

# 不同离心力对小鼠囊胚胞外微囊泡 miRNA组分的影响

刘清<sup>1</sup> 魏子信<sup>1</sup> 王祎婷<sup>2</sup> 把小云<sup>1</sup> 李豪<sup>1</sup> 方廖琼<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>西南大学生物技术学院, 重庆 400716; <sup>2</sup>超声医疗国家工程研究中心, 重庆 401121)

**摘要** 胞外微囊泡(microvesicle, MV)通讯与微囊泡内容物组成相关。不同制备方法所获得的胞外囊泡具有差异性。该文分析了不同离心力对小鼠囊胚胞外微囊泡MV大小和miRNA组分的影响。分别以12 000 ×g、50 000 ×g、100 000 ×g超速离心的方法分离纯化小鼠d 3.5囊胚细胞胞外MV; 粒度仪检测MV的粒径范围; 荧光定量PCR进行MV的miRNA基因表达检测。结果显示, 12 000 ×g离心力所制备的MV平均粒径是(444.5±258.7) nm, 含有333个miRNA; 50 000 ×g的MV平均粒径是(237.0±178.0) nm, 含有339个miRNA; 100 000 ×g MV平均粒径是(164.8±56.5) nm, 含有335个miRNA。微囊泡的尺度和miRNA组分与离心力相关, 不同离心力所获得的MV所含的miRNA种类及相同miRNA的丰度有差异。因此, 不同离心力影响所制备小鼠囊胚MV大小和miRNA的组分。

**关键词** MV; miRNA; 离心力

## Effects of Different Centrifugal Forces on miRNA Components of Mouse Blastocysts-Derived Microvesicles

Liu Qing<sup>1</sup>, Wei Zixin<sup>1</sup>, Wang Yiting<sup>2</sup>, Ba Xiaoyun<sup>1</sup>, Li Hao<sup>1</sup>, Fang Liaoqiong<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>College of Biotechnology, Southwest University, Chongqing 400716, China;

<sup>2</sup>National Engineering Research Center of Ultrasound Medicine, Chongqing 401121, China)

**Abstract** Microvesicle (MV) communication is associated with content composition. The microvesicles obtained by different preparation methods are different. The effects of different centrifugal forces on the size and miRNA components of MV from mouse blastocysts were analyzed. The MV of the blastocysts of d 3.5 was isolated and purified by ultracentrifugation at the force of 12 000 ×g, 50 000 ×g and 100 000 ×g respectively. The particle size range of MV was detected by particle size analyzer. The miRNA quantity of MV was analyzed by real-time PCR technique. The results showed that the average particle size of MV prepared by centrifugal force of 12 000 ×g was (444.5±258.7) nm, containing 333 miRNAs; 50 000 ×g of MV had an average particle size of (237.0±178.0) nm and contained 339 miRNAs; the average particle size of 100 000 ×g MV was (164.8±56.5) nm, 335 miRNAs. The size of the vesicles and the miRNA components are related to the centrifugal force. The miRNAs contained in the MVs obtained by different centrifugal forces and the abundance of the same miRNAs are different. Thus, different centrifugal forces affect the size of the prepared blastocysts MV and the components of the miRNA.

**Keywords** MV; miRNA; centrifugal force

收稿日期: 2017-10-31

接受日期: 2018-05-28

国家自然科学基金面上项目(批准号: 31571453)和国家重大科学仪器设备开发专项资金(批准号: 2013YQ030629)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 023-68485022; E-mail: lqfang06@163.com

Received: October 31, 2017

Accepted: May 28, 2018

These work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31571453) and the National Major Scientific Equipment and Equipment Development Special Funds (Grant No.2013YQ030629)

