DOI:10.16016/j.1000-5404.201604067

海藻糖低温保存血小板 miRNA 差异表达分析

黄梅莓,王世春,张 强,宋 敏,吴建君,陈 敏,陈寒梅,李晨晨,张 丹,刁荣华,赵树铭 (400038 重庆,第三军医大学西南医院输血科,中国人民解放军重庆血站)

[摘要] **目的** 探讨海藻糖低温保存血小板过程中 miRNA 的变化。**方法** 收集 3 份来自相同血型无偿献血员的单采血小板,少量混匀后,平均分为 2 组。对照组:新鲜血小板组(22 ℃,100% 血浆储存的新鲜血小板 2 h);实验组:海藻糖低温保存血小板组(10 ℃,70% 海藻糖保存液储存 5 d);采用高通量测序方法对两组样品进行了 Small RNA 测序,进行生物信息分析,主要包括已知 miRNA 鉴定、miRNA 差异表达分析及富集分析。**结果** 2 组样品经 Small RNA 高通量测序,平均每个样品获得了 11 兆净读值(Clean reads),经过生物信息分析,分别获得了 821 个已知 miRNA。通过差异表达分析,在已知的 miRNA 中共有 460 个差异表达 miRNA,其中 194 个 miRNA 表达上调,266 个 miRNA 表达下调,其中显著差异表达已知 miRNA 共 44 个,分别在钙离子通路、MAPK 通路、凋亡路径、轴突导向等储存损伤相关路径中富集程度较高。相对于对照组,实验组中 hsa-miR-4449、hsa-miR-1296 表达显著上调($P<0.01$,且差异倍数 >2),hsa-miR-665 表达被抑制。**结论** 血小板经过海藻糖低温保存后的 miRNA 呈现出特征性表达变化,提示 miRNA 活动参与了低温时海藻糖对血小板储存损伤的保护作用。

[关键词] 血小板;血小板储存损伤;miRNA;高通量测序
[中图法分类号] R331.143;R394.2;R457.12 [文献标志码] A

Differential expression profiles of platelet miRNAs after trehalose cryopreservation

Huang Meimei, Wang Shichun, Zhang Qiang, Song Min, Wu Jianjun, Chen Min, Chen Hanmei, Li Chenchen, Zhang Dan, Diao Ronghua, Zhao Shuming (Department of Blood Transfusion, Chongqing Blood Station of PLA, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the changes of platelet microRNAs duing trehalose cryopreservation. **Methods** Three bags of apheresis platelets derived from 3 healthy volunteer blood donors of same blood type were firstly mixed well, and subsequently distributed into the control group (22 ℃, with 100% plasma for 2 h) and the experimental group [10 ℃, with 70% trehalose preservation solution (TPS) for 5 d]. High throughput small RNA sequencing was applied to the 2 groups of platelets, and then the obtained bioinformatic data were analyzed, including known miRNAs identification, differential expression analysis and KEGG pathway analysis. **Results** High throughput small RNA sequencing obtained 11 million clean reads data for each sample, and bioinformatic analysis identified 821 known miRNAs. In the known miRNAs, a total of 460 miRNAs were differentially expressed, among which 194 were up-regulated and 266 down-regulated. Among these miRNAs, 44 known microRNAs had significant differences in expression level, and they were respectively enriched in the signaling pathways relative to storage impairment, such as calcium signaling pathway, MAPK pathway, apoptotic pathway and axon guidance. Compared to the control group, the expression levels of hsa-miR-4449 and has-miR-1296 were up-regulated significantly in experiment group ($P<0.01$, with a fold change of >2), but the expression of hsa-miR-665 was suppressed. **Conclusion** After low temperature storage in TPS, platelets have distinctive profiles of differences in miRNAs expression, which suggested that miRNAs are involved in the protection of trehalose to platelet impairment in low temperature.

