

· 经验交流 ·

血小板中 hsa_circ_0060079 的生物信息学分析与验证

郝秀芳 俞露 邓刚

环状 RNA (circular RNA, circRNA) 是一类高度保守、高稳定性的非编码 RNA, 可作为 miRNA 海绵通过吸附 miRNA 调控其靶基因的表达, 从而调控其他相关 RNA 的表达水平^[1]。circRNA 呈封闭环状结构, 不受 RNA 外切酶影响, 表达更稳定, 不易降解。近年的研究表明, circRNA 分子富含 miRNA 结合位点, 在细胞中起到 miRNA 海绵的作用, 能阻断或降低 miRNA 对基因的抑制作用, 从而促进靶基因的表达^[2]。在前期研究中, 发现血小板中存在多种凋亡相关 miRNA^[3], 其中 miR-326 可通过靶向 Bcl-xL 诱导血小板凋亡^[4]。circRNA 以竞争性内源 RNA 方式结合 miRNA 影响其对靶基因的抑制作用。本次研究采用 miR-326 seeds 互补序列 CCCAGAG, 对 circbank 数据库中的 circRNA 序列进行反向检索, 分析发现 hsa_circ_0060079 具有 42 个 miR-326 的结合位点, 可能以 miRNA 海绵形式调控 miR-326 影响血小板凋亡。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 材料 研究起止时间为 2019 年 3 月至 2021 年 5 月, 在宁波市中心血站进行本次研究。血小板来源于无偿献血志愿者。

1.2 生物信息学分析 通过 circBASE 数据库获取 hsa_circ_0060079 的序列信息。利用在线 microRNA 预测工具 (genie. weizmann. ac. il / pubs / mir07 / mir07_prediction.html) 分析 hsa_circ_0060079 剪接序列中 miR-326 的可结合位点数, 并计算 hsa_circ_0060079 对于 miR-326 的吸附效能, 即 miRNA 可结

合位点数目 $\times$ miRNA 序列长度 / circRNA 序列长度。通过 CircSponge 数据库, 分析 hsa_circ_0060079 与 RNA 结合蛋白 (RNA-binding proteins, RBPs) 的互作网络。

1.3 血小板中 hsa_circ_0060079 的检测

1.3.1 血小板的纯化及 RNA 的提取 机采血小板中含有少量白细胞及红细胞, 采用抗白细胞特异性抗原 CD45 免疫磁珠和抗红细胞特异性抗原 CD235 免疫磁珠, 通过反向分选法纯化血小板。流式细胞仪鉴定 CD61 阳性细胞 (血小板) $>99\%$, CD235 阳性细胞 (红细胞) 及 CD45 阳性细胞均 $<0.5\%$ 。纯化的血小板采用 Trizol 提取总 RNA。

1.3.2 PCR 验证 为明确血小板中是否存在 hsa_circ_0060079, 通过在线网站 <https://circinteractome.nia.nih.gov>, 针对 circRNA 全长序列设计 divergent 引物及 convergent 引物, 序列信息详见表 1。对血小板总 RNA 进行 Rnase R 消化后 (37 °C 孵育 3 h), 采用随机六聚体引物合成 cDNA, 使用 divergent 引物及 convergent 引物进行 PCR 验证。

表 1 引物序列

引物名称	碱基序列	类别
F-primer	AAGCCAGTGTCTCAGCTCT	divergent 引物
R-primer	TTCTCCTGAACCTCCTGCTC	
F-primer2	GCCTTGAGCCAGACCAGAAT	convergent 引物
R-primer2	GAAGCTTGTGGAGGGCAGAT	

1.4 hsa_circ_0060079 结合 miR-326 的双荧光素酶实验 根据 circRNA-PLT01 与 miR-326 结合序列的信息, 设计目标序列和突变序列, 化学合成目的基因片段, 合成时在目的片段两端加上 XhoI、NotI 酶切位点。合成的基因片段平端克隆到 PUC57 载体, 然后测序验证。分别采用 XhoI 和 NotI 对目的片段载体及 psiCHECK-2 载体双酶切, 1% 琼脂糖凝胶电

DOI: 10.13558/j.cnki.issn1672-3686.2022.003.017

基金项目: 宁波市自然科学基金 (2019A610268; 2019A610273);
宁波市公益项目 (2019C50083)

作者单位: 315000 浙江宁波, 宁波市中心血站输血研究所

通讯作者: 邓刚, Email: 80625346@qq.com

泳,使用QIAquick Gel Extraction Kit(QIAGEN)并回收酶切产物,T4 DNA Ligase 连接目的片段与的 psi-CHECK-2 载体。将连接产物转化 DH5 α 感受态细胞,接种于含氨苄青霉素的 Luri-Bertani 平板,37 ℃ 生化培养箱过夜培养。筛选阳性克隆并经 XhoI+NotI 双酶切电泳鉴定及测序验证。人工合成 miR-326 及 miR-NC(阴性对照),与上述构建成功的质粒以 lipofectamine™2 000 共转染 MEG01 细胞,每组 3 个平行孔,通过观察荧光变化明确 circRNA-0060079 与 miR-326 的结合情况。

