

DOI: 10.13376/j.cblls/2018027

文章编号: 1004-0374(2018)02-0204-09



龚畅, 外科学博士, 博士生导师, 中山大学孙逸仙纪念医院乳腺肿瘤中心乳腺外科副教授、副主任医师, 乳腺诊断专科主任。主持科技部国家重点研发计划(课题组长)、国家自然科学基金面上项目。入选教育部新世纪优秀人才, 任中国抗癌协会乳腺癌专业委员会康复学组委员。以第一/通讯作者在 *Cancer Cell*、*Nat Comm*、*Cancer Res*、*Oncogene*、*Autophagy*、*JBC*、*Cancer Sci* 等杂志发表论文 20 篇。

非编码RNA作为疾病诊断标志物

谭璐媛, 王妍, 钟文静, 龚畅*

(中山大学孙逸仙纪念医院乳腺肿瘤中心, 广州 510120)

摘要: 非编码 RNA (non-coding RNA, ncRNA) 是不具备编码蛋白质功能的基因组转录产物。研究逐步发现, ncRNA 的表达失调与人类疾病的发生密切相关。由于 ncRNA 表达失调具有组织特异性, 同时, 在人类组织和体液中可被便捷、稳定地检测, 许多研究开始关注 ncRNA 作为临床疾病诊断标志物的应用潜能。现主要围绕微小分子 RNA (miRNA) 和长非编码 RNA (lncRNA) 在恶性肿瘤、自身免疫性疾病及神经系统疾病诊断中的作用进行综述; 同时, 也从 ncRNA 失调与疾病发生的相互关系的角度展示了 ncRNA 相较其他生物分子作为疾病诊断标志物的优势。

关键词: 非编码 RNA; 微小分子 RNA; 长非编码 RNA; 恶性肿瘤诊断; 疾病诊断标志物

中图分类号: Q522; R730.4 **文献标志码:** A

Non-coding RNA biomarkers for diagnosis of human diseases

TAN Lu-Yuan, WANG Yan, ZHONG Wen-Jing, GONG Chang*

(Breast Tumor Center, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract: Non-coding RNAs (ncRNAs) are transcripts without protein-coding functions. Increasing evidence demonstrates that dysregulation of ncRNA plays a critical role in interactions with the initiation of human diseases. Dysregulation of ncRNA has tissue specificity, and also can be stably and conveniently detected in both tissue and body fluids, which makes ncRNA as potential biomarkers for clinical diagnosis of human diseases. This review focuses on the role of miRNA (microRNA) and lncRNA (long non-coding RNA) in the diagnosis of malignant tumors, autoimmune diseases and neurological diseases. At the same time, we show the advantages of ncRNA compared to other molecules as biomarkers of disease diagnosis from the perspective of molecular mechanism.

Key words: non-coding RNA; miRNA; long non-coding RNA; cancer diagnosis; disease diagnosis biomarkers

收稿日期: 2017-10-07; 修回日期: 2017-10-26

基金项目: 国家重点研发计划项目(2017YFC1309100); 国家自然科学基金项目(81772836, 81472466, 81772836); 广东省自然科学基金杰出青年科学基金项目(2014A030306003), 广东省协同创新与平台环境建设项目(国际科技合作领域)(2016A050502018)

*通信作者: E-mail: changgong282@163.com; gchang@mail.sysu.edu.cn

随着人类基因组学研究的开展, 科学家们发现在人类基因组中, 只有约 2% 的基因转录物与蛋白质编码相关^[1]。大部分基因转录产物由于不编码蛋白质, 被称为非编码 RNA (non-coding RNA, ncRNA)。但随着研究的不断深入, 亦有研究报道 ncRNA 可编码短肽^[2]。ncRNA 根据核苷酸长度的不同, 分为长非编码 RNA (long ncRNA, lncRNA) 和小非编码 RNA (small ncRNA, sncRNA)^[3]; 或根据 ncRNA 的功能, 分为管家 ncRNA, 如核糖体 RNA (rRNA) 和转运 RNA (tRNA), 以及调节性的 ncRNA, 如微小分子 RNA (miRNA)、长非编码 RNA (lncRNA)、环状 RNA (circRNA) 和内源性竞争 RNA (ceRNA) 等^[4]; 亦可根据其亚细胞定位分为核小 RNA (snRNA)、核仁小 RNA (snoRNA) 和与位于胞浆的 PIWI 蛋白相互作用 RNA (piRNA) 以及小干扰 RNA (siRNA) 等^[5]。实际上, 由于 ncRNA 的各种特点均存在一定交集, 因此, 很难对某个 ncRNA 进行明确统一的分类 (图 1), 但各种 ncRNA 在调节 DNA 复制、转录、RNA 加工、翻译、蛋白质功能等生理过程中均发挥了重要作用。

随着对 ncRNA 研究的逐步加深, 研究者发现, 发生特定某种疾病的人群与健康人群相比, 某些 ncRNA 存在差异性表达, 提示 ncRNA 具备作为疾病诊断标志物的重要特征^[6]。基于此, 科学家们对 ncRNA 作为疾病诊断标志物展开了大量的相关研究。本文将主要围绕目前研究较为深入的 lncRNA 及 miRNA 分子, 详细综述其在诊断恶性肿瘤、免疫系统疾病以及神经系统疾病的临床应用价值。