\*Corresponding author. Tel: +86-23-68485022; E-mail: lqfang06@163.com

网络出版时间: 2018-07-30 10:54:07

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180730.1051.006.html>

胞外微囊泡(microvesicle, MV)是细胞向外界环境分泌的由脂质双分子界膜和内含物组成的微小囊泡。研究发现,细胞分泌胞外微囊泡具有普遍性,无论是处于正常生理条件下或是病理条件下<sup>[1]</sup>。胞外微囊泡能将信息在细胞间进行传递,从而影响受体细胞的功能和行为<sup>[2]</sup>。Ratajczak等<sup>[3]</sup>证实,小鼠胚胎干细胞的MVs能对人造血干细胞进行核重排。微囊泡中含有蛋白质、脂质、mRNA及miRNA<sup>[4]</sup>。miRNA被证实是微囊泡主要内含物,也是微囊泡通讯重要的信号媒介<sup>[5]</sup>。人们发现,来源同株细胞通过不同制备方式产生不同的MV大小和miRNA组分,从而影响微囊泡所传递的信息内容,最终影响靶细胞产生不同效应。Federica等<sup>[6]</sup>发现,通过超速离心法(EQ)和ExoQuick(UC)方法从神经胶质瘤相关干细胞(GASC)中收集到的外泌体,由于它们的粒径分布不同,导致对A172胶质细胞瘤的摄取、增殖和迁移的影响也不同,粒径分布较小的,能加快靶细胞的摄取和细胞的迁移。

目前,针对囊泡已有成熟的分离提取方法:超速离心、超速离心结合超滤、纳米膜超滤浓缩、ExoQuick试剂盒等<sup>[7]</sup>,这些方法的核心都是超高速离心力对微囊泡的沉降,通过超速离心来分离囊泡被认为是收集不同类型的囊泡的“黄金标准”<sup>[8]</sup>,离心力的不同会导致微囊泡内容物组分差异,甚至微囊泡类型差异。Alvarez等<sup>[9]</sup>研究表明,超速离心方法不仅操作简单而且能够较好地保存微囊泡的RNA。本研究以植入前小鼠囊胚为材料,比较12 000 ×g、50 000 ×g、100 000 ×g三种离心力对微囊泡大小、miRNA组分的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 超数排卵与囊胚获取

BABL/C小鼠在25 °C环境下饲养,动物许可证为SYXK(渝)2017-0023。选取6~8周龄的健康雌鼠,每只小鼠腹腔注射10 U PMSG(孕马血清促性腺激素),48 h后腹腔注射10 U hCG(人绒毛膜促性腺激素),此后雌鼠和雄鼠按1:1合笼过夜。次晨发现阴栓者为第1天(d 1)孕鼠。取d 3.5小鼠,颈椎脱臼法人道处死,75%酒精常规消毒,剪取双侧子宫,用1 mL注射器吸取含有1% BSA的PBS冲洗子宫腔。在体视显微镜下收集发育至中晚期的囊胚。加入红细胞裂解液作用15 min后,用PBS清洗3遍,微量盐酸(pH2.5)作

用去透明带,适量胰酶37 °C 30 min消化分散胚胎细胞。加入10%经处理的FBS(FBS在4 °C条件下经100 000 ×g过夜离心,离心后的上清液0.22 μm过滤后4 °C保存)。

### 1.2 MV制备

收集消化后的小鼠胚胎细胞悬浮液,2 000 ×g、4 °C离心15 min去除沉淀,离心后的上清液12 000 ×g、4 °C离心30 min后收集沉淀。将差速离心后的上清在4 °C条件下50 000 ×g超速离心70 min,收集沉淀,离心后的上清液在4 °C条件下100 000 ×g超速离心70 min,收集沉淀。

### 1.3 扫描电镜

收集囊泡的沉淀,用2.5%戊二醛固定。取出10 μL加入到丝网中,风干后使用导电带将丝网安装在短棒上,在Zeiss Evo LS15扫描电子显微镜(德国卡尔蔡司公司)上在低真空下观察。

