

· 综述 ·

长链非编码 RNA 在甲状腺乳头状癌中的作用

李 淮 陈晓铭 武 革

【摘要】 长链非编码 RNA(lncRNA) 是一类转录本长度大于 200 nt 的 RNA, 自身缺乏编码蛋白质的能力, 能在表观遗传学、转录水平和转录后水平调控基因表达。近年来结合微阵列芯片和基因多态性研究发现了一些 lncRNA 如 BANC1 及 PTCSC3 等在甲状腺乳头状癌中异常表达, 调控肿瘤细胞增殖、凋亡、侵袭及迁移等。深入研究 lncRNA 的作用机制将会为甲状腺肿瘤的诊治提供新的思路。

【关键词】 长链非编码 RNA; 基因表达; 甲状腺乳头状癌

Roles of long non-coding RNA in papillary thyroid carcinoma Li Wei, Chen Xiaoming, Wu Ge. Department of Endocrinology, Affiliated Hospital of Guangdong Medical University, Zhanjiang 524001, China
Corresponding author: Wu Ge, Email: wuge427@aliyun.com

【Abstract】 Long non-coding RNAs(lncRNAs) are RNAs exceeding 200 nt in lengths of transcripts, which lack the capacity for protein coding. LncRNAs regulate the expression of genes at epigenetic, transcriptional and post-transcriptional levels. In recent years, studies combining microarrays and gene polymorphism have found that a variety of lncRNAs such as BANC1, PTCSC3, etc are expressed abnormally in papillary thyroid carcinoma, and regulate the proliferation, apoptosis, migration and invasion of cancer cells. Studying the mechanism of lncRNAs will provide new ideas for the diagnosis and treatment of thyroid cancer.

【Key words】 Long non-coding RNA; Gene expression; Papillary thyroid carcinoma

(Int J Endocrinol Metab, 2015, 35:413-416)

人类基因组测序发现, 蛋白质编码基因只占整个基因组序列的 2%, 绝大多数基因组被转录成非编码 RNA^[1]。其中, 转录本长度大于 200 nt 的非编码 RNA 分子称为长链非编码 RNA(long non-coding RNA, lncRNA)。越来越多的研究表明, 这些曾被认为是转录“噪音”的 RNA 分子, 在细胞遗传信息处理中起着重要的功能调控作用, 调节细胞的多能性和正常组织的发育, 参与细胞的增殖、分化及凋亡等过程^[2]。一旦人体的这种稳态发生改变, 可能引起疾病的发生甚至癌变^[3]。目前一些研究显示, lncRNA 与一些实体肿瘤的发病相关, 本文就 lncRNA 在甲状腺乳头状癌(PTC)中的研究现状作一综述。

1 lncRNA 的分类与特征

lncRNA 缺乏编码蛋白的开放阅读框, 不能编码蛋白质, 根据其在基因组中与相邻蛋白编码基因的位置关系, 可分为 5 类: 顺式(sense) lncRNA, 反义(antisense) lncRNA, 双向(bidirectional) lncRNA, 基

因内(intronic) lncRNA, 基因间(intergenic) lncRNA^[4]。

相对于短链非编码 RNA, lncRNA 在数量上更多, 具有更复杂的二、三级结构, 能以碱基互补方式形成发夹或茎环状结构, 与 RNA、DNA 序列及蛋白质特异性结合, 调节基因转录和表达, 影响蛋白质的结构与功能。lncRNA 分布广泛, 存在于细胞核、细胞质及一些细胞器中^[5-6]。lncRNA 在结构及分布上的特点, 决定了其能以 RNA 形式多层面、多方位地调控基因转录及表达水平。

2 lncRNA 对基因表达的调控

lncRNA 在表观遗传学的调控: lncRNA 能招募染色质重构复合物到特定染色体位点导致相关基因沉默; 与染色质修饰酶相互作用引起染色质重构; 诱导异染色质形成及对组蛋白甲基化、泛素化等修饰^[7]。

lncRNA 在转录水平的调控: lncRNA 通过干扰临近或序列重叠的靶基因表达发挥转录因子的调控作用; 通过改变其他转录因子的活性及空间构象、干扰转录起始复合物的形成; 与下游的靶基因启动子区域结合形成 RNA-DNA 三链复合物结构, 抑制转录因子与启动子区的识别和激活^[8-9]。

lncRNA 在转录后水平的调控: lncRNA 与靶向

mRNA 互补形成双链结构,通过抑制内含子的剪切、促进 Stau1 介导的 mRNA 降解、增强 mRNA 的稳定性等方式影响 mRNA 的剪接、降解及翻译^[10-11]。在 Dicer 酶的作用下,lncRNA 与蛋白编码基因转录本互补而成的 RNA 二聚体进一步形成内源性的小干扰 RNA,调控基因表达^[12]。lncRNA 可以结合特定蛋白改变其活性及蛋白定位,影响蛋白功能^[13]。

