

环状 RNA 与头颈部肿瘤

CircRNA and head and neck cancer

姜 涛,雷芳红,黄 蕴,黄卫国*

JIANG Tao, LEI Fanghong, HUANG Yun, HUANG Weiguo*

(南华大学衡阳医学院肿瘤研究所,肿瘤细胞与分子病理学
湖南省重点实验室,湖南 衡阳 421001)

摘 要: 环状 RNA 是一类共价闭合的环状非编码 RNA,在各种组织和细胞中丰富且稳定,具有高度的组织特异性。研究发现,环状 RNA 分子具有 microRNA(miRNA)海绵,RNA 结合蛋白(RBP)海绵和调节蛋白质的转录和翻译的功能,从而在疾病的发生和发展中起重要作用。头颈部肿瘤(HNC)部位的特异性和治疗的复杂性导致 HNC 患者的生活质量普遍较低。为了提高对 HNC 的认识,寻求更好的治疗方法,提高患者的生活质量,因此本文综述了近年来环状 RNA 的研究进展及其在 HNC 中的作用,为 HNC 的治疗提供了新的思路。

关键词: 环状 RNA; 头颈部肿瘤; miRNA 海绵

Key words: circular RNA; head and neck cancer; microRNA sponge

中图分类号:R739.91 文献标识码:A

头颈部肿瘤(head and neck cancer,HNC)是世界上第六大常见癌症,具有高发病率和死亡率,其最常见的诱发因素包括吸烟和酗酒。除手术切除,放射和标准细胞毒性化疗干预之外的治疗选择很少。尽管治疗方法在不断改进,但 HNC 的存活率并未显著提高,仍只有 50% 左右。由于头颈部的精细和复杂的解剖结构,使根治性切除手术难以实现,迫使人们不断找寻新的治疗方法。与传统的线性 RNA 相比,环状 RNA(Circular RNA,circRNA)不具有 5'和 3'末端,而是形成共价闭合的连续环。不易被核酸外切酶降解,半衰期长达 48h,比线性 RNA 更加稳定,具有高度的保守性,组织特异性,在肿瘤诊断和治疗靶点上存在潜在的价值^[1]。

1 环状 RNA 的形成

1971 年,研究者首次在植物中发现环形植物类病毒,其基因组由闭合的单链 RNA 分子组成^[2]。先前的观点认为,环状 RNA 是错误拼接的产物,并不具有生理功能。随着高通量技术的发展,越来越多

的环状 RNA 分子被发现。目前发现的环状 RNA 主要来源于基因外显子,内含子也很大程度参与了其形成。目前对环状 RNA 的产生机制尚不明确,研究表明环状 RNA 通过特殊的可变剪切产生,可变形式也多种多样。外显子环化形成的环状 RNA 有两种模型,一种是由基因外显子共价结合构成环化的“套索驱动环化”;另一种是由双内含子互补配对形成环状结构的“内含子配对驱动环化”,再通过剪接体剪切剩余内含子形成不同的环状 RNA 分子^[3]。另外,由 RNA 结合蛋白(RNA Binding Protein,RBP)和反式作用因子也可以促进环状 RNA 的形成。根据环状 RNA 成环方式不同,环状 RNA 可分为仅具内含子的 ciRNA;外显子来源的 circRNA;由外显子和内含子共同组成的 ElciRNA。此外,前体 tRNA 可以被切割成环以形成 tricRNA。另外发现在白血病早幼粒白血病/维甲酸受体(PML/RAR α)基因的染色体易位中发现了两个融合环状 RNA,体内试验发现其能促进细胞转化和肿瘤生长^[4]。

2 环状 RNA 的生物学功能

近年,随着研究的不断增多,环状 RNA 的各种生物学功能不断被发现,内源性环状 RNA 通过不同的机制参与基因表达调控,发挥不同的功能。见图 1。

收稿日期:2018-10-08;修回日期:2019-04-11

基金项目:中国自然科学基金(编号 81172210);湖南省自然科学基金(编号 2016JJ2012)。

* 通信作者,E-mail:hwg_doctor@126.com.

