

[J]. J Thromb Haemost, 2005, 3(10): 2340-2345.

[20] 彭文星, 冯频频, 石秀锦, 等. 阿司匹林抵抗的基因多态性及个体化治疗[J]. 中国药房, 2016, 27(23): 3172-3174.

[21] DEVAN W J, FALCONE G J, ANDERSON C D, et al. Heritability estimates identify a substantial genetic contribution to risk and outcome of intracerebral hemorrhage [J]. Stroke, 2013, 44(6): 1578-1583.

[22] NIE H, HU Y, LIU N, et al. Apolipoprotein E gene polymorphisms are risk factors for spontaneous intracerebral hemorrhage: a systematic review and Meta-analysis [J]. Curr Med Sci, 2019, 39(1): 111-117.

[23] FALCONE G J, WOO D. Genetics of spontaneous intracerebral hemorrhage [J]. Stroke, 2017, 48(12): 3420-3424.

[24] WOO D, FALCONE G J, DEVAN W J, et al. Meta-analysis of genome-wide association studies identifies 1q22 as a susceptibility locus for intracerebral hemorrhage [J]. Am J Hum Genet, 2014, 94(4): 511-521.

[25] CHUNG J, MARINI S, PERA J, et al. Genome-wide association study of cerebral small vessel disease reveals established and novel loci [J]. Brain, 2019, 142(10): 3176-3189.

[26] ANDERSON C D, BIFFI A, RAHMAN R, et al. Common mitochondrial sequence variants in ischemic stroke [J]. Ann Neurol, 2011, 69(3): 471-480.

[27] WENG Y C, SONNI A, LABELLE-DUMAIS C, et al. COL4A1 mutations in patients with sporadic late-onset intracerebral hemorrhage [J]. Ann Neurol, 2012, 71(4): 470-477.

[28] JEANNE M, LABELLE-DUMAIS C, JORGENSEN J, et al. COL4A2 mutations impair col4a1 and col4a2 secretion and cause hemorrhagic stroke [J]. Am J Hum Genet, 2012, 90(1): 91-101.

[29] 康纪峰, 黄清, 刘运海. 自发性脑出血遗传学病因的研究进展 [J]. 中华医学遗传学杂志, 2016, 33(5): 702-707.

[30] ZHANG L, LI X, WANG D, et al. Risk factors of recurrent ischemic events after acute noncardiogenic ischemic stroke [J]. Curr Pharm Des, 2019, 25(45): 4827-4834.

[31] 吴娅, 刘承春, 李玮, 等. 5 种评分系统对不同时间窗急性脑梗死静脉溶栓后出血转化风险预测差异的比较研究 [J]. 第三军医大学学报, 2017, 39(17): 1744-1749.

[32] 谷远峰, 陈会生. 五种评分系统对急性缺血性脑卒中静脉溶栓后出血转化风险预测差异的比较研究 [J]. 解放军医药杂志, 2016, 28(3): 26-32.

(收稿日期: 2020-02-02 修回日期: 2020-07-18)

• 综 述 •

外泌体环状 RNAs: 人类癌症的新型生物标志物*

商安全^{1,2,3} 综述, 孙俊俊^{1,2}, 谷晨峥^{1,2}, 平伊丽^{1,2}, 孙祖俊¹, 李 冬^{1△} 审校
(1. 同济大学附属同济医院检验科, 上海 200065; 2. 同济大学医学院, 上海 200065;
3. 江苏省盐城市第六人民医院检验医学科, 江苏盐城 224005)

摘 要: 近年来, circRNAs 因其在外泌体中稳定富集而被发现, 也被称为外泌体环状 RNAs (exo-circRNAs)。尽管它们在基因调控中的确切作用和机制尚不清楚, 但随着研究的深入, exo-circRNAs 作为人类疾病的新生物标志物, 可能成为疾病诊断和靶向治疗的新途径。该文将简要综述 exo-circRNAs 的分子机制和研究新进展, 并探讨 exo-circRNAs 在人类疾病中的特殊作用。

关键词: 外泌体; 外泌体环状 RNA; 生物标志物
DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2020. 19. 027 **中图法分类号:** R730. 4
文章编号: 1673-4130(2020)19-2410-08 **文献标识码:** A

Exosomal circRNAs: the novel biomarkers of human disease*

SHANG Anquan^{1,2,3}, SUN Junjun^{1,2}, GU Chenzheng^{1,2}, PING Yili^{1,2}, SUN Zujun¹, LI Dong^{1△}
(1. Department of Clinical Laboratory, Tongji Hospital of Tongji University, Shanghai 200065, China; 2. School of Medicine, Tongji University, Shanghai 200065, China; 3. Department of Laboratory Medicine, the Sixth People's Hospital of Yancheng, Yancheng, Jiangsu 224005, China)

Abstract: In recent years, circRNAs, also known as exo-circRNAs, have been discovered for their stable enrichment in exosomes. Although the exact role and mechanism of exo-circRNAs in gene regulation is still

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81873975, 81802084, 81974314); 江苏省卫生健康委员会医学研究项目(Z2019039)。
△ 通信作者, E-mail: lidong@tongji. edu. cn。
本文引用格式: 商安全, 孙俊俊, 谷晨峥, 等. 外泌体环状 RNAs: 人类癌症的新型生物标志物[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(19): 2410-2417.

unclear, with the development of research, exo-circRNAs, as a new biomarker of human diseases, may become a new approach for disease diagnosis and targeted therapy. This paper will briefly review the molecular mechanism and the latest findings of exo-circRNAs, and explore the special role of exo-circRNAs in human diseases.

