

细胞外囊泡RNA的多样性特征

把小云¹ 王祎婷² 段乳侠¹ 方廖琼^{1,2*}

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

摘要 细胞外囊泡是一类可携带蛋白质、核酸、脂质等内含物的新型细胞间通讯介质。可向邻近及远处细胞传递生物信息分子, 调控受体细胞正常生理及病理发展过程。在肿瘤发生与发展、疾病的诊断治疗、细胞分子生物学研究等方面发挥着越来越重要的作用。作为基因表达的重要调节剂, RNA是细胞外囊泡中一类丰富的内含物, 且细胞外囊泡RNA种类繁多, 分布及分类水平不等, 对其的研究极具挑战性。该文重点讨论细胞外囊泡RNA的多样性特征, 由此回顾细胞外囊泡RNA的研究进展。

关键词 细胞外囊泡RNA; RNA种类; 不等性; 分选

Diversity Characteristics of Extracellular Vesicle RNA

BA Xiaoyun¹, WANG Yiting², DUAN Ruxia¹, FANG Liaoqiong^{1,2*}

(¹College of Biotechnology, Southwest University, Chongqing 400716, China;

²National Engineering Research Center of Ultrasound Medicine, Chongqing 401121, China)

Abstract Extracellular vesicles are a new type of intercellular communicative medium that can carry proteins, nucleic acids, lipids and other inclusions. They can transmit biological informational molecules to adjacent and distant cells and regulate the normal physiological and pathological development of recipient cells. It plays an increasingly important role in tumorigenesis and development, diagnosis and treatment of diseases, and cellular molecular biology research. As an important regulator of gene expression, RNA is a kind of abundant inclusions in extracellular vesicles, and there are many kinds of extracellular vesicle RNAs, the levels of distribution and classification haven't been established, which means that there will be a big challenge in this research. This article focuses on the diversity of extracellular vesicle RNA, and reviews the advances in extracellular vesicle RNA.

Keywords extracellular vesicle RNA; RNA species; inequality; sorting

1981年Trams等^[1]分离出正常细胞和肿瘤细胞培养上清液中的囊泡结构, 研究人员开始对这种囊泡结构进行了深入研究, 并发现几乎所有的细胞都可以释放由磷脂双分子层包被的类囊膜结构的小泡, 国际胞外囊泡学会(International Society of Extracellular Vesicles, ISEV)将这一类囊膜结构的小泡称为“细胞外囊泡”(extracellular vesicle, EV), 根据其大

小及来源分为凋亡小体、癌小体(oncosome)、微囊泡(microviscle, MV)、外泌体(exosome), 但对其还没有明确的分类界限^[2-6]。传统观点认为, EVs仅扮演细胞释放代谢废物的角色, 极少参与到生命活动中^[7], 但在随后的研究这一观点备受争议, EVs在生命进程中扮演着非常重要的角色, 不仅是参与细胞间通讯的一种重要介质, 而且可以参与正常的生理及病理

收稿日期: 2019-05-13 接受日期: 2019-07-19

国家自然科学基金(批准号: 31571453)资助的课题

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

Received: May 13, 2019 Accepted: July 19, 2019

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31571453)

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

网络出版时间: 2019-12-11 10:20:53 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20191211.1020.010.html>

发展过程^[8]。磷脂双分子层包被的EVs内稳定存在丰富的蛋白质、核酸、脂质等重要信息分子,承载这些信息分子的EVs在生物环境中穿梭,传递至其他受体细胞,被受体细胞摄取后,参与受体细胞内的多种细胞事件,包括免疫信号、应激反应、血管生成、细胞分化等^[9]。2019年在Vesiclepedia(<http://www.microvesicles.org>)最新的网站中记载的1 254种EVs中约有349 988个蛋白质、38 146个RNA、639个脂质^[10],EVs就如一辆车,携带着丰富的货物到受体细胞,影响受体细胞的生物学功能。本文主要是以细胞外囊泡RNA(extracellular vesicle RNA, EV-RNA)^[11]为重点,从EV-RNA种类、不等性及其分选方面进行探究与学习。

1 EV-RNA种类多样性

1971年Kolodny等^[11]首次发现胞外RNA的存在,随后发现存在于胞外的RNA为避免被核糖核苷酸酶(RNA酶)降解。一方面会与一些RNA结合蛋白形成非囊泡核糖核蛋白复合物(ribonucleoproteins, RNP)游离于细胞外,另一方面会被包装到各类囊泡中并被运输至胞外, EV-RNA主要包括编码RNA和非编码RNA^[12-13]。

1.1 编码RNA

早在2007年Valadi等^[14]在EVs领域有一个突破性的发现:肥大细胞衍生的exosomes中携带丰富的核酸物质,研究人员将鼠源exosomes与人源细胞进行共培养之后,发现人源细胞中会选择性出现鼠源蛋白质,并且这些蛋白质在小鼠体内是以mRNA的形式存在。这一发现为EV-RNA的研究奠定了基础。我们都知道人类基因组大部分都会转录成RNA,但仅仅有2%~3%的RNA具有编码蛋白质的功能,作为重要的编码RNA,虽然mRNA在EVs中的丰度不确定,但是已有研究表明,功能性mRNA可以通过EVs转移到受体细胞,在受体细胞内被翻译并改变受体细胞表型^[14]。Hong等^[15]研究表明,来自结肠癌细胞的EVs富含与细胞周期相关的mRNA,可促进内皮细胞增殖^[14]。Lai等^[16]通过多重荧光标记EVs膜,使用RNA结合病毒MS2CP蛋白和GFP mRNA的独立mRNA跟踪系统对EVs中mRNA进行实时监控,发现受体Gli36胶质瘤细胞摄取EVs后一个小时内,mRNA经历了翻译的过程。此外,已有研究证明,mRNA在EVs中多是片段化存在,且EVs中mRNA是

