

环状非编码 RNA 在口腔鳞癌中的研究进展

卫佳宁,续国强,高继萍,宋国华*

(山西医科大学实验动物中心,实验动物与人类疾病动物模型山西省重点实验室,太原 030001)

【摘要】 环状 RNA 是一类新发现的不同于 miRNA 和 lncRNA 的共价闭环状内源性非编码 RNA。目前,已有许多报道关于 circRNA 在疾病发生发展机制的研究,为肿瘤的预防、诊断和精准治疗提供一种全新的理论依据。本文主要对 circRNA 的生物学特征和作用机制及其在口腔鳞癌中发生发展的作用进行综述。

【关键词】 circRNA;口腔鳞状细胞癌;miRNA 海绵作用;生物标志物

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 09-0096-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.09.017

Research progress on cyclic noncoding RNA in oral squamous cell carcinoma

WEI Jianing, XU Guoqiang, GAO Jiping, SONG Guohua*

(Laboratory Animal Center, Shanxi Medical University; Shanxi Key Laboratory of Experimental Animal Science and Human Disease Animal Model, Taiyuan 030001, China)

【Abstract】 Circular RNAs (circRNAs) are a newly discovered class of covalently closed circular endogenous noncoding RNAs that differ from miRNAs and lncRNAs. Many reports have recently been published on the involvement of circRNAs in the mechanism of disease development, providing a new theoretical basis for tumor prevention, diagnosis, and precise treatment. This article reviews the biological characteristics and mechanisms of circRNAs and their role in the development of several common oral squamous cell carcinomas.

【Keywords】 circRNA; oral squamous cell carcinoma; miRNA spongy; biomarker

口腔癌是世界上最常见的第十一种恶性肿瘤,尤其是在发展中国家,在发病总数中排名第九^[1]。虽然随着医学技术的发展,口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)的死亡率保持相对不变。但统计发现口腔癌患者趋于年轻化,该癌症的总体预后较差,生存率约 55% ~ 65%^[2]。这可能是由于延迟诊断,早期诊断是降低口腔癌死亡率的关键,目前寻找一种新的生物标志物和治疗目标是至关重要的。环状 RNA(circular RNA, circRNA)在哺乳动物中广泛存在^[3],通过共价键连接 3' 和 5'

末端形成闭环状结构的内源性非编码 RNA^[4],因其闭环结构能够抗核糖核酸酶的降解,在细胞和组织的发育阶段能够稳定的表达^[5]。一些研究发现, circRNA 可参与 RNA 蛋白复合物的形成和 RNA-RNA 调控网络^[6],可作为一个病毒或病毒复制的模板,在 RNA 加工反应中作为顺式作用元件起作用,如 snoRNA 基因和 miRNA 海绵^[7]。研究表明, circRNA 参与一些疾病的发生发展^[8],尤其在肿瘤方面。因此,从 circRNA 角度研究口腔鳞癌致病机理及治疗方案具有重要意义。

【基金项目】 国家自然科学基金(编号:31772551);山西省自然科学基金(编号:201701D121087);山西省研究生教育创新项目(编号:2017SY037)。

【作者简介】 卫佳宁(1994—),女,硕士研究生,研究方向:人类疾病动物模型。E-mail: 823952957@qq.com

【通信作者】 宋国华(1973—),女,教授,研究方向:人类疾病动物模型。E-mail: ghsongg@hotmail.com

1 CircRNA 的生物合成、分类及作用机制

1.1 CircRNA 的生物合成

CircRNA 是前体 mRNA (pre-mRNA) 通过可变剪切加工产生,广泛且稳定地存在于所有的真核生物中的一类非编码 RNA^[9-10]。大部分的 circRNA 是由外显子序列构成,在不同的物种中具有保守性,同时存在组织及不同发育阶段的表达特异性。CircRNA 也可以通过非经典剪接方式进行反向剪接形成。2013 年,Jeck 等^[5]在《RNA》中提出 circRNA 产生的两种模型:套索驱动环化和内含子驱动环化。套索驱动环化模型认为 pre-mRNA 的转录过程中由于 RNA 发生了部分折叠,拉近了原本非相邻的外显子,从而发生了外显子跳跃,使得被跨越的区域形成了环形 RNA 中间体,进一步通过套索剪接形成由外显子构成的环形 RNA 分子。另一种模型认为,内含子区域的反向互补序列导致内含子区域配对,介导反向剪接,从而形成环形 RNA 分子^[11]。

