

血小板储存损伤的蛋白质组学研究进展*

张洪为 综述, 黄远帅[△] 审校

(西南医科大学附属医院输血科, 四川泸州 646000)

关键词: 血小板储存损伤; 蛋白质组学; 血小板活化; 功能

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2017.18.029

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2017)18-2582-03

近年来,蛋白质组学作为分析特定状态下一种细胞或一个生物体上所有蛋白质的方法,其在输血医学上的应用越来越深入^[1]。很多研究利用蛋白质组学技术对血浆、红细胞和血小板等血液制品的蛋白质水平进行了系统深入的分析^[2-4]。血小板在血栓形成和止血过程中起着关键作用。输注血小板对于进行外科手术、患有癌症或血小板减少症的患者来说,有挽回性命的作用。但是,血小板在体外储存的时间很短,(22±2)℃下储存 5 d。而且,血小板在储存过程中发生了一系列不良变化,导致血小板结构和功能发生渐进性损伤,称之为血小板储存损伤^[5]。这种损伤非常不利于血小板的输血疗效。因此,血小板储存损伤是近年来的研究热点。一些研究开始尝试分析血小板亚蛋白质组,尤其是膜、微粒、α-颗粒以及致密颗粒等在血小板储存过程中的变化^[6-8]。本文将主要讨论运用蛋白质组学技术分析储存过程中血小板蛋白质的变化及其机制。

1 血小板储存损伤的表现

血小板是哺乳动物血液的有形成分之一,是从骨髓成熟的巨核细胞质裂解脱落下来的具有生物活性的小块胞质,具有特定的形态结构和生化组成,在正常血液中有较恒定的数量,在止血、伤口愈合、炎症反应、血栓形成及器官移植排斥等生理和病理过程中有重要作用。血小板结构复杂,由外向内有 3 层结构,即由外膜、单元膜及膜下微丝结构组成的外围为第 1 层;第 2 层为凝胶层,电镜下见到与周围平行的微丝及微管构造;第 3 层为微器官层,有线粒体、致密小体、残核等结构^[9]。临床输血中常用的血小板制品为单采血小板,通过血细胞分离机采集制备而成,盛装在血小板专用保存袋中,置于血小板震荡保存箱中储存 5 d,(22±2)℃。在储存期间,血小板在形态、生化以及功能方面都发生了紊乱,并且仍会发生新陈代谢作用。血小板代谢变化包括乳酸盐积聚以及 pH 下降。研究表明,如果 pH<6.0,输入体内的血小板存活率也会严重下降^[5-8]。另外,血小板在储存期间也趋向于激活状态。随着储存时间的延长,血小板从圆盘形变成球形,β-血小板球蛋白和血小板因子-4 等血栓形成介质水平升高,血小板聚集率明显下降。研究发现,这些有害变化涉及细胞骨架重组、血小板表面糖蛋白表达的损耗、代谢活动的紊乱、类脂膜的变化、类似细胞凋亡的症状以及蛋白质翻译等多个环节^[5-8]。

2 血小板储存损伤的监测和评估

血小板在处理和储存过程中发生的不良变化包括血小板形态异常、平均体积降低、分布异常和密度不均匀、血小板释放的 α-颗粒和细胞溶质的蛋白质增加、促凝活性物质增加以及糖蛋白质表达发生改变等^[5-7]。研究认为,形态学评分和低渗性

休克反应对血小板储存期间发生的变化非常敏感^[10]。为评价血小板的形变程度,Kunicki 等^[11]发明了一种形态评分方法。计数 100 个血小板,圆盘状 4 分,球形 2 分,树突状 1 分,气球状 0 分,然后累计总分。这是评价血小板形态的最经典的方法。通过光散射技术检测发现,储存过程中的血小板形态评分降低、低渗休克反应增强。流式细胞技术能够对数量相对较少的样品中的大量血小板进行快速分析,通过检测血小板表面标志物的变化,例如糖蛋白(GP)的表达(GP I b,GP II b 和 GP III a)、血小板激活标志物的产生(CD40L,CD62P 和 CD63)。在诸如腺苷二磷酸或凝血酶收缩剂的刺激下,GP 表达的监测结果表明血小板在储存期间的反应性有所下降^[12]。如果使用临床化学分析仪,可以轻易确定溶液的 pH 值,并且鉴定血气 PaO₂ 和 PaCO₂ 以及右旋糖和乳糖的浓度^[13]。

