

# 循环 circRNA 作为肺癌液体活检标志物的研究进展\*

赵婷,徐秋月,李娅,段勇(昆明医科大学第一附属医院检验科,昆明 650032)

**摘要:**肺癌是一种发病率和死亡率较高的恶性肿瘤,亟需新型有效的液体活检标志物以补充现有血液学诊疗指标的不足,改善肺癌患者的临床诊疗效果。循环 circRNA 是液体活检的一个重要组成部分,在肿瘤的形成和病情进展过程中发挥关键作用。研究表明,循环 circRNA 可作为肺癌诊断、疗效监测标志物及潜在的治疗靶点,是肿瘤液体活检领域的理想候选标志物。

**关键词:**circRNA;液体活检;肺癌;生物学标志物

**中图分类号:**R446

**文献标志码:**A

肺癌是严重威胁人类健康和生命的常见恶性肿瘤之一。据统计,在 2020 年全球肺癌新发病例约占所有新发癌症病例的 11.4%,相关死亡病例占癌症死亡病例的 18%<sup>[1]</sup>。目前,在肺癌诊疗过程中常用的癌胚抗原(CEA)、鳞状细胞癌相关抗原(SCCA)、神经元特异性烯醇化酶(NSE)和细胞角蛋白 19 片段抗原 21-1(CYFRA21-1)等经典的血清标志物普遍存在敏感性和特异性不高等问题。为更好地满足临床需求,亟需寻找更具灵敏度和特异性的新型液体活检标志物,以弥补现有诊疗指标的不足,改善肺癌患者的临床诊疗效果。

液体活检主要通过分析各类体液中肿瘤来源的蛋白质、核酸、细胞、外泌体和血小板等,客观、实时、无创地监测肿瘤信息。研究表明,环状 RNA(circRNA)有望成为肿瘤液体活检的有力工具,例如 circRNA 通过调节肿瘤细胞的增殖、分化、凋亡和侵袭等生理病理过程,参与调节肿瘤的发生和发展;circRNA 能稳定存在于外周循环、脑脊液、尿液等体液(包含外泌体)中,且在不同的生理和病理状况下均可检测到特定 circRNA 的表达水平发生改变,某种程度上可以反映机体的生理病理状态<sup>[2]</sup>。circRNA 不仅在外泌体中富集并稳定存在,且有助于形成肿瘤微环境<sup>[3]</sup>。循环 circRNA 在作为肺癌诊断、病情进展、疗效监测标志物及潜在的治疗靶点方面受到越来越多的关注,通过广泛且深入的研究有望筛选出具临床转化潜能的循环 circRNA。

## 1 circRNA 的生物学作用

1976 年,Sanger 等<sup>[4]</sup>首次发现 circRNA 时,认为其只是错误剪接的副产物,没有任何有价值的生物学功能。直至 2013 年,有学者首次发现,circRNA 具有 microRNA 海绵的作用<sup>[5]</sup>。目前研究<sup>[6-7]</sup>表明,circRNA 主要通过以下 4 种方式在肿瘤的形成和病情进展中发挥作用:(1)microRNA 海绵:许多 circRNAs 含有 1 个或多个 miRNA 反应元件(MREs),充当 microRNA 海绵阻止 microRNA 与目标 mRNA 结合,从

而发挥内源竞争 RNA(ceRNA)作用;(2)蛋白质海绵:部分 circRNAs 能够与 RNA 结合蛋白(RBP)结合形成 RNA-蛋白质复合物,从而阻止 circRNA 与目标 mRNA 的结合;或者,通过 circRNA 与 RBP 之间的相互调节作用,参与调控蛋白质的表达和功能,如 circMbl 与肌肉盲蛋白(MBL)等;(3)转录调控作用:内含子 circRNA(ciRNA)和外显子-内含子 RNA(EIciRNA)主要分布于细胞核内,在转录和转录后水平调控基因表达;(4)翻译功能:少数 circRNAs 可通过内部核糖体位点(IRES)介导、N6-甲基腺苷(m6A)介导或丰富的开放阅读框(ORFs)3 种方式,参与或促进蛋白质翻译的有效启动。