以特殊片段化形式存在,即富含3'UTR,此片段富含调节序列,对受体细胞中基因表达和蛋白质翻译的调节具有重要意义^[17-18]。Batagov等^[19]的研究表明,细胞分泌的exosomes主要转运mRNA的3'UTR片段,这些片段可以充当许多RNA结合蛋白的结合位点,调节mRNA的稳定性和翻译效率,并且含有miRNA靶位点,引导RNA诱导的沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC)结合,引发RNA降解或翻译终止。

1.2 非编码RNA

EVs中富含进化上保守的非编码RNA(non-coding RNA, ncRNA),ncRNA按照核苷酸的数量分类有>200核苷酸为长的非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)和一些≤200核苷酸的小RNA类群,有microRNA、rRNA、tRNA、Y-RNA、vRNA、circRNA、snoRNA、snRNA、piRNA、siRNA以及一些迄今为止还未知功能、未准确命名的RNA^[20-21]。传统观点认为,这些ncRNA或缺乏开放阅读框,或缺乏密码子的保守性,且仅存在于细胞内,对生命活动影响并不大,但近期的研究表明,ncRNA可以调节多种细胞事件,包括干扰RNA转录、调节mRNA翻译、调控转座子沉默,影响细胞存活、侵袭迁移、免疫炎症、血管生成等^[23]。在EVs中鉴定出极为丰富的ncRNA类群,这些ncRNA对疾病的发生、发展有重要的影响。

lncRNA是一类新兴的调节RNA,没有或仅为有限的蛋白质编码潜能,但可以与蛋白质、DNA、RNA相互作用,并且在表观遗传、转录和转录后水平的基因调控中起关键作用^[23-24]。在肿瘤细胞中lncRNA可参与多种细胞事件,可以作为细胞凋亡、肿瘤侵袭转移、血管生成等方面的调节剂。例如,HeLa细胞和MCF-7细胞分泌的exosomes中富集的lncRNA包括MALAT1、HOTAIR、lincRNA-p21、GAS5、TUG1、CCND1-ncRNA可以反映亲代细胞中DNA损伤反应^[25];膀胱癌在缺氧条件下产生富集lncRNA-UCA1的exosomes,lncRNA-UCA1可以通过调控EMT(上皮间质转化)过程,促进肿瘤细胞进一步侵袭转移^[26];胶质瘤细胞中LncRNA HOTAIR可以促进VEGFA的表达水平,并通过胶质瘤细胞衍生的EVs增强内皮细胞的血管生成^[27]。

miRNA是一组小的高度保守的单链非编码RNA分子,可参与基因表达转录后调节,成熟的

miRNA通过互补碱基配对将靶mRNA募集到RISC中,从而导致翻译抑制和/或转录物降解。miRNA在EVs中的丰度变化还未确定,或许其丰度并不高,但它可以调节30%~70%人类基因的表达^[28],相关研究指出,共有2 267种mRNA至少与一种有影响的miRNA相互作用^[29-31],这使得miRNA在EVs成为细胞表型的强大调节剂。恶性肿瘤来源的EVs内经常会检测到一些特殊的miRNA, Kogure等^[28]列举了十几种在肿瘤细胞转移的过程中,肿瘤细胞及微环境内细胞分泌的EVs内携带的功能性miRNA,包括miR-210、miR-203、miR-21等。这些研究表明,肿瘤的发生、发展依赖于EV-miRNA的调节。以miR-21为例,其一,可调节细胞免疫应答,研究表明,肿瘤相关脂肪细胞(cancer-associated adipocyte, CAA)和成纤维细胞(cancer-associated fibroblast, CAF)分离的exosomes内miR-21水平显著高于卵巢癌细胞,CAA或CAF分泌的exosomes可以向卵巢癌细胞递送miR-21,并靶向APAF1分子,调节卵巢癌细胞的免疫应答^[32];其二,可促进细胞增殖,肿瘤相关巨噬细胞(cancer-associated macrophage, CAM)的exosomes内miR-21表达水平较高,携带miR-21的exosomes可直接从CAM转移到胃癌细胞,下调胃癌细胞内PTEN基因抑制细胞凋亡,进一步激活PI3K/AKT信号通路^[33];其三,可作为肿瘤标志物,神经胶质瘤来源的exosomes内也富含miR-21,且miR-21表达水平与肿瘤等级相关,使得exosomes内的miR-21有望成为胶质瘤诊断和预后的指标^[34]。我们仅在一些文献的基础上总结了部分EVs内miR-21的作用,发现EVs内miR-21可在基因水平上调节多个细胞事件,除miR-21外还有许多已研究以及待研究的EV-miRNA,这些研究将开启EVs研究领域中新征程。

