

# 旋毛虫肌幼虫期外泌体的分离和小 RNA 鉴定

高 欣, 杨 勇, 刘 蕾, 刘晓雷, 刘明远, 白 雪

**摘要:**目的 分离纯化旋毛虫肌幼虫分泌的外泌体,并进行鉴定,为研究旋毛虫免疫逃逸机制提供新的线索。**方法**采用超速离心法提取旋毛虫肌幼虫期外泌体,通过透射电子显微镜、纳米颗粒跟踪分析、免疫印迹和小RNA测序对其进行鉴定。**结果** 旋毛虫肌幼虫期外泌体为有膜的泡状物,直径约80~200 nm,表达外泌体特异性标记蛋白CD63和Enolase,含1266个已知的miRNA。**结论** 经形态、粒径及标记蛋白分析证实成功分离旋毛虫肌幼虫期外泌体,同时构建旋毛虫肌幼虫期外泌体的小RNA文库,鉴定出多种功能性小RNA,为深入研究旋毛虫肌幼虫期外泌体内小RNA分子的应用提供数据。

**关键词:**旋毛虫;肌幼虫期;外泌体;miRNA

中图分类号:R383.15 文献标识码:A 文章编号:1002-2694(2020)04-0261-06

## Isolation of exosomes from *Trichinella spiralis* muscle larvae and identification of small RNAs

GAO Xin, YANG Yong, LIU Lei, LIU Xiao-lei, LIU Ming-yuan, BAI Xue

(Institute of Zoonosis, Key Laboratory of Zoonosis Research, Ministry of Education,  
College of Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, China)

**Abstract:** *Trichinella spiralis* (*T. spiralis*) is an important food-born parasite that can regulate the host immune response to achieve long-term parasitic. Recently, it has been found that exosomes derived from parasites can not only transmit virulence factors between parasites, but also regulate the immune response of hosts. We purified and identified *T. spiralis* muscle larvae exosomes, providing a new direction for the research on the immune regulation ability of *T. spiralis*. In this experiment, exosomes of *T. spiralis* muscle larvae were extracted by ultracentrifugation and were identified by transmission electron microscope, nanoparticle tracking analysis, western blotting and small RNA sequencing. *T. spiralis* muscle larvae exosomes were membrane-structure vesicles with a diameter of 80—200 nm and expressed exosomes-specific markers CD63 and Enolase, containing 1266 known miRNAs. Our study indicated that the exosomes from *Trichinella spiralis* muscle larvae were successfully extracted and were confirmed by the morphology, particle size and markers analyze. Meanwhile, small RNA libraries of exosome were constructed to identify a variety of functional small RNAs. These findings provide data for further study the application of small RNAs in exosomes.

**Keywords:** *Trichinella spiralis*; muscle larvae stage; exosomes; miRNA

Supported by National Key Research and Development Program of China (No.2017YFC1601206, No.2017YFD0501300), Outstanding Young Talents Fund Project of Jilin Province (No.20180520042JH) and Fundamental Research Funds for the Central University, JLNU (No.45119031D082).

Corresponding author: BAI Xue, Email: baixue2008851001@jlu.edu.cn

国家重点研发项目(No.2017YFC1601206, No.2017YFD0501300);  
吉林省优秀青年人才基金项目(No.20180520042JH);中央高校基本  
科研业务费专项资金(No.45119031D082)

通讯作者:白 雪,Email:baixue2008851001@jlu.edu.cn;  
ORCID:0000-0002-5973-0353

作者单位:吉林大学人兽共患病研究所/人兽共患病研究教育部重点  
实验室/动物医学学院,长春 130062

2014年,世界卫生组织(WHO)和联合国粮农组织(FAO)根据寄生虫对人体造成的损伤以及经济损失的综合评估,将旋毛虫列为食源性寄生虫之首<sup>[1]</sup>。自Page和Owen于1835年首次在人体尸检的肌肉中发现,但到目前为止,旋毛虫的具体感染机制仍不清楚<sup>[2]</sup>。研究表明,旋毛虫虫体粗提物和排