### 1.4 粒度仪

将微囊泡溶于1 mL PBS中,涡旋1 min,保持微囊泡均匀分布,把1 mL液加入到比色皿中,随后用Zeta SIZER 3000HS粒度仪(英国马尔文公司)直接测量,观察微囊泡的尺度分布。

### 1.5 聚合酶链式反应(PCR)

获得的沉淀溶液用TRizol法抽提总RNA,用DNA酶消化,排除DNA的污染。MV的miRNA通过383 miRNA qPCR列阵进行检测。荧光定量PCR反应通过ViiATM7 RT-PCR系统进行检测(Thermo Fisher Scientific公司)。整个RNA的收集使用RNA提取试剂盒(Quanto Bio公司)。TaqMan探针实时荧光PCR用的是7900 HT PCR系统(Applied Biosystems公司)。EC4和EC5作为miRNA RT-qPCR的外部控制。基因表达的数量用循环数进行估计(CT值,CT<35)。

### 1.6 统计学分析

实验数据采用GraphPad Prism5.0软件进行分析,多组间均数比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 $t$ 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 小鼠囊胚MV

用马尔文激光粒度仪检测发现,3种微囊泡的粒径大小是不同的(表1),12 000 ×g离心提取的微囊泡粒径主要分布在100~300 nm,平均粒径为

( $444.5 \pm 258.7$ ) nm, 峰值为233.7 nm(图1A); 50 000  $\times$ g离心提取的微囊泡粒径主要分布在50~900 nm, 平均粒径为( $237.0 \pm 178.0$ ) nm, 峰值为206 nm(图1B); 100 000  $\times$ g离心提取的微囊泡粒径主要分布在100~800 nm, 平均粒径为( $164.8 \pm 56.5$ ) nm, 峰值为233.7 nm(图1C)。三组之间有差异性但无统计学意义(图1D)。扫描电镜观察结果显示, 微囊泡呈现其典型的形态特征, 可见大小不等, 呈圆形(图1E)。