对血小板输入人体内的存活率可以采用放射性标记的存活率(Cr-51 和 In-111)来进行监测。研究发现,对健康志愿者自体输注放射性标记血小板后,血小板体内恢复率和存活率至少减少了 25%^[14]。尽管这些数据似乎与血小板形状变异程度和鉴定乳糖水平有很大关系^[15],但目前仍对于体外血小板聚集如何影响输注后体内血小板的功能并不完全了解。当然,血小板制备的方式可能会改变输注后血小板的恢复和存活的特点。最近,Arnold 等^[16]的一项研究表明:单采血小板中的血小板活性要比富血小板血浆中的血小板活性保存得更好;通过比较富含血小板血浆中的血小板和单采血小板,研究发现它们之间在体外功能活性方面存在差异。这种差异可能与血小板中的异质亚群体有关,但仍需进一步研究。

3 储存期间血小板蛋白质的变化

1987 年,Snyder 等^[17]利用二维凝胶电泳首次发现了细胞溶质和膜蛋白质在储存期间发生了变化,确认了 2 种储存前 7 d 在血小板中迅速聚集的肌纤蛋白碎片。随着质谱法的不断发展,蛋白质组学鉴别血小板储存损伤的作用也随之增强。蛋白质组学能鉴定血小板蛋白质的特点及相互关系,分析蛋白质功能和血小板储存损伤过程中相关蛋白质之间的交互作用。Thiele 等^[18]全面检测了储存对用于治疗的血小板浓缩物中的所有蛋白质组谱的影响,发现大约 3% 的血小板蛋白质组在储存期里发生了变化;其中氯苄乙胺 2、β-肌纤蛋白以及钙结合微丝蛋白的浓度在储存期间大大增加,而且很可能与细胞凋亡有关^[19-20]。Glenister 等^[21]的凝胶电泳研究发现血小板浓缩物上清液蛋白质的 2D 凝胶表达谱与血浆蛋白谱的许多特征相同。血小板衍生的细胞因子包括脑源性神经营养因子、表皮生长因子、血小板衍生生长因子等,它们的浓度在血小板浓缩物储存

* 基金项目:四川省医学科研青年创新课题(Q14031);泸州市科技计划项目(2016-S-67)。

△ 通信作者,E-mail:26074937@qq.com。

期间都有大幅的增加。最近一项研究也发现血小板蛋白质 α -辅肌动蛋白、肌动蛋白素、肌球蛋白重链、踝蛋白、凝血酶致敏蛋白以及微管蛋白 $\beta 5$ 链在 7 d 储存期内相对浓度发生的显著变化。同时,整合素连接激酶和 CXCL7 的相对浓度在储存期间也发生了显著变化;然而,相比储存第 1 天,储存第 7 天的整合素连接激酶和 CXCL7 在血小板中的水平更低^[22]。