3 lncRNA 在肿瘤中的作用机制

lncRNA 参与多种生物功能的调控,近年来通过转录组测序技术分析发现,多种 lncRNA 在肿瘤组织中呈现差异性表达,可能在肿瘤的发生及发展中发挥重要作用。

lncRNA 调控肿瘤生长的机制是多样化的,越来越多的证据表明,lncRNA 在肿瘤中的一个重要作用是招募染色质修饰复合物至特定基因位点,引起表观遗传学的变化。Khalil 等^[14]研究发现,人体组织中约存在 3 300 多种基因间 lncRNA,约有 20% 可与多梳抑制复合体 2 (PRC2) 结合,调节基因表达。ANRIL, XIST, HOTAIR 和 KCNQ1OT1 等 lncRNA 皆能招募相应的表观遗传修饰物至特定位点,重构染色质,导致器官发生恶性病变。

近年来研究发现,异常可变剪接与肿瘤的发生、发展相关,一些 lncRNA 可作为 mRNA 前体剪接的调控因子,如长链非编码 RNA-肺腺癌转移相关转录本 1 (MALAT1) 被认为是通过调控 mRNA 前体的选择性剪接作用于转录后水平,它参与核内核小斑的丝氨酸/精氨酸富集蛋白 (serine/arginine-rich proteins, SR) 的磷酸化,是 SR 蛋白表达、活化的物质基础。而后者在 mRNA 前体加工过程中,移动到转录活化部位与 mRNA 前体结合,招募及调控剪接因子,介导 mRNA 的选择性剪接^[15]。

部分 lncRNA 能够调节肿瘤关键的信号转导通路。如长链基因间非编码 RNA p21 (long intergenic ncRNA p21, lincRNA-p21) 能抑制 P53 信号通路下游基因的表达,其启动子区能与 P53 结合,在 DNA 受损时被活化转录,与核不均一核糖核蛋白 K 结合至靶基因的启动子上阻断靶基因的转录,诱导细胞凋亡^[16]。

一些 lncRNA 在生物学功能上作为“诱饵”,整合生物分子并阻止它们履行细胞功能,以竞争性内源 RNA 角色参与肿瘤发生的调控。抑癌基因磷酸酶和张力蛋白同源物 (PTEN) 与它的假基因 PTENP1 的转录物有高度同源的序列,二者的 3' 非翻译区能竞争性结合相同的 miRNA。在癌症中,当

PTENP1 结合位点失活及表达缺失致使结合 miRNA 的能力下降时,过多的 miRNA 可下调 PTEN 的表达,促进肿瘤细胞的增殖^[17]。

4 lncRNA 在 PTC 中的研究

PTC 是最常见的内分泌恶性肿瘤,约占甲状腺肿瘤的 80%,其发病率近年来一直在增加。PTC 病因尚未明了,是一种受多基因、多因子影响的疾病,越来越多的研究发现,lncRNA 在 PTC 的发生、发展中扮演着重要角色。Lan 等^[18]提取 5 对 PTC 及癌旁组织中的总 RNA,用含有 63 431 个 lncRNA 及 39 887 个 mRNA 的 SBC lncRNA 芯片检测,筛选出 3 499 个 (变化倍数 ≥ 2 , $P < 0.05$) 差异表达的 lncRNA,其中上调的 lncRNA 有 1 192 个,上调最高的是 lnc-RXRG-1:3,上调倍数为 204.132 8,下调的 lncRNA 有 2 307 个,下调最高的是 lnc-TPO-1:2,下调倍数为 148.051 9。对差异表达的 lncRNA 进行 cis 靶基因预测,将得到的预测靶基因与芯片上显著共表达的 mRNA 取交集,筛选出在 PTC 中可能受 lncRNA 调节的靶基因 463 个,进一步对它们进行信号通路富集分析,显示靶基因主要富集于癌症通路、钙离子信号通路、黏着斑、嘌呤代谢等信号通路。

