



血小板环状 RNA 研究进展*

邹 燕 刘立民 覃凤娴 王贵生**

(广西医科大学第四附属医院医学检验科, 柳州 545005)

摘要 血小板环状 RNA (platelet circular RNA, platelet circRNA) 是一类在血小板中由 RNA 反向剪切封闭形成的环形 RNA 分子, 具有结构稳定、丰度高以及细胞、组织特异性。血小板环状 RNA 可以参与细胞内 RNA 调控网络, 与疾病的发生和发展密切相关, 可能成为新型的生物标记物及治疗靶点。近年来, 关于血小板环状 RNA 产生、调控、生物学特性、功能及其与疾病的关系等均取得了初步的研究进展。本文将对血小板环状 RNA 的研究进展予以综述。

关键词 血小板环状 RNA, 研究进展, 生物学作用

中图分类号 Q522

DOI: 10.16476/j.pibb.2018.0160

环状 RNA (circular RNA, circRNA) 是一类在真核细胞中广泛存在的非编码 RNA, 结构稳定, 与多种疾病的发生发展、生物组织发育及细胞衰老等相关, 具有广阔的应用空间^[1]。circRNA 具有细胞类型特异性表达的特点, 如在脑和体液 (血液) 中。Memczak 等^[2]对人类外周全血中的 RNA 进行测序, 结果显示超过 100 种 circRNA 的表达量明显高于对应的 mRNA。另外有研究在人类唾液中发现 circRNA, 这提示 circRNA 在不同生物样本中的表达差异使其可能成为用于疾病诊断、组织发育鉴定等方面理想的生物标记物, 并有可能成为有效的治疗靶点。

血小板 (platelet, PLT) 是哺乳动物血液中的有形成分之一, 是从骨髓成熟的巨核细胞胞质裂解脱落下来的具有生物活性的小块胞质^[3], 血小板寿命很短, 只有 8~11 天, 在止血、促进伤口愈合和新生血管的生成中具有重要作用, 没有细胞核的血小板抑制了 RNA 的新陈代谢^[4] 但却仍然可以进行翻译^[5], 而且含有多种非编码序列, 如转运 RNA (tRNA)、微小 RNA (microRNA) 和长链非编码 RNA (long noncoding RNA)^[6]。最近研究提示, 血小板中含有大量的 circRNAs。RNA 测序数据显示, circRNAs 在人类血小板中的表达量是对应有核组织的 17~188 倍, 外显子含量是对应有核组织的 12.7 倍, 而且在人和小鼠中均存在 circRNAs

的差异性表达^[7-8]。血小板属无核细胞, 其转录组已失去超过 90% 的前体 mRNA^[9], 而血小板 circRNA 被认为在血小板转录中具有重要的作用^[10]。血小板 circRNA 的表达量丰富, 其必将具有重要的作用, 因此我们就血小板 circRNA 的研究进展作如下综述。

1 血小板 circRNA 的产生机制

在血小板中 DNA 可以转录形成不成熟的 mRNA (pre-mRNA), 然后剪接形成成熟的 mRNAs, mRNAs 发生转录后迅速被降解, 这也就解释了为什么转录组与蛋白质组表达之间并不一致^[11], 在这一过程中如果发生了血小板 mRNA 反向剪接形成环状结构就形成了 circRNAs (图 1)^[9]。我们观察到, 相对于有核细胞, 在血小板中含有大量的 circRNAs, 所以 circRNAs 的形成很有可能是线性 mRNA 退化的一种形式。另外, 血小板中大量的 circRNAs 是否是在巨核细胞中产生的呢? circRNAs 在成熟的血小板中的含量要远远

* 广西医科大学青年科学基金 (GXMUYSF201639), 广西重点研发计划项目 (桂科 AB17292055) 和柳州市科学研究与技术开发计划课题 (2017BH20306) 资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 0772-3815334, E-mail: marszhouyan@126.com