4 基于蛋白质组学的小血小板储存损伤机制研究

对整联蛋白 GP II b/III a 复合体的研究发现,储存前 7 d GP II b/III a 的相对浓度和表面表达都有所增加,并且还证明血小板在第 10 天储存期内能翻译 GP II b 和 GP III a^[23]。众所周知,血小板包含了所有的蛋白质生物合成细胞质 mRNA 的分子工具,而且血小板还能合成 GPs I b、II b、III a,纤维蛋白原,凝血酶致敏蛋白以及血管性血友病因子。肌动蛋白和微管蛋白都是细胞骨架的成分,并且能直接与以下蛋白质相互作用:辅肌动蛋白、ARP2/3、肌动蛋白素、肌球蛋白、踝蛋白、蛋白质 14-3-3 以及 Rap1(其中一些蛋白质通过 GP II b/III a 参与到细胞信号传导)以及凝血酶致敏蛋白(用胶原和凝血酶激活后,凝血酶致敏蛋白在血小板的亚群体上发挥作用,目的是形成黏着斑^[24-25])。GP II b/III a 相对浓度的增加,以及参与整联蛋白信号传导的蛋白质数量较多,表明这种途径和血小板储存损伤之间可能存在联系。

血小板储存期间蛋白质的变化与蛋白质组学检测到的激动剂激活血小板期间蛋白质的变化很相似。这也证明了早期的观察结果,即血小板是在储存期间被激活。研究发现了一种促进血小板储存损伤的潜在机制,与 GTPase Rap1 激活有关,而 GTPase Rap1 又能促进 GP II b/III a 的激活^[26-27]。因此,蛋白质组学研究开始寻找干扰与血小板储存损伤相关的信号传导不良反应的靶点。抑制剂研究的目标是 PI3-激酶,与其他激酶相比,PI3-激酶介导 Rap1 激活,而且研究结果表明 Rap1 和 GP II b/III a 激活消失以及体外储存引起的变质也有所减缓。血小板储存损伤渐进过程有所减缓主要体现在以下两个方面:形状改变程度测试中糖分解的活性降低以及血小板对激动剂(腺苷二磷酸)的反应增强^[28]。另外,最近一项以小鼠血小板(而非人体血小板)为对象的研究证明抑制剂 p38 MAPK 提高了储存血小板翻译后的存活率及止血功能,并且还能阻止血小板储存损伤的渐进过程,因为 p38 MAPK 信号肽不是激活血小板整联蛋白的主要成分^[29]。

5 展 望

蛋白质组学通过鉴定新的血小板表达蛋白质以及分析血小板蛋白质组的功能变化,成为研究血小板储存损伤的一种有效途径。最近的研究结果表明,蛋白激酶可能是与血小板储存损伤有关的一类重要的蛋白质,并且很可能是被抑制的目标,从而降低血小板储存损伤。

参考文献

- [1] Lion N, Prudent M, Crettaz D, et al. Proteomics and transfusion medicine[J]. Transfus Clin Biol, 2011, 18(2):79-96.
- [2] Johnston HE, Carter MJ, Cox KL, et al. Integrated cellular and plasma proteomics contrasting B-cell cancers reveals common, unique and systemic signatures[J]. Mol Cell Proteomics, 2017, 16(3):386-406.
- [3] D'alessandro A, Dzieciatkowska M, Nemkov T, et al. Red blood cell proteomics update: is there more to discover?

