

REV感染DF-1细胞分泌外体的生物信息学分析

王小满^{1,2#} 庄萍萍^{1#} 孙霞³ 杜旭升¹ 王晓宇¹ 成子强^{1,2} 王桂花^{1,2*}

(¹山东农业大学动物科技学院, 泰安 271018; ²山东省动物生物功能与疾病防治重点实验室, 泰安 271018;

³山东畜牧兽医职业学院, 潍坊 261061)

摘要 该研究探讨了REV感染DF-1细胞分泌外体携带表达差异的蛋白质和微RNA (microRNA, miRNA), 及其基因功能和参与的信号通路, 为病毒致病机制研究提供了基础。通过蛋白组学和转录组学检测技术, 筛选病毒感染组与对照组DF-1细胞分泌外体的差异蛋白质和miRNA, 并利用在线软件数据库对其进行GO功能富集和KEGG信号通路分析。结果筛选到101个差异表达蛋白质, 其中56个表达上调, 45个表达下调, 共参与155条信号通路, 参与蛋白质最多的是肿瘤相关通路; 并筛选到3个表达上调的miRNA, 其中miRNA-155、miRNA-146a-3p编码的靶蛋白(整合蛋白)与差异蛋白质肌动蛋白相关2/3复合体(actinrelated 2/3 complexes, Arp2/3)共同参与肌动蛋白细胞骨架信号通路; 差异蛋白质及miRNA编码靶基因均含有病毒成分, 并参与细胞信号转导、免疫、黏附、运动、生物调节等过程。该研究结果表明, REV感染DF-1细胞来源外体表达差异的蛋白质和miRNA及其参与的生物学过程和信号通路与肿瘤形成密切相关, 外体途径可能在REV致瘤机制中具有重要作用。

关键词 REV; 外体; 肌动蛋白细胞骨架信号通路; 致瘤性

Bioinformatics Analyses of Exosome from REV-Infected DF-1 Cells

Wang Xiaoman^{1,2#}, Zhuang Pingping^{1#}, Sun Xia³, Du Xusheng¹, Wang Xiaoyu¹, Cheng Ziqiang^{1,2}, Wang Guihua^{1,2*}

(¹College of Animal Science and Veterinary Medicine, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China;

²Shandong Provincial Key Laboratory of Animal Biotechnology and Disease Control and Prevention, Tai'an 271018, China;

³Shandong Vocational Animal Science and Veterinary College, Weifang 261061, China)

Abstract The study was to identify the differentially expressed proteins and microRNA (miRNA), their gene function and involved signal pathway of exosome from REV-infected DF-1 cells. The differential proteins and miRNA of exosome were screened between the virus infection group and control group by proteomics and transcription detection technology, and then analyzed with GO function enrichment and KEGG signal pathway database. The results demonstrated that 101 different expressed proteins were screened with 56 up-regulated and 45 down-regulated. These proteins were involved in 155 signal pathways, and the number of proteins involved in the cancer pathway was the highest. There was 3 up-regulated miRNA screened. Both the target proteins (integrins) of miRNA-155 and miRNA-146a-3p, and the differential protein actinrelated 2/3 complexes (Arp2/3) participated in actin cytoskeleton signal pathway. Otherwise, they contained viral components, and involved in cell signaling,

收稿日期: 2017-08-29 接受日期: 2017-10-19

山东省自然科学基金(批准号: ZR2017MC011)、山东省中青年科学家奖励基金(批准号: BS2013SW016)和山东省“双一流”奖补资金资助的课题

#共同第一作者

*通讯作者。Tel: 0538-8233881, E-mail: wguihua1126@163.com

Received: August 29, 2017 Accepted: October 19, 2017

This work was supported by the Shandong Provincial Natural Science Foundation (Grant No.ZR2017MC011), Promotive Research Fund for Young and Middle-aged Scientists of Shandong Province (Grant No.BS2013SW016) and Funds of Shandong “Double Tops” Program

#These authors contributed equally to this work

*Corresponding author. Tel: +86-538-8233881, E-mail: wguihua1126@163.com

网络出版时间: 2017-12-04 12:05:42 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20171204.1205.012.html>

immunization, adhesion, locomotion, biological regulation and other processes. These results suggested that the differentially expressed proteins and miRNA, their gene function and involved signal pathway of exosome from REV infected DF-1 cells were associated with tumor formation. Exosome pathway may play an important role in the REV tumorigenesis mechanism.