tRNA主要的功能是携带氨基酸进入核糖体,参与mRNA翻译为蛋白质的过程,已经发现在血液、神经细胞以及免疫细胞衍生的exosomes中富含tRNA^[35-37],并且也发现了在凋亡小体和MV中富集tRNA^[38]。Chiou等^[39]的研究中提到多泡体释放的exosomes包含特定的tRNA片段,携带这些tRNA片段的exosomes会抑制T细胞活化和细胞因子产生。EVs中最常见的是含有30~32 nt长度5'-tRNA片段(5'-tRFs),也被称为5'-tRNA半部分或tiRNA,是由血管生成素(ANG)产生的进化上保守的分子^[40],有趣的是,在胶质瘤干细胞衍生的exosomes中富含ANG

和5'-tRF,这表明,在EVs中很有可能会发生tRNA的切割,形成的5'-tRF可以影响mRNA切割,抑制翻译过程^[41]。特异性5'-tRF执行关键功能,通常与应激反应中基因表达的调节相关。Chiou等^[39]比较T细胞分离的EV-RNA与细胞RNA相比含45%的tRNA片段(tRFs),及不到1%的miRNA,并且在他的研究中表明,tRFs是功能活跃的小RNA,在EVs内可以响应T细胞激活信号的释放而动态调节其选择性释放。

lncRNA、miRNA、tRNA是近年来EV-ncRNA研究中较为热门的领域,其它的小RNA也会通过EVs参与各项生命活动,比如EVs中Y-RNA涉及细胞内DNA复制及RNA质量监控过程,还有可能参与一系列免疫相关过程,包括炎症、免疫抑制和肿瘤微环境的建立^[42];相比miRNA,存在于EVs中的piRNA更加稳定,将稳定有效地影响受体细胞的表观遗传变化^[43]等。目前,生物技术逐步成熟,通过各种检测分析方法探究EVs内富含的RNA种类,在这里,我们仅是在相关文献的基础上总结了部分RNA及其生物学功能, RNA是生命进展中的强大调节剂,目前的研究存在很多值得深究之处,如EV-RNA还存在许多未知名,未知功能的RNA,这些RNA是否决定不同种类的EVs?在不同的EVs内其表达水平如何?是否随着EVs进入受体细胞内?还是在EVs内就有了改变?这些EV-RNA如何参与到调控生命进展的过程中?等等。我们希望更多的研究能够投入到这些领域,揭开EVs的面纱,探索其影响生命进展的奥秘。

2 EV-RNA不等性

EVs在大小、分子含量、生物遗传起源、性质和功能等各方面都不同,目前还未建立科学有效的方法分离纯化及表征不同的EVs,这也决定了EV-RNA种类多样性,然而在EV-RNA的研究中其种类的多样性,仅是在RNA的角度上,分析EVs携带RNA内含物的类别差异,而在EVs的角度上,我们发现,存在EV-RNA不等性^[41]的现象。我们将对EV-RNA的类别、丰度、表达水平及其片段大小不等性方面进行总结与分析。

2.1 EV-RNA的类别不等性

不同的EVs会存在不同的RNA库。Hinger等^[44]发现,三种结肠癌细胞系包括DKO-1、DLD-1、DKs-8细胞,仅是KRAS基因的突变状态不同,这三种细胞

系之间的RNA水平差异并不大,但是三种细胞系衍生的EV-RNA种类的差异却很大。Wei等^[41]的研究表明,人脑胶质干细胞衍生的MV和exosomes相关RNA的组成不同,并且差异性较大,exosomes要比MV中富集更多的miRNA,此外研究者进一步通过各种测序技术表征EV-RNA,证明EVs中富含小的RNA,除了一些已知的小RNA种类,那些未被表征的小RNA在EVs中也占据了很大的比例,这些未知的小RNA增加了exosomes的复杂性。这些研究表明,EV-RNA类别不等性不仅是因源细胞的差异,也因同一细胞系分泌的不同大小EVs而存在EV-RNA类别的不等性。我们希望通过探究EV-RNA的类别不等性,寻求其中的潜在规律,为深入研究EV-RNA奠定基础。

2.2 EV-RNA丰度不等性

EV-RNA的丰度可以衡量EVs携带RNA的能力,大量的研究表明,EV-RNA丰度存在很大的差异,Wei等^[41]通过对EV-RNA进行化学计量分析,检测到一个EV约有4.45 ag总RNA,对应约836个核糖核苷酸,rRNA和YRNA大约是每个EVs中有一个拷贝,大约10个EVs中才有一个拷贝的mRNA或miRNA。Cheville及其同事^[45]对EVs中的miRNA进行定量分析结果显示,每个exosomes中miRNA分子远远小于1个,并且分离了血浆、精液、树突细胞,肥大细胞和卵肠癌样本中的exosomes,对其中的miRNA进行分析,得到结果也仅为 $0.008\ 25 \pm 0.020\ 00$ 个miRNA分子/exosomes,由此我们发现,EV-miRNA的丰度并不高,但大量的研究已表明,低丰度的EV-miRNA在细胞增殖、凋亡、血管生成、肿瘤形成,转移、侵袭等方面起关键作用^[31]。这提示我们,EVs在生命进展中起着不可小觑的作用,至少其内的miRNA是一个强大的调节剂,或许仅是微量,但对生命进展有着重要的调控作用。