- [J]. Blood Transfus, 2017, 15(2):182-187.
- [4] Burkhart JM, Gambaryan S, Watson SP, et al. What can proteomics tell us about platelets? [J] Cirt Res, 2014, 114(7):1204-1219.
- [5] Mittal K, Kaur R. Platelet storage lesion: an update[J]. Asian J Transfus Sci, 2015, 9(1):1-3.
- [6] Rijkers M, van der Meer PF, Bontekoe IJ, et al. Evaluation of the role of the GPIb-IX-V receptor complex in development of the platelet storage lesion[J]. Vox Sang, 2016, 111(3):247-256.
- [7] Pienimaeki-Roemer A, Fischer A, Tafelmeier M, et al. High-density lipoprotein 3 and apolipoprotein A-I alleviate platelet storage lesion and release of platelet extracellular vesicles[J]. Transfusion, 2014, 54(9):2301-2314.
- [8] Saunders C, Rowe G, Wilkins K, et al. Impact of glucose and acetate on the characteristics of the platelet storage lesion in platelets suspended in additive solutions with minimal plasma[J]. Vox Sang, 2013, 105(1):1-10.
- [9] White JG. Electron microscopic studies of platelet secretion[J]. Prog Hemostasis Thromb, 1974, 2(1):49-98.
- [10] Maurer-Spurej E, Chipperfield K. Past and future approaches to assess the quality of platelets for transfusion[J]. Transfus Med Rev, 2007, 21(4):295-306.
- [11] Kunicki TJ, Tuccelli M, Becker GA, et al. A Study of variables affecting the quality of platelets stored at "room-temperature"[J]. Transfusion, 1975, 15(5):414-421.
- [12] Akay OM, Gunduz E, Basyigit H, et al. Platelet function testing during 5-day storage of single and random donor plateletpheresis[J]. Transfus Apher Sci, 2007, 36(3):285-289.
- [13] Dekkers DW, De Cuyper IM, eer Pvan der MF. Influence of pH on stored human platelets[J]. Transfusion, 2007, 47(10):1889-1895.
- [14] Lannan KL, Refaai MA, Ture SK, et al. Resveratrol preserves the function of human platelets stored for transfusion[J]. Br J Haematol, 2016, 172(5):794-806.
- [15] Cardigan R, Turner C, Harrison P. Current methods of assessing platelet function: relevance to transfusion medicine[J]. Vox Sang, 2005, 88(3):153-163.
- [16] Arnold DM, Heddle NM, Kulczycky M, et al. In vivo recovery and survival of apheresis and whole blood-derived platelets: a paired comparison in healthy volunteers[J]. Transfusion, 2006, 46(2):257-264.
- [17] Snyder EL, Dunn BE, Giometti CS, et al. Protein changes occurring during storage of platelet concentrates. A two dimensional gel electrophoretic analysis[J]. Transfusion, 1987, 27(4):335-341.
- [18] Thiele T, Steil L, Gebhard S, et al. Profiling of alterations in platelet proteins during storage of platelet concentrates [J]. Transfusion, 2007, 47(7):1221-1233.
- [19] 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.

[20] Seghatchian J, Krailadsiri P. Platelet storage lesion and apoptosis; are they related? [J]. Transfus Apher Sci, 2001, 24(1):103-105.

[21] Glenister KM, Payne KA, Sparrow RL. Proteomic analysis of supernatant from pooled buffy-coat platelet concentrates throughout 7-day storage[J]. Transfusion, 2007, 48(1):99-107.

[22] Thon JN, Schubert P, Duguay M, et al. Comprehensive proteomic analysis of protein changes during platelet storage requires complementary proteomic approaches [J]. Transfusion, 2008, 48(3):425-435.

[23] Thon JN, Devine DV. Translation of glycoprotein IIIa in stored blood platelets[J]. Transfusion, 2007, 47(12):2260-2270.

[24] Dale GL. Coated-platelets; an emerging component of the procoagulant response[J]. J Thromb Haemost, 2005, 3(10):2185-2192.

[25] Orr AW, Pallero MA, Xiong WC, et al. Thrombospondin induces RhoA inactivation through FAK-dependent signaling to stimulate focal adhesion disassembly[J]. J Biol Chem, 2004, 279(47):48983-48992.

[26] Stefanini L, Bergmeier W. RAP1-GTPase signaling and platelet function[J]. J Mol Med (Berl), 2016, 94(1):13-19.

[27] Stefanini L, Paul DS, Robledo RF, et al. RASA3 is a critical inhibitor of RAP1-dependent platelet activation[J]. J Clin Invest, 2015, 125(4):1419-1432.

[28] Schubert P, Thon JN, Walsh GM, et al. A signaling pathway contributing to platelet storage lesion development; targeting PI3-kinase-dependent Rap1 activation slows storage-induced platelet deterioration [J]. Transfusion, 2009, 49(9):1944-1955.

[29] 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.