Key words: exosomes; exo-circRNAs; biomarkers

外泌体(Exo)是一种纳米大小的膜性囊泡,含有活性物质(DNA、RNA、蛋白质、脂质等),通过调节细胞间的多种生物过程,在生物学功能及正常机体反应中为细胞间传递效应信息提供了一种新的方法。环状 RNA(circRNAs)是一类具有封闭环状结构的非编码 RNA(ncRNA)。circRNAs 作为微小 RNA(miRNA)海绵、RNA 结合蛋白海绵和翻译调节因子在基因表达调控中发挥着重要作用。circRNAs 与疾病的发展密切相关,已成为研究热点。

1 Exo

1.1 Exo 的起源与特征 Exo 是由大多数细胞(如 T 细胞、B 细胞、树突状细胞和肥大细胞)产生和释放的一类直径为 30~200 nm 的细胞外囊泡(EVs)。Exo 直接从质膜出芽,在其表面有多种生物分子,包括 DNA、RNA、蛋白质、脂类等^[1]。在 Exo 内部同样存在 DNA、信使 RNA(mRNA)、miRNA 和不同的蛋白质。Exo 来源于内泌体途径^[2]。在内体成熟的早期到晚期,内体特殊地向内出芽形成多泡体(MVBs)。MVBs 可与溶酶体融合,致使内腔小泡(ILVs)发生降解。当 MVBs 与细胞膜融合时,ILVs 中又发生了一次向内芽接,产生纳米级的囊泡,并将这些分子分泌到细胞外空间,称为 Exo。运输所需的内体分选复合体(ESCRT)机制在促进内体的形成中起着至关重要的作用^[3]。其中,ESCRT0 在晚期核内体膜中识别并获得泛素化蛋白,ESCRT1 和 ESCRT2 都触发了 MVBs 的萌发和蛋白质 Exo 的分类,ESCRT3 则形成螺旋状结构,有助于 MVBs 萌芽颈的闭合和腺苷三磷酸酶(ATPase)细胞液泡分选蛋白 4(Vps 4)驱动膜的切断。在这个过程的最后,Vps 4 介导所有 ESCRT 分子的回收,而泛素化蛋白对 ESCRT 的定位和功能起修饰或调节作用^[4]。Exo 的分泌则由不同的分子调节,如 Rab27^[5]、Rab35 和 Ral 蛋白^[6]。

1.2 Exo 的功能

1.2.1 调节免疫系统 Exo 具有不同的功能,包括抗原呈递、免疫激活和免疫逃逸。抗原呈递分为抗原递呈细胞(APC)直接传递和间接传递。由于 Exo 的大小和结合位点的限制,与间接传递相比,Exo 的直接传递较弱。在脑胶质瘤小鼠模型中,来自树突状细胞的 Exo 可诱导强大而有效的抗肿瘤 T 细胞免疫反应。富含伴侣蛋白的细胞裂解物(CRCLs)可能在抗肿瘤疫苗中很重要。在该研究中,抗肿瘤的作用机制是通过调节 Cbl-b 和 c-Cbl 信号来实现的^[7]。Exo 激活免疫系统的同时,也导致免疫逃逸。肿瘤细胞释放的 EVs 抗原可阻止 T 细胞或树突状细胞活化^[8]。

1.2.2 促进癌症转移 癌症转移的机制非常复杂,Exo 可能对此有所帮助。癌症细胞分泌的 Exo 能促进上皮细胞-间充质转化(EMT)^[9],这是癌细胞从上皮至间质表型的重编程。EMT 为癌细胞转移提供了“友好”的环境。Exo 也决定了有机性转移^[10]。肿瘤特异性 Exo 被器官特异性细胞摄取,并制备了转移前的基质。DHONDT 等^[11]发现,Exo 中的某些 miRNAs 也会促进癌细胞转移。例如,含 miR-200 的 Exo 可促进乳腺癌细胞转移^[12]。Exo 中 miR-105 破坏了血管内皮屏障,从而促进癌症转移^[13]。乳腺癌分泌的 Exo 携带 miR-122 编程葡萄糖代谢,进而促进乳腺癌细胞转移^[8,14]。

1.2.3 生物标志物 近年来,Exo 被认为是细胞间通讯的重要介质,其在疾病诊断和创新治疗中的临床应用也不断被挖掘^[15]。目前,临床上普遍认为 Exo 具有作为生物标志物和治疗靶点的巨大潜力。CAMUSSI 等^[16]发现了 Exo 介导的细胞间通讯的 4 种机制。首先,Exo 通过直接刺激靶细胞作为信号复合物发挥作用,这是不可缺少的,特别是在血小板凝固过程中,中性粒细胞可释放表达活化的白细胞整合素 α M β 2(或 Mac-1)的 Exo,从而促进血小板活化。第二,Exo 能够在细胞间转移受体。受体转移过程可以发生在各种类型的细胞上,如 B 细胞^[17]、血小板、上皮细胞和肿瘤细胞。其次,Exo 可以在靶细胞内释放,并释放其携带的蛋白质。研究表明,NPC 细胞可以释放含有半乳糖凝集素 9 蛋白(GAL9)和(或)LMP1 的人类白细胞抗原(HLA)II 类阳性的 Exo,后者具有固有 T 细胞抑制活性^[18]。最后,Exo 主要通过依赖 Exo 携带的 miRNAs、mRNAs 或 DNAs 的转化来传递遗传信息,从而影响靶细胞中的表达。XUE 等^[19]发现,血清中的 exo-miR-93 与临床特征(包括分期和肿瘤大小)之间存在明显相关性。除了通过转运遗传物质进行细胞间通信的信使外,Exo 还直接与细胞外基质(ECM)相互作用。活化的中性粒细胞来源的 Exo 分别通过整合素 Mac-1 和表面结合的中性粒细胞弹性酶(NE)与 ECM 结合并降解,从而形成中性粒细胞胞外陷阱(NETs)导致慢性阻塞性肺疾病(COPD)和支气管肺发育不良(BPD)的特征^[20]。这些发现表明 Exo 在生理和病理过程中具有明显的多功能性。因此,Exo 是一种理想的生物标志物。在此,笔者总结了癌症中已知的 exo-miRNA 生物标志物^[21],见表 1。

