

长链非编码 RNA 在肿瘤中的研究进展

崔宏伟 苏秀兰

摘要 长链非编码 RNAs (long non-coding RNAs, lncRNAs) 是指片段长度超过 200 核苷酸 (nt) 的, 不编码蛋白质, 直接以 RNA 形式发挥生物学功能的一类 RNA。它可以在染色质修饰、转录调节以及转录后调节等多个层面发挥生物学功能。近年来研究发现, lncRNAs 的异常调节参与了多种肿瘤的发生、发展和转移, 这已经成为许多肿瘤的基本特征。本文旨在集中已有的证据阐述 lncRNA 在癌症的发生、发展过程中的作用, 以期对癌症形成机制的研究提供新的思路。

关键词 长链非编码 RNA 肿瘤 转录调节

中图分类号 R73

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.04.002

人类基因组计划 (human genome project, HGP) 研究表明, 在基因转录过程中, 只有很少一部分 (约 1%) 的基因可转录成有生物学功能的 RNA, 而绝大多数 (约 98%) 的基因为无蛋白编码功能的非编码 RNA (non-coding RNA, ncRNA)^[1,2]。ncRNA 又包含短链 (siRNAs, snoRNAs, miRNAs 等长度 < 200nt) 和长链 (长度 > 200nt) 非编码 RNA 两类。长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 占非编码 RNA 的大部分。据 lncRNA 在基因组上与编码基因的亲向性, 共分为 5 类, 即正义链、反义链、双向、内含子及基因间 RNA^[3]。既往研究表明, 大约有 15000 种 lncRNA 在组织中具有特异性的表达。其可通过 DNA 甲基化、转录后调控、印迹基因、组蛋白修饰等多种机制, 在细胞的周期、增殖、迁移、侵袭和代谢中发挥调节作用, 从而影响编码基因的表达水平^[4-6]。笔者结合国内外最新文献及数据库资料, 重点阐述 lncRNA 在癌症的发生、发展过程中, 尤其是在胃癌进程中的作用及其调节机制, 以期对癌症形成机制的研究及胃癌的发病机制、临床诊治及预后提供新的思路与方法。

一、LncRNA 的概述

lncRNA 是一类长度 > 200nt 的, 序列上缺少转录过程中重要的开放阅读框 (open reading frames, ORFs) 结构的 ncRNA 转录本。故其虽然在真核细胞

内被普遍转录, 但几乎很少编码蛋白质^[7,8]。据 lncRNA 与蛋白编码基因间的距离及相对位置, 其可以分为正义 (sense lncRNA)、反义 (antisense)、双向 (bidirectional)、基因间 (intergenic) 以及基因内 (intronic) lncRNA 5 大类^[9]。与短链非编码 RNAs (small non-coding RNAs, ncRNAs) 如微小 RNAs (microRNAs, miRNAs)、小干扰 RNAs (small interfering RNAs, siRNAs)、转运 RNAs (transfer RNAs, tRNAs) 等相反的是, 数以千计的 lncRNA 在近年内才被陆续发现, 但其绝大多数的生物学功能仍然不明了。lncRNA 较长的核苷酸链既利于其形成复杂的空间结构, 又利于其与蛋白因子相互作用, 或者为共同参与基因组印迹、性染色体沉默、染色体修饰、核内运输、转录激活与干扰等过程从而调节细胞生长、分化、发展、衰老与死亡的分子提供一个长链结构^[10]。此外, 它们还可作为 miRNA 的前体发挥作用^[11]。总体来说, lncRNA 主要通过调节基因表达, 影响蛋白在细胞中的定位, 通过自身折叠作用与蛋白或细胞亚结构成分形成复合物等方式发挥作用。