## 2 circRNA 作为液体活检标志物的优势

circRNA 是一类由前体 RNA 反向剪接形成的具有独特共价闭合结构的环状 RNA 分子,在真核生物和病毒中广泛表达<sup>[8]</sup>。相比于线性 RNA,circRNA 缺少 5'帽结构和 3'A 尾,对外切核糖核酸酶(Rnase R)具有高度抗性,不仅能够更稳定地存在于各种组织和细胞中,还能在外周循环、尿液、唾液、脑脊液等体液中富集并稳定存在<sup>[9]</sup>。circRNA 表达具有高稳定性、组织/细胞特异性和广泛表达等优势,是肿瘤新型液体活检的理想候选标志物<sup>[10]</sup>。此外,由于循环外周血的微创采集模式和易获性,现已成为液体活检的主要体液之一<sup>[11]</sup>。越来越多的研究也表明,循环 circRNA 在肺癌的早期诊断、病情监测等方面具有重要意义,其还可能成为肺癌的潜在治疗靶标<sup>[12-14]</sup>。

## 3 循环 circRNA 的定量检测方法

目前,PCR 是生物学研究领域用于 circRNA 定量分析的常规和经典的检测方法,包括实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)、数字 PCR(ddPCR)、滚环扩增(RCA)<sup>[15-16]</sup>、环介导等温扩增(LAMP)<sup>[17]</sup>和基于 DNA 探针连接的 PCR<sup>[18]</sup>等。其中,RT-qPCR 是对目标 circRNA 进行相对定量分析

\* 基金项目:国家自然科学基金地区科学基金(82160407,82160696)。

作者简介:赵婷,1997 年生,女,硕士研究生,研究方向:生物化学与分子生物学。

通信作者:段勇,博士,教授,博士研究生导师, E-mail: Duanyong7@139.com。

的常用方法,也是验证 RNA-seq 高通量结果的重要方法<sup>[19]</sup>。但 RT-qPCR 分析存在灵敏度较低的局限性。ddPCR 通过“分而治之”的原理,结合泊松分布可实现对低丰度目标 RNA 的绝对定量分析,这对于循环 circRNA 的绝对定量检测特别有价值。Jiao 等<sup>[16]</sup>基于 RCA 方法开发了一种使用双功能磁珠直接捕获目标 circRNA-miRNA 复合物(CMRRI)以及信号放大的生物传感系统,可直接检测生物样品中的 CMRRI,但不适用于低表达的 circRNA。茎环引物诱导的 LAMP 可精准识别 circRNA 连接序列,并成功地应用于各种均相溶液中,可灵敏且特异地检测目标 circRNA<sup>[17]</sup>。此外,基于 DNA 探针连接的 PCR 法通过在 circRNA 的连接位点使用 splintR 连接酶准确连接 2 个 DNA 探针,从而实现 circRNA 的精准识别和定量检测<sup>[18-19]</sup>。

#### 4 循环 circRNA 作为肺癌液体活检标志物的研究现状

循环 circRNA 不仅可以用于疾病的早期诊断,还能够反映疾病的动态发展情况和治疗效果,且有潜力成为有效的治疗靶标。表 1 列出了近年来具有较大临床应用转化潜能的循环 circRNAs,检测样本主要来自血浆和血清。

