

LncRNA 与结直肠癌诊断治疗的研究进展

潘雪峰^{1,2}, 范乃军², 高春芳²

(1.解放军第二军医大学, 上海 200433; 2.解放军第 150 中心医院, 河南 洛阳 471031)

摘要: 结直肠癌(CRC)是常见的恶性肿瘤之一, 严重威胁着人类的健康。目前大量的研究表明异常表达的长链非编码 RNA(lncRNA)通过影响肿瘤细胞的增殖、凋亡、迁移及侵袭等生物学行为参与了 CRC 的发生发展, 并且发现 lncRNA 的单核苷酸多态性(SNPs)与 CRC 的易感性密切相关。因此, 针对 lncRNA 的深入研究有望为 CRC 的诊断和治疗提供新的手段。

关键词: 长链非编码 RNA; 结直肠肿瘤; 诊断; 治疗

中图分类号: R735.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2017)02-0111-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2017.02.B007

Progress on Long Non-coding RNA in Diagnosis and Treatment of Colorectal Cancer

PAN Xue-feng^{1,2}, FAN Nai-jun², GAO Chun-fang²

(1.The Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2.No.150 Central Hospital of PLA, Luoyang 471031, China)

Abstract: Colorectal cancer (CRC) is one of the most common malignant diseases. At present, studies have indicated that dysregulated long non-coding RNA (lncRNA) are involved in the tumorigenesis and progression of CRC by affecting on various biological behavior, including the proliferation, apoptosis, migration and invasion of tumor cells. Moreover, emerging evidence has revealed that single nucleotide polymorphisms(SNPs) of lncRNA are closely related to the susceptibility of CRC. Further study on lncRNA may provide a new approach for diagnosis and treatment of CRC.

Subject words: long non-coding RNA; colorectal neoplasms; diagnosis; therapy

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是常见的恶性肿瘤之一, 目前全球每年约有 140 万名患者被诊断为 CRC, 其中有近 70 万人死于该疾病^[1]。CRC 的发生除了有较强的家族遗传因素, 还与不良饮食习惯、肥胖及吸烟等因素有关, 但具体发病机制尚不清楚。近年来研究表明, 长链非编码 RNA(long non-coding RNA, lncRNA)通过调控肿瘤相关的关键性基因、蛋白的表达在 CRC 的发生发展及预后等病理过程中发挥着重要作用, 深入研究 lncRNA 不仅能使我们进一步了解 CRC 的发病机制, 而且有望使之成为新的 CRC 诊断标志物和治疗靶点^[2-4]。

通讯作者: 高春芳, 所长, 主任医师, 博士生导师, 博士; 解放军第 150 中心医院肛肠外科研究所, 河南省洛阳市涧西区华夏西路 2 号 (471031); E-mail: chunfanggao@126.com

收稿日期: 2016-07-31; 修回日期: 2016-09-24

1 LncRNA 概况

人类基因组中只有约 1.5% 基因可以编码蛋白, 绝大部分基因被转录成非编码 RNA(non-coding RNA, ncRNA), ncRNA 依据其长度(小于或大于 200nt)可分为短链 ncRNA(包括 miRNA 等)和 lncRNA, 而 lncRNA 是最常见和功能最多样化的一类。LncRNA 由 RNA 聚合酶 II 转录生成, 具有明显的时空表达特异性, 缺少显著的开放阅读框, 广泛存在于细胞核和细胞质内, 不参与或很少参与蛋白质编码。目前在人类全基因组中已经发现有 101 700 个 lncRNA 基因共编码了 167 150 个不同的 lncRNA 转录本^[5]。这些 lncRNA 通过基因沉默、组蛋白修饰、转录激活与干扰等方式在表观遗传学、转录及转录后水平影响

基因的表达,从而促进肿瘤的发生发展,并与恶性肿瘤的临床生物学行为密切相关^[2,3]。

2 LncRNAs 与 CRC 诊断

2.1 结肠癌相关的转录本 1 (colon cancer associated transcript1, CCAT1)

