

长链非编码 RNA 与肺癌的关系研究进展

刘艳茹, 章锐锋, 应可净

浙江大学医学院附属邵逸夫医院呼吸科, 浙江 杭州 310016

[摘 要] 长链非编码 RNA 是一类长度大于 200 个核苷酸、因缺少有意义的开放阅读框而不具有编码蛋白功能的非编码 RNA 分子。近年来的研究表明,长链非编码 RNA 在肿瘤的发生、发展过程中起着重要的作用。本文就长链非编码 RNA 在肺癌中的异常表达、与肺癌发生和转移的关系、在肺癌患者早期诊断和判断预后中的意义等研究进展做一综述,为肺癌的早期诊断和治疗提供新的思路。

[关键词] RNA;肺肿瘤;基因表达调控;综述

[中图分类号] R734.2 **[文献标志码]** A

Roles of long noncoding RNA in lung cancer

LIU Yan-ru, ZHANG Rui-feng, YING Ke-jing (*Department of Respiratory Medicine, Sir Run Run Shaw Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310016, China*)

Corresponding author: YING Ke-jing, E-mail: yingsrrsh@163.com

[Abstract] Long noncoding RNAs are a group of noncoding RNAs with a length more than 200 nucleotides. Recent studies have revealed that long noncoding RNAs play an important role in the development and progression of cancer. Lung cancer is the leading cause of cancer-related death all over the world. In this article, we review the roles of long noncoding RNAs in lung cancer to provide new insights into the diagnosis and treatment of the disease.

[Key words] RNA; Lung neoplasms; Gene expression regulation; Review

[J Zhejiang Univ (Medical Sci), 2014,43(5):607-611.]

长链非编码 RNA (long-noncoding RNA, lncRNA) 是一类长度大于 200 个核苷酸,因缺少有意义的开放阅读框而不具有蛋白编码功能的一

类非编码 RNA 分子^[1]。lncRNA 最初被认为是基因转录中的“噪音”,近年来的研究发现,lncRNA 在染色质修饰、基因印记、转录、翻译等生物过程

收稿日期:2014-04-04 接受日期:2014-07-28

基金项目:国家自然科学基金(81000019,81270107)。

作者简介:刘艳茹(1988-),女,硕士研究生,主要从事肺癌、肺动脉高压的基础研究;E-mail: liuyanru882017@163.com

通讯作者:应可净(1956-),女,博士,主任医师,博士生导师,主要从事肺癌的分子生物学研究及肺栓塞诊治基础和临床研究;E-mail: yingsrrsh@163.com

中扮演着重要的角色^[2]。随着对其功能的深入研究,学者们越来越认识到 lncRNA 与肿瘤等疾病密切相关。

肺癌是对人群健康和生命威胁最大的恶性肿瘤之一,近年来虽然在基因和蛋白水平上对肺癌的发生机制有了一定的了解,但由于缺乏有效的早期诊断和治疗手段,肺癌的高病死率仍没有明显的改变,患者 5 年生存率只有 17%^[3]。本文结合国内外最新的研究报道,对 lncRNA 与肺癌关系做一综述,以期对肺癌的早期诊断和治疗提供新思路,从而有助于提高肺癌患者的生存率。

1 lncRNA 调控基因表达的机制

通过对已发现的 lncRNA 研究表明,lncRNA 能够在多种层面(表观遗传调控、转录调控、转录后调控等)调控基因的表达水平,其中最重要的是参与了编码蛋白基因表达调控的表观遗传学机制,主要有以下几个方面^[4]:① 调节 DNA 甲基化,如短链脱氢还原酶家族成员 4 类 2 (short-chain dehydrogenase/reductase family member 4 like 2, DHRS4L2) 的反义转录本 AS1DHRS4 通过招募 DNA 甲基转移酶在 DHRS4L2 启动子区域诱导了 DNA 甲基化,从而抑制了 DHRS4L2 基因的表达^[5];② 调节组蛋白修饰,从而影响转录区下游基因的表达,如细胞周期蛋白 D1 (cyclin D1, CCND1) 转录出的 lncRNA 可招募 RNA 结合蛋白 TLS 到 CCND1 启动子区,TLS 蛋白变为活性构象与组蛋白乙酰化酶 CBP/P300 结合后抑制酶的活性,使 CCND 表达下降,抑制肿瘤形成^[6];③ 调节染色质重构,可能通过介导染色质重构复合物到特定的基因位点引起表观遗传学改变或者染色体失活两条途径实现。此外,lncRNA 可以结合微 RNA (microRNA),影响微 RNA 的表观遗传修饰作用。