Keywords REV; exosome; actin cytoskeleton signal pathway; oncogenicity

网状内皮组织增生症病毒(reticuloendotheliosis virus, REV)是一种致瘤性的禽逆转录病毒, 主要引起禽群严重的免疫抑制^[1]。虽然REV感染机体引起的临床症状不明显, 但其诱导的免疫抑制会导致继发感染和混合感染频发, 因此, 其危害性不容小觑。我们在前期研究中发现, REV感染DF-1细胞后, 改变细胞分泌的外体的蛋白质组成和免疫调节功能, 感染细胞来源外体具有免疫抑制特性^[2], 外体途径在REV感染中的作用可见一斑, 但具体机制不明。

在生物体中, 蛋白质并不能独立行使其功能, 而是由不同蛋白质相互协调完成一系列生化反应或生物学功能。因此, 通路分析是更系统、全面地了解细胞的生物学过程或疾病的发生机理等最直接和必要的途径。REV利用外体途径, 可能就是通过改变外体蛋白质组成从而影响其参与的信号通路, 改变了机体内级联生物反应, 从而致病。此外, 由于miRNA具有组织特异性和时序性, 在不同组织或相同组织的不同时期, miRNA的表达都有可能存在差异, 而这些差异表达的miRNA往往在基因的调节方面具有十分重要的作用。因此, 探讨病毒感染后是否会引起细胞分泌外体携带miRNA发生改变, 变化的miRNA靶基因的功能及参与的信号通路, 对于揭示REV利用外体途径致病的分子机制具有重要意义。

本研究对REV感染DF-1细胞分泌的外体进行了蛋白组学和转录组学检测, 筛选差异表达蛋白质和miRNA, 并对筛选的蛋白质和miRNA靶基因的基因功能、信号通路进行结合分析, 探究蛋白质变化和miRNA变化间存在的共同点或交叉点, 为进一步深入揭示外体在REV致病机制中的作用研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 细胞和主要试剂

DF-1细胞购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心; DMEM、胎牛血清购自Gibco公司; 胰蛋白酶(trypsin)购自Amresco公司; FITC标记羊抗

鼠/抗兔IgG-FITC购自北京中杉金桥公司; 其他试剂均为国产分析纯; 外体及其RNA提取试剂盒均购自Invitrogen公司; 安捷伦2100 RNA Nano 6000 Assay试剂盒购自Agilent Technologies公司。

1.2 细胞培养及外体的提取

取对数生长期的DF-1细胞, 以 6×10^5 /mL的密度接种于25 cm²的细胞培养瓶, 于37 °C的CO₂培养箱中培养, 细胞完全贴壁后接种moi值为0.01~0.10的REV, 用1%胎牛血清的DMEM完全培养基培养2 h, 弃上清, 更换为5%血清的完全培养基, 5 d后收集细胞上清。未接种病毒的DF-1细胞作为对照。细胞上清以12 000 r/min离心30 min去除细胞碎片, 转移上清, 按照Total Exosome Isolation试剂盒的步骤从上清中提取外体。

1.3 外体的相对定量蛋白质组学(iTRAQ)分析

1.3.1 外体携带蛋白质的定量分析 取3个批次外体样品, 根据参考文献[2]提供的操作步骤, 蛋白质定量后, 取等量蛋白质进行SDS-PAGE分离、酶解、LC-MS/MS分析, 对合格样品进行iTRAQ肽段标记、强离子交换(SCX)色谱法分级、LC-MS/MS分析, 获得质谱原始数据。本研究使用高分辨质谱分析仪Q Exactive(Thermo Scientific)进行定量蛋白质组学分析。

1.3.2 质谱原始数据处理 使用Proteome Discoverer 1.4(Thermo Scientific)软件将Q Exactive产生的原始图谱文件, 提交到MASCOT 2.2服务器进行数据库检索, 根据FDR<0.01的标准对数据进行筛选。本研究使用的数据库为: uniprot-Gallusgalluschicken_REV_ALV_20151130_Combined.fasta(序列总数: 24235, 下载时间: 2015-11-30, 下载链接: <http://www.uniprot.org>)。

1.3.3 差异蛋白质的筛选 符合表达差异倍数大于1.2(上、下调), 且 $P < 0.05$ 筛选标准的蛋白质视为差异表达蛋白质。所定量到的蛋白质序列信息批量提取自UniProtKB数据库(版本号: 201602)。

1.4 外体的转录组学分析

1.4.1 外体总RNA的提取 参考Total Exosome

RNA and Protein Isolation试剂盒的步骤从3个批次外体样品中提取总RNA。微量分光光度计检测RNA的纯度,安捷伦2100 RNA Nano 6000 Assay试剂盒检测RNA样品的完整性和浓度。