2 circRNAs

2.1 circRNAs 起源与特征 人类基因组超过 70%

是主动转录的,但蛋白质编码基因只占人类基因组的 1%~2%,而绝大多数转录本是 ncRNA^[22]。ncRNA 可以分为两个子类^[23],即管家 ncRNA(rRNA、tRNA、snRNA、snoRNA)和调节型 ncRNA。调节型 ncRNA 按长度分类如下:(1)短链非编码 RNA(< 200 bp),包括 miRNA、snRNA、piRNA、siRNA 和其他;(2)长链非编码 RNA(lncRNA, > 200 bp)。在 lncRNA 中,circRNAs 最近作为一类新的竞争性内源 RNA(ceRNA)出现,它们形成了一个共价闭合的连续环,没有 5'帽和 3'尾巴,并广泛存在于哺乳动物细胞中。20 多年前,NIGRO 等^[24]在鉴定候选肿瘤抑制基因的剪接转录本中发现了 circRNAs。然而,这种新型的 RNA 产物被认为是由于没有功能的剪接错误导致的。由于高通量测序的快速发展,已经发现了许

多 circRNAs,并且发现了它们的一些特性。首先,circRNAs 似乎在组织或发育阶段特异性表达^[25]。其次,在体内,circRNAs 比相关的线性 mRNA 更稳定,因为它们对 RNase 活性具有抗性^[25-26]。第三,来自人类成纤维细胞中超过 14% 的活跃转录基因的 circRNAs,在某些情况下,其丰度比相关线性 mRNA 的丰度高 10 倍以上^[26]。第四,circRNAs 主要存在于细胞质中,但是有些似乎富集在细胞核中^[25-27]。circRNAs 是一类新的 ncRNA 生物标志物,在循环过程中具有抗外切酶降解和增强稳定性的特点。根据各种生物遗传模式,circRNAs 可以分为以下三类:外显子 circRNA(EcircRNA)^[26]、环状内含子 RNA(ciRNA)和外显子-内含子 circRNA(EIciRNA)。

表 1 肿瘤来源与相同细胞类型非肿瘤细胞的 Exo 相比

癌症类型	增加(↑)/减少(↓)
乳腺癌	miR-101(↑)、miR-372(↑)、miR-373(↑)
卵巢癌	miR-21(↑)、miR-141(↑)、miR-200a(↑)、miR-200c(↑)、miR-203(↑)、miR-205(↑)、miR-214(↑)
肺腺癌	miR-17-3p(↑)、miR-21(↑)、miR-30a-3p(↑)、miR-100(↑)、miR-106a(↑)、miR-146(↑)、miR-151a(↑)、miR-154-3p(↑)、miR-155(↑)、miR-191(↑)、miR-192(↑)、miR-203(↑)、miR-205(↑)、miR-210(↑)、miR-212(↑)、miR-214(↑)、miR-629(↑)、miR-2006-5p(↑)
鼻咽癌	miR-24-3p(↑)、miR-891a(↑)、miR-106a-5p(↑)、miR-20a-5p(↑)、miR-1908(↑)
食道鳞状细胞癌	miR-21(↑)和 miR-1246(↑)
胰腺癌	miR-21(↑)和 miR-17-5p(↑)
宫颈癌	miR-21(↑)和 miR-146a(↑)
结肠癌	let-7a(↑)、miR-1229(↑)、miR-1246(↑)、miR-150(↑)、miR-21(↑)、miR-223(↑)、miR-23a(↑)
胶质母细胞瘤	miR-21(↑)、miR-320(↑)、miR-574-3p(↑)

2.2 circRNA 功能 circRNAs 的几种潜在功能^[25]包括:(1)通过与 ceRNA 竞争,再与 miRNA 结合,称为 miRNA 海绵;(2)通过内含子 ciRNA 和 EIciRNA 促进基因转录;(3)与蛋白质相互作用;(4)被翻译成蛋白质或多肽。

2.2.1 circRNAs 作为 miRNA 海绵 作为 miRNA 海绵是 circRNA 分子最常见的功能。研究表明,miRNA 可以与 circRNA 结合并失活。结合位点是靶向 mRNA 的 3'非编码区(3'UTR)上的互补位点。一个 circRNA 可以捕获多个 miRNAs,这意味着每个 circRNA 具有多个 miRNAs 目标位点。研究发现,小脑变性相关蛋白 1 反义转录本(CDR1as)可以充当 miR-7a/b 的海绵^[28]。CDR1as 包含 74 个 miR-7 的结合位点,并且可以负调控 miR-7 的功能。CDR1as 过表达时,大量 miR-7 与 CDR1as 结合,导致 miR-7 的靶基因表达被上调。相反,miR-7 的靶基因将在 CDR1as 下调后被下调。睾丸特异性 circRNAs 性别决定区域 Y 基因(SRY)可能具有与 CDR1as 类似的特征和功能,与 miR-138 有 16 个靶位,可作为 miR-

138 海绵。在过去的几年中,越来越多的海绵模型出现。在此,笔者总结了一些常见的充当 miRNA 海绵的 circRNAs^[21],见表 2。

2.2.2 circRNAs 作为调节转录因子 一些 EIciRNA 通过与 U1 snRNA 相互作用来调节基因的表达。EIciRNA 和 U1 snRNP 形成的 EIciRNA-U1 snRNA 化合物与 RNA 聚合酶 II 复合体相互作用,促进基因表达。通过 RNA 和 DNA 调节模型,在拟南芥中发现了 SEPALLATA3(SEP3)蛋白,其是从 SEP3 基因外显子生成的 circRNA,并且该 circRNA 影响相应的同源 mRNA 剪接。SEP3 与相应的 DNA 序列稳定结合,产生 RNA 和 DNA 杂交,从而暂停转录,提高 RNA 剪接因子并形成可变剪切。