2 结果

2.1 靶向 miR-326 的 circRNA 生物信息学预测 hsa_circ_0060079 剪接序列长度为 3603 bp,位于 chr20: 34082350-34092833,来源于 CEP250 基因(RefSeq: NM_007186),包含有 42 个 miR-326 可结合位点数, circ-0060079 的结合效能 0.26,其结合效能接近于小鼠体内经典的 miRNA 海绵的结合效能 0.31。推测 hsa_circ_0060079 与 miR-326 具有较高的结合效率,具备成为 miRNA 海绵的结构基础。

2.2 hsa_circ_0060079 的 RBPs 分析见图 1

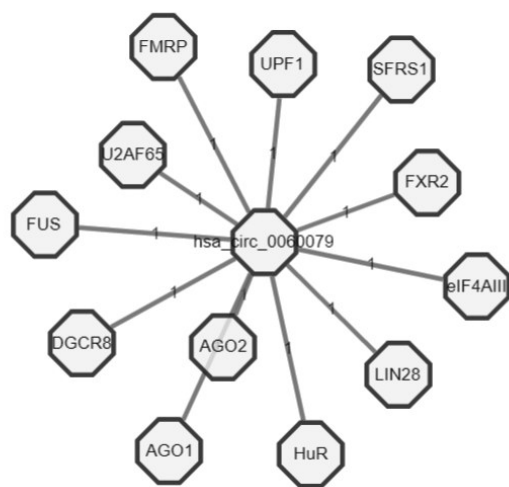
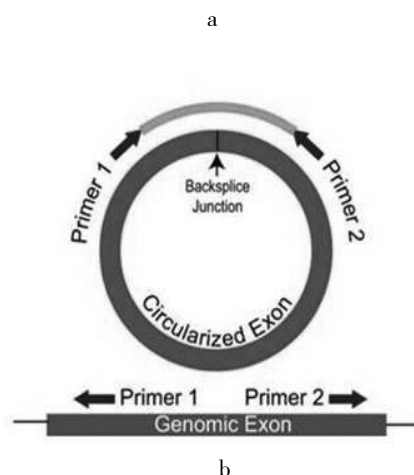
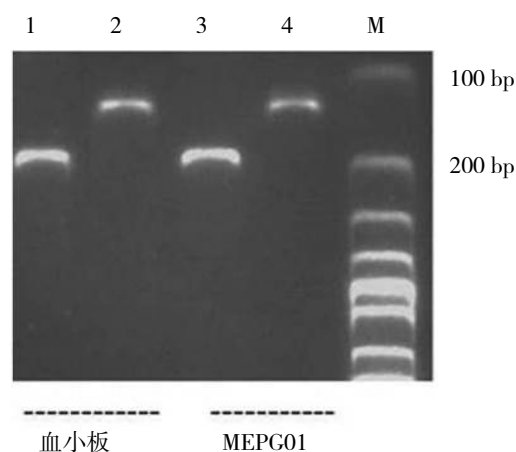


图1 hsa_circ_0060079 的 RBPs 分析图

由图 1 可见, hsa_circ_0060079 可与 12 个常见的 RBPs 发生相互作用,但 hsa 结合力普遍不高,其结合位点均为 1 个。

2.3 血小板中 hsa_circ_0060079 的检测结果见图 2

由图 2 可见,血小板及巨核细胞系 MEG01 中存在引物 convergent primer 及 divergent primer 的特异性扩增产物,证实血小板及巨核细胞系 MEG01 中存在有 hsa_circ_0060079 的表达。



注:a为PCR验证实验电泳结果,其中M泳道为marker,1和3泳道为 convergent primer 验证结果;2和4泳道为 divergent primer 验证结果。b为引物设计示意图。

图2 hsa_circ_0060079 PCR 验证实验电泳结果及引物设计示意图

2.4 双荧光素酶检测结果 双荧光素酶检测 hsa_circ_0060079 与 miR-326 有着较高的结合效率。

3 讨论

近年来,凋亡作为血小板的死亡方式逐渐被学者所认识^[5,6],研究发现无论血小板还是巨核细胞,其凋亡主要由线粒体介导的内始式途径调控^[7]。线粒体凋亡途径取决于 Bcl-2 家族促凋亡因子 Bak/Bax 与抗凋亡因子 Bcl-xL 之间的平衡^[8],其中 Bcl-xL 被认为是内始式凋亡途径的分子开关,是血小板存活的关键调控蛋白,它可以通过与 Bak/Bax(促凋亡因子)结合抑制细胞凋亡,而抑制 Bcl-xL 则可以诱导血小板凋亡^[9]。