除上述作用,lncRNA 还可以通过与蛋白编码基因的转录本形成互补双链,干扰 mRNA 的剪切,从而产生不同的剪切形式;形成互补双链后进一步在 Dicer 酶作用下产生内源性的小干扰 RNA,调控基因的表达水平;通过结合到特定蛋白质上,lncRNA 转录本能调节相应蛋白的活性^[7]。

2 lncRNA 在肺癌中的异常表达

众多研究表明,lncRNA 在正常组织和肿瘤组

织中存在明显的表达异常,在同种肿瘤的不同阶段 lncRNA 表达也存在明显差异。目前发现与肺癌相关的 lncRNA 主要有 MALAT1、H19、GAS6-AS1、SCAL1、HOTAIR、MEG3。

肺腺癌转移相关转录子 (metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1, MALAT1) 最初是 Ji 等^[8]通过递减杂交法技术研究人非小细胞肺癌 (NSCLC) 的转移中鉴定出的一个 lncRNA,在非小细胞腺癌转移肿瘤中表达明显升高,也在许多正常组织中表达。H19 基因是最早鉴定的印迹基因之一,H19 位点编码的 lncRNA 主要表达于胚胎发育期,出生后,在大多数组织中表达明显抑制,而在肺癌中表达明显增加^[9]。生长停滞特异基因 (growth arrest-specific gene 6, GAS6) 转录的反义 RNA 链 GAS6-AS1 是 Han 等^[10]通过生物信息学分析发现的一个新的 lncRNA,在肺癌组织的表达比癌旁组织明显下降。SCAL1 (the smoke and cancer-associated lncRNA-1) 在肺癌细胞中表达明显升高,并且可以由香烟烟雾诱导产生^[11]。HOX 转录反义 RNA (HOX transcript antisense RNA, HOTAIR) 在早期肺癌和原发性肺癌中表达并不明显,在晚期肺癌和肺癌转移肿瘤中表达明显升高^[12]。母系印迹基因 3 (maternal expressed gene 3, MEG3) 是首次由 Miyoshi 等^[13]在 2000 年发现的 lncRNA,后来发现其在肺癌组织中的表达水平明显比正常组织低^[14]。

3 lncRNA 与肺癌的发生

基因印迹是指某些基因呈亲源依赖性单等位基因表达,而其另一个等位基因不表达或者表达极弱^[15]。基因印迹在肿瘤的发生、发展过程中扮演着非常重要的角色,最早研究表明印迹基因 lncRNA H19 印迹表达丢失导致 lncRNA H19 在肺癌中表达过度^[9,16],但是最新一项研究表明致癌基因 c-Myc 通过结合靠近印迹调控区 (imprinting control region) 的非甲基化的 E-boxes 促使组蛋白乙酰化和 lncRNA H19 启动子的转录开始,使 lncRNA H19 单等位基因的表达增加,不影响其印迹性^[17]。同时应用基因敲除方法得到 lncRNA H19 表达降低可以有效降低肺癌细胞集落生成和锚定非依赖生长。这些结果表明 lncRNA H19 作为 c-Myc 上调的基因可以促进肺癌发生;lncRNA H19 也是微 RNA675 的前体,微

RNA675 可能通过下调抑癌基因 RB1 诱发肿瘤发生^[18]。

编码 lncRNA 区域的甲基化异常在肿瘤的发生中也起着重要的作用,其中 MEG3 作为肿瘤抑制相关 lncRNA 之一,研究结果表明其启动子区域的 CpG 岛的过度甲基化是抑制 MEG3 在肺癌细胞中表达的重要原因。进一步研究 MEG3 在细胞凋亡和生长抑制方面的作用机制,发现其在肺癌细胞中过表达可以激活抑癌基因 p53 的表达活性,这为研究 MEG3 抑制肿瘤生长的机制提供了另一个依据^[14]。