(收稿日期:2017-04-02 修回日期:2017-06-02)

• 综 述 •

高通量测序时代的阴道微生物菌群的组成与维护*

李 晴¹, 汪艳珠¹, 刘宸好², 李 华³综述, 黄卓敏^{1△}审校

(1. 深圳市妇幼保健院福强妇科子宫颈疾病诊治中心, 广东深圳 518048; 2. 爱默里大学, 美国乔治亚亚特兰大 30322; 3. 华谱蛋白质系统科技(深圳)有限责任公司, 广东深圳 518000)

关键词: 阴道微生物群; 乳杆菌; 细菌性阴道病; 性传播感染; 益生菌
DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2017.18.030 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-4130(2017)18-2584-05

大量的微生物定居人体,称为人类微生物群;人类微生物群组是指寄居在人体内的微生物种类及其基因与基因组的总和。这个具有丰富生态信息的概念,描述了人类与微生物之间相互影响的关系。随着检测手段的变化和技术设备的发展,过去鉴定细菌需要培养、分离、染色后显微镜观察,现在则是利用高通量测序技术,建立人类微生物群组数据库^[1-2]。过去科学家们只能独立看待微生物的存在,而现在懂得宿主遗传、环境、饮食、免疫等许多因素与人体微生物相互作用,从而影响人体健康和疾病^[3-6]。

阴道内广泛定植的微生物称阴道微生物群(VMB)。阴道是女性生殖系统的门户,结构化微生物群落发展的重要栖息地;阴道是结构化微生物群落发展的重要栖息地,作为能抵抗导致泌尿生殖和性传播疾病(STD)病原体进入的门户,VMB已被认为参与保护宿主免受各种细菌、真菌和病毒感染的重要屏障。VMB是参与保护宿主免受各种细菌、真菌和病毒感染的重要屏障。母亲 VMB 的种类,在新生儿的皮肤、肠道、尿道、阴道等菌群初始定植中起着至关重要的作用,直接建立和发展新生儿健康的肠道和皮肤的微生物群。健康的 VMB 主要由乳杆菌属物种支配,可作为评估人体健康和疾病的重要生物标志物。因此,研究阴道微生物种类和功能,对女性疾病特别是肿瘤的影响意义重大。

1 VMB 素描

利用细菌菌落的 16S rRNA 的 Sanger 测序,16S rRNA 的末端限制性片段长度多态性(T-RFLP)法,荧光定量 qPCR 法和新一代高通量测序(NGS)等技术方法研究阴道微生物的当代统称为高通量测序时代。Verhelst 等^[7]通过革兰染色,鉴定许多不同等级的菌群类型,并进行了 VMB 组的分类,同时进行了 16S rRNA 基因 DNA 测序,开创了测序方法研究阴道微生物的新时代。Hummelen 等^[8]报道,使用基于 Illumina 的 16S rRNA 基因的 V6 区的扩增子测序,在坦桑尼亚妇女中测定存在 8 个主要微生物簇,2 个与正常微生物群相关。Ravel 等^[9]使用 16S rRNA 基因的 V1~V2 高变区的焦磷酸测序方法,在白人、黑人、西班牙裔和北美亚裔妇女中分离出 5 个主要微生物群落。Smith 等^[10]从宫颈部观测到 6 个不同的微生物菌群类型,其中群集 I~IV 类与 Ravel 等^[9]的提出的阴道群落类型相似。Srinivasan 等^[11]利用 16S rRNA 基因 PCR 和焦磷酸测序观察到,没有细菌性阴道病(BV)的妇女,VMB 群落主要由卷曲乳杆菌或惰性乳杆菌主导。由于所用的技术、测序深度、每种类型的样本数目所做的计算选择以及基础数据结构驱动,VMB 群落类型的实际数目仍未确定,未来研究的挑战依然巨大。

以上多个研究初步勾勒出 VMB 群落及其功能的轮廓,而

* 基金项目:深圳市 2015 年度科技创新计划基础研究项目[深科技创新(2015)170 号]。

△ 通信作者, E-mail: pyamyhuang@163.com。