2.3 EV-RNA表达水平不等性

近年来大量的研究表明,EVs往往会选择性富集一些特定的RNA,这些表达水平较高的特定RNA已成为医疗诊断方面重要的候选生物标志物,Kaur等^[46]通过特定表面标志物CD63⁺、CD47⁺、MHC1⁺定义Jurkat T细胞释放的不同EVs,这些EVs具有相似的大小但是每种EVs都存在特定RNA表达水平的差异,CD63⁺ EVs中miRNA表达水平较高,CD47⁺ EVs中snoRNA表达水平较高,而snRNA几乎不表达,

MHC1⁺ EVs中tRNA表达水平较高。Preuber等^[47]比较了血小板释放的MV与exosomes中circRNA的表达水平,结果表明,在MV中可表达1 117个circRNA,而在exosomes中仅表达154个circRNA。Spinelli等^[48]的研究表明,在脑肿瘤EVs中,miRNA是表达水平最高的,其次才是YRNA、tRNA、snRNA。研究发现,EV-RNA表达水平不等性并非只与源细胞有关,有时甚至与源细胞无关,或许还与其复杂的分选机制、EVs的种类、RNA的特性等因素相关。

2.4 EV-RNA片段不等性

之前的研究表明,EVs可以将RNA递送到邻近或远处的细胞,改变受体细胞蛋白表达水平,影响受体细胞的生物学功能。但是我们不得不考虑到EVs体积的限制,以及完整RNA片段的长度。近年来,包括使用最新一代的测序技术发现,EV-RNA大多是以片段化的形式存在,其RNA片段大小主要分布在25~700 nt仅有少量RNA是以全长序列存在,通常<1 000 nt^[44]。在EVs中可以检测到部分miRNA、piRNA基本上都是完整片段,以及少量的mRNA也是以完整片段存在,大多数EV-RNA都是以片段化形式存在^[49],EV-RNAs的这一性质极有可能决定了EV-RNA的复杂性及其不等性。

3 从细胞到EVs: RNA的分选

目前为止,我们已经确定EVs会选择性富集RNA,这就表明,EV-RNA的分选不是简单随机的。对细胞衍生EVs、分选、释放的过程进行观察,发现EV-RNA的分选有其独特的分选机制^[21](图1)。

3.1 EV-RNA的特点

研究表明,EVs会富集与源细胞的致癌、分化状态、缺氧、应激反应及治疗等因素相关的RNA,在这些条件下的EVs通常也会参与到细胞增殖、免疫应答、细胞癌变、转移、侵袭等生命活动^[48]。这表明,EV-RNA货物会反映源细胞RNA水平及种类。但是,研究表明,EVs中RNA模式与源细胞的RNA模式显著不同,且基于EVs的生物发生途径和细胞释放EVs的状态及种类,分泌产生的EV-RNA各有差异^[49-50]。有研究总结了2011至2015年期间在33例癌细胞释放的EVs中的miRNA通过靶向受体细胞特定基因,调控受体细胞转移能力的案例,发现与癌症转移相关的关键miRNA表达量在EVs中都会增加,比如miR-211、miR-21、miR-134、Let-7、miR-429等^[51]。

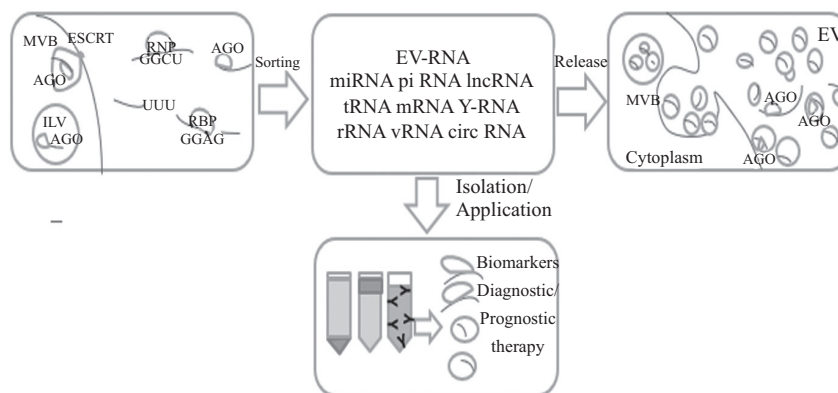


图1 EV-RNA的分选、释放、分离及应用(根据参考文献[21]修改)

Fig.1 Sorting, release, and isolation/application of EV-RNA (modified from reference [21])

Hinger等^[44]在2018年比较了三种源细胞RNA及其衍生EV-RNA, 比较之后均发现细胞衍生的EVs与源细胞相关RNA的差异较大, 且EVs中的大多数RNA都上调了。此外Wei等^[41]研究中表明, 人脑胶质干细胞衍生的MV和exosomes中的RNA与源细胞相比, MV(0.2~0.8 μm)中的RNA最能反映源细胞相关RNA, 而exosomes与源细胞中的RNA相比更加丰富与复杂, 存在大量的未知RNA序列。总之, EV-RNA是复杂的, 一方面它能反应源细胞RNA的水平及种类, 另一方面, 它又与源细胞存在差异, 或特定RNA表达水平高, 或在不同的囊泡中存在的水平及种类有差异, 这些都将是EV-RNA研究领域需解决的一大问题。