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81270649)
[通信作者] 赵树铭,电话:(023)68754270,E-mail:shumingzhao123@qq.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20160601.0840.009.html (2016-06-01)

[**Key words**] platelets; platelet storage impairment; microRNA; high throughput sequencing

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81270649). Corresponding author: Zhao Shuming, Tel: 86-23-68754270, E-mail: shumingzhao123@qq.com

血小板在保存过程中结构和功能会随着时间延长而发生变化,这些改变统称为储存损伤(platelet storage lesion,PSL)[1]。常规的血小板保存条件为22 ℃振荡保存5 d。为了减少血小板的储存损伤,人们尝试采用低温保存方法,低温保存虽可以延长血小板保存时限,但低温易致血小板发生活化,使其在输注到受者体内后失效并很快被清除[2]。研究表明,加入海藻糖能抑制血小板储存过程中的损伤及减少凋亡的发生[3-5],其具体机制还有待进一步阐明。微小RNA(microRNA,miRNA)是一类由内源基因编码的长度为21~22个核苷酸的非编码单链RNA分子,是小分子非编码RNA(small non-coding RNAs,sncRNAs)的一种,主要功能是靶向抑制特异的信使RNA(mRNA)参与胞内的调控过程,参与机体的多种生物学过程[6-8];血小板中含有丰富的miRNA[9],在血小板储存损伤的过程中起重要作用[10-11]。血小板miRNA与储存损伤的研究多基于PCR或者芯片方式[12],本研究使用第2代高通量测序技术,通过检测海藻糖低温保存血小板时的miRNA表达改变,为进一步探索海藻糖保护低温血小板的分子机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

1.1.1 仪器设备 高速冷冻离心机(J6-MC,BECKMAN,美国),无菌接驳机(TSCD-Ⅱ,TERUMO,日本),血小板震荡保存仪(SJM-ID,三江,潍坊),超净工作台(HD-650,苏净安泰,苏州),测序平台(Hiseq4000,Illumina,美国),RNA检测仪(angilent2100,angilent,上海),RNA浓度检测仪(Nanodro2000,Thermo,加拿大)等。

1.1.2 试剂耗材 海藻糖(中诺,南宁),TRIzol RNA提取试剂盒(TIANGEN,北京),Small RNA建库试剂盒(Illumina,美国)等。

1.2 血小板样品的来源与处理

1.2.1 血小板样品采集分组 单采血小板由机采血小板采集仪采集,随机留取同1 d来自于3个同血型健康无偿献血者的血小板20 mL等量混合,平均分成两份每份30 mL,完全随机法进入两组(即对样品编号,随机抽取随机数对应,再将数字由小到大排序后分别进入对照组和实验组)。对照组:22 ℃震荡保存2 h;实验组:使用海藻糖低温保存法10 ℃震荡保存5 d。

1.2.2 海藻糖低温保存 实验组经230×g离心8 min,去除70%血浆(约21 mL),加入事先配置的70%海藻糖添加液(pH=7.0,约21 mL)替代,彻底重悬后37 ℃孵育4 h载入海藻糖,然后置于低温(10 ℃)震荡保存5 d。

1.3 RNA提取与建库测序

RNA提取:对照组于当天留取样本提取总RNA。实验组于海藻糖低温保存法保存血小板5 d后留取样本提取总RNA。具体方法为TRIzol提取Total RNA,检测浓度和完整性后,回收长度在18~30 nt的小RNA用于建库测序。small RNA建库测序的步骤:利用Small RNA Sample Pre Kit试剂盒对样品进行3′和5′接头的连接,然后依次进行RT-PCR、库检、PCR扩增和PAGE胶电泳分离目的大小片段回收,最后上机测序。

1.4 生物信息分析

1.4.1 与基因组比对分析 原始数据过滤得到净读值(Clean reads),通过SOAP(V2.20)比对的方法将small RNA定位到参考基因组上,分析small RNA在基因组上的表达和分布情况,本研究使用人类基因组第19版(hg19)。