收稿日期: 2018-10-29, 接受日期: 2018-11-13

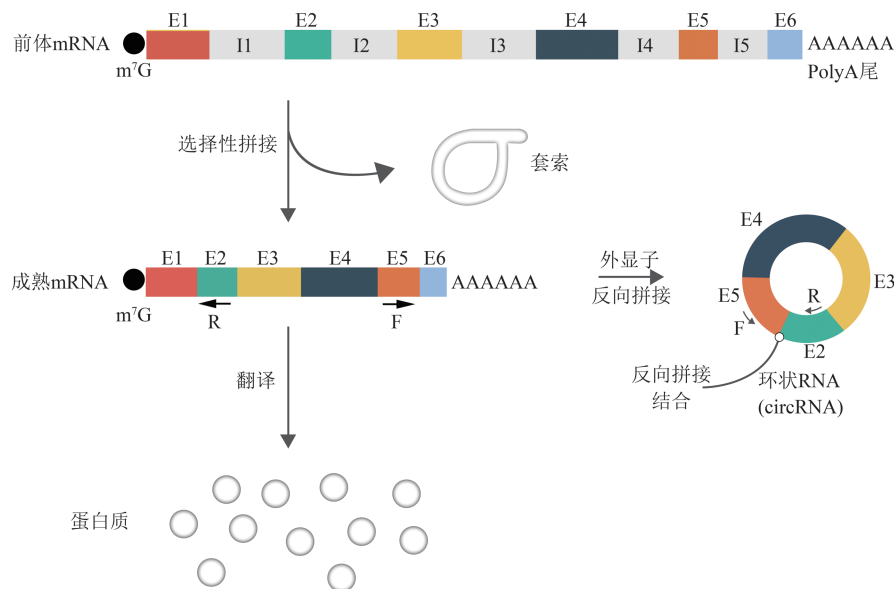


Fig. 1 Possible mechanisms for formation of platelet circRNA^[9]

图1 血小板circRNA的产生机制^[9]

E: 外显子; F: 上游; I: 内含子; m⁷G: 7-甲基鸟嘌呤核苷酸帽子; R: 下游.

多于血小板的前体细胞巨核细胞, 而且巨核细胞中缺乏 circRNAs 从头合成基因的转录, 说明 circRNAs 是在血小板中形成的而不是来自于巨核细胞. 另外, circRNAs 连接点基因 MAN1A2 在血小板中的表达量要远远高于其线性 mRNA, 这又为 circRNAs 的形成提供了有利的条件^[11]. 与此同时多个信号通路也参与到了 circRNAs 的形成过程^[12]. RNA 结合蛋白如 Quaking 和 Muscleblind 可以通过与 circRNAs 的侧翼序列 motif 相结合来调控人类 circRNAs 的生物学特性, 敲减 Quaking 的表达后会同时降低 circRNAs 的表达水平^[13].

2 血小板circRNA的作用及作用机制

血小板中表达多达 3 324 种 circRNAs, 如此丰富的 circRNAs 必然会具有重要的生物学功能及作用, 现就目前研究所提及的血小板 circRNA 的作用及作用机制总结如下:

2.1 血小板circRNA与miRNA相互作用

血小板中的 microRNA (miRNA) 具有重要的调控作用^[4], 血小板 circRNA 的 3' UTRs 区长度是

有核细胞的 2 倍 (1 047 个核苷酸 vs 492 个核苷酸)^[14], 而 3' UTRs 区又含有 miRNA 结合位点, 从而与 miRNA 相互作用. 在有核细胞中, circRNAs 充当了 miRNA 海绵的作用, 在血小板中含有大量的 circRNAs 和 miRNA 也具有类似的功能而发生相互作用^[15].

2.2 血小板circRNA具有调节转录的功能

Maass 等^[16] 研究表明, 血小板中 circRNAs 的表达水平高于其他组织, 如: circRNA ACVR2A、SMARCA5、PTPN12 和 TTN 的表达水平远远高于其 mRNA 水平. 血小板 circRNA SMARCA5 与其线性 mRNA 之比可达 151 : 1. 鉴于血小板缺乏细胞核却可以发生转录和翻译^[17-18], 有研究者假设 circRNAs 可以作为翻译的模板来调控转录, 并在人和苍蝇中得到了证实^[19].

2.3 血小板circRNA可以作为检测mRNA稳定性及血小板寿命的标志物

circRNAs 在人类血小板中含量丰富, 用 RNase R 消化去除线性 mRNA 后血小板中的 circRNAs 含量还要比有核组织高 14~26 倍. 在血小

板中, circRNAs 的含量与 mRNA 稳定性密切相关, mRNA 越稳定其环化形成 circRNAs 的可能性越大, 所以 circRNAs 的表达量也就间接反映了 mRNA 的稳定性. 也有研究证实了阻止转录可以增加 circRNA 水平^[20]. 而且, 血小板 circRNA 可以抵抗核酸外切酶的降解, 相对于线性的 mRNA 更适合作为基因组缺少转录时检测 mRNA 稳定性的标志物. 另外, 有研究表明血小板 circRNA 可能影响血小板的功能和寿命^[21], 所以血小板 circRNA 可以作为判断血小板寿命长短的一种标志物.