泄分泌产物能够诱导宿主强烈的 Th2 型免疫反应,引起宿主免疫抑制,最终建立慢性感染从而达到长期寄生<sup>[3]</sup>。大量实验证明旋毛虫虫体粗提物或排泄分泌产物中存在可调控宿主免疫细胞、参与旋毛虫与宿主的相互作用的关键分子<sup>[4]</sup>。外泌体(exosomes, EXO)是一种表面为磷脂膜的分泌小泡,几乎所有细胞都能产生,存在于生物体液中,包括腹水、胆汁、母乳等<sup>[5]</sup>。EXO 携带多种生物活性物质,如蛋白质、miRNA 和 mRNA,EXO 与靶细胞融合后,其携带的蛋白质和 RNA 转移到靶细胞,进而影响靶细胞的功能<sup>[6]</sup>。

研究表明,包括肝片吸虫、蛔虫、棘球绦虫等在内的很多寄生虫可以分泌外泌体作用于宿主细胞,调控宿主的基因表达和免疫反应,参与寄生虫致病过程<sup>[7]</sup>。2018 年, Li Y 等<sup>[8]</sup>发现弓形虫释放的 EXO 能够激活巨噬细胞,刺激促炎因子分泌,触发宿主免疫反应,对弓形虫感染进行局部保护。Fromm B 等<sup>[9]</sup>发现肝片吸虫释放的 EXO 含有 10 个与宿主同源的 miRNA,提示 EXO 可能干预宿主的转录机制。Eline P. Hansen 等<sup>[10]</sup>发现蛔虫 EXO 中的 miRNA 可以靶向宿主体内编码免疫反应相关的细胞因子,从而调控宿主免疫反应。因此,EXO 在细胞间通过传递效应分子进而介导寄生虫与宿主之间的相互作用,这些研究提示,旋毛虫也可能分泌 EXO 调节宿主免疫反应,从而成功寄生<sup>[11]</sup>。

本研究采用超速离心法从旋毛虫肌幼虫培养上清中成功获得 EXO,并应用透射电子显微镜、纳米颗粒跟踪分析、免疫印迹以及小 RNA 测序对所获的 EXO 进行鉴定,为今后深入研究旋毛虫肌幼虫期 EXO(ML-EXO)参与炎症及其他生物学过程提供基础,并为旋毛虫病的致病机制及靶向治疗提供相关依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材 料

1.1.1 实验动物与旋毛虫虫种 Wistar 雌性大鼠 8 只,体重 180~200 g(吉林大学医学部动物中心),用于旋毛虫传代保种及旋毛虫肌幼虫期外泌体的收集。中国河南猪旋毛虫分离株 *T. spiralis* (ISS534) 由本室传代保种。

1.1.2 主要试剂 胃蛋白酶、盐酸均购于中国惠生化试剂有限公司, RPMI-1640 培养基、10 000 U/mL 青霉素、10 000 U/mL 链霉素、胎牛血清均购于 Gibco 公司, 戊二醛、磷钨酸均购于无锡市江原实业技贸总公司, BCA 试剂盒购于上海碧云天生物技

术有限公司, 免抗鼠 CD63 多克隆抗体、山羊抗鼠 Enolase 多克隆抗体均购于 Abcam 公司, 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG、驴抗山羊 IgG 均购于 Cell Signaling 公司, Tru Seq 小 RNA 文库制备试剂盒购于 Illumina 公司。

### 1.2 方 法

1.2.1 旋毛虫肌幼虫的收集 取 8 只 Wistar 大鼠, 经口感染 3 500 条旋毛虫肌幼虫, 于感染后 35 d (dpi) 脱颈处死, 去其皮肤、脂肪、四肢、内脏等。在显微镜下观察膈肌, 确定有旋毛虫肌幼虫后, 将胴体和膈肌绞碎, 放入人工消化液(10 mL/L 浓盐酸和 10 g/L 胃蛋白酶)中, 在 37 °C 下恒温消化 2 h。液体过筛网并自然沉淀 1 h, 加入清水洗涤直至液体清亮, 收集旋毛虫肌幼虫<sup>[12]</sup>。