**4.1 循环 circRNA 有潜力成为肺癌的诊断标志物** 已有研究揭示了 circRNA 作为肺癌液体活检诊断标志物的可能性。Liu 等<sup>[20]</sup>对 61 例非小细胞肺癌(NSCLC)患者血浆 hsa\_circ\_0046264 的表达水平进行检测分析,结果证实血浆 hsa\_circ\_0046264 对 NSCLC 的诊断均具有潜在的临床价值( $AUC^{ROC} = 0.915$ ,敏感性、特异性分别为 0.927、0.957);此外,其还可能成为肺癌潜在的预后标志物和治疗靶点。该研究结果还显示,血浆 circRNAs 的联合检测可在一定程度上提高诊断效能。hsa\_circ\_005962 与 hsa\_circ\_0086414 的联合应用不仅可用于诊断肺腺癌(LUAD)( $AUC^{ROC} = 0.81$ ,敏感性、特异性分别为 77.80%、72.22%),还能区分 TNM 早期阶段的 LUAD 患者和健康个体( $AUC^{ROC} = 0.83$ )<sup>[21]</sup>。circRNA 除具有较高的早期诊断价值之外,还有潜在的鉴别诊断价值。hsa\_circ\_0047921 可将 NSCLC 病例与慢阻肺疾病区分开( $AUC^{ROC} = 0.890$ ),hsa\_circ\_0056285 联合 hsa\_circ\_0007761 可区分 NSCLC 病例与结核病例( $AUC^{ROC} = 0.820$ );此外,hsa\_circ\_0047921、hsa\_circ\_0056285 和 hsa\_circ\_0007761 三者联合检测在诊断早期 NSCLC 病例与健康对照时也具有重要的意义( $AUC^{ROC} = 0.919$ )<sup>[22]</sup>。在一项 60 例肺腺癌和 58 例健康受试者的队列研究中,单因素和多因素生存分析结果显示,血浆 hsa\_circ\_0001715 除具有较高的诊断价值外( $AUC^{ROC} = 0.871$ ),还可能是肺腺癌患者总生存期(OS)的独立预后因子<sup>[23]</sup>。

外泌体 circRNA 也是一种潜在的无创性肿瘤诊断工具。Wang 等<sup>[24]</sup>使用高通量测序分析了 6 对肺鳞癌(LUSC)患者和健康对照者的血浆外泌体 circRNA 表达谱,共鉴定出 252 个差异表达的外泌体 circRNAs,其中,上调的外泌体 hsa\_circ\_0014235 和 hsa\_circ\_0025880 显示出潜在的诊断价值( $AUC^{ROC}$ 分别为 0.825、0.800)。在 LUAD 中表达上调的血浆外泌体 hsa\_circRNA\_002178 对 LUAD 的早期诊断具有显著的有效性( $AUC^{ROC} = 0.997$ )<sup>[25]</sup>。未来有必要进行更多的

前瞻性研究及大队列研究,以探索循环 circRNA 作为肺癌诊断标志物的更多可能性。

**4.2 循环 circRNA 有潜力成为肺癌的疗效监测标志物** 多项研究通过比较放化疗敏感和耐药患者血浆或血清中差异表达的 circRNAs,证实循环 circRNA 与肿瘤细胞耐药性关系密切,这对于指导临床治疗具有重大意义。circRNA 微阵列分析显示,吉非替尼治疗有效组和无效组间共存在 1 377 个差异表达 circRNAs,进一步通过 RT-qPCR 在独立的验证集中证实 hsa\_circ\_0109320 是 NSCLC 患者表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂(EGFR-TKI)疗效预测的潜在指标<sup>[26]</sup>。Liu 等<sup>[21]</sup>通过比较肺癌患者术前和术后 7 d 血浆 hsa\_circ\_0005962 和 hsa\_circ\_0086414 的表达水平,发现血浆 hsa\_circ\_0005962 在 LUAD 术前及术后患者之间有明显差异,并进一步通过生信分析和体外实验证实,hsa\_circ\_0005962 是评估手术治疗效果的潜在标志物。此外,病情进展的实时监测对于改善肺癌患者治疗效果尤其重要。Luo 等<sup>[27]</sup>筛选了 231 例肺癌患者和 41 例健康人对照的 circRNA 表达谱,并对 hsa\_circ\_0000190 的表达水平进行临床验证,结果表明 hsa\_circ\_0000190 可提示晚期肺癌的肿瘤进展和对免疫治疗的不良反应。

外泌体 circRNA 在疗效监测方面也显现出重要价值。Fang 等<sup>[28]</sup>发现 NSCLC 患者血清来源的外泌体 CircARHGAP10 通过 miR-638/FAM83F 轴抑制了 NSCLC 的进展,表明外泌体 CircARHGAP10 是实现动态监测疾病进程的潜在有效标志物。一项关于 hsa\_circ\_0056616 的研究表明,在肺腺癌患者血浆中高表达的外泌体 hsa\_circRNA\_0056616 可能是淋巴结转移预测的有效生物标志物<sup>[29]</sup>。通过全面理解 circRNA 并挖掘其作为肺癌疗效检测标志物的临床价值,可有效筛选出具有临床应用潜能的循环 circRNA 标志物。