2.2.3 circRNAs 与蛋白质相互作用 circRNAs 可以与 Argonaute(AGO)蛋白、RNA 聚合酶 II 和 RNA 结合蛋白(RBP)结合。SALZMAN 等^[29]研究证明,circRNAs CDR1as 可以通过光活性增强的核糖核苷交联和免疫共沉淀(PAR-CLIP)与 AGO 紧密结合。ci-ankrd52、circEIF3J,以及与聚腺苷酸结合蛋白相互

作用的 circPAIP2 蛋白可以与 RNA 聚合酶 II 结合。

表 2 circRNAs 作为 miRNA 海绵

circRNAs	靶 miRNA	疾病或生理机制
circRNAs_010567	miR-141	心肌纤维化
circRNAs_000203	miR-26b-5p	心肌纤维化
circ100284	miR-217	加速人角质形成细胞的细胞周期
ciRS-7(CDR1as)	miR-7	肝细胞癌、阿尔茨海默病、胰岛素转录和分泌
circRNA ZNF609	miR-150-5p	赫氏弹簧病
circRNAs_100290	miR-29	口腔癌
circTCF25	miR-103a-3p/miR-107	膀胱癌
circHIPK3	miR-124	膀胱尿路上皮癌、乳腺癌、肠癌、肝细胞癌、胃癌、肾透明细胞癌、前列腺腺癌
circRNAs_001569	miR-145	肠癌
heart-related circRNA(HRCR)	miR-223	心脏肥大
circPVT1	miR-125	胃癌
circRNA CER	miR-136	人软骨退化
circRNAs_1093	miR-342	乳腺癌
circZEB1. 5	miR-200	肺癌
circZEB1. 19	miR-200	肺癌
circZEB1. 17	miR-200	肺癌
circMTO1	miR-9	肝细胞癌
MFACR	miR-652-3p	心肌梗死

2. 2. 4 circRNAs 作为蛋白质/肽翻译器 circ-ZNF609 与重聚体相关,可被翻译成蛋白质^[30]。但是,蛋白质翻译的效率与其对应的线性 RNA 不同,线性 RNA 的效率是 circ-ZNF609 的 2 倍。另一项研究表明,circRNAs 可以直接翻译成多肽,他们分析了果蝇脑组织中的核糖体印迹,发现一些 circRNAs 可以整合到核糖体中^[31]。通过一些验证测试,他们认为某些 circRNAs 可以翻译成蛋白质。核糖体印迹分析表明,该 circRNAs(circMbl)的终止密码子与核糖体结合,并在蛋白质谱中发现 circMbl 编码的蛋白质。

2. 2. 5 circRNAs 与癌症 研究表明,circRNAs 与人类多种疾病相关,例如,动脉粥样硬化、阿尔茨海默病、帕金森病、糖尿病及癌症等^[32]。在分析 6 种人类正常组织(脑、心脏、肺、肝、结肠和胃)和 7 种人类癌症(膀胱癌、乳腺癌、肝细胞癌、胃癌、大肠癌、肾透明细胞和前列腺癌)超过 27 000 个 circRNAs 候选基因的测序数据。与正常组织相比,circRNAs 通常在肿瘤组织中下调,而且 circRNAs 水平与临床特征明显相关,包括分期、年龄、性别和远端转移,这归因于恶性肿瘤反向剪接机制的错误——miRNA 的异常调节(由于癌组织中 circRNAs 的降解,或由于细胞增殖增加而导致的 circRNAs 减少)。

2. 2. 6 circRNAs 介导肿瘤免疫监视 与癌症相关的免疫反应可以通过破坏癌细胞或抑制癌细胞的生

长来保护宿主。另一方面,它们还可以通过选择肿瘤逃逸变异或在肿瘤微环境(TME)内建立促进肿瘤特异性、适应性免疫应答发展的条件来促进肿瘤进展。近年来,已发现 circRNAs 在调节肿瘤免疫力中起潜在作用。作为免疫系统抗原,外源纯化的 circRNAs 可以通过体外激活视黄酸诱导型基因 1(RIG-1)介导的途径来调节先天免疫的激活^[33]。circRNAs 诱导的 RIG-1 是众所周知的先天免疫调节剂^[34],并且已证明 RIG-1 激动剂可以激活抗癌免疫反应来对抗肿瘤^[35]。因此,进入肿瘤细胞的外源性 circRNA 具有影响 RIG-1 和激活抗肿瘤免疫力的潜力。

2. 2. 7 circRNAs 作为癌症转录因子 某些 circRNAs 可以增强其亲本基因的转录,从而抑制或促进癌症进展。例如,过表达微小染色体维持蛋白(MCM5)与大肠癌和口腔鳞状细胞癌有关,提示不良预后^[36]。反之,沉默信息调节因子(SIRT7)的低表达与胰腺导管腺癌(PDAC)的侵袭性肿瘤表型和预后不良有关^[37]。cZNF292 可通过降低 cyclin A、p-CDK2、CDK2、β-catenin、p-STAT3 (Tyr705) 和 p-STAT5 (Tyr694)的表达来抑制神经胶质瘤细胞的增殖和血管形成。下调 cZNF292 导致 E2F1、NF-κB、Sp1、HIF-1、AP-1、STAT3 和 STAT5 的转录降低,从而抑制了肿瘤细胞的血管生成^[38]。因此,被认为是另一种剪接异构体的 circRNA 可能在调节基因表达中起关

键作用,从而导致癌症相关基因的表达失调。

2.2.8 circRNAs 作为潜在的癌症生物标志物 circRNAs 具有跨物种高度保守的特征,在唾液、血液和 Exo 中稳定表达,并具有组织或发育阶段的特定特性,故可以满足潜在的癌症生物标志物的要求。与浓度较低的 miRNA 相比, circRNA 更容易被检测。另外,与通过抗原-抗体反应检测蛋白质相比,通过反转录 PCR(RT-PCR)和原位杂交检测 circRNA 的方法更加灵敏和特异。因此, circRNA 可能具有充当潜在癌症生物标志物的优势。在不同的癌症中已经有多种 circRNAs 被认为是潜在的生物标志物。