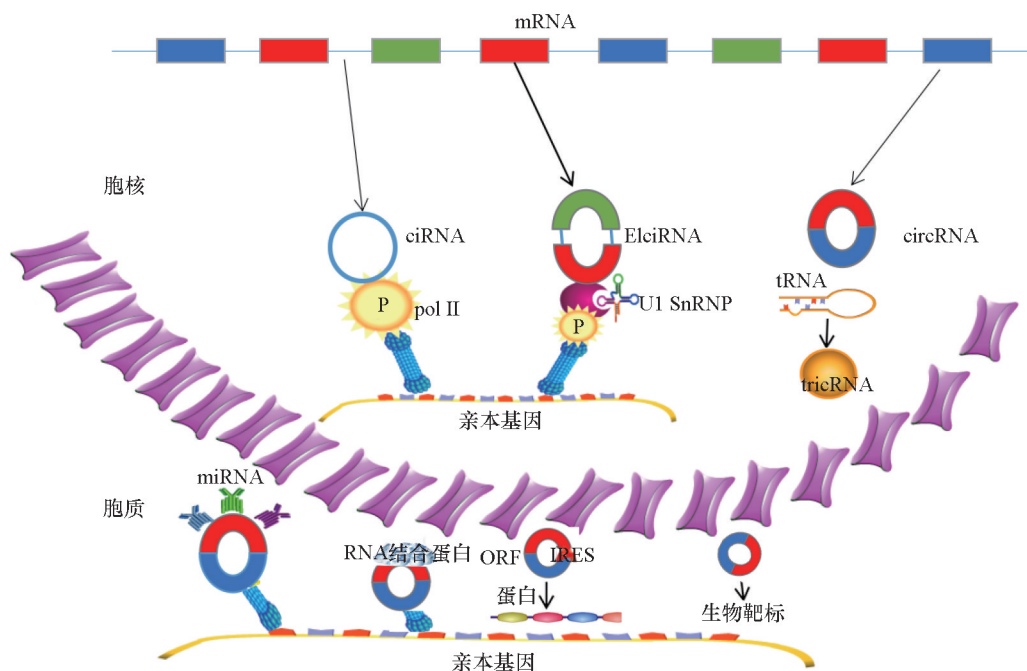


图1 环状 RNA 作用机制^[5] (根据参考文献[5]修改)

2.1 调控线性 RNA 的表达

环状 RNA 的形成方式多种多样,基因组同一位置可转录出 mRNA 和环状 RNA 分子,同一基因位点又可以转录出不同的环状 RNA 分子。环状 RNA 可以通过非经典剪切方式,与前体 mRNA 形成的经典剪切方式相互竞争,影响 mRNA 的表达。此外,通过内含子序列间竞争互补配对可以形成不同的环状 RNA 分子,这些环状 RNA 分子间存在竞争性平衡关系可影响到 mRNA 的表达。

2.2 调控亲本基因的转录

不同的环状 RNA 分子通过不同的途径调控其亲本基因的转录。分布在细胞核中且仅具有内含子的 ciRNA 可直接与 DNA 聚合酶 II (pol II) 结合促进其亲本基因的转录;保留内含子和外显子的 ElciRNA 首先与核糖体 U1 小核 RNA (SnRNPs) 结合形成复合物,进一步与 Pol II 结合促进亲本基因的转录。在细胞质中富集且仅具外显子的 circRNA,可以吸附 miRNA 间接来调控其亲本基因的表达。

2.3 发挥内源性竞争 RNA (ceRNA) 的作用

研究发现,一些高度富集环状 RNA 能起到 ceRNA 的作用。CDR1 基因来源的环状 RNA CiRs-7 具有 70 个 miR-7 结合位点,能够大量吸附 miR-7 来影响哺乳动物兴奋性突触传递功能^[6]。此外, circRNA_036186 通过 circRNA_036186/miR-193b-3p/14-3-3 ζ 信号轴发挥 ceRNA 作用来影响头颈部肿瘤的发生发展。但是,大多数环状 RNA 的表达水平很

低,而且只有少数环状 RNA 具有多个结合位点来结合一个特定的 miRNA。并且环状 RNA 的大部分功能还未知,作为 miRNA 海绵可能并不是环状 RNA 的主要作用。

2.4 通过相关蛋白起作用

环状 RNA 可以与不同的 RBP 结合后可影响相关蛋白的功能。多功能蛋白甘露糖结合凝集素 (mannose binding lectin, MBL) 可以调控 circMBL 及其线性 mRNA 的产生,让其达到一种平衡。此外, circFoxo3 与 ID-1, E2F1, FAK 和 HIF α 多种蛋白结合共同作用影响其抗衰老作用。