1.4.2 文库构建与测序 总RNA样本检测合格后,首先对总RNA进行片段选择,收集18~30 nt或15~35 nt的RNA片段;然后逆转录成cDNA,进行PCR扩增建立测序文库;最后,对检验合格的测序文库进行Illumina HiSeq高通量测序。测序结果最初以原始图像数据存在,经过CASAVA进行碱基识别后转化为原始测序序列,我们称之为Raw Reads。对Raw Reads进行去接头、去低质量以及片段等处理,得到后续分析的目标序列。针对目标序列,对全部序列数量和对应的碱基数量进行统计,同时将拥有相同序列的序列聚为一类,然后统计序列种类及对应的碱基数量。通过统计目标序列中小RNA的长度分布,对测序数据有效性进行初步判断。动物小RNA序列峰值一般出现在22 nt(miRNA)和30 nt(piRNA)。

通过基因组比对分析软件Bowtie(1.1.2版),将测序结果与参考序列进行比对^[3],根据miRBase数据库(Release 21)中的基因组注释信息,鉴定已知miRNA。针对不能与已知序列匹配的,采用软件miRDeep2中的方法进行新miRNA的预测^[4]。

1.4.3 差异miRNA的筛选 采用软件DESeq进行miRNA表达量差异分析,差异miRNA筛选条件为 $P < 0.05$,并且 $|\log_2(\text{Fold_change})| \geq 1$ ^[5]。

1.5 生物信息学分析

对筛选的差异蛋白质以及差异miRNA编码靶基因进行生物学信息学分析,利用DAVID Bioinformatics Resources 6.7在线软件进行细胞组成(cellular component)、分子功能(molecular function)和生物学过程(biological process)聚类分析,获得差异分子相关功能的富集分类。使用KEGG在线软件(网址: <http://www.kegg.jp/kegg/kegg2.html>)进行通路注释,分析其参与的信号通路。

2 结果

2.1 差异蛋白质的GO功能富集分析

通过对蛋白质组学检测分析,筛选实验组与对照组的相对表达量比值在1.2倍以上、且差异具有统计学意义($P < 0.05$)的蛋白质作为表达差异蛋白质,共筛选到101个,其中表达上调的56个,表达下调的

45个。进一步对筛选的差异蛋白质进行GO功能富集分析。对GO第二层次的蛋白质统计发现,筛选的差异蛋白质共分为9大类,包括细胞成分、细胞器、大分子复合物、细胞外成分、膜成分、膜内陷管、病毒成分、细胞外基质、细胞连接成分;具有10种分子功能,包括结合、催化、结构分子活性、转运、酶调节、受体、分子转换器、核酸结合转录因子、翻译调节、防腐(图1)。参与15个生物学过程,包括细胞过程、单细胞生物过程、代谢、生物调节、细胞成分的形成或生物合成、定位、对刺激的反应、多细胞生物过程、信号、发育、免疫、多生物体过程、生物黏附、生长和运动。

2.2 差异蛋白质参与的信号通路分析

通过KEGG注释分析,差异蛋白质共参与156条信号通路,其中大于4个蛋白质参与的通路有15条(图2),主要集中在肿瘤通路、核糖体通路、黏着斑通路等。从表1中可以看出,IL-6参与9个信号通路,提示IL-6可能在不同信号通路的相互联系中起到关键作用,在REV感染过程中具有重要作用。

2.3 RNA的纯度与完整性

通过微量分光光度计检测提取RNA的纯度,结果显示,样品指标符合建库要求,可以尝试进行建库(表2)。由于从外体中提取的RNA样品的主要成分为小RNA分子,无法完全通过RNA完整性指数值判断样品完整性,因此,我们使用了Agilent 2100 Bioanalyzer进行了样品浓度与完整性检测。几乎所有RNA都分布在5S处,符合外体的miRNA特点,说明样品浓度达标,完整性良好,可以进行建库,进行进一步的检测、分析(图3)。

2.4 差异表达的miRNA

通过对miRNA进行表达量差异分析,筛选 $P < 0.05$,并且 $|\log_2(\text{Fold_change})| \geq 1$ 的miRNA作为表达差异miRNA。共筛选到3个表达显著上调的已知miRNA,其中miRNA-155表达上调16倍多,miRNA-146a-5p和miRNA-429-3p均表达上调7倍多,未筛选到表达下调的miRNA以及未知miRNA(表3)。