1.2.2 旋毛虫肌幼虫期外泌体的提取 本实验采用超速离心法提取旋毛虫肌幼虫期 EXO (ML-EXO)。将旋毛虫肌幼虫用含 5% 双抗(10 000 U/mL 青霉素、10 000 U/mL 链霉素)的无血清 RPMI-1640 培养基清洗 5 次后, 置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中用 800 mL 含 2% 双抗的 RPMI-1640 培养基培养 12 h。收集旋毛虫肌幼虫培养液, 分装于 50 mL 离心管中, 首先于 4 °C 下 800 g 离心 15 min, 去除虫体。取上清置于新的离心管中, 于 4 °C 下 5 000 g 离心 15 min 以去除杂质。收集上清, 使用 0.22 μm 过滤器过滤后转移到 10 kDa 超滤管中进行超滤, 4 °C 下 5 000 g 离心 15 min。所得上清于 4 °C 下 120 000 g 离心 2 h, 弃去上清, 沉淀即为 ML-EXO<sup>[13]</sup>。100 μL PBS 重悬 EXO, -80 °C 保存, 以备后续使用。

1.2.3 透射电子显微镜观察旋毛虫肌幼虫期外泌体形态 采用透射电子显微镜的方法对 ML-EXO 形态进行检测。将纯化后的 EXO 在 PBS 中重悬后, 取 10 μL ML-EXO 悬浮液置于铜网, 静置 1 min 后, 用滤纸将液体吸去, 采用 3% 磷钨酸钠溶液室温负染 2 min, 室温风干, 置于透射电子显微镜(Hitachi H-7650)下观察 ML-EXO 形态, 在 80 kV 下调节亮度及焦距进行图像采集<sup>[14]</sup>。

1.2.4 纳米颗粒跟踪分析法检测旋毛虫肌幼虫期外泌体大小 将 ML-EXO 沉淀用 1 mL PBS 重悬制成 1 mL 0.5 g/L 的溶液, 经 0.22 μm 滤器过滤后置于冰上。按照纳米颗粒跟踪分析仪(Nanno Sight NS3000)操作流程, 调整参数, 检测 EXO 的粒子数目、浓度以及粒径分布, 收集并保存数据<sup>[15]</sup>。

1.2.5 蛋白免疫印迹法检测旋毛虫肌幼虫外泌体的 CD63 和 Enolase 蛋白水平 通过 BCA 测定 ML-EXO 浓度, 将其充分裂解, 进行 10% SDS-

PAGE 电泳分离蛋白质,每孔上样 30  $\mu\text{g}$  蛋白质。电泳结束后转膜,5%脱脂奶粉封闭。然后加入兔抗鼠 CD63(1:1 000)、山羊抗鼠 Enolase 多克隆抗体(1:200),4 °C 孵育过夜,使用 1×TBST 缓冲液洗 3 次。再分别加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG(1:2 000)、驴抗山羊 IgG(1:50 000),室温孵育 2 h,使用 1×TBST 缓冲液洗 3 次,加入化学发光显色液,应用凝胶成像分析进行分析<sup>[16]</sup>。

**1.2.6 旋毛虫肌幼虫外泌体中小 RNA 的高通量测序** 采用 Trizol 方法从 ML-EXO 中提取总 RNA,采用 Agilent 2100 系统分析 RNA 质量<sup>[17]</sup>。使用 15% 聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)分离 18~30 nt 之间的小 RNA,使用 Tru Seq 小 RNA 文库制备试剂盒构建小 RNA 文库。经检测合格后的小 RNA,在 Illumina HiSeq2000 测序仪上进行测序分析。本研究的小 RNA 文库构建和测序均由深圳华大基因公司完成。

对原始测序数据,首先去除测序质量较低、不确定碱基大于 10%、5'接头污染、无插入片段、无 3'接头、包含 polyA、小于 18 nt 的片段,得到 clean reads。通过 blast 或 bowtie 将 clean reads 和 miR-Base、GenBank、Rfam 数据库比对,鉴定出与数据库中完全匹配的小 RNA。将测序后的小 RNA 进行分类注释,包括 rRNA、snRNA、tRNA、miRNA 等。对于 miRNA 的分析,通过 targetscan 和 miRanda 软件,预测 miRNA 的靶基因,应用 GO 功能和 ggplot2 分析研究靶基因的生物学功能。

## 2 结 果

**2.1 旋毛虫肌幼虫期外泌体形态学观察** 将超速离心法分离纯化获得的 ML-EXO,置于 40 000 倍透射电子显微镜下观察,可见 EXO 呈典型的椭圆形或圆形的杯状形态,具有明显的膜结构,其腔内有低密度颗粒,背景清晰,无污染,符合 EXO 在透射电子显微镜下的特征(图 1)。利用纳米颗粒跟踪分析法对所提取 ML-EXO 的粒径进行检测,做出分析报告(表 1)。其中直径 80~200 nm 约占 83%,200~300 nm 约占 12%,300~500 nm 约占 5%,可以看出 ML-EXO 大多数处于 80~200 nm 直径范围。