CCAT1 位于被称之为“基因荒漠”区域的染色体 8q24 上,紧邻 MYC 癌基因,是 CRC 特异性的 lncRNA。目前研究表明 MYC 癌基因可以结合 CCAT1 启动子,促进其在 CRC 中的表达,增强细胞的增殖、迁移以及侵袭能力,而 CCAT1 的表达水平与 CRC 的肿瘤浸润深度、分期、血管侵犯以及 CA19-9 水平密切相关,CCAT1 可能通过 EMT 途径促进了 CRC 的发生发展^[6,7]。Nissan 等^[8]研究表明在 CRC 从癌前病变到癌转移的整个病理过程中 CCAT1 均呈现高表达,CRC 组织中 CCAT1 的表达水平是正常黏膜的 235 倍,40% 的患者外周血中其亦呈高表达而健康人则不表达,进一步的研究发现即使在苏木精—伊红染色或免疫组化阴性的淋巴结中亦可检测到 CCAT1 的表达。CCAT1 高度的灵敏度和特异性为 CRC 精确诊断提供了可能。另外,Kam 等^[9]研究表明 CCAT1-特定肽核酸分子信标 (TO-PNA-MB) 与 CCAT1 杂交时可以产生特殊的荧光信号,通过检测 TO-PNA-MB 能够区分良性肿瘤和癌前病变及浸润性腺癌,有助于医生发现临床隐性病灶,更好地进行鉴别诊断和临床分期。

2.2 HOTAIR (homeobox transcript antisense intergenic RNA, HOTAIR)

HOTAIR 是染色体 12q13.13 上的一个反义 lncRNA,可以通过 Wnt/ β -catenin 通路、EMT 过程以及作为竞争性内源性 RNA 在 CRC 发病中发挥重要作用,其表达水平与 CRC 患者的预后有关^[10]。Svoboda 等^[11]的研究发现 CRC 患者血液中的 HOTAIR 明显高于健康人,诊断肿瘤的灵敏度为 67%、特异性为 92.5%,而联合检测血浆中的 HOTAIR 和 CCAT1 诊断 CRC 的灵敏度和特异性分别为 84.3% 和 80.2%,CRC 早期检出率可达到 85%。因此,研究者认为两者联合检测可以用于 CRC 的早期诊断^[11,12]。

2.3 前列腺癌非编码 RNA1 (prostate cancer non-coding RNA1, PRNCR1)

PRNCR1 位于染色体 8q24 上,长约 13kb。最新

的研究表明敲除 PRNCR1 可使细胞停滞于 G₀/G₁ 期,S 期细胞的比例下降,从而抑制细胞的增殖能力,PRNCR1 可能通过影响细胞周期促进了 CRC 的进展。在 CRC 组织中 PRNCR1 表达量平均比正常组织高近 11 倍,ROC 曲线分析 AUC 值为 0.799,优于血清 CEA-CA199 (AUC=0.651),研究者认为 PRNCR1 有望成为更为敏感的 CRC 诊断标志物^[13]。

2.4 结直肠肿瘤差异表达基因 (colorectal neoplasia differentially expressed, CRNDE)

CRNDE 可以通过改变组蛋白甲基转移酶的活性,从表观遗传学方面调节的基因表达,其核转录本可以被胰岛素及胰岛素样生长因子所抑制,是 PI3K/Akt/mTOR 通路和 Raf/MAPK 通路的下游靶点^[14]。最初 Graham 等^[15]研究发现 CRNDE 在 90% 以上的结直肠腺瘤和 CRC 组织中的表达高于健康人,其中 CRNDE-h 表达水平区分腺瘤和正常肠黏膜组织的灵敏度和特异性分别为 95% 和 96%,而血浆中的 CRNDE-h 诊断 CRC 的灵敏度和特异性可达 87% 和 93%。2016 年 Liu 等^[16]的研究进一步证实了 CRNDE-h 的表达水平在 CRC 中的诊断价值。