2.5 差异miRNA的GO功能富集分析

对筛选的3个差异表达miRNA靶基因预测后,进行GO功能富集分析(图4)。结果显示,预测的差异靶基因成分为16大类,包括细胞成分、细胞器、膜成分、大分子复合物、胞外区成分、细胞连接、突触、膜内陷管、细胞外基质、突触、胶原三聚体、细胞、

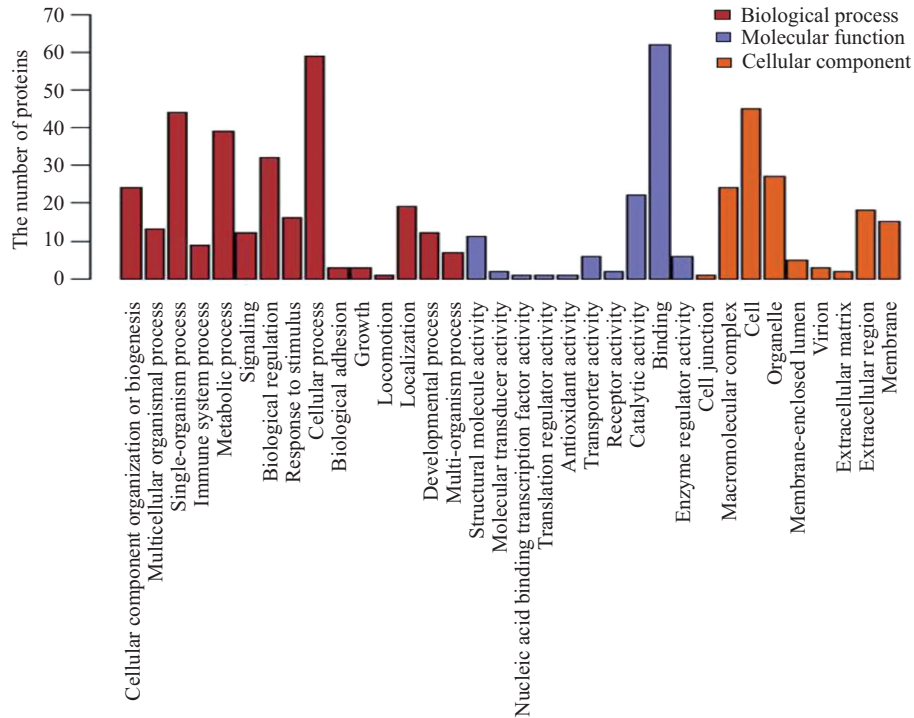


图1 差异蛋白质的GO功能富集分析

Fig.1 The GO function enrichment analysis of differential proteins

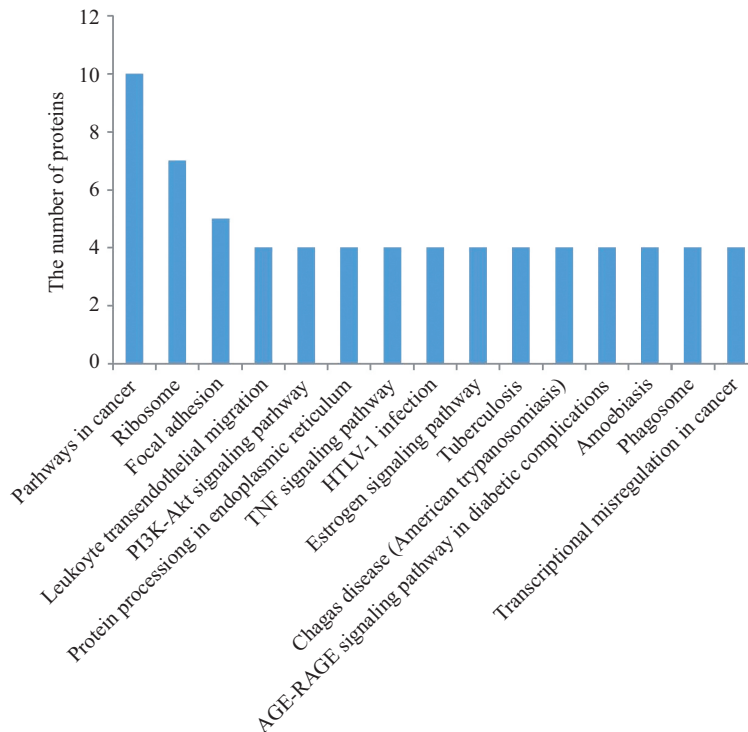


图2 大于4个差异蛋白质参与信号的通路

Fig.2 The number more than 4 of differential proteins involved in the signal pathway