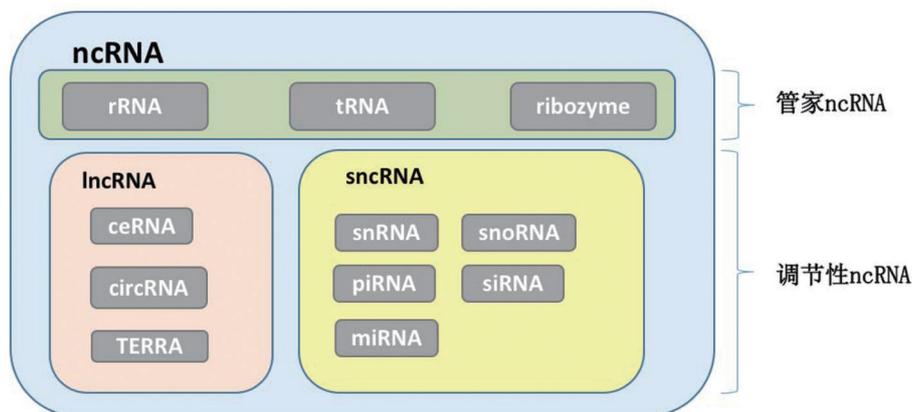
1 ncRNA疾病诊断标志物的特点

与传统的蛋白分子疾病诊断标记物相比, ncRNA 具有以下特点。(1) ncRNA 的表达水平异常与疾病的发生密切相关, 其失调不仅可以导致疾病的发生, 而且随着疾病的进展, ncRNA 的表达进一步异常。例如, miRNA 与 lncRNA 可参与调节人类恶性肿瘤的发生, 并在恶性肿瘤发展的不同阶段发生表达改变。根据其对肿瘤发生的影响, 恶性肿瘤相关 miRNA 与 lncRNA 可分为促癌基因及抑癌基因。在恶性肿瘤中, 某些促癌 miRNA 与 lncRNA 表达上调, 某些抑癌 miRNA 与 lncRNA 表达下调, 使这些 ncRNA 具备作为癌症诊断标志物的潜力^[7-8]。(2) 由于某些 ncRNA 具有组织特异性, 或由特定肿瘤细胞分泌, 因此可作为鉴别肿瘤来源的特异性生物标记物^[9]。(3) 由于某些 ncRNA 可被分泌进入循环系统, 并可通过成熟的技术检测其表达水平, 这使 ncRNA 作为疾病诊断标志物具备临床检测的可行性与便利性。

1.1 ncRNA的失调与疾病的发生关系密切

1.1.1 ncRNA常位于与疾病发生相关的基因序列位点

在疾病中出现异常表达的 ncRNA 基因, 在染色体上并非随机排布, 其往往位于基因序列中的“脆性位点”和致病基因位点^[10-11]。早前科学家们就认识到, 染色体中称作为“脆性位点”的区域更易于断裂, 导致染色体结构发生改变, 影响 DNA 复制, 是人类癌症的“滋生地”。通常, “脆性位点”在体细胞相对稳定, 但它们在癌细胞和某些神经性疾病



ncRNA可根据是否具备调节功能分为管家ncRNA及调节性RNA, 还可以根据核苷酸长短分为lncRNA和sncRNA。其中, lncRNA包括ceRNA、circRNA和端粒复制RNA (TERRA)等; sncRNA包括miRNA, 位于细胞核的snRNA和snoRNA, 以及位于细胞浆的piRNA和siRNA。

图1 ncRNA的分类

细胞中经常发生缺失或重排,表明它们的失稳与这些疾病的发生存在密切关联^[12],且将进一步导致下游相关 ncRNA 的表达水平发生改变。因此,如同“联动机制”一般,位于这些特殊位点的 ncRNA 失调可以很好地反映疾病的发生。

1.1.2 DNA甲基化调控对ncRNA表达水平的影响

表观遗传学修饰在调控 ncRNA 的表达中同样发挥着重要作用,主要包括组蛋白修饰和 DNA 甲基化^[13]。首先,抑癌基因的过度甲基化和癌基因的去甲基化是诱发恶性肿瘤的重要因素。DNA 的甲基化发生在编码基因(包括编码 ncRNA 的基因)启动子序列的 CpG 岛上,某些 miRNA 基因位于 CpG 岛附近或位于 CpG 岛中,这些 miRNA 表达极易受到 DNA 异常甲基化的调控^[14]。在人类基因组中大约包括 38 000 个 CpG 岛,正常状态下一般处于非甲基化状态。在肿瘤形成过程中,CpG 岛发生高甲基化,导致抑癌基因、DNA 修复基因等丧失功能,同时沉默具有抑癌作用的 ncRNA 的表达,进一步导致其下游靶基因(癌基因)过度表达,促进肿瘤发生、发展^[15-17]。DNA 的低甲基化是指在正常组织中发生甲基化的位点出现了去甲基化。去甲基化是通过作用于基因的重复单元、逆转座子、缺乏 CpG 岛的启动子等参与对 ncRNA 表达的调控。如 miRNA let-7a-3 的基因在正常组织中为高甲基化状态,而在肺癌中则出现了去甲基化,进一步导致 let-7a-3 在肺腺癌组织中的高表达,发挥增强肿瘤表型的促癌作用^[18]。由此可见,ncRNA 的转录表达可被 DNA 甲基化(引起疾病的病因之一)所调控,而失调的 ncRNA 将进一步影响疾病的发生。

1.1.3 其他引起ncRNA表达异常而致病的机制

ncRNA 的表达受转录因子,如 P53^[19]、c-MYC^[20-21] 等的调控。P53 不仅是重要的抑癌因子,它还可直接对部分 miRNA 和 lncRNA 表达水平进行调控。许多 miRNA 表现出 p53 依赖性的表达调控模式,其中最具代表性的 miRNA 之一是 miR-34。miR-34 的基因上存在多个 P53 反应元件,P53 可直接与其结合从而调控 miR-34 的转录。由于 P53 突变同样是肿瘤发生的重要机制,因此可观察到 miR-34 在多种实体瘤中表达沉默,而异位表达的 miR-34 可抑制肿瘤增殖、上皮间质转化、迁移和侵袭,扮演着抑癌基因的角色^[22]。此外,在 ncRNA 生物合成过程中起关键作用的酶的缺失是其表达异常的另一重要原因。已有报道的相关酶包括 TARBP2^[23]、DICER^[24] 及 XPO5^[25] 等。

恶性肿瘤是一种异质性疾病,同一种癌症患者,其肿瘤的表型、侵袭能力和预后均不同^[26]。基因及表观遗传层面的改变,往往是恶性肿瘤的病因,也是导致其异质性的原因。ncRNA 的失调与疾病发生密切相关,同时其表达水平异常亦可导致疾病进一步发展,使得它具备作为疾病诊断标志物的优势。ncRNA 不仅可反映肿瘤的异质性,而且可作为精准区分肿瘤表型的诊断标志物,从而为患者提供精准的个体化治疗。