2.4 血小板 circRNA 可以作为一种新型诊断标志物

血小板可以释放大量的细胞外囊泡 (EVs), EVs 被认为是 RNA 的一种降解途径, 循环血浆中 25% 的 EVs 来自于血小板^[22-23]. 所以, 对于 EVs 功能及内容物的研究已经成为当前研究的一个新热点. 有研究通过密度梯度离心法获取血小板来源的外泌体和 EVs, 进一步进行 RNA-seq 测序发现, 血小板中的 circRNAs 都可包装入外泌体和 EVs 中, 并可选择性释放出来, 表明其存在特殊的分选机制, 如: 血小板特异性 circRNA Plt-circR4 就不能被优先释放进外泌体, 而 ASAP1 来源的 circRNA 就可以在 EVs 中优先释放. 鉴于血小板在止血, 伤口愈合和癌症转移等方面都具有重要作用, 提示血小板 circRNA 在这些过程中可能具有重要功能, 是非常有潜力的诊断标志物, 极具研究价值^[24]. 如在腺苷脱氨酶缺乏性严重免疫缺陷 (adenosine deaminase - deficient, severe combined immunodeficiency ADA - SCID) 中可以检测到 ROBO1、CDC42BPA 和 TNFRSF11A 来源的

circRNA, 在湿疹血小板减少伴免疫缺陷综合征中可以检测到 ROBO1 和 CDC42 来源的 circRNA. 而且血小板本身就可以作为一种外泌体, 选择性地传递某种特异的 circRNAs 对于来自周围环境的信号做出相应的反应, 被称为 “tumour-educated” 血小板^[25], 所以血小板 circRNA 将有可能成为判断血小板生物学功能及相关疾病诊断的新型标志物.

3 血小板 circRNA 的研究策略

血小板 circRNA 来源于血小板, 研究它就首先要从外周血中分离血小板, 分离血小板的方法较多, 可手工制备也可应用全自动血细胞分离仪及其配套设备一次性分离血小板^[26]. 对于分离血小板来源的 EVs 中 circRNA 的方法也已有详细报道 (图 2)^[24]. 然后从分离出的血小板中提取总 RNA 并逆转录成 cDNA 后应用相应 circRNAs 引物扩增出目的 circRNAs, 用于后续研究. 目前, 关于 circRNAs 表达及功能研究的技术手段已经比较成熟和深入, 血小板 circRNA 作为 circRNAs 的一种同样适用于 circRNAs 的研究方法, 其主要研究技术包括了实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR)、基因芯片分析 (genechip analysis)、RNA 印迹 (Northern blot)、荧光原位杂交技术 (fluorescence *in situ* hybridization, FISH) 及生物素偶联 circRNA 捕获 (biotin-coupled circRNA capture) 等. 除检测 circRNA 自身的表达外, 使用这些表达分析技术同时还可以检测 circRNA 与相关 miRNA 的表达量, 深入研究 circRNA 吸附 miRNA 分子的 “海绵” 作用, 也是相关研究需要关注的一个方向. 此外, 还可以利用

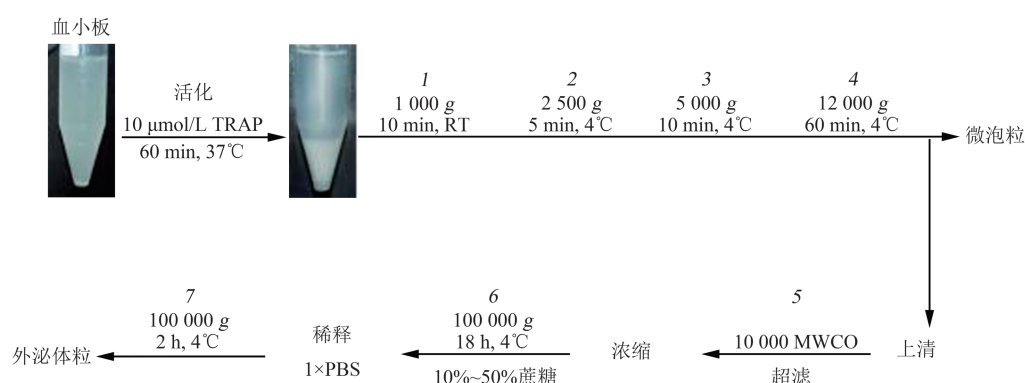


Fig. 2 Isolation of platelet-derived EVs^[24]

图2 血小板来源的EVs的分离方法^[24]

TRAP: 凝血酶受体激活肽; PBS: 磷酸盐缓冲液; RT: 常温; MWCO: 截留分子质量.