线粒体黏附复合体、病毒包涵体、共质体、病毒成分。具有22个分子功能,包括结合、催化、分子功能调节、分子转换器、运输、核酸结合转录、蛋白

质结合转录、酶调节、结构分子、核苷酸交换、通路调节、受体调节、营养储备、排斥、翻译调节、趋化、金属伴侣、抗氧化、D-丙氨酸载体、形态发生、

表1 大于4个差异蛋白质参与的主要信号通路及差异蛋白质

Table 1 The number more than 4 of differential proteins involved insignal pathway and the proteins

通路登陆号 Map ID	通路名称 Map name	参与通路蛋白质名称 Protein name
ko05200	Pathways in cancer	↑: MMP9, CYC, GNAI, IL-6, CTNNA ↓: MMP2, JUP, GNAS, COL4A (F1P2Q3, F1P2R3)
ko03010	Ribosome	↑: RPS10, RPS14, RPS16, RPL6, RPL13, RPL15, RPL19
ko04510	Focal adhesion	↑: PARV ↓: COL4A (F1P2Q3, F1P2R3), THBS2S, ILK
ko04670	Leukocyte transendothelial migration	↑: MMP9, GNAI, CTNNA ↓: MMP2
ko04151	PI3K-Akt signaling pathway	↑: IL-6 ↓: COL4A (F1P2Q3, F1P2R3), THBS2S
ko04141	Protein processing in endoplasmic reticulum	↑: CALR, AAR1, STT3, CNAX
ko04668	TNF signaling pathway	↑: MMP3, MMP9, IL-6 ↓: TRADD
ko05166	HTLV-I infection	↑: CANX, SLC25A4S/ANT, CALR, IL-6
ko04915	Estrogen signaling pathway	↑: GNAS, MMP9, GNAI ↓: MMP2
ko05152	Tuberculosis	↑: IL-6, dnaK, CYC ↓: TRADD
ko05142	Chagas disease (American trypanosomiasis)	↑: GNAI, CALR, IL-6, GNAS
ko04933	AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications	↑: IL-6 ↓: MMP2, COL4A (F1P2Q3, F1P2R3)
ko05146	Amoebiasis	↑: IL-6, GNAS ↓: COL4A (F1P2Q3, F1P2R3)
ko04145	Phagosome	↑: CNAX, CALR, RPL6 ↓: THBS2S
ko05202	Transcriptional misregulation in cancer	↑: MMP3, MMP9, IL-6, JUP

表2 RNA的纯度检测

Table 2 The test of RNA purity

样品名 Name	浓度(pg/μL) Concentration (pg/μL)	总量(ng) Total (ng)	$D_{260/230}$	$D_{260/280}$	28S/18S	RIN	建库类型 Database type	判定结果 Result
Exo-N1	1116	91.3	0.1	1.8	0.3	3.9	Small RNA	B
Exo-N2	1366	54.6	0.1	1.8	0.3	4.0	Small RNA	B
Exo-N3	1494	64.2	0.1	1.8	0.3	3.9	Small RNA	B
Exo-R1	25762	1490.4	0.4	1.9	0.4	2.5	Small RNA	B
Exo-R2	33119	1511.4	0.7	1.8	0.5	2.5	Small RNA	B
Exo-R3	34351	1508.8	0.4	1.8	0.4	2.5	Small RNA	B