3 LncRNAs 与 CRC 治疗

3.1 H19

LncRNA H19 是一个母系表达的癌胚性印迹基因,在胚胎发育和肿瘤形成中发挥着关键作用,H19 几乎表达于人类所有恶性肿瘤中并参与肿瘤发生发展的每个阶段,高表达的 H19 提示肿瘤的不良预后。Han 等^[17]的研究表明 H19 与肿瘤的分化程度和分期密切相关,并可以作为 CRC 患者总生存期和无病生存期的独立预测因子,通过生物信息学分析及免疫共沉淀实验发现 H19 通过募集和结合真核翻译延长因子 4A3(eIF4A3)影响细胞周期调控基因的表达,从而影响肿瘤细胞的增殖,敲除 H19 则可以明显抑制肿瘤细胞的增殖活性甚至导致生长停滞,该研究为 CRC 的基因靶向治疗提供了新的理论依据。

3.2 LincRNA-p21

LincRNA-p21 是一个由细胞周期相关基因 P21 附近位点转录的 lncRNA,参与细胞周期调控及细胞凋亡。研究表明 LincRNA-p21 在 CRC 患者中呈现低表达,并与 Wnt/ β -catenin 信号通路的靶基因表达呈

负相关,而X射线治疗可引起LincRNA-p21表达上调并加速细胞凋亡从而增强肿瘤细胞对射线治疗的敏感性,研究者认为这可能与过表达的LincRNA-p21抑制了Wnt/ β -catenin信号通路有关^[18]。肿瘤干细胞(cancer stem cells,CSCs)是肿瘤放化疗抵抗及复发的根源,最近的研究发现LincRNA-p21在CRC的CSCs中表达亦降低,提高其表达可抑制CSCs;而敲除LincRNA-p21则有利于CSCs特性的获得,同时具有抗CSCs作用的miRNA-451下调。研究者将携带miRNA-451的LincRNA-p21腺病毒构建载体转染裸鼠后可以明显抑制Wnt/ β -catenin信号通路,并遏制CSCs的自我更新能力及成瘤性,研究者认为LincRNA-p21与CRC的CSCs特性获得和维持关系密切,从而为解决CSCs治疗难题提供了新方向^[19]。

3.3 肺腺癌转移相关转录本1(metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript1,MALAT1)

MALAT1定位于人染色体11q13,长约8.1kb,以核散斑形式定位于核内,目前证实多种恶性肿瘤中MALAT1呈高表达并提示预后不良,它主要通过影响磷酸化水平在mRNA前体的选择性剪接和转录调控中发挥重要作用,从而促进细胞的增殖、转移以及影响凋亡^[20,21]。目前研究发现MALAT1通过竞争性结合SFPQ/PTBP2复合体中的抑癌基因SFPQ,释放原癌基因PTBP2,从而参与CRC的发病过程,在CRC患者中MALAT1和PTBP2也均呈现高表达,且与疾病的转移密切相关。研究者认为MALAT1可作为CRC治疗的潜在靶点^[22]。而Yang等^[23]通过DNA微阵列和蛋白质组等分析发现,在CRC中MALAT1至少参与了243个基因的表达调节,其中A激酶PRKA锚定蛋白9(AKAP-9)的基因和蛋白表达水平在体内外试验中均显著增高,而在正常细胞或组织中则不表达;敲除AKAP-9能够阻断MALAT1介导的癌细胞增殖、侵袭能力,该研究表明AKAP-9是CRC发病中MALAT1调控的关键蛋白。而进一步的研究发现AKAP-9的高表达与MALAT1促进SRPK1催化的SRSF1磷酸化过程有关,敲除SRPK1亦能够抑制细胞的增殖、侵袭和迁移过程,因此AKAP-9和SRPK1都有可能成为CRC治疗的新靶点^[23,24]。