2.5 翻译蛋白质

环状 RNA 结构的特殊性使其翻译蛋白的方式不同于线性 RNA 分子。环状 RNA 分子通过翻译启动元件 (Internal Ribosome Entry Site, IRES) 和开放阅读框 (Open Reading Frame, ORF) 翻译蛋白质。初步研究显示, circ-ZNF609 通过 IRES 可直接翻译蛋白并参与肌肉的发生过程^[7]。此外,基于核糖体印迹分析发现果蝇大脑中也存在大量可翻译蛋白的环状 RNA。

2.6 通过融合环状 RNA 发挥作用

基因的突变过程可以产生大量的融合基因,并普遍存在于癌症基因组中。研究发现,环状 RNA 也参与了这一过程,协同其他致癌因素如融合蛋白发生异常融合,促进肿瘤的发生发展^[4]。

2.7 作为疾病诊断标志物

环状 RNA 的生物学特性,使得环状 RNA 在外

泌体、血浆、尿液、唾液中比 mRNA、miRNA,长链非编码 RNA (long non-coding RNA , LncRNA) 更稳定。环状 RNA 有望成为疾病诊断的生物标志物(表 1)。

表 1 环状 RNA 作为诊断标志物

hsa_circ_0000284	circHIPK3	膀胱癌	miR-558	下调	28794202
hsa_circ_0001982	RNF111	乳腺癌	miR-143	上调	28933584
hsa_circ_0001946	CDR1	胃癌	miR-7	上调	28608528
hsa_circ_0043256	ACACA	肺癌	miR-1252, ITCH	上调	28958934
hsa_circ_0071410	PALLD	肝纤维化	miR-9-5p	上调	28774651
hsa_circ_0075828	LINC00340	基底细胞癌	miR-124-3p	上调	27097056
hsa_circ_0001946	ciRS-7	结肠直肠癌	miR-7, EGFR	上调	28174233
hsa_circ_0018289	SYT15	宫颈癌	miR-497	上调	29156822
hsa_circ_0005870	SETD2 8130842	高血压	miR-5095, miR-5096	下调	28534714
hsa_circ_0004277	WDR37	白血病	miR-571, miR-138-5p	下调	28282919
hsa_circ_0005105	SEC24A	骨性关节炎	miR-26a, NAMPT	上调	28276108

3 环状 RNA 与头颈部肿瘤

环状 RNA 在消化,神经和免疫系统疾病中起重要作用,并且在胚胎和外泌体以及肿瘤中高度富

集。与正常细胞相比,环状 RNA 在肿瘤细胞外泌体中大量富集,并且肿瘤患者血清外泌体环状 RNA 的富集程度与肿瘤的大小有关^[8]。表明环状 RNA 在肿瘤诊断和治疗中具有潜在作用(图 2)。