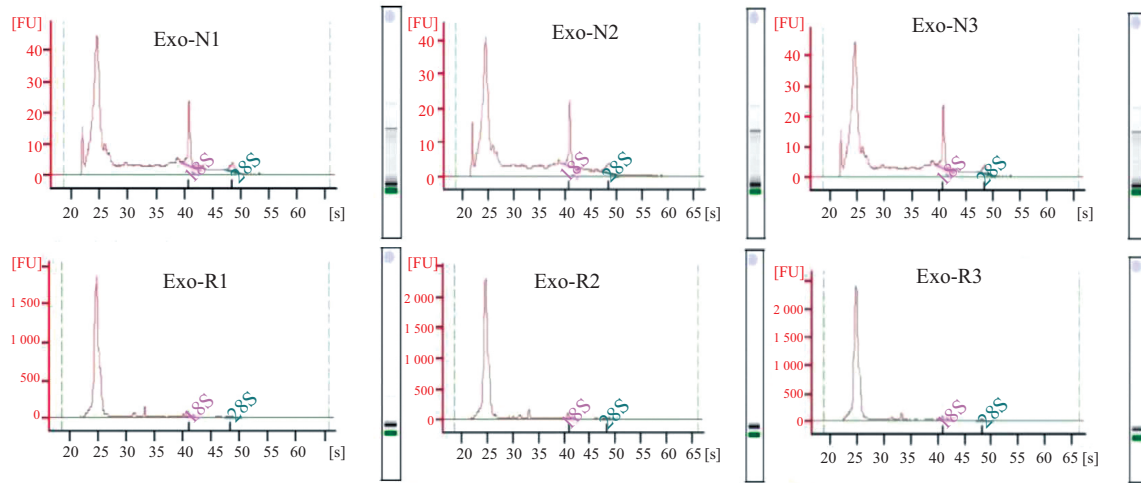
RIN: RNA integrity number, RNA完整性指数; Exo-N: 正常DF-1细胞来源外体中提取RNA; Exo-R: REV感染DF-1细胞来源外体中提取RNA, 1、2、3为3个样品号。样品判定结果A: 样品合格, 符合建库要求; B: 部分指标符合建库要求, 可尝试进行建库; C: 样品不合格, 建议重新送样。

RIN: RNA integrity number. Exo-N: RNA was isolated from normal DF-1 cell-derived exosome. Exo-R: RNA was isolated from REV infected DF-1 cell-derived exosome. 1, 2 and 3 were the number of samples. Sample judgment: A: sample was qualified and met the requirement of library building. B: some of index was met the requirement of database building, and library building can be tried. C: sample was not available, and it is recommended to re-send samples.

表3 不同来源外体差异表达的miRNA

Table 3 The differentially expressed miRNA in exosome

miRNA名称 miRNA	变化倍数 Fold change	P值 P value	变化 Up/down	差异性 Significant
gga-miR-155	16.22	0.000 759 504	Up	Yes
gga-miR-146a-5p	7.26	0.039 816 712	Up	Yes
gga-miR-429-3p	7.26	0.048 293 620	Up	Yes

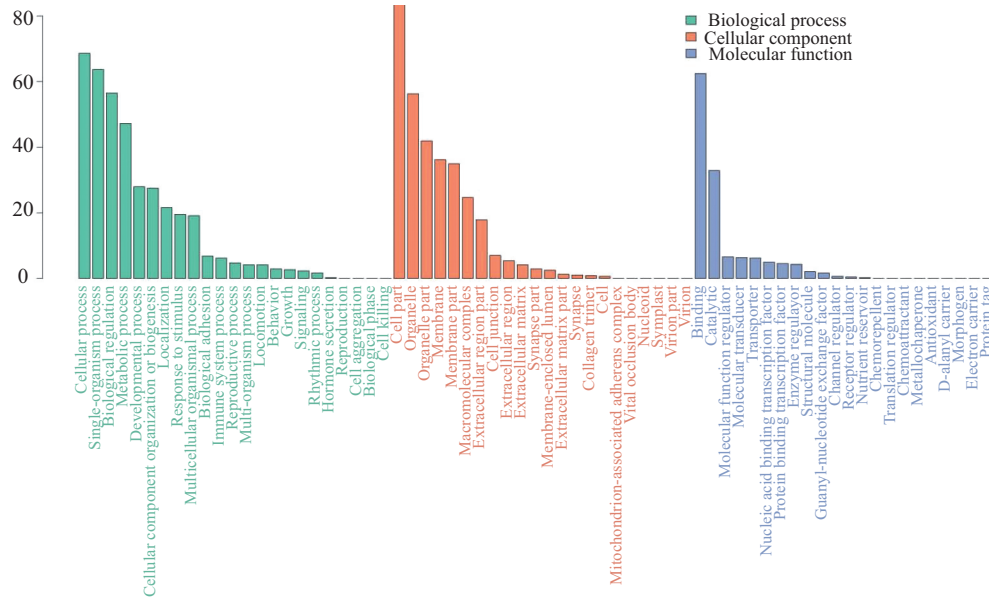


横坐标代表时间, 纵坐标代表5S、18S和28S的量。Exo-N: 正常DF-1细胞来源外体中提取RNA; Exo-R: REV感染DF-1细胞来源外体中提取RNA, 1、2、3为3个样品号。

The abscissa represented time, and the ordinate represented the amount of 5S, 18S and 28S; Exo-N: RNA was isolated from normal DF-1 cell-derived exosome; Exo-R: RNA was isolated from REV infected DF-1 cell-derived exosome. 1, 2 and 3 were the number of samples.