Hansen 等^[7]研究发现剪接序列长度为 1485 nt 的环状 RNA-CDR1as(也称为 ciRS-7),在其序列上有超过 60 个保守的 miR-7 结合位点,因此起到有

效的 miR-7“海绵”作用,影响 miR-7 靶基因活性。此外,序列长度为 1188 nt,含有 16 个 miR-138 结合位点的的 ci-Sry 也被证实起到 miR-138 海绵作用。研究表明, circRNA 可以 miRNA 海绵的方式结合 miRNA 影响其对靶基因的抑制作用,且 circRNA 对特定 miRNA 的海绵效应可能与其剪接序列长度及相应的 miRNA 可结合位点数目密切相关。

血小板中是否存在可高效吸附 miR-326 的 circRNA? 研究通过 circRNA-seq 发现血小板中存在着大量的 circRNAs,通过 find_circ 软件分析共找到 34175 个 circRNA,约 70%与已知报道的 circRNA 一致(与 circBank 数据库比对)。进一步采用生物信息学分析找出包含有 miR-326 seeds 互补序列 CCCAGAG 的 circRNAs,采用 Online microRNA prediction tool 分析上述 circRNAs 拼接序列中 miR-326 可结合位点数,发现 hsa_circ_0060079,拼接序列长度为 3603 bp,包含有 42 个 miR-326 可结合位点数,推测 hsa_circ_0060079 与 miR-326 可能具有较高的结合效率。进一步检测发现在血小板及巨核细胞系 MEG01 细胞中均有 circRNA-0060079,而 RBPs 网络分析表明 hsa_circ_0060079 可能并不是通过与 RBPs 相互作用的方式发挥作用,可能还是以 miRNA 海绵方式来抑制 miRNA 功能参与血小板的功能调控。进一步通过双荧光素酶实验证实 hsa_circ_0060079 与 miR-326 具有相互作用,有着较高的结合效率。由此提出 circRNA-0060079 有可能通过 miRNA sponge 形式调控 miR-326,进而影响 Bcl-xL 表达在 ITP 病理机制中发挥重要作用。

目前, circRNAs 的研究已成为研究热点,被认为是理想的生物标志物,但对于血小板 circRNA 的相关研究尚有很多不足。高纯度的血小板是成功检测到血小板 circRNA 前提条件,本次研究采用免疫磁珠反向筛选去除了富血小板血浆中混杂的红细胞与白细胞,确保了结果的可靠性。本次研究对 circRNA-0060079 进行了初步鉴定和生物信息学分析,但对于 circRNA-0060079 在血小板中的具体作

用尚有待进一步深入研究,尚不清楚 circRNA-0060079 是否只是 mRNA 降解的产物,其表达情况是否与种族、性别、年龄、健康状况相关。在今后研究中将通过构建 circRNA-0060079 过表达载体和血小板凋亡模型,通过相关实验进一步证实其对血小板凋亡基因调控,从而探讨其是否可能成为免疫性血小板减少症紫癜靶向治疗的新工具。

参考文献

- 1 Zhuo WY, Cai ZR, Liu J, et al. Circular RNA: metabolism, functions and interactions with proteins[J]. Mol Cancer, 2020, 19(1): 172.
- 2 Ramanathan S, Palanivel V, Dhandapani R, et al. The circular RNA-miRNA axis: A special RNA signature regulatory transcriptome as a potential biomarker for OSCC [J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2020, 22(4): 352-361.
- 3 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.
- 4 Yu S, Huang H, Deng G, et al. miR-326 targets antiapoptotic Bcl-xL and mediates apoptosis in human platelets [J]. PLoS One, 2015, 10(4): e0122784.
- 5 Zhou YX, Du YJ, Yang X, et al. Circular RNAs function as ceRNAs to regulate and control human cancer progression[J]. Mol Cancer, 2018, 17(1): 79.
- 6 Qi XL, Zhang DH, Wu N, et al. ceRNA in cancer: Possible functions and clinical implications[J]. J Med Genet, 2015, 52(10): 710-718.
- 7 Hansen TB, Jensen T, Clausen BH, et al. Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges[J]. Nature, 2013, 495(7441): 384-388.
- 8 Dahiya N, Sarachana T, Vu L, et al. Platelet microRNAs: An overview[J]. Transfus Med Rev, 2015, 29(4): 215-219.
- 9 Neu CT, Gutschner T, Haemmerle M. Post-transcriptional expression control in platelet biogenesis and function[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(20): 7614.

(收稿日期 2022-02-01)

(本文编辑 高金莲)