 2011, 6(7): e22877
- [23] Rottem S. Interaction of mycoplasmas with host cells[J]. *Physiol Rev*, 2003, 83(2): 417-432
- [24] Pap E, Pallinger E, Falus A. The role of membrane vesicles in tumorigenesis[J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2011, 79(3): 213-223
- [25] Guix FX, Sannerud R, Berditchevski F, et al. Tetraspanin 6: a pivotal protein of the multiple vesicular body determining exosome release and lysosomal degradation of amyloid precursor protein fragments[J]. *Mol Neurodegener*, 2017, 12(1): 25
- [26] Hessvik NP, Llorente A. Current knowledge on exosome biogenesis and release[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2018, 75(2): 193-208
- [27] Boriachek K, Islam MN, Moller A, et al. Biological Functions and Current Advances in Isolation and Detection Strategies for Exosome Nanovesicles[J]. *Small*, 2018, 14(6)
- [28] Wang JP, Tang YY, Fan CM, et al. The role of exosomal non-coding RNAs in cancer metastasis[J]. *Oncotarget*, 2018, 9(15): 12487-12502
- [29] Zhou H, Qiu Z, Gao S, et al. Integrated Analysis of Expression Profile Based on Differentially Expressed Genes in Middle Cerebral Artery Occlusion Animal Models[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(5)
- [30] Bortoluzzi S, Lovisa F, Gaffo E, et al. Small RNAs in Circulating Exosomes of Cancer Patients: A Minireview [J]. *High Throughput*, 2017, 6(4)
- [31] Steinbichler TB, Dudas J, Riechelmann H, et al. The role of exosomes in cancer metastasis [J]. *Semin Cancer Biol*, 2017, 44: 170-181
- [32] Zhang Y, Wang XF. A niche role for cancer exosomes in metastasis [J]. *Nat Cell Biol*, 2015, 17(6): 709-711
- [33] Piao YJ, Kim HS, Hwang EH, et al. Breast cancer cell-derived exosomes and macrophage polarization are associated with lymph node metastasis[J]. *Oncotarget*, 2018, 9(7): 7398-7410
- [34] Weidle UH, Dickopf S, Hintermair C, et al. The Role of micro RNAs in Breast Cancer Metastasis: Preclinical Validation and Potential Therapeutic Targets [J]. *Cancer Genomics Proteomics*, 2018, 15(1): 17-39
- [35] Zhou W, Fong MY, Min Y, et al. Cancer-secreted miR-105 destroys vascular endothelial barriers to promote metastasis [J]. *Cancer Cell*, 2014, 25(4): 501-515