3.2 EV-RNA的分选机制

EV-RNA种类多样性及不等性的特征暗示存在多种分选机制将特定RNA引导至EVs中, 目前在EV-RNA分选领域内研究较多的是miRNA, 大量的研究表明, miRNA有选择性的分选至EVs, 图2所示miRNA存在多种分选机制^[52], 主要存在四种机制。(1)Ago(Argonaute)蛋白是RISC复合体的主要组分, 专一性和miRNA结合的蛋白质, 可协助miRNA分选至EVs中^[53]; (2)神经鞘磷脂酶2(nSMase2)依赖性途径, nSMase2可以调节exosomes内miRNA分泌并促进肿瘤微环境内血管生成及转移^[54]; (3)miRNA富含的特异序列(GGA G), 可与核糖核蛋白(hnRNPA2B1)特异性识别将miRNA分选至EVs中^[55]。此外, GGC U、hEXO等序列也可以与RNA结合蛋白SYNCRIP结合控制miRNA的分选^[56]; (4)miRNA3'发生尿苷酸化, 尿苷酸化将引导miRNA到EV中, 而腺苷酸化有相反的效果^[44,57]。总结了miRNA的分选

机制后, 我们对其他RNA的分选过程总结出以下几点。(1)与RNA结合蛋白结合, 除AGO蛋白之外, 还有高密度脂蛋白^[58]、RISC^[59]、穹窿蛋白(MVP)^[60]、hnRNPA2B1^[55]、SYNCRIP^[56]等。(2)特定的RNA序列会影响RNA分选, 除了GGA G、GGC U、hEXO等影响miRNA分选的序列之外, Bolukbasi等^[61]发现, 胶质母细胞瘤EVs内mRNA富集3'UTR, 该序列上有特殊的25个核苷酸序列, 其中CTG CC核心结构可以结合miR-1289, 通过细胞中相应miRNA的水平进一步增加MV中mRNA的水平; Kossinova等^[62]发现, YB-1蛋白可以与mRNA特定序列即ACC AGC CU, CAG UGA GC和UAA UCC CA)结合控制mRNA的分选。(3)细胞的状态也会影响RNA的分选, 之前研究充分证明, 细胞的状态会影响EV-RNAs的组成及表达水平^[48], Chiou等^[39]比较T细胞活化状态与静息状态下tRF的输出, 发现活化状态下输出tRF是静息状态下的3.3倍。(4)一些特殊蛋白与EV-RNA的分选紧密相关, 如: Kaur等^[46]的研究中表明, CD63⁺ EVs中miRNA表达水平较高, CD47⁺ EVs中snoRNA表达水平较高, MHC1⁺ EVs中tRNA表达水平较高。从这些研究中我们发现, EV-RNA的分选过程存在共性与特性, 未来我们可以以研究EV-miRNA的分选机制为突破点, 深入研究EV-RNA的分选机制, 这将是研究EV-RNA多样性特征的关键之一。

4 结语和展望

近年来, 对于EVs的研究主要集中于EVs的分类研究, 各类EVs中的相关标志物的探究、EVs的生物发生途径、不同分泌方式、不同的分离纯化

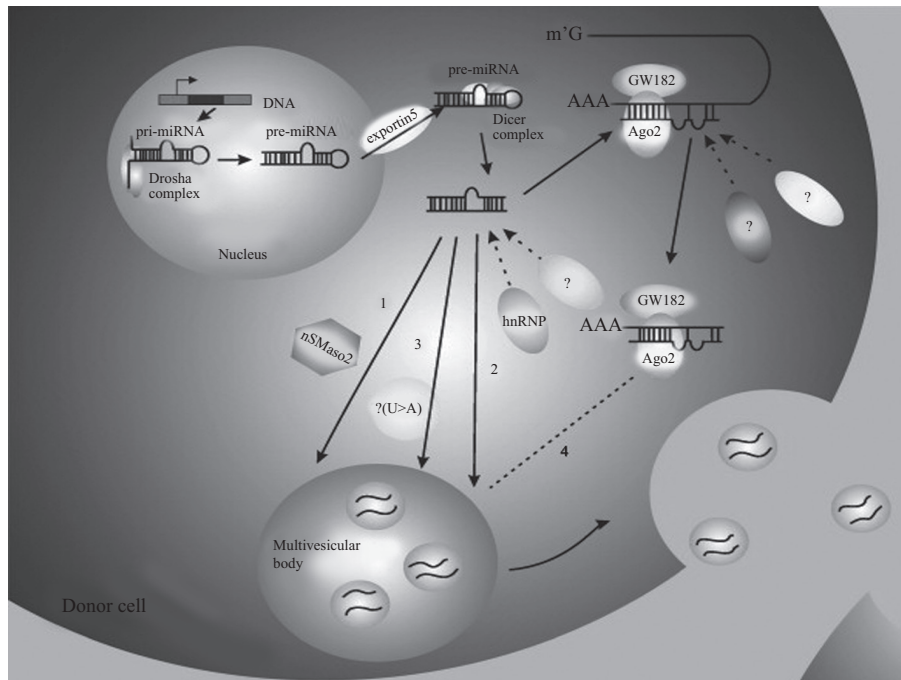


图2 细胞外囊泡miRNA的分选机制(根据参考文献[52]修改)