过表达或基因敲低的方法,探究血小板 circRNA 在组织或机体中起到的作用,但其他相关方法的研究尚需补充.

4 问题与展望

目前 circRNAs 的研究已成为一大研究热点,其研究方法和策略将为我们所关注的血小板 circRNA 的研究提供坚实的基础.而且血小板 circRNA 的表达特点和特性也提示其具有一定的研究前景.虽然相关研究尚有很多不足,还不能断言血小板 circRNA 一定可以被应用于疾病的诊断与治疗及其他领域,但血小板 circRNA 无疑是非常有价值的研究对象,或许可以为 circRNAs 的研究与应用带来突破性进展.但是,血小板 circRNA 的检测和应用尚存在一些问题.其一,要成功检测到血小板 circRNA 首先要获得高纯度的血小板,血小板的分离虽然不难但是就现有的分离血小板的方法和仪器来说尚有提升的空间,血小板纯度的提高将更有利于我们从血小板中分离目的 circRNA,才能为后续的研究提供可靠的基础.其二,由于血小板 circRNA 的系统研究及其与疾病的关系研究刚刚起步,如果能将研究较为成熟的 miRNA 与血小板 circRNA 的关系探究得更加具体,或许能找到血小板 circRNA 与疾病的直接联系,就可为血小板 circRNA 与疾病的关系及其作为标志物领域的研究(诊断、靶向治疗等)打开一个新的局面.其三,还有一些疑问有待于进一步研究,例如:血小板中是否含有 RNA 结合蛋白基因,在人类的上皮间质转化(EMT)中对大量的 circRNAs 进行调控^[13]?在血小板中 circRNAs 应该不只是 mRNA 降解的产物,它还具有哪些我们尚不清楚的作用^[27]?血小板 circRNA 是否与种族、性别、年龄、健康状况相关?小动物模型(如小鼠)的血小板中是否含有 circRNAs?如果有并且很丰富,我们就可以进行体内研究.