1.2 CircRNA 的分类

环状 RNA 的产生多种多样,可来源于不同的基因,也可由同一基因产生。根据来源可以分为 3 类:存在于细胞质中仅由外显子构成的环状 RNA (exonic circRNA);置于细胞核中仅由内含子构成的环状 RNA (intronic circRNA)^[12];包含外显子之间的内含子的 circRNA (exon-intro circRNA)^[13]。

1.3 CircRNA 的作用机制

CircRNA 最初被认为是 mRNA 拼接错误的副产品,具有稳定、多样化和保守的特点。近期研究显示,circRNA 在不同物种中起到 miRNA“分子海绵”的作用,称之为竞争性内源 RNA (competitive endogenous RNA, ceRNA),能竞争性结合疾病相关的 miRNA,解除 miRNA 对其靶基因的抑制作用,上调靶基因的表达水平,从而在疾病调控中发挥重要作用。CircDOCK1 通过作为 ceRNA 调节 BIRC3 表达并参与 OSCC 细胞凋亡的过程^[14]。Circ_100290 通过充当 miR-29 的“分子海绵”在口腔癌中发挥作用^[15]。CircHIPK3 作为 miR-124 海绵,调节靶标水通道蛋白 3 (AQP-3) 表达,AQP-3 进而促进细胞增殖和迁移^[16]。CircRNA 也可与 lncRNA 竞争性结合 miRNA。Li 等^[17]通过 GO 分析和 KEGG 分析发现,在生殖干细胞中 lncRNA Meg3 和 circRNA Igf1r 可以与 miRNA-15a-5p 竞争结合增加靶基因 *InhA*、

ACSL3、*KIF21B* 和 *IGFBP2* 的表达。这些发现为 lncRNAs 和 circRNAs 提供了新的视角,为将来对生殖干细胞中 lncRNAs 和 circRNAs 调控机制的研究奠定了基础。

2 CircRNA 与口腔鳞癌

2.1 口腔鳞癌中充当 miRNA 海绵作用

CircRNA 可以与 miRNA 结合,从而阻止 miRNA 沉默,因此 circRNA 也称 miRNA 海绵^[18-19]。有研究表明^[3, 7, 14-15], circRNA_100290、circDOCK1、circRNA BANP 和 circRNA ITCH 在口腔癌中通过 miRNA 的海绵参与发病机制。

2.1.1 CircRNA_100290

Chen 等^[15]使用微阵列分析对 OSCC 中的 circRNA 进行了全面研究,鉴定出在 OSCC 组织和非癌组织之间差异表达的 circRNAs,发现 circ_100290 在 OSCC 发展中起着重要的调节作用。CircRNA_100290 在口腔癌组织中表达上调,通过充当 miR-29 家族成员的“分子海绵”来调节基因表达。CircRNA_100290 与 OSCC 细胞在体外和体内的增殖相关。他们还发现 circRNA_100290 在 OSCC 组织中上调并与 CDK6 共表达。通过使用 circRNA_100290 特异性小干扰 RNA (small interference RNA, siRNA) 敲低 circRNA_100290 的表达水平,检测 OSCC 细胞系中 G1/S 期阻滞,抑制细胞增殖并降低 CDK6 的表达。通过荧光素酶报告基因检测,观察到 circRNA_100290 直接与 miR-29 家族成员结合,包括 miR-29a、miR-29b 和 miR-29c。进一步 EGFP/RFP 报告分析显示 CDK6 是 miR-29b 的直接靶标。总之, circRNA_100290 可能作为 ceRNA 通过抑制 miR-29b 家族成员来调节 CDK6 表达。这表明 circRNA 可能在 OSCC 中发挥调节功能,可作为 OSCC 治疗的潜在靶点。进一步的研究显示 circRNA_100290 通过携带 miR-29 家族成员来发挥其调控功能,以减少 CDK6 的表达,CDK6 也直接被 miR-29 家族靶向。它表明 circRNA_100290 和 CDK6 mRNA 是由 miR29 家族连接的一对 ceRNA。