目前, 研究表明 lncRNA 的作用机制包括表观遗传学水平、转录水平、转录后水平的调控等机制。lncRNA 通过 DNA 甲基化及去甲基化、RNA 干扰、组蛋白修饰、染色质重塑等表观遗传学机制调节基因表达^[12]。如大家熟知的人类同源异型盒 (HOX) 基因座的反义 RNA (HOX antisense intergenic RNA, HO-TAIR) 在乳腺癌、肝癌、结直肠癌中发生过表达, 同时诱导 PRC2 (polycomb repression complex 2) 并将其定位到 HOXD 位点, 通过 DNA 甲基化机制抑制 HOXD 位点周围 40kb 范围的基因转录^[13]。另外, 失活 X 染色体的 XIST (X inactive specific transcript) 通过自身

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81160254); 内蒙古自治区卫生和计划生育委员会科研基金资助项目 (201302072)

作者单位: 010050 呼和浩特, 内蒙古医科大学附属医院临床医学研究中心

通讯作者: 苏秀兰, 教授, 博士生导师, 电子信箱: xlsu@hotmail.com

胞嘧啶甲基化途径降低与 PRC2 结合的能力,最终引起 X 染色体基因沉默^[14]。在转录水平上, lncRNA 依据其长链空间结构特征,以序列特异性结合的方式结合转录因子和聚合酶,从而影响其活性而发挥调控基因表达的作用。如 lncRNA 通过 cis-acting 或者 trans-acting 方式与靶基因作用参与基因调控过程,上调表达的 lncRNA SRG1 可能以 cis-acting 的方式转录干扰,抑制其邻近基因 SER3 的表达。在转录后水平, lncRNA 与其靶 mRNA 间通过碱基互补配对规律形成 RNA 二聚体,能够封闭调节 mRNA 剪接、翻译、降解作用的转录因子或者转录相关因子的结合位点,从而发挥调控基因作用^[15,16]。如人肺腺癌转移相关转录因子 1 (metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript-1, MALAT1) 可能干扰 mRNA 剪接因子 SR 的磷酸化水平及其细胞内分布,从而作为判断早期非小细胞肺癌转移和患者预后的参考指标^[17]。

二、lncRNA 与肿瘤的关系

癌症是由于细胞内部的遗传及表观遗传改变的持续累积而引发,且癌细胞的染色体常伴有缺失或重组。一些癌症相关的信号转导途径,如 Wnt/ β Catenin、MAPK、TGF β 、p14ARF/p53、PI₃K/AKT 等,在恶性细胞中显著发生改变^[18]。肿瘤细胞转录组的分析表明人类基因组中的大量非编码 RNA 在肿瘤生成中发挥重要作用。特别地, lncRNA 在遗传学和肿瘤的发病机制中发挥关键作用,以及 lncRNA 功能紊乱与癌症进程密切相关^[19-21]。

1. lncRNA 与肿瘤细胞增殖:既往研究表明,部分 lncRNAs 本质为致瘤性的,当其受到外源因素影响,表达上调导致肿瘤发生;部分 lncRNAs 本质为抑瘤性的,当其受到外源因素影响,表达下调导致肿瘤发生^[22]。Prensner 等^[23]对前列腺癌组织中 lncRNA 前列腺癌相关转录体 1 (prostate cancer associated transcript 1, PCAT-1) 的 RNA 测序结果表明, lncRNA PCAT-1 不论在局灶性高分化还是转移性前列腺癌组织中的表达显著上调,随后利用 RNA 过表达技术干扰前列腺癌细胞,发现肿瘤细胞的增殖能力得到显著提升;而对其采用 siRNA 干涉后,发现肿瘤细胞的增殖能力下降程度达到 50%。深入研究表明 siRNA 干涉 PCAT-1 后,约有 255 个基因上调,而这些基因大多数参与了细胞周期的调控,说明 PCAT-1 主要通过调控细胞周期来促进肿瘤细胞增殖。Yang 等^[24]对膀胱癌细胞中 lncRNA 尿路上皮癌胚抗原 1