胃癌的相关研究发现, circ_002059 在胃癌组织中下调,其表达水平失调与性别、年龄、TNM 和远处转移显著相关^[39]。WAN 等^[40]发现,与癌旁组织相比,70% 的肺癌组织中 circ-ITCH 的表达明显降低。YAO 等^[41]证实,在非小细胞肺癌(NSCLC)的肿瘤组织中, circ_100876 明显上调,其过表达水平与淋巴结转移及肿瘤分期密切相关。在结直肠癌细胞系 SW480 和 HCT116 的研究中,证明了 miR-7、miR-20a 和 miR-214 的 circ-ITCH 海绵活性^[42]。 circ_001569 也被证明在结直肠癌中的表达水平高于正常组织。有研究还发现,结直肠癌组织具有高水平的 circ-BTG3 相关核蛋白(BANP)^[43]。GUO 等^[44]研究证明, circ_0000069 在 CRC 中也呈过表达。 circ_001059、 circ_000167、 circ_0067934 和 circ-ITCH 等 circRNAs 的表达水平与食管鳞状细胞癌(ESCC)的癌症相关病死率有关。在乳腺癌相关研究中,发现 circ Foxo3 在肿瘤患者标本和一组癌细胞中下调,而当诱导细胞凋亡时,其在癌细胞中呈高表达水平。 circ Foxo3 在乳腺癌细胞系和乳腺肿瘤组织中明显下调。HCC 组织中有 61 种差异表达的 circRNAs,且 circ_0005075 可能作为 miRNA 海绵抑制 miR-23b-5p 在癌症中的表达。另一研究证明, circ_0001649 在 HCC 组织中表达明显降低^[45]。此外, Cdr1as 在 HCC 组织中明显上调^[46]。高通量分析发现, circ-NT5C2 在骨肉瘤中表达异常,通过调控 miR-448 的表达促进肿瘤细胞的进展和代谢^[47]。此外,低表达的 circ-PVT1 降低了经典的多药耐药相关基因 ATP 结合盒 B 亚家族 1 转运蛋白基因的表达,这表明 circ-PVT1 在诊断骨肉瘤方面可能比碱性磷酸酶更有效^[48]。综上所述,人类癌症中异常表达的 circRNAs 可作为人类一类新的诊断、预后和治疗性生物标志物。

3 exo-circRNAs

3.1 exo-circRNAs 的起源 circRNAs 被证明存在于 Exo 中,这一发现为 circRNAs 的研究开辟了新的方向。 circRNAs 多位于细胞质中,并且 Exo 中 circRNAs 的种类根据不同类型的细胞质类型有所不同,这表明特定 circRNAs 转移至 Exo 的过程可能受到积极调控,这是一个选择性过程。既往研究发现,

circRNAs 转移至 Exo 可能存在两种作用机制:一种是细胞之间的交流方式,因为 Exo 中的物质使远端细胞的物质、信息交流更方便;另一种是 Exo 中的 circRNA 可帮助去除细胞中积累的 circRNA^[49]。

3.2 exo-circRNAs 作为生物标志物 目前,在各类肿瘤的早期诊断、手术方法、放疗及化疗等方面取得了一定的临床进展,然而,一些肿瘤的早期症状并不典型,最终的诊断往往需要复杂的组织活检,这对患者来说是痛苦的。目前临床上仍缺乏快速、准确、无创的早期诊断生物标志物。

众所周知,大多数类型细胞可分泌一种称为 Exo 的内容酶体起源的纳米级 EVs,内含特定负载的 mRNA、miRNA 和蛋白质,能够影响细胞行为,并可能用于诊断多种人类疾病。有研究证实, Exo 中存在几种具有潜在生物学功能的 circRNAs,特别是人类血清 Exo 已被证明含有超过 1 000 个 circRNAs,这可能是由于肿瘤中 circRNAs 进入血流所致^[50]。研究血清 exo-circRNAs 的存在和表达水平可以将癌症患者与健康个体区分开,从而确定新的潜在的基于 Exo 的癌症生物标志物。有研究通过 RNA 测序鉴定了 Exo 中的 RNA 群体,包括 circRNA、lncRNA、miRNA、mRNA、tRNA、rRNA、lncRNA、snRNA、snoRNA 和 piRNA 等^[51]。这些 RNA 可以从亲代细胞转移到靶细胞,在那里它们调节靶基因或作为蛋白质合成的模板。 Exo 还可充当 miRNA 的纳米载体,并在癌症进展中起双重作用。研究发现, circRNAs 在癌症 Exo 中稳定富集, Exo 对 circRNAs 等核酸的转运保护了核酸在细胞外空间免受降解和稀释的保护,从而允许通过血流或组织液进行长距离分布^[52]。

由于 Exo 中含有丰富的 circRNAs,它们可以被人类血液收集。为了检测 exo-circRNAs 是否进入血液循环并可量化用于癌症诊断,在荷瘤小鼠的血清中 Exo 中检测到了人 circRNA-CDYL,并且在异种移植小鼠中发现这种 circRNA-CDYL 的量与肿瘤发展相关,进一步证明 circRNAs 可做癌症的早期诊断生物标志物^[49]。

3.3 exo-circRNAs 的检测方法 许多常用的分子生物学技术已经被应用于 exo-circRNAs 的检测,目前主要技术包括: RT-PCR、实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)、微滴式数字 PCR(ddPCR)、Northern blotting、微阵列(Microarrays)、RNA 测序(RNA Sequencing)、NanoString Technologies nCounter 等。每一项技术都有各自的优缺点,见表 3。

