

循环血中长链非编码 RNA 作为肝癌诊断标志物的研究进展

毕峰瑞,孙树汉*
第二军医大学基础部医学遗传学教研室,上海 200433

[摘要] 肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是一种侵袭性很强的恶性肿瘤,具有较高的致死率。对肝癌进行早期诊断,有助于改善患者的预后。然而,目前的影像学技术和肿瘤标志物检测对肝癌早期诊断的效果还不理想。越来越多的证据显示,肿瘤细胞能够向血中释放大量不被核糖核酸酶降解的 RNAs,并且这些 RNAs 的含量足以用于定量分析。长链非编码 RNA(long non-coding RNAs, lncRNAs)在肝癌发生发展过程中具有重要作用。研究显示,循环血中某些 lncRNAs 表达水平的异常变化与肝癌的病程进展密切相关,提示循环血中的 lncRNAs 具有作为肝癌诊断标志物的潜在价值。本文就循环血中 lncRNAs 作为肝癌诊断标志物的研究进展作一综述。

[关键词] 肝肿瘤;肝细胞癌;长链非编码 RNA;生物学标记;循环血
[中图分类号] R 735.7 [文献标志码] A [文章编号] 0258-879X(2016)04-0465-06

Circulating long non-coding RNAs as diagnosis biomarkers for hepatocellular carcinoma: recent advance

BI Feng-rui, SUN Shu-han*
Department of Medical Genetics, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] Hepatocellular carcinoma(HCC) is an aggressive malignancy with a high mortality rate. Prognosis can be improved significantly with early diagnosis. However, current imaging technologies and tumor biomarkers for early diagnosis of HCC are unsatisfied. Emerging evidence shows that tumor cells release substantial amounts of RNAs into the circulation that can not be degraded by ribonucleases and are present at sufficient levels for quantitative analyses. Long non-coding RNAs (lncRNAs) play critical roles in the development of HCC. Some lncRNAs have been reported significantly altered in expression with HCC progression, and they may thus serve as potential diagnostic biomarkers for HCC. This review summarized the recent advance in circulating lncRNAs as diagnosis biomarkers for HCC.

[Key words] liver neoplasms; hepatocellular carcinoma; long non-coding RNAs; biological markers; circulation
[Acad J Sec Mil Med Univ, 2016, 37(4): 465-470]

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是全球最常见的恶性肿瘤之一,具有致死率高的特点^[1],且每年有近一半的死亡病例发生在中国^[2]。由于肝癌患者在就诊时多数已经进入中晚期,即使对肿瘤进行手术切除,术后依然存在较大的复发风险,累积5年复发率接近70%~80%^[3]。因此,早发现、早诊断对有效改善肝癌患者的预后具有十分重要的意义。

目前,对肝癌的诊断技术主要分为两大类。一类是影像学检查,包括腹部超声波扫描、增强计算机断层扫描(computed tomography, CT)或磁共振成

像(magnetic resonance imaging, MRI)。然而,影像学检查难以发现小病灶,无法准确诊断早期肝癌。另一类是实验室诊断标志物检测,例如甲胎蛋白(α -fetoprotein, AFP)、脱 γ 羧基凝血酶原(des-gamma-carboxy prothrombin, DCP)。尽管血清 AFP 作为诊断标志物已经在临床被广泛使用,但在早期肝癌患者中,单独使用 AFP 作为诊断标志物的假阴性率高达40%。包括晚期患者在内,15%~30%患者的血清 AFP 仍处于正常水平^[4]。据统计,AFP 的敏感性和特异性分别仅为39%~64%和76%~94%^[5]。因此,单独应用 AFP 已经无法满足诊断的

[收稿日期] 2015-10-20 [接受日期] 2016-01-04
[基金项目] 国家自然科学基金(81330037). Supported by National Natural Science Foundation of China(81330037).
[作者简介] 毕峰瑞,硕士生. E-mail: bifengrui@msn.cn
* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-81871055, E-mail: shsun@vip.sina.com

要求,迫切需要寻找新的循环血诊断标志物用来替代 AFP,或者与 AFP 联合应用,以提高肝癌筛查和诊断的准确性。近些年,将循环血中长链非编码 RNAs(long non-coding RNAs,lncRNAs)作为肿瘤的诊断标志物逐渐成为研究的热点,本文就其作为肝癌诊断标志物的研究进展作一综述。