**2.2 Western blotting 检测旋毛虫肌幼虫期外泌体特异性标记物** 采用免疫印记法,对旋毛虫肌幼虫及其 EXO 进行检测,结果显示旋毛虫肌幼虫及其 EXO 均表达特异性标记蛋白 CD63 和 Enolase,大小分别是 43 kDa 和 49 kDa(图 2)。

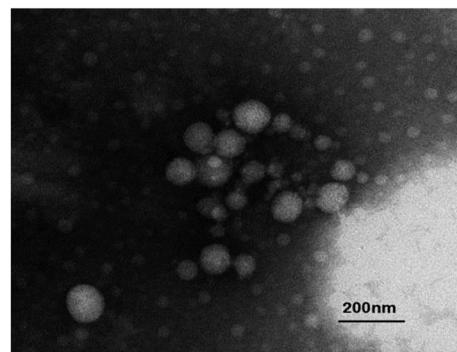


图 1 透射电子显微镜观察旋毛虫肌幼虫期外泌体的形态特征

Fig.1 Morphological characterization of *T. spiralis* muscle larvae exosomes under TEM

表 1 旋毛虫肌幼虫期外泌体不同大小的百分比

Tab.1 Percentage of *T. spiralis* muscle larvae EXO in various size range

Particle size/nm	number %
0~80	0
80~200	83
200~300	12
300~500	5
500~1000	0

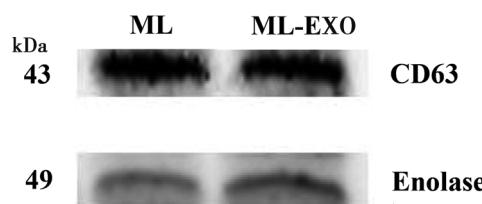


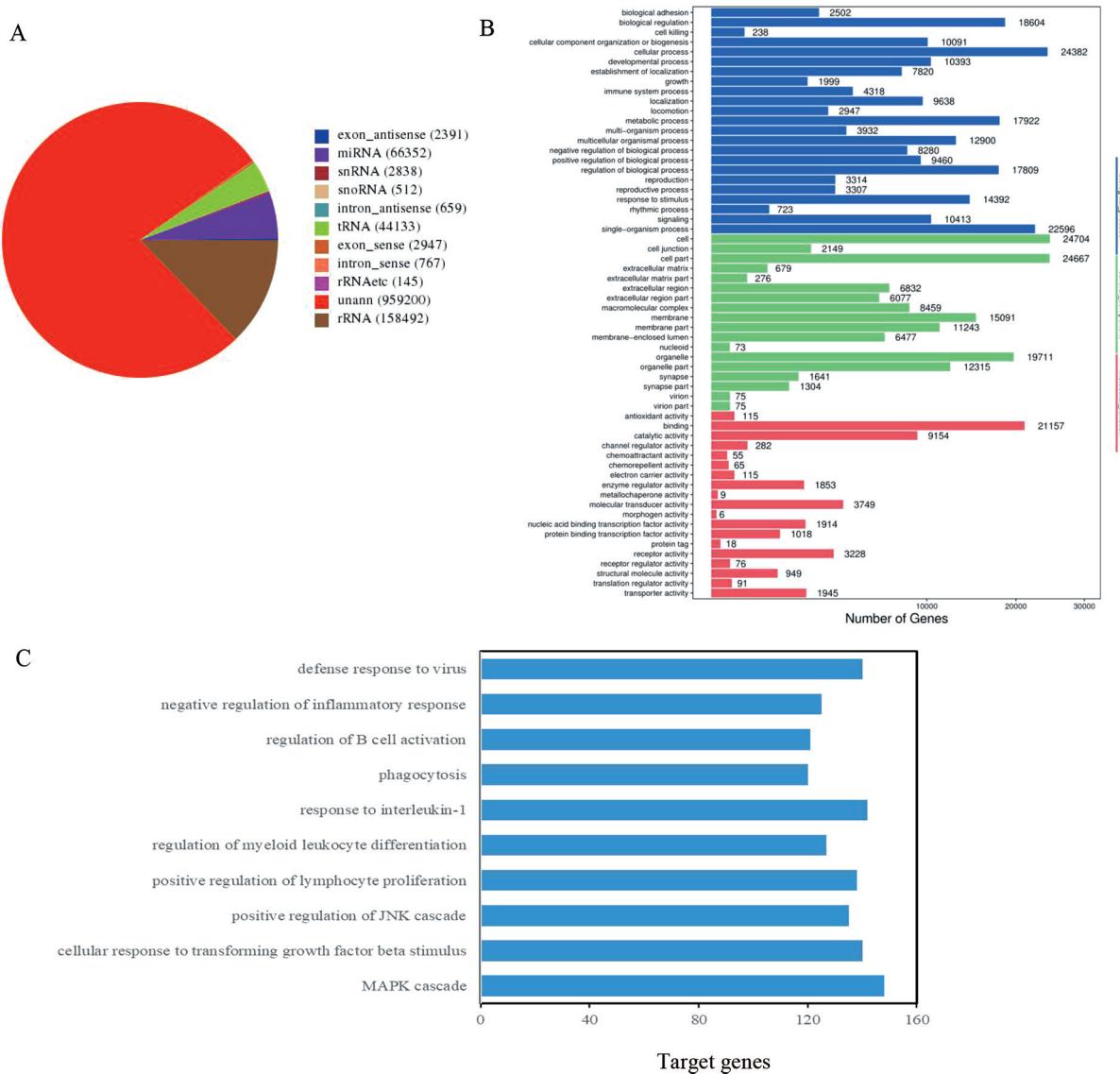
图 2 蛋白质免疫印迹法检测旋毛虫肌幼虫期外泌体特异性标记蛋白 CD63 和 Enolase 蛋白表达