2.1.2 CircDOCK1

CircDOCK1 为环状 RNA 鸟苷酸交换因子,先前有研究显示^[20]通过 TGF- β 处理, circDOCK1 的表达降低,而 circDOCK1 的靶基因 mRNA 表达增加 2 倍。此外 TGF- β 处理可以诱导上皮间质转化 (epithelial mesenchymal transformation, EMT),表明 circDOCK1 的

功能之一可以诱导上皮细胞 mRNA 下调,从而保持细胞稳定性。Wang 等^[14]通过用 TNF- α 刺激 CAL-27 细胞建立凋亡模型,使用高通量微阵列从细胞凋亡模型和正常 CAL-27 细胞中获得差异表达的 circRNA 谱,发现 has_circ_100721 (circDOCK1) 过表达并且敲低 circDOCK1 表达水平可导致细胞凋亡率的增加。他们利用多种生物信息学方法,预测了 circRNA、miRNA 和基因之间的相互作用,并构建了 circDOCK1/miR-196a-5p/BIRC3 网络,确定 circDOCK1 与 miR-196a-5p 通过与 BIRC3 竞争,最终调节细胞凋亡而相互作用。用 siRNA 沉默 circDOCK1 和模拟物上调 miR-196a-5p 的表达,导致 OSCC 细胞中细胞凋亡增加并减少 BIRC3 形成,并通过 qRT-PCR 方法比较口腔鳞状细胞癌组织及癌旁组织中的 circDOCK1,miR-196a-5p 和 BIRC3 的表达进一步证实了此结果。最后得出结论, circDOCK1 通过在 OSCC 中靶向 BIRC3 抑制 miR-196a-5p 来抑制细胞凋亡。

2.1.3 CircRNA BANP 和 circRNA ITCH

研究人员一直在探索控制牙周膜干细胞 (periodontal ligament stem cells, PDLSC) 成骨分化的分子机制。研究表明, circRNA 参与成骨分化^[3, 7]。CircRNA BANP 和 circRNA ITCH 分别为环状 RNA 酸性神经肽和环状 RNA 泛素连接蛋白。CircRNA BANP 和 circRNA ITCH 可能与 miRNA-34a 和 miRNA-146a 相互作用以通过 MAPK 途径调节 PDLSC 成骨分化。虽然有数种 lncRNAs、circRNAs 和 miRNAs 被认为参与了 PDLSC 成骨分化,但是关于它们潜在的网络和功能的数据并不多。为了充分了解 ceRNA 对 PDLSC 成骨分化的影响,整合 lncRNA/circRNA-miRNA-mRNA 竞争性调控网络至关重要。利用 Illumina HiSeq2000 开发 RNA 测序 (RNA-seq), 以全面鉴定正常和成骨诱导性 PDLSCs 中差异表达的 lncRNA 和 circRNA。使用 qRT-PCR 进一步证实了代表性的 lncRNA 和 circRNA。最后, 基于 miRanda 预测了 lncRNA、circRNA、miRNA 和 mRNA 的 ceRNA 网络,并通过 GO 分析和 KEGG 分析研究了它们的潜在调控作用。CeRNA 网络表明, TCONS_00212979、TCONS_00212984、circRNA BANP 和 circRNA ITCH 可能与 miRNA-34a 和 miRNA-146a 相互作用以通过 MAPK 途径调节 PDLSC 成骨分化^[21]。研究结果可能为探索 PDLSC 成骨分化的分子机制提供新的证据。

2.2 转录调节作用

Li 等^[22]研究发现,在人类 HeLa 细胞中存在与 RNA 聚合酶 II 相关的 circRNAs。在这些 circRNA 中,外显子被环化,内含子在外显子之间“保留”,可称它们为外显子-内含子 circRNA 或 ELciRNA (exon-intron circRNA)。ELciRNA 主要定位于核内,与 U1 snRNP 相互作用并促进其亲本基因的转录。他们的研究结果揭示了 circRNA 在调节细胞核中基因表达中的新作用,其中 ELciRNAs 增强其顺式的亲本基因表达,并突出了通过 U1 snRNA 和 ELciRNAs 之间的特定 RNA-RNA 相互作用进行转录控制的调控策略^[22]。