1.2 ncRNA在体液及组织中的表达特点

1.2.1 稳定性

miRNA 在组织、血浆、血清、尿液、唾液中均稳定表达^[6]。lncRNA 虽然稳定性不如 miRNA,但与编码蛋白质的 mRNA 相比,仍有相对长的半衰期^[27]。在肿瘤患者血浆、血清及尿液等体液中均可检测到 ncRNA,表明存在于体液中的 ncRNA 并未受到 RNA 酶的影响而发生降解。研究已发现数种在体液中保护 ncRNA 的运输机制:(1) 体液中的 miRNA 大多是由肿瘤细胞(或肿瘤微环境中其他相关细胞)表达分泌,然后被包裹形成微粒,如外泌体、微泡、凋亡小体等进行运输^[28];(2) 高密度脂蛋白亦可与 miRNA 结合^[29],是 ncRNA 在循环系统中的另一种运输手段;(3) 总体而言,lncRNA 相比 miRNA 较少作为“货物”被循环中的微粒运输。有研究报道在肝细胞癌患者的血液中,lncRNA HULC 与外周血中的蛋白质形成复合物共同运输,从而免受 RNA 酶的降解^[30]。

1.2.2 特异性

上文提到,ncRNA 的异常表达与疾病的发生密切相关,并存在一定的疾病特异性。研究发现,在乳腺癌、卵巢癌、胃癌、肺鳞癌等恶性肿瘤患者的外周血中,均能发现特异的 miRNA 的表达谱^[31-32];在前列腺癌患者尿液的外泌体中可检测到 lncRNA PCA3 特异表达^[33]。这些研究结果均证实 ncRNA 具有组织特异性。

1.2.3 检测方法的无创性

目前恶性肿瘤诊断的金标准仍是病理学,需要通过外科切除或穿刺等有创手段获取组织标本进行诊断。相对于病理组织学,体液中 ncRNA 的检测手段相对创伤极小,这使 ncRNA 非常适合作为癌症早期诊断的标志物。

1.3 检测手段

在检测手段方面,可通过基因芯片、qRT-PCR 或原位杂交等成熟且经典的方法,对临床的组织或

体液标本中的 ncRNA 进行定性、定量以及定位检测^[34-35]。虽然不同方法都有一定的局限性,但也有各自的优势。通过基因芯片等高效的手段筛选出特定的疾病诊断相关 ncRNA,再通过 Northern blot 或 qRT-PCR 等较为便捷的方法检测特定 ncRNA 在组织或体液中的表达情况,这种方法使得 ncRNA 作为疾病诊断标志物的推广具备临床可行性与便捷性。

2 ncRNA作为恶性肿瘤诊断标志物

目前,针对 ncRNA 作为恶性肿瘤的诊断标志物开展的研究众多,但针对临床应用潜能开展的深入且较成熟的研究仍是 lncRNA 和 miRNA。因此,接下来围绕 lncRNA 及 miRNA,探索并总结这一命题的近年最新进展。

2.1 前列腺癌

2.1.1 lncRNA用于诊断前列腺癌

传统前列腺癌相关诊断标记物前列腺特异抗原(PSA)虽然具有组织特异性,但由于只存在于人前列腺腺泡及导管上皮细胞胞浆中,不表达于其他细胞,且良性及恶性前列腺疾病均可导致其升高,因此无肿瘤特异性^[36]。

目前,众多研究通过比较前列腺癌组织标本与正常前列腺组织标本,发现多种 lncRNA 在前列腺癌中表达异常,其中包括 H19、HOTAIR、HOTTIP、MALAT-1、PVT1、HULC、GAS5 和 ENST00000480739 等^[37]。例如前文中所提及的 lncRNA PCA3,已在多个研究中被证实具有前列腺癌诊断价值^[38-40]。Hellels 等^[41]在 2003 年发现,对前列腺癌患者和健康人群分别进行前列腺按摩后收集尿液,PCA3 在前列腺癌患者尿液中的表达量是健康者尿液的 66 倍。之后,有研究者将 PCA3 的表达量与 PSA 的表达量的比值设定为 PCA3 分数,使用 PCA3 分数取代单纯 PSA,作为区分是否需要行前列腺穿刺活检的患者的诊断工具^[39-40],结果显示 PCA3 分数诊断前列腺癌的敏感性与特异性分别为 82.3% 和 89.0%,远高于单独 PSA 敏感性(57.4%)和特异性(53.8%)。来自美国的研究者应用 507 例美国人群对上述结果进行了验证,显示 ROC 曲线下面积(AUC)达 0.761^[42]。一项综合了 2008 年至 2013 年 11 项应用 PCA3 作为前列腺癌诊断标志物临床研究的荟萃分析显示,使用 PCA3 分数可以显著降低不必要的前列腺穿刺发生率^[43]。在欧美人群中,共有 5 个大型前瞻性临床研究(NCT01177436、NCT01020448、NCT01024959、NCT01632930、NCT01632930)对

PCA3 的诊断价值进行了验证,均得到一致的结果。目前,PCA3 已被美国 FDA 批准作为诊断前列腺癌的标志物,成为首个成功应用于临床进行疾病诊断的 ncRNA 标志物。由于目前暂时在中国人群中缺乏相应的研究数据支持,2017 年中国前列腺癌早期诊断专家共识提出:鉴于前列腺癌显著的种族差异性,暂不推荐 PCA3 等新型诊断指标用于中国人群的筛查^[44]。