Fig.2 Sorting mechanism of extracellular vesicle miRNA (modified from reference [52])

方式、受体细胞摄取EVs的不同方式、摄取EVs后受体细胞生物学功能的变化、EVs携带内含物的研究, 以及不同时期、不同环境下EVs的研究等等, 但对EVs的认识仅是在近些年较为火热的, 有许多未知领域仍处于空白状态, 需投入大量的科学研究。EV-RNA的研究仍极具挑战, 就目前的研究现状而言, 已经有大量的研究证明了一些EV-RNA如miRNA、lncRNA、tRNA等在生命进程中发挥重要作用, 但我们似乎只了解到其中的冰山一角, 还有许多问题值得去研究, 比如: EV-RNA的组成和来源仍然存在很多未解之谜, EV-RNA中存在大量未知的RNA, 它们是否也参与到调控受体细胞靶基因的过程中? 细胞在分选RNA到EVs的过程中是否是一个有规律的活动? 特定类别的EV-RNA是如何影响受体细胞的生物学过程? 以及携带RNA的EVs在被受体细胞接受时, 其内RNA如何释放? 如何去调控受体细胞内的基因表达? 等等。我们需要在这些方面投入大量的研究, 未来我们还将深入学习和探究EVs的其他内含物, 将会为疾病的诊断与治疗提供新思路, 为生命科学的研究添加新色彩。

参考文献 (References)

- 1 Trams EG, Lauter CJ, Salem N, Heine U. Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles. *Biochim Biophys Acta* 1981; 645(1): 63-70.
- 2 Mateescu B, Kowal EJK, Balkomc BWM, Bartel S, Bhattacharyya SN, Buzas EI, *et al.* Obstacles and opportunities in the functional analysis of extracellular vesicle RNA-an ISEV position paper. *J Extracell Vesicles* 2017; 6(1): 1286095.
- 3 Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol* 2013; 200(4): 373-83.
- 4 Van GN, D'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2018; 19(4): 213-28.
- 5 Zijlstra A, Vizio DD. Size matters in nanoscale communication. *Nat Cell Biol* 2018; 20(3): 228-30.
- 6 Colombo M, Raposo G, Thery C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2014; 30(1): 255-89.
- 7 Johnstone RM, Adam M, Hammond JR, Orr L, Turbide C. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J Biol Chem* 1987; 262(19): 9412-20.
- 8 EL Andaloussi S, Meager I, Breakefield XO, Wood MJA. Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov* 2013; 12(5): 347-57.
- 9 Yuana Y, Sturk A, Nieuwland R. Extracellular vesicles in physiological and pathological conditions. *Blood Rev* 2013; 27(1): 31-9.
- 10 Pathan M, Fonseka P, Chitti SV, Kang T, Sanwlani R, Van Deun J, *et al.* Vesiclepedia 2019: a compendium of RNA, proteins, lipids and metabolites in extracellular vesicles. *Nucleic Acids Res* 2018; 47(1): 516-9.
- 11 Kolodny GM. Evidence for transfer of macromolecular RNA

