

外泌体非编码 RNA 在肝癌液体活检中的研究进展

张芳雍 吴帆

暨南大学医学院附属广州红十字会医院普通外科 510220

通信作者:吴帆,Email: wufan7911@ext.jnu.edu.cn

【摘要】 外泌体内含有丰富的非编码 RNA,且具有重要的基因调控功能,在肝癌的发生发展中起重要作用。外泌体非编码 RNA 有望成为新型的肝癌液体活检标志物,为肝癌的早期诊断、早期治疗提供新手段。尽管当前外泌体非编码 RNA 的临床应用仍存在不足,但随着研究的深入,外泌体非编码 RNA 在肝癌的诊断、个性化治疗及预后评估等方面将发挥越来越重要的作用。

【关键词】 肝肿瘤;液体活检;外泌体;非编码 RNA

基金项目:广东省自然科学基金(2014A030313654);广东省医学科学技术研究基金(A2018028);广州市科技计划(201804010025)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-422X.2019.06.014

Research progress on exosome-derived non-coding RNAs in liquid biopsy of hepatocellular carcinoma

Zhang Fangyong, Wu Fan

Department of General Surgery, Guangzhou Red Cross Hospital, Medical College, Jinan University, Guangzhou 510220, China

Corresponding author: Wu Fan, Email: wufan7911@ext.jnu.edu.cn

【Abstract】 Exosomes contain ample non-coding RNAs, which mainly function as regulating gene expression and play key roles in the occurrence and development of hepatocellular carcinoma. Exosomal non-coding RNAs are expected to become a new biopsy marker for hepatocellular carcinoma, providing a new means for early diagnosis and early treatment of hepatocellular carcinoma. Although the clinical application of exosomal non-coding RNAs is still insufficient at present, exosomal non-coding RNAs will play an increasingly important role in the diagnosis, personalized treatment and prognosis evaluation of hepatocellular carcinoma with the deepening of research.

【Key words】 Liver neoplasms; Liquid biopsy; Exosomes; Non-coding RNA

Fund program: Natural Science Foundation of Guangdong Province of China (2014A030313654); Medical Scientific Research Foundation of Guangdong Province of China (A2018028); Science and Technology Planning Project of Guangzhou Municipal Bureau of China (201804010025)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-422X.2019.06.014

外泌体内含有丰富的非编码 RNA 并稳定存在于人体体液中。非编码 RNA 是一类由基因组转录产生但不编码蛋白质的 RNA,主要包括微小 RNA (microRNA, miRNA)、长非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA)、环状 RNA 等,在调节细胞增殖、凋亡、细胞周期和 DNA 甲基化中发挥重要的作用^[1]。最近的研究表明 miRNA、lncRNA 和环状 RNA 在外泌体中富集并稳定存在^[1-2],有望成为肝癌新型标志物。筛选出肿瘤特异性及敏感性较高的外泌体 RNA 作为肝癌标志物,可为肝癌的早期诊断、术后复发监测及预后评价提供新的手段。

1 外泌体 miRNA 与肝癌液体活检

外泌体数据库 (<http://www.exocarta>) 数据显示有 2 838 种 miRNA 存在于外泌体中,约占外泌体内总 RNA 的 41.72%^[3]。外泌体 miRNA 具有良好的稳定性并高度富集,易通过实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR) 进行定量,较之外泌体外 miRNA 具有更高的表达水平和更好的检测敏感性^[4-6]。在疾病鉴别方面,外泌体 miRNA 的表现也优于外泌体外 miRNA。Sohn 等^[7]发现与血清外泌体外 miRNA 相比,血清外泌体 miRNA 能更好地区分肝癌、慢性肝炎以及肝硬化,提示外泌体 miRNA 作为理想的肝癌液体活检标志物具有极大的潜力。