2.2 胰腺癌

2.2.1 lncRNA用于诊断胰腺癌

胰腺导管腺癌(PDAC)是最为常见的胰腺癌类型,并且由于缺乏准确的早期诊断方法,患者往往就诊时间晚,预后很差。胰腺导管内乳头状黏液瘤(IPMN)是 PDAC 的癌前病变,早期发现并行手术切除可有效预防胰腺癌的发生。然而,IPMN 目前仅依靠影像学进行临床诊断,并且与预后良好的良性病变难以鉴别。因此,发现敏感的 IPMN 诊断方法显得尤为重要。2017 年,Permuth 等^[45]首次通过检测和分析 IPMN 患者的外周血循环 lncRNA 与健康人群的表达差异,建立了基于 lncRNA 的 IPMN 诊断模型,结果发现在 IPMN 人群中,lncRNA GAS5 和 SRA 的表达较健康人群显著降低。研究者最终建立了包含 ADARB2-AS1、ANRIL、GLIS3-AS1、LINC00472、MEG3、PANDA、PVT1 和 UCA1 这 8 个 lncRNA 的 IPMN 诊断模型。该模型相较传统的影像学在区分 IPMN 与影像表现类似的良性病变上,具有更高的准确性(AUC = 0.77, 95% 可信区间 0.62~0.92, $p = 0.006$),借助这个基于 lncRNA 的诊断模型可在传统影像学基础上,进一步筛选出有恶变倾向的 IPMN 患者,从而达到早期诊断及干预胰腺癌发生的目的。

2.2.2 miRNA用于诊断胰腺癌

一系列研究探索了 miRNA 作为胰腺癌的诊断标志物,其中较为突出的是 2014 年 Schultz 等^[46]开展的大样本量临床研究。该研究纳入了 409 例 PDAC 患者和 312 名健康志愿者,其中 90% 的 PDAC 患者由于肿瘤分期晚已无法行手术,对于非手术患者在化疗前进行外周血采集,对于可手术患者则在手术前采血。在建模过程中,利用 141 例已确诊 PDCA 患者的血标本进行检测,对比 68 例健康志愿者,发现了 38 个差异性表达的 miRNA,在验证人群中最终建立了两个预测模型(模型 I 和模型 II)。模型 I 是基于 miR-145、miR-150、miR-223、miR-636 这 4 个 miRNA 建立的,模型 II 是基于 10

个 miRNA (miR-26b、miR-34a、miR-122、miR-126*、miR-145、miR-150、miR-223、miR-505、miR-636、miR-885.5p) 建立的。单独将这两个模型分别与 CA-199 相比, 其 AUC 并未超过 CA-199, 但当研究者将两个模型分别再纳入 CA-199 指标, 建立融合模型, 再对比单独 CA-199 的检验效能时, 发现结合了 CA-199 的融合模型均优于单独使用 CA199 进行诊断, 模型 I 的 AUC 等于 0.94 (95% 可信区间 0.90~0.98), 模型 II 的 AUC 等于 0.93 (95% 可信区间 0.89~0.97)。该研究结果证实了 miRNA 用于诊断胰腺癌的临床价值, 但仍需更大规模的人群对其进行前瞻性验证。

Li 等^[47] 通过研究发现, PDAC 患者血清中的 miR-1290 (AUC =0.86) 相比 CA-199 (AUC=0.77) 具有更高的诊断准确率, 并且具有预后预测价值。其他研究通过发现血清、血浆或唾液的 miRNA 表达差异建立临床预测模型, 均发现其能提高单独 CA-199 指标的诊断准确性^[48-50]。然而, 这些小样本量的研究由于缺乏后续大样本量的人群验证, 因而均具有一定的局限性。但是, 由于胰腺癌早期诊断困难, 亟需发现筛查诊断效率高的标志物, 所以探索 ncRNA 在胰腺癌早期诊断中的应用具有重要的临床意义。

2.3 乳腺癌

2.3.1 lncRNA用于诊断乳腺癌

HOX 转录反义 RNA (HOTAIR) 是第一个被发现具有反式转录调控作用的长链非编码 RNA, 其在乳腺癌、肝癌及结肠癌等肿瘤组织中均高表达。肿瘤中高表达的 HOTAIR 通过抑制抑癌基因的表达, 从而促进肿瘤复发和转移; 反之, 沉默 HOTAIR 的表达可削弱肿瘤细胞转移能力^[51]。2016 年, Zhang 等^[52] 检测了 30 例配对的乳腺癌与健康乳腺组织的标本, 以及 148 例乳腺癌患者血标本中 HOTAIR 的表达, 其目的是探索 HOTAIR 作为乳腺癌诊断标志物的临床应用价值。结果显示, 在乳腺癌标本及乳腺癌患者血浆中, HOTAIR 的表达较健康乳腺组织显著升高 ($P < 0.05$); 血浆 HOTAIR 作为诊断标志物, 其 AUC 为 0.8 (敏感性 69.2%, 特异性 93.3%), 与传统的循环肿瘤标记物 CEA 和 CA-153 相比, 能显著提高诊断的准确率。另有研究建立了针对三阴性乳腺癌和非三阴性乳腺癌无创性诊断的 lncRNA 模型, 虽然该模型中纳入的 3 个 lncRNA (ANRIL、HIF1A-AS2 和 UCA1) 与三阴性乳腺癌的亚型相关, 但因其临床检测的可行性不强,

因此临床应用价值低^[53]。此外, 有研究发现 lncRNA-BC2 和 lncRNA-BC5 在乳腺癌组织标本中表达上调, 而 lncRNA-BC4 和 lncRNA-BC8 则表达下调^[54], 提示这些 lncRNA 均有作为乳腺癌诊断标志物的临床应用潜能, 但目前尚无临床研究对此进行验证。可见, 目前 lncRNA 在乳腺癌中的作用更多地体现在其通过调控乳腺癌的转移、耐药等生物学功能而影响预后, 有待更多的研究关注 lncRNA 作为乳腺癌诊断标志物的临床应用价值。