1 LncRNAs 与肝癌

LncRNAs 通常是指长度大于 200 nt,不具备蛋白质编码能力的一类 RNA。目前揭示 lncRNAs 能够发挥许多重要的生物学功能,包括 X 染色体失活和基因组印迹、基因表达调控、细胞周期调节、蛋白质组装及染色体修饰^[6]。大量研究显示,肿瘤组织中 lncRNAs 水平的异常变化与肿瘤的发生、增殖、侵袭、转移以及预后多个环节密切相关,并提示 lncRNAs 可以作为肿瘤的诊断标志物和治疗靶点,为肿瘤研究和治疗提供了新的思路^[7-12]。

相较于蛋白编码基因,lncRNAs 作为诊断标志物有如下优势:(1)lncRNAs 发挥生物学功能的方式复杂多样,参与了 RNA、DNA 和蛋白质的生物合成及功能等多层次、多水平的调控^[13-15]。(2)检测手段简易,通过 RT-PCR 方法就能够简便地从血液中检测出 lncRNAs^[16]。(3)相较于 mRNAs 和 microRNAs,lncRNAs 具有更好的肿瘤组织特异性^[17]。

在肝癌组织中,人们已经证实多个 lncRNAs 水平存在异常,并参与了肝癌发生发展的过程,如 lncRNA HULC (highly up-regulated in liver cancer)通过下调 miR-372^[18]和抑癌基因 p18^[19]的表达,促进肝癌细胞的增殖。LncRNA-ATB 通过上调 ZEB1 和 ZEB2 促进肝癌的侵袭和转移,并且 lncRNA-ATB 在肝癌组织中的高表达提示着更差的预后^[8]。在肝癌细胞株 HepG2 和 Huh7 中,靶向抑制 lncRNA-HEIH (lncRNA high expression in HCC),通过上调 P21、P16 和 P27 表达,诱导细胞周期发生阻滞^[12]。由此可见,lncRNAs 在肝癌的发生发展中发挥重要作用,具有在肝癌中作为诊断标志物的巨大潜力。

2 与肝癌相关的循环血 lncRNAs

2.1 HULC HULC(Ensembl: ENSG000-00251164; Chromosome 6: 8 652 137~8 653 846)是人们发现

的第 1 个具有肝细胞特异性 lncRNA^[16]。HULC 在肝癌组织中的转录水平是正常肝组织的 33 倍^[19],它在其他的肿瘤组织,例如肺癌、结肠癌和前列腺癌组织中的转录水平非常低。同时,它在肝硬化组织中的转录水平没有明显变化,提示它在肝癌组织中的表达具有特异性。在 HULC 的核心启动子区(-67 nt 至-53 nt)有 cAMP 反应元件结合蛋白(cAMP responsive element-binding protein, CREB)的结合位点。CREB 通过对 HULC 的启动子区的结合,诱导后者的转录增加。由于 HULC 上具有 miR-372 的结合位点^[18],当 HULC 的转录增加时,可通过降低 miR-372 对 PRKACB(蛋白激酶 PKA 的催化亚基)的转录抑制作用,进一步增强 CREB 的磷酸化水平,促进了 CREB 对 HULC 的结合。最终,HULC 通过正反馈调节机制,增强了其在肝癌中的转录。当 HULC 的转录增加时,可通过下调肿瘤抑制基因 p18 的转录和翻译,促进肝癌细胞的增殖^[19]。

Xie 等^[20]检测了 20 例健康人和 30 例肝癌患者肝组织和血浆中 HULC 的表达并使用受试者特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线评价组织中 HULC 表达区别肿瘤组织和正常对照组织的能力。结果显示,曲线下面积(area under the curve,AUC)为 0.86,提示将组织中的 HULC 作为标志物分子时具有较好的敏感性和特异性。同时,在他们选择的队列中,验证了 HULC 在肝癌组织中的表达高于正常肝组织($P<0.01$)。进一步研究发现,在肝癌患者中,Edmondson 分级与血浆中 HULC 的表达呈正相关($P<0.01$)。乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)阳性的肝癌患者血浆中 HULC 的检出率高于 HBV 阴性的肝癌患者(90% vs 25%, $P<0.01$)。在 63%(19/30)的肝癌患者血浆中能够检测出 HULC,而正常对照组中只有 10%(2/20)能检测出。以上结果提示,血浆中 HULC 的表达水平的升高与肿瘤的侵袭和进展相关。