## 2.2 囊胚微囊泡miRNA

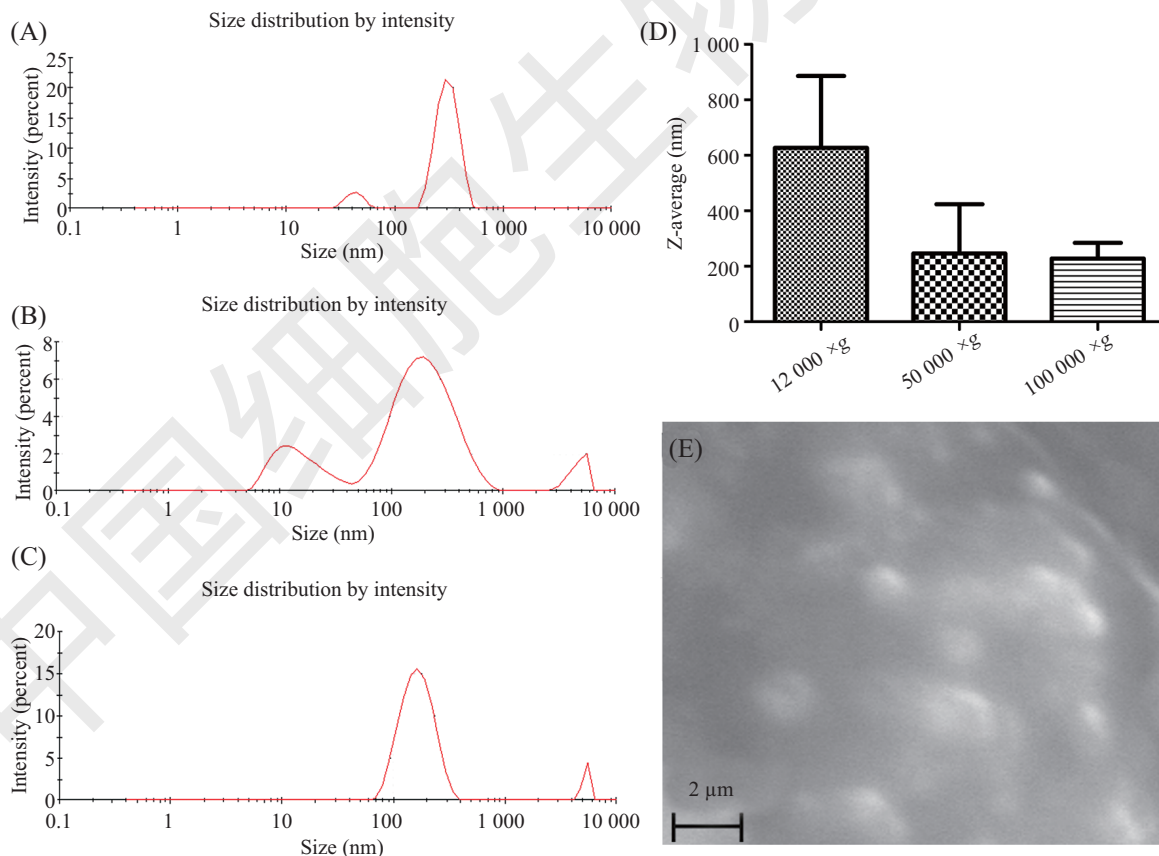
荧光定量PCR方法测得的囊胚微囊泡miRNA

(基因芯片的结果 $CT < 35$ )。用384 miRNA qPCR排列测得12 000  $\times$ g MV中含有333个miRNA, 50 000  $\times$ g含有339个miRNA, 100 000  $\times$ g含有335个miRNA。表2是测得的12 000  $\times$ g、50 000  $\times$ g、100 000  $\times$ g MV中前30位miRNA分析。图2显示, 12 000  $\times$ g、50 000  $\times$ g、100 000  $\times$ g MV中前30位含有相同miRNA的差异性分析( $CT < 35$ , CT值按从小到大排)。CT值表示每个PCR反应管内荧光信号到达设定的域值时所经历的循环数。各模板的CT值与该模板的起始拷贝数的对数存在线性关系, 起始拷贝数越多, CT值越小。

表1 微囊泡粒径分布数据( $n=3$ )

Table 1 Microvesicle size distribution data ( $n=3$ )

离心力( $\times$ g)	平均值(nm)	标准差(nm)	D10(nm)	D50(nm)	D90(nm)
Centrifugal force ( $\times$ g)	Mean (nm)	SD (nm)	D10 (nm)	D50 (nm)	D90 (nm)
12 000	444.5	258.7	174	228	286
50 000	237.0	178.0	12.7	162	297
100 000	164.8	56.5	104	165	282

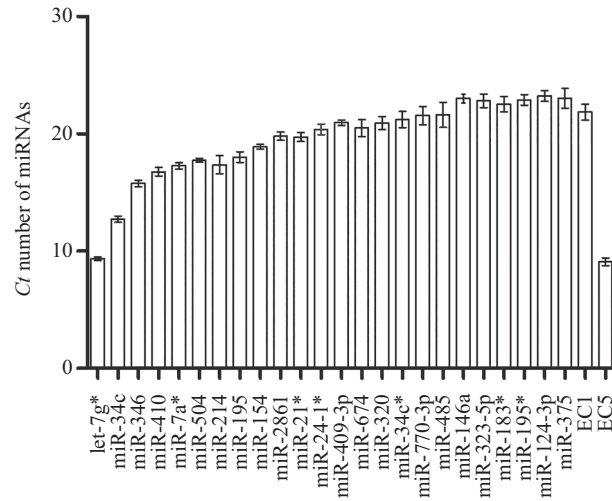


A: 12 000  $\times$ g离心下获得的MV; B: 50 000  $\times$ g离心下获得的MV; C: 100 000  $\times$ g离心下获得的MV; D: 12 000  $\times$ g、50 000  $\times$ g、100 000  $\times$ g MV的粒径大小比较( $n=4$ ); E: Zeiss EVO LS-15扫描电镜图。