2.3.2 miRNA用于诊断乳腺癌

在乳腺癌早期诊断方面, 研究者们尝试通过不同的思路寻找有价值的 miRNA。Heneghan 等^[55] 在不同癌症患者 (乳腺癌、肺癌、肝癌) 的血标本中, 检测 7 个已知的具有癌症诊断潜能的 miRNA 表达水平。结果显示, let-7a、miR-10b 和 miR-155 在大部分癌症患者中均上调, 而 miR-195 则可将乳腺癌从其他癌症及健康人群中区分出来, 其敏感性为 88%, 特异性为 91%。当将 let-7a、miR-10b 和 miR-155 纳入建模后, 模型的预测敏感性上升至 94%。另一个研究采用不同的思路, 首先将与抑癌基因 PTEN 和 PTEN 信号通路相关的 miRNA 筛选出来作为候选分子, 在乳腺癌患者的血液标本中检测上述候选分子的表达, 发现乳腺癌及乳腺良性疾病患者的循环 miR-20a 和 miR-21 表达水平比健康人群高, 而 miR-214 可以将乳腺癌患者从健康人和乳腺良性疾病患者中有效区分出来, AUC 为 0.883^[56]。此外, 有研究在雌激素受体 (ER) 阳性早期乳腺癌患者中抽取外周血样本, 并根据年龄与健康人相配对, 再通过测序的方法检测两组人群 miRNA 谱的差异表达, 发现 9 个 miRNA, 包括 miR-15a、miR-18a、miR-107、miR-133a、miR-139-5p、miR-143、miR-145、miR-365 和 miR-425, 可将乳腺癌与健康人群区分开, 并随后在另一组队列中成功进行了验证^[57]。

Shimomura 等^[58] 纳入了 1 280 例乳腺癌患者、2 836 例健康对照志愿者、451 例其他肿瘤和 63 例乳腺良性疾病患者的血清标本, 进行 miRNA 的基因芯片分析, 最终建立了基于 5 个 miRNA (miR-1246、miR-1307-3p、miR-4634、miR-6861-5p 和 miR-6875-5p) 的诊断模型。该模型可将乳腺癌从对照组及其他肿瘤和乳腺良性疾病中区分出来, 在验证队列中, 该模型的敏感性达 97.3%, 特异性为 82.9%, 准确性达 89.7%。然而, 上述研究的局限性之一是外周血中所检测到的 miRNA 的来源无法确认, 无法确保其具备乳腺癌特异性。为进一步解决这个问题

题, 有研究开始探索乳腺癌组织中 miRNA 的表达与循环 miRNA 表达的相关性。例如, 从乳腺癌患者和健康对照组中分别获得乳腺癌肿瘤组织和正常组织样本, 并且收集两组人群的血清样本, 对以上组织及血清样本中的 miRNA 表达进行全基因组分析。研究结果发现, 在乳腺癌组织和乳腺癌患者外周血中, 有部分 miRNA 的表达水平同时降低, 其中以 miR-1、miR-92a、miR-133a 和 miR-133b 降低的水平最为显著, 该结果在随后独立的乳腺癌患者队列中被成功验证^[59]。以上的研究提示循环 miRNA 可以作为乳腺癌诊断标志物。

目前, 由于乳腺癌的早期筛查主要依靠影像学并且已可获得较高诊断准确率, 因此, 更多 ncRNA 的研究关注于 ncRNA 在乳腺癌预测预后以及预测肿瘤治疗反应性方面的应用价值。现有的将 ncRNA 应用于乳腺癌早期诊断的研究虽然已建立了许多的预测模型, 但均有待大型前瞻性研究进行验证。此外, 还可以探索 ncRNA 在区分良恶性乳头溢液以及无创性诊断乳腺重度不典型增生或原位癌方面的临床应用价值。

2.4 其他恶性肿瘤

2.4.1 lncRNA在其他恶性肿瘤中的诊断价值

前文中所提到的 HOTAIR, 已有研究证实其在肺癌^[60]、肝癌^[61]、结肠癌^[62]、食道癌^[63]及甲状腺癌^[64]中均具有诊断价值。在肺癌相关研究中^[60], 研究者对比了 105 例非小细胞肺癌患者与 80 例健康志愿者血清中 HOTAIR 的表达水平, 结果显示肺癌患者血清 HOTAIR 水平显著高于健康人群, AUC 为 0.791 (95% 置信区间 0.727~0.855), 大于传统肿瘤标志物 CEA (AUC = 0.737, 95% 置信区间 0.666~0.808)。当将肿瘤标志物 CEA 与 HOTAIR 相结合后, 其检测的准确性进一步提高, AUC 为 0.841 (95% 置信区间 0.783~0.898)。总体来说, 有关 HOTAIR 在多种肿瘤中的诊断作用的研究思路相似, 其结果亦是趋于相同。由此可见, HOTAIR 作为一个被反复验证的癌症诊断标志物, 其在临床的推广具有相对较好的潜力。然而, 由于多个研究发现 HOTAIR 在多种肿瘤中均表达升高, 因此缺乏肿瘤特异性, 且多局限于与传统肿瘤标志物相结合才能进一步提高诊断的准确性。除 HOTAIR 外, lncRNA POU3F3、HNF1A-AS1 和 SPRY4-IT1 在食道鳞癌的患者血浆中显著升高, 其中以 POU3F3 的检测效率最高, 当 POU3F3 联合鳞状细胞癌相关抗原 (SCCA) 指标, 其 AUC 可达 0.926, 敏感性 85.7%, 特异性 81.4%,

该模型对早期食道鳞癌的诊断率达 80%^[65], 具有成为早期诊断食道鳞癌潜能的分子标志物。

2.4.2 miRNA在其他恶性肿瘤中的诊断价值

在 miRNA 应用于肺癌早期诊断的众多研究中, Sestini 等^[66]开展的研究是目前最具临床应用前景的研究之一。该研究通过每年或每两年对重度吸烟患者进行低剂量 CT 检查以筛查早期肺癌。随访 5 年后, 在 3 411 名筛查者中发现 84 名早期肺癌患者, 并通过 84 例肺癌患者的血标本, 建立了一个基于 24 个 miRNA 的诊断模型 MSC。目前, 该研究者开展了一项拟入组 4 000 人的临床研究 (NCT02247453), 计划根据高危因素分组, 对比单纯应用 MSC 和 MSC 联合低剂量 CT 筛查早期肺癌中的效率。该研究拟于 2021 年完成, 或许该结果将改变肺癌筛查的临床指南。