2.2 Linc00152 Linc00152(Ensembl:ENSG00000222041; Chromosome 2: 87 455 368~87 606 805)是一个位于基因间的 lncRNA,位于染色体 2p11.2,转录本长度 828 nt。有研究报道,血浆中的 linc00152 在胃癌中的水平发生上调,是潜在的胃癌血浆诊断标志物^[21]。目前已知,肝癌组织中的 linc00152 转录水

平显著升高,并通过激活雷帕霉素机制性靶信号通路,促进肝癌细胞增殖和肿瘤生长^[22]。

Li等^[23]发现,肝癌患者血浆中 HULC($P<0.001$)和 linc00152($P<0.001$)的表达相较于正常对照组有显著的上调。HULC 的表达水平与肿瘤大小($P=0.0253$)、包膜完整性($P=0.0169$)相关。而 linc00152 的表达和肿瘤分化程度($P<0.0001$)、肿瘤大小($P=0.0005$)、TNM 分期($P=0.0066$)、包膜完整性($P=0.0025$)的相关性高。这2个分子在血浆中的表达水平越高,肿瘤发生、恶性程度增加和发生侵袭的风险就越高。以上结论提示,HULC 和 linc00152 有可能在肿瘤发生、发展和侵袭的过程中发挥重要作用,因而这2个 lncRNAs 可作为预测肝癌发病和转移的标志物分子。通过 ROC 曲线分析,对这2个 lncRNAs 的诊断价值进行评价时,HULC 和 linc00152 的 AUC 分别为 0.78 和 0.85;将这2个 lncRNAs 联合应用于鉴别肝癌患者和正常对照时,AUC 提高到 0.87;若与 AFP 联用,AUC 达到 0.89,能够在一定程度上提升诊断的特异性和敏感性^[23]。

2.3 RP11-160H22.5、XLOC_014172 和 LOC149086

Tang 等^[24]先通过高通量 lncRNAs 芯片(Human LncRNA Array v3.0)选取了3例男性肝癌患者术前和术后的血浆,以及3例正常对照者的血浆作为研究对象,筛选血浆中差异表达的 lncRNAs。接着,选择20例肝癌患者和20例正常对照的血浆,用 qRT-PCR 验证芯片结果,最终从中筛选得到3个在肝癌患者血浆中上调表达的 lncRNAs: RP11-160H22.5 (Ensembl: ENSG00000227373; Chromosome 1: 174 115 300~174 160 004)、XLOC_014172 (LNCipedia: lnc-RGL4-4; Chromosome 22: 23 834 998~23 838 909)和 LOC149086 (Ensembl: ENSG00000260386; Chromosome 1: 31 500 085~31 540 885)。最后将样本量扩大到147例肝癌患者和189例正常对照的血浆,验证前期结果的准确性和特异性。该项研究发现,这3个 lncRNAs 在肝癌患者手术前血浆中的表达高于正常对照($P<0.01$)和慢性肝炎($P<0.01$),并且在手术后,血浆 lncRNAs 的表达有下调($P<0.01$)。

研究者使用了风险评估模型对病例和对照样本的肝癌发病风险进行评分。在筛选队列中,当截断

值(cut-off value)取 7.449 时,使用 lncRNAs 诊断肝癌发病风险的敏感性和特异性达到最大,分别为 85% 和 95%。在更大样本量的验证队列中,使用相同的条件,诊断的敏感性和特异性分别为 82% 和 73%。使用 ROC 曲线法评价诊断敏感性和特异性时,在筛选队列中,RP11-160H22.5、XLOC_014172 和 LOC149086 的 AUC 分别为 0.900、0.950 和 0.875。三者联合应用的 AUC 可以达到 0.999。在验证队列中,3个 lncRNAs 单独使用与联合应用时的 AUC 分别为 0.601、0.866、0.759 和 0.896。研究者同时使用了双盲法(double-blind test)验证 lncRNAs 的诊断能力。在50例肝癌患者和50例健康对照者的血浆中,按照 lncRNAs 的表达水平,将样本分为肝癌组和正常对照组,其诊断准确率达 90.0%。