2.3 生物标志物

据报道, circRNA BANP 和 circRNA ITCH 有助于致癌并可能作为癌症生物标志物^[23-24]。CircRNA_100290 作为 miR-29 家族成员的海绵起作用,在口腔癌中起到 CDK6 的 ceRNA 的作用^[15], circDOCK1 通过作为 ceRNA 调节 BIRC3 表达并参与 OSCC 细胞凋亡的过程^[13]。因此, circRNA_100290 和 circDOCK1 可能成为 OSCC 的新型潜在生物标志物和治疗靶点。CircRNA 参与多种病理状态,包括神经系统疾病^[25-26]、血液病^[27]、软骨退化^[28]、先天性巨结肠病^[29]和多种癌症,这可以作为有前途的诊断生物标志物和治疗靶点。与 miRNA 和 lncRNA 相比, circRNA 具有序列保守性,生物学稳定性和组织特异性特点,因此 circRNA 被认为是有希望的生物标志物和治疗靶点,并且可能在基因表达的调节中发挥潜在的功能。

3 展望

近几年来, circRNA 具有充当 miRNA 分子“分子海绵”、调控基因转录、与蛋白质相互作用、吸附蛋白质以及参与蛋白质的翻译等功能,且能稳定存在于血清等特性。虽然目前对 circRNA 的研究并不是很多,但随着 RNA 测序技术的迅速发展, circRNA 这个未来之星在口腔鳞癌的诊断和预后治疗方面有很大的发展前景。从 circRNA 入手挖掘新的生物标志物及 circRNA 在口腔中的潜在功能有助于口腔癌的早发现、早治疗。目前部分 circRNA 已被证实与肿瘤的发生、侵袭、转移和患者的预后相关。随着生物信息学方法及实验技术手段不断成熟,大数据分析的广泛应用,挖掘新数据、筛选具有生物标记的 circRNA、结合 circRNA-miRNA-mRNA 机制及

circRNA-lncRNA-mRNA 机制分析疾病通路对于研究口腔鳞癌发生发展进程具有广阔的发展前景。

参考文献:

- [1] Global Burden of Disease Cancer Collaboration. The Global Burden of Cancer 2013 [J]. JAMA Oncol, 2015, 1(4) : 505 – 527.
- [2] Ghantous Y, Yaffi V, Abu-Elnaaj I. Oral cavity cancer: epidemiology and early diagnosis [J]. Refuat Hapeh Vehashinayim (1993), 2015, 32(3) : 55 – 63, 71.
- [3] Barrett SP, Salzman J. Circular RNAs: analysis, expression and potential functions [J]. Development, 2016, 143(11) : 1838 – 1847.
- [4] Hentze MW, Preiss T. Circular RNAs: splicing ' s enigma variations [J]. EMBO J, 2013, 32(7) : 923 – 925.
- [5] Jeck WR, Sorrentino JA, Wang K, et al. Circular RNAs are abundant, conserved, and associated with ALU repeats [J]. RNA, 2013, 19(2) : 141 – 157.
- [6] Meng X, Li X, Zhang P, et al. Circular RNA: an emerging key player in RNA world [J]. Brief Bioinform, 2017, 18(4) : 547 – 557.
- [7] Lasda E, Parker R. Circular RNAs: diversity of form and function [J]. RNA, 2014, 20(12) : 1829 – 1842.
- [8] You X, Vlatkovic I, Babic A, et al. Neural circular RNAs are derived from synaptic genes and regulated by development and plasticity [J]. Nat Neurosci, 2015, 18(4) : 603 – 610.
- [9] Huang Z, Su R, Deng Z, et al. Identification of differentially expressed circular RNAs in human monocyte derived macrophages response to mycobacterium tuberculosis infection [J]. Sci Rep, 2017, 7(1) : 13673.
- [10] 罗清, 姚芳苒, 邓桢, 等. LPS 诱导的小鼠腹腔巨噬细胞炎症反应中环状 RNA 表达谱变化分析 [J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2017, 37(6) : 405 – 411.
- [11] 战昊, 朱凯, 胡志强, 等. 环状 RNA: 非编码 RNA 研究新方向 [J]. 中国临床医学, 2016, 23(5) : 651 – 655.
- [12] Westholm JO, Miura P, Olson S, et al. Genome-wide analysis of dmsophila circular RNAs reveals their structural and sequence properties and age-dependent neural accumulation [J]. Cell Rep, 2014, 9(5) : 1966 – 1980.
- [13] Chen I, Chen CY, Chuang TJ. Biogenesis, identification, and function of exonic circular RNAs [J]. Wiley Interdiscip Rev RNA, 2015, 6(5) : 563 – 579.
- [14] Wang L, Wei Y, Yan Y, et al. CircDOCK1 suppresses cell apoptosis via inhibition of miR-196a-5p by targeting BIRC3 in OSCC [J]. Oncol Rep, 2018, 39(3) : 951 – 966.
- [15] Chen L, Zhang S, Wu J, et al. circRNA_100290 plays a role in oral cancer by functioning as a sponge of the miR-29 family [J]. Oncogene, 2017, 36(32) : 4551 – 4561.
- [16] Chen G, Shi Y, Liu M, et al. circHIPK3 regulates cell