4.1 与 PTC 信号通路相关的 lncRNA 丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 途径是介导细胞反应的重要信号通路,参与细胞的生长、增殖及分化。RET/PTC 重排、RAS、BRAF 的基因点突变均可异常激活 MAPK 通路。在 PTC 中,最普遍的是 BRAF 突变,据统计有约有 35%~70% 的 PTC 可出现此突变^[19]。Yoon 等^[20]在 BRAF 突变的 PTC 中发现一种下调的非编码 RNA 基因 NAMA (non-coding RNA associated with MAP kinase pathway and growth arrest),进一步研究发现,NAMA 可能作为下游靶基因对 MAPK 途径起抑制作用,引起细胞的生长停滞。

BRAF 激活的长链非编码 RNA (BRAF activated long non-coding RNA, BANCR) 在黑色素瘤中高表达并促进黑色素瘤细胞的增殖与迁移。Wang 等^[21]发现 BANCR 同样在 PTC 中表达上调,过表达 BANCR 可以明显促进 PTC 细胞株 IHH-4 的增殖和抑制细胞凋亡,同时检测到自噬标志物 LC3-II/LC3-I 的比值增高,但这些作用能被自噬抑制剂 3 甲基腺嘌呤所抑制。提示 BANCR 可能通过激活自噬促进肿瘤细胞的增殖。Zheng 等^[22]用小干扰 RNA 沉默 BANCR 后发现,其能下调细胞周期蛋白 D1 的表达,明显抑制 IHH-4 细胞的增殖,使细胞周期停滞在 G₀/G₁ 期。进一步结合染色体免疫共沉淀及 RNA

结合蛋白免疫沉淀技术发现, BANC1 能通过结合 zeste 基因增强子同源物 2 (EZH2) 促进促甲状腺激素受体的表达。Zhou 等^[23]在 PTC 组织及 IHH-4 细胞中发现 lncRNA-PVT1 显著高表达, 在 IHH-4 细胞中沉默 PVT1 后发现它同样可以结合 EZH2, 调控促甲状腺激素受体及细胞周期蛋白 D1 的表达。

母系表达基因 3 (MEG3) 位于染色体 14q32, 由 10 个外显子组成。MEG3 是与 P53 基因相关的 lncRNA, 能促进 P53 的表达。其在许多正常组织中均有表达, 但在胃癌、前列腺癌、肺癌等多种肿瘤组织中低表达甚至缺失。Wang 等^[24]通过定量逆转录-PCR 发现, 与原发 PTC 相比, MEG3 在淋巴结转移的 PTC 组织中显著下调, 进一步研究发现上调的 MEG3 靶向结合 Ras 相关的 C3 肉毒素底物 1 (Rac1) 3'UTR, 在转录后水平对其负性调控, 从而抑制 PTC 细胞的侵袭与迁移。

4.2 与 PTC 基因多态性相关的 lncRNA 全基因组扫描发现 8q24 是自身免疫性甲状腺疾病的易感区段, 该区域有甲状腺免疫球蛋白基因, 其多态性可能与 Graves 病及桥本甲状腺炎易感性相关。近年来发现, PTC 与桥本甲状腺炎关系密切, 桥本甲状腺炎合并 PTC 的发病率明显高于并发其他甲状腺肿瘤。He 等^[25]对一个 PTC 和黑色素瘤的大家系进行全基因组连锁分析, 在 8q24 上发现易感基因 AK023948。AK023948 为非编码 RNA 基因, 大量表达于正常甲状腺组织, 在 PTC 组织中明显下调, 其可能为 PTC 的候选易感基因。

PTC 的易感位点 rs965513 位于叉头框 E1 (FOXE1) 基因的上游约 60 kb 处, He 等^[26]在 rs965513 所在区域发现新的 lncRNA 并命名为 PTC 易感候选基因 (PTCSC) 2, 其在 PTC 中显著下调。Rs965513 的风险等位基因 A 与在 PTC 癌旁组织中未剪接 PTCSC2、FOXE1 及促甲状腺激素受体的低表达相关, 提示 PTCSC2 及其单核苷酸多态性可能参与甲状腺的多层调控网络。