进一步研究发现,XLOC_014172 和 LOC149086 可以作为预测肝癌发生转移的标志分子。研究者随机选择了20例发生了转移和20例未发生转移的肝癌患者作为第1个队列,将另外79例发生转移和78例未发生转移的肝癌患者作为验证队列。当截断值取 3.214 时,在第1个队列中,这2个分子诊断肝癌发生转移的敏感性和特异性分别为 90% 和 90%,阳性预测值和阴性预测值分别为 94% 和 86%。而验证队列中,敏感性和特异性分别为 91% 和 90%。在两个队列中,XLOC_014172、LOC149086 以及联合使用用于区分转移与否的 AUC 分别为 0.875、0.625、0.900,以及 0.904、0.625、0.934。

2.4 LncRNA-uc003wbd 和 lncRNA-AF085935

Lu 等^[25]将138例正常对照、104例 HBV 感染者和137例肝癌患者纳入研究人群。用 qRT-PCR 的方法检测所研究人群血清中 lncRNA-uc003wbd (UCSC: uc003wbd)和 lncRNA-AF085935 (UCSC: AF085935; Chromosome X: 133 897 443~133 897 922)的表达。结果显示,2个 lncRNAs 分子在肝癌患者($P<0.001$)和 HBV 感染者($P<0.001$)血清中的表达相较于正常对照增高。以上结果提示,这2个分子能够将肝癌患者和 HBV 感染者与正常对照进行区分,也能够将肝癌患者与 HBV 感染者区分开。研究者还用 ROC 曲线法,通过 AUC 来评价2个 lncRNAs 的诊断效能。当用于鉴别诊断肝癌患者和 HBV 感染者时,lncRNA-

uc003wbd 的 AUC 为 0.70(95% CI: 0.63~0.76), lncRNA-AF085935 的 AUC 为 0.86(95% CI: 0.80~0.91)。当用于鉴别诊断肝癌患者与正常对照时, lncRNA-uc003wbd 的 AUC 为 0.86(95% CI: 0.82~0.91), lncRNA-AF085935 的 AUC 为 0.96(95% CI: 0.93~0.99)。当用于鉴别诊断 HBV 感染者与正常对照时, lncRNA-uc003wbd 的 AUC 为 0.76(95% CI: 0.70~0.82), lncRNA-AF085935 的 AUC 为 0.77(95% CI: 0.71~0.83)。

3 lncRNAs 分泌入血的机制及存在形式

尽管血中存在大量的核糖核酸酶(ribonucleases, RNases),然而循环血中的某些 lncRNAs 在一定时间内并不受其影响,仍可保持较好的稳定性和较高的表达量,能够满足检测的要求^[26]。Tang 等^[24]用琼脂糖凝胶电泳能够检测出从正常人血浆中扩增出的 lncRNAs。将正常人血浆在室温放置 12 h、24 h 或者经历 3 次反复冻融等处理后,发现 lncRNAs 的浓度几乎没有受影响。究其原因,一方面可能是冻存血液样品所处的低温环境抑制了 RNases 的活性;另一方面,细胞内的 lncRNAs 可能通过特殊的转运方式,从肿瘤组织或肿瘤细胞中分泌入血,避免直接暴露于 RNases。

针对 lncRNAs 分泌入血的机制研究目前还较少。但同样作为非编码 RNA 的一员, microRNAs 作为循环血中肿瘤诊断标志物已经开展了许多研究。microRNAs 分泌入血的机制对 lncRNAs 的相关研究具有借鉴意义。microRNAs 分泌入血的机制大致可分为 3 种: (1) 以外泌体(exosomes)^[27]、微泡(microvesicles)^[28]的形式,从细胞主动释放出来; (2) 与其他子共同分泌入血,如高密度脂蛋白^[29]; (3) 由于慢性感染、坏死或者损伤造成 microRNAs 从细胞中被动地释放出来^[30]。Li 等^[21]发现, linc00152 在血浆和外泌体中的表达没有显著差异($P=0.604$),即血浆中的 linc00152 主要存在于外泌体中,且外泌体维持其在循环血中保持稳定。其他形式的细胞外囊泡也有可能参与了 lncRNAs 分泌入血的过程^[31]。因此, lncRNAs 可能以与 microRNAs 类似的方式从细胞进入血液循环。

不同于 microRNAs(18~22 nt), lncRNAs 的片段长度一般 ≥ 200 nt,而在大部分外泌体中能够检

测到的 RNA 片段长度为 18~28 nt。在对血中的 RNA 进行抽提并检测的操作过程本身必然会造成部分 lncRNAs 发生降解,或发生断裂,这意味着外泌体中存在的 lncRNAs 可能是其全长的降解产物,并以片段化的形式被检测出来。Ren 等^[32]在血浆中发现 MALAT-1 来源的小片段 MD-miniRNA 在前列腺癌中具有诊断价值。他们的结果证实, lncRNAs 并非以全长形式在循环血中存在,而是某个表达丰度高、在血清或血浆中非常稳定的片段。