- between mammalian cells in culture. *Exp Cell Res* 1971; 65(2): 313-24.
- 12 Dhondt B, Rousseau Q, De Wever O, Hendrix A. Function of extracellular vesicle-associated miRNAs in metastasis. *Cell Tissue Res* 2016; 365(3):621-41.
- 13 Kahroba H, Hejazi MS, Samadi N. Exosomes: from carcinogenesis and metastasis to diagnosis and treatment of gastric cancer. *Cell Mol Life Sci: CMLS* 2019; 76(9): 1747-58.
- 14 Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 2007; 9(6): 654-9.
- 15 Hong BS, Cho JH, Kim H, Choi EJ, Rho S, Kim JH, *et al.* Colorectal cancer cell-derived microvesicles are enriched in cell cycle-related mRNAs that promote proliferation of endothelial cells. *BMC Genomics* 2009; 10(1): 556.
- 16 Lai CP, Kim EY, Badr CE, Weissleder R, Mempel TR, Tannous BA, *et al.* Visualization and tracking of tumour extracellular vesicle delivery and RNA translation using multiplexed reporters. *Nat Commun* 2015; 6(1): 7029.
- 17 Liegro CMD, Schiera G, Liegro ID. Extracellular Vesicle-Associated RNA as a Carrier of Epigenetic Information. *Genes* 2017; 8(10): 240.
- 18 Szostak N, Royo F, Rybarczyk A, Szachniuk M, Blazewicz J, Del SA, *et al.* Sorting signal targeting mRNA into hepatic extracellular vesicles. *RNA Biol* 2014; 11(7): 836-44.
- 19 Batagov AO, Kurochkin IV. Exosomes secreted by human cells transport largely mRNA fragments that are enriched in the 3'-untranslated regions. *Biol Direct* 2013; 8(1): 12.
- 20 Fatemeh MH, Getting SJ, Athanasios MS. Extracellular vesicles and their nucleic acids for biomarker discovery. *Pharmacol Ther* 2018; 192: 170-87.
- 21 Sadik N, Cruz L, Gurtner A, Rodosthenous RS, Dusoswa SA, Ziegler O, *et al.* Extracellular RNAs: A New Awareness of Old Perspectives. *Method Mol Biol* 2018; 1740: 1-15.
- 22 Torreesudero EDL, Robinson MW. Extracellular vesicle-mediated communication in host-parasite interactions: insight from *Fasciola hepatica*. *Ann Transl Med* 2017; 5(Suppl 1): S8.
- 23 Wang M, Zhou L, Yu F, Zhang YF, Li PF, Wang K. The functional roles of exosomal long non-coding RNAs in cancer. *Cell Mol Life Sci* 2019; 76(11): 2059-76.
- 24 Drusco, A, Croce CM. MicroRNAs and Cancer: A Long Story for Short RNAs. *Adv Cancer Res* 2017; 135(25): 1-24.
- 25 Gezer U, Ozgur E, Cetinkaya M., Isin M, Dalay N. Long non-coding RNAs with low expression levels in cells are enriched in secreted exosomes. *Cell Biol Int* 2014; 38(9): 1076-9.
- 26 Xue M, Chen W, Xiang A, Wang R, Chen H, Pan J, *et al.* Hypoxic exosomes facilitate bladder tumor growth and development through transferring long non-coding RNA-UCA1. *Mol Cancer* 2017; 16(1): 143.
- 27 Ma X, Li Z, Li T, Zhu LWS, Li ZSN, Tian N. Long non-coding RNA HOTAIR enhances angiogenesis by induction of VEGFA expression in glioma cells and transmission to endothelial cells via glioma cell derived-extracellular vesicles. *Am J Transl Res* 2017; 9(11): 5012-1.
- 28 Kogure A, Kosaka N, Ochiya T. Cross-talk between cancer cells and their neighbors via miRNA in extracellular vesicles: an emerging player in cancer metastasis. *J Biomed Sci* 2019; 26(1): 7.
- 29 Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 2009; 19(1): 92-105.
- 30 Lunavat TR, Cheng L, Kim DK, Bhandury J, Jang SC, Lasser C, *et al.* Small RNA deep sequencing discriminates subsets of extracellular vesicles released by melanoma cells-Evidence of unique microRNA cargos. *Rna Bio* 2015; 12(8): 810-23.
- 31 Hannafon BN, Ding WQ. Intercellular communication by exosome-derived microRNAs in cancer. *Int J Mol Sci* 2013; 14(7): 14240-69.
- 32 Au Yeung CL, Co NN, Tsuruga T, Yeung TL, Kwan SY, Leung CS, *et al.* Exosomal transfer of stroma-derived miR-21 confers paclitaxel resistance in ovarian cancer cells through targeting APAF1. *Nat Commun.* 2016; 7: 11150.
- 33 Zheng P, Chen L, Yuan X, Luo Y, Liu Y, Xie G, *et al.* Exosomal transfer of tumor-associated macrophage-derived miR-21 confers cisplatin resistance in gastric cancer cells. *J Exp Clin Canc Res* 2017; 36(1): 53.
- 34 Shi R, Wang PY, Li XY, Chen JX, Li Y, Zhang XZ, *et al.* Exosomal levels of miRNA-21 from cerebrospinal fluids associated with poor prognosis and tumor recurrence of glioma patients. *Oncotarget* 2015; 6(29): 26971-81.
- 35 Lässer C, Alikhani VS, Ekström K, Eldh M, Paredes PT, Bossios A, *et al.* Human saliva, plasma and breast milk exosomes contain RNA: uptake by macrophages. *J Transl Med* 2011; 9(1): 9.
- 36 Bellingham SA, Coleman BM, Hill AF. Small RNA deep sequencing reveals a distinct miRNA signature released in exosomes from prion-infected neuronal cells. *Nucleic Acids Res* 2012; 40(21): 10937-49.
- 37 Nolte-t Hoen ENM, Buermans HPI, Waasdorp M, Stoovogel W, Wauben MHM, Thoen PAC. Deep sequencing of RNA from immune cell-derived vesicles uncovers the selective incorporation of small non-coding RNA biotypes with potential regulatory functions. *Nucleic Acids Res* 2012; 40(18): 9272-85.
- 38 Lunavat TR, Cheng L, Einarsson BO, Bagge RO, Muralidharan SV, Sharples RA, *et al.* BRAF(V600) inhibition alters the microRNA cargo in the vesicular secretome of malignant melanoma cells. *Proc Nati Acad Sci* 2017; 114(29): 5930-9.
- 39 Chiou NT, Kageyama R, Ansel KM. Selective Export into Extracellular Vesicles and Function of tRNA Fragments during T Cell Activation. *Cell Rep* 2018; 25(12): 3356-70.
- 40 Emara MM, Ivanov P, Hickman T, Dawra N, Tisdale S, Keder-sha N, *et al.* Angiogenin-induced tRNA-derived stress-induced RNAs promote stress-induced stress granule assembly. *J Biol Chem* 2010; 285(14): 10959-68.
- 41 Wei ZY, Batagov AO, Schinelli S, Wang JT, Wang Y, El Fatimy R, *et al.* Coding and noncoding landscape of extracellular RNA released by human glioma stem cells. *Nat Commun* 2017; 8(1): 1145.
- 42 Kowalski MP, Krude T. Functional roles of non-coding Y RNAs. *Int J Biochem Cell Biol* 2015; 66: 20-29.
- 43 Sarkar A, Volff J N, Vaury C. PiRNAs and their diverse roles: A transposable element-driven tactic for gene regulation? *FASEB J* 2017; 31(2): 436-46.
- 44 Hinger SA, Cha DJ, Franklin JL, Higginbotham JN, Dou YC,