(urothelial carcinoma associated 1, UCA 1) 研究结果表明, UCA1 通过影响蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB) 的活性和表达,利用磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B (phosphatidylinositol 3 kinase / proteinkinase B, PI₃K/Akt) 信号转导通路来与转录因子环磷酸腺苷反应元件结合蛋白 (coactivator cAMP response element, binding protein, CREB) 相互作用,调节蛋白的定位,最终促进肿瘤细胞增殖。

2. lncRNA 与癌基因的活化、抑癌基因的失活: lncRNA 通过调节抑癌基因或者癌基因的表达水平,或者 lncRNA 自身结构改变导致功能失调,从而参与肿瘤的进程。Li 等通过软琼脂克隆及裸鼠成瘤实验发现,经亲和色谱分析法分离出 5 种与人双链 DNA 结合蛋白 PSF (hPSF) 结合的非编码 RNA 片段的表达都能分别促使肿瘤的发生。进一步研究将其用小干扰 RNA 敲除后即导致致瘤能力的减弱。同时,开展对 9 株不同癌细胞系进行检测,结果表明其均有高水平的 hPSF 结合 RNA 表达。由此得出与 hPSF 结合的非编码 RNA 通过逆转 PSF 介导的原癌基因转录抑制促使肿瘤发生, hPSF 结合非编码 RNA 失调在人类癌症发生中起到核心作用^[25]。而另一项对于抑癌基因 p16 的研究表明, lncRNA ANRIL (antisense non-coding RNA in the INK4 locus) PRC1 (polycomb repression complex 1) 的亚单位 CBX7 相结合,招募 PRC1 至 p16 (INK4A)/p14 (ARF) 位点,使 p16 (INK4A)/p14 (ARF) 基因沉默,促进了前列腺癌的发生^[26]。

3. lncRNA 与肿瘤转移和浸润:恶性肿瘤进程常伴随血液、淋巴等途径进行局部或远处转移,形成转移病灶,往往提示患者预后较差,现有研究证实, lncRNA 的异常表达可能也参与该过程。如人们所熟知的 lncRNA AHOTAIR (HOX Transcript Antisense Intergenic RNA) 中的 HOXD10 (homeobox D10)、PGR (progesterone receptor)、PCDH10 (protocadherin10)、PCDHB5 (protocadherin Beta 5)、JAM2 (junctional adhesion molecule 2) 等都与肿瘤的转移、浸润密切相关。这些基因的上调参与各种恶性肿瘤进程,如原发或转移性乳腺癌、胃癌、非小细胞肺癌等。MALAT-1 (metastasis associated lung adenocarcinoma transcript1) 是另一个研究较透彻的 lncRNA。报道称其在大多数肿瘤如乳腺癌、前列腺癌、结肠癌、肝癌、子宫内膜癌中同样高表达,通过 siRNA 技术干扰 MALAT-1 表达后,发现肿瘤的转移能力显著减弱。由此可见,

MALAT-1 可能是一个潜在的人类广谱肿瘤标志物,有望成为肿瘤分子治疗的一个靶点。

4. lncRNA 与凋亡抑制:研究表明,部分异常表达的 lncRNA 可以通过抑制细胞凋亡引发肿瘤形成。如 lncRNA 生长阻滞特异转录物 5 (Gas 5),一种调控细胞生长和凋亡的关键作用因子,具有与糖皮质激素应答元件相似的结合糖皮质激素受体 DNA 结构域的结构特点,最终能阻止糖皮质激素受体与糖皮质激素应答元件的相互作用,从而抑制其下游基因的表达,最后促进细胞凋亡的发生,影响了细胞生长。此外,在前列腺癌中高表达的 PCGEM (prostate - specific gene),可能通过抑制 p53、p21 活性而起到抗凋亡作用。