4 小结与展望

肝细胞癌在全球范围内具有发病率高、致死率高的特点,患者的 5 年生存率非常低,仅为 6%~11%^[33]。因此若能及早进行人群筛查和诊断,就能对肝癌进行有效的治疗,并极大地改善患者的预后。循环血中肿瘤标志物的检测作为一种无创的诊断技术,具有安全、成本低、操作简便的优点。许多血清标志物,包括 AFP、甲胎蛋白异质体 3(AFP-L3)、磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3(GPC3)、高尔基体蛋白 73(GP73)、DCP 等,都在临床上广泛应用于肝癌的检测^[34]。然而,现有的肿瘤标志物在诊断的敏感性和特异性上还有待提高。

随着高通量测序技术(microarray 或 RNA-seq)的发展,揭示了 lncRNAs 在肿瘤的发生、侵袭、转移等多个环节发挥了重要作用^[35]。许多研究显示,肿瘤中异常表达的 lncRNAs 与肿瘤的进展密切相关,并且可以作为、胃癌^[36]、前列腺癌^[37]等多种肿瘤的诊断标志物分子。目前,已有许多关于 lncRNAs 在肝癌中具有诊断意义和预后判断价值的研究报道,如 lncRNA 同源盒基因转录反义 RNA(HOX transcript antisense RNA, HOTAIR)^[38]与肝移植后的肿瘤复发相关, H19^[39]和 HBX 相关的下调表达的 lncRNA(lncRNA down-regulated expression by HBx, lncRNA-Dreh)^[40]与肝癌的转移相关,肝癌微血管浸润相关的 lncRNA^[9]与肝癌的预后相关。

然而,大量研究仅关注 lncRNAs 在肿瘤组织中的差异和重要价值,其在循环血中作为肝癌诊断标志物的研究才刚刚起步。PCA3 是目前唯一被 FDA 批准的可用于临床诊断的 lncRNAs^[37]。相较于 lncRNAs, microRNAs 作为肝癌循环血诊断标志物的研究开展较早,更为成熟。一方面循环血

microRNAs 在肝癌诊断中的研究可以为 lncRNAs 的相关研究提供参考,另一方面,由于 lncRNAs 与 microRNAs 之间存在着错综复杂的相互作用调控网络^[41],将循环血 lncRNAs 和 microRNAs 作为一个整体用于肝癌的早期诊断或许能取得更好的效果。当然,作为循环血中肝癌的诊断标志物, lncRNA 还有许多问题需要解决,例如通过改进采集患者血样的方式方法和 RNA 抽提技术,最大程度保持 lncRNAs 在循环血中的稳定性。此外,通过寻找特异性更好的 lncRNAs 或者将联合应用多个标志物,提高 lncRNAs 在肝癌诊断中的特异性,排除其他疾病的干扰。毫无疑问,随着高通量测序技术的发展和研究的深入,人们将发现更多肝癌特异的 lncRNAs,推动其在循环血中作为诊断标志物的临床应用,提高早期诊断率并有效改变患者的预后。

[参考文献]