4 lncRNA 与肺癌的早期诊断

吸烟是引起肺癌的主要危险因素,90% 肺癌患者的发病与吸烟有关^[19]。随着分子生物学研究的不断深入,对吸烟所致肺癌的分子机制的揭示将对其预防、早期诊断和治疗有重要意义。SCAL1 在吸烟人群中及肺癌患者中高表达,并且 Thai 等^[11]通过体外实验证明了香烟烟雾可以诱导这种 lncRNA 在气管上皮细胞内表达。Kaplan 等^[20]对每年至少吸 10 包烟的人群进行研究,发现印迹基因 lncRNA H19 在支气管上皮细胞表达明显增加。因为 lncRNA H19 在第五个外显子上有 Rsa I 多态性酶切位点,利用聚合酶链反应(PCR)技术结合限制性多态性技术对 lncRNA H19 在支气管上皮细胞表达印迹的状态进行分析。结果显示 lncRNA H19 单等位基因被激活导致其在吸烟人群支气管上皮细胞中表达量增加,而不是因为印迹丢失导致双等位基因表达。曾有研究表明 lncRNA H19 的印迹丢失与肺癌有关^[9,16],所以评估吸烟人群中 lncRNA H19 印迹状态以及筛查 SCAL1 在吸烟人群中的表达水平有可能为肺癌早期诊断提供帮助。

5 lncRNA 与肺癌的转移

MALAT1 最初是在 NSCLC 中发现的一种与肺癌侵袭转移有关的基因。为了进一步研究 MALAT1 与肺癌转移的调节机制,Tano 等^[21]应用基因敲除和基因表达芯片分析发现 MALAT1 在转录、转录后水平调节运动相关基因的表达,比如三螺旋重复胶原蛋白 1(CTHRC1)、真核细胞伴侣素(CCT4)、透明质酸调节运动受体(HMMR)、分化调节因子 1(ROD1),这些基因对细胞的迁移有

重要作用^[22-26]。说明 MALAT1 可能通过影响生长、迁移相关基因的表达,增强细胞的运动能力,促进肺癌转移。Gutschner 等^[27]应用反义寡聚核苷酸在异种移植裸鼠模型中对 MALAT1 表达进行抑制,结果可以有效地阻止肺癌转移,并且应用基因芯片分析得出 MALAT1 通过调节相关基因的表达促进肺癌的转移,而不调节选择性剪切。

最初发现 HOTAIR 是在原发性和转移性乳腺癌组织中表达上调,Nakagawa 等^[12]对 HOTAIR 在肺癌转移中的作用也进行了研究,临床研究表明 HOTAIR 在晚期肺癌及肺癌转移患者中也呈高表达,体外实验证明高表达的 HOTAIR 的肺癌 A549 细胞株的转移能力增强,而沉默 HOTAIR 的表达会降低 A549 的侵袭能力。

6 lncRNA 与肺癌的预后和治疗

MALAT1 在肺癌中高表达与患者的预后有密切关系。Schmidt 等^[28]通过原位杂交的方法分析,结果 MALAT1 表达水平与鳞癌患者的预后有关,而非鳞癌患者预后与 MALAT1 的表达无关。同时有研究表明,下调 MALAT1 表达水平能抑制肺癌细胞的转移和侵袭,这些研究提示 MALAT1 可能成为新的诊断预后标志物。Lu 等^[14]对 44 例 NSCLC 患者的临床资料分析发现,MEG3 高表达的肺癌患者生存期明显高于低表达患者,提示 MEG3 是影响 NSCLC 患者预后的因素之一,可能用于生存预测。对临床病理资料研究显示,lncRNA GAS6-AS1 是影响 NSCLC 患者整体生存率的独立危险因素,且转移灶中通常存在 lncRNA GAS6-AS1 低表达^[10]。GAS6 是生长停滞特异性基因所编码的蛋白产物之一,参与细胞的增殖、凋亡、趋化、粘附和识别等过程,同时在肿瘤的形成、侵袭以及转移过程中扮演着重要的角色^[29]。作为 GAS6 反义链的 lnc GAS6-AS1 与 GAS6 mRNA 表达水平成负相关,提示 lncRNA GAS6-AS1 可能通过影响它的宿主基因 GAS6 来参与 NSCLC 的进展,但详细的机制仍在探索中。

关于 lncRNA 与肺癌治疗的关系,有研究表明,肺腺癌细胞株对顺铂耐药现象与核因子相关因子 2(nuclear factor erythroid2-related factor 2, Nrf-2)以及其作用下游基因的高表达有关^[30]。Thai 等^[11]通过干扰 Nrf-2 基因表达的实验体系等方法,发现 Nrf-2 能结合到 SCAL1 的启动子区域,

转录活化 SCAL1 的表达。这为我们进一步研究 Nrf-2 在肺癌耐药性的作用机制提供了可能,同时 SCAL1 也有望成为肺癌生物治疗中更有效的药物靶点。所以利用 lncRNA 在表观遗传中的调控作用有望抑制肿瘤细胞的产生,从而达到早期治疗肿瘤的目的^[31]。