1.1 外泌体 miRNA 作为肝癌液体活检的诊断标志物

外泌体高表达 miRNA 可能成为肝癌液体活检的诊断标志物。Xue 等^[8]对肝癌患者和健康个体的血清外泌体 miRNA 分析发现,有 8 种外泌体 miRNA (miR-122、miR-125b、miR-145、miR-192、miR-194、miR-29a、miR-17-5p、miR-106a)在肝癌患者血清外泌体中的水平高于健康个体血清外泌体 miRNA 水平,差异具有统计学意义。也有其他研究发现外泌体 miR-122、miR-148a、miR-1246 和 miR-665 在肝癌患者中表达升高^[9-10]。这表明外泌体 miRNA 可以作为肝癌患者的诊断标志物。除此之外,外泌体 miRNA 在鉴别诊断肝癌、肝硬化和肝炎时有较好的特异性。研究发现肝癌患者血清外泌体 miR-18a、miR-221、miR-222、miR-224 和 miR-125b 的水平显著高于慢性肝炎或肝硬化患者^[7,11]。Wang 等^[10]也发现血清外泌体 miR-122、miR-148a 和 miR-1246 可作为鉴别肝癌、肝硬化和健康个体的诊断标志物,联合甲胎蛋白检测具有更高的诊断价值。然而,对外泌体 miR-21 的研究却呈现不同的结果,Sohn 等^[7]认为血清外泌体 miR-21 在肝癌组和健康对照组中的水平差异无统计学意义,但 Wang 等^[4]认为肝癌组外泌体 miR-21 的表达比慢性乙型肝炎组和健康对照组高,且比全血清 miR-21 具有更高的特异性和敏感性。miR-21 表达的差异可能因实验设计、样本量大小和类型、对照组的选择、病因学因素等差异引起^[10]。外泌体低表达 miRNA 也可能成为肝癌液体活检的新型诊断标志物。Tang 等^[12]发现来自肝癌患者的血清外泌体 miR-9-3p 水平显著低于健康个体,可作为诊断肝癌的潜在标志物。Sohn 等^[7]也认为外泌体低表达的 miR-101、miR-106b、miR-122 和 miR-195 可作为肝癌和慢性肝炎的鉴别诊断标志物。

1.2 外泌体 miRNA 作为肝癌液体活检预后评价标志物

Liu 等^[11]发现外泌体 miR-125b 表达水平与患者肿瘤数量、TNM 分期、术后复发时间和总生存期等预后因素密切相关,是肝癌预后评价的新型潜在标志物。Shi 等^[13]也观察到血清外泌体 miR-638 水平与肝癌肿瘤大小、血管浸润和 TNM 分期相关,并且血清外泌体 miR-638 水平与肝癌患者的总体生存率呈明显正相关。外泌体 miR-638 水平下调预示肝癌患者预后不良。此外,Sugimachi 等^[5]发现血清外泌体 miR-718 可以作为肝移植后预测肝癌复发的新型生物标志物。可见,外泌体 miRNA 作为新型标志物在肝癌评价预后和预测复发方面有巨大的潜力。

2 外泌体 lncRNA 与肝癌液体活检

血清外泌体 lncRNA 由于细胞外囊泡的保护具有良好的稳定性,不轻易被血液中的 RNA 酶降解^[14]。外泌体中富含 lncRNA,在结直肠癌的鉴别诊断方面具有更高的特异性和敏感性^[15]。尽管外泌体 lncRNA 在肝癌中的确切功能未知,但并未限制其作为肝癌诊断生物标志物的可能性^[16]。

2.1 外泌体 lncRNA 作为肝癌液体活检的早期诊断标志物

Sun 等^[17]通过 RT-qPCR 技术检测了肝癌患者、健康个体和慢性肝炎患者血清外泌体 LINC00161 水平的差异,发现 LINC00161 可以作为肝癌潜在的诊断标志物。还有研究发现血液循环中外泌体 lncRNA ATB、FAL1 也是肝癌新的潜在诊断标志物^[6,18]。外泌体 lncRNA 不仅对肝癌的诊断有良好的敏感性及特异性,其在鉴别肝炎、肝硬化和肝癌方面也具有良好的敏感性及特异性。研究发现血清外泌体 lncRNA (HEIH、ENSG00000258332.1、LINC00635)可以作为鉴别乙肝病毒和丙肝病毒相关的肝炎、肝硬化和肝癌的分子标志物^[19-20]。还有研究发现,外泌体 lncRNA (ENSG00000258332.1、LINC00635)和甲胎蛋白联合检测能明显提高诊断效能^[20]。