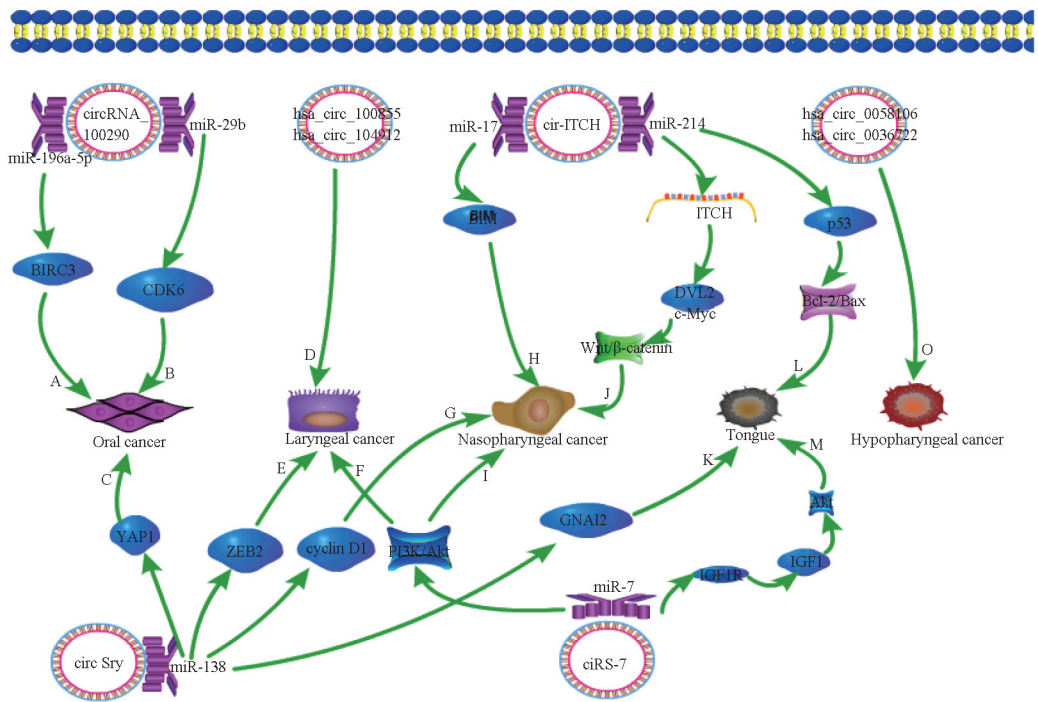


图 2 环状 RNA 与头颈部肿瘤

3.1 环状 RNA 与口腔癌

在人口腔鳞状细胞癌(Oral squamous cell carcinoma, OSCC)中,hsa_circ_0109291 表达显著增加,低表达可抑制 OSCC 细胞系的增殖和迁移。并且,环状 RNA 可通过 hsa_circ_0008309-miR-136-5P/

hsa-miR-382-5P-ATXN1 信号轴调节口腔癌的进程^[9]。此外, circRNA_100290 在 OSCC 组织中上调,并与细胞周期依赖性蛋白激酶 6 (cyclin dependent kinase 6, CDK6) 共表达,通过海绵吸附 miR-29b 家族成员调节 CDK6 表达,体内外实验发

现敲除 circRNA_100290 能降低 CDK6 的表达并抑制 OSCC 细胞的增殖。此外,研究发现 circSry 拥有 16 个 miR-138 结合位点而发挥 ceRNA 的作用^[10],并且在口腔鳞状细胞癌中,miR-138 显著下调,而 miR-138 能结合 Yes 相关蛋白 1 的 mRNA 的 3'-非翻译区(untranslated region,UTR)来抑制细胞增殖,从而调控口腔癌的发生发展。近期研究发现,circ-DOCK1 通过调控 miR-196a-5p 的表达靶向调节 BIRC3,从而抑制 OSCC 凋亡^[11]。不仅如此,OSCC 患者术后唾液中 hsa_circ_0001874 和 hsa_circ_0001971 的表达水平明显降低。此外,hsa_circ_001242 的表达水平与肿瘤大小和 T 分期呈负相关。因此,环状 RNA 在口腔鳞癌中起着重要的作用。

3.2 环状 RNA 与下咽癌

通过 circRNA 微阵列分析下咽鳞状细胞癌(hypopharyngeal squamous cell carcinoma, HSCC)获得 2392 个差异环状 RNA 分子。其中,1303 个 circRNA 在 HSCC 组织中上调,1088 个 circRNA 下调。在 HSCC 组织中,hsa_circ_0058106, hsa_circ_0058107 和 hsa_circ_0024108 的表达显著增高。hsa_circ_0036722, hsa_circ_0002260 和 hsa_circ_0001189 的表达显著降低^[12]。但针对这些 circRNA 在 HSCC 中的作用尚未进行证实,仍需进一步实验。此外,也有研究通过分析 HSCC 中失调环状 RNA 差异谱,发现 hsa_circ_0008287 和 hsa_circ_0005027 两个环状 RNA,可通过 circRNA-miRNA 调控网络调控 miR-548C-3p 的表达,通过调控 miR-548C-3p 的表达间接调控 ErbB, Hippo 信号传导途径进而影响 HSCC 的预后^[13]。

3.3 环状 RNA 与喉头癌

通过高通量测序筛选喉鳞状细胞癌(Laryngeal squamous cell carcinoma, LSCC)组织,获得 698 个差异环状 RNA,其中 302 个表达上调和 396 个表达下调。其中,hsa_circRNA_100855 在 LSCC 组织中显著上调,并且 hsa_circRNA_100855 的高表达与淋巴结转移和晚期临床分期有关。相反,hsa_circRNA_104912 在 LSCC 组织中显著下调,且与 TMN 分期、淋巴结转移相关。最新研究发现通过检测环状 RNA 分子可以区分 LSCC 标本和正常标本^[14]。综上所述,环状 RNA 可能在 LSCC 的发生发展中起重要作用,并可能有助于该疾病的诊断和预后。