**4.3 循环 circRNA 有潜力成为肺癌的治疗靶标** 研究表明,循环 circRNA 亦具备作为肿瘤新型治疗靶标的潜能。Shi 等<sup>[30]</sup>发现,hsa\_circ\_0008928 敲减可提高 NSCLC 细胞对顺铂(CDDP)的敏感性,为 NSCLC 的 CDDP 耐药疗法提供了新的依据。一项包含 28 例奥西替尼耐药和 32 例敏感的 NSCLC 患者队列研究结果表明,hsa\_circ\_0002130 通过靶向 miR-498 调节糖酵解进而逆转耐药的发生,在体内和体外均抑制了 NSCLC 患者对奥西替尼的耐药性,这可能是改善肺癌患者临床治疗的理想措施<sup>[31]</sup>。多项研究表明,hsa\_circ\_102481、CircCDYL 和 CircPIP5K1A 也可能是肺癌靶向治疗的新型靶点<sup>[12-14]</sup>。

#### 5 总结与展望

随着对 circRNA 的独特分子结构和生物学功能研究的深入,表明循环 circRNA 有潜力成为肺癌液体活检中具有临床应用价值的诊断、病情监测标志物和治疗靶点。然而,目前液体活检 circRNA 在生物医学领域研究和临床转化方面依然面临巨大的挑战和困难:(1) circRNA 的命名规则尚未统一,在很大程度上阻碍了整个研究领域的快速发展;(2) 循环 RNA 抽提技术和富集方法的有效性均有待突破;(3) 目前的研究大多集中于基础研究,需广泛的临床研究证实

circRNA 用于肿瘤诊疗标志物的可行性; (4) 各研究之间缺乏可比性和一致性, 需建立相应的标准品、检测方法学标准和质量控制体系; (5) circRNA 通过何种方式扩散入外泌体中以及外泌体 circRNA 丰度的调节机制均有待研究。未来

迫切需要加快循环 circRNA 富集方法、标准品的研发和改进, 通过开展科学、创新的基础研究和系统、全面的真实世界队列研究, 争取早日实现肺癌循环 circRNA 检测体系的持续改进和临床转化。

表 1 肺癌相关的循环 circRNAs

circRNA	表达失调	检测方法	样本来源	研究队列	AUC <sup>ROC</sup>	潜在应用价值	参考文献
hsa_circ_0046264	上调	qRT-PCR	血清	61 例 NSCLC	0.971/0.915	诊断/预后/治疗靶点	[20]
hsa_circ_0005962/ hsa_circ_0086414	上调/上调	qRT-PCR	血浆	153 例 LUAD/54 例 HC; 54 例术前/术后	0.810	诊断/疗效预测	[21]
hsa_circ_0047921/ hsa_circ_0056285/ hsa_circ_0007761	下调/下调/ 上调	qRT-PCR	外泌体 (血清)	63 例 NSCLC/58 例 COPD/ 46 例 TB	0.890/ 0.820/ 0.919	诊断	[22]
hsa_circ_0001715	上调	qRT-PCR	血浆	60 例 LAUD/58 例 HC	0.871	诊断	[23]
hsa_circ_0014235/ hsa_circ_0025880	上调/上调	qRT-PCR	外泌体 (血清)	30 例 LUSC/30 例 HC	0.825/ 0.800	诊断/治疗靶点	[24]
hsa_circ_002178	上调	qRT-PCR	外泌体 (血浆)	120 例 LUAD/30 例 HC	0.997	诊断	[25]
hsa_circ_0109320	下调	qRT-PCR	血浆	28 例耐药 NSCLC/10 例敏感 NSCLC	0.810	疗效预测	[26]
hsa_circ_0000190	上调	qRT-PCR	血浆	231 例 LC/41 例 HC	0.950	疗效预测/肿瘤进展	[27]
CircARHGAP10	上调	qRT-PCR	外泌体 (血清)	40 例 NSCLC/40 例 HC	-	肿瘤进展	[28]
hsa_circ_0056616	上调	qRT-PCR	外泌体 (血浆)	42 例 LAC 伴 LNM/48 例 LAC LNM	0.812	肿瘤进展/诊断	[29]
hsa_circ_0008928	上调	qRT-PCR	外泌体 (血清)	28 例耐药 NSCLC/19 例敏感 NSCLC/47 例 HC	-	治疗靶点/疗效预测	[30]
hsa_circ_0002130	上调	qRT-PCR	外泌体 (血浆)	28 例耐药 NSCLC/32 例敏感 NSCLC	0.792	治疗靶点/疗效预测	[31]
hsa_circ_102481	上调	qRT-PCR	外泌体 (血清)	63 对耐药前/后 NSCLC	-	治疗靶点	[12]
CircCDYL	下调	qRT-PCR	血浆	30 例 NSCLC/30 例 HC	-	治疗靶点	[13]
CircPIP5K1A	上调	qRT-PCR	外泌体 (血清)	20 例 NSCLC	-	治疗靶点	[14]