2.2 外泌体 lncRNA 作为肝癌液体活检预后评价的标志物

外泌体 lncRNA 在肝癌预后评价方面也有很大的潜力。Hou 等^[21]对癌症和肿瘤基因图谱数据库中肝癌患者的 lncRNA 表达数据和相应临床信息进行分析,筛选出与肝癌总生存率显著相关的 5 种外泌体 lncRNA,发现其中的 2 种外泌体 lncRNA (CTD-2116N20.1 和 RP11-538D16.2)可通过调节外泌体蛋白质的表达进而导致肝癌患者的预后不良。Lee 等^[6]的研究发现外泌体 lncRNA ATB 与肝癌 TNM 分期、门静脉癌栓等因素相关,且低 lncRNA ATB 表达组肝癌患者的 3 个月、6 个月和 12 个月总体生存率显著高于高表达组的患者。Xu 等^[20]发现外泌体 ENSG00000258332.1、LINC00635 水平与肝癌的门静脉癌栓、淋巴结转移、TNM 分期和总体生存率相关,是评价肝癌患者预后及监测肿瘤术后复发的潜在标志物。综上可知,外泌体 lncRNA 或许是理想的肝癌预后评价和术后复发的新型液体活检标志物。

3 外泌体环状 RNA 与肝癌液体活检

环状 RNA 是近年研究的热点,其作为液体活检标志物的研究同样令人期待。研究表明在人血清外泌体中存在超过 1 000 种环状 RNA,并且环状 RNA 在外泌体中相对富集,外泌体环状 RNA 的水平是细胞内环状 RNA 的 2 倍以上^[2]。通过对细胞内和外泌

体 RNA 的种类和含量进行比较发现,外泌体环状 RNA 与外泌体总 RNA 的比值要高于细胞内环状 RNA 与细胞内总 RNA 的比值,这说明环状 RNA 比线性 RNA 更多地渗入到外泌体中^[2]。与线性 RNA 不同,环状 RNA 形成共价闭合的连续环结构,其既不具有 5'-3' 极性也不具有多腺苷酸化尾部,这使得环状 RNA 对核酸内切酶具有一定的抵抗性,因而比线性 RNA 更稳定^[22]。外泌体环状 RNA 作为液体活检的新型标志物可能有着比线性 RNA 更为独特的优势及前景。

目前对于环状 RNA 肝癌液体活检的研究多聚焦在血清中的环状 RNA,外泌体环状 RNA 作为肝癌液体活检标志物的报道较少。Zhang 等^[23]发现 circRNA_104075 在肝癌细胞株、组织标本和血清中均呈高表达,进一步分析发现 circRNA_104075 在鉴别肝癌患者和健康个体方面具有巨大的潜力,其敏感性为 96.0%,特异性为 98.3%,曲线下面积为 0.973。此外,该研究还发现血清 circRNA_104075 水平与较高的肝癌分期显著相关,并且手术后血清 circRNA_104075 水平显著降低。这也说明环状 RNA 可能成为评价肝癌患者预后及术后监测的标志物。Zhang 等^[24]采用环状 RNA 微阵列鉴定出 20 种在肝癌组织和癌旁组织中差异表达的环状 RNA,并且通过 RT-qPCR 对 20 种环状 RNA 的表达水平进行验证,发现 hsa_circ_16245-1 和 hsa_circ_0091579 的表达与微阵列测定结果一致。进一步研究发现,hsa_circ_0091579 在肝癌组织中表达显著上调,且其表达水平与肝癌患者的总体生存率密切相关。表明 hsa_circ_0091579 可能参与肝癌的发生发展,并可作为评价肝癌患者预后的潜在生物标志物。此研究还发现 hsa_circ_0001445、hsa_circ_00224、hsa_circ_103809 及 hsa_circ_00520 在肝癌组织或血清中的水平相比癌旁组织或健康个体血清中的水平差异具有统计学意义,并有可能成为肝癌早期诊断或评价预后的新型标志物^[25-27]。Wang 等^[28]对 82 例肝癌患者和 47 例健康个体的血清外泌体环状 RNA 进行检测发现,hsa_circ_0008043 和 hsa_circ_0088030 在肝癌患者血清外泌体中的水平上调,并且与健康个体相比差异具有统计学意义。进一步研究发现外泌体内 hsa_circ_0008043、hsa_circ_0003731 和 hsa_circ_0088030 的水平与肝癌的临床分期密切相关,且生存曲线分析显示这 3 种环状 RNA 水平低的肝癌患者预后要好于高水平的患者。此研究还发现 circPTGR1 通过 miR-449a-MET 途径调节肝癌的转移,并且 circPTGR1 还可以作为肝癌诊断和评价预后的潜在生物标志物。外泌体