A: 12 000  $\times$ g MV obtained under centrifugation; B: 50 000  $\times$ g MV obtained under centrifugation; C: 100 000  $\times$ g MV obtained under centrifugation; MD: 12 000  $\times$ g, 50 000  $\times$ g, 100 000  $\times$ g MV size comparison; E: Zeiss EVO LS-15 scanning electron micrograph.

图1 小鼠囊胚MV

Fig.1 Mouse blastocysts MV



CT<35, CT值按从小到大排,  $n=3$ 。

CT<35, CT values from small to large row,  $n=3$ 。

图2 12 000  $\times g$ 、50 000  $\times g$ 、100 000  $\times g$  MV中前30位含有相同miRNA的差异性分析

Fig.2 12 000  $\times g$ , 50 000  $\times g$ , 100 000  $\times g$  MV in the first 30 contains the same miRNA difference analysis

### 3 讨论

MV是从细胞膜上脱落形成的,介导细胞间的信息传递。MV的直径通常在100~1 000 nm,成分中含有与母细胞膜相似的脂类和蛋白质<sup>[10]</sup>。本文采用超速离心的方法获得MV。差速离心是通过多次连续离心,去除掉沉淀,并进一步根据更大的离心来分离较小和低密度的部分。除了囊泡的大小和密度有效的分离囊泡还取决于形态和溶液黏度,以及温度、离心时间和离心转子的类型。通常2 000  $\times g$ 被用来去除沉淀和细胞碎片,接下来根据以往研究者的经验及反复的实验,我们采用了12 000  $\times g$ 、50 000  $\times g$ 、100 000  $\times g$ 的3种离心力来获得囊泡。从微囊泡形态观察中,我们对马尔文粒度仪结果进行分析发现,虽然3组之间无统计学差异,但是3种微囊泡的粒度大小是具有差异性的。12 000  $\times g$ 离心提取的微囊泡的平均粒径为(444.5 $\pm$ 258.7) nm; 50 000  $\times g$ 离心提取的微囊泡的平均粒径为(237.0  $\pm$ 178.0) nm; 100 000  $\times g$ 离心提取的微囊泡的平均粒径为(164.8 $\pm$ 56.5) nm(图1)。从粒度分布来看,12 000  $\times g$ 离心提取的微囊泡主要为大囊泡组分,从50 000  $\times g$ 离心开始获得的微囊泡含有外泌体(小于100 nm)组分,尤其100 000  $\times g$ 离心获得的微囊泡含有此尺度范围的丰度更高。

微囊泡中含有蛋白质、RNA等。微囊泡内的RNA主要含有miRNA、mRNA。miRNA是长度为19~24个核苷酸的内源性非编码RNA<sup>[11]</sup>。我们通过

荧光定量PCR的方法对小鼠囊胚miRNA进行了检测,结果显示,3种微囊泡含有的miRNA的种类是不同的(CT<35),12 000  $\times g$ 离心提取的微囊泡中含有333个miRNA,50 000  $\times g$ 离心提取的微囊泡中含有339个miRNA,100 000  $\times g$ 离心提取的微囊泡中含有335个miRNA。除了共同的miRNA外,12 000  $\times g$ 微囊泡还含有miR-204、miR-421。50 000  $\times g$ 微囊泡中含有miR-302c、miR-31\*、miR-20a\*、miR-211。100 000  $\times g$ 微囊泡含有miRNA有miR-140、miR-30e\*。miRNA通过与靶基因mRNA结合方式,使靶基因mRNA降解或抑制翻译,参与各种生理和病理过程。Kai等<sup>[12]</sup>研究表明,miR-302c靶向MTDH抑制肝细胞癌细胞的生长。Yang等<sup>[13]</sup>的研究表明,miR-421靶向CLDN11促进人胃癌MKN28/MKN74细胞的增殖、侵袭和转移。