注: AUC<sup>ROC</sup> 为 ROC 曲线下面积; NSCLC, 非小细胞肺癌; HC, 健康对照; LAC, 肺腺癌; LNM, 淋巴结转移; LC, 肺癌; LUAD, 肺腺癌; LUSC, 肺鳞癌; COPD, 慢性阻塞性肺疾病; TB, 肺结核。

6 参考文献

[1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249.

[2] Wang SM, Zhang K, Tan SY, et al. Circular RNAs in body fluids as cancer biomarkers: the new frontier of liquid biopsies[J]. Mol Cancer, 2021, 20(1): 13.

[3] Seimiya T, Otsuka M, Iwata T, et al. Emerging roles of exosomal circular RNAs in cancer[J]. Front Cell Dev Biol, 2020, 8: 568366.

[4] Sanger HL, Klotz G, Riesner D, et al. Viroids are single-stranded covalently closed circular RNA molecules existing as highly base-paired rod-like structures[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1976, 73(11): 3852-3856.

[5] Hansen TB, Jensen TI, Clausen BH, et al. Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges[J]. Nature, 2013, 495(7441): 384-388.

[6] Wang SM, Zhang K, Tan SY, et al. Circular RNAs in body fluids as cancer biomarkers: the new frontier of liquid biopsies[J]. Mol Canc-

er, 2021, 20(1): 13.

[7] Lei M, Zheng GT, Ning QQ, et al. Translation and functional roles of circular RNAs in human cancer[J]. Mol Cancer, 2020, 19(1): 30.

[8] Xue C, Li GL, Lu J, et al. Crosstalk between circRNAs and the PI3K/AKT signaling pathway in cancer progression [J]. Signal Transduct Target Ther, 2021, 6(1): 400.

[9] Wang YX, Liu JB, Ma JF, et al. Exosomal circRNAs: biogenesis, effect and application in human diseases[J]. Mol Cancer, 2019, 18(1): 116.

[10] Huang LX, Rong Y, Tang X, et al. Circular RNAs are promising biomarkers in liquid biopsy for the diagnosis of non-small cell lung cancer[J]. Front Mol Biosci, 2021, 8: 625722.

[11] de Rubis G, Rajeev Krishnan S, Bebawy M. Liquid biopsies in cancer diagnosis, monitoring, and prognosis[J]. Trends Pharmacol Sci, 2019, 40(3): 172-186.

[12] Yang B, Teng F, Chang L, et al. Tumor-derived exosomal circRNA \_102481 contributes to EGFR-TKIs resistance via the miR-30a-5p/ROR1 axis in non-small cell lung cancer[J]. Aging, 2021, 13(9): 13264-13286.