7 展 望

近年来,内源性小分子非编码 RNA 的研究已经取得了重要的成果,而对于 lncRNA 的作用机制了解还处于初步阶段,大多数研究还仅仅停留于 lncRNA 在疾病表达水平的差异上,尤其在肺癌这一领域认识还较肤浅,目前还有许多问题亟待解决。例如:①随着生物技术的发展,更多与肺癌密切相关的 lncRNA 被发现,但是其在肺癌中的生物功能是如何实现,其作用机制、作用靶点和其他基因的相互作用少有报道。②众多研究表明,在一些肿瘤细胞中,lncRNA 表达水平会发生显著差异,如前列腺癌的 lncRNADD3 (也称 PCA3)已成为前列腺癌高度特异的诊断标志物,其特异性高于血清前列腺癌特异性抗原(PSA)。这种表达水平差异可以作为癌症诊断的标志物和潜在的药物靶点,但至今与肺癌相关特异性表达的 lncRNA 暂时还未发现。这些问题的深入研究将为肺癌的特异性分子标志物、治疗和预后判断等提供新的思路。

参考文献:

- [1] GUTTMAN M, AMIT I, GARBER M, et al. Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals [J]. **Nature**, 2009, 458(7235): 223-227.
- [2] PONTING C P, OLIVER P L, REIK W. Evolution and functions of long noncoding RNAs [J]. **Cell**, 2009, 136(4): 629-641.
- [3] SIEGEL R, NAISHADHAM D, JEMAL A. Cancer statistics, 2013 [J]. **CA Cancer J Clin**, 2013, 63(1): 11-30.
- [4] MERCER T R, DINGER M E, MATTICK J S. Long non-coding RNAs: insights into functions [J]. **Nat Rev Genet**, 2009, 10(3): 155-159.
- [5] LI Q, SU Z, XU X, et al. AS1DHRS4, a head-to-head natural antisense transcript, silences the DHRS4 gene cluster in cis and trans [J]. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 2012, 109(35): 14110-14115.
- [6] WANG X, ARAI S, SONG X, et al. Induced ncRNAs allosterically modify RNA-binding proteins in cis to inhibit transcription [J]. **Nature**, 2008, 454(7200): 126-130.
- [7] WILUSZ J E, SUNWOO H, SPECTOR D L. Long noncoding RNAs: functional surprises from the RNA world [J]. **Genes Dev**, 2009, 23(13): 1494-1504.
- [8] JI P, DIEDERICH S, WANG W, et al. MALAT-1, a novel noncoding RNA, and thymosin beta4 predict metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer [J]. **Oncogene**, 2003, 22(39): 8031-8041.
- [9] KONDO M, SUZUKI H, UEDA R, et al. Frequent loss of imprinting of the H19 gene is often associated with its overexpression in human lung cancers [J]. **Oncogene**, 1995, 10(6): 1193-1198.
- [10] HAN L, KONG R, YIN D D, et al. Low expression of long noncoding RNA GAS6-AS1 predicts a poor prognosis in patients with NSCLC [J]. **Med Oncol**, 2013, 30(4): 694.
- [11] THAI P, STATT S, CHEN C H, et al. Characterization of a novel long noncoding RNA, SCAL1, induced by cigarette smoke and elevated in lung cancer cell lines [J]. **Am J Respir Cell Mol Biol**, 2013, 49(2): 204-211.
- [12] NAKAGAWA T, ENDO H, YOKOYAMA M, et al. Large noncoding RNA HOTAIR enhances aggressive biological behavior and is associated with short disease-free survival in human non-small cell lung cancer [J]. **Biochem Biophys Res Commun**, 2013, 436(2): 319-324.
- [13] MIYOSHI N, WAGATSUMA H, WAKANA S, et al. Identification of an imprinted gene, Meg3/Gtl2 and its human homologue MEG3, first mapped on mouse distal chromosome 12 and human chromosome 14q [J]. **Genes Cells**, 2000, 5(3): 211-220.
- [14] LU K H, LI W, LIU X H, et al. Long non-coding RNA MEG3 inhibits NSCLC cells proliferation and induces apoptosis by affecting p53 expression [J]. **BMC Cancer**, 2013, 13: 461.
- [15] HALL J G. Genomic imprinting: review and relevance to human diseases [J]. **Am J Hum Genet**, 1990, 46(5): 857-873.
- [16] KONDO M, TAKAHASHI T. Altered genomic imprinting in the IGF2 and H19 genes in human lung cancer [J]. **Nihon Rinsho**, 1996, 54(2): 492-496.
- [17] BARSYTE-LOVEJOY D, LAU S K, BOUTROS P C, et al. The c-Myc oncogene directly induces the H19 noncoding RNA by allele-specific binding to