proliferation and migration by sponging miR-124 and regulating AQP-3 expression in hepatocellular carcinoma [J]. Cell Death Dis, 2018, 9(2) : 175.

- [17] Li X, Ao J, Wu J. Systematic identification and comparison of expressed profiles of lncRNAs and circRNAs with associated co-expression and ceRNA networks in mouse germline stem cells [J]. Oncotarget, 2017, 8(16) : 26573 – 26590.
- [18] Momen-Heravi F, Bala S. Emerging role of non-coding RNA in oral cancer [J]. Cell Signal, 2018, 42 : 134 – 143.
- [19] Jeck WR, Sharpless NE. Detecting and characterizing circular RNAs [J]. Nat Biotechnol, 2014, 32(5) : 453 – 461.
- [20] Conn SJ, Pillman KA, Toubia J, et al. The RNA binding protein quaking regulates formation of circRNAs [J]. Cell, 2015, 160(6) : 1125 – 1134.
- [21] Gu X, Li M, Jin Y, et al. Identification and integrated analysis of differentially expressed lncRNAs and circRNAs reveal the potential ceRNA networks during PDLSC osteogenic differentiation [J]. BMC Genet, 2017, 18(1) : 100.
- [22] Li Z, Huang C, Bao C, et al. Exon-intron circular RNAs regulate transcription in the nucleus [J]. Nat Struct Mol Biol, 2015, 22(3) : 256 – 264.
- [23] Zhu M, Xu Y, Chen Y, et al. Circular BANP, an upregulated circular RNA that modulates cell proliferation in colorectal cancer [J]. Biomed Pharmacother, 2017, 88 : 138 – 144.
- [24] Guo W, Zhang J, Zhang D, et al. Polymorphisms and expression pattern of circular RNA circ-ITCH contributes to the carcinogenesis of hepatocellular carcinoma [J]. Oncotarget, 2017, 8(29) : 48169 – 48177.
- [25] Kumar L, Shamsuzzama, Haque R, et al. Circular RNAs: the emerging class of non-coding RNAs and their potential role in human neurodegenerative diseases [J]. Mol Neurobiol, 2017, 54(9) : 7224 – 7234.
- [26] Nan A, Chen L, Zhang N, et al. A novel regulatory network among LncRpa, CircRar1, miR-671 and apoptotic genes promotes lead-induced neuronal cell apoptosis [J]. Arch Toxicol, 2017, 91(4) : 1671 – 1684.
- [27] Bonizzato A, Gaffo E, Te Kronnie G, et al. CircRNAs in hematopoiesis and hematological malignancies [J]. Blood Cancer J, 2016, 6(10) : e483.
- [28] Liu Q, Zhang X, Hu X, et al. Circular RNA related to the chondrocyte ECM regulates MMP13 expression by functioning as a MiR-136 ' sponge ' in human cartilage degradation [J]. Sci Rep, 2016, 6 : 22572.
- [29] Peng L, Chen G, Zhu Z, et al. Circular RNA ZNF609 functions as a competitive endogenous RNA to regulate AKT3 expression by sponging miR-150-5p in Hirschsprung ' s disease [J]. Oncotarget, 2017, 8(1) : 808 – 818.