图3 RNA的浓度和完整性检测

Fig.3 The test of RNA concentration and integrity



横坐标为Ontology分类; 纵坐标数值为该Class中基因数占样本中所有Class基因数总和的百分比。

The abscissa was the classification of Ontology. The ordinate was the percentage of the number of target gene in class.

图4 miRNA靶基因GO功能富集分类柱状图

Fig.4 The GO function enrichment classification histogram of miRNA target gene

电子载体、蛋白质标签。参与23个细胞生物学过程, 包括细胞过程、单细胞生物过程、生物调节、代谢、发育、细胞成分的形成或生物合成、定位、对刺激的反应、多细胞起源、多细胞生物过程、生物黏附、免疫、生殖过程、多生物过程、运动、行为、生长、信号、周期性、激素分泌、再生、细胞聚集、生物相和细胞杀伤。

对差异表达miRNA编码靶基因进行KEGG注释, 发现靶基因参与2个信号通路, 肌动蛋白细胞骨架通路和细胞外基质受体互作通路。

3 讨论

机体内细胞生物学过程是一个庞大、精细又复杂的网络, 由蛋白质之间的相互协调作用完成, 任何

一个环节发生改变都可能会引起级联反应,从而导致机体从微观到宏观的机能变化,甚至疾病的发生。近年来,新兴的高通量基因芯片技术能够在整个基因组或者转录组水平上,从复杂庞大的信息数据中筛选出差异、有效的信息,有助于我们抽丝剥茧,探索疾病的发生、发展。本研究采用蛋白质组学和转录组学的方法检测、分析REV感染DF-1细胞分泌的外体携带差异表达的蛋白质和miRNA,并对筛选到的蛋白质和miRNA靶基因进行功能注释和参与信号通路分析。

通过对REV感染和未感染细胞分泌外体的比较,共筛选到101个差异表达蛋白,其中表达上调的56个,表达下调的45个;差异表达的miRNA有3个,全部表达上调。差异表达蛋白质变化最大的钙黏蛋白-13上调120倍^[2],miRNA变化最大的miRNA-155上调16倍。由此可见,REV感染对外体携带蛋白质的数量以及变化倍数影响更大。研究显示,外体在逆转录病毒感染机制过程中具有重要作用^[6-8]。REV感染后利用exosome途径,主要通过引起外体携带蛋白质变化还是miRNA变化而致病?还是二者变化后引起机体的共同生物学过程的改变而致病?我们对变化的蛋白质和miRNA编码的靶基因进行了成分和功能的分类,并对其参与的信号通路进行分析。结果发现,差异表达的蛋白质和miRNA靶基因,在成分、功能分类和参与的信号通路方面均有重叠性。这说明,REV可能通过蛋白质水平和miRNA水平两方面变化引起共同信号通路的改变,从而导致机体的免疫抑制或肿瘤形成。

通过对差异miRNA的靶基因与差异蛋白质参与信号通路的深入分析,发现miRNA-155和miRNA-146a-3p的靶蛋白整合蛋白(integrin、ITG α 1和ITG α 11)与差异蛋白质肌动蛋白相关2/3复合体(Arp2/3)共同位于肌动蛋白细胞骨架通路上。Arp2/3在肌动蛋白细胞骨架参与一些特殊细胞功能具有重要作用,包括细胞极性的建立、细胞运动等。而细胞骨架是细胞内运动、细胞器固定、细胞外型维持、信号传导和细胞分裂的物质基础之一。REV可能通过促进miRNA-155和miRNA-146a-3p的上调,引起靶蛋白整合蛋白的表达下调以及Arp2/3表达下调,改变肌动蛋白细胞骨架通路,从而导致细胞运动、信号传递等过程的改变、疾病的发生。肌动蛋白细胞骨架通路在REV感染过程中的作用机制有待进一步验证。