- potentiate tumorigenesis [J]. **Cancer Res**, 2006, 66(10): 5330-5337.
- [18] TSANG W P, NG E K, NG S S, et al. Oncofetal H19-derived miR-675 regulates tumor suppressor RB in human colorectal cancer [J]. **Carcinogenesis**, 2010, 31(3): 350-358.
- [19] PIROZYNSKI M. 100 years of lung cancer [J]. **Respir Med**, 2006, 100(12): 2073-2084.
- [20] KAPLAN R, LUETTICH K, HEGUY A, et al. Monoallelic up-regulation of the imprinted H19 gene in airway epithelium of phenotypically normal cigarette smokers [J]. **Cancer Res**, 2003, 63(7): 1475-1482.
- [21] TANO K, MIZUNO R, OKADA T, et al. MALAT-1 enhances cell motility of lung adenocarcinoma cells by influencing the expression of motility-related genes [J]. **FEBS Lett**, 2010, 584(22): 4575-4580.
- [22] PYAGAY P, HEROULT M, WANG Q, et al. Collagen triple helix repeat containing 1, a novel secreted protein in injured and diseased arteries, inhibits collagen expression and promotes cell migration [J]. **Circ Res**, 2005, 96(2): 261-268.
- [23] STERNLICHT H, FARR G W, STERNLICHT M L, et al. The t-complex polypeptide 1 complex is a chaperonin for tubulin and actin in vivo [J]. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 1993, 90(20): 9422-9426.
- [24] LE CLAINCHE C, CARLIER M F. Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration [J]. **Physiol Rev**, 2008, 88(2): 489-513.
- [25] SHERMAN L, SLEEMAN J, HERRLICH P, et al. Hyaluronate receptors: key players in growth, differentiation, migration and tumor progression [J]. **Curr Opin Cell Biol**, 1994, 6(5): 726-733.
- [26] YAMAMOTO H, TSUKAHARA K, KANAOKA Y, et al. Isolation of a mammalian homologue of a fission yeast differentiation regulator [J]. **Mol Cell Biol**, 1999, 19(5): 3829-3841.
- [27] GUTSCHNER T, HAMMERLE M, EISSMANN M, et al. The noncoding RNA MALAT1 is a critical regulator of the metastasis phenotype of lung cancer cells [J]. **Cancer Res**, 2013, 73(3): 1180-1189.
- [28] SCHMIDT L H, SPIEKER T, KOSCHMIEDER S, et al. The long noncoding MALAT-1 RNA indicates a poor prognosis in non-small cell lung cancer and induces migration and tumor growth [J]. **J Thorac Oncol**, 2011, 6(12): 1984-1992.
- [29] LEE Y, LEE M, KIM S. Gas6 induces cancer cell migration and epithelial-mesenchymal transition through upregulation of MAPK and Slug [J]. **Biochem Biophys Res Commun**, 2013, 434(1): 8-14.
- [30] SING A, BOLDIN-ADAMASKY S, THIMMULAPPA R K, et al. RNAi-mediated silencing of nuclear factor erythroid-2-related factor 2 gene expression in non-small cell lung cancer inhibits tumor growth and increases efficacy of chemotherapy [J]. **Cancer Res**, 2008, 68(19): 7975-7984.
- [31] MOSKALEV E A, SCHUBERT M, HOHEISEL J D. RNA-directed epigenomic reprogramming: an emerging principle of a more targeted cancer therapy? [J]. **Genes Chromosomes Cancer**, 2012, 51(2): 105-110.

[本文编辑 沈 敏 蒋婉洁]

· 消 息 ·

第十五次全国内科学学术会议消息

为培养大内科系统临床医师全面的临床思维方式、卓越的临场技能,推动我国内科系统疾病的学术交流与发展、帮助广大同仁了解内科系统疾病基础与临床的最新进展,提高内科疾病的诊治水平,由中华医学会、中华医学会内科学分会主办,浙江省医学会承办的中华医学会第十五次全国内科学学术会议将于2014年11月7~9日在杭州市之江饭店会议中心召开。大会采取专题报告、优秀论文交流和疑难病例讨论的形式,邀请国内外著名内科学专家共同交流,探讨内科常见病和疑难病的综合诊断与治疗,推广新的内科用药和治疗方法,讨论住院医师的规范化培养模式,探讨内科教育模式和教学方法的改革。正式注册代表可获得国家级一类继续医学教育学分。