三、lncRNA 的研究方法

目前在 lncRNA 研究中使用较为成熟技术有 lncRNA 芯片 (lncRNA microarray)、RNA 测序 (RNA - seq)、DNA 印迹 (Northern blot)、实时荧光定量反转录聚合酶链反应 (qRT - PCR)、荧光原位杂交 (FISH)、RNA 干扰 (RNAi) 和 RNA 结合蛋白免疫共沉淀 (RIP) 等。lncRNA 芯片和 RNA - seq 是高通量检测和筛选 lncRNA 表达情况的有效手段。Northern blot 和 qRT - PCR 不仅广泛应用于分析 lncRNA 的表达水平,而且常用于验证 lncRNA 芯片数据的可靠性。上述实验技术主要用于 lncRNA 的定量及定性分析,在 lncRNA 功能研究中,使用较多的方法有 RNAi 和 RIP。RNAi 用来干扰特定的 lncRNA 已经得到广泛的应用。RIP 是一项研究 RNA 和蛋白质之间相互作用的实验方法,可用于筛选与 lncRNA 结合并发挥作用的相关蛋白质。这些技术方法的联合应用将更有利于揭示 lncRNA 的生物学功能。

四、lncRNA 研究中存在的问题

目前 lncRNA 研究正处于初期阶段,因此面临着许多亟待解决的问题:①由于 lncRNA 种类和功能的多样性,在区分 lncRNA 功能性和非功能性非编码转录产物方面存在困难,导致难以阐明 lncRNA 具体的生物学功能;②lncRNA 缺少一个统一的命名原则,多数是根据其功能、结构特点、作用方式等进行命名,所以很难从名称中了解其真正的含义和功能;③目前,关于 lncRNA 数据库及功能预测的工具缺乏。相对于其他非编码 RNA 数据库,lncRNA 相关数据库存在内容还不够全面,针对 lncRNA 的生物信息学工具极少等问题;④用于 lncRNA 研究的新技术相对较少。因此,需要建立更多、更有效的研究方法用于系统地

研究 lncRNA 的结构和功能。

综上所述,随着越来越多的研究者关注并且投身到 lncRNA 研究领域,对 lncRNA 的认识也越来越深入。lncRNA 可以影响细胞凋亡、信号通路和肿瘤转移及浸润等各个方面,在肿瘤进程中发挥重要作用。然而由于 lncRNA 作用机制的多样和复杂,目前对 lncRNA 功能的认识仍然只是冰山一角。这就要求不断地努力深入揭示 lncRNA 在肿瘤进程中的分子机制,开发出更多的新技术运用于 lncRNA 的功能研究中,为进一步解析 lncRNA 的功能及其分子调控机制,以及其在疾病发生、发展中的病理机制做出贡献。

参考文献

- 1 Rio D. Twenty years of RNA [J]. RNA, 2015, 21(4):718 - 720
- 2 Grimson A. Noncoding RNA: linking microRNAs to their targets [J]. Nat Chem Biol, 2015, 11(2):100 - 101
- 3 Archer K, Broskova Z, Bayoumi AS, et al. Long non - coding RNAs as master regulators in cardiovascular diseases [J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(10):23651 - 23667
- 4 Daniel C, Lagergren J, Öhman M. RNA editing of non - coding RNA and its role in gene regulation [J]. Biochimie, 2015, 117:22 - 27
- 5 Ma Y, Ma W, Huang L, et al. Long non - coding RNAs, a new important regulator of cardiovascular physiology and pathology [J]. Int J Cardiol, 2015, 188:105 - 110
- 6 Sang H, Liu H, Xiong P, et al. Long non - coding RNA functions in lung cancer [J]. Tumour Biol, 2015, 36(6):4027 - 4037
- 7 Tsai M C, Manor O, Wan Y, et al. Long noncoding RNA as modular scaffold of histone modification complexes [J]. Science, 2010, 329(5992):689 - 693
- 8 Kung JT, Colognori D, Lee JT. Long noncoding RNAs: past, present, and future [J]. Genetics, 2013, 193(3):651 - 669
- 9 Morris KV, Mattick JS. The rise of regulatory RNA [J]. Nat Rev Genet, 2014, 15(6):423 - 437
- 10 Li X, Wu Z, Fu X, et al. Long noncoding RNAs: insights from biological features and functions to diseases [J]. Med Res Rev, 2013, 33(3):517 - 553
- 11 Wang X, Song X, Glass CK. The long arm of longnoncoding RNAs: roles as sensors regulating gene transcriptional programs [J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011, 3(1):a003756
- 12 Fu XD. Non - coding RNA: a new frontier in regulatory biology [J]. Natl Sci Rev, 2014, 1(2):190 - 204
- 13 Lu L, Zhu G, Zhang C, et al. Association of large noncoding RNA HOTAIR expression and its downstream intergenic CpG island methylation with survival in breast cancer [J]. Breast Cancer Res Treat, 2012, 136(3):875 - 883
- 14 Araújo ES, Vasques LR, Stabellini R, et al. Stability of XIST repression in relation to genomic imprinting following global genome demethylation in a human cell line [J]. Braz J Med Biol Res, 2014, 47(12):1029 - 1035