3.4 环状 RNA 与鼻咽癌

研究发现,在鼻咽癌中^[15],miR-7 可影响鼻咽癌细胞系 CNE-1 和 CNE-2 的放射敏感性,其表达水

平越高,细胞对辐射的敏感性越强。ciRS-7 发挥 ceRNA 作用,海绵吸附 miR-7 影响鼻咽癌的放疗敏感性^[10]。并且 miR-7 还通过抑制 EGFR/PI3K/Akt 信号传导途径抑制鼻咽癌细胞增殖和集落形成。最新研究发现,在鼻咽癌患者血清和组织中, circRNA_0000285 显著增加,并影响鼻咽癌患者的放疗敏感性^[16]。另外, circSry 通过海绵吸附 miR-138 影响细胞周期蛋白 D1 的表达,从而影响鼻咽癌的发生发展。研究报道, cir-ITCH 是一种肿瘤抑制基因,在食管鳞状细胞癌中显著下调,充当 miR-17 和 miR-214 海绵,提高 ITCH 水平;而 ITCH 的过表达可促进泛素介导的蓬乱蛋白 2(DVL2)降解并抑制癌基因 c-Myc 的表达,从而抑制 Wnt/ β -catenin 信号转导途径来影响鼻咽癌的进程^[17]。

3.5 环状 RNA 与舌癌

在舌鳞癌细胞中(Tongue squamous cell, TSCC)^[18], ciRS-7 可海绵吸附 miR-7,促进胰岛素样生长因子 1 受体(insulin-like growth factor 1, IGF1R)的表达,诱导由胰岛素样生长因子 1(IGF1)诱导的 Akt 信号通路激活,促进细胞增殖和细胞周期,抑制细胞凋亡的作用。circ-ITCH 海绵吸附 miR-214,促进 p53 蛋白质的表达,抑制 Bcl-2/Bax 相关蛋白质的作用,达到抑癌的效果。此外, circSry 通过吸附 miR-138 促进 GNAI2 的表达,影响舌鳞状细胞癌的转移。通过高通量测序分析 TSCC 组织和邻近组织发现,环状 RNA 在一定程度上参与肿瘤的发生发展,并且与肿瘤相关的 miRNA 具有复杂的相关性。

4 环状 RNA 研究策略

环状 RNA 在疾病中作用机制的研究是时下的热点。用于检测环状 RNA 表达及其功能研究的方法有很多。可以通过 RNA 测序和微阵列筛选目标环状 RNA,然后利用逆转录-聚合酶链反应,液滴数字 PCR, RNA 印迹和荧光原位杂交进行验证。通过过表达或敲除实验进行环状 RNA 功能研究。结合生物信息学, RNA 免疫共沉淀和 RNA 质谱进行机制研究。目前,已经开发了很多的数据库和分析工具供研究者使用(表 2)。CircInteractome 具有环状 RNA 引物和干扰 RNA 设计功能。ExoRBase 用于分析血液外泌体中特异性环状 RNA 分子。通过这些免费工具,我们可以分析组织、血液、外泌体中环状 RNA 的差异表达,预测与之结合的 miRNA,研究环状 RNA 分子具有的功能。

表 2 环状 RNA 数据库

名称	简述	网址	PMID
Circbank	人类环状 RNA 综合数据库	http://www.circbank.cn/	25234927
Circbase	人类环状 RNA 综合数据库	http://www.circbase.org/	25234927
CircRNADb	编码蛋白的环状 RNA 数据库	http://202.195.183.4:8000/circrnadb/circRNADb.php	27725737
CircRNADisease	环状 RNA 和疾病关联数据库	http://cgga.org.cn:9091/circRNADisease/	29700306
TSCD	组织特异性环状 RNA 数据库	http://gb.whu.edu.cn/TSCD/	27543790
CSCD	肿瘤特异性环状 RNA 数据库	http://gb.whu.edu.cn/CSCD/	29036403
Circ2Traits	人类疾病相关环状 RNA 数据库	http://gyanxet-beta.com/circdb/	24339831
ExoRBase	外泌体环状 RNA 数据库	http://www.exoRBase.org	30053265