- [1] Li W Q, Park Y, McGlynn K A, Hollenbeck A R, Taylor P R, Goldstein A M, et al. Index-based dietary patterns and risk of incident hepatocellular carcinoma and mortality from chronic liver disease in a prospective study[J]. *Hepatology*, 2014, 60: 588-597.
- [2] Jemal A, Bray F, Center M M, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics[J]. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61: 69-90.
- [3] Zhang Y C, Xu Z, Zhang T F, Wang Y L. Circulating microRNAs as diagnostic and prognostic tools for hepatocellular carcinoma[J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21: 9853-9862.
- [4] Zhang Z Q, Meng H, Wang N, Liang L N, Liu L N, Lu S M, et al. Serum microRNA 143 and microRNA 215 as potential biomarkers for the diagnosis of chronic hepatitis and hepatocellular carcinoma [J]. *Diagn Pathol*, 2014, 9: 135.
- [5] Zinkin N T, Grall F, Bhaskar K, Otu H H, Spentzos D, Kalmowitz B, et al. Serum proteomics and biomarkers in hepatocellular carcinoma and chronic liver disease[J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14: 470-477.
- [6] Yang L, Froberg J E, Lee J T. Long noncoding RNAs: fresh perspectives into the RNA world[J]. *Trends Biochem Sci*, 2014, 39: 35-43.
- [7] Gutschner T, Diederichs S. The hallmarks of cancer: a long non-coding RNA point of view[J]. *RNA Biol*, 2012, 9: 703-719.
- [8] Yuan J H, Yang F, Wang F, Ma J Z, Guo Y J, Tao Q F, et al. A long noncoding RNA activated by TGF- β promotes the invasion-metastasis cascade in hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Cell*, 2014, 25: 666-681.
- [9] Yuan S X, Yang F, Yang Y, Tao Q F, Zhang J, Huang G, et al. Long noncoding RNA associated with microvascular invasion in hepatocellular carcinoma promotes angiogenesis and serves as a predictor for hepatocellular carcinoma patients' poor recurrence-free survival after hepatectomy[J]. *Hepatology*, 2012, 56: 2231-2241.
- [10] Tsai M C, Spitale R C, Chang H Y. Long intergenic noncoding RNAs: new links in cancer progression[J]. *Cancer Res*, 2011, 71: 3-7.
- [11] Yang X, Song J H, Cheng Y, Wu W, Bhagat T, Yu Y, et al. Long non-coding RNA HNF1A-AS1 regulates proliferation and migration in oesophageal adenocarcinoma cells[J]. *Gut*, 2014, 63: 881-890.
- [12] Yang F, Zhang L, Huo X S, Yuan J H, Xu D, Yuan S X, et al. Long noncoding RNA high expression in hepatocellular carcinoma facilitates tumor growth through enhancer of zeste homolog 2 in humans[J]. *Hepatology*, 2011, 54: 1679-1689.
- [13] Gong C G, Maquat L E. LncRNAs transactivate S T A U 1-mediated mRNA decay by duplexing with 3'UTRs via Alu elements[J]. *Nature*, 2011, 470: 284-288.
- [14] Zhou J H, Yang L H, Zhong T Y, Mueller M, Men Y, Zhang N, et al. H19 lncRNA alters DNA methylation genome wide by regulating S-adenosylhomocysteine hydrolase [J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 10221.
- [15] McHugh C A, Chen C K, Chow A, Surka C F, Tran C, McDonel P, et al. The Xist lncRNA directly interacts with SHARP to silence transcription through HDAC3[J]. *Nature*, 2015, 521: 232-236.
- [16] Panzitt K, Tschernatsch M M, Guelly C, Moustafa T, Stradner M, Strohmaier H M, et al. Characterization of HULC, a novel gene with striking up-regulation in hepatocellular carcinoma, as noncoding RNA [J]. *Gastroenterology*, 2007, 132: 330-342.
- [17] Derrien T, Johnson R, Bussotti G, Tanzer A, Djebali S, Tilgner H, et al. The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression[J]. *Genome Res*, 2012, 22: 1775-1789.
- [18] Wang J, Liu X, Wu H, Ni P, Gu Z, Qiao Y, et al. CREB up-regulates long non-coding RNA, HULC expression through interaction with microRNA-372 in liver cancer[J]. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38: 5366-5383.
- [19] Du Y, Kong G, You X, Zhang S, Zhang T, Gao Y, et al. Elevation of highly up-regulated in liver cancer (HULC) by hepatitis B virus X protein promotes