1.4.2 小RNA分类注释 将获得的净读值分别与重复序列、miRBase、Rfam(Rfam 11.0)和GenBank数据库进行比对,对获得的small RNA进行全面分类注释,尽可能地发现并去除其中可能的rRNA、scRNA、snoRNA、snRNA、tRNA。

1.4.3 已知miRNA鉴定 依靠与miRBase数据库(miRBase 21.0)中人的已知miRNAs比对的结果来进行分析的,综合前体和成熟体两方面比对情况得到人血小板中miRNA的表达结果。

1.4.4 miRNA表达谱构建 miRNA差异表达分析首先要构建表达谱,将miRNA与miRBase中该物种已知的miRNA前体/miRNA成熟序列进行比对,结果将显示匹配上的小RNA的详细情况,每个miRNA的表达量按照比对情况进行加和计算得出。

1.4.5 miRNA差异表达分析 对照组和实验组样品中表达的miRNA统计,用t检验判断在两样品之间的表达量差异是否有统计学意义,并分别使用log2比率、散点图比较两者共同表达的miRNA表达量的差异。

1.4.6 显著差异表达miRNA靶基因富集分析 首先通过miRBase数据库中的软件及数据,对显著差异

表达的 miRNA 进行靶基因预测,将预测的靶基因序列使用 Blast 软件比对到 NR 库,然后根据差异表达基因列表,使用 blast 软件将靶基因比对到 KEGG 数据库中,得到基因的信号通路注释信息。然后根据差异表达基因列表,应用超几何检验进行差异表达基因的信号通路富集分析。

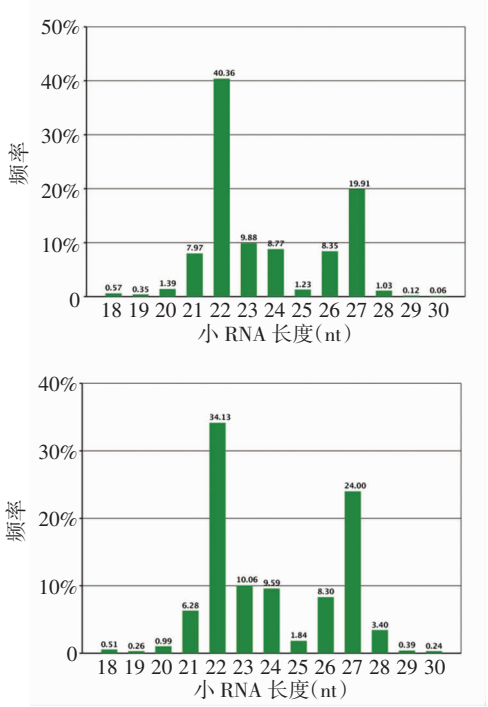
2 结果

2.1 血小板小 RNA 测序评估及长度分布

原始数据会包含一定的低质量、污染读值,因此分析前需对数据进行过滤处理。经过过滤后,对照组和实验组样品分别获得了 11 兆净读值(Clean reads),见表 1。两组 Q30 均在 94% 以上,表明测序质量较高。小 RNA 的长度分布,见图 1,通过图示可以看出,对照组和处理组的长度分布相似且主要长度集中在 22 nt。提示样品及测序结果比较理想,质量较高。

表 1 血小板小 RNA 测序数据统计结果

组别	原始读值	Q20(%)	Q30(%)	净读值	唯一净读值
对照组	13,205,701	96.08	94.53	11,255,694	109,400
实验组	13,305,205	95.88	94.32	11,474,474	129,456



A:对照组;B:实验组

图 1 评估两组血小板小 RNA 测序长度的分布

2.2 血小板小 RNA 与人类基因组比对分析

血小板小 RNA 与参考基因组 hg19 比对结果,见表 2。对照组和实验组样品通过高通量测序得到的总读值与参考基因组 hg19 的比对率达 88% 以上。唯一小 RNA 是样本中除去两样本共有部分的特有 RNA。