Fig.2 Expression of specific markers CD63 and Enolase in *T. spiralis* muscle larvae EXO by western blotting

**2.3 旋毛虫肌幼虫期外泌体的小 RNA 分析** 将所有 ML-EXO 中的小 RNA 与各类 RNA 的比对、注释情况进行总结。结果发现,在 ML-EXO 小 RNA 文库中,来源于编码蛋白质的内含子和外显子共 6 764 种,约占小 RNA 的 0.55%,表明总 RNA 质量完好,基本没有降解。各类非编码小 RNA 共 206 120 种,占小 RNA 的 16.64%,其中 rRNA 的比例最高,占 12.80%。未注释的小 RNA 共 959 200 种,占小 RNA 的 77.45%,这部分序列可能是新小

RNA 序列,其分类和功能值得进一步研究(图 3A)。通过将小 RNA 和 miRBase 数据库比对,鉴定出已知 miRNA 共 66 352 种,占小 RNA 的 5.36%。对已知 miRNA 用多个软件进行靶基因预测,发现靶基因数量为 34 437 个(表 2)。为了确定预测的靶基因行使的主要生物学功能,本研究通过 GO 富集分析

靶基因的功能分类体系,发现在细胞、生物学调节、代谢等过程中,靶基因显著富集(图 3B)。进一步利用 ggplot2 对丰度前 50 的 miRNA 的靶基因进行功能预测,发现其参与了多种免疫调节如 MAPK 级联反应、JNK 级联反应和 B 细胞活化等过程(图 3C)。



A 为小 RNA 的种类;B 为 miRNA 的 GO 功能分析;C 为 miRNA 对免疫相关靶基因的调节分析

图 3 旋毛虫肌幼虫期外泌体中的小 RNA 分析

Fig.3 Small RNA analysis in *T. spiralis* muscle larvae EXO

表 2 旋毛虫肌幼虫期外泌体中的 miRNA 靶基因预测统计

Tab.2 Summary of *T. spiralis* muscle larvae EXO miRNA target prediction

software	miRNA number	Target gene number	Count of miRNA::corresponding target gene	Target location number
targetscan	1279	34859	3662318	4265265
miRanda	1270	34510	2578906	3055763
Result	1266	34437	986331	—