3.4 CCAT1

2016年的研究发现在CpG岛甲基化型CRC中

(CIMP型)BET蛋白家族中的BRD4是调节肿瘤细胞增殖和分化的关键性分子,应用BET抑制剂-JQ1可遏制肿瘤细胞生长并诱导细胞分化,同时MYC表达下调,因此研究者认为MYC基因的转录有赖于BET蛋白的活性。通过集成的转录组和基因组分析发现在CIMP型CRC中CCAT1的高表达预示着BET介导的MYC基因的激活,并且能够预测BET抑制剂的敏感性。该研究表明CCAT1的表达水平与MYC基因转录及其相关癌细胞生长密切相关,CCAT1可作为BET抑制剂治疗CRC的优势人群筛选^[25]。

3.5 肿瘤放化疗敏感性相关的lincRNA

最新的研究发现HOTAIR可能与CRC的放疗抵抗有关,而通过基因敲除技术降低HOTAIR的表达可以抑制肿瘤细胞的增殖、迁移及侵袭能力,并增强癌细胞的凋亡和对放射治疗的敏感性^[26]。而Bian等^[27]研究发现尿路上皮癌相关转录本1(UCA1)在CRC中表达上调并且和患者的生存期呈负相关,UCA1作为“miRNA海绵”能够吸附内源性miR-204-5p并抑制其活性,增强细胞增殖、抑制凋亡,从而降低CRC细胞对5-Fu类化疗药物的敏感性。这些研究为解决CRC患者的放化疗抵抗提供了新思路。

4 LncRNA的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms,SNPs)与CRC的筛查和治疗

人类基因组计划研究表明,个体间基因序列仅存在约0.1%的遗传差异即遗传多态性,其中90%表现为SNPs,正是这微小的差别造就了不同个体对某些疾病的易感性不同。近年研究表明lncRNA编码基因的SNPs与恶性肿瘤易感性密切相关,SNPs研究有助于确定罹患肿瘤的高危人群、尽早进行临床干预。

2013年研究者利用聚合酶链式反应—限制性片段长度多态性分析技术(PCR-RFLP)进行了一项包括313例CRC患者和595名健康人的病例对照研究,结果发现PRNCR1的SNPs与CRC的发生有密切关系,rs13252298 AG基因型和G等位基因分别与AA基因型和A等位基因相比较显著降低了CRC的发生风险,而rs1456315AG基因型与AA基

因型相比较同样也降低了 CRC 的发生风险。进一步分层研究结果显示在 CRC 患者中携带 rs1456315 G 等位基因者具有更大肿瘤体积和更差的细胞分化倾向^[28]。随后 Xue 等^[29]关于 HOTAIR 的遗传性变异研究表明 rs7958904 CC 基因型携带者与 GG 基因型相比较显著降低了 CRC 的发病风险,因此 HOTAIR rs7958904 有望成为预测 CRC 发病的生物标记。

母本印迹表达基因 3(maternally expressed gene 3, MEG3) 是第一个发现的具有肿瘤抑制功能的 lncRNA, 表达于多种正常组织而在肿瘤中表达降低。CRC 中 MEG3 的低表达与肿瘤组织学分级、浸润深度、肿瘤分期密切相关, 其表达水平可以作为 CRC 预后不良的独立预测因子^[30]。Cao 等^[31]关于 MEG3 的遗传多态性研究发现 rs7158663 AA 基因型比 GG 基因型罹患 CRC 的风险显著增加($P=0.006$), 分层分析表明 rs7158663 增加的患癌风险主要与年龄和家族因素有关, 而与性别和吸烟与否无关。另外, 最近研究表明 lncRNA-H19 的 rs2839698 携带者具有更高的 CRC 的发病风险, 分层分析发现吸烟和饮酒者更易于患病。进一步通过生物信息学研究揭示 rs2839698 通过影响 H19 的二维结构并能够改变其靶向作用的 miRNA, 从而增加了发病风险, 具体机制有待深入研究^[32]。