肝细胞癌 (HCC) 死亡人数的半数以上发生在中国, 尽早发现 HCC 可以提高其生存率, 但目前缺乏更为准确的临床前诊断的生物标志物。有研究利用来自前瞻性队列的 HCC 患者的组织和血浆样品, 评估 miRNA 对 HCC 的诊断和预测潜力^[67]。与乙型肝炎病毒 (HBV) 阳性的非 HCC 患者相比, HBV 阳性的 HCC 患者有 8 个 miRNA 表达水平显著升高, 基于该 8 个 miRNA 所建立的预测模型可用于在 HBV 阳性患者中筛选 HCC 患者。研究者进一步在两个前瞻性队列中, 评估这 8 个新筛选的 miRNA 和 3 个前期已有报道的 miRNA (miR-192-5p、miR-21-5p 和 miR-375) 对早期 HCC 诊断的潜力, 并最终建立了一个基于 4 个血清 miRNA 的新模型 (miR-20a-5p、miR-320a、miR-324-3p 和 miR-375), 该模型与甲胎蛋白 (AFP) 组合可作为 HCC 早期筛查诊断标志物。

3 ncRNA作为自身免疫疾病诊断标记物

自身免疫性疾病是一类具有高度异质性的疾病的统称, 其种类超过 100 多种。自身免疫疾病患者的免疫系统被错误地激活以攻击体内正常存在的组织。miRNA 在确保机体发挥正常免疫功能和免疫细胞发育以及预防自身免疫发生等过程中, 均扮演了十分重要的角色^[68]。虽然目前该领域大多数研究都停留在细胞和动物的层面, 但仍有证据表明一些 miRNA (例如 miR-21、miR-125a、miR-146a 和 miR-148a) 在系统性红斑狼疮 (SLE)、类风湿性关节炎 (例如 miR-124a、miR-146a 和 miR-155) 和多发性硬化 (例如 miR-17-5p、miR-20a、miR-34a、miR-

155 和 miR-326) 中起关键作用^[69]。小鼠模型中的一些初步数据发现 lncRNA GAS5 与 SLE 的易感性之间存在相关性^[70]。此外, 遗传学研究证实 GAS5 染色体位点 1q25 与人类 SLE 发生有关。总之, 自身免疫性疾病中异常 ncRNA 表达的研究仍处于探索阶段。

4 ncRNA作为神经系统疾病诊断标记物

帕金森病 (PD) 是第二常见的神经退行性疾病, 影响 5% 的老年人群。尽管在运动症状出现异常多年以前就可出现非运动异常的其他改变, 但目前 PD 的临床诊断仍然是基于神经运动症状的出现。因此, 发现可用于 PD 早期诊断的标志物其临床意义非常重要。由于 miRNA 可以穿过血脑屏障, 因此被认为是神经退行性疾病的潜在生物标志物, 但目前仅发现有限数量的 miRNA 与 PD 有关^[71]。脑脊液 (CSF) 已经广泛用于研究 PD 背景下的蛋白质和其他代谢产物的异常。Burgos 等^[72] 对首诊晚期 PD 患者的 CSF 进行 RNA 测序, 研究结果显示, 65 例 PD 患者和 70 例健康对照组相比, PD 患者 CSF 中出现了 17 种异常表达的 miRNA, 其中 6 个 miRNA (let-7g-3p、miR-128、miR-433、miR-485-5p、miR-132-5p 和 miR-212-3p) 已在其他文献中被报道与 PD 相关。

5 展望

在过去的十年中, lncRNA 及 miRNA 作为非编码 RNA 领域研究的热点, 其在疾病的发生发展中所起的作用已被许多研究所证实, 而其他种类的 ncRNA, 如 circRNA、ceRNA 等在疾病中的作用也逐渐被关注。体液 ncRNA 的检测具有无创性与便利性, 经济成本不高, 具有一定的疾病特异性, 且大量研究已证实其作为疾病诊断标记物具有临床应用潜能, 但目前仍需要更大型的前瞻性临床研究进行验证, 才能最终将某个或某些 ncRNA 在诊断中的应用潜能真正推向临床。然而, 体液 ncRNA 作为疾病诊断标志物仍存在如下需要重视和解决的问题。(1) 如何确定血循环 ncRNA 的疾病特异性, 因同一患者可同时罹患多种疾病, 因此可能同时影响血循环中 ncRNA 的表达水平, 这样会影响诊断的特异性。(2) 如何选择血循环 ncRNA 的内参进行表达量的校正, 因为以组织相关的内参进行循环 ncRNA 表达量校正是不严谨的。未来的下一个十年, 期待高敏感和高特异性的疾病诊断标记物, 可能并

不再是一个或两个独立的分子指标, 或许是由多种 ncRNA 与其他分子指标, 如免疫标志物、传统的蛋白标志物等共同构成的早期诊断模型, 从而使癌症及其他难以早期筛查的疾病获得更早发现的机会, 从而获得更好的预后。

[参 考 文 献]

- [1] Carninci P, Kasukawa T, Katayama S, et al. The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science*, 2005, 309: 1559-63
- [2] Nelson BR, Makarewich CA, Anderson DM, et al. A peptide encoded by a transcript annotated as long noncoding RNA enhances SERCA activity in muscle. *Science*, 2016, 351: 271-5
- [3] Consortium EP, Birney E, Stamatoyannopoulos JA, et al. Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature*, 2007, 447: 799-816
- [4] Ponting CP, Oliver PL, Reik W. Evolution and functions of long noncoding RNAs. *Cell*, 2009, 136: 629-41
- [5] Lipovich L, Johnson R, Lin CY. MacroRNA underdogs in a microRNA world: evolutionary, regulatory, and biomedical significance of mammalian long non-protein-coding RNA. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1799: 597-615
- [6] Cortez MA, Bueso-Ramos C, Ferdin J, et al. MicroRNAs in body fluids--the mix of hormones and biomarkers. *Nat Rev Clin Oncol*, 2011, 8: 467-77
- [7] Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6: 857-66
- [8] Johnsson P, Lipovich L, Grander D, et al. Evolutionary conservation of long non-coding RNAs; sequence, structure, function. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1840: 1063-71
- [9] Mishra PJ, Merlino G. MicroRNA reexpression as differentiation therapy in cancer. *J Clin Invest*, 2009, 119: 2119-23
- [10] Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 2999-3004
- [11] Calin GA, Liu CG, Ferracin M, et al. Ultraconserved regions encoding ncRNAs are altered in human leukemias and carcinomas. *Cancer Cell*, 2007, 12: 215-29
- [12] Barlow JH, Faryabi RB, Callen E, et al. Identification of early replicating fragile sites that contribute to genome instability. *Cell*, 2013, 152: 620-32
- [13] Baer C, Claus R, Plass C. Genome-wide epigenetic regulation of miRNAs in cancer. *Cancer Res*, 2013, 73: 473-7
- [14] Kozaki K, Imoto I, Mogi S, et al. Exploration of tumor-suppressive microRNAs silenced by DNA hypermethylation in oral cancer. *Cancer Res*, 2008, 68: 2094-105
- [15] Shen J, Wang S, Zhang YJ, et al. Genome-wide aberrant DNA methylation of microRNA host genes in hepatocellular