3.4 exo-circRNAs 在癌症中的作用 有研究在 KRAS 突变状态不同的 3 种同基因结直肠癌细胞系的细胞和 Exo 中发现, circRNAs 在 KRAS 突变的结直肠癌中被下调,并且可以在 Exo 中分泌。在 HCC 中, circRNA_100284 随着恶性转化细胞的 Exo 中释放,并转移到邻近的正常细胞中,促进肝细胞异常增

殖。一些来自脂肪组织的 *exo-circRNAs* 可以影响 HCC 中的去泛素化,尤其是在体脂率较高的患者中,存在更多的外环去泛素化(*circ-DB*)^[53]。在胃癌研究中,发现血浆中一种名为 *ciRS-133* 的 *exo-circRNA* 与白色脂肪组织(WAT)的褐变和癌症相关的恶病质密切相关^[54]。PDAC 是最具有侵略性和致命性的癌症之一,其 5 年生存率低至 5%,这是由于转移和复发的高风险所致^[55-56]。研究人员在 *Exo* 介导的 *circRNAs* 在 PDAC 中作用机制研究中,通过芯片分析, *circ-PDE8A* 在 PDAC 中是一种高表达的 *circRNA*^[57]。一项研究表明, *circ-PRMT5* 可以作为 *miR-30c* 海绵

促进膀胱尿路上皮癌细胞 EMT,从而增强其靶基因 *SNAIL1* 和 *E-cadherin* 的表达,使细胞更具侵袭性^[58]。XU 等^[59]通过 RNA-seq 技术分析 *circRNAs* 在子宫内膜癌患者和健康个体血清中分离出的 *Exo* 中的表达情况,发现与健康受试者相比,子宫内膜癌患者 *Exo* 中上调 *circRNAs* 的数量高于下调 *circRNAs* 的数量。以上研究数据表明,源自人类癌症的 *circRNAs* 可以进入血液,并易于在血清中定量,而 *exo-circRNAs* 可以影响靶细胞,有助于识别癌症发展的新机制。

表 3 *exo-circRNAs* 的主要检测方法

方法	优点	缺点
RNA Sequencing	可以发现新的 <i>circRNAs</i>	结果分析需要生物信息学专业知识和计算机编程能力
Microarrays	可同时分析大量 <i>circRNAs</i>	不能提供对应的线性信息
Northern blotting	无酶检测	步骤烦琐
RT-PCR	有标准化的设备和检测要求	不能定量
RT-qPCR	可定量	检测精度不稳定
ddPCR	可精确定量	需专业设备
NanoString Technologies nCounter	无酶、可精确定量	需专业设备

5 小结与展望

对 RNA 领域的不断深入研究表明, *circRNAs* 在生理和病理过程中起着重要的作用。尽管关于 *circRNAs* 的研究很多,但是其形成机制和清除机制仍不清楚。作为纳米级的生物囊泡, *Exo* 仍被认为是“粗糙的钻石”,其携带了特殊的蛋白质和 RNA 序列,可以作为细胞间信息交换的新方法,从而促进细胞间的通信。由于其独特性和高特异性, *Exo* 与 *circRNAs* 结合可以增加其作为癌症早期诊断和预后标志物的潜力,而且它们可以作为许多疾病的生物标志物。生物标志物是血液、组织和体液中含有的生物分子,可以作为正常和病理状态的客观评价和测量指标^[60]。生物标志物的使用对于不同疾病的早期检测和诊断以及对治疗反应的监测具有很重要的临床意义^[61]。这些生物标志物的典型特征,如稳定性、敏感性和特异性,使其能够在临床实践中得到应用。

精准医疗尤其是液体活检的目标是发现癌症生物标志物。这些生物标志物对癌症风险指征具有较强的监测能力,有助于患者接受最合适的治疗,并有助于临床医生监测疾病的进展或复发。研究表明, *Exo* 是癌症诊断预后和预测的潜在生物标志物, *Exo* 用作生物标志物的目的是与全身体液相比,大大降低了样品的复杂性,并且在液体活检中具有微创性,甚至是无创性^[62]。此外,由于 *Exo* 具有良好的生物分布和生物相容性,为了成功地开发治疗癌症的渐进治疗方法,尤其是精准医疗, *exo-circRNA* 应是治疗靶标

的一种选择。尽管如此,与 *Exo lncRNA* 和 *miRNA* 相比,目前对 *circRNAs* 与 *Exo* 之间关系的了解仍然存在许多空白,例如, *exo-circRNA* 在体液中传递的机制,以及 *exo-circRNAs* 在癌症中的作用。阐明与人类癌症相关的 *exo-circRNAs* 的功能和分子机制将开辟新的认识途径,为恶性肿瘤的诊疗提供新的方法。

参考文献

[1] BEBELMAN M P, SMIT M J, PEGTEL D M, et al. Biogenesis and function of extracellular vesicles in cancer[J]. *Pharmacol Ther*, 2018, 188: 1-11.

[2] FÉVRIER B, RAPOSO G. Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2004, 16(4): 415-421.

[3] FUTTER C E, PEARSE A, HEWLETT L J, et al. Multivesicular endosomes containing internalized EGF-EGF receptor complexes mature and then fuse directly with lysosomes[J]. *J Cell Biol*, 1996, 132(6): 1011-1023.

[4] HENNE W M, STENMARK H, EMR S D. Molecular mechanisms of the membrane sculpting ESCRT pathway[J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2013, 5(9): 1-12.

[5] FUKUDA M. Rab27 effectors, pleiotropic regulators in secretory pathways[J]. *Traffic*, 2013, 14(9): 949-963.

[6] HSU C, MOROHASHI Y, YOSHIMURA S, et al. Regulation of exosome secretion by Rab35 and its GTPase-activating proteins TBC1D10A-C[J]. *J Cell Biol*, 2010, 189(2): 223-232.