### 3 讨 论

2013 年, Rothman、Schekman 和 Sudhof 对外泌体(EXO)运输调节机制的研究获得诺贝尔生理或医学奖。自此, EXO 成为研究热点<sup>[18]</sup>。旋毛虫是一种重要的食源性寄生虫,严重危害公共卫生安全,但关于旋毛虫肌幼虫期 EXO 的研究尚未报道<sup>[19]</sup>。目前分离 EXO 的方法很多,常用的有超速离心法、蔗糖密度梯度离心法、超滤法等<sup>[20]</sup>。超速离心法是分离 EXO 的常用方法,已被广泛应用于各种 EXO 的分离,主要依据粒子密度和大小设置离心力,一般为高速离心和低速离心配合,可获得较高纯度的 EXO,具有操作简单、不易污染等优点,因此是 EXO 提取的金标准<sup>[21]</sup>。我们通过超速离心法分离旋毛虫肌幼虫培养 12 h 后的上清,在透射电子显微镜观察发现,旋毛虫肌幼虫期外泌体(ML-EXO)呈球形,与 EXO 的经典形态相似。纳米颗粒追踪技术原理是对每个颗粒的布朗运动进行跟踪和分析,结合 Stockes-Einstein 方程式计算出纳米颗粒的流体力学直径和浓度,该技术的样本处理简单,能保证 EXO 原始状态,检测速度快,已成为鉴定 EXO 的方法之一<sup>[22]</sup>。采用纳米颗粒追踪技术检测到 ML-EXO 直径在 80~200 nm 之间。EXO 的标记物有 CD9、CD63、CD81、Enolase 等,其中 CD63 是一种保守的四聚体跨膜蛋白,直接参与了 EXO 内容物的分选,Enolase 则参与 EXO 的合成过程<sup>[23]</sup>。因此,本研究检测了 ML-EXO CD63 和 Enolase 的表达,均为阳性。这些结果表明我们成功分离获得了旋毛虫肌幼虫期 EXO。

miRNA 可以通过 EXO 从寄生虫传递到宿主细胞,从而调节靶基因的表达,参与寄生虫与宿主的相互作用,因此,鉴定 EXO 中的 miRNA 为研究寄生虫病的发病机制和药物靶点开辟了新的途径<sup>[24]</sup>。Let-7 是蠕虫中发现的第一个 miRNA,同时也出现在寄生虫 EXO 中,可下调宿主的免疫反应,miRNA 还与寄生虫的生长发育有关,miR-277 和 miR-4989 可通过介导信号通路参与血吸虫的发育<sup>[25]</sup>。本研究通过 targetscan 和 miRanda 软件,在 ML-EXO 中鉴定了 1 266 种 miRNA。研究 miRNA 功能的前提是确定其靶基因,然而,由于互补的序列较少,使得对 miRNA 靶基因预测的准确性较低<sup>[26]</sup>。但是对 miRNA 与靶基因的研究发现它们的作用有一定规律,预测一个靶基因的决定因素为 miRNA 的 5' 端有 6~8 个核苷酸可以与靶基因 mRNA 的 3' 端精确互补,这 6~8 个核苷酸称为“种子序列”<sup>[27]</sup>。因此,miRNA 靶基因预测主要用种子序列的互补

程度和 miRNA 与相应靶基因结合的稳定性作为基础<sup>[28]</sup>。基于这些原则,人们开发 miRNA 靶基因预测软件有 Targetscan、miRanda 等<sup>[29]</sup>。Targetscan 软件基于 miRNA 的种子序列与靶基因序列互补,而 miRanda 软件基于 miRNA 与相应靶基因结合的稳定性。因此,这些软件的算法和侧重点有区别,对预测同一个 miRNA 靶基因也有偏差<sup>[30]</sup>。所以,我们用 Targetscan 和 miRanda 软件进行预测,取交集作为预测结果,结果表明,miRNA 的靶基因数量有 34 437 个,靶基因预测结果还需进一步验证。在 miRNA 靶基因的 GO 富集分析中,ML-EXO 中 miRNA 的靶基因富集到细胞过程、生物学调节、代谢过程等过程中,这表明 EXO 中 miRNA 的靶基因在细胞过程、生物学调节、代谢过程中发挥重要作用。寄生虫对宿主的免疫调节作用是通过寄生虫和宿主之间遗传信息的传递形成的,因此,寄生虫 miRNA 在调节宿主免疫系统中发挥了重要作用,我们通过 ggplot2 分析,发现一些 miRNA 调节免疫相关的靶基因,可能是旋毛虫逃避宿主免疫防御的重要机制,这将为旋毛虫与宿主的相互作用提供新的思路。