Jendrzejewski 等^[27]对 PTC 进行全基因组关联分析, 在 14q13.3 发现易感位点 rs944289, 在其下游 3.2 kb 处发现具有 PTC 表达特异性的 lncRNA, 称为 PTCSC3, 在 PTC 组织中明显下调。进一步研究发现, rs944289 位于 CCAAT/增强子结合蛋白 α 和 β 蛋白的结合位点, 后者能激活 PTCSC3 的启动子, 而风险等位基因 T 能破坏结合位点从而抑制 PTCSC3 的表达。在 PTC 细胞系中过表达 PTCSC3 能抑制细胞的生长, 通过表达谱芯片进一步分析发

现, PTCSC3 可能影响 DNA 复制、重组和修复, 与细胞运动、肿瘤形态和细胞死亡有关。提示 lncRNA PTCSC3 具有抑癌基因的作用。在后续实验中, 他们用基因芯片筛选出 PTCSC3 的靶基因 S100A4。S100A4 是钙结合蛋白 S100 家族的成员之一, 是肿瘤转移相关基因, 在 PTC 组织中显著上调。在 PTC 细胞中上调 PTCSC3 的表达可以明显抑制 S100A4 及其下游靶基因血管内皮生长因子和基质金属蛋白酶-9 的表达, 减少细胞的侵袭与迁移^[28]。此外, 有研究认为 PTCSC3 可能在 PTC 中作为竞争性内源 RNA 与 miR-574-5p 之间相互作用, 参与靶基因的表达调控^[29]。

5 展望

LncRNA 作为一类新发现的调控分子在细胞分化及个体发育中有不可或缺的作用, 并通过多种机制影响肿瘤的发生、发展和转移。异常表达的 lncRNA 可能成为一种新的肿瘤标志物用于肿瘤的临床诊断及预后的风险评估。在肿瘤的治疗中, lncRNA 可以为靶向治疗提供新的靶点及方向, 有观点认为, 在肿瘤细胞形成早期, 利用 lncRNA 纠正表观遗传的调控失衡可能扼制肿瘤的发生。目前, lncRNA 在 PTC 中的研究尚处于起步阶段, 主要集中在其表达及功能上, 对于其在肿瘤中的作用机制研究仍然缺乏。LncRNA 在肿瘤的防治中有巨大的潜力, 相信对 lncRNA 的研究不断深入, 将会为甲状腺肿瘤的诊治提供新的方向及策略。

参 考 文 献

- [1] ENCODE Project Consortium. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome[J]. Nature, 2012, 489 (7414): 57-74.
- [2] Ren S, Peng Z, Mao JH, et al. RNA-seq analysis of prostate cancer in the Chinese population identifies recurrent gene fusions, cancer-associated long noncoding RNAs and aberrant alternative splicings[J]. Cell Res, 2012, 22(5): 806-821.
- [3] Cheetham SW, Gruhl F, Mattick JS, et al. Long noncoding RNAs and the genetics of cancer[J]. Br J Cancer, 2013, 108 (12): 2419-2425.
- [4] Mercer TR, Dinger ME, Mattick JS. Long non-coding RNAs: insights into functions[J]. Nat Rev Genet, 2009, 10(3): 155-159.
- [5] Sen R, Ghosal S, Das S, et al. Competing endogenous RNA: the key to posttranscriptional regulation[J]. Scientific World Journal, 2014, 2014: 896206.
- [6] Geisler S, Coller J. RNA in unexpected places: long non-coding RNA functions in diverse cellular contexts[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2013, 14(11): 699-712.
- [7] Guttman M, Rinn JL. Modular regulatory principles of large