表 2 血小板小 RNA 与参考基因组 hg19 比对统计结果

组别	唯一小 RNA	唯一比对上的读值	唯一比对率(%)	总小 RNA	总比对上的读值	总比对率(%)
对照组	109,400	33,290	30.43	11,255,694	9,958,866	88.48
实验组	129,456	48,637	37.57	11,474,474	10,150,346	88.46

2.3 血小板小 RNA 分类注释

对血小板小 RNA 进行分类注释,对照组包含 6、516、284 条 miRNA,占总小 RNA 的 57.89%;实验组包含 5、882、250 条 miRNA,占总小 RNA 的 51.26%。

2.4 已知 miRNA 鉴定

依靠与 miRBase 数据库(miRBase 21.0)中人类已知 miRNA 比对的结果进行分析,综合前体和成熟体两方面比对情况得到该物种 miRNA 的表达情况。

表 3 血小板已知 miRNA 鉴定结果

组别	miRNA	miRNA 前体	miRNA-5p	miRNA-3p	匹配上 miRNA 前提的 unique sRNAs
物种总 miRNA	821	1881	879	888	-
对照组表达	128	682	370	370	4,636
实验组表达	118	692	386	367	4,686

2.5 miRNA 差异表达分析

通过构建表达谱得到每个样品中每个 known miRNA 表达量,通过 log2-ratio、Scatter plot 图比较两者共同表达的 miRNA 表达量的差异。比较血小板对照组和经过海藻糖保护液低温保存的处理组中 miRNA 的表达量,分析发现,known miRNA 中共有 460 个差异表达 miRNA,其中 194 个 miRNA 表达上调,266 个 miRNA 表达下调;见图 2,在图中越靠近图的左右两端和图顶端的 miRNA,差异越显著且置信度越高。通过 miRNA 差异表达分析,筛选条件为:t 检验 $P \leqslant 0.05$ 且 $|\log2\text{Ratio}| \geqslant 1$,一共获得,44 个显著差异表达的已知 miRNA,如 hsa-let-7b-3p、hsa-miR-301a-3p、hsa-miR-493-3p 等。

2.6 差异表达已知 miRNA 的靶基因富集分析

对显著差异表达的 44 个已知 miRNA 进行靶基因预测,经比对统计靶基因,对靶基因进行 KEGG 信号通路富集分析。44 种差异显著已知 miRNA,预测靶基因分布在 270 个信号通路,通过 Q 值和靶基因数目评估富集前 20 位如图 3 所示。