综上所述,本研究首次证实了旋毛虫肌幼虫可分泌 EXO,同时,证明了 EXO 中含有多种功能性小 RNA,为旋毛虫 EXO 分离提供实验依据,也为后续 ML-EXO 发挥免疫调节作用等相关研究提供基础。

利益冲突:无

引用本文格式:高欣,杨勇,刘蕾,等.旋毛虫肌幼虫期外泌体的分离和小 RNA 鉴定[J].中国人兽共患病学报,2020,36(4):261-266. DOI:10.3969/j.issn.1002-2694.2020.00.037

### 参 考 文 献:

- [1] FAO/WHO. Multicriteria-based ranking for risk management of food-borne parasites 2014[EB/OL]. (2014-12-31)[2019-12-14]. [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/112672/9789241564700\\_eng.pdf?sequence=1](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/112672/9789241564700_eng.pdf?sequence=1)
- [2] 廖成水,王晓利,杜付玉,等.旋毛虫 5'-nucleotidase 基因特征与克隆表达[J].中国人兽共患病学报,2018,34(11):971-976. DOI:10.3969/j.issn.1002-2694.2018.00.186
- [3] 孟诗,张妍,李晓云,等.旋毛虫 TsGLS 和 TsGAD 重组蛋白免疫保护作用的研究[J].中国兽医科学,2019,49(4):418-424. DOI:10.16656/j.issn.1673-4696.2019.0052
- [4] Coakley G, McCaskill JL, Borger JG, et al. Extracellular vesicles from a helminth parasite suppress macrophage activation and constitute an effective vaccine for protective immunity[J]. Cell Rep, 2017, 19(8):1545-1557. DOI:10.1016/j.celrep.2017.05.001