- hepatoma cell proliferation via down-regulating p18 [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287: 26302-26311.
- [20] Xie H, Ma H, Zhou D. Plasma HULC as a promising novel biomarker for the detection of hepatocellular carcinoma[J]. *Biomed Res Int*, 2013, 2013: 136106.
- [21] Li Q, Shao Y, Zhang X, Zheng T, Miao M, Qin L, et al. Plasma long noncoding RNA protected by exosomes as a potential stable biomarker for gastric cancer[J]. *Tumour Biol*, 2015, 36: 2007-2012.
- [22] Ji J, Tang J, Deng L, Xie Y, Jiang R, Li G, et al. LINC00152 promotes proliferation in hepatocellular carcinoma by targeting EpCAM via the mTOR signaling pathway[J]. *Oncotarget*, 2015, 6: 42813-42824.
- [23] Li J, Wang X, Tang J, Jiang R, Zhang W, Ji J, et al. HULC and linc00152 act as novel biomarkers in predicting diagnosis of hepatocellular carcinoma[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 37: 687-696.
- [24] Tang J, Jiang R, Deng L, Zhang X, Wang K, Sun B. Circulation long non-coding RNAs act as biomarkers for predicting tumorigenesis and metastasis in hepatocellular carcinoma[J]. *Oncotarget*, 2015, 6: 4505-4515.
- [25] Lu J, Xie F, Geng L, Shen W, Sui C, Yang J. Investigation of serum lncRNA-uc003wbd and lncRNA-AF085935 expression profile in patients with hepatocellular carcinoma and HBV[J]. *Tumour Biol*, 2015, 36: 3231-3236.
- [26] Tsui N B, Nq E K, Lo Y M. Stability of endogenous and added RNA in blood specimens, serum, and plasma[J]. *Clin Chem*, 2002, 48: 1647-1653.
- [27] Kosaka N, Iguchi H, Yoshioka Y, Takeshita F, Matsuki Y, Ochiya T. Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells[J]. *J Boil Chem*, 2010, 285: 17442-17452.
- [28] Skog J, Würdinger T, van Rijn S, Meijer D H, Gainche L, Sena-Esteves M, et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers[J]. *Nat Cell Biol*, 2008, 10: 1470-1476.
- [29] Vickers K C, Palmisano B T, Shoucri B M, Shamburek R D, Remaley A T. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins[J]. *Nat Cell Biol*, 2011, 13: 423-433.
- [30] Wang K, Zhang S, Marzolf B, Troisch P, Brightman A, Hu Z, et al. Circulating microRNAs, potential biomarkers for drug-induced liver injury[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 4402-4407.
- [31] Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles; exosomes, microvesicles, and friends[J]. *J Cell Biol*, 2013, 200: 373-383.
- [32] Ren S, Wang F, Shen J, Sun Y, Xu W, Lu J, et al. Long non-coding RNA metastasis associated in lung adenocarcinoma transcript 1 derived miniRNA as a novel plasma-based biomarker for diagnosing prostate cancer[J]. *Eur J Cancer*, 2013, 49: 2949-2959.
- [33] Zhao J, Greene C M, Gray S G, Lawless M W. Long noncoding RNAs in liver cancer: what we know in 2014[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2014, 18: 1207-1218.
- [34] Tsuchiya N, Sawada Y, Endo I, Saito K, Uemura Y, Nakatsura T. Biomarkers for the early diagnosis of hepatocellular carcinoma[J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21: 10573-10583.
- [35] Zhang X M, Ma Z W, Wang Q, Wang J N, Yang J W, Li X D, et al. A new RNA-seq method to detect the transcription and non-coding RNA in prostate cancer[J]. *Pathol Oncol Res*, 2014, 20: 43-50.
- [36] Zhou X, Yin C, Dang Y, Ye F, Zhang G. Identification of the long non-coding RNA H19 in plasma as a novel biomarker for diagnosis of gastric cancer[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 11516.
- [37] Filella X, Foj L, Milà M, Augé J M, Molina R, Jiménez W. PCA3 in the detection and management of early prostate cancer[J]. *Tumour Biol*, 2013, 34: 1337-1347.
- [38] Yang Z, Zhou L, Wu L M, Lai M C, Xie H Y, Zhang F, et al. Overexpression of long non-coding RNA HOTAIR predicts tumor recurrence in hepatocellular carcinoma patients following liver transplantation[J]. *Ann Surg Oncol*, 2011, 18: 1243-1250.
- [39] Zhang L, Yang F, Yuan J H, Yuan S X, Zhou W P, Huo X S, et al. Epigenetic activation of the MiR-200 family contributes to H19-mediated metastasis suppression in hepatocellular carcinoma [J]. *Carcinogenesis*, 2013, 34: 577-586.
- [40] Huang J F, Guo Y J, Zhao C X, Yuan S X, Wang Y, Tang G N, et al. Hepatitis B virus X protein (HBx)-related long noncoding RNA (lncRNA) down-regulated expression by HBx (Dreh) inhibits hepatocellular carcinoma metastasis by targeting the intermediate filament protein vimentin[J]. *Hepatology*, 2013, 57: 1882-1892.
- [41] Jalali S, Bhartiya D, Lalwani M K, Sivasubbu S, Scaria V. Systematic transcriptome wide analysis of lncRNA-miRNA interactions[J]. *PloS One*, 2013, 8: e53823.