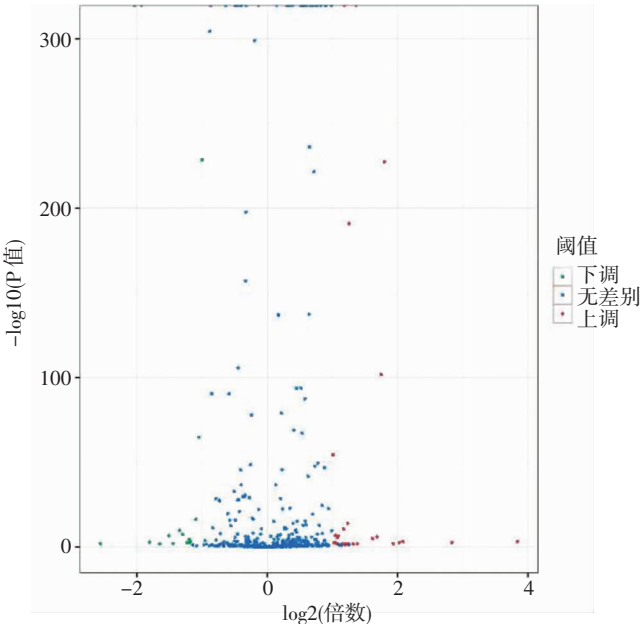


图 2 血小板对照组与实验组 miRNA 差异表达分析

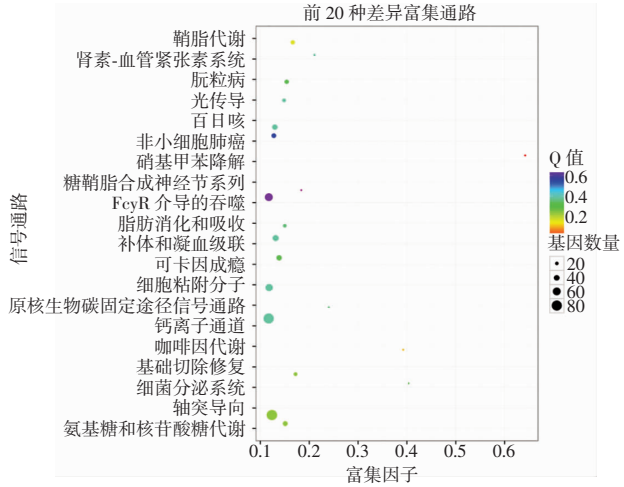


图 3 海藻糖低温保存血小板差异已知 miRNA 靶基因 KEGG 富集的结果(富集程度前 20)

3 讨论

血小板细胞中虽然没有细胞核和基因组 DNA,但是已经有研究证明血小板中含有比较丰富的微小 RNA(miRNA)[6]。自从 2006 年首次报道 miRNA 参与调控血小板生成以来,血小板中 miRNA 的重要调控功能越来越重视,其相应的调控机制也研究越来越深入[10]。Dahiya 等[9]对储存离体储存不同时间的血小板 miRNAs 和 mRNAs 进行了组学分析,分析其相互作用联系,确定了那些未经报道的证明 miRNAs 确实在血小板储存活动中起重要作用。

本研究通过高通量测序的方法研究了经过海藻糖低温储存后,血小板 miRNA 的表达差异情况,发现多个储存损伤相关信号通路出现差异,包括钙离子通道、凋亡路径、MAPK 通路、轴突导向通路等,其中多种相关 miRNA 表达出现改变,如 hsa-miR-4449、hsa-miR-1296 显著上调,hsa-miR-665 表达被抑制,说明其均在海藻糖低温保存血小板过程中发挥重要作用。

与对照组相比,实验组发现了多个 miRNA 与储存损伤变化紧密相关。血小板在离体保存过程中所发生的功能和结构的变化,包括一些类似细胞凋亡现象[2],统称为储存损伤。hsa-miR-4449 同时调控钙离子通道多种蛋白、血小板表面糖蛋白 CD42、轴突导向通路中的 Rho 激酶(ROCK)、血小板蛋白激酶 C(PKC)和凋亡蛋白酶活化因子-1(Apaf-1)的表达。hsa-miR-4449 靶向调控 CD42,即血小板的表面血管性假血友病因子的受体,它随血小板聚集活性增高时表达增强[14],实验组较之对照组 hsa-miR-4449 显著增高,说明 CD42 表达明显上调血小板聚集活性增强,符合储存损伤趋势。hsa-miR-4449 另一靶蛋白 ROCK 可调节细胞肌动蛋白骨架,参与血小板激活细胞骨架重构过程。除了 hsa-miR-4449,hsa-miR-589-3p、hsa-miR-6862-5p 和 hsa-miR-1296-5p 均显著上调,他们靶向调控钙离子通路的多种蛋白,这与学者们报道的血小板保存后 Ca^{2+} 浓度增加相符,钙离子通道激活表达上调后,也激活 Fc-γ 受体介导的吞噬通路[15]和 MAPK 通路,最后调节肌动蛋白,细胞骨架重塑,促进吞噬的发生,这个过程与储存损伤是一致的。蛋白激酶 C(PKC)信号传导途径参与 T 细胞的增殖和凋亡过程,介导细胞凋亡的途径主要有 Fas/FasL 途径、TNFR/TNF 途径等,而以 Fas/FasL 途径介导的细胞凋亡紊乱是体液和细胞免疫失调的主要原因[16]。Fas-L 是 hsa-miR-1296-5P 的靶基因,hsa-miR-1296-5p 在储存后血小板内显著高表达,激活 Fas/FasL 介导的细胞凋亡发生。同时 hsa-miR-4449 的又一靶蛋白 Apaf-1 是多种凋亡活动的发动者,在多种细胞中作为自抑制单位存在,成为凋亡体后能募集激活凋亡蛋白酶(Caspase)[17]。Liu 等将海藻糖加入保护液用于冷藏血小板,观察到保存过程中 Bcl-xl 降低和 Bax 升高都是最缓慢的,表明海藻糖在很大程度上起到了抑制血小板储存过程中的损伤乃至凋亡的发生[3]。我们同样注意到,实验组虽然出现了多种促凋亡现象,但是与其他研究不同,我们发现调控 NF-κB 的 miRNA——hsa-miR-665 下调并不明显,NF-κB 能促进幸存基因 BCL-xl 的表达。并且差异 miRNA 的靶基因里不包括幸存基因 Bcl - xl,为海藻糖低温储存法保护血小板储存损伤提供了支持。