对测得的12 000  $\times g$ 、50 000  $\times g$ 、100 000  $\times g$ 三组中前30位miRNA进行分析(CT<35, CT值按从小到大排),三者含有24种相同的miRNA,且它们三者之间是具有差异性的(图2)。三者中还含有12种不同的miRNA,在前30种miRNA中12 000  $\times g$ 组和100 000  $\times g$ 组中含有mmu-miR-21、mmu-miR-483-3p; 50 000  $\times g$ 组和100 000  $\times g$ 组中含有mmu-miR-877; 12 000  $\times g$ 组和50 000  $\times g$ 组中含有mmu-miR-369-3p、mmu-miR-26b\*。12 000  $\times g$ 组中特有的是mmu-miR-714、mmu-miR-370; 50 000  $\times g$ 组中特有的是mmu-

表2 荧光定量PCR方法测得的12 000 ×g、50 000 ×g、100 000 ×g MV中前30位miRNA分析

Table 2 Real-time PCR measured 12 000 ×g, 50 000 ×g, 100 000 ×g MV in the first 30 miRNA analysis

miRNA	序列(5'→3')	12 000 ×g	50 000 ×g	100 000 ×g
miRNA	Sequence (5'→3')	12 000 ×g	50 000 ×g	100 000 ×g
mmu-Let-7g*	ACU GUA CAG GCC ACU GCC UUG C	+	+	+
mmu-miR-34c	AGG CAG UGU AGU UAG CUG AUU GC	+	+	+
mmu-miR-346	UGU CUG CCC GAG UGC CUG CCU CU	+	+	+
mmu-miR-410	AAU AUA ACA CAG AUG GCC UGU	+	+	+
mmu-miR-7a*	CAA CAA AUC ACA GUC UGC CAU A	+	+	+
mmu-miR-504	AGA CCC UGG UCU GCA CUC UAU C	+	+	+
mmu-miR-214	ACA GCA GGC ACA GAC AGG CAG U	+	+	+
mmu-miR-195	UAG CAG CAC AGA AAU AUU GGC	+	+	+
mmu-miR-154	UAG GUU AUC CGU GUU GCC UUC G	+	+	+
mmu-miR-2861	GGG GCC UGG CGG CGG GCG G	+	+	+
mmu-miR-21*	CAA CAG CAG UCG AUG GGC UGU C	+	+	+
mmu-miR-24-1*	GUG CCU ACU GAG CUG AUA UCA GU	+	+	+
mmu-miR-409-3p	GAA UGU UGC UCG GUG AAC CCC U	+	+	+
mmu-miR-674	GCA CUG AGA UGG GAG UGG UGU A	+	+	+
mmu-miR-320	AAA AGC UGG GUU GAG AGG GCG A	+	+	+
mmu-miR-34c*	AAU CAC UAA CCA CAC AGC CAG G	+	+	+
mmu-miR-770-3p	CGU GGG CCU GAC GUG GAG CUG G	+	+	+
mmu-miR-485	AGA GGC UGG CCG UGA UGA AUU C	+	+	+
mmu-miR-370	GCC UGC UGG GGU GGA ACC UGG U	+	-	-
mmu-miR-21	UAG CUU AUC AGA CUG AUG UUG A	+	-	+
mmu-miR-146a	UGA GAA CUG AAU UCC AUG GGU U	+	+	+
mmu-miR-323-5p	AGG UGG UCC GUG GCG CGU UCG C	+	+	+
mmu-miR-183*	GUG AAU UAC CGA AGG GCC AUA A	+	+	+
mmu-miR-195*	CCA AUA UUG GCU GUG CUG CUC C	+	+	+
mmu-miR-369-3p	AAU AAU ACA UGG UUG AUC UUU	+	+	-
mmu-miR-483-3p	UCA CUC CUC CCC UCC CGU CUU	+	-	+
mmu-miR-714	CGA CGA GGG CCG GUC GGU CGC	+	-	-
mmu-miR-124-3p	UAA GGC ACG CGG UGA AUG CC	+	+	+
mmu-miR-375	UUU GUU CGU UCG GCU CGC GUG A	+	+	+
mmu-miR-26b*	CCU GUU CUC CAU UAC UUG GCU C	+	+	-
mmu-miR-742	GAA AGC CAC CAU GCU GGG UAA A	-	+	-
mmu-miR-34b-3p	AAU CAC UAA CUC CAC UGC CAU C	-	+	-
mmu-miR-877	GUA GAG GAG AUG GCG CAG GG	-	+	+
mmu-miR-151-3p	CUA GAC UGA GGC UCC UUG AGG	-	-	+
mmu-miR-150*	CUG GUA CAG GCC UGG GGG AUA G	-	-	+
mmu-miR-718	CUU CCG CCC GGC CGG GUG UCG	-	-	+