环状 RNA 具有成为肿瘤标志物的独特优势,可能是肝癌液体活检的新型标志物,具有较高的研究价值。

4 结语

对于肝癌液体活检而言,外泌体非编码 RNA 较之外泌体外非编码 RNA 具有更明显的优势,原因如下:①具有高度的稳定性;②具有更高的敏感性及特异性;③外泌体非编码 RNA 的检测只需要少量体液,并且具有方便、快捷、非侵入性、可多次取样、能动态监测疾病等诸多优点。虽然目前外泌体非编码 RNA 作为肝癌液体活检标志物在临床应用中仍面临许多挑战,如外泌体分离和纯化尚缺乏标准的方法、肿瘤特异性及敏感性较强的非编码 RNA 不多、外泌体非编码 RNA 在肿瘤中具体作用机制及功能不清等,但外泌体非编码 RNA 作为肝癌液体活检的新型标志物仍具有巨大的潜力,可为肝癌诊断和预后评价提供新的手段,值得进一步开展深入的研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] Kaikkonen MU, Adelman K. Emerging roles of non-coding RNA transcription[J]. Trends Biochem Sci, 2018, 43(9): 654-667. DOI: 10.1016/j.tibs.2018.06.002.
- [2] 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): 981-984. DOI: 10.1038/cr.2015.82.
- [3] Huang X, Yuan T, Liang M, et al. Exosomal miR-1290 and miR-375 as prognostic markers in castration-resistant prostate cancer[J]. Eur Urol, 2015, 67(1): 33-41. DOI: 10.1016/j.eururo.2014.07.035.
- [4] Wang H, Hou L, Li A, et al. Expression of serum exosomal microRNA-21 in human hepatocellular carcinoma[J]. Biomed Res Int, 2014, 2014: 864894. DOI: 10.1155/2014/864894.
- [5] Sugimachi K, Matsumura T, Hirata H, et al. Identification of a bona fide microRNA biomarker in serum exosomes that predicts hepatocellular carcinoma recurrence after liver transplantation[J]. Br J Cancer, 2015, 112(3): 532-538. DOI: 10.1038/bjc.2014.621.
- [6] Lee YR, Kim G, Tak WY, et al. Circulating exosomal non-coding RNAs as prognostic biomarkers in human hepatocellular carcinoma [J]. Int J Cancer, 2018, 144(6): 1444-1452. DOI: 10.1002/ijc.31931.
- [7] Sohn W, Kim J, Kang SH, et al. Serum exosomal microRNAs as novel biomarkers for hepatocellular carcinoma [J]. Exp Mol Med, 2015, 47: e184. DOI: 10.1038/emmm.2015.68.
- [8] Xue X, Zhao Y, Wang X, et al. Development and validation of serum exosomal microRNAs as diagnostic and prognostic biomarkers for hepatocellular carcinoma[J]. J Cell Biochem, 2019, 120(1): 135-142. DOI: 10.1002/jcb.27165.
- [9] Qu Z, Wu J, Wu J, et al. Exosomal miR-665 as a novel minimally invasive biomarker for hepatocellular carcinoma diagnosis and prognosis[J]. Oncotarget, 2017, 8(46): 80666-80678. DOI: 10.18632/