[7] BU N, WU H, ZHANG G, et al. Exosomes from dendritic

- cells loaded with chaperone-rich cell lysates elicit a potent T cell immune response against intracranial glioma in mice[J]. *J Mol Neurosci*, 2015, 56(3): 631-643.
- [8] BOBRIE A, THÉRY C. Exosomes and communication between tumours and the immune system: are all exosomes equal? [J]. *Biochem Soc Trans*, 2013, 41(1): 263-267.
 - [9] RAHMAN M A, BARGER J F, LOVAT F, et al. Lung cancer exosomes as drivers of epithelial mesenchymal transition[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(34): 54852-54866.
 - [10] KOSAKA N, IZUMI H, SEKINE K, et al. microRNA as a new immune-regulatory agent in breast milk [J]. *Silence*, 2010, 1(1): 7.
 - [11] DHONDT B, ROUSSEAU Q, DE WEVER O, et al. Function of extracellular vesicle-associated miRNAs in metastasis[J]. *Cell Tissue Res*, 2016, 365(3): 621-641.
 - [12] LE M T, HAMAR P, GUO C, et al. miR-200-containing extracellular vesicles promote breast cancer cell metastasis[J]. *J Clin Invest*, 2014, 124(12): 5109-5128.
 - [13] ZHOU W, FONG M Y, MIN Y, et al. Cancer-secreted miR-105 destroys vascular endothelial barriers to promote metastasis[J]. *Cancer Cell*, 2014, 25(4): 501-515.
 - [14] FONG M Y, ZHOU W, LIU L, et al. Breast-cancer-secreted miR-122 reprograms glucose metabolism in premetastatic niche to promote metastasis [J]. *Nat Cell Biol*, 2015, 17(2): 183-194.
 - [15] MOREL O, TOTI F, HUGEL B, et al. Cellular microparticles: a disseminated storage pool of bioactive vascular effectors[J]. *Curr Opin Hematol*, 2004, 11(3): 156-164.
 - [16] CAMUSSI G, DEREGIBUS M C, BRUNO S, et al. Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication[J]. *Kidney Int*, 2010, 78(9): 838-848.
 - [17] QUAH B J, BARLOW V P, MCPHUN V, et al. Bystander B cells rapidly acquire antigen receptors from activated B cells by membrane transfer [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(11): 4259-4264.
 - [18] KERYER-BIBENS C, PIOCHE-DURIEU C, VILLEMA NT C, et al. Exosomes released by EBV-infected nasopharyngeal carcinoma cells convey the viral latent membrane protein 1 and the immunomodulatory protein galectin 9[J]. *BMC Cancer*, 2006, 6: 283.
 - [19] XUE X, WANG X, ZHAO Y, et al. Exosomal miR-93 promotes proliferation and invasion in hepatocellular carcinoma by directly inhibiting TIMP2/TP53INP1/CDKN1A[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 502(4): 515-521.
 - [20] 赵艳, 万毅新, 陶红艳. 慢性炎症与慢性阻塞性肺疾病和肺癌进展的研究[J]. *临床肺科杂志*, 2013, 18(1): 108-109.
 - [21] SHI X, WANG B, FENG X, et al. circRNAs and exosomes: a mysterious frontier for human cancer[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2019, 19: 384-392.
 - [22] DJEBALI S, DAVIS C A, MERKEL A, et al. Landscape of transcription in human cells [J]. *Nature*, 2012, 489(7414): 101-108.
 - [23] COCQUERELLE C, MASCREZ B, HÉTUIN D, et al. Mis-splicing yields circular RNA molecules [J]. *FASEB J*, 1993, 7(1): 155-160.
 - [24] NIGRO J M, CHO K R, FEARON E R, et al. Scrambled exons [J]. *Cell*, 1991, 64(3): 607-613.
 - [25] MEMCZAK S, JENS M, ELEFSINIOTI A, et al. Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency [J]. *Nature*, 2013, 495(7441): 333-338.
 - [26] JECK W R, SORRENTINO J A, WANG K, et al. Circular RNAs are abundant, conserved, and associated with ALU repeats [J]. *RNA*, 2013, 19(2): 141-157.
 - [27] WANG Z. Not just a sponge: new functions of circular RNAs discovered [J]. *Sci China Life Sci*, 2015, 58(4): 407-408.
 - [28] GENG H H, LI R, SU Y M, et al. The circular RNA cdr1as promotes myocardial infarction by mediating the regulation of miR-7a on its target genes expression [J]. *PLoS One*, 2016, 11(3): e0151753.
 - [29] SALZMAN J, CHEN R E, OLSEN M N, et al. Cell-type specific features of circular RNA expression [J]. *PLoS Genet*, 2013, 9(9): e1003777.
 - [30] LEGNINI I, DI TIMOTEO G, ROSSI F, et al. Circ-ZNF609 is a circular rna that can be translated and functions in myogenesis [J]. *Mol Cell*, 2017, 66(1): 22-37.
 - [31] PAMUDURTI N R, BARTOK O, JENS M, et al. Translation of circRNAs [J]. *Mol Cell*, 2017, 66(1): 9-21.
 - [32] SCOTTI M M, SWANSON M S. RNA mis-splicing in disease [J]. *Nat Rev Genet*, 2016, 17(1): 19-32.
 - [33] CHEN Y G, KIM M V, CHEN X, et al. Sensing self and foreign circular RNAs by intron identity [J]. *Mol Cell*, 2017, 67(2): 228-238.
 - [34] BARBALAT R, EWALD S E, MOUCHESS M L, et al. Nucleic acid recognition by the innate immune system [J]. *Annu Rev Immunol*, 2011, 29: 185-214.
 - [35] IURESCIA S, FIORETTI D, RINALDI M. Nucleic acid sensing machinery: targeting innate immune system for cancer therapy [J]. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*, 2018, 13(1): 2-17.
 - [36] DE WIT M, KANT H, PIERSMA S R, et al. Colorectal cancer candidate biomarkers identified by tissue secretome proteome profiling [J]. *J Proteomics*, 2014, 99: 26-39.
 - [37] MCGLYNN L M, MCCLUNEY S, JAMIESON N B, et al. SIRT3 & SIRT7: potential novel biomarkers for determining outcome in pancreatic cancer patients [J]. *PLoS One*, 2015, 10(6): e0131344.
 - [38] YANG P, QIU Z, JIANG Y, et al. Silencing of cZNF292 circular RNA suppresses human glioma tube formation via the Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(39): 63449-63455.
 - [39] LI P, CHEN S, CHEN H, et al. Using circular RNA as a novel type of biomarker in the screening of gastric cancer [J]. *Clin Chim Acta*, 2015, 444: 132-136.
 - [40] WAN L, ZHANG L, FAN K, et al. Circular RNA-ITCH suppresses lung cancer proliferation via inhibiting the