- 15 Beltran M, Puig I, Pena C, *et al.* A natural antisense transcript regulates Zeb2/Sip1 gene expression during Snail1 - induced epithelial - mesenchymal transition [J]. *Genes Dev*, 2008, 22(6): 756 - 769
- 16 Yap KL, Li S, Munoz - Cabello AM, *et al.* Molecular interplay of the noncoding RNA ANRIL and methylated histone H3 lysine 27 by polycomb CBX7 in transcriptional silencing of INK4a [J]. *Mol Cell*, 2010, 38(5): 662 - 674
- 17 Shen L, Chen L, Wang Y, *et al.* Long noncoding RNA MALAT1 promotes brain metastasis by inducing epithelial - mesenchymal transition in lung cancer[J]. *J Neurooncol*, 2015, 121(1):101 - 108
- 18 Haemmerle M, Gutschner T. Long non - coding RNAs in cancer and development: where do we go from here? [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(1):1395 - 1405
- 19 Spizzo R, Almeida MI, Colombatti A, *et al.* Long non - coding RNAs and cancer: a new frontier of translational research? [J]. *Oncogene*, 2012, 31(43):4577 - 4587
- 20 Li CH, Chen Y. Targeting long non - coding RNAs in cancers: progress and prospects[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2013, 45(8):1895 - 1910
- 21 Qiu MT, Hu JW, Yin R, *et al.* Long noncoding RNA: an emerging paradigm of cancer research [J]. *Tumour Biol*, 2013, 34(2):613 - 620
- 22 Qi P, Du X. The long non - coding RNAs, a new cancer diagnostic and therapeutic gold mine[J]. *Mod Pathol*, 2013, 26(2):155 - 165
- 23 Prensner JR, Iyer MK, Balbin OA, *et al.* Transcriptome sequencing across a prostate cancer cohort identifies PCAT - 1, an unannotated lincRNA implicated in disease progression [J]. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(8): 742 - 749
- 24 Yang C, Li X, Wang Y, *et al.* Long non - coding RNA UCA1regulated cell cycle distribution via CREB through PI3 - K dependent pathway in bladder carcinoma cells[J]. *Gene*, 2012, 496(1): 8 - 16
- 25 Li L, Feng T, Lian Y, *et al.* Role of human noncoding RNAs in the control of tumorigenesis [J]. *P Nat Acad Sci*, 2009, 106(31): 12956 - 12961

(收稿日期:2015 - 10 - 01)

(修回日期:2015 - 10 - 09)

(上接第3页)