5 结 语

目前研究表明 lncRNA 与 CRC 的诊断、治疗等关系极为密切, 深入研究对于揭开肿瘤发生发展的神秘面纱势必具有里程碑式的意义。但是人们对 lncRNA 的了解多局限于某一特定 lncRNA 对 CRC 的调控, 而肿瘤的发生是多因素、多环节及多步骤共同作用的结果, 诸如多种 lncRNA 在肿瘤发病中的相互作用、相互影响以及 lncRNA 与 miRNA 之间的调控关系尚不十分清楚^[3]。期待在未来建立 lncRNA 研究的系统模型, 探索 lncRNA 在肿瘤发病过程中的具体调控机制, 为 CRC 的诊断及治疗开启新篇章。

参考文献:

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(1): 7-30.
- [2] Xie X, Tang B, Xiao Y F, et al. Long non-coding RNAs in colorectal cancer[J]. Oncotarget, 2016, 7(5): 5226-5239.
- [3] Liz J, Esteller M. lncRNAs and microRNAs with a role in cancer development[J]. Biochim Biophys Acta, 2016, 1859(1): 169-176.
- [4] Han D, Wang M, Ma N, et al. Long noncoding RNAs: novel players in colorectal cancer [J]. Cancer Lett, 2015, 361(1): 13-21.
- [5] Zhao Y, Li H, Fang S, et al. NONCODE 2016: an informative and valuable data source of long non-coding RNAs[J]. Nucleic Acids Res, 2016, 44(D1): D203-D208.
- [6] He X, Tan X, Wang X, et al. C-Myc-activated long non-coding RNA CCAT1 promotes colon cancer cell proliferation and invasion [J]. Tumour Biol, 2014, 35 (12): 12181-12188.
- [7] Ye Z, Zhou M, Tian B, et al. Expression of lncRNA-CCAT1, E-cadherin and N-cadherin in colorectal cancer and its clinical significance [J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(3): 3707-15.
- [8] Nissan A, Stojadinovic A, Mitrani-Rosenbaum S, et al. Colon cancer associated transcript-1: a novel RNA expressed in malignant and pre-malignant human tissues[J]. Int J Cancer, 2012, 130(7): 1598-606.
- [9] Kam Y, Rubinstein A, Naik S, et al. Detection of a long non-coding RNA (CCAT1) in living cells and human adenocarcinoma of colon tissues using FIT-PNA molecular beacons[J]. Cancer Lett, 2014, 352(1): 90-96.
- [10] Hajjari M, Salavaty A. HOTAIR: an oncogenic long non-coding RNA in different cancers[J]. Cancer Biol Med, 2015, 12(1): 1-9.
- [11] Svoboda M, Slysokova J, Schneiderova M, et al. HOTAIR long non-coding RNA is a negative prognostic factor not only in primary tumors, but also in the blood of colorectal cancer patients[J]. Carcinogenesis, 2014, 35(7): 1510-1515.
- [12] Zhao W, Song M, Zhang J, et al. Combined identification of long non-coding RNA CCAT1 and HOTAIR in serum as an effective screening for colorectal carcinoma[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(11): 14131-14140.
- [13] Yang L, Qiu M, Xu Y, et al. Upregulation of long non-coding RNA PRNCR1 in colorectal cancer promotes cell proliferation and cell cycle progression [J]. Oncol Rep, 2016, 35(1): 318-324.
- [14] Ellis BC, Graham LD, Molloy PL. CRNDE, a long non-coding RNA responsive to insulin/IGF signaling, regulates genes involved in central metabolism[J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1843(2): 372-386.
- [15] Graham LD, Pedersen SK, Brown GS, et al. Colorectal