- carcinoma. *Epigenetics*, 2012, 7: 1230-7
- [16] Anwar SL, Lehmann U. DNA methylation, microRNAs, and their crosstalk as potential biomarkers in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*, 2014, 20: 7894-913
- [17] He XX, Kuang SZ, Liao JZ, et al. The regulation of microRNA expression by DNA methylation in hepatocellular carcinoma. *Mol Biosyst*, 2015, 11: 532-9
- [18] Brueckner B, Stresemann C, Kuner R, et al. The human *let-7a-3* locus contains an epigenetically regulated microRNA gene with oncogenic function. *Cancer Res*, 2007, 67: 1419-23
- [19] Suzuki HI, Yamagata K, Sugimoto K, et al. Modulation of microRNA processing by p53. *Nature*, 2009, 460: 529-33
- [20] Sabo A, Kress TR, Pelizzola M, et al. Selective transcriptional regulation by Myc in cellular growth control and lymphomagenesis. *Nature*, 2014, 511: 488-92
- [21] Walz S, Lorenzin F, Morton J, et al. Activation and repression by oncogenic MYC shape tumour-specific gene expression profiles. *Nature*, 2014, 511: 483-7
- [22] Rokavec M, Li H, Jiang L, et al. The p53/miR-34 axis in development and disease. *J Mol Cell Biol*, 2014, 6: 214-30
- [23] Yu X, Li Z. The role of TARBP2 in the development and progression of cancers. *Tumour Biol*, 2016, 37: 57-60
- [24] Gibbings D, Mostowy S, Jay F, et al. Selective autophagy degrades DICER and AGO2 and regulates miRNA activity. *Nat Cell Biol*, 2012, 14: 1314-21
- [25] Li Y, Wang X, He B, et al. Downregulation and tumor-suppressive role of XPO5 in hepatocellular carcinoma. *Mol Cell Biochem*, 2016, 415: 197-205
- [26] Bernards R. It's diagnostics, stupid. *Cell*, 2010, 141: 13-7
- [27] Clark MB, Johnston RL, Inostroza-Ponta M, et al. Genome-wide analysis of long noncoding RNA stability. *Genome Res*, 2012, 22: 885-98
- [28] Orozco AF, Lewis DE. Flow cytometric analysis of circulating microparticles in plasma. *Cytometry A*, 2010, 77: 502-14
- [29] Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, et al. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat Cell Biol*, 2011, 13: 423-33
- [30] Panzitt K, Tschernatsch MM, Guelly C, et al. Characterization of HULC, a novel gene with striking up-regulation in hepatocellular carcinoma, as noncoding RNA. *Gastroenterology*, 2007, 132: 330-42
- [31] Etheridge A, Lee I, Hood L, et al. Extracellular microRNA: a new source of biomarkers. *Mutat Res*, 2011, 717: 85-90
- [32] Sieuwerts AM, Mostert B, Bolt-de Vries J, et al. mRNA and microRNA expression profiles in circulating tumor cells and primary tumors of metastatic breast cancer patients. *Clin Cancer Res*, 2011, 17: 3600-18
- [33] Nilsson J, Skog J, Nordstrand A, et al. Prostate cancer-derived urine exosomes: a novel approach to biomarkers for prostate cancer. *Br J Cancer*, 2009, 100: 1603-7
- [34] Robertson KL, Vora GJ. Locked nucleic acid flow cytometry-fluorescence *in situ* hybridization (LNA flow-FISH): a method for bacterial small RNA detection. *J Vis Exp*, 2012: e3655
- [35] Cissell KA, Deo SK. Trends in microRNA detection. *Anal Bioanal Chem*, 2009, 394: 1109-16
- [36] Cox B, Sneyd MJ. PSA testing in asymptomatic men to diagnose prostate cancer remains experimental. *N Z Med J*, 2009, 122: 10-4
- [37] Previdi MC, Carotenuto P, Zito D, et al. Noncoding RNAs as novel biomarkers in pancreatic cancer: what do we know? *Future Oncol*, 2017, 13: 443-53
- [38] Goode RR, Marshall SJ, Duff M, et al. Use of PCA3 in detecting prostate cancer in initial and repeat prostate biopsy patients. *Prostate*, 2013, 73: 48-53
- [39] Ochiai A, Okihara K, Kamoi K, et al. Clinical utility of the prostate cancer gene 3 (PCA3) urine assay in Japanese men undergoing prostate biopsy. *BJU Int*, 2013, 111: 928-33
- [40] Salagierski M, Mulders P, Schalken JA. Predicting prostate biopsy outcome using a PCA3-based nomogram in a Polish cohort. *Anticancer Res*, 2013, 33: 553-7
- [41] Hessels D, Klein Gunnewiek JM, van Oort I, et al. DD3(PCA3)-based molecular urine analysis for the diagnosis of prostate cancer. *Eur Urol*, 2003, 44: 8-15; discussion 15-6
- [42] Deras IL, Aubin SM, Blase A, et al. PCA3: a molecular urine assay for predicting prostate biopsy outcome. *J Urol*, 2008, 179: 1587-92
- [43] Luo Y, Gou X, Huang P, et al. The PCA3 test for guiding repeat biopsy of prostate cancer and its cut-off score: a systematic review and meta-analysis. *Asian J Androl*, 2014, 16: 487-92
- [44] 2017年中国前列腺癌早期诊断专家共识. *Chin J Surg*, 2017, 55: 340-41
- [45] Permeth JB, Chen DT, Yoder SJ, et al. Linc-ing circulating long non-coding RNAs to the diagnosis and malignant prediction of intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. *Sci Rep*, 2017, 7: 10484
- [46] Schultz NA, Dehlendorff C, Jensen BV, et al. MicroRNA biomarkers in whole blood for detection of pancreatic cancer. *JAMA*, 2014, 311: 392-404
- [47] Li A, Yu J, Kim H, et al. Serum miR-1290 as a marker of pancreatic cancer--response. *Clin Cancer Res*, 2013, 19: 5252-3
- [48] Szafranska AE, Davison TS, John J, et al. MicroRNA expression alterations are linked to tumorigenesis and non-neoplastic processes in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncogene*, 2007, 26: 4442-52
- [49] Liu J, Gao J, Du Y, et al. Combination of plasma microRNAs with serum CA19-9 for early detection of pancreatic cancer. *Int J Cancer*, 2012, 131: 683-91
- [50] Xu J, Cao Z, Liu W, et al. Plasma miRNAs effectively distinguish patients with pancreatic cancer from controls: a multicenter study. *Ann Surg*, 2016, 263: 1173-9
- [51] Deng J, Yang M, Jiang R, et al. Long non-coding RNA HOTAIR regulates the proliferation, self-renewal capacity, tumor formation and migration of the cancer stem-like cell (CSC) subpopulation enriched from breast cancer cells.