- oncotarget. 20881.
- [10] Wang Y, Zhang C, Zhang P, et al. Serum exosomal microRNAs combined with alpha-fetoprotein as diagnostic markers of hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Med*, 2018, 7(5): 1670-1679. DOI: 10.1002/cam4.1390.
- [11] Liu W, Hu J, Zhou K, et al. Serum exosomal miR-125b is a novel prognostic marker for hepatocellular carcinoma[J]. *Onco Targets Ther*, 2017, 10: 3843-3851. DOI: 10.2147/OTT.S140062.
- [12] Tang J, Li Y, Liu K, et al. Exosomal miR-9-3p suppresses HBGf-5 expression and is a functional biomarker in hepatocellular carcinoma[J]. *Minerva Med*, 2018, 109(1): 15-23. DOI: 10.23736/S0026-4806.17.05167-9.
- [13] Shi M, Jiang Y, Yang L, et al. Decreased levels of serum exosomal miR-638 predict poor prognosis in hepatocellular carcinoma[J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(6): 4711-4716. DOI: 10.1002/jcb.26650.
- [14] Revenfeld AL, Baek R, Nielsen MH, et al. Diagnostic and prognostic potential of extracellular vesicles in peripheral blood[J]. *Clin Ther*, 2014, 36(6): 830-846. DOI: 10.1016/j.clinthera.2014.05.008.
- [15] Dong L, Lin W, Qi P, et al. Circulating long RNAs in serum extracellular vesicles; their characterization and potential application as biomarkers for diagnosis of colorectal cancer[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2016, 25(7): 1158-1166. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-16-0006.
- [16] Zhou R, Chen KK, Zhang J, et al. The decade of exosomal long RNA species; an emerging cancer antagonist[J]. *Mol Cancer*, 2018, 17(1): 75. DOI: 10.1186/s12943-018-0823-z.
- [17] Sun L, Su Y, Liu X, et al. Serum and exosome long non coding RNAs as potential biomarkers for hepatocellular carcinoma[J]. *J Cancer*, 2018, 9(15): 2631-2639. DOI: 10.7150/jca.24978.
- [18] Li B, Mao R, Liu C, et al. LncRNA FAL1 promotes cell proliferation and migration by acting as a CeRNA of miR-1236 in hepatocellular carcinoma cells[J]. *Life Sci*, 2018, 197: 122-129. DOI: 10.1016/j.lfs.2018.02.006.
- [19] Zhang C, Yang X, Qi Q, et al. lncRNA-HEIH in serum and exosomes as a potential biomarker in the HCV-related hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Biomark*, 2018, 21(3): 651-659. DOI: 10.3233/CBM-170727.
- [20] Xu H, Chen Y, Dong X, et al. Serum exosomal long noncoding RNAs ENSG00000258332.1 and LINC00635 for the diagnosis and prognosis of hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2018, 27(6): 710-716. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-17-0770.
- [21] Hou Y, Yu Z, Tam NL, et al. Exosome-related lncRNAs as predictors of HCC patient survival; a prognostic model[J]. *Am J Transl Res*, 2018, 10(6): 1648-1662.
- [22] Bao C, Lyu D, Huang S. Circular RNA expands its territory[J]. *Mol Cell Oncol*, 2016, 3(2): e1084443. DOI: 10.1080/23723556.2015.1084443.
- [23] Zhang X, Xu Y, Qian Z, et al. circRNA_104075 stimulates YAP-dependent tumorigenesis through the regulation of HNF4a and may serve as a diagnostic marker in hepatocellular carcinoma[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(11): 1091. DOI: 10.1038/s41419-018-1132-6.
- [24] Zhang C, Zhang C, Lin J, et al. Circular RNA hsa_circ_0091579 serves as a diagnostic and prognostic marker for hepatocellular carcinoma[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 51(1): 290-300. DOI: 10.1159/000495230.
- [25] Zhang X, Zhou H, Jing W, et al. The circular RNA hsa_circ_0001445 regulates the proliferation and migration of hepatocellular carcinoma and may serve as a diagnostic biomarker[J]. *Dis Markers*, 2018, 2018: 3073467. DOI: 10.1155/2018/3073467.
- [26] Matboli M, Shafei AE, Ali MA, et al. circRNAs (hsa_circ_00156, hsa_circ_000224, and hsa_circ_000520) are novel potential biomarkers in hepatocellular carcinoma[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(5): 7711-7724. DOI: 10.1002/jcb.28045.
- [27] Li X, Shen M. Circular RNA hsa_circ_103809 suppresses hepatocellular carcinoma proliferation and invasion by sponging miR-620[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(2): 555-566. DOI: 10.26355/eurrev_201902_16868.
- [28] Wang G, Liu W, Zou Y, et al. Three isoforms of exosomal circPTGR1 promote hepatocellular carcinoma metastasis via the miR449a-MET pathway[J]. *EBioMedicine*, 2019, 40: 432-445. DOI: 10.1016/j.ebiom.2018.12.062.

(收稿日期:2019-03-04 修回日期:2019-03-25)

(本文编辑:颜建华)