- [13] Bian WX, Xue F, Wang LY, *et al.* Circular RNA CircCDYL regulates proliferation and apoptosis in non-small cell lung cancer cells by sponging miR-185-5p and upregulating TNRC6A [J]. *Cancer Manag Res*, 2021, 13: 633-642.
- [14] Shao N, Song L, Sun XG. Exosomal circ\_PIP5K1A regulates the progression of non-small cell lung cancer and cisplatin sensitivity by miR-101/ABCC1 axis [J]. *Mol Cell Biochem*, 2021, 476 (6): 2253-2267.
- [15] Liu YQ, Zhang X, Liu M, *et al.* Direct detection of circRNA in real samples using reverse transcription-rolling circle amplification [J]. *Anal Chim Acta*, 2020, 1101: 169-175.
- [16] Jiao J, Duan CJ, Zheng J, *et al.* Development of a two-in-one integrated assay for the analysis of circRNA-microRNA interactions [J]. *Biosens Bioelectron*, 2021, 178: 113032.
- [17] Zhang PB, Gao KJ, Liang YC, *et al.* Ultrasensitive detection of circular RNA by accurate recognition of the specific junction site using stem-loop primer induced double exponential amplification [J]. *Talanta*, 2020, 217: 121021.
- [18] Zhang PB, Guo N, Gao KJ, *et al.* Direct recognition and sensitive detection of circular RNA with ligation-based PCR [J]. *Org Biomol Chem*, 2020, 18(17): 3269-3273.
- [19] Pandey PR, Munk R, Kundu G, *et al.* Methods for analysis of circular RNAs [J]. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2020, 11 (1): e1566.
- [20] Liu ZH, Yang SZ, Chen XT, *et al.* Correlations of hsa\_circ\_0046264 expression with onset, pathological stage and chemotherapy resistance of lung cancer [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(18): 9511-9521.
- [21] Liu XX, Yang YE, Liu X, *et al.* A two-circular RNA signature as a noninvasive diagnostic biomarker for lung adenocarcinoma [J]. *J Transl Med*, 2019, 17(1): 50.
- [22] Xian JF, Su WP, Liu L, *et al.* Identification of three circular RNA cargoes in serum exosomes as diagnostic biomarkers of non-small-cell lung cancer in the Chinese population [J]. *J Mol Diagn*, 2020, 22(8): 1096-1108.
- [23] Lu GJ, Cui J, Qian Q, *et al.* Overexpression of hsa\_circ\_0001715 is a potential diagnostic and prognostic biomarker in lung adenocarcinoma [J]. *Onco Targets Ther*, 2020, 13: 10775-10783.
- [24] Wang YW, Zhang HY, Wang J, *et al.* Circular RNA expression profile of lung squamous cell carcinoma: identification of potential biomarkers and therapeutic targets [J]. *Biosci Rep*, 2020, 40(4): BSR20194512.
- [25] Wang JF, Zhao XH, Wang YB, *et al.* circRNA-002178 act as a CeRNA to promote PDL1/PD1 expression in lung adenocarcinoma [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(1): 32.
- [26] Liu YT, Han XH, Xing PY, *et al.* Circular RNA profiling identified as a biomarker for predicting the efficacy of Gefitinib therapy for non-small cell lung cancer [J]. *J Thorac Dis*, 2019, 11(5): 1779-1787.
- [27] Luo YH, Yang YP, Chien CS, *et al.* Plasma level of circular RNA hsa\_circ\_0000190 correlates with tumor progression and poor treatment response in advanced lung cancers [J]. *Cancers*, 2020, 12(7): 1740.
- [28] Fang K, Chen X, Qiu F, *et al.* Serum-derived exosomes-mediated circular RNA ARHGAP10 modulates the progression of non-small-cell lung cancer through the miR-638/FAM83F axis [J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2022, 37(2): 96-110.
- [29] He F, Zhong XJ, Lin Z, *et al.* Plasma exo-hsa\_circRNA\_0056616: a potential biomarker for lymph node metastasis in lung adenocarcinoma [J]. *J Cancer*, 2020, 11(14): 4037-4046.
- [30] Shi Q, Ji T, Ma Z, *et al.* Serum exosomes-based biomarker circ\_0008928 regulates cisplatin sensitivity, tumor progression, and glycolysis metabolism by miR-488/HK2 axis in cisplatin-resistant non-small cell lung carcinoma [J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2021. doi: 10.1089/cbr.2020.4490.
- [31] Ma J, Qi G, Li L. A novel serum exosomes-based biomarker hsa\_circ\_0002130 facilitates osimertinib-resistance in non-small Cell lung cancer by sponging miR-498 [J]. *Onco Targets Ther*, 2020, 13: 5293-5307.

(收稿日期:2021-09-18)

(本文编辑:许晓蒙)