CT<35, CT值按从小到大排,“+”代表12 000 ×g、50 000 ×g、100 000 ×g MV含有此miRNA,“-”代表12 000 ×g、50 000 ×g、100 000 ×g MV中不含有此miRNA。

CT<35, CT values from small to large, “+” represents 12 000 ×g, 50 000 ×g, 100 000 ×g MV contains this miRNA, “-” represents 12 000 ×g, 50 000 ×g, 100 000 ×g MV dose not contain this miRNA.

miR-742、mmu-miR-34b-3p; 100 000 ×g组中特有的  
是mmu-miR-151-3p、mmu-miR-150\*、mmu-miR-  
718(表2)。结合尺度分布的表征,推测100 000 ×g组  
中miRNA可能表现出囊胚细胞外泌体的miRNA特  
征,需要分离出外泌体做进一步的研究来验证。

MVs被表述为细胞与细胞联系的一种介质,  
通过传递蛋白质、特定的mRNAs和miRNAs进  
行信息的传递<sup>[14]</sup>。MV通过运输生物活性分子  
来调节靶细胞的功能<sup>[15]</sup>。研究发现,微囊泡可以  
携带miRNAs到达受体细胞,影响受体细胞的功

能, 在微囊泡功能的实现和发挥中起着重要作用。Fonsato等<sup>[16]</sup>发现, 成人肝干细胞的微泡通过转运 miR-451、miR-24和miR-31等来抑制肝癌细胞增殖和促进其凋亡。Zhang等<sup>[17]</sup>发现, MV介导miR-29a/c对胃癌的血管生成和肿瘤生长具有抑制作用。miRNA在血清、血浆、唾液、尿液和其他体液中存在<sup>[18]</sup>。miRNA能调节和调控大部分生物学过程, 包括细胞分裂、分化、迁移、细胞凋亡、形态建成和器官形成等<sup>[19]</sup>。通过对结果的前30个miRNA进行分析发现, 12 000 ×g、50 000 ×g、100 000 ×g的MV所含有的miRNA组分是不同的, 可能导致微囊泡所传递的信息内容是不同的。小鼠囊胚MV中含有抗肿瘤相关、与免疫调节相关和与增值相关的miRNA, 但是小鼠囊胚MV是否能够通过传递miRNA发挥它的作用需要我们进一步的研究。

综上所述, 同一来源的细胞通过不同的离心力得到不同的微囊泡, 并且携带的信息也有所不能, 功能也可能具有差异性, 同时也验证了小鼠囊胚MV中含有许多功能性的miRNA。该结果不仅有助于我们对小鼠囊胚MV有了认识, 也为我们对小鼠囊胚MV功能性的研究奠定了理论基础和依据。