- Ping J, *et al.* Diverse long RNAs are differentially sorted into extracellular vesicles secreted by colorectal cancer cells. *Cell Rep* 2018; 25(3): 715-25.
- 45 Chevillet JR, Kang Q, Ruf IK, Briggs HA, Vojtech LN, Hughes SM, *et al.* Quantitative and stoichiometric analysis of the microRNA content of exosomes. *Proc Natl Acad Sci* 2014; 29(41): 14888-93.
- 46 Kaur S, Elkahoulou AG, Arakelyan A, Young L, Myers TG, Otaizo-Carrasquero F, *et al.* CD63, MHC class 1, and CD47 identify subsets of extracellular vesicles containing distinct populations of noncoding RNAs. *Sci Rep* 2018; 8(1): 2577.
- 47 Preuber C, Hung LH, Schneider T, Schreiner S, Hardt M, Moebus A, *et al.* Selective release of circRNAs in platelet-derived extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles* 2018; 7(1): 1424473.
- 48 Spinelli C, Adnani L, Choi D, Rak J. Extracellular Vesicles as Conduits of Non-Coding RNA Emission and Intercellular Transfer in Brain Tumors. *NonCoding RNA* 2018; 5(1): 1-26.
- 49 Abels ER, Breakefield XO. Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake. *Cell Mol Neurobiol* 2016; 36(3): 301-12.
- 50 Skog J, Wurdinger T, Van RS, Meijer DH, Gainche L, Sena-Esteves M, *et al.* Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol* 2008; 10(12): 1470-6.
- 51 Dhondt B, Rousseau Q, De Wever O, Hendrix A. Function of extracellular vesicle-associated miRNAs in metastasis. *Cell Tissue Res* 2016; 365(3): 621-41.
- 52 Zhang J, Li S, Li L, Li Meng, Guo C, Yao J, *et al.* Exosome and exosomal MicroRNA: Trafficking, sorting, and function. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 2015; 13(1): 17-24.
- 53 Gibbings DJ, Ciaudo C, Erhardt M, Voinnet O. Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity. *Nat Cell Biol* 2009; 11(9): 1143-9.
- 54 Kosaka N, Iguchi H, Hagiwara K, Yoshioka Y, Takeshita F, Ochiya T. Neutral sphingomyelinase 2 (nSMase2)-dependent exosomal transfer of angiogenic microRNAs regulate cancer cell metastasis. *J Biol Chem* 2013; 288: 10849-59.
- 55 Villarroya-Beltri C, Gutierrez-Vazquez C, Sanchez-Cabo F, Perez-Hernandez D, Vazquez J, Martin-Cofreces N, *et al.* Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nat Commun* 2013; 4(1): 2980.
- 56 Santangelo L, Giurato G, Cicchini C, Montaldo C, Mancone C, Tarallo R. The RNA-Binding Protein SYNCRIP Is a Component of the Hepatocyte Exosomal Machinery Controlling MicroRNA Sorting. *Cell Rep* 2016; 17(3): 799-808.
- 57 Koppers-Lalic D, Hackenberg M, Bijnsdorp IV, van Eijndhoven MAJ, Sadek P, Sie D, *et al.* Nontemplated nucleotide additions distinguish the small RNA composition in cells from exosomes. *Cell Rep* 2014; 8(6): 1649-58.
- 58 Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD, Remaley AT. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat Cell Biol* 2011; 13(4): 423-33.
- 59 Guduric-Fuchs J, O'Connor A, Camp B, O'Neill CL, Medina RJ, Simpson DA, *et al.* Selective extracellular vesicle-mediated export of an overlapping set of microRNAs from multiple cell types. *BMC Genomics* 2012; 13(1): 357.
- 60 Teng Y, Ren Y, Hu X, Mu J, Samykutty A, Zhuang X, *et al.* MVP-mediated exosomal sorting of miR-193a promotes colon cancer progression. *Nat Commun* 2017; 8: 14448.
- 61 Bolukbasi MF, Mizrak A, Ozdener GB, Madlener S, Strobel T, Erkan EP, *et al.* miR-1289 and "Zipcode" -like Sequence Enrich mRNAs in Microvesicles. *Mol Ther Nucleic Acids* 2012; 1(2): e10.
- 62 Kossinova OA, Gopanenko AV, Tamkovich SN, Krasheninina OA, Tupikin AE, Kiseleva K, *et al.* Cytosolic YB-1 and NSUN2 are the only proteins recognizing specific motifs present in mRNAs enriched in exosomes. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom* 2017; 1865 (6): 664-73.