- non-coding RNAs[J]. *Nature*, 2012, 482(7385): 339-346.
- [8] Zhang Y, Zhang XO, Chen T, et al. Circular intronic long noncoding RNAs[J]. *Mol Cell*, 2013, 51(6): 792-806.
- [9] Calaway JD, Lenarcic AB, Didion JP, et al. Genetic architecture of skewed X inactivation in the laboratory mouse [J]. *PLoS Genet*, 2013, 9(10): e1003853.
- [10] Ørom UA, Shiekhattar R. Long noncoding RNAs usher in a new era in the biology of enhancers[J]. *Cell*, 2013, 154(6): 1190-1193.
- [11] Gong C, Maquat LE. IncRNAs transactivate STAU1-mediated mRNA decay by duplexing with 3' UTRs via Alu elements [J]. *Nature*, 2011, 470(7333): 284-288.
- [12] Wu Y, Ai Z, Yao K, et al. CHIR99021 promotes self-renewal of mouse embryonic stem cells by modulation of protein-encoding gene and long intergenic non-coding RNA expression [J]. *Exp Cell Res*, 2013, 319(17): 2684-2699.
- [13] Prensner JR, Iyer MK, Sahu A, et al. The long noncoding RNA SCHLAP1 promotes aggressive prostate cancer and antagonizes the SWI/SNF complex [J]. *Nat Genet*, 2013, 45(11): 1392-1398.
- [14] Khalil AM, Guttman M, Huarte M, et al. Many human large intergenic noncoding RNAs associate with chromatin-modifying complexes and affect gene expression [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(28): 11667-11672.
- [15] Tripathi V, Ellis JD, Shen Z, et al. The nuclear-retained non-coding RNA MALAT1 regulates alternative splicing by modulating SR splicing factor phosphorylation [J]. *Mol Cell*, 2010, 39(6): 925-938.
- [16] Huarte M, Guttman M, Feldser D, et al. A large intergenic non-coding RNA induced by p53 mediates global gene repression in the p53 response [J]. *Cell*, 2010, 142(3): 409-419.
- [17] Poliseno L, Salmena L, Zhang J, et al. A coding-independent function of gene and pseudogene mRNAs regulates tumour biology [J]. *Nature*, 2010, 465(7301): 1033-1038.
- [18] Lan X, Zhang H, Wang Z, et al. Genome-wide analysis of long noncoding RNA expression profile in papillary thyroid carcinoma [J]. *Gene*, 2015, 569(1): 109-117.
- [19] Russo M, Malandrino P, Nicolosi ML, et al. The BRAF(V600E) mutation influences the short-and medium-term outcomes of classic papillary thyroid cancer, but is not an independent predictor of unfavorable outcome [J]. *Thyroid*, 2014, 24(8): 1267-1274.
- [20] Yoon H, He H, Nagy R, et al. Identification of a novel noncoding RNA gene, NAMA, that is downregulated in papillary thyroid carcinoma with BRAF mutation and associated with growth arrest [J]. *Int J Cancer*, 2007, 121(4): 767-775.
- [21] Wang Y, Guo Q, Zhao Y, et al. BRAF-activated long non-coding RNA contributes to cell proliferation and activates autophagy in papillary thyroid carcinoma [J]. *Oncol Lett*, 2014, 8(5): 1947-1952.
- [22] Zheng H, Wang M, Jiang L, et al. BRAF-activated long non-coding RNA modulates papillary thyroid carcinoma cell proliferation through regulating thyroid stimulating hormone receptor [J]. *Cancer Res Treat*, 2015, [Epub ahead of print].
- [23] Zhou Q, Chen J, Feng J, et al. Long noncoding RNA PVT1 modulates thyroid cancer cell proliferation by recruiting EZH2 and regulating thyroid-stimulating hormone receptor (TSHR) [J]. *Tumor Biol*, 2015, [Epub ahead of print].
- [24] Wang C, Yan G, Zhang Y, et al. Long non-coding RNA MEG3 suppresses migration and invasion of thyroid carcinoma by targeting of Rac1 [J]. *Neoplasia*, 2015, 62(4): 541-549.
- [25] He H, Nagy R, Liyanarachchi S, et al. A susceptibility locus for papillary thyroid carcinoma on chromosome 8q24 [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(2): 625-631.
- [26] He H, Li W, Liyanarachchi S, et al. Genetic predisposition to papillary thyroid carcinoma: involvement of FOXE1, TSHR, and a novel lincRNA gene, PTCSC2 [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2015, 100(1): E164-E172.
- [27] Jendrzewski J, He H, Radomska HS, et al. The polymorphism rs944289 predisposes to papillary thyroid carcinoma through a large intergenic noncoding RNA gene of tumor suppressor type [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(22): 8646-8651.
- [28] Jendrzewski J, Thomas A, Liyanarachchi S, et al. PTCSC3 is involved in papillary thyroid carcinoma development by modulating S100A4 gene expression [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2015, 100(10): E1370-E1377.
- [29] Fan M, Li X, Jiang W, et al. A long non-coding RNA, PTCSC3, as a tumor suppressor and a target of miRNAs in thyroid cancer cells [J]. *Exp Ther Med*, 2013, 5(4): 1143-1146.

(收稿日期:2015-05-15)