### 参考文献 (References)

- Cocucci E, Racchetti G, Meldolesi J. Shedding microvesicles: artefacts nomore. *Trends Cell Biol* 2009; 19(2): 43-51.
- Tkach M, Thery C. Communication by extracellular vesicles: Where we are and where we need to go. *Cell* 2016; 164(6): 1226-32
- Ratajczak J, Miekus K, Kucia M, Zhang J, Reca R, Dvorak P, *et al.* Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: Evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia* 2006; 20(5): 847-56.
- Van der Pol E, Boing AN, Harrison P, Sturk A, Nieuwland R. Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. *Pharmacol Rev* 2012; 64(3): 676-705.
- Camussi G, Deregibus MC, Bruno S, Cantaluppi V, Biancone L. Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication. *Kidney Int* 2010; 78(9): 838-48.
- Caponnetto F, Manini I. Size-dependent cellular uptake of exosomes. *Nanomedicine* 2017; 13(3): 1011-20.
- Royo F, Zuñigagarcia P, Sanchezmosquera P, Egia A, Perez A, Loizaga A, *et al.* Different EV enrichment methods suitable for clinical settings yield different subpopulations of urinary extracellular vesicles from human samples. *J Extracell Vesicles* 2016; 5: 29497.
- Gould SJ, Raposo G. As we wait: coping with an imperfect nomenclature for extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles* 2013; 15: 2.
- Alvarez ML, Khosroheidari M, Kanchi Ravi R, Distefano JK. Comparison of protein, microRNA, and mRNA yields using different methods of urinary exosome isolation for the discovery of kidney disease biomarkers. *Kidney Int* 2012; 82(9): 1024-32.
- Maiso P, Huynh D, Moschetta M, Sacco A, Aljawai Y, Mishima Y, *et al.* Metabolic signature identifies novel targets for drug resistance in multiple myeloma. *Cancer Res* 2015; 75(10): 2071-82.
- Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009; 136(2): 215-33.
- Zhu K, Pan Q, Jia LQ, Dai Z, Ke AW, Zeng Hy, *et al.* MiR-302c inhibits tumor growth of hepatocellular carcinoma by suppressing the endothelial-mesenchymal transition of endothelial cells. *Sci Rep* 2014; 4: 5524.
- Yang P, Zhang M, Liu X, Pu H. MicroRNA-421 promotes the proliferation and metastasis of gastric cancer cells by targeting claudin-11. *Exp Ther Med* 2017; 14(3): 2625-32.
- Ratajczak J, Wysoczynski M, Hayek F, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak MZ. Membrane-derived microvesicles: Important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication. *Leukemia* 2006; 20(9): 1487-95.
- Szatanek R, Baran J, Siedlar M, Bajkrzyworzeka M. Isolation of extracellular vesicles: Determining the correct approach. *Int J Mol Med* 2015; 36(1): 11-7.
- Fonsato V, Collino F, Herrera MB, Cavallari C, Deregibus MC, Cisterna B, *et al.* Human liver stem cell-derived microvesicles inhibit hepatoma growth in SCID mice by delivering antitumor microRNAs. *Stem Cells* 2012; 30: 1985-98.
- Zhang H, Bai M, Deng T, Liu R, Wang X, Qu Y, *et al.* Cell-derived microvesicles mediate the delivery of miR-29a/c to suppress angiogenesis in gastric carcinoma. *Cancer Lett* 2016; 375(2): 331-9.
- Hanke M, Hoefig K, Merz H, Feller AC, Kausch I, Jocham D, *et al.* A robust methodology to study urine microRNA as tumor marker: microRNA-126 and microRNA-182 are related to urinary bladder cancer. *Urol Oncol* 2010; 28(6): 655-61.
- Kocamis H, Hossain M, Cinar MU. Expression of microRNA and microRNA processing machinery genes during early quail (*Coturnix japonica*) embryo development. *Poult Sci* 2013; 92(3): 787-97.