- PLoS One, 2017, 12: e0170860
- [52] Zhang Y, Zhang K, Luo Z, et al. Circulating long non-coding HOX transcript antisense intergenic ribonucleic acid in plasma as a potential biomarker for diagnosis of breast cancer. *Thorac Cancer*, 2016, 7: 627-32
- [53] Liu M, Xing LQ, Liu YJ. A three-long noncoding RNA signature as a diagnostic biomarker for differentiating between triple-negative and non-triple-negative breast cancers. *Medicine: Baltimore*, 2017, 96: e6222
- [54] Su X, Malouf GG, Chen Y, et al. Comprehensive analysis of long non-coding RNAs in human breast cancer clinical subtypes. *Oncotarget*, 2014, 5: 9864-76
- [55] Heneghan HM, Miller N, Kelly R, et al. Systemic miRNA-195 differentiates breast cancer from other malignancies and is a potential biomarker for detecting noninvasive and early stage disease. *Oncologist*, 2010, 15: 673-82
- [56] Schwarzenbach H, Milde-Langosch K, Steinbach B, et al. Diagnostic potential of PTEN-targeting miR-214 in the blood of breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*, 2012, 134: 933-41
- [57] Kodahl AR, Lyng MB, Binder H, et al. Novel circulating microRNA signature as a potential non-invasive multi-marker test in ER-positive early-stage breast cancer: a case control study. *Mol Oncol*, 2014, 8: 874-83
- [58] Shimomura A, Shiino S, Kawauchi J, et al. Novel combination of serum microRNA for detecting breast cancer in the early stage. *Cancer Sci*, 2016, 107: 326-34
- [59] Chan M, Liaw CS, Ji SM, et al. Identification of circulating microRNA signatures for breast cancer detection. *Clin Cancer Res*, 2013, 19: 4477-87
- [60] Li N, Wang Y, Liu X, et al. Identification of circulating long noncoding RNA HOTAIR as a novel biomarker for diagnosis and monitoring of non-small cell lung cancer. *Technol Cancer Res Treat*, 2017, 16: 1060-6
- [61] Wu L, Zhang L, Zheng S. Role of the long non-coding RNA HOTAIR in hepatocellular carcinoma. *Oncol Lett*, 2017, 14: 1233-9
- [62] Luo ZF, Zhao D, Li XQ, et al. Clinical significance of HOTAIR expression in colon cancer. *World J Gastroenterol*, 2016, 22: 5254-9
- [63] Wang W, He X, Zheng Z, et al. Serum HOTAIR as a novel diagnostic biomarker for esophageal squamous cell carcinoma. *Mol Cancer* 2017, 16(1):75.
- [64] Zhang Y, Yu S, Jiang L, et al. HOTAIR is a promising novel biomarker in patients with thyroid cancer. *Exp Ther Med*, 2017, 13: 2274-8
- [65] Tong YS, Wang XW, Zhou XL, et al. Identification of the long non-coding RNA POU3F3 in plasma as a novel biomarker for diagnosis of esophageal squamous cell carcinoma. *Mol Cancer*, 2015, 14: 3
- [66] Sestini S, Boeri M, Marchiano A, et al. Circulating microRNA signature as liquid-biopsy to monitor lung cancer in low-dose computed tomography screening. *Oncotarget*, 2015, 6: 32868-77
- [67] Wen Y, Han J, Chen J, et al. Plasma miRNAs as early biomarkers for detecting hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*, 2015, 137: 1679-90
- [68] Furer V, Greenberg JD, Attur M, et al. The role of microRNA in rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. *Clin Immunol*, 2010, 136: 1-15
- [69] Dai R, Ahmed SA. MicroRNA, a new paradigm for understanding immunoregulation, inflammation, and autoimmune diseases. *Transl Res*, 2011, 157: 163-79
- [70] Haywood ME, Rose SJ, Horswell S, et al. Overlapping BXSBS congenic intervals, in combination with microarray gene expression, reveal novel lupus candidate genes. *Genes Immun*, 2006, 7: 250-63
- [71] Teixeira Dos Santos MC, Bell R, da Costa AN. Recent developments in circulating biomarkers in Parkinson's disease: the potential use of miRNAs in a clinical setting. *Bioanalysis*, 2016, 8: 2497-518
- [72] Burgos K, Malenica I, Metpally R, et al. Profiles of extracellular miRNA in cerebrospinal fluid and serum from patients with Alzheimer's and Parkinson's diseases correlate with disease status and features of pathology. *PLoS One*, 2014, 9: e94839