Canault 等[18]研究发现在 22℃及 37℃不同储存条件下,血小板 p38 MAPK 信号通路被激活,推测 p38

MAPK 信号通路参与了血小板储存损伤的发生[19]。实验组 miRNA 的靶基因在 MAPK 通路中富集程度较高,多个靶基因出现了上调,涉及的 miRNA 主要有 hsa-miR-4449、hsa-miR-3177、hsa-miR-150-3p 等多个已知 miRNA。hsa-miR-4449 和 hsa-miR-3177 分别靶向调控 MEK/ERK 通路和 MKK/JNK 通路,在实验组中二者均出现显著差异。相对地,调控 MKK/p38MAPK 通路的 miRNA 反而没有差异。该发现说明 p38-MAPK 信号通路有可能参与了海藻糖对血小板储存损伤的保护机制。

另外,hsa-miR-1296-5p 显著上调,增强血小板膜糖蛋白 CD9 表达,其拷贝数相当于 GPⅡbⅢa,以及 hsa-let-7b 表达增强也与之前报道相符,也发现实验中 hsa-miR-1468-5p 抑制 PI3K 表达。

本研究初步探讨了海藻糖低温保存血小板前后 miRNA 表达差异,为探索海藻糖低温保护血小板的机制奠定了基础。后期可进一步结合蛋白组数据、大样品量高通量测序结果,深度挖掘血小板储存分子机制,从而探索优质高效的血小板储存方法,提高临床用血小板制剂的质量。

参考文献:

[1] Mittal K, Kaur R. Platelet storage lesion: An update [J]. Asian J Transfus Sci, 2015, 9(1): 1 - 3. DOI: 10.4103/0973-6247.150933

[2] Tablin F, Wolkers W F, Walker N J, *et al*. Membrane reorganization during chilling: implications for long-term stabilization of platelets [J]. Cryobiology, 2001, 43(2): 114 - 123. DOI: 10.1006/cryo.2001.2355

[3] 王昕, 史蓉华, 李静, 等. 改良血小板添加液低温液态保存血小板的形态及功能研究[J]. 中国实验血液学杂志, 2009, 17(3): 797 - 801.