5 结 论

综上所述,环状 RNA 的稳定性和特异性,在靶点的准确性上优于 miRNA 和 lncRNA,在肿瘤诊断和治疗中存在潜在的价值。如果能实现体内控制内源环状 RNA 在特定组织和细胞中的表达,可能增加治疗的疗效,极大降低外源物质所带来的副作用,这将增加环状 RNA 的价值,也将是未来基因治疗的重大突破。尽管已经初步提出了环状 RNA 的形成模型,但是仍需要大量的实验来探索其生成机制,包括环状 RNA 的产生、二级结构,以及不同 RNA 之间的相互关系。目前,肿瘤中环状 RNA 的检测主要依赖于组织样本,而头颈部肿瘤位置的复杂性以及复杂性使组织样品获得困难,增加了临床研究难度。与组织相比,血液中的环状 RNA 表达通常很高,细胞可以通过外泌体将环状 RNA 分泌到血液中。因此,血液,尿液,唾液等更容易获得的非侵入性临床样本将在未来头颈部肿瘤环状 RNA 研究中广泛应用。

参考文献:

[1] JECK WR, SORRENTINO JA, WANG K, et al. Circular RNAs are abundant, conserved, and associated with ALU repeats[J]. RNA, 2013, 19(2): 141-57.

[2] DIENER TO. Potato spindle tuber "virus". IV. A replicating, low molecular weight RNA[J]. Virology, 1971, 45(2): 411-28.

[3] IVANOV A, MEMCZAK S, WYLER E, et al. Analysis of intron sequences reveals hallmarks of circular RNA biogenesis in animals [J]. Cell Rep, 2015, 10(2): 170-7.

[4] GUARNERIO J, BEZZI M, JEONG JC, et al. Oncogenic role of fusion-circRNAs derived from cancer-associated chromosomal translocations[J]. Cell, 2016, 166(4): 1055-6.

[5] LI X, YANG L, CHEN LL. The biogenesis, functions, and challenges of circular RNAs[J]. Mol Cell, 2018, 71(3): 428-42.

[6] PIWECKA M, GLAZAR P, HERNANDEZ-MIRANDA LR, et al.

Loss of a mammalian circular RNA locus causes miRNA deregulation and affects brain function[J]. Science, 2017, 357(6357).

[7] LEGNINI I, DI TIMOTEO G, ROSSI F, et al. Circ-ZNF609 is a circular RNA that can be translated and functions in myogenesis [J]. Molecular Cell, 2017, 66(1): 22.

[8] LI Y, ZHENG Q, BAO C, et al. Circular RNA is enriched and stable in exosomes; a promising biomarker for cancer diagnosis [J]. Cell Res, 2015, 25(8): 981-4.

[9] LI B, WANG F, LI X, et al. Hsa_circ_0008309 may be a potential biomarker for oral squamous cell carcinoma[J]. Dis Markers, 2018, 2018(7496890).

[10] HANSEN TB, JENSEN TI, CLAUSEN BH, et al. Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges[J]. Nature, 2013, 495(7441): 384-8.

[11] WANG L, WEI Y, YAN Y, et al. CircDOCK1 suppresses cell apoptosis via inhibition of miR196a5p by targeting BIRC3 in OSCC[J]. Oncol Rep, 2018, 39(3): 951-66.

[12] CAO S, WEI D, LI X, et al. Novel circular RNA expression profiles reflect progression of patients with hypopharyngeal squamous cell carcinoma[J]. Oncotarget, 2017, 8(28): 45367-79.

[13] FENG C, LI Y, He X, et al. CircRNA-associated ceRNA network reveals ErbB and hippo signaling pathways in hypopharyngeal cancer[J]. Int J Mol Med, 2019, 43(1): 127-42.

[14] LU C, SHI X, WANG AY, et al. RNA-Seq profiling of circular RNAs in human laryngeal squamous cell carcinomas [J]. Mol Cancer, 2018, 17(1): 86.

[15] 苏雷,刘文玲,贺修胜,等. STGC3 基因高表达对 CNE2 细胞放疗敏感性的影响[J]. 中南医学科学杂志, 2018, 46(03): 260-6.

[16] SHUAI M, HONG J, HUANG D, et al. Upregulation of circRNA _0000285 serves as a prognostic biomarker for nasopharyngeal carcinoma and is involved in radiosensitivity[J]. Oncol Lett, 2018, 16(5): 6495-501.

[17] LI F, ZHANG L, LI W, et al. Circular RNA ITCH has inhibitory effect on ESCC by suppressing the Wnt/beta-catenin pathway[J]. Oncotarget, 2015, 6(8): 6001-13.

[18] 孙小雅,严汉兴,左建宏,等. 舌癌多种治疗方式的临床疗效比较[J]. 中南医学科学杂志, 2018, 46(1): 16-9.

(本文编辑:蒋湘莲)