- [5] Sampaio NG, Cheng L, Eriksson EM. The role of extracellular vesicles in *malaria* biology and pathogenesis[J]. *Malar J*, 2017, 16(1):245. DOI:10.1186/s12936-017-1891-z
- [6] Dong G, Filho AL, Olivier M. Modulation of host-pathogen communication by extracellular vesicles (EVs) of the protozoan parasite *Leishmania*[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2019, 9: 100. DOI:10.3389/fcimb.2019.00100. eCollection 2019
- [7] Wu Z, Wang L, Li J, et al. Extracellular vesicle-mediated communication within host-parasite interactions[J]. *Front Immunol*, 2018, 9:3066. DOI:10.3389/fimmu.2018.03066. eCollection 2018
- [8] Li Y, Liu Y, Xiu F, et al. Characterization of exosomes derived from *Toxoplasma gondii* and their functions in modulating immune responses[J]. *Int J Nanomedicine*, 2018 13: 467-477. DOI:10.2147/IJN.S151110
- [9] Fromm B, Ovchinnikov V, Hoye E, Bernal D, et al. On the presence and immunoregulatory functions of extracellular microRNAs in the trematode *Fasciola hepatica*[J]. *Parasite Immunol*, 2017, 39(2):e12399. DOI:10.1111/pim.12399
- [10] Hansen EP, Fromm B. Exploration of extracellular vesicles from *Ascaris suum* provides evidence of parasite-host cross talk[J]. *J Extracell Vesicles*, 2019, 8(1):1578116. DOI:10.1080/20013078.2019.1578116. eCollection 2019
- [11] de la Torre-Escudero E, Gerlach JQ, Bennett APS, et al. Surface molecules of extracellular vesicles secreted by the helminth pathogen *Fasciola hepatica* direct their internalisation by host cells[J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2019 13(1):e0007087. DOI:10.1371/journal.pntd.0007087. eCollection 2019 Jan
- [12] 吴合亮,李美辰,潘靖丹,等.旋毛虫肌幼虫排泄分泌蛋白对非小细胞肺癌A549增殖的影响[J].医学理论与实践,2019,32(9):1284-1285. DOI:10.19381/j.issn.1001-7585.2019.09.002
- [13] Rossi IV, Gavinho B, Ramirez MI. Isolation and characterization of extracellular vesicles derived from *Trypanosoma cruzi* [J]. *Methods Mol Biol* 2019, 1955:89-104. DOI:10.1007/978-1-4939-9148-8\_7
- [14] 葛锁华,马永宾,芮星,等.大鼠骨髓间充质干细胞来源的胞外囊泡分离和鉴定[J].细胞与分子免疫学杂志,2017,33(10):1381-1384.
- [15] 李洪超,金银鹏,王哲,等.人脂肪干细胞及其外泌体的分离与鉴定[J].中国组织工程研究,2018,22(13):2033-2038. DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.0494
- [16] 王维冰,吴世双,付佳乐,等.胶质瘤细胞来源外泌体的提取与鉴定[J].临床神经外科杂志,2017,14(05):321-325. DOI:10.3969/j.issn.1672-7770.2017.05.001
- [17] Liang P1, Mao L1, Zhang S, et al. Identification and molecular characterization of exosome-like vesicles derived from the *Taenia asiatica* adult worm[J]. *Acta Trop*, 2019, pii:S0001-706X(18)30828-3. DOI:10.1016/j.actatropica.2019.05.027
- [18] 李佳祺,杨娜,尹德琦,等.外泌体在寄生原虫中的研究进展[J].动物医学进展,2017,38(10):102-106. DOI:10.16437/j.cnki.1007-5038.2017.10.019
- [19] Yang F, Yang DQ, Song YY, et al. *In vitro* silencing of a serine protease inhibitor suppresses *Trichinella spiralis* invasion, development, and fecundity[J]. *Parasitol Res*, 2019. DOI:10.1007/s00436-019-06344-4
- [20] Zhang P, Yeo JC, Lim CT. Advances in technologies for purification and enrichment of extracellular vesicles[J]. *SLAS Technol*, 2019:2472630319846877. DOI:10.1177/2472630319846877
- [21] Momen-Heravi F. Isolation of extracellular vesicles by ultracentrifugation[J]. *Methods Mol Biol* (Clifton, NJ), 2017, 1660:25-32. DOI:10.1007/978-1-4939-7253-1\_3
- [22] Bai K, Barnett GV, Kar SR, et al. Interference from proteins and surfactants on particle size distributions measured by nanoparticle tracking analysis (NTA)[J]. *Pharm Res*, 2017, 34(4):800-808. DOI:10.1007/s11095-017-2109-3
- [23] Hurwitz SN, Nkosi D, Conlon MM, et al. CD63 Regulates Epstein-Barr Virus LMP1 Exosomal packaging, enhancement of vesicle production, and noncanonical NF- $\kappa$ B signaling[J]. *J Virol*, 2017, 91(5). DOI:10.1128/JVI.02251-16
- [24] Silva VO, Maia MM, Torrecilhas AC, et al. Extracellular vesicles isolated from *Toxoplasma gondii* induce host immune response[J]. *Parasite Immunol*, 2018, 40(9):e12571. DOI:10.1111/pim.12571
- [25] Protasio AV, van Dongen S, Collins J, et al. MiR-277/4989 regulate transcriptional landscape during juvenile to adult transition in the parasitic helminth *Schistosoma mansoni*[J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2017, 11(5):e0005559. DOI:10.1371/journal.pntd.0005559
- [26] Gu H, Wu L, Chen H, Huang Z, et al. Identification of differentially expressed microRNAs in the bone marrow of osteoporosis patients[J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(5):2940-2954.
- [27] Feng JL, Yang ZJ, Chen SP, et al. High throughput sequencing of small RNAs reveals dynamic microRNAs expression of lipid metabolism during *Camellia oleifera* and *C. meiocarpa* seed natural drying[J]. *BMC Genomics*, 2017, 18(1):546. DOI:10.1186/s12864-017-3923-z
- [28] Ling LZ, Zhang SD, Zhao F, et al. Transcriptome-wide identification and prediction of miRNAs and their targets in paris polyphylla var. yunnanensis by high-throughput sequencing analysis[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(1):219. DOI:10.3390/ijms18010219
- [29] Plotnikova OM, Skoblov MY. Efficiency of the miRNA-mRNA interaction prediction programs[J]. *Mol Biol (Mosk)*, 2018, 52(3):543-554. DOI:10.7868/S0026898418030187
- [30] Wang JD, Zhou HS, Tu XX, et al. Prediction of competing endogenous RNA coexpression network as prognostic markers in AML[J]. *Aging (Albany NY)*, 2019, 11(10):3333-3347. DOI:10.18632/aging.101985