[4] Wang X, Fan Y, Shi R, *et al*. Quality assessment of platelets stored in a modified platelet additive solution with trehalose at low temperature (10 ℃) and *in vivo* effects on rabbit model of thrombocytopenia[J]. Platelets, 2015, 26(1): 72 - 79. DOI: 10.3109/09537104.2013.872772

[5] Landry P, Plante I, Ouellet D L, *et al*. Existence of a microRNA pathway in anucleate platelets [J]. Nat Struct Mol Biol, 2009, 16(9): 961 - 966. DOI: 10.1038/nsmb.1651

[6] Cho W C. MicroRNAs: potential biomarkers for cancer diagnosis, prognosis and targets for therapy[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2010, 42(8): 1273 - 1281. DOI: 10.1016/j.biocel.2009.12.014

[7] Simon L M, Edelstein L C, Nagalla S, *et al*. Human platelet microRNA-mRNA networks associated with age and gender revealed by integrated plateletomics [J]. Blood, 2014, 123(16): e37 - e45. DOI: 10.1182/blood-2013-12-544692

[8] Wang Y, Gao X, Wei F, *et al*. Diagnostic and prognostic value of circulating miR-21 for cancer: a systematic review and meta-analysis[J]. Gene, 2014, 533(1): 389 - 397. DOI: 10.1016/j.gene.2013.09.038

[9] Dahiya N, Sarachana T, Vu L, *et al*. Platelet MicroRNAs: An Overview [J]. Transfus Med Rev, 2015, 29(4): 215 - 219. DOI: 10.1016/j.tmrv.2015.08.002

[10] Yu S, Deng G, Qian D, *et al*. Detection of apoptosis-associated microRNA in human apheresis platelets during storage by quantitative real-time polymerase chain reaction analysis [J]. Blood Transfus, 2014, 12(4): 541 - 547. DOI: 10.2450/2014.0291-13

[11] Liu Q, Xu L, Jiao S X, *et al*. Trehalose inhibited the phagocytosis of refrigerated platelets *in vitro via* preventing apoptosis[J]. Transfusion, 2009, 49(10): 2158 - 2166. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2009.02254.x

[12] Koboldt D C, Steinberg K M, Larson D E, *et al*. The next-generation sequencing revolution and its impact on genomics [J]. Cell, 2013, 155(1): 27 - 38. DOI: 10.1016/j.cell.2013.09.006

[13] Devine D V, Serrano K. The platelet storage lesion[J]. Clin Lab Med, 2010, 30(2): 475 - 487. DOI: 10.1016/j.cll.2010.02.002

[14] 李怀营, 余唯琪, 庞立红等. 高胆红素血症新生儿血小板活化率与心肌酶的关系[J]. 实用儿科临床杂志, 2009, 24(18): 1421 - 1422.

[15] Corrotte M, Nyguyen A P T, Harlay M L, *et al*. Ral isoforms are implicated in FcγR-mediated phagocytosis: Activation of phospholipase D by RalA[J]. The Journal of Immunology, 2010, 185(5): 2942 - 2950. DOI: 10.4049/jimmunol.0903138. Epub 2010 Aug 2

[16] Arnsten A F T. Stress signalling pathways that impair prefrontal cortex structure and function[J]. Nature Reviews Neuroscience, 2009, 10(6): 410 - 422. DOI: 10.1038/nrn2648

[17] Zhou M, Li Y, Hu Q, *et al*. Atomic structure of the apoptosome: mechanism of cytochrome c-and dATP-mediated activation of Apaf-1 [J]. Genes & development, 2015, 29(22): 2349 - 2361. DOI: 10.1101/gad.272278.115. Epub 2015 Nov 5

[18] Canault M, Duerschmied D, Brill A, *et al*. p38 mitogen-activated protein kinase activation during platelet storage: consequences for platelet recovery and hemostatic function *in vivo*[J]. Blood, 2010, 115(9): 1835 - 1842. DOI: 10.1182/blood-2009-03-211706

[19] Beaulieu L M Freedman J E. p38: signaling improved platelet storage? [J]. Blood, 2010, 115(9): 1665 - 1666. DOI: 10.1182/blood-2009-12-259259

(**收稿**:2016-06-10;**修回**:2016-08-16)

(编辑 栾 嘉)