差异蛋白质和miRNA编码靶基因均包括病毒成分,参与细胞的信号转导、免疫、黏附、运动、生物调节等重要的生命过程,说明病毒通过蛋白质和miRNA两个合成过程将自身成分整合到外体途径中,参与细胞生物过程,在细胞间进行信息传递或转移。KEGG富集分析显示,差异蛋白质参与的信号通路主要集中在肿瘤通路、核糖体通路、黏着斑通路。参与肿瘤通路的基质金属蛋白酶9(matrix metalloproteinase 9, MMP9)表达上调对肿瘤形成具有促进作用^[9],而基质金属蛋白酶2(MMP2)表达下调则有抑制肿瘤的作用^[10],因此,究竟哪些差异蛋白质的变化对信号通路起到主宰作用有待验证。黏着斑(focal adhesion)是细胞与细胞外基质的主要连接方式,有利于维持细胞在运动过程中的张力以及细胞生存的信号传递,与肿瘤形成密切相关^[11]。研究显示,miRNA-155在多种肿瘤形成过程中作为癌基因发挥作用,促进肿瘤形成^[12]。由此可见,外体携带差异蛋白质和miRNA的变化对REV的致瘤性具有重要作用。

差异蛋白质参与的15个重要信号通路中,有IL-6参与的9个,提示IL-6可能在REV感染引起变化的不同信号通路的相互联系中起关键作用。研究显示,IL-6在逆转录病毒HIV感染过程中分泌增加,且血清中IL-6的高表达水平促进HIV引起的损伤^[13-14],IL-6在REV的感染机制中的作用有待进一步研究。

参考文献 (References)

- 1 Witter R, Fadly A. Reticuloendotheliosis virus. *Diseases of Poultry*, 11th ed. Ames: Iowa State University Press 2003, 517-36.
- 2 庄萍萍,王小满,孟薇,李根,成子强,王桂花. 网状内皮组织增生症病毒感染改变外分泌体蛋白质组成和免疫调节功能. *中国细胞生物学学报*(Zhuang Pingping, Wang Xiaoman, Meng Wei, Li Gen, Cheng Ziqianag, Wang Guihua. The infection of Reticuloendotheliosis virus changed the protein composition and immunomodulation of exosome. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2016; 38(6): 682-90.
- 3 Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol* 2009; 10(3): R25.
- 4 Friedlander MR, Mackowiak SD, Li N, Chen W, Rajewsky N. miRDeep2 accurately identifies known and hundreds of novel microRNA genes in seven animal clades. *Nucleic Acids Res* 2012; 40(1): 37-52.
- 5 Anders S, Huber W. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol* 2010; 11(10): R106.
- 6 Aqil M, Naqvi AR, Bano AS, Jameel S. The HIV-1 Nef protein binds argonaute-2 and functions as a viral suppressor of RNA

- interference. PLoS One 2013; 8(9): e74472.
- 7 Cheruiyot C, Pataki Z, Williams R, Ramratnam B, Li M. SILAC based proteomic characterization of exosomes from HIV-1 infected cells. J Vis Exp 2017; 3(121): e54799.
 - 8 Eleonora O, Claudia A, Francesco M, Simona A, Maurizio F. The contribution of extracellular Nef to HIV-induced pathogenesis. Curr Drug Targets 2016; 17(1): 46-53.
 - 9 Reggiani F, Labanca V, Mancuso P, Rabascio C, Talarico G, Orecchioni S. *et al.* Adipose progenitor cell secretion of GM-CSF and MMP9 promotes a stromal and immunological microenvironment that supports breast cancer progression. Cancer Res 2017; doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-0914.
 - 10 Guan H, Guo Z, Liang W, Li H, Wei G, Xu L. *et al.* Trop2 enhances invasion of thyroid cancer by inducing MMP2 through ERK and JNK pathways. BMC Cancer 2017; 17(1): 486.
 - 11 Yoon SO, Shin S, Karreth FA, Buel GR, Jedrychowski MP, Plas DR. *et al.* Focal adhesion- and IGF1R-dependent survival and migratory pathways mediate tumor resistance to mTORC1/2 inhibition. Mol Cell 2017; 67(3): 512-27.
 - 12 Kang L, Huo Y, Ji Q, Fan S, Yan P, Zhang C, *et al.* Noninvasive visualization of microRNA-155 in multiple kinds of tumors using a radiolabeled anti-miRNA oligonucleotide. Nucl Med Biol 2016; 43(2): 171-8.
 - 13 Manion M, Hullsiek KH, Wilson EMP, Rhame F, Kojic E, Gibson D, *et al.* Vitamin D deficiency is associated with IL-6 levels and monocyte activation in HIV-infected persons. PLoS One 2017; 12(5): e0175517.
 - 14 Nitkiewicz J, Borjabad A, Morgello S, Murray J, Chao W, Emdad L, *et al.* HIV induces expression of complement component C3 in astrocytes by NF- κ B-dependent activation of interleukin-6 synthesis. J Neuroinflammation 2017; 14(1): 23.