参 考 文 献

- [1] Han B, Chao J, Yao H. Circular RNA and its mechanisms in disease: From the bench to the clinic. *Pharmacology & Therapeutics*, 2018, **187**: 31-44
- [2] Memczak S, Papavasileiou P, Peters O, *et al.* Identification and characterization of circular RNAs as a new class of putative Biomarkers in human blood. *Plos One*, 2015, **10**(10): e0141214
- [3] Deutsch V R, Tomer A. Megakaryocyte development and platelet production. *British Journal of Haematology*, 2006, **134**(5): 453-466
- [4] Ple H, Landry P, Benham A, *et al.* The repertoire and features of human platelet microRNAs. *Plos One*, 2012, **7**(12): e50746
- [5] Weyrich A S, Schwertz H, Kraiss L W, *et al.* Protein synthesis by platelets: historical and new perspectives. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*: JTH, 2009, **7**(2): 241-246
- [6] Bray P F, Mckenzie S E, Edelstein L C, *et al.* The complex transcriptional landscape of the anucleate human platelet. *BMC Genomics*, 2013, **14**: 1
- [7] Memczak S, Jens M, Elefsinioti A, *et al.* Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency. *Nature*, 2013, **495**(7441): 333-338
- [8] Salzman J, Gawad C, Wang P L, *et al.* Circular RNAs are the predominant transcript isoform from hundreds of human genes in diverse cell types. *Plos One*, 2012, **7**(2): e30733
- [9] Alhasan A A, Izuogu O G, Al-Balool H H, *et al.* Circular RNA enrichment in platelets is a signature of transcriptome degradation. *Blood*, 2016, **127**(9): e1-e11
- [10] Provost P. Platelets enrich their transcriptome circle. *Blood*, 2016, **127**(9): 1080-1081
- [11] Denis M M, Tolley N D, Bunting M, *et al.* Escaping the nuclear confines: signal-dependent pre-mRNA splicing in anucleate platelets. *Cell*, 2005, **122**(3): 379-391
- [12] Chen L L. The biogenesis and emerging roles of circular RNAs. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2016, **17**(4): 205-211
- [13] Conn S J, Pillman K A, Toubia J, *et al.* The RNA binding protein quaking regulates formation of circRNAs. *Cell*, 2015, **160**(6): 1125-1134
- [14] Dittrich M, Birschmann I, Pfrang J, *et al.* Analysis of SAGE data in human platelets: features of the transcriptome in an anucleate cell. *Thrombosis and Haemostasis*, 2006, **95**(4): 643-651
- [15] Hansen T B, Jensen T I, Clausen B H, *et al.* Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges. *Nature*, 2013, **495**(7441): 384-388
- [16] Maass P G, Glazar P, Memczak S, *et al.* A map of human circular RNAs in clinically relevant tissues. *Journal of Molecular Medicine*, 2017, **95**(11): 1179-1189
- [17] Bugert P, Dugrillon A, Gunaydin A, *et al.* Messenger RNA profiling of human platelets by microarray hybridization. *Thrombosis and Haemostasis*, 2003, **90**(4): 738-748
- [18] Machlus K R, Thon J N, Italiano J E, Jr. Interpreting the developmental dance of the megakaryocyte: a review of the cellular and molecular processes mediating platelet formation. *British Journal of Haematology*, 2014, **165**(2): 227-236
- [19] Pamudurti N R, Bartok O, Jens M, *et al.* Translation of circRNAs. *Molecular Cell*, 2017, **66**(1): 9-21 e27
- [20] Jeck W R, Sorrentino J A, Wang K, *et al.* Circular RNAs are abundant, conserved, and associated with ALU repeats. *RNA*, 2013, **19**(2): 141-157
- [21] Sunderland N, Skroblin P, Barwari T, *et al.* MicroRNA biomarkers and platelet reactivity: the clot thickens. *Circulation Research*, 2017, **120**(2): 418-435

-
- [22] Aatonen M T, Ohman T, Nyman T A, *et al.* Isolation and characterization of platelet-derived extracellular vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles*, 2014, **3**
- [23] Arraud N, Linares R, Tan S, *et al.* Extracellular vesicles from blood plasma: determination of their morphology, size, phenotype and concentration. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2014, **12**(5): 614-627
- [24] Preusser C, Hung L H, Schneider T, *et al.* Selective release of circRNAs in platelet-derived extracellular vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles*, 2018, **7**(1): 1424473
- [25] Best M G, Sol N, Kooi I, *et al.* RNA-Seq of tumor-educated platelets enables blood-based pan-cancer, multiclass, and molecular pathway cancer diagnostics. *Cancer Cell*, 2015, **28**(5): 666-676
- [26] Amisten S. A rapid and efficient platelet purification protocol for platelet gene expression studies. *Methods in Molecular Biology*, 2012, **788**: 155-172
- [27] Li Z, Huang C, Bao C, *et al.* Exon-intron circular RNAs regulate transcription in the nucleus. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2015, **22**(3): 256-264

Research Progress on Platelet circRNA*

ZOU Yan, LIU Li-Min, QIN Feng-Xian, WANG Gui-Sheng**

(Medical Science Laboratory, The Fourth Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Liuzhou 545005, China)

Abstract Platelet circular RNA (platelet circRNA) is a kind of circular RNA molecules formed by RNA "back-splicing" and closing, which has stable structure, high abundance, and cellular and tissue specificity. Platelet circRNA can regulate intracellular network, and is closely related to the occurrence or progression of various diseases. Its difference in expression may make it to be ideal biomarker and therapeutic target. In recent years, research achievements on its production, regulation, biological characteristics, functions as well as its relationship with diseases have been made. Here we present a review of progress in platelet circRNA research.

Key words platelet circular RNA, research progress, biological function

DOI: 10.16476/j.pibb.2018.0160

* This work was supported by grants from Youth Science Foundation of Guangxi Medical University (GXMUYSF201639), Key R & D Projects in Guangxi (guikeAB17292055) and Project of Scientific Research and Technology Development in Liuzhou (2017BH20306).

** Corresponding author.

Tel: 86-772-3815334, E-mail: marszouyan@126.com

Received: October 29, 2018 Accepted: November 13, 2018