- neoplasia differentially expressed (CRNDE), a novel gene with elevated expression in colorectal adenomas and adenocarcinomas[J]. *Genes Cancer*, 2011, 2(8): 829–840.
- [16] Liu T, Zhang X, Yang YM, et al. Increased expression of the long noncoding RNA CRNDE-h indicates a poor prognosis in colorectal cancer, and is positively correlated with IRX5 mRNA expression[J]. *Oncol Targets Ther*, 2016, 9: 1437–1448.
- [17] Han D, Gao X, Wang M, et al. Long noncoding RNA H19 indicates a poor prognosis of colorectal cancer and promotes tumor growth by recruiting and binding to eIF4A3 [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(16): 22159–22173.
- [18] Wang G, Li Z, Zhao Q, et al. LincRNA-p21 enhances the sensitivity of radiotherapy for human colorectal cancer by targeting the Wnt/beta-catenin signaling pathway[J]. *Oncol Rep*, 2014, 31(4): 1839–1845.
- [19] Wang J, Lei ZJ, Guo Y, et al. miRNA-regulated delivery of lincRNA-p21 suppresses beta-catenin signaling and tumorigenicity of colorectal cancer stem cells [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(35): 37852–37870.
- [20] Yoshimoto R, Mayeda A, Yoshida M, et al. MALAT1 long non-coding RNA in cancer[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1859(1): 192–199.
- [21] Tang R, Jiang M, Liang L, et al. Long noncoding RNA MALAT-1 can predict poor prognosis: a Meta-analysis[J]. *Med Sci Monit*, 2016, 22: 302–309.
- [22] Ji Q, Zhang L, Liu X, et al. Long non-coding RNA MALAT1 promotes tumour growth and metastasis in colorectal cancer through binding to SFPQ and releasing oncogene PTBP2 from SFPQ/PTBP2 complex [J]. *Br J Cancer*, 2014, 111(4): 736–748.
- [23] Yang MH, Hu ZY, Xu C, et al. MALAT1 promotes colorectal cancer cell proliferation/migration/invasion via PRKA kinase anchor protein 9[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1852(1): 166–174.
- [24] Hu ZY, Wang XY, Guo WB, et al. Long non-coding RNA MALAT1 increases AKAP-9 expression by promoting SRPK1-catalyzed SRSF1 phosphorylation in colorectal cancer cells[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(10): 11733–11743.
- [25] McClelland ML, Mesh K, Lorenzana E, et al. CCAT1 is an enhancer-templated RNA that predicts BET sensitivity in colorectal cancer[J]. *J Clin Invest*, 2016, 126(2): 639–652.
- [26] Yang XD, Xu HT, Xu XH, et al. Knockdown of long non-coding RNA HOTAIR inhibits proliferation and invasiveness and improves radiosensitivity in colorectal cancer[J]. *Oncol Rep*, 2016, 35(1): 479–487.
- [27] Bian Z, Jin L, Zhang J, et al. LncRNA-UCA1 enhances cell proliferation and 5-fluorouracil resistance in colorectal cancer by inhibiting miR-204-5p [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 23892.
- [28] Li L, Sun R, Liang Y, et al. Association between polymorphisms in long non-coding RNA PRNCR1 in 8q24 and risk of colorectal cancer [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2013, 32: 104.
- [29] Xue Y, Gu D, Ma G, et al. Genetic variants in lncRNA HOTAIR are associated with risk of colorectal cancer[J]. *Mutagenesis*, 2015, 30(2): 303–310.
- [30] Yin DD, Liu ZJ, Zhang E, et al. Decreased expression of long noncoding RNA MEG3 affects cell proliferation and predicts a poor prognosis in patients with colorectal cancer[J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(6): 4851–4859.
- [31] Cao X, Zhuang S, Hu Y, et al. Associations between polymorphisms of long non-coding RNA MEG3 and risk of colorectal cancer in Chinese [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(14): 19054–19059.
- [32] Li S, Hua Y, Jin J, et al. Association of genetic variants in lncRNA H19 with risk of colorectal cancer in a Chinese population[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(18): 25470–25477.