- 7 Lawitz E, Gane EJ. Sofosbuvir for previously untreated chronic hepatitis C infection[J]. *N Engl J Med*, 2013, 368(20):1878 - 1887
- 8 Zeuzem S, Dusheiko GM, Salupere R, *et al.* Sofosbuvir and Ribavirin in HCV Genotypes 2 and 3[J]. *N Engl J Med*, 2014, 370(21): 1993 - 2001
- 9 Pawlotsky JM. New hepatitis C therapies: the toolbox, strategies, and challenges[J]. *Gastroenterology*, 2014, 146(5):1176 - 1192
- 10 Sulkowski MS, Gardiner DF, Rodriguez - Torres M, *et al.* Dacatasvir plus sofosbuvir for previously treated or untreated chronic HCV infection[J]. *N Engl J Med*, 2014, 370(3):211 - 221
- 11 Kowdley KV, Gordon ST, Reddy KR, *et al.* Ledipasvir and sofosbuvir for 8 or 12 weeks for chronic HCV without cirrhosis[J]. *N Engl J Med*, 2014, 370(20):1879 - 1888
- 12 Reddy KR, Bourliere M, Sulkowski M, *et al.* Ledipasvir and sofosbuvir in patients with genotype 1 hepatitis C virus infection and compensated cirrhosis: an integrated safety and efficacy analysis[J]. *Hepatology*, 2015,62(1):79 - 86
- 13 Aql BA, Pungpapong S, Leise M, *et al.* Multicenter experience using simeprevir and sofosbuvir with or without ribavirin to treat Hepatitis C genotype 1 in patients with cirrhosis[J]. *Hepatology*, 2015,62(4):1004 - 1012
- 14 Saxena V, Nyberg L, Pauly M, *et al.* Safety and efficacy of simeprevir/sofosbuvir in hepatitis C - infected patients with compensated and decompensated cirrhosis[J]. *Hepatology*, 2015,62(3):715 - 725
- 15 Zeuzem S, Ghalib R, Reddy R, *et al.* Grazoprevir - elbasvir combination therapy for treatment - naïve cirrhotic and noncirrhotic patients with chronic HCV genotype 1, 4, or 6 infection[J]. *Ann Intern Med*, 2015,163(1):1 - 13
- 16 Reiberger T, Rutter K, Ferlitsch A, *et al.* Portal pressure predicts outcome and safety of antiviral therapy in cirrhotic patients with hepatitis C virus infection[J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2011,9(7): 602 - 608
- 17 Liu C, Zhu H, Tu Z, *et al.* CD81 T - cell interaction with HCV replicon cells; evidence for both cytokine - and cell - mediated antiviral activity[J]. *Hepatology*, 2003,37(6):1335 - 1342
- 18 Poveda E, Wyles DL, Mena A, *et al.* Update on hepatitis C virus resistance to direct - acting antiviral agents[J]. *Antivir Re*, 2014,108(4): 181 - 191
- 19 Svarovskaia ES, Dvory - Sobol H, Parkin N, *et al.* Infrequent development of resistance in genotype 1 - 6 hepatitis C virus - infected subjects treated with sofosbuvir in phase 2 and 3 clinical trials[J]. *Clin Infect Dis*, 2014,59(12):1666 - 1674
- 20 Donaldson EF, Harrington PR, O'Rear JJ, *et al.* Clinical evidence and bioinformatics characterization of potential hepatitis C virus resistance pathways for sofosbuvir[J]. *Hepatology*, 2015, 61(1):56 - 65
- 21 O'Brien TR, Feld JJ, Kottlil S, *et al.* No scientific basis to restrict 8 weeks of treatment with ledipasvir/sofosbuvir to patients with HCV RNA <6000000 IU/ml[J]. *Hepatology*,2016,63(1):28 - 30
- 22 Kohli A, Osinusi A, Sims Z, *et al.* Virological response after 6 week triple - drug regimens for hepatitis C: a proof - of - concept phase 2A cohort study[J]. *Lancet*, 2015, 385(9973):1107 - 1113
- 23 Kattakuzhy S, Wilson E, Sidharthan S, *et al.* Moderate sustained virologic response rates with 6 - week combination directly acting anti - hepatitis C virus therapy in patients with advanced liver disease[J]. *Clin Infect Dis*, 2016,62(4):440 - 447

(收稿日期:2015 - 01 - 25)

(修回日期:2015 - 01 - 26)