- wnt/ β -catenin pathway[J]. Biomed Res Int, 2016, 2016: 1579490.
- [41] YAO J T, ZHAO S H, LIU Q P, et al. Over-expression of CircRNA_100876 in non-small cell lung cancer and its prognostic value[J]. Pathol Res Pract, 2017, 213(5): 453-456.
- [42] HUANG G, ZHU H, SHI Y, et al. cir-ITCH plays an inhibitory role in colorectal cancer by regulating the Wnt/ β -catenin pathway[J]. PLoS One, 2015, 10(6): e0131225.
- [43] ZHU M, XU Y, CHEN Y, et al. Circular BANP, an up-regulated circular RNA that modulates cell proliferation in colorectal cancer[J]. Biomed Pharmacother, 2017, 88: 138-144.
- [44] GUO J N, LI J, ZHU C L, et al. Comprehensive profile of differentially expressed circular RNAs reveals that hsa_circ_0000069 is upregulated and promotes cell proliferation, migration, and invasion in colorectal cancer[J]. Onco Targets Ther, 2016, 9: 7451-7458.
- [45] QIN M, LIU G, HUO X, et al. Hsa_circ_0001649: a circular RNA and potential novel biomarker for hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Biomark, 2016, 16(1): 161-169.
- [46] YU L, GONG X, SUN L, et al. The circular RNA Cdr1as ACT as an oncogene in hepatocellular carcinoma through targeting miR-7 expression[J]. PLoS One, 2016, 11(7): e0158347.
- [47] LIU X, ZHONG Y, LI J, et al. Circular RNA circ-NT5C2 acts as an oncogene in osteosarcoma proliferation and metastasis through targeting miR-448[J]. Oncotarget, 2017, 8(70): 114829-114838.
- [48] ZHU K P, MA X L, ZHANG C L. Overexpressed circPVT1, a potential new circular RNA biomarker, contributes to doxorubicin and cisplatin resistance of osteosarcoma cells by regulating ABCB1[J]. Int J Biol Sci, 2018, 14(3): 321-330.
- [49] 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.
- [50] LI S, LI Y, CHEN B, et al. exoRBase: a database of circRNA, lncRNA and mRNA in human blood exosomes[J]. Nucleic Acids Res, 2018, 46(D1): D106-D112.
- [51] NOLTE-¹ T HOEN E N, BUERMANS H P, WAAS-DORP M, et al. Deep sequencing of RNA from immune cell-derived vesicles uncovers the selective incorporation of small non-coding RNA biotypes with potential regulatory functions[J]. Nucleic Acids Res, 2012, 40(18): 9272-9285.
- [52] MORTON D J, KUIPER E G, JONES S K, et al. The RNA exosome and RNA exosome-linked disease[J]. RNA, 2018, 24(2): 127-142.
- [53] ZHANG H, DENG T, GE S, et al. Exosome circRNA secreted from adipocytes promotes the growth of hepatocellular carcinoma by targeting deubiquitination-related USP7[J]. Oncogene, 2019, 38(15): 2844-2859.
- [54] ZHANG H, ZHU L, BAI M, et al. Exosomal circRNA derived from gastric tumor promotes white adipose browning by targeting the miR-133/PRDM16 pathway[J]. Int J Cancer, 2019, 144(10): 2501-2515.
- [55] LENNON A M, WOLFGANG C L, CANTO M I, et al. The early detection of pancreatic cancer: what will it take to diagnose and treat curable pancreatic neoplasia? [J]. Cancer Res, 2014, 74(13): 3381-3389.
- [56] WOLFGANG C L, HERMAN J M, LAHERU D A, et al. Recent progress in pancreatic cancer[J]. CA Cancer J Clin, 2013, 63(5): 318-348.
- [57] LI Z, YANFANG W, LI J, et al. Tumor-released exosomal circular RNA PDE8A promotes invasive growth via the miR-338/MACC1/MET pathway in pancreatic cancer[J]. Cancer Lett, 2018, 432: 237-250.
- [58] CHEN X, CHEN R X, WEI W S, et al. PRMT5 circular rna promotes metastasis of urothelial carcinoma of the bladder through sponging miR-30c to induce epithelial-mesenchymal transition[J]. Clin Cancer Res, 2018, 24(24): 6319-6330.
- [59] XU Z, YAN Y, ZENG S, et al. Circular RNAs: clinical relevance in cancer[J]. Oncotarget, 2018, 9(1): 1444-1460.
- [60] HENRY N L, HAYES D F. Cancer biomarkers[J]. Mol Oncol, 2012, 6(2): 140-146.
- [61] MAYEUX R. Biomarkers: potential uses and limitations[J]. Neuro Rx, 2004, 1(2): 182-188.
- [62] TAVERNA S, GIALLOMBARDO M, GIL-BAZO I, et al. Exosomes isolation and characterization in serum is feasible in non-small cell lung cancer patients: critical analysis of evidence and potential role in clinical practice[J]. Oncotarget, 2016, 7(19): 28748-28760.

(收稿日期: 2020-03-07 修回日期: 2020-06-20)